



## 비피도박테리아 증식능 유청발효 동결건조물과 프럭토올리고당 비교평가

문기성\*

한국교통대학교 생명공학과

### Comparison of Freeze-dried Fermented Whey Presenting Bifidogenic Growth Stimulation Activity with Fructooligosaccharide

Gi-Seong Moon\*

Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 368-701, Korea

**Abstract:** Freeze-dried fermented whey (FDFW) was compared with fructooligosaccharide (FOS) in bifidogenic growth stimulation (BGS) activity. FDFW and FOS increased the growth of bifidobacterial strains *Bifidobacterium lactis* BL 750 and *Bifidobacterium longum* FI10564 when compared with control where only the bifidobacterial cells were inoculated in RCM (Reinforced Clostridial Medium) broth or the cells with whey solution. The BGS activity of FDFW was slightly higher than that of FOS, but not significantly different. In optical density test at 600 nm, the sample with FDFW reached 1.371 for *B. lactis* and 1.844 for *B. longum* whereas the sample with non-fermented whey solution reached 1.064 and 1.237, respectively. In viable cell count test, FDFW and FOS also showed BGS activity in mid-growth phase (9 h) of *B. lactis* strain where the difference between FDFW added sample and no added control was 0.38 Log CFU/mL. Finally FDFW was tested for maintenance of *B. lactis* strain in yogurt during storage at 10°C. After 20 d, the viable cell count of no added control was decreased 6.86 to 4.1 Log CFU/mL, whereas those of FDFW (1%) and FOS (1%) added samples were 6.82 to 4.93 and 6.81 to 4.51, respectively. These results indicate FDFW can be used for bifidogenic growth stimulator and applied to various dairy products as a functional food ingredient.

**Keywords:** freeze-dried fermented whey, bifidogenic growth stimulator, bifidobacteria, probiotics, prebiotics

## 서 론

비피도박테리아(bifidobacteria)는 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)과 더불어 인체 가장 유익한 균 중에 하나로 잘 알려져 있다(Ventura *et al.*, 2014). 따라서 많은 유제품에 비피도박테리아 속(*Bifidobacterium* sp.) 균주들이 프로바이오틱스(probiotics)로서 첨가되어 있다(Lavermicocca, 2006). 또한 최근 들어 인체 장내 균총의 조성 변화가 사람의 다양한 생리와 상관관계가 있다는 것이 과학적으로 규명되면서 유산균을 포함하는 인체 유익균에 대한 관심이 증대되고 있다(Aggarwal *et al.*, 2013). 이러한 관점에서 보면 식품을 통해 인체 유익균을 지속적으로 섭취하는 것은 당연

한 일이며 이를 산업계에서는 마케팅 전략으로 활용하고 있다. 인체 유익균을 지속적으로 공급하는 것도 좋은 방법이지만 다른 한편으로 이미 장내에 서식하고 있는 유익균을 선택적으로 증식시키는 것도 합리적인 방법이 될 수 있다. 갈락토올리고당(Galactooligosaccharide; GOS)을 비롯한 프리바이오틱스(prebiotics)가 이러한 용도로 활용되고 있다(Petschow *et al.*, 2013). 프리바이오틱스는 인체 소화효소 및 장내 유해 미생물에 의해서는 분해되지 않고 비피도박테리아와 같은 유익균에 의해서만 선택적으로 분해되어 그들의 생육을 향상시키는 소재이다(Gibson and Roberfroid, 1995).

유청(whey)은 주로 자연 치즈 생산을 통해 부산물로 얻어지며 그 양이 치즈생산의 약 10배에 달하는 것으로 알려져 있다. 과거 유청은 폐수처리의 대상이었지만 유청에 포함된 다양한 영양 및 기능성 성분으로 인해 현재는 여러 산업(식품, 제약, 화장품 산업 등)에서 활용되고 있다(Lagrange, 1998). 그럼에도 불구하고 유청은 여전히 낮은 판매가격대를 형성하고 있어 유산균의 값싼 배지원으로 활용될 수 있다.

\*Corresponding author: Gi-Seong Moon, Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 368-701, Korea.  
Tel: 82-43-820-5251, Fax: 82-43-820-5272  
E-mail: gsmoon@ut.ac.kr  
Received December 2, 2013; Revised January 3, 2014;  
Accepted January 5, 2014

본 저자의 선행연구에서 유청발효를 통해 비피도박테리아를 증식시키는 유산균주 *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 및 *Lactobacillus casei* CJNU 0588을 선발하였으며 (Moon, 2009; Eom and Moon, 2010) 이 균주들을 이용해 비피도박테리아 증식능 유청발효물을 대량배양하였다. 배양액을 이용하여 세 가지 제형(액상살균, 분무건조, 동결건조)으로 조제 후 비피도박테리아 증식능을 비교한 결과 동결건조 유청발효물에서 가장 우수한 효과가 확인되어 본 연구를 진행하게 되었다(Lee *et al.*, 2011).

본 연구에서는 동결건조 유청발효물의 상업화 가능성을 타진하기 위해 프리바이오틱스 소재로 널리 사용되고 있는 프럭토올리고당과 비피도박테리아 증식능 및 요거트 내 비피도박테리아의 보존력을 상호 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

비피도박테리아 증식능 검증을 위해 사용한 균주는 *Bifidobacterium lactis* BL 750 (Culture Systems Inc., Mishawaka, IN, USA)와 *Bifidobacterium longum* FI10564 (Moon *et al.*, 2009)이며 이들의 배양을 위하여 RCM(Reinforced Clostridial Medium, Difco) broth가 사용되었다. 또한 혐기적인 조건을 유지하기 위하여 혐기 jar(Oxoid, Cambridge, UK)와 GasPak™ EZ Anaerobic Container System (Sparks, MD, USA)이 사용되었다.

### 유청발효 동결건조물 생산

선행연구(Lee *et al.*, 2011)에서 보고한 바와 같이 동결건조 세포분말(*Leu. mesenteroides* CJNU 0147:  $4.68 \times 10^9$ ; *L. casei* CJNU 0588:  $3.44 \times 10^9$  CFU/g) 0.5%(w/v)를 살균 유청배지(10% 유청분말 포함)에 접종하여 20°C에서 48시간 배양하였으며 원심분리 후 농축하여 동결건조 하였다. 제조된 유청발효 동결건조물(Freeze-dried Fermented Whey; FDFW)은 사용시까지 4°C에서 보관하였다.

### 유청발효 동결건조물과 프럭토올리고당의 비피도박테리아 증식능 비교

프럭토올리고당(Fructooligosaccharide; FOS)은 프리바이오틱스 소재로 널리 사용되고 있으며(Gibson and Roberfroid, 1995) 이를 FDFW의 비피도박테리아 증식능 비교물질로 사용하였다. 비피도박테리아 증식능은 흡광도( $OD_{600}$ )와 생균수(viable cell count, CFU/mL) 측정을 통해 검증하였다. 흡광도( $OD_{600}$ ) 측정 실험은 앞서 언급한 비피도박테리아(*B. lactis* BL 750, *B. longum* FI10564)를 활성화시켜 RCM broth에 2%(v/v) 접종한 후, 최종농도가 10%(w/v)되게 멸균수에 녹인 FDFW와 액상 FOS를 원심분리(6,000 rpm, 10분)하여 그 상등액을 여과(0.45  $\mu$ m syringe filter, Milli-

pore, Billerica, MA, USA)한 후 그 여액(filtrate)을 각각 최종농도 2%(v/v)와 5%(w/v) 첨가하였다. 이를 37°C에서 14시간 혐기적으로 배양한 후 흡광도를 측정하여 증식 유무를 상호 비교하였다. 생균수 측정 실험에서는, 비피도박테리아(*B. lactis* BL 750)를 RCM broth에 1%(v/v) 접종한 후 최종농도가 10%(w/v)되게 멸균수에 녹인 FDFW와 FOS를 각각 최종농도 1%(v/v)와 5%(w/v) 첨가하여 37°C에서 혐기적인 조건으로 배양하면서 0, 6, 9, 12, 18, 24시간째 시료의 생균수(CFU/mL)를 측정하였다. 생균수의 측정은 원시료를 10진 희석법으로 희석한 후 RCM 고체배지에 도말하여 37°C, 24시간, 혐기적 조건으로 배양하여 형성된 콜로니에 대한 호기 배양(비피도박테리아는 생육이 억제됨)과 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)으로 비피도박테리움 속 균임을 확인하였다. PCR에 사용한 프라이머는 Bif164(5'-GGGTGGTAATGCCGATG-3')와 Bif662(5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3')(Kok *et al.*, 1996)이다.

### 발효유에 포함된 비피도박테리아 보존능 검증

FDFW가 발효유에 포함된 비피도박테리아의 보존에 미치는 영향을 검증하였다. 액상 요거트 제조를 위해 탈지분유 16.5%, 포도당 4%를 멸균수에 첨가하여 녹인 후 95°C에서 3시간 살균하였다. 여기에 탈지유(10%, w/v)에서 2회 계대 배양한 *L. casei* CJNU 0588 균주 2%(v/v)를 무균적으로 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였으며 이를 균질화시킨 후 균질액 100 g에 설탕 45 g과 멸균수 155 g을 가하여 액상 요거트를 제조하였다. 50 mL씩 분주된 액상 요거트에 RCM broth에서 활성화된 비피도박테리아(*B. lactis* BL 750)를 1%(v/v) 접종한 후 FDFW와 FOS를 각각 최종농도 1%와 5% (w/v)가 되도록 첨가하여 10°C에서 저장하면서 12시간 간격으로 20일 동안 비피도박테리아의 생균수(CFU/mL)를 측정하였다. 생균수의 측정방법은 앞서 설명한 내용과 동일하다.

### 통계 처리

본 논문에서 수행된 실험은 3반복으로 진행하였으며 결과값은 평균 혹은 평균과 표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성 분석을 위한 Duncan's multiple range test( $p < 0.05$ )를 수행하기 위해 SPSS v. 12.0(SPSS Co., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### FDFW와 FOS의 비피도박테리아 증식능 비교

FDFW의 비피도박테리아 증식능을 평가하기 위해 비피도박테리아 증식인자 혹은 프리바이오틱스로 널리 이용되는 물질인 FOS를 대조구로 하여 흡광도( $OD_{600}$ )와 생균수

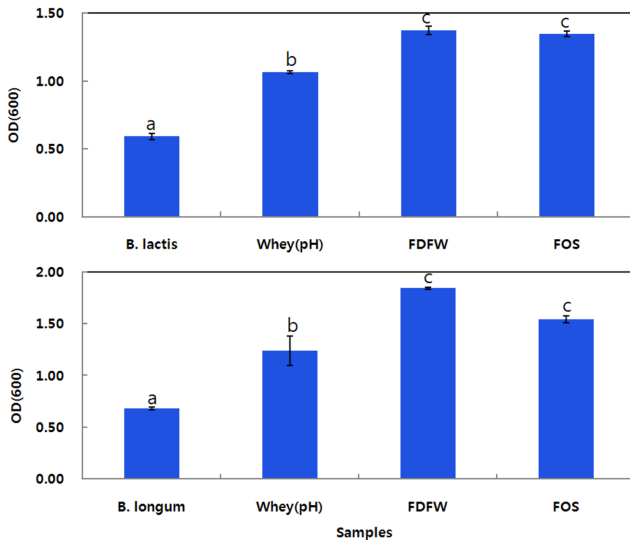


Fig. 1. Bifidogenic growth stimulation activity test with optical density at 600 nm in RCM broth at 37°C for 14 h. *B. lactis* or *B. longum*: only bifidobacterial cells were inoculated; Whey (pH): bifidobacterial cells plus non-fermented whey solution adjusted to pH 4.5 with lactic acid; FDFW: plus freeze-dried fermented whey; FOS: plus fructooligosaccharide. Different letters mean significantly different by Duncan's multiple range tests ( $p < 0.05$ ).

(viable cell count, CFU/mL) 값을 비교 분석하였다. 흡광도 실험의 경우, 사용한 비피도박테리아 균주는 *B. lactis* BL 750과 *B. longum* F110564였으며, 균주만 첨가한 경우 14시간 배양 후 흡광도가 각각 0.591과 0.679였고 대조군으로 유청 용액을 첨가한 경우 각각 1.064와 1.237이었다. 이에 비해 FDFW를 첨가한 경우 두 균주에 대해 각각 1.371과 1.844값을 보였으며 양성 대조군으로 사용한 FOS는 각각 1.345와 1.543값을 나타내었다. 이 결과는 FDFW와 FOS가 사용한 비피도박테리아 균주에 대해 우수한 증식효과를 나타내는 것이며 통계적인 유의 차(significant difference)는 보이지 않았지만 평균 값으로만 비교해 보면 사용한 농도에서 FDFW가 FOS에 비해 다소 높은 비피도박테리아 증식능을 나타내었다(Fig. 1). 또한 생균수 실험에서 *B. lactis* BL 750 균주를 사용하였을 때, 6시간까지는 시료 간에 차이를 보이지 않다가 이후 FDFW와 FOS 첨가시료에서 증식속도가 증가하다가 9시간째 대조군과 가장 큰 차이를 보였다. 이후 시료간의 차이가 서서히 줄어드는 경향을 나타내었다. FDFW와 FOS 사이에 유의적인 차이는 관찰되지 않았지만 전반적으로 FDFW가 첨가된 시료에서 다소 높은 비피도박테리아 증식능을 나타내었다(Fig. 2).

#### 발효유에 포함된 비피도박테리아 보존능 검증

발효유(요거트) 조제 후 *B. lactis* BL 750 균주와 FDFW를 첨가하여 저온(10°C) 저장 시 *B. lactis* 균주의 보존력

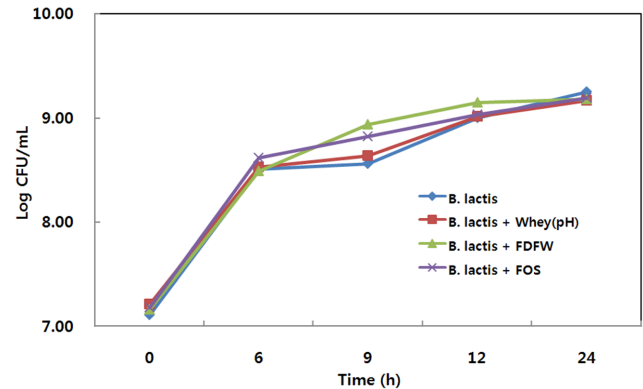


Fig. 2. Bifidogenic growth stimulation activity test with viable cell count during cultivation in RCM broth at 37°C. *B. lactis*: only bifidobacterial cells were inoculated; Whey (pH): bifidobacterial cells plus non-fermented whey solution adjusted to pH 4.5 with lactic acid; FDFW: plus freeze-dried fermented whey; FOS: plus fructooligosaccharide.

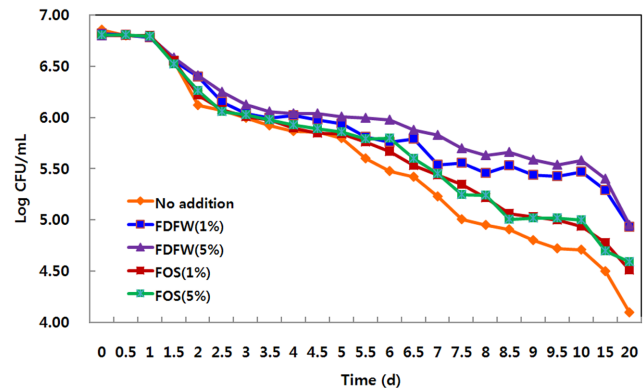


Fig. 3. Viable cell counts of *B. lactis* strain in yogurt during storage at 10°C. No addition: only bifidobacterial cells were inoculated; FDFW: bifidobacterial cells plus freeze-dried fermented whey; FOS: plus fructooligosaccharide.

항상 여부를 20일까지 확인한 결과 1.5일까지는 생균수가 대조군(*B. lactis* 균주만 첨가)과 비슷하게 감소하는 경향을 보였으나 1.5일 이후에는 FDFW와 FOS를 첨가한 실험군에서 *B. lactis* 균주에 대한 보존력이 확인되었다. 특히 5.5일 이후에는 양성 대조군으로 사용한 FOS와 비교했을 때도 FDFW의 보존력이 더 우수한 것으로 확인되었다(Fig. 3). FOS는 프리바이오틱스로서 많은 제품에 적용되고 있는데 이를 5%(w/v) 적용한 시료보다도 FDFW를 1%(v/v) 적용한 시료에서의 비피도박테리아 보존력이 더 우수한 것으로 나타난 것은 상대적으로 적은 양의 FDFW를 사용하더라도 기존의 FOS 이상의 효능을 발휘할 수 있다는 장점을 가지게 된다. 물론 보다 완벽한 평가를 위해서는 산업적인 규모에서의 기능성 및 유효 농도 측정이 필수적인데 이는 추

가연구를 통해 가능할 것으로 판단된다. 더 나아가 응용적인 측면에서 FDFW의 활용도를 높이기 위해서는 발효유뿐만 아니라 다양한 유제품에의 적용이 필요한데 분유가 주요대상이 될 수 있다. 분유의 경우 주로 유아들을 대상으로 하고 또 분말 상태의 제형이기 때문에 FDFW의 적용이 용이하여 유아들의 장내에서 주로 발견되는 비피도박테리아 균종에 대한 추가적인 증식능이 검증된다면 기능성식품 소재로서 활용도가 높을 것으로 판단된다. 또한 FDFW는 첨가물의 형태가 아닌 최종 제품으로도 개발이 가능하다는 유청발효물의 스타터(starter) 균주로 사용한 생균이 그대로 존재하고 있어 적정량의 균수만 확보된다면 프로바이오틱스 균주가 함유된 건강기능식품으로 상업화가 가능할 것이다. 따라서 추가적인 심화연구가 수행되고 상업성이 확보된다면 FDFW의 활용범위는 훨씬 더 확대될 것으로 판단된다.

## 요 약

본 논문은 동결건조 유청발효물(Freeze-dried fermented whey; FDFW)과 프럭토올리고당(Fructooligosaccharide; FOS)의 비피도박테리아 증식능을 비교 검증한 내용이다. FDFW와 FOS 모두 비피도박테리아 균주 *Bifidobacterium lactis* BL 750과 *Bifidobacterium longum* FI10564에 대해 증식효과가 우수한 것으로 확인되었으며 통계적인 유의 차는 없었지만 FDFW가 FOS에 비해 다소 높은 활성을 보였다. 흡광도(600 nm)를 이용한 실험에서 FDFW 첨가균은 14시간 배양 후 *B. lactis* 균주는 1.371에 도달하였고 *B. longum* 균주는 1.844에 도달하였다. 반면 대조균으로 사용한 유청첨가균의 경우 각각 1.064와 1.237에 도달하였다. 생균수 실험에서는 9시간째 *B. lactis* 균주에 대한 비피도박테리아 증식능이 확인되었고 FDFW 첨가균과 대조균(무첨가균) 사이에 0.38 Log CFU/mL의 차이가 관찰되었다. 마지막으로 요거트에 첨가된 *B. lactis* 균주의 보존력을 확인하기 위해 10°C에 보관하면서 20일 동안 생균수를 분석한 결과 무첨가균은 6.86에서 4.1 Log CFU/mL로 감소한 반면 FDFW(1%)와 FOS(1%) 첨가균은 각각 6.82에서 4.93, 6.81에서 4.51로 감소하였다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 FDFW는 비피도박테리아 증식인자로서 사용될 수 있고 또한 기능성 식품소재로서 다양한 낙농제품에 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구(과제번호: 110111-1)는 농림수산식품부 식품기술 개발사업에 의해 이루어진 것이다. 또한 본 저자는 실험에 도움을 준 엄지은 학생에게 감사를 표한다.

## 참고문헌

- Aggarwal J, Swami G, and Kumar M (2013) Probiotics and their effects on metabolic diseases: An update. *J. Clin. Diagn. Res.* **7**, 173-177.
- Eom JE and Moon GS (2010) *Leuconostoc mesenteroides* producing bifidogenic growth stimulator via whey fermentation. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 235-238.
- Gibson GR and Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**, 1401-1412.
- Kok RG, De Waal A, Schut F, Welling GW, Weenk G, and Hellingwerf KJ (1996) Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3668-3672.
- Lagrange V (1998) U.S. whey proteins and new fractions as ingredients in functional dairy products and innovative nutraceuticals. *Kor. Dairy Technol.* **16**, 106-118.
- Lavermicocca P (2006) Highlights on new food research. *Dig. Liver Dis.* **38**, Suppl. 2:S295-299.
- Lee JK, Eom JE, Shin HS, Shin WS, and Moon GS (2011) Optimal production of fermented whey presenting bifidogenic growth stimulator activity. *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 1451-1455.
- Moon GS (2009) Bifidobacterial growth stimulation by *Lactobacillus casei* via whey fermentation. *J. Food Sci. Nutr.* **14**, 265-268.
- Moon GS, Wegmann U, Gunning AP, Gasson MJ, and Narbad A (2009) Isolation and characterization of a theta-type cryptic plasmid from *Bifidobacterium longum* FI10564. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 403-408.
- Petschow B, Doré J, Hibberd P, Dinan T, Reid G, Blaser M, Cani PD, Degnan FH, Foster J, Gibson G, Hutton J, Klaenhammer TR, Ley R, Nieuwdorp M, Pot B, Relman D, Serazin A, and Sanders ME (2013) Probiotics, prebiotics, and the host microbiome: the science of translation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1306**, 1-17.
- Ventura M, Turrone F, Lugli GA, and van Sinderen D (2014) Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 163-168.