



## 원유에서 분리한 *Enterococcus faecalis* MD366의 생리적 특성 및 비만 억제 효과

박선영 · 조성아 · 한누리 · 임상동\*  
한국식품연구원

### Physiological Characteristics and Anti-Obesity Effect of *Enterococcus faecalis* MD366 isolated from Raw Milk

Sun-Young Park, Seong-A Cho, Noo-Ri Han and Sang-Dong Lim\*  
Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

#### Abstract

The aim of this study was to investigate the physiological characteristics and anti-obesity effects of *E. faecalis* MD366 isolated from raw milk. *E. faecalis* MD366 inhibited lipase activity ( $65.0 \pm 0.9\%$ ) and differentiation of 3T3-L1 adipocytes ( $27.4 \pm 1.4\%$ ) at a concentration of  $100 \mu\text{g/mL}$  ( $10^8$  CFU/g *E. faecalis* MD366). The optimum growth temperature of *E. faecalis* MD366 was  $37^\circ\text{C}$ . Among 16 tested antibiotics, *E. faecalis* MD366 demonstrated the highest sensitivity to novobiocin and the highest resistance to neomycin, kanamycin, and vancomycin. The strain also showed high acid phosphatase activity. Moreover, *E. faecalis* was relatively tolerant to bile juice and acid, and displayed high resistance to *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* (80.4%, 60.2%, and 65.4%, respectively). These results demonstrate that *E. faecalis* MD366 can be potentially used as a probiotic with anti-obesity effects.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, physiological characteristics, anti-lipase activity, anti-adipogenic activity

#### 서론

비만은 음식물의 과다 섭취와 에너지 사용의 불균형, 육체적 활동 감소 및 유전적 요인 등에 의해 지방조직에 과도하게 많은 양의 지방 축적을 초래되는 질병으로 정상적인 생리적 및 생화학적 기능에 영향을 미친다(Chua *et al.*, 1997; Huh, 1990). 비만은 세계적으로 건강과 보건에 대해 부정적인 영향을 미치고 있으며, 이에 세계보건기구에서는 비만을 하나의 현상이나 증상이 아닌 질병으로 분류하고 있다(McGee, 2005). 비만은 만성대사성 질환의 원인으로 동맥경화와 심근경색 등의 심혈관질환, 고혈압, 고지혈증, 제 2형

당뇨병 등과 같은 심각한 질환의 발병률을 증가시킨다(Lew, 1985; Spiegelman, 2001). 지금까지, 다양한 형태의 비만억제용 제품이 소개되고 있지만, 약물요법으로는 지속적인 체중 감소 효과를 보이지 못하고, 그 중에는 신체적 부작용 발생 등의 문제점이 대두되고 있다(Glenny *et al.*, 1997). 그러므로, 앞으로의 연구는 비만 발병률을 줄이는데 사용될 수 있는 효과적이고 안전한 요법의 개발이 요구되는 실정이다.

Probiotics는 숙주동물의 건강에 매우 유익한 효과를 주는 살아있는 유익한 미생물로, 고혈압 조절, 혈중 콜레스테롤 저하, 과민성 대장증후군 같은 위장관 질환의 개선 효과, 암 예방, 면역체계 조절, 지질대사 개선 등의 연구결과가 보고되고 있다(Bhathena *et al.*, 2009; Lye *et al.*, 2009; Rafter *et al.*, 2004; Baken *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2013). 게다가, 최근 연구들에서 probiotics의 사

\* Corresponding author: Sang-Dong Lim, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea. Tel: +82-31-780-9082, Fax: +82-31-780-9160, E-mail: limsd@kfri.re.kr

용으로 인한 비만의 예방 효과가 보고되고 있다. Song 등(2013)은 *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*으로 발효한 삼정환에서 지방구 수의 감소를 확인할 수 있었다. Kim 등(2010)은 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* KC-3을 이용한 발효두유를 3T3-L1 지방세포에 사용한 결과, 지방 생성을 억제하고, 지방 축적을 효과적으로 감소하였다고 보고하였다. 또한 Moon 등(2012)의 보고에 의하면 김치에서 분리한 젖산균주인 *Weissella koreensis* OK1-6을 3T3-L1 세포의 지방전구세포 분화처리에 사용한 결과, 세포 내 지질 축적 양이 상당히 작아졌다고 보고되었으며, Kwon 등(2004)은 고지방식사와 함께 김치유산균 추출물 분말을 첨가한 결과, 체중 저하뿐만 아니라, 복부지방의 축적을 억제하고, 혈장 지질을 저하시키는 결과를 보고하였다. 미생물이 probiotic으로써 유익한 효과를 발휘하기 위해서는 여러 주요적인 특성을 지녀야 한다. Probiotic은 장내의 낮은 pH와 담즙산에 대한 내성을 지녀야 하고, 안정성이 확보된 generally recognized as safe(GRAS) 미생물이어야 한다. 또한 숙주동물의 장 표피에 정착이 가능해야 하며, 인돌(indole), 암모니아, 페놀과 같은 유해대사산물을 생성하지 않아야 하고, 공정, 저장과정에서 안정성 및 강한 생존능력을 유지할 수 있어야 한다 (Isolauri *et al.*, 2004; Lonkar *et al.*, 2005; Paul and Somkuti, 2010).

본 연구는 원유로부터 분리·선발된 *Enterococcus faecalis* MD366을 기능성 식품으로 적용할 수 있는 지 알아보기 위해 *E. faecalis* MD366의 비만 억제 효과와 생리적인 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 젖산균 분리

서울우유 중부, 남부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소 및 경북 가축위생시험소에서 지원받아 목장별 원유를 채취하여 modified MRS medium(Lim *et al.*, 2011)에서 순수분리 하였다. 순수분리 후 Lactobacilli MRS broth(Difco, USA)에서 37°C, 18시간 배양한 다음 triptic soy agar(Difco, USA) slant에 37°C에서 18시간 배양하여 보관하였다. 발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산 생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리 균주를 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 응고된 균주를 선발하였다.

### 2. Lipase 억제활성 측정

Lipase 억제활성은 Lee 등(2007)의 방법에 따라 Porcine pancreatic lipase(sigma, USA)를 이용하여 측정하였다. Porcine

pancreatic lipase(sigma, USA)를 이용하여 lipase 활성저해 정도를 측정하였다. 시료를 1 mg/mL의 농도로 희석한 후에 0.167 nM p-Nitrophenylpalmitate(PNP; Sigma, USA)용액, 0.061M Tris-HCl buffer(pH 8.5), 0.3 mg/mL lipase 용액과 함께 plate에 넣어 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 405 nm에서 absorbance를 측정하였으며, blank는 enzyme를 증류수로, control은 시료를 용매로 대체하였다. Lipase 억제활성은 다음의 식으로 구하였다.

$$\text{Lipase inhibition activity(\%)} = \{1 - (A/B)\} \times 100$$

A: 시료의 absorbance, B: control의 absorbance

### 3. 세포 생존율 측정(MTT assay)

시료에 대한 세포 생존율은 Mosmann(1983)의 방법에 따라 MTT {3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} assay 방법으로 실험하였다. 세포는  $1.6 \times 10^4$  cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하고, 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco, USA) 100  $\mu$ L에 농도 별로 희석한 시료(10, 100, 1,000  $\mu$ g/mL)를 각각 첨가하여 24시간 배양한 다음, 5 mg/mL로 제조한 MTT(Sigma, USA) 용액 20  $\mu$ L를 각 well에 첨가하고, 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고, 각 well에 100  $\mu$ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader(BioTek, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 대한 세포의 생존율은 다음의 식으로 구하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 - (A - B)/A \times 100$$

A: 대조군의 흡광도, B: 시료처리군의 흡광도

### 4. 3T3-L1 세포 배양 및 분화

3T3-L1 세포 배양 방법은 Hemati 등(1997)의 방법을 변형하여 사용하였다. 3T3-L1 지방전구세포는 미국 세포 은행(American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VA)을 통하여 구입하였다. 실험에 사용한 3T3-L1 지방전구세포는 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA)과 1% penicillin-streptomycin(P/S; Gibco, USA)이 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air가 공급되는 조건의 항온기(incubator)에서 배양하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 분화 유도하기 위하여 세포를 6 well plate의 각 well에  $1.25 \times 10^5$  cells/well로 분주하고, 2일 후 배지를 교환하여 3~4일째에 세포가 완전히 융합상태가 되게 하였다. 융합상태에서 첫날에는 10% FBS와 MDI solution(0.5 mM 3-iso

Buthyl-1-methylxanthine, 1  $\mu$ M dexamethsone, 5  $\mu$ g/mL insulin) (Sigma, USA)을 처리하여 분화를 유도하였고, 이때, 시료가 지방세포 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 시료를 농도별로 함께 처리하였다. 분화 유도 2일 후, 배지를 시료, 10% FBS, 1% P/S, 5  $\mu$ g/mL insulin이 포함된 DMEM으로 교환하였고, 분화 유도 4일째부터는 시료와 함께 2일에 한번씩 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM으로 교환하여 세포를 분화시켜 8일간 지방을 유도한 지방세포에서 실험하였다.

### 5. Oil-Red O 염색

세포 내 생성된 지질의 축적량은 세포 내 생성된 지방구와 특이적으로 반응하는 Oil Red O(Sigma, USA)를 사용하여 측정하였다. Oil-Red O 염색 방법은 Ramirez-Zacarias 등(1992)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 먼저 지방 분화가 완료된 세포의 배지를 제거한 뒤에, 세포를 PBS로 2번 세척하고, 10% formalin으로 4°C에서 1시간 동안 고정 한 다음 증류수로 3번 세척하였다. 세척된 세포는 Oil Red O working solution(stock solution: 3.5 mg/mL in isopropanol; working solution: 60% oil red O stock solution and 40% distilled water)으로 30분 동안 실온에서 염색하였다. 염색 후, 염색액을 제거하고 증류수를 이용해 3번 세척한 다음, 증류수를 well에 채우고 현미경으로 관찰하였다. 중성지방의 정량은 증류수를 제거하고, 완전히 마른 well에 100% isopropyl alcohol을 2 mL 첨가하여 Oil-Red O를 다시 용출시킨 후 ELISA reader로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. 선발 균주의 동정

분리·선정된 MD366 균주는 MRS 액체배지에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등(1992)의 방법에 의하여 실시하였다. 순수 분리된 균주는 Gram 염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장, Catalase 생성, 15°C 및 45°C에서의 성장, glucose로부터 가스 생성, arginine으로부터 ammonia 생성을 측정하였으며, 현미경 관찰과 API 20 strep kit(API bioMerieux, France)를 이용한 당 발효 실험을 실시하였다. 젖산균의 DNA sequence 분석에는 universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, solgent EF-Taq을 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭과정은 95°C, 15분을 한 후 95°C, 20초; 50°C, 40초; 72°C, 1분 30초를 30회 시행하였으며, 72°C, 5분으로 마무리 하였다. 서열 분석은 PCR product를 solgent PCR purification kit(SolGent, Korea)로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer(Applied Biosystems,

USA)로 자동 분석하였다.

### 7. 젖산균의 성장

*E. faecalis* MD366 균주의 생장은 생균수, pH를 측정하여 시험하였다. 생균수는 10% MRS broth 150 mL에 젖산균을 10  $\mu$ L( $9.6 \times 10^5$  CFU/mL)를 접종한 후 34, 37, 40°C에서 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone 용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에 부어 균희 후 37°C에서 48시간 배양하여 계수하였고, 온도 및 시간 별로 pH 변화를 측정하였다. 이때 pH는 pH meter(Mettler model 345, England)로 측정하였다.

### 8. 항생제 내성 시험

항생제 내성 시험은 MRS 액체배지에 *E. faecalis* MD366 균주를 접종하고, 37°C에서 18시간 배양한 후 0.1% peptone 용액에 적정농도로 희석하였다. 각 항생제가 각 농도별로 포함된 tryptic soy 액체배지에  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL 수준으로 접종하고, 37°C에서 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 성장 여부를 결정하였다. 항생제 내성 측정은 2배 희석방법을 사용하였으며, 억제된 가장 낮은 농도를 MIC(Minimal inhibitory concentration) 값으로 결정하였다. 항생제는 Sigma (USA)로 부터 구매하여 사용하였다. 항생제는 Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin, Penicillin-G, Methicillin, Oxacillin, Ampicillin, Bacitracin, Rifampicin, Novobiocin, Lincomycin, Polymyxin B 및 Chloramphenicol 을 시험에 사용하였다.

### 9. 효소활성 시험

MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 동안 배양한 *E. faecalis* MD366 균주를 생리식염수로 희석하여  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL 수준의 시료를 조제한 후, API ZYM kit(API bioMerieux, Lyon, France)를 이용하여 37°C에서 5시간 배양한 다음 효소반응시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0~5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의 alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

### 10. 내담즙성 실험

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 따라 MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 배양된 *E. faecalis* MD366 균주를 0.05%

cysteine이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 배지와 대조구로서 oxgall을 첨가하지 않은 배지에 각각 1% 접종하였다. 37°C의 incubator에서 7시간까지 혐기배양 하면서 시간별로 BCP plate count agar 평판에서 부어 균힌 후 37°C에서 48시간 혐기배양하여 계수하였다.

### 11. pH 내성

Clark 등(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 2, 3, 4 용액과 대조구로서 pH 6.4 용액을 제조하였고, 제조된 pH 용액 10 mL에 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에서 37°C, 24시간 배양된 *E. faecalis* MD366 균주(약 10<sup>9</sup> CFU/mL)를 1 mL씩 섞은 후 37°C에서 혐기 배양 하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 BCP plate count agar 평판에서 부어 균힌 후 37°C에서 48시간 혐기배양한 다음 계수하였다.

### 12. 항균력 실험

Gilliland와 Speck(1977)의 방법에 따라 항균력 측정에 사용한 지시균인 *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* 및 *Staphylococcus aureus*는 한국식품연구원으로부터 분양 받았으며, 지시균의 증식배지로서 *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*는 nutriunt 액체배지에서 호기적으로 37°C, 24시간 배양하였다. 혼합배양 및 대조균에 사용된 배지는 MRS 액체배지로서 젖산균과 지시균을 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 선택배지로서 *Escherichia coli*는 EMB agar, *Salmonella Typhimurium*은 Bismuth sulfite agar, *Staphylococcus aureus*는 Baird parker agar를 사용하여 37°C에서 6시간 배양하였다. 젖산균에 의한 지시균의 억제율은 다음의 식으로 구하였다.

Inhibition (%) = (대조균의 균수 CFU/mL - 혼합배양 후의 균수 CFU/mL) / 대조균의 균수 CFU/mL

### 13. 통계분석

결과는 평균±표준편차(SD)로 나타내고, 통계분석은 Statistical Package for Social Sciences(SPSS, SPSS Inc., USA)로 실시하였다. 유의차는 one-way ANOVA로 통계처리 하였고, Duncan's multiple range tests를 사용하여 유의성 5% 수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 젖산균 분리

각 지역의 원유를 채취한 후, Modified MRS 배지를 사

용하여 노란색 집락을 형성하는 1,222개의 단일 균락을 분리하였고, 산 생성 능력을 보기 위해 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37°C에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주를 선발한 결과, 598개의 균주가 선발되었다.

### 2. 비만억제 균주의 선발

분리된 젖산균을 대상으로 lipase 억제 활성을 측정된 결과, 50% 이상인 균주 9 균주가 선발되었으며, 그 중 MD366 균주가 65.03±0.94%로서 가장 높은 억제 활성을 나타내었다(Table 1). MD366 균주가 3T3-L1 세포에 세포독성을 나타내는지 측정하기 위해 MTT assay를 수행한 결과, 100 µg/mL 농도수준 이하에서 세포의 생존력에 영향을 주지 않아 세포독성이 없는 것으로 나타났다(데이터 생략). 따라서 분화과정에서 3T3-L1 세포에 10, 100 µg/mL 농도로 MD366 균주를 첨가하였다. 분화가 끝난 후, 세포 내에 생성된 지방구를 Oil-Red O 염색액으로 염색하여 현미경으로 관찰한 결과, 분화배지만 처리한 군에 비해서 균주를 처리한 군의 염색된 지방구 수가 농도의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 용출하여 520 nm에서 흡광도를 측정된 결과, 각각 대조군 대비 8.16±1.6%, 27.4±1.4%의 지방 분화 억제율을 보였다(Fig. 1).

### 3. 선발 균주의 동정 및 DNA sequence

선발된 MD366균주의 genus와 species를 결정하기 위하여 생리적, 생화학적 시험을 하였다. 선발된 MD366 균주는 Gram 양성을 나타내었고, 현미경으로 관찰 시 cocci 형태의 hetero균이며, 산소 유무와 상관없이 잘 생장하였으며, catalase와 운동성은 음성으로 나타났다. 45°C와 15°C에서는 생장하지 않았으며, glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니

Table 1. Anti-lipase activity of selected lactic acid bacteria

Strains	Anti-lipase activity	Source
MD79	56.72±0.86 <sup>d</sup>	Raw milk
MD95	50.31±0.53 <sup>f</sup>	Raw milk
MD122	52.46±0.05 <sup>e</sup>	Raw milk
MD157	50.76±0.12 <sup>f</sup>	Raw milk
MD215	62.31±0.03 <sup>b</sup>	Raw milk
MD218	59.37±0.79 <sup>c</sup>	Raw milk
MD243	59.66±0.68 <sup>c</sup>	Raw milk
MD265	58.64±0.34 <sup>c</sup>	Raw milk
MD366	65.03±0.94 <sup>a</sup>	Raw milk

All values are mean±standard deviation of three replicates.

<sup>a-f</sup> Means values with different superscript are significantly different ( $p<0.05$ ).

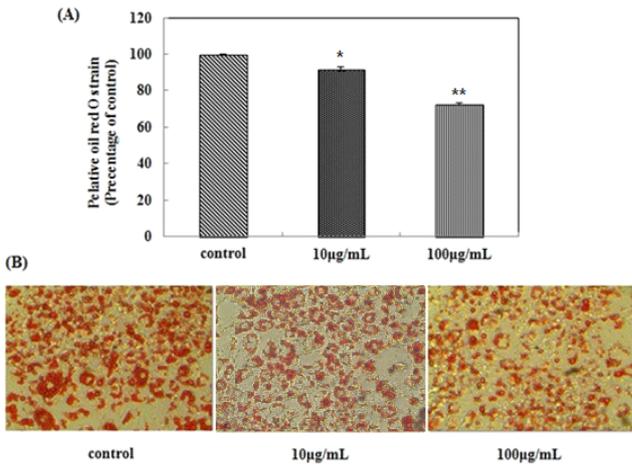


Fig. 1. The effects of *Enterococcus faecalis* MD366 on oil red O stained in 3T3-L1 adipocyte: (A) quantification of oil red O staining (B) photograph of oil red O staining. Cells were stained with oil red O observed by using a microscope (original magnification×200). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (vs. control)

아를 생성하지 않아 genus *Enterococcus*에 속하였다. Species를 정하기 위하여 API 20 strep kit(BioMereux, France)를 이용하여 20종의 당 발효 시험을 실시한 결과(Table 2), MD366 균주는 pyruvate 등 11종으로부터 산을 생성하였다. 그 결과를 ATB identification system에 입력한 결과, *Enterococcus faecalis*로 판명되었으며, 16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열 분석하였다. 분석된 염기서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과, *E. faecalis* (I.D. 99%)로 동정되었고, *Enterococcus faecalis* MD366으로 명명하였다.

#### 4. *E. faecalis* MD366의 생장

Fig. 2A에서 보는 바와 같이 *E. faecalis* MD366의 최적 생장온도를 알기 위하여 MRS broth 150 mL에 젓산균 배

Table 2. Physiological characteristics of *Enterococcus faecalis* MD366

Gram reaction	+
Cell type	Cocci
Spore forming	-
Motility	-
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	+
Catalase reaction	-
Growth at 15°C	-
Growth at 45°C	-
Gas forming from glucose	-
Ammonia production from alginin	-
<hr/>	
Acid production from	
Pyruvate	+
Hippurate	-
Esculin	+
Pyrrolidonyl 2 naphthylamide	+
6-Bromo-2-naphyl- $\alpha$ -D-glucuronate	-
Naphtol AS-BI $\beta$ -D-glucuronate	-
2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	-
2-naphthyl phosphate	-
L-leucine-2naphthylamide	+
Arginine	+
Ribose	+
L-Arabinose	-
Mannitol	+
Sorbitol	+
Lactose	+
Trehalose	+
Inulin	-
Raffinose	-
Starch	+
Glycogen	-

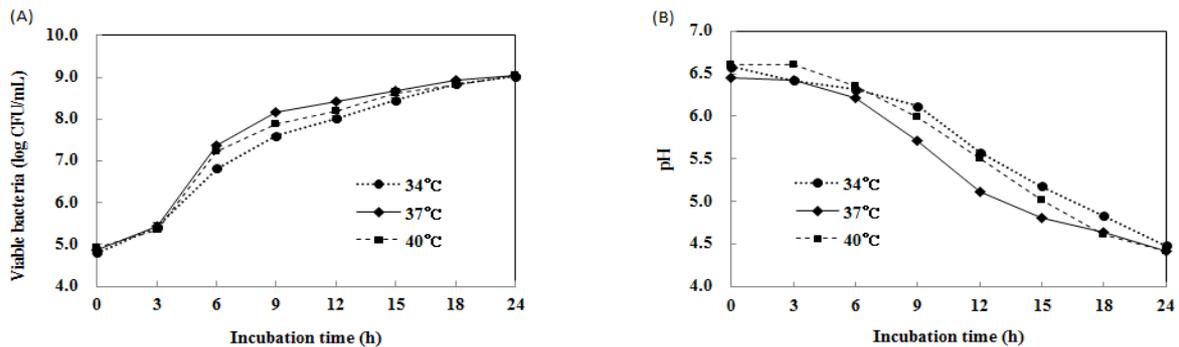


Fig. 2. Growth curve (A), and pH changes (B) of *Enterococcus faecalis* MD366 in MRS broth at various temperatures. (A) All values are within the mean  $\pm$  standard deviation of the three replicates.

양액을 10  $\mu$ L 접종한 후 34°C, 37°C, 40°C 별로 3시간 간격으로 24시간까지 배양시험한 결과, *E. faecalis* MD366 균주는 34°C, 37°C, 40°C에서 거의 차이가 없었으나, 37°C가 약간 빠른 성장률을 보였다. Fig. 2B는 24시간까지의 pH 변화를 나타낸 것으로 pH 역시 34°C, 37°C, 40°C에서 차이가 거의 없었으며, 34°C 및 40°C에 비해 37°C에서 가장 완만한 산 생성을 보였다. 이는 Yu 등(2011)이 티벳버섯으로 제조한 요구르트로부터 분리한 *Enterococcus faecalis* OA18 균주가 4, 10, 25, 30, 37, 40°C의 범위에서 배양한 결과, 30~37°C 범위에서 성장하였으며, 최적온도는 37°C라고 한 결과와 일치하였다.

### 5. *E. faecalis* MD366의 항생제 내성

치료 목적으로 섭취된 항생제나 식품에 존재하는 항생물질에 의해서 probiotics 균주가 사멸될 경우에 생체 내에서의 기능성이 낮아지게 되는데, 이러한 측면에서 항생제에 대한 내성은 매우 중요한 요소로 인식되고 있는 실정이다(Charteris *et al.*, 2001). 따라서 시중에서 이용되고 있는 총 16가지의 항생제에 대해 *E. faecalis* MD366 균주가 내성이 있는지를 Table 3에 나타내었다. 그 결과, kanamycin, neomycin, vancomycin에 대한 항생제 내성의 MIC 농도가 6,400  $\mu$ g/

Table 3. Antibiotics susceptibility of *Enterococcus faecalis* MD366

Antimicrobial agents		Minimal inhibitory concentrations( $\mu$ g/mL)
Aminoglycosides	Amikacin	640 $\pm$ 0
	Gentamycin	2,560 $\pm$ 0
	Kanamycin	6,400 $\pm$ 0
	Neomycin*	6,400 $\pm$ 0
	Streptomycin	400 $\pm$ 0
$\beta$ -Lactams	Penicillin-G*	160 $\pm$ 0
	Methicillin	320 $\pm$ 0
	Oxacillin	480 $\pm$ 0
	Ampicillin	320 $\pm$ 0
Gram-positive spectrum	Bacitracin*	60 $\pm$ 0
	Rifampicin	15 $\pm$ 0
	Novobiocin	7.5 $\pm$ 0
	Lincomycin*	100 $\pm$ 0
Gram-negative spectrum	Polymyxin B*	4800 $\pm$ 0
Broad spectrum	Chloramphenicol	40 $\pm$ 0
	Vancomycin	6400 $\pm$ 0

\* Units/mL

All values are the mean $\pm$ standard deviation of three replicates.

mL로서 가장 내성이 높았고, polymyxin B, gentamycin 순이었다. 반면, novobiocin에 대한 MIC 농도는 7.5  $\mu$ g/mL로서 가장 감수성이 높았고, rifampicin, chloramphenicol 등도 감수성이 높은 것으로 나타났다. 균주의 항생제 내성은 균주마다 다양하게 나타난다(Mathur and Singh, 2005). 그러나 *E. faecalis* MD366 균주는 비교적 높은 항생제 내성을 지니고 있기 때문에 항생제 내성 유전자가 전이될 잠재적인 위험성을 지니고 있다. 이를 해결하기 위한 방안으로 *E. faecalis* MD366 균주로부터 비만억제 유전자를 클로닝하여 식품에 도입하는 방법을 이용하여 유전자 전이의 위험을 막을 수 있다. Kim 등(2007)은 김치에서 분리하고 GABA 생성능이 높은 *Lactobacillus brevis* BH2 균주로부터 GABA를 생성하는 glutamate decarboxylase 유전자를 PCR로 복제하고 증폭하여 *Escherichia coli* 세포에 발현하였다고 보고하였다.

### 6. *E. faecalis* MD366의 효소활성

효소활성 또한 probiotics로 이용하기 전에 고려되어야 하는 주요 요소 중 하나이다. Probiotics는 우선  $\beta$ -glucuronidase를 생성하지 않아야 하는데, 이는 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소이기 때문이다(Borriello *et al.*, 2003). 반면, lipase와 protase,  $\beta$ -galactosidase와 같은 효소는 유당을 분해하여 유당을 소화시켜주는 잇점을 가지고 있다(Kumar *et al.*, 2012). *E. faecalis* MD366의 효소활성 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. Acid phosphatase와 naphthol-AS-BI-phosphohydrolase가 각각 4와 3을 나타내 효소활성이 다른 효소들에 비해 높게 나타났으나, 전반적으로 효소활성이 높지 않은 것으로 나타났다. 유당을 glucose와 galactose로 분해시키는 유당분해효소인  $\beta$ -galactosidase는 2를 나타내어, 유당불내증 해소에 약간 도움이 될 것이라고 보여진다. 반면, 발암효소인  $\beta$ -glucuronidase의 경우에도 효소활성이 2로 나타나, 안전성이 약간 부족하므로 유전자 클로닝 방법 등을 통해 보완해야 할 필요성이 있다고 사료된다.

### 7. *E. faecalis* MD366의 내담즙성

담즙 내성은 소장에서 살아남기 위해 꼭 지녀야 하는 특징 중 하나이다. 담즙산은 십이지장에서 분비되는 물질로 세균의 세포막을 파괴하여 성장을 억제하기 때문에 probiotics로의 기능을 하기 위해서는 담즙에 대한 내성을 지니고 있어야 한다(Gilliland and Speck, 1977; Saarela *et al.*, 2000). 또한 적어도 0.3% 농도의 담즙산에서 생존해야지만 인간의 위 장간에서도 생존할 수 있다고 보고 있다(Gilliland *et al.*, 1984). *E. faecalis* MD366 균주의 담즙 내성 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이, 7시간 동안 배양 후 생균수를 비교해

Table 4. Enzyme patterns of *Enterococcus faecalis* MD366

Enzyme	<i>E. faecalis</i> MD366
Alkaline phosphatase	2
Esterase(C4)	2
Esterase lipase(C8)	2
Lipase(C14)	1
Leucine arylamidase	2
Valine arylamidase	1
Cystinearylamidase	1
Trypsin	2
$\alpha$ -Chymotrypsin	1
Acid phosphatase	4
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	3
$\alpha$ -Galactosidase	2
$\beta$ -Galactosidase	2
$\beta$ -Glucuronidase	2
$\alpha$ -Glucosidase	0
$\beta$ -Glucosidase	0
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	0
$\alpha$ -Mannosidase	0
$\alpha$ -Fucosidase	0

\*: A value ranging from 0 to 2 is assigned to the standard color: zero represents a negative; 5 represents a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength: 1 corresponds to the liberation of 5 nanomoles, 2 to 10 nanomoles, 3 to 20 nanomoles, 4 to 30 nanomoles, and 5 to 40 nanomoles or more.

보았을 때, 0.3% oxgall을 첨가하지 않았을 때의 생균수는  $2.1 \times 10^9$  CFU/mL, 0.3% oxgall을 첨가하였을 때의 생균수는  $1.2 \times 10^9$  CFU/mL로 약간 억제를 받기는 하였으나, 담즙

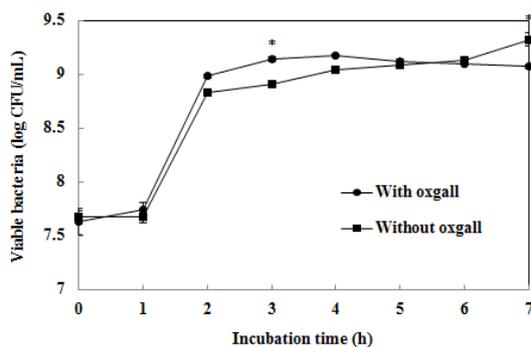


Fig. 3. Growth of *Enterococcus faecalis* MD366 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with/without 0.3% oxgall. \* $p < 0.05$  between ox gall and without oxgall ( $t$ -test).

내성이 있는 것으로 나타났다.

### 8. *E. faecalis* MD366의 pH 내성

좋은 probiotics가 되기 위해서는 적어도 pH 3보다 낮은 pH에서 생존하여 위 장관을 통과하고, 소장 내로 도달하여 야만 한다(Booth, 1985; McDonald *et al.*, 1990). 위액의 pH는 pH 0.9이지만, 음식을 섭취하였을 경우 위의 pH는 pH 3까지 올라가기 때문이다(Erkkila and Petaja, 2000). 산에 대한 *E. faecalis* MD366의 내성 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 대조구인 pH 6.4에서의 균수와 비교한 결과, *E. faecalis* MD366 균주는 pH 2에서 0시간에는 생존율이 100%이던 것이 3시간 이후에는 86.36%로 감소하였고, pH 3과 pH 4에서는 생존율 감소를 보이지 않았다. Pennacchia 등 (2004)의 실험에서 젓산균을 pH 2.5의 PBS에 3시간 동안 37°C에서 배양한 결과, 60~80%의 생존율을 보인 결과와 비교해 보았을 때, *E. faecalis* MD366 균주는 내산성 실험에서 우수한 결과를 보였다.

### 9. *E. faecalis* MD366의 항균력

*E. faecalis* MD366이 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 5와 같다. *E. faecalis* MD366은 *Escherichia coli*와 *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 80.4%와 60.2%, 65.4%로서, 큰 억제효과를 보였다. 배양 후 pH의 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH 6.5이며, 혼합배양액은 pH 5.6~5.7로서 pH가 약간 감소하였지만 pH의 저하가 식중독균의 억제에 큰 영향은 미치지 않은 것으로 보인다. 균주의 항균력은 같은 종의 균주라 하더라도 병원균에 따라 각기 다른 정도를 보인다(Jacobsen *et al.*, 1999; Larsen *et al.*, 1993). Daeschel(1989)과 Havinaar 등(1992)은 pH 강

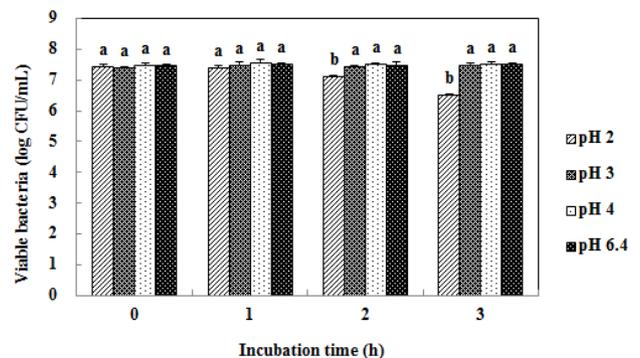


Fig. 4. Survival of *Enterococcus faecalis* MD366 after three hours in HCl solution (pH 2.0, 3.0, 4.0 and 6.4). <sup>a,b</sup> Means values with different superscript within same time are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 5. Inhibition of pathogens by *Enterococcus faecalis* MD366 in MRS broth

Pathogens	Pathogens <sup>a</sup>		<i>E. faecalis</i> MD366 <sup>a</sup> + Pathogens		Inhibition(%)
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.0±0.4×10 <sup>6</sup>	6.5	3.0±0.3×10 <sup>5</sup>	5.6	80.4
<i>Salmonella</i> Typhimurium	3.0±0.3×10 <sup>6</sup>	6.5	1.0±0.2×10 <sup>6</sup>	5.7	60.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.2±0.5×10 <sup>8</sup>	6.5	1.5±0.3×10 <sup>8</sup>	5.6	65.4

\* Initial count of *E. faecalis* MD366: 2.8±0.5×10<sup>6</sup> CFU/mL

<sup>a</sup> Determined after 6 h of incubation at 37°C

All values are the mean ± standard deviation of three replicates.

하, 산화 환원 전위의 감소, 유해균과의 경쟁적 영양성분 소비, 과산화수소의 생성, 젖산균이 생산하는 유기산과 박테리 오신의 살균작용과 강한 항균활성물질 분비에 의해 젖산균의 항균효과가 나타난다고 보고하였다. 본 실험에서 *E. faecalis* MD366에 의한 *Escherichia coli*와 *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*의 생육 억제는 이러한 억제 요소들의 작용에 기인하는 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 원유로부터 비만 억제 능력이 있는 젖산균을 분리 및 동정하고, 이 균주의 생리적 특성을 규명하여 상업적으로서의 이용가능성을 검토하고자 실시하였다. 이를 위해 Modified MRS 분별배지를 사용하여 노란색 집락을 형성하는 균주를 대상으로 각각 Anti-lipase activity와 Anti-adipogenic activity가 우수한 균주를 선발한 결과, MD366 균주가 최종 선발되었다. MD366 균주는 lipase 억제활성 65.03±0.94%, 지방 분화 억제활성 27.4±1.4%로 나타났으며, 동정결과 *Enterococcus faecalis*로 판명되었고, *Enterococcus faecalis* MD366으로 명명하였다. *E. faecalis* MD366의 최적 성장 온도는 37°C이었으며, 담즙산과 산성의 pH에서 모두 우수한 생존력을 나타내었다. 효소활성은 전반적으로 낮았으나 acid phosphatase에 대해 비교적 높은 효소 활성을 나타내었다. 항생제 내성 실험 결과 neomycin, kanamycin, vancomycin에 내성이 있는 반면, novobiocin에 감수성을 나타냈으며, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium과 *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 80.4%, 60.2%와 65.4%의 억제 효과를 지니고 있는 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원 고부가식품기술개발사업(No. 111151-3)의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Baken, K. A., Ezendam, J., Gremmer, E. R., De Klerk, A., Pennings, J. L., Matthee, B., Peijnenburg, A. A. and Van Loveren, H. 2006. Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota: Immune function, autoimmunity and gene expression. *Int. J. Food. Microbiol.* 112:8-18.
2. Bhatena, J., Martoni, C., Kunlamarva, A., Urbanska, A. M., Malhotra, M. and Prakash, S. 2009. Orally delivered microencapsulated live probiotic formulation lowers serum lipids in hypercholesterolemic hamsters. *J. Med. Food.* 12:310-319.
3. Booth, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* 49:359-378.
4. Borriello, S. P., Hammes, W. P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M. and Valtonen, V. 2003. Safety of probiotics that contain *Lactobacillus* or bifidobacteria. *Clin. Infect. Dis.* 36:775-780.
5. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. 2001. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *J. Food Prot.* 64:2007-2014.
6. Chua, S. C. and Leibel, R. L. 1997. Obesity genes: molecular and metabolic mechanisms. *Diabetes Rev.* 5:2-7.
7. Clark, P. A., Cotton, L. N. and Martin, J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cul. Dairy Prod. J.* 28:11-14.
8. Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as preservatives. *J. Food Technol.* 43:164-167.
9. Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of

- bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci.* 55:279-300.
10. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:15-18.
  11. Gilliland, S. E. and Walker, D. K. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.* 73:905-911.
  12. Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67:3045-3051.
  13. Glenny, A. M., O'meara, S., Melville, A., Sheldon, T. A. and Wilson, C. 1997. The treatment and prevention of obesity: a systematic review of the literature. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21:715-737.
  14. Hammes, W. P., Weiss, N. and Holzapfel, W. 1992. The genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. pages 1563-1578 in *The Prokaryotes*. 2nd ed, Springer-Verlag, New York. USA.
  15. Havinaar, R., Brink, B. T. and Veid, J. H. J. I. 1992. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R. (ed), *Probiotics*, Chapman & Hall, London. pp. 209-224.
  16. Hemati, N., Ross, S. E., Erickson, R. L., Groblewski, G. E. and MacDuygald, O. A. 1997. Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP  $\alpha$ ) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes: Correlation with CLUT4 gene expression. *J. Biol. Chem.* 272:25913-25919.
  17. Huh, K. B. 1990. Recent progress in obesity research: pathogenesis of obesity. *Kor. J. Nutr.* 23:333-336.
  18. Isolauri, E., Salminen, S. and Ouwehand, A. C. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.* 18:299-313.
  19. Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M. and Jakobsen, M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4949-4956.
  20. Kang, J. H., Yun, S. I., Park, M. H., Park, J. H., Jeong, S. Y. and Park, H. O. 2013. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PLoSOne.* 8.1:e54617.
  21. Kim, D. H., Choi, M. R., Hong, J. E., Lee, J. Y., Lee, S. I., Jung, S. H. and Kim, E. J. 2014. Effect of mixture of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 on obesity and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43:1484-1490.
  22. Kim, J. Y., Jeong, J. E., Moon, S. H. and Park, K. Y. 2010. Antiobesity effect of *Bacillus subtilis* KC-3 fermented soymilk in 3T3-L1 adipocytes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39:1126-1131.
  23. Kim, S. H., Shin, B. H., Kim, Y. H., Nam, S. W. and Jeon, S. J. 2007. Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus brevis* BH2. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12:707-712.
  24. Kumar, M., Ghosh, M. and Ganguli, A. 2012. Mitogenic response and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from indigenously pickled vegetables and fermented beverages. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 703-711.
  25. Kwon, J. Y., Cheigh, H. S. and Song, Y. O. 2004. Weight reduction and lipid lowering effects of *kimchi* lactic acid powder in rats fed high fat diets. *Korean J. Food Sci.* 36:1014-1019.
  26. Larsen, A. G., Vogensen, F. K. and Josephsen, J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J. Appl. Bacteriol.* 75:113-122.
  27. Lee, K., Paek, K., Lee, H. Y., Park, J. H. and Lee, Y. 2007. Anti obesity effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *J. Appl. Microbiol.* 103:1140-1146.
  28. Lew, E. A. 1985. Mortality and weight: insured lives and the American Cancer Society studies. *Ann. Intern. Med.* 103:1024-1029.
  29. Lim, S. D., Kim, K. S. and Do, J. R. 2011. Physiological characteristics and production of vitamin K2 by *Lactobacillus fermentum* LC272 isolated from raw milk. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 31:513-520.
  30. Lonkar, P., Harne, S. D., Kalorey, D. and Kurkure, N. V. 2005. Isolation, *in vitro* antibacterial activity, bacterial sensitivity and plasmid profile of *Lactobacilli*. *Asian Austral. J. Anim.* 18:1336-1342.
  31. Lye, H. S., Kuan, C. Y., Ewe, J. A., Fung, W. Y. and

- Liong, M. T. 2009. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *Int. J. Mol. Sci.* 10:3755-3775.
32. Mathur, S. and Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *Int. J. Food. Microbiol.* 105:281-295.
33. Mcdonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2124-2128.
34. McGee, D. L. 2005. Body mass index and mortality: a metaanalysis based on person-level data from twenty-six observational studies. *Ann. Epidemiol.* 15:87-97.
35. Moon, Y. J., Soh, J. R., Yu, J. J., Sohn, H. S., Cha, Y. S. and Oh, S. H. 2012. Intracellular lipid accumulation inhibitory effect of *Weissella koreensis* OK1-6 isolated from Kimchi on differentiating adipocyte. *J. Appl. Microbiol.* 113:652-658.
36. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 62:55-63.
37. Paul, M. and Somkuti, G. A. 2010. Hydrolytic breakdown of lactoferricin by lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37:173-178.
38. Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. and Villani, F. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci.* 67:309-317.
39. Rafter, J. 2004. The effects of probiotics on colon cancer development. *Nutr. Res. Rev.* 17:277-284.
40. Ramirez-Zacarias, J. L., Castro-Munozledo, F. and Kuri-Harcuch, W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochem.* 97:493-497.
41. 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.
42. Song, M. Y., Bose, S. and Kim, H. J. 2013. Effect of probiotics-fermented Samjunghwan on differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42:1-7.
43. Spiegelman, B. M. and Flier, J. S. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 104:531-543.
44. Yu, J. J., Kim, S. G., Seo, K. W. and Oh, S. H. 2011. Isolation, identification and characterization of ornithine producing *Enterococcus faecalis* OA18 from kefir grain. *Korean. J. Microbiol.* 47:218-224.

---

(Received 19 November, 2014 / Accepted 8 December, 2014)