

ORIGINAL ARTICLE

항고혈압 활성을 가진 식물유래 젖산균의 생균제 특성

이예람 · 손용준 · 박수연 · 장은영 · 유지연 · 손흥주*

부산대학교 생명환경화학학과 및 생명산업융합연구원

Probiotic Potential of Plant-Derived Lactic Acid Bacteria with Antihypertensive Activity

Ye-Ram Lee, Young-Jun Son, Soo-Yun Park, Eun-Young Jang, Ji-Yeon Yoo,
Hong-Joo Son*

Department of Life Science and Environmental Biochemistry/Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are industrially important microorganisms for probiotics. The recent widespread application of LAB for preparation of functional food is attributable to the accumulating scientific evidence showing their beneficial effects on human health. In this study, we isolated and characterized plant-derived LAB that show angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant activities. The selected strain K2 was isolated from Kimchi, and identified as *Lactobacillus plantarum* by 16S rRNA gene analysis. The strain grew under static and shaking culture systems. They were also able to grow in different culture conditions like 25°C~37°C temperature, 4~10 pH range and ~6% NaCl concentration. *L. plantarum* K2 was highly resistant to acid stress; survival rate of the strain at pH 2.5 and 3 were 80% and 91.6%, respectively. The strain K2 also showed high bile resistance to 0.3% bile bovine and 0.3% bile extract with more than 74% of survival rate. The cell grown on MRS agar plate containing bile extract formed opaque precipitate zones around the colonies, indicating they have bile salt hydrolase activity. The strain showed an inhibitory activity against pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*; antibacterial activity was probably due to the lactic acid. The K2 strain showed relatively higher autoaggregation values, antihypertensive and antioxidant activities. These results suggest that *L. plantarum* K2 could be not only applied as a pharmabiotic for human health but also is also starter culture applicable to fermentative products.

Key words : Antihypertensive activity, Antioxidant, Lactic acid bacteria, Probiotics

1. 서론

생균제(Probiotics)는 사람이나 동물이 섭취했을 때 위장관에 머물러 생존할 수 있는 살아있는 미생물로서,

특정 병리적 상태의 예방이나 치료 효과를 줄 수 있는 유익한 미생물을 말한다(Saarela et al., 2000). 병원성 미생물을 억제하기 위해 무해한 미생물을 이용하는 방법은 인간이 발효식품을 섭취하기 시작하면서부터 사용되어

Received 3 March, 2016; Revised 14 March, 2016;

Accepted 14 March, 2016

*Corresponding author : Hong-Joo Son, Department of Life Science and Environmental Biochemistry/Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Phone: +82-55-350-5544

E-mail: shjoo@pusan.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© 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.

왔는데, 1906년 러시아의 생물학자인 Elie Metchnikoff가 'The prolongation of life'라는 논문을 통해 젖산균의 섭취는 장관의 정상적 미생물 균총 형성에 유익한 영향을 주고, 요구르트와 같은 젖산 발효유의 섭취는 사람의 부패를 방지하여 노화를 억제한다고 주장한 이후, 젖산균 및 젖산균 발효식품에 대한 연구는 전 세계적으로 활발하게 진행되고 있다(Ouwehand et al., 2002).

현재 연구되고 있는 대부분의 생균제 미생물은 젖산균(lactic acid bacteria)이다. 젖산균은 발효를 통하여 젖산 및 다양한 대사산물을 생산하는 세균으로서, 오랜 세월동안 산업적으로 이용되어 온 중요한 세균의 하나이다. 젖산균은 장내 이상발효의 개선, 장내 부패세균의 억제, 항암, 항균, 면역증강, 유당 불내증의 완화, 혈중 콜레스테롤 저하 등 다양한 효과가 있는 것으로 보고(Gismondo and Lombardi, 1999)되어 젖산균의 활용에 대한 인식이 재평가되고 있으며, 동시에 기능성 식품의 starter 및 생균제로서의 활용에 대한 연구가 폭넓게 진행되고 있다(Hammes and Hertel, 2002).

젖산균은 요구르트, 치즈 등 유제품 발효에 관여하는 동물성 젖산균과 채소, 과일, 곡물이나 식물발효식품(된장, 간장, 김치 등) 등 식물소재에서 유래하는 식물성 젖산균으로 구분될 수 있다(Cho et al., 2009). 식물성 젖산균은 동물성 젖산균보다 산성 환경에 강하기 때문에 동물성 젖산균보다 더 용이하게 장까지 도달하는 것으로 알려져 있다(Molin, 2001). 지금까지 이들에 대한 연구는 발효 유제품 및 육제품, 사람의 분변에서 분리된 동물성 젖산균들을 대상으로 한 것들이 대부분이며, 식물성 젖산균에 대한 연구는 미진한 실정이다. 최근들어 김치 발효에 관여하는 젖산균에 대한 연구(Chung et al., 2003; Lee and Chang, 2008)가 수행되고 있으나 자연 상태의 식물로부터 젖산균을 분리하고 그 특성을 조사한 연구는 소수에 불과한 실정이다.

한편, 고혈압의 원인은 renin-angiotensin system이 중요한 역할을 하는데, 여기에는 angiotensin-converting enzyme (ACE)이 관여하는 것으로 보고되어 있다(Sun et al., 2009). 인체 내에 존재하는 renin은 angiotensinogen을 angiotensin I으로 분해하고, angiotensin I은 ACE에 의해 강력한 혈관 수축작용이 있는 angiotensin II로 전환된다(Sun et al., 2009). Angiotensin II는 동맥 혈관을 수축하여 혈압을 상승시키고, 부신에서

aldosterone의 분비를 촉진하여 신장의 나트륨 및 수분의 재흡수를 증가시킴으로써 고혈압 발병에 관여한다(Pihlanto et al., 2010). 식품의 생체조절 작용 중 ACE 저해능이 있다는 것이 보고되면서 식품의 ACE 저해물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Quiros et al., 2005). 한편, 산화적 스트레스는 생화학 반응을 통하여 다양한 활성산소 등을 생성하여 인간에게 유해한 증상을 유발한다. 따라서 이러한 스트레스를 소거할 수 있는 항산화 물질의 개발은 매우 중요한 과제이다.

젖산균을 이용한 발효제품의 건강 기능성을 증진시키기 위해서는 인공위액 내성, 담즙내성 및 항균능 등의 기본적인 조건 외에 새로운 기능을 지닌 젖산균을 분리하여 이용하는 것을 생각할 수 있다. 본 연구는 생약한방식물이나 식이 가능한 식물을 젖산 발효시켜 항산화 및 항고혈압 활성이 부여된 식품제조를 최종 목표로 설정되었다. 따라서 먼저 다양한 식물 및 발효식품으로부터 인공위액 내성 및 담즙내성이 있으며, 또한 항산화능과 항고혈압 활성인 ACE 저해능이 있는 식물성 젖산균을 분리 및 동정한 후, 그 생육 특성 및 생균제 특성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 젖산균의 분리 및 동정

다양한 농작물의 뿌리, 열매, 잎 등과 된장, 김치, 채소 절임과 같은 식물유래 발효식품을 젖산균 분리용 시료로 사용하였다. 수집된 시료를 멸균된 생리식염수 9 ml에 1 g을 첨가하여 혼합 후, 계단희석하였다. 희석된 각 시료 100 μ l를 젖산균 선택배지인 MRS 평판배지(0.5% CaCO₃ 함유)에 도말하였다. 37°C에서 48시간 동안 배양한 후, 콜로니 주위에 투명환을 생성하는 균주들을 선정하였고, 이후 상기 배지에서 3번 반복 도말함으로써 순수한 균주를 실험균주로 선정하였다.

선정된 실험균주를 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 16S rRNA 유전자 증폭에 사용된 primers는 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-TACGGYTTTTCCTTGTACGACTT-3') primer이었다. 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정한 후, NCBI GenBank의

데이터베이스를 통하여 유사균주들과 비교하였다. 또한 염기서열을 Clustal X program을 이용하여 정렬한 후, MEGA 4 프로그램을 이용하여 실험균주의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

2.2. 생육 특성 조사

실험균주를 MRS broth에 접종하여 37℃, 24시간 전 배양하였다. 전배양액 2% (v/v)를 본배지에 접종하여 배양하면서 pH (4~10), 온도(10~34℃) 및 NaCl 농도(0~8%)에 따른 균체 생육도를 조사하였다.

2.3. 생균제 특성 조사

실험균주의 인공위액 내성은 Kobayashi et al.(1974)의 방법에 따라 조사하였다. 펩신 0.3%가 첨가된 MRS broth의 pH를 1 N HCl을 이용하여 pH 2~3으로 조정 한 후, 실험균주를 접종하여 37℃에서 1시간 동안 배양 하였다. MRS broth (pH 6.8)를 대조구로 하여 plate count agar법에 의하여 생균수를 측정 한 후, 백분율로 환산한 생존율로서 인공위액 내성을 나타내었다.

실험균주의 담즙 내성은 Kobayasi et al.(1974)의 방법에 따라 조사하였다. 각종 담즙(bile salt, bile extract, bile bovine)이 각각 0.1%~0.5% 첨가된 MRS broth에 실험균주를 접종한 후, 37℃에서 배양하면서 시간 경과에 따른 균체 생육도를 600 nm에서 측정하였다. 담즙 내성은 24시간 배양액을 이용하여 산출하였다. 즉, 담즙이 첨가되지 않은 MRS broth를 대조구로 하여 600 nm에서의 흡광도를 측정 한 후, 백분율로 환산한 생존율로서 담즙 내성을 나타내었다.

실험균주의 bile salt hydrolase (BSH) 활성은 Dashkevicz and Feighner(1989)의 방법에 따라 조사하였다. Bile extract 0.3% 및 sodium taurodeoxycholic acid 0.3%가 각각 첨가된 MRS 평판배지를 조제하였다. 평판배지에 멸균된 원형 여지를 놓은 후, MRS broth에서 37℃, 24시간동안 증식시킨 실험균주 배양액 100 μl을 적하하였다. 37℃에서 48시간 동안 호기 및 혐기배양을 수행한 후, BSH 활성을 조사하였다. 콜로니 주위에 불투명 침전대가 형성(bile extract)되거나 불투명 침전대 형성없이 콜로니가 불투명(sodium taurodeoxycholic acid)하면 BSH 활성이 있는 것으로 판단하였다(Dashkevicz and Feighner, 1989).

실험균주의 병원성 세균에 대한 항균능은 agar-well diffusion법을 이용하여 조사하였다. 각 실험균주를 MRS broth에서 24시간 동안 배양한 후, 10000 g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 상등액의 pH를 조정하지 않은 것과 6.8로 조정 한 것을 시료로 사용하였다. 피검균주인 *Escherichia coli* KCCM 40880, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 및 *Listeria monocytogenes* KCCM 40307을 nutrient agar 평판배지에 도말하고, 직경 0.8 mm의 구멍을 뚫은 후, 시료 200 μl를 분주하였다. 37℃에서 24시간 동안 배양하여 생육 저지대의 직경을 측정하였다.

실험균주의 autoaggregation은 Xu et al.(2009)의 방법에 따라 조사하였다. 실험균주를 MRS broth에 접종하여 37℃, 24시간 배양한 후, 10000 g에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였다. Phosphate-buffered saline (PBS)을 이용하여 A₆₀₀ = 0.5±0.02가 되도록 희석한 후, 희석액 2 ml을 각각 두 시험관에 취하고 첫 번째 시험관의 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다(A₀). 두 번째 시험관은 37℃, 2시간 동안 배양한 후, 상층액 1 ml을 취해 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다(A₁). 실험균주의 autoaggregation은 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Autoaggregation (\%)} = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

실험균주의 hydrophobicity는 microbial adhesion to hydrocarbon (MATH) 방법을 이용하여 조사하였다 (Xu et al., 2009). 실험균주를 MRS broth에 접종하여 37℃, 24시간 배양한 후, 10000 g에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 PBS로 세척한 후, A₆₀₀ = 0.5±0.02로 조정하였다(A₀). 무극성 용매인 xylene 및 toluene을 각각 3 ml씩 1 ml의 세포현탁액에 분주한 후, 진탕하였다. 실온에서 1시간 동안 방치한 후, 수용액을 회수하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다(A₁). 또한 실험균주의 세포 표면 특성을 파악하기 위하여 산성용매인 chloroform와 알칼리성 용매인 ethylacetate에 대한 부착능을 상기와 같은 방법으로 조사하였다. 실험균주의 hydrophobicity는 다음 식에 의하여

산출하였다.

$$\text{Hydrophobicity (\%)} = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

2.4. 항고혈압 및 항산화 활성 조사

실험균주의 항고혈압 활성은 ACE 저해능을 조사하여 평가하였다(Chung and Chushman, 1971). 먼저 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3)에 ACE 100 μl , ACE의 기질인 12.5 mM Hip-His-Leu 용액 100 μl , 시료 50 μl 를 혼합하여 37 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 여기에 ethylacetate를 첨가하여 반응산물을 추출한 후, 원심분축기를 이용하여 완전히 건조시켰다. 건조물에 증류수를 첨가하여 229 nm에서 흡광도를 측정하였으며, ACE 저해능은 다음 식에 의하여 산출하였다. 대조구로 captopril (0.1 mg/ml)을 이용하였다.

$$\begin{aligned} \text{ACE inhibitory activity (\%)} = & \\ & \frac{(\text{Control} - \text{Control blank}) - (\text{Sample} - \text{Sample blank})}{(\text{Control} - \text{Control blank})} \\ & \times 100 \end{aligned} \quad (3)$$

실험균주의 항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능을 조사하여 평가하였다(Lu and Foo, 2000). 시료 1 ml와 200 μM DPPH 1 ml를 혼합하여

37 °C에서 30분 동안 반응시킨 후, 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음 식에 의하여 산출하였다. 대조구로 ascorbic acid (0.1 mg/ml)를 이용하였다.

$$\begin{aligned} \text{DPPH radical scavenging activity (\%)} & \\ = & \frac{(\text{Control} - \text{Sample})}{\text{Sample}} \times 100 \end{aligned} \quad (4)$$

다른 언급이 없는 한, 모든 실험은 삼반복 수행하였으며, 결과는 평균값으로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 실험균주의 분리 및 동정

다양한 식물성 시료로부터 CaCO_3 가 첨가된 MRS 평판배지에서 투명환을 생성하는 256 균주를 순수분리하였다. 분리균주들의 colony 형태, 색깔 및 투명환의 크기에 따라 74 균주를 선정하였다. 이중 pH 2.5에서 내산성이 가장 큰 K2 균주를 실험균주로 선정하였다. K2 균주는 김치에서 분리되었으며, 운동성이 없는 단간균의 그람양성 세균으로서 catalase를 생성하지 못했으나 proteolysis 및 glucose로부터 산 생성반응에는 양성을 나타내었다. 또한 호기 및 혐기조건에서 모두 생육할 수 있었으며, lactose로부터 가스를 생성하지 않아 동형젖

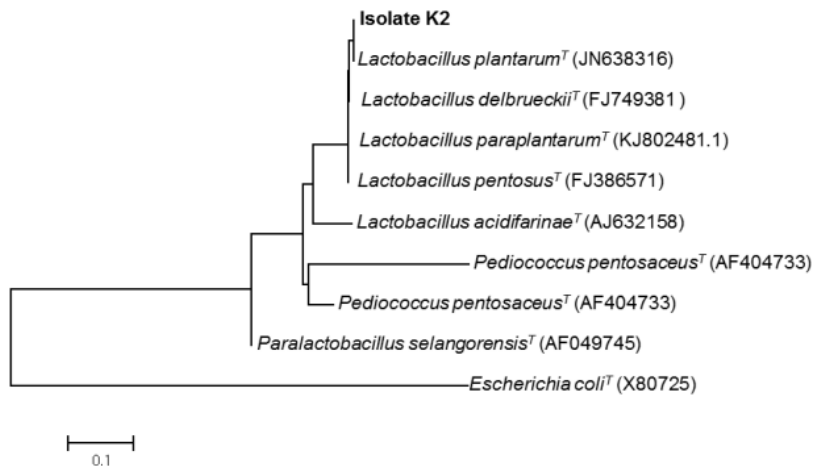


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the positions of isolate K2 and type strains of some lactic acid bacteria.

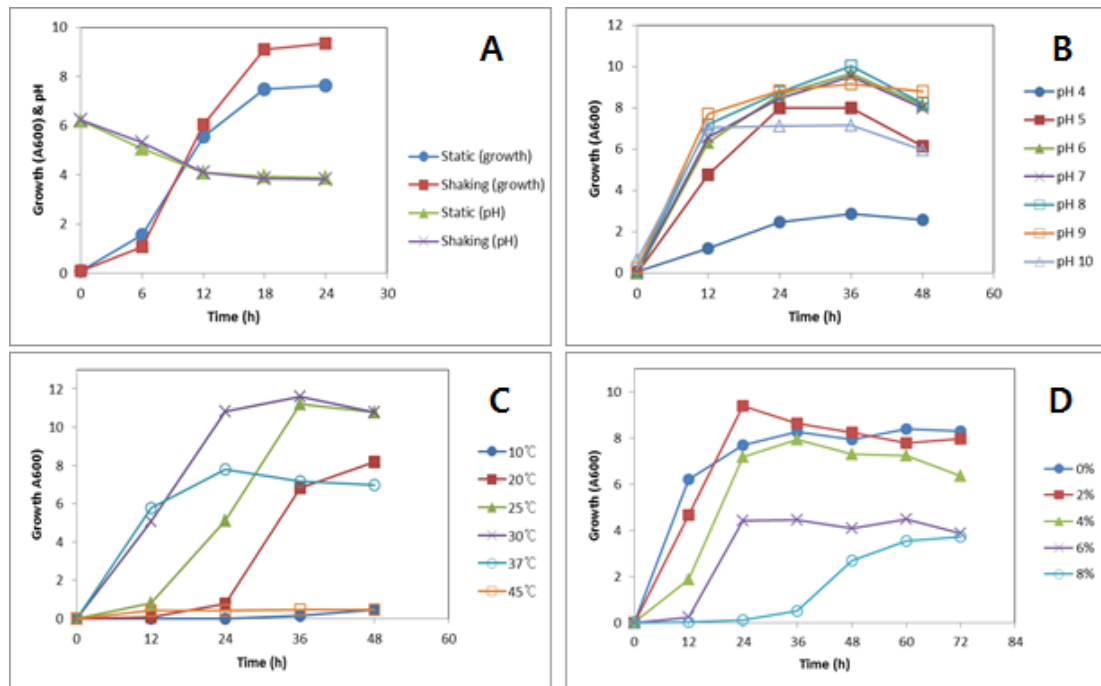


Fig. 2. Effect of culture mode (A), initial pH (B), temperature (C) and NaCl concentration (D) on cell growth of *Lactobacillus plantarum* K2.

산발효를 수행하는 것으로 추정되었다. K2 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 NCBI GenBank에 등록된 각 표준균주와 비교한 결과, *Lactobacillus plantarum*과 98%의 상동성을 가지고 있었다. 그리고 16S rRNA 유전자의 구조에 근거하여 기존 젖산균과의 분자계통학적 유연관계를 파악하기 위하여 계통수를 작성한 결과, 본 균주는 *L. plantarum*을 포함하는 계통학적 그룹에 속함을 알 수 있었다(Fig. 1). *L. plantarum*은 전통적으로 식물질의 젖산 발효에 있어 가장 중요한 젖산균이다(Salminen et al., 2004). 즉, 양배추, 오이 등의 절임에 이용되기도 하며, 가축용 silage 등의 젖산발효를 주도하는 것으로 알려져 있다. 또한 다른 젖산균들보다 넓은 영양적 다양성을 가지고 있으며, 생존율과 적응력이 높은 것으로 보고되어 있다.

3.2. 실험균주의 생육 특성

실험균주의 분류학적 특성에 따라 정치배양 및 진탕 배양을 통하여 균체 생육도 및 pH 변화를 조사하였다.

두 배양조건에서 18-24시간 경에 정지기에 돌입하였으며, 균체 생육 증가에 따라 배양액의 pH는 산성으로 변화되어 최종 pH 3.7~3.8을 나타내었다(Fig. 2A). 젖산균의 일반적인 특성과 달리 실험균주는 진탕배양에서 균체생육이 더 좋았다.

실험균주는 pH 4에서 균체 생육이 가장 저조하였으며, pH 6~7 범위에서 균체 생육이 가장 우수하였다. 또한 pH 8~10의 알칼리 영역에서도 대체로 높은 균체 생육을 나타내었으나 초기 pH가 알칼리일수록 상대적으로 균체 생육은 낮았다(Fig. 2B). 실험균주는 25~37°C에서 양호한 균체 생육을 나타내었으며, 그 중 30°C에서 가장 높은 균체 생육을 보여주었다(Fig. 2C). 그러나 10°C 및 40°C에서는 균체 생육이 나타나지 않았다. 실험균주의 균체 생육에 미치는 NaCl 농도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 2D에서 보는바와 같다. 2% NaCl이 첨가된 배지에서 균체 생육이 가장 좋았으며, 6% NaCl에서 균체 생육이 약간 저해되었다. 8% NaCl이 첨가된 배지에서 배양 36시간까지 균체 생육이 거의 인정되지 않았으나 배

양시간이 경과함에 따라 서서히 균체 생육이 일어남을 알 수 있었다. NaCl은 식품산업에서 이용되는 일반적인 물질이다. 예를 들면, 치즈의 종류에 따라 다르지만 숙성 과정 중 NaCl의 농도는 4~6%이며(Morales et al., 2011), 3% 이상의 NaCl은 많은 젖산균의 생육을 억제하는 것으로 보고되어 있다(Modzelewska-Kapitula et al., 2009). 따라서 실험균주는 가염 공정이 있는 치즈 발효나 염장 식품 발효를 위한 starter로서의 역할이 기대된다.

3.3. 실험균주의 생균제 특성

젖산균이 생균제로서 기능을 수행하기 위해서는 소화관 내에서 생존해야 한다. 즉, 사람의 입을 통하여 섭취된 생균제가 장에 도달하기 위해서는 강산성의 위액과 십이지장에서 분비되는 담즙에 견딜 수 있어야 한다(Chateau et al., 1994) 실험균주의 내산성을 평가하기 위하여 위액 성분인 pepsin이 첨가된 인공위액을 조제하여 pH를 2~3으로 조정 후, K2 균주를 접종하여 생존율을 조사하였다. Table 1에서 보는바와 같이 pH 2의 인공위액에서 1시간 후 5.9%의 생존율을 나타내었다. pH 2.5의 인공위액에서 1시간 및 3시간 배양 후, 80.0% 및 67.8%의 생존율을 나타내었으며, pH 3에서는 각각 91.6% 및 80%의 생존율을 나타내었다. 순수한 위액의 pH는 1.5~2 범위에 있으며, 대부분 미생물은 이 범위에서 사멸하게 된다. 그러나 섭취한 음식물의 완충작용으로 인하여 위 속의 pH가 높아진다는 것을 고려한다면 생존율은 보다 높아질 것으로 판단된다(Shin et al., 1998).

젖산균이 생균제로서 기능을 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도(0.3%)보다 높은 환경에서 생육할 수 있어야 한다(Paik et al., 2002). 따라서 소의 담즙성분인 bile bovine, 돼지의 담즙성분인 bile extract 및 정제된 형태의 담즙성분인 bile salt를 0.1~0.5%의 범위로

MRS broth에 첨가한 후, K2 균주를 접종하여 생존율을 조사하였다. Bile salt에서 다소 낮은 생존율(15.9~68.9%)을 나타내었으나 bile bovine (76.4~107.4%)과 bile extract (71~133.5%)에서는 높은 생존율을 나타내었다(Table 1). 특히 0.1% bile bovine과 bile extract에서는 대조구보다 높은 균체생육을 나타내었다. 이것은 실험균주가 bile bovine과 bile extract 속 특정 성분을 영양원으로 이용했거나 또는 bile 분해산물의 일부를 영양원으로 이용한 것에 기인하는 것으로 판단된다. 많은 젖산균이 인공위액에서 저항성이 높은 반면 담즙 내성이 낮은 점(Chung et al., 2003; Champagne and Gardner, 2008)을 고려할 때 실험균주 *L. plantarum* K2는 높은 내산성과 함께 담즙에 대한 내성 역시 높아 생균제로서 응용가능성이 매우 높음을 알 수 있었다.

BSH에 의하여 bile salt가 분해되면 deoxycholic acid 등의 bile acid가 생성되며, 이것은 콜레스테롤의 용해도를 감소시킨다(Pereira et al., 2003). 즉, BSH 활성이 있는 젖산균을 섭취하게 되면 숙주 장내에서 콜레스테롤은 담도를 통해 배출되고, 지용성 비타민, 물과 전해질의 흡수를 도와주는 것으로 알려져 있다(Pereira et al., 2003). 따라서 실험균주의 BSH 활성 보유 유무를 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 3에서 보는바와 같다. 실험균주를 bile extract가 첨가된 MRS 평판배지에서 배양한 경우, 호기 및 혐기조건에서 불투명 침전대를 형성하였으며, sodium taurodeoxycholic acid가 첨가된 MRS 평판배지에서는 불투명 침전대를 형성하지 않았으나 대조구인 MRS 평판배지보다 뚜렷한 불투명의 흰색 콜로니를 형성하였다. Dashkevicz and Feighner(1989)는 BSH에 의하여 bile extract나 sodium taurodeoxycholic acid가 분해되면 중간산물로서 deoxycholic acid가 생성되고, 이것은 산성에서 침전물의 형태로 나타나거나 침전

Table 1. Survival rate of *Lactobacillus plantarum* K2 in artificial gastric fluid, and in various biles after 24 h of incubation

pH	Survival rate (%)		Bile type	Survival rate (%)		
	1 h	3 h		0.1%	0.3%	0.5%
2.0	5.9	0	Bile salt	68.9	19.7	15.9
2.5	80.0	67.8	Bile bovine	107.4	83.2	76.4
3.0	91.6	80.0	Bile extract	133.5	74.7	71.0

물 생성없이 콜로니의 색깔을 흰색으로 전환시킨다고 보고하였다. 실험균주 배양액의 pH는 3.7의 산성을 나타내었고, 따라서 콜로니 주변의 불투명 침전대나 흰색의 콜로니는 BSH 활성이 있음을 나타낸다. 결과적으로 실험균주는 BSH를 생성할 수 있으며, 이에 따라 콜레스테롤 감소효과가 있는 것으로 판단되었다. 한편, 콜로니 주위의 불투명 침전대의 크기를 비교했을 때, 혐기배양에서 BSH 활성이 더 높은 것으로 나타났다. 지금까지 젖산균의 BSH 활성은 혐기배양에서만 나타나는 것으로 최초 보고(Begley et al., 2006)되어 이후 많은 연구자들이 호기배양에서 BSH 활성을 조사하지 않았다. 본 실험 결과에 의하면 실험균주들은 호기배양에서도 BSH 활성이 나타났으므로 향후 젖산균의 생리적 특성을 조사하고

자 할 때 이러한 조건 역시 고려해야 할 것으로 판단된다. 한편, 담즙은 BSH 생성능이 있는 젖산균에 의하여 탈중합되고, 그 산물로 생성된 glycine, taurine이 젖산균의 생육을 부양할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 담즙 자체를 생육을 위한 기질로서 완전히 무기화할 수 있는 젖산균도 보고되어 있다(Begley et al., 2006; Philipp, 2011). 따라서 본 실험균주의 높은 BSH 활성은 담즙 내성 결과에서 보여준 균체 생육 증가 현상과 밀접한 관계가 있는 것으로 추정되며, 이에 대한 세부적인 실험이 필요함을 알 수 있었다.

실험균주의 병원성 세균에 대한 항균능을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 실험균주 배양액의 최종 pH는 3.7이었으며, 이 경우 실험균주는 모든 피검균주의 생육을 억제하였다. 한편, 시료의 pH를 6.8로 조정 한 경우, 실험균주는 *P. aeruginosa*를 제외한 모든 피검균주의 생육을 억제할 수 없었다. 젖산균은 lactic acid를 생성하여 산도를 낮추어 줌으로써 병원성 세균의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다(Messens and De Vuyst, 2002). 또한 bacteriocin 등의 항균성 펩티드를 생성하여 항균작용을 나타내기도 하는데, bacteriocin은 산성~알칼리성 등 넓은 범위의 pH, 특히 생리학적 pH에서 안정한 것으로 알려져 있다(Messens and De Vuyst, 2002). 유기산 생성에 의한 병원균 억제효과를 배제하기 위하여 시료의 pH를 6.8로 조정 한 경우, 피검균주에 대한 항균능이 나타나지 않아 실험균주에 의한 항균능은 주로 이들이 생산한 유기산에 의한 것으로 추정되었다. 그러나 이 경우, *P. aeruginosa*에 대해 약간의 항균능을 보였으므로 유기산 생성에 의한 항균작용과 함께 *P. aeruginosa*에 특이적인 bacteriocin 생성에 의한 항균작용 가능성도 배제할 수 없었으며, 향후 이에 대한 구체적인 실험이 필요함을 알 수 있었다.

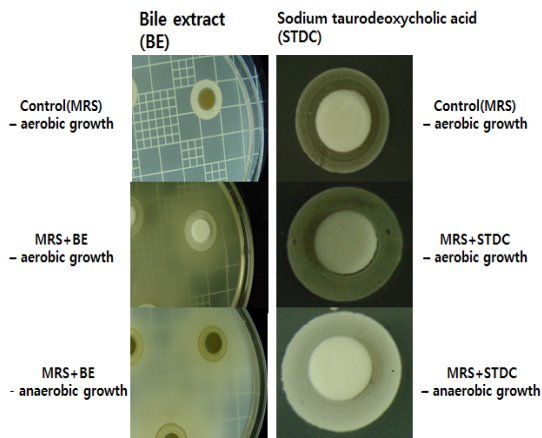


Fig. 3. Photograph showing bile salt hydrolase activity of *Lactobacillus plantarum* K2 on MRS plate containing bile extract (left) and sodium taurodeoxycholic acid (right).

Table 2. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* K2 against pathogenic bacteria

	Inhibitory zone (cm)			
	Gram positive bacteria		Gram negative bacteria	
	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Culture (pH 3.7)	1.4	1.6	2.0	1.5
Filtrate (pH 3.7)	1.5	1.6	1.8	1.5
Filtrate (pH 6.8)	-	-	1.2	-

Table 3. Autoaggregation rate and cell surface hydrophobicity of *Lactobacillus plantarum* K2

Autoaggregation rate (%)	60.7	
Cell surface hydrophobicity (%)	Xylene	21.1
	Toluene	31.8
	Chloroform	90.6
	Ethylacetate	18.0

사람 장의 상피세포나 조직에 젖산균이 부착하는 능력은 그들의 집락화와 이에 따른 병원성 미생물의 부착 방식에 있어 중요한 요인 중의 하나이다(Kos et al., 2003). 젖산균은 특이적 및 비특이적으로 조직에 부착하는데 특이적 부착은 autoaggregation, 비특이적 부착은 hydrophobic interaction이 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히, autoaggregation은 세포에의 부착에 필수적인 과정이며, 이 과정은 젖산균이 biofilm을 형성할 수 있는 능력의 척도로 알려져 있다(Nader-Macias et al., 2008). 따라서 실험균주의 autoaggregation rate를 조사하였으며 그 결과, 60.7%임을 알 수 있었다. 이 결과는 본 실험균주는 세포와 세포간에 특이적 결합을 형성할 수 있음을 의미한다(Table 3). 젖산균의 autoaggregation은 상피세포 부착능을 향상시킬 뿐만 아니라 소화장관 내에서 젖산균이 제거되는 것을 방지해 주는 것으로 보고되어 있다(Nader-Macias et al., 2008). 한편, 실험균주의 비특이적 부착능을 hydrophobicity를 조사하여 평가한 결과는 Table 3에서 보느냐와 같다. Xylene과 toluene에 대한 부착능이 21.1%, 31.8%로서 그렇게 높은 hydrophobicity는 나타나지 않았다. 이것은 젖산균의 세포표면 hydrophobicity가 상피세포 부착에 관여하는 유일한 기전이 아니라는 사실을 의미한다. 이와 관련하여 Schneitz et al.(1993)은 젖산균의 대사산물이나 젖산균 세포표면에 존재하는 당단백질이 젖산균의 부착에 중요한 요소라고 하였다. 따라서 젖산균의 세포 부착능을 평가하기 위해서는 hydrophobicity와 함께 세포표면 단백질 등의 특성에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 추가로 실험균주의 세포표면 특성을 조사한 결과, 모든 실험균주들은 산성 용매인 chloroform(전자수용체)에 대한 부착능이 높았고, 알칼리성 용매인 ethylacetate(전자공여체)에 대한 부착능은 낮았다. 따라서 실험균주들의

표면은 강력한 전자공여체를 수용하고 있음을 알 수 있었다.

3.4. 실험균주의 항고혈압 및 항산화 활성 조사

고혈압의 발병에는 ACE가 작용하는 것으로 보고되어 있다(Sun et al., 2009). 즉, ACE는 angiotensin I을 혈관 수축작용이 강한 angiotensin II로 전환시킴으로써 고혈압 발병에 관여한다. 따라서 ACE의 활성을 저해할 수 있다면 고혈압을 예방할 수 있을 것이다. 실험균주가 ACE 저해활성을 보유하고 있는지 조사한 결과, MRS broth에서 배양된 실험균주의 ACE 저해능은 72.8%이었으며, 0.1% skim milk가 첨가된 MRS broth에서는 90.7%의 저해능을 나타내어 양성 대조구인 1 mg/ml captopril (59.7%)보다 훨씬 높은 항고혈압능을 나타내었다. 젖산균 자체의 ACE 저해능에 대한 연구는 소수인 반면, 젖산균을 이용한 발효식품에 있어 ACE 저해물질에 대한 연구는 활발한 편이다. 일부 젖산균들은 우유에서 생육하는 동안 casein을 분해하여 ACE 저해 펩티드를 생성할 수 있는 것으로 보고되어 있다(Sun et al., 2009). 실험균주의 경우, skim milk가 첨가된 MRS broth에서 보다 높은 ACE 저해능을 나타내었으므로 균주 자체의 ACE 저해활성 외에 skim milk에 함유된 casein을 분해함으로써 ACE 저해물질을 생산할 수 있는 것으로 판단되었다.

산화된 식품의 섭취와 산소 호흡으로 인한 생체 내 대사 과정 중에 발생된 다양한 활성산소는 인간 세포에 산화적 손상을 유발함으로써 동맥경화증 등 혈관 질병을 야기하는 것으로 알려져 있다. 따라서 tert-butylhydroxyanisole 등의 합성 항산화제가 개발되어 사용되고 있으나 이들은 발암, 기형, 돌연변이, 알리지 등 많은 부작용을 초래할 수 있어 최근 천연 항산화제에 대한 연구가 진행되고 있다. 따라서 실험균주의 항산화능을 DPPH radical 소거

능으로 측정된 결과, 양성 대조구인 0.1 mg/ml ascorbic acid (91.2%)보다 DPPH radical 소거능은 낮았지만 61.5%의 소거능을 나타내었다.

4. 결론

최근 음식물 섭취를 통하여 건강을 유지하고, 질병을 예방하려는 의식이 급속히 확산되면서 의학적 효과가 높은 기능성 식품을 찾는 경향이 높아지고 있다. 기능성 식품의 중심에 있는 것 중의 하나가 바로 생균제(probiotics)로 이용되고 있는 젖산균 및 이들을 이용한 젖산 발효식품이다. 지금까지 동물성 젖산균에 대한 연구는 활발히 수행되었으나 식물성 젖산균에 대한 연구는 그렇게 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 다양한 식물성 시료로부터 식물성 젖산균을 탐색한 후, 이들의 생균제 특성 등을 조사함으로써 새로운 미생물자원을 확보하고자 하였다. 다양한 식물체 및 발효식품으로부터 내산성이 우수한 균주를 분리하였으며, 그중 김치에서 분리된 *Lactobacillus plantarum* K2를 실험균주로 선정하였다. 실험균주는 정치 및 진탕배양, 조사한 모든 pH 범위(pH 4~10)에서 생육하였으며, 특히 pH 6~7에서 우수한 생육을 나타내었다. 또한 이들은 25~37°C, 0~6% NaCl에서 높은 균체 생육을 나타내었다. 본 균주는 인공위액과 담즙에 대한 높은 내성을 가지고 있었으며, bile salt hydrolase 활성을 나타내어 콜레스테롤 감소효과도 있는 것으로 판단되었다. 또한 실험균주는 *Staphylococcus aureus* 등 병원성 세균의 생육을 억제할 수 있었다. 실험균주는 강한 전자공여능을 보유한 세포표면을 가지고 있었고, 항고혈압 및 항산화 활성을 나타내었다. 이상의 연구결과를 통해 본 실험균주는 의약품 생균제로서의 응용 가능성과 함께 다양한 식용식품 발효를 위한 종균으로 활용될 수 있는 잠재적 가능성이 높은 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G. M., 2006, Bile salt

hydrolase activity in probiotics, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 1729-1738.

Chateau, N., Deschamps, A. M., Sassi, A. H., 1994, Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium, *Lett. Appl. Microbiol.*, 18, 42-44.

Cho, Y. H., Park, S. N., Jeong, S. W., 2009, A Study on the physiological activity and industrial prospects of plant-origin lactic acid bacteria, *Kor. J. Dairy Sci. Technol.*, 27, 53-57.

Chung, H. S., Chushman, D. W., 1971, Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung, *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1637-1641.

Chung, W. B., Soe, W. S., Cha, J. Y., Cho, Y. S., 2003, Isolation and characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for probiotics production from korean dongchimi, *Kor. J. Food Preserv.*, 10, 406-410.

Champagne, C. P., Gardner, N. J., 2008, Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses, *Food Res. Int.*, 41, 539-543.

Dashkevicz, M., Feighner, S. D., 1989, Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 11-16.

Gismondo, M. R., Lombardi, L. D. A., 1999, Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora, *Int. J. Antimicrobial Agents*, 12, 287-292.

Hammes, W. P., Hertel, C., 2002, Research approaches for pre- and probiotics: Challenges and outlook, *Food Res. Int.*, 35, 165-170.

Kobayashi, Y., Tohyama, K., Terashima, T., 1974, Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *Jpn. J. Microbiol.*, 29, 691-697.

Kos, B., Ssovic, J., Vukovi, S., Smpraga, M., Frece, J., Matos, S., 2003, Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *J. Appl. Microbiol.*, 94, 981-987.

Lee, Y., Chang, H. C., 2008, Isolation and characterization of Kimchi lactic acid bacteria showing anti-*Helicobacter pylori* activity, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 106-114.

Lu, Y., Foo, Y., 2000, Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, *Food*

- Chem., 68, 81-85.
- Messens, W., De Vuyst, L., 2002, Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs - a review, *Int. J. Food Microbiol.*, 72, 31-43.
- Modzelewska-Kapitula, M., Kleukowska, L., Kornacki, K., Lukaszuk, W., 2009, The Evaluation of usefulness of potentially probiotic *Lactobacillus* strains as components of industrial starter cultures, *Polish J. Natural Sci.*, 24, 254-262.
- Molin, G., 2001, Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v, *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 380S-385S.
- Morales, F., Morales, J. I., Hernandez, C. H., Hernandez-Sanchez, H., 2011, Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 164, 889-905.
- Nader-Macias, M. E. F., Otero, M. C., Espeche, M. C., Maldonado, N. C., 2008, Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 1387-1395.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E., 2002, Probiotics: An Overview of beneficial effects, *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.
- Paik, H. D., Jung, M. Y., Jung, H. Y., Kim, W. S., Kim, K. T., 2002, Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 34, 73-78.
- Pereira, D. I. A., McCartney, A. L., Gibson, G. R., 2003, An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 4743-4752.
- Philipp, B., 2011, Bacterial degradation of bile salts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89, 903-915.
- Pihlanto, A., Virtanen, T., Korhonen, H., 2010, Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk, *Int. Dairy J.*, 20, 3-10.
- Quiros, A., Hernandez-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I., 2005, Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir, *J. Dairy Sci.*, 88, 3480-3487.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T., 2000, Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties, *J. Biotechnol.*, 84, 197-215.
- Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A., 2004, Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, Marcel Dekker, Inc., USA.
- Schneitz, C., Nuotio, L., Lounatma, K., 1993, Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer), *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 290-294.
- Shin, M. S., Lee, J. J., Na, S. H., Bae, H. S., Huh, C. S., Baek, Y. J., 1998, Characteristics of *Bifidobacterium* spp. isolated from korean feces for probiotics, *Kor. J. Dairy Sci.*, 20, 273-282.
- Sun, T., Zhao, S., Wang, H., Cai, C., Chen, Y., Zhang, H., 2009, ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from *Xinjiang koumiss* in China, *Eur. Food Res. Technol.*, 228, 607-612.
- Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y., Ahn, J., 2009, Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains, *Lett. Appl. Microbiol.*, 49, 434-442.