

산양유 쿠미스의 제조와 *Candida kefir*의  
젖산 생성

함 준 상

축산기술연구소



# 산양유 쿠미스의 제조와 *Candida kefir*의 젖산 생성

합 준 상  
축산기술연구소

## I. 서 론

발효유는 일반적으로 우유, 산양유, 마유, 염소유 등과 같은 포유동물의 젖을 원료로 유산균이나 효모와 같은 미생물로 발효시켜 만든 식품으로서 포유동물을 기르거나 유목 생활을 하던 지역에서 전통식품으로 음용되었으나 기술의 발전으로 제품의 균일화를 거쳐 건강식품 및 의약품적 식품으로 개발되고 있다. 발효유의 일종인 쿠미스는 중앙아시아에서 말젖을 원료로 젖산과 알콜발효에 의해 만들어지고, 러시아에서는 폐결핵환자의 치료식으로 많이 이용되고 있으며 그 효과도 인정되고 있다. 쿠미스 제조에 이용되는 균주는 *tubercle bacilli*, *Escherichia coli*, *Bacillus prodigiosum*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus mesentericus* 그리고 *Bacillus subtilis*에 항균특성을 가지는 것으로 알려져 있다 (Lang과 Lang, 1970). 한편, 생산량이 적은 말젖 대신에 탈지유를 이용하여 쿠미스를 제조하려는 연구가 수행되었으며 1967년에 우유를 이용한 쿠미스 제조에 적절한 스타터 컬처의 상업적 제조 방법이 보고된 바 있다 (Seleznev 등, 1970).

일반적으로 산양유는 다른 젖에 비해 조성분이 우유와 가장 유사하며, 단백질 및 지방의 소화율이 용이하여 우유에 알러지를 보이거나 소화에 고통을 겪는 사람에게 유용한 제품으로 판매되고 있다 (Haenlein, 1995). 국내 산양유의 사육은 1970년대 농가의 부업 및 국민 보건 향상의 목적으로 일부 농가에서 자가소비의 형태로 사육되었으나 그 후 젖소사육의 급속한 증가에 의해 사육두수 및 생산이 매우 미진하였다가, 1990년대 중반부터 소득의 증가와 더불어 안전하고 위생적인 고품질 축산식품에 대한 소비자의 선호와 다양한 선택 경향으로 강원 홍천지방과 충북 영동지방을 중심으로 다시 유산양의 사육이 시작되고 있다. 유산양은 일정한 양의 젖을 생산하는데 소요되는 노동시간과 수익성 등의 면에서 젖소와 비교하여 유리하며, 조방한 사양관리 조건하에서도 비교적 잘 자라고 산유능력이 우수할 뿐만 아니라 번식력도 강하여 우리나라 농촌에서 손쉽게 사육할 수 있는 가축이다. 또한 지대가 높거나 교통이 불편하여 이용되지 못하는 산야의 유휴지에 있는 풀을 이용할 수 있는 장점이 있으므로 우리나라에서 사육을 장려하는 것이 바람직하며, 산양유의 건강적 이미지를 살린 건강발효유의 개발은 사육농가의 소득증대 및 국민건강에 기여

할 수 있을 것으로 생각된다.

한편, 분자생물학의 발전으로 스타터 미생물의 특성을 개선하려는 연구들이 진행되어, 최근에 Dequin과 Barre (1994)은 *Saccharomyces cerevisiae*에 *Lactobacillus casei*의 L (+)-LDH (lactate dehydrogenase) gene을, Gold 등 (1996)은 *L. casei*에 *Zymomonas mobilis*의 PDC (pyruvate decarboxylase)와 ADH (alcohol dehydrogenase) gene을 형질전환하여 젖산-알콜 동시 발효 균주를 개발한 바 있으며, 식품에의 적용을 위한 food-grade 벡타로 nisin 저항성 (Froseth와 McKay, 1991)과 cadmium 저항성 (Liu 등, 1996)을 이용한 벡타가 개발되었다.

이 글에서는 고부가가치 발효유의 개발을 위한 쿠미스의 원료로써 산양유의 특성과, 전통 쿠미스에서 분리된 균주를 이용한 쿠미스 스타터의 제조 방법, 그리고 형질전환 기법을 이용한 스타터 미생물의 특성 개선에 관하여 기술하고자 한다.

## II. 산양유의 특성

산양은 고기, 털, 가죽, 유제품 등의 생산을 목적으로 사육되어 왔으며 세계적으로 1991년에 5억 8천여 마리에서 1997년에 7억여 마리로 사육이 증가하였으며 (FAO, 1997), 인도, 방글라데시, 파키스탄 등에서 경제적, 사회적으로 중요한 의미를 갖는 가축이다 (Table 1). 우리나라에서는 1991년에 사육두수가 약 34만 6천두에서 1997년에 약 66만 3천두로 증가하였고 (Table 2), 유생산량도 동기에 약 3천 8백톤에서 6천 6백톤으로 증가하였으며, 생산자가 직접 가공처리하여 서울, 대전 지역에서 고가로 판매되고 있다. 선진국에서도 산양유가 빈자의 기아 해소식이라는 이미지에서 벗어나 유제품으로서 새롭게 인식되고 있어 고가의 특정 산양유 제품들이 미식가들에 의해 소비되고 있으며, 우유에 알러지를 보이거나 소화에 고통을 겪는 사람에게 유용한 제품으로 판매되고 있다 (Haenlein, 1995).

Table 1. The world leading goat milk countries (1,000t)

(FAO, 1991, 1997)

Country	Production		Country	Production	
	1991	1997		1991	1997
India	2,000	2,160	Indonesia	180	196
Iran	897	396	Yemen	156	16
Pakista	666	769	China	155	211
Somalia	640	390	Mali	140	168
Sudan	528	655	Brazil	135	141
France	520	478	Italy	125	150
Bangladesh	499	1,328	Mexico	125	121
Greece	465	460	Kenya	101	95
Spain	410	390	Ethiopia	99	93
Turkey	389	265	Bulgaria	62	150
Russia	350	268	Iraq	62	18
Algeria	210	145	Portugal	43	43

Table 2. Goat population and goat milk production in Korea

(FAO, 1991-1997)

Year	1991	1993	1995	1997
Goat stock(Head)	346,358	557,617	680,762	663,219
Goat milk production(MT)	3,795	5,500	6,325	6,600

### 1. 조 성

산양유도 우유와 마찬가지로 질소화합물은 콜로이드 형태로, 유당과 염이 용해된 수용액에 지방이 유화되어 있는 복잡한 혼합물로 유조성분은 품종, 유생산량, 비유기, 사양수준 및 형태에 따라 다양하나, 일반 조성은 우유와 비슷하다 (Talbe 3). 산양유의 유당은 건물의 주성분으로 환원당이며 액상 (liquid phase)에 존재하고 우유의 유당과 특별한 차이가 없으며 비유기에 따른 함량 변화도 거의 없다.

산양유 질소화합물의 전체 함량은 우유와 유사하나 구성 질소화합물의 분포는 다르다.  $\alpha_s$ -casein의 함량은 산양유가 21.2%인 반면 우유는 40%이고,  $\beta$ -casein 함량은 67.4%로 우유의 43.3%에 비해 월등히 높으며 전기영동도도 다르며 (Pierre, 1977), 전체 유단백질중 렌넷에 응고되는 질소화합물의 비율도 산양유는 69%인 반면 우유는 75%이다 (Ricordeau와 Mocquot, 1967). 케이신 마이셀의 크기는 품종간뿐만 아니라 품종내에서도 다양하나 우유보다 작으며 (Barbaro와 Calapaj, 1958), 비단백태 질소화합물은 산양이 9%이고 우유는 5%로 보고된 바 있다 (Mahieu, 1976). 단백질 함량의 변이는 지방함량보다 적고 유전적 요인보다는 영양 등의 환경적 요인에 좌우된다.

지방은 glycerides와 steroids (99%)로 이루어져 있으며 크기가 작은 지방구의 비율이 우유에 비해 높아 소화율이 높은 것으로 알려져 있으며, 지방산 조성에 있어서는 단쇄지방산 ( $C_4 \sim C_{10}$ ) 함량이 15%로 우유의 9%보다 높고 (Table 4), 세계의 휘발성 지방산인 caproic, caprylic, 그리고 capric acid가 산양유제품에 특징적 풍미를 부여하는 것으로 보고되고 있다. 또한 산양유는 우유의 노란색을 나타내는 carotene이 함유되어 있지 않다.

무기물은 모두 용액에 존재하는 것이 아니라 일부는 콜로이드상의 형성에 중요한 역할을 한다. 칼륨, 칼슘, 그리고 인은 주요 무기물이며 칼슘의 2/3와 인의 1/2 이상이 calcium-phosphocaseinate complex를 형성하고 있다. 산양유와 우유의 무기물 조성은 유사하며 용해상태와 콜로이드 상태의 비율은 대부분 같으나 모유에 있어서는 무기물 함량이 낮으며, 젖의 광물질 함량은 변이가 많다 (Table 5, 6).

Table 3. Composition of milk of different species

(Le Jaoue, 1981)

	Yield	Dry matter	Lactose	Nitrogen	Fat	Salt
	kg			g/kg		
Goat	500~1,000	115~130	40~50	28~35	30~38	7~9
Cow	3,500~5,000	115~130	45~50	30~35	35~40	7~9
Mare	-	95~100	60~65	15~20	9~15	3~4

**Table 4. Pattern of fatty acids in milk fat of different species**

(Allais, 1974)

Species	C <sub>4</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>
Goat	0.7	2.4	3.2	8.7	4.7
Cow	1.4	2.2	1.8	3.6	4.0
Human	0.1	0.2	0.3	2.1	7.2
	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>
Goat	10.7	28.5	13.0	25.2	2.9
Cow	13.0	30.2	13.7	27.1	3.0
Human	10.9	29.6	7.3	35.4	6.7

**Table 5. Minerals in milk of different species**

(Allais, 1974)

	Goat	Cow	Human*
	g/litre		mg/litre
Potassium	1.6	1.6	520
Sodium	0.4	0.5	150
Calcium	1.3	1.3	310
Magnesium	0.15	0.14	37
Phosphorus	1.0	1.0	145
Chlorine	1.5	1.1	420
Sulphur	0.2	0.35	140

\* Renner, 1973

**Table 6. Trace element content of different species**

(Salter, 1977)

	Goat	Cow	Human
	ppm		
Iron	0.25~0.68(?)	0.64	1.25
Copper	0.04~0.57(?)	0.08	0.40
Iodine	n.d.	0.04	0.07
Manganese	0.17	0.09	7(?)
Zinc	n.d.	3.2	5.3
Cobalt		0.0006	n.d.
Molybdenum	0.012	0.073	n.d.

산양유의 비타민 함량은 계절, 사양 및 다른 요인에 의해 변이가 심하며, folic acid 및 vitamin C를 제외한 다른 비타민의 함량은 모유와 유사하다. 산양유에는 vitamin B<sub>6</sub>와 vitamin B<sub>12</sub>가 우유보다 적게 함유되어 있으나 영양적으로 문제가 되지는 않는다 (Table 7).

Table 7. Vitamin contents of milk of different species

(Salter, 1974)

	Goat	Cow	Human
Vitamin A(IU/100mL)	191	159	190
Vitamin B <sub>1</sub>	0.04	0.04	0.02
Vitamin B <sub>2</sub>	0.18	0.17	0.04
Niacin	0.19	0.09	0.15
Vitamin B <sub>6</sub>	0.01	0.06	0.01
Pantothenic acid	0.34	0.34	0.18
Biotin	0.004	0.003	0.001
Folacin	0.0008	0.0059	0.0038
Vitamin B <sub>12</sub>	0.00007	0.00042	0.00003
Vitamin C	1.5	2.1	4.3
Vitamin D(IU/100mL)	2.4	2.2	2.2
Vitamin E	?	0.10	0.65

(mg/100mL unless otherwise indicated)

## 2. 물리적 특성

위생적으로 생산 보존된 일반 신선 산양유가 우유보다 강한 냄새를 풍기지 않는다고는, 냄새나는 사료나 청결하지 못한 사육조건에서 생산된 산양유는 특유의 냄새가 발생되며 부적절한 보존시 냄새가 더욱 강해진다. 산양유의 적정산도와 pH는 각각 0.14%와 6.4로 우유의 0.16%와 6.7보다 약간 낮으며, 이러한 차이는 단백질, 특히 케이신의 산도에서 기인된다. 비중은 유조성과 밀접한 관련이 있으며, 1.026~1.042로 보고되며, 빙점은 우유보다 약간 낮은 -0.58°C로 보고되고 있다. 그외 점도, 표면장력, 전기전도도, 또는 굴절계수는 우유와 다른 수치가 보고되고 있으나 일반화하기에는 부족하다 (Parkash와 Jeness, 1968).

## 3. 영양적 특성

일반적으로, 산양유는 우유와 가장 유사하여 우유 대용으로 사용될 수 있으며 (Desjeux, 1993), 우유 알러지를 보이는 아이들에게 좋은 우유 대체품이 될 수 있다 (Alichanidis와 Polychroniadou, 1996). 의학적 자료에 따르면 산양유는 모유를 대체할 수 있으며, 다른 식품과 함께 한 살 이상 유아의 영양공급에 사용될 수 있다 (Desjeux, 1993). 산양유는 개발도상국 특히, 우유가 생산되지 않거나 조제분유가 너무 비싼 지역에서 영양이 부족한 유아에게 우유 대체식으로 매우 귀중한 가치가 있고, 산양유 지방은 우유 지방보다 소화율이 높아 장에서 흡수장애가 있는 유아에 있어 중요성을 가지며 (Hachelaf 등, 1993), 높은 소화율은 부분적으로 장쇄지방산보다 더 간단한 기작에 의해 흡수되는 단쇄 및 중쇄 지방산의 함량이 높기 때문이다. 또한 산양유는 암과 심장혈관 질환의 방지에 효과가 있는 “항산화”인자로 보고되는 selenium 함량이 우유보다 높으며 모유와 유사 (1.25 µg/100 ml)하다고 보고되고 있다.

### Ⅲ. 산양유 쿠미스의 제조

#### 1. 전통적인 쿠미스 제조방법

암말의 착유는 새끼를 낳은 후 20~30일 후에 시작되어 하루에 6회 정도 이루어지며. 젖은 마리당 5~10리터를 150일 동안 생산한다. 생산된 젖은 이미 충분히 발효된 전날의 우유를 10~20% 함유하고 있는 나무 용기에 담아 일정하지는 않지만 실온 (20~25°C)에 보관하고 종종 교반하며, 뚜껑으로 덮어 놓는다. 발효된 쿠미스는 즉시 소비한다 (Montanari 등, 1996)

#### 2. 탈지우유를 원료로한 쿠미스 제조방법 (All-Union Dairy Research Institute)

탈지우유의 산도는 20° Thörner를 넘지 않아야 하고, 비중은 1.030 이하이고, off-flavor가 없고 스타터 컬처를 구성하는 lactobacilli와 효모의 배지로써 결합이 없어야 한다. 쿠미스에 사용되는 컬처는 탈지분유에서 배양된 순수한 lactobacilli (*L. bulgaricus*와 *L. acidophilus*)와 유당을 분해하는 효모 (*Saccharomyces lactis*)를 사용한다. 쿠미스 제조시 스타터가 접종된 탈지우유의 적절한 적정산도는 28~30° Thörner이며, 이는 스타터를 10~12% 접종시 얻을 수 있다 (Khrisanfova, 1966). 혼합 스타터를 10% 접종시 급격한 산도 증가에 따라 효모의 생장에 좋은 조건이 만들어지며 26~28°C에서 적정산도 75~85° Thörner까지 배양하여 커드가 형성되면 16~18°C로 냉각하고 교반 배양한다. 설탕을 2.5% 첨가시 젖산과 알콜 발효가 적절히 일어나 관능적, 물리적, 화학적 품질이 좋은 쿠미스를 얻을 수 있으며, 일반적으로 1일 발효 쿠미스는 달콤한 맛을 가진다. 더 많은 설탕의 첨가는 효모가 이용할 수 없으므로 불필요하고, 2일 및 3일 발효 쿠미스에서도 설탕 맛이 뚜렷하므로 설탕의 첨가량은 2.5%로 표준화 한다 (Lang과 Lang, 1970). 제조된 쿠미스는 적정산도와 알콜 함량에 따라 'weak, medium, strong'으로 구분된다 (Table 8).

#### 3. 몽고산 쿠미스에서 분리한 젖산균과 효모를 이용한 산양유 쿠미스 제조방법

전통적인 방법으로 제조된 몽고산 쿠미스에서 젖산균과 효모를 분리하여, 형태적·생리적·생화학적 특성을 시험한 결과 젖산균은 *Lactobacillus plantarum*으로, 효모는 *Candida kefir*로 확인되었다 (함 등, 1999a). 쿠미스 제조용 스타터 조제를 위해 탈지유에 혼합 배양하면서 10배의 탈지유와 혼합하여 적정산도를 측정 한 결과, 48시간 배양후에도 10배의 탈지유와 혼합시 0.25% 이상의 적정산도를 얻을 수 없었으나 (Fig. 1), *L. bulgaricus* LB120 (Rhone-Poulenc, U.S.A)를 혼합배양시 산생성이 급증하여 (Table 9), 48시간 배양시 스타터로 사용하기에 적합한 적정산도를 얻을 수 있

Table 8. Classification of koumiss (Lang and Lang, 1970)

Characteristics	Koumiss		
	"weak"	"medium"	"strong"
Acidity(° Thörner)	100~120	120~140	140~150
Content of alcohol(%)	0.1~0.3	0.2~0.4	up to 1.0



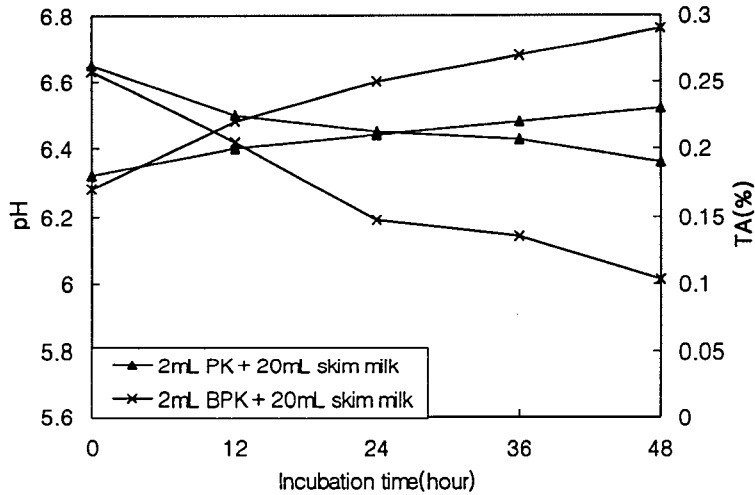


Fig. 1. pH and titratable acidity of skim milk when 10% starter culture was added.

PK : 1% *L. plantarum* + 1% *C. kefir*

BPK : 1% *L. plantarum* + 1% *L. bulgaricus* LB120 + 1% *C. kefir*

Table 9. Symbiotic acid production of *L. plantarum* and *L. bulgaricus* LB120

Incubation time	2%	2%	1% <i>L. bulgaricus</i> LB120
	<i>L. bulgaricus</i> LB120	<i>L. plantarum</i>	+ 1% <i>L. plantarum</i>
0	5.82	5.83	5.84
12 hour	5.33	5.28	5.06
24 hour	4.82	4.96	4.51

었다 (Fig. 1).

산양유 쿠미스 제조방법은 Fig. 2와 같으며, 산양유의 크림을 분리하고 2.5%의 설탕을 첨가한 후 열처리 (90~92°C, 5 min)하고 28°C로 냉각한다. 탈지유에서 48시간 배양한 혼합스타터 (*L. plantarum*, *L. bulgaricus* LB120, *C. kefir*)를 10% 첨가하고 28°C에서 9시간 배양한 후에 16~18°C로 냉각하고 교반배양 (150 rpm)한다. 교반배양 시간에 따라 산도, 알콜 함량, 점도, 아미노산 조성, 관능적 특성이 다른 제품을 제조할 수 있으며, 2일 발효 쿠미스가 1일이나 3일 발효 쿠미스보다 좋은 관능적 특성을 나타냈다 (함 등, 1999b).

#### IV. *C. kefir*의 젖산 생성

발효유의 제조시 스타터 컬처의 관리는 비용이 많이 요구되며, 쿠미스처럼 젖산균과 효모의 혼합 균주를 이용하는 경우 발효과정도 2단계로 이루어져 제조공정이 복잡해진다. 그런데 젖산과 알콜의 생성과정은 모두 pyruvate에서 시작되며 젖산균은 LDH (lactae dehydrogenase), 효모는

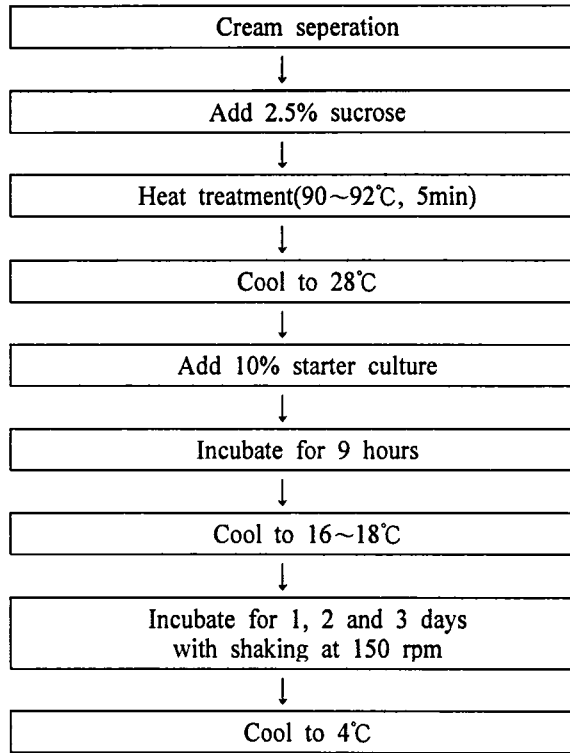


Fig. 2. Flow diagram of goat milk Koumiss making.

PDC (pyruvate decarboxylase)와 ADH (alcohol dehydrogenase)의 작용에 의해 pyruvate를 각각 젖산과 알콜로 전변시킨다. 따라서, LDH gene을 효모에 또는 PDC (pyruvate decarboxylase)와 ADH (alcohol dehydrogenase) gene을 젖산균에 형질전환하면 각각 젖산을 생산하는 효모와 알콜을 생산하는 젖산균을 개발할 수 있다 (Dequin과 Barre, 1994; Gold 등, 1996).

### 1. *L. plantarum*에서 LDH gene의 PCR (Polymerase chain reaction) 증폭

몽고산 쿠미스에서 분리한 *L. plantarum*에서 LDH gene을 분리하기 위하여 primer를 디자인하였다. *L. plantarum* D-, L-LDH gene의 염기서열은 Taguchi와 Ohta (1991)가 보고한 바 있으며 이를 기초로 primer 1 (DLDHU, DLDHL pair), 2 (LLDH1U, LLDH1L pair)를 디자인하였다. 한편 Ferain 등 (1994)은 Taguchi와 Ohta (1991)의 L-LDH gene의 염기서열은 *L. pentosus*일 것이라고 주장하며 새로운 염기서열을 보고하였으며 이를 기초로 primer 3 (LLDH2U, LLDH2L)을 디자인하였다. 각각의 primer에는 벡터와의 ligation을 위한 제한효소 작용 염기서열을 첨가하였으며, 제한효소 절단 부위는 vector의 cloning sites와 LDH의 염기서열 분석 (DNASIS 2.1)을 고려하여 결정하였다. *L. plantarum*에서 genomic DNA의 분리는 Kit (Wizard<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification System)를 사용하였으며, PCR 조건은 Table 9에 기술되었다. PCR은 premix (Accupower<sup>TM</sup>, Bioneer)를 사용하였으며, template는 kit로 분리된 *L. plantarum*의 genomic DNA 1  $\mu$ l, primer 3  $\mu$ l (20 pmol)와 증류수 16  $\mu$ l를 첨가하여 반응시킨 결과는 Fig. 3에 표시되었다. Primer 1, 2, 3를 이용

Table 10. PCR amplification condition for LDH gene of *L. plantarum*

	Temperature (°C)	Time	Cycle
First step	94	3 min	1
Subsequent step	94	2 min	35
	60	1 min	
	72	2 min	
Last step	72	5 min	1

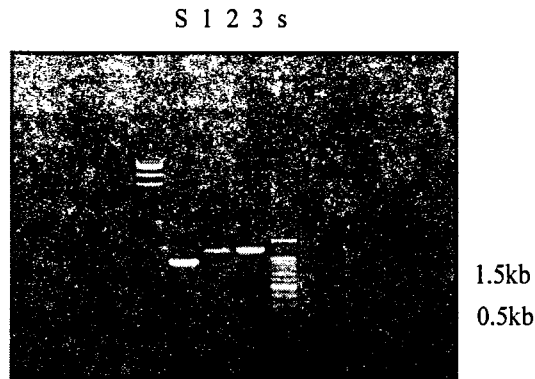


Fig. 3. PCR amplification of LDH (lactate dehydrogenase) gene of the *L. plantarum* genomic DNA.

- S :  $\lambda$  Hind III (Promega)
- 1 : Primer 1 (DLDHU, DLDHL)
- 2 : Primer 2 (LLDH1U, LLDH1L)
- 3 : Primer 3 (LLDH2U, LLDH2L)
- s : 100bp DNA Ladder (Promega)

해 각각 약 0.8, 1.2, 1.2kb의 PCR 증폭산물을 얻었다. Primer 1에 의한 PCR 증폭산물의 염기서열을 분석하고 NCBI BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) 결과 *L. plantarum* D-ldh gene (D90339)과 95%의 동일성을 보였으나 coding region이 전부 증폭되지는 않았으며, primer 2의 증폭산물은 염기서열 분석결과가 양호하지 않았고, primer 3의 증폭산물은 *L. plantarum* L-ldh gene (X70926)과 6개의 염기서열이 다르게 나타나 99%의 동일성을 보였다 (Fig. 4).

## 2. 형질전환을 위한 vector의 제조

Primer 3을 이용한 PCR 증폭산물은 kit (QIAquick PCR purification kit, Qiagen)를 이용하여 정제하였으며 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 처리한 후 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 처리된 shuttle vector (pYES2, Invitrogen)에 Rapid DNA Ligation Kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 결합시켰다 (Fig. 5). pYES2 벡터는 박테리아에서의 선발을 위한 Ampicillin resistant 유전자를 가지고 있으며 효모에

TGTCAAGCATGCCAAATCATCAAAAAGTTGTGTTAGTCGGCGACGGC (←  
 T)GCTGTTGGTTCTAGTTACGCTTTTGCCATGGCACACAAGGAATTGCTGAAGAATT  
 TGTAATTGTCGATGTTGTTAAAGATCGGACAAAGGGTGACGCCCTTGATCTTGAAG  
 (←C)ACGCCCAAGCATTACCGCTCCCAAGAAGATTTACTCAGGCGAATATTAGATT  
 GTAAGGACGCTGACTTAGTTGTTATTACAGCCGGTGCCT (←  
 G)CAAAAGCCTGGTGAATCACGTTTAGACTTAGTTAAACAAGAATTTAAATATCCTATC  
 ATCCATTGTCAAACCGATTGTTGACTCCGGCTTTGACGGCATCTTCTTAGTTGCTGCT  
 AACCTGTTGACATCTTAACCTACGCTACTTGGAAATTCACAGGTTCCCAAAGGATC  
 GTGTCATTGGTTCAGGGACTTCCTTAGACTCTTCACGTTTACGCGTTGCGTTAGGCAA  
 ACAATTCAATGTTGATCCTCGTTCGTTGATGCTTACATCATGGGTGAACCGGTGAT  
 TCTGAATTTGCTGCTTACTCAACTGCAACCATCGGGACACGTCCAGTTCGCGATGTC  
 GCTAAGGAACAAGGCGTTTCTGACGAAGATTTAGCCAAGTTAGAAGATGTTGTTTCGT  
 AACAAAGCTTACGACATCAACTTGAAGGGTGCCACGTTCTACGGTATCGGGACT  
 GCTTTAATGCGGATTTCAAAGCCATTTTACGTGATGAAAATGCCGTTTACCAGTA  
 GGTGCCTACATGGACGGCCAATACGGCTTAAACGACATTTATATCGGGACTCCGGCT  
 GTGATTGGTGGAACTGGTTTGAACAATAATCATCGAATCACCACCTTCAGCTGACGAA  
 CTAAGAAGATGCAAGATTCCGCCGCAACTTTGAAAAAAGTGCTTAACGACGGTTTA  
 GCTGAATTAGAAAATAAATAATCATTTCATACGATTAAG (←  
 A)TGTATGATGAACGCTCGTT (←C)TATAGCAGACGGGCGTTTTTTTGTGTTGCTTGA  
 (←T)GGGTACCTTAGCGATTCATTAAGCGCAACACGCACTAAAGGCTATTTTTAAA  
 CTTTCTTATCAGGATTACCGGCTTGAAGTTTGCACCTCATCTCACTTCTGTTATAAGG  
 TGAGAATATTACGAATATATGGAGGACCAA

Fig. 4. DNA sequence of PCR product obtained from primer 3.

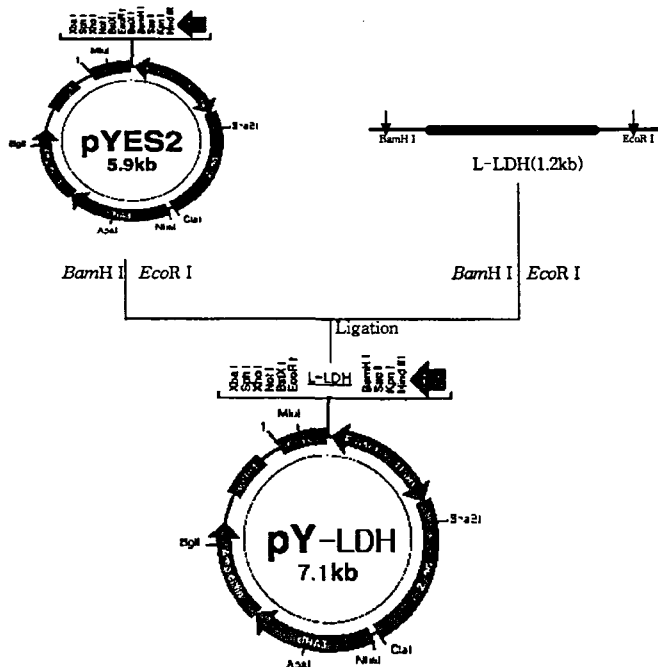


Fig. 5. Ligation L-LDH gene with shuttle vector.

서의 선발을 위한 URA3 유전자를 가지고 있다. 이렇게 제조된 약 7.1kb의 벡터 (이하 pY-LDH) 를 상업용 competent *E. coli* (One Shot Top 10F', Invitrogen)에 형질전환하였으며 ampicillin (100

$\mu\text{g/mL}$ )을 함유하는 LB agar (GIBCO BRL)에서 성장하는 *E. coli*를 선발하고 kit (Plasmid Mini kit, QIAGEN)를 이용하여 플라스미드를 분리하였다 (Fig. 6). ↓ 표시된 콜로니가 pY-LDH가 형질전환된 것으로 생각되었으며 ampicillin이 함유된 LB broth (GIBCO BRL)에서 대량 배양하여 플라스미드를 정제하였다 (Plasmid Maxi kit, QIAGEN). 그런데, 벡타의 크기는 agarose 전기영동 상에서 일치하지 않았으며, 증량을 위하여 *E. coli*에 형질전환하여 정제한 벡타의 크기는 4,361bp 이하로 나타났다 (Fig. 7). 그러나 *Mlu* I 으로 절단시 카타로그에 제시된 5.9kb 정도의 크기가 나타났다으며, 이것은 다소 큰 차이는 하지만 circular 형태와 linear 형태의 차이에 기인된 것으로 생각되며, 벡타의 정제 및 저장 중 형태변화가 일어났을 것으로 생각되었으며, pY-LDH에 있어서도 같은 결과를 얻었다. 대량 배양하여 정제한 pY-LDH를 template로, primer 3에 의한 PCR 결과 *L. plantarum*의 genomic DNA를 template로 PCR 했을 때와 같은 증폭산물을 얻어 insert를 확인하였다 (Fig. 7).

### 3. pY-LDH 벡타의 전기형질전환

pY-LDH 벡타의 electroporation은 Becker와 Guarente (1991)의 방법을 변형하여 실시하였다. 500ml YPD 배지 (g/L, 20g peptone, 10g yeast extract, 20g dextrose, pH 6.5)가 담긴 1 l 플라스크에 24시간 배양한 *C. kefir*를 0.2% 접종하고 25°C에서 교반 (150rpm)하면서 12시간 배양하였다. 배양액을 2개의 250 ml 튜브에 넣어 5,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하고 상정액을 버린 후 각각 250 ml ice-cold 멸균 증류수에 분산하였다. 다시 5,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 상정액을 버리고, 각각 125 ml ice-cold 멸균 증류수에 분산한 다음 하나로 합쳤다. 다시 원심분리하여 상정액을 버리고, 20 ml 1M sorbitol에 분산하여 30 ml 원심분리 튜브로 옮겼다. 최종적으로 5,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리한 후 상정액을 버리고 0.5 ml ice-cold 1M sorbitol을 첨가하여 분산하고 얼음위에 보관하였다. 40  $\mu\text{l}$ 의 yeast suspension을 멸균된 에펜돌프 튜브에 넣은 다음, 벡타 5  $\mu\text{l}$ 를 넣고 가볍게 섞어 얼음위에서 약 5분간 배양하고 차가운 0.2-cm electroporation cuvette으로 옮겼다. 1.5kV, 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ 으로 pulse를 가하고 즉시 1ml cold 1M sorbitol을 첨가하

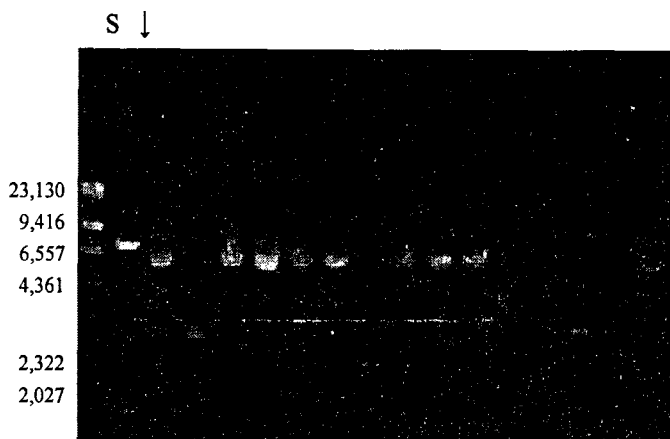


Fig. 6. Selection of Ampicillin resistant *E. coli* DH5  $\alpha$ .

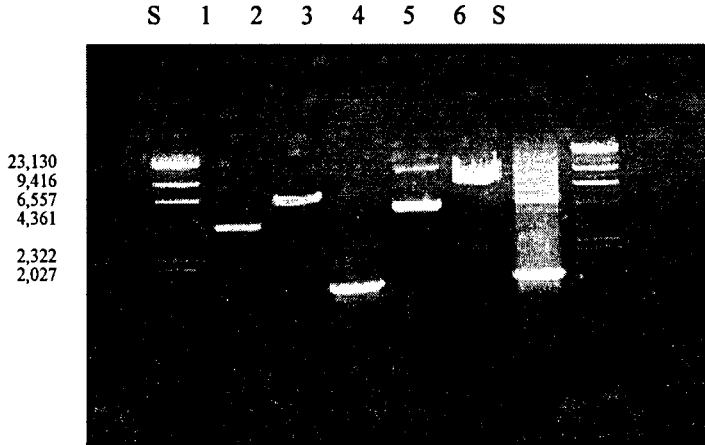


Fig. 7. Zymogram of pYES2 and pY-LDH.

S :  $\lambda$  Hind III

1 : pYES2 (Prepared from transformed *E. coli*)

2 : Digested pYES2 by *Mlu* I

3 : L-LDH gene (PCR products of *L. plantarum* by primer 3)

4 : pY-LDH (Prepared from transformed *E. coli* : Fig. 4 ↓)

5 : Digested pY-LDH by *Mlu* I

6 : PCR products of pY-LDH by primer 3

고 selective plate에 spreading하였다. pYES2와 pY-LDH의 선택 표지유전자는 URA3로 형질전환 시킬 효모균주는 표지유전자에 상응하는 영양요구성 돌연변이체를 사용하여야 하며, 형질전환된 효모 균주는 uracil이 없는 배지에서 선발할 수 있다. 그런데, 몽고산 쿠미스에서 분리한 *C. kefir*는 야생형으로 uracil이 없는 배지에서도 생장이 가능하여 형질전환 균주의 선발이 불가능하였으나, pY-ldh 유전자를 *C. kefir*에 eletroporation하고 Bromocresol purple을 0.008% 첨가한 YPG (g/L, 20g peptone, 10g yeast extract, 20g dextrose, pH 6.5) 배지에 spreading한 결과, 주위를 노랗게 변색시키는 균락을 관찰할 수 있었으며 이는 L-ldh 유전자의 발현으로 생각되었다.

한편, pY-ldh 벡터를 식품에 이용하기 위해서는 항생제 마커 (Ampicillin resistant)의 제거가 필요하여, *Bgl* I과 *Mlu* I로 절단하여 정제 (pFY-ldh)한 후 primer 3에 의한 PCR로 insert (L-ldh)의 존재를 확인하였다 (Fig. 8). pFY-ldh를 *C. kefir*에 eletroporation (1.5kV, 25 $\mu$ F, 200  $\Omega$ )하고 BCP를 첨가한 YPG agar에 spreading하여 두가지 균락 (Fig. 9)을 선발하였으며, 현재 배양조건에 따른 산의 생성 및 효소의 정제 및 활력 측정에 관한 연구가 진행 중이다.

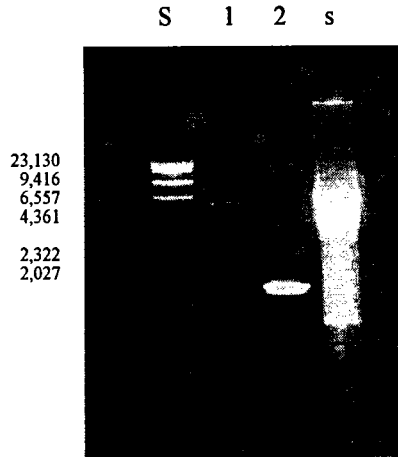


Fig. 8. pFY-ldh and PCR amplification by primer 3.

S :  $\lambda$  *Hind* III

1 : pFY-ldh purified after digestion of pY-ldh by *Mlu* I and *Bgl* I

2 : PCR products of pFY-ldh by primer 3

s : 100 bp ladder (Amersham pharmacia)

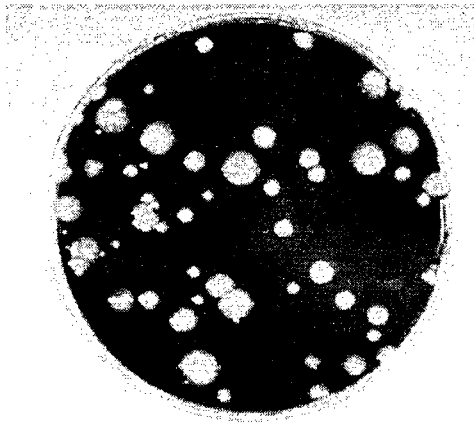


Fig. 9. The growth of *C. kefir* on YPG agar containing 0.008% bromocresol purple after electroporation with pFY-ldh.

## V. 결 론

산양유는 우유와 일반 조성분 함량이 비슷하지만, 케이스ن 조성에 차이가 있어 우유에 알러지를 나타내는 사람이 이용하기에 적당하다. 또한 지방구의 크기가 작고 단백질 및 중쇄 지방산 함량이 높아 소화가 용이하고 건강적 이미지를 가지고 있어 생산이 증가하고 있으며, 일부 산양유 생산

농가에서는 직접 가공처리하여 판매까지 수행함으로써 높은 소득을 올리고 있다. 쿠미스는 젖산 뿐만 아니라 알콜발효를 이용하여 제조되는 독특한 발효유제품으로서 러시아에서는 폐결핵 환자의 영양보충식으로 이용되고 있으며 그 효과도 인정되고 있다. 몽고산 쿠미스에서 분리한 *L. plantarum*과 *C. kefir*를 이용하여 산양유를 원료로 쿠미스를 제조할 때 *L. bulgaricus*와의 혼합배양이 필요하였으며, 2일 발효 쿠미스의 관능적 특성이 가장 우수하였다. 한편, 젖산발효는 lactate dehydrogenase, 알콜발효는 pyruvate decarboxylase 및 alcohol dehydrogenase에 의해 pyruvate를 각각 젖산과 알콜로 변화시킨다. 따라서 젖산균의 *ldh* 유전자를 효모에 형질전환시킨 형질전환 효모에 의해 알콜-젖산 동시발효가 가능하여 쿠미스 제조공정을 단순화시킬 수 있을 것으로 생각된다. *L. plantarum*에서 PCR을 이용해 *L-ldh* gene을 분리한 후, 상업용 shuttle vector와 결합하여 항생제 마커를 제거하고 *C. kefir*에 electroporation하여 bromocresol purple을 함유하는 YPG agar에서 2종류의 균락을 얻을 수 있었으며, 주위를 노랗게 변색시키는 균락은 형질전환에 의해 LDH 유전자가 발현된 것으로 생각되었다. 현재 LDH 유전자의 발현조건과 LDH 효소의 정제 및 활력에 관한 연구가 진행 중이나, 형질전환 식품에 대한 거부감을 극복하기 위해서는 항암제나 조혈촉진제 같은 유용물질 생성 유전자와의 결합이 필요할 것으로 생각된다.

## VI. 참고문헌

1. Alichanidis, E. and Polychroniadou, A. : Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. pp.21-43. In Production and utilization of ewe and goat milk. IDF (ed). Brussels (1996).
2. Allais, C. : SEP, Paris. pp.366-368. In Goat production. C. Gall (ed). Academic press. Inc. London (1974).
3. Barbaro, A. d'A. and Calapaj, G.G. : Acta Med. vet. Napoli 4:9. In Goat production. C. Gall (ed). Academic press. Inc. London(1958).
4. Becker, D.M. and Guarente, L. : High-efficiency transformation of yeast by electroporation. Methods Enzymol., 194:182-187 (1991).
5. Dequin S. and Barre, P. : Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH. Biotechnology, 12:173-177 (1994).
6. Desjeux, J.F. : Valeur nutritionnell du lait de chevre. Lait, 73:573-580 (1993).
7. FAOSTAT. <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl>
8. Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N., Hols, P. and Delcour, J. : *Lactobacillus plantarum ldhL* Gene:Overexpression and deletion. J. Bacteriol., 176:596-601 (1994).
9. Froseth, B.R. and McKay, L.L. : Development and application of pFM011 as a possible food-grade cloning vector. J. Dairy Sci., 74:1445-1453 (1991).
10. Gold, R.S., Meagher, M.M., Tong, S., Hutkins, R.W. and Conway. T. : Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* "Production of Ethano" Genes in *Lactobacillus casei*. Curr Microbiol., 33:256-250 (1996).



11. Hachelaf, W., Boukhrelda, M., Benbouabdellah, M., Coquin, P., Desjeux, J.F., Boudraa, G. and Touhami, M. : Digestibilit des graisses du lait de chevre chez les enfants presentant une malnutrition d'origine digestive. Comparison avec le lait de vache. *Lait*, 73:593-599 (1993).
12. Haenlein, G.F.W. : Status and prospects of the dairy goat industry in the United States. *J. Anim. Sci.*, 74:1173-1181 (1995).
13. Khrisanfova, L. : Scientific principles of koumiss manufacture using pure cultures. Dissertation: Moscow (1966).
14. Lang, F. and Lang, A. : A study of koumiss manufacture as a potential new outlet for milk. *The Milk Industry*, 67:22-25 (1970).
15. Le Jaouen, J.C. : Milking and the technology of milk and milk products. pp.345-377. *In* Goat production. C. Gall (ed). Academic press. Inc. London(1981).
16. Liu, C.Q., Leelawatcharamas, V., Harvey, M.L. and Dunn, N.W. : Cloning vector for lactococci based on a plasmid encoding resistance to cadmium. *Curr Microbiol.*, 33:35-39 (1996).
17. Mahieu, H. : Mimeograph ITOVIC, Paris. pp.34 (1976).
18. Montanari, G., Zambonelli, C., Grazia, L., Kamesheva, G.K. and Shigaeva, M. : *Saccharomyces unisporus* as the principal alcoholic fermentation microorganism of traditional koumiss. *J. Dairy Res.*, 63:327-331 (1996).
19. Parkash, S. and Jenness, R. : The composition and characteristics of goats' milk : A Review. *Dairy Sci. Abstr.*, 30:67-87 (1968).
20. Pierre, A. : *Fals. Exp. Chim.*, No. 752, 213-222 (1977).
21. Ricordeau, G. and Mocquot, G. : *Ann. Zootechn.*, 16, 165-181 (1967).
22. Salter, D.L. : *Dairy Goat J.*, 55:12-16 (1977).
23. Seleznev, V. I., Artykova, L. and Trudy, A. : *Vsesoyuznyi nauchnoissledovatel'skii Institut Molochnoi Promysh- lennosti* 27:86-91 (1970).
24. Taguchi, H. and Ohta, T. : D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific -2-hydroxyacid dehydrogenase family. *J. Biol. Chem.*, 266:12588-12594 (1991).
25. 함준상, 정종율, 정석근, 안종남, 안영태, 김선기, 김현욱. : Effects of feeding with *Lactobacillus plantarum* and *Candida kefir* isolated from Mongolian koumiss on the growth and fecal microflora of broilers. *한국낙농학회지*, 21(3):241-246 (1999a).
26. 함준상, 정석근, 안영민, 김희발, 김동운, 김용곤, 김현욱. : Fermentation of goat milk using *Lactobacillus plantarum* and *Candida kefir* isolated from Mongolian koumiss. *한국낙농학회지*, 21(3):247-254 (1999b).