

Isolation of Cholesterol-Lowering Lactic Acid Bacteria from Pig and Human Feces

Hye Myung Ryu¹, Sang Gyo Kim², Su Won Kim¹, Ju Yun Choi¹,
Jin Sik Nam³ and Min Yoo^{1†}

¹Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea.

²Vilac Company LTD. R&D Center, Kimhae, Kyongnam 621-190, Korea.

³Department of Food& Nutrition, Suwon Women's College, Kyonggi 445-895, Korea

Elevated level of serum cholesterol in humans is a risk factor correlated with the development of coronary heart disease. We have screened lactic acid bacteria from pig and human feces for the development of probiotics which have an anti-cholesterol effect. We have used special media to isolate only lactic acid bacteria and they were subjected to the experiments such as oxgal test, carbohydrate fermentation test. Results from the acid tolerance test and growth test in the presence of oxgal demonstrated that some strains would likely survive in thuman stomach, where acidity is high, and in small intestine, where bile fluid is present. In conclusion, we were able to screen lactic acid bacteria which were tolerant against bile acid and supposed to be prominent to lower the cholesterol level in human serum.

Key Words: Cholesterol, Feces, Lactic acid bacteria, Acid tolerance, Oxgal

서 론

콜레스테롤은 뇌와 신경, 담즙, 성호르몬의 성분으로 체내에서 꼭 필요한 지질이지만 적정량을 초과했을 때에는 동맥경화증을 유발시키기도 한다. 혈액내 콜레스테롤 함량이 높은 것을 고지혈증이라고 하는데, 총 콜레스테롤 양이 높아지는 것은 관상동맥계통 심장질환의 위험도가 더 커진다는 적신호라 할 수 있다 (Castelli et al., 1990).

유산균은 사람의 장내에서 많은 건강증진 효과를 나타낸다. 건강증진 효과로는 유해미생물의 성장 억제, 유해미생물 성장 억제를 통한 발암물질의 농도 저하, 발암세포에서의 암 발생 억제, 총 콜레스테롤의 억제, 그리고 변비 치료 등을 들 수 있다. 이러한 유산균의 건강증진 효능으로 인해 유산균을 함유한 보조식품 개발이 최근 관심의 초점이 되기도 했다. 그밖에도 유산균은 흔히 유아식품과 다양한 약제로 사용되고 있다 (Sanders, 1999). 그러나 유산균의 가장 유용한 건강증진 효과는 혈중내 콜레스테롤을 감소시키는 능력이다 (Harrison and Peat, 1975; Lim et al., 2004). 물론 이러한 콜레

스테롤 저해 능력은 장으로까지 도달할 수 있는 유산균의 능력과 생체내 분비물에 대한 유산균의 내성, 그리고 장내에서의 성장 능력에 의해서 크게 그 효과가 결정지어진다.

인체에 유용한 유산균은 인간을 비롯한 여러 동물의 소화기관에도 풍부하게 존재하는 것으로 알려져 있다. Yin 등은 9마리의 돼지 분변으로부터 *Lactobacillus*를 선택적으로 분리할 수 있는 MRS 배지를 사용하여 다수의 균주를 분리한 후 당분해능을 측정한 바 있다 (Yin and Zheng, 2005). 소화기관에는 많은 균들이 있으며, 그 종류로는 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacteroids*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* 등이 존재하는데 이 가운데 *Lactobacillus*와 같은 균주들은 건강학적으로 많은 잠재능력을 가지고 있다고 이미 알려져 있다 (Zani et al., 1998).

유산균이 살아있는 상태로 장내에 도달하기 위해서는 HCl 과 각종 효소가 존재하는 위를 통과하여야 하는데, 위의 산성도는 음식물의 섭취 여부에 따라 pH 2~8의 범위를 갖는다. 따라서 위액의 세균 사멸 활성 정도는 pH 의존적이다 (Toit et al., 1998). 그리고 위를 통과한 유산균은 체장에서 분비되는 담즙산에 또다시 노출되기 때문에 내담즙성을 갖는 유산균만이 생존하여 최종적으로 장내에서 그 유용성을 나타낼 수 있다 (Overdahl et al., 1991).

본 연구에서는 제주도에서 채취한 돼지의 분변과, 경북대학교에서 채취한 인변으로부터 유산균을 분리한 다음 이들 유산균 가운데 기존의 알려져 있는 항콜레스테롤 유산균주

*논문 접수: 2005년 11월 10일

수정재접수: 2005년 12월 1일

†교신저자: 유민, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000,

계명대학교 생물학과

Tel: 82-53-580-5000, Fax: 82-53-580-5537

e-mail: ymin@kmu.ac.kr

보다 더 강한, 콜레스테롤을 체내에서 분해 또는 억제할 수 있는 새로운 유산균을 분리하고자 하였다. 그리고 이들 균주의 내산성과 내담즙성 정도를 측정함으로써 분리된 유산균주가 장내 생존 가능성이 있는지 여부를 측정하였으며, 당분해능을 통해 유산균 스타터 (seed starter)로서의 균주 가능성을 확인하였다. 본 연구는 궁극적으로 항콜레스테롤 기능성 발효유 개발에 기여할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 균주의 선발

제주도에서 채취한 돼지의 분변 샘플과 경북대학교 의과대학에서 무작위로 선별한 인변 샘플 5종을 MRS 배지에 streaking하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 자라난 다수의 균들에서 단일 colony들을 다시 선별하여 MRS 액체배지에 재배양하고, 이 배양액을 15% skim milk에 5% 농도로 접종하였다. 다시 37°C에서 24~48시간 배양한 다음 이중 curd 생성력이 우수한 균주만을 선발하였다. 이렇게 선별된 균주들의 내산성, 내담즙성 및 콜레스테롤 저해능을 조사하여 가장 우수한 균주를 최종 선발하였다.

2. 유산균의 보관

선발된 균주들은 MRS 액체배지 (pH 6.5)에 배양한 후 glycerol의 최종 농도가 20% 되도록 첨가하여 -70°C에 냉동 보관하였다. 필요에 따라 MRS 고체배지에 접종, 배양하거나 15% skim milk 배지에 배양하여 4°C에 보관하며 사용하였다.

3. 내담즙성

선발된 균주들을 MRS 액체배지 (pH 6.5)에서 37°C, 24시간 배양한 다음 oxgal이 0.5% 첨가된 0.05M 인산나트륨 완충액 (pH 7.0)에 10% seed culture하여 37°C에서 2시간 간격으로 배양하였다. 시간별로 배양된 균액은 0.5% pepton 용액 (NaCl 0.5 g, pepton 0.5 g, pH 7.2)으로 희석한 후 균주의 생존율을 희석평판법으로 계수하여 내담즙성을 측정하였다.

4. 내산성

선발된 균주들을 MRS 액체배지 (pH 6.5)에서 37°C, 24시간 배양한 다음 HCl을 첨가하여 pH 2, pH 4, pH 6으로 맞춘 MRS 액체배지에 각각 10%씩 seed culture하였고 시간에 따른 균주의 생존율을 희석평판법으로 계수하여 측정하였다.

5. Cholesterol 저해 정도

Curd 형성 능력이 우수한 균주를 선발하여 MRS agar plate에 streaking한 다음 단일 콜로니를 MRS broth 5 ml에 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 배양된 균액 1%를 수용성

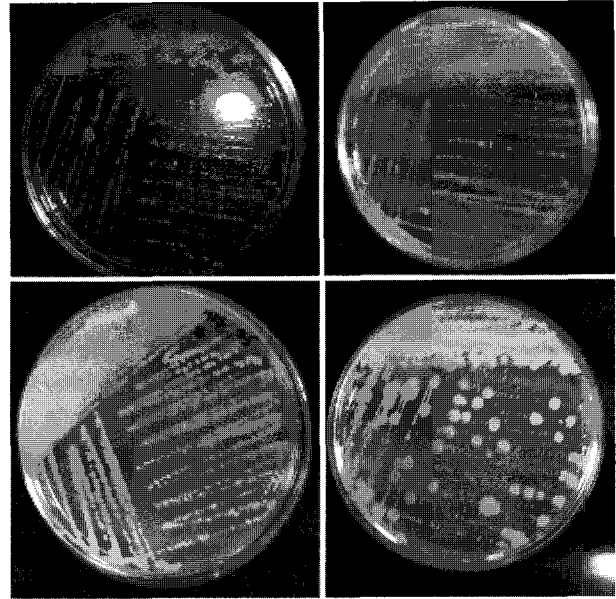


Fig. 1. Examples of isolated lactobacillus strains from pig (upper left and right) and human feces (lower left and right).

콜레스테롤 (polyoxyethanylcholesteryl sebacate) 100 µg/ml이 첨가된 MRS broth 5 ml에 접종하여 24시간 배양한 후 4,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 새로운 튜브에 담아 콜레스테롤을 첨가하지 않은 MRS broth 배지 및 콜레스테롤을 100 µg/ml의 농도로 첨가한 MRS broth 배지 (실험대조군)와 함께 Roche사의 D2400 분석기기를 이용하여 잔류 콜레스테롤 양을 측정하였다.

6. 유산균주의 당분해능 측정

분리된 유산균주의 당분해능 검사를 위해서 (주)코메드 제품인 Easy 24E plus kit을 사용하였다. 실험방법은 해당회사의 protocol을 따라 진행하였다. 최종 관찰은 37°C에서 이틀간 배양한 후에 실시하였다.

결 과

1. 분변으로부터 유산균주의 분리

돼지의 분변 샘플과 무작위로 선정된 5명의 인변 샘플을 MRS agar 배지에 도말한 다음 24~48시간, 37°C에서 배양한 결과 다양한 유산균주들이 나타나오는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 이 중에서 특히 colony를 크게 형성한 다수의 single colony를 skim milk 배지에 접종하여 다시 한 번 curd 형성이 원활한 균주들을 선발하였다. Curd 형성으로 인해 굳어진 skim milk 배지를 다시 streaking하여 single colony를 확보하였으며, skim milk 배지의 curd 생성력이 뛰어나고 균 성장이 빠른 균주를 최종 선발하였다. 돼지 분변에서는 2개의 균주

(D1-1, K1-1)가, 인변에서는 1개의 균주 (St 4-3)가 최종 선정되었으며 이들에 대해 내담즙성과 내산성 분석을 시행하였다.

2. 내담즙성

돼지 분변 샘플의 균주들인 D1-1과 K1-1은 0.5% oxgal에서 배양 후 2시간째까지 균이 살아 있음을 관찰할 수 있었으나, 6시간이 경과하였을 때부터는 균이 자라나오지 않는 것을 확인하였다. 이는 일정시간이 지나면 균주의 담즙내성이 떨어지는 것을 알 수 있는 결과이다 (Fig. 2). 인변 샘플의 균주인 St 4-3의 경우 0.5% oxgal 용액에서 배양한 다음 4시간까지의 균수는 차이가 거의 없었으나 역시 6시간 배양 후 균의 생존율이 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 그러나 돼지 분변 샘플에 비교할 때 내담즙성이 보다 우수한 것을 확인할 수 있었다.

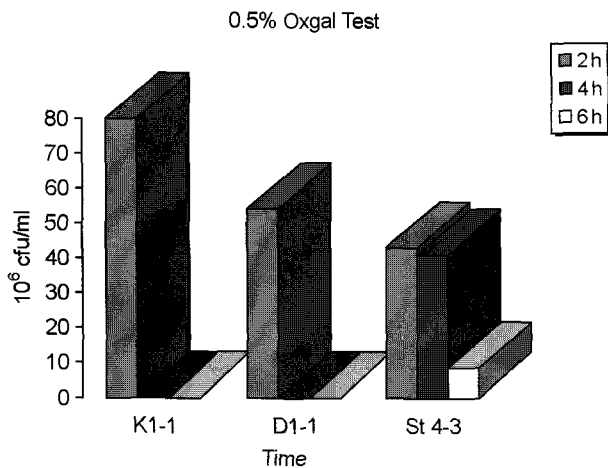


Fig. 2. Tolerance test of the selected lactic acid bacteria from pig and human feces in the presence of 0.5% oxgal.

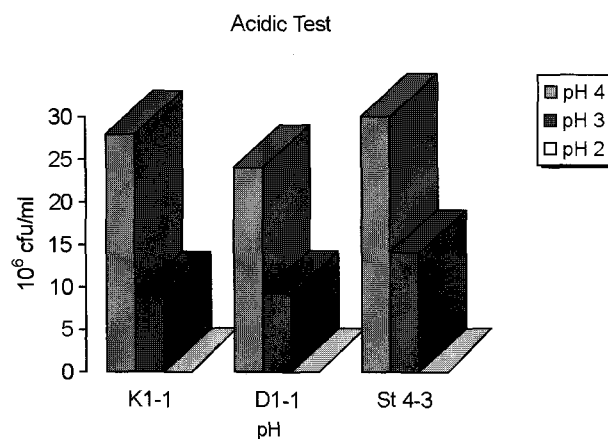


Fig. 3. Tolerance test against acidity of the selected lactic acid bacteria from pig and human feces.

3. 내산성

MRS 배지의 pH를 2, 3, 4로 각각 맞춘 다음 유산균주를 접종하여 사전 실험한 결과 시간별 차이는 없었으므로 (data not shown) 이후 모든 실험을 동일하게 6시간 동안 균을 배양하여 측정하였다. 균의 생존 정도를 살펴보면 pH 2에서는 모든 균이 사멸하였고, pH 3에서는 K1-1과 D1-1의 균수가 pH 4에서와 비교할 때 50% 이상 사멸하였다. St 4-3은 이보다 다소 우수한 내산성을 가지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

Table 1. Cholesterol-lowering ability

Source	Strain	Cholesterol Removal (%)
Human	St 4-3	60%
	D1-1	40%
Pig	K1-1	40%

Table 2. Results of the test for carbohydrate fermentation

Substrate	Reaction/Enzyme	St 4-3	D1-1	K1-1
Arabitol	Fermentation/Oxidation	-	-	-
Lactose	Fermentation/Oxidation	+	+	+
sucrose	Fermentation/Oxidation	-	+	+
manitol	Fermentation/Oxidation	-	+	+
Dulcitol	Fermentation/Oxidation	+	+	+
Adonitol	Fermentation/Oxidation	-	-	-
Sorbitol	Fermentation/Oxidation	-	+	-
Cellobiose	Fermentation/Oxidation	+	-	-
Raffinose	Fermentation/Oxidation	+	-	-
Rhamnose	Fermentation/Oxidation	-	+	+
Inositol	Fermentation/Oxidation	-	-	-
Maltose	Fermentation/Oxidation	-	+	+
Glucopyranoside	Fermentation/Oxidation	-	-	-
Esculin	Esculin hydrolysis	+	-	-
ONPG	beta-galactosidase	+	+	+
Tryptophan	Indole production	+	+	+
Phenylalanine	Phenylalanine eaminase	-	-	-
Potassium nitrate	NO ₂ production	+	+	+
Urea	Urease	-	-	-
Sodium thiosulfate	Hydrogen sulfate production	-	-	-
Lysine	Lysine decarboxylase	+	+	+
Arginine	Arginine decarboxylase	-	-	-
Ornithine	Ornithine decarboxylase	+	+	+
Glucose	Fermentation/ Under mineral Oil	+	+	+

4. 콜레스테롤 저해능

콜레스테롤이 첨가된 MRS 액체 배지에 선발 균주를 1% 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 각 선발 균주의 콜레스테롤 저해 정도를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 3개의 균주 중 인변으로부터 분리한 St 4-3이 약 60%로 가장 높았으며, 돼지 분변으로부터 분리한 K1-1과 D1-1 균주는 40%로 이에 비해 다소 낮았다. 그럼에도 불구하고 우리가 분리한 이 3종의 균주가 모두 콜레스테롤 저해능이 있음을 확인할 수 있었다. 당분해 결과를 통해 이 균주들의 lactose 분해능을 확인하였다. 유산균의 특성인 당분해성이 모두에게 있었으며, K1-1과 D1-1의 당분해능은 매우 유사하였다 (Table 2).

고 찰

서구화된 식습관으로 인해 혈액내 콜레스테롤이 축적됨으로써 심장질환의 위험이 증가하고 있다. 콜레스테롤을 저하시키기 위한 노력으로 많은 기능성 식품들이 개발되고 있으며, 건강증진 효과를 갖는 유산균을 이용한 식품 개발도 그러한 노력의 일환으로 연구되고 있다. 본 연구는 분변으로부터 콜레스테롤 저해능이 뛰어난 균주를 분리하고, 이들의 내담즙성과 내산성을 측정함으로써 장내에서 생존율이 높은 새로운 균주를 확보하기 위한 것이다.

유산균에 의한 콜레스테롤 제거 기능은 지속적으로 연구되어 왔다 (Klaver and Van der Meer, 1993; Pereira et al., 2003; Taranto et al., 2003). 그러나 유산균에 의한 혈중 콜레스테롤 감소 기작은 아직 정확하지 않다. 일부 *Lactobacillus acidophilus*의 균주가 담즙산 분해 효소를 분비하는 것이 발견되었고, 이 효소는 taurin conjugated bile salt를 아미노산 잔기와 free bile salt로 가수분해하는 역할을 한다고 보고된 적이 있었다 (Brashears et al., 1998; Corzo and Gilliland, 1999). Free bile salt는 conjugated bile salt보다 덜 용해되고 그 결과 장내로 흡수가 덜 된다는 원리이다. 담즙산을 분해해 버리면 콜레스테롤이 줄어든 만큼의 새로운 담즙산 형성에 쓰이게 되므로 그 결과 혈중내 콜레스테롤을 감소시킬 수 있기 때문이다. 또 다른 가능성은 세포에 의해 콜레스테롤이 용화된다는 것이다. 이러한 가능성은 *Lactobacillus acidophilus*의 일부 균주들에서 콜레스테롤이 세포막에 융합되었다는 연구 결과에 의해 뒷받침 된다 (Noh et al., 1997; Dambekodi and Gilliland, 1998).

사람과 돼지의 소화기관과 분변에는 풍부한 미생물이 존재하며 *Lactobacillus*는 동물의 장내에 존재하는 가장 주된 균주이다. 본 연구에서는 제주도 돼지와 무작위로 추출된 5명의 인변을 MRS agar 배지에 streaking하여 자라나는 colony 들을 선별한 다음 이들 균주의 내담즙성, 내산성, 콜레스테

롤 저해능 및 당분해능을 측정하였다. 유산균이 그 효용을 나타내기 위해서는 HCl과 각종 효소가 존재하는 위를 통과하여야 한다. 또한 소장에서의 담즙에 대한 내성을 가져야 한다 (Kimoto et al., 2002; Kimoto et al., 2003). 모두 3종의 균주가 분리되었는데 이들을 pH 2, 3, 4로 맞춘 MRS 배지에 배양하여 내산성을 측정하였을 때 인변에서 분리한 St 4-3 균주가 돼지 분변에서 분리한 균주 (K1-1, D1-1)에 비해 다소 높은 내산성을 보여주었다. 시간별로 pH에 따른 균수를 측정한 결과 2시간, 4시간 6시간 모두에서 유의할 만한 차이는 관찰되지 않았다. Oxgal을 이용하여 내담즙성을 확인한 결과 0.5% oxgal 용액에서 모두 우수함을 보여 주었다. 이들 균주 대부분이 oxgal 용액에서 시간이 경과함에 따라 성장이 다소 감소하다가 유지되는 양상을 보였으며, 이는 이들 균주가 살아 있는 상태로 장내에 도달할 가능성이 높음을 반영하는 결과로 생각된다. 결론적으로 이들 3종 모두가 내산성과 내담즙성이 뛰어나고 콜레스테롤 저해능이 강한 것으로 확인되었다. 당분해능 검사의 결과 역시 서로 간에 다소 차이는 있었으나 lactose 분해능이 우수한 것으로 확인되었다. 실험 결과를 종합해 볼 때 St 4-3의 내산성과 콜레스테롤 분해능이 다른 균주에 비해 약간 더 우수한 것으로 확인되었다.

결론적으로 우리는 돼지와 사람의 분변으로부터 내담즙성과 콜레스테롤 저해능이 우수한 균주를 3종 분리하였다. 이들 유산균은 앞으로 콜레스테롤 저해능이 더욱 높은 돌연변이 균주를 유도하기 위한 기초 자료가 됨과 동시에 콜레스테롤의 혈중 수치를 낮춰주는 기능성 제품 개발에 도움이 되리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것임.

REFERENCES

- Brashears MM, Gilliland SE, Buck LM. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. J Dairy Sci. 1998. 81: 2103-2110.
- Castelli WP, Wilson PF, Levy D, Anderson K. Serum lipids and risk of coronary artery disease. Atherosclerosis Rev. 1990. 21: 7-19.
- Corzo G, Gilliland SE. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. J Dairy Sci. 1999. 82: 472-480.
- Dambekodi PC, Gilliland SE. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of bifidobacterium longum. J Dairy Sci. 1998. 81: 1818-1824.
- Harrison VC, Peat G. Serum cholesterol and bowel flora in the

- new born. *Am J Clin. Nutr.* 1975. 28: 1351-1355.
- Kimoto H, Nomura M, Kobayashi M, Mizumachi K, Okamoto T. Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract. *Can J Microbiol.* 2003. 49: 707-711.
- Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol removal from media by lactococci. *J Dairy Sci.* 2002. 85: 3182-3188.
- Klaver FA, van der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *App Environ Microbiol.* 1993. 59: 1120-1124.
- Lim HJ, Kim SY, Lee WK. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J Vet Sci.* 2004. 5: 391-395.
- Noh DO, Kim SH, Gilliland SE. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J Dairy Sci.* 1997. 80: 3107-3113.
- Overdahl BJ, Zottola EA. Relationship between bile tolerance and the presence of a ruthenium red staining layer on strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci.* 1991. 74: 1196-2100.
- Pereira DIA, McCartney AL, Gibson GR. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing lactobacillus fermentum strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl and Environ Microbiol.* 2003. 69: 4743-4752.
- Sanders TA. Food production and food safety. *BMJ.* 1999. 318: 1689-1693.
- Taranto MP, Fernandez Murga ML, Lorca G, de Valdez GF. Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of lactobacillus reuteri. *J Appl Microbiol.* 2003. 95: 86-91.
- Toit M, Franz CM, Dicks LM, Schillinger U, Haberer P, Warlies B, Ahrens F, Holzapfel WH. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, feces pH and feces moisture. *Int J Food Microbiol.* 1998. 40: 93-104.
- Yin Q, Zheng Q. Isolation and identification of the dominant *Lactobacillus* in gut and feces of pigs using carbohydrate fermentation and 16S rRNA analysis. *J Biosci Bioengi.* 2005. 99: 68-71.
- Zani JL. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. *J Appl Microbiol.* 1998. 84: 6-71.