

한국인에서 분리된 *Lactobacillus* 속 젖산균의 동정 및 생리적 특성

강동규 · 강석필* · 장동훈 · 김상호 · 윤성식¹

학교법인 연세대학교 연세우유 품질개발실, ¹연세대학교 생물자원공학과

Isolation and Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Korean Feces

Dong-Gyu Kang, Seog-Pil Kang*, Dong-Hoon Chang,
Sang-Ho Kim and Sung-Sik Yoon¹

Quality and Development Unit, Yonsei University Milk

¹Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University

Lactobacilli have been generally recognized as an important lactic acid bacteria present in the normal human intestinal flora. Fifty two *Lactobacillus* isolates were recovered from the feces of healthy Koreans whose age ranged from thirteen days after birth to 37 years. Among the isolates above, 17 isolates were tentatively identified as strains of *Lactobacillus acidophilus* and 3 isolates as strains of *Lactobacillus casei*. For their characterization, these twenty isolates were subjected to the experiments for the resistance to the artificial gastric juice, pH2.5 and bile salt. Interestingly, 3 strains survived pH 2.5 after 3 hour incubation in the artificial gastric juice with more than 75% of survival rate. *L. acidophilus* a-4 had the highest survival rate of 100%. Four strains including *L. acidophilus* a-3 grew gradually in MRS broth in the presence of the artificial bile salt. Cholesterol assimilation was also tested for the 20 isolates. The result showed that cholesterol concentration of the medium was reduced by 10 *Lactobacillus* isolates with more than 60%, as compared to the control. *L. acidophilus* a-2 had the highest reduction rate of 77%. Judging from these data obtained *in vitro*, some isolates were likely to reach the lower small intestine after consumption without a significant loss of viability, suggesting that they had the potential to be developed as a probiotic culture which might lower the cholesterol level in human.

Key words: *Lactobacillus* isolation, artificial gastric juice, bile salt, cholesterol

서 론

Lactobacillus 속은 포자를 형성하지 않고 혐기적 또는 통성 혐기성으로 증식하는 그람 양성 세균으로, 자연계에 널리 분포할 뿐만 아니라 사람의 구강 또는 소화기관 등에서도 발견되는 미생물이다⁽¹⁾. 이 세균은 인체에 유익한 미생물로서 다양한 발효 유제품의 스타터로 널리 이용되고 있다. 젖산균이 함유된 발효 유제품의 섭취가 동물의 소화관 내에서 유해 세균의 증식을 억제한다는 사실이 밝혀짐에 따라 *Lactobacilli*는 가축이나 사람의 생균제재(probiotics) 또는 정장제로서 그 이용가치가 매우 높아지고 있다⁽²⁾. 또한 최근 연구 결과 장내 유해세균의 억제, 항암효과, 유당(lactose) 이용성 증진, 혈중 콜레스테롤 저하 등⁽³⁾ 인체의 건강에 유용한 다양

한 생리적 기능을 담당하는 것으로 인식된 후 국내·외에서 이 분야의 연구가 활발히 수행되고 있다. 특히 *Lactobacillus acidophilus*(이하 *L. acidophilus*)와 *Lactobacillus casei*(이하 *L. casei*)등은 위와 같은 기능 이외에 소장 점막에 정착(colonization)이 가능한 균주로 보고⁽⁴⁾된 바 있으며, 이러한 이유로 현재 상업적으로 생산되고 있는 Probiotic 요구르트 제품용 스타터로 널리 사용되고 있다.

발효 유제품에 사용되는 젖산균이 인체에 대한 바람직한 건강 효과를 나타내기 위해서는 몇 가지 전제 조건이 필요하다. 일단 섭취된 젖산균은 구강을 통해 섭취된 후 대장까지 이동하게 되는데⁽⁵⁾, 구강에서는 lysozyme 등과 같은 가수분해 효소의 작용에 대한 저항성을 갖고 있어야 하며⁽⁶⁾ 위, 십이지장 및 각 소화관 부위에서 받을 수 있는 치명적인 스트레스를 이겨낼 수 있어야 한다. 결국, 최종 제품에서 충분한 생균수 유지⁽⁷⁾는 물론, 장내에서 서식 및 정착이 가능할 뿐만 아니라⁽⁸⁾ 소화기관의 최종 부위에 도달할 때까지 생존할 수 있어야 한다⁽⁹⁾. 위는 공복 시에 pH 1.5 정도의 매우 낮은 산성 환경을 제공하고⁽¹⁰⁾, 십이지장에서는 담즙산이나 췌장액에 함유된 각종 효소 및 염류의 영향 하에 노출됨으

*Corresponding author : Seog-pil Kang, Quality and Development Unit, Yonsei University Milk, 427 Sandong-Ri, Umbong-Myun, Asan, Chungnam 336-863, Korea
Tel: 82-41-533-0015
Fax: 82-41-533-0533
E-mail: spkang@ysmilk.co.kr

로써 미생물의 생존이 크게 위협받게 된다⁽⁵⁾. 이러한 여러 인체 내의 불리한 환경을 거쳐 장에 정착하기 위해서는 발효 유제품에서 유용 유산균이 적어도 10^6 cfu/mL 정도는 포함되어야 한다는 연구 보고⁽¹¹⁾가 발표된 바 있다. 또한 *Lactobacilli*는 숙주 특이성을 갖고 있는 것으로 알려져 있으므로 해당 숙주의 장내 환경에 얼마나 잘 적응하느냐 여부도 중요하며, 숙주의 장에 존재하는 다른 미생물과 경쟁할 수 있어야 한다⁽¹²⁻¹⁵⁾.

최근 들어 한국인 장 내용물로부터 유산균을 분리하여 이를 식품 및 의약품에 이용하고자 하는 노력이 활발하게 진행되고 있는 데⁽¹⁶⁻²¹⁾, 이러한 노력은 주로 *Bifidobacterium* spp.에 연구의 초점이 맞추어져 있으며, *Lactobacilli*에 대한 연구는 아주 미흡한 실정이다. 현재 국내에서는 *Lactobacilli*가 상업적으로 발효 유제품, 의약품 및 동물약품 등에 널리 사용되고 있으나, 사용되는 양의 대부분은 외국에서 수입된 것들이다.

따라서 본 연구는 한국인의 특성에 맞는 정장제용 우량균주를 개발하고, 그 기본 특성규명을 위해 건강한 한국인 분변으로부터 *Lactobacilli*를 분리, 동정하고, 분리균의 종별 출현빈도, 산생성 능력, 인공위액 및 인공 담즙에 대한 내성 및 cholesterol 저하능력 등 몇 가지 생리적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

Lactobacilli의 분리

생후 3일부터 37세까지의 남자 8명, 여자 5명, 총 13명으로부터 *Lactobacilli*를 분리하였다. 분변 채취에 응한 모든 지원자는 유아기 때 모유를 섭취한 경험이 있으며 특별한 장 질환이나 질병이 없는 건강한 사람을 선발하였고, 1개월간 발효 유제품의 섭취를 제한하고, 항생물질의 투약이나 주사를 금하는 등의 식이 조절을 받게 하였다. 분변의 채취는 식이조절 후 즉시 실시하였고, 혐기성 미생물의 채취가 가능한 Culturette(BBL, USA)를 사용하였다. 채취된 시료는 재빨리 10 mL의 MRS broth(pH 6.8)가 들어 있는 시험관(외경 16 mm)에 투입 후 얼음 box 중에서 보관하면서 48시간 이내에 분리 실험을 사용하였다.

Lactobacillus 속 균주의 분리는 다음과 같이 실시하였다. 상기 MRS broth(Difco) 중에서 현탁된 시료를 멸균 생리적 식염수(0.85% NaCl 용액)로 적절한 배수량만큼 희석하고, 토마토즙이 함유된 LBS agar(BBL)⁽²²⁾ 상에 가급적 50~100개의 집락(colony)이 형성되도록 도말한 후 37°C 배양기 내에서 48시간 배양하였다. 일단 배지 상에 형성된 집락에 대하여 외관의 모양이 유사하고 출현 빈도가 많은 것을 우선적으로 선별하고, 동일 배지에 2~3회 희석 배양하여 순수 분리한 후 MRS broth 중에서 37°C로 배양 후 5°C로 냉장 보관하면서 사용하였다.

Lactobacilli의 동정

상기의 분리된 *Lactobacillus* 속 균주를 Gram 염색하고 현미경 관찰에 의하여 형태를 확인한 후, 당 이용능력 및 몇 가지 생화학적 특성에 따라 최종 동정하였다. 당 이용성은 분리된 각 균주를 MRS agar 배지에 37°C에서 48시간 anaer-

obic system(Becton Dickinson)에서 혐기적으로 배양한 후 원심분리(3000×g, 3 min) 하여 생리적 식염수로 2회 세척한 후 멸균 증류수에 현탁시켜 API 50 CHL strip(bioMerieux, France)에 첨가하고 37°C에서 48시간 배양하였다. 이 결과를 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*⁽²³⁾에 기술된 특징과 bioMerieux의 database system(Apilab plus V3.2.2)의 결과를 토대로 하여 각 균주를 동정하였다.

인공위액에 대한 내성 시험

인공 위액에 대한 내성 실험은 Kobayashi등⁽²⁴⁾의 기술한 방법에 따라서 다음과 같이 실시하였다. 분리 균주를 MRS broth에 2회 계대 배양한 후 균체를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 회수하고 세척한 다음, HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정된 인공위액(MRS broth + 1% pepsin)에 접종하였다. 37°C에서 3시간 가볍게 진탕 배양 후 0.1 mL 취하여 MRS agar 상에 도말하여 동일 온도에서 배양 후 생성된 집락을 계수하여 배양전의 집락수와 비교하였다. 생존율은 인공위액에서 배양 전의 생균수에 대한 배양한 후의 생균수의 비를 백분율(%)로 표시하였다.

내담즙성 실험

Christiaens 등⁽²⁵⁾의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 분리된 20 주를 상기 MRS broth에 2회 계대 배양 후 0.3% oxgall이 포함된 MRS agar에 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 생성된 집락수를 계수하였다. 대조구는 oxgall이 포함되지 않은 MRS agar를 사용하였다. 생존율은 oxgall이 포함되지 않은 MRS agar의 생균수에 대한 0.3% oxgall이 포함된 MRS agar의 생균수의 비를 백분율(%)로 표시하였다.

산 생성능 측정

L. acidophilus 및 *L. casei*로 분류된 균종을 MRS broth에 2회 계대 배양 후 멸균된 12%(w/v) 환원 탈지유에 1%(v/v) 접종하여 37°C에서 정지 배양하면서 적정산도 및 pH를 측정하였다. 적정 산도는 상법에 준하여 실시하였으며 젖산의 양으로 환산하여 %로 표시하였다. pH의 측정은 pH meter(model 691, Metrohm)를 사용하여 20°C에서 측정하였다.

Cholesterol 저하능력의 측정

Cholesterol assimilation activity를 측정하기 위해, Walker와 Gilliland⁽²⁶⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. 먼저 cholesterol-phosphatidyl choline micelle의 제조는 Razin 등⁽²⁷⁾의 방법에 따라 수행하였다. 22 mg phosphatidyl-choline (L- α -lecithin, Sigma)과 10 mg의 cholesterol (Sigma)을 시험관에 넣고 클로로포름(CHCl_3 , Merck)을 첨가하여 혼합한 후 질소가스 중에서 완전히 건조하였다. 이것이 들어 있는 tube에 0.4 M sucrose 용액 10 mL를 첨가하고 같은 온도에서 5분 간격으로 15분 동안 sonication한 후 4°C에서 38,000×g로 30분 원심분리 하였다. 이 여액을 membrane(0.45 μm , Nalgene)을 이용하여 제균한 후 4°C에서 보관하면서 사용하였다. 미리 제조된 cholesterol-phosphatidyl choline micelle 1 mL와 MRS-Thio broth(MRS 액체배지 55 g, thioglycolic acid(Sigma) 2 g,

0.3%(w/v) oxgall/ 1 L 증류수) 9 mL를 test tube 중에서 잘 혼합한 다음 활력이 우수한 시험 균주를 1% 접종하고, 37°C의 anaerobic system(Becton Dickinson)에서 19시간 배양하였다. 배양 후 4°C에서 12,000×g로 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액을 정량시험에 사용하였다. 대조구는 분리균주를 접종하지 않고 상기와 동일하게 조제하였다.

콜레스테롤 정량분석은 Rude과 Morris⁽²⁸⁾의 방법에 의하여 실시하였으며, Assimilation activity는 대조구의 cholesterol 값에 대한 실험구 균체의 cholesterol 값(대조구 시료에서 실험구 상등액의 cholesterol 값을 뺀 수치)의 백분율로 정의하여 percent(%)로 표시하였다.

결과 및 고찰

Lactobacillus 속 균주의 선별 및 동정

생후 13일부터 37세까지의 총 13명의 남·여로부터 분리된 260개의 균주 중 현미경 관찰을 통해 Gram 양성이며 catalase 반응이 음성인 균주로서 특징적인 집락의 모양을 나타낼 뿐만 아니라 지속적으로 LBS 및 MRS배지에서 성장하는 *Lactobacillus* 속으로 판단되는 52 주를 일차적으로 분리하였다. 각 분리균은 API 50 CHL kit(bioMerieux, France)를 사용하여 당 발효능을 실험한 바, Table 1과 같은 결과가 얻어졌다. 연령이 생후 13일부터 13개월까지의 영·유아에서는 *L. acidophilus* 9주 및 *L. plantarum*이 8주로 가장 많이 검출되었고, 다음으로는 *L. casei* 3주, *L. salivarius* 2주, *L. rhamnosus* 1주 및 *L. brevis* 1주의 순이었다. 한편, 13세 이상의 성인에게서도 *L. acidophilus*가 10주로 가장 많았고 다음으로 *L. plantarum*이 5주, 그밖에 *L. salivarius*, *L. brevis*, *L. pentosus* 등이 분리되었다. 남녀를 불문하고 전체적으로 *L. acidophilus*가 19주로 가장 많이 분리되었는데, 그 이유는 확실치 않다. 다만 젖산균의 분리 효율을 올리기 위해 LBS 배지에 첨가된 tomato juice가 이 균종의 증식에 영향을 미칠 수도 있다고 생각된다. 본 연구에서 *L. plantarum*이 두 번째로 많이 분리(13주)된 것은 매우 흥미로운 현상으로 여겨진다. 이 균종은 김치의 발효 후기에 많이 분리되는 유산균으로 알려져 있어⁽²⁹⁾ 피 실험자의 김치 섭취와 관련이 있을 것으로 추측된다.

상기의 분리된 총 52주 중에서 예비실험 결과(data not shown) 내산성이 우수한 것으로 나타난 *L. acidophilus* 19주 중 보관 및 계대 배양 과정에서 사멸한 2주를 제외한 17주와 3주의 *L. casei*에 대하여 몇 가지 생리적 특성을 파악하기 위한 실험을 수행하였다.

인공위액에 대한 내성

20개 분리균주(*L. acidophilus* 17주 및 *L. casei* 3주)에 대한 내산성을 실험한 결과 *L. acidophilus*로 동정된 a-4 주는 pH 2.5에서 3시간 경과 후에도 전혀 사멸하지 않고 100% 생존하였으며, *L. acidophilus* a-2와 *L. casei* b-3도 75% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. 이에 반해서 *L. acidophilus* a-1을 포함한 4주는 40% 내외의 생존율을 나타내었고, 그 밖의 13주는 40% 미만의 생존율을 나타내어 균주 별로 인공위액에 대한 내성은 큰 차이가 있음이 관찰되었다(Table 2).

Table 1. Isolation frequency of some *Lactobacillus* spp. isolated from 13 Korean feces using MRS agar

Species	Age	Sex	No of isolates
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	13 d	F	1
	40 d	F	5
	60 d	M ¹⁾	2
	13 mo	F ²⁾	1
	26 yr	M	3
	27 yr	M	2
	29 yr	M	5
	<i>Lactobacillus casei</i>	40 d	F
	60 d	M	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	40 d	F	2
	12 mo	M	6
	17 yr	F	2
	28 yr	M	1
	29 yr	M	1
	32 yr	M	1
<i>Lactobacillus brevis</i>	40 d	F	1
	17 yr	M	1
	32 yr	M	1
	37 yr	M	1
<i>Lactobacillus pentosus</i>	26 yr	M	1
	32 yr	M	1
<i>Lactobacillus salivarius</i>	12 mo	M	2
	17 yr	F	1
	17 yr	M	3
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	37 yr	M	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	12 mo	M	1
<i>Leuco.mes.mes/dext</i> ³⁾	13 yr	F	1
<i>Leuco.mesen. cremoris</i>	28 yr	M	1
<i>Leuconostoc lactis</i>	32 yr	M	1
Total		13	52

¹⁾M: male; ²⁾F: female

³⁾*Leuco mes/dext*: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*.

내 담즙성

L. acidophilus 17주 및 *L. casei* 3주에 대하여 oxgall이 0.3% 포함된 MRS 배지에서 내담즙성을 측정된 결과는 Table 3에 표시한 바와 같다. *L. acidophilus* a-3, a-8, a-13, a-17의 4주는 담즙의 존재에도 불구하고 균체 증식에 지장을 받지 않고 배양 시간이 증가함에 따라 생균수가 비슷하거나 오히려 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 *L. acidophilus* 중 a-2 및 a-16은 이 농도에서 50% 이상 생균수가 감소하는 것으로 나타났고 나머지 13주도 54%에서 99% 정도로 생존율이 감소하는 것으로 나타나 전반적으로 균주에 따라 내담즙성의 정도 차가 큰 것으로 나타났다.

분리 균주의 산 생성능

L. acidophilus 17주 및 *L. casei* 3주를 12%(w/v) 환원 탈지유 배지 중에서 배양하면서 산 생성능을 측정된 결과(Table 4), *L. acidophilus* a-2 및 a-16은 60시간 경과 후 pH가

Table 2. Survival rate of the twenty isolates of *Lactobacillus* isolates of *L. acidophilus* and *L. casei* in the artificial gastric juice, pH 2.5

Strain	Counts (CFU/mL)		Survival rate (%)	
	Before incubation ($\times 10^7$)	After incubation ($\times 10^7$)		
<i>L. acidophilus</i>	a-1	110	52	47
	a-2	34	26	77
	a-3	6	3	50
	a-4	32	34	106
	a-5	32	0	0
	a-6	12	1	8
	a-7	61	19	31
	a-8	71	0	0
	a-9	46	3	7
	a-10	87	3	3
	a-11	84	1	1
	a-12	176	38	22
	a-13	99	0	0
	a-14	83	1	1
	a-15	5	2	40
	a-16	67	27	40
	a-17	12	0	0
<i>L. casei</i>	b-1	15	0	0
	b-2	320	70	22
	b-3	80	60	75

¹⁾All the strains tested were transferred twice in MRS broth. After diluted properly, bacterial counts were determined after holding each culture in the artificial gastric juice (pH 2.5) for 3 hr and the survival rate was expressed as a percent of bacterial counts after incubation to those before the treatment.

²⁾Numbers are an average of the data obtained by three independent counts.

3.5~3.6에 도달하였으며, 적정산도도 2.1~2.3%까지 도달하여 산 생성능력이 상당히 우수함을 알 수 있었다. 60시간 경과 후 적정산도가 0.8%에 도달하지 못한 균주는 총 10주였으며 *L. acidophilus* a-6은 pH 5.2, 적정 산도 0.5로 산 생성 능력이 가장 미약하였다.

Cholesterol 저하 효과

Gilliland⁽³⁰⁾은 *L. acidophilus*를 콜레스테롤이 첨가된 배지에서 혐기적으로 배양하여, 원심분리했을 때 어떤 균주는 과도하게 상등액의 cholesterol이 감소하고 균체의 cholesterol은 증가하는 사실을 관찰하였으며 이 현상을 cell에 의한 cholesterol assimilation이라고 표현하였고, 이러한 assimilation activity가 높은 균주는 동물실험에서도 cholesterol 저하능력이 우수하다고 보고하였다. Assimilation은 국내에서는 발표자에 따라 동화⁽³¹⁾, 흡수⁽³²⁾ 또는 소화⁽³³⁾ 등으로 표현되고 있어 아직 용어정리가 안된 상태이며 cholesterol저하능력이 우수한 균주를 선별하기 위한 *in vitro* 실험으로 많이 이용하고 있다.

17주의 *L. acidophilus* 및 3주의 *L. casei*에 대하여 cholesterol 저하 능력을 측정한 결과는 표 5와 같다. 시험에 사용

Table 3. Survival rate of the twenty *Lactobacillus* isolates of *L. acidophilus* and *L. casei* in the presence of bile salt (0.3% oxgall)

Strain	Counts (CFU/mL)		Survival rate (%)	
	Control ($\times 10^7$)	0.3% Oxgall ($\times 10^7$)		
<i>L. acidophilus</i>	a-1	50	44	88
	a-2	64	24	38
	a-3	330	396	112
	a-4	54	30	56
	a-5	101	89	88
	a-6	39	36	92
	a-7	357	311	87
	a-8	90	90	100
	a-9	78	66	85
	a-10	50	27	54
	a-11	83	75	90
	a-12	300	268	89
	a-13	82	82	100
	a-14	89	80	90
	a-15	350	346	99
	a-16	20	2	10
	a-17	84	85	101
<i>L. casei</i>	b-1	71	51	72
	b-2	388	262	68
	b-3	52	32	62

¹⁾All the strains tested were transferred twice in MRS broth. After diluted properly, bacterial counts were determined in MRS agar containing 0.3% oxgall at 37°C for 48 hr and the survival rate was expressed as a percent of bacterial counts on MRS agar containing 0.3% oxgall to those on MRS agar without the oxgall

²⁾Numbers are an average of the data obtained by three independent counts.

된 총 20주중에서 *L. acidophilus* a-2주 와 a-6주가 70%이상의 현저한 저하능력을 나타냈다. 그밖에 10주가 60%이상의 저하율을 나타냈으며, 4주는 50%이하의 저하율을 나타내었다. cholesterol 저하능력은 분리된 사람에 따라, 또한 같은 사람에게서 분리했어도 균주별로 차이가 큰 것으로 보고 되었고⁽³⁴⁾ 본 실험에서도 동일한 결과가 얻어졌다(data not shown). 담즙산에 대한 내성과 cholesterol 저하능력과 관련성을 살펴본 결과 상호간의 유의적인 관계가 없는 것으로 나타났으며 이는 Gilliland 등⁽³⁵⁾의 연구결과와 일치하였다. *In vitro* 상태와 인체에서 미생물에 의한 콜레스테롤 저하 능력의 관련성에서 Gilliland 등⁽³⁰⁾은 *in vitro*에서 콜레스테롤 저하능력이 우수한 균주가 동물실험에서도 콜레스테롤 저하능력이 우수하였다고 발표한 바 있으나, 그 증거는 아직 불충분 한 상태이다. 따라서 본 실험에서 콜레스테롤 저하능력이 우수하게 나타난 균주에 대하여 향후 동물실험을 통한 연구의 보완이 필요하다고 생각된다.

요 약

본 연구에서는 한국인 분변으로 부터 분리, 동정된 *Lacto-*

Table 4. Acid production of the twenty isolates of *L. acidophilus* and *L. casei* in MRS broth with different incubation times at 37°C

Strain	Acid production (%)						
	12 hr		36 hr		60 hr		
	pH	TA	pH	TA	pH	TA	
<i>L. acidophilus</i>	a-1	5.8	0.33	4.8	5.5	4.3	0.9
	a-2	5.0	0.5	3.6	16.5	3.5	2.3
	a-3	6.0	0.26	4.7	6.0	4.2	1.0
	a-4	5.7	0.33	4.6	5.7	4.4	0.9
	a-5	6.2	0.25	5.2	3.3	5.1	0.6
	a-6	6.3	0.24	5.7	3.8	5.2	0.5
	a-7	6.1	0.25	4.6	6.5	4.9	0.7
	a-8	6.1	0.26	5.2	4.0	5.2	0.6
	a-9	6.1	0.25	5.3	4.2	5.1	0.6
	a-10	5.8	0.35	5.2	5.1	4.3	0.8
	a-11	6.2	0.25	5.9	3.0	5.2	0.5
	a-12	5.7	0.3	4.8	6.2	4.5	0.8
	a-13	6.1	0.26	5.9	3.0	4.6	0.9
	a-14	6.2	0.26	5.9	2.8	4.4	0.9
	a-15	5.1	0.38	4.8	6.2	4.0	1.2
	a-16	4.8	0.55	3.6	16.5	3.6	2.1
	a-17	6.2	0.26	6.0	2.8	4.4	0.9
<i>L. casei</i>	b-1	5.9	0.27	5.1	6.2	4.8	0.8
	b-2	5.8	0.29	4.9	5.0	4.1	1.0
	b-3	5.7	0.37	4.6	5.2	4.3	0.8

¹⁾Values are an average of the data obtained by three independent measurements.

Table 5. Cholesterol assimilation activities of the twenty isolates of *L. acidophilus* and *L. casei* in MRS containing cholesterol at 37°C

Strain	Cholesterol (mg/mL)		Assimilation activity (%) [(spent broth/(control broth-spent broth))]	
	Control broth	Spent broth		
<i>L. acidophilus</i>	a-1	76.7	32.1	58
	a-1	76.7	17.9	77
	a-3	76.7	23.6	69
	a-4	76.7	31.6	59
	a-5	76.7	26.0	66
	a-6	76.7	21.8	72
	a-7	76.7	32.2	58
	a-8	76.7	25.4	67
	a-9	76.7	25.1	67
	a-10	76.7	30.4	60
	a-11	76.7	24.5	68
	a-12	76.7	40.4	47
	a-13	76.7	38.8	49
	a-14	76.7	41.3	46
	a-15	76.7	30.8	60
	a-16	76.7	31.6	59
	a-17	76.7	26.3	66
<i>L. casei</i>	b-1	76.7	40.4	47
	b-2	76.7	25.1	67
	b-3	76.7	26.0	66

Each isolate was added at 1%(v/v) inoculum into the medium consisting of 1 mL of cholesterol-phosphatidyl choline micelle and 9 mL of MRS-Thio broth(MRS broth powder 55 g, thioglycolic acid 2 g, 0.3%(w/v) oxgall/ 1L distilled water), and then incubated anaerobically at 37°C for 19 hr. After centrifugation the supernatant was subjected to cholesterol determination.

¹⁾Cholesterol assimilation activities were expressed as percentage of the cholesterol of cells in broth as described in Materials and Methods.

²⁾Values are an average of the data obtained by three independent determinations.

bacillus 속 균주의 종별 출현빈도, 산 생성능, 인공 위액 및 인공 담즙에 대한 내성, cholesterol 저하능력 등이 검토되었다. 생후 3일부터 37세까지의 총 13명의 남·여의 분변으로부터 총 52균주의 *Lactobacilli*가 분리되었고 이 중 *L. acidophilus*가 19주로 가장 많았으며 다음으로 *L. plantarum* 순이었다. 분리주 중 *L. acidophilus*로 동정된 17주와 *L. casei*로 동정된 3주에 대해서 생리적 특성을 검토한 바 각각 다음과 같은 결과가 얻어졌다. 인공위액에 대한 내성 실험결과 *L. acidophilus* a-4는 pH 2.5에서 3시간 경과 후에도 전혀 사멸하지 않고 100% 생존하는 것으로 나타났으며, *L. acidophilus* a-2와 *L. casei* b-3도 75%이상의 높은 생존율을 나타내었다. 나머지 13주는 40%이하의 생존율을 나타내어, 균주 별로 인공위액에 대한 내성은 큰 차이를 나타냈다. 내 담즙성을 측정할 결과 *L. acidophilus* a-3를 포함한 4주는 성장에 지장을 받지 않았으나 대부분의 분리 균주는 생균수가 처리전 보다 54~99% 정도로 감소되는 것으로 나타나 인공위액 내성과 마찬가지로 균주에 따라 편차가 큰 것으로 나타났다. 환원 탈지유를 이용한 산생성능에 있어서는 두 *L. acidophilus* 균주 (a-2 및 a-16)가 60시간 경과 후 2.1~2.3%의 적정 산도까지 도달하였고 이때 pH는 3.5~3.6이었다. 60시간 배양 후 적정 산도가 0.8%에 도달하지 못한 것은 총 20주중 10주였다. 한편 cholesterol 저하능을 측정할 결과 공시한 20개 분리주 중에서 *L. acidophilus* a-2 주와 a-6 주가 70% 이상의 우수한 저하능을 나타냈고, 12 균주가 60% 이상의 저하능을 나타냈다. cholesterol 저하능은 동일 균종이라 하더라도 분리원(사람)은 물론 동일 분리원에서 유래된 균주 간에도 큰 차이가 나타났다. 담즙산에 대한 내성과 cholesterol 저하능력과의 관련성은 상호간의 유의적인 관계가 없는 것으로 나타났다. 결론적으로 본 실험에서 얻은 몇 균주는 인체에 섭취될 경우 사멸하지 않고 소화관 하부까지 도달할 수 있는 잠재성이 있었으며, 따라서 이들 분리주는 정장제로 이용될 수 있다고 생각되었다.

문 헌

- Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlious, P. and Bellom-Fontaine, M.N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1725-1731(1997)
- Lilly, D.M. and Stillwel, R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganism. *Science* 147: 747-748(1965)
- Gilliland, S.E. Acidophilus milk products: A review of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.* 72: 2483-2494(1989)
- Tamime, A.Y. and Robinson, R.K. In *Yoghurt: science and technology*. 2nd Ed. pp. 358-360. CRC Press, N.Y(1999)
- Chow, L. and Weimer, B. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 82: 23-31(1999)
- Fuller, R. *Probiotics: The scientific basis*, Chapman & Hall, London(1992)
- Speck, M.L. Interactions among *Lactobacilli* and Man. *J. Dairy Sci.* 59: 336-343(1976)
- Havenaar, R., Brink, B.T. and Huis in't Veld, J. H. J. Selection of strains for probiotic use. pp.209-224 in *Probiotics*. R. Fuller, ed. Chapman & Hall, London(1992)
- Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D. and Reinheimer, J.A. Viability of probiotic(*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. *J. Dairy Sci.* 83: 1905-1911(2000)
- Lankaputhra, W.E.V. and Shah, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salt. *Cult. Dairy Prod. J.* 30: 2-7(1995)
- Blanchette, L., Roy, D., Belanger, G. and Gauthier, S.F. Production of cottage cheese using dressing fermented by *bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.* 79: 8-15(1996)
- Gilliland, S.E., Bruce, B.B., Bush, L.J. and Staley, T.E. Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. *J. Dairy Sci.* 63: 964-972(1980)
- Fuller, R. Ecological studies of the *Lactobacillus* flora associated with the chop epithelium of the fowl. *J. Appl. Bacteriol.* 36: 131-139(1973)
- Lin, J.H. and Savage, D.C. Host specificity of the colonization of murine gastric epithelium by lactobacilli. *Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Lett.* 24: 67-72(1984)
- Morishita, Y., Mitsuoka, T.M., Kaneuchi, C., Yamamoto, S. and Ogata, M. Specific establishment of lactobacilli in the digestive tract of germ-free chickens. *J. Microbiol.* 15: 531-538(1971)
- Baek, Y.J. Isolation and industrialization of Korean originated bifidobacteria. The 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Human Health. 48-60(1997)
- Shin, M.S., Kim, H.M., Kim, G.T., Huh, C.S., Bae, H.S. and Baek, Y. J. Selection and characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean feces. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 495-501(1999)
- Shin, M.S., Lee, J.J., Na, S.H., Bae, H.S., Huh, C.S. and Baek, Y.J. Characteristics of *Bifidobacterium* spp. isolated from Korean feces for probiotics. *Korean J. Dairy Sci.* 20: 273-282(1998)
- Ahn, J.B., Lee, K.H. and Park, J.H. Isolation and Identification of oxygen resistant *bifidobacterium* sp. from Korean and its characteristics. *Korean J. Food Nutr.* 10: 122-126(1997)
- Ahn, J.B., Ji, G.E., Jeong, H.K., Lee, K.H. and Park J.H. Isolation and selection of *Bifidobacterium* spp. from Korean feces for fermented dairy foods. *Korean J. Dairy Sci.* 19: 349-360(1997)
- Jin, H.S. Growth in skim milk of the *bifidobacteria* isolated from Korean feces. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 248-252(1997)
- Rogosa, M., Mitchell, J.A. and Wiseman, R.F. A selective medium for isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.* 62: 132-133(1951)
- Krieg, N.R. and Holt, J.G. *Bergey's manual of systematic Bacteriology*, pp. 1209-1234. Williams & Wilkins, Baltimore, USA(1986)
- Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* 29: 691-697(1974)
- Christiaens, H., Leer, R.J., Pouwels, P.H. and Verstraete, W. Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3792-3798(1992)
- Walker, D.K. and Gilliland, S.E. Relationships among bile tolerance bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 76: 956-961(1993)
- Razin, S., Kutner, S., Efrati, H. and Rottem, S. Phospholipid and cholesterol uptake by mycoplasma cells and membrane. *Biocem and Biophys. Acta.* 598: 628-640(1980)
- Rudel, L.L. and Morris, M.D. Determination of cholesterol using *o*-phthalaldehyde. *J. Clin. Res.* 14: 364-366(1973)
- Lee, C.W., Ko, C.Y. and Ha, D.M. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 102-109 (1992)
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *App. Environ. Microbiol.* 49: 377-381(1985)
- Ahn, Y.T. and Kim, H.U. A review on the hypocholesterolemic

- effect of lactic acid bacteria. Korean Dairy Technol. 17: 109-121(1999)
32. Yoon, Y.H., Kang, D.H., Baek, Y.J. and Huh, C.S. Cholesterol assimilation activity of *Lactobacillus* spp. from kefir and yoghurt and non starter strains. Korean J. Dairy Sci. 20: 143-152(1998)
33. Ji, G.E. Lactic acid bacteria and cholesterol. Proceedings of fall symposium. Korean Society for Food Science of Animal Resources. 71-85(1995)
34. Buck, Lys M. and Gilliland, S.E. Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. J. Dairy Sci. 77: 2925-2933(1994)
35. Gilliland, S.E. and Walker, D.K. 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(1990)
-
- (2001년 1월 19일 접수)