

# 유럽 Kefir와 Yogurt의 Starter *Lactobacillus* spp.와 non-starter 균주의 항암, cholesterol 저하 및 길항활성과 Genome PFGE에 의한 균주동정

윤 영 호  
중앙대학교 축산학과

## I. 서 언

발효유 제품생산에 이용되는 starter 균주의 건강증진을 위한 유익한 작용을 포괄적으로 표현하는 용어로 probiotic 활성이라고 한다. 유럽은 다양한 형태의 발효유가 오랜 역사적인 배경을 통하여 발전해온 지역으로서 일인당 소비량면에서도 세계 최고수준을 갖는 지역이며 코카서스 산맥에 인접한 국가를 위시한 전통적인 발효유 발상지역이 포함되어 있는 지역이다. 발효유에 있어 starter 균주의 중요성은 재강조의 여지가 없을 정도로 큰 것으로 판단되나 생산자가 개별 starter의 활성을 평가하는 시험결과를 얻은 후 비교 평가하기도 용이한 것은 아니다.

본 연구에서는 우유기질을 연속적으로 하여 배양된 균군이 여러 형태의 발효유제품에 포함되어 있는 상태에서 그 기능성을 어떠한 정도로 유지하고 있는지에 관한 의문에 대한 해답을 non starter의 경우와 대비하여 얻고 그 결과를 비교하고자 하는 의도가 있었고, 근래에 와서 장내에서 생존 가능한 균주가 이용하여 생산하는 biogurt와 복합균주를 활용하는 kefir 중에 존재하는 *Lactobacillus* spp.의 균주간의 차이는 어느 정도로 인정되는지 그 현상을 파악하고자 하는 의도가 있었으며 한국의 소비자들이 이용하고 있는 발효유의 종균 상태는 유럽의 경우와 대비할 때 어떠한 수준에 있는지 발전의 여지 등을 검토하기 위한 기초가 필요하다는 배경에서 이 연구가 시도되었다.

본 연구에서는 EU 지역에서 수집된 kefir와 yoghurt 시료 100여 점과 국내 시료 10여 점에서 분리된 *Lactobacillus* spp.와 국내 연구기관에 보존 중인 *Lactobacillus* spp. 및 *Bifidobacterium* spp. 균주를 대상으로 하여 항암활성의 정도를 측정하기 위한 돌연변이 억제 활성을 Ames 방법에 따라서, cholesterol 흡수활성 및 담즙산에 대한 저항성, 병원성 *Staphylococcus aureus*를 억제하는 길항활성을 측정하고 균주간의 유전적인 구조 차이를 구명하여 이를 토대로한 균주동정 체계로 활용하기 위한 data base를 구축하여 그 유전적인 근연성 분석을 시도하였다.

## II. 시료채취 및 균주 분리 동정

본 실험에 사용한 균주는 유럽국가 및 한국에서 채취된 시료에서 분리 동정된 49균주 *Lactobacillus* spp.를 MRS broth(Difco)에 37℃, 24시간 계대배양하여 사용하였고 보존균주는 -80℃ 냉동고에 보

존하면서 필요에 따라 사용하였다. 1996년 7월부터 1997년 8월 기간 중에 13개 유럽국가에서 전통 발효 유 및 Biogurt, Kefir제품에서 시료를 채취하여 액체질소통에 보관되어 운반하였다.

시료를 MRS배지에서 배양하여 순수분리하였고 분리한 *Lactobacillus* spp.를 Gram 염색한 후 현미경으로 관찰, 확인하였고 생리적인 최적 생장온도 및 내염성 시험과 당 발효실험결과를 종합하여 동정하였으며, 당 발효시험은 API 50 CHL kit(bioMerieux, France)를 이용하여 공급자에 의해 제시된 실험방법에 따라 수행하였고 37℃에서 48시간 배양하면서 색변화를 관찰하여 동정하였다.

### Ⅲ. 항 돌연변이원 활성

Top agar 100ml(증류수 0 당 agar 6g, NaCl 5g)를 microwave에서 녹인 후 0.05mM L-histidine / biotin 10ml를 첨가하여 항은 수조에서 45℃로 유지시키고 시험관에 변이원 물질 2-Nitrofluorene 100 $\mu$ l(10 $\mu$ g)을 넣고 *Lactobacillus* 배양액 100 $\mu$ l를 첨가하였다. 혼합액에 pH 7.4로 조정된 0.1M potassium phosphate buffer 0.5ml 또는 대사활성화 방법을 적용한 경우에는 S-9 mix 0.5ml를 첨가한 다음 16시간 배양된 *Salmonella. typhimurium* TA 98을 100 $\mu$ l 첨가한다. 그 혼합액을 37℃의 incubator에서 30분간 예비 배양한 후 2ml의 top agar를 첨가하여 미리 준비한 minimal glucose agar plate에 중층한 다음 37℃에서 48시간 배양한 후에 균수를 계수하여 측정하였다. 변이원 물질이 첨가되지 않은 대조구로는 100 $\mu$ l의 변이원 물질대신에 100 $\mu$ l의 Dimethylsulfoxide가 첨가되었다. 돌연변이 억제활성은 positive control에 대한 colony수의 감소로서 측정된다. 각 실험은 처리구당 2개의 plate를 사용하였으며 3회씩 반복하여 실험하였다.

#### 1. Kefir 및 biogurt에서 분리된 *Lactobacillus* spp.의 항돌연변이원 활성

유럽지역에서 분리된 *Lactobacillus* spp. 40균주에 대하여 화학적 돌연변이원 물질 2-nitrofluene에 대한 항변이원성이 측정되었으며 36균주가 항변이원성을 나타내었고 그 결과는 Table 1과 Fig. 1에 제시되었다. 균주에 따라 돌연변이 억제 활성의 차이를 보였으며 최고 억제활성 50.34%를 보인 균주와 10% 이하의 미약한 활성을 나타낸 균주도 4균주가 있었고 평균 억제활성은 25% 수준으로 나타났다.

*L. plantarum* CU722가 50.34%의 가장 높은 억제율을 보였고 *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CU 693도 45.18%로 높은 억제 활성을 나타내었다. 종별로 나타난 특성 중에는 *L. plantarum*이 특이한 항돌연변이원성을 보였으며 5균주 공히 25% 이상으로 높은 항돌연변이원성을 보였으나 *L. acidophilus*는 균주에 따른 변이폭이 매우 큰 것으로 나타나 측정된 18균주 중 2.58%로부터 36%까지의 변이폭이 나타났다.

우리 나라에서 생산된 발효유제품에서 분리된 *Lactobacillus* spp. 항돌연변이활성은 16%로부터 25% 수준의 항돌연변이 활성을 나타내어 유럽의 수준에는 못미치는 수준을 보였으나 그 활성이 균일하게 나타나고 있다는 점은 특징적이다.

돌연변이원 물질의 생체세포 내의 수준과 동일한 대사활성을 조성해 주기 위한 S-9 mix 첨가에 의한 영향은 Fig. 1에 제시되었으며 12균주에 대한 첨가효과를 종합하면 첨가에 의하여 억제활성이 상승한 균주는 5균주인 반면 S-9 mix 첨가에 의하여 항돌연변이원성이 저하된 균주가 7균주인 것으로 나타났다. 따라서 *L. acidophilus* 균주의 경우 S-9 mix 첨가에 의한 항돌연변이원성은 균주에 따라 차이를 보

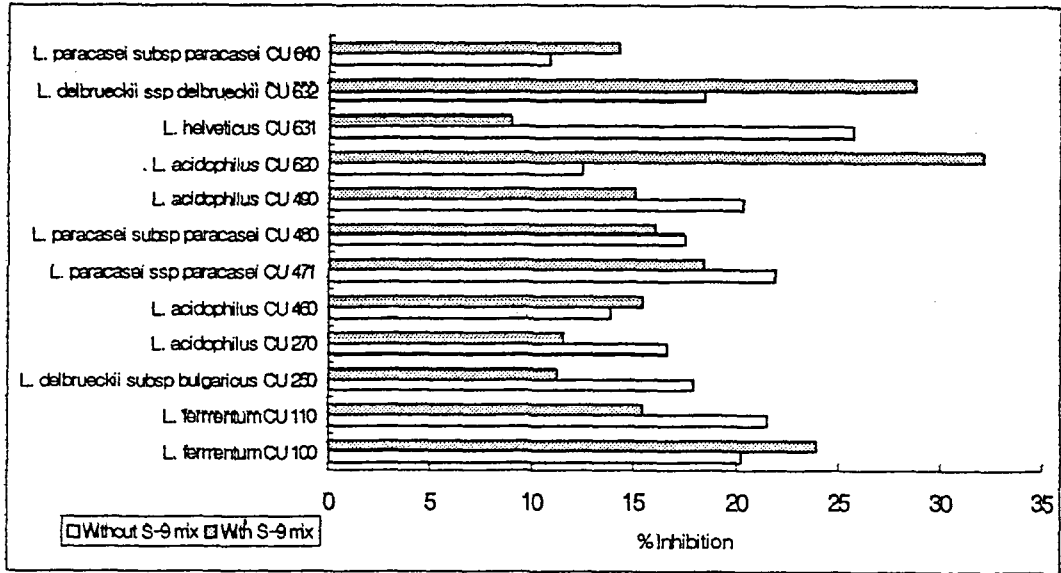


Fig. 1. Antimutagenicity of *Lactobacillus* spp. against 2-nitrofluorene with and without S-9 mix.

이는 것으로 확인되었다. 항돌연변이원성에 관한 보고에서 Hosono 등(1986)은 발효유가 화학적 발암 물질, 즉 돌연변이 유발물질과 결합하는 작용이 있음을 처음으로 보고하였고, *Propionibacteria*와 *E. faecalis*의 배양 초기에는 이들 균주가 배지 내로 thiol group을 분비하는 것으로 밝혀졌고 4NQO에 대한 항돌연변이성은 이들 균주가 환원물질을 생성하여 돌연변이 물질의 전자친화 group을 불활성화시키는 것과 관련있는 것으로 주장하였다. MNNG의 돌연변이 유도기전은 MNNG가 glutathione에 의해 비효소적 작용을 받아 methyl diazonium cation으로 변환되면 자연발생적으로  $CH_3^+$ 을 형성하게 되는데, 이것은 유력한 methylating agent로서 guanine의 O<sup>6</sup> 부분을 공격하여 GC를 AT로 변환시키게 되는 것으로 추측된다 (Lawley와 Thatcher, 1970).

## 2. Non starter *Lactobacillus* 및 *Bifidobacterium* 균주의 항돌연변이원성

*Lactobacillus* 13균주의 항돌연변이성 시험에서 평균 15% 이상의 항돌연변이성을 나타내었고 최저 11.2%로부터 최고치 *L. casei* KCTC 2680에서 22.9%를 나타내어 발효유에서 분리된 균주에 비교할 때 변이폭이 매우 낮은 균일한 억제활성을 보였다.

또한 보존 균주의 항돌연변이원성 결과는 *Lactobacillus* 종간에 특이한 성향을 보이지 않았고 S-9 mix 첨가효과는 14균주 중에서 억제원성이 증가한 경우가 6균주에서 저하한 경우가 8균주에서 각각 나타나 균주 차이에 따라서 2-nitrofluorene에 대한 변이억제원성을 다양하게 나타낼 수 있는 것으로 나타났다. 대사활성을 적용한 경우 가장 높은 억제율을 보인 균주는 *L. casei* KCTC 2680, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KFRI 673, *L. plantarum* KCTC 1048이 각각 22.95%, 20.48%, 20.11%로 나타났고 가장 낮은 억제율을 보인 균주는 *L. casei* IFO 3533으로 11.18%의 억제율을 보였다.

보존 균주 중에서 *Bifidobacterium* 속의 균종에 의한 2-nitrofluorene에 대한 돌연변이 억제원성을 측

Table 1. Antimutagenicity of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and biogurt against 2-nitrofluorene with S-9 mix

Strains		Inhibition(%)
B2	<i>L. acidophilus</i> CU 732	4.20
B3	<i>L. acidophilus</i> CU 733	2.58
D1	<i>L. acidophilus</i> CU 701	13.67
F1	<i>L. acidophilus</i> CU 671	33.71
F3	<i>L. acidophilus</i> CU 673	23.19
F4	<i>L. acidophilus</i> CU 674	13.6
F7	<i>L. acidophilus</i> CU 677	36.40
G1	<i>L. acidophilus</i> CU 721	16.06
G3	<i>L. acidophilus</i> CU 723	6.48
G5	<i>L. acidophilus</i> CU 725	8.88
N4	<i>L. acidophilus</i> CU 694	27.91
S1	<i>L. acidophilus</i> CU 681	7.03
S3	<i>L. acidophilus</i> CU 683	17.06
SP1	<i>L. acidophilus</i> CU 711	11.85
D5	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CU 705	28.09
N3	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CU 693	45.18
SP3	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CU 713	21.58
D2	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CU 702	32.43
F2	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CU 672	13.70
B1	<i>L. plantarum</i> CU 731	32.49
G2	<i>L. plantarum</i> CU 722	50.34
N1	<i>L. plantarum</i> CU 691	24.09
S5	<i>L. plantarum</i> CU 685	37.62
SP6	<i>L. plantarum</i> CU 716	34.70

정한 결과는 평균치가 약 20% 이상 *Lactobacillus*의 경우보다 강한 억제원성을 나타내었고 *B. bifidum* ATCC 29521이 26.3%의 항돌연변이원성을 나타내었다.

*Bifidobacterium* spp.의 경우는 일관되게 S-9 mix의 첨가에 의해 변이억제활성이 현저하게 증가되는 현상을 보였다. S-9 mix를 첨가하지 않았을 경우 가장 높은 억제율을 보인 균주는 *B. longum* ATCC 15707로서 17.47%였고 가장 낮은 균주는 *B. infantis* ATCC 15697로 6.55%의 다소 낮은 억제효과가 있었다. S-9를 첨가한 경우는 *B. breve* ATCC 15700이 26.72%로 가장 높았으며 *B. longum* ATCC 15707 균주가 16.34%로 가장 낮게 나왔다. 한가지 특이한 것은 S-9 mix를 첨가하지 않았을 때 비교적 낮게 측정되었던 *B. infantis* ATCC 15697과 *B. breve* ATCC 15700 균주가 S-9 mix의 첨가에서는 높은 활성을 나타내고 *B. longum* ATCC 15707은 S-9 mix의 첨가 여부에 크게 작용하지 않았다.

#### IV. *Lactobacillus* spp. 및 *Bifidobacterium* spp.에 의한 항돌연변이 활성의 특성

*Lactobacillus* spp. 및 *Bifidobacterium* spp.에 의한 2-nitrofluorene에 대한 항돌연변이원 활성은 Fig. 1에 제시되었다. *Lactobacillus* spp.의 평균 항돌연변이 활성은 20.53%였고 *Bifidobacterium* spp.에 의한 항돌연변이원 활성은 21.69%였고 그 평균치는 20.29%로 나타났다.

*Lactobacillus* 속 중에 7종에 대한 항돌연변이원성이 측정되었으며 종별 평균치는 억제활성이 높은 순으로 보면 *L. plantarum* 30.7%, *L. delbrueckii* 27.0%, *L. fermentum* 19.7%, *L. paracasei* 18.9%, *L. casei* 17.0% *L. acidophilus* 16.4%, *L. bulgaricus* 15.8%의 돌연변이 억제활성을 각각 나타내었다. 균주별로 가장 강한 억제활성을 보인 균주는 *L. plantarum* CU 722로 50.3%의 억제활성을 보였다. *Bifidobacterium* spp.의 경우 *B. breve* ATCC 15700이 26.7%의 항변이원 활성을 보였다.

돌연변이원 물질을 4NQO로 대체한 후 돌연변이 억제성향을 측정할 결과 보존 균주 21균주 대부분이 90%를 상회하는 고도의 억제활성을 보였으며 21균주 중 2균주만이 80% 이하의 억제율을 나타내었다. 억제활성의 정도는 *Lactobacillus* spp.가 *Bifidobacterium* spp.보다 강하게 나타났으며 균주에 따라 변이 억제활성은 유의한 수준으로 나타났다. 이 중 가장 높은 억제 성향을 가진 균주는 *L. plantarum* KCTC 1048으로 99.3%의 강한 억제활성을 나타내었다. 위의 결과를 근거로 할 때 항돌연변이 억제원활성은 변이원 물질에 따라 크게 차이를 보일 수 있다는 사실이 입증되었다. Hosono 등(1986)이 *Escherichia coli* B/r WP2 trp- hcr- 균주를 이용하여 4NQO에 대한 항돌연변이 활성실험에서 약 77% 정도의 억제활성을 나타내었고, *S. typhimurium* TA 98의 streptomycin-dependent 균주인 SD 510을 사용하여 실시한 실험에서는 *Streptococcus thermophilus*와 *Lactobacillus bulgaricus*가 각각 83.14%, 98.58%의 억제활성을 나타낸 것으로 보고한 결과와 유사한 성향을 보인다.

##### 1. 2-Nitrofluene 항돌연변이 활성성분의 분포

젖산균이 생장과 수반하여 생산하는 젖산과 배양에 이용되는 배지 및 세포성분 중 세포질과 세포벽 성분을 구분하여 돌연변이 억제활성을 측정할 결과는 Table 2에 제시하였다.

젖산균 세포에서 어느 부분에 돌연변이 억제활성이 분포되었는가를 탐지하기 위해 젖산균 중 억제활성이 높은 것으로 알려진 *L. plantarum* CU 722 균주를 사용하여 실시한 결과가 Table 2에 제시된 바 있다. 배양액과 분리된 세포 간의 변이억제활성 차이를 비교한 결과 세포 부분의 억제활성이 높은 것으

Table 2. Antimutagenicity of cell fractions of *L. plantarum* CU 722 against 2-nitrofluorene

Component	Inhibition(%)
Whole cell	17.16
Cell free cultured broth	5.43
Sonicated cell	18.02
Cytoplasm	24.48
Cell wall component	34.91

로 확인되었으며, 세포가 전혀 존재하지 않는 배양액에도 낮은 수준의 억제활성은 나타내었다. 이중 세포벽 부분의 활성이 가장 높은 34.91%를 나타냈으며 세포질 부분이 24.48%, 세포벽 분해된 세포가 02%, whole cell 부분이 17.16% 그리고 whole cell을 제외한 배양액에서 5.43%의 활성이 있는 것으로 밝혀졌다.

Nadathur 등(1994)은 2%의 lactic acid를 발효하지 않은 우유에 첨가한 후에 실시한 실험에서 lactic acid에 의한 억제효과는 없는 것으로 나타났다. Hosono 등(1986)도 96시간까지의 반응에서 lactic acid에 의한 효과는 크게 나타나지 않는 것으로 보고한 바 있다. 젖산균이 발효하면서 생성하는 산에 의해 pH를 낮추어 병원성 미생물을 억제하는 효과가 있으나 돌연변이 유발물질에 대한 돌연변이 억제에 미치는 영향은 그다지 크지 않다고 할 수 있다.

## 2. 항돌연변이원 활성의 최적 조건

배양시간에 따른 젖산균의 항돌연변이원 활성을 *L. casei* KCTC 2680, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KFRI 673, *B. bifidum* ATCC 11863, *B. breve* ATCC 15700, *L. casei* YIT 9018 등을 사용하여 탈지유 배지에서 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96시간 배양하면서 성장시간에 따른 돌연변이 colony수의 감소 성향과 그에 따른 억제율을 관찰하였고 그 결과를 Fig. 2에 제시하였다.

전체균주가 성장기에 의하여 영향을 받으며 대수적인 12시간에서 24시간 배양된 배양액에서 가장 높은 항돌연변이활성을 갖는 것으로 나타났다. 또한 발효시간이 48시간을 지나 96시간으로 가면서 그 억제현상이 저하되는 경향으로 나타났다. Hosono 등(1986)이 *Str. faecalis* IFO 12964를 가지고 배양하면서 측정한 결과에 따르면 발효 3시간 이후부터 12시간까지의 억제효과가 증가하면서 12시간 이후 24시간부터 다시 감소하는 추세를 보였다. 또한 Hosono 등(1988)은 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*로 같은 실험을 하였다. 이 실험 결과 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 경우 48시간에, *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*는 24시간에 각각 가장 높은 억제 활성을 갖는 것으로

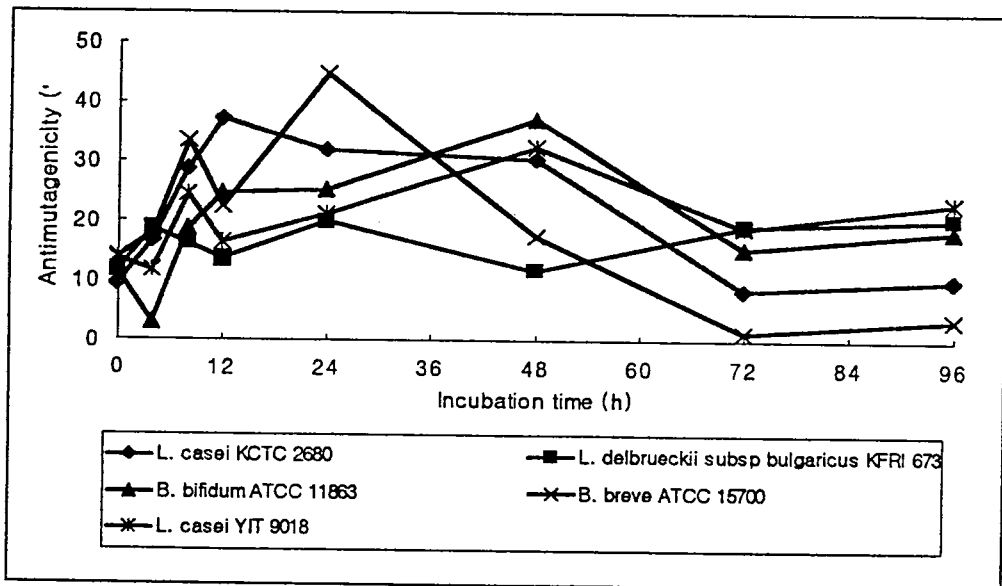


Fig. 2. Changes of antimutagenicity of cultured milk during cultivation.

로 나타났으며 두 균주 모두 48시간을 넘기면서 억제활성이 다시 감소하는 것으로 나타났다. 이것으로 미루어 볼 때 유산균의 배양시간이 끝나감에 따라 돌연변이 억제에 관계하는 물질의 생성 또한 감소하는 것으로 사료된다.

*L. acidophilus* KCTC 2182, *L. casei* KCTC 2680, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KFRI 673, *L. plantarum* KCTC 110, *B. bifidum* ATCC 11863, *B. breve* ATCC 15700, *L. casei* YIT 9018 등의 균주로 실시한 결과에서 *L. acidophilus* KCTC 2182균주는 30분에서, *L. casei* KCTC 2680은 60분에서, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KFRI 673은 60분, *L. plantarum* KCTC 110균주는 30분, *B. bifidum* ATCC 11863도 30분, *B. breve* ATCC 15700은 120분, *L. casei* YIT 9018은 60분 배양액에서 각각 가장 높은 억제활성을 보였다.

이 결과를 종합할 때 30분에서 60분 예비배양시간에서 가장 높은 활성을 나타내었다. Hosono 등 (1986)의 결과에서는 각 균주로 발효된 발효유가 유지시간이 경과함에 따라 유의하게 저하하는 경향을 보였다. 본 실험에서도 균주마다 약간의 차이는 보였으나 배양시간이 경과하면서 억제율은 점차로 저하한 이후 48시간을 경과하면 점차 증가하는 경향을 나타냈다.

## V. Cholesterol 흡수 활성

보존 균주와 분리하여 동정한 균주를 이 실험에 사용하였으며 micelle 1ml와 MRS-Thio broth 9ml를 test tube에 같이 첨가하였고 혼합한 후 계대 배양한 균주를 1% 접종한 후 37℃에서 혐기적(BBL Gaspak system, USA)으로 19시간 배양한 후 4℃에서 12,000 × g로 10분간 원심분리를 하여 cell pellet과 broth를 분리하여 사용하였다. Cell pellet은 culture의 최초량을 증류수로 다시 현탁하였으며 cholesterol 흡수활성은 cell pellet과 broth를 시료로 하여 Rudel과 Morris(1973)의 방법에 따라 측정하였다.

### 1. kefir와 biogurt에서 분리된 스타터 및 비스타터 균주에 의한 cholesterol 저하 활성

유럽지역에서 채취된 kefir 및 biogurt시료에서 분리 동정한 40균주에 대한 cholesterol 흡수활성 측정결과는 Table 3에 제시되었다.

Kefir 7시료에서 분리된 7균주의 *Lactobacillus* spp. 중에서 cholesterol 저하 활성을 나타낸 균주는 2균주였으며 *L. plantarum* CU 691은 51.3%의 저하율을 보였으며, *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CU632는 28.7%의 저하 활성을 나타내었다.

Biogurt로부터 분리된 33균주의 *Lactobacillus* 균주 중에서 18균주만 cholesterol 저하 활성을 나타내었다. 총분리균주 40균주에서 20균주가 저하 활성을 보여 50%의 발현율을 보인 것으로 확인되었다.

*Lactobacillus*의 종별 저하율을 보면 *L. acidophilus*의 경우 19균주 중에서 cholesterol 저하 활성을 보인 균주는 8균주로 나타났다. *L. acidophilus* CU673이 분리균주 중에서 가장 높은 저하율 68.8%을 보였다. *L. acidophilus* CU 673(68.83%)은 *L. paracasei* CU 480, *L. acidophilus* CU 671(6.51%), *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CU 693(6.87%), *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CU 705(5.05%)보다 유의하게 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

*L. plantarum* CU 685, 691, 722, 731이 60% 이상 높은 저하율을 보였으며 시험균주 5균주 중에서 4

Table 3. Cholesterol Assimilation activity of *Lactobacillus* spp. starter strains isolated from kefir and biogurt

Species	Strain	Assimilation activity(%) <sup>1</sup>
<i>L. fermentum</i>	CU 110	36.53 <sup>cdef</sup>
<i>L. acidophilus</i>	CU 460	43 <sup>bcdef</sup>
<i>L. paracasei</i>	CU 480	6.75 <sup>i</sup>
<i>L. acidophilus</i>	CU 490	31.43 <sup>efg</sup>
<i>L. paracasei</i>	CU 580	44.53 <sup>bcdef</sup>
<i>L. acidophilus</i>	CU 620	34.66 <sup>defg</sup>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	CU 632	28.7 <sup>fgh</sup>
<i>L. acidophilus</i>	CU 671	6.51 <sup>i</sup>
<i>L. paracasei</i>	CU 672	13.43 <sup>ghj</sup>
<i>L. acidophilus</i>	CU 673	68.83 <sup>a</sup>
<i>L. acidophilus</i>	CU 674	60.27 <sup>ab</sup>
<i>L. plantarum</i>	CU 685	59.36 <sup>AaB</sup>
<i>L. plantarum</i>	CU 691	51.34 <sup>abcde</sup>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	CU 693	6.87 <sup>i</sup>
<i>L. paracasei</i>	CU 702	56.99 <sup>abc</sup>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	CU 705	5.05 <sup>i</sup>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	CU 713	8.69 <sup>hi</sup>
<i>L. plantarum</i>	CU 722	63.55 <sup>ab</sup>
<i>L. plantarum</i>	CU 731	53.52 <sup>abcd</sup>
<i>L. acidophilus</i>	CU 732	51.89 <sup>abcde</sup>
<i>L. acidophilus</i>	CU 733	46.05 <sup>bcdef</sup>

<sup>1</sup>Number with different superscripts differ significantly(P < 0.05).

균주가 고도의 콜레스테롤 저하 활성을 보였으며 종별억제 성향을 볼 때 특이한 점으로 판단된다.

*L. casei*의 경우 6균주 중에서 4균주 CU 480, 580, 672, 702가 저하 활성을 나타내었고 *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* 4균주 중 3균주에서 활성을 보인 반면 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*는 활성을 나타내지 않았다. *L. fermentum* 2균주 중 1균주가 cholesterol 저하 활성을 보였고 *L. helveticus* 중 분리균주 1균주는 활성을 보이지 않았다. 분리된 스타터 균주에서는 보관 중인 비스타터 균주보다 더 많은 수의 균주들이 cholesterol을 전혀 흡수하지 않은 것으로 나타났으며 더 낮은 흡수활성을 보인 균주도 많았다.

Cholesterol을 흡수하는 균주들은 원심분리한 결과에 cell과 함께 추출물이 추출되어 나오는 것을 확인할 수 있었으며, Klaver와 Meer(1993)은 cell이 직접적으로 흡수하는 것이 아니라 배양시간 동안 담즙산과 함께 침전되는 것으로 보고되었다.

비 스타터 형태의 보관 중인 *Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* spp. 20여 종의 균주를 사용하여 세포 및 배양후 세포 제거한 액체배지의 cholesterol 함량을 측정된 결과를 이용하여 cell을 총량으로 나



누어 측정된 cholesterol 흡수활성 결과를 제시하였다.

*Lactobacillus* spp.의 경우 사용된 12균주 중 *L. delbrueckii* NRRLB 763만을 제외하고 모든 균주가 고도의 cholesterol을 저하능력을 갖는 것으로 나타났다.

스타터 균주의 경우 50% 수준의 흡수활성 양성균주율을 보인 반면 비스타터 보존 균주에서는 95% 수준의 cholesterol 저하 활성 양성균주율을 나타내는 근거에 대한 적절한 설명은 없으나 균주 차이 및 연속적인 배양과 수반하여 나타나는 변이 등을 그 원인으로 이해할 수 있다.

*L. delbrueckii bugarius* KFRI 673은 68.08%의 저하율을 보였고 *L. plantarum* KCTC 1048은 62.93%의 저하 활성을 나타내어, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9496보다 cholesterol 흡수가 유의하게 높게 나타났다( $P < 0.05$ ). *L. acidophilus* KCTC 2182, *L. casei* KCTC 2680, *L. casei* IFO3533, *L. plantarum* KCTC 110, *L. fermentum* ATCC 14931의 cell에서 모두 60% 이상의 높은 수준의 cholesterol 흡수 활성을 보였으며, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9496은 cell에서 흡수활성이 미약한 것으로 확인되었고 *L. delbrueckii* NRRLB 763은 cell에서 cholesterol 흡수가 전혀 나타나지 않았다. 균종에 의한 cholesterol 저하 활성의 특성 중에서 *L. casei*와 *L. plantarum*이 60% 이상의 저하 활성을 나타내어 발효유의 분리 균주의 경우와 일치하는 성향을 보였다.

*Bifidobacterium* spp. 7균주의 cholesterol 저하 활성 측정결과의 특이한 점은 모든 종의 *Bifidobacterium*이 저하 활성 양성을 보였다는 점이다. 콜레스테롤 저하활성면에 관한한 이 모든 균주의 특성을 총괄하여 비교 평가할 때 특징으로 나타나는 점으로 강조된다. 저하활성율을 보면 *Lactobacillus* spp.의 경우처럼 다양한 흡수활성을 보였으나 *B. longum* ATCC 15707은 68.29%의 높은 활성을 나타내었으며 *B. bifidum* ATCC 11863보다 유의하게 높게 나타났으며( $P < 0.05$ ), *B. bifidum* CU 1370, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. breve* ATCC 15700, *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. infantis* ATCC 1567는 40~50% 흡수활성을 보였다.

*Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* spp.의 경우처럼 균주에 따라 cholesterol 흡수활성이 다양하게 분포된 것을 확인할 수 있었다.

Spent broth와 cell을 각각 분리하여 측정된 결과 대부분 균주의 spent broth와 cell의 흡수활성을 더하면 100%에 가까운 것으로 나타났다.

## 2. Cholesterol 저하활성 영향 요인

배지 종류에 따른 cholesterol 저하 활성은 MRS-Thio broth에서 저하율이 가장 높았으며 탈지유 배지에서 가장 낮았다. 그리고 MRS broth에서도 낮게 나타났으며 혐기성 배양이 호기성 배양보다 cholesterol 저하 활성이 높았으며 균주가 cholesterol을 세포로 흡수하기 위해서는 담즙산이 있는 상태에서 혐기성 조건이어야 한다는 보고(Gilliland 등, 1985)와 일치하였다.

담즙산 농도에 의한 cholesterol 흡수활성에 영향을 측정하기 위해서 *L. acidophilus* CU 1382와 *B. bifidum* CU 1370을 가지고 oxgall 농도별로 배지와 세포현탁액내 cholesterol 흡수활성을 측정된 결과는 Fig. 3에 제시되었으며 Oxgall 농도가 증가함에 따라 배지 내의 cholesterol량은 감소하는 반면 세포현탁액 내의 cholesterol량이 증가하는 것으로 나타났다.

배양시간에 따른 저하 능력의 변화는 시간이 경과함에 따라 세포현탁액내 cholesterol 흡수는 점점 높게 나타나고 있으며 배지 내의 함량도 차이는 있지만 전반적으로 낮아지는 경향을 나타내고 있다. 특

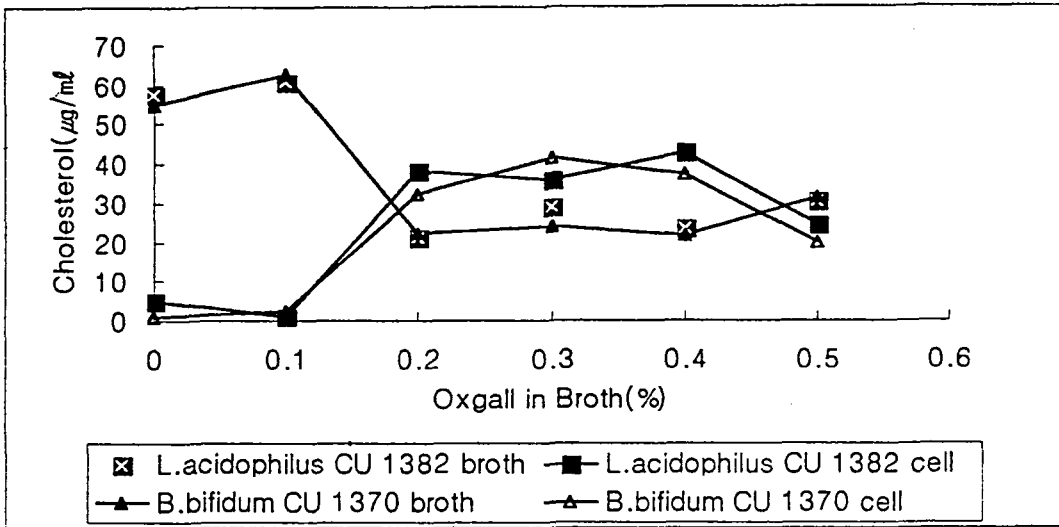


Fig. 3. The effect of oxgall concentration in broth on cholesterol assimilation activity.

히 9~12시간 사이에서 가장 변화가 심한 것으로 나타나고 있으며 18시간에서 cholesterol 흡수활성이 가장 높게 나타나고 시간이 지날수록 안정되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 cell의 시간별 성장을 생각할 때, 시간이 지날수록 다른 요인이 아닌 cell에 의해 cholesterol 흡수활성에 직접적으로 영향을 미친다고 볼 수 있다

## VI. 병원성 세균에 대한 억제활성

실험균주를 계대배양한 후 MRS agar에 희석배율을 조절하여 100µl씩 하여 37°C에서 48시간 배양하여 미리 배양한 병원성 세균 *Staphylococcus aureus* ATCC 3939 Brain heart infusion에 계대배양한 후 soft agar에 접종하여 2ml씩 증충한다. 이것을 다시 37°C에서 48시간 배양 후 억제대 생성상태를 확인하여 억제대 직경을 측정하였다.

*L. acidophilus* spp.에 의한 병원성 *Staphylococcus aureus* ATCC 3939에 억제활성 측정결과를 보면 비 starter 균주인 *L. acidophilus* ATCC 4962는 억제대의 직경이 9.39 mm인 강한 억제효율을 나타낸 반면 분리된 starter 균주 18균주 중에서 15균주는 병원성 *Staphylococcus aureus* ATCC 3939에 억제활성을 보이지 않았으며 *L. acidophilus* CU 460, CU 673, CU 674만이 억제활성을 나타내었다.

Starter 균주에 의한 억제활성이 대부분의 *L. acidophilus*에 의하여 나타나지 않는 결과에 주목할 필요가 있으며 Matsoni에서 분리된 *L. acidophilus*의 억제효과가 매우 강하게 나타났다는 보고와 대조를 이루고 있다(Alatossava 등, 1995; Sandine, 1979). *Staphylococcus aureus*가 억제되는 기작은 유기산 생성에 의한 것으로 설명되며 젖산생성에 의하여 pH가 급격하게 5.3 이하로 저하됨으로 기인되는 것으로 제시된 바 있다(Hechelmann 등, 1988).

*L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* 7균주중 2균주는 non starter 형태의 균주이고 5균주가 kefir 및 biogurt로부터 분리 동정된 균주이며 ATCC 9469 및 CU 693만이 억제활성을 보였고 나머지 5균주는

억제활성을 보이지 않았다.

*L. casei* 및 *paracasei* 균주 8균주는 모든 균주가 억제활성을 강력하게 나타내는 특성을 보여서 균종의 공통적인 특성으로 나타났다. *Staphylococcus aureus*는 여러 종의 젖산균에 의하여 생성되는 과산화수소에 대한 내성이 매우 낮아 *Lactobacillus*의 경우보다 2~10배 민감한 것으로 확인되었으며 6 $\mu$ g/ml의 농도에서도 *Staphylococcus aureus* 생장은 정지되는 것으로 알려져 있다(Gudkow, 1987; Barefoot and Klaenhammer, 1984).

*L. plantarum* 8균주중 6균주는 분리 동정된 균주로서 그 병원성균에 대한 억제활성은 2균주를 제외하고 억제활성을 나타내었다.

*L. fermentum*, *bulgaricus*, *helveticus*는 미약하거나 혹은 억제활성 음성반응을 나타내었으며 *L. brevis*는 강한 억제활성을 나타내었다.

*Bifidobacterium* spp. 5균주의 억제활성 측정결과는 1균주를 제외하고 모두 활성의 양성반응을 나타내었다.

병원성 세균에 대한 억제활성은 투명대가 나타나 크기에 colony의 크기를 뺀 나머지 크기를 측정하였고, 억제활성을 가장 크게 보인 균주는 *L. acidophilus* KCTC 2182로서 9.39mm로 나타났다.

## Ⅶ. Genomic DNA의 PFGE에 의한 균주동정과 probiotic 활성

시험균주를 하룻밤 배양한 후 chloramphenicol 100 $\mu$ g/ml 농도로 첨가한 후 2시간 더 배양하였다. 1.5ml 배양액을 취한 후 원심분리(15,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15분)하여 세포를 회수하고 1M NaCl과 10mM Tris(pH 7.6)로 세척하고 다시 1M NaCl과 10mM Tris(pH 7.6) 300 $\mu$ l에 현탁시킨 후 저융점 agarose를 1M NaCl과 10mM Tris에 2%가 되도록 가한 후 끓는 수욕에서 용해시키고 50 $^{\circ}$ C 정온기에서 보관하면서 동량의 균액과 혼합하였다. 이 혼합액을 시료몰드에 분주하여 block을 형성시킨다. 형성된 block을 lysozyme(1mg/ml)과 mutanolysin 100U가 함유된 EC 완충액(6mM Tris pH 7.6, 1M NaCl, 0.1M EDTA pH 7.5, 1% Sarkosyl)에 넣어 16시간 정치한 후 ES 완충액(0.5M EDTA pH 9.2, 1% Sarkosyl)에 proteinase K(1mg/ml)를 함유한 용액으로 옮기고 37 $^{\circ}$ C에서 48~72시간 작용시켰다. 다시 TE(10mM Tris pH 8.0, 0.1mM EDTA pH 7.5)에 1mM phenylmethylsulfonyl(PMSF)를 함유한 용액에서 7시간 동안 실온에서 정치시키고 새로운 PMSF 용액으로 하룻밤 정치시킨 후 TE를 이용하여 2시간 간격으로 실온에서 3회 세척한 후 0.5M EDTA(pH 8.0)와 1% Sarkosyl 용액에서 보관하였다(4 $^{\circ}$ C).

본 실험에서는 가장 적절한 band수를 나타내는 Sma I (CCC/GGG), Apa I (GGG/CCC)으로 실험하였다.

조제된 block을 1~2mm으로 절단한 후 TE로 2회, 각 제한효소 1X 완충액으로 1회 세척하였다. 제시된 제한효소 20U를 적당한 완충액과 온도에서 16시간 작용시켰다. 제한효소 처리된 block은 TE로 1회, 0.5X TBE(0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA)용액에 1회 세척한 후 전기영동을 실시하였다. 각 균주 genomic DNA의 band 특성을 분석하기 위하여 Bio-rad CHEF DR III system을 활용하여 1.1% agarose gel에서 0.5X TBE 용액을 이용하여 14 $^{\circ}$ C의 온도를 유지하는 상태에서 23시간 전기영동을 실시하였다.

Pulse time을 변동시키는 조건에서 lambda ladder을 size marker로 하여 PFGE를 실시하고 단편의 중복 band를 확인하였다. 절편의 분자량 측정은 나타나는 band의 개별 크기를 측정한 후 그 수치를 총합하여 계산하였다.

분리된 균주의 동정을 위하여 genomic DNA를 제한효소로 절단하여 나타나는 유전자지문 분석과 genomic DNA 크기 및 지문분석시험의 결과는 Table 4에 제시되었다. 제한효소 Sma I과 Apa I으로 16균주의 *Lactobacillus* spp. genomic DNA를 처리한 후 나타나는 절편의 분포를 분석한 결과 11균주에서 특징적인 지문분포를 얻을 수 있었으며 CU 677, 721, 723, 694, 711은 동일 genome size와 절편

Table 4. Genomic DNA PFGE pattern of *L. acidophilus* and *L. plantarum* and Probiotic activity

ID	Genomic DNA		PFGE No. Frag	Probiotic activity			*Origin
		Genome size(Mb)		Antagonism inhibition zone(mm)	Cholesterol assimilation (%)	Antimuta- genicity (%)	
<i>L. acidophilus</i>							
CU 677	ApaI	2.70	13	0	0	36.4	F7y
CU 721	ApaI	2.72	13	0	0	16.0	G1y
CU 723	ApaI	2.75	13	0	0	6.5	G3y
CU 694	ApaI	2.74	13	0	0	27.9	N4y
CU 711	ApaI	2.76	13	0	0	11.8	Sp1y
CU 490	SmaI	1.35	12	0	31.4	15.0	A3y
CU 620	SmaI	1.35	12	0	34.6	32.1	Ne1y
CU 460	SmaI	1.48	11	4.5	43.0	15.4	Gr4y
CU 733	SmaI	2.4	9	0	46.0	2.6	E3y
CU 270	SmaI	2.3	12	0	0	11.5	Gr3y
CU 230	SmaI	2.1	14	0	0		Gr1y
CU 806				6.8	11.2	16.6	K6y
CU 805				3.2	0	21.6	K5y
CU 802				0	33.9	16.6	K2y
<i>L. plantarum</i>							
CU 691	ApaI	1.73	11	2.8	51.3	24.1	N1k
CU 731	ApaI	1.71	8	4.6	53.5	32.5	E1c
CU 716	ApaI	1.88	14	0	0	34.7	Sp3y
CU 722	ApaI	1.72	8	2.8	63.5	50.3	G2y
CU 685	ApaI	1.74	8	2.8	59.3	37.6	S5f

\*K; Korea F; Finland, G; Germany, N; Norway, Sp; Spain, A; Austria, Ne; Netherland, G; Greece, E; England, S; Sweden, y; yoghurt, k; kefir, f; filmjolk, c; cottage cheese

의 크기 및 수에 있어서도 동일하였으므로 동일균주임이 확인되었다. 이 균주는 Finland, 독일, Norway, Spain 등 다른 지역에서 yoghurt starter로 활용되고 있으나 3부분의 probiotic 활성은 동일하게 나타났다.

11균주의 *L. acidophilus*는 pulsed field gel electrophoresis에 의하여 6개 groupe으로 구분이 가능하였고 *L. plantarum*은 3 groupe으로 구분이 가능하였다.

*L. plantarum* CU 731, 722, 685는 동일한 genome 특성을 가지며 그 3부분의 probiotic 활성 모두 나타내어 우수 균종으로 인정되었다.

## Ⅷ. 결 론

이 연구는 *Lactobacillus* spp.의 genomic DNA 구조에 근거하여 균주를 동정하고 각 균주의 probiotic 활성을 총괄하는 data base를 얻는 연구의 일부이다.

스타터 균주와 비스타터 균주 간에 유의성이 있는 차이를 나타냄은 물론 스타터 균주 중에서도 그 genomic DNA 구조에 따라 병원성 세균에 대한 길항작용과 cholesterol 흡수활성 및 돌연변이 억제 활성에 있어서도 균주 간에 차이를 크게 나타내며 위에 열거된 3종의 활성을 모두 갖춘 균주도 존재하고 있었으며 시험에 사용된 전체 균주 중에서도 이러한 모든 활성을 갖는 균주는 3개 균주 정도로 나타났다.

## Ⅸ. 참고문헌

1. Alatossava, T., N. Chanishvili, A. Tilsala, and G. Natroshvili. 1996. Microbiological study of Matsoni, the traditional endemic caucasian milk product. Abstract 5th Symposium on Lactic acid bacteria G10 FEMS.
2. Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin B. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 26: 328-334.
3. Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Mawell. 1985. Assimilation of cholesterol of *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 49:377.
4. Gudkow, A. V. 1987. Starters: as a means of controlling contaminating organisms. Milk-The Vital Force pp. 83-93.
5. Klaver, F. A. M., and R. Van der Meer. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their salt-deconjugation activity. Appl. Environ. Microbiol. 59:1120.
6. Hechelmann, H., F. K. Lucke and U. Schillinger. 1988. Ursachen und Vermeidung von *Staphylococcus-aureus*-Intoxikationen nach Verzehr von Tohwurst und Rohschinken. Mittbl. Bundesanstalt Fleischforsch. Kulmbach 100, 7956-7964.
7. Hosono, A., S. Sagae and F. Tokita. 1986. Desmutagenic effect of cultured milk on che-

- micably induce mutagenesis in *Escherichia coli* B/r WP2 trp<sup>hcr</sup>. *Milchwissenschaft*. 41: 142-145.
8. Nadathur, S. R., S. J. Gould and A. T. Bakalinesky. 1994. *J. Dairy Sci.* 77:3287-3295.
  9. Rudel, L. L., and M. D. Morris. 1973. Determination of cholesterol using *o*-phthaldehyde. *J. Lipid Res.* 14:364.
  10. Sandine, W. E. 1979. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J. Food Prot.* 42:259-262.