

Caenorhabditis elegans 생체대체모델을 이용한 한국 영유아분변 유래 프로바이오틱스 균주의 *in vivo* 장 우점능 검토

박미리 · 정은선¹ · 오상남 · 송민호² · 두재균³ · 정용섭¹ · 문용일⁴ · 김영훈*

전북대학교 동물자원과학과, ¹전북대학교 식품공학과, ²충남대학교 동물자원생명과학과,
³소피아 여성병원, ⁴우석대학교 동물자원식품학과

Rapid *in vivo* Colonization Screening of Probiotic Bacteria Isolated from Human Infants using *Caenorhabditis elegans* Surrogate Host

Miri Park, Eun-Seon Jeong¹, Sangnam Oh, Min-Ho Song², Jae-Kyun Doo³, Yong-Seob Jeong¹,
Yong-Il Moon⁴, and Younghoon Kim*

Department of Animal Science, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

²Department of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³Sophia Women's Hospital, Jeonju 560-900, Korea

⁴Department of Animal Source Foods, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

Abstract

The ability of probiotics to adhere to the intestinal epithelium likely plays an important role in their colonization of the gastrointestinal tract. Here, we performed high-throughput screening (HTS) for suitable characteristics of potential probiotic bacteria using attachment and colonization ability through a *C. elegans* surrogate *in vivo* model. A total of 100 strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from infant feces were subjected to the colonization assay using *C. elegans* intestine. Based on colonization ability, we showed that nine isolates have a high attachment ability during whole experimental periods (up to 168 h), compared to *Lactobacillus rhamnosus* strain GG as a control. Also, through the use of an *in vitro* cell attachment model, nine isolates revealed highly binding activity to the mucus layer. Next, the selected 9 isolates were assayed for their survival ability when exposed to acidic and bile conditions as well as cholesterol reduction and the utilization of prebiotic substrates. As a result, the isolated nine strains were determined to be highly resistant to acid and bile conditions. In addition, they have significant activity for the reduction of cholesterol and utilization of several prebiotic substrates as a carbon source. Finally, the selected nine strains were identified by either *L. rhamnosus* or *L. plantarum* (4 strains for *L. rhamnosus* and 5 strains for *L. plantarum*, respectively). Taken together, we propose that the direct colonization of probiotics using *C. elegans* may be applicable to the rapid screening of valuable probiotic strains *in vivo*.

Key words: lactic acid bacteria, probiotics, *in vivo* colonization, *Caenorhabditis elegans*

서 론

1907년, 메치니코프에 의해 요거트(yogurt) 발효에 중요한 미생물이 인간의 건강증진에 중요한 역할을 한다는 보고 이후 프로바이오틱스(probiotics) 생균제의 개념이 점차 광의의 의미로 인식되기 시작했고, 이후 현재까지 다양한 기

능성 식품에 사용되는 프로바이오틱 유산균의 선발에 대한 연구가 전 세계적으로 광범위하게 진행되고 있다. 프로바이오틱스 균주는 숙주의 소화관 내 유익균과 유해균의 균형을 조절함으로써 건강에 이로운 효과를 주는 살아있는 고기능성 미생물체제로, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 등과 같은 유산균(Lactic Acid Bacteria; LAB)이 산업적으로 많이 사용되고 있다(Kirjavainen *et al.*, 2001; Salminen *et al.*, 1998). 이중 유산균은 유제품을 생산하는 낙농산업에서 주로 사용하는 미생물로, 장내 균총을 안정화하고, 병원균이나 부패균의 증식을 억제하며, 혈중 콜레스테롤을 낮추고, 암을 예방하며, 유당불내증을 감소시키는 등 다양한 생리활성물질

*Corresponding author: Younghoon Kim, Department of Animal Science and Institute of Rare Earth for Biological Application, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea. Tel: 82-63-219-5265, Fax: 82-63-270-2612, E-mail: ykeys2584@jbnu.ac.kr

의 생산력이 뛰어난 것으로 보고되고 있어 기능성 식품 및 건강보조제, 의약품, 동물용 생균제 및 사료에 이르기까지 사용 범위가 점차 확대되고 있는 실정이다(Fang *et al.*, 2000; Mitsuoka, 1990).

인간을 포함하는 동물의 장관에는 수많은 장내세균이 서로 상호작용하며 살고 있으며, 이 균들이 장에 정착하기 위해서는 무엇보다 장 상피표면의 부착력이 필수적으로 요구된다. 중요하게도 프로바이오틱스 균주는 점막층의 장벽 세포나 미세융모의 경계부근에 더 잘 흡착함으로써 유해미생물들을 경쟁적으로 배제하고, 부착능력이 없는 세균에 비해 연동운동에 의해 쉽게 제거되지 않으므로 장에 생존하기가 더욱 유리하다. 장 점막의 상피세포에 군락(colony)을 형성한 프로바이오틱스 균주는 mucin생성을 촉진하거나 장 투과성을 감소시켜 병원성 미생물의 부착과 독성물질의 투과를 억제함으로써 장내 상피세포의 손상을 막아 숙주의 방어 시스템을 강화하며(Saulnier *et al.*, 2009), 특히 *Lactobacillus*는 상피세포에 부착을 잘하고, 증식 중 생성된 억제 물질이 병원성균이 상피세포에 부착하는 것을 저해하여 장벽역할을 한다고 보고되었다(Boris *et al.*, 1997; Reid *et al.*, 1988). 또한, *Lactobacillus acidophilus*는 직접 콜레스테롤을 세포 표면에 흡착하여 분변을 통해 배출됨으로써 장내 콜레스테롤 함량을 낮춰 준다고 보고된 바 있다(Gilliland *et al.*, 1985).

이러한 특성 중 프로바이오틱스 균주로서 우수한 기능을 나타내기 위한 선별조건으로는 섭취한 균이 사람의 소화기관을 지나 장내에 정착을 하여야 함으로, 유산균이 프로바이오틱 생균제로 사용되기 위해서는 사람 장관의 위산과 담즙산에 대한 안정성을 보유해야 한다(Saarela *et al.*, 2000). 또한 유산균이 장 내에서 활동하기 위한 필수 조건으로서, 장내 부착능(attachment)과 우점능(colonization)이 중요시되고 있다. 하지만 지금까지 유산균이 갖는 장내 우점능에 관한 연구는 인체의 상피세포와 유사한 Caco-2 세포와 HT-29세포배양을 이용한 생체의 *in vitro* 표면을 이용한 연구에 관해 이루어져 왔으나 이러한 연구는 직접적으로 생체 환경을 대체할 수 없다는 한계점을 가지고 있으며 또한 장기간 배양이 불가능하다는 단점을 가지고 있다(Coconnier *et al.*, 1992; Ouwehand *et al.*, 2001). 반면, Mouse 같은 동물모델을 사용하여 직접적으로 유산균의 장 우점화 능력을 측정하려고 하는 연구도 시도되고 있으나 최근 강화되고 있는 동물복지의 측면과 함께 소요 비용 및 인력을 감안하였을 때 현재까지 동물모델을 활용한 *in vivo* 장 우점능 연구는 미흡한 실정이다.

예쁜 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)은 1960년대 Brenner에 의한 신경생물학과 유전학에서의 첫 사용 이후로 다양한 감염증과 면역학적 연구에서 *in vivo* 모델로서 널리 이용되고 있다(Brenner, 1974). 크기가 작아 실험실에서 유지 배양하기 쉬울 뿐만 아니라 균에 대해 *in vitro* 효능 가

능성을 가진 어떤 화합물의 독성을 제공할 수 있는 이점이 있으며, 투명한 큐티클 구조를 가지기 때문에 실험실에서 일반적인 해부현미경을 이용한 장관 내부 변화과정의 직접 관찰이 가능하다(Riddle *et al.*, 1997). 특히 단지 20개 정도의 세포가 포유류의 장 상피와 유사하게 탈락되지 않고 재생이 안되기 때문에(Irazaqui *et al.*, 2010), 잠재적인 세포 증식과 조직 재생 없이 *in vivo*에서 선천성 방어 기작 연구에 유용하다는 장점을 가지고 있다. 따라서 *C. elegans*는 다양한 식중독 유발 병원균의 감염에 따른 숙주의 반응을 위한 간편 장환경 동물모델로 각광받고 있다.

본 연구에서는 한국 영유아 분변으로부터 분리한 유산균들의 장내 부착/우점능을 알아보기 위해 *in vivo* 상에서 *C. elegans*를 이용한 방법을 통해 우점능을 측정하였으며, 우수한 우점능을 가지는 9개의 균주를 선발하였다. 그 후 *in vitro* 상에서 mucin을 이용한 방법과 부착능을 비교분석한 후, 내산성 및 내담즙성을 확인하였고, 콜레스테롤 동화능과 bacteriocin 생성여부, prebiotics 사용능력 등의 프로바이오틱스 균주생리활성능을 검토하여 *in vivo* 우점능력과 프로바이오틱스 균주 특성과의 상관관계를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 유아로부터 선별된 균주를 제외한 *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* A4, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. acidophilus* ATCC 43121, *L. acidophilus* E4191, 그리고 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797 균주는 전북대학교에서 보관중인 균주를 사용하였다. 유산균주는 De Man, Rogosa, Sharpe broth (MRS broth, Difco, USA)에 접종하고 37°C에서 18시간, 2회 계대배양하여 배양액을 50% glycerol과 혼합하여 -80°C에서 보관하며 사용하였다.

분변시료의 수집 및 처리

전북지역의 산후조리원에서 9개월 미만의 모유 수유아들로부터 채취한 분변시료(5 g)를 멸균된 L-cystein회석액(8.5 g NaCl, 0.5 g L-cystein, D.W. 1 L) 45 ml에 혼합한 후 연속 희석하고 MRS-BCP(bromocresol purple) 배지에 plating하여 혐기상태에서 37°C, 48시간 동안 배양한 다음 노란색 집락을 띄는 균주들을 선택하여 순수 분리하였다. 선발된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 따라 그람염색, catalase test, gas 형성 등을 조사하여 최종 100종의 유산균을 분리하였다. 모든 균주는 cryoprotect로 50% glycerol을 첨가한 후 -80°C에서 보관하였고, 실험 직전에 MRS broth에 접종하여 2회 계대배양(ca. 1×10^9 CFU/mL)한 후 사용하였다.

C. elegans 배양

본 실험에 사용한 *C. elegans*는 전북대학교에서 보관중인 CF512 *fer-15(b26)II;fem-1(hc17)IV* mutant stock을 사용하였다(Kim and Mylonakis, 2012). 5배 농축한 *E. coli* OP50을 분주하고 건조시켜 (대략 500 mg이 되도록 균일하게 bacterial lawn을 준비함)이 깔려있는 Nematode Growth Media(NGM) plate에 *C. elegans*를 올린 후 15°C에서 약 4일간 배양하였다. 개체의 밀도가 높은 plate를 M9 buffer를 이용하여 알과 성충 등을 모아 3,500 rpm에서 1분간 원심분리 후 상등액을 제거하였다. Sodium hypochlorite와 5 N NaOH 혼합액을 가하여 약 3분간 흔들어서 알과 성충을 분리하였고, M9 buffer를 이용하여 3번 세척하였다. 이 과정을 통해 분리한 알을 25°C에서 overnight 동안 rotation하여 부화시켜 L1 stage까지 성장시킨 후, 5배 농축한 *E. coli* OP50을 분주한 NGM plate에 옮겨, 2일 후 L4 stage가 되도록 동조화(age synchronized worm)시켰다(Powell and Ausubel, 2008).

C. elegans in vivo 장우점화 능력 평가

분리 균주의 *in vivo* 장우점화 능력을 평가하기 위하여 실험동물은 동조화시킨 *fer-15(b26)II;fem-1(hc17)IV* *C. elegans*를 각 균주당 10마리씩 사용하였다. 선발된 9종의 배양액을 13,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 균체를 M9 buffer에 5회 세척한 다음 5배로 농축하여 NGM agar plate에 분주하고 건조시킨 배지(대략 500 mg이 되도록 균일하게 bacterial lawn을 준비함)에 동조화된 L4 stage의 성충을 약 100마리 정도씩 옮기고 25°C에서 배양하였다. 1, 5, 7일 후, Kanamycin과 Streptomycin이 첨가된 BHI agar plate에 분리 유산균주를 섭취한 성충을 10마리씩 옮기고 Gentamycin 희석액(25 mg/ml)을 5 ul씩 떨어뜨린 후 5분 방치하여 *C. elegans* 표면에 존재하는 세균을 제거하였다. M9 buffer에 옮겨 3회 세척하고 buffer를 최대한 제거한 다음 1% triton X-100을 첨가하여 분쇄하였다. M9 buffer에 연속희석하여 6 N HCl을 사용하여 pH 5.0로 조정된 MRS agar plate에 3번복으로 점적하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음 생균수를 측정하였다.

In vitro mucin 부착능 측정

장내 부착능 측정은 mucin protein과 96 well plate를 이용하여 수행하였다(Azcarate-Peril *et al.*, 2009). 96 well plate (BD falcon, USA)의 well에 Mucin solution(10 mg/mL in dH₂O) 100 ml을 분주하고, 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켜 mucin을 well 표면에 부착시켰다. 다음날 plate의 각 well을 0.85% NaCl로 2회 세척하였다. 여기에 MRS broth에서 37°C, 18시간 동안 2회 계대배양한 분리 균주를 13,000 rpm으로 2분간 원심분리하고 회수한 균체를 0.85% NaCl로 2회 세척 및 현탁하여 연속희석을 실시하였고, 이를 100 ml(*ca*

1.0×10⁷ CFU/ml 수준으로 균일하게 접종)씩 분주하고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응하지 않은 균체를 제거하기 위해 상등액을 제거한 후, 0.85% NaCl로 각 well을 5회 세척하였다. 각 well에 0.1% triton X-100을 분주하여 pipetting으로 mucin에 부착된 균체를 회수한 후 0.85% NaCl에 십진 희석하여 MRS agar plate에 3번복으로 plating하고 37°C에서 24시간 배양 후 생균수를 측정하였다. 장 우점화 능력평가와 동일하게 *L. rhamnosus* GG를 positive control로 사용하였다.

내산성 및 내담즙성 측정

내산성 및 내담즙성 측정은 기존의 확립된 방법으로 실시하였다(Oh *et al.* 2000). 내산성 실험은 6 N HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정된 MRS broth에 250 unit/mg pepsin (Sigma-Aldrich, USA)을 첨가한 배지를 0.45 μm filter로 제균하여 사용하였다. MRS broth에서 37°C, 18시간 배양된 시험균과 positive control인 *L. acidophilus* A4를 접종(*ca* 1.0×10⁶ CFU/ml 수준으로 균일하게 접종)하여 37°C에서 3시간 동안 배양한 후 0.85% NaCl에 연속희석하여 MRS agar plate에 3번복으로 점적한 후 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 균수를 측정하였다. 한편 내담즙성 실험은 분리 균주를 0.5% Bile(oxgall, Sigma-Aldrich, USA)이 첨가된 MRS broth에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 0.85% NaCl에 십진 희석하여 MRS agar plate에 3번복으로 점적한 다음 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 담즙산에 대한 내성을 측정하였다. 내산성 및 내담즙성에 대한 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

생존율(%) =

$$[\text{생존 균수(CFU/mL)} / \text{초기 균수(CFU/mL)}] \times 100$$

콜레스테롤 저해능력 측정

콜레스테롤의 동화 능력을 Rudel과 Morris(Rudel and Morris, 1973)의 방법에 따라 측정하였다. 0.2 g thioglycolic acid와 0.3 g oxgall이 함유된 MRS-THIO broth에 100 mg cholesterol(Sigma-Aldrich, USA)을 첨가한 후 선발된 9종의 분리 균주를 접종(*ca* 1.0×10⁶ CFU/ml 수준으로 균일하게 접종)하고 37°C에서 20시간 배양하였다. 배양 후 원심분리(13,000 rpm, 6 min)하고 회수한 상등액에 ethanol과 50% KOH를 첨가한 후 10분간 60°C에서 heating한 다음 Hexane을 첨가하여 vortex로 강하게 혼합하고 분리된 hexane층을 회수하여 질소가스 하에서 증발시켰다. 여기에 0.055 g의 *o*-phthalaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)를 100 ml Acetic acid에 용해시킨 용액과 2 ml 진한황산을 가하여 10분간 방치한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하여 균을 접종하지 않은 standard의 농도와 비교하였다(Razin *et al.*, 1980).

콜레스테롤 저하능(%)=
 $(100 - [\text{배양액 내 콜레스테롤 함량}] / [\text{접종하지 않은 배지 내 콜레스테롤 함량}]) \times 100$

Bacteriocin 활성 측정

기존에 확립된 방법을 이용하여 시험균의 배양 상등액을 paper disk에 가하여 생육 저해환을 관찰하는 paper disk assay를 사용하여 항균활성을 측정하였다. 선발된 9종의 유산균주를 MRS broth에 접종($ca. 1.0 \times 10^6$ CFU/ml 수준으로 균일하게 접종)하고 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 원심 분리(13,000 rpm, 2 min)하여 균체를 제거하고, 회수한 상등액에 10 N NaOH를 첨가하여 pH를 중성으로 조정하여 다음 filter(0.45 mm pore size)에 통과시켜 조박테리오신을 제조하였다. 지시균주인 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797를 대상으로 조박테리오신이 점적된 6 mm 직경의 멸균 paper disk(Advantec, Japan)를 올리고 이를 37°C에서 24시간 배양하여 지시균주에 대한 생육저해환을 관찰하였다. Positive control로 *L. acidophilus* ATCC 4356 (Han *et al.*, 2002)를 사용하였다.

Prebiotics 사용능력

Prebiotic 기질 이용능력은 기존에 확립된 방법을 일부 변형하여 실시하였다(Ann *et al.*, 2007). Prebiotic 기질로는 positive control로 사용된 Glucose를 포함하여 Xylitol, D-Tagatose, Inulin, Lactitol, Lactulose, Fructooligosaccharide (FOS), Galactooligosaccharide(GOS) 등 총 8종을 사용하였다. 분리균주에서 선발한 9종을 96-well plate를 이용하여 prebiotic minimum media(per liter of H₂O; 5.0 g of peptone, 2.5 g of sodium acetate, 0.5 ml of 1 M magnesium sulfate 7H₂O, 0.5 ml of 1 M manganese sulfate 4H₂O, 5.0 ml of Tween 80, 1.0 g of diammonium citrate, 1.0 g of dipotassium phosphate, and 20.0 g of each prebiotic substrates)와 기질이 첨가되지 않은 배지에 6반복으로 접종($ca. 1.0 \times 10^6$ CFU/ml 수준으로 균일하게 접종)한 다음 37°C에서 배양하며 24시간 간격으로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

유산균주의 동정

선발된 9종의 유산균주는 API 50 CHL carbohydrate test kit (Biomerieux, France)를 이용한 당 발효성을 조사하여 ATB identification program (Biomerieux, France)에 입력한 결과를 바탕으로 동정한 후 16S rDNA sequencing(Kim *et al.*, 2000)을 통해 NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 유사성 조사 후 최종동정을 실시하였다.

통계분석

모든 실험은 3반복을 실시하였으며 실험결과는 SPSS software (SPSS; Statistical Package for the Social Sciences

Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 처리구간의 차이를 $p < 0.05$ 수준에서 t-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

in vivo 장 부착능 측정

본 연구에서는 유아분변에서 분리한 100종의 유산균주를 직접적으로 *in vivo* 숙주인 *C. elegans*에 급여하여 장에 정착되는 수준을 확인하였고 최종적으로 부착능이 우수한 9종의 유산균주를 선발하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 초기 attachment 시기인 1일째는 약 5 CFU/ml/worm로 모두 유사하게 부착하는 것으로 관찰되었으나 본격적으로 우점화가 시작되는 5일째에는 대조군으로 사용된 *L. rhamnosus* strain GG보다 9종의 균종이 모두 유의적으로 장 우점능이 높은 것으로 확인되었다($p < 0.05$). 특히, 33균주는 5.075 ± 0.073 CFU/ml/worm으로 가장 높게 우점되었고 44균주는 4.234 ± 0.080 CFU/ml/worm으로 가장 적게 우점되는 것으로 관찰되었다. 흥미롭게도 7일째에는 6균주가 4.787 ± 0.082 CFU/ml/worm로 높게 검출되었으며, 44가 3.920 ± 0.151 CFU/ml/worm로 가장 적게 측정되었다. 이러한 결과는 선발된 유산균주가 *C. elegans*의 상재균이 아닌 외부 도입균이지만 장내환경에서 일정기간 장 점막에 정착하여 우점화를 통해 장내에서 오랫동안 증식할 수 있다는 것으로 판단된다. 6, 90, 98균주들을 최종 실험일까지 높은 우점능력을 유지하였으나 이들을 제외한 나머지 균주들이 일자가 지날수록 우점능이 감소하는 것을 보아 급여 초기에는 *C. elegans* 장 내에서 시험균주가 활발하게 부착하였지만, 이후 우점화 능력이 감소하여 탈부착된 것으로 판단된다. 따라서 이

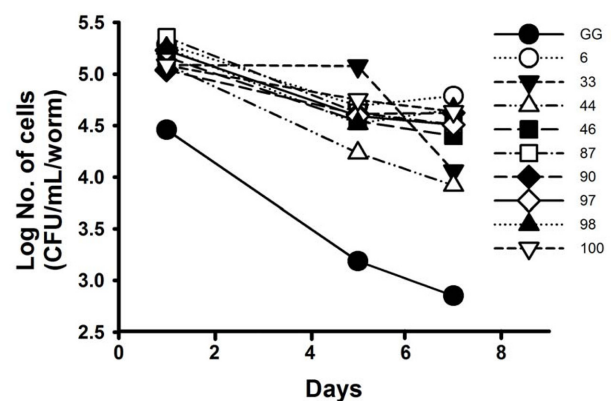


Fig. 1. Colonization of LAB strains in the *fer-15;fem-1* nematode intestine. After exposing to LAB cells for appropriate periods, nematodes were washed five times with M9 medium and worms were placed in new sterile tubes containing M9 medium with 1% Triton X-100 and were mechanically disrupted by using a pestle. Colonization was determined by plating on modified MRS (pH 5.0) agar. Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of three experiments.

러한 직접적 *in vivo* 장 우점화능력 측정방법은 프로바이오틱스 균주의 중요한 필요조건인 장 부착 및 우점화 능력 선별을 위한 방법으로 사용이 가능할 것으로 판단된다.

In vitro 부착능 측정

본 연구에서 사용된 *in vivo* *C. elegans*의 장 우점능력 결과를 기존의 *in vitro* 장부착 실험 결과와 비교분석하기 위하여 9개월 미만의 모유수유아의 분변에서 분리한 균주를 대상으로 mucin binding assay를 이용하여 mucin에 대한 결합능을 측정하였다. 동일하게 positive control인 *L. rhamnosus* GG의 부착된 생균수를 기준으로 장내 부착능을 비교하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이, *L. rhamnosus* GG와 유의적으로 부착능의 차이는 관찰되었으나($p < 0.05$) 선발된 9 균주 모두 5.4 log CFU/mL 이상으로 상대적으로 우수한 결합능을 나타내었다. 이 결과는 기존의 *Lactobacillus* spp.를 포함하는 다양한 유산균주가 높은 장내 부착능을 보였다는 연구결과와 일치하나 (Matsumura *et al.*, 1999), *in vivo* 우점능 결과와 비교하였을 때 대부분의 분리균주가 단시간의 높은 부착능을 나타내는 것으로 관찰된 바 균주 간의 부착특이성으로 프로바이오틱스를 선별하기 어려우며 장기간 장내에 존재하면 나타날 수 있는 우점화능력의 특성을 관찰할 수 없는 단점을 가진 것으로 판단된다. 따라서 이러한 연구결과를 종합하였을 때 *C. elegans*를 이용한 고효율 *in vivo* 장우점화능력 평가는 기존의 *in vitro* 결과와 구별되게 직접적이고 신속하게 장 유사 환경에서 부착/우점능이 우수한 유산균주를 선별할 수 있는 분석에 적용이 가능할 것으로 판단된다.

내산성 및 내담즙산성 측정

다음으로 본 연구진은 *C. elegans*를 이용하여 선발된 장

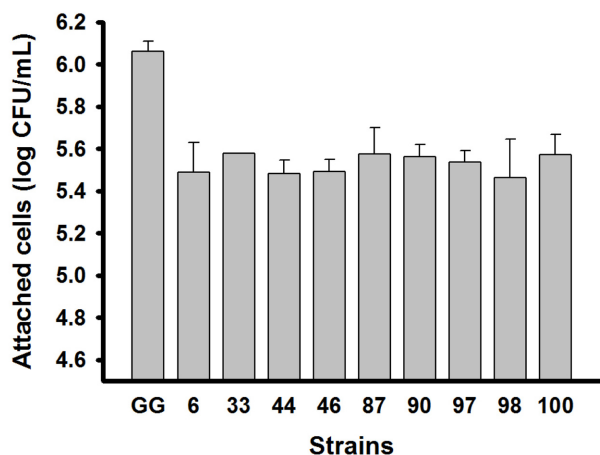


Fig. 2. Attachment of the LAB strains to the mucin surface in 96 well plates. The results are calculated as a logarithm units of the *L. rhamnosus* GG as positive control strain. Data are expressed as the mean±standard deviation (SD) of three experiments.

우점능 우수 유산균주를 대상으로 이들의 다양한 프로바이오틱스 활성을 검토하였다. 유산균이 생균제로서 효능을 발휘하기 위해서는 먼저 소화관 내에서 생존하여 장 내까지 도달해야 하므로, 인체 내 위액과 같은 강산성과 십이지장에서 분비되는 담즙산에 대한 pH안정성을 갖추어야 한다 (Oh *et al.*, 2000). 따라서 선발된 9종의 유산균주를 대상으로 pH를 2.5로 조정하고 pepsin을 첨가한 인공 위액 조건에서 내산성을 검토하였으며, *L. acidophilus* A4를 positive control으로 사용하였다. 그 결과, 선발한 9종의 균주 모두 산성조건에 노출되기 전의 균수와 비교하였을 때 생존율 97% 이상으로 측정되었으며 대부분의 균이 생존하는 것으로 관찰된 바 내산성이 높은 것으로 확인되었다(Fig. 3A). 이 중 33번 균주가 생존율 104%로 가장 높은 내산성을 보였으며, 46, 90, 44, 98순의 5종의 균주는 3시간이 지난 후에도 사멸하지 않고 100% 이상 생존율을 보여 산에 대한 강한 내성을 나타내는 것으로 관찰되었다. 대부분의 미생물이 pH 0.78-1.5의 실제 위액에서 사멸하지만 유산균과 함께 섭취한 음식물의 완충작용으로 인해 pH가 3.0 이상으로 상승되며, 음식물이 위를 통과하는 시간은 약 2-4시간인 것(Paik, 2004)을 고려한다면 시험균의 생존율은 더욱 높을 것으로 판단된다.

다음으로 위를 안전하게 통과한 미생물은 췌장과 십이지장을 통과하며 이 때 분비되는 담즙산에 영향을 받는다. 담즙산에 저항성을 가지는 생균제의 선별에 적합한 담즙의 농도는 약 0.3%로 보고되었다(Erkilä and Petäjä, 2000). 본 연구에서는 이보다 높은 0.5% oxgall을 함유한 MRS broth에 균을 접종하여 37°C에서 18시간 배양하고 생균수를 측정하였다. 예상대로 담즙조건에 노출되기 전의 균수와 비교하였을 때 생존율 99%를 나타낸 6번 균주를 제외한 8종의 균주는 인공 담즙산에서 높은 성장율이 관찰되었다(Fig. 3B). 흥미롭게도 33번 균주는 내산성에서 생균수 7.63×10^6 CFU/ml를 나타내어 생존율 104% 이상을 유지하였으며, 0.5% oxgall의 인공담즙을 처리하였을 때는 생균수 7.558×10^7 CFU/ml로 생존율 103% 이상을 나타내 선발한 9균주 중 가장 높은 내산성과 내담즙성을 나타냈다. 최근 유아분변에서 분리한 *Lactobacillus* 균주를 0.3% oxgall이 첨가된 배지에 5시간 동안 배양 후 약 57%의 생존율인 점과 비교하였을 때(Lee *et al.*, 2008), 본 연구에서의 분리균주 9종은 높은 내산성의 기능을 지니면서 동시에 담즙에 대한 저항성도 나타내어 구강으로 섭취시 유효한 수의 균이 생존하여 장으로 이동할 수 있는 가능성이 더 높을 것으로 사료된다.

Bacteriocin 활성 측정

유산균은 장내균총의 안정화와 새로 유입되는 병원성균에 의한 감염 및 증식을 억제하기 위해 사용되기도 하며, 유해세균을 억제하는 방법으로는 박테리오킨과 같은 항균성 peptide를 생성하여 유해균 세포막의 음이온성 지질에

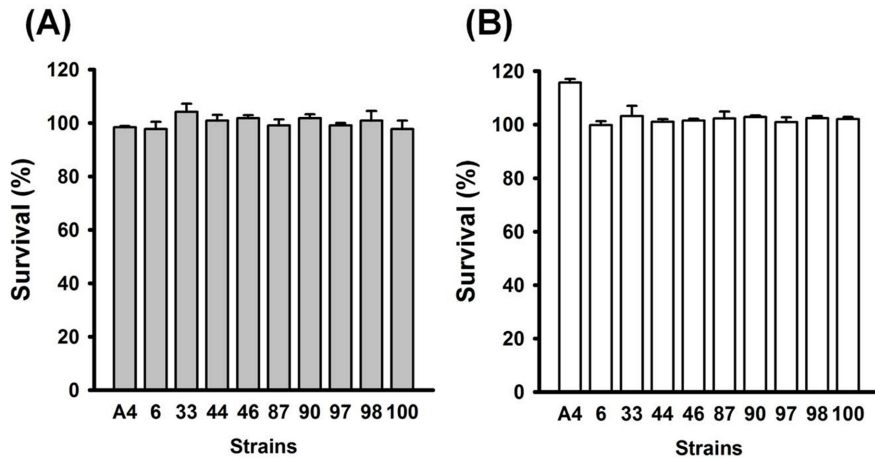


Fig. 3. The susceptibility of selected 9 LAB strains after exposure to acid conditions with synthetic gastric juice (pH 2.5) (A) and bile conditions with 0.5% oxgall (B). Data are expressed as the mean±standard deviation (SD) of three experiments.

흡착해 구멍을 만들어 세포를 파괴하는 것으로 알려져 있다(Reid and Burton, 2002). 본 실험에서는 박테리오신의 indicator 균주로 사용된 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797에 대한 유산균의 성장억제 능력을 paper disk assay에 의해 측정하였으며, positive control으로는 *L. acidophilus* ATCC 4356 (Han *et al.*, 2002) 균주를 이용하였다. 예상과는 다르게 실험에 사용된 9종의 유산균 모두 대조군으로 사용된 *L. acidophilus* 4356 균주와 비교하였을 때 지시균으로 사용된 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797에 대한 억제능은 관찰되지 않았다(data not show). 따라서 *C. elegans* 장우점능을 바탕으로 선발된 유산균주는 박테리오신 생산능과는 특이적인 상관관계를 관찰할 수 없었으며 향후 보다 세부적인 항균효능과 장우점능과의 상관관계 연구를 통하여 이러한 차이를 설명할 수 있을 것으로 기대된다.

콜레스테롤 저해효과 분석

최근 다양한 프로바이오틱스 균주는 혈중 콜레스테롤 감소 능력을 가지고 있다고 보고되고 있다. 이 중 유산균에 의해 복합 담즙산으로부터 유리 담즙산이 생성되고 용해도가 낮아져 분변으로 배출된 양만큼 콜레스테롤을 이용하여 새로운 복합 담즙산을 생성하기 때문에 결과적으로 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추는 작용기작을 가지기도 하고(Sridevi *et al.*, 2009), 일부 Lactobacilli 균주는 *in vivo* 상에서 콜레스테롤을 동화(assimilation)시켜서 직접적으로 혈중 콜레스테롤의 농도를 감소시킨다고 보고되었다(Dambekodi and Gilliland, 1998).

본 연구에서는 *C. elegans* 장 우점능에 의해 분리된 9균주들을 대상으로 콜레스테롤 저해효능을 측정하였다(Fig. 4). 예상대로 선발된 모든 균주는 negative control인 *L. acidophilus* E4191과 비교하였을 때 유의적으로 높은 콜레스테롤 저하능을 나타내었다 ($p < 0.05$). 흥미롭게도 *C. elegans* 장 우점능이 우수한 9종의 콜레스테롤 저해능은 모두 positive

control인 *L. acidophilus* ATCC 43121(Kim *et al.*, 2008)의 저해효과($81.10 \pm 0.51\%$)와 비교하였을 때 상대적으로 더 높은 활성이 관찰되었다. 특히, 6번 균주의 동화능이 $85.09 \pm 0.17\%$ 로 가장 높은 반면, 44, 87, 90, 97, 100균주 등 5균주가 약 81%로 control과 유사한 콜레스테롤 저하효능이 관찰되었다. 따라서 박테리오신 활성과는 다르게 *C. elegans* 장우점능을 바탕으로 선발된 유산균주는 일부 유의적인 상관관계를 관찰할 수 있었으며 이러한 장환경에서의 우점화 능력과 콜레스테롤 저하효과와의 상관관계에 대한 보다 세부적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Prebiotic 기질 이용능 측정

Prebiotics는 사람이나 동물에 의해서 소화가 되지 않는

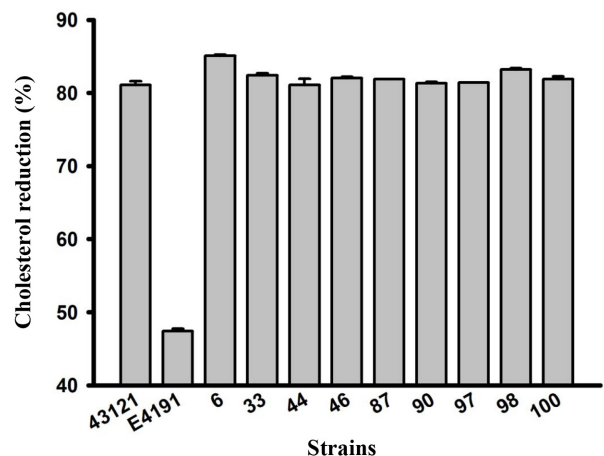


Fig. 4. The Cholesterol reduction by selected 9 LAB strains in an MRS-THIO broth supplemented with 0.2% sodium taurocholate and 100 mg/ml of cholesterol micelles. *L. acidophilus* ATCC 43121 and E4191 were used as positive or negative control strains, respectively. Data are expressed as the mean±standard deviation (SD) of three experiments.

난소화성 성분으로써 프로바이오틱스 균주의 탄소원이 되어 Bifidobacteria, Lactobacilli와 같은 장내 유익한 bacteria의 성장을 선택적으로 촉진시켜 장내 환경을 개선하는 데 도움을 주는 복합 당류이며, oligosaccharides과 같이 탄수화물로 이루어져 있는 경우가 많고, 대부분이 식이섬유의 형태로 존재한다(Roberfroid, 2007). 최근에는 프로바이오틱스 균주와 prebiotics를 함께 처리하는 synbiotics 제제가 개발되었는데, 이들은 상호작용을 통해 prebiotic가 프로바이오틱스 균주의 증식을 촉진하고, 장내 정착 능력을 더욱 강화시켜 주는 것으로 알려져있다(Ann *et al.*, 2007). 최근까지 다양한 보고를 통해 각종 prebiotics가 선택적으로 장내 유익균의 성장을 촉진시킨다는 사실이 밝혀짐에 따라 식품첨가물로서의 이용성이 점차 확대되고 있다(Biedrzycka and Bielecka, 2004). 따라서 본 연구에서는 prebiotic 기질원으로써 xylitol, lactitol, inulin, tagatose, lactulose, FOS, 그리고 GOS 8가지의 prebiotics를 사용하여 24시간 간격으로 시험균의 성장을 측정하였다(Fig. 5). 흥미롭게도 GOS에서 모든 균주의 성장율이 glucose 대비 평균 O.D 1.0 이상으로 가장 높은 성장율을 나타내었고, 그 다음 FOS와 lactulose의 기질순으로 높게 측정되었다. 한편, Xylitol에서는 가장 낮은 성장율을 보였으며 lactitol, inulin, tagatose를 포함한 4 기질에서 9균주 모두 O.D 0.3 이하의 낮은 성장율이 관찰되었다($p < 0.05$). 이 결과는 전형적으로 당분자당 2-8결합을 갖는 oligofructose와 같은 짧은 사슬 prebiotics는 좀 더 빨

리 발효되고, inulin 같은 긴 사슬 prebiotics는 당분자당 9-64결합을 갖기 때문에 상대적으로 발효되는 속도가 느리다는 보고(Kleesien *et al.*, 2001)와 일치하는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구결과를 종합할 때 *C. elegans* 장 우점능이 우수한 유산균주는 일부 prebiotics 기질 이용능력도 우수한 것으로 판단된다.

선발된 신규 유산균주의 동정

API 50CHL Kit(Biomerieux, France)를 사용하여 분리 균주 9종(6, 33, 44, 46, 87, 90, 97, 98, 100)의 당 이용성 조사를 통해 동정한 후 16S rDNA sequencing 실험을 통해 재검증한 결과 최종적으로 4종의 *L. rhamnosus*와 5종의 *L. plantarum*로 판정되었으며, 다음과 같이 명명하였다 (*L. rhamnosus* JFM6, *L. rhamnosus* JFM33, *L. plantarum* JFM44, *L. plantarum* JFM46, *L. plantarum* JFM87, *L. rhamnosus* JFM90, *L. rhamnosus* JFM97, *L. plantarum* JFM98, *L. plantarum* JFM100).

본 연구의 결과를 종합하였을 때 본 연구에서 *C. elegans* *in vivo* 우점능력을 우선으로 선발한 9종의 분리균주가 내산성 및 내담즙산성이 우수하고 부착능 및 장내 우점성이 우수하여 프로바이오틱스로서 요구되는 조건을 충족시킨다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 *C. elegans* 장우점능을 이용한 저비용, 고효율 유산균주 선발기술은 인체의 장내에서 다양한 건강기능성을 위한 신개념 프로바이오틱 개발

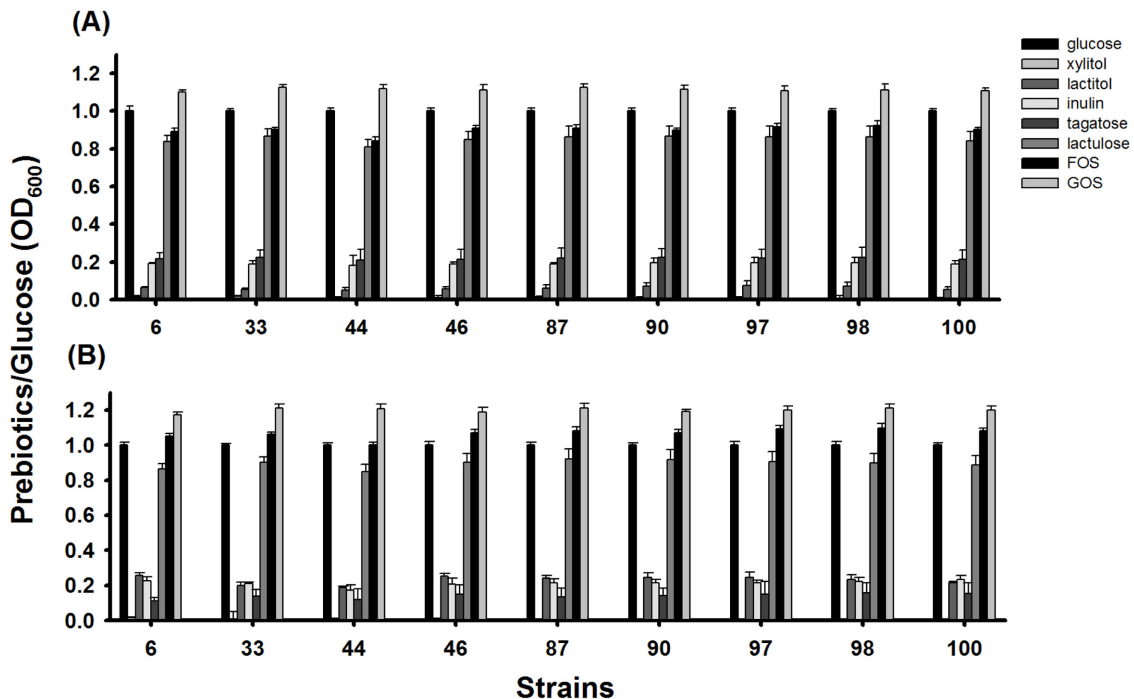


Fig. 5. Growth of selected 9 LAB strains for 24 h (A) and 48 h (B) in prebiotic minimum media containing different carbohydrates carbon sources including xylitol, lactitol, inulin, tagatose, lactulose, fructooligosaccharide (FOS), and galactooligosaccharide (GOS). The results are measured at 600 nm using a microtiter ELISA reader to glucose as positive control. Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of three experiments.

에 빠르게 적용이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

Probiotic 가능성이 우수한 유산균을 선별하기 위하여 9개월 미만의 모유수유아로부터 100종의 *Lactobacillus* 균을 분리하였다. *C. elegans*를 이용한 *in vivo* 실험으로 장내 우점능을 검사하여 *L. rhamnosus* GG와 비교했을 때 다른 균주들보다 상대적으로 장환경에 대하여 우수한 우점특성을 갖는 probiotic 유산균 9종을 선별하였다. Mucin을 이용한 *in vitro* 부착능력 검토결과, *L. rhamnosus* GG대비 90% 이상의 부착능을 보였으며, pH 2.5에서의 내산성 및 0.5% oxgall을 함유한 내담즙성에서 각각 97% 이상과 99% 이상의 높은 생존율을 나타냈다. 또, 81% 이상의 높은 콜레스테롤 저해능과 다양한 prebiotics 이용가능성을 확인하였고 최종적으로 *L. rhamnosus* 4종, *L. plantarum* 5종인 것으로 동정되었다. 이상의 결과로부터 *in vivo* 실험을 통해 우선 선별한 균주들이 프로바이오틱스 균주로서 요구되는 조건을 우수하게 충족시킨다는 것을 알 수 있었으며, 따라서 *in vivo* 모델로서 *C. elegans*을 이용한 장내우점능력 검토는 내산성, 내담즙성, 콜레스테롤 저하, 그리고 prebiotic 기질 이용능 등의 고기능성의 probiotic 균주 선별에 직접적으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 신진연구자 지원연구과제(Project No. PJ009769 to Y.K.)과 중소기업청 산학연공동기술개발사업(Grants No. C0033435 to Y.I.M.)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Ann, E. Y., Kim, Y., Oh, S., Imm, J. Y., Park, D. J., Han, K. S., and Kim, S. H. (2007) Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *Int. J. Food Sci. Tech.* **42**, 411-419.
- Azcarate-Peril, M. A., Tallon, R., and Klaenhammer, T. R. (2009) Temporal gene expression and probiotic attributes of *Lactobacillus acidophilus* during growth in milk. *J. Dairy Sci.* **92**, 870-886.
- Biedrzycka, E. and Bielecka, M. (2004) Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci. Tech.* **15**, 170-175.
- Boris, S., Suarez, J., and Barbes, C. (1997) Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 413-420.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Coconnier, M. H., Klaenhammer, T., Kerneis, S., Bernet, M., and Servin, A. (1992) Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microb.* **58**, 2034-2039.
- Dambekodi, P. C. and Gilliland, S. E. (1998) Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* **81**, 1818-1824.
- Erkkilä, S. and Petäjä, E. (2000) 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.
- Fang, H., Elina, T., Heikki, A., and Seppo, S. (2000) Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol. Med. Mic.* **29**, 47-52.
- Gilliland, S., Nelson, C., and Maxwell, C. (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microb.* **49**, 377-381.
- Han, K. S., Imm, J. Y., Oh, S. J., Jeon, W. M., and Kim, S. H. (2002) Characterization and purification of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Food Sci. Biotechnol.* **11**, 531-536.
- Irazaqui, J. E., Urbach, J. M., and Ausubel, F. M. (2010) Evolution of host innate defence: Insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 47-58.
- Kim, J., Chun, J., and Han, H. U. (2000) *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **50**, 1915-1919.
- Kim, Y. and Mylonakis, E. (2012) *C. elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM enhances Gram-positive immune responses. *Infect. Immun.* **80**, 2600-2508
- Kim, Y., Whang, J. Y., Whang, K. Y., Oh, S., and Kim, S. H. (2008) Characterization of the cholesterol-reducing activity in a cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Biosci. Biotech. Biochem.* **72**, 1483-1490.
- Kirjavainen, P. V., Apostolou, E., Arvola, T., Salminen, S. J., Gibson, G. R., and Isolauri, E. (2001) Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol. Med. Mic.* **32**, 1-7.
- Kleesen, B., Hartmann, L., and Blaut, M. (2001) Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Brit. J. Nutr.* **86**, 291-300.
- Lee, S., Yang, E., Kwon, H., Kang, J., and Kang, B. (2008) Potential probiotic properties of *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203 isolated from infant feces. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 121-127.
- Matsumura, A., Saito, T., Arakuni, M., Kitazawa, H., Kawai, Y., and Itoh, T. (1999) New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **82**, 2525-2529.
- Mitsuoka, T. (1990) Bifidobacteria and their role in human health. *J. Ind. Microbiol.* **6**, 263-267.
- Oh, S., Kim, S. H., and Worobo, R. W. (2000) Characteriza-

- tion and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.* **83**, 2747-2752.
22. Ouwehand, A. C., Tuomola, E. M., Tölkkö, S., and Salminen, S. (2001) Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 119-126.
 23. Paik, H. D. (2004) Identification and probiotic properties of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal, a Korean fermented food. *Food Sci. Biotechnol.* **13**, 411-416.
 24. Powell, J. and Ausubel, F. (2008) Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens. In: Innate Immunity. Ewbank, J. and Vivier, E. (eds) Humana Press, pp. 403-427.
 25. Razin, S., Kutner, S., Efrati, H., and Rottem, S. (1980) Phospholipid and cholesterol uptake by mycoplasma cells and membranes. *BBA-Biomembranes* **598**, 628-640.
 26. Reid, G. and Burton, J. (2002) Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* **4**, 319-324.
 27. Reid, G., McGroarty, J. A., Angotti, R., and Cook, R. L. (1988) *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can. J. Microbiol.* **34**, 344-351.
 28. Riddle, D. L., Meyer, B. J., and Priess, J. R. (eds) (1997) *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
 29. Roberfroid, M. (2007) Prebiotics: The concept revisited. *J. Nutr.* **137**, 830S-837S.
 30. Rudel, L. and Morris, M. (1973) Determination of cholesterol using *o*-phthalaldehyde. *J. Lipid Res.* **14**, 364-366.
 31. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. (2000) Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* **84**, 197-215.
 32. Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M., Roberfroid, M., and Rowland, I. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr.* **80**, S147.
 33. Saulnier, D. M. A., Spinler, J. K., Gibson, G. R., and Versalovic, J. (2009) Mechanisms of probiosis and prebiosis: Considerations for enhanced functional foods. *Curr. Opin. Biotech.* **20**, 135-141.
 34. Sridevi, N., Vishwe, P., and Prabhune, A. (2009) Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. *Food Res. Int.* **42**, 516-520.

(Received 2013.5.6/Revised 2013.7.22/Accepted 2013.7.24)