

## 혐기적 산성조건하에서 젖산균의 생존과 그 특성

신용서\* · 김성호 · 이갑상

원광대학교 농화학과

### Survivals of Lactic Acid Bacteria and its Characteristics under the Acidic and Anaerobic Condition

Yong-Seo Shin\*, Sung-Hyo Kim and Kap-Sang Lee

Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iri, Chonbuk 570-749, Korea

**Abstract** — We investigated the survival,  $\beta$ -galactosidase activity and cellular permeability of lactic acid bacteria such as *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFO 3533, *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797, and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 in anaerobic condition of pH 1.5~3.5 range. Numbers of all tested viable cells did not decrease at pH 3.5, but decreased rapidly at pH 1.5 and pH 2.5 during 2 hour incubation at modified EG medium. Immediately after 2 hour incubation, the decrease in population at pH 1.5 and pH 2.5 was about 6~8 and 5~7 log cycles/ml, respectively. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 showed the highest survival of all tested bacteria. The  $\beta$ -galactosidase activity from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 and *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185 decreased rapidly at pH 1.5 and 2.5, but there was a little decrease at pH 3.5. The cellular permeability that was measured by the leakage of intracellular materials increased with decrease of pH. These results suggest that the ingested lactic acid bacteria may be destroyed in contact with low pH of gastric acid.

젖산균은 발효유제품이나 발효채소류와 같은 식품 속에 존재하면서 인간에게 여러가지 영양학적인 효과를 부여하는 것으로 알려져 있다. 즉 젖산, 펩톤, 펩티드 및 기타 미량활성물질과 같은 젖산균 대사산물에 의한 식품의 관능성 및 저장성 향상 그리고 젖산균의 장내증식에 의한 정장작용등의 효과가 있다(1, 2). 특히 젖산균의 장내증식에 의한 효과로는 장내세균총의 개선, 혈청콜레스테롤의 감소, 유당소화의 촉진 그리고 대장암 발생율의 저하등 매우 다양하게 나타나고 있다(3-6). 그러나 젖산균이 살아 있는 상태로 장내로 도달하기 위해서는 먼저 염산과 각종 효소가 존재하는 위를 통과해야만 한다(7). 이러한 위액의 pH는 대단히 큰 변화성을 가지며 음식물 섭취 여부에 따라 그 pH 값은 2~8 범위를 나타낸다. 식품과 함께 구강으로 섭취된 미생물들은 낮은 pH의 위액에 노출되어 많은 수가 사멸되거나 그 활성이

저하되는 것으로 보고되어 왔으며 이러한 위액의 살균활성(gastric bactericidal activity)은 위액에 존재하는 다른 성분보다는 거의 pH-HCl 의존성(pH-hydrochloric acid dependence)인 것으로 알려져 있다(8-10). 따라서 섭취된 젖산균도 위산의 작용에 의해 많은 수가 사멸될 것으로 사료되며, 젖산균의  $\beta$ -galactosidase도 산변성에 의해 그 활성이 감소할 것으로 예상된다. 한편  $\beta$ -galactosidase는 젖산균이 분비하는 intracellular enzyme으로 세포내에서 유당을 glucose와 galactose로 분해하며, 장내에서 이 효소가 부족하면 우유를 섭취하였을 때 유당불내증(lactose-intolerance)을 일으킨다. 이러한 증세는 유전적인 현상으로 흑인종이나 황인종에게서 많이 나타나고 있다(11, 12). 따라서 장관내에서 젖산균의 생존율과 함께 그  $\beta$ -galactosidase활성도 영양학적인 측면에서 상당히 중요한 것으로 보고되고 있다. 한편 산성조건하에서 젖산균의 생존율과  $\beta$ -galactosidase의 잔존율에 대한 연구(7, 13, 14)가 일부 진행되어 왔으나 장관조건인 anaerobic system에서 연구한 보고는 아직까지 발표되지 않고 있으며 더욱이 그 기작에 대한 연구는

**Key words:** Lactic acid bacteria, acidic and anaerobic condition,  $\beta$ -galactosidase, acid-tolerance, cellular permeability

\*Corresponding author

전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 혐기적 산성조건하에서 젖산균의 생존율과  $\beta$ -galactosidase 활성의 변화 및 젖산균 세포막의 투과성 변화를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 젖산균은 본 대학 미생물학교실에 보관중인 것으로 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFO 3533, *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842였으며, 실험에 사용하기 전 Lactobacilli MRS broth에 3회 계대하였다. 내산성(acid tolerance) 실험에 사용한 배지는 modified EG 배지였으며, 젖산균수 측정용 배지는 BCP plate count agar(Eiken Co., JAPAN)였다.

### 젖산균의 생존율 측정

혐기적 산성조건하에서 젖산균의 생존율을 측정하기 위해 혼합기체( $\text{CO}_2$ : 15%,  $\text{H}_2$ : 5%,  $\text{N}_2$ : balance)로 bubbling 한 modified EG배지에서 24시간 동안 배양시킨 젖산균 배양액을 멸균된 HCl로서 pH를 3.5, 2.5, 1.5로 조정하고 37°C의 anaerobic controlled glove box(Sheldon Manufacturing, USA)에서 혐기적으로 2시간 동안 배양하면서 30분 간격으로 시료를 취해 BCP plate count agar를 이용한 희석평판법으로 생존수를 측정하였다.

### $\beta$ -galactosidase 활성도

젖산균의  $\beta$ -galactosidase 활성의 변화를 측정하기 위해 modified EG medium에서 24시간 혐기적으로 배양시킨 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185와 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842의 배양액을 멸균된 HCl로서 pH를 3.5, 2.5, 1.5로 조정한 후 37°C에서 2시간 동안 혐기 배양하면서 30분간격으로 시료를 취해 Shah 등(13)의 방법에 준하여 0.1M phosphate 완충용액(PBS, pH 7.0)으로 10배 희석하고, ice-bath 상에서 10분간 초음파처리(Danbary model LC 500, 16 KHz)하여 세포벽을 파괴시켜 조효소액으로 하였다. 기질은 o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside(ONPG, Sigma Chemical Co.)를 0.1M PBS(pH 7.0)에 5 mM 되게 용해시켜 사용하였다. 준비된 기질 5 ml에 조효소액 1 ml를 가하고 37°C의 water-bath에서 20분간 반응시킨 후 0.1M-

$\text{NaCO}_3$  2.5 ml로 반응을 정지시킨 다음 유리된 o-nitrophenol을 420 nm에서 비색정량(UV-Visible Spectrophotometer, Varian DMS 200)하였다. 이때  $\beta$ -galactosidase activity는 1 g의 배양액에서 1분간 ONPG로부터 1  $\mu$ mole의 o-nitrophenol을 유리할 때를 1 unit로 하였다.

### 젖산균 세포막의 투과성 측정

혐기적 산성조건하에서 젖산균의 세포막 투과성 변화를 측정하기 위해 pH가 조정된 modified EG medium에 젖산균을 접종하고 37°C에서 혐기적으로 2시간동안 배양시킨 다음, Noh 등(15)의 방법에 준하여 배양액을 원심분리(10000 $\times$ g, 20 min, 4°C)하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 0.1M PBS에 resuspension 시킨 후 37°C에서 10분간 방치하여 용출된 세포질 성분의 양을 260 nm에서 비색정량하여 세포막투과성으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 젖산균의 생존율

젖산균을 pH 3.5, 2.5, 1.5로 조정된 modified EG medium에서 혐기적으로 2시간동안 배양하면서 정기적으로 측정된 생존수는 Table 2와 같다. 즉 pH 3.5에서는 5종의 젖산균은 모두가 배양 2시간동안 균의 사멸없이 일정한 균수를 유지하였으나, pH 2.5에서는 초기균수 9.6~10.4 log CFU/ml 수준에서 배양시간이 경과함에 따라 서서히 감소하여 배양 2시간 후에 2.62~4.9 log CFU/ml 수준으로 5~7 log cycles/ml 정도의 많은 수의 젖산균이 사멸한 것으로 나타났다. 균주들간의 비교에서 볼 때, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842가 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFO 3533, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797보다 더 높은 생존율을 보였다. 그 중 *Lactobacillus aci-*

Table 1. Composition of modified EG medium (g/l)

Beef extract	2.0
Proteose peptone	10.0
Yeast extract	5.0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4.0
Souble starch	0.5
Glucose	1.5
L-cystein HCl	0.4
Tween 80	0.52

*acidophilus* ATCC 4356가 가장 높은 생존율을 나타내어 내산성(acid-tolerance)이 우수한 것으로 판명되었다. pH 1.5에서, 모든 젖산균은 배양 30분만에 급격히 감소하였으며, 그 중 pH 2.5에서 비교적 내산성이 약한 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFO 3533와 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797의 감소폭이 더 심하였다. 또한 초기균수 9.6~10.4 log CFU/ml 수준에서 배양 2시간만에 1.53~3.62 log CFU/ml로 감소하여 거의 모든 균이 사멸(6~8 log cycles/ml)하였으며, pH 2.5에서와 같이 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356가 가장 높은 생존율을 나타내었다. Shah 등(13)은 *Lactobacillus acidophilus*가 pH 1.5에서 약 6.0 log cycles/ml 정도 감소한다고 보고하였으며, Conway 등(14)은 *Lactobacillus acidophilus*가 *Lactobacillus bulgaricus*보다 더 높은 내산성을 나타낸다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하였다. 이상의 결과에서, 위에서의 젖산균의 생존율은 위액에서 분비되는 염산과 그에 따른 pH 저하에 기인(13)한다고 볼 때 구강섭취된 젖산균은 위산에 의해 많은 수가 사멸될 것으로 판단된다. 그러나 이러한 위액의 젖산균에 대한 살균활성은 다른 식품과 함께 섭취했을 때 그 식품의 완충작용에 의해 큰 차이를 보일 것으로 사료된다. Martini 등(17)은 요구르트의 완충능은 상당히 높고 이러한 완충능은 요구르트와 함께 섭취된

젖산균을 위산으로부터 보호할 수 있다고 보고하였으며, 실제 젖산균은 다른 식품과 함께 구강 섭취되기 때문에 산성조건하의 배지상태에서 젖산균의 생존율 보다는 상당히 많은 수가 살아있는 상태로 위를 통과할 것으로 사료된다.

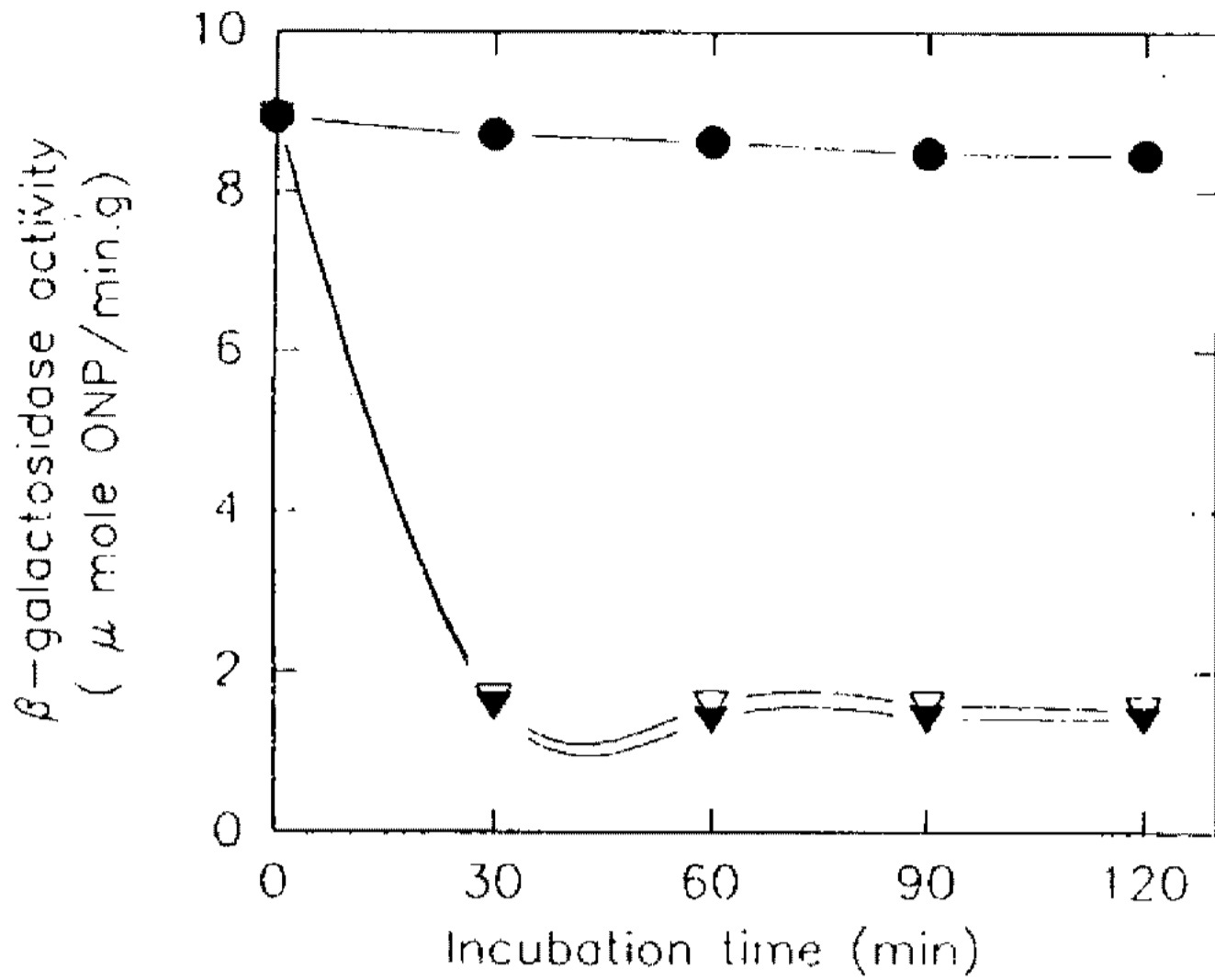
#### β-galactosidase 활성도 측정

유가공업체에서 요구르트제조시 주요 mother starter로 사용하는 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185와 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842를 선정하여 혐기적 산성조건하에서의 젖산균의 β-galactosidase 활성을 측정한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 즉 pH 3.5에서의 β-galactosidase 활성은 균의 생존율과는 달리 배양 2시간동안 약간 감소하는 경향이였으며, *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185가 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842보다 그 감소폭이 다소 높았다. 이러한 현상은 pH 3.5의 산에 의해서 균의 사멸이 일어나지는 않았지만 대사과정이 어느 정도 억제되어 β-galactosidase 활성이 저해되는 것으로 사료된다. pH 2.5, 1.5에서의 β-galactosidase 활성은 배양 30분만에 급격히 감소하였으며, 그 이후 2시간동안은 큰 변화가 없었으며 두 균종간의 차이는 거의 없었다. 균의 생존율과 비교해 볼 때 β-galactosidase의 잔존 활성이 더 높았

Table 2. Survivals of lactic acid bacteria during the incubation in modified EG medium under the acidic and anaerobic conditions (unit: log CFU/ml)

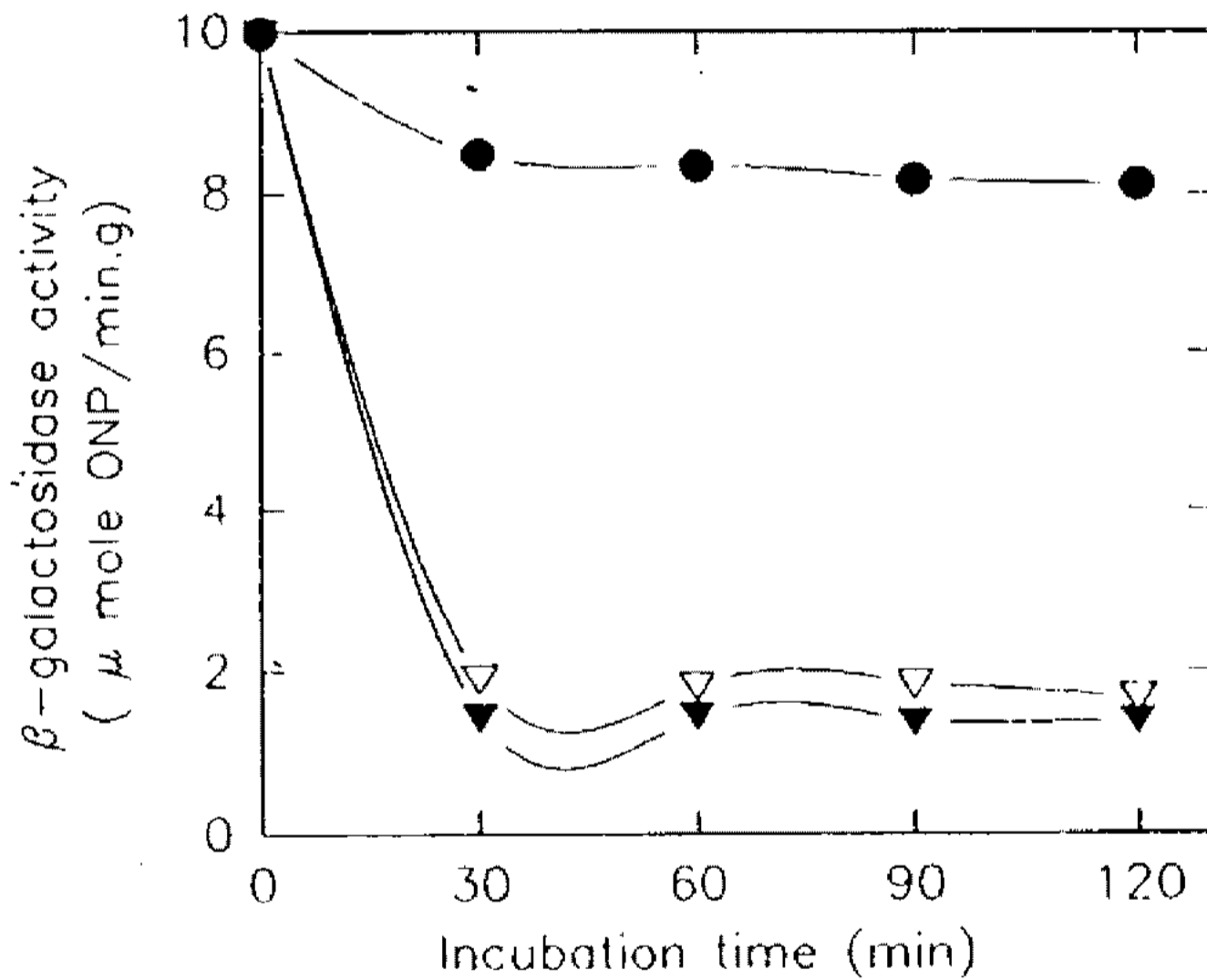
Strains	pH	Incubation time (min)				
		0	30	60	90	120
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> IFO 3533	3.5	9.62	9.64	9.63	9.62	9.63
	2.5	9.62	5.96	5.07	3.93	3.00
	1.5	9.62	2.73	2.57	1.92	1.90
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	3.5	9.77	9.76	9.78	9.80	9.80
	2.5	9.77	6.00	5.93	4.38	4.30
	1.5	9.77	3.90	3.47	2.45	2.23
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	3.5	9.76	9.78	9.79	9.77	9.80
	2.5	9.76	6.89	6.08	5.76	4.90
	1.5	9.76	4.32	4.00	3.95	3.62
<i>Streptococcus thermophilus</i> KCTC 2185	3.5	10.43	10.40	10.40	10.35	10.36
	2.5	10.43	6.90	6.53	4.94	4.86
	1.5	10.43	4.91	3.80	2.80	2.51
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	3.5	9.85	9.86	9.84	9.85	9.86
	2.5	9.85	6.30	5.62	2.59	2.62
	1.5	9.85	2.45	2.08	1.53	1.53

Each value is the mean of three trials.



**Fig. 1.** Changes in  $\beta$ -galactosidase activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 in modified EG medium under the acidic and anaerobic conditions.

—●—: pH 3.5, —▽—: pH 2.5, —▼—: pH 1.5  
Each value is the mean of three trials.

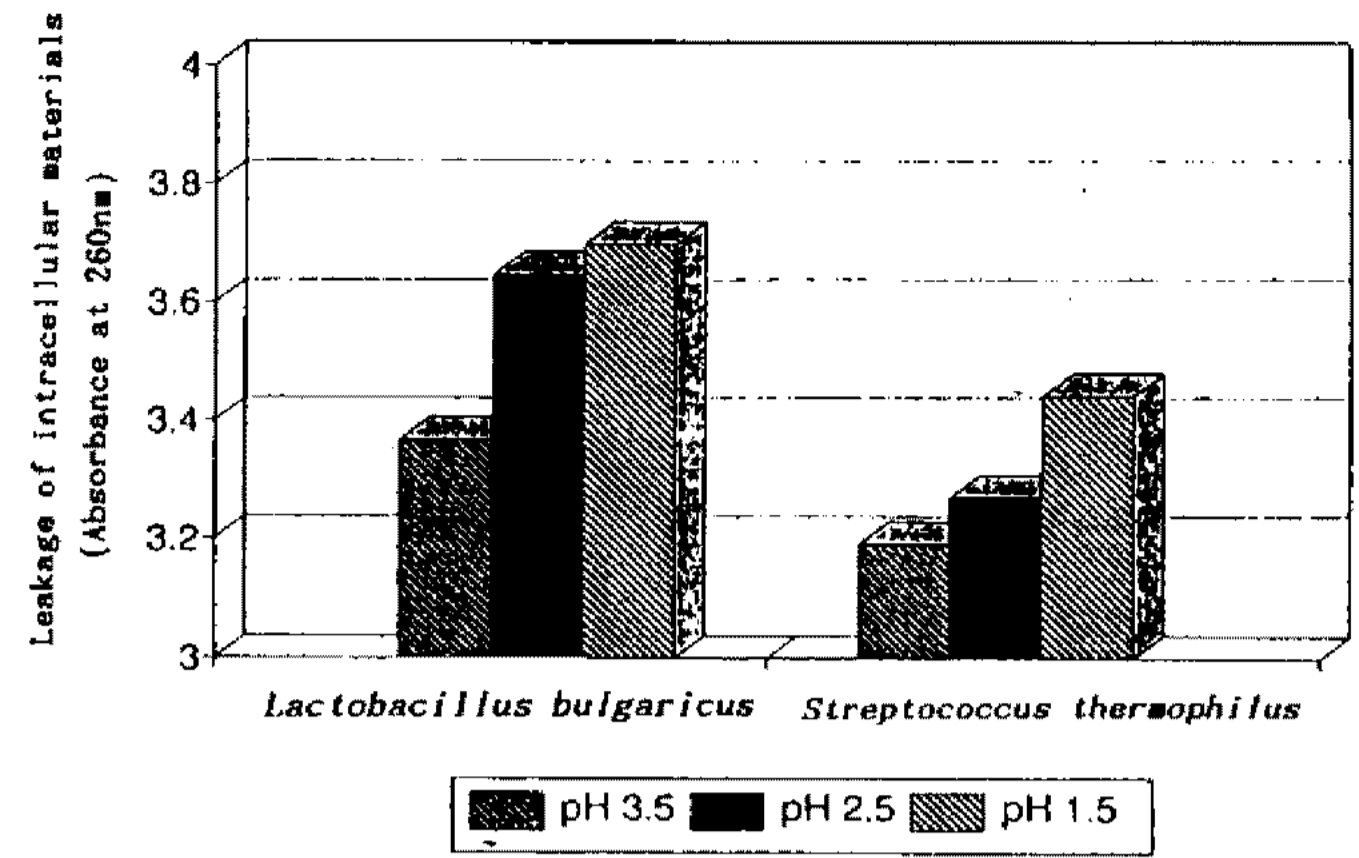


**Fig. 2.** Changes in  $\beta$ -galactosidase activity of *Streptococcus thermophilus* ATCC 2185 in modified EG medium under the acidic and anaerobic conditions.

—●—: pH 3.5, —▽—: pH 2.5, —▼—: pH 1.5  
Each value is the mean of three trials.

는데 이는 pH 1.5, 2.5 정도에서 젖산균의  $\beta$ -galactosidase는 비역가적으로 불활성화 된다는 Savaiano 등 (17)의 보고에서 알 수 있듯이 세포내 효소인  $\beta$ -galactosidase 활성은 세포막의 보호를 받아 산변성이 비교적 적게 일어남으로써 균의 생존율에 비해 비교적 높은 것으로 나타났다.

**젖산균 세포막의 투과성 측정**



**Fig. 3.** Changes in cellular permeability of lactic acid bacteria under the acidic and anaerobic conditions.

After incubation for 2 hours in modified EG medium, absorbance was measured. Each value is the mean of three trials.

혐기적 산성조건하에서 젖산균의 사멸과  $\beta$ -galactosidase 활성 저하는 세포막에의 proton의 농도가 증가되면 정상적인 pH 구배를 형성하기 위해 proton이 세포내로 이동하게 되어 세포질내의 pH를 낮추게 되고 대사 과정의 효소를 불활성화 시킴으로써 균의 사멸을 초래하는 것으로 보고(18)되었으나, 일차적으로는 산과 직접 접촉이 되는 세포막에 영향을 줄 것으로 사료되어 산성조건하에서의 젖산균의 막투과성을 측정하였으며 그 결과는 Fig. 3과 같다. 이 때 막투과성은 젖산균을 산에 노출시킨 후 균체를 회수하여 0.1M PBS에서 용출된 세포질량으로 하여 비교측정하였다. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842와 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185에서 모두 같은 경향으로 용출된 세포질성분은 pH 1.5가 가장 많았으며 다음은 pH 2.5, 3.5 순으로 많았다. 또한 두 균종간의 투과성에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 젖산균의 세포막에 있는 여러가지 permease들이 산변성에 의해 불활성화됨으로써 세포막의 선택적 투과성 기작이 억제되거나 파괴되어 세포질 성분들이 삼투압(osmosis)에 의해서 균체보다 상대적으로 농도가 낮은 0.1M PBS로 유출되는 것으로 생각된다. 한편 Bender와 Marquis(19)은 *Lactobacillus casei* 4646을 대상으로 낮은 pH에서 세포막 손상에 따른 세포질  $Mg^{+2}$ (cytosolic  $Mg^{+2}$ )의 유출정도를 측정한 결과 pH 4.0에서는 유출이 없었으나, pH 3.0에서 4시간 경과 후  $Mg^{+2}$ 이 유출되기 시작하였으며, pH 2에서는 1시간내에 대부분이 유출되었다고 보고하고 있어 본 실험 결과와 측정된 세포질 성분은 다르지만 산에 의해 젖산균의 세포막 투과성이 증가한다는 것은 유사하였다.



## 요 약

혐기적인 산성조건하에서 젖산균(*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFO 3533, *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842)의 생존율과  $\beta$ -galactosidase 활성 및 세포막 투과성을 modified EG 배지에서 측정하였다. pH 3.5에서 모든 젖산균은 배양 2시간 동안 일정한 균수를 유지하였으며, pH 2.5와 1.5에서는 배양시간이 경과함에 따라 젖산균수는 감소하여 2시간 후 각각 5~7 log cycle/ml, 6~8 log cycle/ml 정도의 많은 수가 사멸하였다. 균종간의 비교에서는 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356가 가장 높은 내산성을 보였다. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842와 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185의  $\beta$ -galactosidase 활성은 pH 3.5에서 배양 2시간 동안 약간 감소하였으나, pH 2.5와 1.5에서는 배양 30분만에 급격히 감소하였으며, 그 이후 2시간동안은 큰 변화가 없었다. 또한 두 균종간에 활성의 차이는 없었다. 혐기적인 산성조건하에서 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842와 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185의 세포막 투과성은 용출된 세포질 성분량(O.D. : 260 nm)으로 pH 1.5에서 가장 많았으며, pH 2.5, 3.5순이었다. 따라서 구강 섭취된 젖산균은 위산의 살균활성에 의해 그 많은 수가 사멸될 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Tamine, A.Y. and P.K. Robinson. 1985. Yogurt: Science and Technology. Chap. 4. 5. Pergamon Press, New York.
2. Wood, B.J.B. 1992. *The lactic acid Bacteria in Health & Disease*, Pp. 233-262. Elsevier Applied Science, London.
3. Gilliland, S.E., C.R. Nelson, and C. Maxwell. 1985. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 337-342.
4. 荒井辛一郎, 室田一也, 早川邦彦, 片岡元行, 光岡之足. 腸内 flora와 發癌(光岡之足編). 學會出版. 東京.
5. Kilara, A. and K.M. Shahani. 1975. Lactase activity of cultured and acidified dairy products. *J. Dairy Sci.* **59**: 2031-2035.
6. Wynder, E.L. 1975. The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res.* **35**: 3388-3394.
7. 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.
8. Franklin, M.A. and S.C. Skoryna. 1971. Studies on natural gastric flora; survival of bacteria in fasting human subjects. *CMA. J.* **105**: 380-386.
9. Giannella, R.A., S.A. Broitman, and N. Zamchick. 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man; studies *in vivo* and *in vitro*. *Gut.* **13**: 251-256.
10. Maffei, H.V.L. and F.J. Norbrega. 1975. Gastric pH and microflora of normal and diarrhoeic infants. *Gut.* **16**: 719-726.
11. Flatz, G. and C. Saengudom. 1969. Lactose Tolerance in Asians a Family Study. *Nature.* **224**: 915-916.
12. Paige, D.M., T.M. Bayless, and Ferry, G.D. 1971. Lactose malabsorption and milk rejection in Negro children. *Johns Hopkins Med., J.* **129**: 163-169.
13. Shah, N. and P. Jelen. 1990. Survival of lactic acid bacteria and their lactase under acidic conditions. *J. Food Sci.* **55**: 506-509.
14. Conway, P.L., S.L. Gorbach, and B.R. Goldin. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70**: 1-5.
15. Noh, D.O. and S.E. Gilliland. 1993. Influence of bile on cellular integrity and  $\beta$ -galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **76**: 1253-1259.
16. Martini, M.C., G.L. Bollweg, M.D. Levitt, and D. A. Savaiano. 1987. Lactose digestion by yogurt  $\beta$ -galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**: 432-436.
17. Savaiano, D.A., D.A.G. Abdelhak Abou Elanour, Smith, D.E. and M.D. Levitt. 1984. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactose-deficient individuals. *Am. J. Clin. Nutr.* **40**: 1219-1223.
18. Booth, J.R. 1983. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microb. Rev.* **49**: 359-363.
19. Bender, G.R. and R.E. Marquis. 1987. Membrane ATPase and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2124-2127.

(Received 23 March 1995)