creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000264234

2014年 2月

碩士學位 論文

김치로부터 분리한 유산균의 콜레스테롤 저하 효과

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

崔 銀 娥

김치로부터 분리한 유산균의 콜레스테롤 저하 효과

Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria isolated from Kimchi

2014年 2月 25日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

崔 銀 娥

김치로부터 분리한 유산균의 콜레스테롤 저하 효과

指導敎授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함.

2013年 10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

崔 銀 娥

崔銀娥의 碩士學位論文을 認准함

委員長　조선대학교　교수　　이명렬　印

委　員　조선대학교　교수　　이재준　印

委　員　조선대학교　교수　　장해춘　印

2013 年 11 月

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT ····· Ⅷ
LIST OF TABLES ····· Ⅳ
LIST OF FIGURES ····· Ⅴ

제 1 장 서 론 ····· 1

제 2 장 실험재료 및 방법 ····· 4
제 1 절 콜레스테롤 저하 균주의 분리 · 동정 및 특성규명 · 4
1. 콜레스테롤 저하 균주의 분리 ····· 4
2. 분리 균주의 동정 및 특성규명 ····· 5
가. 사용균주 및 배지 ····· 5
나. 분리 균주의 동정 ····· 5
다. 온도에 따른 일반 생육도 ····· 6
제 2 절 분리 균주의 안전성 확인 ····· 8
1. 항생제 감수성 ····· 8
제 3 절 분리 균주의 기능성 확인 ····· 9
1. 내산성 및 인공위액 저항성 측정 ····· 9
2. 인공담즙 저항성 ····· 10
3. 효소활성 측정 ····· 10
4. 콜레스테롤 동화능 및 특성규명 ····· 11
가. 균주 및 배지 ····· 11
나. 콜레스테롤 배지 조성물에 따른 온도별 생육도 ····· 11

다. 콜레스테롤 동화능 ····· 12
(1) Standard curve graph ····· 12
(2) Growing cell의 콜레스테롤 동화능 ····· 12
(3) Resting cell 및 Dead cell의 콜레스테롤 동화능 ····· 15
(4) 콜레스테롤 동화 활성 유산균의 세포벽 분리 ····· 15
(5) 유산균의 세포벽을 이용한 콜레스테롤 동화능 ····· 16
다. Scanning Electron Microscopy (SEM) ····· 18
(1) Growing cell의 Scanning Electron Microscopy 관찰 ····· 18
(2) Dead cell의 Scanning Electron Microscopy 관찰 ····· 18

제 3 장 결과 및 고찰 ····· 21

제 1 절 콜레스테롤 저하 균주의 분리 · 동정 및 특성규명 21

1. 콜레스테롤 저하 균주의 분리 ····· 21
2. 분리 균주의 동정 및 특성규명 ····· 21
가. 분리 균주의 동정 ····· 21
(1) 형태 및 배양학적 특성 ····· 22
(2) 당 대사능 ····· 22
(3) 16S rRNA 염기서열 분석 ····· 22
나. 온도에 따른 일반 생육도 ····· 23

제 2 절 분리 균주의 안전성 확인 ····· 32

1. 항생제 감수성 ····· 32

제 3 절 분리 균주의 기능성 확인 ····· 34

1. 내산성 및 인공위액 저항성 측정 ····· 34
2. 인공담즙 저항성 ····· 35
3. 효소활성 측정 ····· 39
4. 콜레스테롤 동화능 및 특성규명 ····· 41
가. 콜레스테롤 배지 조성물에 따른 온도별 생육도 ····· 41

나. 콜레스테롤 동화능 ····· 46
(1) Standard curve graph ····· 46
(2) Growing cell의 콜레스테롤 동화능 ····· 46
(3) Resting cell 및 Dead cell의 콜레스테롤 동화능 ····· 48
(4) 유산균의 세포벽을 이용한 콜레스테롤 동화능 ····· 49
다. Scanning Electron Microscopy (SEM) ····· 58

제 4 장 결 론 ····· 65

제 5 장 참 고 문 헌 ····· 68

LIST OF TABLES

Table 1. List of lactic acid bacterias (LAB) used in the experiment ····· 7

Table 2. Gram staining and Pre-screening on 50 selected lactic acid bacteria ····· 24

Table 3. Sugar utilization characteristics of the isolate EM ····· 26

Table 4. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics for LAB ····· 33

Table 5. API ZYM analysis of the enzyme activities of the LAB ····· 40

LIST OF FIGURES

Figure 1. Cholesterol assimilation method of Rudel and Morris ····· 14

Figure 2. Isolation of lactic acid bacteria cell wall fraction ····· 17

Figure 3. Scanning electron microscopy (SEM) preparation protocol ····· 20

Figure 4. Gram staining of the isolated strain ····· 25

Figure 5. 16S rRNA sequence from the isolated strain *Lb. plantarum* EM ····· 27

Figure 6. 16S rRNA sequence from the isolated strain *Lb. sakei* DC1 ····· 28

Figure 7. Phylogenic relationship between *Lb. plantarum* EM and *Lb. sakei* DC1 and other related bacteria based on 16S rRNA sequence ····· 29

Figure 8. Growth Curves of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 37℃ ····· 30

Figure 9. Growth Curves of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 30℃ ····· 31

Figure 10. Acid tolerance of the LAB in Phosphate-buffered saline (PBS, pH 2.5) 36

Figure 11. Survival of the LAB in the simulated gastric juice (SGJ, pH 2.5) ····· 37

Figure 12. Survival of the LAB in the bile salt (0.3% oxgall, pH 8.0) ····· 38

Figure 13. Growth of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 37℃ in cholesterol and oxgall media ····· 42

Figure 14. Growth of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 30℃ in cholesterol and oxgall media ····· 43

Figure 15. Growth of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 37℃ in cholesterol and taurodeoxycholic acid media ····· 44

Figure 16. Growth of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 30℃ in cholesterol and taurodeoxycholic acid media ····· 45

Figure 17. Standard curve graph for cholesterol determination using *O*-phthalaldehyde ····· 50

Figure 18. Cholesterol assimilation of the growing cell in the cholesterol and oxgall at 37℃(A) and 30℃(B) ····· 51

Figure 19. Cholesterol assimilation of the growing cell in the cholesterol and taurodeoxycholic acid at 37℃(A) and 30℃(B) ····· 52

Figure 20. Cholesterol assimilation of the resting cell in the cholesterol and oxgall at 37℃(A) and 30℃(B) ····· 53

Figure 21. Cholesterol assimilation of the resting cell in the cholesterol and taurodeoxycholic acid at 37℃(A) and 30℃(B) ····· 54

Figure 22. Cholesterol assimilation of the dead cell in the cholesterol and oxgall at 37℃(A) and 30℃(B) ····· 55

Figure 23. Cholesterol assimilation of the dead cell in the cholesterol and taurodeoxycholic acid at 37℃(A) and 30℃(B) ····· 56

Figure 24. Cholesterol assimilation of the cell wall fraction in the cholesterol and taurodeoxycholic acid at 37℃ ····· 58

Figure 25. SEM micrograph of *Lb. plantarum* EM growing cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24 h 59

Figure 26. SEM micrograph of *Lb. acidophilus* ATCC 43121 growing cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24 h ····· 60

Figure 27. SEM micrograph of *Lb. sakei* DC1 growing cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24 h 61

Figure 28. SEM micrograph of *Lb. plantarum* EM dead cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24 h 62

Figure 29. SEM micrograph of *Lb. acidophilus* ATCC 43121 dead cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24 h ····· 63

Figure 30. SEM micrograph of *Lb. sakei* DC1 dead cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24 h ····· 64

ABSTRACT

Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria isolated from Kimchi

Choi, Eun A
Advisor : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.
Department of Food and Nutrition,
Graduate School of Chosun University

Probiotics potential properties of lactic acid bacteria isolated from kimchi. The isolated four strains were identified by examing their morphological and metabolic properties and 16S rRNA gene sequences. They were identified as *Lactobacillus plantarum* EM, *Lactobacillus plantarum* HD1, *Lactobacillus plantarum* NO1, and *Leuconostoc kimchii* GJ2. Growth of the isolated strains was measured at 30℃ and 37℃ for 48 h. The probiotic potential properties of lactic acid bacteria investigated include antibiotic resistance, acid and bile tolerance, enzymatic activities and cholesterol assimilation ability. Antibiotic susceptibility tests indicated that four isolates were sensitive to ampicillin, vancomycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline and chloramphenichol, which were included in the European Food Safety Authority. To obtain antibiotic susceptibilities of lactic acid bacteria, minimum inhibitory concentration (MIC) of 8 antibiotics for 4 LAB isolates from Kimchi were determined. Four strains were highly resistant to acid, simulated gastric juice, and bile salt. The enzyme profiling is an important factor for selection of strains. When examined by API-ZYM kit, β-glucuronidase was not produced by *Lb. plantarum* EM, HD1, *Leu. kimchii* GJ2. The ability of cholesterol-binding appeared to be growth and strain specific. The isolated LAB strains were able to assimilate cholesterol at varying levels ranging

from 76.2 to 96.4% at 30℃ and from 72.4 to 95.1% at 37℃ in MRS medium supplemented with oxgall. Additionally, the isolated LAB showed the cholesterol assimilation capability from 50.3 to 98.4% at 30℃ and from 23.8 to 97.9% at 37℃ in MRS medium supplemented with taurodeoxycholic acid. The four strains showed still high cholesterol assimilation ability with dead cell stage. cholesterol assimilation ability with the growing cell and dead cell were confirmed by scanning electron microscopy observation. SEM showed that cholesterol was adhered to the cellular surface of the lactic acid bacteria cells. In conclusion, these results suggest that the *Lactobacillus plantarum* EM potentially probiotic functional strain.

제 1 장 서 론

현대의 급속한 성장과 더불어 현대인들은 신체활동이 감소하고, 식생활의 서구화에 따른 고지방, 고당질 가공식품 및 동물성 식품 소비가 크게 증가하면서, 고혈압, 당뇨병, 비만, 고지혈증, 악성 종양, 동맥경화증 등 각종 생활습관 질환의 발병률이 증가하여 건강에 위협을 받고 있다. 특히 과량의 지방과 콜레스테롤의 섭취는 혈관에 침착하여 동맥이 막히거나, 혈액이 공급되지 않는 심혈관계 질환을 일으키는 주요위험요인이라고 잘 알려져 있다(28). 물론 콜레스테롤은 고등동물의 세포 성분으로 인지질과 함께 세포의 막을 구성하는 주요성분으로 막 구조나 기능에 큰 역할을 하며, 생체 내에서 출발물질로 하여 비타민 D, 테스토스테론·프로게스테론과 같은 성호르몬, 부신피질호르몬, 담즙산 합성 등에 작용하며 지질 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나, WHO는 2030년, 세계 23.3 million 이상의 인구가 죽음의 원인이 심혈관 질환일 것으로 예측하며, 2008년 17.3 million의 인구가 심혈관 질환으로 사망하였다고 발표하였다(3). 또한 저소득 및 중산층의 나라에서 심혈관 질환으로 인한 죽음이 80% 이상으로 남성과 여성이 거의 동등한 비율로 발생하였으며, 혈액 지질 특성을 가지고 있는 사람에 비해, 고 콜레스테롤 혈증이 있는 사람에게서 심장발작이 세배 높다고 발표하였다(3).

한국인을 위한 “바람직한(desirable) 총 콜레스테롤” 수치는 200 mg/dL미만이며, 200~239 mg/dL은 “경계수준(borderline-high)”, 그리고 240 mg/dL이상은 “고 콜레스테롤 혈증(high)”이라고 정의한다. 또한 미국 NCEP (National Cholesterol Education Program)가 설정한 혈장 콜레스테롤 수준과 Coronary heart disease의 위험율은 LDL 콜레스테롤은 100 mg/dL미만이면 “적절한 수준(optimal)” 이며 100~129 mg/dL이면 “적정수준에 근접하였거나 조금 상위하는 수준(near optimal/above optimal)”, 130~159 mg/dL이면 “경계위험수준(borderline high)”, 160~189 mg/dL이면 “고위험수준(high)”, 그리고 190 mg/dL이상이면 “매우 고위험 수준(very high)”으로 규정한다(9).

정상인의 1일 콜레스테롤의 섭취량이 약 400~500 mg일 경우 일반적으로 식이 콜레스테롤은 약 60~80%가 흡수된다. 식이 콜레스테롤을 40~2,000 mg섭취하는 경우, 평균 30~40%가 흡수된다고 보고된 바도 있다(52). 한편, 제한된 콜레스테롤의 흡수율에 따라 흡수되지 않은 식이 콜레스테롤은 콜레스테롤 형태 내지 대장과 직장의 박테리아 효소반응에 의한 대사산물로 배설된다. 식이 지방의 소화흡수과정에 필수적인 담즙은

하루 그 분비량이 800~1,200 mg 이며, 담즙을 구성하는 주요성분은 담즙산이 92%, 담즙산염이 6% 유리 콜레스테롤이 0.3%이며 그 외 소량의 인지질, 유리지방산 및 빌리루빈을 포함한다.

콜레스테롤 수치가 1 mg/dL이 상승할 때 마다 심장병 발생위험이 2~3% 증가되는 것으로 보고되었다(36). 이러한 심혈관계 질환을 지닌 환자들은 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추기 위해 약물들을 복용하는데, 약물의 콜레스테롤 조절 작용 유형으로는 소장 콜레스테롤 가수 분해 및 에스테르화 효소 활성도 저해를 이용한 장내 콜레스테롤 흡수조절(1), 장내 흡수 차단제(sequestrant)로 작용하여 스테롤 배설 촉진을 이용한 콜레스테롤과 담즙산 배설 조절(40), HMG-CoA reductase 저해로 인한 콜레스테롤 생합성 조절, 간의 VLDL 합성 관련 효소 저해(21), lipoprotein lipase 활성화작용에 의한 혈중 VLDL 합성/분해조절, 기타 알려지지 않은 작용으로 항산화영양소(비타민 E)의 조절작용으로 콜레스테롤 수치를 낮추는 유형의 약물이다(61). 그러나 이러한 약물들을 장기 복용 시 심각한 간 손상 및 기능 저하, 관절 근육통, 변비 및 설사, 오심 등의 부작용을 초래한다. 따라서 부작용이 없는 혈중 콜레스테롤수치를 낮추기 위한 목적으로 각국에서 식이요법과 함께 사용될 각종 기능성 식품 및 고지혈증 개선용 식이보충제의 합성에 주력하고 있는 상황이다.

김치는 한국의 대표적인 채소 발효 식품으로 무, 배추, 오이, 열무 등을 주원료로 하여 이를 소금에 절인 후 고추, 파, 마늘, 생강, 젓갈 등의 양념을 혼합하여 발효시킨 식품이며 원료와 미생물의 작용으로 유래되는 성분이 조화되어 고유한 풍미를 가진다(5, 23, 45). 김치 발효과정에 관여하는 유산균의 효능은 프로바이오틱(Probiotics)으로서 다양한 방면에서 연구되어 일차적인 기능으로 장내 균총의 균형 유지(13), 세균성 식중독의 억제(41, 57), 장내 상피 세포 보호(38), 독성 물질의 흡수 저해(49), 정장작용 외에 변비 및 설사의 개선(25, 60), 혈압의 저하(62), 혈중 콜레스테롤 저하, 항암 · 항알레르기(17, 44) 효과 Helicobacter pylori 억제작용 등 그 효능이 입증되고 있다.

프로바이오틱이란 “장내 미생물 균형을 증진시킴으로써 숙주동물에 유익한 효과를 주는 살아 있는 미생물 제제”로 정의하였다(50). 현재 프로바이오틱으로 이용되고 있는 미생물은 *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus thermophilus, Pediococcus pentosaceus, Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium* 등의 세균 및 *Saccharomyces* 같은 효모가 있다(14).

유산균에 관한 유익한 건강효과 중 혈중 콜레스테롤 함량을 저하시키는 작용은 결합 담즙산의 분해에 따른 담즙산 재흡수 억제, 장내 콜레스테롤의 흡수 억제, 콜레스테

롤의 동화(assimilation)(48), 콜레스테롤의 유산균 세포벽 흡착(32), 탈결합 담즙산과 콜레스테롤의 침전(33) 유산균의 성장과 세포막의 콜레스테롤 포합(35), coprostanol로의 콜레스테롤 전환(34) 등의 기작으로 설명된다. 그러나, 유산균에 의한 혈중 콜레스테롤 저하 기작은 아직까지도 명확하게 밝혀지지 않고 있으며, 이 중에서도 콜레스테롤의 유산균 세포막 흡착 및 담즙산 분해효소(bile salt hydrolase, BSH)(27)에 따른 기작에 의한 콜레스테롤 저하 가능성이 높은 비율을 차지하고 있다. 세포막 흡착에 관한 기전은 배지 내에 존재하는 콜레스테롤 수준이 유산균의 성장과 함께 감소하고, 이는 유산균이 콜레스테롤을 세포막에 부착시켜 배출됨에 의한다고 설명되어진다(15). 또한, 콜레스테롤 배지 내 유산균의 세포막 탄성이 증가하는 것은 유산균의 콜레스테롤 세포막 부착설(assimilation)에 의한다고 보고되어 유산균에 의한 콜레스테롤 저하효과 가능성을 높여 주었다(42). 콜레스테롤의 접합 능력은 세포벽의 아미노산을 함유한 peptidoglycans의 화학적, 구조적 성질에 의해 영향을 받는다고 연구되었다(18). 반면 담즙산 분해효소에 의한 저하기작은 유산균이 결합 담즙산의 분해를 도와 소장에서의 담즙산 재흡수 억제를 통해 담즙산 전구체인 콜레스테롤을 이용을 증가시켜 혈중 콜레스테롤 농도가 낮아진다는 것이다. 탈결합 담즙산은 지방의 가용성화와 흡수에 있어서 결합담즙산과 같은 기능을 하지 못하며, 체내 일정 농도 유지를 위해 지속적으로 담즙산으로 변환시킴으로서 콜레스테롤 합성을 조절하여 농도를 낮춘다고 설명하였다(37). 담즙염의 탈결합 활성은 균체 생육의 기하증식기 말기에 가장 높으며 이 때 콜레스테롤 분해능력이 가장 높다고 발표하였다(7, 8, 19, 56).

따라서, 본 연구에서는 최근 식생활의 서구화에 따른 심혈관계 질환의 발병률 증가로 콜레스테롤 수치를 낮추는 약물들을 복용하는데 장기복용 시 심각한 부작용을 초래하므로 이 문제점을 극복하기위한 방안으로서, 전통발효식품인 김치로부터 분리된 유산균을 이용하여 기능성 식품 및 고지혈증 개선용 식이보충제로서의 가능성을 제시하고자 하였다. 김치로부터 분리된 4종의 유산균을 이용하여 probiotics 제제로 사용되기 위해 항생제 내성특성을 통해 안전성을 확인하고, 위산에 기인되는 산에 대한 내성 및 인공위액 저항성, 담즙에 견뎌 장내에 도달할 수 있는 생존능력, 유해효소 활성 보유여부로 분리균주의 기능성을 탐색하였다. 또한, *in vitro* 조건 하에서 BSH (bile salt hydrolase)의 활성 및 콜레스테롤 동화능(assimilation)측정, SEM (scanning electron microscopy)을 이용한 유산균 세포표면의 관찰을 통해 콜레스테롤 저하기작을 유추하여 보고자 하였다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 콜레스테롤 저하 균주의 분리 · 동정 및 특성규명

1. 콜레스테롤 저하 균주의 분리

콜레스테롤 저하 균주를 분리하기 위하여 다양한 김치로부터 분리된 김치 유산균 50종을 수집 한 후, 선별 단계로 김치 유산균 50종을 0.5%(w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma, Deisenhofen, Germany)과 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 MRS 액체배지에 분리균주를 1%(v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 혐기 배양 (BD, Gas-pak, USA)한 후, 원심분리(9,950 ×*g*, 5 min, 4℃)하여 얻어진 상등액 1 mL에 2 mL의 50% (w/v) KOH를 반응시켜 탁도 및 600 nm (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에서 흡광도를 측정하여 대조구보다 낮은 수치를 가진 균주를 1차 선별하였다. 대조구로는 균주를 첨가하지 않은 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma Deisenhofen, Germany)와 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 MRS 액체배지를 원심분리(9,950 ×*g*, 5 min)하여 얻어진 상등액 1 mL에 2 mL의 50% (w/v) KOH를 반응시켜 측정하였다.

1차로 선별된 김치 유산균 13종 중 담즙산 분해효소를 생성하는 김치 유산균을 선별하기 위해 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma Deisenhofen, Germany)와 0.37 g/L $CaCl_2$ (Sigma, USA)이 포함된 MRS 고체배지 위에 김치 유산균 13종 10 μL를 떨어뜨린 후 37℃에서 48시간 혐기 배양 (BD, Gas-pak, USA)하여 담즙산 분해효소를 생성하는 균주 4종을 2차 선별하였다(10).

2. 분리 균주의 동정 및 특성규명

가. 사용균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 본 실험실에서 분리된 4종의 균주와 American Type Culture Collections (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 구입한 2종으로 Table 1와 같다. 모든 균주는 De Man Rogosa Sharpe (MRS; Difco, Laboratories, USA) 액체배지에 배양한 후 대수기에 있는 배양액에 glycerol이 25% (v/v)가 되게 첨가하여 -70℃에서 저장하였다. 5종의 균주는 5 mL MRS 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 계대하여 사용하였고, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121는 5 mL MRS 액체배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 계대하여 사용하였다.

나. 분리 균주의 동정

콜레스테롤 저하능을 나타내는 분리균주의 동정을 위하여 일차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그람 염색 및 현미경 관찰과 API 50 CHL system (BioMerieux, Marcy IEtoile, France)을 이용하여 당 발효능을 조사한 후에 균주동정 프로그램 (http://apiweb.biomerieux.com)을 이용하여 균주를 동정하였다. 최종적인 동정을 위하여 분리균주의 16S rRNA 염기서열을 결정하여 알려진 균주들과 비교하였다. 분리균주의 16S ribosomal RNA sequencing은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 분리균주의 Chromosomal DNA를 DNeasy QIAGEN blood & tissue kit를 이용하여 분리한 후, 16S rRNA sequencing은 27F(5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′), 1492R(5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′) primer를 이용하여 PCR (DNA Engine Dyad Dual-Bay thermal cycyler, BIO-RAD)을 진행 한 후, inter-primer인 518F(5′-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3′), 800R(5′-TACCAGGGTATCTAATCC-3′) primer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열의 상동성 검사는 GenBank database에 등록된 정보를 대상으로 실행하였다. sequence alignment는 CLUSTER W 알고리즘으로 정렬한 후 MEGA 5.05 program으로 neighbor-joining tree에 의해 계통도를 작성하여 유전적 유사성을 확인하였다.

다. 온도에 따른 일반 생육도

김치로부터 분리된 유산균 4종 *Lactobacillus plantarum* EM, *Lactobacillus plantarum* HD1, *Lactobacillus plantarum* NO1, *Leuconostoc. kimchii* GJ2 및 *Lactobacillus acidophillus* ATCC 43121, *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 총 6종의 온도에 따른 일반 생육도를 확인하였다. MRS 액체배지 5 mL에 유산균주를 1% (v/v) 접종하여 30℃와 37℃에서 24시간 전배양한 후, MRS 액체배지 5 mL에 전배양액을 1% (v/v) 접종하여 4시간 간격으로 30℃와 37℃에서 0~48시간 동안 정치배양하면서 흡광도 (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 600 nm에서 측정하였다.

Table 1. List of lactic acid bacteria (LAB) used in the experiment

No.	Strains	Medium	Incubation temp. (℃)	Reference
1	*Lb. plantarum* EM	MRS	30℃	This lab
2	*Lb. plantarum* HD1	MRS	30℃	This lab
3	*Lb. plantarum* NO1	MRS	30℃	(30)
4	*Lb. sakei* DC1	MRS	30℃	This lab
5	*Leu. kimchii* GJ2	MRS	30℃	(22)
6	*Lb. acidophillus* ATCC 43121	MRS	37℃	(15)
7	*Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103	MRS	30℃	(55)

제 2 절 분리 균주의 안전성 확인

1. 항생제 감수성

김치로부터 분리된 4종의 유산균 항생제 감수성 측정은 액체 배지 희석법(Broth microdilution method)을 이용하여 측정하였다(12). 실험에 사용된 항생제는 총 8종으로 ampicillin (Sigma, Saint Louis, USA), gentamicin (Sigma, Saint Louis, USA), kanamycin (Sigma, Saint Louis, USA), streptomycin (Sigma, Saint Louis, USA), erythromycin (Sigma, Saint Louis, USA), clindamycin (Sigma, Saint Louis, USA), tetracycline (Sigma, Saint Louis, USA), chloramphenicol (Sigma, Saint Louis, USA) 이며, 이들 항생제는 규정된 용매에 녹인 후 사용하였다. 항생제 감수성을 측정하기 위한 배지는 0.5% dextrose를 첨가한 Muller-Hinton (MH, Becton Dickson, USA) 액체 배지에 항생제를 각 농도별로 조정하여 첨가하였다. 항생제의 최소 생육저해 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위해 4종의 유산균은 MRS 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 배양액을 원심분리(9,950 ×*g*, 4 min)하여 균체를 회수한 후 0.5% Dextrose가 함유된 Muller-Hinton (MH) broth에 현탁하여 OD_{600} = 0.4~0.5가 되도록 한 후 현탁액을 MH 액체배지에 1 : 10 희석하고, 항생제를 단계별로 희석하여 준비한 배지에 균주의 현탁액을 넣어준 후 혐기적인 조건하에 30℃에서 12시간동안 배양하였다. 감수성 여부는 탁도 및 600 nm (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에서 흡광도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 탁도 및 생육도의 대조구로는 항생제를 첨가하지 않은 MH 액체배지에서 배양된 4종의 균주를 사용하였다. 각각의 균주에 대한 감수성 해석은 European Food safety Authority (EFSA, 2008)(11)를 참고하여 각각의 항생제가 첨가된 배지에서 균주가 증식하지 않는 최소 농도로 최소 생육저해 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 결정하였다.

제 3 절 분리 균주의 기능성 확인

1. 내산성 및 인공위액 저항성 측정

분리균주의 산 저항성 실험으로 단순 산성 pH에 대한 내성 측정은 1.0 N HCl을 사용하여 pH 2.5으로 조정한 phosphate-buffered saline (PBS, pH 2.5; Hyclone, Logan, UT, USA)에서 시행하였다. 인공위액에서의 저항성은 체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 인공위액을 조제하여 실시하였다. 인공위액의 조제는 Santini (53)과 Lian(29)의 방법을 일부 변형하여 1.0 N HCl을 사용하여 pH 2.5으로 조정한 0.5% saline buffer에 pepsin (Sigma, Co., USA)이 3 mg/mL가 되도록 첨가하여 조제하였다.

김치로부터 분리된 4종의 균주 및 대조균주로 쓰인 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103을 MRS 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양하였고, *Lb. acidophilus* ATCC 43121의 경우 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 배양 한 후 원심분리(9,950 ×*g*, 5 min)하여 상등액을 제거하고 8.2~9.6 log CFU/mL의 균체를 회수한 다음 pH 2.5으로 조정한 1 mL의 phosphate-buffered saline 용액과 인공위액을 첨가하여 37℃에서 1시간 배양하였다. 1시간 배양 후 phosphate-buffered saline 용액과 인공위액으로 처리된 유산균을 MRS 액체배지에 재 현탁 시킨 후 멸균수로 10배씩 순차적으로 희석하고, MRS 고체 배지에 100 μL 도말하여 30℃에서 48시간 배양 하였다. *Lb. acidophilus* ATCC 43121의 경우는 37℃에서 48시간 배양 한 후 형성된 colony의 수를 측정하였고, 내산성과 인공위액에 대한 저항성을 생균수를 계수하여 생존율을 측정하였다. 생균수는 3회 반복 실험 한 후 평균값을 사용하였다. 내산성 및 인공위액 처리 한 실험구와 대조구는 내산성과 인공위액을 처리하지 않은 것으로 하였다.

2. 인공담즙 저항성

인공담즙 저항성 실험은 Santini(53)과 Lian(31)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 인공담즙은 PBS (pH 8.0)에 oxgall(Sigma, Co., USA)을 0.3% (w/v)가 되도록 첨가하여 시행하였다.

김치로부터 분리된 4종의 균주 및 대조균주로 쓰인 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103을 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양하였고, *Lb. acidophilus* ATCC 43121의 경우 MRS 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 배양 한 후 원심분리(9,950 ×*g*, 5 min)하여 상등액을 제거하고 8.2~9.6 log CFU/mL의 균체를 회수한 다음 pH 8.0으로 조정한 1 mL의 0.3% oxgall 용액에 첨가하여 37℃에서 3시간 배양하였다. 3시간 배양 후 pH 8.0의 0.3% oxgall 용액에 처리된 유산균을 MRS 액체배지에 재 현탁 시킨 후 멸균수로 10배씩 10^1~10^7까지 순차적으로 희석하고 MRS 고체 배지에 100 μL 도말하여 30℃에서 48시간 배양 하였다. *Lb. acidophilus* ATCC 43121의 경우는 37℃에서 48시간 배양 한 후 형성된 colony의 수를 측정하여 인공담즙에 대한 저항성을 확인 하였다. 생균수는 3회 반복 실험 한 후 평균값을 사용하였다. 인공담즙 처리 한 실험구와 대조구는 인공담즙을 처리하지 않은 것으로 하였다.

3. 효소 활성 측정

분리균주의 효소 활성을 측정하기 위해 API ZYM kit (BioMerieux, France)를 사용하였다. 실험을 위해 먼저 김치로부터 분리된 4종의 유산균은 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 배양액을 원심분리 (9,950 ×*g*, 4 min, 4℃)하여 상징액을 제거하고 균체를 회수한 후, 멸균수에 균을 풀어 현탁액을 준비하였다. 현탁액 500 μL를 5 mL suspension medium에 풀어준 후 5~6 McFarland (BioMerieux, France)로 탁도를 맞추었다. Incubation box를 준비하고 멸균수를 tray에 부어 수분을 유지하도록 한 후 스트립을 tray에 올려 준비하고 희석한 유산균을 API ZYM kit의 각 cupule에 65 μL씩 분주한 뒤, 접종된 스트립은 밝은 빛에 노출시키지 않고 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 표면활성 증가와 용해를 돕기 위한 ZYM-A (BioMerieux)와 ZYM-B (BioMerieux) 시약을 각 각의 cupule에 한 방울씩 떨어뜨린

후 밝은 곳에서 약 5분간 반응시킨 후 색의 변화정도를 관찰하여 효소활성을 측정하였다. 색의 변화 정도에 따라 0~5까지의 값으로 표시할 수 있으며, 0 (=0 namomoles)은 음성반응, 5 (≥40 namomoles)는 최대 강도의 반응이고 4, 3, 2, 1은 각각 30, 20, 10, 5 nM의 중간 값을 나타내며, 3 이상이면 양성으로 판정하였다.

4. 콜레스테롤 동화능 및 특성규명

가. 균주 및 배지

콜레스테롤 동화능 및 콜레스테롤 배지 조성물에 따른 온도별 생육도와 Scanning Electron Microscopy (SEM, 주사전자현미경)에 사용된 배지는 De Man Rogosa Sharpe (MRS; Difco, Laboratories, USA)와 0.5% (w/v) oxgall (Sigma, Germany)과 0.1 g/L water soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 배지와 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma, Deisenhofen, Germany)와 0.1 g/L water soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 배지에 2차 계대배양 하여 실험하였다.

나. 콜레스테롤 배지 조성물에 따른 온도별 생육도

배지의 조성물에 따른 온도별 유산균주의 성장과 콜레스테롤 저하능에 미치는 영향을 조사하기 위하여, MRS 액체배지 5 mL에 유산균주를 1% (v/v) 접종하여 30℃와 37℃에서 24시간 전 배양한 후 0.5% (w/v) oxgall (Sigma, Germany)과 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 MRS 액체배지에 분리 유산균 전 배양액을 1% (v/v)접종하여 24시간 간격으로 48시간까지 30℃ 및 37℃에서 정치배양하고, 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma Deisenhofen, Germany)와 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 MRS 액체배지에 전 배양액을 1% (v/v)접종하여 24시간 간격으로 48시간까지 30℃ 및 37℃에서 정치배양하면서 흡광도 (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 600 nm에서 측정하였다.

다. 콜레스테롤 동화능

(1) Standard curve graph

콜레스테롤 동화능 정도를 측정하기 위해 Rudel and Morris (Figure 1)의 방법을 일부 변형한 *O*-phthalaldehyde 정색반응을 이용하여 standard curve graph를 작성하였다. SWIFT Ⅱ Quantification program을 이용하여 콜레스테롤 동화능의 정색반응 최대 흡수 파장인 550 nm로 UV를 설정하고 0.5% oxgall (Sigma, Germany) 및 0.5% sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma, Deisenhofen, Germany)와 각 각의 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.0 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)에 해당하는 농도로 준비하여, 최대 5지점의 농도를 설정한 후, cholesterol assimilation assay를 진행한 농도별 sample을 연속적으로 흡광도(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 550 nm에서 측정하여 standard curve graph를 작성하였다.

(2) Growing cell의 콜레스테롤 동화능

콜레스테롤 동화능 실험은 Rudel and Morris(51)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 계대 배양한 김치 유산균 4종 및 대조균주 2종을 0.5% (w/v) oxgall (Sigma, Germany)과 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 MRS 액체배지와 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma Deisenhofen, Germany)와 0.1 g/L water soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 MRS 액체배지를 이용하여 30℃, 37℃에서 24시간, 48시간 혐기 배양 (BD, Gas-pak, USA)한 후, 원심분리(9,950 ×*g*, 5 min, 4℃)하여 얻어진 상등액 1 mL에 2 mL의 50% (w/v) KOH와 3 mL의 95% (v/v) ethanol을 첨가한 후 1분간 잘 혼합하고 60℃의 수욕조에서 10분간 유지한다. 이 것을 차가운 흐르는 물에 냉각시킨 후 5 mL의 hexane을 첨가하여 잘 혼합하고 1 mL의 증류수를 첨가하여 재 현탁시킨 후, 층 분리를 위해 상온에 10분간 방치한다. 분리된 상층의 hexane 층 3 mL를 깨끗한 시험관에 옮긴 후 60℃의 수욕조 상에서 질소가스로 농축시킨다. 농축시킨 시료에 4 mL *O*-phthaladehyde reagent (0.5 mg *O*-phthalaldehyde/glacial acetic

acid 1 mL, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 잘 혼합한 후, 상온에서 10분 간 방치한 다음 2 mL의 진한 황산을 천천히 첨가하여 잘 섞어주고 10분 후 흡광도(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 550 nm에서 측정한다.

sampling(anaerobic incubation)

↓

cell remove, centrifugation

↓

1 mL Aliquot + 2 mL 50% (w/v) KOH +3 mL 95% (v/v) absolute ethanol

↓ vortexing

heated 60℃ 10 min (water bath) → after cooling (cold running water)

↓

5 mL hexane

↓ vortexing

1 mL distilled water

↓ vortexing

for phase separation

(room temperature, 10 min)

↓

3 mL hexane layer to clean test tube

↓

evaporated under nitrogen gas in 60℃ water bath

↓

4 mL freshly prepared *O*-phthalaldehyde regent to dissolve

(※ 0.5 mg *O*-phthalaldehyde per mL of glacial acetic acid)

(room temperature, 10 min)

↓ vortexing

2 mL concentrated sulfuric acid

(room temperature, 10 min)

↓ vortexing

SWIFT Ⅱ quantification standard curve

↓

reading absorbance at 550 nm

Figure 1. Cholesterol assimilation method of Rudel and Morris

(3) Resting cell 및 Dead cell의 콜레스테롤 동화능

Resting cell 및 Dead cell의 콜레스테롤 동화능 실험은 김치 유산균 4종 및 대조균주 2종을 MRS에 1% 접종하여 각 각의 생육적온(Table 1)에 배양한 뒤 원심분리(9,950 ×*g*, 5 min, 4℃)하여 얻어진 균체를 멸균수로 두 번 세척하여 준비한다. Resting cell의 경우, pH 6.8으로 조정한 0.05 M phosphate buffer에 0.5% (w/v) oxgall (Sigma, Germany)과 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)을 첨가한 용액과 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma Deisenhofen, Germany)와 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 용액에 균체를 현탁시킨 후, 30℃, 37℃에서 24시간, 48시간 혐기 배양 (BD, Gas-pak, USA)한다. Dead cell의 경우 멸균수로 두 번 세척하여 준비한 균체를 식염수에 현탁시킨 후 121℃에서 15분간 autoclave시킨다. 얻어진 dead cell을 원심분리(9,950 ×*g*, 5 min, 4℃)하여 균체를 수확한 후 0.5% (w/v) oxgall (Sigma, Germany)과 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 MRS 액체배지와 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma Deisenhofen, Germany)와 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim Germany) 이 첨가된 MRS 액체배지에 현탁시킨 후 30℃, 37℃에서 24시간, 48시간 혐기 배양 (BD, Gas-pak, USA)한다. Resting cell 및 dead cell의 콜레스테롤 동화능은 growing cell의 Rudel and Morris방법을 일부 변형한 cholesterol assimilation과 동일한 실험 방법으로 확인한다.

(4) 콜레스테롤 동화 활성 유산균의 세포벽 분리

유산균의 세포벽을 분리하기 위하여 De Man Rogosa Sharpe (MRS; Difco, Laboratories)에 계대 배양한 김치 유산균 *Lb. plantarum* EM 및 대조균주 *Lb. acidophilus* ATCC 43121를 원심분리(9,950 ×*g*, 20 min, 4℃)하여 얻어진 균체를 PBS로 2번 세척한 후 PBS 20 mL를 가하여 sonication(Amp 60, 10 min, Purse 2 sec, Sonics VC 13D Newton, USA) 를 2회 반복한다. 얻어진 세포벽 파쇄물(cell wall fraction)을 원심분리(9,950 ×*g*, 30 min, 4℃)하여 5% SDS(Sodium dodecyl sulfate, Roche diagnostics, USA)를 첨가하여 30℃에서 18시간 반응시킨 후 원심분리(9,950 ×*g*, 20 min, 4℃)하여 얻어진 균체를 PBS로 2번 세척하였다. 3차 멸균수에

ribonuclease A(Sigma, USA)를 0.01 g/mL제조하여 PBS와 함께 37℃에서 4시간 반응시킨 후 세포파쇄물을 PBS로 세척하고 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 및 10 mM $MgCl_2$에 현탁시킨 deoxyribonuclease I(Sigma, USA) 0.01 g/mL와 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)에 현탁시킨 trypsin(Sigma, USA) 0.01 g/mL을 PBS와 함께 첨가하여 37℃에서 4시간 반응시킨다. PBS로 세포벽파쇄물을 세척한 후, PBS 20 mL를 가하여 2차 sonication(Amp 60, 10 min, Purse 2 sec, Sonics VC 13D Newton, USA) 를 2회 반복하여 제조된 2차 세포파쇄물을 동결건조(Freeze dry, Samwon engineering. co, Korea)하였다. 제조된 2차 세포파쇄물을 0.5% (w/v) TDCA 와 0.1 g/L water-soluble cholesterol이 첨가된 MRS 액체배지에 풀어 콜레스테롤 동화능 실험에 사용하였다.

(5) 유산균의 세포벽을 이용한 콜레스테롤 동화능

Growing cell, resting cell 및 dead cell의 콜레스테롤 동화능을 확인하여 콜레스테롤 동화 활성이 높은 수치를 나타내는 김치유산균 1종과 대조균주 1종의 세포벽을 분리 유산균을 제조하여 dead cell의 콜레스테롤 동화 활성 정도를 기준하여 적용시켰다. Dead cell을 원심분리(9,950 ×*g*, 5 min, 4℃)하여 균체를 수확한 후 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma, Deisenhofen, Germany)와 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, steinheim, Germany)이 첨가된 MRS 액체배지에 현탁시킨 흡광도 (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 600 nm에서 측정한 값에 기준하여, 세포파쇄물(cell wall fraction)을 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma Deisenhofen, Germany)와 0.1 g/L water- soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany) 이 첨가된 MRS 액체배지에 현탁시키고, 현탁액을 37℃에서 24시간, 48시간 혐기 배양 (BD, Gas-pak, USA) 한다. 혐기배양한 세포벽의 콜레스테롤 동화능은 growing cell의 Rudel and Morris 방법을 일부 변형한 cholesterol assimilation과 동일한 실험 방법으로 확인한다.

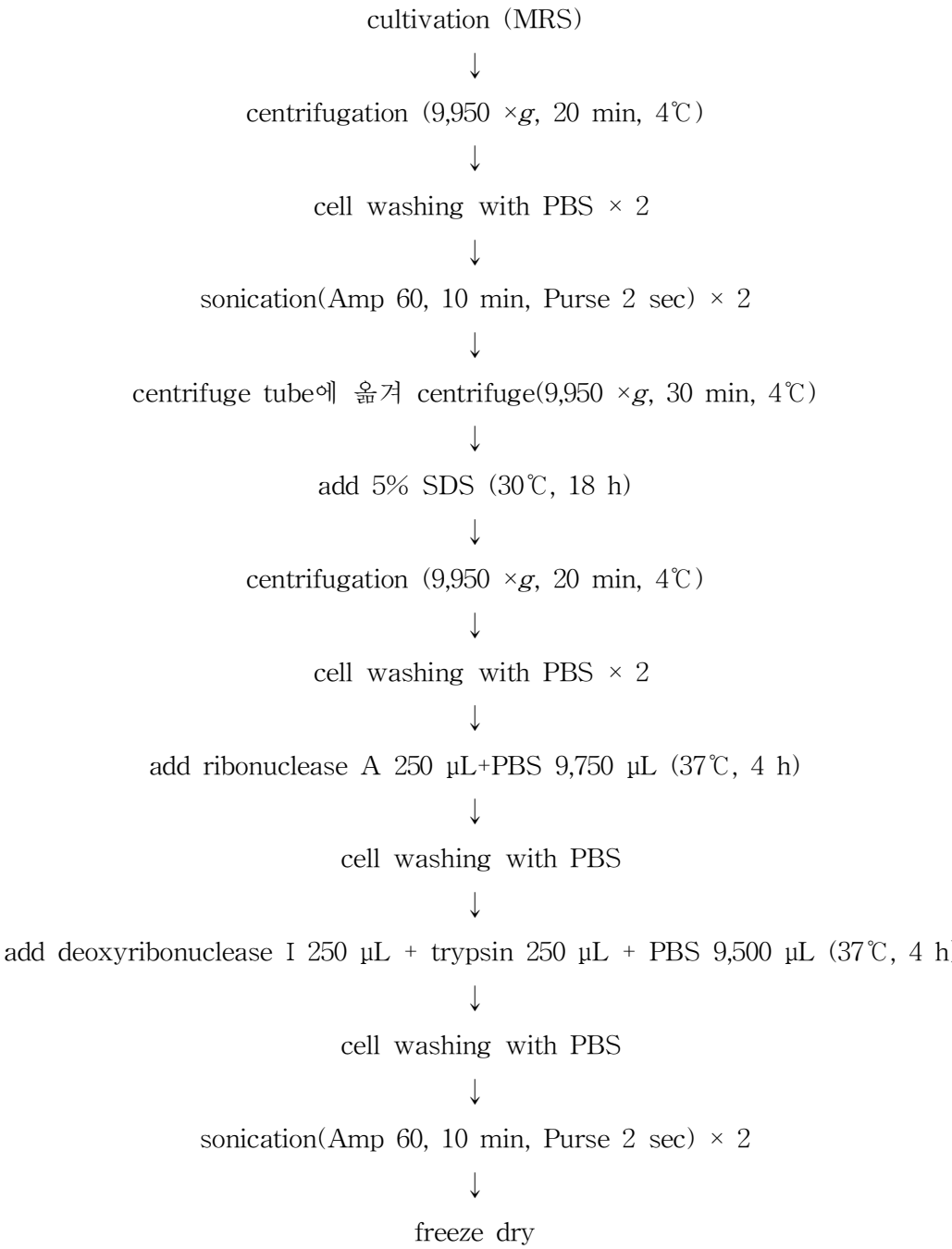

Figure 2. Isolation of lactic acid bacteria cell wall fraction

다. Scanning Electron Microscopy (SEM)

(1) Growing cell의 Scanning Electron Microscopy 관찰

분리 균주 *Lb. plantarum* EM, *Lb. acidophilus* ATCC 43121, *Lb. sakei* DC1의 세포와 세포벽에 콜레스테롤이 흡착된 모습을 Scanning Electron Microscopy (SEM)으로 확인하기 위해 Giorgio(16)의 방법을 변형하여 전처리 과정을 시행하였다(Figure 3). 0.5%(w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma, Deisenhofen, Germany)와 0.1 g/L water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 MRS 액체배지에, MRS에 배양된 전 배양액 1% (v/v)를 접종하여 24시간 혐기배양하여 growing cell을 준비하고, growing cell의 대조구로는 MRS 액체배지에 전 배양액 1% 접종하여 24시간 혐기배양한 유산균을 사용한다. 이 후 각 각 원심분리(9,950 ×*g*, 5 min, 4℃)하여 얻어진 균체를 PBS로 2번 세척한 후 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)에 희석된 2.5% (v/v) glutaraldehyde (pH 7.4, Sigma)로 4℃에서 2시간 전 고정 시켰다. 전 고정된 시료를 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)로 15분씩 3번 세척하고 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)에 녹인 1% (w/v) osmium teroxide (OsO_4, Sigma, Saint Louis, USA)를 넣어 4℃에서 1~2시간 동안 후 고정시킨 후 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)로 15분 씩 3번 세척한다. 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 100% (v/v)의 ethanol로 각 각 2분씩 처리하여 탈수과정을 거친 후, 최종 *tert*-butanol (Sigma, Saint Louis, USA)로 2번 치환하여 이온 코팅기 (E-1030 Ion sputter, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 시료를 백금으로 코팅한 후, Field emission scanning electron microscope (FE-SEM; S-4700, Hitachi)로 관찰하였다.

(2) Dead cell의 Scanning Electron Microscopy 관찰

Dead cell의 SEM 촬영은 MRS에 배양된 전 배양액을 원심분리(9,950 ×*g*, 5 min, 4℃)하여 얻어진 균체를 멸균수로 두 번 세척하고, 식염수에 현탁시킨 후 121℃에서 15 min간 autoclave시켜 얻어진 dead cell을 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma, Deisenhofen, Germany)와 0.1 g/L

water-soluble cholesterol (Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 MRS 액체배지에 현탁하여 24시간 혐기적으로 정치시키며, dead cell의 대조구로는 전 처리된 dead cell을 MRS 액체배지에 현탁하여 24시간 혐기적으로 정치시킨 것을 사용하였다.

sampling

(MRS+TDCA+water-soluble cholesterol)

↓

washed with PBS × 2

↓

pre-fixation with 2.5% glutaraldehyde (2 h)

↓

washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer × 3

↓

post-fixation with 1% OsO4 :(1~2 h)

↓

washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer × 3

↓

dehydaration with ethanol

Ethanol 50% × 1 (2 min)

Ethanol 60% × 1 (2 min)

Ethanol 70% × 1 (2 min)

Ethanol 80% × 1 (2 min)

Ethanol 90% × 1 (2 min)

Ethanol 95% × 1 (2 min)

Ethanol 100% × 1 (2 min)

↓

intermediate with butanol

tert-Butanol × 2

↓

platinum coating

↓

Field emission scanning electron microscope(FE-SEM)

Figure 3. Scanning electron microscopy (SEM) preparation protocol

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 콜레스테롤 저하 균주의 분리 · 동정 및 특성규명

1. 콜레스테롤 저하 균주의 분리

가정, 명가, 유명 식당 및 사찰에서 식용되는 김치 중 가장 맛이 좋은 최적 숙성기의 김치를 수집하여 실험실에 보유중인 김치 유산균 중 동정이 된 유산균과 동정되지 않은 유산균 50종(Table 2)을 무작위로 선별하여 1차 gram staining 및 콜레스테롤 동화능 적용배지에 유산균주 배양상등액 1 mL를 넣어 KOH와 반응시켜 pre-screening 단계로 현탁도를 측정하였다. 그 결과 현탁도의 수치가 유산균주 배양액을 넣지 않은 대조구보다 낮은 수치를 보이는 김치 유산균 13종을 1차 선별하였다.

1차 선별된 13종 중 담즙산 분해효소를 생성하여 colony 주변으로 담즙산의 침전으로 인한 불투명한 환이 생기며, 은색 빛과 함께 알갱이 모양을 형성하는 김치 유산균 4종을 최종적으로 선별하였다(*Lactobacillus plantarum* EM, HD1, NO1, *Leuconostoc kimchii* GJ2). 이 분리 균주는 동정이 되어있는 균주 *Lactobacillus plantarum* HD1, NO1, *Leuconostoc kimchii* GJ2(22)를 제외한 1종의 분리균주를 EM이라 명명하였다.

2. 분리 균주의 동정 및 특성규명

가. 분리 균주의 동정

1차 및 2차를 통해 최종 선별된 김치 유산균 4종의 형태학적 특성 및 배양학적 특성을 조사하고, 동정되지 않은 EM의 API 50 CHL의 당 발효능을 통한 생화학적 특성과 16S rRNA sequencing을 통한 분자 생물학적 특성을 살펴보았다.

(1) 형태 및 배양학적 특성

선별된 김치 유산균 4종을 MRS 액체배지에 접종하여 24시간 혐기 배양하고, gram staining을 하여 광학 현미경으로 관찰한 결과(Figure 4) 분리 균주 3종 (*Lb plantarum* EM, HD1, NO1)은 그람양성의 간균이며, colony는 3종 모두 둥글고 불투명한 연한 노란 빛을 나타내었고, *Leu. kimchii* GJ2는 그람양성의 구균으로 colony는 둥글고, 불투명한 아이보리 빛을 나타내었다.

(2) 당 대사능

API 50 CHL은 biochemical 특성을 이용한 동정법으로 분리 유산균주를 배양하여 배양 기간 동안 49가지의 탄수화물이 발효 유무에 따라 산의 생성으로 색의 변화를 일으켜 양성, 음성을 판독하는 방법이다. 당 대사능의 결과로 간이 동정해 본 결과(Table 3) 배양 24시간 후 *Lactobacillus plantarum* 83.0%으로 나타났으며, 배양 시간 48시간이 완료되었을 때 *Lb. plantarum*으로 99.9%의 상동성을 나타내었다. Biolog data는 균주의 C-화합물의 대사능을 알아보는 자료로 삼았다.

(3) 16S rRNA 염기서열 분석

동정된 유산균주 *Lb plantarum* HD1, NO1(30), *Leu. kimchii* GJ2(22)를 제외한 1종의 분리 유산균은 16S rRNA 염기서열 분석을 통한 균주 동정을 위하여 분리 균주 EM으로부터 chromosomal DNA를 추출하고 518F와 800R primer를 이용하여 16S rRNA를 PCR에 의해 증폭하였다. 그 결과 (Figure 5)에서와 같이 EM은 총 1,881bp의 증폭 단편을 얻었다. 16S rRNA sequence 분석은 Blast program을 사용하여 상동성을 검색한 결과, *Lactobacillus plantarum* WCFS1의 complete genome과 99%의 높은 상동성을 나타내었다. 분리유산균주 EM의 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과를 GeneBank에 등록된 다른 균주들과 염기서열을 비교한 결과 *Lactobacillus plantarum* 16S ribosomal RNA, JCM 1149 (1,519 bp) Type strain과 비교하여 99.9%의 상동성을 나타냈고, 당 대사능을 포함한 일반적인 특성을 통해 *Lactobacillus plantarum* EM으로 명명하고, 16S rRNA 염기서열은 GenBank에 등록하였다(KC422389.1). 또한 콜레스테롤 저하능을 갖지 않은 음성대조균주로 사용한 분리 유산균주를 16S rRNA 염기서열

분석을 통한 균주 동정을 위하여 분리 균주 DC1으로부터 chromosomal DNA를 추출하고 518F와 800R primer를 이용하여 16S rRNA를 PCR에 의해 증폭하였다. 그 결과 (Figure 6)에서와 같이 DC1은 총 1,471 bp의 증폭 단편을 얻었으며, 읽어진 16S rRNA sequence 분석은 Blast program을 사용하여 상동성을 검색한 결과 *Lactobacillus sakei* DSM 20017과 99%의 높은 상동성을 나타내었다. Figure 7에 16S rRNA 염기서열을 기초로 한 다른 bacteria와의 계통 발생론적 관계를 나타내었다.

.

나. 온도에 따른 일반 생육도

김치 분리 유산균 4종 *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2 및 양성대조균주인 *Lb. acidophillus* ATCC 43121(15), *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103(55) 총 6종의 온도에 따른 일반 생육도를 3회 반복실험하여 평균값을 나타내었다(Figure 8, 9). *Lb. plantarum* EM은 37℃보다 30℃에서 높은 흡광도 수치를 나타내었으며, 배양 4시간에 대수기에 접어들어 생육 24시간에 최대 생육도를 나타내었고, 그 이후 사멸기에 접어들면서 흡광도의 수치는 서서히 감소하였다. *Lb. plantarum* HD1의 균주의 경우, 30℃와 37℃ 온도에서 생육 곡선이 같은 패턴으로 나타났으며, 배양 28시간에 최대 생육도를 나타내었다. *Lb plantarum* NO1은 37℃보다 30℃에서 더욱 높은 생육을 나타냈으며, 나머지 5종의 균주에 비교하여 제일 높은 생육도를 나타내었다. *Leu. kimchii* GJ2의 경우 30℃에서 배양 8~12시간에 대수기에 접어들었고 오랜 정지기에 머물며 배양 48시간에 흡광도의 수치가 감소하였다. 반면 *Leu. kimchii* GJ2는 37℃에서 배양시간이 지남에 흡광도의 수치가 오르지 않는 것으로 보아 균체의 증식이 37℃에서 이루어지지 않고 온도에 민감한 것으로 나타났다. *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103의 경우는 37℃에서 배양 20시간에 최대 생육을 나타냈으며, 30℃에서는 배양 28시간까지 서서히 흡광도의 수치가 높아지는 것을 확인할 수 있었다. *Lb. acidophillus* ATCC 43121의 균주는 37℃에서 배양 4시간에서 8시간까지 급격한 생육이 이루어졌으며 12시간 이후로 완만한 곡선을 그리며 사멸기에서 접어드는 것을 확인하였다. 이에 반해 30℃에서는 최대 생육에 도달하기까지 오랜 시간에 걸리는 것으로 확인되었다.

Table 2. Gram staining and pre-screening on 50 selected Lactic acid bacteria

균주	Gram-staining	Pre-screening Abs. (600 nm)	균주	Gram-staining	Pre-screening Abs. (600 nm)
C12	rod	1.986	동C3	short rod	2.065
C14	rod	1.876	동M1	coccus	2.106
DC1	rod	2.142	목포1	short rod	1.837
DJ1	coccus	1.927	목C-A1	short rod	2.004
EM	rod	0.425	민속C-항1	short rod	2.007
GJ2	coccus	1.025	민속C-A1	short rod	2.017
GJ6	short rod	1.925	백양사M-A1	rod	2.035
GJ7	rod	1.827	불C1	coccus	2.088
HA1	short rod	2.025	석C2	coccus	2.135
HD1	rod	0.497	송M1	rod	1.974
MP1	coccus	2.069	심향사2	rod	2.005
NG1	coccus	1.880	운주사1	rod	1.988
NJ1	short rod	2.111	유C2	short rod	2.136
NO1	rod	0.486	유M1	short rod	2.001
PH2	rod	1.954	장성1	short rod	1.955
R1	coccus	2.012	전복1	rod	1.960
W1	coccus	2.036	정토사1	coccus	1.980
고서1	rod	2.063	주월1	short rod	1.979
곡성1	short rod	2.056	중흥1	short rod	2.022
광운사1	coccus	1.988	증심사3	coccus	2.011
굴2	rod	1.854	진도C1	short rod	1.996
나주6	short rod	1.928	최C1	rod	2.035
나M1	short rod	1.868	최M1	short rod	2.022
남평6	coccus	1.912	최M3	short rod	1.470
달성사1	rod	1.982	화정1	short rod	1.982
동C1	rod	2.104	화C1	coccus	1.986

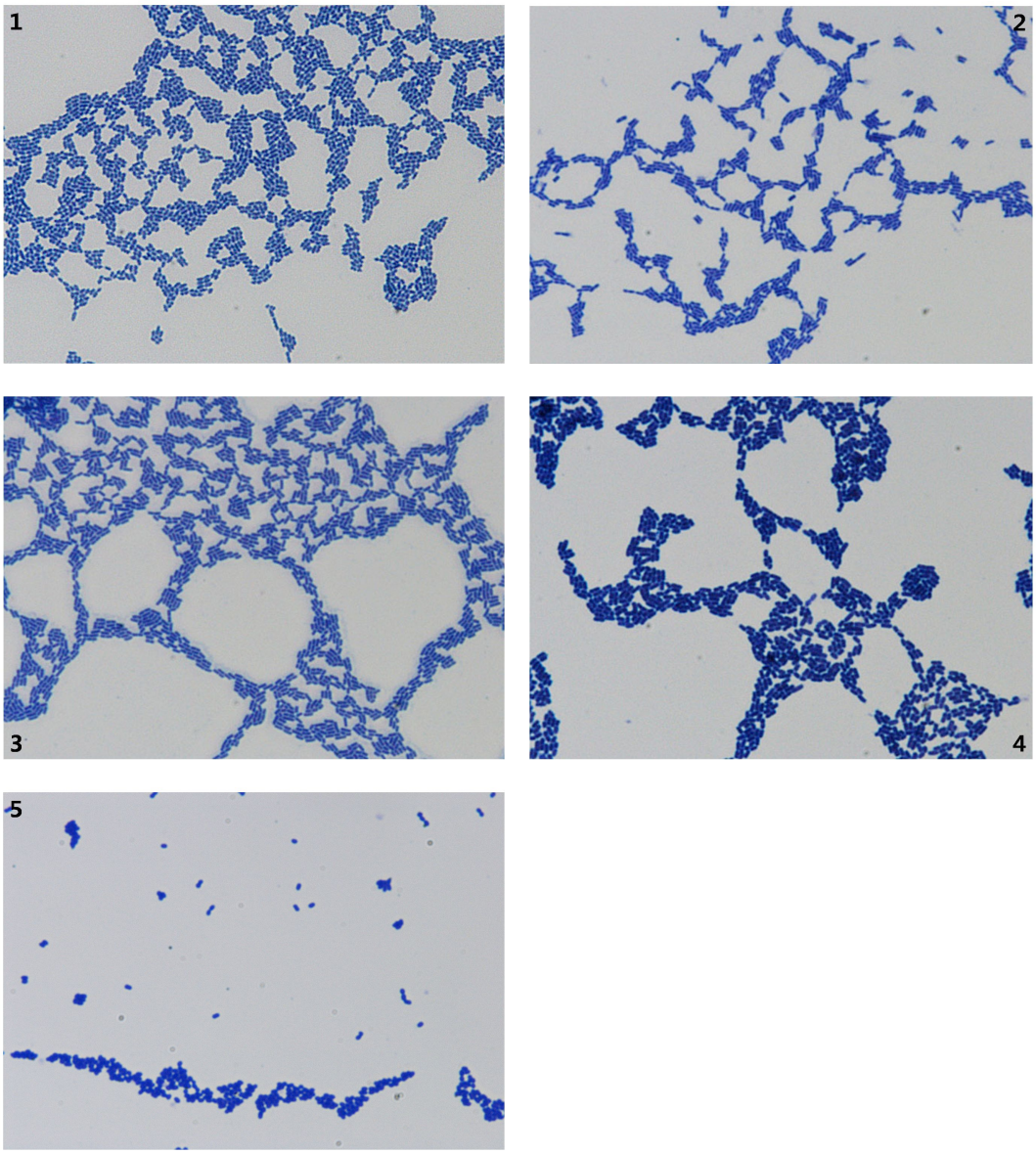

Figure 4. Gram staining of the isolated strain

1. Isolated strain *Lb. plantarum* EM
2. Isolated strain *Lb. plantarum* HD1
3. Isolated strain *Lb. plantarum* NO1
4. Isolated strain *Lb. sakei* DC1
5. Isolated strain *Leu. kimchii* GJ2

Table 3. Sugar utilization characteristcs of the isolate EM

Test items	Metabolism	Test items	Metabolism
Control	-	Esculine	+
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	-
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-D-Xyloside	-	Melezitose	+
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Amidon	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β-Gentibiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Manitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α-Methyl-D-Mannoside	+	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-Glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl-Glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdaline	+	2-Cetogluconate	-
Arbutin	+	5-Cetogluconate	-

Identification : *Lactobacillus plantarum* (99.9%)

```
   1 TTATGCTAGC GTTGGTTTAC TTTGAAAAAC AGTCGTTGAA AATTAAAGGG AGATTTATTG 60
  61 AACTTTTGCT TGCTATCTTA ATAAAAACCC CGTAAAATAT AGTCTATTGC GACATTAATC 120
 121 GGTGTTTAAA ACTTTTCTGA AATTAATTCA TAAAAAGGGT TGACCCGGGT CGTTATTCTT 180
 181 GGTATTATAT TTCTTGTCGT TAAGAGCGAT ATGCAACATT ACTCATTATT ATGAATATTC 240
 241 AAATTGATGT GAGCATTTAC ATTGAATAGT TATTCAAAAT AATTTATAAA AAGATGTTGA 300
 301 CAGCTTGTTC TGATGATGAT AAACTTTAAT AGTTGCGTTG AGGTAATCAA CGAACGATTT 360
 361 AGACCTTTGA AAACTGAACA AAGTTTCGAC GAATCAAATG TGTAGGGTCT CTTGATTTTG 420
 421 AATCAAGAGC AAAACATTTG CGAAGTCAAT TCGCTAGCAA ATAAATTTTA GTACAACATT 480
 481 AAATGAGCTT TTTAGAACTC ATCATTAATT TGAGAGTTTG ATCCTGGCTC AGGACGAACG 540
 541 CTGGCGGCGT GCCTAATACA TGCAAGTCGA ACGAACTCTG GTATTGATTG GTGCTTGCAT 600
 601 CATGATTTAC ATTTGAGTGA GTGGCGAACT GGTGAGTAAC ACGTGGGAAA CCTGCCCAGA 660
 661 AGCGGGGGAT AACACCTGGA AACAGATGCT AATACCGCAT AACAACTTGG ACCGCATGGT 720
 721 CCGAGCTTGA AAGATGGCTT CGGCTATCAC TTTTGGATGG TCCCGCGGCG TATTAGCTAG 780
 781 ATGGTGGGGT AACGGCTCAC CATGGCAATG ATACGTAGCC GACCTGAGAG GGTAATCGGC 840
 841 CACATTGGGA CTGAGACACG GCCCAAACTC CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCCA 900
 901 CAATGGACGA AAGTCTGATG GAGCAACGCC GCGTGAGTGA AGAAGGGTTT CGGCTCGTAA 960
 961 AACTCTGTTG TTAAAGAAGA ACATATCTGA GAGTAACTGT TCAGGTATTG ACGGTATTTA 1020
1021 ACCAGAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG TGGCAAGCGT 1080
1081 TGTCCGGATT TATTGGGCGT AAAGCGAGCG CAGGCGGTTT TTTAAGTCTG ATGTGAAAGC 1140
1141 CTTCGGCTCA ACCGAAGAAG TGCATCGGAA ACTGGGAAAC TTGAGTGCAG AAGAGGACAG 1200
1201 TGGAACTCCA TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATATGG AAGAACACCA GTGGCGAAGG 1260
1261 CGGCTGTCTG GTCTGTAACT GACGCTGAGG CTCGAAAGTA TGGGTAGCAA ACAGGATTAG 1320
1321 ATACCCTGGT AGTCCATACC GTAAACGATG AATGCTAAGT GTTGGAGGGT TTCCGCCCTT 1380
1381 CAGTGCTGCA GCTAACGCAT TAAGCATTCC GCCTGGGGAG TACGGCCGCA AGGCTGAAAC 1440
1441 TCAAAGGAAT TGACGGGGGC CCGCACAAGC GGTGGAGCAT GTGGTTTAAT TCGAAGCTAC 1500
1501 GCGAAGAACC TTACCAGGTC TTGACATACT ATGCAAATCT AAGAGATTAG ACGTTCCCTT 1560
1561 CGGGGACATG GATACAGGTG GTGCATGGTT GTCGTCAGCT CGTGTCGTGA GATGTTGGGT 1620
1621 TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTTATTA TCAGTTGCCA GCATTAAGTT GGGCACTCTG 1680
1681 GTGAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAATCA TCATGCCCCT 1740
1741 TATGACCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GATGGTACAA CGAGTTGCGA ACTCGCGAGA 1800
1801 GTAAGCTAAT CTCTTAAAGC CATTCTCAGT TCGGATTGTA GGCTGCAACT CGCCTACATG 1860
1861 AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT C
```

Figure 5. 16S rRNA sequence from the isolated strain *Lb. plantarum* EM

```
   1 CAGGACGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AACGCACTCT CGTTTAGATT 60
  61 GAAGGAGCTT GCTCCTGATT GATAAACATT TGAGTGAGTG GCGGACGGGT GAGTAACACG 120
 121 TGGGTAACCT GCCCTAAAGT GGGGGATAAC ATTTGGAAAC AGATGCTAAT ACCGCATAAA 180
 181 ACCTAACACC GCATGGTGTA GGGTTGAAAG ATGGTTTCGG CTATCACTTT AGGATGGACC 240
 241 CGCGGTGCAT TAGTTAGTTG GTGAGGTAAA GGCTCACCAA GACCGTGATG CATAGCCGAC 300
 301 CTGAGAGGGT AATCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG 360
 361 CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGAAAG TCTGATGGAG CAACGCCGCG TGAGTGAAGA 420
 421 AGGTTTTCGG ATCGTAAAAC TCTGTTGTTG GAGAAGAATG TATCTGATAG TAACTGATCA 480
 481 GGTAGTGACG GTATCCAACC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT 540
 541 ACGTAGGTGG CAAGCGTTGT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTCTT 600
 601 AAGTCTGATG TGAAAGCCTT CGGCTCAACC GAAGAAGTGC ATCGGAAACT GGGAAACTTG 660
 661 AGTGCAGAAG AGGACAGTGG AACTCCATGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA TATATGGAAG 720
 721 AACACCAGTG GCGAAGGCGG CTGTCTGGTC TGTAACTGAC GCTGAGGCTC GAAAGCATGG 780
 781 GTAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCATGCCGTA AACGATGAGT GCTAGGTGTT 840
 841 GGAGGGTTTC CGCCCTTCAG TGCCGCAGCT AACGCATTAA GCACTCCGCC TGGGGAGTAC 900
 901 GACCGCAAGG TTGAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGT GGAGCATGTG 960
 961 GTTTAATTCG AAGCAACGCG AAGAACCTTA CCAGGTCTTG ACATCCTTTG ACCACTCTAG 1020
1021 AGATAGAGCT TTCCCTTCGG GGACAAAGTG ACAGGTGGTG CATGGTTGTC GTCAGCTCGT 1080
1081 GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC CTTATTACTA GTTGCCAGCA 1140
1141 TTTAGTTGGG CACTCTAGTG AGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGACGACGT 1200
1201 CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGAT GGTACAACGA 1260
1261 GTTGCGAGAC CGCGAGGTTT AGCTAATCTC TTAAAACCAT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC 1320
1321 TGCAACTCGC CTACATGAAG CCGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA 1380
1381 ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GAGAGTTTGT AACACCCAAA 1440
1441 GCCGGTGAGG TAACCCTTCG GGGAGCCAGC C
```

Figure 6. 16S rRNA sequence from the isolated strain *Lb. sakei* DC1

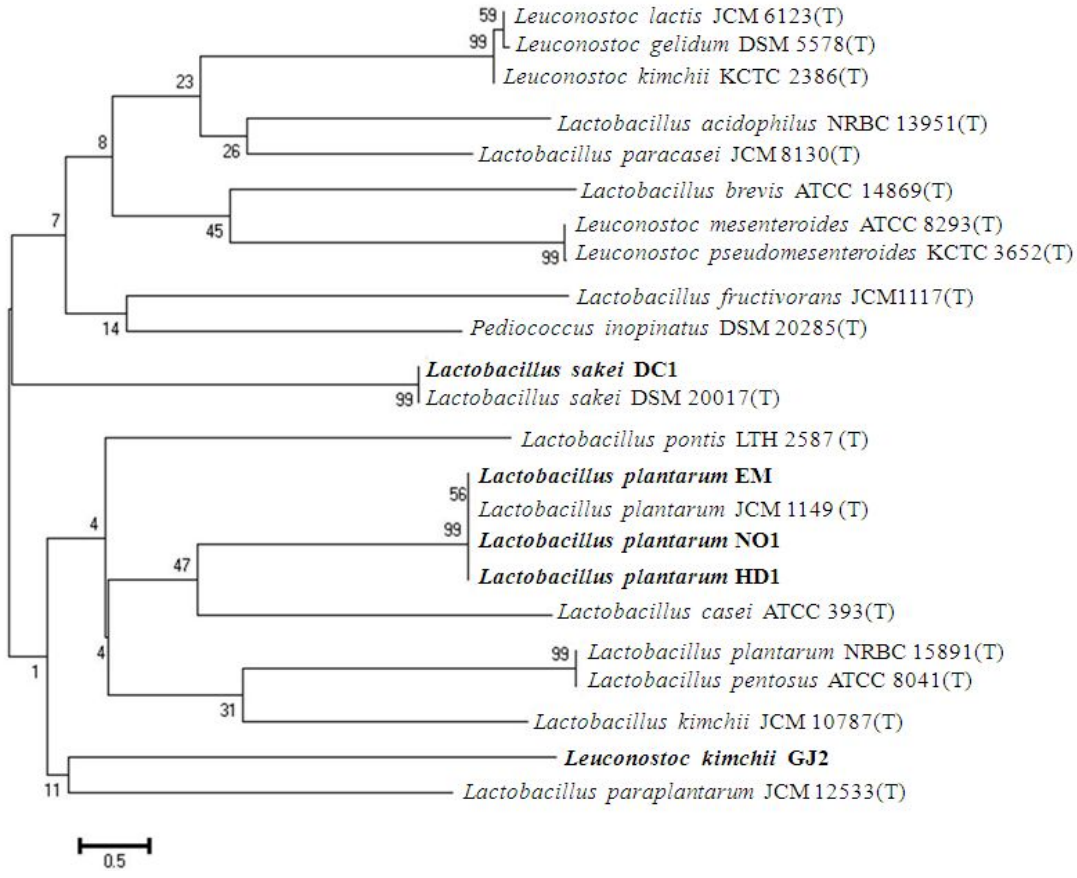

Figure 7. Phylogenic relationship between *Leu, kimchii* GJ2 and *Lb. plantarum* EM, HD1, NO1 and *Lb. sakei* DC1 and other related bacteria based on 16S rRNA sequence

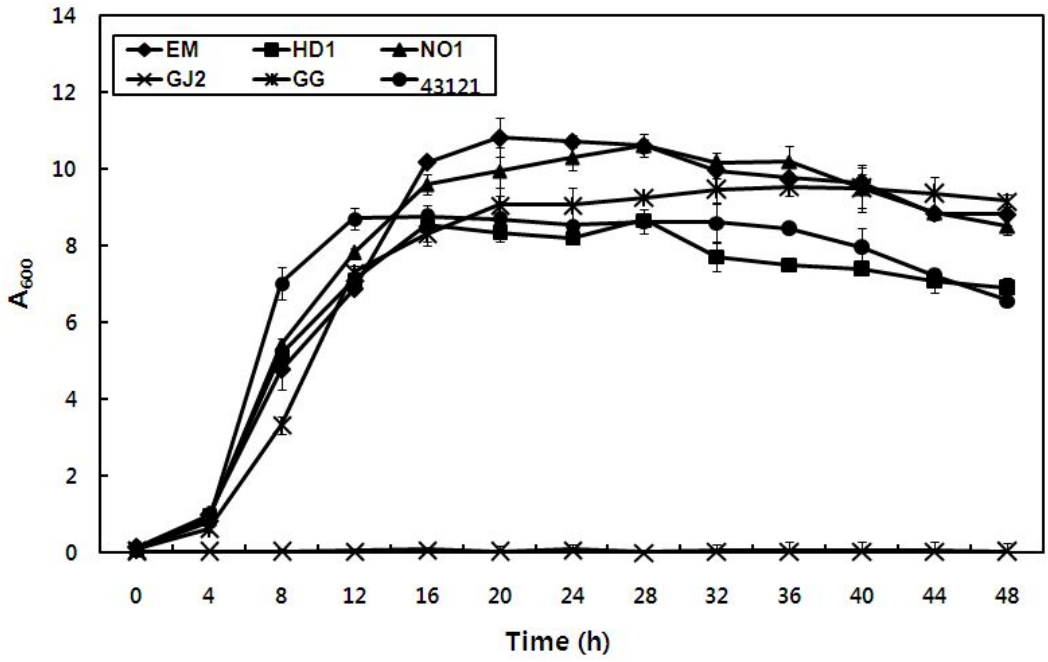

Figure 8. Growth curves of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 37℃

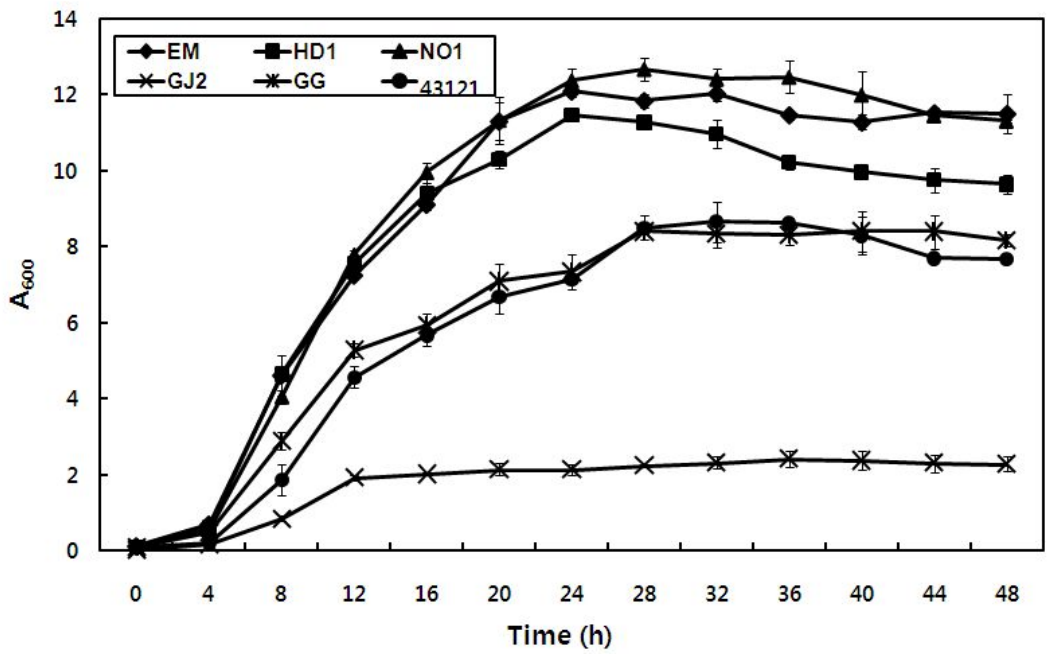

Figure 9. Growth curves of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 30℃

제 2 절 분리 균주의 안전성 확인

1. 항생제 감수성

본 실험에서는 김치로부터 분리된 4종의 유산균에 대하여 European Food Safety Autority (EFSA, 2008)(11)에서 제시한 *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc* spp.에 대한 break point를 참고하여, 여러 항생제 ampicillin, gentamicin, kanamycin streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol을 포함한 8 종류의 항생제 감수성 또는 내성을 최소 생육 저해 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)로 측정하여 결정하였다. 그 결과 김치로부터 분리된 4종의 김치 유산균은 모든 8 종류의 항생제에 대하여 EFSA 2008 항생제 감수성 기준에서 제시한 break point보다 낮은 최소 생육 저해 농도를 보이면서 모두 감수성을 나타내었다 (Table 4). Ampicillin의 경우 4종의 김치유산균에서 MIC가 2 μg/mL 농도의 감수성을 보였으며, gentamicin은 0.25~0.5 μg/mL 농도 범위에서 나타났고, EFSA 2008에서 제시한 break point인 16 μg/mL보다 낮은 농도에서 MIC를 나타냈다. Kanamycin은 4~16 μg/mL 농도 범위에서 MIC를 나타냈으며, streptomycin은 2~32 μg/mL 농도로 감수성을 나타내었다. Erythromycin에 대한 EM과 HD1의 유산균주 MIC는 0.125 μg/mL의 농도를 나타냄으로써 EFSA 2008에서 제시한 break point보다 8배 낮은 최소 생육 저해 농도의 감수성을 보였다. Clindamycin은 EFSA 2008에서 제시한 break point가 1 μg/mL으로 4종의 균주는 같거나 이보다 낮은 농도에서 감수성을 나타냈으며, tetracycline의 경우 2~16 μg/mL 범위의 감수성을 나타내었다. Chloramphenicol은 *Lb. plantarum* EM, HD1, NO1 균주에서 4 μg/mL의 MIC를 나타냈으며, *Leu. kimchii* GJ2는 2 μg/mL의 MIC 수치를 나타내면서 감수성을 보였다.

Table 4. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics for LAB

strains	MIC (μg/mL)[b]								
	AMP	VAN	GEN	KAN	STR	ERY	CLI	TET	CHL
Break points for *Lactobacillus plantarum*[a]	2	n.r.[c]	16	64	n.r.	1	1	32	8
Lactobacillus plantarum EM	2	>512	0.5	16	4	0.125	1	16	4
Lactobacillus plantarum HD1	2	>512	0.5	16	4	0.125	1	16	4
Lactobacillus plantarum NO1	2	>512	0.25	4	2	0.06	1	8	4
Break points for *Leuconostocs*[a]	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4
Leuconostoc kimchii GJ2	2	>512	0.5	8	32	0.03	0.015	2	2

[a] Breakpoints were according to the guidelines of the EFSA (EFSA 2008)

[b] Strains with MICs lower than or equal to the breakpoints are considered susceptible. *AMP* ampicillin; *VAN* vancomycin,; *GEN* gentamycin; *KAN* kanamycin; *STR* streptomycin, *ERY* erythromycin; *CLI* clindamycin; *TET* tetracycline; *CHL* chloramphenicol

[c] *n.r.* Not required

제 3 절 분리 균주의 기능성 확인

1. 내산성 및 인공위액 저항성 측정

대부분의 미생물들이 위장관을 통과하면서 낮은 pH 견디지 못하기 때문에 프로바이오틱 미생물의 선택기준으로 낮은 pH에 대한 저항성은 중요하며, 좋은 효과를 수행하기 위해서는 강한 산성조건의 위장관에서 장까지 도달하여 생존하여야 한다(2). 김치로부터 분리된 4종의 균주에 대하여 단순 내산성 측정을 위해, 1.0 N HCl을 이용하여 pH 2.5으로 조정한 PBS조건에서 1시간 처리 시, *Lb. plantarum* EM의 경우 82.7%의 생존율을 나타내었으며, *Lb. plantarum* HD1은 99.6%, *Lb. plantarum* NO1은 98.5%의 높은 저항성을 나타내었다. 저항성의 정도를 비교하기 위해 대조구로 사용된 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103의 82.1%의 생존율보다 *Lb. plantarum*의 3종의 생존율은 더 높은 생균수를 유지하며 저항성을 나타내었다. *Leu. kimchii* GJ2의 경우 24.6%으로 정상 젖산발효균인 *Lb. plantarum* 3종에 비해 낮은 생존율을 보였다(Figure 10).

인공위액에 대한 저항성을 측정하기 위해, 1.0 N HCl을 사용하여 pH 2.5으로 조정한 0.5% saline buffer에 pepsin (3 mg/mL)을 첨가하여 1시간 처리 시, *Lb. plantarum* EM은 87.1%, *Lb. plantarum* HD1은 62.4.%, *Lb. plantarum* NO1은 99.7%의 생존율을 보였다. 이상 젖산발효균인 *Leu. kimchii* GJ2는 낮은 저항성을 나타내어 16.5%의 수치를 보였다. 따라서 본 인공위액 실험에서 *Lb. plantarum* NO1을 제외한 김치에서 분리된 3종의 균주는 대조균주로 사용된 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103의 88.2%의 인공위액 저항성보다 낮은 수치를 나타내었다(Figure 11). Jamaly(20)보고에 의하면 *Lactobacillus plantarum*에 인공위액을 처리 했을 때, 초기 균수 10^9 CFU/mL에서 1~1.35 log cycle이 감소한 10^7~10^9 CFU/mL을 나타내며 비교적 낮은 생존율을 보였다. 또한 Mishra(39) 등에 의하면 pH 1.0에서 균주는 생존하지 못하였으며, 1 h 동안 pH 2에서 *Lactobacillus. casei* 3개의 균주에서만 5.0~7.3 log 범위의 생존을 보였다. 대조균주로 사용된 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103의 생존율은 처리 1, 90 및 180분간 생존율을 확인 하였을 때, 0.36, 1.3 및 3 log cycle이 감소하여, 본 실험과 기존 보고와 동일한 저항성을 갖는 것으로 확인되었다(4). 이러한 결과들을 통해서 김치로부터 분리된 *Lb. plantarum* 균주 3종은 장내 환경에 대한 높은 생존성을 나타내어 probiotics로 섭취 시 위장관 내에 도달하여 다양한 기능성을 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

2. 인공담즙 저항성

김치유산균 4종에 대하여 인공담즙 저항성을 확인하기 위해 PBS (pH 8.0)에 oxgall을 0.3%(w/v)가 되도록 첨가하여 3시간 처리 후 초기 균수에 비교하여 생존율 확인 시, *Lb. plantarum* EM의 경우 56.5%의 인공담즙에 대한 저항성을 나타내었다. *Lb. plantarum* HD1은 56.9%의 생존율을 보이며, *Lb. plantarum* NO1의 경우 85.0%로 인공담즙에 대한 저항성이 가장 높은 균주로 나타났다. *Leu. kimchii* GJ2는 초기균수의 64.1%의 생균수를 유지하였고, 이는 인공담즙 저항성 실험의 대조균주로 사용된 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103의 54.6% 생존율보다 높은 저항성을 나타낸 것으로 확인되었다. 따라서, 김치로부터 분리된 4종의 실험균주는 대조균주로 쓰인 균주에 비해 인공담즙 저항성이 높은 것으로 나타났다(Figure 12). 기존 보고된 Wang(59)실험에 의하면, 유아 분변 및 절임양배추에서 분리한 *Lactobacillus*의 경우 0.3%의 oxgall을 첨가하여 인공담즙에 대한 저항성을 확인해 본 결과, 초기균수에 대하여 1.0~6.1 log이 감소하여 넓은 범위의 저항성을 보였다. 또한, Vinderola(58)보고에 의하면 *Lb acidophilus*의 경우 1% oxgall을 첨가하였을 때 69% 이상의 생존율을 보였으며 *Lb. casei* 및 *Lb. rhamnosus*의 경우 3~73%의 저항성을 보였다. 또한 *Bifidobacteria*의 경우, 3~43%의 범위의 저항성을 나타난 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 토대로 모든 probiotics 균주가 인공담즙에 높은 저항성을 나타내는 것은 아니며, 일부 균주에서는 낮은 저항성을 나타내어, 본 실험에 사용된 균주 3종의 경우 57% 이상의 저항성을 나타내는 것으로 보아 장내에 생존하여 다양한 좋은 영향을 끼칠 수 있을 것으로 생각된다.

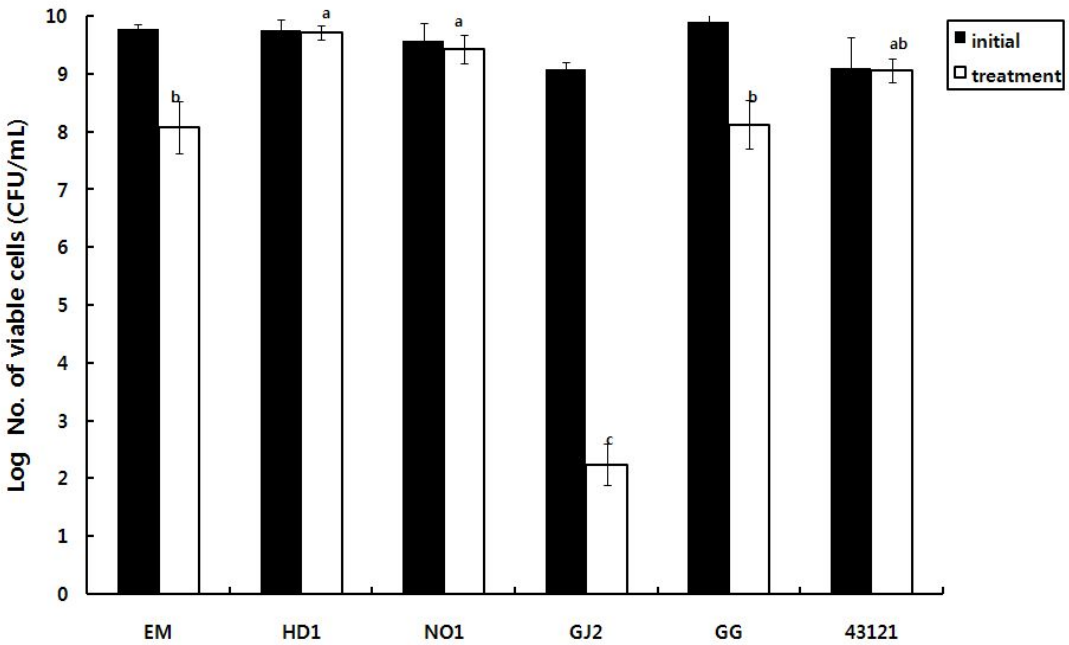

Figure 10. Acid tolerance of the LAB in Phosphate-buffered saline (PBS, pH 2.5)

[a-c]Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test

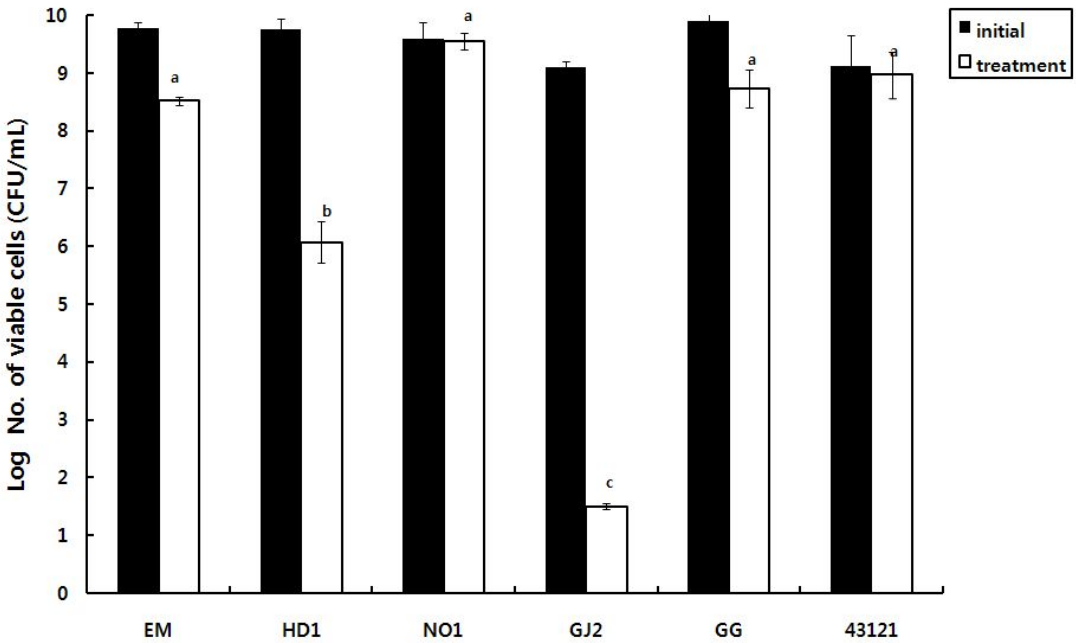

Figure 11. Survival of the LAB in the simulated gastric juice (SGJ, pH 2.5)

[a-c]Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test

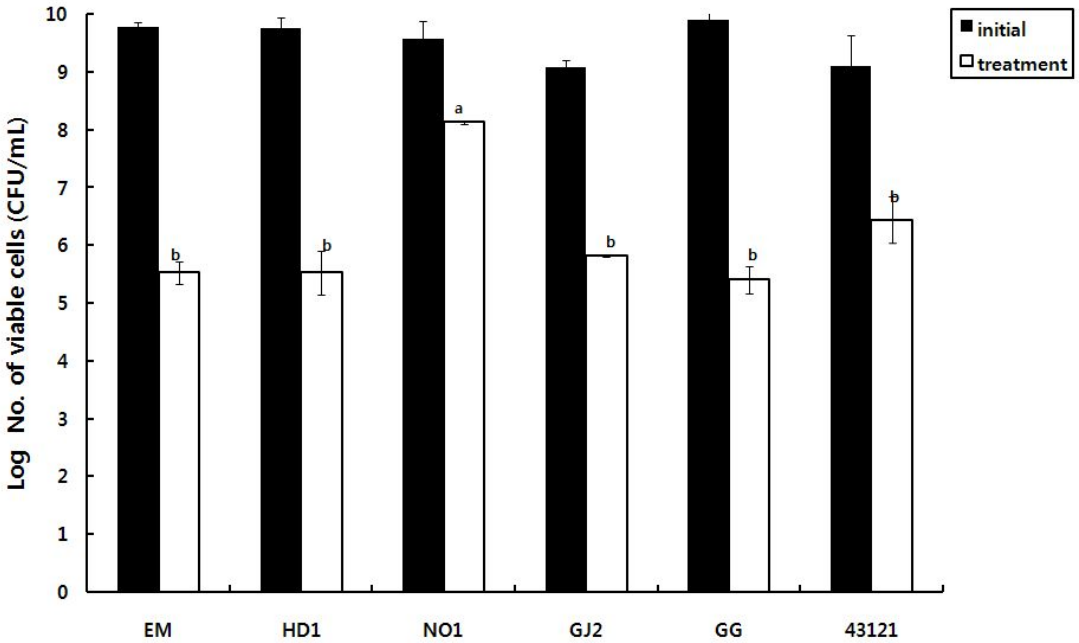

Figure 12. Survival of the LAB in the bile salt (0.3% oxgall, pH 8.0)

[a-c]Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test

3. 효소 활성 측정

김치로부터 분리된 유산균 4종의 효소 활성을 확인하기 위하여 API-ZYM kit를 사용하였다. Table 5와 같이 alkaline phosphatase는 *Lb. plantarum* HD1에서 아주 미약한 활성을 나타내었으며, esterase (C4)의 경우는 *Lb. plantarum* NO1과 *Leu. kimchii* GJ2에서 5 nM의 활성을 나타냈다. Esterase lipase(C8)은 3종의 균주에서 미약한 활성을 나타내었으며, lipase (C14)와 trypsin에서는 활성이 없는 것으로 나타났다. Leucine arylamidase와 valine arylamidase는 분리 유산균주 4종 모두에 대하여 0~30 nM로 넓은 범위의 활성을 띄었으며, α-chymotrypsin은 김치분리 유산균주 4종에 대하여 활성을 보이지 않았다. Acid phosphatase는 *Lb. plantarum* EM과 HD1 및 NO1 경우 5 nM로 미약한 활성을 보였으며, *Leu. kimchii* GJ2 에서는 20 nM의 활성을 보였다. Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase의 경우 *Lb. plantarum* NO1에서 5 nM의 활성을 확인할 수 있었다. α-Galactosidase는 *Leu. kimchii* GJ2에서 활성을 보이지 않았으며, 3종의 균주에서 5 nM으로 약한 활성을 보였다. β-galactosidase의 경우 3종에서 35~40 nM 이상의 높은 활성을 보였으며, 발암효소로 알려진 β-glucuronidase는 benzopyrene과 같은 독성물질이 인체에 들어왔을 때, 간에서 gluculonic acid와 결합되어 그 독성이 중화가 되지만, 이 결합된 물질이 소장에서 담즙과 함께 장내에 배설되고 장내세균의 β-glucuronidase에 의해 탈포합되면 다시 독성이 생길 수 있다(43, 46). 따라서 김치 분리유산균주 4 종은 0 nM로 활성을 보이지 않아 probiotic 균주로 인한 발암유발의 잠재적 위험성이 없다는 것을 입증하였다. α-Glucosidase은 5~20 nM의 활성이 확인되었으며, β-glucosidase와 N-acetyl-β-glucosiminidase는 *Leu. kimchii* GJ2에서 활성을 보이지 않았고, 3종의 균주에서 10~20 nM의 활성을 보였다. α-mannosidase와 α-fucosidase 는 모든 균주가 활성이 없는 것으로 나타났다.

Table 5. API ZYM analysis of the enzyme activities of the LAB

Enzyme	LAB strain					
	Lb. plantarum EM	*Lb. plantarum* HD1	*Lb. plantarum* NO1	*Leu. kimchii* GJ2	*Lb. rhamnosus* GG	*Lb .acidophillus* 43121
Alkaline phosphatase	0	5	0	0	5	0
Esterase (C4)	0	0	10	0	10	5
Esterase lipase (C8)	5	0	5	0	5	5
Lipase (C14)	0	0	0	0	0	5
Leucine arylamidase	25	25	30	0	25	25
Valine arylamidase	25	25	10	0	20	5
Cystine arylamidase	0	0	5	0	5	5
Trypsin	0	0	0	0	0	0
α-Chymotrypsin	0	0	0	0	0	0
Acid phosphatase	5	5	5	20	10	0
Naphtol-AS-BI-phophohydrolase	5	5	5	0	5	10
α-Galactosidase	5	5	5	0	5	5
β-Galactosidase	≥40	35	≥40	0	10	0
β-Glucuronidase	0	0	0	0	0	0
α-Glucosidase	5	10	5	20	0	0
β-Glucosidase	20	20	10	0	15	0
N-Acetyl-β-glucosaminidase	15	20	20	0	0	0
α-Mannosidase	0	0	0	0	0	5
α-Fucosidase	0	0	0	0	5	0

All values were mean ± S.D.(n=3)

0, No enzyme activity; 5, 10, 20, 30, ≥40 indicates nM of hydrolyzed substrate after 4 h of incubation at 37 °C

4. 콜레스테롤 동화능 및 특성규명

가. 콜레스테롤 배지 조성물에 따른 온도별 생육도

배지의 조성물에 따른 온도별 유산균주의 성장과 콜레스테롤 저하능에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 담즙염의 형태인 0.5% oxgall과 0.5% sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDCA)를 각 각 첨가한 0.1 g/L water-soluble cholesterol과 MRS 조성물에 24시간 간격으로 48시간까지 배양 후 온도에 따른 균체의 증식을 확인하였다. 0.5% oxgall과 0.1 g/L water-soluble cholesterol 및 MRS가 첨가된 배지에서는 균체의 생육에 30℃와 37℃에서 큰 차이를 보이며 30℃에서 더욱 월등히 균체의 생육이 높아짐을 확인할 수 있었다(Figure 13, 14). 균체의 증식에 가장 큰 효과가 있는 콜레스테롤 배지 조성물은 0.5% TDCA와 0.1 g/L water-soluble cholesterol 및 MRS가 첨가된 배지였으며, *Lb. acidophillus* ATCC 43121를 제외한 5종의 균주는 37℃보다 30℃에서 균체의 생육에 영향을 끼치는 것으로 나타났다(Figure 15, 16). 콜레스테롤 배지 조성물 및 온도에 따라 평균적으로 0.5% TDCA(30℃) > 0.5% TDCA(37℃) > 0.5% oxgall(30℃) > 0.5% oxgall(37℃) 순으로 균체의 생육정도가 이루어졌으며, 이에 따라 콜레스테롤 배지 조성물 및 온도에 따라 균체의 생육이 영향을 미친다는 결과를 얻을 수 있었다. Shin(53)의 보고에 의하면 경시적으로 잔존 콜레스테롤 양을 측정하여 콜레스테롤 동화능(%)을 산정하였으며 균주의 증식율을 조사하였을 때, *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070의 균주는 24시간째에 64.5%의 가장 높은 콜레스테롤 동화능을 나타냈으며 균의 증식과 함께 동화능도 증가함을 확인하였다. 또한 Kumar(26)에 의하면 담즙염 존재하에 37℃에서 6시간 간격으로 24시간 생육도를 확인하였을 때, *Lactobacillus casei* LA-1균주가 성장함에 따라 콜레스테롤 감소율이 높아지는 것을 확인하였다. 이러한 결과들을 통하여, 담즙염의 종류에 따라 균주의 생육이 영향을 받으며, 동화능에도 영향을 미칠 것으로 보인다.

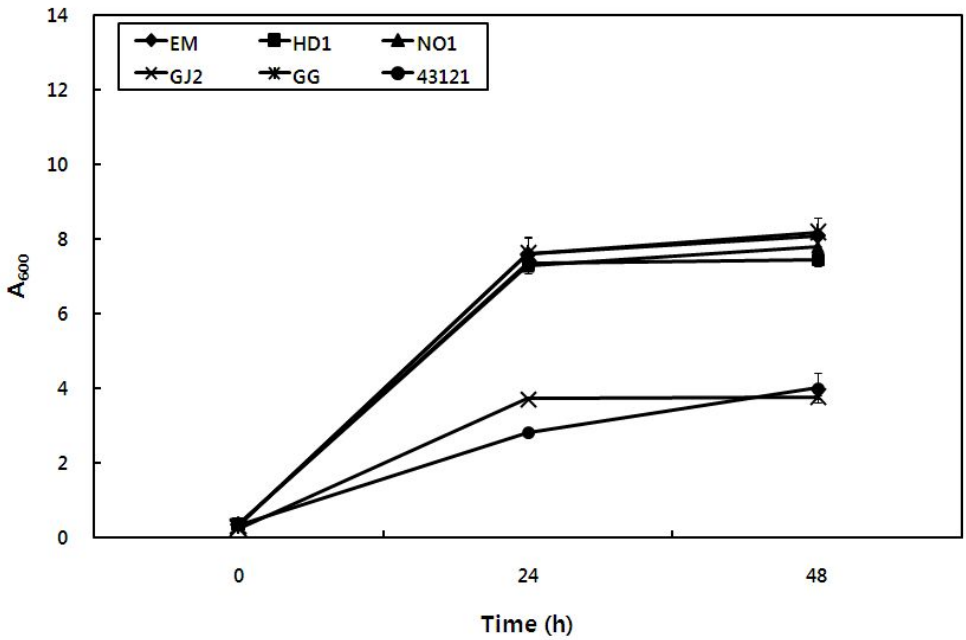

Figure 13. Growth of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 37℃ in cholesterol and oxgall media

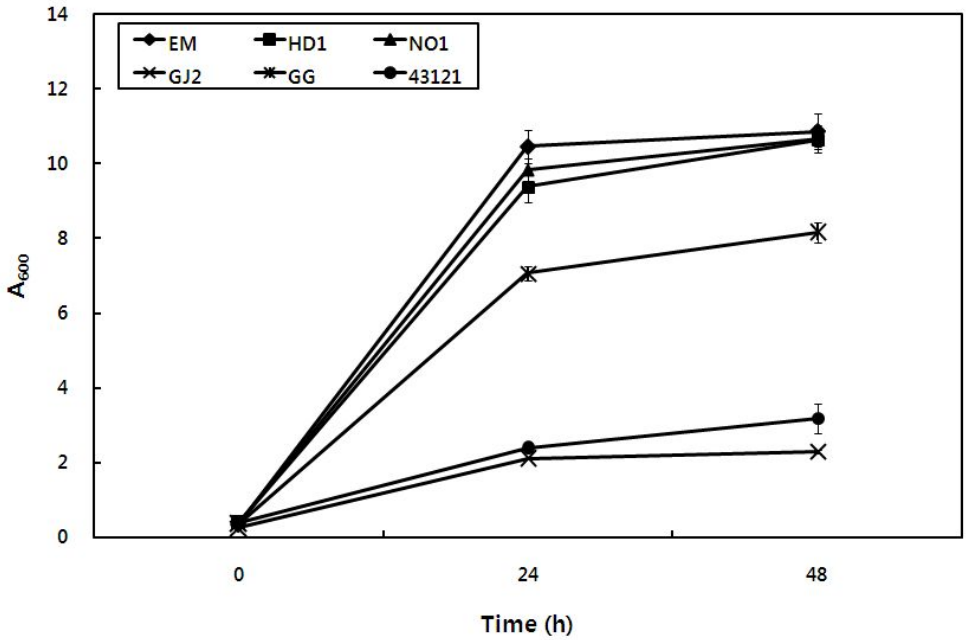

Figure 14. Growth of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 30℃ in cholesterol and oxgall media

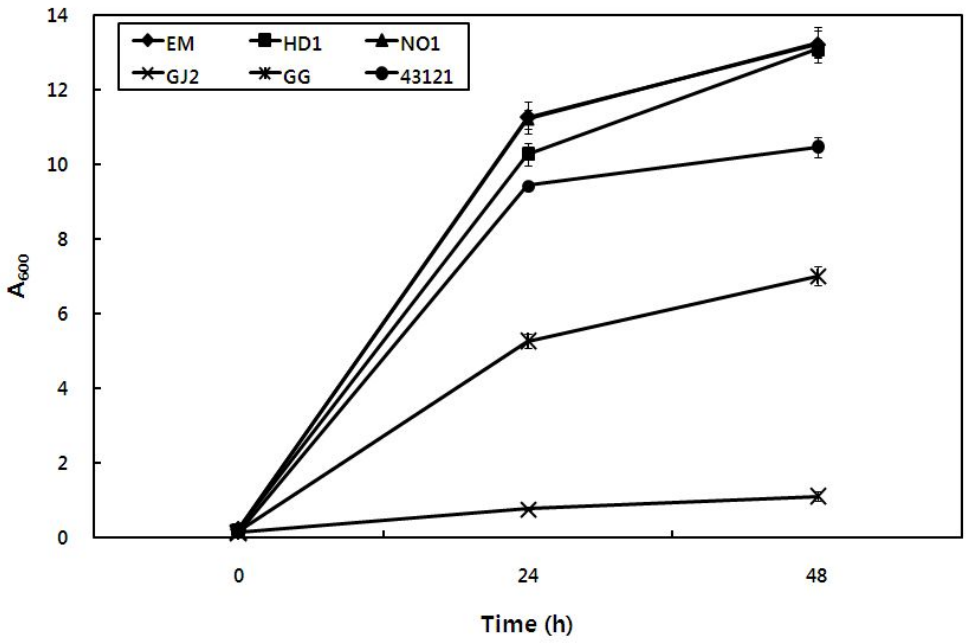

Figure 15. Growth of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 37℃ in cholesterol and taurodeoxycholic acid media

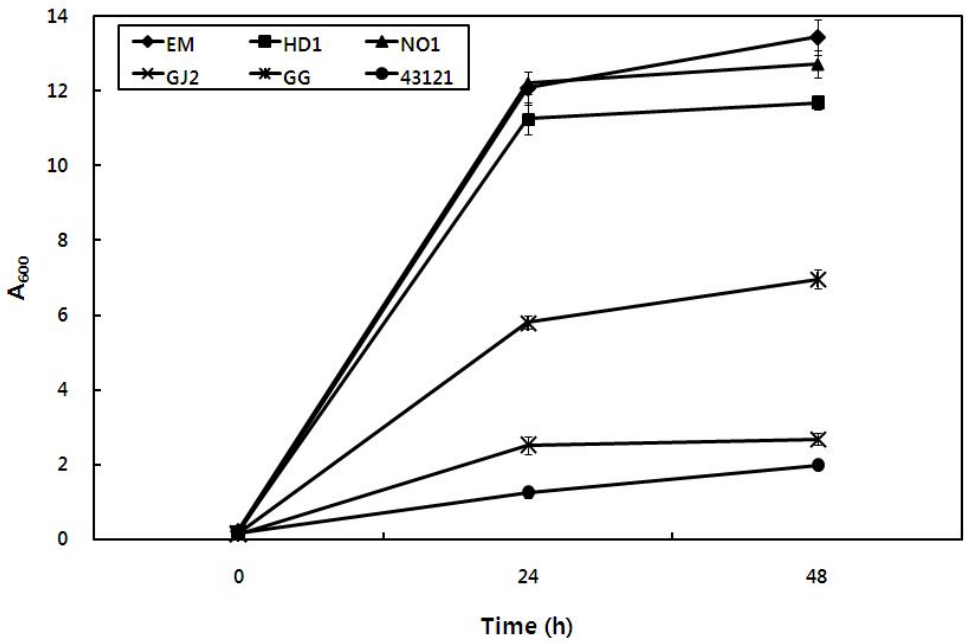

Figure 16. Growth of *Lb. plantarum* EM, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* NO1, *Leu. kimchii* GJ2, *Lb rhamnosus* GG, and *Lb. acidophilus* 43121 at 30℃ in cholesterol and taurodeoxycholic acid media

나. 콜레스테롤 동화능

(1) Standard curve graph

대조구와 비교하여 김치로부터 분리한 유산균 4종의 콜레스테롤 동화능 정도를 측정하기 위하여 standard curve graph(Figure 17)를 작성하였다. 최대 5지점의 농도로 assay를 진행하여 wavelength 550 nm에서 연속적으로 SWIFT Ⅱ Quantification program을 이용하여 측정하였다. 실험 결과, line quality가 100%로 일직선의 형태로 나타났으며, standard curve의 정확도를 확인할 수 있었다. 이 결과를 통하여 다음 단계의 콜레스테롤 동화능을 진행하여 standard curve위에 sample의 흡광도를 측정하여 잔여의 콜레스테롤 농도를 간접적으로 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

(2) Growing cell의 콜레스테롤 동화능

김치에서 분리된 4종의 균주에 대하여 콜레스테롤 동화능을 확인하기 위해 0.5% (w/v) oxgall과 0.1 g/L water-soluble cholesterol이 첨가된 MRS 액체배지 및 0.5% (w/v) TDCA 와 0.1 g/L water-soluble cholesterol이 첨가된 MRS 액체배지를 이용하여 유산균을 각각 30℃ 및 37℃에서 24시간, 48시간 혐기 배양한 후 *O*-phthalaldehyde 정색반응 정도에 따라 콜레스테롤 동화능을 확인하였다(Figure 18, 19).

0.5% (w/v) oxgall과 0.1 g/L water-soluble cholesterol이 첨가된 MRS 액체배지에서 균주 배양 최적온도인 30℃에서 24시간 혐기 배양 하였을 때, *Lb. plantarum* EM의 경우 94.64%, *Lb. plantarum* HD1은 93.88%, *Lb. plantarum* NO1은 95.32%, *Leu. kimchii* GJ2는 가장 낮은 동화능을 보여 76.19%의 수치를 나타냈다. 콜레스테롤 동화능 정도를 비교하기 위해 대조균주로 사용된 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103은 76.70%이며, *Lb. acidophillus* ATCC 43121은 57.65%으로 김치유산균 2종이 대조균주에 비해 더욱 높은 동화능을 나타내는 것으로 확인되었고, 48시간 혐기 배양 후 콜레스테롤 동화정도는 *Lb. plantarum* EM이 94.39%, *Lb. plantarum* HD1은 95.58%, *Lb. plantarum* NO1은 96.43%, *Leu. kimchii* GJ2는 76.96%으로 나타났다. 대조균주 2종에 대해서는 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103은 88.44%이며, *Lb. acidophillus* ATCC 43121은 88.44%의 동화능을 보였다. 본 실험 결과 시간이 지남에 따라 콜레스테롤 동

화능 수치는 미미한 증가를 보이거나, 많게는 30% 정도의 증가를 보이는 것으로 확인되었다. 또한 체내의 유사한 환경에서 콜레스테롤 동화능을 측정하기 위해 신체온도인 37℃에서 6종의 유산균을 24시간 혐기 배양하여 콜레스테롤 동화능을 비교하였을 때, *Lb. plantarum* EM이 83.59%, *Lb. plantarum* HD1은 80.10%, *Lb. plantarum* NO1은 92.52%, *Leu. kimchii* GJ2는 72.36%, *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103는 88.01%이며, *Lb. acidophillus* ATCC 43121은 79.25%의 수치를 나타냈다. 48시간 혐기배양 후 동화능 수치를 확인 한 결과 *Lb. plantarum* EM이 95.07%, *Lb. plantarum* HD1은 94.30%, *Lb. plantarum* NO1은 94.39%, *Leu. kimchii* GJ2는 74.15%, *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103은 91.50%이며, *Lb. acidophillus* 43121은 91.67%으로 나타났다.

결합담즙염 형태인 0.5% (w/v) TDCA와 0.1 g/L water-soluble cholesterol이 첨가된 MRS 액체배지에 6종의 유산균을 30℃에서 24시간 혐기 배양 하였을 때, *Lb. plantarum* EM의 경우 72.81%, *Lb. plantarum* HD1은 62.78%, *Lb. plantarum* NO1은 66.86%, *Leu. kimchii*는 50.31%의 콜레스테롤 동화능을 보였으며 대조균주 2종에 대해서는 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103이 55.00% 동화능을 보였고, *Lb. acidophillus* ATCC 43121은 25.07%의 수치를 나타내었다. 또한 30℃에서 48시간 배양하여 콜레스테롤 동화능 정도를 비교해 본 결과 *Lb. plantarum* EM의 경우 97.77%, *Lb. plantarum* HD1은 98.26%, *Lb. plantarum* NO1은 98.43%, *Leu. kimchii* GJ2는 54.26%의 콜레스테롤 동화능을 보였으며 대조균주 2종 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103및 *Lb. acidophillus* ATCC 43121의 경우 각각 57.82%, 41.88%의 동화능을 보였다. 체내의 유사한 환경인 37℃에서 김치유산균 4종 및 대조균주 2종을 포함한 6종의 콜레스테롤 동화능을 24시간, 48시간 후의 동화정도를 비교하였다. *Lb. plantarum* EM의 경우 24시간 후는 61.16%를 나타냈고, 48시간 후 측정한 결과 97.93%의 동화능이 확인되었다. 같은 정상 젖산 발효균인 *Lb. plantarum* HD1와 *Lb. plantarum* NO1은 각각 24시간 후 60.34%, 59.29%의 동화능을 나타냈고, 48시간 배양 후에는 각각 88.34%, 97.35%의 수치를 보였다. *Leu. kimchii* GJ2는 24시간 후 23.78%, 48시간 후 28.24%로 가장 낮은 콜레스테롤 동화능을 보였으며, 대조균주 2종 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 및 *Lb. acidophillus* ATCC 43121에 대해서는 24시간 후 각각 59.07%, 98.1% 48시간 후 68.57%, 101.16%의 동화능을 보였다. Kimoto(24)에 따르면 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N7의 균주를 37℃에서 24시간 0.2% sodium taurocholic acid 및 cholesterol을 첨가한 배지에서 성장하는 동안 콜레스테롤 제거율을 확인한 결과 97.3%의 높은 값을 나타내었다. 또한 Liong(32)에 의하면 *L. acidophilus*와 *L. casei*의 균주

를 20시간 0.3% oxgall 및 water-soluble cholesterol을 첨가한 배지에서 배양하였을 때, 12.03~32.25 μg/mL 범위의 콜레스테롤을 감소시켰으며, 0.3% taurocholic acid가 첨가된 배지 내에서는 3,76~20.80 μg/mL의 감소를 보였다. 이러한 결과들을 통해서 본 실험에 사용한 담즙염의 종류에 따라 콜레스테롤 동화능은 차이를 보였으며, 결합 담즙염 형태인 sodium taurocholic acid를 첨가한 콜레스테롤 배지보다 oxgall을 첨가한 콜레스테롤 배지에서 더욱 높은 콜레스테롤 동화능을 보이는 것으로 확인되었다.

(3) Resting cell 및 Dead cell의 콜레스테롤 동화능

김치 유산균 4종 및 대조균주 2종에 대하여 resting cell 과 dead cell의 콜레스테롤 동화능을 측정한 결과는 Figure 20, 21, 22 및 23과 같다. 0.5% (w/v) oxgall과 0.1 g/L water-soluble cholesterol을 첨가한 배지 상에서 resting cell의 콜레스테롤 동화능은 균주마다 현저한 차이를 나타냈으며 30℃에서 24시간 처리 하였을 때, *Lb. plantarum* NO1이 83.82%로 콜레스테롤 동화능이 가장 높은 반면 *Leu. kimchii* GJ2는 64.87%으로 가장 낮은 콜레스테롤 동화능 수치를 나타내었다. 또한 48시간 혐기적으로 처리 하였을 시, 유산균 6종의 콜레스테롤 동화능은 24시간에 비교하여 (0.32~4.46%)의 미미한 증가율을 보였고, 24시간과 마찬가지로 균주마다 유의적인 동화능 값을 나타내었다. 37℃에서 콜레스테롤 동화능을 측정해 본 결과, 63.73~84.49%으로 균주마다 현저한 차이를 보이며 30℃와 마찬가지로 균종에 따라 비슷한 콜레스테롤 동화능 양상을 보였다. Dead cell의 경우, 유산균 6종 중에서 콜레스테롤 동화능이 가장 높은 값을 나타낸 균주는 30℃에서 *Lb. plantarum* EM으로 76.91%의 수치를 보여주었으며, 가장 낮은 동화능을 나타낸 균주는 *Leu. kimchii* GJ2로 60.88%의 값을 보였다. 37℃에서 처리한 6종의 균주는 59.52~78.74%의 범위의 콜레스테롤 동화능을 보였다. 생균의 콜레스테롤 동화능은 처리시간이 지남에 따라 점진적으로 증가하는 모습을 보인 반면, dead cell의 동화능 값은 처리시간별 차이가 나타나지 않았다.

0.5% (w/v) TDCA와 0.1g/L water-soluble cholesterol을 첨가한 배지 상에서 resting cell의 콜레스테롤 동화능을 각각 30℃와 37℃에서 24시간 처리 하여 6종의 동화능을 비교한 결과 48.91~66.33%와 49.06~66.83%로 나타났다. 또한 48시간 처리 하였을 시, *Lb. plantarum*의 경우 30℃와 37℃ 모두에서 63% 이상의 동화능이 확인 되었으며, 가장 낮은 동화능을 보인 균주는 30℃에서 처리한 *Lb. acidophilus* ATCC 43121으로 48.91% 값을 나타냈다. Dead cell의 경우, 30℃에서 높은 콜레스테롤 동화능

을 가지는 균주 *Lb. plantarum* EM 과 가장 낮은 동화능을 가지는 균주 *Lb. acidophilus* ATCC 43121은 크게 17.9%의 차이를 보였으며, 37℃에서는 10.62%의 차이를 가지는 것으로 나타났다. Liong(32)에 의하면, resting cell 및 dead cell의 콜레스테롤 감소 능력은 growing cell에 비교하여 작은 감소를 보이며, 대부분의 균주는 dead cell에 반하여 resting cell일 때, 더욱 높은 콜레스테롤의 감소를 보였고, resting cell 및 dead cell 균주의 콜레스테롤 제거 능력은 콜레스테롤이 세포에 결합을 통해 제거 될 수 있다고 보고되었다. 또한 Kimoto(24)등은 *L. lactis subsp. lactis*가 배지에서 콜레스테롤을 동화하는데 dead cell이 생균의 25% 정도 제거하였고, resting cell 상태일 때에도 dead cell과 같은 결과를 얻었다고 보고하였으며, 이 결과를 통해 균주의 콜레스테롤 제거능력은 세포벽에 콜레스테롤 결합 현상과 관련이 있을 것이라 제안하였다. Lye(35)의 연구에 의하면 resting cell 및 dead cell의 콜레스테롤 제거능력은 growing cell의 건조 중량 31.17~94.61 μg/g에 비하여 5.15~38.44 μg/g 범위의 건조 중량으로 적은 콜레스테롤 감소를 나타냈다. 따라서, 본 실험은 기존에 보고된 resting cell과 dead cell 상태의 콜레스테롤 감소능력이 growing cell일 때 더욱 높은 범위의 감소를 보인다는 결과와 일치하는 것으로 보인다. 또한 김치로부터 분리된 유산균이 살아있는 상태뿐 만 아니라 생육이 정지하거나 사멸한 상태에서도 콜레스테롤 감소능력을 보여줄 수 있는 중요한 실험결과인 것으로 판단된다.

(4) 유산균의 세포벽을 이용한 콜레스테롤 동화능

Growing cell, resting cell 및 dead cell의 콜레스테롤 동화능을 확인하여 콜레스테롤 동화 활성이 높은 수치를 나타내는 김치유산균 1종 *Lactobacillus plantarum* EM과 대조균주 1종 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121의 세포벽 분리 유산균의 콜레스테롤 동화능을 측정한 결과, Figure 24와 같다. 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid와 0.1 g/L water-soluble cholesterol이 첨가된 MRS 액체배지상에서 37℃에서 24시간 혐기적으로 처리하였을 때, *Lactobacillus plantarum* EM의 세포파쇄물의 경우 30.90%로 대조균주 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121에 비교하여 16.26% 높은 수치를 나타내었다. 또한 48시간 혐기적으로 처리 하였을 시, 세포벽 분리 유산균 2종은 각 각 31.04%, 14.16%으로 반응시간이 지남에 따라 콜레스테롤 동화능 값이 증가하는 모습을 보이지 않는 것으로 보아 처리시간 별 차이가 나타나지 않는 것으로 나타났다.

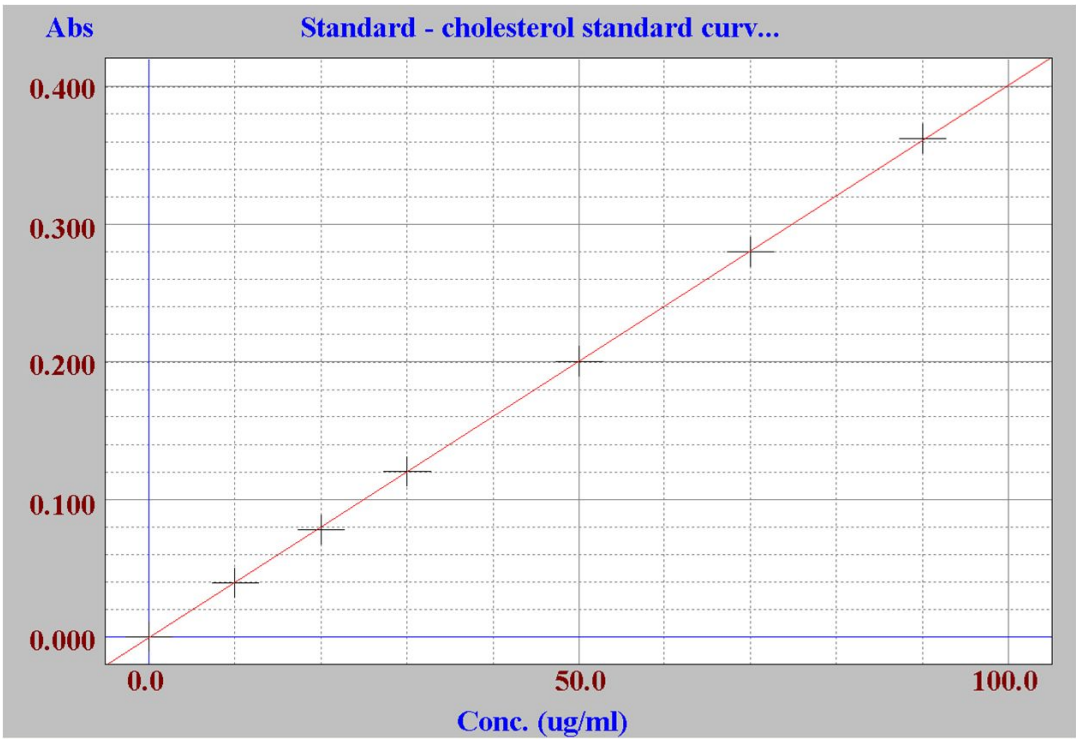

Figure 17. Standard curve graph for cholesterol determination using *O*-phthalaldehyde.

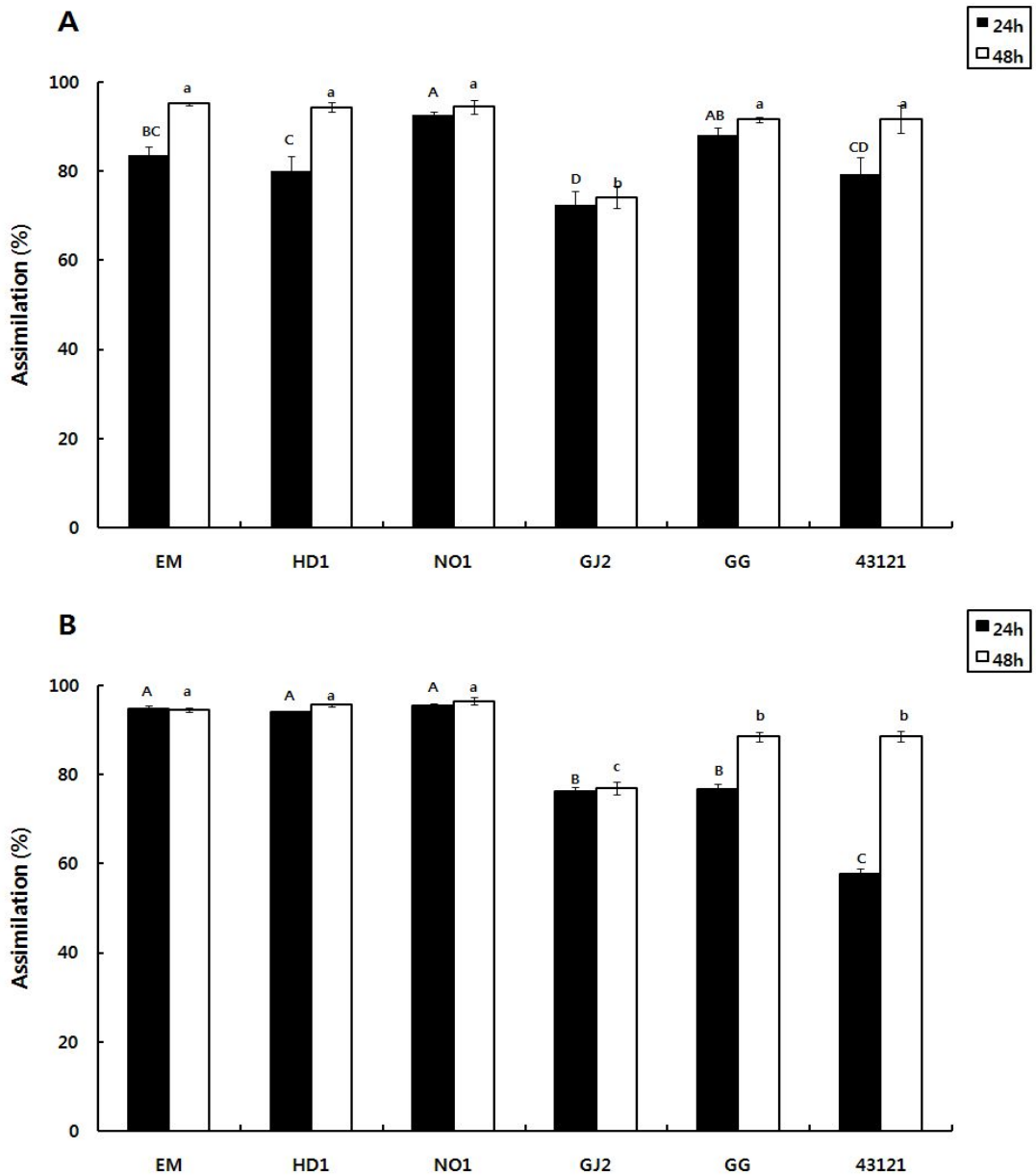

Figure 18. Cholesterol assimilation of the growing cell in the cholesterol and oxgall at 37℃(A) and 30℃(B) All values were mean ± S.D. (n=3)

[A-D]Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (24 h)

[a-c]Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (48 h)

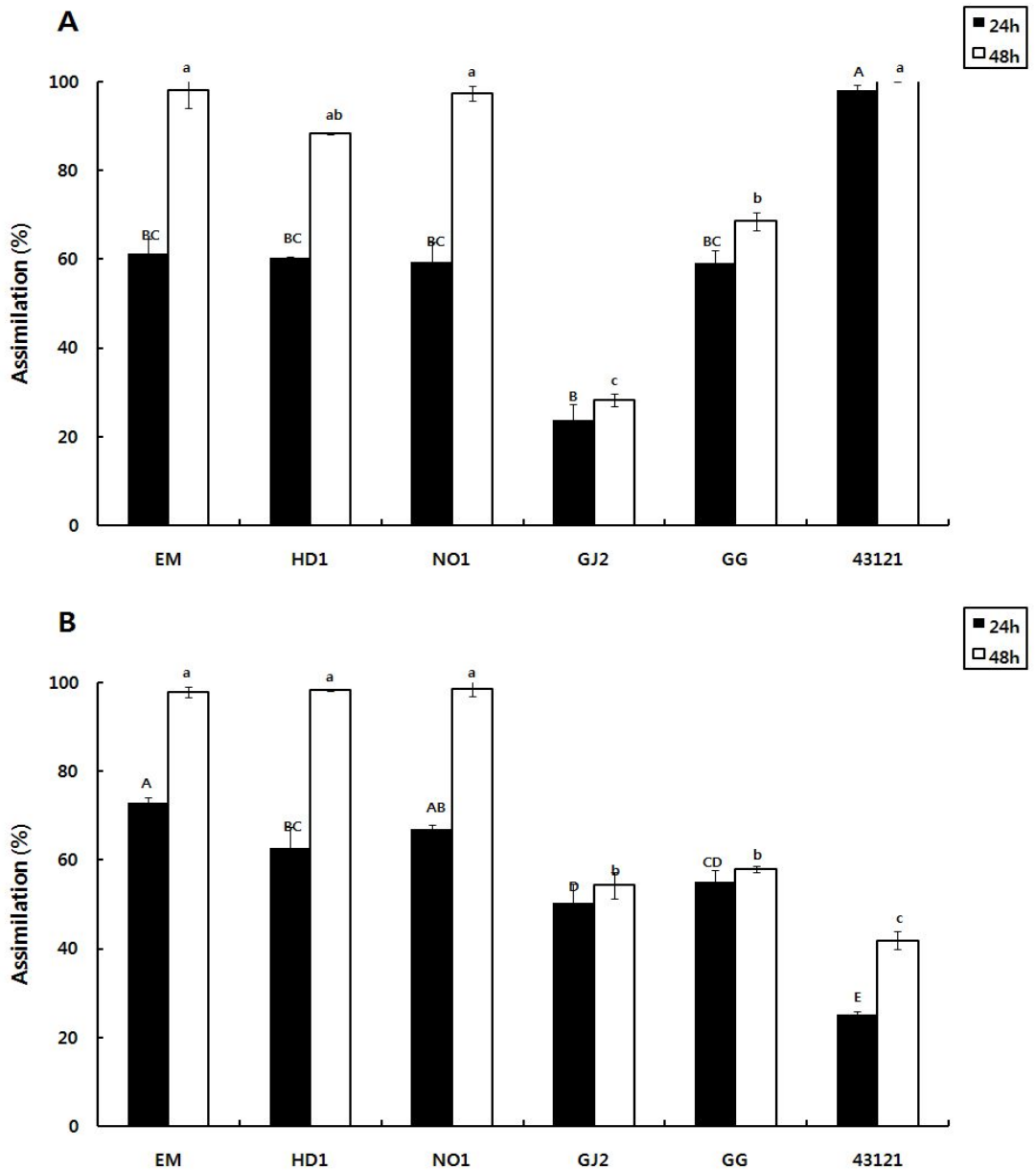

Figure 19. Cholesterol assimilation of the growing cell in the cholesterol and taurodeoxycholic acid at 37℃(A) and 30℃(B) All values were mean ± S.D. (n=3)

$^{A-E}$Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (24 h)

$^{a-c}$Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (48 h)

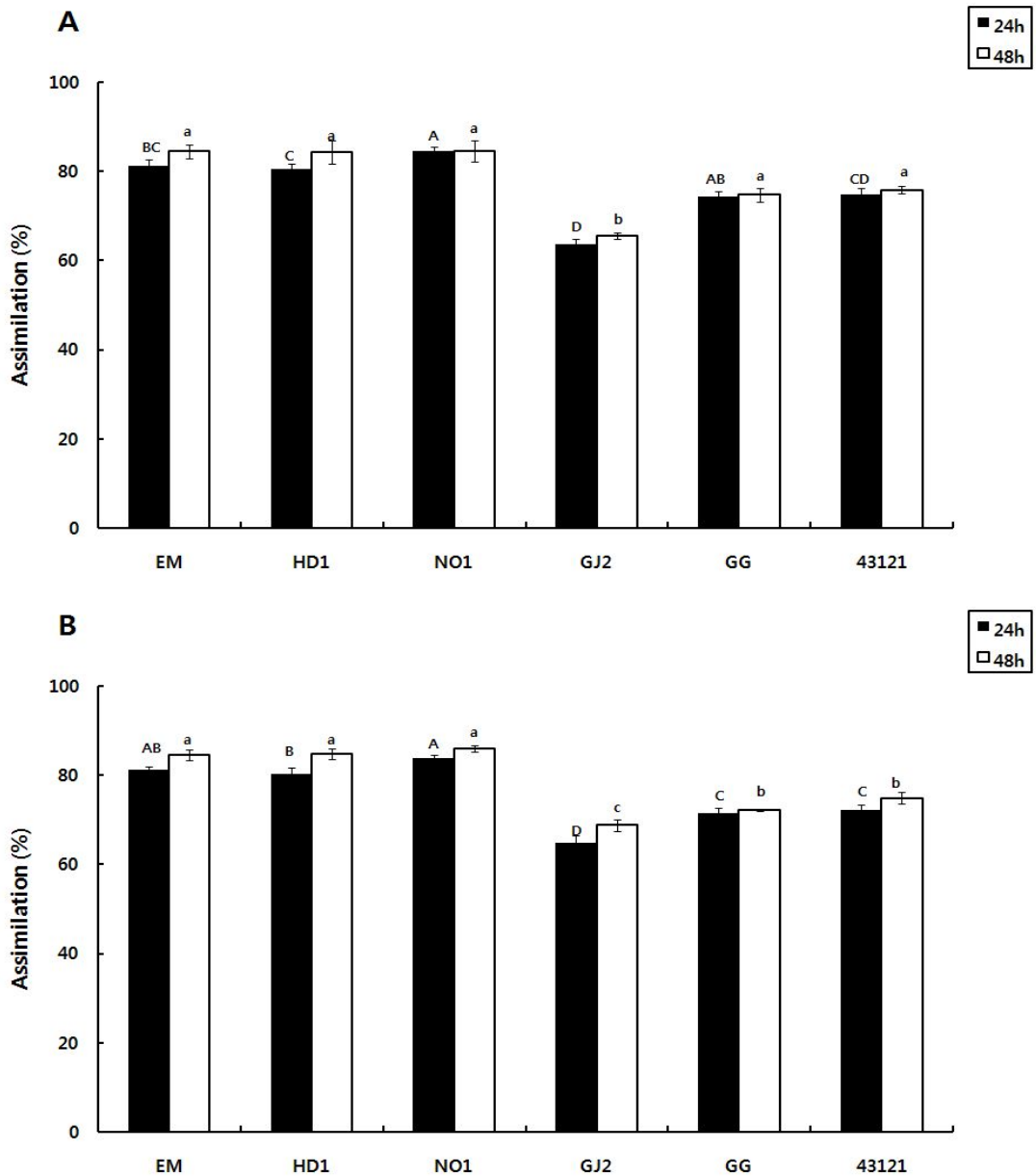

Figure 20. Cholesterol assimilation of the resting cell in the cholesterol and oxgall at 37℃(A) and 30℃(B) All values were mean ± S.D. (n=3)

[A-D]Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (24 h)

[a-c]Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (48 h)

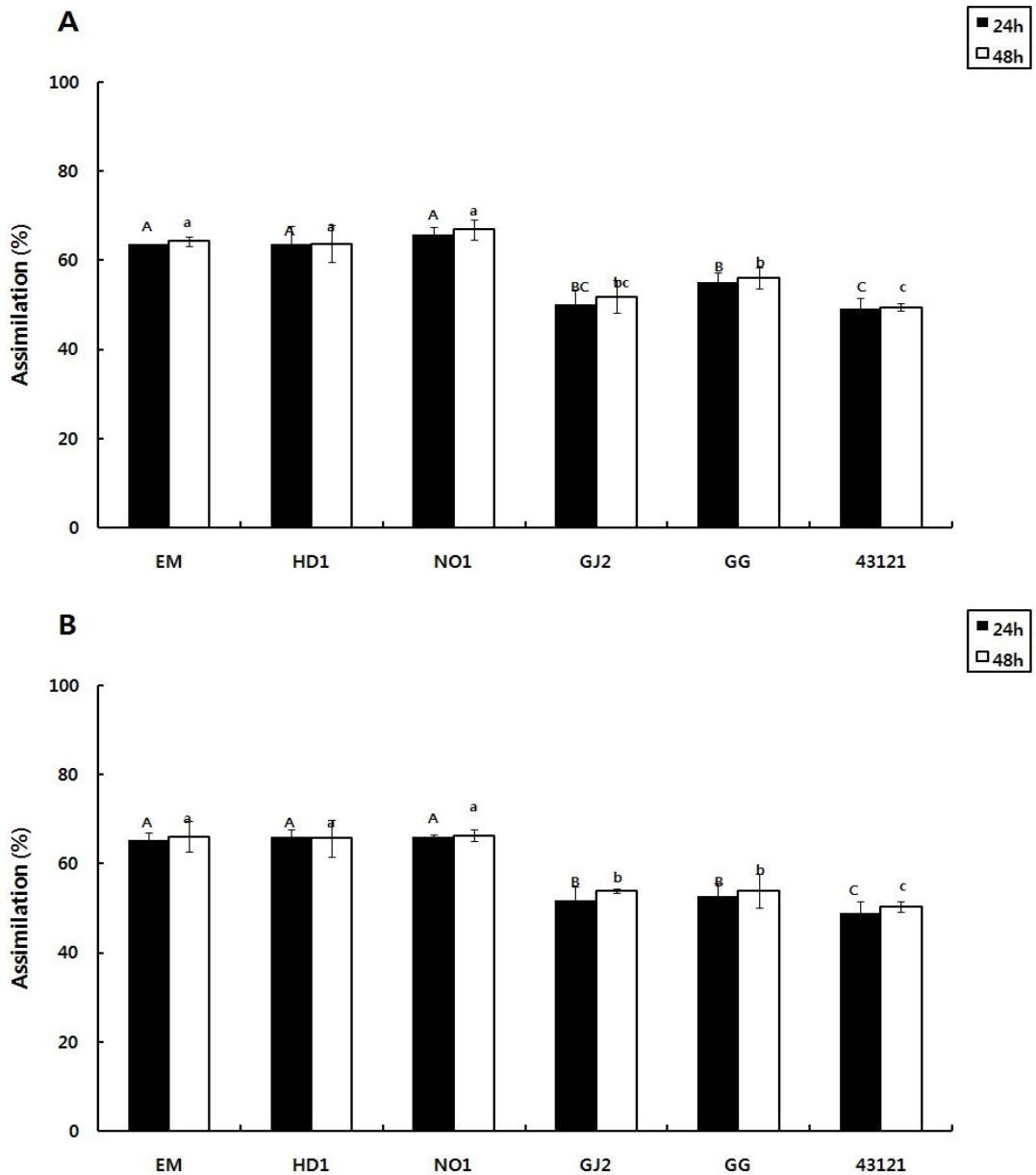

Figure 21. Cholesterol assimilation of the resting cell in the cholesterol and taurodeoxycholic acid at 37℃(A) and 30℃(B) All values were mean ± S.D. (n=3)

$^{A-C}$Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (24 h)

$^{a-c}$Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (48 h)

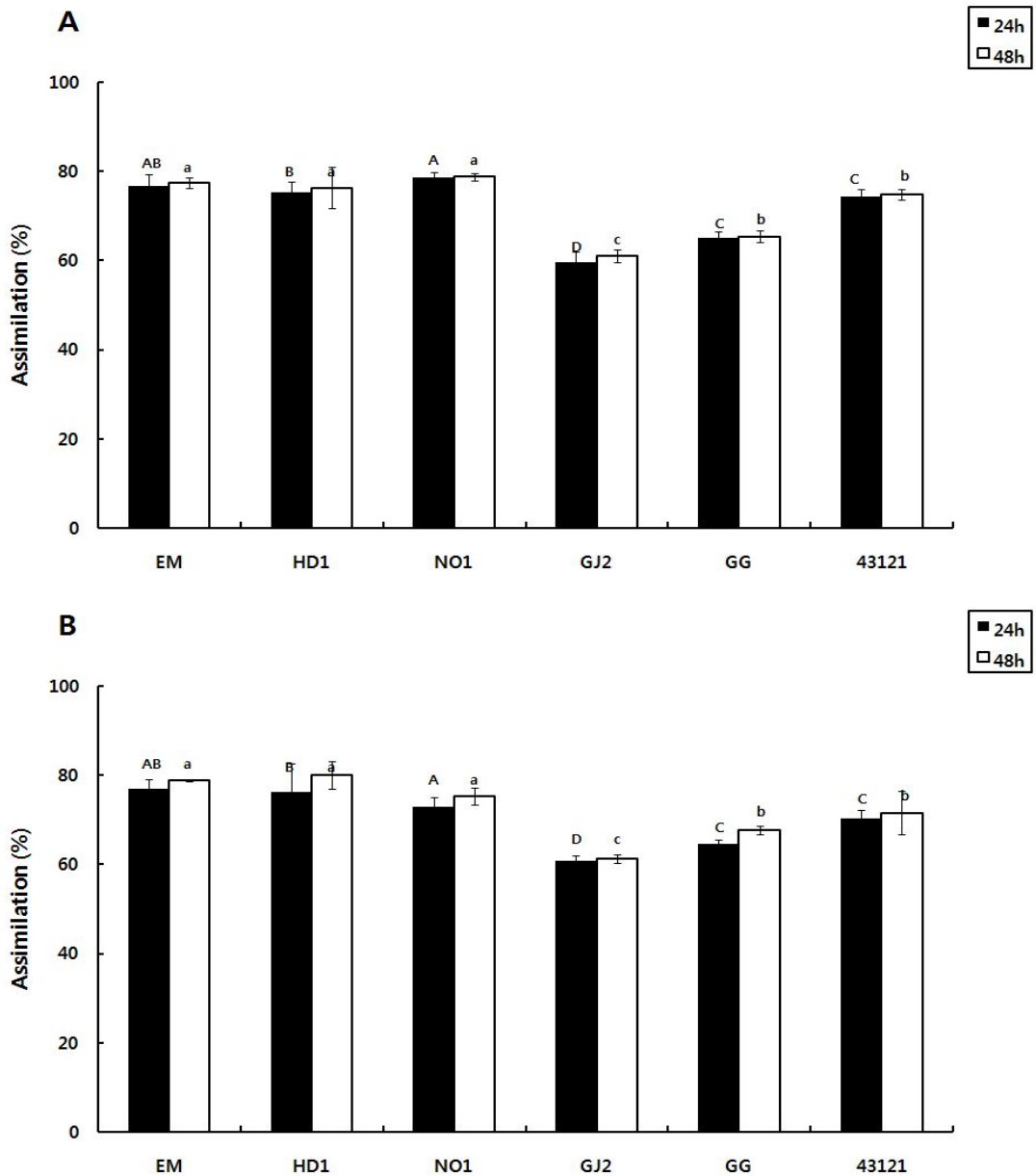

Figure 22. Cholesterol assimilation of the dead cell in the cholesterol and oxgall at 37℃(A) and 30℃(B) All values were mean ± S.D. (n=3)

$^{A-D}$Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (24 h)

$^{a-c}$Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (48 h)

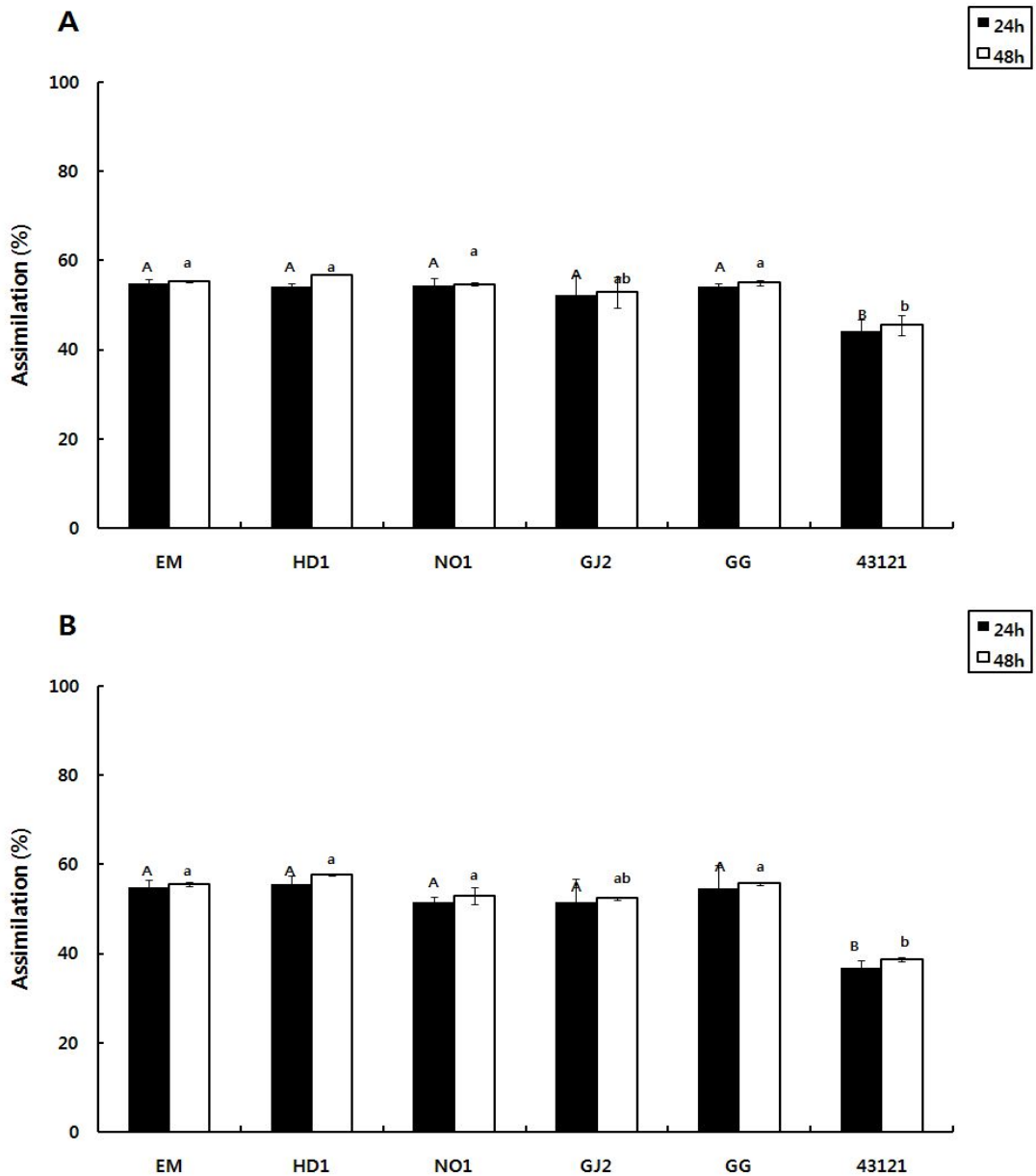

Figure 23. Cholesterol assimilation of the dead cell in the cholesterol and taurodeoxycholic acid at 37℃(A) and 30℃(B) All values were mean ± S.D. (n=3)

$^{A-B}$Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (24 h)

$^{a-b}$Means with the same letters in the same row(different stains) are significantly differents($p<0.05$) by Tukey's multiple range test (48 h)

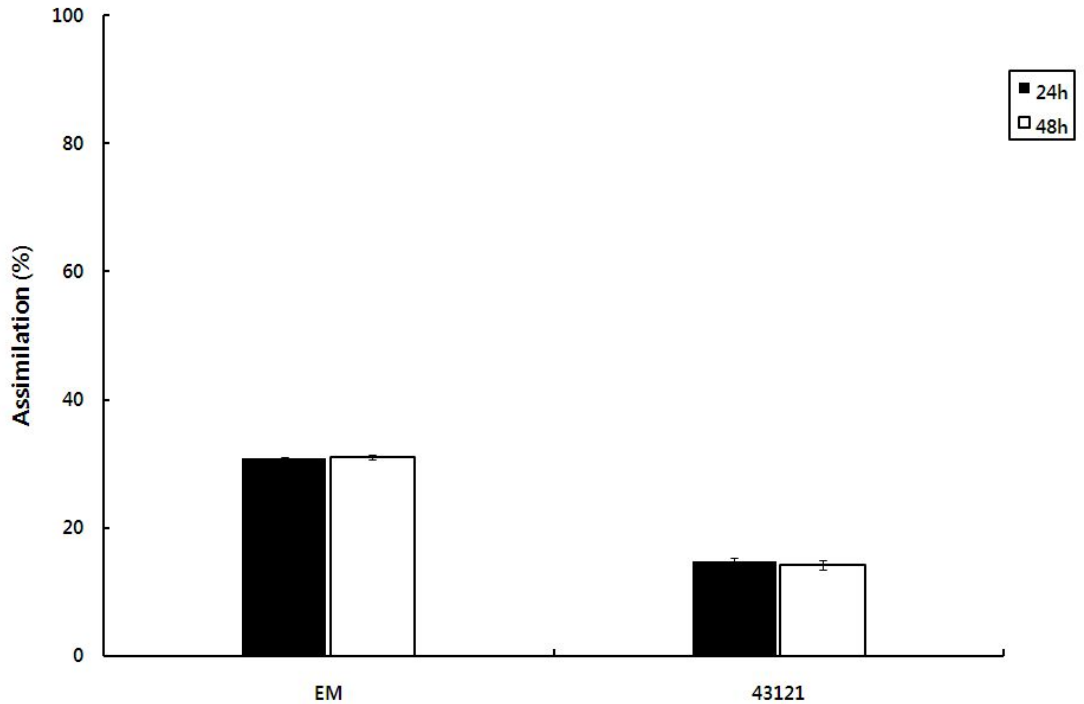

Figure 24. Cholesterol assimilation of the cell wall fraction in the cholesterol and taurodeoxycholic acid at 37℃

All values were mean ± S.D. (n=3)

다. Scanning Electron Microscopy (SEM)

분리 균주 *Lb. plantarum* EM, *Lb. acidophilus* ATCC 43121, *Lb. sakei* DC1의 세포와 세포벽에 콜레스테롤이 흡착된 모습을 Scanning Electron Microscopy(SEM)으로 촬영하였다. 대조구로는 담즙염과 콜레스테롤을 첨가하지 않은 배지 내에서 일반 영양세포를 관찰하고, 분리유산균에 담즙염과 콜레스테롤을 처리하여 결과를 확인하였다. Growing cell의 상태에서는 콜레스테롤 동화능을 가지는 분리균주 *Lb. plantarum* EM의 일반 영양세포와 담즙염과 콜레스테롤을 처리한 배지 내에서의 영양세포를 비교하였을 때, 콜레스테롤이 부착된 모습을 확인할 수 있었으며, 대조균주로 사용된 *Lb. acidophilus* ATCC 43121에서도 *Lb. plantarum* EM과 같은 결과로 세포의 표면에 콜레스테롤이 부착된 모습을 확인할 수 있었다. 그러나. 분리균주 *Lb. plantarum* EM의 경우 (Figure 25, “A”, “B”) 모두에서 cell의 크기나 형태의 변함이 없었으나, *Lb. acidophilus* ATCC 43121 (Figure 26, “A”, “B”)의 cell의 크기 및 형태를 비교하였을 때 cell이 신장된 것으로 보아 콜레스테롤 이 세포벽에 흡착하는 기전 외에 다른 영향을 미치는 것으로 유추해 볼 수 있을 것이다. 음성대조균주로 사용된 *Lb. sakei* DC1의 경우, 영양세포 뿐만 아니라 콜레스테롤을 처리한 실험구인 “B”에서도 콜레스테롤이 흡착된 모습을 확인할 수 없었으며, cell의 크기나 형태면에서도 변함이 없는 것으로 확인되었다(Figure 27). Dead cell 영양세포 상태에서도 담즙염과 콜레스테롤을 처리한 배지 내에서 콜레스테롤이 부착된 모습을 확인 할 수 있었다. 세포의 형태는 growing cell에 비교하여 많은 변화가 나타나. Cell이 쪼그라들거나, 구멍이 생기는 현상이 나타났으며, dead cell은 크기 면에서는 growing cell에 비해 큰 변화가 없는 것으로 나타났다(Figure 28, 29, 30).

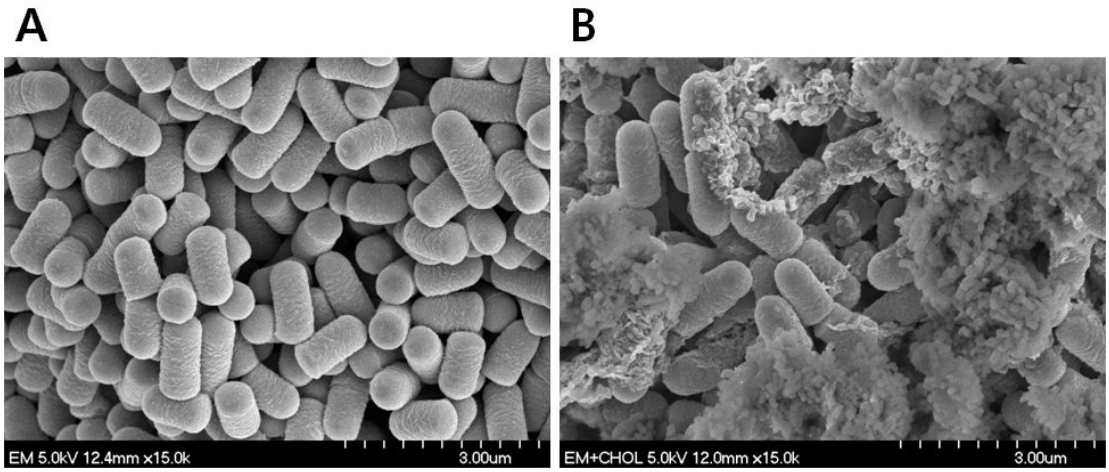

Figure 25. SEM micrograph of *Lb. plantarum* EM growing cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24h

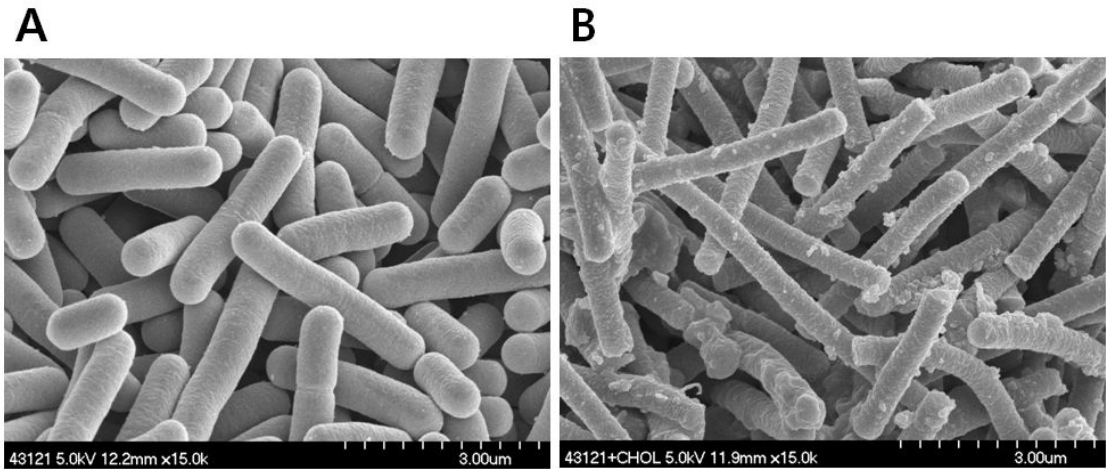

Figure 26. SEM micrograph of *Lb. acidophilus* ATCC 43121 growing cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24h

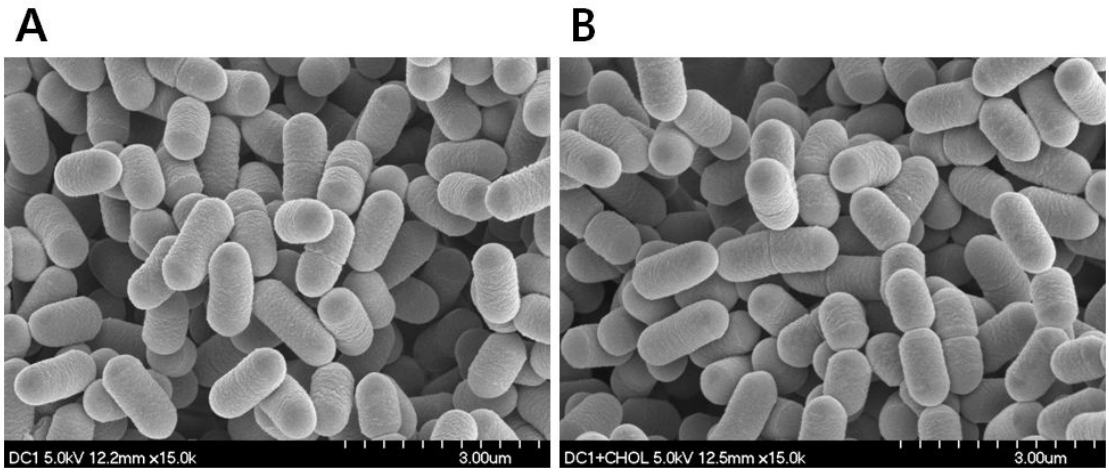

Figure 27. SEM micrograph of *Lb. sakei* DC1 growing cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24h

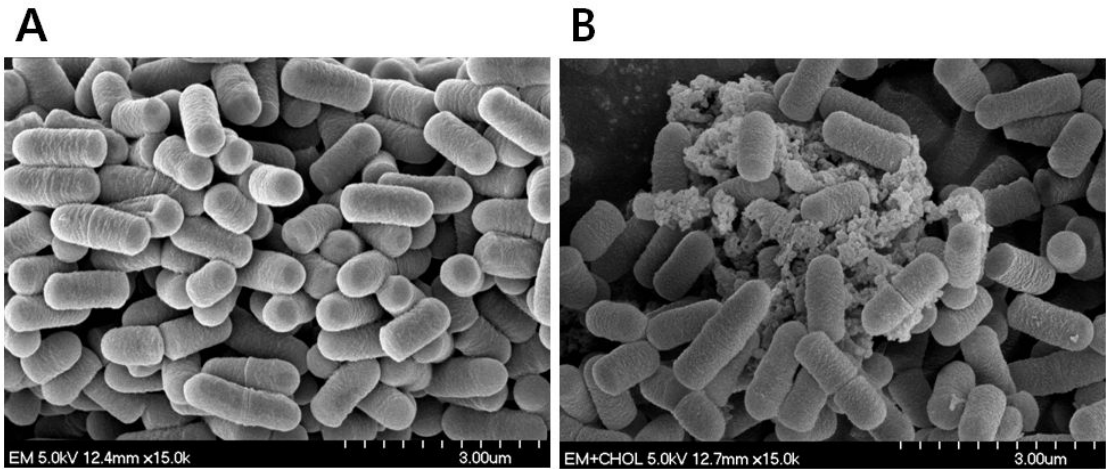

Figure 28. SEM micrograph of *Lb. plantarum* EM dead cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24h

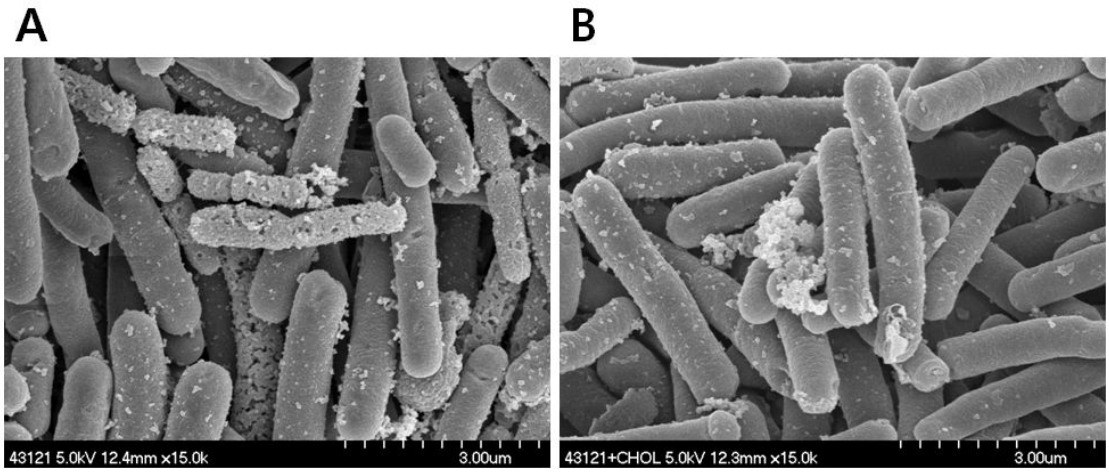

Figure 29. SEM micrograph of *Lb. acidophilus* ATCC 43121 dead cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24h

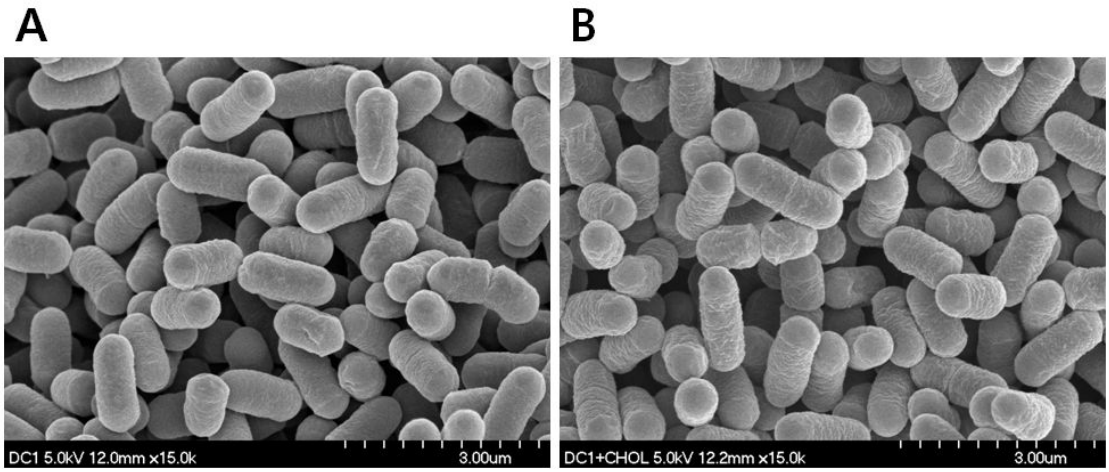

Figure 30. SEM micrograph of *Lb. sakei* DC1 dead cell stage in (A) broth containing no cholesterol and (B) broth containing cholesterol fermented for 24h

제 4 장 결 론

김치는 한국의 대표적인 전통발효식품으로 발효과정에 관여하는 유산균의 경우 면역활성 증진, 비타민 생성, 혈중 cholesterol 저하, 장내 균총의 균형 유지, 정장작용 외에 변비 및 설사의 개선, 항암 · 항알레르기 효과 등 다양한 기능성이 보고되고 있다(29). 그 중, 본 연구를 통해 김치로부터 분리한 유산균의 cholesterol을 낮추는 기능적인 면과 probiotics 기준에 해당하는 선행조건인 내산성 및 인공위액 저항성, 내담즙성 등을 통한 장내 생존성 여부, 유해효소 활성 보유 여부, 안전성 확인을 위한 항생제 내성 등의 특성을 조사하였다. 연구결과를 토대로 혈중 콜레스테롤 저하기작을 유추하여 심혈관계 질환을 예방할 콜레스테롤 조절 관련 기능성 물질 및 식품, 고지혈증 개선용 식이보충제로서 식품시장의 기초기반 연구에 기여하리라 사료된다.

1차로 선별된 김치 유산균 13종 중 담즙산 분해효소를 생성하는 김치 유산균을 선별하기 위해 결합담즙산과 $CaCl_2$가 첨가된 MRS 고체배지에 유산균 13종을 적용시켜 확인한 결과 4종의 균주에서 담즙산 분해효소를 생성하여 colony 주변으로 담즙산의 침전으로 인한 불투명한 환을 가진 것으로 나타나 2차 선별하였다. 선별된 유산균은 gram staining을 이용한 현미경 관찰과 API 50 CHL system으로 당 발효능을 확인하여 형태학적 특성과 생화학적 특성을 조사하였고, 16s rRNA 염기서열을 통한 분자생물학적 특성을 조사한 결과, 이미 동정된 *Lactobacillus plantarum* HD1, *Lactobacillus plantarum* NO1, *Leuconostoc kimchii* GJ2외 동정되지 않은 균주는 *Lactobacillus* plantarum 및 *Lactobacillus sakei*로 동정되었으며 이들을 각 각 *Lactobacillus* plantarum EM, *Lactobacillus sakei* DC1이라 명명하였다.

선별된 균주의 온도에 따른 일반 생육도를 관찰한 결과, 30℃와 37℃로 온도를 설정하였을 때 생육에 미치는 정도가 선별유산균에서는 모두 30℃에서 최대생육을 하는 것으로 관찰 되었으며, 생육곡선의 패턴은 온도에 대한 차이가 크게 나타나지 않았고 *Lb. plantarum* EM은 16~20시간, *Lb. plantarum* HD1 및 *Lb. plantarum* NO1은 24~28시간 *Leu. kimchii* GJ2는 8~12시간에 대수기에 접어드는 것으로 확인되었다. 안전성 탐색으로 김치 유산균의 항생제 감수성을 8종류의 항생제 ampicillin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline 및 chloramphenicol에 대하여 최소생육저해농도(MIC) 방법으로 측정하였다. EFSA(2008)에서 제시한 break point보다 낮은 MIC를 보이면서 감수성을 나타냈다. 이는 항생제를 복용하는 환

자에게 유산균 선택에 바른 정보를 제공하여 내성유전자의 확산방지에 도움이 될 것으로 보여진다. 4종의 김치유산균의 장내 생존성 여부 확인을 위하여 pH 2.5의 PBS로 조정한 내산성 및 pH 2.5의 0.5% saline buffer 및 pepsin을 첨가한 인공위액에서 처리한 결과 *Lb. plantarum* EM과 *Lb. plantarum* NO1이 10^8~10^9(CFU/mL)를 유지하며 82~99%로 높은 생존성을 보였다. 또한 pH 8.0으로 조정한 PBS에 0.3% oxgall을 첨가하여 인공담즙에 대한 내성을 확인한 결과 4종의 균주는 10^5~10^7(CFU/mL)으로 초기균수에 대하여 56~85%에 해당하는 균수를 나타내었다. API-ZYM kit를 사용하여 효소 활성을 확인한 결과 발암효소로 알려진 β-glucuronidase는 선별된 김치 유산균 4종에서 전혀 활성을 나타내지 않았으며, 바람직하지 않은 효소로 알려진 α-chymotrypsin의 경우에도 0 nM로 활성을 보이지 않았다. N-acetyl-β-glucosiminidase는 0~20 nM에 해당하는 활성을 나타내었다. 이는 선별된 유산균이 유해효소에 대하여 대부분 활성이 없거나, 미약한 것으로 확인되어 probiotics 균주로 발암 유발의 위험이 없음을 입증하였다. 콜레스테롤 조성물에 따른 온도별 생육곡선을 확인하였다. 즉, 각기 다른 두 종류의 담즙산을 첨가한 배지에서 유산균의 생육도는 oxgall보다 결합담즙산으로 이루어진 TDCA(taurodeoxycholic acid)에서 더욱 높은 생육이 이루어지는 것으로 확인되었다. 또한 대조균주로 사용된 *Lb. acidophilus* ATCC 43121을 제외한 모든 균주는 30℃에서 잘 자라는 것으로 확인되었며, 온도별 일반 생육도와 비교하여, 24시간 이후에도 균주는 정지기에 머무르지 않고 계속해서 생육하는 것으로 확인되었다. 이를 바탕으로 콜레스테롤 assimilation을 Rudel and Morris(51)방법을 변형하여 두 종류의 각기 다른 담즙산과 콜레스테롤을 공급하고 30℃와 37℃에서 24시간, 48시간 배양하여 *O*-phthalaldehyde 정색반응 정도에 따른 흡광도를 확인하여 콜레스테롤 동화능력을 측정한 결과 *Lb. plantarum* EM의 경우 61~98%, *Lb. plantarum* HD1은 60~98%, *Lb. plantarum* NO1은 59~98%, *Leu. kimchii* GJ2는 24~77%에 해당하는 콜레스테롤 동화능 수치를 보였다. 대조균주로 사용한 *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103의 경우 55~92%, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121은 25~101%의 동화능을 보였다. 본 실험을 통해 콜레스테롤 동화능을 측정한 결과 온도 및 유산균의 배양온도에 따라 동화능에 영향을 미치는 것으로 유추해 볼 수 있다. 또한 growing cell 뿐만 아니라 생육정지기의 resting cell 과 가열살균한 dead cell을 *in vitro* 상에서 growing cell과 같은 조건 하에 콜레스테롤 동화능을 확인한 결과, 각 각 *Lb. plantarum* EM의 경우 64~84%, 55~79% *Lb. plantarum* HD1은 64~85%, 54~80% *Lb. plantarum* NO1은 66~86%, 52~79% *Leu. kimchii* GJ2는 50~69%, 51

~61%으로 나타났으며, 대조균주로 사용한 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103의 경우 53~75%, 54~65% *Lb. acidophilus* ATCC 43121은 49~76% 37~75%의 동화능을 보여 기존의 growing cell 뿐만 아니라, resting cell 및 dead cell 에서도 혈중 콜레스테롤을 저하 하는 것으로 확인되었다. 세포벽 분리 유산균의 콜레스테롤 동화능은 37℃에서 24시간 혐기적으로 처리하였을 때, *Lactobacillus plantarum* EM의 경우 30.90%, 대조균주 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121의 경우 14.65%을 나타내었고, 48시간 혐기적으로 처리 하였을 시, 세포벽 분리 유산균 2종은 각 각 31.04%, 14.16%의 수치를 보였다. 이는 반복 실험의 평균 값으로, growing cell 및 resting cell, dead cell의 콜레스테롤 동화능보다 낮은 수치를 보이나, 세포벽파쇄물에서도 콜레스테롤을 저하하는 것으로 유추해 볼 수 있다.또한 *Lb. plantarum* EM 및 양성대조균주로 사용된 *Lb. acidophilus* ATCC 43121과 콜레스테롤 동화능이 전혀 나타나지 않은 것으로 확인된 음성대조균주 *Lactobacillus sakei* DC1에 대해서 영양세포 및 영양세포에 콜레스테롤을 처리하여, 영양세포에 콜레스테롤이 흡착된 growing cell 및 dead cell의 모습을 SEM(주사전자현미경)을 이용하여 관찰하였다. 즉, 이 자료를 통해 명확하게 밝혀지지 않은 유산균에 의한 혈중 콜레스테롤 저하 기작을 간접적으로 유추해 볼 수 있는 중요한 자료로 제시될 수 있을 것으로 사료된다.

본 논문 실험을 통해 김치로부터 분리한 유산균의 기능성 탐색으로 콜레스테롤 저하 효과를 확인하였다. *Lb. plantarum* EM은 김치유산균의 최적 배양 온도뿐만 아니라 신체온도 모두에서 생육이 잘 이루어지므로 생균제제 및 기능성 식품으로 이용가능 할 것이라 생각되며, 내산성 및 인공위액, 내담즙성이 강한 균주로 장내생존이 뛰어난 것으로 확인되었다. 또한 유해효소 활성을 나타내지 않으며 항생제에 내성을 나타내지 않는 안전한 균주로 *in vitro*에서 확인되었으나, *Lb. plantarum* EM이 산업적으로 이용되기 위해서는 *in vivo*상에서의 콜레스테롤 조절관련 기능성 평가를 위한 일반시험법으로 동물시험, 인체시험이 추가로 수행되어야 할 것으로 생각된다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. Allen, J., Taylor, M.D., Todd C. Villines, M.D., Eric J. Stanek, Pharm.D., PatrickJ. Devine, M.D., Len Griffen, M.D., Michael Miller, M.D., Neil J. Weissman, M.D., and Mark Turco, M.D. N., 2009. Extended-Release Niacin or Ezetimibe and Carotid Intima - Media Thickness. *The New England Journal of Medicine*. **361:** 2113-2122.

2. Burns, P., Patrignani, F., Serrazanetti, D., et al., 2008. Probiotic crescenza cheese containing lactobacillus casei and lactobacillus acidophilus manufactured with high-pressure homogenized milk. *Journal of Dairy Science*. **91:** 500 - 512.

3. Cardiovascular diseases (CVDs) Fact sheet N°317 Updated March 2013 http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html.

4. Charteris, W.P., Kelly,P.M., Morelli, L., and Collins, J.K., 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. **84:** 759 - 768.

5. Cheigh, Hong.Sik., Park, Kun. Young., & Professor Lee, C. Y., 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **34:** 175-203.

6. Cheng, Hsing., Hsien, Lai., Ming, Hoang., 2000. Fermentation of Resistant Rice Starch Produces Propionate Reducing Serum and Hepatic Cholesterol in Rats1. *Journal of Nutrition*. **130:** 1991-1995.

7. Danielson, A.D., Peo, E.R., Jr. K.M., Shahani, A.J., Lewis, P.J., Whalen. 1989. Anticholesteremic Property of Lactobacillus Acidophilus Yogurt Fed to Mature

Boars. *Animal Science*. **67:** 966-974.

8. De, Rodas, B.Z., Gilliland, S.E., Maxwell, C.V., 1996. Hypocholesterolemic Action of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121 and Calcium in Swine with Hypercholesterolemia Induced by Diet1. *Journal of Dairy Science*. **79:** 2121 - 2128.

9. Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on NIH Publication No. 01-3670 May 2001.

10. Du Toit, M., Franz, C.M., Dicks, L.M., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F., Holzapfel, W.H., 1998. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal Food Microbiol.* **40:** 93-104.

11. European food safety authority (EFSA). 2008. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human and veterinary importance. The EFSA Journal. **732:** 1-15.

12. Flórez, A, B., Egervärn, M, Danielsen M, Tosi L, Morelli L, Lindgren S, Mayo B. 2006. Susceptibility of Lactobacillus plantarum strains to six antibiotics and definition of new susceptibility-resistance cutoff values. *Microbial Drug Resistance.* **12:** 252-256

13. Galdeano, C.M., de LeBlanc, A., de M, Vinderola, G, Bonet, MEB, Perdigón, G., 2007. Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*. **14:** 485 - 492.

14. Gerald, W. Tannock., 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in Biotechnology.* **15:** 270-274.

15. Gilliland, S. E., Nelson, C. R., and C Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. *Applied and Environmental Microbiology*. **49**: 377 - 381.

16. Giorgio, Weber., Piero, Tosi., 1971. Observations with the scanning electron microscope on the development of cholesterol aortic atherosclerosis in the guinea-pig. *Virchows Archiv* A. **353**: 325-332.

17. Hirayama, K., Rafter, J., 2000. The Role Of Probiotic Bacteria in Cancer Prevention. *Microbes and Infection*. **2**: 681-686.

18. Hiromi, KIMOTO.NIRA., Koko, MIZUMACHI., Masaru NOMURA, Miho KOBAYASHI, Yasuhito FUJITA, Takashi OKAMOTO1, Ichirou SUZUKI, Noriko M. TSUJI, Jun-ichi KURISAKI, Sadahiro OHMOMO. 2007. Lactococcus sp. as Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria. *Japan Agricultural Research Quarterly.* **41**: 181-189.

19. I, De. Smet., L, Van. Hoorde1., N, De. Saeyer., M, Vande. Woestyne., and W, Verstraete. 1994. In Vitro Study of Bile Salt Hydrolase (BSH) Activity of BSH Isogenic Lactobacillus plantarum 80 Strains and Estimation of Cholesterol Lowering through Enhanced BSH Activity. *Microbial Ecology in Health & Disease*. **7**: 315-329.

20. Jamaly, N., Benjouad, A., Bouksaim, M., 2011. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from known popular traditional moroccan dairy products. *British Microbiology Research Journal*. **1**: 179 - 94.

21. Kausik, K. Ray., MD, MPhil., FACC, FESC; Sreenivasa Rao Kondapally Seshasai, MD, MPhil; Sebhat Erqou, MD, MPhil, PhD; Peter Sever, PhD, FRCP, FESC; J. Wouter Jukema, MD, PhD; Ian Ford, PhD; Naveed Sattar, FRCPath.

2010. Statins and All-Cause Mortality in High-Risk Primary Prevention. *Archives of Internal Medicine*. **170:** 1024-1031.

22. Kim, H. J., and Chang, H. C., 2006. Isolation and characterization of the exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from Kimchi. *The Korean Society for Microbiology and Biotechnology*. **34:** 196-203

23. Kim, Seon.Jae., 2005. Physicochemical characteristics of yogurt prepared with lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Korean Food Journal Food Culture*. **20:** 337-340.

24. Kimoto, H., Ohmomo, S., Okamoto, T., 2002. Cholesterol removal from media by lactococci. *Journal of Dairy Science*. **85:** 3182-3188.

25. Kirjavainen, P.V,, Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Salminen, S.J., 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett.* **167:** 185-189.

26. Kumar, A., Kumar, M., Ghosh, M., Ganguli, A., 2013. Modeling in vitro cholesterol reduction in relation to growth of probiotic Lactobacillus casei. *Microbiology and Immunology*. **57:** 100-110.

27. Lambert, J.M., Bongers RS, de Vos WM, Kleerebezem M. 2008. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in Lactobacillus plantarum WCFS1. *Applied and Environmental Microbiology*. **15:** 4719-4726.

28. Law, M.R., Wald, N.J., Wu, T., Hackshaw, A, and Bailey, A. 1994. Systematic underestimation of association between serum cholesterol concentration and ischaemic heart disease in observational studies : data from BUPA study. *British Medical Journal.* **308:** 363-366

29. Lay, gaik. Ooi., Min, tze. Liong., 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of *in vivo* and *in vitro* findings. *International journal of molecular sciences*. 11: 2499 - 2522.

30. Lee, Y., and Chang, H. C., 2008. Isolation and Characterization of Kimchi Lactic Acid Bacteria Showing Anti-Helicobacter pylori Activity. *The Korean Society for Microbiology and Biotechnology*. 36: 106-114.

31. Lian, W.C., Hsiao, H.C., Chou, C.C., 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology.* 86: 293-301.

32. Liong, M.T., Shah, N.P., 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science.* 88: 55-66.

33. Liong, M.T., Shah, N.P., 2006. Effects of a Lactobacillus casei synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats. *Journal of Dairy Science.* 89: 1390-1399.

34. Lye, H.S., Rusul, G., Liong, M.T., 2010. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of Dairy Science.* 93: 1383-92.

35. Lye, Huey. Shi., Gulam Rusul Rahmat-Ali, Min-Tze Liong. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*. 20: 169 - 175.

36. Mahmood, Syed.S., Daniel, Levy., b c, Ramachandran, S. Vasan., Thomas, J. Wang., 2013. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *The Lancet, Early Online Publication*. 6736: 61752-61753.

37. Máire, Begley., Colin, Hill., and Cormac, G. M., Gahan. 2006. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. **72:** 1729-1738.

38. Mercenier, A., Pavan, S., Pot, B., 2003. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*. **9:** 175-191.

39. Mishra, V., and Prasad, D.N., 2005. Application of in vitromethods for selection of Lactobacillus casei strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. **103:** 109 - 115.

40. Mohammad, Reza. Farahmandfar., Mohsen, Chabok., Michael, Alade., Amina, Bouhelal., Bijendra, Patel., 2012. Post Cholecystectomy Diarrhoea－A Systematic Review. *Surgical Science*. **3:** 332-338

41. Morten, Danielsen., Anette, Wind., 2003. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*. **82:** 1 - 11

42. Noh, D.O., Kim, S.H., Gilliland, S.E., 1997. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. *Journal of Dairy Science*. **80:** 3107-3013.

43. Oakey, H.J., Harty, D.W., and Knox, K.W., 1995. Enzyme production by lactobacilli and the potential link with infective endocarditis. *Journal of Applied Bacteriology*. **78:** 142 - 148.

44. Ouwehand, A.C., 2007. Antiallergic Effects of Probiotics. *Journal of Nutrition*. **137:** 794 - 797.

45. Park, K.Y., 1995. The Nutritional Evaluation, and Antimutagenic and Anticancer

Effects of Kimchi. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition.* **24:** 169-182.

46. Parodi, P.W., 1999. The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics. *Australian Journal of Dairy Technology.* **54:** 103 - 121.

47. Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., 2004. Selection of Lactobacillus strains fromfermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science.* **67:** 309 - 317.

48. Pereira, D. I., Gibson, G.R.,. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology.* **68:** 4689-4693.

49. Pereira, DIA., Gibson, G.R., 2002. Effects of Consumption of Probiotics and Prebiotics on Serum Lipid Levels in Human. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* **37:** 259 - 281.

50. Robert Havenaar, Jos. H. J. Huis In't Veld., 1992. Probiotics: A General View The Lactic Acid Bacteria. *Applied Science.* **1:** 151-170.

51. RUDEL, L. L., MORRIS, M. D., 1973. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *Journal of Lipid Research.* **14:** 364-366

52. Samuel, Paul., Donald, J. McNamara., 1983. Differential absorption of exogenous and endogenous cholesterol in man. *The Journal of Lipid Research.* **24:** 265-276

53. Santini, C., Baffoni, L., Gaggia, F., Granata, M., Gasbarri, R., Di Gioia D, Biavati, B., 2010. Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against Campylobacter jejuni. I*nternational Journal of Food*

Microbiology. **141**: S98 - S108.

54. Shin, Hwa.Jin., Choi, Hye. Jung., Kim, Dong. Wan., Ahn, Cheol. Soo., Lee, Young. Geun., Jeong, Young.Kee., Joo, Woo. Hong., 2012. Potential of Pediococcus pentosaceus BCNU 9070. *journal of life science*. **22**: 1194-1200.

55. Silva, M., Jacobus, N. V., Deneke, C., and Gorbach, S. L., 1987. Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain. *Antimicrob Agents Chemother*. **31**: 1231 - 1233.

56. Taranto, M.P., Medici, M.G., Perdigon, A.P., Ruiz Holgado, G.F., Valdez. 1998. Evidence for Hypocholesterolemic Effect of Lactobacillus reuteri in Hypercholesterolemic Mice. *Journal of Dairy Science*. **81**: 2336 - 2340

57. Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., 1999. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. **26**: 137-142.

58. Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” +study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*. **36**: 895 - 904.

59. Wang, C.Y., Lin, P.R., Ng, C.C., and Shyu, Y.T., 2010 Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*. **16**: 578 - 585.

60.. Weston, S., Halbert, A., Richmond, P., Prescott, S.L., 2005. Effects of Probiotics on Topic Dermatitis: A Randomised Controlled Trial. *Archives of Disease in Childhood*. **90**: 892 - 897.

61. Yamamoto, A., 2008. A Uniqe Antilipidemic Drug – Probucol. *Journal of*

Atherosclerosis and Thrombosis. **15**: 304-305.

62. Yeo, S.K., Liong, M.T., 2010. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity and Bioconversion of Isoflavones by Probiotics in Soymilk Supplemented with Prebiotics. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* **61**: 161 - 181

감사의 글

어느덧 2년의 대학원 생활이 주마등처럼 흘러가 많은 분들의 격려와 도움 속에 지금의 결실을 맺게 되어 감사의 마음을 전하고자 합니다.

학부과정부터 석사논문이 나오기까지 학문적으로, 인격적으로 많은 가르침을 주시고 세심한 지도로 도와주신 장해춘 교수님께 고개 숙여 감사드립니다. 또한, 논문 심사위원장님을 맡아주시며, 멋진 필자로 제 논문을 빛내주신 이명렬 교수님, 바쁘신 중에도 많은 관심으로 세심한 지도와 아낌없는 조언을 주신 이재준 교수님, 학부과정부터 대학원에 이르기까지 많은 가르침을 주신 식품영양학과 노희경 교수님, 김경수 교수님, 김복희 교수님, 이주민 교수님께 큰 감사를 드립니다.

희로애락을 함께해온 고마운 실험실 식구들 많이 사랑합니다. 항상 못난 점 감싸주시며, 실험실 총대를 잡아주신 장지윤 박사님. 지금은 조금 더 먼 곳에 있지만 활발히 연구활동하시며, 제게 실험적으로 많은 가르침을 주신 양은주 박사님, 이젠, 엄마의 따뜻한 품으로...귀여운 윤홍이와, 사랑스런 담후에게 힘이 되어주고 계신 장미박사님. 학부 때부터 어린 저를 가장 가까이서 봐주시며 마음을 잘 헤아려 주신 정지혜 선생님. 지금은 넘볼 수 없는 가장 큰 산이 되어버린 송희 박수님이지만 그래도 제겐 간식주는 마음 따뜻한 간식대장 송희언니. 긴 머리 휘날리며 식영과 주름잡던 여신, '연애란, 내게 맡겨라' 정선언니. 눈물, 콧물 질질 짤 때, 눈물 닦아주던 은혜로운 은혜언니. 부러운 성숙한 몸매의 소유자 해훈언니. 잠깐이나마 실험실생활 같이 했던 내 동갑내기, '유행어는 죄다 내입에서 만들어진다' 희정이. 나보다 더 맏언니 같았던... 실험실 중재자 노릇 톡톡히 해낸 마음착한 슬기. 우울함도 다 날려주던 팡팡터지는 유머쟁이 세연. 엊그제만 해도 같이 고민하며 지냈던 실험실 식구 아기피부 송이. 서로의 자리에서 최선을 다하며 대학원 생활 같이 했던 08 동기들 희경·성화. 매사에 긍정적이고 섹쉬한 목소리를 가진 설화. 다리하나는 끝내주는 동생은지. 조그마한 얼굴에 가녀린 몸매의 소유자 다혜. 똑부러진 성격의 매력만점 목소리 성경. 두피마저 빨개지는 웃음 많은 해피해비. 하얀 얼굴, 다정다감한 수진. 귀여운 막내들까지, 고마움을 전합니다.

자주 만나지 못해도, 마음은 여전히 날 응원해주던 내 고마운 친구들, 각자의 자리에서 최고가 되어있는 유진, 소영, 경수, 한나, 아름, 가희, 상미, 대학원 친구 홍석이, 존재만으로도 힘이 되는 나의 두 번째 엄마 기숙쌤. 사랑합니다.

강아지, 강아지, 우리강아지, 손녀밖에 없다며 뒤돌아 눈물 훔치시는 조그맣고 귀여운 할머니. 멋지게 나이드신 패셔니스타 외할머니. 자주 뵙지 못하지만 늘 묵묵히 믿어주시며, 한결같이 사랑한다는 문자로 힘이 되어주시는 아빠. 막내 딸 때문에 고생한다며, 투정부리는 우리엄마 커서 용돈 꼭 드릴게요. 하나밖에 없는 나의 언니 작은 나의 부모님. 엄청나게 커버려서 내 뒷바라지 다해주는 착한 우리 언니. 너무너무 고맙고 사랑해. 무한사랑 보내주시는 이모. 은아가 생각났다며 길가다 멈춰서 복숭아 선물 주는 광훈이 삼촌. 유명한 야구선수된 내 동생 강지광. 그리고 많은 응원과 격려해주신 친지분들께도 감사의 마음을 전합니다.

따뜻한 마음씨의 룸메이트이자 학과선배 지혜언니. 4년의 학부생활을 함께해 준 든든한 동기 솔이, 지은이, 린이, 미진이. 2년도 채 안되지만 알고지낸 건 소꿉친구 같았던 좋은 친구 광중이. 인생의 조언자 역할을 해준 감성 돋는 현대인 재욱이형아. 다들 응원해주셔서 감사합니다. 마지막으로, 징징대며 투정부려도 항상 곁에서 다독여주는 장난꾸러기 요물현웅 고마워.

제 삶에 힘이 되어주신 모든 분들에게 다시 한 번 진심으로 감사드리며, 건강하고 항상 행복하시길 바랍니다.

저작물 이용 허락서

학 과	식품영양학과	학 번	20127040	과 정	석사
성 명	한글 최은아	한문 崔 銀 娥	영문 Choi Eun A		
주 소	전라북도 완주군 상관면 신리로 159-3				
연락처	e-mail : steunar@naver.com				
논문제목	한글:김치로부터 분리한 유산균의 콜레스테롤 저하 효과				
	영문:Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria isolated from Kimchi				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함(다만, 저작물의 내용변경은 금지함)
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2013 년 11 월

저작자 : 최은아 (인)

조선대학교 총장 귀하