



국내 액상 발효유용 유산균 스타터 미생물의 동정 및 생리적 특성

전상록 · 송태석 · 김지연² · 신원철¹ · 허송욱² · 윤성식*

연세대학교 생물자원공학과, ¹강원대학교 생물공학과, ²한국기초과학지원연구원 춘천센터

Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Starters Isolated from the Commercial Drink-Yogurt Products

Sang-Rok Jeon, Tae-Suk Song, Ji-Yoon Kim², Won-Cheol Shin¹, Song Wook Her², and Sung-Sik Yoon*

Dept. Biological Resources and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

¹Department of Biological Engineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 220-701, Korea

²Korean Basic Science Institute, Chuncheon 220-701, Korea

ABSTRACT

Starters of lactic acid bacteria(LAB) were isolated from the commercial yoghurt products and the four isolates have been studied on their identification and some physiological characteristics. For the purpose of identification, microscopic examination, API test, and 16s rRNA gene sequencing were conducted. Isolate A from a yogurt product of local dairy company A was shown to be Gram-positive rod-shaped bacterium. All strains isolated were turned out to be as *Lactobacillus paracasei* by using a API 50 CHL kit. In contrast, isolate A was identified as a strain of *Lactobacillus helveticus* based on the 16S rRNA sequencing data, and *L. casei* ssp. *casei* for both B and D and *L. paracasei* for C. All the isolates survived the simulated gastric juice, pH 2.0 within 3 hours and sharply decreased in viability so that no viable cell was observed after 4.5 hours incubation. In addition, the four isolated strains were almost identical in antibiotic susceptibility to six different kinds of antibiotics including erythromycin (15 µg), ampicillin (10 µg), gentamycin (10 µg), neomycin (30 µg), but rather resistant to colistin (10 µg) and streptomycin (10 µg). It was noteworthy that four isolates were confirmed to produce antibacterial substance against foodborne pathogens of Gram-positive *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Escherichia coli* 0157:H7 as test organisms based on the inhibitory zones on an MRS soft agar medium. At presence, the inhibitory factor is unknown so that further studies are required to ascertain the active factor responsible for the inhibitory activities.

Key words: Lactic acid bacteria, starters, drink-yogurt, identification, characterization

서 론

최근 전 세계적으로 마시는 요구르트 시장은 매년 15% 이상씩 증가하고 있으며, 최근(2005-2006) 통계에 따르면 연간 시장 규모가 77억 달러 정도로 추산된다(Elder, 2003). 국내외에서 판매되고 있는 다양한 형태의 발효유 제품 중에서 특히 유산균을 이용하여 발효시킨 발효유는 우리나라 국민 1인당 연간 섭취량이 10.3 kg이나 되며, 치즈의 경우에는 1.34 kg/인 정도로서 외식산업의 성장과 더불어 증가 추세에 있다(한국유가공협회 2006). 요구르트는 원유 또는 유제품을 유산균 또는 효모로 발효시켜 호상, 액상

및 동결한 제품으로서 무지 유고형분(nonfat milk solid)이 3% 이상인 것으로 정의된다. 국내 식품공전에는 우유, 산양유, 마유 등과 같은 포유동물의 젖을 원료로 하여 유산균이나 효모 또는 이 두 가지 미생물을 종균(스타터)으로 하여 발효시킨 제품에 향료, 과즙 등을 첨가하여 음용하기에 적합하게 만든 것으로 기술되어 있다. 유산균 발효유의 종류는 제품의 유형에 따라 액상발효유, 농후발효유, 크림발효유, 농후크림 발효유, 버터발효유로 구분될 수 있으며 국내에서는 주로 액상발효유와 농후발효유가 널리 소비되고 있다.

요구르트를 발효시키는 유산균(lactic acid bacteria)은 자연계에 널리 분포하는 미생물로서 김치를 비롯한 다양한 식품, 사료 및 발효 제품에서 발견된다. 기존의 연구 보고에 의하면 유산균은 nisin과 같이 병원성 세균의 증식을 저해하는 유용한 항세균작용(antibacterial activity)을 비롯

*Corresponding author : Sung-Sik Yoon, Dept. Biological Resources and Technology, College of Science and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea. Tel: 82-33-760-2251, Fax: 82-33-760-2803, E-mail: sunsik@yonsei.ac.kr

하여 인체에 대한 다양한 유용 효과를 발휘함으로써 그 잠재적 이용성이 매우 크고 현재 인간과 동물용 probiotics 제품으로 개발하기 위한 연구가 활발하게 추진되고 있다. 식품 발효에 이용되는 미생물 중에서 유산균은 이러한 기능성 probiotic 미생물로서 가장 주목되고 있는 유익한 세균으로서 인체에 대한 영양효과 뿐만 아니라 다양한 생리적 기능을 담당한다고 보고되었다(Sanders and Huis in't Veld, 1999). 전 세계적으로 probiotics 시장은 이미 2002-2005 사이에 46.9% 성장하였고, 이런 추세대로 라면 2010까지 32.6% 추가 성장이 예상된다. 우리나라에서도 probiotic 유산균(*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium longum* 등)을 이용하여 기능성 유제품을 개발하여 자사 제품을 차별화시키려는 각 유가공 업체 간의 경쟁이 치열하다. 따라서 요구르트와 같은 발효식품 제조에서 중요한 유산균들의 생육과 제품의 품질에 영향을 미치는 새로운 기능성 소재들의 개발은 매우 의미가 있으며(Suh *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2004) 이처럼 기능성 유산균을 산업적으로 이용하려는 노력은 비단 국내뿐만 아니라 외국의 발효유나 치즈산업에서도 활발하게 연구가 진행되고 있는 분야이다(Gilliland, 1984; Hayes *et al.*, 2007).

우리나라 국민들이 가장 선호하는 유제품인 요구르트의 제조에 이용되는 종균제(유산균 starter)는 국내에서 자체 개발하여 상업적으로 사용된 예가 거의 전무한 실정으로 대부분 Christian Hansen(홈페이지 자료), Danisco AS(홈페이지 자료) 등과 같은 외국의 종균회사에서 직접 구입하여 사용하고 있다. 국내 유가공 업체에서 외국 종균에 의존하는 가장 큰 이유 중의 하나는 미생물 이용 산업에서 가장 다루기 힘든 종균 관리를 피할 수 있으며, bacteriophage에 의한 발효 지연 또는 발효 정체 등과 같은 심각한 사고를 방지할 수 있기 때문으로 판단된다. 그러나 장기적인 관점에서 보면 국내의 종균관리 및 발효기술을 선진화하고 기능성 발효유 시장을 선점하기 위해서는 한국인은 물론 전 세계적으로 인정되는 유익한 유산균 종균을 탐색하여 이를 산업적으로 이용하는 방안이 바람직할 것이다. 따라서 본 연구에서는 우선 시중에서 다양한 상품명으로 판매되고 있는 액상발효유 제품의 종균을 확인하기 위하여 상업적으로 판매되고 있는 액상 발효유 제품을 수집한 다음 유산균의 균종과 그 생리적 특성을 연구한 결과이다.

재료 및 방법

요구르트 시료의 구입 및 유산균의 분리

2007년 6월 강원도 소재의 대형할인점에서 국내 발효유 제조업체(A, B, C, D로 표기함)에서 판매하고 있는 대표적인 액상발효유 제품을 각각 구입하였다. 유산균을 분리하기 위하여 각 요구르트 제품으로부터 시료를 1 mL씩

취하고 즉시 0.85% 생리적 식염수에 십진 희석하여 MRS 한천배지에 고르게 도말한 후 37°C에서 48시간 배양시켰다. 대략 개체수가 10⁶ CFU/mL 이상 되는 배지 상에서 자란 single colony를 백금으로 채취 후 그람 염색하여 현미경(Olympus model CH 663029, Japan) 검경으로 형태를 확인하였다.

피검균주의 배양

실험에 사용된 피검균주로는 병원성 세균인 *Staphylococcus aureus* KCCM 12103, *E. coli* O157:H7 ATCC 35150을 사용하였다. *S. aureus*는 brain heart infusion(BHI; Difco, Detroit, MI) 액체배지를 사용하여 37°C에 12시간동안 배양하였고, *Escherichia coli* O157:H7은 Luria-Bertani (LB; Difco, Detroit, MI)를 사용하여 37°C에서 12시간동안 배양하였다.

전자현미경 사진 촬영

MRS broth 중에서 대수증식기까지 자란 유산균 배양액을 7,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 모으고 0.1 M cacodylate buffer에 현탁하여 20분 동안 방치하였다. 그 후 4% glutaraldehyde 용액으로 1시간 동안 처리하고 상기 0.1 M cacodylate buffer 중에서 20분씩 2회 반복 처리하였다. 완충용액을 제거한 후 50% 에탄올에 15분간 담구고 10% 간격으로 농도를 올려가면서 90%까지 동일한 방법으로 처리하였다. 마지막으로 100% 에탄올 용액 중에서 15분 동안 처리하고 HMDS(1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane)으로 15분씩 2회 반복 처리하였다. 이것을 stub에 뿌린 후 건조하고 백금으로 coating하여 12 kV에서 SEM(Hitachi model LV-SEM S-3500N, 한국기초과학지원센터, 춘천) 사진을 촬영하였다.

분리 균의 동정

1) API test에 의한 동정. MRS 배지 상에 자란 colony를 조심스럽게 채취하여 API 50 CHL media(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)에 현탁하고, 잘 혼합한 현탁액을 API 50 CHL strip에 무균적으로 분주한 다음 37°C에서 24시간 및 48시간동안 배양한 후 각각의 당 이용성을 비교하였다. 즉 API 50 CHL kit에 들어 있는 49개의 탄소원에 대하여 37°C에서 48시간 배양하면서 미생물 증식에 의한 색의 변화 여부를 관찰하여 각 탄소원 이용 여부를 관찰하였고 동정결과는 Apilab Plus Software, Version 3.3.3(bioMérieux)를 이용하여 확인하였다.

2) PCR 동정을 위한 분리균주를 MRS 액체배지 중에서 37°C에서 15시간 간격으로 3번 계대 배양하였으며, 배양 후 원심분리하여 균체를 회수한 다음 genomic DNA는 DNeasyTissue Kit(Qiagen, USA)를 이용하여 분리하였으며, 추출된 DNA는 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

16s rRNA 염기서열 분석. 유산균 분리주의 16S rRNA gene은 ribosomal DNA primer database(Wilmotte 등, 1993)에 기술된 bacterial 16S rRNA 증폭용 forward primer F1 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 및 reverse primer R6 (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Bioneer, Daejeon, Korea) 을 사용하였다. PCR 실험은 thermocycler (Model PTC-100 TM, MJ Research Inc. Watertown, MA, USA)를 사용하였다. PCR 실험 조건은 다음과 같이 프로그램을 입력하였다. 초기 denaturation은 94°C, 2 min, 다음 94°C/30 sec, 51°C/30 sec, 72°C/1 min 으로 40 cycle, 마지막으로 72°C에서 10 min간 반응시켰다. PCR 후 생성된 1,498 bp product는 BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit 을 이용한 chain-termination dideoxynucleoside triphosphate 법(Sanger 등, 1977)으로 ABI 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Lennik, Belgium) 장비를 사용하여 염기서열을 정하였다. 염기서열의 similarity를 확인하기 위하여 Blast(Altschul, 1990) 검색을 실시하였다.

항균활성 실험

항균활성 실험은 Parret 등의 방법(2003)을 약간 수정하여 실험하였다. 즉, MRS 액체배지 중에서 대수증식기까지 자란 각 분리주 배양액 1 µL(10^8 - 10^9 cfu/mL)을 MRS 한천배지 상에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 시험균의 추가적 증식을 억제하기 위하여 chloroform 증기에 약 30분간 노출시킨 다음 즉시 지시균 *S. aureus* KCCM 12103가 10^8 cfu/mL 들어있는 55°C로 유지된 3 mL의 BHI soft agar(10% NaCl, 10% Bacto peptone, 5% yeast extract, 0.5% agar)를 증충하였고, *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 가 10^8 cfu/mL 들어있는 55°C로 유지된 3 mL의 Luria-Bertani soft agar(LB; Difco, Detroit, MI)를 사용하여 증충하였다. 그 위에 멸균된 paper disc를 올려 놓은 다음 각 분리주 배양액을 50 µL씩 적가하고 30분간 방치한 다음 37°C에서 하룻밤 동안 배양하면서 유산균 집락 주변에 생긴 투명한(clear zone)의 유무를 측정하였다.

항생물질 감수성 실험

각 분리 유산균의 항생제 감수성 실험은 Charteris 등(1998)이 기술한 증충법에 준하여 실험하였다. 즉, MRS 액체 배지에서 하룻밤 동안 키운 각 분리주를 0.3 g/L cysteine이 첨가된 soft MRS agar(0.75%, w/v) 배지와 잘 혼합한 후 bottom agar에 증충 평판한 다음 약 1시간 동안 방치하였다. 다음 6 종의 항생물질(ampicillin(10 µg), neomycin(10 µg), erythromycin(15 µg), streptomycin(10 µg), colistin(10 µg), gentamycin(10 µg))이 함유된 paper disc(BD BBL™ Sensi-Disc™를 올려 37°C에서 24시간 배양한 후 digital callipers(Mauser digital 2)를 이용하여 저지환의 크기를 측정하였다.

인공위액의 조제

인공위액(simulated gastric juice)의 조제 및 생존능 실험은(Corcoran 등, 2005)의 방법에 따라서 실시하였다. 우선 분리 균주를 15 mL MRS 액체 배지 중에서 하룻밤 증식시킨 다음 $4000 \times g$ 에서 20 min간 원심분리하였다. 침전시킨 균체를 동량의 4°C로 냉각시킨 5 mL의 PBS로 현탁하여 세균수를 대략 10^7 - 10^8 cfu/mL 수준으로 조정하였다. 분리균주 1 mL와 인공위액 1 mL을 현탁한 용액을 37°C로 180분간 가볍게 진탕하면서 1시간 간격으로 4.5시간 동안 시료를 취하였고, 채취한 시료는 즉시 0.85%(w/v) 생리적 식염수로 적당히 희석하여 MRS 한천배지 상에 평판 배양하고 24시간 후에 나타난 집락을 세균수로 계산하였다.

통계 처리

데이터의 통계분석 및 유의차 검정은 ANOVA(Statistical Analysis System, SAS, version 6.03)을 이용하였고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 계산하였다.

결 과

분리 균의 동정

선발된 균주들은 현미경으로 검경 결과 4균주 모두 Gram 양성, 장간균 형태로 관찰되었으며 전형적으로 *Lactobacillus* 속 세균으로 판단되었다. 추가로 분리주의 생리적, 생화학적 특성을 파악하기 위하여 API CHL 50 kit(bioMerieux)를 사용한 당 이용성을 실험하였다. Fig. 1 및 Table 1-2에 표시한 바와 같이 4 균주는 *Lactobacillus casei/paracasei*로 동정되었다. 그러나 분리주 B, C, 및 D에서는 adonitol이 positive(+)로 나왔지만 A주에서는 negative(-)로 나타났다. SEM사진 촬영을 통하여 얻은 형태적 특징을 파악하였다(Fig. 3). 분리주 A는 2.39 ± 0.09 µm(long) \times 581.66 ± 22.74 nm(width), B는 2.52 ± 0.16 µm \times 496.50 ± 31.93 nm, C는 2.23 ± 0.24 µm \times 461.56 ± 20.73 nm, D는 3.01 ± 0.1 µm \times 478.99 ± 3.08 nm로 측정되었다. 4개 분리주중 3주(B, C, D)는 16s rRNA 유전자 분석결과 *Lactobacillus casei/paracasei* ATCC 334(Mori 등, 1997, Makarova 등, 2006)의 sequence와 일

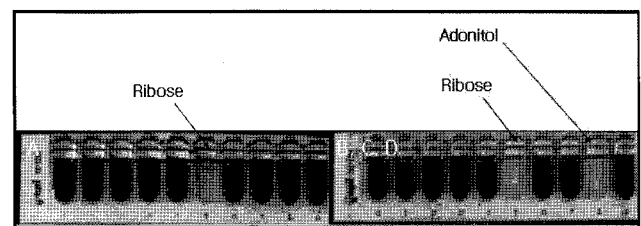


Fig. 1. Comparison of carbohydrate utilization patterns between LAB isolate A and B using API 50 CHL kit (API. bioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

Table 1. Carbohydrate utilization patterns of an Isolate A

Carbohydrates	Results	Carbohydrates	Results
Control	-	Esculin	+
Glycerol	-	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	-
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	-	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	-
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-xyloside	-	Melezitose	+
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Amidon	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	+	β-Gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	+
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucosamine	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl-glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdalin	-	2 ceto-gluconate	-
Arbutin	+	5 ceto-gluconate	-

Symbols denote positive(+) and negative(-) in sugar utilization patterns of API 50 CHL kit.

Table 2. Carbohydrate utilization patterns of an Isolate B

Carbohydrates	Results	Carbohydrates	Results
Control	-	Esculin	+
Glycerol	-	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	-	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	-
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	+	Inulin	-
β-Methyl-xyloside	-	Melezitose	+
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Amidon	+
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	+	β-Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	+
Inositol	-	D-Tagatose	+
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucosamine	+	L-Arabitol	-
N-Acetyl-glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	+	2 ceto-gluconate	+
Arbutin	+	5 ceto-gluconate	+

Symbols denote positive(+) and negative(-) in sugar utilization patterns of API 50 CHL kit.

치하였다. 단 A 분리주는 *Lactobacillus helveticus*(Naser 등, 2006)의 그것과 정확하게 일치하여 *L. helveticus*로 동정하였다.

항균활성 실험

항균활성 실험을 조사하기 위해 각각 LB 한천평판배지에 BHI 한천 평판 배지를 준비하고 *E. coli*(pH 6.7)는 LB soft agar에 접종하여 증충하였고, *S. aureus*(pH 6.7)는 BHI

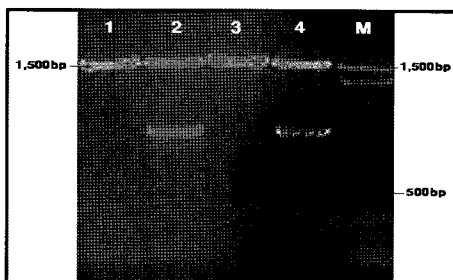


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the PCR products of the isolated starter strains from the commercial yoghurt products. Marker: 100 bp DNA ladder (Takara). Lanes: 1, Isolate A; 2, Isolate B; 3, Isolates C; 4, Isolates D.

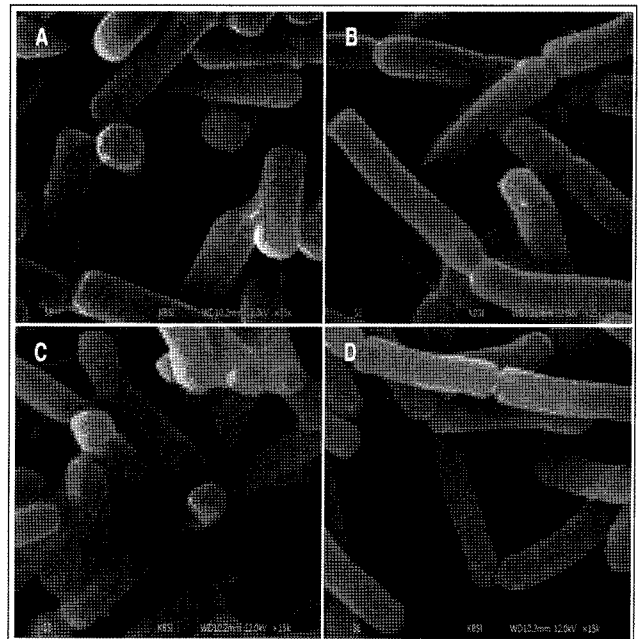


Fig. 3. Scanning electron micrograph of the isolated starter strains from the commercial yoghurt products. Size: A, $2.39 \pm 0.09 \mu\text{m}$ (long) \times $581.66 \pm 22.74 \text{ nm}$ (width); B, $2.52 \pm 0.16 \mu\text{m}$ \times $496.50 \pm 31.93 \text{ nm}$; C, $2.23 \pm 0.24 \mu\text{m}$ \times $461.56 \pm 20.73 \text{ nm}$; D, $3.01 \pm 0.1 \mu\text{m}$ \times $478.99 \pm 3.08 \text{ nm}$.

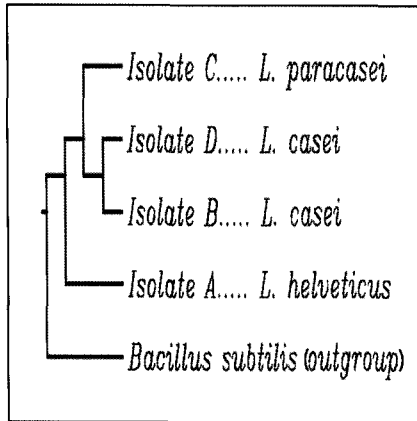


Fig. 4. Dendrogram showing the NJ tree of 5 LAB isolates and *Bacillus subtilis* C4 (accession EU 195328, NCBI, Bethesda, MD, USA) as an out-group.

soft agar에 접종하여 증충하였다. 약 30분 동안 실온에 방치하여 배지를 굳힌 후 멸균 paper disc를 올려놓고 그 위에 각 분리균주를 50 µL씩 접종하고 37°C에 24시간 배양하였다. 유산균 집락 주변에 clear zone이 형성되는 것을 확인하였다. 지시균으로 사용한 *S. aureus*에 대하여 각각 A주 2.7 cm, B주 3.0 cm, C주 3.0 cm, D주, 2.7 cm의 저지환을 보여 주었다. 한편 그람 음성인 *E. coli* O157:H7에 대하여는 각각 A 1.8 cm, B주 2.0 cm, C주 1.9 cm, D주 1.8 cm의 저지환을 나타냈다(Fig. 5).

항생물질에 대한 감수성 측정

항생제 감수성을 조사하기 위해서 MRS soft agar 배지에 4종의 유산균 스타터 분리주(A, B, C, D)를 각각 접종하고 증충한 후 항생제 paper disc(BBL™ Sensi-Disc™, BD Biosciences, USA)를 사용하여 항생제 감수성을 비교하였다. 6종의 항생제(ampicillin(10 µg), neomycin(10 µg), erythromycin(15 µg), streptomycin(10 µg), Colistin(10 µg), gentamycin(10 µg)를 paper disc 방법으로 조사한 결과 Fig.

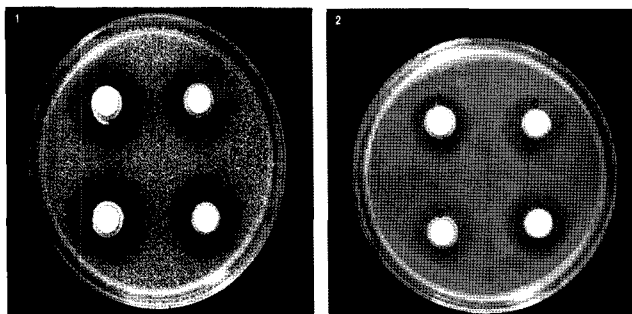


Fig. 5. Antimicrobial activity of the isolated LAB starter strains against *Staphylococcus aureus* KCCM 12103 (1) and *E. coli* 0157:H7 (2) (Isolate A (50 µL), Isolate B (50 µL), Isolates C (50 µL), Isolates D (50 µL)).

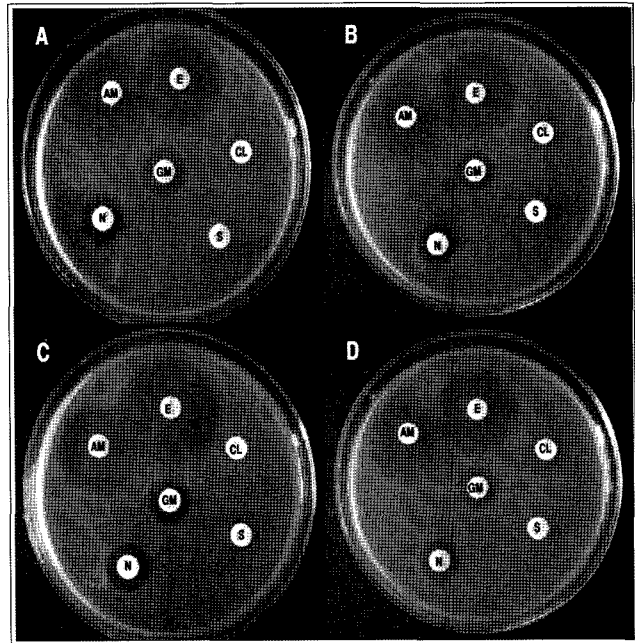


Fig. 6. Antibiotic susceptibility test of the isolated LAB starter strains from the commercial yoghurt products. The disc impregnated with varying levels of individual antibiotics were placed on a 0.7% MRS soft agar plate with each LAB isolate as indicator organism and incubated for 48 hr. Antibiotics: E, erythromycin (15 µg); AM, ampicillin (10 µg); GM, gentamycin (10 µg); N, neomycin (30 µg); S, streptomycin (10 µg); CL, colistin (10 µg).

6에 나타난 바와 같이 각 분리주는 erythromycin(15 µg), ampicillin(10 µg), gentamycin(10 µg), neomycin(30 µg)에 대한 감수성을 나타내는 반면 colistin(10 µg)과 streptomycin(10 µg)에 대해서는 내성을 가지고 있음을 확인하였다.

인공위액 내성 실험

일반적으로 섭취한 유산균이 장에 도달하기 위해서는 위산에 대한 충분한 내성을 가져야 한다고 보고되었다. 위산에 대한 내성을 측정하는 수단으로 인공위액을 이용하여 간접적으로 측정된 다수의 연구 결과가 발표된 바 있다. 본 연구에서도 분리한 4종의 유산균 스타터에 대하여 인공위액에 대한 내성을 측정하였다(Table 1). Pepsin과 HCl을 혼합하여 pH 2.0의 인공위액을 조제하고 하룻밤 동안 배양시킨 배양액 1 mL과 상기 인공위액 1 mL을 충분히 혼합한 후 37°C로 180분간 진탕배양하면서 1시간 간격으로 측정된 결과, 1.5시간 후에는 4.5×10⁴ cfu/mL, 3시간 후에는 1.8×10¹ cfu/mL로 나타났으나 4.5시간 이후에는 집락을 확인하지 못하였다. 따라서 이들 유산균 스타터들이 실제로 위장에서 생존할 가능성이 매우 낮을 것으로 추측되었다(Table 3).

Table 3. Survival of the LAB isolated strains in simulated gastric juice, pH 2.0

LAB isolates	Incubation time, 37°C				pH of gastric juice
	0 hr	1.5 hr	3 hr	4.5 hr	
A	5.1×10^6 cfu/mL	4.5×10^4 cfu/mL	1.8×10^1 cfu/mL	0	2.0
B	4.8×10^6 cfu/mL	4.2×10^4 cfu/mL	1.6×10^1 cfu/mL	0	2.0
C	5.3×10^6 cfu/mL	4.5×10^4 cfu/mL	1.7×10^1 cfu/mL	0	2.0
D	5.0×10^6 cfu/mL	4.3×10^4 cfu/mL	1.7×10^1 cfu/mL	0	2.0

Each isolated strains were thoroughly mixed with simulated gastric juice (see materials and methods), pH 2.0. During incubation with slight agitation at 37°C, viable cells were determined for the samples taken at every 90 min.

고찰

인간의 장관 내에는 적어도 100종 이상의 미생물과 100억 마리 이상의 세균이 존재하며, 이러한 다양한 미생물은 장관 점막을 구성하는 장벽으로 인식되고 있다. 장관에 서식하는 다양한 미생물들은 유익한 종과 해로운 것으로 대별할 수 있고 이들 간의 이상적인 균형을 유지하는 것이 인체 건강에 상당한 영향을 미친다고 알려져 있다. 현재 전 세계적으로 기능성 시장이 크게 성장하고 있는 추세이므로 기능성 probiotics 시장 또한 그 성장 잠재성이 매우 크다고 판단된다(Rastall and Martin, 2002). 일본의 경우에는 후생성으로부터 400여종의 식품이 기능성 식품으로 인가를 받았으며 그 대부분은 probiotics를 함유한 발효유 제품이다(Saito, 2004).

유산균이 probiotics로서 효능이 인정되기 위해서는 미생물학적 안전성(safety)을 비롯한 여러 가지 바람직한 조건들이 고려되어야 한다(Heller, 2001). 그중에서도 특히, 섭취한 유산균이 사멸되지 않고 위장관을 통과하여 생존하는 능력을 추정하기 위해 인공위액을 이용한 실험방법이 섭취한 유산균의 바람직한 효능을 파악하는 간접적인 지표로 사용되어 왔다(Fuller, 1992). 실제로 성인의 위장 pH는 매우 낮은 뿐만 아니라 위산분비에 따른 항균효과 때문에 소장으로 유입되는 미생물의 생존을 위협하는 장벽이다(Vizoso *et al.*, 2006). 인체의 위액은 pH가 1.4-2.0 정도로 대부분의 미생물을 사멸시키지만 섭취된 음식물의 완충작용으로 인하여 pH의 변화가 생겨서 어느 정도 미생물의 사멸을 감소시킬 수도 있다. 본 연구 결과 인공위액(pH 2.0)에서는 유산균 중균이 모두 사멸하였으나, pH 3.0의 인공위액에서는 분리군주에 따라서 약간의 차이가 있는 것으로 나타났다. 그러나 식품에 함유된 성분에 따라서 위장의 pH가 크게 영향을 받으므로 인공위액으로 실험한 결과만으로는 위장 통과 시 얼마나 사멸되는지 판단하기 어렵다는 의견들이 제안되었다(Charteris *et al.*, 1998; Conway *et al.*, 1987; Huang and Adams, 2004). 분명한 사실은 위산에 대한 약한 내성은 실제로 위장에서의 생존에 불리하며 쉽게 사멸할 가능성이 높다 하겠다. 그러나 완충효과를 가지는 타 식품과 같이 섭취할 경우 산에 의한

사멸로부터 보호 받아 생존율이 상당히 개선될 것으로 판단된다.

소장에 존재하는 담즙(bile salts) 및 소화효소(pancreatin)는 유산균이 극복해야 할 또 하나의 장해 요인이다(Dare 등, 1972). 대략 소장의 pH는 8.0 정도(Titus *et al.*, 1991)로 알려져 있다. 비결합성 담즙산염(unconjugated bile salts)은 비록 낮은 농도로 존재한다 하더라도 미생물의 증식을 상당히 억제할 수 있다고 보고되었다. 세균의 증식을 억제하는 담즙의 한계 농도를 측정한 실험에서 Gilliland 등(1984)은 0.3%의 담즙산이 내성 미생물을 선발하는 기준 농도라고 보고하였다. 그 외에도 미생물이 숙주에게 유용한 효과를 제공하기 위해서는 장관 부착능(colonization)이 중요하다. 연구보고(Havenaar *et al.*, 1992)가 있으나, 장부착성 실험은 추후 연구를 통하여 비교할 예정이다.

한편 *L. casei*는 그람 양성 통성혐기성(facultative) 헤테로형 젖산 발효를 담당하는 세균으로 유제품, 육제품, 밀가루 반죽(dough), 사일리지(silage), 하수구 등 다양한 서식처에서 발견된다. *L. casei*는 원래 5개의 아종, 즉 *L. casei* ssp. *casei*, *alactosus*, *pseudoplantarum*, *rhamnosus*, 및 *tolerans*가 보고되었다. 그러나 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(2001)에서는 5개 아종에서 *L. alactosus*를 *L. casei*로 통합하고 4개만으로 재분류하였다. 1989년 Collins 등은 DNA-DNA 유사성을 기초로 3개로 분류한 바 있으며, 1991년 Dellagio 등은 *paracasei* 종의 삭제를 주장하였다. 한편 1996년 Dicks 등은 *L. zeae*는 수정되어야 하며 *L. casei* ATCC 134도 *L. casei* ssp. *casei*의 new strain으로 변경해야 하고 *paracasei*는 삭제하여야 한다고 발표하였다. 1997년 Mori 등은 *L. casei* 16s rRNA 서열을 근거로 *L. zeae*(*L. casei* 포함), *L. paracasei*(*L. casei* ATCC 334 포함), *L. rhamnosus*의 3개 아종으로 구분해야 한다고 주장한 바 있다. 본 연구에서는 *L. casei/paracasei*로 확인된 3개의 스타터 분리주가 거의동일한 생리적 특성을 보여 종(species)의 수준에서는 구별하기 어려웠다. 따라서 아종(subspecies) 차원에서 더 상세한 동정결과를 얻고자 16s rDNA sequence data를 이용한 alignment를 수행하였다. 그 결과 4개 스타터 중에서 3개사의 요구르트 스타터가 *L. casei*로 동정되었으나, clustralW를 이용한

multi-alignment를 실시한 결과 2개는 *L. casei* ssp. *casei*로 다른 하나는 *L. paracasei*로 나타났다. 따라서 2개 회사는 요구르트 발효용 중균제의 사용에 있어서 완전하게 동일한 스타터를 사용하고 있었으며, 1개 회사는 거의 구별이 어려울 정도로 유사한 균주를 사용하고 있는 것으로 나타났다. 그 외 추가로 몇 개의 회사의 요구르트 제품에서 분리한 유산균 스타터를 본 연구에서 사용한 동일한 방법으로 동정하였으나 거의 비슷한 결과를 확인하였다(data not shown). 결과적으로 국내의 유가공 회사들이 거의 유사한 균주를 구입하여 사용하는 것으로 생각되었으며 각 제조원별로 요구르트 제품의 미생물학적 차별성을 인정하기 어려웠다. 향후 국내 유가공 회사 별로 생산되는 중균의 사용을 주기적으로 모니터링 하여 그 기능성을 객관적으로 평가할 필요가 있다고 생각된다.

참고문헌

- Annabel, H., Parret, A., Schoofs, G., Proost, P., and De Mot, R. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 897-908.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Bergey's manual of systematic bacteriology. Boone, David, R., Castenholz, and Richard, W. (eds.) Williams and Wilkins, 2nd ed., 2001.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. (1998) Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 759-768.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. (1998) Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Let. Appl. Microbiol.* **26**, 333-337.
- Chou, L. and Weimer, B. (1999) Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **82**, 2331-2335
- Conway, P. L., Gorbach, S. L., and Goldin, B. R. (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70**, 112-116.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2005) Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3060-3067.
- Dare, R., Magee, J. T., and Mathison, G. E. (1972) *In-vitro* studies on the bacteriocidal properties of natural and synthetic gastric juices. *J. Med. Microbiol.* **5**, 395-406.
- Elder, R. (2003) Drinkable yogurt beats the bagel. *Drug Store News.* **25**, 42-50.
- Ennahar, S., Cai, Y., and Fugita, Y. (2003) Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 441-451.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
- Fuller, R. (1992) Probiotics: The scientific basis. Chapman & Hall, London.
- Gilliland, S. E., Staley, T. E., and Bush, L. J. (1984) Importance in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J Dairy Sci.* **67**, 3045-3051.
- Havenaar R. and Huis in't Veld J. (1992) Probiotics: A general view. In: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. pp. 151-170.
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2007) Review: putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview. *Biotechnol. J.* **2**, 426-34.
- Heller, K. J. (2001) Probiotic bacteria in the fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**(suppl), 374-379.
- Huang, Y. and Adams, M. C. (2004) *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **91**, 253-260.
- Huis in 't Veld, J., Drost, J. S., and Havenaar, R. (1982) Establishment and localization of mixtures of *Streptococcus mutans* serotypes in the oral cavity of the rat. *J. Dent. Res.* **61**, 1199-1205.
- Kwon, T. Y. and Lee, J. H. (2004) Characterization of the *scr* gene cluster involved in sucrose utilization in *Bifidobacterium longum*. *Kor. J. Microbial. Biotechnol.*, **32**, 199-205.
- Dicks, L. M. T., DU Plessis, E. M., Dellaglio, F., and Lauer, E. (1996) Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **46**, 337-340.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goldstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J. H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., and Mills, D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 15611-15616.
- Mori, K., Yamazaki, K., Ishiyama, T., Katsumata, M., Kobayashi, K., Kawai, Y., Inoue, N., and Shinano, H. (1997) Comparative sequence analysis of the genes coding for 16s rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 54-57.
- Naser, S. M., Hagen, K. E., Vancanneyt, M., Cleewerck, I., Swings, J., Tompkins, T. A., Cachat and Priest B. (2006) *Lactobacillus suntoryeus* is a later synonym of *Lactobacillus*

- helveticus* (Orla-Jensen 1919). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 355-360.
25. Rastall, R. A. and Martin, V. (2002) Probiotics and symbiotics: towards the next generation. *Current Opinion Curr. Biotechnol.* **13**, 490-496.
 26. Saito, T. (2004) Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. *Animal Science. J.* **75**, 1-13.
 27. Sanders, M. E. and Huis in't Veld, J. (1999) Review: Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **76**(1-4), 293-315.
 28. Suh, H. J., Kim, Y. S., Kim, J. M., and Lee, H. (2006) Effect of mulberry extract on the growth of yogurt starter cultures. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.*, **26**, 144-147.
 29. Vlez, M. P., Hermans, K., Verhoeven, T. L., Lebeer, S. E., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. (2007) Identification and characterization of starter lactic acid bacteria and probiotics from Columbian dairy products. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 666-674.
 30. Vizoso, P., Pinto, M. G., Franz, C. M., Schillinger, U., and Holzapfel, W. H. (2006) *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.*, **109**, 205-214.
 31. Wilmotte, A., Van der Auwera, G., and de Wachter, R. (1993) Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic *Cyanobacterium chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Lett.* **317**, 96-100.
 32. Zhou, X., Pan, Y., Wang, Y., and Li, W. (2007) *In vitro* assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, **B8**(9), 686-692.
 33. 한국유가공협회(Korea Dairy Industries Association) 홈페이지 자료. <http://www.koreadia.or.kr>, 2007.
 34. 홈페이지 자료 Christian Hansen(<http://www.chr-hansen.com>).
 35. 홈페이지 자료 Danisco AS(<http://www.danisco.com>).

(2007. 11. 26. 접수/2007. 12. 12. 채택)