



모유 섭취 신생아 유래 *Lactobacillus acidophilus*의 생리적 특성

홍성문 · 소병천 · 윤승원 · 김철현*

단국대학교 동물자원학과

Biochemical Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* Isolated from a Breast-Fed Infant

Sung-Moon Hong, Byung-Chun So, Seung-Won Yoon and Cheol-Hyun Kim*

Dept. of Animal Resource & Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

ABSTRACT

Lactobacillus acidophilus isolated from the feces of a 7-day-old breast-fed infant was characterized to examine the scope of its commercial use. Forty-three *Lactobacillus* strains, which could grow at pH 5.5, were isolated. From these *Lactobacillus* isolates, 14 *Lactobacillus* strains were selected, which demonstrated more than 80% viability and homofermentative lactic fermentation. Finally, 9 *L. acidophilus* strains (NB 201~NB 209) were identified as candidate strains based upon biochemical properties, carbohydrate utilization, and cellular fatty acid composition. *L. acidophilus* isolates demonstrated a survival rate of more than 80% when exposed to pH 2.5 for 2 h. In particular, *L. acidophilus* NB 204 showed a strong acid tolerance, with a 71% survival rate even at pH 2.0. *L. acidophilus* isolates also manifested high bile acid tolerance; more than 87% of the cells survived on agar containing 1% bile extract, except for *L. acidophilus* NB 206, which showed a 73% survival rate. All *L. acidophilus* isolates were confirmed to have proteolytic activity; *L. acidophilus* NB 204 and NB 209 yielded higher levels of TCA-soluble peptides and free amino acids. The β -galactosidase activity of the *L. acidophilus* isolates was in the range of 1.97~2.45 units/mL.

Keywords : Acid tolerance, bile acid tolerance, breast-fed infant feces, *L. acidophilus*, probiotics

서론

여러 연구자들에 의해 probiotics로서 젖산균의 선발기준이 제시되었고, 이 기준에 따라 선발된 젖산균만이 인체내에서 다양한 유용기능을 기대할 수 있으며(Collins *et al.*, 1998), 발효유제품의 제조에 사용되는 젖산균의 경우 probiotics로서의 선발 기준과 더불어 단백질 분해 능력(Xanthopoulos *et al.*, 2000)과 발효과정을 통해 생성되는 풍미성분(Imhof *et al.*, 1995) 등 역시 매우 중요한 선정 기준이 된다. 따라서 젖

산균의 선발조건으로 안전성, 기능성(생존력, 흡착능, 정착성, 인체 유용 효과 작용 및 유용 물질 생성능 등) 및 기술적 특성(우유에서의 성장, 관능적 특성, 생산공정 및 유통 중의 안정성과 생존력 등) 등이 함께 고려되어야 한다(Holzappel & Schillinger, 2002). 그 중 젖산균이 장관에서 그 기능을 발휘하기 위해선 장관까지 활력과 기능을 유지한 상태에서 도달하는 것이 가장 중요한 선결과제이며, 이를 위해 구강과 위의 효소, 위산, 소장의 담즙 및 점액 등에 대한 저항성이 기본적으로 요구된다(Fuller, 1989).

사람은 생후 1년 정도가 되면 위액의 pH가 1.4~2.0 수준에 이르러 안정되며, 위에 음식물이 유입되면 침과 음식물 자체의 완충효과에 의해 위 내용물의 pH가 높아지게 되어 젖산균의 생존가능성은 더욱 높아지게 된다(Pochart *et al.*,

* Corresponding author: Cheol-Hyun Kim, Dept. of Animal Resource and Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea. Tel: +82-41-550-3656, Fax: +82-41-550-3604, E-mail: hichkim@dankook.ac.kr

1992). 여러 연구자들에 의해 *L. acidophilus*는 pH 2.0~2.5에서 2시간 반응 후 10^5 cfu/mL 이상 생존한다고 보고되었으며(Conway *et al.*, 1987; Shin *et al.*, 1999), 또한 *L. acidophilus*의 답즙산 내성이 다른 lactobacilli에 비해 매우 높게 나타나 probiotic으로서의 안정성이 뛰어나다고 하였다(Chow & Weimer, 1999; Kang *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 1999).

유당 대사능은 젖산균의 대표적 특성인 젖산의 생성을 통한 생리적 기능과 발효유제품의 풍미를 형성토록 하는 필수 불가결한 요인이다. 젖산균의 유당 대사경로는 크게 두 가지로 첫 번째 경로는 phosphoenol-pyruvate-dependent sugar transferase system(PEP-PTS)으로 유당이 lactose-6-phosphate 형태로 세포내로 이동된 후, β -D-phosphogalactosidase에 의하여 glucose와 galactose-6-phosphate로 분해되고, 1 M의 유당으로부터 4 M의 젖산이 생성된다(Dills *et al.*, 1980). 두 번째 경로는 proton motive force-linked transport system으로 유당이 free sugar 형태로 세포내로 이동된 후, β -galactosidase에 의하여 glucose와 galactose로 가수분해된다(Poolman *et al.*, 1989). 대부분의 homo 젖산발효 젖산균과 *S. thermophilus*, *Leuconostoc* 등은 proton motive force-linked transport system을 이용하여 유당을 이용한다(Poolman, 1993).

이러한 유당 대사 경로의 차이로 인해 hetero 젖산발효 젖산균은 유당대사과정 중 lactate, ethanol, acetate 및 CO₂를 생성하게 되며, *L. acidophilus*와 같은 homo 젖산발효 젖산균은 일련의 과정을 거쳐 생성된 glucose가 Embden-Meyerhof(EMP) 대사경로를 통해 pyruvate로 전환되고, 대부분의 homo 젖산발효 젖산균이 함유하고 있는 lactate dehydrogenase에 의해 약 95%가 젖산으로 전환되며, 이를 통해 생성된 젖산은 발효유제품의 풍미, 조직 및 영양 면에서 중요한 역할을 담당하게 된다(Alm, 1982; Ostlie *et al.*, 2003). 그리고 유당대사와 더불어 단백질 분해능은 젖산균이 우유에서 생육하기 위해서 필수적인 특성 중의 하나로, Reiter과 Oram(1962)은 젖산균에게서 생육에 있어 여러 가지 필수영양소가 요구되며, 그 중에서도 특히 외인성 아미노산이 필요하다고 하였다. 그러나 우유내 유리아미노산과 펩타이드의 농도는 젖산균이 빠른 생장을 하기에는 충분하지 않으므로 미생물들은 아미노산원으로서 케이신을 이용하기 위해 유단백질을 펩타이드까지 분해해서 세포내로 유입한 후 peptidase에 의해서 아미노산까지 분해하는 일련의 proteolytic system을 가지고 있으며(Tamine & Robinson 1999), 또한 젖산균은 응유효소와 세포벽의 단백질 분해효소를 이용하여 케이신을 분해하고, 세포에 펩타이드와 아미노산을 공급하기 때문에 발효유 스타터로서의 능력으로 젖산균의 단백질 분해능이 중요하다고 보고되고 있다(Salminen *et al.*, 1996).

따라서 본 연구에서는 모유를 섭취하고 있는 생후 7일의

신생아로부터 분리 및 선발된 *L. acidophilus*를 분리 및 동정하고, 이들의 생리적 특성을 규명하여 상업적 이용가능성을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. Lactobacilli의 분리

모유를 섭취하고 있는 생후 7일째 신생아의 분을 무균 면봉으로 채취하여 0.02% sodium azide(Sigma Chem. Co., USA)가 첨가된 pH 5.5의 MRS 액체배지(Difco Lab., USA)에 무균적으로 접종하고, 냉장 상태에서 실험실로 운송하였다. Lactobacilli의 분리를 위해 신생아의 분 시료를 37°C에서 24시간 배양한 후 lactobacilli를 선택적으로 분리하기 위해 dextrose를 maltose로 대체하고, 0.02% sodium azide가 첨가된 MRS 한천평판배지(Difco Lab., USA)에 백금으로 분산 도말하였다. 37°C에서 약 3일간 배양한 후 MRS 한천배지 상에 나타난 특징적인 균락을 백금으로 채집하여 MRS 액체배지에 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 80% 이상이며, homo 젖산 발효를 하는 균주를 우선 선발하여 시험에 사용하였다.

2. 생화학적 특성 분석

분리된 균주들은 crystal violet 용액으로 분리 균주를 염색한 후 광학현미경(Leitz Ltd., Germany)을 이용하여 선발된 14종의 lactobacilli의 형태를 관찰하고, Gram 염색, 15°C와 45°C에서의 생장 여부와 catalase 생성 여부 및 37°C에서 24시간 배양 후 정지한 MRS 배지에서 hot loop 시험을 통한 gas 생성 시험을 실시하였다.

3. 당 이용성 측정

선발된 14종의 lactobacilli의 당 이용성을 측정하기 위해 API kit(API50 CHL, bioMerieux, France)를 이용하여 49종의 당 발효실험을 하였다. 시험 균주를 MRS 액체배지에서 16시간 배양한 후 0.1% peptone 용액으로 세척한 다음 적당한 비율로 희석하였다. API kit의 사용법에 따라 접종액을 만들고 API 50 CHL 배지에 접종하여 strip을 만든 다음 37°C에서 48시간 배양한 후 색 변화를 관찰하였으며, 실험 결과는 Bergey's manual과 API LAB PLUS 프로그램(API50 CHL, bioMerieux,

France)으로 비교 분석하였다.

4. 균체 지방산 조성 분석.

2차 동정을 위해 선발된 14종의 lactobacilli의 균체 지방산 조성을 확인하였으며, Rizzo 등(1987)의 방법을 일부 개선하여 다음과 같이 전처리하였다. MRS 액체배지에서 16~18시간 배양한 후 17,400×g로 10분간 원심분리하여 얻어진 균체를 멸균 증류수로 2회 세척한 후 동결건조하였으며, 동결 건조된 균체 20 mg을 15 mL 시험관에 넣은 뒤 45 g NaOH에 150 mL의 메탄올과 증류수를 각각 첨가하여 제조된 검화용액을 1 mL 첨가한 후 5~10초간 강하게 교반하였다. 100°C에서 30분간 cell lysis를 일으켜 세포지질로부터 인지질을 추출한 후 냉각하고, 6 N HCl 325 mL와 275 mL 메탄올이 혼합된 methylation 용액 2 mL 첨가한 후 80°C에서 10분간 열처리하여 핵산과 methyl-tert butyl 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 0.25 N NaOH 용액 3 mL를 첨가한 뒤 5분간 반응시켜 유리지방산과 잔류 용매를 제거한 후 무수 Na₂SO₄ (Junsei Chem. Co., Japan)를 첨가하여 수분을 제거하고 분석 시료로 하였다. 젖산균의 지방산 조성을 분석하기 위해서 HP G1512A auto sampler가 장착된 HP 5890 Series II gas chromatography(GC, Agilent Co., USA)를 사용하였고, 분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1의 조건에 따라 측정된 젖산균의 균체 지방산의 조성비를 통해 Sherlock microbial identification system(SMIS, MIDI Inc., USA)을 이용하여 동정하였다.

Table 1. Instrument and operating conditions of GC for the analysis of cellular fatty acids in *L. acidophilus* isolates

Detector	FID
Column	Ultra 2 (Agilent Co., USA., 25 m × 0.2 mm i.d., 0.33 μm film thickness)
Flow rate	Split ratio: 100:1 Column head pressure: 9 psi(H ₂) Air: 400 mL/min H ₂ : 30 mL/min Make-up(N ₂): 30 mL/min
Temperature	Inlet: 250°C Detector: 300°C Oven: 170°C to 260°C→hold at 260°C for 18 min→5°C/min to 310°C→hold at 310°C for 1.5 min
Injection vol.	2 μL

5. 내산성 측정

내산성 실험은 Hood와 Zottola(1988)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 젖산균주를 접종하고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 생존율을 측정하였다.

6. 담즙산 내성 측정

Ahn 등(1999)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.

$$\% \text{ survival} = \frac{\text{Log}_{10} \text{ number of viable cells survived (cfu/mL)}}{\text{Log}_{10} \text{ number of initial viable cells inoculated (cfu/mL)}} \times 100$$

7. 유단백질 분해활력 측정

*L. acidophilus*의 우유내의 유단백질 분해 활성을 well diffusion 방법을 개선하여 다음과 같이 실험하였다. Metal boring cylinder(diameter: 8 mm)를 멸균하여 petri-dish에 세운 후 1.6% 탈지유 한천배지를 부어 천공된 평판을 제조하고, cylinder를 제거한 후 well의 하단에 탈지유 한천배지를 30 μL씩 주입하여 붓입하였다. 선발된 *L. acidophilus*를 각각의 well에 150 μL씩 주입하고, agar 평판을 4°C에서 12시간 방치한 다음 37°C에서 24시간 배양한 후 투명환을 관찰하였다.

8. TCA 가용성 펩타이드 및 유리 아미노산 분석

0.1~0.2% yeast extract가 첨가된 8% 탈지유에 MRS 액체배지에서 16~18시간 배양한 *L. acidophilus*를 1% 접종하여 각각 37°C에서 24 및 48시간 배양하였다. 배양액 2.5 g에 10 mL의 0.72 N TCA를 첨가하여 혼합한 후, 70°C 항온수조에서 20분간 방치한 다음 4,350×g로 15분간 원심분리하고, 2.5 mL의 여액을 취한 후 5 mL의 SCSHP 용액(Sigma Chem. Co., USA)을 첨가하여 혼합하고, 3배로 희석된 1.5 mL의 Folin-reagent를 첨가하여 2~3초간 혼합하였다. 얻어진 혼합액을 30°C 항온수조에서 30분간 방치한 후 650 nm에서 흡광도(UV-Visible spectrophotometer UV-1601, Shimadzu Co., Japan)를 측정하였다. 시료내의 TCA 가용성 단백질 및 유리아미노산 함량은 L-tyrosin 표준액의 표준곡선으로부터 tyrosine 함량(μg/mL)으로 나타냈다.

9. β -galactosidase 활성 측정

MRS 액체배지에서 37°C에서 24시간 배양된 *L. acidophilus*의 β -galactosidase의 활성은 Miller(1972)의 방법을 개선하여 시행하였다. 얻어진 배양액을 17,400×g로 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, Z 완충액(60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 5 mM β -mercaptoethanol, pH 7.0)으로 2회 세척하고, 1 mL의 현탁액으로 만들었다. 50 μ L의 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma Chem. Co., USA)와 두 방울의 chloroform을 첨가한 다음 5초 동안 혼합한 후 37°C에서 5분간 방치시켰다. 200 μ L의 o-nitrophenyl-D-galactopyranoside(ONPG, Sigma Chem. Co., USA) 용액(4 mg/mL in 0.1 M phosphate buffer)을 첨가한 다음 반응시켜 노란색이 나타나면 이때의 반응시간을 기록하고 500 μ L의 1 M Na₂CO₃(Sigma Chem. Co., USA)를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 4°C에서 15분간 17,400×g로 원심분리하여 세포를 제거하고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 나타난 β -galactosidase 활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\beta\text{-Galactosidase activity(Units/mL)} = \frac{1,000 \times A_{420}}{V \times t}$$

A₄₂₀ : 420 nm에서 흡광도, V : 배양액의 총 부피, t : 활성 측정에 소요된 반응시간

결과 및 고찰

1. 생화학적 특성

생후 7일째 신생아의 분변에서 pH 5.5에서 생장이 가능한 lactobacilli 43균주를 분리하였으며, 이중 pH 2.5에서 생존율이 약 85% 이상이면서 homo 젖산 발효를 하는 14균주를 1차 선발하여 생화학적 특성을 확인하였다.

1차로 선발된 젖산균주들의 공통된 특성은 Table 2와 같으며, 분리된 균주들은 Gram 양성균의 간균으로 catalase를 생

Table 2. Characteristics of fourteen *Lactobacillus* strains isolated from 7 days old breast -fed infant feces

Characteristics	
Morphology	Rod
Growth at 45°C	+
Growth at 15°C	
Catalase production	
Gas from glucose	
Growth at pH 9.6	+
Growth at pH 4.0	+

산하지 않고 45°C에서는 잘 성장하였으나, 15°C에서는 성장하지 않았다.

2. 당 이용성

1차 선발된 14균주를 API kit(API50 CHL, bioMerieux, France)를 이용하여 당 발효 시험을 실시한 결과, 9종의 *L. acidophilus* (NB 201-NB 209)를 선발하였고, Bergey's Manual에 제시된 22종의 당 이용성에 따라 Table 3과 같이 3개 group으로 분류하였다. 즉, Group 1은 *L. acidophilus* NB 204, NB 205 및 NB 208, Group 2는 *L. acidophilus* NB 201, NB 206 및 NB 207, Group 3은 *L. acidophilus* NB 202, NB 203 및 NB 209로 각각 구분하였다.

3. 균체 지방산 조성

당 이용성을 통해 확인된 9종의 *L. acidophilus*를 SMIS를 이용하여 지방산 조성을 분석하였다(Table 4). 대부분 시험 균주의 균체 지방산 조성 중에서 oleic acid(C_{18:1})의 함량이

Table 3. Pattern¹⁾ of carbohydrates fermentation of isolated nine *L. acidophilus* strains

Carbohydrates	Group 1	Group 2	Group 3
Amygdalin	-	+	+
Arabinose	-	-	-
Cellobiose	+	+	+
Esculin	+	+	+
Fructose	+	+	+
Galactose	+	-	+
Glucose	+	+	+
Gluconate	-	-	-
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Mannitol	-	-	-
Mannose	+	+	+
Melezitose	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Raffinose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Ribose	-	-	-
Salicin	+	+	+
Sorbitol	-	-	-
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Xylose	-	-	-

¹⁾ +: acid produced, -: acid not produced.

Table 4. Cellular fatty acid composition of *L. acidophilus* isolates

Strain	Composition of fatty acids(%)							Similarity (%)
	C _{14:0}	C _{16:1}	C _{16:0}	C _{18:1}	C _{18:0}	C _{18:2}	C _{19:0 cyc}	
NB 201	2.1	4.5	6.9	46.3	3.2	4.3	11.3	82
NB 202	2.4	4.8	7.5	51.1	3.1	4.1	11.6	88
NB 203	2.6	5.1	6.4	42.3	2.8	4.3	12.3	64
NB 204	2.1	4.9	7.1	48.2	3.4	4.7	10.8	53
NB 205	2.8	4.3	7.3	44.8	3.1	5.2	11.6	61
NB 206	2.7	4.8	6.7	42.3	3.3	4.3	10.8	81
NB 207	2.6	4.8	7.3	46.5	3.1	4.5	12.1	66
NB 208	2.3	4.6	7.5	47.4	2.9	4.2	11.4	58
NB 209	2.8	4.7	6.9	46.2	3.2	4.5	11.6	83

40% 이상으로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 11,12-methylene hexadecanoic acid(C_{19:0 cyc}) 및 palmitic acid(C_{16:0})의 비율이 주로 높았고, myristic acid(C_{14:0}), palmitoleic acid(C_{16:1}), straric acid(C_{18:0}) 및 linoleic acid(C_{18:2})는 2~5%의 함량비를 나타내었다.

SMIS library와의 유사성을 확인한 결과, 9종의 *L. acidophilus* 중 4종은 *L. acidophilus*로서 80% 이상의 유사성을 나타내었으며, 나머지 5종은 *L. acidophilus*로서의 유사성은 50~60% 대로 낮았으나, 다른 *Lactobacillus*로서의 유사성은 나타나지 않아 *L. acidophilus*로서 인정하였다.

유사성이 낮은 결과는 전처리 중 손실 또는 GC에 사용되는 gas 유량의 불안정으로 인한 retention time의 근소한 오차에 의한 것으로 생각된다. Rizzo 등(1987)의 보고에 의하면 lactobacilli의 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 나타났으며, 특히 실험에 사용된 다른 lactobacilli의 지방산 조성은 서로 유사성이 70% 이상으로 높았으나, *L. acidophilus*의 균체 지방산 조성은 다른 lactobacilli와 유사성이 나타나지 않았다고 하여 본 실험 결과와 일치하였다.

시험 균주들의 균체 지방산 중 상대적으로 oleic acid의 함량이 높게 나타난 것은 배지 조성에서 기인된 것으로 생각되며(Johnson *et al.*, 1995), Rizzo 등(1987)은 *L. casei*, *L. plantarum* 및 *L. acidophilus*의 균체를 검화하여 분석하였을 때 C_{19:0 cyc}의 조성비가 35~39%로 높게 나타났으나, *L. bulgaricus*의 경우 조성비가 13%로 상대적으로 매우 낮았는데, 이는 *L. bulgaricus*의 내산성이 다른 균주에 비해 상대적으로 낮은 것을 감안하여 C_{19:0 cyc}의 함량과 내산성과의 연관성을 제기하였다. 또한 Fernandez Murga 등(2000)은 *L. acidophilus*와 같은 젖산균은 Gram 양성균으로 모든 지질이 세포막에 존재하

기 때문에 이러한 지방산에 의해 세포막의 안정성이 유지된다고 하였다. Peltrochche 등(2000)은 미생물의 세포막은 인지질과 단백질로 이루어져 있고, 인지질을 구성하는 지방산은 약 300개 이상으로 매우 다양하며, 10~24개 정도의 탄소사슬로 이루어져 있고, 그들의 길이, 이중결합의 위치, 치환기 및 cyclopropane의 유무 등에 따라 Genus 수준에서의 다른 지방산 조성을 가지며, 서로 다른 종간의 미생물은 양상은 같지만 구성성분들 간에 정량적인 차이가 나타나기 때문에, 균체 지방산 조성 분석을 통한 미생물의 동정은 비용과 시간이 많이 소모되는 분자생물학적 방법에 비해 신속하며 정확성이 높은 동정 방법이라고 하였다.

4. 내산성

pH 2.5 및 pH 2.0으로 조정된 MRS 배지에서 선발된 *L. acidophilus*의 내산성을 실험한 결과는 Table 5에 나타난 바와 같다. 대부분의 균주가 pH 2.5에서는 80% 이상의 생존율을 보였으며, pH 2.0에서는 약 40~50%의 생존율을 보였다. 그 중 *L. acidophilus* NB 204는 내산성이 높아 pH 2.0에서도 71%의 높은 생존율을 보였다(모든 균주가 pH 2.5에서는 80% 이상의 생존율을 보였으며, pH 2.0에서는 평균 55%의 생존율을 보였으나 *L. acidophilus* NB 204는 내산성이 높아 pH 2.0에서도 71%의 높은 생존율을 보였다).

사람은 생후 1년 정도가 되면 위액의 pH가 1.4~2.0 수준에 이르러 안정되며, 위에 음식물이 유입되면 침과 음식물 자체의 완충효과에 의해 위 내용물의 pH가 높아지게 되어 젖산균의 생존가능성은 더욱 높아지게 된다(Pettersson *et al.*, 1983; Pochart *et al.*, 1992). 또한 위장내 음식물의 체류시간

Table 5. Survival rate of *L. acidophilus* isolates incubated for 2 hours in sodium phosphate buffer adjusted to pH 2.5 and 2.0

Strain	Counts of <i>L. acidophilus</i> (cfu/mL)			Survival rate(%) ¹⁾	
	Before incubation	After incubation		pH 2.5	pH 2.0
		pH 7.0	pH 2.5		
NB 201	8.9×10 ⁷	7.8×10 ⁷	5.5×10 ⁷	87.6	61.8
NB 202	5.6×10 ⁷	4.7×10 ⁷	2.4×10 ⁷	83.9	42.9
NB 203	7.6×10 ⁷	6.7×10 ⁷	3.4×10 ⁷	88.2	44.7
NB 204	8.2×10 ⁷	7.1×10 ⁷	5.8×10 ⁷	86.6	70.7
NB 205	3.1×10 ⁷	2.5×10 ⁷	1.6×10 ⁷	80.6	51.6
NB 206	4.4×10 ⁷	3.8×10 ⁷	2.4×10 ⁷	86.4	54.5
NB 207	7.3×10 ⁷	6.1×10 ⁷	3.5×10 ⁷	83.6	47.9
NB 208	9.2×10 ⁷	7.5×10 ⁷	5.4×10 ⁷	81.5	58.7
NB 209	4.8×10 ⁷	4.1×10 ⁷	3.1×10 ⁷	85.4	64.6

¹⁾ Each data indicates the mean of triplicate.

도 젖산균의 생존에 중요한 영향을 미치게 되는데, 발효유의 위장 통과 시간을 측정된 결과, 섭취 후 45분이 지나면 50%, 90분이 지나면 약 80%, 3시간 후에는 모두 통과하며, 이때까지 위액의 pH는 2.7 미만으로 유지된다고 하였다(Martoni *et al.*, 1987; Berrada *et al.*, 1991). Conway 등(1987)은 *L. acidophilus*가 pH 2.5에서 10^5 cfu/mL 가량 생존하며, 10% 탈지유가 위액의 pH를 상승시켜 *L. acidophilus*의 생존율을 향상시켰다고 하였다. Marteau 등(1997)은 인공 위와 소장을 고안하여 음식과 함께 젖산균을 통과시키며 내산성을 실험한 결과, *Bifidobacterium spp.*와 *L. acidophilus*보다 내산성이 약한 것으로 알려진 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*도 많은 수가 생존해서 십이지장에 도달하였으며, 이는 식후의 pH가 pH 3.8 이상으로 유지될 때 통과하였기 때문에 젖산균이 생존한 상태에서 소장에 도달하기 위해서는 초기 공복 기간이 중요하다고 강조하였다.

Shin 등(1999)은 한국인의 분변에서 분리한 *L. acidophilus*의 내산성을 확인한 결과, pH 2.5에서는 약 90% 이상의 높은 생존율을 나타내었으나, pH 2.0에서는 초기 접종 농도인 10^7 cfu/mL에서 10^3 cfu/mL 이하로 생존율이 급격히 저하하였으며, 일부 *L. acidophilus*의 경우는 완전히 사멸하는 것으로 나타나, 이 실험에서 나타난 대부분의 *L. acidophilus*의 내산성은 높은 것으로 생각되었다. Kang 등(2001)도 한국인의 분변에서 분리한 *L. acidophilus*의 내산성을 확인한 결과, 극히 일부는 pH 2.5에서 3시간 동안 100% 생존하였으나, 나머지 대부분의 경우 40% 이하의 생존율을 나타내어 균주에 따라 내산성이 매우 차이가 있었다고 하였다.

또한 Hood와 Zottola(1988)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 등(1987)은 이러한 균주별 내산성의 차이에 대해 균체 세포막내의 C_{19:0} cyc의 함량과 연관이 있다고 하였다.

5. 담즙산 내성

선발된 *L. acidophilus*를 bile extract가 1% 첨가된 배지에서 배양하며 담즙산 내성을 측정된 결과는 Table 6과 같다. 선발 균주들 중 생존율이 72.7%로 나타난 *L. acidophilus* NB 206을 제외한 대부분의 균주가 생존율이 85% 이상으로 매우 우수하여 상업적 이용 가능성이 높을 것으로 나타났다.

담즙산에 대한 내성이 약한 균주는 담즙산이 없는 배지에서도 내성이 강한 균주보다 성장속도가 낮고(Gilliland *et al.*, 1984), 장관내에서 유래하지 않은 lactobacilli의 경우 0.05% 이하의 담즙산이 함유된 배지에서도 생장이 억제되며(Gilliland & Speck, 1977), *L. bulgaricus* 및 *S. thermophilus*와 같이 장내

Table 6. Survival rate of *L. acidophilus* isolates incubated for 2 hours in MRS broth containing 1% bile extract

Strain	Counts of <i>L. acidophilus</i> (cfu/mL)		Survival rate(%) ¹⁾
	Before incubation	After incubation	
NB 201	8.9×10^7	8.0×10^7	89.9
NB 202	5.6×10^7	4.9×10^7	87.5
NB 203	7.6×10^7	6.7×10^7	88.2
NB 204	8.2×10^7	7.1×10^7	86.6
NB 205	3.1×10^7	2.9×10^7	93.5
NB 206	4.4×10^7	3.2×10^7	72.7
NB 207	7.3×10^7	6.6×10^7	90.4
NB 208	9.2×10^7	8.0×10^7	87.0
NB 209	4.8×10^7	4.2×10^7	87.5

¹⁾ Each data indicates the mean of triplicate.

에서 유래하지 않은 젖산균은 0.15~0.3%의 oxgall이 첨가된 LBS 배지에서는 성장하지 못하는 것으로 보고되었다(Kobayashi *et al.*, 1974; Khattab & Abou-Donia, 1987).

Klaenhammer와 Kleeman(1981)은 *L. acidophilus*와 같은 젖산간균은 세포 형태에 따라 담즙에 대한 내성에 차이가 있으며, 표면이 매끈한 형태보다는 거친 형태의 표면을 가진 *L. acidophilus*가 담즙에 대한 내성이 강하다고 하였다. 또한 Chow와 Weimer(1999)은 *L. acidophilus*의 담즙산 내성이 다른 lactobacilli에 비해 매우 높게 나타나 probiotic으로서의 안정성이 뛰어나다고 하였으며, Shin 등(1999)과 Kang 등(2001)도 한국 성인의 분변에서 분리한 *L. acidophilus*가 0.3% 및 0.5%의 oxgall이 포함된 배지에서 매우 높은 생존율을 나타내었다고 하였다.

6. 유단백질 분해 활력

Well diffusion 방법을 응용하여 탈지유 한천 배지 상에서

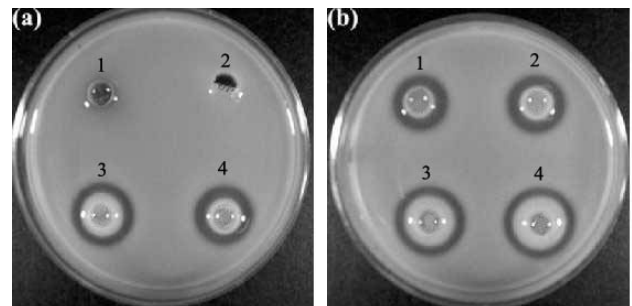


Fig. 1. Protease activity of *L. acidophilus* isolates on skim milk agar plate. (a) 1: MRS broth, 2: Distilled water, 3: NB 204, 4: NB 205, (b) 1: NB 206, 2: NB 207, 3: NB 208, 4: NB 209.

선발된 *L. acidophilus*의 유단백질 분해 활력을 실험한 결과, Fig. 1에 제시된 바와 같이 모든 처리구에서 선발된 *L. acidophilus*가 분비한 extracellular protease에 의해 유단백질이 분해되어 투명환이 형성되었으며, 이를 통해 9종의 균주가 단백질 분해 활력이 있는 것으로 확인되었다.

7. TCA 가용성 펩타이드 및 유리 아미노산 생성

탈지유에서 선발된 *L. acidophilus*들의 배양 중 생성되는 TCA 가용성 펩타이드 및 유리 아미노산의 생성량을 yeast extract의 첨가량과 배양시간을 달리하여 측정된 결과는 Fig. 2 및 3과 같다. 0.1% yeast extract가 첨가된 탈지유에서는 *L. acidophilus* NB 207, 208 및 209가 상대적으로 많은 양의 TCA 가용성 펩타이드 및 유리 아미노산을 생성하는 것으로 나타났다. 그리고 0.2% yeast extract를 첨가했을 때는 0.1% 첨가구에 비해 생성량이 증가하였으며, 그 중 *L. acidophilus* NB 204의 증가량이 높은 것으로 나타났다. 한편, 0.1% yeast extract를 첨가하고 배양시간을 달리하여 배양하였을 때 배양시간에 따라 TCA 가용성 펩타이드 및 유리 아미노산의 생성량이 증가하였으며, 특히 *L. acidophilus* NB 209의 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

8. β -Galactosidase 활성

선발된 *L. acidophilus*의 β -galactosidase 활성을 실험한 결과, 시험 균주들의 β -galactosidase활성은 1.97~2.45 unit/mL

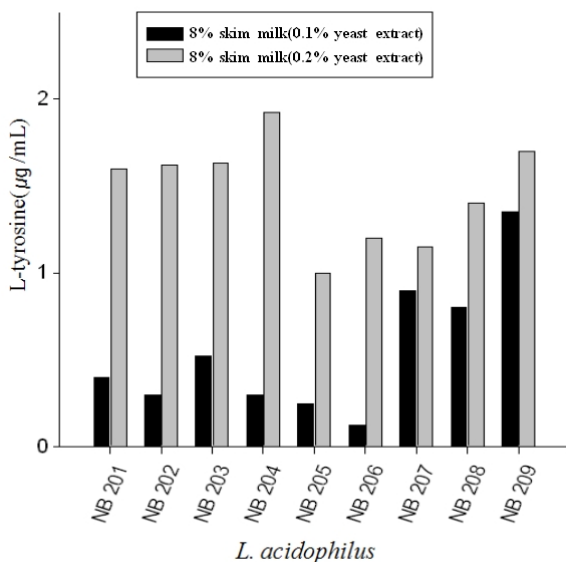


Fig. 2. The amounts of TCA soluble peptides and free amino acids resulted from degradation of milk proteins by *L. acidophilus* isolates grown in 8% skim milk medium containing 0.1% or 0.2% yeast extract for 24 hours.

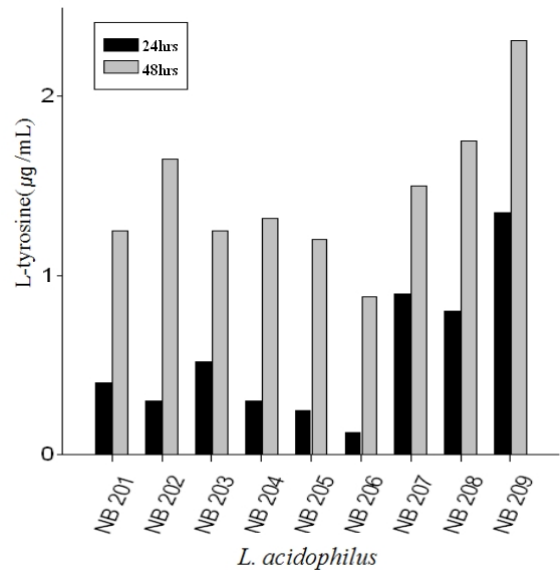


Fig. 3. The amount of TCA soluble peptides and free amino acids resulted from degradation of milk proteins by *L. acidophilus* isolates grown in 8% skim milk medium containing 0.1% yeast extract for 24 hours or 48 hours.

Table 7. β -Galactosidase activity of *L. acidophilus* isolates cultured in MRS broth at 37°C for 24 hours

Strain	Activity(nmole) ¹⁾
NB 201	2.11±0.02
NB 202	1.99±0.02
NB 203	1.97±0.02
NB 204	2.45±0.02
NB 205	2.22±0.02
NB 206	2.02±0.02
NB 207	2.21±0.02
NB 208	1.98±0.02
NB 209	2.14±0.02

¹⁾ Each data indicates the mean±SD of triplicate.

의 범위를 나타내어 발효유 제조 시 시험 균주에 의한 적절한 유당 대사가 가능할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 모유를 섭취하고 있는 생후 7일째 신생아의 분변으로부터 *L. acidophilus*를 분리 및 동정하고, 이들의 생리적 특성을 규명하여 상업적 이용가능성을 검토하고자 실시하였다. 이를 위해 pH 5.5에서 성장하는 lactobacilli 43균주를 분리하고, 그 중 pH 2.5에서 생존율이 약 80% 이상이고,

homo 젖산 발효를 하는 lactobacilli 14균주를 1차 분리하였으며, 분리된 lactobacilli 14균주의 생화학적 특성, 당 이용성 및 균체 지방산 조성의 확인을 통해 동정된 *L. acidophilus* 9균주(NB 201~NB 209)를 시험 균주로 선발하였다. 내산성 실험 결과, 시험 균주를 pH 2.5에서 2시간 배양하였을 때 모든 시험 균주가 80% 이상의 생존율을 나타내었으며, *L. acidophilus* NB 204는 pH 2.0에서도 71%의 생존율을 보여 내산성이 높은 것으로 나타났다. 담즙산 내성은 73%의 생존율을 보인 *L. acidophilus* NB 206을 제외한 8균주가 bile extract가 1%의 농도로 첨가된 배지에서 생존율이 85% 이상으로 담즙산 내성이 매우 우수한 것으로 확인되었다. 또한 시험 균주 모두가 단백질 분해 활력이 있는 것으로 확인되었으며, yeast extract 0.1% 첨가한 것과 비교하여 0.2% 첨가 시 또는 24시간 배양과 비교하여 48시간 배양 시 TCA 가용성 펩타이드 및 유리 아미노산 생성량이 높았으며, 특히 *L. acidophilus* NB 204와 NB 209가 높은 생성량을 보였다(또는, yeast extract의 첨가량 및 배양시간이 증가함에 따라 TCA 가용성 펩타이드 및 유리 아미노산 생성량이 증가하였으며, 특히 *L. acidophilus* NB 204와 NB 209가 높은 생성량을 보였다). 시험 균주들의 β -galactosidase 활성은 1.97~2.45 unit/mL의 범위를 나타내었다.

참고문헌

- 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.
- Alm, L. 1982. Effect of fermentation on L(+) and D(-) lactic acid in milk. *J. Dairy Sci.* 65:515-521.
- Berrada, N., Lemeland, J. F., and Piaia, G. L. 1991. Bifidobacterium from fermented milks: Survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74:409-413.
- Chow, L. and Weimer, B. 1999. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 82:23-31.
- Collins, J. K., Thornton, G. and Sullivan, G. O. 1998. Selection of probiotics for human application. *Int. Dairy J.* 8:487-490.
- 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.
- Dills, S. S., Apperson, A., Schmidt, M. R. and Saier, M. H. 1980. Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 44:777-785.
- Fernandez Murga, M. L., Cabrera, G. M., Valdez, G. F., Disalvo, A. and Seldes, A. M. 2000. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 88:342-348.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.
- Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborn pathogenic associative culture. *J. Food Prot.* 40:820-823.
- Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67:3045-3051.
- Holzappel, W. H. and Schillinger, U. 2002. Introduction to pre-and probiotics. *Food Res. Int.* 35:104-116.
- 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.
- Imhof, R., Glatti, H. and Basset, J. O. 1995. Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic single strain dairy starter cultures. *Lebensm Wiss Technol.* 28:78-85.
- Johnson, T., Nikkila, P., Toivonen, L., Rosenqvist, H. and Laakso, T. 1995. Cellular fatty acid profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains in relation to the oleic acid content of the cultivation medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4497-4499.
- Kang, D. G., Kang, S. P., Chang, D. H., Kim, S. H. and Yoon, S. S. 2001. Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains isolated from Korean feces. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 33:567-573.
- Khattab, A. A. and Abou-Donia, S. A. 1987. The effect of bile salt on the growth of some lactic acid cultures. *Egy. J. Dairy Sci.* 15:51-56.
- 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.
- Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terachima, T. 1974. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus* : II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance-strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* 29:691-697.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. and Huis in't Veld,

- J. H. J. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine : Validation and effects of bile. *J. Dairy Sci.* 80:1031-1037.
21. Martoni, M. C., Bolleweg, G. L., Levit, M. D. and Savaiano, D. A. 1987. Lactose digestion by yogurt β -galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am. J. Clin. Nutr.* 45:432-439.
22. Miller, J. J. 1972. Assay of β -galactosidase. In *Experiments in molecular genetic*. New York: Cold Spring Harbor. pp. 352-356.
23. 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.
24. Peltrochche, L. H., Seibold, M., Luttkick, R. and Haase, G. 2000. Differentiation between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* by fatty acid methyl ester analysis using gas-liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* 38:3696-3704.
25. Pochart, P., Marteau, P., Bouhmik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P. and Rambaud, J. 1992. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an *in vivo* study using intestinal perfusion. *Am. J. Clin. Nutr.* 55:78-80.
26. Poolman, B. 1993. Biochemistry and molecular biology of galactosidase transport and metabolism in lactic acid bacteria. *Lait.* 73:87-96.
27. Reiter, B. and Oram, J. D. 1962 Nutritional studies on cheese starters vitamins and amino acid requirements of single strain starters. *J. Dairy Res.* 29:63-77.
28. Rizzo, A. F., Korkeala, H. and Mononen, I. 1987. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharide in the identification of lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2883-2888.
29. Salminen, S., Laine, M., Wright, A., Vuopio-Varkila, J., Korhonen, T. and Mattila-Sandholm, T. 1996. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential functional foods: a Nordic and European approach. *Bioscience Microflora.* 15:61-67.
30. Shin, M. S., Kim, H. M., Kim, G. T. and Baek, Y. J. 1999. Selection and characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean feces. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 31: 495-501.
31. Tamine, A. Y. and Robinson, P. K. 1999. Biochemistry of fermentation. In *Yoghurt: Science and technology*. Oxford. England. pp.433-485.
32. Xanthopoulos, E., Tzanetaki, L. and Tzanetakis, N. 2000. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant feces as dietary adjuncts. *Food Microbiol.* 17:205-215.

(Received 2012.6.10 / Accepted 2012.6.25)