

협기적 Broth System에서 젖산균의 담즙산염 내성

신용서* · 김성호 · 이갑상
원광대학교 농화학과

Bile Salt-Tolerance of Lactic Acid Bacteria under Anaerobic Broth System

Yong-Seo Shin*, Sung-Hyo Kim and Kap-Sang Lee

Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iri, Chonbuk 570-749, Korea

Abstract — To evaluate bile salt-tolerance of lactic acid bacteria (LAB, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* IFO 3533, *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185, *Lactobacillus lactis* ATCC 4797, and *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842), We investigated the survivals, acid production and β -galactosidase activity of LAB under anaerobic broth system. Cellular permeability of LAB and their cellular retention of β -galactosidase were also examined in the same system. Although the growth of LAB was slightly suppressed by 0.3% bile salt, they showed normal growth curve. *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185 was significantly more resistant to bile salt than the others. The β -galactosidase activity from *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185 and *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 and their cellular retention of β -galactosidase decreased by 0.3% bile salt. The cellular permeability of LAB in the presence of bile salt increased significantly.

젖산균은 발효 식품속에 널리 존재하면서 인간에게 여러가지 식품·영양학적인 효과를 부여하는 것으로 알려져 있다. 즉 젖산균 대사산물에 의한 식품의 관능성 및 저장성의 향상, 젖산균의 장내증식에 의한 정상작용등의 효과가 있다. 특히 젖산균의 장내증식에 의한 효과로는 장내세균총의 개선, 혈청콜레스테롤의 감소, 유당소화의 촉진 그리고 대장암 발생율의 저하등 매우 다양하게 나타나고 있다(1-4). 그러나 이러한 유용한 효과를 발휘하기 위해서 젖산균은 장내 환경에 적응해야만 한다. 구강으로 섭취된 젖산균은 먼저 위에서 분비되는 위산에 의해 그 많은 수가 사멸되는 것으로 보고(5, 6)되고 있으며, 위를 통과한 젖산균은 소장내에서 지방소화를 위해 분비되는 담즙산염에 다시 노출되게 된다. 따라서 젖산균이 장관내에서 유용한 효과를 발휘하기 위해서는 장관내에서 분비되는 담즙산염의 생리학적 농도에 내성이 있어야만 한다(7, 8). Mayia-Makinen(9) 등은 담즙산염에 대한 *Lactobacillus*속의 내성이 다양하게 나타난다고 보고하였으며, Overdahl과 Zottola(7)는 *Lactobacillus acidophilus*의 경우 세포막에 존재하는 polysaccharides 층이 담즙산염 내성과는 일정한 상관관계가

없다고 보고하는 등 젖산균의 담즙산염 내성에 대한 연구는 아직까지 일부 균종에만 국한되어 진행되어 왔을 뿐만 아니라 더욱이 장관조건에 보다 근접하게 하는 anaerobic system(배지, 배양조건)에서 조사한 보고나 그 억제기작에 대한 연구는 거의 없는 실정에 있다.

한편 β -galactosidase는 젖산균이 분비하는 intracellular enzyme으로 세포내에서 젖당을 glucose와 galactose로 분해하며, 장관내에서 이 효소가 부족하면 우유를 섭취하였을 때 젖당불내증(lactose-intolerance)을 일으킨다. 따라서 담즙산염 조건하에서 젖산균의 β -galactosidase 활성은 균의 생존율과 함께 식품·영양학적인 측면에서 매우 중요하다(10, 11).

본 연구에서는 장관내에서 젖산균의 담즙산염 내성을 평가하기 위해, 담즙산염이 첨가된 협기적 broth system에서 젖산균의 생존율, 산생성 능력, β -galactosidase 활성의 변화 그리고 젖산균의 세포막 투과성 변화 및 젖산균의 β -galactosidase 보유력을 측정하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지

본 실험에 사용된 젖산균은 *Lactobacillus acidophi-*

Key words: Bile salt-tolerance, lactic acid bacteria, β -galactosidase activity, cellular permeability
*Corresponding author

Table 1. Composition of modified EG medium (unit g/l)

| | |
|----------------------------------|------|
| Beef extract | 2.0 |
| Proteose peptone | 10.0 |
| Yeast extract | 5.0 |
| Na ₂ HPO ₄ | 4.0 |
| Souble starch | 0.5 |
| Glucose | 1.5 |
| L-cystein HCl | 0.4 |
| Tween 80 | 0.52 |

lus ATCC 4356, *Lactobacillus casei* IFO 3533, *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185, *Lactobacillus lactis* ATCC 4797 및 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842였으며, 실험에 사용하기 전 Lactobacilli MRS Broth(Difco, USA)에 3회 계대하였다. 젖산균의 담즙산염에 대한 생육실험에 사용한 배지는 modified EG medium(12)이었으며, 그 조성은 Table 1과 같다. 젖산균수 측정용 배지는 BCP plate count agar(Eiken Co., Japan)였다.

젖산균의 생존율과 산 생성량에 미치는 담즙산염의 영향

담즙산염 존재하에서 젖산균의 생육을 측정하기 위해 혼합기체(CO₂ : 15%, H₂ : 25%, N₂ : balance)로 bubbling 하여 용존산소를 제거시킨 modified EG medium에 담즙산염(Sigma Chemical Co.)을 0.3% 되게 첨가하고 anaerobic controlled glove box(Sheldon Manufacturing, USA)에서 젖산균을 접종(4%, v/v)하여 48시간 동안 혐기적으로 배양시키면서 6시간 간격으로 시료를 취하였다. pH, 적정산도는 상법에 준하여 측정(13)하였으며, 생균수는 배양액을 혐기성 희석액(0.85% NaCl, 0.1% L-cystein HCl, 0.1% sodium thioglycollate)에 일정배수로 희석하고 BCP plate count agar에 도포하여 37°C에서 72시간 배양시킨 후 나타난 colony를 계수하여 측정하였다(13).

β-galactosidase 활성도 측정

담즙산염이 젖산균의 β-galactosidase 활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842와 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185를 선정하고 modified EG medium(0.3% bile salt 함유)에서 48시간 배양하면서 6시간 간격으로 시료를 취해 신 등(1)의 방법에 준하여 0.1M PBS로 10배 희석하고 초음파처리(Danbary model LC500, 16 KHz)하여 세포벽을 파괴시켜 조효소액으로 하였다.

기질은 o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG, Sigma Chemical Co.)를 0.1M PBS(pH 7.0)에 5 mM 되게 용해시켜 사용하였다. 준비된 기질 5 ml에 조효소액 1 ml를 가하고 37°C의 water bath에서 20분간 반응시킨 후 1M-NaCO₃ 2.5 ml로 반응을 정지시킨 다음 유리된 o-nitrophenol을 420 nm에서 비색정량(UV-Visible Spectrophotometer, Varian DMS 200)하였다. 이때 β-galactosidase 활성은 1 g의 시료에서 1분간 ONPG로부터 1 μmole의 o-nitrophenol을 유리할 때 1 unit로 하였다.

β-galactosidase의 세포내 보유력 측정

담즙산염 존재하에서 β-galactosidase의 젖산균체내 보유력을 측정하기 위해, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842와 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185를 modified EG medium(0.3% bile salt 함유)에 24시간 동안 배양한 후 배양액을 원심분리(10000×g, 20 min, 4°C)하여 얻은 상등액의 β-galactosidase 활성을 측정하여 세포외 β-galactosidase 활성(extracellular β-galactosidase activity)으로 하였으며, 분리된 균체성분을 0.1M PBS(pH 7.0)에 resuspension시킨 후 초음파 처리하여 측정된 β-galactosidase 활성을 세포내 β-galactosidase 활성(intracellular β-galactosidase activity)으로 하여 세포내 보유력을 평가하였다.

젖산균의 세포막 투과성 변화의 측정

젖산균의 세포막 투과성을 측정하기 위해 담즙산염이 0.3% 첨가된 modified EG medium에서 24시간 배양된 배양액을 원심분리(10000×g, 20 min, 4°C)하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체 0.5 g(wet weight)를 0.1M PBS에 resuspension시킨 후 37°C에서 10분간 방치하여 용출된 세포질 성분을 UV-Visible Spectrophotometer로 260 nm에서 측정하여 세포막 투과성으로 하였다.

결과 및 고찰

젖산균의 생육에 미치는 담즙산염의 영향

젖산균은 장내에서 그 유용성을 가지기 위해서는 체장에서 십이지장으로 분비되는 담즙에 내성이 있어야 한다. 0.3%의 담즙산염이 첨가된 혐기적 broth system에서 젖산균의 생육을 산생성량(pH, 적정산도)과 생균수의 측정을 통해 평가한 결과는 Table 2와 같다.

5종의 젖산균은 모두 담즙산염에 의해 저해를 받아

Table 2. Changes in pH, titratable acidity and viable cell count of lactic acid bacteria in modified EG medium containing 0.3% bile salt under the anaerobic condition

| Strains | Incubation time(hr) | pH | | Titratable acidity(%) | | Viable cell count (log CFU/ml) | |
|-------------------------|---------------------|---------|-------------------------|-----------------------|-----------|--------------------------------|-----------|
| | | Control | Treatment ¹⁾ | Control | Treatment | Control | Treatment |
| <i>L. bulgaricus</i> | 0 | 6.20 | 6.20 | 0.309 | 0.296 | 6.51 | 6.51 |
| | 6 | 5.15 | 5.91 | 0.625 | 0.315 | 7.76 | 6.52 |
| | 12 | 4.10 | 5.91 | 1.407 | 0.331 | 9.04 | 6.52 |
| | 24 | 3.80 | 5.90 | 1.960 | 0.334 | 9.54 | 7.56 |
| | 48 | 3.61 | 5.35 | 2.228 | 0.491 | 9.78 | 7.54 |
| <i>L. acidophilus</i> | 0 | 6.20 | 6.20 | 0.309 | 0.296 | 6.53 | 6.53 |
| | 6 | 5.16 | 5.95 | 0.571 | 0.317 | 7.97 | 6.53 |
| | 12 | 4.00 | 5.85 | 1.516 | 0.349 | 9.23 | 7.20 |
| | 24 | 3.80 | 5.50 | 1.923 | 0.476 | 9.53 | 7.60 |
| | 48 | 3.61 | 5.25 | 2.239 | 0.487 | 9.91 | 7.76 |
| <i>L. casei</i> | 0 | 6.20 | 6.20 | 0.309 | 0.296 | 6.36 | 6.36 |
| | 6 | 5.46 | 6.00 | 0.458 | 0.309 | 7.62 | 6.36 |
| | 12 | 4.30 | 6.00 | 1.162 | 0.339 | 8.53 | 7.00 |
| | 24 | 3.85 | 6.08 | 1.952 | 0.347 | 9.56 | 7.66 |
| | 48 | 3.68 | 5.40 | 2.202 | 0.497 | 9.62 | 7.67 |
| <i>St. thermophilus</i> | 0 | 6.20 | 6.20 | 0.309 | 0.296 | 6.70 | 6.70 |
| | 6 | 5.65 | 6.15 | 0.404 | 0.293 | 8.15 | 6.71 |
| | 12 | 4.10 | 6.10 | 1.097 | 0.326 | 9.32 | 7.32 |
| | 24 | 3.85 | 5.50 | 1.958 | 0.475 | 9.68 | 7.85 |
| | 48 | 3.65 | 5.23 | 2.265 | 0.722 | 9.80 | 8.18 |
| <i>L. lactis</i> | 0 | 6.20 | 6.20 | 0.309 | 0.296 | 6.49 | 6.49 |
| | 6 | 5.46 | 6.10 | 0.442 | 0.297 | 7.88 | 6.49 |
| | 12 | 4.10 | 6.10 | 1.512 | 0.331 | 9.00 | 7.30 |
| | 24 | 3.85 | 5.80 | 1.956 | 0.388 | 9.43 | 7.53 |
| | 48 | 3.65 | 5.35 | 2.216 | 0.487 | 9.79 | 7.53 |

¹⁾Cultures incubated in modified EG medium with (Treatment) and without (Control) 0.3% bile salt.

유도기(lag time)가 대조구에 비해 6~12시간 정도 연장되었으며, 그 중 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842가 12시간으로 내성이 가장 약한 것으로 나타났다. 또한 배양 24시간만에 생균수가 대조구에 비해 1.62~2.26 log cycle/ml 정도의 적은 균수의 증가를 보였다. 균종간의 담즙산염 내성은 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185가 가장 높았으며, *Lactobacillus lactis* ATCC 4797와 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842가 다른 균주에 비해 상대적으로 낮았다. 젖산균의 산생성량과 그에 따른 pH 변화도 생균수와 같은 경향으로 나타났다. 즉 담즙산염 첨가로 젖산균의 산생성량은 감소되었으며 그에 따라 pH의 감소폭도 적었다. 균종간 비교에서는 *Streptococcus thermophilus*

KCTC 2185가 다른 균주에 비해 비교적 높은 산생성량을 보여 담즙산염 내성이 높은 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 보면, 젖산균은 0.3% 담즙산염에 노출되어 대조구에 비해서 유도기가 연장되고, 생균수와 산생성량이 감소하는 등 그의 생육이 다소 억제되기는 하나 비교적 정상적인 생육곡선(normal growth curve)를 나타내고 있을 뿐만 아니라 배양시간이 경과함에 따라 산생성량이 증가하는 것으로 나타나 0.3%의 담즙산염이 첨가된 broth system에서 생육할 수 있는 것으로 판명되었다. Gilliland 등(14)과 Mayia-Makinen 등(9)은 젖산균이 담즙산염이 첨가된 broth system에서 생육할 수 있으며, 균종에 따라 그 생육정도는 다양하게 나타난다고 보고하고 있어 본

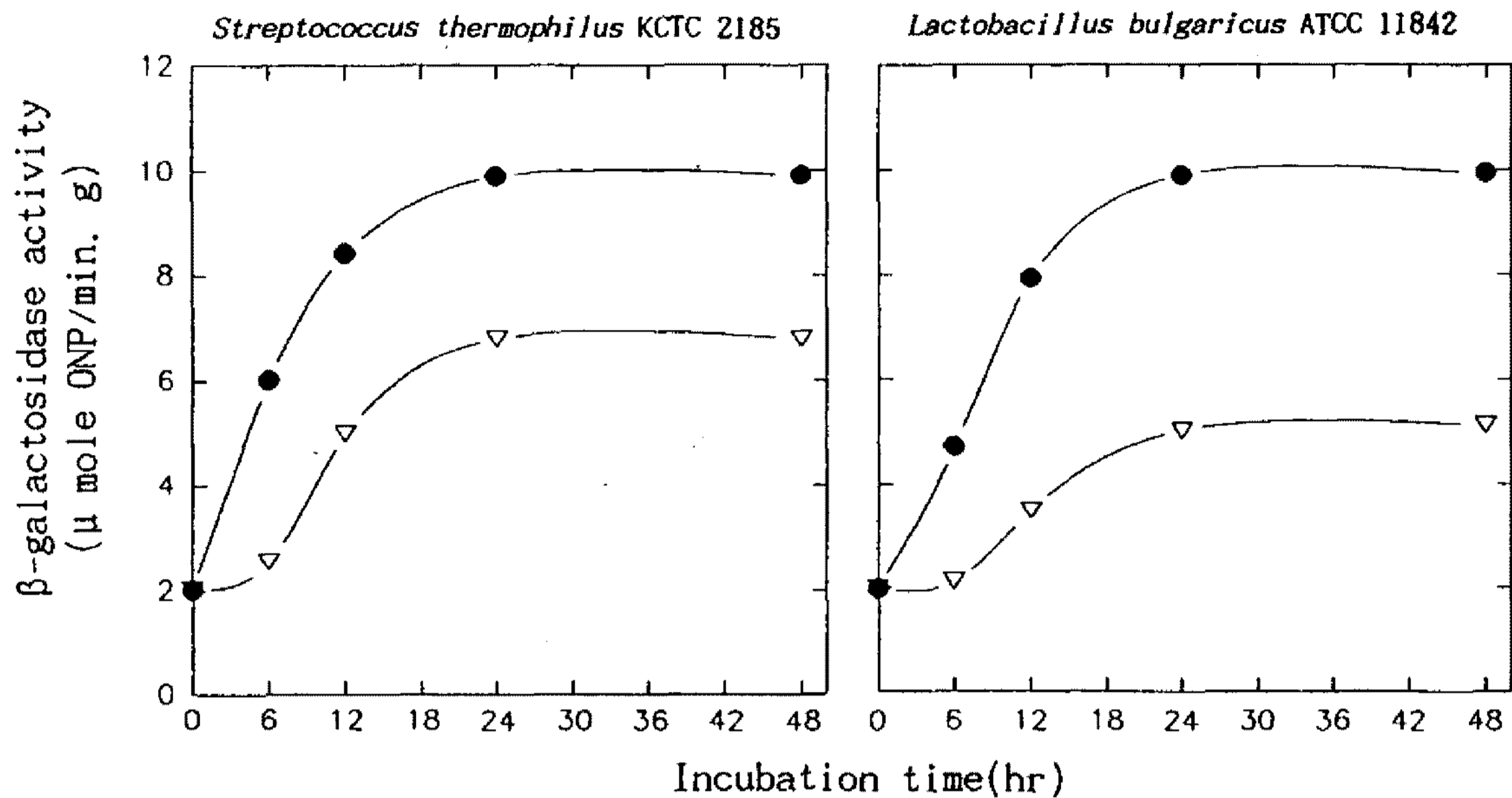


Fig. 1. Changes in β -galactosidase activity of lactic acid bacteria in modified EG medium containing 0.3% bile salt under the anaerobic condition.

-●-: without bile salt, -▽-: with bile salt

Enzyme activity is expressed as micrograms of o-nitrophenol released per min from one gram of cultures. Each value is the mean of three trials.

Table 3. Effect of bile salt on cellular retention of β -galactosidase by lactic acid bacteria

| Strains | Sample ²⁾ | β -Galactosidase activity ¹⁾ | | | Intracellular retention ratio(%) |
|-------------------------|----------------------|---|---------------|-------|----------------------------------|
| | | Intracellular | Extracellular | Total | |
| <i>L. bulgaricus</i> | Control | 8.34 | 1.72 | 10.06 | 82.9 |
| | Treatment | 3.83 | 1.14 | 4.97 | 77.1 |
| <i>St. thermophilus</i> | Control | 8.09 | 1.71 | 9.80 | 82.6 |
| | Treatment | 5.14 | 1.21 | 6.35 | 80.9 |

¹⁾Enzyme activity is expressed as micrograms of o-nitrophenol released per min; Each value is the mean of three trials. ²⁾See foot note 1) of table 2.

실험의 결과와 유사하였다.

β -galactosidase 활성의 변화

β -galactosidase 활성에 대한 담즙산염의 영향을 평가하기 위해 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185 와 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842을 선정하고 0.3% 담즙산염이 첨가된 혐기적 broth system에서 배양하면서 정기적으로 측정된 β -galactosidase 활성 변화는 Fig. 1과 같다. β -galactosidase 활성은 담즙산염 첨가로 대조구에 비해 낮았으나 배양시간이 경과함에 따라 그 활성은 증가하였으며, *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185가 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842에 비해 더 높은 β -galactosidase 활성을 나타내었다. 이는 담즙산염 존재하에서 젖산균 생육의 결과와 같은 경향으로 담즙산염에 의한 젖산균수의

감소로 인하여 β -galactosidase 활성이 낮게 나타난 것으로 사료된다.

β -galactosidase 세포내 보유력의 측정

0.3%의 담즙산염이 첨가된 modified EG medium에서 24시간 동안 혐기적으로 배양시킨 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185와 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842의 β -galactosidase의 세포내 보유력을 측정된 결과는 Table 3과 같다.

담즙산염 첨가 유무에 관계없이 젖산균의 β -galactosidase는 대부분 세포내에 존재하는 것으로 나타났으며, 담즙첨가로 인해 β -galactosidase 세포내 보유력은 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842의 경우 82.9%에서 77.1%로 감소하였고 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185는 82.6%에서 80.9%로 감소하여

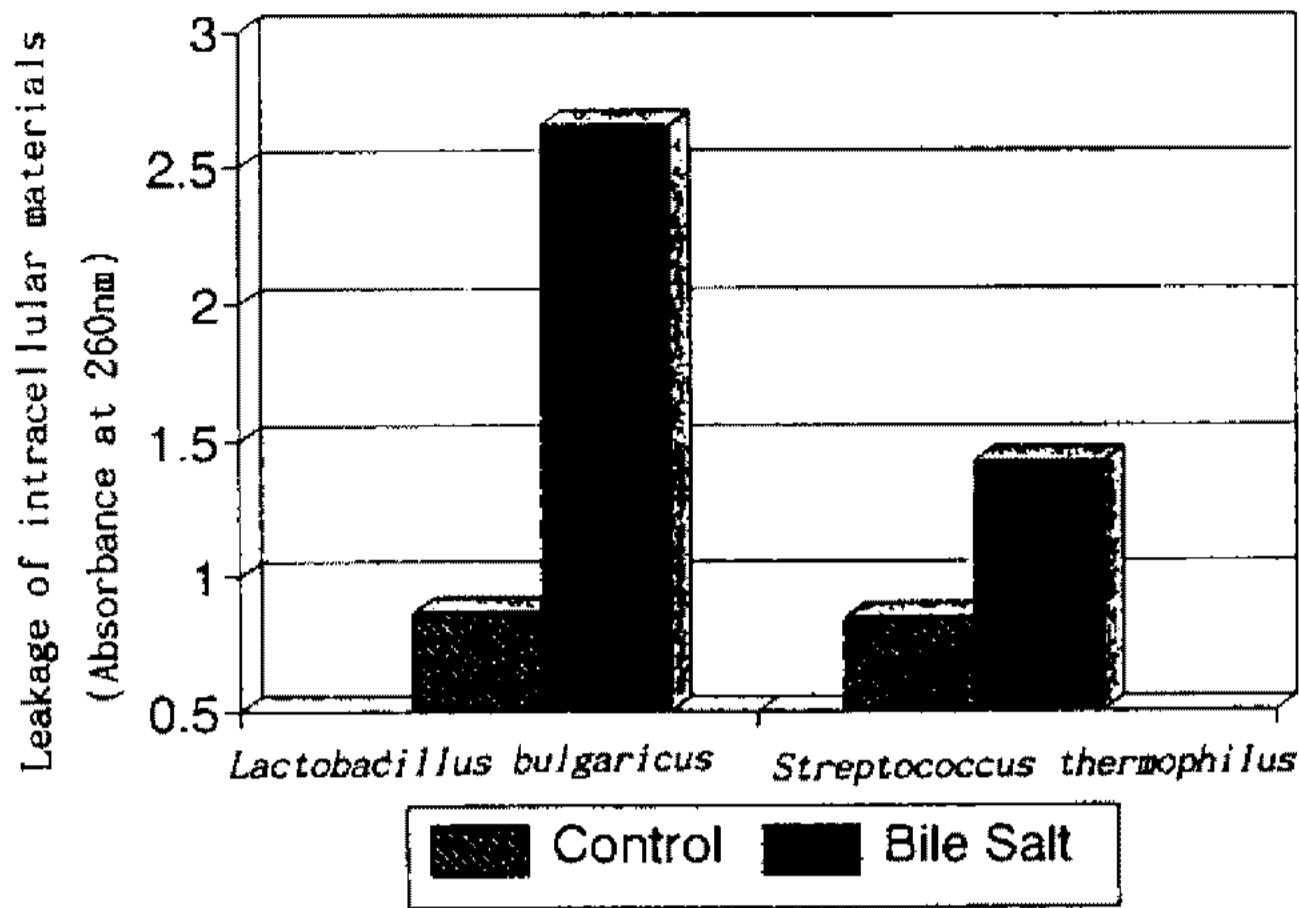


Fig. 2. Influence of bile salt on the cellular permeability of lactic acid bacteria under the anaerobic condition. Cellular permeability is expressed as amount of UV-absorbing materials by reading $A_{260\text{nm}}$ with Spectrophotometer; each value is the mean of three trials.

Lactobacillus bulgaricus ATCC 11842보다 보유력이 더 높은 것으로 나타났다. 이는 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185가 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842보다 담즙산염에 대한 내성이 강한 것으로 나타난 결과와 상관관계가 있을 것으로 사료된다. 젖산균이 담즙산염에 노출되어 그 생육이 억제되는 것은 담즙산염에 의해 endoenzyme들의 세포내보유력(intercellular retention)이 감소되는 것으로 보아 젖산균 세포막의 투과성(selective permeability)기작에 손상을 주는 것으로 사료된다.

젖산균 세포막의 투과성 변화

담즙산염에 의한 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185와 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842의 세포막 투과성 변화를 측정하기 위해 0.3% 담즙산염이 첨가된 혐기적 broth system에서 24시간 동안 배양된 균체를 회수하여 0.1M PBS에서 방치한 후 용출된 세포질 성분의 양을 260 nm에서 비색정량한 결과는 Fig. 2와 같다.

담즙산염 첨가로 용출된 세포질 성분은 증가하였으며, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842가 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185보다 상대적으로 많은 양을 용출한 것으로 나타나 담즙산염이 젖산균의 투과성을 증가시키는 양상을 보였다. 이는 담즙산염에 의해 젖산균 세포막의 선택적 투과성기작이 손상되어 세포질성분들이 삼투압에 의해서 상대적으로 낮은 농도인 0.1M PBS로 용출된 것으로 사료된다. 이상의 결과는 담즙산염이 혐기적 broth system에서 젖산균 β -galactosidase의 세포내 보유력을 감소시킨

다는 앞선 결과(Table 3)와 유사하였으며, 이러한 세포내 보유력 감소는 젖산균이 세포막 투과성 증가로 인해 야기된 것으로 추론할 수가 있다.

요 약

젖산균의 담즙산염 내성을 평가하기 위해 0.3%의 담즙산염이 첨가된 혐기적 broth system에서 젖산균 (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* IFO 3533, *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185, *Lactobacillus lactis* ATCC 4797, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842)의 생육, 산생성량, β -galactosidase 활성, 세포막 투과성 및 β -galactosidase의 세포내 보유력의 변화를 측정하였다. 시험한 5종의 젖산균은 모두 anaerobic broth system에서 0.3% 담즙산염에 노출되어 생육이 다소 억제되기는 하나 비교적 정상적인 생육곡선을 나타내었다. 균종간의 비교에서 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185가 가장 높은 담즙산염 내성을 나타내었으며, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842가 가장 낮은 내성을 보였다. *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842와 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185의 β -galactosidase 활성과 세포내 보유력은 담즙산염에 의해 감소되었으며 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185가 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842보다 더 높은 β -galactosidase 활성과 보유력을 보였다. 또한 담즙산염에 의해 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185와 *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842의 세포막 투과성이 증가되었다.

참고문헌

1. 신용서, 성현주, 김동한, 이갑상. 1994. 산성조건하에서 시판요구르트의 생존률과 β -galactosidase의 활성도. 한국농화학회지 37: 143-147.
2. 김성효, 신용서, 성현주, 김동한, 이갑상. 1994. 젖산균과 그 대사산물이 *Staphylococcus aureus*의 생육에 미치는 억제 효과. 한국식품과학회지 26: 644-648.
3. Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and C. Maxwell, 1985. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 337-342.
4. 荒井辛一郎, 室田一也, 早川邦彦, 片岡元行, 光岡之足. 腸内 flora와 發癌(光岡之足編). p. 105, 學會出版, 東京.
5. Hood, S.K. and E.A. Zottola. 1988. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* 53: 1514-1516.
6. Franklin, M.A. and S.C. Skoryna. 1971. Studies

- on natural gastric flora; survival of bacteria in fasting human subjects. *Can. Med. Assoc. J.* **105**: 380-386.
7. Overdahl, B.J. and E.A. Zottola. 1991. Relationship between bile tolerance and the presence of a ruthenium red staining layer on strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **74**: 1196-1200.
 8. Fernandes, C.F. and K.M. Shahani. 1988. Effect of nutrient media and bile salts on growth and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **71**: 3222-3226.
 9. Mayia-Makinen, A., M. Manninen, and H. Gyllenberg. 1983. The adherence of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves. *J. Appl. Bacteriol.* **55**: 241-244.
 10. Ramanarao, M.V. and S.M. Dutta. 1981. Purification and properties of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.* **46**: 1419-1423.
 11. Bayless, T.A., B. Rothfeld and C. Massa. 1975. Lactose and milk intolerance; clinical implications. *N. Engl. J. Med.* **292**: 1156-1162.
 12. 신용서, 김성효, 김동한, 이갑상. 1995. 혐기적 조건 하에서 젖산균의 cadmium 축적. *한국산업미생물학회지* **23**: 352-358.
 13. 신용서, 성현주, 김동한, 이갑상. 1994. 감자를 첨가한 요구르트의 제조와 특성. *한국식품과학회지* **26**: 266-271.
 14. Gilliland, S.E., Staley, T.E. and L.J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* **67**: 3045-3051.

(Received 4 July 1995)