

Orotic acid의 원유내 함량과 발효중 유산균에 의한 감소

송영민 · 김철현 · 백승천*
서울우유 기술연구소

Content of Orotic Acid in Raw milk and Reduction of OA by Lactic Acid Bacteria during Fermentation

Young Min Song, Cherl-Hyun Kim, and Seung-Cun Baick*
Institute of Dairy Food Research, Seoul Dairy Co-op.

Changes in orotic acid (OA) contents of raw milk and during cultivation and storage at refrigerated temperature were determined. OA contents of raw and 10% reconstituted milk held at 121°C for up to 15 min decreased by 17.6 and 22.4%, and those fermented at 40 and 37°C for 72 hr with *Lactobacillus helveticus* 166 and *Lactobacillus casei* 955 decreased 37.8-43.2 and 41.8-76%, whereas when fermented at 40°C for 72 hr with *Streptococcus thermophilus* ST-37, did not decrease significantly compared with fermentation by other lactobacilli. OA content did not change during storage at refrigeration temperature. OA reduction by *Lactobacillus* sp. was dramatically increased at the initiation of stationary phase during fermentation. OA reduction varied among different lactobacilli. These results show decrease in cultivation time, rapid cooling of yogurt, and proper selection of *Lactobacillus* sp. prevent OA content reduction.

Key words: orotic acid, raw milk, lactic acid bacteria, fermentation

서론

Pyrimidine nucleotide 생합성의 중간생성물질로서 live cell의 영양성분이기도한 orotic acid(OA)는 우유에 자연적으로 존재하며 체내 간 보호, 혈구생성 촉진 및 성장 촉진작용에 관여하고, 심장 질환 등을 예방하는 것으로 보고된 바 있다(1,2). 이러한 OA는 면양유나 산양유보다 우유에 많이 존재하는 것으로 나타나 종에 따라 OA의 함량 차이가 많은 것으로 보고된 바 있으며(3), 열에 매우 안정하고(4), 미생물의 성장활력 및 향미 형성에도 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(5). 또한, OA는 아미노산 결핍증 진단에 사용되기도 하는데, OA가 소변으로 과도하게 배출되면 ornithine이나 arginine의 결핍 증상을 일으키는 것으로 보고되었다(6). 조 등(7)은 OA가 rats의 간에서 cholesterol의 생합성과 사람의 혈청내 cholesterol이 증가하는 것을 억제 시키지만 OA를 1%씩 과다 투여 한 결과 nucleotide와의 평형 때문에 간장장애 특히 지방간을 야기시키는 것으로 보고하였다. 그러나, Durschlag 등(8)의 보고에 의하면 rat의 다른 종에서는 OA를 1%씩 투여한 결과 지방간을 일으키지 않은 것으로 나타나, OA는 종에 따라 생리 활성의

차이가 큰 것으로 나타났다. 한편 원유에 미량 존재하는 OA는 유산균의 성장인자로 작용하여 유산균에 의한 발효 시 OA가 50%정도 감소되는 것으로 보고되고 있는데(9), 최근의 연구 동향을 살펴보면 원유내 OA의 영양학적 기능이나 생리활성 기능에 대한 관심은 높아지고 있지만 유산균에 의한 OA의 손실을 최소화 하기 위한 연구는 거의 이뤄 지지 않고있다.

따라서 본 연구는 원유내 OA 함량 및 열 안정성을 측정하고 상업적으로 이용되고 있는 유산균에 의한 발효 및 냉장 저장 중 OA의 변화를 측정하여 발효 시 OA의 손실을 최소화 하기 위한 방안을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 사용 균주

실험에 사용된 시료는 서울우유 협동조합에 납유 되는 원유와 탈지분유를 사용하였다. 유산균에 의한 OA의 이용성을 측정하기 위해서 상업적으로 이용되고 있는 *Lactobacillus helveticus* 166외 3종, *Lactobacillus casei* 955외 4종 및 *Streptococcus thermophilus* ST-37외 4종을 선택하여 원유에 탈지분유를 10% 첨가하여 제조한 10% 환원유(reconstituted milk)에서 3회 계대 배양 후 사용하였으며, 사용 균주는 Table 1에 나타난 바와 같다.

생균수 측정

발효액 1 mL을 취하여 멸균된 0.85% 생리식염수에 십진법으로 희석한 다음 BCP agar에 1 mL씩 pouring culture method

*Corresponding author: Seung-Chun Baick, Institute of Dairy Research, Seoul Dairy Co-op. 1059, Shingil-dong, Danwon-gu, Ansan-city, Gyeonggi-do, Korea
Tel: 82-31-491-3867
Fax: 82-31-491-9179
E-mail: baicksc@seoulmilk.co.kr

Table 1. List of microorganisms used for test

Strain	Origin
<i>Lactobacillus helveticus</i> KY3	Rodia, Inc., USA
<i>Lactobacillus helveticus</i> 163	
<i>Lactobacillus helveticus</i> 166	
<i>Lactobacillus casei</i> 911	
<i>Lactobacillus casei</i> 923	
<i>Lactobacillus casei</i> 955	
<i>Lactobacillus casei</i> 01	Christian Hansen, Inc., Denmark
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST-36	
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST-37	
<i>Streptococcus thermophilus</i> P	Visby, Inc., Germany
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST-99	Rodia, Inc., USA

로 접종한 후 *L. helveticus* 166과 *S. thermophilus* ST-37은 40°C에서 72시간, *L. casei* 955는 37°C에서 72시간 배양하여 나타난 흰색의 균락을 계수하여 CFU(colony forming unit)/mL로 나타내었다.

pH 및 적정산도

발효액의 pH는 Orion 520A pH meter(Orion, USA)를 이용하여 측정하였고, 적정산도는 716 DMS Titrino 자동적정기(Metrohm Ltd., Switzerland)를 이용하여 9g의 시료에 동량의 증류수를 첨가한 후 0.1 N NaOH로 적정하였다.

시료의 열처리

원유와 10% 환원유의 열처리조건은 85°C 항온수조에서 각각 10분, 1시간 실시 하였으며, MLS-3000 소형고압멸균기(Sanyo Electric Co. Ltd., Japan)를 사용하여 121°C, 15분간 실시하였다.

표준시료의 조제

분석에 사용된 OA의 표준시료는 Sigma사(Sigma Chemical Co., USA)에서 구입하여 사용하였으며, 각각 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm의 농도로 조제하여 얻어진 면적 값을 통해 표준곡선의 기울기 값을 검정하여 표준농도로 하였다(10,11).

분석시료의 조제

열처리 및 미생물에 의한 OA의 함량변화를 분석하기 위해서 Khursheed 등(5)의 방법을 일부 수정하여 다음과 같은 방법으로 실시하였으며, 모든 시약은 HPLC등급을 사용하였다. 5g의 시료를 centrifuge tube에 넣은 뒤 5% oxalic acid 0.5 mL과 95% ethanol 10 mL을 첨가하여 10분간 혼합 한 후 35,000×g에서 15분간 원심 분리하였다(J2-21M/E Centrifuge, Beckman, USA). 원심분리 후 상등액을 0.45 µm membrane filter(Gelman, USA)를 사용하여 여과 한 뒤 rotary evaporator(VV2011 Rotary evaporator, Heidolph, Germany)에서 시료를 농축하였다. 농축된 시료에 3차 증류수를 첨가하여 10 mL로 정용하고 0.45 µm membrane filter로 2차 여과 한 후 시료 10 µL를 취하여 HPLC에 주입하였다.

컬럼 및 이동상

OA는 HPLC를 이용하여 분석하였으며 조건은 Table 2에 나타난 바와 같다.

Table 2. The HPLC operating conditions for the analysis of OA

Item	Condition
Instrument	Shimadzu Model LC-6A, Japan
Detector	UV-Vis Spectrophotometric detector
Column	Aminex HPX-87H, Bio-Rad, USA
Flow rate	0.7 mL/min
Mobile phase	0.009 N sulfuric acid
Oven temp.	22°C
Injection vol.	10 µL

결과 및 고찰

열처리 조건에 따른 OA의 변화

원유 및 10% 환원유를 각각의 조건에 맞게 열처리 한 후 sample 5 mL을 취하여 OA함량을 측정 한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 원유내 존재하는 OA는 15.3(±1.4) ppm정도 함유되어 있었으며, OA의 열 안정성을 측정하기 위해 85°C, 121°C에서 각각 열처리 한 후 측정된 결과 85°C에서 1시간 경과 시 14.1(±1.8) ppm으로 최초농도보다 7.8% 감소하였으며, 동일 시료를 121°C에서 15분간 열처리 한 후 OA함량을 측정 한 결과 12.6(±1.6) ppm으로 17.6% 감소하였다. 10% 환원유를 제조한 후 OA함량을 측정된 결과 27.2(±1.5) ppm정도 함유되어 있었으며 원유와 동일한 조건으로 열처리한 결과 85°C에서 열처리 시 25.7(±1.2) ppm으로 5.5% 감소하였고, 121°C에서 열처리 시 21.1(±1.3) ppm으로 22.4% 감소하였다. 이러한 결과는 OA가 열에 안정하다는 Saidi 등(4)의 연구 보고와 유사한 결과로 나타나 상업적으로 시판되고 있는 유제품의 살균 조건을 볼 때 살균 온도에 따른 유제품 내 OA 손실은 극히 미약 할 것으로 판단된다. 그러나, 서 유럽국가의 원유와 초유에 존재하는 OA함량은 각각 88(±19) ppm, 21(±7) ppm정도로써 실험에 사용된 국내 원유의 OA함량보다 현저히 높은 수준인데, Larson(3)과 James 등(12)에 의하면 OA함량은 품종, 개체 차이, 초유 및 착유 시기 등 여러 요인에 의해서 함량 차이가 큰 것으로 보고한 바 있어 계절별, 사료 공급원의 차이 등 여러 원인에 대한 보강실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

유산균에 따른 OA의 변화

요구르트 제조 시 상업적으로 이용되고 있는 유산균을 사용하여 10% 환원유에 각각의 균주를 10⁶ CFU/mL수준이 되도록

Table 3. Changes of OA concentration by heat treatment

Samples	Orotic acid (ppm)			
	No heat	85°C/10 min	85°C/60 min	121°C/15 min
Raw milk	15.3 ± 1.4	15.3 ± 1.6	14.1 ± 1.8	12.6 ± 1.6
10% Reconstituted milk	27.2 ± 1.5	26.2 ± 2.1	25.7 ± 1.2	21.1 ± 1.3

All values were indicated mean ± SE (n=36).

Table 4. Concentration of OA after inoculated with different microorganisms

Strain	Orotic acid (ppm)		Decreased ratio (%)
	Before	After	
<i>Lactobacillus helveticus</i> KY3		13.4 ± 1.2	51
<i>Lactobacillus helveticus</i> 163		6.8 ± 1.5	75
<i>Lactobacillus helveticus</i> 166		15.7 ± 1.8	42
<i>Lactobacillus casei</i> 911		20.5 ± 0.7	25
<i>Lactobacillus casei</i> 923		9.1 ± 1.6	67
<i>Lactobacillus casei</i> 955	27.2 ± 1.5	20.4 ± 2.1	25
<i>Lactobacillus casei</i> 01		15.5 ± 1.4	43
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST-36		25.6 ± 2.3	6
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST-37		26.7 ± 1.6	2
<i>Streptococcus thermophilus</i> P		24.8 ± 0.9	9
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST-99		21.3 ± 1.4	22

All values were indicated mean ± SE (n=33).

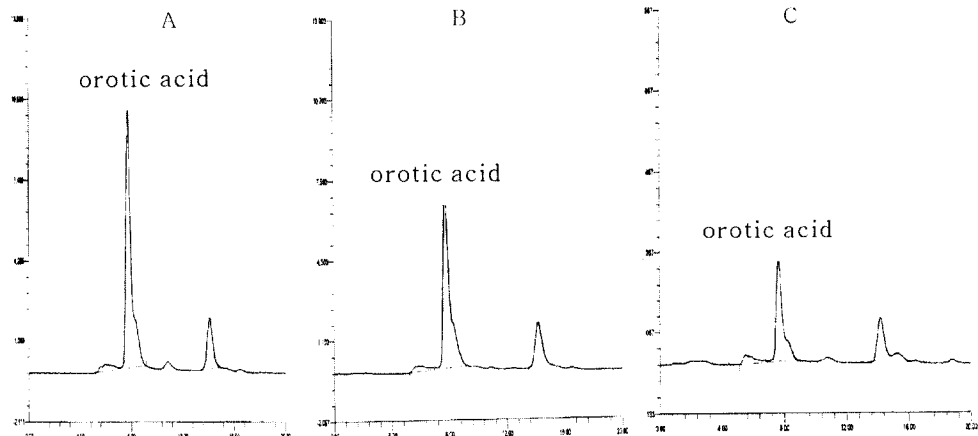


Fig. 1. Changes of OA contents in 10% reconstituted milk medium inoculated with *Lactobacillus helveticus* 166 at 40°C for 72 hr.
A: Fermentation for 4 hr, B: Fermentation for 24 hr, C: Fermentation for 72 hr.

접종한 뒤 40°C, incubator에 배양하였다. 유산균에 따른 OA의 감소량을 측정된 결과는 Table 4에 나타난 바와 같이 균종별 차이가 큰 것으로 나타났다. *L. helveticus*속의 균주는 OA를 42-75% 정도로 가장 많이 감소시켰으며, *L. casei*속의 균주는 25-67% 정도 감소시키는 것으로 나타났는데, OA의 감소율은 strain에 따라서 큰 차이를 보이고 있다. *S. thermophilus*속의 균주는 OA를 2-22% 정도만 감소시킨 것으로 나타났는데, 다른 균종과 비교하여 볼 때 OA의 감소율이 상대적으로 제일 낮게 나타났다.

발효 및 냉장저장 중 OA의 변화

균종별 OA의 감소율이 가장 낮은 *L. helveticus* 166, *S. thermophilus* ST-37 및 *L. casei* 955 균주를 선발하여, 10% 환원유에 0 ppm, 50 ppm 및 100 ppm수준으로 OA를 첨가한 후 유산

균에 의한 OA의 변화를 HPLC로 측정하였다. 배지는 85°C에서 10분간 열처리 하였으며 각각의 균주를 10⁶ CFU/mL수준이 되도록 접종 한 뒤 시간대별 유산균수, pH 및 TA 변화와 배양 종료 후 냉장 저장 중의 변화를 측정하였다.

***L. helveticus* 166에 의한 OA의 변화:** 10% 환원유에 *L. helveticus* 166을 10⁶ CFU/mL수준으로 접종한 뒤 40°C에서 72시간까지 발효시키면서 OA의 감소량을 측정된 결과, Fig. 1에 나타난 chromatogram에서 보듯이 7.6분대에서 OA의 피크가 형성되었으며 접종 24시간 경과 후부터 OA의 피크가 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 유산균수, pH 및 TA 변화를 측정된 결과는, Fig. 2와 Table 5에 나타난 바와 같다. 각각의 농도별로 OA를 첨가한 배지에 *L. helveticus* 166을 접종 한 후 24시간 경과 시 변화를 측정된 결과 유산균 수는 2.1-2.8(10⁹ CFU/mL을

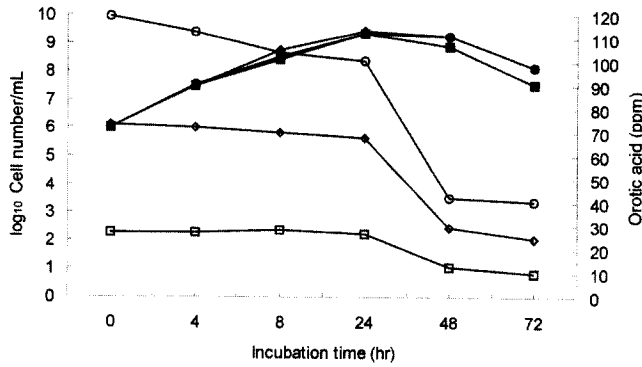


Fig. 2. Changes of OA contents in 10% reconstituted milk medium inoculated with *Lactobacillus helveticus* 166 at 40°C for 72 hr.

Cell number: 0 ppm(-■-), 50 ppm(-◆-), 100 ppm (-●-).
Orotic acid: 0 ppm(-□-), 50 ppm(-◇-), 100 ppm (-○-).

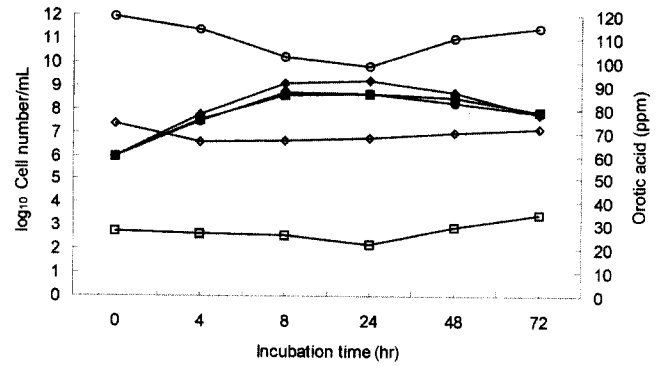


Fig. 3. Changes of OA contents in 10% reconstituted milk medium inoculated with *Streptococcus thermophilus* ST-37 at 40°C for 72 hr.

Cell number: 0 ppm(-■-), 50 ppm(-◆-), 100 ppm (-●-).
Orotic acid: 0 ppm(-□-), 50 ppm(-◇-), 100 ppm (-○-).

유지했고, pH는 6.1-4.2, TA는 0.25-0.78로서 접종 후 균수는 최고점에 도달했지만 OA의 감소율은 2.5-16% 정도로 미미 하였다. 그러나, 발효 24시간부터 72시간까지 성장 정지기(stationary phase)와 사멸기(death phase)를 거치는 동안 OA의 감소가 심한 것으로 나타났다. OA를 첨가하지 않은 경우 유산균 수는 24시간 발효 시 2.1×10^9 CFU/mL에서 72시간 발효 시 3.4×10^7 CFU/mL로 다소 감소했지만, OA는 37.8%이상 급격히 감소하였다. 50 ppm의 OA를 첨가한 경우 유산균 수는 24시간 발효 시 2.8×10^9 CFU/mL에서 72시간 발효 시 1.3×10^8 CFU/mL로서 거의 변화가 없었으나, OA의 감소율은 43.2%이상으로 가장 높게 나타났다. 또한, 100 ppm의 OA를 첨가한 경우 24시간 발효 시 2.4×10^9 CFU/mL에서 72시간 발효 시 1.3×10^8 CFU/mL로서 유산균수의 감소는 미미하였으나, OA는 40.3%이상 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Laconi 등(1)과 Fernandez 등(9)이 OA가 미생물들의 성장 인자로서 작용한다고 연구 보고한 바와 유사한 결과로서 OA의 감소율이 높을수록 유산균수도 높게 나타났다. 냉장 저장 중 OA의 변화를 측정하기 위해 발효 24시간 후 급속 냉각 하여 10°C incubator에 96 시간동안 저장하면서 감소량을 측정된 결과 pH는 4.4-3.9, TA는 0.75-1.4까지 변화를 보였지만 OA의 변화는 거의 없는 것으로 나타났다.

S. thermophilus ST-37에 의한 OA의 변화: *S. thermophilus* ST-37를 10^6 CFU/mL수준으로 접종한 뒤 40°C에서 72시간 발효시키면서 OA의 감소량, 유산균수, pH 및 TA 변화를 측정된 결과는 Fig. 3과 Table 6에 나타난 바와 같다. OA를 첨가하지 않은 경우 접종 후 24시간 경과 시 유산균 수는 4.6×10^8 CFU/mL로서 최고점에 이른 뒤 72시간 경과 시 7×10^7 CFU/mL로 다소 감소하였으며 pH는 6.1-4.0, TA는 0.25-1.11까지 변화를 보였다. *S. thermophilus* ST-37에 의한 OA의 변화를 측정된 결과, 접종 후 24시간 까지 27.4(±1.7) ppm에서 21.7(±3.4) ppm으로 20.8% 감소하였지만, 24시간부터 OA가 서서히 증가하여 72시간 경과 후 34.8(±8.3) ppm으로서 최초 함량보다 27% 정도 증가한 것으로 나타났다. 50 ppm의 OA를 첨가한 경우 접종 후 24시간 경과 시 유산균 수는 1.5×10^9 CFU/mL로서 최고점에 이른 뒤 72시간 경과 시 5.7×10^7 CFU/mL로 감소하였으며 pH는 6.1-4.1, TA는 0.25-1.11까지 변화를 보이는 동안 OA는 접종 후 4시간까지 73.4(±6.4) ppm에서 65.8(±7.2) ppm으로 10.4% 감소했지만, 4시간 이후부터 OA가 증가하여 72시간 경과 시 71.2(±9.1) ppm으로서 최초 OA함량 수준을 회복한 것으로 나타났다. 100 ppm의 OA를 첨가한 경우 24시간 경과 후 유산균 수는 4.9×10^8 CFU/mL로서 최고점에 이른 뒤 72시간 경과 시 6.8×10^7 CFU/mL로 감소하였으며 pH는 6.1-

Table 5. Changes of OA concentration, pH and TA by inoculated with *L. helveticus* 166

Condition	Time (hr)	Concentration of OA (ppm)			Changes of pH / TA		
		0 ppm	50 ppm	100 ppm	0 ppm	50 ppm	100 ppm
Incubation (40°C)	0	27.4 ± 1.7	73.4 ± 6.4	119.4 ± 7.8	6.1 / 0.25	6.1 / 0.25	6.1 / 0.25
	4	27.5 ± 2.0	72.5 ± 5.3	114.1 ± 11.7	5.7 / 0.29	5.7 / 0.29	5.7 / 0.28
	8	28.5 ± 2.2	70.2 ± 5.9	103.8 ± 6.1	5.0 / 0.46	4.8 / 0.57	4.9 / 0.51
	24	26.7 ± 1.4	67.6 ± 6.8	100.4 ± 7.8	4.5 / 0.75	4.2 / 0.77	4.3 / 0.78
	48	12.6 ± 0.7	32.7 ± 3.1	42.5 ± 8.4	3.6 / 2.02	3.5 / 2.22	3.5 / 2.19
	72	10.1 ± 0.8	29.2 ± 2.7	40.5 ± 9.3	3.5 / 2.18	3.4 / 2.32	3.5 / 2.28
Storage (10°C)	24	26.7 ± 2.6	67.6 ± 5.7	100.4 ± 7.4	4.4 / 0.76	4.5 / 0.75	4.5 / 0.78
	48	25.7 ± 1.4	65.2 ± 4.7	99.21 ± 0.3	3.9 / 1.37	3.9 / 1.38	3.9 / 1.26
	72	25.3 ± 3.2	63.2 ± 4.9	99.3 ± 7.9	3.9 / 1.38	3.9 / 1.36	3.9 / 1.35
	96	26.2 ± 2.9	61.9 ± 5.1	98.2 ± 8.3	3.9 / 1.28	3.9 / 1.39	3.9 / 1.31

All values were indicated mean ± SE (n=90).

Table 6. Changes of OA concentration, pH and TA by inoculated with *S. thermophilus* ST-37

Condition	Time (hr)	Concentration of orotic acid (ppm)			Changes of pH / TA		
		0 ppm	50 ppm	100 ppm	0 ppm	50 ppm	100 ppm
Incubation (40°C)	0	27.4 ± 1.7	73.4 ± 6.4	119.4 ± 7.8	6.1/0.25	6.1/0.25	6.1/0.25
	4	26.4 ± 4.1	65.8 ± 7.2	113.9 ± 5.2	5.9/0.25	5.9/0.25	5.9/0.25
	8	25.7 ± 2.6	66.3 ± 6.9	102.4 ± 4.1	4.8/0.56	4.9/0.54	4.9/0.54
	24	21.7 ± 3.4	67.3 ± 4.1	98 ± 5.7	4.6/0.72	4.6/0.70	4.6/0.70
	48	29.3 ± 8.9	69.8 ± 9.7	109.9 ± 11.4	4.0/1.06	4.1/1.06	4.1/1.08
	72	34.8 ± 8.3	71.2 ± 9.1	114.2 ± 14.9	4.0/1.11	4.1/1.11	4.1/1.12
Storage (10°C)	24	21.7 ± 3.4	67.3 ± 4.1	98 ± 5.7	4.6/0.72	4.6/0.70	4.6/0.70
	48	19.2 ± 2.5	68.2 ± 3.7	96.1 ± 8.0	4.4/0.88	4.4/0.87	4.4/0.86
	72	20.6 ± 4.9	67.1 ± 7.7	98.6 ± 8.9	4.4/0.89	4.3/0.89	4.4/0.88
	96	18.3 ± 3.1	66.5 ± 7.3	94.2 ± 13.1	4.3/0.9	4.4/0.88	4.4/0.89

All values were indicated mean ± SE (n=90).

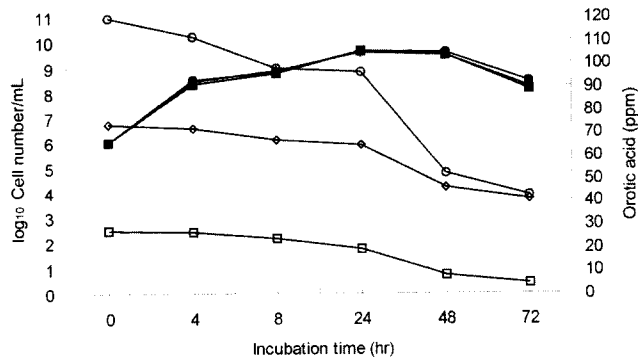


Fig. 4. Changes of OA contents in 10% reconstituted milk medium inoculated with *Streptococcus thermophilus* ST-37 at 37°C for 72 hr.

Cell number: 0 ppm(-■-), 50 ppm(-◆-), 100 ppm (-●-).
Orotic acid: 0 ppm(-□-), 50 ppm(-◇-), 100 ppm (-○-).

4.1, TA는 0.25-1.12까지 변화를 보이는 동안 OA는 접종 후 24시간 까지 119.4(±7.8) ppm에서 98(±5.7) ppm으로 17.9% 감소되었다가 24시간부터 서서히 증가 하여 배양 72시간 경과 시 114.2(±14.9) ppm으로 최초 OA함량 수준을 회복한 것으로 나타났다. *S. thermophilus* ST-37에 의한 OA의 감소량을 측정할 결과 OA의 첨가 수준에 따른 유산균수의 차이는 거의 없었

며 또한 미생물들의 생장 인자로서 작용한다는 Fernandez 등 (9)의 연구 보고와는 달리 OA의 감소량이 미약하거나 다소 생성하는 것으로 나타났는데, 이는 발효 과정 중 *S. thermophilus* ST-37이 skim milk를 이용하여 OA를 생성 한 것으로 판단되어 지며, 이러한 결과는 발효유 제조 시 OA의 감소를 최소화 하기 위한 유산균 선정에 있어 중요한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 냉장 저장 중 OA의 변화를 측정하기 위해 발효 24시간 후 급속 냉각 하여 10°C incubator에 96시간동안 저장하면서 감소량을 측정할 결과 pH는 4.6-4.3, TA는 0.7-0.9까지 변화를 보였지만 OA의 변화는 거의 없는 것으로 나타났다.

L. casei 955에 의한 OA의 변화: *L. casei* 955를 10⁶ CFU/mL수준으로 접종한 뒤 37°C에서 72시간 발효시키면서 OA의 감소량, 유산균 수, pH 및 TA 변화를 측정할 결과는 Fig. 4와 Table 7에 나타난 바와 같다. OA를 첨가하지 않은 경우 접종 후 24시간 경과 시 유산균 수는 2.3×10⁸ CFU/mL로서 최고점에 이른 뒤 72시간 경과 시 1.4×10⁸ CFU/mL로 감소하였으며 pH는 6.1-3.4, TA는 0.25-2.28까지 변화를 보이는 동안 OA의 감소량은 24시간 경과 시 30.7%, 72시간 경과 시 76%로서 OA의 감소율이 가장 높았다. 50 ppm의 OA를 첨가한 경우 접종 후 24시간 경과 시 유산균 수는 4.1×10⁹ CFU/mL로서 최고점에 이른 뒤 72시간 경과 시 1.7×10⁸ CFU/mL로 감소하

Table 7. Changes of OA concentration, pH and TA by inoculated with *L. casei* 955

Condition	Time (hr)	Concentration of orotic acid (ppm)			Changes of pH / TA		
		0 ppm	50 ppm	100 ppm	0 ppm	50 ppm	100 ppm
Incubation (37°C)	0	27.4 ± 1.7	73.4 ± 6.4	119.4 ± 7.8	6.1/0.25	6.1/0.25	6.1/0.25
	4	26.8 ± 3.7	80.9 ± 9.4	111.5 ± 12.9	5.8/0.26	5.8/0.26	5.7/0.28
	8	23.8 ± 5.6	66.7 ± 9.5	98 ± 10.2	4.8/0.53	4.9/0.56	5.0/0.48
	24	19 ± 6.2	70.3 ± 16.9	102.4 ± 16.2	4.6/0.67	4.6/0.68	4.6/0.71
	48	7.7 ± 34	46 ± 7.9	43.2 ± 12.0	3.4/2.17	3.5/2.20	3.5/2.17
	72	4.5 ± 2.3	40.9 ± 4.8	42.3 ± 7.2	3.4/2.28	3.4/2.30	3.4/2.31
Storage (10°C)	24	19 ± 6.2	70.3 ± 16.9	102.4 ± 16.2	4.6/0.68	4.6/0.67	4.6/0.71
	48	19.6 ± 9.1	68.2 ± 9.1	99.7 ± 12.5	4.0/1.17	4.0/1.18	4.0/1.22
	72	19.3 ± 7.1	69.6 ± 8.5	98.2 ± 7.8	3.9/1.25	3.9/1.25	4.0/1.25
	96	17.9 ± 6.7	70.2 ± 9.6	99.8 ± 10.6	4.0/1.18	4.0/1.19	4.0/1.22

All values were indicated mean ± SE (n=90).

였으며 pH는 6.1-3.4, TA는 0.25-2.3까지 변화를 보이는 동안 OA의 감소량은 접종 후 24시간까지 미미하였으나 24시간 이후 OA의 감소량이 증가하여 72시간 경과 시 OA는 41.8%정도 감소하였다. 100 ppm의 OA를 첨가한 경우 접종 후 24시간 경과 시 유산균 수는 4.7×10^8 CFU/mL로서 최고점에 이른 뒤 72시간 경과 시 2.8×10^8 CFU/mL으로 감소하였으며 pH는 6.1-3.4, TA는 0.25-2.31까지 변화를 보이는 동안 OA의 감소량은 접종 후 24시간 까지 14%로서 미미했지만 24시간 이후 OA의 감소량이 증가하여 72시간 경과 시 OA가 58.7%까지 감소하였다. 이런 결과는 OA가 미생물의 성장인자로 작용한다는 Suzuki 등(13)의 연구보고와 유사하게 나타났다. 냉장 저장 중 OA의 변화를 측정하기 위해 발효 24시간 후 급속 냉각 하여 10°C incubator에 96시간동안 저장하면서 감소량을 측정한 결과 pH는 4.6-3.9, TA는 0.67-1.25까지 변화를 보였지만 OA의 변화는 거의 없는 것으로 나타났다.

요 약

다양한 기능성 작용이 있는 물질로 알려진 OA에 대하여, 발효 과정에서 유산균에 의해 발생하는 손실을 줄이기 위한 방법을 찾고자 본 실험을 실시했다. 원유와 10% 환원유를 121°C에서 15분간 열처리를 한 결과, OA의 감소율은 각각 17.6%, 22.4% 정도로서 비교적 열에는 안정한 것으로 나타났다. 발효 과정 중 유산균에 의한 OA의 변화를 측정한 결과 *L. helveticus* 166과 *L. casei* 955는 균수가 최고점에 도달하는 발효 24시간까지 OA의 감소는 미미하였으나 24시간 이후부터 72시간까지 각각 43.2%, 76%까지 OA가 급격히 감소하였고, *S. thermophilus* ST-37은 발효 72시간까지 OA의 감소가 미미하거나 오히려 생성하는 것으로 나타나 유산균의 종류에 따라 OA의 변화가 큰 것을 확인 할 수 있었다. 냉장 저장 중 OA함량은 유산균의 종류에 관계없이 변화가 없었다.

문 헌

1. Laconi E, Denda A, Rao PM, Rajalakshmi S, Pani P, Sarma

- DSR. Studies of liver tumor promotion in the rat by orotic acid: Dose and minimum exposure time required for dietary orotic acid to promote hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 14: 1771-1775 (1993)
2. Rosenfeldt FL, Richards SM, Lin Z, Pepe S, Conyers RAJ. Mechanism of cardioprotective effect of orotic acid. *Cardiovascular Drugs Ther.* 12: 159-170 (1998)
3. Larson BL, Hegarty HM. Orotic acid in milks of various species and commercial dairy products. *J. Dairy Sci.* 62: 1641-1644 (1979)
4. Saidi B, Warthesen JJ. Analysis and stability of orotic acid in milk. *J. Dairy Sci.* 72: 2900-2905 (1989)
5. Khursheed PN, Huang RS, Fryer EB, Fryer HC. Effects of fermentation and storage on the concentration of orotic acid and uric acid in skim milk. *J. Food Sci.* 55: 585-586 (1990)
6. Seiler N, Grauffel C, Therrien G, Sarhan S, Knoedgen B. Determination of orotic acid in urine. *J. Chromatogr. B* 653: 87-91 (1994)
7. Cho YS, Kim SH, Cha JY. Effect of ingested orotic acid on serum, liver and kidney lipid concentration in rats. *Agric. Chem. Biotechnol.* 39: 206-211 (1996)
8. Durschlag RP, Robinson JL. Orotic acid content of infant formulas. *The American J. Clin. Nutr.* 33: 2192-2193 (1980)
9. Fernandez GE, McGregor JU. Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. *J. Dairy Sci.* 77: 2934-2939 (1994)
10. Akalin AS, Goenc S. The determination of orotic acid in ruminant milks using HPLC. *Milchwissenschaft* 51: 554-556 (1996)
11. Ferreira MPLVO, Ferreira MA. Simultaneous determination of sugars, uric and orotic acids in infant formulae by HPLC-UV/RI. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 20: 3419-3429 (1997)
12. James LR. Bovine milk orotic acid: Variability and significance for human nutrition. *J. Dairy Sci.* 63: 865-871 (1980)
13. Suzuki I, Kato S, Kitada T, Yano N, Morichi T. Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 2. Characteristics of purine nucleotides, pyrimidine nucleotides and nucleic acid synthesis. *J. Dairy Sci.* 69: 971-978 (1986)

(2003년 9월 25일 접수; 2003년 12월 18일 채택)