

원유에서 분리한 *Lactobacillus acidophilus* RMK567의 GABA 생성 및 생리적 특성

임상동* · 김기성 · 도정룡
한국식품연구원

Physiological Characteristics and GABA Production of *Lactobacillus acidophilus* RMK567 Isolated from Raw Milk

Sang-Dong Lim*, Kee-Sung Kim, and Jeong-Ryong Do
Korea Food Research Institute, Sungnam 463-746, Korea

Abstract

In order to develop a new starter for fermented milk, 2082 bacteria were isolated from raw milk. The strain that showed excellent acid forming and γ -aminobutyric acid (GABA) production (711.40 $\mu\text{g/g D.W}$) characteristics after incubation at 37°C for 18 hr was selected and identified as *Lactobacillus acidophilus* by the result of API carbohydrate fermentation pattern and 16S rDNA sequence. *L. acidophilus* RMK567 was investigated for its physiological characteristics. RMK67 strain showed good GABA production compared with commercial lactic acid bacteria. The optimum growth temperature of *L. acidophilus* RMK567 was 40°C and cultures took 15 hr to reach pH 4.3. *L. acidophilus* RMK567 showed higher sensitivity to penicillin-G, novobiocin, as compared to other 14 different antibiotics. However, it showed more resistance to kanamycin, neomycin, streptomycin. It showed higher leucine arylamidase and β -galactosidase activities compared to 16 other enzymes. It was comparatively tolerant to bile juice and able to survive at pH 2 for 3 hr. It showed resistance to *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* with rates of 29.2%, 39.1% and 51.4%, respectively. Based on these and previous results, *L. acidophilus* RMK567 could be an excellent starter culture for fermented milk with excellent GABA contents.

Key words : GABA, *Lactobacillus acidophilus*, fermented milk, physiological characteristics

서 론

GABA(γ -aminobutyric acid)는 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로 포유동물의 뇌나 척수에 존재하는 신경 전달 물질로 의약품으로는 뇌의 혈류를 개선하여 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사 향상 및 의욕저하 등의 치료제로 사용되며, brain food라고도 하며 이 외에도 연수의 혈관중추에 작용하여 항이노호르몬인 바소프레신의 분비를 억제하고 혈관을 확장시켜 혈관을 낮추는 고혈압 저하효과 및 이노효과 특히 폐경기나 갱년기 중에 발생하는 불면, 우울, 불안 등에 대한 신경안정 효과 등의 생리활성 기능이 있다(Stanton, 1963; Omori *et al.*, 1987; Okada *et al.*, 2000).

지금까지의 연구에 따르면 GABA는 건망증세 등을 나타내는 노인성 치매나 정신증상을 보이는 파킨슨병인 경우 수액중의 농도가 감소한다는 것이 밝혀졌다(Manyam *et al.*, 1980). 또 중적 발작을 보이는 간질 환자의 수액에 GABA 농도가 저하되어 있다는 사실로부터 GABA에 신경의 흥분을 억제하는 작용이 있을 것으로 추측하고 있다(大熊誠太郎 *et al.*, 1997). 더욱이 Roy 등(1991)은 기분장애나 알콜성 억울증 환자에서 수액 중 GABA 농도가 감소하고 있음을 보고하였다.

한편, GABA를 생산하는 젖산균으로는 Hanaoka(1967)가 lactobacilli의 일부 균주에서 glutamate를 탈카르복실화하여 최종산물로 GABA와 CO₂를 생성한다고 하였고, Nomura 등(1999)이 *Lactococcus lactis*에 대해 GABA를 생산하는 능력을 검사한 결과 *L. lactis* subsp. *lactis* 균주가 이 산을 생산한 반면 *L. lactis* subsp. *cremoris*는 생산하지 못하였다고 보고하였다. 農水省·畜産試験場(1997)에 따르

*Corresponding author : Sang Dong Lim, Korea Food Research Institute, Sungnam 463-746, Korea, Tel: 82-31-780-9082, Fax: 82-31-780-9160, E-mail: limsd@kfri.re.kr

면 치즈에는 통상 거의 GABA를 함유하지 않지만 GABA 생성능을 가진 젖산균을 사용하여 혈압 강하작용을 지닌 GABA의 함량을 크게 향상시킨 치즈와 동시에 유청음료를 개발하였다고 하였다.

본 연구는 GABA 생성능이 우수한 젖산균을 원유에서 분리하고 선발하여 기능성 발효유 제품의 스타터로서 적합한지 알아보기 위해 *L. acidophilus* RMK567의 생리적 특성에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

전국 가축위생시험소(경기, 경북, 전북)와 축산진흥원(제주도)에 들어와 있는 목장원유를 수거하여 Modified MRS 배지(Table 1)에 0.1mL씩 평면도말법으로 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 그런 다음, 각 균락을 Modified MRS 배지에서 순수분리하고, 노란색으로 변한 균락을 잠정적 젖산균으로 선발하였다. 선정된 균주는 Modified MRS 배지에 3회 백금이로 streaking한 후 호기 배양하여 순수 분리 하였다. 순수 분리된 균주는 10% 환원 탈지유(Difco Laboratories, USA)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하여 응고여부를 확인하였다. 양성반응을 보이며 pH 4.4에 도달하는 균주 861개를 선발하여 GABA 양을 측정하였다.

GABA 정량

가. 시료의 전처리

Zhang과 Bown(1997)의 방법에 따라 eppendorf tube에 시료 0.1 g과 methanol 400 μ L를 넣고 잘 섞은 다음 60-70°C로 예열된 water bath에서 완전 건조(약 30분 소요)시켰다. 여기에 70 mM LaCl₃ 1mL를 가하여 잘 섞고 13,600 g(10,000 rpm정도)에서 5분간 원심분리 후 상등액 700 μ L와 0.1 M KOH 160 μ L를 eppendorf tube에 가한 다음 3-

5분간 교반하였다. 다시 13,600 g에서 5분간 원심분리 후 상등액(buffer로 1/5 dilution하여 사용함) 550 μ L를 cuvette에 넣었다.

나. standard 준비 및 GABA의 정량법

GABA(mM)	0	0.005	0.01	0.02	0.05	0.1	sample	blank
① 1 mM GABA	0(mL)	0.005	0.01	0.02	0.05	0.1	0.55	0
② 0.5 M K ₄ P ₂ O ₇	0.75	0.745	0.74	0.73	0.7	0.65	0.2	0.75
③ 4 mM NADP	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
④ 2.0 units Gabase/mL	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
⑤ 20 mM α -KG	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

①②③④번을 혼합하여 340 nm에서 흡광도 측정(initial A)하고 ⑤ α -KG를 가하여 1시간 동안 실온에서 방치한 후 340 nm에서 흡광도 측정(final A)한 다음 표준곡선을 그리고, 측정된 흡광도(final A-initial A)를 대입하여 GABA량을 구하였다. 그러나 실제 GABA량은 측정된 GABA \times (100/55 \rightarrow 0.1 g에 LaCl₃ 1 mL를 가하여 700 μ L를 취하고 나중에 550 μ L를 취했으므로) \times 5(희석배수)

선정된 균주의 동정 및 DNA sequencing

분리·선정된 젖산균주는 MRS 액체배지에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등(1992)의 방법에 의하여 실시하였다. 순수 분리된 균주는 Gram 염색, 포자 생성, 호기적 및 혐기적 성장, Catalase 생성, 15°C 및 45°C에서의 성장, glucose로부터 가스 생성, arginine으로부터 ammonia 생성, 현미경 관찰과 API 50CHL kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 49종의 당 발효 실험을 실시하였다. 젖산균의 DNA sequence는 universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, Solgent EF-Taq을 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭과정은 95°C, 15분을 한 후 95°C, 20초; 50°C, 40초; 72°C, 1분30초를 30회 시행하였으며 72°C, 5분으로 마무리하였다. 서열분석은 PCR product를 Solgent PCR purification kit로 정제한 후 ABI 3730XL DNA sequencer로 자동분석 하였다.

젖산균의 성장

젖산균의 생장은 생균수, pH를 측정하여 실험하였다. 생균수는 10% 환원탈지유 200 mL에 젖산균을 50 μ L (9.6 \times 10⁵/mL) 접종한 후 34°C, 37°C, 40°C에서 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에 부어 균현 후 37°C에서 48시간 배양하여 계수하였다.

Table 1. Composition of modified MRS agar

Component	gram/liter
Proteose Peptone #3	10.0
Beef Extract	10.0
Yeast Extract	5.0
Lactose	20.0
Tween 80	1.0
Ammonium Citrate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Magnesium Sulfate	0.1
Manganese Sulfate	0.05
Dipotassium Phosphate	2.0
Sodium Azide	0.25
Bromocresol purple	0.04
Agar	15.0

젖산균의 단백질 분해

10% 환원탈지유를 90°C에서 30분간 살균하여 단백질 분해력 측정배지로 사용하였다. MRS 액체배지에서 18시간 배양된 균주를 1% 접종하고 37°C에 배양하면서 0, 16시간의 시료를 채취하였다. Hull(1947)의 방법에 따라 시료 5 mL를 취하여 0.72N trichloroacetic acid 10mL와 섞어 흔든 후 10분간 정치한 다음 whatman No. 42 여과지에 여과된 시료를 다시 5 mL 취하여 sodium carbonate-sodium tetraphosphate solution 10 mL와 잘 섞은 다음 phenol reagent 3mL를 다시 섞어서 5분 동안 잘 흔들어 청색 발색시킨 후 spectrophotometer(Hitachi model 200-20, Japan)를 이용하여 650 nm에서 측정한 값을 미리 만들어진 tyrosine standard의 값으로 환산하여 값을 구하였다. Tyrosine standard curve의 일차식은 $y=0.9664x+0.02107$ 이며 R^2 는 0.9893으로 나타났다.

항생제 내성

항생제 내성 시험은 Tryptic soy broth(Difco, USA)를 사용하여 2배 희석방법에 의해 16종의 항생제에 대한 *L. acidophilus* RMK567의 최소 생육 저해 농도(MIC, minimal inhibitory concentration) 값으로 측정하였다.

효소활성

효소활성 실험은 MRS 액체배지에서 37°C, 18시간동안 배양한 균주를 생리식염수로 희석하여 10^5 - 10^6 CFU/mL 수준의 시료를 조제한 후 API ZYM kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 37°C에서 5시간 배양한 다음 효소반응 시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0-5의 수치로 나타내었다.

담즙내성

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 따라 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 후 liquid paraffin oil을 증충한 다음 MRS액체배지에서 37°C, 18시간 배양하였다. 배양된 균주를 0.3% oxgall이 첨가된 MRS 액체배지와 첨가되지 않은 MRS 액체배지에 각각 1% 접종하여 37°C에서 시간별로 anaerobic jar에서 혐기조건으로 배양하여 OD₆₂₀값을 측정하였다.

pH 내성

Clark 등(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 2, 3, 4용액과 대조구로서 pH 6.4용액을 제조하였고, 제조된 pH용액 10mL에 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에서 37°C, 24시간 배양된 각각의 균주 1 mL씩을 섞은 후 37°C에서 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 37°C, 48시간 혐기배양한 다음 계수하였다.

항균력

Gilliland와 Speck(1977)의 방법에 따라 *L. acidophilus* RMK567의 항균력 실험을 하였으며, 사용한 지시균은 병원성균(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*)이다.

결과 및 고찰

젖산균의 분리 및 선발

전국 가축위생시험소(경기, 경북, 전북)와 축산진흥원(제주도)에 들어와 있는 목장별 원유를 멸균된 peptone용액으로 단계희석하고, Modified MRS 배지를 사용하여 노란색 집락을 형성하는 2,082개의 단일 균락을 분리하였고 잡

Table 2. pH and GABA content produced after incubation at 37°C for 18hr in the 10% reconstituted skim milk added 1% monosodium glutamate and 1% lactic acid bacteria

Strains	Source	pH	GABA ($\mu\text{g/g D.W}$)
<i>L. acidophilus</i> ¹⁾	NCFM, Rhone-poulenc	4.21	32.50±0.89
<i>L. acidophilus</i> ¹⁾	Culture systems. Inc.	4.53	22.65±1.75
<i>Streptococcus thermophilus</i> ¹⁾	Culture Systems. Inc.	4.32	30.53±2.50
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	ATCC 21053	5.81	5.91±1.21
<i>L. lactis</i>	ARRL B-633	6.07	9.85±1.37
<i>L. diacetylactis</i>	NRRL B-2356	4.75	6.89±0.41
<i>L. casei</i>	ATCC 393	5.44	5.91±0.45
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 11506, IFO 3205	5.45	5.91±0.54
<i>L. cremoris</i>	KFRI 00349	5.66	3.94±0.34
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i>	ATCC 7830, IFO 3376	5.30	5.94±0.28
<i>L. bulgaricus</i>	ATCC 33409	5.30	8.86±0.62
<i>L. amylophilus</i>	NRRL B-4437	6.07	5.91±0.26
<i>L. reuteri</i>	KFRI 00661	5.84	10.83±0.83
RMK 567 strain isolated from raw milk		4.30	711.40±17.06

¹⁾Commercial lactic acid bacteria.

정적으로 젖산균이라 추정하였다. 순수 분리된 균주는 10% 환원 탈지유에 접종하고 37°C에서 18시간 배양한 후 응고여부를 확인하였다. 양성반응을 보이며 pH 4.4에 도달하는 균주 861개를 선발하였다.

GABA 생성균주 선발

원유에서 분리된 젖산균을 대상으로 monosodium glutamate 1%가 첨가된 10% 환원탈지유에 37°C에서 18시간 배양한 후 GABA 양이 711.40 µg/g D.W을 생산하는 균주를 선발하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 분리된 젖산균 RMK567 균주와 상업균주와의 GABA 함량을 비교한 결과, 상업균주의 경우 대부분이 5-30 µg/g D.W을 나타내었고, 또한 Park과 Oh(2005)에 따르면 쌀요구르트의 GABA 함량이 137.17 µg/g D.W인 것에 비교해서도 RMK567 균주가 GABA 생성능이 매우 우수하였다.

선발된 젖산균의 동정 및 DNA sequence

선발된 RMK567의 genus와 species를 결정하기 위하여 생리적, 생화학적 시험을 하였다. 선발된 RMK567은 Gram 양성을 나타내었고 현미경으로 관찰 시 rod 형태의 동중 발효균이며, 산소유무와 상관없이 잘 성장하였고, catalase와 운동성은 음성으로 나타났다. 45°C에서 성장하는 반면 15°C에서는 성장하지 않았으며, glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니아를 생성하지 않아 genus *Lactobacillus*에 속하였다. Species를 정하기 위하여 API 50CHL kit(Bio-Mereux, France)를 이용하여 49종의 당 발효 시험을 실시한 결과(Table 3) RMK567은 lactose 등 18종으로부터 산을 생성하였다. 그 결과를 ATB identification system에 입력한 결과 *Lactobacillus acidophilus*로 판명되었으며, 16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열분석 하였다(Fig. 1). 분석된 염기서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과 *L. acidophilus*(I.D. 100%)으로 동정되어 *Lactobacillus acidophilus* RMK567로 명명하였다.

L. acidophilus RMK567의 생장

Fig. 2에서 보는 바와 같이 *L. acidophilus* RMK567의 최적 생장온도를 알기 위하여 10% 환원탈지유 200mL에 젖산균을 50 µL(9.6×10^5 /mL) 접종한 후 온도별로 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 결과 40°C에서 가장 빠른 생장률을 보였다. Fig. 3은 24시간까지의 pH 변화를 나타낸 것으로 34°C 및 37°C에 비해 40°C가 가장 빠른 산 생성을 보였으며, 이 때 발효유의 최적 pH 조건인 pH 4.3에 도달하는데 15시간 소요되었다. Shin 등(1999)에 따르면 *Lactobacillus acidophilus* KY 2104를 우유배지에 10^6 CFU/mL 정도 접종, 배양했을 때 24시간이 지난 후 5.0×10^8 CFU/mL였으며, 이 때 pH가 4.1이었다고 한 결과보다 약

Table 3. Physiological characteristics of *L. acidophilus* RMK567

Gram reaction			+
Cell type			rod
Spore forming			-
Motility			-
Aerobic growth			+
Anaerobic growth			+
Catalase reaction			-
Growth at 15°C			-
Growth at 45°C			+
Gas forming from glucose			-
Ammonia production from arginine			-
Acid production from			
Glycerol	-	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	-	Lactose	+
Ribose	-	Melibiose	-
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-D-Xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-glucose	+	Starch	+
D-Fructose	+	Glycogen	+
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-turanose	-
Dulcitol	-	D-lyxose	-
Inositol	-	D-tagatose	-
Mannitol	-	D-fucose	-
Sorbitol	-	L-fucose	-
α-Methyl-D-Mannoside	-	D-arabitol	-
α-Methyl-D-Glucoside	-	L-arabitol	-
N acetyl glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	+	2-keto-gluconate	+
Arbutin	+	5-keto-gluconate	-
Esculin	+		

간 산 생성이 높은 결과를 보였다.

L. acidophilus RMK567의 단백질 분해

MRS 액체배지에서 18시간 배양된 *L. acidophilus* RMK567 1%를 10% 환원탈지유에 접종하고 37°C에 배양하면서 16시간 후 시료를 채취하여 시료의 흡광도를 표준곡선에 대입하여 tyrosine 농도를 구한 결과 0시간일 때 0.553 ± 0.0022 mg에서 16시간 경과 후 0.810 ± 0.068 mg을 나타내었는데, 이는 Lim 등(1996)이 *Lactococcus lactis*로 연구한 결과 0.11 mg이라고 보고한 결과에 비해 단백질 분해력이 높았다. Table 5에서 보면 trypsin이나 chymotrypsin의 활성은 없지만 protease가 단백질을 분해하지 않았으나 사료되었다.

```

Query: 2      cttagacggctcctcccgaaggtaggccaccggcttgggcattgcagacttccatgg 61
             |||
Sbjct: 1452  cttagacggctcctcccgaaggtaggccaccggcttgggcattgcagacttccatgg 1393
Query: 62      tgtgacgggCGGTgtgtacaaggcccgggaacgtattcaccgCGGCGTtctgatccgCGA 121
             |||
Sbjct: 1392  tgtgacgggCGGTgtgtacaaggcccgggaacgtattcaccgCGGCGTtctgatccgCGA 1333
Query: 122     ttactagcgattccagcttCGTgcagtcgagttgcagactgcagtcCGAactgagaacag 181
             |||
Sbjct: 1332  ttactagcgattccagcttCGTgcagtcgagttgcagactgcagtcCGAactgagaacag 1273
Query: 182     ctttcagagattCGcttgccttcgaggctCGcttctCGttgactgcccattgtagcac 241
             |||
Sbjct: 1272  ctttcagagattCGcttgccttcgaggctCGcttctCGttgactgcccattgtagcac 1213
Query: 242     gtgtgtagcccaggtcataaggggcatgatgacttgacgtcatccccaccttctccggt 301
             |||
Sbjct: 1212  gtgtgtagcccaggtcataaggggcatgatgacttgacgtcatccccaccttctccggt 1153
Query: 302     ttgtcaccggcagTctcattagagtGCCAacttaatgctggCAactaataataagggtt 361
             |||
Sbjct: 1152  ttgtcaccggcagTctcattagagtGCCAacttaatgctggCAactaataataagggtt 1093
Query: 362     gcgctCGTtgcgggactaaccCAacatctcagcagacgagctgacgacagccatgcacc 421
             |||
Sbjct: 1092  gcgctCGTtgcgggactaaccCAacatctcagcagacgagctgacgacagccatgcacc 1033
Query: 422     acctgtcttagcgtccccgaagggaactcctaactctcttaggatggcactagatgtcaag 481
             |||
Sbjct: 1032  acctgtcttagcgtccccgaagggaactcctaactctcttaggatggcactagatgtcaag 973
Query: 482     acctggaaggTtcttcgCGttgcttCGaattaaccacatgctccaccgcttGTgCGGG 541
             |||
Sbjct: 972   acctggaaggTtcttcgCGttgcttCGaattaaccacatgctccaccgcttGTgCGGG 913
Query: 542     cccccgTcaattccttgagttcaaccttgcggtCGtactcccaggCGgagtgcttaa 601
             |||
Sbjct: 912   cccccgTcaattccttgagttcaaccttgcggtCGtactcccaggCGgagtgcttaa 853
Query: 602     tgcgttagctgcagcactgagaggCGgaacctccaacacttagcactcatcgTTtAcg 661
             |||
Sbjct: 852   tgcgttagctgcagcactgagaggCGgaacctccaacacttagcactcatcgTTtAcg 793
Query: 662     gcatggactaccagggtatctaactctgttCGctaccatgcttCGagcctcagCGtca 721
             |||
Sbjct: 792   gcatggactaccagggtatctaactctgttCGctaccatgcttCGagcctcagCGtca 733
Query: 722     gttgcagaccagagagccgccttcgCCactggTtcttccatatactacgcattccac 781
             |||
Sbjct: 732   gttgcagaccagagagccgccttcgCCactggTtcttccatatactacgcattccac 673
Query: 782     cgctacacatggagTtccactctccttctgCactcaagaaaaacagTtccgagTca 841
             |||
Sbjct: 672   cgctacacatggagTtccactctccttctgCactcaagaaaaacagTtccgagTca 613
Query: 842     ttctcggTtaagccgagggttccacatcagacttattcttccgCctgCGctCGcttTa 901
             |||
Sbjct: 612   ttctcggTtaagccgagggttccacatcagacttattcttccgCctgCGctCGcttTa 553
Query: 902     cgcccaataaatccggacaacgcttGCCacctacgtattaccgCGgctgctggcagctag 961
             |||
Sbjct: 552   cgcccaataaatccggacaacgcttGCCacctacgtattaccgCGgctgctggcagctag 493

```

Fig. 1. A comparison of 16S rDNA partial sequences of the isolated RMK567 with *L. acidophilus*. Query means RMK567 isolate and sbjct means *L. acidophilus*.

```

Query: 962   ttagccgtgactttctggttgattaccgtcaaataaaggccagttactacctctatcctt 1021
            |||
Sbjct: 492   ttagccgtgactttctggttgattaccgtcaaataaaggccagttactacctctatcctt 433
Query: 1022  cttaccaacaacagagctttacgatccgaaaccttcttactcacgcgcggttgctcc 1081
            |||
Sbjct: 432   cttaccaacaacagagctttacgatccgaaaccttcttactcacgcgcggttgctcc 373
Query: 1082  atcagacttgcgtccattgtggaagattccctactgctgcctcccgtaggagttgggcc 1141
            |||
Sbjct: 372   atcagacttgcgtccattgtggaagattccctactgctgcctcccgtaggagttgggcc 313
Query: 1142  gtgtctcagtcaccaatgtggccggtcagttctcaactcggctatgcatcattgccttg 1201
            |||
Sbjct: 312   gtgtctcagtcaccaatgtggccggtcagttctcaactcggctatgcatcattgccttg 253
Query: 1202  taagccgttaccttaccactagctaatgcaccgcggggcatcccatagcgacagctta 1261
            |||
Sbjct: 252   taagccgttaccttaccactagctaatgcaccgcggggcatcccatagcgacagctta 193
Query: 1262  cgccgcctttataagctgatcatgcatgctgttattatccggtattagcacctggtt 1321
            |||
Sbjct: 192   cgccgcctttataagctgatcatgcatgctgttattatccggtattagcacctggtt 133
Query: 1322  ccaagtggatcctagactatggggcaggttcccacgtgttactacccatccgccgct 1381
            |||
Sbjct: 132   ccaagtggatcctagactatggggcaggttcccacgtgttactacccatccgccgct 73
Query: 1382  cgcgctcccagcgctcattaccgaagtaaactctgctggttctgctcgctcgacttgc 1441
            |||
Sbjct: 72    cgcgctcccagcgctcattaccgaagtaaactctgctggttctgctcgctcgacttgc 13
Query: 1442  at 1443                                     1501
            ||
Sbjct: 12   at 11
    
```

Fig. 1. Continued.

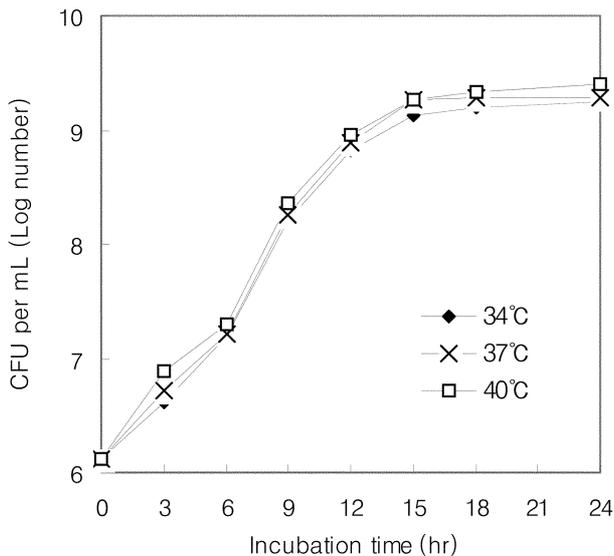


Fig. 2. Growth of *L. acidophilus* RMK567 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

L. acidophilus RMK567의 항생제 내성

치료 목적으로 섭취된 항생제에 의해서 프로바이오틱 균

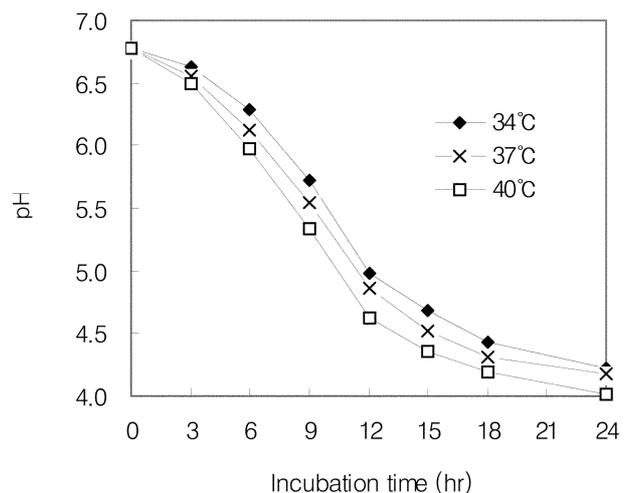


Fig. 3. pH change of 10% reconstituted skim milk during the growth of *L. acidophilus* RMK567 at various temperatures.

추가 사멸될 경우에 생체 내에서의 기능성이 낮아지게 되는데, 이러한 측면에서 항생제에 대한 내성은 매우 중요한 요소로 인식되고 있는 실정이다. 따라서 시중에서 이

Table 4. Antibiotics susceptibility of *L. acidophilus* RMK567

Antimicrobial Agents	Minimal inhibitory concentrations ($\mu\text{g/mL}$)
Aminoglycosides	
Amikacin	160
Gentamycin	160
Kanamycin	1600
Neomycin	1600
Streptomycin*	1600
β -lactams	
Penicillin-G*	20
Methicillin	160
Oxacillin	120
Ampicillin	640
Gram-positive spectrum	
Bacitracin*	50
Rifampicin	120
Novobiocin	30
Lincomycin	400
Gram-negative spectrum	
Polymyxin B*	600
Broad spectrum	
Chloramphenicol	80
Vancomycin*	400

*units/mL.

용되고 있는 총 16가지의 항생제에 대해 *L. acidophilus* RMK567 균주가 내성이 있는지를 Table 4에 나타내었다.

Park 등(1996)에 따르면 *Lactobacillus* 속 균주에 대한 항생제 내성 실험에서 ampicillin은 $0.37 \mu\text{g/mL}$, rifampicin은 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 로 감수성을 나타내었다. 또한 Kim 등(2003)의 연구에 따르면 *Lactobacillus plantarum* KCTC3099에 대한 항생제 내성 실험에서 ampicillin은 $<1 \mu\text{g/mL}$, streptomycin은 $<0.25 \mu\text{g/mL}$, gentamycin은 $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, vancomycin은 $<32 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타내었다고 보고된 반면, 본 연구에서 분리한 *L. acidophilus* RMK567 균주는 ampicillin은 $640 \mu\text{g/mL}$, rifampicin은 $120 \mu\text{g/mL}$, streptomycin은 $1,600 \mu\text{g/mL}$, gentamycin은 $160 \mu\text{g/mL}$ 특히, vancomycin에 대한 항생제 내성의 MIC 농도는 $400 \mu\text{g/mL}$ 으로 *L. plantarum* KCTC3099와 비교했을 때 높은 내성을 나타내었다.

L. acidophilus RMK567의 효소활성

L. acidophilus RMK567의 효소활성 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. Leucine arylamidase와 β -galactosidase는 4를 나타내 효소활성이 높게 나타났으며, β -glucosidase에 대해서도 3을 나타냄으로써 비교적 높은 효소활성을 보였다. 특히, 유당을 glucose와 galactose로 분해시키는 유당 분해효소인 β -galactosidase가 4를 나타냄으로써 젖산균으로 적합하였다. 또한 benzopyrene을 발암성 물질로 전환

Table 5. Enzyme patterns of *L. acidophilus* RMK567

Enzymes	<i>L. acidophilus</i> RMK567
Alkaline phosphatase	0
Esterase(C4)	1
Esterase lipase(C8)	0
Lipase(C14)	0
Leucine arylamidase	4
Valine arylamidase	1
Cystine arylamidase	1
Trypsin	0
Chymotrypsin	0
Acid phosphatase	2
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	0
α -galactosidase	0
β -galactosidase	4
β -glucuronidase	1
α -glucosidase	1
β -glucosidase	3
N-acetyl- β -glucosaminidase	0
α -mannosidase	0
α -fucosidase	0

*A value ranging from 0 to 5 is assigned to the standard color, Zero represents a negative; 5 represent a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength; 1 corresponds to the liberation of 5 nanomoles, 2 to 10 nanomoles, 3 to 20 nanomoles, 4 to 30 nanomoles and 5 to 40 nanomoles or more.

시키는 발암효소인 β -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 1로 나타나 비교적 안전한 젖산균임을 알 수가 있었다. Shin 등(1999)의 연구에서도 *L. acidophilus* KY 2104의 효소활성이 β -galactosidase에 대해서는 5를 나타내었고, β -glucuronidase에 대해서는 0으로 안전성을 보인 결과와 유사하였다.

L. acidophilus RMK567의 담즙내성

담즙에 대한 *L. acidophilus* RMK567의 내성결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 7시간 동안 배양 후에 O.D.값이 0.3% oxgall을 첨가하지 않았을 때는 1.511, 0.3% oxgall을 첨가하였을 때는 1.127로 약간 억제력을 받기는 하나 담즙 내성이 있는 것으로 나타났다. Shin 등(1999)에 따르면 *L. acidophilus* KY 2104의 담즙농도별 내성 변화를 측정 한 결과, 0.3% oxgall 농도까지 아무런 억제 현상이 없었다고 보고한 결과와 유사하였다.

L. acidophilus RMK567의 pH 내성

유산균 미생물체로서 충분한 기능을 발휘하기 위해서는 pH 3 이하의 낮은 pH 조건의 위장관을 통과하여 소장내로 도달하여 생존하여야만 한다(Booth, 1985; McDonald *et al.*, 1990). 산에 대한 *L. acidophilus* RMK567의 내성 결

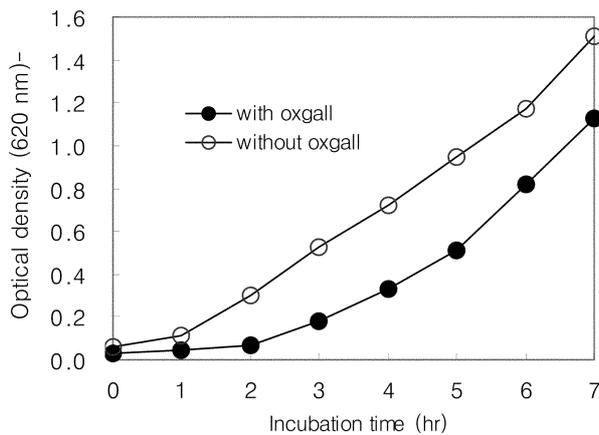


Fig. 4. Growth of *L. acidophilus* RMK567 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

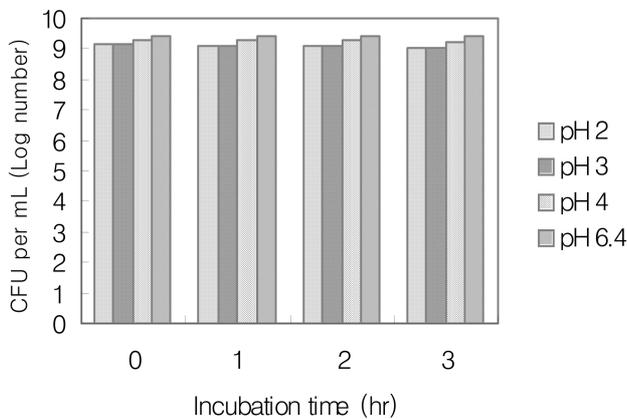


Fig. 5. Survival of *L. acidophilus* RMK567 after 3 hrs in HCl solution (pH 2, 3, 4, and 6.4).

과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 대조구인 pH 6.4의 균수와 비교한 결과 pH 2와 3에서는 생존의 변화가 거의 없어 pH에 대한 내성이 있음을 보였다. 이는 Shin 등(1999)에 따르면 pH 3.0의 조건에서 2시간동안 *L. acidophilus* KY 2104가 처음 접종 농도의 100%까지 생존하는 것으로 나타났으며, pH 2.0에서는 10^7 CFU/mL에서 1.2×10^4 CFU/mL으로 감소하였다는 결과보다는 우수하였으며, Park 등(2003)이 *L. acidophilus* KY 1909균주를 pH 2.5의 조건에서 1시간동안 처리한 후 6.8×10^7 CFU/mL에서 6.5×10^7 CFU/mL으로 나타났다는 결과와 유사하였다.

L. acidophilus RMK567의 항균력

L. acidophilus RMK567이 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 6과 같다. *L. acidophilus* RMK567은 식중독균에 대해 항균력이 우수한 것으로 나타났는데, *Escherichia coli*에 대해 29.2%, *Salmonella typhimurium*에 대해 39.1%, *Staphylococcus aureus*에 대해서 51.4%의 항균력을 보였다. 배양 후 pH의 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH 6.65-6.68이며, 혼합배양액은 pH 4.93-5.04이었다. 이는 *L. acidophilus* RMK567과 식중독균의 혼합배양과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 있는 것으로 사료되며, Shin 등(1999)에 따르면 *L. acidophilus* KY 2104와 *S. typhimurium*, *S. aureus*의 생장이 급격하게 감소하여 5 log viable cells 이상 억제율이 나타났으며, *E. coli*의 경우도 2 log viable cells 정도의 성장억제율을 보였다는 결과와 비교할 때 우수한 결과를 보였다.

요 약

본 연구는 국내 각 지역의 목장에서 수거한 원유에서 분리된 젖산균을 대상으로 monosodium glutamate 1%가 첨가된 10% 환원탈지유에 37°C에서 18시간 배양한 후 GABA 양이 711.40 µg/g D.W을 생산하는 우수한 균주를 선별하였다. 선정된 균은 Gram 양성, rod형태의 동종발효 균이며, 당 발효실험과 16S rDNA 분석결과 *Lactobacillus acidophilus*로 판명되었고, *L. acidophilus* RMK567로 명명하였다. 발효유에 적합한 starter인지 확인하기 위해 생리적 특성을 조사하였다. *L. acidophilus* RMK567은 배양온도 40°C에서 빠른 성장을 보였고, pH 4.3에 도달하는데 15시간이 소요되었다. 16종의 항생제 중 kanamycin, neomycin, streptomycin에 대해 내성이 높았으며, 효소활성실험에서 leucine arylamidase와 β-galactosidase의 활성도가 높았다. 담즙 첨가시 약간의 영향을 받았으나 담즙에 대한 내성이 있는 것으로 나타났으며, pH 내성 실험결과 pH 2에서 큰 변화가 없음에 따라 내산성이 있었다. 항균력 시험에서는 *Escherichia coli*에 대해 29.2%, *Salmonella typhimurium*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 39.1%, 51.4%의 억제력을 보였다. 이러한 결과를 토대로 GABA 생성능이 우

Table 6. Inhibition of pathogens by *L. acidophilus* RMK567 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>L. acidophilus</i> RMK567* + Pathogens		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.8×10^7	6.65	1.3×10^7	5.04	29.21
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.3×10^7	6.65	7.8×10^6	4.93	39.06
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.5×10^7	6.68	1.2×10^7	4.98	51.40

* Initial count of *L. acidophilus* RMK567 : 1.32×10^6 CFU/mL.

^a Determined after 6 hr incubation at 37°C.

수한 기능성 발효유 제품의 스타터로 *L. acidophilus* RMK567은 적합하다고 할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어졌으며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Booth, I. R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359-378.
- 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. *Cultured Dairy Products J.* **28**, 11-14.
- Gilliland, S. E. and Speck, M. L. (1977) Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.* **40**, 820-823.
- Gilliland, S. E. and Walker, D. K. (1990) Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.* **73**, 905-911.
- Hammes, W. P., Weiss, N., and Holzapfel, W. (1992) The Genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. In *The prokaryotes*. 2nd Edition. Springer-Verlag. New York. pp. 1563-1578.
- Hanaoka, Y. (1967) Studies on preservation of soy sauce. (VI) Enzymatic decomposition of L-aspartic acid in soy sauce by *Lactobacilli*. *Hakkokogaku.* **45**, 312-319.
- 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.
- Kim, E. R., Jung, B. M., Kim, J. Y., Kim, S. Y., Jung, H. K., Lee, H. J., and Chun, H. N. (2003) Basic physiological activities of *Bifidobacterium infantis* Maeil-K9 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3099 selected by anticarcinogenic activities. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 348-354.
- Lim, S. D., Kim, H. S., Kim, K. S., Choi, I. W., Jin, Y. S., and Kim, H. U. (1996) A study on biochemical and physiological characteristics of *Lactobacillus pentosus* LSDM isolated from Kimchi. *Korean J. Dairy Sci.* **18**, 41-52.
- Manyam, N. V., Katz, L., Hare, T. A., Gerber, J. C., and Grossman, M. H. (1980) Levels of gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid in various neurologic disorders. *Arch. Neurol.* **37**, 352-355.
- McDonald, L. C., Fleming, H. P., and Hassan, H. M. (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2124-2128.
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., and Suzuki, I. (1999) Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 163-166.
- Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., and Takahashi, R. (2000) Effect of Defatted Rice Germ Enriched with GABA for Sleeplessness, Depression, Autonomic Disorder by Oral Administration. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **47**, 596-603.
- Omori, M., Yano, T., Okamoto, J., Tsushida, T., Murai, T., and Higuchi, M. (1987) Effect of anaerobically treated tea (gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **61**, 1449-1451.
- Park, J. G., Yun, S. Y., Oh, S. J., Shin, J. G., and Baek, Y. J. (2003) Probiotic Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 isolated from Korean breast-fed infant. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**, 1244-1247.
- Park, K. B. and Oh, S. H. (2005) Production and Characterization of GABA Rice Yogurt. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 518-522.
- 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.
- Roy, A., DeJong, J., Lamparski, D., George, T., and Linnoila, M. (1991) Depression among alcoholics. Relationship to clinical and cerebrospinal fluid variables. *Arch. Gen. Psychiatry.* **48**, 428-432.
- Shin, M. S., Kim, H. M., Kim, G. T., Hur, C. S., Bae, H. S., and Baek, Y. J. (1999) Selection and Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean feces. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 495-501.
- Stanton, H. C. (1963) Mode of action of gamma aminobutyric acid on the cardiovascular system. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **143**, 195-200.
- Zhang, G. and Bown, A. W. (1997) The rapid determination of gamma aminobutyric acid. *Phytochem.* **44**, 1007-1009.
- 農水省・畜産試験場. 日本化学工業日報. 1997. 6. 19日号.
- 大態誠太郎・桂昌司・廣内雅明. 1997. 神経精神薬理別冊「ニューロトランスミッタ」 **19**, 167.

(Received 2008.10.2/Revised 2008.12.19/
Accepted 2008.12.24)