

## 콜레스테롤 저하 유산균의 분리 및 이들 균주의 이화학적 특성

김종현\* · 오민근 · 이영환 · 최기춘<sup>1</sup> · 이용규<sup>1</sup> · 신승이<sup>2</sup>

전남대학교 농화학과, <sup>1</sup>동물자원학과, <sup>2</sup>동아인재대학 식품가공과

**초 록** : 전통 발효유로부터 콜레스테롤 저하능을 갖는 *Lactobacillus* (*L.*) *rhamnosus*, *L. casei*, *Lactococcus* (*Lacto.*) *lactis* spp., 그리고 *Enterococcus* (*E.*) *faecium* 각각 1주를 분리, 동정하고, 이들 균주의 내산성, 내담즙성, 콜레스테롤 저하 정도를 조사하였다. 선발 균주의 내산성은 pH 1.5에서는 *L. rhamnosus* 2084가, pH 2.5에서는 *L. casei* 0781이 가장 높게 나타났으나, pH 3.0에서는 4 균주가 유사하였다. 내담즙성 및 콜레스테롤 저하 정도는 전반적으로 *L. rhamnosus* 2084가 가장 우수하였다. 이들 균주를 starter로 요구르트를 제조하여 경시적으로 제조된 발효유의 pH, 산도, 유산균수 등의 이화학적 특성을 조사하였다. 배양 온도 및 배양 시간에 따른 pH, 산도, 그리고 유산균수의 변화를 고려했을 때, 선발 균주의 요구르트 제조 적정 온도 및 배양시간은 *L. casei* 0781과 *L. rhamnosus* 2084의 경우 40°C에서 각각 6시간, 4시간이었으며, *Lacto. lactis* 204는 37°C에서 6시간, 그리고 *E. faecium* 402는 37°C 및 40°C에서 12시간이었다.(1999년 1월 22일 접수, 1999년 2월 25일 수리)

### 서 론

유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로서 오래 전부터 발효 유제품 (발효유, 치즈 등)을 중심으로 각종 장류, 김치, 발효 소세지, 의약품 및 가축의 사료 첨가제에 이르기까지 그 특성에 따라 인류생활에 광범위하게 활용되면서 인류의 생활에 직접, 간접적으로 밀접한 관계를 맺고 있으며, 지금까지 유산균은 300~400여 종이 있는 것으로 알려져 있다. 이들은 균의 형태, 발효 형식, 산소 내성 등의 성상에 따라 *Lactobacillaceae*에 속하는 *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* 와 *Actinomycetaceae*에 속하는 *Bifidobacterium*, 그리고 *Bacillaceae*에 속하는 *Sporolactobacillus*의 6가지 genus로 구분된다.<sup>1,3)</sup> 유산균은 발효유제품의 starter로 이용될 뿐만 아니라 장내 세균수의 안정화,<sup>4)</sup> 위장관내 병원균의 증식억제,<sup>5)</sup> 혈중 콜레스테롤의 저하,<sup>6)</sup> 특이 비특이 면역 반응의 유도 및 영향소 이용의 향상,<sup>7)</sup> 암퇴화 및 장내 효소 활성 감소로 결장암의 예방효과,<sup>8)</sup> 그리고 비타민과 같은 인체 유용물질의 합성에 의한 영양 및 건강증진 효과를 목적으로 광범위하게 이용되고 있다. 그러나, 유산균이 살아있는 상태로 장내에 도달하기 위해서는 HCl과 각종 효소가 존재하는 위를 통과하여야 하며,<sup>9)</sup> 이 때 위의 pH는 상당히 큰 가변성을 가지고 있고 음식물의 섭취여하에 따라 pH 2~8의 범위를 나타낸다. 따라서 구강을 통하여 위에 도달하는 대부분의 미생물은 사멸하거나 활성이 저하된다. 이와 같은 위액의 세균 사멸 활성은 위액의 pH 및 HCl 의존성이며,<sup>10,12)</sup> 통성 혐기성 미생물인 유산균은 호기성 미생물 보다 생육 가능한 pH 범위가 넓어 상대적으로 낮은 pH에서도 생육이 가능하다고 보고되었

다.<sup>13)</sup> 위를 통과한 유산균은 위에서 분비되는 담즙산에 노출됨에 따라 내담즙성을 갖는 유산균만이 생존하여 장내에서 그 유용성을 발휘할 수 있다.<sup>14,15)</sup> 유산균의 이러한 내담즙성에 대한 연구는 일부 균종에서만 진행되었을 뿐 아직까지 미미하다. 또한 콜레스테롤(cholesterol)은 탄소 27개로 이루어진 알콜류로서 동물성 지질에만 함유되어 있으며, 음식을 통하여 외부로부터 섭취하거나 간 및 장에서 주로 생합성되어 지방산과 결합하여 ester형으로 모든 체조직과 뇌, 신경 조직에서 발견된다. 성인의 경우 1일 1,000~2,000 mg 정도의 콜레스테롤이 합성되며, 인체에 없어서는 안되는 중요한 물질로서 조직의 세포막 성분뿐만 아니라, 간에서 분해되어 지방의 소화 흡수에 필요한 담즙산의 전구물질, 성호르몬, 부신피질 호르몬 등의 각종 호르몬, 비타민 D의 전구물질이 되기도 하며 뇌와 신경 조직에서는 세포의 myelinization에 관여하는 체조직의 필수 성분이다. 그러나 혈중 콜레스테롤의 증가는 동맥경화, 심근경색, 뇌혈전 등의 발생을 증가시킨다고 보고되었다.<sup>16)</sup> 유산균 발효유의 응용이 이러한 혈중 콜레스테롤 저하 효과가 있으며,<sup>17,19)</sup> 담즙에 대한 저항성과 콜레스테롤 소화능력이 큰 균주가 혈중 콜레스테롤 수치를 저하시키는 능력이 높다고 보고된바 있다.<sup>20)</sup> 또한, *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus megaterium*, 그리고 *Proteus mirabilis* 등의 몇몇 균종은 이들 세포막으로 콜레스테롤을 통합하며,<sup>21)</sup> 어떤 미생물은 성장하는 동안 콜레스테롤을 가수분해하여 coprosterol 이나 coprostanol의 형태로 변형시킬 수 있고,<sup>22)</sup> lactobacilli의 경우, 세포막 내로 콜레스테롤이 통합된다면, lactobacilli가 외부로 배설됨으로서 소화기관내의 콜레스테롤 함량을 감소시킬 수 있다고 하였다.<sup>23)</sup>

따라서 본 연구에서는 유산균 중 *in vitro*에서 콜레스테롤 저하 정도가 우수한 균주를 분리, 선발 및 동정하고 이들 유산균의 이화학적 특성을 조사하여 향후 기초 자료로 활용하고자 하였다.

찾는말 : *Lactobacillus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *Lactococcus*, *L. lactis*, *Enterococcus*, *E. faecium*, yogurt, cholesterol

\*연락처자

## 재료 및 방법

### 유산균의 분리 및 선발

발효유를 오래 전부터 음용하느라 장수촌이 많은 곳으로 유명한 불가리아 스모리안 지방과 조오지아 공화국 코카스지방의 장수촌과 터키 등을 방문하여 민간인들이 전통적으로 사용하고 있는 각종 발효유를 MRS, M17, CATC 등의 고체배지에 희석, 평판 도말 한 다음 24~48 시간 배양한 후 형성된 균락을 액체 배지에 재 배양하고 15% skim milk에 배양액 5%를 접종하여, 이 중 우유 응고력이 우수한 균주만을 선발하였다. 이들 균주 중 내산성, 내담즙성 및 콜레스테롤 저하능을 조사하여 가장 우수한 균주를 최종 선발하였다.

### 유산균의 동정 및 보관

분리, 선발된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,<sup>3)</sup> The prokaryotes,<sup>24)</sup> Microbiological Method<sup>25)</sup> 등에 기술된 방법에 따라 형태학적, 생물학적 성질 등을 조사하였고, api20 strep과 api 50 CH 동정 kit(bioMerieux co. France)를 이용하여 분류, 동정하였다. 또한 본 실험의 대조 균주로는 *Lactobacillus acidophilus* 145를 사용하였으며, 선발 균주와 *L. acidophilus* 145는 MRS broth(pH 6.5)에 배양한 후 glycerol의 최종농도가 20%(w/v)되도록 첨가하여 -70°C에 냉동 보관하며 필요에 따라 MRS 배지에 접종, 배양하거나, 15% skim milk 배지에 배양하여 4°C에 보관하며 사용하였다.

### 내산성

Pepsin(Sigma Co.)이 1000 unit/ml 첨가된 MRS 액체 배지를 pH 1.5, 2.0, 그리고 pH 3.0의 산성 조건으로 조정 한 후 Kobayashi 등<sup>26)</sup> 및 Sim 등<sup>27)</sup>의 방법에 따라 37°C에서 1시간 동안 배양하여 균주의 생존율을 희석평판법으로 계수하여 조사하였다.

### 내담즙성

Oxgal(Difco, USA)이 0.1, 0.3, 0.5% 첨가된 0.05 M 인산 나트륨 완충액(pH 7.0)에 일정량의 균주 배양액(약  $1 \times 10^8$  CFU/ml)을 가하고 37°C에서 1.5시간 간격으로 배양하여 0.5% pepton(NaCl; 0.5 g, pepton; 0.5 g, pH 7.2) 용액으로 희석한 후 균주의 생존율을 희석평판법으로 계수하여 내담즙성을 측정하였다.

### Cholesterol 저하 정도

0.3% oxgal 및 water soluble cholesterol(polyoxyethanyl-cholesteryl sebacate, Sigma Co.)이 첨가된 MRS-Thio broth<sup>28)</sup> 10 ml에 선발 균주 배양액 1%를 접종하여 24시간 혐기 배양 후 Rudel과 Morris<sup>29)</sup>의 방법에 따라 조사하였다.

### 요구르트 제조

시유에 탈지 분유(Skim milk)의 최종농도가 3%(W/V) 되

도록 첨가한 후 50~55°C에서 30분간 교반하여 균질하고, 85°C에서 15분간 멸균한 배지에 15% skim milk에서 수회 계대 배양한 균주 배양액을 각각 5%(V/V)의 농도로 접종한 후 37°C 및 40°C에서 정치 배양하며 요구르트를 제조하였다.

### pH 및 산도

선발 균주를 starter로 요구르트를 제조하여 pH는 Shin 등<sup>30)</sup>의 방법에 따라 pH meter(Orion mode 420A, USA)로 측정하였고, 산도는 우유 유제품 시험법(한국 유가공 기술과학회편) 및 Collins 등<sup>31)</sup>의 방법에 준하여 적정 산도를 측정하였다.

### 완충능 및 생균수

완충능은 Martini 등<sup>32)</sup>의 방법에 따라 제조된 요구르트 100 ml을 1.0 N HCl용액으로 고유의 pH값에서 2단위 낮은 pH값까지, 1.0 N NaOH용액으로 4단위 높은 pH값까지 적정하여 소모된 양을 조사하였다. 요구르트 내에서의 생균수는 Shan 등<sup>33)</sup>의 방법에 따라 희석평판법으로 집락을 계수하였다.

## 결과 및 고찰

### 콜레스테롤 저하 유산균의 분리

유산균 분리 시료로부터 618주의 유산균을 분리하고, 이들 유산균들로부터 당 발효능 및 0.6%(w/v) CaCO<sub>3</sub>가 첨가된 고체 배지에서의 CaCO<sub>3</sub> 이용성을 우선 조사하여 동일한 균주를 배제 한 후 15% skim milk 배지에서 우유 응고력이 우수한 108주의 유산균을 선발하였으며, 내산성이 우수한 66주의 내산성 균주를 선발하였다. 이들 균주를 Rudel 과 Morris<sup>29)</sup>의 방법에 따라 콜레스테롤 저하 정도를 측정 한 결과 *in vitro*에서 콜레스테롤 저하 정도가 1~20% 균주는 50주, 20~30% 균주는 12주, 30%이상 균주는 4주이었다.

### 유산균주의 동정

*In vitro* 콜레스테롤 저하 정도가 30% 이상인 4개 균주를 선발 균주로 선정하고, 이들 균주의 형태는 동결 건조 후 gold coating하여 전자 현미경(SEM, Model Hitachi S-2400, Japan)으로 관찰하였다. 그 결과 2주는 간균이었고 2주는 구균이었다(Fig. 1). 또한, 이들 균주의 생리, 생화학적 특성을 Bergey's manual of systematic bacteriology, The prokaryotes, Microbiological method에 기술된 방법 및 api 20 strep과 api 50CH 동정 kit (bio Merieux Co.)를 이용하여 조사한 결과, Table 1, 2에서 보는 바와 같이 *Lactobacillus(L.) rhamnosus*, *Lactobacillus(L.) casei*, *Lactococcus(Lacto.) lactis* spp., 그리고 *Enterococcus(E.) faecium*으로 각각 동정되었고, *L. rhamnosus* 2084 (*L. r* 2084), *L. casei* 0781 (*L. c* 0781), *Lacto. lactis* spp. 204 (*Lacto. l* 204), 그리고 *E. faecium* 402 (*E. f* 402)로 각각 명명하였다.

### 내산성

선발 균주의 내산성을 Kobayashi 등<sup>26)</sup> 및 Sim 등<sup>27)</sup>의 방법

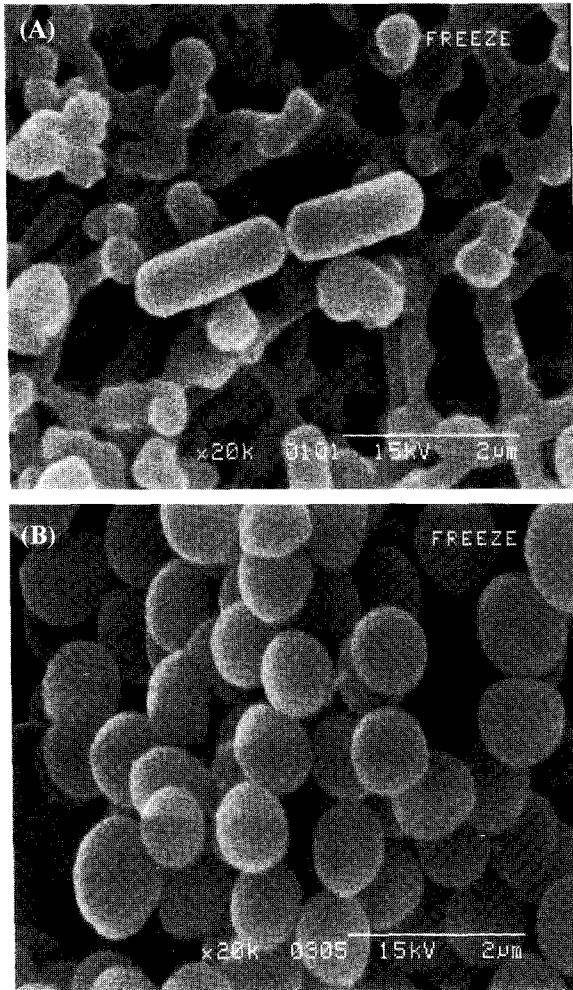


Fig. 1. Electron micrographs of the selected lactic acid bacteria. A: *Lactobacillus rhamnosus* 2084, B: *Lactococcus lactis* spp. 204.

에 따라 조사한 결과 Fig. 2에서와 같이 pH 1.5에서는 *L. rhamnosus* 2084가, 그리고 pH 2.0에서는 *L. casei* 0781이 현저하게 강한 내산성을 보였으며, pH 3.0에서는 모든 균주의 내산성 비율이 유사하였으나 대조 균주보다 선발 균주가 대체적으로 더 강한 내산성을 나타내었다. Sim 등<sup>27)</sup>은 *L. casei*의 내산성 연구에서 온도별, 배양 시간별 균주 생존을 조사하였는데 pH 2.0에서 대부분의 균주가 사멸하였고, 35.5°C에서 23시간 배양하여 pH 3.0에서 처리한 균주의 경우, 약 10<sup>4</sup>의 균주 생존을 관찰하였다고 보고하였다. 이들의 결과와 비교해 볼 때 성장 액체 배지에서의 배양 시간 및 온도가 약간 차이는 있으나 선발 균주의 경우 pH 1.5에서 약 10<sup>1</sup> CFU/ml 이상, pH 2.0에서 약 10<sup>2</sup> CFU/ml 이상, 그리고 pH 3.0에서 약 10<sup>6</sup> CFU/ml 이상의 균주 생존을 보임으로서 내산성이 우수한 것으로 관찰되었다.

**내담증성**

Oxgal에 대한 선발 균주의 생존율은 Fig. 3, 4, 5에서와 같이 6시간 처리 후 모든 oxgal 용액에서 *L. rhamnosus* 2084의 내담증성이 가장 우수하였다. 또한, 선발 균주 대부분이 0.1%와 0.3% oxgal 용액에서 시간이 경과함에 따라

Table 1. Physiological and biological characteristics of the selected lactic acid bacteria

Factor examined	Lactic acid bacteria strain No.			
	<i>L. casei</i> 0781	<i>L. rhamnosus</i> 2084	<i>Lacto. lactis</i> spp. 204	<i>E. faecium</i> 402
Shape	rod	rod	spherical	spherical
Size (µm)	0.6~0.7×	0.6~0.8×	0.7~1.0	0.9~1.3
width × length	1.9~2.7	1.6~2.1		
Gram-stain	+	+	+	+
Spore formation	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-
Anaerobic growth	+	+	+	+
Test of catalase	-	-	-	-
V-P	+	+	+	+
Hydrolysis of				
Hippurate	+	-	-	+
Esculin	+	+	+	+
Pyrrolidonyl- amidase	+	+	+	+
α-galactosidase	+	+	-	-
β-glucuronidase	+	+	-	-
β-galactosidase	+	+	+	+
Alkaline phosphatase	+	+	+	+
Leucine arylamidase	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	+	+
Acidification of				
Ribose	+	-	+	+
L-arabinose	-	-	+	+
Mannitol	+	-	-	+
Sorbitol	+	-	-	-
Lactose	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Starch	-	-	+	+
Glycogen	-	-	-	-

성장이 약간 감소하다가 유지되는 형태를 보였으나, 0.5% oxgal 용액에서는 서서히 감소하는 형태를 보였다. 이들 결과를 고려해 볼 때 선발 균주는 살아 있는 상태로 장내에 도달하는 균주의 빈도가 높을 것으로 사료된다.

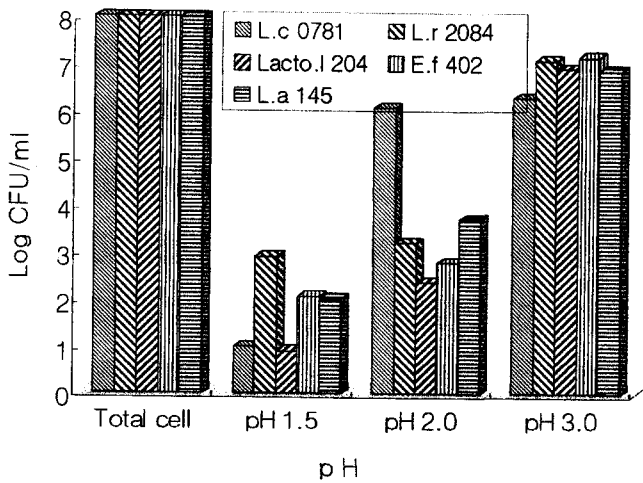
**In vitro에서의 콜레스테롤 저하 정도**

Oxgal(Difco Co.) 0.3%와 콜레스테롤을 첨가한 MRS-Thio 액체 배지에 선발 균주를 1% 접종하여 37°C에서 24시간 혐기 배양한 다음 in vitro에서 각 선발 균주에의 콜레스테롤 저하정도를 조사한 결과는 Table 3과 같다. 4균주 중 *L. rhamnosus* 2084 균주가 spent broth상에서 약 52.8%로 콜레스테롤 저하 정도가 가장 높았으며, 다음으로 *L. casei* 0781이 약 46.3%로 높게 관찰되었다. 이 두 균주는 *L. acidophilus* 145의 약 45.9% 보다 높은 저하 정도를 보인 반면, *Lacto. lactis* 204와 *E. faecium* 402는 각각 약 42.3%, 45.9%로 *L. acidophilus* 145보다 낮은 콜레스테롤 저하 정

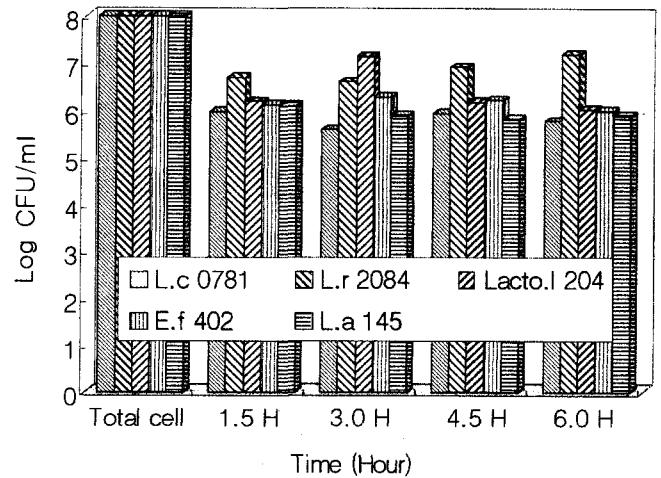
**Table 2. Pattern of carbohydrate fermentation of the selected lactic acid bacteria**

Carbohydrates	strains				Carbohydrates	strains			
	L.c 0781	L.r 2084	L.l 204	E.f 402		L.c 0781	L.r 2084	L.l 204	E.f 402
Glycerol	-	-	-	-	Esculin	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	Salicin	+	+	+	+
D-arabinose	+	-	-	-	Celiobiose	+	+	+	+
D-xylose	-	-	-	-	Maltose	+	+	+	+
L-xylose	-	+	-	-	Melibiose	-	-	+	+
Adonitol	-	-	-	-	Sucrose	+	+	+	+
βMethyl-D-xyloside	-	-	-	-	Melezitose	+	+	-	-
D-galactose	+	+	+	+	Xylitol	-	-	-	-
D-glucose	+	+	+	+	β-Gentiobiose	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+	D-turanose	-	+	-	-
D-mannose	+	+	+	+	D-Lyxose	-	-	-	-
L-sorbose	+	+	-	-	D-Tagatose	+	+	-	-
Rhamnose	+	+	-	-	D-Fucose	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	L-Fucose	+	-	-	-
Inositol	+	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-	-
α-Methyl-D-Mannoside	-	+	-	-	L-Arabitol	+	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	+	+	-	-	Gluconate	+	+	-	-
N-acetyl-Glucosamine	+	+	+	+	2-Keto-gluconate	-	-	-	-
Amygdalin	+	+	+	-	5-Keto-gluconate	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+					

Symbol +: 90% or more of strains are positive.  
 -: 90% or more of strains are negative.



**Fig. 2. Tolerance against acid of the selected lactic acid bacteria.**



**Fig. 3. Tolerance against 0.1% oxgall of the selected lactic acid bacteria.**

도를 나타내었고, suspended cell에서도 spent broth에서도 동일한 결과를 보였다.

**pH 및 산도**

한국인이 선호하는 요구르트의 pH는 3.7~4.2라는 Lee 등<sup>34)</sup>의 보고와 발효유의 적정 산도는 1.0~1.1%일 때 가장 좋은 품질을 나타낸다는 Goh 등<sup>35)</sup>의 보고를 기준으로 선발 균주를 starter로 37°C와 40°C에서 발효유를 제조하였을 때 이들 산도에 도달하는데 소요되는 시간과 그 때의 pH를 조사한 결과, pH 변화는 Fig. 6, 7 그리고 산도변화는 Fig. 8, 9에 나타낸 바와 같다. 37°C에서 *L. rhamnosus* 2084와 *Lacto. lactis* 204는 배양 6시간에 각각 1.11%, 0.99%의 산도를 나

타내었으며 이 때의 pH는 4.26, 4.75이었다. *L. casei* 0781은 배양 8시간에 1.03%, pH는 4.22이었고, *E. faecium* 402는 배양 12 시간에 1.04%, pH는 4.34로 선발 균주 중 가장 늦었으며, *L. acidophilus* 145는 배양 10시간에 1.02%, pH는 3.84를 나타내었다. 40°C에서는 *L. rhamnosus* 2084를 4시간 배양하였을 때 1.01%로 가장 빠르게 약 1.0%의 산도에 도달하였으며, 이 때의 pH는 4.19이었다. *L. casei* 0781은 6시간 배양하였을 때 1.1%의 산도와 4.0의 pH를 나타내었고, *Lacto. lactis* 204와 *L. acidophilus* 145는 8시간 배양했을 때 각각 0.98%, 1.05%를, pH는 4.62와 4.01을 보였다. *E. faecium* 402는 12시간 배양하였을 때 1.2%, pH는

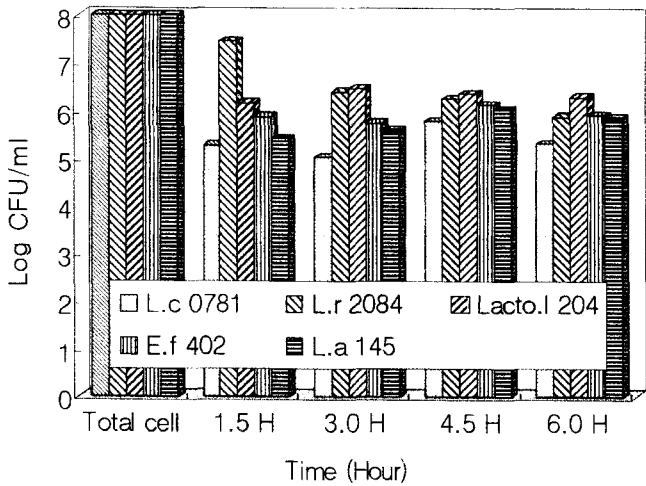


Fig. 4. Tolerance against 0.3% oxgal of the selected lactic acid bacteria.

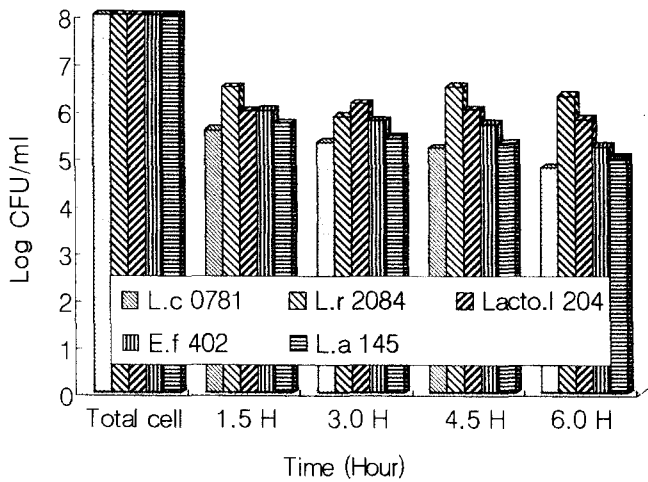


Fig. 5. Tolerance against 0.5% oxgal of the selected lactic acid bacteria.

Table 3. Assimilation of cholesterol by the selected lactic acid bacteria during anaerobic growth

Strains	Control (ug/ml)	L.c 0781	L.r 2084	Lacto.l 204	E.f 402	L.a 145
Spent broth		51.16±5.15 <sup>b</sup>	45.00±4.77 <sup>b</sup>	55.00±6.61 <sup>b</sup>	52.66±4.04 <sup>b</sup>	51.60±7.23 <sup>b</sup>
rate (%)	95.34±	53.7	47.2	57.7	55.2	54.1
Suspend cell	4.51 <sup>a</sup>	43.83±4.23 <sup>b</sup>	49.83±4.51 <sup>b</sup>	39.83±3.33 <sup>b</sup>	41.17±4.01 <sup>b</sup>	43.20±3.99 <sup>b</sup>
rate (%)		46.0	52.3	41.8	43.2	45.3

1. Cells were incubated for 24 hrs at 37°C in MRS-Thio broth containing water soluble cholesterol and 0.3% oxgal.

2. All numbers are the means of 6 trials: means with different superscripts differ significantly (P<0.05).

4.25를 나타내었다. 따라서 이들 선발 균주를 발효유 제조의 starter로 사용할 경우, *L. rhamnosus* 2084와 *L. casei* 0781은 40°C에서 각각 4시간, 6시간, *Lacto. lactis* 204는 37°C에서 6시간, 그리고 *E. faecium* 402는 37°C 및 40°C에서 12시간 배양이 최적 발효유 제조 온도 및 시간으로 판단

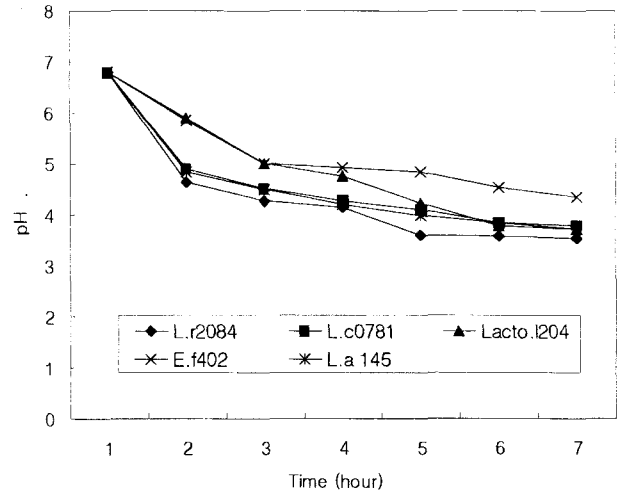


Fig. 6. pH of yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 37°C.

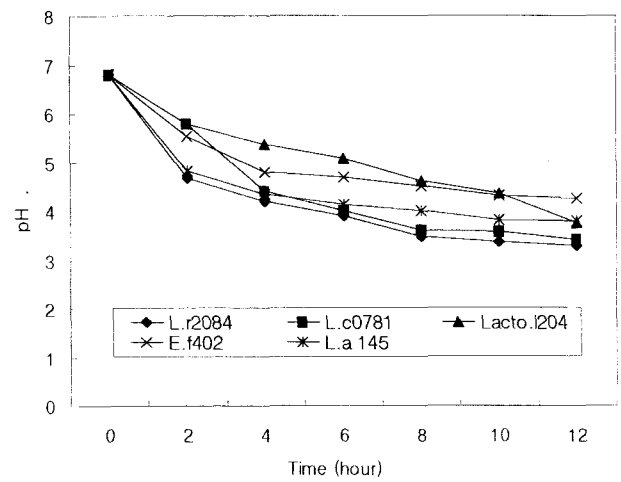


Fig. 7. pH of yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 40°C.

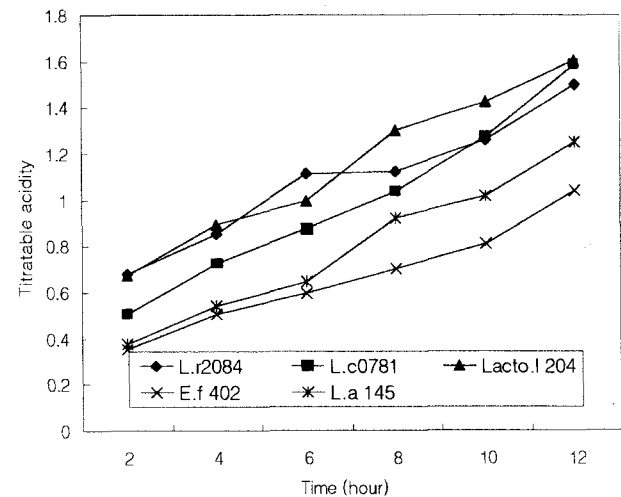


Fig. 8. Titratable acidity (%) of yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 37°C.

되었다. 이상의 결과를 Shin 등<sup>35)</sup>의 국내 시판 요구르트의 이화학적 특성에 대한 보고 내용과 비교했을 때, 발효유 제

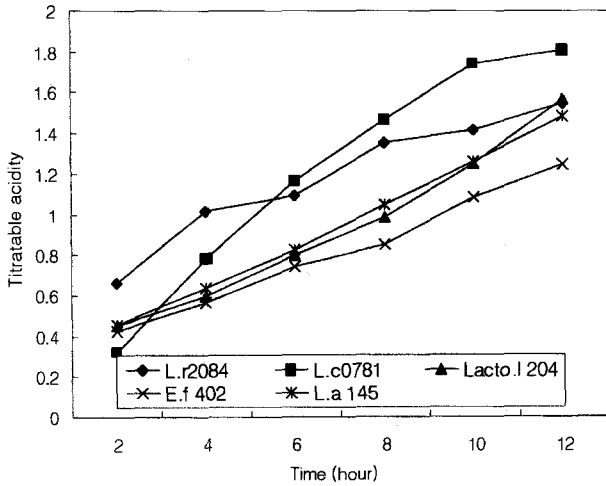


Fig. 9. Titratable acidity (%) of yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 40°C.

조를 위한 starter로서 선발 균주의 사용이 가능하였으며, 추후 발효유 제조의 starter로 사용할 경우 관능검사가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

**유산균수 및 완충능**

제조 요구르트의 생균수 및 완충능은 균주별 최적 배양 온도에서 각각 조사하였다. 선발 균주 대부분의 생균수는 37°C 또는 40°C에서 배양 12시간까지 서서히 지속적인 증가 경향을 보였으며, pH 및 산도에 의한 최적 온도별 생균수는 Fig. 10에서 보는바와 같다. 40°C에서 *L. casei* 0781은 배양 6시간 때  $2.5 \times 10^7$  cfu/ml, *L. rhamnosus* 2084는 배양 4시간에  $2.0 \times 10^7$  cfu/ml, *L. acidophilus* 145는 배양 10시간에  $4.8 \times 10^7$  cfu/ml의 유산균수를, *Lacto. lactis* 204는 37°C에서 배양 6시간에  $6.03 \times 10^7$  cfu/ml를, 그리고 *E. faecium* 402는 37°C와 40°C에서 배양 12시간에 각각  $3.1 \times 10^{10}$  cfu/ml와  $3.8 \times 10^{10}$  cfu/ml의 유산균수를 나타내었다. 선발 균주 모두 규정 유산균수에 근사한 수준을 유지하였다.

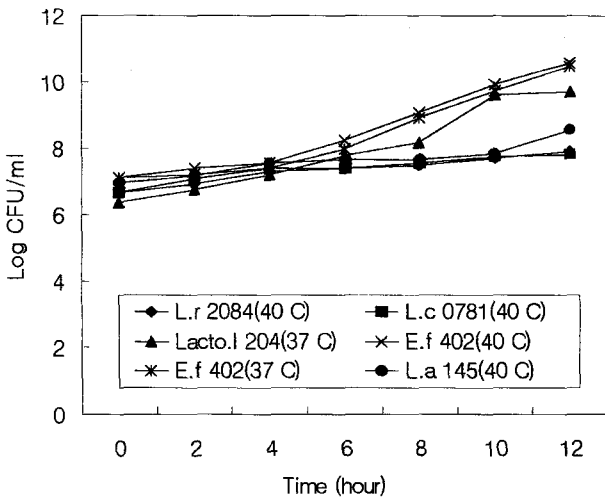


Fig. 10. Change of cell counts on yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 37°C or 40°C.

또한 산과 염기에 대한 유산균의 완충능 조사 결과는 Fig. 11, 12에 나타낸 바와 같다. 산(1.0 N HCl)에 대한 완충능은 40°C에서 배양한 *L. rhamnosus* 2084 균주가, 염기(1.0 N NaOH)에 대한 완충능은 *L. casei* 0781 균주가 가장 높게 나타났다. 또한 40°C에서 *L. casei* 0781의 경우 배양 6시간 때 HCl과 NaOH가 각각 12.39, 12.91 ml이었으며, *L. rhamnosus* 2084는 배양 4시간에 각각 13.77, 8.57 ml로 나타났다. *Lacto. lactis* 204는 37°C에서 배양 6시간에 12.64 ml의 HCl과 10.19 ml의 NaOH가 소모되었으며, *E. faecium* 402는 배양 12시간에 37°C에서 14.0 ml의 HCl, 12.3 ml의 NaOH, 40°C에서는 각각 15.6, 13.5 ml이었다. Martini 등<sup>32)</sup>은 요구르트의 완충능은 전유보다 약 2.7배 높다고 보고하였으며, 이는 원료인 우유 성분 중 유 단백질, 인산염의 함량, 그리고 유산균의 대사산물에 의해 달라진다고 하였다. Giannella 등<sup>33)</sup>은 위의 산성 조건하에서 균의 사멸은 균과 같이 섭취한 식품의 물리적 보호 작용에 따라 달라지며, 완충능이 높은 것일수록 보다 많은 유산균이 살아 있는 상태

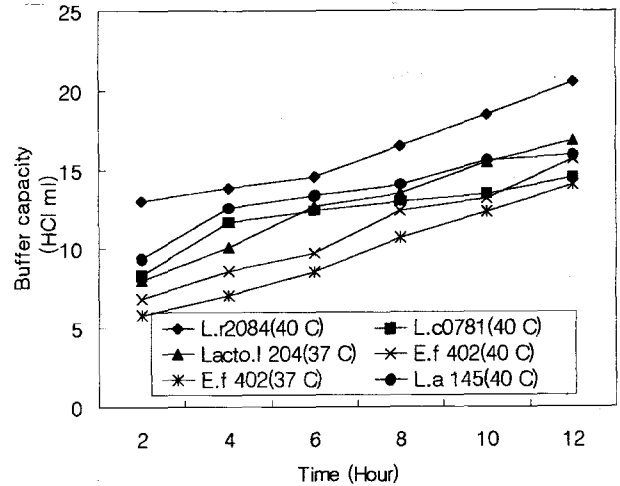


Fig. 11. Change of buffer capacity against 1.0 N HCl on yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 37°C or 40°C.

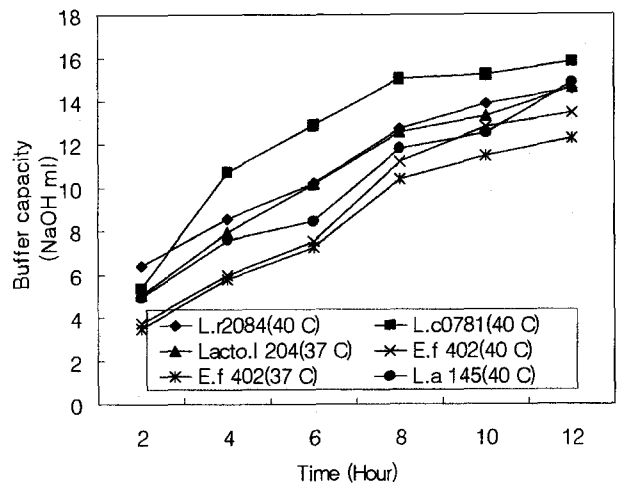


Fig. 12. Change of buffer capacity against 1.0 N NaOH on yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 37°C or 40°C.

로 장내에 도달할 수 있고 효소활성의 잔존 활성도 향상시킬 수 있어 정상 작용의 효과도 증대시킬 수 있다고 하였다. 국내 발효유의 경우, 발효유 50 ml를 0.1 N HCl 및 NaOH로 적정하였을 때 약 3.58~4.33 ml의 HCl과 3.19~3.40 ml의 NaOH가 소모되었다는 Shin 등<sup>30)</sup>의 결과와 비교해 볼 때 본 연구에서는 100 ml의 발효유로 수행하였으나, 객관적으로 판단해 볼 때 높은 산-염기의 완충능을 갖고 있는 것으로 관찰되었다.

### 감사의 글

본 연구는 1995년도 농림기술개발사업 연구비(295153-3) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사 드립니다.

### 참고문헌

- Wood, B. J. B. (1992) The lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier Science Publishers. U.K. Vii-x.
- Orla-Jensen, S. (1991) The lactic acid bacteria. Horst, Copenhagen, Denmark, p. 1-196.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Smith, N. R. (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2, Williams and Wilkins. Waverly press, Baltimore, U. S. A.
- Lidbeck, G. J. and Nord, C. E. (1987) Impact of *Lactobacillus acidophilus* on the normal intestinal flora after administration of two antibiotic agents. *Infection* **16**, 329-336.
- Fernandes, C. F., Shahani, K. M. and Amer, M. A. (1987) Therapeutic role of dietary lactobacilli fermented dairy products. *FEMS*. **46**, 343-356.
- Suzuki, Y. and Kaizu, H. (1991) Effect of cultured milk on serum cholesterol concentration in rats which were fed high-cholesterol diets. *Anim. Sci. Technol.* **62**, 565.
- Fernandes, C. F., Chandan, R. C. and Shahani, K. M. (1992) Fermented dairy products and health In: The lactic acid bacteria, Volume 1, edited by Wood, B. J. B. London, New York : Elsevier Applied Science. p.297-342.
- Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. (1984) The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**, 756-761.
- 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**, 1514-1516.
- Flanklin, M. A. and Skoryna, S. C. (1971) Studies on natural gastric flora; survival of bacteria in fasting human subjects. *Can. Med. Assoc. J.* **105**, 380-386.
- Giannella, R. A., Broitman, S. A. and Zamchick, N. (1972) Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man; studies *in vivo* and *in vitro*. *Gut*. **13**, 251-256.
- Maffei, H. V. L. and Nobrega, F. J. (1975) Gastric pH and microflora of normal and diarrhetic infants. *Gut*, **16**, 719-724.
- Booth, J. R. (1983) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microb. Rev.* **49**, 359-363.
- Overdahl, B. J. and Zottola, E. A. (1991) Relationship between bile tolerance and the presence of a ruthenium red staining layer on strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **74**, 1196-1200.
- Fernandes, C. F. and Shahani, K. M. (1988) Effect of nutrient media and bile salts on growth and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **71**, 3222-3226.
- Castelli, W. P., Wilson, P. F., Levy, D. and Anderson, K. (1990) Serum lipids and risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis Rev.* **21**, 7-19.
- Mann, G. V. and Spoerry, A. (1974) Studies of a Surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am. J. Clin. Nutr.* **27**, 464-469.
- Hepner, G., Fried, R., Jeor, S., Fusetti, L. and Morin, R. (1979) Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**, 19-24.
- Nair, C. R. and Mann, G. V. (1977) A factor in milk which influences cholesteremia in rat. *Atherosclerosis* **26**, 363-367.
- Gilland, S. E., Nelson, E. R. and Maxwell, C. (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 377-381.
- Razin, S. (1975) Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *J. Bacteriol.* **124**, 570-572.
- Parmentier, G. and Eyssen, H. (1974) Mechanism of biohydrogenation of cholesterol to coprostanol by *Eubacterium* ATCC 21408. *Biochem. Biophys.* **348**, 279.
- Gilland, S. E. (1989) Acidophilus milk products : A review of potential benefits to consumers. *J. Dairy. Sci.* **72**, 2483-2494.
- Starr, M. P., Truper, H. G. and Schlegel, H. G. (1984) A Hand book and identification of bacteria. The prokaryotes, Springer-Verlag Berlin Heidelberg., New York.
- Collins, C. H. and Lyne, P. M. (1984) Microbiological methods. 5th ed, Butterworths.
- Kobayashi, H. (1985) A proton translocating ATPase regulates pH of the lactic acid bacterial cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **260**, 72-76.
- Sim, J. H., Kim, S. K., Baek, Y. J., Oh, T. K. and Yang, H. C. (1995) Influence of culture conditions in acid tolerance of *lactobacillus casei* YIT 9018. *Korean J. Applied Microbiol. Biotech.* **23**, 17-23.
- Noh, D. O. (1995) Cholesterol uptake by *Lactobacillus acidophilus*: Its fate and factors influencing the uptake. Doctoral Thesis, Oklahoma State University.
- Rudel L. L. and M. D. Morris (1973) Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J. Lipid Research.* **14**, 364-366.
- Shin, Y. S., Sung, H. J., Kim, D. H. and Lee, K. S. (1994) Survival rate of lactic acid bacteria and the change of  $\beta$ -galactosidase activity in commercial yogurts under the acidic conditions. *Agric. Chem. Biotechnol.* **37**, 143-147.
- Collins, J. L., Ebah, C. B, Mount, J. R., Demott, B. J. and Draughon, F. A. (1991) Production and evaluation of milk-sweet potato mixtures fermented with yogurt bacteria. *J. Food. Sci.* **56**, 685-688.
- Martini, M. C., Bollweg, G. L., Levitt, M. D. and Savaiano, D. A. (1987) Lactose digestion by  $\beta$ -galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**, 432-436.
- Shan, N. and Jelen, P. (1990) Survival of lactic acid bacteria

- and their lactases under acidic conditions. *J. Food Sci.* **55**, 506-509.
34. Lee, J. S., Han, P. J. and Suh, K. B. (1972) Studies on production of modified yoghurt (soy cream) from soybean milk (I). *Korean J. Food Sci. Tech.* **4**, 194-199.
35. Goh, J. S., Yang, B. K. and Ahn, J. K. (1982) Studies on the manufacture of semi-solid type set yoghurt. *Korean J. Dairy Sci.* **4**, 129-137.

---

#### **Selection and Physico-Chemical Characteristics of Lactic Acid Bacteria which had Cholesterol Lowering Activities**

Jong-hyun Kim\*, Min-keun Oh, Yong-hwan Rhee, Ki-chun Choi<sup>1</sup>, Yong-kyu Lee<sup>1</sup> and Seung-ye Shin<sup>2</sup>  
 (Department of Agricultural Chemistry; <sup>1</sup>Department of Animal Science, Chonnam National University, Kwang-Ju, 500-757, Korea; <sup>2</sup>Department of Food Science & Technology, Dong-A Injae College, Yong-Am, 526-870, Korea)

**Abstract** : Four strains of lactic acid bacteria which had cholesterol lowering activities were selected from foreign fermented milk. The strains were identified as *Lactobacillus(L.) rhamnosus* 2084, *L. casei* 0781, *Lactococcus (Lacto.) lactis* spp. 204, and *Enterococcus(E.) faecium* 402. We observed that the *L. rhamnosus* 2084 was the most tolerant against pH 1.5, *L. casei* 0781 against pH 2.0, but not significantly different in the tolerance against pH 3.0. The *L. rhamnosus* 2084 was the most tolerant against bile acid and prominent in the degree of lowering cholesterol level. All four strains were used as starters in producing yogurt, and then investigated physico-chemical characteristics, such as pH, titratable acidity, and viable cell counts of yogurt base. *L. casei* 0781, *L. rhamnosus* 2084, *Lacto. lactis* 204, and *E. faecium* 402 were incubated for 6 hours at 40°C, 4 hours at 40°C, 6 hours at 37°C, and 12 hours at 37°C and 40°C, respectively, for the optimum conditions of fermented milk.

---

Key words : *Lactobacillus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *Lactococcus*, *L. lactis*, *Enterococcus*, *E. faecium*, yogurt, cholesterol

\*Corresponding author