

Note

김치 유래 유산균의 프로바이오틱스 특성

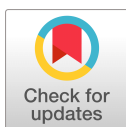
추동훈¹ · 국무창^{2,*}

¹콜마비엔에이치 · ²배화여자대학교 식품영양과

Probiotics Characterization of *Lactobacillus* Species Isolated from Kimchi

Donghun Chu¹ and Moochang Kook^{2,*}

¹Kolmarbnh · ²Dept. of Food & Nutrition, Baewha Women's University



Received: Jun 3, 2019

Revised: Jun 19, 2019

Accepted: Jun 19, 2019

*Corresponding author : :

Moochang Kook
 Department of Food and Nutrition,
 Baewha Women's University,
 Seoul, 03039, Korea
 Tel: +82-2-399-0765,
 E-mail: bmse153@gmail.com

ORCID

Donghun Chu
<https://orcid.org/0000-0002-6719-6234>
 Moochang Kook
<https://orcid.org/0000-0003-4098-8298>

Abstract

한국의 전통음식인 김치에서 분리한 유산균 중 *Lactobacillus pentosus* A67과 *L. plantarum* subsp. *plantarum* C2의 내산성, 내담즙성과 항생제 내성시험을 통해 프로바이오틱스 활성을 확인하여 기능성 프로바이오틱스 소재로서의 활용 가능성을 검토하였다. 서울과 경기 지역의 재래시장과 가정집에서 김치를 수집하여 *E. coli*에 대한 항균활성이 가장 우수한 분리균 A67과 C2를 프로바이오틱스 활성 평가 균주로 선정하여 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과, 각각 *L. pentosus* ATCC 8041 (유사성 100%), *L. plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917(유사성 100%)와 가장 유사하였다. pH 2.5 인공위액상에서 *L. pentosus* A67은 약 98.35%, *L. plantarum* C2는 약 95.62%의 생존율을 보였으며, 0.3% Bile salt상에서 *L. pentosus* A67은 약 94.56%, *L. plantarum* C2는 약 88.81%의 생존율을 보였다. *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 quinolone, aminoglycoside, macrolide, glycopeptide, tetracycline, cephalosporin, penicillin 계열에 해당하는 항생제에서 생존하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 같은 종의 균주보다 우수한 내산성능 및 내담즙성능을 가진 프로바이오틱스로 판단되며, 또한 다양한 계열의 항생제에 대하여 우수한 내성을 가진 프로바이오틱스로 판단된다.

Keywords

Lactobacillus pentosus, *Lactobacillus plantarum*, 프로바이오틱스, 내산성, 내담즙성, 항생제 내성

프로바이오틱스는 우리 몸의 장 속에 주로 서식하며 적절한 양으로 투여할 경우, 장내 미생물 균형 개선을 포함하여 일반적인 영양 이상으로 숙주에 건강상의 이익을 부여하는 살아있는 미생물로 알려져 있다(Saarela 등, 2000). 프로바이오틱스가 인체에서 정장작용 및 다양한 생리 활성을 발휘하기 위한 중요한 조건은 위산과 담즙이 존재하는 환경에서 생존력이 높아야 하며, 대장 상피세포에 대해 높은 부착능을 발휘하고, 유해세균을 제어할 수 있는 항균물질 생산능을 갖춰야 한다고 알려져 있다(Garcia 등, 2014). 또한 프로바이오틱스는 돌연변이 유발이나 용혈능이 없어야 하며, 비병원성이며, 바이오제닉

아민 등과 같은 유해물질 생성에 따른 독성 발생 가능성이 낮아야 하는 등 반드시 안전성이 확보되어야 한다(Gueimonde과 salminen, 2006). 이와 더불어, 프로바이오틱 유산균은 항생제의 세포벽, 단백질, 핵산 합성저해, 경쟁적 대사 저해에 대하여 내성을 가져야 하며, 감수성이 높으면 사용할 수 없다고 알려져 있다(Ann, 2011). 이러한 내산성, 내담즙성과 항생제 내성 등을 포함한 프로바이오틱스의 특성들은 미생물의 종류에 따라 그 정도가 다르게 나타나며, 같은 종에 속한 미생물의 경우에도 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Gueimonde과 salminen, 2006; Tulumoglu 등, 2013).

따라서 본 연구에서는 한국의 전통음식인 김치에서 분리한 유산균 중 *Lactobacillus pentosus* A67과 *L. plantarum* subsp. *plantarum* C2의 내산성, 내담즙성과 항생제 내성시험을 통해 프로바이오틱스 활성을 확인하여 기능성 프로바이오틱스 소재로서의 활용 가능성을 검토하였다.

본 실험은 서울과 경기 지역의 재래시장과 가정집에서 김치를 수집하여 Bromocresol purple (BCP; Difco, USA) 한천배지를 이용하여, 유산균으로 판단되는 균주를 1차 분리 후, *Lactobacilli* de Man, Rogosa and Sharpe (MRS; Difco, USA) 한천배지에서 증균하여 본 연구에서 사용하였다. 분리된 균주는 16S rRNA gene sequence 분석을 실시하였으며, 균주의 생화학적, 생리학적 분석을 위해 API 50CHL kit (bioMérieux, France)를 이용한 당 이용성 분석과 API ZYM kit (bioMérieux, France)을 이용한 효소활성 분석을 진행하였다(Francoise 등, 2005).

노란색 환을 형성하는 유산균 colony를 무작위로 선별하여, 한천 배지확산법을 통해 항균활성을 확인한 결과, *E. coli*에 대한 항균 활성이 가장 우수한 분리균 A67과 C2를 프로바이오틱스 활성 평가 균주로 선정하였다. 선별된 균주 A67과 C2의 16S rRNA 염기서열 상동성은 각각 *L. pentosus* ATCC 8041 (유사성 100%), *L. plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917(유사성 100%)와 가장 유사했다. API 50CHL kit을 이용하여 당 이용성을 분석한 결과, 공통적인 당이용성 이외에 *L. pentosus* A67은 *L. pentosus* ATCC 8041보다 inulin, melezitose, α -methyl-D-mannoside, D-turanose, D-arabitol의 이용성을 추가로 보였으나, *L. pentosus* ATCC 8041가 이용한 glycerol, L-arabinose, D-xylose, galactose는 이용하지 못하였다. *L. plantarum* C2는 *L. plantarum* ATCC 14917과 비교하였을 때 glycerol, lactose, raffinose, α -methyl-D-mannoside, D-arabitol의 이용성을 추가로 보였다. API ZYM kit을 이용하여 효소활성을 분석한 결과, 공통적인 활성 이외에 *L. pentosus* A67은 *L. pentosus* ATCC 8041보다 alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), α -galactosidase, β -glucuronidase

효소 활성을 추가로 보였으며, *L. plantarum* C2는 *L. plantarum* ATCC 14917보다 alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), α -galactosidase, β -glucuronidase, trypsin, α -chymotrypsin 효소 활성을 추가로 보였다. 따라서 *L. pentosus* THK-aA67과 *L. plantarum* THK-C2는 각각 *L. pentosus* ATCC 8041, *L. plantarum* ATCC 14917과 16S rRNA 염기서열상 유사하나, 당 이용성과 효소 활성에 있어서 차이를 보이므로 표준균주와는 생리학적, 생화학적으로 다른 특성을 보일 것이라 판단된다.

유산균이 체내에 경구적으로 투여되었을 때 소화액과 투여된 항생제로부터 높은 저항성을 가지며, 인체에 유익한 역할을 하는 프로바이오틱스로 활용하기 위하여 프로바이오틱스 특성을 검토하였다. 모든 실험에서 생존율은 생존율(%)으로 산출하였고, 모든 과정은 3회 반복 시험되었다. 유산균의 내산성, 내담즙성 실험 및 항생제 내성시험은 Tulumoglu 등(2013)의 연구방법을 응용하였다. 유산균의 내산성 시험은 인공위액 환경(pH 2.5)을 조성하고, 10^8 CFU/mL 수준으로 접종하여 관찰하였다. 내담즙성 시험은 인공담즙 환경(0.3% Bile salts)을 조성하고, 10^8 CFU/mL 수준으로 접종하여 관찰하였다. 유산균의 항생제 내성시험은 10개의 계열별 항생제를 용해 가능한 최대 농도 (12.5 mg/mL)에서부터 96 well plate 상에 순차적으로 2배수 희석하고, 유산균을 10^6 CFU/mL로 접종한 후 지시균주의 생장 여부를 관찰하였다.

내산성 시험결과(Fig. 1), pH 2.5 인공위액상에서 30분까지 *L. pentosus* A67은 약 98.35%의 생존율을 보였고, *L. plantarum* C2는 약 95.62%의 생존율을 보였다. 이와 같은 결과는 Tulumoglu 등(2013)의 연구와 비교하였을 때, *L. pentosus* A67이 내산성이 우수한 *L. pentosus* T13의 생존율 95%보다 3.35% 더 높은 생존율을 보였으며, *L. plantarum* C2는 내산성이 우수한 *L. plantarum* T15의 생존율 92%보다 3.62% 더 높은 생존율을 보였다. 일반적으로 유산균의 내산성은 당분해 과정 흐름 (glycolytic flux)의 변화, 세포 내 pH 조절 능력과 세포막의 ATPase와 관계가 있으며, 식품의 성분에 의해 저항성은 유의하게 증가되는 것으로 보고되어 있다(Radulovic 등 2017). 따라서 *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 세포 내 pH 조절능력 우수하며, 세포막의 ATPase 작용들에 의해 위산에 대하여 높은 저항성을 보이는 것으로 판단된다.

내담즙성 시험 결과 (Fig. 2), 0.3% Bile salt 상에서 *L. pentosus* A67은 30분까지 약 94.56%의 생존율을 보였고, *L. plantarum* C2는 60분까지 약 88.81%의 생존율을 보였다. 이와 같은 결과는 Tulumoglu 등(2013)의 연구와 비교하였을 때, *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 각각 내담즙성이 우수한 *L. pentosus* T13(생존율 96%)과 *L. plantarum* T15(생존율 93%)등과 비교하

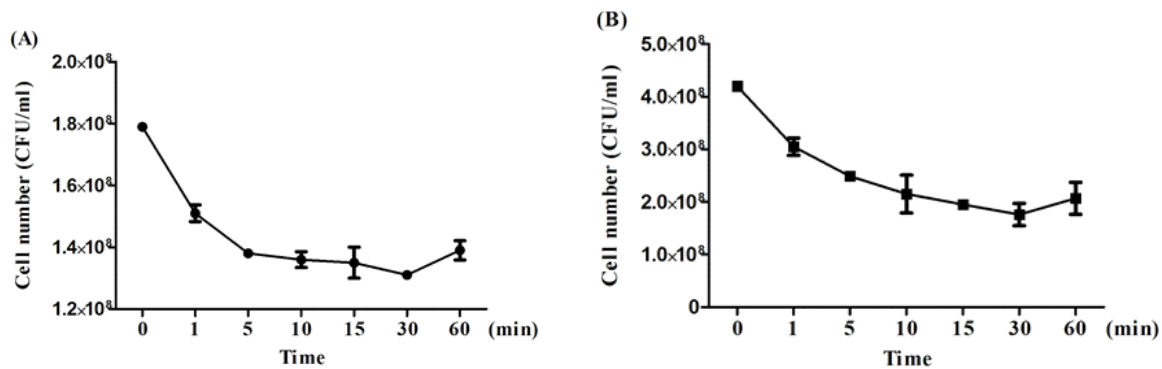


Fig. 1. Acid resistance of *Lactobacillus pentosus* A67 and *L. plantarum* C2.

(A) The cell number of *L. pentosus* A67 survived from artificial gastric juice of pH 2.5 until 60 minutes. (B) The cell number of *L. plantarum* C2 survived from HCl of pH 2.5 until 60 minutes. Each bar shows the mean ± SD of the three independent experiments repeated in triplicate.

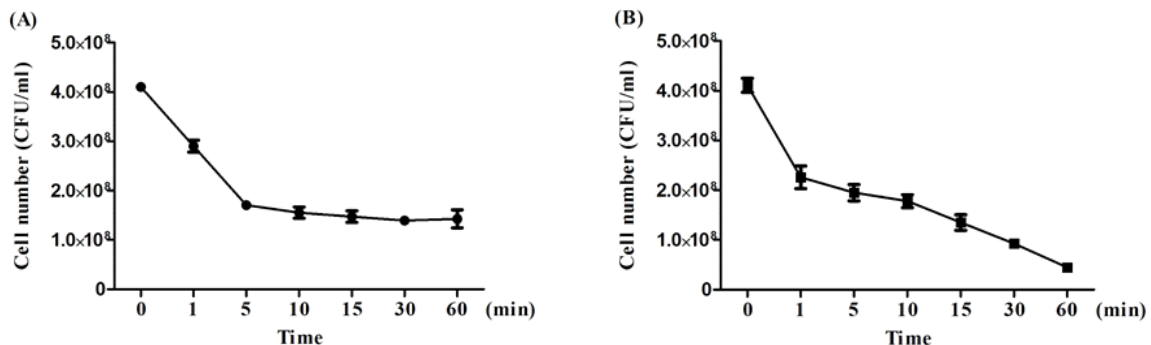


Fig. 2. Bile acid resistance of *L. pentosus* A67 and *L. plantarum* C2.

(A) The cell number of *L. pentosus* A67 survived from bile salt of 0.3% until 60 minutes. (B) The cell number of *L. plantarum* C2 survived from bile salt of 0.3% until 60 minutes. Each bar shows the mean ± SD of the three independent experiments repeated in triplicate.

였을 때, 유사한 생존율을 보였다. 일반적으로 담즙산은 지질로 구성된 미생물의 세포막에 영향을 주어 미생물의 생장을 억제하는 것으로 알려져 있는데, *Lactobacillus*속을 포함한 많은 종의 유산균에서는 담즙산염 가수분해효소를 생성하여 담즙산을 가수분해하고, 이 같은 억제작용을 감소시키는 것으로 보고되어 있다(Sahadeva 등, 2011).

항생제 내성시험 결과 (Table 1), *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 quinolone, aminoglycoside, macrolide, glycopeptide, tetracycline, cephalosporin, penicillin 계열에 해당하는 항생제에서 생존하는 것으로 확인되었다. 또한 항진균제로 쓰이는 miconazole과 amphotericin B에 대하여 *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 12500 mg/mL의 고농도에서도 생존하였다. Ampicillin의 MIC는 *L. pentosus* A67과 *L. plantarum*

C2에 대하여 각각 0.98 mg/mL, 1.95 mg/mL 였으며, *L. plantarum* C2가 *L. pentosus* A67보다 streptomycin sulfate와 ampicillin에서 상대적으로 0.98 mg/mL만큼 더 높은 농도에서도 생존하였다. 일부 *Lactobacillus* 속은 본질적으로 광범위한 항생제에 대한 저항성을 보이는 것으로 알려져 있는데, vancomycin에 대한 저항성은 많은 유산균들의 본질적인 특성이며, chloramphenicol, erythromycin 및 tetracycline에 대한 저항성은 균주에 따라 다양하다고 보고되어 있다(Saarela 등, 2000). Casado 등(2016)의 연구와 비교하였을 때, 우수한 항생제 내성을 가진 *L. pentosus* MP-10는 *L. pentosus* A67보다 vancomycin-HCl에서 103.00 mg/mL만큼 더 높은 항생제 농도에서 생존을 보였지만, *L. pentosus* A67이 *L. pentosus* MP-10보다 streptomycin sulfate, erythromycin, tetracycline, ampicillin에서 각각

Table 1. Antibiotic resistance activity of *L. pentosus* A67 and *L. plantarum* C2

Category	Antibiotics	<i>L. pentosus</i> A67 (mg/mL)	<i>L. plantarum</i> C2 (mg/mL)
Quinolone	Ciprofloxacin	781.26	781.26
Quinolone	Norfloxacin	390.62	390.62
Aminoglycoside	Streptomycin-sulfate	195.31	390.62
Macrolide	Erythromycin	31.25	31.25
Glycopeptide	Vancomycin-HCl	25	25
Tetracycline	Tetracycline	12.20	12.20
Cephalosporin	Cefaclor	7.81	7.81
Penicillin	Ampicillin	0.98	1.95
Imidazole	Miconazole	12,500	12,500
Polyene	Amphotericin B	12,500	12,500

This result means MIC of antibiotics on *L. pentosus* THK-aA67 and *L. pentosus* MP-10 as control strain. The inoculation concentration of *L. pentosus* THK-aA67 was CFU/mL and it was cultured at 30°C for 1 day. Three independent experiments repeated in triplicate.

45.31 mg/mL, 31.24 mg/mL, 4.20 mg/mL, 0.78 mg/mL만큼 더 높은 항생제 농도에서 생존함으로써 더 많은 계열의 항생제에서 상대적으로 강한 항생제 내성을 보인다는 것을 확인하였다. 또한 Georgieva 등(2015)의 연구와 비교하였을 때,

우수한 항생제 내성을 가진 *L. plantarum* 24-2L이 *L. plantarum* C2보다 vancomycin-HCl과 tetracycline에서 각각 더 높은 농도의 항생제에서 생존하며 내성을 보였지만, *L. plantarum* C2는 streptomycin sulfate, erythromycin, ampicillin에서 *L. plantarum* 24-2L보다 366.62 mg/mL, 30.50 mg/mL, 1.57 mg/mL만큼 더 높은 항생제 농도에서 생존함으로써 더 많은 계열의 항생제에서 상대적으로 강한 항생제 내성을 보였다. 특히 Georgieva 등(2015)의 연구에 따르면 *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. leichmannii*, *L. acidophilus* 등은 D-alanine ligase-related enzymes을 가지고 있으므로 약제에 대한 저항성이 큰 것으로 보고되어 있다. 따라서 *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2도 D-alanine ligase-related enzymes에 의해 항생제에 대한 내성을 보인 것으로 사료된다.

이러한 결과로 미루어 볼 때, *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 장내환경에 생존하기 적합하고 같은 종의 균주보다 우수한 내산성능 및 내담즙성능을 가진 프로바이오틱스로 판단되며, 다양한 계열의 항생제에 대한 우수한 내성을 가진 프로바이오틱스로 판단된다. 따라서, *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 다양한 항생제와 병행하여 처방될 수 있고, 장내에서 항생물질을 견딜 수 있으며, 동일한 종의 균주들보다 우수한 항생제 내성을 보유하고 있

는 기능성 프로바이오틱스로 판단되며, 추가적인 연구가 요구된다.

References

- Ann YG (2011) [Lactic acid bacteria] Probiotic lactic acid bacteria. *Korean J. Food & Nutr.* **24**, 817-832.
- Casado MMC, Benomar N, and Ennahar S *et al.* (2005) Comparative proteomic analysis of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance and biocide tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* **222**, 8-15.
- Francoise B, Anna C, and Daniel KO *et al.* (2005) *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1629-1634.
- García RA, González LD, and Esteban FA *et al.* (2014) Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiol.* **44**, 220-225.
- Georgieva R, Yocheva L, and Tserovska L *et al.* (2015) Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnol. Bio-technol. Equip.* **29**, 84-91.



6. Gueimonde M, and Salminen S (2006) New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig. Liver Dis.* **38**, S242-S247.
7. Radulović Z, Miočinović J, and Mirković N, *et al.* (2017) Survival of spray-dried and freeze-dried cells of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 564 in soft goat cheese. *Anim. Sci. J.* **88**, 1849-1854.
8. Saarela M, Mogensen G, and Fonden R *et al.* (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* **84**, 197-215.
9. Sahadeva RPK, Leong SF, and Chua KH *et al.* (2011) Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *Int. Food Res. J.* **18**, 1515-1522.
10. Tulumoglu S, Yuksekdogan ZN, and Beyatli Y *et al.* (2013) Probiotic properties of *Lactobacilli* species isolated from children's feces. *Anaerobe.* **24**, 36-42.