

## 유산균들의 콜레스테롤 저하성, 내산성, 내담즙성, 항생제 내성 비교

박소영<sup>1,2</sup> · 고영태<sup>2</sup> · 정후길<sup>3</sup> · 양진오<sup>3</sup> · 정현서<sup>1,4</sup> · 김영배<sup>4</sup> · 지근억<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한림대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>덕성여자대학교 식품영양학과,

<sup>3</sup>매일유업(주) 중앙연구소, <sup>4</sup>고려대학교 식품공학과

**Effect of Various Lactic Acid Bacteria on the Serum Cholesterol Levels in Rats and Resistance to Acid, Bile and Antibiotics.** So-Young Park<sup>1,2</sup>, Young-Tae Ko<sup>2</sup>, Hoo-Kil Jeong<sup>3</sup>, Jin-Oh Yang<sup>3</sup>, Hyun-Seo Chung<sup>1,4</sup>, Young-Bae Kim<sup>4</sup> and Geun-Eog Ji<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea, <sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition, Duksung University, 132-714, Korea, <sup>3</sup>Central Research Institute, Mael Dairy Industry Co., Seoul 451-860, Korea, <sup>4</sup>Department of Food Science and Technology, Korea University, Seoul 136-701, Korea - For a probiotic yoghurt it is desirable to utilize lactic acid bacteria with a high survival rate and beneficial function to human beings. We have examined a variety of lactic acid bacteria to assess the acid and bile tolerance and antibiotic resistance. In addition, an in vitro culture experiment was performed to evaluate their ability to reduce cholesterol levels in the growth medium. Thirteen strains were selected from in vitro cholesterol assays and fed to Sprague-Dawley rats with a high-cholesterol diet. Among the 13 strains tested, 8 strains were shown to reduce serum cholesterol levels significantly after 24 days of administration *in vivo*. Rats were fed lyophilized yoghurt powder fermented with a combination of 3 selected strains: *Bifidobacterium infantis* AM-220, *Lactobacillus* AM-245, and *Streptococcus* MA-1. The levels of total cholesterol and low density lipoprotein were significantly lower ( $p \leq 0.05$ ) in rats fed the yoghurt powder compared with control group. These studies suggest that yoghurt fermented with appropriately selected lactic acid bacteria may have a anticholesterolemic effect.

20세기초 러시아 과학자인 Metchnicoff는 불가리아 지방 사람들이 장수하는 이유는 요구르트를 많이 섭취하기 때문이라고 주장하였다. 따라서 Metchnicoff의 불로장수설은 많은 관심을 끌고 왔고 발효유의 건강 증진 효능에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔다. 이들 전통적인 발효를 일으키는 주된 유산균은 *Lactobacillus bulgaricus* 임이 밝혀졌으나 그후 유산균의 인체 장내에서의 정착성과 생리적 유용성에 대한 연구가 보다 진전됨에 따라서 *Lb. acidophilus*와 *Bifidobacterium* 등이 중요한 생리활성 유산균주로 대두되었다.

유제품 산업에서 사용되는 유산균은 끊임없는 개량을 통하여 선발되고 있다. 일반적으로 우수 균주가 갖추어야 할 조건으로서 장내 정착성, 산과 담즙에 대한 내성, 제품과 맛에 미치는 관능적 우수성, 유해균에 대한 길항 작용 등이 주된 평가 기준으로 사용되어 왔다. 그러나 현재 경제 발전 및 소득 수준이 향상됨에 따라서 각종 성인성 질환이 급증하고 암과 동맥경화증 등이 현대인의 사망 요인으로 가장 중요하게 대두되었다. 따라서 유제품 산업에서도 유산균 및 발효유 제품이 이들 성인성 질환에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 커다란 관심을 가지게 되었다(1-4).

성인성 질환을 유발시키는 요인 중에서 가장 중요한 것은 동물성 지방의 과다한 섭취로 인한 고 콜레스테롤 혈증이다. 그러나 유산균 및 발효유 제품의 섭취가 과연 콜레스테롤 수준을 저하시킬 수 있는가에 대한 연구 결과는 상반된 실정이다. 즉, Mann(5)은 요구르트를 다량으로 섭취하면 콜레스테롤 함량이 저하된다고 보고하였으며 Hepner 등(6)과 Jaspers 등(7)은 적당량의 요구르트를 섭취한 사람들의 혈중 콜레스테롤 함량이 저하되었다고 발표하였다. 반면에 Lin 등(8)은 하루에 450g씩 섭취하는 사람들의 콜레스테롤 함량에 아무런 변화가 없었다고 발표하였으며 Thompson 등(9)은 발효유의 섭취가 콜레스테롤 감소에 아무런 효과가 없다고 하였다.

따라서 Gilliland와 Walker(10)는 이러한 연구 결과들이 상호 일치하지 못하는 것은 사용하는 유산균의 차이에 기인하는 것으로 생각하였다. 실제로 서로 다른 종류의 유산균을 사용하여 동물 실험을 한 결과 균주마다 콜레스테롤 저하 능력이 상이하다고 발표하였다.

본 연구에서는 Gilliland와 Walker(10)의 보고에 근거하여 실험에 사용되는 유산균의 종류와 수를 광범위하게 책정하고 콜레스테롤 저하 능력을 가지는 균주를 선발하여 요구르트를 제품화하는 자료로 이용하며 산과 담즙에 대한 내성, 항생제 내성도 조사하여 제품 개발에 유용한 자료로 활용하고자 하였다.

\*Corresponding author.

Key words: Lactic acid bacteria, serum cholesterol

재료 및 방법

실험균주 및 배양

Bifidobacteria, lactobacilli, enterococci, leuconostoc, streptococci 등의 상업용 유산균주와 한국유전자은행(KCTC)의 표준균주를 실험에 사용하였다. 상업용 유산균은 4개의 종균회사로부터 공급받았다. 실험에 사용한 균주의 목록은 Table 1에 나타내었다. 계대 배양을 위하여 screw-capped tube에 0.05%의 L-cysteine·HCl·H<sub>2</sub>O가 첨가된 MRS broth(Difco)를 약 0.5 ml의 head space만 남기고 가득 채운뒤 10시간 배양된 접종균액을 2% 첨가하였다. 마개를 막고 37°C의 항온기에서 배양하면서 균의 증식도를 측정하였다.

내산성 실험

MRS broth의 초기 pH를 7.0, 5.0, 4.5, 4.0으로 각각 달리 조정하여 배양하면서 균주의 성장을 OD<sub>600</sub>에서 경시적으로 측정하였다.

내담즙성 실험

MRS broth의 pH를 7.0으로 조절하고 담즙산 농도를 0, 0.3, 0.5, 1.5%로 각각 달리 조정하여 배양하면서 균주의 성장을 OD<sub>600</sub>에서 경시적으로 측정하였다.

항생제 내성 실험

14종의 항생제를 다양한 농도로 조절하여 첨가한 고체배지를 실험에 사용하였다. 생육이 활발한 균주를 replica 방법을 이용하여 37°C에서 48시간 배양한 다음 각각의 균주의 생육 정도를 측정하였으며 anaerobic jar와 anaerobic glove box(Lab Line Instruments Inc., USA)를 이용하여 혐기적으로 배양하였다. 배양후 세균이 증식하지 않은 배지 중 항생제의 농도가 가장 낮은 배지의 농도를 최소 생육 저해 농도(MIC, Minimum inhibitory concentration)로 표시하였다.

콜레스테롤 정량 분석

Danielson 등(11)의 방법에 의거하여 가용성의 콜레스테롤(polyoxyethanyl-cholesteryl sebacate, Sigma)이 함유된 배지에 배양한 균주를 원심분리(4°C, 4000 rpm)하여 0.5 ml의 상등액을 분리한다. 여기에 5% KOH 2 ml와 95% ethanol 3 ml를 첨가하여 60°C에서 10분간 유지하였다. 냉각한 후 5 ml의 hexane을 첨가하여 혼합하고 다시 3 ml의 증류수를 첨가한 후 잘 혼합하였다.

이것을 상온에서 15분간 방치하면 층분리 현상이 일어나는데 이때 hexane층을 2.5 ml 분리하였다. 분리한 hexane층을 N<sub>2</sub> gas를 이용하여 60°C에서 증발시키고 O-phthalaldehyde reagent(0.5 mg O-phthalaldehyde/

Table 1. Strains of lactic acid bacteria used in this study.

Bacteria	Strains
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bif. animalis</i> KCTC 3125, <i>Bif. bifidum</i> KCTC 3202, <i>Bif. breve</i> KCTC 3220, <i>Bif. catenulatum</i> KCTC 3221, <i>Bif. pseudocatenulatum</i> KCTC 3223, <i>Bif. longum</i> K-146, <i>Bif. longum</i> M-12, <i>Bif. longum</i> K-111, <i>Bif. longum</i> K-112, <i>Bif. longum</i> S-1, <i>Bif. infantis</i> S-1, <i>Bif. infantis</i> AM-220
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> KCTC 1047, <i>Lb. bulgaricus</i> KCTC 3188, <i>Lb. gasseri</i> KCTC 3138, <i>Lb. gasseri</i> KCTC 3163, <i>Lb. gasseri</i> KCTC 3172, <i>Lb. casei</i> KCTC 2180, <i>Lb. helveticus</i> M-13, <i>Lb. helveticus</i> M-17, <i>Lb. helveticus</i> K-12, <i>Lb. acidophilus</i> S-1, <i>Lb. acidophilus</i> K-12, <i>Lb. acidophilus</i> AM-245, <i>Lb. acidophilus</i> K-15, <i>Lb. bulgaricus</i> M-118, <i>Lb. bulgaricus</i> AS-220, <i>Lb. bulgaricus</i> K-12, <i>Lb. bulgaricus</i> K-112, <i>Lb. casei</i> MR-1, <i>Lb. casei</i> K-11, <i>Lb. casei</i> AS-211, <i>Lb. plantarum</i> MV-1
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuc. cremoris</i> SA-1, <i>Leuc. cremoris</i> SZ-1, <i>Leuc. cremoris</i> M-18, <i>Leuc. cremoris</i> K-11, <i>Leuc. cremoris</i> S-14
<i>Streptococcus</i>	<i>Str. thermophilus</i> KCTC 2185, <i>Str. thermophilus</i> KCTC 3236, <i>Str. thermophilus</i> S-11, S-12, S-15, <i>Str. thermophilus</i> K-116, <i>Str. thermophilus</i> K-120, <i>Str. thermophilus</i> K-14, <i>Str. thermophilus</i> K-11, <i>Str. thermophilus</i> AK-216, <i>Str. thermophilus</i> K-13, <i>Str. thermophilus</i> K-136, <i>Str. thermophilus</i> K-137, <i>Str. thermophilus</i> MH-1, <i>Str. thermophilus</i> MA-1, <i>Str. thermophilus</i> MV-11, <i>Str. thermophilus</i> KB-11, <i>Str. thermophilus</i> MC-1, <i>Str. diacetylactis</i> M-1, <i>Str. diacetylactis</i> MA-1, <i>Str. filant</i> M-11
<i>Enterococcus</i>	<i>Ent. faecalis</i> KCTC 2011, <i>Ent. faecium</i> KCTC 2012, <i>Ent. faecium</i> KCTC 3077, <i>Ent. faecium</i> KCTC 3080, <i>Ent. faecium</i> KCTC 3122, <i>Ent. faecium</i> KCTC 3123, <i>Ent. faecium</i> KCTC 3206

KCTC: Korean Collection for Type Cultures

glacial acetic acid 1 ml) 4 ml를 첨가하고 10분간 방치하였다. 여기에 진한 황산 2 ml를 천천히 첨가하여 잘 혼합하고 10분 후 550 nm에서 흡광도값(optical density)을 측정하였다.

*In vivo* 실험에서의 콜레스테롤 정량은 제품화되어 있는 콜레스테롤 kit(Wako, Japan)를 이용하였다. 실험 동물의 혈액을 원심분리하여 상등액인 혈청을 25  $\mu$  취하고 여기에 kit 내의 발색제를 3 ml 첨가하여 37°C에서 5분간 방치하였다. 이것을 550 nm에서 흡광도값을 측정하고 콜레스테롤 kit의 환산법에 의거하여 콜레스테롤 함량을 계측하였다.

### 콜레스테롤 저하 균주의 선발 실험

*In vitro* 실험을 위하여 MRS broth의 담즙산(oxgall)의 농도를 0%와 0.4%로 조절하였다. 가용성 콜레스테롤을 360 mg/l로 첨가한 뒤 20시간 동안 배양한 후 배양액 상등액 중의 콜레스테롤 함량을 정량하였다. *In vivo* 실험에는 4주 연령의 SD(Sprague-Dawley) rat를 사용하였다. 식이는 콜레스테롤 유도 식이군으로 조성하였으며 유산균 분말균주는 식이 중량의 1%를 혼합하여 공급하였다. 실험에 사용된 콜레스테롤 유도 식이의 성분 조성은 Table 2에 나타내었다.

**Table 2. Composition of the high cholesterol diet used in this experiment.**

Ingredients	Contents (%)
Casein	20.0
L-Methionine	0.3
Lard	10.0
Choline chloride	0.2
Vitamin mixture	1.0
Mineral mixture	3.5
Sucrose	20.0
Corn starch	44.3
Cholic acid	0.2
Cholesterol	0.5
Total	100.0

### 요구르트 제조 및 급여 실험

본 실험을 통하여 선발된 유산균주로 요구르트를 제조하고 동결건조시킨 요구르트의 분말을 이용하여 동물실험을 하였다. 요구르트의 제조를 위하여는 1%의 탈지분유와 0.3%의 펙틴이 첨가된 원유를 95°C에서 10분간 열처리하여 살균하고 동결된 균주를 10<sup>6</sup> CFU/ml 수준으로 접종하여 37°C에서 12시간 발효시켰다. 4주된 SD rat를 3개의 실험군으로 나누고 배양액의 동결건조 분말, 살균된 배양액의 동결건조 분말, 조유액의 동결건조 분말을 각각 20 g의 고 콜레스테롤 식이당 0.5 g씩 첨가하였다. 한편 대조군에는 배양액, 살균 배양액 및 조유액의 동결건조 분말을 첨가하지 않았다. 상기 시료를 24일간 급여한 후 동맥 중의 혈청을 채취하여 총 콜레스테롤 함량, HDL과 LDL 콜레스테롤, TG(triglyceride)값을 분석하였다. HDL과 TG값은 정량분석 kit(Wako, Japan)를 사용하여 측정하였으며 LDL 콜레스테롤은 다음 방정식에 의거하여 정량하였다(12).

$$\text{LDL 콜레스테롤} = \frac{\text{총 콜레스테롤} - \text{HDL 콜레스테롤} - \text{TG}}{5}$$

### 통계 분석 및 유의성 검정

실험 결과는 Windows용 Minitab Program(Minitab Inc., U.S.A.)을 사용하여 통계 처리에 의한 실험 결과의 유의성 검증을 시도하였다.

## 결 과

### 내산성

실험에 사용된 표준균주와 유산균주의 생육곡선으로부터 각각의 균주에 대하여 대수기 초기의 OD<sub>600</sub>이 0.2 Unit 증가하는 시간을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. *Enterococcus*의 모든 표준균주는 내산성이 약하였으며 *Str. thermophilus*도 2~3균주 이외에는 모두 pH 4.5에서 생육이 불가능하였다. *Bifidobacterium* 균주는 상업용 유산균주가 표준균주보다 대체적으로 내산

**Table 3. Comparison of the growth of lactic acid bacteria in MRS broth at different initial pH.**

Bacteria	No of Strains	pH 7.0		pH 5.0		pH 4.5		pH 4.0	
		Min.	NSG	Min.	NSG	Min.	NSG	Min.	NSG
<i>Bifidobacterium</i>	14	60~160	12	114~136	6	210~558	2	380~600	
<i>Enterococcus</i>	7	30~48	7	64~540	3	252~600			
<i>Lactobacillus</i>	23	30~90	20	56~280	17	88~600	9	205~600	
<i>Str. thermophilus</i>	15	50~94	10	92~378	3	145~250	2	170~540	
<i>Leuconostoc</i>	2	35~75	2	45~97	2	85~175	1	470	

\*Min.: Minutes required for absorption at 600 nm to increase 0.2 Units for the growing cells at the initial log phase

\*NSG: Number of strains grown above A<sub>600</sub> 0.2 Units

성이 강하였으나 *Lactobacillus*에 비하여 전반적으로 약하였다. 한편 *Lactobacillus*의 경우에는 *Lb. acidophilus*와 *Lb. bulgaricus* 및 *Lb. helveticus* 균주가 강한 내산성을 나타냈으며 *Lb. gasseri* 균주는 다소 미약하였다.

**내담즙성**

담즙산을 0.5%와 1.5% 첨가했을 때 담즙산의 침전이 일어나는 경우가 관찰되었다(data not shown). 따라서 0%와 0.3% 담즙산 농도에서 대수기 초기의 OD<sub>600</sub>이 0.2 Unit 증가하는 시간을 측정한 결과는 Table 4에 나타내었다.

*Enterococcus* 균주는 내산성이 매우 약하였으나 내담즙성은 가장 강하였다. *Str. thermophilus*는 10균주 중에서 2균주 이외에는 모두 0.3% oxgall 존재하에서 생육이 불가능하였다. 즉, 내산성과 내담즙성이 모두 약한 것으로 나타났다. 한편 대부분의 *Bifidobacterium*과

**Table 4. Comparison of growth of lactic acid bacteria in MRS broth with and without 0.3% oxgall.**

Bacteria	No of Strains	MRS Broth	MRS Broth + 0.3% Oxgall	
		Min.	NSG	Min.
<i>Bifidobacterium</i>	14	60~160	8	95~504
<i>Enterococcus</i>	7	30~48	7	52~206
<i>Lactobacillus</i>	23	30~90	13	60~600
<i>Str. thermophilus</i>	15	50~94	2	155~170
<i>Leuconostoc</i>	2	35~75	2	53~102

\*Min.: Minutes required for absorption at 600 nm to increase 0.2 Units for the growing cells at the initial log phase

\*NSG: Number of strains grown above A<sub>600</sub> 0.2 Units

*Lactobacillus*는 비교적 담즙산에 약하였으나 몇 종류의 균주는 강한 담즙산 내성을 보유하는 것으로 나타났다. *Lactobacillus*의 경우에는 균종에 따른 차이보다는 각 균주별 내성 능력의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

**항생제 내성**

실험에 사용된 항생제의 농도 구간은 대부분의 균주가 증식할 수 있는 농도부터 대부분의 균주가 사멸하는 농도까지 선택하였다. 이 농도는 고체 배지상의 농도이기 때문에 액체 배양했을 때의 내성 농도와는 차이가 있다. 상기의 결과로부터 각각의 항생제의 최소 생육저해 농도 분포를 결정한 후 중간값을 취하여 균주별로 정리한 결과는 Table 5에 나타내었다.

*Bifidobacterium*은 erythromycin(0.3 mg/l)과 metronidazole(100 mg/l)에 높은 감수성을 나타냈으며 tetracyclin, neomycin, gentamycin 등에는 내성을 나타냈다. 한편 *Enterococcus*는 erythromycin, gentamycin, streptomycin 등에 높은 내성을 나타냈다. *Str. thermophilus*는 amoxicillin, gentamycin, streptomycin에 약하였고 rifampicin에는 강한 편이었다. *Lactobacillus*는 gentamycin에 약한 편이었다.

**콜레스테롤 저하 균주의 선발**

동물 실험을 위한 식이 조성을 결정하기 위하여 예비실험을 한 결과 식이의 성분 조성은 콜레스테롤 수준에 커다란 영향을 미쳤다. 즉, chow diet로 24일간 급여하였을 때에는 혈중 콜레스테롤 함량이 56 mg/100 ml인데 비하여 혼합식이 급여시에는 115 mg/100 ml로 증가하여 현저한 차이를 나타냈다(data not shown). 또한 혼합식이에 콜레스테롤을 0.5% 첨가하여 급여한 경우에는 300 mg/100 ml 이상으로 증가하였다. 실험에

**Table 5. Median value of the MIC (minimum inhibitory concentration) of the various lactic acid bacteria tested.**

(unit of MIC: mg/l)

Bacteria	No of Strains	Erythromycin	Rifampicin	Amoxicillin	Metronidazole	Sulfamethoxazole	Ampicillin	Streptomycin
<i>Bifidobacterium</i>	7	<0.3	0.4	1.6	<100	240<	<0.37	1000
<i>Enterococcus</i>	7	1.5<	0.5	0.4	500<	240<	<0.37	1000
<i>Lactobacillus</i>	19	1.1	0.5	1.6	500<	240<	<0.37	200
<i>Str. thermophilus</i>	18	0.3	0.5<	<0.4	500<	160	<0.37	<25
<i>Leuconostoc</i>	3	1.5	0.5<	1.6<	500<	240<	1.5	1000

  

Bacteria	No of Strains	Kanamycin	Chloramphenicol	Tetracyclin	Penicillin-G	Neomycin	Gentamycin	Nalidixic Acid
<i>Bifidobacterium</i>	7	400<	7.8	6.20<	<0.13	2000<	160<	1600
<i>Enterococcus</i>	7	400<	7.8	1.55	<0.13	1000	160<	1600<
<i>Lactobacillus</i>	19	400<	7.8	6.20<	<0.13	1000	160	1600<
<i>Str. thermophilus</i>	18	400	7.8	1.55	<0.13	500	80	1600
<i>Leuconostoc</i>	3	400<	7.8	6.20<	<0.13	1000	80	1600

**Table 6. Serum cholesterol level of the SD rats fed lyophilized lactic acid bacteria.**

Strains	Mean	SD	P
<i>Bif. longum</i> M-12	239.0	56.7	0.003
<i>Bif. longum</i> K-146	252.3	48.9	0.009
<i>Bif. longum</i> K-111	236.1	63.0	0.003
<i>Bif. infantis</i> AM-220	272.0	100.0	0.190
<i>Lb. acidophilus</i> K-15	263.3	84.2	0.080
<i>Lb. acidophilus</i> AM-245	228.5	87.8	0.006
<i>Lb. acidophilus</i> S-1	279.5	68.3	0.180
<i>Lb. bulgaricus</i> AS-220	256.8	82.9	0.049
<i>Str. thermophilus</i> MA-1	244.1	63.5	0.007
<i>Str. thermophilus</i> K-120	300.6	80.5	0.620
<i>Str. thermophilus</i> MV-1	272.6	56.6	0.082
<i>Ent. faecium</i> AM-203	244.6	63.7	0.008
<i>Leuc. cremoris</i> S-14	245.6	80.1	0.018
Control	314.4	69.4	

SD: Standard deviation, P: Significance level

사용된 균주중 *in vitro*에서 콜레스테롤 저하 효과가 우수한 13균주를 1차 선별하여(data not shown) 이들에 대하여 *in vivo* 실험을 수행하였다.

각 실험균주당 15마리의 SD rat를 실험에 사용하였다. 4주된 SD rat를 구입하여 3일간 적응시킨 후 24일간 유산균 분말균주를 한 마리당 0.1 g( $10^9 \sim 10^{10}$  cfu/day)씩 공급한 결과 모든 유산균주는 대조군에 비하여 콜레스테롤 함량을 저하시키는 것으로 나타났다. 이들 중에서 8가지 유산균주의 콜레스테롤 저하능이 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다(Table 6).

특히 상기 실험에서 선별된 유산균주는 18.3~27.3%의 콜레스테롤 감소율을 나타내어 콜레스테롤 저하 효과가 현저함을 알 수 있었다. 이러한 효과를 나타내는 유산균은 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* 등에 모두 분포되어 있는 것으로 나타났다. 따라서 위와 같은 결과는 콜레스테롤 저하 기능을 목표로 하는 발효유 제품을 제조할 경우에 상기의 유산균주를 다양하게 조합하여 최적화할 수 있는 가능성을 보여 주었다.

### 요구르트 제조 및 급여

요구르트 제조를 위하여는 *Bif. infantis* AM-220, *Lb. acidophilus* AM-245, *Str. thermophilus* MA-1를 혼합하여 발효하였다. 이상의 3균주로 발효된 요구르트의 동결건조 분말을 실험동물에 급여한 후 혈중 콜레스테롤 함량을 측정된 결과는 Table 7에 나타내었다. 즉, 배양액 동결건조 분말의 급여구만이 무첨가구에 비하여 총 콜레스테롤 함량과 LDL 콜레스테롤 함량을 유의적으로 저하시켰다. 반면에 HDL 콜레스테롤 함량과 TG값은 유의적인 변화를 보이지 않았다.

**Table 7. Effect of lyophilized yoghurt intake on serum lipid level. (units: mg/100 ml)**

	Diet group			
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Cholesterol	220.1±70.7 <sup>a</sup>	257.0±101.0 <sup>ab</sup>	263.6±77.1 <sup>ab</sup>	335.0±113.0 <sup>b</sup>
LDL	149.1±70.9 <sup>a</sup>	185.0±76.1 <sup>ab</sup>	191.6±67.5 <sup>ab</sup>	245.0±103.0 <sup>b</sup>
HDL	34.8±13.0	38.0±29.2	43.5±22.8	50.7±36.1
TG	200.0±111.0	188.8±74.3	182.3±66.8	202.1±90.8

\*Values are means±SD for 14, 15, 15, and 12 rats for group 1, 2, 3, and 4, respectively.

\*Values on the same row not sharing common superscripts are significantly different.

\*Significance level:  $p \leq 0.05$

\*Group 1: Rats fed lyophilized powder of yoghurt.

Group 2: Rats fed lyophilized powder of pasteurized yoghurt.

Group 3: Rats fed lyophilized powder of unfermented milk.

Group 4: Control(No supplement)

한편 유산균의 사균 균체 및 대사산물의 영향, 그리고 조유액 자체가 콜레스테롤 함량에 미치는 영향을 규명하기 위하여 급여한 살균 배양액과 조유액의 동결건조 분말은 대조구에 비해서 낮은 콜레스테롤 함량을 나타냈지만 통계적인 유의성은 인정되지 않았다. 결국 혈중 콜레스테롤 함량을 저하시키는 능력은 생균 상태의 유산균주에 의해서 가장 커다란 영향을 받는 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서 선별된 유산균주를 이용한 생균 함유 배양액의 콜레스테롤 저하 효과가 가장 우수하였다. 이것은 특히 인체에 유해한 LDL 콜레스테롤 함량의 저하에 기인하는 것으로 나타났다.

### 고 찰

실험에 사용된 다양한 종류의 유산균주는 *in vitro* 및 *in vivo* 실험 조건에서 콜레스테롤 함량을 저하시키는 것으로 나타났다. 전반적으로 *in vitro* 실험에서 선별된 유산균주는 *in vivo* 조건에서도 콜레스테롤 함량을 저하시키는 것으로 나타났다. 그러나 *in vitro* 실험의 유용성 및 *in vivo* 실험과의 상관관계는 더욱 연구되어야 한다. 한편 Klaver와 van der Meer(13)는 배양액 중의 콜레스테롤이 감소하는 이유는 유산균이 담즙산을 탈포합시켜 콜레스테롤과 담즙산을 침전시키기 때문이라고 하였는데 이와 같은 기작이 장내에서도

작용하는지에 대해서는 보완 연구가 필요하다.

여러 연구자들은 콜레스테롤 공급원으로 PPLO(pleuropneumonia-like organism serum)(8, 15, 16)를 사용하였으나 PPLO에 함유되어 있는 콜레스테롤의 함량이 때에 따라서 일정하지 않을 수 있다. 본 연구에서는 Danielson 등(11)의 방법에 따라서 가용성 cholesterol을 첨가하였고 Walker와 Gilliland(17)는 콜레스테롤 미셀을 사용하였는데 이들의 상호관계가 비교되어야 한다. 특히, *in vivo* 실험에서는 유산균이 살아서 장에까지 도달하는 능력과 장내에서의 정착성 및 증식 능력이 영향을 미칠 것으로 생각된다.

본 연구에서는 콜레스테롤 함량이 높은 식이를 성장기의 쥐에 투여하였기 때문에 유산균에 의한 콜레스테롤 저하 효과가 매우 잘 나타난 것으로 해석된다. 특히 *Bifidobacterium*와 *Lb. acidophilus*, *Str. thermophilus* 등에 콜레스테롤 저하 효과가 우수한 균주가 분포되어 있어서 요구르트 제조에 사용되는 유산균주의 배합을 최적화하는데 유용한 결과를 얻었다.

내산성은 *Lactobacillus*가 전반적으로 강하였고 *Bifidobacterium*과 *Enterococcus*는 중간 정도의 내산성을 나타냈으며 *Str. thermophilus*는 매우 약하였다. 한편 내담즙성에서는 *Enterococcus*가 가장 강하였고 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*가 중간 정도였으며 *Str. thermophilus*는 약하였다. 그러나 산과 담즙에 대한 유산균주의 감수성은 균주별로 상당한 차이를 나타냈다. 따라서 각각의 균종으로부터 내산성과 내담즙성이 상대적으로 강한 균주를 선택적으로 사용할 수 있다는 것을 보여 주었다.

한편 내담즙성 실험에서는 담즙산이 0.5% 이상인 경우에 침전물이 형성되어 유산균의 증식 정도를 측정하는 것이 어려운 경우가 다수 발생하였다. 이것은 앞에서 언급된 바와 같이 유산균의 담즙산 탈포합 효소에 의한 영향인 것으로 생각되며 콜레스테롤 대사와의 밀접한 관련이 있기 때문에 향후 이에 대한 연구가 보완되어야 한다(13).

항생제에 대한 내성은 균종별로 커다란 차이를 보여주었고 또한 같은 균종 내에서도 균주별로 커다란 차이를 나타냈다. 이러한 항생제 내성 결과는 항생제를 복용하는 사람들에게 투여하는 적절한 유산균의 종류를 선택하는데 도움이 될 것이다. 또한 요구르트 제품 검사시 요구되는 선택배지의 개발에 참고 자료로 유용하다.

한편 Lim 등(18)은 액체배지 상에서 *Bifidobacterium*의 항생제 내성을 조사하였다. 본 연구는 고체배지 상에서 수행되었기 때문에 항생제에 대한 최소 생육저해 농도는 상이한 차이를 나타냈다. 그러나 각각의 항생제에 대한 상대적 내성은 Lim 등(18)의 결과와 유사한 경향을 보였다. 이와같이 본 연구에서는 다양한 유산균주로부터 콜레스테롤 저하 효과가 우수한 균주를

선발하였으며 각 균주에 대하여 내산성, 내담즙성, 항생제 내성 정도의 차이를 비교 연구하였다.

## 요 약

기능성 요구르트의 제조에 사용되는 유산균은 인체에 유익한 생리활성과 우수한 생존능력을 보유하고 있는 것이 바람직하다. 본 연구에서는 다양한 유산균주의 산과 담즙 및 항생제에 대한 내성을 조사하였으며 *in vitro*에서 콜레스테롤 저하능을 조사하였다. *In vitro*에서 콜레스테롤 저하능이 우수한 13균주를 선발하여 이들의 동결건조 분말을 고 콜레스테롤 식이의 실험쥐에 투여하였다. 그 결과 8균주는 비 투여구보다 유의적으로 18.3~27.3%의 콜레스테롤 저하능을 나타냈다 ( $P \leq 0.05$ ). 이들 중에서 *Bifidobacterium infantis* AM-220, *Lactobacillus acidophilus* AM-245, *Streptococcus thermophilus* MA-1의 3균주를 이용하여 요구르트를 제조한 후 동결건조 분말을 이용하여 급여실험을 수행한 결과, 총 콜레스테롤과 LDL 함량이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다.

## 참고문헌

- Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 175-188.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
- Marteau, P. and J.C. Rambaud. 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 207-220.
- Driessen, F.M. and R. de Boer. 1989. Fermented milks with selected intestinal bacteria: a healthy trend in new products. *Neth. Milk Dairy J.* **43**: 367-382.
- Mann, G.V. 1977. A factor in yoghurt which lowers cholesteremia in man. *Atherosclerosis* **26**: 335-340.
- Hepner, G., R. Friend, S. St. Jeor, L. Fusetti, and R. Morin. 1979. Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**: 19-24.
- Jaspers, D.A., L.K. Massey, and O.L. Lloyd. 1984. Effect of consuming yogurts prepared with three culture strains on human serum lipoproteins. *J. Food Sci.* **49**: 1178-1181.
- Lin, S.Y., J.W. Ayres, W. Winkler, and W.E. Sandine. 1989. Lactobacillus effect on cholesterol: *In vitro* and *in vivo* results. *J. Dairy Sci.* **72**: 2885-2899.
- Thompson, L.U., D.J.A. Jenkins, D.M. vic Amer, R. Reichert, A. Jenkin, and J. Kamulsky. 1982. The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* **36**: 1106-1111.
- 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.

11. Danielson, A.D., E.R. Peo, K.M. Shahani, A.J. Lewis, P.J. Whalen, and M.A. Amer. 1989. Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J. Ani. Sci.* **67**: 966-974.
12. Friedwald, W.T., R.I. Ley, and D.S. Fredricson. 1972. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**: 499-502.
13. Klaver, F.A.M. and R. van der Meer. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugation activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1120-1124.
14. Gilliland, S.E., T.E. Staley, and L.J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjuncts. *J. Dairy Sci.* **67**: 3045-3051.
15. Grunewald, K.K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* **47**: 2078-2079.
16. Rasic, J.L., I.F. Vujicic, M. Sklinjar, and M. Vulic. 1992. Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnol. Lett.* **14**: 39-44.
17. Walker, D.K. and S.E. Gilliland. 1992. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **76**: 956-961.
18. Lim, K.S., C.S. Huh, and Y.J. Baek. 1993. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* **76**: 2168-2174.

(Received 25 December 1995)