

가열살균한 *Lactobacillus rhamnosus*와 *Lactobacillus plantarum*의 콜레스테롤 저하 효과

김대원¹ · 양대혁² · 김선영² · 김광수¹ · 정명준¹ · 강상모^{2*}

¹(주)셀바이오텍, R&D 센터, ²건국대학교 미생물공학과

Hypocholesterolemic Effect of Lyophilized, Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum*, Kim, Dae-Weon¹, Dae-Hyeok Yang², Sun-young Kim², Kwang-Soo Kim¹, Myun-Gjun Chung, and Sang-Mo Kang^{2*}. ¹R&D Center, Cellbiotech, Co. Ltd, Gyunggi-do 415-871, Korea, ²Dept. of Microbiological Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea – Lactic acid bacteria (LAB) were well known to enhance the intestinal health of human. For the development of pharmaceutical LAB, it was screened that the LAB with activity lowering the cholesterol *in vitro* and evaluated the hypocholesterolemic effect of live and heat-killed (HK) LAB on rats. The selected *Lactobacillus plantarum* CBT 1209 and *Lactobacillus rhamnosus* CBT 1702 had the deconjugation of bile salts and assimilation of cholesterol micelles activities from laboratory media. The mixture of 1702 and 1209 strains was administrated to the rats with high cholesterol diet. The experiment performed by 4 groups which were control, HCD, LLAB, HKLAB groups. The hypocholesterolemic effect of LAB (strains 1702, 1209) at blood level, the phenomena of AI decreasing through LDL-cholesterol dwindling, was assessed. This effect of 1702 and 1209 was enhanced when it comes to be the HKLAB more the live-LAB. This data means that the *Lactobacillus rhamnosus* CBT 1702 and *Lactobacillus plantarum* CBT 1209 were very useful functional ingredient for hypercholesterolemia.

Key words : Lactic acid bacteria, hypercholesterolemia, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*

서 론

사람의 혈중 콜레스테롤 농도는 포화지방으로부터의 콜레스테롤 생합성, 순환 중 콜레스테롤의 제거, 식이 콜레스테롤의 흡수, 담즙과 대변으로의 배출 등에 의하여 조절된다. 혈중 콜레스테롤과 중성지방의 농도가 높아지는 질병인 고지혈증은 고혈압, 흡연, 비만 및 지질섭취에 의하여 유도될 수 있다. 일반적으로 고지혈증은 심장 질환과 동맥경화증의 원인이 될 수 있다[3]. 고지혈증 환자들은 많은 약들을 복용하는데 콜레스테롤 흡수의 억제, 대사와 배출을 촉진, 콜레스테롤 합성저해 등의 기작으로 콜레스테롤을 저하시키는 약들이다. 그러나 이러한 약들에서는 간 기능 저하, 근육통, 지용성 비타민의 결핍 등의 부작용을 유발한다[14, 15].

그러므로 부작용이 없이 혈중 콜레스테롤을 저하시킬 수 있는 식이요법에 대한 개발이 시도되고 있다. 저콜레스테롤과 포화지방산 함유 식품의 섭취 등의 식이요법이 시도되고 있으나 혈중 콜레스테롤의 저하효과는 불충분하다[6, 13].

유산균은 사람의 장 건강에 도움을 주는 것으로 잘 알려져 있으며 유산균의 혈중 콜레스테롤 저하기능도 동물과 사

람의 실험을 통하여 연구되고 있다[20]. 유산균은 담즙산 및 콜레스테롤과 결합하여 외부에서 섭취된 콜레스테롤 흡수를 저하시키거나 자체 생산되는 담즙산 분해효소에 의한 탈결합(deconjugation)을 통하여 콜레스테롤을 소모시키는 방법으로 혈중 콜레스테롤을 낮춘다[1, 4, 7, 11].

최근에 우리는 배지 내에서 콜레스테롤을 낮추는 균주를 개발하였다. 본 연구에서는 랫트 실험을 통하여 screening한 CBT 1702와 1209 균주가 콜레스테롤을 낮추는 기능을 가진 것을 확인하였다. 또한 가열살균한 유산균이 *in vivo*에서 콜레스테롤을 저하시킨다는 보고는 아직 없는데 이의 균들을 가열하여 사멸시킨 경우 혈중 콜레스테롤 저하에 더욱 효과적인 것을 알았다.

재료 및 방법

사용균주와 *in vitro* assay

본 실험에서 사용한 *Lactobacillus rhamnosus* CBT 1702, *Lactobacillus plantarum* CBT 1209 균주와 다른 유산균은 Cellbiotech Co. (Kimpo, Korea)의 보관균주를 사용하였다. 또한 모든 유산균은 MRS 배지(Difco)에서 계대배양하여 보존하였다.

콜레스테롤 흡수와 담즙산의 해리를 측정하기 위해, 균은 0.2% sodium thioglycolate, 0.2% sodium taurocholate,

*Corresponding author

Tel: 82-2-450-3524, Fax: 82-2-3437-8360

E-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

0.3% water-soluble cholesterol, 0.05% Tween 80을 추가한 MRS 액체 배지에서 24시간, 37°C의 혐기적 조건에서 정치 배양하였다. 배양 후, 세포를 12,000×g에서 20분 동안 원심 분리하여 배양 배지로부터 분리하고, 상층액의 콜레스테롤의 양을 측정하기 위해 효소 kit(Asan Pharmaceutical Co., Korea)를 사용하였다. 배양 배지 내의 해리된 담즙산과 결합 상태의 담즙산 농도는 O-phthalaldehyde를 사용하여 측정하였다[7, 11].

균체 회수에서 *Lactobacillus rhamnosus* CBT 1702 균주와 *Lactobacillus plantarum* CBT 1209 균주를 MRS 액체 배지에서 37°C, 18시간 동안 각각 배양한 뒤, 500 ×g에서 15분 동안 원심분리하여 증류수로 세척하고 1:1비율로 하여 10% skim milk 용액에 100배 농축되게 현탁시켰다. 농축시킨 균액은 균이 균일하게 되도록 잘 섞고, 40°C에서 3일간 동결건조시켰다. 여기서 얻은 균체를 LLAB(lyophilized lactic acid bacteria, 균주 1702와 1209를 1:1비율로 함유)라고 하였으며 가열살균한(heat-killed) LAB(가열살균 균주 1702와 1209를 1:1비율로 함유)을 HKLAB라고 하였다. 가열살균은 110°C에서 15분간 처리하였으며 그 뒤 동결건조시켰다. 동결건조된 가루는 LLAB의 CFU(colony forming unit) 측정과 HKLAB의 계수 측정(hematocytometric counting)을 위한 분석에 사용하였다.

동물실험

2주령 된 40마리의 랫트(Male Sprague-Dawley)을 (주)대 한바이오링크(Seoul, Korea)에서 구입하고, 온도와 습도는 표준 조건 하에서 유지하고 (주)삼양사료 (Seoul, Korea)의 사료를 1주간 식이하였다. 1주간의 안정 식이 후, 30마리의 rat에게는 고콜레스테롤 식이(hypercholesterolemic diet, HCD)를 공급하였고, 나머지 10마리의 랫트는 대조군으로써 기존의 사료를 공급하되 고콜레스테롤 식이와 같은 형태로 식이하기 위하여 분쇄하여 가루로 공급하였다. 고콜레스테롤 식이의 조성은 Table 1과 같다. 실험군은 고콜레스테롤 식이를 4주간 식이한 뒤, 고콜레스테롤혈증이 유도되는 지 확인하였다. 다음 30마리의 랫트 실험군을 좀 더 세분화시켜 3군으로 나누어 7주 동안 고콜레스테롤 식이만 공급한 HCD군, 고콜레스테롤 식이에 살아있는 LAB을 첨가하여 공급한 LLAB군, 가열살균한 LAB와 고콜레스테롤 식이를 함께 공급한 HKLAB군으로 실험하였다.

랫트의 체중은 실험 기간 중 1주간 간격으로 측정하였고, 식이량은 최초에 주어진 식이의 양에서 식이 후 남은 잔여물의 양을 빼서 계산하였다. 식이효율(food efficiency ratio, FER)은 식이 섭취량과 체중 증가량의 상관관계를 나타내는 지표로, 식이 섭취량에 대한 체중 증가량 (체중증가량(g)/식이섭취량(g))으로 계산하였다. 랫트는 희생시키기 전 24시간 동안 절식시켰다. 전혈은 꼬리의 정맥으로부터 채혈하고, 혈액의 응고를 막기 위해 1% EDTA와 식염수가 혼합된 용액

에 보관하였다. 혈장은 2,000×g에서 15분 동안 저속으로 원심분리하여 전혈로부터 분리하였으며, 혈중 콜레스테롤의 농도는 *in vitro* 상의 실험과 같은 방법으로 확인하였다. 동맥경화지수(atherogenic index, AI)와 심장위험인자(cardiac risk factor, CRF)는 아래의 식으로 계산하였다.

$$AI = (\text{총 콜레스테롤} - \text{HDL 콜레스테롤}) / \text{HDL 콜레스테롤}$$

$$CRF = \text{총 콜레스테롤} / \text{HDL 콜레스테롤}$$

대변의 담즙산 농도

콜레스테롤 식이에 의해 변화된 변 중 담즙산의 양을 확인하였다. 변 중 담즙산의 양은 gas-liquid chromatography (GLC)로 확인하였다[5].

통계처리

모든 실험결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science 12.0) 프로그램을 이용하여 평균값(mean)과 표준편차(SD)를 계산하였다. 각 군 간에 차이를 살펴보기 위하여 유의수준은 $p < 0.05$ 에서 One-way ANOVA를 사용하여 분산 분석하였다. 유의한 차이가 있는 경우 Duncan's multiple range test를 실시하여 각 군별 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

In vitro 콜레스테롤 저하 활성에 의한 유산균 screening

담즙산에 대하여 저항성을 갖는 유산균주들로부터 콜레스테롤 저하 활성을 갖는 균주를 screening하였다. 약 50개의 유산균주들로부터 0.2% sodium thioglycolate, 0.2% sodium taurocholate, 0.3% cholesterol를 첨가한 MRS배지에서 성장성이 보이는 *Lactobacillus plantarum* CBT 1209와 *Lactobacillus rhamnosus* 1702균주를 얻었다. 이러한 생균의 유산균 저항 능력은 여러 논문에 보고된 바 있으며 콜레스테롤을 조절하는 유산균 스크리닝 방법으로 이용된다[4, 7, 11]. 두 유산균의 반응 특성을 알아보기 위하여 콜레스테롤 제거와 탈결합 test를 수행하였다(Fig. 1). 생균 1209와 1702 균주는 콜레스테롤 함유 MRS 배지에서 24시간 배양한 후 콜레스테롤 측정용 kit로 분석한 결과 20.4 mg/mL의 콜레스테롤을 15.4 mg/mL와 11.9 mg/mL로 각각 25%, 42%나 감소시켰다(Fig. 1A). 그러나 이들 열처리 균주들은 감소력이 약하여 각각 대조군에 비해 12%와 21% 감소시켰다(Fig. 1B).

Liong와 Shah는 *L. acidophilus*들이 콜레스테롤을 배지에서 동화하는데 가열살균한 균도 생균의 10~20%정도 제거하는 것을 보고하였다[12]. 또한 Kimoto 등은 *L. lactis* subsp. *lactis*가 배지에서 콜레스테롤을 동화하는데 가열살균한 균이 생균의 25% 정도 제거한다고 보고하였다[9]. 따라서 본 균주의 활성은 이들 보고 [9, 12]와 같이 콜레스테롤 혼합물의 동화능력(assimilation capacity)에 의한 것으로 추정할 수

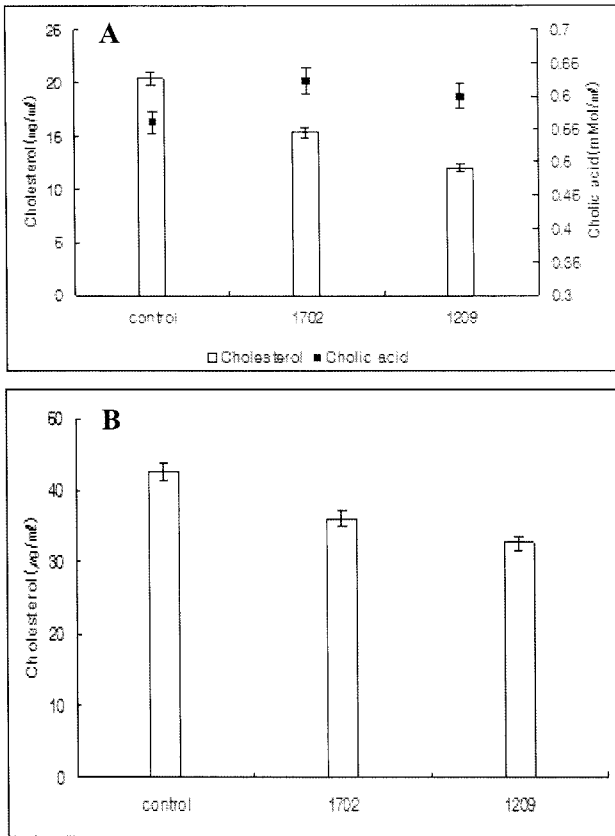


Fig. 1. The activity of cholesterol removal and deconjugation of sodium taurocholate by live 1209 and 1702 strains (A) and heat-killed 1209 and 1702 strains (B).

있었으며 이들 가열살균한 균도 생균에 비해 떨어지나 제거 능력을 어느 정도 가지고 있음을 알 수 있었다.

담즙산은 장내에서 지질 등 지용성물질을 유화시켜 체내로 흡수되도록 도와준다. 장내의 경우, 담즙산 분해대사에서 가장 중요한 반응 중 하나는 미생물이 지용성물질에 결합된 담즙산(conjugated bile acid)을 탈결합시키는 것이다. 탈결합된 담즙산은 지질의 용해와 흡수 활성을 떨어뜨리기 때문에 이러한 반응은 혈중 콜레스테롤의 농도를 조절하는데 매우 중요한 작용의 하나이다. 1209와 1702 균주를 배양하여 배지 내에 해리된 담즙산 정도를 O-phthalaldehyde를 사용하여 측정하였다. 초기 사람의 담즙산인 콜릭산의 농도가 0.56 mM에서 24시간 배양동안 0.62 mM와 0.6 mM로 증가하여(Fig. 1) 이러한 담즙산이 탈결합되는 반응을 확인하였다. 따라서 본 *Lactobacillus rhamnosus* CBT 1702와 *Lactobacillus plantarum* CBT 1209는 콜레스테롤의 동화와 탈결합 활성이 동시에 있음을 확인할 수 있었다.

Screening 균주에 의한 in vivo 콜레스테롤 저하 효과

본 실험에서는 Table 1과 같은 식이 조성으로 먼저 고농도 콜레스테롤 식이를 공급하는 동물모델을 확립하였다. 고콜레스테롤 식이를 4주간 투여한 후 HCD군(156.5±31.2 mg/

Table 1. Compositions of basal and hypercholesterolemic diet

| Ingredient | Basal Diet (%) | HCD (%) | LAB + HCD (%) |
|--------------------------------------|----------------|---------|-----------------|
| Corn starch | 35 | 35 | 34 |
| Sucrose | 30 | 30 | 30 |
| Casein | 15 | 15 | 15 |
| Lard | - | 8 | 8 |
| Corn oil | 10 | 2 | 2 |
| Cholesterol | - | 1 | 1 |
| Non-nutritive fiber | 5.45 | 4.45 | 4.45 |
| AIN-76 Vitamin mixture ¹⁾ | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| AIN-76 Mineral Mixture ²⁾ | 1 | 1 | 1 |
| Choline chloride | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| LAB | - | - | 1 ³⁾ |
| Total | 100 | 100 | 100 |

- 1) AIN-76 Vitamin mixture (g/kg) : Thiamine hydrochloride 0.6, rabofalvin 0.6, pyridoxine hydrochloride 0.7, nicotinic acid 3, D-calcium panthothenate 3, folic acid 0.2, D-biotin 0.02, cyanocobalamin (vitamin B12) 0.01, retinyl palmitate (vitamin A, 250,000 IU/g) cholecalciferol (vitamin D3, 400,000 IU/g) 0.005, DL-aaa-tocopherol acetate (250 IU/g) 0.25, menaquinone (vitamin K2) 0.005, sucrose, finely powdered 972.9.
- 2) AIN-76 Mineral mixture (g/kg) : Calcium phosphate diabasic 500, sodium cholide 74, potassium citrate monohydrate 220, potassium sulfate 52, magnesium oxide 24, magnesium carbonate (43-48% Mn) 3.5, ferric citrate (16-17% Fe) 6, zinc cabonate (70%ZnO) 1.6, cupric cabonate (53-55%) 0.3, potassium iodate 0.01, sodium selentie 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose, finely powdered 118.
- 3) LAB : The cell count of lyophilized powder are 1.0E+09 cfu/g at LLAB and 1.0E+09 count/g at HKLAB.

dL)과 콜레스테롤 비첨가 식이의 대조군(74.2±4.8 mg/dL)간의 콜레스테롤 차이를 확인하였다. 대조군, 고지혈증 유발 랫트를 식이 조건에 따라 HCD군(HCD only), 생균 1702와 1209를 함유하는 LLAB군(HCD + live LAB)과 가열살균된 균주 1702와 1209를 함유하는 HKLAB군(HCD + heat-killed LAB)으로 나누고 7주간 실험을 진행하였다. 먼저 4개 랫트 그룹의 식이 섭취량에 대해 조사하였다. 대조군에 비하여 콜레스테롤 그룹들의 식이 섭취와 체중이 감소하는 경향을 보였으나 유의적 차이를 나타내지는 않았다(Table 2).

Table 2. Feed intake, body weight gain and food efficiency ratio of rats on experimental period.

| Group | Food intake | Body weight gain | FER ¹⁾ |
|---------|-------------|------------------|-------------------|
| Control | 870.1±80.2 | 201±13.5 | 0.231±0.025 |
| HCD | 805.2±72.2 | 180±18.2 | 0.223±0.016 |
| LLAB | 838.5±82.4 | 179±15.7 | 0.213±0.022 |
| HKLAB | 845.4±81.1 | 182±16.4 | 0.215±0.018 |

1) FER: Food efficiency ratio = Body weight gain (g)/food intake (g). Mean with different superscripts in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Values are mean±S.D. (n=10)

Table 3. Effects of LAB administration on cholesterol level in rat blood at high cholesterol diet.

| Group | Total cholesterol | HDL cholesterol | LDL cholesterol | HDL/LDL cholesterol ratio | Triglyceride |
|---------|-------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|--------------|
| Control | 115.3± 9.7 ^b | 56.8±2.1 ^a | 41.2±3.2 ^d | 1.38±0.37 ^a | 86.6 ±8.7 |
| HCD | 204.0± 6.2 ^a | 39.8±1.7 ^c | 145.4±6.7 ^a | 0.27±0.15 ^d | 93.9 ±7.1 |
| LLAB | 131.9±17.4 ^b | 40.1±2.4 ^c | 70.7±5.6 ^b | 0.57±0.21 ^c | 96.54±7.4 |
| HKLAB | 125.0±16.5 ^b | 47.2±1.2 ^b | 58.7±4.8 ^c | 0.80±0.16 ^b | 95.75±5.3 |

Mean with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are mean \pm S.D. (n=10)

다음으로 유산균 섭취에 의한 혈 중 콜레스테롤량을 조사한 결과 HCD군의 경우 204±6.2 mg/dL에서 LLLAB군은 131.9±17.5 mg/dL, HKLAB군은 125.0±16.5 mg/dL로 LLLAB군과 HKLAB군이 콜레스테롤 농도를 HCD군 대비 각각 35%, 40%정도 씩 유의적으로 감소시켰다(Table 3). 여기에서 가열살균 균주 1702와 1209를 투여한 HKLAB에서 총 콜레스테롤 저하효과가 이들 생균체 식이인 LLLAB군보다 유의적이진 않지만 5% 더 좋은 것을 알 수 있었다.

혈중 총콜레스테롤은 생화학적 대사 기작에 의하여 유지되나 장시간의 과다한 콜레스테롤 섭취 후에는 노화와 여러 대사 이상을 초래할 수 있다[19]. 본 결과로 랫트 모델에서 유산균이 콜레스테롤을 감소시키는 활성을 갖는 것을 확인하였다. 또한 가열살균 유산균에 의한 콜레스테롤 저하 보고는 *in vitro* 실험은 있으나[9, 12] *in vivo* 실험은 아직 보고된 바 없는데 본 실험에서 가열살균한 균을 식이한 HKLAB군이 생균을 식이한 LLLAB군보다 콜레스테롤 제거에 유의적이지는 않지만 5% 더 좋은 것을 알았다.

혈중의 HDL-cholesterol(HDL-C)은 혈액내의 콜레스테롤을 제거하여 동맥경화를 방지하고 LDL-cholesterol(LDL-C)은 혈관기관 내에 콜레스테롤을 축적하여 질병을 촉진시키므로 동맥경화증과 심장질환에 깊이 연관되어 있는 것으로 알려져 있다[7, 11]. 랫트에 대한 콜레스테롤 식이는 HDL-C를 56.8±2.1 mg/dL에서 39.8±1.7 mg/dL로 유의적으로 감소시키고 LDL-C를 41.2±3.2 mg/dL에서 145.4±6.7 mg/dL로 유의적으로 증가시켰다 (Table 3). 유산균 섭취군의 경우, 특히 HKLAB군은 HCD군 및 LLLAB군과 비교하여 HDL-C를 약 20%씩 유의적으로 증가시키고 LDL-C를 각각 60%, 20% 정도 씩 유의적으로 감소시켰다. 그리고 HDL/LDL-C 값에서는 HCD군, LLLAB군에 비해 각각 200%, 40% 정도 유의적으로 증가시키는 효과를 나타내었다. 이 결과로 가열살균 유산균의 콜레스테롤 저하 활성은 HDL-C를 증가시키는 것과 이 증가시키는 정도의 2배 이상 LDL-C를 감소시킴으로서 이루어지는 것을 알 수 있었다. 그리고 생균은 HKLAB군보다는 약하여 LDL-C저하에만 효과를 보였다. 이와 같이 가열살균한 HKLAB군이 HDL-C와 LDL-C에 대하여 바람직한 방향으로 뛰어난 기능을 갖는 것을 확인하였으며 이러한 *in vivo* 실험은 아직 보고된 바 없다.

동맥경화증과 심장질환에 대한 유산균의 효과를 알아보기

위해 이들의 동맥경화지수인 AI와 심장위험인자 CRF을 비교하기 위하여 Table 3으로부터 AI와 CRF의 값을 구하였다. 대조군의 AI는 1.0±0.05이고 HCD군은 4.1±0.1이었으며 LLLAB군과 HKLAB군은 2.3±0.2와 1.6±0.15로, LLLAB군과 HKLAB군은 HCD군 대비 각각 1.8배, 2.6배 정도로 낮아졌다. 그리고 대조군의 CRF는 2.01±0.14이고 HCD군은 5.2±0.43이었으며 LLLAB군과 HKLAB군은 3.4±0.32와 2.6±0.13로, LLLAB군과 HKLAB군은 HCD군 대비 각각 1.5배, 2배 유의적으로 낮아졌다(Fig. 2). 그리고 HKLAB군은 LLLAB군에 비해 AI는 30% 유의적으로 낮고 CRF도 24% 유의적으로 낮았다. 따라서 이러한 질환에 대한 위험도가 유산균에 의하여 유의적으로 낮아짐을 알 수 있었으며 가열살균한 균주 1702와 1209를 식이한 HKLAB군이 생균 식이 LLLAB군보다 유의적인 차이를 보여 더 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 동맥경화와 심장질환의 예방 및 치료에는 생균보다는 가열살균한 1209와 1702 균을 복용하는 것이 보다 효과적일 것으로 생각되었다.

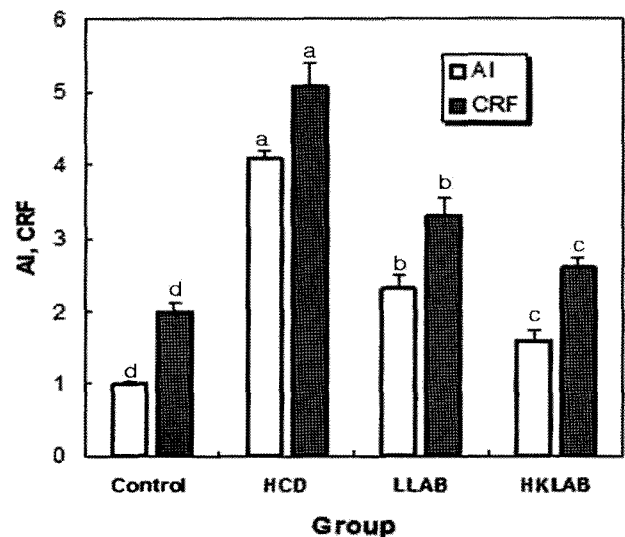


Fig. 2. Effects of LLAB and KHLAB on atherogenic index and cardiac risk factor in hypercholesterolemic rats fed high cholesterol diet. Mean with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are mean \pm S.D. (n=10). Atherogenic Index = (Total cholesterol-HDL-cholesterol)/(HDL-cholesterol). Cardiac risk factor = (Total cholesterol/HDL-cholesterol).

대변의 담즙산 농도는 위장관에서 배출되는 콜레스테롤량의 지표로 볼 수 있다. 고콜레스테롤 식이는 변 중의 담즙산 농도를 증가시킨다[8]. Table 3의 실험에서 실험군 중 HCD군(1.12±0.07 mg/g feces)은 대조군(0.02±0.02 mg/g feces)에 비하여 6배정도의 높은 담즙산 농도를 나타내었으며 LLAB군(1.12±0.08 mg/g)도 같은 효과를 보였는데 HKLAB군(1.25±0.05 mg/g)은 LLAB군보다 10% 더 높은 유의적인 담즙산 농도를 보였다(Fig. 3).

일반적으로 말하는 혈중 콜레스테롤이 저하되는 기작에는 두 가지가 있다. 1) 간의 콜레스테롤이 담즙산 합성으로 감소되면 간의 LDL-C 수용체가 활성화되어 혈액의 LDL-C를 사용하여 혈중 콜레스테롤이 감소된다. 2) 담즙산과 콜레스테롤이 체외로 배출되면 간은 혈중 콜레스테롤로부터 담즙산을 합성함으로써 혈중 콜레스테롤이 감소된다[17-19]. 이와 같은 기작으로 볼 때 Table 3의 혈액 내 콜레스테롤 저하관련 인자들 실험에서 HKLAB군이 LLAB군보다 모두 좋은 결과를 보였으며 가열살균한 HKLAB군이 담즙산을 더 배출되도록 작용하므로 LLAB군보다 HKLAB군을 복용하는 것이 훨씬 콜레스테롤 관련 문제해결에 더 많은 도움이 될 것으로 생각되었다.

본 실험에서 유산균(균주 1702와 1209)을 섭취한 LLAB군은 HCD군과 비교 시에 LDL-C가 50%정도 감소하였으며 다른 인자인 HDL-C, triglyceride(Table 3)와 fecal bile acid(Fig. 3)는 HCD군과 차이가 나지 않았다. 따라서 본 유산균들은 간의 LDL 수용체를 활성화하여 LDL-C의 농도를 낮춘다고 가정할 수 있으며[2], 향후 연구를 통하여 이를 증명하고자 한다. 본 결과에서 유산균의 고지혈 저하효과는 열처리 유산균에서 더욱 증가되었다. 유산균의 어느 성분이 혈중 LDL-C의 농도를 감소시키는지 확실치 않으나 본 균주

의 성분이 혈중 LDL-C를 낮추는데 영향을 주는 형태로 전환된다고 판단된다. 또한 생균체 식이는 HDL-C의 농도에는 거의 영향을 주지 못하였으나 가열살균 유산균은 HDL-C를 20% 정도 높이는 기능을 갖는 것으로 보아 생균체보다는 가열살균체가 고지혈 저하 효과에 더욱 효과적이라고 생각되었다. 이는 가열살균에 의해 균주의 어떤 성분이 낮아진 HDL-C의 농도를 정상상태에 가깝도록 올리는 기능을 하도록 하는 형태로 전환된다고 생각되었다. 또한, 이는 가열살균함으로써 유산균 세포벽의 베타글루칸의 저분자화로 콜레스테롤 저하 기능이 증가한 것으로 보인다. 효모나 버섯 유래의 베타글루칸이 면역세포 수 및 기능을 촉진시켜 면역력을 향상시키며[21], 효모, 버섯, 곡류 등의 베타글루칸이 마우스의 콜레스테롤 수치를 저하시켜 고지혈증에 효과적이라는 보고가 있다[22]. 따라서 유산균에서도 이와 마찬가지로 세포벽에 존재하는 베타글루칸에 의해 콜레스테롤 저하 가능성이 있으며, 가열처리에 의해 세포벽으로 존재할 때보다 세포벽에서 일부 떨어져 나와 보다 저분화된 베타글루칸에 의해 더 효과적으로 콜레스테롤을 저하시켰을 가능성이 있다. 또한 최근의 Liatis S 등[10]의 보고에 따르면, 수용성의 베타글루칸에 의해 마우스의 콜레스테롤 농도가 저하되어 고지혈증에 효과적인 것으로 밝혀졌다. 따라서 가열살균에 의해 유산균의 세포벽에 있던 베타글루칸의 일부는 수용성으로까지 저분화되었을 가능성도 있다. 그리고 다른 가능성으로는 세포가 열에 의해 파괴됨으로써 세포질의 기능 물질들이 용출되어 콜레스테롤을 저하시켰을 가능성도 있다. 세포질의 어떤 물질이 어떤 기작으로 콜레스테롤 저하에 효과가 있는지는 앞으로 검토할 예정이다.

Liong와 Shah는 *L. acidophilus*, Kimoto 등은 *L. lactis* subsp. *lactis*의 가열살균 균이 *in vitro*에서 콜레스테롤을 저하시킨다는 것을 보고하였다[9, 12]. 그러나 *in vivo* 실험에서 가열살균한 균이 콜레스테롤을 저하시킨다는 보고는 아직 없는데 본 논문에서는 *in vivo*에서 생균보다 가열살균한 1702와 1209 균주가 콜레스테롤 관련 인자들에 더 효과적인 것을 확인하였다.

결론적으로 본 유산균은 고지혈 랫트의 AI를 감소시켜 동맥경화의 가능성을 감소시켰으며 이의 가열살균 균체는 이에 더욱 효과적이었으며 이러한 증상을 개선시키는 유용한 기능성 원료로 가능성을 보여주었다.

요 약

유산균은 사람의 장 기능을 증가시키는 것으로 잘 알려져 있다. 우리는 배지에서 콜레스테롤 농도를 낮추는 균주 *Lactobacillus rhamnosus* CBT 1702 and *Lactobacillus plantarum* CBT 1209를 screening하였다. 이 균주들을 이용하여 콜레스테롤 저하효과를 보았다. 콜레스테롤과 담즙산이 함유된 MRS배지에서 콜레스테롤을 동화, 담즙산을 탈결

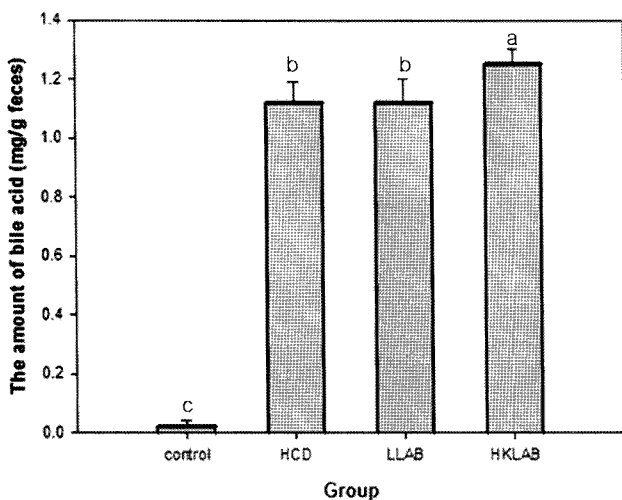


Fig 3. The amount of bile acids in feces were increased by high cholesterol diet. Mean with different superscripts in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Values are mean ± S.D. (n=10).

합시키는 것을 확인하였다. 랫트에게 이들 균주를 혼합식이 하여 콜레스테롤 제거능 정도를 보았다. 실험은 대조군, 고콜레스테롤군(HCD군), 고콜레스테롤에 생균첨가군(LLAB군)과 고콜레스테롤에 가열살균 균 첨가군(HKLAB)으로 하였다. 그 결과 LLAB군과 HKLAB군이 혈중 콜레스테롤 농도를 HCD군에 비하여 각각 35%, 40% 유의적으로 감소시켰다. 그리고 특히 HKLAB군은 HCD군 및 LLAB군과 비교하여 HDL-C를 약 20%씩 유의적으로 증가시키고 LDL-C를 각각 60%, 20% 정도 씩 유의적으로 감소시켰다. 동맥경화지수인 AI와 심장위험인자 CRF를 비교하였을 때 LLAB군과 HKLAB군은 HCD군 대비 각각 1.5배, 2배 유의적으로 낮았다. 또한 HKLAB군은 LLAB군에 비해 AI는 30% 유의적으로 낮고 CRF도 24% 유의적으로 낮았다. 결론적으로 본 유산균 *Lactobacillus rhamnosus* CBT 1702와 *Lactobacillus plantarum* CBT 1209는 고지혈 랫트의 AI와 CRF 값을 감소시켜 동맥경화와 심장질환의 가능성을 감소시켰으며 이의 가열살균 균체는 이에 더욱 효과적이었으며 이러한 증상을 개선시키는 유용한 기능성 원료로 가능성을 보여주었다.

REFERENCES

- Anderson, J. W. and S. E. Gilliland. 1999. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Nutr.* **18**(1): 43-50.
- Brown, M. S., J. L. Goldstein, D. W. Russel, T. C. Sudhof, and D. W. Martin. 1995. Method and composition for identifying substances which activate transcription of the LDL receptor gene. *Biotechnology Advances.* **13**(4): 724-725.
- Creager, M. A., J. P. Cooke, M. E. Mendelsohn, S. J. Gallagher, S. M. Coleman, and J. D. Loscalzo. 1990. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J. Clin. Invest.* **86**(1): 228-234.
- Dora, I.A. Pereira, and G. R. Gibson. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ Microbiology.* **68**(9): 4689-4693.
- Grundy, S. M., E. H. Jr, Ahrens, and T. A. Miettinen. 1965. Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total and fecal bile acids. *J Lipid Res.* **6**: 397-410.
- Holme, I. 1995. Cholesterol reduction and its impact on coronary artery disease and total mortality. *Am. J. Cardiol.* **76**(9): 10-17.
- Jung, H. K., E. R. Kim, H. S. Yae, S. J. Choi, J. Y. Jung, and S. L. Juhn. 2000. Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria and fermented milks as probiotic functional foods. *Food Industry and Nutrition.* **5**(2): 29-35.
- Kesaniemi, Y. A., S. Tarpila, and T. A. Miettinen. 1990. Low vs high dietary fiber and serum, biliary and fecal lipids in middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.* **51**(6): 1007-1012.
- Kimoto, H., S. Ohmomo, and T. Okamoto. 2002. Cholesterol removal from media by Lactococci. *J. Dairy Sci.* **85**: 3182-3188
- Liatis, S., P. Tsapogas, E. Chala, C. Dimosthenopoulos, K. Kyriakopoulos, E. Kapantais, and N. Katsilambros. 2009. The consumption of bread enriched with beta-glucan reduces LDL-cholesterol and improves insulin resistance in patients with type2 diabetes. 2009. *Diabetes Metab.* **19**.
- Lin, M. Y. and T. W. Chen. 2000. Reduction of cholesterol by lactobacillus acidophilus in culture broth. *J. Food Drug Anal.* **8**: 113-118.
- Liong, M. T. and N. P. Shah. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains. *J. Dairy Sci.* **88**: 55-66.
- Mazza, G. 1998. *Functional Foods: Biochemical and Processing aspects.* Technomic publishing company. Inc, Lancaster., PA. USA p234.
- Mckenney, J. M. 2001. Lipid management: tools for getting to the goal. *Am. J. Manag. Care.* **7**(9suppl.): S299-306.
- Miettinen, T. A. 2001. Cholesterol absorption inhibition: a strategy for cholesterol-lowering therapy. *Int. J. Clin. Pract.* **55**(10): 710-716.
- Miettinen, T. A. and S. Trapila, S. 1989. Serum lipids and cholesterol metabolism during guar gum, plantago ovata and high fiber treatments. *Clin Chim Acta.* **183**(3):253-262.
- Myant, N. B. and Mitropoulos K. A. 1977. Cholesterol 7aaa-hydroxylase. *J. LipidRes.* **18**(2):135-153.
- Seyama, Y. 2003. Cholestanol metabolism, molecular pathology, and nutritional implications. *J. Med. Food.* **6**(3): 217-224.
- Stephen, H. 2001. Third Report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel "High Blood Cholesterol" *NIH Publication No. 01-3670.*
- St-Onge, M. P., E. R. Farnworth, and P. J. Jones. 2000. Consumption of fermented and non fermented dairy products: effects on cholesterol concentration and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**(3): 674-681.
- Vetvicka, V., A. Vashishta, S. Saraswat-Ohri, and J. Vetvickova. 2008. Immunological effects of yeast- and mushroom-derived beta-glucans. *J Med Food.* **11**(4): 615-22.
- Vetvicka V, Vetvickova J. Physiological effects of different types of beta-glucan. 2007. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **151**(2): 225-31

(Received Feb. 17, 2009/Accepted March 15, 2009)