

젖산 발효제품에서 분리한 유산균의 내산성 비교

심재현 · 오세종 · 김상교 · 백영진

한국야쿠르트 유업(주) 연구소

Comparative Tests on the Acid Tolerance of Some Lactic-Acid-Bacteria Species Isolated from Lactic Fermented Products

Jae-Hun Sim, Se-Jong Oh, Sang-Kyo Kim and Young-Jin Baek

Hankuk Yakult Institute, Euiwang-shi, Kyunggi-do, Korea

Abstract

We isolated sixty lactic acid bacteria(LAB) from lactic fermented products. Among 60 isolates of LAB, 30 isolates were identified as *Lactobacillus casei* ssp.(5 strains), *Lactobacillus acidophilus*(2 strains), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*(6 strains), *Lactobacillus plantarum*(4 strains), *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*(11 strains), and *Streptococcus faecalis*(2 strains). The acid tolerance and bile resistance of 30 LAB were determined. Because the acid tolerance was affected by the initial cell concentrations, the analysis of covariance could be used to remove the effect of initial cells on acid tolerance when testing for differences in acid tolerance among six species. Viability of LAB under acidic condition, pH 3 for 2 hours at 37°C, was significantly different among the species. *L. casei* and *L. acidophilus* strains showed great viability, but *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* strains were very weak in acid tolerance.

Key words: acid tolerance, lactic acid bacteria, bile resistance.

서 론

Probiotics로서 유산균이 보유해야 할 특성으로는 여러 가지가 있는데, 그 중에서 가장 중요한 것은 생존력이 높아야 한다는 점이다⁽¹⁾. 구강을 통해 투여되는 유산균은 위와 십이지장을 생존하여 통과해야 비로서 목적부위인 장에 도달하게 된다. 순수한 위액의 pH는 1.4~2.0 정도로 거의 대부분의 미생물을 사멸시킨다. 다만 섭취된 음식물의 완충작용으로 인하여 다소 pH가 높아져 미생물의 사멸을 어느정도 감소시킬 수는 있다. 또한 미생물이 생존한 상태로 장관에 도달하려면 체장에서 십이지장으로 분비되는 담즙에 대한 내성이 있어야 한다⁽²⁾. Gilliland 등(1984)⁽³⁾은 유산균이 probiotics로서의 기능을 수행하려면 oxgall이 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있을 정도의 내성을 갖고 있어야 한다고 보고하였다. 이러한 내산성 및 내담즙산성은 미생물의 종류에 따라 그 정도가 다르게 나타나며 같은 종(species)에 속한 미생물의 경우에도 차이가 있는데, 유산균 중에서 특히 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*들은 비교적 이러한 성질이 약한 것으로 보고되고 있다. 그러나 이는 유산균의 각 균주(strain)끼리 비교하였을 뿐 유산균 종(species)에

대해서 비교한 것은 아니었다. 일반적으로 그룹들의 평균을 비교할 때에는 다중비교방법이 많이 사용되는데⁽⁴⁾, 처리요인에 의하여 분류되는 그룹이 미생물인 경우에는 매우 신중을 기해야 된다. 미생물 실험은 개체 하나를 가지고 실험하는 것이 아니고 균집형태의 개체를 가지고 실험하며, 생균수 등과 같은 자료는 첨가되는 초기 cell농도에 따라 달라질 수 있다. 또한 평가되는 자료의 단위가 매우 커서(예를들어, 10⁶, 10⁹) 실험 외적 요인의 작은 변화에 매우 크게 영향을 받는다. 따라서 이런 실험은 초기 균수를 같게 해주고, 실험 외적인 오차를 매우 작게 해 주어야 되는데, 이는 현실적으로 매우 어려우므로 단순한 분산분석 모형에 적합시킬 수 없는 것이다.

본 실험은 발효유제품 30여종과 야채 발효제품 2종에서 분리한 유산균의 내산성과 담즙산 내성을 각각 측정하여 종간의 차이를 평가하여 probiotics의 이용에 기초자료를 얻고자 수행하였으며, 분석모델로 공분산 모델을 적용시켜 보았다.

실험방법

유산균의 분리 및 동정

유통기한내의 국내의 유제품 30여종과 야채 발효제품 2종을 각각 구입하여 시료로 사용하였다. 시료의 일부를 취한 후 M-17, MRS-azide, BCP 배지를 이용하여 35°C와

Corresponding author: Jae-Hun Sim, Hankuk Yakult Institute, Euiwang-shi, Kyunggi-do, 437-020 Korea

43°C 에서 각각 2일간 호기적으로 배양한 다음 colony를 분리하였다⁶⁾. 이들의 세포형태와 API 50 CHL kit(API, France)를 이용한 당 이용성을 조사하여 유산균을 동정하였다.

내산성 측정

pH를 3으로 조정된 MRS broth에 pepsin을 1000 unit/ml이 되도록 첨가하여 내산성 측정용 인공위액으로 사용하였다. 분리된 유산균은 각각 MRS, M-17 배지에서 2회 이상 계대하여 활력을 높인 다음 준비된 인공위액에 균 현탁액을 1%(약 10⁶)수준으로 각각 접종하였다. 유산균이 접종된 인공위액은 37°C 에서 2시간 배양한 다음 0.05% L-cysteine이 첨가된 0.2 M phosphate buffered saline(pH 7.2)에 희석한 후 MRS 한천평판배지를 이용하여 생균수를 측정하였다.

담즙산 내성 측정

MRS 한천평판배지에 여과 제균된 Oxgall(Difco, USA) 용액을 0.25, 0.5, 0.75, 1.0%가 되도록 첨가하여 준비한 다음, 유산균 현탁액과 함께 petridish에 분주한 후 37°C 에서 3일간 배양하였다. 담즙산 내성의 판정은 Oxgall이 첨가되지 않은 대조군과 비교하여 대조군 colony수의 90% 이상인 경우를 ++로, 50~90%인 경우를 +로, 50% 이하인 경우를 -로 표기하였다.

통계처리

내산성 차이에 대한 통계처리는 SAS package를 이용하였으며 GLM procedure를 이용하여 least squares mean(LSmean)을 비교하였다⁶⁾.

결과 및 고찰

총 60개의 유산균주를 분리하여, 이중 30균주의 동정을 완료하였는데, *Lactobacillus casei* ssp.(5 strains), *Lactobacillus acidophilus*(2 strains), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*(6 strains), *Lactobacillus plantarum* (3 strains), *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*(11 strains), *Streptococcus faecalis*(2 strain)로 나타났다. *L. casei*의 경우 sub-species가 *rhamnosus*인지 *casei*인지 불분명한 경우가 있어 *L. casei* ssp.로 하였다. 각 종(species)간 내산성 차이의 분석은 공분산 분석을 이용하였는데, 다음과 같은 모델을 이용하였다⁴⁾.

$$\text{General model : } Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta(X_{ij} - X_{..}) + \varepsilon_{ij}$$

여기서 Y는 인공위액 조건에서의 생균수, τ_i 는 유산균 종(species)의 효과, β 는 회귀계수, ε_{ij} 는 오차항을 의미한다. 단, $i=1, \dots, 6$; $j=1, \dots, 6$.

이때 각 종(species)에 속한 균주(strain)들은 반복으로 처리되며, 전체 평균은 각 균주의 차이를 보정하여 계산하였고, 유산균의 내산성은 접종된 생균수에 영향을

Table 1. ANOVA table for acid tolerance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr>F
Model	6	157.970	26.329	14.18	0.0001
Error	24	44.566	1.857		
Corrected Total	30	202.536			

R² = 0.78

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr>F
Species	5	20.541	4.108	2.21	0.068
Viable cells	1	18.973	18.973	10.22	0.0039

Table 2. Least squares means and standard error for the viable cells of lactic acid bacteria in artificial gastric juice

Species	Viable cells ¹⁾ LSMEAN	Std Err LSMEAN	Pr> T H ₀ :LSMEAN=0
<i>L. casei</i>	5.052 ^a	0.811	0.0001
<i>S. faecalis</i>	4.614 ^a	0.990	0.0001
<i>L. acidophilus</i>	4.576 ^{ab}	1.233	0.0011
<i>L. plantarum</i>	4.185 ^{ab}	0.775	0.0001
<i>S. thermophilus</i>	3.961 ^a	0.720	0.0001
<i>L. bulgaricus</i>	2.327 ^b	0.564	0.0004

¹⁾log₁₀ number of viable cells

^{ab}Values with different superscripts in same row differ(p<0.05)

Table 3. Comparison of LSMeans among the viable cells of lactic acid bacteria in artificial gastric juice

i/j ¹⁾	1	2	3	4	5	6
1	.	0.372	0.412	1.004	0.811	2.628*
2	-0.372	.	0.026	0.368	0.491	1.975*
3	-0.410	-0.026	.	0.332	0.358	1.597
4	-1.004	-0.368	-0.332	.	0.173	1.851
5	-0.811	-0.491	-0.358	-0.173	.	1.916*
6	-2.628*	-1.975*	-1.597	-1.851	-1.916*	.

¹⁾test for H₀: LSMean(i) = LSMean(j)/Pr>|T|

*p<0.05

1 = *L. casei*; 2 = *S. faecalis*; 3 = *S. thermophilus*; 4 = *L. acidophilus*; 5 = *L. plantarum*; 6 = *L. bulgaricus*.

받으므로 이를 외생변수, 즉 공변수로 하여 모델에 포함시켰다.

공분산 분석으로 요인효과를 검정하려면, 공변수간의 교호효과에 대한 검정이 선행되어야 하는데⁶⁾, homogeneity-of-slopes test를 한 결과 초기 접종된 균수와 종(species)과의 교호효과는 P-value가 0.867로 유의성이 없는 것으로 보아 공변수가 반응변수를 잘 설명하는 것으로 나타났다(data was not shown).

Table 4. Bile acid resistances of 30 lactic acid bacteria isolated from lactic fermented products

		Oxgall %			
		0.25	0.5	0.75	1.0
<i>L. casei</i>	YIT 9018	++	++	+	+
	HYL 07	++	+	+	-
	HYL 25	++	+	+	-
	HYL 27w	++	+	+	-
	HYL 29	++	++	+	+
<i>S. faecalis</i>	HYC 12	+	+	+	-
	HYC 16	++	+	+	-
<i>L. acidophilus</i>	CH 2	++	+	-	+
	HYL 01	++	++	++	+
<i>L. plantarum</i>	HYL 12	++	++	++	+
	HYL 26	++	+	++	+
	HYL 13	++	+	+	+
	CH	++	++	++	+
<i>S. thermophilus</i>	HYC 01	-	-	-	-
	HYC 02	-	-	-	-
	HYC 03	-	-	-	-
	HYC 04	-	-	-	-
	HYC 05	-	-	-	-
	HYC 06	-	-	-	-
	HYC 07	-	-	-	-
	HYC 08	-	-	-	-
	HYC 09	-	-	-	-
	HYC 10	-	-	-	-
	HYC 11	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i>	HYL 01	-	-	-	-
	HYL 02	-	-	-	-
	HYL 03	-	-	-	-
	HYL 04	-	-	-	-
	HYL 05	-	-	-	-
	HYL 06	-	-	-	-

또한 공분산 분석으로 검정할 때에는 공변수 즉, 초기 균수의 효과를 제외시킨 보정된 평균을 사용해야 올바른 결과를 얻을 수 있다. Table 1은 2시간 후의 생균수를 반응변수로 하여 species와 초기 생균수와의 교호항을 제외시키고 분석한 결과로, 평방제곱합(초기 생균수/species)에 대한 3중 제곱합(Type III SS)의 p-value는 0.068로 5% 수준에서 유의성은 없었지만 어느정도는 요인수준의 차이가 있다고 인정되었다(p<0.1). 따라서 인공 위액조건에서의 내산성은 초기 접종 농도에 영향을 받는 것으로 생각되었다.

Table 2는 공분산 분석을 하여 얻어진 유산균의 종에 따른 생균수의 평균을 나타낸 것으로(LS Mean), 유산균의 각 종에 따라 내산성의 차이를 비교한 것으로 이에 관한 t-test 결과는 Table 3에 나타나 있다.

인공위액에서의 생균수는 *L. casei*에 속하는 균주들이 가장 높았으며, *L. bulgaricus* 균주들은 가장 낮은 생균수를 보였다(p<0.05). 이러한 결과는 소(1985)와 Kobayashi(1974)의 보고와 일치하는 것으로^(10,11), 유산균 종

(species)에 따라 근본적으로 내산성의 차이가 존재함을 알 수 있었다.

Table 4는 각 균주(strain)의 담즙산 내성을 나타낸 결과로 통계처리를 하지 않았지만, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *S. faecalis* 균주들은 비슷한 경향을 보였으며, *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus* 그룹에 속하는 균주들의 경우 담즙산 내성은 거의 없는 것으로 나타나 위와 장내에서 생존은 거의 불가능한 것으로 판단되었다. 여러 보고에 의하면 장에서 분리된 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum* 등은 담즙에 대한 내성이 있으나, 장에서 유래하지 않은 유산균들은 담즙 함유배지에서 증식하지 못한다고 하여 본 실험에서 나타난 담즙산 내성의 차이는 이에 기인한 것으로 생각된다^(2,11,12).

결국 본 실험에서 나타난 바와 같이 내산성이 강한 *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *S. faecalis* 균주들이 상대적으로 담즙산 내성이 우수하여 probiotics로서 이용 가능성이 높은 유산균 종(species)인 것으로 생각되었다.

요 약

유제품 30여종과 야채발효 제품 2종에서 *Lactobacillus casei* ssp.(5 strains), *Lactobacillus acidophilus*(2 strains), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*(6 strains), *Lactobacillus plantarum*(3 strains), *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*(11 strains), *Streptococcus faecalis*(2 strain)를 각각 분리하여 이들의 내산성과 담즙산 내성을 평가하였다. 초기생균수를 고려하여 공분산분석으로 내산성을 비교한 결과, *L. casei*에 속하는 균주들의 내산성이 가장 우수하였으며, *L. bulgaricus* 균주들은 가장 낮은 내산성을 보였다(p<0.05). 담즙산 내성은 *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *S. faecalis* 균주들의 경우 비슷한 경향을 보였으나, *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus* 그룹에 속하는 균주들의 담즙산 내성은 거의 없는 것으로 나타났다.

문 헌

- Fuller, R.: *Probiotics: The scientific basis*. Chapman & Hall, London (1992)
- Dare, R., Magee, J.T. and Mathison, G.E.: In-vitro studies on the bacteriocidal properties of natural and synthetic gastric juices. *J. Med. Microbiol.*, **5**, 395-406 (1972)
- Gilliland, S.E., Staley, T.E. and Bush, L.J.: Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.*, **67**, 3045-3051 (1984)
- Montgomery, D.C.: *Design and Analysis of Experiments*. Wiley, New York (1991)
- Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E.: Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophage. *Appl.*

- Bacteriol.*, 29, 807-813 (1974)
6. De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, N.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 23, 130-135 (1960)
 7. Harrigan, W.F. and McCance, M.E.: *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press, London (1976)
 8. SAS Institute, Inc. *SAS/STAT User's Guide, Release 6.04.*, Cary, NC (1988)
 9. Hinkelmann, K. and Kempthorne, O.: *Design and Analysis of Experiments*. Vergina Polytechnic Institute and State University (1989)
 10. 소명환 : 국내 액상 발효유에서 분리한 유산균의 동정 및 소화관액 내성 조사. 한국식품과학회지, 17, 192-196 (1985)
 11. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T.: Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*. II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance-strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.*, 29, 691-697 (1974)
 12. Floch, M.H., Henry, M.S., Binder, J., Beatrice, M.D., Filburn, B.S. and William, M.S.: The effect of bile acids on intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 1418-1426 (1972)
-
- (1994년 11월 11일 접수)