성인으로부터 분리된 *Lactobacillus casei* CU2604의 우유배지에서의 생장 특성 및 생리적 특성

김희진¹ · 최재경¹ · 이경민 · 임중현 · 엄석진 · 김근배*

중앙대학교 동물자원과학과

Growth Characteristics and Physiological Properties in Milk of *Lactobacillus casei* CU2604 Isolated from Adult Feces

Hee Jin Kim¹, Jae Kyoung Choi¹, Kyung Min Lee, Jung Hyun Im, Seok Jin Eom, and Geun-Bae Kim*

Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea

Abstract

As a trial for the development of a new starter culture for yogurt products, more than two hundred lactic acid bacteria strains were isolated from raw milk and healthy human feces. The strains that showed excellent growth and acid production ability in the 10% skim milk media were selected and identified as *Lactobacillus casei* through the API carbohydrate fermentation pattern and 16S rDNA sequence analysis. *L. casei* CU2604 was further investigated for its physiological characteristics as a starter culture compared with a commercial strain. The CU2604 strain showed good acid production and growth characteristics in milk, which were comparable to those of the *L. casei* Shirota strain. Despite the fact that both these strains displayed the same sugar fermenting pattern and PFGE band pattern, and had similar growth characteristic in milk, *L. casei* CU2604 exhibited different fatty acid composition in the cell wall, showed more tolerance to bile and to pH, and presented better growth inhibition activity against pathogenic bacteria. Based on these results, the *L. casei* CU2604 strain holds great promise for use as a novel and efficient starter culture in the production of yogurt. Additional studies on the probiotic characteristics of this strain are currently being conducted.

Key words: *Lactobacillus casei*, yogurt starter, probiotics, PFGE, fatty acid composition

서 론

많은 소화관 질환이 장 점막 기능의 변화와 연관이 있고 probiotic 유산균은 장내 균총의 안정화를 위한 새로운 기능성 식품인 것이 밝혀지면서(Marteau *et al.*, 1993; Salminen *et al.*, 1996; Sanders, 1995) probiotic 유산균이 함유된 발효유 제품이 주는 건강에 유익한 효과에 대한 관심이 증가하고 있다.

Probiotics란 장내미생물 균형을 유지시킴으로써 숙주에게 이로운 작용을 하는 살아있는 미생물을 의미하며(Fuller, 1989), 충분한 양을 섭취할 경우 면역-염증반응의 억제(Cebra, 1999), 항암작용(Fuller and Gibson, 1997), 장내균

총의 안정화, 유당불내증 경감, 콜레스테롤 수치 감소 등과 같은 수요자에게 유익한 효과를 제공한다고 보고되었다(Heenan *et al.*, 2004; Sanders, 1993; Schaafsma, 1996a,b). 효과적인 probiotics는 장관을 통과하며 위산과 담즙산에 견뎌야 하고, 장관 내에 부착력이 있어야 하며(Mishra and Prasad, 2005), 내열성이 뛰어나고 증식이 빨라야 한다(Park *et al.*, 1996).

Probiotics로 사용되고 있는 미생물로는 *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*가 연구되었는데(Gilliland, 1979) *Lactobacilli*의 섭취는 인체의 병원성균에 대한 저항성을 증가시키며, 이는 probiotic의 선택적인 증가로 인해 병원성균에 대한 경쟁력이 증가하는 것과 면역조절효과가 있는 것으로 보고되었다(Havenaar and Spanhaak, 1994). 또한, *Lactobacilli*의 섭취는 macrophages와 lymphocytes, natural killer cells를 증가시키고 γ -interferon의 생산과 IgA 분비를 증가시킨다고 보고되었다(Kaila *et al.*, 1992; Perdigon *et al.*, 1990).

¹These authors are equally contributed in this work.

*Corresponding author : Geun-Bae Kim, Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea. Tel: 82-31-670-3027, Fax: 82-31-676-5986, E-mail: kimgeun@cau.ac.kr

Lactobacillus casei strain은 유럽과 아시아 등지에서 발효유 제품을 생산하는데 널리 이용되고 있으며, 특히 *Lactobacillus casei* Shirota(Yakult Ltd., Japan)와 *Lactobacillus casei* DN114001(Danone, France)는 발효유제품 ‘Yakult’와 ‘Actimel’에 이용되는 대표적인 probiotic 균주이다(Saxelin, 2005). *L. casei* strain은 많은 연구 결과 rotavirus를 비롯한 바이러스성 설사에 효과적이고 방광암의 재발을 감소시키며 면역조절작용이 있는 것으로 밝혀졌다(Aso *et al.*, 1995; Nagao *et al.*, 2000; Sugita and Togawa, 1994).

발효유 제조에 이용되는 starter에 대한 국내연구는 생리활성물질인 GABA 생성, ACE 억제능, CLA생성 등 lactic acid bacteria(LAB)에 대한 다양한 이로운 효과들을 확인하여(Lim *et al.*, 2008, Lim *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2008) probiotics에 대한 자체개발이 점차적으로 진행되어지는 추세이다. 이에 본 연구는 건강한 성인 분변으로부터 발효유 제조에 사용가능한 *Lactobacillus* 균주를 분리 및 동정하고, 상업적으로 이용되는 균주와 비교하여 종균제의 국내 개발에 발판을 마련하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

균주의 선별

건강한 성인의 분변을 수거하여 혐기희석액(KH_2PO_4 4.5 g/L, Na_2HPO_4 6.0 g/L, L-Cystein·HCl 0.5 g/L, Tween 80 0.5 g/L)으로 희석한 시료를 Rogosa SL agar(Difco, USA)에 0.1 mL씩 평판도말법으로 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 형성된 균의 집락을 0.05% L-Cystein·HCl이 함유된 MRS배지(Difco, USA)에 순수 분리하여 젖산균으로 추정되는 집락을 streaking하여 호기적 배양을 하였다. 순수 분리된 균주를 그람염색과 현미경관찰을 통하여 그람 양성 간균을 선별하고 10% skim milk(Difco, USA)에서 24시간 배양 후 커드 형성능력이 있는 균주를 선별한 후, 10% skim milk에서 2차 계대배양을 하면서 커드 형성 능력과 산 생성 능력이 뛰어난 균주를 최종 선별하였다.

선발된 균주의 동정

API kit를 이용한 생화학적 동정

선발된 균주의 발효특성을 알아보기 위하여 API 50 CHL Carbohydrate Test Kit(bioMerieux Co., France)를 이용하였다. MRS 액체배지에 2회 계대배양 한 후 원심분리(10,000 g, 10 min, 4°C)를 한 후 상등액을 버리고, 균체만 모아 5 mL의 50 mM sodium phosphate buffer(SPB, pH 6.5)로 2회 세척한 후, 동일한 buffer를 이용하여 Mcfarland Standard 4 이상의 탁도를 맞추어 접종용 균주로 사용하였다. API 50 CHL medium(5 mL)에 균주 배양액 1.5 mL를 넣은 후, 각 strip에 100 µL씩 분주하고 strip에 mineral oil로 중층이

되도록 첨가하였다. 37°C에서 24시간 및 48시간 동안 배양한 후 각각의 당 이용성을 비교하였다. 49가지 탄소원에 대하여 미생물 증식에 의한 색의 변화 여부를 관찰하여 각 탄소원의 이용 여부를 관찰하였고 최종 동정 결과는 동정용 프로그램 API web을 이용하여 해석하였다.

16s rDNA sequencing을 통한 분자 생물학적 동정

MRS agar 배지에 자란 colony를 채취하여 PCR tube에 Lyse-N-Go PCR reagent(Pierce, USA)를 5 µL 넣고 Genomic DNA를 추출한 후, 25 µL의 HotStarTaq Master mix(Qiagen, Germany)와, 각각 1 µL씩의 primer, 18 µL의 distilled water를 첨가한 후 PCR program을 실시하였다. MRS agar에서 48시간 배양한 균주를 template로 이용하였고, primer는 universal primer 27F와 1492R을 사용하였다. PCR product는 PCR purification kit(Qiagen, Germany)을 이용하여 정제하였다. 정제과정을 통해 얻어진 DNA를 Nano Drop(Nanophotometer, Implen, Germany)을 이용하여 농도를 측정 한 후에 25-50 µL로 최종적 농도를 맞춘 후 double strand DNA sequencing(Macrozen, Korea)을 실시하였다. 얻어진 sequence는 BLAST로 검색하여 strain을 동정하였다.

담즙내성

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 의하여 0.05% L-Cystein·HCl이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가하여 2차 계대가 끝난 균주들을 0.5% 접종하였고, 대조균으로는 0.3% oxgall을 첨가하지 않은 MRS 액체배지에 동량을 접종하여 3반복 실험을 수행하였다. OD₆₂₀ 값을 측정하기 위하여 배양액과 시료를 4:1로 희석하여 측정하였으며, 호기적인 조건으로 37°C water bath에서 배양하여 12시간 후에 OD₆₂₀ 값을 측정하였다.

내산성

Hyronimus 등(2000)의 방법에 따라 0.05% L-Cystein·HCl이 함유된 MRS 액체배지에 3.0 M hydrochloric acid로 pH 3.0을 맞추어 제조한 후, overnight 배양시킨 균주를 1% 접종하였다. 대조균인 초기균수를 측정하기 위하여 phosphate buffer(0.1 M, pH 6.2)로 희석한 후 pouring하여 37°C에서 48시간 배양하고, 균주를 접종한 용액을 37°C water bath에서 3시간 동안 정치배양한 후 위와 동일한 방법으로 희석하여 배양하였다. 그리고 배양 후에 나타난 집락수를 계수함으로써 산성 pH에 대한 내성을 측정하였다.

항균력

분리한 유산균을 MRS 액체배지에서 배양하고, 병원성 균인 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888, *Listeria monocytogenes* KCTC 3710, *Salmonella* Typhimurium ATCC 43174를 tryptic soy broth(TSB)에서 각각 배양한

후, 200 mL MRS 액체배지 속에 분리된 균주 10^7 CFU/mL와 병원성균 10^6 CFU/mL를 MRS 액체배지에 혼합접종하고 병원성 균만을 단독 접종한 다음 37°C water bath에서 9시간 동안 배양하였다. 배양 후, 각각의 배양액을 병원성 균에 대한 선택배지, 즉 *E. coli* O157:H7은 Eosin Methylene Blue agar(Difco, USA), *L. monocytogenes*는 Oxford Medium Base(Difco, USA), *S. Typhimurium*은 Xylose Lysine Desoxycholate agar(Difco, USA)에 100 µL씩 평판도말법으로 접종하였다. 37°C에서 24시간 동안 배양하여 집락수를 계수하고, 혼합 배양한 것과 단독 배양한 것을 비교하였다.

환원탈지유에서 젖산균의 생장특성

성인분변에서 분리된 *L. casei* CU2604와 한국야쿠르트(주)에서 분양 받은 *L. casei* YIT 9029의 생균수, pH, 산도를 측정하여 비교 실험하였다. 생균수는 MRS 액체배지에 2차 계대 배양한 뒤 10% skim milk에 2% glucose를 첨가한 20 mL 용액에 젖산균을 200 µL 접종한 후 37°C에서 4시간 간격으로 36시간까지 배양하면서 측정하였다. 배양한 각 시료를 0.1% peptone용액에 희석하여 MRS agar를 이용하여 pouring한 후 37°C에서 48시간 배양하여 계수하였다. pH는 배양한 시료를 pH meter기(M530P, Nova Analytics Crop., USA)를 이용하여 측정하였고, 오염방지를 위하여 균주마다 각각 9개(0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36 h)의 tube에 균주를 접종하여 4시간 간격으로 측정하였다.

Rapid pulsed field gel electrophoresis(PFGE)를 이용한 동정

Rapid PFGE methods는 Brizinski와 Roberts(2006) 방법에 의하여 실시하였다. 시험균주를 MRS 액체배지에 overnight로 배양한 후 2 mL를 취하여 원심분리(14000 g, 4°C, 10 min)하여 cell pellet을 회수하였다. 2 mL의 100 mM Tris, 100 mM EDTA(pH 7.6)로 1회 세척 후 600 µL의 동일한 buffer를 이용하여 현탁시키고 160 µL를 새로운 tube에 옮겼다. 40 µL의 lysozyme(100 mg/mL)과 10 µL의 proteinase K(20 mg/mL)을 첨가한 후 같은 양(volume)의 0.1% SDS가 함유된 1.6% agarose와 섞어 re-usable plug mold(Bio-rad Laboratories, USA)에 분주하였다. Lysis를 위하여 plug를 2 mL의 lysozyme(4 mg/mL)과 mutanolysin(200 units/mL)이 함유된 0.5 M EDTA, 1% sarkosyl buffer(pH 9.0)에 55°C, 90분간 배양하였다. 그 후 proteinase K(0.5 mg/mL)가 함유된 fresh sarkosyl buffer에 55°C, 60분간 배양하였다. 50°C로 예열된 멸균 증류수를 이용하여 50°C에서 15분간 세척한 후, 50°C로 예열된 10 mM Tris, 1 mM EDTA buffer(pH 7.6)를 이용하여 50°C, 15분간 75 rpm으로 진탕 배양하며 buffer를 3번 교체하며 세척하

였다. Lysis가 끝난 plug는 comb size에 맞게 절단 후 200 µL의 restriction digest mixture(50 units의 *Sfi* I 또는 *Not*I)을 이용하여 37°C에서 18시간 처리하였다.

전기영동은 0.5× TBE buffer(45 mM Tris, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 이용하여 1%의 agarose gel을 이용하여 수행하였다. Lambda ladder(Bio-rad Laboratories, USA)를 molecular size marker로 이용하였다. CHEF DR-III(Bio-rad Laboratories, USA)를 이용하여 switch times를 1.0 sec에서 20.0 sec로 6 V/cm, 14°C에서 18시간 동안 전기영동 하였다.

전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide(0.4 mg/L; Promega, USA)을 이용하여 1시간 염색 후, 증류수로 2시간 탈색하여 UV trans-illuminator를 이용하여 band pattern을 관찰하였다.

지방산 조성

분리 균주의 세포벽 지방산 조성은 Miller(1982)의 방법에 따라 수행하였다. 배양한 cell 약 40 mg을 Screw cap tube에 옮긴 후, 50% methanol에 15% NaOH를 첨가한 용액 1 mL을 넣고 100°C에서 30분간 가열하여 실온에서 냉각하였다. 여기에 methanolic-HCl 2 mL(6.0 N HCl 325 mL과 methanol 275 mL 혼합용액)을 첨가하여 80°C에서 10분간 가열한 뒤 급냉 한 후 1.25 mL의 hexane/methyl-tert-butylether(1:1, v/v)을 넣고 10분간 잘 섞어주었다. 실온에 정치한 후 반응액이 2개의 층으로 분리되면 하등액만을 제거하고 3 mL의 dilute NaOH(10.8 g NaOH/900 mL D.W)를 첨가하여 10분간 잘 섞어준 후 실온에 정치하여 상등액의 2/3정도를 screw-capped sample vial(12×32 mm, Agilent technologies)로 옮겨 capping하여 지방산 분석용 시료로 사용하였다.

준비된 시료의 분석에는 Agilent technologies 6890 Gas chromatography가 이용되었으며 separation column은 A30 m×0.320 mm×0.25 µm Crosslinked Methyl siloxane column(HP-1)을 사용하였다. 분석된 profile은 Sherlock MIS Software를 이용하였으며 standard calibration 용액과의 비교에 의해 peak의 동정, retention time, peak의 면적, 면적 비율을 구하였다.

통계처리

통계처리는 SAS(SAS, USA, 1996)프로그램을 사용하여 Duncan의 다중검정을 통하여 유의성 검정($p < 0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

Lactobacillus 균주의 분리 및 선발

건강한 성인의 분변으로부터 분리한 균주로서 선택배지

에서의 성장, 그람 양성, 현미경하에서 간균인 총 204개의 sample 중에서 10% skim milk에서 24시간 배양 후 커드 형성 여부에 따라 19개를 선발하였고, 2차 계대하여 48시간 후에 커드 형성 여부를 통해 6개를 선발하였으며, 이중 pH를 측정하여 산 생성 능력이 우수한 3개의 균주 CU2604, CU3204, LC8과 원유에서 분리한 *L. casei* MCL 그리고 한국야쿠르트(주) 중앙연구소에서 분양 받은 *L. casei* YIT 9029를 실험에 이용하였다.

선발된 균주의 당 발효 패턴과 16S rDNA sequencing

API kit를 이용하여 선발된 균주 3개와 원유로부터 분리한 *L. casei* MCL, *L. casei* YIT 9029의 당 이용성 확인 결과, ribose, galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, mannitol, sorbitol, N acetyl glucosamine, esculin, maltose, lactose, saccharose, trehalose, D-turanose, D-tagatose, gluconate는 모든 균주들이 이용하는 능력이 있었으며, adonitol, L-sorbose, amygdalin, arbutin, salicin, cellobiose, iunin, melezitose, gentiobiose, D-lyxose, L-arabitol에 대해서는 균주별로 다른 패턴을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Table 1). 이를 동정용 프로그램 API web에 입력한 결과, 선발된 3개의 균주 모두 *Lactobacillus casei*로 판명되었다.

이 중, *L. casei* YIT 9029와 같은 당 발효 패턴을 보인 CU2604를 universal primer인 27F와 1492R을 이용하여 16S rRNA 유전자 부분을 증폭하여 DNA sequencing (Macrogen, Korea)을 실시하였다. CU2604의 염기서열(Fig. 1)을 BLAST search한 결과, *L. casei*(I.D.99%)로 동정되어 *L. casei* CU2604로 명명하였다.

Table 1. Carbohydrate fermentation of the 5 strains of *Lactobacillus casei* on API 50 CHL kit

Carbohydrate substrate	Result				
	9029	CU2604	CU3204	LC8	MCL
Adonitol	+	+	-	-	-
Sorbose	+	+	+	+	-
Amygdalin	+	+	-	+	+
Arbutin	+	+	-	+	+
Salicin	+	+	-	+	+
Cellobiose	+	+	-	+	+
Iunin	-	-	-	+	+
Melezitose	-	-	+	+	+
Gentiobiose	+	+	-	+	+
D-Lyxose	-	-	-	+	-
L-Arabitol	-	-	-	+	-

9029 : *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 1 99.9%, 2604 : *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 1 99.9%, 3204 : *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 1 98.8%, LC8 : *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 1 99.9%, MCL : *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 1 99.3%

*Lactobacillus casei*의 담즙내성

담즙에 대한 *L. casei* 다섯 균주의 내성결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 모두 담즙내성을 보였으나, 균주간에 차이가 있었다. 0.3% oxgall을 첨가한 액체배지에서 12시간 후의 OD₆₂₀값을 각각의 초기균수와 비교하였을 때 *L. casei* YIT 9029보다 *L. casei* CU2604, *L. casei* LC8, *L. casei* MCL의 생존율이 더 우수한 것으로 나타났다. 성공적인 probiotics로서 균주가 갖추어야 할 특성인 담즙내성, 내산성이 있음으로써 장내에서도 살아남아 장내 균총을 유익한 방향으로 향상시킨다는 결과가 보고된 바 있으며 (Mishra and Prasad, 2005), 이는 분리한 균주들의 probiotic

1	GCTATACATGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGACCCGAGATTCAACATGGAACGAG	70
	TGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTA	
	ATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGA	
	CCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGG	
	TTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGGTAGGGAATCTTCCAC	
	AATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGT	
	TGGAGAAGAAATGGTTCGGCAGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACT	
	ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	
	AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACT	
631	TGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAG	700
	TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA	
	TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAG	
	CTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	
	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTT	
	TGATCACCTGAGAGATCAGTTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC	
	GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGAACGAGCGCAACCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTG	
	GGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT	
	ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATC	
	TCTTAAAGCCATTCTCAGTTTCGACTGTAGGCTGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC	
	GCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTT	
1400	GTAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTTAGGGAGCGAGCCGTTTAAGGTGAC	1456

Fig. 1. 16S rRNA gene sequences of *L. casei* CU2604.

Fig. 2. Survival rates of five *Lactobacillus casei* strains after 12 h in MRS broth containing 0.3% oxgall. ^{a-c}Means with different superscript are significantly differ at $p < 0.05$.

Fig. 3. Survival rates of five *Lactobacillus casei* strains after 3 h in MRS broth (pH 3.0). ^{a-b}Means with different superscript are significantly differ at $p < 0.05$.

적용에 대한 잠재성을 확인할 수 있었다.

*Lactobacillus casei*의 내산성

산에 대한 *L. casei*의 내성은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 모두 높은 pH 내성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. pH 3.0의 조건에서 3시간 정치 배양한 후, 87.84%의 생존율을 보인 *L. casei* YIT 9029의 균주와 비교했을 때 *L. casei* CU2604는 89.51%로 비교균주들 중 가장 높은 생존율을 보였다. LAB에 대한 내산성 실험은 과거에도 많은 연구가 진행되었으며, 대부분 pH 3.0에서 높은 생존율을 나타내는 결과를 확인할 수 있었다(Cho *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2008). Martini 등(1987)은 음식 또는 유제품과 함께 소화될 때 위의 pH를 3.0이나 그 이상으로 높여 주기 때문에 pH 3.0에서의 생존율은 중요하다고 발표한 바 있다.

L. casei CU2604의 항균력

L. casei CU2604이 병원성 균주에 대하여 어느 정도 억제 능력이 있는지 측정, 비교하기 위해 혼합배양을 실시

한 결과는 Table 2와 같다. 본 실험에 앞서 병원성 균주와 *L. casei*의 초기 균수를 측정하였으며, 각각의 균주마다 자라는 속도가 다르게 나타난 병원성 균주들은 최종적으로 약 10^6 CFU/mL의 농도에 맞추어 실험을 수행하였고, *L. casei*는 약 10^7 CFU/mL을 맞추어 실험하였다. Control은 병원성 균주들을 MRS 액체배지에서 단독 배양하였을 때의 증식 균수이며, *L. casei* CU2604와 혼합 배양하였을 때의 균수와 비교하여 병원성 균주들의 성장 억제 비율을 조사하였다. 또한 *L. casei* YIT 9029와 혼합 배양한 것과 항균력을 비교하였는데 *L. casei* CU2604는 *E. coli* O157:H7에 대해 86.89%, *S. Typhimurium*에 대해 85%, *L. monocytogenes*에 대해서 82.50%의 항균력을 보였고 *L. casei* YIT 9029와 비슷한 항균력을 보였으며, 두 균주 모두 병원성균에 대한 우수한 항균력을 보였다. 배양 후 pH의 변화를 보면 *L. casei* CU2604와 혼합배양한 것은 pH 4.62-4.65이고, *L. casei* YIT 9029와 혼합배양한 것은 pH 4.59-4.64이며, 대조구인 병원성균만 단독 배양한 것은 pH 5.54-6.01이었는데 이는 혼합배양과정 중에 *L. casei* CU2604와 *L. casei* YIT 9029이 생성하는 젖산에 의해 병원성 균주의 증식 억제효과가 있는 것으로 사료된다.

Table 2. Growth competition of pathogens with *L. casei* CU2604 and *L. casei* YIT 9029 in MRS broth after 9 h incubation at 37°C

Pathogens	Growth Competitors						Inhibition rates (%)	
	Control ¹⁾		<i>L. casei</i> YIT9029 ²⁾ +Pathogens		<i>L. casei</i> CU2604 ³⁾ +Pathogens			
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	YIT 9029	CU2604
<i>Escherichia coli</i>	2.9×10 ⁷	5.54	3.3×10 ⁶	4.64	3.8×10 ⁶	4.64	88.62	86.89
<i>Salmonella</i> Typhimurium	3.0×10 ⁷	6.00	4.5×10 ⁶	4.59	4.5×10 ⁶	4.62	85.00	85.00
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.2×10 ⁷	6.01	1.1×10 ⁶	4.62	2.1×10 ⁶	4.65	90.83	82.50

¹⁾ Initial count of pathogens : 1.0×10^6 CFU/mL

²⁾ Initial count of *L. casei* YIT 9029 : 1.0×10^7 CFU/mL

³⁾ Initial count of *L. casei* CU2604 : 2.1×10^7 CFU/mL

Fig. 4. The change of pH and titratable acidity of 10% reconstituted skim milk supplemented with 2% glucose during bacterial growth at 37°C.

우유배지에서의 성장능력 비교

성인분변으로부터 분리된 *L. casei* CU2604와 *L. casei* YIT 9029의 생균수, pH, 산도를 측정하여 비교 실험한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 *L. casei* CU2604의 pH 변화는 *L. casei* YIT 9029와 비슷한 양상을 보였다. 16시간 이후에 *L. casei* YIT 9029의 pH가 급격히 감소하였으나 최종 pH는 *L. casei* CU2604가 더 낮았으며, 발효유의 최적 pH조건인 pH 4.3에 도달하는데 24시간 이상의 시간이 소요되는 결과를 얻을 수 있었다. Fig. 5는 생균수의 변화를 나타낸 것으로 pH 변화와 같이 *L. casei* CU2604의 생균수는 *L. casei* YIT 9029와 같은 양상을 보였고, 12-20 시간에 *L. casei* YIT 9029의 균수가 급격히 증가하나 36시간 배양 후 살펴보면 *L. casei* YIT 9029보다 *L. casei* CU2604의 생균수가 더 많음을 알 수 있다. 두 균주는 4-8시간대에 대수기를 나타내었다.

Rapid pulsed field gel electrophoresis(PFGE)를 이용한 동정

각 시료로부터 분리하여 당 발효 패턴과 16S rRNA gene sequencing 결과 *L. casei*로 동정된 균주들의 strain 간의 차이를 보기 위해 *Sfi*I, *Not*I으로 digestion한 후 PFGE한 결과는 Fig. 6과 같다. 분리균주 중 *L. casei* CU2604는 *L. casei* YIT 9029와 같은 패턴을 보이는 것이 관찰되었고 *L. casei* CU3204와 *L. casei* LC8, *L. casei* MCL은 서로 다른 PFGE 패턴을 보이는 것을 관찰하였다.

*Lactobacillus*에 대한 연구결과 PFGE는 strain간의 구분을 위한 가장 효과적인 방법이라고 보고되었다(Bjorkroth et al., 1996; Ferrero et al., 1996; Roussel et al., 1993). 일반적인 방법으로는 시간과 비용이 많이 든다는 단점이 있

Fig. 5. Bacterial growth in 10% reconstituted skim milk supplemented with 2% glucose at 37°C.

Fig. 6. PFGE patterns of genomic DNA of *Lactobacillus* strains after digestion by *Sfi*I (1 to 5) and *Not*I (6 to 10). Lane M, rambda ladder; lane 1, *Lactobacillus casei* YIT 9029; lane 2, *L. casei* CU2604; lane 3, *L. casei* CU3204; lane 4, *L. casei* LC8; lane 5, *L. casei* MCL; lane 6, *L. casei* YIT 9029; lane 7, *L. casei* CU2604; lane 8, *L. casei* CU3204; lane 9, *L. casei* LC8; lane 10, *L. casei* MCL.

으나, 본 연구에서는 Briczinski와 Roberts(2006)가 발표한 rapid method를 이용함으로써 그 단점을 보완하였다.

L. casei CU2604의 지방산 조성

두 균주의 세포벽 지방산 조성을 살펴보면, *L. casei* YIT

Table 3. Cellular fatty acid composition of *L. casei* YIT 9029 and *L. casei* CU2604

Fatty acids	<i>L. casei</i> YIT 9029	<i>L. casei</i> CU2604
C12:0	-*	0.65
C14:0	2.63	1.52
C16:1 w7c/15 iso 2OH	6.12	-
C15:0 iso 2OH/16:1w7c	4.39	-
C16:0	6.63	8.67
C15:0 3OH	4.27	-
C18:1 w9c	33.88	54.52
C18:1 w7c	12.03	2.55
C18:0	3.04	4.74
C19:0 iso	0.98	-
C19:0 cyclo w10c/19w6	26.03	27.36

*Not detected.

9029의 경우 C12:0가 존재하지 않고 C18:1 w9c가 33.88%로 가장 많은 비율을 차지하고 있으며 C19:0 cyclo w10c/19w6와 C18:1 w7c와 함께 대부분을 이루고 있다(Table 3). 반면에 *L. casei* CU2604는 C12:0가 미량으로 존재하고 C18:1 w9c가 54.52%로 *L. casei* YIT 9029보다 많은 비율을 차지하고 있다. 또 *L. casei* YIT 9029에는 존재하는 C16:1 w7c/15 iso 2OH와 C15:0 iso 2OH/16:1w7c, C15:0 3OH는 존재하지 않는 것이 확인되었고, 이에 *L. casei* CU2604는 *L. casei* YIT 9029와 다른 균주임을 알 수 있었다.

요 약

이 연구는 성인분변으로부터 발효유 제조에 이용되는 probiotic로서의 우수한 능력을 지닌 균주를 선발하는데 목적을 두었으며 선택배지에서의 성장, 그람 양성, 현미경 관찰을 통해서 간균인 총 204개의 sample 중에서 10% skim milk에서 24시간 배양 후 커드 형성 여부에 따라 19개를 선발하였고, 2차 계대하여 48시간 후에 커드 형성 여부를 통해 6개를 선발하였다. 그 중에서 산 생성 능력이 우수한 균주를 3개 선발하여 원유로부터 분리한 *L. casei* MCL과 *L. casei* YIT 9029의 특성을 비교하였다. 선발된 균주는 그람 양성이고, 간균이며, 당 발효 실험과 16S rDNA 분석결과 *Lactobacillus casei*로 판명되어 *L. casei* CU2604, *L. casei* CU3204, *L. casei* LC8로 명명하였다. 이 중 *L. casei* YIT 9029과 동일한 당 발효패턴을 보인 *L. casei* CU2604는 pH 변화와 생균수의 변화가 *L. casei* YIT 9029와 비슷한 양상을 보이고 PFGE 패턴이 같았다. 그러나 세포벽 지방산조성 분석결과를 통하여 *L. casei* YIT 9029와는 다른 균주임을 알 수 있었으며, 담즙내성, pH내성은 더 우수한 결과를 보였고, 또한 *L. casei* CU2604는 병원성균에 대하여 우수한 생육억제 능력을 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 *L. casei* CU2604는 상업용 균주에

못지 않은 스타터로서의 특징을 가지고 있는 것으로 판단되며, 이 균주의 probiotics 특성에 대한 추가적인 연구가 진행 중에 있다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 중앙대학교 연구장학기금 지원에 의한 것임.

참고문헌

1. Aso, Y., Akaza H., Kotake T., Tsukamoto T., Imai K., and Naito S. (1995) Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. *Eur. J. Urol.* **27**, 104-109.
2. Bjorkroth, J., Ridell, J., and Korkeala H. (1996) Characterization of *Lactobacillus sake* strains associating with production of ropy slime by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns. *Int. J. Food Microbiol.* **31**, 59-68.
3. Briczinski, E. P. and Roberts, R. F. (2006) A rapid pulsed-field gel electrophoresis method for analysis of *Bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.* **89**, 2424-2427.
4. Cebra, J. J. (1999) Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 1046-1051.
5. Cho, J. K., Li, G. H., Cho, S. J., Yoon, Y. C., Hwang, S. G., Heo, K. C., and Choe, I. S. (2007) The identification and physiological properties of *Lactobacillus plantarum* JK-01 isolated from Kimchi. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **27**, 363-370.
6. Ferrero, M., Cesena, C., Morelli, L., Scolari, G., and Vecovo, M. (1996) Molecular characterization of *Lactobacillus casei* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**, 215-219.
7. Fuller, R. (1989) Probiotic in man and animals. A review. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
8. Fuller, R. and Gibson, G. R. (1997) Modification of the intestinal flora using probiotics and prebiotics. *Scandi. J. Gastroenterol.* **32** (Suppl. 222), 28-31.
9. Gilliland, S. E. (1979) Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J. Food Prot.* **42**, 164-167.
10. 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.
11. Havenaar, R. and Spanhaak, S. (1994) Probiotics from an immunological point of view. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 320-325.
12. Heenan, C. M., Adams, M. C., Hosken, R. W., and Fleet, G. H. (2004) Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *Lebensmittel Wissenschaft und technol.* **37**, 461-466.
13. Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, H., and Deschamps, A.

- (2000) Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* **61**, 193-197.
14. Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., and Arvilommi, H. (1992) Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhoea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr. Res.* **32**, 141-144.
 15. Lim, S. D., Kim, K. S., and Do, J. R. (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. D., Kim, K. S., and Do, J. R. (2009) Physiological characteristics and GABA production of *Lactobacillus acidophilus* RMK567 isolated from raw milk. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **29**, 15-23.
 17. Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y., and Rambaud, J. C. (1993) The fate and effect of transiting nonpathogenic microorganisms in the human intestine. In *Intestinal Flora, Immunity, Nutrition and Health*, ed. AP Simopoulos, T Corning and A Rérat. *World Rev. Nutr. Diet.* **74**, 1-21.
 18. Martini, M. C., Bolweg, G. L., Levitt, M. D., and Savaiano, D. A. (1987) Lactose digestion by yoghurt β -galactosidase : Influence of pH and microbial cell integrity. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**, 432-437.
 19. Miller, L. T. (1982) Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acid. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 861-867.
 20. Mishra, V. and Prasad, D. N. (2005) Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. Food. Microbiol.* **103**, 109-115.
 21. Nagao, F., Nakayama, M., Muto, T., and Okumura, K. (2000) Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2706-2708.
 22. Park, J. G., Song, W. H., Hong, S. M., and Kim, C. H. (2008) Production of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* isolated from breast-fed infants. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **28**, 580-586.
 23. 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.
 24. Perdigon, G., Nader de Marcias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G., and Pesce de Ruiz Holgado A. A. (1990) Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with fermented milk with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Res.* **57**, 255-264.
 25. Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J. M., and Decaris, B. (1993) Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Møcquot). *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 549-556.
 26. Salminen S., Isolauri E., and Salminen E. (1996) Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 347-358.
 27. Sanders, M. E. (1993) Effect of consumption of lactic cultures on human health. In: *Advances in Food and Nutrition Research* (edited by J. Kinsella), San Diego, CA, USA: Academic Press. pp. 67-130.
 28. Sanders, M. E. (1995) Lactic acid bacteria as promoters of human health. In *Functional Foods: Designer Foods, Pharmaceuticals, Nutraceuticals*, ed. I. Goldberg, London: Chapman and Hall. pp. 294-322.
 29. SAS (1996) SAS/STAT User's Guide. Release 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
 30. Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., and de Vos, W. M. (2005) Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 204-211.
 31. Schaafsma, G. (1996a) Significance of probiotics in human diets. In: *SOMED 21st International Congress on Microbial Ecology and Disease*, Paris, October 28-30. pp. 38.
 32. Schaafsma, G. (1996b) State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutrition Newsletters*. **5**, 23-24.
 33. Sugita, T. and Togawa, M. (1994) Efficacy of *Lactobacillus* preparation Biolactis powder in children with rotavirus enteritis. *Jpn. J. Pediatr.* **47**, 2755-2762.

(Received 2009.5.28/Revised 2009.9.23/Accepted 2009.9.28)