

Probiotics로서의 젖산균주의 특성 및 면역활성

서재훈 · 이 호^{1,*}

대상(주) 중앙연구소 식품연구실, ¹경기대학교 이과대학 식품생물공학전공

Characteristics and Immunomodulating Activity of Lactic Acid Bacteria for the Potential Probiotics

Jae-Hoon Seo and Ho Lee^{1,*}

Traditional Research Team, Food R&D Center, Daesang Co.

¹Department of Food Science & Biotechnology, Kyonggi University

Abstract This study was designed to examine the suitable characteristics of potential probiotic bacteria. Possible probiotic bacteria, including *Lactobacillus acidophilus* DDS-1, *Lb. acidophilus* B-3208, *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3357, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293, and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962 were selected. We then measured their acid and bile tolerances, adhesion properties in the gastrointestinal tract, antimicrobial activity against pathogenic bacteria, and immunomodulation activity. The acid tolerances of *Lb. acidophilus* DDS-1, *Lb. acidophilus* B-3208, *Lb. plantarum*, and *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293, in PBS (pH 2.5) for 2 hr, were high enough that 50% of the inocula survived. The bile tolerances of all bacteria, except *Lc. lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962, were also observed at a 3% oxgall concentration in MRS broth. The results of the adhesion property assay showed that the total binding affinities of *Lb. acidophilus* DDS-1, *Lb. acidophilus* B-3208, and *B. bifidum* were about three times higher than those of the other bacteria. In testing their antimicrobial activities against pathogens, *Lb. acidophilus* B-3208, *B. bifidum* KCTC 3357, and *Lb. plantarum* inhibited the growth of pathogenic bacteria. For their immunomodulation activity, the cell wall fractions from *Lb. acidophilus* DDS-1 and *Lb. acidophilus* B-3208 showed the highest bone marrow cell proliferation activities. However, the cell wall fractions of *Lb. acidophilus* DDS-1 and *B. bifidum*, and the cytosol fraction of *Lc. lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962 showed higher macrophage stimulation activities than those of the other bacteria. Since *Lb. acidophilus* DDS-1 and *Lb. acidophilus* B-3208 satisfy the requirements for probiotics, they can be considered suitable probiotic bacteria.

Key words: probiotic, acid and bile tolerances, immunomodulation activity, lactic acid bacteria

서 론

프로바이오틱스(probiotics)란 용어는 항생물질(antibiotics)에 대비되어 사용되는 말로서 ‘숙주의 장내 균총의 능력을 개선시킴으로 숙주의 건강에 유익한 효과를 주는 살아 있는 미생물(젖산균과 다른 박테리아, 또는 건조된 상태 또는 발효제품 내의 효모)’이라 정의되고 있다(1). 현재 프로바이오틱스로 사용되고 있는 미생물은 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*와 같은 젖산균이 많이 사용되어지고 있으며, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* 그리고 효모 등은 주로 동물에 사용되고 있다(2). 특히 프로바이오틱 젖산균은 정상적인 장관 및 비효생식기의 미생물 균총 유지, 유당불내증의 완화, 혈중 콜레스테롤의 감소, 항암작용, 면역 증강작용, 식품의 영양학적 가치의 증진 등의 유익한 효과와 비효생식기의 미생물 오염방지, 번비의 완화, 여

행자 설사의 예방, 유아 설사의 방지, 항생제 사용에서 유래된 설사의 완화, 혈중 콜레스테롤 상승방지, 장암·방광암의 방지, 간경변의 부작용 방지, 위산과다에의 효과, 골다공증의 방지 등의 치료적인 효과를 가진다고 알려져 있다(3-6).

미생물이 프로바이오틱스로서 유용한 기능을 나타내기 위해서는 섭취한 많은 수의 균이 사람의 소화기관을 통과하여 장내에 정착을 하여야 함으로, 젖산균이 프로바이오틱스로 사용되기 위해서는 사람 장관의 위산과 담즙산에 대한 안정성을 기본적으로 보유해야 한다. 이와 같은 필요성에 프로바이오틱스 균주의 선발 시 균주의 내산성 및 내담즙성에 대한 연구가 필요하다(7). 한편 담즙에 대한 내성은 소장에도 도달한 프로바이오틱스의 생존 및 기능성에 중요한 역할을 하기 때문에 프로바이오틱스로 사용하기 위해 반드시 갖추어야 할 특성이다. 실제로 젖산균이 프로바이오틱스 균주로서의 기능을 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도(0.3%)보다 훨씬 많은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가지고 있어야 한다(8).

또한 젖산균이 장내에서 기능을 나타내기 위한 전제 조건으로서, 장내점착능과 증식능이 중요시되고 있다. 젖산균주의 장내 점착능에 대한 연구는 인체의 상피세포와 유사한 Caco-2 세포와 HT-29세포를 대상으로 이루어져 왔으나(9,10), 젖산균이 대장에서 상재할 때는 상피세포와의 결합보다는 젖산균 표면에 존재하는

*Corresponding author: Ho Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, San 94-6, Ieui-dong, Young-tong-gu, Suwon, Gyeonggi-do 442-760, Korea

Tel: 82-31-249-9653

Fax: 82-31-249-9650

E-mail: hlee@kyonggi.ac.kr

Received September 17, 2007; accepted September 19, 2007

렉틴상 단백질(surface lectin-like protein, SLP)과 점막층을 구성하는 단백질인 mucin의 당쇄 구조간의 인식 및 결합에 의해 이루어진다고 보고되고 있다(11,12). 따라서 Kim 등(13)은 rat colonic mucin(RCM)과 젓산균의 SLP 결합력을 이용한 colonic-mucin binding assay를 개발하여 장내 점착능이 우수한 균주를 선발하는데 사용하였으며, 실험 균들 중에서 *Lb. brevis*가 가장 우수한 것으로 보고했다.

한편, 젓산균은 건강한 사람의 장내 미생물 생태계의 일부로 존재하며, 특히 및 비특이적 면역체계의 증강에 의해 숙주를 보호하여 준다고 알려져 있어 젓산균에 의한 면역증강 효과에 관한 연구가 많이 진행되어 왔다(14-18). Shin 등의 연구에 의하면 *in vivo*(16)와 *in vitro*(17)상에서 bifidobacteria의 세포벽 획득에 의해 장관면역 활성을 통한 골수세포 증식활성이 보고되는 등 장관면역 활성화를 통한 전신 면역계 활성이 증명되었으며, 또한 다른 연구자(15,18)들도 젓산균에 의해 선천성 면역계(백혈구, 대식세포 탐식능 증가 및 NK 세포 활성화)와 후천성 면역계(림프구 증식 및 항체생산 증가)의 증강작용 등 다양한 면역작용을 보이는 것으로 밝혀졌다.

따라서 본 연구에서는 젓산균 공시균주와 발효식품으로부터 분리하여 확보하고 있는 젓산균주를 대상으로 내산성, 내담즙성, 병원성균 억제능, 장내 점착능, 면역활성 등을 측정하였으며, 종합적으로 프로바이오틱스로서의 특성이 우수한 젓산균주를 선별하기 위한 기초 자료를 획득할 목적으로 본 연구를 수행하였다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 시약

실험에서 사용한 균주는 대표적인 젓산균들인 *Lb. acidophilus* DDS-1과 B-3208, *B. bifidum* KCTC 3357, *Lb. plantarum*, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293, 그리고 *Lc. lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962 균주를 사용하였으며, 병원성균주로서 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Listeria monocytogenes* ATCC 59414, *Salmonella enteritidis* ATCC 4931, *Staphylococcus aureus*를 사용하였다.

실험에 사용된 젓산균주의 배양 배지로는 MRS(Lactobacilli MRS, Difco™, Detroit, MI, USA) broth에 L-cysteine·HCl이 0.05%첨가된 MRS broth와 병원성균 배양에 사용된 BHI(brain heart infusion), TSB(trypsin soy broth), NB(nutrient broth), Oxford agar, MacConkey agar, Staphylococcus 110 agar는 BD Bioscience사(Franklin Lakes, NJ, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

젓산균의 장내 점착능 측정 실험에서 사용된 시약으로 Guanidine·HCl, TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine liquid substrate system)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품, SLP(surface lectin-like protein) 제조에 사용된 biotin은 Roche사(Sandhofer Strasse, Germany) 제품을 사용하였으며, SAV-HRP (Streptoavidine-Horseradish Peroxide Conjugate)는 BD Bioscience사(Franklin Lakes, NJ, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약은 시판되는 1급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

실험 동물

본 실험에 사용된 mouse는 C3H/He계(female, 6-7주령), ICR계(male, 6-8 주령)로 (주대한 바이오 링크로부터 구입하여 사용하였으며, 실온(23±3°C, 습도 55-70%)에서 물과 사료를 자유급식 하며 사육하였다. Rat은 Wister hannover계(female, 10주령)를 (주)

샘타코 BIO KOREA로부터 구입하여 사용하였으며 사육조건은 mouse와 동일한 조건으로 하였다.

내산성 및 내담즙성 측정

내산성 측정은 먼저, 젓산균 6종을 MRS(with 0.05%-L-cysteine·HCl)액체 배지에서 혐기조건으로 37°C, 24시간 배양한 후, 균수가 약 1×10^7 cell/mL 되도록 링거액(NaCl: 8 g/L, KCl: 0.3 g/L, CaCl₂: 0.33 g/L)으로 희석하고, 9 mL의 PBS(phosphate buffer saline; pH 2.5)에 1 mL 넣어준 후 37°C에서 2시간 배양을 하였다. 회수한 배양액은 링거액을 사용하여 적당한 농도로 희석한 후, MRS-agar plate를 사용하여 double layer로 plating하고 혐기적 조건으로 37°C, 48시간 배양한 후 균수를 측정하였다(19). 한편, 내담즙성의 경우에는 젓산균 6종을 MRS액체 배지에서 혐기조건으로 37°C, 24시간 배양한 후, 균수가 약 1×10^7 cell/mL 되게 링거액으로 희석한 후, 희석된 균주를 oxgall(0-3.0%)이 첨가된 MRS-agar에 double layer로 하여 plating한 후 혐기조건으로 37°C, 72시간 배양한 후 젓산균의 담즙산에 대한 내성을 측정하였다(20).

장내 점착능 측정

장내 점착능 측정을 위한 시료의 준비과정으로 Rat colonic mucin(RCM)의 조제, SLP 획득, 그리고 biotinylated-SLP의 조제는 Kim 등(13)의 방법에 따라 수행하였다. 준비된 RCM을 96-well plate에 75 μL씩 분주하고, monolayer를 형성시키기 위해 4°C에서 16시간 반응시킨 후, PBST(phosphate buffer solution with 0.5% tween 20)로 3회 세척을 하고, RCM으로 채워지지 않은 빈 공간을 채우기 위해 blocking buffer를 각 well에 분주한 후, 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 PBST로 4회 세척을 실시한 후 biotinylated-SLP를 각각의 well에 분주하여 상온에서 1시간동안 RCM과 결합을 시켰다. 이것을 PBST로 2회 세척한 후 SAV-HRP를 분주한 후 상온에서 1시간 반응시킨 후 7회 세척하였다. TMB를 각 well에 분주한 후 암소에서 10분간 반응시킨 후 정지 용액(2 M H₂SO₄)을 분주하여 반응을 종료시킨 후, microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

병원성균 억제능 측정

젓산균에 의한 병원성균 억제능 측정은 사람의 장관과 유사한 조건을 만들어 주기 위해 0.05%-L-cysteine·HCl을 MRS 배지에 첨가하여 혐기조건에서 병원성 균주와 젓산균주의 혼합배양에 의해 실험하였다(21). 6종의 젓산균주와 4종의 병원성균주를 각각의 배양배지에서 37°C에서 24시간 배양 후, 젓산균과 병원성균주를 각각 초기농도가 대략 $1 \times 10^{6.7}$ cfu/mL이 되게 MRS배지에 접종하였다. 배양 후 병원성균의 선택배지를 이용하여 균수를 측정하였다. 대조군으로는 병원성 균주만을 MRS배지에 접종하여 동일 조건으로 배양 후 선택배지에서 균수를 측정하여 비교하였다.

면역활성 측정

면역활성 측정용 균체 성분의 분리: 6종의 젓산균을 MRS(with 0.05%-L-cysteine·HCl)액체 배지에서 혐기 조건으로 37°C, 24시간 배양한 후 원심분리(5,000 rpm, 4°C, 20 min)하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 생리 식염수(0.85% NaCl)용액으로 3회 세척한 후 150 mL의 2차 증류수에 현탁하였다. 현탁한 균체를 초음파 분쇄기(Ultrasonic processor, Sonic and Material INC., Newtown, CT, USA; 4°C, 5 min)를 이용하여 세포벽을 파괴한 후 원심분리(5,000 rpm, 4°C, 30 min)하고, 상등액 부분을 다시 원심분

리(12,000 rpm, 4°C, 10 min)하여 세포질 성분(cytosol fraction)과 세포벽 성분(cell-wall fraction)으로 분획하였다. 이렇게 얻어진 각획분을 동결건조하여 일정 농도의 용액으로 조제한 후 장관면역활성능 시료로 사용하였다.

장관면역 활성도 측정: 장관면역의 활성도는 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응 후 회수한 상등액을 골수세포와 반응시켜 골수세포가 증식되는 정도로서 나타내는데, 증식도 측정은 Alamar Blue™(Biosource International Inc., Camarillo, CA, USA)의 형광시약이 살아있는 골수세포의 전자전달계에서 방출되는 전자에 의해 환원되어 방출되는 측정법을 사용하였다(22). 즉, 골수세포와 위의 배양 상등액과의 배양종료 18시간 전에 Alamar Blue™ 20 µL를 첨가한 다음, 형광분석기(Luminescence spectrophotometer, Perkin Elmer Ltd., Seer Green, UK)를 이용하여 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 골수세포 증식도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 LPS, 음성 대조군으로는 생리식염수를 시료 대신 사용한 대조군과 비교하여 정량화하였다.

Splenocyte Mitogen 활성도 측정: ICR mouse(6-8주령, 웅성)에서 비장을 적출하여 splenocyte를 획득한 후 0.2% 식염수를 이용하여 적혈구를 제거하고, RPMI 1640-FBS 배지(Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA)로 2-3회 세척하여 세포수를 5×10⁶ cell/mL가 되도록 조정하였다. 이때 얻어진 세포 부유액은 96 well plate에 90 µL씩 분주하고 10 µL의 시료용액을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양한 후 각 well에 MTT(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 첨가하여 5시간 배양 후, 형성된 MTT formazan의 양을 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여(23) mitogen 활성화능을 측정하였다.

마크로파지 활성도 측정: 마크로파지 활성도 측정은 수정된 Suzuki 등(24)의 방법을 사용하였다. 즉, ICR mouse(male, 6-8주령)의 복강에 5% thioglycollate 배지(TG)를 2 mL 주입하고 72-96 시간 내에 유도된 대식세포(macrophage)를 회수한 후 RPMI 1640으로 2-3회 세척하고 세포 수를 1×10⁶ cell/mL로 조정한 후 96 well plate에 100 µL씩 분주하였다. 이를 5% CO₂ incubator에서 배양(37°C, 2 hr)하여 macrophage monolayer를 형성시키고, 상등액을 제거한 후 각 well에 RPMI 1640(with 7% FCS)을 180 µL를 분주하고, 20 µL의 시료를 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양 후 활성화된 macrophage monolayer를 배지로 세척하고, 1% Triton X-100을 가하여 세포막을 용해한 후 유리된 lysosomal phosphatase를 기질인 p-NPP(p-nitrophenylphosphate disodium salt)와 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

내산성과 내담즙성 측정

젖산균이 프로바이오틱스로서 역할을 수행하기 위해서는 우선 강산성의 위를 통과하여 장내로 이동하여야 하는데 위에서 분비되는 염산은 평상시 pH 0.78-0.9를 유지하지만, 음식물이 유입될 때에는 pH가 약 2.0-3.0으로 상승되며, 음식물이 위를 통과하는데 소요되는 시간은 약 2-4시간이다(25). 지금까지 젖산균의 위액에 대한 내산성 실험은 *in vivo*상에서 직접 생존율을 확인하는 실험과, 인공위액 및 PBS 등의 buffer를 이용한 *in vitro*상의 간접적인 방법이 이용되어 왔다. 그러나 위액에 의한 미생물 사멸작용

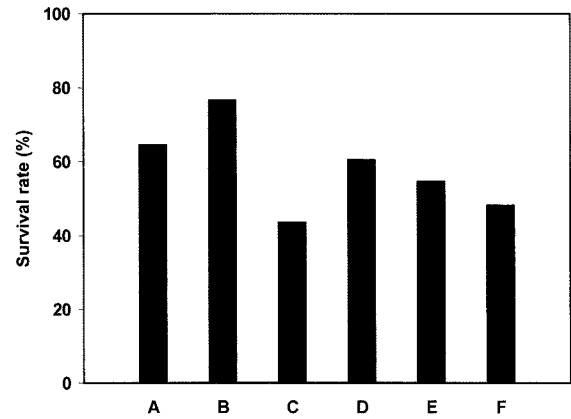


Fig. 1. Effect of the acid exposure on the survival of lactic acid bacteria. LAB were incubated in PBS adjusted to pH 2.5 for 2 hr and diluted with saline, and then plated out in MRS-agar. A; *Lactobacillus acidophilus* DDS-1, B; *Lactobacillus acidophilus* B-3208, C; *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3357, D; *Lactobacillus plantarum*, E; *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293, F; *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962.

의 주요원인이 염산에 의한 낮은 pH인 것으로 밝혀졌으며, *in vitro*의 실험 결과와 *in vivo*에서의 결과가 거의 유사하다고 보고 됨으로써 미생물의 생존은 그들의 낮은 pH에 대한 저항성에 따른 것으로 알려지고 있다(26).

따라서 본 실험에서는 염산(HCl)으로 pH를 2.5로 조절된 PBS를 이용하여 6종의 젖산균의 내산성을 검토하였으며(Fig. 1), 희석액은 인간의 체액과 유사한 링거액을 이용하였다. *Lb. acidophilus* DDS-1, *Lb. acidophilus* B-3208, *Lb. plantarum*, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293 등의 4균주는 생존율이 50% 이상으로 높게 나타났으며, 특히 *Lb. acidophilus* B-3208과 DDS-1은 생존율이 60%이상으로 다른 젖산균에 비해 높은 내산성을 나타내었다. 그러나 *B. bifidum* KCTC 3357, *Lc. lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962는 생존율이 50% 미만으로 나타났다. 따라서 이들 *Lb. acidophilus* DDS-1, *Lb. acidophilus* B-3208, *Lb. plantarum*, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293 등 4균주는 *in vivo* 상의 산성조건에서도 유효한 수의 균이 위를 통과하여 장으로 이동할 수 있을 것이라 사료된다.

한편, 담즙산에 대한 내성은 위에서의 산성조건에 대한 저항성과 더불어 프로바이오틱스 미생물이 갖추어야 할 기본적인 특성 중 하나이다. 담즙은 소장의 상부에서 분비되어 섭취된 지질식품의 소화, 흡수를 촉진하고, 미생물에 대해 세제와 유사한(detergent-like) 작용을 함으로써 지방과 지방산으로 구성되어있는 미생물의 세포막에 영향을 주어 미생물 살균작용을 하는 것으로 알려졌다. 그러나 몇몇 미생물은 담즙산염 가수분해효소(bile salt hydrolase, BSH)에 의해 담즙산염을 가수분해하여, 그들의 용해도를 감소시킴으로써 이러한 작용을 저하시킬 수 있다. 특히 *Lactobacillus*를 포함한 많은 종의 젖산균에서 BSH 효소가 발견되었으나, 이들의 담즙산에 대한 작용기작은 아직 확실히 밝혀지지 않았다(27).

본 실험에서는 Gilliland와 Speck의 방법(28)을 변형하여 oxgall의 농도를 달리한(0-3.0%) MRS 배지 내에서 담즙산 내성을 측정된 결과, Table 1에서 나타난 바와 같이, 본 실험에서 사용된 젖산균주 중 *Lc. lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962를 제외한 5종의 균주는 3%의 oxgall이 함유된 MRS 배지에서도 성장을 하였다. Erkki와 Petaja(29)에 의하면, 장내의 oxgall의 농도는 다양하지만, 소화관 내에서 저항성 있는 프로바이오틱스 균주 선별에 이용되

Table 1. Effect of bile salt concentration on the growth of lactic acid bacteria

Strain	Bile salts (%)							
	0	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
A	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	-	-	-	-	-

Lactic acid bacteria are cultivated in MRS-agar containing oxgall. The strain-names of lactic acid bacteria are as described in the legend of Fig. 1.

는 담즙의 농도는 0.3% 정도라고 알려져 있다. 따라서 실험에 사용된 젖산균주 중 *Lc. lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962를 제외한 5종의 젖산균주는 실제 소장을 통과할 때에 담즙산에 대한 영향을 크게 받지 않음으로써, 소장을 통과한 많은 균이 대장에 도착할 수 있을 것으로 사료된다.

장내 점착능 측정

인간의 대장 내 미생물의 균총은 태어난 지 일주일 내에 형성된다고 보고되어 왔으며, 이 대장 미생물들 중 프로바이오틱스의 장내 점막에 대한 점착은 균총 형성을 위한 선행 조건으로 강조되어 왔다(30). 장내 점막에 대한 프로바이오틱스의 결합은 점막 중 특정성분 또는 부위와 균주표면에 존재하는 렉틴상 단백질(lectin-like protein)이 관여하고 있으며, Kenji 등(31)은 *Lactobacillus casei*의 결합능이 대장 점막 중 다양한 당쇄 구조가 장내 점착능에 영향을 준다는 사실을 보고하였다. 따라서 장내 점착능 측정은 젖산균주의 SLP와 RCM과의 결합력을 이용한 colonic mucin-binding assay(13)로 측정하였으며, 이 방법은 장내 점착능

평가의 재현성과 신뢰성이 높은 것으로 보고되었다.

젖산균주를 대상으로 한 점착능 실험에서는 *Lb. acidophilus* DDS-1, *Lb. acidophilus* B-3208, *B. bifidum* KCTC 3357, *Lc. lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293, *Lb. plantarum* 순으로 장내 점착능이 감소하는 것으로 나타났다(Table 2). 특히 *Lb. acidophilus* DDS-1과 B-3208, *B. bifidum* KCTC 3357은 다른 3가지 균주에 비해 약 2-3배 높은 장내 점착능을 나타내었으며, 이 결과는 bifidobacteria(32)와 *Lb. acidophilus* 그룹(33)의 균주가 우수한 높은 장내 점착능을 나타내었다는 연구 결과와 일치한다. 따라서 이들 균주들은 다른 젖산균주와 비교하여 높은 장내 점착능을 가지는 것으로 사료되며, 사람의 위와 소장을 통과하여 장내에 높은 농도로 점착할 수 있을 것으로 보인다.

병원성균 억제능 측정

젖산균은 항생제 투여 후 장내균총의 정상화와 장내병원균의 감염 및 성장을 억제하기 위하여 사용되기도 하는데, 젖산균에 의한 유해균의 억제 기작으로는 박테리오파지와 같은 항생물질의 생산, 대사산물(유기산, H₂O₂ 등) 생성, 장내 상피세포의 부착장소 경쟁 등이 알려져 있다(34).

본 실험에서는 장내 병원성균 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *L. monocytogenes* ATCC 59414, *Sal. enteritidis* ATCC 4931, *Staph. aureus* 등에 대한 젖산균의 성장억제 능력을 혼합배양에 의해 측정하였으며, 대조군으로는 병원성 균주만을 MRS배지에서 단독 배양하였을 때의 균수를 이용하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 젖산균주와 병원성 균주의 혼합배양의 경우 *Lb. acidophilus* DDS-1과 B-3208, *B. bifidum* KCTC 3357, *Lb. plantarum* 등 4종의 젖산균주는 *Staph. aureus*를 제외한 다른 3종의 병원성 균주를 1×10² cfu/mL 이하의 균수로 성장을 억제하였으며, 다른 2종의 젖산균주는 병원성균에 대한 억제능이 낮은 수준으로 나타났다. 한편 실험에 사용된 6종의 젖산균 모두 *Staph.*

Table 2. Adhesion property of SLP of lactic acid bacteria to rat colonic mucosa

Strain	Protein (μg/mL)	Binding affinity ¹⁾ (O.D. at 450 nm)	Total binding affinity ²⁾ (Mean ± SD)
<i>Lb. acidophilus</i> DDS-1	50.51	1.96 ± 0.06	99.00 ± 3.13
<i>Lb. acidophilus</i> B-3208	42.32	2.33 ± 0.03	98.39 ± 1.31
<i>B. bifidum</i> KCTC 3357	60.02	1.37 ± 0.02	82.41 ± 0.96
<i>Lb. plantarum</i>	15.56	1.34 ± 0.01	20.79 ± 0.16
<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	31.08	0.90 ± 0.02	28.00 ± 0.46
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 7962	27.71	1.41 ± 0.01	39.10 ± 0.14

¹⁾Binding affinity to mucin was measured by colonic mucin-binding assay (13) and expressed as mean ± SD of quadruplicate tests. The concentration of biotinylated-SLP was 5 μg/mL.

²⁾Relative binding affinity = Protein (μg/mL) × Binding affinity/100.

Table 3. Inhibitory effect of lactic acid bacteria on pathogenic bacteria in associative cultures

Enteric pathogen	Viable cells (cfu/mL)						
	Control ¹⁾	Strain ²⁾					
		A	B	C	D	E	F
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	2.6 × 10 ⁸	<10 ²	<10 ²	1 × 10 ²	<10 ²	2.2 × 10 ⁷	1.7 × 10 ⁷
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 59414	3.5 × 10 ⁸	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	4.5 × 10 ⁶
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 4931	2.6 × 10 ⁸	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	1.58 × 10 ⁶
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.3 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸

¹⁾Only enteric pathogen was grown in MRS broth.

²⁾Each strain was grown with enteric pathogen in MRS broth. The strain-names of lactic acid bacteria are as described in the legend of Fig. 1.

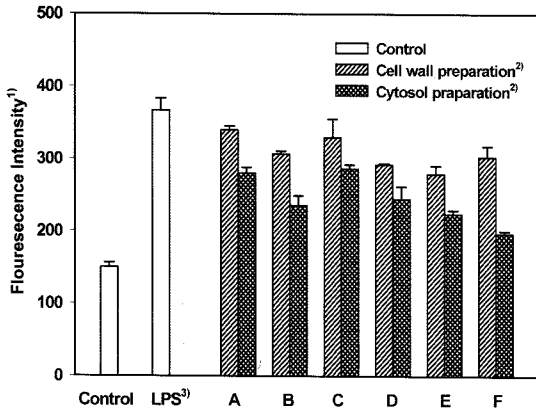


Fig. 2. Intestinal immune system modulating activities of the cellular components prepared from lactic acid bacteria. The strain-names of lactic acid bacteria are as described in the legend of Fig. 1. ¹⁾The proliferation of bone marrow cells through Peyer's patch was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay. Each value was expressed as mean ± SD of quadruplicate assays. ²⁾The final concentration of sample was 100 µg/mL. ³⁾LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control.

*aureus*에 대한 억제능은 낮게 나타났다. 한편 각각의 젖산균주가 병원성균에 대한 성장 억제능에서 차이를 보이는 것은 Shin 등 (35)의 실험결과에서와 같이 병원성균이 그람양성 또는 그람음성 균에 따른 억제 현상보다는 그 병원균 종류에 따라 젖산균에 의한 성장 억제정도가 다르다는 것을 보여준 것과 일치한다. 그러나 본 실험에서는 젖산균에 의한 병원성균 억제능만을 확인하였을 뿐 억제기작에 관하여는 검토하지 않았기 때문에 향후 젖산균의 병원균 증식억제에 대한 기작연구를 통하여 이러한 차이를 규명할 수 있을 것으로 기대된다.

면역활성 측정

장관 면역활성 측정: 발효 유제품 및 생균 형태로 인체에 공급되어 다양한 생체조절효과를 나타낸다고 알려진 *Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium* 등의 젖산균주를 대상으로 장관면역 활성화 여부에 대해 검토하였다. MRS 배지에서 배양한 젖산균을 초음파 처리하여 세포벽을 파쇄하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액과 침전물로 분리한 후, 이들을 세포질 획분과 세포벽 획분으로 사용하였다. 각 획분들을 동결건조한 후, 100 µg/mL 농도로 시료 용액을 조제하고 장관면역 활성화 정도를 측정하였다. 그 결과, Fig. 2에 나타난 바와 같이 전체적으로 장관면역 활성화는 세포질 획분보다 세포벽 획분에서 상대적으로 높게 나타났으며, *Lb. acidophilus* DDS-1과 *B. bifidum*의 세포벽 획분에서 양성대조군으로 사용된 endotoxin인 LPS와 유사한 활성을 나타냈다. 특히 *Lb. acidophilus* DDS-1의 세포벽 획분의 경우 다른 젖산균주에 비해 높은 골수세포 증식활성을 보임으로써 장관면역 활성화에 중요하게 관여함을 알 수 있었다.

Mitogen 활성 측정(splenocyte proliferation): 비장(spleen)은 혈액으로부터 항원을 수집하며, B 및 T 림프구의 성숙과 항원에 의해 자극을 받은 후 림프구의 분화가 이루어지는 주요한 림프 기관으로서 비장 내 림프구의 증식은 면역시스템에서 매우 중요한 의미를 지닌다. 준비된 6종의 젖산균주의 세포벽 성분과 세포질 성분을 100 µg/mL, 10 µg/mL로 조제하여 mitogen 활성을 MTT

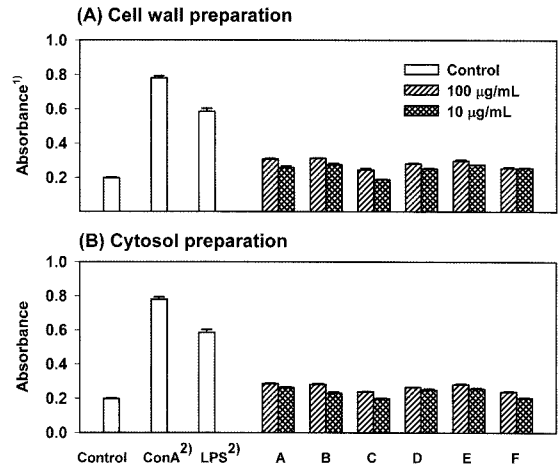


Fig. 3. Splenocyte mitogenic activities of the cellular components prepared from lactic acid bacteria. The strain-names of lactic acid bacteria are as described in the legend of Fig. 1. Splenocytes were cultured with each cellular component (100 µg/mL) and control. ¹⁾Splenocyte mitogenic activity was measured by MTT assay and expressed as mean ± SD of quadruplicate cultures. ²⁾ConA and LPS were used as a positive control.

법으로 측정하였다. Fig. 3에 나타난 것과 같이 실험에 사용된 젖산균주의 세포질 획분과 세포벽 획분 모두 음성대조군과 비교하여 높은 활성을 나타내었지만, 양성대조군으로 사용된 LPS와 ConA(concanavalin A)의 비장세포 활성화능 보다는 대단히 낮은 활성화를 나타내었다. 또한 Chae 등(36)은 *Lb. plantarum*의 세포질 획분을 경구 투여할 때 비장 세포의 활성화에 영향을 미치지 않는다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 한편 *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *B. lactis* 등의 젖산균을 경구 투여한 Gill(14)과 *B. bifidum*의 세포벽 획분 중 수용성 성분만을 경구 투여한 Shin 등(17)의 연구에서는 젖산균이 대조군 보다 높은 비장세포 증식능을 나타냈었다.

대식세포 활성화능 측정(macrophage lysosomal enzyme activity): 대식세포에 의한 탐식작용은 감염성 미생물 등 이물질이 침입하였을 때 일어나는 면역 반응으로 외부물질을 비특이적으로 제거시키는 반응이다. 또한 대식세포는 항원을 가공하여 일부를 자신의 표면에 부착, 제시함으로써 T 림프구를 유도하고 후천성 면역계를 작동할 수 있도록 해주는 effector cell로서의 기능을 수행한다(18). 본 실험에서는 5% TG로부터 유도된 생쥐의 대식세포와 젖산균주 6종의 세포벽 성분 및 세포질 성분을 100 µg/mL 농도로 조제하여 in vitro상에서 mouse 복강 내의 대식세포 활성화능을 측정하였다(Fig. 4). 젖산균의 세포벽 성분에 의한 대식세포 활성화능은 모든 시료군에서 대조군보다 높은 대식세포 활성화능을 가지고 있었으며 *Lb. acidophilus* DDS-1, *B. bifidum*, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293와 *Lb. acidophilus* B-3208 등은 LPS와 유사한 정도의 높은 활성을 보이고 있었다. 또한 젖산균의 세포질 획분을 대상으로 실험한 경우에서도 모든 시료군이 대조군보다 강한 활성능을 가지고 있었으며, 특히 *Le. lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962는 LPS보다 높은 대식세포 활성화능을 나타내었다. 이는 Gill(14)과 Shin 등(17)의 연구에서 lactobacilli와 bifidobacteria의 경구투여에 의해 대식세포 활성화와 식작용 증강이 이루어진다는 보고와 본 실험에서 측정된 6종의 젖산균의 세포벽 획분과 세포질 획분에 의한 대식세포 유도의 결과와

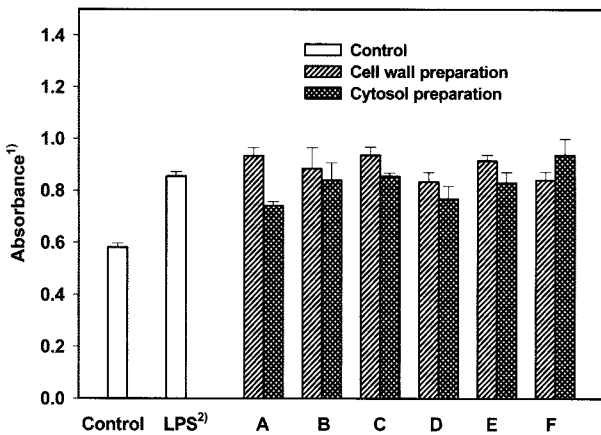


Fig. 4. Macrophage-stimulating activities of the cellular components prepared from lactic acid bacteria. The strain-names of lactic acid bacteria are as described in the legend of Fig. 1. TG-elicited macrophages were cultured with each cellular component (100 µg/mL) and control. ¹⁾The macrophage-stimulating activity was measured by lysosomal phosphatase activity and expressed as mean ± SD of quadruplicate cultures. ²⁾LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control.

유사한 결과로 충분히 면역계를 활성화할 수 있는 능력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 본 실험에 사용된 6종의 유산균주 중 *Lb. acidophilus*에 속하는 균주가 내산성, 내담즙성 및 장내 점착성 등 프로바이오틱스로서 요구되는 조건을 충족시킨다는 것을 알 수 있었으며, 각종 면역활성도 우수하여 상업적 사용에 적합함을 알 수 있었다.

요 약

Probiotics로서의 사용을 위한 우수 젖산균주 선발을 위해 김치 및 발효유 제품으로부터 분리한 젖산균과 공시 젖산균주를 대상으로 내산성, 내담즙성, 장내 점착능, 병원성균 억제능 등의 probiotics 특성과 장관면역활성, mitogenic activity 및 대식세포 활성화 등의 면역활성을 검토하였다. 내산성 실험의 결과, *Lactobacillus acidophilus* DDS-1, *Lb. acidophilus* B-3208, *Lb. plantarum* 과 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293의 경우 생존률이 50% 이상으로 나타났으며, 특히 *Lb. acidophilus* DDS-1과 *Lb. acidophilus* B-3208의 경우에는 70% 정도의 높은 생존률을 나타내었다. 또한 젖산균주의 담즙산 내성에서는 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962를 제외한 모든 균주가 3% oxgall이 함유된 MRS배지에서도 성장이 가능한 것으로 관찰되었다. 젖산균주의 장내 점착능 면에서 볼 때, *Lb. acidophilus* DDS-1, *Lb. acidophilus* B-3208과 *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3357의 장내 점착능이 실험에 사용된 다른 젖산균주와 비교하여 우수하다고 관찰되었으며, 특히 *Lb. acidophilus* DDS-1과 B-3208의 장내점착능이 높게 나타났다. 젖산균주의 병원성균 억제능 실험의 결과, *Lb. acidophilus* DDS-1, *Lb. acidophilus* B-3208 및 *B. bifidum* KCTC 3357은 *Staphylococcus aureus*를 제외한 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Listeria monocytogenes* ATCC 59414, 그리고 *Salmonella enteritidis* ATCC 49313에 대해 높은 증식억제능을 나타내었다. 젖산균의 세포질 획분과 세포벽 획분을 대상으로 면역활성 실험을 실시한 결과, 장관면역 활성화는 젖

산균의 세포질 획분에서 양성 대조군으로 사용한 LPS와 같은 수준의 면역활성을 나타내었고, 특히 *Lb. acidophilus*속 균주들의 세포벽 획분의 장관 면역활성이 다른 균주보다 높게 나타났다. 한편 젖산균주의 세포질과 세포벽 성분에 대한 비장 림프구의 증식능은 대조군과 비슷한 수준으로 낮게 관찰되었으나, 이들의 대식 세포증식능은 세포벽 및 세포질 모두의 획분에서 대조군보다 높았으며 특히 세포벽 획분의 경우에는 양성대조군인 LPS 보다 높거나 유사한 정도의 높은 활성을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 시험 균주 중에서 *Lb. acidophilus* 균주인 DDS-1과 B-3208이 프로바이오틱스로서 요구되는 조건을 충족시킨다는 것을 알 수 있었으며, 이들 균주의 상업적 이용 가능성을 재차 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 경기대학교 연구년 수혜로 연구되었음.

문 헌

- Havenaar R, Huis in't Veld JHJ. Probiotics: A general view. Vol. 1, pp. 151-170. In: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Wood BJB (ed). Elsevier, New York, NY, USA (1992)
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Probiotics. Best Prac. Res. Cl. Em. 18: 299-313 (2004)
- Sanders ME. Probiotics. Food Technol.-Chicago 53: 67-77 (1999)
- Gill HS. Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. Best Prac. Res. Cl. Em. 17: 755-773 (2003)
- Jayaprakasha HM, Yoon YC, Paik HD. Probiotic functional dairy foods and health claims: An overview. Food Sci. Biotechnol. 13: 523-528 (2005)
- Saarela M, Lahteenmaki L, Crittenden R, Salminen S, Mattila-Sandholm T. Gut bacteria and health foods- the European perspective. Int. J. Food Microbiol. 78: 99-117 (2002)
- Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84: 197-215 (2000)
- Hyronimus B, Marrec CL, Sassi AH, Deschamps A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 61: 193-197 (2000)
- Cocconnier MH, Klaenhammer TR, Kerneis S, Bernet MF, Servin AL. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. Appl. Environ. Microb. 58: 2034-2039 (1992)
- Kim ER, Jung HK, Juhn SL, YU JH. Factor affecting the adherence of Bifidobacteria to Caco-2 Cell. Korean J. Food Sci. Animo. Resour. 21: 133-141 (2001)
- Matsumura A, Saito T, Arakuni M, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 82: 2525-2529 (1999)
- Mukai T, Kaneko S, Matsumoto M, Ohori H. Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. Int. J. Food Microbiol. 90: 357-362 (2004)
- Kim SY, Shin KS, Lee H. Screening of lactic acid bacteria with potent adhesive property in human colon using colonic-mucin binding assay. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 959-967 (2004)
- Gill HS. Stimulation of immune system by lactic acid cultures. Int. Dairy J. 8: 535-544 (1998)
- Kim JH, Shin KS, Lee H. Characterization and action mode of anti-complementary substance prepared from *Lactobacillus plantarum*. Korean Food Sci. Technol. 34: 290-295 (2002)
- Shin MS, Yu KW, Shin KS, Lee H. In vitro bone marrow cell proliferation of cell wall preparation from *Bifidobacterium bifidum* SL-21. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 484-489 (2004)
- Shin MS, Yu KW, Shin KS, Lee H. Enhancement of immunolog-

- ical activity in mice with oral administration of cell wall components of *Bifidobacterium bifidum*. Food Sci. Biotechnol. 13: 85-89 (2004)
18. Kim SY, Shin KS, Lee H. Immunopotentiating activities of cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB-1. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 1552-1559 (2004)
 19. Roy D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. Int. J. Food Microbiol. 69: 167-182 (2001)
 20. Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Sci. 67: 309-317 (2004)
 21. Talwalkar A, Kailasapathy K. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* ssp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. Int. Dairy J. 14: 143-149 (2004)
 22. Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of *kampo* (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To". Phytomedicine 5: 353-360 (1998)
 23. Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S. Amyloid β -peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. Neuroscience 115: 201-211
 24. Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. Effects of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. Int. J. Immunopharmacol. 12: 675-684 (1990)
 25. Lee NK, Kim TH, Choi SY, Lee SK, Park HD. Identification and probiotic properties of *Lactobacillus lactis* NK24 Isolation from *jeotgal*, a Korean fermented food. Food Sci. Biotechnol. 13: 417-420 (2004)
 26. Shah NP. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. J. Dairy Sci. 83: 894-907 (2000)
 27. Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ. Importance of bile tolerance of *Lact. acidophilus* used as a dietary adjunct. J. Dairy Sci. 67: 3045-3051 (1984)
 28. Gilliland SE, Speck ML. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. Appl. Environ. Microb. 33: 15-18 (1977)
 29. Erkki S, Petaja E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Sci. 55: 297-300 (2000)
 30. Fuller R. Probiotics in man and animal. J. Appl. Bacteriol. 66:365-378 (1989)
 31. Kenji Y, Takuya M, Hiromu T, Tomokazu N, Kyoto S, Tetsuki T, Hidehiko K. Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. Biochem. Biophysic. Res. Co. 228: 148-152 (1996)
 32. Matsumoto M, Tani H, Ono H, Ohishi H, Benno Y. Adhesive property of *Bifidobacterium lactis* LKM512 and predominant bacteria of intestinal microflora to human intestinal mucin. Curr. Microbiology. 44: 212-215 (2002)
 33. Matsumura A, Saito T, Arakuni M, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 82: 2525-2329 (1999)
 34. Reid G, Burton J. Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes Infect. 4: 3119-324 (2002)
 35. Shin MS, Kim HM, Kim GT, Huh CS, Bae HS, Baek YJ. Selection and characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean feces. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 495-501 (1999)
 36. Chae OW, Shin KS, Chung HK, Choe TB. Immunostimulation effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 13: 424-430 (1998)