

김치에서 분리된 콜레스테롤 감소능을 가진 젖산세균의 특성

박홍엽 · 박슬기 · 김보금 · 류대규 · 임은서¹ · 김영목*
부경대학교 식품공학과 · ¹동명대학교 식품영양학과

Isolation and characterization of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from kimchi

Hong-Yeop Park, Seul-Ki Park, Bo-Geum Kim, Dae-Gyu Ryu,
Eun-Seo Lim¹, and Young-Mog Kim*

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University
¹Department of Food Science and Nutrition, Tongmyong University

Abstract The objective of this study was to isolate and characterize lactic acid bacteria (LAB) exhibiting cholesterol-lowering activity from the Korean traditional fermented food, kimchi. The previously isolated LAB strains were assessed for cholesterol-lowering efficacy in the presence of 0.1% cholesterol. All LAB strains tested in this study were able to assimilate cholesterol at varying levels, ranging from 35.0 to 99.4%. Among them, the *Lactobacillus plantarum* FMB 31 strain exhibited the highest cholesterol-lowering effect with 99.4% cholesterol removal efficiency. The strain was stable in the presence of acid, bile, and salt stress, and showed high adherence on HT-29 cells, a human colon line. In addition, the LAB strain showed no pathogenic properties such as the production of hemolysin and biogenic amines. Thus, this study suggests that the *L. plantarum* FMB 31 strain isolated from kimchi can be a potential source of probiotic products with strong cholesterol-lowering effect.

Keywords: cholesterol-lowering activity, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, kimchi

서 론

젖산세균(lactic acid bacteria, LAB)은 자연계에 널리 분포하는 균주로, 여러 나라의 전통 발효식품 제조 및 가공에 사용된다. LAB는 발효 식품을 발효하는 과정에서 당을 분해해 유기산 등의 대사산물을 생산하는데, 이 과정에서 제품의 풍미는 좋아지고 부패균의 증식은 억제되며 미국 식품의약품안전청(FDA)에서는 LAB가 생산하는 대사산물을 generally recognized as safe (GRAS)로 인정하고 있다(1).

세계보건기구(WHO)에서는 프로바이오틱스(probiotics)가 숙주의 건강에 좋은 효과를 주는 살아있는 균으로 정의하고 있으며 프로바이오틱스는 신체 내 유해 세균 성장의 억제(2), 장내 기능의 개선(3), 콜레스테롤 감소(4) 등의 기능이 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 유엔식량기구(FAO)와 WHO에서도 적당한 양의 프로바이오틱스 섭취가 사람 또는 동물의 건강 증진에 도움이 된다고 보고하고 있다. 한편, 발효유에 포함된 LAB가 콜레스테롤 혈증을 완화하는 데 도움이 된다는 결과가 보고된 1970년대 이후 LAB와 비피더스균의 콜레스테롤 저하 효과에 대한 연구가 많이

진행되고 있다(5,6). 하지만 콜레스테롤 저하 효과를 가지는 프로바이오틱스는 인체 내에는 일반적으로 존재하지 않기 때문에 프로바이오틱스를 지속적으로 섭취해야만 그 효과를 거둘 수 있다(7).

이에 본 연구에서는 콜레스테롤 저하 효과를 가지는 프로바이오틱스 균주 개발을 목적으로, 우리나라의 전통발효식품인 김치에서 분리한 LAB 중 콜레스테롤 저하 활성이 우수한 LAB를 분리하고, 이들을 대상으로 내산성, 내담즙성, 장 정착성 및 인체에 대한 안전성 등에 대한 실험을 진행하였다. 본 연구에서 분리된 콜레스테롤 저하 활성이 우수한 LAB는 향후 콜레스테롤 저하 기능을 가지는 다양한 건강 기능식품 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

콜레스테롤을 감소시키는 LAB 분리에 사용된 균주는 부경대학교 식품공학과 식품미생물학 연구실에서 보관하고 있는 전통 발효식품인 김치에서 분리하여 동정된 23종의 LAB를 사용하였으며, Korean Collection for Type Cultures (KCTC; Daejeon, Korea)에서 분양 받은 표준균주 *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033는 대조군으로 사용하였다(Table 1).

본 연구에서 사용된 LAB의 배양을 위해서 deMan Rogosa Sharpe medium (MRS; Difco Laboratories Inc., Detroit, MI)을 사용하였고 LAB의 용혈활성 측정을 위해서는 5% sheep blood (v/v)가 함유된 Mueller-Hinton agar (MHA; Difco Laboratories Inc.)를 사용하였다.

*Corresponding author: Young-Mog Kim, Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea
Tel: +82-51-629-5832
Fax: +82-51-629-5824
E-mail: ymkim@pknu.ac.kr
Received March 24, 2017; revised May 18, 2017;
accepted May 18, 2017

생체아민(biogenic amines) 생성 분석에는 대조균주로 *Enterococcus faecalis* KCTC 3206 및 *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637 균주를 사용하였다.

콜레스테롤 감소 활성 분석

콜레스테롤을 감소시키는 정도를 확인하기 위해서 Rudel과 Morris(8)의 방법을 일부 변형한 *O*-프탈알데하이드(phthalaldehyde) 정색반응을 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 0.3% 황소쓸개즙(oxgall; Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO)을 첨가한 MRS 액체배지에 수용성 콜레스테롤(water-soluble cholesterol; Sigma-Aldrich)을 각각 0.0, 0.125, 0.25, 0.5 및 1.0 g/L에 해당하는 농도로 준비하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준보정곡선을 작성하였다.

LAB의 콜레스테롤 감소활성은 Choi 등(9)의 방법을 약간 변형하여 진행하였다. 배양한 LAB 23종과 대조구 1종을 0.1% cholesterol이 포함된 MRS 액체배지를 이용하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 원심분리(7,000×g, 14 min, 4°C)하여 얻어진 상층액 1 mL에 2 mL의 50% (w/v) 수산화포타슘(KOH)과 3 mL의 95% 에탄올(v/v)을 첨가한 후 1분간 혼합하고 60°C의 항온수조에서 10분간 방치하였다. 그 후 시료를 냉각시키고 5 mL의 헥세인(hexane)을 첨가하여 혼합하였다. 그리고 1 mL의 증류수를 첨가하여 현탁 시킨 후 10분간 방치하였다. 분리된 상층의 헥세인 층 3 mL를 시험관에 옮긴 후 60°C의 항온수조 상에서 질소가스로 농축하였다. 농축시킨 시료에 4 mL *O*-프탈알데하이드 반응액[0.5 mg *O*-프탈알데하이드/빙초산(glacial acetate) in 1 mL]을 첨가하여 혼합하고 상온에서 10분간 방치한 다음 2 mL의 진한 황산을 천천히 첨가하여 섞어주고, 10분 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

내담즙성 측정

내담즙성 실험은 Ji 등(10)의 방법을 일부 변형하여 인산완충 식염수(phosphate buffered saline; 0.1 M, pH 7.0)에 인공 담즙인 황소쓸개즙을 각각 0.1, 0.3% 및 0.5% (w/v) 첨가하여 실행하였다. 실험에 사용한 총 24개의 균주는 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리 하여 상등액을 제거하여 균체(약 1.0×10^8 CFU/mL)를 회수하였다. 그리고 각 균체를 서로 다른 농도의 황소쓸개즙이 첨가된 인산완충 식염수에 희석한 뒤 37°C에서 6시간 배양하였다. 이후 LAB를 순차적으로 희석하여 MRS 고체 배지에 37°C에서 24시간 배양한 후, MRS 고체배지에 형성된 집락(colony)의 수를 측정하여 내담즙성을 확인하였다. 실험은 3회 반복했으며 평균값을 사용하였다.

내산성 측정

내산성 실험은 Ji 등(10)의 방법을 일부 변형하여 염산(HCl)을 사용하여 pH를 각각 1.5, 2.0 및 3.0으로 조정된 인산완충 식염수(0.1 M, pH 7.0)에 펩신(Sigma-Aldrich; 1 mg/mL)을 첨가하여 진행하였다. 실험에 사용한 총 24개의 균주는 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리 하여 상등액을 제거하여 균체를 회수하였다. 그리고 각 균체(약 1.0×10^8 CFU/mL)를 pH가 조정된 인산완충 식염수에 희석한 뒤 37°C에서 2시간 배양 후 각각의 LAB를 L-시스테인(cysteine, Sigma-Aldrich)이 첨가된 희석수로 세척한 뒤 순차적으로 희석하여 MRS 고체 배지에 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 MRS 고체배지에 형성된 집락의 수를 측정하여 내산성을 확인하였다. 실험은 3회 반복했으며, 평균값을 사용하였다.

내염성 측정

내염성 실험은 Khedid 등(11)의 방법을 일부 변형하여 37°C에

서 24시간 전 배양한 LAB 배양액 0.1 mL을 NaCl 함량을 3, 6% 및 9%로 조정된 MRS 액체배지에 37°C에서 24시간 배양한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 내염성을 확인하였다.

장내 상피세포에 대한 LAB 부착능

장 부착능 실험은 Korean Cell Line Bank (KCLB; Seoul, Korea)로부터 분양 받은 장내 상피 세포인 HT-29 세포를 이용하여 Lim 등(12)의 방법에 따라 다음과 같이 진행하였다. 56°C에서 30분간 가열 처리한 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; Gibco, Rockville, MD, USA; v/v), 2 mM L-글루타민(glutamine), 1 mM 피루브산소듐(sodium pyruvate), 100 U/mL 페니실린(penicillin)과 0.1 mg/mL streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM; Sigma-Aldrich)에 HT-29 세포를 접종하고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. Monolayer를 형성한 HT-29 세포를 소태아혈청과 항생제가 첨가되지 않은 DMEM 배지가 분주된 6-well culture plate (Falcon; Beckton Dickinson, Sparks, MD, USA)에 1.0×10^5 cells/mL 되도록 조정하고 1.0×10^8 CFU/mL의 LAB를 접종하였다. 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 부착되지 않은 HT-29 세포를 제거하고, 부착된 세포는 trypsin-EDTA 용액으로 탈착시켜 인산완충 식염수로 세척하고 MRS 고체배지를 이용하여 LAB 균수를 측정하였다.

용혈능 분석

용혈능 실험은 Lim 등(12)의 방법을 약간 변형하여 분석하였다. MRS 액체배지에 LAB 균주를 37°C에서 24시간 배양 후 5% sheep blood가 함유된 MHA 배지에 희석 집중 후 37°C에서 48시간 배양한 후 알파 용혈(α -hemolysis, 집락 주변 녹색환 생성), 베타 용혈(β -hemolysis, 집락 주변 황색 투명한 생성)과 감마 용혈(γ -hemolysis, 집락 주변 환 생성 없음)을 조사하였다.

생체아민 생성능 분석

생체아민 생성능은 Bover-Cid와 Holzapfel(13)의 방법을 일부 변형하여 아미노산을 첨가한 카복실기 제거배지(decarboxylating medium; DCM, Difco Laboratories Inc.)에서 측정하였다. LAB에서 관련 효소 생성을 촉진시키기 위해 각각의 전구체 아미노산(L-histidine monohydro-chloride monohydrate, L-tyrosine disodium salt, L-lysine monohydro-chloride 및 L-ornithine monohydrochloride; 1 g/L)과 pyridoxal 5-phosphate (1 mg/L)를 첨가한 DCM 액체배지에서 LAB를 37°C에서 24시간 동안 5회 배양하여 관련 효소 활성을 유도하였다. 그 후 각각의 전구체 아미노산(2%, w/v)이 첨가된 DCM 액체배지를 96 well-microtiter plate의 각 well에 100 μ L 분주하고 LAB 배양액 50 μ L을 접종하였다. 그리고 37°C에서 72시간 동안 혐기적인 조건 하에서 배양한 후 자색으로 변한 경우 양성으로 판정하였다. 같은 조건에서 배양한 *P. aeruginosa* KCTC 1637을 음성 대조균으로, *E. faecalis* KCTC 3206 균주를 양성 대조균으로 사용하였다.

통계 분석

본 연구에서 얻어진 연구결과는 SAS (ver. 9.4, Statistical Analysis System, Milwaukee, WI, USA)를 이용하여 평균 및 표준편차를 계산하였으며, 군간의 분산 분석은 ANOVA (Analysis of Variance) test를 사용하였고, Duncan의 다중 비교(Duncan's multiple range test)로 $p < 0.05$ 유의수준에서 유의성 보정을 실시하였다.

결과 및 고찰

LAB 균주의 콜레스테롤 감소 활성

한국전통식품인 다양한 김치에서 분리하여 부경대학교 식품공학 과 식품미생물 연구실에서 보관중인 23종의 LAB와 1종의 표준균주인 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 콜레스테롤에 대한 감소 활성을 분석하였다(Table 1). *L. rhamnosus* KCTC 5033는 현재 프로바이오틱스로서 상업적으로 이용되고 있으며 콜레스테롤 감소활성도 있는 것으로 보고되어 본 연구에서 대조구로 사용하였다(9). LAB 균주들의 콜레스테롤 분해 활성은 콜레스테롤 표준 용액에 대한 표준보정곡선(상관 계수 $R^2=0.9965$)을 이용하여 비교하였다(결과 미제시).

LAB를 콜레스테롤이 첨가된 MRS 액체배지에서 24시간 배양한 결과, LAB 균주에 따른 콜레스테롤 감소 활성의 차이가 관찰되었고 LAB를 접종하지 않은 대조구와 비교하였을 때 35.0%에서부터 99.4% 범위에서 콜레스테롤 감소가 나타났다(Fig. 1). 본 연구에서 사용된 LAB 균주들 중에서 *L. plantarum* FMB 31 균주가 가장 높은 99.4%의 콜레스테롤 감소가 나타났으며, 다음으로 *L. plantarum* FMB 27 균주가 90.7%의 감소 활성을 나타내었다. *L. plantarum* FMB 24번 균주는 35.0%로 가장 낮은 수치를 나타내었고 대조구로 사용된 *L. rhamnosus* KCTC 5033은 88.1%의 콜레스테롤 감소 수치를 나타내어 2종의 분리 젖산세균인 *L. plantarum* FMB 27 균주와 *L. plantarum* FMB 31 균주 보다는 다소 낮은 감소율을 나타내었다(Fig. 1).

콜레스테롤 감소 능력에 대한 Choi와 Chang(14)의 보고에 따르면 김치에서 분리한 50종 LAB 균주의 콜레스테롤(0.1 g/L) 감소율은 3.51%에서 80.86% 범위라고 보고하고 있다. Lim 등(15)은 7종의 *Streptococcus* sp.가 평균적으로 17.3%, 11종의 *Lactobacillus* sp.가 평균 약 55.9% 그리고 7종의 *Bifidobacterium* sp. 가 평균적으로 약 29.1%의 콜레스테롤 감소 능력을 가지고 있다고 보고하고 있다. 이러한 결과들을 고려해 보면, 본 연구에서 사용된 두 분리균주(*L. plantarum* FMB 27 및 FMB 31)는 상대적으로 우수한 콜레스테롤 감소 능력을 가지고 있는 것으로 판단된다.

김치 유래 젖산세균의 인공 담즙에 대한 저항성

LAB는 기본적으로 담즙에 대한 내성이 있어야만 장내에서 생존하고 증식할 수 있다고 보고되고 있다(15,16). 이에 본 연구에서 사용된 LAB의 인공담즙에 대한 저항성을 확인하기 위해 황소쓸개즙 농도별 생존율을 확인하였다. 그 결과, 황소쓸개즙 농도가 증가함에 따라 대부분 균의 생존율은 감소하는 경향이 나

Table 1. Lactic acid bacteria (LAB) isolated from kimchi used in this study

No.	LAB strains
1	<i>Lactobacillus brevis</i> FMB 01
2	<i>L. brevis</i> FMB 02
3	<i>L. brevis</i> FMB 03
4	<i>L. brevis</i> FMB 04
5	<i>L. brevis</i> FMB 05
6	<i>L. brevis</i> FMB 06
7	<i>L. brevis</i> FMB 07
8	<i>L. brevis</i> FMB 08
9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FMB 01
10	<i>P. pentosaceus</i> FMB 22
11	<i>L. plantarum</i> FMB 20
12	<i>L. plantarum</i> FMB 21
13	<i>L. plantarum</i> FMB 24
14	<i>L. plantarum</i> FMB 26
15	<i>L. plantarum</i> FMB 27
16	<i>L. plantarum</i> FMB 31
17	<i>L. plantarum</i> FMB 34
18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> FMB 3
19	<i>L. plantarum</i> FMB 35
20	<i>L. plantarum</i> FMB 37
21	<i>L. brevis</i> FMB 53
22	<i>L. paraplantarum</i> FMB 78
23	<i>L. casei</i> FMB 94
24	<i>L. rhamnosus</i> KCTC 5033

타났다(Fig. 2). 0.1% 황소쓸개즙에서는 6시간 후 *L. mesenteroides* FMB 3, *L. plantarum* FMB 35, *L. plantarum* FMB 37, *L. brevis* FMB 53, *L. paraplantarum* FMB 78 및 *L. casei* FMB 94 균주들은 생존하지 못하거나 생존율이 급격하게 감소하였다. 하지만 그 외 대부분의 균주는 70% 이상의 생존율을 나타내었다(Fig. 2). 0.3% 황소쓸개즙이 첨가된 인산완충식염수에 37°C에서 6시간 배양한 후 생존율을 확인하면, 모두 사멸한 6종을 제외하면 평균적으로 78.4%의 생존율을 나타내었으며, 그 중 *L. plantarum* FMB 24 균주는 91.6%, *L. plantarum* FMB 21 균주는 82.8%, *L. brevis* FMB 4 균주는 80.0%, *L. brevis* FMB 3 균주는 79.9%, *L. plantarum* FMB 31 균주는 79.9%, *L. brevis* FMB 8 균주는 79.7% 그리고 *L. brevis* FMB 5 균주가 78.8%의

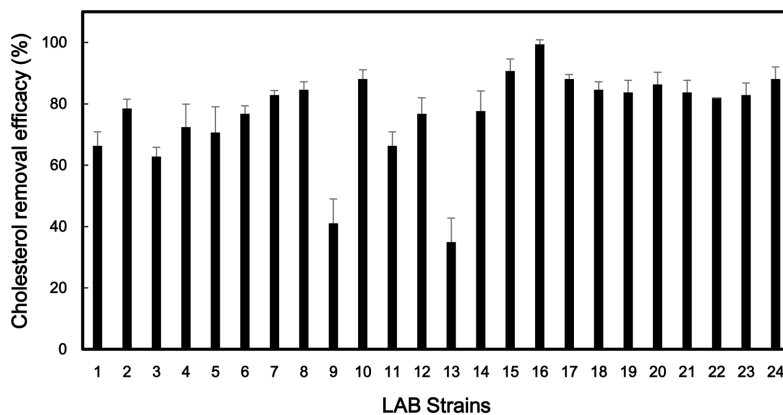


Fig. 1. Cholesterol removal efficacy of isolated lactic acid bacteria in MRS broth containing 0.1% cholesterol.

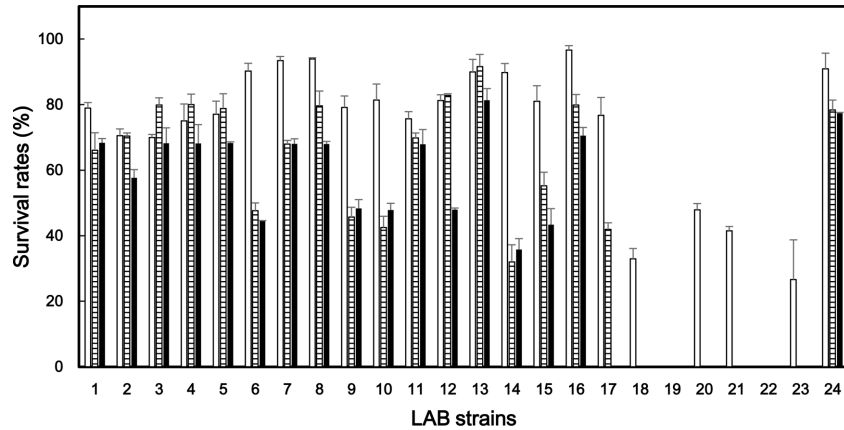


Fig. 2. Bile tolerance of isolated lactic acid bacteria in the presence of 0.1% (□), 0.3% (▤) and 0.5% oxgall (■).

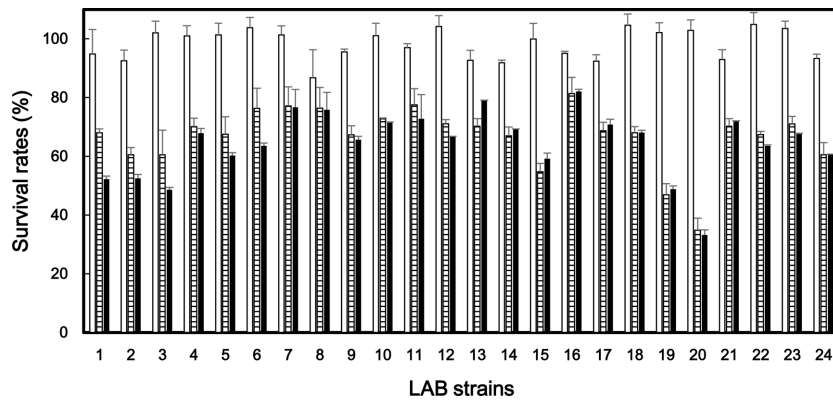


Fig. 3. Acid tolerance of isolated lactic acid bacteria in 0.1 M phosphate buffer saline adjusted to pH 3.0 (□), pH 2.0 (▤) and pH 1.5 (■).

생존율을 보이며 대조구로 사용된 *L. rhamnosus* KCTC 5033 균주의 78.4%의 생존율과 비교하였을 때 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2). 0.5% 황소쓸개즙에서의 생존율의 경우, 모두 사멸한 7종을 제외했을 때 평균 61.7%의 생존율을 나타내었으며 *L. plantarum* FMB 24 균주가 81.3%로 가장 높은 생존율을 나타내었고 다음으로 *L. plantarum* FMB 31 균주가 70.5%로 높은 생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 대조구로 사용된 *L. rhamnosus* KCTC 5033 균주의 77.4%의 생존율과 비교 하였을 때 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

Vinderola 등(17)은 5종의 *L. casei* 및 3종의 *L. rhamnosus* 균주들에 대한 인공담즙 내성에 대한 실험 결과, 0.1% 황소쓸개즙의 조건에서 균주별로 3.0%-73.0%의 서로 다른 담즙 내성을 나타낸다고 보고하고 있다. 또한 Papamanoli 등(18)도 0.3% 황소쓸개즙에서 *L. sakei* 49 균주는 0.0% 그리고 *L. curvatus* 24 균주는 58.0%의 생존율을 나타낸다고 보고하였다. 이상의 결과에서처럼, 모든 젖산세균이 인공담즙인 황소쓸개즙에 대한 높은 내성을 가지고 있는 것은 아니며 이러한 결과들을 종합해 보았을 때 본 연구에서 사용된 김치에서 분리된 젖산세균들 중에서 *L. plantarum* FMB 24 및 *L. plantarum* FMB 31 균주는 상대적으로 우수한 담즙 내성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

김치 유래 젖산세균의 내산성

대부분의 LAB는 낮은 pH 조건에서의 생존율이 떨어지기 때문에 프로바이오틱스로서 갖추어야 할 중요한 조건들 중의 하나는 내산성으로, 강한 산성 조건의 위를 통과 후 장까지 도달하여

생존하여야 한다(19). 이에 본 연구에서 분리된 LAB의 내산성을 확인하였다. pH 3.0에서 LAB의 평균 생존율은 평균 98.2%로 나타나 별다른 영향을 받지 않는 것으로 조사 되었다(Fig. 3). 이는 대조구로 사용한 *L. rhamnosus* KCTC 5033 균주와 비교하였을 때도 큰 차이가 없었다. pH 2.0의 조건에서는 LAB의 평균 생존율은 67.0%로 큰 폭으로 감소하였으나, 46.9%의 생존율을 보인 *L. plantarum* FMB 35 균주와 34.8%의 생존율을 보인 *L. plantarum* FMB 37 균주를 제외하면 60.5%의 생존율을 보인 대조구 *L. rhamnosus* KCTC 5033 균주와 비교하였을 때 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). pH 1.5로 조정된 인산완충식염수에서의 LAB 평균 생존율은 pH 2.0 조건보다 다소 낮은 64.5%로 나타났으며, 그 중에서도 *L. plantarum* FMB 31 균주는 82.1%로 가장 높은 생존율을 나타내었다. 그 외에도 *L. plantarum* FMB 24 (79.0%), *L. brevis* FMB 7 (76.7%), *L. brevis* FMB 8 (75.8%), *L. plantarum* FMB 20 (72.8%) 균주들이 높은 내산성을 나타내었으며 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033 (60.6%) 보다 높은 내산성을 가지고 있는 것으로 분석되었다(Fig. 3).

Liong과 Shah(20)은 *L. acidophilus* 4종과 *L. casei* 7종의 LAB 균주를 pH 2.0에서 내산성에 대해 실험한 결과, 대부분의 LAB가 초기 30분까지는 산성에 대한 별다른 영향을 받지 않지만, 1시간이 지난 후부터 대체적으로 모든 LAB의 생존율이 감소하기 시작하며 시간이 지남에 따라 LAB의 생존율이 큰 폭으로 감소한다고 보고하였다. *L. acidophilus* 4종의 경우 평균 약 61.9%의 생존율을 그리고 *L. casei* 7종의 경우 평균 약 49.5%의 생존율을 나타내었고 그 중에서도 *L. acidophilus* ATCC 4962 균주가

73.9% 그리고 *L. casei* ASCC 292 균주는 70.2%의 생존율을 나타냈다. 이러한 결과들을 고려해 보면, 본 연구에서 사용된 분리 균주 *L. plantarum* sp. FMB 27 및 *L. plantarum* FMB 31 균주는 상대적으로 우수한 내산성 능력을 가지고 있는 것으로 판단된다.

김치 유래 젖산세균의 내염성

LAB를 3%, 6% 및 9% 염화소듐이 첨가된 MRS broth에 37°C에서 24 시간 처리 후에 대부분의 LAB 균주들은 생존하였다. 하지만 *L. plantarum* FMB 35, *L. paraplantarum* FMB 78 및 *L. casei* FMB 94 균주들은 6% 염화소듐이 첨가된 배지에서 생존을 확인할 수 없었고, 6%에서 생존하지 못한 3종의 균주 외에 *L. brevis* FMB 06, *Pediococcus pentosaceus* FMB 01, *P. pentosaceus* FMB 22, *L. plantarum* FMB 26 및 *L. plantarum* FMB 34 균주들은 9% 염화소듐이 첨가된 배지에서 생존을 확인할 수 없었다(결과 미제시).

Khedid 등(11)은 염화소듐 함량이 3-4%인 배지에서는 LAB가 생육하는 데 지장이 없지만, 염화소듐 함량이 6%가 넘어가면 LAB 균주들의 특성에 따라 생존에 변화가 있는 것으로 보고하고 있다. 본 실험에 사용한 분리 LAB는 염화소듐 함량이 9%인 배지에서도 23 종의 균주 중 15 종의 균주가 생존하였는데 이는 식염 함량이 상대적으로 높은 발효식품인 김치에서 분리한 균주이기 때문에 일반적인 LAB에 비해 염에 대한 저항성이 높은 것으로 사료된다(21).

***L. plantarum* FMB 31 균주의 장내 상피세포에 대한 정착성**

본 연구에서 사용된 LAB 균주들 중에서 *L. plantarum* FMB 31 균주가 높은 콜레스테롤 감소활성을 가지면서 내담증성, 내산성 그리고 내염성이 우수한 것으로 나타났다. 또한 *L. plantarum* 균주는 프로바이오틱스로서 인정되고 있기 때문에 이 분리균주는 활용한 기능성 프로바이오틱스 제품개발을 위한 종균체로서 활용될 수 있을 것으로 판단된다(22). 이에 프로바이오틱스 균주로서 중요한 요소들 중의 하나인 장내 정착성에 대한 실험을 진행하였다. 장내 상피세포인 HT-29 세포를 이용하여 *L. plantarum* FMB 31 균주의 장내 정착능에 대한 실험을 진행하였고, *L. plantarum* FMB 31 균주는 HT-29 세포에 대한 20.0%의 정착성을 나타내었다.

Lee 등(23)은 *L. plantarum* SY11 균주가 장내 상피세포에 대해 7.2%의 정착성을, *L. plantarum* SY12 균주가 5.3%의 정착성을 각각 나타내었다고 보고하였다. 이외에도 Jung과 Kim(24)은 *L. plantarum* BSM-2 균주는 4.0%, *L. plantarum* EHI-1균주는 4.6%, *L. casei* GSM-3 균주는 11.8%, *L. casei* EHI-2 균주는 7.11%의 정착성을 나타낸다고 보고하고 있다. 이러한 결과들을 고려해 보면, *L. plantarum* FMB 31 균주는 상대적으로 우수한 장내 정착성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

***L. plantarum* FMB 31 균주의 용혈 활성**

용혈활성은 프로바이오틱스 균주 선발을 위한 조건 중 인체 안전성 측면과 관련한 실험이다. 용혈이란 적혈구의 막을 파괴하거나 혹은 막의 표면 물질에 변화를 주어 적혈구의 내부 물질을 유출하는 작용을 갖는 독소의 총칭으로 병원성과 관련된 알파 용혈(α -hemolysis)과 베타 용혈(β -hemolysis)이 있다. 알파 용혈의 경우 적혈구의 불완전한 용해를 일으켜 세균 집락 주위로 녹색의 불투명한 환이 생성되고, 베타 용혈의 경우 적혈구의 완전한 용해를 일으켜 세균 집락 주위에 황색의 투명한 환을 생성한다(24).

본 연구에서 분석된 LAB 분리 균주 23종과 대조구 1종을 포

Table 2. Production of biogenic amines of the *Lactobacillus plantarum* FMB 31

Biogenic amines	Strains		
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1637	<i>L. plantarum</i> FMB 31
Histamine	+ ¹⁾	- ²⁾	-
Tyramine	+	-	-
Cadaverine	+	-	-
Putrescine	+	-	-

E. faecalis ATCC 29212 and *P. aeruginosa* KCTC 1637 were used as positive and negative control strain, respectively.

¹⁾Production of biogenic amine; ²⁾Non-production of biogenic amine.

함한 모든 LAB 균주들은 용혈활성이 없는 감마 용혈 활성을 나타내어 인체 병원성이 없는 것으로 확인되었다(결과 미제시). Estifanos(25)의 보고에서도 7종의 LAB에서 감마 용혈 활성을 나타낸다고 보고하였으며, Simone 등(26)도 18종의 *Enterococcus* sp. 를 용혈능 실험한 결과 감마 용혈 활성을 나타내어 프로바이오틱스로서 적합하다고 보고된 바 있다.

***L. plantarum* FMB 31 균주의 생체아민 생성능**

일반적으로 과량의 생체아민 섭취는 알레르기를 유발할 수 있고, 알레르기 환자 및 아민산화효소(monoamine oxidase) 저해제를 복용하는 환자의 경우에는 생체아민이 인체에 심각한 문제를 일으킬 수 있다고 알려져 있다(27). 이러한 이유로 FDA의 경우 참치나 다랑어류에 한해 히스타민(histamine)의 잔류허용기준을 50 mg/kg, 유럽과 CODEX의 경우 어류 및 가공어육에 한해 히스타민의 잔류허용기준을 100 mg/kg으로 제한하고 있다(28).

한편, Victoria와 Carmen(29)은 와인에서 분리한 31종의 LAB 중에서 6종이 생체아민을 생성한다고 보고하고 있고, Curiel 등(30)도 식품에서 분리한 93종의 LAB 중에서 13종이 생체아민을 생성한다고 보고된 바 있다. 이에 본 연구에서도 프로바이오틱스 균주로서 *L. plantarum* FMB 31 균주의 인체 안전성 분석을 위해 생체아민 생성에 대한 분석을 진행하였다. Table 2에 나타난 것과 같이, *L. plantarum* FMB 31 균주는 히스티딘(histidine), 티로신(tyrosine), 라이신(lysine) 및 오르니틴(ornithine) 등의 전구체를 분해(탈탄산 반응)하여 히스타민, 타이라민(tyramine), 카다베린(cadaverine) 및 푸트레신(putrescine) 등의 생체아민을 생성하는 활성이 없는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면, 김치에서 분리된 프로바이오틱스 젖산세균 *L. plantarum* FMB 31 균주는 내산성, 내담증성을 가지고 인체에 대한 안전성도 지니고 있을 뿐만 아니라 콜레스테롤 감소능도 우수한 LAB로서, 향후 콜레스테롤 저하 기능을 가진 프로바이오틱스 종균체로서 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 한국 전통식품인 김치에서 분리된 LAB를 이용하여 콜레스테롤 감소능을 가지고 있는 LAB를 분리하고 그 특성을 규명하였다. 23 종의 분리 LAB 중에서 *L. plantarum* FMB 31 균주가 99.4%의 높은 콜레스테롤 감소 활성을 나타내었고, 프로바이오틱스로서 활용하기 위한 중요한 특성인 내담증성, 내산성 그리고 내염성 등이 대조구로 사용된 *L. rhamnosus* KCTC 5033 균주보다 우수하거나 동등하였다. 또한 *L. plantarum* FMB

31 균주는 인체 안전성과 관련된 용혈독성 및 생체아민 생성능 실험에서도 안전성에 문제가 없는 것으로 분석되었다. 향후, 이 분리균은 콜레스테롤 저하 기능을 가지는 다양한 건강 기능 식품 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 미래창조과학부 (재)연구개발특구진흥재단의 기술이전사업화사업(과제번호 15BSI1054)의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Wessels S, Axelsson L, Hansen EB, de Vuyst L, Laulund S, Lahteenmaki L, Lindgren S, Mollet B, Salminen S, Wright A. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 498-505 (2004)
- Widyastuti Y, Rohmatussolihat, Febrisiantosa A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food Nutr. Sci.* 5: 435-442 (2014)
- Lee JJ, Lee YM, Kim AR, Chang HC, Lee MY. Effect of *Leuconostoc kimchii* GJ2 Isolated from kimchi (Fermented Korean Cabbage) on Lipid Metabolism in High Cholesterol-Fed Rats. *Korean J. Food Preserv.* 15: 760-768 (2008)
- Jackson MS, Bird AR, McOrist AL. Comparison of two selective media for the detection and enumeration of lactobacilli in human faeces. *J. Microbiol. Methods* 51: 313-321 (2002)
- Pereira DI, Gibson GR. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37: 259-281 (2008)
- Fatemeh M, Mutarned A, Frank S, Lily S. Cholesterol reduction mechanism and fatty acid composition of cellular membranes of probiotics *Lactobacilli* and *Bifidobacterium*. *J. Funct. Foods* 9: 295-305 (2014)
- Homayouni A, Azizi A, Javadi M, Mahdipour S, Ejtahed H. Factors influencing probiotic survival in ice cream: A review. *Int. J. Dairy Sci.* 10: 3923 (2012)
- Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using *o*-phthalaldehyde. *J. Lipid Res.* 14: 364-366 (1973)
- Choi HJ, Lim BR, Kim DW, Kwon GS, Joo WH. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Kimchi. *J. Life Sci.* 24: 1231-1237 (2014)
- Ji KH, Jang YN, Kim YT. Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from *Kimchi* and infant feces. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 1568-1577 (2015)
- Khedid K, Faid M, Mokhtari A, Soulaymani A, Zinedine A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.* 164: 81-91 (2009)
- Lim ES, Kim YM, Lee EW. Probiotic properties and safety assessment of lactic acid bacteria isolated from salt-fermented anchovy. *Korean J. Food Sci.* 48: 306-316 (2016)
- Bover-Cid S, Holzapfel WH. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 33-41 (1999)
- Choi EA, Chang HC. Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT- Food Sci. Technol.* 62: 210-217 (2015)
- Lim HJ, Kim SY, Lee WK. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J. Vet. Sci.* 5: 391-395 (2004)
- Custy FF, Khem MS. Effect of nutrient media and bile salts on growth and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 71: 3222-3229 (1988)
- Vinderola CG, Medici M, Perdigon G. Relationship between interaction sites in the gut hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 96: 230-243 (2004)
- Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65: 859-867 (2003)
- Burns P, Patrignani F, Serrazanetti D, Vinderola GC, Reinheimer JA, Lanciotti R, Guerzoni ME. Probiotic Crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk. *J. Dairy Sci.* 91: 500-512 (2008)
- Liong MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *J. Dairy Sci.* 88: 55-66 (2005)
- Jo GY, Ha DM. Isolation and identification of the lactic acid bacteria from Nuruk. *Agric. Chem. Biotechnol.* 38: 95-99 (1995)
- Seo JG, Lee GS, Kim JE, Chung MJ. Development of probiotic products and challenges cell biotech. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* 25: 303-310 (2010)
- Lee NK, Kim SY, Han KJ, Eom HD. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. *Food Sci. Technol.* 58: 130-134 (2014)
- Jung SE, Kim SH. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw Makgeolli. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 44-50 (2015)
- Estifanos H. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from curd and *in vitro* evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. *Afr. J. Microbiol.* 8: 1419-1425 (2014)
- Simone P, Robson A, Thiago A, Flavio C, Adriano B. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB 18s. *Food Control* 37: 251-256 (2014)
- Bodmer S, Imark C, Kneubuhl M. Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflamm. Res.* 48: 1023-3830 (1999)
- Kim JH, Ryu SJ, Lee JW, Kim YW, Hwang HJ, Kwon OK. Investigation on biogenic amines in plant-based minor Korean fermented foods. *J. Appl. Biol. Chem.* 56: 113-117 (2013)
- Victoria MAM, Carmen PM. Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food Microbiol.* 25: 875-881 (2008)
- Curiel JA, Ruiz-Capillas C, de las Rivas B, Carrascosa AV, Jimenez-Colmenero F, Munoz R. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. *Meat Sci.* 88: 368-373 (2011)