

잠재적 생균제로서 식물 젖산균의 분리 및 특성

김정도¹ · 박성보¹ · 이나리¹ · 정진하¹ · 이희섭² · 황대연¹ · 이종섭³ · 정성윤⁴ · 손흥주^{1*}

¹부산대학교 생명자원과학대학, ²부산대학교 식품영양학과,

³밀양 산동농협, ⁴대구가톨릭대 의생명과학과

Received : July 26, 2011/ Revised : September 3, 2011/ Accepted : September 4, 2011

Isolation and Characterization of Plant-Derived Lactic Acid Bacteria as Potential Probiotic. Kim, Jeong-Do¹, Sung-Bo Park¹, Na-Ri Lee¹, Jin-Ha Jeong¹, Hee-Seob Lee², Dae-Youn Hwang¹, Jong-Sup Lee³, Seong-Yun Jeong⁴, and Hong-Joo Son^{1*}. ¹College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea, ²Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, ³Sandong Processing Plant, Nonghyup, Miryang 627-706, Korea, ⁴Department of Medical Life Science, Catholic University of Daegu, Daegu 712-784, Korea – Plant lactic acid bacteria were isolated from plant-associated fermentative foods and crops, and their probiotic properties were investigated. Isolates K27 and O2 were isolated from *Kimchi* and onion, and identified as *Lactobacillus plantarum* on the basis of 16S rRNA gene analysis. The two strains were highly resistant to acid (an MRS broth at pH 2.5), where the survival rates of *L. plantarum* K27 and *L. plantarum* O2 were 90.2% and 97.3%, respectively. *L. plantarum* K27 and *L. plantarum* O2 also showed high bile resistance to 0.5% oxgall, with a more than 70% survival rate. They showed an inhibitory effect against pathogenic strains of *Escherichia coli* KCCM 40880 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. The antibacterial effect of the two strains was probably due to the presence of lactic acid. ACE inhibitory activities of the two strains ranged from 72.8% to 80.6% in MRS broth. Notably, the two strains showed high ACE inhibitory activity (89.2~98.2%) in MRS broth containing 10% skim milk. Antioxidant activity was tested by DPPH radical scavenging activity, with antioxidant activities of the strains being in the range of 56.8~61.5%. The results obtained in this study suggest that *L. plantarum* K27 and *L. plantarum* O2 may be potential probiotic starter cultures with applications with fermentative products.

Key words: Acid tolerance, bile tolerance, lactic acid bacteria, probiotic, starter

1906년 러시아의 생물학자인 Elie Metchnikoff가 ‘The prolongation of life’라는 논문을 통해서 젖산균 발효유 섭취가 사람 장의 부패를 방지하여 노화를 억제한다고 주장한 이후, 젖산균 및 젖산균 발효식품에 대한 연구가 전 세계적으로 활발하게 진행되었다. 젖산균은 오랜 세월동안 산업적으로 이용되어 온 중요한 세균의 하나로서, 요거트, 치즈, 버터 등의 유제품, 발효소시지 등의 육제품뿐 만 아니라[9] 우리나라의 김치류, 장류, 젓갈 등 자연발효식품에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 젖산균은 장내 이상발효의 개선, 장내 부패세균의 억제, 항암, 항균, 면역증강, 혈중 콜레스테롤 저하능 등[6]이 있는 것으로 보고되어 젖산균의 활용에 대한 인식이 재평가되고 있으며, 동시에 기능성 식품의 starter 및 probiotic으로서의 활용에 대한 연구가 진행되고 있다[10].

Probiotic이나 발효식품의 starter로서 젖산균은 내산성, 담즙내성이 있어 사람의 위장환경에서 높은 생존율을 나타내어야 하며, 유해 미생물 생육억제 작용이 있어야 한다[22]. 지금까지 이들에 대한 연구는 발효 유제품 및 육제품, 사람의 분변에서 분리된 동물성 젖산균들을 대상으로 한 것들이 대부분이며[22], 식물성 젖산균에 대한 연구는 미진한 실정이다. 식물성 젖산균은 채소, 과일, 곡물이나 식물발효식품 등 식물소재에서 유래된 젖산균을 말하며, 곡물이나 채식을 주식으로 하는 동양인의 위장에 동물성 젖산균보다 더 적합한 것으로 보고되어 있다[3]. 최근에는 김치 발효에 관여하는 젖산균에 대한 다양한 연구[5, 14, 16]가 수행되고 있으나 자연 상태의 식물로부터 젖산균을 분리하고 그 특성을 조사한 연구는 그렇게 많지 않다.

젖산균을 이용한 발효제품의 건강 기능성을 증진시키기 위해서는 앞에서 언급한 내산성, 담즙내성 및 항균능 등의 기본적인 조건 외에 새로운 기능을 지닌 젖산균을 분리하여 이용하는 것을 생각할 수 있다. 한편 맥문동(*Liriope platyphylla*)은 기침, 가래 등 질병 치료제로서 전통적으로 사용되어 온

*Corresponding author

Tel: +82-55-350-5544, Fax: +82-55-350-5549

E-mail: shjoo@pusan.ac.kr

항산화자원이다. 본 연구는 미생물 발효를 통하여 맥문동에 항산화능 및 항고혈압능 등 새로운 생리활성을 부여 및 보강하고, 손쉽게 음용할 수 있는 음료 제조를 최종 목표로 설정되었다. 따라서 먼저 다양한 식물 및 식물발효식품으로부터 내산성 및 담즙내성이 있으며, 또한 항산화능과 항고혈압 활성인 angiotensin-converting enzyme(ACE) 저해능이 있는 식물성 젖산균을 분리하여 그 특성을 조사하였다.

다양한 농작물(양파, 오이, 호박, 맥문동 등)과 발효식품(가정에서 제조된 된장, 김치, 채소절임, 동동주 등)을 수집한 후, 멸균된 생리적 식염수 90 mL에 10 g을 첨가하였다. Homogenizer를 이용하여 시료를 파쇄 및 계단회석한 후, 희석된 각 시료를 MRS 평판배지(0.5% CaCO₃ 함유)에 도말하였다. 37°C에서 48시간 동안 배양한 후, 콜로니 주위에 투명환을 생성하는 균주들을 선정하여 순수분리하였다. 실험균주의 동정은 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 수행하였다. 16S rRNA 유전자 증폭에 사용된 primers는 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') primer와 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACG ACTT-3') primer이었다[13]. 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정한 후, NCBI GenBank의 database를 통하여 유사균주들과 비교하였다. 또한 염기서열을 Clustal X program[26]을 이용하여 정렬한 후, neighbor-joining method[23]에 의거하여 실험균주의 계통분류학적 위치를 조사하였다.

실험균주의 내산성 및 담즙내성은 Kobayashi 등[12]의 방법에 따라 조사하였다. 실험균주는 MRS broth(pH 6.8)에서 37°C, 24시간 동안 전배양하였다. Pepsin 0.3%가 첨가된 MRS broth의 pH를 각각 2.5 및 3.0으로 조정된 것과 oxgall이 각각 0.1%, 0.3% 및 0.5% 첨가된 MRS broth에 실험균주를 접종하여 37°C에서 배양하였다. 내산성 실험은 3시간 동안 배양하여 생균수를, 담즙내성 실험은 12시간 및 24시간 동안 배양 후, 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Pepsin 또는 oxgall이 첨가되지 않은 MRS broth(pH 6.8)를 대조군으로 하여 생균수 또는 600 nm에서의 흡광도를 비교한 후, 백분율로 내산성과 담즙내성을 나타내었다.

실험균주의 항균능은 agar-well diffusion법[11]을 이용하여 조사하였다. 실험균주를 MRS broth에서 48시간동안 배양한 후, 10000 g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 상등액의 pH를 조정하지 않은 것과 6.8로 조정된 것을 시료로 사용하였다. 피검균주인 *Escherichia coli* KCCM 40880, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 및 *Listeria monocytogenes* KCCM 40307 등을 BHI 평판배지에 도말하고, 직경 0.8 mm의 구멍을 뚫은 후, 시료 200 µL를 분주하였다. 37°C에서 24시간 동안 배양하여 생육 저지대의 직경을 측정하였다.

실험균주의 항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능을 조사하여 평가하였다[18]. 시료 1 mL와 200 µM DPPH 1 mL를 혼합하여 37°C에서 30분 동

안 반응시킨 후, 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능(%)은 [(대조군 - 실험군)/대조군] × 100에 의하여 산출하였다. 실험균주의 ACE 저해 활성은 Cushman과 Cheung[4]의 방법에 따라 조사하였다. 실험균주를 MRS broth 및 10% skim milk가 함유된 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양한 것을 시료로 사용하였다. 0.1 M sodium borate buffer(0.3 M NaCl 함유, pH 8.3)에 기질용액(12.5 mM hip-his-leu) 100 µL, ACE 100 µL, 시료 50 µL를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 229 nm에서 흡광도를 측정하였으며, ACE 저해 활성(%)은 [(대조군 - 실험군)/대조군] × 100에 의하여 산출하였다. 특별한 언급이 없는 한, 모든 실험은 3반복 수행하였으며, 결과는 평균값으로 나타내었다.

각 시료로부터 콜로니의 형태가 서로 다른 78균주를 분리하였다. 즉 양파, 오디, 포도 및 호박잎으로부터 각각 4균주, 콩, 오이, 양배추, 고구마, 당근 및 부추로부터 각각 1균주, 배추 및 옥수수 잎으로부터 각각 2균주가 선정되었으며, 무김치, 목은김치, 부추김치 등 각종 김치로부터 33균주가 선정되었다. 또한 양파절임으로부터 4균주, 된장, 식혜 및 동동주로부터 각각 9균주, 5균주, 1균주가 선정되었다. 그 중 콜로니 주변 투명환의 직경이 큰 K27 및 O2 균주를 실험균주로 선정하였다. 이들은 각각 김치와 양파에서 분리된 균주들이었다. 두 균주는 그람양성 세균으로 catalase를 생성하지 않았으며, 운동성이 없었다. 또한 lactose로부터 가스를 생성하지 않아 동형젖산발효균인 것으로 추정되었다. 두 균주 모두 MRS 평판배지에서 원형(circular)의 불투명한 콜로니를 형성하였으며, 유주현상 및 점성은 없었다. K27 균주는 단간균으로서, convex form의 측면을 가진 콜로니를 형성하였으나 O2 균주는 단간균으로, raised form의 측면을 가진 콜로니를 형성하였다. 실험균주를 정확하게 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 NCBI GenBank에 등록된 각 표준균주와 비교한 결과, K27 균주는 *Lactobacillus plantarum*과 98%, O2 균주는 97%의 상동성을 가지고 있었다. Drancourt 등[7]은 species 수준의 동정으로는 99% 이상의, genus 수준의 동정으로는 97% 이상의 상동성을 가져야 한다고 보고하였으나 아직 16S rRNA 유전자 염기서열에 근거한 세균 동정에 관여하는 염기서열 상동성 비교의 기준이 정해진 것은 아니다[8]. 16S rRNA 유전자의 구조에 근거하여 기존 젖산균과의 분자계통학적 유연관계를 파악하기 위하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성한 결과, 각 실험균주들은 위에서 언급한 각 젖산균을 포함하는 계통학적 그룹에 포함됨을 알 수 있었다(Fig. 1). 본 연구에서 분석된 O2 균주 및 K27 균주의 염기서열은 GenBank database에 등록하였으며, 각각 accession number JN638316, JN638317을 부여받았다.

식품과 함께 섭취된 젖산균이 효과를 나타내기 위해서는 사람의 소화관내에서 생존해야 하므로 강산성의 위액에 대

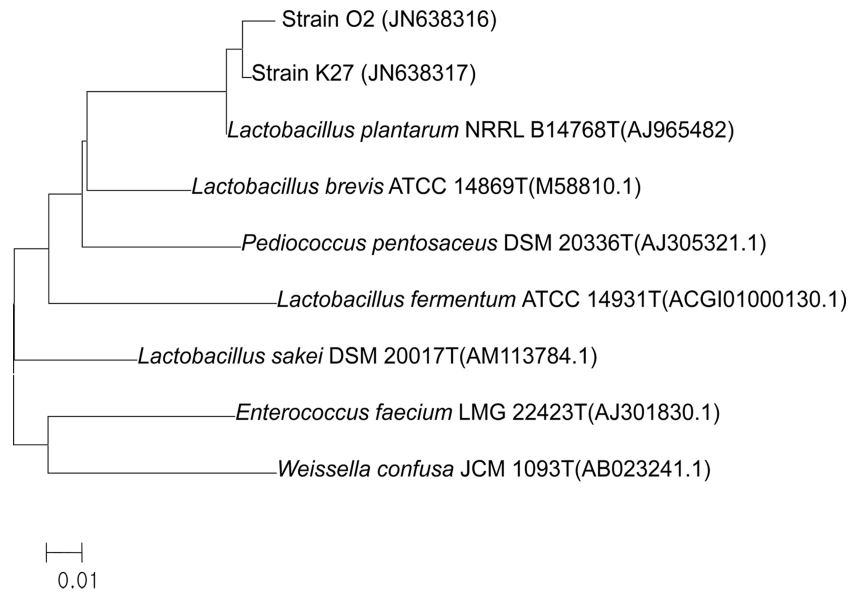


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the positions of strains isolated and type strains of some lactic acid bacteria.

한 내성을 가지고 있어야 하며, 장내 담즙 농도(0.3%)보다 고농도의 oxgall이 함유된 배지에서 생육할 수 있어야 한다 [20]. 따라서 K27 및 O2 균주의 내산성과 담즙내성을 조사한 결과, pH 2.5에서 90.2% 및 97.3%, pH 3.0에서 98.5% 및 99.8%의 높은 내산성을 나타내었다(Table 1). 그리고 두 균주 모두 0.3% oxgall 뿐만 아니라 0.5% oxgall에서도 70% 이상의 높은 담즙내성을 가지고 있었으며, 12시간보다 24시간 배양시 담즙내성이 더 높았으므로 실험균주들은 담즙에 대해 적응과정을 거쳤으리라 추정된다. 흥미롭게도 K27 균주의 경우, oxgall의 농도가 높을수록 담즙내성이 더 높았다. Bile salt hydrolase 생성능이 있는 젖산균은 담즙을 탈중합시켜 glycine과 taurine을 생성하며, 이들 아미노산은 젖산균의 생육에 이용되는 것으로 보고되어 있다[1]. 또한 생육 기질로서 담즙을 이용할 수 있는 균주도 보고되어 있다[21].

따라서 K27 균주는 이러한 기능을 가지고 있을 것으로 예측되어 향후 추가실험을 통하여 확인할 예정이다. 한편, 산양유로부터 분리된 *Streptococcus salivarius*와 *Lactobacillus lactis*는 pH 3.0에서 대부분 사멸하였으며, 0.3% bile에서 22~29%의 담즙내성을 나타내었다고 보고[17]되었으나 원유에서 분리된 *Lactobacillus zeae*의 경우, pH 3.0과 6.4에서의 생육에 큰 차이가 없었으며, 0.3% oxgall이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에서의 생육 역시 차이가 없었다고 보고되었다[15]. 김치에서 분리된 *L. plantarum* NO1의 경우, pH 3.0에서 99%, 0.3% oxgall에서 97%의 생존율을 나타내었다[14]. 동치미에서 분리된 *Lactobacillus* sp. FF-3은 인공 위액에서 내성이 높은 반면, 담즙에서 생존율은 6%로 나타났다[5]. 따라서 본 실험균주들은 높은 내산성과 담즙내성을 나타내어 probiotic으로서 활용될 가능성이 높은 것으로 판

Table 1. Acid and bile-resistance of lactic acid bacteria isolated from onion and Kimchi.

Strain	Acid resistance (%)				Bile resistance (%)				Source		
	pH 2.5		pH 3.0		0.1%		0.3%			0.5%	
	3 h	3 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h			
K27	90.2	98.5	70.9	105.6	70.1	103.6	70.4	106.2	Kimchi		
O2	97.3	99.8	75.7	90.1	69.7	75.3	69.0	69.8	Onion		

Table 2. Antibacterial, ACE inhibitory and antioxidant activities of lactic acid bacteria isolated from onion and Kimchi.

Strain	Antibacterial activity (mm)				ACE inhibition activity (%)		DPPH radical scavenging activity (%)
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	MRS	MRS with skim milk	
K27	180	190	-	110	72.8	89.2	61.5
O2	170	210	-	-	80.6	98.2	56.8

단되었다.

실험균주의 병원성 세균에 대한 항균능을 조사한 결과, pH를 조절하지 않은 K27 균주 배양액은 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*의 생육을 억제하였으며, O2 균주 배양액은 *E. coli*, *P. aeruginosa*의 생육을 억제하였다(Table 2). 이들 배양액의 최종 pH는 3.9~4.1이었으며, 시료의 pH를 6.8로 조정할 경우, 항균능은 나타나지 않았다(미제시). 젖산균은 lactic acid를 생성하여 산도를 낮추어 줌으로써 병원성 세균의 생육을 억제하는 것[24]으로 알려져 있으며, bacteriocin 등의 항균성 펩티드를 생성하여 항균작용을 나타내기도 하는데, bacteriocin은 산성~알칼리성 등 넓은 범위의 pH, 특히 생리학적 pH에서 안정한 것으로 알려져 있다[19]. 본 실험균주가 lactic acid 생성에 따른 산도 저하에 의해 또는 bacteriocin 생성에 의해 병원성 세균의 생육 억제효과를 나타내는지 확인하기 위하여 시료의 pH를 6.8로 조정할 경우, 대상균주에 대한 항균능이 나타나지 않았다. 따라서 실험균주에 의한 항균능은 주로 이들이 생산한 유기산에 의한 것으로 추정되었다.

고혈압의 발병에는 angiotensin-converting enzyme(ACE)이 작용하는 것으로 보고되어 있다[25]. 즉, ACE는 angiotensin I을 혈관 수축작용이 강한 angiotensin II로 전환시킴으로써 고혈압 발병에 관여한다. 따라서 실험균주들의 ACE 저해활성을 조사한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 MRS broth에서 배양된 두 균주는 72.8~80.6%의 ACE 저해활성을 나타내었으며, 10% skim milk가 함유된 MRS broth에서 배양된 경우, 89.2~98.2%의 저해활성을 나타내었다. 일부 젖산균들은 우유에서 생육하는 동안 casein을 분해하여 ACE 저해 펩티드를 생성할 수 있는 것으로 보고되어 있다[25]. 따라서 본 실험균주들은 균주 자체의 ACE 저해활성 외에 skim milk에 함유된 casein을 분해함으로써 ACE 저해물질을 생산할 수 있는 것으로 판단되어 현재 추가실험을 진행하고 있다.

산화적 스트레스는 생화학 반응을 통하여 다양한 활성 산소 등을 생성하여 동맥경화증, 혈관질환, 노화 등을 초래하는 것으로 알려져 있다[2]. 활성산소를 소거하기 위하여 tert-butylhydroxyanisole 등의 합성 항산화제가 실용화되었으나 이들은 많은 부작용을 초래할 수 있어 최근 천연 항산화제에 대한 연구가 진행되고 있다[2]. 따라서 실험균주들의 DPPH radical 소거능을 측정하여 항산화능을 조사하였으며, 그 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 K27 균주는 61.5%, O2 균주는 56.8%의 항산화 활성을 나타내었다. 김치에서 분리된 *L. plantarum* GK81은 70.8%의 DPPH radical 소거능을 나타내는 반면, *Lactobacillus acidophilus* GK20, *Lactobacillus brevis*는 50% 이하의 소거능을 나타내었다고 보고되었다[5].

이상의 연구 결과를 통해 김치 및 양파에서 분리된 *L. plantarum* K27과 *L. plantarum* O2는 내산성, 담즙내성, 일부 병원성 세균에 대한 길항능 등 probiotic으로서의 특성을

가지고 있었으며, ACE 저해활성 및 항산화 활성 등도 가지고 있는 것으로 확인되었다. 따라서 본 실험균주들은 probiotic으로서의 활용 가능성 외에 생약자원인 맥문동을 포함한 다양한 식용식물의 발효를 위한 starter culture로도 응용될 수 있는 잠재적 가능성이 높은 것으로 판단되며, 향후 실제 식물 발효를 통한 이들의 생리활성 증진 유무를 확인해야 할 것이다.

Acknowledgement

This study was supported by Technology Development Program for Agriculture, Forestry and Fisheries Food, Ministry for Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (110119-3).

REFERENCES

- Begley, M., C. Hill, and C. G. M. Gahan. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1729-1738.
- Castro, L. and B. A. Freeman. 2001. Reactive oxygen species: human health and disease. *Nutrition* **17**: 161-165.
- Cho, Y. H., S. N. Park, and S. W. Jeong. 2009. A study on the physiological activity and industrial prospects of plant-origin lactic acid bacteria. *Kor. J. Dairy Sci. Technol.* **27**: 53-57.
- Chung, H. S. and D. W. Chushman. 1971. Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**: 1637-1641.
- Chung, W. B., W. S. Soe, J. Y. Cha, and Y. S. Cho. 2003. Isolation and characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for probiotics production from Korean dongchimi. *Kor. J. Food. Preserv.* **10**: 406-410.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 777-788.
- Drancourt, M., C. Bottel, A. Carlioz, R. Martelin, J.P. Gayral, and D. Raoult. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3623-3630.
- Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, and P. Jurtshuk, Jr. 1992. How close is close: 16S rDNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 166-170.
- Giraffa, G., N. Chanishvili, and Y. Widyastuti. 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol.* **161**: 480-487.
- Hammes, W. P. and C. Hertel, 2002. Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook. *Food Res. Int.* **35**: 165-170.
- Hechard, Y., M. Dherbomez, Y. Cenatiempo, and F. Lettlier.

1990. Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the sandwich method. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**: 185-188.
12. Kobayashi, Y., K. Tohyama, and T. Terashima. 1974. Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain. *Jpn. J. Microbiol.* **29**: 691-697.
13. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175, In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York.
14. Lee, Y. and H. C. Chang. 2008. Isolation and characterization of Kimchi lactic acid bacteria showing anti-*Helicobacter pylori* activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 106-114.
15. Lim S. D., K. S. Kim, and J. R. Do. 2008. Physiological characteristics and ACE inhibitory activity of *Lactobacillus zae* RMK354 isolated from raw milk. *Kor. J. Food. Sci. Ani. Resour.* **28**: 587-595.
16. Lim, S. M. 2010. Resistance to reactive oxygen species and antioxidant activities of some strains of lactic acid bacteria from the mustard leaf Kimchi. *Kor. J. Microbiol.* **46**: 375-382.
17. Lim, Y. S., S. Y. Kim, and S. K. Lee. 2008. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from Kefir made of goat milk. *Kor. J. Food. Sci. Ani. Resour.* **28**: 82-90.
18. Lu, Y. and Y. Foo. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* **68**: 81-85.
19. Messens, W. and L. De Vuyst. 2002. Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs- a review. *Int. J. Food Microbiol.* **72**: 31-43.
20. Paik, H. D., M. Y. Jung, H. Y. Jung, W. S. Kim, and K. T. Kim. 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**: 73-78.
21. Philipp, B. 2011. Bacterial degradation of bile salts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**: 903-915.
22. Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto, and T. Mattila-Sandholm. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* **84**: 197-215.
23. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-426.
24. Salminen, S., M. Laine, A. Wright, J. Vuopio-Varkila, T. Korhonen, and T. Mattila-Sandholm. 1996. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential functional foods: a nordic and european approach. *Biosci. Microflora* **15**: 61-67.
25. Sun, T., S. Zhao, H. Wang, C. Cai, Y. Chen, and H. Zhang. 2009. ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from *Xinjiang koumiss* in China. *Eur. Food Res. Technol.* **228**: 607-612.
26. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.