pISSN 1229-1153 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 30, No. 3, pp. 295~301 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.3.295

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

프로바이오틱스의 기능성 향상을 위한 배양법

장보윤 · 한지혜 · 차범석[1] · 안상호[1] · 김성연*
원광대학교 약학대학 약품연구소, [1]영사이언스샬라우코리아

Optimization of Culture Condition for Enhancing the Probiotics Functions

Bo Yoon Chang, Ji Hye Han, Bum-Suk Cha[1], Sung-Ho Ann[1], and Sung Yeon Kim*
Institute of Pharmaceutical Research and Development, College of Pharmacy, Wonkwang University
[1]Young Science Scharlau Korea, Jeonnam Biotechnology Research Center, No.121
(Received July 10, 2015/Revised August 13, 2015/Accepted September 9, 2015)

ABSTRACT - The functions of probiotics, particularly Lactic acid bacteria, have been studied in a range of human diseases, including cancer, infectious diseases, gastrointestinal disorders, and allergies. Among the many benefits associated with the consumption of probiotics, modulation of immune activity has received the most attention. This study aimed at investigating the improved immune stimulatory and stability of *L. plantarum* when cultivated on modified basal media supplemented with the *Undaria pinnatifida* co-cultured with *L. plantarum.* An in vitro test showed that *U. pinnatifida* media cultured L. plantarum is strong enough to survive in the gastric juice (gastric and bile acid). Mouse macrophage-derived cell lines RAW 264.7 was used to measured immune stimulating activity of *L. plantarum*. When *U. pinnatifida* media cultured by *L. plantarum* was NO and TNF-α production is significantly increased compared to basal media cultured *L. plantarum.* These results show that *U. pinnatifida* could be applied for a component for cultivation of *L. plantarum*. This optimized *U. pinnatifida* medium can be used the improving of stability and immune function on production of probiotics.

Key words: probiotics, *L. plantarum*, *Undaria pinnatifida*, stability, immune

건강한 삶에 대한 욕구가 증대되어 건강기능식품의 개발이 미래 식품산업의 주류로 급부상하고 있다. 건강기능식품의 수요 증가와 함께 프로바이오틱스(probiotics)의 의학식품, 약품으로서 이용 가능성이 제시되고 있다[1,2].

프로바이오틱스란 인간이나 동물 등 숙주의 건강에 유익한 효과를 나타내는 미생물 또는 그 성분으로 균주 특이적이며 같은 종과 속에 해당하는 균주라도 효능은 매우 다르다. 주로 치즈, 김치와 같은 식품 및 동물의 분변 등에서 분리되며 최근에는 식물 유래 유산균에 대한 관심이 커지고 있다. 프로바이오틱스는 장 건강 등 일차적인 기능성 외에도 면역증강, 대사증후군, 뇌건강 등 신체 전반에 도움을 주는 기능성이 알려져 있다[3,4]. 이 중 면역증강에 대한 연구는 프로바이오틱스 섭취 또는 그 발효물에 의한 면역세포 및 장관면역 활성화가 보고 된 바 있다[5-7].

*Correspondence to: Sung Yeon Kim, Institute of Pharmaceutical Research and Development, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749, South Korea
Tel: 82-63-850-6806, Fax: 82-63-853-6821
E-mail: sungykim@wonkwang.ac.kr

이러한 프로바이오틱스가 면역증강을 위해서는 유산균이 소화기관을 거쳐 장내까지 생존하여야 하며 장내표면이나 상피세포에 어떠한 형태로든 결합하여 지속적으로 살아갈 수 있는 능력이 있어야한다. 하지만, 유산균은 섭취 후 위산에 의해 90% 이상이 사멸되고, 위산에 생존한 유산균은 다시 담즙산에 의해 사멸되는 것으로 알려져 있다. 즉 유산균이 최종 목적지인 장(腸)에 도착할 확률은 5% 정도에 불과하다[8]. 이를 개선하기 위해, 유산균 자체를 코팅하는 기술과 배양시 탄산염, 계면활성제 및 폐배추와 같은 천연물 추출액등 다양한 배지성분 활용하는 방법과 열처리 방법을 달리하여 배양하는 방법에 대한 연구가 진행되어지고 있다[9,10]. 그 외에도 체내 안정성을 위해 프로바이오틱스와 프리바이오틱스(prebiotics)의 조합인 신바이오틱스(synbiotics)를 이용한 연구도 점차 증가하고 있다[11,12].

프리바이오틱스는 유익한 장내 미생물의 성장이나 활성을 촉진함으로써, 숙주의 건강에 좋은 효과를 나타내는 소화되지 않는 영양성분을 일컫는다. 대표적으로 올리고당, 키토산, 식이섬유 등이 다량 함유되어 있는 채소류 및 해조류 등이 프리바이오틱스로 광범위하게 사용되어지고 있

다[4,13]. 그 중, 해조류는 소화 흡수율이 낮아 영양학적인 측면에서 관심을 끌지 못하였으나, 최근 해조류에 함유된 탄수화물이 혈관콜레스테롤 침착 방지 및 장관 운동을 원활히 하고, 중금속 배출을 촉진시키며 고지혈증의 개선 등, 식용 해조류로부터 생리활성 물질들이 확인되면서 기능성 식품으로서의 개발에 관심이 모아지고 있다[14,15].

미역(*Undaria pinnatifida*)은 대표적인 갈조류로서 다당류인 alginate, fucoidan 이 풍부하고 미역의 부위에 따라 유리아미노산인 alanine, glycine, glutamate 및 asparagine 등이 함유되어있다[16]. 그 중, 산성수용성 다당류인 fucoidan은 혈액응고작용, 항종양 및 항암활성, 항산화 효과가 연구된 바 있다. 또한 미역에 다량 함유된 alginate는 효소에 의해 분해되면 alginate oligomer가 된다. 이것은 면역세포에서의 cytokine 분비 증가와 아연의 생체 이용률을 개선시킴으로 체내 면역시스템 활성에도 직·간접적으로 기여하는 등 많은 연구로 기능성이 입증되고 있다[17-19]. 그러나 미역을 프로바이오틱스 배양단계에서부터 첨가하여 프로바이오틱스의 면역증강 효능을 높이는 연구는 보고 된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 신바이오틱스 제제로서의 체내 유용성을 규명 하고자, 미역을 프로바이오틱스 배양 단계부터 첨가하여 실험실 수준(1 L 플라스크 배양)과 생산 수준(50 L 발효조 배양)에서의 연구를 진행하였다. 기존 프로바이오틱스의 취약점인 대량배양 및 체내 안정성 개선과 면역증강 효과를 추가로 확인하고, 이를 통해 향후 기능성 식품 및 의약품으로 산업적 이용의 가능성을 제시할 수 있는 기초자료를 얻고자 하였다.

Materials and Methods

배지

기본배지는 공개되어 있는 기존 유산균 생산업체의 자료를 기본으로 고가의 성분을 제외한 2% glucose, 0.5% yeast extract, 0.2% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% KH_2PO_4, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% Tween 80 및 정제수 잔량을 포함하는 기본 유산균 배양배지 조성물을 준비하고 미역분말을 1% 첨가하여 미역첨가 배양배지를 제조 후, 121°C에서 15분간 멸균 후 사용하였다.

실험에 사용된 미역은 건조된 완도산 미역(sea mustard, *Undaria pinnatifida*)을 수분량이 10% 미만이 되도록 2차 건조 후, 분쇄하고 11,000 가오스 자석 및 흔들채에 통과된 80 mesh 미역분말을 밀봉 판매하는 (주)가루나라에서 구입하여 −20°C에서 냉동 보관 후 사용 하였다.

균주

식물성 유산균인 *L. plantarum* 균주는 한국 미생물보존센터(KCCM 11322, ATCC 8014)으로 부터 분양 받았고, MRS (de man rogosa and sharpe) 배지에서 3회 이상 계대배양을 거쳐 glycerol stock법으로 −70°C에 균주를 보관하였다.

면역증강 실험은 제조 배지에 배양 후 생균과 사균으로 분리하여 생균은 10^4 CFU부터 10^1 CFU까지 희석하여 사용하였으며 사균은 100°C에서 15분간 끓이고, 식힌 뒤 세포에 처리 하였다.

배양

실험실 수준으로 제조배지를 1 L로 제조하였다. 또한, 산업적 유용성을 평가하기 위해 50 L 발효조(X cellex)를 이용하여 제조배지를 제조하였다(생산 수준). MRS 액체배지에 접종하여 전배양 시킨 유산균을 10%로 본 배양배지에 접종하였으며, 배양 온도 37°C, 교반속도 180 rpm으로 배양하며 시간별로 생균수를 확인하였다.

프로바이오틱스 pH 및 생장활성도 평가

배양 후 pH 변화는 pH 미터(mettler-toledo)를 활용하여 측정하였다. 생균수는 균배양액을 생리식염수로 10배씩 연속적으로 희석시키고, 그 희석액 1 mL에 plate count agar 9 mL을 혼합하는 pour 법으로 확인하였다. 37°C에서 48시간동안 배양하고 생성된 colony 수를 계수하여 생성 콜로니 개수(colony forming unit per gram, CFU/mL)로 생균수를 측정하였다.

인공위액 내성

인공위액에 대한 내성은 1 mg/mL 펩신용액에 염산을 이용하여 pH를 2.5로 조정하여 인공위액을 조제하였다[20]. 여기에 유산균을 10^3 CFU/mL 접종하고 37°C에서 배양하며 1, 3, 6시간 마다 생균수를 측정하였다.

담즙산 내성

인공 담즙산에 대한 내성평가는 0.02 M 콜릭산, 0.02 M 디옥시콜산, 0.05 mg/mL 리파아제, 0.02 mg/mL 판크레아틱용액에 1 N 염산 및 수산화 나트륨을 이용하여 pH 8.0로 조정하여 인공 담즙산을 준비하였다[20]. 인공 답즘산에 준비한 유산균 현탁액을 접종하여 37°C에서 배양하며 1, 3, 6시간 마다 생균수를 측정하였다.

열 안정성

열 안정성은 MRS broth에서 배양한 유산균을 55°C에 2시간 방치 후 1, 3, 6시간 마다 생균수를 측정하였다.

면역 세포독성 및 활성 측정

마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 분주되도록 1×10^6 cells/mL의 세포를 100 uL씩 넣고 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24

시간동안 배양한 후, 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. 유산균 현탁액은 생균 및 사균으로 각각 10, 10^2, 10^3, 10^4 CFU/well의 농도로 각각 처리하고 24시간 동안 배양하였다.

배양이 끝난 뒤, 면역증강 지표인 Nitric oxide의 측정은 상층액과 같은 양의 Griess reagent (5% 인산에 용해된 0.1% N-1-naphthylethylenediamine과 1% sulfanilamide을 1:1로 혼합)을 처리해 실온에서 10분 방치 후 microplate reader (TECAN, CA, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

TNF-α 측정 역시, 배양이 끝난 상층액으로 TNF-α ELISA Kit (R&D)을 활용하여 정량하고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

시험에 얻어진 결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였으며, Graphpad Prism v5.0 프로그램을 활용하여 student *t*-test를 수행하여 유의성을 검증하였다. 실험군이 3개 이상인 경우 일원분산분석(one-way ANOVA)를 수행한 후 Tukey's multiple comparison test로 검정하였다. 통계적인 유의성은 *P* 값이 0.05 이하인 경우를 기준으로 판정하였다.

Results and Discussion

프로바이오틱스 증식률

*L. plantarum*는 김치에서 분리된 식물성 프로바이오틱스로 면역강화, 정장작용, 항산화, 항암 등 다양한 생리활성을 나타내며, *L. plantarum* 균주가 *L. casei* 균주 및 *Leuconostoc* 속보다 위산 및 담즙산 내성이 우수하다고 보고된 바 있고 이를 활용한 식품 및 의약학 분야가 점점 확대되고 있다[21,22]. 본 연구에서는 식물성 프로바이오틱스인 *L. plantarum*의 산업적 활용을 위한 고농도 대량 배양 및 면역 기능성, 안정성을 높일 수 있는 방법으로 알칼리성 대표 해조류인 미역을 배양단계에서부터 첨가하여 연구를 진행하였다.

유산균주는 유기산을 생성하며 자신이 생산한 유기산에 의해 균체가 사멸되는 현상이 발생하므로 배양 중에 적절하게 pH 조절하는 조건의 설정이 필요하다. 그러나 pH 조절제의 사용은 배양액 내 이온강도를 지속적으로 증가시켜 균의 활력과 증식을 감소시킬 뿐만 아니라 많은 양의 알칼리 용액의 첨가로 인하여 배양액이 희석되므로 균의 생화학적 환경변화를 가져올 수 있으며 유산균의 효율적인 고농도 균체를 얻는데 한계가 있다. 이를 개선하기 위해 화학물질 대신 calcium carbonate-alginate bead를 대체제로 이용한 연구가 발표된 바 있다[23].

본 연구에서는 실험실 수준의 기본배지와 미역첨가배지를 비교 하였을 때 별도의 pH 조절 없이 균 배양 2시간 후 pH 5.0, 4시간 후 pH 4.0 이하로 떨어지는 것을 알 수 있었다(Fig. 1A). 배양 종료시점인 24시간 배양 후 pH는 3.5이하였으며 생균수를 측정해 보았을 때 기본배지는 8.5 ± 2.1 (10^8 CFU/mL), 미역첨가배지는 9.5 ± 3.5 (10^8 CFU/mL)으로 pH 저하로 인해 균의 성장이 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1B).

본 실험 조건에서 pH 조절 없이 대수기에 이르는 시간은 기본배지는 12시간째 55 ± 7.0 (10^8 CFU/mL) 미역첨가배지는 18시간째 271 ± 26.8 (10^8 CFU/mL)으로 차이를 나타냈다(Fig. 1B).

실험에 사용한 미역은 회분식 산도 측정을 통해 김, 다시마 보다 높은 알칼리성을 나타내었으며 미역을 첨가하였을 때 화학적 중화제의 첨가 없이 실험실 수준에서의 미역첨가배지의 대수기 균수는 기본배지에 비해 4.9배 높은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 수산화나트륨으로 pH 6.8로 유지하며 24시간 배양한 Moon et al.[24]의 생균수 10.74 ± 0.73 (10^9 CFU/mL)와 비교하여도 2배의 증가율을 나타내는 것을 알 수 있다. 생산 수준 배양에서는 18시간째에 10^{22}의 고농도 프로바이오틱스 생산을 확인하였다(Table 1). 이러한 결과는 미역첨가배지를 사용하였을 때 별도의 pH 조절제를 첨가하지 않아도 단시간 내에 *L.*

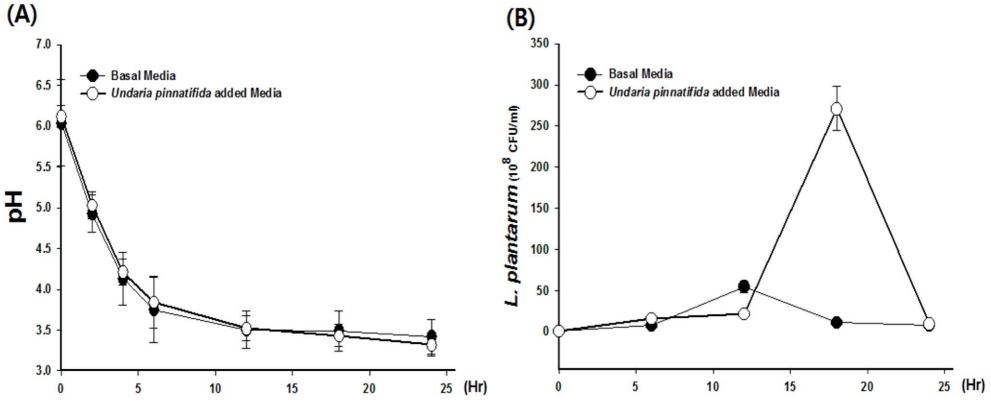

Fig. 1. Effects of *U. pinnatifida* in lab-scale cultivation of *L. planatarum*. The values were presented as means ± S.D.

Table 1. Effects of *U. pinnatifida* in scale-up cultivation of *L. planatarum*

Culture time (Hr)	pH	Cell growth (CFU/ml)
0	6.13	$2.1 \pm 0.2 \times 10^{8}$
6	3.57	$4.3 \pm 6.7 \times 10^{18}$
12	3.79	$9.4 \pm 4.9 \times 10^{19}$
18	3.46	$2.0 \pm 0.1 \times 10^{22}$
20	3.42	$2.0 \pm 10 \times 10^{14}$
22	3.43	$9.5 \pm 0.9 \times 10^{9}$
24	3.43	$5.8 \pm 0.3 \times 10^{9}$

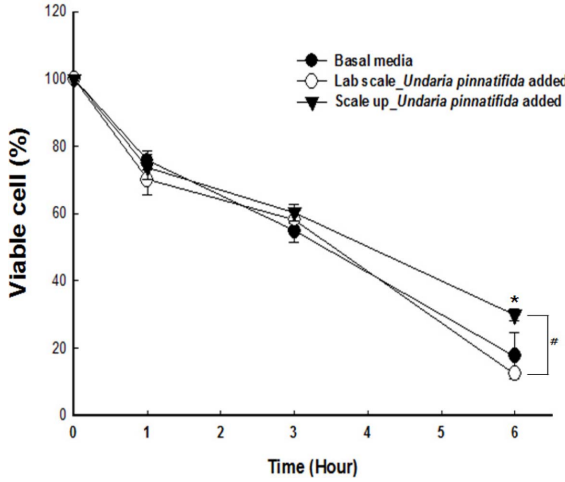

Fig. 2. Survival ratio of cultured *L. plantarum* in heat condition (55°C, 6 hr). The values were presented as means ± S.D. Statistical analysis was done by one-way ANOVA, and the differences between the treatments were compared by Tukey's multiple-comparison test; $*p < 0.05$ compared to basal media.

*plantarum*의 고농도 배양이 가능한 것을 알 수 있었다.

열 안정성

프로바이오틱스가 제품으로 이용될 경우에는 미생물 생육 최적조건과는 달리 고온 등의 온도 변화에 노출될 수 있다. 또한 제제화 방법인 spray dring과정 동안 고온의 환경에 노출되면 생균력이 급격히 감소 될 수 있으므로 이에 대응하여 세포의 열에 대한 내성이 높은 균주를 선별 및 배양 하는 것이 중요하다.

미역첨가배지의 열안정성은 55°C에서 6시간 배양하면서 각 시간별로 생존하는 수를 조사하였다. 모두 1시간째는 약 기본배지는 70%, 3시간째에는 55% 생존하여 비슷한 감소율을 보였다. 6시간째 기본배지는 18%, 실험실 수준으로 배양한 미역첨가배지는 12% 생존율을 보이는 반면 생산 수준으로 배양한 미역첨가배지의 유산균 생존율은 30%로 열 안정성 면에서 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 2).

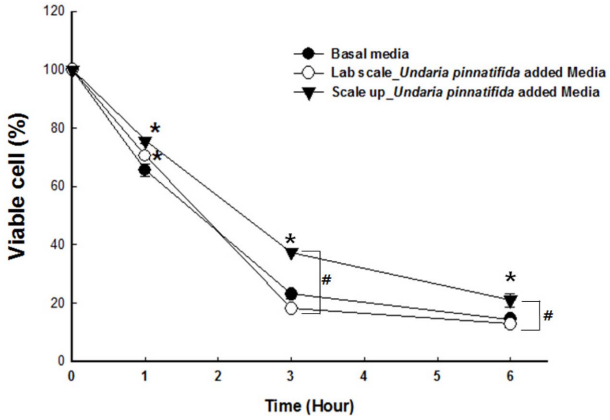

Fig. 3. Survival ratio of cultured *L. plantarum* in stimulated small intestinal condition. The values were presented as means ± S.D. Statistical analysis was done by one-way ANOVA, and the differences between the treatments were compared by Tukey's multiple-comparison test; $*p < 0.05$ compared to basal media, $\#p < 0.05$ compared to labscale media.

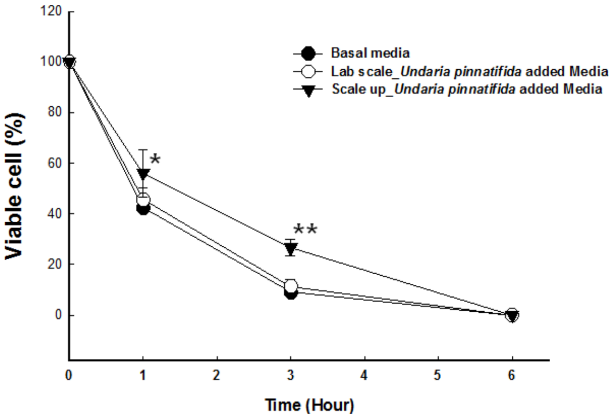

Fig. 4. Survival ratio of cultured *L. plantarum* in stimulated gastric condition. The values were presented as means ± S.D. Statistical analysis was done by one-way ANOVA, and the differences between the treatments were compared by Tukey's multiple-comparison test; $*p < 0.05$ compared to basal media, $\#p < 0.05$ compared to labscale media.

위액 및 담즙 내성

유산균은 섭취 후 프로바이오틱스로 정장작용 및 체내에서 여러 생리적 기능을 발휘하기 위해서는 소화관 내의 조건에서 생존하여야 한다. 섭취한 균이 최종적으로 장에 도달하여, 정장작용 및 면역기능을 발휘하기 위해서는 위액과 담즙이 존재하는 환경에서 생존이 요구된다[25]. 순수한 위액은 pH 1.0-2.0 정도로 유지되어 대부분의 미생물은 위액 내에서 사멸되나 섭취한 음식물의 완충 작용에 의해서 다소 pH가 높아져 미생물의 사멸을 감소시킬 수 있다[26]. 그러나 유산균이 생리적 기능을 발휘하려면 위산에 대해 생존이 가능하여야 한다.

각 균주의 인공 위액에 대한 내성을 측정하기 위해 pH

2.5 및 소화효소인, 펩신을 함유한 인공위액에 배양한 균주를 접종하여 시간별로 생균수를 측정하였다. 시험 결과, 실험실 수준에서 1시간 배양 후 기본배지 생균수는 42%, 미역첨가배지는 46%, 생산 수준의 미역첨가배지 배양은 56%의 유산균 생존율을 나타내었다. 생산 수준에서 3시간 배양 후 미역 첨가 배지의 유산균의 생존율은 27%로 기본배지 배양보다 위산에 대한 안정성 면에서 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 3). 인공 담즙에 대한 내성을 측정한 결과는 Fig. 4에 나타내었으며 초기반응인 1시간 후 기본배지(66%)에 비해 미역첨가배지에 배양한 유산균의 생존율이 실험실 수준 배양은 70%, 생산 수준 배양은 76%를 나타내었다. 3시간과 6시간 후에도 생산 수준의 미역첨가배지로 배양한 유산균의 생존율은 각각 37%, 21%로 기본배지와 비교하여 유의적인 차이를 나타내었다.

미역을 첨가한 배지에서 배양한 프로바이오틱스가 인공위액에서 생존이 가능하고 인공담즙에서도 내성을 가지는 것으로 보아 섭취 후 장까지 도달하여 정장작용 및 장관면역활성을 통한 인체 면역증가가 유도 될것으로 예상된

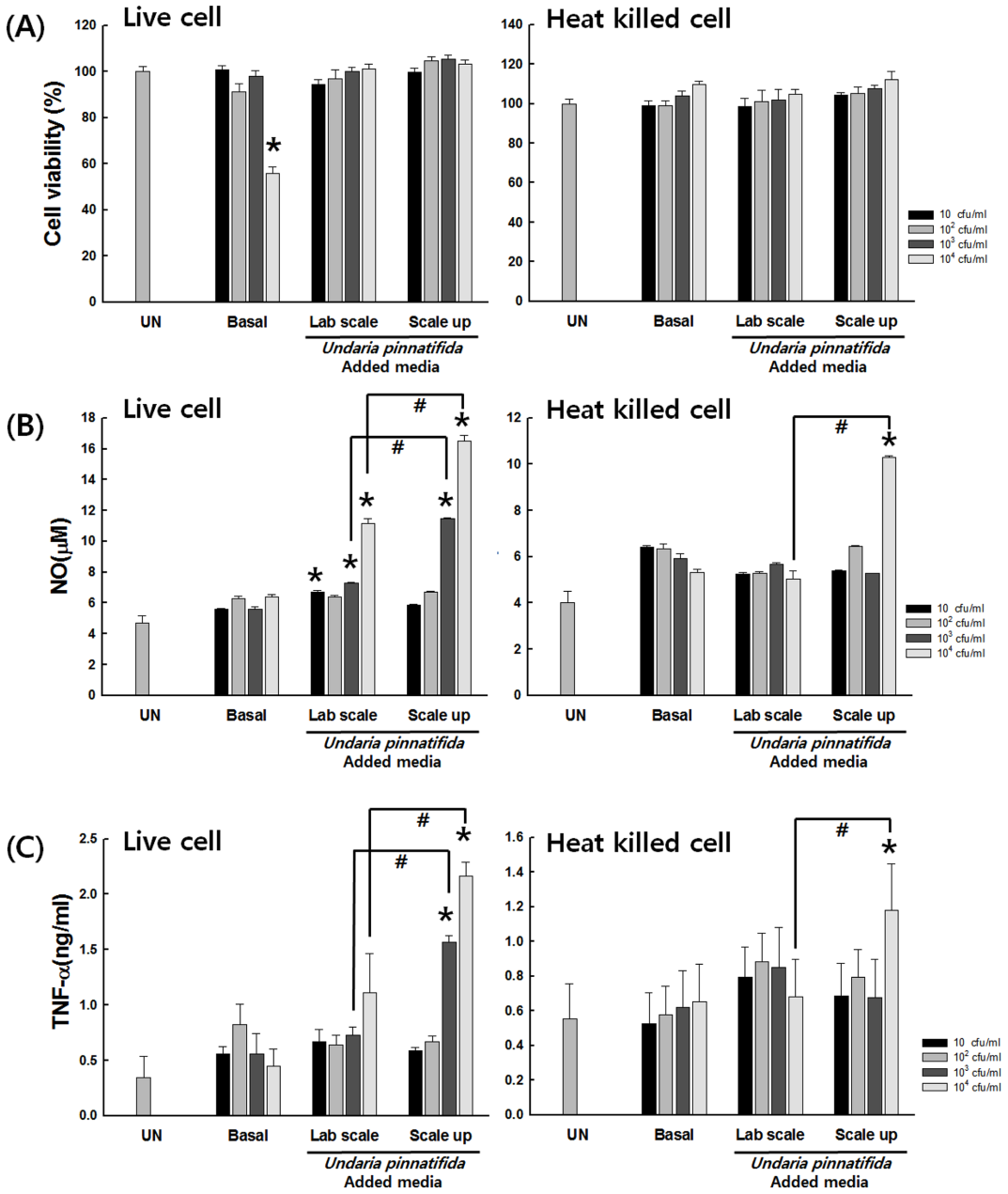

Fig. 5. Immune - stimulatory activity of cultured *L. plantarum* by *U. pinnatifida* media (A) Cell viability, (B) NO production, (C) TNF-α in macrophage (RAW 264.7). The values were presented as means ± S.D. Statistical analysis was done by one-way ANOVA, and the differences between the treatments were compared by Tukey's multiple-comparison test; *$p < 0.05$ compared to basal media, #$p < 0.05$ compared to labscale media.

다. 이는 유용한 생균제가 장내에서 기능을 하기 위해서는 장내 위장의 낮은 pH와 소장의 담즙에 대한 강한 내성을 가져야 한다는 점을 고려할 때 미역 첨가배지를 이용한 배양법이 기능성 프로바이오틱스 배양에 우수하다고 사료된다.

면역증강

기존의 유산균 기능성은 발효유의 품질평가에서 생균수를 기준으로 하였기 때문에 생균 중심의 연구를 수행하였다. 그러나 면역학이 발전하면서 생균 중심의 연구에서 사균체의 기능으로 관심이 바뀌고 있다[27]. 이러한 점을 고려하여 미역첨가배지에 배양한 프로바이오틱스 면역증강을 생균과 사균(Heat killed)의 상태로 대식세포에 대한 활성을 검토하였다.

면역기능성 검증에 사용한 대식세포는 체내로 이물질(감염성 미생물 등)이 침입하였을 때 이들을 초기에 비 특이적으로 제거시키는 탐식세포로써, 세포 매개성 면역에 중요한 역할을 하는 면역세포이며 종양억제 작용 등 다양한 기능을 수행한다. 또한 항원을 탐식 및 분해하여 그 일부를 자신의 세포 표면에 부착 및 제시함으로써 림프구에 대한 면역반응을 유도하며 후천성 면역계가 작동할 수 있도록 effector cell로서의 작용한다.

이러한 대식세포에 배양한 유산균을 첨가하여 세포 독성 및 면역증강을 측정한 결과, 생균의 조건에서는 10^4 CFU를 처리한 기본배지에서 45%의 세포 독성을 나타내었지만, 미역첨가배지에서의 유산균 처리 그룹에서는 세포독성이 나타나지 않음을 확인 하였다. 또한 사균의 상태에서는 모든 그룹에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Fig. 5A).

RAW 264.7 세포에서 미역첨가배지에서 아질산 이온(NO^{2-})의 농도는 생균으로 처리하였을 때 실험실 수준 배양에서 기본배지는 10^4 CFU를 처리한 그룹에서는 6.40 ± 0.14 μM, 미역첨가배지에서는 11.1 ± 0.03 μM로 1.7배 증가하였고 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 사균에서는 기본배양과 실험실 수준 배양의 미역첨가배지 배양에 차이는 없었다. 하지만 생균과 사균 모두 생산 수준의 미역첨가배지 배양에서는 10^4 CFU로 처리하였을 때 아질산 이온의 농도가 유의적으로 증가된 것을 알 수 있었다(Fig. 5B).

미역첨가배지에서 종양괴사인자인자 TNF-α는 실험실 수준 배양에서 기본배지는 10^4 CFU를 처리한 그룹에서는 0.45 ± 0.14 ng/mL, 미역첨가배지에서는 1.11 ± 0.35 ng/mL로 2.4배 증가하였고 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$).

사균에서는 기본배양과 실험실 수준 배양의 미역첨가배지 배양에 차이는 없었다. 하지만 생균과 사균 모두 생산 수준의 미역첨가배지 배양에서는 10^4 CFU로 처리하였을 때는 각각 2.16 ± 0.12 ng/mL, 1.18 ± 0.26 ng/mL으로 TNF-α의 농도가 유의적으로 증가된 것을 알 수 있었다($p < 0.05$, Fig. 5C).

실험실 수준 배양과 비교해 발효조를 이용한 생산 수준 배양은 유산균 증식을 위한 공기량을 일정하게 공급함으로서 미역첨가배지 배양에 따른 유산균의 배양능, 안정성 및 면역원성을 높인 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 미역첨가배지를 활용해 생산 수준에서 *L. plantarum*을 배양할 경우 일반배지에 배양한 *L. plantarum*과 비교하여 생균과 사균 모두 면역원성을 더 효과적으로 개선할 수 있음을 보여준다.

Acknowledgement

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2014년도 산학연공동기술개발사업(No. C0236539)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

국문요약

본 연구에서는 식물성 프로바이오틱스에 해조류인 미역을 첨가하여 프로바이오틱스의 체내 안정성 및 면역원성을 향상 시킬 수 있는 고농도 배양법을 개발하고자 하였다. 미역 첨가 배지를 생산 수준으로 유산균을 배양하였을 때 유산균수는 18시간째 10^{22}, 24시간째 10^9으로 고농도 배양이 가능하였다. 미역첨가배지로 배양된 유산균의 열 안정성, 위산 및 담즙 안정성의 효과도 기본배지와 비교 하여 유의적인 증가를 확인할 수 있었다. 미역첨가배지로 배양된 프로바이오틱스는 생균 및 사균 모두 면역증강효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 배양만으로 기능성이 향상된 프리바이오틱스를 개발함에 따라, 다양한 프로바이오틱스의 기능성 향상의 기반 기술로서 활용이 가능할 것으로 사료 된다.

References

1. DeKivit, S., Tobin, M.C., Forsyth, C.B., Keshavarzian, A. and Landay, A.L.: Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. *Front Immunol.* **18**, 60-66 (2014).
2. Rolfe, R.D.: The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* **130**, 396-402 (2000).
3. Kang, K.H.: Health Benefits of Lactic Acid Bacteria. *Curr. Top LAB Probiotics.* **1**, 1-8 (2013).
4. Ghouri, Y.A., Richards, D.M., Rahimi, E.F., Krill, J.T., Jelinek, K.A. and DuPont, A.W.: Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **9**, 473-487 (2014).
5. Vander, M.J., Hulst, M.M., Smits, M.A. and Schuurman, T.:

Small intestinal segment perfusion test in piglets: future applications in studying probiotics-gut crosstalk in infectious diarrhoea. *Benef. Microbes.* **1**, 439-445 (2010).
6. Iebba. V., Nicoletti, M. and Schippa, S.: Gut microbiota and the immune system: an intimate partnership in health and disease. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **25**, 823-833 (2012).
7. Bansal, S., Mangal, M., Sharma, S.K. and Gupta, R.K.: Non-Dairy Based Probiotics: A Healthy Treat for Intestine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **43**, 65-66 (2015).
8. Garcia-Albiach, R., Pozuelo de Felipe, M.J., Angulo, S., Morosini, M.I., Bravo, D., Baquero, F. and del Campo, R.: Molecular analysis of yogurt containing Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus in human intestinal microbiota. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 91-96 (2008).
9. Jeun, J.1., Kim, S., Cho, S.Y., Jun, H.J., Park, H.J., Seo, J.G., Chung, M.J. and Lee, S.J.: Hypocholesterolemic effects of Lactobacillus plantarum KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition.* **26**, 321-330 (2010).
10. Jeong, E.J., Moon, D.W., Oh, J.S., Moon, J.S., Eom, H.J., Choi, H.S., Kim, C.S. and Han, N.S.: Composition optimization of cabbage extract medium for cell growth of Lactobacillus plantarum. *Korean Soc. Biotechnol. Bioengineering J.* **27**, 347-351 (2012).
11. Morrow, L.E., Gogineni, V. and Malesker, M.A.: Probiotic, prebiotic, and synbiotic use in critically ill patients. *Curr. Opin. Crit. Care.* **18**, 186-191 (2012).
12. Passariello, A., Terrin, G., Cecere, G., Micillo, M., De Marco, G., Di Costanzo, M., Cosenza, L., Leone, L., Nocerino, R. and Canani, R.B.: Randomised clinical trial: efficacy of a new synbiotic formulation containing Lactobacillus paracasei B21060 plus arabinogalactan and xilooligosaccharides in children with acute diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther.* **35**, 782-788 (2012).
13. Mugambi, M.N., Musekiwa, A., Lombard, M., Young, T. and Blaauw, R.: Probiotics, prebiotics infant formula use in preterm or low birth weight infants: a systematic review. *Nutr. J.* **28**, 58-65 (2012).
14. Im, YG., Choi, J.S. and Kim, D.S.: Mineral contents of edible seaweeds collected from Gijang and Wando in Korea. *J. Kor. Fish. Soc.* **39**, 16-22 (2006).
15. Baek, E.Y.: A study on the distribution structure of seaweed market in Korea. *Korea Maritime Review.* **272**, 55-68 (2007).
16. Choi, J.S., Bae, H.J., Kim, Y.C., Park, N.H., Kim, T.B., Choi, Y.J., Choi, E.Y., Park, S.M. and Choi, I.S.: Nutritional Composition and Biological Activities of the Methanol Extracts of Sea Mustard (Undaria pinnatifida) in Market. *J. Life Sci.* **18**, 387-394 (2008).
17. Maruyama, H., Tamauchi, H., Iizuka, M. and Nakano, T.: Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of Undaria pinnatifida. *In Vivo.* **17**, 245-249 (2003).
18. Zhang, W., Oda, T., Yu, Q. and Jin, J.O.: Fucoidan from Macrocystis pyrifera Has Powerful Immune-Modulatory Effects Compared to Three Other Fucoidans. *Mar. Drugs.* **19**, 1084-1104 (2015).
19. Kim, K.H. and Kim, C.S.: Studies on the manufacture of Undaria pinnatifida, laver and it's physiocochemical properties Kor. *J. Food Sci. Tech.* **14**, 336-341 (1982).
20. Botes, M., van Reenen, C.A. and Dicks LMT.: Evaluation of Enterococcus mundtii ST4SA and Lactobacillus plantarum 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 362-370 (2008).
21. Nagata, Y., Hashiguchi, K., Kamimura, Y., Yoshida, M. and Gomyo, T.: The gastrointestinal transit tolerance of Lactobacillus plantarum strain No. 14 depended on the carbon source. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2650-2655 (2009).
22. Zhang, H., Liu, L., Hao, Y., Zhong, S., Liu, H., Han, T. and Xie, Y.: Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product. *Microbiol. Immunol.* **57**, 746-755 (2013).
23. Jung, W.J., Lee, K.G., Kim, C.W. and Lee S.H.: Assessment of Applicability of a Calcium Carbonate-Alginate Beads as Neutralizer for the High Cell Density Cultivation of Isolated Sourdough Lactic Acid Bacteria. *Food Engineering Progress.* **3**, 208-216 (2010).
24. Moon, S.H., Chang, H.C. and Kim, I.C.: Development of a Novel Medium with Chinese Cabbage Extract and Optimized Fermentation Conditions for the Cultivation of Leuconostoc citreum GR1. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 1125-1132 (2013).
25. Senz, M., van Lengerich, B., Bader, J. and Stahl, U.: Control of cell morphology of probiotic Lactobacillus acidophilus for enhanced cell stability during industrial processing. *Int. J. Food Microbiol.* **192**, 34-42 (2015).
26. Ko, S.J., Jeong, S.S., Choi, C.H. and Kim, K.H.: pH and buffering capacity in some commercial fermented milks. *Journal of Korean society of Dental Hygiene.* **4**, 23-26 (2013).
27. Chuang, L., Wu, K.G., Pai, C., Hsieh, P.S., Tsai, J.J., Yen, J.H. and Lin, M.Y.: Heat-killed cells of Lactobacilli Skew the immune response toward T Helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 11080-11086 (2007).