

Kefir로부터 분리된 *Lactobacillus sp.*의 특성

유숙진 · 조진국 · 허강철*

국립한경대학교 낙농과학과

서 론

Kefir는 kefir grain으로 발효시켜서 만드는 발효유제품으로 산과 알코올을 함유하고 있고 우수한 약리작용이 있는 것으로 밝혀지고 있다⁽¹⁾. Kefir의 미생물은 *Torula kefir*와 *Saccharomyces kefir* 같은 효모와 *Lactobacillus caucasicum* 과 *Lactococcus lactis ssp. lactis*같은 다수의 박테리아로 구성되어 있다. Kefir의 효능은 이들 미생물에 기인하는 것으로 사료되나 각각의 미생물에 대한 효과의 검증은 *Lactobacillus kefiranofaciens*를 제외하고는 아직 보고 되지 않은 것이 많다⁽²⁾.

본 연구에서는 Kefir에서 효소 생성능이 우수하며 내산성 및 내담즙산성과 열안정성이 우수한 미생물을 찾기 위한 일환으로 *Lactobacillus sp.*균을 분리하였고 probiotics로서의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재 료

Kefir는 러시아 시장에서 구입한 것을 사용하였고, *Lactobacillus acidophilus*와 대장균은 한국유전자은행(KCTC)에서 구입하였다. *Lactobacillus sp.*는 MRS broth(Difco, USA), 대장균은 Nutrient Broth(Difco, USA)를 사용하였다.

*Lactobacillus sp.*의 분리 · 동정

Kefir 시료를 0.02% NaN₃를 포함한 MRS agar에 도말하여 1차적으로 성장이 뛰어난 *Lactobacillus sp.* 균주들을 분리하였다. 분리균주 중 특성이 가장 우수한 *Lactobacillus sp.*를 API Kit와 16s rRNA sequencing 방법을 사용하여 동정하였다⁽³⁾. 총생균수는 평판배지에 0.1ml씩 도말한 후, 콜로니 형성 단위(colony forming unit)를 측정하여 계산하였다.

효소활성 측정

*Lactobacillus sp.*의 균체를 glass homogenizer로 파쇄한 다음 15,000 rpm으로 20분간

원심분리하여 상등액을 효소시료로 이용하였다. Xylanase, amylase, cellulase는 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법⁽⁴⁾으로 흡광도 540nm에서 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. Phytase 활성은 Shimizu의 방법⁽⁵⁾에 따라 측정하였다. 효소활성은 비활성(umole/min/mg protein)으로 나타내었고, 단백질 농도는 Bradford 방법으로 측정하였다.

내산성 및 내담즙능 및 열안정성 분석

분리균주의 pH 내성은 Kobayashi등의 방법⁽⁶⁾으로 측정하였다. 내담즙산능은 bile salt를 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%(w/v)를 첨가하여 MRS broth에 균주(2.0×10^9 CFU/ml)를 접종하고 37℃에서 6시간 동안 방치한 후, MRS agar plate에 도말하여 생존율(%)을 확인하였다. 열 안정성은 생장배지에서 배양한 다음 실온, 30℃, 60℃, 80℃, 100℃에서 10분간 정치 후 잔존 미생물수를 조사하였다.

대장균 생육억제 시험

대장균을 MRS배지에 약 5.0×10^7 CFU/ml이 되도록 접종하고, 또 하나의 MRS 배지에는 대장균과 분리한 *Lactobacillus rhamnosus*를 약 5.0×10^7 CFU/ml 되도록 혼합 접종하였다. 접종된 배지를 37℃배양기에서 정치 배양하면서 3시간 또는 6시간 간격으로 배양액을 채취한 후, Nutrient agar에 도말하여 나타난 대장균수를 측정하였으며, MRS 배지에 단독으로 접종한 대장균수와 비교하여 분리 균에 의한 대장균의 생육억제 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

*Lactoabacillus sp.*의 분리 동정

최종적으로 선발된 균주는 API Kit 분석에서는 *Lactobacillus rhamnosus* (99.5%) 로 나타났다⁽⁷⁾. 16S rRNA 분석에서는 1499개의 염기배열이 *Lactoabacillus rhamnosus*(97%)임을 알 수 있었다(data not shown).

Table 2. Sugar-fermentation of isolated *Lactobacillus rhamnosus* on API 50 CHL kit.

Control	-	SALicm	+
GLYcerol	-	CELlobiose	+
ERYthritol	-	MALtose	+
D ARAbinose	-	LACTose	+
L ARAbinose	-	MELibiose	-
RIBose	+	Sucrose	+
D XYlose	-	TREhalose	+
L XYlose	-	INULin	+
ADONitol	-	MeLeZitose	-
Beta Methyl-D-Xylose	-	RAFfinose	+
GALactose	+	Starch	-
GLUcose	+	GLYcogen	-
FRUctose	+	XyLiTol	-
MaNnosE	+	GENTiobiose	+
SorBosE	+	D TURanose	+
RHAMnose	+	D LYXose	+
DULcitol	+	D TAGatose	+
INOsitol	+	D FUCose	-
MANnitol	+	L FUCose	-
SORbitol	+	D ArabitoL	-
Alpha-Methyl-D-Mannoside	-	L Arabitol	-
Alpha-Methyl-D-Glucoside	+	GlucONaTe	+
N-Acethyl-Glucosamine	+	2-keto-Gluconate	-
AMYgdalin	+	5-keto-Gluconate	-
ARButin	+		
Esculin	+		

+: positive, -: negative

효소활성 측정

*Lactobacillus rhamnosus*는 amylase와 cellulase, xylanase의 비활성이 0.673과 0.269, 0.288 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 이었으며 phytase활성도 0.117 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 로 나타났다.

Table 3. Enzyme activities of supernatant fraction extracted from *Lactobacillus* sp.

Class	Protein conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Total activity ($\mu\text{mole}/\text{ml}$)				Specific activity ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$)			
		amylase	cellulase	xylanase	phytase	amylase	cellulase	xylanase	phytase
<i>Lactobacillus</i> sp.	52	0.35	0.14	0.15	0.061	0.673	0.269	0.288	0.117

pH내성과 내담즙산능 및 내열성

*Lactobacillus rhamnosus*의 pH내성은 Fig. 3에 나타낸 바와 같이, pH 5에서는 2×10^9 cfu/ml 이던 것이, pH 2에서는 7×10^8 cfu/ml로 65% 감소하였으나, pH 2에서 90% 감소한 *Lactobacillus acidophilus* 대조구 보다 pH내성이 높은 것으로 나타났다. 0.1~1.0%의 담즙산 농도에서의 생존율은 Fig. 4에 나타낸 바와 같이, *Lactobacillus rhamnosus*는 1.0%의

담즙산에서도 72% 존재하는 우수한 결과를 나타냈다. 열안정성은 Fig. 5에 나타낸 바와 같이, *Lactobacillus rhamnosus*는 30℃에서 7×10^9 cfu/ml 이던 것이 80℃에서는 7.0×10^8 cfu/ml으로 10% 잔존하는 것으로 나타났으나, 대조구인 *Lactobacillus acidophilus* 보다도 높은 내열성을 가진 것으로 확인되었다.

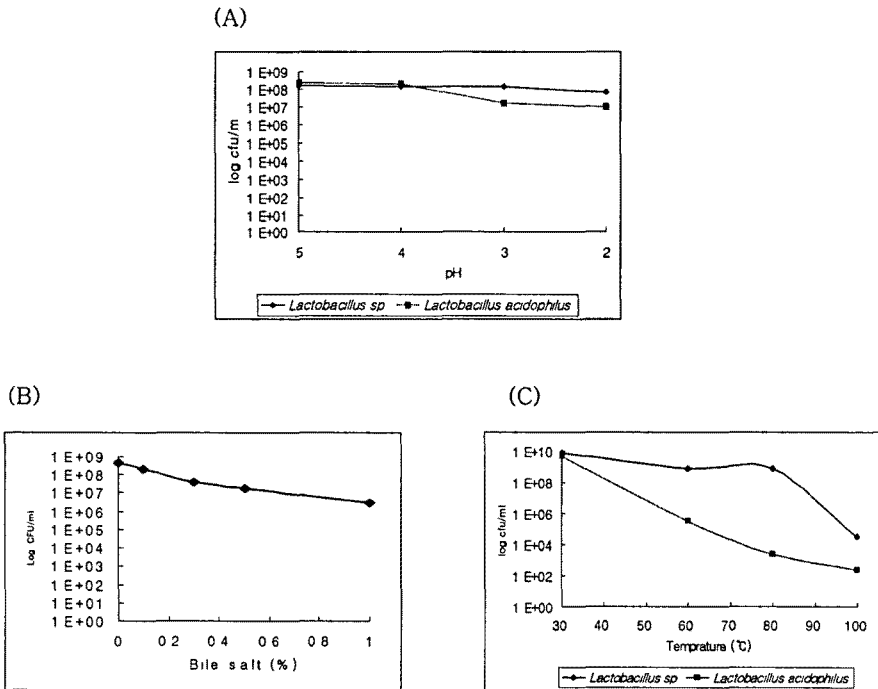


Fig. 2. pH resistance (A), Bile salt resistance (B) and Heat stabilities (C) of *Lactobacillus rhamnosus*.

대장균 생육 억제능

대장균 생육억제의 생육이 Fig. 6에 나타낸 바와같이 *Lactobacillus rhamnosus*를 혼합 첨가했을때 대장균의 생육이 9시간까지 완전한 저해되었고, 18시간 후에는 대장균이 완전히 사멸하는 저해 효과가 나타났다. 분리 젖산균에 의한 대장균의 생육억제는 산성 pH와 bacteriocin에 의한 사멸 작용에 기인하는 것으로 사료되었다.

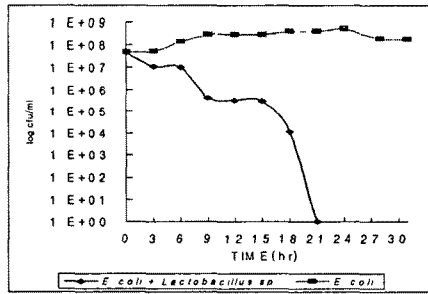


Fig. 6. Growth inhibition of E.coli KCTC 1041 by Lactobacillus rhamnosus in MRS broth (■ : Lactobacillus rhamnosus + E.coli ●: only E.coli).

요 약

본 연구에서는 Kefir를 MRS선택배지에 도말하여 생장이 우수한 *Lactobacillus* sp. 최종 분리하였다. 분리된 *Lactobacillus* sp. 균은 API Kit의 당발효 시험과 16s RNA배열 분석으로부터 *Lactobacillus rhamnosus*로 동정되었다. *Lactobacillus rhamnosus* 균주는 amylase와 cellulase, xylanase 비활성이 0.673과 0.269, 0.288 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 높은 활성을 보였다. 그리고, pH 2에서 65% 이상이 잔존하는 강한 pH내성과 1.0% 담즙산이 함유된 배지에서도 72% 생존하는 내담즙성을 나타냈으며, 열안정성도 비교적 뛰어난 것으로 확인되었다. 대장균에 *Lactobacillus rhamnosus*를 첨가하여 혼합배양시는 18시간이내에 대장균이 100% 사멸되었다. 이상의 결과로부터 분리된 *Lactobacillus rhamnosus* 균주는 probiotics로서의 우수한 특성을 가진 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Shiomi, M. K. et al. (1982) *Jap. J. Medical Science and Biology*. 35, 75-80
2. Adachi, S. et al. (1990) *International J. food microbiology*. 11(2), 127-34.
3. Loffler, F. E. et al. (2000) *Appl. Enviroro. Microbiol.* 66, 1369-1374.
4. Miller, G. L. (1959) *Anal. Chem.* 31, 426-428
5. Shimizu, M. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1266-1272
6. Kobayashi, Y. et al. (1974) *Japan. J. Microbiol.* 29, 691-697
7. Williams and Wilkins (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2*. Waverly press, Baltimore, U. S. A.