

내담즙산성, 항대장균성 유산균의 분리 및 동정

하철규 · 문무상 · 김명국 | 한국폴리텍바이오대학 바이오배양공정과

서론

유산균은 장내 세균 군수의 안정화¹⁾, 위장관내 병원균의 증식억제²⁾, 혈중 콜레스테롤의 저하^{3,4)}, 특이 및 비특이 면역반응의 유도 및 영양소 이용의 향상⁵⁾, 암퇴화 및 장내 효소 활성 감소에 의한 결장암의 예방효과⁶⁾, 그리고 비타민과 같은 인체 유용물질의 합성에 의한 영양 및 건강증진 효과 등이 있다.

그러나 유산균이 장내에서 유익한 역할을 수행하기 위해서는 인체 소화기기관 내의 위액, 각종 소화효소, 담즙산, 장의 연동 운동, 면역반응(immune response) 및 낮은 표면장력 등 미생물의 생존을 저해하는 요인들을 극복해야 한다⁷⁾.

이러한 요인들 중 담즙산은 콜레스테롤 대사의 산물로서 정상인의 담즙산은 41% cholate, 39% chenodeoxycholate, 15% deoxycholate, 4% ursodeoxycholate, 1% lithocholate로 구성되어 있다⁸⁾. 담즙으로 분비되는 담즙산은 소화장관의 전역에서 흡수되거나 회장하부로부터 재흡수되어 간장으로 돌아오는 장간순환을 하는데, 97%가 이 경로로 흡수된다^{9,10)}.

이러한 장간순환 시, 외과적, 약물학적, 병리학적, 간섭에 의해 담즙산이 유실되면, 새로운 담즙산 합성을 위한 전구물질로 콜레스테롤을 필요로 하게 된다^{11,12)}.

한편, 장내 미생물들은 복합담즙산의 amide 결합을 가수분해하여 유리 담즙산을 생성하고, 7-carbon hydrosyl group을 제거하여 2차 담즙산을 생성하며, 또 hydrosyl group들을 산화·환원하여 담즙산을 전환시킬 수 있다⁹⁾. 담즙산은 glycine 또는 taurine과 함께 N-acyl conjugation을 형성하여 담즙으로부터 분비되며¹³⁾, 체내에서 콜레스테롤을 제거하는 주경로로서¹⁴⁾ 체내 콜레스테롤 대사를 조절하는 주요한 수단이다¹⁵⁾.

담즙산과 taurine 또는 glycine의 결합은 bile salt hydrolase에 의해 분해되며, 이 복합담즙산 분해효소의 활성은 *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium* 그리고 *Streptococcus* 속에서 발견되고 있다^{10,16)}.

Gilliland와 Speck¹⁷⁾은 *Lactobacilli*에 의해 glycholate 및 taurocholate 등이 분해되면 더 이상 분해되지 않는 성질이 있으며, pH 6의 혐기상태에서 가장 활발하였다고 하였다.

본 고에서는 사람의 분변에서 담즙산 분해능이 뛰어난 유산균을 분리하고 유산균의 내담즙산성 및 항대장균성 등 균주특성을 조사하여 활성이 높은 균주를 선별하고, 동정한 내용에 대하여 기술하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

유산균은 건강한 성인의 분변으로부터 분리하여 사용하였고, 대장균은 한국유전자은행(KCTC)의 표준균주 *E. coli* KCTC 1041를 실험에 사용하였고, 담즙산은 oxgall powder와 bile extract(Sigma, Louis, U.S.A.)를 사용하였다. 유산균 배양용 배지로는 MRS broth(Difco, Detroit, U.S.A.)를 사용하였고, 대장균은 LB broth(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl)를 사용하였으며 배양조건은 37°C에서 1일간 진탕 배양하였다.

2. 유산균 분리

건강한 성인 30명으로부터 분변을 채취하여 0.02% sodium azide(NaN_3)가 첨가된 MRS 액체배지가 담긴 15ml 시험관에 멸균된 면봉을 이용하여 넣고, 멸균된 가위를 이용하여 면봉의 1/3 부분을 잘라 넣은 후, 37°C에서 약 2일간 배양하였다. MRS 한천 배지상에 생성된 균락을 백금이로 채집하여 MRS 액체 배지에 접종하고, 다시 배양하였다. 배양된 균주의 colony의 형태, catalase 음성, Gram 양성, 유산생성 등을 기준으로 하여 유산균으로 추정되는 균주를 선별하였다. 선별된 균주들을 원심분리(7,000rpm, 15min)하고 상등액을 멸균된 20% 탈지유로 치환하여 냉동(-70°C) 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 유산균의 담즙산 분해

유산균의 담즙산 분해는 Dashkevich와 Feighner¹⁸⁾의 agar plate assay를 이용하여 시험하였다. 시험에 사용한 담즙산은 oxgall powder와 bile extract(Sigma, Louis, U.S.A.)를 사용하였다. Oxgall과 bile extract를 MRS 배지에 각각 0.5% 첨

가하고 agar(Difco, Detroit, U.S.A.)를 1.7% 첨가하여 멸균한 다음 한천배지평판을 만들고, 시험 유산균을 도말 접종한 후, 37°C로 조정된 배양기에서 3일간 배양하였다. 담즙산 분해 반응의 정도는 균락 주위에 형성된 투명환을 육안으로 관찰하였다.

4. 내담즙성 분석

담즙산 분해능이 우수한 균주의 내담즙성의 분석을 위하여 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%(w/v)의 bile salt를 함유한 각각의 MRS broth에 각 분리 균주(2.0×10^8 CFU/ml)를 접종하여 37°C로 6시간 동안 방치하였다. MRS agar plate에 도말하여 배양한 후 다음식에 의해 내담즙성을 나타내기 위한 생존율(%)을 계산하였다.

$$\text{생존율}(\%) = (\text{cell number in MRS containing bile salt} \div \text{cell number in MRS}) \times 100$$

5. 대장균 생육억제 시험

분리균주들은 MRS 배지에서 대장균은 LB 배지에서 12-24시간 각각 배양한 후, 하나의 MRS 배지에는 대장균을 약 5.0×10^8 CFU/ml이 되도록 접종하고 다른 하나의 MRS 배지에는 분리균주와 대장균이 각각 약 5.0×10^8 CFU/ml의 수가 되도록 혼합 접종하였다. 접종된 배지를 37°C 배양기에서 정지 배양하면서 3시간 또는 6시간 간격으로 배양액을 채취하여 멸균 생리식염수로 희석한 후 LB 평판배지에 나타난 균락으로부터 대장균 수를 측정하였다. 분리균에 의한 대장균의 생육억제 정도는 MRS 배지에 단독으로 접종하여 배양한 대장균수와 비교하여 계산하였다.

6. 유산균 동정

분리균주는 Bergey's manual과 16S rRNA sequencing 방법을 사용하여 동정하였다.

7. 통계처리

실험에 의한 자료처리는 Windows 용 MS Excel 및 SAS(Stastic Analytical System, USA) Program(1989)을 사용하여 구하였고, 신뢰구간 검정은 χ^2 검정에 의하였고, 유의차 검정은 Duncan Multiple Range Test로 모두 95% 이상의 신뢰구간을 기준으로 산술하였다.

결과 및 고찰

1. 균주분리

사람의 분변 현탁액을 분리원으로 하여 120여 개의 단일 colony를 얻었으며, 얻어진 colony의 형태, catalase 음성, Gram 양성, 유산생성 등을 기준으로 하여 유산균으로 추정되는 30여 주를 선발하였다(data not shown). 선발된 균주 중 담즙산이 첨가된 배지에서 1차적으로 투명한 형성이 비교적 큰 균주 4종을 선별하여 *Lactobacillus* sp. CK 101, CK 103, CK 104, CK 105로 명명하고, 다음 시험에 이용하였다.

2. 유산균의 담즙산 분해능

도말된 배지상의 담즙산 분해시험에서는 담즙산이 분해된 투명환을 생성하였다. 투명환의 생성 크기를 3등급으로 나누어 표시하였을 때는 <표 1>의 결과와 같이 *Lactobacillus* sp. CK 104가 가장 큰 투명환을 나타냈다. 이 결과로부터 담즙산 분해능은 기타의 *Lactobacillus* sp.들 보다도 *Lactobacillus* sp. CK 104가 가장 우수한 것으로 확인되었다.

한편 담즙산이 고농도일 경우에 침전물이 형성되어 유산균

표 1. Deconjugation of bile salt by lactic acid bacteria under anaerobic condition.

Bile salt	Deconjugation			
	CK101	CK103	CK104	CK105
Oxgall	-	-	+	+
Bile extract	+	+	++	+

- : No halos of precipitate around colonies.
- + : Halos of precipitate around colonies.
- ++ : Big halos of precipitate around colonies.
- +++ : Very big halos of precipitate around colonies.

의 담즙산 분해 정도를 측정하는 것이 어려운 경우가 다수 발생하였다(data not shown). 이것은 유산균의 담즙산 탈포합 효소에 의한 영향인 것으로 생각되며 콜레스테롤 대사와의 밀접한 관련이 있기 때문에 향후 이에 대한 연구가 보완되어야 한다¹⁹⁾.

3. 내담즙성

십이지장에서 분비되는 담즙에 대한 내성을 실험하기 위하여 담즙산의 다양한 농도(0.1~1.0%)에서의 생존율을 조사한 결과, CK 104 균주가 담즙산 농도 1.0%에서 생존율 65.2%로 가장 우수한 생존율을 나타내었다<표 2>. 이는 내산성이 강한 *Lactobacillus* sp. CK 104 균주가 비교적 산성이 강한 담즙산에도 강한 생존율을 나타내는 것임을 알 수 있었다.

담즙산은 십이지장에서 분비되는 물질로서 세균의 성장을 억제하는 기능을 지니고 있으며 특히 장내 유래 세균이 아닌 경우에는 담즙산이 함유된 배지에서는 자랄 수 없다고 알려져 있다¹⁷⁾. 본 실험에서는 분리된 균주를 담즙산이 0~1.0% 함유된 MRS 배지에 도말하였을 때 담즙산 함량에 반비례하여 성장하였고, 담즙산 함량이 높은(0.5%이상 함량) 배지에서는 colony 형태가 pin point형인 것으로 보아 이는 분리된 균주가 담즙산에 의해 사멸되지는 않고 성장이 저해되는 것으로 추측되어 진다.

표 2. Bile salt-tolerance of various isolates of *Lactobacillus* sp. at different concentration of bile salts.

Bile salt (%)		CK101	CK103	CK104	CK105
0.1	Viable cell(CFU/ml)	1.98×10^8	1.52×10^8	1.98×10^8	1.32×10^8
	Viability(%) ^a	99.0±5.0	76.2±3.8	99.0±5.0	66.1±3.3
0.3	Viable cell(CFU/ml)	1.10×10^8	9.02×10^7	1.98×10^8	6.24×10^7
	Viability(%) ^a	55.1±2.8	45.1±2.3	99.0±5.0	31.2±1.6
0.5	Viable cell(CFU/ml)	7.06×10^7	2.38×10^7	1.98×10^8	0
	Viability(%) ^a	35.3±1.8	11.9±0.6	99.0±5.0	0
1.0	Viable cell(CFU/ml)	2.42×10^7	0	1.30×10^8	0
	Viability(%) ^a	12.1±0.6	0	65.2±3.3	0

Viability(%)^a=(cell number in MRS containing HCl or bile salt ÷ cell number in MRS) × 100. Inoculated various *Lactobacillus* sp. were approximately 2.0×10^8 CFU/ml at initial time and regarded as 100%.

4. 대장균 생육억제능

본 실험을 통하여 분리된 균주를 대장균과 혼합배양하여 대장균 생육억제능의 시험결과를 <그림 1>에 나타내었다. 대부분의 분리 유산균들은 접종 후 6~9시간까지 완전한 저해 효과를 나타내었고, 30시간에는 거의 모든 대장균을 사멸시키는 효과가 나타났다. 특히 *Lactobacillus* sp. CK 104의 경우는 12시간 이후부터는 대장균수가 급속히 감소하기 시작하여 24시간에는 대장균이 전혀 나타나지 않았다<그림 1>.

대장균의 성장억제가 배양과정에서 유산균이 생성한 유산에 의해 낮아진 pH의 영향인지 파악하기 위하여 pH 별로 대장균 성장억제 실험을 실시해 본결과 산성 pH에서는 성장은 억제되었으나 사멸은 되지 않았음을 알 수 있었다(data not shown). 유산균에 의한 유해 세균의 억제는 유산균이 생산하는 bacteriocin에 의해서 이루어지는 것으로 알려져 있다^{20,21}. 이와 같은 사실로부터 분리 유산균에 의한 대장균의 생육억제는 산성 pH와 bacteriocin에 의한 사멸작용에 기인하는 것으로 사료된다.

조 등²²⁾은 *L. acidophilus*, *L. casei* 및 *L. bulgaricus*를 이용하여 *E. coli*와 *Salmonella typhimurium*등의 증식에 미치는 영향을 조사하였는데 *L. bulgaricus*에 의해서는 33~34시

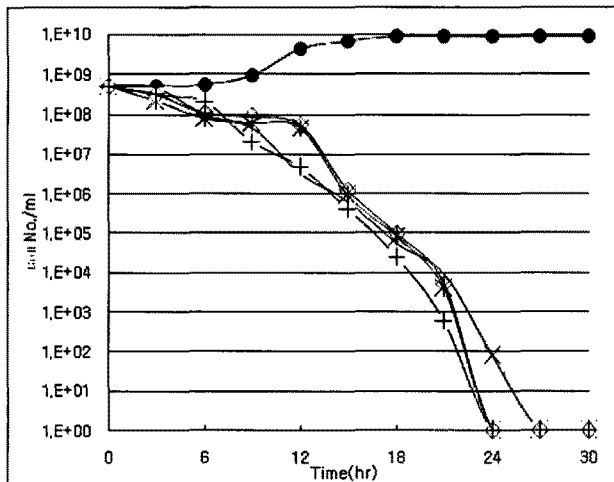


그림 1. Growth inhibition of *E. coli* KCTC 1041 by *Lactobacillus* sp. CK 101, 103, 104 and 105 in MRS broth.

- : only *E. coli*
- : *E. coli* by *Lactobacillus* sp. CK 101
- ×: *E. coli* by *Lactobacillus* sp. CK 103
- + : *E. coli* by *Lactobacillus* sp. CK 104
- ◇: *E. coli* by *Lactobacillus* sp. CK 105

간까지 배양하였을 때 대장균과 *Salmonella*의 증식을 모두 억제하였으나 *L. acidophilus*와 *L. casei*의 경우엔 107의 균수에 대하여 40시간 후, $10^5 \sim 10^6$ 까지 저해하여 *L. bulgaricus* 비해 저해능이 저조하다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 분리한 *Lactobacillus* sp. CK 104에 대해서는 24시간 이후에는 대장균이 검출되지 않아 조 등의 결과보다 빠른 시간에 대장균의 생육을 억제하는 것으로 나타났다.

5. 유산균 동정

본 연구에서 선발된 유산균들 중 가장 우수한 결과를 보여준 *Lactobacillus* sp. CK 104를 Bergey's manual에 의해 동정한 결과 <표 3>과 같이 확인되었다. 16S rRNA 분석에서는 *Lactobacillus* sp. CK 104의 510개의 염기배열을 분석한 결과 *Lactobacillus plantarum*과 98%의 염기서열이 동일함을 알 수 있었다<그림 2>.

```

CTGGTTAATCCGTCCTACCTGACAGTTACTCTCAGATATGTTCCTCTTTA 50
ACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCCTCTTCACTCAGCGGGCGTTGCT
CCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCTACTGCTGCCCTCCGTA
GGAGTTTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCCTCTCAGGT
CGGCTACGTATCATGCCATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTAAT
ACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAACCTCG
GACCATGCGGTCCAAGTTGTATGCGGATTAGCATCTGTTCCAGGTGT
TATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCA
CTCACTCAAATGTAATCATGATGCAAGCACCACCAATCAATACCAAGATTCG
TTGCACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGGTTGCTCTGAGCANGGN 500
ATCAAACCTCT 510
    
```

그림 2. 16S rRNA sequence of *Lactobacillus plantarum* CK 104.

표 3. Bacteriological characteristics of *Lactobacillus plantarum* CK 104.

Morphology	
cellular	rod
Gram staining	+
colony(at MRS medium)	gray(flat)
spore-forming	-
motility	-
Physiological characteristics	
optimum pH	6.0 - 7.0
optimum temperature	35 - 37°C
growth at 15°C	-
growth at 42°C	+
growth at 0.3% bile	+
growth under aerobic condition	+
catalase	-
β -galactosidase	+

+: positive, -: negative

이상의 결과로부터 분리된 *Lactobacillus* sp. CK 104 균주는 담즙산 분해능과 내산성, 내담즙성이 뛰어나며, 대장균 억제효과가 있는 *Lactobacillus plantarum*의 일종으로 밝혀졌다.

본 균종은 건강한 인체의 분변에서 분리하였기 때문에 어느정도 안전성이 확보되어 있을 것으로 추정되며, 담즙산 분해능으로 인한 콜레스테롤 저하효과를 추가적인 실험으로 밝힌다면 건강보조식품 또는 사료첨가제 등의 유용한 소재로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Lidbeck, G. J. and Nord, C. E., "Impact of *Lactobacillus acidophilus* on the normal intestinal flora after administration of two antibiotic agents", *Infection*, 16, pp. 329~335, 1987.
- Fernandes, C. F., Shahani, K. M., and Amer, M.A., "Therapeutic role of dietary lactobacilli fermented dairy products", *FEMS*, 46, 343~356, 1987.
- Hepner, G., Friend, R., St. Jeor, S., Fusetti, L., and Morin, R., "Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk", *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, 19~24, 1979.
- Suzuki, Y. and Kaizu, H., "Effect of cultured milk on serum cholesterol concentration in rats which were fed highcholesterol diets. *Anim. Sci. Technol.*, 62, 565~576, 1991.
- Fernades, C. F., Chandan, R. C., and Shahani, K. M., "Fermented dairy products and health In: the lactic acid bacteria, Volume 1, edited by Wood, B. J. B. London, new York : ELSEVIA", *Applied Science*, 297~342, 1992.
- Goldin, B. R. and Gorbach, S. L., "The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity", *Am. J. Clin. Nutr.*, 39, 756~761, 1984.
- Gilliland, S.E., "Beneficial interrelationships between certain Microorganisms and Humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts", *J. Food Pro.*, 42, 164~167, 1979.
- Elliot, W. H., "Metabolism of bile acid in liver and extrhepatic tissue". In *Sterols and Bile Acids*, 12, H. Danielsson and J. Sjovall, (Ed.), Elsevier Science publishers, B. V., 303~343, 1985.
- Hofmann, A. F., "Bile Acids" In *THE LIVER Biology and Pathobiology*, I. M. Arias, W. B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter and D. A. Shafritz, (Ed.), 2nd ed., RAVEN PRES, New York, 553~572, 1988.
- Macdonald, I. A., Bokkeheuser, V. D., Winter, J., McLernon, A. M., and Mosbach, E. H., "Degradation of steroids in the human gut. *J. Lipid Res.*, 24, 675-700, 1983.
- De Roadas, B. Z., Gilliland, S. E., and Maxwell, C. V., "Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* Atcc 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diety", *J. Dairy Sci.*, 79, 2121~2128, 1996.
- Driessen, F. M. and De Boer, R., "Fermented milks with selected intestinal bacteria: a healthy trend in new products", *Neth. Milk Dairy J.*, 43, 367~382, 1989.
- Hofmann, A. F. and Mysels, K. J., "Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions", *J. Lipid Res.*, 33, 617~626, 1992.
- Turley, S. D. and Dietschy, J. M., "The metabolism and excretion of cholesterol by the liver", In I. M. Arias., 617~641, 1988.
- Chen, Z., Herdt, T. H., Liesman, J. S., Ames, N.K., and Emery, R. S., "Reduction of bovine plasma cholesterol concentration by partial interruption of enterohepatic circulation of bile salts: a novel hypocholesterolemic model. *J. Lipid Res.*, 36, 1544~1556, 1995.
- Hylemon, P. B., "Metabolism of bile acids in intestinal micro flora", In *Sterols and Bile Acids*, 12, 331~334, 1985.
- Gilliland, S.E. and Speck, M. L., "Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli", *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 15~18, 1977.
- Dashkevich, M. P. and Feighner, S. D., "Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* sp.", *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 11~16, 1989.
- Klaver, F. A. M. and R. van der Meer., "The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugation activity", *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1120~1124, 1993.
- Huttunen, E. K., Noro, K., and Yang, Z., "Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains", *Int. Dairy J.*, 5, 503~513, 1995.
- Gourama, H. and Bullerman, L. B., "Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus species*", *J. Food Prot.* 58, 1249~1256, 1995.
- 조성근, 강호조, 김용환, "Lactobacillus 균속이 설사 자돈에서 유래한 병원성 장내세균의 증식에 미치는 영향", *경상대학교 부설 축산진흥연구소보* 11, 73~81, 1984.