

프로바이오틱스에 의한 레자주린의 화학적 변화와 생균수 및 환원활성 측정에서의 적용

이효원¹ · 오영지² · 홍정일^{1,*}

¹서울여자대학교 자연과학대학 식품응용시스템학부, ²서울대학교 식품바이오융합연구소

Chemical changes in resazurin by probiotics and its application for evaluating living bacterial cell counts and their reduction potentials

Hyowon Lee¹, Yeong Ji Oh², and Jungil Hong^{1,*}

¹Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University

²Department of Food and Animal Biotechnology, Center for Food and Bioconvergence, Seoul National University

Abstract Resazurin, an oxidized blue dye, is reduced to resorufin, showing a peak absorbance change and emitting fluorescence due to the metabolic activity of living cells. In this study, the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) and the redox potential of living probiotic bacteria were evaluated based on changes in the absorbance or fluorescence of resazurin. Fluorescence analysis is a more accurate and sensitive method for quantifying viable LGG than the colorimetric absorbance measurement of resazurin change. Fluorescence measurement could detect LGG of 6.5-9.5 log CFU/mL within 30 min with $R^2=0.99$. No significant effect of further reduction of resorufin to dihydroresorufin by LGG was observed. Various probiotics showed different resazurin-reducing activities, and *L. kimchicus* had the highest reducing activity among the six probiotics tested. These findings suggests that fluorescence measurement in a resazurin-based assay is useful for analyzing bacterial growth and the redox potential of living probiotics.

Keywords: resazurin, probiotics, resorufin, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus kimchicus*

서 론

미생물은 의약산업에서 항생물질(Fleming, 1929; Mannanov and Sattarova, 2001), 인슐린(Ladisch and Kohlmann, 1992), 소화효소 제 등의 생산에 활용되고, 폐기물 처리 및 폐수 정화(Cohen, 2002; Glick, 2003) 등의 환경분야를 포함한 다양한 산업분야에서 이용되고 있다. 특히 식품 산업에서 미생물은 빵, 맥주, 치즈, 김치 등 발효식품의 생산과정에 필수적인 역할을 한다(Caplice and Fitzgerald, 1999; Ros 등, 2002). 한편 최근 생균 자체로서 활성을 가진 프로바이오틱스가 연구는 물론 관련 산업분야에서 주목을 받으면서 이들의 성장과 특성을 파악하기 위한 신속하고 간편한 평가 방법들이 제시되었다(Devi 등, 2015; Jung 등, 2017). 프로바이오틱스 유산균 제제를 통해 사람의 장내환경을 개선시키기 위해서는 보통 10^8 - 10^9 CFU의 생균을 섭취하는 것이 적당하며(Speck, 1978), 제품의 미생물의 수가 10^7 cells/g보다 많아지면 일반적인 식품의 부패를 야기할 수도 있는 보고도 있다(Wijtzes 등, 1998). 따라서, 미생물들의 발효나 부패의 제어에 있어서는 물론, 적정

프로바이오틱스 균수 및 활성 조절 측면에 있어서도 보다 신속하고 정확한 측정방법이 요구되고 있다.

미생물의 성장과 증식을 측정하기 위해서는 도말 평판 배양법, 탁도 측정, 직접 현미경 계수법, 건조 중량 측정 등의 방법이 사용되고 있다(Jung 등, 2019). 평판계수법은 실험실에서 가장 일반적으로 사용되는 생균수 측정방법이지만 균에 따른 배지를 선별해야 하고 비교적 장시간의 배양시간이 필요하다. 또한, 콜로니 수를 셀 수 있는 적절한 범위 내로의 희석을 위해 많은 시간과 노력을 필요로 하며 측정 균수 간의 오차범위도 대단히 크게 나타나는 경우가 빈번하다(Brugger 등, 2012). 그 밖에 탁도 측정법, 현미경 계수법은 생균과 사균이 모두 포함된 결과 값을 얻게되며, 건조 중량 측정 역시 여과 및 원심분리의 절차를 거쳐야 하고 역시 균의 생존율과 활성을 정확하게 파악하기 어렵다(Jung 등, 2019).

레자주린(resazurin, 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one10-oxide)은 무독성, 수용성, 청색의 산화된 형태의 염료로 세포의 산화환원 효소에 의해 강한 형광을 띠는 선홍색의 레소루핀(resorufin)으로 환원되며, 이러한 발색과 형광의 변화를 측정하여 빠르고 간단하게 세포의 생존 정도를 확인할 수 있다(Mariscal 등, 2009; O'brien 등, 2000; Vega-Avila 등, 2011). 한편, 레소루핀은 다이하이드로레소루핀(dihydroresorufin)으로 더 환원이 진행될 수 있는데, 레소루핀에서 레자주린으로의 산화는 비가역적이거나 다이하이드로레소루핀에서 레소루핀으로의 산화는 산소 존재 하에 가역적이라고 보고되었다(Guerin 등, 2001). 레자주린은 우유의 미생물 오염을 확인하는 지표로서 활용되었으며 정액 품질 평가(Erb

*Corresponding author: Jungil Hong, Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University, Hwarang-ro 621, Nowon Gu, Seoul 01797, Korea
Tel: +82-2-970-5639
Fax: +82-2-970-5977
E-mail: hjil@swu.ac.kr
Received January 12, 2021; revised February 17, 2021; accepted February 17, 2021

and Chlers, 1950), 바이오 필름 정량(Peeters 등, 2008)과 항균 특성 평가(Sarker 등, 2007) 등에 이용된 바 있다. 하지만 생균에 의한 레자주린의 흡광특성, 형광성 변화 비교 및 활성조건이 면밀하게 검토된 바 없으며, 레소루핀에서 디하이드로레소루핀으로의 추가환원 여부 및 프로바이오틱스 균에 따른 서로 다른 레자주린 환원활성에 대해서는 거의 연구된 바 없다.

본 연구에서는 실험실에서 널리 사용되는 도말 평판 배양법과 같은 미생물의 생균수 측정방법이 가지고 있는 여러 한계를 보완하고 관련 실험 시스템의 간편화를 위한 레자주린의 활용가능성을 제시하고자 하였다. 이를 위해 *Lactobacillus rhamnosus* GG 생균에 의한 레자주린 화학적 변화와 정확한 균수 측정에 영향을 미치는 간섭 요인들을 파악하고, 레자주린으로부터 환원된 레소루핀이 LGG에 의해 디하이드로레소루핀으로의 추가 환원 가능성에 대해서도 검토하였다. 또한 LGG를 비롯한 프로바이오틱스의 생균수 측정은 물론 균주별 생균 환원 특성 파악을 위한 레자주린의 활용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용배지 및 시약

유산균 배양에 사용된 배지 MRS agar 및 broth는 Difco (Detroit, MI, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 레자주린(resazurin sodium salt)과 레소루핀은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Amresco (Solon, OH, USA)에서 구입하였다. 이 외에 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

사용 균주 및 배양 조건

프로바이오틱스 기능을 가진 유산균 *Lactobacillus rhamnosus* GG (American Type Culture Collection: ATCC) 53103, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactococcus lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus kimchicus* (Korean Collection for Type Cultures: KCTC) 12976, *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3530을 실험에 이용하였다. 균주의 배양을 위해 MRS agar와 MRS broth (Difco)를 사용하였고, *Leu. mesenteroides* (KCTC 3530)는 30°C에서, 다른 5종의 균주는 35°C에서 24시간 동안 배양 후, 2-3회 계대 후 활성화시켜 사용하였다.

생균에 의한 레자주린 흡광 및 형광특성 변화

각 프로바이오틱스 균주를 MRS broth 배지에 1% 접종하여 30 또는 35°C에서 24시간 동안 배양한 후 배양액을 원심분리(2,500×g, 5분, RT) (C12000, HWLAB, Zhe Jiang, China)하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 PBS로 2회 세척 후, PBS에 재현탁하였고, 균의 일부는 멸균 생리식염수로 단계별 희석하고 MRS agar (Difco) 평판 배지에 도말하여 30 또는 35°C에서 24-48시간 동안 배양하여 계수하였다. 균 희석 용액(6.5-9.5 log CFU/mL)을 100 μM 레자주린(1:1, v/v)과 혼합하여 35°C에서 0-180분 동안 반응시키고 원심분리(2,500×g, 5분, RT) (Force 1418, Labnet International, Inc., NJ, USA)하여 상등액을 회수하였다. 상등액 200 μL를 96 well plate에 분주하고 마이크로플레이트 판독기(Spectra Max M3; Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570, 600 nm에서 흡광도와 excitation 560 nm, emission 585 nm에서 형광을 측정하였다. 생균에 의한 레자주린의 환원률은 다음의 식에 의해 계산하였다.

환원률(Reduction percentage)

$$= \frac{\epsilon_{OX_600\text{ nm}} \times A_{570\text{ nm}_t} - \epsilon_{OX_570\text{ nm}} \times A_{600\text{ nm}_t}}{\epsilon_{RED_600\text{ nm}} \times A_{600\text{ nm}_t} - \epsilon_{RED_600\text{ nm}} \times A_{570\text{ nm}_t}}$$

$\epsilon_{OX \text{ or } RED}$, 산화(OX) 또는 환원(RED) 레자주린의 몰흡광계수; $A_{570\text{ nm}}$ or 600 nm t_0 , 570 또는 600 nm에서 초기 흡광도; $A_{570\text{ nm}}$ or 600 nm t_x , 반응시간 x후 570 또는 600 nm에서의 흡광도

기타 균 성장 측정

LGG 1% 접종액을 35°C 배양기에서 0-72시간 동안 배양하면서 배양기간 별 성장정도를 레자주린 분석과 병행하여, 탁도 측정(600 nm) 및 도말 평판 배양법으로 분석하였다. 탁도 측정을 위해 배양 시간별 LGG 현탁액의 흡광도를 600 nm에서 측정하였다. 도말 평판 배양법은 LGG 현탁액을 0.85%의 멸균 생리식염수로 단계별 희석하였고 MRS agar (Difco) 평판 배지에 도말하여 35°C에서 24-48시간 동안 배양하여 계수하였다.

생균에 의한 레소루핀 변화 분석

생균에 의한 레소루핀의 추가적 환원 여부를 LGG를 이용하여 조사하였다. LGG를 MRS broth 배지에 접종하여 35°C에서 24시간 동안 배양하고 원심분리(2,500×g, 5분, RT) (HWLAB)하여 회수한 균체를 PBS로 2회 세척하였다. LGG의 희석 용액(6.5-9.5 log CFU/mL)을 400 μM 레소루핀(1:1, v/v)과 혼합하여 35°C에서 0-240분 동안 반응시키고 원심분리(6,000×g, 3분, RT) (1730MR, Gyrozen Co., Ltd. Gyeonggi, Korea)하여 상등액을 회수하였다. 상등액 200 μL를 96 well plate에 분주하고 마이크로플레이트 판독기(Spectra Max M3)를 이용하여 570, 600 nm에서 흡광과 ex. 560 nm, em. 585 nm에서 형광 변화를 측정하였다.

산화방지활성 평가

각 프로바이오틱스 균주를 24시간 동안 배양한 후, 2,500×g에서 5분 간 원심분리하여 균체를 회수한 후 PBS로 2회 세척하였다. 이를 다시 원심분리하여 얻은 균체를 3차 증류수에 재현탁하고 70W, 50% amplitude, 30-40 tune의 조건에서 50초 on, 10초 off 간격으로 10회 반복하여 초음파 파쇄기(VC50AT, Sonics Vibra cell, CT, USA)를 이용하여 균체를 파쇄하였다. 이를 15,000×g에서 3분 동안 원심분리하여 상등액을 취해 균 파쇄액을 얻었고, 단백질 함량은 소혈청 알부민을 표준물질로 하여 Coomassie brilliant blue G-250을 사용하여 정량하였다(Bradford, 1976). 각 균 파쇄액의 산화방지활성은 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Re 등, 1999)와 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Blois, 1958) 라디칼 소거활성으로 측정하였다. 균체 파쇄액의 ABTS와 DPPH 라디칼 소거활성은 각각 400, 2500 μg/mL에 해당하는 시료단백질량으로 희석하여 측정하였다.

MTT 환원능 분석

LGG와 *L. kimchicus* 생균의 환원 능력을 비교하기 위해 MTT를 사용하여 분석하였다. LGG와 *L. kimchicus*를 1% 접종하여 35°C 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 위와 동일한 방법으로 세척, 원심분리하여 0-80배 생균 희석액을 제조하였다. 각 희석 용액 5 mL에 5 mg/mL의 MTT 500 μL를 첨가하여 15분 동안 반응시킨 후, 원심분리(2,500×g, 3분)하여 균체를 회수하였다. 이에 1 N NaOH를 1 mL 분주하여 균체를 파쇄하고 균체 내에 생성된 MTT formazan을 용해시킨 후 200 μL를 96 well plate에 분주하

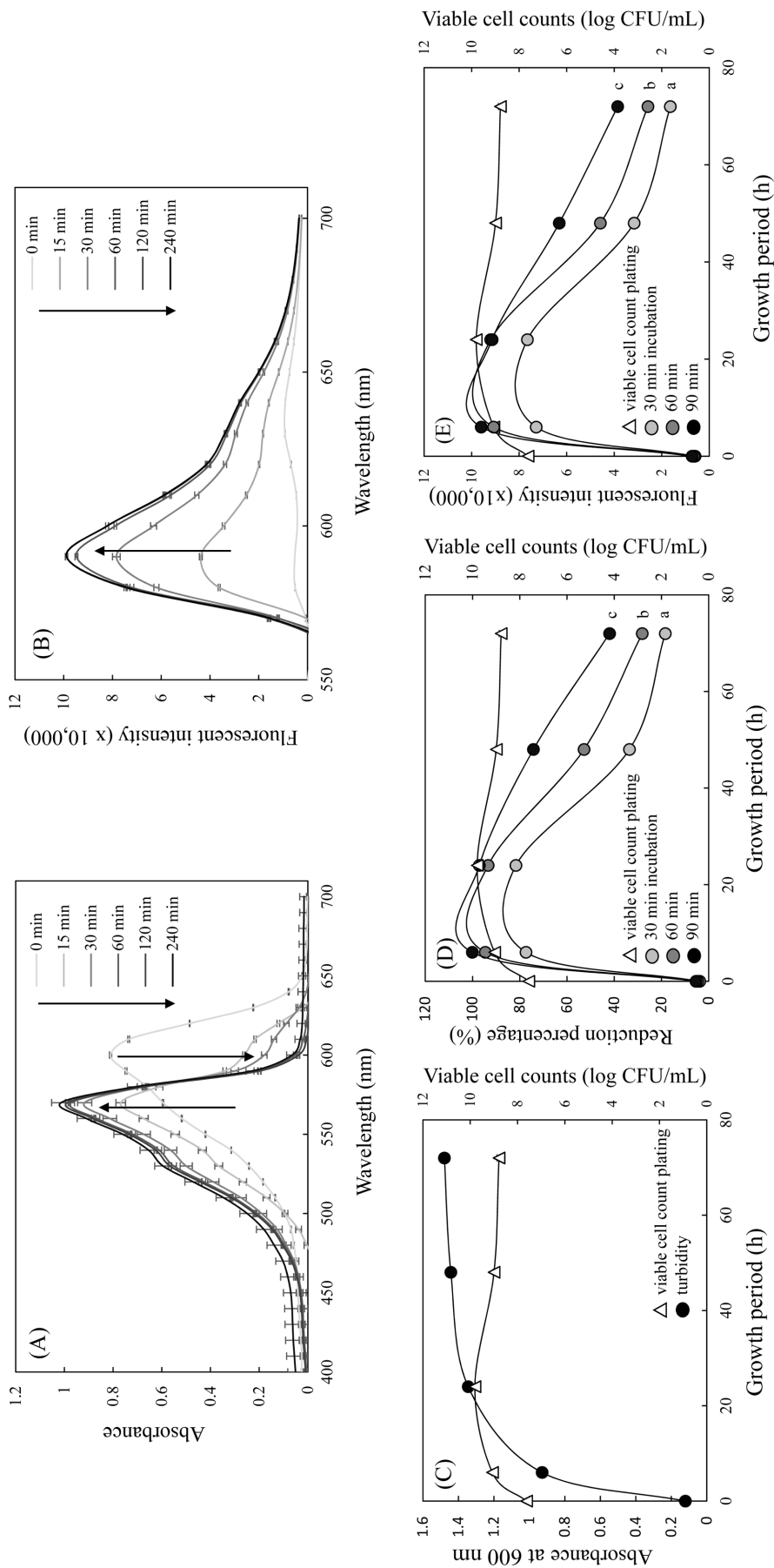


Fig. 1. Chemical changes of resazurin by living bacteria and comparison with different bacterial growth assays. Changes in absorbance (A) and fluorescence (B) spectra of resazurin (100 μ M) incubated with LGG (9.8 log CFU/mL) at different time (0-240 min) were shown. Colony counting assay and turbidity analysis at 600 nm were performed for analyzing LGG growth during 72 h (C). Resazurin-based assay by colorimetric changes (D), and fluorescence changes (E) with different incubation times were also compared. Each value represents the mean \pm SD (n=3, except n=2 for viable cell counts). Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test.

여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Spectra Max M3). MTT 분석에 사용된 LGG와 *L. kimchicus*는 PBS로 세척 후 멸균 생리식염수로 단계별 희석하였고 MRS agar (Difco) 평판 배지에 도말하여 35°C에서 24시간 동안 배양하여 계수하였다.

통계처리

실험결과는 3회 이상 분석하여 평균±표준편차로 나타냈다. 각 실험 별 대조군과의 유의차는 Student's *t*-test로 95%의 유의수준에서 검정하였으며 필요에 따라 세 군 이상의 다중비교의 경우 일원배치분산분석(one-way ANOVA)과 Tukey's HSD test를 실시하여 95%의 유의수준에서 검정하였다. 도말 평판 배양법은 2반복하여 평균값으로 나타냈다.

결과 및 고찰

LGG에 의한 레자주린의 화학적 특성 변화

레자주린의 가시광선 영역에서의 흡수 스펙트럼을 분석한 결과, 600 nm에서 최대 흡광영역을 보였으며 이를 LGG와 반응시켰을 때 600 nm에서의 흡광도가 감소하고 570 nm로 최대 흡광영역이 이동하였다. 또한, 반응시간이 증가할수록 600 nm 피크의 감소와 570 nm 피크의 증가 양상이 더욱 현저하였고 570 nm 부근 영역의 흡광도가 전반적으로 증가하였다(Fig. 1A). 또한, 레자주린을 LGG와 함께 반응시켰을 때 반응 생성물의 형광성이 발

현되면서 585 nm에서 최대 형광 영역을 나타냈으며, 반응시간이 증가할수록 피크를 포함한 해당영역의 형광강도가 현저하게 증가되었다(Fig. 1B). 이러한 현상은 600 nm에서 최대 흡광영역을 가지고 형광성이 없는 레자주린이 LGG에 의해 570 nm 영역의 최대 흡광도와 형광성을 가지는 레소루핀으로 환원되면서 나타나는 것으로 파악되며, 배양시간의 증가에 따라 레소루핀으로의 환원이 더욱 진행되었기 때문으로 판단된다.

레자주린이 생균에 의해 레소루핀으로 환원되면서 흡광과 형광의 변화가 수반된다는 사실을 이용하여 레자주린을 이용한 프로바이오틱스 생균 수 측정 효과를 평가하였고, 이를 도말 평판 배양법, 탁도 측정법과 비교하였다. LGG를 72시간 동안 배양하면서 균수의 변화를 도말평판 배양법과 탁도측정법으로 비교한 결과 도말평판 배양법에서 24시간까지 증가하던 균수가 이후 48, 72시간에서 다소 감소하였으나, 탁도 측정법의 경우 LGG의 배양시간 증가에 따라 72시간까지 지속적으로 흡광도 값이 증가하였다(Fig. 1C). 이와 대조적으로, 레자주린의 환원률(Fig. 1D)과 형광(Fig. 1E) 변화는 24시간 이후 지속적으로 감소하여 도말 평판 배양법에서의 양상과 유사하였다. 각 방법을 비교한 결과, 탁도 측정법과는 달리 도말 평판 배양법과 레자주린 법은 정지기를 지나 사멸기에 이른 생균수의 감소를 측정할 수 있는 것으로 나타났으며, 특히 레자주린 법에서는 그 감소 현상이 대단히 민감하게 검출되었다. 생균수 측정 방법에 주로 사용되는 도말 평판 배양법은 배양배지의 선별 및 배양시간 고려, 단계별 희석에 의한

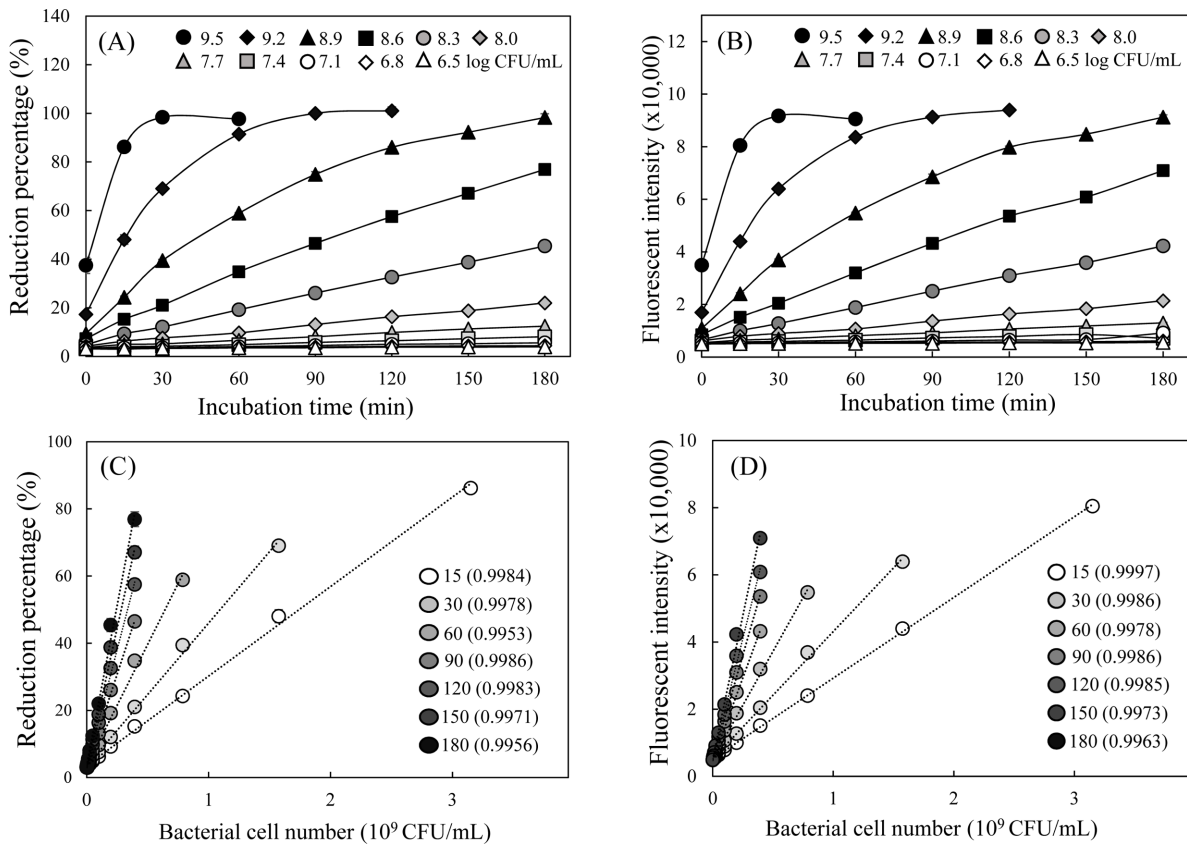


Fig. 2. Chemical changes of resazurin by LGG for different incubation periods and linear regression between resazurin reduction vs. viable cell numbers. Resazurin was incubated with different numbers of living LGG (6.5-9.5 log CFU/mL) during different periods (15-180 min). At each incubation time, reduction rate from colorimetric changes (A) and fluorescence intensity (B) were analyzed. Linear regressions between viable cell numbers vs. reduction percentage (C), or vs. fluorescence intensity (D) within linear region were shown with each incubation period (correlation coefficient, R^2). Each value represents the mean±SD (n=3).

실험적 오차가 발생할 가능성이 높고(Brugger 등, 2012), 프로바이오틱스 유효 균수 영역으로 알려진 10^8 - 10^9 의 협소한 범위의 생균수 변화를 정확하게 측정하기에 한계가 있다. 따라서 레자주린을 이용한 방법이 프로바이오틱스를 비롯한 다양한 균주들의 간편하고 정확한 생균수 측정방법으로 활용될 수 있으리라 판단된다.

LGG에 의한 레자주린의 변화와 정량성 평가

Fig. 1의 결과는 레자주린이 환원되어 생성되는 레소루핀의 흡광특성 변화와 형광성으로 말미암아 생균수의 변화를 비교적 정확하고 측정할 수 있음을 보여주었으며, 특히 8-9 log CFU/mL 범위의 LGG 생균수에 대한 큰 민감성을 나타냈다(Fig. 1D, E). 이에 생균에 의한 레자주린의 흡광 및 형광의 화학적 변화가 실제 생균수와 정량성을 갖는지, 또한 반응시간에 따른 정량성 변화를 평가하였다. 레자주린을 6.5-9.5 log CFU/mL의 LGG와 0-180분 사이에서 시간을 달리하여 반응시킨 후 흡광 및 형광 변화를 분석한 결과, 전반적으로 균 수와 반응시간에 비례하는 흡광 및 형광의 변화가 수반되었다(Fig. 2). 과량의 균에 의한 장시간의 반응은 레자주린의 화학적 변화를 더 이상 진행시키지 못했는데, 9.5 log CFU/mL LGG는 반응시간 30분 이상, 9.2 log CFU/mL LGG는 반응시간 60분 이상에서 plateau 현상이 나타났다(Fig. 2A, B). 생균수 변화에 대한 레자주린의 환원을 및 형광 변화를 반응시간별 회귀직선으로 분석한 결과, 반응시간 15분에서 6.5-9.5 log CFU/mL, 30분에서 6.5-9.2 log CFU/mL, 60분에서 6.5-8.9 log CFU/mL, 그리고 반응시간 90-180분에서 6.5-8.6 log CFU/mL 균수 사이에 $R^2=0.99$ 이상의 상관관계를 보였다(Fig. 2C, D).

본 실험에서 적용한 15-180분 사이 대부분 반응시간에서 생균수 변화에 대한 레자주린의 환원률보다 형광 변화의 기울기가 더 크게 나타났으며(data not shown), 상관계수 R^2 의 값도 높았다(Fig. 2C, D). 대표적으로 30분 반응시간에서의 생균수에 대한 레자주린 환원률과 형광 변화를 비교하였을 때, 기울기는 물론 R^2 값도 더 높아 흡광도보다는 형광강도의 측정이 더 민감한 결과를 도출할 수 있었다(Fig. 3A). 한편 동일한 생균수에 대한 레자주린의 환원률과 형광값의 변동계수(coefficient of variation, CV)를 비교하였을 때, 형광값에서 또한 유의적으로 낮은 값을 보여 형광강도에 근거한 균수 측정의 정확도와 정밀도가 더 높은 것으로 판단된다(Fig. 3B). 한편, 도말 평판 배양법의 경우 단계별 희석의 영향으로 측정값 간의 편차가 커서 CV값이 매우 높게 나타났다. 따라서, 균에 의한 레자주린의 화학적 특성 변화는 환원률보다 형광 강도를 비교하는 것이 상대적으로 더 민감하고 정확한 결과를 제시할 수 있을 것으로 판단되며, 레자주린법이 도말 평판 배양법을 보완할 수 있음을 시사한다. 레자주린은 pH 6.8 이상에서 파란색, pH 5.3 이하에서 적색을 띄며, 레소루핀은 pH 6.8 이상에서 적색, pH 5.3 이하에서 주황색을 띠므로(Min and Kang, 2011), 산에 의한 pH 감소로 인해 젖산균의 생균 활성 측정에 적합하지 않으며(Jung 등, 2017), 배지에 의한 영향이 존재한다고 보고된 바 있다(O'Brien 등, 2000). 또한 본 연구에서도 MRS broth 자체에 의한 레자주린의 흡광 변화도 관찰되었다(data not shown). 이러한 산과 배지 성분들에 의한 간섭요인들을 배제하기 위해서는 균을 PBS로 세척하는 과정의 추가가 필요하며, 세척 후 균과 레자주린의 반응을 통해 보다 정확한 생균활성 측정이 가능할 것으로 생각된다.

LGG에 의한 레소루핀의 화학적 반응 변화

레자주린은 생균의 환원활성에 의해 레소루핀으로 전환되는데,

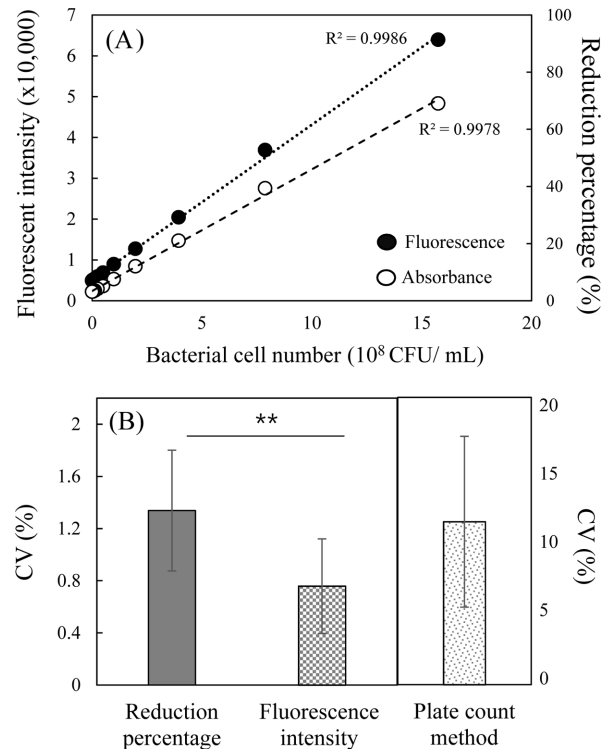


Fig. 3. Comparison of correlation and accuracy between colorimetric and fluorescence analysis for resazurin reduction by living bacteria. Correlation of reduction rate based on colorimetric analysis and fluorescence intensity from resazurin reduction by different cell numbers of living LGG were compared at 30 min incubation (A). CVs of measured values from reduction percentage, fluorescence intensity and plate counts were also compared (B) Each value represents the mean±SD (n=3).

레소루핀은 흡광특성이 변화되고 형광성이 없는 다이하이드로레소루핀으로 재차 환원이 가능하다(Guerin 등, 2001). 따라서 과량의 균이나 균과의 장시간의 반응은 레소루핀을 다이하이드로레소루핀으로 더 환원시켜 균수 측정의 오류를 유발할 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 레소루핀으로 환원된 후에도 생균에 의해 계속적으로 다이하이드로레소루핀으로 환원이 진행되는지 여부를 평가하기 위하여 LGG와 레소루핀을 직접 반응시켜 흡광 및 형광의 변화를 분석하였다(Fig. 4). 레소루핀의 흡광 및 형광 스펙트럼은 레자주린의 환원에 의해 변화되는 Fig. 1의 양상과 일치하였으며, 570 nm에서의 최대 흡광영역, 590 nm에서 최대 emission 형광영역을 보였다(Fig. 4A, B). 레소루핀을 9.5 log CFU/mL LGG와 직접 0-4시간 동안 반응시킨 결과, 570 nm에서 최대 흡광 피크의 감소는 유의적인 차이를 보이지 않았으며(Fig. 4C). 590 nm에서의 형광강도는 4시간 반응 시에 일부 감소하는 결과를 나타냈다(Fig. 4D). 본 결과는 생균에 의한 레소루핀의 화학적 변화가 일부 일어나고 흡광변화 보다 민감한 형광에서의 변화가 감지될 수 있으나, 일반적인 균수 측정범위와 측정시간에서 레소루핀이 다이하이드로레소루핀으로 환원되어 나타나는 오류는 레자주린을 이용한 생균수의 측정에 거의 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

프로바이오틱스의 생균활성 측정

레자주린의 환원은 diaphorase, carnitine 3-dehydrogenase (Mastsumoto 등, 1990), NADH dehydrogenase (EC 1.6.99.3)

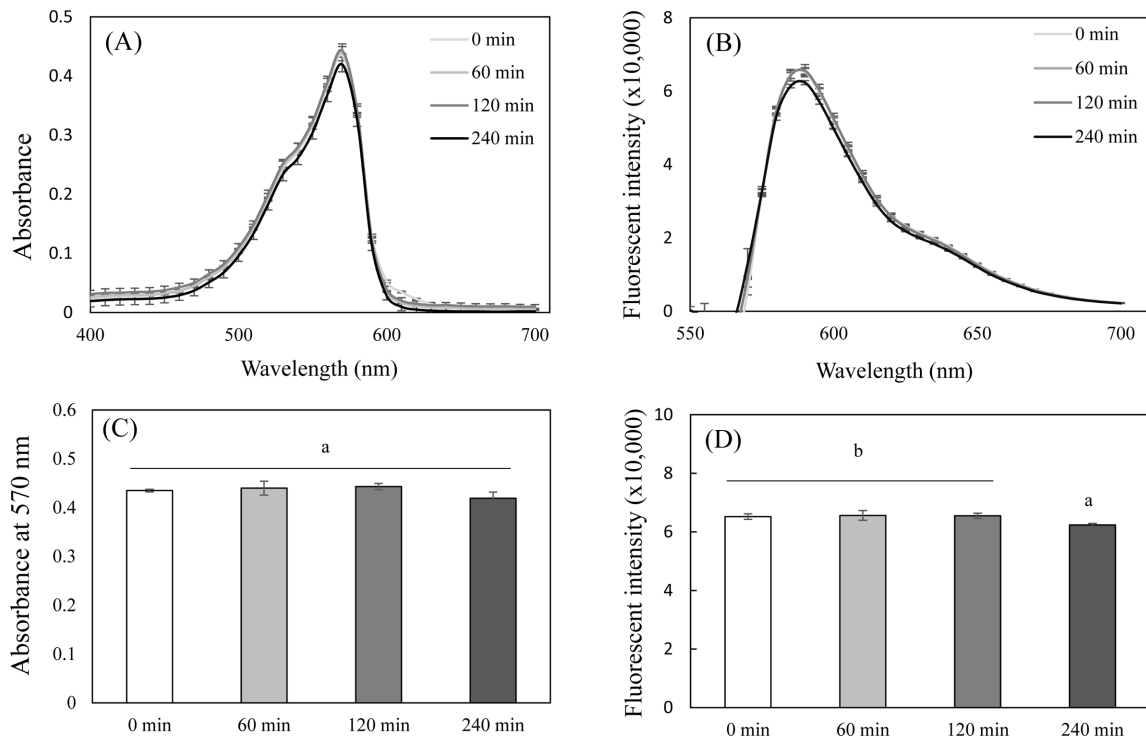


Fig. 4. Effects of living LGG on resorufin reduction to dihydroresorufin. Changes in absorbance (A) and fluorescence (B) spectrums of resorufin by incubation with living LGG (9.5 log CFU/mL) were shown at different time (0-240 min). Changes in absorbance at 570 nm (C) and fluorescence intensity (D) of resorufin were also analyzed at each incubation time. Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test (C and D).

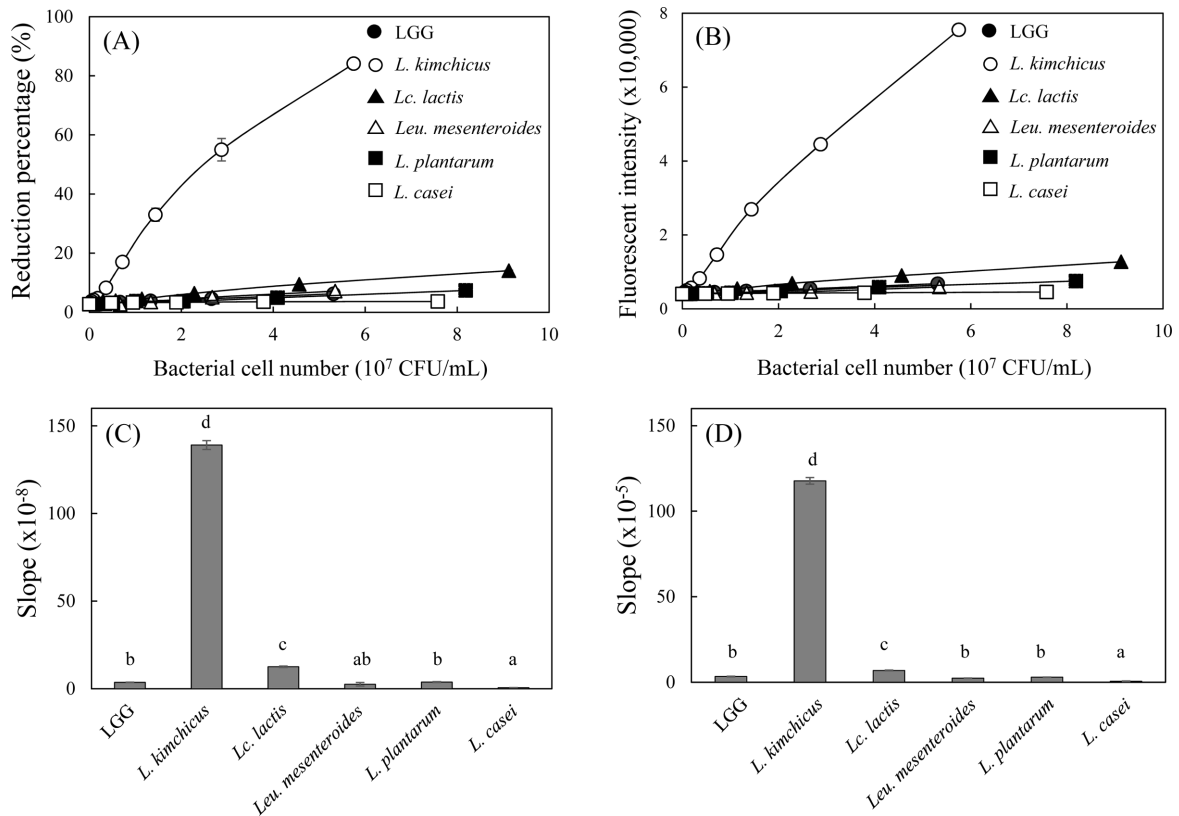


Fig. 5. Comparison of resazurin reduction abilities by different probiotics bacteria. Resazurin was incubated with different numbers of 6 different probiotics for 30 min and changes in reduction rate (A) and fluorescence intensity (B) were analyzed. Slopes from cell numbers vs. reduction rate (C) or vs. fluorescence intensity (D) by each bacterium were also calculated. Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test (C and D).

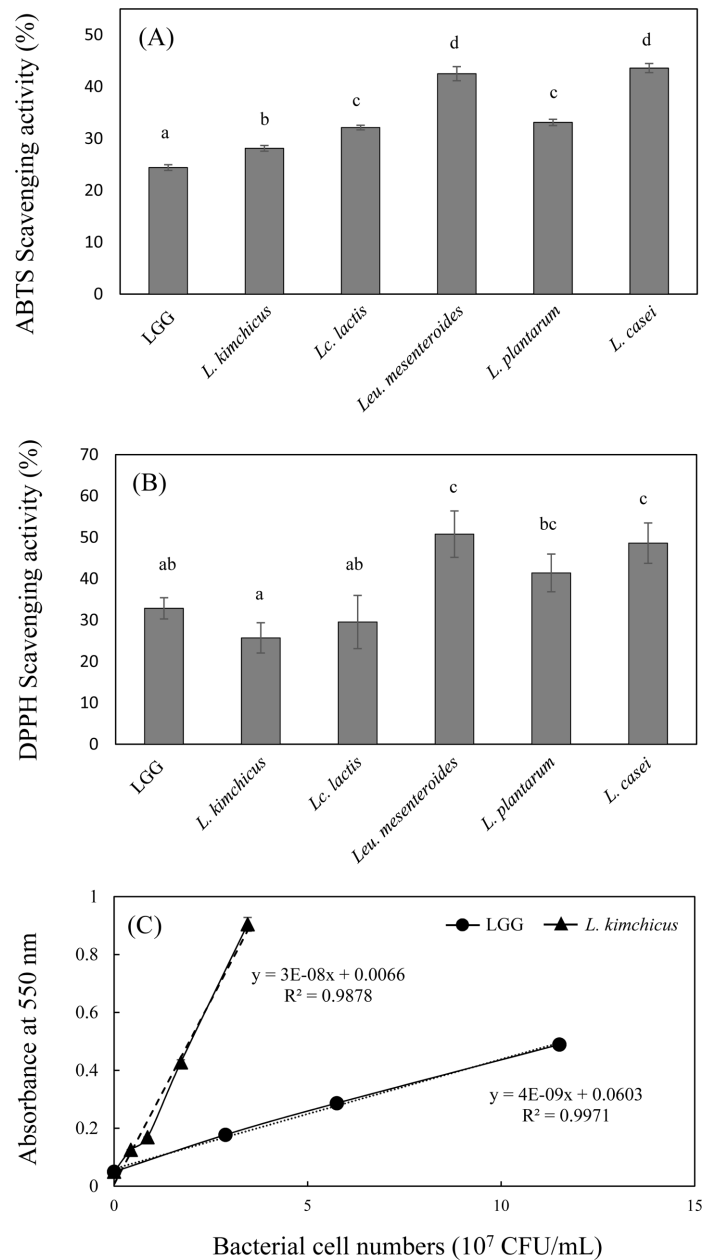


Fig. 6. Antioxidant activities of probiotic bacteria and abilities of MTT reduction by LGG and *L. kimchicus*. Scavenging activities of ABTS (A) and DPPH (B) radicals of 6 probiotic bacterial cell lysates were analyzed. Abilities of MTT reduction by living LGG and *L. kimchicus* were also compared (C). Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test (A and B).

(Barnes and Spenny, 1980) 등 살아있는 세포의 환원효소 또는 탈수소효소에 의해 일어나며, 균체가 보유한 다양한 환원성, 항산화성 물질들에 의해서도 진행된다(Wang 등, 2017). 따라서 균마다 이러한 환원력의 차이가 나타날 것이며 이러한 차이가 다양한 균종이 혼합되어 있을 경우 균수의 측정에 오차를 유발할 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 6종의 대표적인 프로바이오틱스 균주들을 선별하여 레자주린에서 레소루핀으로의 환원능력을 환원률과 형광강도로 확인하였다. 그 결과, 균의 레자주린 환원능력에는 상당한 차이를 보였으며, 특히 *L. kimchicus*는 다른 균주들에 비해 월등한 환원능을 나타내어 균수에 따른 급격한 레자주린의 환원률과 형광 증가를 유도하였다(Fig. 5A, B). 각 균주별 레자주린 환원능을 비교하기 위해 생균수와 환원률 또는 형

광강도 간의 기울기를 계산한 결과, *L. kimchicus*>*L. lactis*>LGG, *Leu. mesenteroides*, *L. plantarum*>*L. casei* 순의 환원력을 보였고 그 양상은 흡광과 형광에 근거한 산출값에서 일치하는 경향을 나타냈다(Fig. 5C, 4D). 따라서 균마다 레자주린의 환원 활성에 큰 차이를 보이므로 레자주린에 의한 프로바이오틱스 생균수 측정은 복합 균주보다 단일 균주 측정에 적절할 것으로 판단된다.

한편 이와 같은 레자주린에 대한 환원력의 차이는 생균의 환원효소 활성 뿐만 아니라 균체에 포함된 환원성 화학물질에 의해서도 나타날 수 있을 것으로 판단되어, 균을 파쇄 후 균체 성분에 의한 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능을 평가하였다. ABTS 라디칼에 대해서는 *Leu. mesenteroides*와 *L. casei*가 각각 약 42.5,

43.6%의 유의적으로 높은 활성을 나타냈으며, LGG가 24.4%로 가장 낮은 활성을 보였다(Fig. 6A). 또한, DPPH 라디칼 소거활성은 *Leu. mesenteroides*와 *L. casei*가 각각 약 50.8%, 48.6%의 소거활성을 보여 유의적으로 높았으며, 오히려 *L. kimchicus*는 25.7%로 가장 낮은 소거활성을 나타냈다(Fig. 6B).

프로바이오틱스 균주의 non-viable bacterial products 또는 대사 부산물이 숙주에서 생물학적 활성을 갖는 경우 포스트바이오틱스로 정의할 수 있다(Patel and Denning, 2013). 본 실험에 사용된 프로바이오틱스 균주들 중 *L. kimchicus*의 레자주린에 대한 환원활성이 가장 높았으나(Fig. 5), ABTS 및 DPPH 라디칼 소거활성은 오히려 다른 균주들에 비해 유의적으로 낮은 결과를 보였다. 따라서 *L. kimchicus*에 의한 레자주린의 환원은 생균에 의한 환원활성으로 균체 파쇄 후 균체에 존재하는 환원성 물질에 의한 것이 아니며 따라서 포스트바이오틱스에 의한 환원능과는 관련이 없음을 시사한다.

한편 살아있는 *L. kimchicus*의 환원능력에 의해 레자주린의 환원이 유도되었는가를 확인하기 위해 세포의 성장활성을 측정하는데 널리 사용되는 MTT에 대한 환원능력을 평가하였다. MTT는 살아있는 세포의 대사에 의해 MTT formazan으로 환원되며 이를 이용하여 세포활성을 측정하는데 널리 사용된다(Grela 등, 2018). 그 결과 *L. kimchicus*의 MTT 환원활성은 LGG에 비해 현저하게 높았으며, 기울기를 비교하였을 때 7.5배 이상의 높은 환원활성을 나타냈다(Fig. 6C). 이상의 결과는 *L. kimchicus*가 다른 프로바이오틱스 유산균에 비해 특징적으로 높은 생균으로서의 환원활성을 보유하고 있다는 것을 의미한다. 일부 프로바이오틱스는 다양한 산화방지활성 기작을 발휘하면서 항산화 보충제로 사용될 수 있으며(Lin 등, 1999), nitrate 환원능 등은 유용 프로바이오틱스 선별을 위한 주요 활성으로 이용되고 있다(Sobko 등, 2006). 따라서, 레자주린은 생균수의 신속하고 정확한 측정은 물론 환원력이 높은 유용 프로바이오틱스의 발굴에 있어서도 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 살아있는 프로바이오틱스 균주에 의한 레자주린의 흡광 및 형광특성의 변화와 레소루핀과의 반응성을 분석하고, 균주별 레자주린에 대한 환원능을 비교하였다. LGG에 의해 레자주린은 흡광과 형광의 변화를 수반하며 레소루핀으로 환원되고 반응시간과 생균수의 증가에 따라 환원정도가 증가하였으며, 형광의 변화에서 더 정확하고 민감한 반응성을 보였다. 한편 LGG에 의한 레소루핀으로부터 다이하이드로레소루핀으로의 환원반응은 거의 유발되지 않았다. 프로바이오틱스 6개 균주 중 *L. kimchicus*의 생균에 의한 레자주린 환원력이 월등하게 높은 반면, 균체 파쇄 후의 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능은 다른 양상을 보이며 *L. plantarum*과 *L. casei*가 높은 활성을 나타냈다. 한편 생균의 MTT 환원능은 *L. kimchicus*가 LGG에 비해 현저히 높아 레자주린 환원능과 유사한 양상을 보였다. 본 연구결과는 레자주린이 단일 균주 프로바이오틱스의 생균수 측정에 유용하며, 프로바이오틱스의 선별 및 환원활성 측정에 활용될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원의 한국연구재단 중견연구자 지원사업(NRF-2016R1A2B1007540와 NRF-2019R1A2C1089617)에 의해 수행되었음.

References

- Barnes S, Spenny JG. Stoichiometry of the NADH-oxidoreductase reaction for dehydrogenase determinations. Clin. Chim. Acta 107: 149-154 (1980)
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200 (1958)
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)
- Brugger SD, Baumberg C, Jost M, Jenni W, Brugger U, Mühlemann K. Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. PLoS One e33695 (2012)
- Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. Food Microbiol. 50: 131-149 (1999)
- Cohen Y. Bioremediation of oil by marine microbial mats. Int. Microbiol. 5: 189-193 (2002)
- Devi SM, Archer AC, Halami PM. Screening, characterization and in vitro evaluation of probiotic properties among lactic acid bacteria through comparative analysis. Probiotics Antimicro. 7: 181-192 (2015)
- Erb RE, Chlers MH. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen fertilizing capacity. J. Dairy Sci. 33: 853-864 (1950)
- Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Brit. J. Exp. Pathol. 10: 226-236 (1929)
- Glick BR. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotechnol. Adv. 21: 383-393 (2003)
- Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria-A review. Acta Histochem. 120: 303-311 (2018)
- Guerin TF, Mondido M, McClenn B, Peasley B. Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading microorganisms. Lett. Appl. Microbiol. 32: 340-345 (2001)
- Jung DS, Kim SY, Oh YJ. Food microbial experiment for HACCP application. Gyomoonsa, Gyeonggi, Korea. pp. 47-48 (2019)
- Jung MY, Lee J, Park B, Hwang H, Sohn SO, Lee SH, Lee JH. Applicability of a colorimetric method for evaluation of lactic acid bacteria with probiotic properties. Food Microbiol. 64: 33-38 (2017)
- Ladisch MR, Kohlmann KL. Recombinant human insulin. Biotechnol. Progr. 8: 469-478 (1992)
- Lin MY, Yen CL. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. J. Agr. Food Chem. 47: 1460-1466 (1999)
- Mannanov RN, Sattarova RK. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. Chem. Nat. Compd. 27: 117-123 (2001)
- Mariscal A, Lopez-Gigosos RM, Carnero-Varo M, Fernandez-Crehuet J. Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. Appl. Microbiol. Biot. 82: 773-783 (2009)
- Min TG, Kang WS. Simple, quick and nondestructive method for Brassicaceae seed viability measurement with single seed base using resazurin. Hortic. Environ. Biote. 52: 240-245 (2011)
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur. J. Biochem. 267: 5421-5426 (2000)
- Patel RM, Denning PW. Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence?. Clin. Perinatol. 40: 11-25 (2013)
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J. Microbiol. Meth. 72: 157-165 (2008)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio. Med. 26: 1231-1237 (1999)
- Ros RP, Morgan S, Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future. Int. J. Food Microbiol. 79: 3-16 (2002)
- Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibac-

- terial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42: 321-324 (2007)
- Sobko T, Huang L, Midtvedt T, Norin E, Gustafsson LE, Norman M, Lundberg JO. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. *Free Radical Bio. Med.* 41: 985-991 (2006)
- Speck ML. Enumeration of viable *Lactobacillus acidophilus* organisms in dairy products. *J. Food Protect.* 42: 135-137 (1978)
- Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *P. W. Pharmacol. Soc.* 54: 10-14 (2011)
- Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, Li W. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients* 9: 521 (2017)
- Wijtzes T, Van't Riet K, in't Veld JH, Zwietering MH. A decision support system for the prediction of microbial food safety and food quality. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 79-90 (1998)