

인체장모델시스템에 의한 열무김치로부터 프로바이오틱스 균주 선발

강미란 · 김다람 · 김태운 · 박성희 · 김현주 · 장지영 · 한응수[†]

세계김치연구소

Selection of Probiotic Bacteria from Yulmoo Kimchi Using a Stimulated Human Intestinal Model System

Miran Kang, Daram Kim, Tae-Woon Kim, Sung-Hee Park,
Hyun Ju Kim, Ja Young Jang, and Eung Soo Han[†]

World Institute of Kimchi, Gyeonggi 463-746, Korea

Abstract

To select potent probiotics from lactic acid bacteria in Yulmoo Kimchi, an *in vitro* and stimulated human intestinal model system (SHIMS) test were performed. One *Leuconostoc mesenteroides* strain from five strains of Yulmoo Kimchi and one *Lactobacillus plantarum* from 12 strains of KCTC and KCCM were selected according to survival in acidic and bile salts conditions. Between the two species, *Leu. mesenteroides* displayed higher survival activity in a SHIMS test. The strain was identified as *Leu. mesenteroides* by 16S rRNA sequencing and was designated as *Leu. mesenteroides* K01.

Key words: Yulmoo Kimchi, lactic acid bacteria, probiotics, stimulated human intestinal model system

서 론

김치는 배추나 무를 주원료로 마늘, 생강, 파, 고춧가루, 젓갈 등 다양한 향신료를 첨가하여 일정기간 발효시킨 한국 고유의 발효식품이며, 이들 원료와 미생물의 작용에서 유래되는 성분이 잘 조화되어 고유의 맛을 나타내게 된다(1,2). 이러한 채소발효식품과 관련된 미생물 중 유산균들의 기능성과 효능에 관한 연구결과들이 활발하게 진행되면서 유산균의 활용에 대한 인식이 재평가되고 있다.

유산균은 자연계에 광범위하게 분포하며 전통적으로 다양한 발효식품에 이용되어 왔고 일반적으로 안전하다고 인식되는 미생물(GRAS, generally recognized as safe)이다. 많은 유산균은 프로바이오틱스로서 소화 흡수를 돕고 장내 부패를 억제하며 설사 변비의 치료 효과, 장내 유해균의 억제, 비타민의 생성, 혈중 콜레스테롤 저하능, 항암 효과, 인체의 면역 능력 증강 등 다양한 기능이 보고되고 있다(3-6).

그러나 모든 유산균이 프로바이오틱스로 이용 가능한 것은 아니며, 프로바이오틱스로 사용되려면 다음 조건을 만족하여야 한다. 1) 숙주에 도움이 되어야 하며, 2) 장관에 서식이 가능하여야 하고, 3) 섭취 후 상부 위장관을 살아서 통과하여 장관의 정상 세균총과 경쟁하며 자랄 수 있어야 하고, 4) 병적이지 않고 독소를 생산하지 않아야 하고, 5) 살아있는 상태로 증식이 가능하고, 6) 산성 환경이나 담즙산에 저항하

여 장관 안에서 생존하고 대사할 수 있고 장관에 부착된 상태를 유지할 수 있어야 하고, 7) 음식이나 약품제제 안에서 생존된 상태로 유지되고 보관할 수 있어야 한다(7).

유산균의 이러한 특성을 시험하는 방법은 시험관 수준의 시험을 거쳐 인체시험을 하는 방법이 사용되나 기존의 프로바이오틱스로 이용 가능한 균주를 선별하는 내산성, 내담즙산성 시험이 인체의 환경을 반영하지 못한다는 판단 하에 이를 보완하기 위하여 최근 인체시험에 앞서 인체의 내장과 유사한 모델을 개발하여 시험하는 *in silico* 방법이 시도되고 있다. 서양에서는 네덜란드 TNO Nutrition and Food Research에서 개발한 stomach and intestinal model과 벨기에의 simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME), 그리고 미국의 DePaola의 소화시스템 등 인체장 모델시스템이 개발되어 유제품 관련 연구, 생리활성 물질의 생체 이용률 확인 등 다양한 분야에 적용되어 왔으나(8-12), 아시아 국가에서 인체장모델시스템에 대한 연구는 미미한 실정이다.

한국식품연구원에서 생물 기능분자의 전달 및 반응특성을 구명하기 위하여 구축한 내장모델 시스템(simulated human intestinal reactor; SHIR)(13)을 변형하여 인체와 유사한 조건에서 미생물의 생존을 시험을 위한 인체장모델시스템(simulated human intestinal model system; SHIMS)을 구축하였다. SHIMS는 외국의 사례를 분석한 다음 유산균의

[†]Corresponding author. E-mail: hanakimchi@wikim.re.kr
Phone: 82-31-780-9018, Fax: 82-31-709-0882

생존을 시험에 초점을 맞추어 시스템을 2개의 반응기로 단순화하였다. 본 연구에서는 개발한 인체장모델시스템을 열무김치로부터 분리한 유산균의 생존을 시험에 적용하여 열무김치로부터 분리한 김치유산균으로부터 프로바이오틱스로 이용 가능한 균주를 선발하였다.

재료 및 방법

김치 유래 유산균 분리 및 배양

김치 유래 유산균의 분리를 위한 열무김치시료 국물은 멸균거즈로 여과하였으며 얻어진 여액을 동량 혼합한 다음, 균의 분리가 가능한 농도로 생리식염수로 희석하여 MRS 고체배지에 도말하여 30°C, 미호기 조건에서 48시간 배양하였다. 배지에서 성장한 150여개의 집락들 중 외관상 색깔과 모양이 차이가 나는 집락 5개를 순수분리 하였다. 유산균주들은 MRS 액체배지(Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하여 배양한 후 대수기에 있는 배양액에 글리세롤 25%(v/v)가 되게 첨가하여 -70°C에서 보관하였으며 실험에 사용할 경우 5 mL MRS 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 MRS 액체배지에 1차 계대배양하고 다시 MRS 액체배지에 2차 계대하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 본 연구에 사용된 분리균주 및 표준균주는 Table 1과 같다.

In vitro 내산성 및 내담즙산성 시험

내산성 시험은 HCl과 NaOH 용액을 사용하여 pH 2.0 및 7.0으로 각각 조정된 MRS 액체배지에 유산균 배양액을 10% 접종하고, 37°C에서 2시간 배양한 후 생균수를 측정하였다. 내담즙산성 시험은 담즙(Oxgall, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.3%가 첨가된 MRS 액체배지에 유산균 배양액을 10% 접종하여 37°C에서 4시간 배양한 후 담즙을 첨가하지 않은 대조군의 생균수와 비교하여 생존율을 계산하였다.

SHIMS 설계 및 제작

인체 내에서 생존 가능한 김치유산균을 선발하기 위해 인



Fig. 1. Apparatus of stimulated human intestinal model system (SHIMS). (1) Control system (pH & pump); (2) Peristaltic pump; (3) Gastric & intestinal fluid, HCl, bile salt; (4) Stomach vessel; (5) Small intestine vessel; (6) Magnetic stirrer; (7) Temperature controller.

체의 내장과 유사한 인체장모델시스템을 설계하여 Fig. 1과 같이 제작하였다. SHIMS는 인체 소화기관의 특징을 조사하여 대표적 특징을 선발하고 네덜란드 TNO Nutrition and Food Research사의 stomach and intestinal model과 벨기에의 SHIME, 그리고 미국 DePaola의 소화 시스템을 비교하여 위장과 소장의 기능을 시험할 수 있는 2단모델(two stage model)로 설계하였다.

유산균은 프로바이오틱스로 이용되기 위하여 위, 소장에서 생존하여 대장에 도달하여야 하므로 사람의 입, 위, 소장의 조건을 설정하고 이를 재현하는 시스템으로 설계하고 제작하였다. 인체의 소화액은 모두 Sigma 제품을 사용하였고 연동펌프를 통하여 유속을 조절하고 식품 및 소화액, 산, 알칼리를 주입하였고 pH는 pH controller를 이용하여 조사할 수 있도록 하였다. 소화 효소액은 주로 균을 대상으로 하였기 때문에 지방분해효소와 전분분해효소를 배제하고 단백질분해효소를 중심으로 구성하였다.

조건에 따라 호기성, 혐기성, 혹은 미호기성 기체 조성을

Table 1. Bacterial strains tested for the screening of probiotics

Strains	Source	Reference
Isolates K01-K05	Yulmoo Kimchi	This study
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	Pickled cabbage	KCTC ¹⁾
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3108	Pickled cabbage	KCTC
<i>Weissella confusa</i> KCTC 3499	Sugar cane	KCTC
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC 3507	Dried American beer yeast	KCTC
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCTC 3525	Vacuum-packaged meats	KCTC
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC 3526	Honeydew of rye ear	KCTC
<i>Lactobacillus sakei</i> KCTC 3603	"Moto" starter of sake	KCTC
<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC 3678	Human feces	KCTC
<i>Lactobacillus paracasei</i> KCCM 32822	-	KCCM ²⁾
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCCM 40265	Rat feces	KCCM
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 40399	Feces	KCCM
<i>Lactobacillus pentosus</i> KCCM 40997	Corn silage	KCCM

¹⁾KCTC: Korean Collection for Type Culture.

²⁾KCCM: Korea Culture Center of Microorganisms.

Table 2. Feed composition, working volume, residence time and feed rate in stimulated human intestinal model system (SHIMS)

Vessel	Pump	Feed	Composition	Working volume	Time	Feed rate
1	1	HCl	1 N HCl (pH 2.0)	39.6 mL	2 hr	pH maintain 0.33 mL/min
	2	GF (gastric fluid)	pepsine (0.1 g), mucin (3.5 g), NaCl (8.5 g), DW (1 L), pH 2.0			
Transfer	3	GC-IC		144 mL	2 hr	1.2 mL/min
	4	IF (intestinal fluid)	trypsin (0.1 g), pancreatin (3.5 g), DW (1 L)	79.2 mL	4 hr	0.33 mL/min
2	5	0.3 M NaHCO ₃	25.2 g, DW (1 L), pH 6.5	19.8 mL	1 hr	0.33 mL/min
		0.1 M NaHCO ₃	8.4 g, DW (1 L)	59.4 mL	3 hr	0.33 mL/min
	6	4% bile salt	40 g, DW (1 L)	15 mL	0.5 hr	0.5 mL/min
		2% bile salt	20 g, DW (1 L)	105 mL	3.5 hr	0.5 mL/min

가진 소켓을 이용하여 유지할 수 있도록 하였다. 그러나 위와 소장의 초기 부분은 소량의 공기가 함유되어 있으며 대부분의 실험에 사용한 균주가 호기성 혹은 통성혐기성임을 고려하여 공기조성을 조절하지는 않았다. 5개의 펌프와 각각 소화장에서 분비하는 소화효소, pH 조절시약, 그리고 소화 시 분비되는 액을 같이 공급할 수 있도록 시스템을 설계하였고 음식물과 잘 섞일 수 있도록 자석교반기를 이용하여 교반하고 온도는 물온탕기를 통해 이중자켓 사이로 공급되어 온도가 37°C로 유지되도록 하였다. pH 변화는 컴퓨터를 통하여 확인하였으며 입에서 침과 교반된 시료와 미생물을 위와 소장의 조건을 나타내는 반응조를 통과시켜 반응된 액을 채취하여 미생물을 분석하였다. 구체적인 조성, 공급량, 유속 및 반응시간은 Table 2와 같이 설정하였다.

반응조 1과 반응조 2 각각의 모든 소화액 주입관을 연결한 후 고압멸균(121°C, 15분)하여 충분히 건조시켜 물기를 제거한 다음 pH controller와 연결하여 변화를 조사하였다. SHIMS 가동 시 반응조 1을 입속 조건으로 맞추기 위하여 타액(NaCl 6.2 g, KCl 2.2 g, CaCl₂ 0.22 g, NaHCO₃ 1.2 g/L)과 시료를 1:1로 섞어준 후 2분간 교반하여 침과 음식물이 섞이도록 하였다. 입을 지난 후 위장의 조건으로 맞추기 위하여 반응조 1에 1 N HCl과 위액(GF, gastric fluid; pepsin 0.1 g, mucin 3.5 g, NaCl 8.5 g/L, pH 2.0로 조정)을 주입하였다. 1 N HCl은 위장의 조건을 신속하게 맞추기 위하여 투입하였으며, 10분 안에 pH 2.0에 도달하도록 하였고, 정해진 pH로 내려가면 1 N HCl 주입펌프가 자동으로 멈추게 된다. 위액은 39.6 mL을 제조하여 2시간 동안 주입하였으며, 2시간 동안 위장의 소화를 끝낸 후 시료를 100 µL 취하여 고체배지에 도말하였다. 반응조 1의 2시간 과정이 끝난 후 시료는 자동으로 반응조 2로 이동하며 이동시간은 10분 이내로 하였다. 소장에서는 소장액(IF, intestinal fluid; trypsin 0.1 g, pancreatin 3.5 g/L), 4% 담즙산염, 그리고 0.1 M NaHCO₃을 주입하였고, 각각의 주입량은 소장액 39.6 mL, 4% 담즙산염 37.5 mL이었다. 그리고 0.1 M NaHCO₃은 소장의 pH 조건을 맞추어 주기 위해 10분 이내에 pH 6.5에 도달하도록 하였다. 소화된 시료는 4시간 후 시료를 취하여 고체배지에 도말

하고 배양하여 균수를 확인하였다(13).

Genomic DNA 추출 및 균주의 동정

Genomic DNA는 G-spin genomic DNA extraction kit (iNtRon biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 분리하고 제조사의 protocol에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 균주를 동정하기 위해 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. Genomic DNA는 PCR 기계(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 증폭하였으며 각각의 primer 1 µL(40 pmol), 10X buffer 2.5 µL, dNTP 2 µL(2.5 mM, Takara, Shiga, Japan), Taq polymerase(5 unit/µL, Takara) 0.1 µL가 포함된 25 µL 혼합액에 1 µL template DNA를 넣어 증폭시켰다. 각 반응은 95°C에서 5분간 예비변성(predenaturation)을 1회 실시한 후, 본변성(denaturation)은 95°C에서 1분, 풀림(annealing)은 45°C에서 1분, 확장(extention)은 72°C에서 1분간의 중합반응 과정으로 30회 실시하였고 마지막으로 추가확장을 72°C에서 10분간 더 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 확인 후 염기서열을 분석하였다. 그 결과 확인된 염기서열을 균 동정을 위하여 National Center for Biotechnology Information(NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) 프로그램을 이용하여 염기서열을 비교하였다.

결과 및 고찰

In vitro 내산성 및 내담즙산성

유산균이 프로바이오틱스로서 역할을 수행하기 위해서는 우선 강산성의 위를 통과하여 장내로 이동하여야 한다. 위에서 분비되는 염산은 평상시 pH 0.78~0.90을 유지하지만 음식물이 유입될 때에는 pH가 2.0~3.0으로 상승되며, 음식물이 위를 통과하는데 소요되는 시간은 2~4시간이다(14). 지금까지 유산균의 위액에 대한 내산성 실험은 *in vivo* 상에서 직접 생존율을 확인하는 실험과 인공위액 및 PBS(phosphate buffered saline) 등의 완충용액을 이용한 *in vitro* 상의 간접적인 방법이 이용되어 왔다. 그러나 위액에 의한 미생물 사멸작용의 주요원인이 염산에 의한 낮은 pH인 것으로 밝혀

Table 3. Effect of the acid exposure on the survival of lactic acid bacteria

LAB samples	Acid tolerance		Survival ratio (%)
	log ₁₀ CFU		
	pH 7.0	pH 2.0	
K01	5.60±0.03	5.16±0.12	37.65
K02	7.51±0.26	1.50±0.12	0.00
K03	7.97±0.07	2.15±0.04	0.01
K04	7.70±0.02	2.24±0.17	0.03
K05	7.83±0.17	3.20±0.52	2.46
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	7.62±0.23	5.76±0.80	8.87
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3108	7.76±0.07	6.11±0.26	2.32
<i>Weissella confusa</i> KCTC 3499	7.91±0.13	5.10±0.69	1.52
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC 3507	8.24±0.27	2.00±0.83	0.00
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCTC 3525	7.52±0.13	1.89±0.67	0.01
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC 3526	7.89±0.14	4.15±0.20	0.05
<i>Lactobacillus sakei</i> KCTC 3603	7.33±0.24	1.95±0.76	0.03
<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC 3678	8.02±0.18	2.15±0.04	0.01
<i>Lactobacillus paracasei</i> KCCM 32822	8.01±0.02	0.00±0.00	0.00
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCCM 40265	6.67±1.55	1.65±0.33	0.00
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 40399	7.45±0.11	5.92±0.34	3.19
<i>Lactobacillus pentosus</i> KCCM 40997	7.57±0.20	5.02±0.54	0.33

LAB were incubated in MRS broth adjusted to pH 2 for 2 hr and diluted with saline, and then plated out in MRS-agar.

지고 *in vitro*의 실험과 *in vivo*에서의 결과가 유사하다고 보고됨으로써 미생물의 생존은 그들의 낮은 pH에 대한 저항성에 따른 것으로 알려지고 있다(15).

따라서 본 실험에서는 염산으로 pH 2.0으로 조절한 MRS 액체배지를 이용하여 17종 유산균의 내산성을 시험하였으며(Table 3), 희석액은 0.85% NaCl용액을 이용하였다. 시험 결과 열무김치로부터 분리한 1종의 생존율이 37.65%로 높았으며, 표준균주 중 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104가 생존율이 8.87%로 높게 나타났다. 실험에서 사용한 열무김치는 pH 4.3의 적숙기의 열무김치였으며, *L. plantarum* KCTC 3104는 양배추 피클로부터 분리한 균주로 비교적 pH가 낮은 조건에서 생육하였기 때문에 내산성을 가지는 것

로 생각된다.

한편, 담즙산에 대한 내성은 위에서의 산성조건에 대한 저항성과 더불어 프로바이오틱스 미생물이 갖추어야 할 기본적인 특성 중 하나이다. 담즙은 소장의 상부에서 분비되어 섭취된 지질식품의 소화와 흡수를 촉진하고 미생물에 대해 세제와 유사한(detergent-like) 작용을 함으로써 지질로 구성되어있는 미생물의 세포막에 영향을 주어 미생물 살균작용을 하는 것으로 알려졌다. 그러나 몇몇 미생물은 담즙산염 가수분해효소(bile salt hydrolase, BSH)에 의해 담즙산염 가수분해하여 그들의 용해도를 감소시킴으로써 이러한 작용을 저하시킬 수 있다. 특히 *Lactobacillus*를 포함한 많은 종의 유산균에서 BSH 효소가 발견된 바 있으나 이들의 담즙

Table 4. Effect of bile salt on the growth of lactic acid bacteria

LAB samples	Bile tolerance		Survival ratio (%)
	log ₁₀ CFU		
	MRS	MRS + 0.3% bile	
K01	7.05±0.40	6.98±0.35	83.94
K02	7.88±0.24	7.80±0.14	73.69
K03	8.31±0.18	8.15±0.05	44.83
K04	8.43±0.10	8.13±0.32	28.02
K05	8.42±0.09	8.20±0.23	46.79
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	8.36±0.20	8.15±0.09	48.05
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3108	8.55±0.02	8.39±0.20	40.80
<i>Weissella confusa</i> KCTC 3499	8.57±0.42	8.23±0.36	46.31
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC 3507	8.18±0.48	7.98±0.14	73.19
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCTC 3525	7.80±0.28	7.32±0.34	33.11
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC 3526	8.04±0.01	7.68±0.25	47.54
<i>Lactobacillus sakei</i> KCTC 3603	7.64±0.40	7.64±0.53	101.49
<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC 3678	8.27±0.83	7.84±0.23	146.63
<i>Lactobacillus paracasei</i> KCCM 32822	8.40±0.31	8.09±0.14	27.30
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCCM 40265	8.21±0.19	7.85±0.13	43.55
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 40399	7.73±0.16	7.42±0.08	48.62
<i>Lactobacillus pentosus</i> KCCM 40997	7.86±0.06	7.71±0.09	71.14

LAB are cultivated in MRS broth containing oxgall for 4 hr and diluted with saline, and then plated out in MRS-agar.

Table 5. Time course of the pH changes in stimulated human intestinal model system (SHIMS)

<i>Leuconostoc mesenteroides</i> K01				<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104			
Vessel 1 (Stomach)		Vessel 2 (Intestine)		Vessel 1 (Stomach)		Vessel 2 (Intestine)	
Time (min)	pH	Time (min)	pH	Time (min)	pH	Time (min)	pH
0	6.67	120	6.75	0	5.83	120	6.60
10	2.12	130	6.75	10	2.56	130	6.44
20	2.01	140	6.99	20	2.00	140	6.30
30	2.00	150	6.94	30	2.01	150	6.27
40	2.00	160	6.96	40	2.02	160	6.21
50	2.00	170	6.95	50	2.02	170	6.18
60	2.00	180	6.98	60	2.03	180	6.24
70	2.00	190	6.95	70	2.04	190	6.25
80	2.00	200	6.91	80	2.04	200	6.27
90	1.99	210	6.89	90	2.04	210	6.28
100	1.99	220	6.87	100	2.04	220	6.29
110	1.99	230	6.87	110	2.04	230	6.35
120	1.99	240	6.87	120	2.04	240	6.41

산에 대한 작용기작은 아직 확실히 밝혀지지 않았다(16,17).

본 실험에서는 Gilliland와 Speck의 방법(18)을 변형하여 0.3% oxgall을 첨가한 MRS 배지 내에서 담즙산 내성을 측정 한 결과, Table 4에 나타낸 바와 같이 모든 균주가 0.3%의 oxgall이 함유된 배지에서 28% 이상 생존하였고 특히 열무 김치에서 분리한 균주 중 pH 2.0 조절배지에서 생존율이 높 았던 균주가 담즙산 첨가 배지에서도 83.94%로 높은 생존율 을 보였다. 이 실험에서 사용한 *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. brevis*는 분변에서 유래한 유산균이므로 담즙산에 대한 내성을 가지고 있을 것으로 사료된다.

SHIMS에서 김치유산균의 생존율 변화

인체 내에서 유산균의 생존율 시험은 시료 채취의 어려움 과 윤리적인 통제로 인하여 거의 수행된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 유산균에 미치는 염산과 담즙산염의 영향을 알아보기 위하여 SHIMS를 이용하였다. 이는 강산성의 위를 통과한 후, 소장에서의 담즙산에 의한 영향을 알아보는 연속 적인 자극을 주게 되는 시스템으로 시간에 따른 유산균의 생존율 변화를 확인할 수 있다(Table 5). SHIMS에 적용하 는 균으로는 *in vitro* 내산성 및 내담즙산성 시험에서 우수한 생존율을 보인 K01균주와 *L. plantarum* 종의 두 균주(*L. plantarum* KCTC 3104와 *L. plantarum* KCTC 3108) 중 우 수한 내산성 및 내담즙산성을 나타낸 *L. plantarum* KCTC 3104를 선정하였다. 열무김치로부터 분리한 K01균주는 위 와 소장의 조건을 통과한 후에도 초기 10^7 마리 수준에서 6시 간 후 10^5 마리 수준을 유지하여 높은 생존율을 나타내었으 나, *in vitro*에서 염산과 담즙산에 대한 생존율이 비교적 높 았던 *L. plantarum* KCTC 3104는 SHIMS에 적용 시험에서 2시간 후에는 모두 사멸하는 결과를 나타내었다(Fig. 2). 그 리고 2종의 균을 SHIMS의 소장시스템에만 적용한 결과 각 각 60.83%와 24.80%의 생존율을 보여 *in vitro* 내담즙산성 시험의 결과와 유사하였다(data not shown). 강산성의 위를

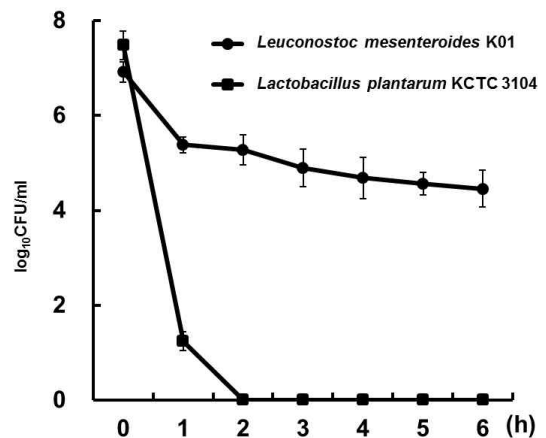


Fig. 2. Time-dependent survival rate of lactic acid bacteria in stimulated human intestinal model system (SHIMS).

통과한 유산균은 연속적인 담즙산염의 자극에 의하여 생존 율이 크게 저하되었다. 공복 시 위 내는 pH 2.0 이하의 강산 성이지만 음식물 섭취 후 2~3시간 동안은 음식물에 희석되 어 pH 2.0 이상인 점을 고려할 때, 열무김치로부터 분리한 K01균주는 염산과 담즙산에 대한 내성이 있어 위장관에서 의 생존가능성이 더 높을 것이다.

균주의 동정

열무김치로부터 내산성과 내담즙산성이 우수하여 선발된 김치유산균을 분자생물학적 방법으로 동정하기 위하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다. 선발된 균주의 염기서열을 NCBI의 BLAST program을 이용하여 상동성을 비교한 결 과 *Leu. mesenteroides* 균주(GenBank accession number JN673550)와 98%의 상동성을 나타내어 이 균주를 *Leu. mesenteroides* K01으로 명명하였다. 일반적으로 *L. plan tarum*이 *Leu. mesenteroides*에 비하여 내산성, 내담즙산성 이 우수하며(19) 따라서 김치발효 초기와 중기의 높은 pH에 서는 *Leu. mesenteroides*가 생육하며 pH가 낮아지는 발효

후기에 *L. plantarum*이 생육한다(20). 하지만 이는 전반적인 종의 특성이며 *L. rhamnosus* GG와 같이 내산성, 내담즙산성, 장세포 부착성과 병원성 미생물의 경쟁적 저해 등 균주 자체의 특수성을 가지는 균이 존재한다(21). 따라서 이번 연구를 통해 선별한 *Leu. mesenteroides* K01 균주는 내산성과 내담즙산성이 뛰어나다는 특수성을 가지는 바 *Leu. mesenteroides* K01은 프로바이오틱스로 다양하게 이용할 가치가 있다고 사료된다. 하지만 이 균주가 어떠한 특성에 의하여 내산성과 내담즙산성을 가지는지에 대한 작용기작은 아직 밝혀지지 않았으므로 이에 대한 연구는 향후 더 진행되어야 할 것이다.

요 약

열무김치로부터 김치유산균을 분리하고 프로바이오틱스로 이용 가능한 균주를 선발하기 위하여 인체의 장관과 유사한 인체장모델시스템(SHIMS)을 이용한 *in silico* 실험을 수행하였다. 열무김치에서 분리한 5종과 표준균주 12종에 대해 내산성 및 내담즙산성을 시험하여 생존율이 높은 2종의 균주를 선발하였다. 선발한 균주를 SHIMS에서 시험하여 가장 높은 생존율을 나타낸 균주의 16S rRNA를 분석한 결과 *Leu. mesenteroides*로 동정되었으며 이 김치유산균을 *Leu. mesenteroides* K01으로 명명하였다. 이 균주는 SHIMS에서 생존율이 높았기 때문에 프로바이오틱스로 다양하게 이용할 가치가 있다고 판단된다.

감사의 글

이 연구는 세계김치연구소 기관과유사업(KE0004-1)의 연구비 지원을 받아 수행되었습니다.

문 헌

- Kim SJ. 2005. Physicochemical characteristics of yogurt prepared with lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor J Food Culture* 20: 337-340.
- Kong CS, Kim DK, Rhee SH, Rho CW, Hwang HJ, Choi KL, Park KY. 2005. Fermentation properties and *in vitro* anticancer effect of young radish kimchi and young radish watery kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 311-316.
- Lee SH, Yang EH, Kwon HS, Kang JH, Kang BH. 2008. Potential probiotic properties of *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203 isolated from infant feces. *Kor J Microbiol Biotechnol* 36: 121-127.
- Sandine WE, Muralidhara KS, Elliker PR, England DC. 1972. Lactic acid bacteria in food and health: A review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *J Milk Food Technol* 35: 691-702.
- Kim HJ, Chang HC. 2006. Isolation and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from Kimchi. *Kor J Microbiol Biotechnol* 34: 196-203.
- Gilliland SE. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 7: 175-188.
- Baik HW. 2007. Probiotics & prebiotics. *Gut Liver* 49: 119-124.
- Minekus M, Marteau P, Havenaar R. 1995. A multicompartamental dynamic model simulating the stomach and small intestine. *ALTA* 23: 197-209.
- Karsson M, Minekus M, Havenaar R. 1997. Estimation of the bioavailability of iron and phosphorus in cereals using a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *J Sci Food Agr* 74: 99-106.
- Gardiner G, Stanton C, Lynch PB, Collins JK. 1999. Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *J Dairy Sci* 82: 1379-1387.
- Marteau P, Minekus M, Havenaar R. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 80: 1031-1037.
- Molly K, Vande Woestyne M, Verstraete W. 1993. Development of a S-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* 39: 254-258.
- Korea Food Research Institute. 2005. *Development of delivery reactive system of bio-molecule*. Seongnam, Korea. 22-23.
- Lee NK, Kim TH, Choi SY, Park HD. 2004. Identification and probiotic properties of *Lactobacillus lactis* NK24 isolation from *jetgal*, a Korean fermented food. *Food Sci Biotechnol* 13: 417-420.
- Shah NP. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 83: 894-907.
- Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J Dairy Sci* 67: 3045-3051.
- Seo JH, Lee H. 2007. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korea J Food Sci Technol* 39: 681-687.
- Gilliland SE, Speck ML. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 33: 15-18.
- McDonald LC, Fleming HP, Hassan HM. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 57: 2120-2124.
- Cheigh HS. 2004. *Kimchi: Fermentation and Food Science*. Hyoil Publishing Co., Seoul, Korea. 143-192.
- Gorbach SL, Chang TW, Goldin B. 1987. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet* 330: 1519-1519.

(2011년 11월 30일 접수; 2012년 1월 20일 채택)