

*Lactobacillus sporogenes*에 의한 혈중 Cholesterol의 저하

석은경 · 김태한 · 이정치 · 정필근 · 이금기

일동제약(주) 중앙연구소

(Received 15 July, 1987)

Lowering of Serum Cholesterol by *Lactobacillus sporogenes*

Eun Kyung Seok, Tae Han Kim, Jung Chi Lee, Pil Keun Chung and Kum Ki Lee

Research Laboratories, Il Dong Pharm. Co., LTD., Seoul 132, Korea

Abstract—The increase in the serum cholesterol level of the rabbit fed a high cholesterol diet was prevented by the administration of a *Lactobacillus sporogenes* preparation, proportionally to the amount of the preparation. About 90% of the increase in the serum cholesterol level was inhibited in the rabbits fed the preparation (2%) as feed additives. *In vitro*, *L. sporogenes* cultured in MRS broth containing PPLO serum fraction as a cholesterol source decreased the cholesterol concentration in the spent broth and increased the intracellular cholesterol concentration. The ability of *L. sporogenes* to accumulate cholesterol was enhanced by the presence of oxgall in the medium. These results suggest that *L. sporogenes* may directly assimilate the cholesterol in the gastrointestinal tracts and may prevent the increase of the serum cholesterol level.

유산균의 자연서식처는 yogurt, butter, cheese 등과 같은 발효 유제품¹⁾과, 인간이나 동물의腸管, 口腔, 臍 등의 체내 기관²⁾으로 크게 나눌 수 있다. 유산균의 이와 같은 성질을 이용하여 식품의 발효에 유산균이 사용되어져 왔으며, 최근에는 유산균 정장제, 질정등이 다수 개발되어 있다.

우수한 유산균주의 투여는 난소화성인 유당의 분해³⁻⁵⁾, 장내 병원성 세균의 발육 저해⁶⁻⁹⁾, 비타민류의 합성^{10,11)} 등의 임상효과 외에도, 최근에는 혈중 cholesterol의 저하효과¹²⁻¹⁴⁾ 및 항암효과¹⁵⁻¹⁷⁾ 등이 알려져 있어 주목을 끌고 있다. 특히, Mann¹⁸⁾에 의하면 Africa Maasai 족은 고농도의 cholesterol을 섭취함에도 불구하고, 야생 *Lactobacillus*에 의한 유산균 발효유를 상용하기 때문에 다른 종족보다 오히려 낮은 혈중 cholesterol 농도를 나타낸다고 보고하였으며, 이외에도 yogurt의 섭취가 인체 및 가토에서 혈중 cholesterol치를 감소시키는 것으로 보고되어 있다.¹⁹⁻²¹⁾

본 연구에서는 국내에서 유산균 정장제로 생

산, 판매되고 있는 포자형성 유산균인 *L. sporogenes*가 가토의 혈청 cholesterol 농도에 미치는 영향을 조사하였으며, 이에 관한 작용기작을 규명하고자 하였다.

실 험 방 법

실험동물 및 사료—실험동물로는 체중 2.5~2.7kg인 가토를 사용하여 Purica chow pellet을 1일 100g씩 급여하였다. 사료에 첨가한 cholesterol은 Fluka제품을 사용하였고, 실험기간 중 물은 무제한 공급하였다.

배지 및 시약—배양배지로는 MRS broth²²⁾를 사용하였으며, 배지중의 cholesterol원으로는 Sigma社의 PPLO serum fraction을 여과 멸균하여 무균적으로 첨가하였다.

***Lactobacillus sporogenes*균 원료 조제**—*L. sporogenes*를 배양하여, 균체를 수거하여 부형제(Lactose와 Starch의 혼합분말)로 적당히 희석한 후, 건조 제분하였다. 실험에 사용한 시료는 g당 50억의 생균수를 함유한 것으로 하

였다.

동물실험—일차 동물실험에서는 가토 16마리를 각 군당 4마리씩 분배하여 일반 사료만 투여한 군(대조군), 사료에 cholesterol 0.3%를 첨가하여 투여한 군(cholesterol 단독 투여군), 사료에 *L. sporogenes*균 원료 1.0%를 첨가하여 투여한 군(*L. sporogenes*균 원료 단독 투여군), cholesterol 0.3% 및 *L. sporogenes*균 원료 1.0%를 같이 투여한 군(cholesterol 및 *L. sporogenes*균 원료 병용 투여군)으로 나누어 실험하였고, 이차 동물실험에서는 cholesterol의 투여량은 0.2%로 고정하고, 여기에 *L. sporogenes*균 원료를 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0%로 첨가 투여하였다. 이차 동물실험에서도 사료만 먹인 군을 대조군으로 하였고, 각 군당 마리수는 5마리로 임의 분배하였다.

혈중 cholesterol 농도 측정—가토 귀정맥으로부터 채혈하여 혈청을 조제한 후, OPA법²³⁾에 따라 혈청 및 표준액 40 μ l에 OPA 시약(θ -phthalaldehyde 1mg/10ml 빙초산) 4.0ml를 혼합하여 실온에 20분 방치한 후, 550nm에서 흡광도를 구하여 산출하였다. 표준액은 빙초산 100 ml에 cholesterol 200mg을 용해한 것을 사용하였다.

배양여액 및 균체 중 cholesterol 농도 측정—Cholesterol원으로 PPLO serum fraction이 포함된 MRS broth에 *L. sporogenes*를 37°C에서 배양하여 균체 및 배양여액 중의 cholesterol 농도 변화를 Gilliland등¹⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다.

분변 중 생균수 측정—채취한 분변을 한 등²⁴⁾의 방법에 따라 1% peptone수 100ml에 현탁하여 homogenizer로 균질화하여 적당히 희석한 후 BCP 한천배지에 pour plating하여 50°C에서 48시간 배양한 후 나타난 전형적인 *L. sporogenes* 집락을 계측하였다.

실험결과 및 고찰

혈중 cholesterol 농도 변화—일차 동물실험에서, 대조군 및 *L. sporogenes*균 원료 단독 투여군의 혈중 cholesterol 농도는 실험기간 중 거의

변화가 없었으며, cholesterol 단독 투여군에서는 시간이 경과함에 따라 혈중 cholesterol 농도가 급격히 증가하였다. 그러나 cholesterol 및 *L. sporogenes*균 원료 동시 투여군에서는 혈중농도의 증가가 현저히 억제되었다(Fig. 1). 이 결과에서 *L. sporogenes*가 내생적 cholesterol에 의한 혈중 cholesterol 농도에는 영향을 미치지 않지만, 외부로부터 섭취된 cholesterol에 의한 혈중 cholesterol의 증가를 억제하는 것으로 나타났다. 이차 동물실험에서는 *L. sporogenes*균 원료를 농도별로 투여한 결과, 유산균의 투여량이 증가함에 따라, 혈중 cholesterol 농도의 증가에 대한 억제 효과가 상승함을 알 수 있었다(Fig. 2). 즉, *L. sporogenes*균 원료 0.5% 투여군 및 1.0% 투여군에서는 약 50%의 억제효과가 나타났으며, 2.0% 투여군에서는 90% 이상의 cholesterol 상승 억제효과가 있었다.

가토 분변 중 *L. sporogenes* 생균수의 변화—일차 동물실험에서 *L. sporogenes*균 원료 단독 투여군 및 *L. sporogenes*와 cholesterol 병용 투여군에서는 분변 중 *L. sporogenes* 생균수가 계속

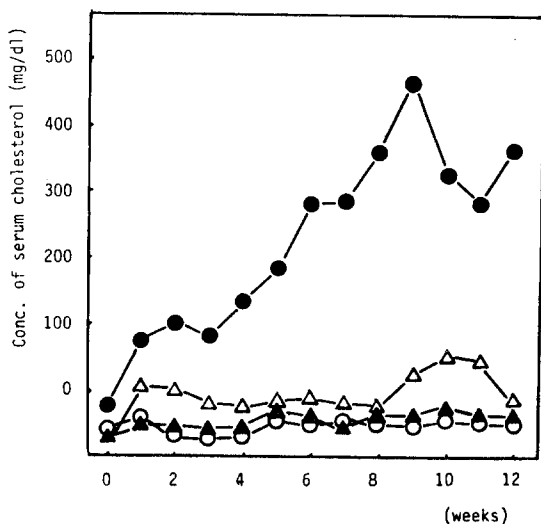


Fig. 1—The influence of feeding *L. sporogenes* preparations on serum cholesterol levels in the rabbits.

○-○ : control

●-● : cholesterol 0.3%

△-△ : cholesterol 0.3%+sp preparation 1.0%

▲-▲ : sp preparation 1.0%

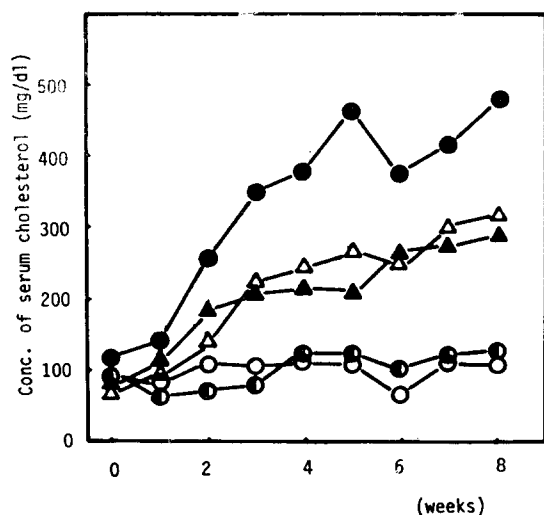


Fig. 2—The effects of sp preparations concentration on the serum cholesterol levels in the rabbits.

- : control
- : cholesterol 0.2%+sp preparation 0.5%
- △—△ : cholesterol 0.2%+sp preparation 1.0%
- ▲—▲ : cholesterol 0.2%+sp preparation 2.0%
- : cholesterol 0.2%

증가하여 8주 이후부터 최고치를 유지하는 경향을 나타내었다. 그러나 *L. sporogenes*균 원료를 투여하지 않은 군에서는 분변 중 생균수의 변화가 없었다(Table I).

가토의 체중 변화—Table II와 같이 일차 및 이차 동물실험에서 가토 체중변화에는 각 군 사이에 거의 차이가 없어 유산균 및 cholesterol의 투여가 가토의 체중변화에 특이한 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

*L. sporogenes*의 균체내 cholesterol 축적—*L. sporogenes*를 cholesterol원으로 PPLO serum fraction을 첨가한 배지에서 배양하였을 때, 균

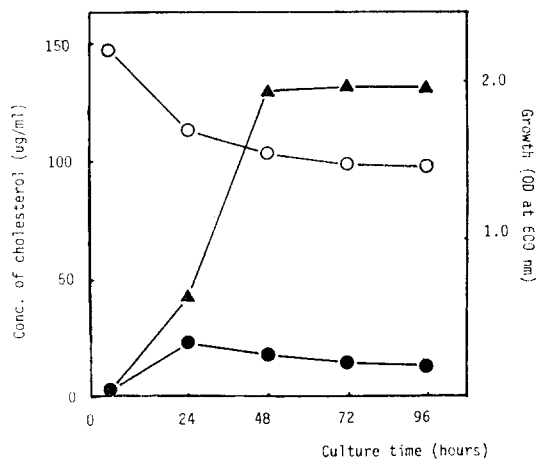


Fig. 3—The assimilation of cholesterol by *L. sporogenes* grown anaerobically in MRS broth containing PPLO serum fraction (Difco) as cholesterol source.

- : conc. of cholesterol in cells
- : conc. of cholesterol in supernatants
- ▲—▲ : growth

의 성장에 따른 균체 및 배양여액중의 cholesterol 농도 변화를 측정할 결과는 Fig. 3과 같다. 배양여액 중의 cholesterol치는 점차로 감소하는 반면, 균체내의 cholesterol치는 증가하였다. 진탕 배양, 정지배양 및 혐기배양의 배양조건에 따른 cholesterol 축적작용의 차이를 조사한 결과, Table III에서와 같이 배양조건에 따른 차이는 없으며, 첨가된 cholesterol의 약 50%가 균체내로 축적되었다. 균체와 여액내 cholesterol양의 합이 점증하지 않고 동일한 조작을 거친 배지중의 cholesterol양과 거의 일치하는 결과를 보였으므로, *L. sporogenes*에 의한 cholesterol 분해는 일어나지 않았음을 알 수 있었다.

Table I—Changes in viable counts of *L. sporogenes* in the feces of the rabbits.

Additives to basal diet (%)	Viable counts ($\times 10^5$ /g) of <i>L. sporogenes</i>						
	Initial	2	4	6	8	10	12 (week)
None (control)	3.3	3.3	2.0	1.0	4.0	4.2	3.1
Cholesterol 0.3	5.5	1.9	4.7	1.6	4.8	1.5	2.8
Cholesterol 0.3+sp preparation 1.0	4.8	7.9	11.7	15.3	21.8	29.6	25.4
Sp preparation 1.0	5.2	4.0	14.0	17.0	31.3	28.1	31.1

Table II—Changes in the body weight of the rabbits during the experimental period.

Exp. No.	Additives to basal diet (%)	Initial body weight (kg)	Body weight increase (kg)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (week)
1	none (control)	2.67	0.07	0.11	0.13	0.18	0.01	0.21	0.21	0.23	0.32	0.37	0.38	0.39
	cholestrol 0.3	2.62	0.17	0.26	0.30	0.39	0.30	0.47	0.47	0.48	0.55	0.55	0.62	0.65
	cholesterol 0.3 + sp prep. 1.0	2.59	0.13	0.21	0.21	0.21	0.09	0.35	0.21	0.33	0.41	0.41	0.44	0.39
	sp prep.* 1.0	2.58	0.23	0.21	0.34	0.25	0.11	0.37	0.39	0.32	0.23	0.32	0.32	0.36
	none (control)	2.30	0.06	0.20	0.26	0.19	0.25	0.35	0.23	0.27	—	—	—	—
2	cholesterol 0.2	2.35	0.04	0.12	0.16	0.18	0.21	0.37	0.29	0.30	—	—	—	—
	cholesterol 0.2 + sp prep. 0.5	2.36	0.04	0.08	0.17	0.13	0.20	0.29	0.23	0.22	—	—	—	—
	cholesterol 0.2 + sp prep. 1.0	2.31	0.04	0.05	0.07	0.07	0.10	0.19	0.19	0.21	—	—	—	—
	cholesterol 0.2 + sp prep. 2.0	2.20	0.01	0.08	0.14	0.12	0.25	0.26	0.22	0.23	—	—	—	—
	cholesterol 0.2 + sp prep. 2.0	2.20	0.01	0.08	0.14	0.12	0.25	0.26	0.22	0.23	—	—	—	—

* sp prep. : sp preparation.

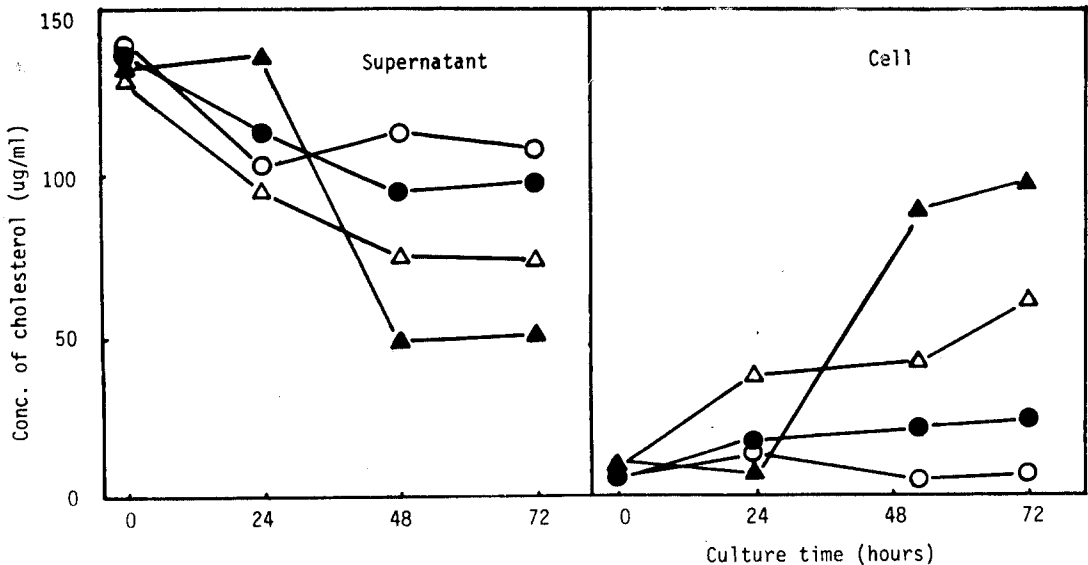


Fig. 4—The effect of oxgall in the culture medium on the assimilation of cholesterol by *L. sporogenes*.
 ○—○ : none ●—● : oxgall 0.1% △—△ : oxgall 0.3% ▲—▲ : oxgall 0.5%

***L. sporogenes*의 cholesterol 축적에 대한 oxgall의 효과—*L. acidophilus*의 어떤 strain에서 균체내 cholesterol의 축적이 소의 담즙인 oxgall에 의하여 촉진된다는 보고¹⁴⁾가 있으므로 본 균주의 cholesterol 축적에 대한 oxgall의 효과를 살펴본 바, Fig. 4와 같이 oxgall 0.5% 첨가**

에서 높은 효과를 보였다. 0.5% 이상의 농도에서는 균의 발육이 심하게 억제되었다.

유산균 또는 유산균 발효유가 혈중 cholesterol 농도를 저하시키는 작용기작으로는 HMG (3-hydroxy-3-methyl glutarate)²⁵⁾ 또는 orotic acid^{26,27)}에 의한 체내 cholesterol 합성저해, orotate

Table III—Comparison of cholesterol assimilation by *L. sporogenes* grown for 48 hours in aerobic, stationary, and anaerobic conditions.

Culture condition	Cholesterol conc. (ug/ml) in		
	Uninoculated Broth	Supernatant	Cell
Aerobic	120.7	62.3	57.1
Stationary	120.4	70.0	50.8
Anaerobic	120.7	60.6	64.2

의 중간대사물질에 의한 hypocholesterolemic effect,²⁸⁾ cholesterol oxidase에 의한 cholesterol의 생체내 분해²⁹⁾ 및 유산균의 체내 cholesterol assimilation 작용¹⁴⁾ 등이 보고되고 있다. 그러나 발효유 중의 HMG와 orotic acid의 함량이 우유 중의 함량보다 더 높지 않으므로³⁰⁾ 이들이 cholesterol 저하인자라고 보기는 어렵다. 또한 cholesterol oxidase에 의한 cholesterol의 생체내 분해 작용에 대하여 조사하였으나, *L. sporogenes* 균주에서는 cholesterol oxidase 역가가 나타나지 않았다.

이들 결과를 종합해 볼 때, *L. sporogenes*는 외부로부터 섭취한 cholesterol을 균체내에 축적함으로써 소화 흡수되는 것을 막아 혈중 cholesterol 농도의 증가를 억제하는 것으로 생각되며, 이에 따라 *L. sporogenes*의 지속적인 투여가 고 cholesterol 혈증, 동맥경화증 및 기타 심장혈관계 질환의 증상을 완화시키거나 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

가토에 cholesterol 및 *L. sporogenes*균 원료를 투여하여 혈중 cholesterol 농도의 변화를 조사하였다. Cholesterol과 *L. sporogenes*균 원료를 동시에 투여한 균에서는 cholesterol만 투여한 균보다 혈중 cholesterol 농도의 상승이 현저히 억제되었고, 이와 같은 억제 효과는 *L. sporogenes*균 원료의 투여양에 비례하여 2.0% *L. sporogenes*균 원료 투여균에서는 혈중 cholesterol 농도의

증가가 90% 이상 억제되었다. *L. sporogenes*를 cholesterol원으로서 PPLO serum fraction을 첨가한 MRS broth에서 배양한 결과, 균체내의 cholesterol 농도가 증가하고 배양여액 중의 cholesterol 농도는 감소하였으며, 균의 작용에 의한 분해는 일어나지 않았다. 이와 같은 cholesterol의 축적은 oxgall 0.5% 첨가에 의해 촉진되었으며, 배양 조건에 따른 차이는 나타나지 않았다.

이와 같은 실험결과는 *L. sporogenes*가 장관내에서 외부로부터 섭취한 cholesterol을 균체내에 축적함으로써 外因性 cholesterol에 의한 혈중 cholesterol 상승을 효과적으로 억제할 수 있음을 나타내었다.

문 헌

- 1) Carr, J.G., Cutting, C.V., and Whiting, G.C.: Lactic acid bacteria in beverages & foods. Academic Press, New York (1975).
- 2) Speck, M.L.: Interactions among lactobacilli and man. *J. Dairy Sci.* 59, 338 (1976).
- 3) Bayless, T.M., Rothfeld, B., Massa, C., Wise, L.M., and Bedine, M.S.: Intolerance of recommended amounts of milk and lactose by lactose intolerant adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 26, 465 (1973).
- 4) Goodenough, E.R., and Kleyn, D.H.: Influence of viable yogurt microflora on digestion of lactose by the rat. *J. Dairy Sci.* 59, 601 (1976).
- 5) Kilara, A., and Shahani, K.M.: Lactose activity of cultured and acidified dairy products. *J. Dairy Sci.* 59, 2031 (1975).
- 6) Kavaniskov, E.I., and Sudenko, V.I.: Antibiotic properties of *L. brevis*. *Mikrobiol. Zh.* 29, 146 (1967).
- 7) Shahani, K.M., Vakil, J.R., and Chandan, R.C.: Antibiotic acidophilin and the process for preparing the same. U.S. Patent 3, 689, 640, Sept. 5. (1972).
- 8) Shahani, K.M., Vakil, J.R., and Kilara, A.: Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. I. Cultural conditions

- required for the production of antibiosis. *Cult. Dairy Prod. J.* **11**, 14 (1976).
- 9) Collins, E.B., and Aramaki, K.: Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **63**, 353 (1980).
 - 10) Reif, G.D., Shahani, K.M., Vakil, J.R., and Crowe, L.K.: Factors affecting B-complex vitamin content of cottage cheese. *J. Dairy Sci.* **59**, 410 (1976).
 - 11) Reddy, K.P., Shahani, K.M., and Kulkarni, S. M.: B-complex vitamins in cultured and acidified yogurt. *J. Dairy Sci.* **59**, 191 (1976).
 - 12) Mott, G.E., Moore, R.W., Redmond, H.E., and Reiser, R.: Lowering of serum cholesterol by intestinal bacteria in cholesterol-fed piglets. *Lipids* **8**, 428 (1973).
 - 13) Pulusani, S.R., and Rao, D.R.: Whole body, liver and plasma cholesterol levels in rats fed thermophilus, bulgaricus, and acidophilus milks. *J. Food. Sci.* **48**, 280 (1983).
 - 14) Gilliland, S.E., Nelson, C.R., and Maxwell, C.: Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Envir. Microbiol.* **49**, 377 (1985).
 - 15) Oda, M., Hasegawa, H., Komatsu, S., Kambe, M., and Tsuchiya, F.: Antitumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1623 (1983).
 - 16) Mizutani, T., and Mitsuoka, T.: Inhibitory effect of some intestinal bacteria on liver tumorigenesis in gnotobiotic C3H/He male mice. *Canc. Lett.* **11**, 89 (1980).
 - 17) Kanbe, M.: Physiological activities of extracellular polysaccharide produced by lactic acid bacteria. *Jpn. J. Dairy Food Sci.* **30**, A219 (1981).
 - 18) Mann, G.V., and Spoerry, A.: Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am. J. Clin. Nutr.* **27**, 464 (1974).
 - 19) Hepner, G., Fried, R., Jeor, S.St., Fusetti, L., and Morin, R.: Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**, 19 (1979).
 - 20) Mann, G.V.: A factor in yogurt which lowers cholesteremia in man. *Atherosclerosis* **26**, 335 (1977).
 - 21) Thakur, C.P., and Jha, A.N.: Influence of milk, yogurt and calcium on cholesterol induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* **89**, 211 (1981).
 - 22) deMan, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.C.: A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130 (1960).
 - 23) 김재영 · 나영옥 · 유병단 · 이주선 · 조영주 · 추상규 · 임상화학 실기, 고문사, p. 307.
 - 23) 한인규 · 이상철 · 이진후 · 이금기 · 이정치, 생균 제제의 성장촉진 효과에 관한 연구 I. 브로일러에 대한 *Lactobacillus sporogenes*의 성장 촉진효과와 분변 및 장내 세균총의 변화에 미치는 영향, 한국축산학회지 **26**, 150 (1984).
 - 25) Lupien, P.J., Tremblay, M. and Beg, Z.H.: 3-hydroxy-3-methylglutaric acid: Protective action in experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* **18**, 407 (1973).
 - 26) Bernstein, B.A., Richardson, T., Amundson, C. H.: Inhibition of cholesterol biosynthesis by bovine milk, cultured butter milk and orotic acid. *J. Dairy, Sci.* **59**, 539 (1976).
 - 27) Bernstein, B.A., Richardson, T., Amundson, C. H.: Inhibition of cholesterol biosynthesis and acetyl coenzyme A synthetase by bovine milk and orotic acid. *J. Dairy. Sci.* **60**, 1846 (1977).
 - 28) Rao, D.R., Chawan, C.B. and Pulusani, S.R.: Influence of milk and hepatic cholesterologenesis in rats. *J. Food. Sci.* **46**, 1339 (1981).
 - 29) Watanabe, K., Shimizu, H., Aihara, H., Nakamura, R., Suzuki, K., and Komagata, K.: Isolation and identification of cholesterol-degrading Rhodococcus strains from food of animal origin and their cholesterol oxidase activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**, 137 (1986).
 - 30) Okonkwo, O.O., and Kinsella, J.E.: Orotic acid in food milk powders. *Am. J. Clin. Nutr.* **22**, 532 (1969).