

공학석사 학위논문

Kefir 발효유에서 분리된 효모와  
젖산균의 향산화효과

지도교수 장 동 석

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.



2005년 2월

부경대학교 대학원

식품공학과

김성준

김성준의 공학석사 학위논문을 인준함

2004년 12월

주 심 농 학 박 사 안 동 현



위 원 농 학 박 사 양 지 영



위 원 이 학 박 사 장 동 석



# 목 차

<b>Abstract</b> .....	1
<b>서 론</b> .....	4
<b>재료 및 방법</b> .....	7
1. 재료 .....	7
1-1. Starter .....	7
1-2. 배지 및 시약 .....	7
2. 방법 .....	8
2-1. 생균수 측정 .....	8
2-2. pH 및 O.D. 측정 .....	8
2-3. Kefir 발효유로부터 미생물의 분리·동정 .....	8
2-4. 향산화력 측정 .....	9
<b>결과 및 고찰</b> .....	10
1. Kefir 발효유의 특성 .....	10
1-1. 배양시간에 따른 생균수 및 pH변화 .....	10
2. Kefir 발효유로부터 미생물의 분리·동정 .....	12
3. 배양시간에 따른 O.D, pH 및 향산화력 측정 .....	14
3-1. 효모류 .....	14
3-2. 젖산균류 .....	18
4. 분리균주의 생육특성 .....	22

4-1. 효모류 .....	22
4-2. 젖산균류 .....	31
5. 분리균주의 혼합배양시 생육특성과 향산화력 측정 .....	37
5-1. 1:1 혼합배양 .....	37
5-2. 5:1 혼합배양 .....	40
6. 미생물을 통한 향산화물질 생산을 위한 천연배지의 검색 .....	43
6-1. 2% 맥아추출 배지 .....	43
6-2. 2% 미강추출 배지 .....	45
6-3. 2% 다시마추출 배지 .....	47
6-4. 1% 복합배지 .....	49
6-5. 2% 복합배지 .....	51
6-6. 5% 복합배지 .....	53
<b>요 약</b> .....	<b>55</b>
<b>참고문헌</b> .....	<b>58</b>

# **Antioxidant Effect of Yeasts and Lactic Acid Bacteria Isolated from Kefir Fermented Milk**

**Sung-Jun Kim**

*Department of Food Science and Technology,  
Graduate school of  
Pukyong National University*

## **Abstract**

Research in recent years has shown the implication of oxidative and free-radical-mediated reactions in degenerative processes related to aging and diseases such as cancer, coronary heart disease.

Antioxidant defenses in the organism against reactive oxygen species produced during normal cell aerobic respiration may be of endogenous or dietary origin.

Increased intakes of dietary antioxidants may help to maintain an adequate antioxidant status, defined as the balance between antioxidants and oxidants in living organism.

Kefir is the traditional fermented milk in Caucasian area and is made mainly by fermenting milk with lactic acid bacteria and yeasts.

Kefir fermented milk has recently been known as a healthy soft drink, because of its functional characteristics such as antimicrobial activity, digestion support, immunological and antitumor activity.

Therefore In this study, the author attempted to analyze the microorganisms of kefir fermented milk and measure the antioxidant power of supernatant of culture solution from the isolated strains such as *L. parapara casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *P. ormeri*, *C. kefir* and *C. holmii*.

Identification results of the microorganisms from the kefir fermented milk most of the strains were lactics and yeasts as 87% of the total. And detection number of yeasts was higher than that of lactic acid bacteria by 2 times.

The predominant microorganisms isolated were *Lactobacillus plantarum* in lactic acid bacteria and *Pichia ormeri* in yeasts as 70% in each groups.

The antioxidant power were determined using the ferric reducing/antioxidant power assay (FRAP assay). this was determined using a simple, reproducible and inexpensive method. this procedure involves the reduction of  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ to a blue colored  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPTZ by biological antioxidants and chemical reductants, some of which might have no antioxidant

activity in a sample.

The FRAP assay compares the change in absorbance at 593nm of a sample compared with the change in absorbance of a known standard( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) to determine antioxidant levels. the contribution of ascorbic acid to the antioxidant power of the supernatant from culture solution was also calculated.

*Pichia ormeri* in yeasts is the most relatively antioxidant power in the supernatant of YM culture solution and *L. brevis* is the most relatively antioxidant power in the supernatant MRS culture solution.

In mixed cultrued of *Lactobacillus brevis* and *Pichia ormeri* (1:1), the optimum conditions to produce antioxidant power material was at 37°C in MRS broth. and In mixed cultrued of *Lactobacillus brevis* and *Pchia ormeri* (5:1), the optimum conditions to produce antioxidant power material was at 25°C in MRS broth.

*Candida kefyri* in yeasts is the most relatively antioxidant power about the supernatant of culture solution in natural media and *Lactobacillus plantarum* is the most relatively antioxidant power about the supernatant of culture solution in natural media. and the higher concentrations of natural media are the higher the antioxidant power about the supernatant of culture solution.

## 서 론

경제성장의 발달로 풍족한 식생활과 고지방 식이 섭취 등의 식생활 패턴의 변화로 인해 비만을 포함하여 당뇨병, 고혈압, 동맥경화증, 심장병 등의 순환기계 질환과 암으로 인한 사망률이 크게 증가하는 추세에 있어 건강에 대한 관심은 날로 높아지고 있는 실정이다. (National Statistical Office, 2001)

생체 내에서 산화스트레스에 의한 free radical(유리기) 생성은 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 산화시키고, 이로 인해 생성된 과산화 지질의 증가는 여러 조직을 손상시켜 대사 장애를 초래함으로써 생체기능의 저하나 노화 및 만성 퇴행성질환등의 유발과 밀접한 관련을 가지는 것으로 알려지고 있다. (Suzuki 등, 1999 ; De Mattia 등, 2003) 따라서 생체 내에서 free radical 형성에 의한 체내의 산화적 손상을 억제시킬 수 있는 생리활성 물질이 있다면 이는 순환기계 질환과 암 등 만성질환의 발병률을 낮추는 데에도 크게 기여할 것으로 생각된다. (Cha 등, 1999 ;Suzuki 등, 1999 ; Cha 등 2001)

따라서 이러한 질병의 예방 및 치료를 위해서 면역증진과 항암기능을 가지는 전통 발효유에 대한 관심이 고조되고 그 효능이 이미 입증되었다. (Perdigon 등, 1986a, 1986b)

최근, 건강 증진을 위한 생리활성 물질 탐색에 관한 연구가 여러 방향으로 활발하게 진행되고 있으며, 우리가 일상적으로 섭취하고 있는 발효식품 중에서도 항산화 효과가 있는 성분이 다수 보고 되고 있다. (Iwai 등, 2002 ; Iwai 등, 2002) 발효식품에 존재하는 미생물 중에서 극히 일부 균종만이 우리 식생활에 주로 이

용되고 있을 뿐이다. 최근 항산화 효과가 뛰어난 미생물 유래 항산화 물질에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 곰팡이, 세균 유래의 배양액에서 항산화 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. (Rashid 등, 1993 ; Rashid 등, 1993 ; Chung 등, 2002)

Kefir는 코카서스 지방, 티벳 또는 몽고에서 기원한 전통적인 발효유이다. 19세기 후반에 Kefir는 동유럽과 중앙유럽으로 전해졌고 이어 여러 나라로 전파되었다. (Kneifel 등, 1991 ; Kroger, 1993 ; Kwak 등, 1996 ; Marshall 등, 1985)

Kefir는 'Kefir grains'에 의해서 발효되는 발효유로서, grain은 Kefir를 만드는 동안에 점점 자라며 (Saloff-Coste, 1996), Kefir grain의 미생물들은 우유를 발효하여 산, 풍미물질을 생산하고 우유를 응고시키게 된다.

Kefir grain은 protein과 polysaccharide로 구성되며, 여러 효모 (*Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Kluyveromyces* spp.)와 젖산균 (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp.) 이 공생관계를 이루고 있는 것으로 보고되고 있다. (Lee 등 1986 ; Ramakanth 등, 1988 ; Kim 등, 1994 ; Tamai 등, 1995)

현재까지의 연구동향은 Kefir 발효액의 미생물 균총에 관한 연구와 여기에서 분리한 젖산균의 특성 및 Kefir를 제조하는 방법 등에 대한 연구가 주로 수행되어 왔으며(Duitschaever 등, 1987 ; Koroleva, 1988a ; Assadi 등, 2000 ; Beshkova 등, 2002), 콜레스테롤 저하를 비롯한 항암활성이나 면역증강능력 등과 같은 건강 기능성에 대한 연구는 비교적 적인 편이다. (Yoon 등, 1998 ; Diniz 등, 2003 ; Otle' 등, 2003 )

따라서 본 연구에서는 Kefir 발효유에 주요 미생물을 분리, 동정한 후 이들 균주를 이용하여 향산화 물질의 생산을 위하여 각 균주별로 생육특성에 관한 기초실험을 실시하였으며, 이를 바탕으로 향산화물질의 생산을 위한 최적조건을 확인하였으며, 값싼 맥아, 미강, 다시마 등의 열수추출물을 배지로 이용하여 미생물 유래 향산화물질의 대량 생산을 통한 산업화 가능성을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1-1. Starter

Starter 제조는 국내에 유통되고 있는 kefir grain이 함유된 kefir 발효유를 분양 받아서 사용하였다. Kefir 발효유에서 grain 만을 체로 걸러서 멸균수로 충분히 세척한 후 멸균된 10% skim milk broth 300mL에 약 30g을 무균적으로 첨가하고, 이를 상온에서 24시간 배양하였다. (Otle' 등, 2003 ; Ham 등, 1999 ; Koroleva, 1988b)

#### 1-2. 배지 및 시약

본 실험에 사용한 배지는 모두 Difco Co.(U.S.A) 제품이었다. 세균 측정 및 배양용 배지로는 Nutrient broth/agar(NA)를, 효모 측정 및 배양용 배지로는 Potato dextrose agar/broth(PDA) 또는 Yeast-Mold agar/broth(YM)를 사용하였다. Kefir 발효용 기질로는 희창유업(Korea)으로부터 제공받은 고순도의 탈지분유를 사용하였다.

분리균을 이용하여 항산화 물질의 생산을 위한 천연배지로는 맥아배지(맥아 20g을 1L 증류수에 혼합하여 60℃에서 열수 추출하여 여과한 것), 미강배지(미강 20g을 1L 증류수에 혼합하여 60℃에서 열수 추출하여 여과한 것), 다시마 배지(맥아 20g을 1L 증류수에 혼합하여 60℃에서 열수 추출하여 여과한 것)를 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

미생물 신속, 분리동정을 위해 API Kit (BioMerieux Co.)를 사용하여 생화학 검사를 실시하였으며, 젖산균의 분리는 API 50CHL, 효모의 분리는 ID 32C를 사용하였다.

항산화력 측정용 시약 (tripyridyltrizine, ferric chloride 등) 및 그 외 시약은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)로 부터 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

## 2. 방법

### 2-1. 생균수 측정

생균수 측정은 Nutrient agar, Potato dextrose agar, MRS등의 배지를 이용하여 배양시간별로 균수의 변화를 pour plate method(식품공전, 2002)로 측정하였다. (Ramakanth등, 1998)

### 2-2. pH 및 O.D 측정

배양시간별로 배양액의 pH변화를 유리전극 pH meter(Fisher Scientific Accumet model 15, Fairlawn, NJ, USA)을 사용하여 측정하였으며, Optical Density의 변화는 spectrophotometer(HACH 4000, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 2-3. Kefir 발효유로부터 미생물의 분리·동정

Kefir 발효유로부터 균을 분리하기 위하여 효모의 분리에는 YM 배지(Chloramphenicol 10mg/100mL 첨가), 젖산균의 분리에는 MRS 배지 각각을 이용하여 pour plate method로 실시하였으

며, 이를 통하여 얻어진 평판상에 생성된 colony들을 모두 Gram 염색 후, Gram 염색 상태와 크기로서 효모와 세균으로 대별하고 API Kits를 사용하여 미생물을 동정하였다.

#### 2-4. 분리균의 최적온도와 pH

분리된 젖산균과 효모의 증균배지 (MRS broth 또는 YM broth) 300ml에 전 배양한 균액 one drop를 접종하여 24시간별로 2ml씩 취하여 균의 증식을 540nm에서의 흡광도로 측정하였다.

분리균의 최적 증식 온도를 조사하기 위해 25°C, 37°C의 조건에서 배양하였으며, 최적 증식 pH 확인은 pH가 3, 4, 5, 6, 7, 8로 각각 조정된 배지에 분리된 균을 접종하여 배양 시간에 따른 균 증식을 540nm에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Kefir fermented milk의 특성

#### 1-1. 배양시간에 따른 생균수 및 pH 변화

Skim milk 배지 500ml에 Kefir grain 20g을 접종하고 25℃에서 배양하면서 배양에 따른 생균수 변화를 조사하였다. 접종 초기의 균수는  $10^3$  CFU/ml이었으며 배양 12시간까지 균수가 급속히 증가하였으며, 이후 48시간까지는 균의 증가 속도가 완만하였다.

한편 균의 증식과 더불어 pH의 감소현상이 나타났는데, 접종초기의 pH 6.8에서 균의 증식속도가 빠른 배양 12시간까지는 pH의 감소 폭이 컸으며 이후 완만한 감소 경향을 나타내어 48시간째 pH 3.5정도에 달하였다.

배양배지의 양을 줄이거나 늘려도 균의 증가 속도와 pH 감소 경향은 유사한 양상으로 나타난다. (data is not shown here)

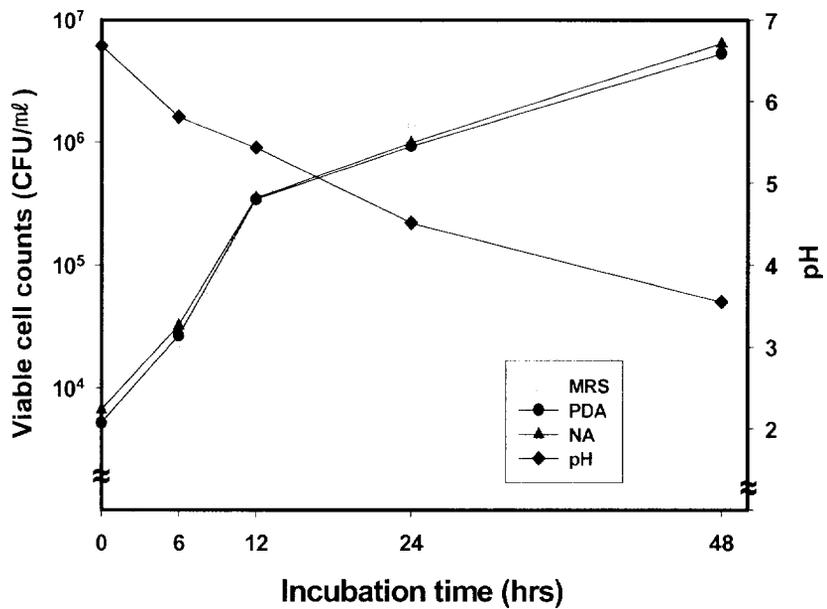


Fig.1. Changes of viable cell counts and pH in Kefir fermented milk 500ml

## 2. Kefir fermented milk로부터 미생물의 분리·동정

Kefir fermented milk로부터 발효에 관여하는 유용한 미생물을 분리·동정하기 위하여 MRS 배지를 사용하여 분리한 결과 MRS 에서 형성된 colony 100개 모두 Gram 염색하였을 때 효모가 58 종으로 세균 29종에 비해 2배가 더 많이 검출되었다. (Table 1.)

분리된 세균은 *Lactobacillus para para casei*, *Lactobacillus brevis* 및 *Lactobacillus plantarum* 이었으며, 효모는 *Candida kefyri*, *Candida holmii*, 그리고 *Pichia ohmeri* 이었다. 그 중 주된 종은 *L. para para casei*와 *C. kefyri* 이었다.

이상 Kefir fermented milk 에서 배양과정에 관여하는 미생물은 젖산균과 효모가 주로 관여하는 것으로 나타났다.

한편 이 등(1986)은 *Sacharomyces*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefyri* 등이 분리되었다고 보고하였으나 본 연구에서는 이러한 균들이 분리되지 않았다.

Table 1. Microorganisms isolated from kefir fermented milk

Number of isolated strains (%)		Identification
Bacteria	3	<i>Lactobacillus para para casei</i>
	10	<i>Lactobacillus brevis</i>
	16	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Yeasts	54	<i>Pichia ormeri</i>
	3	<i>Candida kefyra</i>
	1	<i>Candida holmii</i>
Molds	0	
Etc.	13	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Gemella spp.</i>
<b>Total</b>	<b>100</b>	

### 3. 배양시간에 따른 O.D, pH 및 항산화력 측정

#### 3-1. 효모류

Kefir 발효유에서 분리된 효모 3균주를 YM broth 300mL에 one drop을 접종하고 25°C에서 배양하면서 24시간 간격으로 O.D, pH 및 Relative antioxidant power의 변화를 조사하였다 (Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4).

24시간 배양이후 *Candida kefyr*, *Candida holmii*는 안정기에 들어갔으며 *Pichia ormeri*의 경우에는 배양 2일째에 안정기에 들어갔다. 그리고 배양에 따른 pH의 변화를 보면 산의 생성으로 배양24시간 후에 3균주는 모두 pH 4~5범위를 나타내었다. 한편 항산화력의 경우에는 균의 증식과 함께 증가하였으며 3균주 중 *Pichia ormeri*가 가장 높은 것으로 나타났다.

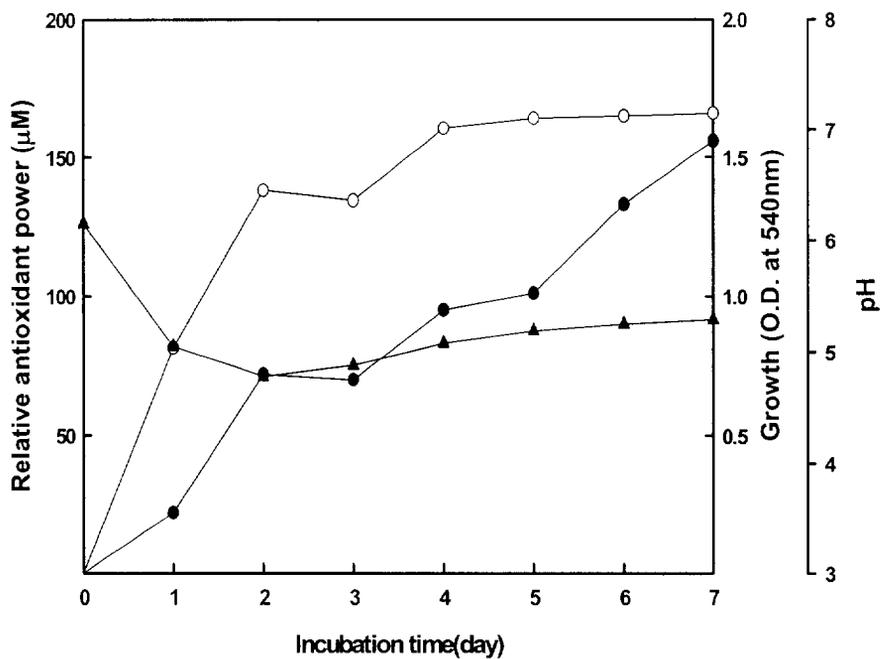


Fig.2. Changes of relative antioxidant power and pH on the growth of *Pichia ormeri* in YM broth

-○-; O.D, -●-; Relative antioxidant power, -▲-; pH

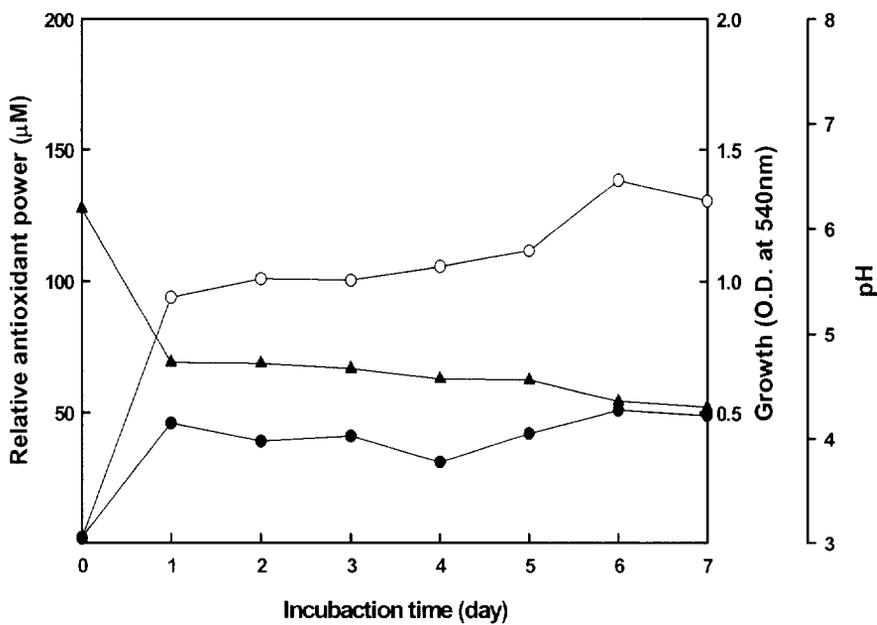


Fig.3. Changes of relative antioxidant power and pH on the growth of *Candida kefir* in YM broth

-○-; O.D, -●-; Relative antioxidant power, -▲-; pH

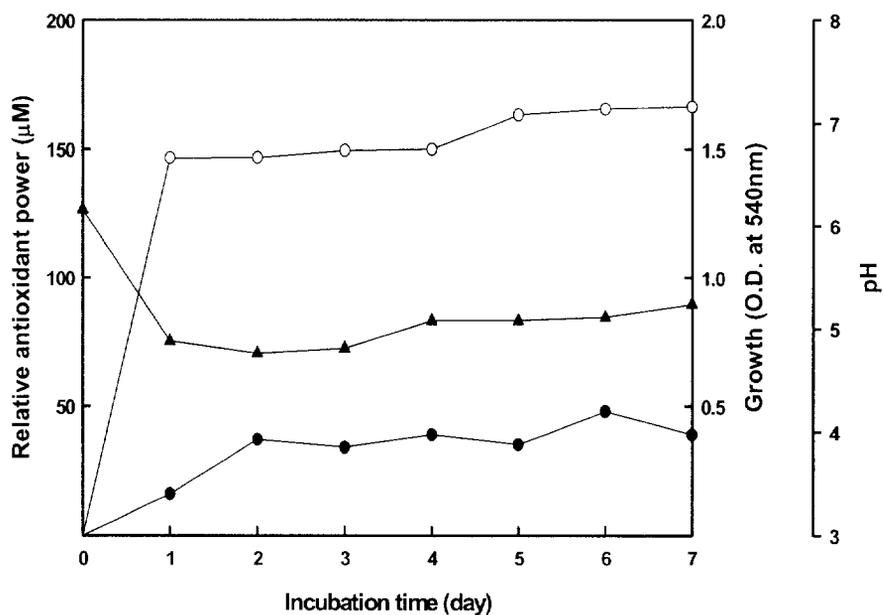


Fig.4. Changes of relative antioxidant power and pH on the growth of *Candida holmii* in YM broth

-○-; O.D., -●-; Relative antioxidant power, -▲-; pH

## 1-2. 젓산균류

Kefir 발효유에서 분리된 효모 3균주를 MRS broth 300mL에 one drop을 접종하고 37°C에서 배양하면서 24시간 간격으로 O.D, pH 및 Relative antioxidant power의 변화를 조사하였다 (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7).

24시간 배양후 *Lactobacillus para para casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* 모두 안정기에 들어갔으며 배양과정중 산의 생성으로 pH는 *L. para para casei*와 *L. brevis*는 pH 5.0부근, *L. plantarum*은 pH 4를 가르키며 배양 7일째까지 유지되었다.

한편 항산화력의 경우에는 효모류의 경우와 마찬가지로 균의 증식과 함께 증가하였으며 3 균주중 *L. plantarum*이 가장 높은 것으로 나타났다.

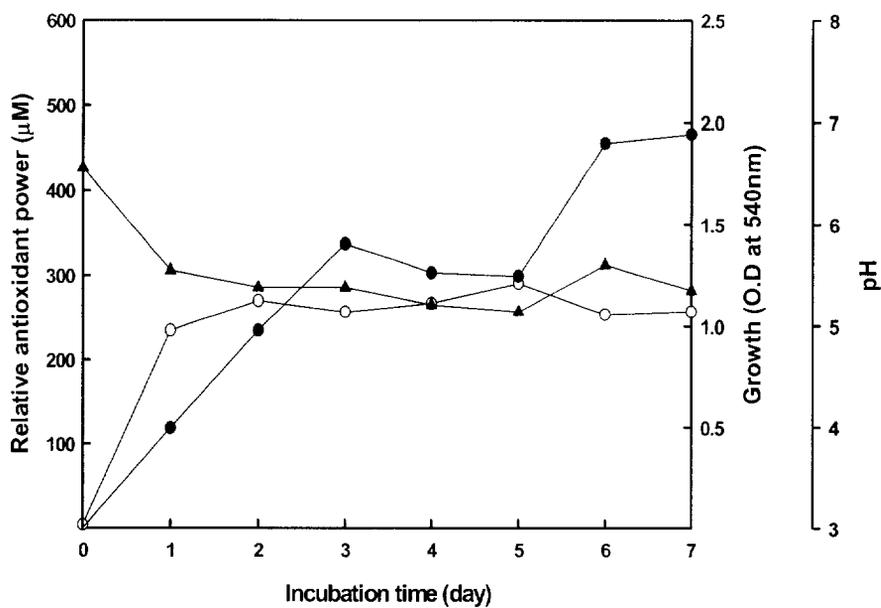


Fig.5. Changes of relative antioxidant power and pH on the growth of *Lactobacillus para para casei* in MRS broth

-○-; O.D, -●-; Relative antioxidant power, -▲-; pH

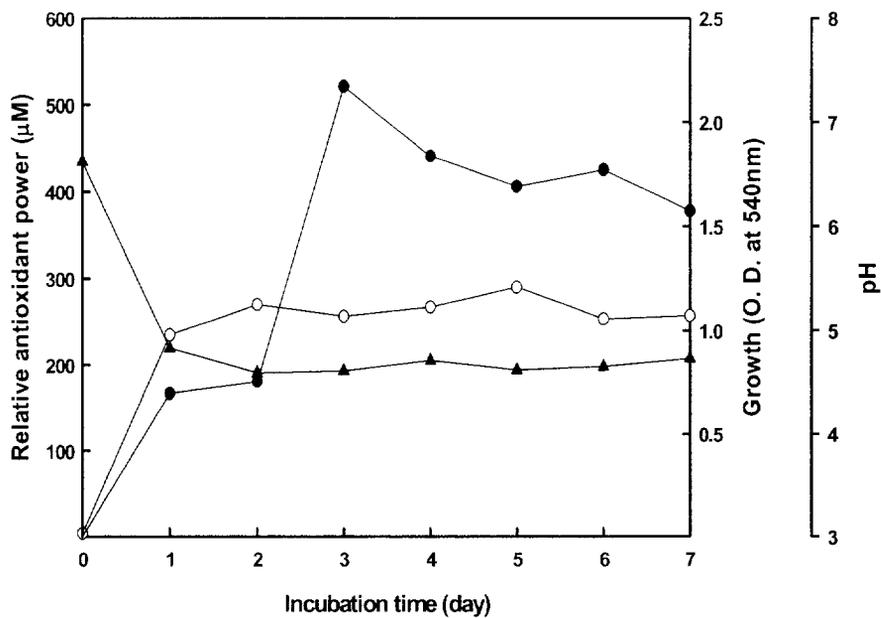


Fig.6. Changes of relative antioxidant power and pH on the growth of *Lactobacillus brevis* in MRS broth

-○-; O.D, -●-; Relative antioxidant power, -▲-; pH

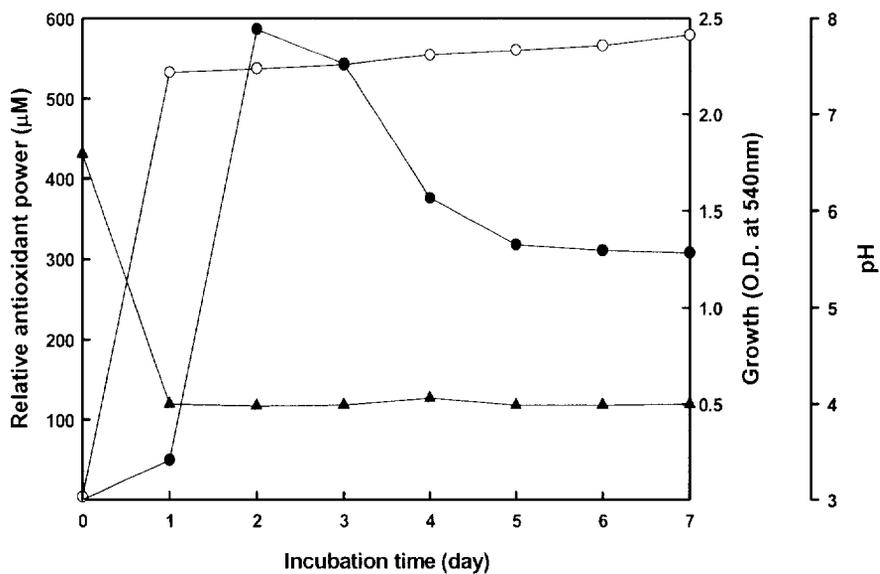


Fig.7. Changes of relative antioxidant power and pH on the growth of *Lactobacillus plantarum* in MRS broth

-○-; O.D, -●-; Relative antioxidant power, -▲-; pH

#### 4. 분리균주의 생육특성

##### 4-1. 효모류

##### 4-1-1. *Pichia ormeri*

pH가 3, 4, 5, 6, 7, 8로 각각 조정된 YM broth 300mL에 전 배양된 *Pichia ormeri*를 one drop 접종하여 25°C와 37°C에 배양하면서 O.D. 와 pH를 측정하였다. 항산화력은 25°C에서 배양된 pH 4와 pH 7의 YM broth에서 1mL을 취하여 원심분리(4°C, 7000rpm, 20분)하고 상청액 100μL를 시료액으로 사용하여 측정하였다.

25°C 배양시 배지 pH 조성에 크게 영향을 받지 않아 생육 가능한 pH 범위는 3~8로 나타났으며 pH 4와 pH 7로 조정된 실험구의 균 성장이 가장 좋았다. 또한 pH가 높은 실험구일수록 균의 성장에 따른 산의 생성량이 더 많음을 알 수 있다. 그리고 이들 실험구의 최종 pH는 4~5 부근이었다(fig. 8).

37°C 배양시에는 모든 실험구의 균 성장이 모두 비슷하였으며 생육 가능한 pH 범위는 3~8로 나타났으며 최종 pH는 5~6 부근으로 25°C 배양시보다 산 생성량이 더 작았다(fig. 9).

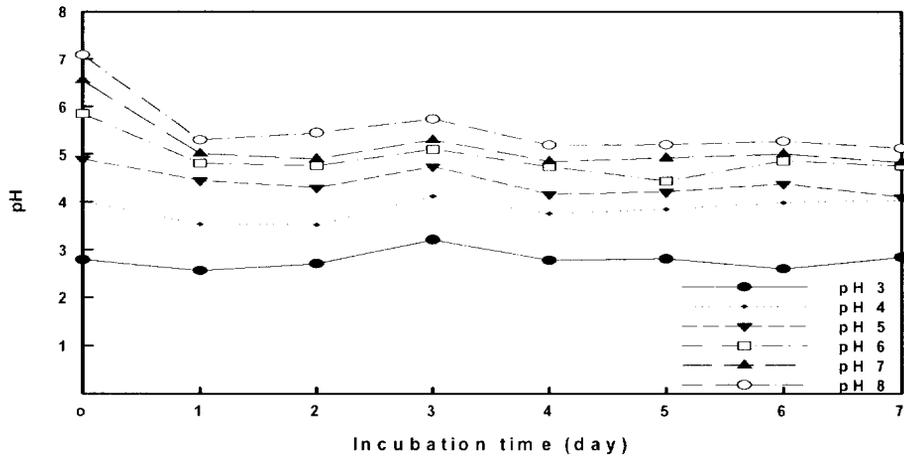
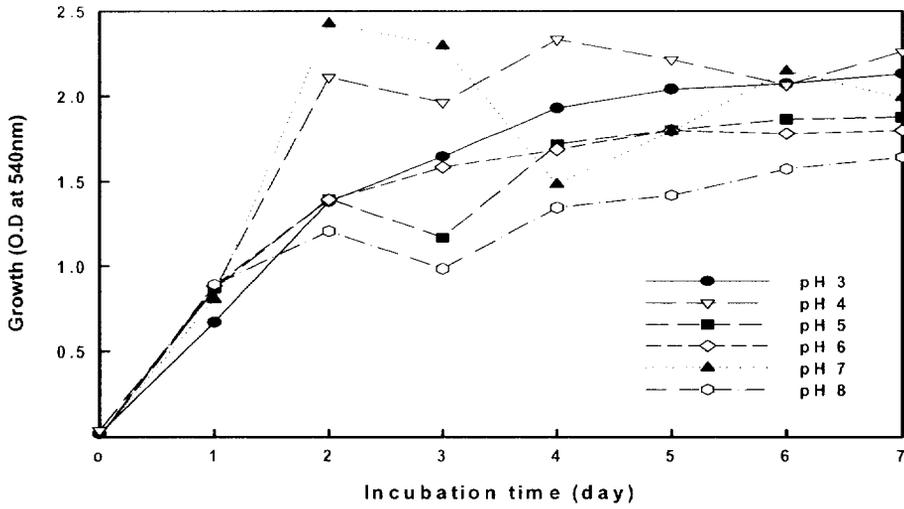


Fig.8. Effect of pH on the growth of *Pichia ormeri* in YM broth at 25°C

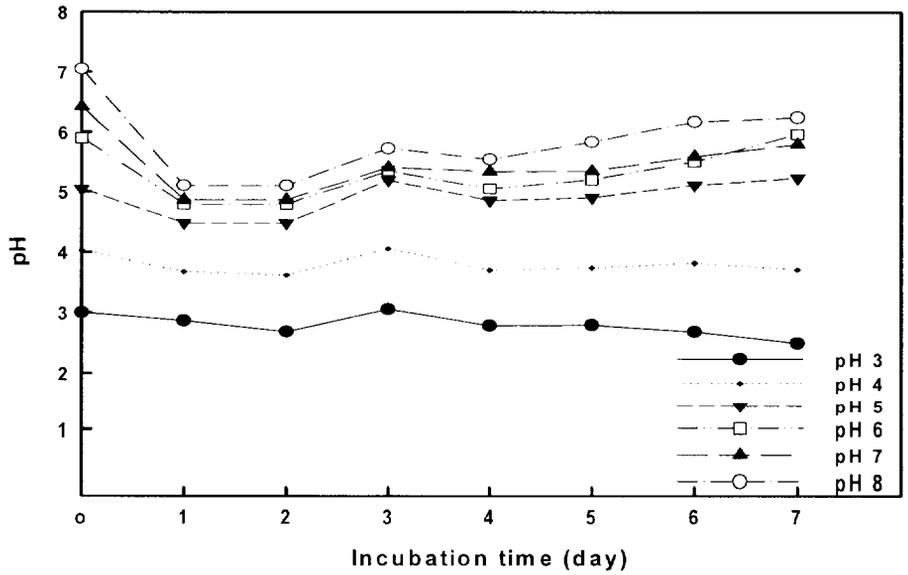
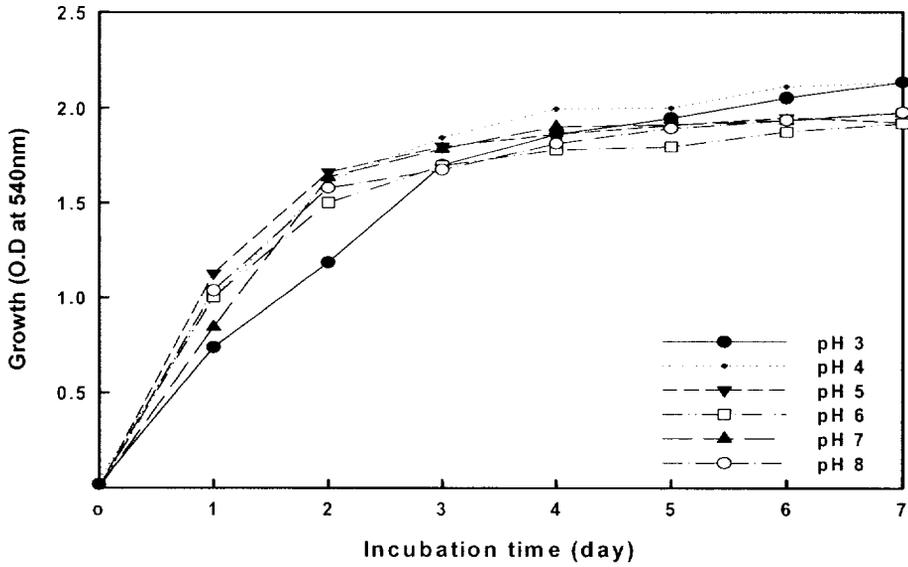


Fig.9. Effect of pH on the growth of *Pichia ormeri* in YM broth at 37°C

#### A-1-2. *Candida kefyr*

25℃에서 *Candida kefyr*를 각 실험구별로 배양한 결과 생육 가능한 pH는 3~8로 나타났으며 pH 4로 조정된 실험구에서 균의 성장이 가장 좋았다. 또한 산 생성량의 경우에도 pH 3, pH 4로 조정된 실험구를 제외한 pH가 높은 실험에서 균의 성장에 따른 산 생성량이 더 많음을 알 수 있고 최종 pH는 4~5 부근이었다(fig. 10).

37℃ 배양시 역시 생육 가능한 pH는 3~8로 나타났으며 각 실험구의 산 생성량 역시 25℃ 배양시와 비슷한 pH 4~5 부근이었다. 이는 37℃보다 25℃ 배양시 산 생성량이 많았던 *Pichia ormeri*와는 상반된 결과를 나타내었다(fig. 11).

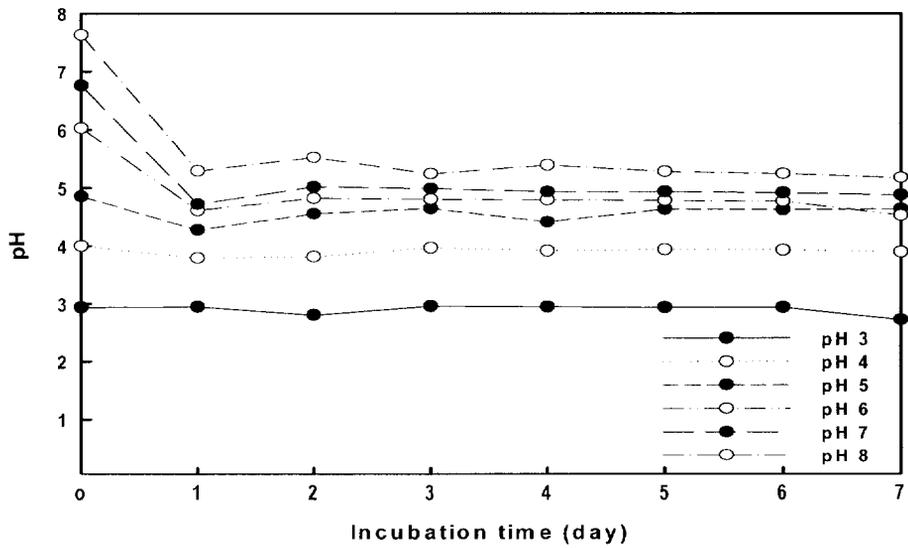
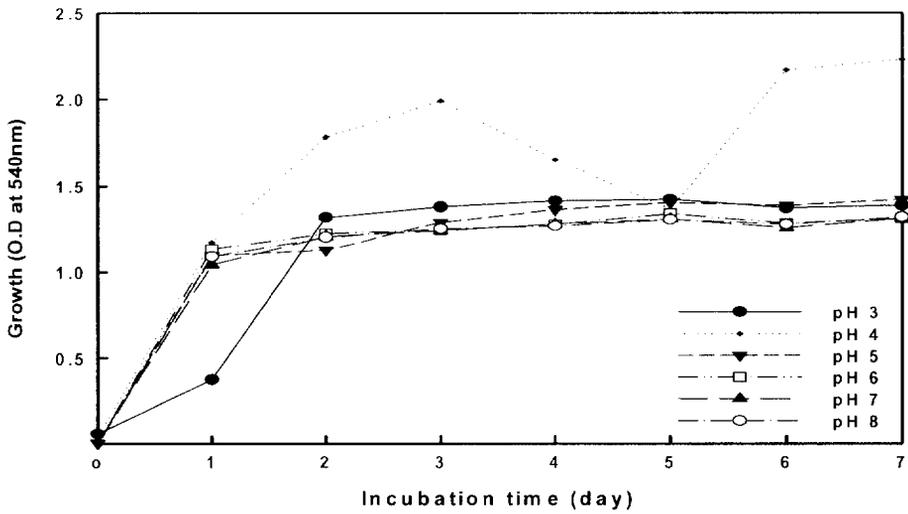


Fig.10. Effect of pH on the growth of *Candida kefyr* in YM broth at 25°C

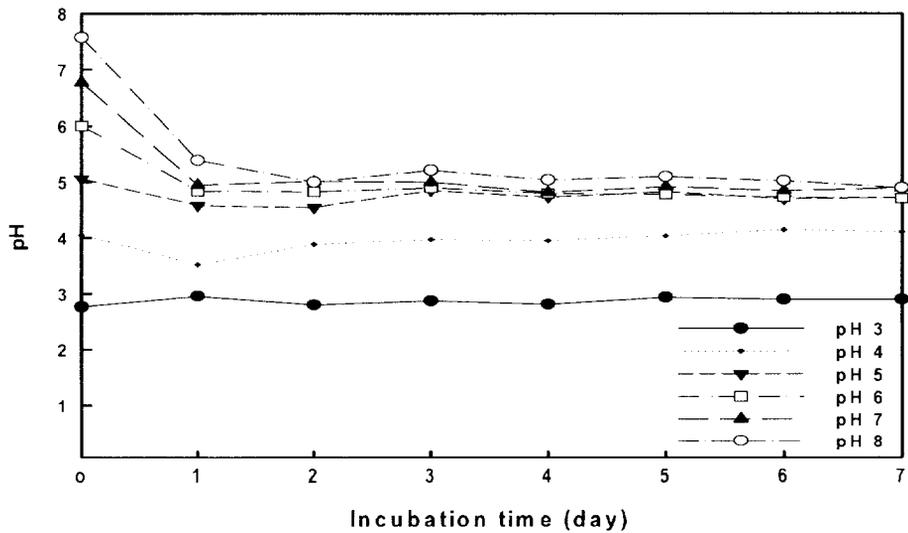
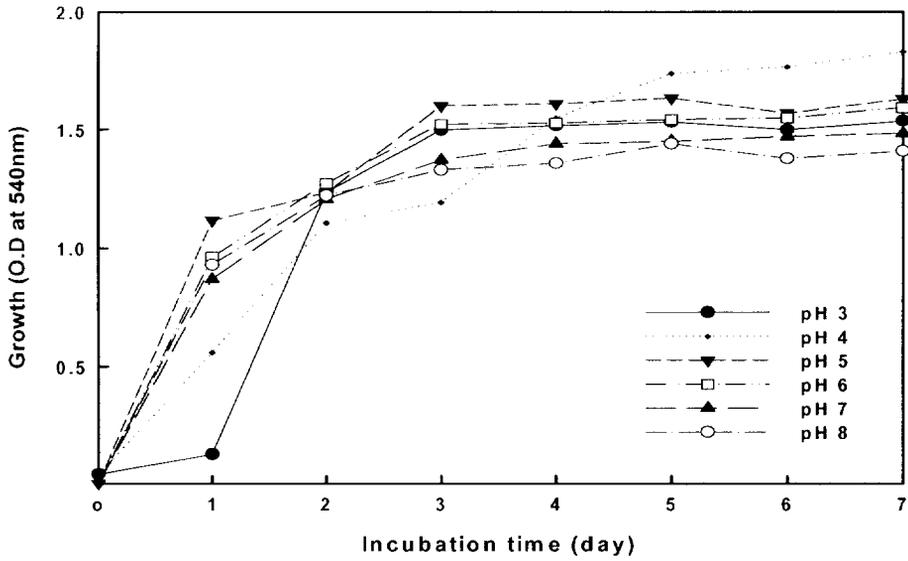


Fig.11. Effect of pH on the growth of *Candida kefyr* in YM broth at 37°C

#### 4-1-3. *Candida holmii*

25℃에서 *Candida holmii*를 각 실험구별로 배양한 결과 생육 가능한 pH는 3~8로 나타났으며 생성량의 경우에도 pH 3, pH 4로 조정된 실험구를 제외한 pH가 높은 실험에서 균의 성장에 따른 산 생성량이 더 많음을 알 수 있고 최종 pH는 4.5~5 부근이었다 (fig. 12).

37℃ 배양시 역시 생육 가능한 pH는 3~8로 나타났으며 각 실험구의 산 생성량 역시 25℃ 배양시와 비슷한 pH 4.5~5 부근이었다. 이는 *Candida kefyri*와는 동일한 결과이나 37℃보다 25℃ 배양시 산 생성량이 많았던 *Pichia ormeri*와는 상반된 결과를 나타내었다 (fig. 13).

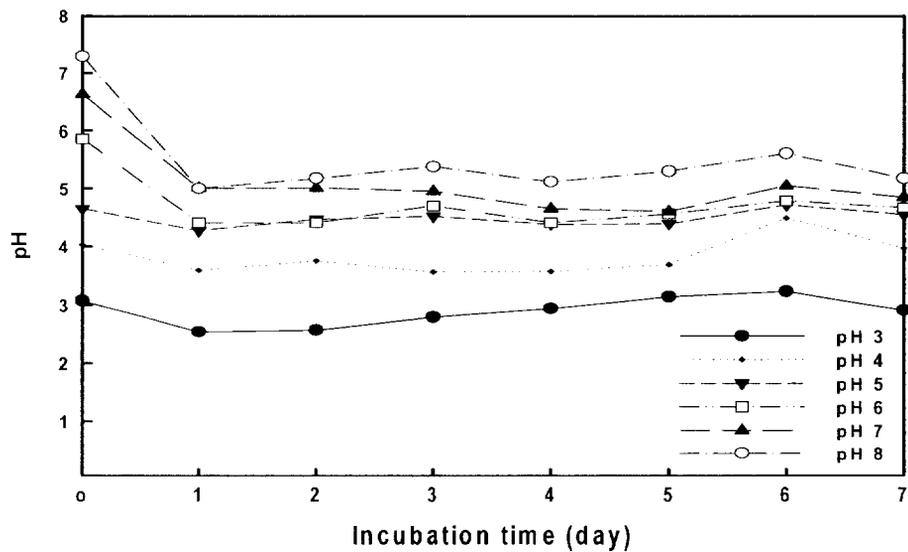
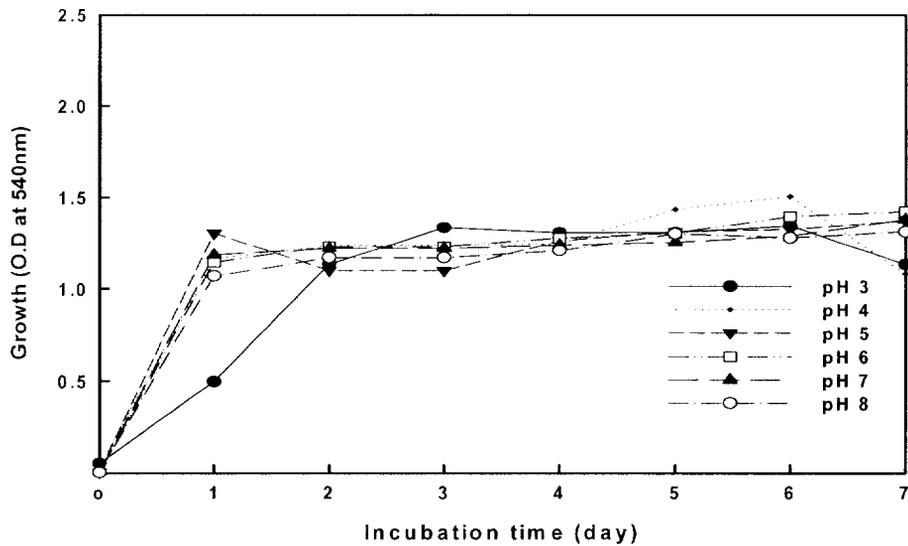


Fig.12. Effect of pH on the growth of *Candida holmii* in YM broth at 25°C

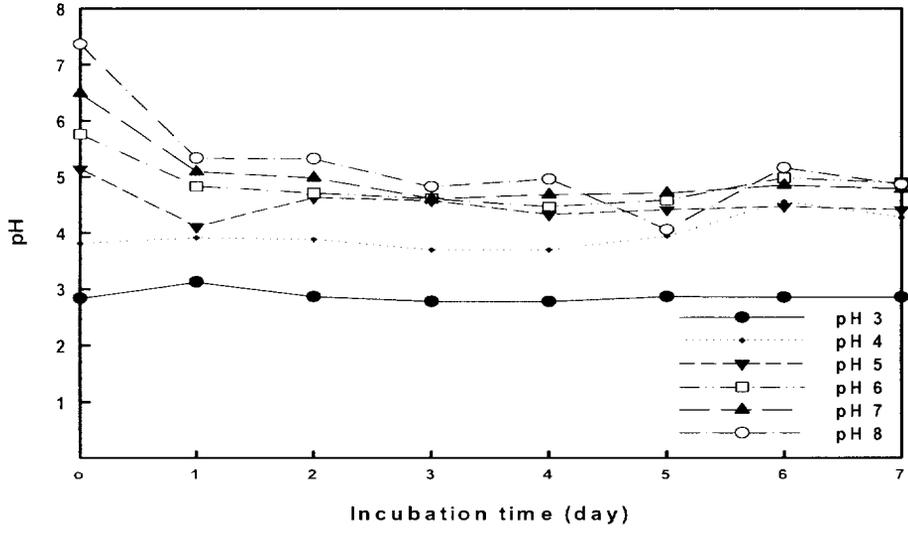
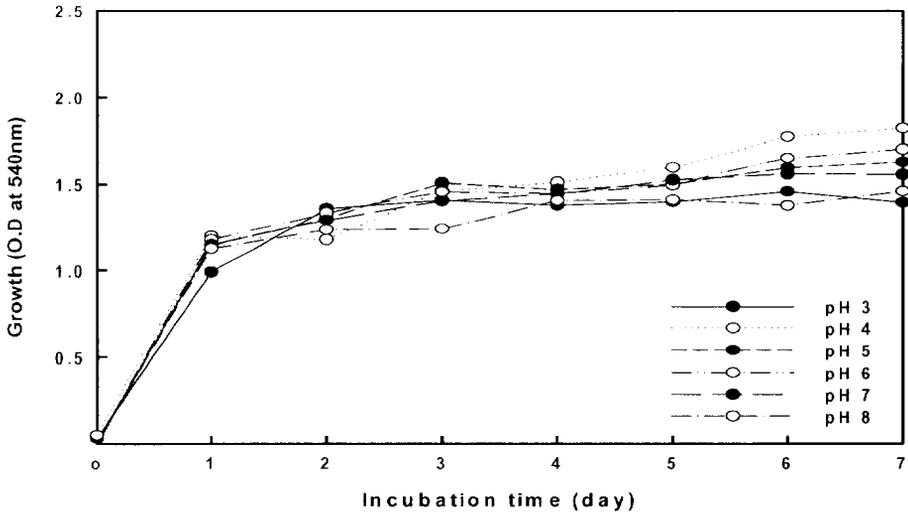


Fig.13. Effect of pH on the growth of *Candida holmii* in YM broth at 37°C

## 4-2. 젖산균류

### 4-2-1. *Lactobacillus para para casei*

pH가 3, 4, 5, 6, 7, 8로 각각 조정된 MRS broth 300mL에 전 배양된 *Lactobacillus para para casei*를 one drop 접종하여 25°C와 37°C에 배양하면서 O.D. 와 pH를 측정하였다. 항산화력은 25°C에서 배양된 pH 4와 pH 7의 MRS broth에서 1mL을 취하여 원심분리(4°C, 7000rpm, 20min)하고 상청액 100μL를 시료액으로 사용하여 측정하였다.

25°C 배양시 pH 3, pH 4, pH 5로 조정된 실험구에서는 산의 저해를 받아 균이 거의 성장하지 못하는 것으로 보아 생육 가능한 pH 범위는 pH 6~8이다. 또한 산 생성량을 보면 효모류와 마찬가지로 배지 pH 조성이 높을수록 균 성장에 따른 산 생성량이 많은 것을 알 수 있으며 최종 pH는 4~5 부근이다(fig. 14).

37°C 배양한 결과 25°C 배양시와 균의 성장과 산 생성량에 있어서 거의 유사한 결과를 나타내었다(fig. 15)

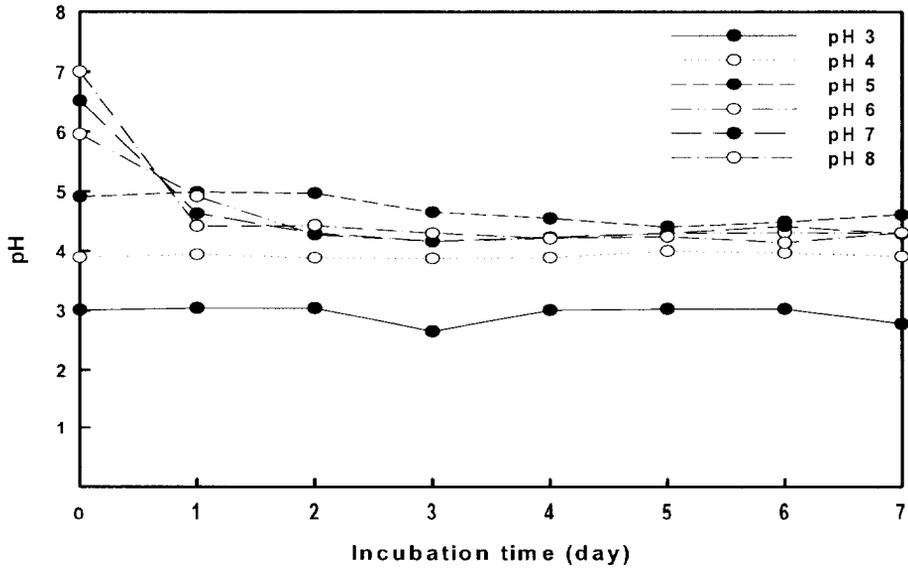
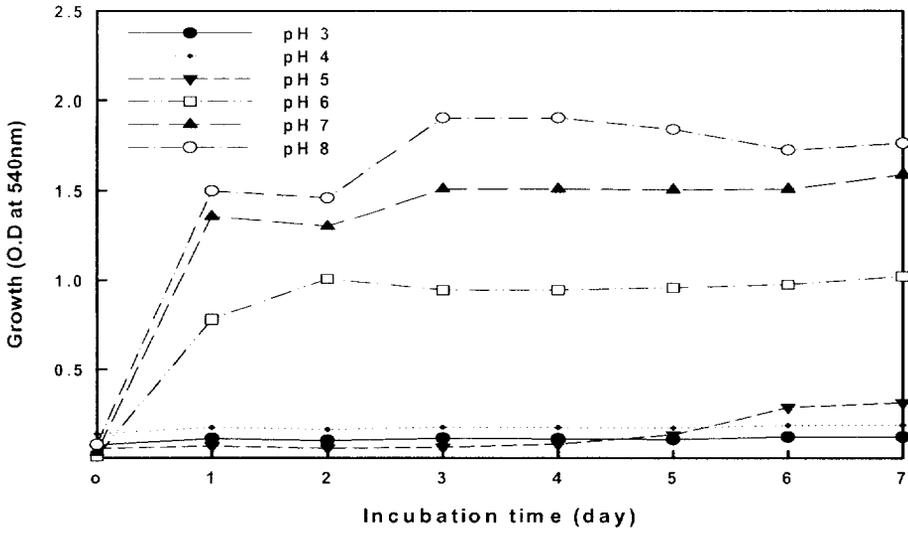


Fig.14. Effect of pH on the growth of *Lactobacillus para para casei* in MRS broth at 25°C

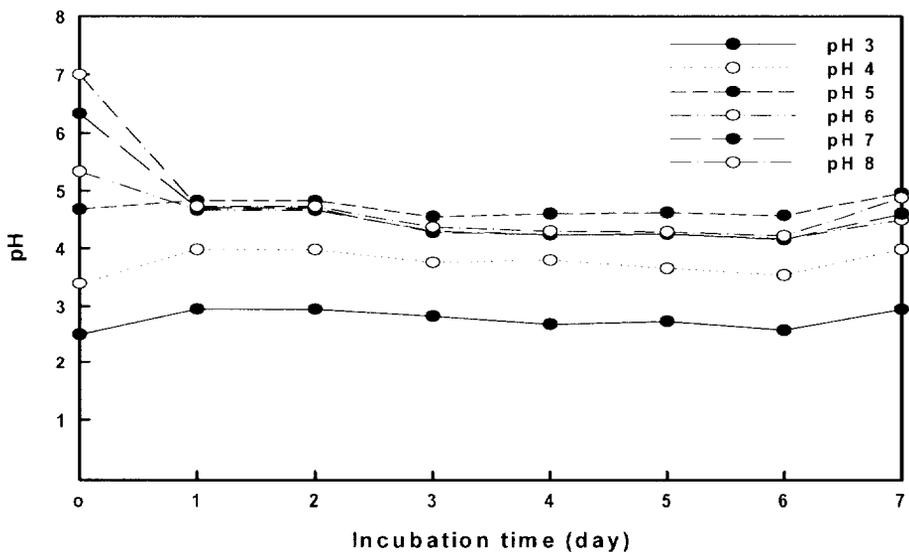
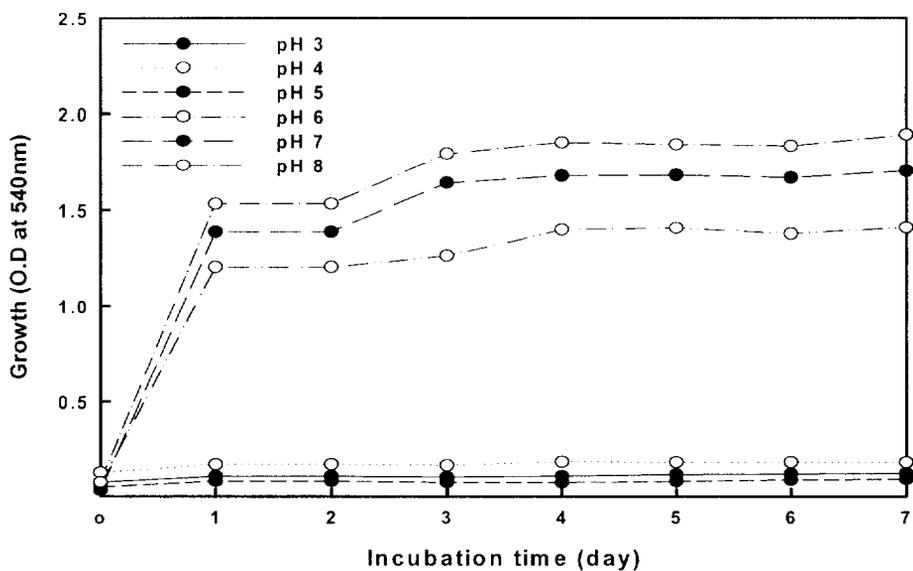


Fig.15. Effect of pH on the growth of *Lactobacillus para para casei* in MRS broth at 37°C

#### 4-2-2 *Lactobacillus brevis*

25℃ 배양시 *L. brevis*는 산의 저해를 받아 pH 3으로 조정된 실험구에서는 균이 증식하지 못하며 pH 4로 조정된 실험구에서는 산의 저해를 받아 그 성장이 느리다. 나머지 pH 5, 6, 7, 8의 실험구에서는 큰 저해를 받지 아니하고 성장함에 따라 생육 가능한 pH 범위는 pH 4~8로 나타났다. 산 생성량에 있어서는 pH 3과 pH 4의 실험구를 제외하고 pH가 높은 배지에서 성장한 균일수록 산 생산량이 높다는 것을 알 수 있었으며 최종 pH는 4~5부근이다(fig. 16).

37℃ 배양에서는 25℃배양에 있어서 균의 성장 및 산 생산량이 모든 실험구에서 유사하게 나타났다. 최종 pH는 4~5부근으로 25℃ 배양때와 유사한 결과를 나타내었다(fig. 17).

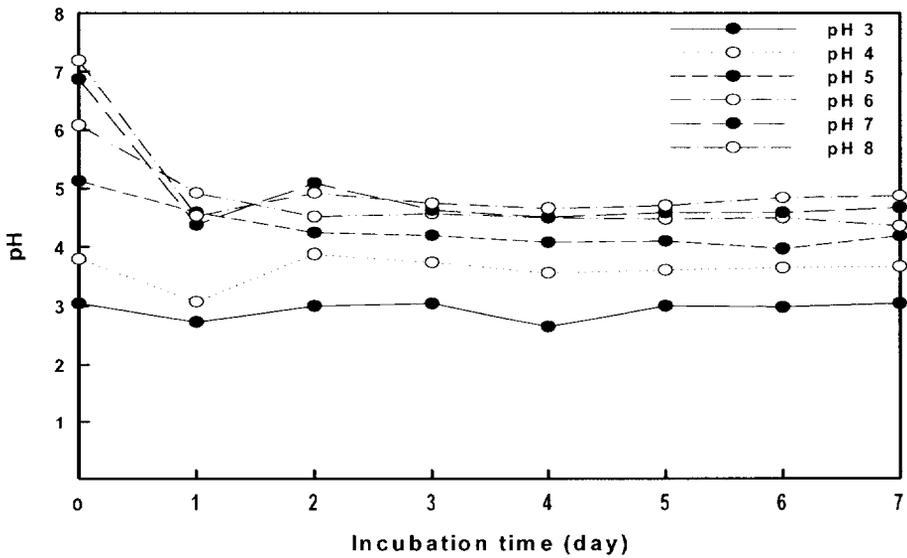
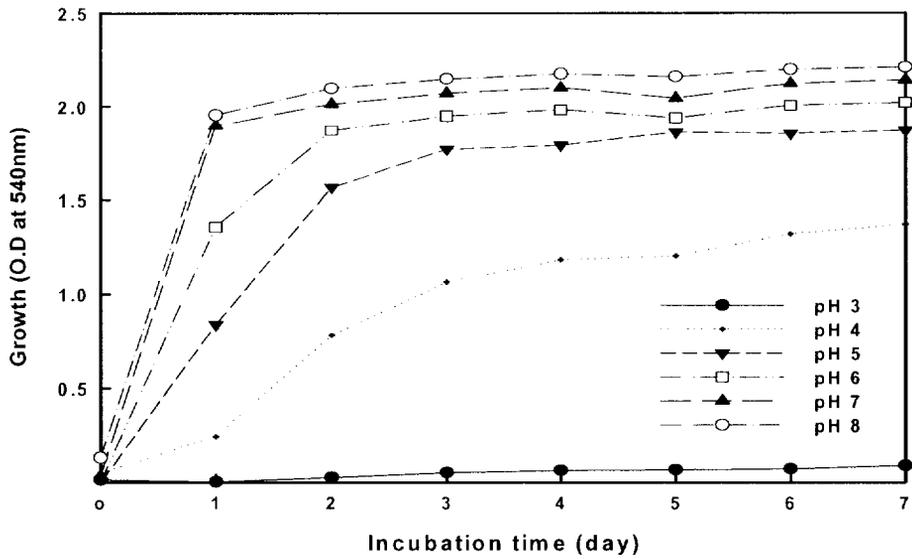


Fig.16. Effect of pH on the growth of *Lactobacillus brevis* in MRS broth at 25°C

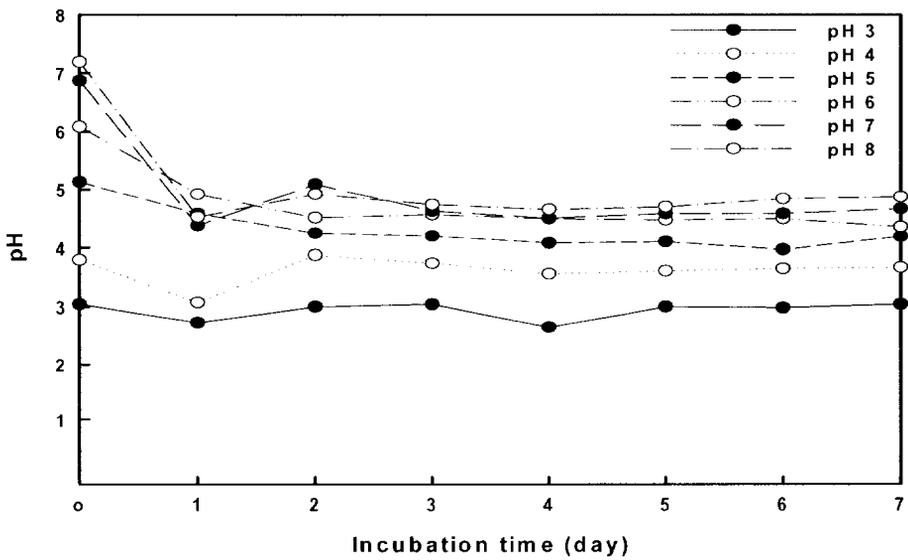
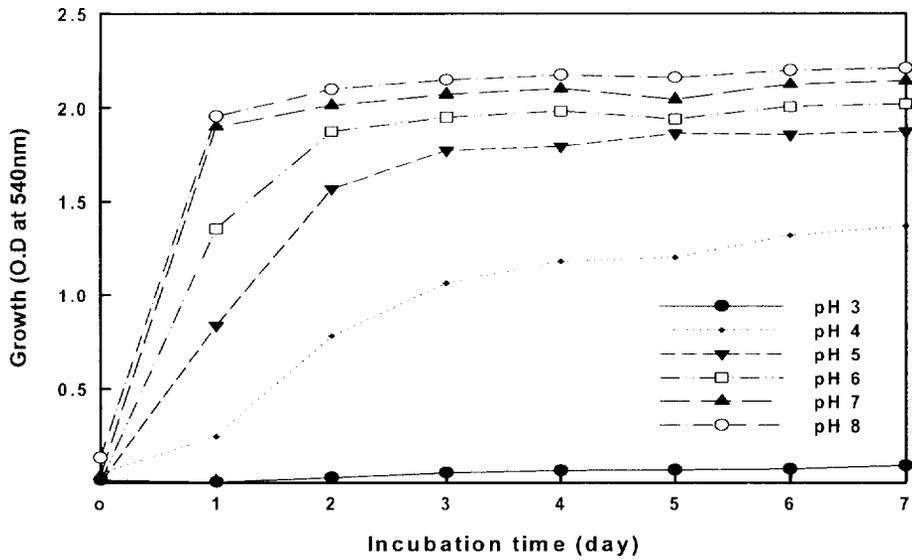


Fig.17. Effect of pH on the growth of *Lactobacillus brevis* in MRS broth at 37°C

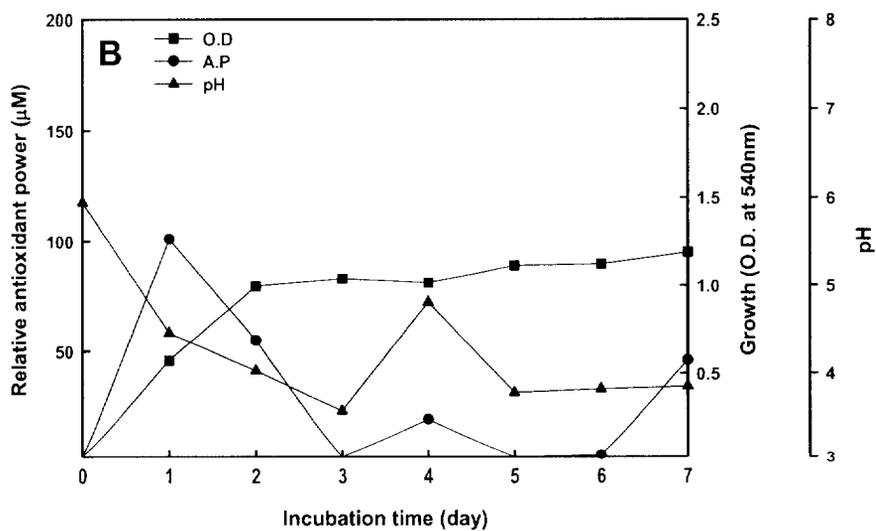
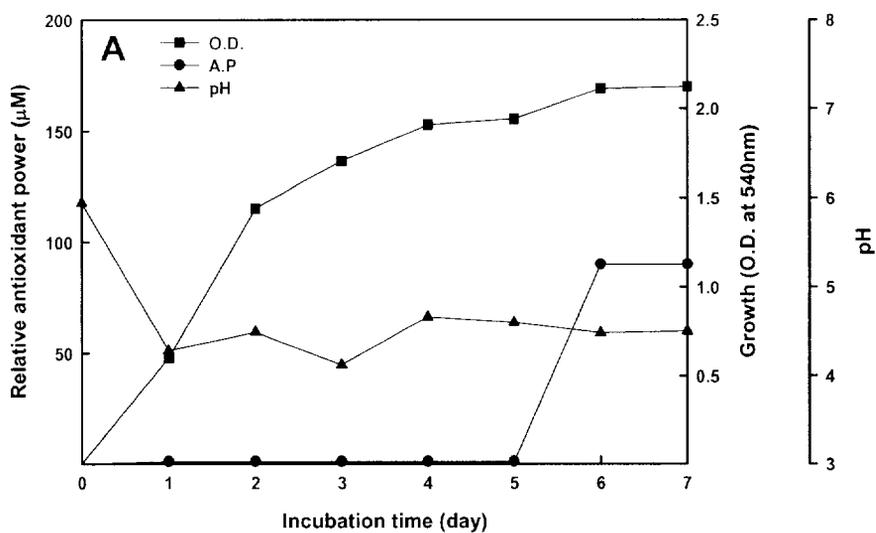
## 5. 분리균주 혼합배양시 생육특성과 향산화력 측정

### 5-1. 1:1 혼합배양

앞선 실험의 결과를 바탕으로 kefir 발효유 분리균 중 높은 향산화력을 가지는 두 균주인 *Pichia ormeri*와 *Lactobacillus brevis*를 각각 선발하였다. 이들 균주를 전 배양하여 YM broth와 MRS broth에 각각 동량의 균을 접종하여 25℃와 37℃에서 각기 배양하면서 O.D., pH 및 향산화력을 측정하였다.

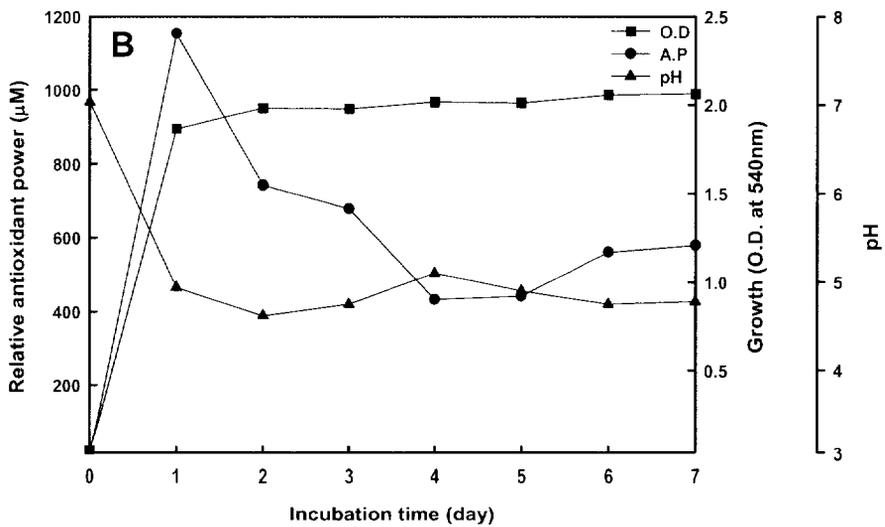
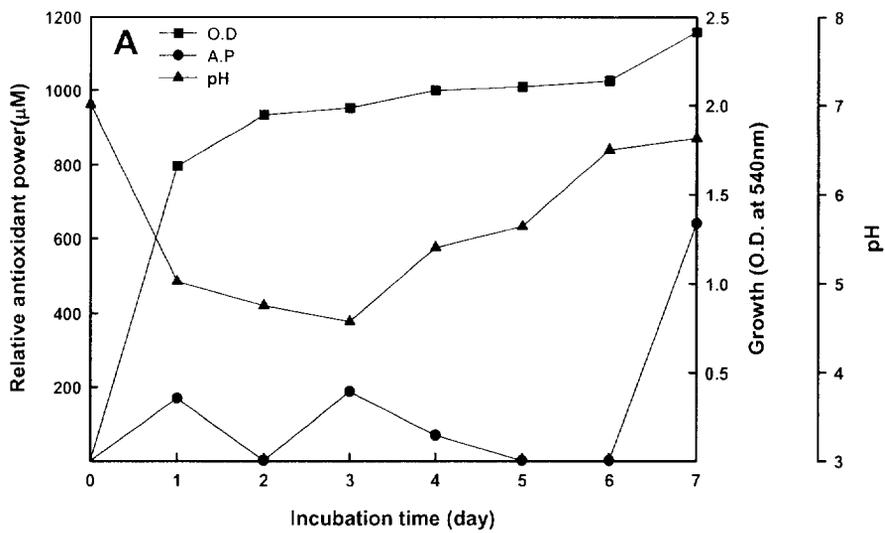
YM broth에 접종하여 배양한 결과 균의 성장면에서는 25℃배양 실험구가 더 좋았으며 최종 pH의 경우 25℃ 배양 실험구가 37℃ 배양 실험구보다 조금 높은 pH 4.5부근이었다. 또한 향산화력의 경우 25℃ 배양 실험구에서는 배양 6~7일째에 37℃ 배양 실험구에서는 배양 1~2일째에 가장 높게 나타났다(fig. 18).

MRS broth에 접종하여 25℃와 37℃에 배양한 결과 균의 성장은 두 실험구 모두 큰 차이가 없었으며 최종 pH도 5.0부근으로 큰 차이가 없었다. 또한 향산화력의 경우 25℃ 배양 실험구에서는 배양 6~7일째, 37℃ 배양 실험구에서는 배양 1~2일째에 가장 높게 나타나 YM broth를 이용한 경우와 같은 결과를 나타내었다 (fig. 19).



**Fig.18.** Change of relative antioxidant power and pH by mixed culture(*P. oremri* : *L. brevis*= 1:1) in YM broth

A: 25°C ; B: 37°C



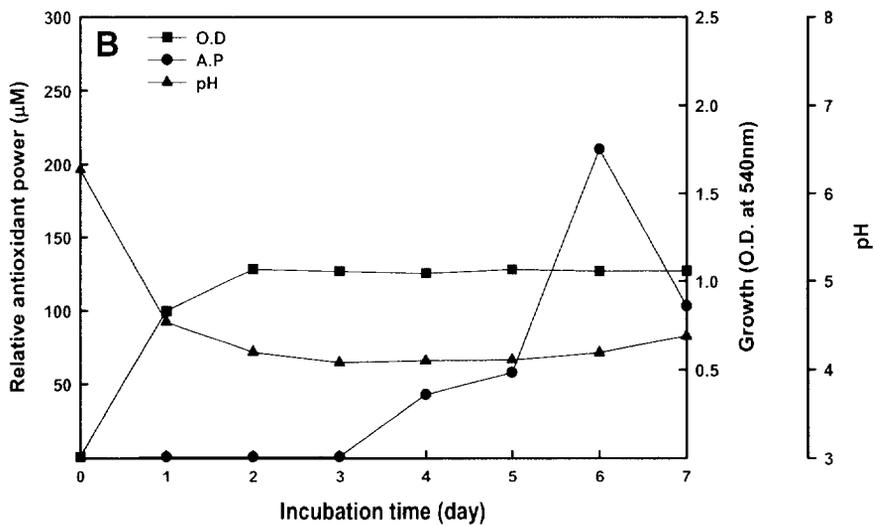
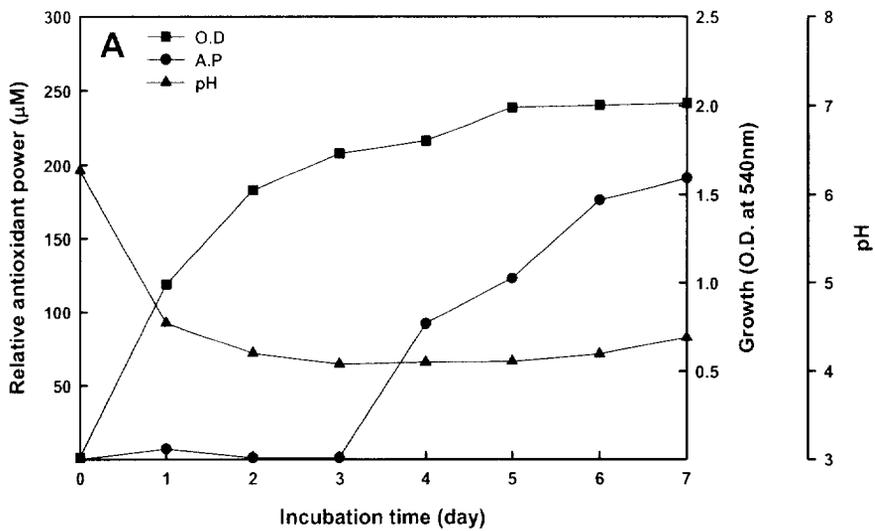
**Fig.19.** Change of relative antioxidant power and pH by mixed culture (*P. oremri* : *L. brevis*= 1:1) in MRS broth  
 A: 25°C ; B: 37°C

## 5-2. 5:1 혼합배양

앞선 실험에서는 *Pichia ormeri*와 *Lactobacillus brevis*를 5:1로 하여 YM broth와 MRS broth에 각각 접종하여 25℃와 37℃에서 각기 배양하면서 O.D., pH 및 향산화력을 측정하였다.

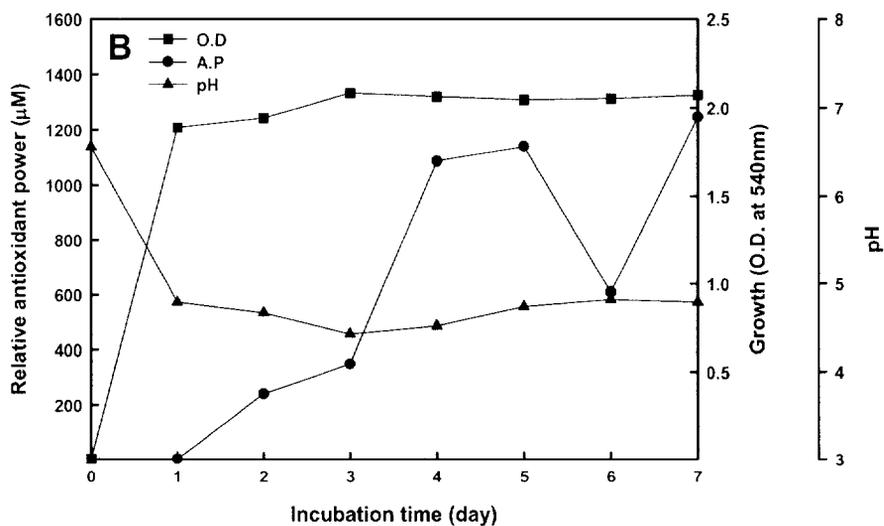
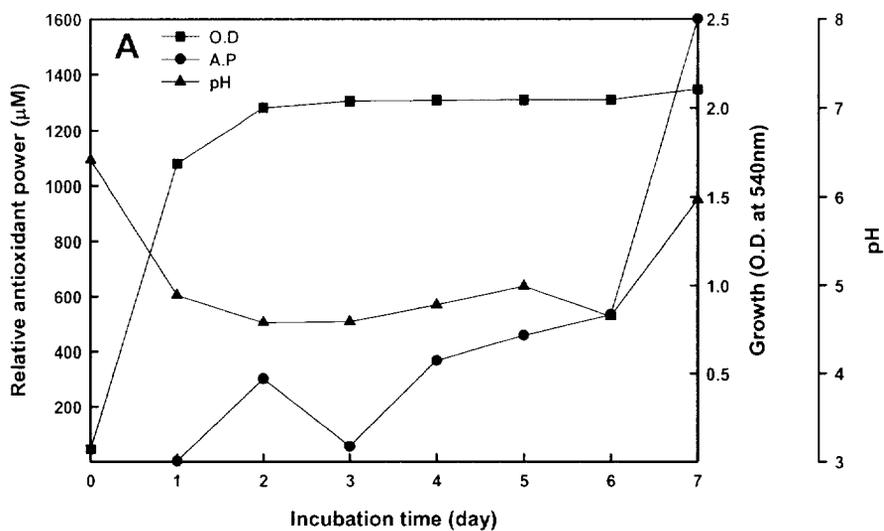
YM broth에 접종하여 25℃와 37℃에 배양한 결과 균의 성장은 두 실험구 모두 큰 차이가 없었으며 최종 pH도 4.0~4.5부근으로 비슷하였다. 또한 향산화력의 경우 25℃와 37℃ 배양 실험구 모두 배양 6~7일째에 가장 높게 나타나 *Pichia ormeri*와 *Lactobacillus brevis*를 동량 접종한 경우와는 다른 결과를 나타내었다(fig. 20).

MRS broth에 접종하여 25℃와 37℃에 배양한 결과 균의 성장은 두 실험구 모두 큰 차이가 없었으며 최종 pH도 4.5~5.0부근으로 YM broth에 접종한 실험구에 비하여 pH가 조금 높았다. 또한 향산화력의 경우 25℃와 37℃ 배양 실험구 모두에서 배양 6~7일째에 가장 높게 나타나 *Pichia ormeri*와 *Lactobacillus brevis*를 동량 접종하여 37℃ 배양 실험구에서 배양 1~2일째에 가장 높게 나타난 것과 반대의 경향을 나타내었다(fig. 21).



**Fig.20.** Change of relative antioxidant power and pH by mixed culture(*P. oremri* : *L. brevis*= 5:1) in YM broth

A: 25°C ; B: 37°C



**Fig.21.** Change of relative antioxidant power and pH by mixed culture (*P. oremri* : *L. brevis*= 5:1) in MRS broth

A: 25°C ; B: 37°C

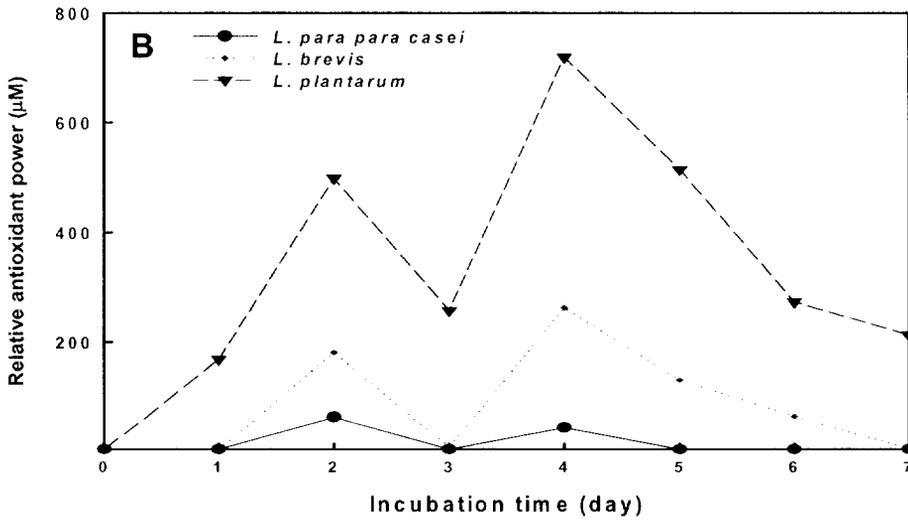
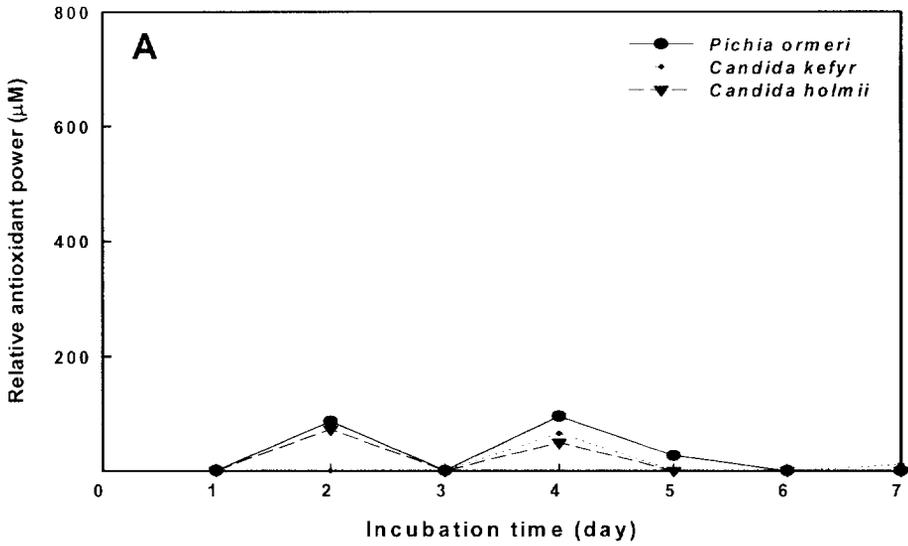
## 6. 미생물을 통한 향산화물질 생산을 위한 천연배지의 검색

### 6-1. 2% 맥아추출 배지

2% 맥아 열수 추출물을 121°C, 15분간 멸균하여 배지로 사용하였다. kefir 발효유 분리균주인 효모와 젖산균 각각 3균주를 전배양하여 one drop씩 동량 접종한후 37°C에서 배양하면서 24시간 간격으로 배양액 1mL을 취하여 원심분리(4°C, 7000rpm, 20min)하여 상청액을 시료액으로 하여 향산화력을 측정하였다.

효모 분리균주간의 향산화력에 있어서는 일반 배지상에서 *Pichia ormeri*가 가장 높았던 것과는 달리 이들 분리균주 상호간의 차이는 없는 것으로 나타났다(fig. 22-A).

젖산균류의 경우에 일반 배지상에서 *L. brevis*가 가장 높았던 것과는 달리 *L. plantarum*이 가장 높게 나타났으며 전반적으로 효모 분리균주보다는 향산화력이 높은 것으로 나타났다. 이는 일반배지상의 결과와 일치한다(fig. 22-B).



**Fig.22. Change of relative antioxidant power by growth of microorganisms in malt extract medium(2%)**

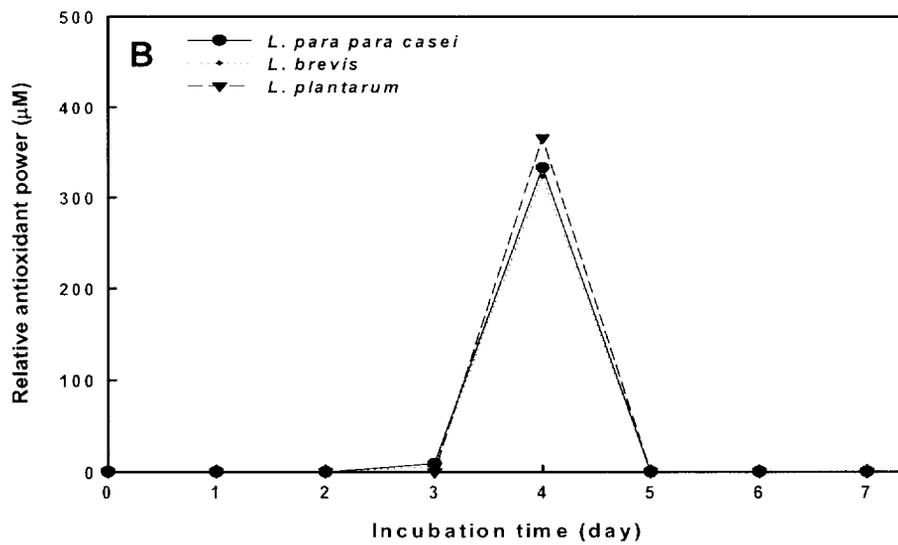
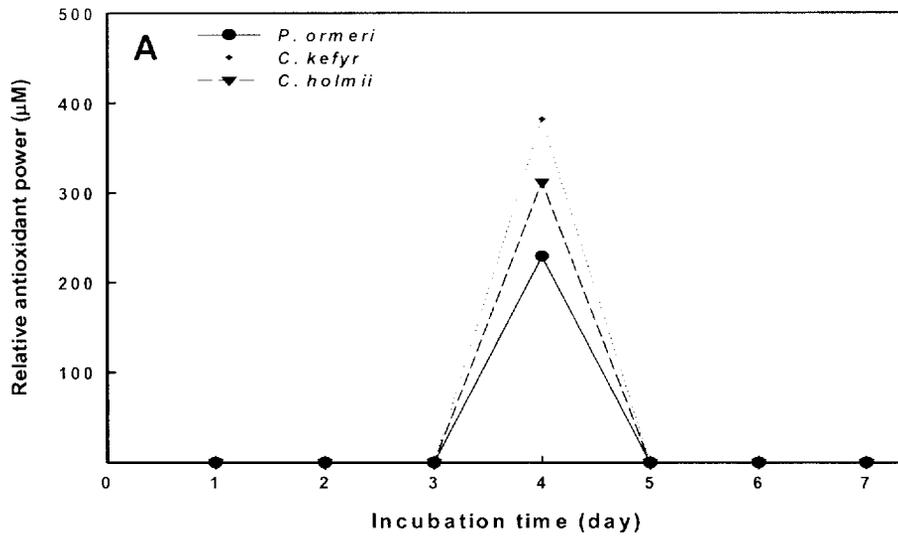
A: Yeasts; B: Lactic acid bacteria

## 6-2. 2% 미강추출 배지

2% 미강 열수 추출물을 121℃, 15분간 멸균하여 배지로 사용하였다. kefir 발효유 분리균주인 효모와 젖산균 각각 3균주를 전배양하여 one drop씩 동량 접종한후 37℃에서 배양하면서 24시간 간격으로 배양액 1mL을 취하여 원심분리(4℃, 7000rpm, 20min)하여 상청액을 시료액으로 하여 향산화력을 측정하였다.

효모 분리균주간의 향산화력에 있어서는 일반 배지상에서 *Pichia ormeri*가 가장 높았던 것과는 달리 *C. kefir* > *C. holmii* > *P. ormeri* 순으로 나타났다(fig. 23-A).

젖산균류의 경우에 일반 배지상에서 *L. brevis*가 가장 높았던 것과는 달리 젖산균 분리균주간의 별다른 차이가 없을 뿐만 아니라 효모류와 비교하여도 거의 유사한 것으로 나타났다. 이는 일반배지상에서 효모류의 배양액에서보다 젖산균류의 배양액에서 향산화력이 더 높은 것과는 차이가 있었다(fig. 23-B) .



**Fig.23. Change of relative antioxidant power by growth of microorganisms in rice bean extract medium(2%)**

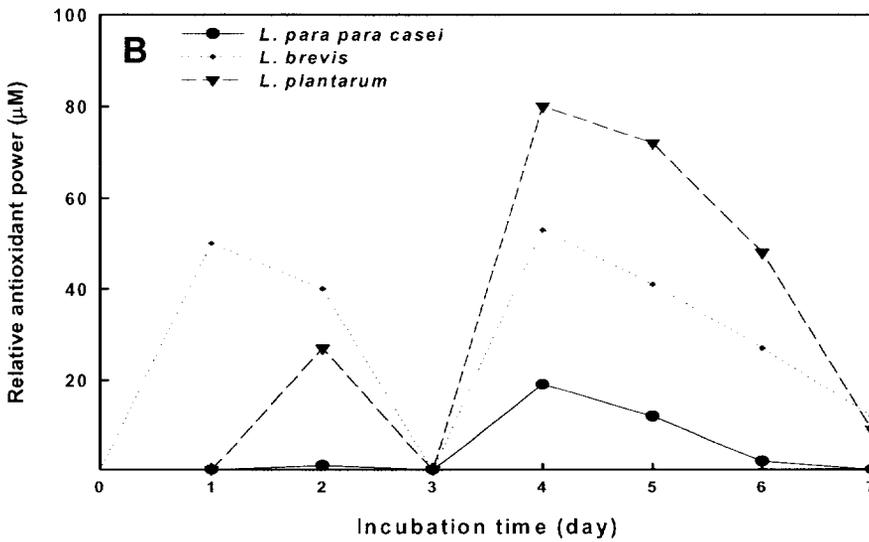
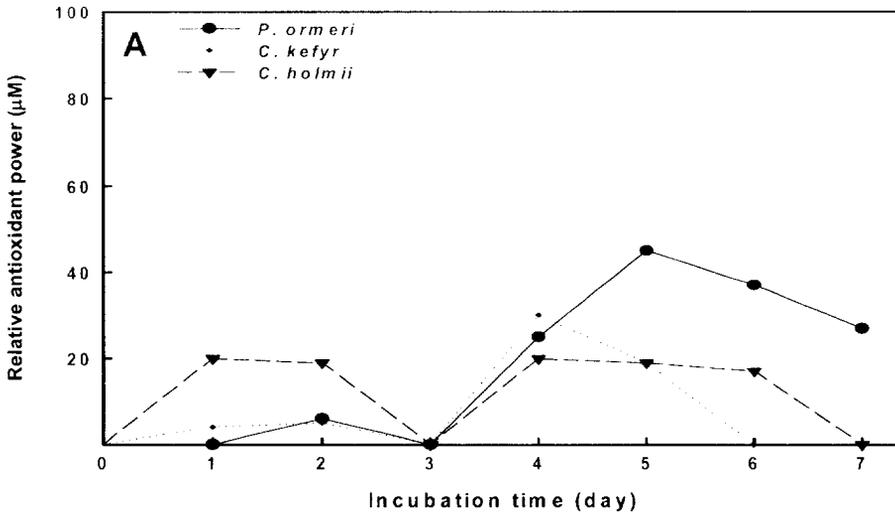
A: Yeasts; B: Lactic acid bacteria

### 6-3. 2% 다시마추출 배지

2% 다시마 열수 추출물을 121℃, 15분간 멸균하여 배지로 사용하였다. kefir 발효유 분리균주인 효모와 젖산균 각각 3균주를 전배양하여 one drop씩 동량 접종한후 37℃에서 배양하면서 24시간 간격으로 배양액 1mL을 취하여 원심분리(4℃, 7000rpm, 20min)하여 상청액을 시료액으로 하여 항산화력을 측정하였다.

효모 분리균주간의 항산화력에 있어서는 일반 배지상에서 *Pichia ormeri*가 가장 높았던 것과 같이 *Pichia ormeri*가 가장 높게 나타났다(fig. 24-A).

젖산균류의 경우에 일반 배지상에서 *L. brevis*가 가장 높았던 것과는 달리 젖산균 분리균주에서는 2% 맥아추출배지의 경우와 같이 *L. plantarum*이 가장 높게 나타났다. (fig. 24-B).



**Fig.24. Change of relative antioxidant power by growth of microorganisms in kelp extract medium(2%)**

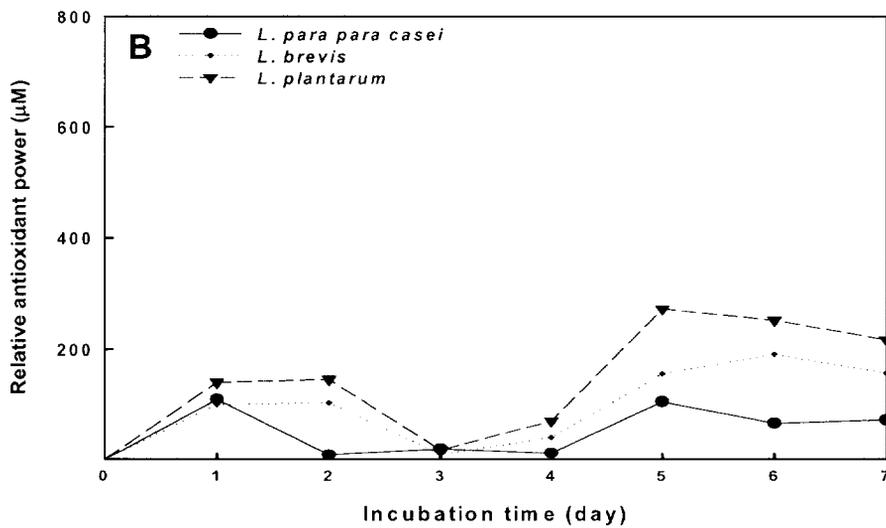
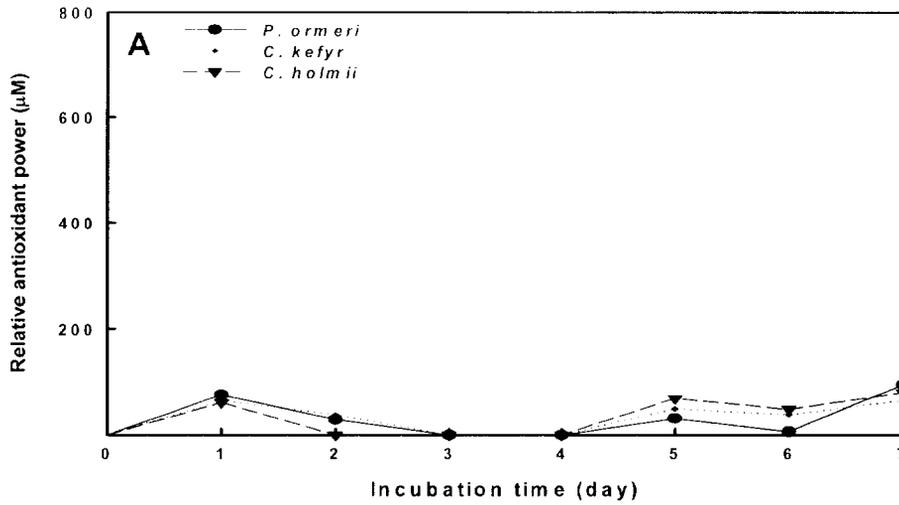
A: Yeasts; B: Lactic acid bacteria

#### 6-4. 1% 복합 배지

1% 맥아, 미강, 다시마 열수 추출물을 동량의 비율로 혼합하여 이를 121℃, 15분간 멸균하여 배지로 사용하였다. kefir 발효유 분리균주인 효모와 젖산균 각각 3균주를 전배양하여 one drop씩 동량 접종한후 37℃에서 배양하면서 24시간 간격으로 배양액 1mL을 취하여 원심분리(4℃, 7000rpm, 20min)하여 상청액을 시료액으로 하여 향산화력을 측정하였다.

효모 분리균주간의 향산화력에 있어서는 일반 배지상에서 *Pichia ormeri*가 가장 높았던 것과는 달리 이들 분리균주 상호간의 차이는 없는 것으로 나타났다(fig. 25-A).

젖산균류의 경우에 일반 배지상에서 *L. brevis*가 가장 높았던 것과는 달리 *L. plantarum*이 가장 높게 나타났으며 전반적으로 효모 분리균주보다는 향산화력이 높은 것으로 나타났다. 이는 일반배지상의 결과와 일치한다(fig. 25-B).



**Fig.25. Change of relative antioxidant power by growth of microorganisms in natural extract medium(1%)**

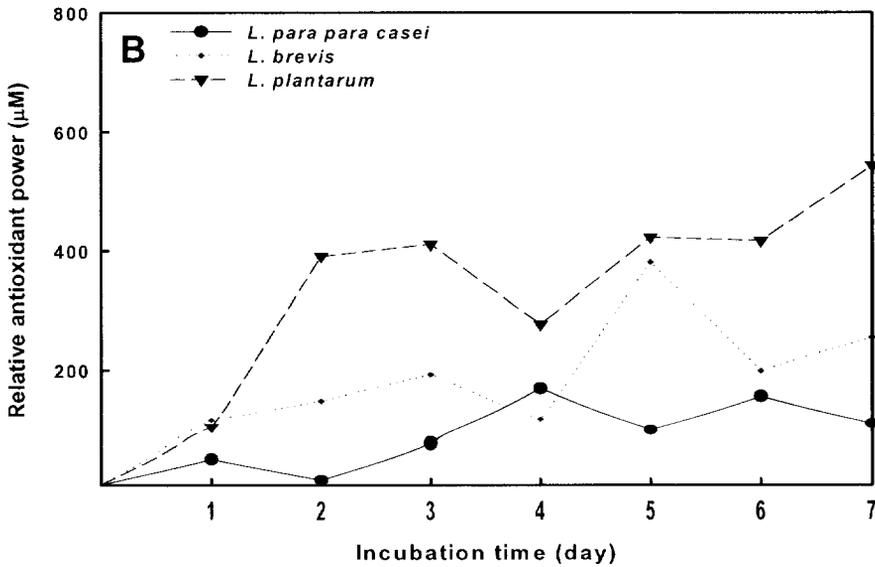
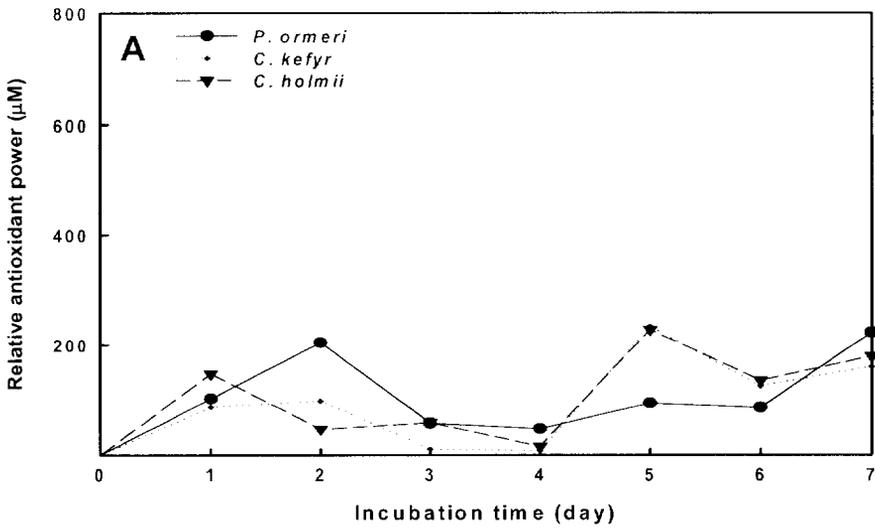
A: Yeasts; B: Lactic acid bacteria

#### 6-5. 2% 복합 배지

2% 맥아, 미강, 다시마 열수 추출물을 동량의 비율로 혼합하여 이를 121℃, 15분간 멸균하여 배지로 사용하였다. kefir 발효유 분리균주인 효모와 젖산균 각각 3균주를 전배양하여 one drop씩 동량 접종한후 37℃에서 배양하면서 24시간 간격으로 배양액 1mL을 취하여 원심분리(4℃, 7000rpm, 20min)하여 상청액을 시료액으로 하여 향산화력을 측정하였다.

효모 분리균주간의 향산화력에 있어서는 일반 배지상에서 *Pichia ormeri*가 가장 높았던 것과 같이 *Pichia ormeri*와 *C. holmii* 가장 높게 나타났다(fig. 26-A).

젖산균류의 경우에 일반 배지상에서 *L. brevis*가 가장 높았던 것과는 달리 젖산균 분리균주에서는 2% 맥아추출배지의 경우와 같이 *L. plantarum*이 가장 높게 나타났다. 전반적으로 같은 배지상에서 효모의 배양액보다는 젖산균의 배양액에서 향산화력이 높게 나타났다(fig. 26-B).



**Fig.26. Change of relative antioxidant power by growth of microorganisms in natural extract medium(2%)**

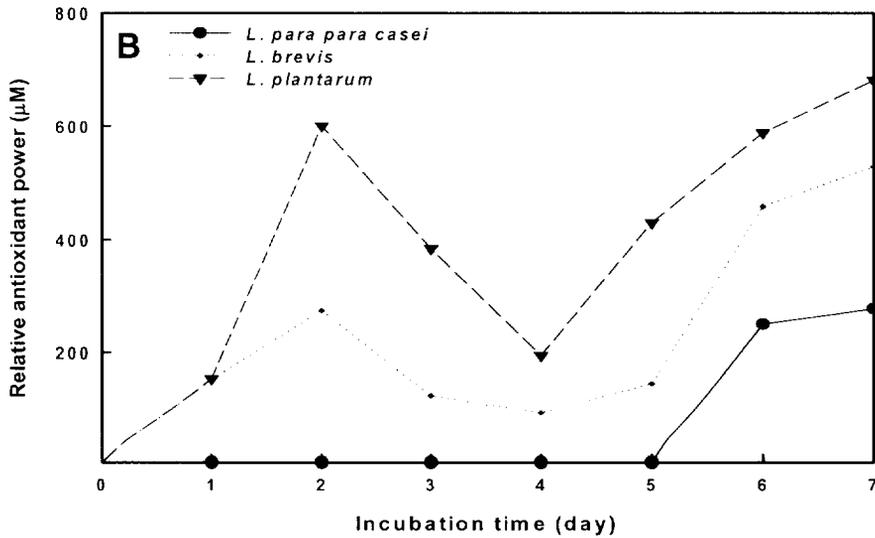
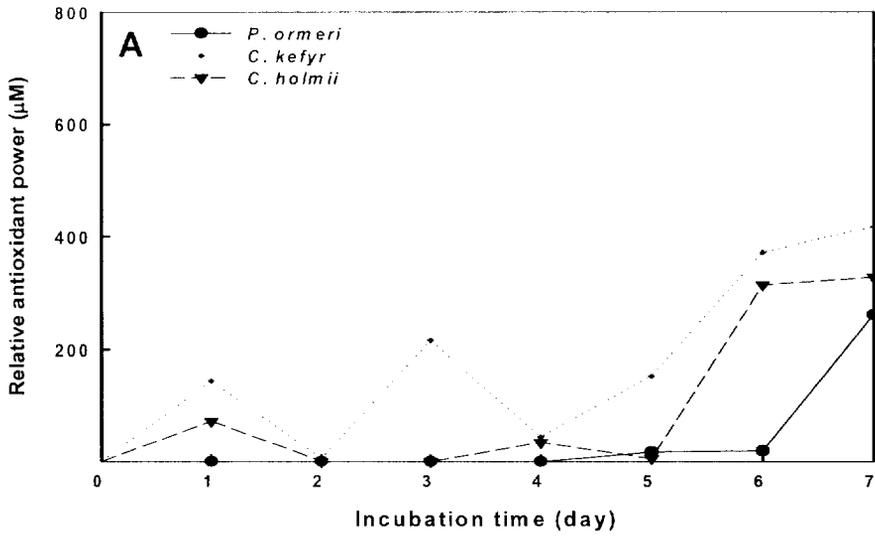
A: Yeasts; B: Lactic acid bacteria

#### 6-6. 5% 복합 배지

5% 맥아, 미강, 다시마 열수 추출물을 동량의 비율로 혼합하여 이를 121℃, 15분간 멸균하여 배지로 사용하였다. kefir 발효유 분리균주인 효모와 젖산균 각각 3균주를 전배양하여 one drop씩 동량 접종한후 37℃에서 배양하면서 24시간 간격으로 배양액 1mL을 취하여 원심분리(4℃, 7000rpm, 20min)하여 상청액을 시료액으로 하여 항산화력을 측정하였다.

효모 분리균주간의 항산화력에 있어서는 일반 배지상에서 *Pichia ormeri*가 가장 높았던 것과 달리 *C. kefir*이 가장 높게 나타났다. (fig. 27-A).

젖산균류의 경우에 일반 배지상에서 *L. brevis*가 가장 높았던 것과는 달리 젖산균 분리균주에서는 2% 맥아추출배지의 경우와 같이 *L. plantarum*이 가장 높게 나타났다. 그리고 배양 2일째와 7일째에 가장 높게 나타났으며 전반적으로 같은 배지상에서 효모의 배양액보다는 젖산균의 배양액에서 항산화력이 높게 나타났다 (fig. 27-B).



**Fig.27. Change of relative antioxidant power by growth of microorganisms in natural extract medium(5%)**

A: Yeasts; B: Lactic acid bacteria

## 요 약

최근, 건강 증진을 위한 생리활성 물질 탐색에 관한 연구가 여러 방향으로 활발하게 진행되고 있으며, 우리가 일상적으로 섭취하고 있는 발효식품 중에서도 향산화 효과가 있는 성분이 다수 보고되고 있다. Kefir 발효유는 각종 유기산과 ethanol로 인해 발효유 특유의 좋은 향미를 가지고 있으며 요구르트와 같이 건강증진 효과도 좋은 제품이다. 발효의 starter로 이용되는 Kefir grain은 protein과 polysaccharide로 구성되어 있으며 여러 효모와 젖산균이 공생관계를 이루고 있다. 따라서 본 연구에서는 Kefir 발효유에 주요 미생물을 분리, 동정한 후 이들 균주를 이용하여 향산화 물질의 생산을 위하여 각 균주별로 생육특성에 관한 기초실험을 실시하였으며, 이를 바탕으로 향산화물질의 생산을 위한 최적조건을 확인하였으며, 값싼 맥아, 미강, 다시마 등의 열수추출물을 배지로 이용하여 미생물 유래 향산화물질의 대량 생산을 통한 산업화 가능성에 대하여 알아보았다.

1. Kefir 발효유에서 분리한 균주는 *P. ormeri*, *C. kefir*, *C. holmii*의 효모류와 *L. para para casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*의 젖산균류가 주류를 이루었으며 효모과 젖산균의 구성비율은 약 2:1 정도였다.

2. 분리균주 중 효모류인 *P. ormeri*, *C. kefir*, *C. holmii*를 YM broth에 각각 접종하여 배양한 결과 *P. ormeri*의 향산화력이 가장 높게 나타났다.

3. 분리균주 중 젖산균류인 *L. para para casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*를 MRS broth에 각각 접종하여 배양한 결과 *L. brevis*의 향산화력이 가장 높게 나타났다.
4. 효모류와 젖산균류 중 가장 높은 향산화력을 나타낸 *P. ormeri*와 *L. brevis*를 동량으로 접종하여 혼합배양한 결과 25°C보다 37°C MRS broth상에서 향산화력이 높게 나타났다.
5. 효모류와 젖산균류 중 가장 높은 향산화력을 나타낸 *P. ormeri*와 *L. brevis*를 5:1로 접종하여 혼합배양한 결과 25°C MRS broth상에서 향산화력이 높게 나타났다.
6. Kefir 발효유에서 분리한 효모류와 젖산균류를 천연배지 (1,2,5%)에 접종하여 배양한 결과 *C. kefyri*와 *L. plantarum*이 각각 가장 높은 향산화력을 나타내었으며 배지농도가 증가할수록 높게 나타났다.

## 참고문헌

Annual report on the cause of death statistics. 2001. National Statistical Office, R. O. K.

Assadi, M.M., R. Rourahmad and N. Moazami. 2000. Use of isolated Kefir starter cultures in kefir production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 541-543.

Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 2001. Effect of stem bark extract from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid concentrations and tissue lipid peroxidation in the cholesterol-fed rats. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 33, 128-134.

Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 1999. Effect of potato polyphenolics on lipid peroxidation in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 28, 1131-1136.

Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F. and Chou, S. T. 2002. Antioxidantive activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Agric. Food Chem.*, 50, 2454-2458.

De Mattia, G., Laurenti, O. and Fava, D. 2003. Diabetic endothelial dysfunction effect of free radical scavenging in type

2 diabetic patients. *J. Diabetes Complications*, 17. 30-35

Ham, J. S., Jeong, S. G., In, Y. M., Kim, D. W., Kim, Y. K., Kim, Y. K., Ahn, Y. T., and Kim, H, U. 1999. Fermentation of goat milk using *Lactobacillus plantarum* and *Candida Kefyr* isolated from Mongolian koumiss. *Kor. J. Dairy Sci.*, 21(3). 247-254.

Iwai, K., Nakaya. N., Kawasaki, Y. and Matsue, H. 2002. Inhibitory effect of natto, a kind of fermented soybeans, on LDL oxidation *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3592-3596.

Iwai, K., Nakaya. N., Kawasaki, Y. and Matsue, H. 2002. Antioxidantive functions of natto, a kind of fermented soybeans: Effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3597-3601.

Kim, D.S., S.K. Park, H.S. Kwark and K.W. Lee. 1994. Isolation, identification and characterization of lactose non-fermenting yeast from Kefir cultures. *Korean J. Food Sci. Resour.*, 14(2), 175-178.

Kneifel, W., and Mayer, H. K. 1991. Vitamin profiles of kefir made from milks of different species. *Int. J. Food. Sci. Tech.*, 26, 423-428.

Koroleva, N. S. 1988b. Technology of kefir and kumys. *I. Dairy Federation Bulletin.*, 227, 96-99.

Kroger, M. 1993. Kefir. *Cult. Dairy. Prod. J.*, 28, 26-29.

Kwak, H. S., Park, S. K., and Kim, D. S. 1996. Biostabilization of Kefir with a nonlactose-fermenting yeast. *J. Dairy. Sci.*, 79, 937-942.

Lee, K.S. and D.S. Kim. 1986. Studies on Microbiological characteristics of Kefir cultures. *Korean J. Dairy Sci.*, 8(4), 266-274.

Marshall, V. M. and Cole. W. M. 1985. Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. *J. Dairy. Res.*, 52, 451-456.

Otle', S. and Cagindi, O. 2003. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan J. nutrition*, 2(2), 54-59.

Perdigon, G., Alvarez, S., Nader, de Macias, M. E., Magni, R. A., Oliver, G. and Pesce de Ruiz Hogaldo, A. A. 1986a. Lactobacilli administrated orally induce release of enzymes from peritoneal macrophages in mice. *Milchwiss*, 41, 344-348.

Ramakanth, R.R. and N.P. Shah. 1998. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. 1998. *Biotechnology Techniques.*, 12(11), 819-822.

Rashid, M. H. O., Kato, F., Murata, A. and Kondo, M. 1993. Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus sojae*. *Biosci. Biotechnol, Biochem.* 75, 45-53.

Suzuki, S., Hinokio, Y., Komatu, K. Ohtomo, M., Hirai, S., Hirai, A., Chiba, M., Kasuga, S., Akai, H. and Toyota, T. 1999. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complication. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 45. 161-168.

Tamai, N., N. Yochimitsu, Y. Watanabe, Y. Kuwabara and S. Nagai. 1996. Effect of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. *J. Ferment. Bioengineering*, 81(2), 181-182.

Yoon, Y. H., Kang, D. C., Back, Y. J., and Huh, C. S. 1998. Cholesterol assimilation activity of *Lactobacillus* spp. from kefir and yoghurt and non starter strains. *Kor. J. Dairy. Sci.*, 20, 143-152.