

1660.6
293人

최 종
연구보고서

생명공학 기술에 의한 항 콜레스테롤 유산균 개발과 이를 이용한 혈중 콜레스테롤 저하 신기능성 발효유 생산 기술 개발

Development of Anticholesterolemic Lactic Acid Bacteria by Biotechnology and Production of New Functional Fermented Milk Lowering Blood Cholesterol Level.

항 콜레스테롤 유산균 선발 및 콜레스테롤 저하 기능 탐색
Selection of Anticholesterolemic Lactic Acid Bacteria and
Detection of Cholesterol Lowering Function

항 콜레스테롤 유산균 개발을 위한 형질 전환 및 vector
system 개발

Transformation and Development of Vector System for
Anticholesterolemic Lactic Acid Bacteria

항 콜레스테롤 발효유 제조 및 *in vivo* 실험을 통한 혈중
콜레스테롤 저하기능 연구

Production of Anticholesterolemic Fermented Milk and Studies
on its Effect on lowering Blood

연 구 기 관

전 남 대 학 교

농 립 부

최 종 보 고 서

1995년도 농림특정연구사업에 의하여 완료된 “생명공학 기술에 의한 항콜레스테롤 유산균 개발과 이를 이용한 혈중콜레스테롤 저하 신기능성 발효유 생산개발”에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1998 . 12 . 20

주관연구기관 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 이 용 규



주관연구기관장 : 전남대학교 총장



농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생명공학기술에 의한 항 콜레스테롤 유산균 개발과 이를 이용한 혈중 콜레스테롤을 저하 신기능성 발효유산균개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20

주관기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 이용규

연구원 : 이영환

연구원 : 오종석

연구원 : 김종현

연구원 : 신승이

협동연구기관명: 파스퇴르유업 (주)

협동연구책임자 : 정성숙

연구원 : 이홍열

연구원 : 이현구

요 약 문

I. 제목

생명공학 기술에 의한 항 콜레스테롤 유산균 개발과 이를 이용한 혈중콜레스테롤 저하 신기능성 발효유 생산개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

유산균은 현대과학이 발달하기 오래 전부터 유산균만이 갖고 있는 독특한 성질을 이용하여 많은 발효제품(발효유, 치즈, 소시지, 주류, 김치, 장류 등)의 제조에 사용되어 왔으며, 미생물학의 발전과 더불어 이들 제품에서의 역할이 밝혀지게 되었다. 발효유제품에 사용되어온 유산균은 예전에는 원유나 자연계에서 분리하여 사용하였으나 이들은 대사 능력이 불안정하여 제품의 특성에 따라 적합한 균주의 개량이 필요하게 되었으나, 유전 공학적 유산균의 개량은 극히 제한되어 있었다. 그러나 최근 유전공학 기술의 발달과 더불어 유전자 조작에 의한 균주의 개량이 가능하게 되었다. 우리 나라에서 생산되고 있는 발효유에 사용하는 유산균 starter는 대부분 수입 균주에 의존하고 있으며, 최근 수요가 크게 증가하고 있는 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 발효유 제조에 이용되는 유산균도 국내개발이 되지 않고 수입 균주를 사용하고 있는 실정이다.

따라서 본 연구사업은 자연계 및 기존 발효유제조 유산균으로부터 혈중 콜레스테롤 저하 기능이 우수한 유산균주의 선발, 동정, 형질전환 및 기능 향상에 관련된 유전자의 cloning 및 분석, *in vitro* 및 *in vivo*(동물 투여 실험)을 통한 콜레스테롤 저하능 검색 등의 과정을 통하여 혈중 콜레스테롤 저하능이 우수한 starter를 선발함과 동시에 이

를 이용한 발효유 생산 기술을 개발함으로써 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 신 기능성 발효유를 제조하는데 연구개발의 목적을 두고 있다.

III. 연구 개발 내용 및 범위

본 연구 과제는 3개의 세부과제로 구분되어 연구가 진행되었으며 각 세부과제별 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

제 1 세부과제 : 항 콜레스테롤 유산균 선발 및 콜레스테롤 저하 기능 탐색

연구 개발 내용	범 위
-항 콜레스테롤 유산균의 선발 및 동정	-자연계 및 기존 발효유 제조 유산균으로부터 항콜레스테롤 유산균의 선발, 동정
-유산균의 배양법 개발 및 배양조건 조사	-배양 온도, 배지선정, 생육조건 조사
-콜레스테롤 분석 조건 검토	-발색법, 기기분석법의 비교 검토
-유산균의 콜레스테롤 저하기능 탐색	- <i>in vitro</i> 콜레스테롤 저하기능 조사
-유산균의 이화학적 특성조사	-적정 pH, 적정온도, 내 산성, 내 담즙성, 우유 응고력 등 조사

제 2 세부과제 : 항 콜레스테롤 유산균 개발을 위한 형질 전환 및
vector system 개발

연구 개발 내용	범 위
-유산균의 원형질체 나출 방법 개발	-원형질체 나출, 나출용 배지조건 확립
-원형질체 배양법 개발	-원형질체 배양조건, 배지 선정 등 배양법 확립
-세포 융합체 유도	-배지조건 검토 및 융합체 유도, 융합체의 안정성 및 이화학적 특성 조사
-형질전환 조건 조사	-vector도입을 위한 형질 전환조건 확립
-vector 개발 및 형질 전환 유도	-vector 제조 및 형질 전환체 유도
-항 콜레스테롤에 관련된 유전자 cloning	-유전자 cloning 및 재조합 vector 제조
-외부유전자 도입에 의한 형질 전환체 유도	-형질 전환체 제조 및 분석
-항 콜레스테롤 관련 유전자 분석	-유전자 제한지도 작성

제 3 세부과제 : 항 콜레스테롤 발효유 제조 및 *in vivo* 실험을 통한
혈중 콜레스테롤 저하기능 연구

연구 개발 내용	범 위
-우수 starter 선발	-선발균주이용 발효유 제조, 특성 비교 검토 (적정온도, 산도, 관능 검사 등)
-항 콜레스테롤 발효유 제조 조건 확립	-발효유 성분표 작성, 성분분석, 실험실 및 pilot plant 제조조건 확립
- <i>in vivo</i> 동물 실험 조건 확립	-발효유 및 사료급여 사양 조건 확립
-발효유 투여 효과 탐색	-발효유 동물 투여 후 혈액 내 콜레스테롤 저하 효과 및 동맥 경화증 관계 조사
-대량 생산화 체계 최적 조건 확립	-발효유 성분표 검토, 생산 기기 조건 및 대량제조 공정 확립

IV. 연구 개발 결과 및 활용에 관한 건의

제 1 세부과제 : 항 콜레스테롤 유산균 선발 및 콜레스테롤 저하 기능 탐색

1. 항 콜레스테롤 유산균을 분리하기 위한 전 단계로 MRS, M17, CATC등의 배지를 이용하여 618주의 유산균을 국외발효유와 국내 김치 및 젓갈류로부터 분리하였으며, 이들로부터 우유 응고력이 우수한 108주의 유산균을 분리하였다. 인공 내액에서의 내 산성 시험을 거쳐 66주의 내 산성 균류를 분리한 후 이들에 대한 *in vitro* 콜레스테롤 저하능이 1-20% 균주는 50주, 20-30% 균주는 12주, 30%이상 균주는 4주이었으며, 이들은 본 실험 선발 균주로 하였다.

2. 본 실험의 4개 선발균주를 동정한 결과 *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* spp, *Enterococcus faecium*으로 동정되었으며, 이들을 *L. casei* 0781 (*L.C* 0781), *L. rhamnosus* 2084 (*L.r* 2084), *Lacto. lactis* spp 204 (*Lacto.l* 204), *E. faecium* 402 (*Ef* 402)로 명명하였다.

3. 선발 균주의 성장배지에서의 균주 배양은 37℃에서 행하였으며, 내 산성과 내 담즙성 조사를 행한 결과, pH 2.0에서는 *L.c* 0781이 강한 내 산성을 보였으며, pH3.0에서는 내 산성 비율이 각 균주간 유사하였다. 대조 균주 (*Lactobacillus acidophilus*)보다는 더 강한 내 산성을 보였다. 또한 내 담즙성은 oxgal이 각각 0.1, 0.3, 0.5% 첨가된 0.005M 인산나트륨 완충용액 (pH7.0)에서 37℃에서 1.5시간 간격으로 처리하였을 때 1.5 시간 이 후 선발 균주 중 *L.r* 2084가 가장 내 담즙성이 우수하였다.

4. 선발 균주에 대한 발효유 제조 조건 (적정 온도는 배양 시간, pH, 산도, 유산균수)은 *L.r* 2084와 *L.c* 0781은 40℃에서 각각 4 시간, 6시간, *Lacto. l* 204는 37℃에서 6 시간, 그리고 *Ef* 402는 37℃ 및 4

0℃에서 12 시간 배양이 최적 발효유 제조 온도 및 배양 시간이었다. 대조 균주인 *La* 145는 40℃에서 8시간이었다.

5. 선발 균주에 대한 콜레스테롤 저하 기능을 초음파 파쇄에 의한 세포 저항성, TLC, G.C에 의한 조사 결과, 선발 균주에 의한 콜레스테롤의 대사는 관찰할 수 없었으며, 단지 세포막내로 침착 또는 흡수되어 세포막 성분 변화의 원인으로 작용하는 것으로 사료된다.

6. 선발 균주의 콜레스테롤 저하능은 *Lr* 2084 균주가 약 55.6 %로 콜레스테롤 저하능이 가장 우수하였으며, 다음으로 *Lc* 0781이 약 48.9 %였다. 이 두 선발 균주는 *La* 145의 48.8 % 보다 높은 콜레스테롤 저하능을 보였으나, *Lacto.l* 204 및 *Ef* 402는 각각 46.9 %, 48.3 %로 대조 균주 보다 다소 낮은 콜레스테롤 저하능을 보였다.

제 2 세부과제 : 항 콜레스테롤 유산균 개발을 위한 형질 전환 및 vector system 개발

1. 유산균의 원형질체 형성 및 재생을 위하여 37℃에서 60분간 Lysozyme과 mutanolysin을 동시에 처리하였을 때 99.9% 이상의 나출율을 보였고, 또한, 배양 초기에 최종농도 0.1%의 glucose가 첨가된 배지에서 시험 균주를 배양하였을 때 0.5%에서 보다 높은 재생율을 보였다. *Lc* 0781, *Lr* 2084 그리고 *Streptococcus thermophilus* 2590 (*S.t* 2590) 균주는 LCM-R 재생 배지에서, 그리고, *Streptococcus thermophilus* 13101 (*S.t* 13101) 균주는 TCM-R 재생배지에서 가장 높은 재생 빈도를 보였다.

2. 각 균주의 항생제 내성을 선발 marker로 이용하여 lysozyme과 mutanolysin을 동시에 처리하여 원형질체를 형성한 후 PEG를 매개로 세포 융합을 시도하여 22 개체의 융합 균주를 선발한 후 융합체의 안정성을 조사하였으나, 4-10회의 제대배양 동안 대부분이

segregation 되어 안정성에 문제가 있는 것으로 나타났다.

3. Bio-Rad의 Gene Pulser System을 이용하여, *L.c* 0781과 *L.r* 2084 균주에 pKH80 plasmid DNA를 electrotransformation한 결과, 두 균주 모두 4.5kV/cm의 field strength에서 가장 높은 형질 전환의 효율을 보였다. *L.c* 0781 균주보다 *L.r* 2084균주의 pulse 후의 균주 생존율이 높았으며, field strength가 증가할수록 균주 생존율 및 형질 전환율은 감소하였다.

4. Field strength를 4.5kV/cm로 조정 한 후 parallel resistor를 조정 하며 electroporation을 시도하였을 때, parallel resistor에 따른 time constant가 증가할수록 균주 생존율 및 형질 전환 효율은 감소하였다. 따라서 field strength가 4.5kV/cm이며, time constant가 4.7 일 때 가장 높은 형질 전환 효율을 나타내었다.

5. Field strength를 4.5kV/cm, discharge capacitor를 25uF, 그리고 parallel resistor를 200 Ω 으로 조정 한 후 cold-deionized water를 electroporation buffer로 사용하여 형질 전환을 시도하였을 때, 다른 buffer 보다 *L.c* 0781, *L.r* 2084 두 균주 모두에서 가장 높은 형질 전환 효율을 보였고 이때의 time constant는 4.5 ms 이었다.

6. 그램 positive 균인 유산균에 가장 적절한 vector 개발을 위하여 형질 전환체의 선발에 필요한 marker와 유산균 내에서의 발현을 고려하여 여러 종류의 vector를 electroporation에 의한 방법으로 형질전환을 시도하던 중 연구가 종료되었고. 항 콜레스테롤 관련 유전자의 cloning은 콜레스테롤 대사 및 assimilation, degradation 관련 유전자를 탐색하던 중 2 년차 연구로 종료됨에 따라 소기의 목적을 달성하지 못하였다.

제 3 세부과제 : 향 콜레스테롤 발효유 제조 및 *in vivo* 실험을 통한
혈중 콜레스테롤 저하기능 연구

1. 선발 균주 중에서 가장 좋은 starter를 선발하기 위하여 선발 균주의 활력 시험, pH 및 적정 산도, 커드 형성 및 유청 분리 조사를 한 결과 선발 균주 중에서 *L.r* 2084가 starter로서 가장 우수한 기능을 나타내었다.

2. 발효유 원료 배합률 작성은 신선유를 81%로 하고 각종 당과 청포도 농축액을 첨가하여 향 성분을 강화하였으며, 기능성 물질로는 혈당 저하 및 콜레스테롤 기능이 있다고 알려진 silk powder를 첨가하였고 당도는 Brix 16%가 되도록 하였다.

3. 발효유의 대량 생산 조건 확립을 위한 예비 실험으로 실험실 내에서 여러 차례의 발효유 제조시험을 통하여 실험실내 발효유 제조공정을 확립하였고, 선발 균주를 starter로 사용하여 발효유로 제조하면서 대량 생산하여 상품화하기 위한 생산 기기 조건 및 대량 제조 공정의 plant를 확립하였다.

4. 발효유의 관능검사는 panel 20명을 선정하여 2점 기호 선택시험 (paired comparison & preference test)을 사용하였으며, 질문지를 만들어 선택비율에 대한 t-검정으로 유의성을 조사하였다. 대조구는 현재 향 콜레스테롤 발효유 제품의 starter로 사용하고 있는 *L.a* 145로 제조한 발효유를 사용하였고 t-value를 가지고 평가할 때 *L.r* 2084 starter로 제조한 발효만이 5%수준의 유의성을 나타내었을 뿐 기타 시료간에는 유의성이 없었다. 대부분의 panel들에 대한 기호선택 이유는 풍미가 신선하고 후미가 좋은 것이었으며 균주별로는 *L.r* 2084로 제조한 발효유의 관능평가가 가장 좋은 것으로 나타났다.

5. 발효유를 급여하지 않은 구를 대조구로 하고 급여한 구를 실험구로 배치하여 2 주 간격으로 혈액을 채취한 후 Total cholesterol,

LDL-C, HDL-C의 함량을 측정한 결과, 6 주 후부터 대조구와 실험구 사이에 5%의 유의성이 있었으며 10주차에는 1%수준의 유의성이 있었다. 그러나 HDL-C의 경우는 유의성이 없었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 선발 균주로 제조한 발효유를 실험동물 (토끼)에 투여할 경우 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 효과가 있음을 확인하였다.

6. 본 실험에 사용한 토끼를 대상으로 대동맥과 관상동맥의 실질 장기를 채취, 포르말린으로 고정한 후 표본을 제조하여 대동맥 및 관상동맥에 대한 병리 조직학적 검사를 수행하였던 바 발효유를 급여하지 않은 군에서는 대동맥, 관상동맥에서 동맥경화증의 소견이 뚜렷이 관찰되었으며, 이와는 대조적으로 발효유를 급여한 군에서는 이러한 병변이 경미하게 관찰되었거나 전혀 관찰되지 않았으며 특히 *Lr 2084*로 제조한 발효유를 급여한 군이 가장 병변이 관찰되지 않았다. 따라서 본 실험에 사용한 선발 유산균들이 동맥경화증의 예방 및 치료에 상당히 효과가 있음을 병리 조직학적으로 확인하였다.

활용에 관한 건의 : 본 연구를 통하여 선발된 항 콜레스테롤 유산 균주는 Single starter나 mixed starter로 이용하여 발효유를 제작하여 상품화하기로 협력기관인 파스퇴르유업(주)와 협의가 되었으며, 본 연구의 결과는 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 기능성 발효유 제조 및 활용을 위하여 “항 콜레스테롤 유산균을 이용한 기능성 발효유 제조 방법”으로 국내 특허 출원 신청을 하였다.

SUMMARY

I. Tittle

Development of Anticholesterolemic Lactic Acid Bacteria by Biotechnology and Production of New Functional Fermented Milk Lowering Blood Cholesterol Level.

II. Importance and objects of the study

The lactic acid bacteria have been used to produce the fermented products such as fermented milk, cheese, sausage, beverages, *kimchi*, pickled fish etc. and as the development of microbiology, the role of those bacteria was known in their products.

The lactic acid bacteria used for the fermented milk products separated from raw milk and natural resources before, but they were unstable in metabolic ability according to the properties of products. Despite the need for the improvement of strain, achievement were extremely limited. However, with development of genetic engineering it becomes possible to improve lactic acid bacteria. Most of lactic acid starters to produce fermented milk in Korea depended on importation. Also, the lactic acid bacteria using for production of fermented milk lowering the blood cholesterol have not been developed in Korea, and those strains are imported.

The purposes of this study were as follows; selection and identification of good lactic acid bacteria for lowering blood cholesterol, transformation of gene cloning and analysis related to improving their functions, and selection of good starters for lowering the blood cholesterol level through *in vitro* and *in vivo* test (animal supply experiment) as well as developing the production technique of fermented milk (yoghurt) and functional fermented milk lowering the blood cholesterol level.

III. Contents and Range of Research

This study was divided into three subjects and study development contents and ranges are as follows.

1. First subject : Selection of Anticholesterolemic Lactic Acid Bacteria and Detection of Cholesterol Lowering Function

Study development contents	Range
-Selection and identification of anticholesterolemic lactic acid bacteria	-Selection and identification from commercial fermented milk products and natural resources
-Development of incubation methods and investigation of incubation conditions	-Incubation temp, media selection, investigation of growth conditions
-Investigation of analysis conditions for cholesterol	-Comparative investigation of colorimetric method and G.C method
-Investigation of cholesterol lowering function	-Investigation of cholesterol lowering function at <i>in vitro</i> conditions optimum pH,
-Investigation of physico-chemical properties of lactic acid bacteria	-Optimum temp, tolerance-against acid, tolerance against bile acid, milk clotting ability and inhibition against pathogenic organisms

2. Second subject : Transformation and Development of Vector System for Anticholesterolemic Lactic Acid Bacteria.

Study development contents	Range
-Development of incubation method of protoplast	-Forming the protoplast, condition of media for forming protoplast, incubation of protoplast, select media
-Induction of cell fusant	-Condition of section media, induce fusant, stability of fusant, investigate physio-chemical characteristics
-Investigation of trans-formation condition	-Invesigate condition of transformation for introduction of vector
-Vector development and incubation of transformation cloning of anticholesterolemic	-Handling of gene cloning and manufacture of recombination vector, production and analysis of transformants, prepare restriction map

3. Third subject : Production of Anticholesterolemic Fermented Milk and Studies on its Effect on lowering Blood Cholesterol Level through *in vivo* experiment.

Study development contents	Range
-Selection of best starter	-Comparison of properties (optimum temp, acidity, sensory evaluation etc. of the selected lactic acid bacteria)
-Establishment of production condition of anticholesterolemic fermented milk	-Establishment of composition table of fermented milk, composition analysis, establishment of production conditions in experimental room and pilot plant
-Establishment of <i>in vivo</i> animal experimental conditions	-Establishment of feeding condition (fermented milk and feed) for animal experiment
-Detection of feeding effect of fermented milk	-Detection of feeding to fermented milk on experimental animal
-Establishment of best conditions of mass production system	-Investigation of composition table of fermented milk, establishment and production to equipment and mass production system

IV. Results.

The result of the research project are summarized.

First subject : Selection of Anticholesterolemic Lactic Acid Bacteria and Detection of Cholesterol Lowering Function

1. As the prestep to separate anticholesterolemic lactic acid bacteria using MRS, M17 and CATC media, 618 strains of lactic acid bacteria were separated from foreign fermented milk, *Kimchi* and pickled fish products. After that, 108 strains of lactic acid bacteria which had milk clotting ability were separated. Among them, the ability of lowering cholesterol by 1~20% were 50 strains, by 20~30% were 12 strains, by over 30% were 4 strains.

In this study, 4 strains that are able to lower over 30 % were used as experimental strains.

2. Four strains of lactic acid bacteria which had cholesterol lowering effect over 30% were identified with *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* spp., and *Enterococcus faecium*. they were noted as *Lactobacillus rhamnosus* 2084(*L.r* 2084), *Lactobacillus casei* 0781(*L.C* 0781), *Lactococcus lactis* spp. 204(*L.l* 204) and *E. faecium* 402(*E.f* 402), respectively.

3. The selected bacteria were incubated in each growth media at 37°C. *L.c* 0781 was the most tolerant against acid in its media adjusted to pH 2.0, but not significantly different in the tolerance against acid at pH 3.0.

The tolerance of the selected bacteria against acid were higher than that of control(*Lactobacillus acidophilus* 145). When the

selected bacteria were treated with 0.005M sodium phosphate containing 0.1%, 0.3%, and 0.5% oxgal at 37°C for 1.5 hours intervals, *L.r* 2084 was the most tolerance against bile acid.

4. *L.c* 0781, *L.r* 2084, *Lacto.l* 204, and *Ef* 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 related to incubation time, pH, titratable acidity value, and lactic acid bacterial counts. The strain of *La* 145 as a control was incubated for 8 hours at 40°C.

5. It was considered that the function of lowering of cholesterol level by the selected lactic acid bacteria was not caused by metabolism, only due to the adsorption on cell membranes of the bacteria as a results of analysis by ultra sonication, TLC, and G. C.

6. Among the four selected strains, *L.r* 2084 strain had the best ability of lowering cholesterol level, the value were about 55.6 %. The next strain was *L.c* 0781, about 48.9 %. Ability of lowering cholesterol level of those two strains were higher than that of *La* 145. That of *Lacto.l* 204, and *Ef* 402 were lower than *La* 145 and the value of those strain were 46.9 %, 48.3 %, respectively.

Second subject : Transformation and Development of Vector System for Anticholesterolemic Lactic Acid Bacteria.

1. When the selected lactic acid bacteria were treated with lysozyme and mutanolysin for the protoplast formation and regeneration for 60 min at 37°C, the protoplast forming yield were 99.9%. Furthermore, the regeneration yield of protoplast of the

selected lactic acid bacteria grown in growth media containing 0.1% glucose were higher than that of 0.5% glucose. The regeneration frequency of *L.c* 0781, *L.r* 2084, and *Streptococcus thermophilus* 2590 (*S.t* 2590) was the highest on LCM-R regeneration medium and *Streptococcus thermophilus* 13101 (*S.t* 13101) was the highest in TCM-R regeneration medium.

2. Twenty two fusants were selected after induction of protoplast fusion by using selection marker against antibiotics. Stability of fusants rapidly decreased during successive cultivation from 4 to 10 times.

3. The optimum condition of transformation for *L.c* 0781 and *L.r* 2084 treated with pKH80 plasmid DNA using Gene Pulser System (Bio-Rad) was 4.5kV/cm of field strength and 4.7ms of time constant. The viability yield of *L.r* 2084 was higher than that of *L.c* 0781 after pulse, which was lower viability and transformation yield at higher field strength.

4. The optimum electrotransformation buffer of both *L.c* 0781 and *L.r* 2084 was cold-deionized buffer and that of time constant was 4.5ms when field strength, discharge capacitor, and parallel resistor were adjusted to 4.5kV/cm, 25 μ F, and 200 Ω , respectively.

5. Development of vector system for transformation by electroporation method was not achieved because this study did not last continuously by the third year. So, gene cloning for developing cholesterol-lowering bacteria was unsuccessful because this work was not continued after the second year.

Third subject : Production of Anticholesterolemic Fermented Milk and Studies on its Effect on lowering Blood

Cholesterol Level through *in vivo* Experiment.

1. Results showed that a starter cultures from *L.r* 2084 was the most effective for making fermented milk through in evaluation of activity, pH and acid values, curd formation and whey separation.

2. For preparation of fermented milk, the mixture of raw materials was 81% of fresh milk fortified with various sugar and concentrations of grapes with flavor materials. Additionally, silk powder was fortified which has known as a cholesterol-lowering substance and Brix was adjust to 16%.

3. A preliminary work was periodically performed to commercial production of fermented milk and a scheme of flow chart was established by developing a new commercial processing procedures under optimum conditions for making fermented milk.

4. Sensory evaluations of fermented milk were performed with 20 members of trained panel, Students't test being used for sensory evaluation analysis. Starter cultures from *La* 145 was used as control in fermented milk. Sensory scores noted that fermented milk added with starter cultures from *L.r* 2084 showed a significant difference ($p < 0.05$) between other strains. Results showed that fermented milk treated with starter cultures from *L.r* 2084 was "more preferable" category for flavor and odor.

5. Total cholesterol, LDL-C, and HDL-C in rabbits fed with fermented milk showed significant differences at $p < 0.05$ compared to the controls after 6 weeks, and significant differences at $p < 0.01$ between treatments and control after 10 weeks. Results showed

that fermented milk could be an effective dietary foodstuff for lowering the levels of cholesterol in rabbit.

6. Decrease in the amount of atherosclerosis was found in fermented milk fed rabbits, which was conformed by analysis. Specimens of arteria fixed with 40% formaldehyde. When rabbits fed with fermented milk including starter cultures from *L.r* 2084 was the most effective for decrease of atherosclerosis.

Based on these results, the selected lactic acid bacteria in this study could be used for prevention and decrease of atherosclerosis.

V. Suggestion for their application

Anticholesterolemic lactic acid bacteria selected by our study will use to produce commercial fermented milk (yogurt) at Pasteur Milk Company (LTD.) as a single starter or mixed starter. Also, I presented patent to prevent our technique. The name of patent is "Production method of functional yogurt which lowers in blood cholesterol by using developed anticholesterolemic lactic acid bacteria".

CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	24
1. Purpose of the Research -----	24
2. Range of the Research -----	28
3. Reference -----	31
Chapter 2. Transformation and Development of Vector System for Anticholesterolemic Lactic Acid Bacteria. -	34
1. Introduction -----	34
2. Material and Method -----	39
3. Result and Discussion -----	50
4. Reference -----	103
Chapter 3. Transformation and Development of Vector System for Anticholesterolemic Lactic Acid Bacteria. --	108
1. Introduction -----	108
2. Material and Method -----	111
3. Result and Discussion -----	120
4. Reference -----	140

Chapter 4. Production of Anticholesterolemic Fermented Milk and studies on its effect on lowering Blood Cholesterol Level through <i>in vivo</i> experiment. -----	145
1. Introduction -----	145
2. Material and Method -----	150
3. Result and Discussion -----	155
4. Reference -----	181

목 차

제 1 장 서 론 -----	24
제 1 절 연구 개발의 목적 -----	24
제 2 절 연구 개발의 범위 -----	28
제 3 절 참고 문헌 -----	31
제 2 장 항 콜레스테롤 유산균 선발 및 콜레스테롤 저하 기능 탐색 -----	34
제 1 절 서 설 -----	34
제 2 절 재료 및 방법 -----	39
제 3 절 결과 및 고찰 -----	50
제 4 절 참고 문헌 -----	103
제 3 장 항 콜레스테롤 유산균 개발을 위한 형질전환 및 vector system 개발 -----	108
제 1 절 서 설 -----	108
제 2 절 재료 및 방법 -----	111
제 3 절 결과 및 고찰 -----	120
제 4 절 참고 문헌 -----	140

제 4 장 항 콜레스테롤 발효유 제조 및 <i>in vivo</i> 실험을	
통한 혈중 콜레스테롤 저하 기능 연구 -----	145
제 1 절 서 설 -----	145
제 2 절 재료 및 방법 -----	150
제 3 절 결과 및 고찰 -----	155
제 4 절 참고 문헌 -----	181

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

최근 국민소득이 증가함에 따라 동물성 식품의 소비도 증가하고 있으며 동물성 식품에 많이 함유되어 있는 콜레스테롤은 세포막의 구성성분이며 steroid, vitamin-D의 전구물질로서 필수 영양분이지만 다량 섭취 할 경우에 혈중 콜레스테롤의 수준이 높아지고, 이에 따라 동맥 경화증과 심장병을 포함한 순환기 계통의 질병이 높아진다고 알려져 있다. 현대 산업 사회를 사는 모든 사람들의 큰 관심사는 건강이며, 건강은 우리가 섭취하는 식품과 깊은 관계가 있으며, 식품 가운데 우유는 가장 완전해 가까운 식품으로 평가받고 있지만, 그 중에서도 발효유는 여러 가지 건강 증진 기능이 높은 건강식품으로 인정되고 있다. 과거 20여 년간에 걸친 연구결과 발효유와 유산균이 항암 효과와 더불어 혈중의 콜레스테롤(콜레스테롤) 함량도 저하시킨다는 사실이 확인되고 있어서 현대인의 가장 중요한 성인병인 동맥 경화증과의 싸움에서 또 하나의 중요한 예방수단으로 인정받을 가능성이 높아지고 있다. 전세계적으로 관상동맥의 경화에 의한 순환기계 질병은 의학과 영양학계의 매우 중요한 연구과제가 되었고 건강한 생활을 추구하는 40세 이후의 인구집단에게 가장 위협적인 성인병으로 알려지게 되었으며 우리나라에서도 이미 중요한 성인병으로 인식되게 되었다. 특히 미국인 사망률의 약 50%가 콜레스테롤이 관상동맥에 축적되어 혈류를 방해하고 심장마비를 일으키는 동맥 경화증(atherosclerosis)에 의하여 발생하고 있다는 보고도 있다. 동맥내의 경화조직을 만드는 콜레스테롤은 혈액내의 LDL(low density lipoprotein)입자에 의하여 발생하여 혈액내의 LDL입자의 함량이 높으면 더 많은 동맥경화증을 일

으키게 된다.

발효유는 우유를 주원료로 하며 유산균(lactic acid bacteria)을 접종하여 발효시킨 발효유제품으로, 발효유의 건강증진효과는 발효유를 평상의 많이 먹는 지방의 사람들 중에 장수자가 많다는 사실이 알려지고, 특히 1905년 러시아 생물학자 메치니코프가 불가리아지방과 코카서스 지방에 장수자가 많은 것은 발효유를 많이 섭취함으로써 장내 이상 발효와 위장 질환을 방지하기 때문이라고 하는 불로 장수설을 제창한 후부터 그 소비가 급격히 증가하였다. 유산균(lactic acid bacteria)은 Gram 양성이고 탄수화물을 발효에 의한 energy원으로 사용하여 최종 산물로 유산(lactic acid)과 초산(acetic acid)등 유기산을 생산하는 미생물을 말한다. 유산균은 혐기 조건하에서 성장하며, 산소의 존재하에서도 잘 성장하는 특징을 갖고 있다. 유산균은 *Streptococcus*속(屬), *Lactococcus*속, *Leuconostoc*속, *Pediococcus*속, *Enterococcus*속, *Lactobacillus*속에 속해 있으며, *Bifidobacterium*속의 미생물도 산업적으로 유산균 부류에 포함시키는 경향이 있다. 유산균은 종(種)에 따라 상당한 차이가 있지만 우유 및 유제품, 인간과 동물의 구강 및 소화관, 채소류, 치즈, 발효 소세지, 발효 위스키, 김치, 장류, 발효 빵과 같은 식품제조 이외에 사일레지, 의약품, 기타 여러 생물학적 활성물질의 생산에 널리 이용되어 오고 있다. 유산균을 이용한 발효식품은 특유의 풍미와 생성된 유산에 의한 우수한 보존성, 단백질의 부분 분해에 의한 소화 흡수성 향상 등 기호성, 영양학적인 우수성을 나타내며 전세계를 통하여 엄청난 시장규모를 형성하고 있고, 우리나라에서는 1971년 한국야구르트유업(주)에서 처음으로 발효유를 소비자에게 소개한 후 현재는 거의 모든 유업체가 발효유를 생산하고 있고 국민 1인당 소비량도 해마다 증가하고 있다.

국내에서의 유산균과 콜레스테롤과의 관계에 대한 연구는 아직까지 하지 미비한 편이지만, 외국에서는 오래 전부터 혈중 콜레스테롤을 저

하시키는 식품에 관한 연구 대상으로 발효유가 관심의 대상이 되어왔다. 즉, Mann과 Spoery (1974)는 발효 전지유를 항상 음용하고 있는 동아프리카의 마사이족이 고 콜레스테롤 음식을 섭취함에도 불구하고 혈중 콜레스테롤이 저하함을 입증시켰다. Rao 등 (1981)도 *Streptococcus thermophilus*로 발효시킨 발효유가 혈중 콜레스테롤의 저하시키는 것은 발효유에 methanol에 의해 추출되는 화합물이 생성되었기 때문이라고 하였으며, Jasper 등 (1984)은 요구르트 섭취에 의한 혈중 콜레스테롤의 저하효과를 내는 인자로서 uric acid, oreic acid, hydroxymethyl glutaric acid등의 함량은 군주간에 차이가 없어서 이들이 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 인자일 가능성은 적다고 하였다. Thakur 등 (1981)은 고 콜레스테롤 사료와 함께 발효유를 급여한 토끼가 고 콜레스테롤만을 급여한 토끼보다 혈중 콜레스테롤 수준이 낮았다고 하였으며, Grunervald (1982)는 *Lactobacillus acidophilus*로 발효시킨 탈지유를 급여한 rat와 급여하지 않은 rat의 혈중 콜레스테롤을 비교한 결과 발효유를 급여한 rat에서 혈중 콜레스테롤이 낮게 나타났다고 보고하였다. Gilliland 등 (1985)은 담즙에 대한 저항성과 콜레스테롤 소화력이 높은 *Lactobacillus acidophilus*를 콜레스테롤 함량이 높은 사료를 먹인 돼지에게 급여했을 때에 혈중 콜레스테롤 저하 효과가 컸다고 보고하였다. 한편 Danielson 등 (1989)은 콜레스테롤이 많은 사료를 먹인 돼지에서 선발된 *Lactobacillus acidophilus* LA16으로 만든 발효유를 하루에 0.454kg 씩을 먹인 결과 혈중 콜레스테롤과 LDL (low density lipoprotein)함량을 저하시켰으나 혈중 triglyceride 및 HDL (high density lipoprotein)함량에는 영향이 없었다고 보고하였다. 반면에 몇몇 연구자들은 발효유 또는 유산균의 섭취가 혈중 콜레스테롤이나 lipoprotein 수준에 영향을 준다는 증거를 발견하지 못했다고 하였는데, 이것은 이들이 연구에 사용한 발효유의 형태와 사용량이 다양하고, 유산균의 종류, 실험 대상의 성, 나이 및 혈

중 콜레스테롤 등이 다양하여 연구 결과들의 직접 비교 평가는 어려운 형편이다. 이상과 같이 발효유가 혈중 콜레스테롤 함량을 감소시킨다는 연구결과는 계속 발표되고 있으나 발효유가 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 기작에 대한 연구는 아직 결론에 이르지 못하고 있으며 계속된 연구가 진행 중에 있다. 발효유제품에 사용 되어온 유산균은 예전에는 원유나 자연계에서 분리하여 사용하였으며, 대사 능력이 불안정하여 제품의 특성에 따라 적합한 균주의 개량이 필요하게 되었으나, 유전 공학적 유산균의 개량은 극히 제한되어 있었다. 그러나 최근 유전공학 기술의 발달과 더불어 유전자 조작에 의한 균주의 개량이 가능하게 되었다. 우리 나라에서 생산되고 있는 발효유에 사용하는 유산균 starter는 대부분 수입 균주에 의존하고 있으며, 최근 수요가 크게 증가하고 있는 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 발효유 제조에 이용되는 유산균도 국내개발이 되지 않고 수입 균주를 사용하고 있는 실정이다.

따라서 본 연구사업은 자연계 및 기존 발효유제조 유산균으로부터 혈중 콜레스테롤 저하 기능이 우수한 유산균주의 선발, 동정, 형질전환 및 기능 향상에 관련된 유전자의 cloning 및 분석, *in vitro* 및 *in vivo* (동물 투여 실험)을 통한 콜레스테롤 저하능 검색 등의 과정을 통하여 혈중 콜레스테롤 저하능이 우수한 starter를 선발함과 동시에 이를 이용한 발효유 생산 기술을 개발함으로써 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 신 기능성 발효유를 제조하는데 연구개발의 목적을 두고 있다.

제 2 절 연구개발의 범위

1. 연구개발의 최종목표

본 연구개발의 최종적 수행목표는 다음과 같다.

- 1) 콜레스테롤 저하기능이 우수한 유산균의 선발
- 2) 유산균의 콜레스테롤 저하기능탐색
- 3) 항 콜레스테롤 유산균 개발을 위한 host-vector 및 형질전환 system 개발
- 4) 유산균의 원형질체 융합 및 안정성 유도
- 5) 유산균의 혈중 콜레스테롤 저하 및 유산균 기능 향상에 관련된 유전자 cloning 및 분석
- 6) 혈중 콜레스테롤 저하능 탐색
- 7) 혈중 콜레스테롤 저하능 우수 starter선발
- 8) 혈중 콜레스테롤 저하 발효유 제조 및 생산 기술개발

2. 연구 개발의 범위

본 연구 과제는 상기의 연구개발 목표를 달성하기 위하여 3개의 세부과제로 나누어 연구를 수행하였으며 각 세부과제별 연구내용과 범위는 다음과 같다.

- 1) 제 1 세부과제 “항 콜레스테롤 유산균 선발 및 콜레스테롤 저하 기능 탐색”의 연구개발 내용과 범위
 - (가) 자연계의 기존 발효유 제조 유산균으로부터 항 콜레스테롤 유산균의 선발과 동정
 - (나) 선발유산균의 배양온도, 배지 선정, 생육 조건 등 배양법 개발과 배양조건 조사

- (다) 콜레스테롤 분석을 위한 분석법의 비교 검토
- (라) 선발유산균의 *in vitro* 내 콜레스테롤 저하 기능 조사 및
항 콜레스테롤 유산균의 선발
- (마) 항 콜레스테롤 유산균의 적정 pH, 적정 온도, 내 산성,
내 담즙성, 우유 응고성 등 이화학적 특성조사

2) 제 2세부과제 “ 항 콜레스테롤 유산균 개발을 위한 형질전환 및
vector system개발 ”의 연구개발 내용과 범위

- (가) 유산균의 원형질체 나출, 나출용 배지 조건 확립 등 원형질체
나출 방법 개발
- (나) 원형질체 배양 조건, 배지 선정 등 원형질체 배양법 개발
- (다) 세포 융합체 유도를 위한 배지조건, 안정성 및 융합체의
이화학적 특정조사
- (라) vector 제조 및 형질 전환체 유도
- (마) 항 콜레스테롤에 관련된 유전자 cloning 및 재조합 vector제조
- (바) 외부 유전자 도입에 의한 형질 전환체 유도를 위한 형질전환체
제조 및 분석
- (사) 항 콜레스테롤 관련 유전자 분석을 위한 유전자 제한 지도 작성

3) 제 3세부과제 “ 항 콜레스테롤 발효유제조 및 *in vivo* 실험을
통한 혈중 콜레스테롤 저하 기능 연구”의 연구개발 내용과 범위

- (가) 항 콜레스테롤 선발 균주를 이용하여 발효유 (요구르트)를 반복
제조 후 특성 비교한 다음 가장 우수한 starter 선발
- (나) 발효유를 상품화하기 위한 성분표 작성 및 성분분석
- (다) 항 콜레스테롤 발효유 제조 조건 확립을 위한 실험실 및 pilot
plant 제조 조건 검토
- (라) *in vivo* 동물 실험을 위한 실험 동물의 사양 조건 확립

- (마) 선발 균주를 starter로 사용하여 실험 동물에 투여 후
혈중 콜레스테롤 저하 효과 탐색
- (사) 항 콜레스테롤 발효유 대량 생산화 최적 조건을 위한 발효유
성분표 검토, 생산 기기 조건 및 대량 제조 공정 확립

제 3 절 참고 문헌

1. Biss, K., Ho, K. J., Mikkelsen, B., Lewis, L., and Talyor, C. B. 1971. Some unique biological characteristics of the Masai of East Africa. *N. Engl. J. Med.* 284: 694-699.
2. Danielson, A. D., Peo, E. R., Shahani, K. M., Lewis, A. J., Whalen, P. J. and Amer, M. A. 1989. Anticholesterolemic property of *Lactobacilli acidophilus* yogurt fed to mature bears. *J. Anim. Sci.* 67: 966-974.
3. Gilliland S. E., Nelson C. R., Maxwell C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 377-381.
4. Grunewald, K. K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* 47: 2078-2079.
5. Harrison, V. C. and Peat, G. 1975. Serum cholesterol and bowel flora in the newborn. *Am. J. Clin. Nutr.* 28: 1351-1355.
6. Hepner, G., Fried R., St. Jeor, S., Fusetti, L. and Morin, R. 1979. Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 19-24.
7. Holund U. 1993. Cholesterol-lowering effect of a new fermented milk product. *Danish Med. J.* 155: 3015-3016.
8. Hussi, E., Miettinen, T. A., Ollus, A. 1981. Lack of serum cholesterol-lowering effect of skimmed milk and butter milk under controlled conditions. *Atherosclerosis.* 39: 267-272.

9. Jasper D. A., Massey L. K. and Luedeke L. 1984. Effect of consuming yogurts prepared with 3 culture strains on human serum lipoproteins. *J. Food Sci.* 49: 1178-1181.
10. John, B. Luchansky, M. Christine, Tennant, and Todd, R. Klanenhammer. 1991. Molecular cloning and deoxyribonucleic acid polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*. *J. Dairy Sci.* 74: 3293-3302.
11. Kiyosawa H., Sugawara C., Sagawara N. and Miyake H. 1984. Effect of skim milk and yogurt on serum lipids and development of sudanophilic lesions in cholesterol-fed rabbits. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 479-484.
12. McNamara D. J., Lowell A. E., Sabb J. E. 1989. Effect of yogurt intake on plasma lipid and lipoprotein levels in normolipidemic males. *Atherosclerosis.* 79: 167-171.
13. Mann, G. V. and Sperry, A. 1974. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am. J. Clin. Nutr.* 27: 464-469.
14. Mann, G. V. 1977. A factor in yogurt which lowers cholesterolemia in man. *Atherosclerosis.* 26: 335-340.
15. Mott, G. E., Moore, R. W., Redmone, H. E. and Reiser R. 1973. Lowering of serum cholesterol by intestinal bacteria in cholesterol-fed pigs. *Lipids.* 8: 423-431.
16. National Cholesterol Education Program. 1988. Report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adult.
17. Pulusani, S. R. and Rao, D. R. 1983. Whole body, liver and plasma cholesterol levels in rats fed *Thermophilus bulgaricus* and *Acidophilus* milks. *J. Food Sci.* 48: 280-281.

18. Rao, D. R., Chawan, C. B. and Pulusani, S. R. 1981. Influence of milk and *Thermophilus* milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterogenesis in rats. *J. Food Sci.* 46: 1339-1341.
19. Rossouw, J. E., Burger, E. M., Vyver, P V Der, Ferreira, J. J. 1981. The effect of skimmed milk, yogurt and full cream milk on human serum lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 351-356.
20. Sanders, M. E. 1993. Effect of consumption of Lactic cultures on human health. *Advances in Food and Nutrition.* 17: 67-130.
21. Sellars, R. L. 1989. Health properties of yogurt, in Chandan, R. C.(Ed), Yogurt, Nutritional and Health properties. National Yogurt Association, McLean Virginia, 115-144.
22. Simons, L. A. 1986. Interrelations of lipids and lipoproteins with coronary artery disease mortality in 19 countries. *Am. J. Cardiol.* 57: 5G-10G.
23. Stamler, J., Wentworth, D., Meaton, J. D. 1986. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded. *JAMA.* 256: 2823-2828.
24. Thakur, C. P. and Jha, A. N. 1981. Influence of milk yogurt and calcium on cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis.* 39: 211-215.
25. Thompson, L. U., Jenkins, D. J. A., Amer, M. A., Reichert, R., Jenkins, A. and Kamulsky, J. 1982. The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 36: 1106-1111.
26. 강국희. 1990. 유산균과 건강생활. 유한문화사.
27. 이재영, 유제현, 강국희. 1981 신제 유가공학. 향문사

제 2 장 향 콜레스테롤 유산균 선발 및 콜레스테롤 저하기능 탐색

제 1 절 서 설

유산균은 유당, 포도당 같은 탄수화물을 이용하여 유산(젖산), 휘발산, 초산, 에칠 알콜을, 탄산가스 등을 생산하며 질산염을 환원하지 않고 catalase 음성균이 많으나 catalase 생성 유산균도 알려지고 있다. 이러한 유산균은 그람 양성균으로 단백질을 분해하지만 부패시키는 능력은 없으며 인체에 해로운 물질들을 생성하지 않고 유익한 작용을 하는 세균을 말한다. 즉, 젖산, 펩톤, 펩티드 및 기타 미량활성물질과 같은 유산균 대사산물에 의한 식품의 품질, 저장성 및 소화율의 증진 효과 그리고 유산균의 장내 증식에 의한 정상작용 등을 하는 것으로 알려져 있다(신 등 1994, 김 등 1994). 이들은 균의 형태, 발효 형식, aero-tolerance 등의 성상에 따라 *Lactobacillaceae*에 속하는 *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomycetaceae*에 속하는 *Bifidobacterium*, 그리고 *Bacillaceae*에 속하는 *Sporolactobacillus*의 6가지 genus로 구분된다(Wood 1992, Orla-Jensen 1991, Breed 1986). 유산균은 우유와 유제품 외에 다른 식품이나 동물의 체강 또는 소화기 등 자연계에 널리 분포되어 있으며, 지금까지 유산균은 300~400여 종이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 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 있는 공생체의 하나이다. 유산균은 발효유제품의 starter로 이용될 뿐만 아니라 장내 세균수의 안정화

(Lidbeck *et al.*, 1987), 위장관내 병원균의 증식억제 (Fernandes *et al.*, 1987), 혈중 콜레스테롤의 저하 (Suzuki *et al.*, 1991), 특히 비특이 면역 반응의 유도 및 영양소 이용의 향상 (Fernandes *et al.*, 1992), 암 퇴화 및 장내 효소 활성 감소로 결장암의 예방효과 (Goldin *et al.*, 1984), 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 (Hood *et al.*, 1988), 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 gastric bactericidal 활성은 위액의 pH 및 HCl 의존성인 것으로 보고되었다 (Flanklin *et al.*, 1971, Giannella *et al.*, 1972, Maffei *et al.*, 1975). Booth (1985)와 McDonald 등 (1990)은 혐기성 미생물인 유산균은 호기성 미생물보다 생육 가능한 pH 범위가 넓어 상대적으로 낮은 pH에서도 생육이 가능하다고 하였다. 그러나 이러한 내 산성에 대한 기작은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았으며, 다만 원형질막에 결합된 H⁺-ATPase의 활성과 그 양이 발효 과정 중 내 산성에 관여하는 것으로 Bender 등 (1986, 1987)과 Kobayashi (1985)가 보고한 바 있다. 이는 발효에 의해 생성되는 유기산에 의해 pH가 낮아지면 세포 내부로 proton의 유입이 증가하며 이 때 H⁺-ATPase의 활성이 높으면 세포 내부로 들어오는 proton을 효과적으로 방출시킴으로서 세포 내부의 pH를 유지한다는 것이다. 위를 통과한 유산균은 췌장에서 분비되는 담즙산에 노출됨에 따라 내 담즙성을 갖는 유산균만이 생존하여 장내에서 그 유용성을 발휘할 수 있다 (Overdahl *et al.*, 1991, Fernandes *et al.*, 1988). Mayia-Makinen 등 (1983)은 Lactobacilli의 다양한 내 담즙성에 대하여 보고하였으며, Overdahl 등 (1991)은 세포벽에 존재하는

polysaccharide층은 *Lactobacillus acidophilus*의 내 담즙성의 상관관계에 대하여 보고하였는데 이들 간에는 상관관계가 없다고 하였다. 유산균의 이러한 내 담즙성에 대한 연구는 일부 균종에서만 진행되었을 뿐 아직까지 미미하다. 또한 콜레스테롤(cholesterol)은 탄소 27개로 이루어진 알콜류로서 동물성 지질에만 함유되어 있으며, 음식물을 통하여 외부로부터 섭취하거나 뇌를 제외한 대부분의 부위에서 생합성되며, 간 및 장이 주된 합성장소이다. 생합성된 free cholesterol은 지방산과 결합하여 ester형으로 모든 체조직과 뇌, 신경조직에서 발견된다. 성인의 경우 1일 1,000~2,000mg정도의 콜레스테롤이 합성되는 것으로 알려져 있다. 콜레스테롤은 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 등을 발생을 높인다고 보고되었다(Castelli *et al.*, 1990). 혈중 콜레스테롤이 관상동맥성 심질환의 주요 원인 인자라고 발표된 이후 혈중 콜레스테롤에 영향을 주는 요인들에 대한 연구가 다각적으로 진행되었으며, 유전적인 요인으로는 간세포의 LDL receptor의 결함으로 인한 familial hypercholesterolemia (Goldstein *et al.*, 1977)와 lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) (Klein *et al.*, 1993), cholesterol ester transfer (CETP) (Brown *et al.*, 1989), lipoprotein (Rees *et al.*, 1990) 등의 유전자 발현이상 등이며, 기타 요인으로 식이, 약물, 생약성분, 운동, 음주, 흡연 등이 있다. 유산균 발효유의 음용이 이러한 혈중 콜레스테롤의 저하 효과를 가져올 수 있다는 연구결과가 많이 보고되고 있다. Mann과 Spoery (1974)는 아프리카 Maasai족이 육류를 다량 섭취함에도 불구하고 하루 4~5l의 발효유를 섭취함으로써 혈중 콜레스

테롤이 낮으며, 관상동맥심질환의 발병도 낮다는 사실을 발견하였고, Hepner등(1979)은 사람에게 요구르트를 응용시킨 결과 혈중 콜레스테롤이 감소하였다는 연구결과를 보고하였다. Thakur와 Jha (1982)는 우유, 요구르트, 그리고 칼슘이 보강된 각 식이를 섭취한 토끼 등의 혈청과 동맥 조직의 콜레스테롤 함량이 동일한 수준으로 감소되는 것은 유제품에 함유된 칼슘이 콜레스테롤 저하인자라고 하였다. 또한 Neir와 Mann (1977)등은 우유 또는 0.1% HMG를 섭취한 쥐들의 혈중 콜레스테롤이 비슷한 수준으로 감소하였다고 보고하였으며, 요구르트와 우유의 콜레스테롤 저하인자는 HMG라고 밝힌 바 있다. 그러나 MHG 성분은 우유내에 아주 미량으로 존재하므로 혈중 콜레스테롤의 저하에의 영향은 적을 것이라는 보고도 있다 (Thakur *et al.*, 1981). 또한 *in vivo*에서의 발효유에 의한 콜레스테롤의 저하에 대한 보고 뿐만 아니라 *in vitro*에서도 유산균에 의한 콜레스테롤 저하에 관한 연구가 보고가 되었다. Gilland 등 (1985)은 담즙에 대한 저항성과 콜레스테롤 소화능력이 큰 균주가 혈중 콜레스테롤 수준을 저하시키는 능력이 높다고 하였으며, *Mycrococcus lysodeikticus*, *Bacillus megaterium*, 그리고 *Proteus mirabilis* 등의 몇몇 균종은 그들 세포막으로 콜레스테롤을 통합한다고 Razin (1975)은 보고하였다. mycoplasma 또한 그들 세포막으로 콜레스테롤을 통합할 수 있으며 이들 균종은 콜레스테롤을 생합성할 수 없기 때문에 콜레스테롤의 공급을 외부로부터 받아들인다고 하였다. Parmantier 등 (1974)은 어떤 미생물은 성장하는 동안 콜레스테롤을 가수분해하여 coprosterol 이나 coprostanol의 형태로 변형시킬 수 있다고 하였다. Gilland 등 (1989)은 lactobacilli의 세포막 내로 콜레스테롤이 통합된다면, lactobacilli가 외부로 배설됨으로서 소화기관내의 콜레스테롤 함량을 감소시킬 수 있다고 하였다.

따라서 본 분야의 연구에서는 유산균 중에서 콜레스테롤 저하능이 우수한 균주의 선발, 콜레스테롤 분석법 비교, 검토, 유산균의 콜레스테

를 저하기능을 *in vitro* 실험을 통하여 규명하는 것을 연구의 목적으로 두었다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 유산균 분리 시료

항 콜레스테롤 유산균을 선별하기 위한 전 단계로 우선 우수한 유산균을 확보하기 위하여 발효유를 오래 전부터 음용하므로써 장수촌이 많은 곳으로 유명한 불가리아 스모리안 지방과 조오지아 공화국 코카스지방의 장수촌과 터키 등을 방문하여 민간인들이 전통적으로 사용하고 있는 각종 발효유 26종과 브라질 및 남미 발효유 17종, 국내 김치 및 젓갈류를 유산균 분리 시료로 사용하였다.

2. 유산균의 분리

시료를 희석 및 활성화한 후 MRS, M17, CATC 등에 CaCO_3 가 첨가된 선발 고체 배지에 도말, 접종한 후 40°C 에서 24~48 시간 호기조건으로 배양하였다. 이때 형성된 colony중 투명대를 크게 형성하는 colony를 액체 성장 배지에 재 배양하여 15% 탈지 분유 배양액에 유산균 배양액 5%를 접종하고 37°C 에 배양하면서 우유 응고력이 우수한 유산균주만을 분리하였다.

3. 유산균의 동정

균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Prokaryotes, Microbiological Method에 기술된 방법에 따라 형태학적, 생물학적 성질을 검사하였고, bio Merieux사 (France)의 api 20 strep과 api 50 CH 동정 kit를 이용하여 동정하였다. 또한 균주 배양액 5ml를 0.2um pour의 filter paper (German science Inc.)에 압축, 여과한 다음, 진공 상태에서 10분간 방치하였다. 여기에 고정액 (4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate

buffer; pH7.2)을 가하여 4 ℃에서 4시간 처리한 후 동일 완충 용액으로 20분간, 2회 세척하고, 50%, 70%, 90%, 95%, 그리고 100% ethylalcohol을 이용하여 10분간 1~2회 처리하여 탈수하였다. 여기에 다시 t-butylalcohol을 가하여 10분간 3회 처리 후 동결 건조한 다음 gold cotting하여 전자 현미경(SEM, Hitachi S-2400, Japan)으로 균의 형태 및 크기를 관찰하였다.

4. 항균성 조사

전남대학교 의과대학에서 분양 받은 병원성미생물인 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*와 *E.coli*, 그리고 *Bacillus subtilis*를 성장 액체 배지에 접종, 배양 및 회수하여 현탁하고 이 현탁액을 약 1×10^8 수준으로 MRS 고체 배지에 도말 접종하였다. 여기에 MRS 및 각 선발 균주의 성장 고체 배지에서 형성된 colony를 toothpick으로 취하여 일정 간격으로 접종한 후 37℃에서 3~5일간 배양하며 관찰하였다.

5. pH 및 산도 측정

선발 균주를 starter로 요구르트를 제조하고 시료를 무균적으로 취하여 pH는 APHA의 standard methods(1985) 및 신 등 (1984)의 방법에 따라 pH meter(Orion mode 420A, USA)로 측정하였고, 산도는 우유 유제품 시험법 (한국 유가공 기술과학회편) 및 Chollins 등 (1991)의 방법에 준하여 요구르트 10g에 멸균수 40ml를 가하고 잘 혼든 후 0.1N NaOH로 pH 8.1까지 적정하여 유산으로 계산하여 적정 산도를 측정하였다.

6. 완충능 및 생균수 측정

완충능은 Martini 등 (1987)의 방법에 따라 제조된 요구르트 100ml을 1.0N HCl용액으로 고유의 pH값에서 2단위 낮은 pH값까지, 1.0N

NaOH용액으로 4단위 높은 pH값까지 적정하여 소모된 양을 조사하였다. 요구르트 내에서의 생균수는 Shan 등 (1990)의 방법에 따라 멸균 증류수를 사용하여 희석한 후 37°C에서 희석 평판법으로 집락을 계수하였다.

7. 내 산성 측정

Kobayashi 등 (1985) 및 심 등 (1995)의 방법을 약간 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, pepsin(Sigma Co.)이 1000unit/ml 첨가된 MRS 액체배지를 HCl 용액을 이용하여 pH 1.5, 2.0, 3.0의 산성조건으로 조정하였다. 그리고 대수증식기 말기의 세포배양액 약 10ml를 원심 분리한 후 이를 1ml의 생리식염수 (0.85% NaCl)로 세척 및 현탁하고 이 중 균수가 약 1×10^8 CFU/ml 정도의 수준이 되도록 취하여 pH가 1.5, 2.0, 3.0으로 조정된 MRS 액체 배지에 가한 후 37°C에서 1시간 배양한 다음 0.05% L-cystein이 첨가된 phosphate buffer (pH 7.2, 0.2M)로 희석하고, 성장 고체 배지에 접종, 배양하여 생균수를 측정하였다.

8. 내 담즙성 측정

oxgal (Difco, USA) 이 0.1, 0.3, 0.5% 첨가된 0.05M 인산나트륨 완충액 (pH 7.0)에 일정량의 균주 배양액 (약 1×10^8 CFU/ml)을 가하여 37°C에서 1.5시간 간격으로 일정 시간대별로 37°C에서 배양하고 0.5% pepton (NaCl; 0.5g, pepton; 0.5g, pH7.2) 용액으로 희석한 후 균주의 생존율을 희석 평판법으로 생균수를 계수하여 내 담즙성을 측정하였다.

9. 유기산 측정

제조 발효유의 유기산 측정을 위하여 Kim 등 (1993) 및 윤 (1983, 1987)의 방법을 변형하여 선발균주를 starter로 제조한 요구르트를 vortex mixer로 혼합한 다음 원심분리(10,000 rpm, 10 min)후 pH 8.1 까지 중화하는데 0.1N NaOH용액 약 10ml가 소모되는 양의 상등액을 취하여 4℃에 보관하면서 사용하였다.

가. Butyl ester화

농축된 나트륨염 시료에 부탄올 2 ml, 무수황산나트륨 2g, 농황산 0.2ml를 가하고 냉각관을 부착하여 교반하면서 약 30분간 유조(oil bath)에서 117~118℃의 온도로 비등시켜 유기산을 butyl ester화 하였다.

나. Ester 추출 및 GC 분석

분액 깔대기를 이용하여 3차 증류수 5 ml와 hexane 5ml를 가하고 잘 혼합하여 ester를 hexane으로 전용하였으며, 다시 5ml씩의 hexane으로 3회 추출한 후 0.5% n-nonadecane (내부표준물질)의 hexane용액 1 ml를 첨가하고 20 ml의 용량 플라스크에 옮겨 hexane으로 정용하였다. 무수 탄산 나트륨 0.5g이 들어있는 유리솜을 유리 깔대기에 넣은 후 마개가 있는 시험관에 깔대기를 놓고 위의 용액을 통과시켜 미량의 황산을 제거하였다. 이 용액 1 μ l를 gas chromatography (GC, model Varian 3600cx, USA)를 이용하여 Table 1-1의 조건으로 분석하였다.

Table 1-1. Operating conditions for quantitative of organic acid by G. C analysis

Instrument	Verian 3600cx
Column	XTI-5(crossed5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane)
Column temp.	
Initial temp	60°C (6 min. holding)
Final temp	240°C (20 min. holding)
Programmed rate	5°C/ min.
Injector temp.	260°C
Detector temp.	260°C
detector type	FID
Split rate	1:20
carrier gas	N ₂ gas(1ml / min.)
Make up gas	N ₂ (30ml / min.)

10. 선발 균주의 콜레스테롤 저하기능 조사

가. 초음파 파쇄에 의한 세포 저항성

Noh (1990)의 방법에 따라 선발 균주를 각각 MRS-Thio (MRS broth containing 2g of thioglycolic acid and 2.16g of taurocholic acid or 3g of oxgal per 1 liter) 액체 배지 및 0.3% oxgal 및 약 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 water soluble cholesterol을 포함하는 MRS-Thio 액체 배지에 1% 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 회수하여 멸균 증류수로 약 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ CFU/ml 되도록 현탁한 다음 얼음 위에 보관하며 초음파 파쇄기(Ultrasonics Ltd. USA)를 이용하여 15분간 90 uA의 출력으로 초음파 파쇄하였다. 이것을 각 시험균주의 성장 고체 배지에 희석 평판하여 균주의 생균수를 조사하였다.

나. Thin layer chromatography(TLC)에 의한 유산균 세포 내

콜레스테롤 저하기능 탐색

Cholesterol의 대사 경로를 추적하기 위하여 Dashkevicz 등 (1989)의 방법을 변형하여 0.3%의 oxgal 및 $1\alpha, 2\alpha$ [N]- ^3H -cholesterol (C-8794, Sigma co.)을 1.2×10^6 cpm 그리고 cold (방사선 동위원소로 표지 되지 않은 cholesterol)로는 water soluble cholesterol을 첨가한 MRS-Thio 액체 배지 10ml에 선발 균주를 각각 1% 접종한 후 20시간 배양하였다. 이 배양액을 Figure 1-1과 같은 방법으로 처리하여 시료를 준비한 후 20ul를 TLC plate(20×20 cm RP-8 F_{254s} Merck Co.)에 spot하여 isooctane-isopropyl ether-isopropanol-acetic acid(2:1:1:1) 용액으로 전개 및 건조하였다. 이것을 radiation film에 전이한 후 Bio-imaging analyzer (BAS-1500, Fuji, Japan)로 영상 분석하였다.

다. Gas chromatography에 의한 유산균의 콜레스테롤 저하
기능 탐색

G.C를 이용하여 cholesterol의 대사 경로를 또한 추적하기 위하여 0.3%의 oxgal 과 100ug/ml의 water soluble cholesterol을 첨가한 MRS-Thio 액체 배지에 *L.r* 2084 균주를 접종하고 배양한 후 회수하여 1 mM MgCl₂를 함유한 0.02M HEPES (pH7.0) 용액으로 균체를 세척, 회수하고 10mM NaCl을 포함한 동일 용액으로 재 현탁하여 37°C에서 15분간 정치하였다. 그 후 0.5mg/ml의 lysozyme을 가한 후 37°C에서 60분간 재 배양하여 균체를 용균한 다음, 여기에 4M의 NaCl 용액을 가하여 30분간 재 배양한 후 5,000×g로 원심 분리하여 상등액과 pellet을 분리한 다음 분리된 상등액을 200,000×g로 초고속 원심 분리하였다. 이렇게 얻어진 pellet을 Figure 1-3의 방법을 약간 변형하여 시료를 준비하고 Table 1-2의 조건으로 G.C 분석하였다.

11. 콜레스테롤 함량측정

*in vitro*에서의 콜레스테롤 함량 측정은 Rudel (1973)의 비색법 (Figure 1-2)과 Hesani 등 (1993)의 G.C 분석법 (Figure 1-3)을 병행하여 사용하였으며, 시료가 대량일 경우에는 조작 방법 및 과정이 비교적 간편한 o-phthalaldehyde 비색법 (Rudel *et al.*, 1973)으로 정량하고 정밀분석에는 Table 1-2의 분석 조건으로 G.C 분석하였다.

12. 균주의 보관 및 이용

균주를 MRS broth (pH 6.5)에 배양한 후 glycerol의 최종농도가 20%(v/v)되도록 첨가하여 -70°C에 냉동 보관하면서 필요에 따라 성장 액체 및 고체 배지에 접종 배양하거나 15% 탈지분유액에 배양한 후 4°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

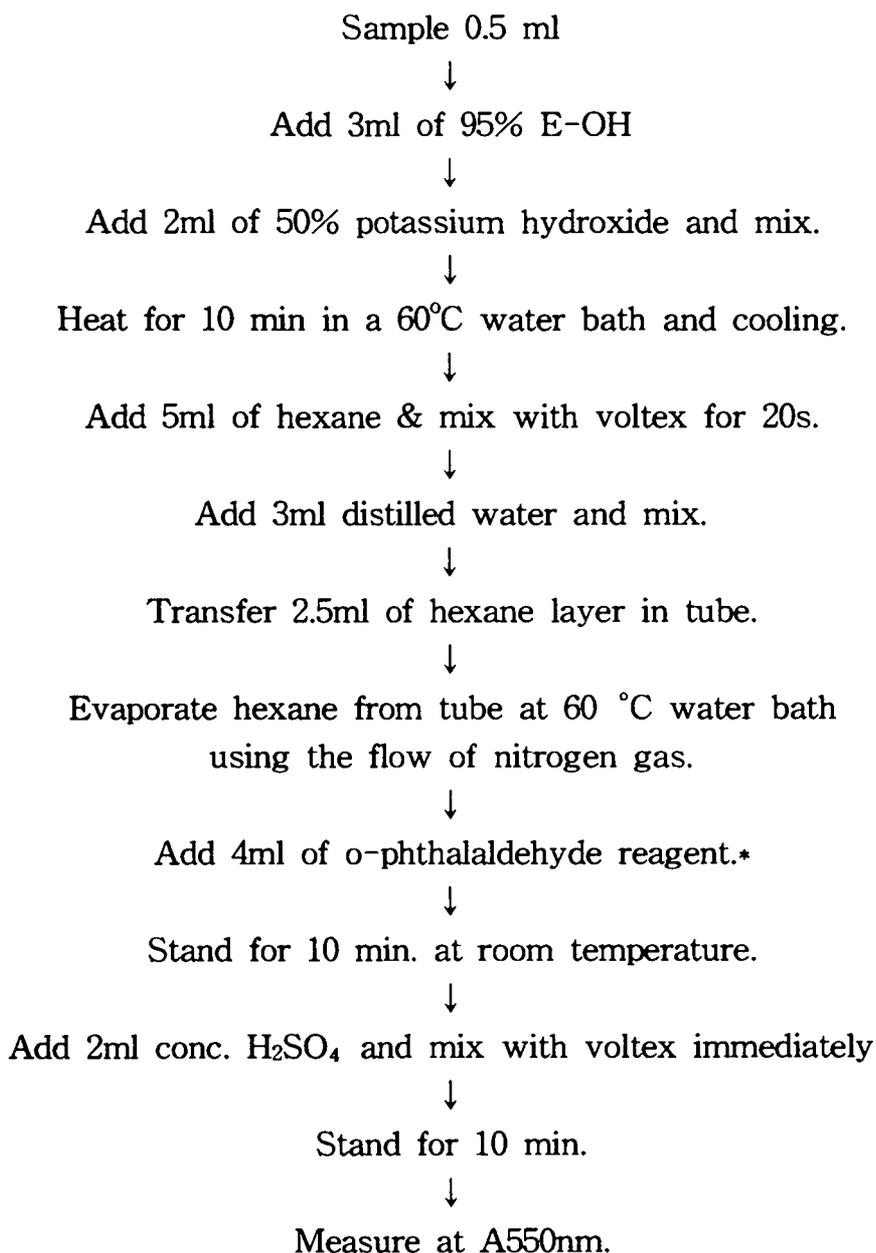


Figure 1-2. Diagram of the determination of cholesterol using o-phthalaldehyde.

*o-phthalaldehyde reagent : 0.5 mg o-phthalaldehyde per ml of glacial acetic acid.

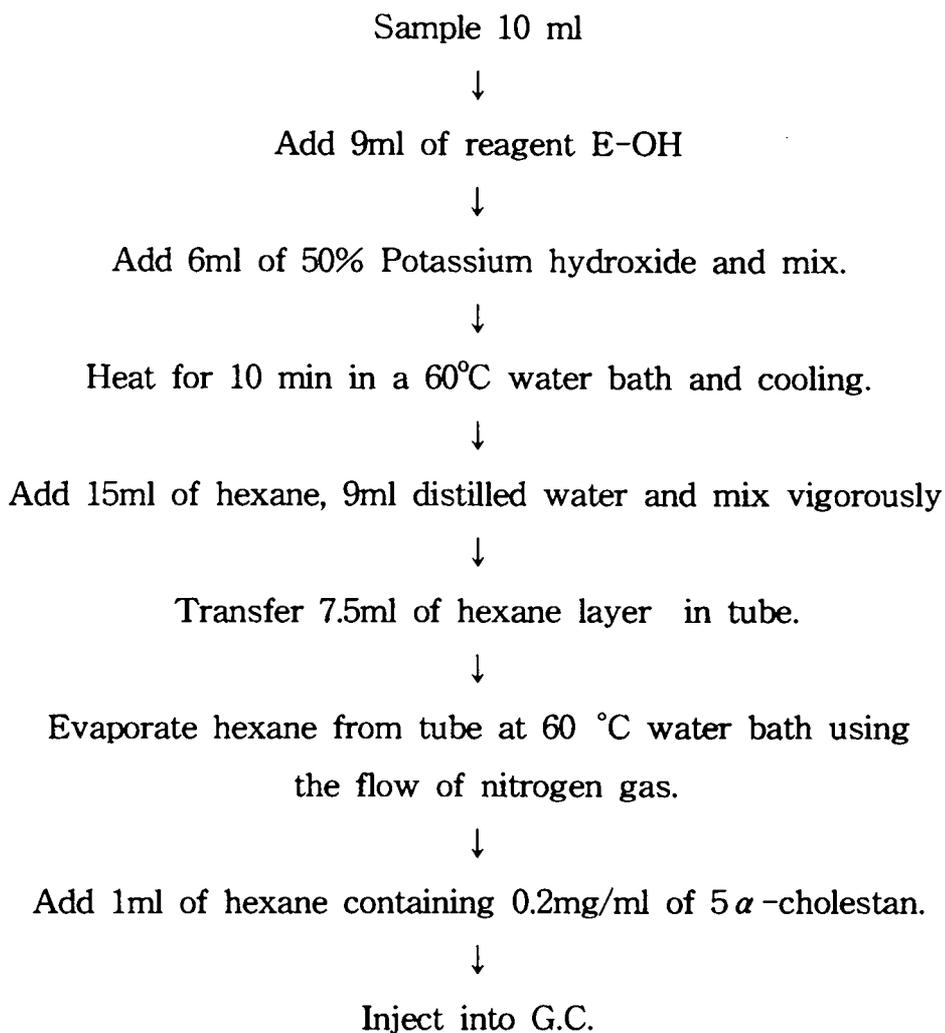


Figure 1-3. Diagram of the determination of cholesterol using gas chromatography.

Table 1-2. Operating conditions of G. C for determination of cholesterol.

Instrument	: Varian Star 3600 CX Varian 8200 CX autosampler
Column	: XTI-5 (30 meter, 0.32 mmID, 0.5 df ; 5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane)
Column temperature	
Initial temp.	: 245 °C
Final temp.	: 285 °C
Programmed rate	: 5 °C/min.
Injector temp.	: 280 °C
Detector temp.	: 300 °C
Detector type	: Flame Ionization Detector (FID)
Split rate	: 1:20
Carrier gas	: N ₂ (1ml / min.)
Make up gas	: N ₂ (30ml / min.)

제 3절 결과 및 고찰

1. 항 콜레스테롤 유산균의 분리 및 콜레스테롤 저하능 조사

항 콜레스테롤 유산균을 다음과 같은 단계를 거쳐 분리한 후 콜레스테롤 저하능을 조사하였다. 즉, 유산균 분리 시료로부터 MRS, M17, CATC 등의 배지를 이용하여 유산균 분리방법에 따라 618주의 유산균을 분리하였다. 이들 유산균들로부터 당 발효능 및 0.6% (w/v) CaCO₃가 첨가된 고체 배지에서의 CaCO₃ 이용성을 우선 조사하여 동일한 균주를 배제 한 후 15% skim milk 배지에서 우유 응고력이 우수한 108주의 유산균주를 선발하였으며, 내산성 측정 방법에 따라 내산성이 우수한 66주의 내 산성 균주를 선발하였다.

내산성 균주 66 중에서 내 담즙성과 또한 항 콜레스테롤이 있는 유산균을 분리하기 위하여 0.3% oxgal 및 water soluble cholesterol (polyoxyethanyl-cholesterol sebacate, sigma Co.)이 첨가된 MRS-THIO broth (MRS containing 0.2% thioglycolic acid, or 0.004M taurocholic acid, Sigma Co.) 10ml에 균주 배양액 1%를 접종한 후 20시간 혐기 배양한 다음 회수하여 액체배지 및 균체의 콜레스테롤 함량을 o-phthalaldehyde 분석 방법을 사용하여 측정하였던바, *in vitro* 에서 콜레스테롤 저하능이 1~20% 균주는 50주, 20~30% 균주는 12주, 30%이상 균주는 4주이었다.

2. 항 콜레스테롤 유산균의 동정

in vitro 콜레스테롤 저하능이 30% 이상인 4개 균주를 선발 균주로 선정한 후 이들에 대한 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology, The prokaryotes, Microbiological method에 기술된 방법에 따라 형태학적, 생물학적 성질을 조사하였고, api 20 strep과 api

50CH 동정 kit (bio Merieux Co.)를 이용하여 분류 동정하였으며, 균의 형태는 동결 건조 후 goldcotting하여 전자 현미경 (SEM, Model Hitachi S-2400, Japan)으로 관찰하였다.

그 결과 시험균 4 균주 모두 운동성이 없으며 비 포자성인 Gram양성 균이었고, esculin을 가수분해 하였으며, catalase test에 음성, V-P test에 양성이었다. 또한, pyrrolidonyl-amidase, β -galactosidase, alkaline phosphatase, leucine arylamidase 효소활성을 가지고 있었다.

이들을 동정한 결과, *Lactobacillus(L.) rhamnosus*, *Lactobacillus(L.) casei*, *Lactococcus(Lacto.) lactis* spp., 그리고 *Enterococcus(E.) faecium*으로 동정되었다. 따라서 이들 균주를 *L. rhamnosis* 2084 (*L.r* 2084), *L. casei* 0781 (*L.c* 0781) *Lacto. lactis* spp. 204 (*Lacto.l* 204), *E. faecium* 402 (*E.f* 402)로 명명하였으며, 이들에 대한 생리학적 특성, 탄수화물 발효성은 Table 1-3 및 1-4에, 그리고 균의 형태는 Figure 1-4, 1-5에 각각 나타낸 바와 같다. *L.c* 0781과 *L.r* 2084은 각각 $0.6\sim 0.7 \times 0.9\sim 2.7\mu\text{m}$, $0.6\sim 0.8 \times 1.6\sim 2.1\mu\text{m}$ 의 간균이었고, *Lacto.l* 204와 *E.f* 402는 지름이 각각 $0.7\sim 1.0\mu\text{m}$, $0.9\sim 1.3\mu\text{m}$ 크기의 구균이었다. 또한, *L.c* 0781과 *E.f* 402는 hipurate를 가수분해하는 반면, *L.r* 2084와 *Lacto.l* 204는 가수분해하지 못하였다. 효소 활성화에 있어서는 *L.c* 0781과 *L.r* 2084 두 균주는 α -galactosidase, β -glucuronidase에 양성, arginine dihydrolase에는 음성을 보였고, 나머지 두 균주는 각각의 효소 반응에 반대 경향을 보였다. 이는 Bergey's manual of systematic bacteriology, The prokaryotes의 분류기준과 동일하였다. 반면, *L.c* 0781은 D-arabinose의 발효에서 양성을, esculine의 발효에서는 음성을 보였고, *L.r* 2084는 ribose, mannitol, sorbitol, 그리고 esculine의 당 발효에서 음성이었으며, *Lacto.l* 204는 melibiose 발효에서, 그리고 *E.f* 402는 D-arabinose 발효에서 음성을 보임으로서 Bergey's manual of systematic bacteriology, The prokaryotes의 분

류기준과 비교했을 때 약간의 차이를 보였다. 그러나 이는 각 선발 균주의 생육 조건 및 환경의 차이로 인한 것으로 사료되며, 이외의 특성은 동일하였다. 또한 이들 선발 균주의 분류, 동정은 bio Merieux의 균주 동정 프로그램과 비교하여 최종적으로 동정한 결과이다.

Table 1-3. 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> <i>spp.</i> 204	<i>E. faecium</i> 402
Shape	rod	rod	spherical	spherical
Size(μm) width \times length	0.6~0.7 \times 1.9~2.7	0.6~0.8 \times 1.6~2.1	0.7~1.0	0.9~1.3
Gram-stain	+	+	+	+
Spore formation	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-
Anaerobic growth	+	+	+	+
Test of catalase	-	-	-	-
V-P	+	+	+	+
Hydrolysis of				
Hippurate	+	-	-	+
Esculin	+	+	+	+
Pyrrolidonyl- amidase	+	+	+	+
α -galactosidase	+	+	-	-
β -glucuronidase	+	+	-	-
β -galactosidase	+	+	+	+
A l k a l i n e phosphatase	+	+	+	+
L e u c i n e arylamidase	+	+	+	+
A r g i n i n e dihydrolase	-	-	+	+
Acidification of				
Ribose	+	-	+	+
L-arabinose	-	-	+	+
Mannitol	+	-	-	+
Sorbitol	+	-	-	-
Lactose	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Starch	-	-	+	+
Glycogen	-	-	-	-

Table 1-4. Pattern of carbohydrate fermented of the selected lactic acid bacteria.

Carbo- hydrates	strains				Carbo- hydrates	strains			
	<i>L.c</i>	<i>L.r</i>	<i>L.l</i>	<i>Ef</i>		<i>L.c</i>	<i>L.r</i>	<i>L.l</i>	<i>Ef</i>
	0781	2084	204	402		0781	2084	204	402
Glycerol	-	-	-	-	Esculin	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	Salicin	+	+	+	+
D-arabinose	+	-	-	-	Celiobiose	+	+	+	+
D-xylose	-	-	-	-	Maltose	+	+	+	+
L-xylose	-	+	-	-	Melibiose	-	-	+	+
Adonitol	-	-	-	-	Sucrose	+	+	+	+
β Methyl-	-	-	-	-	Melezitose	+	+	-	-
D-xyloside					Xylitol	-	-	-	-
D-galactose	+	+	+	+	β -Gentiobio	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	se				
D-fructose	+	+	+	+	D-turanose	-	+	-	-
D-mannose	+	+	+	+	D-Lyxose	-	-	-	-
L-sorbose	+	+	-	-	D-Tagatose	+	+	-	-
Rhamnose	+	+	-	-	D-Fucose	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	L-Fucose	+	-	-	-
Inositol	+	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-	-
α -Methyl-D	-	+	-	-	L-Arabitol	+	-	-	-
-Mannoside					Gluconate	+	+	-	-
α -Methyl-D	+	+	-	-					
-glucoside					2-Keto-	-	-	-	-
N-acetyl-	+	+	+	+	gluconate				
Glucosamine					5-Keto-	-	-	-	-
Amygdalin	+	+	+	-	gluconate				
Arbutin	+	+	+	+					

Symbol + : 90 % or more of strains are positive

- : 90 % or more of strains are negative

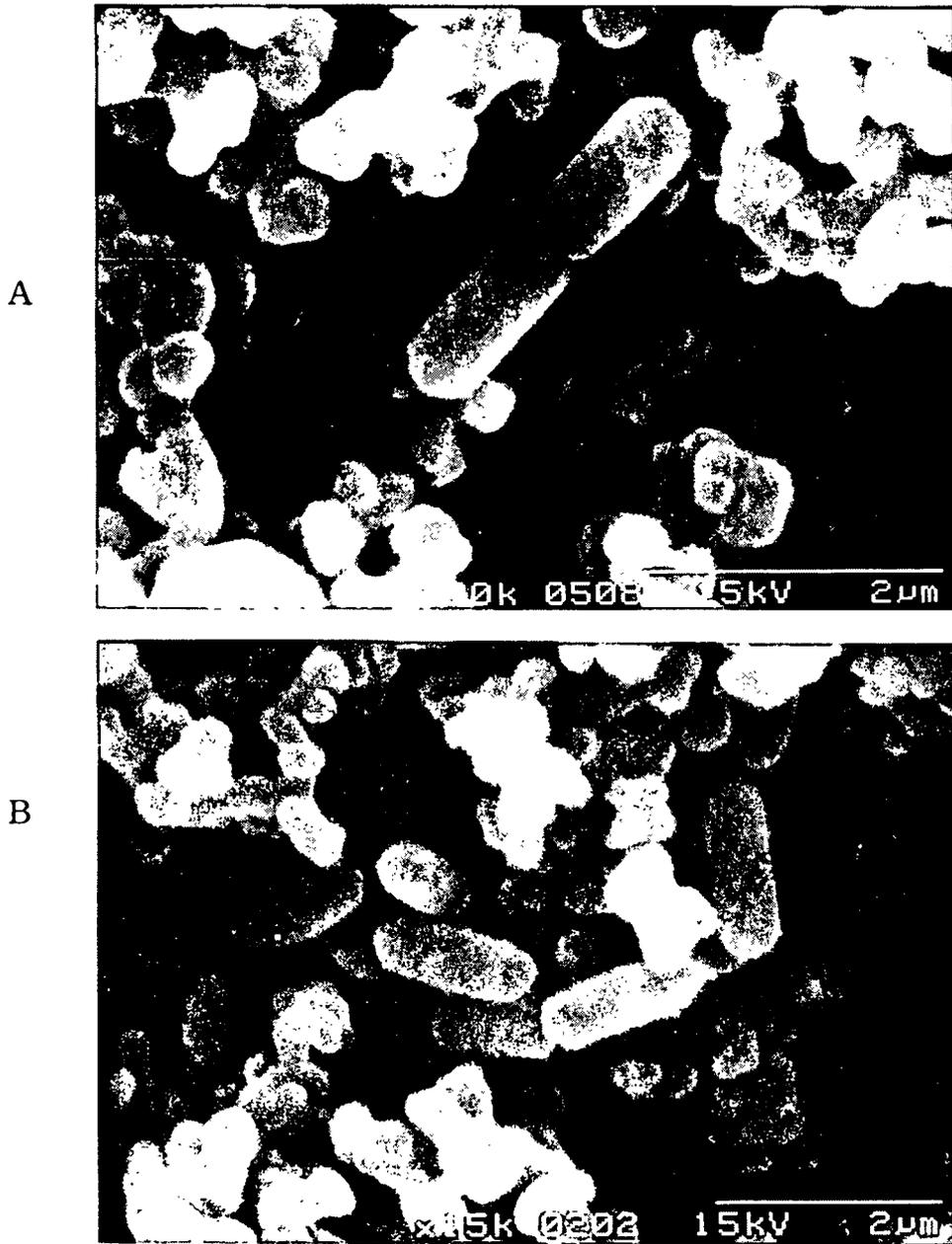
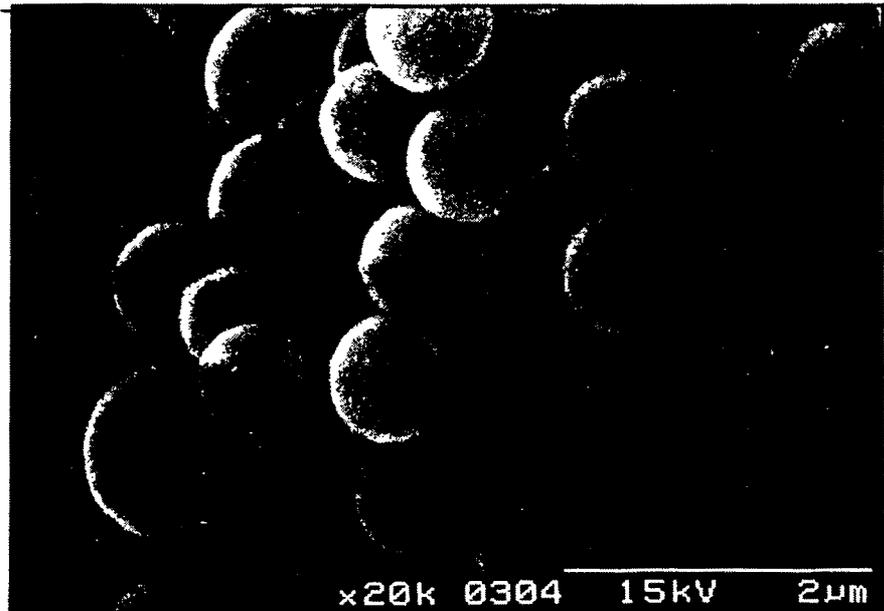


Figure 1-4. Electron micrographs of the selected lactic acid bacteria
A : *Lactobacillus rhamnosus* 2084 B: *Lactobacillus casei* 0781

A



B

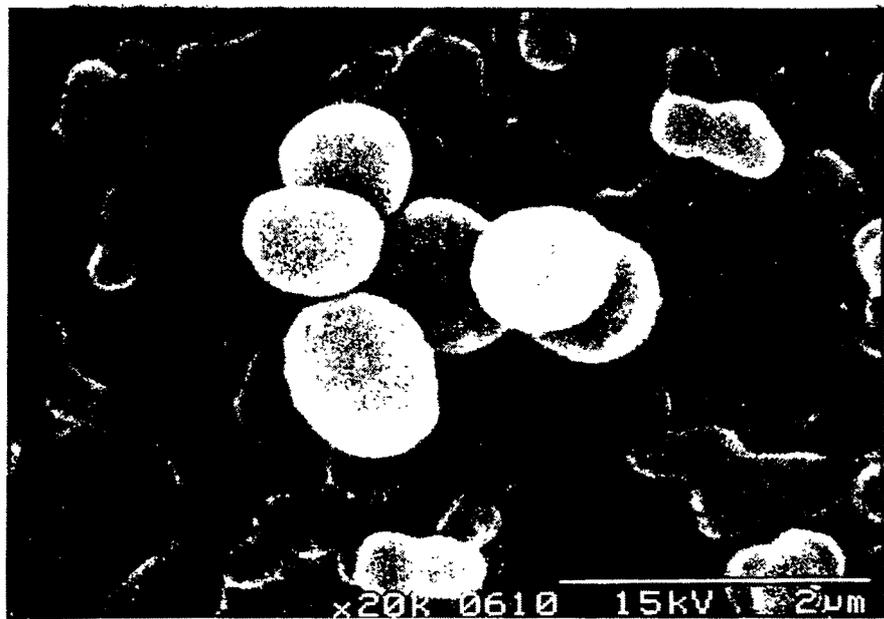


Figure 1-5. Electron micrographs of the selected lactic acid bacteria.

A : *Lactococcus lactis* spp. 204 B: *Enterococcus faecium* 402

3. 선발 균주의 이화학적 특성 조사

가. 배양조건

선발 균주를 MRS, M17등의 성장배지에 접종하여 30℃, 37℃, 42℃등의 온도에서 배양하면서 성장 정도를 관찰한 결과 *L.c* 0781, *L.r* 2084, 그리고 *L.a* 145는 MRS 액체 배지에서, *Ef* 402와 *Lacto.l* 204는 MRS 액체 배지에서와 M17 액체 배지에서 잘 성장하였으며, 특히 M17 액체 배지에서 가장 잘 성장하였다. 균주별 성장 곡선을 배양 온도 30℃, 37℃, 42℃에서 조사한 결과, 42℃에서 *L.c* 0781은 배양 8시간까지, 그리고 *L.r* 2084, *L.a* 145는 배양 10시간까지 가장 빠른 성장 곡선을 보였으나 그 이후의 배양 시간에는 감소하는 경향을 보였고, 30℃에서는 이들 모든 균주가 저조한 균주 성장 속도를 나타내었다. 반면, 37℃에서는 배양 12 시간 이후에도 지속적인 균주 성장 곡선을 나타내었다 (Figure 1-6, 1-7, 1-10). *Lacto.l* 204는 42℃, 37℃, 그리고 30℃에서 유사한 균주 성장 양상을 보였으나, 37℃에서 성장 속도가 가장 빨랐다. *Ef* 402 또한 모든 온도에서 빠른 균주 성장 곡선을 보였으나, 배양 8 시간 이후 42℃에서는 서서히 사멸하는 반면, 37℃와 30℃에서는 지속적인 증가 추세를 보였으며 특히 37℃에서 가장 잘 성장하였다 (Figure 1-8, 1-9). 따라서 선발 균주의 최적 성장 배지는 *L.c* 0781, *L.r* 2084, 그리고 *L.a* 145의 경우는 MRS 배지이었고, *Ef* 402와 *Lacto.l* 204의 경우는 M17 배지이었다. 성장 액체 배지에서의 최적 배양 온도는 균주의 성장 속도가 42℃에서 보다 약간 느리기는 하였으나, 선발 균주 모두 배양 8시간 이후에서도 지속적으로 성장하는 경향을 보이는 37℃이었으며, 이 후 성장 배지에서의 균주 배양은 37℃에서 수행하였다.

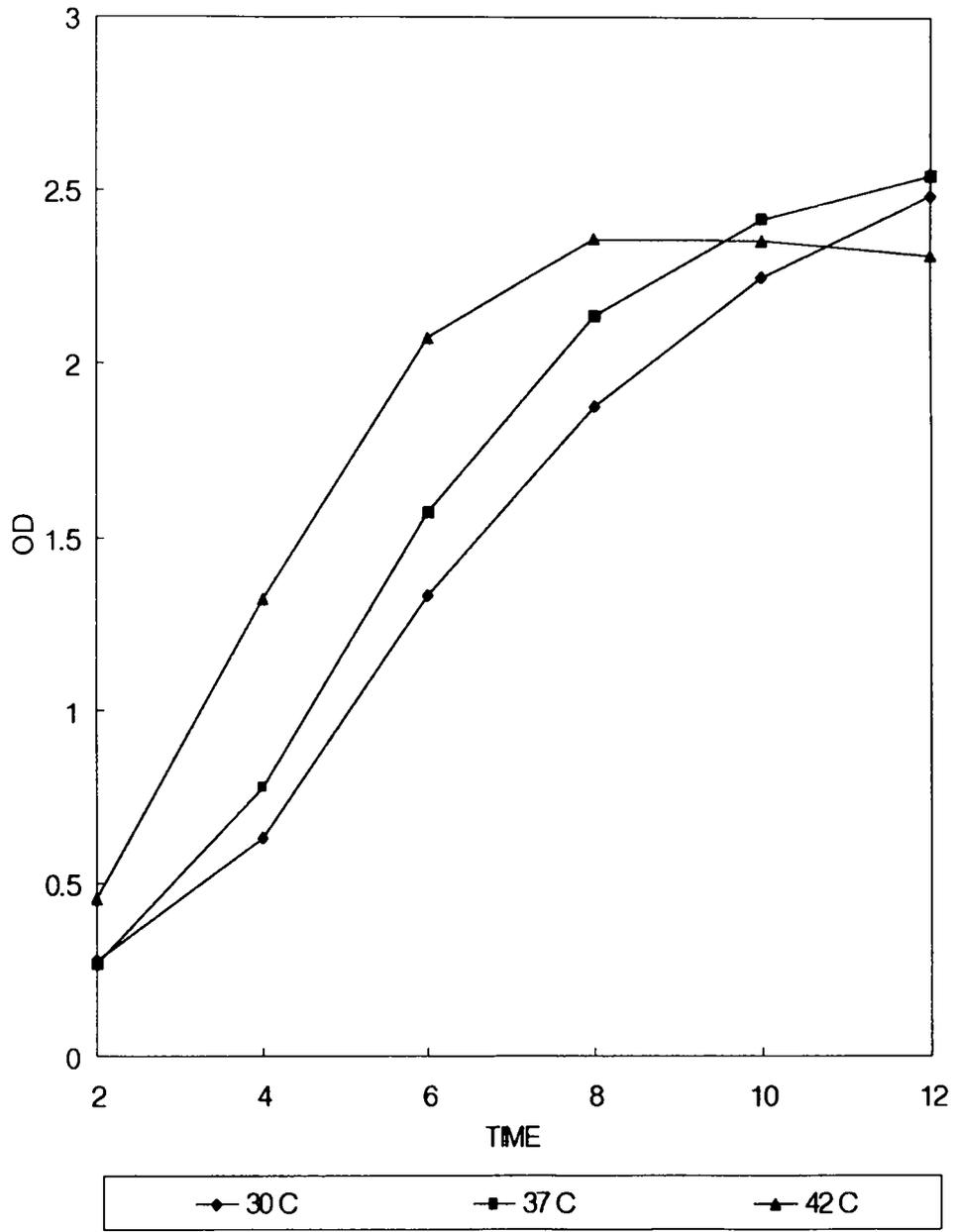


Figure 1-6. Growth curve of *L.c 0781* at various temperature.
 Time : hour, O.D : 600 nm

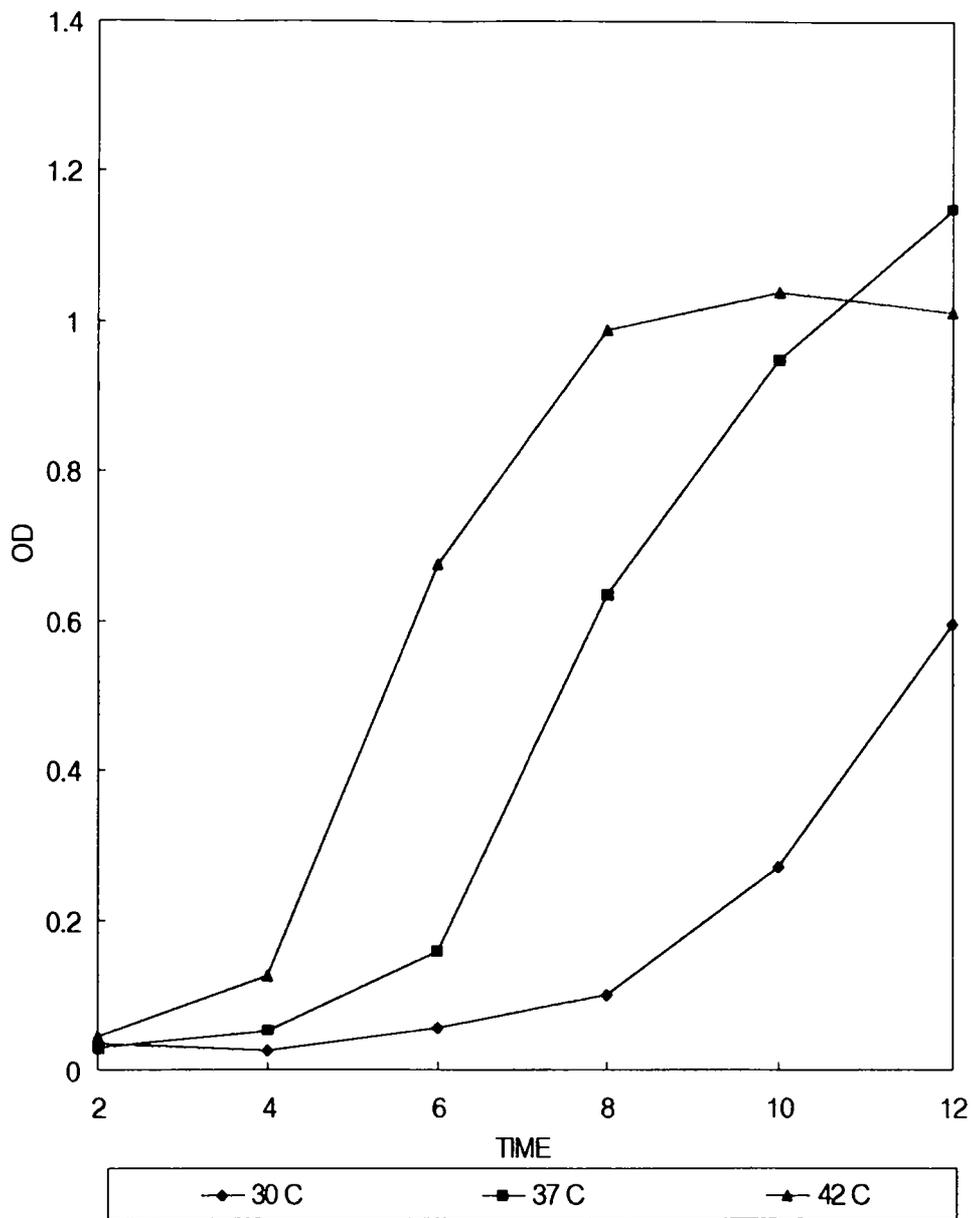


Figure 1-7. Growth curve of *L.r* 2084 at various temperature.
 Time : hour, O.D : 600 nm

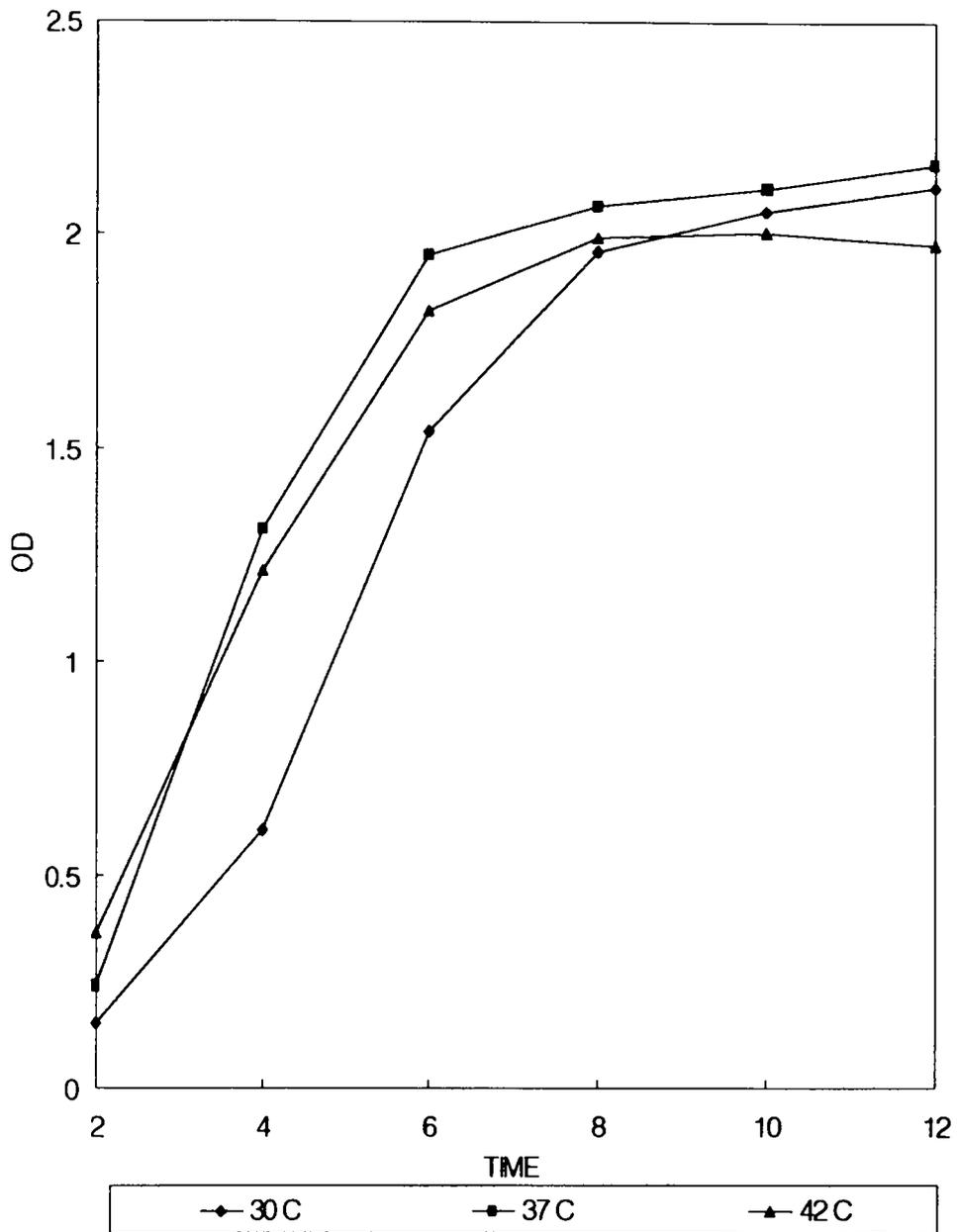


Figure 1-8. growth curve of *Lacto. l 204* at various temperature
 Time : hour, O.D : 600 nm

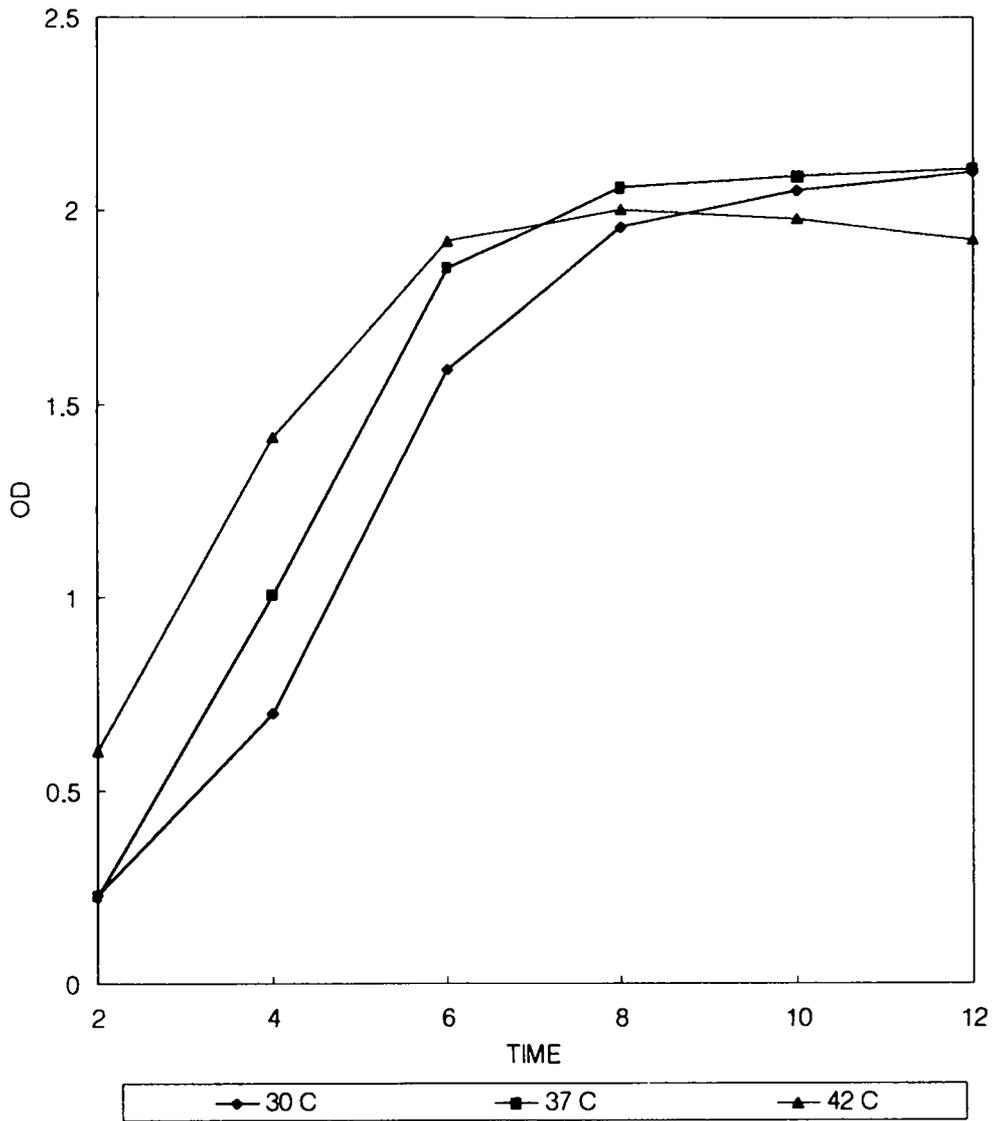


Figure 1-9. Growth curve of *E.f* 402 at various temperature.

Time : hour, O.D : 600 nm

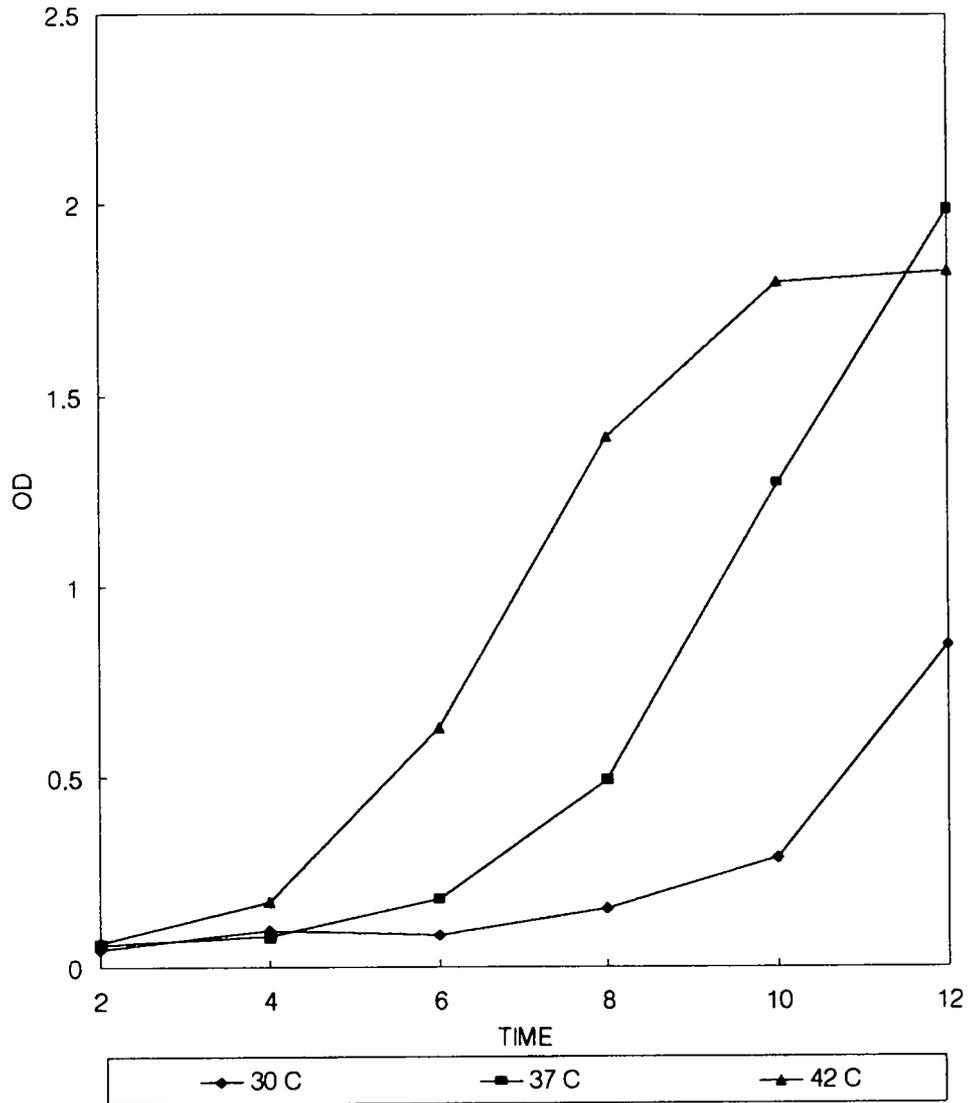


Figure 1-10. Growth curve of *L.a* 145 at various temperature.
 Time : hour, O.D : 600 nm

나. 항균성 조사

병원성 미생물인 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*와 *E.coli*, 그리고 *Bacillus subtilis*를 약 1×10^8 수준으로 MRS 고체 배지에 접종, 배양하고 여기에 MRS 및 각 선발 균주의 생장 고체 배지에서 형성된 colony를 toothpick으로 취하여 일정 간격으로 접종한 후 37°C에서 24 시간 배양하며 관찰한 결과, Figure 1-11에서 보는 바와 같이 선발 균주 모두 이들 균주에 대한 강한 항균성이 관찰된 반면, 대조 균주인 L.a 145는 항균성이 약하였다. 이는 유산균이 생성하는 bacteriosin (Yoo et al., 1991)의 영향 때문으로 사료된다.

다. 내 산성 및 내 담즙성

유산균은 소화기관을 거치면서 장내에 정착하여야만 유산균이 갖는 유용한 특성들을 발휘할 수가 있다. 유산균이 살아 있는 상태로 장내에 도달하기 위해서는 먼저 인체 소화기관 내의 위액 성분인 염산과 각종 소화 효소가 존재하는 위를 통과하여야 하며, 이러한 위의 pH 범위는 대단히 큰 가변성을 갖는다. 특히, 음식을 섭취하였을 때 위산이 분비되어 크게 떨어지며 섭취된 유산균은 위산에 노출되어 그 중 많은 수가 사멸된다. 또한, 담즙, 장의 연동운동, 면역 반응 및 낮은 표면 장력 등 미생물의 생존을 저해하는 요인들을 극복하여야 한다. 그러므로 유산균은 기본적으로 내 산성과 내 담즙성의 특성을 가지고 있어야만 살아 있는 상태로 장내에 도달할 수가 있다 (Overdahl et al., 1991, Fernandes et al., 1988). 따라서 선발 균주들의 내 산성과 내 담즙성을 Kobayashi 등 (1985) 및 심 등 (1995)의 방법에 따라 조사하였다. 대수 증식기 말기(37°C, 24시간 배양)에 선발 균주의 세포를 회수하고 생리식염수로 세척 및 현탁하여, pepsin(Sigma Co.)을 1000unit/ml 함유한 pH 1.5, 2.0, 그리고 pH 3.0로 조정된 성장 액체

배지에 접종한 후 37°C에서 1시간 배양하여 균주의 생존율을 조사한 결과 Figure 10과 같이 pH 1.5에서는 *Lr* 2084가, 그리고 pH 2.0에서는 *Lc* 0781이 현저하게 강한 내 산성을 보였으며, pH3.0에서는 모든 균주의 내 산성 비율이 유사하였으나 대조 균주보다 선발 균주가 대체적으로 더 강한 내 산성을 나타내었다. 심 등 (1995)은 *L. casei*의 내 산성 연구에서 온도별, 배양 시간별 균주 생존을 조사하였는데 pH 2.0에서 대부분의 균주가 사멸하였고, 35.5°C에서 23시간 배양한 균주의 경우 pH 3.0에서 약 10^4 의 균주 생존을 관찰하였다고 보고하였다. 이들의 결과와 비교해 볼 때 배양 시간 및 온도가 약간 차이는 있으나 선발 균주의 경우 pH 1.5에서 약 10^1 CFU/ml 이상, pH 2.0에서 약 10^2 CFU/ml 이상, 그리고 pH 3.0에서 약 10^6 CFU/ml이상의 균주 생존을 보임으로서 내 산성이 매우 우수하였다.

또한 내 담즙성 조사는 oxgal이 각각 0.1, 0.3, 0.5%첨가된 0.005M 인산나트륨 완충 용액(pH 7.0)에 일정량의 균주 배양액을 가하여 37°C에서 1.5시간 간격으로 처리한 후, 균주의 생존율을 조사하였다 (Figure 1-13, 1-14, 1-15). 그 결과 6시간 처리 후 모든 oxgal 용액에서 *Lr* 2084의 내 담즙성이 가장 우수하였다. 또한, 선발 균주 대부분이 0.1%와 0.3% oxgal 용액에서 시간이 경과함에 따라 성장이 약간 감소하다가 유지되는 형태를 보였으나, 0.5% oxgal 용액에서는 서서히 감소하는 형태를 보였다. 이들 결과를 고려해 볼 때 선발 균주는 매우 우수한 내 산성 및 내 담즙성을 갖고 있으며, 따라서 살아 있는 상태로 장내에 도달하는 균주의 빈도가 매우 높은 것으로 사료된다.

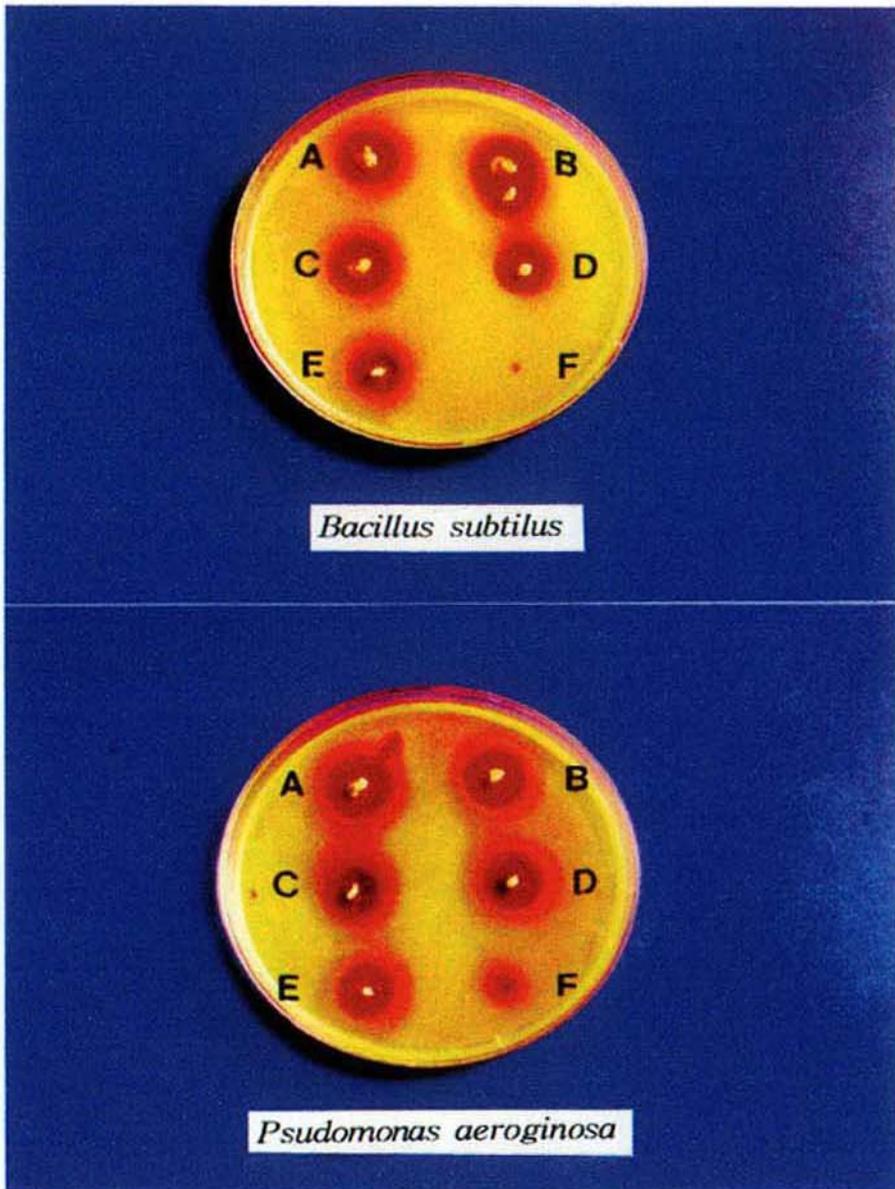


Figure 1-11. Observation of inhibitory zone formed by selected lactic acid bacteria against *Bacillus subtilis* or *Pseudomonas aeruginosa*. It was cultured on MRS plate for 48 hours at 37°C. A: *L.r* 2084 B: *L.c* 0781 C: *Lacto.l* 204 D: *Ef* 402 E: *L. acidphilus* F: *La* 145.

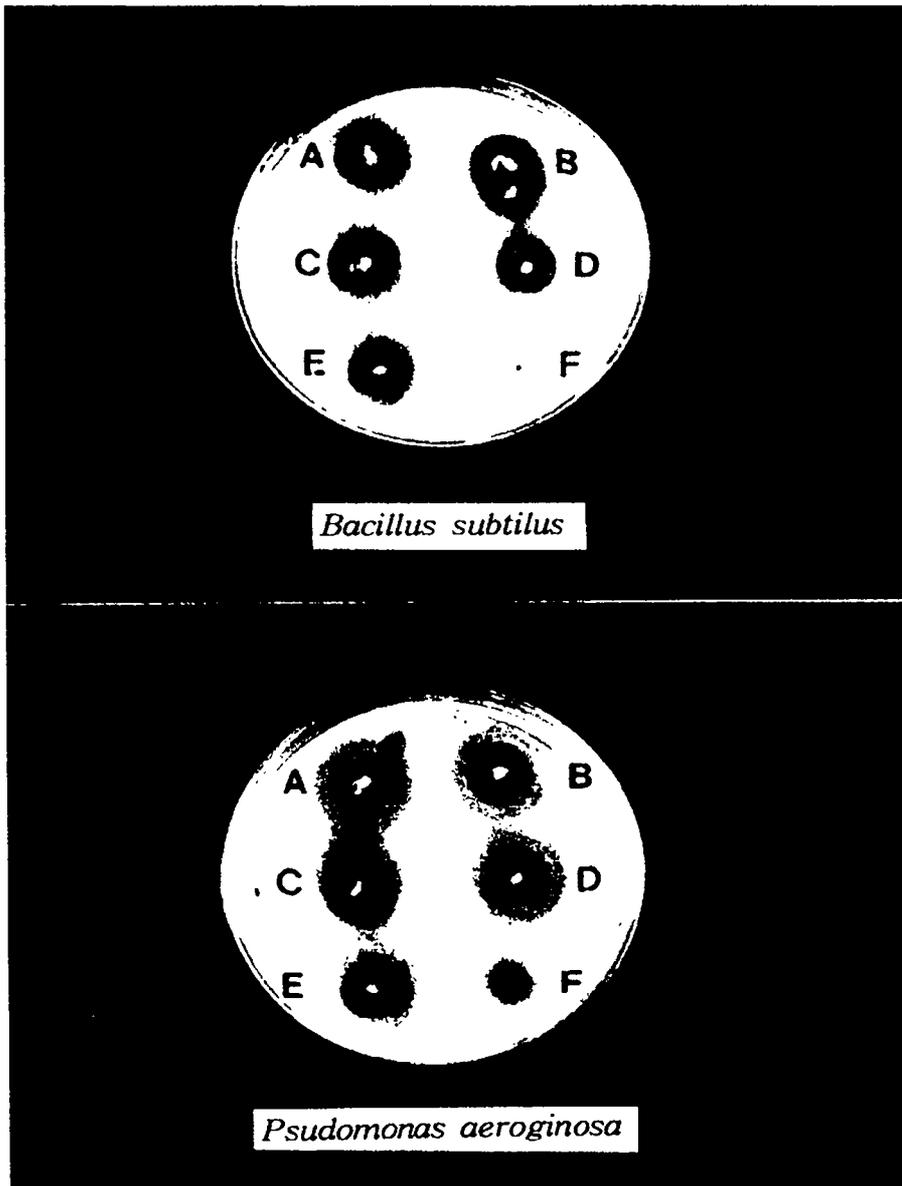


Figure 1-11. Observation of inhibitory zone formed by selected lactic acid bacteria against *Bacillus subtilis* or *Pseudomonas aeruginosa*. It was cultured on MRS plate for 48 hours at 37°C. A: *L.r* 2084 B: *L.c* 0781 C: *Lacto.l* 204 D: *Ef* 402 E: *L. acidphilus* F: *La* 145.

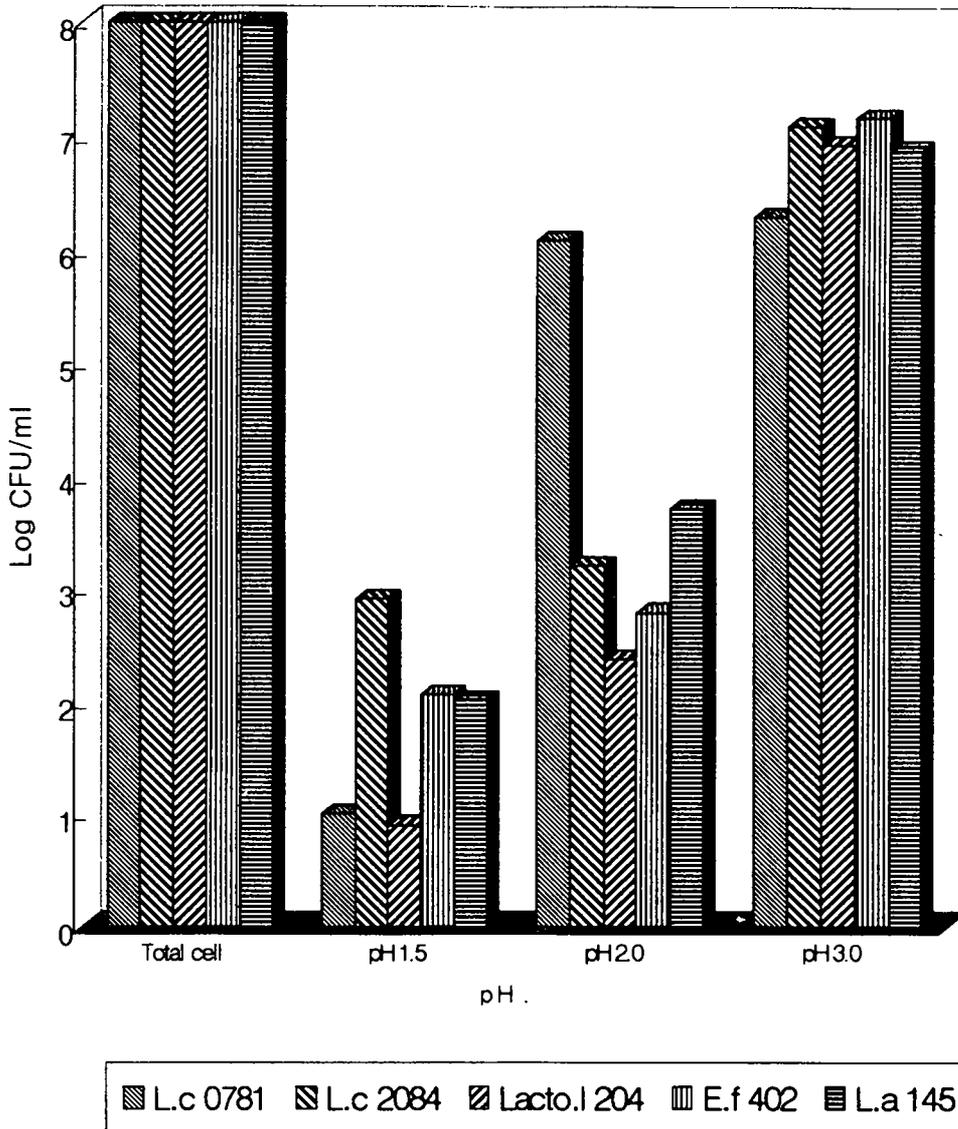


Figure 1-12. Tolerance against acid of the selected lactic acid bacteria.

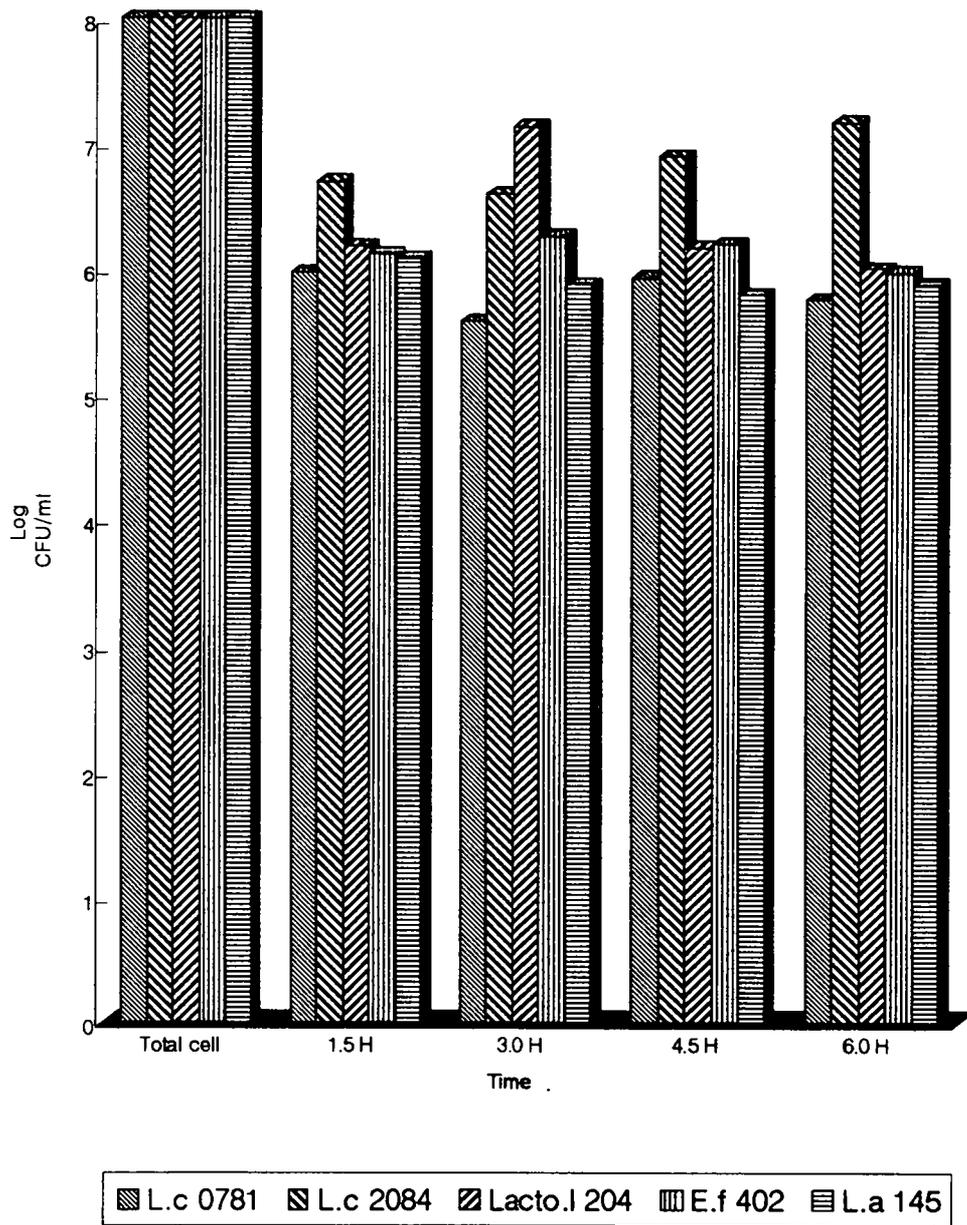


Figure 1-13. Tolerance against 0.1% oxgal of the selected lactic acid bacteria.

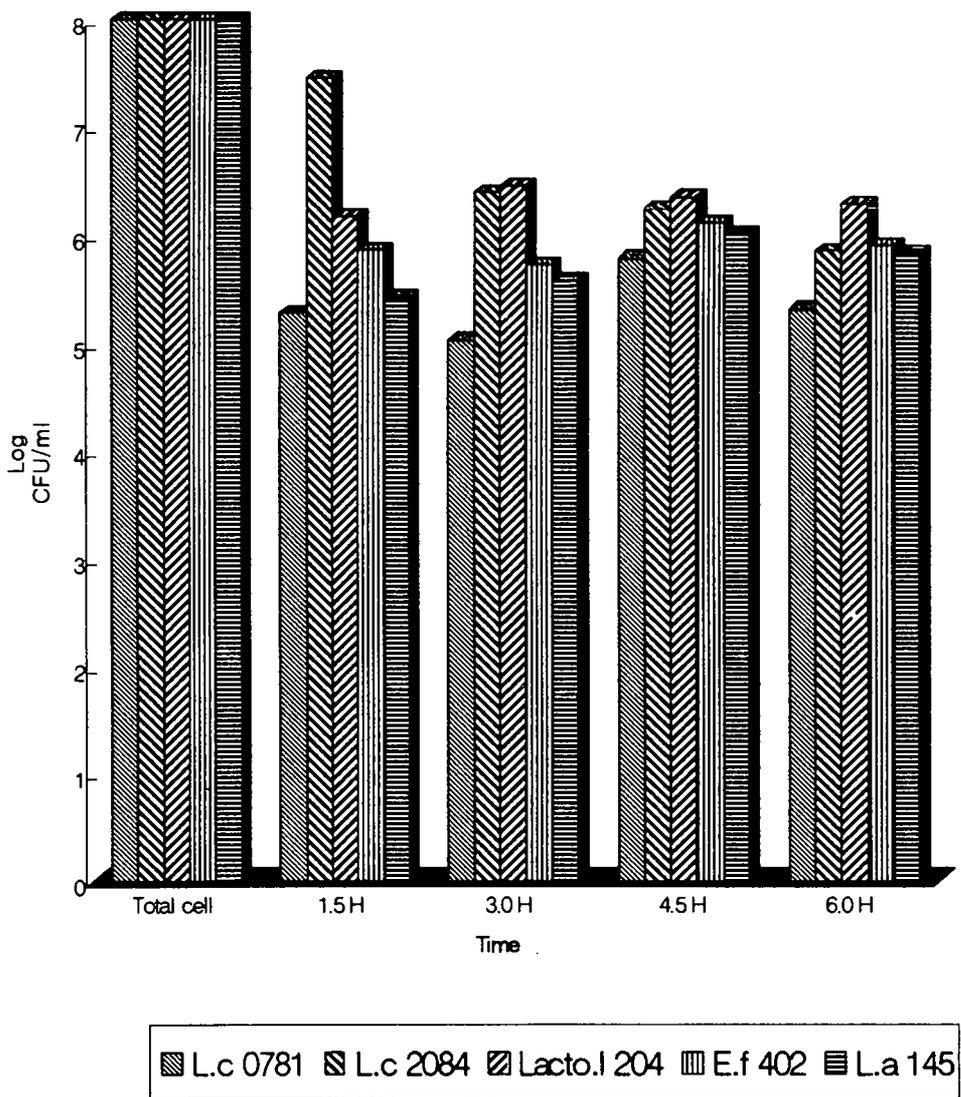


Figure 1-14. Tolerance against 0.3% oxgal of the selected lactic acid bacteria.

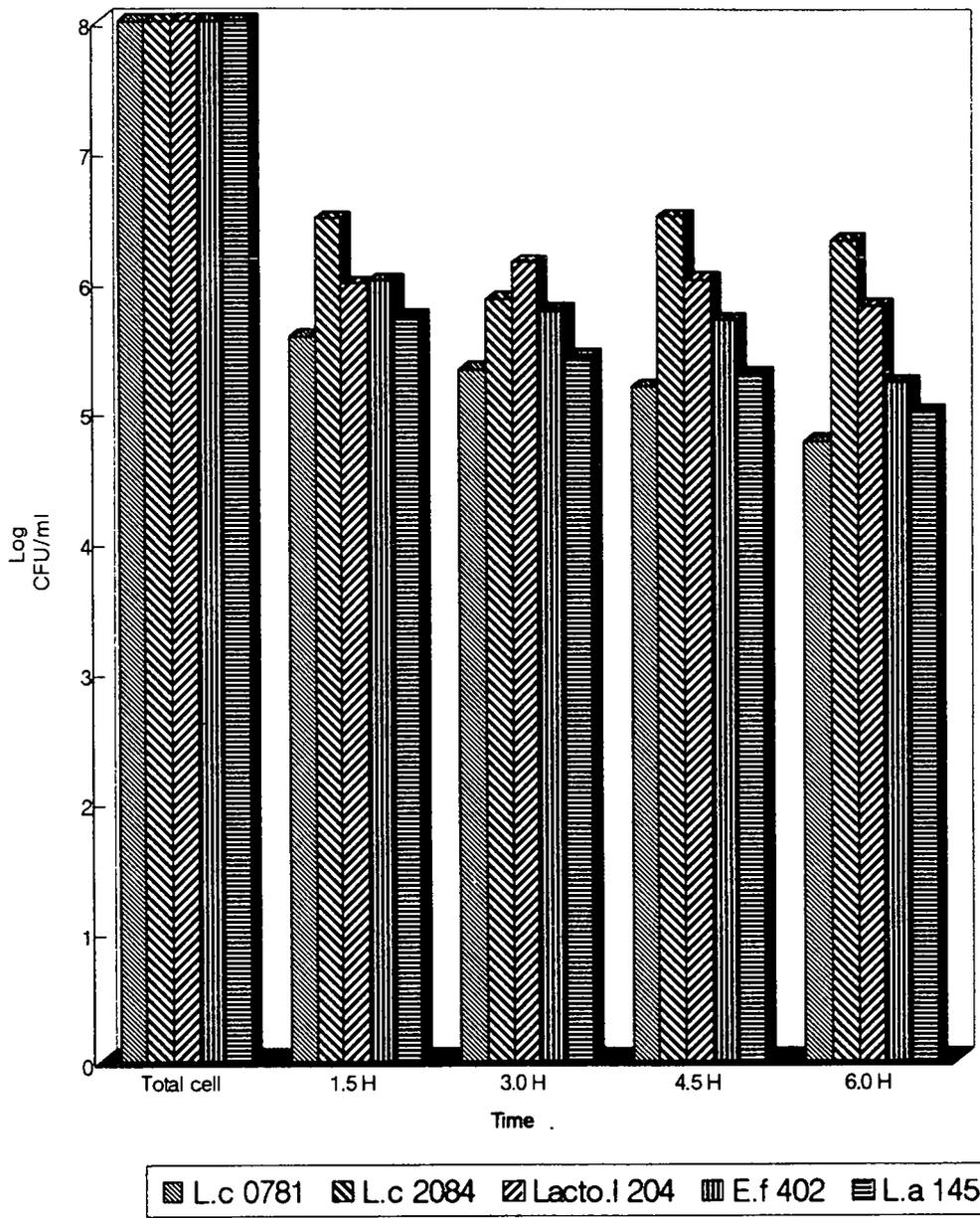


Figure 1-15. Tolerance against 0.5% oxgal of the selected lactic acid bacteria.

4. 선발 균주의 발효유 제조 조건 검토

가. pH 및 산도 변화

선발 균주를 각각 starter로 사용하여 5% 탈지분유가 첨가된 시유 배지에 접종한 후 37℃와 40℃에서 배양하며 시간 경과에 따른 pH 변화를 조사한 결과 Figure 1-16, 1-17에 나타낸 바와 같다. 요구르트 배양시 너무 높은 온도에서의 배양은 요구르트의 조직을 거칠게하여 품질에 나쁜 영향을 미친다는 백 등 (1991)의 보고에 따라 42℃에서의 발효유 제조는 배제하였다. 이 등 (1972)의 한국인이 선호하는 요구르트의 pH는 3.7~4.2이라는 연구 보고를 기준으로 선발 균주를 starter로 발효유를 제조하였을 때 이들 pH에 도달하는데 소요되는 시간과 그 때의 pH를 조사하였다. 37℃와 40℃에서 배양 4시간 때 *L.r* 2084 균주를 starter로 하는 시유 배지의 커드가 형성되었으며, 이때 *L.r* 2084의 pH는 각각 4.26, 4.19 이었다. *L.c* 0781은 37℃와 40℃에서 6시간 배양 했을 때 pH는 각각 4.27, 4.0이었다. 따라서 *L.r* 2084와 *L.c* 0781 균주의 커드 형성 및 pH 저하는 40℃에서 가장 빠르게 진행되는 것으로 나타났다. *Lacto.l* 204는 배양 12시간 때 37℃에서의 pH는 4.22였고, 40℃에서는 배양 10시간 때 4.36을 보임에 따라 40℃에서 보다는 37℃에서 더 좋은 결과를 보였다. *Ef* 402는 37℃와 40℃에서 12시간 배양했을 때 각각의 pH는 4.34, 4.25를 보여 40℃에서 더 좋은 발효유 제조 경향을 보였다. *La* 145는 37℃와 40℃에서 6시간 배양했을 때 각각 4.21, 4.13의 pH를 보임으로서 발효유 제조의 적정 온도는 40℃이었다. 고 등 (1991)은 발효유의 적정 산도는 1.0~1.1% 일 때 가장 좋은 품질을 나타낸다고 하였다. 따라서 적정 산도 변화를 선발 균주별로 조사하였으며 그 결과는 Figure 1-18, 1-19와 같다. 37℃에서 *L.r* 2084와 *Lacto.l* 204는 배양 6시간에 각각 1.11%, 0.99%

를 나타내었으며 이 때의 pH는 4.26, 4.75이었다. *L.c* 0781은 배양 8 시간에 1.03%, pH는 4.22이었고, *Ef* 402는 배양 12 시간에 1.04%, pH는 4.34로 선발 균주 중 가장 늦었으며, *La* 145는 배양 10 시간에 1.02%, pH는 3.84를 나타내었다. 40℃에서는 *L.r* 2084를 4 시간 배양 하였을 때 1.01%로 가장 빠르게 약 1.0%의 산도에 도달하였으며, 이 때의 pH는 4.19이었다. *L.c* 0781은 6 시간 배양하였을 때 1.1%의 산도와 4.0의 pH를 나타내었고, *Lacto. l* 204와 *La* 145는 8 시간 배양했을 때 각각 0.98%, 1.05%를 pH는 4.62와 4.01을 보였다. *Ef* 402는 12시간 배양하였을 때 1.2%, pH는 4.25를 나타내었다. 따라서 이들 선발 균주를 발효유 제조의 starter로 사용할 경우, *L.r* 2084와 *L.c* 0781은 40℃에서 각각 4 시간, 6 시간, *Lacto. l* 204는 37℃에서 6 시간, 그리고 *Ef* 402는 37℃ 및 40℃에서 12 시간 배양이 최적 발효유 제조 온도 및 시간으로 판단되었다. 이상의 결과를 신 등(1994)의 국내 시판 요구르트의 이화학적 특성에 대한 보고 내용과 비교했을 때 발효유 제조를 위한 starter로서 선발 균주의 사용이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

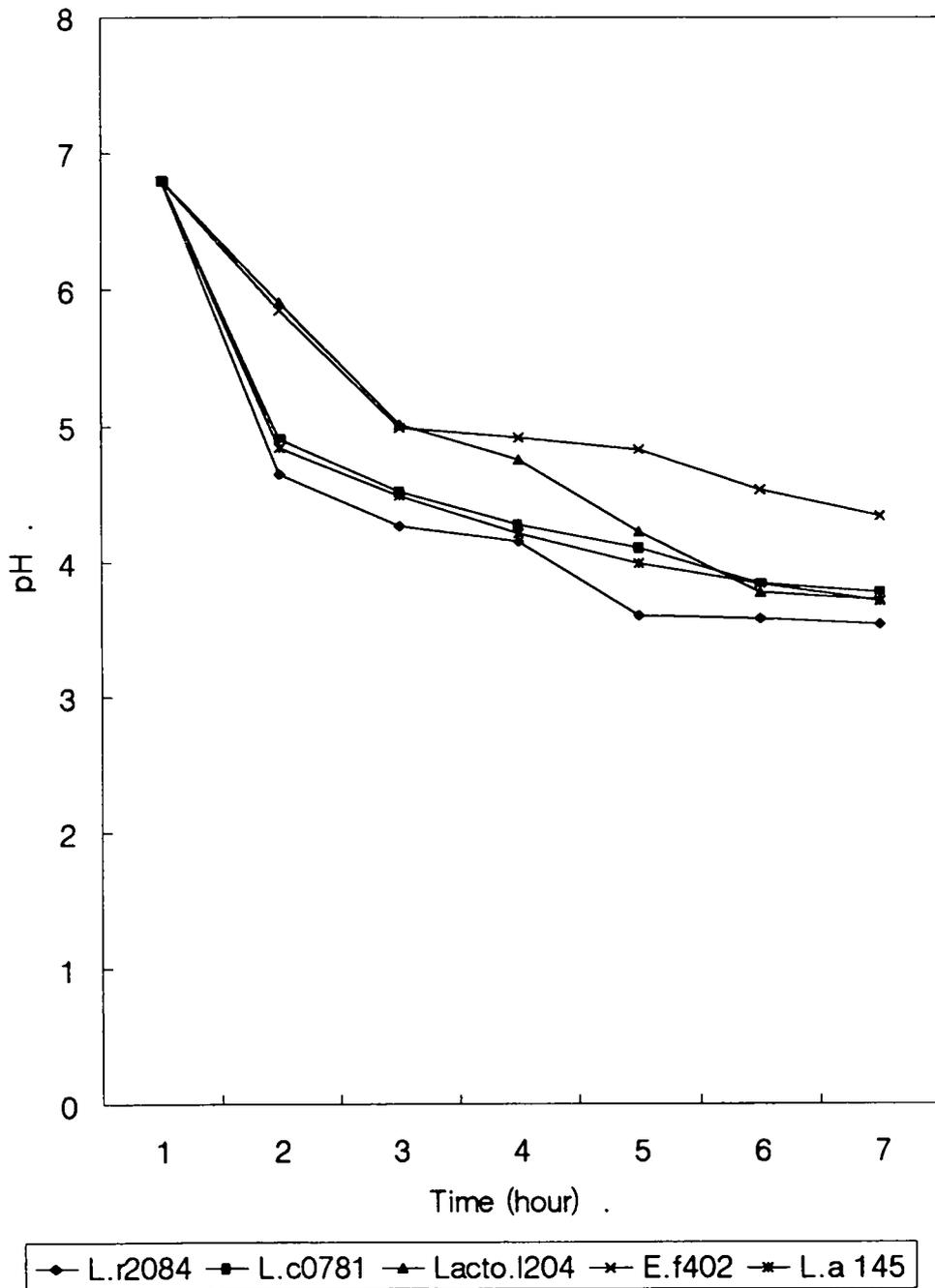


Figure 1-16. Change of pH of yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 37°C.

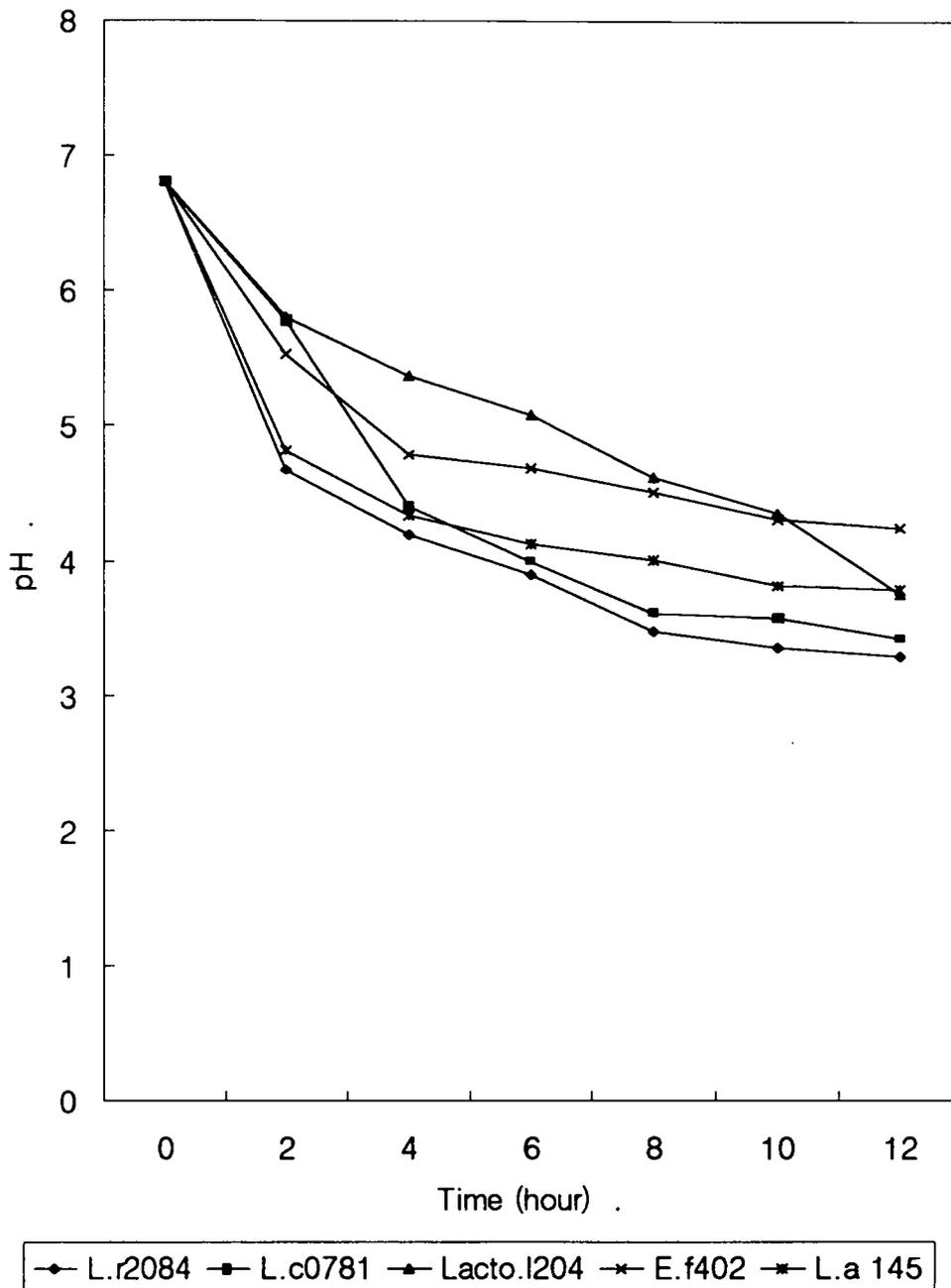


Figure 1-17. Change of pH of yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 40°C.

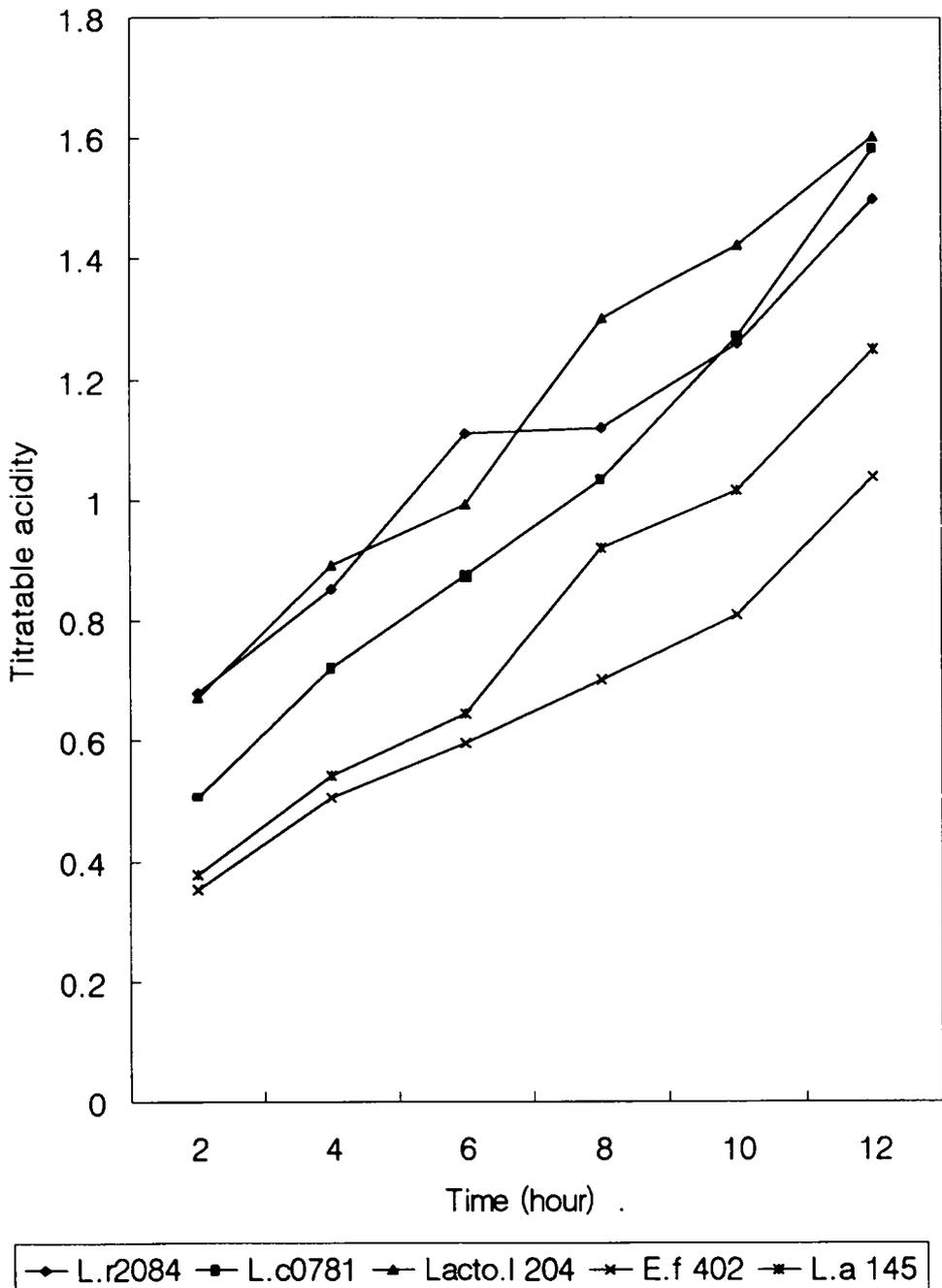


Figure 1-18. Change of titratable acidity(%) of yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 37°C.

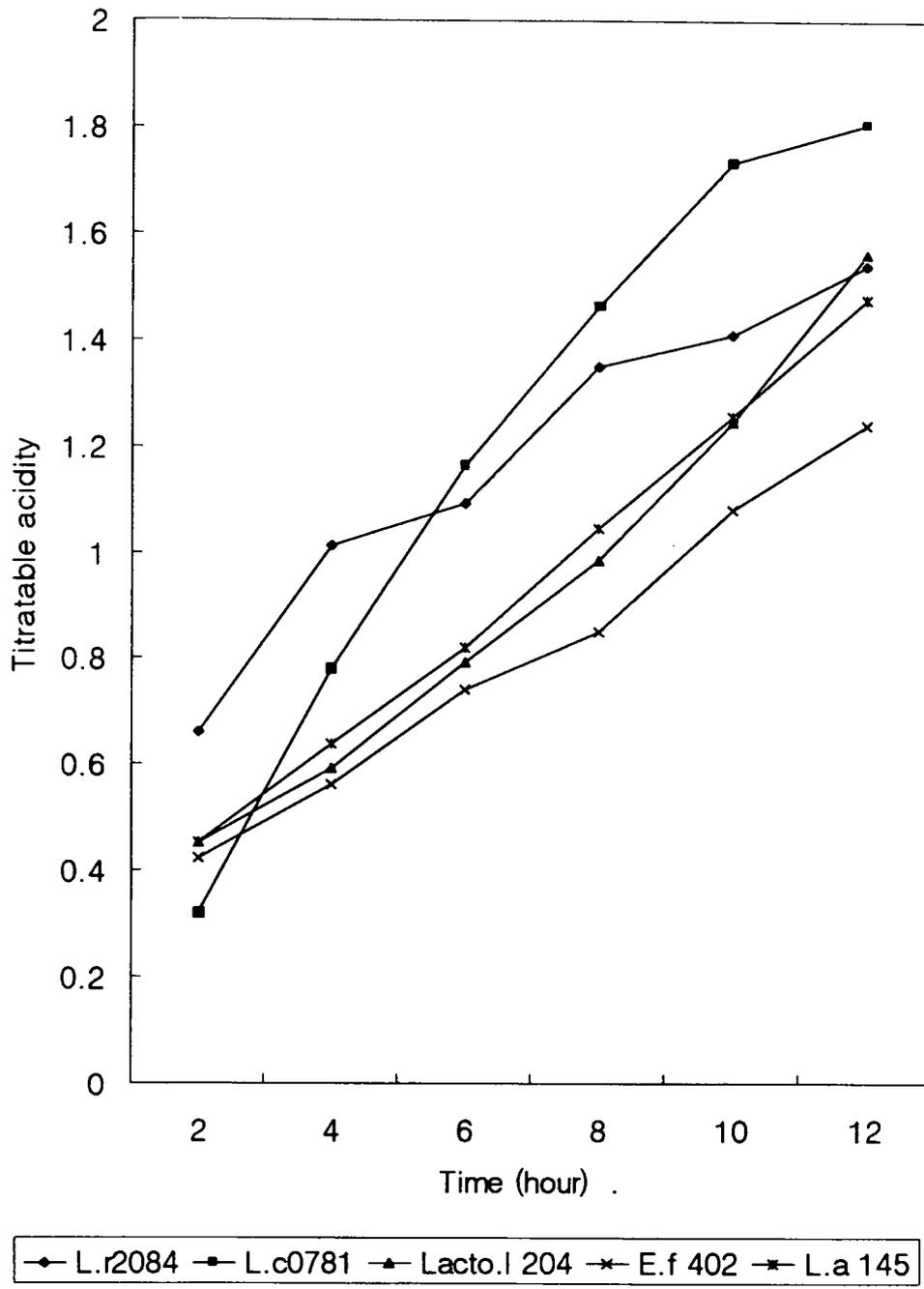


Figure 1-19. Change of titratable acidity(%) of yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 40°C.

나. 유산균수 및 완충능

선발 균주를 각각 starter로 사용하여 시유에 5%의 탈지분유를 첨가한 우유 액체 배지에 접종한 후 37℃와 40℃에서 배양하면서 시간 경과에 따른 유산균 수를 측정한 결과는 Figure 1-20, 1-21에 나타낸 바와 같다. 대부분의 균주가 37℃와 40℃에서 배양 12시간까지 서서히 지속적인 증가 경향을 보였으며, pH 및 산도에 의한 온도별 최적 배양 시간에 따른 생균수는 다음과 같다. 37℃에서 *L.c* 0781은 배양 8시간에 1.7×10^8 cfu/ml, *L.r* 2084는 배양 6시간에 3.6×10^7 cfu/ml, *Lacto.l* 204는 배양 6시간에 6.03×10^7 cfu/ml, *Ef* 402는 배양 12시간에 3.1×10^{10} cfu/ml, 그리고 *L.a* 145는 배양 10시간에 5.3×10^7 cfu/ml이었다. 또한, 40℃에서는 *L.c* 0781은 배양 6시간 때 2.5×10^7 cfu/ml, *L.r* 2084는 배양 4시간에 2.0×10^7 cfu/ml, *Lacto.l* 204는 배양 8시간에 7.8×10^7 cfu/ml, *Ef* 402는 배양 12시간에 3.8×10^{10} cfu/ml, 그리고 *L.a* 145는 배양 10시간에 4.8×10^7 cfu/ml이었다. 두 온도에서 *Lacto.l* 204의 균주가 가장 현저한 성장 속도와 균수를 보였다. 이는 규정 유산균수에 근사한 수준을 유지하였다.

또한 산과 염기에 대한 유산균의 완충능을 조사하기 위하여 산에 대한 완충능을 1.0N HCl, 염기에 대한 완충능은 1.0N NaOH를 사용하였으며, 배양 시간별 완충능에 대한 조사 결과는 Figure 1-22, 1-23, 1-24, 1-25에 나타낸 바와 같다.

산(1.0N HCl)에 대한 완충능(Figure 1-22, 1-23)은 37℃와 40℃에서 배양한 *L.r* 2084 균주가 가장 높았으며, 염기(1.0N NaOH)에 대한 완충능(Figure 1-24, 1-25)은 37℃와 40℃에서 배양한 *L.c* 0781 균주가 가장 높게 나타났다. 또한 37℃에서 *L.r* 2084는 배양 4시간 때 HCl은 14.23ml, NaOH는 8.05ml 소모되었으며, *L.c* 0781은 배양 8시간에 HCl은 14.33ml, NaOH는 14.59ml 이었다. *Lacto.l* 204는 배양 6시간에

12.64ml의 HCl과 10.19ml의 NaOH가 소모되었으며, *Ef* 402는 배양 12 시간에 14.0 ml의 HCl, 12.3ml의 NaOH, 그리고 *La* 145는 배양 10 시간에 15.95ml의 HCl과 11.4ml의 NaOH가 소모되었다. 또한 40℃에서는 *L.c* 0781의 경우 배양 6 시간 때 HCl과 NaOH가 각각 12.39, 12.91ml이었으며, *L.r* 2084는 배양 4 시간에 각각 13.77, 8.57ml로 나타났다. *Lacto.l* 204는 배양 8 시간에 HCl과 NaOH가 각각 11.29, 11.48ml이었고, *Ef* 402는 배양 12 시간에 각각 15.6, 13.5ml이었다. 그리고 *La* 145는 배양 10 시간에 14ml의 HCl과 11.85ml의 NaOH가 소모되는 것으로 나타났다. Martini 등 (1987)은 요구르트의 완충능은 전유보다 약 2.7배 높다고 보고하였으며, 이는 원료인 우유 성분 중 유단백질, 인산염의 함량, 그리고 유산균의 대사산물에 의해 달라진다고 하였다. Gianella 등 (1972)은 위의 산성 조건하에서 균의 사멸은 균과 같이 섭취한 식품의 물리적 보호 작용에 따라 달라지며, 완충능이 높은 것일수록 보다 많은 유산균이 살아 있는 상태로 장내에 도달할 수 있고 효소활성의 잔존 활성도 향상시킬 수 있어 정상 작용의 효과도 증대시킬 수 있다고 하였다. 국내 발효유의 경우, 발효유 50ml를 0.1N HCl 및 NaOH로 적정하였을 때 약 3.58~4.33ml의 HCl과 3.19~3.40ml의 NaOH가 소모되었다는 신 등 (1994)의 결과와 비교해 볼 때 본 연구에서는 100ml의 발효유로 수행하였으나, 객관적으로 판단해 볼 때 대단히 높은 산-염기의 완충능을 갖고 있는 것으로 관찰되었다.

다. 선발 균주의 발효유 제조 조건 확립

시유에 5%의 탈지 분유를 첨가한 후 각 선발 균주를 starter로 발효유 제조를 위한 각 균주의 배양 적정 온도 및 배양 시간은 pH, 산도, 유산균수, 그리고 완충능 등을 고려해 볼 때 *L.r* 2084와 *L.c* 0781은 40℃에서 각각 4 시간, 6시간, *Lacto. l* 204는 37℃에서 6 시간, 그리고 *Ef* 402는 37℃ 및 40℃에서 12 시간 배양이 최적 발효유 제조 온도 및 배양 시간으로 판단되었다. 대조 균주인 *La* 145는 40℃에서 8시간이었다. 따라서 선발 균주를 starter로 하는 이 후의 발효유 제조는 상기의 조건으로 제조하였다.

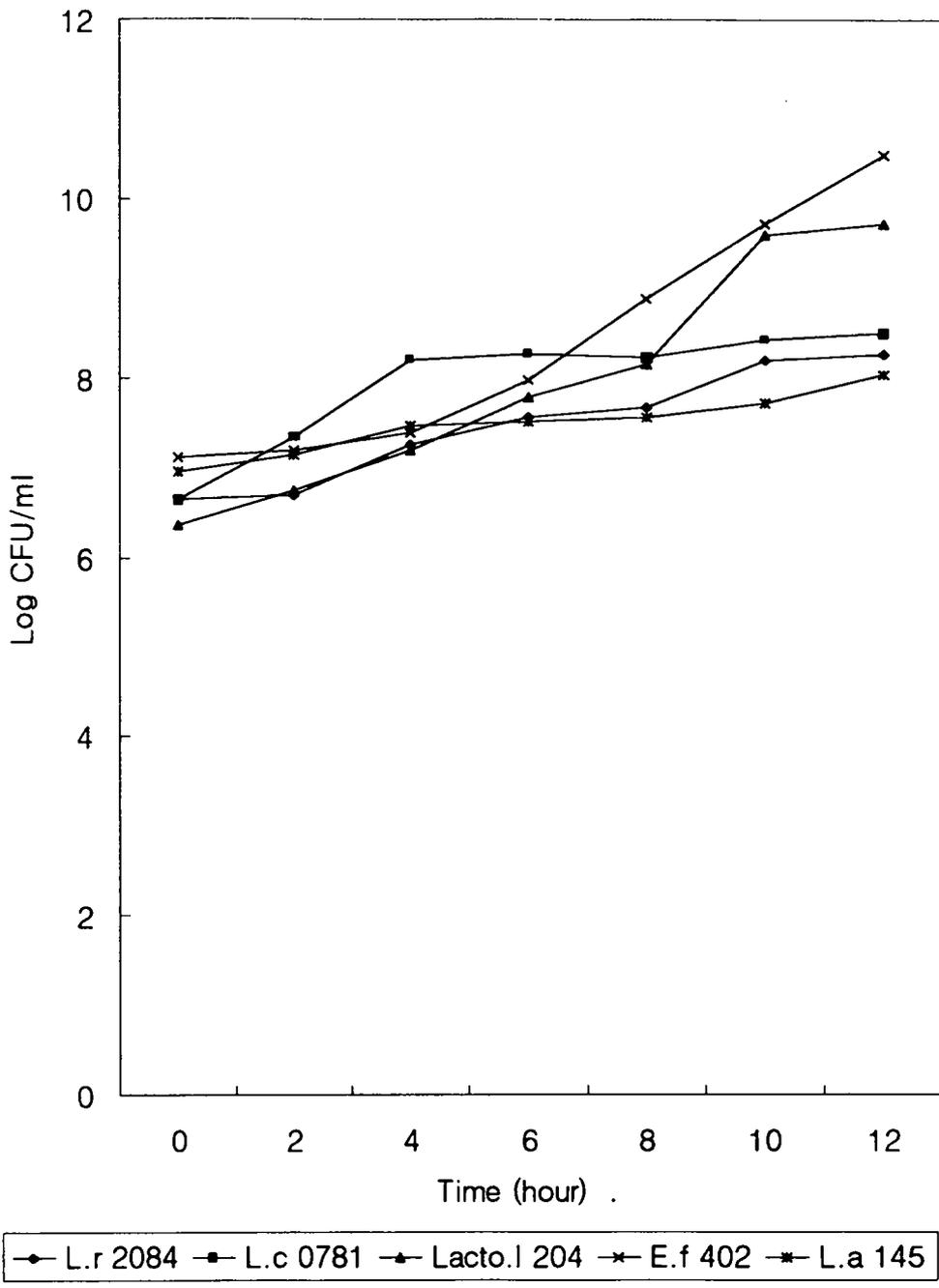


Figure 1-20. Change of cell count on yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 37°C.

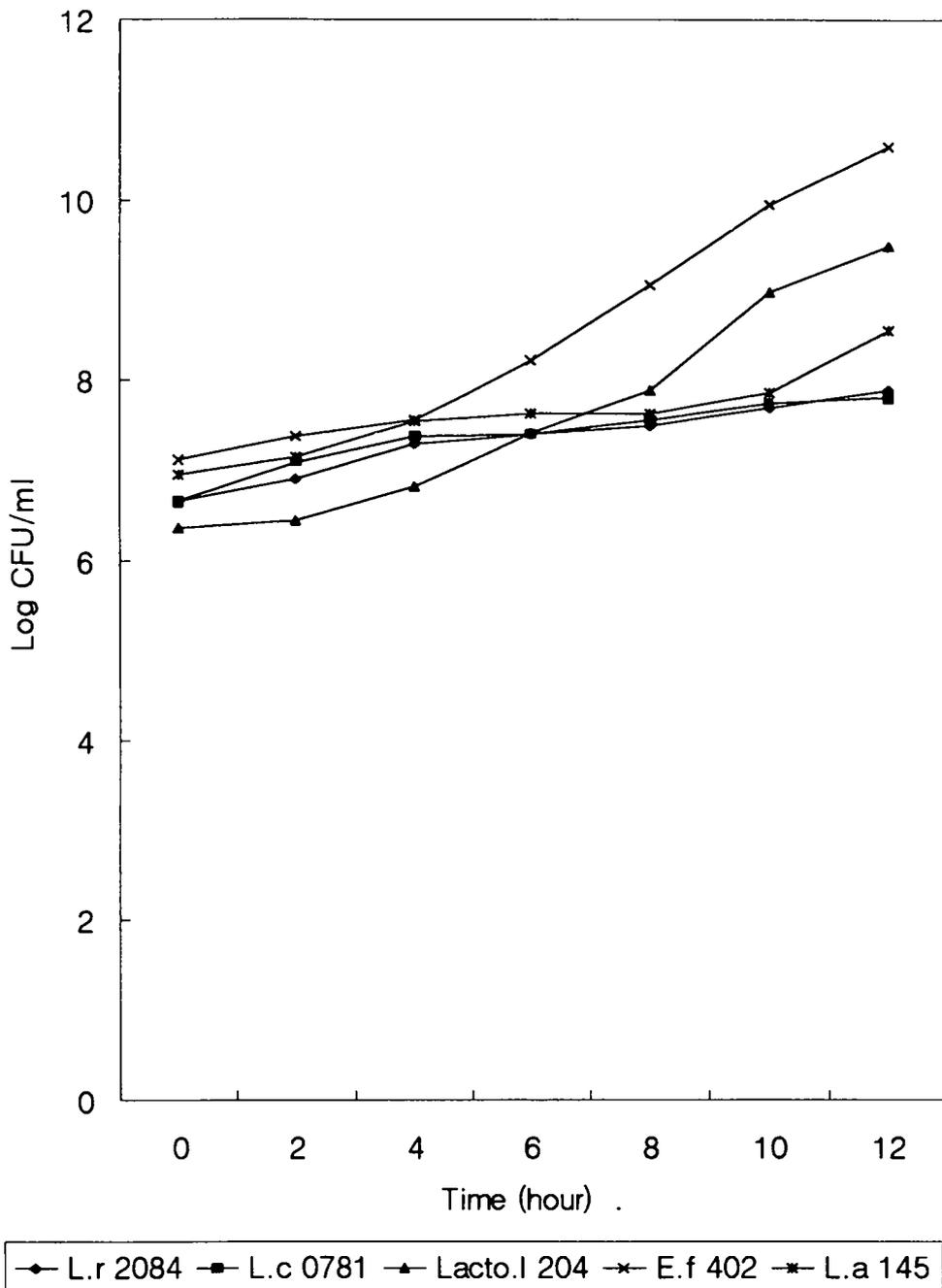


Figure 1-21. Change of cell count on yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 40°C.

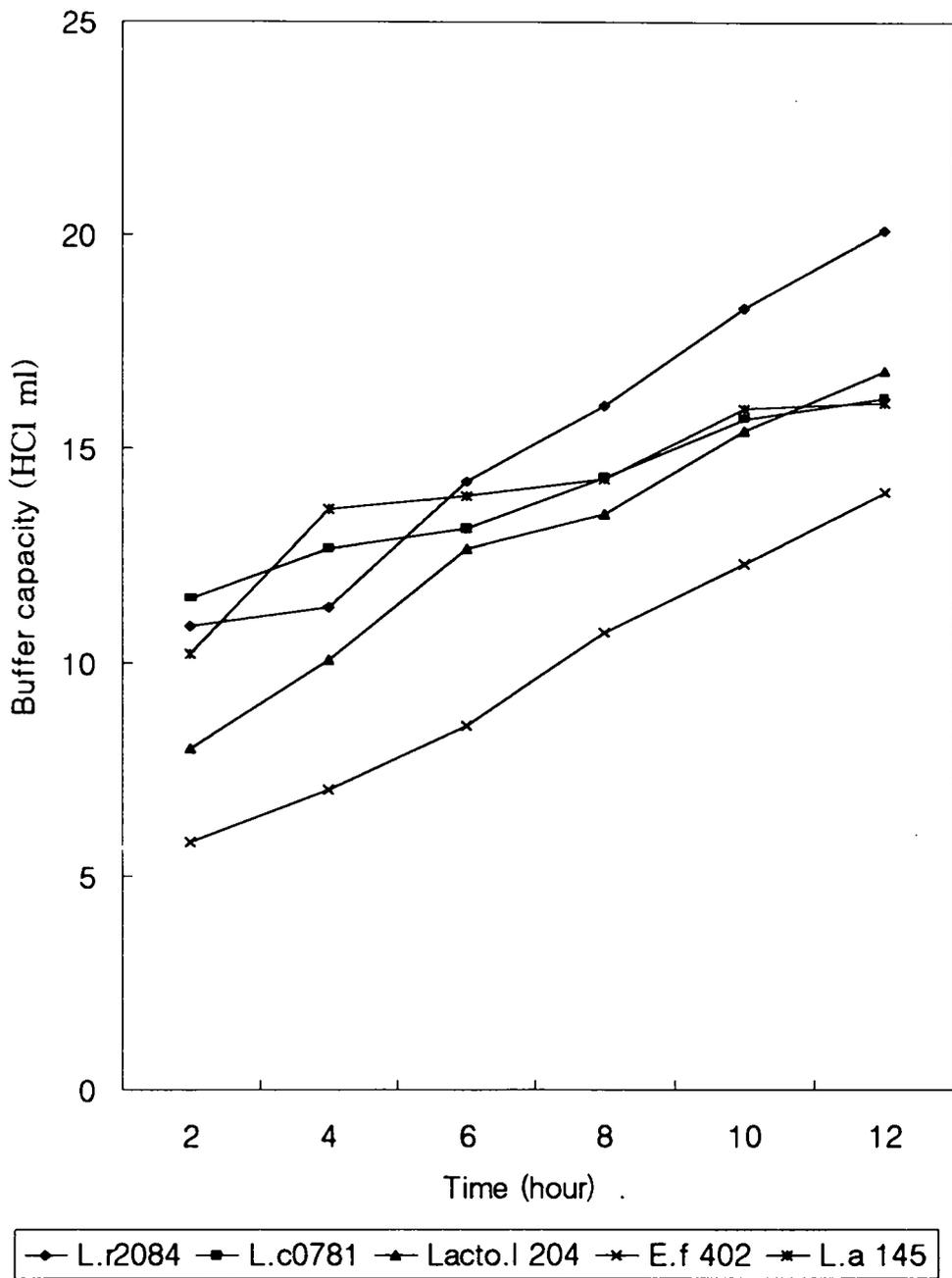


Figure 1-22. Change of buffer capacity against 1.0N HCl on yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 37°C.

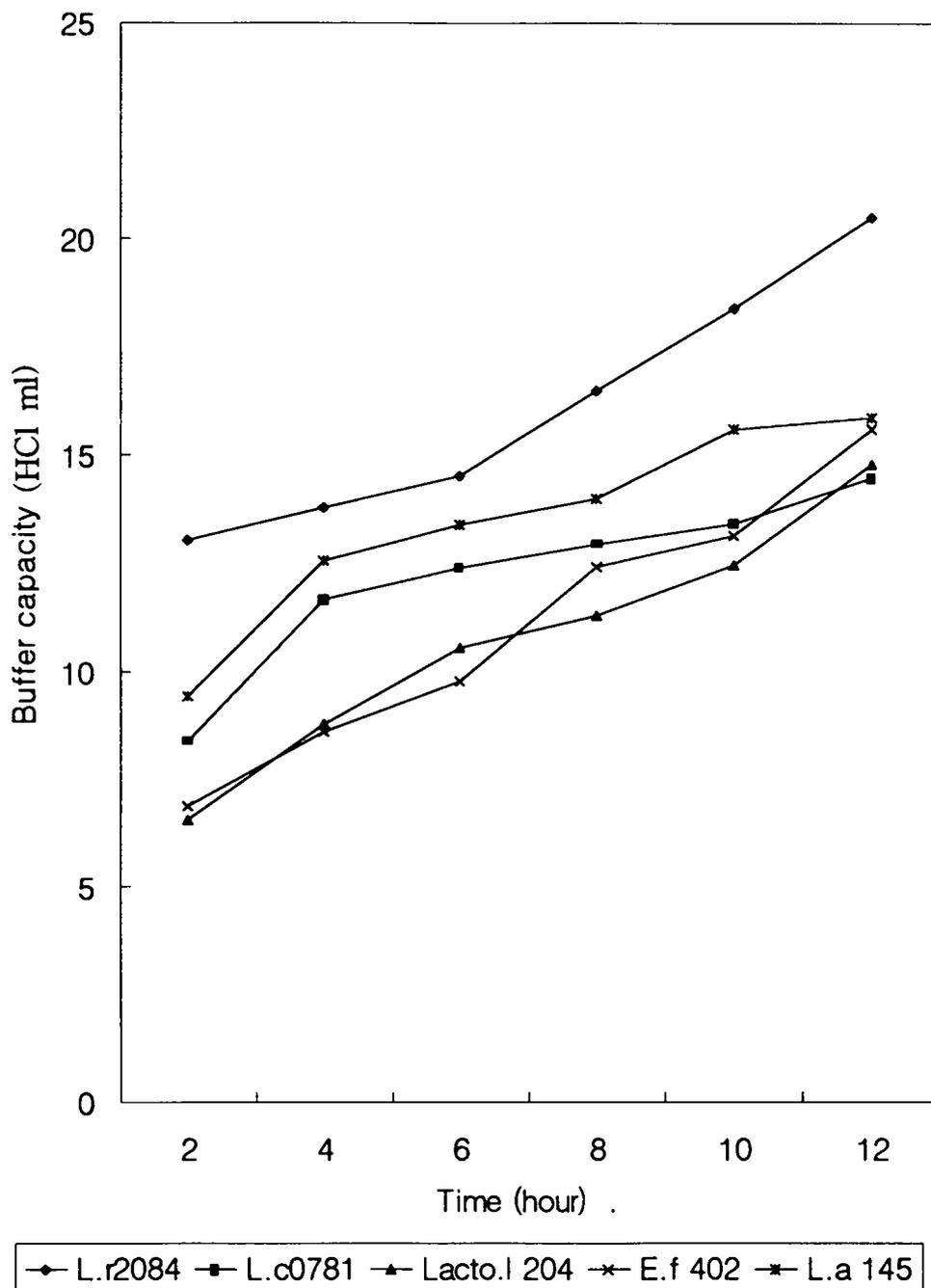


Figure 1-23. Change of buffer capacity against 1.0N HCl on yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 40°C.

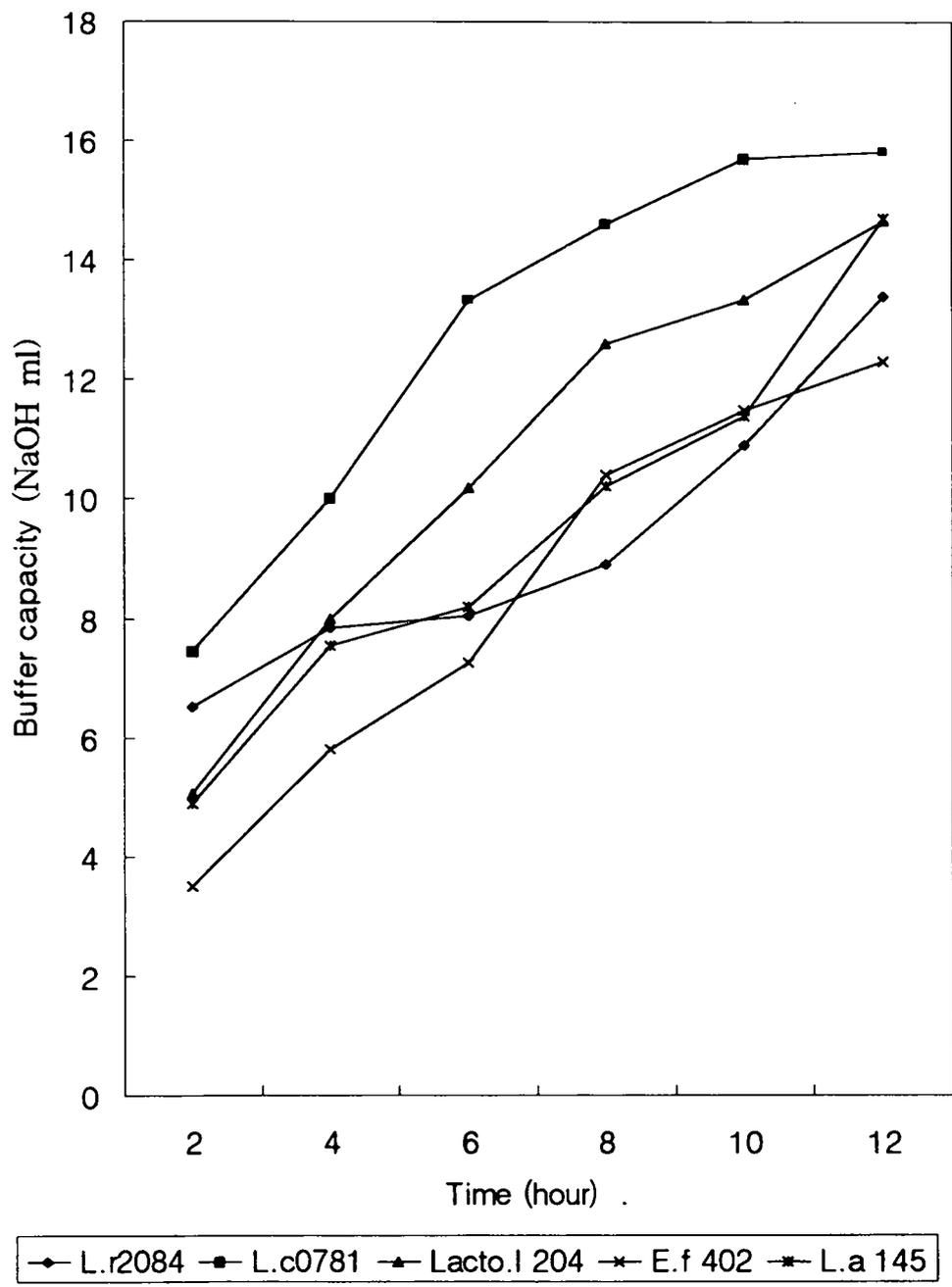


Figure 1-24. Change of buffer capacity against 1.0N NaOH on yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 37°C.

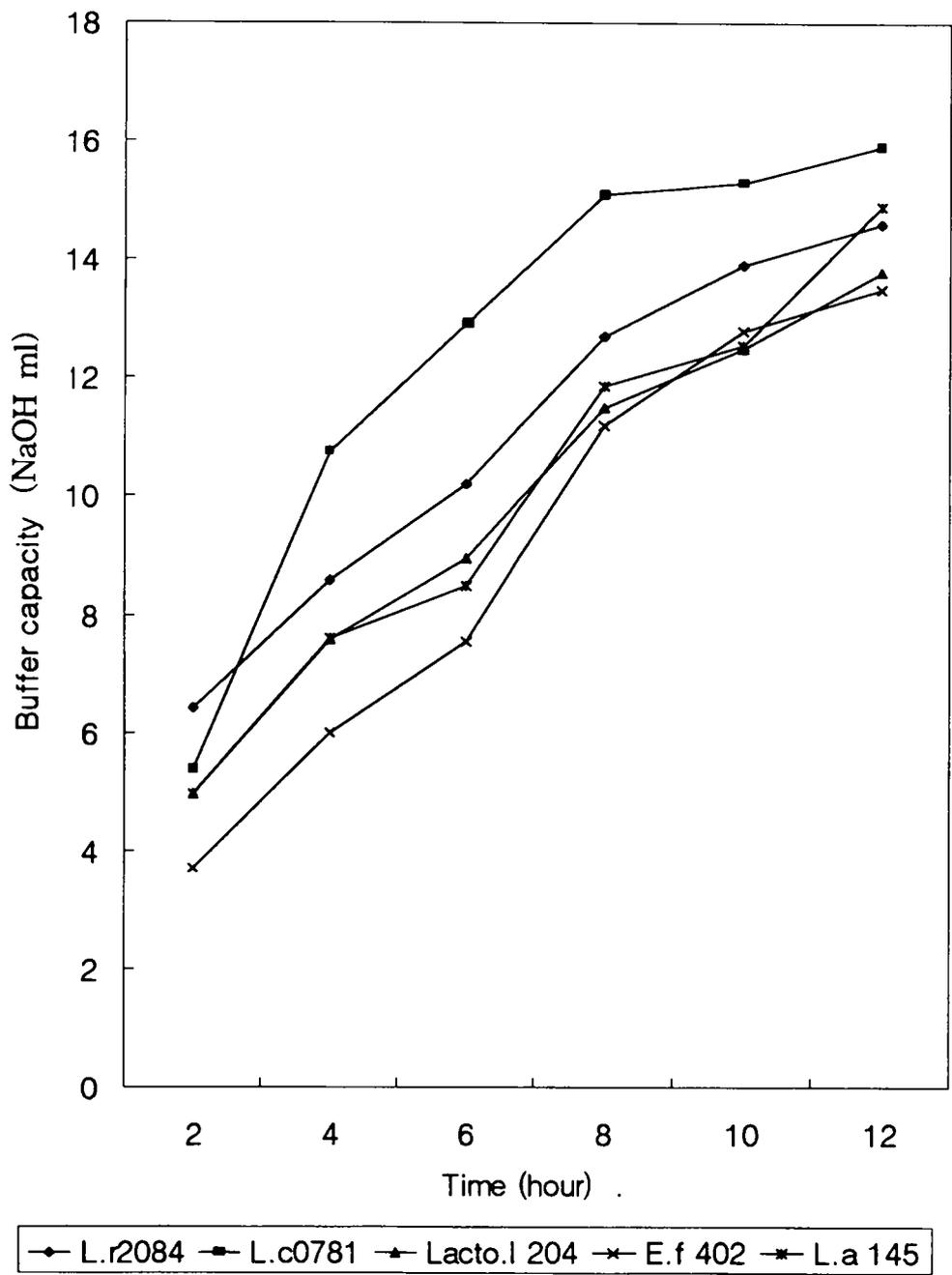


Figure 1-25. Change of buffer capacity against 1.0N NaOH on yogurt made with the selected lactic acid bacteria at 40°C.

라. 유기산 분석

선발 균주를 starter로 *L.r* 2084와 *L.c* 0781은 37℃와 40℃ 두 온도를 사용하여, *Lacto. l* 204는 37℃에서, 그리고 *Ef* 402와 *La* 145는 40℃에서 각각 제조한 요구르트를 변형한 Kim 등 (1993) 및 윤 (1983, 1987)의 방법에 따라 pH 8.1까지 중화하는데 0.1N NaOH용액 약 10ml가 소모되는 양의 상등액을 취하여 butyl ester화한 다음, ester를 hexane으로 추출, 건조하고 내부표준물질인 n-nonadecane을 첨가하여 20 ml로 정용하였다. 이 용액 1 μ l를 gas chromatography (GC, model Varian 3600cx, USA)를 이용하여 분석하였다. 표준물질도 동일한 방법으로 처리하였으며 Figure 1-26에서 보는 바와 같은 chromatogram을 얻었다. 이들 각 peak의 retention time은 Table 1-5와 같으며, Figure 1-26의 표준물질의 peak와 retention time을 근거로 internal standard method로 각 물질의 함량을 정량한 결과는 Table 1-6에서와 같다. Acetic acid는 *L.c* 0781을 40℃에서 배양하였을 때 1.14 mg/g으로 가장 높았으며, lactic acid는 *L.r* 2084를 40℃에서 배양하였을 때 8.11 mg/g으로 가장 높게 나타났다. 또한 succinic acid는 0.2969mg/g으로 *L.r* 2084를 37℃에서 배양하였을 때 가장 높았고, citric acid는 *L.r* 2084를 40℃에서 배양하였을 때 0.136 mg/g으로 가장 낮은 값을 나타내었다. *L.r* 2084와 *L.c* 0781의 경우 37℃에서 보다 40℃에서 lactic acid 및 acetic acid의 생성량이 많았으며 citric acid의 양은 낮았다. 이는 일반적으로 citric acid는 발효에 의해 lactic acid 및 acetic acid 등으로 변화되어 요구르트의 풍미를 나타낸다는 김 등 (1995)의 보고와 일치하였다. 또한 lactic acid의 함량이 대조구인 *La* 145를 제외한 모든 선발 균주의 경우, 6.59~8.11 mg/g의 범위로 나타나, 요구르트의 lactic acid의 농도는 7.5~9.9 mg/g이라는 Rasic 등 (1978)의 보고와 유사하였다. 최 등 (1990)은 우유 요구르트의 경우 24

시간 발효 후 lactic acid의 함량이 acetic acid 함량의 9~10배 정도이며, lactic acid가 요구르트의 주요 유기산이라고 보고하였는데 이들 연구 보고에 선발 균주를 starter로 제조한 발효유의 결과가 일치하였다.

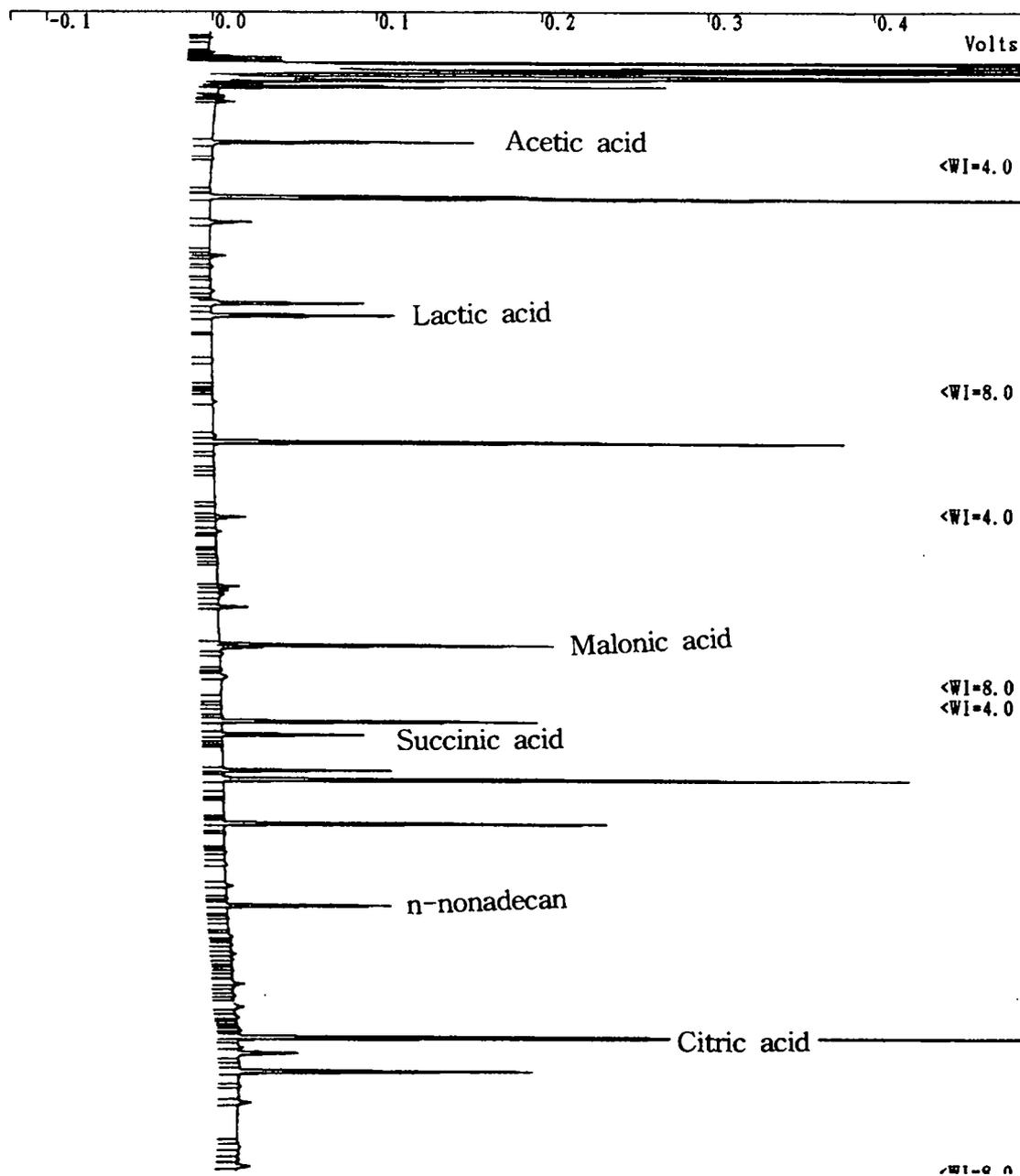


Figure 1-26. Chromatogram of standard materials for analysis of organic acid.

Table 1-5. Retention time of butyl ester derivative of standard organic acids.

Standard organic acids	Retention time(min.)
Acetic acid	5.537
Propionic acid	8.969
Butyric acid	12.212
Lactic acid	12.790
Malonic acid	26.198
Fumaric acid	26.304
Malic acid	29.299
Succinic acid	29.846
Glutaric acid	31.718
Tartaric acid	33.538
Isocitric acid	41.997
trans-Aconitic acid	42.271
Citric acid	42.909

Table 1-6. Organic acids of yogurt made by selected lactic acid bacteria.

unit: mg/g

Materials	Acetic acid	Lactic acid	Malonic acid	Succinic acid	Citric acid
<i>L.c</i> 0781 at 37°C	0.76	6.62	0.0109	0.2768	0.4780
<i>L.c</i> 0781 at 40°C	1.14	7.79	0.0105	0.2059	0.3281
<i>L.r</i> 2084 at 37°C	0.65	7.48	0.0153	0.2969	0.1416
<i>L.r</i> 2084 at 40	0.71	8.11	0.0881	0.1651	0.1360
<i>Lacto.l</i> 204 at 37°C	0.89	7.40	0.0519	0.1502	0.3813
<i>E.f</i> 402 at 40°C.	0.62	6.59	0.0216	0.1152	0.5756
<i>La</i> 145 at 40°C	0.92	4.83	0.1060	0.1161	0.3549

mean values of triplications.

6. 선발 균주의 콜레스테롤 저하기능 조사

가. 초음파 파쇄에 의한 세포 저항성

선발 균주를 MRS-Thio 액체 배지와 0.3% oxgal 및 cholesterol이 첨가된 MRS-Thio 액체 배지에 각각 접종하여 37°C에서 배양한 후 회수하고 다시 멸균 증류수로 현탁하였다. 이 중 일부를 얼음 위에서 15분간 90 uA의 출력으로 초음파 파쇄기 (Ultrasonics Ltd.)를 이용하여 파쇄한 다음 회석 평판법으로 균주 생균수를 조사하였으며 그 결과는 Table 1-7에서 보는 바와 같이 MRS-Thio 액체 배지에서 보다 0.3% oxgal 및 water soluble cholesterol을 포함하는 MRS-Thio 액체 배지에서 성장한 균주가 초음파 파쇄에 대한 저항성이 높게 나타났다. 콜레스테롤을 assimilation하는 유산균을 cholesterol이 포함되지 않은 배지에서 배양하였을 때 초음파 파쇄율이 95%이고, cholesterol이 포함된 액체 배지에서 배양하였을 때 파쇄율이 17% 정도였다는 Noh (1995)의 보고와 비교할 때 본 선발 균주의 파쇄 정도에서 다소 차이가 있으나 이는 초음파 파쇄기 및 균주의 종류, 실험 조건에서 다소 차이가 있기 때문으로 사료된다. 이러한 초음파 파쇄에 대한 유산균주의 저항성의 향상은 성장배지에 첨가된 cholesterol이 유산균주의 세포막 및 세포벽의 성분에 어떠한 변화를 초래한 때문으로 Kim과 Gilliland (1997)등은 가정하였다. 또한 *L. acidophilus*가 콜레스테롤 assimilation 배지에서 성장하는 경우, Gram positive 염색이 잘 되지 않으며, lysozyme에 의한 lysis와 sonication에 의한 파쇄에 더 강한 저항성을 보이고, 단순히 MRS 성장 배지에서 성장한 균주의 세포막 성분과는 다르다고 보고한 바 있다.

Table 1-7. Comparison of lysis by sonication of cells of lactic acid bacteria in the presence and absence of cholesterol and bile salts.

Strains & media		Control (CFU/ml)	Sonicated (CFU/ml)	Disruption of cells(%)
<i>L.c</i> 0781	Media A ¹⁾	1.5×10^8	3.8×10^6	97.5
	Media B ²⁾	7.5×10^7	2.6×10^7	65.3
<i>L.r</i> 2084	Media A	3.3×10^7	2.3×10^6	93.0
	Media B	6.0×10^7	2.6×10^7	56.7
<i>Lacto.l</i> 204	Media A	1.8×10^7	1.9×10^6	89.5
	Media B	1.1×10^7	4.7×10^6	57.3
<i>Ef</i> 402	Media A	1.5×10^7	3.2×10^6	78.7
	Media B	1.2×10^7	9.4×10^6	21.7
<i>L.a</i> 145	Media A	2.1×10^8	2.5×10^6	98.8
	Media B	6.1×10^7	2.5×10^7	59.0

* Cells were grown in Media A or Media B for 24 hrs at 37°C and sonicated for 15min with sonicator(Ultrasonics Ltd.).

*1. Media A : MRS-THIO broth.

*2. Media B : MRS-THIO broth containing 0.3% of oxgal and 100ug/ml of water soluble cholesterol.

나. Thin layer chromatography(TLC)에 의한 유산균 세포 내 콜레스테롤 저하기능 탐색

Dashkevicz 등 (1989)의 방법을 약간 변형하여 0.3%의 oxgal 및 $1\alpha,2\alpha$ [N]- 3 H-cholesterol, 그리고 cold로 water soluble cholesterol을 첨가한 MRS-Thio 액체 배지에 선발 균주를 접종하여 배양한 다음 ethylacetate로 추출하였다. 이것을 TLC plate(RP-8 F Merck Co.)에 spot하여 isooctane-isopropyl ether-isopropanol-acetic acid(2:1:1:1) 용액으로 전개 및 건조하고 radiation film에 전이한 후 Bio-imaging analyzer (BAS-1500, Fuji, Japan)로 영상 분석한 결과, Figure 1-27에서 보는 바와 같이 $1\alpha,2\alpha$ [N]- 3 H-cholesterol만을 전개한 control과 같은 위치에서 선발 균주의 배양 배지 및 세포 균체 추출물의 radiation activity가 관찰되었다. 따라서 선발 균주의 배양 배지 및 세포 균체에서 추출된 cholesterol이 대사 되지 않은 상태로 존재함을 알 수 있었다.

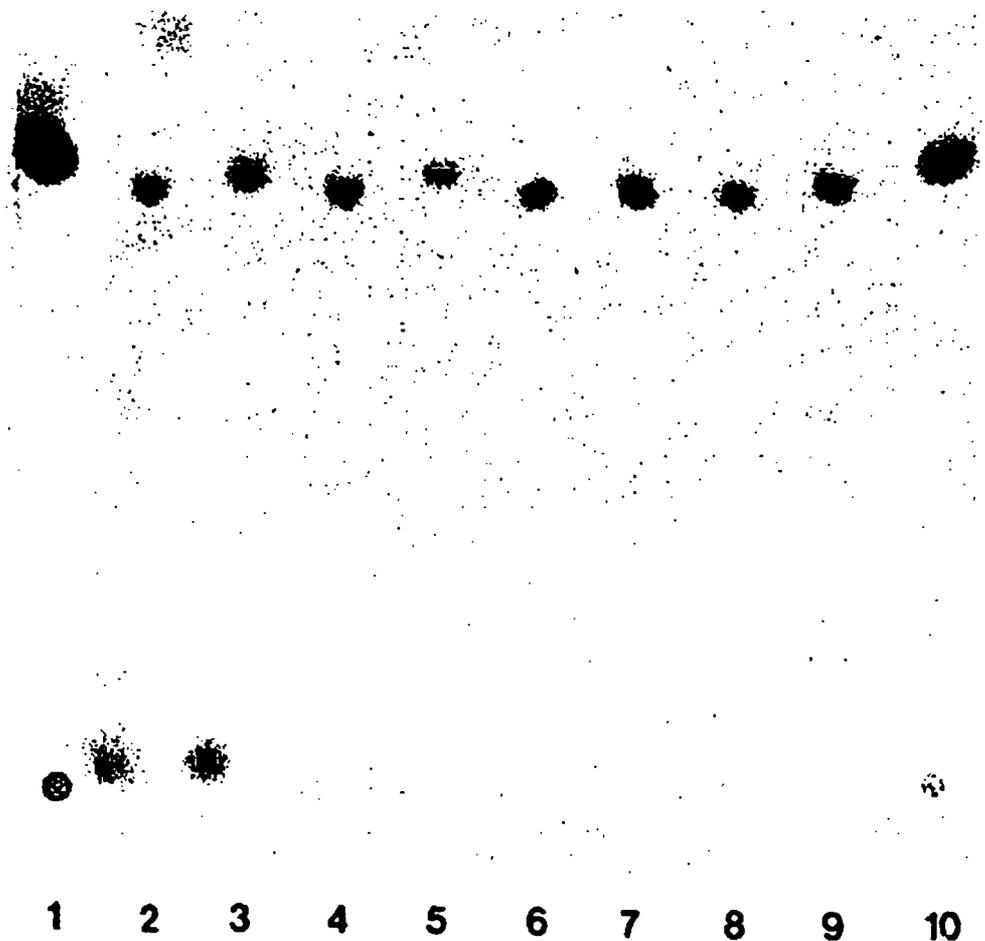


Figure 1-27. Thin-layer chromatogram of ethyl acetate extracted cholesterol from spent broth and cell pellet of the lactic acid bacteria.

1, 10: control($1\alpha,2\alpha$ [N]- 3H -cholesterol) 2: spent broth of *L.c* 0781
 3: cell pellet of *L.c* 0781 4: spent broth of *L.r* 2084 5: cell pellet of *L.r* 2084
 6: cell pellet of *Lacto.l* 204 7: cell pellet of *E.f* 402
 8: spent broth of *L.a* 145 9: cell pellet of *L.a* 145.

다. Gas chromatography에 의한 유산균의 콜레스테롤 저하
기능 탐색

0.3%의 oxgal과 water soluble cholesterol을 첨가한 MRS-Thio 액체 배지에 *L.r* 2084 균주를 접종하고 배양한 후 회수하여 Hepes (pH7.0) 용액으로 균체를 세척, 회수 및 10mM NaCl을 포함한 동일 용액으로 재 현탁하였다. 여기에 0.5mg/ml의 lysozyme을 가하여 균체를 용균한 다음, 원심 분리하여 상등액과 pellet을 분리하고 분리된 상등액을 초고속 원심 분리하였다. 이렇게 얻어진 pellet을 n-hexane으로 추출하여 G.C 분석하였다. 그 결과 Figure 1-28, 1-29에서 보는 바와 같이 내부 표준 물질인 5α -cholestan과 cholesterol의 standard chromatogram에서의 peak와 비교했을 때 동일한 retention time (Table 1-8)에서 두 개의 주 peak를 얻었으며, cholesterol의 대사산물로 여겨지는 peak는 관찰되지 않았다. 또한 Figure 1-30에서 보는 바와 같이 *L.a* 145에서도 동일한 결과를 보였다. Gilliland 등 (1985)은 *L. acidophilus* 균주가 성장 배지에서 성장하는 동안 세포에 의해서 콜레스테롤이 assimilation 된다고 하였으며, Klaver 등 (1993)은 pH 6.0에서 유산균에 의한 콜레스테롤 저하가 관찰되지 않음에 따라 *L. acidophilus*에 의한 콜레스테롤의 assimilation은 유산균이 성장하는 동안 bile acid가 deconjugation됨으로서 free bile acid와 함께 콜레스테롤이 동반 침전하는 때문이라고 주장하였다. 그러나, Noh (1995)는 pH를 6.0으로 유지하며 *L. acidophilus*에 의한 콜레스테롤의 저하를 관찰하였으며, 콜레스테롤의 저하는 free bile acid와 관계가 없다고 하였다. 또한 Razin 등(1967, 1980)은 mycoplasma 세포막내로의 콜레스테롤의 통합을 보고하며, 세포막내로 통합된 콜레스테롤이 막의 장력을 증가시킨다고 하였다. 이러한 보고 내용과 TLC 분석, G.C 분석, 그리고 초음파 파쇄에 대한 저항성 향상 등의 결과를 종합해 볼 때

유산균에 의한 cholesterol의 대사는 이루어지지 않고 있으며 단지, 세포막 또는 세포벽 내에 침착 또는 흡수, 통합되어 세포막 성분으로 포함됨에 따라 세포막 또는 세포벽 성분 변화의 원인 물질로 작용하는 것으로 사료된다. 이는 HPLC를 이용한 Kim 등 (1997)의 *L. acidophilus*의 세포막 성분 fraction의 분석 결과와 동일하였다.

Table 1-8. Retention time of cholesterol for analysis of gas chromatography

Material	Retention time
5 α -cholestan	16.16
cholesterol	23.51

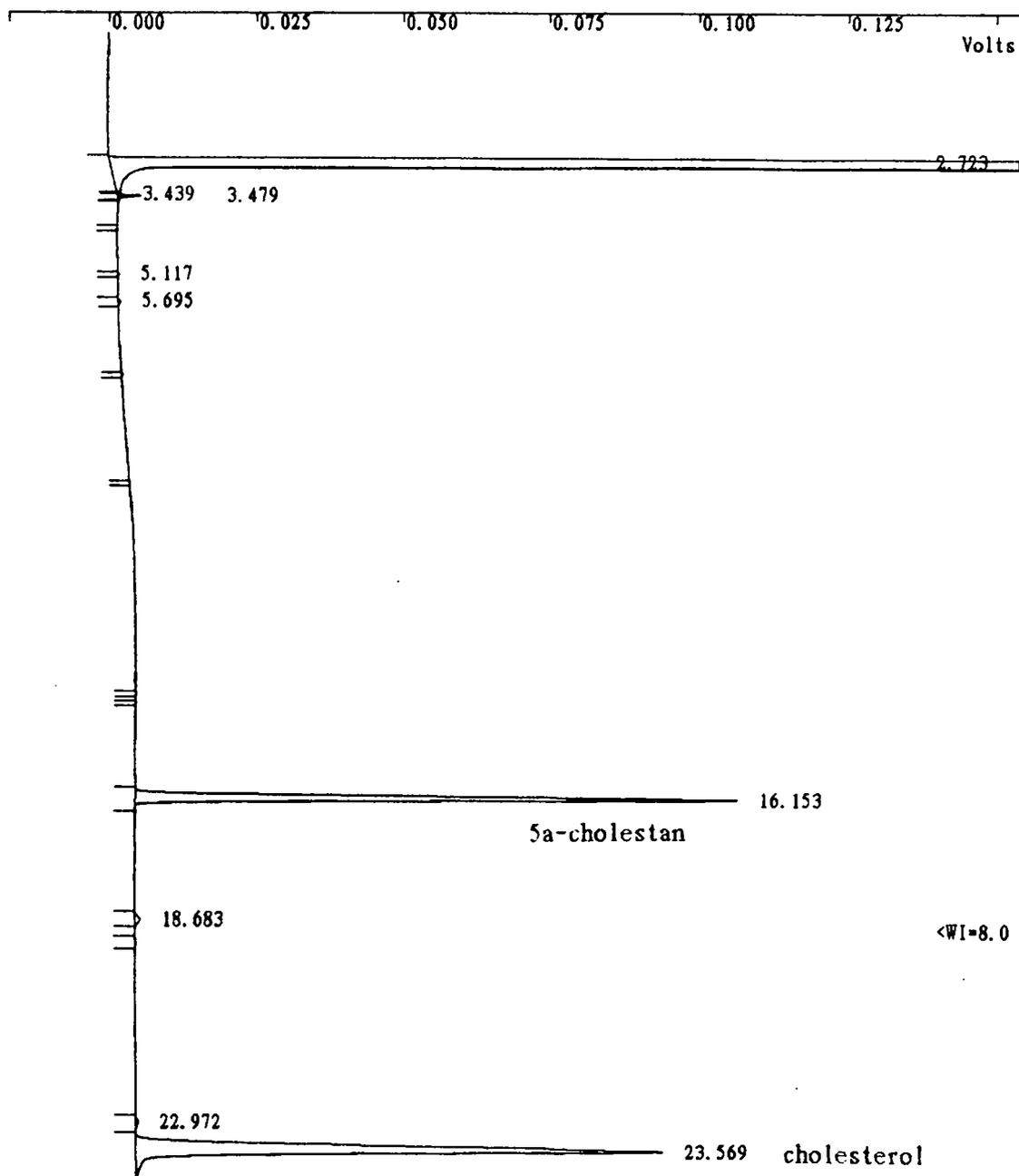


Figure 1-28. Gas chromatogram of 5 α -cholestan as internal standard and cholesterol.

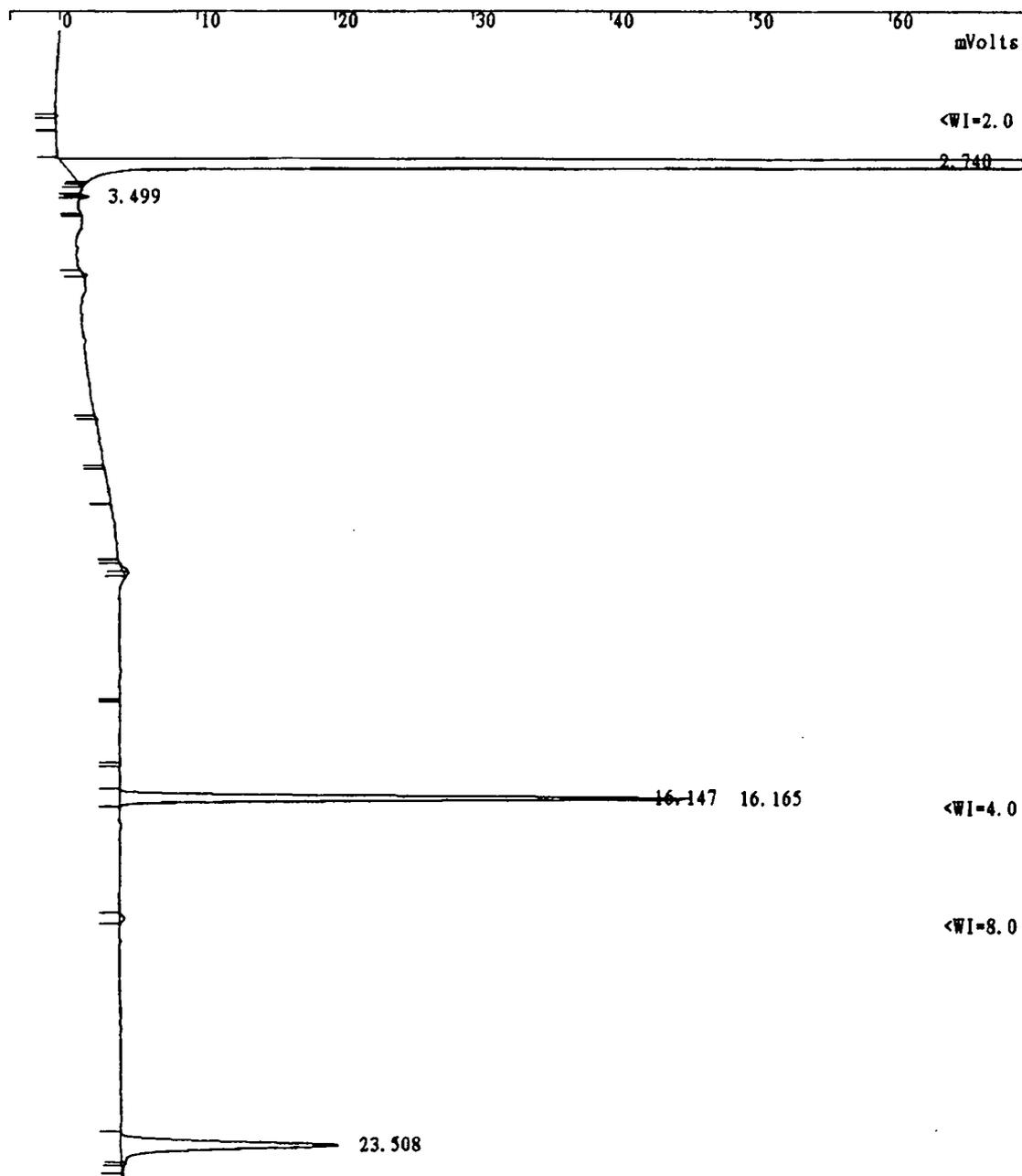


Figure 1-29. Gas chromatogram of cell membrane fraction isolated from *Lr* 2084.

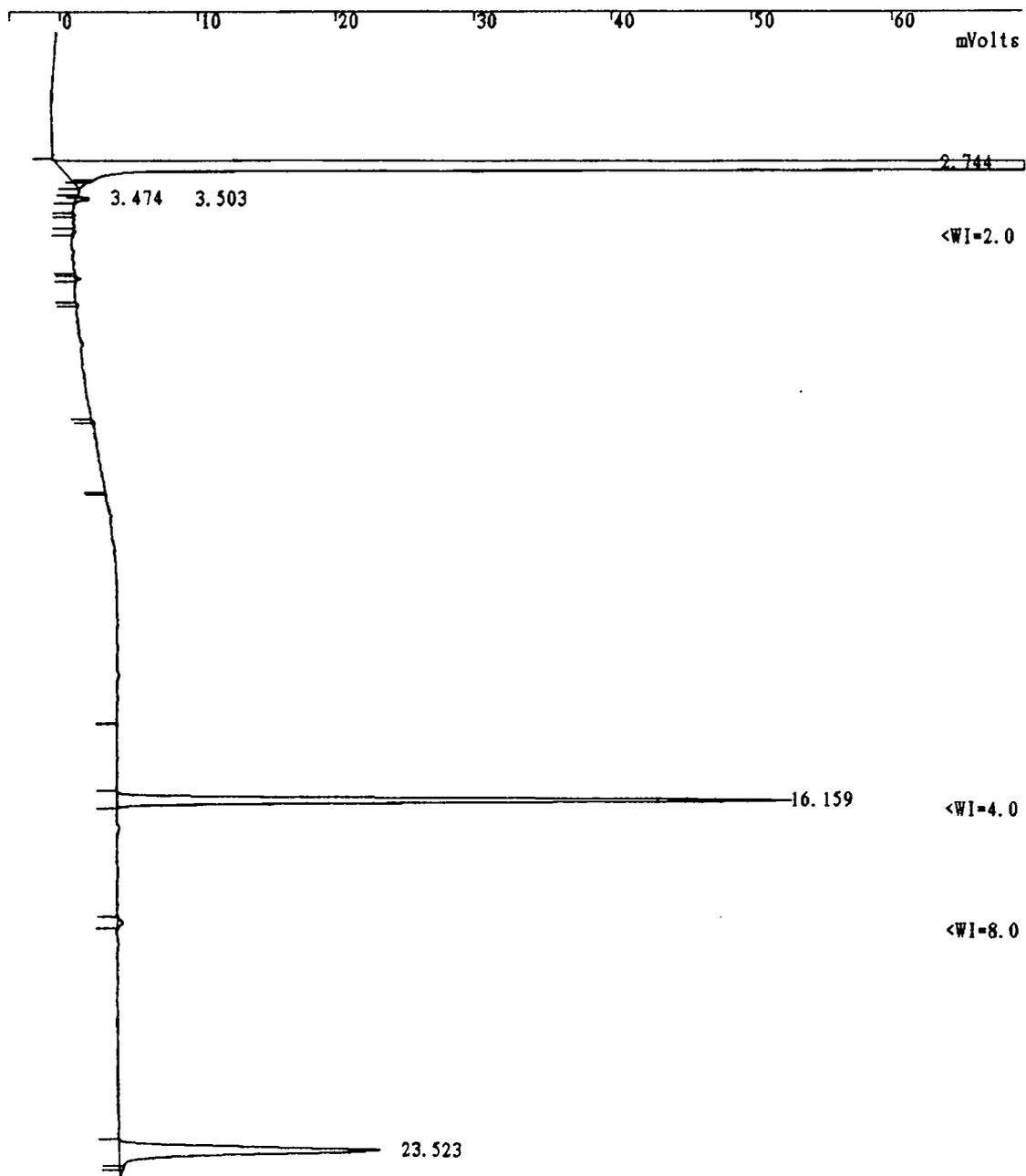


Figure 1-30. Gas chromatogram of cell membrane fraction isolated from *La* 145.

6. *in vitro* 콜레스테롤 저하능

Oxgal (Difco co.) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 그리고 0.5%와 콜레스테롤을 첨가한 MRS-THIO 액체 배지에 선발 균주를 1% 접종하여 37°C에서 24시간 혐기배양한 다음 *in vitro*에서 각 선발 균주에의 콜레스테롤 저하정도를 o-phthalaldehyde 분석 방법으로 조사한 결과는 Table 6, 7과 같다. 콜레스테롤의 assimilation 정도는 oxgal의 농도가 증가할수록 상승하는 경향을 보였고, 호기 조건에서 보다 콜레스테롤 assimilation 정도가 상당히 증가하였다. 이는 cholesterol의 assimilation 정도는 oxgal의 존재 및 혐기 배양 조건일 때 증가한다는 Gilliland 등 (1985)의 보고와 일치하였다. oxgal의 농도가 0.3%이었을 때 전반적으로 가장 높은 assimilation 정도를 보임에 따라 (Table 1-8, 1-9) 이 때의 콜레스테롤의 함량을 Figure 1-3 및 Table 1-2의 G. C 분석 조건으로 재조사하였다. 그 결과는 Table 1-10과 같이 o-phthalaldehyde 분석 방법의 결과와 유사하였고, 이때 *L.r* 2084 균주가 약 55.6 %로 콜레스테롤 저하능이 가장 우수하였으며, 다음으로 *L.c* 0781이 약 48.9 %였다. 이들 균주는 본 실험의 대조 균주로 협력 연구 기관에서 현재 콜레스테롤 저하 발효유 제조에 사용되고 있는 *L.a* 145의 48.8 % 보다 높은 콜레스테롤 저하능을 보였으나, *Lacto.l* 204 및 *E.f* 402는 각각 46.9 %, 48.3 %로 대조 균주 보다 다소 낮은 콜레스테롤 저하능을 보였다.

Table 1-8. Assimilation of cholesterol by the selected lactic acid bacteria during anaerobic growth.

Strains Media		Control ($\mu\text{g/ml}$)	<i>L.c</i> 0781	<i>L.r</i> 2084	<i>Lacto.l</i> 204	<i>Ef</i> 402	<i>La</i> 145
Media A	Spent broth	78.00 ± 1.00^a	71.00 ± 6.04^a	66.66 ± 2.08^b	72.00 ± 4.87^a	72.26 ± 3.92^a	77.20 ± 7.01^a
	rate(%)		91.0	85.5	92.3	92.6	98.9
Media B	Spent broth	80.06 ± 0.76^a	65.26 ± 3.20^b	62.66 ± 3.78^b	71.00 ± 3.15^b	70.40 ± 6.39^a	75.00 ± 7.25^a
	rate(%)		80.9	77.7	88.0	87.3	92.9
Media C	Spent broth	82.66 ± 4.01^a	54.00 ± 2.37^b	46.34 ± 2.57^b	56.00 ± 3.04^b	53.00 ± 6.66^a	60.00 ± 7.04^b
	rate(%)		65.3	56.1	67.7	64.1	72.6
Media D	Spent broth	95.34 ± 4.51^a	51.16 ± 5.15^b	45.00 ± 4.77^b	55.00 ± 6.61^b	52.66 ± 4.04^b	51.60 ± 7.23^b
	rate(%)		53.7	47.2	57.7	55.2	54.1
Media E	Spent broth	99.22 ± 6.79^a	54.50 ± 4.60^b	46.00 ± 2.78^b	58.00 ± 3.74^b	55.00 ± 6.25^b	55.50 ± 5.17^b
	rate(%)		54.9	46.4	58.5	55.4	55.9
Media F	Spent broth	107.66 ± 1.61^a	59.34 ± 3.78^b	51.00 ± 2.50^b	63.80 ± 6.13^b	59.00 ± 3.50^b	59.20 ± 6.11^b
	rate(%)		55.1	47.4	59.3	54.8	54.9

1. Cells were incubated for 24 hrs at 37°C in MRS-THIO broth containing water soluble cholesterol and oxgal (Media A: none, Media B: 0.1%, Media C: 0.2%, Media D: 0.3%, Media E: 0.4%, Media F: 0.5%).
2. All numbers are the means of 6 trials: means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

Table 1-9. Assimilation of cholesterol by the selected lactic acid bacteria during anaerobic growth.

Strains Media		Control ($\mu\text{g/ml}$)	<i>L.c</i> 0781	<i>L.r</i> 2084	<i>Lacto.l</i> 204	<i>Ef</i> 402	<i>La</i> 145
Media A	Suspend cell	78.00 ± 1.00^a	7.10 ± 0.65^b	11.00 ± 3.00^b	6.17 ± 1.44^a	6.12 ± 0.95^a	1.40 ± 0.75^a
	rate(%)		9.1	14.1	7.91	7.8	1.8
Media B	Suspend cell	80.06 ± 0.76^a	14.88 ± 1.84^b	16.70 ± 5.51^b	9.50 ± 0.79^b	9.90 ± 1.52^a	5.75 ± 1.40^a
	rate(%)		18.6	20.9	11.9	12.4	7.2
Media C	Suspend cell	82.66 ± 4.01^a	29.08 ± 3.21^b	35.70 ± 7.73^b	31.83 ± 5.51^b	28.50 ± 6.16^a	21.60 ± 4.56^b
	rate(%)		35.2	43.2	38.5	34.5	26.1
Media D	Suspend cell	95.34 ± 4.51^a	43.83 ± 4.23^b	49.83 ± 4.51^b	39.83 ± 3.33^b	41.17 ± 4.01^b	43.20 ± 3.99^b
	rate(%)		46.0	52.3	41.8	43.2	45.3
Media E	Suspend cell	99.22 ± 6.79^a	43.75 ± 4.36^b	43.42 ± 3.09^b	41.17 ± 2.47^b	43.75 ± 3.40^b	43.50 ± 7.09^b
	rate(%)		44.1	43.8	41.5	44.1	43.8
Media F	Suspend cell	107.66 ± 1.61^a	47.83 ± 6.42^b	47.41 ± 7.52^b	44.10 ± 4.44^b	47.67 ± 2.93^b	47.60 ± 8.56^b
	rate(%)		44.4	44.0	41.0	44.3	44.2

1. Cells were incubated for 24 hrs at 37°C in MRS-THIO broth containing water soluble cholesterol and oxgal (Media A: none, Media B: 0.1%, Media C: 0.2%, Media D: 0.3%, Media E: 0.4%, Media F: 0.5%).
2. All numbers are the means of 6 trials: means with different superscripts differ significantly ($P < .05$).

Table 1-10. Assimilation of cholesterol by the selected lactic acid bacteria measured by G.C.

	<i>L.c</i> 0781	<i>L.r</i> 2084	<i>Lacto.l</i> 204	<i>E.f</i> 402	<i>L.a</i> 145
Uninoculate	107.55 ± 2.86 ^a				
Spent broth	55.02 ± 1.73 ^b	47.78 ± 2.37 ^b	57.09 ± 3.98 ^b	55.60 ± 3.35 ^b	55.03 ± 4.89 ^b
Suspended cells	52.53 ± 4.27 ^b	55.51 ± 2.98 ^b	49.73 ± 7.38 ^b	48.89 ± 4.22 ^b	51.17 ± 4.16 ^b

1. Cells were incubated for 24hrs at 37°C in MRS-Thio containing 0.3% oxgal and water soluble cholesterol.
2. All numbers are the means of 3 trials: means with different superscripts differ significantly ($P < .05$).

제 4 절 참고 문헌

1. Al-Hasani S. M. and M. W. Capenter. 1993. Rapid determination of cholesterol in single and multicomponent prepared foods. *J. AOAC International*. 76: 902-906.
2. Booth, J. R. 1983. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microb. Rev.* 49: 359-363.
3. 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.
4. Brown, M.L., Inazu, A., Hesler, C.B., Agellon, L.B., Mann, C., Whitlock, M.E., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Koizumi, J., Mabuchi H., Takeda, R., Tall A.R. 1989. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 342: 448-451.
5. 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.
6. 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.
7. Dashkevicz, M.P., and Feighner, S.D. 1989. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 11-16.

8. Fernandes, C. F., Chandan, R. C. and Shahani, K. M. 1992. Fermented dairy products and health In: The lactic acid bacteria, Volum 1, edited by Wood, B. J. B. London, New York : Elsevier Applied Science. p.297-342
9. Fernandes, C. F., Shahani, K. M. and Amer, M. A. 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli fermented dairy products. *FEMS*. 46: 343-356
10. 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.
11. Franklin, 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.
12. 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.
13. Gilland, S. E., Nelson, E. R. and Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 377.
14. Gilland, S. E. 1989. Acidophilus milk products : A review of potential benefits to consumers. *J. Dairy. Sci.* 72: 2483.
15. Goldin, B. R., Gorbach, S. L. 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am.J.Clin.Nutr.* 39: 756-761.
16. Goldstein, J.L., Brown, M.S. 1977. The Low density lipoprotein receptor and its regulation to atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 46: 879-930.

17. Hepner, G., Fried, R., Jeor, S., Fusetti, L. and Morin, R. 1979. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 19-24.
18. 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.
19. Klaver, F.A.M., and Meer, R.V. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1120.
20. Klein, H. G., Lohse, P., Duverger, N., Albers, J. J., Rader, D. T., Zech, L. A., Santamarino-Fojo, and S., Brewer, J.B. 1993. Two different allelic mutations in the lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) gene resulting in classic LCAT deficiency: LCAT (tyr⁸³-stop) and LCAT (tyr¹⁵⁶-asn). *J Lipid Res* 34: 49-57.
21. Kobayashi, H. 1985. A proton translocating ATPase regulates pH of the lactic acid bacterial cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 260: 72-76.
22. Kim, S.H., and Gilliland, S.E. 1997. Incorporation of assimilated cholesterol into cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus*. *Kor. J. Food. Sci. Ani. Resour.* 17: 12-16.
23. Lidbeck, Gustafsson. 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
24. Maffei. H. V. L. and Nobrega, F. J. 1975. Gastric pH and microflora of normal and diarrheic infants. *Gut*, 16: 719-724.
25. Mann, G.V. and Sperry, A. 1974. Studies of a Surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am. J. Clin. Nutr.*, 27: 464-469.

- 26 Martini, M.C., Bollweg, G.L., Levitt, M.D., and Savaiano, D.A. 1987. Lactose digestion by β -galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 432-436.
27. Mayia-Makinen, A., M. Manninen, and H.Gyllenberg. 1983. The adherence of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves. *J. Appl. Bacteriol.*, 55: 241-244.
28. Mitsuoba, T. 1990. Bifidobacteria and their roll in human heart. *J. Industrial Microbiology.* 6: 263-268.
29. Neir, C.R., Mann, G.V. 1977. A factor in milk which influences cholesteremia in rat. *Atherosclerosis* 26: 363-367.
30. Noh, D.O. 1995. Cholesterol uptake by *Lactobacillus acidophilus*: Its fate and factors influencing the uptake. Doctoral Thesis, Oklahoma State University.
31. Orla-Jensen, S. 1991. The lactic acid bacteria. Horst, Copenhagen, Denmark, p. 1-196.
32. 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.
33. Parmentier, G. and Eyssen, H. 1974. Mechanism of biohydrogenation of cholesterol to coprostanol by *Eubacterium* ATCC 21408. *Biochem. Biophys.* 348: 279.
34. Rasic, J.L., and Kurmann, J.A. 1978. Yogurt : Scientific grounds, technology, manufacture and preparation. Technical Dairy Publishing House. Denmark.
35. Razin, S. 1967. The cell membrane of mycoplasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 143: 115.
36. Razin, S. 1975. Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *J. Bacteriol.* 124: 570.

37. Razin, S., Kutner, S., Efrati, H., and Rottem, S. 1980. Phospholipid and cholesterol uptake by mycoplasma cells and membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 598: 628.
38. Rees, A., Bishop, A., Morgan, R. 1990. The apo(a) gene; Structure/function relationships and the possible link with thrombotic atheromatous disease. *Brit Med Bull* 46: 873-900.
39. Rose, A.H. 1981. *Scientific Amer.* 245: 127-128.
Rudel L. L. and M. D. Morris. 1973. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J. Lipid Research.* 14: 364-366.
40. Shan, N. and Jelen, P. 1990. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *J. Food Sci.* 55: 506-509.
41. 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
42. Thakur, C.P., Jha, A.N. 1981. Influence of milk, yogurt and calcium on cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 39: 211-215.
43. Wood, B.J.B. 1992. The lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier Science Publishers. U.K. Vii-x.
44. Yoo, J.Y., Lee, I.S., Chung, K.S., and Nam, Y.J. 1991. Isolation and properties bacteriocin-producing microorganism. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 8-13.
45. 김성효, 신용서, 성현주, 김동한, 이상갑. 1994. 젓산균과 meotkksanfi Staphylococcus aureus의 생육에 미치는 억제 효과. *한국 식품과학회지*, 26: 644-648.
46. 고준수, 야부근, 안종건. 1991. 반고체형 set 요구르트 제조에 관한 연구. *한국 낙농학회지*. 4: 129-132

47. 김영주, 백승천, 유제현. 1995. *Bifidobacterium infantis* 420에 의한 요구르트 base제조시 올리고당 및 생육촉진물질의 효과. *Kor. J. Dairy Sci.* 17: 167-173.
48. 낙농미생물학. 1984. 강국회 외 7인. 선진문화사
49. 백영진. 1998. 한국유가공기술과학회지 . 69-84
50. 백현임, 허태련. 1991. *Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium bifidum*의 발효 유제품내의 성장. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 6: 413-414.
51. 신용서, 성현주, 김동한, 이갑상. 1994. 산성조건하에서 시판요구르트의 유산균 생존율과 β -galctosidase의 활성도. 한국 농화학회지 37(3): 143-147.
52. 심재현, 김삼교, 백영진, 오태광, 양한철. 1995. 배양조건에 따른 *Lactobacillus casei* YIT 9018의 내산성 변화. 한국미생물학회지, 23: 17-23 .
53. 이재성, 한판주, 서기봉. 1972. 두유를 이용한 변형 요구르트 제조에 관한 연구. 한국 식품과학회지. 4: 194-199.
54. 최신양, 기명봉, 유진영, 이인선, 정건섭, 구영조. 1990. 김치제조시의 온도 및 염농도에 따른 저장 효과. *Kor. Food Sci. Tech.* 22: 707-710.

제 3 장 항콜레스테롤 유산균 개발을 위한 형질전환 및 vector system 개발

제 1 절 서 설

유산균은 수 천년 동안 인간과 동물이 소비하는 음식물의 발효에 유용한 역할을 담당하는 균종이었으며, 또한 동물과 인간의 장내, 그리고 소장에서 우세 균종을 이루는 미생물이다. 치즈, 요구르트, 발효 음료, 소시지, 김치 장류 그리고 사일리지 등은 이들 유산균만이 갖는 독특한 특성이 이용되는 대표적인 예이며, 미생물학의 발전과 더불어 이들 제품에서의 유산균의 역할이 밝혀지게 되었다. 이들 유산균은 원유나 자연계에서 분리되어 사용되어 왔으나, 대사 능력이 불안정하여 제품의 특성에 따라 적합한 균주의 개량이 필요하게 되었다. 형질전환은 새로운 균주를 개발하는데 필수적인 방법이며, Chassy 등 (1976)은 산업적으로 중요한 유산균의 형질분석 및 재조합 유전자 기술은 cloning vector system의 개발이 선행되어야하고, host-vector 체계의 선택이 중요하다고 하였다. 형질 전환 방법에는 protoplast transformation (Lin *et al.*, 1986), conjugation (Vescovo *et al.*, 1983), protoplast fusion (Gasson 1980)등의 방법이 있으며, 이들 유용한 형질 전환 방법이 적용되기 전까지는 단지, 고전적인 돌연변이와 선발에 의해서만 균주 개량이 가능하였다. 유전학적 조작에서의 원형질체는 transformation에의 이용과 새로운 유전학적 다양성을 위한 원형질체 융합에 이용되어져왔다. 이러한 원형질체 융합 방법은 유전학적 형질 전환 system이 밝혀지지 않은 미생물의 산업적 이용을 위한 개량 방법 (Hopwood, 1981)으로, 또한 균주 육종 (Morgan, 1983), 종간 잡종 형성 (Anne *et al.*, 1976), 세포내 소기관의 전달 (Fournier *et*

al., 1980), 세포학적 이용 (Sentandreu *et al.*, 1983)등에 주로 이용되어왔다. 유산균의 원형질 형성을 위하여 Simon 등(1986)은 대수 증식기 초기에 균주를 회수하여 사용하였고, 일반적으로 유산균의 세포벽은 lysozyme의 용균 활성화에 강한 저항성을 나타내므로 Kondo 등(1982, 1984)은 원형질 형성에 mutanolysin을, 그리고 Lin 등(1986)은 mutanolysin과 lysozyme을 혼용하여 유산균의 세포벽을 제거하였다. Connel 등(1988)은 *Lactobacillus gasseri* 균주를, 그리고 Lee-Wickner 등(1984)은 *Lactobacillus casei* 균주를 사용하여 원형질체의 재생에 대하여 보고한 바 있다. 유산균에서의 원형질체 융합은 lactic Streptococci균주를 이용하여 PEG를 매개로 Gasson(1980)이 처음으로 protoplast fusion을 증명하였으며, 이 후 Okamoto 등 (1983, 1985)에 의해서 *Streptococcus lactis* 속간 융합이 이루어졌고, Kanatani 등(1990)에 의해 *Lactobacillus*의 융합이 시도되었다. 또한, 유산균의 plasmid는 젖당 대사, 아미노산 대사, 단백질 분해효소, bacteriocin 생성, 당 전달과 phage 내성 등의 유전형질을 갖고 있다는 것이 확인되었다 (McKay *et al.*, 1982). 그러나 유산균이 갖는 plasmid DNA는 자연적으로 손실되기 쉬우며, 이들의 형질은 chromosomal 보다 불안정하다. 따라서 유산균의 유용한 기능들이 자연적으로 없어지는 불안정성이 starter 이용에 있어서 문제점으로 지적되고 있다 (McKay 1983). 따라서, Neumann 등(1982)에 의하여 eukaryotic cell의 형질 전환에 이용되었던 electroporation이 최근 electrotransformation과 electrofusion 방법으로 유산균주의 개량에 이용되고 있다. 이는 세포에 강한 전기장을 형성하면 임계전압에서 세포벽과 막이 탈 분극되어 거대분자들이 이동할 수 있는 pore가 형성되는 원리를 이용하여 세포간 유전자의 전이(Reed 1987) 또는 세포 내로의 외부 유전자의 도입 (Hashiba *et al.*, 1990) 그리고 세포 외로의 유전자 전이 등에 응용되고 있다. 이 방법은 외부 유전자의 도입을 위하여 원형질체의 형성 및

재생 과정이 필요하지 않으므로 빠르고 간편하게 수행할 수 있고 plasmid를 갖는 전이균주의 회복에 적절하다는 장점이 있다 (Chassy et al., 1987, Harlander, 1987). Chassy 등은 *Lactobacillus casei* 에서의 electrotransformation을 최초로 보고하였으며, Zink 등 (1991)과 Luchansky 등(1988)은 전압의 크기에 따른 *Lactobacillus* 균종의 electrotransformation 효율을 비교하였다. Holo와 Nes (1989)는 sucrose와 glycerol을 buffer에 첨가하여 *L. lactis* 균주에서, Luchansky 등(1988) phosphate 또는 HEPES-based buffer를 사용하여 *Lactobacillus acidophilus* 균주에서 높은 electrotransformation 효율을 얻었다고 보고하였다. 또한 성장 배지도 electrotransformation의 중요한 인자로서 작용하는데, McIntyre 등 (1989)은 DL-threonine이 성장 배지에 첨가되었을 때, 그리고 Holo와 Nes (1989)는 glycine과 sucrose 존재 하에서 *L. lactis*의 형질전환에, 그리고 Hashba 등 (1990)은 *Lactobacillus helveticus* 균주에서, Aukrust 등(1988)과 Cosby 등(1989)은 *L. plantarum* 균주에서 glycine의 첨가가 긍정적인 효과를 나타낸다고 보고하였다. 일반적으로 형질전환에서 DNA의 크기가 클수록 형질전환 효율은 감소하며 DNA의 농도가 증가할수록 형질전환 효율 또한 증가하는 것으로 알려져 있으나, Powell 등(1988)과 McIntyre와 Harender (1989)는 *L. lactis* 균주에서의 DNA 크기는 형질전환 효율과 관계가 없다고 하였으며, DNA의 농도가 낮을수록 형질전환 효율이 증가하였다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro*에서 콜레스테롤 저하능이 우수한 균주로 선발된 선발균주를 이용하여, 이들 균주 간의 원형질 융합과 electrotransformation 방법을 이용하여 선발 유산 균주의 개량을 목적으로 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 유산균의 원형질체 나출 조건

각 선발 균주의 원형질체 나출 조건을 확립하고자, Lee-Wickner 등 (1984)의 방법을 변형하여 수행하였다. 우선 *L.r* 2084를 MRS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 균주 배양액 0.5ml를 취하여 MRS 액체 배지 10ml에 재 접종하여 OD₆₀₀의 값이 0.5~1 사이일 때 회수한 후 PFB(protoplast forming buffer; 0.5M sucrose, 20mM Hepes(pH7.0))으로 2회 세척 및 회수하였다. 이 균체를 동일한 buffer로 약 1×10^8 CFU/ml로 현탁한 후 일부는 성장 고체 배지에 일정량을 도말, 접종 및 배양하여 총균수를 계수 하였으며, 또한 적정량의 현탁액에 lysozyme 및 mutanolysin을 적절한 농도로 단독 또는 혼합하여 첨가하고, 37°C에서 일정 시간 동안 처리하여 회수한 다음, 멸균 증류수로 삼투압 충격을 준 후 성장 고체 배지에 도말 접종하여, 3~5일간 배양하며 형성된 균락을 계수하여 나출 정도를 다음과 같이 조사하였다.

$$\text{나출율(PF)} = \frac{[\text{총균수(TVC)} - \text{삼투압 미조절 배지상의 균락수(OSC)}]}{\text{총균수} \times 100}$$

상기의 방법으로 *L.r* 2084의 원형질체 나출율이 99.9% 이상을 보이는 lysozyme 및 mutanolysin의 양과 처리 시간을 결정한 후, 나머지 선발 균주의 원형질체 나출 정도를 비교 검토하였다.

2. 유산균의 원형질체 재생 및 배양

Lysozyme과 mutanolysin을 동시에 처리하여 형성된 각 균주 원형질체의 재생을 위한 조건을 조사하기 위하여 glucose의 최종 농도가 각각 0.1%, 0.5%로 첨가된 MRS 및 M17 액체 배지에 접종, 배양한 후 균주 배양액을 상기의 glucose가 첨가된 MRS 액체 배지에 재 접종하여 회수한 다음, PFB(protoplast forming buffer; 0.5M sucrose, 20mM HEPES(pH7.0))로 세척 및 회수하였다. 이 균체를 동일한 buffer로 약 1×10^8 CFU/ml로 현탁하여 lysozyme 500 μ g/ml와 mutanolysin 25 μ g/ml를 첨가한 후 모든 시험 균주가 99.96% 이상의 나출율을 보인 37°C에서 60분간 처리하고 회수한 다음, 다시 PFB로 세척 및 회수하여 Lysozyme과 mutanolysin을 제거하였다. 이 균체를 동일 buffer로 현탁하여 일부는 각 선발 균주의 성장 고체 배지에 도말, 접종하여 총균수 계수에, 그리고 일부는 멸균 증류수로 삼투압 충격을 주어 *L.c* 0781과 *L.r* 2084는 MRS 고체 배지에, *S.t* 13101과 *S.t* 2590은 M17 고체 배지에 각각 도말 접종하고, 또한 일부는 Table 2-1에 나타난 재생 배지에 접종하여 37°C에서 3~5일간 배양하며 형성된 균락을 계수하여 균주 배양 액체 배지의 glucose 농도 및 재생 배지의 종류에 따른 재생율을 다음과 같이 조사하였다.

$$\text{재생율(RF)} = \frac{(\text{재생 배지상의 균수} - \text{삼투압 미조절 배지상의 균락수})}{(\text{총균수} - \text{삼투압 미조절배지상의 균락수})} \times 100$$

Table 2-1. Composition of media for regeneration of protoplast.

Composition	Regeneration media(g/litter)			
	A-mR II	LCM-R	MRS-R	TCM-R
Ammonium citrate		2	2	
Ammonium sulfate	1.0			
Bacto beefextract	1.5		10	4.5
Bacto peptone	5.0			7.5
Bacto proteouse peptone			10	
Bacto yeast extract	1.5	5	5	5
Dextrose	5.0		20	
CaCl ₂		25mM	25mM	3mM
cysteine		0.2		
gelatin		25	25	
Ferrous sulfate		0.034		
glucose		0.5-2.0%	10	1.0
BSA*	5ml(0.5%)	5ml(0.5%)	5ml(0.5%)	3ml(0.3%)
K ₂ HPO ₄	3.5	3	2	3.0
KH ₂ PO ₄	1.5	3		1.5
Magnesium sulfate		0.575	0.1	0.1
Manganase sulfate		0.12	0.5	0.025
Mgcl ₂	42mM	25mM	25mM	3mM
Sodium acetate		1	5	
sucrose	0.5M	0.5M	0.5M	0.5M
Trypticase		10		
Tryptose		3		
DL-Threonine		20mM		
Bacto agar	10	10	10	10
pH	7.3	6.8	6.5	6.8

* : Heat inactivation at 56°C for 30minutes.

3. 세포 융합체 유도

가. 시험 균주의 항생제 내성 조사

선발 균주가 갖는 고유의 항생제 내성을 융합 균주의 선발 marker 로 이용하고자, MRS 또는 M17 배지에 tetracyclin, chloramphenicol, erythromycin, neomycin, 그리고 gentamycin 등의 항생제를 적절한 농도로 첨가하여 각 항생제를 포함하는 고체 배지를 제조한 후 각각의 선발 균주를 도말, 접종하고 3~5일간 배양하며 항생제 내성을 조사하였다

나. 세포 융합

최종 농도가 0.1% 되도록 glucose가 첨가된 성장 액체 배지에서 배양된 각 균주 배양액을 상기의 방법으로 lysozyme 500 μ g/ml와 mutanolysin 25 μ g/ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하여 원형질체를 형성한 다음, 융합하고자 하는 각 균주의 원형질체 현탁액을 각각 1:1로 혼합하여 회수하고 PFB로 세척 및 회수한 다음, 동일 buffer 100 μ l로 재 현탁하였다. 여기에 40% PEG 3,350 (polyethylene glycol, sigma Co.) 또는 40% PEG 8,000 0.9ml를 첨가하여 1분 또는 30분간 37 $^{\circ}$ C에서 처리하였다. 이것을 다시 회수하여 PEG를 제거하고 LCM-R 액체 재생 배지 1ml로 재 현탁하여 37 $^{\circ}$ C에서 각각 0분, 30분, 그리고 24시간 배양 처리한 후 항생제 (tetracyclin 30ppm, gentamycin 30ppm)가 들어 있는 LCM-R 재생 배지에 접종하여 5일~7일간 배양하여 형성된 균락을 세포 융합체로 판정하였다. 또한 융합 균주의 안정성 조사를 위하여 tetracyclin과 gentamycin이 첨가된 선발 배지에서 수회 계대 배양하며 안정성을 관찰하였다.

4. 형질 전환 조건

가. 선발 균주의 plasmid DNA 분리

선발 균주를 0.5%가 첨가된 MRS 또는 M17 액체 배지에 접종 배양한 후 회수하여 O'Sullivan과 klaenhammer의 방법을 변형한 Figure 2-1의 방법에 따라 TES (25mM Tris, 10mM EDTA, 15% sucrose) 용액으로 세척하고 30mg/ml의 lysozyme과 40ug/ml의 mutanolysin을 포함하는 25% sucrose 용액으로 현탁한 후 배양하여, 각 시험 균주의 plasmid DNA를 분리하였으며 이를 전기 영동 하였다.

Growth (10ml. MRS + 0.5% Glu)
 ↓ centrifuge
 Wash pellet twice with TES buffer
 ↓ transfer to eppendorf tube.
 Resuspend pellet in 25% sucrose sol. containing 30mg of lysozyme/ml
 and 40µg of mutanolysin/ml, to 200µl.
 ↓ incubate at 37°C for 15mins.
 Add 200µl of resuspension solution (25mM Tris, 10mM EDTA)
 ↓ keep 5 mins. at room temperature)
 Add 400µl of alkaline SDS solution (3% SDS, 0.2N NaOH)
 ↓ mix immediately & keep 5mins. on ice.
 Add 300µl of ice-cold 5M K-acetate
 ↓ mix immediately & keep 5mins. on ice
 & spin 15mins at 4°C.
 Transfer supernatant to ep-tube and add equal volume of
 cold isopropanol.
 ↓ mix well & freeze for 15min.
 & spin at max. speed, 15min. at 4°C.
 Remove all liquid and resuspend pellet in 320µl of ddH₂O.
 ↓
 Add 200µl of 7.5M ammonium acetate containing 0.5mg/ml EtBr.
 and add 350µl phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)
 ↓ mix well & Spin at max. speed for 5 mins (4°C).
 Transfer upper phase to new eppi. and 1ml of ethanol(-20°C).
 ↓ mix well & freeze for 30 mins. & Spin at max.
 speed for 15 mins (4°C).
 Wash pellet in 70% ethanol(-20°C) & remove all liquid
 & resuspend pellet in TE buffer.
 ↓
 Remove RNA(Treat with RNase at 37°C for 1hr.)

Figure 2-1. Diagram of isolation protocol of the lactic acid bacterial plasmid.

나. Electrotransformation 조건

1) Field strength의 영향

McIntyre 등 (1989)의 변형된 방법에 따라 Bio-Rad의 Gene Pulser System(Bio-Rad, USA)을 이용하여, 각각의 균주를 선발 배지에 접종, 배양한 후 재 계대 배양하고 OD₆₀₀이 0.5~1.0일 때 회수하여 1mM HEPES (pH 7.0) 용액으로 세척하고 deionized water에 현탁하였다. 이 현탁액 0.1ml에 CsCl₂ gradient 방법으로 추출 정제된 pKH80 plasmid DNA(Figure 2-2) 1 μ g을 첨가한 후 혼합하고 ice상에서 10분간 배양하여 electroporation하였다. 우선, discharge capacitor는 25 μ F로 고정한 후 Voltage 변화에 따른 형질전환 효과를 조사하고자 pulse-controller는 200 Ω 으로 조정하고, field strength는 2.5kV에서부터 12.5kV/cm까지 단계적으로 변화시키며 균주 생존을 및 형질전환 효율을 조사하였으며, pulse 후 곧바로 0.5% glucose가 첨가된 cold-MRS 액체배지 0.9ml를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양한 후 항생제 (tetracyclin 10 μ g/ml와 erythromycin 10 μ g/ml)를 포함하고 있는 선발 MRS 고체 배지에 도말 접종하여 3~5일간 배양하며 형성된 균락을 관찰, 계수하여 field strength의 변화에 따른 electroporation 효율을 조사하였다.

2) Parallel resistor setting에 의한 Time constant의 영향

상기의 방법으로 field strength에 따른 electrotransformation 효율을 조사한 후 가장 높은 형질 전환 효율을 보이는 field strength로 voltage를 고정하여 parallel resistor를 100, 200, 400, 800, 그리고 1,000 Ω 으로 조정하며 time constant에 따른 electrotransformation 효율을 조사하였다.

3) Electroporation buffer의 영향

Field strength와 parallel resistor setting에 의한 time constant의 변화에 따른 electrotransformation의 효율이 자장 좋은 것으로 나타난 field strength의 voltage와, 25 μ F의 discharge capacitor, 그리고 parallel resistor를 고정한 후 electroporation buffer를 cold-deionized water, 10% glycerol (v/v), HGEB (1mM HEPES, pH7.0, 10% glycerol), SMEB (1mM HEPES, pH7.0, 300mM sucrose, 1mM MgCl₂) 그리고 PEB (7mM potassium phosphate ; pH7.4, 1mM MgCl₂, 0.5M sucrose)로 변경하며 형질 전환을 시도하여 electrotransformation 효율을 조사하였다.

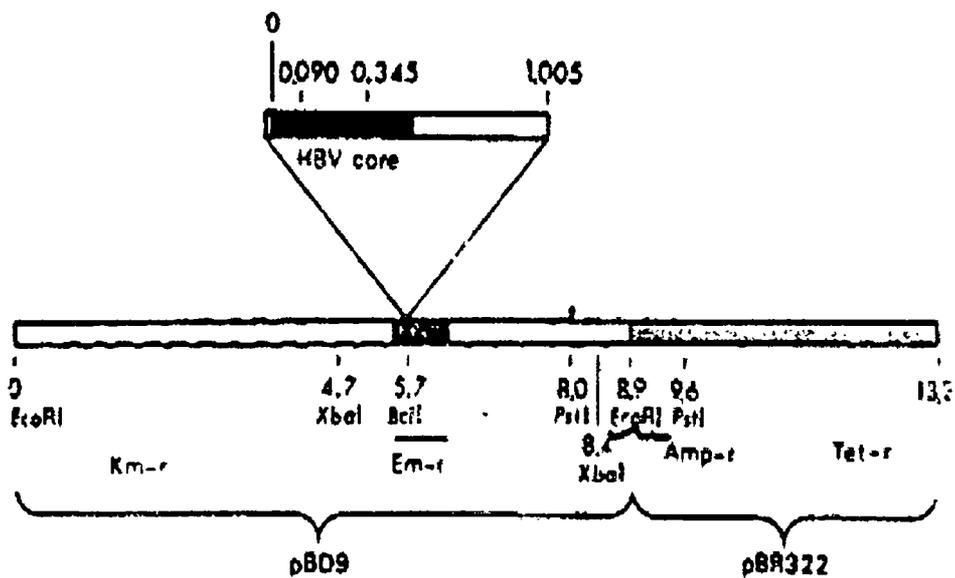


Figure 2-2. Diagram of restriction enzyme map of pKH80 plasmid vector.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 유산균의 원형질체 나출 조건

선발 균주의 나출 조건을 확립하기 위하여 변형한 Lee-Wickner 등 (1984)의 방법에 따라 우선 *Lr* 2084를 MRS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 배양한 후 균주 배양액을 MRS 액체 배지에 재 접종하여 OD₆₀₀의 값이 0.5~1 사이일 때 회수한 후 PFB로세척 및 회수한 다음, 이 균체를 약 1×10^8 CFU/ml로 현탁하였다. 여기에 lysozyme 및 mutanolysin을 각각 1,000ug/ml, 25ug/ml의 농도로 단독 처리하거나 또는 lysozyme의 농도를 각각 250, 500, 1,000ug/ml, 그리고 mutanolysin의 농도를 25ug/ml로 적절히 혼합하여 첨가하고, 37°C 수욕조에서 30, 60, 90, 그리고 120분간 처리하여 회수한 다음, 멸균 증류수로 삼투압 충격을 준 후 MRS 고체 배지에 도말 접종하여, 3~5일간 배양하며 형성된 균락을 계수하여 나출정도 조사하였다.

그 결과 Table 2-2에서 보는 바와 같이 lysozyme 250 μ g/ml와 mutanolysin 25 μ g/ml를 첨가하여 120분 처리하였을 때, lysozyme 500 μ g/ml와 mutanolysin 25 μ g/ml 그리고 lysozyme 1,000 μ g/ml와 mutanolysin 25 μ g/ml를 60분 이상 처리하였을 때 99.99% 이상의 나출율을 얻을 수 있었다. Chassy 등 (1980)은 PEG의 존재하에서 lysozyme에 의하여 lactobacilli 균종의 세포벽이 용균 될 수 있으며, 이때 PEG는 융합을 매개하는 삼투압 안정제로서, 그리고 원형질체를 뭉치게 하는데 사용된다고 보고한바 있다. 그리고 Lee-Wickner 등 (1984)은 *Lactobacillus*의 원형질 형성을 위하여 lysozyme이나 mutanolysin 단독 처리로는 높은 나출율을 얻을 수 없으며, 가장 적절한 lysozyme의 농도는 250~1,000 ug/ml이며 mutanolysin은 25 ug/ml라고 하였다. 또한, Lee-Wickner 등 (1984)은 *L. casei* 균주에,

Connell 등 (1988)은 *L. casei* ATCC393와 *L. reuteria* 균주에 1,000 ug/ml의 lysozyme과 25 ug/ml mutanolysin을 동시에 각각 1시간이상, 그리고 2 시간 처리하여 99.9% 이상의 나출율을 보였다고 보고하였다. 그러나, 본 연구 결과에서는 1,000 ug/ml의 lysozyme의 단독 처리만으로도 약 99% 이상의 나출율을 얻을 수 있었는데, 이는 사용 균종이 다르며, 현미경을 이용한 직접 계수 방법이 아닌 때문으로 사료된다. Table 2-2의 결과에 따라 이후의 실험은 *Lr* 2084 균주에서 99.99% 이상의 나출율을 보인 lysozyme 500 μ g/ml와 mutanolysin 25 μ g/ml를 혼합 사용하여 각 시험 균주의 처리시간에 따른 나출율을 조사하였다. Smith 등 (1985)은 *Streptococcus faecalis*의 원형질체 형성을 위하여 1,000ug/ml의 lysozyme으로 60분간 처리하였으며, Kondo 등 (1984)은 mutanolysin 25ug/ml를 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 처리하여 *Streptococcus lactis*의 원형질체를 형성하였다. 본 연구에서는 Table 2-3에서와 같이 *L.c* 0781과 *Streptococcus thermophilus* 13101 (*S.t* 13101)은 lysozyme 500 μ g/ml와 mutanolysin 25 μ g/ml를 동시 사용하여 60분 처리했을 때 99.96%, 120분 처리 때 99.99%의 나출율을, *Streptococcus thermophilus* 2590 (*S.t* 2590)은 30분 처리만으로도 99.99% 이상의 나출율을 보였다. Lee-Wickner 등 (1984) 및 Kim 등 (1993)은 원형질체의 재생은 용균 효소에의 노출 시간의 길이에 의존하며, 효소처리의 시간이 짧을수록 높은 재생율을 보인다고 하였다. 그러나 높은 재생율을 얻기 위한 짧은 효소 처리시간으로 인하여 부분적인 세포벽의 가수분해가 융합을 저해할 수 있기에 이로인한 것은 아니라고 하였다. 따라서 본 연구에서는 모든 선발 균주가 높은 나출율을 보이는 조건으로 원형질을 형성하고자 하였다.

Table 2-2. Effect of mutanolysin and lysozyme concentrations and time of incubation on the production of protoplasts of *L.r* 2084.

Treatment	Total cells (CFU/ml)	ORS(CFU/ml) per time (min.)			
		30min	60min	90min	120min
Lysozyme 1000 μ g/ml	1.25 $\times 10^8$	9.42 $\times 10^3$ 99.25%	1.59 $\times 10^3$ 99.87%	8.24 $\times 10^4$ 99.93%	1.28 $\times 10^4$ 99.98%
Mutanolysin 25 μ g/ml		5.5 $\times 10^3$ 99.55%	2.27 $\times 10^3$ 99.82%	4.83 $\times 10^4$ 99.96%	1.05 $\times 10^4$ 99.99%
Lysozyme 250 μ g/ml + Mutanolysin 25 μ g/ml		9.95 $\times 10^4$ 99.92%	2.98 $\times 10^4$ 99.97%	2.09 $\times 10^4$ 99.98%	1.448 $\times 10^3$ >99.99%
Lysozyme 500 μ g/ml + Mutanolysin 25 μ g/ml		9.54 $\times 10^4$ 99.92%	1.35 $\times 10^4$ >99.99%	1.03 $\times 10^4$ >99.99%	8.08 $\times 10^3$ >99.99%
Lysozyme 1000 μ g/ml + Mutanolysin 25 μ g/ml		1.92 $\times 10^4$ 99.98%	9.25 $\times 10^3$ >99.99%	8.65 $\times 10^3$ >99.99%	1.2 $\times 10^2$ >99.99%

*Treated with 500 μ g/ml of lysozyme, 25 μ g/ml of mutanolysin and incubated at 37°C.

ORS : Osmotically resistant cells

CFU : Colony forming unit

Table 2-3. Protoplast production of the selected lactic acid bacteria.

Strains	TVC (CFU/ml)	ORS(CFU/ml) per time (min.)			
		30	60	90	120
<i>L.c</i> 0781	2.18×10^{10}	1.25×10^7 (99.94%)	7.19×10^6 (99.96%)	5.01×10^6 (99.98%)	2.64×10^6 (99.99%)
<i>L.r</i> 2084	1.25×10^8	9.54×10^4 (99.92%)	1.35×10^4 (>99.99%)	1.03×10^4 (>99.99%)	8.8×10^3 (>99.99%)
<i>S.t</i> 13101	3.41×10^{10}	4.25×10^7 (99.89%)	1.38×10^7 (99.96%)	3.81×10^6 (99.98%)	2.54×10^6 (>99.99%)
<i>S.t</i> 2590	1.06×10^{10}	7.24×10^5 (>99.99%)	7.0×10^4 (>99.99%)	2.45×10^4 (>99.99%)	1.59×10^4 (>99.99%)

* () : protoplast forming frequency.

TVC : Total viable cells before enzyme treatment

ORS : Osmotically resistant cells

CFU : Colony forming unit

2. 유산균의 원형질체 재생 및 배양

Lysozyme과 mutanolysin을 동시에 처리하여 형성된 각 균주 원형질체의 재생을 위한 조건을 조사하고자, lysozyme과 mutanolysin을 첨가한 후 모든 시험 균주가 99.96% 이상의 나출율을 보인 37°C에서 60분간 처리하고 PFB로 세척 및 회수하여 lysozyme과 mutanolysin를 제거하였다. 이 균체를 동일 buffer로 현탁하여 일부는 멸균 증류수로 삼투압 충격을 주어 각 선발 균주의 성장 고체 배지에 도말 접종하고, 일부는 각 재생 배지에 접종하여 37°C에서 3~5일간 배양하며 형성된 균락을 계수하여 균주 배양 액체 배지의 glucose 농도 및 재생 배지의 종류에 따른 재생율을 조사한 결과는 Table 2-4에서 보는 바와 같다. 선발 4 균주 모두 배양 초기 glucose 농도가 0.5% 보다는 0.1%에서 높은 재생율을 보였으며, *S.t* 13101을 제외한 모든 균주가 LCM-R 재생 배지에서 *L.c* 0781은 2.45%, *L.r* 2084는 4.58%, 그리고 *S.t* 2590은 0.51%로 A-mR II, MRS-R, 그리고 TCM-R 재생 배지에서 보다 높은 재생율을 보였다. 이는 Lee-Wickner의 *L. casei*에서의 결과와 유사하였으나, 삼투압 안정제로 raffinose (0.3M) 이외에 lactose (0.5M), sucrose (0.5~0.5M), succinate (0.5M), NaCl (0.5M) 또는 galactitol (0.5M) 등을 사용하였을 때 원형질 재생은 전혀 관찰되지 않았다는 보고와는 다르게 0.5M sucrose를 사용하였을 때도 선발 균주의 원형질체 재생이 이루어졌다. 반면, *S.t* 13101은 0.1%의 glucose가 첨가된 배지에서 배양되었을 때, TCM-R 재생배지에서 3.1%의 가장 높은 재생 빈도를 보였다. Gasson (1980)은 lactic streptococci의 재생 배지로 GM17+S가 가장 적절하다고 하였는데 이는 glucose (0.1%), CaCl₂ (25mM), MgCl₂ (25mM), BSA (0.5%), gelatin (2.5%)를 포함하고 있으며, BSA 대신 horse serum 10%를 사용할 수 있고, 둘 중 하나는 필수적인 요소라 하였다. 이는 LCM-R

재생 배지와 유사한 조성을 갖는다. 따라서, *S.t* 2590은 Gasson (1980)의 보고와 동일한 결과를 보이나, *S.t* 13101은 다소의 차이를 보였으며, 이는 각 균주가 갖는 균주 특이성 때문으로 사료된다.

3. 세포 융합체 유도

가. 시험 균주의 항생제 내성 조사

세포융합의 선발 marker로 영양 요구성 돌연변이를 유도하는 방법과 항생제 내성을 이용하는 방법이 있으나, 영양 요구성 돌연변이 유도 균주의 경우, 자외선 조사 또는 돌연변이 유도 물질의 사용으로 유전자의 변형이 불가피 하므로 이에 따른 유용한 특성의 변화를 감수하여야 한다. 따라서 각 균주가 갖는 고유의 항생제 내성을 선발 marker로 이용하고자 MRS 또는 M17 배지에 항생제를 첨가하여 시험 균주를 도말, 접종 후 3~5일간 배양하며 내성을 조사하였다. Table 2-5에서 보는 바와 같이 *L.c* 0781, *L.r* 2084는 tetracyclin, chloramphenicol, erythromycin에 감수성이었으며, neomycin, gentamycin에 *L.c* 0781는 내성, *L.r* 2084는 감수성이었다. 또한, *S.t* 13101, *S.t* 2590은 tetracyclin, chloramphenicol에 내성이었고, erythromycin, neomycin, gentamycin에는 감수성이었다. 따라서 이들 항생제 내성을 이용하여 *L.c* 0781과 세포 융합을 유도하였다.

Table 2-4. Effect of glucose concentrations on the production and regeneration of lactic acid bacteria.

Strain	Glucose Con.	TVC (CFU/ml)	ORC (CFU/ml)	RC(CFU/ml)&RF(%) on each Media			
				A-mRII	MRS-R	TCM-R	LCM-R
<i>L.c</i> 0781	0.1%	4.08×10^{10}	4.4×10^5	8.25×10^7 (0.20%)	7.64×10^8 (1.87%)	3.75×10^8 (0.92%)	9.98×10^8 (2.45%)
	0.5%	7.68×10^{10}	2.65×10^5	5.1×10^7 (0.07%)	2.03×10^8 (0.26%)	1.0×10^9 (9.57 $\times 10^4$ %)	4.52×10^8 (0.59%)
<i>L.r</i> 2084	0.1%	8.6×10^8	4.1×10^4	2.84×10^3 (0.03%)	1.08×10^7 (1.25%)	8.48×10^6 (0.98%)	3.94×10^7 (4.58%)
	0.5%	1.34×10^8	1.0×10^5	1.37×10^3 (0.03%)	1.06×10^6 (0.72%)	7.53×10^5 (0.49%)	1.52×10^6 (1.06%)
<i>S.t</i> 13101	0.1%	1.1×10^{10}	9.99×10^5	5.48×10^7 (0.49%)	2.93×10^8 (2.65%)	3.42×10^8 (3.10%)	3.14×10^8 (2.85%)
	0.5%	2.48×10^{10}	4.47×10^6	5.72×10^7 (0.21%)	1.62×10^8 (0.64%)	1.77×10^8 (0.70%)	1.83×10^8 (0.72%)
<i>S.t</i> 2590	0.1%	8.5×10^{10}	1.88×10^6	6.24×10^7 (0.07%)	1.12×10^8 (0.13%)	3.45×10^8 (0.40%)	4.38×10^8 (0.51%)
	0.5%	3.81×10^{10}	2.24×10^6	1.79×10^7 (0.04%)	2.52×10^7 (0.06%)	4.89×10^7 (0.12%)	3.24×10^7 (0.08%)

* () : Regeneration frequency.

TVC : Total viable cells before enzyme treatment

ORS : Osmotically resistant cells

RC : Regenerated cells

RF : Regeneration frequency

CFU : Colony forming unit

Table 2-5. Antibiotic resistance of the selected lactic acid bacteria.

Antibiotics	Lactic acid bacteria				
	<i>L.c</i> 0781	<i>L.r</i> 2084	<i>S.</i> 13101	<i>S.t</i> 2590	Selected fusant
Tetracyclin 10	-	-	+	+	+
Chloramphen. 5	-	-	+	+	+
Erythromycin 10	-	-	-	-	-
Neomycin 100	+	-	-	-	+
Gentamycin 20	+	-	-	-	+

* Concentration unit of antibiotics is ug/ml (ppm).

나. 세포 융합

0.1% glucose가 첨가된 성장 액체 배지에서 배양된 각 균주 배양액을 PFB로 세척 및 현탁한 후 lysozyme 및 mutanolysin으로 처리하여 형성된 원형질체를 각각 1:1로 혼합하고 회수 및 세척하여 100 μ l의 PFB로 재 현탁하였다. 이 혼합액에 40% PEG 3,350 또는 PEG 8,000을 첨가하여 일정시간 37 $^{\circ}$ C에서 정치 배양한 후 PEG를 제거하고 LCM-R 액체 재생 배지로 재 현탁하여 일정시간 37 $^{\circ}$ C에서 배양 처리한 후 항생제가 들어 있는 선발 LCM-R 재생 배지에 접종, 배양하여 세포 융합 균주를 선발하였다. 상기 실험 결과 Table 2-6과 같이 40% PEG 3,350의 처리시간이 1분이며 LCM-R 재생 액체 배지의 처리시간이 0분, 30분, 24시간에서 각각 14개체, 8개체, 그리고 1개체의 융합체를 선발하였으나, 40% PEG 3,350의 처리시간이 30분, 그리고 PEG 8,000을 융합 매개체로 사용한 경우는 융합이 이루어지지 않았다. 한편, 선발된 이들 융합체는 안정성 조사를 위하여 2일 간격으로 항생제 (tetracyclin 30ppm, gentamycin 30ppm)가 포함된 성장 고체 배지에 계대 배양하여 안정성을 조사하였으나, 4~10회의 계대 배양 동안 대부분이 segregation 되었다. 이는 Kim 등 (1993)의 *Lactobacillus bulgalicus*와 *L. helveticus* 균주를 종간 원형질 융합한 후 1주 간격으로 3회 계대 배양하였을 때 99% 이상이 segregation 되었다는 보고와 유사하였다. 또한, 동일 종간의 원형질체 융합은 다소 보고(Okamoto *et al.* 1983, 1985, Connel *et al.* 1988, Iwata *et al.* 1986)된 바 있으나, 유산균의 형태가 다른 균종간의 원형질 융합은 아직 보고된바가 없다. 따라서, 간균 형태인 *Lactobacillus*와 구균 형태인 *Streptococcus*의 종간 원형질 융합은 안정성에 문제가 있는 것으로 사료되며, 향후 세포융합 기술은 유산균의 경우 동일 형태 또는 동일 종간의 원형질 융합에 적용되어야 할 것으로 사료된다.

Table 2-6. Effect of fusion on treatment time of PEG and regeneration media on *L.c* 0781, *S.t* 13101, and *S.t* 2590.

Treatment time	Fusant(CFU/ml)	
	<i>L.c</i> 0781+ <i>S.t</i> 13101	<i>L.c</i> 0781+ <i>S.t</i> 2590
PEG 1min, & LCM-R broth 0 min.	14	-
PEG 1min, & LCM-R broth 30 min.	4	4
PEG 1min, & LCM-R broth 24 hours	-	1
PEG 30min, & LCM-R broth 0 min.	-	-
PEG 30min, & LCM-R broth 30 min.	-	-
PEG 30min, & LCM-R broth 24 hours	-	-

4. 형질 전환 조건

Electroporation에 의한 형질전환은 균주간의 다양성, 성장 배지와 성장시기, plasmid DNA의 크기와 양, 전압, 완충액의 성분과 농도, pulse length, 전이시킬 plasmid와 균주에 상주하는 extra DNA간의 유사성과 크기 등에 의해서 형질전환의 가능성 및 효율이 결정 된다 (Trevors *et al.*, 1992)고 하였다. 따라서 이를 근거로 선발 균주의 electroporation에 의한 형질전환의 가능성과 형질전환 조건을 조사하고자하였다.

가. 선발 균주의 plasmid DNA 분리

Wild type의 선발 균주가 갖고 있는 고유의 extra DNA 유무를 확인하고자, 0.5% glucose가 첨가된 성장 액체 배지에서 접종, 배양 및 회수된 각 선발 균주의 균체를 O'Sullivan과 klaenhammer의 방법을 변형한 Figure 2-1의 방법에 따라 선발 균주의 plasmid DNA를 분리하여 전기 영동한 결과, 선발 균주 모두에서 extra DNA 즉, 고유의 plasmid DNA는 관찰되지 않았다.(Data not shown)

나. Electrotransformation 조건

1) Field strength의 영향

각각의 선발 균주를 성장 액체 배지에 접종, 배양한 후 회수하고 1mM HEPES (pH 7.0) 용액으로 세척하여 deionized water에 현탁한 후 현탁액 0.1ml에 pKH80 plasmid DNA 1 μ g을 첨가하여 Bio-Rad의 Gene Pulser System(Bio-Rad, USA)을 이용하여 electroporation하였다. pulse 후 곧바로 0.5% glucose가 첨가된 cold-MRS 액체배지를 가하여 균주를 안정화한 다음 항생제를 포함하고 있는 선발 MRS 고체 배지에 도말 접종하여 3~5일간 배양하며 형성된 균락을 관찰하였다.

이때 electroporation의 조건을 조사하기 위하여 *L.c* 0781과 *L.r* 2084균주 그리고 pKH80 plasmid DNA를 이용하였고 우선, discharge capacitor의 변화가 미생물의 electrotransformation에 미치는 영향에 대해서 알려진 바가 없기 때문에 본 연구에서는 25 μ F로 고정하여 수행하였다. 또한, Voltage 변화에 따른 형질전환 효과를 조사하고자 pulse-controller는 200 Ω 으로 조정한 후 field strength는 2.5kV에서부터 12.5kV/cm까지 단계적으로 변화시키며 균주 생존율 및 형질전환 효율을 조사한 결과는 Figure 2-3과 2-4에서 보는 바와 같이 *L.c* 0781과 *L.r* 2084균주 모두 4.5kV/cm의 field strength에서 각각 1.91×10^2 , 4.9×10^2 으로 가장 높은 형질 전환의 효율을 보였다. 이는 Chassy와 Flickinger (1987)의 5.0kV/cm의 field strength에서 *L. casei*로 electroporation하였을 때 가장 높은 형질전환 효율을 얻었다는 보고와 유사하였다. 이 때의 균주 생존율은 각각 7.6 %, 24.64 % 였다. 또한 time constant는 4.5ms이었다. *L.c* 0781 균주 보다 *L.r* 2084 균주의 pulse 후의 균주 생존율이 높았으며, field strength가 증가할수록 균주 생존율 및 형질 전환율은 감소하였다. Zick 등 (1991)은 2~8kV/ml의 field strength에서 실험을 수행하였을 때, 그리고 Luchansky 등 (1988) 또한 *Lactobacillus* strain은 6.5kV/cm에서 가장 높은 형질 전환 효율을 나타냈다고 하였는데 전체적인 결과와 비교해 볼 때 이들 보고와 유사하였다. 그러나 12.5 kV/cm의 field strength에서 두 균주 모두 생존율 및 형질 전환 효율이 약간 증가하는 경향을 보였는데 이는 time constant의 영향인 것으로 사료되며 이때의 time constant는 3.6ms이었다.

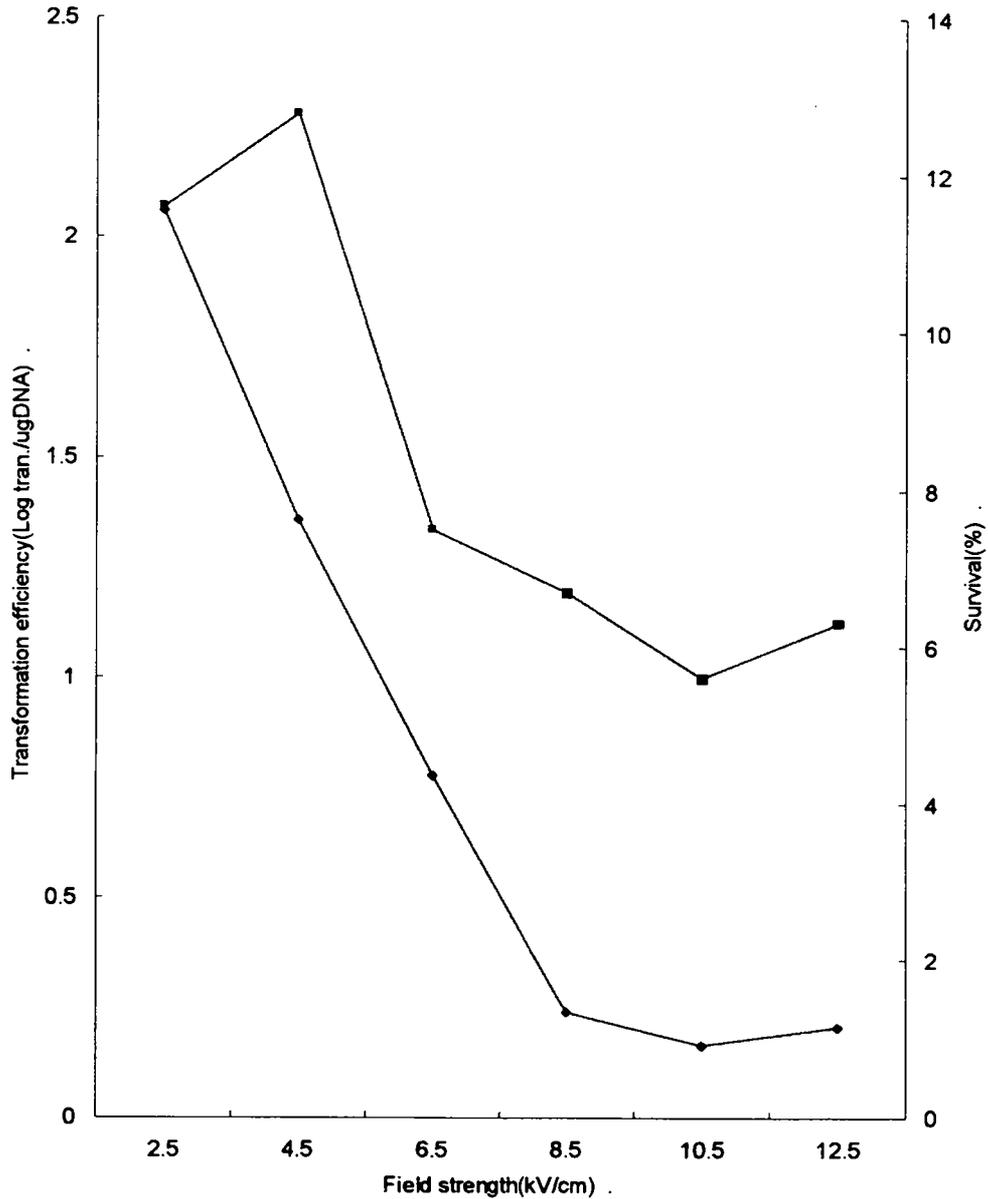


Figure 2-3. Effect of variation in field strength on transformation efficiency(■-■) and post-pulse cell survival(%)(◆-◆) of *L.c* 0781 with plasmid pKH80 in deionized water. Discharge capacitor setting, 25uF; parallel resistor setting on Pulse controller, 200Ω.

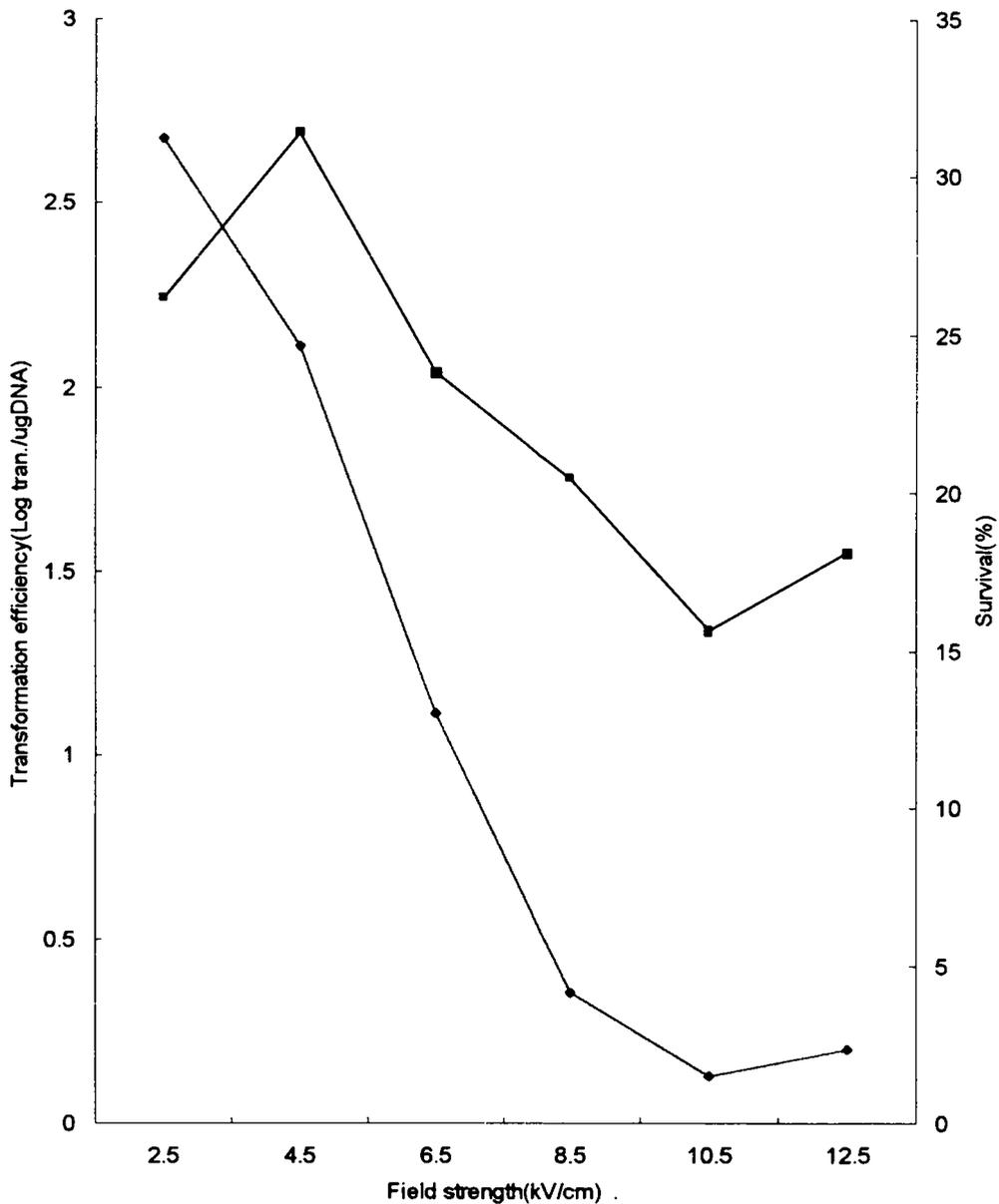


Figure 2-4. Effect of variation in field strength on transformation efficiency(■-■) and post-pulse cell survival(%)(◆-◆) of *L.r* 2084 with plasmid pKH80 in deionized water. Discharge capacitor setting, 25uF; parallel resistor setting on Pulse controller, 200Ω.

2) Parallel resistor setting에 의한 Time constant의 영향

Field strength가 4.5kV/cm일 때 가장 높은 형질 전환 효율을 보임에 따라 field strength를 4.5kV/cm로 조정한 후 parallel resistor를 100, 200, 400, 800, 그리고 1,000 Ω 으로 조정하며 electroporation을 시도하였다. 그 결과 Figure 2-5, 2-6에서 보는 바와 같이 parallel resistor 100, 200, 400, 800, 그리고 1,000 Ω 에 따른 time constant는 각각 2.4~2.5, 4.7, 9.3~9.5, 13.8, 17.8, 22.6~22.7 ms를 보였으며, parallel resistor에 따른 time constant가 증가할수록 균주 생존율 및 형질 전환 효율은 감소하였다. 이는 Jonathan 등 (1990)과 Rhee 등 (1995)의 *Pseudomonas*에서 행한 실험 결과와 유사하였으며, 이들 결과를 볼 때, field strength가 4.5kV/cm이며, time constant가 4.7 일 때 가장 높은 형질 전환 효율을 나타내었다.

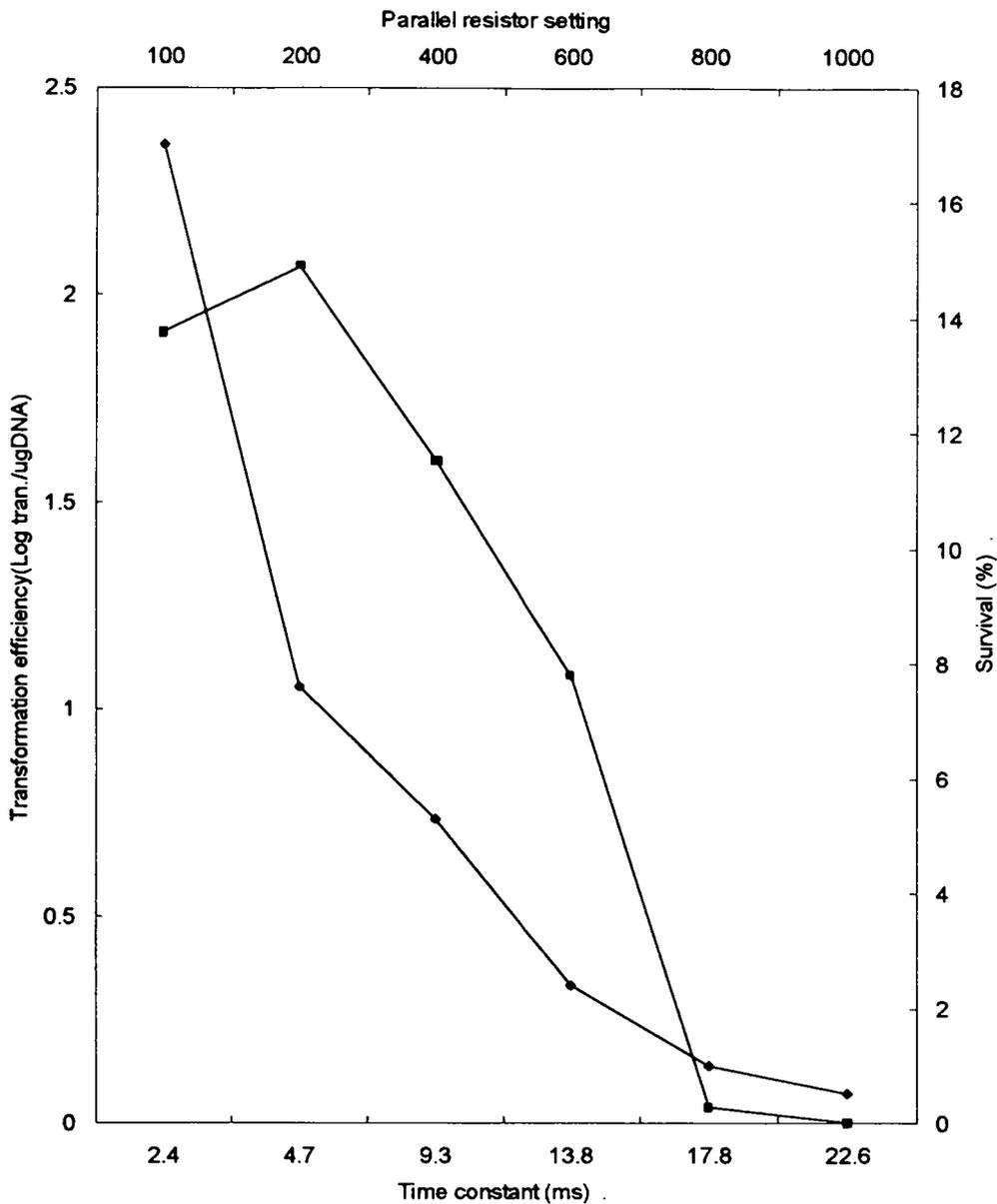


Figure 2-5. Effect of variation of time constant on transformation efficiency(■-■) and post-pulse cell survival(◆-◆) of *L.c* 0781 with plasmid pKH80 in deionized water. Discharge capacitor setting, 25uF; field strength, 4.5kV/cm (0.9kV applied voltage).

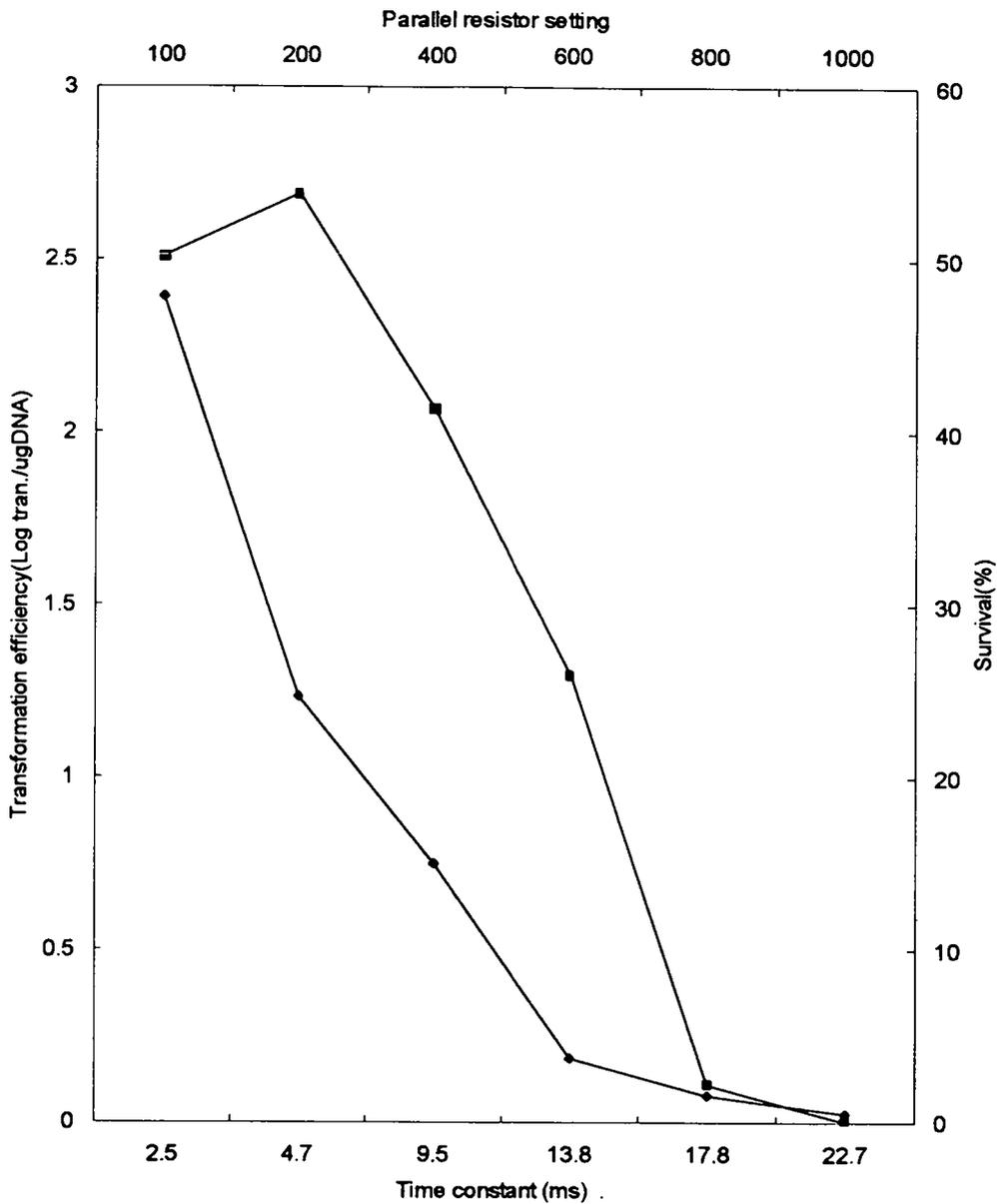


Figure 2-6. Effect of variation of time constant on transformation efficiency(■-■) and post-pulse cell survival(◆-◆) of *L.r* 2084 with plasmid pKH80 in deionized water. Discharge capacitor setting, 25uF; field strength, 4.5kV/cm (0.9kV applied voltage).

3) Electroporation buffer의 영향

높은 voltage는 균주 치사의 주요한 요인으로 작용하며, electroporation buffer 그리고 특정 종이나 유산균주의 종류 또한 균주 치사에 영향을 미친다. 따라서 electroporation buffer에 대한 transformation의 효율을 조사하고자, field strength를 4.5kV/cm, discharge capacitor를 25 μ F, 그리고 parallel resistor를 200 Ω 으로 조정 한 후 electroporation buffer를 cold-deionized water, 10% glycerol (v/v), HGEb, SMEb 그리고 PEB (McIntyre *et al.*, 1989)로 변경하며 형질 전환을 시도하였다. 결과는 Table 2-7과 같이 cold-deionized water를 사용하였을 때 *L.c* 0781은 1.90×10^2 , *L.r* 2084는 4.82×10^2 으로 두 균주 모두에서 가장 높은 형질 전환 효율을 보였으며 이때의 time constant는 4.5 ms 이었다. 다음으로 *L.c* 0781, *L.r* 2084 모두 HGEb를 사용하였을 때 각각 5.9×10^1 , 1.02×10^2 이었다. 이는 McIntyre 등 (1989)이 보고한 *L. lactis*의 electrotransformation에서 deionized distilled water를 현탁액 및 buffer로 사용하였을 때 형질 전환 효율이 가장 좋았다는 결과와 유사하였다. 또한 electroporation의 최적 time constant는 약 5 ms라는 Pulse-controller Instrument manual (Bio-Red Catalog No. 165-2098)과 일치하였다. 따라서 위의 모든 조건을 종합해 볼 때 *L.c* 0781, *L.r* 2084 두 균주의 최적 electro-transformation의 조건은 Field strength는 4.5kV/cm, discharge capacitor는 25 μ F, 그리고 parallel resistor는 200 Ω (time constant=4.5~4.7 ms)이며 electroporation buffer는 cold-deionized water이었다.

Table 2-7. Effect of electroporation buffer composition on transformation of *L.c* 0781 and *L.r* 2084 with plasmid pKH80.

Buffer	Time constant (ms)	pKH80(transformant/ugDNA)	
		<i>L.c</i> 0781	<i>L.r</i> 2084
dd H ₂ O	4.5	1.90×10^2	4.82×10^2
10% glycerol	4.7	3.4×10^1	6.7×10^1
HGEB	4.6	5.9×10^1	1.02×10^2
SMEB	4.0	4.2×10^1	5.4×10^1
PEB	3.6	5.1×10^1	4.8×10^1

Discharge capacitor setting, 25uF; parallel resistor setting on Pulse controller , 200Ω ; field strength, 4.5kV/cm (0.9kV applied voltage).

5. Vector 개발 및 항 콜레스테롤 유전자의 cloning

그랩 positive 균인 유산균에 가장 적절한 vector 개발을 위하여 형질 전환체의 선발에 필요한 marker와 유산균 내에서의 발현을 고려하여 여러 종류의 vector를 electroporation에 의한 방법으로 형질전환을 시도하던 중 연구가 종료되었고. 항 콜레스테롤 관련 유전자의 cloning은 콜레스테롤 대사 및 assimilation, degradation 관련 유전자를 탐색하던 중 2년차 연구로 종료됨에 따라 소기의 목적을 달성하지 못하였다.

제 4 절 참고 문헌

1. Anne. J., H. Eyssen and P.D, Sommer. 1976. Somatic hybridization of *Penicillium roqueforti* with *P.chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature*. 262: 719-721
2. Aukrust, T. and Nes, I.F. 1988. Transformation of *Lactobacillus plantarum* with the plasmid pTV1 by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 52: 127-132.
3. Chassy, B. M., Gibson, E., and Giuffrida, A. 1976. Evidence for extra chromosomal elements in lactobacilli. *J. Bacteriol.* 127: 1576-1578.
4. Chassy, B. M. and J. L. Flickinger. 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 173-177.
5. Connel, H., Lemmon, J. and Tannock, G.W. 1988. Formation and regeneration of protoplasts and spheroplasts of gastrointestinal strains of lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1615-1618.
6. Cosby, M.W., Axelsson, L.T. and Dobrogosz, W.J. 1989. Tn917 transposition in *Lactobacillus plantarum* using the highly temperature-sensitive plasmid pTV1Ts as vector. *plasmid* 22: 236-243.
7. Fournier. F., C. Gerbaud, H. Balano, M. Aigle, T. Heslot and M. Guerineau. 1980. Use of spheroplasts to transform yeast with chimeric plasmids. L. Ferenczy and G.L. Farkas (ed), Pp. 43-48. *In Advances in Protoplast Research*. Pergamon Press. Oxford.

8. Gasson, M.J. 1980. Production, regeneration and fusion of protoplasts in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: 99-102.
9. Harlander, S. K. 1987. Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, In *Streptococcal Genetics* (eds. by Ferretti, J, J., and Curtiss, R.), Washington. D. C; American Society for Microbiology. pp 229-233.
10. Hashiba, H., R. Takiguchi, S. Ishii, and K. Aoyama. 1990. Transformation of *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti* with plasmid pLHR by electroporation. *Agri. Biol. Chem.* 54: 1537-1541.
11. Holo, H. and Nes, I.F. 1989. High-frequency transformation, by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3119-3123.
12. Hopwood, D.A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 237-272
13. Jonathan, M.D., Larry, E.B. and Pamela, A.S. 1990. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Analytical Biochem.* 189: 75-79.
14. Kanatani, K., Yoshida, K., Tahara, T., Sakamoto, M. and Oshimura, M. 1990. Intraspecific protoplast fusion of *Lactobacillus plantanum*. *Agri. Biol. Chem.* 54: 225-227
16. Kondo, J.K. and McKay ,L.L. 1982. Mutanolysin for improved lysis and lipid protoplast formation in dairy streptococci. *J. Dairy Sci.* 65: 1428-1431.

17. Kondo, J.K. and McKay ,L.L. 1984. Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: Optimization and use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 252-259.
18. Lee-Wicner, L.J. and Chassy, B.M. 1984. Production and regeneration of *Lactobacillus casei* protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 994-1000.
19. Lin, J.H.C. and Savage, D.C. 1986. Genetic transformation of rifampicin resistance in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2107-2111.
20. Luchensky, J.B., Muriana, P.M. and Klaenhammer,T.R. 1988. Application of electroporation for transfer of plasmid DNA into *Lactobacillus*, *Luconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. *Mol. Microbiol.* 2: 637-646.
21. McKay, L.L. 1983. Fuctional properties of plasmid in lactic streptococci. *Antonie Leewenhoek J. Microbiol. Serol.* 49: 259-274.
22. McKay, L.L. and Baldwin, K.A. 1982. Characterization and transfer ability of plasmids among group N streptococci. *In Microbiology* 210-212
23. McIntire, D. A. and Harlander, S. K. 1989. Improved electroporation efficacy of intact *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* grown in defined media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2621-2626.
24. Morgan, A.J. 1983. Yeast strain improvement by protoplast fusion and transformation. In 6th International Protoplast Symposium. pp. 156-166. Basel.

25. Neumann, E., Scaufer-Ridder, M., Wang, Y. and Hofschneider, P. 1982. Gene transfer into mouse myeloma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO. J.* 1: 841-845.
26. Okamoto, T., Y. Fujita, and R. Irie. 1983. Protoplast formation and regeneration of *Streptococcus lactis* cells. *Agric. Biol. Chem.* 47: 259-263.
27. O'Sullivan, D.J., and Klaenhammer, T. R. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2730-2733.
28. Powel, I. B. Achen, M.G. Hillier, A. and Davidson, B.E. 1988. A simple and rapid method for genetic transformation of lactic streptococci by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655-660.
29. Reed, W. M. 1987. Protoplast fusion of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus lactis* via electric field or chemical induction. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 33: 287-294.
30. Rhee, Y.H. and Kim, J.H. 1995. Transformation of rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* by electroporation. *Agricul. Chem. and Biotech.* 38: 371-375.
31. Sentandreu, R., E. Herrero, M., V. Elorza, H. Rico and J. Pastor. 1983. Synthesis and assembly of wall polymers on regenerating yeast protoplasts. In 6th International Protoplast Symposium. pp 187-195. Basel.
32. Shimizu-Kadota, M. and S. Kudo. 1984. Liposome-mediated transfection of *Lactobacillus casei* spheroplasts. *Agric. Biol. Chem.* 48: 1105-1107.

33. Simon, D., Rouault, A. and Chopin, M.C. 1986. High-efficiency transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 394-395.
34. Smith, M.D. 1985. Transformation and fusion of *Streptococcus faecalis* protoplasts. *J. Bacteriol.* 92-97.
35. Trevors, J.T., Chassy, B.M., Dower, W.J., and Blaschek, H.P. 1992. Electroporation of bacteria by plasmid DNA. In Guide to electroporation and electrofusion. Chang, D.C. et al. Ed. Academic Press. London. p265-290
36. Vescovo, M., Morelli, L., Bottazzi, V., and Gasson, M.J. 1983. Conjugal transfer of broad-host-range plasmid pAM β 1 into enteric species of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 753-756.
37. Zink, A., Klein, J.R. and Plapp, R. 1991. Transformation of *Lactobacillus delburuckii* spp. *lactis* by electroporation and cloning of origins of replication by use of a positive selection vector. *FEMS Microbiol. Lett.* 78: 207-212.

제 4 장 항 콜레스테롤 발효유제조 및 *in vivo* 실험을 통한 혈중콜레스테롤 저하기능 연구

제 1 절 서 설

옛날부터 독성이 없고 비 병원성인 유산균을 유제품에 첨가하여 산도를 낮추고 응고시켜 만든 발효 유제품이 인간의 건강에 유익한 영향을 미친다고 알려져 왔다. 우리 나라에서도 김치 등을 만들 때 유산균이 함유되어 있는 젓갈을 사용하여 김치 맛을 내고 오랫동안 보존하여 오고 있다. 1908년 Eli Metchnikoff가 유산균이 사람의 장내에서 유해미생물의 성장을 억제하여 독소를 생산하지 못하게 함으로써 수명을 연장하는데 도움을 줄 수 있다는 학설을 발표한 이래 오늘날 대표적인 발효유인 요구르트(yogurt)산업을 탄생시켰다. 현대 산업사회를 사는 모든 사람들의 큰 관심사는 건강이며, 건강은 우리가 섭취하는 식품과 깊은 관계가 있는데, 그 중에서도 발효유는 여러 가지 건강 증진 기능이 높은 건강식품으로 인정되고 있다.

한편 cholesterol은 세포막의 구성 성분이며, steroid 호르몬, vitamin D의 전구물질로서 필수 영양분이다. 그러나, 콜레스테롤을 과다 섭취하는 경우, 흡연 및 비만 등의 다른 요인과 결부되어 혈중 cholesterol을 증가시키게 되면 동맥 경화증과 심장병을 포함한 순환기계 질병을 유발시키는 것으로 알려져 있다(Hurley, 1980). 소득의 향상과 더불어 지방을 다량 함유한 음식물의 섭취가 증가함에 따라 콜레스테롤과 이로 인한 동맥경화증에 대한 관심이 더욱 높아지고 있다. 따라서, 전세계적으로 관상동맥의 경화에 의한 순환기계 질병은 의학계와 영양학계의 매우 중요한 연구과제가 되었고, 건강한 생활을 추구하는 40세

이후의 인구집단에게 가장 위협적인 성인병으로 알려지게 되었으며 우리나라에서도 이미 중요한 성인병으로 인식되게 되었다(경제기획원 조사 통계국, 1980~1993). 특히, 미국인 사망률의 약 50%가 cholesterol이 관상동맥벽에 축적되어 혈류를 방해하고 심장마비를 일으키는 동맥경화증(atherosclerosis)에 의하여 발생하고 있다는 보고도 있다. 동맥내의 경화 조직을 만드는 cholesterol은 혈액내의 LDL (low density lipoprotein)입자에 의하여 발생하며 혈액내의 LDL입자의 함량이 높으면 동맥경화증을 일으키는 확률도 또한 높아진다. 외국에서는 오래 전부터 혈중 cholesterol을 저하시키는 식품에 관한 연구 대상으로 발효유가 관심의 대상이 되어왔다. 과거 20여 년간에 걸친 연구 결과 발효유와 유산균이 항암 효과 (Goldin *et al.*, 1984)와 더불어 혈중의 cholesterol 농도도 저하시킨다는 사실이 확인되고 있어서 현대인의 가장 중요한 성인병인 동맥경화증과의 싸움에서 또 하나의 중요한 예방수단으로서의 가능성이 높아지고 있다. 이러한 연구는 Biss 등 (1971)이 아프리카의 마사이족을 연구하던 중 그들이 동물성 식품을 다량 섭취하면서도 혈중 콜레스테롤 수치가 낮고 허혈성 심장병의 빈도가 낮다는 것을 발견하면서 이는 식이 중 다량 섭취하는 발효유와 관련이 있으며 허혈성 심장병이 성인 사망률의 가장 높은 비율을 차지하는 선진국과는 대치되는 현상이 나타남에 따라 그로부터 발효유의 혈중 콜레스테롤 저하 작용에 대한 연구가 시도되었다(Mann *et al.*, 1974, Harrison *et al.*, 1979, Mann 1977, Hepner *et al.*, 1979, Danielson *et al.*, 1989, Jasper *et al.*, 1984). 그로부터 많은 연구자들이 발효유 제품을 섭취하면 혈중 콜레스테롤이 저하된다고 주장하였으나, 그렇지 않다고 하는 보고도 있었다(Huss *et al.*, 1981). Rossouw 등 (1981)은 요구르트나 크림에 비교하여 탈지우유의 콜레스테롤 저하 효과가 더 현저하다고 하였고, Thompson 등 (1982)은 발효시킨 우유와 발효시키지 않은 우유를 인간에게 섭취시켰을 때 혈중 콜레스테롤 수

치에 차이가 없었다고 하였다. 또한 McNamara 등 (1989)도 정상인에게 저지방 요구르트를 복용시켰을 때 혈중의 HDL, LDL, 총 콜레스테롤 수치에 아무런 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 반면, Mott 등 (1973), Grunewald (1982), Kiyosawa 등 (1984), 그리고 Danielson 등 (1989)의 동물에 실시한 실험 결과에서 발효유와 혈중 콜레스테롤 수치의 밀접한 관계가 증명되었다. 그러나, 쥐의 경우 인간과 다른 지질 대사 때문에 그 결과를 인간에 적용할 수 없다는 의견이 지배적이다. Thakur 등 (1981)은 고 cholesterol 사료와 함께 발효유를 급여한 토끼가 고 cholesterol만을 급여한 토끼보다 혈중 cholesterol 수준이 낮았으며, 토끼를 사용한 실험에서 요구르트와 비슷한 칼슘의 콜레스테롤 저하 효과를 보고하고 요구르트내의 칼슘이 중요한 인자이지만 그 외에 다른 인자도 콜레스테롤 저하에 영향을 줄 것이라고 보고하였다. Grunerwald (1982)는 *Lactobacillus acidophilus*로 발효시킨 탈지유를 급여한 rat과 급여하지 않은 rat의 혈중 cholesterol을 비교한 결과 발효유를 급여한 rat에서 혈중 cholesterol이 낮게 나타났다고 보고하였다. Gilliland 등(1985)은 담즙에 대한 저항성과 cholesterol 소화력이 높은 *Lactobacillus acidophilus*를 cholesterol 함량이 높은 사료를 먹인 돼지에게 급여했을 때에 혈중 cholesterol 저하 효과가 컸다고 보고하였다.

한편 Danielson 등(1989)은 cholesterol이 많은 사료를 먹인 돼지에게서 선발된 *Lactobacillus acidophilus* LA16으로 만든 발효유를 하루에 0.454kg씩을 먹인 결과 혈중 cholesterol과 LDL (low density lipoprotein) 함량을 저하시켰으나 혈중 triglyceride 및 HDL (high density lipoprotein) 함량에는 영향이 없었다고 보고하였다. 최근에 덴마크의 Aarhus 대학병원의 Agerbaek, Gerdeo와 Richelsen (1995)등은 Caucasus의 장수촌인 Abkharia의 장수노인의 장 내용물에서 Kiev대학 연구진이 분리한 유산균(*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*

thermophilus)으로 발효시킨 발효유를 매일 200 ml씩 44세의 정상적인 남자 (혈중 cholesterol 수준, 체구, 건강상태 등) 58명에게 급여했을 때에 6 주 후에 총 혈중 cholesterol 함량이 상당히 저하하였으며 (-0.37 mmol/l), 저하된 cholesterol의 전부가 LDL cholesterol이었다고 주장하였다. 위에서 언급했듯이 몇몇 연구자들은 발효유 또는 유산균의 섭취가 혈중 cholesterol이나 lipoprotein 수준에 영향을 준다는 증거를 발견하지 못했다고 하였는데, 이러한 발효유 제품의 혈중 콜레스테롤에 대한 상반된 결과는 이들이 연구에 사용한 발효유의 형태와 사용량이 다양하고, 유산균의 종류, 실험 대상의 성, 나이 및 혈중 cholesterol 등이 다양하여 연구 결과들의 직접 비교 평가 자체가 어려운 형편이나, Jasper 등 (1984)이 발효에 사용된 유산균의 종류에 따라 혈중 콜레스테롤이 다르게 변화하였다는 보고로 볼 때 발효에 사용된 미생물의 균주 및 여러 가지 다른 요인들 때문이라고 믿어지고 있다. 지금까지 국내의 유산균과 cholesterol과의 관계에 대한 연구는 국산 발효유 제품에서 분리한 유산균을 이용한 cholesterol 소화량 시험 등이 있으나 생명공학기술을 이용하여 특정한 기능을 가진 유산균을 개발하고 그것을 동물실험을 하여 확인한 실적은 없다. 그러나 최근 동물성 식품의 소비가 증가함에 따라 포화지방과 cholesterol에 의한 혈중 cholesterol의 증가가 동맥경화증을 두려워하는 성인 남녀에게 큰 관심이 됨에 따라 각 유업체에서 이에 대한 연구나 제품개발이 활발히 진행되고 있다. 이상과 같이 발효유가 혈중 cholesterol 함량을 감소시킨다는 연구 결과는 계속 발표되고 있으나 발효유가 혈중 cholesterol을 저하시키는 기작에 대한 연구는 아직 결론에 이르지 못하고 있으며 계속 연구가 진행중이다. 따라서 본 연구에서는 제 1 세 부과제에서 선발한 항 cholesterol 유산균을 starter로 사용한 기능성 발효유를 제조하기 위한 제반조건 검토와 기능성 발효유를 동물에 투여한 후 선발된 유산균이 혈중 cholesterol 농도를 저하시키는가를 확

인함과 동시에 동맥경화증예방 및 치료에도 효과가 있는가를 조사하는데 연구의 목적을 두었다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 일반 조성분의 분석

단백질, 지방, 탄수화물 등은 식품 분석법의 방법에 따라 분석하였으며, 섬유소, 회분, 인산, 칼슘 등은 AOAC의 방법으로 분석하였다.

2. pH 및 적정산도

pH는 APHA의 standard methods(1985) 및 신 등 (1984)의 방법에 따라 pH meter로 측정하였고, 산도는 우유 유제품 시험법 (한국 유가공 기술과학회편) 및 Chollins 등 (1991)의 방법에 준하여 적정 산도를 측정하였다.

3. 관능검사

관능 검사 방법에는 여러 가지 방법이 있으나 본 실험에서는 소비자 기호 시험에 많이 이용하는 2점 기호 선택 시험 (paired comparison preference test)을 사용하였으며 파스퇴르유업(주)에 근무하는 직원 중에서 20명을 패널(panel)원으로 선정하였다. 관능 검사 실시 조사 방법은 다음과 같다. 즉 선발 균주를 starter로 사용하여 제조한 발효유 (요구르트)에 대한 기호도를 비교하기 위하여 패널원으로 하여금 제시된 2개의 시료 중에서 어느 것을 선택하겠는가를 질문하여 답하도록 하였으며, 선택한 이유를 기호성 특성 항목 중에서 한가지 또는 그 이상 지적하게 하였다. 이때 사용한 질문지는 Table 3-1과 같으며 선택된 비율에 대한 t-검정으로 유의성을 조사하였다.

Table 3-1. Questionnaire of paired comparison preference test.

품명 : 성명 : 설명	기호 : 년월일 :					
1. 제시된 두 개 시료중 풍미가 보다 좋은 것에 v표로서 표시하여 주시오. 2. 보다 좋다고 선택한 이유를 다음 표 중에서 선택하여 v표로 표시하여 주시고 그 외에 다른 요소가 있으면 기타 란에 적어 주시오.						
시 료 (기 호)	좋은것 에 지적(V)	선택 기준 (기 호 성)				기 타
		신선 하다	달다	후미가 좋다	풍부 하다	

4. 실험동물 실험 설계

가. 실험동물

초기 체중 2kg 내외의 New Zealand white 암컷을 사용하였다.

나. 실험 사료

애그리 브랜드 퓨리나 코리아(주)의 큰 토끼 사료 펠렛형을 사용하였으며, 실험 사료의 성분표는 다음과 같다.

Composion	Rate of composion(%)
Crude protein	15.0
crude fat	2.0
crude fiber	15.0
crude ash	10.0
phosphate	0.4
calcium	0.8

다. 실험구 배치 및 발효유 급여

발효유를 급여하지 않고 사료에 콜레스테롤만을 급여하는 구를 대조구로 하고, 실험구는 선발 균주 4주(*La* 2084, *Lc* 0781, *Lacto. l* 204, *Ef* 402)와 대조균주(*La* 145)로 제조한 발효유에 콜레스테롤을 혼합하여 급여하는 구로 나누어 6 개 구로 하여 각 시험구 당 5마리의 실험동물을 배치하였다. 또한 일반 사료와 물은 각 구 동일하게 자유급식 시켰으며 콜레스테롤 5-cholestan-3 β -ol;3 β -hydroxy-5-cholestan (Sigma Co.)은 각 구 동일하게 1 일 체중 1kg당 0.3g을 급여하였고 발효유 급여는 1일 체중 kg당 10cc를 매일 급여하였으며, 발효유의 평균 조성은 Table 3-2와 같다.

Table 3-2. Chemical composition of the yogurt made with the selected lactic acid bacteria.

(unit: %)

composition yoghurt	Protein	Fat	Carbohy drate	Ash	T.S	Water	pH	Viable cell(cfu/ml)
1	3.51	2.84	9.51	0.56	16.42	83.58	4.3	1.12×10^8
2	3.42	2.83	9.35	0.54	16.14	83.86	4.2	1.20×10^9
3	3.43	2.75	9.61	0.55	16.43	83.66	4.5	1.25×10^8
4	3.52	2.82	9.52	0.54	16.40	83.60	4.3	1.24×10^8
5	3.53	2.76	9.35	0.53	16.17	83.83	4.5	1.21×10^9

1. Yoghurt made with *L.r* 2084
2. Yoghurt made with *L.c* 0781
3. Yoghurt made with *Lacto.l* 204
4. Yoghurt made with *Ef* 402
5. Yoghurt made with *La* 145

라. 혈액채취 및 혈장 분리

혈액은 매 2주 간격으로 채취하였으며 혈액 채취 12 시간 전에 절식시킨 토끼의 이정맥으로 부터 10ml 주사기로 약 10ml 채취한 후 항응고제가 들어 있는 15ml polypropylene tube에 넣은 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리 하여 혈장을 채취한 후 -70℃에 냉동 보관하면서 콜레스테롤 측정 시료로 사용하였다.

마. 혈중 콜레스테롤 측정

채취한 혈액으로부터 분리한 혈장을 혈액성분 자동분석기 (Johnson & Johnson, EKTA Chem 60II, U.S.A)를 이용하여 total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglyceride, low density cholesterol (LDL-C)를 측정하였다.

바. 통계처리

각 시험구의 측정값 상호 비교시 유의성은 MINITAB program을 사용한 ANOVA법으로 검정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 우수 starter 선발

선발 균주 중에서 가장 좋은 starter를 선발하기 위하여 선발 균주를 사용한 발효유 제조 실험을 여러 차례 반복 실험한 후 선발 균주간의 특성을 비교하였으며 그 결과는 다음과 같다.

가. 선발 균주의 활력시험

선발 균주의 생균수는 BCP 배지를, 효모 및 곰팡이 오염 여부 측정에는 PDA배지를 이용하여 선발 균주별 적정 배양 온도에서 6 시간 배양 후 조사한 결과는 Table 3-3과 같이 선발 균주 모두 활력이 양호하였으며 효모나 곰팡이는 음성을 나타내었다.

Table 13-3. Activity test of the selected lactic acid bacteria after 6 hours incubation

Strain	Cell count(cfu/ml)	Yeast and fungi	Activity
<i>L.c</i> 0781	1.04×10^8	-	Good
<i>L.r</i> 2084	3.70×10^8	-	Good
<i>Lacto.l</i> 204	3.32×10^7	-	Good
<i>Ef</i> 402	1.60×10^8	-	Good
<i>L.a</i> 145	5.36×10^8	-	Good

※ Means value of triplication.

나. pH 및 적정 산도

선발 균주를 15 % 탈지 우유 배지를 사용하여 85℃에서 15분간 살균 후 전 배양액 10%를 접종한 다음 선발 균주별 적정 배양 온도에서 6 시간 배양 후 pH 및 적정 산도를 조사하였으며 그 결과는 Table 3-4와 같다. Table 3-4에 나타난 바와 같이 모든 선발 균주에서 배양 6 시간 후 pH는 우유의 등전점에 도달하였고, 발효유의 적정 산도는 1.0~1.1%일 때 가장 좋았다고 보고 (고 등, 1991)되었던 바 선발 균주도 이 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

Table 3-4. pH and titratable acidity of the selected lactic acid bacteria

Strains	pH	Titratable acidity(%)
<i>L.c</i> 0781	3.9	1.2
<i>L.r</i> 2084	4.1	1.4
<i>Lacto.l</i> 204	4.3	1.3
<i>E.f</i> 402	4.7	1.5
<i>L.a</i> 145	4.0	1.3

※ Means value of triplication.

다. 커드 형성 및 유청 분리 조사

선발 균주를 15% 탈지 우유 배지를 배지로 사용하여 85℃에서 15분 살균 후 선발 균주별 적정 배양 온도에서 전 배양액 5%를 접종한 후 정치 배양하면서 커드 형성과 유청 분리(whey off) 시험을 실시하였던 바 그 결과는 Table 3-5와 같이 6시간 후부터 선발 균주 모두 커드 형성이 시작되었고 9시간 후에는 커드 형성이 완료되었다. 또한 선발 균주 모두 커드 형성이 우수하였고, 유청 분리도 적었으며 특히 *L.r* 2084가 커드 형성력이 좋고 유청 분리도 가장 적었다. 그 후 수차례의 계대 배양과 혼합 배양 실험을 통하여 조사한 결과를 종합하여 볼 때 선발 균주 중에서 *L.r* 2084가 starter로서 가장 우수한 기능을 나타내었다. 발효유 제조시 사용하는 starter에 따라 커드 형성 시간이 달라지는데 본 실험균주의 커드 형성은 9시간까지 완료되었으며 whey off (유청 분리)도 적었다.

Table 3-5. Test of curd formation and whey off of the selected lactic acid bacteria.

Strains items Incubation time	<i>La</i> 145		<i>L.r</i> 2084		<i>L.c</i> 0781		<i>Lacto.l</i> 204		<i>E.f</i> 402	
	Curd	Whey off	Curd	Whey off	Curd	Whey off	Curd	Whey off	Curd	Whey off
3 hrs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 hrs	++	+	+++	-	++	+	++	-	++	+
9 hrs	+++	+	+++	-	+++	+	+++	+	+++	+

Whey off : - : None, + : Degree of whey off

Curd formation : - : None, + : Degree of curd formation

2. 향 콜레스테롤 발효유 제조 방법 확립

가. 발효유 원료 배합표 작성

기본 원료로는 신선 원유를 81%로 하고 각종 당과 청포도 농축액을 첨가하여 향 성분을 강화하였으며, 기능성 물질로는 현재 혈당 저하 및 콜레스테롤 저하기능이 있다고 알려진 실크파우더(silk powder)를 첨가하였다. 당도는 Brix 16%가 되도록 발효유 조성표를 작성하였으며 원료의 성분 분석표는 Table 3-6과 같다. 또한 Table 3-6을 토대로 한 원료에 대한 혼합 비율과 성분 분석표는 Table 3-7과 같다. 발효유 원료 배합표 작성시 탈지분유를 넣지 않고 생유를 81% 첨가함으로써 기능성 물질을 포함한 조성을 갖도록 하였으며 당도는 flavor test를 통하여 가장 적합하다고 생각되는 Brix 16 %로 정하였다.

Table 3-6. Chemical composition of raw material for yoghurt manufacture.

(unit : %)

composition materials	Protein	Fat	Carbohydrate	T.S	Water
Raw milk	3.6	3.4	4.68	11.68	88.32
SMP75/25	27.2	0.5	53.5	53.1	6.9
Glucose			92.0	92.0	8.0
Fructose			98.0	98.0	2.0
Isomalto-origo sacchoride			75.0	75.0	25.0
Green grape concentrate			68.0	68.0	32.0
Pine fiber			95.5	95.5	4.5
Maxilact LX500	14.6	51.2		65.8	34.2
Silk powder	99.6	0.1		99.7	0.3

Table 3-7. Mix ratio and chemical composition of raw material for yoghurt manufacture.

(unit : %)

Materials	Composition		Protein	Fat	Carbo- hydrate	T.S	Water
	Mix ratio						
Raw milk	81.955		2.95	2.78	3.85	9.75	72.1
SMP 75/25	2.7		0.73	0.013	1.44	2.183	0.18
Glucose	1.8		0	0	1.66	1.665	0.144
Fructose	0.6		0	0	0.588	0.588	0.012
Isomalto-origo saccharide	2.9		0	0	2.17	2.175	0.725
Green grape concentrate	9.0		0	0	6.12	6.12	6.12
Pine fiber	1.0		0	0	0.955	0.955	0.045
Maxilact LX500	0.03		0.004	0.0015	0	0.019	0.01
Silk powder	0.01		0.009	0	0	0.009	0.004
Blue color k-8813	0.005		0	0	0	0	0
Total	100		3.693	2.7945	16.783	23.464	76.1

나. 실험실 내 발효유 제조 공정 확립

발효유의 대량 생산 조건을 확립하기 위한 예비 실험으로 실험실 내에서 여러 차례의 발효유 제조 시험을 통하여 다음과 같은 실험실 내 발효유 제조 공정을 확립하였다.

- 1). Mixing bowl에 원유를 넣어 50~55℃로 예열 한다.
- 2). 예열된 원유에 탈지 분유(SMP)와 실크 파우더 등 배양액 성분을 첨가 혼합하고 30분간 교반하여 완전히 용해한다.
- 3). 멸균된 삼각 플라스크와 멸균된 stirrer를 준비한 후, 여기에 용해된 원료를 옮겨서 85℃에서 약 15분간 살균한다.
- 4). 균주별 적정 배양 온도까지 서서히 냉각시키며, 냉각이 어느 정도 되면 배양 온도 조건 water - bath에서 배양 온도를 유지시켜 준다.
- 5). 유당 분해 효소와 선발 균주 배양액을 접종하고 10~20분간 교반한다.
- 6). water - bath에서 균주별 배양 온도로 5-6시간 정치 배양한다.
- 7). 배양 후 pH 4.6부근에서 배양이 완료되면, 교반을 실시하여 curd를 파쇄시킨다.
- 8). 살균. 냉각시킨 균질기에 압력을 180 bar로 하여 균질한 후 즉시 4℃로 냉각시킨다.
- 9). 무균 충전하여 냉장고에 보관하여 안정화시킨다.

다. 대량생산(상품화)제조공정 Flow chart 확립

선발 균주를 starter로 사용하여 발효유를 제조하면서 발효유를 대량 생산하여 상품화하기 위한 생산 기기 조건 및 대량 제조 공정의 Flow chart를 Figure 3-2과 같이 확립하였다.

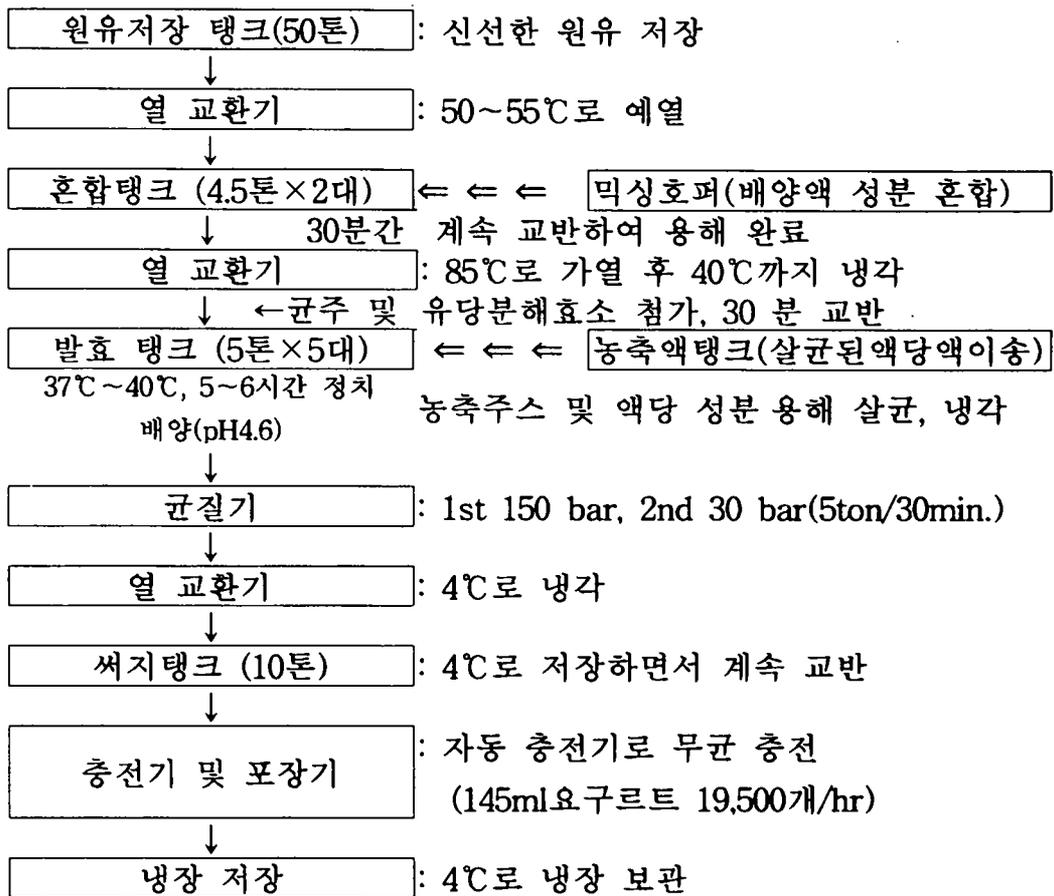


Figure 3-2. Flow chart of the mass production of the fermented milk.

상기공정에서 우유의 가열 동안에는 지방 구의 형태 변화가 거의 없으므로 균질하는데 있어서 발효유의 적당한 균질압은 150 - 300 Bar가 좋은 것으로 알려있으므로 본 실험은 1차 균질압을 150 Bar로 하고 2차 균질압은 300 Bar로 하는 것으로 균질 조건을 잡았다. 열처리하는 원료 성분에 크게 손상을 주지 않는 살균 온도를 택하여 예비 가열 온도는 50~55℃, 다음은 85℃에서 30분 가열하고 원유의 살균과 더불어 첨가물의 용해를 촉진시켰으며, 배양은 선발 균주의 적정 온도에서 5~6 시간으로 하였고 일일 원유 50 톤 처리규모를 확립하기 위하여 여러 차례 제조공정을 반복 실험하므로써 상기 Flow chart를 완성하였다.

3. 향 콜레스테롤 발효유의 관능검사

식품 산업에서 판매의 목적으로 제조 출하된 식품은 중국에 소비자에 의하여 선택 소비되지 않는다면 아무 소용이 없게 된다. 즉 제품의 품질을 사용하는 소비자가 좋아하고 사용하여 주어야만 그 목적을 달성할 수 있다. 이러한 목적을 달성하기 위한 한가지 수단으로 식품에 대한 관능 검사를 실시한다. 소비자 기호 시험에 많이 이용하는 2점 기호 선택 시험 (paired comparison preference test)을 사용하여 파스퇴르유업(주)에 근무하는 직원 중에서 20명을 패널(panel)원으로 선정한 후 선발 균주를 starter로 사용하여 제조한 발효유 (요구르트)와 대조구(A)로 현재 상품화 발효 제조에 사용하고 있는 starter인 *L.a* 145로 제조한 발효유를 사용하여 Table 3-1과 같은 질문지를 사용, 관능 검사를 실시하였다. 이때 선택된 비율에 대한 t-검정으로 유의성을 조사하였다.

그 결과는 Table 3-8에 나타난 바와 같이 t value를 가지고 평가하여 볼 때 A와 B(*L.r* 2084) 시료간만이 $t=2.70$ 으로 5% 수준의 유의성에 필요한 수치를 초과하였을 뿐 기타의 시료간에는 이 기준에 도달하지 못하였다.

B 이외는 A와 비교한 시료 모두가 소비자 기호도에 대하여 5% 수준에서도 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 그렇지만 대부분의 panel 들에 대한 기호 선택 이유를 살펴보면 풍미가 신선하고 후미가 좋은 것이었으며, 균주별로는 *L.r* 2084로 제조한 발효유의 관능 평가가 가장 좋은 것으로 나타났다.

Table 3-8. Paired comparison preference test for 5 paired of samples

Sample paired ¹⁾	Frequency preferred ²⁾	Basis of preference (flavor)				t-value	
		Fresh	Sweet	After taste	Rich	computation	Table (significance)
A	4	3		2	2	2.70	2.09(5%)
B	16	13		15	13		2.86(1%)
A	14	7	1	10	4	1.80	2.09(5%)
C	6	5		5	3		
A	13	10		8	11	1.35	2.09(5%)
D	7	5		3	5		
A	12	9		8	10	0.90	2.09(5%)
E	8	6		5	5		

1) A : Yoghurt made with *La* 145

B : Yoghurt made with *Lr* 2084

C : Yoghurt made with *Lc* 0781

D : Yoghurt made with *Lacto.l* 204

E : Yoghurt made with *Ef* 402

2) A preference test was run with 20 panel members

4. 발효유의 혈중 콜레스테롤 저하능 조사

발효유를 급여하지 않는 구를 대조구로 하고 급여한 구를 실험구로 하여 상기와 같은 실험구 배치로 실험 동물에 대한 혈액을 2 주 간격으로 10 주간 채취한 후 혈장을 분리하여 Total cholesterol, LDL-C, HDL-C의 농도를 측정 한 결과는 Figure 3-3 (Table 3-9), Figure 3-4 (Table 3-10), Figure 3-5 (Table 3-11)와 같다. 즉, Total cholesterol 과 LDL-C의 경우는 6 주 후부터 대조구와 실험구 사이에 5% 수준의 유의성이 있었으며, 10주차에는 1% 수준의 유의성이 있었으나 HDL-C의 경우는 유의성이 없었다. 혈중 cholesterol이 관상동맥성 심 질환의 주원인이라고 알려진 이후 혈중 cholesterol에 영향을 주는 요인에 대하여 다양한 연구들이 수행되어 왔으며, 이들은 대체로 내적인 요인과 외적인 요인으로 대별될 수 있다. 유전적으로 혈중 cholesterol의 농도가 항상 높은 familial hypercholesterolemia (FH Type II)가 간세포의 low density lipoprotein (LDL) receptor의 결함에 기인한 현상이라고 밝혀졌으며(Goldstein *et al.*, 1977), 이는 혈중 cholesterol에 영향을 주는 내적 요인 중 가장 중요한 것으로 알려졌다. 혈장 lipoprotein fraction의 cholesterol은 LDL의 약 50%, high density lipoprotein (HDL)의 약 20%, very low density lipoprotein (VLDL)의 약 10%, 그리고 chylomicron의 약 2~3%를 차지하고 있다. LDL cholesterol은 cholesterol의 주된 운반형이며 동맥벽이나 말초조직에 cholesterol을 운반 축적시킴으로서 동맥경화를 촉진하는 인자로 알려져 있다. Goldstein 등 (1977)은 또한 혈중 LDL은 간장과 기타 조직의 세포 표면의 특정 부위인 수용기 부위에 결합되어 endocytosis작용에 의해 제거된다고 하였으며, Applebaum-Boden 등 (1984)은 유전적 요인에 의하여 이 LDL-receptor부위에 결함이 생기거나 과량의 식이성 cholesterol 섭취에 의하여 LDL-receptor활성이 저하되면, LDL

-receptor 부위에 LDL이 결합하지 못하고, 혈액내에 남아 계속 순환하게 되므로, 혈중의 LDL 농도가 상승되는 것으로 보고하였다. 반면, Nicoll 등 (1980)은 HDL은 말초조직 및 혈관벽에 축적된 cholesterol을 제거하여 cholesteric ester형태로 전환시켜 간장으로 운반한 후, 담즙 합성에 이용케 하며, LDL cholesterol이 혈관벽에 축적되는 것을 억제하므로서 혈중 cholesterol 농도를 저하시켜 동맥경화를 방지한다고 보고하였다. 혈중 콜레스테롤의 상승은 식이에 의한 LDL 콜레스테롤의 증가에 기인하는데, 본 실험에도 LDL의 수치가 지속적으로 상승하는 것으로 나타났다 (Figure 3-5). 이는 실험동물 모두에게 콜레스테롤을 매일 급여한 때문이며, 발효유를 급여하지 않은 구에 비해 6 주부터 5%의 수준 차이가 관찰되었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 선발 균주로 제조한 발효유를 실험 동물(토끼)에게 투여하였을 때, LDL 콜레스테롤의 증가와 더불어 입자의 수와 크기의 증가가 관찰되었으며, 시간이 경과함에 따라 대조구와 실험구 사이에 유의성 ($P < 0.05$)이 있는 것으로 보아 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 효과가 있음을 알수 있었다.

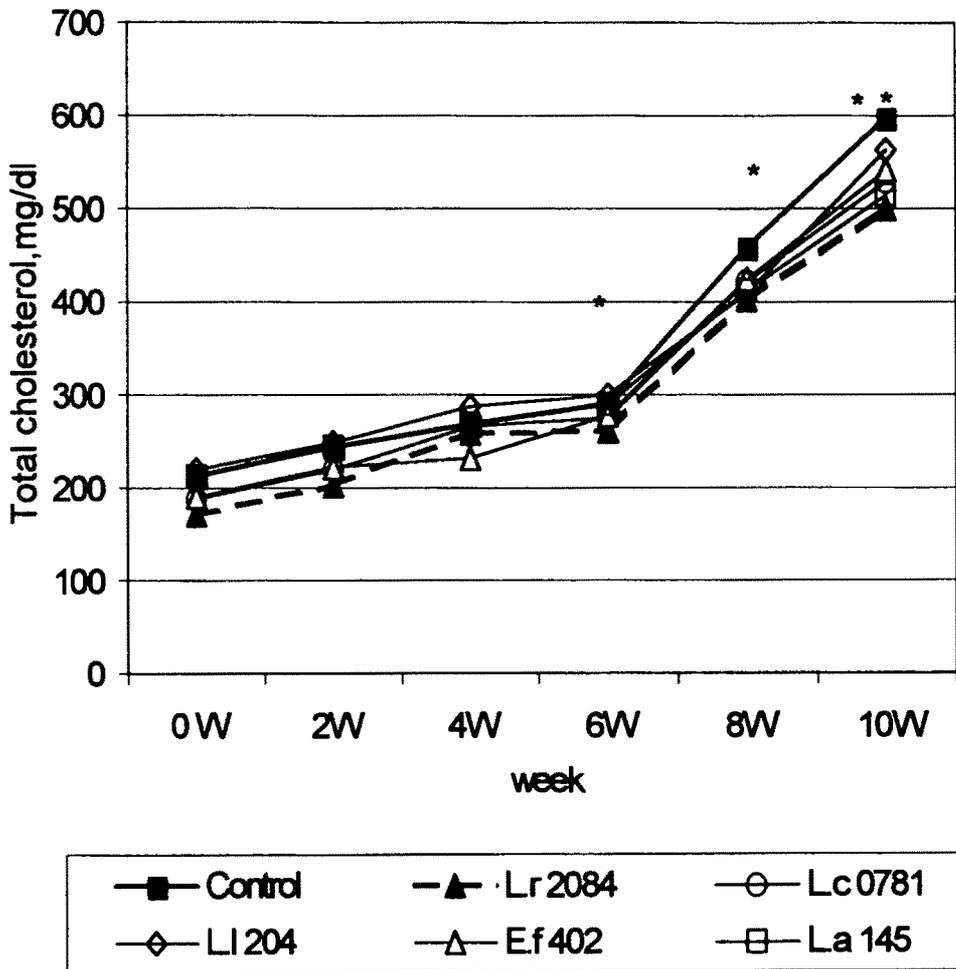


Figure 3-3. Effect of the yogurts made with the selected lactic acid bacteria on the total cholesterol in blood of experimental animal (rabbit).

* : $p < .05$; ** : $p < .01$

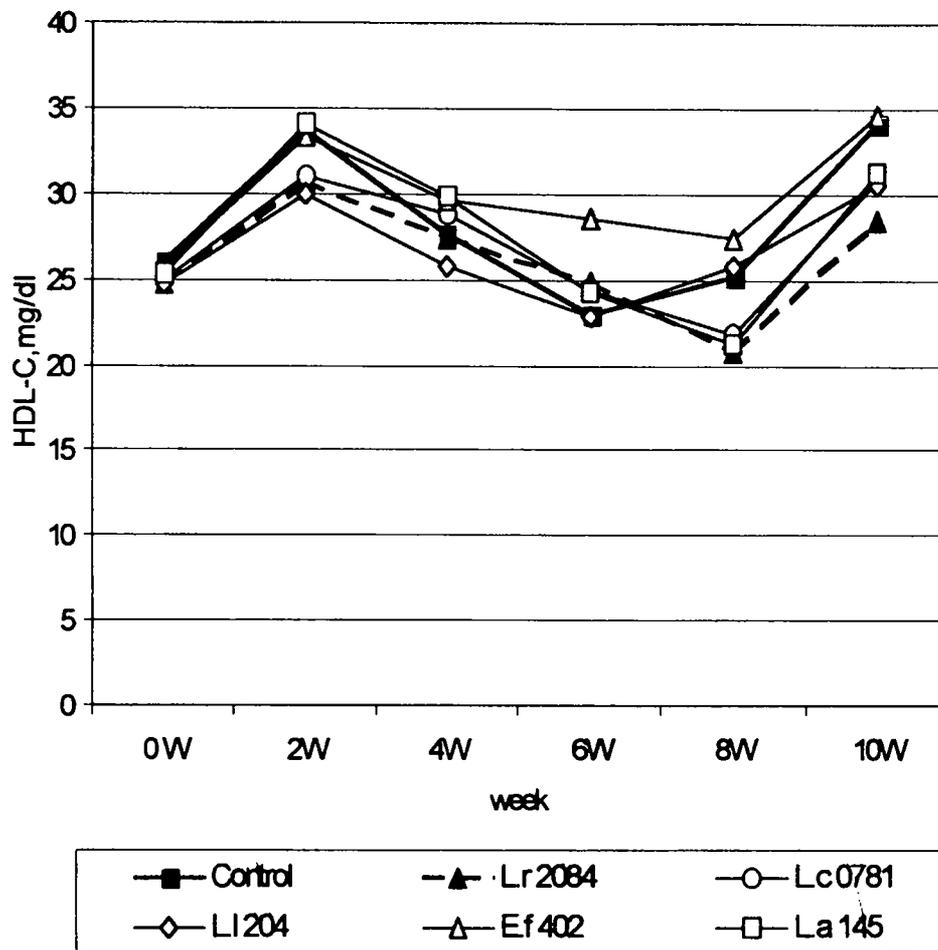


Figure 3-4. Effect of the yogurts made with the selected lactic acid bacteria on the HDL in blood of experimental animal (rabbit).

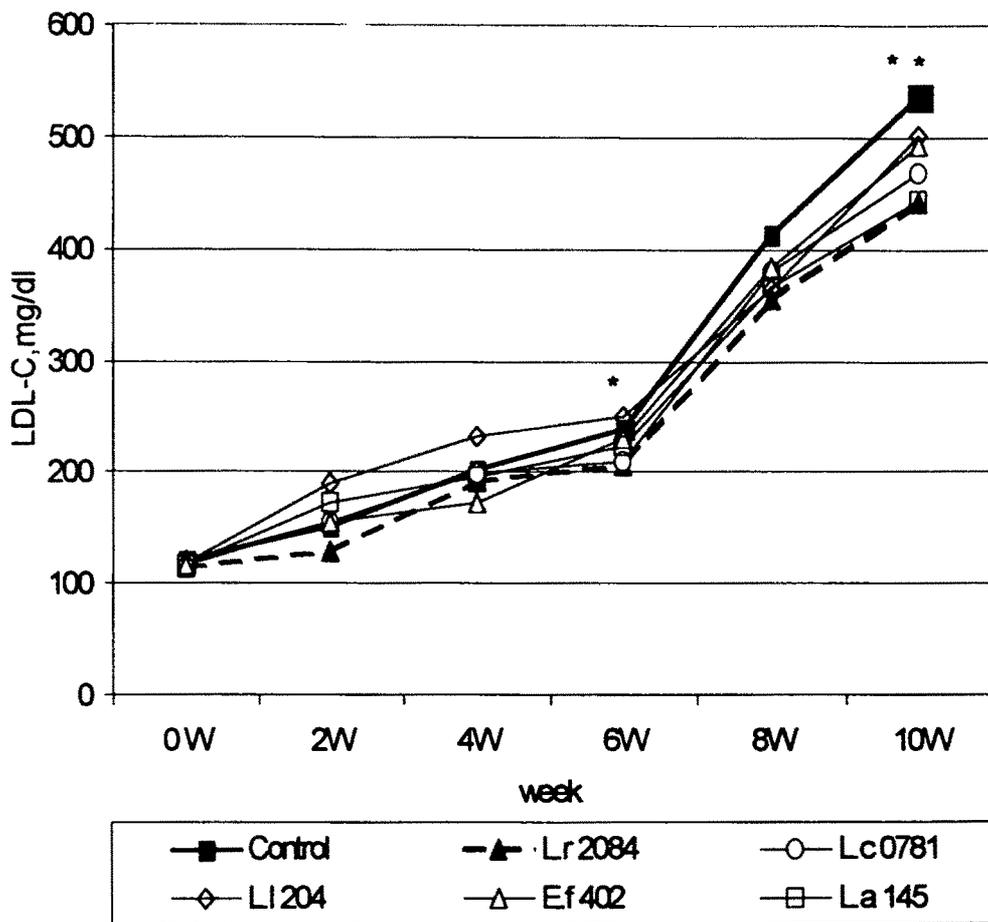


Figure 3-5. Effect of the yogurts made with the selected lactic acid bacteria on the LDL in blood of experimental animal (rabbit).

* : $p < .05$; ** : $p < .01$

Table 3-9. Effect of the yogurts made with the selected lactic acid bacteria on the total cholesterol in blood of experimental animal (rabbit).

(unit : mg/dl)

	0 Week	2 Week	4 Week	6 Week	8 Week	10 Week
Control	205.33 ± 14.33	244.33 ± 14.35	269.40 ± 13.64	290.00 ± 9.53	458.40 ± 13.30 ^a	597.00 ± 15.22 ^a
<i>L. r</i> 2084	184.67 ± 10.27	201.67 ± 10.27	257.60 ± 10.03	261.40 ± 7.58	401.40 ± 12.85 ^b	500.20 ± 14.21 ^b
<i>L. c</i> 0781	183.33 ± 13.78	219.00 ± 13.05	265.00 ± 11.73	274.80 ± 8.49	421.20 ± 11.49 ^{ab}	529.40 ± 15.21 ^b
<i>Lacto.l</i> 204	203.67 ± 13.69	250.00 ± 13.87	287.60 ± 11.33	300.60 ± 8.00	409.80 ± 9.8 ^b	562.60 ± 15.08 ^{ab}
<i>E. f</i> 402	211.33 ± 14.36	221.67 ± 13.69	232.40 ± 12.17	278.40 ± 8.23	424.20 ± 10.96 ^{ab}	542.40 ± 14.57 ^{ab}
<i>L. a</i> 145	233.67 ± 6.20	244.00 ± 14.36	267.60 ± 10.43	290.20 ± 7.93	411.40 ± 8.72 ^b	514.40 ± 13.74 ^b

10week : $P < 0.01$; 6 week : $P < 0.05$

Table 3-10. Effect of the yogurts made with the selected lactic acid bacteria on the HDL in blood of experimental animal (rabbit).
(unit : mg/dl)

	0 Week	2 Week	4 Week	6 Week	8 Week	10 Week
Control	26.000 ±1.155	33.667 ±1.202	27.600 ±1.166	23.000 ±2.214	25.200 ±2.417	34.200 ±2.437
<i>L. r</i> 2084	24.667 ±1.856	30.667 ±2.729	27.400 ±3.970	24.800 ±1.500	20.800 ±2.177	28.400 ±5.006
<i>L. c</i> 0781	25.000 ±1.528	31.000 ±5.131	28.800 ±1.562	24.400 ±2.874	21.800 ±1.908	30.800 ±3.611
<i>Lacto.l</i> 204	24.667 ±1.202	30.000 ±6.350	25.800 ±1.068	22.800 ±4.042	25.800 ±5.953	30.600 ±1.288
<i>E. f</i> 402	25.667 ±1.856	33.333 ±0.882	29.600 ±0.872	28.600 ±5.938	27.400 ±8.262	34.600 ±2.158
<i>L. a</i> 145	25.667 ±1.764	34.000 ±1.732	29.800 ±2.354	24.200 ±2.709	21.200 ±0.860	31.200 ±1.685

Table 3-11. Effect of the yogurts made with the selected lactic acid bacteria on the LDL in blood of experimental animal (rabbit).
(unit : mg/dl)

	0 Week	2 Week	4 Week	6 Week	8 Week	10 Week
Control	26.000 ±1.155	33.667 ±1.202	27.600 ±1.166	23.000 ±2.214	25.200 ±2.417	34.200 ±2.437
<i>L. r</i> 2084	24.667 ±1.856	30.667 ±2.729	27.400 ±3.970	24.800 ±1.500	20.800 ±2.177	28.400 ±5.006
<i>L. c</i> 0781	25.000 ±1.528	1.000 ±5.131	28.800 ±1.562	24.400 ±2.874	21.800 ±1.908	30.800 ±3.611
<i>Lacto.l</i> 204	24.667 ±1.202	30.000 ±6.350	25.800 ±1.068	22.800 ±4.042	25.800 ±5.953	30.600 ±1.288
<i>E. f</i> 402	25.667 ±1.856	33.333 ±0.882	29.600 ±0.872	28.600 ±5.938	27.400 ±8.262	34.600 ±2.158
<i>L. a</i> 145	25.667 ±1.764	34.000 ±1.732	29.800 ±2.354	24.200 ±2.709	21.200 ±0.860	31.200 ±1.685

10week : $P < 0.01$; 6 week : $P < 0.05$

5. 동맥경화증의 실험적 유발과 발효유 투여 효과

동맥경화증은 사람에서도 빈번히 일어나는 중요한 혈관질환으로서 심근경색, 뇌경색 동맥류 및 기타 합병증을 일으키는 치명적인 질환이다. 본 실험에 사용한 실험 토끼를 대상으로 대동맥과 관상동맥의 실질장기를 채취. 포르말린으로 고정한 후 통상적인 방법으로 표본을 제작한 후, 동맥경화증을 실험적으로 유발한 동물에 대한 대동맥 및 관상동맥에 대한 병리 조직학적 검사를 수행하였던 바 그 결과는 Table 3-12와 Figure 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10과 같다. 즉, 발효유를 급여하지 않은 군(Group 1)에서는 대동맥, 관상동맥 등에서 동맥경화증의 소견이 뚜렷이 관찰되었으며(Table 3-12, Figure 3-9, 3-10), 이와는 대조적으로 발효유를 급여한 군(Group 2~6)에서는 이러한 병변이 경미하게 관찰되었거나 전혀 관찰되지 않았으며 특히 유산균 *Lr* 2084로 제조한 발효유를 급여한 군이 가장 병변이 관찰되지 않았다(Figure. 3-8, 3-9). 따라서 유산균이 동맥경화증의 예방 및 치료에 상당한 효과가 있음을 병리 조직학적 소견으로 확인하였다.

Table 3-12. Cholesterol deposition in the aorta of rabbit.

Individual NO.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
1	++	-	±	±	+	-
2	+++	-	-	-	±	+
3	++	±	±	±	-	±
4	+++	-	±	-	-	+
5	++	-	-	-	+	-

Group 1 : Only cholesterol supplied

Group 2 : Cholesterol + Yoghurt made with *L.r* 2084

Group 3 : Cholesterol + Yoghurt made with *L.c* 0781

Group 4 : Cholesterol + Yoghurt made with *Lacto. l* 204

Group 5 : Cholesterol + Yoghurt made with *E.f* 402

Group 6 : Cholesterol + Yoghurt made with *La* 145

(- ; absence, ±; slight and indistinct, + ; mild , ++; moderate, +++ ; very severe to obstruct over half the tract aorta)

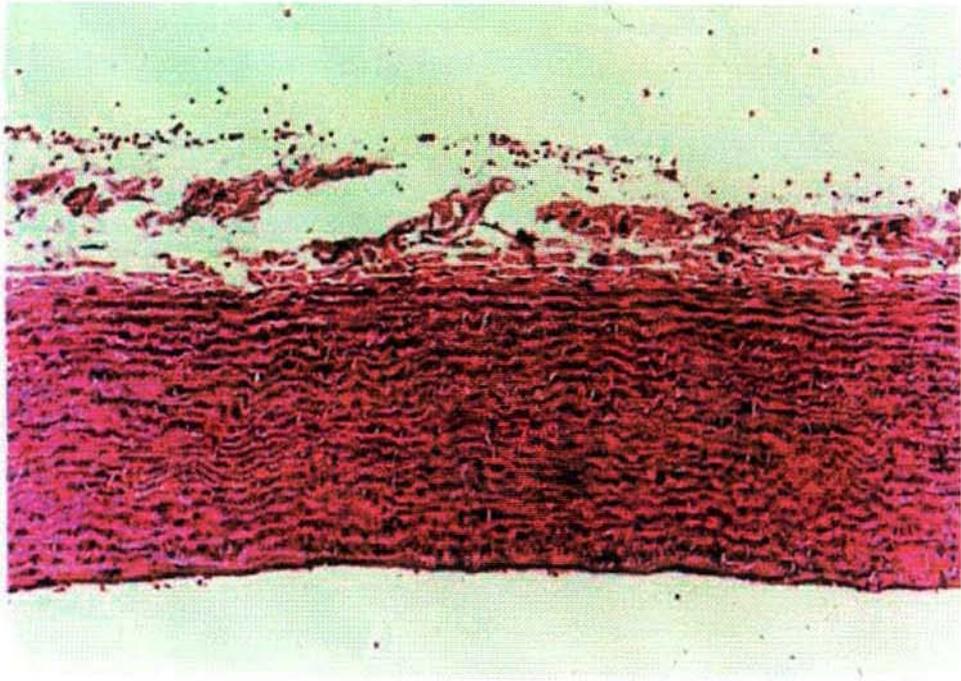


Figure 3-6. Aorta wall of normal rabbit.($\times 100$, H&E stain)

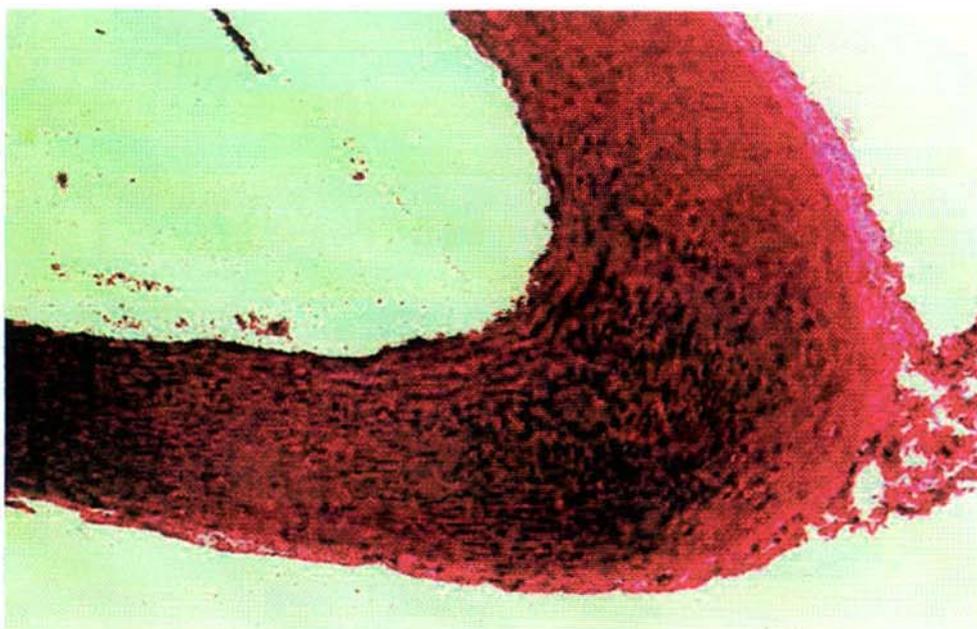


Figure 3-7. Aorta wall of rabbit supplied yogurt made with
L.r 2084. No distinct abnormal change ($\times 40$, H&E stain)

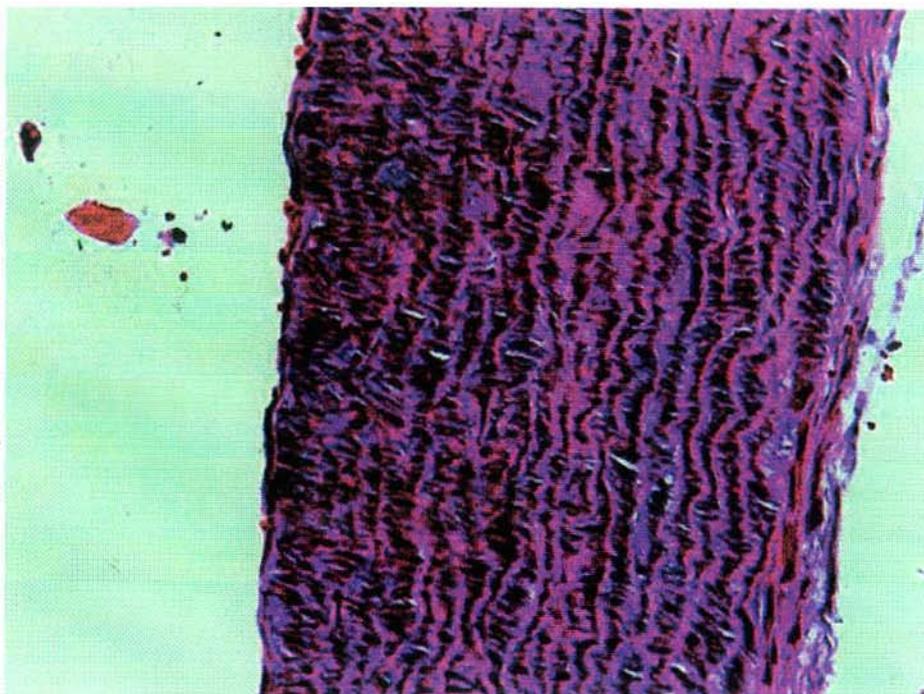


Figure 3-8. Aorta wall of rabbit supplied yogurt made with *L.r* 2084. No distinct abnormal change ($\times 200$, H&E stain)

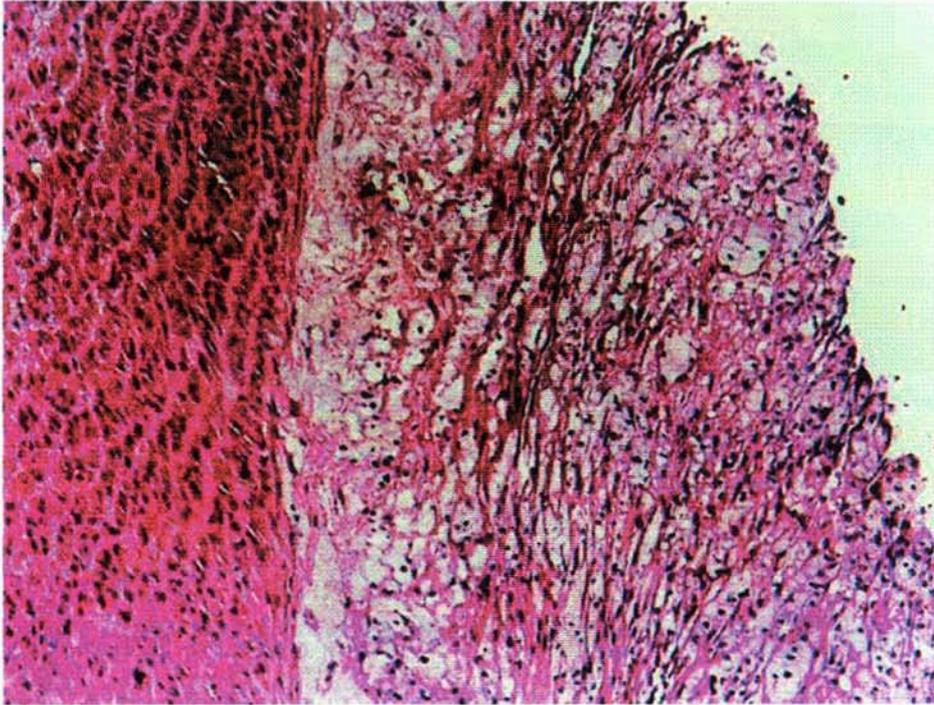


Figure 3-9. Aorta wall of only cholesterol administered rabbit.
the lumen (atheroma)

Intimal plaque composed of altered lipid-laden smooth
muscle cells projecting into the lumen ($\times 100$, H&E
stain)

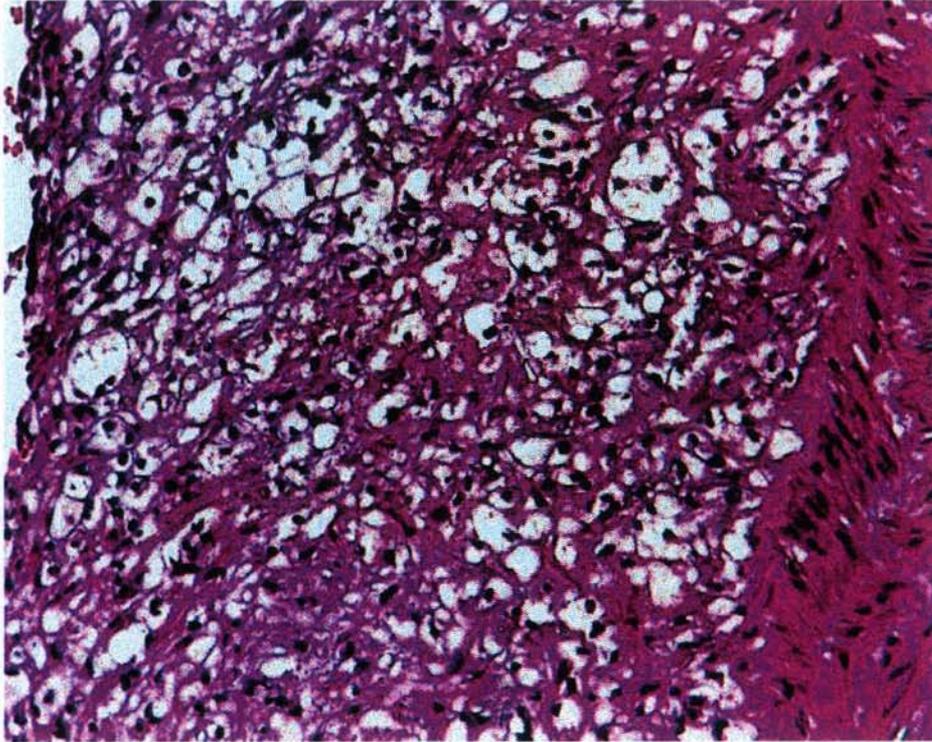


Figure 3-10. Aorta wall of only cholesterol administered rabbit. Atherosclerosis. Atheroma in the intima and media; collections of lipid-laden foam are protruding into lumen. ($\times 100$, H&E stain)

제 4 절 참고 문헌

1. Applebaum-Boden, C., Haffner, S.M., Hartsook, E., Luk, K.H., Albers, J.J., and Hazzard, W.R. 1984. Downregulation of the low-density lipoprotein receptor by dietary cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 39: 360-367.
2. Biss, K., Ho, K. J., Mikkelsen, B., Lewis, L., and Talyor, C. B. 1971. Some unique biological characteristics of the Masai of East Africa. *N. Engl. J. Med.* 284: 694-699.
3. Collins, J.L., Ebah, C.B, Mount, J.R., Dermott, 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.
4. Danielson, A. D., Peo, E. R., Shahani, K. M., Lewis, A. J., Whalen, P. J. and Amer, M. A. 1989. Anticholesterolemic property of *Lactobacilli acidophilus* yogurt fed to mature bears. *J. Anim. Sci.* 67: 966-974.
5. Gilland, S. E., Nelson, E. R. and Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 377.
6. Goldin, B. R., Gorbach, S. L. 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am.J.Clin.Nutr.* 39: 756-761.
7. Goldstein, J.L., Brown, M.S. 1977. The Low density lipoprotein receptor and its regulation to atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 46: 879-930.

8. Grunewald, K. K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* 47: 2078-2079.
9. Harrison, V. C. and Peat, G. 1975. Serum cholesterol and bowel flora in the newborn. *Am. J. Clin. Nutr.* 28: 1351-1355.
10. Hepner, G., Fried, R., Jeor, S., Fusetti, L. and Morin, R. 1979. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 19-24.
11. Hussi, E., Miettinen, T. A., Ollus, A. 1981. Lack of serum cholesterol-lowering effect of skimmed milk and butter milk under controlled conditions. *Atherosclerosis.* 39: 267-272.
12. Jasper D. A., Massey L. K. and Luedeke L. 1984. Effect of consuming yogurts prepared with 3 culture strains on human serum lipoproteins. *J. Food Sci.* 49: 1178-1181.
13. Kiyosawa H., Sugawara C., Sagawara N. and Miyake H. 1984. Effect of skim milk and yogurt on serum lipids and development of sudanophilic lesions in cholesterol-fed rabbits. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 479-484.
14. McNamara D. J., Lowell A. E., Sabb J. E. 1989. Effect of yogurt intake on plasma lipid and lipoprotein levels in normolipidemic males. *Atherosclerosis.* 79: 167-171.
15. Mann, G.V. and Spoerry, A. 1974. Studies of a Surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am. J. Clin. Nutr.*, 27: 464-469.
16. Mann, G. V. 1977. A factor in yogurt which lowers cholesterolemia in man. *Atherscleosis.* 26: 335-340.
17. Mott, G. E., Moore, R. W., Redmone, H. E. and Reiser R. 1973. Lowering of serum cholesterol by intestinal bacteria in cholesterol-fed pigs. *Lipids.* 8: 423-431.

18. Nicoll, A., Miller, N.E., and Lewis, B. 1980. High density lipoprotein metabolism. *Adv. Lipid Res.* 17: 53-105.
19. Rossouw, J. E., Burger, E. M., Vyver, P V Der, Ferreira, J. J. 1981. The effect of skimmed milk, yogurt and full cream milk on human serum lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 351-356.
20. Thakur, C.P., Jha, A.N. 1981. Influence of milk, yogurt and calcium on cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 39: 211-215.
21. Thompson, L. U., Jenkins, D. J. A., Amer, M. A., Reichert, R., Jenkins, A. and Kamulsky, J. 1982. The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 36: 1106-1111.
22. 경제기획원 조사통계국 (1980~1993) 사망 원인 통계 연보
23. 고준수, 야부근, 안종건. 1991. 반고체형 set 요구르트 제조에 관한 연구. *한국 낙농학회지*. 4: 129-132
24. 신용서, 성현주, 김동한, 이갑상. 1994. 산성조건하에서 시판요구르트의 유산균 생존율과 β -galactosidase의 활성도. *한국 농화학회지* 37(3): 143-147.
25. 주현규외 5인. 1990. 식품 분석법. 유럽문화사.