ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2018 Vol. 28. No. 1. 68~77 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2018.28.1.68

Isolation of Biogenic Amine Non-producing *Lactobacillus brevis* SBB07 and Its Potential Probiotic Properties

Hee-Jong Yang†, Su-Ji Jeong†, Seong-Yeop Jeong, Myeong Seon Ryu and Do-Youn Jeong*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 595-804, Korea

Received October 13, 2017 / Revised January 15, 2018 / Accepted January 18, 2018

The purpose of this study was to isolate the probiotic lactic acid bacteria, and verify the possibility of the final selection strain as probiotic material. For screening of biogenic amines non-producing microorganisms, 42 lactic acid bacteria were isolated from various berries, extract and vinegar grown in Sunchang. Isolates were investigated for various physiological activities such as extracellular enzyme, antimicrobial and antioxidant activities, and 5 isolates were firstly screened. SBB07 was finally selected by analyzing the biogenic amine, and named *Lactobacillus brevis* SBB07 by 16S rRNA sequencing analysis. Next, SBB07 was assayed for their survival ability when exposed to acidic and bile conditions as well as heat and antibiotic resistance. As a result, SBB07 showed more than 86% and 54% higher survival rate in acidic condition at pH 2.0 and bile resistance with 0.5% oxgall. In addition, SBB07 showed a survival rate of more than 113% in 60℃, and also confirmed that it has resistant to various antibiotics. As a result of confirming the possibility of prebiotics, SBB07 showed the best utilization of GOS as a prebiotic substrate, and utilization of FOS and inulin were also high. These results suggest that SBB07 have good potential for application as probiotic lactic acid bacteria.

Key words : Antibiotic resistance, biogenic amine, *Lactobacillus brevis*, prebiotic, probiotic

서 론

발효식품은 미생물의 발효 과정을 통해 만들어지는 식품으로 발효 과정에 관여하는 미생물에 따라 식품의 성분이 분해되고 새로운 물질이 합성되어 독특한 풍미를 형성하게 되며, 미생물로부터 다양한 대사산물이 생성되어 발효 식품의 영양가와 저장성을 높일 수 있다. 하지만 발효를 통해 바이오제닉 아민과 같은 유해한 물질 또한 생성되어 최근에는 국내뿐만 아니라 국외에서도 발효 식품내 바이오제닉 아민의 높은 함량이 인체에 해로운 수준이라고 그 위험성을 보고하고 있다[6]. 바이오제닉 아민은 식품의 발효과정에서 흔히 amino acid decarboxylase 생산 미생물에 의해 생성되는 물질로 *Bacillus cereus*와 aflatoxin과 같이 식품의 안전을 좌우하는 주요 인자 중 하나이다. 특히 인체내 질소원, 호르몬, 핵산과 같은 단백질의 전구체로서 생리 기능 조절에 관여하는 질소화합물로 체내 대사과정을 통해 균형을 이루고 있으나 과잉 섭취 시 구토, 알레르기, 혈압저하 및 발암물질 등의 독성을 유발하게 된다[15]. 사람이 섭취하게 되는 바이오제닉 아민은 식품을 통해 체내 축적되게 되며 한국인의 주요 섭취 식품인 전통 장류나 김치, 젓갈과 같은 발효식품에 높은 함량으로 존재하고 이는 발효 과정 중 발효 미생물의 아미노산, 온도, 산소 농도, pH와 같은 외부 환경에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다[25]. 하지만 국내 발효식품의 경우 일부 미생물의 작용에 의해 발효가 진행되는 것이 아니라 다양한 미생물이 관여하여 발효가 이루어지기 때문에 미생물에 의해 생성되는 바이오제닉 아민의 제어는 어려운 실정으로 국내에서는 이를 해결하기 위해 식품의 발효 과정에서 *Bacillus subtilis, B. licheniformis, Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus plantarum* 등과 같은 바이오제닉 아민 비생성 및 분해 미생물을 활용해 바이오제닉 아민의 저감화를 위한 연구가 진행되고 있는 추세이다[15, 16, 34].

유산균은 대표적인 GRAS (Generally recognized as safe) 균주로 발효식품에 존재하는 바이오제닉 아민의 생산을 저해하거나 분해하고[3], 발효과정에서 병원성미생물의 증식 억제와 유기산과 단백질, 전분, 섬유소 등과 같은 분해효소를 생산함으로써 독특한 풍미와 조직감을 유지시켜줄 뿐만 아니라[23] 체내 유용 장내 미생물로 존재하며 항암 및 혈중 콜레스테롤 저감 작용과 면역력 증진 등에 도움을 준다고 알려져 있어[22] 의약품이나 건강기능 식품의 개발에 있어 사람의 건강에 이로운 작용을 하는 프로바이오틱스로 주목 받고 있다. 프로바이오틱스는 프리바이오틱스인 lactulose, lactosucrose, oligosaccharides, raffinose, inulin, stachyose 등 복합다당류를 탄소원으로 사용하여 대표적인 프로바이오틱스인 *Bacillus*와

†Authors contributed equally.
*Corresponding author
Tel : +82-63-653-9579, Fax : +82-63-653-9590
E-mail : jdy2534@korea.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.

같은 고초균과 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus* 속 유산균의 성장을 선택적으로 촉진시켜 주며, 인간과 동물의 장내 유해균을 제어함으로써 장내 환경을 개선시키는 역할 한다고 보고되고 있다[1]. 또한 peroxisome proliferator activated receptor 감마 활성화를 통한 염증 억제 효과[8], 아토피성 피부염[33], 만성 신장질환[18] 등에 대한 효능이 밝혀지고 있으며, 프리바이오틱스 소재를 활용한 신바이오틱스의 염증성 질환에 대한 효과[32], 장내 미생물 및 소화효소 활성에 미치는 영향[35] 등과 같이 프로바이오틱스와 식품 원료로 사용 가능한 프리바이오틱스를 조합하여 장내 환경을 효과적으로 개선할 수 있는 신바이오틱스에 대한 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다. 국내에서도 건강에 대한 인식이 날로 증가하고 자연 식품에 대한 선호나 항생제 남용으로 인한 문제 등으로 프로바이오틱스의 사용이 권장되고 있는 추세이나 대부분의 프로바이오틱스가 외국에서 수입한 생균을 원료로 사용하여 상품화되고 있기 때문에 수입대체 및 국내의 독자적 프로바이오틱스 균주의 개발과 관련 기술의 확보가 무엇보다도 중요한 시기이다.

따라서 본 연구에서는 블루베리, 복분자와 같은 베리류와 베리류를 활용한 식초 및 엑기스로부터 프로바이오틱스 균주로 사용 가능한 유산균을 확보하고, 이들 분리주를 대상으로 바이오제닉 아민의 생성 여부와 항산화 및 효소 활성과 같은 다양한 기능성 효과를 검증하여 우수 균주를 선별하며 최종 선별한 유산균을 대상으로 프로바이오틱스 소재로의 활용 가능성을 검증하기 위한 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 배양

프로바이오틱스 유산균으로 활용하기 위한 균주의 선별을 위해 전라북도 순창군에서 재배된 베리류(블루베리, 복분자, 오디, 아로니아) 생과와 베리류를 전통적으로 발효시켜 제조한 식초 및 엑기스 약 40여 종을 수집하여 균원 시료로 사용하였고, 수집한 시료 1 g을 채취하여 멸균된 0.85% NaCl용액 9 ml에 각 단계별로 희석한 후 희석액 100 ul을 Lactobacilli MRS agar (Difco^{TM}, MI, USA) 배지에 도말하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 미생물의 형태적 차이를 이용하여 1차로 분리주를 선별한 후 다시 순수 배양하여 균주를 분리하였다. 분리한 미생물은 다음 연구에 사용을 위하여 -80℃에서 보관 후 사용하였다.

세포외 효소 활성

분리 균주의 세포외 효소 중 protease, cellulase의 활성은 Yang 등[34]의 방법에 따라 측정하였다. Protease 분비능은 skim milk (Difco^{TM})를 기질로 선택하여 2% skim milk에 1.5% agar를 첨가한 skim milk agar배지를 제조하여 사용하였고, cellulase 분비능은 carboxylmethyl cellulose (CMC, JUNSEI, Tokyo, Japan)을 기질로 선택하여 1% CMC agar 배지를 제조하여 사용하였다. 각각의 세포외 효소 활성 측정 배지에 각 균주의 배양 상등액을 0.45 μm syringe filter (Sartorius, Frankfurt, Germany)로 제균한 뒤 100 ul을 직경 8 mm의 well에 분주하여 25℃에서 24시간 동안 반응시킨 후 투명환의 크기에 따라 protease 및 cellulase 활성을 측정하였다. β-glucosidase 효소 활성을 분석하기 위해 1.0% esculin (Difco^{TM})과 0.5% ferric ammonium citrate (JUNSEI)를 첨가하여 제조한 Lactobacill MRS agar plate에 분리주를 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 colony 주변에 생기는 검정색 환의 유무에 따라 β-glucosidase 효소활성을 조사하였다.

식품 부패 원인균에 대한 항균 활성

선별 균주의 식품 부패 원인균에 대한 항균 활성 측정은 병원성 세균 *Bacillus cereus* KCCM40935, *Bacillus cereus* KCTC 3624 등 총 2종의 균주가 각각 포함되어 있는 0.8% soft agar plate를 제조하여 well diffusion 법[21]에 준하여 조사하였으며 0.45 μm membrane filter (Sartorius)로 제균한 분리주의 배양 상등액 100 ul을 각각의 항균 활성 측정 배지에 분주한 뒤 30℃에서 24시간 동안 배양하여 형성된 억제환의 크기에 따라 항균 활성의 유무를 측정하였다.

항산화 활성 측정

분리주에 대한 항산화 활성은 2,2-dipheyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH, Sigma-aldrich, MO, USA)을 일부 변환하여 측정하였다[21]. 100 μM DPPH Ethanol 용액 180 ul에 20 ul의 배양 상등액을 첨가한 후 반응 산물을 30분 동안 실온에서 반응시키고 UV/VIS spectrophotometer (SPECORD200, Analytik jena, Jena, Germany)로 517 ㎚에서 흡광도를 측정하여 아래 식에 따라 항산화 활성을 측정하였다. 대조구로는 MRS 액체 배지를 첨가한 실험구를 사용하여 동일한 방법으로 처리 후 측정하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = [1-(Abs_{517\ nm\ of\ sample})/(Abs_{517\ nm\ of\ control})] \times 100$$

바이오제닉 아민 생성 여부 조사

선별 분리주의 바이오제닉 아민 생성 여부 조사는 MRS 액체 배지에 각 분리주를 접종한 후 37℃ shaking incubator (VS-1203P3V, Vision Scientific Co. Ltd., Daejeon, Korea) 150 rpm에서 24시간 전배양 후 배양액 1 ml을 히스타민과 티라민의 전구체 아미노산인 히스티딘(Sigma-aldrich)과 티로신(Sigma-aldrich)이 0.1% 포함된 MRS 액체 배지 9 ml에 접종하고 37℃ shaking incubator 150 rpm에서 24시간 동안 본배양하였다. 본배양액은 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 균체가 제거된 배양 상등액을 바이오제닉 아민 분석을 위한 시료로 사용하였다. 시료와 표준 용액을 각각

0.5 ml 취한 후 0.25 ml 1,7-diaminoheptane (Sigma-aldrich)와 0.25 ml 포화 Na_2CO_3 용액(Sigma-aldrich), 1% acetone (Sigma-aldrich), 0.4 ml dansyl chloride (Sigma-aldrich)을 혼합한 후 45℃에서 1시간 동안 유도체화 하였다. 유도체화 한 시료에 0.25 ml의 10% proline (Sigma-aldrich)을 가한 후 잔량의 dansyl chloride를 제거한 뒤 2.5 ml의 ethyl ether (Samchun, Seoul, Korea)를 가하여 3분간 진탕한 후 분리된 상등액을 취하여 증발시키고 남은 잔사를 0.5 ml acetonitrile에 정용하여 0.45 μm syringe filter (Sartorius)로 여과 후 분석에 사용하였다. 바이오제닉 아민 분석을 위한 기기 분석 조건은 Yang 등[34]의 조건에 따라 분석하였다.

선별 균주의 동정 및 phylogenetic tree 작성

최종 선별 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자분석을 실시하였다. 균주의 동정을 위하여 균체를 MRS brorh에 접종하고 37℃에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하였으며, ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep kit (Zymo Research Corp., CA., USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 universal primer인 27F와 1492R primer로 합성하여 유전자 단편을 증폭시켰고[13], 증폭된 PCR산물은 QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany)로 정제한 후 ㈜마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 분석한 후 결과를 National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)의 BLAST를 사용하여 GeneBank에 등록된 염기서열과 상동성을 비교하였다. 염기서열은 ExTaxone-e 서버(http://www.eztaxon.org)를 통해 표준 균주의 염기서열을 확보한 뒤 MEGA 6.0 program [19]을 사용하여 염기서열간 상호 비교 후 계통도를 작성하였다. 계통도는 Neighbor-joining 알고리즘[30]을 사용하였으며, 1,000회 반복으로 bootstrapping하여 작성한 계통도의 견고성을 확인하였다.

API ZYM을 이용한 효소 활성 조사

최종 선발한 균주의 효소 활성을 조사하기위해 API ZYM kit (bioMerieux Co., Marcy-I'Etoile, France)를 사용하여 alkaline phosphatase 외 18가지 효소 활성을 검사하였다. 최종 선발 균주를 MRS 고체배지에서 배양하여 균체를 회수하고 멸균수에 3회 세척한 후 멸균수에 현탁하여 시료를 준비하였다. 현탁액 500 ul를 5 ml suspension medium에 풀어준 후 5~6 Mcfarland (bioMerieux Co.)로 탁도를 조정하였다. 탁도를 조정한 현택액을 ZYM kit의 각 큐플에 접종하여 37℃에서 4시간 배양한 후 표현 활성 증가와 용해를 도와주는 ZYM A, B 시약을 각각의 큐플에 한 방울씩 떨어뜨려 5분간 반응 후 색깔의 변화를 관찰하여 효소 활성 정도를 조사하였다. 색의 변화 정도에 따라 0~5까지의 값으로 표시하였으며, 0은 음성반응, 5 (≥40 nmoles)는 최대 강도의 반응이고 4~1은 각각 30, 20, 10, 5 nmoles의 중간 값을 나타내며 3 이상일 경우 양성으로 판정하였다.

내산성, 내담즙성 및 내열성 분석

위산에 대한 저항성을 확인하기 위해 pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 (in 0.1N HCl (Sigma-aldrich))로 조정한 MRS broth에 균주를 접종(10^6 CFU/ml)하여 30분 정치 후 시료를 회수하여 생균수를 측정하였다. 생존율은 대조구와 비교하여 생균수가 증가한 실험구를 내산성을 가진 것으로 평가하였다. 내담즙성 평가는 Oxgall (Sigma-aldrich)을 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%의 농도로 첨가하여 제조한 MRS broth에 유산균 배양액 1%(2.0×10^9 CFU/ml)를 접종한 후 37℃에서 6시간 배양하여 내산성과 동일한 방법으로 균의 생존율을 조사하였다. 열에 대한 안전성은 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 80℃로 유지된 MRS broth에 일정량을 접종하고 10분간 정치한 이후에 생존한 미생물 수를 계수하여 측정하였다.

선별 균주의 항생제 감수성 측정

항생제 감수성은 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 disk diffusion법으로 실시하였다. 사용한 항생제 디스크(BBL Sensi-disc, Becton Dickinson Co., NJ, USA)는 amikacin (AMK), amoxicillin-clavulanic acid (AMC), ampicillin (AMP), cephalothin (CEF), ciprofloxacin (CIP), colistin (CST), doxycycline (DOX), erythromycin (ERY), gentamicin (GEN), lincomycin (LCC), kanamycin (KAN), tetracycline (TET), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) 등 16종을 사용하였다. 균주를 Mueller Hinton broth (Merck, Darmstadt, Germany)에 접종하고 37℃에서 5시간 동안 배양한 후 Macfarland (bioMerieux) No. 0.5로 탁도를 조정하여 Mueller-Hinton agar (Difco)에 도말하였으며, 30분간 건조 시킨 후 16종의 항생제 디스크를 놓고 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양이 종료된 후 각 항생제에 대한 억제환의 크기를 측정하고 CLSI 가이드라인에 의해 감수성과 내성을 판정하였다.

프리바이오틱스 기질 이용 능력

최종 선별 균주의 프리바이오틱스 기질 사용 능력은 Ann 등[2]의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 프리바이오틱스 기질로는 glucose (Sigma-aldrich), xylitol (Sigma-aldrich), D-Tagatose (Sigma-aldrich), inulin (Sigma-aldrich), lactitol (Sigma-aldrich), lactulose (Sigma-aldrich), frutooligosaccharide (FOS, Sigma-aldrich), galactooligosaccharide (GOS, Sigma-aldrich) 등 총 8종을 사용하였으며, 96-well plate에 prebiotic minimum media (0.5% of peptone, 0.25% of sodium acetate, 0.05% of 1M magnesium sulfate $7H_2O$, 0.05% of 1M manganese sulfate $4H_2O$, 0.5% of tween80, 0.1% of diammonium citrate, 0.1% of dipotassium phosphate and 2% of each prebiotic substrates)와 기질이 첨가되지 않은 배지에 선별 균주의

배양액을 1.0×10^6 CFU/ml가 되도록 접종한 다음 37℃에서 24시간 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 기질 이용 능력을 측정하였다.

결과 및 고찰

미생물의 분리

프로바이오틱스 유산균의 분리를 위해 전라북도 순창군에서 재배된 베리류(블루베리, 복분자, 오디, 아로니아) 생과와 베리류를 전통적인 방법으로 발효시켜 제조한 식초 및 엑기스 48종을 수집하였다. 수집한 시료는 단계 희석법을 이용하여 유산균 선택 배지에 배양하고 육안으로 집락의 형태, 색 등의 형태적 특징에 따라 42종의 분리주를 확보하였다.

분리주의 세포외 효소 활성

일반적으로 유산균은 종류에 따라 endopeptidase, aminopeptidase, dipeptidase 등 다양한 종류의 protease를 생산하여 발효식품에서 구수한 맛 성분인 유리아미노산의 함량에 영향을 주며, 특히 발효 중 protease 이외에도 amylase, cellulase 등과 같은 다양한 효소를 생성하여 식품의 풍미, 조직감뿐만이 아니라 다양한 기능성을 갖는 2차 산물이 생성 된다고 알려져 있다[20]. 따라서 앞서 선별한 42종의 분리주를 대상으로 protease, cellulase, β-glucosidase 3종에 대한 세포외 효소 활성을 측정하였고, 분리주 중 9종에서 protease, cellulase 및 β-glucosidase 3가지 효소를 모두 생성하는 것을 확인하였다(Table 1). 특히 비배당체의 형성과 이소플라본 배당체의 가수분해에 필요한 촉매작용을 한다고 보고된 β-glucosidase에 대하여 활성을 갖고 있어[9], 전통발효식품에 주로 존재하는 대두 이소플라본 배당체인 제니스틴과 다이드진의 체내 흡수를 위해 비배당체 형태로 전환하는 생물 전환 공정에 활용가능성을 갖는 β-glucosidase 활성이 우수한 분리주 SBB07, SBB11, SOD62를 선별하였다.

식품 유해 미생물에 대한 항균 활성 측정

유산균은 발효 중 생산하는 각종 유기산에 의해 식중독 원인균 및 부패 세균과 같은 유해미생물의 증식을 억제하고, 식품의 저장성을 높여주기 때문에 항균 활성이 있는 유산균 및 이를 이용한 식품 제조 연구가 많이 이루어지고 있다[24, 27]. 식품유해미생물에 대한 항균 활성은 효소활성측정을 통하여 선별한 1차 분리주 9종을 대상으로 조사하였다. KCTC 3624와 KCCM 40935의 *B. cereus* 2종에 대하여 항균 활성을 측정한 결과 9종의 선별 균주 모두 유해미생물에 대하여 항균 활성을 갖고 있었으며, 분리주 중에서도 SBB07, SBB11, SBBJ43, SBBJ56, SOD62 등 5종이 *B. cereus*에 대하여 우수한 항균 활성을 지니고 있었다(Table 1). 따라서 앞서 선발한 9종의 분리주는 식품 유해미생물에 대해 항균 활성을 모두 지니므로 식품내 부패균의 증식을 억제하여 식품 보존 및 유통과정에서의 산업적 적용이 가능한 분리주로 활용성이 높음을 확인하였다.

항산화 활성

세포외 효소 활성 및 항균 활성 측정 실험을 통해 선발된 5종의 분리주를 대상으로 DPPH에 의한 free radical 제거 효과를 측정하는 방법으로 항산화 활성을 조사하였다. DPPH는 항산화 활성을 측정하기 위한 대표적인 기질로 페놀성 물질에 대한 항산화 작용 지표 중 하나이다. 항산화제는 식용 유지나 지방질 식품의 가공 및 저장 중 산화로 인한 산패, 냄새, 풍미의 변화, 변색의 방지를 위해 free radical에 전자를 공여하는 식품 내 지방질 산화를 억제하는 역할을 하며[12], 인체 내 산소 free radical 반응이 생체 조직의 노화나 질병에 영향을 주는데 다양한 페놀성 물질들은 이러한 free radical 소거능이 우수하여 노화나 질병 예방하는데 중요한 역할을 한다[26]. 따라서 DPPH를 이용하여 분리주의 항산화 활성을 측정한 결과(Fig. 1) 선별 균주 중 SBB07, SBBJ56, SOD62이 15% 이상의 DPPH 활성을 나타냈으며, SBB07이 24.25%로 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다.

Table 1. Conditions of enzyme activity, antibacterial activity for selected

Test contents	Selected strains								
	SBB07	SBB09	SBB11	SBB24	SBB36	SBBJ43	SBBJ56	SOD41	SOD62
Protease[a]	14	14	13	14	14	15	13	13	13
Cellulase[a]	12	8	8	10	11	8	12	12	8
β-glucosidase[a]	21	0	15	0	15	8	8	0	20
Bacillus cereus KCTC 3624[a]	15	17	15	16	16	16	16	16	16
Bacillus cereus KCCM 40935[a]	18	13	16	14	15	15	14	14	14
Histamine	ND[b]	NQ[c]	ND	ND	NQ	ND	NQ	ND	NQ
Tyramine	ND	NQ	NQ	ND	ND	ND	NQ	NQ	ND

[a]Size of clear zone (diameter).
[b]Not detected. [c]Not quantified.

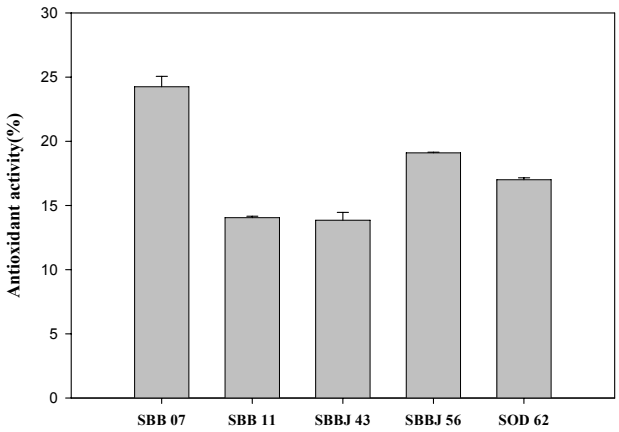

Fig. 1. Comparison of antioxidant activity for selected strains.

바이오제닉 아민 생성 확인

바이오제닉 아민은 주로 단백질 함유량이 높은 청국장, 된장 등과 같은 국내 전통 식품이 발효 및 숙성되거나 부패되는 과정에서 아미노산의 탈탄산 반응에 의해 생성되거나 탈탄산 효소활성을 갖는 미생물에 의해 생성된다. 특히 히스타민과 티라민은 사람이 섭취 시 알레르기를 유발시키거나 혈압상승 및 두통을 일으킬 수도 있어[34] 식품 안전성 측면에서 바이오제닉 아민에 대한 조사가 매우 중요하다. 따라서 분리주를 대상으로 전구체 히스티딘과 티로신이 포함된 액체 배지에 선별균주 5종을 접종 및 배양하여 분리주가 생성한 히스타민, 티라민의 함량을 HPLC로 측정하였다(Table 1). SBB11, SBBJ56, SOD62 분리주 3종에서는 바이오제닉 아민이 검출은 되었지만 정량이 되지 않는 매우 낮은 수치로 검출되었으며, SBB07, SBBJ43의 2종의 분리주에서는 히스타민과 티라민이 모두 검출되지 않은 것을 확인하였다. 식품내 히스타민과 티라민은 약 100 mg 이상을 섭취해야 중독 증상을 일으킬 수 있다고 보고되고 있어[4] 정량은 되지 않았지만 검출이 된 3종의 분리주도 모두 유해한 수준은 아님을 확인하였다. 따라서 선별한 균주 5종을 대상으로 효소 활성, 항균 활성, 항산화 활성 등의 조사결과와 바이오제닉 아민 분석결과를 비교하였을 때 SBB07의 활성이 가장 우수하고 다양한 식품 분야에 적용이 가능하

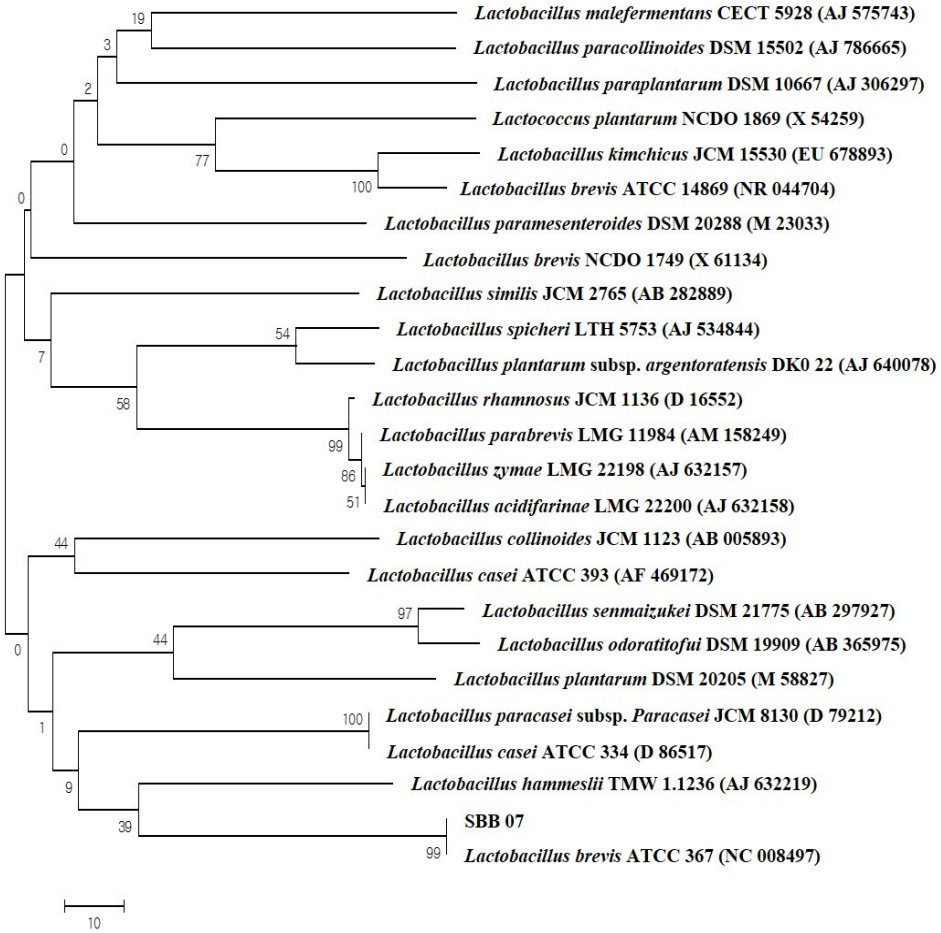

Fig. 2. Phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequence of strain SBB07. All sequences used here were from *Lactobacillus* type strain. *Lactobacillus* species and other related lactic acid bacteria, based on 16S rRNA sequences. GenBank accession numbers are given in parentheses. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bootstrap values are expressed as percentages of 1,000 replicates.

기 때문에 최종 선별 균주로 SBB07을 선택하였다.

최종 선별 균주의 동정

최종 선별한 SBB07의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과를 이용하여 BLAST search 결과 *Lactobacillus brevis*로 판명되었으며, Eztaxon serve에서 표준 균주와 상동성을 비교 분석하였다. Sequence alignment 분석에 사용한 parameter 및 option 값은 protein weight matrix로 Gonnet series를 사용하였고, gap opening 15, gap extension 6.66, delay transition weight 0.5로 설정하였으며, gap penalty 5, K-tuple size 2, top diagonals 4, window size 4로 설정하였다. 그 결과 SBB07 (1302 bp)는 *Lactobacillus brevis* ATCC 367 (NC 008497)과 99%의 상동성을 나타내었다. 염기서열을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하기 위해 evolutionary distances의 추론은 maximum composite Likehood 방법을 모델로 사용하였다(Fig. 2). 최종적으로 *Lactobacillus brevis* SBB07로 명명하였고, SBB07은 한국미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 *Lactobacillus brevis* KCCM12102P로 기탁하였다.

API ZYM Kit을 이용한 효소 활성

일반적으로 유산균이 프로바이오틱스로 사용되기 위해서는 이들이 생산하는 효소 또한 매우 중요한 부분을 차지하고 있어 최종 선별한 SBB07의 앞선 protease, amylase 이외의 효소 생산 여부를 확인하기 위해 API ZYM Kit을 이용하여 조사하였다. SBB07은 leucine arylamidase, valine arylamidase, cysteine arylamidase 계열의 protease 효소에 대하여 10 nmole의 약한 활성을 나타내었다. 하지만 Naphol-AS-BI- phosphohydrolase의 경우 30 nmole의 높은 활성을 나타내었으며, β-galactosidase는 40 nmole 이상의 높은 활성을 나타내어 한국인의 80%가 겪는 우유 중 lactose에 의한 유당 불내증의 저하에 많은 도움이 될 것으로 나타났다[31]. 또한 발암 효소로 알려진 β-glucuronidase의 경우 benzopyrene과 같은 독성물질이 체내 들어왔을 때, 간에서 gluculonic acid와 결합되어 그 독성이 증가하며, 결합된 물질이 소장에서 담즙과 함께 장내 배설되어 장내 세균의 β-glucuronidase에 의해 탈포합 되면서 다시 독성이 생길 수 있기 때문에[7] 프로바이오틱스 유산균으로 사용되기 위해서는 활성이 낮은 균주가 바람직하며 SBB07의 경우 10 nmole 이하로 활성이 미약하여 프로바이오틱스 균주로 인한 발암 유발의 위험이 없음을 확인하였다(Table 2). SBB07은 일반적으로 보고된 *L. brevis* 균주와 대부분 유사한 효소 활성을 보였으나, α-galactosidase와 esterase의 활성을 지니고 있지 않아 앞서 보고된 균주와 일부 특성이 다르다는 것을 확인하였다[14].

Table 2. Enzyme activities of *L. brevis* SBB07 by API ZYM analysis

Enzymes	*Lactobacillus brevis* SBB07
Control	0[a]
Alkaline phosphatase	0
Esterase (C4)	0
Esterase lipase (C8)	5
Lipase (C14)	0
Leucine arylamidase	10
Valine arylamidase	10
Cystine arylamidase	10
Trypsin	0
α-chymotrypsin	5
Acid phosphatase	10
Naphol-AS-BI-phosphohydrolase	30
α-galactosidase	0
β-galactosidase	≥40
β-glucuronidase	10
α-glucosidase	20
β-glucosidase	30
N-acetyl-β-glucosaminidase	10
α-mannosidase	0
α-fucosidase	0

All values were mean ± S.D (n=3).
[a]0, no enzyme activity: 5, 10, 20, 30, ≥40 indicates nanomoles of hydrolysed substrate after 4 hr of incubation at 37℃.

SBB07의 내산성, 내담즙성 및 내열성

유산균이 식품과 함께 섭취 시 프로바이오틱스로서의 효과를 나타내기 위해서는 소화액 수준인 pH 3 이하의 낮은 pH 조건과, 장내 담즙산의 농도보다 고농도의 담즙산이 함유된 배지에서 생장 수 있는 조건이 요구되어야 한다[10]. SBB07의 내산성 조사 결과 초기 접종 균수와 비교하였을 때 pH 3까지는 전혀 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, pH 2에서 약 14%가 감소하였지만 약 86%의 생육이 가능함을 나타내었다(Fig. 3A). 일반적으로 프로바이오틱스 생균의 주요 사멸 원인은 낮은 pH이며, *Lactobacillus* 균주는 일반적으로 1% 내외의 생존율을 보이지만 *L. brevis* 는 높은 내산성을 지닌다는 보고와 일치하는 결과를 얻었다[28]. 인공 담즙에 대한 저항성은 장내 담즙 농도(0.3%)보다 높은 oxgall이 0.5% 함유된 배지에서 약 54%, 1.0% 함유된 배지에서는 약 46%가 생육한 것을 확인하여 내담즙성 또한 우수한 것을 확인하였고(Fig. 3B), 일반적으로 내산성을 보인 균주는 십이지장에서 분비되는 비교적 산성이 강한 담즙에도 역시 내성을 나타내는 특성을 지닌다는 보고와 일치하는 결과를 얻었다[31]. 분리 균주의 내열성은 MRS broth 배지에 분리 균주 SBB07을 접종 후 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 80℃에서 10분간 정치 후 생존하는 수를 측정한 결과 60℃에서도 약 113% 생존율을 보여 매우 높은 내열성을 나타내었다(Fig. 3C). *Lactobacillus* 계열의 미생물은 다른 종류의 미생물에 비해 내열성이 가장 약한 것으로 보고되고 있으

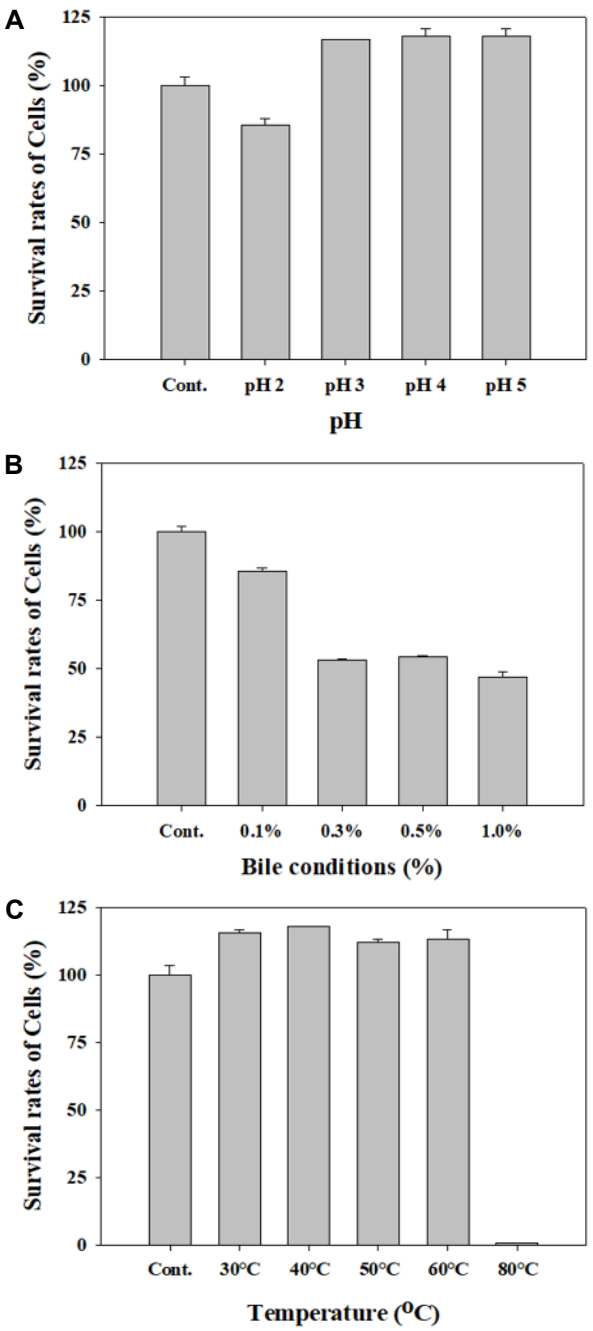

Fig. 3. pH resistance at various pH from 5.0 to 2.0 (A) and bile salts tolerance of *L.brevis* SBB07 at various bile salt from 0 to 1.0% (B). Heat stabilities of *L.brevis* SBB07 (C).

며[5], 생균의 제품 가공 처리 공정이 보통 60~80℃에서 이뤄지기 때문에 펠렛화 공정과 같이 균주가 유산균일 경우 특히 내열성에 대한 고려가 필요하다. 결론적으로 SBB07은 유산균 제제의 제품화에 가장 큰 문제점이 되는 안정성과 보존성이 우수하며, 이로 인해 급격한 활력 저하와 사멸율에 대해 유리한 프로바이오틱스 소재로 활용 가능함을 확인하였다.

항생제 내성

Lactobacillus 속은 본질적으로 광범위한 항생제에 대하여 높은 저항성을 보인다고 알려지고 있다. 특히 vancomycin에 대한 저항성은 많은 유산균의 본질적 특성이며, erythromycin과 tetracycline에 대한 저항성은 균주에 따라 다양하고, 사람의 경우 약이나 식품에 항생제가 들어있어서 섭취한 프로바이오틱스 유산균은 항생제와 쉽게 접촉하게 되므로 항생제에 대한 내성이 강할수록 생존 가능성이 높아 장관 내 증식하여 유용한 기능성을 발휘할 수 있다고 알려져 있다[11]. 따라서 최종 선별 균주 SBB07에 대한 항생제 감수성을 조사한 결과 amoxicillin/clavulanic acid, doxycycline, erythromycin에 대하여 생육이 억제됨을 확인하였고, amikacin, cephalothin, ciprofloxacin, colistin, lincomycin, kanamycin, norfloxacin, streptomycin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole 계열의 항생제에 대하여는 내성을 지니고 있음을 확인하였다(Table 3). 따라서 SBB07 균주를 사용하여 프로바이오틱스 제품 개발 시 다양한 항생제와 병행하여 사용 가능하며, 장내에 존재하는 항생물질에 강한 내성을 지니게 되므로, 동일한 종의 타 균주 보다 우수한 항생제 내성을 보유하는 기능성 프로바이오틱스로 판단된다.

프리바이오틱스 기질 이용 능력

프리바이오틱스는 사람이나 동물에 의해 잘 소화되지 않는 난소화성 성분으로 프로바이오틱스 균주의 탄소원이 되어 장내 유익균의 생장을 선택적으로 촉진시켜 장내 환경을 개선하는데 도움을 주는 복합 당류로, 대부분 탄수화물이나 식이섬유 형태로 존재하는 것으로 보고되고 있다[29]. 최근 프로바이오틱스 균주와 프리바이오틱스를 함께 처리하는 신바이오틱스 제제가 개발되고 있는 추세이며, 프로바이오틱스 균주를 활용한 제제와 비교해 증식 및 장내 정착 능력이 더욱 우수한 것으로 밝혀졌다[2]. 따라서 최종 선별 균주 SBB07의 프리바이오틱스 기질 이용 능력을 조사하기위해 프리바이오틱스 기질원으로써 glucose, xylitol, D-tagatose, inulin, lactitol, lactulose, frutooligosaccharide (FOS), galactooligosaccharide (GOS) 등의 8가지를 이용하여 24시간 동안 균의 생장율을 측정한 결과(Fig. 4), GOS에서 glucose 대비 O.D 1.27로 가장 높은 성장률을 나타내었고, 다음으로 FOS와 inulin 순으로 높게 측정되었다. 하지만 lactitol, lactulose, tagatose, xylitol에서는 O.D 0.4 이하로 낮은 성장률을 보여($p<0.05$), oligofructose와 같은 짧은 사슬의 프리바이오틱스에서는 더 빨리 발효가 이루어진다는 보고와 일치하는 것을 확인하였다[17]. 결론적으로 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 SBB07은 세포외 효소 및 항균 활성이 우수하며, 내담즙, 내산성, 내열성 및 항생제 내성을 지니고 있고, GOS와 같은 프리바이오틱스 기질 이용 능력도 우수한 프로바이오틱스 소재로 활용 가능성이 높은 균주로 판단된다.

Table 3. Distribution of antibiotic susceptibility and resistance of *L.brevis* SBB07

Enzyme	Code/Disc potency	Result
Amikacin	AN/30 μg	ND
Amoxicillin/clavulanic acid	AMC/20 μg, 10 μg	SS
Ampicillin	AM/10 μg	SS
Cephalothin	CF/30 μg	ND
Ciprofloxacin	CIP/5 μg	ND
Colistin	CL/10 μg	ND
Doxycycline	D/30 μg	SS
Erythromycin	E/15 μg	SS
Gentamicin	GM/10 μg	S
Kanamycin	K/30 μg	ND
Lincomycin	L/2 μg	ND
Neomuycin	N/30 μg	S
Norfloxacin	NOR/10 μg	ND
Streptomycin	S/10 μg	ND
Tetracycline	TE/30 μg	ND
Trimethoprim/sulfamethoxazole	SXT/1.25 μg, 23.75 μg	ND

Diameter, cm; ND, Not detected; S, 1.2~1.5; SS, 1.6~2.0.

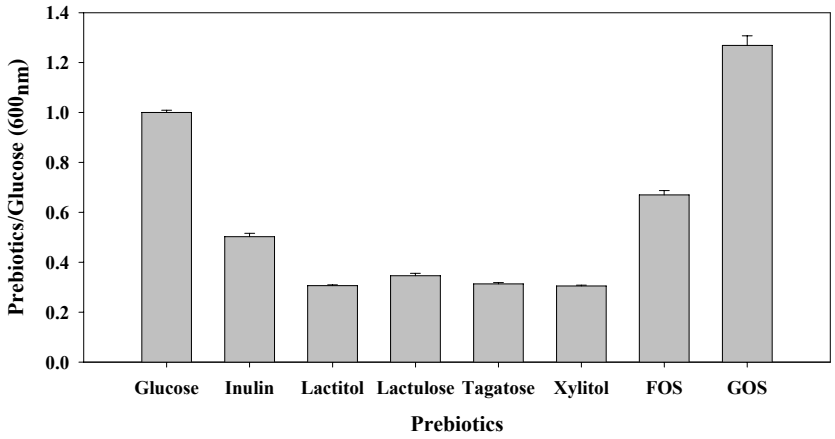

Fig. 4. Growth of selected SBB07 for 24 hr in prebiotic minimum media containing different carbohydrates carbon sources including inulin, lactitol, lactulose, tagatose, xylitol, fructooligosaccharide (FOS), and galactooligosaccharide (GOS). The results are measured at 600 nm using a microtitrator ELISA reader to glucose as positive control.

감사의 글

본 연구는 순창군 향토건강식품명품화사업의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

1. Ahn, Y. J. and Choi, H. S. 2014. Potential probiotic properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from fermented soybean product. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 749-755.
2. Ann, E. Y., Kim, Y., Oh, S., Im, J. Y., Park, D. J., Han, K. S. and Kim, S. H. 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridization system. *Int. J. Food Sci. Technol.* **42**, 411-419.
3. Choi, H. J., Lim, B. R., Kim, D. W., Kwon, G. S. and Joo, W. H. 2014. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Kimchi. *J. Life Sci.* **24**, 1231-1237.
4. Choi, J. Y., Hong, S. W. and Chung, K. S. 2012. Selection of biogenic amine-reducing microorganisms from a traditional Korean-style fermented food, Cheonggukjang. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 196-201.
5. Cho, M. K., Kim, K., Kim, C. H., Lee, T. K. and Kim, K, Y. 2000. Isolation and characterization of *Lactobacillus fermentum* YL-3 as a poultry probiotic. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 279-284.
6. Cho, T. Y., Han, G. H., Bahn, K. N., Son, Y. W., Jang, M. R., Lee, C. H., Kim, S. H., Kim, D. B. and Kim, S. B. 2006. Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**, 730-737.
7. Cole, C. B., Fuller, R. and Carter, S. M. 1989. Effect of probiotic supplements of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium adolescentis* 2204 on β-glucosidase and β-glucuronidase activity in the lower gut of rats associated with a human faecal flora. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2**, 223-225.
8. Eun, C. S., Han, D. S., Lee, S. H., Jeon, Y. C., Sohn, J. H., Kim, Y. S. and Lee, J. 2007. Probiotics may reduce inflamma-

tion by enhancing peroxisome proliferator activated receptor gamma activation in HT-29 cells. *Kor. J. Gastroenterol.* **49**, 139-146.
9. Esaki, H., Watanabe, R., Hishikawa, N., Osawa, T. and Kawakishi, S. 2004. Utility of isoflavone preparation from soy sauce cake as antioxidant materials. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **51**, 47-53.
10. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 15-18.
11. Gueimonde, M. and Salminen, S. 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig. Liver Dis.* **38**, 242-247.
12. Jang, J. K. and Han, J. Y. 2002. The antioxidant ability of grape seed extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 524-528.
13. Jeong, S. J., Shin, M. J., Jeong, S. Y., Yang, H. J. and Jeong, D. Y. 2014. Characteristic analysis and production of short-ripened Korean traditional soy sauce added with rice bran. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 550-556.
14. Kim, S. E. 2009. Identification of lactic acid bacteria (LAB) from Mukeunji, a long-term ripened Kimchi and analysis of availability of LAB as probiotics. M.S. dissertation, Kyunghee University, Seoul, Korea.
15. Kim, Y. S., Cho, S. H., Jeong, D. Y. and Uhm, T. B. 2012. Isolation of biogenic amines-degrading strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* from traditionally fermented soybean products. *Kor. J. Microbiol.* **48**, 220-224.
16. Kim, Y. S., Jeong, J. H., Cho, S. H., Jeong, D. Y. and Uhm, T. B. 2012. Antimicrobial and biogenic amine-degrading activity of *Bacillus licheniformins* SCK B11 isolated from traditionally fermented red pepper paste. *Kor. J. Microbiol.* **48**, 163-170.
17. Kleesen, B., Hartmann, L. and Blaut, M. 2001. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br. J. Nutr.* **86**, 291-300.
18. Koppe, L., Mafra, D. and Fouque, D. 2015. Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney Int.* **88**, 958-966.
19. Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3 : Intergrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings Bioinf.* **5**, 150-163.
20. Law, J. and Haandrikman, A. 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **7**, 1-11.
21. Lee, J. H., Chae, M. S., Choi, G. H., Lee, N. K. and Paik, H. D. 2009. Optimization of medium composition for production of the antioxidant substances by *Bacillus polyfermenticus* SCD using response surface methodology. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 959-964.
22. Lee, J. J., Son, H. Y., Choi, Y. M. J., Cho, H., Min, J. K. and Oh, H. K. 2016. Physicochemical components and antioxidant activity of *Sparassis crispa* mixture fermented by lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Preserv.* **23**, 361-368.
23. Lim, S. M. 2012. Synbiotic potential of yoghurt manufactured with probiotic lactic acid bacteria isolated from mustard leaf *Kimchi* and prebiotic fructooligosaccharid. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 226-236.
24. Lim, S. M., Kim, D. S. and Ahn, D. H. 2014. Anti-*Helicobacter pylori* activity of yogurt fermented with lactic acid bacteria from Baikkimchi. *Kor. J. Microbiol.* **50**, 334-344.
25. Oh, H., Ryu, M., Heo, J., Jeon, S., Kim, Y. S., Jeong, D. and Uhm, T. B. 2014. Characterization of biogenic amine-reducing *Pediococcus pentosaceus* isolated from traditionally fermented soybean products. *Kor. J. Microbiol.* **50**, 319-326.
26. Park, C. K., Cha, J. Y., Jeon, B. S., Kim, N. M. and Shim, K. H. 2000. Effects of chicory root water extracts on serum triglyceride and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) activity in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 518-524.
27. Park, J. M., Lee, H. M., Eom, H. J., Kim, S. H., Song, I. G. and Yoon, H. S. 2013. Quality characteristics of sourdough bread with lactic acid bacteria in the antibacterial activity. *Kor. J. Food Nutr.* **26**, 199-207.
28. Park, K. Y. 1995. The nutritional evaluation and antimutagenic and anticancer effects of Kimchi. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **24**, 169-182.
29. Roberfroid, M. 2007. Prebiotics: The concept revisited. *J. Nutr.* **137**, 830S-837S.
30. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
31. Shin, M. S., Kim, H. M., Kim, G. T., Huh, C. S., Bae, H. S. and Baek, Y. J. 1999. Selection and characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean faces. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 495-501.
32. Steed, H., Macfarlane, G. T. and Macfarlane, S. 2008. Prebiotics, synbiotics and inflammatory bowel disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 898-905.
33. Weston, S., Halbert, A., Richmond, P. and Prescott, S. L. 2005. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomized controlled trial. *Arch. Dis. Child.* **90**, 892-897.
34. Yang, H. J., Jeong, S. J., Jeong, S. Y., Heo, J. H., Choi, N. S. and Jeong, D. Y. 2016. Screening of Non-biogenic-amine-producing *Bacillus subtilis* and medium optimization for improving biomass by the response surface methodology. *J. Life Sci.* **26**, 571-583.
35. Yang, S. C., Chen, J. Y., Shang, H. F., Cheng, T. Y., Tsou, S. C. and Chen, J. R. 2005. Effect of synbiotics on intestinal microflora and digestive enzyme activities in rats. *World J. Gastroenterol.* **11**, 7413-7417.

초록 : 바이오제닉 아민 비생성 *Lactobacillus brevis* SBB07의 분리 및 잠재적 프로바이오틱스 특성 분석

양희종 · 정수지 · 정성엽 · 류명선 · 정도연*
((재)발효미생물산업진흥원)

바이오제닉 아민 비생성 유산균의 선별을 위해 순창군에서 재배된 베리류 및 엑기스, 식초 등으로부터 42종의 유산균을 분리하였다. 분리주를 대상으로 세포외 효소 활성, 항균 활성, 항산화 활성과 같은 다양한 생리활성 분석을 실시하여 5종의 분리주를 1차 선별하였다. 분리주를 대상으로 바이오제닉 아민 생성 여부를 분석하여 최종적으로 SBB07을 선별하였고, 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 *Lactobacillus brevis* SBB07로 명명하였다. SBB07의 프로바이오틱스 활용 가능성을 확인하기 위해 효소 생산 여부, 내산성, 내담즙성, 내열성, 항생제 내성을 조사하였고, pH 2.0에서의 내산성 및 0.5% oxgall을 함유한 내담즙성에서 각각 86% 이상과 54% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. 또한 60℃에서도 113% 이상의 생존율을 나타내어 내열성도 우수하며 다양한 항생제 내성을 갖는 것을 확인하였다. 프리바이오틱스 이용가능성을 확인한 결과에서는 GOS의 이용 능력이 가장 우수하였으며, FOS와 inulin의 이용 능력도 높게 나타났다. 따라서 SBB07은 세포외 효소 및 항균 활성이 우수하고, 내담즙, 내산성, 내열성 및 항생제 내성을 지니며 프리바이오틱스 기질 이용 능력도 우수한 프로바이오틱스 소재로 활용가능성이 높은 유산균으로 기대된다.