



### 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](#)

2012年 2月

碩士學位論文

김치유산균의 프로바이오틱  
특성 조사

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

柳 恩 惠

김치유산균의 프로바이오틱  
특성 조사

Probiotic assessment of Kimchi lactic acid bacteria

2012年 2月 24日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

柳 恩 惠

# 김치유산균의 프로바이오틱 특성 조사

指導教授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함.

2011年 10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

柳 恩 惠



# 柳恩惠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

2011年 11月

朝鮮大學校 大學院

# 목 차

ABSTRACT .....	VI
LIST OF TABLE .....	III
LIST OF FIGURE .....	V
제 1장 서론 .....	1
제 2장 실험 재료 및 방법 .....	7
1. 사용균주 및 배지 .....	7
2. 내산성 및 인공위액 저항성 측정 .....	7
3. 장내 부착능 실험 ( <i>in vitro</i> ) .....	10
1) 세포배양 .....	10
2) 장내 부착 실험 방법 .....	10
3) Scanning electron microscopy (SEM) .....	11
4. 소수성 측정 .....	13
5. 응집성 측정 .....	13
6. 효소활성 측정 .....	14
7. 항생제 감수성 측정 .....	14

제 3장 결과 및 고찰 .....	16
1. 내산성 및 인공위액 저항성 측정 .....	16
2. 장내부착능( <i>in vitro</i> ) .....	20
1) Caco-2 세포주에 대한 부착능 .....	20
2) HT-29 세포주에 대한 부착능 .....	28
3. 소수성 측정 .....	31
4. 응집성 측정 .....	35
5. 효소활성 측정 .....	40
6. 항생제 감수성 측정 .....	43
제 4장 결론 .....	47
제 5장 참고문헌 .....	50

## LIST OF TABLE

Table 1. Desirable properties of probiotic bacteria .....	6
Table 2. List of lactic acid bacteria (LAB) used in the experiment .....	9
Table 3. Adhesion of LAB to Caco-2 cell <i>in vitro</i> with $10^7$ CFU/mL cell inoculation .....	22
Table 4. Adhesion of LAB to Caco-2 cell <i>in vitro</i> with $10^8$ CFU/mL cell inoculation .....	23
Table 5. Adhesion of LAB to Caco-2 cell <i>in vitro</i> with $10^9$ CFU/mL cell inoculation .....	24
Table 6. Average adhesion rate of LAB to Caco-2 cell <i>in vitro</i> .....	25
Table 7. Adhesion of LAB to HT-29 cell <i>in vitro</i> .....	29
Table 8. Cell surface hydrophobicity (CSH) of LAB by hexadecane method .....	33
Table 9. Autoaggregation ability of LAB .....	37
Table 10. Enzyme activities of LAB by API ZYM analysis .....	42
Table 11. Microbiological breakpoints ( $\mu\text{g/mL}$ ) categorizing some LAB species as resistant .....	45

Table 12. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of LAB to antimicrobial agents  
as determined by the broth microdilution method ..... 46

## LIST OF FIGURE

Figure 1. Scanning electron microscopy (SEM) preparation protocol .....	12
Figure 2. Acid tolerance of the LAB in 0.05 M sodium phosphate (pH 2.5) .....	18
Figure 3. Survival of the LAB in the artificial gastric juice (pH 2.5) .....	19
Figure 4. Adhesion of LAB to Caco-2 cell observed using light microscopy after Gram-stainig .....	26
Figure 5. Scanned electron microscopic images of LAB on Caco-2 cell line .....	27
Figure 6. Adhesion of LAB to HT-29 cell observed using light microscopy after Gram-stainig .....	30
Figure 7. Correlation of hydrophobicity and the adhesion ability to Caco-2 cells .....	34
Figure 8. Correlation of auto-aggregation and the adhesion ability to Caco-2 cells .....	38
Figure 9. The correlation of hydrophobicity and auto-aggregation of LAB showed <i>in vitro</i> adherent abilities .....	39

# ABSTRACT

## Probiotic assessment of Kimchi lactic acid bacteria

Ryu, Eun Hye

Adviser : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

A total of 10 strains of lactic acid bacteria (LAB) was isolated from Kimchi were characterized for probiotic properties. Acid and artificial gastric juice tolerance of these 10 strains of LAB were investigated. The result of viability test in acid and artificial gastric juice, strains *Lactobacillus plantarum* AF1 and *Lactobacillus plantarum* NO1 showed high viability (maintain initial viable cell,  $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL) for 2 hours in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 2.5), and artificial gastric juice. The adhesion of 10 strains of LAB was studied using Caco-2 cell lines as an *in vitro* model for intestinal epithelium. The two most adhesive strains were *Leuconostoc kimchii* GJ2 and *Pediococcus pentosaceus* MP1. Adhesion of all the strains was dependent of the number of bacteria used. This study was also carried out to investigate the cell surface hydrophobicity (CSH) and cell autoaggregation ability of 10 strains of LAB. Among the tested strains, *Lb. plantarum* AF1 and *Lb. plantarum* NO1 were highly observed hydrophobicity and cell autoaggregation, compared to *Lactobacillus rhamnosus* GG as control. However, no correlation could be observed cell surface hydrophobicity and autoaggregation between adhesion abilities of the tested strains of LAB. The enzyme profiling is an important factor for selection of strains as starter cultures. The enzymatic potential of the strains was evaluated using the API ZYM kit. Leucine arylamidase activity

was strong for *P. pentosaceus* MP1, the mean value being > 40 nmole of substrate. Strong  $\beta$ -galactosidase activities were observed by *Lb. buchneri* MS, *Lb. plantarum* AF1 and *Lb. plantarum* NO1. To obtain antibiotic susceptibilities of LAB, minimum inhibitory concentration (MIC) of 8 antibiotics for 10 LAB isolates from Kimchi were determined. All strains tested were sensitive to ampicillin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline and chloramphenicol. Taken together these results, *Lb. plantarum* NO1 isolated Kimchi may be used as probiotic strains.



# 제 1 장 서 론

김치는 배추나 무를 주원료로 하고 마늘, 생강, 파, 고춧가루, 젓갈 등 다양한 향신료를 첨가하여 발효시킨 우리나라의 대표적인 전통 발효 식품이며, 이들 원료와 미생물의 작용에서 유래되는 성분이 잘 조화되어 고유의 맛을 나타내게 된다(37, 44). 김치의 맛과 영양은 재료의 조성 과 함량, 소금 농도, 발효온도와 조건, 유산균 종류 등에 따라 다양한 맛을 내는 고도로 발달된 식품이다. 김치는 100 g당 9~18 kcal의 저열량 식품으로서 식이섬유소 및 비타민 A, C, B군, 칼슘, 철, 인, 나트륨, 칼륨 등의 무기질 공급원이 되고 있으며(52), 부재료의 특성에 따라 캡사이신과 진저롤, 알릴화합물, 필수지방산 등이 함유된 식품으로 알려져 있다(72). 최근에는 김치의 식이섬유소와 김치속의 재료인 마늘, 생강, 고추 등의 항돌연변이 활성이 알려져 대장암, 빈혈, 동맥경화 등(8, 38) 중요한 영양생리학적 작용에 대한 연구결과가 보고됨에 따라 국내에서만 아니라 국제적으로도 관심이 높아져 중요한 수출 품목이 되고 있다.

김치 발효는 원료 속에 존재하고 있는 여러 미생물에 의해 시작되는데, 김치의 발효 과정 초기에는 호기성 미생물의 수가 증가하다가, 발효 중간과정부터 혐기성 미생물의 수가 계속 증가하면서 호기성 미생물의 수는 감소한다. 김치의 발효에 관여하는 유산균은 *Lactobacillus* 속, *Leuconostoc* 속, *Pediococcus* 속, *Streptococcus* 속 등이 있으며(25), 발효 초기에는 *Leuconostoc* 속 등과 같은 이상젖산균(heterofermentative lactic acid bacteria)의 번식에 의해 발효가 시작되며 발효 중기 이후 pH가 4.0 이하로 낮아지면서 내산성이 강한 정상젖산균(homofermentative lactic acid bacteria)인 *Lactobacillus* 속 등이 빨리 증식하면서 많은 유기산을 생성하여 김치의 산패를 일으키며 효모에 의해 이취가 나고 연부현상이 나타난다(31, 43).

최근에는 김치의 기능성과 효능에 관한 연구들이 활발하게 진행되면서 김치발효과정에 관여하는 유산균에 대한 관심 또한 높아지고 있다. 김치발효과정에 관여하는 유산균은 유기산과 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해 되지만 안정성이 높은 bacteriocin과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 diacetyl 생성으로 인해 항균작용을 나타내며(37), 또한 면역기능 강화(61), 혈중 cholesterol 저하(28), 간 기능 항진작용(3), 항암작용(32), 항산화작용(36) 등의 다양

한 건강 증진 기능이 보고 되고 있다.

유산균은 자연계에 널리 분포하고 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 젖산을 생성하는 미생물로서 유제품, 육류, 야채 등의 다양한 발효 가공에 종균으로 사용되어지고 있으며, 식품의 보존성 향상뿐만 아니라 관능적 특성 및 영양적 가치에도 기여하고 있다. 식품에서 유산균에 의한 젖산발효는 상큼한 향과 맛을 내게하고 나아가 당, 유기산, 단백질 및 지방성분을 이용하여 독특한 향과 풍미성분으로 전환시켜 제품의 질 향상에 바람직한 역할을 하게 한다(54). 일반적으로 유산균은 Gram 양성, 무아포, 비 운동성으로서 간균 또는 구균의 형태를 가지며 DNA base의 G+C조성은 50 mol% 미만이며, 통성 혐기적 배양특성, 까다로운 영양 요구성, 내산성의 특징을 가진다. 유산균은 cytochrome과 같은 porphyrin 화합물을 합성하지 못해 전자 전달 인산화 반응이 아닌 기질수준의 인산화 반응에 의해 에너지를 생산한다. 자연계에 널리 분포되어 있으며 특히 우유 및 유제품, 인간과 동물의 구강 및 소화기관, 채소류, silage, 발효식품 등에서 주로 발견된다(56). 지금까지 밝혀진 유산균은 300~400여 종에 달하며 그 중 약 20 종류 정도의 유산균이 주로 발효유 및 발효 산업에 이용되고 있다(71).

유산균은 Orla-Jensen(1919)에 의해 형태, 발효형식, 생육조건 등을 통해 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* 4개 속으로 분류 되었다가 Schleifer와 Ludwig(1995)에 의해 *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* 속으로 재분류되었다(58). 유산균의 가장 큰 특징은 유산을 생산하는 것이며 이는 균주에 따라 두 가지의 발효 방식을 거친다. Homo-lactic 형은 Embden-Meyerhof-Parnas pathway를 거쳐 최종 산물로 lactic acid를 만들어내며 이와 다르게 최종산물로 ethanol, acetate, CO<sub>2</sub>와 함께 lactic acid를 만들어내는 6-phosphogluconate/phosphoketolase pathway 방식을 거치는 hetero-lactic형이 있다. Homo type 유산균에는 *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* 속과 더불어 group I과 II lactobacilli가 속한다. 그러나 *Lactobacillus casei* 계열인 group II lactobacilli와 *Pediococcus* 속은 obligate homo 형인 반면에, 생육조건에 변화가 생기면 facultative hetero 발효형식을 나타낸다. Hetero type 유산균에는 *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* 속과 group III의 lactobacilli가 해당된다(13).

유산균은 오랫동안 발효유제품의 스타터로 이용되어 왔으며 여러 가지 프로바이오틱 기능성이 알려지기 시작하면서 식품 뿐만 아니라 의약, 화장품 및 사료 분야까지 확대되어 사용되고 있다.

프로바이오틱(Probiotics)이란 용어는 항생물질(antibiotics)에 대비되어 사용되는 말로서“Pro”와 ”bios”의 그리스어의 합성어로 “생명을 위하여(for life)”란 뜻으로부터 유래되었다(21). 그 이후 여러 과학자들에 의해 몇 차례의 수정을 거쳐 정의가 추가로 제안되었다. 1989년 Fuller는 프로바이오틱의 정의를 “장내미생물 균총을 증진시킴으로써 숙주에 유익한 효과를 주는 살아 있는 미생물 제제”로 재정립하였고, 1992년 Havenaar(26) 등은 “숙주의 장내 균총의 능력을 개선시킴으로서 숙주의 건강에 유익한 효과를 주는 단일 혹은 복합형태의 살아 있는 미생물 제제”로 정의 하였다.

현재 프로바이오틱으로 이용되고 있는 미생물은 *Lactobacillus*속(*L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. lactis*), *Bifidobacterium*속(*B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. adolescentis*), *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bacillus* 일부, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* 및 효모 *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*가 있다(27, 64). 이 중 가장 많이 연구되며 이용되는 유산균은 장내 균총의 균형 유지, 유해 세균의 증식 억제, 장내 상피 세포 보호, 독성 물질의 흡수 저해, 설사 예방, 항암 작용, 유당 불내증의 완화, 콜레스테롤 저하, 항알레르기 효과, *Helicobacter pylori* 의 억제효과 등 다양한 프로바이오틱 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다(15, 39, 48, 65). 이러한 프로바이오틱 유산균의 선발을 위한 이론적인 근거는 안전성, 기능성 측면(생존성, 정착성, 서식성, 항미생물제 생성능, 면역 증강능, antigenotoxic 활성, 병원성 세균의 억제능), 기술적 측면(관능적 특성, 안정성, bacteriophage 저항성, 제조 과정 중의 생존성), 그리고 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로서 장내에서 생존력이 커야한다는 것 등을 들 수 있다(1, 9, 43, 69).

산업적 이용을 위한 프로바이오틱 유산균의 선발 시 고려할 사항은 내산성 및 내담즙성, 장내 세포에의 정착성 및 서식성, 분변에서의 검출능, 면역 증강능, 항돌연변이원성, 콜레스테롤 저하능, 항암 및 항종양 활성, 병원성 세균의 생육 억제능, 그리고 안전성 등이 포함된다(22, 55). 프로바이오틱스의 바람직한 특성을 요약하면 Table 1과 같다(29).

프로바이오틱 생균으로서 가져야할 여러 가지 특성 중 하나가 생존력이 높아야 한다는 점이다. 프로바이오틱 유산균의 위장 통과와 장내 정착성을 용이하게 하기 위해서는 내산성과 내담즙성을 요구하게 된다. 구강을 통하여 섭취되는 균은 위와 십이지장을 통과하여 최종 목적지인 장에 도달하기까지 여러 물리적, 화학적 방해로 받게 된다.

순수한 위액의 pH는 1.4~2.0 정도로 거의 대부분의 미생물은 여기에서 사멸하게 된다. 하지만 섭취한 음식물들의 완충작용으로 인해 다소 pH가 높아 pH 2.5 정도의 위액의 산성 조건을 견뎌내더라도 궤장에서 십이지장으로 분비되는 담즙산에 의한 생육 저해 또한 극복해야 한다(20, 42). 프로바이오틱 유산균의 내산성 기작은 명확히 규명되지 않았지만 일반적으로 원형질막에 결합되어 있는 H<sup>+</sup>-ATPase 활성화 및 함량과 관계되어 있는 것으로 알려져 있다.(29)

모든 프로바이오틱이 장내에서 생리 활성을 발휘하기 위해서는 장내세포에 정상적으로 부착하여 집락을 형성할 수 있어야 한다(50). 현재 유산균주의 장내 점착능에 대한 연구는 인체 장내 상피세포 계열인 Caco-2 세포와 HT-29 세포주 등을 이용하여 프로바이오틱 유산균의 부착능 연구가 이루어지고 있다. 특히 Caco-2 세포는 *in vitro* 조건에서 형태적이고 기능적인 분화를 일으키며, 또한 polarization, 기능성 췌자연(brush border), 그리고 장용모 침단에서 분비하는 hydrolase 등의 성숙한 enterocyte 특성을 가지고 있어 인체 장내세포의 조직과 기능성 연구에 광범위하게 사용되고 있다(11). 유산균이 점막세포와 결합하는데에는 유산균의 ligand와 특정 수용체와의 상호작용이 필요하기 때문에 인체 장내의 Caco-2 세포와 HT-29 세포는 실제적으로 유산균과 바이러스의 장내 정착을 연구하는데 있어 가장 유용한 모델이다. 일반적으로 부착능력은 유산균과 상피세포 사이의 흡인력 및 반발력과의 상호 작용의 소산이라고 할 수 있다. 세포 정착능은 세포의 표면 접촉 등을 포함한 다단계 과정으로 단독적인 요소에서 이루어지는 것이 아니라 세포간의 접촉과 세포막의 구성과 구조에 의한 영향, 그리고 세포 표면에 의한 영향 등 다양한 요소에 의해 이루어진다고 보고되고 있다(54). 따라서 세포 표면 소수성과 응집성 및 전기적 이동 등 주로 물리, 화학적 특성에 대한 연구가 이루어져 왔으나(5, 14), 이러한 보고들은 연구자에 따라 상반된 결과를 포함하고 있어 이러한 물리, 화학적 특성과 균의 부착능력의 관계는 보다 다양한 검토가 필요한 실정이다.

질병예방 및 치료의 목적으로 사용되고 있는 항생제는 매년 그 사용빈도와 농도가 증가하고 있고, 무분별한 항생제 오·남용으로 인해 내성균주가 증가하여 오히려 질병 예방 및 치료에 문제점이 되고 있다. 최근 인체 및 동물 등을 통하여 항생제에 노출되는 빈도가 증가함에 따라 내성유전자의 확산이 염려되는 상황이며, 근래에 문제가 되고 있는 *Enterococcus* spp.은 장내 세균총의 균형을 개선하며, 사람과 동물의 장염의 치료 등을 위한 프로바이오틱으로 알려져 왔지만, 이 세균이 대부분의 현재 사용되고 있는 항생제에 내성을 가지게 되어 균혈증, 심내막염 등을 유발시키는 기회감염 세균

으로 인식되기 시작했다. 따라서 프로바이오틱 유산균의 항생제 감수성을 조사하는 것은 항생제를 복용하는 환자에 대하여 적절한 유산균 선택에 올바른 정보를 제공하여 내성유전자의 확산방지에 도움이 될 수 있으며 아울러 균주별 항생제에 대한 선택적 내성은 균주별 선택적 차별화에도 도움이 된다(29).

유산균은 장내의 바람직한 미생물로서, 오래 전부터 식품에 사용되어 왔으며 보편적으로 안전한 GRAS (generally recognized as safe) 미생물로 인식되고 있다. 그러나 유산균을 프로바이오틱으로 이용하기 위해서는 안전성 측면에 대한 연구의 필요성이 증가되고 있다. 이미 유럽에서는 새로운 식품으로서 프로바이오틱 유산균, prebiotics, 유전자 조작 세균 등을 사용하고자 할 때에는 안전성 측면에 대한 선결 조건으로서 급성 독성(acute toxicity)과 관련된 기초적인 자료를 요구하고 있으며, 그 이외에도 변이성, 또는 발암성 등이 없어야 하고, 더불어 plasmid의 세포 간 이동 없이 안정해야 한다. 그 이외에도 프로바이오틱 유산균의 경우 장내 점질성 glycoprotein을 분해 하지 않아야 치료용으로 안전하게 사용할 수 있다(17).

본 연구는 최근 몇 년 동안에 프로바이오틱에 대한 관심이 증가하는 추세이며, 특히 영양 생리학적 기능이 우수한 것으로 알려진 유산균의 프로바이오틱에 대한 관심이 증가함에 따라, 우리나라 전통 발효 식품인 김치로부터 분리된 *Lb. buchneri* MS와 *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* NO1, *Leuc. citreum* GJ7, *Leuc. citreum* GR1, *Leuc. citreum* C2, *Leuc. mesenteroides* PH12, *Leuc. mesenteroides* DM1, *Leuc. kimchii* GJ2 및 *P. pentosaceus* MP1을 포함한 김치유산균 10종을 대상으로 프로바이오틱으로서 갖추어야 할 기본 특성인 내산성과 인공위액 저항성을 통해 장내 생존성을 확인하고, Caco-2 세포와 HT-29 세포를 이용하여 장내 부착능을 확인함과 동시에 소수성과 응집성, 효소활성, 항생제 감수성 등의 실험을 통해 그 특성을 알아보고, 종합적으로 우수한 균주의 프로바이오틱으로서의 이용 가능성을 알아보기 위하여 실시 하였다.

**Table 1. Desirable properties of probiotic bacteria**

<b>Health and clinical properties</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>· Human origin</li><li>· Resistance to acid and bile</li><li>· Adherence to human intestinal cells</li><li>· Colonization of the human gut</li><li>· Production of antimicrobial substances</li><li>· Antagonism against cariogenic and pathogenic bacteria</li><li>· Safe for human consumption</li><li>· Clinically validated health effects</li></ul>
<b>Stability and technical properties</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>· Ability to maintain verified viability</li><li>· Maintenance of good flavor and aroma profile after fermentation</li><li>· Maintenance of mild acidity throughout storage: good</li><li>· Maintenance of colonizing properties throughout processing acidity profile and storage</li><li>· Development of good storage stability in fermented products</li><li>· Stability after freeze drying and other drying methods</li><li>· Accurate strain identification</li><li>· Dose-response data for required effects</li></ul>

The table has been adapted from the Jung, H. K.(2001)(29)

## 제 2 장 실험 재료 및 방법

### 1. 사용균주 및 배지

실험에 사용한 균주들은 본 실험실에서 개발된 10종의 균주와 American Type Culture Collections(ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 구입한 1종으로 Table 2와 같다. 모든 균주는 De Man Rogosa Sharpe (MRS; Difco Laboratories) 액체배지에 배양한 후 대수기에 있는 배양액에 glycerol이 25%(v/v)가 되게 첨가하여 -70°C에서 보관하였으며, 실험에 사용할 경우 10종의 균주는 5 mL MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 계대하여 사용하였고, *Lb. buchneri* MS는 5 mL MRS 액체배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 계대하여 사용하였다.

내산성 및 인공위액 저항성과 장내부착실험에 사용된 exopolysaccharides (EPS)를 생성하는 균주의 EPS 생성을 위해서 균주를 5 mL MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 sucrose 액체 배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, dipotassium phosphate 5 g, diammonium citrate 5 g, sucrose 50 g/L, pH 7.0)에 2차 계대하여 30°C에서 48시간 배양하여 사용하였다.

### 2. 내산성 및 인공위액 저항성 측정

분리균주의 산 저항성 시험으로 우선 단순 산성 pH에 대한 내성의 측정은 1.0 N HCl을 사용하여 pH 2.5으로 조정한 0.05 M sodium phosphate에서 시행하였다(51). 인공위액 하에서의 저항성은 체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위해 인공위액을 조제하여 실시하였다. 인공위액의 조제는 Kobayashi 등의(41) 방법을 일부 변형하여 1.0 N HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정한 MRS 액체배지에 pepsin (Sigma Co., USA)을 1,000 unit/mL 되도록 첨가하였다.

김치로부터 분리된 9종의 유산균과 프로바이오틱 균주로 이용되고 있는

*Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103을 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였고, *Lb. buchneri* MS는 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 원심분리 (9,950×g, 5 min)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수한 다음 pH 2.5의 0.05 M sodium phosphate 용액과 인공위액을 각각 상정액과 동량으로 첨가하여 30°C에서 2시간 배양하였다. 2시간 배양 후 0.05 M sodium phosphate 용액과 인공위액으로 처리된 유산균을 멸균수로 10배씩  $10^1 \sim 10^7$ 까지 희석한 후 MRS 고체배지에 100 μL 도말하여 배양하였다. 30°C에서 48시간 배양 후 형성된 colony의 수를 측정하여 내산성과 인공위액에 대한 저항성을 확인하였다. 또한 EPS생성균주의 EPS생성 여부에 따른 내산성 및 인공위액 저항성 비교를 확인하기 위해서 sucrose 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 EPS를 생성한 균주를 원심분리(9,950×g, 5 min, 4°C)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수한 후 상기의 방법대로 실험 하였다. 실험의 대조군은 10종의 김치 분리 유산균과 *Lb. rhamnosus* GG를 0.05 M sodium phosphate (pH 2.5) 용액과 인공위액 대신 MRS 액체배지를 사용하여 30°C에서 2시간 배양한 후 측정된 생균수로 하였다.



Table 2. List of lactic acid bacteria (LAB) used in the experiment

No.	Strains	Medium	Incubation temp.(°C)	Reference
1	<i>Lb. buchneri</i> MS	MRS <sup>1)</sup>	30°C	(10)
2	<i>Lb. plantarum</i> AF1	MRS	30°C	(70)
3	<i>Lb. plantarum</i> NO1	MRS	30°C	(45)
4	<i>Leuc. citreum</i> GJ7	MRS	30°C	(6)
5	<i>Leuc. citreum</i> GR1	MRS	30°C	(7)
6	<i>Leuc. citreum</i> C2	MRS	30°C	this lab
7	<i>Leuc. mesenteroides</i> PH12	MRS	30°C	this lab
8	<i>Leuc. mesenteroides</i> DM1	MRS	30°C	this lab
9	<i>Leuc. kimchii</i> GJ2	MRS	30°C	(35)
10	<i>P. pentosaceus</i> MP1	MRS	30°C	this lab
11	<i>Lb. rhamnosus</i> GG ATCC 53103	MRS	30°C	(63)

<sup>1)</sup> MRS: De Man Rogosa Sharpe

### 3. 장내 부착능 실험(*in vitro*)

#### 1) 세포 배양

실험에 사용한 인체 결장암 세포주 Caco-2 와 HT-29 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB, Korea)로부터 분양받아 사용하였다. Caco-2 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Hyclone, Logan, Utah, USA)으로 배양하고, HT-29 세포는 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640; Hyclone, Logan, Utah, USA)으로 배양하였다. 각각의 배지에는 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone), 1% streptomycin/penicillin (10,000 IU/ml, Hyclone), 1% non-essential amino acid (Hyclone), 10 mM HEPES, 1 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate (Hyclone)을 첨가하였다. Caco-2, HT-29 세포주는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 조건으로 배양하였다. 장내 부착능 실험은 24 well tissue culture plates에 5×10<sup>5</sup> cells/well로 seeding한 후 격일로 배지를 바꿔주었으며 cell이 완전하게 monolayer를 형성될 때까지 15일 동안 분화시켜 사용하였다. 장내부착능에 사용한 Caco-2 세포의 passage는 24~36 이었으며, HT-29 세포의 passage는 48~55까지였다.

#### 2) 장내 부착 실험 방법

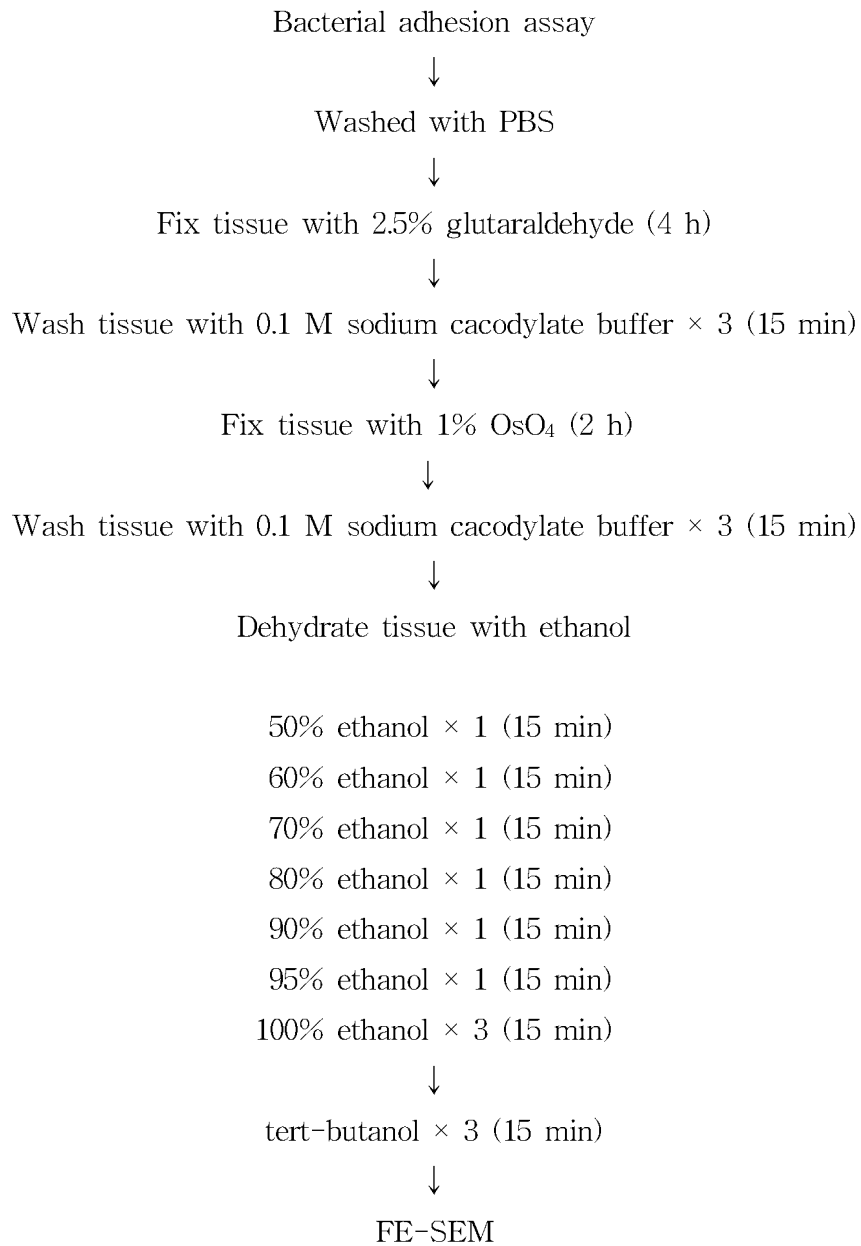
장내 부착능 실험을 위해 15일 동안 배양하여 24 well tissue culture plates에서 monolayer를 형성한 Caco-2 세포를 부착실험 1시간 전에 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)으로 2회 세척한 후 항생제와 FBS가 들어 있지 않은 DMEM 배지를 각 well에 0.5 mL씩 넣어 주었다. 김치로부터 분리된 9종의 유산균은 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였고, *Lb. buchneri* MS는 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수한 후 PBS로 3번 세척하였다. 여기에 유산균은 균수에 따른 부착성의 변화를 측정하기 위하여 10<sup>7</sup> ~10<sup>9</sup> CFU/mL의 범위로 준비하여 항생제와 FBS가 들어있지 않은 DMEM 배지에 현탁한 후 각 well에 넣어주었다. 이를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> /95% air 조건하에서 1시간 동안 배양한 후 부착하지 못한 균을 제거하기 위해 PBS로 3회 세척하였다. Gram염색 시료는 24 well tissue culture plates에 cover slip을 넣고 5×10<sup>5</sup> cells/well로 seeding한 후

장내 부착 실험한 cover slip이 들어있는 각 well에 배탄을 1 mL씩 넣고 5분 동안 세포가 cover slip에 고정되도록 하여 Gram 염색 후, 광학 현미경으로 관찰하였다. 또한 plate counting을 위해, 각 well마다 0.05% triton X-100 1 mL를 넣고 10분 동안 흔들어 주었다. 이를 연속 10배 희석하여 MRS agar에 도말하고 30°C에서 24~48시간 배양하여 부착율을 계산하였다. Positive control로 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103은 5 mL MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 위와 같은 방법으로 실험하였다. Caco-2 cell에 대한 유산균의 부착율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{부착율(\%)} = (\text{viable cell count} \div \text{initial cell count}) \times 100$$

### 3) Scanning electron microscopy (SEM)

SEM을 위한 전처리 과정은 cover slip위의 Caco-2 세포에 부착된 유산균을 PBS로 3회 세척한 후 2.5%(v/v) glutaraldehyde (pH 7.4)로 4시간 동안 전고정 시켰다. 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)로 15분씩 3회 세척하고 1%(v/v) OsO<sub>4</sub> (Sigma)를 넣어 2시간동안 후고정 하였다. 다시 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)로 15분씩 3회 세척하고 50, 60, 70, 80, 90, 95%까지 에탄올 농도를 순차적으로 높여 탈수과정을 각 15분씩 거친 다음, 최종 100% 에탄올에 대해 3번의 탈수과정을 거쳤다. 마지막으로 tert-butanol을 20분씩 3번 치환하는 과정을 거쳐 FE-SEM (field emission scanning electron microscope S-4700, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다(Fig 1).



**Figure 1. Scanning electron microscopy (SEM) preparation protocol**

## 4. 소수성 측정(Cell Surface Hydrophobicity, CSH)

세포 표면 소수성은 Rosenberg 등의(66) 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 김치로부터 분리된 9종의 유산균을 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였고, *Lb. buchneri* MS는 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 배양액을 원심분리(9,950×g, 4 min)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수하였다. PBS (pH7.4)로 2회 수세한 후, PBS를 이용하여 OD<sub>600</sub>이 0.5가 되도록 조정된 유산균 현탁액 1.2 mL에 0.2 mL hexadecane (Sigma)을 첨가하여 2분동안 vortex하였다. 15분 동안 실온에서 방치한 뒤 수용액 층을 OD<sub>600</sub>에서 흡광도를 측정한 후 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{CSH (\%)} = (A_0 - A) \times 100 / A_0$$

$$A_0 = \text{초기 흡광도} \quad A = \text{최종 흡광도}$$

## 5. 응집성 측정

분리된 유산균의 세포 응집성은 Del Re 등의(16) 방법을 일부 변형하여 실험하였다. 김치로부터 분리된 9종의 유산균은 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였고, *Lb. buchneri* MS는 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 배양액을 원심분리(9,950×g, 4 min)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수하였다. PBS (pH7.4)로 2회 수세한 후, PBS를 이용하여 OD<sub>600</sub>=0.5로 조정된 유산균 현탁액 2 mL를 원심분리(9,950×g, 4 min)한 후 PBS에 재현탁하였다. 37°C에서 2시간동안 배양한 뒤 상등액 1 mL를 취하여 OD<sub>600</sub>에서 흡광도를 측정한 후 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Aggregation} = 1 - (\text{O.D. upper suspension} / \text{O.D. total bacterial suspension}) \times 100$$

## 6. 효소활성 측정

분리균주의 효소 활성을 측정하기 위해서 API ZYM kit (BioMerieux, France)를 사용하였다. 실험을 위해 먼저 김치로부터 분리된 9종의 유산균은 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였고, *Lb. buchneri* MS는 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 배양액을 원심분리(9,950×g, 4 min, 4°C)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수한 후 멸균수에 균을 풀어 현탁액을 준비하였다. 현탁액 500 µL를 5 mL suspension medium에 풀어준 후 5~6 Mcfarland (BioMerieux.)로 탁도를 맞추었다. 스트립을 준비하여 회석한 유산균을 ZYM kit의 각 cupule에 65 µL씩 분주한 뒤, 37°C에서 4시간동안 배양하였다. 그리고 표면활성 증가와 용해를 돕기 위한 ZYM-A (BioMerieux)와 ZYM-B (BioMerieux)시약을 각각의 cupule에 한 방울씩 떨어뜨린 후 밝은 곳에서 약 5분간 반응시킨 후 색의 변화 정도를 관찰하며 효소활성을 측정하였다. 색의 변화 정도에 따라 0~5까지의 값으로 표시할 수 있으며, 0 (=0 nanomoles)은 음성반응, 5 (≥40 nanomoles)는 최대 강도의 반응이고 4, 3, 2, 1은 각각 30, 20, 10, 5 nanomoles의 중간 값을 나타내며, 3 이상이면 양성으로 판정하였다.

## 7. 항생제 감수성 측정

김치로부터 분리된 10종의 유산균 항생제 감수성은 액체 배지 희석법(Broth microdilution method)을 이용하여 측정하였다. 실험에 사용된 항생제는 총 8종으로 ampicillin (Sigma), gentamicin (Sigma), kanamycin (Sigma), streptomycin (Sigma), erythromycin (Sigma), clindamycin (Sigma), tetracycline (Sigma), chloramphenicol (Sigma)이며, 이들 항생제는 규정된 용매에 녹인 후 사용하였다. 항생제 감수성을 측정하기 위한 배지는 0.5% Dextrose를 첨가한 Muller-Hinton (MH) broth에 항생제를 각 농도별로 조절하여 첨가하였다. 항생제의 최소 생육저해 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위해 9종의 유산균은 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였고, *Lb. buchneri* MS는 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 배양액을 원심분리(9,950×g, 4min)하여 균체를 회

수 한 후 0.5% Dextrose가 함유된 Muller-Hinton (MH) broth에 현탁하여  $OD_{600}=0.4\sim 0.5$ 가 되도록 한 후 현탁액을 MH broth에 1:10 희석하고, 항생제를 단계별로 희석하여 준비한 배지에 균주의 현탁액을 접종한 후 혐기적인 조건하에서 30℃에서 12시간동안 배양하였다. 감수성 여부 및 탁도는 600 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, 각각의 균주에 대한 감수성 해석은 European Food Safety Authority (EFSA, 2008)(19)를 참고하여 각각의 항생제가 첨가된 배지에서 균주가 증식하지 않는 최소 농도로 최소 생육저해 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 결정하였다.

## 제 3 장 결과 및 고찰

### 1. 내산성 및 인공위액 저항성 측정

유산균이 프로바이오틱으로서 역할을 수행하기 위해서는 pH 3.0 이하의 강한 산성 조건의 위장관을 통과하여 장까지 도달하여 생존해야 한다. 지금까지 유산균의 내산성 실험은 위액에 대한 인공위액 및 PBS 등의 buffer를 이용한 *in vitro*상의 간접적인 방법과, *in vivo*상에서 직접 생존율을 확인하는 방법이 이용되어 왔다. 그러나 위액에 의한 미생물 사멸작용은 염산에 의한 낮은 pH가 주요 원인임이 밝혀졌으며, *in vitro*의 실험 결과와 *in vivo*에서의 결과가 거의 유사하다고 보고됨에 따라 미생물의 생존은 그들의 낮은 pH에 대한 저항성에 따른 것으로 알려지고 있다(60). 따라서 본 실험에서는 김치로부터 분리된 10종의 김치유산균에 대하여 단순 산성 pH에 대한 내성을 측정하기 위하여 pH 2.5로 조정된 0.05 M sodium phosphate 용액과 위액에 대한 내성을 알아보기 위하여 pepsin (1,000 unit/mL)이 함유된 인공위액을 제조하여 저항성 시험을 실시하였다. 내산성 및 인공위액 저항성 확인은 생균수를 측정하여 비교한 것으로, 생균수 측정은 3회 반복 실험하여 측정된 것을 평균치로 나타내었다. 그리고 그 저항성의 정도를 비교하기 위해 프로바이오틱 균주로 많이 사용되고 있는 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103을 대조균으로 사용하였다.

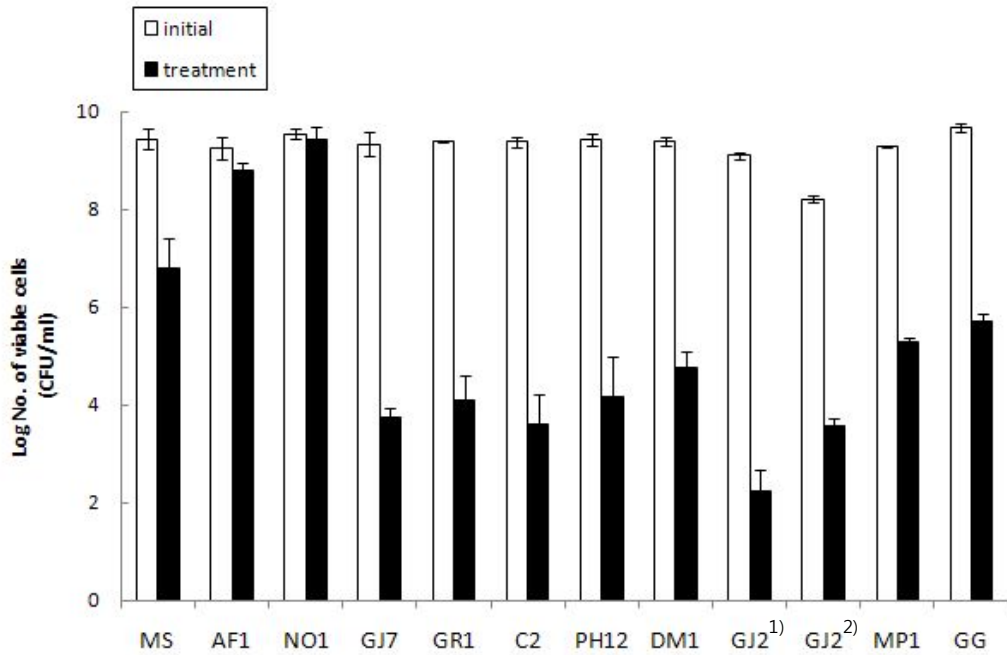
먼저 내산성 실험결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 *Lb. plantarum* AF1과 *Lb. plantarum* NO1은 0.05 M sodium phosphate 용액에서 2시간이 지난 후에도 사멸하지 않고 대조구로 사용한 *Lb. rhamnosus* GG보다 높은 생존율을 나타냈으며, 특히 *Lb. plantarum* NO1의 경우에는 초기균수( $10^9$  CFU/mL)의 80% 이상의 생균수를 유지하며 높은 저항성을 나타냈다.

인공위액에 대한 저항성은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Lb. rhamnosus* GG의 생존율보다는 낮은 값을 나타내었지만 *Lb. plantarum* NO1과 *Lb. plantarum* AF1이 초기균수의 70% 이상의 높은 생존율을 나타냈고, 특히 *Lb. plantarum* NO1의 경우 96%의 생존율로 초기 균수( $10^9$  CFU/mL)의 90% 이상의 높은 저항성을 나타냄으로써 위에서



생존하여 장으로 이동할 수 있을 것이라 사료된다. 한편, EPS 생성균주인 *Leuc. kimchii* GJ2의 EPS 생성 여부에 따른 내산성 및 인공위액 저항성을 확인한 결과 sucrose 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성한 경우가 MRS 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성하지 않았을 때의 경우보다 내산성은 1.8배, 인공위액의 경우 2.1배 높은 생존율을 보였다. 이는 위내에서의 생존 가능성이 균주의 EPS 생성으로 인한 균체 보호막 작용에 의한 결과라고 생각되어진다.

지금까지 산에 대한 강한 내성을 지님으로써 프로바이오틱스로 기능을 할 수 있는 유산균들에 대한 많은 연구들이 수행되어 보고되고 있으나, 이들 균주들의 분리원이 동물의 장이나 분변에서 분리한 것이고, 식품에서 분리한 경우도 대부분 발효유제품에서 분리한 것이다. 김치에서 분리한 유산균의 경우로 Lee 등(43)의 보고가 있지만 인공위액을 처리했을 때 초기 균수  $10^9$  CFU/mL에서 1~2 log cycle이 감소한  $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL을 나타내며 비교적 낮은 생존율을 보였다. 또한 Kim 등(34)에 의하면 프로바이오틱 생균의 pH에 대한 영향으로, pH 4.0 에서 *Lactobacillus* 균주는 약 1% 내외의 생존율을 보인다고 보고하였다. 공복 시 위내 환경은 pH 2.0 이하의 강산성으로 음식물의 섭취량이나 종류에 따라 차이가 있겠지만 음식물이 위를 통과하는데 2~3시간이 소요되며 위산의 pH가 음식물에 의해 희석된다는 점을 감안할 때 *Lb. plantarum* AF1과 *Lb. plantarum* NO1은 프로바이오틱 유산균으로서의 가능성이 보여진다.

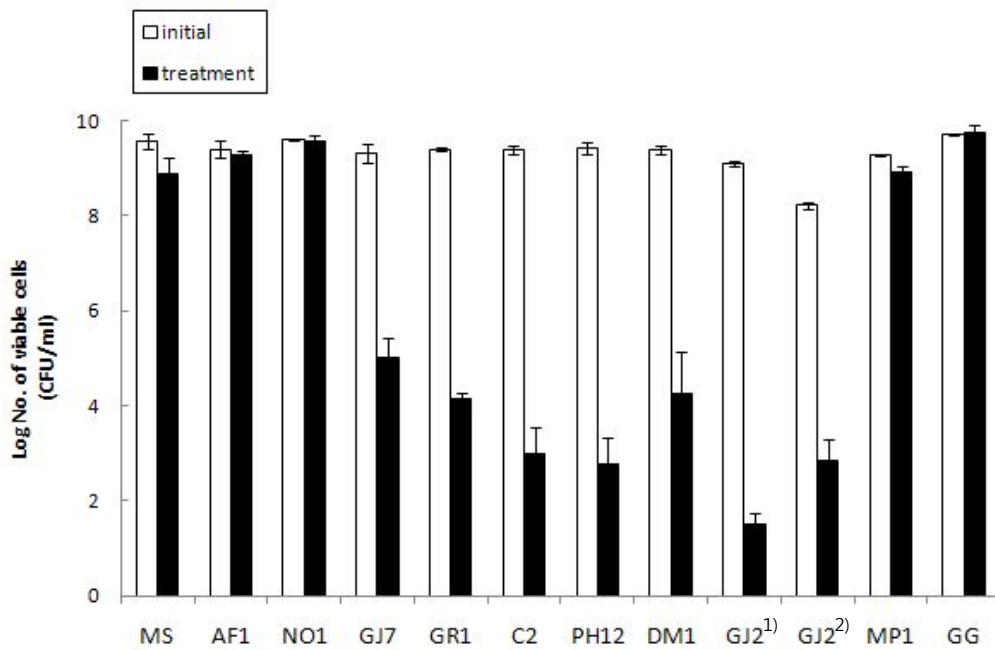


**Figure 2. Acid tolerance of the LAB in 0.05 M sodium phosphate (pH 2.5)**

All values were mean  $\pm$  S.D. (n=3)

<sup>1)</sup> Preculture in MRS medium at 30°C for 24 hours

<sup>2)</sup> Preculture in sucrose medium at 30°C for 48 hours



**Figure 3. Survival of the LAB in the artificial gastric juice (pH 2.5)**

All values were mean  $\pm$  S.D.(n=3)

<sup>1)</sup> Preculture in MRS medium at 30°C for 24 hours

<sup>2)</sup> Preculture in sucrose medium at 30°C for 48 hours

## 2. 장내 부착능 (*in vitro*)

### 1) Caco-2 세포주에 대한 부착능

프로바이오틱 유산균이 위와 십이지장을 통과하여 최종목적 부위인 장에 도달하였을 때 장내 상피세포에 정상적으로 부착이 되어야 그 기능을 제대로 발휘 할 수 있다. *in vitro*에서 프로바이오틱의 활성을 측정하는 것은 유산균의 사람에게 대한 영향 및 효과를 정확하게 반영할 수는 없으나, 유산균의 프로바이오틱으로서의 가능성을 평가하기 위해서 *in vitro* 상의 점액층 또는 상피세포주에 대한 부착을 확인하는 것이 우선적이다(18). 따라서 본 실험에서는 Caco-2 세포를 이용하여 김치로부터 분리된 10종의 유산균에 대하여 초기 접종 균수에 따른 부착능의 변화를 관찰하기 위해 균 현탁액을 희석 또는 농축하여  $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL 범위에서 부착능을 측정하였으며, 부착능의 정도를 비교하기 위해 프로바이오틱 균주로 많이 사용되고 있는 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103을 대조균으로 사용하였다. 또한 EPS 생성균주의 EPS 생성 여부에 따른 부착능을 비교하기 위해 sucrose 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성한 경우와 MRS 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성하지 않았을 때의 부착능을 각각 측정하였다. 그 결과 각 균주마다 접종되는 균수가 많을수록 부착되는 균수가 높아지는 것으로 나타났으며, 초기 접종 균수에 따른 부착 균수의 비율은 초기 접종 균수의 증가와 상관없이 대부분의 균주에서 일정하게 나타났다(Table 3, 4, 5). 한편, EPS 생성균주인 *Leuc. kimchii* GJ2의 EPS 생성 여부에 따른 부착능을 확인한 결과 sucrose 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성한 경우가 MRS 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성하지 않았을 때의 경우보다 초기균수  $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL 모든 범위에서 부착능이 높게 나타났으며, 부착율의 평균이 10배 이상 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 10종의 김치 유산균의 초기 균수  $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL에 해당하는 각각의 부착율을 평균치로 계산하였을 때 대조균으로 사용한 *Lb. rhamnosus* GG보다 부착율이 우수한 것으로 나타난 균주는 3종으로 *Lb. plantarum* NO1은 *Lb. rhamnosus* GG보다 1.5배가 높았고, *Leuc. kimchii* GJ2는 EPS 생성 시 2.3배가 높았으며, *P. pentosaceus* MP1의 경우에는 2.5배 높은 부착율을 보였다(Table 6). 이는 Gram 염색 후 현미경 관찰을 통해서도 이들의 부착율이 높은 수준임을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 초기 균수  $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL에서 *Lb. rhamnosus* GG보다 부착율이 우수한 것으로 나타난 2종의 유산균주의 SEM 관찰 결과

에서 *P. pentosaceus* MP1과 EPS 생성 시의 *Leuc. kimchii* GJ2는 서로 붙어서 부착된 모습을 보였고, MRS에서 전 배양되어 EPS를 생성하지 않았을 때의 *Leuc. kimchii* GJ2는 연쇄상으로 부착되어 있는 모습을 보였다(Fig. 5)

Tumola와 Salminen(65)에 의하면 Lactobacilli 유산균의 정착성은 각각의 균수에 의존한다고 보고하였으며, Lehto와 Salminen(46)은 Caco-2 세포에 결합된 균수는 첨가된 균수와 직접적인 연관성을 가지는데 Caco-2 세포에 결합된 유산균수는 첨가된 유산균수의 함수로서 직선적으로 증가한다고 보고하여 본 실험의 결과와는 상이한 것으로 나타났다. 장내 상피세포 및 점액층 표면에 유산균이나 병원성 미생물이 부착하는 것은 다양한 요인들의 상호작용에 의한 것으로 알려져 있으며, 현재까지 추정되고 있는 기작으로는 S-layer protein, lectin, lipoteichoic acid, adhesin, colonization factor 같은 표면 단백질의 상피세포 및 점액층에 대한 receptor-ligand 결합 또는 전자기적 결합, 소수 결합, passive 및 steric forces 등의 작용이 있으며(4, 49), 세포외다당에 의한 점액층의 다당류와의 망상구조 형성(2)등이 있다. 특히 EPS는 건조, 식균작용, 원생동물의 습식, 항생제, 독성화합물, 삼투압 스트레스 등과 같은 외부환경으로부터 자신을 보호하는 작용을 하기 때문에(30), 장내 부착능을 향상시키는데 중요한 요인으로 작용할 것으로 사료된다.

**Table 3. Adhesion of LAB to Caco-2 cell *in vitro* with  $10^7$  CFU/mL cell inoculation**

Strains	Initial counts (CFU/mL)	Adhered counts (CFU/mL)	Adhesion (%) <sup>1)</sup>
<i>Lb. buchneri</i> MS	$(2.19 \pm 0.13) \times 10^7$	$(1.01 \pm 0.45) \times 10^4$	0.05
<i>Lb. plantarum</i> AF1	$(2.07 \pm 0.23) \times 10^7$	$(1.59 \pm 0.93) \times 10^5$	0.77
<i>Lb. plantarum</i> NO1	$(2.23 \pm 0.18) \times 10^7$	$(3.75 \pm 1.50) \times 10^5$	1.68
<i>Leuc. citreum</i> GJ7	$(1.51 \pm 0.31) \times 10^7$	$(3.56 \pm 0.84) \times 10^4$	0.24
<i>Leuc. citreum</i> GR1	$(4.32 \pm 0.16) \times 10^7$	$(2.77 \pm 0.60) \times 10^5$	0.64
<i>Leuc. citreum</i> C2	$(2.08 \pm 0.15) \times 10^7$	$(6.98 \pm 1.87) \times 10^4$	0.34
<i>Leuc. mesenteroides</i> PH12	$(1.53 \pm 0.37) \times 10^7$	$(1.19 \pm 4.16) \times 10^5$	0.77
<i>Leuc. mesenteroides</i> DM1	$(3.00 \pm 0.38) \times 10^7$	$(5.94 \pm 1.12) \times 10^4$	0.20
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2 <sup>2)</sup>	$(1.57 \pm 0.22) \times 10^7$	$(2.34 \pm 1.50) \times 10^4$	0.15
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2 <sup>3)</sup>	$(1.70 \pm 0.33) \times 10^7$	$(4.68 \pm 1.74) \times 10^5$	2.75
<i>P. pentosaceus</i> MP1	$(2.80 \pm 0.48) \times 10^7$	$(8.16 \pm 1.77) \times 10^5$	2.91
<i>L. rhamnosus</i> GG	$(1.51 \pm 0.01) \times 10^7$	$(2.05 \pm 0.11) \times 10^5$	1.36

Wells with Coac-2 cells were inoculated with  $1.51 \times 10^7 \sim 4.32 \times 10^7$  viable cells of each bacterial cell suspension.

All values were mean  $\pm$  S.D.(n=3)

<sup>1)</sup> Adhesion to Caco-2 cells was done in triplicate

<sup>2)</sup> Preculture in MRS medium at 30°C for 24 hours

<sup>3)</sup> Preculture in sucrose medium at 30°C for 48 hours

**Table 4. Adhesion of LAB to Caco-2 cell *in vitro* with  $10^8$  CFU/mL cell inoculation**

Strains	Initial counts (CFU/mL)	Adhered counts (CFU/mL)	Adhesion (%) <sup>1)</sup>
<i>Lb. buchneri</i> MS	$(1.72 \pm 0.51) \times 10^8$	$(1.58 \pm 0.50) \times 10^5$	0.09
<i>Lb. plantarum</i> AF1	$(1.41 \pm 0.15) \times 10^8$	$(7.81 \pm 3.43) \times 10^5$	0.55
<i>Lb. plantarum</i> NO1	$(3.16 \pm 0.63) \times 10^8$	$(2.67 \pm 1.15) \times 10^6$	0.84
<i>Leuc. citreum</i> GJ7	$(1.47 \pm 0.25) \times 10^8$	$(2.82 \pm 0.72) \times 10^5$	0.19
<i>Leuc. citreum</i> GR1	$(1.21 \pm 0.02) \times 10^8$	$(9.06 \pm 0.58) \times 10^5$	0.75
<i>Leuc. citreum</i> C2	$(2.69 \pm 1.32) \times 10^8$	$(1.81 \pm 0.75) \times 10^6$	0.67
<i>Leuc. mesenteroides</i> PH12	$(2.00 \pm 0.55) \times 10^8$	$(5.50 \pm 1.56) \times 10^5$	0.28
<i>Leuc. mesenteroides</i> DM1	$(2.99 \pm 0.78) \times 10^8$	$(5.29 \pm 2.01) \times 10^5$	0.18
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2 <sup>2)</sup>	$(1.44 \pm 0.19) \times 10^8$	$(3.68 \pm 3.23) \times 10^5$	0.26
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2 <sup>3)</sup>	$(1.46 \pm 0.23) \times 10^8$	$(2.76 \pm 1.05) \times 10^6$	1.89
<i>P. pentosaceus</i> MP1	$(2.99 \pm 0.63) \times 10^8$	$(5.84 \pm 1.60) \times 10^6$	1.95
<i>Lb. rhanmnosus</i> GG	$(3.56 \pm 0.85) \times 10^8$	$(3.63 \pm 0.96) \times 10^6$	1.02

Wells with Coac-2 cells were inoculated with  $1.21 \times 10^8 \sim 3.56 \times 10^8$  viable cells of each bacterial cell suspension.

All values were mean  $\pm$  S.D.(n=3)

<sup>1)</sup> Adhesion to Caco-2 cells was done in triplicate

<sup>2)</sup> Preculture in MRS medium at 30°C for 24 hours

<sup>3)</sup> Preculture in sucrose medium at 30°C for 48 hours

**Table 5. Adhesion of LAB to Caco-2 cell *in vitro* with  $10^9$  CFU/mL cell inoculation**

Strains	Initial counts (CFU/mL)	Adhered counts (CFU/mL)	Adhesion (%) <sup>1)</sup>
<i>Lb. buchneri</i> MS	$(2.04 \pm 0.01) \times 10^9$	$(7.40 \pm 0.08) \times 10^5$	0.04
<i>Lb. plantarum</i> AF1	$(2.81 \pm 0.65) \times 10^9$	$(2.15 \pm 0.79) \times 10^7$	0.77
<i>Lb. plantarum</i> NO1	$(4.20 \pm 0.85) \times 10^9$	$(6.30 \pm 1.93) \times 10^7$	1.50
<i>Leuc. citreum</i> GJ7	$(2.89 \pm 0.58) \times 10^9$	$(7.18 \pm 2.42) \times 10^6$	0.25
<i>Leuc. citreum</i> GR1	$(2.95 \pm 0.23) \times 10^9$	$(5.10 \pm 2.60) \times 10^6$	0.17
<i>Leuc. citreum</i> C2	$(2.13 \pm 0.26) \times 10^9$	$(1.54 \pm 0.96) \times 10^7$	0.72
<i>Leuc. mesenteroides</i> PH12	$(2.72 \pm 1.27) \times 10^9$	$(9.16 \pm 3.21) \times 10^6$	0.34
<i>Leuc. mesenteroides</i> DM1	$(4.24 \pm 0.61) \times 10^9$	$(7.28 \pm 2.88) \times 10^6$	0.17
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2 <sup>2)</sup>	$(1.06 \pm 0.22) \times 10^9$	$(1.84 \pm 1.02) \times 10^6$	0.17
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2 <sup>3)</sup>	$(1.56 \pm 0.32) \times 10^9$	$(2.71 \pm 0.63) \times 10^7$	1.74
<i>P. pentosaceus</i> MP1	$(2.84 \pm 0.30) \times 10^9$	$(6.09 \pm 2.14) \times 10^7$	2.14
<i>Lb. rhanmnosus</i> GG	$(3.19 \pm 1.35) \times 10^9$	$(1.23 \pm 0.73) \times 10^7$	0.39

Wells with Caco-2 cells were inoculated with  $1.06 \times 10^9 \sim 4.24 \times 10^9$  viable cells of each bacterial cell suspension.

All values were mean  $\pm$  S.D.(n=3)

<sup>1)</sup> Adhesion to Caco-2 cells was done in triplicate

<sup>2)</sup> Preculture in MRS medium at 30°C for 24 hours

<sup>3)</sup> Preculture in sucrose medium at 30°C for 48 hours



**Table 6. Average adhesion rate of LAB to Caco-2 cell *in vitro***

Strains	Adhesion (%) <sup>1)</sup>
<i>Lb. buchneri</i> MS	0.06±0.02
<i>Lb. plantarum</i> AF1	0.70±0.32
<i>Lb. plantarum</i> NO1	1.34±0.51
<i>Leuc. citreum</i> GJ7	0.23±0.12
<i>Leuc. citreum</i> GR1	0.52±0.24
<i>Leuc. citreum</i> C2	0.58±0.36
<i>Leuc. mesenteroides</i> PH12	0.46±0.09
<i>Leuc. mesenteroides</i> DM1	0.18±0.06
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2 <sup>2)</sup>	0.19±0.12
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2 <sup>3)</sup>	2.13±0.74
<i>P. pentosaceus</i> MP1	2.33±0.81
<i>Lb. rhanmnosus</i> GG	0.92±0.14

All value were mean ± S.D.(n=3)

<sup>1)</sup> The adherent rate of lactic acid bacteria was meant as the average number of the adherent LAB per the Caco-2 cell lines.

<sup>2)</sup> Preculture in MRS medium at 30°C for 24 hours

<sup>3)</sup> Preculture in sucrose medium at 30°C for 48 hours

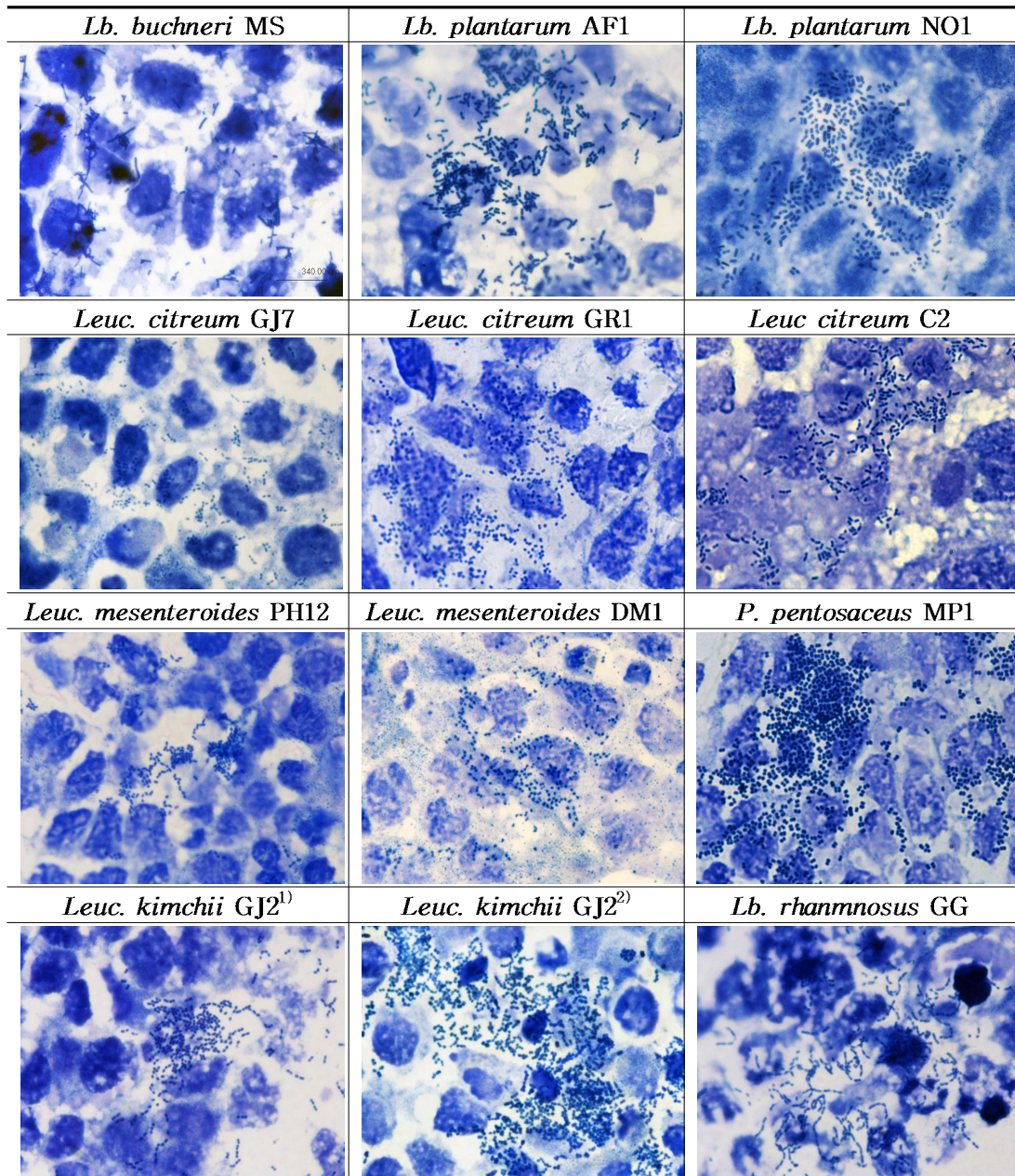


Figure 4. Adhesion of LAB to Caco-2 cell observed using light microscopy after Gram-stainig (magnification  $\times 1,000$ )

<sup>1)</sup> Preculture in MRS medium at 30°C for 24 hours

<sup>2)</sup> Preculture in sucrose medium at 30°C for 48 hours

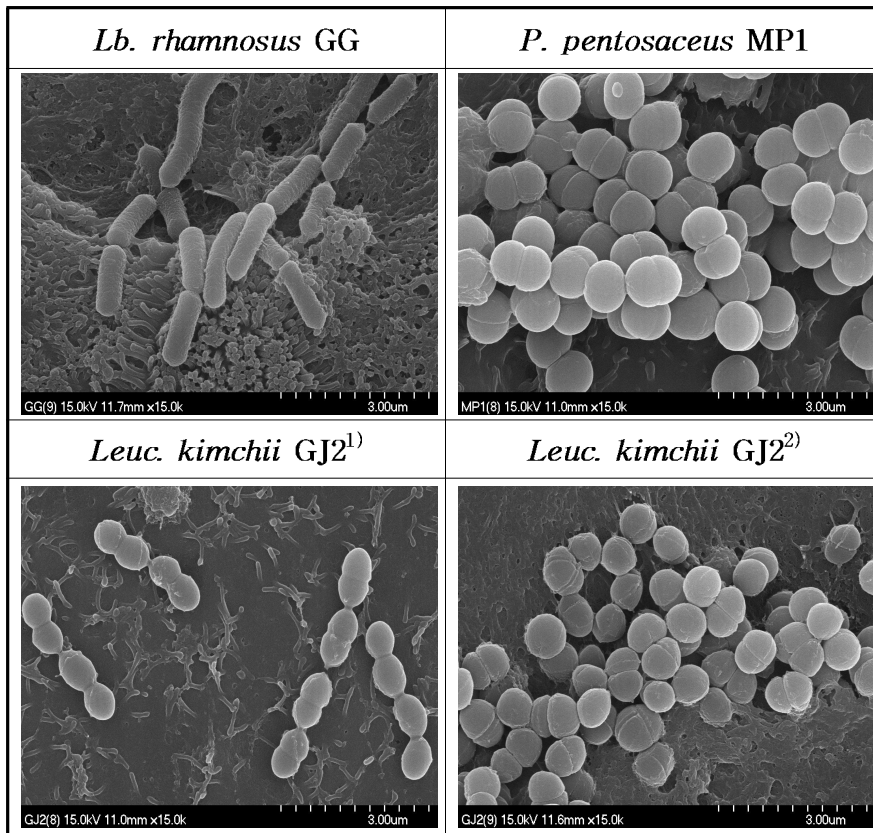


Figure 5. Scanned electron microscopic images of LAB on Caco-2 cell line ( $\times 15,000$ )

<sup>1)</sup> Preculture in MRS medium at 30°C for 24 hours

<sup>2)</sup> Preculture in sucrose medium at 30°C for 48 hours

## 2) HT-29 세포주에 대한 부착능

유산균의 장내부착능은 주로 Caco-2 세포를 사용해왔는데 최근 들어 실제 소장 및 대장에서 유산균이 노출되는 부위는 점액층에 해당되므로 분화과정을 거치는 동안 점액이 분비되는 HT-29 세포를 이용하여 Caco-2 세포에서 장내 부착능이 우수한 것으로 1차 선별된 *P. pentosaceus* MP1과 *Leuc. kimchii* GJ2의 장내부착능을 확인하였다 (Table 7). 그 결과 HT-29 세포주에서  $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL에 해당하는 각각의 초기 균수에 대한 부착 정도는 Caco-2 세포에서보다 더 낮은 수치를 나타냈고, HT-29 세포주에 대한 부착율은 대조구로 사용한 *Lb. rhamnosus* GG의 경우 Caco-2 세포에 대한 부착율보다 1.6~3.6배 정도 감소하는 것으로 나타났으며, 김치 유산균 *P. pentosaceus* MP1과 *Leuc. kimchii* GJ2는 Caco-2 세포에 대한 부착율보다 그 수치는 감소하였지만 *Lb. rhamnosus* GG보다 높은 부착율을 보였다. EPS 생성균주인 *Leuc. kimchii* GJ2의 EPS 생성 여부에 따른 HT-29 세포의 부착능을 확인한 결과 sucrose 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성했을 때가 MRS 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성하지 않았을 때의 경우보다 10배 이상의 높은 부착율을 보임으로써 Caco-2 세포에서의 부착능과 비슷한 결과를 나타냈다. Gopal 등(23)에 의하면 3종의 유산균 *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *B. lactis*와 positive control인 *Lb. rhamnosus* GG 및 negative control로 사용한 *Lb. bulgaricus* LB1의 부착능을 확인한 결과 Caco-2 세포주보다 HT-29 세포주에 대하여 전체적으로 2~3배 정도 부착능이 낮게 나타나 본 실험과 유사한 결과를 나타냈다.

Table 7. Adhesion of LAB to HT-29 cell *in vitro*

Strains	Initial counts (CFU/mL)	Adhered counts (CFU/mL)	Adhesion (%) <sup>1)</sup>
<i>P. pentosaceus</i> MP1	(2.10±0.21)×10 <sup>7</sup>	(1.91±0.13)×10 <sup>5</sup>	0.91±0.10
	(2.44±0.08)×10 <sup>8</sup>	(1.33±0.44)×10 <sup>6</sup>	0.85±0.15
	(2.02±0.35)×10 <sup>9</sup>	(2.38±0.19)×10 <sup>7</sup>	1.18±0.13
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2 <sup>2)</sup>	(1.43±0.09)×10 <sup>7</sup>	(1.03±0.28)×10 <sup>4</sup>	0.07±0.30
	(2.15±0.22)×10 <sup>8</sup>	(1.59±0.78)×10 <sup>5</sup>	0.09±0.03
	(1.53±0.38)×10 <sup>9</sup>	(1.06±0.14)×10 <sup>6</sup>	0.07±0.02
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2 <sup>3)</sup>	(3.17±0.39)×10 <sup>7</sup>	(2.42±0.54)×10 <sup>5</sup>	0.76±0.14
	(2.97±0.44)×10 <sup>8</sup>	(2.15±0.77)×10 <sup>6</sup>	0.72±0.19
	(1.99±0.29)×10 <sup>9</sup>	(1.86±0.24)×10 <sup>7</sup>	0.95±0.22
<i>Lb. rhanmnosus</i> GG	(1.34±0.08)×10 <sup>7</sup>	(5.17±1.20)×10 <sup>4</sup>	0.38±0.07
	(2.35±0.53)×10 <sup>8</sup>	(8.31±0.63)×10 <sup>5</sup>	0.36±0.05
	(2.18±0.26)×10 <sup>9</sup>	(5.16±1.59)×10 <sup>6</sup>	0.24±0.06

Wells with HT-29 cells were inoculated with  $1.34 \times 10^7 \sim 2.18 \times 10^9$  viable cells of each bacterial cell suspension.

All values were mean ± S.D.(n=3)

<sup>1)</sup> Adhesion to HT-29 cells was done in triplicate

<sup>2)</sup> Preculture in MRS medium at 30°C for 24 hours

<sup>3)</sup> Preculture in sucrose medium at 30°C for 48 hours

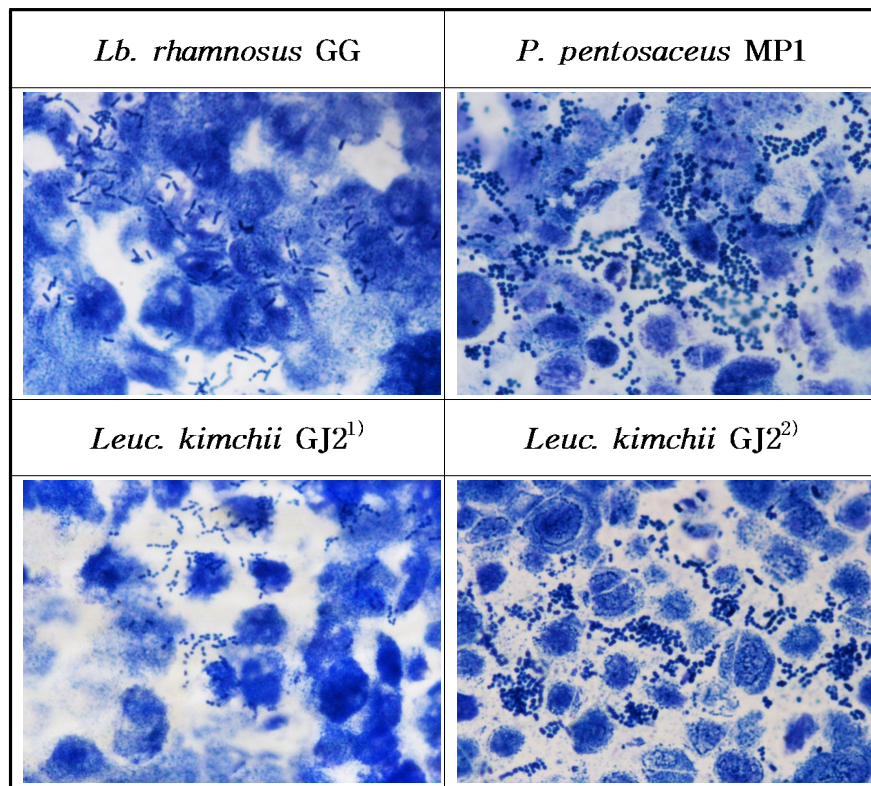


Figure 6. Adhesion of LAB to HT-29 cell observed using light microscopy after Gram-stainig (magnification  $\times 1,000$ )

<sup>1)</sup> Preculture in MRS medium at 30°C for 24 hours

<sup>2)</sup> Preculture in sucrose medium at 30°C for 48 hours



### 3. 소수성 측정

세포표면 소수성 및 응집성은 세포 표면 단백질의 특성이나 표면 구조의 영향을 나타낸 것으로서, 소수성을 지니는 유산균은 장의 점막성분과 소수성 결합이 가능하므로 소수성이 높으면 장내 부착능도 높을 것이라고 예상되고 있다. 또한 Perez 등(53)에 의하면 세포 표면 소수성이 85% 이상이 되어야 장 상피세포 부착성이 있다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 *in vitro* 장내부착능이 확인된 10종의 김치 분리 유산균주의 hexadecane에 대한 소수성을 확인하였으며 실험의 대조군으로는 프로바이오틱으로서 이용되고 있는 *Lb. rhamnosus* GG를 사용하여 본 실험에 사용된 균주와 비교하여 Table 8에 나타내었다. 실험 균주 중에서 5종의 균주 *Lb. buchneri* MS, *Leuc. citreum* GJ7, *Leuc. citreum* GR1, *Leuc. mesenteroides* DM1, *Leuc. kimchii* GJ2는 소수성이 없었으며, 4종의 균주 *P. pentosaceus* MP1, *Lb. plantarum* NO1, *Leuc. mesenteroides* PH12, *Lb. plantarum* AF1은 6~52%의 전반적으로 낮은 소수성을 보였고, *Leuc. citreum* C2는 88%로서 10종의 균주 중 가장 높은 소수성을 나타냈다. Caco-2 세포에 대한 평균 부착율과 세포 표면 소수성과의 상관관계를 측정한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 장내 부착능이 우수하여 프로바이오틱으로서 이용되고 있는 *Lb. rhamnosus* GG의 경우 소수성이 10% 미만으로 낮은 소수성을 나타냈으며, Caco-2 세포에 대한 장내 부착능이 *Lb. rhamnosus* GG보다 2.5배 높게 나타난 *P. pentosaceus* MP1의 경우 소수성 측정 결과 6.88%로 *Lb. rhamnosus* GG에 비해 소수성이 낮게 나타났다. 또한 본 실험에서 가장 소수성이 뛰어난 것으로 나타난 *Leuc. citreum* C2의 경우 Caco-2 세포에 대한 장내 부착율이 1% 이하로 나타나 장내 부착능과 소수성간의 상관관계가 적음을 확인 할 수 있었다.

Del Re 등(16)에 의하면 13개 균주의 *B. longum*을 이용하여 Caco-2 세포에 대한 부착능, 소수성 및 응집성을 측정한 실험에서 부착능이 우수한 균주가 소수성과 응집성이 높게 나타났다고 보고하여 본 실험의 결과와는 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 Kim 등(33)은 Bifidobacteria의 경우 세포표면의 소수성이 80% 이상 관찰된 균주에서 높은 부착능력이 나타난다고 보고하였으며, Wadstrom 등(68)은 porcine의 소장에서 분리하여 porcine의 상피세포에 높은 부착능력을 나타낸 *Lactobacillus* 균주를 대상으로 세포 표면 소수성을 실험한 결과 모두 높은 소수성을 나타냈으며 이들은 높은 상관관계가 있다고 보고하였다. 한편, Savage 등(57)은 murine gastric mucosa를 이용하여

*Lactobacillus*의 부착능력과 세포 표면 소수성과의 관계를 측정한 결과 어떠한 상관관계도 관찰 할 수 없었다고 보고하였으며, Ouwehand 등(50)에 의하면 intestinal mucus를 이용하여 17개 유산균의 부착능력과 세포 표면 소수성과의 관계를 관찰하였을 때 부착능력이 우수하게 나타난 4종의 균주의 세포표면 소수성이 18% 미만으로 나타났으며 이 중 가장 높은 부착능력을 나타낸 *Lb. rhamnosus* GG의 경우 9% 정도의 소수성을 나타내었다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 관찰 할 수 있었다. 따라서 부착능이 우수한 균주 선발 시 1차적으로 분리 균주의 세포 표면 소수성만을 측정하여 선발하는 것은 바람직하지 않으며, 물리, 화학적 특성과 균의 부착능력의 관계는 보다 다양한 검토가 필요한 것으로 사료된다.



**Table 8. Cell surface hydrophobicity (CSH) of LAB by hexadecane method**

Strains	Hydrophobicity (%)
<i>Lb. buchneri</i> MS	0
<i>Lb. plantarum</i> AF1	52.42±0.75
<i>Lb. plantarum</i> NO1	28.76±1.95
<i>Leuc. citreum</i> GJ7	0
<i>Leuc. citreum</i> GR1	0
<i>Leuc. citreum</i> C2	88.53±0.40
<i>Leuc. mesenteroides</i> PH12	5.52±0.29
<i>Leuc. mesenteroides</i> DM1	0
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2	0
<i>P. pentosaceus</i> MP1	6.88±0.30
<i>Lb. rhanmnosus</i> GG	9.74±0.06

All values were mean ± S.D.(n=3)

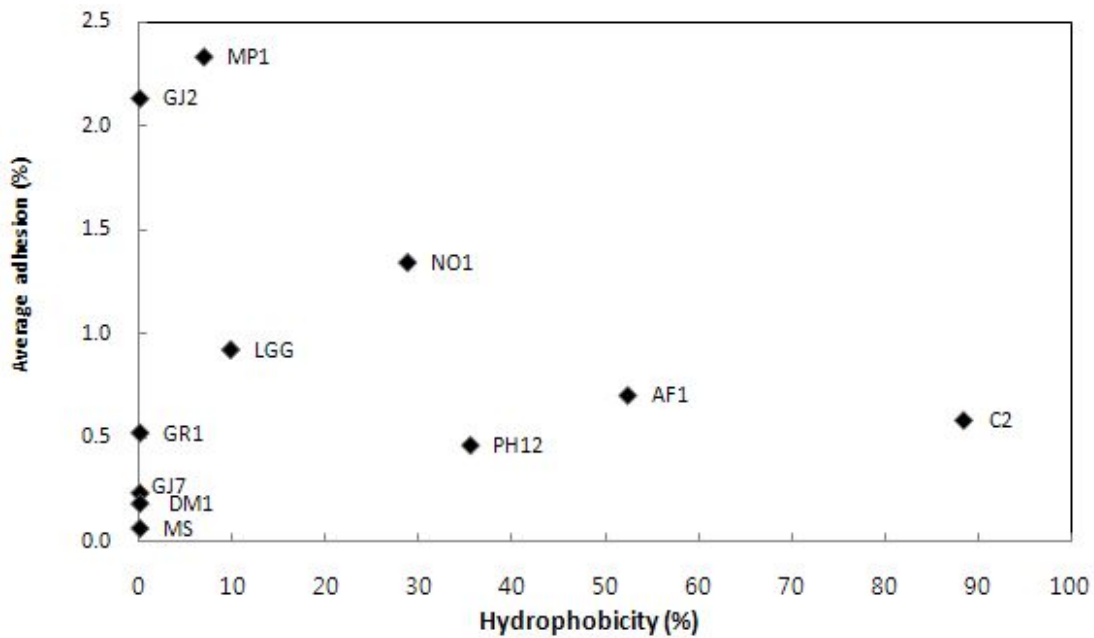


Figure 7. Correlation of hydrophobicity and the adhesion ability to Caco-2 cells

The adherent rate of lactic acid bacteria was meant as the average number of the adherent LAB per the Caco-2 cell lines.

#### 4. 응집성 측정

세포 응집반응은 세포 표면 소수성과 함께 세포 표면 특성을 측정하는 방법으로 알려져 있으며, 이는 균주가 자체적으로 엉겨 붙어서 가라앉는 현상을 나타낸다. 이러한 응집성을 갖는 균주는 대부분 장내 부착능을 나타내므로 장내부착능이 우수한 균주 선발 시 간접적인 지표로 사용되고 있으며, Del Re 등(16)에 따르면 *Bifidobacteria*의 장내세포에 대한 부착능과 세포 응집반응이 강한 상관관계를 갖고 있다고 보고한 바 있다. 또한 최근에는 응집성을 보이는 균주가 *in vivo* 장내 부착능력을 향상시키며(47) 면역활성을 조절한다는 보고가 있어 유산균의 중요한 특성으로 여겨지고 있다(67). 따라서 김치로부터 분리된 10종의 유산균의 응집성을 측정하여 Table 9에 나타내었다. 실험 균주의 응집성은 23~74%로 다양하게 나타났으며, *Leuc. citreum* GR1과 *Leuc. mesenteroides* DM1은 30% 미만의 응집성을 나타낸 반면, *Lb. plantarum* NO1과 *Lb. plantarum* AF1은 응집력이 55% 이상으로 높은 응집력을 나타냈다.

Caco-2 세포에 대한 부착능과 세포 응집반응과의 상관관계를 측정한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 이 둘의 상관관계는 적음을 확인 할 수 있었다. 장내 부착능에서 대조균으로 사용한 *Lb. rhamnosus* GG의 경우 응집성이 54%로 나타났으며, Caco-2 세포에 대한 장내 부착능이 *Lb. rhamnosus* GG보다 2배 이상 높게 나타난 *P. pentosaceus* MP1과 *Leuc. kimchii* GJ2의 경우 응집성 측정 결과 50% 미만으로 *Lb. rhamnosus* GG에 비해 응집성이 낮게 나타났다. 반면, *Lb. plantarum* AF1의 경우 Caco-2 세포에 대한 장내 부착율은 *Lb. rhamnosus* GG보다 1.3배 정도 낮게 나타났으나 응집성 측정 결과 70% 이상으로 *Lb. rhamnosus* GG 보다 높게 나타남을 확인 할 수 있었다. 한편, 세포 표면 소수성과 응집성과의 상관관계를 측정한 결과 이 둘은 약한 상관관계를 나타냄을 확인 할 수 있었다(Fig. 9)

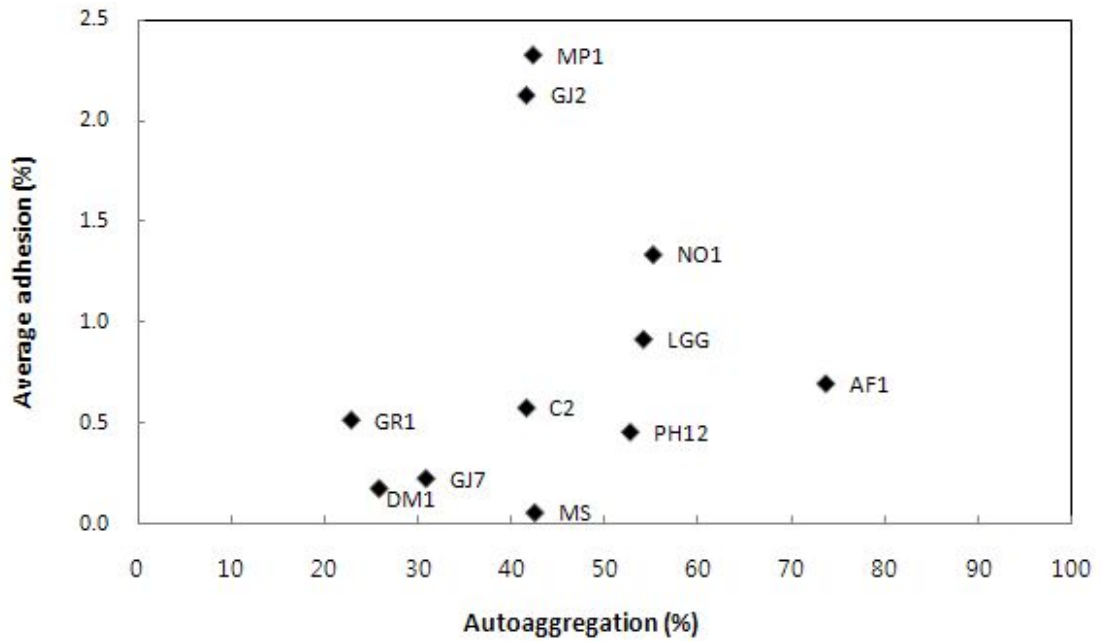
일반적으로 장내 부착능은 유산균과 상피세포 사이의 흡인력 및 반발력과의 상호 작용의 결과이며(24), 세포 부착능은 세포의 표면 접착 등을 포함한 다단계 과정으로서 세포막 및 상호 작용하는 표면 성분과 구조에 커다란 영향을 받는다. 따라서 본 실험에서 10종의 유산균의 소수성과 응집성을 측정한 결과 이들 모두 장내 부착능과 상관관계를 찾을 수 없었으며 실험에 사용된 10종의 유산균의 경우 세포표면 소수성과 응집성에 의해 부착능력이 나타나는 것이 아니라 다른 여러 복합적인 기작에 의해 부착능력이 나타나는 것으로 생각된다. 최근 들어 세포표면 소수성과 응집성 이외에 유산

균과 장내 상피세포와의 결합에 관련된 다양한 수용체에 대한 연구가 활발히 진행되면서 Coconnier 등(11)은 *L. acidophilus*의 발효산물 중 부착을 유도하는 단백질성분이 존재하는 것을 보고 한 바 있으며, 유산균의 표면에 존재하며 하나 또는 여러 가지 당 단백질로 구성된 S-layer protein이 유산균주의 부착능력에 중요한 요소로 보고되고 있다(59).

**Table 9. Autoaggregation ability of LAB**

Strains	Autoaggregation (%)
<i>Lb. buchneri</i> MS	42.45±0.84
<i>Lb. plantarum</i> AF1	73.61±0.92
<i>Lb. plantarum</i> NO1	55.12±1.80
<i>Leuc. citreum</i> GJ7	30.80±0.99
<i>Leuc. citreum</i> GR1	22.80±1.39
<i>Leuc. citreum</i> C2	41.56±1.11
<i>Leuc. mesenteroides</i> PH12	52.67±0.08
<i>Leuc. mesenteroides</i> DM1	25.77±1.93
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2	41.53±0.88
<i>P. pentosaceus</i> MP1	42.26±1.45
<i>Lb. rhanmnosus</i> GG	54.08±0.96

All values were mean ± S.D.(n=3)



**Figure 8. Correlation of auto-aggregation and the adhesion ability to Caco-2 cells**

The adherent rate of lactic acid bacteria was meant as the average number of the adherent LAB per the Caco-2 cell lines.

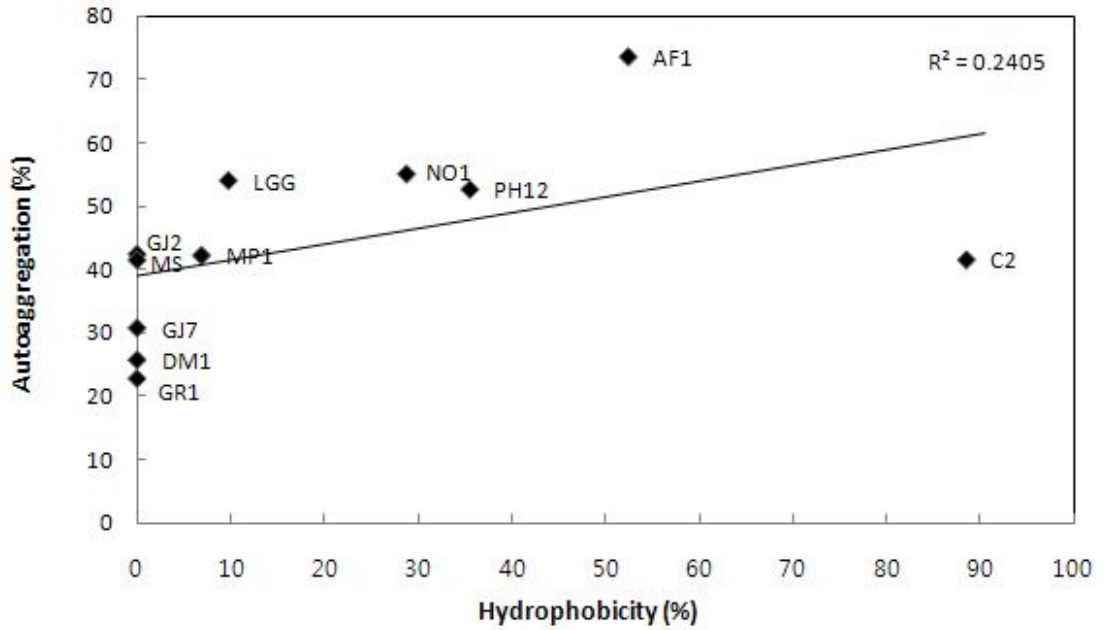


Figure 9. The correlation of hydrophobicity and auto-aggregation of LAB showed *in vitro* adherent abilities

## 5. 효소 활성 측정

유산균이 프로바이오틱으로 이용되기 위해서는 이들이 생산하는 효소 또한 중요한 부분을 차지하고 있다. 따라서 김치로부터 분리된 유산균 10종의 효소 활성을 확인하기 위해 API ZYM kit를 사용하였다.

Table 10에서 보는 바와 같이 Alkaline phosphatase와  $\alpha$ -fucosidase는 10종의 균주 모두 활성이 없는 것으로 나타났다. Esterase (C4)의 경우 *Lb. plantarum* NO1과 *Leuc. citreum* GJ7이 미약한 활성을 보였으며, Esterase lipase (C8)의 활성은 3종의 균주에서 나타났다. Lipase (C14)는 *Lb. plantarum* AF1과 *Leuc. citreum* GJ7에서 미약한 활성을 보였으며, Leucine arylamidase와 Valine arylamidase의 경우 5종의 균주에서 활성이 나타났는데 *Lb. plantarum* AF1과 *Leuc. citreum* GJ7은 5 nmole로 미약한 활성을 보였으며, *Lb. buchneri* MS은 2가지 효소에 대해 10 nmole의 활성을 나타냈다. *Lb. plantarum* NO1의 경우 Leucine arylamidase에 대해서 30 nmole로 높은 활성을 보였으며, Valine arylamidase의 활성은 20 nmole을 나타냈다. 한편 *P. pentosaceus* MP1의 경우 Leucine arylamidase에 대해서는 40 nmole 이상의 높은 활성을 나타냈지만, Valine arylamidase에 대한 활성은 20 nmole로 Leucin arylamidase보다 낮은 활성을 보였다. Cystine arylamidase은 *Lb. plantarum* NO1과 *Leuc. citreum* GJ7에서 낮은 활성을 확인할 수 있었고, Trypsin과  $\alpha$ -Chymotrypsin의 경우 *Lb. buchneri* MS가 약한 활성을 보였다. Acid phosphatase는 6가지 균주에서 활성이 나타났는데 *Leuc. citreum* GJ7과 *Leuc. kimchii* GJ2은 각각 20 nmole을 보였으며, *Lb. plantarum* AF1과 *Leuc. citreum* GR1, *Lb. buchneri* MS, *Lb. plantarum* NO1은 5~10 nmole에 해당하는 활성을 보였다. Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase의 경우 7종의 균주에서 활성을 확인할 수 있었는데 이 중에서 *Lb. plantarum* AF1이 30 nmole로 가장 높은 활성을 나타냈다.  $\alpha$ -galactosidase는 *Lb. buchneri* MS와 *Lb. plantarum* NO1이 약한 활성을 보였으며  $\beta$ -galactosidase의 경우 *Lb. buchneri* MS, *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* NO1 3종의 균주 모두 40 nmole 이상의 높은 활성이 확인됨에 따라 우유 중의 lactose에 의한 유당불내증의 저하에 많은 도움이 될 것으로 생각된다(62).

발암효소로 알려진  $\beta$ -glucuronidase의 경우 benzopyrene같은 독성물질이 인체에 들어왔을 때, 간에서 gluculonic acid와 결합되어 그 독성이 중화가 되지만, 이 결합된 물질이 소장에서 담즙과 함께 장내에 배설되어 장내세균의  $\beta$ -glucuronidase에 의해 탈포



합되면 다시 독성이 생길 수 있다(12). 따라서 유산균이 프로바이오틱으로 사용되기 위해서는 발암효소로 알려진  $\beta$ -glucuronidase의 활성이 높은 것은 바람직하지 않으며, 실험에 사용된 10종의 균주 대부분이 활성이 없거나 10 nmole이하로 활성이 미약하여 probiotic 균주로 인한 발암 유발의 위험이 없음을 입증하였다.

$\alpha$ -glucosidase의 활성은 2종의 균주를 제외한 모든 균주에서 그 활성이 확인되었으며,  $\beta$ -glucosidase는 7종의 균주에서 활성을 보였으며 이 중에서 *Lb. plantarum* AF1이 가장 높은 활성을 보였다. N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase의 경우 4가지 균주에서 활성을 나타냈으며, 가장 높은 활성을 보인 균주는 *Lb. plantarum* NO1으로 30 nmole을 나타냈다.  $\alpha$ -mannosidase는 *Lb. buchneri* MS와 *Leuc. citreum* GJ7을 제외하고는 거의 모든 균주가 활성을 보이지 않았다.

**Table 10. Enzyme activities of LAB by API ZYM analysis**

Enzyme	LAB strains									
	MS	AF1	NO1	GJ7	GR1	C2	PH12	DM1	GJ2	MP1
Alkaline phosphatase	0 <sup>1)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esterase(C4)	0	0	10	5	0	0	0	0	0	0
Esterase lipase(C8)	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
Lipase(C14)	0	5	0	5	0	0	0	0	0	0
Leucine arylamidase	10	5	30	5	0	0	0	0	0	≥40
Valine arylamidase	10	5	20	5	0	0	0	0	0	10
Cystine arylamidase	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0
Trypsin	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Chymotrypsin	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acid phosphatase	10	5	10	20	5	0	0	0	20	0
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	20	30	10	5	10	5	0	5	0	0
α-galactosidase	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0
β-galactosidase	≥40	≥40	≥40	0	0	0	0	0	0	0
β-glucuronidase	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0
α-glucosidase	0	20	20	10	10	10	10	10	20	0
β-glucosidase	10	30	20	5	0	0	10	20	0	10
N-acetyl-β-glucosaminidase	0	10	30	5	0	0	0	0	0	10
α-mannosidase	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0
α-fucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

All values were mean ± S.D.(n=3)

<sup>1)</sup> 0, no enzyme activity: 5,10,20,30,≥40 indicates nanomoles of hydrolysed substrate after 4 h of incubation at 30°C

## 6. 항생제 감수성 측정

최근 질병예방 및 치료의 목적으로 사용되고 있는 항생제는 매년 그 사용빈도와 농도가 증가하면서, 무분별한 항생제 오·남용에 의한 항생제 내성균주가 사회적 문제로 대두되고 있으며, 이에 따라 항생제 사용을 규제하고 그 사용량을 줄여가는 추세이다. 유산균이 프로바이오틱으로서 이용되기 위해서는 항생제 내성 유전자를 보유하지 않아 항생제 내성유전자를 다른 미생물에 전달하지 않는 항생제 감수성이 있는 균주를 사용해야 하며, 항생제 내성균의 식별 면에서 여러 항생제에 대한 내성 또는 감수성에 대한 조사가 필요하다. 따라서 본 실험에서는 김치로부터 분리된 10종의 유산균에 대하여 European Food Safety Authority (EFSA,2008)(19)에서 제시한 *Lactobacillus* facultative heterofermentative, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus* spp. *Leuconostoc* spp.에 대한 break point (Table 11)를 참고하여 ampicillin과 gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline 및 chloramphenicol을 포함한 8종류의 항생제 감수성을 최소 생육 저해 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)로 측정하였다(Table 12). 그 결과 실험한 10종의 김치유산균 모두 8종류의 항생제 ampicillin과 gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline 및 chloramphenicol에 대해 EFSA 2008(19)에서 제시한 breakpoint보다 낮은 MIC를 보이면서 감수성을 나타냈다. ampicillin의 경우 10종의 유산균의 MIC가 0.5-2 µg/mL 농도범위에서 나타났으며, gentamicin은 대부분 균주의 MIC가 2 µg/mL 이하로 EFSA2008(19)에서 제시한 break point인 16 µg/mL보다 낮은 농도에서 MIC를 나타냈으며, kanamycin은 1-16 µg/mL 농도범위에서 MIC를 나타내면서 감수성을 나타냈다. streptomycin은 0.5-32 µg/mL 농도범위에서 MIC를 나타냈으며, erythromycin에 대한 10종의 실험균주의 MIC는 0.125-0.03 µg/mL범위에서 나타냄으로써 EFSA2008(19)에서 제시한 break point보다 8~33배 낮은 농도에서 감수성을 나타내는 것으로 나타났다. clindamycin은 EFSA2008(19)에서 제시한 break point가 1 µg/mL로서 10종의 유산균 모두 이보다 낮은 농도에서 MIC를 나타내면서 감수성을 나타냈고, tetracycline의 경우 MIC가 1-8 µg/mL범위에서 나타나면서 감수성을 나타냈으며, chloramphenicol은 2-4 µg/mL범위에서 MIC를 나타내면서 감수성을 보였다.

Klare 등(40)은 *Lactobacillus*와 *Pediococcus* 및 *Lactococcus* 에 속하는 473개의 균주를 microdilution 방법을 이용하여 16종류의 항생제에 대해 MIC를 측정한 결과,

gentamicin의 MIC<sub>90</sub>(mg/L)가 *Pc. pentosaceus*와 *Lb. plantarum*의 경우 2 mg/L으로 나타났으며, streptomycin의 경우 MIC<sub>90</sub>(mg/L)가 *Pc. pentosaceus*는 64 mg/L, *Lb. plantarum*은 32 mg/L을 나타냈고, erythromycin의 경우 *Pc. pentosaceus*는 0.125 mg/L, *Lb. plantarum*은 0.25 mg/L로서 본 실험의 결과보다 항생제에 대한 MIC가 높게 나타났다. 따라서 유산균을 이용한 새로운 프로바이오틱을 개발하기 위해서는 이러한 항생제 감수성 및 내성에 대한 특성을 분석하고 항생제 내성 위해성에 대한 검증이 필요한 것으로 사료된다.

Table 11. Microbiological breakpoints ( $\mu\text{g/mL}$ ) categorizing some LAB species as resistant

Antibiotic	Species			
	<i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i>	<i>Pediococcus</i> spp.	<i>Leuconostoc</i> spp.
Ampicillin	4	2	4	2
Gentamicin	16	16	16	16
Kanamycin	64	64	64	16
Streptomycin	64	n.r. <sup>1)</sup>	64	64
Erythromycin	1	1	1	1
Clindamycin	1	1	1	1
Tetracycline	8	32	8	8
Chloramphenicol	4	8	4	4

The table has been adapted from the EFSA2008(19). Strains with MICs higher than the breakpoints are considered as resistant.

<sup>1)</sup> n.r.: not required.

Table 12. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of LAB to antimicrobial agents as determined by the broth microdilution method

Strains	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )							
	AMP <sup>1)</sup>	GEN	KAN	STR	ERY	CLI	TET	CHL
<i>Lb. buchneri</i> MS	1 <sup>2)</sup>	0.25	4	4	0.06	0.125	8	2
<i>Lb. plantarum</i> AF1	1	0.03	1	0.5	0.03	0.06	4	2
<i>Lb. plantarum</i> NO1	2	0.25	4	2	0.06	1	8	4
<i>Leuc. citreum</i> GJ7	0.5	2	4	16	0.125	0.06	2	4
<i>Leuc. citreum</i> GR1	0.5	2	16	32	0.06	0.015	1	4
<i>Leuc. citreum</i> C2	0.5	1	16	16	0.06	0.015	1	4
<i>Leuc. esenteroides</i> PH12	2	0.5	16	16	0.125	0.06	2	4
<i>Leuc. mesenteroides</i> DM1	1	0.125	4	4	0.125	0.06	2	2
<i>Leuc. kimchii</i> GJ2	2	0.5	8	32	0.03	0.015	2	2
<i>P. pentosaceus</i> MP1	1	0.5	16	8	0.03	1	4	2

<sup>1)</sup> AMP: ampicillin, GEN: gentamicin, KAN: kanamycin, STR: streptomycin, ERY: erythromycin, CLI: clindamycin, TET: tetracycline, CHL: chloramphenicol.

<sup>2)</sup> R: resistant, S: sensitive, according to the proposed breakpoints mentioned in Table 11.

## 제 4 장 결 론

김치는 우리나라의 대표적인 발효 식품으로서 이미 항암효과, 면역활성 증진, 항균력 등 다양한 기능성과 영양생리학적 특성이 알려져 국내 뿐 아니라 국제적으로도 관심받고 있는 식품이며 특히 김치발효과정에 관여하는 유산균의 경우 장내의 바람직한 미생물로서 항균작용, 면역기능 강화, 혈중 콜레스테롤 저하, 항진작용, 항암작용, 항산화작용 등의 다양한 건강 증진 효능이 보고되고 있다.

최근 프로바이오틱스에 대한 관심이 증가되면서 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물로 알려진 유산균을 이용하여 프로바이오틱 선발 기준에 해당하는 안전성, 기능성 측면(생존성, 정착성, 서식성, 항미생물제 생성능, 면역 증강능, antigenotoxic 활성, 병원성 세균의 억제능), 기술적 측면(관능적 특성, 안정성, bacteriophage 저항성, 제조 과정 중의 생존성)등에 따라 발효유 및 유제품, 사료, 건강 보조식품, 정장제 등에 사용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 김치로부터 분리된 김치유산균 10종의 프로바이오틱 특성을 살펴보기 위하여 장내 생존성 여부, 장내 부착능, 세포 표면 소수성 및 응집성, 효소 활성, 항생제 감수성을 측정하였으며, 프로바이오틱으로서의 이용 가능성을 알아보고 특성이 우수한 유산균주를 선별하고자 하였다.

김치로부터 분리된 10종의 김치유산균의 장내 생존성 여부 확인을 위하여 내산성 및 인공위액에서 처리한 결과 *Lb. plantarum* AF1과 *Lb. plantarum* NO1이 pH 2.5의 0.05 M sodium phosphate buffer와 인공위액에서 2시간 처리한 후에도 초기균수( $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL)를 유지하면서 높은 저항성을 나타내었다.

Caco-2 세포를 이용하여 김치로부터 분리된 유산균 10종의 장내부착능을 확인한 결과 초기접종균수가 많을수록 부착되는 균수가 높아지는 것으로 나타났으며, 초기 접종균수에 따른 부착 균수의 비율은 초기 접종 균수의 증가와 상관없이 대부분의 균주에서 일정하게 나타났다. 대조구로 사용한 *Lb. rhamnosus* GG보다 초기 균수  $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL 모든 범위에서 부착능이 우수한 것으로 나타난 균주는 *Leuc. kimchii* GJ2와 *P. pentosaceus* MP1으로 나타났으며, *Leuc. kimchii* GJ2의 경우 EPS를 생성했을 때가

EPS를 생성하지 않았을 때보다 부착능이 높게 나타나 균체의 EPS 생성 여부가 프로바이오틱으로서 기능할 수 있는데 영향을 주는 요인임을 보여주었다. 또한 Caco-2 세포에서 장내부착능이 우수한 것으로 나타난 2종의 유산균 *Leuc. kimchii* GJ2와 *P. pentosaceus* MP1을 HT-29 세포를 이용하여 부착능을 확인해 본 결과  $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL에 해당하는 각각의 초기 균수에 대한 부착 정도는 Caco-2 세포에서보다 더 낮은 수치를 나타냈으나, *P. pentosaceus* MP1과 EPS 생성시의 *Leuc. kimchii* GJ2가 대조구로 사용한 *Lb. rhamnosus* GG보다 높은 부착율을 보임으로써 Caco-2 세포에서의 부착능과 비슷한 결과를 나타냈다.

유산균의 장내부착능은 세포 표면의 구조와 구성에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있기 때문에 세포표면 소수성 및 응집성을 측정하여 장내부착능과 상관관계가 있는지 조사하였다. 그 결과 *Lb. plantarum* AF1과 *Lb. plantarum* NO1이 소수성 및 응집성 모두 대조구로 사용한 *Lb. rhamnosus* GG보다 높게 나타났으며, 세포표면 소수성 및 응집성과 장내부착능의 상관관계를 확인해본 결과 이들은 상관관계가 거의 없는 것으로 나타났고, 소수성과 응집성간의 상관관계는 약한 상관관계가 있는 것으로 보였다. 따라서 실험에 사용된 10종의 유산균의 경우 세포표면 소수성과 응집성에 의해 부착능력이 나타나는 것이 아니라 다른 여러 복합적인 기작에 의해 부착능력이 나타나는 것으로 추측되어 진다.

유산균이 프로바이오틱으로 이용되기 위해서는 이들이 생산하는 효소 또한 중요한 부분을 차지하고 있기 때문에 10종의 김치 유산균의 효소활성을 측정한 결과 *P. pentosaceus* MP1이 Leucine arylamidase에 대해 40 nmole 이상의 높은 활성을 나타냈으며, *Lb. buchneri* MS, *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* NO1 3종의 균주 모두  $\beta$ -galactosidase 활성이 40 nmole 이상으로 강한 활성이 확인됨에 따라 우유 중의 lactose에 의한 유당불내증의 저하에 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

프로바이오틱 유산균의 항생제 감수성을 조사하는 것은 항생제를 복용하는 환자에 대하여 적절한 유산균 선택에 올바른 정보를 제공하여 내성유전자의 확산방지에 도움이 될 수 있으며 아울러 균주별 항생제에 대한 선택적 내성은 균주별 선택적 차별화에도 도움이 된다. 따라서 10종의 김치 유산균을 8종류의 항생제 ampicillin과 gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline 및 chloramphenicol에 대하여 감수성을 측정한 결과 10종의 균주 모두 8종류의 항생제에 대해 EFSA 2008(19)에서 제시한 breakpoint보다 낮은 MIC를 보이면서 감수성을 나타냈다.

본 연구는 김치로부터 분리된 10종의 균주에 대한 프로바이오틱 특성을 조사하기 위



해 내산성 및 인공위액 저항성, 장내부착능, 소수성 및 응집성, 효소활성 및 항생제 감수성을 측정하였다. 그 결과 각각의 균주는 프로바이오틱 특성이 다양하게 나타났으며, 2종 이상의 프로바이오틱 기능을 지닌 유산균은 *Lb. plantarum* NO1으로 내산성 및 인공위액에서 높은 저항성을 보였으며, 장내부착능과 소수성 및 응집성이 높은 것으로 나타났다. 그러나 이를 산업적인 프로바이오틱으로서 이용하기 위해서는 면역 증강능, 병원성 세균의 억제능, *in vivo* 상에서의 장내부착능 등의 기능성 측면과 관련된 실험 및 안전성 측면등의 실험이 추가로 수행되어야 할 것으로 생각된다.

## 제 5 장 참 고 문 헌

1. Ahn, Y. T., Kim, Y. H., Jung, E. J., Lim, J. H., Kang, H. J., and Kim, H. U. 1999. Resistance of lactobacilli and bifidobacteria isolated from fermented milk products to low pH and bile acid. *Kor. J. Anim. Sci.* **41**: 335-342.
2. Angeloni, S., Ridet, J. L., Kusy, N., Gao, H., Crevoisier, F., Guinchard, S., Kochhar, S., Sigrist, H., and Sprenger, N. 2004. Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology.* **15**: 31-41.
3. Baek, Y. J. 1993. Lactic acid bacteria and human health. *Kor. J. Food Nutr.* **6**: 53-65.
4. Buck, B. L., Altermann, E., Svingerud, T., and Klaenhammer, T. R. 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8344-8351.
5. Busscher, H. J., Geertsema-Doombusch, G. I., and van der Mei, H. C. 1993. On mechanisms of oral microbial adhesion. *J. Appl. Bacteriol. suppl.* **74**: 136S-146S.
6. Chang, J. Y., Lee, H. J., and Chang, H. C. 2007. Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI 464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 2504-2515.
7. Chang, H. C., Chang, J. Y., Jung, J. H., and Ryu, E. H. 2011. Lactic acid bacterium separated from Kimchii and fermented food using the strain. *Korean patent.* 10-0037005.
8. Cheigh, H. S., and Hwang, J. H. 2000. Antioxidative characteristics of Kimchi. *Food Industry and Nutrition.* **6**:52-56.
9. Cho, M. K., Kim, K., Kim, C. H., Lee, T. K., and Kim, K. Y. 2000. Isolation and characterization of *Lactobacillus fermentum* YL-3 as a poultry probiotic. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 279-284.

10. Cho, Y. R., Chang, J. Y., and Chang, H. C. 2007. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 104-109.
11. Coconnier, M. H., Klaenhammer, T. R., Kerneis, S., Bernet, M. F., and Servin, A. L. 1992. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2034-2039.
12. Cole, C. B., Fuller, R., and Carter, S. M. 1989. Effect of probiotic supplements of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium adolescentis* 2204 on  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucuronidase activity in the lower gut of rats associated with a human faecal flora. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2**: 223-225.
13. Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M., and Wallbanks, S. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Letters.* **77**: 5-12.
14. Crow, V. L., Gopal, P. K., and Wicken, A. J. 1995. Cell surface differences of lactococcal strains. *Int. Dairy J.* **5**: 45-68.
15. Danielsen, M., and Wind, A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food microbiol.* **82**: 1-11.
16. Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., and Palenzona, D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**: 438-442.
17. Donohue, D. C. and S, Salminen. 1996. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **5**: 25-28.
18. Dunne, C., O'Mahoney, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C.,

- Shanahan, F., and Collins, J. K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 386S-392S.
19. EFSA(European Food Safety Authority). 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.
  20. Gilliland, S. E., Staley, T. E., Bush, L. J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* **67**: 3045 - 3051.
  21. Gismondo, M. R., Drago, L., and Lombardi, A. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **12**: 287-292.
  22. Goldin, B. R. 1998. Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.* **80**: S203-S207.
  23. Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H. S. 2001. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 207-216.
  24. Greene, J. D., and Klaenhammer, T. R. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4487-4494.
  25. Han, H. U., Lim, C. R., and Park, H. K. 1990. Determination of microbial community as an indicator of kimchi fermentation. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **22**: 26-32.
  26. Havenaar, R., and Huis in't Veld, J. H. J. 1992. Probiotics: a general view. In: *The Lactic Acid Bacteria: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease.* pp: 151-170. Ed. Wood, B. J. B. Vol. 1, Elsevier Applied Science. London and Newyork.
  27. Heyman, M., and Ménard, S. 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1151-1165.

28. Jung, H. K., Kim, E. R., Yae, H. S., Choi, S. J., Jung, J. Y., and Juhn, S. L. 2000. Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria and fermented milks as probiotic functional foods. *Food Ind. Nutr.* **5**: 29-35.
29. Jung, H. K. 2001. Selection Criteria for Probiotics and Their Industrial Applications. *Bioindustrynews.* **14**: 39-48.
30. Kang, H. J., Baick, S. C., and Yu, J. H. 2005. Studies on the Properties of the Stirred Yogurt Manufactured by Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **25**: 84-91.
31. Kang, S. M., Yang, W. S., Kim, Y. C., Joung, E. Y., and Han, Y. G. 1995. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for kimchi fermentation and effect of starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 461-471.
32. Kato, I., Endo, K., and Yokokura, T. 1994. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **16**: 29-36.
33. Kim, E. Y. 2001. Adherence competition of bifidobacteria to Caco-2 and MA-104 cell with *Escherichia coli* 0157:H7 and rotavirus. a doctoral dissertation. Konkuk Univ. Korea.
34. Kim, G. B., Lee, J. H., Lim, K. S., Huh, C. S., Bae, H. S., Baek, Y. J., and Kim, H. U. 1999. Bile salt deconjugation activity of *Lactobacillus* strains isolated from yogurt products. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 385-390.
35. Kim, H. J., and Chang, H. C. 2006. Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria from Kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 196-203.
36. Kim, H. S., and Ham, J. S. 2003. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. Ani. Resou.* **23**: 186-192.
37. Kim, S. J. 2005. Physicochemical characteristic of Yogurt prepared with Lactic

- acid Bacteria Isolated from Kimchi. *Korean J. Food Culture*. **20**: 337-340.
38. Kim, Y. J. 1999. Physiological properties of Kimchi. *Food Industry and Nutrition* **4**: 59-65.
39. Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., and Salminen, S. J. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 185-189.
40. Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Muller-Bertling, S., Witte, W., and Goossens, H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother.* **59**: 900-912.
41. Kobayashi, Y., Tohyama, K., and Terashima, T. 1974. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* **29**: 691-698.
42. Lankaputhra, W. E. V., and Shah, N. P. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* **30**: 2-7.
43. Lee, C. W., Ko, C. Y., and Ha, D. M. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 102-109.
44. Lee, S. H., and No, M. J. 1997. Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 617-622.
45. Lee, Y., and Chang, H. C. 2008. Isolation and Characterization of Kimchi Lactic Acid Bacteria Showing Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 106-114.

46. Lehto, E. M., and Salminen, S. 1997. Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus*, and one *Propionibacterium* strain to cultured human intestinal Caco-2 cell line. *Biosci. Microflora*. **16**: 13-17.
47. Marcotte, H., Ferrari, S., Cesena, C., Hammarstrom, L., Morelli, L., Pozzi, G., and Oggioni, M. R. 2004. The aggregation-promoting factor of *Lactobacillus crispatus* M247 and its genetic locus. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 749-756.
48. Mercenier, A., Pavan, S., and Pot, B. 2002. probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Des.* **9**: 175-191.
49. Neeser, J. R., Chambaz, A., Golliard, M., Link-Amster, H., Fryder, V., and odziejczyk, E. 1989. Adhesion of colonization factor antigen II-Positive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to human enterocytelike differentiated HT-29 cells: a basis for host-pathogen interactions in the gut. *Infect Immun.* **57**: 3727-3734.
50. Ouwehand, A. C., Kirjavanen, P. V., Shortt, C., and Salminen, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* **9**: 43-52.
51. Park, J. G., Yun, S. Y., Oh, S., Shin, J. G., and Baek, Y. J. 2003. Probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 Isolated from Korean Breast-Fed Fufant. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **35**: 1244-1247.
52. Park, K. Y. 1995. The nutritional evaluation and antimutagenic and anticancer effects of Kimchi. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**: 169-182.
53. Perez, P. F., Minnaard, Y., Disalvo, E. A., and De Antoni, G. L. 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 21-26.
54. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. dairy. J.* **12**: 163-171.
55. Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A.,

- Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., and Rowland, I. 1998c. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* **80**(Suppl.1): S147-171.
56. Salminen, S., Deighton, M. A., Benno, Y., Gorbach, S. L. Lactic acid bacteria in health and disease. In: Salminen, S., von, Wright. A., eds. 1998. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc. 211-254.
57. Savage, D. C. 1992. Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing keratinizing gastric epithelium in the mouse. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1992-1995.
58. Schleifer, K. H. and Ludwig, W. 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 461-467.
59. Schneitz, C., Nuotio, L., and Lounatma, K. 1993. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer(S-layer). *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 290-294.
60. Shah, N. P. 2000. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy. Sci.* **83**: 894-907.
61. Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Amitani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., and Kaminogawa, S. 1998. *Lactobacillus Casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **115**: 278-287.
62. Shin, M. S., Kim, H. M., Kim, G. T., Huh, C. S., Bae, H. S., and Baek, Y. J. 1999. Selection and characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean faces. *kor. J. Food Sci. Technol.* **31**: 495-501.
63. 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.



64. Tannock, G. W. 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: Plenty of scope for fundamental R and D. *Trends Biotechnol.* **15**: 270-274.
65. Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., and Salminen, S. J. 1999. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**: 137-142.
66. Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. 1984. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS microbiol. Lett.* **9**: 29-33.
67. Voltan, S., Castagliuolo, I., Elli, M., Longo, S., Brun, P., D'Inca, R., Porzionato, A., Macchi, V., Palù, G., Sturniolo, G.C., Morelli, L., and Martines, D. 2007. Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**: 1138-1148.
68. Wadstrom, T., Andersson, K., Sydow, M., Axelsson, L., Lindgren, S., and Gullmar, B. 1987. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J. Appl. Bacteriol.* **62**: 513-520.
69. Xanthopoulos, V., E. Litopoulou-Tzanetaki, and N. Tzanetakis. 2000. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant feces as dietary adjuncts. *Food Microbiol.* **17**: 205-215.
70. Yang, E. J., and H. C. Chang. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 276-284.
71. 문홍석. 2001. 유산균의 산업적 이용과 발전방향. *식품산업과 영양.* **6**: 71-77.
72. 박종철. 2006. 김치의 효능, 서울: 푸른세상 출판

## 감사의 글

어느덧 2년이라는 짧고도 길었던 시간이 지나 벌써 졸업을 앞두고 지난 시간을 돌이켜 보니 아쉬움과 후회도 남지만 인내와 도전을 통해 한걸음 더 성장할 수 있었던 시간이었습니다. 힘들고 지쳐서 포기하고 싶었을 때 마다 항상 저를 응원해주시고 따뜻한 말과 함께 격려해주신 모든 분들께 감사의 말씀을 드립니다.

먼저 부족한 저를 학문의 길로 이끌어 주시고 따뜻한 관심과 열정으로 앞으로 나아가야 할 길과 방향에 대한 지도를 해주시며, 여러 가지로 아낌없는 지원과 배려를 해주신 장해춘 지도교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 논문심사를 맡아 세심한 부분까지 꼼꼼하게 봐주시고 따뜻한 조언해주신 이명렬 교수님과 이재준 교수님께도 감사드리며, 학부시절부터 학문적으로 큰 가르침을 주신 노희경 교수님, 김경수 교수님, 김복희 교수님께도 감사의 말씀 드립니다.

지난 3년 동안 함께 지내며 기쁨과 슬픔을 나누던 우리 실험실 식구들..정말 감사합니다. 실험실의 정신적 지주로 저희들의 부족한 부분을 세심하고 꼼꼼하게 너무나 잘 챙겨주시고, 학문적으로도 많은 조언과 가르침을 아낌없이 해주신 양은주 박사님, 항상 저희들을 감싸주시고 따뜻한 마음으로 걱정해주시며 너무나 잘 챙겨주신 장지윤 박사님, 학부 때부터 힘들 때마다 저를 걱정해주시고 저에게 웅자란 별명과 함께 너무나 소중한 추억 많이 만들어 주신 된장팀의 보스~ 장미 박사님, 언제나 우리들의 마음을 잘 헤아려 주시고 힘들 때마다 기도로 응원해주신 지혜언니, 같이 고생 많이 하면서 실험도 하고, 고민상담도 많이 해주며 너무나 잘 챙겨준 송희언니, 항상 열심히 하며 밝고 즐거운 정선언니, 매사에 진지하며 차분하게 말은 일 잘하는 은아, 씩씩하고 밝은 모습이 보기 좋은 윤세, 실험실의 활력소로 항상 밝고 웃음소리가 매력적인 송이, 힘들 때마다 옆에서 도와주며 기운나게 해준 마음착한 슬기, 그리고 나와 함께 3년의 시간을 보내며 함께 고생하며 말없이 잘 챙겨준 든든한 내 동기 해훈이, 마지막으로 만날 때마다 항상 밝고 따뜻하게 웃어주시는 효주언니, 율언니, 지용언니, 현경언니, 은정언니, 대현엄마 선미언니, 그리고 유리언니께 감사드립니다. 또한 굿은일도 씩씩하게 잘 해준 희정이와 대학원 생활을 같이 했던 동기들 주희, 영수언니에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다.

힘들고 지칠 때마다 응원해주며 힘이 되어주는 사랑하는 나의 믿음의 친구들..항상 기도로 중보해주며 든든한 후원자가 되어준 웅이와 찐돌이, 영서, 현철이, 또한 대학교 4년 동안 함께한 나의 단짝 경란이, 지금은 각자의 길에서 최선을 다하느라 너무 바빠서 얼굴은 잘 못 보지만 마음만은 함께 하는 지민이와 현영이, 희경이, 경아, 현주, 지현이, 그

리고 15년 지기 친구 지나, 그리고 항상 실험이 잘되는지 논문은 잘 쓰는지 궁금해 하시며 기도로 중보해주시며 응원해주신 광주순복음교회 목사님과 집사님들에게도 감사드립니다.

제가 늘 바르고 건강하게 자랄 수 있도록 밤낮가리지 않고 기도와 금식으로 저를 뒷바라지 해주시며 사랑으로 보살펴주신 엄마, 아빠 그리고 하나뿐인 소중한 율언니, 혜정언니..가족이란 이름으로 저에게 너무나 큰 사랑을 주시고 항상 힘이 되어주셔서 감사하고..너무너무 사랑합니다.

항상 격려해주시고 응원해주신 친지 분들과 주위의 모든 분들께도 감사드리며 항상 좋은 일들만 가득하시길 기도합니다.

마지막으로 저와 항상 동행하시며 저를 인도해주시고, 제가 하는 일 가운데 항상 힘이 되어 주시는 사랑의 하나님 아버지께 진심으로 감사드립니다.

# 저작물 이용 허락서

학 과	식품영양학과	학 번	20107043	과 정	석사
성 명	한글 류은혜	한문 柳恩惠		영문	Ryu eunhye
주 소	광주 광역시 북구 오치동 1021-2				
연락처	e-mail : stargirl1208@nate.com				
논문제목	김치유산균의 프로바이오틱 특성 조사				
	영문 Probiotic assessment of Kimchi lactic acid bacteria				

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(    )

2011 년 11 월

저작자 :            류은혜    (인)

**조선대학교 총장 귀하**