

**ORIGINAL ARTICLE**

Inhibition Effect on Pathogenic Microbes and Antimicrobial Resistance of Probiotics

Jae Soo Kim^{1,†}, Young Sam Yuk^{2,†}, Ga Yeon Kim³¹Department of Laboratory Medicine, Dankook University Hospital, Cheonan, Korea²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Dankook University, Korea³Department of Public Health, Dankook University Graduate School, Cheonan, Korea

Probiotics의 병원성 미생물에 대한 억제효과와 항균제 내성

김재수^{1,†}, 육영삼^{2,†}, 김가연³¹단국대학교병원 진단검사의학과, ²단국대학교 임상병리학과, ³단국대학교 대학원 보건학과**ARTICLE INFO**Received July 17, 2019
Revised 1st August 10, 2019
Revised 2nd August 28, 2019
Revised 3rd August 30, 2019
Revised 4th September 3, 2019
Revised 5th September 4, 2019
Accepted September 4, 2019**Key words**Antibiotic resistance
Pathogenic microbes
Probiotics**ABSTRACT**

To investigate the inhibition effect on pathogenic microbes and the antimicrobial resistance of probiotics, a total of 140 probiotics were isolated from 35 kinds of Korean commercially available Kimchi. Of those, *L. plantarum* was identified from 53 strains (37.9%), *E. faecium* from 27 strains (19.3%), and *L. rhamnosus* from 7 strains (5.0%) using 16S rRNA gene sequencing. Sixty nine strains (49.3%) showed overall antimicrobial activity against pathogenic microbes, namely *S. Typhi*, *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *S. flexneri*, NAG Vibrio, *Listeria monocytogenesis*, *Y. enterocolitica*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *G. vaginalis*, *C. albicans*, and *P. acne*. The proportions of *L. plantarum*, *E. faecium*, and *L. rhamnosus* strains to pathogenic microbes were 75.5%, 40.7%, and 28.6%, respectively. In addition, a resistance test with 18 antimicrobial agents using a disk diffusion assay revealed a resistance incidence of 98.6% for nalidixic acid, 83.6% for streptomycin, 75.7% for gentamicin, 73.6% for vancomycin, 72.1% for norfloxacin, and 67.9% for ciprofloxacin. In conclusion, *L. plantarum*, *L. sakei*, and *E. faecium* strains with various antimicrobial activities and broad antibiotic resistance are useful for treating diarrhea in long-term inpatients and for the alternative use for treating *Candida* species female vaginitis.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

Probiotics는 WHO와 FAO의 정의에 의하면 적당량을 투여하였을 때, 숙주에게 건강을 제공하는 살아있는 미생물로 정의되어 있는 건강에 유익한 박테리아로서 장내 건강을 유지하고 소화가 잘 되도록 돕는다[1]. 김치에서 분리된 *Lactobacillus*는

아토피성 피부염과 식품 알러지를 경감하는 능력과 함께 다량의 IL-12와 IFN- γ 을 생산함으로써 Th1/Th2 균형을 조절하는 것으로 알려져 있으며[2], 오메가 3 polyunsaturated fatty acid가 풍부한 젓갈 기름은 알러지 감작을 감소시킬 수 있다[3]. 항생제 치료시 probiotics를 보충제로 제공해야 한다는 의견을 지지하는 연구가 점차 증가하고 있으며 실제로 항생제 치료 과정에서 probiotics 보충제를 첨가하면 장내 환경에서 발생하는 항생제로 인한 부작용을 감소시킬 수 있다[4]. 식물성 유산균은 동물성 유산균보다 고농도의 염도나 영양이 풍부하지 않은 곳에서도 생존할 수 있으며, 산에 강해 90%가 살아있는 상태로 장에 도달할 수 있다.

* Corresponding author: Ga Yeon Kim
Department of Public Health, Dankook University Graduate School, Dandae-ro,
Dongnam-gu, Cheonan 3116, Korea
E-mail: sysnhj77@gmail.com

* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8751-5055>

[†]These authors contributed equally to this work.

본 연구에서는 국내에서 시판중인 김치에서 probiotics을 분리하여 16S rRNA sequencing을 통한 균 동정과 각종 병원성 미생물에 대한 억제효과를 조사하였으며 또한 환자치료에 사용되는 총 18종의 항균제 내성 패턴을 조사하여 장기간 항균제 치료중인 설사질환 환자의 치료 및 예방목적에 사용될 수 있는 probiotics를 개발하여 국민보건 향상에 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 검체

검체는 2016년 1월말부터 12월말까지 시판되는 김치와 가정에서 제조된 김치 등 총 35종을 사용하였으며, 김치액을 무균의 50 mL 채취병에 채취하여 사용하였다.

2. Probiotics 분리 및 동정

Probiotics의 분리시험은 식품의 기준 및 규격[5] 및 건강기능식품의 기준 및 규격[6]에 따라 실시하였다. 즉 김치액을 멸균 식염수로 10배 단계희석을 한 후, 각 분리용 배지에 희석액 0.1 mL를 접종하고 spreader를 이용하여 배지 전체에 균일하게 도말하고, TOS-MUP agar (Difco, MI, USA) BS agar (Difco, MI, USA) 및 BL agar (Difco, MI, USA)는 혐기배양을, 나머지 배지는 10% CO₂ incubator에서 35°C 48시간 배양하였다. 배양 후 분리된 집락을 선택한 후 유산균 배양을 위해 Lactobacilli MRS agar (Difco, MI, USA)에 희선 도말하여 순수 배양됨을 확인하였다. 또한 분리균의 동정은 Kaewsrichan 등[7], Lawalata 등[8], Aboserh 등[9]의 방법에 따라 16S rRNA sequencing을 실시하였다. 보관된 균주의 동정을 위해 Lactobacilli MRS agar (Difco)에 재도말하고 35°C, 10% CO₂ incubator에서 48시간 배양하고 균집락 형성을 확인하고 Lactobacilli MRS agar (Difco)에서 배양하고 냉장상태로 140개의 균주를 염기서열 분석기관인 주마크로젠(Korea)에 의뢰하여 각 균종에 대한 16S rRNA 염기서열 분석을 바탕으로 Genbank의 BLAST search를 통한 균 동정 결과를 회사측으로부터 얻었다. 염기서열 분석을 위해 사용된 PCR primer와 sequencing primer는 현재 보편적

으로 사용되는 것으로써 Table 1과 같다.

3. Probiotics 배양균액의 병원성 미생물에 대한 억제효과

억제시험은 Ligocka와 Paluszak [10], Kaewsrichan 등[11]의 방법에 따라 실시하였다. 즉 -80°C에 보관된 균주를 Lactobacilli MRS agar (Difco)에 희선도말하고 35°C에서 10% CO₂, 24~48시간 배양하여 순수배양 유무를 확인하고 3회 계대배양한 균액을 시험에 사용하였다.

시험균주로 사용된 병원성 미생물들은 장내설사를 일으키는 *Eschericia coli* O157:H7 (ATCC 43895; *E. coli* O157:H7), *Salmonella* Typhi (ATCC 19430; *S. Typhi*), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076; *S. Enteritidis*), *Shigella flexneri* (ATCC 12022; *S. flexneri*), Non-agglutinable *Vibrio cholerae* (ATCC 25873; NAG-*Vibrio*), *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932; *L. monocytogenes*), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610; *Y. enterocolitica*), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1927; *S. aureus*) 등 총 8종과 패혈증을 일으키는 *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615; *S. pyogenes*), 질염을 일으키는 *Gardnerella vaginalis* (KCTC 5097; *G. vaginalis*)와 *Candida albicans* (KCTC 7752; *C. albicans*), 그리고 피부염을 일으키는 *Propionibacterium acnes* (KCTC 5012; *P. acnes*) 등 4종을 포함하여 총 12종의 병원성 미생물을 사용하였다.

4. Probiotics 배양균액의 항균제 내성시험

항균제 감수성 및 내성시험은 2017년 CLSI guideline M100 S27을 기준으로 시험하였으며[12] 또한 Manual of antimicrobial susceptibility testing [13], WHO [14] 및 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [15]을 참고하여 실시하였다. Lactobacilli MRS agar (Difco)을 이용하여 디스크 한천 확산법을 사용했으며, 임상에서 많이 사용되는 총 18종의 항균제 중 다양한 계열을 포함시켰고 Table 2와 같이 β-lactam 계열이 3개, cephalosporins 계열이 2개, aminoglycosides 계열이 2개, quinolone 계열이 3개, 그리고

Table 1. Primers used for PCR sequencing of 16S rRNA

Primer name	Sequence	Use
27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'	PCR amplification
1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'	
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	PCR sequencing
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	

Table 2. The antimicrobials used in this study

Groups	Antimicrobials	Abbreviation
β-lactam	Ampicillin	AM
	Penicillin	P
	Oxacillin	OX
Cephalosporins	Cefotetan	CTT
	Cephalothin	CF
Aminoglycosides	Gentamicin	GM
	Streptomycin	S
Quinolone	Ciprofloxacin	CIP
	Norfloxacin	NOR
	Nalidixic acid	NA
Glycopeptide	Vancomycin	VA
Tetracyclines	Tetracycline	TE
Lincosamide	Clindamycin	CC
Carbapenem	Imipenem	IMP
Macrolide	Erythromycin	E
Others	Chloramphenicol	C
	Trimethoprim/sulfamethoxazole	SXT
	Refampin	RA

Table 3. Identification of probiotics isolated from Kimchi by 16S rRNA sequencing

Identification of probiotics	No. of isolates (%)	Genbank (Accession No.)
<i>L. plantarum</i>	53 (37.9)	NR104573
<i>E. faecium</i>	27 (19.3)	NR114742
<i>L. rhamnosus</i>	7 (5.0)	NR043408
<i>L. sakei</i>	6 (4.3)	NR042443
<i>Leu. mesenteroides</i>	2 (1.4)	CP012009
<i>L. acidophilus</i>	1 (0.7)	NR117062
<i>L. alimentarius</i>	1 (0.7)	LC063166
<i>L. casei</i>	1 (0.7)	KP326371
<i>L. pentosus</i>	1 (0.7)	NR029133
<i>S. thermophilus</i>	1 (0.7)	NR042778
Unidentified	40 (28.6)	
Total	140	

glycopeptide, tetracyclines, lincosamide, carbapenem, macrolide 계열이 각 1개씩, 기타 항균제가 2개 사용되었다.

결 과

1. 검체에서의 probiotics 분리율

시판 김치 15종과 가정에서 만든 김치 20종을 검사한 결과 총 140주의 probiotics를 분리하였으며 시판 김치에서는 60주 (42.9%), 가정에서 만든 김치에서는 80주(57.1%)를 각각 분리 하였다(Table 3).

Table 4. Distribution of the antimicrobial activity rates of the cell-free cultured solution of probiotics isolated from Kimchi

Probiotics	No. of isolates	No. of antimicrobial activity (%)
<i>E. faecium</i>	27	11 (40.7)
<i>L. acidophilus</i>	1	-*
<i>L. alimentarius</i>	1	1 (100)
<i>L. casei</i>	1	1 (100)
<i>L. pentosus</i>	1	1 (100)
<i>L. plantarum</i>	53	41 (75.5)
<i>L. rhamnosus</i>	7	2 (28.6)
<i>L. sakei</i>	6	4 (66.7)
<i>Leu. mesenteroides</i>	2	-
<i>S. thermophilus</i>	1	1 (100)
Unidentified	40	7 (17.5)
Total	140	69 (49.3)

* Presents not inhibition.

2. 분리된 probiotics 균종 동정

분리한 140주의 probiotics를 16S rRNA sequencing 분석을 위해 사용된 primers와 동정된 결과는 Table 1, 2와 같다. 이 중 *Lactobacillus plantarum*이 53주(37.9%)로 가장 많이 분리 되었으며, *Enterococcus faecium*이 27주(19.3%), *Lactobacillus rhamnosus* 7주(5.0%), *Lactobacillus sakei* 6주(4.3%), *Leuconostoc mesenteroides* 2주(1.4%), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus pentosus*, *Streptococcus thermophilus* 각 1주(0.7%), 미동정 분류군은 40주(28.6%)이었다.

3. Probiotics 배양균액의 병원성 미생물에 대한 억제효과

12종의 병원성 미생물에 대한 probiotics의 항균성을 시험한 결과 분리한 140주의 전체적인 항균성은 49.3% (69)주로 나타났다(Table 4). 균종별로는 *L. plantarum* 53주 중 41주 (75.5%)가 항균효과를 나타내었고, 이어서 *L. sakei* 6주 중 4주 (66.7%), *E. faecium* 27주 중 11주(40.7%)에서 항균성을 나타내었으며, *L. alimentarius*, *L. casei* 그리고 *L. pentosus* 각 1주씩, *L. rhamnosus* 7주 중 2주(28.6%), 그리고 *S. thermophilus* 1주가 모두 항균효과를 나타내었다. 한편 배양액에 대한 균종별 억제효과는 Table 5, 6과 같았다. *E. coli*O157:H7을 억제한 균주는 15주(10.7%)이었고, *S. typhi* 억제는 20주(14.3%), *S. enteritidis*는 18주(12.9%), *S. flexner*는 31주(22.1%), *Y. enterocolitica*는 5주(3.6%), NAG- *Vibrio*는 32주(22.9%) 그리고 *L. monocytogenes*를 억제한 균주는 13주(9.3%)로 나타났다(Table 3, 4). 또한 *S. pyogenes*를 억제한 균주는 2주 (1.4%), *S. aureus*는 2주(1.4%), *P. acnes*는 4주(2.9%), 그리고

Table 5. The inhibition effects of cell-free cultured solution of probiotics to pathogenic microbes

Probiotics	No. of isolates	No. of inhibited isolates						
		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> Typhi	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Shigella</i> flexnerii	NAG-Vibrio [†]	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>E. faecium</i>	27	2	3	3	3	4	1	—*
<i>L. acidophilus</i>	1	—*	—	—	—	—	—	—
<i>L. alimentarius</i>	1	—	1	—	—	1	—	—
<i>L. casei</i>	1	—	—	—	—	1	—	—
<i>L. pentosus</i>	1	—	—	—	1	1	—	—
<i>L. plantarum</i>	53	12	14	14	25	24	1	—
<i>L. rhamnosus</i>	7	—	2	1	2	1	—	—
<i>L. sakei</i>	6	1	—	—	—	—	—	—
<i>Leu. mesenteroides</i>	2	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. thermophilus</i>	1	—	—	—	—	—	—	—
Unidentified	40	—	—	—	—	—	—	—
Total	140	15 (10.7%)	20 (14.3%)	18 (12.9%)	31 (22.1%)	32 (22.9%)	2 (1.4%)	0 (0%)

* Presents not inhibition.

[†] Presents non agglutinable vibrio.**Table 6.** The inhibition effects of cell-free cultured solution of probiotics to pathogenic microbes

Probiotics	No. of isolates	No. of inhibited isolates (%)				
		<i>Staphyrococcus aureus</i>	<i>Staphyrococcus pyogenes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>E. faecium</i>	27	2	2	2	4	3
<i>L. acidophilus</i>	1	—	—	—	—*	—
<i>L. alimentarius</i>	1	—	—	—	—	—
<i>L. casei</i>	1	—	—	—	—	—
<i>L. pentosus</i>	1	—	—	—	1	—
<i>L. plantarum</i>	53	—	—	1	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	7	—	—	1	2	1
<i>L. sakei</i>	6	—	—	—	—	—
<i>Leu. mesenteroides</i>	2	—	—	—	—	—
<i>S. thermophilus</i>	1	—	—	—	—	—
Unidentified	40	—	—	—	—	—
Total	140	2 (1.4%)	2 (1.4%)	4 (2.9%)	13 (9.3%)	5 (3.6%)

* Presents not inhibition.

*G. vaginalis*는 2주(1.4%)였으나 *C. albicans*를 직접적으로 억제하는 probiotics는 전혀 관찰되지 않았다.

4. Probiotics 배양균액의 항균제 내성시험

분리한 probiotics에 대한 항균제 내성 및 감수성 시험결과는 Table 7과 같다. Ampicillin내성률은 11.4%이었고 streptomycin은 83.6%, sulfamethoxazole/trimethoprim 59.3%, vancomycin 73.6%, gentamicin 75.7%, tetracycline 10%, oxacillin 70%, norfloxacin 72.1%, nalidixic acid 98.6%, erythromycin 32.1%, cephalothin 19.3%, clindamycin 26.4%, rifampicin 22.9%, cefotetan 97.1%, chloramphenicol 10%,

penicillin 10%, imipenem 10.7% 그리고 ciprofloxacin 내성률이 67.9%로 나타났다.

고찰

발효야채와 우유제품에서 분리된 많은 종의 유산균은 박테리옌, 니신과 같은 항균물질을 생산함으로써 항미생물 작용을 갖고 있으며[16, 17] 특히 김치유산균같은 probiotics는 장내 시스템의 감염을 포함하여 감염성 질환의 치료에 새로운 대체적인 항균 물질로서 흥미롭게 조명되고 있다[18].

본 실험에서는 항균제에 많이 노출된 장기 입원환자의 설사

Table 7. Distribution of resistant, intermediate and susceptible isolates in probiotics isolated from Kimchi to antimicrobial agents

Antimicrobials	No. of isolates (%)		
	Resistant	Intermediate	Susceptible
Ampicillin	16 (11.4)	11 (7.9)	113 (80.7)
Streptomycin	117 (83.6)	5 (3.6)	18 (12.9)
Sulfamethoxazole/ Trimethoprim	83 (59.3)	12 (8.6)	45 (32.1)
Vancomycin	103 (73.6)	2 (1.4)	35 (25.0)
Gentamicin	106 (75.7)	0	34 (24.3)
Tetracycline	14 (10.0)	8 (5.7)	118 (84.3)
Oxacillin	98 (70.0)	18 (12.9)	24 (17.1)
Norfloxacin	101 (72.1)	24 (17.1)	15 (10.7)
Nalidixic acid	138 (98.6)	1 (0.7)	1 (0.7)
Erythromycin	45 (32.1)	0	95 (67.9)
Cephalothin	27 (19.3)	34 (24.3)	79 (56.4)
Clindamycin	37 (26.4)	28 (20.0)	75 (53.6)
Rifampicin	32 (22.9)	24 (17.1)	84 (60.0)
Cefotetan	136 (97.1)	1 (0.7)	3 (2.1)
Chloramphenicol	14 (10.0)	1 (0.7)	125 (89.3)
Penicillin	14 (10.0)	57 (40.7)	69 (49.3)
Imipenem	15 (10.7)	0	125 (89.3)
Ciprofloxacin	95 (67.9)	22 (15.7)	23 (16.4)

질환 증상을 완화시킬 수 있는 probiotics 개발을 위해 국내 시판 35종의 김치에서 140주의 probiotics를 분리하였으며, 이들의 대부분은 *L. plantarum* (37.9%), *E. faecium* (19.3%)이 차지하였으며 소량 발견된 *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. alimentarius*, *L. acidophilus*, *L. pentosus* 및 *L. sakei*도 있었다. 서울대에서 보고된 김치에서 분리한 유산균 중 *Lactobacillus*가 63.7%인 것에 비해 본 실험에서는 50%보다 조금 높게 나타났으며[19], Kwon 등[20]은 김치에는 30종 이상의 유산균종이 있으며, 그 중 우점종으로는 *L. plantarum*, *L. brevis*, *E. faecalis* 그리고 *Leu. mesenteroides*인 것으로 보고 하였다. 젓갈류에는 *Lactobacillus* 속의 유산균주[21], 장류인 간장에서는 *Pediococcus* 속의 유산균주가 많이 분리된다고 보고되고 있으며[22], 본 시험에서는 *E. faecium*이 19%나 검출되어 검체 환경조건에 따라 다양한 균주가 분포함을 나타내었다. 분리한 김치유산균 총 140주 중 49.3%에서 항균성을 나타냈으며, 균종별 분포를 살펴보면 NAG-Vibro에 대한 항균성이 22.9%, *S. flexner*는 22.1%로 이중 가장 높았으며, *S. Typhi*는 14.3%, *S. enteritidis* 12.9%, *E. coli* O157:H7 10.7%, *L. monocytogenes* 9.3% 순으로 나타났다. 본 실험에서는 대다수의 병원균에 항균활성과 광범위한 항균제 내성을 나타낸 *L. plantarum*, *L. sakei*, 그리고 *E. faecium*가 향후 장기간 항균제 치료 설사질환 치료시 대체할 수 있는 유용한 항균물질로 생각된다. 최근의 국외보고에 의하면 항균제 치료 후 probiotics 처리시 장점막

microbiome의 재구성이 떨어진다고 하며 또한 자가 분변이식 (aFMT)은 오히려 증강시킨다고 보고 되었으나[23] 본 실험에서는 역으로 항균활성과 항균제 내성이 있는 probiotics를 선별하여 항균제 처리 전이나 병용 처리시 장이나 질에 투입하여 선제적으로 장점막의 유산균과 microbiome을 보존함과 동시에 재건함을 목표로 실험에 임하였다. 한편 18종의 항균제에 대한 내성시험 결과 nalidixic acid (98.6%), streptomycin (83.6%), gentamicin (75.7%), vancomycin (73.6%), norfloxacin (72.1%) 그리고 ciprofloxacin (67.9%)에 높은 내성률을 나타내었고 또한 chloramphenicol (89.3%), imipenem (89.3%), tetracycline (84.3%), ampicillin (80.7%) 그리고 erythromycin (67.9%)는 반대로 높은 감수성을 나타내어 분리된 probiotics가 여러 항균제에 선천적인 내성과 감수성이 다양하게 분포함을 알 수 있었다. 다른 연구자와 비교해 보면 Coppola 등[24]은 치즈에서 분리한 *L. rhamnosus* 63주에서 ampicillin, penicillin, imipenem, tetracycline, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, rifampin의 감수성과 vancomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim 내성을 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었으며, Han 등[25]은 *Lactobacillus* 29주에서 vancomycin, streptomycin, gentamicin, nalidixic acid의 높은 내성과 rifampin, cephalothin, ampicillin, tetracycline 및 chloramphenicol의 낮은 내성을 나타내어 본 실험과는 약간 다른 결과를 나타내었다. Charteris 등[26]은 vancomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim의 내성과 tetracycline, chloramphenicol, clindamycin, rifampin의 감수성을 보고하여 본 실험과 다른 결과를 보고 하였으며, Beyan 등[27]은 penicillin, tetracycline 및 erythromycin 감수성과 norfloxacin의 내성을 보고하였고, Lonkar 등[28]은 ampicillin, gentamicin, penicillin, 및 tetracycline의 감수성을 보고하여 균종마다 약간의 차이와 다양성을 발견할 수 있었다. 따라서 장기 항균제 투여 설사질환 환자나 여성질환환자의 치료시 유익한 장내 유산균총과 microbiome의 재건시 이러한 항균제의 내성과 감수성 특성등을 파악하여 항균제를 선별하는 것이 치료효과를 크게 증대시킬 수 있을것이라 생각되며 향후 이러한 probiotics에 대한 최소한의 안정성 평가항목인 항생제 내성패턴, 대사활성, side effects, 독소생성 및 용혈 가능성, 동물연구에서의 감염성 결핍확인 등의 추가적인 안전성 연구와 *Enterococcus* 속의 경우 식품의약품안전처 고시대로 항생제 내성유전자 10종, 독성유전자 4종 등의 확인시험 절차가 추가적으로 담보되어야 할것으로 생각된다[29]. 한편 최근 국내외 연구에서 특히 체력과 면역력이 부족한 사람의 경우 구토, 설사,

복통, 피부두드러기 증상 등의 probiotics 부작용에 대한 보고가 있으며 특히 면역력 취약층인 미숙아, 노인, 중증질환자들의 균혈증, 진균혈증, 패혈증을 일으킨 사례가 보고 되고 있다. Probiotics의 과다 장내유입은 장내 미생물간의 경쟁을 유발시켜 장내세균 활동을 크게 위축시키고 이것은 특히 면역력이 부족한 환자의 장점막을 일시적으로 손상시켜 균혈증을 초래한 것으로 생각된다[30].

이상을 종합해 보면 국내 시판중인 김치에서 분리된 probiotics는 여러 병원성 미생물과 임상치료에 사용되는 18종의 다양한 계열의 항균제에 대해 광범위한 항균효과와 내성을 나타내었는데 이것은 병원에서 장기 항균제 치료중인 입원환자의 설사질환 치료제 및 장내 시스템의 개선제로서의 대체 사용에 유용할 것으로 생각된다.

요 약

국내시판 김치로부터 분리한 probiotics의 병원성 미생물에 대한 억제효과와 항균제 내성을 조사하기 위해 35종의 국내시판 김치에서 총 140주의 probiotics를 분리하였으며, 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 *L. plantarum*이 53주(37.9%), *E. faecium* 27주(19.3%) 그리고 *L. rhamnosus* 7주(5.0%) 순으로 동정되었고, 12종(species)의 다양한 병원성 미생물 즉 *S. Typhi*, *S. Enteritidis*, *E. coli O157:H7*, *S. flexneri*, *NAG Vibrio*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *G. vaginalis*, *C. albicans*, *P. acne*에 대한 전체적인 항균성은 69주(49.3%)이었으며, 균종별로 살펴보면 *L. plantarum* 75.5%, *L. sakei* 66.7%, *E. faecium* 40.7%, 그리고 *L. rhamnosus* 28.6% 순이었다. 또한 디스크 확산법에 의한 18종의 다양한 계열의 항균제에 대한 내성시험 결과 nalidixic acid가 98.6%의 내성을, S 83.6%, gentamicin 75.7%, vancomycin 73.6%, norfloxacin 72.1%, 그리고 ciprofloxacin 67.9% 순으로 나타났다. 결론적으로 본 실험에서 다양한 항균 활성과 광범위한 항생제 내성을 지닌 *L. plantarum*, *L. sakei*, 그리고 *E. faecium* 균주가 장기 항생제 치료환자에 대한 유용한 설사 치료용 및 *Candida* 속이 야기하는 여성질염 치료제로서의 사용이 유용할 것으로 생각된다.

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Kim JS¹, M.T.; Yuk YS², Professor; Kim GY³, Professor.

REFERENCES

1. FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London: FAO/WHO; 2002.
2. Won TJ, Kim B, Song DS, Lim YT, Oh ES, Lee DI, et al. Modulation of Th1/Th2 balance by lactobacillus strains isolated from kimchi via stimulation of macrophage cell line J774A.1 *in vitro*. J Food Sci. 2011;76:55-61. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02031.x>.
3. Han SC, Kang GJ, Ko YJ, Kang HK, Moon SW, Ann YS, et al. Fermented fish oil suppresses T helper 1/2 cell response in a mouse model of atopic dermatitis via generation of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells. BMC Immunol. 2012;13:44. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-44>.
4. Song GS. The history of antimicrobial drug development and the current situation. Infect Chemother. 2012;44:263-268. <https://doi.org/10.3947/ic.2012.44.4.263>.
5. Ministry of Food and Drug Safety. Food standards. Cheonju, KOR: MFDS; Notice 2016-23.
6. Ministry of Food and Drug Safety. Standards and specifications of health functional foods. Cheongju, KOR: MFDS; Notice 2014-204.
7. Kaewsrichan J, Peeyananjarasri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;48:75-83. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00124.x>.
8. Lawalata HJ, Sembiring L, Rahayu ES. Molecular identification of lactic acid bacteria producing antimicrobial agents from bakasang. An Indonesian traditional fermented fish product. Indonesian J Biotechnol. 2011;16:93-99. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.16368>.
9. Abosereh NA, El Ghani S, Gomaa RS, Fouad MT. Molecular identification of potential probiotic lactic acid bacteria strains isolated from Egyptian traditional fermented dairy products. Biotechnol. 2016;15:35-43. <https://doi.org/10.3923/biotech.2016.35.43>.
10. Ligoocka A, Paluszak Z. Capability of lactic acid bacteria to inhibit pathogens in sewage sludge subjected to biotechnological processes. Bull Vet Inst Pulawy. 2005;49:23-27.
11. Kaewsrichan J, Chandarajoti K, Kaewnopparat S, Kaewnopparat N. Evaluation of lactobacilli containing suppository formulation for probiotic use. Mahidol Univ J Pharm Sci. 2007;34:1-8.
12. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; approved standard. M100-S27. Wayne, PA: CLSI; 2017.
13. OIE. OIE terrestrial manual. Paris: OIE; 2008. p56-65.
14. WHO. Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world. Geneva: WHO; 2003.
15. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. M02-A11. Wayne PA: CLSI; 2012. p32.
16. Tamang JP, Tamang B, Schillinger U, Guigas C, Holzapfel WH.

- Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. *Int J Food Microbiol.* 2009;135:28-33. <https://doi.org/10.1023/A:1008867511369>.
17. Khan H, Flint S, Yu PL. Enterocins in food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2010;141:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.005>.
 18. Abedi D, Feizizadeh S, Akbari V, Jafarian-Dehkordi A. *In vitro* anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Res Pharm Sci.* 2013;8:260-268.
 19. Seoul National University. Development of lactic acid bacterial starter for Kimchi production. Research report. Seoul: Ministry of Agriculture and Forestry; 2002.
 20. Kwon MS, Ryoo CR, Kang CH, Min KH, Kim WJ. Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in kimchi and its characteristics. *J Microbiol Biotech.* 2002;12:96-105.
 21. Jeun JH, Kim HD, Lee HS, Ryu BH. Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. produced aminobutyric acid (GABA) from traditional salt fermented anchovy. *Kor J Food Nutr.* 2004;17:72-79.
 22. Jung YS. Microbiological studies of soysauce: identification and isolation of bacteria from traditional soysauce. *Kor J Microbiol.* 1963;1:30-35.
 23. Suez j, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bashiardes M, Bashiardes S, et al. Post-Antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell.* 2018;6:1406-1423. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.047>.
 24. Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, Sorrentino E. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from parmigiano Reggiano cheese. *Le Lait.* 2005;85:193-204. <https://doi.org/10.1051/lait:2005007>.
 25. Han J, Chen D, Li S, Li X, Zhou W-W, Zhan B, et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Ital J Food Sci.* 2015;27:283-289. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v270>.
 26. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot.* 1998;61:1636-1643. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.12.1636>.
 27. Beyan A, Ketema T, Bacha K. Antimicrobial susceptibility pattern of lactic acid bacteria isolated from Ergo, a traditional ethiopian fermented milk, jimma, south west ethiopia. *Ethiop J Educ & Sc.* 2011;7:9-17.
 28. Lonkar P, Harne SD, Kalorey DR, Kurkure NV. Isolation, in vitro antibacterial activity, bacterial sensitivity and plasmid profile of *Lactobacilli*. *Asian-Aust J Anim Sci.* 2005;18:1336-1342. <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.1336>.
 29. NECA. Research for the safe use of probiotics. Seoul: NECA; 2016. Available from: <https://www.bioin.or.kr/InnoDS/data/upload/tech/e7253c4c84624931aa91432dd0387637.pdf>.
 30. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bashiardes S, Kotler E, et al. Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell.* 2018;174:1388-1405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041>.