한 국 축 산 식 품 학 회 지
Korean J. Food Sci. Ani. Resour.
Vol. 28, No. 1, pp. 82~90(2008)

산양유 Kefir 발효물에서 분리한 유산균의 특성

임영순 · 김수영[1] · 이시경*
건국대학교 응용생물화학과, [1]건국대학교 생명과학과

Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kefir Made of Goat Milk

Young-Soon Lim, Soo-Young Kim[1], and Si-Kyung Lee*
Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
[1]Department of Biological Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

ABSTRACT

Two strains of pure lactic acid bacteria capable of forming both acid and slime were isolated from the kefir made of goat milk. The isolated strains observed by morphological and physiological properties, and their 16S rDNA partial sequence were identified as *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (LFG-1) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LFG-2) with over 99% homology. The optimum temperature of *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* LFG-1 for growth was 40-45°C, and its generation time was 40.6 minutes. The final pH of cultured broth by *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* LFG-1 and the commercial strain *Str. thermophilus* Body-1 for 24 hr at 37°C were 4.30 and 4.55, respectively. The coagulative activity of *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* LFG-1 was almost as strong as that of commercial strain *Str. thermophilus* Body-1. However, the LFG-2 strain showed lower coagulative activity than *Str. thermophilus* Body-1. The survival rate of lactic acid bacteria were between 22-29% in 0.3% bile extract. At pH 1.0 all of the bacteria were killed, and most of lactic acid bacteria died against pH 3.0. However, all lactic acid bacteria survived well at pH 4.5.

Key words : kefir, goat milk, *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*, growth, bile resistance

서 론

유산균은 발효유의 스타터로 이용되는 것 외에 항암성을 나타내거나 천연 항생물질을 생산하는 등의 유용한 특성들이 많이 보고되고 있다(Rasic and Kurmann, 1978). 유산균 발효는 영양소의 양과 이용율, 소화율, 동화율을 증가시킴으로써 식품의 영양가를 개선시킨다. 또한 발효가 진행되는 동안 유산균은 유기산 외에 세포벽에 부착되지 않는 점성의 다당류를 생성한다. Sandford(1979)는 다당류를 세균의 세포 표면에 존재하는 위치에 따라 3가지 그룹으로 분류했다. 즉, 세포막의 일부로서 존재하는 intracellular polysaccharide, 세포벽의 구조적 성분인 cell-wall polysaccharide, 세포벽 외부에 존재하는 extracellular polysaccharide 등이다. 이와 유사한 분류로서 Sutherland (1972)는 세포외 다당류를 세균의 세포와의 구조적인 관계에 따라 slime, capsular, microcapsular의 3가지 형태로 분류하고 이들을 총칭해서 세포외 다당체(exopolysaccharide: EPS)라 하였다. 이러한 다당류에 대해서 Hur 등(1995)은 세포내 다당류는 에너지 저장물질로서 poly-β-hydroxybutylate나 glycogen 등이 있으며, 세포벽 다당류는 세포벽의 구성성분인 gram(-)균의 lipopolysaccharide, 효모의 β-glucan과 같은 성분이 있으며, EPS는 세포벽 주위에 협막을 형성하거나 세포벽 외부에 점액형태로서 존재하는 미생물의 1차 또는 2차 대사산물이라고 하였다(Wiseman, 1983; Beveridge *et al.*, 1991).

최근 들어 유산균이 생성하는 EPS가 식용 다당류로서 제품의 안정제, 유화제, gel화 및 수분결합물질 등 다양한 용도로서의 사용이 가능하다는 장점 때문에 EPS를 생성하는 유산균에 대한 관심이 점차 높아지고 있다(Dick, *et al.*, 1995). 그러나 그동안 EPS 생산에 관한 연구는 주로 *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Acetobacter* sp. 그리고 *Escherichia coli*

*Corresponding author : Si-Kyung Lee, Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-450-3759, Fax: 82-2-456-7183, E-mail: lesikyung@konkuk.ac.kr

등에 대한 연구가 실시되었으며, EPS 생산에 유산균을 이용하는 연구는 미흡하였다(Berg, *et al.*, 1993).

한편, kefir는 코카사스지방 원산의 알콜 발효유로 우유와 산양유 및 면양유 등이 주원료로 사용되며, kefir grain이라 불리는 여러 종류의 유산균과 효모균체가 응집한 고형체를 스타터균으로 사용한다. Kefir grain은 여러 종류의 미생물들이 점성을 가진 다당류에 의하여 응집되어 있으며, 대표적인 다당 생성균으로 *Lactobacillus kefiranofaciens*가 분리 동정되어 있다. 이 균주는 점질 다당으로 glucose 2분자와 galactose 3분자가 반복되어 구성된 kefiran을 생산한다(Jeong, 2004). 본 연구는 산양유를 이용한 고점성 발효유 제조에 적용시킬 수 있는 산 생성과 EPS 생성력이 높은 유산균을 선발할 목적으로 산양유 kefir 제품으로부터 산 생성과 slime생성력이 우수한 균주를 분리 동정하였으며, 이들의 생육 특성과 산 및 담즙산 내성을 조사하여 고점성 산양유 요구르트 생산을 위한 기초 자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

유산균의 분리 및 선발

국산 산양유 kefir 분말제품(DMJ Biotech. Co., Korea)으로부터 유산균을 분리하였으며, 멸균수에 용해시킨 뒤 MRS broth에서 30°C로 48시간 배양하고, 배양액을 10배 희석법으로 희석한 후 $CaCO_3$을 첨가한 MRS agar에 0.1 mL씩 평판도말하여 37°C에서 48시간 배양하고 투명환이 생성된 집락을 잠정적 젖산균으로 분리하였다. 분리된 균주는 동일조건의 MRS agar에 백금이로 획선 접종한 후 37°C에서 48시간 동안 호기 배양하여 투명환 생성이 우수한 균락을 임의 선택하고, 생리적, 생화학적 실험 및 현미경 관찰을 통하여 특징적인 균주를 최종 선발하여 사용하였다. 또한 비교를 위하여 상업용 균주로는 *Str. thermophilus* Body-1 및 *Str. thermophilus* TH3(Chr. Hansen, Denmark)를 사용하였다.

16S rDNA 염기서열 분석

DNA분리는 배양된 균체에서 Wizard Genomic DNA Prep. kit(Promega, USA)를 사용하여 chromosomal DNA를 분리하였으며, 16S rDNA를 증폭시키기 위하여 forward primer(27 mf) : (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 reverse primer(1492r) : (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR 조건은 0.5 μM primers, 200 μM deoxynucleoside triphosphate, 10 × PCR buffer 10 μL와 2 unit *Taq* DNA 중합효소(Promega, USA)를 첨가하여 최종 부피를 100 μL로 하여 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초로 30 cycle을 반복하였으며, 72°C에서 5분간 반응 후 종료하였다. PCR 반응산물을 2% agarose gel로 전기영동을 실시하여 확인하였으며, 유전자 배열결정 quality를 좋게 하기 위하여 GeneAll^R Gel SV kit(GeneAll Biotechnology, Korea)를 사용하여 정제한 후 sequencing에 사용하였다. DNA의 sequencing은 ABI 3730 자동 염기서열 분석기를 이용하였으며, Lane 등(1985)과 Hutter 등(2003)의 방법에 따라 수행하였다. 분석결과는 NCBI blast(www.ncbi.nih.gov/blast/)의 database를 이용하여 조사하였다.

유산균의 Scanning Electron Microscopy(SEM) 관찰

유산균의 형태는 Williams와 Davies(1967)의 방법에 의하여 관찰하였으며, 순수 분리균을 MRS agar배지에서 37°C로 72시간 동안 배양하여 집락이 형성된 부분을 5×5 mm 크기로 절단하여 시료로 사용하였다. 시료 절편을 0.05 M sodium cacodylate buffer(pH 7.2)를 이용하여 제조한 8% paraformaldehyde와 2.5% glutaraldehyde용액에 담근 후 4°C에서 2시간 동안 고정시켰다. 0.05 M sodium cacodylate buffer(pH 7.2)로 2분씩 3회 세척하여 1% osmium tetroxide 용액으로 4°C에서 2시간 동안 처리하여 고정한 후 다시 3차 증류수로 실온에서 2회 세척하였다. 고정된 시료는 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 에탄올에 각 10분씩 그리고 100% 에탄올에서는 3회 각 10분씩 탈수하였다. 탈수 후 실온에서 100% propylene oxide로 15분간 2회 transition하여 metal stubs에 mounting하고, sputter coater(Agar Scientific Ltd. SC502, USA)를 이용하여 금으로 도포한 다음 Scanning Electron Microscope(Philips XL30E, USA)로 관찰하였다.

유산균의 증식

분리한 유산균의 증식은 생균수와 pH의 변화로 측정하였다. MRS broth에 유산균을 접종한 후 30, 35, 37, 40, 45°C에서 24시간 동안 각각 배양하면서 3시간 간격으로 시료를 취하고, Spectrophotometer(Shimadzu UV-1601, Japan)로 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 또한 시료를 십진 희석법으로 희석하여 평판배양법으로 BCP한천배지에 0.1 mL씩 분주하고 37°C에서 72시간 동안 배양하여 생균수를 계수한 후 흡광도와 비교하여 증식정도를 측정하였다. pH의 변화는 10% 환원탈지유에 유산균을 접종한 후 37°C에서 3시간 간격으로 24시간 동안의 변화를 pH meter(Mettler model 345, England)를 이용하여 측정하였다.

유산균의 단백질 응고성

유단백질의 응고성은 분리된 특정균주를 MRS broth에서 37°C로 24시간 동안 배양한 다음 10% 환원 탈지유에 2%씩 접종하였다. 이것을 40°C에서 12시간 동안 배양하여 커드의 형성정도를 관찰하고 발효유 제조용 starter로서

의 사용 가능성을 판단하였다.

유산균의 단백질 분해력 측정

분리균의 단백분해력 측정은 10% 환원탈지유를 단백분해용 배지로 사용하였으며, 유리되는 tyrosine함량으로 나타내었다. 살균된 배지에 계대배양된 균주 1%를 접종한 후 40°C에서 24시간 동안 배양하면서 일정시간별로 시료를 취하였으며, Hull(1947)의 방법을 다음과 같이 수정하여 실험하였다. 시료를 whatman(No. 2) 여과지로 여과한 후 여과액 5 mL에 0.44 M trichlroacetic acid 5 mL를 가해 침전시켰다. 30분간 방치 후 whatman(No. 42) 여과지로 여과하여 여과액 1 mL와 0.44 M Na_2CO_3 2.5 mL를 혼합한 후 1 N folin시약 200 μL를 가하여 5분 동안 잘 흔들어 청색 발색시켰다. 발색시킨 시료를 Spectrophotometer (Shimadzu UV-1601, Japan)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 측정값을 준비해 둔 tyrosine standard의 값으로 환산하여 유리된 tyrosine양을 계산하였다.

내담즙성 시험

내담즙성은 Park 등(1996)의 방법에 준하여 시험하였다. MRS액체배지에 0.3% bile extract을 첨가하고, 각각 분리된 균주들을 2%씩 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였으며, 배양종료 후 BCP한천배지에서 생균수를 측정하였다.

내산성 시험

Clark 등(1996)의 방법을 응용하여 1 N HCl을 증류수에 희석하여 MRS 중성 broth(pH 6.4)와 MRS 산성 broth(pH 1, 3, 4.5)를 준비하고, 37°C MRS broth에서 24시간 동안 배양된 균주를 각각 10^7 cfu/mL 수준으로 접종하여 37°C에서 3시간 동안 배양하고, BCP한천배지로 생균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

산양유 kefir 발효물에서 분리한 유산균의 분리 및 16S rDNA 염기서열 분석

산양유 kefir 분말제품을 MRS broth를 이용하여 37°C에서 48시간 배양하고, $CaCO_3$가 첨가된 MRS Agar배지에서 투명환을 형성하는 집락을 산생성력을 가진 유산균으로 판단하여 1차로 50 집락을 임의 선발하였다. 선발한 colony들을 다시 동일배지를 이용하여 37°C에서 48시간 동안 배양하면서 투명환의 크기와 성장을 관찰하여 2차로 5 균주를 선발하였다. 선발균을 10% 환원 탈지유에 배양시킨 결과 대부분 37°C에서 10-22시간 동안에 단백질을 응고시켰으며, 그 중 1개 균주가 높은 점성을 가진 발효물을 생산하는 특징을 보여 최종 선발하였다(LFG-1). 이 선발균은 현미경 관찰을 통하여 구균으로 확인되었으며, 젖산과 점질생성력에서 유사한 경향을 보이며 형태가 다른 1개의 구균 균주(LFG-2)를 같이 선발하여 비교실험에 사용하였다. 선발한 분리균을 동정하기 위하여 생리적, 생화학적 실험을 하였으며 결과는 Table 1과 같다.

이들 균주는 모두 gram(+)구균이며, catalase test에서는 음성을 보였고 산소유무와 관계없이 잘 증식을 하였다. 리트머스 우유를 이용한 증식 시험에서 선발된 LFG-1 균주는 10°C에서는 생장하지 않는 반면에 45°C에서는 생장하였고, LFG-2 균주는 상대적으로 10°C에서는 생장을 보인 반면에 45°C에서는 생장하지 못하였으며, 두 균주 모두 spore는 형성하지 않았다.

분리균을 동정하기 위하여 GenBank에 등록된 data와 비교하여 16S rDNA 염기서열을 분석하였다. 분리균의 16S rDNA 1.5 Kb 단편의 염기서열은 forward와 reverse primer를 이용하여 증폭하였으며, GenBank의 blast search의 database를 이용하여 염기서열을 비교 결정하였다. LFG-1과 LFG-2 균주의 16S rDNA의 부분적 염기서열을 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*와 *Lc. lactis* subsp. *lactis*의 16S rDNA의 부분적 염기서열과 비교한 결과는 Fig. 1과 2와 같다. LFG-1 균주는 99%의 높은 상동성을 보이며 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*로 동정되었으며, LFG-2 균주도 99%의 높은 상동성으로 *Lc. lactis* subsp. *lactis*로 동정되었다.

이상에서 국산 산양유 kefir제품으로부터 분리한 세포외 다당체 생성 유산균(LFG-1)은 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*로 잠정 동정되었으며, 본 균주를 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* LFG-1로 명명하였다. 이러한 결과는 Simova 등(2003)이 kefir에 존재하는 중온성 유산균은 *Lc. lactis* subsp. *lactis*이 높은 수준으로 발견되었다고 하였으며, 또한 Joo(2003)는 6종의 kefir grains으로부터 우점균을 분리한 결과 *Lc. lactis* subsp. *lactis*라고 보고한 결과와 유사하였다.

분리균의 전자현미경 관찰

선발 분리된 유산균을 전자현미경으로 관찰한 결과 2균

Table 1. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from kefir made of goat milk

Characteristics	LFG*-1	LFG-2
Morphology	cocci	cocci
Gram stain	+	+
Catalase test	-	-
Aerobic growth	+	+
Anaerobic growth	+	°æ
Growth at 10°C	-	+
Growth at 45°C	+	-
Spore formation	-	-

*LFG : Lactic acid bacteria isolated from Fermented Goat milk

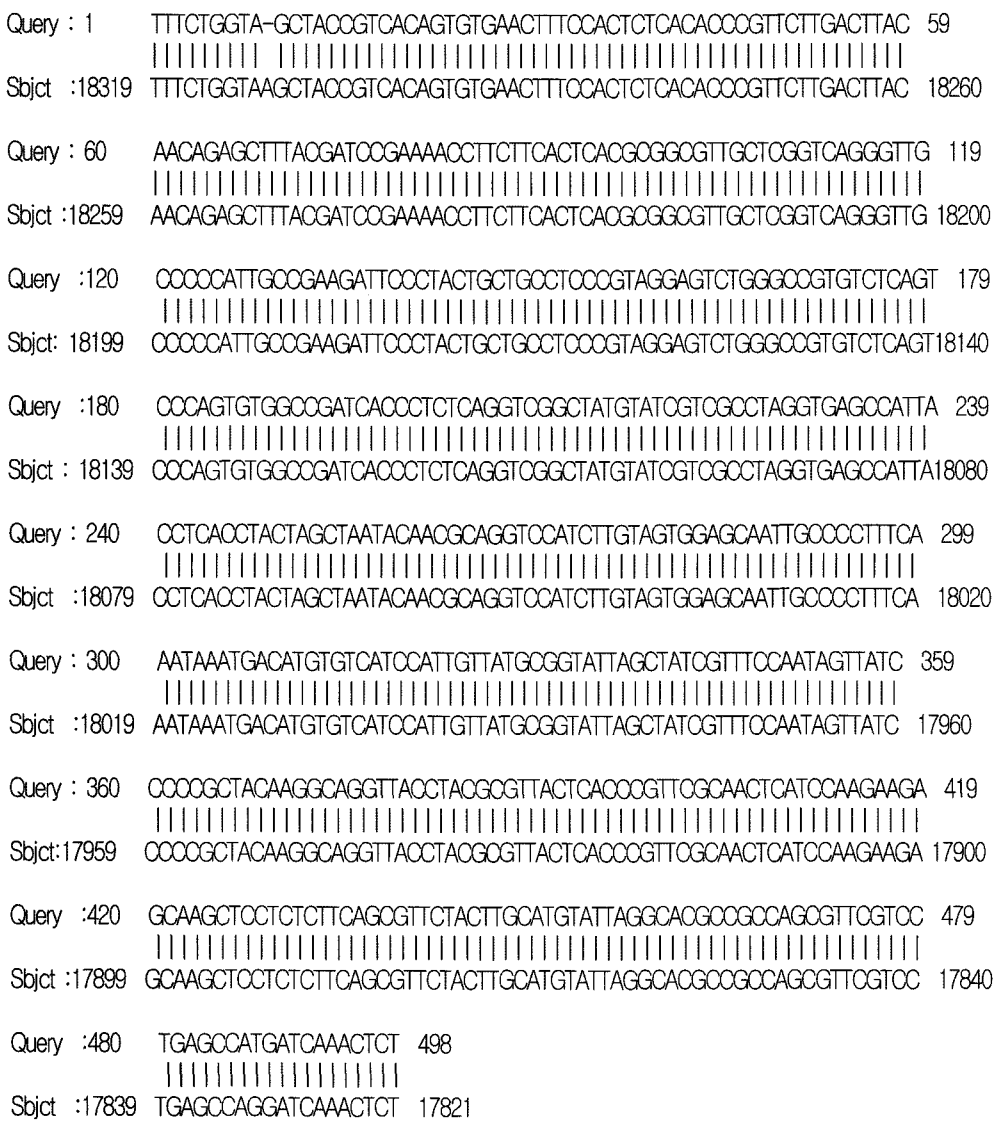

Fig. 1. A comparison of 16S rDNA partial sequence of an isolated LFG-1 with *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*. Query means LFG-1 isolate and Sbjct means *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*.

주 모두 구균으로서 세포의 표면상태는 점질물이 없이 매끄러운 형태를 보였으나, 주변으로 다량의 점질물질이 생성되어 있음을 확인할 수 있었으며, *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* LFG-1은 균체가 비교적 길게 연결된 연쇄상을 하고 있고(Fig. 3), *Lc. lactis* subsp. *lactis* LFG-2는 쌍구균 또는 비교적 짧은 연쇄상 구균 형태를 보였다(Fig. 4).

분리균의 최적 생장온도 및 pH변화

분리된 유산균의 최적 생장온도를 조사하기 위하여 MRS broth를 이용하여 각각 다른 온도에서 24시간 동안 배양하면서 흡광도를 측정하여 균의 생장을 조사한 결과는 Fig. 5 및 6과 같다.

Fig. 5에서와 같이 LFG-1 균주의 생장은 전체적으로 9-12시간까지 대수기를 보이며 35-48°C범위에서 2×10^9 cfu/mL수준으로 잘 증식하였고, 특히 40-48°C에서 성장이 우수하였다. 9시간까지의 세대시간은 40-48°C에서는 약 40.6분, 35-37°C에서는 약 58.4분이었으며 30°C에서는 약 90분으로 다른 온도범위에 비하여 생장이 크게 느렸다. 30-45°C의 범위에서는 배양 24시간 까지는 대수기 이후 정지기를 유지하였으나 48°C에서는 배양 18시간 이후 사멸기를 보였다.

LFG-2 균주의 생장은 Fig. 6에서와 같이 37-40°C에서 가장 우수하였으며 45°C에서는 생장률이 낮은 중온균의 특성을 보였다. Joo(2003)는 kefir에서 분리한 젖산균의 생육이 25-37°C에서 빠르게 진행되었으며, 3×10^9 cfu/mL 수준으로 보고하였고, Ham 등(2000)은 몽고산 쿠미스로부터 분리한 유산균과 효모를 이용한 쿠미스의 제조에서 28°C를 최적온도로 보고하여 본 실험의 LFG-2균주와 일부 유사한 경향을 보였지만 LFG-1균주와는 차이를 보였다. 이는 전통적으로 제조된 kefir grain 및 쿠미스에서 분리한

```
Query:1    TTTCTGGGTAGTTACCGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACC  60
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:499  TTTCTGGGTAGTTACCGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACC  440

Query:61   AACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTT  120
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:439  AACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTT  380

Query:121  CGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGT  180
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:379  CGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGT  320

Query:181  CCCAATGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTA  240
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:319  CCCAATGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTA  260

Query:241  CCTCACCAACTAGCTAATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCA  300
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct :259  CCTCACCAACTAGCTAATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCA  200

Query :301  AACTTAAAACTTGTGTTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTC  360
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  :199  AACTTAAAACTTGTGTTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTC  140

Query:361  CCCCGCTCAAAGGCAGATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTCGCTGCTCATCCAGTCGGT420
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct :139  CCCCGCTCAAAGGCAGATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTCGCTGCTCATCCAGTCGGT 80

Query:421  ACAAGTACCAACCTTCAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCC 480
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct :79   ACAAGTACCAACCTTCAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCC  20

Query : 481  TGAGCCATGATCAAACTCT  499
           ||||||||||||||||||
Sbjct  : 19  TGAGCCAGGATCAAACTCT  1
```

Fig. 2. A comparison of 16S rDNA partial sequence of an isolated LFG-2 with *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Query means LFG-2 isolate and Sbjct means *Lc. lactis* subsp. *lactis*.

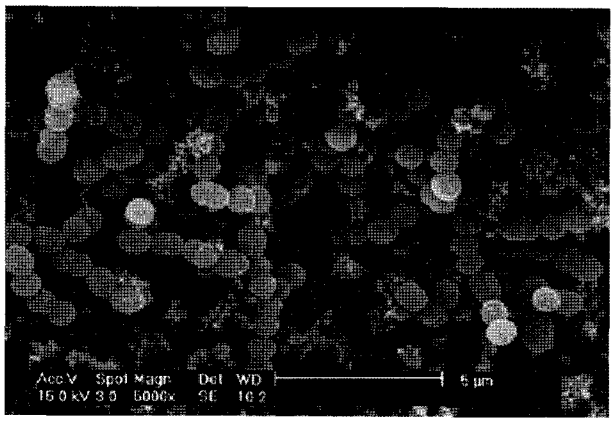

Fig. 3. Photograph of *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* LFG-1 grown on the MRS agar at 37°C for 48 hr (× 5,000).

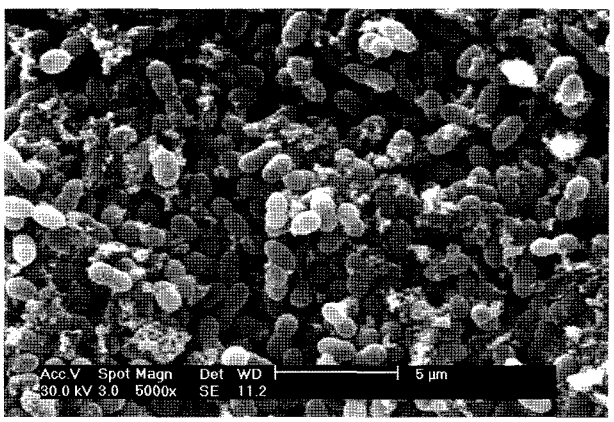

Fig. 4. Photograph of *Lc. lactis* subsp. *lactis* LFG-2 grown on the MRS agar at 37°C for 48 hr (× 5,000).

것과 달리 본 실험에서는 산업적으로 제조된 kefir에서 분리한 것으로, 사용된 원료 균주들의 배양조건에 따라 미생물 조성에 차이를 보인 것이라 생각한다.

분리된 유산균의 배양온도에 따른 pH의 변화는 LFG-1

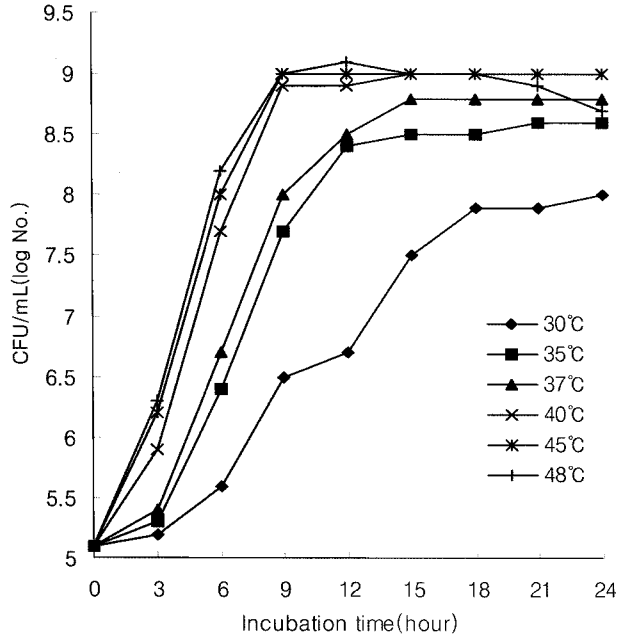

Fig. 5. Growth of *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* LFG-1 in MRS broth at different temperatures for 24 hr.

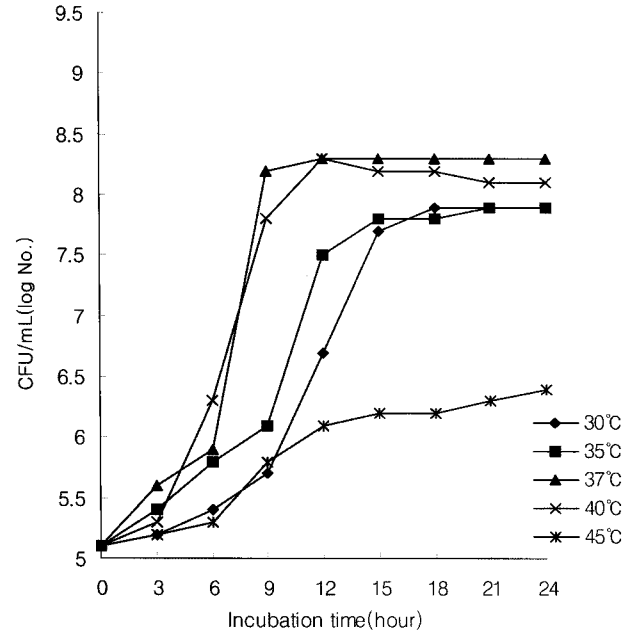

Fig. 6. Growth of *Lc. lactis* subsp. *lactis* LFG-2 in MRS broth at different temperatures for 24 hr.

균주의 경우 Fig. 7과 같이 생균수의 증가와 유사한 형태로 30°C를 제외하고는 9시간까지 pH 4.6범위로 급격한 저하를 보였으며, 배양 24시간 후 최종 pH는 40-45°C에서는 pH 4.3을 보였고, 48°C에서는 pH 4.2의 결과를 보였다. LFG-2 균주는 Fig. 8과 같이 37-40°C 온도 범위에서 배양 9시간에 pH 4.85로 가장 빠른 저하를 보였으나 배양 24시간 후에도 최종 pH가 4.75로 다소 높은 값을 보였다.

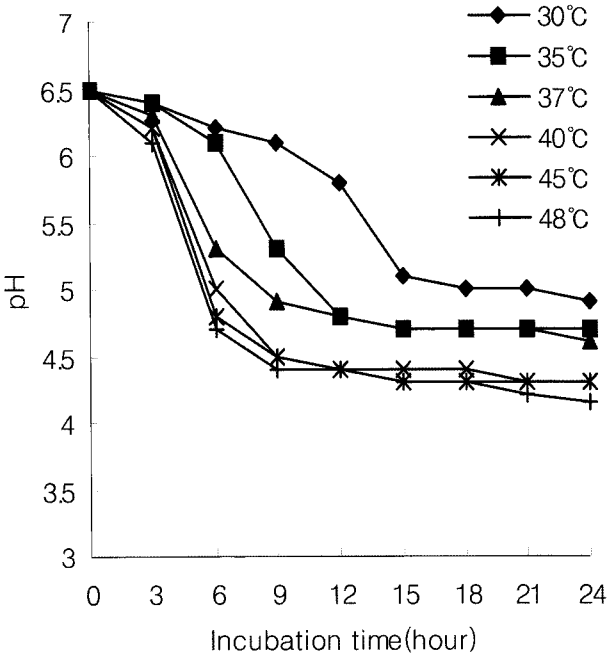

Fig. 7. Changes in pH of broth cultured at different temperature by *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* LFG-1 with time for 24 hr.

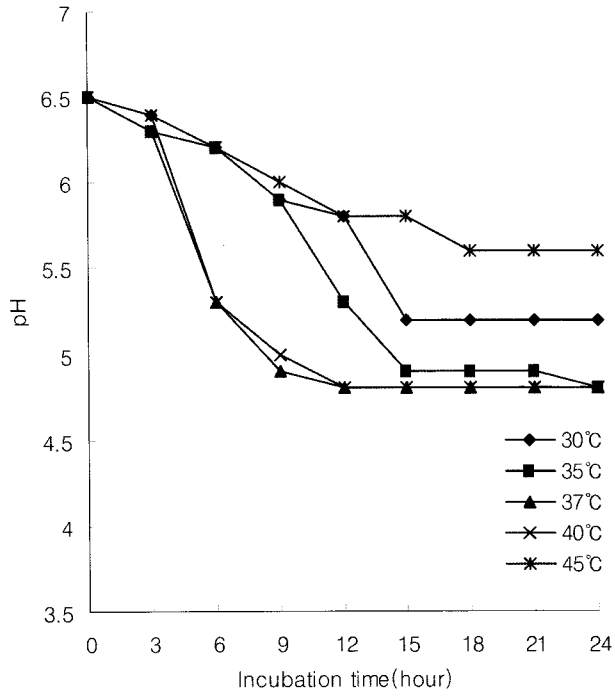

Fig. 8. Changes in pH of broth cultured at different temperature by *Lc. lactis* subsp. *lactis* LFG-2 with time for 24 hr.

분리균의 생장 특성

분리균인 LFG-1 균주의 생장을 비교하기 위해 대조균으로 LFG-2 균주와 상업용 *Str. thermophilus* Body-1, *Str. thermophilus* TH3을 MRS broth에 접종한 후 40°C에서 24

시간 배양하였을 때 이들의 성장곡선은 Fig. 9와 같다. LFG-1 균주는 상업용 균주인 *Str. thermophilus* Body-1 및 *Str. thermophilus* TH3과 거의 유사한 형태로 9시간까지 대수기를 보이며 1.6×10^9 cfu/mL수준까지 잘 증식하였으며, LFG-2 균주의 성장은 대수기 이후 정상기의 생균수가 2.5×10^8 cfu/mL으로 다소 낮았다. 이러한 결과들은 kefir grains에서 분리한 *Lc. lactis* subsp. *lactis*를 10% 환원탈지유에 접종하여 30°C에서 배양한 결과 배양 12시간 후 1.2×10^9 cfu/mL의 우수한 발효능을 보였다는 Joo(2003)의 결과와 최적온도 및 생장률에서 다소 차이를 보였는데, 이는 균종이 다르고 각각의 생육조건에 따라 생육 특성이 달라진 것에 기인하는 것으로 생각된다.

한편, 각 균주를 40°C에서 MRS broth에 배양시 pH의 변화는 Fig. 10에서와 같이 LFG-2 균주를 제외하고는 모두 9시간까지 pH 4.7 이하로 급격한 저하를 보였으며, 24시간 후 최종 pH는 *Str. thermophilus* Body-1이 pH 4.55, *Str. thermophilus* TH3이 4.10, 그리고 LFG-1 균주는 4.30으로 나타나 다소 차이를 나타내었으며, LFG-2 균주는 pH 4.84로 가장 높았다. 이는 최적 배양온도와 균주에 따른 산 생성능력의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

분리균의 단백질 응고

분리균의 유단백질 응고성을 확인하기 위하여 환원탈지유에서의 커드형성 특성을 상업균주인 *Str. thermophilus* Body-1과 비교 조사하였다. Table 2에서와 같이 LFG-1 균주는 상업균주와 유사한 수준으로 단백질 응고력이 우수

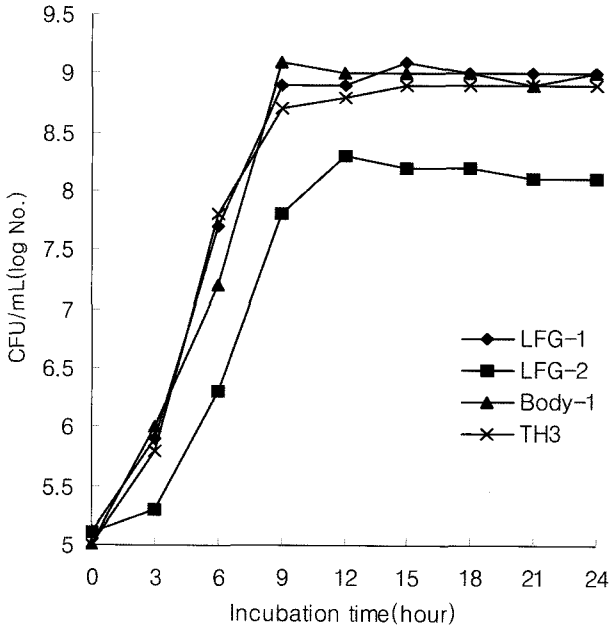

Fig. 9. Growth of LFG-1, LFG-2, *Str. thermophilus* Body-1 and TH3 in MRS broth at 40°C for 24 hr. LFG-1, LFG-2: Isolated lactic acid bacteria, Body-1: *Str. thermophilus* Body-1 TH3 : *Str. thermophilus* TH3.

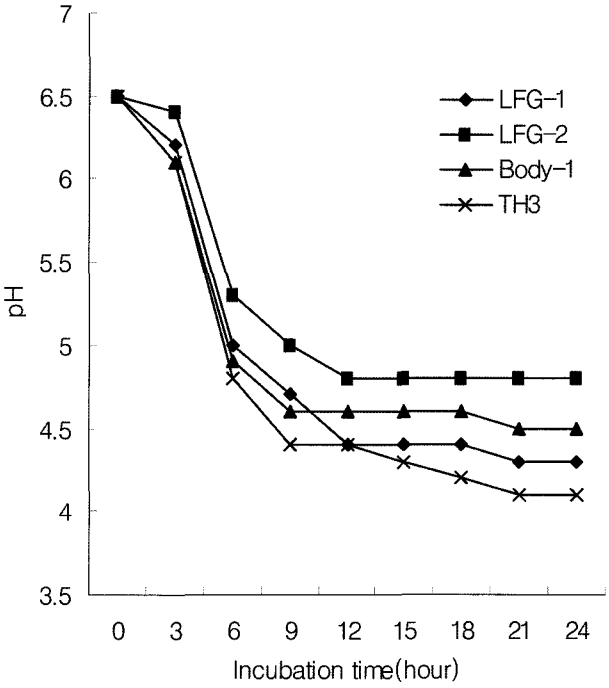

Fig. 10. Changes in pH of broth during the growth of LFG-1, LFG-2, *Str. thermophilus* Body-1 and TH3 at 40°C for 24 hr. LFG-1, LFG-2: Isolated lactic acid bacteria, Body-1: *Str. thermophilus* Body-1, TH3 : *Str. thermophilus* TH3.

Table 2. Coagulation of milk protein by lactic acid bacteria isolated from kefir made of goat milk

Strains	LFG-1	LFG-2	*Str. thermophilus* Body-1
Coagulation of milk protein	++	+	++

+ : Week coagulation of milk protein after 12 hrs at 40°C.
++: Coagulation of milk protein after 12 hrs at 40°C.

하여 배양 12시간에 유단백질이 응고되었으나, LFG-2 균주는 같은 배양시간 동안 비교적 낮은 수준의 유단백질 응고력을 보였다. 이러한 LFG-1 균주의 우수한 커드형성 능력은 발효유용 starter로서 적합하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

분리균의 Caseinolysis

10% 환원탈지유를 이용하여 LFG-1 균주 및 LFG-2 균주와 상업균주인 *Str. thermophilus* Body-1를 각각 40°C에서 24시간 동안 배양하면서 용출되는 tyrosine 함량으로 casein분해력을 측정한 결과를 Fig. 11에 나타내었다.

3개의 시험구 모두에서 배양 후 6시간까지는 유의적인 단백분해력을 보이지 않았다. LFG-1 균주와 *Str. thermophilus* Body-1 균주는 배양 후 6시간에서 15시간까지 비슷한 수준으로 tyrosine 함량이 급격하게 증가하였으며, 그 중 LFG-1은 배양 초기인 6-9시간 사이에 0.065 mg/mL로 *Str. thermophilus* Body-1 균주의 0.078 mg/mL에 비교하여 다

소 낮은 분해율을 보였다. 그러나 배양 12시간 이후에는 유사한 수준을 보였다. LFG-2 균주는 배양 후 6-12시간 사이에 급격한 분해율 증가를 보였으나 LFG-1균주와 *Str. thermophilus* Body-1 균주에 비하여 낮은 수준을 보였다. Lee(1991)는 완전배지를 이용한 30°C에서 *Micrococcus* sp. LL3의 casein 분해를 측정하고, 배양 24시간부터 36시간에 분해속도가 가장 높았다고 하여 본 실험과 차이를 보였는데, 이는 균주에 따른 단백분해효소의 활성차이 뿐만 아니라 배지종류 및 온도 등 배양조건의 차이 때문으로 생각한다.

내담즙성 및 내산성

산양유 kefir로부터 분리한 LFG-1과 LFG-2 균주의 내담즙성과 내산성 측정은 bile extract 0.3%와 pH 1, 3, 4.5의 조건에서 성장상태를 pH 6.4에서의 성장과 비교하였으며, 37°C에서 24시간 동안 실험한 결과는 Fig. 12와 같다.

Bile extract 0.3% 첨가구에서 LFG-1 균주는 2.8×10^8 cfu/mL, LFG-2 균주는 1.2×10^8 cfu/mL로 무첨가구의 9.7×10^8 cfu/mL, 5.5×10^8 cfu/mL와 비교할 때 29-22%의 생장율을 보여 다소 억제되기는 하였으나, 모두 10^8 cfu/mL이상으로 내성이 강한 성장상태를 보였다. 이는 Joo(2003)의 bile extract 0.3%를 첨가한 MRS broth에서 kefir로부터 분리한 유산균이 44%의 생존율을 보인 것보다 낮은 수준이지만 비교적 유사한 형태를 보였으며, 시판 발효유제품에서 분리한 *Lactobacillus acidophilus*가 담즙산을 1-2% 첨가한 탈지유에서 90%이상의 생존율을 보였다는 Ahn 등(1999)의 결과보다는 낮은 수준을 보였다.

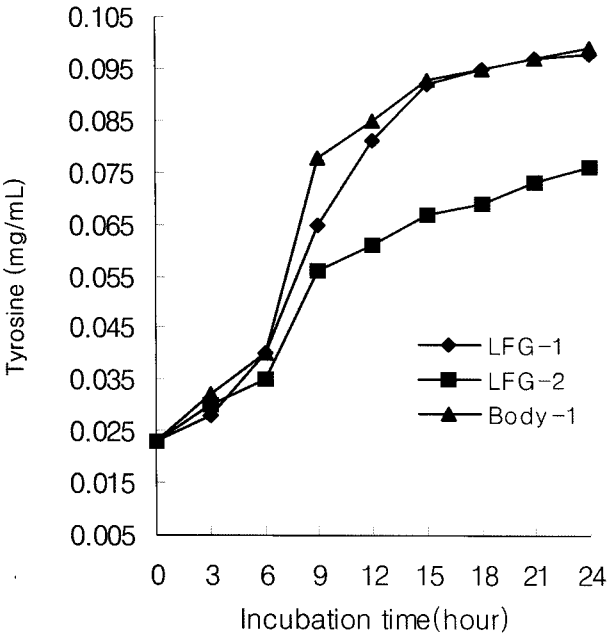

Fig. 11. Proteolytic activity of LFG-1, LFG-2 and *Str. thermophilus* Body-1 in 10% reconstituted skim milk at 40°C for 24 hr. LFG-1, LFG-2 : Isolated lactic acid bacteria, Body-1 : *Str. thermophilus* Body-1.

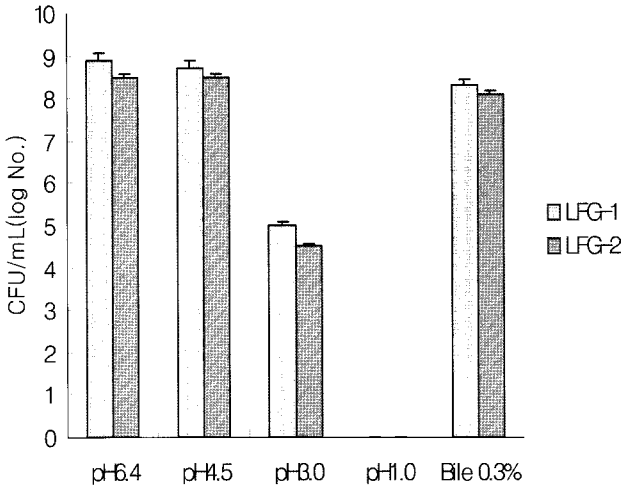

Fig. 12. Acid and bile-resistance of lactic acid bacteria isolated from goat milk kefir.

분리균의 내산성은 위산과 유사한 pH 1, 3, 4.5의 조건으로 37°C에서 3시간동안 유산균주의 생존여부를 관찰하였다. Fig. 12에서 보는 바와 같이 LFG-1와 LFG-2 균주간에는 생존균수의 차이가 없었으며, pH 1에서는 두 균주 모두 사멸하였고 pH 3에서도 대부분 사멸하였다. *B. longum*의 경우 pH 3에서는 어느 정도 생존력을 보였다는 Clark 등(1993)의 결과와, pH 2.5-3.5에서 *L. acidophilus*가 90% 이상의 생존성을 보였다는 Ahn 등(1999)의 결과에 비하여 LFG-1과 LFG-2 균주의 pH 내성은 매우 약한 내산성을 보였다. 반면 *L. bulgaricus*와 *Str. thermophilus*의 경우 pH 1.0에서 1시간 이후에 모두 사멸하였다는 Conway 등(1987)의 결과와 유사한 경향을 보였다. 한편 pH 4.5에서는 균의 증식이 좋은 것으로 나타났다. 이는 pH 4.5에서도 내성을 가지며 영양원이 공급될 경우 빠르게 증식할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

Kefir 분말제품으로부터 점질물 생성에 관여하는 유산균을 분리 동정하였으며, 분리균의 배양 특성을 조사하였다. 국산 산양유 kefir제품으로부터 순수 분리된 우수한 점질 생성특성을 갖는 2개 균주를 형태 및 생리학적 특성과 16S rDNA염기서열을 기초로 분석한 결과, 각 균주는 99% 이상의 상동성으로 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*(LFG-1)과 *Lc. lactis* subsp. *lactis*(LFG-2)로 동정되었다. *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* LFG-1의 최적 생장온도는 40-45°C, 최적온도에서 대수기의 세대시간은 40.6분이었고, 37°C에서 배양 24시간 후 최종 pH는 4.30으로, 상업균주인 *Str. thermophilus* Body-1의 pH 4.55 보다 다소 낮은 경향을 나타내었다. *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* LFG-

1의 단백질 응고력은 상업균주와 같이 높은 응고력을 보였으나, *Lc. lactis* subsp. *lactis*(LFG-2)는 낮은 응고력을 보였다. 모든 균주들은 0.3% bile extract 첨가조건에서 22-29%의 내담즙성을 나타내었고, pH 3.0 이하 에서는 대부분 사멸하는 약한 내산성을 보였으나 pH 4.5에서는 생장이 양호하여 요구르트와 같은 발효유 제품용 스타터로서 사용 가능성을 보였다.

참고문헌

1. Ahn, Y. T., Kim, Y. H., Jung, E. J., Lim, J. H., Kang, H. J., and Kim, H. U. (1999) Resistance of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* isolated from fermented milk products to low pH and bile acid. *Kor. J. Anim. Sci.* **41**, 335-342.
2. Berg, J. C., Smiths, A., Pot, B., Ledeboer, A. M., Kersters, K., Verbake, M. A., and Verrips, C. T. (1993) Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotech.* **7**, 189-205.
3. Beveridge, T. J. and Graham, L. L. (1991) Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 684-705.
4. Clark, P. A., Cotton, L. N., and Martin, J. H. (1993) Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods : II-Tolerance to simulated pH of Human Stomachs. *Milk Industry Foundation* **28**, 11-14.
5. Conway, P.L., Gorbach, S. L., and Goldin, B. R. (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70**, 1-12.
6. Dick, J. C., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M. L. F., Vreeker, R., Kamerling, J. P., Vliegnthart, J. F. G., Ledeboer, A. M., and Verrips, C. T. (1995) Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2840-2844.
7. Ham, J. S., In, Y. M., Jeong, S. G., Kim, D. W., Kim, H. B., Kim, Y. K., Ahn, Y. T., and Kim, H. U. (2000) Goat milk koumiss making and lactic acid production of *Candida kefir*. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* **18**, 151-163.
8. Hull, M. E. (1947) Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.* **30**, 881-884.
9. Hur, C. S., Lee, J. H., Baek, Y. J., and Kim, H. U. (1995) Characteristics of polysaccharide produced by *Bifidobacteria* and lactic acid bacteria. *Kor. J. Dairy Technol. & Sci.* **13**, 27-39.
10. Hutter, G., Schlagenhauf, U., Valenza, G., Horn, M., Burgemeister, S., Claus, H., and Vogel, U. (2003) Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology.* **149**, 67-75.
11. Jeong, D. H. (2004) Science of lactic acid bacteria. Shinilbooks Co., Seoul, Korea, pp.120-136.
12. Joo, Y. C. (2003) Studies on the characteristics of fermented milk cultured with lactic acid bacteria and yeast isolated from kefir. Ph. D. Thesis, Seoul Natl. Univ.
13. Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., and Pace, N. R. (1985) Rapid determination of 16s ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 6955-6959.
14. Lee, S. K. (1991) Biochemical changes in accelerated low-fat cheddar cheese ripening with *Micrococcus* spp. as adjunct. Ph. D. Thesis, Konkuk Univ.
15. 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.
16. Rasic, J. L. and Kurmann, J. A. (1978) Yogurt-scientific grounds. technology, manufacture and preparations. Tech. Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark, pp.12-137.
17. Sandford, P. A. (1979) Exocellular, microbial polysaccharides. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.* **36**, 265-313.
18. Simova, E., Beshkova, D., Angellov, A., Hiritozova, T. S., Fregonova, G., and Spasov, Z. (2002) Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1-6.
19. Sutherland, I. W. (1972) Bacterial exopolysaccharide. *Adv. Microbial physio.* **8**, 143-213.
20. Williams, S. T. and Davis, F. L. (1967) Use of a scanning electron microscope for the examination of Actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **48**, 171-177.
21. Wiseman, A. (1983) Principles of biotechnology. Blackie & Son Ltd. London, p. 23.

(2008. 1. 9. 접수/2008. 3. 17. 채택)