

동치미 유래 생균제로서 가능성이 있는 *Lactobacillus* sp. FF-3의 분리와 특성

정원복 · 서원석 · 차재영 · 조영수
동아대학교 생명자원과학대학 응용생명공학부

Isolation and Characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for Probiotics Production from Korean *Dongchimi*.

Won-Bok Chung, Won-Seok Soe, Jae-Young Cha and Young-Su Cho

Department of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Abstract

For selection of lactic acid bacteria for probiotics, we have examined isolated strains from Korean *Dongchimi* to assess the acid, bile, and pancreatic tolerance and the growth inhibition on the pathogens. Especially, a kind of isolated strains, FF-3 showed the highest resistancy to both of HCl and bile salt, as well as the highest inhibitory activities against *Salmonella* sp. and *Escherichia coli*. Further the bacteriocin of FF-3 showed relatively wide range of inhibition spectrum against gram positive and some gram negative bacterias. By using 16s rDNA sequencing method, FF-3 of the selected lactic acid bacteria were found to be identified as genus *Lactobacillus*.

Key words : *dongchimi*, isolation, characterization, lactic acid bacteria, probiotic

서 론

Probiotics(생균제)란 숙주의 장내미생물 균형을 유지시킴으로써 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물을 의미한다(1). 이와 같은 probiotics는 장내 균총의 안정화, 유해세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 질병 예방, 면역활성화 작용, 항암작용, 콜레스테롤 저하, 유당불내증의 경감, 변비 억제 등의 기능을 갖고 있다고 알려져 있다(2-6). 따라서 기능성 식품으로 probiotics를 이용하려는 제품 개발 및 연구가 활발하게 이루어지고 있다(7-9). 현재, 생균제로는 주로 *Lactobacillus*(10-13), *Enterococcus*(14), *Bifidobacterium*(15) 등이 연구되었으나, probiotics로 가장 많이 이용되고 있는 균주는 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*이며, 발효유, 건강식품, 유산균 정장제 및 동물 약품 등에 사용되고 있다.

Probiotics로서 균이 가져야할 가장 중요한 특성 즉, 가축이나 동물이 아닌 사람으로부터 분리되어 안전한 것이어야 하며, 위의 낮은 pH에서 생존하여 위산을 통과하여야 하며, 소장 에 분비된 담즙에 대한 내성을 지니고 있어 장내에서 생존하여야 하고, 병원성균에 대한 억제 등의 유익한 작용들을 해야한다(1,16). 이러한 probiotics로 이용 가능한 유산균

중 일부는 사람이 아닌 가축이나 동물에서 분리되어 사람과 동물의 구분없이 사용함으로써 안전성의 문제점을 지니고 있거나, 내산성과 내담즙산성이 낮아 probiotics로서 부족함 점도 있었다.

또한, 생균제 분리원으로 발효유, 유아 또는 성인의 분변, 모유 등에서 분리하였으나 발효식품에서 분리한 예는 거의 없다. 우리나라 겨울철에 많이 섭취하는 김치류 중의 하나인 동치미는 무를 원료로 한 발효식품으로서 유산균들이 NaCl 및 무기질을 공급원으로 체액의 산도 평형을 조절하는 건강식품으로서의 가치를 지닌다(17). 그러나 동치미에 관한 연구는 김치에 비해 대단히 미흡한 실정이며 현재까지 연구된 동치미에 관한 내용은 주로 동치미 발효 과정 중 pH, 일반성분, 산도 및 당분의 변화 등이 대부분이었으며, 동치미 발효균의 생균제 가능성에 관한 연구는 거의없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 내산성, 내담즙산성 및 병원성균 증식억제능 등의 생균제로서 이용 가능성이 있는 유산균을 동치미로부터 분리하여 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 선별 및 동정

동치미로부터 유산균의 분리를 위하여 2002년 12월 중순 부산시 사하구 지역 일반가정 10여 곳에서 동치미를 수집하

Corresponding author : Young-Su Cho, Dept. of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea
E-mail : choys@daunet.donga.ac.kr

였다. 수집된 동치미는 4°C에서 약 15일간 보관하여 숙성시켰다. 유산균을 분리하기 위한 선택배지로 brocresol purple(BCP)을 함유한 BCP agar(BCP 0.004%, bacto-peptone 0.5%, yeast extract 0.25%, tween 80 0.1%, L-lysine 0.01%, glucose 0.1%, agar 1.5%) 배지를 사용하였으며, 준비된 시료를 homogenize한 후 평판회석 도말법을 이용하여 BCP agar 배지에 평판 도말하였다. 37°C에서 1~3일 지켜보며 균체 주변에 황색환을 형성하는 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주들은 BCP agar 배지에 단독으로 spot 배양하여 그 중 활성이 우수한 균주들을 2차 선별하였다. 선별된 균들은 내산성, 내담즙산성, 내취장액성 및 항균력을 관찰하여 가장 우수한 균주를 선별하여 gram 염색, 현미경 관찰, catalase 반응 그리고 10% 환원탈지유에서의 curd 형성 여부 등을 통한 생리학적 성질을 조사한 후 한국생명공학연구원 유전자 센터에 의뢰하여 16s rDNA 염기서열로 동정한 결과 *Lactobacillus* sp.으로 판명되어 *Lactobacillus* sp. FF-3으로 명명하였다.

생균수 측정

2차 선별된 균주들의 생육 정도를 알아보기 위해 각각 증배액인 배양액을 MRS broth 배지에 2% 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액 1 mL을 0.85% NaCl 9 mL가 든 시험관에 넣고 vortexing한 후 1/10의 배수로 경시적으로 희석한 뒤, 각각 100 µL를 준비된 MRS agar에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양 후 생균수를 측정하였다. 일반적으로 균수가 약 30~300 범위에 들어오는 petridish를 골라 회석배출을 곱한 값을 생균수로 나타내었다.

인공위액에 대한 저항성

MRS broth 배지에 각 균을 접종한 뒤 37°C에서 24시간 증배양하였다. 배양액 1 mL를 각각 50 mL의 인공위액(1,000 U pepsin/mL NB, pH 3.0)과 pH 7.0의 Nutrient Broth(NB)배지액(50 mL, 대조군)에 넣고 2시간 동안 37°C에서 정치시킨 뒤, 이 중 1 mL를 취해 0.85% NaCl로 연속 희석시켜 petridish에서 배양하고 생균수를 측정하였다. 인공위액의 조제는 Kobayashi(18) 등의 방법을 변형한 것으로 배양액의 pH를 1 N HCl로 3.0으로 조정하고 pepsin을 1,000 U/mL되도록 첨가하였다.

담즙산에 대한 저항성

0.22µm filter(Millipore, Membrane Filter, Ireland) 로 여과 제균된 돼지 담즙산(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 0.3% 첨가한 배양액에, 인공 위액의 pH에서 생존한 균을 접종하였다(15). 37°C에서 24시간 배양 후 100 µL를 petridish에 도말하고 이것을 37°C에서 24시간 배양 후 나타난 생균수를 측정하였다.

취장액에 대한 저항성

0.22µm filter(Millipore, Membrane Filter, Ireland) 로 여과 제균된 돼지 취장액(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 0.5% 첨가한 배양액에 인공 위액의 pH와 담즙산에서 생존한 균을 접종하였다. 37°C에서 24시간 배양 후 100 µL를 petridish에 도말한 뒤 이것을 37°C에서 24시간 배양 후 나타난 생균수를 측정하였다.

유해균 억제능

분리 균주를 MRS broth배지에서 24시간 배양한 후 4°C에서 10,000×g로 원심분리하여 상등액을 얻어 0.22 µm filter(Millipore, Membrane Filter, Ireland)를 통과시켜 cell free supernatant를 회수하였다. 항균력 측정은 agar diffusion assay의 방법(19)을 변형하여 사용하였다. 즉, MRS agar를 미리 첨가시켜 균한 배양 접시에 억제 여부 시험균을 1% 접종한 MRS soft agar(agar 0.7% 포함) 7 mL를 첨가하여 표면을 미리 건조시킨 다음 원심분리한 상등액을 5 µL 점적하여 12시간 배양한 후 억제환 생성 여부로 판정하였다.

항균 spectrum

분리 균주의 항균 spectrum을 조사하기 위하여 부패 및 병원균을 포함하는 gram 양성 및 gram 음성균들을 대상으로 억제환을 측정하였다. 수정된 agar diffusion assay의 방법(19)을 사용하여 억제환 크기(mm)를 비교하였다.

결과 및 고찰

Lactobacillus sp.의 선별 및 동정

부산시 사하구 일원의 일반가정에서 수집한 동치미를 4°C에서 15일간 숙성시켜 BCP를 함유한 plate count agar 배지에 황색환을 형성하는 약 20여 균주를 1차 분리하였다. 1차 분리된 균주를 단독 spot 배양하여 2차로 우수한 6균주를 선별하였다. 선별된 균주들을 각각 MRS broth에 37°C에서 24시간 동안 배양 후 내산성, 내담즙액성 및 내취장액성 뿐만 아니라 병원성균 억제력이 우수한 1균주를 최종 선별하였다.

최종선발된 균주의 생리학적 특성을 조사한 결과 gram 양성균의 간균으로 포자를 형성하지 않으며, catalase 음성, 혐기 또는 호기에서도 성장하였다. 10% 환원 탈지유에 배양 시 curd를 형성하였고, glucose 배양 시 gas를 형성하지 않는 정상발효 유산균이었다(Table 1). 본 균주를 16s rDNA sequence 동정 결과 *Lactobacillus pentosus* JCM 1588과 99.59%, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014와 99.45%의 상동성을 보여 *Lactobacillus* sp.로 동정되었으며, 본 연구자들에 의하여 *Lactobacillus* sp. FF-3로 명명하였다(Table 2).

Table 1. Bacteriological characteristics of *Lactobacillus* sp. FF-3 isolated from *Dongchimi*

Classification	FF-3
Morphological characteristics	
Form	rod
Gram stain	+
Spore-forming	-
Motility	-
Facultative anaerobic	+
Cultural characteristics	
Catalase	-
Gas from glucose	-
Growth under aerobic condition	+
10% skim milk culture	curd

Table 2. Identified determination of 16s rDNA sequencing of *Lactobacillus* sp. FF-3 from *Dongchimi*

Strain	Similarity(%)
<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1588	99.59
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	99.45
<i>Lactobacillus buchneri</i> NCDO 110(T)	92.47
<i>Lactobacillus collinoides</i> JCM 1123(T)	91.75
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869(T)	91.59
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> ATCC 15521	91.54
<i>Lactobacillus alimentarius</i> ATCC 29643	91.14
<i>Lactobacillus brevis</i> NCDO 1749	91.12
<i>Lactobacillus hilgardii</i> ATCC 8290	90.35
<i>Lactobacillus fructivorans</i> ATCC 8288	90.07

생균제로서 분리된 유산균들의 비교 평가

2차 선별된 분리 균들의 생육 정도를 비교하기 위하여 생균수를 측정된 결과 Table 3과 같이 나타났다. 분리된 균들 모두 산을 생성하며 생육 정도도 일반적인 유산균과 비슷하였다. 생균제로서의 가능성에서 분리 균들의 산에 대한 생존률은 FF-3, FF-5, FF-6가 각각 90.20%, 98.57% 및 90.00%로 위산에 매우 강한 균임이 확인되었으며 특히, FF-3균주가 가장 많은 생균수를 나타내었다. 반면, 생육에서 가장 좋았던 FF-1 균은 24.40%로 낮은 생존률을 보여 산에 대한 저항성이 약한 것으로 나타났다(Table 4). 담즙산에서의 생존률은 위산과 상대적으로 비슷한 결과를 나타내었으나 전체적으로 생존률이 매우 낮았다. 그 중에서도 FF-3균주가 5.64%로 가장 높은 생존률을 보였다(Table 5). 이러한 담즙산에 대한 약한 특성은 *Lactobacillus* 속에서 보이는 일반적인 현상으로 알려져 있다(13). 담즙의 성분은 공역 담즙산(conjugated acids)으로 이루어져 있는데 미생물이 공역 부위를 자르는 효소를 가지고 있으면 담즙의 존재에 취약하다고 보고된 바 있다(20). 아마도 분리 균들도 이러한 작용 때문에 담즙산의 존재하에서 생존률이 급격히 줄어든 것으로 추정된다. 위산과 담즙산에서 생존한 균들의 체장액에서의 생

존률은 FF-1을 제외한 나머지 균들에서 1.2~2.8배 정도 더 생육함을 확인할 수 있었다(Table 6). 따라서, 생균제로서의 1차 조건으로 내산성, 내담즙산성 및 내체장액성을 조사한 결과 FF-3, FF-5, FF-6의 3종의 균주가 생존률이 우수한 것으로 나타났다.

Table 3. Measure of cell growth and pH on isolated lactic acid bacterias from *Dongchimi*

Lactic acid bacterias	Cell growth(10^8 cfu/mL)	pH
FF-1	12.5	4.20
FF-2	6.7	4.51
FF-3	8.4	3.92
FF-4	8.0	4.18
FF-5	8.4	3.72
FF-6	8.8	3.78

Table 4. Effect of artificial gastric juice on the growth of isolated lactic acid bacterias

Lactic acid bacterias	Viable cell no. ($\times 10^4$ cfu/mL)		Viability(%)
	No treatment	Treatment	
Acid tolerance after 2hr incubation at pH 3.0			
FF-1	750	183	24
FF-2	1660	244	15
FF-3	500	451	90
FF-4	940	125	13
FF-5	70	69	99
FF-6	100	90	90

Table 5. Effect of 0.3% bile acids on the growth of isolated lactic acid bacterias

Lactic acid bacterias	Viable cell no. ($\times 10^5$ cfu/mL)		Viability(%)
	No treatment	Treatment	
FF-1	1,000	0.2	0.02
FF-2	960	0.1	0.01
FF-3	2,020	114	6
FF-4	540	0.05	0.01
FF-5	690	12	2
FF-6	187	9	5

Table 6. Effect of 0.5% pancreatic juice on the growth of isolated lactic acid bacterias

Lactic acid bacterias	Viable cell no. ($\times 10^5$ cfu/mL)		Viability(%)
	No treatment	Treatment	
FF-1	1,150	710	62
FF-2	1,530	1,970	129
FF-3	2,890	3,360	116
FF-4	430	1,230	286
FF-5	280	650	232
FF-6	630	670	106

위 결과에 따른 유해균의 억제능을 각각 조사한 결과 Table 7과 같이 나타났다. 3종 모두 유해균에 대한 억제능을 가지고 있는 것으로 확인되었으며, FF-3와 FF-6 두 종의 균주가 비슷한 양상을 나타내었다. 생균제로서의 1, 2차 조건을 조사하여 최종 선발된 균주 FF-3의 특성을 조사하고, 동정하였다.

Table 7. Growth inhibition of isolated lactic acid bacterias on the pathogens

Lactic acid bacterias	Clear zone (mm)		
	E-coli (O-157)	Salmonella sp.	Bacillus sp.
FF-3	20	38	21
FF-5	18	10	19
FF-6	22	40	17

항균 spectrum

MRS agar 배지 상에서 gram 음성균주와 gram 양성균주를 포함하는 부패 및 병원균을 대상으로 *Lactobacillus* sp. FF-3의 항균 spectrum을 조사한 결과를 Table 8에 나타내었다. *Lactobacillus* sp. FF-3는 *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Bacillus* spp., 등 gram 양성뿐만 아니라 *Pseudomonas* spp., *Shigella* spp. 등 gram 음성균에도 항균 활성을 나타내었다. 분리균과 같은 속의 *Lactobacillus delbrueckii-lactis* KCTC 1058과 *Lactobacillus brevis* KCTC 3498에는 항균 활성이 나타나지 않았다. 또한 부패균에 대한 항균 활성보다는 병원균에 대한 항균 활성이 더 높은 것으로 확인되었다.

Table 8. Inhibitory effect of antimicrobial spectrum by *Lactobacillus* sp. FF-3

Microorganism tested	Growth medium	Temp.(°C)	Inhibition ^a
<i>Lactobacillus delbrueckii-lactis</i> KCTC 1058	TJ, YEM	37	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> KCTC 3112	MRS+Glu	37	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3108	MRS+Lac	37	+
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3498	MRS	30	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	TJA	25	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC 3507	MRS	30	+
<i>Enterococcus faecium</i> KCTC 3095	BHI	37	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC 2344	NA	26	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TV 17	MHM	30	++
<i>Bacillus cereus</i> JCM 2152	MHM	37	++
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	MHM	37	++
<i>Shigella dysenteriae</i> TV11	MHM	37	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> N 92	MHM	37	++
<i>Hafnia alvei</i> N 84	MHM	37	++

^a : -, no inhibition zone; +, radius of inhibition zone < 6mm; ++, radius of inhibition zone > 6mm

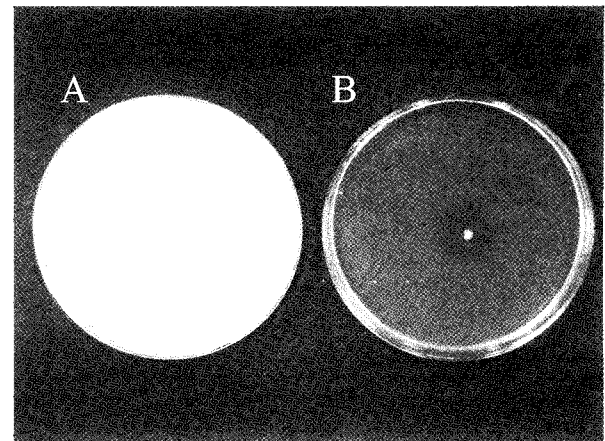


Fig. 1. Growth inhibition zone of *Lactobacillus* sp. FF-3 against several food spoilage and pathogenic microorganism.(A : 50 µL cell free supernatant, B : spot culture).

요 약

생균제로서 가능성 있는 유산균의 선별을 위해 발효식품인 동치미로부터 분리된 균주들의 내산성, 내담즙성, 내취장액성 및 유해균 억제능을 조사하였다. 특히 분리된 균종 중에서 FF-3가 인공위액과 담즙산에 대한 높은 내성을 나타내었을 뿐만 아니라, *Salmonella* sp. 과 *Escherichia coli*에 대하여 높은 항균 활성을 나타내었다. FF-3유래 박테리옌은 그람 양성 및 음성 세균에서 넓은 항균 범위를 나타내었다. 본 연구에서 최종선별된 FF-3 균주를 16s rDNA sequence 동정한 결과 *Lactobacillus* sp.으로 확인되어 FF-3으로 명명하였다.

감사의 글

이 논문은 2002학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제) 지원에 의하여 연구 되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365-371
- Fuller, R. (1991) Probiotics in human medicine. *Gut.*, 32, 439-445
- Hilton, E., Henry, D.I., Phyllis, A., Kenneth, F. and Michael, T.B. (1992) Ingestion of youghurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. *Ann. Int. Med.*, 116, 353-359

4. Takiguchi, R., Mochizuki, E., Suzuki, Y., Nakajima, I. and Benno, Y. (1997) *Lactobacillus acidophilus* SBT2062 and *Bifidobacterium longum* SBT2928 on harmful intestinal bacteria. J. Int. Microbiol., 11, 11-17
5. Goldin, B. R. and Borbach, S. L. (1997) Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements, and dimethylhydrazine. Cancer, 40, 2421-2428
6. Matsuzaki, T., Hashimoto, S. and Yokokura, T. (1996) Effects on antitumor activity and cytokine production in the thoracic cavity by intrapleural administration of *Lactobacillus casei* in tumor-bearing mice. Med. Microbiol. Immunol. Berl., 185, 157-162
7. Lee, Y. K. and Salminen, S. (1995) The coming of age of probiotics. Trends Food Sci. Technol., 6, 241-248
3. Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr., 125, 1401-1406
9. Tannock, G. W. (1997) Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. Trends. Biotechnol., 15, 270-278
0. Hong, S. Kim, W. J. Cha, S. and Lee, B. H. (1996) Growth of *Lactobacillus acidophilus* in whey-based medium and preparation of cell concentrate for production of probiotics. J. Microbiol. Biotechnol., 6, 128-134
1. Conway, P. L. Gorbach, S. L. and Goldin, B. R. (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci., 70, 1-8
2. McDonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M. (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol., 56, 2120-2128
3. Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. T. (1984) Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J. Dairy Sci., 67, 3045-3049
14. 박종진, 변정수, 조윤경, 홍승서, 이현수 (1996) 동물의 장에서 분리한 *Enterococcus* sp. 의 특성 및 분말화, 산업미생물학회지 24, 393-403
15. 박소영, 고영태, 정후길, 양진오, 정현서, 김영배, 지근익 (1996) 유산균들의 콜레스테롤 저하성, 내산성, 내담즙성, 항생제 내성 비교, 산업미생물학회지 24, 304-310
16. Salminen, S., Laine, M., Wright, A., Vuopio-Varkila, J., Korhonen, T. and Mattila-Sandholm, T. (1996) Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a nordic and european approach. Bioscience Microflora, 15, 61-67
17. Kang, K. O., Sohn, H. J. and Kim, W. J. (1991) Changes in chemical and sensory properties of *Dongchimi* during fermentation. Kor. J. Food Sci. Technol., 23, 267-273
18. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. (1974) Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. Jpn. J. Microbiol., 29, 691-698
19. Burns, J. L., Saiman, L., Whittier, S., Larone, D., Krzewinski, J., Liu, Z., Marshall, S. A. and Jones, R. N. (2000) Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol., 38, 1818-1822
20. Floch, M., Binder, H. J., Filburn, B. and Gershengoren, W. (1992) The effect of bile acids on intestinal microflora. Am. J. Clin. Nutr., 25, 1418-1423

(접수 2003년 6월 22일, 채택 2003년 8월 20일)