ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2014** Vol. 24. No. 11. 1231~1237 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2014.24.11.1231

Probiotic Properties of *Lactobacillus* strains Isolated from Kimchi

Hye Jung Choi[1], Bo Ram Lim[1], Dong Wan Kim[2], Gi-Seok Kwon[3] and Woo Hong Joo[1,*]

[1]*Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-240, Korea*
[2]*Department of Microbiology, Changwon National University, Changwon 641-240, Korea*
[3]*School of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea*

Received September 24, 2014 /Revised November 24, 2014 /Accepted November 27, 2014

The objective of this study was to evaluate the safety and functional properties of four potential probiotic strains isolated from Kimchi, traditional Korean fermented vegetables. Based on being higher tolerance to bile salts and showing higher acid resistance or hydrophobic properties, one *Lactobacillus arizonensis* strain (BCNU 9032) and three *L. brevis* strains (BCNU 9037, BCNU 9098 and BCNU 9101) were selected in the screening experiment. All strains can survived up to 99% after 3h culture in pH 2.5 and resistant to 1% bile salts. These strains also showed good antimicrobial activities against a number of food borne pathogens, especially against *Escherichia coli* and *Shigella sonnei*. The ability to lower cholesterol levels of *L. arizonensis* BCNU 9032 and *L. brevis* 9037 were demonstrated by bile salt hydrolytic activity and cholesterol assimilation tests. Moreover, *L. brevis* BCNU 9098 and BCNU 9101 showed higher adherence to Caco-2 cells (12.76 and 11.86%, respectively) than *Lactobacillus rhamnosus* GG, a commercial probiotic strain used worldwide. The results suggest that these strains could be used as probiotics.

Key words : Adhesion abilities, cholesterol assimilation, *Lactobacillus* strains, potential probiotics

서 론

한국의 대표적인 전통발효 식품으로 자리매김한 김치는 최근 국외에서도 건강식품으로서 그 기능성이 인정되어 세계 5대 건강식품 중에 하나로 꼽혀 미국 health magazine에 소개된 바가 있다(http://www.health.com/world's healthiest foods Kimchi-Korea, Feb 1, 2008). 배추, 양배추 무, 무청 및 파 등 소금에 절인 채소에 마늘, 고춧가루, 생강, 소금 및 젓갈 등을 양념으로 첨가하여 발효시킨 김치는 항산화, 면역자극활성, 항돌연변이[5], 항종양[23], 항혈전, 항노화[13], 항동맥경화[14] 및 항균활성[22] 등 다양한 기능을 가지고 있음이 보고되면서 관심이 고조되고 있다. 이러한 기능성은 각종 비타민, 무기질, 식이섬유 및 phytochemical 등 원재료 자체의 생리활성과 젖산균에 의한 발효산물 그리고 상존하는 미생물 군집의 활성에서 기여되고 있는 것으로 보고되고 있다[15]. *Leuconostoc* (*Leuc.*), *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* 그리고 *Lactococcus* 속 종 등을 포함하고 있는 lactic acid bacteria (LAB)는 김치 발효에서 맛과 질뿐만 아니라 인체 건강에도 중요한 역할을 담당하고 있으며, 최근에는 김치 발효 표준화를 위해 *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. citreum* 및 *L. plantarum*을 starter 균주로 적용한 제품이 다수 출시되고 있다. 일반적으로 LAB는 미국과 유럽의 안전성 평가기준인 Generally Recongnized as Safe (GRAS)와 Qualified Presumption of Safety (QPS)에 해당되는 균주로 인체위해성이 없는 것으로 간주되고 있지만, Lactobacilli와 bifidobacteria는 매우 드물게 인체에 기회감염을 일으켜 감염성 심내막염 또는 균혈증 등의 감염병변[4]에서 발견되기도 하여 프로바이오틱스 연구에 있어서 기본적으로 안전성이 확보된 균주의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

*Lactobacillus*는 대표적인 김치 유산균 가운데 하나로 *L. acidophilus* LA1, *L. casei* Shirota, *L. plantarum* LP01, *L. rhamnosus* GG 및 *L. fermentum* RC14 등은 현재 프로바이오틱스로서 상업적으로 이용되고 있다[9]. 특히 *Lactobacillus*는 장내균총의 안정화, 과민성대장증후군 및 유당불내증 개선효과가 뛰어나며[1, 27], 유산균 및 장내 유해균에 의해 생성되어 인체에 위해를 줄 수 있는 발효식품에 존재하는 biogenic amine을 생산하지 않거나 분해하는 등 인체 건강에 도움을 주는 것으로 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 안전성 확보 및 향상된 기능성을 가진 잠재적인 프로바이오틱스를 분리하기 위해 일반가정에서 담근 다양한 김치로부터 *Lactobacillus* sp.을 분리하였으며, 항생제 내성, 용혈성 및 유해효소 생산 및 기본적인 안전성, 내산성 및 내담즙산 등의 안정성과 식중독 원인균에 대한 항균활성, bile salt hydrolase 활성, 콜레스테롤 동화작용 및 Caco-2 cell을 이용한 장 상피세포 부착능 등의 기능성 검증을 통해 다기능성 프로바이오틱스 균주를 개발하고자 본 연구를 수행

***Corresponding author**
Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459
E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하였다.

재료 및 방법

프로바이오틱스의 분리 및 동정

일반가정에서 담근 배추김치, 열무김치, 물 김치, 총각김치 5종의 다양한 김치를 수집하여 프로바이오틱스 균주를 분리하는데 이용하였다. 1 ml의 시료를 PBS buffer (pH 6)에 10배 희석하여 이를 nutrient agar (NA), 0.5% (w/v) $CaCO_3$을 첨가한 lactobacilli de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar 및 R2A 배지에 접종하여 37°C에서 2-4일 배양한 후 균주를 순수분리하였다. 순수분리된 균주는 PBS (pH 2.0)에 현탁하고 2시간 정치 배양 후, 내산성이 뛰어난 균주 20 colonies를 1차 선별하였고, Bergey's Manual of determinative bacteriology를 참고하여 생리·생화학적 특성을 조사하였다[24]. 또한 16S 리보솜 RNA 염기서열을 분석한 뒤 Bioedit (USA), Clustal X2.0 (CLC bio, Denmark) 그리고 Mega 4를 이용하여 계통학적인 위치를 확인하였다[21].

용혈성 및 안전성 검사

대상균주를 면양혈액한천배지(Asan Pharmacy Co., Seoul, Korea)에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 뒤, 균주의 용혈성 여부를 확인하였고, Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN, 2002)와 European Food Safety Authority (EFSA, 2008) 지침을 참고하여 ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, streptomycin 및 tetracycline에 대한 항생제 감수성을 조사하였다[8, 20]. 또한 β-glucoronidase, tryptophanse 및 urease와 같은 효소 생성여부를 대조군으로 *Escherichia coli* ATCC 10798과 *L. acidophilus* ATCC 4356을 사용하여 조사하였다.

내산성 및 내담즙산 활성조사

MRS 배지에 전배양한 실험균주 1 ml을 원심분리하여 (8,000 × g, 15 min, 4℃), PBS (pH 6.0)로 두 번 세척한 뒤 버퍼 및 배지 1 ml에 현탁하였다. 내산성 조사는 9 ml의 PBS (pH 2.5)에 접종하여 37℃에서 3시간 동안 진탕배양한 뒤 0시간과 3시간 후의 생균수를 측정하였고, 담즙산염에 대한 저항성은 0.3%, 0.6% 및 1%의 bile salt가 각각 첨가된 9 ml MRS broth에서 0시간과 24시간 배양 후의 생균수를 비교함으로써 생존률을 조사하였다.

항균활성 조사

6종의 식중독 원인균(*Bacillus cereus* ATCC 14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 10798, *Shigella sonnei* ATCC 25931 및 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028)에 대한 항균활성은 agar diffusion 법으로 조사하였다[18]. MRS 배지에서 전배양한 균주를 원심분리하여(8,000 × g, 15 min, 4°C) 배양 상등액을 pH 6.5로 중화시킨 뒤, 여과하여(0.22 μm membrane; Millipore) 항균력 측정을 위한 시료로 사용하였다.

Bile salt hydrolase (BSH) 활성 및 콜레스테롤 동화작용

BSH 활성은 0.5% taurodeoxycholic acid와 0.37 g/l $CaCl_2$이 함유된 MRS agar에 실험균주 배양액을 10 μl 점적하여, 37°C에서 48시간 배양한 뒤 흰색환의 생성여부로 판단하였다. 또한 콜레스테롤 동화능의 측정은 0.5% (w/v) TDCA와 0.1 g/l 수용성 cholesterol을 첨가한 MRS broth에 실험균주(10^8 cells/ml)를 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 원심분리한 뒤(10,000 × g, 10 min, 4°C) 배양 상등액에 95% 에탄올과 0.5 M potassium hydroxide을 첨가하여 60°C에서 반응시켰다. 10분 후 hexane을 첨가하여 실온에서 추가 반응시킨 후 용매층을 회수하여 액체질소로 증발시키고 *o*-phthaladehyde 용액과 H_2SO_4를 가하고 10분간 반응시킨 후 흡광도(OD_{550})를 측정하여 잔존 콜레스테롤 양을 정량적으로 측정하였다[2, 17].

세포표면 소수성

균주의 세포표면 소수성은 탄화수소로서 *n*-hexadecane과 chloroform에 부착하는 정도를 측정하였다[7]. 전배양한 균주는 원심분리 후, 균체를 모아 PBS (pH 6.0)로 두 번 세척하였고 10^5 cells/ml 농도로 현탁한 뒤 *n*-hexadecane 또는 chloroform을 1:1 비율로 첨가하였다. 2분간 혼합하고 실온에서 30분간 정치배양을 한 뒤에 배지층의 흡광도(OD_{580})를 측정하여 초기 흡광도와 비교함으로써 세포표면의 소수성 정도를 확인하였다.

Caco-2 cell에 대한 부착능 측정

실험에 사용한 colon cancer cells (Caco-2 cells, KCLS)은 10% FBS (fetal bovine serum), 100 units/ml penicillin과 100 μg/ml streptomycin이 첨가된 Dulvecco's Modified Eagle Media (DMEM, Gibco) 배지를 사용하여, 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 실험균주를 MRS 배지에서 18시간 배양한 후, 원심분리(3,000 rpm, 20 min, 4°C)로 균체를 회수하여 PBS (pH 7.2)로 2회 세척한 후에 serum free DMEM에 10^8 CFU/ml 농도로 현탁하고 caco-2 세포가 10^6 cells/well 농도로 접종되어 있는 24-well plates에 0.5 ml/well를 첨가하였다. 37°C, 5% CO_2 조건하에서 2시간 배양한 후에 1 ml의 0.1% tritonX-100을 첨가하여 5분간 고정시키고 PBS로 세척을 통해 부착되지 않은 세포를 제거한 뒤 생균수를 측정함으로써 대조구와 비교하여 Caco-2 cell에 대한 부착능을 측정하였다[25].

결과 및 고찰

Lactobacillus 균주들의 선발 및 동정

1차 선별된 50여개의 콜로니는 형태 및 생리학적 특성조사를 통해 그람양성의 장간균으로 낮은 pH 범위에서 생존가능한 4종의 균주를 선별하였고(Table 1), 16S 리보솜 RNA 염기서열 분석을 통해 최종적으로 *L. arizonensis* DSM 13273^T (GenBank accession number: AJ965487)와 근연종인 BCNU 9032와 *L. brevis* DSM 20054^T (GenBank accession number: M58810)의 근연종인 BCNU 9037, BCNU 9098 그리고 BCNU 9101 균주를 선발하였다.

안전성 조사를 위한 *in vitro* 시험

프로바이오틱스로서 섭취시 인체에 유해성을 나타낼 수 있는 여러가지 인자를 조사한 결과, 4종의 균주는 sheep blood가 포함된 한천배지에서 용혈현상이 없는 γ-형으로 나타났고, 장내세균이 생산하는 유해효소인 β-glucoronidase, tryptophanase 및 urease를 분비하지 않는 것으로 조사되었다(Table 2). 섭취하는 음식과 장내세균은 밀접한 관계가 있으며, 유해하지 않은 식품도 대사과정에서 장내세균이 생산하는 유해효소(β-glucoronidase와 tryptophanase 등)로 인해 발암물질로 전환될 수 있다는 연구가 보고된 바 있다[12].

항생제 감수성 조사에서 BCNU 9032가 streptomycin에 대해 EFSA와 SCAN의 기준보다 높은 저항성을 가지고 있었으며, 4종의 균주가 gentamicin에 대해 SCAN 기준에 비해 저항성이 있는 것으로 나타났다(Table 3). 그러나 Danielsen & Wind는 많은 *Lactobacillus* 속 균주가 aminoglycoside계 항생제에 저항성이 높은 것으로 보고하였으며[6], 김치에서 분리된 다수의 *L. sakei*와 *L. plantarum*이 선발균주와 비슷한 경향의 항생제 감수성을 가진 것으로 보고되었다[15]. 그러므로 선발된 균주 모두 안전한 것으로 판단된다.

pH 및 담즙산염에 대한 안정성

섭취 시 균체가 장내에 도달하여 기능성을 나타내기 위해서는 낮은 pH와 담즙산에 대한 내성 능력이 필수적이다. 선발된 균주의 pH에 대한 내성은 pH 2.5에서 초기균수와 3시간 후의

Table 1. Physiological properties of selected *Lactobacillus* strains

Characteristics	BCNU 9032	BCNU 9037	BCNU 9098	BCNU 9101
Gram's reaction	+[1)]	+	+	+
Optimum growth temperature (℃)	37	37	37	37
Growth pH	2.5-9.0	2-9.0	2-9.0	2.5-9.0
Growth NaCl (%)	3-5	3-5	3-5	3-5
Assimilation of carbohydrate				
Arabinose	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Xylose	-	+	+	+

[1)]+ ; Positive, - ; negative

Table 2. Haemolytic activity and production of enzyme in LAB strains

Characteristics	BCNU 9032	BCNU 9037	BCNU 9098	BCNU 9101	*E. c*	*L. a*
Heamolysis	γ-hemolysis	γ-hemolysis	γ-hemolysis	γ-hemolysis	-	γ-hemolysis
Gelatinase	-[1)]	-	-	-	-	-
β-glucosidase	-	-	-	-	+	-
β-glucuronidase	-	-	-	-	+	-
Tryptophanase	-	-	-	-	+	-
Urease	-	-	-	-	-	-

[1)]*E.c*: *Escherichia coli* ATCC 10798; *L.a*: *Latobacillus. acidophilus* ATCC 4356

[2)]+ : positive, - : negative

Table 3. Minimum inhibitoy concentration (MIC) μg/ml of antibiotics to *Lactobacillus* strains

	Em[1)]	Gm	Am	Te	Ch	Sm
BCNU 9032	<0.25	16	<0.25	1	1	>64
BCNU 9037	<0.25	4	<0.25	4	1	32
BCNU 9098	<0.25	4	<0.25	2	1	16
BCNU 9101	<0.25	2	<0.25	2	1	16
SCAN	4	1	2	16	16	16
Danielsen & Wind	4	128	4	4	16	>256
EFSA	1	16	4	8	4	64

[1)]Em: erythromycin; Gm: gentamicin; Am: ampicillin; Te: tetracycline; Ch: chloramphenicol; Sm: streptomycin.

Table 4. Acid resistance of *Lactobacillus* sp. strains

	Initial mean counts (log CFU/ml)	Survival after 3 hr at pH 2.5	Survival rate (%)
BCNU 9032	8.81±0.01	8.82±0.01	100.11
BCNU 9037	8.84±0.01	8.83±0.01	99.89
BCNU 9098	8.97±0.00	8.94±0.11	99.67
BCNU 9101	8.89±0.01	8.93±0.00	100.45

생존력을 비교함으로써 확인하였다(Table 4). BCNU 9032와 BCNU 9101은 낮은 산성 환경에 전혀 영향을 받지 않았으며, BCNU 9037과 BCNU 9098도 99.6% 이상 생존률을 보임으로써 산에 대한 안정성은 매우 높은 것으로 확인되었다. 또한 4종의 선발균주는 1%의 고농도의 담즙산에서 99-100% 생존률을 보임으로써 담즙산에 대한 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며(Table 5), 이는 김치에서 분리한 10여종의 *L. sakei*가 3.25% oxgall에서 생존률이 10% 내외인 것으로 보고된 바 있으나[15] 이에 비해 4개의 선발균주가 본 실험을 통해 담즙산에 대한 뛰어난 안정성을 보유한 균주임이 확인되었다.

항균활성

Paper disc법에 따라 8 mm의 disc에 50 μl의 균 배양 상등액을 접종하여 그람양성 세균 3종과 그람음성 세균 3종의 식중독 원인균에 대해 항균활성을 조사하였다. BCNU 9032와 BCNU 9037의 배양 상등액은 대체로 넓은 항균스펙트럼을 가지고 있는 것으로 나타났다(Table 6). 특히 *E. coli*에 대해 저해환 19 mm의 높은 항균 활성을 보였고, *List. monocytogenes*와 *S. sonnei*에 대해서도 우수한 항균 활성을 가지고 있음이 확인되었다. BCNU 9098과 BCNU 9101의 배양 상등액 또한 *E. coli*에 대한 항균 활성이 가장 높은 것으로 나타남으로써 4종의 균주가 생산하는 이차대사산물들이 전반적으로 그람음성 세균에 대한 높은 항균 활성을 나타내는 것으로 조사되었다. 기존의 연구된 *Lactobacillus* sp. 균주가 대부분 *E. coli*에 대한 항균 활성이 없거나 *S. aureus*에 비해 상대적으로 낮은 항균 활성을 가진 것과 비교하여 다소 차이가 있었으며[11, 17], 실험균

Table 5. Bile resistance of *Lactobacillus* sp. strains

	Control (log CFU/ml)	0.3%	Survival rate (%)	0.6%	Survival rate (%)	1%	Survival rate (%)
BCNU 9032	7.87±0.01	7.87±0.02	100.01	7.85±0.01	99.72	7.78±0.01	98.87
BCNU 9037	7.89±0.02	7.88±0.02	99.97	7.89±0.03	100	7.86±0.01	99.72
BCNU 9098	7.97±0.00	8.15±0.00	102.30	8.07±0.01	101.29	8.01±0.01	100.60
BCNU 9101	7.75±0.01	7.97±0.01	102.77	7.90±0.01	101.91	7.76±0.02	100.13

Survival of LAB strains was compared by plate counting after exposure with bile salt 0.3%, 0.6%, 1% in MRS broth for 0 and 24 hr.

Table 6. Antimicrobial activities of *Lactobacillus* sp. strains against food-borne pathogens

	B. c[1)]	*L. m*	*S. a*	*E. c*	*S. s*	*S. t*
BCNU 9032	11.5±0.5[2)]	16.5±2.1	-[3)]	19	16±1.4	13.5±0.7
BCNU 9037	12±1.0	15.5±3.5	-	19±1.0	15.5±0.7	12.5±0.7
BCNU 9098	-	-	11.5±0.5	16.5±0.5	11±1.4	-
BCNU 9101	11±1.0	-	15.5±2.1	17±1.0	11	-

[1)]B.c: *Bacillus cereus*; L.m: *Listeria monocytogenes; S.a: Staphylococcus aureus*; E.c: *Escherichia coli; S.s: Shigella sonnei*; S.t: *Salmonella typhimurium*.

[2)]Each value represents a diameter of clear zone (mm; mean ± SD, n=3).

[3)]- ; negative

Table 7. Cholesterol-related activities and hydrophobicity of selected probiotic *Lactobacillus* sp. strains

Strains	BSH activity	Cholesterol assimilation (%)	Hydrophobicity (%)	
			n-hexadecane	chloroform
BCNU 9032	+[1)]	54.28 ± 5.31	56.70 ± 2.08	63.22 ± 0.52
BCNU 9037	+	50.90 ± 8.66	99.65 ± 0.23	96.28 ± 1.68
BCNU 9098	-	17.81 ± 1.74	92.53 ± 1.31	98.33 ± 2.70
BCNU 9101	-	7.93 ± 3.54	97.83 ± 0.40	94.52 ± 1.46

[1)]+; positive for BSH activity, - :negative for BSH activity

이 대부분의 식중독 원인균인 그람음성 세균에 대해 활성이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

콜레스테롤 저하 효능과 소수성

BSH 활성은 BSH agar 배지에서 흰색 침전환이 생성되는 것으로 확인할 수 있었으며, BCNU 9032와 BCNU 9037은 모두 BSH 활성을 가지고 있는 효소를 분비하는 것으로 확인되었다(Table 7). 그리고 TDCA와 수용성 cholesterol을 배지에 첨가하고 배양하여 잔존 콜레스테롤양을 측정하는 동화능 실험에서도 BCNU 9032와 BCNU 9037은 50% 이상의 활성을 보임으로써 콜레스테롤 저하 효능이 뛰어남을 확인할 수 있었다. 김치에서 분리한 *L. sakei*는 40-60%, *L. plantarum* NR74는 47.8% 그리고 상업 균주인 *L. rhamnosus* GG가 48%의 콜레스테롤 저하효능이 있음이 보고되어 있다[15]. 그러므로 실험에 사용한 균주에서 이들 균주보다 다소 뛰어난 콜레스테롤 저하 효능이 확인되었다.

세포표면의 소수성은 병원성 세균과의 부착 및 응집현상, 숙주세포의 방어 등 다양한 현상들과 연관되어 있으며[3, 10], 본 연구에서는 미생물의 탄화수소에 대한 부착능을 측정함으로써 소수성 정도를 측정하였다. BCNU 9037은 *n*-hexadecane 첨가시 99.6% 이상의 높은 부착능을 보였으며, BCNU 9098과 BCNU 9101도 90% 이상의 부착능을 가짐으로써 세포표면의 소수성이 매우 높은 것으로 나타났다(Table 7). 발효 코코아에서 분리한 *L. brevis* FFC199와 SAU105는 xylene 첨가시 각각 0.26%, 60.98%의 부착능을 보였으며, *L. rhamnosus* GG는 *n*-hexadecane 처리시 100%의 부착능을 가진 것으로 나타남으로써 콜레스테롤 동화능과 세포표면 소수성면에서 BCNU 9037과 유사함을 확인할 수 있었다.

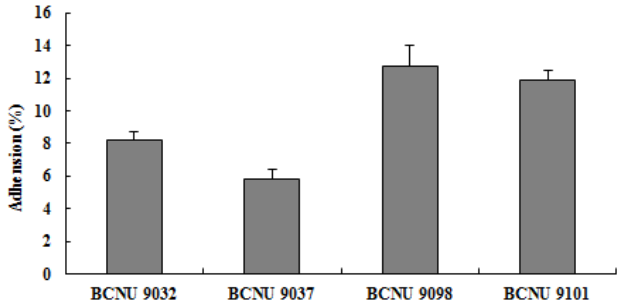

Fig. 1. Adhesion ability of *Lactobacillus* sp. strains to Caco-2 cell. The adherence percentage of LAB strains to Caco-2 cells was calculated by comparing the plate counts between initial and adhered bacteria. Each value represents mean ± SD, n=3.

Caco-2 cell에 대한 부착능

프로바이오틱스 균주의 장관 상피세포 유래의 Caco-2 cell에 대한 부착능력은 BCNU 9098과 BCNU 9101이 각각 12.8%, 11.9%로 BCNU 9032의 8.2%, BCNU 9037의 5.8%보다 상대적으로 높게 나타났다(Fig. 1). 세포표면 특성은 장내세포와의 응집력 및 부착능과 연관성이 높은 것으로 알려져 있으며[26], 소수성이 높은 BCNU 9098과 BCNU 9101이 상대적으로 Caco-2 cell에 대한 부착능이 높은 것으로 본 실험에서도 확인되었다. 낙농제품에서 분리한 29종의 *Lactobacillus* sp. 균주의 Caco-2 부착능은 0.1-25.5% 범위로 평균 5% 내외인 것으로 보고되고 있으며[16], *L. plantarum* SAU96, *L. brevis* FFC199 및 상업 균주인 *L. rhamnosus* GG의 Caco-2 cell 부착능은 각각 1.8%, 0.9% 그리고 1.5%로 보고되고 있으므로[19] 결과를 참고로 할 때 이들 균주들은 인체장관의 상피세포에의 부착능력도 우수할 것으로 사료되며 차후에 이를 실험으로 증명할 필요가 있다.

김치로부터 분리한 4종의 *Lactobacillus* sp.는 GRAS 균주로 식품첨가물로써 사용가능한 안전한 균주이며, 본 연구에서도 인체에 유해할 수 있는 효소 생산을 하지 않는 것으로 확인되었다. 프로바이오틱스로서 기본적인 산성과 담즙산에 대해 우수한 안정성을 보였으며, BCNU 9032와 9037은 *E. coli*와 *S. sonnei*에 대해 특히 뛰어난 항균활성을 가진 것으로 나타났다. 또한 BCNU 9032와 9037은 BSH 활성 및 콜레스테롤 수준을 50% 이상 감소시켰으며, 소수성 실험을 통해 섭취시 장내 부착능이 우수할 것으로 판단되어 프로바이오틱스로서 섭취시 장내환경 개선에 크게 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2013~2014년도 창원대학교 연구비에 의하여 연구되었음.

References

1. Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilppo-

nen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T. and Von Wright, A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* **65,** 351-354.
2. Allain, C. C., Poon, L. S., Chen, C. G., Richmond, W. and Paul, C. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* **20,** 470-475.
3. Bar-Ness, R., Avrabamy, N., Matsuyama, T. and Rosenberg, M. 1988. Increased cell surface hydrophobicity of a *Serraia marcescens* NS 38 mutant lacking wetting activity. *J Bacteriol* **170,** 4361-4364.
4. Borriello, S. P., Hammes, W. P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M. and Valtonen, V. 2003. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Infect Dis* **36,** 775-780.
5. Cho, E. J., Rhee, S. H., Lee, S. M. and Park, K. Y. 1997. *In vitro* antimutagenic and anticancer effects of kimchi fractions. *J Korean Ass Cancer Prev* **2,** 113-121.
6. Danielsen, M. and Wind, A. A. 2003. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* **82,** 1-11.
7. Doyle, R. J. and Rosenberg. M. 1995. Measurement of microbial adhesion to hydrophobic substrates. *Methods Enzymol* **253,** 542-550.
8. EFSA. (2008). Technical guidance prepared by the panel on additives and products or substances in animal feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human and veterinary importance. *EFSA J* **732,** 1-15.
9. Giraffa, G., Chanishvili, N. and Widyastuti, Y. 2010. Importance of lactobacilli in food and feed *biotechnology*. *Res Microbiol* **161,** 480-487.
10. Hazen, K. C., Lay, J. G., Hazen, B. W., Fu, R. C. and Murthy, S. 1990. Partial biochemical charaterization of cell surface hydrophobicity and hydrophilicity of *Candida albicans*. *Infect Immun* **58,** 3469-3476.
11. Bang, J. H., Shin, H, J., Choi, H. J., Kim, D. W., Ahn, C. S., Jeong ,Y. K. and Joo, W. H. 2012. Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates. *J Life Sci* **22,** 251-258.
12. Keisuke, T., Emiko, H., Nakagawa, G. U. and Masuo, S. 1996. Long-term effect of dietary fiber and fat intake on Japanese colon cancer mortality. *Biosc Microflora* **15,** 77-74.
13. Kim, B. K., Park, K. Y., Kim, H. Y., Ahn, S. C. and Cho, E. J. 2011. Anti-aging effects and mechanisms of Kimchi during fermentation under stress-induced premature senescence cellular system. *Food Sci Biotechnol* **20,** 643-649.
14. Kim, H. J., Kwon, M. J., Seo, J. M., Kim, J. K., Song, S. H., Suh, H. S. and Song, Y. O. 2004. The effect of 3-(4′-hydroxyl-3′,5′-dimethoxyphenyl) propionic acid in Chinese cabbage kimchi on lowering hypercholesterolemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **33,** 52-58.
15. Lee, H. J., Yoon, H. S., Ji, Y. S., Kim, H, N., Park, H. J., Lee, J. E., Shin, H. K. and Holzapfel, W. H. 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *Int J Food Microbiol* **145,** 155-161.
16. Maragkoudakisa, P. A., Zoumpopouloua, G., Miarisa, C., Kalantzopoulosa, G., Potb, B. and Tsakalidoua, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy droducts. *Int Dairy J* **16,** 189-199.
17. Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C. M. A. P., Kutima, P. M., Mbugua, S., Shin, H. K. and Holzapfel, W. H. 2008. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. Form traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int J Food Microbiol* **126,** 57-64.
18. Mishra, V. and Prasad, D. N. 2005. Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int J Food Microbiol* **103,** 109-115.
19. Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F. and Jespersen, L. 2013. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol* **36,** 22-29.
20. SCAN. 2002. Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. European commission, health and consumer protection directorate general; directorate C, scientific opinions, 18 April 2002.
21. Saito, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **79,** 426-434.
22. Sheo, H. J. and Seo, Y. S. 2003. The antibacterial action of Chinese cabbage kimchi juice on *Staphylococcus aureus, Salmonellla enteritidis* and *Enterobacter cloacae. J Korean Soc Food Sci Nutr* **32,** 1351-1356.
23. Shin, K., Chae, O., Park, I., Hong, S. and Choe, T. 1998. Antitumor effects of mice fed with cell lysates of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* **13,** 357-363.
24. Sneath, P. H. A. 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci, pp. 1104-1139. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.), Bergey's manual of systematic *Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
25. Thirabunyanon, M., Boonprasom, P. and Niamsup, P. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol Lett* **31,** 571-576.
26. Todorv, S. D. and Dicks, L. M. T. 2008. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. *Ann Microbiol* **58,** 661-670.
27. Vrese, M., Stegelmann, A., Ritcher, B., Fenselau, S., Laue, C. and Schrezenmeir, J. 2001. Probiotics: compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* **73,** S421-S429.

초록 : 김치로부터 분리된 *Lactobacillus* strains의 probiotic 특성

최혜정[1] · 임보람[1] · 김동완[2] · 권기석[3] · 주우홍[1]*
([1]창원대학교 생물학과, [2]창원대학교 미생물학과, [3]안동대학교 생명자원과학부)

본 연구의 목적은 한국의 전통 발효 식품인 김치로부터 분리된 4개의 잠재적인 프로바이오틱스 균주의 안전성과 기능적 특성을 측정하기 위한 것이다. 담즙산염에 대한 높은 내성과 내산성 그리고 소수성 특성에 기초하여 한 균주의 *Lactobacillus arizonensis* (BCNU 9032)와 3 균주의 *L. brevis* (BCNU 9037, BCNU 9098 and BCNU 9101)는 선택되었다. 모든 균주는 pH 2.5에서 3시간 후에도 99% 이상 생존가능했고, 1%의 담즙산염에 내성을 보였다. 이들 균주는 특히 *Echerichia coli*와 *Shigella sonnei* 같은 다수의 식중독 원인균에 대해 우수한 항균활성을 보였다. *L. arizonensis* BCNU 9032와 *L. brevis* 9037의 콜레스테롤 수준을 감소시키는 능력은 시험관내 담즙염 가수분해 활성과 콜레스테롤 동화작용 시험을 통해 검증되었다. 게다가, *L. brevis* BCNU 9098과 BCNU 9101은 Caco-2 cells에 대해(각각 12.76, 11.86%) 상업균주인 *Lactobacillus rhamnosus* GG 보다 높은 부착능을 가진 것으로 확인되었다. 이러한 결과들을 이들 균주를 프로바이오틱스로서 사용할 수 있음을 제시하고 있다.