



김치 및 유아분변에서 분리한 유산균의 Probiotic 활성 조사

송수연¹ · 이현준² · 김종훈² · 오세종^{1*}

¹전남대학교 동물자원학부, ²농심 연구소

Probiotic Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Home-made Kimchi and Infant Feces

Sooyeon Song¹, Hyun-Jun Lee², Jong-Hoon Kim², and Sejong Oh^{1*}

¹Division of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Research & Development Center, Nong Shim Co. Ltd., Seoul 156-709, Korea

Abstract: We isolated 105 strains of lactic acid bacteria (LAB) from home-made kimchi and breast milk-fed Korean infant feces on the basis of morphological analysis. This study aimed to compare the probiotic characteristics of selected strains of LAB including bile and acid tolerances, cholesterol assimilation and adhesion activity. Among the isolates of LAB, 54 isolates were identified as *Lactobacillus plantarum* (14 strains), *L. brevis* (12 strains), *L. sakei* (9 strains), *L. acidophilus* (3 strains), *L. casei* (1 strain), and *L. fermentum* (1 strain). Acid tolerances under artificial gastric juice, pH 2.5 for 2 h at 37°C, were significantly different among the *Lactobacillus* species. *Lactobacillus acidophilus* and *L. plantarum* strains exhibited high tolerance in acid and bile. *Lactobacillus acidophilus* strains exhibited high cholesterol assimilation activity and showed a significantly higher tolerance to 0.3% bile acid than other *Lactobacillus* strains ($p < 0.05$). Based on these results, we selected the best strain, named NS1 (*L. acidophilus*) as a potential probiotics that can be utilized in the manufacturing of dairy foods and dietary supplements.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, probiotics, cholesterol, bile tolerance, acid tolerance

서론

Lilliy와 Stillwell(1965)은 1965년에 발표한 논문에서 probiotics라는 단어를 사용했는데 ‘미생물이 분비하는 물질로 다른 미생물의 성장을 자극하는 물질’로 정의하였다. 1967년 Sperti는 ‘미생물 성장을 촉진하는 조직 추출물’이라고 probiotics를 정의하였으며, 1974년에 Darker는 ‘숙주동물에게 유익한 효과를 주는 생물 또는 물질’이라고 정의함으로써 probiotics를 섭취한 숙주에 대한 유용성을 강조하였다(Oh, 2009). 1989년에 Fuller는 ‘장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제’라고 정의하였는데, 살아 있는 미생물로서의 probiotics에 대한 개념이 비로소 정립되었다. 1991년에 In'T Huis Veld와

Havenaar는 ‘사람 또는 동물에 대해 장내 균총의 성질을 개선시켜 숙주에게 유익한 효과를 주는 살아 있는 미생물의 단독 또는 혼합 배양물’이라는 정의를 내렸는데 이는 Fuller의 정의에 미생물의 혼합 배양물 개념이 추가된 것으로, 현재 유산균 정장제나 발효유 등에 유용미생물들이 혼합으로 많이 사용되는 이론적 근거를 마련해주고 있다(Goldin과 Gorbach, 1992). Fuller의 개념을 바탕으로 2002년 FAO/WHO 연합회의에서 제정한 Probiotics 정의를 보면, “유효한 수준을 투여하였을 때 숙주의 건강증진을 가져오는 살아있는 미생물”로 하여 건강증진 효과를 나타내는 유효한 수준을 강조하기도 하였다. 현재까지 FAO/WHO의 정의가 많은 학자들에게 받아들여지고 있다(Oh, 2009)

구강을 통해 투여되는 유산균은 위와 십이지장을 생존하여 통과해야 비로소 목적부위인 장에 도달하게 된다. 위장 내 위액의 pH는 1.0~2.0으로 대부분의 미생물을 사멸시킨다. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*는 소장 하부에 도달하기 전에 사멸하는데 이들은 내산성과 내담즙산성이 비교적 약한 특성을 갖고 있다(Gilliland, 1979). 그러나 발효제품에는 이들 균들이 매우 많은 숫자로 존재하기 때문에 섭취 시에도 장까지 상당수

*Corresponding author: Sejong Oh
Division of Animal Science, Chonnam National University,
Gwangju 61186, Korea
Tel: 82-62-530-2116, Fax: 82-62-530-2129
E-mail: soh@chonnam.ac.kr
Received December 10, 2015; Revised December 18, 2015;
Accepted December 20, 2015

의 균들이 도달하기도 한다.

*Lactobacillus plantarum*과 *L. acidophilus* 등과 같은 유산균은 낮은 pH에서도 생존하는 것으로 보고되고 있다. 물론, 위를 살아서 통과했다라도 췌장에서 십이지장으로 분비되는 담즙에 대한 내성이 있어야 한다. 소장과 대장에는 담즙산이 고농도로 존재하며 이로 인해 미생물의 성장이 저해되거나 사멸된다. 따라서 probiotics으로서의 기능을 수행하려면 oxgall이 최소 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있을 정도의 내성을 갖고 있어야 한다.

장상피세포에 부착하는 능력, 즉, 장 부착성은 probiotics가 가지고 있어야 할 특성 중의 하나인데, 장 부착성이 있어야 장내에 서식하여 유산균이 제 기능을 발휘할 수 있기 때문이다. 유산균이 장상피세포에 어떠한 기작으로 부착을 하는지에 대해서는 아직까지 확실한 설명이 되고 있지 않지만 부착성이 있는 경우 장시간 장내에서 생존할 수 있으며, colonization이 가능한 것으로 생각된다. 다만 숙주특이성(host specificity)과 균주특이성(strain specificity)이 존재한다는 견해가 지배적이다(Oh, 2009).

본 연구는 probiotics 활성이 우수한 유산균을 선발하기 위하여 다양한 원천에서 유산균을 분리하여 내산성과 내담즙산성을 조사한 다음 선별된 유산균을 대상으로 콜레스테롤 저하작용과 장상피세포 부착능력을 비교하였다.

재료 및 방법

유산균의 분리

전남대학교 동물자원학부 및 고려대학교 식품미생물학 연구실 보유 유산균을 포함하여 가정에서 직접 담근 김치, 유아분변 등으로부터 미생물을 새롭게 채취하여 사료로 사용하였다. 확보된 시료를 희석용 완충용액으로 희석하여 pH 5.4로 조정된 MRS 배지에서 37°C, 48시간 배양하여 유백색의 집락을 분리하였다. 분리된 집락은 bromocresol purple 0.004%가 첨가된 MRS agar에 도말하여 노란색 집락을 띄는 균주들을 선택하여 재분리하였다. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 따라 Gram 염색, catalase 및 gas 형성 등을 조사하였다.

내담즙산성 평가

내담즙산성 평가는 MRS 배지에 여과 제균된 oxgall (Difco, USA) 용액을 0.3% (w/v)가 되도록 첨가하여 준비한 다음 준비한 유산균 현탁액을 접종하여 37°C에서 0, 24시간 배양하여 생균수를 평가하였다. 최초 균수와 비교하여 1 log 이하 감소한 경우 -, 초기균수와 유사한 경우 +, 1 log 이상 증가한 경우 ++, 2 log 이상 증가한 경우를 +++로 각각 표시하였다.

내산성 평가

내산성 평가는 내담즙산성 평가에서 선별된 균주를 MRS broth에 18시간 2차 계대 배양하여 본 실험에 사용하였다. 0.05 M Sodium phosphate 용액을 제조하여 pH를 2.5로 조정된 MRS broth에 pepsin (Sigma Co., USA)을 1,000 unit/mL 되도록 첨가하였다. 초기 균 수가 10^8 CFU/mL 정도가 되도록 0.05 M Sodium phosphate buffer에 접종한 후 37°C에서 0, 2시간 배양한 후 생균수를 평가하여 내산성을 비교하였다. 초기 생균수와 비교하여 초기 생균수에서 3 log 이상 감소를 -, 2~3 log 감소를 +, 1 log 감소를 ++, 초기 균수를 유지한 경우를 +++로 각각 표시하였다.

콜레스테롤 저하 작용

유산균들의 콜레스테롤 저하 작용 평가는 Buck와 Gilliland 방법(1994)을 이용하여 *in vitro*에서 실험하였다. 유산균을 MRS broth (Polyoxyethanyl cholesteryl sebacate 0.045%, Cysteine 0.05% 함유)에 접종하여 24시간 혐기 배양한 후 원심분리(12,000×g, 4°C, 10분)하여 상등액을 0.5 mL를 첨가하여 60°C water bath에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 냉각시킨 다음 5 mL의 Hexane을 첨가하여 잘 섞고 다시 3 mL의 증류수를 첨가하여 섞은 다음 15분간 실온에서 방치하여 층 분리가 일어나게 하였다. 그 후 2.5 mL의 Hexane 층을 질소 가스를 이용하여 60°C에서 증발시킨 다음 4 mL의 o-phthalaldehyde reagent (0.5 mg o-phthalaldehyde/glacial acetic acid 1 mL)를 첨가하고 10분간 반응시킨 후, 2 mL 농황산을 첨가하여 다시 10분간 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 계산하였다. 여기서 콜레스테롤 감소율을 30% 이하를 -, 30~40% +, 40~50% 감소한 경우 ++, 50% 이상 감소한 경우 +++로 각각 표시하였다.

Cholesterol reduction (%)

$$= \frac{\text{Cholesterol added} - \text{Cholesterol left}}{\text{Cholesterol added}} \times 100$$

장상피세포 부착능력

Monolayer를 형성한 HT-29 세포를 PBS buffer를 이용하여 5회 세척하고 항생제가 첨가되지 않은 RPMI 1640배지 0.5 mL를 첨가하였다. 유산균주를 1.0×10^9 CFU/mL의 농도로 RPMI에 현탁한 다음, well plate에 접종하고 37°C에서 2시간 배양하였다. 배양이 완료된 후 부착이 되지 않은 유산균의 제거와 세척에 따른 부착능력을 확인하기 위하여 3분씩 200 rpm의 속도로 교반하면서 PBS buffer를 사용하여 3회 수세하였다. 수세 후, 0.2% Trypsin-EDTA를 분주하여 부착되어 있는 세포를 떼어내고 MRS 배지를 이용하여 생균수를 평가하였다. 초기 유산균수와 비교하여 5 log 이상 감소한 경우 -, 3~5 log 감소한 경우 +, 2~3 log 감소한 경우 ++, 1 log 또는 감소하지 않은 경우를 +++로 각각 표시하였다.

유산균의 16S rDNA 추출

유산균은 MRS broth에 접종한 다음 37°C에서 18시간 2차 계대 배양하여 배양액 2 mL를 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 다음, 0.85% NaCl로 3회 수세하였다. 수세 후, lysozyme(10 mg/mL) 0.5 mL을 첨가하여 37°C, 1시간 동안 반응시킨 후 protease K (10 mg/mL) 20 μ L와 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 25 μ L를 첨가한 후, 60°C water bath에서 30분 처리한 후 RNase 1 μ L 첨가하여 37°C, 1시간 정치하였다. 동량의 Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25:24:1)을 첨가하여 현탁한 후, 14,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리하여 3 M ammonium acetate (pH 4.8)와 100% alcohol을 첨가하고 -20°C에서 1시간 정치하였다. 그 다음 원심분리(14,000 rpm, 5 min, 4°C) 하여 70% ethanol 1 mL를 넣고 다시 14,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리하여 DNA를 추출하였다.

유산균의 동정

16S rDNA를 증폭시키기 위해 forward primer(27f): (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 reverse(1492r): (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였다. PCR premix (Bioneer; Cat No. K-2012)에 17 μ L의 증류수와 forward primer 1 μ L, reverse primer 1 μ L, DNA 1 μ L를 첨가하여 혼합한 후 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 처리 후, 94°C에서 1분, 62°C에서 40초, 72°C에서 40초로 30 cycles을 반복하였으며, 72°C에서 40초로 반응을 종료하였다. PCR 반응산물을 0.8% agarose gel로 전기영동을 실시하여 확인하였다. 염기서열 분석은 바이오닉스(www.bionicsro.co.kr)에 의뢰 분석하며 NCBI blast search (www.ncbi.nlm.nih.gov)를 통해서 sequence 결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

다양한 원천으로부터 분리하여 선발된 최종 균주의 집락 수는 다음과 같다 (Table 1). BCP배지, SPC 배지 그리고 MRS 배지에서 집락을 각각 채취하여 Gram 염색과 catalase 시험을 한 다음 유산균으로 추정되는 후보균을 분리하였다. 총 105균주를 1차 분리하여 MRS 배지에 각각 계대 배양한 후, 원심분리(3,000 \times g, 10 min)한 다음 cell pellet에 skim milk (10%), glucose (1%), yeast extract (0.3%)가 함유된 배지를 제조하여 혼합하였다. 이것을 vial에 1 mL씩 분주하여 -80°C의 냉동고에 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

내담즙산성 및 내산성 조사

김치와 유아분변에서 분리하여 유산균의 일반적인 특성, 즉 BCP 배지에서 노란색 집락, Gram 양성, catalase 음성인 균주를 선택하여 내담즙산성과 내산성을 평가하였는데

Table 1. 다양한 원천에서 분리한 유산균

Sample	BCP (pH 6.9)	SPC	MRS (pH 5.4)	No. of selection
1	1.1×10^8	1.9×10^9	1.7×10^5	11
2	3.6×10^7	2.0×10^8	1.9×10^5	9
3	4.4×10^7	1.6×10^7	1.7×10^5	11
4	9.0×10^8	3.6×10^8	3.4×10^4	14
5	2.2×10^7	9.0×10^5	8.0×10^5	14
6	3.4×10^7	2.8×10^7	5.9×10^6	11
7	2.6×10^6		9.0×10^4	4
8	9.6×10^6		3.0×10^6	11
9	3.9×10^5		5.5×10^2	5
10	7.6×10^5		2.0×10^4	15

Table 2. Results of probiotic characteristics

Strain	Bile tolerance	Acid tolerance	Cholesterol reduction	Adherence
1	++	++	-	+
2	+	+	-	-
3	+	++	-	-
4	+	+	-	-
5	+	+	-	-
6	++	+	-	-
7	+	+	-	-
8	++	++	-	-
9	++	+	-	-
10	+	-	-	-
11	+	++	-	-
12	++	-	-	-
13	+	+	-	-
14	++	+	-	-
15	++	+	-	-
16	++	+	-	-
17	++	+	-	-
18	++	+	-	-
19	++	+	-	-
20	+	+	-	-
21	++	+	-	-
22	+	+	-	-
23	++	++	-	-
24	++	+	+	-
25	++	+	-	-
26	++	+	-	-
27	++	+	-	-
28	++	+	-	-
29	++	+	-	-
30	++	+	-	-
31	++	+	-	-
32	++	+	-	-
33	+	+	-	-
34	+	+	-	-
35	+	+	-	-
36	+	+	-	-
37	+	+	-	-
38	+	+	-	-
39	+	+	-	-

Table 2. Results of probiotic characteristics (continued)

Strain	Bile tolerance	Acid tolerance	Cholesterol reduction	Adherence
40	++	++	-	-
41	+++	++	+++	++
42	++	++	+	++
43	++	++	++	++
44	++	++	++	-
45	+++	++	++	+
46	+++	+++	+++	+++
47	+	+	+	-
48	+	+	+	-
49	+	+	+	-
50	+	+	-	-
51	+	+	-	-
52	+	+	-	-
53	+	+	-	-
54	+	++	-	-
55	+	+	-	-
56	+	+	-	-
57	+	+	-	-
58	+	+	-	-
59	+	+	-	-
60	+	+	-	-

전체 시료 중의 40% 정도는 내담즙산성을 가지고 있지 않았으며 약 20%의 균주들은 매우 높은 내담즙산성을 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 인공위액(pH 2.5)에서 내산성을 평가한 결과 일부 유산균에서 매우 높은 내산성을 보였는데, 이들은 초기 접종생균수 대비 약 1 log 감소만을 나타내었다.

콜레스테롤 저하작용 및 장상피 세포 부착능력

다음은 내담즙산성과 내산성에서 우수한 효과를 보인 균주를 선발하여 콜레스테롤 저하효과를 측정하였다. 그 결과, 선발된 균주는 20~70%까지 콜레스테롤 저하효과를 보였다.

장상피 세포 부착성이 가장 높은 유산균은 접종된 균수 ($10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml) 보다 약 1 log 감소한 46번 균주이었는데, 이 균주는 대조구로 사용한 *Lactobacillus rhamnosus* GG균보다 높게 나타났다. 본 실험에서는 3회 washing을 하기 때문에 접종 균수보다 높게 나온 처리구는 없었다. 유산균의 장상피세포 부착능력이 높을수록 장의 연동운동을 정상화시켜 소장에서는 영양분을 흡수하는 기능과 대장에서는 변을 배출하는 기능이 원활해지도록 도와줄 수 있을 것으로 생각되고 있다.

선발 유산균의 분석

다음은 우수한 활성을 보인 유산균에 대하여 16S rDNA sequence 분석을 실시하였다. 유산균 동정결과는 Table 3에

Table 3. Identification of lactic acid bacteria by 16s rDNA sequence

Strain	Identification	Source
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	kimchi
2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	kimchi
3	<i>Lactobacillus curvatus</i>	kimchi
4	<i>Lactobacillus curvatus</i>	kimchi
5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	kimchi
6	X	kimchi
7	<i>Lactobacillus curvatus</i>	kimchi
8	X	kimchi
9	<i>Lactobacillus curvatus</i>	kimchi
10	X	kimchi
11	<i>Pediococcus acidilactici</i>	kimchi
12	<i>Lactobacillus sakei</i>	kimchi
13	<i>Lactobacillus curvatus</i>	kimchi
14	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	kimchi
17	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
18	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
19	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
20	<i>Lactobacillus sp</i>	kimchi
21	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
22	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	kimchi
24	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
25	<i>Lactobacillus sakei</i>	kimchi
26	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
27	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
28	<i>Lactobacillus casei</i>	kimchi
29	<i>Lactobacillus plantarum</i>	kimchi
30	<i>Lactobacillus plantarum</i>	kimchi
31	<i>Lactobacillus sakei</i>	kimchi
32	<i>Lactobacillus plantarum</i>	kimchi
33	X	kimchi
34	X	kimchi
35	<i>Lactobacillus sakei</i>	kimchi
36	<i>Lactobacillus sakei</i>	kimchi
37	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	kimchi
38	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi
39	X	kimchi
40	<i>Lactobacillus plantarum</i>	infant feces
41	<i>Lactobacillus plantarum</i>	infant feces
42	<i>Lactobacillus plantarum</i>	infant feces
43	<i>Lactobacillus fermentum</i>	infant feces
44	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	infant feces
45	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	infant feces
46	<i>Lactobacillus acidophilus NSI</i>	infant feces
47	<i>Lactobacillus sp</i>	kimchi
48	<i>Lactobacillus sp.</i>	kimchi
49	<i>Lactobacillus sp</i>	kimchi
50	<i>Lactobacillus sakei</i>	kimchi
51	<i>Lactobacillus sakei</i>	kimchi
52	<i>Lactobacillus sakei</i>	kimchi
53	<i>Lactobacillus brevis</i>	kimchi

Table 3. Identification of lactic acid bacteria by 16S rDNA sequence (continued)

Strain	Identification	Source
54	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	kimchi
55	<i>Lactobacillus sakei</i>	kimchi
56	<i>Lactobacillus plantarum</i>	kimchi
57	<i>Lactobacillus plantarum</i>	kimchi
58	<i>Lactobacillus plantarum</i>	kimchi
59	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	kimchi
60	<i>Lactobacillus plantarum</i>	kimchi

X: not identified.

나타낸 바와 같다. 각각의 유산균 sequence의 homology를 조사하기 위해 NCBI blast (www.ncbi.nih.gov/blast/)의 database를 이용하여 분석한 결과, 60종의 선발 유산균 중 54종이 분석되었다. 주요 *Lactobacillus* 속 유산균의 분포를 요약해 보면 *L. plantarum* 14종, *L. brevis* 12종, *L. sakei* 9종, *L. acidophilus* 3종, *L. casei* 1종, 및 *L. fermentum* 1종으로 확인되었다.

요 약

가정에서 담근 김치와 신생아의 분변으로부터 내산성과 내담즙산성이 우수하고, 콜레스테롤 저하능력과 장부착성이 우수한 probiotics를 선발하기 위하여 총 60종의 유산균을 대상으로 실험을 하였다. 유산균 후보군에 대하여 16S rDNA 분석결과 *L. plantarum* 14종, *L. brevis* 12종, *L. sakei* 9종, *L. acidophilus* 3종, *L. casei* 1종, 및 *L. fermentum* 1종이 각각 확인되었다. 본 연구에서 내담즙산성, 내산성, 콜레스테롤 감소작용, 장내부착성을 모두 고려한 결과 46번 유

산균 후보군이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 이 후보 유산균은 *L. acidophilus* 균주로 동정되어 *L. acidophilus* NS1으로 명명하였다. 이와 같은 결과는 *L. acidophilus* NS1 유산균이 향후 정장작용과 콜레스테롤 저하작용의 기능을 강화시킨 유제품, 식품 및 건강기능성 식품등에 이용 가능할 것으로 판단되었다.

참고문헌

- Buck LM and Gilliland SE (1994) Comparison of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. *J. Dairy Sci.* **77**, 2925-2933.
- Burgey DH, Breed RS, and Murray EGD (1938) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins. 5th ed: pp. 77.
- Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
- Gilliland SE (1979) Beneficial interrelationships between certain microorganism and humans: Candidate microorganism for use as dietary adjuncts. *J. Food Protect.* **2**, 100-182, 164-167(4).
- Goldin BR and Gorbach SL (1992) Probiotics for humans. in *Probiotics*. R. Fuller ed. Chapman & Hall. London. Springer Netherlands. pp. 355-376.
- In'T Huis Veld JHJ and Havenaar R (1991) Probiotics and health in man and animal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **51**, 562-567.
- Karel K and Marc V (2005) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Verlag.
- Lilly DM and Stillwell RH (1965) Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**, 747-748.
- Oh S (2009) Probiotics and prolongation of life. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* **26**, 31-37.