

Probiotics용 유산균의 Design과 Molecular Typing에 의한 동정법

윤 성 식

연세대학교 문리대학 생물자원공학과

Design of Lactic Acid Bacteria Aiming at Probiotic Culture and Molecular Typing for Phylogenetic Identification

Sung-Sik Yoon

Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

ABSTRACT

Over decades of work, the probiotic research has grown rapidly with a number of new cultures, which is claimed a variety of benefit. However, many of the specific effects attributed to the ingestion of probiotics remain convoluted and scientifically unsubstantiated. Accordingly, the scientific community faces a greater challenge and must objectively seek cause and effect relationships for many potential and currently investigated probiotic species. Rational selection and design of probiotics remains an important challenge and will require a solid information about the physiology and genetics of candidate strains relevant to their intestinal roles, functional activities, and interaction of with other resident microflora. As far as beneficial culture of lactic acid bacteria (LAB) is concerned, simple, cost-effective, and exact identification of candidate strains is of foremost importance among others. Until recently, the relatedness of bacterial isolates has been determined solely by testing for one or several phenotypic markers, using methods such as serotyping, phage-typing, biotyping, and so forth. However, there are problems in the use of many of these phenotype-based methods. In contrast, some of newer molecular typing methods involving the analysis of DNA offer many advantages over traditional techniques. These DNA-based methods have the greater discriminatory power than that of phenotypic procedures. This review focuses on the importance and the basis of molecular typing methods along with some considerations on design and selection of probiotic culture for human consumption.

(Key Words; molecular typing, probiotic culture, selection, phylogenetic analysis, lactic acid bacteria)

I. 서 론

국내외를 막론하고 가공 식품의 생산은 매년 증가하고 있으며 식품 시장 또한 꾸준히 증가하고 있다. 식품 산업은 새로운 시대를 맞이하여 부가가치가 높고 건강을 증진시킬 수 있는 식품의 개발에 박차를 가하고 있다. 근래에 접어들어 식품의 3차 기능(tertiary function) 즉 생리적 활성을 증진시키려는 연구가 학계는 물론 산업계에서도 매우 활발히 진행되고 있다. 기능성 혹은 생리활성 식품이란 영양성, 관능적 만족성, 생리적 기능 조절능과 같은 효과를 나타내는 식품을 의미한다. 보고 자료에 의하면 미국의 기능성 식품 시장은 1,340억 달러로 추산되며, 여기에는 천연 식품, FOSHU(Foods and ingredients for specified health use), medical foods, nutraceuticals, 및 drug foods 등이 포함된다(Sanders, 1998). 일본의 경우에는 1998년 5월까지 108 품목의 FOSHU가 후생성으로부터 허가되었다(Benno, 1998). 이러한 기능성 식품이 식품인가 아니면 의약품인가라는 논쟁은 접어두고라도 장기적인 안목에서 볼 때 식품 산업의 생리활성 물질 탐색 연구는 바람직한 측면으로 이해된다. 식품 미생물 분야에 있어서도 식품 가공과 관련된 미생물의 기능성을 극대화하려는 방향으로 연구가 추진되고 있는 데, 이 가운데 향후 유망한 연구 분야의 하나로 지목되고 있는 것이 probiotics 연구라 할 수 있다.

본 고에서는 probiotics의 개발 연구와 관련된 몇 가지 고려 사항을 검토하고, 이상적인 probiotic용 후보 유산균의 분리 및 동정연구와 관련하여 최근 미생물의 분류 동정에 있어 가장 신속, 간편하고 믿을 만한 방법으로 인식되고 있는 분자 분류법(molecular typing method)을 간략하게 소개하고자 한다.

1. Probiotics란 ?

Probiotics란 “장내 미생물의 균형을 개선시킴으로써 동물에 유익한 효과를 제공할 수 있는 살

아있는 미생물 제제”(Fuller, 1989)로 정의할 수 있다. 이러한 정의는 그후 “토착 균총을 개선시킴으로서 인간과 동물에 유익한 하나 또는 다수의 미생물 배양제”(Havenaar와 Huisin't Veld, 1992)로 그 의미가 약간 확대되었다. 본래 포유동물의 소화관에는 g당 10¹²마리의 세균이 존재하며 수백 종의 미생물이 서식하는 것으로 알려져 있다(Savage 등, 1977). 이 미생물 집단은 그들이 서식하는 숙주에 대하여 상당한 영향을 미치는 것으로 보인다. 대체로 probiotics를 급여함으로써 얻어질 수 있는 유익한 효과를 살펴보면 다음과 같다(Tannock, 1997).

- 1) 병원성 세균의 증식 억제 및 길항 작용
- 2) 면역증강 및 면역조절 작용
- 3) 항암 또는 항돌연 변이 작용
- 4) 유당 불내증(lactose intolerance)의 완화
- 5) 혈중 콜레스테롤 저하작용
- 6) 혈압 강하 작용
- 7) 설사의 빈도 및 지속 기간의 단축
- 8) 자궁염(vaginitis)의 예방
- 9) 정상 상태의 장 점막 유지

이상에 열거한 바와 같이 다양한 효과를 제공한다고 주장되고 있는 probiotics용 미생물은 어떠한 특성을 지녀야 하는가? 이에 대한 대답은 이 분야의 연구에 가장 중요한 고려 사항으로 볼 수 있다.

김(1999)은 생균 제제로서 갖추어야 할 몇 가지 조건을 제시하였다. 첫째는 제조 보관이 용이하며, 소화관내에서의 생존성이 높은 것, 둘째는 적정량의 미생물 균체가 함유되어 있을 것, 셋째는 분류학적 위치가 명확하고 안전성(safety)이 확인된 균주 일 것, 넷째는 생균의 활성화 속도가 빠를 것, 다섯째는 생균제 투여에 의한 효과가 일정할 것, 여섯째는 유용균의 증식을 도모할 것, 일곱째는 장 점막에 대해 정착성이 강하여 분변으로의 배출이 적을 것, 마지막으로 항생제 및 기타 화학 요법제와 병용시 내성을 가질 것 등이다(Barrow 등, 1980).

그러나 과거 수십 년간 이 분야의 연구 노력이

상당하게 추진되어왔음에도 불구하고 불행스럽게도 probiotics 투여에 의한 특별한 효과가 구체적으로 검증된 사례는 손꼽을 정도로 적다(O'Sullivan, 1992). 그 이유중의 하나는 장관(gastrointestinal tract: GI-tract) 내에 존재하는 복잡 다양한 미생물군에 대한 정보가 아직 부족하며 실제로 장관 내에서 바람직한 효과를 발휘할 수 있는 균종을 확인하지 못한데 있다고 여겨진다. 따라서 현재 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacteria*를 중심으로 이루어지고 있는 probiotics 연구는 전반적으로 생균제가 가지는 probiotic functionality의 파악 쪽으로 그 초점이 맞추어져야 한다.

II. 균주의 분리, 선택 및 동정법

1. 유산균이란?

무엇이 유산균(lactic acid bacteria; LAB)인가? 이 질문에 정확한 대답을 할 수 있는 사람은 별로 없을 것이다. 그 이유는 현재 유산균의 종류가 계속 증가하고 있고, 생리적인 특성이 다양한 미생물 집단이기 때문이다. 20세기초 고전적 개념으로 유산균이란 “우유를 시어지게 하는 미생물(milk souring organisms)”이라는 분명한 정의가 있었다. 그후 우유 이외의 다른 식품에서 기존 유산균과 매우 유사한 미생물들이 발견되면서 혼동이 생기게 되었다. 일찍이 Orla-Jensen은 미생물의 형태, glucose의 발효 형식, 생육 온도 범위, 유산균의 이성질체[D(-) 혹은 L(+)] 형 등을 기초로 유산균을 정의하였고, 아직도 그의 분류 지표는 유용하게 이용되고 있다.

즉 전형적인 유산균(typical lactic acid bacteria)이란 Gram 양성, G+C 조성 50 mol% 이하, 비아포성(nonspore-forming), catalase 음성, cytochrome의 부재(devoid of cytochrome), 혐기성 또는 미호기성(nonaerobic habit but aerotolerant), 까다로운 영양 요구성(nutritionally fastidious), 내산성(acid tolerant), 유산의 발효 생성(lactic acid as a major end product of

sugar fermentation), 저 당농도 하에서 pseudo-catalase 활성 등이다(박 등, 1999). 통상적으로 인식되고 있는 이상의 전형적인 유산균에 부합하는 미생물로는 *Aeromonas*속, *Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, *Pediococcus*속, *Oenococcus*속, *Weissella*속 그리고 *Streptococcus*속이 있고, *Streptococcus*속은 다시 *Enterococcus*속, *Lactococcus*속, *Streptococcus*속 및 *Vagococcus*속(motile)로 세분될 수 있으며, 종래에 *Lactobacillus*속에 속 하였던 간균중에서 *Carnobacterium*속이 분리되어 나오게 되었다. 이 세균은 *Lactobacillus*와는 달리 acetate media 상에서 자랄 수 없다(Collins 등, 1987). 그러나 유산균의 수가 늘어나면서 생리적 특성만으로는 분류가 불가능하게 되었다. 한편, *Bifidobacterium*속은 분류학적으로 *Actinobacteria*강에 속하며, 유산균과는 판이하게 다른 성질 때문에 일반적으로 유산균에 포함시키지 않는 경우가 많다(박 등, 1999).

2. 사용 배지

미생물의 분리에서 사용 배지의 선택은 분리 효율을 좌우하기 때문에 매우 중요하다. 인체 및 동물의 장관에서 미생물을 분리하고자 하는 경우 소화관의 물리화학적 특성을 고려하여, 분리용 배지에는 다음과 같은 성분이 함유되도록 설계되어야 한다. 기본적인 성분으로는 탄소원(에너지), 질소원, 무기질과 완충능을 동시에 제공하는 무기질 용액, 산화-환원 전위차를 낮추는 환원제, 산화-환원 상태를 표시하는 지시약 등이다. 탄소원과 질소원의 종류는 분리하고자 하는 미생물의 종류에 따라 상당히 달라질 수 있다.

환원제는 배지 중에서 산화되어 절대 혐기성 세균을 치사시키지 않는 것이어야 한다. 현재 환원제로 사용되고 있는 대표적인 시약은 cysteine-HCl, sulfide, dithiothreitol, titanium citrate, titanium nitrilotriacetate, ferrous sulfide, sodium thioglycolate, sodium dithionate 그리고 ascorbic acid 등이다. 이중 cysteine-HCl이 가장 널리 사용되고 있다. 분리용 배지의 선택에서

무엇보다도 우선적으로 고려할 사항은 미생물의 본래 서식처(niche)를 모방한 배지(habitat-simulating media)를 사용하는 것이다. 한가지 좋은 예로 장액(rumen fluid) 등을 첨가함으로써 미지의 growth factor를 보충하는 효과를 얻을 수 있었다고 한다(Leedle과 Hespell, 1980). 장관은 매우 다양한 미생물이 경쟁적 또는 협동적 상호작용을 통하여 살아가는 장소이므로 한 특정 미생물의 증식과 영양소의 관련성을 파악하는 일은 힘들다. 이상의 내용과 관련하여 한가지 유념해야 할 사항은 배지 제조시 탄소원을 보충하지 않은 대조 plate를 만들어 배양 후 나타난 background 집락과 탄소원이 첨가된 plate상의 집락을 상호비교 해야 한다는 점이다.

3. 균주의 선발 및 동정

유산균은 probiotic culture로서 사용되고 있는 가장 흔한 미생물이다(Table 1 참조). 그 이유는 유산균이 장내의 바람직한 세균중의 하나이며, 발효유 제품의 제조에 오랫동안 사용되어 왔고, 보편적으로 안전한(Generally recognized as safe: GRAS) 미생물로서 인식되고 있기 때문이

다. 종래의 바람직한 미생물의 선발은 주로 후보 균주가 가지는 산업적인 측면에서 가치가 큰 특징(제조 보관의 용이, 탁월한 생존능 등)을 기준으로 하였다.

그러나 실제 *in vivo*에서 probiotics 기능을 수행할 수 있는지에 대한 판단은 거의 불가능 하였다. 따라서 바람직한 균주의 선발시 종합적으로 검토되어야 할 사항은 Table 2에 표시한 바와 같다. 즉, 균주의 적절성(appropriateness), 기술적 적합성(technological suitability), 경쟁력(competitiveness), 건강 증진성 및 기능성(performance and functionality)이 그것이다.

이중에서 무엇보다도 가장 기본적인 사항이라 할 수 있는 것은 정확한 균주의 분리 동정(accurate taxonomic identification)이라 할 수 있다. 실제로 probiotic 균주를 순수 분리한 후 그것을 동정하고자 할 경우, 기존 방법은 대개 후보 균주가 나타내는 생리적/생화학적 특징(phenotypic characteristics)을 기초로 하여 수행되어 왔다. 그러나 이러한 방법은 사용 배지의 종류나 기타 환경요인의 변화에 따라 일관성 있는 결과를 얻기 어려운 단점이 있었다. 역사적으로도 몇 가

Table 1. Examples of microorganisms used in probiotic products

Products for humans	Products for farm animals
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota strain	<i>L. casei</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subspecies <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subspecies <i>bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Torulopsis</i> spp.

Table 2. Selection criteria for probiotic strains^a

Appropriateness	Accurate taxonomic identification
i.	Normal inhabitant of the species targeted: human origin for human probiotics
ii.	
iii.	Nontoxic, nonpathogenic, GRAS status
Technological suitability	
iv.	Amenable to mass production and storage: adequate growth, recovery, concentration, freezing, dehydration, storage, and distribution
v.	Viability at high populations (preferred at $10^6 \sim 10^8$)
vi.	Stability of desired characteristics during culture preparation, storage, and delivery
vii.	Provides desirable organoleptic qualities (or no undesirable qualities) when included in foods or fermentation processes
viii.	Genetically stable
ix.	Genetically amenable
Competitiveness	
x.	Capable of survival, proliferation, and metabolic activity at the target site <i>in vivo</i>
xi.	Resistant to bile
xii.	Resistant to acid
xiii.	Able to compete with the normal microflora, including the same or closely related species; potentially resistant to bacteriocins, acid, and other antimicrobials produced by residing microflora
xiv.	Adherence and colonization potential preferred
Performance and functionality	
xv.	Able to exert one or more clinically documented health benefits (e.g. lactose tolerance)
xvi.	Antagonistic toward pathogenic / cariogenic bacteria
xvii.	Production of antimicrobial substances (bacteriocins, hydrogen peroxide, organic acids, or other inhibitory compounds)
xviii.	Immunostimulatory
xix.	Antimutagenic
xx.	Anticarcinogenic
xxi.	Production of bioactive compounds (enzymes, vaccines, peptides)

지 발효유 제조용 유산균의 동정 오류가 있었음은 주지의 사실이다. 표현형적(phenotypic) 특징에 기초한 동정법은 유사한 미생물의 구별하려 할 경우 더 더욱 곤란하다. *Lactobacilli* 균주 중에서 probiotics용 균주로 가장 널리 사용되고 있는 *L. acidophilus*의 예를 들어보자. 이 균은 그 생태적 서식 환경이나 기능특성이 매우 유사한 몇 종류의 미생물 집단이다. 그러므로 *L. acidophilus* complex로 불린다(Schleifer 등, 1995).

Fig. 1에 표시한 바와 같이 6개의 균주로 된 complex(*L. acidophilus*, *L. criptopatus*, *L. gasseri*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. johnsonii*)를 각각 동정하기 위해서는 신뢰할 수 있는 정확한 방법을 통하지 않고는 거의 불가능하다. *L. delbrueckii*는 3개 아종을 가지는데 *L. delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*는 80%의 상동성(homology)을 가진다. *L. casei*도 기존 5개 subspecies에서 DNA 상동성 data를 근거로 하여 *L. paracasei*, *L. paracasei subsp. tolerans*, *L. rhamnosus*, *L. casei subsp. casei*로 재분류되었다(Hansen과 Lessel, 1971; Hertel 등, 1993).

현재 phylogenetic analysis method로 가장 일반적인 방법이 ribosomal RNA(rRNA, rrn) operon의 보존 영역(conserved region) 또는 가변영역(variable region)을 분석하는 방법이다(O'Sullivan, 1999).

좀더 상세히 설명하면 1) 약 1500 bp 길이의 16S rRNA 유전자의 PCR을 이용한 증폭 및 염기서열 결정, 2) 약 450 bp 길이의 intergenic transcribed spacer 영역의 PCR을 이용한 증폭 및 염기서열 결정, 3) 약 50 bp 길이의 16S rRNA 유전자의 가변영역(variable region)에 대한 PCR 증폭 및 염기서열의 결정 등이다. Fig. 2는 16S rDNA sequence을 기초로 하여 유산균을 분류한 계통도이다. 이 자료에 의하면 유산균은 *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* 등이 포함된다. 이상에서 언급한 바와 같이 기존 유산균의 동정에는 상당한 오류가 있다고 판단되며, 이에 대한 정확하고도 총체적인 연구가 시급하다.

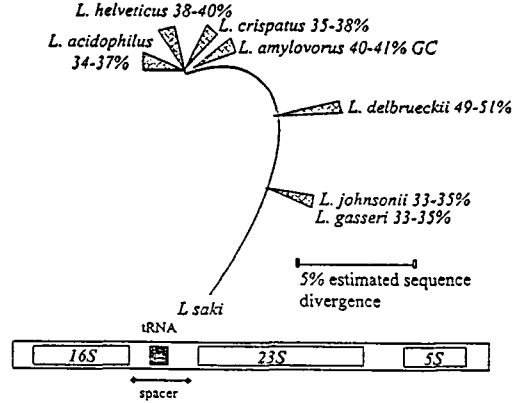


Fig. 1. Phylogenetic relationships among members of the *Lactobacillus acidophilus* complex. Adapted from: Schleifer et al., 1995. Phylogenetics for the genus *Lactobacillus* and related genera. Syst. Appl. Microbiol. 18, 461-467.

III. Molecular typing법

미생물을 분류, 동정하는 방법의 일반적 기준이란, 동정 가능성(typability), 분별력(discriminatory power) 그리고 결과의 해석과 조작의 용이성(ease of interpretation and ease of performance)등을 손꼽을 수 있다. 생태학적 관점에서 바라볼 경우 천연 발효식품이나 동물의 소화관 같은 곳은 수많은 미생물이 서식하는 복잡 다양한 생태계를 형성하고 있다. 이 중에서도 관심의 대상이 되는 균주를 어떤 방식으로 정확하게 찾을 수 있을 것인가? 이에 대해 기존에 발표된 것 것은 probe::target hybrid 형성법이다. 고정시킨 RNA와 hybridization시키는 방법은 복잡한 생태계로부터 원하는 균종을 정량적으로 파악할 수 있다고 주장되었다. Yamamoto 등(1992)도 16S를 기초로 한 DNA probe를 사용하여 human origin의 *Bifidobacterium* spp.를 성공적으로 확인 할 수 있었다. 그러나 이들 방법도 정확성에 있어 여러 가지 문제점이 지적되었다.

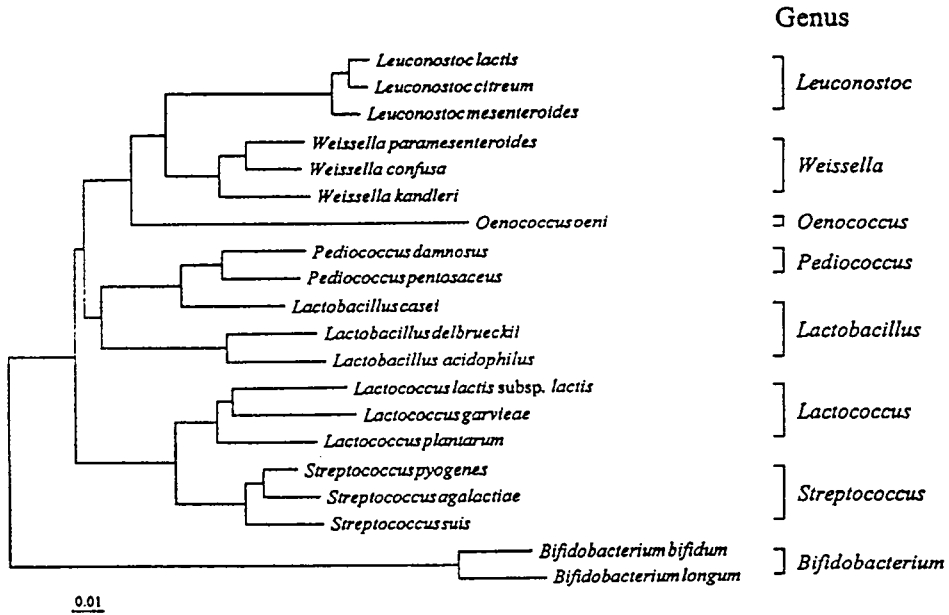


Fig. 2. Rooted phylogenetic tree based on 16S rDNA/ rRNA sequences showing the relationship among representatives of lactic acid bacteria.

그런데 다행스럽게도 bacteria의 species 수준에서는 서로 다른 미생물을 동정할 만한 충분한 유전적 다양성이 존재한다는 사실이 밝혀졌다. 따라서 분자 유전학적 실험을 통하여 미생물을 동정하는 정확하고 간편한 방법들이 개발되게 되었다. 미생물들이 다양하게 뒤섞여 있는 환경에서 원하는 미생물을 분리, 증식시키지 않고도 동정할 수 있는 방법이 16S rRNA-based hybridization이다. Species-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe를 이용하므로써 소의 위장에 들어 있는 미생물을 분리하거나 계수할 수 있었다. 특히 Bifidobacteria는 장질환을 예방하거나 치료하는데 있어 응용성이 큰 미생물이라는 인식 때문에 16S rRNA-targeted probe를 이용한 계수법이 개발된 바 있다.

미생물이 가지는 표현형적 특성에 의존하여 동정하는 방법, 즉 biotyping, serotyping, phage-typing, bacteriocin-typing 등 아직도 유용하게 사용되고 있으나 여러 가지 단점 및 제약이 있다.

이에 반하여 genotyping법은 염색체나 plasmid와 같은 유전물질을 직접 분석하는 기술로서 기존 방법에 비해 여러 가지 장점을 가진다. 가장 큰 장점은 무엇보다도 분별력의 향상이다. 종래의 방법으로는 동일한 미생물 동정되는 균주도 이 방법을 사용하면 서로 다른 미생물로 구분이 가능하다. 그 외의 장점으로는 1) DNA는 항상 세균으로부터 추출될 수 있기 때문에 모든 strain의 동정이 가능 하며, 2) 실험결과에 대한 분석 전략이 비슷하여 어떠한 DNA 시료에도 적용할 수 있고, 3) Genomic DNA는 안정하므로 배양조건이나 추출 방법에 따라 그 염기 조성이 변하지 않는다는 점이다. 현재 미생물을 동정하기 위하여 일반적으로 사용되고 있는 molecular typing 방법을 간략하게 소개하면 다음과 같다.

1. Plasmid typing

이 방법은 비교적 오래된 방법으로 분석하는

대상이 염색체(chromosome)가 아니라 extra-chromosomal DNA라는 점이다. 주지하다시피 plasmid는 그 크기가 작고 초나선 구조를 하고 있는 이중나선 DNA 분자이다. 작은 것은 1.5 kb 부터 큰 것은 300 kb까지 그 크기가 다양하다. plasmid DNA를 분리한 다음 agarose gel 상에서 전기영동 하여 그 수(number)와 크기(size)를 확인하는 방법이다. 그러나 동일한 크기라 하더라도 nucleotide 서열은 다를 수 있으므로, 이를 확인하기 위해서는 적절한 한가지 제한효소로 절단한 다음 재차 전기영동 하여 DNA 단편의 이동 패턴을 상호 비교하면 된다.

2. Chromosomal DNA restriction analysis

이 방법은 흔히 restriction endonuclease analysis(REA) 또는 DNA microrestriction analysis법으로 불린다. Chromosomal DNA를 세균으로부터 분리한 다음 제한효소로 절단하고 난 후 agarose gel 상에서 전기 영동 시킨다. 1000~20000 bp 사이의 단편들은 크기에 반비례적으로 이동하며, ethidium bromide로 염색한 후 UV 광선 하에서 관찰한다. Banding pattern은 DNA-fingerprint라 하는데 재현성이 비교적 높다. 두 분리 균의 banding pattern이 서로 상이하다면 이는 restriction-fragment length polymorphism(RFLP)으로 불린다.

한가지 단점으로 지적되는 것은 제한효소 절단 후 지나치게 잘린 단편의 수가 많을 수 있다는 점이다. 그러나 이것도 제한효소를 적절히 선택하면 극복할 수 있다.

3. Ribotyping

Ribotyping법이란 ribosome 단백질을 암호화하는 유전자들을 인식할 수 있는 probe를 사용하는 조작을 지칭한다. 보통 세균의 경우 총 RNA의 82%가 ribosomal RNA(rRNA)이며 23S, 16S 및 5S rRNA로 구성된다. rRNA 유전자들은 매우 보존적으로 존재한다는 사실이 알려졌다.

이는 상이한 세균이라 할지라도 이들 유전자들이 매우 유사하다는 의미이다. 대부분 세균의 유전자는 오직 1 copy만 존재하는 반면 rRNA(rrn) operon은 세포당 2~11 copy가 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이론적으로 copy수가 많을수록 ribotyping의 분별력은 높아지게 된다. 앞에서 기술한 RFLP-typing과 마찬가지로 세균으로부터 chromosomal DNA를 추출한 다음 적당한 제한효소를 처리하여 작은 단편으로 잘라 놓는다. 전기영동후 DNA단편을 Nylon 또는 Nitrocellulose membrane 상에 blotting 시킨 다음 23S 또는 16S rRNA sequence를 포함하는 probe(방사선 동위원소 또는 화학적 발색시약으로 표지된 것)와 hybridization 시켜 확인하는 방법이다(Swaminathan과 Matar, 1993).

rRNA로 역전사 효소(reverse transcriptase)를 처리하면 조제한 cDNA를 사용할 수도 있다. 대개 1~15개 band가 나타나는데, 이것들은 서로 비교하여 동정 할 수 있다(Fig. 3c). Chemiluminescence ribotyping법은 digoxigenin-labeled cDNA를 이용하는 ribotyping의 변법이다. 이 방법의 가장 큰 장점의 하나는 ribosome 유전자의 유사성으로 인하여 보편적 probe(universal probe)가 사용될 수 있다는 점이다.

종래의 ribotyping법 이외에도 여러 가지 변법이 등장하였다. Gel상의 DNA단편과 상보성을 확인하기 위해 rRNA probe를 사용하는 대신 그 외의 다양한 probe가 사용될 수 있다. 이러한 probe에는 toxin gene(Swaminathan과 Matar, 1993)이나 insertion sequence가 있다.

4. PFGE-typing

Pulse-field gel electrophoresis법은 보통 PFGE-typing법으로 불린다. 분별력이나 재현성이 높아 점차 인기를 모으고 있다. 이 방법은 상기의 microrestriction analysis의 단점을 보완하기 위해 개발되었다. 추출한 DNA를 다음, 시료를 특수한 제한효소(보통 6~8 base를 인식)로 절단하면 5~20개의 큰 단편을 얻게 된다. 각 단편은

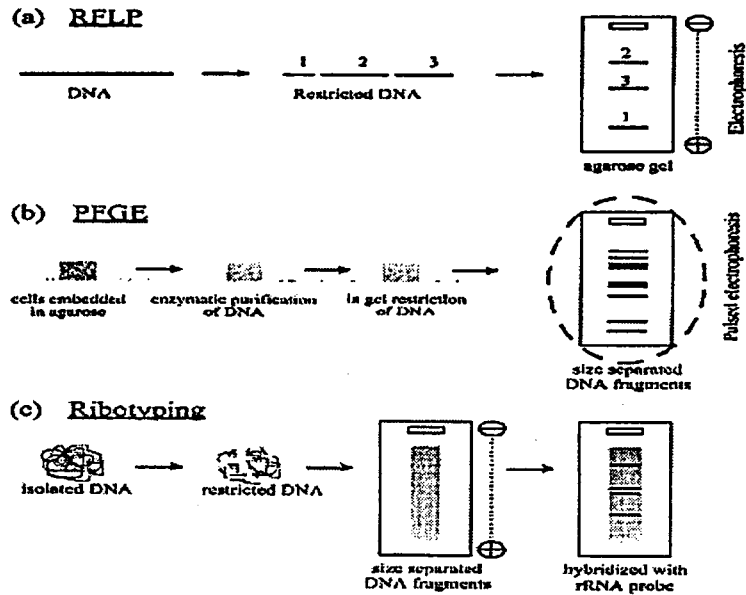


Fig. 3. Schematic illustration of RFLP, PFGE, and Ribotyping.

10~800 kb 정도이다. PFGE가 갖는 특징은 크게 2가지로 요약할 수 있다. 첫째는 25 kb보다 큰 DNA 단편은 전기 영동 할 수 없다는 기존의 전기 영동법의 한계를 gel 양단의 electric field 방향을 주기적으로 바꾸어 좁으므로 극복하였다는 점이다. Contour-clamped homogenous electric field(CHEF)은 3 mb이상이나 되는 대단히 큰 DNA 분자를 분리 할 수 있는 기술로서 서로 120°각도에서 균일한 전장(electric field)를 만드는데 사용되는 hexagonal electrodes를 장착하였다. 이렇게 하므로서 DNA 단편은 휘거나 뒤틀리지 않고 똑바로 gel상을 이동하게 된다. 단 한가지 특징은 DNA가 전단력에 의해 절단되어 random fragment가 되지 않도록 하는 방법이다. Intact DNA를 제조하기 위해 agarose plug를 만들고 그 속에 미생물 자체를 주입한 후 lysozyme과 같은 시약을 처리하여 용균 시킨다.

계속해서 proteinase K를 첨가하여 단백질을 제거한 다음, protease inhibitor(PMSF)처리하여 DNA를 조제하고 제한효소로 절단하는 것이

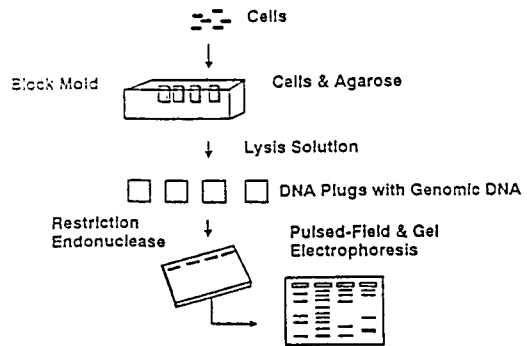


Fig. 4. Schematic illustration of PFGE.

다. DNA는 보통 low-frequency cutting enzyme (인식부위가 적은 효소)를 사용한다(Fig. 4).

5. PCR-based typing system

1) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

최근 *E. coli*, *Listeria monocytogenes*와 같은 식품 유래 미생물을 동정하기 위해 개발된 방법으로서 매우 간편하고 신속한 동정법이다. Primer의 길이는 일반적 PCR보다 짧은 9- 또는 10-mer 정도이며 target DNA의 sequence를 사전에 알아둘 필요가 없다. Annealing 온도도 normal PCR 온도보다 다소 낮게 설정한다. 두 primer는 200~2000 bp사이에서 불완전한 annealing을 일으키며, 이 부분이 증폭된다. 상이한 banding pattern이 생기는 원인은 priming site의 deletion, insertion 등 때문이다. 재현성이 문제가 될 수도 있으나, 최근 연구결과에 따르면 세심한 작동 조건하에서 높은 재현성을 보였다고 한다.

2) PCR-based Ribotyping법

비교적 최근에 개발된 동정법이다. 미생물의 rRNA유전자(23S, 16S, 5S)간에는 space region이 존재하며 미생물의 종류에 따라 이 영역의 길이가 다르다(heterogeneity)는 점을 이용한 방법이다. 따라서 이 방법을 사용하면 genus 및 species 수준에서 동정이 가능하다.

Primer는 기존에 밝혀진 rRNA-coding DNA sequence에 의존한다 보통 16S 및 23S의 보존영역을 oligomer의 primer 제작에 사용한다. 동정 분별력을 향상시키기 위해서는 23S와 5S rRNA 유전자 사이의 spacer region을 증폭하거나 증폭된 DNA(amplicon)를 제한효소로 절단 할 수도 있다 (Fig. 6). 장점으로는 보편적 primer의 사용, 조작의 용이 및 신속성, molecular epidemi-

ology에 광범위하게 사용될 수 있다는 점 등이다.

3) Rep-PCR

Rep-PCR은 세균의 genome상에 흩어져서 존재하는 특정 DNA sequence(rep:repetitive DNA element)의 정확한 copy수를 알고 있는 경우 사용된다. 반복되는 DNA부위 (rep)는 세균의 species 또는 strain에 따라서 서로 다른 위치에 존재하며 다양한 거리를 두고 서로 떨어져 있다. PCR로 chromosome 상에 존재하는 이들 반복 부위 사이의 영역을 증폭하면 다양한 DNA단편을 얻을 수 있다. PCR 수행 후 얻어진 amplicon은 전기영동으로 크기를 분석할 수 있다. Repeti-

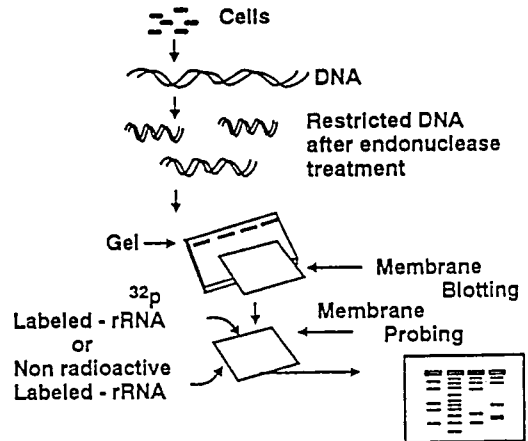


Fig. 6. Schematic illustration of ribotyping.

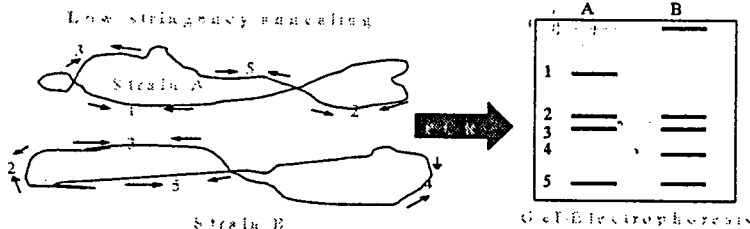


Fig. 5. Schematic illustration of RAPD-PCR.

tive chromosomal sequence는 Gram-negative 세균에 흔히 존재하며 eucaryotic 미생물을 동정하는 데도 응용되고 있다. 재현성 및 분별력은 중간 정도이다.

IV. Functional Genomics

Functional genomics (기능 유전체적 연구)란 미생물 genome의 염기 배열 순서를 확인한 다음 특정한 환경 또는 자극에 따라 발현되는 기능(function)과 대응하는 유전자 정보의 상관 관계를 구체적으로 파악하는 연구라 할 수 있다. 간단히 genotype와 phenotype의 상관관계를 구체적으로 이해하는 작업이다. 따라서 미생물의 완전한 genome sequence가 결정된다면 균주의 functionality에 대한 해석이 가능하다. 미생물 genome project는 이와 같은 맥락에서 필요하며 이미 *L. acidophilus* *L. johnsonii*(Klaenhammer, 1998)를 대상으로 착수된 바 있다. *Bifidobacterium*의 경우에는 probiotic culture로 인기가 있는 인체 유래의 *B. longum*/*B. infantis*부터 시작되어야 할 듯 싶다. Probiotic culture에 대한 유전학적 연구는 아직 초보단계를 벗어나지 못하고 있으나, 향후 실용화 될 수 있는 유용한 정보들이 계속적으로 축적되고 있기 때문에 유망 상당히 분야이다.

다시 말하면 각 미생물의 genomic sequence 정보가 미리 확보된다면 한 미생물이 끊임없이 바꾸는 환경(매개식품 또는 장관)에서 생존 및 활성을 유지하기 위하여 획득한 유전자(acquired gene)가 무엇이며, 매개식품 (food-carrier)이나 장관(GI-tract) 내에서 부딪히는 다양한 자극에 대응하는 유전자 (responsive gene)가 무엇인지 균주간 상호 비교가 가능하다. 이 분야는 현재 외국에서 비교 유전체학 (comparative genomics)으로 불리고 있다. 인체의 정장효과를 목표로 하는 경우, 장 정착성(adherence), bacteriocin의 생산, 내산성 (acid tolerance) 및 유발적 발현 (induced expression)도 생체 내에서 probiotic culture의 생존 및 활성을 결정하는

인자 중에서 가장 핵심적인 요소라 생각된다. 위와 같은 관점에서 쉽게 예상되는 바와 같이 probiotic 균주는 food-carrier나 GI-tract으로부터 다양한 stress(acid bile)를 받게 되며, GI-tract의 목표지점에서 경쟁 미생물의 길항을 받을 가능성이 크다. 이러한 불리한 환경 하에서 미생물의 거동을 종합적으로 파악하는 일은 기존 방법으로는 거의 불가능하다고 해도 과언은 아닐 것이다. 따라서 functional genomics란 probiotic culture가 획득한 gene이 무엇인지 inducible gene은 어떤 양상으로 발현되는지 파악할 수 있는 가장 확실한 정보이다. Fig. 7에 probiotic culture가 실제 환경 하에서 받을 수 있는 대표적인 stress를 표시하였다.

Product /carrier의 측면에서 또한 GI-tract에서 그림과 같이 미생물에게는 치명적일 수 있는 다양한 자극에 노출되기 때문에 probiotic culture를 선택하기 위해서는 이 점을 염두에 두고 치밀한 검토가 있어야 하겠다. 한마디로 말하자면 식품용은 인체로부터, 동물용은 각 동물로부터 분리한 균주를 사용하는 편이 합리적이라는 뜻이다. 그 이유는 probiotic culture가 받는 stress의 종류와 질 그리고 강도가 동물에 따라 크게 상이하기 때문이다 (Klaenhammer, 1982). 동물의 분변에서 분리한 유산균이 인간이 섭취할 probiotic culture로 사용될 경우, 그 미생물의 입

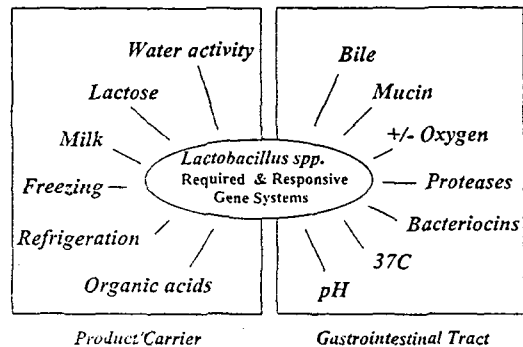


Fig. 7. Stimuli encountered by probiotics in two key environments.

장에서 본다면 동물의 장관에서 길들여져 있던 stress의 종류와 인체의 장관에서 받는 다양한 stress가 서로 상이하므로 인간 GI-tract에서 바람직한 performance를 기대하기는 어렵다고 본다. 다양한 환경 자극 (pH, 온도 등)에 대응하여 미생물체 내에서 유발되는 유전(responsive gene: rpoS, cspB, groELS, hsp 등)에 대한 연구가 최근 들어 크게 활성화되는 이유도 여기에 있다. 결국 functional genomics의 연구가 불완간에 크게 활성화 될 것으로 기대된다.

V. 결론 및 향후의 응용 분야

미생물은 그들이 서식하는 숙주에 대하여 상당한 영향을 미친다. 즉 위에서 언급한 바와 같이 probiotics를 투여함으로써 얻어질 수 있는 유익한 효과는 병원성 세균의 증식 억제 및 길항 작용, 면역증강 및 면역조절, 항암 또는 항돌연 변이 작용, 유당 불내증의 완화, 혈중 콜레스테롤 저하작용, 혈압 강하 작용, 설사의 빈도 및 지속기간의 단축, 자궁염의 예방, 정상 상태의 장 점막의 정상 유지 등을 예시할 수 있다. 이러한 효과를 기대할 수 있는 미생물 중에서 유산균은 보편적으로 안전한 미생물로 인식되고 있기 때문에 probiotic culture로서 널리 사용되고 있다. 그러나 실제 *in vivo*에서 probiotics로서 기능을 수행할 수 있는지에 대한 예측은 매우 어려우나 바람직한 균주의 선택은 실험실 차원에서 가능하다고 본다. 이 경우 가장 기본적으로 검토해야 할 사항은 정확한 균주의 분리 동정이라 할 수 있다. 주지하다시피 기존 동정법은 대개 후보 균주가 나타내는 생리적/생화학적 특징을 기초로 하여 수행되어 왔으나 그것으로는 일관성 있는 결과를 얻기 어려운 단점이 있었다. 현재 계통적 분류법 중에서 DNA-DNA hybridization, whole-cell protein의 SDS-PAGE 등이 자주 사용되고 있으나, 가장 신뢰할 수 있는 방법은 ribosomal RNA (rRNA, rrrn) operon의 보존 영역(conserved region) 또는 가변영역(variable region)을 분석하

는 방법이다. 본고에서는 PCR을 기초로 한 molecular typing법을 중심으로 그 필요성과 내용을 간략하게 소개하였다.

수많은 유산균 관련 연구 논문 중에서 probiotic culture에 대한 유전학적 연구는 이제 시작에 불과하지만, 향후 실용화 될 수 있는 유용한 정보들이 계속적으로 축적되고 있기 때문에 연구의 활성화가 크게 기대된다. 따라서 미생물 기능과 유전자의 직접적 관련성 즉, functional genomics 정보는 미생물이 끊임없이 바꾸는 환경 하에서 생존 및 활성을 유지하기 위하여 획득한 유전자가 무엇이며, 환경으로부터 당하는 다양한 자극에 대응하는 유전자(responsive gene)가 무엇인지 파악할 수 있게 할 것이다.

이와 관련하여 언급하고 싶은 것은 현재 학계 일각에서 인식되고 있는 국내 토착 미생물 (indigenous microorganism) 자원의 개발, 확보에 위에 언급한 연구 방법 및 정보가 이용될 수 있으므로 국가적인 차원에서 시급하게 추진되어야 할 연구 분야이다. 또한 자연 발효 식품에 스타터를 첨가하건 전적으로 스타터 첨가에 의해 제조되는 발효 조절 식품 (controlled fermented food)이건, 인위적으로 첨가한 스타터가 발효 과정 중 어떤 양상으로 변화되는지 경시적으로 monitoring 할 필요가 있다. 이 경우 스타터 미생물에 대한 functional genomics 정보를 미리 알고 있다면 항생물질과 같은 marker를 사용하지 않더라도 채취한 시료에서 스타터 미생물의 동적 변화를 strain-specific molecular typing 기법을 통하여 신속, 정확하게 분석해 낼 수 있을 것이다. 그 외에도 molecular typing법은 식품 및 의약품 산업체에서 인체에 병원성을 나타내는 미생물의 분석 등 HACCP 프로그램에 이용되고 있다 (Dodd, 1994). 결론적으로 이 분야의 연구는 장차 probiotic culture의 선택이나 식품의 품질관리에 효과적으로 광범위하게 응용될 수 있을 것이다.

VI. 참고문헌

1. Barrow, P.A., Brooker, B.E., Fuller, R. and Newport, M.J. : The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and it's important in the microecology of the intestine. *J. Appl. Bacteriol.*, 48: 147-154 (1980).
2. Benno, Y. : Probiotic lactic acid bacteria for functional food. *Proc. Int'l. Symp. Probiotic Researches on Lactic Acid Bacteria*, pp.14-16. Seoul, Korea (1998).
3. Dodd, C.E.R. : Application of molecular typing techniques to HACCP. *Trends Food Sci. Technol.*, 5: 160-164 (1994).
4. Farber, J.M. : An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food Protec.*, 59: 1091-1101(1996).
5. Fuller, R. : Probiotics of man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-378 (1989).
6. Hansen, P.A. and Lessel, E.F. : *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 21: 69-71(1971).
7. Hertel, D., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K. and Schleifer, K.-H. : Differentiation of *Lactobacilli* occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic profiles. *Syst. Appl. Microbiol.*, 14: 463-467 (1993).
8. Jensen, M.A., Webster, J.A. and Straus, N. : Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 945-952 (1993).
9. Klaenhammer, T.R. and Kullen, M.J. : Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 45-57(1999).
10. Klaenhammer, T.R. : Microbiological considerations in selection and preparation of *Lactobacillus* strains for use as dietary adjunct. *J. Dairy Sci.*, 65: 1339-1349 (1982).
11. Leedle, J.A.Z. and Hespell, R.B. : Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacteria populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 709 (1980).
12. Naidu, A.S., Bidlack, W.R., and Clemens, R.A. : Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 39: 13-126 (1999).
13. O'Sullivan, M.G., Thorton, G. O'Sullivan, G. and Collins, J.K. : Probiotic bacteria: myth or reality? *Trens Food Sci. Technol.*, 3: 309-314 (1992).
14. O'Sullivan, D.J. : Methods for the analysis of the intestinal microflora. In: Tannock, G.W.(Ed.), *Probiotics: a critical review*. Horizon Scientific Press, Norfolk, U.K. pp. 23-44 (1999).
15. Ricke, S.C. and Pilai, S.D. : Conventional and molecular methods for understanding probiotic bacteria functionality in gastrointestinal tracts. *Crit. Rev. Microbiol.*, 25: 19-38 (1999).
16. Sanders, M.E. : Overview of functional foods:emphasis on probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 8: 341-349 (1998).
17. Savage, D.C. : Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31: 107-133 (1977).
18. Schleifer, K.-H., Ehrmann, M., Brockmann, E., Ludwig, W. and Amann, R. : Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 5: 1081-1094 (1995).

19. Swaminathan, B. and Matar, G.M. : Molecular typing methods. pp. 26-50. In: Persing, D.H., T.F. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White(ed.) Diagnostic molecular microbiology, principle and applications, ASM Press, Washington, D.C. USA (1993).
20. Tannock, G.W. : Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. Trends in Biotechnology, 15: 270-274 (1997).
21. Yamamoto, T., Morotomi, M. and Tanaka, R. : Species-specific oligonucleotide probes for five Bifidobacterium species detected in human intestinal microflora. Appl. Environ. Microbiol., 58: 4076-4079 (1992).
22. 김영민 : 가축의 유산균 probiotics 이용 현황과 전망. 생물산업. 제 12권 2호, pp.23-28 (1999).
23. 박용하, 장영효, 윤정훈, 김홍중 : 유산균 연구와 최근 분류학적 고찰. 생물산업. 제 12권 2호, pp.35-43 (1999).