

신생아분변 유래 *Lactobacillus acidophilus*의 프로바이오틱으로서의 특성

김은아 · 이동희*
건국대학교 미생물공학과

The Probiotic Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* Isolated from Infant Feces

Eun-Ah Kim and Dong-Heui Yi*

Department of Microbiological Engineering, Konkuk University, Seoul 143-140, Korea

Received April 18, 2008; Accepted May 7, 2008

This study was conducted to obtain a good probiotic strain of *L. acidophilus* from infant feces which have the acid and bile tolerance. The selection criteria for the strain included antimicrobial activity, serum cholesterol reduction, resistance to the hydrogen peroxide, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition activity and iron solubility. To this end, five probiotic *Lactobacillus* strains have been isolated from infant feces. Especially, *L. acidophilus* SD 105 had strong antimicrobial activity against *Listeria* sp., high deconjugation activity in the medium which contained 0.5% of glycocholate (GCA) and high resistance to the hydrogen peroxide. *L. acidophilus* SD 102 showed the highest ACE inhibition activity among the tested cultures and *L. acidophilus* SD 103 showed iron solubility of more than 70%.

Key words: ACE inhibition activity, antimicrobial activity, infant feces, iron solubility, probiotic

서 론

유산균은 1857년 Pasteur에 의해 처음 발견되었으며 1889년 파스퇴르 연구소의 Tissier는 모유 영양아의 분변에서 혐기성 미생물의 일종인 *Bifidobacteria*를 분리하였고, 1900년에 오스트리아의 소아과 의사인 Moro에 의해 인공영양아의 분변에서 *Lactobacillus acidophilus*를 발견하였다. 그후 유아 영양아의 장내 균총에 대한 연구는 1980년대부터 활발히 이루어졌는데¹⁾ *Lactobacilli*는 인간과 동물의 장내 정상 유산균 중 다량 분포되어 있으며 내산성을 가진 조건적 혐기성 간균으로 숙주동물의 장내 정상 균총을 유지하기 위해 발효유 형태로 가장 먼저 이용되었고, 특히 *L. acidophilus*는 장내에 서식하는 토착 균종으로서 장내 정상 균총을 유지하는데 중요한 역할을 하는 유산균으로 인식되어 왔다. *L. acidophilus*는 소화관 내의 낮은 pH, 담즙산 및 lysozyme에 대한 저항성이 있고 장관 상피세포에 흡착할 수 있는 성질 등이 있어서 소화기관 내에서 생존력과 정착성이 우수하며 특히 회장 말단 부위에서의 성장력이 높은 것

으로 보고되었으며 건강증진 효과가 우수한 것으로 알려졌다.²⁾ 최근 발효유 제조에 사용되는 starter culture와 더불어 *L. acidophilus*와 같은 probiotic 유산균이 함유된 상업적 발효유의 생산이 급증하고 있다.³⁾ 이로 인해 probiotic 유산균이 첨가되어 형성되는 발효유의 풍미 및 조직감과 같은 관능적 특성에 미치는 영향에 대해서도 많은 관심을 가지게 되었으며⁴⁾ 또한 probiotic 유산균의 인체유용효과와 생리활성 물질 생성에 관한 연구도 매우 다양해지고 있다. 유산균의 주요 섭취원인 발효유의 제조 중 유단백질은 유산균에 의해 소화되면서 펩타이드를 생성하게 되며, 이로 인해 단백질의 소화율이 증가됨은 물론 이때 생성된 일부 펩타이드들은 면역체계, 혈압, 무기물 수송 및 혈액응고 조절 등과 같은 다양한 기능성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.⁵⁾

따라서 이 연구에서는 위의 산성도와 담즙산에 대한 내성이 뛰어나고 건강증진 효과가 우수한 것으로 알려진 *L. acidophilus*를 외부환경 유래 유산균으로 구성된 성인보다 장정착성이 우수한 신생아의 분변에서 분리 및 선발하였다. 선발균주에 의한 장내 유해미생물 억제, 혈중 cholesterol 저하, 과산화수소에 대한 저항성 등과 더불어 발효과정 중 생성되는 유기산, 풍미성분 및 유단백질 유래 펩타이드 등에 관한 기초 지식을 확보하여 우수한 starter culture 종균으로 개발하고자 실시하였다.

*Corresponding author
Phone: +82-2-450-3522; Fax: +82-2-3437-8360
E-mail: dhyi@konkuk.ac.kr

재료 및 방법

Lactobacilli의 분리. 신생아(생후 2주 이내)의 분변을 무균 면봉으로 채취하여 0.02% sodium azide(Sigma Chem. Co., USA)가 첨가된 pH 5.5의 MRS액체배지(Difco Lab., USA)에 무균적으로 접종하고 냉장 상태에서 실험실로 운송하였다. *Lactobacilli*의 분리를 위해 신생아의 분변 시료를 37°C에서 약 3일간 배양한 후 MRS 한천배지 상에 나타난 특징적인 균락을 백금이로 채집하여 MRS액체배지에 접종하고, 다시 배양한 후 얻어진 균주들을 4,350×g에서 15분간 원심분리(J2-21ME, JA-20, Beckmann, Germany)하여 상정액을 제거한 후 2.5 ml의 12% 탈지유(Difco lab., USA)와 2.5 ml의 MRS 액체배지를 넣어 혼합한 다음 시험에 사용될 때까지 -60°C에서 보관하였으며, 분리된 균주들은 해동하고 37°C에서 2회 계대배양하여 pH 2.5에서 생존율이 약 85% 이상이며 homo 유산 발효를 하는 균주를 우선 선발하여 시험에 사용하였다.

Lactobacilli의 동정. 분리된 균주들은 crystal violet 용액으로 염색한 후 광학현미경(Leitz Ltd., Germany)을 이용하여 선발된 11종의 *Lactobacilli*의 형태를 관찰하고 Gram 염색, 15°C와 45°C에서의 성장 여부와 catalase 생성 여부 및 37°C에서 24시간 배양 후 정지한 MRS배지에서 hot loop 시험을 통한 gas 생성 시험을 실시하여 생화학적 조사를 하였다. 선발된 11종의 *Lactobacilli*의 당 이용성을 측정하기 위해 API kit(API 50 CHL, bioMerieux, France)를 이용하여 49종의 당 발효성을 하였다. 시험 균주를 MRS액체배지에서 16시간 배양한 후 0.1% peptone 용액으로 세척한 다음 적당한 비율로 희석하였다. API kit의 사용법에 따라 접종액(inoculum)을 만들고 API50 CHL배지에 접종하여 strip을 만든 다음 37°C에서 48시간 배양한 후 색 변화를 관찰하였으며, 실험 결과는 Bergey's manual⁶⁾과 API LAB PLUS 프로그램(API50 CHL, bioMerieux, France)으로 비교 분석하였다.

균체 지방산 조성. 2차 동정을 위해 선발된 11종의 *Lactobacilli*의 균체 지방산 조성을 확인하기 위해 Rizzo 등⁷⁾의 방법을 일부 개선하여 다음과 같이 전처리 하였다. MRS액체배지에서 16~18시간 배양한 후 17,400×g로 10분간 원심분리하여 얻어진 균체를 멸균 증류수로 2회 세척한 후 동결건조 하였으며, 동결건조된 균체 20 mg을 15 ml 시험관에 넣은 뒤 45 g NaOH에 150 ml의 MeOH와 증류수를 각각 첨가하여 제조된 검화용액을 1 ml 첨가한 후 5~10초간 강하게 교반하고 100°C에서 3분간 cell lysis를 일으켜 세포지질로부터 인지질을 추출한 후 냉각하고, 6 N HCl 325 ml와 275 ml MeOH가 혼합된 methylation 용액 2 ml 첨가한 후 80°C에서 10분간 열처리하여 hexane과 methylene ether(MTBE, Sigma Chem. Co., USA)를 동량 혼합한 용액을 1.25 ml 첨가하고 서서히 회전하며 10분간 반응시킨 후 지방산을 추출하였다. 얻어진 용액의 하층 부분을 Pasteur 피펫을 이용하여 제거하고 여액에 NaOH 용액(10.8 g NaOH/900 ml in deionized water) 3 ml를 첨가한 뒤 5분간 반응시켜 유리지방산과 잔류 용매를 제거한 후 Na₂SO₄ anhydrous(Junsei Chem. Co., Japan)를 첨가하여 수분을 제거하고 분석시료로 하였다. 유산균의 지방산 조성을 분석하기 위해서 HP G1512A

auto sampler가 장착된 HP 5890 Series II GC(Agilent Co., USA)를 이용하였고 FID detector와 Ultra 2 column(Agilent Co., USA, 25 m×0.2 mm i.d., 0.33 μm film thickness)을 사용하였다. 분석조건에 따라 측정된 유산균의 균체 지방산의 조성비를 통해 Sherlock microbial identification system(SMIS, MIDI inc., USA)을 이용하여 동정하였다.

L. acidophilus의 Probiotic 특성. 위의 산성도에 대한 내성실험은 Hood와 Zottola⁸⁾의 방법에 따라 MRS 액체배지에서 16~18시간 배양한 *L. acidophilus*를 4,350×g로 15분간 원심분리하여 상정액을 제거한 후 0.8% NaCl로 희석하고, 10 N HCl를 이용하여 pH 2.0, 2.5 및 7.0으로 각각 조절된 0.05 M sodium phosphate 완충용액에 10⁷ cfu/ml 수준이 되도록 유산균주를 접종하고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 생존율을 측정하였다.

담즙산에 대한 내성 측정실험은 Ahn 등⁹⁾의 방법에 따라 16~18시간 배양한 *L. acidophilus*를 1% bile extract(porcine; Sigma Chem. Co., USA)가 첨가된 MRS 액체배지에 1% 접종하여 37°C에서 2시간 배양한 후 생존율을 아래와 같은 식에 의해 측정하였다.

$$\text{Survival (\%)} = \frac{\text{Log}_{10} \text{ number of viable cells survived (cfu/ml)}}{\text{Log}_{10} \text{ number of initial viable cells inoculated (cfu/ml)}} \times 10^0$$

유기산 측정. 선발된 *L. acidophilus*를 8% 탈지유에 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 배양액내 유기산을 Laye 등¹⁰⁾의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 측정 하였다. 발효과정 중 각 시간대별 배양액 5 g을 취하여 여기에 0.0085 N H₂SO₄(Matsuno Chem. Ltd., Japan) 25 ml를 첨가한 후 실온에서 2시간 방치하고, 4,350×g로 10분간 원심분리한 후 얻어진 상정액을 0.2 μm membrane필터로 여과하여 분석 시료로 사용하였다. 유기산 분석은 HPLC(Model LC6A, Shimazu Co., Japan)를 이용하였고 분석 조건은 UV/Visible detector (Shimazu, Model SPD-6AV, Japan)와 Aminex HPX-87H column(Bio-Rad, USA)을 사용하였다.

휘발성 향미성분. 선발된 *L. acidophilus*를 8% 탈지유에 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 배양액내 휘발성 향미성분을 Bassette과 Ward¹¹⁾의 방법에 따라 분석하였다. 배양액 50 g을 Kemmerer-hallet type micro-kjeldahl distillation unit의 증류 플라스크에 넣고 내부표준용액으로 ethyl acetate 5 ppm을 첨가한 후, 증류시켜 증류액 5 ml를 수집하고 이중 2 ml를 20 ml의 space vial에 취한 후 여기에 Na₂SO₄ anhydrous 0.5 g을 첨가한 후 Teflon 마개로 막고 60°C 수조에서 2분간 정치시킨 후, 5분간 교반하고 다시 8분간 정치시킨 후 headspace 1 ml를 취하여 GC로 분석하였으며 FID detector와 Supelcowax-10 fused silica capillary column(Supelco Inc., USA)을 사용하였다. 정량 분석한 성분은 발효유의 주요 휘발성 향미성분인 acetaldehyde, acetone, ethanol 및 diacetyl이었다.

유해 미생물 생육억제. 선발된 *L. acidophilus*에 의한 병원성 미생물 억제 능력을 시험하기 위하여 well diffusion assay 방법을 개선하여 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* KCTC

3710, *L. welshimeri* KCTC 3587, *Listeria ivanovii* KCTC 3444, *Bacillus cereus* KCTC 1014 및 *Streptococcus mutans* NN2025에 대한 억제효과를 다음과 같이 실험하였다. Metal boring cylinder(diameter; 8 mm)를 이용하여 *Listeria*는 *Listeria* 선택배지(Oxoid Ltd., England)에 *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus* 및 *S. mutans*는 Tryptic Soy 한천배지(Difco Lab., USA)에 천공된 평판을 만든 다음 각각의 한천평판에 멸균한 면봉으로 병원균을 도말하였다. Well의 바닥에 *Listeria* 선택배지 또는 Tryptic Soy 한천배지를 30 μ l씩 주입하여 막고, 시험공에 72시간 배양한 *L. acidophilus* 배양물을 150 μ l씩 접종한 후 각 한천평판을 4°C에서 12시간 방치한 다음 37°C에서 24시간 배양 후 억제환을 관찰하였다. 또한 유산균이 생성하는 산에 의한 병원균 억제 효과를 배제하기 위하여 유산균 배양액을 4,350 \times g로 10분간 원심분리하여 균체를 침전시킨 후 pH 7.0으로 중화시킨 유산균 배양물의 상층액을 다시 well diffusion assay 하였다.

Listeria와의 혼합 배양. 선발된 *L. acidophilus*를 37°C에서 24시간 배양시킨 MRS 액체배지 배양액에 *Listeria*를 10⁸ cfu/ml의 수준이 되도록 첨가하고 1시간 간격으로 *L. acidophilus*와 *Listeria*의 생균수를 측정하였으며, 이때 생균수는 0.1% peptone 용액으로 적당히 희석한 후 시료를 0.02% sodium azide가 첨가된 MRS 한천배지에 접종하여 균한 다음 37°C에서 48시간 배양한 후 측정하였으며, *Listeria*의 생균수는 *L. acidophilus*와 동일한 방법으로 희석한 후 *Listeria* 선택배지에 도말하여 측정하였다.

복합담즙산염 분해. 선발된 *L. acidophilus*의 복합담즙산염 분해능력을 측정하기 위해 Dashkevicz와 Feighner¹²⁾의 agar plate assay를 개선하여 실험하였다. Taurocholate(TCA), taurochenodeoxycholate(TCDCA), taurodeoxycholate(TDCA), tauroolithocholate(TLCA), glycocholate(GCA), glycochenodeoxycholate(GCDCA) 및 glycodeoxycholate(GDCA)를 MRS 액체배지에 0.05% 또는 0.5%를 각각 첨가하고 한천(Difco Lab., USA)을 1.7% 첨가하여 멸균한 다음 한천평판배지를 제조하였으며, 복합담즙산은 Sigma사(USA)의 것을 사용하였다. 0.2% sodium thioglycolate(Sigma Chem. Co., USA)가 첨가된 MRS 액체배지에서 2회 계대배양된 *L. acidophilus*를 복합담즙산염이 첨가된 MRS 한천평판배지에 도말 접종한 후 Gaspak anaerobic system(BBL Co., USA)을 사용하여 37°C에서 3일간 배양하고, 복합담즙산 분해 반응의 정도는 균락 주위에 형성된 침전환을 육안으로 관찰하였다.

Hydrogen peroxide 처리에 대한 내성. 선발된 *L. acidophilus*의 hydrogen peroxide에 대한 저항성을 Kullisaar 등¹³⁾의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 실시하였다. *L. acidophilus*를 MRS액체배지에서 24시간 배양한 후 isotonic saline으로 2회 세척한 다음 10⁷ cfu/ml수준이 되도록 isotonic saline에 접종하고 0.4 mM hydrogen peroxide를 첨가한 후 37°C에서 보관하면서 시료를 취하여 생균수를 측정하였다. 생균수는 시료를 0.1% peptone 용액으로 희석하고 적당한 희석액을 MRS 한천배지에 접종하여 37°C에서 2일간 anaerobic jar(BBL Co., USA)를 이용하여 혐기 배양한 후 한천평판배지에 형성된 균락을 측정하

였으며 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{생존율(\%)} = 100 \times \frac{\text{Log}_{10} \text{ of viable cells at hydrogen peroxide}}{\text{Log}_{10} \text{ of initial viable cells}}$$

ACE 저해 활성. 유단백질 분해에 의해 *L. acidophilus*가 생산하는 펩타이드 또는 유단백질 가수분해물은 Nakamura 등¹⁴⁾의 방법을 개선하여 다음과 같이 제조하였다. 선발된 5종의 *L. acidophilus*를 12% 탈지유에 2% 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 50% lactic acid와 10 N NaOH를 이용하여 탈지유 배양액의 pH를 4.6으로 조절한 후 4°C에서 4,350 \times g로 10분간 원심분리하였다. 상정액의 pH를 10 N NaOH를 이용하여 다시 pH 8.3으로 조절한 다음 4°C에서 4,350 \times g로 10분간 원심분리한 후 상정액을 실험에 사용하였다. ACE 저해 효과는 Maruyama와 Suzuki¹⁵⁾의 방법을 개선하여 다음과 같이 시행하였다. 실험에 사용한 borate-NaCl 완충용액은 0.2 M H₃BO₄ (Sigma Chem. Co., USA)와 0.005 M Na₂B₄O₇ (Sigma Chem. Co., USA)을 5.5:4.4의 비율로 혼합하여 pH 8.3으로 조절한 다음 최종 농도가 0.4 M이 되도록 NaCl을 첨가하여 제조하였으며, 1g의 rabbit acetone powder(Sigma Chem. Co., USA)를 50 mM borate-NaCl 완충용액(pH 8.3) 10 ml에 현탁하여 4°C에서 24시간 교반한 다음 4°C에서 17,400 \times g로 30분간 원심분리한 후 얻어진 상정액을 냉동보관하면서 ACE 조효소액으로 사용하였다. ACE의 기질은 Hip-His-Leu(Sigma Chem. Co., USA)를 3.8 mM의 농도가 되도록 borate-NaCl 완충용액에 용해하여 사용하였다. 펩타이드가 함유된 0.05 ml의 시료를 150 ml의 기질(3.8 mM Hippuryl-L-histidyl-L-leucine)과 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 0.05 ml의 ACE 조효소액을 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시키고 0.25 ml의 1 N HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 1.5 ml의 ethyl acetate를 첨가하여 30초간 혼합하고 4,350 \times g에서 10분간 원심분리 하였다. 얻어진 상정액 1 ml를 시험관에 옮긴 후 80°C에서 완전히 건조시키고 3 ml의 1 M NaCl을 첨가하여 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 ACE 저해율은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{ACE 저해율(\%)} = (E_c - E_s) / (E_c - E_b) \times 100$$

E_c: 증류수 첨가 시 흡광도

E_s: 시료 첨가 시 흡광도

E_b: 반응정지 후 시료 첨가 시 흡광도

철분 가용성 증가. 펩타이드 첨가 실험전 pH 변화에 따른 철분의 용해성 변화를 확인하기 위해 pH 2.0~7.0까지 pH를 달리 하여 FeCl₃(50 μ g/ml, Sigma Chem. Co., USA)를 반응시켜 Ferrozine 방법¹⁶⁾으로 용해도를 측정하였고, 펩타이드에 의한 철분의 가용화 실험은 다음과 같이 실시하였다. 선발된 *L. acidophilus*를 12% 탈지유에 2% 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 50% lactic acid와 10 N NaOH를 이용하여 탈지유 배양액을 pH 4.6으로 조절하고 4°C에서 4,350 \times g로 10분간 원심분리 하였다. 얻어진 상정액을 투석막(MW cut-off 1kDa)에 담그고 증류수로 4°C에서 24시간 동안 투석시킨 후 동결건조시켜 시료로 사용하였다. 1 mg의 동결건조된 시료를 10 ml의 증류수에 용해시킨 다음 2.5 ml의 FeCl₃와 혼합하고 1 N NaOH를

이용하여 pH 6.0으로 조절한 후, 37°C에서 1시간 반응하고 4,000×g에서 30분간 4°C에서 원심분리하여 침전되지 않고 잔존한 상정액내의 가용성 철분의 양을 Ferrozine 방법으로 정량하였다. 가용성 철분이 함유된 10 ml의 상정액에 0.02% L-ascorbic acid 0.625 ml를 혼합한 다음 10분간 방치하고, 0.5 ml의 10% ammonium acetate(Sigma Chem. Co., USA)와 혼합하고 다시 1 mM ferrozine(Sigma Chem. Co., USA) 0.625 ml를 첨가하여 혼합한 후 20분간 암소에서 발색시킨 후, 증류수 0.5 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 562 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 철분 표준용액으로 Titrisol(Merck Co., USA)을 사용하였다. 가용성 철분의 농도를 측정하기 위해 선발 균주 중 상대적으로 철분 가용화율이 높은 것으로 나타난 4종의 *L. acidophilus*에 의해 얻어진 1 mg의 동결건조된 펩타이드 시료를 10 ml의 증류수에 용해시킨 다음 2.5 ml의 FeCl₃와 혼합하고 1 N NaOH를 이용하여 pH 6.0으로 조절한 후 37°C에서 1시간 반응시키고, 4°C에서 4,350×g로 30분간 원심분리하여 상정액내 가용성 철분의 양을 Inductively coupled plasma (ICP) spectrophotometer(SPECTRO Anal. Inc., Germany)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

Lactobacilli의 분리. 인체의 장내 환경에서 생존력과 정착성이 우수하고 발효유의 starter로서 적합한 *L. acidophilus*를 분리하기 위하여 생후 2주일 이내 10명의 신생아의 분변에서 pH 5.5에서 생장이 가능한 *Lactobacilli* 34균주를 분리하였으며, 분리된 *Lactobacilli* 중에서 pH 2.5에서 생존율이 약 85% 이상인 면서 homo 유산 발효를 하는 11균주를 선발하여 생화학적 특성을 확인하였다. 1차로 선발된 유산균주들의 공통된 생육조건은 Table 1에서 보는 바와 같으며, 분리된 균주들은 Gram양성

Table 1. Growth Conditions of *Lactobacilli* isolated from infant feces

Growth	Conditions
Morphology	Rod
Growth at 45°C	+
Growth at 15°C	-
Catase production	-
Gas from glucose	-
Growth at pH 9.6	+
Growth at pH 4.0	+

의 간균으로 catalase를 생성하지 않고 45°C에서는 잘 성장하였으나 15°C에서는 성장하지 않았다.

Lactobacilli의 동정. 1차로 선발한 11균주를 API kit(API50 CHL, bioMerieux, France)를 이용하여 당 발효 시험을 실시한 후 그 결과를 LAB PLUS 프로그램(API50 CHL, bioMerieux, France)으로 분석하여 Bergey's Manual을 기준으로 *Lactobacillus* 속 균의 22종의 당 이용성에 따라 *L. acidophilus* 5균주 SD 101, SD 102, SD 103, SD 104, SD 105를 선발하였으며 결과는 Table 2와 같다.

균체 지방산 조성. 당 이용성을 통해 확인된 5종의 *L. acidophilus*를 SMIS를 이용하여 지방산 조성을 분석하여 확인하였으며 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 대부분 시험 균주의 균체 지방산 조성 중에서 oleic acid(C_{18:1})의 함량이 40% 이상으로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 11,12-methylene hexadecanoic acid(C_{19:0 cyc}) 비율이 높게 나타났다. SMIS library와의 유사성(similarity)을 확인한 결과 5종의 *L. acidophilus* 중

Table 2. Pattern of carbohydrates fermentation of *L. acidophilus* isolates

Carbohydrates	SD 101	SD 102	SD 103	SD 104	SD 105
Amygdalin	+	-	+	-	+
Arabinose	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	-	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Gluconate	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+
Rehalose	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-

¹⁾+: acid produced -: acid not produced

Table 3. Cellular fatty acid composition of *L. acidophilus* isolates

Strain	Composition of fatty acids (%) ¹⁾							Similarity (%)
	C _{14:0}	C _{16:1}	C _{16:0}	C _{18:1}	C _{18:0}	C _{18:2}	C _{19:0 cyc}	
SD 101	2.6	5.1	6.4	42.3	2.8	4.3	12.3	64
SD 102	2.1	4.9	7.1	48.2	3.4	4.7	10.8	53
SD 103	2.6	4.8	7.3	46.5	3.1	4.5	12.1	66
SD 104	2.3	4.6	7.5	47.4	2.9	4.2	11.3	58
SD 105	2.8	4.7	6.9	46.2	3.2	4.5	11.6	83

¹⁾C_{14:0}: myristic acid, C_{16:1}: palmitoleic acid, C_{16:0}: palmitic acid, C_{18:1}: oleic acid, C_{18:0}: stearic acid, C_{18:2}: linoleic acid, C_{19:0 cyc}: 11,12-methylene hexadecanoic acid.

1종은 *L. acidophilus*로서 80% 이상의 유사성을 나타내었으며, 나머지 2종은 *L. acidophilus*로서 유사성은 50% 대로 낮았으나 다른 *Lactobacillus*로서의 유사성은 결과에 나타나지 않아 *L. acidophilus*로서 인정하였다. Rizzo 등⁷⁾의 보고에 의하면 *Lactobacilli*의 균체 지방산 조성을 분석한 결과 *L. acidophilus*의 경우 oleic acid의 함량이 41.7%로 가장 높게 나왔고 다른 지방산의 조성도 이 실험의 결과와 유사하게 나타났다.

***L. acidophilus*의 Probiotic 특성.** pH 2.5 및 pH 2.0으로 조정된 MRS 배지에서 선발된 *L. acidophilus*의 위의 산성도에 대한 내성을 실험한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. 대부분의 균주가 pH 2.5에서는 85% 이상의 생존율을 보였으며, pH 2.0에서는 약 40~50%의 생존율을 보였다. 그중 *L. acidophilus* SD 102는 내산성이 높아 pH 2.0에서도 71%의 높은 생존율을 보였다. Hood와 Zottola 등⁸⁾은 *Lactobacillus* 중 *L. casei*와 *L. acidophilus* 등의 내산성이 높으며 특히 *L. acidophilus*의 경우 pH 2.0에서는 30~45분 정도 생존하고, pH 3.0에서는 대부분 생존하는 것으로 보고하였다. Rizzo 등⁷⁾은 이러한 균주별 내산성

Table 4. Survival of *L. acidophilus* isolates in sodium phosphate buffer adjusted to pH 2.5 and 2.0 after 2 hours

Strain	Counts of <i>L. acidophilus</i> (cfu/ml)			Survival (%) ¹⁾	
	Before incubation	After incubation			
	-	pH 2.5	pH 2.0	pH 2.5	pH 2.0
SD 101	7.6×10 ⁷	6.7×10 ⁷	3.4×10 ⁷	88.2	44.7
SD 102	8.2×10 ⁷	7.1×10 ⁷	5.8×10 ⁷	86.6	70.7
SD 103	7.3×10 ⁷	6.1×10 ⁷	3.5×10 ⁷	83.6	47.9
SD 104	9.2×10 ⁷	7.5×10 ⁷	5.4×10 ⁷	81.5	58.7
SD 105	4.8×10 ⁷	4.1×10 ⁷	3.1×10 ⁷	85.5	64.6

¹⁾Each data indicates a mean of triplicate (standard deviation)

Table 5. Survival of *L. acidophilus* isolates in MRS broth containing 1 % bile extract after 2 hours

Strain	Counts of <i>L. acidophilus</i> (cfu/ml)		Survival (%) ¹⁾
	Before incubation	After incubation	
SD 101	7.6×10 ⁷	6.7×10 ⁷	88.2
SD 102	8.2×10 ⁷	7.1×10 ⁷	86.6
SD 103	7.3×10 ⁷	6.6×10 ⁷	90.4
SD 104	9.2×10 ⁷	8.0×10 ⁷	87.0
SD 105	4.8×10 ⁷	4.2×10 ⁷	87.5

¹⁾Each data indicates a mean of triplicate (standard deviation)

Table 6. Organic acids concentration in 8% skim milk fermented with *L. acidophilus* isolates at 37°C for 24 hours

Strain	Concentration of the organic acids (mg/g) ¹⁾				
	citric acid	lactic acid	acetic acid	formic acid	butyric acid
SD 101	0.31±0.02	5.7±0.41	0.65±0.07	0.09±0.03	0.49±0.02
SD 102	0.48±0.05	9.3±0.09	0.72±0.06	0.14±0.01	ND ²⁾
SD 103	0.45±0.01	8.7±0.36	0.81±0.06	0.12±0.03	ND
SD 104	0.61±0.02	8.3±0.25	1.21±0.08	0.17±0.02	0.51±0.03
SD 105	0.56±0.03	11.3±0.36	1.39±0.05	0.16±0.02	0.53±0.03

¹⁾Each data indicates a mean of triplicate (standard deviation)

²⁾Not detected

의 차이에 대해 균체 세포막내의 C_{19:0 cyc}의 함량과 연관이 있다고 하였다.

선발된 *L. acidophilus*를 bile extract가 1% 첨가된 배지에서 배양하며 담즙산에 대한 내성을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 대부분의 균주가 생존율이 80% 이상으로 매우 우수하였고, 선발 균주들 중 *L. acidophilus* SD 103의 생존율이 90.4%로 가장 높게 나타났다. Klaenhammer와 Kleeman¹⁷⁾은 *Lactobacillus*와 같은 유산 간균은 세포 형태에 따라 담즙에 대한 내성에 차이가 있으며, 표면이 매끈한 형태보다는 거친 형태의 표면을 가진 *L. acidophilus*가 담즙에 대한 내성이 다른 *Lactobacilli*에 비해 매우 높게 나타나 probiotic으로서의 이용성이 뛰어나다고 하였다.

유기산 분석. 선발된 *L. acidophilus*를 8% 탈지유에 배양하여 생성되는 유기산을 측정하였으며 결과는 Table 6에 나타난 바와 같다. 시험 균주 중 *L. acidophilus* SD 105에 의해 제조된 발효액 내 유기산 함량이 전체적으로 높게 나타났다. Lactic acid의 경우 전 처리구에서 다른 유기산에 비해 높게 생성되어 전형적인 homo형 유산발효가 이루어졌다. 실험 결과 acetic acid도 소량 생성되었는데 Ostile 등⁴⁾은 lactic acid에 의해 배지의 pH가 저하하면 유산균의 세포내 pH도 감소하며 lactic dehydrogenase의 활성이 낮아져서 homo 유산발효 유산균이라도 소량의 acetic acid를 생성하게 된다고 하였다.

휘발성 향미성분. 선발된 *L. acidophilus*를 8% 탈지분유에 접종하여 생성되는 휘발성 향미성분을 분석하였으며 결과는 Table 7에 나타난 바와 같다. 발효유의 대표적 향미성분인 acetaldehyde의 경우 *L. acidophilus* SD 105가 가장 높게 생성하였고 *L. acidophilus* SD 101의 생성량이 가장 낮았다. 발효유의 전형적인 휘발성 향미성분 중 acetaldehyde, diacetyl, acetone, acetoin 및 2-butanone이 주요 향미성분으로 그 중 acetaldehyde가 가장 큰 영향을 미치는데¹⁸⁾ 실험결과 대부분의 균주가 발효유의 주요 향미성분인 acetaldehyde가 다른 휘발성 향미성분에 비해 많이 생성되었으며 *L. acidophilus* SD 105의 경우 acetaldehyde와 acetone의 생성 비율이 2.95:1.23으로 나타났는데, Bottazzi와 Vescovo¹⁹⁾는 acetaldehyde와 acetone의 생성 비율이 2.8:1일 경우 발효유의 가장 적합한 향미를 느낄 수 있다고 하였다. 또한 일반적인 발효유에 있어 diacetyl이 0.5 ppm 미만으로 다른 휘발성 향미성분에 비해 낮게 존재하나 발효유의 부드러운 지방취를 형성하여 주는 주요 향미 성분이라고 하였다.

Table 7. Volatile aroma compounds produced in 8 % skim milk fermented with *L. acidophilus* isolates at 37°C for 24 hours

Strain	Concentration of the aroma compounds (ppm) ¹⁾			
	acetaldehyde	acetone	ethanol	diacetyl
SD 101	4.49±0.22	2.57±0.08	0.20±0.04	0.25±0.02
SD 102	3.51±0.08	1.71±0.05	0.43±0.09	0.37±0.04
SD 103	4.36±0.43	1.79±0.08	0.51±0.12	0.36±0.06
SD 104	3.45±0.67	0.84±0.05	0.48±0.11	0.48±0.07
SD 105	5.89±0.44	2.46±0.05	0.63±0.06	0.52±0.06

¹⁾Each data indicates a mean of triplicate (standard deviation)

Table 8. Antimicrobial activity of *L. acidophilus* strains on the growth of *Listeria* sp. as measured by well diffusion assay

Strain	Inhibition activity ¹⁾	
	<i>L. monocytogenes</i> ²⁾	<i>L. ivanovii</i> ³⁾
SD 101	9.41 ¹⁾	10.54
SD 102	9.32	10.60
SD 103	9.19	10.21
SD 104	11.70	11.00
SD 105	12.02	12.82

¹⁾Each data indicates a mean of triplicate (standard deviation)

²⁾*L. monocytogenes* inhibition activity as clear zone diameter (mm)

³⁾*L. ivanovii* inhibition activity as clear zone diameter (mm)

유해 미생물 생육억제. 선발된 *L. acidophilus*에 의한 유해 미생물 생육 억제 well diffusion assay 방법을 이용하여 실험한 결과 *E. coli*, *S. typhimurium*에 대한 생육억제효과는 없었으며, *B. cereus*와 *S. mutants*에 대해서는 약한 생육억제효과를 나타냈다. 그러나 대부분의 실험 균주들에 있어 특이적으로 *Listeria* 균주들에 대한 억제 효과가 매우 높게 나타났으며 *L. monocytogenes* KCTC 3710와 *L. ivanovii* KCTC 3444에 대한 억제능이 제일 높았으며 결과는 Table 8과 같다. 각 균주의 억제환의 크기는 크게 차이가 없었으나 SD 105가 제일 억제효과가 큰 것으로 나타났다. *L. acidophilus*에 의한 장관내 병원성 미생물의 생육 억제 효과는 주로 장관상피세포에서 병원성 미생물과 *L. acidophilus*간의 경쟁적인 부착과 *L. acidophilus*가 병원성 균주들과 응집하는 능력에 있다고 보고되고 있다.²⁰⁾ 또한 이러한 물리적인 기작 이외에도 *L. acidophilus*가 생성하는 유기산, hydrogen peroxide, diacetyl, bacteriocin 및 일부 지방산 등과 같은 대사산물에 의한 병원성 미생물의 생육 억제 효과가 알려져 있다.⁹⁾

Listeria와의 혼합 배양. *Listeria*에 대한 생육억제 효과가 다른 병원성 미생물에 비해 매우 뚜렷하게 나타남에 따라 *L. acidophilus* SD 105를 *Listeria*와 혼합 배양하여 생육 억제 효과를 실험하였다. *L. acidophilus* SD 105를 24시간 배양한 MRS액체배지에 *L. monocytogenes* 및 *L. ivanovii*를 첨가하여 생육억제 효과를 측정하였으며 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 혼합 배양 1시간 이후부터 시험 균주들에 의한 *L. monocytogenes* 및 *L. ivanovii*에 대한 생육 억제 효과가 뚜렷하게 나타났으며, 배양 3시간대 이후부터 대부분 사멸하는 것으로 나타나 시험 균주들의 특이적인 *Listeria*에 대한 생육억제 효과가 확인되었다.

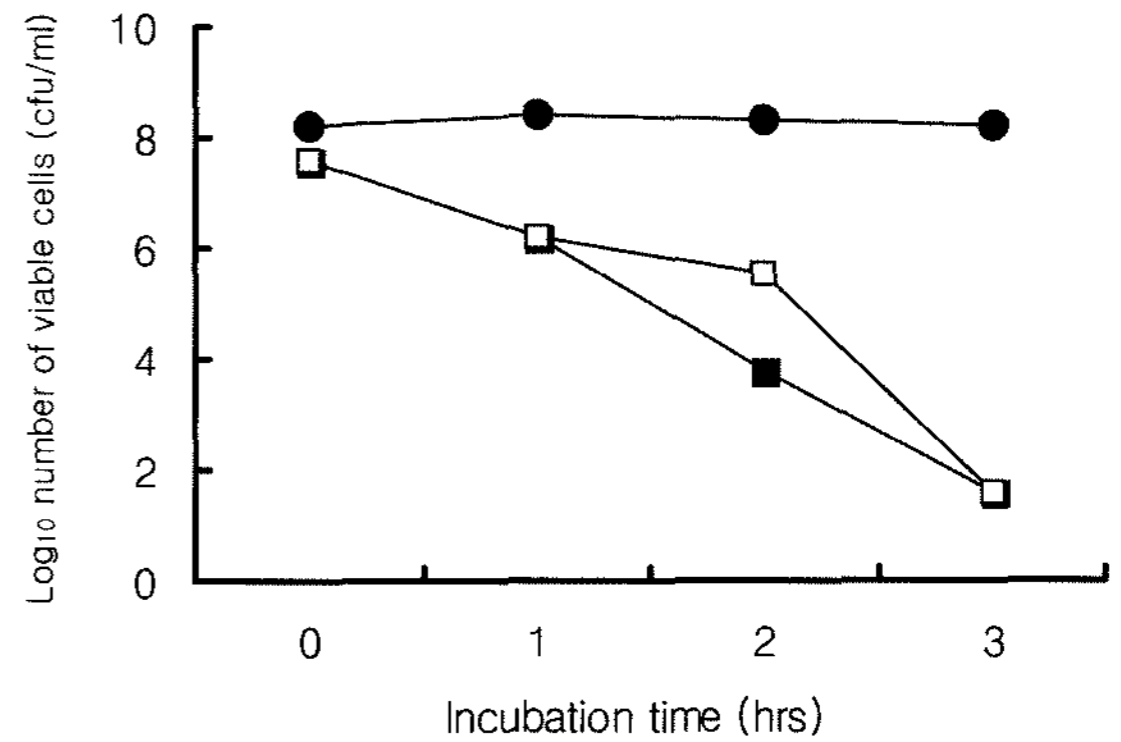


Fig. 1. The growth inhibition of *L. ivanovii* and *L. monocytogenes* cultured with *L. acidophilus* SD 105 in MRS broth at 37°C for 24 hours. -●- *L. acidophilus* SD 105 -■- *L. ivanovii* -□- *L. monocytogenes*

복합담즙산염 분해. 선발된 *L. acidophilus*의 복합담즙산염 분해를 실험한 결과는 Table 9과 같다. 실험 결과 모든 시험 균주들이 실험에 사용한 복합담즙산의 종류에 따라 유산균의 분해반응 정도의 차이는 있으나 복합담즙산염들을 분해하는 것으로 나타났다.²¹⁾ 전반적으로 glycine과 결합된 복합담즙산염보다는 taurine과 결합된 복합담즙산염이 첨가된 MRS한천평판배지에서 잘 성장하였고, glycine과 결합된 복합담즙산염의 농도가 증가할수록 생육이 억제되었으며, 0.5%를 첨가할 때 생육이 크게 억제되었다. 따라서 glycine보다는 taurine과 결합한 복합담즙산염에 대해 저항성 및 분해 활성이 높은 것으로 나타났으며, 시험 균주들 중 특히 *L. acidophilus* SD 105는 다른 균주에 비해 glycine과 결합된 복합담즙산염에 대해 내성이 높아 잘 성장하였고, 0.5% GCA를 첨가했을 때 높은 분해활력을 나타냈다. 유산균에 의한 혈중 콜레스테롤의 저하는 콜레스테롤 동화, 복합담즙산 분해, 유산균 세포와 콜레스테롤의 결합 등에 의해 직접적으로 장관의 콜레스테롤 대사에 영향을 줌으로써 이루어진다고 보고되고 있으며, 그 중 복합담즙산 분해가 유산균에 의한 혈중 콜레스테롤의 저하에 있어 주요 기작으로 확인되고 있다.²²⁾

Hydrogen peroxide 처리에 대한 내성. 선발된 *L. acidophilus*를 배양하여 세척하고 0.4 mM hydrogen peroxide를 첨가하여 2시간 동안 배양하며 생균수를 측정하는 결과는 Table 10에 나타난 바와 같다. 배양 1시간 전까지는 대부분의 실험 균주들이 약 70% 이상의 생존율을 나타냈으며 배양시간이 증가함에 따라 생존율이 전반적으로 낮아졌으며, 배양 2시간 후에는 0.4

Table 9. Deconjugation of bile salts by *L. acidophilus* isolates

Strain	0.5% bile salts				0.05% bile salts		
	TCA	TCDCA	TDCA ¹⁾	TLCA ²⁾	GCA	GCDCA	GDCA ³⁾
SD 101	++ ⁵⁾	+++ ⁶⁾	+++	+++	+ ⁴⁾	+	++
SD 102	+++	+++	+++	+++	+	++	++
SD 103	+++	+++	+++	++	+	++	++
SD 104	+++	+++	+++	+++	+	+	++
SD 105	+++	+++	+++	+++	+	+++	++

¹⁾Precipitate halo around opaque granular white colonies
²⁾Clear zone around white colonies
³⁾No halo of precipitate around colonies
⁴⁾Halo of precipitate around colonies < 2 mm
⁵⁾2 mm < halo of precipitate around colonies < 5 mm
⁶⁾5 mm < halo of precipitate around colonies

Table 10. Survival of *L. acidophilus* isolates in 0.4 mM hydrogen peroxide at 37°C

Strain	Survival (%) ¹⁾		
	Incubation time (hrs)		
	1.0	1.5	2.0
SD 101	77.9	49.4	48.7
SD 102	74.8	41.7	41.0
SD 103	75.3	38.4	21.5
SD 104	83.7	58.7	57.2
SD 105	84.7	64.6	62.5

¹⁾means of triplicate: means not followed by the same letter in the same column differ significantly from one another ($p < 0.05$)

mM hydrogen peroxide에 의해 대부분의 실험 균주들의 생존율이 급격히 감소하였고, 시험 균주 중 *L. acidophilus* SD 103은 가장 높은 감소율을 나타내었다. 반면 *L. acidophilus* SD 105는 배양 1시간대에서는 80%의 생존율을 보였으며, 배양 2시간 후에도 생존율이 60% 이상으로 나타나 0.4 mM hydrogen peroxide에 대한 저항성이 높은 것으로 확인되었다. Klebanoff 등²³⁾은 이러한 *Lactobacilli*의 hydrogen peroxide에 대한 저항성은 이들 유산균이 hydrogen peroxide와 peroxidase를 함께 생산하며, 생산된 peroxidase가 hydrogen peroxide를 hypochlorous acid로 전환시켜 유해 미생물 억제기능을 가지며 동시에 과도한 hydrogen peroxide의 농도를 조절한다고 하였다.

ACE 저해 활성. ACE 활성 억제력이 있는 펩타이드를 탐색하기 위해 선발된 *L. acidophilus*를 탈지유에서 배양한 후에 얻어진 펩타이드의 ACE 활성 억제를 실험하였으며 결과는 Fig. 2와 같다. 시험 균주들에 의해 생성된 펩타이드에 의해 약 8~18%의 ACE활성이 억제되었고, 그 중 *L. acidophilus* SD 102는 배지에 생성된 펩타이드의 ACE 억제력이 18%로 시험 균주 중 가장 높은 것으로 나타났으며, *L. acidophilus* SD 105의 경우 약 8%의 ACE 활성 억제 효과가 나타났다. 유산균은 자신이 생산하는 여러 종류의 protease와 peptidase에 의해 단백질을 펩타이드와 아미노산으로 분해하여 스스로의 생육에 사용하며, 우유 단백질은 유산균에 의한 단백질의 분해과정 중 일정한 아미노산 배열의 생리활성을 가진 펩타이드를 생성하게 된다.^{5,24)} Angiotensin I은 혈압상승에 중요한 역할을 하는 angiotensin II

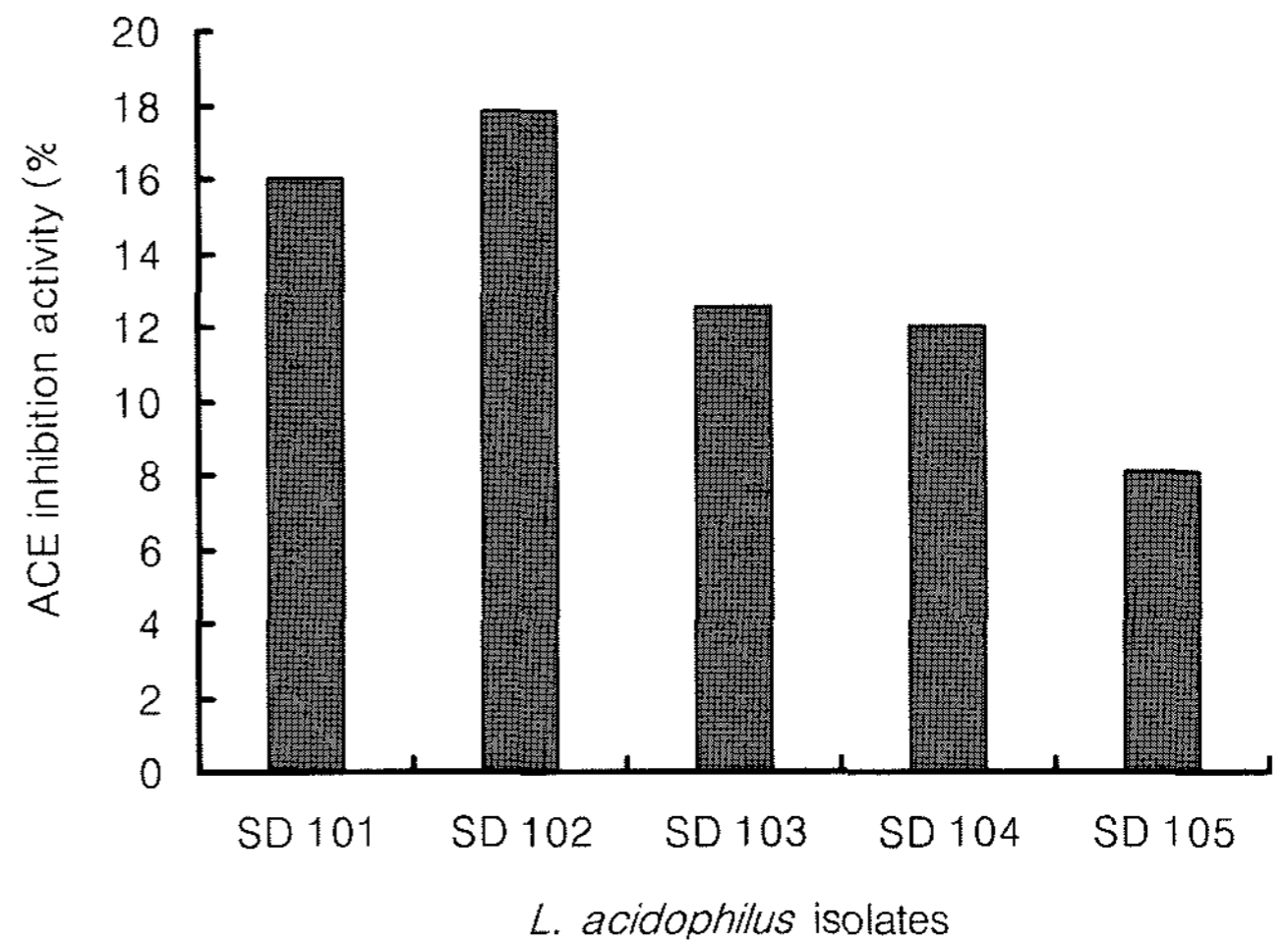


Fig. 2. Effect of peptides produced by *L. acidophilus* isolates on the ACE inhibition activity.

의 전구체 역할을 하며 ACE 작용에 의해 angiotensin II로 전환된다. 따라서 ACE inhibition activity를 측정함으로써 혈압강화작용을 하는 유단백질 유래 펩타이드 생성정도를 측정할수 있다. 또한 Nakamura 등¹⁴⁾은 탈지유에 *L. helveticus*와 *Saccharomyces cerevisiae*를 배양하였을 때 ACE억제 활성이 높은 펩타이드가 생성되었다고 하였다.

철분 가용성 증가. pH에 따른 철분의 용해성 변화를 실험한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 위(胃)의 조건과 유사한 pH 2.0 부근에서는 대부분의 철분이 가용성 상태로 존재하나, pH가 높아지면서 철분의 가용성이 급격히 감소하여 pH 4.0에서는 10%의 가용성을 나타냈으며, 철분이 흡수되는 십이지장의 pH인 6.0에서는 약 8% 정도의 철분이 가용성 상태로 존재하는 것으로 확인되었다. 철분의 체내흡수는 소장 상부의 십이지장에서 일어나는 것으로 알려져 있으며 체내 철분 저장 상태에 따라 다르지만 성인의 경우 섭취한 철분의 약 5~10%만이 흡수된다고 알려져 있다.²⁵⁾ 따라서 철분의 체내 이용성을 높이기 위해서는 철분의 십이지장의 조건에서 가용상태를 유지하는 것이 중요하다. 시험 균주를 탈지유에서 배양한 후에 얻어진 펩타이드에 의한 철분의 가용화 실험 결과는 Fig. 4에 제시된 바와 같다. 펩타이드 첨가에 의해 pH 6.0에서 철분의 가용화가

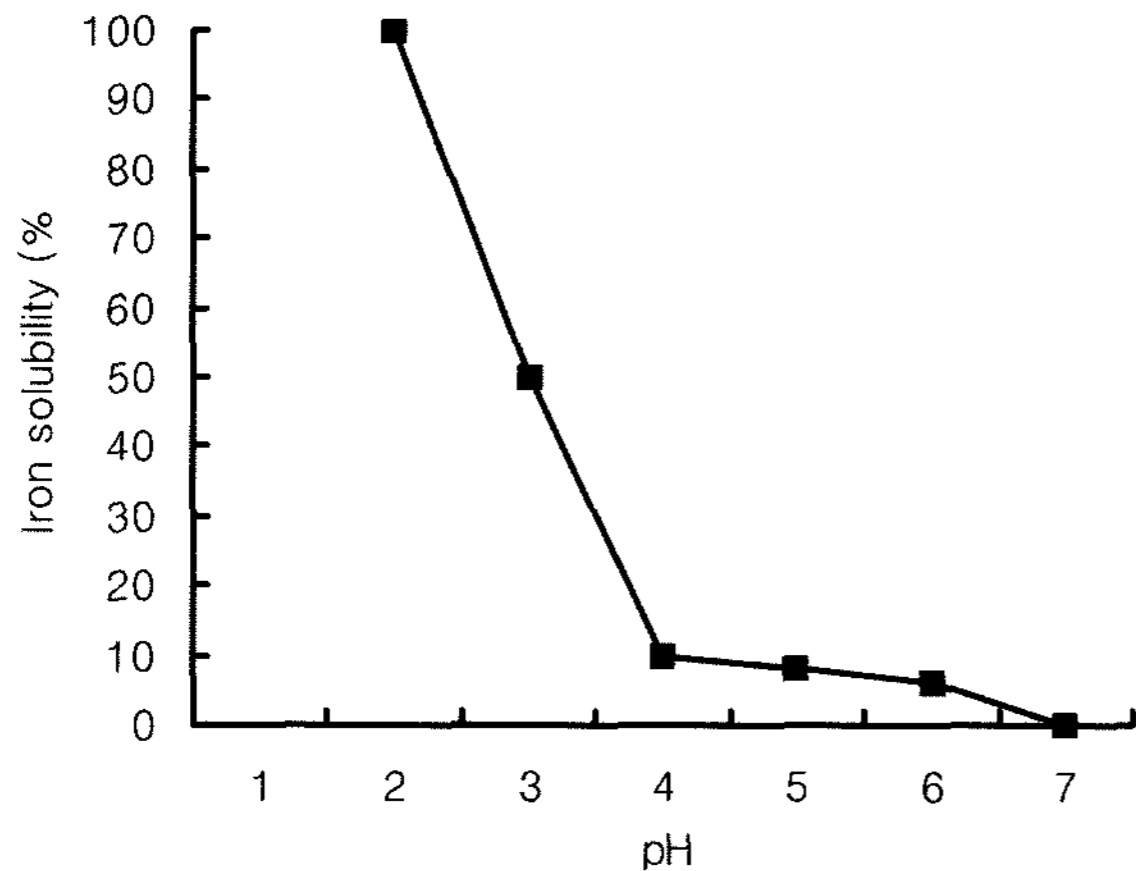


Fig. 3. Changes of the iron solubility at various pH measured by Ferrozine method.

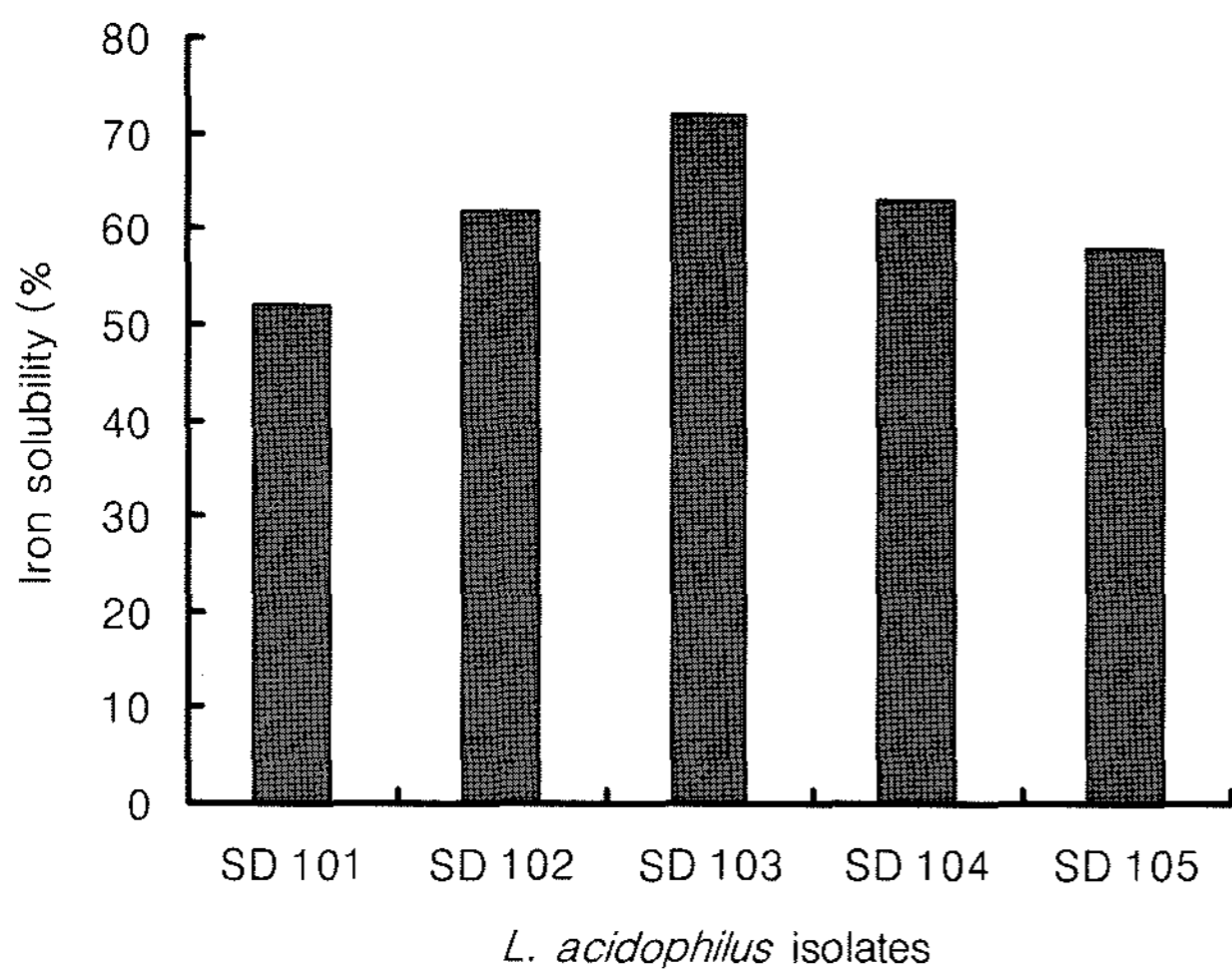


Fig. 4. Effect of peptides produced by *L. acidophilus* isolates on the iron solubility at pH 6.0. Iron solubility was measured by ICP spectrophotometer.

전반적으로 증가하는 것으로 나타났다. 모든 시험 균주들에 의해 생성된 펩타이드 첨가에 따라 50% 이상의 철분이 가용성 상태로 존재하였으며, *L. acidophilus* SD 102, SD 103 및 SD 104에 의해 생성된 펩타이드는 약 60%의 철분 가용화 효과를 나타내었고, 특히 *L. acidophilus* SD 103에 의해 생성된 펩타이드는 약 70% 이상의 철분을 가용성 상태로 존재하게 하였다. Ferrozine 방법에 의해 시험 균주들 중 pH 6.0에서의 철분 가용화능이 우수한 것으로 나타난 *L. acidophilus* SD 102, SD 103 및 SD 104에 있어 추출물이 첨가된 시료내 가용성 철분의 농도를 ICP spectrophotometer를 이용하여 측정하였으며, 결과는 Table 11에 제시된 바와 같이 *L. acidophilus* SD 103에 의해 생성된 펩타이드를 첨가하였을 때 가용성 철분의 농도가 가장 높은 것으로 확인되었다. 유단백질내 케이신의 phosphoserine 잔기에 철분이 강력하게 결합하여 십이지장내 알칼리 조건에서 용해성을 유지하게 함에 따라 철분의 흡수를 용이하게 해주며²⁶⁾ 또한 칼슘의 체내 흡수율을 증가시키는 casein phospho peptide(CPP)는 칼슘이나 철분과 같은 2가 또는 3가 양이온들과 가용성 복합체를 형성할 수 있으므로 유산균에 의

Table 11. Concentration of iron in peptide solution prepared from whey adjusted to pH 6.0 after fermentation in skim milk by *L. acidophilus* isolates

Strain	Concentration of iron (ppm) ¹⁾
Control	0.029±0.003
SD 102	2.153±0.002
SD 103	2.234±0.002
SD 104	2.214±0.003

¹⁾Each data indicates a mean of triplicate (standard deviation)

해 분해된 우유 유래 펩타이드의 이용 가능성이 매우 높다고 하였다.¹⁶⁾

초 록

본 연구는 내산성과 담즙산 내성이 뛰어나고 건강증진 효과가 우수한 *L. acidophilus*를 신생아의 분변에서 분리 및 선발하고 이들에 의한 장내 유해미생물 생육억제, 혈중 cholesterol 저하 및 과산화수소에 대한 저항성과 탈지유 발효를 통한 풍미성분 형성, ACE 저해활성, 철분가용성 증진 등에 관한 기초 지식을 확보하여 다양한 생리활성 기능을 가진 유산균을 개발하고자 실시하였다. 실험 결과 신생아(생후 2주 이내)에서 분리된 5종의 *L. acidophilus* 중 특히 *L. acidophilus* SD 105는 *Listeria* sp.에 대한 항균활성, 복합담즙산염 분해활성 및 항산화효과가 다른 시험 균주에 비해 모두 높게 나타나 그 이용성이 매우 다양할 것으로 생각된다. 또한 *L. acidophilus* SD 102는 ACE활성 억제효과가 18%로 시험균주 중에 가장 높았으며 *L. acidophilus* SD 103은 유단백질 유래 철분가용화 펩타이드 생성능이 높아 철분흡수율 증가와 연관된 probiotic 유산균으로서의 활용가능성이 있는 것으로 사료된다.

Key words: ACE 저해활성, 항균활성, 신생아분변, 철분가용성, probiotic 유산균

참고문헌

- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
- Gilliland, S. E. (1989) Acidophilus milk products: A review of potential benefits to consumers. *J. Dairy sci.* **72**, 2483-2494.
- Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B. C. (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* **11**, 1-17.
- Ostlie, H. M., Helland, M. H. and Narvhus, J. A. (2003) Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 17-27.
- Smacchi, E. and Gobetti, M. (2000) Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzyme. *Food Microbiol.* **17**, 129-141.
- Krieg, N. R. and Holt, J. G. (1994) In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.) Williams & Wilkins, Baltimore.
- Rizzo, A. F., Korkeala, H. and Mononen, H. (1987) Gas

- chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharide in the identification of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(12), 2883-2888.
8. 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**, 1514-1520.
9. 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. Ani. Sci.* **41**, 335-352.
10. Laye, I., Karleskind, D. and Morr, V. V. (1993) Chemical, Microbiological and Sensory properties of plain nonfat yogurt. *J. Food Sci.* **58**, 991-997.
11. Bassette, R. and Ward, G. (1975) Measuring parts per billion of volatile materials in milk. *J. Dairy Sci.* **58**, 428-435.
12. Dashkevicz, M. P. and Feighner, S. D. (1989) Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 11-16.
13. Kullisaar, T., Zilmer, M., Milkelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C. and Kilk, A. (2002) Two antioxidative *lactobacilli* strains as promising probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **72**, 215-224.
14. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamasaki, S. and Takano, T. (1995) Purification and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* **78**, 777-783.
15. Maruyama, S. and Suzuki, H. (1982) A peptide inhibitor of angiotensin converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1393-1399.
16. Choi, I. W., Kim, K. S., Lim, S. D. and Kim, H. S. (1997) A study on iron binding peptides from casein hydrolysates. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 1052-1056.
17. Klaenhammer, T. R. and Kleeman, E. G. (1981) Growth characteristics. Bile sensitivity and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1461-1467.
18. Kang, Y. J., Frank, J. F. and Lilard, D. A. (1988) Gas chromatographic detection of yogurt flavor compounds and changes during refrigerated storage. *Cultured Dairy Prod. J.* Nov. pp. 6-12.
19. Bottazzi, V. and Vescovo, M. (1969) Carbonyl compounds produced by yogurt bacteria. *Netherlands Milk Dairy J.* **23**, 71-77.
20. Bernet, M. F., Brassar, D., Neeser, J. R. and Servin, A. L. (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* **35**, 483-489.
21. Ahn, Y. T. (2000) A study on the reduction of cholesterol absorption in intestine by *Lactobacillus acidophilus*, Ph.D. thesis, Seoul National University, Suwon, Korea.
22. Corzo, G. and Gilliland, S. E. (1999) Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **82**, 472-480.
23. Klebanoff, S. J., Hillier, S. L., Eschenbach, D. A. and Waterdorph, A. M. (1991) Control of the microbial flora of the vaginal by hydrogen peroxide-generating *lactobacilli*. *J. Infect. Dis.* **164**, 94-100.
24. Masuda, O., Nakamura, Y. and Takano, T. (1996) Hypertensive peptide are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides spontaneously hypertensive rats. *J. Nutrition.* **126**, 3063-3067.
25. Charlton, R. W. and Bothwell, T. H. (1983) Iron absorption. *Annu. Rev. Med.* **34**, 55-59.
26. Emery, T. (1992) Iron oxidation by casein. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **182**, 1047-1052.