

β -Galactosidase 생산 유산균 선별 및 특성 조사

이영기 · 최수산² · 박용일² · 박찬선 · 윤병대 · 황윤식³ · 김희식*

한국생명공학연구원 환경생명공학연구소, ²가톨릭대학교 생명공학전공, ³(주)애니켄

β -Galactosidase (lactase)를 생산하는 유산균을 선별하고 그들이 생산하는 β -galactosidase의 특성을 조사하였다. X-gal이 포함된 MRS배지에서 푸른색을 나타내는 약 100여개의 콜로니를 김치로부터 분리하였다. 그들 중 ET-1과 LA-12 두 균주를 최종 선별하였으며, 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 각각 *Lactobacillus fermentum*과 *L. acidophilus*와 상동성이 높은 *Lactobacillus* 속으로 동정되었다. 선별된 두 균주는 높은 β -galactosidase activity와 우수한 생존력을 나타내었으며, 이들이 생산하는 β -galactosidase의 최적 활성조건을 조사한 결과, 반응온도 55°C에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 반응 pH의 경우 ET-1은 pH 5.5에서 최고 활성을 나타내었고, LA-12는 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 보였다. 선별 유산균 ET-1과 LA-12는 위액과 담즙산액에 대해 우수한 내성을 나타내었다. 두 개의 선별 균주는 인공위액에 3시간 배양 후 초기 생균수와 비교하여 생균수 변화가 거의 없었고, 담즙산액으로 사용한 0.3% oxgall에서 24시간 반응 후에도 1 log cycle 정도 감소된 10^8 CFU/ml의 생균수를 유지하였다. 이러한 결과를 바탕으로 유산균 ET-1과 LA-12는 유제품 산업에 이용 가능성이 크다고 판단된다.

Key words □ β -galactosidase, *Lactobacillus*, 내담즙성, 내산성, 유산균

유산균은 인간이나 동물의 장관에 상존하여 건강유지에 큰 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 장내에 정착한 유산균은 병원성 세균이 소화관 상피에 부착하는 것을 방해하여 질병발생을 막아주며, 유산균에 의해 생성된 bacteriocin 같은 대사산물은 설사를 일으키는 병원성 미생물과 장내 유해균을 죽이거나 증식을 억제하는 등의 건강 증진 효과를 보여준다(9). 또한 건강을 추구하는 현대에 있어서 성인과 관련된 질병의 예방 및 치료 측면에서 볼 때, 병원성 세균의 억제능, 콜레스테롤 저하능, 면역 증강능, 항 돌연변이원성, 항종양활성 및 항암 효과가 있어 건강유지에 큰 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(8, 11).

포유류의 젖 성분에는 많이 존재하는 유당, lactose는 galactose와 glucose가 $\beta(1\rightarrow4)$ glycoside 결합으로 형성된 이당류이며, 이를 가수분해하는 효소는 인간에서는 lactase로, 세균에서는 β -galactosidase로 알려져 있다. Lactase의 활성이 결핍된 사람의 경우 우유를 섭취하였을 때 우유 성분 중 유당이 섭취되지 않고 소장의 내강에 축적되어 삼투압 상승을 유발한다. 이로 인하여 수분 과잉이 되며, 맹장 내의 미생물에 의하여 발효됨으로서 탄산가스를 발생시키고 대장 내 pH 저하 및 장을 자극하여 불쾌감을 줄 뿐만 아니라 일시적인 설사나 대장의 만성 염증을 유발하여 만성 설사를 일으킨다. 이를 유당불내증(lactose intolerance)이라 하고 경우에 따라 만성적인 염증은 잠재적으로 결장암의 유발과 관련 있다는 보고가 있다. 이러한 유당불내증은 전 세계 인구의 약 2/3에서 발생되고 있으며, 우리나라의 경우는 약 84~

86%에 이른다고 보고되고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 lactase가 함유된 우유를 개발하여, 소장에 결핍된 유당분해효소를 공급함으로써 유당불내증의 원인인 유당을 소화시키면서 소비자들의 기호에 맞도록 할 필요성이 대두되고 있다(4).

본 연구에서는 한국인이 섭취하는 음식 중 가장 많은 부분을 차지하는 김치를 대상으로 β -galactosidase (lactase)를 생산하며 한국인의 장내 정착성이 우수한 유산균을 분리하고, 선별된 균주의 인공위액과 담즙에 대한 내성을 조사하여 probiotic으로서의 가능성을 검토하며, pH 및 온도에 대한 효소 활성을 비교, 조사하여 β -galactosidase 활성과 생산에 대한 최적의 조건을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

β -Galactosidase 생산 유산균 분리 및 동정

β -Galactosidase 생산 유산균을 분리하기 위하여 1 ml 김치액에 0.85% saline solution을 사용하여 희석한 후 32 μ g/ml의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside (X-gal, Sigma, USA)가 포함된 MRS 고체배지(Difco, USA)에서 37°C, 3일간 배양하였다(16). 형성된 colony 중 외관상 표면이 부드럽고 푸른색을 나타내는 colony를 대상으로 1차 분리하였다(12). 1차 분리된 colony들을 대상으로 Cutting 등의 방법(6)을 사용하여 β -galactosidase 활성을 측정하였다. 분리한 colony 중 1,500 Miller Units/ml 이상의 β -galactosidase 활성을 나타내는 균주를 2차 분리하였다.

분리 균주의 동정은 배양된 균주로부터 Genomic DNA isolation kit (Quiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 chromosomal DNA를 분리하였다. PCR kit (Perkin Elmer Co., CT, USA)와

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-860-4326, Fax: 042-860-4594
E-mail: hkim@kribb.re.kr

universal primer (9F, 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 536R, 5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3')를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 그 조건은 다음과 같다; denaturation 95°C, 5 min, annealing 60°C, 1 min, extension 72°C, 1 min, final extension 72°C, 10 min, 30 cycles. PCR 반응 후, 1% agarose gel (FMC, ME, USA)을 사용하여 증폭된 PCR 산물을 확인하였다. pGEM T-easy vector (Quiagen)와 *E. coli* DH5 α competent cell을 사용하여 transformation을 수행하였다. QIAprep spin miniprep kit (Qiagen)를 사용하여 plasmid DNA를 추출한 후, 염기서열 결정 및 분석을 수행하였다. 결정된 염기서열 분석은 BLAST Search Program (NCBI)을 통하여 GenBank의 database와 비교 분석하였다.

β -Galactosidase 활성 측정

유산균 배양액 1 ml을 8,000 \times g에서 2 분간 원심 분리한 후, 침전된 균체를 0.85% saline solution으로 2회 세척한 다음, Z buffer (Na₂HPO₄ · 7H₂O 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ · 7H₂O 1 mM, β -mercaptoethanol 50 mM, pH 7.0) 1 ml에 현탁하였다. ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, Sigma) 기질을 4.0 mg/ml이 되도록 첨가하여 30°C에서 5 분간 반응한 후 1 M sodium carbonate로 반응을 종결시켰다. 상등액에 대하여 흡광도를 420 nm와 550 nm에서 측정하여 β -galactosidase 활성을 계산하였으며, 효소 활성은 배양액 1 ml당 Miller unit으로 나타내었다(6).

Buffer 종류와 ONPG 농도에 따른 β -galactosidase 활성의 차이를 측정하였다. pH 7.0인 Z buffer (containing β -mercaptoethanol)와 acetate buffer (pH 4.0), phosphate buffer (pH 7.0, omitting β -mercaptoethanol)를 사용하여 효소 활성을 비교하였으며, ONPG 농도에 대한 효소 활성의 경우, 4.0 mg/ml과 16 mg/ml의 ONPG를 사용하여 효소 활성을 비교하였다. 또한, 균체 파쇄 방법에 따른 효소 활성을 비교하였다. Toluene 혹은 sonicator (Sonic & Materials Inc., USA)를 사용하여 세포를 파쇄한 후, 효소 활성을 비교하였다. Sonication은 50/60 Hz에서 30초간 30회, 얼음 속에서 고온에 의한 효소 실활을 최소화하면서 세포를 파쇄하였으며, toluene 방법은 배양액 1 ml에 toluene 10 μ l를 첨가하여 세포파쇄 후, 활성을 측정하였다.

생존력과 효소 안정성

MRS 액체배지를 이용하여 37°C에서 18시간 동안 전배양 한 후, 본 배양 배지에 전배양액 1% (v/v)를 접종하였다. 37°C, 18시간 배양한 후 배양액 1 ml을 원심 분리하여 saline solution으로 2회 세척한 다음 생존력과 효소 안정성을 조사하였다.

생존력의 경우 1) MRS medium, 2) 0.85% saline solution, 3) 저온 (4°C), 4) 상온 (30°C)의 4가지 조건을 조합하여 20일간 균주의 생존수를 측정하였으며, 효소의 안정성은 β -galactosidase 활성을 측정하여 나타내었다.

온도와 pH에 따른 효소 활성

온도에 따른 β -galactosidase 활성 변화를 조사하기 위해서 pH

6.5의 ONPG solution을 사용하여 25°C~65°C 범위에서 반응을 수행하였다. 효소반응은 prewarming을 거쳐 온도변화에 의한 β -galactosidase 활성의 오차를 최소화하였다.

pH에 따른 β -galactosidase 활성 변화를 조사하기 위해 pH 4.0~pH 9.0로 조정된 0.1 M phosphate buffer를 사용하였고, 효소 활성 측정 시 반응온도를 37°C와 55°C로 구분하여 효소 활성을 비교하였다.

HPLC 분석

선별 유산균이 생산하는 β -galactosidase의 lactose 분해능 확인을 위하여 HPLC 분석을 수행하였다. S10 NH₂ column (Waters Spheriob Co.)을 사용하였으며, mobile phase는 acetonitrile : DW (65 : 35, v/v)를 사용하였고, flow rate는 1.7 ml/min이었다. 당류의 검출은 RI detector (Shodex, RI-71)를 사용하였다.

유산균의 장내환경에 대한 내성

장내환경요인에 따른 유산균 내성 조사를 위하여 시중에 유통되고 있는 A사와 B사의 유제품에 사용되는 *Lactobacillus* 속 균주 각 1종과 선별 균주의 위액과 담즙산액에 대한 내성을 비교, 조사하였다.

MRS 액체배지에 pepsin 1% (w/v)를 첨가하고 1N HCl로 pH 2.0, 2.5, 3.0으로 조정된 인공위액을 사용하여 위액에 대한 내성을 조사하였다(14, 17). 인공위액에서 37°C, 24시간 배양하여 배양액 1 ml을 8,000 \times g, 5분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 균체에 인공위액을 1:1 (v/v) 비율로 첨가하여 3시간 처리한 후 MRS 고체배지에서 37°C, 48시간 배양하여 생존수 측정을 통하여 인공위액에 대한 내성을 나타내었다.

담즙산액에 대한 내성을 조사하기 위하여 MRS 액체배지에서 37°C, 24시간 동안 배양한 후 배양액 1 ml을 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 인공위액에서 3시간 처리한 후 0.3% oxgall (Difco)이 첨가된 인공 담즙산액(pH 6.5)을 1:1 (v/v) 비율로 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 배양하여 담즙산액에 대한 내성을 측정하였다(15).

결과 및 고찰

β -Galactosidase 생산 유산균 분리 및 동정

Klaenhammer *et al.*(13)에 의하면 유산균 간균의 형태에 따라 담즙에 대한 내성에 차이가 있으며, colony 형태의 경우 rough type colony보다 smooth type이 담즙에 대한 내성이 우수하다고 보고된 바 있다. 김치로부터 위액과 담즙산액에 대하여 내성을 가지며 β -galactosidase 활성이 우수한 균을 분리하기 위해 2% X-gal이 첨가된 MRS 배지로부터 표면이 부드럽고 푸른색을 나타내는 약 100 여개의 colony를 1차 선별하였으며, 선별된 colony들을 대상으로 Cutting 등의 방법(6)을 사용하여 β -galactosidase 활성을 측정하였다. 100 여개 colony들 중 1,500 Miller Unit/ml 이상의 β -galactosidase 활성을 나타낸 6 균주를 2차 분리하였으며, 2차 분리된 균주를 MRS 배지에서 배양한 후,

4°C에서 7일간 보존한 다음, 생균수를 측정하여 생존력이 다른 균주들 보다 높고, 효소 활성이 우수한 ET-1과 LA-12 균주를 최종 선별하였다. 선별된 균주에 대하여 16S rDNA 염기서열 결정 및 분석을 수행하여 균주를 동정하였다. 그 결과 최종 선별된 2 균주, ET-1과 LA-12는 각각 *Lactobacillus fermentum*과 *L. acidophilus*와 높은 상동성을 보이는 *Lactobacillus* 속으로 동정되었다(Table 1).

시중에서 유통되는 요쿠르트 A와 B사 제품으로부터 분리한 유산균과 β -galactosidase 활성을 비교하였다. 선별균주 ET-1과 LA-12의 경우 약 2,600~2,700 Miller Unit/ml의 효소 활성을 보여 시판되는 A사와 B사의 유산균(약 1,600~1,800 Miller Unit/ml)에 비해 약 50% 정도 높은 β -galactosidase 활성을 나타내었다(data not shown).

생존력(viability)과 효소 안정성

β -Galactosidase 생산 유산균의 실용화에 있어서 균주의 생존력과 효소 안정성은 가장 중요한 요인 중 하나이다. 본 실험에서는 선별된 β -galactosidase 생산 유산균의 상업적 이용 가능성을 검토하기 위하여 선별 유산균의 생존력과 유산균이 생산하는 β -galactosidase의 안정성에 대한 실험을 수행하였다. 선별 유산균의 생존력과 β -galactosidase 안정성 실험은 온도(저온과 상온)와 배지(MRS 배지와 saline solution) 조건을 서로 조합하여 20일간 보존하면서 측정하였다.

ET-1의 경우, 4°C, MRS (4M) 조건에서 보존 하였을 때, 보존 16일까지 10⁸ CFU/ml 이상의 생균수를 유지하였다. 효소 안정성은 상온, saline solution (RS) 조건을 사용하여 보존하였을 경우, 보존 5일까지 β -galactosidase 활성이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었으나, 9일 이후 급격한 감소를 나타내었다. 이에 비해 4M 조건인 경우, 보존 7일까지 상대적으로 낮은 효소 활성을 보였으나, 전자에 비해 효소 활성이 안정적이며 1,100 Miller Units/ml 이상의 효소 활성을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1, panel A).

LA-12 균주의 경우, 4°C, saline solution (4S) 조건을 사용하여 보존할 경우, 20일 경과 후에도 높은 생균수(10⁷ CFU/ml)를 나타내었다. 그러나 효소 활성은 상온, saline solution 조건으로 보관하였을 때 활성이 높게 유지되었으며, 20일 경과 후 약 800 Miller Units/ml로 낮아지는 것을 확인 할 수 있었다. 균주 LA-12는 효소 안정성만 고려한다면 4°C, MRS 조건에서 보관할 경우 상온, saline solution 조건보다 보존 7일까지 상대적으로 낮은 활성을 나타내었지만 보존 9일 이후에는 효소 활성의 변화가 적고 완만하여 다른 조건보다 효소활성 유지에 우수한 것으로 관찰 되었다(Fig. 1, panel B).

이상의 결과를 바탕으로 선별 균주에 대한 생존력과 효소의 안정성을 유지하기 위해서는 4°C, MRS 배지 조건을 사용하여

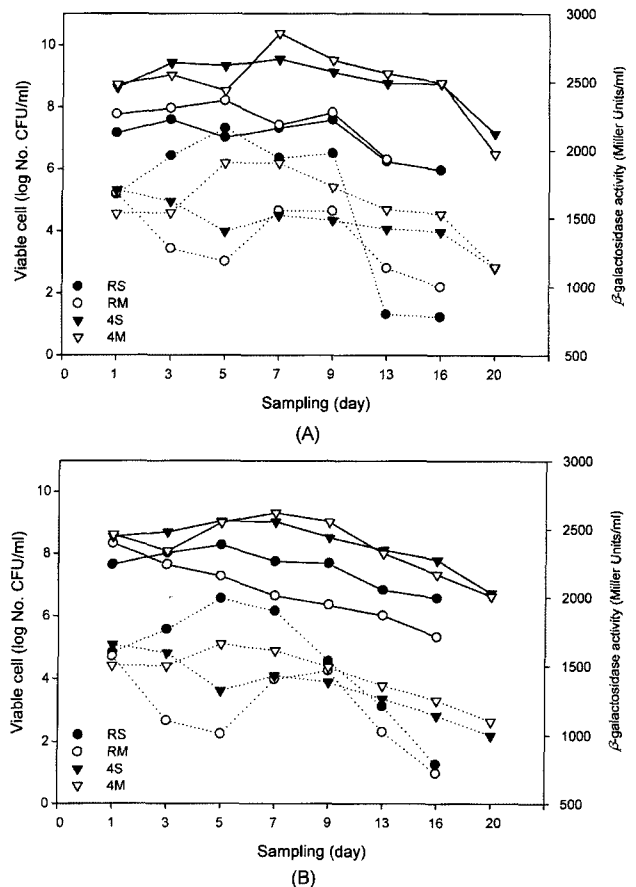


Fig. 1. Viability of selected lactic acid bacteria during the preservation with different conditions. Several experiments were performed, and typical results are shown. Solid lines and dot lines represent viable cell number and β -galactosidase activity, respectively. Panel A, *Lactobacillus fermentum* ET-1; panel B, *Lactobacillus acidophilus* LA-12. RS, saline solution at room temperature; RM, MRS medium at room temperature; 4S, saline solution at 4°C; 4M, MRS medium at 4°C.

보존하는 경우와 4°C, saline solution 조건을 사용하여 보존하는 경우가 가장 효율적이었다. 그러나 선별 균주의 상업화시 비용절감 효과를 통한 경제적 가치를 고려할 경우 4°C, saline solution 조건으로 보존하는 것이 최적으로 판단된다.

β -Galactosidase 활성 분석 조건 검토

β -Galactosidase는 endoenzyme에 속하는 효소로서 일반적으로 매우 소량으로 존재하며 기존의 발효 조건에서는 세포 밖으로 분비되지 않는다고 알려져 있다. 또한 배양조건과 측정 방법에 따라 효소 활성에 차이를 나타낸다(12). 본 실험에서는 선별 균주 중 효소 활성이 가장 높은 ET-1을 사용하여 buffer의 종류,

Table 1. 16S rDNA sequencing analysis of the selected lactic acid bacteria

Strain	Identification (%)	Closet strain	Accession number
ET-1	466/472 (98%)	<i>Lactobacillus fermentum</i>	AY929283.1
LA-12	500/500 (100%)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	AB186327.1

ONPG 기질의 농도, 그리고 세포 파쇄방법에 따른 효소 활성의 차이를 조사하였다. ET-1 (초기 생균수 10^9 CFU/ml)을 phosphate buffer (pH 7.0), acetate buffer (pH 4.5)와 Z buffer (pH 7.0)를 사용하여 희석한 후 sonication을 통하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리하여 상등액과 균체 침전물로 구분한 후 4.0 mg/ml 와 16 mg/ml ONPG 농도를 사용하여 효소 활성을 측정하였다. Buffer의 경우 phosphate buffer를 사용하여 활성을 측정한 결과(Table 2), Z buffer 혹은 acetate buffer와 비교하여 16%~50% 정도 높은 효소 활성을 보였다. ONPG의 경우, 효소 반응 시 ONPG 기질 농도에 따른 효소 활성은 차이가 없는 것으로 확인되었다 (Table 2).

세포 파쇄 방법에 따른 효소 활성의 차이를 확인하기 위하여 toluene 방법(6)과 sonication 방법을 사용하여 세포를 파쇄한 후 효소 활성의 차이를 비교하였다. Sonication의 경우 초음파를 통하여 세균의 세포벽을 파괴하는 방법으로 효소 활성에 negative 혹은 positive effect를 나타낸다고 보고된 바 있다(11). Phosphate buffer에 균체를 현탁하여 sonication으로 세포를 파쇄한 경우, 약 3,000 Miller Units/ml의 효소 활성이 측정되었고, sonication 방법을 사용하여 측정된 효소 활성은 toluene 방법에 비해 15% 정도 활성이 증가하였다(Table 2).

이상의 결과로부터 분리 균주 ET-1의 β -galactosidase 활성 분석의 최적 조건은 phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 sonication (50/60 Hz, 30 sec, 30 times)법으로 세포를 파쇄한 후, 4.0 mg/ml의 ONPG를 기질로 이용하여 30°C에서 5 min간 반응할 경우 최적의 효소 활성을 얻을 수 있었다.

온도와 pH에 따른 효소 활성

β -Galactosidase 활성은 pH, 온도 그리고 저해제와 같이 다양한 조건에 의해 영향을 받는다(10). 본 실험에서는 ET-1과 LA-12가 생산하는 β -galactosidase에 대하여 온도와 pH에 따른 활성을 비교하였다. 반응온도는 두 균주에서 생산된 효소 모두 55°C에서 측정된 효소 활성이 37°C 효소 활성에 비해 20~40% 정도 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

선별 균주의 pH에 따른 β -galactosidase 활성 변화를 55°C에서

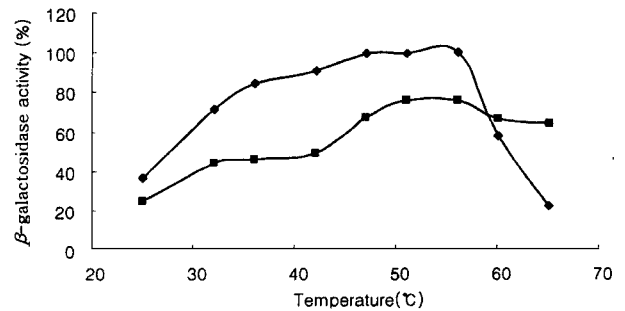


Fig. 2. Optimum temperature for β -galactosidase activity of lactic acid bacteria ET-1 and LA-12. The activity represented as a relative activity (%) against that at 50°C. Square (■) and diamond (◆) represent LA-12 and ET-1, respectively.

조사한 결과, ET-1의 경우, pH 5.5에서 효소 활성이 가장 높게 관찰되었으며, pH 7.0 이상에서 감소되는 경향을 나타내었다. LA-12의 경우는 ET-1과 다르게 pH 7.0에서 최적 효소 활성을 나타내었으며, 이후 급격히 감소되는 경향을 보였다(Fig. 3). Fig. 2와 Fig. 3의 결과로부터 ET-1과 LA-12가 생산하는 β -galactosidase의 경우, 반응온도 55°C에서 가장 높은 활성을 나타내었고, pH 5.5에서 ET-1은 최고 활성을 나타내었고, LA-12는 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 보였다.

지금까지는 ONPG를 유사기질로 사용하여 β -galactosidase 활성을 측정하였다. 실제 선별 균주의 β -galactosidase가 lactose를 galactose와 glucose로 분해하는지 확인하기 위하여 HPLC를 이용하여 반응액을 분석하였다. Lactose 0.5 g을 control로 사용하여 분석을 수행한 결과, retention time (RT) 3.72 min에서 lactose의 control peak가 관찰되었으며, ET-1과 LA-12의 경우는 RT 3.12 min과 3.37 min에서 각각 galactose와 glucose에 해당하는 peak가 분해산물로 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이 결과로부터 선별 균주가 생산하는 β -galactosidase는 lactose에 대한 분해능을 가진 것으로 확인할 수 있었으며, 산업적인 이용 가능성을 확인할 수 있었다.

Table 2. Effects of buffer, ONPG concentration, and cell disruption method on β -galactosidase activity of ET-1

Buffer	Fraction	Activity (Miller Units/ml)			
		1× ONPG ^c	4× ONPG	Sonication ^d	Toluene ^d
Phosphate buffer	Sup ^a	1,316	1,139	1,616	
	Pel ^b	1,092	474	1,092	
	Total	2,989	2,519	2,989	
Acetate buffer	Sup	327	117	130	
	Pel	420	189	438	
	Total	400	289	400	
Z buffer	Sup	1,457	1,237		1,457
	Pel	996	691		996
	Total	2,562	2,017		2,562

^aSup, supernatant; ^bPel, pellet.

^c1× ONPG means the concentration of 4.0 mg/ml.

^dCells were disrupted by sonication and toluene method, respectively.

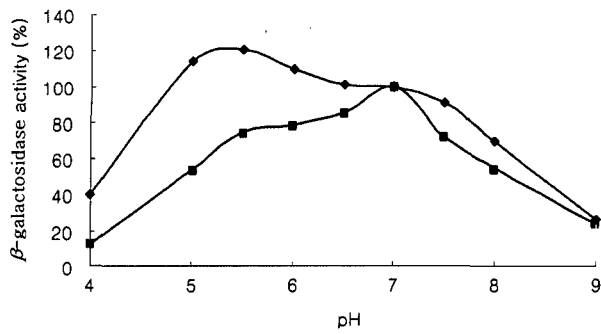


Fig. 3. Optimum pH for β-galactosidase activity of lactic acid bacteria ET-1 and LA-12. The activity represented as a relative activity (%) against that at pH 7.0. Square (■) and diamond (◆) represent LA-12 and ET-1, respectively.

장내환경요인에 따른 유산균의 내성

순수한 위액의 pH는 1.4~2.0 정도로 대부분의 미생물은 사멸되지만 음식물의 유입으로 인하여 위장내의 pH가 상승하여 미생물의 사멸을 소폭 감소시킬 수 있다. 그러나, 유산균이 체내에서 정상작용과 같은 다양한 생리적 기능을 발휘하기 위해서는 음식물이 위에 머무르는 체류시간(일반적으로 2~3시간) 동안 낮은 pH의 위액에 대하여 내성을 가져야 한다(1, 15, 17).

선별된 균주 (ET-1과 LA-12)를 pH 2.0, pH 2.5, pH 3.0으로 조정된 인공 위액을 사용하여 내성 실험을 수행하였고, 시판되는 유제품에서 분리한 유산균과 비교하였다. ET-1의 경우 위액처리 3시간 후 초기 생균수(10¹⁰ CFU/ml)에 비해 1 log cycle 정도의 감소를 나타내었고, LA-12의 경우에는 생균수의 변화가 거의 없어 시중에서 판매되는 유산균 A와 B의 위액에 대한 내성과 비교하여 그 차이가 없음을 확인하였다(Table 3).

구강을 통해서 섭취되는 유산균이 위와 십이지장을 거쳐 장에 도달하려면 회장에서 십이지장으로 분비되는 담즙에 대한 내성을 가져야 한다고 알려져 있다(2, 3). 본 실험에서는 인공 위액을 처리한 후 인공 담즙산액에 대한 생존력을 시판되는 유제품에서 분리한 유산균과 비교, 조사하였다. ET-1과 LA-12는 0.3%

Table 3. Effects of artificial gastric juice^a on the viability of lactic acid bacteria. (Viable cell, log No. CFU/mL)

Strains	pH	Incubation time (min)		
		0	60	180
ET-1	3.0	10.03	10	9.41
	2.5	10.03	9.61	9.43
	2.0	10.03	9.36	9.14
LA-12	3.0	9.44	9.37	9.36
	2.5	9.44	9.43	9.36
	2.0	9.44	9.38	9.29
A ^b	2.0	10.92	10.16	9.90
B ^b	2.0	10.69	9.99	9.75

^aArtificial gastric juice is prepared by adding pepsin to MRS medium at 1% (w/v) (adjusted pH by 1N HCl).

^bA and B are the lactic acid bacteria isolated from the commercial products

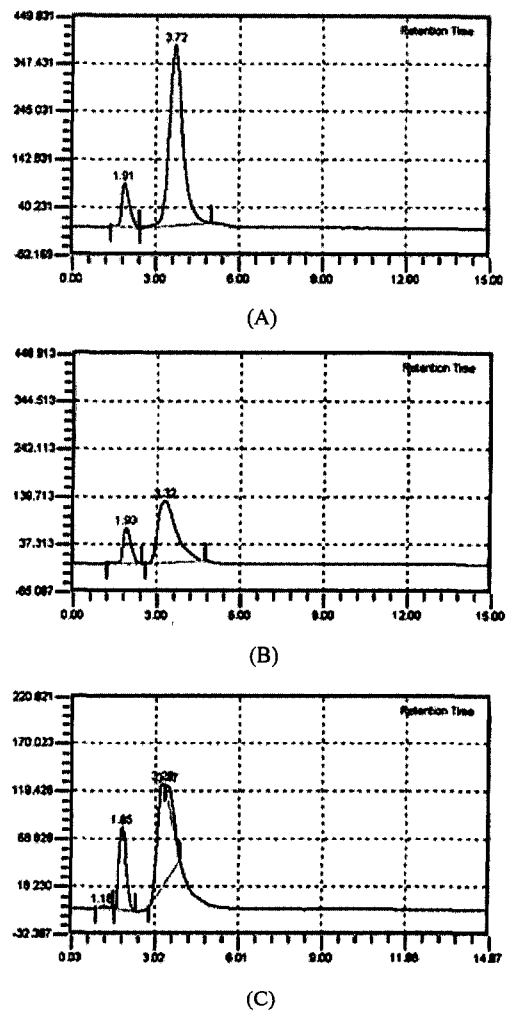


Fig. 4. HPLC analysis of β-galactosidase activity produced by the selected lactic acid bacteria. Panel (A), control (lactose 0.5 g); panel (B), ET-1; panel (C), LA-12.

Table 4. Effects of bile on the viability^a of lactic acid bacteria.

(Viable cell, log No. CFU/ml)

Strains		Incubation time (hr)		
		0	8	24
ET-1	Control ^b	9.84	9.73	10.34
	Bile ^c	9.84	9.87	8.7
LA-12	Control	9.76	9.71	10.21
	Bile	9.76	9.8	8.64
A ^d	Control	9.48	10.38	10.11
	Bile	9.48	10.11	8
B ^d	Control	9.23	10.46	9.84
	Bile	9.23	10.04	7.91

^aThe viability of lactic acid bacteria was examined during the incubation in MRS medium with and without oxgall for 24 hr at 37°C after treated with artificial gastric juice for 2 hr at 37°C.

^bControl means the MRS medium without oxgall.

^cBile is prepared by adding oxgall to MRS medium at 0.3% (w/v).

^dA and B are the lactic acid bacteria isolated from the commercial products.

oxgall과 8시간 반응 후, control (without oxgall)과 유사하게 초기 생균수인 10^9 CFU/ml 이상의 생균수를 유지하였다. 24시간 반응 후에도 10^8 CFU/ml 이상의 생균수를 유지하는 것으로 확인되었으며, 시판되는 유산균 B의 생균수보다 1 log cycle 정도 높게 유지하는 것으로 확인되었다(Table 4). 본 실험을 통하여 선별 균주 ET-1과 LA-12는 담즙산액에 대한 내성 또한 시판되는 유산균 A, B 균주와 비교하여 동등하거나 우수한 것으로 확인되어 제품화시 장내에서 probiotics로서 그 기능을 충분히 발휘할 것이라 생각된다.

이상의 결과들로부터 본 실험에서 분리한 균주 ET-1과 LA-12는 높은 생존력과 우수한 효소 활성(β -galactosidase)을 나타냄으로써 유당불내증 저감 기능을 발휘할 것으로 기대되며, 현재 시중에 유통되고 있는 유제품으로부터 분리된 균주와 비교하여 위액과 담즙산액에 대한 내성 또한 우수하여 기능성 유가공 식품 혹은 기타 유제품 제조 시 상품화 가치가 우수하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 산학연 공동기술개발 컨소시엄사업 및 KRIBB 기관 고유사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Ahn, Y.-Y., Y.-H. Kim, E.-J. Jung, H.-T. Lim, H.-J. Kang, and H.-U. Kim. 1999. Resistance of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* isolated from fermented milk products to low pH and bile acid. *Kor. J. Anim. Sci.* 41, 335-342.
- Berrada, N., J.F. Lemeland, G. Laroche, P. Thouvenot, and M. Piaia. 1991. *Bifidobacterium* from fermented milk: Survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74, 409-413.
- Chung, S.H., H.J. Suh, and H. Lee. 1997. Utilization of soybean curd whey as a medium for *Lactobacillus acidophilus* and acid and bile-tolerance of cultured strains. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 26, 872-877.
- Chung, C.-W. 1999. Potential correlation between lactose intolerance and cancer occurrence. *J. Kor. Ass. Cancer Prevention.* 4, 52-60.
- Conway, P., L. Gorbach, and B.R. Goldin. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70, 1-12.
- Cutting, S.M. and P.B. Vander Horn. 1990. Genetic analysis, p. 27-74. In C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley, Chichester.
- Dare, R., J.T. Magee, and G.E. Mathison. 1972. *In vitro* studies on the bactericidal properties of natural and synthetic gastric juices. *J. Med. Microbiol.* 5, 395.
- De man, J.C., M. Rogosa, and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135.
- Giannella, R.A., S.A. Broitman, and N. Zamchick. 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man : studies *in vivo* and *in vitro*. *Gut.* 13, 251-256.
- Hood, S.K. and E. A. Zottola. 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.
- Jasewicz, L. and A.E. Wasserman. 1961. Quantitative determination of lactase. *J. Dairy Sci.* 44, 393-400.
- Kilara, A. and K.M. Shahani. 1976. Lactase activity of cultured and acidified dairy products. *J. Dairy Sci.* 59, 2031-2035.
- Klaenhammer, T.R. and E.G. Kleeman. 1981. Growth characteristics, bile sensitivity and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1461-1467.
- Kobayashi, Y., K. Tohyama and T. Terashima. 1974. Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Jap. J. Microbiol.* 29, 691-697.
- Lee, S.-H. and M.-J. No. 1997. Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some Lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 617-622.
- Park, J.-W., J.-S. Yoo, and D.-H. Roh. 2006. Identification of novel psychrotolerant bacterial strain and production of β -galactosidase. *Kor. J. Microbiol.* 42, 40-46.
- Shah, N. and P. Jelen. 1990. Survival of lactic acid bacteria and their lactase under acidic conditions. *J. Food Sci.* 55, 506-509.

(Received July 3, 2006/Accepted August 19, 2006)

ABSTRACT: Characterization and Selection of Lactic Acid Bacteria Producing β -Galactosidase
 Young-Ki Lee, Susanna Choi², Young-Il Park², Chan-sun Park, Byung-Dae Yoon, Yun-Sik Hwang³, and Hee-Sik Kim* (Environmental Biotechnology Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea, ²Department of Biotechnology, Catholic University of Korea, Seoul 150-010, Korea, ³Anichem Company Ltd., KRIBB BVC, Daejeon 305-806, Korea)

This study was carried out to select the lactic acid bacteria producing β -galactosidase (lactase) and investigate the properties of the β -galactosidase. About 100 strains of lactic acid bacteria showing blue colony on the MRS agar medium containing X-gal were isolated from several kinds of Kimchi. Among them, 2 strains were selected as potential β -galactosidase producers. The selected strains, ET-1 and LA-12, were identified as *Lactobacillus fermentum* and *L. acidophilus*, respectively by the analysis of 16S rDNA sequences. They showed relatively high β -galactosidase activity and cellular viability. Their β -galactosidase showed the highest activity at 55°C. And the optimum pHs of the enzymes produced by ET-1 and LA-12 were pH 5.5 and pH 7.0, respec-

tively. They were also highly resistant to artificial gastric juice and bile. Two selected strains showed little change of viable cell number for 3 hr incubation in artificial gastric juice, and maintained the viable cell number at 10^8 CFU/ml for 24 hr in 0.3% oxgall after incubation for 2 hours in artificial gastric juice. Based on these results, ET-1 and LA-12 are expected to be applied in dairy industry.