

# Lactobacillus acidophilus ATCC 43121의 Probiotic 특성 및 쥐(Rat) 소화기관내 모니터링

한경식 · 김세현  
고려대학교 식품과학부

## I. 서론

유산균은 대사를 통해 각종 생고분자물질, 효소, 유기산, 알코올 등을 생산할 뿐 아니라 probiotic 균주로 동물산업, 식품산업과 최근에는 건강증진 및 질병예방 목적의 의약품 생산 등에 널리 사용되고 있어 경제적으로 중요한 미생물이라 할 수 있다(Fuller, 1989). 특히, 유산균 중 *Lactobacillus*속 균주들은 약 56개의 종으로 구성되어 있으며 가장 산에 안정하고 사람과 동물의 피부, 모유, 구강, 질(vagina) 및 소화기관내 널리 분포되어 있다. 그 중에서도 *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum* 및 *L. brevis* 등이 사람의 장관내 주요 균주들로 알려져 있다(Conway, 1989). *Lactobacillus* 속 균주들은 다양한 생화학적 및 물리적 특성을 보유하고 있어 이들을 다시 발효능과 관련 효소의 존재여부에 따라 Group I, II 및 III로 구분하며 Group I의 대표적인 균주는 *L. acidophilus*라 하겠다(Salminen과 von Wright, 1993). 현재에도 *Lactobacillus* 균주를 이용한 각종 probiotic 제품이 개발되고 있는데 이는 소화기관내 중요한 미생물이며 지금까지 수많은 유제품 제조에 사용되어 그 안전성이 입증되었다는 점과 대량생산 및 보존 관련기술이 구축되어왔다는 점 등이 주된 이유라 하겠다. 그 중에서도 *L. acidophilus* 균주는 사람 및 각종 동물의 건강과 기능 향상에 사용되고 있으며 특히 면역증진작용, 장관내 미생물총의 균형, 항암작용, 설사의 방지 등의 효과가 인정되고 있다(Gilliland, 1990; Sanders와 Klaenhammer, 2001). 특히, 본 고에서 언급된 *L. acidophilus* ATCC 43121 균주는 여러 probiotic 특성 중에서 혈중 콜레스테롤 저하 효과가 우수한 균주로 알려져 있다(Gilliland와 Walker, 1990).

경제발전과 더불어 각종 성인성 질환이 급증하고 암과 동맥경화 등이 현대인의 사망 요인으로 부각되면서 유산균 및 발효유 제품과 이들 질환과의 상관관계에 대해 커다란 관심을 갖게 되었으며 이와 관련된 probiotic 균주의 연구와 적용이 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 건강증진 효과를 위해 사용되어질 probiotic 균주의 선발기준으로는 먼저, 안전성이 입증되어야 하고 대량생산과 가공, 저장 중 생존력이 우수해야 한다. 또한 다양한 제품에 사용되었을 때 바람직한 품질을 제공해야 하며 목적부위에 도달할 수 있도록 여러 저해 인자에 대한 저항성과 점착, 증식면에서 경쟁적인 우수성이 뛰어나야 한다. 마지막으로 다양한 항미생물작용, 면역능 증강작용, 항암작용과 같은 기능성을 발휘해야 한다(Klaenhammer와 Kullen, 1999). 본 고에서는 *L. acidophilus* ATCC 43121 균주의 일반적인 probiotic 특성과 균주 이용성 증진을 위한 prebiotic과 미세캡슐화의 적용에 대해 언급하였다. 또한, Green Fluorescence Protein (GFP) 발현 벡터의 제작 및 electroporation의 최적 조건과 *L. acidophilus* ATCC 43121 균주의 급여시기와 절식시기 동안 쥐(Rat) 소화기관내 분포 양상을 조사하였다.

## II. Probiotic 특성

### 1. 내산성 및 내담즙성

사람을 비롯한 각종 동물의 소화기관에는 미생물들이 생존하기에 열악한 요인들이 존재하는데 대표적인 것이

위액, 각종 소화효소, 담즙염, 장의 연동운동, 면역반응 등과 같은 것이며 그 밖의 유기산, 지방산, 황화수소 등도 포함된다(Sandine, 1979). 섭취된 대부분의 미생물들은 일차적으로 위에서 분비되는 위산에 의해 사멸되지만 유산균 중에서도 *L. acidophilus* 균주는 산에 대한 내성이 높은 것으로 알려져 있으며 일반적으로 pH 3에서도 거의 사멸하지 않는다(Hood와 Zottola, 1988). 산은 미생물의 세포막 구성요소의 합성 저해와 세포막의 손상을 유발하고 세포질 pH의 항상성 소실에 의해 효소와 DNA를 손상시켜 세포를 사멸하는 것으로 알려져 있다(Moat와 Foster, 1995). 세포막은 친수성 부분과 소수성 지방산이 부착되어 있는 인지질로 구성되어 있고 선택적 투과성을 나타내어 내부 환경을 일정하게 유지시키는데 내산성이 우수한 균주는 세포막의 형태를 변화시켜 산 침입을 억제하여 내산성을 나타내며 이러한 세포막 형태 변화는 세포막의 조성 변화에 의한다(Forestier 등, 2001). 또 다른 대표적인 저해 인자로서 담즙염이 있다. 담즙염은 간에서 합성되어 십이지장으로 분비되는 양친매성 지방 분해 요소로서 미생물 세포막 구조를 붕괴시켜 미생물에 유해하게 작용한다(Altman과 Dittman, 1968). 내담즙성을 나타내는 미생물의 세포막도 담즙염과 같은 소수성 물질의 세포내 침입을 억제하는 막이 형성되며 막 형성은 지질 다당체와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되어 있다(Nikaido와 Vaara, 1985). 특히, 장에서 분리된 유산균들은 주로 담즙염에 내성이 있으나 장에서 분리하지 않은 많은 유산균들은 0.15% oxgall에서도 성장하지 못한다고 보고되었다(Gilliland 등, 1984).

본 연구에서는 11종의 *L. acidophilus* 균주를 대상으로 인공 위액을 제조, 내산성을 조사한 결과 1시간 배양시에는 대부분 우수한 내산성을 나타냈으나 3시간 배양후에는 몇몇 균주가 급격한 감소 현상을 보여 *L. acidophilus* 균주간에도 균주 특이적인 양상을 나타냈다(Table 1). 특히, 43121 균주는 조사되어진 균주들 중에서도 내산성이 우수한 종으로 나타났다. 또한, 내담즙성의 경우 몇 종의 균주를 제외하고 대부분 높은 내성을 보여주었으며 0.3% 담즙염에 대해 우수한 내성을 나타낸 균주는 0.5% 담즙염에도 우수한 내성을 나타냈다(Table 1). 내산성이 우수한 43121 균주의 경우 상대적으로 다른 균주들에 비해 낮은 내담즙성을 나타내어 반드시 내산성과 내담즙성이 양의 상관관계를 나타내지는 않았다(Table 1).

## 2. 콜레스테롤 저하 작용

콜레스테롤은 성장과 유지를 위해 필요한 모든 동물세포의 구성물질이며 생체 세포막의 물리적 상태를 조절해주는 물질일 뿐 아니라 동물의 스테로이드 호르몬, 담즙산, 비타민 D의 전구물질, 미생물 및 바이러스 감염억제 등 생체의 기능유지에 없어서는 안되는 물질이다. 그러나, 과잉의 콜레스테롤 섭취는 순환계 질환 등의 원인이 되어 동맥의 벽이 두꺼워져 생기는 동맥경화증과 같은 혈관 및 심장질환과의 높은 상관관계를 나타내는 것으로 보고되어 있다(van Itallie, 1985). 유산균의 건강 증진 효능에 대한 연구 중 수많은 연구자들이 발효유를 섭취한 실험동물의 혈중 콜레스테롤이 유의적으로 감소함을 보고하였다. 특히, *L. acidophilus* 균주가 콜레스테롤 저하 능력이 뛰어난 것으로 나타나 이를 목적으로 하는 probiotic 균주로의 개발 가능성이 높은 것으로 알려져 있다(Danielson 등, 1989). 혈중 콜레스테롤 저하는 사람의 일차적인 콜레스테롤 흡수장소인 소장에서의 콜레스테롤 제거를 통해 이루어질 수 있으며 *in vitro*상 콜레스테롤의 동화작용(assimilation)이 우수하였던 *L. acidophilus* 균주를 사용하여 혈중 고콜레스테롤증이 유기된 돼지와 쥐에게 급여한 결과 혈중 콜레스테롤 함량이 감소함을 알 수 있었다(Grunwald, 1982; Gilliland 등, 1985). 이러한 현상은 유산균의 성장과 생존에는 어떠한 영향도 미치지 않고 세포벽에 콜레스테롤이 부착된다는 가설로(Razin, 1975) 배지내 콜레스테롤 수준 저하를 유기한 *L. acidophilus* ATCC 43121의 세포막 탄성이 증가하여 콜레스테롤이 존재하지 않는 배지에서 성장한 균주에 비해 초음파처리시 생존율이 향상되었다는 Noh 등(1997)의 보고로 이 가설이 뒷받침되고 있다. 본 연구에서도 *L. acidophilus* 균주들이 정도의 차이는 있었지만 모두 콜레스테롤 동화작용을 나타내었으며 특히 43121 균주가 가장 높은 콜레스테롤 감소율(57.5%)을 나타냈다(Table 1). 또한, 콜레스테롤 수준을 저하시킨 균주를 TEM으로 관찰한 결과 일반적인 균주와는 달리 세포막

Table 1. Acid tolerance, bile tolerance, cholesterol assimilation and glycocholate deconjugation of strains of *L. acidophilus*.

Strains of <i>L. acidophilus</i>	Acid tolerance <sup>1</sup>	Bile tolerance <sup>2</sup>	Cholesterol assimilation <sup>3</sup>	Glycocholate deconjugation <sup>4</sup>
ATCC 43121	-0.309±0.227	-1.339±0.488	57.5	0.623±0.058
A4	-1.114±0.272	1.459±0.606	53.0	0.611±0.041
ATCC 4356	-0.178±0.184	-0.269±0.856	33.2	0.588±0.054
30SC	-2.554±0.427	0.302±0.473	29.1	0.620±0.021
GP2A	-3.539±0.156	0.685±0.624	57.0	0.630±0.051
NCFM	-0.237±0.234	-2.602±0.293	51.0	0.651±0.015

<sup>1</sup> The strains were incubated at 37°C for 3 hrs in MRS adjusted pH to 2.5. Each value (increased Log cfu/ml) represents an average from six trials.

<sup>2</sup> The strains were incubated at 37°C for 24 hrs in MRS containing 0.5% bile salt. Each value (increased Log cfu/ml) represents an average from six trials.

<sup>3</sup> The strains were incubated in MRS-THIO broth containing cholesterol micelle for 18 hrs at 37°C. Cholesterol in cultured media was measured and presented as reduced cholesterol %.

<sup>4</sup> The strains were incubated in MRS broth containing 1 mM glycocholate and remained glycocholate was measured by HPLC. Each value represents an average from three trials.

주위에 콜레스테롤로 추정되는 물질이 부착되어 있음을 확인할 수 있었다.

반면, Chikai 등(1987)은 발효유 급여에 의한 혈중 콜레스테롤 저하는 유산균이 생산하는 담즙염 분해효소에 의한 것이라 보고하였는데 이는 담즙염을 분해시켜 유리 담즙염으로 전환될 경우 유리 담즙염의 용해도가 낮아져 소장 하부에서의 흡수가 현저히 감소하며 그러므로 지방소화에 요구되는 담즙염이 콜레스테롤로부터 연속적으로 생산되어 체내 콜레스테롤 수준이 감소한다는 가설이다. 인위적으로 혈중 고 콜레스테롤 수준을 유지시킨 쥐에 담즙염 분해효소 생산능력이 우수한 유산균을 급여할 경우 혈중 콜레스테롤 수준이 감소함은 물론 분변에 존재하는 유리 담즙염의 양과 유산균수의 증가가 이 가설을 뒷받침한다. 본 연구에서 조사되어진 *L. acidophilus* 균주들의 담즙염 분해능력은 다양하게 나타났으며 생체내 담즙염은 glycocholate가 taurocholate의 3배에 달하므로 전자의 분해능력을 기준으로 보았을 때 43121의 경우 우수한 담즙염 분해능을 나타냈다(Table 1). 또한, taurocholate와 glycocholate 분해능력은 서로 부의 상관관계임을 알 수 있었다. 그러나 아직 콜레스테롤 저하 기작은 불분명한 것이며 단지 가설만이 그 기작을 뒷받침하고 있다.

### 3. Shiga-like toxin 중화 작용

병원성을 나타내는 대장균 중 enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7은 미국과 일본 등 선진국에서 대량 식중독 사태를 일으킨 바 있으며 감염시 출혈성 요독 증후군(hemolytic uremic syndrome), 출혈성 장염(hemolytic colitis) 및 혈소판 감소성 자반증(thrombotic thrombocytopenic purpura) 등의 증상을 유발시켜 특히, 면역능이 약한 유아나 노약자의 경우에는 사망에까지 이르게 하는 치명적인 병원성 미생물로 알려져 있다(Forestier 등, 2001). 이러한 원인은 *E. coli* O157:H7이 vero cell을 사멸시킬 수 있는 Shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II를 각각 또는 동시에 생산하기 때문으로 알려져 있다(Park 등, 1999). 이와 같은 병원균의 치료를 위해 주로 항생제가 사용되고 있지만 항생제 내성이 증가하면서 최근 들어 probiotics에 의한 장내 균총 조절과 병원성 미생물 예방에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 현재, 유산균에 의한 병원균 억제 기작 중 병원균의 장 독소 중화 작용과 장점막 부착 저하 작용이 probiotic 균주의 주된 치료 및 예방 기작으로 알려져 있으며(Vanderhoof, 2000) 수종의 *L. acidophilus* 균주가 in vivo 또는 in vitro상 다양한 병원균의 점착과 발병에 억제 능력을 보이는 것으로 나타났다(Velraeds 등, 1996; Nicholls 등, 2000).

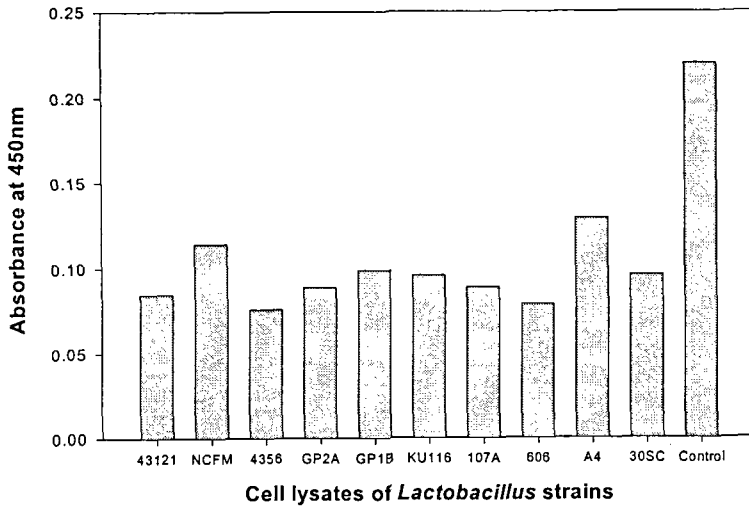


Fig. 1. Effect of cell lysates from *Lactobacillus* strains on the interaction between shiga-like toxin II and monoclonal antibody.

독소와 체내 수용체와의 결합의 본질은 수용체가 지닌 독특한 당 구조가 독소 결합 능력의 핵심이라 할 수 있으며 유사한 당 구조를 가진 물질들이 수용체와의 결합을 억제시키므로서 독소에 의한 발병을 막을 수 있으리라 판단된다(Mylvaganam과 Lingwood, 1999). 본 연구에서는 *E. coli* O157:H7 ATCC 43889의 shiga-like toxin II에 대해 43121 균주를 포함한 *L. acidophilus* 균주들의 장 독소 중화 능력을 조사해 보았다. 각종 *L. acidophilus* 균주의 세포 파쇄물들을 사용하여 monoclonal anti-VT IgG와 shiga-like toxin II 결합 저해능을 평가해 보았으며 그 결과 실험된 대부분의 균주들이 독소와 항체와의 결합을 저해하는 것으로 나타나 이는 세포파쇄물이 독소와 결합함으로써 장관 내 독소 중화작용에 어떠한 요인으로 작용할 수 있음을 간접적으로 시사한다(Fig. 1). 더 나아가 HeLa cell을 대상으로 독성 중화 작용을 검증해 본 결과 세포파쇄물이 첨가된 처리구가 shiga-like toxin II만 첨가한 대조구에 비해 HeLa cell의 생존률이 유의적으로 높다는 것을 확인하였다.

### III. 균주 이용성 증진 방안

#### 1. Prebiotic

Prebiotic이란 대장내 다양한 균들 중 숙주에게 유익한 영향을 미치는 균들만을 선택적으로 증진시켜주는 비소화성 식품성분을 총칭한다(Gibson과 Proberfroid, 1995). 이러한 비소화성 성분들 중 대표적인 것으로 oligosaccharide를 들 수 있는데 이는 상부관에서 소화되지 않고 대장에서 발효되어 장관의 건강을 향상시켜준다(Roberfroid와 Delzenne, 1998). Soybean oligosaccharides(raffinose와 stachyose)는 대부분의 bifidobacteria와 lactobacilli 균주에 의해 이용될 수 있으며 인간의 분변 미생물총을 조사한 결과 다른 균종들의 증가 없이 선택적으로 성장이 증진됨을 알 수 있었다(Masai 등, 1987). 또한, 단백질의 과다섭취와 섬유소의 부족에 의해 형성될 수 있는 indole, 황화수소, 암모니아와 같은 화합물의 생성을 방지하며 장내 연동운동을 증가시켜 변비를 완화시키고 직간접적인 기작을 통해 병원성균의 감염으로부터 보호작용을 한다(Kunz와 Rudloff, 1993). 주요 당 급여원료 7종의 prebiotic (xylitol, sorbitol, mannitol, inulin, fructooligosaccharide, lactulose, raffinose)으로 제한하고 여기에 yeast extract, proteose

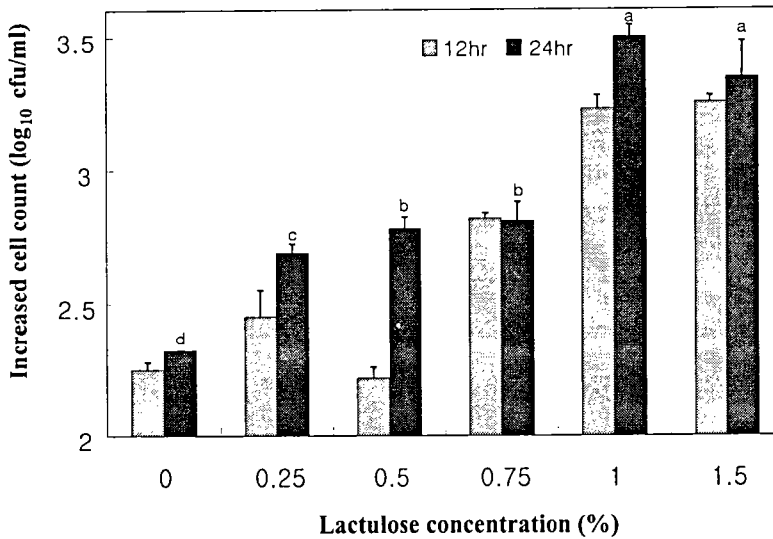


Fig. 2. Change of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 in modified media added with latulose at different concentrations.

peptone과 여러 미네랄을 첨가한 배지를 제조한 다음 약  $1 \times 10^4$  cfu/ml 수준으로 *L. acidophilus* ATCC 43121를 접종하여 12시간과 24시간 동안 균주의 성장 변화량(증가량)을 조사해 본 결과 3종의 prebiotic(fructooligosaccharide, lactulose, raffinose)만이 이용 가능하여 균수가 유의적으로 증가할 수 있었다( $p < 0.05$ ). Lactulose의 경우 1.0% 이상의 농도에서 동일하게 가장 높은 증가량을 나타냈으며 최종 pH 역시 균수의 성장과 더불어 pH 5.4까지 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

## 2. 미세캡슐화(Microencapsulation)

미세캡슐화는 내부물질과 외부물질과의 바람직하지 않은 접촉을 차단하여 내부물질을 외부환경으로부터 보호하고 원하는 시점에서 내부물질을 방출시키는 것을 주목적으로 식품 및 제약산업에서 상업적으로 응용되고 있다(Risch, 1995). 미세캡슐 내부에 존재하면서 코팅되는 물질을 중심물질(core material), 중심물질을 감싸는 물질을 피복물질(wall material)이라 하는데 피복물질로는 butter fat, agar, gelatin, gum, maltodextrin, caseinate 등의 지방질, 단백질 혹은 탄수화물 등을 사용하고 있다. 이 피복물질은 단일물질로 구성되는 경우보다는 두 가지 이상으로 혼합된 피복물질로 만들어질 경우 중심물질의 주변환경에 대한 저장 안정성이 더욱 향상된다(Kim 등, 1996).

기존의 유산균 대량생산을 위하여 분말상태에서 이용되었던 대표적인 미세캡슐화 방법은 분무건조이며 이 공정은 수화된 피복재에 피복대상이 되는 내부물질을 분산시켜 고온의 건조실에 분무하는 공정으로 이루어지므로 민감한 균체의 피복기술로는 적합하지 않을 수 있다(Porubcan과 Sellars, 1979). 본 연구에 사용된 Hybridization system을 이용한 피복처리 기술은 미세한 분체에 보다 작은 입자의 피복재를 압축공기로 쏘아 분체표면의 성질을 개선하기 위해 개발된 방법으로 최근 비타민C, 비피더스균 등의 미세캡슐화에 적용되고 있다(Takafumi 등, 1993; Ono, 1994). 표면처리는 분체간의 정전기적 힘으로 내용물 주위에 피복물질을 부착하여 규칙적 배열의 혼합물(ordered mixture)을 형성하고 규칙적 배열의 혼합물이 압축공기와 회전 rotor에 의해 기계적, 열적 에너지를 개별 입자에 부여하여 단시간내에 고형화 처리 및 피복된 분체를 회수하는 원리로 되어 있다(Staniforth 등, 1982; McGinity 등, 1985). 표면처리를 통한 내열성의 변화를 조사하기 위하여 55°C의 항온수조에서 장시간동안 가열하

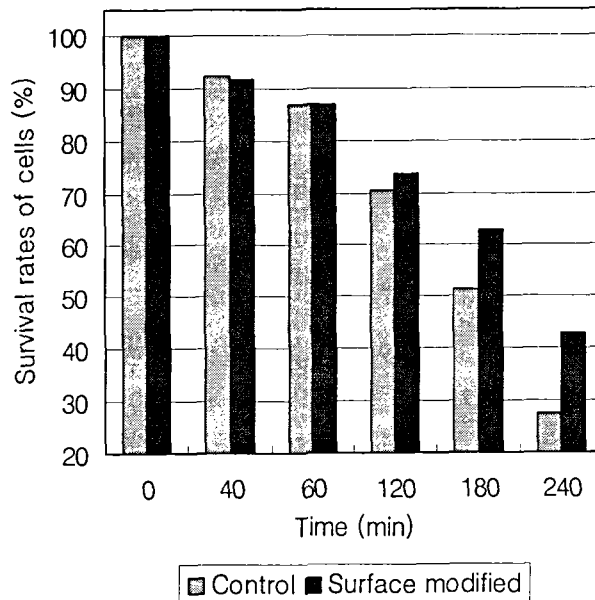


Fig. 3. Change of heat tolerance of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 after surface modification. Heat tolerance was determined after exposing samples for the designated times in a 55°C water bath. Surface modification was done for 3 min with Sureteric at the rotor speed of 15,000 rpm.

며 표면처리 전후의 유산균 생존율의 변화를 조사한 결과 열처리후 초기 균수 대비 생균수의 감소율은 120분 이후 부터 대조구와 처리구간의 유의적인 차이가 관찰되었으며 표면처리한 균주의 열안정성이 우수하였다( $p < 0.05$ ). 또한 240분까지 장기간 열처리시 대조구와 처리구간의 균수는 더 큰 차이를 보여 이는 표면처리를 통해 유산균의 열 안정성이 일부 향상될 수 있음을 의미한다(Fig. 3).

#### IV. GFP 발현벡터 제작 및 Electroporation 최적조건 탐색

과거 20여년 동안 유산균 연구는 다양한 분자생물학적 기법들이 접목되면서 급속하게 발전해 왔다. 이러한 연구들 중 chloramphenicol acetyltransferase(Achen 등, 1986),  $\beta$ -glucuronidase 유전자(Platteuw 등, 1994), luciferase 유전자(Eaton 등, 1993), nuclease 유전자(Poquet 등, 1998)와 같은 여러 보고유전자(reporter gene)들을 유산균의 target signal로 이용한 연구들이 보고되었으나 이러한 유전자들을 발현시키기 위해서는 부가적인 외래 기질을 첨가해야 하는 불편함이 있어 in vivo상 연구에 한계를 나타냈다. 이와 같은 단점을 보완하고자 해파리(*Aequorea victoria*)로부터 분리된 GFP 유전자가 그람음성균을 비롯해 몇 종의 유산균들(*Streptococcus bovis*, *Lactococcus lactis*, *L. plantarum* 등)에게 적용되어 왔다(Chalfie 등, 1994; Scott 등, 1998). GFP 발현시스템 구축은 부가적인 기질의 첨가 없이 균주의 비파괴적 관찰이 가능하다는 장점이 있으며 현재에도 다양한 방법을 이용하여 더욱 향상된 발현이 가능하게 되었다. 본 연구에서는 GFP의 세포내 발현을 위해 chloramphenicol 내성 유전자를 보유한 pNZ123 벡터(2.8 kb)에 GFP 유전자와 *L. acidophilus* ATCC 4356에서 유래한 slpA promoter 및 terminator 서열로 구성된 오페론을 발현 벡터에 결합시켰으며 형광현미경의 관찰 결과 우수한 발현도를 나타냈다(Fig. 4).

유산균의 고전적인 사용 범주에서 벗어나 바람직한 특성을 향상시킨 형질전환 균주의 생산을 위해 다양한 유전적 기법들 즉, transduction, conjugation, fusion 및 transformation과 같은 방법들이 이용되어 왔다. 이러한 방법들 중

conjugation 및 protoplast와 같은 기법들은 낮은 효율성과 재현성 문제 등의 단점이 있으며 이러한 문제를 보완하고자 최근에 *Lactobacillus* 균주의 transformation 방법이 개발되었고 그 중에서도 electroporation이 가장 간편한 방법으로 알려져 있다(Pouwels 등, 1998). Electroporation 효율은 주로 대상 균주(competent cell)의 성장 단계, 세포수, 성장배지, electrical pulse strength와 length 같은 요인들에 따라 달라지는데 이 중에서도 세포벽의 강도와 두께에 직접적인 영향을 미치는 배지성분이 가장 중요한 역할을 담당한다. 많은 연구들이 세포벽을 화학적 혹은 효소적으로 약화시키는 방법을 모색해 왔으며 그 예로 glycine, lysozyme 등으로 유산균의 Electroporation 효율을 향상시켰음이 보고되었다(Wei 등, 1995). 현재 *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. sakei*와 같은 균주들에 대해서는 electroporation 조건에 대해 다양한 연구결과들이 보고되었지만(Berthier 등, 1996) *L. acidophilus* 균주들을 대상으로 한 연구 결과는 드문 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 *L. acidophilus* ATCC 43121 균주를 대상으로 BTX 830(Genetronics, San Diego, CA, USA) 기기를 사용하여 고효율의 electroporation 최적 조건을 탐색하였다. 본 연구를 통해 설정된 최적의 조건으로 다른 7종의 *L. acidophilus* 균주들과 대조구로서 *L. brevis* 3102를 대상으로 실험

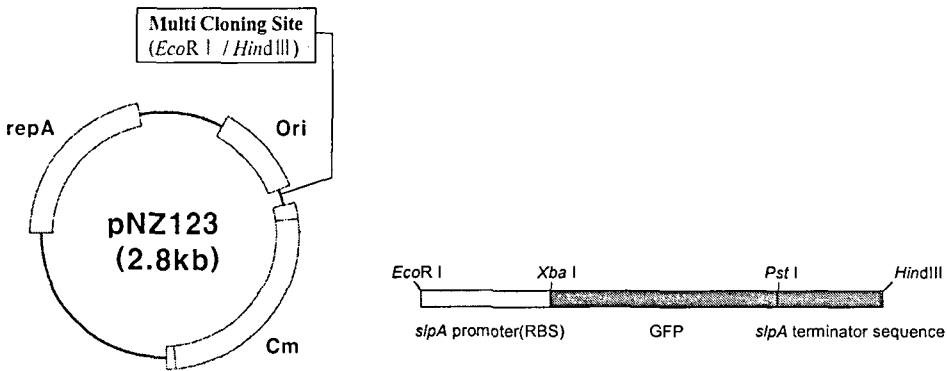


Fig. 4. Plasmid pNZ123 carrying the GFP gene under the control of the *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 *slpA* promoter.

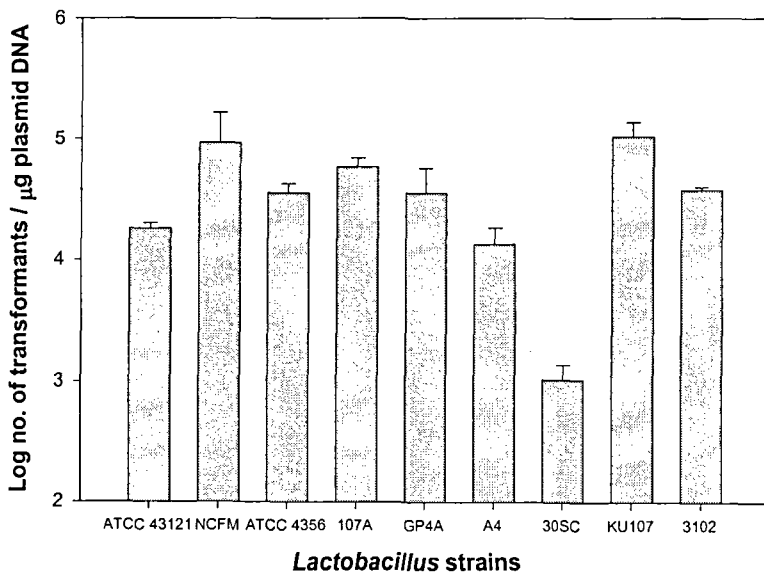


Fig. 5. Electrotransformation efficiency of *Lactobacillus* strains with pNZ123 under optimal conditions.

이 실시되었다. 그 효율은  $1.40 \times 10^3$ 에서  $9.32 \times 10^4$  cfu/g DNA 까지 다양하게 나타났으며 효율의 차이는 주로 균주 특이성에 기인한다(Fig. 5).

## V. 쥐(Rat) 소화기관내 모니터링

유산균이 probiotic 균주로서 또는 잠재적인 치료, 예방 목적의 기능성 물질 전달자로 사용될 때 구강으로 섭취된 후 여러 저해요인을 겪으며 목적기관인 장에 도달하고 정착, 증식해야 하지만 이러한 현상은 섭취된 유산균의 종류에 따라 소화기관내 생존율, 분포 양상 및 우점의 지속성이 다르리라 판단된다. 따라서, 사용하고자 하는 유산균의 소화기관내 운명에 관한 연구는 반드시 선행되어야 할 과제임에도 불구하고 이에 관련된 연구들은 아직 미비한 실정이다. 본 연구에서는 GFP 발현백터가 주입된 *L. acidophilus* ATCC 43121 균주를 쥐(Rat)에게 1일 약  $5 \times 10^9$ 의 균수로 9일동안 급여하고 3일 간격으로 소화기관내 분포양상을 조사하였으며 또한 6일 동안 균주 급여를 중지함으로 그 감소 양상을 조사하였다. Geoffroy 등(2000)에 따르면 소화기관내 GFP 발현 형질전환 균주를 flow cytometry로 모니터링한 결과와 전통적인 agar plating 방법으로 조사한 결과는 동일하게 나타난 바 본 연구에서는 먼저 chloramphenicol이 함유된 MRS 배지(pH 5.0)로 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장 및 결장(직장)의 장 내용물을 회수, 균수를 측정하였으며 그 중 회장, 맹장 및 결장(직장) 부위의 균수 변화는 Fig. 6과 같다. 균주 급여기간이 진행되면서 회장과 맹장의 경우 9일째 가장 높은 균수(약  $1 \times 10^8$  cfu/g)를 나타냈으며( $P < 0.05$ ) 결장(직장)의 경우 6일과 9일째 가장 높은 균수를 나타냈다( $P < 0.01$ ). 세 부위(회장, 맹장, 결장) 균수의 차이는 단지 급여 6일후 회장의 균수가 다른 부위보다 유의적으로 낮은 경우를 제외하고 모두 유사한 균수 분포를 나타냈다( $P < 0.05$ ). 또한 균주 급여가 중단되면서 세 부위 모두 유의적으로 균수의 완만한 감소현상이 나타나 *L. acidophilus* ATCC 43121 균주는 급여가 중지된 후 다양한 요인에 의해 장 정착과 증식이 억제되는 것을 짐작할 수 있었으며 장관내 지속적인 우점을 위해서는 꾸준한 급여가 필요하리라 판단된다.

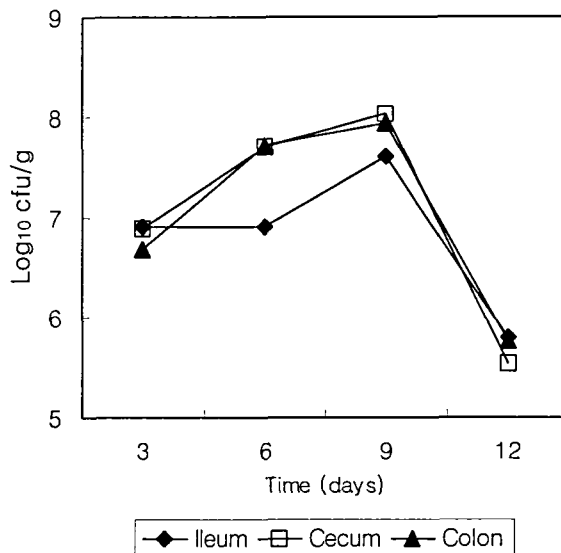


Fig. 6. Enumeration of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 in intestinal tracts of rats.



## VI. 맺음말

현대의 소비자들은 식품의 기능성에 대한 관심이 점차 고조되어 영양적인 가치 이상의 의미를 부여하는 경향이 있다. 그 중에서도 전형적인 관심의 대상은 장건강을 위한 미생물총의 향상에 관한 것으로 여기에 관련된 식품 개발이 기능성 식품의 중요한 부분을 차지하고 있다. 사람의 소화기관내에는 400여종의 미생물이 약  $10^{14}$  이상 존재하며 이들 미생물들은 상호 공생작용과 길항작용을 통해 균형을 이루고 있다. 유산균은 오랜 기간 다양한 발효식품에 사용되어 오면서 그 안전성과 기능성이 입증되어온 미생물로 이중 대표적인 균주로 *L. acidophilus* 균주를 들 수 있으며 이미 건강증진효과가 입증되었고 현재에도 다양한 발효제품에 널리 사용되고 있다. 현대의 probiotic 유산균의 사용은 고전적인 범주를 벗어나 점차 질병예방 목적의 의약품 생산과 같은 새로운 분야로 도전하고 있으며 이러한 시점에서 우수한 probiotic 균주를 선발하고 작용기작을 연구하며 적용과 생산 방법 등 이용성 증진에 관련된 연구가 무엇보다 중요하다 하겠다. 현재 우리나라는 경제적인 소득 증대와 식단의 서구화 및 노령화시대가 도래하면서 성인병 및 각종 대장 관련 질병이 점차 증가하고 있으며 이에 관련되어 다양한 probiotic 균주의 수요가 예상된다. 전 세계적으로도 유아식, 각종 발효 제품류 및 질병 치료와 예방차원의 식품 등과 같이 probiotic을 함유한 새로운 기능성 식품들이 개발 중에 있으나 우리나라의 경우 probiotic 균주의 외국 수입 의존도가 높아 한국인에 알맞은 생리활성 유산균과 다양한 기능성 식품 개발을 위한 연구인력 양성 및 기술개발이 절실히 요구되어진다.

## VII. 참고문헌

1. Achen, M.G., B.E. Davidson, and A.J. Hillier. 1986. Construction of plasmid vectors for the detection of streptococcal promoters. *Gene*, 45, 45-49.
2. Altman, P.L. and D.S. Dittman. 1968. *Metabolism*. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Md. P262.
3. Berthier, F., M. Zagorec, M. Champomier-Verges, S.D. Ehrlich, and F. Morel-Deville. 1996. Efficient transformation of *Lactobacillus* sake by electroporation. *Microbiol.* 142, 1273-1279.
4. Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, and D.C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263, 802-805.
5. Chitai, T., H. Nakao, and K. Uchida. 1987. Deconjugation of bile acids by human intestinal bacteria implanted in germ free rats. *Lipids*. 22, 669.
6. Conway, P. 1989. Lactobacilli: fact and fiction, in *The regulatory and protective role of the normal microflora*. R. Grubb, T. Midtvedt, and E. Norin, eds. M. Stockton Press, Stockholm, p263-283.
7. Danielson, A.D., E.R.J. Peo, K.M. Shahani, A.J. Lewis, P.J. Whalen, and M.A. Amer. 1989. Anticholesterolemic property of *L. acidophilus* yoghurt fed to mature boars. *J. Animal Sci.* 67, 966-974.
8. Eaton, T.J., C.A. Shearman, and M.J. Gasson. 1993. The use of bacterial luciferase gene as reporter genes in *Lactococcus*: regulation of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* lactose genes. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1495-1501.
9. Forestier, C., C. De Champs, C. Vatouz and B. Joly. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol.* 152, 167-73.
10. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 66, 365-78.
11. Geoffroy, M., C. Guyard, B. Quatannens, S. Pavan, M. Lange, and A. Mercenier. 2000. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 383-391.
12. Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401-1412.

13. Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 175-188.
14. Gilliland, S.E., C.R. Nelson and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 377-381
15. Gilliland, S.E. and D.K. Walker. 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.
16. Gilliland, S.E., T.E. Staley and L.J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67, 3045-3051.
17. Grunewald, K.K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* 47, 2078
18. 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.
19. Kim, H.J., K.W. Lee, S.J. Baick, H.S. Kwak, and J.O. Kang. 1996. Studies on the microencapsulation of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid. *Korean J. Food Sci. Tehcnol.* 28, 743-749.
20. Klaenhammer, T.R. and M.J. Kullen. 1999. Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 45-57.
21. Kunz, C. and S. Rudloff. 1993. Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr.* 82, 903-912.
22. Masai, F., K. Wada, and K. Hayakawa. 1987. Effects of soybean oligosaccharides on human intestinal flora and metabolic activities *Jpn. J. Bacteriol.* 42, 313-340.
23. McGinity, J.W. and G.W. Cuff. 1985. Nylon-encapsulated pharmaceuticals. *Methods Enzymol.* 112, 84-101.
24. Moat, A.G. and J.W. Foster. 1995. *Microbial physiology*. 3rd ed. Woley-Liss, Inc., New York. p266-269.
25. Mylvaganam, M. and C.A. Lingwood. 1999. Adamantyl Globotriaosy Ceramide: A Monovalent Soluble Mimic Which Inhibits Verotoxin Binding to Its Glycolipid Receptor. *BBRC.* 257, 391-394.
26. Nicholls L., T.H. Grant, and R.M. Robins-Browne. 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol.* 35, 275-88.
27. Nikaido, H. and M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49, 1-32.
28. Noh, D.O., S.H. Kim, and S.E. Gilliland. 1997. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci.* 80, 3107-3113.
29. Ono, K. 1994. Powder milling and composition technology, (1st) Powder process technology seminar. Korean Institute of Chemical Engineers, Daejon.
30. Park, S., R.W. Worobo and R.A. Durst. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: A literature review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 481-502
31. Platteuw, C., G. Simons, and W.M. de Vos. 1994. Use of the *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 587-593.
32. Poquet, I., S.D. Ehrlich, and A. Gruss. 1998. An export-specific reporter designed for gram positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 180, 1904-1912.
33. Porubcan, R.S. and R.L. Sellars. 1979. Lactic starter culture concentrates. In H.H. Peppler and D. Perlman (Eds.), *Microbial technology* (2nd ed.) vol. 1 pp9-92. New York. Academic Press.
34. Pouwels, P.H., R.J. Leer, M. Shaw, M.J.H. Bakglashuwer, F.D. Tielen, E. Smit, B. Martinea, J. Jore, and P.L. Conway. 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicle for oral immunization purposes. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 155-167
35. Razin, S. 1975. Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *J Bacteriol.* 124, 570-572.
36. Risch S.J. 1995. Encapsulation. pp. 2-7. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*. American Chemical Society Symposium Series No. 590, Washington DC., USA.
37. Roberfroid, M.B. and N.M. Delzenne. 1998. Dietary fructans. *Annu. Rev. Nutr.*, 18, 117-143.
38. Salminen, S. and A. von Wright. 1993. *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker, Inc., New York. USA.

39. Sanders, M.E. and T.R. Klaenhammer. 2001. Invited review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.* 84, 319-331.
40. Sandine, W.E. 1979. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J. Food Prot.* 42, 259-262.
41. Scott, K.P., D.K. Mercer, L.A. Glover and H.J. Flint. 1998. The green fluorescent protein as a visible marker for lactic acid bacteria in complex ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 219-230.
42. Staniforth, J.N. J.E. Rees, F.K. Lai, and J.A. Hersey. 1982. Interparticle forces in binary and ternary ordered powder mixes. *J. Pharm. Pharmacol.* 34, 141-145.
43. Takafumi, I., H. Honda, and M. Koishi. 1993. Drug dissolution from indomethacin-starch hybrid powders prepared by the dry impact blending method. *J. Pharm. Pharmacol.* 45, 770-774.
44. Van Itallie, T.B. 1985. Health implications of overweight and obesity in the United States. *Annals of Internal Medicine.* 103, 983-988.
45. Vanderhoof, J.A. 2000. Probiotics and intestinal inflammatory disorders in infants and children. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 30, Suppl 2, S34-S38.
46. Velraeds M.M., H.C. van der Mei, G. Reid, and H.J. Busscher. 1996. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 62, 1958-1963.
47. Wei, M.Q., C.M. Rush, H.M. Norman, L.M. Hafner, R.J. Epping, and P. Timms. 1995. An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *J. Microbiol. Methods.* 21:97-109.