J. Milk Sci. Biotechnol.
Vol. 33. No. 2, pp. 93~102(2015)

# 원유에서 분리한 *Lactobacillus fermentum* 450의 생리적 특성과 면역활성

한누리 · 박선영 · 임상동*

한국식품연구원

# Physiological Characteristics and Immunomodulation Activity of *Lactobacillus fermentum* 450 isolated from Raw Milk

Noori Han, Sun-Young Park and Sang-Dong Lim*

*Korea Food Research Institute*

**Abstract**

The aim of this study was to investigate the physiological characteristics and immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* 450 isolated from raw milk. *L. fermentum* 450 showed optimum growth at 40℃ and exhibited immunomodulatory effects on interleukin-1α, tumor necrosis factor-α, and nitrous oxide at concentrations of >2,500 pg/mL, >2,000 pg/mL, and 11.55±2.95 μM, respectively. Of the 16 antibiotics tested, *L. fermentum* 450 exhibited the highest sensitivity to rifampicin, followed by penicillin-G, and the highest resistance to kanamycin, followed by neomycin and polymyxin B. The strain showed high acid phosphatase activity and was comparatively tolerant to bile juice and acid. Moreover, the strain displayed high resistance to *Salmonella* Typhimurium (63.86%). These results demonstrate that *L. fermentum* 450 has potential for use as a probiotic with immunomodulatory activity.

Keywords: *Lactobacillus fermentum*, physiological characteristics, immunomodulating activity

## 서 론

Probiotics는 숙주의 장내 균총의 능력을 개선시킴으로써 숙주동물에 매우 유익한 효과를 주는 살아있는 미생물로 항암효과, 항균작용, 혈중콜레스테롤 저하, 면역체계 조절 등의 다양한 효능을 나타내고 있다(Sanders, 1999; Gill, 2003; Seo and Lee, 2007). 이러한 유익한 젖산균은 macrophage와 lymphocyte 활성, T-cell과 B-cell 증식, natural killer-cell 기능 등의 면역기능을 자극하여 면역체계를 조절함으로써 면역증강 효과에 기여하고 있다.

면역은 외부로부터 들어오는 병원성 인자들로부터 우리의 몸을 보호하고 무해한 환경물질에 대한 과도한 반응을 억제하기 위해 복잡한 기전을 통해 조절되고 있다. 젖산균은 점막의 선천성 면역시스템과 지속적인 상호작용을 하고 장관 내 염증질환의 발생을 조절을 하며, macrophage의 탐식능(phagocytic capacity) 증가 및 natural-killer(NK) 세포 활성, IgA와 사이토카인의 생성 유도, 림프구 증식 및 항체 생산 증가 등을 통해 면역시스템을 조절해준다(Arunachalam *et al*., 2000; Kim, 2009). Kim 등(2004)은 *L. brevis* FSB-1을 대상으로 전균체, 세포벽, 세포질 및 균체의 획분으로 각각 분리하고, 장관면역 활성을 측정한 결과, macrophage의 활성능이 진균체, 세포벽, 세포직 획분에서 상대적으로 높은 활성을 보였다. *Lactobaillus* spp.가 RAW 264.7 machrophage와 EL-4 Thymoma cell line에 미치는 영향에 대한 Marin 등(1997)의 연구에 의하면, 자극 받지 않은 RAW 264.7 cell에서 대부분의 lactobacilli $10^6$~$10^8$/mL 농

* 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

도에서 대조구와 비교할 때 최대 411배까지 TNF-α를 생산하였고, $10^8$/mL 농도에서는 88배까지 IL-6이 생산되었다. 또한 Perdigon 등(1986a;b)은 *L. acidophilus*와 *L. casei* 혼합 균주를 쥐에 급여한 후 macrophage와 lymphocyte 활성이 증가되었고, *L. casei*와 *L. bulgaricus* 혼합 균주를 쥐에 경구 투여한 후 복막 macrophage가 활성되었다고 보고하였다. 젖산균은 살아있는 균(생균)만이 아니라, 죽은 균(사균)도 유용한 역할을 하는데, 죽은 젖산균의 세포가 장내에 있는 유해물질을 흡착하여 몸 밖으로 배출시키는 작용을 한다(Hirose *et al*., 2006).

젖산균이 프로바이오틱스로서의 기능을 나타내기 위해서는 사람의 소화기관을 지나 장내까지 생존해야 하기 때문에 장내 점착능과 증식능을 갖추어야 하며, 사람 장관의 위산과 담즙산에 대한 안정성을 갖추어야 한다. 이로써 프로바이오틱스로서의 균주 선발에 균주 내산성 및 내담즙성에 대한 연구가 필요하다.

따라서 본 연구는 원유로부터 분리・선발된 *Lactobacillus fermentum* 450을 기능성 식품으로 적용할 수 있는지 알아보기 위해 *Lactobacillus fermentum* 450의 생리적인 특성과 면역증진 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 젖산균 분리

서울우유 중부, 남부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소 및 경북 가축위생시험소에서 지원받아 목장 별 원유를 채취하여 MRS 배지에서 Bromcresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후, 37℃에서 48시간 배양한 다음 노란색 colony 중 각기 다른 모양의 colony를 선발하였고, 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 tryptic soy agar(Difco, USA) slant에 37℃에서 18시간 배양하여 보관하였다. 발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산 생성 능력이 있어야 하므로 10% 탈지분유에 분리 균주를 접종한 후, 37℃에서 24시간 배양하여 응고된 균주를 선발하였다.

### 2. *L. fermentum* 450 균주의 동정

분리・선정된 D205 균주는 MRS 액체배지에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등(1992)의 방법에 의하여 실시하였다. 순수분리된 균주는 Gram 염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 생장, Catalase 생성, 15℃ 및 45℃에서의 생장, glucose로부터 가스생성, arginine으로부터 ammonia 생성을 측정하였으며, 현미경 관찰과 API 50CHL 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℃, 15분을 한 후 95℃, 20초; 50℃, 40초; 72℃, 1분 30초를 30회 시행하였으며, 72℃, 5분으로 마무리하였다. 서열 분석은 PCR product를 solgent PCR purification kit(SolGent, Korea)로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer(Applied Biosystems, USA)로 자동 분석하였다.

### 3. 세포 배양

세포 배양 시 사용된 배지는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, with or without phenol red, Gibco)을 사용하였다. 배양 플라스크, 피펫, microplate(96-well) 등은 멸균된 제품들을 이용하였으며, 배양병 등 초자기구들은 autoclave에서 121℃, 15 lb에서 15분간 가압 멸균한 후 사용하였다. 배지는 3차 증류수로 용해한 후 sterilized filter(0.22 μm pore size)로 여과하여 멸균한 다음, 10% fetal bovine serum과 1% streptomycin-penicillin을 첨가하여 이용하였으며, 세포 세척 및 계대 배양 시 37℃을 유지하면서 사용하였다.

세포는 배양 플라스크 바닥에 confluent하게 자랐을 때 부착된 세포를 분리하여 이용하였다. DMEM이 담긴 배양 플라스크에 세포를 각각 37℃, 5% $CO_2$를 유지하면서 $CO_2$ incubator에서 배양하였다. Anchorage-dependent한 세포는 배지를 제거하고 trypsin-EDTA(0.05% trypsin, 0.53mM EDTA・4Na)를 37℃에서 5분간 처리하였다. 이들 세포를 분리한 후, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하고, 다시 배지를 넣어 원심 분리하는 과정을 3번 반복하였다. 이렇게 얻어진 세포를 배지에 분산시킨 후 일정한 세포수로 맞추어 사용하였다. 세포는 freezing용 배지를 첨가하여 −70℃ liquid nitrogen tank에 보관 후 사용 직전에 해동하여 배양하였다.

### 4. 반응성 질소종 분비능

96-well plate에 시료 20 μL 및 RAW264.7($2\times10^5$/well) 100 μL를 넣고 48시간 동안 $CO_2$ incubator에서 37℃를 유지하면서 배양하였다. 배양액 중의 NO 농도는 microplate assay를 이용하여 측정하였다. 먼저 48시간 동안 배양한 후 상징액 50 μL aliquots를 취하여 같은 용량의 Griess 시약(1% sulfanilamide/ 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride in 2.5% $H_3PO_4$)을 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. 이 때 ELISA reader (Molecular Device, USA) 로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였다.

### 5. Interleukin-1α 분비능

RAW264.7($2\times10^5$/well) 100 μL와 시료 20 μL를 96-well plate

에 넣어 37℃, 5%의 $CO_2$ incubator에서 48시간 동안 배양한 후 상징액을 취해 대식세포가 분비하는 Interleukin-1α(IL-1α)을 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA)를 이용하여 측정하였다. 즉, anti-mIL-1α 단일 클론 항체가 코팅된 microtiter plate(Mouse IL-1α ELISA, comabiotech, KOREA)에 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 blocking 시약(3% BSA 용액, w/v)을 가한 다음 Tween 20이 0.05%(v/v) 함유된 0.01M PBS(PBST, pH 7.4) 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 세척한 plate에 biotinylated anti-mIL-1α 항체를 50 μL씩 넣고, 표준 IL-1α 또는 배양한 시료액을 50 μL씩 well에 주입하고, 25℃에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 3회 세척하고, 1.5 μg/mL 농도의 streptavidin-conjugated horse reddish peroxidase 100 μL씩 가한 다음, 25℃에서 30분 반응시킨 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 여기에 발색기질용액(3,3',5,5'- tetramethyl benzidine)을 100 μL 첨가하여 25℃에서 30분간 발색반응을 시킨 후 1.0 N sulfuric acid를 100 μL씩 가해 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader (Molecular device, USA)로 450nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준 곡선에서 IL-1α 함량을 계산하였다.

### 6. Tumor necrosis factor 분비능

Microtiter plate(Mouse TNF-α ELISA, Comabiotech)에 표준 TNF-α 또는 배양한 시료액 및 biotinylated anti-mTNF를 50 μL씩 well에 주입하고, 25℃에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 5회 세척하고, HRP-conjugated anti-mTNF를 100 μL씩 넣어 25℃에서 30분 배양한 다음 세척용 완충액으로 5회 세척하였다. 여기에 기질(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine)을 100 μL 첨가하여 25℃에서 30분간 발색반응을 시킨 후 1.0 N sulfuric acid를 100 μL씩 가해 반응을 정지시킨 다음, ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준 곡선에서 TNF-α 함량을 계산하였다.

### 7. 젖산균의 생장

*L. fermentum* 450 균주의 생장은 생균수, pH를 측정하여 시험하였다. 생균수는 10% 탈지분유 150 mL에 젖산균을 50 μL ($9.6\times10^5$ CFU/mL)를 접종한 후, 34, 37, 40℃에서 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone 용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후, 35℃에서 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 *L. fermentum* 450 균주를 접종하고, 30℃에서 18시간 배양한 후 0.1% peptone 용액에 적정농도로 희석하였다. 각 항생제가 각 농도 별로 포함된 tryptic soy 액체배지에 $10^5$~$10^6$ CFU/mL 수준으로 접종하고, 30℃에서 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 생장 여부를 결정하였다. 항생제 내성 측정은 2배 희석방법을 사용하였으며, 억제된 가장 낮은 농도를 MIC(Minimal inhibitory concentration) 값으로 결정하였다. 항생제는 Sigma(USA)로부터 구매하여 사용하였다. 항생제는 amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, penicillin-G, methicillin, oxacillin, ampicillin, bacitracin, rifampicin, novobiocin, lincomycin, polymyxin B 및 cloramphenicol을 시험에 사용하였다.

### 9. 효소활성 시험

MRS 액체배지에서 30℃, 18시간 동안 배양한 *L. fermentum* 450 균주를 생리식염수로 희석하여 $10^5$~$10^6$ CFU/mL 수준의 시료를 조제한 후, API ZYM kit(API bioMerieux, Lyon, France)를 이용하여 30℃에서 5시간 배양한 다음 효소반응시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0~5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의 alkaline phosphatase, eterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, β-glucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, α-mannosidase, β-fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

### 10. 내담즙성 실험

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 따라 MRS 액체배지에서 37℃, 18시간 배양된 *L. fermentum* 450 균주를 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 배지와 대조구로서 oxgall을 첨가하지 않은 배지에 MRS 배지에 각각 1% 접종하였다. 37℃의 incubator에서 7시간까지 혐기 배양하면서 시간별로 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳인 후 37℃에서 48시간 혐기 배양한 다음 계수하였다.

### 11. pH 내성

Clark 등(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 1, 2, 3용액과 대조구로써 pH 6.4 용액을 제조하였고, 제조된 pH 용액 10 mL에 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에서 37℃, 24시간 배양된 *L. fermentum* 450 균주를 1 mL씩 섞은 후, 37℃에서 혐기 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 37℃에서 48시간 혐기 배양한 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, *Staphyloccous aureus*는 nutriunt 액체배지에서 호기적으로 37℃, 24시간 배양하였다. 혼합배양 및 대조군에 사용된 배지는 MRS 액체배지로써 젖산균과 지시균을 각각 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 선택배지로써 *Escherichia coli*은 EMB agar, *Salmonella* Typhimurium은 Bismuth sulfite agar, *Staphyloccous aureus*는 Baird parker agar를 사용하여 37℃에서 6시간 배양하였다. 젖산균에 의한 지시균의 억제율은 다음의 식으로 구하였다.

Inhibition (%) = (대조군의 균수 CFU/mL－혼합배양 후의 균수 CFU/mL)/대조군의 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 통계처리하였고, Duncan's multiple range tests를 사용하여 유의성 5% 수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 젖산균 분리

각 지역의 원유를 채취한 후, Modified MRS 배지를 사용하여 노란색 집락을 형성하는 1,054개의 단일 균주를 분리하였고, 산 생성 능력을 보기 위해 10% 탈지분유에 분리균주를 접종한 후, 37℃에서 18시간 및 24시간 배양하여 응고된 균주를 선발한 결과, 598개의 균주가 선발되었다.

### 2. 면역증진 균주의 선발

젖산균은 면역계에 관여하는 세포에서 분비되는 단백질인 사이토카인(cytokine)을 분비하여 하는 것으로 알려져 있고, 대식세포를 활성화 시켜서 NO 생성과 사이토카인의 한 종류인 TNF-α의 생성을 촉진하는 것으로 나타났다(Park 등, 2007). 또한 IL-1α는 면역반응, 염증, 생체 방어기전 등의 조절에 관련되어 있다. 분리된 젖산균을 대상으로 10% 탈지분유에서 37℃에서 24시간 배양하여 응고된 균주만 선택하여 면역활성을 측정한 결과, *L. fermentum* 450 균주의 IL-1α, TNF-α, NO 값이 각각 2,500 pg 이상/mL, 2,000 pg 이상/mL, 11.55±2.95 μM으로 나타났다(Table 1). Cho 등(2010)에 따르면 상업균주인 *L. fermentum* ATCC 14931($10^8$ CFU/mL)의 IL-1α, TNF-α, NO 값이 각각 445.21±19.87 ρg/mL, 2,219.42±81.57 ρg/mL, 6.52±1.42 μM로 나타남에 따라, 본 연구에서 분리된 *L. fermentum* 450 균주의 IL-1α, NO 값이 상업균주에 비해 분비능이 높은 것으로 나타났다.

### 3. 선발 균주의 동정 및 DNA sequence

*L. fermentum* 450 균주의 genus와 species를 결정하기 위하여 생리적, 생화학적 시험을 하였다. *L. fermentum* 450 균주는 Gram 양성을 나타내었고, 현미경으로 관찰 시 Rod 형태의 hetero 균이며, 산소 유무와 상관없이 잘 생장하였고, catalase와 운동성은 음성으로 나타났다. 45℃에서는 생장하나, 15℃에서는 생장하지 않았으며, glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니아를 생성하지 않아 genus *Lactobacillus*에 속하였다. Species를 정하기 위하여 API 50CHL kit(BioMereux, France)를 이용하여 49종의 당 발효 시험을 실시한 결과(Table 2), *L. fermentum* 450 균주는 D-ribose 등 13종으로부터 산을 생성하였다. 그 결과를 ATB identification system에 입력한 결과, *Lactobacillus fermentum*으로 판명되었으며, 16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열분석하였다. 분석된 염기 서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과, *Lactobacillus fermentum*(I.D. 99%)으로 동정되었고, *Lactobacillus fermentum* 450으로 명명하였다.

Table 2. Physiological characteristics of *Lactobacillus fermentum* 450

| | |
|---|---|
| Gram reaction | + |
| Cell type | Rod |
| Spore forming | − |
| Motility | − |
| Aerobic growth | + |
| Anaerobic growth | + |
| Catalase reaction | − |
| Growth at 15℃ | − |
| Growth at 45℃ | + |
| Gas forming from glucose | − |
| Ammonia production from alginin | − |

Table 1. Effect of *Lactobacillus fermentum* 450 on the production of IL-1α, TNF and NO in Raw 264.7 cells

| Strains | Dose(CFU/mL) | IL-1α(ρg/mL) | TNF(ρg/mL) | NO(μM) |
|---|---|---|---|---|
| *L. fermentum* 450 | $10^6$ (1,000 μg/mL) | >2,500 | >2,000 | 11.55 |

Table 2. Continued

| | | | |
|---|---|---|---|
| Acid production from | | | |
| Glycerol | − | Salicin | − |
| Erythritol | − | D-Celibiose | − |
| D-Arabinose | − | D-Maltose | + |
| L-Arabinose | − | D-Lactose | + |
| D-Ribose | + | D-Melibiose | + |
| D-Xylose | − | D-Saccharose | + |
| L-Xylose | − | D-Trehalose | + |
| D-Adonitol | − | Inulin | − |
| Methyl-βD-Xylopyranoside | − | D-Melezitose | − |
| D-Galactose | + | D-Raffinose | + |
| D-Gluose | + | Amidon(starch) | − |
| D-Fructose | + | Glycogen | − |
| D-Mannose | + | Xylitol | − |
| L-Sorbose | − | Gentiobiose | − |
| L-Rhamnose | − | D-Turanose | − |
| Dulcitol | − | D-Lyxose | − |
| Inositol | − | D-Tagatose | − |
| D-Mannitol | + | D-Fucose | − |
| D-Sorbitol | − | L-Fucose | − |
| Methyl-αD-Mannopyranoside | − | D-Arabitol | − |
| Methyl-αD-Glucopyranoside | − | L-Arabitol | − |
| N-Acetylglucosamine | − | Potassium Gluconate | + |
| Amygdalin | − | Potassium 2-KetoGluconate | − |
| Arbutin | − | Potassium 5-KetoGluconate | − |
| Esculin ferric citrate | − | | |

### 4. *Lactobacillus fermentum* 450의 생장

Fig. 1에서 보는 바와 같이 *L. fermentum* 450의 최적 생장 온도를 알기 위하여 MRS broth 150 mL에 젖산균 배양액을 10 μL 접종한 후 34℃, 37℃, 40℃ 별로 3시간 간격으로 24시간까지 배양 시험한 결과, *L. fermentum* 450 균주는 대수기까지 6시간이 소요되었고, 37℃, 40℃에서 거의 비슷하게 성장하였으나, 40℃가 약간 빠른 생장률을 보였다. Fig. 2는 24시간까지의 pH 변화를 나타낸 것으로, pH 역시 37℃, 40℃에서 차이가 거의 없었으며, 40℃가 가장 빠른 산 생성을 보임에 따라 40℃가 최적온도로 나타났다. Lim 등(2011)이 원유로부터 분리한 *Lactobacillus fermentum* LC272 균주가 34, 37, 40℃의 범위에서 3시간 간격으로 24시간 배양 확인 결과, 대수기까지 6시간이 소요되고, 37℃, 40℃에서 거의 비슷하게 성장한 결과와 일치하였으며, pH 역시 40℃가 가장 빠른 산 생성을 보이는 결과와 일치하였다.

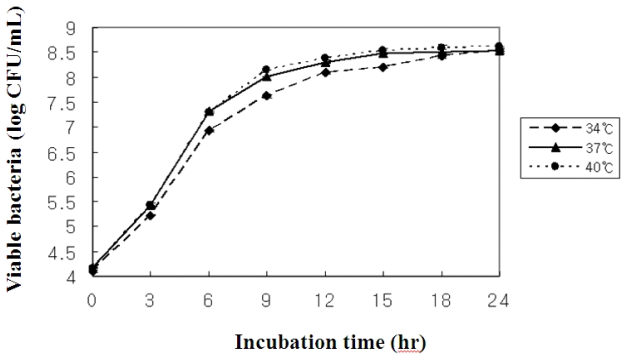


Fig. 1. Growth of *Lactobacillus fermentum* 450 in 10% reconstituted skim milk at various temperature.

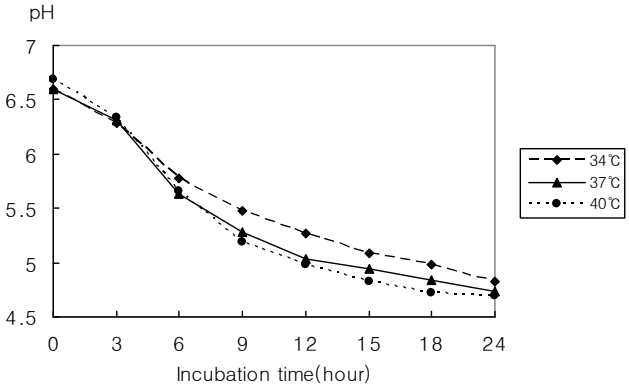


Fig. 2. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactobacillus fermentum* 450 at various temperatures.

### 5. *Lactobacillus fermentum* 450의 항생제 내성

항생제가 들어있는 물질이나 항생제를 섭취한 상황에서 젖산균의 항생제에 대한 내성은 probiotics로서 필수적인 요인이다(Havinaar *et al*., 1992). 따라서 시중에서 이용되고 있는 총 16가지의 항생제에 대해 *L. fermentum* 450 균주가 내성이 있는지를 Table 3에 나타내었다. 그 결과, kanamycin에 대한 항생제 내성의 MIC 농도가 3,200 μg/mL로서 가장 내성이 높았고, neomycin, polymyxin B 순이었다. 반면, novobiocin에 대한 MIC 농도는 2.5 μg/mL로서 가장 감수성이 높았고, gentamycin, lincomycin, chloramphenicol 등도 감수성이 높은 것으로 나타났다. Mathur와 Singh(2005)는 균주의 항생제 내성은 균주마다 다양하게 나타난다고 하였으며, Zoumpopoulou 등(2008)은 카레리 치즈로부터 분리한 *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179가 8가지의 항생제 중 streptomycin, teichoplanin, vancomycin에 대해 강한 내성을 보였다고 하였다. 또한 Lim 등(2011)은 원유로부터 분리한 *Lactobacillus fermentum* LC272 균주는 16가지의 항생제에 대해 내성을 확인한 결과, rifampicin

Table 3. Antibiotics susceptibility of *Lactobacillus fermentum* 450

| Antimicrobal agents | | Minimal inhibitory concentrations(μg/mL) |
|---|---|---|
| Aminoglycosides | Amikacin | 160±0 |
| | Gentamycin | 10±0 |
| | Kanamycin | 3,200±0 |
| | Neomycin | 1,600±0 |
| | Streptomycin* | 200±0 |
| β-Lactams | Penicillin-G* | 10±0 |
| | Methicillin | 20±0 |
| | Oxacillin | 8±0 |
| | Ampicillin | 640±0 |
| Gram-positive spectrum | Bacitracin* | 50±0 |
| | Rifampicin | 7.5±0 |
| | Novobiocin | 2.5±0 |
| | Lincomycin | 10±0 |
| Gram-negative spectrum | Polymyxin B* | 1,200±0 |
| Broad spectrum | Chloramphenicol | 20±0 |
| | Vancomycin* | 6.25±0 |

All values are the mean±standard deviation of three replicates.
*: Units/mL

과 penicillin-G가 14가지의 항생제에 비해 감수성이 가장 높은 것으로 나타난 반면, streptomycin에 대한 내성이 가장 높은 것으로 나타났다고 하였다.

### 6. *Lactobacillus fermentum* 450의 효소활성

효소활성 또한 probiotics로 이용하기 전에 고려되어야 하는 주요 요소 중 하나이다. Probiotics는 우선 β-glucuronidase를 생성하지 않아야 하는데, 이는 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소이기 때문이다(Borriello *et al*., 2003). *L. fermentum* 450의 효소 활성 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. Leucine arylamidase에 대해 효소활성이 5이었고, acid phosphatase는 효소활성이 4를 나타내었다. 또한 naphtol-AS-BI-phosphohydrolase가 3을 나타내 효소활성이 다른 효소들에 비해 높게 나타났으나, 전반적으로 효소활성이 높지 않은 것으로 나타났다. Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β-glucuronidase의 경우에는 효소활성이 0으로 효소활성이 없는 것으로 나타나, 안전성을 확인할 수 있었다. Sanni 등(2002)의 연구에서도 나이지리아 전통발효음료인 쿠눈자키(kununzakki)로부터 분리한 *L. fermentum* K9의 효소활성 결과, leucine arylamidase, naphtol-AS-BI-phosphohydrolase의 활성이 높게 나타났고, β-glucuronidase는 효소활성이 없는 것으로 나타나, 본 연구의 결과와 유사하였다.

Table 4. Enzyme patterns of *Lactobacillus fermentum* 450

| Enzyme | *L. fermentum* 450 |
|---|---|
| Alkaline phosphatase | 0 |
| Esterase(C4) | 0 |
| Esterase lipase(C8) | 1 |
| Lipase(C14) | 1 |
| Leucine arylamidase | 5 |
| Valine arylamidase | 0 |
| Cystinearylamidase | 0 |
| Trypsin | 0 |
| α-Chymotrypsin | 0 |
| Acid phosphatase | 4 |
| Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase | 3 |
| α-Galactosidase | 1 |
| β-Galactosidase | 1 |
| β-Glucuronidase | 0 |
| α-Glucosidase | 1 |
| β-Glucosidase | 0 |
| N-Acetyl-β-glucosaminidase | 0 |
| α-Mannosidase | 0 |
| α-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.

### 7. *Lactobacillus fermentum* 450의 내담즙성

담즙산은 십이지장에서 분비되는 물질로 세균의 세포막을 파괴하여 성장을 억제하기 때문에 probiotics로의 기능을 하기 위해서는 담즙에 대한 내성을 지니고 있어야 한다(Gilliand and Speck, 1977; Saarela *et al*., 2000). *L. fermentum* 450 균주의 담즙 내성 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 7시간 동안 배양 후 생균수를 비교해 보았을 때, 0.3% oxgall을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우 약간의 차이는 있었지만, 비슷하게 성장하는 추세를 보였다. 생균수는 $2.1\times10^9$ CFU/mL, 0.3% oxgall을 첨가하였을 때의 생균수는 $1.2\times10^9$ CFU/mL로 약간 억제를 받기는 하였으나, 담즙 내성이 있는 것으로 나타났다. Cho 등(2000)은 닭의 맹장에서 분리한 *L. fermentum* YL-3 균주를 12시간 배양하는 동안 생균수를 비교해 보았을 때 0.3% oxgall을 첨가한 경우, 첨가하지 않은 경우에 비해 느린 성장을 보

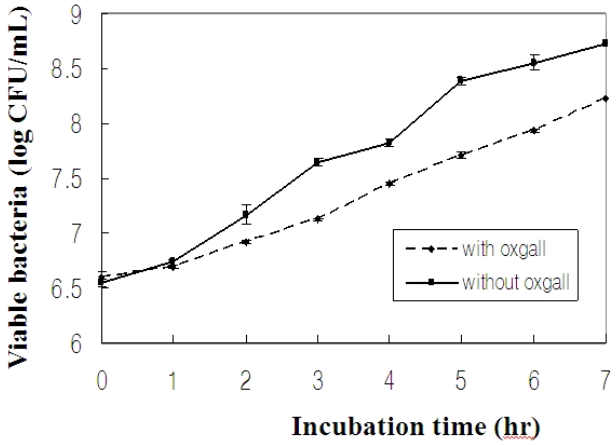


Fig. 3. Growth of *Lactobacillus fermentum* 450 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.

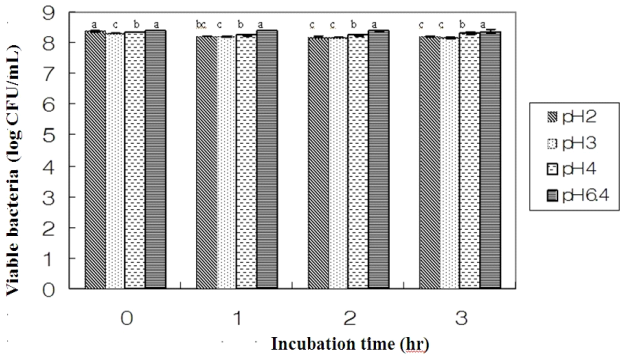


Fig. 4. Survival of *Lactobacillus fermentum* 450 after three hours in HCl solution (pH 2.0, 3.0, 4.0 and 6.4). [a,b] Means values with different superscript within same time are significantly different ($p$<0.05). * Initial log count before pH treatment : 8.40

였으나, 계속적인 성장을 이루었다고 하였다. 또한 Lin 등(2007)은 돼지 장내에서 분리한 *L. fermentum* SG2 균주를 4시간 동안 배양 후, 0.3% oxgall을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우의 생균수를 비교해 보았을 때 담즙산에서 100% 생존률을 보임으로써 담즙산에 대한 영향을 받지 않는 것으로 나타났다고 하였다.

### 8. *Lactobacillus fermentum* 450의 pH 내성

위액의 pH는 금식의 경우 pH 0.78~0.90이지만, 음식을 섭취하였을 경우 위의 pH가 2.0~3.0까지 올라가며, 음식물이 위를 통과하는 시간은 2~4시간이다(Jacobsen *et al*., 1999; Lee *et al*., 2004). Probiotics로서의 효과를 나타내기 위해서는 pH 3 이하에서 생존하여 위를 거쳐 소장 내로 도달하여야 한다(Booth, 1985; Mcdonald *et al*., 1990). 산에 대한 *L. fermentum* 450의 내성 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 대조구인 pH 6.4에서의 균수와 비교한 결과, *L. fermentum* 450 균주는 pH 2에서 0시간일 때 $2.4\times10^8$ CFU/mL이던 것이 1시간 경과 후 $1.7\times10^8$ CFU/mL, 2시간 경과 후 $1.6\times10^8$ CFU/mL, 3시간 경과 후 $1.6\times10^8$ CFU/mL로서 젖산균 수가 33% 감소하는 것으로 나타났다. pH 3에서 0시간일 때 $2.0\times10^8$ CFU/mL이던 것이 1시간 경과 후 $1.6\times10^8$ CFU/mL, 2시간 경과 후 $1.5\times10^8$ CFU/mL, 3시간 경과 후 $1.5\times10^8$ CFU/mL로서 젖산균 수가 25% 감소하는 것으로 나타났으나, pH 4와 6.4는 각각 9%와 8%의 감소를 보임에 따라 거의 변화가 없었다. Zoumpopoulou 등(2007)에 따르면 *L. fermentum* ACA-DC 179 균주가 pH 2.5에서 3시간에도 살아있다고 하였으며, Strompfova 등(2006)은 전통 발효식품에서 분리한 *L. fermentum* AD1이 pH 3에서 1시간 이후에는 99.9%, 2시간 이후에는 94.7%, 3시간 이후에는 86.8%의 생존률을 보였다고 하였다. 또한 Park 등(2013)은 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* K74 균주가 pH 2에서 3시간 이후에는 38.5% 감소하는 것으로 나타났다고 하였다.

### 9. *Lactobacillus fermentum* 450의 항균력

*L. fermentum* 450이 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 5와 같다. *L. fermentum* 450 균주는 *Salmonella* Typhimurium에 대해 63.86%로서 비교적 높은 항균력을 보인 반면, *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 항균력이 없었다. 배양 후 pH

Table 5. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus fermentum* 450 in MRS broth

| Pathogens | Pathogens[a] | | *L. fermentum* 450[a]+ Pathogens | | Inhibition (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| | CFU/mL | pH | CFU/mL | pH | |
| *Escherichia coli* | $9.8\times10^7$ | 6.41 | $1.6\times10^8$ | 5.46 | - |
| *Salmonella* Typhimurium | $8.3\times10^6$ | 6.40 | $3.0\times10^6$ | 5.43 | 63.86 |
| *Staphyloccous aureus* | $9.2\times10^7$ | 6.49 | $9.0\times10^7$ | 5.42 | 2.17 |

* Initial count of *L. fermentum* 450: $5.0\times10^6$ CFU/mL
[a] Determined after 6 h of incubation at 37℃

의 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH 6.40~6.49이며, 혼합배양액은 pH 5.42~5.46으로 혼합배양과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 약간은 있었지만, 크게 좌우하지는 않은 것으로 사료되었다. 균주의 항균력은 같은 종의 균주라 하더라도 병원균의 종류에 따라 젖산균에 의한 생장 억제 정도가 다르다는 것을 보여준다(Jacobsen *et al*., 1999; Larsen *et al*., 1993). Bao 등(2010)의 연구에 따르면 *L. fermentum* IMAU60145 균주는 오직 *Staphylococcus aureus*에 대해 항균력을 나타내었다. Lim 등(2011)의 연구에 따르면 *L. fermentum* LC272 균주는 *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 82.9%, 86.3%의 항균력을 보인 반면, *Escherichia coli*에 대한 항균력은 없었다. 젖산균은 젖산균이 생산하는 대사산물(유기산, 과산화수소 등)과 pH 저하, 산화 환원 전위의 감소, 박테리오신, 루테린, 로테린사이클린과 같은 항생물질의 생산, 영양원의 소비, 장내 상피세포의 부착장소 경쟁, 항균활성물질 분비 등을 통해 항균효과가 나타난다고 알려져 있다(Havinnar *et al*., 1992; Parente and Ricciardi, 1999; Reid and Burton, 2002; Makras *et al*., 2006). *L. fermentum* 450에 의한 *Salmonella* Typhimurium의 생육 억제는 젖산균이 생산하는 대사산물과 여러 억제 요소들이 복합적으로 작용하여 기안하는 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 원유로부터 면역증진 젖산균을 분리 및 동정하고, 이 균주의 생리적 특성을 규명하여 상업적으로의 이용가능성을 검토하고자 실시하였다. 이를 위해 Modified MRS 분별배지를 사용하여 노란색 집락을 형성하는 균주를 대상으로 면역활성이 높은 균주를 선발한 결과, D205 균주가 최종 선발되었다. D205 균주는 IL-1α, TNF-α, NO 값이 각각 2,500 pg 이상/mL, 2,000 pg 이상/mL, 11.55±2.95 μM로 나타났으며, 동정결과 *Lactobacillus fermentum*으로 판명되었고, *Lactobacillus fermentum* 450으로 명명하였다. *Lactobacillus fermentum* 450의 최적 생장 온도는 40℃이었으며, 담즙산과 산성의 pH에서 모두 우수한 생존력을 나타내었다. 효소활성은 leucine arylamidase와 acid phosphatase가 비교적 높게 나타났다. 항생제 내성 실험 결과, kanamycin, neomycin, polymyxin B에 내성이 있는 반면 novobiocin에 감수성을 나타냈으며, *Salmonella* Typhimurium에 대해 63.86%의 억제 효과를 지니고 있으나, *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*에 대해서는 항균력이 거의 없는 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원 농림기술개발사업(No. 107074-3)의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Arunachalam, K., Gill, H. S. and Chandra, R. K. 2000. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). Eur. J. Clin. Nutr. 54: 263-267.
2. Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y. and Zhang, H. 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. Food Control 21(5):695-701.
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. Cho, M. K., Kim, K., Kim, C. H. and Kim, K. Y. 2000. Isolation and characterization of *Lactobacillus fermentum* YL-3 as a poultry probiotics. Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol. 28(5):279-284.
6. Cho, S. A., Kim, K. S., Do, J. R., Kim, S. H. and Lim, S. D. 2010. Physiological characteristics and immunomodulating activity of *Streptococcus macedonicus* LC743 isolated from raw milk. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 30(6):957-965.
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. Gill, H. S. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. Best Prac. Res. CI. EM. 17(5): 755-773.
9. Gilliand, S. E. and Speck, M. L. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. Appl. Environ. Micobiol. 33:15-18.
10. 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.
11. 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.

12. Hammes, W. P., Weiss, N. and Holzapfel, W. 1992. The genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. pages 1563-1578 in The Prokaryotes. 2nd, Springer-Verlag, New York. USA.
13. Havinaar, R., Brink, B. T. and Veid, J. H. J. I. 1992. Selection of strains for probiotic use. In Probiotics. Springer Netherlands. pp 209-224.
14. Hirose, Y., Murosaki, S., Yamamoto, Y., Yoshikai, Y. and Tsuru, T. 2006. Daily intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 augments acquired immunity in healthy adults. J. Nutr. 36(12):3069-3073.
15. 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.
16. Kim, C. 2009. Immunomodulatory effects of lactic acid bacteria and bioactive peptides derived from milk. Korean J. Dairy Sci. Tecnol. 27(1):37-43.
17. Kim, S. Y., Shin, K. S., and Lee, H. 2004. Immunopotentiating activities of cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB-1. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33(9):1552-1559.
18. 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.
19. Lee, N. K., Kim, T. H., Choi, S. Y. and Park, H. D. 2004. Identification and probiotic properties of *Lactobacillus lactis* NK24 isolation from *jetgal*, a Korean fermented food. Food Sci. Biotechnol. 13:417-420.
20. 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.
21. Lin, W. H., Yu, B., Jang, S. H. and Tsen, H. Y. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. Anaerobe 13(3):107-113.
22. Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Serivin, A. and De Vuyst, L. 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Res. Microbiol. 157(3):241-247.
23. Marin, M. L., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunol, Z. and Pestka, J. J. 1997. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. J. Dairy Sci. 80:2713-2720.
24. Mathur, S. and Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria－a review. Int. J. Food Microbiol. 105(3):281-295.
25. Mcdonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei*. Appl. Environ. Microbial. 53:2124-2128.
26. Parente, E. and Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52(5): 628-638.
27. Park, S. H., Kim, Y. A., Lee, D. K., Lee, S., Chung, M. J., Kang, B. Y., Kim, K. and Ha, N. J. 2007. Antibacterial activity and macrophage activation of lactic acid bacteria. J. Environ. Toxicol. 22(4):287-297.
28. Park, S. Y., Shim, H. Y., Kim, K. S. and Lim, S. D. 2013. Physiological characteristics and GABA production of *Lactobacillus plantarum* K74 isolated from kimchi. Korean J. Dairy Sci. Technol. 31(2):143-152.
29. Perdigon, G., de Macias, M. E. N., Alvarez, S., Medici, M., Oliver, G., de Ruiz, H. and Pesce, A. 1986a. Effect of a Mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice. J. Food Prot. 49(12):986-993.
30. Perdigon, G., de Macias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G., and de Ruiz Holgado, A. A. 1986b. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. Infect. Immunity 53(2):404-410.
31. Reid, G. and Burton, J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes Infect. 4(3):319-324.
32. 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.
33. Sanders, M. E. 1999. Probiotics. Food Technol. 53(11):67-77.
34. Sanni, A. I., Morlon-Guyot, J. and Guyot, J. P. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. Int. J. Food Microbiol. 72(1):53-62.
35. Seo, J. H. and Lee, H. 2007. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential pro-

biotics. Korean J. Food Sci. Technol. 39(6):681-687.

36. Strompfová, V., Marciňáková, M., Simonová, M., Bogovič-Matijašić, B. and Lauková, A. 2006. Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. Anaerobe 12(2):75-79.
37. Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. Int. J. Food Microbiol. 121(1):18-26.

Received 27 April, 2015
Revised 12 May, 2015
Accepted 17 May, 2015