



원유에서 분리한 *Lactobacillus zeae* RMK354의 생리적 특성 및 ACE 억제능

임상동* · 김기성 · 도정룡
한국식품연구원

Physiological Characteristics and ACE Inhibitory Activity of *Lactobacillus zeae* RMK354 Isolated from Raw Milk

Sang-Dong Lim*, Kee-Sung Kim, and Jeong-Ryong Do
Korea Food Research Institute

Abstract

In order to develop a new starter for fermented milk, 1037 bacterial strains were isolated from raw milk. The strain that showed excellent acid producing and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity (88.6%) was selected and identified as a *Lactobacillus zeae* based on the result of API carbohydrate fermentation pattern and 16S rDNA sequence. *Lactobacillus zeae* RMK354 was investigated further to study its physiological characteristics. It showed strong ACE inhibitory activity compared with commercial LAB starters tested. The optimum growth temperature of *L. zeae* RMK354 was 40°C and it took 10 hr to reach pH 4.3 under this condition. *L. zeae* RMK354 showed more sensitive to penicillin-G, bacitracin, novobiocin, in a comparison of 14 different antibiotics, and showed most resistance to polymyxin B and vancomycin. It showed higher esterase and leucine arylamidase activities compared with 16 other enzymes. It was comparatively tolerant to bile juice and able to survive at pH 2 for 3 hr. It showed inhibitory activity against *Salmonella* Typhimurium with the rate of 60%. Based on these and previous results, *L. zeae* RMK354 could be an excellent starter culture for fermented milk with high level of ACE inhibitory activity.

Key words : ACE inhibitory activity, *Lactobacillus zeae*, physiological characteristics, fermented milk

서론

현대 성인병의 대표적인 질환인 고혈압의 대부분을 차지하고 있는 본태성고혈압은 renin-angiotensin계가 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다. 즉 angiotensinogen이 renin의 특이적 분해를 받아서 angiotensin I을 생성하는데, 이는 다시 angiotensin 전환효소(ACE)에 의하여 혈관수축작용을 하는 angiotensin II를 생성한다. ACE는 또한 혈관이 완작용을 가진 bradykinin을 분해하여 불활성화시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승하는 역할을 한다. 이와 같이 혈압의 상승에는 ACE의 관여가 크므로 혈압의 강하에는 ACE의 저해가 필수적이고, 또한 ACE 저해제들이 고혈압 치료제로서의 개발가능성이 제시되면서 고혈압 예방 및 치료에 있어서 ACE 저해제의 중요성이 부각되고 있다.

1977년 ACE의 강력한 저해제인 captopril(2-D-mercapto-propanoyl-L-proline)이 개발되었고 이후 enalapril, benazepril 등 수종의 ACE 저해제가 상품화되어 고혈압 치료제로서 이용되고 있으나 마른기침, 식욕부진, 미각이상, 발진, 백혈구 감소 등 각종 부작용이 많다(水島裕, 宮本昭正, 1996).

식품산업에서 젖산균에 의한 우유 발효는 물론 식품 단백질의 효소분해로부터 분리된 ACE 억제물질은 기능성 식품으로 부각되고 있다. 현재 스타터 젖산균에 의해 우유 발효중 방출된 bioactive peptide는 상당한 관심이 되고 있다. Smacchi와 Gubbetti(2000)는 선발균주인 *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*가 항고혈압 peptide를 생성하였다고 하였으며, *Lactobacillus helveticus*와 *Saccharomyces cerevisiae*로 제조된 칼피스는 항고혈압 bioactive peptide를 함유하였고 생체실험에서 ACE의 억제와 혈압 감소를 보였다고 하였다.

우유발효의 스타터인 젖산균은 세포표면 단백질분해효소를 합성하고 유단백을 가수분해하며 배지에서 일부 peptide

*Corresponding author : Sang Dong Lim, Korea Food Research Institute, Sungnam 463-746, Korea. Tel: 82-31-780-9082, Fax: 82-31-780-9160, E-mail: limsd@kfri.re.kr

를 방출할 수 있다(Gilbert *et al*, 1997). Peptide는 박테리아 성장에 모두 사용되지 않기 때문에 많은 양의 peptide가 발효 중에 축적된다(Juillard *et al*, 1995). 스타터로서 *L. helveticus*로 발효된 일부 유제품은 *in vivo*상에서 항고혈압 활성이 입증되었다(Sipola *et al*, 2002). 국내에서는 한 유업체에서 혈압을 낮추는 발효유가 출시되고 있으나, 주요 발효 균주는 수입에 의존되고 있는 실정으로 국내에서 개발된 젖산균을 이용하여 제품을 만듦으로써 젖산균의 수입 대체효과와 더 나아가 외국에 수출할 수 있는 국제경쟁력을 키울 수 있으리라 여겨진다. 본 연구는 ACE 억제활성능이 우수한 젖산균을 원유에서 분리하고 선발하여 기능성 발효 유 제품의 스타터로서 적합한지 알아보기 위해 *L. zeae* RMK354의 생리적 특성을 확인하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

전국 가축위생시험소(경기, 경북, 전북)와 축산진흥원(제주도)에 들어와 있는 목장원유를 수거하여 modified MRS 배지(Table 1)에 0.1mL씩 평면도말법으로 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 형성된 각 균락을 modified MRS 배지에서 순수분리하고, 노란색으로 변한 균락을 잠정적 젖산균으로 선발하였다. 선정된 균주는 modified MRS 배지에 백금으로 3회 streaking한 후 호기 배양하여 순수분리 하였다. 순수 분리된 균주는 10% 환원 탈지유(Difco Laboratories, USA)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하여 응고여부를 확인하였다. 양성반응을 보이며 pH 4.4에 도달하는 균주를 선발하였다.

ACE 억제활성 측정

가. Whey fraction 조제

발효유 중 우유의 ACE 억제활성을 측정하기 위하여

10% skim milk에 젖산균 1% 접종하여 배양해서 얻어진 커드를 6,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상층액을 whey fraction으로 사용하였다.

나. ACE 억제활성 측정법

Cushman과 Cheung(1971)의 방법에 준하여 실시하였다. NaCl을 0.3 M 함유한 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)에 기질 Hip-His-Leu 2.5 mM을 녹인액 50 μ L, ACE 50 μ L와 whey fraction 50 μ L를 혼합하였으며, 대조구는 whey fraction 대신 증류수 50 μ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1 N HCl 250 μ L 첨가로 반응을 중지시켰다. 다시 여기에 ethylacetate 1.5 mL를 가하여 15초간 교반한 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리시켜 상정액 1 mL를 취하였다. 이 상정액을 121°C에서 30분간 가열하여 완전히 건조시킨 뒤 증류수 3 mL를 가하여 용해시킨 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = 1 - \frac{(S - S.C)}{(C - C.C)} \times 100$$

S : 시료의 흡광도

S.C : 시료 대조구의 흡광도

C : blank의 흡광도

C.C : blank의 대조구 흡광도

선정된 균주의 동정 및 DNA sequencing

분리·선정된 젖산 균주는 MRS 액체배지에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등(1992)의 방법에 의하여 실시하였다. 순수 분리된 균주는 Gram염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장, catalase생성, 15°C 및 45°C에서의 성장, glucose로부터 가스 생성, arginine으로부터 ammonia생성, 현미경 관찰과 API 50CHL kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 49종의 당 발효 실험을 실시하였다. 젖산균의 DNA sequence는 universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, solgent EF-Taq을 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭과정은 95°C, 15분을 한 후 95°C, 20초; 50°C, 40초; 72°C, 1분30초를 30회 시행하였으며 72°C, 5분으로 마무리 하였다. 서열분석은 PCR product를 solgent PCR purification kit로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer로 자동분석 하였다.

recA 유전자 증폭을 위한 PCR primer 디자인

recA 유전자를 증폭하기 위한 primer 디자인을 위하여 시료(*Lactobacillus* sp.)의 16S rDNA 서열 분석 결과를 토대로 대상 균주를 선택하였다. 16S rDNA 염기서열 분석 결과, 대상 균주인 *Lactobacillus*는 *L. zeae*와 *L. casei*가 동

Table 1. Composition of modified MRS agar

Component	gram/L
Proteose peptone #3	10.0
Beef extract	10.0
Yeast extract	5.0
Lactose	20.0
Tween 80	1.0
Ammonium citrate	2.0
Sodium acetate	5.0
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.05
Dipotassium phosphate	2.0
Sodium azide	0.25
Bromocresol purple	0.04
Agar	15.0

일하게 99%의 nucleotide 상동성을 보였다. 이 결과를 토대로 NCBI GenBank(<http://www.ncbi.nih.gov/>)로부터 *L. zeae*(Accession No. = AJ286121)와 *L. casei*(Accession No. = NC_010999)에 대한 *recA* 유전자 염기서열을 얻은 후 비교하여 PCR primer를 디자인하였다. 디자인된 primer 서열은 다음과 같다.

LrecA-F : 5'-GAT GGA TCC GAA GTA TGC GGC-3'
LrecA-R : 5'-CCA AAC ATC ACG CCA ACT TTT TC-3'

recA 유전자의 PCR 증폭, 정제 및 염기서열 분석

recA 유전자의 PCR 증폭을 위한 주형 DNA는 대상 균주로부터 SolGent Genomic DNA prep kit(SolGent, Korea)를 이용하여 manual에 제시된 방법으로 genomic DNA를 분리하였다. 반응액 25 µL에 100 ng의 genomic DNA와 0.625U의 EF-*Taq* DNA polymerase(SolGent, Korea), 각각 5 mM의 dNTP mix(SolGent, Korea), 그리고 각 10 pmole의 LrecA-F와 LrecA-R primer를 첨가한 후, 95°C, 20초/58°C, 40초/72°C, 1분(30 cycles)의 조건으로 PCR 반응을 수행하였다. PCR 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 전기영동법을 이용하여 확인하였다. 확인된 증폭 산물을 SolGent PCR purification kit를 이용하여 manual에 제시된 방법으로 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 BigDye Terminator Ver. 3.1(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열 분석을 위한 반응을 하였고, ABI 3730XL DNA analyzer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열이 분석되었다. 얻어진 *recA* 유전자의 염기서열을 BlastN(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)분석을 통하여 상동성 검색을 수행하였다.

젖산균의 생장

젖산균의 생장은 생균수, pH를 측정하여 실험하였다. 생균수는 10% 환원탈지유 200 mL에 젖산균을 50 µL(9.6×10^5 /mL) 접종한 후 34°C, 37°C, 40°C에서 3시간 간격으로 24 시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에 부어 균현 후 37°C에서 48 시간 배양하여 계수하였다.

항생제 내성

항생제 내성 시험은 tryptic soy broth(Difco, USA)를 사용하여 2배 희석방법에 의해 16종의 항생제에 대한 *L. zeae* RMK354의 최소 생육 저해 농도(MIC, minimal inhibitory concentration) 값으로 측정하였다.

효소활성

효소활성 실험은 MRS 액체배지에서 37°C, 18시간동안 배양한 균주를 생리식염수로 희석하여 10^5 - 10^6 CFU/mL 수

준의 시료를 조제한 후 API ZYM kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 37°C에서 5시간 배양한 다음 효소반응 시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0-5의 수치로 나타내었다.

담즙내성

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 따라 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 후 liquid paraffin oil을 증충한 다음 MRS액체배지에서 37°C, 18시간 배양하였다. 배양된 균주를 0.3% oxgall이 첨가된 MRS액체배지와 첨가되지 않은 MRS액체배지에 각각 1% 접종하여 37°C에서 시간별로 anaerobic jar에서 혐기조건으로 배양하여 OD₆₂₀값을 측정하였다.

pH 내성

Clark 등(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 2, 3, 4 용액과 대조구로서 pH 6.4 용액을 제조하였고, 제조된 pH 용액 10 mL에 0.05% cysteine이 함유된 MRS액체배지에서 37°C, 24시간 배양된 각각의 균주 1 mL씩을 섞은 후 37°C에서 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 37°C, 48시간 혐기 배양한 다음 계수하였다.

항균력

Gilliland와 Speck(1977)의 방법에 따라 *L. zeae* RMK354의 항균력 실험을 하였으며 사용한 지시균은 병원성균인 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* 등이다.

결과 및 고찰

젖산균의 분리 및 선발

전국 가축위생시험소(경기, 경북, 전북)와 축산진흥원(제주도)에 들어와 있는 목장별 원유를 멸균된 peptone용액으로 단계희석하고, modified MRS 배지를 사용하여 노란색 집락을 형성하는 1,505개의 단일 균락을 분리하였고 잠정적으로 젖산균이라 추정하였다. 순수 분리된 균주는 10% 환원 탈지유에 접종하고 37°C에서 18시간 배양한 후 응고여부를 확인하였다. 양성반응을 보이며 pH 4.4에 도달하는 균주 512개를 선발하였다.

ACE 억제활성균주 선발

원유에서 분리된 젖산균과 상업용 젖산균 1%를 10% 환원탈지유에 37°C에서 pH 4.4에 도달할 때까지 배양한 다음 각각에서 얻어진 유청으로 ACE 저해율을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

분리된 젖산균 RMK354 균주의 ACE 저해율이 88.6%인 반면 상업균주의 ACE 저해율은 44.3-84.8%를 나타내

Table 2. ACE inhibitory ratio in the 10% reconstituted skim milk added 1% lactic acid bacteria at 37°C

Strains	Source	ACE inhibitory ratio (%)
<i>L. acidophilus</i> ¹⁾	NCFM, Rhone-poulenc	55.4±5.6
<i>L. acidophilus</i> ¹⁾	Culture systems. Inc.	53.1±3.4
<i>Streptococcus thermophilus</i> ¹⁾	Culture systems. Inc.	44.3±5.4
<i>L. acidophilus</i> ¹⁾	NCFM, Rhone-poulenc	48.7±2.1
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	ATCC 21053	63.1±3.4
<i>L. cremoris</i>	KFRI 00349	62.6±3.3
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i>	ATCC 7830	73.1±7.6
<i>L. bulgaricus</i>	ATCC 33409	84.8±3.4
<i>L. amylophilus</i>	NRRL B-4437	74.5±4.6
<i>L. reuteri</i>	KFRI 00661	82.5±6.3
<i>L. zeae</i> RMK354	This study	88.6±1.8

¹⁾Commercial lactic acid bacteria
pH of fermented milk incubated : 4.4

었고, 또한, Ashar과 Chand(2003)가 ACE 억제를 목적으로 *in vitro*상에서 22개의 젖산균을 선발하여 이들 중 *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*와 *Lactobacillus helveticus* whey fraction에서 ACE 억제율이 72%와 78%라고 한 것에 비교해서도 RMK354 균주가 ACE 저해율이 매우 우수하였다.

선발된 젖산균의 동정 및 DNA sequence

선발된 RMK354의 genus와 species를 결정하기 위하여 생리적, 생화학적 시험을 하였다. 선발된 RMK354은 Gram 양성을 나타내었고 현미경으로 관찰 시 rod 형태의 homo 균이며, 산소유무와 상관없이 잘 성장하였고, catalase와 운동성은 음성으로 나타났다. 또한 15°C와 45°C에서 성장하였으며, glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니아를 생성하지 않아 genus *Lactobacillus*에 속하였다. Species를 정하기 위하여 API 50CHL kit(BioMereux, France)를 이용하여 49종의 당 발효 시험을 실시한 결과(Table 3) RMK354는 lactose 등 20종으로부터 산을 생성하였다. 그 결과를 ATB identification system에 입력한 결과 *Lactobacillus zeae*로 판명되었으며, 16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열분석 하였다(Fig. 1). 분석된 염기서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과 *L. zeae*와 *L. casei*가 공히 99%의 상동성을 보였다. 그러나 *Lactobacillus*의 분자적 계통 분류에는 16S rDNA에 대한 염기서열 분석 결과뿐만 아니라, *recA* 유전자의 염기서열을 이용하여 균 분류에 이용하는 것으로 알려져 있다(Shim and Lee, 2008; Torriani *et al.*, 2001). 이에 16S rDNA에서 가장 높은 상동성을 보인 두 *Lactobacillus* 균주에 대한 *recA* 유전자 염기서열을 비교하여 제작된 primer를 이용하여 대상 균주로부터 분리된 genomic DNA에 대하여 PCR 증폭한 결과, 예상하는 350 bp 크기의 PCR 증폭 산물을 확인하였다. 정제된 PCR

Table 3. Physiological characteristics of *L. zeae* RMK354

Gram reaction	+
Cell type	rod
Spore forming	-
Motility	-
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	+
Catalase reaction	-
Growth at 15°C	+
Growth at 45°C	+
Gas forming from glucose	-
Ammonia production from alginin	-
Acid production from	
Glycerol	- Salicin +
Erythritol	- Cellobiose +
D-Arabinose	- Maltose +
L-Arabinose	+ Lactose +
Ribose	+ Melibiose -
D-Xylose	- Saccharose +
L-Xylose	- Trehalose +
Adonitol	- Inulin -
β-Methyl-D-xyloside	- Melezitose +
Galactose	+ D-Raffinose -
D-glucose	+ Starch -
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-glucoside	- L-arabitol -
N-acetyl glucosamine	+ Gluconate -
Amygdalin	+ 2-keto-gluconate -
Arbutin	+ 5-keto-gluconate -
Esculin	+

```

Query: 5      ATACATGCA-GTCGAACGAGTTTTGGTCGATGAACGGTGCTTGCATCGTGATTCAATTTA 63
|||||
Sbjct: 24     ATACATGCAAGTCGAACGAGTTTTGGTCGATGAACGGTGCTTGCATCGTGATTCAACTTA 83
Query: 64     AAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACA 123
|||||
Sbjct: 84     AAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACA 143
Query: 124    TTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGA 183
|||||
Sbjct: 144    TTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGA 203
Query: 184    TGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG 243
|||||
Sbjct: 204    TGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG 263
Query: 244    GCTCACCAAGGCCATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGA 303
|||||
Sbjct: 264    GCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGA 323
Query: 304    GACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGT 363
|||||
Sbjct: 324    GACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGT 383
Query: 364    CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGG 423
|||||
Sbjct: 384    CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGG 443
Query: 424    AGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACG 483
|||||
Sbjct: 444    AGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACG 503
Query: 484    GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATT 543
|||||
Sbjct: 504    GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATT 563
Query: 544    GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCG 603
|||||
Sbjct: 564    GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCG 623
Query: 604    AGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG 663
|||||
Sbjct: 624    AGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG 683
Query: 664    TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCT 723
|||||
Sbjct: 684    TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCT 743
Query: 724    GTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC 783
|||||
Sbjct: 744    GTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC 803
Query: 784    CATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTA 843
|||||
Sbjct: 804    CATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTA 863
Query: 844    ACGCATTAAACGATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC 903
|||||
Sbjct: 864    ACGCATTAAACGATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC 923
    
```

Fig. 1. A comparison of 16S rDNA partial sequence of an isolated RMK354 with *L. zeae*. Query means RMK354 isolate and Sbjct means *L. zeae*.

```

Query: 904  GGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC 963
          |||
Sbjct: 924  GGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC 983
Query: 964  CAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGA 1023
          |||
Sbjct: 984  CAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGA 1043
Query: 1024 CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACG 1083
          |||
Sbjct: 1044 CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACG 1103
Query: 1084 AGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGT 1143
          |||
Sbjct: 1104 AGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGT 1163
Query: 1144 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA 1203
          |||
Sbjct: 1164 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA 1223
Query: 1204 CACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCT 1263
          |||
Sbjct: 1224 CACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCT 1283
Query: 1264 TAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCT 1323
          |||
Sbjct: 1284 TAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCT 1343
Query: 1324 AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGGCCTTGTACACACCGCCCG 1383
          |||
Sbjct: 1344 AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGGCCTTGTACACACCGCCCG 1403
Query: 1384 TCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTAGGGAGCGAGC 1443
          |||
Sbjct: 1404 TCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTAGGGAGCGAGC 1463
Query: 1444 CGTCTAA 1450
          |||
Sbjct: 1464 CGTCTAA 1470
    
```

Fig. 1. Continued.

산물을 염기서열 분석하여 BlastN을 이용하여 분석한 결과 *L. zeae*의 partial *recA*(AJ286121)와 nucleotide 수준에서 94%의 상동성을 보인 반면 *L. casei*는 83%를 나타내었다. 따라서 16S rDNA와 *recA* 유전자에 대한 염기서열 분석 결과를 근거로 대상 균주는 *L. zeae*라고 판단되어 *Lactobacillus zeae* RMK354로 명명하였다.

***L. zeae* RMK354의 성장**

Fig. 2에서 보는 바와 같이 *L. zeae* RMK354의 최적 성장온도를 알기 위하여 10% 환원탈지유 200 mL에 젖산균을 50 µL(9.6×10⁵/mL) 접종한 후 온도별로 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 결과 40°C에서 가장 빠른 성장을 보였다. Fig. 3은 24시간까지의 pH 변화를 나타낸 것으로 34°C 및 37°C에 비해 40°C가 가장 빠른 산 생성을 보였으며, 이 때 발효유의 최적 pH 조건인 pH 4.3에 도달하는데 10시간 소요되었다.

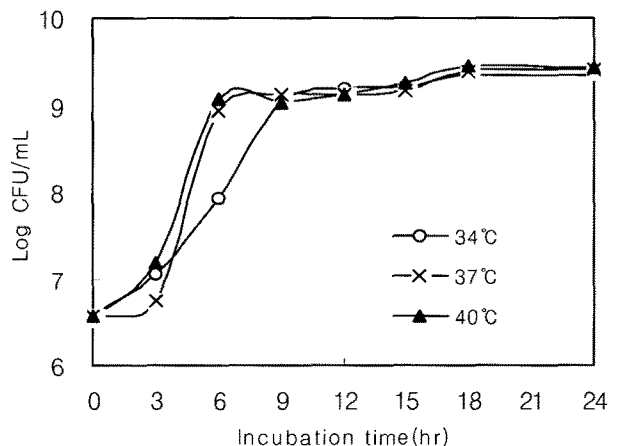


Fig. 2. Growth of *L. zeae* RMK354 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

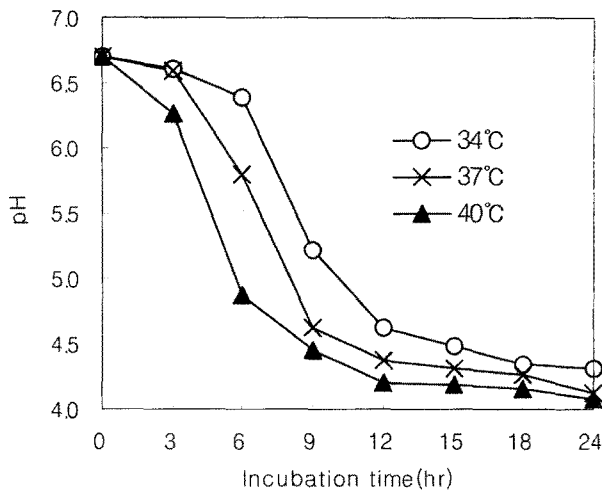


Fig. 3. pH change of 10% reconstituted skim milk during the growth of *L. zeae* RMK354 at various temperature.

L. zeae RMK354의 항생제 내성

치료 목적으로 섭취된 항생제에 의해서 프로바이오틱 균주가 사멸될 경우에 생체 내에서의 기능성이 낮아지게 되는데, 이러한 측면에서 항생제에 대한 내성은 매우 중요한 요소로 인식되고 있는 실정이다. 따라서 시중에서 이용되고 있는 총 16가지의 항생제에 대해 *L. zeae* RMK354 균주가 내성이 있는지를 Table 4에 나타내었다.

Park 등(1996)에 따르면 *Lactobacillus* 속 균주에 대한 항생제 내성 실험에서 ampicillin은 0.37 µg/mL, rifampicin은

Table 4. Antibiotics susceptibility of *L. zeae* RMK354

Antimicrobial Agents	Minimal inhibitory concentrations (µg/mL)
Aminoglycosides	
Amikacin	1.25
Gentamycin	1.25
Kanamycin	100
Neomycin	12.5
Streptomycin*	50
β-lactams	
Penicillin-G*	0.156
Methicillin	160
Oxacillin	7.5
Ampicillin	20
Gram-positive spectrum	
Bacitracin*	0.312
Rifampicin	30
Novobiocin	0.312
Lincomycin	20
Gram-negative spectrum	
Polymyxin B*	1200
Broad spectrum	
Chloramphenicol	10
Vancomycin*	1600

*units/mL.

0.5 µg/mL로 감수성을 나타내었다. 또한 Kim 등(2003)의 연구에 따르면 *Lactobacillus plantarum* KCTC3099에 대한 항생제 내성 실험에서 ampicillin은 <1 µg/mL, streptomycin은 <0.25 µg/mL, gentamycin은 ≤4 µg/mL, vancomycin은 <32 µg/mL으로 나타내었다고 보고된 반면 본 연구에서 분리한 *L. zeae* RMK354 균주는 ampicillin은 20 µg/mL, rifampicin은 30 µg/mL, streptomycin은 50 µg/mL, gentamycin은 1.25 µg/mL. 특히, vancomycin에 대한 항생제 내성의 MIC 농도는 1600 µg/mL으로 *Lactobacillus plantarum* KCTC3099와 비교했을 때 높은 내성을 나타내었다.

L. zeae RMK354의 효소활성

L. zeae RMK354의 효소활성 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. Esterase와 leucine arylamidase는 3을 나타내 다른 효소에 비해 높은 활성을 보인 반면, 유당을 glucose와 galactose로 분해시키는 유당분해효소인 β-galactosidase가 1을 나타냄으로써 효소활성이 약간 미약하였다. 한편 benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β-glucuronidase의 경우에는 효소활성이 0으로 나타나 안정된 젖산균임을 알 수가 있었다. Lee 등(2006)의 연구에서도 *Lactobacillus plantarum* NK181의 효소활성이 β-galactosidase에 대해서는 4를 나타낸 결과보다 미약하였지

Table 5. Enzyme activities of *L. zeae* RMK354

Enzymes	The value assigned*
Alkaline phosphatase	0
Esterase (C4)	3
Esterase lipase (C8)	2
Lipase (C14)	0
Leucine arylamidase	3
Valine arylamidase	0
Cystine arylamidase	0
Trypsin	0
Chymotrypsin	0
Acid phosphatase	0
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	1
α-galactosidase	0
β-galactosidase	1
β-glucuronidase	0
α-glucosidase	0
β-glucosidase	0
N-acetyl-β-glucosaminidase	0
α-mannosidase	0
α-fucosidase	0

*A value ranging from 0 to 5 is assigned to the standard color. Zero represents a negative; 5 represent a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength; 1 corresponds to the liberation of 5 nanomoles, 2 to 10 nanomoles, 3 to 20 nanomoles, 4 to 30 nanomoles and 5 to 40 nanomoles or more.

만, β-glucuronidase에 대해서는 0으로 안정성을 보인 결과와 유사하였다.

L. zeae RMK354의 담즙내성

담즙에 대한 *L. zeae* RMK354의 내성결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 7시간 동안 배양 후에 O.D.값이 0.3% oxgall을 첨가하지 않았을 때는 0.250, 0.3% oxgall을 첨가하였을 때는 0.252로 거의 영향을 받지 않음으로써 담즙내성이 있는 것으로 나타났다. Kim 등(2003)에 따르면 *Lactobacillus plantarum* KCTC3099의 담즙내성에 대한 반응시간대별 흡광도 변화를 측정된 결과, 배양 24시간 경과후의 흡광도에서 oxgall을 첨가하지 않은 대조구는 최고 O.D.₆₁₀값이 1.1을 보인 반면, 처리구들은 O.D.₆₁₀값이 0.5 정도의 수치를 나타내어, 담즙에 의해 저해를 받았다고 보고된 결과보다 우수한 결과를 보였다.

L. zeae RMK354의 pH 내성

유산균 미생물제로써 충분한 기능을 발휘하기 위해서는 pH 3 이하의 낮은 pH 조건의 위장관을 통과하여 소장내로 도달하여 생존하여야만 한다(Booth, 1985; McDonald *et al.*, 1990). 산에 대한 *L. zeae* RMK354의 내성 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 대조구인 pH 6.4의 균수와 비교한

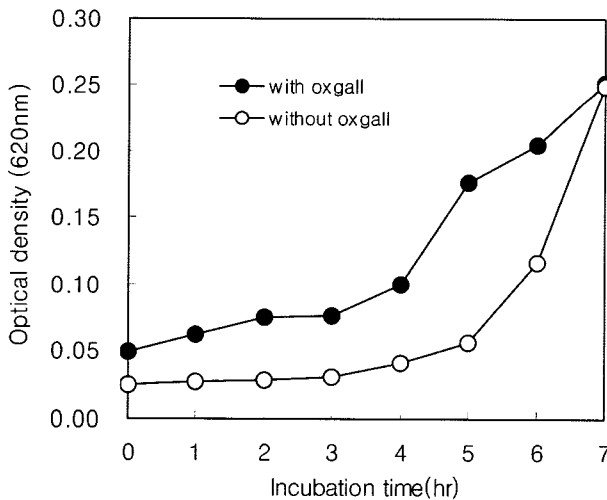


Fig. 4. Growth of *L. zeae* RMK354 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

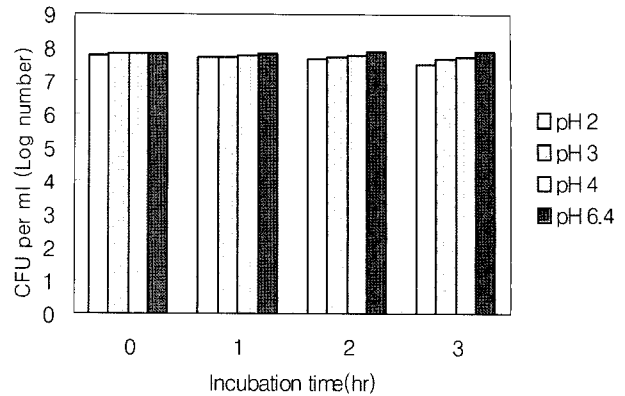


Fig. 5. Survival of *L. zeae* RMK354 after three hours in HCl (pH 2, 3, 4, 6.4).

결과 pH 2와 3에서는 생존의 변화가 거의 없어 pH에 대한 내성이 있음을 보였다. 이는 pH 3.0의 조건에서 24시간동안 *Lactobacillus plantarum* KCTC3099의 생육의 변화를 확인할 수 없다는 Kim 등(2003)의 연구결과와 유사하였다.

L. zeae RMK354의 항균력

L. zeae RMK354가 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 6과 같다. *L. zeae* RMK354는 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 억제력이 없었으나 *Salmonella typhimurium*에 대해 60.0%의 항균력을 보였다. 배양 후 pH의 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH 6.55-6.56이며, 혼합배양액은 pH 5.64-5.76이었다. 이는 *L. zeae* RMK354와 식중독균의 혼합배양과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 거의 없는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 국내 각 지역의 목장에서 수거한 원유에서 분리된 젖산균을 대상으로 10% 환원탈지유에 37°C에서 pH 4.4에 도달할 때까지 배양한 다음 각각에서 얻어진 유청으로 ACE 저해율을 측정된 결과 88.6%인 우수한 균주를 선발하였다. 선정된 균은 Gram 양성, rod형태의 homo 균이며, 당 발효실험과 16S rRNA 분석결과 *Lactobacillus*

Table 6. Inhibition of pathogens by *L. zeae* RMK354 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>L. zeae</i> RMK354* + Pathogens		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	9.2 × 10 ⁶	6.56	2.3 × 10 ⁷	5.64	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.45 × 10 ⁷	6.55	5.8 × 10 ⁶	5.67	60.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.2 × 10 ⁶	6.55	7.7 × 10 ⁷	5.76	-

*Initial count of *L. zeae* RMK354 : 3.8 × 10⁶ CFU/mL.

^aDetermined after 6 hr incubation at 37°C.

zeae로 판명되었고, *Lactobacillus zeae* RMK354로 명명하였다. 발효유에 적합한 starter인지 확인하기 위해 생리적 특성을 조사하였다. *L. zeae* RMK354는 배양온도 40°C에서 빠른 성장을 보였고, pH 4.3에 도달하는데 10시간이 소요되었다. 16종의 항생제 중 polymyxin B와 vancomycin에 대해 내성이 높았으며, 효소활성실험에서 esterase와 leucine arylamidase의 활성도가 높았다. 담즙에 대한 내성이 있는 것으로 나타났으며, pH 내성 실험결과 pH 2에서 큰 변화가 없음에 따라 내산성이 있었다. 항균력 시험에서는 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 억제력이 없었으나 *Salmonella typhimurium*에 대해 60.0%의 항균력을 보였다. 이러한 결과를 토대로 ACE 억제활성능이 우수한 기능성 발효유 제품의 스타터로 *L. zeae* RMK354는 적합하다고 할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어졌으며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Ashar, M. N. and Chand, R. (2003) ACE-Inhibitory activity of lactic acid bacteria in fermented milks. *Milchwissenschaft* **58**, 59-61.
- Booth, I. R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359-378.
- Clark, P. A., Cotton, L. N., and Martin, J. H. (1993) Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. Dairy Prod. J.* **28**, 11-14.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637-1648.
- Gilbert, C., Blanc, B., Frot-Coutaz, J., Portalier, R. and Atlan, D. 1997. Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *J. Dairy. Res.* **64**, 561-571.
- Gilliland, S. E. and Speck, M. L. (1977) Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.* **40**, 820-823.
- Gilliland, S. E. and Walker, D. K. (1990) Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.* **73**, 905-911.
- Hammes, W. P., Weiss, N., and Holzapfel, W. (1992) The Genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. In: *The Prokaryotes*. 2nd ed, Springer-Verlag Publication, New York, pp. 1563-1578.
- Juillard, V., Laan, H., Kunji, E. R. S., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P. and Konings, W. N. (1995) The extracellular P1-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.* **177**, 3472-3478.
- Kim, E. R., Jung, B. M., Kim, J. Y., Kim, S. Y., Jung, H. K., Lee, H. J. and Chun, H. N. (2003) Basic physiological activities of *Bifidobacterium infantis* Maeil-K9 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3099 selected by anticarcinogenic activities. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 348-354.
- Lee, N. K., Kim, H. W., Chang, H. I., Yun, C. W., Kim, S. W., Kang, C. W., and Paik, H. D. (2006) Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* NK81 isolated from jeotgal, a korean fermented food. *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 227-231.
- McDonald, L. C., Fleming, H. P., and Hassan, H. M. (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2124-2128.
- Park, S. Y., Ko, Y. T., Jeong, H. K., Yang, J. O., Chung, H. S., Kim, Y. B., and Ji, G. E. (1996) Effect of various lactic acid bacteria on the serum cholesterol levels in rats and resistance to acid, bile and antibiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 304-310.
- Shim, S. M. and Lee, J. H. (2008) PCR-based detection of lactic acid bacteria in korean fermented vegetables with *recA* gene targeted species-specific primers. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 96-100.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H., and Nurminen, M. L. (2002) Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy Res.* **69**, 103-111.
- Smacchi, E. and Gubbetti, M. (2000) Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* **17**, 129-141.
- Torriani, S., Felis, G. E., and Dellaglio, F. (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primer. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3450-3454.
- 水島裕, 宮本昭正 (1996) 今日の治療薬, 南江堂, 東京, pp. 505-506.

(2008.10.08 접수/2008.11.14 수정/2008.11.17 채택)