



담즙산 분해능이 뛰어난 젖산균의 분리 및 동정

하철규 · 조진국¹ · 채영규 · 허강칠^{1*}

한양대학교 생화학 및 분자생물학과, ¹국립환경대학교 낙농과학과, *(주)빅바이오젠

Isolation and Identification of Lactic Bacteria Containing Superior Activity of the Bile Salts Deconjugation

Chul-Gyu Ha, Jin-Kook Cho¹, Young-Gyu Chai and Kang-Chil Heo^{1*}

Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

¹Dept. of Dairy Science and Bigbiogen Co., #102 Dairy Extension Service Center, Hankyong National University, Anseong 450-149, Korea

Abstract

The purpose of this study is to isolate probiotic lactic acid bacteria (LAB) that produced bile salts hydrolase. One hundred twenty strains were initially isolated from human feces. Based on their resistance of acid, tolerances of bile salts, and inhibitory activity against *Escherichia coli*, five strains were selected. A strain producing highest activity of bile salts hydrolase was identified as *Lactobacillus plantarum* using API carbohydrate fermentation pattern and 16S rRNA sequences, and named CK102. *Lactobacillus plantarum* CK102 survived at a level of 1.36×10^8 CFU/ml in pH 2 buffer for 6 h and showed exhibited excellent bile tolerance. When *L. plantarum* CK102 was cultured with *E. coli* in MRS broth, no viable cells of *E. coli* was detected after 18 h fermentation. These results suggest that *Lactobacillus plantarum* CK 102 may be commercially used for the probiotic culture.

Key words : bile salts, lactic acid bacteria, deconjugation, isolation and identification

서 론

현재 경제 발전 및 소득 수준이 향상됨에 따라서 각종 성인성 질환이 급증하고 암과 동맥경화증 등이 현대인의 사망 요인으로 가장 중요하게 대두되었다. 성인성 질환을 유발시키는 요인 중에서 가장 중요한 것은 동물성 지방의 과다한 섭취로 인한 혈중 고 콜레스테롤이다. 젖산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로서 오래전부터 제약, 식품, 사료 산업에서 생균제(probiotics)로서 널리 사용되어 오고 있다(Wood, 1992). 인간의 장으로부터 분리된 젖산균들은 이러한 혈중 콜레스테롤의 감소에 효과와 관계가

있다는 연구결과(Ahn et al., 1999; Kim et al., 1999)들이 발표되면서 우리나라 젖산균에 관한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다.

젖산균에 의한 효과는 장내 세균균수의 안정화(Lidbeck et al., 1987), 위장관내 병원균의 증식억제(Fernandes et al., 1987), 혈중 콜레스테롤의 저하(Hepener et al., 1979; Suzuki et al., 1991), 특이 및 비특이 면역반응의 유도 및 영양소 이용의 향상(Fernandes et al., 1992), 암퇴화 및 장내 효소 활성 감소에 의한 결장암의 예방효과(Goldin et al., 1984), 그리고 비타민과 같은 인체 유용물질의 합성에 의한 영양 및 건강증진 효과 등이 있다. 그러나 젖산균이 장내에서 유익한 역할을 수행하기 위해서는 인체 소화기기관 내의 위액, 각종 소화효소, 담즙산, 장의 연동 운동, 면역반응(immune response) 및 낮은 표면장력 등 미생물의 생존을 저해하는 요인들을 극복해야 한다(Gilliland, 1979).

* Corresponding author : Kang-Chil Heo, Bigbiogen Co., #102 Dairy Extension Service Center, Hankyong National University, Anseong 450-749, Korea. Tel: 82-31-670-5208, Fax: 82-31-670-5238, E-mail: hckue@hanmail.net

이러한 요인들 중 담즙산은 콜레스테롤 대사의 산물로서 평상인의 담즙산은 41% cholate, 39% chenodeoxycholate, 15% deoxycholate, 4% ursodeoxycholate, 1% lithocholate로 구성되어 있다(Elliott, 1985). 담즙으로 분비되는 담즙산은 소화장관의 전역에서 흡수되거나 회장하부로부터 재흡수되어 간장으로 돌아오는 장간순환을 하는데, 97%가 이 경로로 흡수된다(Hofmann, 1988; Macdonald et al., 1983). 이러한 장간순환 시, 과학적, 약물학적, 병리학적, 간접에 의해 담즙산이 유실되면, 새로운 담즙산 합성을 위한 전구물질로 콜레스테롤을 필요로 하게 된다(De Rodas et al., 1996; Driessen and De Boer, 1989).

한편, 장내 미생물들은 복합담즙산의 amide 결합을 가수분해하여 유리 담즙산을 생성하고, 7 carbon hydroxyl group을 제거하여 2차 담즙산을 생성하며, 또 hydroxyl group들을 산화·환원하여 담즙산을 전환시킬 수 있다(Hofmann, 1988). 담즙산은 glycine 또는 taurine과 함께 N-acyl conjugation을 형성하여 담즙으로부터 분비되며(Hofman and Mysels, 1992), 체내에서 콜레스테롤을 제거하는 주경로로서(Turley and Dietschy, 1988), 체내 콜레스테롤 대사를 조절하는 주요한 단단이자(Chen et al., 1995). 담즙산과 taurine 또는 glycine의 결합은 bile salt hydrolase에 의해 분해되며, 이 복합담즙산 분해효소의 활성은 *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium* 그리고 *Streptococcus* 속에서 발견되고 있다(Hylemon, 1985; Macdonald, 1983).

Gilliland와 Speck(1977)은 lactobacilli에 의해 glycholate 및 taurocholate 등이 분해되면 더 이상 분해되지 않는 성질이 있으며, pH 6의 혼기상태에서 가장 활발하였다고 하였다.

따라서 본 연구에서는 사람의 분변에서 담즙산 분해능이 뛰어난 젖산균을 분리하고, 이 젖산균의 혈중 콜레스테롤의 저하효과에 관한 기초 지식을 얻고자, 젖산균의 내산성, 내담즙산성 및 항대장균성 등 균주특성을 조사하여 활성이 높은 균주를 선별하고, 동정하였다.

재료 및 방법

재료

젖산균은 건강한 성인의 분변으로부터 분리하여 사용하였고, 대장균은 한국유전자은행(KCTC)의 표준균주 *E. coli* KCTC 1041를 실험에 사용하였고, 담즙산은 oxgall powder와 bile extract(Sigma, Louis U.S.A.)를 사용하였다. 젖산균 배양용 배지로는 MRS broth(Difco, Detroit, U.S.A.)를 사용하였고, 대장균은 LB broth(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl)를 사용하였으며 배양조건은 37°C에서 1일간 호기적으로 배양하였다.

젖산균 분리

건강한 성인 30명으로부터 분변을 채취하여 멸균된 시료 병에 넣은 다음 아이스박스에 넣어 실험실로 옮긴 후, 분변을 0.02% sodium azide(NaN₃)가 첨가된 MRS 액체배지가 담긴 15 mL 시험관에 멸균된 면봉을 이용하여 넣고, 멸균된 가위를 이용하여 면봉의 1/3 부분을 잘라 넣은 후, 37°C에서 약 2 일간 배양하였다. MRS 한천 배지상에 생성된 균락을 백금으로 채집하여 MRS 액체 배지에 접종하고, 다시 배양하였다. 배양된 균주의 colony의 형태, catalase 음성, Gram 양성, 유산 생성 등을 기준으로 하여 젖산균으로 추정되는 균주를 선발하였다. 선발된 균주들을 원심분리(7,000 rpm, 15 min)하고 상등액을 멸균된 20% 탈지유로 치환하여 냉동(-70°C) 보관하면서 실험에 사용하였다.

젖산균의 담즙산 분해

젖산균의 담즙산 분해는 Dashkevitz와 Feighner(1989)의 agar plate assay를 이용하여 시험하였다. 시험에 사용한 담즙산은 oxgall powder와 bile extract(Sigma, Louis U.S.A.)를 사용하였다. Oxgall과 bile extract를 MRS 배지에 각각 0.5% 첨가하고 agar(Difco, Detroit, U.S.A.)를 1.7% 첨가하여 멸균한 다음 한천배지평판을 만들고, 시험 젖산균을 도말 접종한 후, 37°C로 조정한 배양기에서 3일간 배양하였다. 담즙산 분해반응의 정도는 균락 주위에 형성된 투명환을 육안으로 관찰하여 3등급으로 구분하였다.

내산성과 내담즙산성 분석

담즙산 분해능이 우수한 균주의 내산성 또는 내담즙산성의 분석을 위하여 pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0인 1/15M KH₂PO₄-HCl 완충용액과 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%(w/v)의 bile salt를 함유한 각각의 MRS broth에 각 분리 균주(2.0×10^8 CFU/mL)를 접종하여 37°C로 6시간 동안 방치하였다. MRS agar plate에 도말하여 배양한 후 다음식에 의해 내산성 또는 내담즙산성을 나타내기 위한 생존율(%)을 계산하였다.

$$\text{생존율(%)} = (\text{cell number in MRS containing HCl or bile salt} / \text{cell number in MRS}) \times 100$$

대장균 생육억제 시험

분리균주들은 MRS 배지에서 대장균은 LB 배지에서 12~24시간 배양한 후, 하나의 MRS 배지에는 대장균을 약 5.0×10^8 CFU/mL이 되도록 접종하고 다른 하나의 MRS 배지에는 분리균주와 대장균이 각각 약 5.0×10^8 CFU/mL의 수가 되도록 혼합 접종하였다. 접종된 배지를 37°C 배양기에서 정차 배양하면서 3시간 또는 6시간 간격으로 배양액을 채취하여 멸균 생리식염수로 희석한 후 LB 평판배지에 나타난 균락으

로부터 대장균 수를 측정하였다. 분리균에 의한 대장균의 생육억제 정도는 MRS 배지에 단독으로 접종하여 배양한 대장균수와 비교하여 계산하였다.

젖산균 동정

분리균주 중 특성이 가장 우수한 *Lactobacillus* sp. CK 102 균주를 API kit를 이용한 당 발효실험과 Bergey's manual (Williams and Wilkins, 1986)에 의한 동정을 실시한 후, 16S rRNA sequencing 방법(Loffler et al., 2000)을 사용하여 동정하였다.

통계처리

실험에 의한 자료처리는 Windows 용 MS Excel 및 SAS (Statistic Analytical System, USA) Program(1989)을 사용하여 구하였고, 신뢰구간 검정은 κ^2 검정에 의하였고, 유의차 검정은 Duncan Multiple Range Test로 모두 95% 이상의 신뢰구간을 기준으로 산출하였다.

결과 및 고찰

균주분리

시람의 분변 혼탁액을 분리원으로 하여 120여개의 단일 colony를 얻었으며, 얻어진 colony의 형태, catalase 음성, Gram 양성, 유산생성 등을 기준으로 하여 젖산균으로 추정되는 30 여주를 선별하였다(data not shown). 선발된 균주중 담즙산이 첨가된 배지에서 1차적으로 투명환의 형성이 비교적 큰 균주 5종을 선별하여 *Lactobacillus* sp. CK 101, CK 102, CK 103, CK 104, CK 105로 명명하고, 다음 시험에 이용하였다.

젖산균이 미생물 제제로써 그 기능을 발휘하기 위해서는 섭취후 위와 십이지장을 통하여 소장 및 대장에 정상적으로 도달하여 장점막에 정착한 후 왕성한 번식을 하여야 한다 (Park et al., 1996). 이러한 목적을 달성하기 위해서는 사용하고자 하는 젖산균을 건강한 성인의 분변에서 분리하는 것이 가장 좋을 것으로 생각되어 동물 및 인간의 장으로부터 분리하는 것보다 분변을 사용하였다.

젖산균의 담즙산 분해능

도말된 배지상의 담즙산 분해시험에서는 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 담즙산이 분해된 투명환을 생성하였다. 투명환의 생성크기를 3등급으로 나누어 표시하였을 때는 Table 1의 결과와 같이 *Lactobacillus* sp. CK 102가 가장 큰 투명환을 나타냈다. 이 결과로부터 담즙산 분해능은 기타의 *Lactobacillus* sp.들보다도 *Lactobacillus* sp. CK 102가 가장 우수한 것으로 고찰되었다.

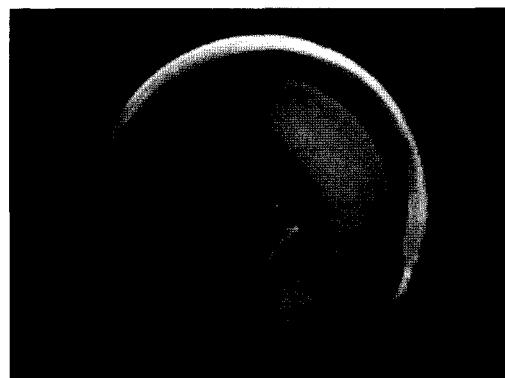


Fig. 1. Deconjugation of conjugated bile salts by *Lactobacillus* sp. CK 102 grown on MRS agar plates containing bile salts.

Table 1. Deconjugation of bile salt by lactic acid bacteria under anaerobic condition

Bile salts	Deconjugation				
	CK 101	CK 102	CK 103	CK 104	CK 105
Oxgall	-	++	-	+	+
Bile extract	+	+++	+	++	+

-: No halos of precipitate around colonies.

+: Halos of precipitate around colonies.

++: Big halos of precipitate around colonies.

+++: Very big halos of precipitate around colonies.

한편 담즙산이 1.0% 이상인 경우에 침전물이 형성되어 젖산균의 담즙산 분해 정도를 측정하는 것이 어려운 경우가 다수 발생하였다. 이것은 젖산균의 담즙산 탈포합 효소에 의한 영향인 것으로 생각되며 콜레스테롤 대사와도 밀접한 관련이 있기 때문에 향후 이에 대한 연구가 보완되어야 한다 (Klaver et al., 1993).

내산성과 내담즙산성

젖산균 미생물제로써 충분한 기능을 발휘하기 위해서는 pH 3이하의 낮은 pH 조건의 위장관을 통하여 소장내로 도달하여 생존하여야만 한다(Booth, 1985; McDonald et al., 1990). 이에 본 연구에서는 젖산균의 생존에 영향을 미치는 다양한 pH(pH 2.0~5.0)에서의 생존율을 조사하였다(Table 2). 이상으로 pH 4에서는 모든 유산균주들이 약 94% 이상으로 생존하였으나, pH가 낮아짐에 따라 생존율이 감소하였다. pH 2.0에서는 CK 102 균주와 CK 104 균주가 각각 68.2%와 34.6%의 생존율을 나타내었다. pH 2.0에서 6시간 이후부터 급격히 균수가 감소하므로 균주간의 산에 대한 생존율의 차이를 뚜렷하게 볼 수 있는 반응시간이라 인지되어, 6시간 후 각 균주를 도말하여 생균수를 측정하였다(Lee et al., 2002) 십이지장에서 분비되는 담즙에 대한 내성을 실험하기 위

하여 담즙산의 다양한 농도(0.1~1.0%)에서의 생존율을 조사한 결과, CK 102 균주가 담즙산 농도 1.0%에서 생존율 92.2%로 가장 우수한 생존율을 나타내었고 CK 104 균주도 65.2%로 우수한 결과를 나타내었다(Table 3). 이는 내산성이 강한 *Lactobacillus* sp. CK 102, 104 균주들이 비교적 산성이 강한 담즙산에도 강한 생존율을 나타내는 것임을 알 수 있었다.

담즙산은 십이지장에서 분비되는 물질로서 세균의 성장을 억제하는 기능을 지니고 있으며 특히 장내 유래세균이 아닌 경우에는 담즙산이 함유된 배지에서는 자랄 수 없다고 알려져 있다(Gilliand et al., 1977). 본 실험에서는 분리된 균주를 담즙산이 0~1.0% 함유된 MRS 배지에 도말하였을 때 담즙산 함량에 반비례하여 성장하였고, 담즙산 함량이 높은(0.5% 이상 함량) 배지에서는 colony 형태가 pin point형 인 것으로 보아 이는 분리된 균주가 담즙산에 의해 사멸되지는 않고 성

장이 저해되는 것으로 추측되어진다.

대장균 생육억제능

본 실험을 통하여 분리된 균주를 대장균과 혼합배양하여 대장균 생육억제능의 시험결과를 Fig. 2에 나타내었다. 대부분의 분리 젖산균들은 접종 후 6~9시간까지 완만한 저해효과를 나타내었고, 30시간에는 거의 모든 대장균을 사멸시키는 효과가 나타났다. 특히 *Lactobacillus* sp. CK 102의 경우는 12시간 이후부터는 대장균수가 급속히 감소하기 시작하여 18시간에는 대장균이 전혀 나타나지 않았다(Fig. 2).

대장균의 성장억제가 배양과정에서 젖산균이 생성한 젖산에 의해 낮아진 pH의 영향인지 파악하기 위하여 pH 별로 대장균 성장억제 실험을 실시해 본 결과 산성 pH에서는 성장은 억제되었으나 사멸은 되지 않았음을 알 수 있었다(data not

Table 2. Hydrochloric acid-tolerance of various isolates of *Lactobacillus* sp. at different initial pH

		pH	CK 101	CK 102	CK 103	CK 104	CK 105
pH 2.0	Viable cell(CFU/mL)		0	1.36×10^8	0	6.92×10^8	0
	Viability(%) ^a		0	68.2±3.4	0	34.6±1.7	0
pH 3.0	Viable cell(CFU/mL)		3.08×10^7	1.65×10^8	0	1.52×10^8	6.64×10^7
	Viability(%) ^a		15.4±0.8	82.7±4.1	0	75.8±3.8	33.2±1.7
pH 4.0	Viable cell(CFU/mL)		1.90×10^8	1.98×10^8	8.32×10^7	1.98×10^8	1.89×10^8
	Viability(%) ^a		95.1±4.8	99.0±5.0	41.6±2.1	99.0±5.0	94.6±4.7
pH 5.0	Viable cell(CFU/mL)		1.94×10^8	1.98×10^8	1.54×10^8	1.98×10^8	1.92×10^8
	Viability(%) ^a		97.2±4.9	99.0±5.0	77.2±3.9	99.0±5.0	96.2±4.8

Viability(%)^a=(cell number in MRS containing HCl or bile salt ÷ cell number in MRS)×100. Inoculated various *Lactobacillus* sp. were approximately 2.0×10^8 CFU/mL at initial time and regarded as 100%.

Table 3. Bile salt-tolerance of various isolates of *Lactobacillus* sp. at different concentration of bile salts

		Bile salts (%)	CK 101	CK 102	CK 103	CK 104	CK 105
0.1	Viable cell(CFU/mL)		1.98×10^8	1.98×10^8	1.52×10^8	1.98×10^8	1.32×10^8
	Viability(%) ^a		99.0±5.0	99.0±5.0	76.2±3.8	99.0±5.0	66.1±3.3
0.3	Viable cell(CFU/mL)		1.10×10^8	1.98×10^8	9.02×10^7	1.98×10^8	6.24×10^7
	Viability(%) ^a		55.1±2.8	99.0±5.0	45.1±2.3	99.0±5.0	31.2±1.6
0.5	Viable cell(CFU/mL)		7.06×10^7	1.98×10^8	2.38×10^7	1.98×10^8	0
	Viability(%) ^a		35.3±1.8	99.0±5.0	11.9±0.6	99.0±5.0	0
1.0	Viable cell(CFU/mL)		2.42×10^7	1.84×10^8	0	1.30×10^8	0
	Viability(%) ^a		12.1±0.6	92.2±4.6	0	65.2±3.3	0

Viability(%)^a=(cell number in MRS containing HCl or bile salt ÷ cell number in MRS) × 100. Inoculated various *Lactobacillus* sp. were approximately 2.0×10^8 CFU/mL at initial time and regarded as 100%.

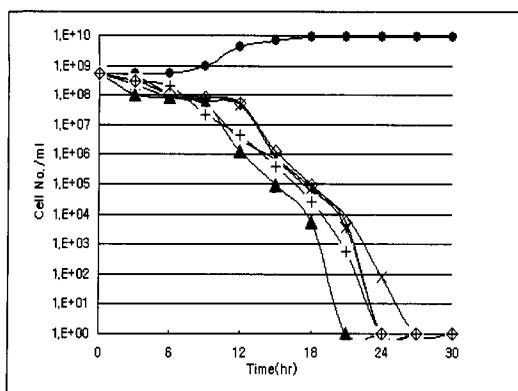


Fig. 2. Growth inhibition of *E. coli* KCTC 1041 by *Lactobacillus* sp. CK 101, 102, 103, 104 and 105 in MRS broth.

●: only *E. coli*, *: *E. coli* by *Lactobacillus* sp. CK 101, ▲: *E. coli* by *Lactobacillus* sp. CK 102, ×: *E. coli* by *Lactobacillus* sp. CK 103, +: *E. coli* by *Lactobacillus* sp. CK 104, ◇: *E. coli* by *Lactobacillus* sp. CK 105

shown). 젖산균에 의한 유해 세균의 억제는 젖산균이 생산하는 bacteriocin에 의해서 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Huttu-men et al., 1995; Gourama and Bullerman, 1995). 이와 같은 사실로부터 분리 젖산균에 의한 대장균의 생육억제는 산성 pH와 bacteriocin에 의한 사멸작용에 기인하는 것으로 사료된다.

조 등(1984)은 *L. acidophilus*, *L. casei* 및 *L. bulgaricus*를 이용하여 *E. coli*와 *Salmonella typhimurium* 등의 증식에 미치는 영향을 조사하였는데 *L. bulgaricus*에 의해서는 33~34 시간 까지 배양하였을 때 *E. coli*와 *Salmonella*의 증식을 모두 억제하였으나 *L. acidophilus*와 *L. casei*의 경우엔 10^7 의 균수에 대하여 40시간 후, 10^5 ~ 10^6 까지 저해하여 *L. bulgaricus* 비해 저해능이 저조하다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 분리한 *Lactobacillus* sp. CK 102에 대해서는 18시간 이후에는 대장균이 검출되지 않아 조 등(1984)의 결과보다 빠른 시간에 대장균의 생육을 억제하는 것으로 나타났다.

유산균 동정

본 연구에서 선발된 젖산균들 중 가장 우수한 결과를 보여 준 *Lactobacillus* sp. CK 102를 API kit를 이용한 당발효 실험과 16S rRNA 분석을 통하여 동정하였다. API kit 분석에서는 *Lactobacillus plantarum*으로 나타났다(Table 4). 그리고 16S rRNA 분석에서는 *Lactobacillus* sp. CK 102의 510개의 염기배열이 *Lactobacillus plantarum*임을 알 수 있었다(Fig. 3). 따라서 동정된 CK 102 균주는 미생물제로써 사용이 가능한 안전성이 있는 젖산균임을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 분리된 *Lactobacillus* sp. CK 102 균주

Table 4. Bacteriological characteristics of *Lactobacillus plantarum* CK 102

Morphology	
Cellular	rod
Gram staining	+
Colony(at MRS medium)	gray(flat)
Spore-forming	-
Motility	-
Physiological characteristics	
Optimum pH	6.0 ~ 7.0
Optimum temperature	35 ~ 37°C
Growth at 15°C	-
Growth at 42°C	+
Growth at 0.3% bile	+
Growth under aerobic condition	+
Catalase	-
β-Galactosidase	+
Acid formation	
Amygdalin	+
Arabinose	-
Celllobiose	+
Galactose	+
Glucose	+
Fructose	+
Mannose	+
Ribose	-
N-acetyl glucosamine	+
Esculin	+
Salicine	+
Maltose	+
Lactose	+
Melibiose	+
D-Raffinose	+
Amidone	-

+: positive, -: negative

CTGGTTAATCCGTCTACCTGACAGTTACTCTCACGATATGTTCTCTTITA
ACAACAGAGTTTACGAGGCCAAACCCCTCTTCACTCACGGCGTGTGCT
CCATCAGACTTCGTCCATTGTGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA
GGAGTTGGGCCGTGCTCAGTCCAATGTGGCCGATTACCCCTCTCAGGT
CGGCTACGTATCATGCCATGGTGAGCCGTTACCCACCCTAGCTAAT
ACGCCCGGGACCATCCAAAAGTGTAGCCGAAGCCATTTCAAACCTCG
GACCATGCGGTCCAAGTTGTATGCGGTATTAGCATCTGTTCCAGGTGT
TATCCCCGCTCTGGCAGGTTCACCGAGTTGCCA
CTCACTCAAATGTAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAAGAGTCG
TTCGACITGCATGTATTAGGCACGCCAGCGTCTGAGCANGGN 500
ATCAAACCTCT 510

Fig. 3. 16S rRNA sequence of *Lactobacillus plantarum* CK 102.

는 담즙산 분해능과 내산성, 내담즙산성이 뛰어나며, 대장균 억제효과가 있는 *Lactobacillus plantarum*으로 판명되었다.

본 균종은 건강한 인체의 분변에서 분리하였기 때문에 어느정도 안전성이 확보되어 있을 것으로 추정되며, 담즙산 분해능으로 인한 콜레스테롤 저하효과를 추가적인 실험으로 밝힌다면 건강보조식품 또는 사료첨가제 등의 유용한 소재로 사용이 가능할 것으로 생각되었다.

요 약

건강한 성인의 분변으로부터 담즙산 분해능이 우수한 젖산균의 분리를 위하여 무작위 선별법과 도말법을 사용하여 총 120주의 젖산균을 1차 분리하였고, 그중 5종의 젖산균을 최종 선발하였다. 유용한 젖산균이 갖추어야 할 중요한 성질인 내산성, 내담즙산성, 대장균 저해능을 시험한 결과 *Lactobacillus* sp. CK 102이 가장 우수한 균주로 나타났다. *Lactobacillus* sp. CK 102 균주는 pH 2.0에서 68% 이상의 내성과 1.0% 담즙산이 함유된 배지에서 90% 이상의 내성을 나타냈으며 MRS 배지에서 대장균과 혼합 배양시 18시간 이내에 대장균을 100% 사멸시켰다. 젖산균제로써 기능이 가장 우수한 균주인 *Lactobacillus* sp. CK 102를 API kit와 16S rRNA sequencing 방법을 사용하여 동정한 결과 *Lactobacillus plantarum*으로 밝혀졌다. 이상의 결과에서 분리한 *Lactobacillus* sp. CK 102는 생균제로서 안전하게 이용할 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 고품질친환경 농축산물 생산기술연구센타(KRRC)의 연구비 지원으로 일부 연구되었습니다.

참고문헌

- Ahn, Y. T. and Kim, H. U. (1999) Bile salts deconjugation of lactic acid bacteria found in the feces of normal Korea adults in fermented milk products. *Kor. J. Anim. Sci.* **41**, 183-192.
- Booth, I. R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359-378.
- Chen, Z., Herdt, T. H., Liesman, J. S., Ames, N. K., and Emery, R. S. (1995) Reduction of bovine plasma cholesterol concentration by partial interruption of enterohepatic circulation of bile salts: a novel hypocholesterolemic model. *J. Lipid Res.* **36**, 1544-1556.
- Dashkevitz, M. P. and Feighner, S. D. (1989) Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 11-16.
- De Roosas, B. Z., Gilliland, S. E., and Maxwell, C. V. (1996) Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. *J. Dairy Sci.* **79**, 2121-2128.
- Driessens, F. M. and De Boer, R. (1989) Fermented milks with selected intestinal bacteria: a healthy trend in new products. *Neth. Milk Dairy J.* **43**, 367-382.
- Elliot, W. H. (1985) Metabolism of bile acid in liver and extrhepatic tissues. In *Sterols and Bile Acids*, **12**, Danielsson, H. and Sjovall, J.(eds.), Elsevier Science Publishers, B. V., pp. 303-343.
- Fernandes, C. F., Chandan, R. C., and Shahani, K. M. (1992) Fermented dairy products and health In: *the Lactic acid Bacteria*, Volume 1, Wood, B. J. B.(ed.), London, New York : ELSEVIA Applied Science, pp. 297-342.
- Fernandes, C. F., Shahani, K. M., and Amer, M. A. (1987) Therapeutic role of dietary lactobacilli fermented dairy products. *FEMS*. **46**, 343-356.
- Gilliland, S. E. (1979) Benefical interrelationships between certain Microorganisms and Humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J. Food Prot.* **42**, 164-167.
- Gilliland, S. E. and Speck, M. L. (1977) Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 15-18.
- 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.
- Gourama, H. and Bullerman, L. B. (1995) Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* **58**, 1249-1256.
- Hepner, G., Friend, R., St. Jeor, S., Fusetti, L., and Morin, R. (1979) Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**, 19-24.
- Hofmann, A. F. (1988) Bile Acids. In *The Liver Biology and Pathobiology*; Arias, I. M., Jakoby, W. B., Popper, K., Schachter, D., and Shafritz, D. A.(eds.), 2nd ed., Raven Press, NY, pp. 553-572.
- Hofmann, A. F. and Mysels, K. J. (1992) Bile acid solubility and precipitation *in vitro* and *in vivo*: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *J. Lipid Res.* **33**, 617-626.

17. Huttunen, E. K., Noro, K., and Yang, Z. (1995) Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *Int. Dairy J.* **5**, 503-513.
18. Hylemon, P. B. (1985) Metabolism of bile acids in intestinal micro flora. In *Sterols and Bile Acids*, **12**, 331-334.
19. Kim, J. H., Oh, M. K., Rhee, Y. H., Lee, Y. K., and Shin, S. Y. (1999) Selection and physico-chemical characteristics of lactic acid bacteria which had cholesterol lowering activities. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 83-90.
20. Klaver, F. A. M. and van der Meer, R. (1993) The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugation activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1120-1124.
21. Lee, J. Y., Hwang, K. Y., Kim, K., and Sung, S. I. (2002) Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting gastro-intestinal pathogenic bacteria of domestic animal. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 129-134.
22. 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**, 329-335.
23. Loffler, F. E., Sun, Q., Li, J., and Tiedje, J. (2000) 16S rRNA gene-base dedection of tetrachloroethene-dechlorinating desulfuromonase and dehalococcoides species. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1369-1374.
24. Macdonald, I. A., Bokkeheuser, V. D., Winter, J., McLernon, A. M., and Mosbach, E. H. (1983) Degradation of steroids in the human gut. *J. Lipid Res.* **24**, 675-700.
25. McDonald, L. C., Fleming, H. P., and Hassan, H. M. (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2124-2128.
26. Park, C. J., Pyeon, J. S., Cho, Y. K., Hong, S. S., and Lee, H. S. (1996) Characteristics of *Enterococcus* sp. isolated from animal intesting and its powder. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 393-398.
27. SAS (1989) SAS User's Guide. Statistical Analysis System, Cary, NC.
28. Suzuki, Y. and Kaizu, H. (1991) Effect of cultured milk on serum cholesterol concentration in rats which were fed highcholesterol diets. *Anim. Sci. Technol.* **62**, 565-576.
29. Turley, S. D. and Dietschy, J. M. (1988) The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. In *I. M. Arias*, 617-641.
30. Williams and Wilkins (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2. Waverly press, Baltimore, U. S. A.
31. Wood, B. J. B. (1992) The lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier Science Publishers. U.K. VII-X.
32. 조성근, 강호조, 김용환, 1984. *Lactobacillus* 균속이 설사 자돈에서 유래한 병원 성장내세균의 증식에 미치는 영향. 경상대학교 부설 축산진흥연구소보 11, 73-81.

(2004. 1. 29. 접수 ; 2004. 6. 9. 채택)