



Kefir로부터 분리한 *Lactobacillus rhamnosus*의 Probiotic 특성

유숙진* · 조진국¹ · 황성구 · 허강칠

국립환경대학교 낙농과학과 · ¹고품질친환경농축산물 생산기술연구센터

Probiotic Characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* Isolated from Kefir

Suk-Jin You, Jin-Kook Cho¹, Seong-Gu Hwang and Kang-Chil Heo

Department of Dairy Science

¹GRRC, Hankyoung National University, Anseong 450-149, Korea

Abstract

To search probiotic microorganisms, we isolated *Lactobacillus* sp. from kefir. The *Lactobacillus* sp. strain showed 99.5% of identity to species *Lactobacillus rhamnosus* by API kit. *Lactobacillus rhamnosus* showed high resistances to acidic environment, which grew well even at pH 2.0 and 1.0% bile salt. Enzyme activity of *Lactobacillus rhamnosus* was higher in amylase (0.673 μmol/min/mg) than that in xylanase (0.288 μmol/min/mg), cellulase(0.117 μmol/min/mg) and phytase(0.269 μmol/min/mg). Especially, the *Lactobacillus rhamnosus* showed high heat stability which remained 1×10^6 CFU/ml at 60°C. The maximum numbers of *Lactobacillus rhamnosus* on growth curve was reached at 24 h fermentation and pH was decreased to 4.6. The resistances of *Lactobacillus rhamnosus* to acidic pH and bile salt were better than that of *Lactobacillus acidophilus* used as control. When *Lactobacillus rhamnosus* was cultured with *E. coli* in MRS broth, *E. coli* was disappeared after 18 h. These results suggest that the isolated *Lactobacillus rhamnosus* has a useful probiotics properties.

Key words : kefir, *Lactobacillus rhamnosus*, probiotics, bile salt

서 론

Probiotics(생균제)는 일반적으로 숙주에 정착하여 유해 세균을 억제하거나 배제하거나 산을 생성하거나 병원체의 생장에 항균적 작용을 하는 과산화수소나 박테리오신을 생산하는 능력을 내포하고 있으며, 그 효과로 위장질병의 예방(Tannock 등, 1988)과 면역 증강(Kimura 등, 1997) 및 항들연변이, 항암 활성(Fuller와 Gibson, 1997) 등이 보고되고 있다. 한편, 항생제는 인간과 동물의 건강을 증진시키는데 사용되어 왔지만, 이의 남용, 오용은 인간에게 병원성 미생물에 대한 내성을 증가시키고 인체 대사에 영향을 미칠 수 있기 때문에 여러 국가에서 항생제의 사용을 금하고 있으며 그 사용

량 및 식품에서 잔류 허용량의 규제가 더욱 엄격해지고 있다 (Smith, 1975; Van Houweling, 1971). 이러한 항생제의 대체방안으로 부작용이 없는 생균제가 대안으로 제시되어 많은 연구가 진행 중이며, 이미 제약이나 요구르트의 형태로 시판되고 있고 또 동물사료 등에 첨가되고 있다. 현재 생균제로는 주로 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 등이 연구되었으나 사람이나 동물에 상업적으로 사용되는 생균제는 *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* 등이 혼합된 형태로 제품화되고 있다(Gilliland, 1979). 특히, 식품 분야의 Probiotic 유산균은 발효 유제품 및 유산균 정장제 및 생균제 등으로서 널리 사용되고 있고(Hood 등, 1988), 요구르트나 치즈 등 빌호 유제품에 대한 소비자의 기호가 다양화되면서 우수한 맛과 향기를 주는 새로운 균주 개발이 더욱 중요시되고 있다(Tannock, 1997). 효과적인 생균제로서는 증식이 빠르며 내열성이 있고 장관을 통과하며 위산과 담즙산에 견뎌야 하며 여러 가지 환경조건에서 살아남아야 한다(Park 등, 1996).

* Corresponding author : Suk-Jin You, Department of Dairy Science, Hankyoung National University, Anseong 450-149, Korea. Tel: +82-31-670-5208, Fax: +82-31-670-5127, E-mail: y4002@hanmail.net

Kefir는 코카서스(caucasus) 산악지대에서 유래된 발효유로 최근 산과 알코올을 함유하고 있고 우수한 약리작용이 있는 것으로 밝혀지고 있다(Toba, 1987 ; Shiomi, 1982). 가장 오랜 역사를 가지고 있는 발효 유제품 중의 하나로서 유산균이 배양 중에 생성한 물질이 인체 건강에 직간접적 효과가 알려지면서 장수 건강식품으로 그 소비가 세계적으로 증가하는 추세를 보이고 있다(Haenlein, 1995). Kefir는 kefir grain이라는 미생물균체를 발효시켜서 만드는데, kefir grain의 미생물은 *Torula kefir*와 *Saccharomyces kefir* 같은 효모와 *Lactobacillus caucasicus*과 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 같은 박테리아로 구성되어 있다. 특히 Kefir가 나타내는 항종양 활성 및 면역 증강 작용 등의 생리작용은 kefir grain에 있는 것으로 밝혀졌으므로, kefir grain 중의 미생물들은 생균제로서의 부가적인 기능이 있을 것으로 기대되는 바가 크다(Kroger와 Kumann, 1989; Itoh, 1990).

본 연구는 Kefir에서 *Lactobacillus* sp. 균을 분리하여 동정하였고, 내열성 및 내산성 내답즙산성을 비교하고 각종 소화효소 활성과 대장균 생육 억제 효과 등을 측정하여 probiotics로의 이용 가능성을 판단하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

재료

Kefir는 러시아의 슈퍼마켓에서 구입한 것과 전국대학교 유가공 실험실에서 분양 받은 것을 사용하였고, *Lactobacillus acidophilus*(KCTC 3140)와 *E. coli*(KCTC 1041)는 한국유전자은행의 표준균주를 사용하였다. MRS broth와 Nutrient broth는 Difco (USA)에서 구입하였다.

Lactobacillus sp.의 분리 및 동정

Kefir는 시유 500ml에 Kefir grain을 10% 접종한 후 23°C의 incubator에서 48시간 계대배양하여 시료로 이용하였다(Otle' et al., 2003 ; Koroleva, 1988). 배양한 Kefir 시료를 0.02% (NaN_3)를 포함한 MRS agar에 도말하여 1차적으로 10개의 *Lactobacillus* sp. 균주를 선발하였다. 이중 효소 분비능과 생육이 뛰어난 *Lactobacillus* sp.를 분리하여 API Kit(Biomerieux, France)의 당 발효실험을 이용하여 동정하였고(Loeffler et al., 2000), MRS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 48시간 배양이 끝난 것을 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

미생물 성장곡선 및 균수 측정

Lactobacillus rhamnosus 성장곡선은 Jar Fermenter(Kobiotech, Korea)를 이용하여 각각 MRS 배지에 pH 조절없이 32°C에서 72시간 배양하였다. 총생균수는 배양액을 0.85% NaCl 용액

에 10배석 연속적으로 희석시킨 다음 평판 배지에 0.1mL씩 분주하여 도말한 후, 최적온도에서 배양하고 콜로니 형성 단위(colony forming unit)를 측정하여 계산하였다(APHA. Standard Methods. 1985).

효소 활성

*Lactobacillus rhamnosus*의 배양액을 4°C, 150rpm으로 20분간 원심분리하여 균체를 회수하고 생리식염수를 균체 무게의 2배 비율로 가하여 glass homogenizer로 세포를 파쇄한 후, 균체를 1,500rpm으로 20분간 원심 분리하여 그 상등액을 조효소 시료로 사용하였다.

xylanase 및 amylase, cellulase 활성은 3,5-dinitro salicylic acid(DNS) 방법(Khasin, 1993)에 따라 측정하였다. 조효소시료 50 μL 를 취하여 각각 950 μL 의 0.5% substrate solution(xylan, carboxymethylcellulose, starch)를 포함하는 0.1M Tris-HCl완충액(pH 7.0)에 첨가하여 37°C의 water bath에서 10분간 반응시킨 후, 1mL DNS solution을 첨가하여 반응을 중지시켜 100°C에서 5분간 발색 반응시킨 후 ice water로 즉시 냉각시키고 8mL의 중류수를 첨가하여 spectrophotometer(UV-1601 PC, Shimadzu, Japan)를 사용하여 파장 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성을 계산하기 위하여 xylanase는 10 mM xylose solution을 cellulase와 amylase는 10mM glucose solution을 희석하여 표준곡선을 작성하여 계산하였다. DNS 용액은 3,5-Dinitro salicylic acid 5g과 NaOH 8g 그리고 sodium potassium tartrate 150g을 500mL 중류수에 녹여 제조하였다.

Phytase(EC 3.1.3.8) 활성은 Shimizu(1992)의 방법에 따라 75 μL 효소액과 2mM Na-phytate를 함유한 0.5 M sodium acetate(pH 4.0) 효소반응액 300 μL 를 37°C에서 30분간 반응시키고 10% TCA(Trichloroacetic acid)용액 375 μL 를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 750 μL 의 발색 시약(2.5% Ammonium molybdate sol , 10% ascorbic acid sol, 1M H₂SO₄ (1:1:3) 비율의 혼합액)을 첨가하여 45°C에서 20분간 발색시켜 820nm에서의 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 KH₂PO₄를 희석하여 작성된 표준 곡선으로부터 계산하였다.

단백질 농도 측정

단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)을 standard로 하여 Bradford 방법(Bradford, 1976)으로 측정하였다.

내산성 및 내답즙산성 분석

내산성 평가는 (Kobayashi, 1974) 방법을 수정하여 MRS broth를 0.1N HCl로 pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0로 조정한 다음 *Lactobacillus rhamnosus*를 첨가하여 30분 정치 후 잔존한 미

생물 수를 측정하였다.

내담즙산성은 bile salt를 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%(w/v)를 첨가한 MRS broth에 *Lactobacillus rhamnosus* 균주(2.0×10^9 CFU/mL)를 접종하여 37°C에서 6시간 방치한 후, 각 broth 0.1mL를 MRS agar plate에 도말하여 나타난 미생물수를 계수하여 생존율(%)을 확인하였다.

열 안정성

열 안정성은 30°C, 40°C, 50°C, 60°C로 에서 10분간 정치 후 생존한 미생물 수를 조사하였다.

대장균 생육억제 시험

미리 *Lactobacillus rhamnosus* 균주는 MRS 배지에서, 대장균은 Nutrient broth에서 12~24시간 배양한 후, 대조구로 MRS 배지에는 대장균만을 약 5.0×10^7 CFU/ml이 되도록 접종하고, 다른 하나의 MRS 배지에는 *Lactobacillus rhamnosus* 와 대장균이 각각 약 5.0×10^7 CFU/ml이 되도록 혼합 접종하였다. 접종된 액상배지를 37°C 배양기에서 정치 배양하면서 3시간 간격으로 배양액을 채취하였고, 채취액은 다시 멸균 생리식염수로 희석한 다음 Nutrient agar plate 도말하였다. 24시간 37°C에서 배양하여 나타난 균락으로부터 대장균 수를 측정하였다.

항생제 내성

여러 가지 항생제에 대한 균주 저항성을 검사하기 위하여 minimum inhibition concentration(MIC) test 방법으로 항생제 내성을 검사하였다. 항생제는 국내에서 가축사료에 첨가하고 있는 CTC, Bambermycin, Maduramycin, Diclazuril, Avilamycin, Lincomycin, Tylosin, OTC, Neomycin, Clopidol, Super-tia, Sulfathiazole, Collistin 등을 각각의 ppm 농도가 되도록 MRS broth 배지에 첨가한 후, 각각 균종을 접종하고 37°C에서 2일간 배양하여 *Lactobacillus rhamnosus*의 수를 계수하여 생장 여부를 조사하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정 결과

최종적으로 선발된 균주는 배지상의 colony 형태, 냄새, 현미경 관찰 및 내생포자 형성 여부 등의 관찰한 결과를 Bergey's Manual에 따라 비교하였다(data not shown).

최종적으로 선발된 균주는 배지상의 colony 형태, 냄새, 현미경 관찰 및 내생포자 형성 여부 등을 관찰하여 Bergey's Manual에 따라 비교하였다(data not shown). Table 1에 나타낸 바와 같이 API Kit에 의한 당 발효 결과에서 분리한 *Lacto-*

Table 1. Sugar-fermentation of the isolated *Lactobacillus* sp. on API 50 CHL kit

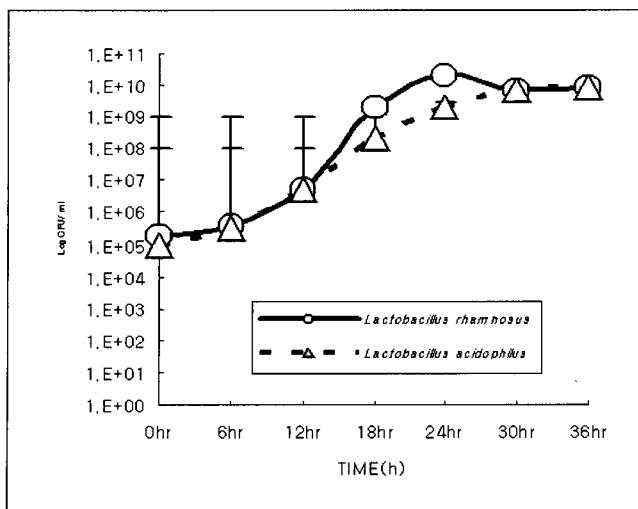
Sugar substrate	Result	Sugar substrate	Result
Control	-	SALicin	+
GLYcerol	-	CELLobiose	+
ERYthritol	-	MALTose	+
D ARABinose	-	LACtose	+
L ARABinose	-	MELibiose	-
RIBose	+	Sucrose	+
D XYlose	-	TREhalose	+
L XYlose	-	INULin	+
ADOnitol	-	MeLeZitose	-
Beta Methyl-D-Xylose	-	RAFFinose	+
GALactose	+	Starch	-
GLUCose	+	GLYCogen	-
FRUctose	+	XyLiTol	-
MaNNosE	+	GENtiobiose	+
SorBosE	+	D TURanose	+
RHAmnose	+	D LYXose	+
DULcitol	+	D TAGatose	+
INOsitol	+	D FUCose	-
MANnitol	+	L FUCose	-
SORbitol	+	D ArabitoL	-
Alpha-Methyl-D-Mannoside	-	L Arabitol	-
Alpha-Methyl-D-Glucoside	+	GlucoNaTe	+
N-Acetyl-Glucosamine	+	2-keto-Gluconate	-
AMYgdalin	+	5-keto-Gluconate	-
ARButin	+		
Esculin	+		

+: positive, -: negative.

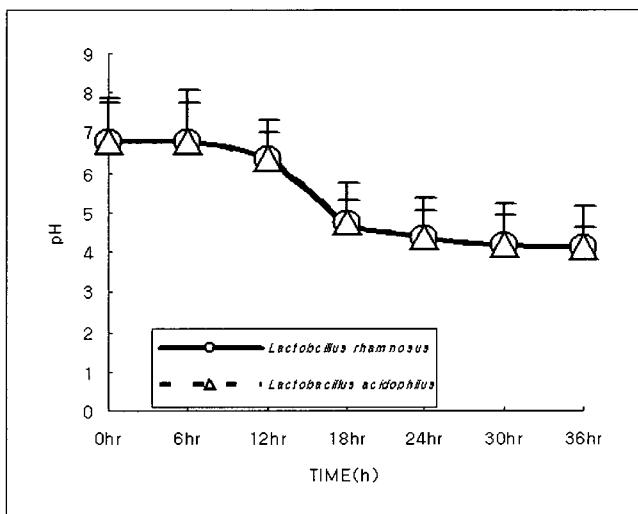
bacillus sp.는 *Lactobacillus rhamnosus*와 99.5%의 상동성을 나타냈으나 앞으로 더 정확한 균의 동정을 위해 지방산 분석 및 16s rRNA의 분석이 요구된다. 이후 실험에서는 분리한 균주를 *Lactobacillus rhamnosus*로 표기하였다.

성장곡선

*Lactobacillus rhamnosus*의 최적의 성장조건을 구하기 위해서 MRS 배지에 72시간 배양하여 균수를 측정하였다. Fig. 1(A)와 같이 대조구로 이용한 *Lactobacillus acidophilus*는 24시간 배양시 2.0×10^9 CFU/mL로 나타났으나, *Lactobacillus rhamnosus*는 24시간 배양시 1.8×10^{10} CFU/mL로 대조구보다 10배 가량 균수가 증가하였다. 최대 정상기에 달하는데 *Lactobacillus acidophilus*는 30시간 걸린데 비하여 *Lactobacillus rhamnosus*는 24시간으로 성장이 빨랐다. 또 배양시간에 따



(A)



(B)

Fig. 1. Growth curve of *Lactobacillus rhamnosus* cultured in MRS Broth(A) and its pH profile (B). Values are mean \pm SD (bar).

른 pH의 변화는 Fig. 1(B)에 나타났다. 접종 6시간 후부터 시간의 경과에 따라 pH가 감소하여 24시간이 되었을 때 약 pH 4.6을 나타내었고 그 후 일정하게 유지되었다. *Lactobacillus rhamnosus*와 *Lactobacillus acidophilus*간의 pH 변화의 차이는 거의 없었다.

효소 활성 측정

프로바이오틱 생균들이 분비하는 효소는 사람이나 동물이 영양분을 섭취하였을 때 전분, 단백질 및 지방과 같은 영양소의 이용을 개선시킬 수 있으며, 이로 인해 음식물 또는 사료의 에너지 가치를 올릴 수 있다(Walsh *et al.*, 1993). 효소 활성을 측정하기 위하여 균체를 homogenization하여 파쇄하고 효소 활성을 측정하였다. Table 2에 나타냈듯이 *Lactobacillus rhamnosus*의 비활성은 amylase와 xylanase 활성이 0.673과 0.288 μ mole/min/mg으로 가장 높았으며 cellulase와 phytase 비활성은 0.117과 0.269 μ mole/min/mg를 나타냈다. 이중 phytase는 단백질과 무기물질의 이용성을 감소시키며 배설되어 환경오염의 주요 원인으로 지적되고 있는 phytic acid를 분해하여 myo-inositol과 무기태 인을 형성하게 하는 효소로 식물, 동물의 장관 및 미생물에 존재하는 것으로 알려져 있다. Phytase 생산 미생물은 *Aspergillus* sp. 및 *Bacillus* sp.가 대표적이며 유산균의 phytase 활성은 곰팡이와 *Bacillus* sp.가 생산하는 활성에 비해 낮은 것으로 알려졌다(Shiral *et al.*).

*Lactobacillus rhamnosus*는 당 분해와 관련된 효소 이외에 유산균으로서는 높은 phytase 활성을 나타내 활용 가치가 있는 것으로 판단되었다. 그러나, 각 효소의 기질로 첨가한 screening 배지상에서 형성되는 투명환의 크기는 다른 *Bacillus* sp. 균주들과 비교할 때 작게 나타나(data not shown), 이를 효소들은 균체내 분비효소인 것으로 고찰되며 최적 활성을 나타내는 미생물의 배양조건 및 효소 측정 조건은 더 검토할 필요가 있다고 생각한다.

내산성

Kefir에서 분리한 *Lactobacillus rhamnosus*의 내산성을 대조구인 *Lactobacillus acidophilus*와 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 분리한 *Lactobacillus rhamnosus*는 pH 5에서는 2×10^9 CFU/mL, pH 2에서는 7×10^8 CFU/mL로 약 35% 감소하였고, *Lactobacillus acidophilus*는 pH 5에서는 1×10^9 CFU/mL이던 것이 pH 2에서는 1×10^6 CFU/mL로 99%감소하였다. 생균 제로서 기능을 발휘하기 위해서는 pH 3이하의 낮은 pH 조건의 위장관을 통과하여 소장내로 도달하여 생존하여야 한다(Booth, 1985). 높은 산성에서도 견딜 수 있는 *Lactobacillus plantarum*의 경우 세포내 pH는 다른 내산성 균주보다 낮은

Table 2. Enzyme activities of homogenate fraction from *Lactobacillus rhamnosus*

	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>				Protein amount (ug/ml)
	Amylase	Cellulase	Xylanase	Phytase	
Specific activity (μ mole/min/mg)	0.673 \pm 0.13	0.269 \pm 0.22	0.288 \pm 0.17	0.117 \pm 0.5	52 \pm 0.22
Total activity (μ mole/ml)	0.35 \pm 0.21	0.14 \pm 0.12	0.15 \pm 0.23	0.061 \pm 0.15	

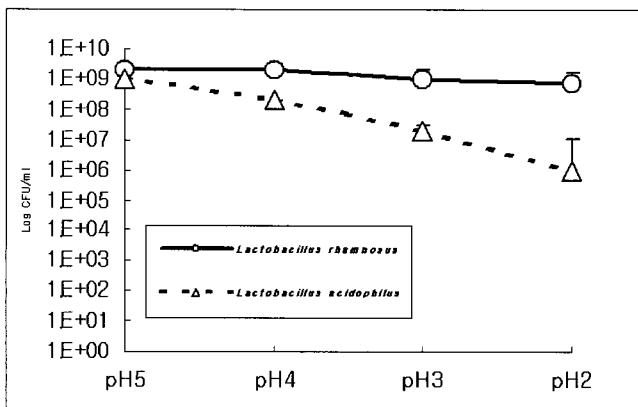


Fig. 2. Acid resistance of *Lactobacillus rhamnosus* at various pHs. Values are mean \pm SD (bar).

4.6~4.8로 알려져 있고, 또 동물의 장에서 분리한 생균제인 *Enterococcus* sp.는 pH 3의 인공위액 조건에서 2시간 후의 생존률이 90~100%로 알려져 있다(Klaver 와 van der Meer, 1993). 본 연구에서 분리한 *Lactobacillus rhamnosus*는 pH 2에서도 강한 생존율을 나타냈다는 점과, 분비위액의 pH가 1~2이지만 침과 음식의 섭취에 의해 희석되므로 위에서의 이 균의 생존율은 나쁘지 않을 것으로 추정된다.

내담즙산성

분리된 균주를 담즙산에 대한 내성을 실험하기 위하여 0.1~1.0%의 담즙산의 농도에서의 생존율을 조사한 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 *Lactobacillus acidophilus*(4.0×10^8 CFU/mL)는 bile salt 0.1%에서 2.0×10^8 CFU/mL, 0.5%에서 3.0×10^6 CFU/mL로 약 1.0% 및 0.15% 만이 생존하였으나, *Lactobacillus rhamnosus*(2.0×10^8 CFU/mL)는 bile salt 0.1%에서 4.0×10^8 CFU/mL, 0.5%에서 2.0×10^7 CFU/mL로 약 40% 및 2%가 생존하였다. 담즙산은 십이지장에서 분비되는 물질로서 세균의 성장을 억제하는 기능을 지니고 있으며, 특히 장

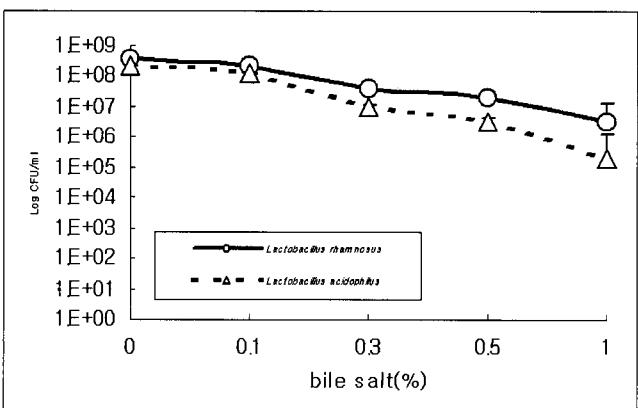


Fig. 3. Bile salt-tolerance of various isolates of *Lactobacillus rhamnosus* at different concentration of bile salts. Values are mean \pm SD (bar).

내 세균이 아닌 경우에는 담즙산이 함유된 배지에서는 자랄 수 없다고 알려져 있는데(Gilliand et al., 1997), *Lactobacillus rhamnosus*는 대조구인 *Lactobacillus acidophilus* 보다 내담즙산성이 우수한 것으로 나타났다.

열 안정성

분리 유산균의 열 안정성은 MRS 배지에 투여한 다음 실온 30°C, 40°C, 50°C, 60°C에서 10분간 정치 후 생존하는 수를 조사하였다(Fig. 4). 대조구인 *Lactobacillus acidophilus*는 30°C에서 1.0×10^9 CFU/mL, 60°C에서는 8.0×10^5 CFU/mL 정도만이 생존하였으나, 새로 분리한 *Lactobacillus rhamnosus*는 30°C에서 2.0×10^9 CFU/mL인 것이 60°C에서는 2.0×10^7 CFU/mL 정도가 잔존하여 *Lactobacillus acidophilus*보다는 60°C에서도 100배 이상 생존율이 높은 것으로 나타났다.

대장균 생육 억제 효과

항균 활성을 보기 위하여 유산균을 대장균(*E. coli*)에 함께 첨가하여 배양하였고, 대장균이 사멸되는 시간과 균수를 측정하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 *Lactobacillus rhamnosus*는 접종후 9시간까지 급격히 대장균이 감소하기 시작하여 18시간 후에는 완전히 사멸되었으나, 대조구인 *Lactobacillus acidophilus*는 27시간 후 대장균이 완전히 사멸하였다. 따라서 *Lactobacillus rhamnosus*는 대장균의 생육 억제 효과가 우수한 것으로 생각된다. 유산균에 의한 유해 세균의 억제는 유산균이 생산하는 bacteriocin에 의해서 이루어지는 것으로 알려져 있다(Huttunen et al., 1995). 또, Havenaar 등(1992)은 유산균에 의한 pH 강화, 유해균과 경쟁적인 영양 성분의 소비, 산화 환원 전위의 감소, 호기적 상태에서 과산화수소의 생성, 항균 활성 물질의 분비 등을 억제 작용으로 설명하고 있다. 본 실험에서 분리한 유산균에 의한 대장균의 생육 억제는 이러한 억제 요소들의 작용에 기인하는 것으로 고찰되

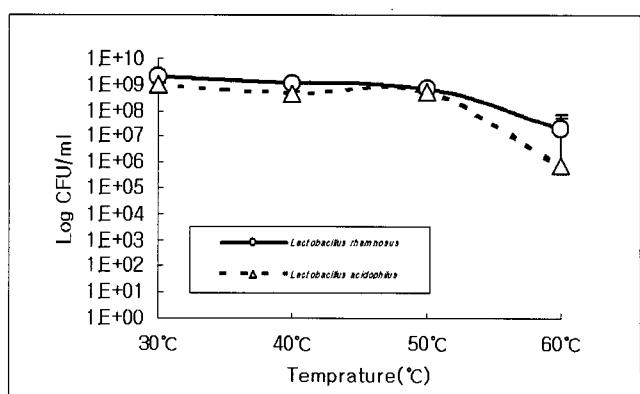


Fig. 4. Heat stabilities of *Lactobacillus rhamnosus*. Values are mean \pm SD (bar).

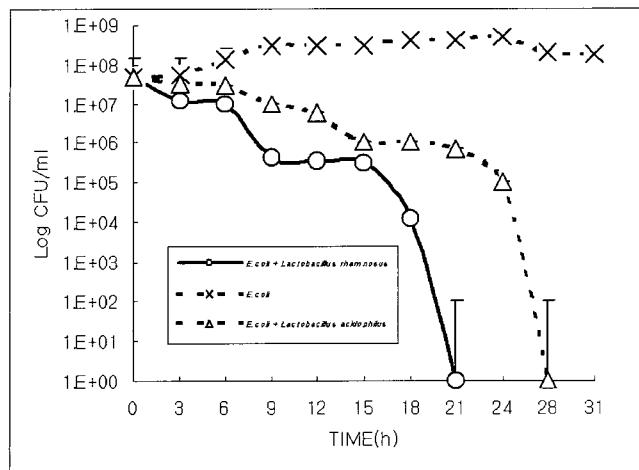


Fig. 5. Growth inhibition of *E. coli* (KCTC 1041) by *Lactobacillus rhamnosus* in MRS broth. Values are mean±SD (bar).

나 규명을 위해서는 더욱 연구가 필요하다.

항생제 내성

MIC test 방법에 따라 13개 사료용 항생제를 각각의 농도에서 배양 후, *Lactobacillus rhamnosus*의 생장 여부를 관찰한 결과를 Table 3에 나타냈다. *Lactobacillus rhamnosus*는 100ppm CTC, 50ppm OTC에 의해 성장이 억제되었고, 150 ppm Lincomycin, 200ppm Tylosin에 의해서도 성장이 억제되었다. 그러나, 이들 항생제를 제외한 기타의 9가지의 항생제에 대하여는 법적 첨가 허용 수준일 경우 성장이 억제되지 않아 항생제에 강한 내성을 갖는 것으로 고찰되었다. 항생제는 내성 자체로서 치료의 어려움뿐만 아니라 질병 치료에 대한 항생제의 선택과 적절한 항생제 사용에 대한 어려움을 야기하게 되어 문제가 될 수 있다. 따라서 항생제 내성의 확산

Table 3. Minimum inhibition concentrations of various antibiotics for *Lactobacillus rhamnosus*

Antibiotics	Reaction of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> against various antibiotics				
CTC	+++ (0 ppm)	++ (50ppm)	- (100ppm)	- (200ppm)	- (300ppm)
Bambermycin	+++ (0 ppm)	+++ (1ppm)	+++ (3ppm)	+++ (5ppm)	+++ (7ppm)
Maduramycin	+++ (0 ppm)	+++ (1ppm)	+++ (3ppm)	+++ (5ppm)	+++ (7ppm)
Diclazuril	+++ (0 ppm)	+++ (1ppm)	+++ (3ppm)	+++ (5ppm)	+++ (7ppm)
Avilamycin	+++ (0 ppm)	+++ (5ppm)	+++ (10ppm)	+++ (20ppm)	+++ (30ppm)
Lincomycin	+++ (0 ppm)	+++ (50ppm)	++ (80ppm)	+ (110ppm)	- (150ppm)
Tylosin	+++ (0 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (80 ppm)	+++ (100 ppm)	+++ (200 ppm)
OTC	+++ (0 ppm)	- (50ppm)	- (100ppm)	- (200ppm)	- (300ppm)
Neomycin	+++ (0 ppm)	+++ (10 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (110 ppm)	+++ (200 ppm)
Clopidol	+++ (0 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (100 ppm)	+++ (200 ppm)	+++ (500 ppm)
Supertia	+++ (0 ppm)	++ (20ppm)	++ (50ppm)	++ (65ppm)	++ (100ppm)
Sulfathiazole	+++ (0 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (100 ppm)	+++ (200 ppm)	+++ (300 ppm)
Collistin	+++ (0 ppm)	+++ (2 ppm)	+++ (5 ppm)	+++ (10 ppm)	+++ (20 ppm)

-: none, +: 30% or less microorganism, ++: 30~60% microorganism, +++: microorganism above 60%.

을 막기 위해 이들에 대한 철저한 관리와 항생제를 대체할 수 있는 생균제의 연구가 이어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 Kefir를 0.02% NaN_3 를 포함하는 MRS agar에 도말하여 1차적으로 *Lactobacillus* sp.를 선별하였고, 그 중 가장 우수한 균을 최종 분리하였다. 분리된 유산균은 API kit를 이용한 당 발효성 및 생화학적 시험을 토대로 *Lactobacillus rhamnosus*에 99.5 %의 상동성을 가진 유산균종으로 동정되었다. *Lactobacillus rhamnosus*는 amylase와 xylanase 비활성이 0.673과 0.288 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 비교적 높은 활성을 보였다. pH 2에서 65% 이상의 강한 생존률을 나타냈고 1.0% 담즙산에서도 72%가 생존하는 내성을 나타냈다. 60°C에서도 *Lactobacillus rhamnosus*는 강한 열 안정성을 나타내 대조구인 *Lactobacillus acidophilus*보다 100배 이상의 생존률을 보였다. 또한 *Lactobacillus rhamnosus*는 대장균에 첨가하여 혼합배양시 18시간 이내에 대장균을 100% 사멸시켜 높은 항균 활성을 나타냈다. *Lactobacillus rhamnosus*는 100ppm CTC, 50ppm OTC, 150ppm Lincomycin, 200ppm Tylosin에서는 생장이 억제되나 기타의 9가지의 항생제에 대하여는 강한 내성을 갖는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로부터 새로 분리한 *Lactobacillus rhamnosus*는 소화에 관련한 효소 활성이 높고 내산성 및 내담즙산성, 열 안정성이 우수하며 높은 항균 활성을 함유하여 식품용 probiotics로 충분한 활용 가치가 있는 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 한경대학교 고품질친환경농축산물생산기술연구센터(GRRC)의 2004년도 연구비 지원으로 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. APHA (1985) Standard methods for the examination of dairy products, 15th ed, American Public Health Association, Washington. D. C.
2. Booth, I. R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359-378.
3. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
4. Fuller, R. and Gibson, G. R. (1977) Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroenterol.* **22**, 28-31.
5. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. (1997) Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 15-18.
6. Gilliland, S. E. (1979) Benefical interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J. Food Prot.* **42**, 164-167.
7. Haenlein, G. F. W. (1995) Status and prospects of the dairy goat industry in the United States. *J. Anim. Sci.* **74**, 1173-1181.
8. Havenaar, R., Brink, B. T., and Veld, J. H. (1992) Selection of strains for probiotic use. In "Probiotics" Fuller, R.(ed), Chapman & Hall, New York, pp. 209-224.
9. Hood, S. K. and Zottola, E. A. (1988) Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* **53**, 1541-1516.
10. Itoh, K. (1990) Lactic acid bacteria and intestinal microflora, The 11th Internation Symposium on Lactic Acid Bacteria and Human Health, Seoul, Korea, pp. 23-25.
11. Khasin, A., Alchanati, I., and Shoham, Y. (1993) Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1725-1730.
12. Kimura, K., McCartney, A. L., McConell, M. A., and Tannock, G. W. (1977) Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological response of their human hosts to the predominant strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 3394-3398.
13. Klaver, F. A. M. and van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity. *Appl. Environ. Microbial.* **59**, 1120-1124.
14. Koroleva, N. S. (1988). Technology of kefir and kumys. *Internation Dairy Federation Bulletin.* **227**, 96-99.
15. Kobayashi, Y., Tohyaman, K., and Terashima, T. (1974) Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*. II. Tolererance of the multiple antibiotic resistance-strain, L. casei PSR3002, to artificial digestive fluids. *Japan. J. Microbiol.* **29**, 691-697.

16. Kroger, M. and Kurmann, J. A. (1989) Fermented milks - past. present and future. *Food Technol.* **43**, 92-99.
17. Loffler, F. E., Sun, Q., Li, J., and Tiedje, J. (2000) 16S rRNA gene-base detection of tetrachloroethene-dechlorinating desulfuromonase and dehalococcoides species. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1369-1374.
18. Otle', S. and Cagindi, O. (2003) Kefir; A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan J. of Nutrition* **2(2)**, 54-59.
19. Park, S. Y., Ko, Y. T., Jeong, H. K., Yang, J. O., Chung, H. S., Kim, Y. B., and Ji, G. E. (1996) Effect of various lactic acid bacteria on the serum cholesterol levels in rats and resistance to acid bile and antibiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 304-310.
20. Shiomi, M. K., Sakai, M., Murofushi, M., and Aibara, K. (1982) Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **35(2)**, 75-80.
21. Shimizu, M. (1992) Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis*(natto) N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1266.
22. Shiral, K., Revah-Molseev, S., Garcia-Garlbay, M., and Marshall, V. M. (1994) Ability of some strains of lactic acid bacteria to degrade phytic acid. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 366-369.
23. Smith, H. W. (1975) Persistence of tetracycline resistance in pig. *Nature* **258**, 628-629.
24. Tannock, G. W., Crichton, C., Welling, G. W., Koopman, J. P., and Midtvedt, T. (1988) Reconstitution of the gastrointestinal microflora of lactobacillus-free mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2971-2975.
25. Tannock, G. W. (1997) Probiotic properties of lactic acid bacteri: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in Biotechnology* **15**, 270-274.
26. Toba, T. (1987) Symposium Reports on Advance of Dairy Science and Technology in Japan. *Japanese Journal of Dairy and Food Science* **36(6)**, A235-A243.
27. Van Houweling, C. D. (1971) FDA's views regarding antibiotics used in feed. In: Proceedings of the university of Maryland nutrition conference, Washington, DC, MD, USA.
28. Walsh, G. A., Power, R. F., and Headon, D. R. (1993) Enzymes in the animal-feed industry. *Tibtech.* **11**, 424-429.

(2005. 8. 7. 접수 ; 2005. 9. 16. 채택)