

한국인 유아 분변에서 분리한 *Lactobacillus acidophilus* KY1909의 프로바이오틱 특성

박종길 · 윤석영 · 오세종 · 신정걸* · 백영진
(주)한국야쿠르트 중앙연구소

Probiotic Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 Isolated from Korean Breast-Fed Infant

Jong-Gil Park, Suk-Young Yun, Sejong Oh, Jung-Gul Shin* and Young-Jin Baek
R & D Center of Korea Yakult Co. Ltd.

The purpose of this study was to isolate lactic acid bacteria that produced L(+) lactic acid from infant feces. Thirteen colonies were isolated with a MRS-plate containing 0.5% CaCO₃ to determine their ability to produce lactic acid. Based on their lactic acid production, 10 strains of *Lactobacillus* were identified to assess the ratio of lactate isomer using HPLC. A strain producing L-lactic acid was identified as *Lactobacillus acidophilus*, using API carbohydrate fermentation patterns and physiological tests, and named KY1909. The strain exhibited good acid tolerance in an artificial gastric juice as well as high bile resistance in MRS containing 0.5% bile acids. *L. acidophilus* KY1909 produced D(-) and L(+) lactic acid at a ratio of 6:94; whereas commercial strains of *Lactobacillus acidophilus* produced D(-) and L(+) lactic acid at a ratio of 1:1. These results demonstrate the *L. acidophilus* KY1909 can be utilized in fermented milk products and dietary supplements as a probiotic culture.

Key words: L-lactic acid, probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, acid tolerance

서 론

프로바이오틱스(probiotics)로 이용되는 미생물로는 *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* 및 효모 *Saccharomyces boulardii* 등을 들 수 있으며⁽¹⁾, 과거부터 유제품을 포함하여 사일리지, 육제품, 청과류, 및 주류의 스타터 균주로 이용되어 왔다^(2,3). 그 중에서도 *L. acidophilus*는 1921년에 Rettger 등이 처음 보고된 이래로 발효 유제품 및 유산균 정장제 및 생균제로 널리 사용되는 대표적인 프로바이오틱 유산균이다^(4,6). 최근 DNA의 homology를 통한 연구에서 *L. acidophilus*는 6개의 major species로 분류되어지는데, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, 및 *L. acidophilus* group으로 나누어 질 수 있음이 보고되었다⁽⁷⁾.

Lactic acid는 lactose의 일부를 유산균이 대사하는 과정에서 생성되는데 lactic acid에는 L(+) form과 D(-) form, 2종의

광학이성체가 있다. L(+) lactic acid의 경우 fructose-1,6-diphosphate에 의해 활성화 되는 NAD의존성 lactic dehydrogenase에 의해 생성되는 반면, D(-) lactic acid는 NAD비의존성 lactic dehydrogenase에 의해 생성되어 유산의 생성이 아닌 유산의 산화에 관여하고 있다. L(+), D(-) form 모두 장관에서 흡수되지만, L(+) form은 체내에서도 일부 합성되며, phosphoenol pyruvate나 glucose-6-phosphate를 거쳐 glucose나 glycogen으로 완전 전환되는 반면, D(-) form은 분해효소인 D-2-hydroxy acid dehydrogenase를 갖고있지 않아 대부분은 전환되지 못하고 뇨중에 배설되거나, 일부는 L(+) form의 작용을 방해하여 혈액 내 lactic acid의 축적에서 기인하는 acidosis(산성혈증)을 유발한다⁽⁸⁾. 이러한 문제점에 따라 WHO는 1966년 D(-) lactic acid에 대한 일일 섭취량을 100 mg/kg body mass 이하로 권장하였고, 1974년에는 섭취대상을 3개월 이하의 유아로 그 범위를 한정하였다^(8,9).

유산균 중 *L. delburueckii*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. leichmanii*는 D(-) 형태의 유산만을 만들고 *L. casei*, *L. salivarius*, *B. bifidum*은 L(+) 형태의 유산만을 만든다. *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. jugurti* 등은 D(-) 형태와 L(+) 형태를 함께 만든다. *Lactobacillus acidophilus*는 보통 D(-):L(+) lactic acid 비율이 50:50 정도로 알려져 있다.

*Corresponding author: Jung-Gul Shin, R & D Center of Korea Yakult Co. Ltd., Yongin-Si 449-901, Korea
Tel: 82-31-286-9600
Fax: 82-31-286-9601
E-mail: jgshin@re.yakult.co.kr

따라서 본 연구는 프로바이오틱스로 이용할 목적으로 내산성 및 담즙산 내성이 우수하며 L(+) lactic acid를 우세하게 생산하는 *L. acidophilus* 균을 선발하는 것을 목적으로 실시하였다.

재료 및 방법

유산균의 분리

모유만을 먹은 생후 3개월 신생아의 분변을 채취하여 잘 혼합한 후 2.5~5.0 g을 10배 부피의 pH 7.0 완충용액에 넣어 잘 혼합한 후 희석용 완충용액으로 희석하여 0.4%(w/v) bromocresol purple이 함유된 MRS 배지에 각각 도말하고 37°C에서 48시간동안 배양한 후 노란색 집락을 띄는 colony 들을 선발하였다.

내산성 및 내담즙산성 평가

내산성 평가는 Kobayashi 등⁽¹⁰⁾의 방법을 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 0.05 M sodium phosphate 용액을 제조하여 HCl로 pH를 2.5로 조정하였다. 여기에 유산균을 MRS broth (Difco, USA)에서 18시간 배양한 후 cell을 원심분리(5,000×g, 15분) 한 다음 0.85% saline으로 3회 세척하였다. 초기 균수가 10⁸ CFU/mL 정도가 되도록 0.05 M sodium phosphate buffer에 접종 한 후 37°C에서 2시간 진탕 배양기에서 배양한 후 생균수를 평가하여 내산성을 비교 하였다. 내담즙산성 평가는 MRS 배지에 여과 제균된 oxgall(Difco, USA) 용액을 oxgall 함량으로 0.5%(w/v)가 되도록 첨가하여 준비한 다음 내산성평가에서 준비한 유산균 현탁액을 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 생균수를 평가하였다.

Lactic acid의 이성질체 평가

L-lactic acid은 Olieman과 de Vries의 방법⁽¹¹⁾을 이용하여 HPLC로 분석하였으며, C18 column(Shiseido Capcell pak C18 UG-80, Japan)을 사용하여 1 mL/min의 유속으로 240 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 용매는 8 mM N,N'-dipropyl-L-alanine buffer와 4 mM copper acetate buffer(gradient buffer)를 사용하였으며 gradient buffer의 농도를 30%에서 80%까지 증가시키면서 분석하였다.

전자현미경 사진 촬영

주사전자현미경(S-2380N Scanning electron microscope, Hitachi, Japan)을 이용하여 측정하였다⁽¹²⁾. 양면테이프를 알맞은 크기로 잘라 표본대에 부착한 후 그 위에 관찰하고자 하는 시료분말을 가볍게 떨어뜨렸다. 준비된 표본은 SEM ion sputter coater를 이용하여 gold-palladium 층으로 진공상태에서 60초간 코팅시켰다. 표본의 형태는 15 kV의 accelerating voltage에서 관찰하였으며 대표적인 화상을 즉석필름(FP-3000B45, 912 cm, Fuji, Japan)으로 출력하여 비교하였다.

결과 및 고찰

유산균의 분리 및 동정

모유만을 먹은 생후 3개월 된 유아의 분변을 채취하여 균

Table 1. Bacteriological characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY 1909

Morphology	
Cellular	Rod
Gram staining	+
Colony at MRS medium	Gray (flat)
Spore-forming	-
Optimum temperature	37°C
Catalase	-
Gas from glucose	-
Carbohydrates fermentation	
Adonitol	-
Amidon	-
Amygdaline	+
Arabinose	-
Cellobiose	+
Esculine	+
Fructose	+
galactose	+
Gluconate	+
Glucose	+
Lactose	+
Maltose	+
Mannitol	+
Mannose	+
Melezitose	-
N-Acethyl glucosamine	+
Raffinose	-

주 분리를 통하여 총 45개의 집락을 분리하였다. 이 중에서 Gram 양성이면서 막대모양을 가진 13개 균주에 대하여 산 생성능력과 탄수화물 분해능 실험을 실시하였다. 산 생성능이 우수한 유산균의 선발은 0.5% CaCO₃가 첨가된 MRS 배지에 유산균 배양액 10μL를 paper disc에 점적한 다음, 24시간, 48시간 배양 후 0.85% lactic acid control과 투명환의 크기를 비교하여 결정하였다(data were not shown). 또한 1차 선발된 균주는 Bergey's manual⁽¹³⁾에 따라 catalase 활성, gas 형성능, API 50 CHL carbohydrate test(Bio Merieux, France)를 실시하였다.

산 생성 능력이 가장 우수하였던 균주를 선발하여 동정한 결과 *L. acidophilus*로 확인되었고(Table 1), *L. acidophilus* KY1909라 명명하였으며 주사전자 현미경으로 촬영 결과 전형적인 유산간균의 형상을 지닌 것으로 확인되었다(Fig. 1).

내산성 및 담즙산 내성

L. acidophilus KY1909 균주를 포함하여 상업적으로 이용되는 4종의 *L. acidophilus*과 3종의 lactobacilli에 대하여 내산성을 비교하였다. *L. acidophilus* KY1909의 경우 약 6.8×10⁷ CFU/mL 수준으로 접종하여 pH 2.5 인공위액에서 1시간 처리한 후에 생균수를 평가한 결과 6.5×10⁷ CFU/mL으로 나타나 인공위액 조건에서 거의 사멸하지 않는 것으로 확인되었으며, 다른 상업용 유산균들도 우수한 내산성을 보였다(Fig. 2). Figure 3에서 보는 바와 같이 *L. reuteri* 균주를 제외하고는

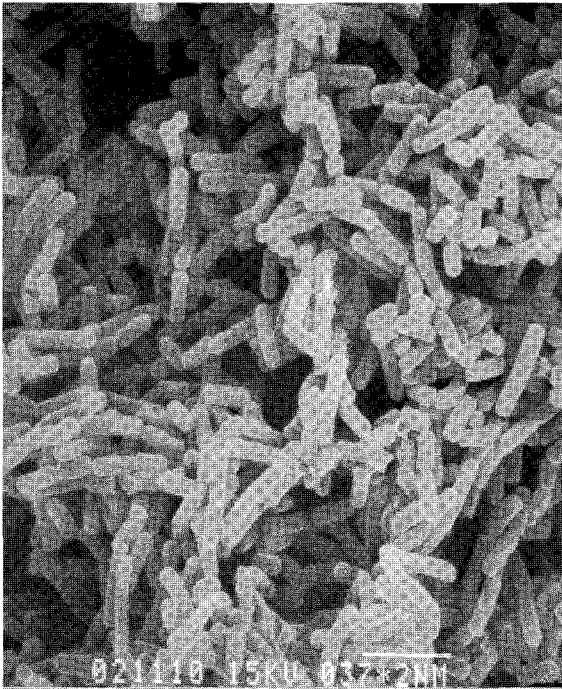


Fig. 1. Scanning electron micrograph of cell of *Lactobacillus acidophilus* KY1909.

대부분의 균주가 0.5% oxgall 함유 MRS 배지에서 접종균수를 유지하는 것으로 확인되어 본 실험에 사용한 균주가 비교적 우수한 내담즙산성을 갖고 있는 것으로 나타났다.

Lactic acid의 이성질체 비율

Lactic acid 분석 예비시험에서 gradient buffer로 사용한 8 mM copper acetate buffer의 농도가 60%에서 분리능이 우수하게 나타나 모든 실험은 이 농도에서 실시하였다. 또한 각 분석 과정이 끝날 때 마다 0.01 M HCl을 함유한 70% acetonitrile로 column 및 line을 세척하여 분석결과의 재현성을 유지하였다.

Lactic acid의 이성질체 분석은 *L. acidophilus* 3개 균주와 *L. rhamnosus* 2개 균주, *L. reuteri*, *L. casei* 균주를 각각 비교하였다. 유산균을 MRS 배지에서 37°C, 24시간 배양한 후 0.45 µm로 여과한 후 HPLC 시료로 사용하였다. Table 2는

Table 2. Comparison of lactic acid isomer produced by *Lactobacillus* strains

	Lactic acid content (mg/mL)			Isomer ratio (%)	
	D (-)	L (+)	Total (D+L)	D (-)	L (+)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>					
KY 1909	0.540	8.402	8.942	6.04	93.96
NCFM	2.240	2.475	4.714	47.51	52.49
CH5	6.177	4.280	10.456	59.07	40.93
ATCC 43121	0.222	0.887	1.109	19.99	80.01
NOCKS	1.143	2.471	3.914	36.87	63.13
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HY1213					
<i>Lactobacillus</i> GG	0.769	7.703	8.472	9.08	90.92
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2.372	3.299	5.671	41.82	58.18
<i>Lactobacillus casei</i> YIT 9029	0.605	7.422	8.027	7.53	92.47

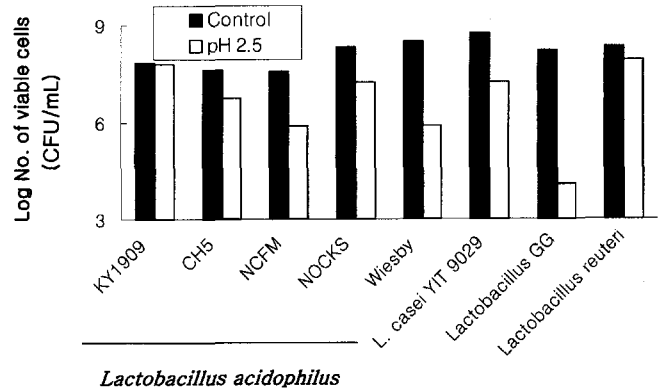


Fig. 2. Acid tolerance of lactobacilli strains in artificial gastric solution.

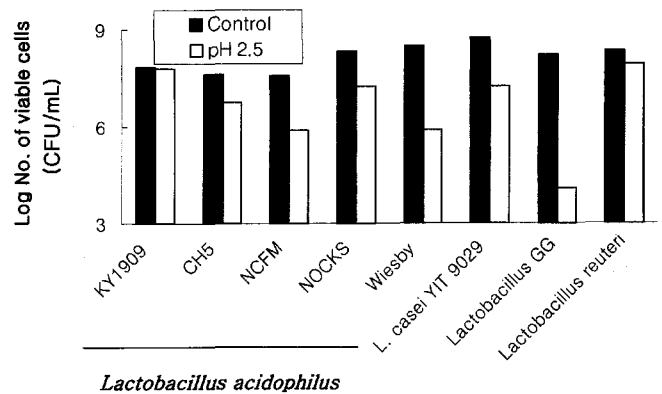


Fig. 3. Bile tolerance of lactobacilli strains in MRS medium containing 0.5% oxgall.

이들 시험 균주들의 lactic acid 입체 이성질체를 비교한 표이다.

Lactic acid는 lactate dehydrogenase에 의하여 pyruvate가 환원되면서 생성되는데, NAD-dependent LDH에 의하여 isomer를 생산한다. 현재까지 보고에 의하면 D-lactate 생산 lactobacilli는 lactic acidosis, 뇌질환(encephalopathy)의 발병요인으로 추정되고 있다^(14,15). 일반적으로 *L. casei*나 Bifidobacteria는 L-form만을 생산하는 것으로 알려져 있으며, *L. acidophilus*의 경우 L/D의 비율이 비슷한 것으로 보고되고 있다.

본 실험결과 발효유제품에 사용되는 *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* CH5, *L. acidophilus* NOCKS 들은 전체 lactic acid중에서 L(+) form이 차지하는 비율이 각각 52.49, 40.63 및 63.13%로 나타났으며, 콜레스테롤 흡착활성이 있는 것으로 보고된 *L. acidophilus* ATCC 43121균주의 경우에는 L(+) form과 D(-) form의 비율이 8:2로 생산하는 것으로 나타났다. 그러나 유아 분변에서 분리한 *L. acidophilus* KY 1909의 경우 L(+) form을 93.96% 생산하는 것으로 확인되었으며, 이는 유아 또는 어린이 제품에 새로운 활성 유산균으로 사용이 가능할 것으로 판단되었다.

요 약

발효 및 유산균 제품에 모유만을 먹은 생후 3개월된 유아의 분변으로부터 bromocresol pule을 함유한 MRS 배지에서 노란색의 집락을 형성하는 균주들을 내산성 및 담즙산 내성이 우수한 13종의 *Lactobacillus* 균주들을 분리하였으며 당발효성 및 생화학적 실험을 토대로 분리된 유산균들을 동정하였다. 최종적으로 선발한 균주를 *L. acidophilus*로 KY1909로 명명하였다. Lactic acid 생성 능력을 평가한 후 이성질체를 분석한 결과 상업적으로 이용되는 *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* CH5, *L. acidophilus* NOCKS 균주들은 전체 lactic acid 중에서 L(+) form이 차지하는 비율이 각각 52.49, 40.63 및 63.13%로 나타났으나, *L. acidophilus* KY1909는 L(+) lactic acid의 비율이 93.96%로 나타났다.

문 헌

- Gilliland, S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J. Food Prot.* 42: 164-167 (1979)
- Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. Probiotics for humans, pp. 355-376. In: Probiotics. Fuller, R. (ed). Chapman & Hall, London, UK (1992)
- Havenaar, R., Brink, B.T. and Huis in't Veld, J.H.J. Selection of strains for probiotic use, pp. 209-224. In: Probiotics. Fuller, R. (ed). Chapman & Hall, London, UK (1992)
- Hood, S.K. and Zottola, E.A. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* 53: 1514-1516 (1988)
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. and Clemens, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Technol.* 38: 13-126 (1999)
- Sandine, W.E. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J. Food Prot.* 42: 259-262 (1979)
- Hammes, W.P. and Vogel, R.F. The genus *Lactobacillus*, pp. 19-53. In: The Lactic Acid Bacteria. Vol. 2. Wood, B.J.B. and Holzafel, W.H. (eds.). Blackie Academic and Professional, NY, USA (1995)
- Perlmutter, D.H., Boyle, J.T., Compos, J.M., Egler, J.M. and Watkins, J.B. D-lactic acidosis in children: an unusual complication of small bowel resection. *J. Pediatr.* 102: 234-238 (1983)
- Dahlquist, N.R., Perrault, J.C., Callaway, W. and Jones, J.D. D-lactic acidosis and encephalopathy after jejunoileostomy: response to overfeeding and to fasting in humans. *Mayo Clin. Proc.* 59: 141-145 (1984)
- 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. *Japan J. Microbiol.* 29: 691-697 (1974)
- Olieman, C. and de Vries, E.S. Determination of D- and L-lactic acid in fermented dairy products with HPLC. *Neth. Milk Dairy J.* 42: 111-120 (1988)
- Bae, C.S., Park, C.H., Chang, B.J., Kim, H.Y., Cho, I.H. and Um, C.S. Effects of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed powder on bone resorption in ovariectomized rats. *Korean J. Electron Microscopy* 31: 109-116 (2001)
- Kandler, O. and Weiss, N. Regular, nonsporing gram-positive rods, pp. 1208-1234. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1986)
- Lee, K.W., Shin, Y.K. and Baick, S.C. D(-) and L(+)-Lactic acid determination of *Lactobacillus acidophilus* during fermentation and storage period. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 168-174 (1998)
- Jo, Y.B., Jun, E.J., Baik, H.S. and Jun, H.K. Study on the production of L-Lactic acid from soluble starch by *Streptococcus* sp. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 425-432 (1998)

(2003년 6월 4일 접수; 2003년 7월 2일 채택)