



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

윤원호¹ · 남보라 · 김진만 · 김창한*

¹서울대학교 식품가공과, 건국대학교 축산식품생물공학과

Characteristics of Functional Fermented Milk by Mixed Starters of *Lactobacillus bulgaricus* and *Kluyveromyces marxianus*

Won-Ho Yoon¹, Bo-Ra Nam, Jin-Man Kim, and Chang-Han Kim*

¹Department of Food Science and Technology, Seoil College, Myunmok-dong, Jungnang-gu, Seoul 131-702, Korea
Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate characteristics of acid and alcohol fermented milk by mixed starters made by *Lactobacillus bulgaricus* (KCTC 3635) and *Kluyveromyces marxianus* (KCTC 17212) for 36 hours when the curds were formed. Final pH and titratable acidity were about 4.5 and 0.68%, respectively. The viable cell counts of lactic acid bacteria and yeast for alcohol fermented milk were increased to 3.2×10^9 CFU/mL and 5.3×10^9 CFU/mL, respectively. The ethanol contents increased to 0.35% during fermentation. Antitumor activities of the fermented milk against tumor cell lines, such as HEP-2, HEC-1B, SW-156 and SK-MES-1 showed to 86.6, 70.3, 60.4 and 57.14%, respectively.

Key words : alcohol fermented milk, *Lactobacillus bulgaricus*, *Kluyveromyces marxianus*, antitumor activity

서 론

유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로 이들 유산균의 이용은 첫째, 유산균 발효에 의한 식품 보존성의 향상, 둘째, 유산을 비롯한 대사산물에 의한 향미 증진, 셋째, 길항물질 등의 생성으로 인체 유해 미생물의 억제에 의한 건강 향상, 넷째, 비타민과 같은 인체 유용물질의 합성에 의한 영양 및 건강 증진 효과를 목적으로 광범위하게 이용되고 있다(Lee *et al.*, 1999). 유산-알코올 발효유의 대표적인 제품인 케피어(kefir)는 코카시아(caucasia) 산악지

대에서 유래된 가장 오래된 발효유 중 하나로서(Analie *et al.*, 2002), 다양한 종류의 유산균(*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* 등)과 효모(*Candida kefir*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* 등)가 포함되어 있는 작은 덩어리 모양의 Kefir grain 들로 구성 되어 있고, 다른 발효유에 비해 folic acid, vitamin B₁ · B₂ 의 함량이 높고, 항균 작용에 의한 장내 유해균의 억제, 상처 치유 효과, 항암 활성 등 건강식품으로 가치가 높다(Cletus *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000; Luis *et al.*, 2003; Shim *et al.*, 1998; Kamila *et al.*, 2005). 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 부여하

* Corresponding author : Chang-Han Kim, Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-450-3688, Fax: 82-2-455-1044, E-mail: chhan@konkuk.ac.kr:

며 pH를 저하하고 여러 종류의 유해미생물 억제 물질을 생산하여 병원성 세균과 변태 미생물 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2000). 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, ethanol 함량, 항암 활성에 대해 알아보 고자 하였다.

재료 및 방법

공시 균주

발효유 제조에 사용된 스타터 조제에는 단일균주 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC3635와 *Kluyveromyces marxianus* KCTC17212를 사용하였으며, *Lactobacillus bulgaricus*는 MRS agar를 이용하여 37°C incubator에서 2일간 천자 배양하였고, *Kluyveromyces marxianus*는 GPY agar를 이용하여 사면배지를 만들어 30°C incubator에서 2일간 배양하여 계대 보존하여 사용하였다.

종양세포

본 실험에 사용한 종양세포주는 SK-MES-1(human lung carcinoma), SW-156(human kidney carcinoma), HEP-2(human larynx carcinoma) 및 HEC-1B(human endometrial adenocarcinoma)를 사용하였으며, Gibco사(Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA)의 배지를 이용하여 계대 배양하였다.

SK-MES-1, SW-156와 HEC-1B 세포주는 RPMI 1640, HEP-2 세포주는 MEM 배지에 10% fetal bovine serum(FBS, heat inactivated)을 함유한 배지를 사용하여 37°C에서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

혼합 스타터의 조제 및 발효유의 제조

본 연구에 사용된 *K. marxianus*와 *L. bulgaricus*는 각각 GPY broth, MRS broth에 30, 37°C에서 2일간 전배양하고, 10% 환원 탈지유 배지에서 각각 3일과 1일간 본 배양한 후 각 균의 혼합 비율을 1 : 2로 조제하였다. 발효유 제조를 위한 시유로는 서울우유(서울우유협동조합, Ansan, Korea)를 사용하였으며, 발효유 제조는 시유에 혼합 스타터를 접종(2%)하고 30°C에서 curd가 형성되는 시점인 36시간까지 발효시켜 제조하였다.

진탕 배양시 rpm의 선택

혼합 스타터를 접종한 후 회전 진탕배양기(model TGR 1-D, Iwashia Co., Japan)를 이용하여 30°C에서 0, 30, 60 및

90 rpm에서 각각의 생균수와 산도를 측정하여 최적의 배양 rpm을 선택하였다.

발효유의 분석

36시간 동안 배양한 발효유에 대하여 생균수, pH, 적정산도, 그리고 ethanol 함량을 측정하였다. 생균수 측정은 36시간동안 발효시키면서 4시간 간격으로 발효유를 채취하여 *K. marxianus*는 GPY agar, *L. bulgaricus*는 BCP agar와 MRS agar 5 mL에 각각 희석시료 1 mL를 첨가하여 colony forming unit(CFU/mL)를 측정하였다. pH는 유리전극 pH meter(Beckman mode No. 72009, Germany)로 측정하였다. 적정산도는 Nakashini의 방법(Nakashini, 1967)에 의해 발효유 10 mL에 증류수 10 mL, phenolphthalein 용액 0.5 mL를 가하고 0.1N NaOH 용액으로 적정한 후 alkali 적정량을 산출하여 그 값의 10%를 산도로 하였다. Ethanol 함량은 Amerine 등의 방법(Amerin *et al.*, 1967)에 따라 steam distillation을 하여 채취된 증류액을 thermal conductivity detector(TCD)가 장착된 GC(Varian 3300, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

항종양활성 측정

발효유의 항종양 활성을 알아보기 위하여 *in vitro* 검색법인 MTT assay (Monks *et al.*, 1991; Rubinstein *et al.*, 1990)로 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 세포주를 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 증식억제물질이 첨가된 well (drug blank well)에 MTT(0.5mg/mL) 용액 50 µL를 각각 첨가한 후 96 well plate를 37°C에서 4시간 추가 배양하여 formazan 형성을 유도시키고, 추가 배양이 끝난 후 원심분리(1,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 상등액을 제거하였다. 원심분리한 후 생긴 blue formazan을 용해시키기 위하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 각각 well당 100 µL씩 첨가한 후 plate shaker (Wallac, Finland)에서 20분간 교반 후 각 well의 흡광도를 570 nm에서 multi-well scanning spectrophotometer로 측정하였다. MTT assay는 $(1 - (OD \text{ of treated cell} / OD \text{ of control cell})) \times 100$ 을 계산하여 % 억제율로 나타내었으며, 억제율이 50% 이상인 경우에 종양 세포 증식 억제 효과가 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

진탕 배양시 최적 rpm 선택

배양 rpm별 생균수와 산 생성량은 Fig. 1에서 나타난 바와 같다. 각각 36시간 배양시의 최종 생균수와 산 생성량을 나타낸 것으로 60 rpm으로 진탕 배양하여 발효시킨 발효유에서 효모(2.49×10^{13} CFU/mL)는 물론 유산균(1.15×10^{13} CFU/mL)이 가장 많이 증식하였고 산 생성량(0.7%)도 많았다. 0 rpm과 30 rpm은 뚜렷한 차이가 없었으며, 90 rpm의 조건에서 발효시킨 경우 유산균(9.1×10^{10} CFU/mL)은 물론 효모(1.1×10^{12} CFU/mL)의 증식도 60 rpm에서 발효시켰을 때보다 감소하는 것으로 나타났다. 유산균과 효모의 혼합 스타터를 이용하여 발효유를 제조할 경우에는 정치 배양이 아닌 60 rpm으로 진탕배양하는 것이 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

발효유의 생균수 변화

유산균과 효모를 2:1의 비율로 접종하여 30℃에서 60 rpm으로 36시간 진탕 발효시켜 제조한 발효유의 유산균과 효모의 생균수 변화는 Fig. 2에서 나타난 바와 같다. 배양 초기에 *L. bulgaricus*는 4.3×10^5 CFU/mL, *K. marxianus*는 2.5×10^5 CFU/mL이었던 것이 배양 36시간 후에는 각각 3.2×10^9 CFU/mL, 5.3×10^9 CFU/mL까지 증가하였다. 배양 8시간 이후에는 효모(*K. marxianus*)의 배양 속도가 더 빠른 것으로 관찰되었다.

발효유의 산 생성량과 pH 변화

36시간 진탕 발효시켜 제조한 발효유의 산 생성량과 pH 변화는 Fig. 3에서 나타난 바와 같다. 산 생성량은 발효 12

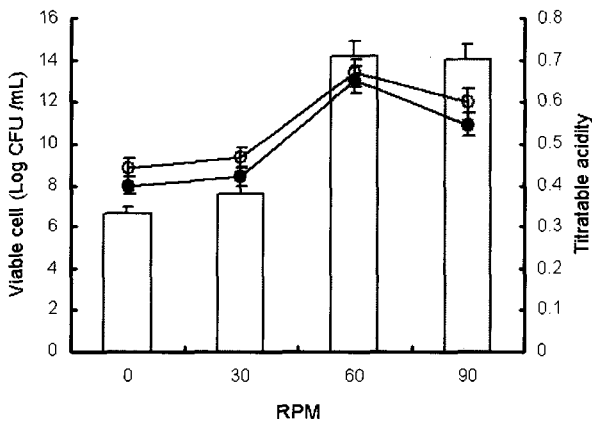


Fig. 1. Changes of viable cell counts and titratable acidity in fermented milk with mixed starters at different rpm at 30℃ for 36 hr. ■ : Titratable acidity, ● : Viable cell counts of *L. bulgaricus*, ○ : Viable cell counts of *K. marxianus*.

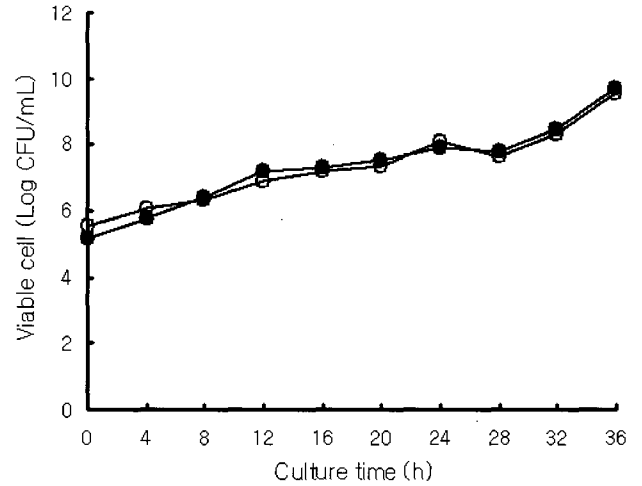


Fig. 2. Changes of lactic acid bacteria and yeast cell counts in fermented milk with a mixed starters during fermentation at 30℃ for 36 hr. ● : Viable cell counts of *K. marxianus*, ○ : Viable cell counts of *L. bulgaricus*.

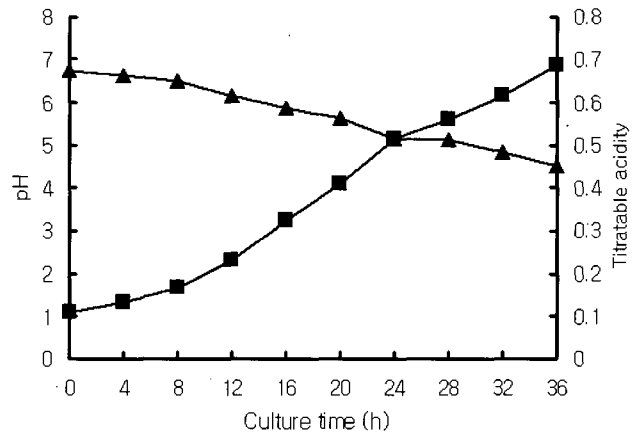


Fig. 3. Changes of pH and titratable acidity in fermented milk with mixed starters during fermentation at 30℃ for 36 hr. ▲ : pH, ■ : Titratable acidity.

에서 24시간까지 급격히 증가하였고 초기 0.1%에서 최종적으로 0.68%에 도달하였다. pH는 발효 36시간 후 pH 6.8에서 pH 4.5까지 감소하였다.

발효유의 Ethanol 함량

Ethanol 함량은 Fig. 4에서 나타난 바와 같다. 발효 후 20시간에서 36시간까지 급격히 증가하였고 초기의 0%에서 최종 0.35%에 도달하였다. 심 등(6)이 *K. marxianus*는 다른 효모와는 달리 유당을 이용할 수 있다고 보고하였던 점에서 비추어 볼 때, 발효 20시간 후부터 *K. marxianus*의 활발한 대사 작용에 의해 ethanol의 생성이 촉진된 것으로 사료된다.

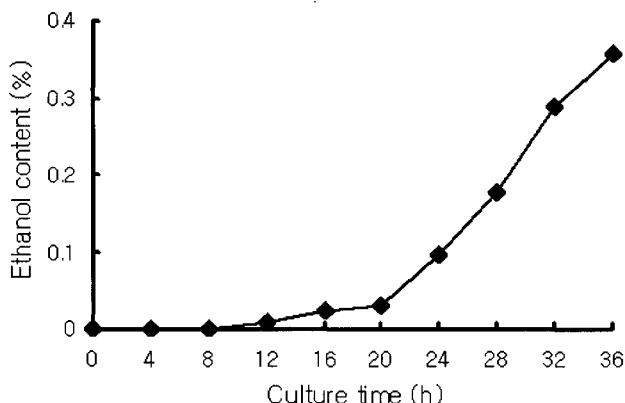


Fig. 4. Ethanol contents in fermented milk with mixed starters during fermentation at 30°C for 36 hr.

항종양 활성

제조된 발효유를 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 분리한 상층액을 0.45 µm filter(GE Osmonics, Westborough, MA, USA)로 제균하여 그 액을 MTT assay의 시료로 사용하였다. 발효유의 종양세포 증식 억제 효과는 Table 1에서 나타난 바와 같다. 36시간 배양한 발효유 원액은 HEp-2(human larynx carcinoma)에 대하여 86.6%, HEC-1B(human uterus carcinoma)에 대해서는 70.3%의 높은 종양세포 증식 억제를 나타내었다. 또한 SW-156 (human kidney carcinoma)에 대해서는 60.4%, SK-MES-1 (human lung carcinoma)에 대해서는 57.14%의 항종양 활성을 나타내었다. 이상의 결과 기존의 유산균 발효유에 효모를 첨가한 알코올 발효유의 제조는 제품의 항종양 활성의 측면에서도 높은 기능성을 나타내는 것으로 나타났다.

요약

본 연구는 기능성 발효유로서 티벳산 발효유에서 분리한 효모(Kluyveromyces marxianus)와 유산균(Lactobacillus bulga-

ricus)의 혼합스타터를 이용한 발효유를 제조하여 배양 기간 별 균수 측정, pH, 적정산도, ethanol 함량, 항암 활성에 대해 알아보았다. 배양은 30°C에서 curd가 형성되는 시점에 마치게 되는데 이때의 최종 산도는 0.68%, pH는 4.5 이었다. 배양 36시간 후의 균수는 K. marxianus는 5.3×10⁹ CFU/mL, L. bulgaricus는 3.2×10⁹ CFU/mL 이었고 ethanol 함량은 0.35% 까지 증가하였다. 36시간 배양하여 제조된 발효유의 항종양 활성은 HEp-2에 대해서는 86.6%, HEC-1B에 대해서는 70.3%, SW-156에 대해서는 60.4%, SK-MES-1에 대해서는 57.14%의 항종양 활성을 나타내었다. 이상의 결과 기존의 유산균 발효유에 효모를 첨가한 알코올 발효유의 제조가 가능하며, 제품의 항종양 활성의 측면에서도 높은 기능성을 나타내는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 서일대학 학술연구비 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, J. L., Huh, C. S., and Baek, Y. J. (1999) Utilization of fermented milk and it's health promotion. *Kor. Dairy Techno.* **17**, 58-71.
2. Analie, L. H. and Bennie, C. V. (2002) Survival of dairy associated yeast in yoghurt and yoghurt related products. *Food Microbiol.* **19**, 597-604.
3. Cletus, P. K., Christie, J. R., and Eleanor, B. P. (2001) *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporegenous yeast from 'Kombucha tea'. *FEMS Yeast Res.* **1**, 133-138.
4. Lee, K. H., Kim, R. H., Lim, D. S., and Kim, C. H. (2000) Anti-lukemic and antimutagenic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate isolated from *Aloe vera* Linne. *J. Pharm Pharmacol.* **52**, 1037-1041.
5. Luis, N., Miguel, G., Leocadio, A., and Clara, G. R. G. (2003) Inhibition of *Bacillus cereus* growth in carbonated fermented bifidus milk. *Food Microbiol.* **20**, 519-526.
6. Shim, Y. S., Kim, J. W., and Yoon, S. S. (1998) Alcohol fermentation of cheese by *Kluyveromyces marxianus* and lactic acid bacteria. *Kor. J. Food SCI. Technol.* **30**, 161-167.
7. Kamila, L. R., Lucélia, R. G. C., Jose, C. T. C., João, E., and Jose, M. S. (2005) Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *Int. J. Antimicrobial. Agents.*

Table 1. Antitumor activities 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 (%)	86.6*	70.3*	60.4*	57.14*

* : Sensitivity i.e., % inhibition ≥ 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.

- 25, 404-408.
8. Kim, M. H. and Kwak, H. S. (2000) Antimutagenicity and anticancer activity of fermented milk. *J. Kor. Dairy Techno. and SCI.* **18**, 171-182.
 9. Beshkova, D. M., Simova, E. D., Simov, Z. I., Frengova, G. I., and Spasov, Z. N. (2002) Pure cultures for making kefir. *Food Microbiol.* **19**, 537-5544.
 10. Nakanishi, T. (1967) 牛乳と乳製品の微生物. p. 157.
 11. Amerine, M. A., Berg, H. W., and Cruess, W. V. (1967) The technology of wine making, 2nd edition. AVI Company Inc., Westport, CT. p. 696.
 12. Monks, A., Scudiero, G., Leocadio, P., Robert, S., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronese, P., Vairo-Wolff, A., Cray-goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., and Boyd, M. (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 757-766.
 13. Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Scudiero, D. A., Monks, A., and Boyd, M. R. (1990) Comparison of *in vitro* anticancer drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1113-1118.
 14. Bauer, A. W., Kibby, M. M., Sherrin, J. C., and Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 493-496.
 15. Chang, I. S., Kim, D. H., Kim, B. H., Shin, P. K., Yoon, J. H., Lee, J. S., and Park, Y. H. (1997) Isolation and identification of carbon monoxide utilizing anaerobe, *Eubacterium limosum* KIST612. *Kor. Appl. Microbial. Biotechnol.* **25**, 1-8.

(2006. 4. 13. 접수 ; 2006. 6. 15. 채택)