

## Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070

Hwa Jin Shin<sup>1</sup>, Hye Jung Choi<sup>1</sup>, Dong Wan Kim<sup>2</sup>, Cheol Soo Ahn<sup>3</sup>, Young Geun Lee<sup>4</sup>,  
Young-Kee Jeong<sup>5</sup> and Woo Hong Joo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Interdisciplinary Program in Biotechnology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea,

<sup>3</sup>Cho-A Pharm. Co, LTD., Haman 637-810, Korea

<sup>4</sup>Department of Food Science and Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

<sup>5</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-174, Korea

Received June 11, 2012 / Revised August 9, 2012 / Accepted August 16, 2012

Lactic acid bacteria are generally recognized as beneficial probiotic organisms. Recent studies revealed that the potential of probiotic strains was essentially dependent on the bacterial-binding and adhesion capabilities to gut epithelial cells and the hydrophobicity of the cell surface. In this study, we screened some indigenous lactic acid bacteria from Kimchi and selected one lactic acid bacterium as a potential probiotic based on its cell surface hydrophobicity. Analysis of the 16S rRNA gene sequences of probiotic isolates indicated that the selected isolate (BCNU 9070 strain) was a member of *Pediococcus pentosaceus*. *P. pentosaceus* BCNU 9070 showed resistance to bile acids and acidic pH. The *P. pentosaceus* BCNU 9070 strain also inhibited the cell growth of six food-borne pathogens including *Listeria monocytogenes* and *Shigella sonnei*. In addition, the *P. pentosaceus* BCNU 9070 strain expressed bile salt hydrolase activity and showed an ability to assimilate cholesterol *in vitro*. On the basis of these results, *P. pentosaceus* BCNU 9070 is considered to have probiotic potential for applications in functional foodstuffs.

**Key words** : Cholesterol assimilation, food-borne pathogens, hydrophobicity, *Pediococcus pentosaceus*, probiotics

### 서 론

프로바이오틱스 균주는 적정양 섭취시 유당불내증의 경감, 면역활성 및 조절, 알레르기 반응 및 염증의 완화, 혈중 콜레스테롤의 감소, 대장암에 대한 억제효과, 아토피 피부염, 크론병 (Crohn's disease), 설사, 칸디다 감염증 및 요도감염의 임상적 증상감소 그리고 병원균의 경쟁적 저해 등을 통하여 숙주의 건강에 유익한 영향을 부여하는 미생물을 총칭한다[11,13].

대표적인 프로바이오틱스 균주인 유산균(lactic acid bacteria, LAB)은 이미 여러나라에서 다양하게 상품화되어 사용되고 있다[15]. 유산균은 일반적으로 *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp. 등의 균종을 포함하고 있으며 젖산과 아세트산과 같은 유기산, 과산화수소 그리고 bacteriocin과 같은 항균물질 등 다양한 대사물질을 생산하여 장내 부패균 및 유해한 병원성 세균의 생육을 저해하고 있는 것으로 알려져 있다[8,12]. 이들 균주들이 프로바이오틱스 제제로 사용되기 위해서는 위산에 기인되는 극한의 낮은 pH와 담즙산에서 견디어 장내에 도달할 수 있는 생존능력, 즉 균주의 안정성이 먼저 고려되어야 하며 이들 균주의 군집화를 위한 장 상피세포 부착능과 자가응집능력도 구비되어야

한다[14,17].

한편, 체내 콜레스테롤(5-cholesten-3-ol)이 대사조절의 이상으로 혈장과 조직에 240 mg/dl 이상 축적될 경우 고지혈증이 나타나며 동맥경화, 뇌혈전 및 심근경색 등의 심혈관 질환으로 이어진다. 정상인이 식이 콜레스테롤을 40-20,000 mg 섭취할 경우 평균적으로 30-40%가 흡수된다고 보고되어 있으며, 제한된 콜레스테롤 흡수율에 따라 흡수되지 않은 또는 흡수중인 콜레스테롤은 장내 미생물의 효소에 의한 다른 대사산물로 전환된다[16]. 그러므로 유산균의 기능성 중 콜레스테롤 변환에 따른 콜레스테롤 저하능은 건강 개선적인 측면에서 주목받고 있다.

현재까지 알려진 미생물에 의한 콜레스테롤의 분해경로 및 감소 기작은 다양한 균종에서 보고되고 있다. *Nocardia erythropolis*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* sp. 그리고 *Bacillus sphaericus*는 콜레스테롤을 cholesterin-3-one으로 전환시키는 것으로 알려져 있으며[5], *Corynebacterium*와 *Brevibacterium*은 cholesterol oxidase (COX)를 생산하여 콜레스테롤을 분해함이 보고되어 있다[6,12]. 그리고 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides* sp.은 담즙산가수분해효소(bile salt hydrolase, BSH)를 생산하여 담즙산을 glycine과 taurine 및 유리담즙산으로 전환시킨다. 이 때 생성된 유리담즙산은 복합담즙산보다 용해율이 떨어져 장내에 재흡수되지 않고 분변으로 배출시켜 체내의 총 콜레스테롤 양을 감소시키게 된다. 또한 유산발효로 생성된 hydrox-

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

ymethyl glutarate (HMG)는 콜레스테롤의 합성을 저해하며 *Lactobacillus acidophilum* 및 *L. ruteri*는 콜레스테롤을 직접 분해하는 것으로 알려져 있다[11].

따라서 본 연구에서는 경남지방의 가정에서 제조한 김치로부터 유산균을 분리 및 선별하여 동정하였으며, 산성조건 및 담즙산과 같은 생육저해 환경에서의 안정성을 측정하였다. 그리고 대표적인 기능성으로 콜레스테롤 저하 정도를 조사하여 향후 신규 미생물제제 개발의 기초자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 유산균의 분리

산을 생성하는 균을 분리하기 위하여 0.75% 식염수에 김치 국물을 현탁한 후 1 ml을 0.5% CaCO<sub>3</sub>를 함유한 MRS agar에 도말하였다. 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 투명 환을 생성하는 집락을 선별하였다. 그리고 균주의 세포표면 소수성을 측정하기 위하여 미생물의 탄화수소에 부착하는 정도를 측정하였다. 소수성 측정을 위한 탄화수소로는 *n*-hexadecane을 사용하였으며, 소수성이 높은 유산균을 최종적으로 선별하였다.

### 생리·생화학적 특징 및 분자진화학적 동정

최종선발된 균주의 생리학적, 생화학적 특징을 Bergey's manual of determinative bacteriology의 방법에 의거하여 조사하였다. 또한 16S 리보솜 DNA 를 PCR로 증폭하여 염기서열 분석을 하였으며 Genebank의 database에 등록된 표준균주들의 16S 리보솜 DNA의 염기서열들과 상동성을 비교 분석하였다. 이들 결과에 기초하여 clustal X2.0 (CLC bio, Denmark)을 이용하여 계통수를 구축하였다[10,16].

### 분리균주의 인체유해성 조사

유해효소 생성여부를 확인하기 위해 선발균주의 조효소액을 제조하였다. 이 조효소액에 10 mM의 p-nitrophenyl-β-D-glucuronide, 2 mM의 p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside 또는 tryptophanase 반응혼합액을 각각 첨가하여 발암성 효소인 β-glucosidase, β-glucuronidase 및 tryptophanase 효소 활성 여부를 확인하였으며 또한 indole, urease 등의 유해 대사산물 생성여부 및 면양혈액천배지를 이용하여 β-용혈현상을 조사하였다[3,7].

### 분리균주의 내산성 및 담즙산에 대한 안정성 조사

균주의 산에 대한 내성을 조사하기 위하여 MRS broth에 18시간 배양 후 1 ml의 배양액을 pH 2.5-5.0로 조정된 PBS 용액(phosphate buffered saline, PBS: 0.8% NaCl, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.015% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)에 각각 접종하였다. 각각의 샘플은 37°C에서 4시간 배양 후 생균수를 측정하였으며 생존률은 log cfu/ml로 계산하였다. 선별균주의 담즙산에 대한 내성을

조사하기 위해 24시간 배양된 1 ml의 배양액을 0.3%, 0.6% 또는 1.0% (w/v)의 oxgall (Sigma Co., U.S.A)이 포함되어 있는 9 ml의 MRS broth에 각각 접종한 후 48시간 동안 균의 성장곡선을 분광광도계를 이용해 측정하였으며 담즙산이 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 사용하였다[7].

### 분리균주의 소수성 측정 및 응집반응

최종적으로 선발된 균주를 xylene, ethylacetate 및 chloroform을 사용하여 용매에 부착하는 정도를 확인함으로써 세포 표면특성을 조사하였다. 그리고 응집실험은 Dolye과 Rosenberg의 방법을 변형하여 실시하였다[17,18]. 인산 완충 용액을 이용하여 OD<sub>600</sub>=0.1이 되도록 각 균의 현탁액을 제조하였다. 선발균주의 자가응집능은 5시간 동안 시간별 흡광도를 측정하여 아래와 같은 식으로 계산하여 산출하였다.

$$\text{Auto-aggregation (\%)} = \frac{(\text{OD}_1 - \text{OD}_2)}{(\text{OD}_1)} \times 100$$

OD<sub>1</sub>=초기 흡광도 값

OD<sub>2</sub>=각각의 시간별 흡광도 측정값

### 분리균주의 항균력 조사

식중독균인 *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10798, *Shigella sonnei* ATCC 25931 및 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 그리고 균류인 *Aspergillus niger* ATCC 4695와 *Candida albicans* ATCC 10231에 대한 선발균주의 항균력을 조사하였다. 선발균주를 37°C에서 24시간 배양한 후 균체를 제거한 뒤 0.22 μm membrane 필터(Millipore, Membrane Filter, Ireland)로 여과한 상등액을 항균력 측정을 위한 시료로 사용하였다. 각각의 테스트균주가 도말된 고체배지에 80 μl의 배양상등액이 흡수된 8 mm paper disc를 올려놓고 37°C에서 12시간 배양한 후 생육억제환을 측정해 항균력을 조사하였다.

### 분리균주의 항생제 감수성

항생제 감수성은 disc diffusion method로 측정하였다[9]. 분리된 유산균을 MacFarland scale 0.5로 보정하였으며, MRS agar에 100 μl 분주하여 도말하였다. 유산균이 도말된 배지에 농도 별로 접종된 항생제 paper disc를 올려놓고 37°C에서 24시간 배양하여 항생제의 감수성 정도를 조사하였다.

### Bile salt hydrolase (BSH) 활성 및 콜레스테롤 동화능 조사

Bile salt hydrolase (BSH) 활성 여부는 0.5% (w/v)의 taurodeoxycholic acid sodium salt (Sigma, Deisenhofen, Germany)와 CaCl<sub>2</sub> (0.37 g/l)가 함유된 MRS agar에 선발균주의 전배양액 10 μl를 분주한 뒤 48시간 배양한 후 흰색 침전환

의 여부를 확인하였다[12]. 그리고 콜레스테롤 동화능의 측정 은 24시간 배양한 배양액을 3 mM 콜레스테롤이 함유된 MRS broth 100 ml에 접종( $10^8$  cfu/ml<sup>1</sup>)한 후 24시간 동안 배양하였다. 원심분리(10,000× g, 10분, 4°C)하여 얻은 상등액 1 ml에 95% 에탄올 3 ml과 0.5 M potassium hydroxide 2 ml을 가한 후 10분간 60°C 항온수조에서 반응시켰다. Hexane을 첨가하고 10분간 실온에서 방치 후 hexane층을 회수하여 질소가스하에서 증발시키고 잔여물에 *o*-phthalaldehyde (0.5 mg)용액을 첨가하였다. 이 후 진한황산 2 ml을 가한 후 10분간 반응시켰으며 550 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 콜레스테롤 양을 정량하였다[2,12].

결 과

유산균의 분리 및 동정

김치로부터 CaCO<sub>3</sub>를 함유한 MRS agar에서 넓은 투명환을 생성하는 균주를 수십종 분리하였다. 분리 유산균의 *n*-hexadecane에 대한 부착능을 측정한 결과 각각 20.3% ~ 94.2%의 부착능을 가지는 것으로 확인되었다. 분리된 *Lactobacillus* sp. 균주 중에서 부착능이 가장 좋은 균주는 BCNU 9033로써 부착능이 51.2%이었으며, *Lactococcus* sp. 균주 중에서는 BCNU 9049가 부착능이 62.9%, *Leuconostoc* sp. 균주 중에서는 BCNU 9082가 65.2%로 가장 높게 나타났다 (Fig. 1). 프로바이오틱스로서의 필수적인 기능인 장내 부착능은 세포 표면의 소수성과 주요한 상관성이 있으므로[20] 소수성 정도가 94.2%로 가장 높은 BCNU 9070을 이하 시험균주로

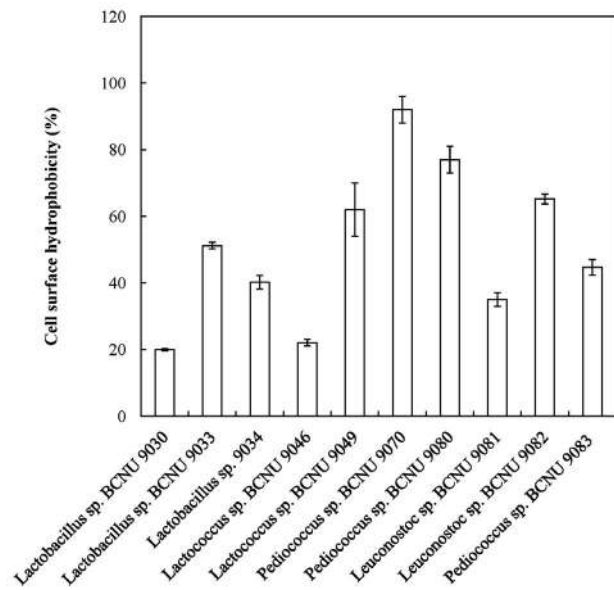


Fig. 1. Cell surface hydrophobicity of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070 strains. Error bars indicate standard errors. X-and Y-axes ~

선발하였다. 선발균주는 그람양성으로 pH 2.5-9.0의 넓은 pH 범위에서 생육가능하며 최적배양온도는 37°C로 나타났고, catalase음성이며 fructose, lactose, mannose, raffinose 등의 탄소원 자화능을 가지는 것으로 나타났다(Table 1). 16S 리보솜 DNA 염기서열의 분석결과를 NCBI BLAST를 이용해 *Pediococcus* 속들과 상동성 조사결과, *Pediococcus pentosaceus*와 99%의 상동성을 보이며 계통적으로도 *Pediococcus pentosaceus*의 subcluster에 속해 최종적으로 *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070으로 명명하였다(Fig. 2).

Table 1. Physiological properties of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070

Characteristic	BCNU 9070
Gram's staining	+
Catalase	-
Oxidase	-
Optimum growth temperature (°C)	37°C
Growth pH	2.5-9.0
Growth NaCl (%)	3-10%
Utilization of carbohydrates <sup>1)</sup>	
Arabinose	+
Cellobiose	-
Fructose	+
Galactose	-
Glucose	±
Lactose	+
Mannose	+
Mannitol	-
Raffinose	+
Rhamnose	-
Sucrose	-
Xylose	-

<sup>1)</sup>+: Positive reaction, ±: doubtful reaction, -: negative reaction

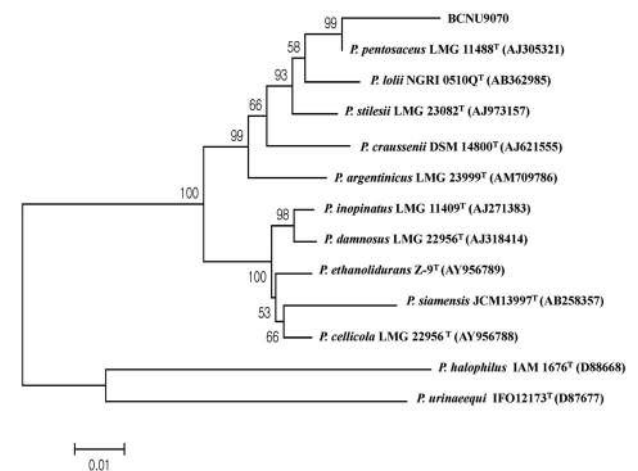


Fig. 2. A phylogenetic tree, showing the position of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070 among the *Pediococcus* species.

**인체유해성**

*P. pentosaceus* BCNU 9070은  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase, tryptophanase와 같은 암형성에 관여 할 수 있는 효소를 생성하지 않았다. 또한 유해대사산물로 알려진 urease, indole과 phenylpyruvic acid를 생성하지 않았으며 병원성인  $\beta$ -용혈현상을 나타내지 않았다. 따라서 유해효소, 유해대사산물 및 용혈현상을 가지지 않아 전체적으로 프로바이오틱스 균주로서 안전성이 있을 것으로 여겨진다(Table 2).

**안정성 조사**

초기 접종균수를  $8.1 \pm 1.3$  log cfu/ml로 하였을 때 pH 5.0에서는 4시간째의 생균수에서 8.2 log cfu/ml로 영향을 받지 않았으며 pH 4.0의 인산완충용액에서도 BCNU 9070 균주는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. pH 2.5에서 4시간 뒤의 생균수는 8.04 log cfu/ml로 확인되었으며 전체적으로 낮은 산에 대하여 안정성이 매우 우수한 것으로 확인되었다(Fig. 3). 담즙산에서 대조구와 비교할 때 0.3%, 0.6%, 1.0%의 담즙산의 농도에서 약간의 저해를 확인하였으나 내성은 가지고 있어 생육하는데 큰 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 그러므로 BCNU 9070 균주는 전체적으로 안정성이 우수한 것으로 나타났다.

**항균력**

병원성 균주와 *P. pentosaceus* BCNU 9070을 2회 계대 배양 및 10 ml 액체배지에 18~24시간 전배양하여 본시험에 사용하였다. 식중독균에 대하여 항균력을 측정된 결과 *B. cereus*와 *L. monocytogenes*에 각각  $11.87 \pm 0.71$  mm,  $14.21 \pm 0.52$  mm의 억제환을 나타냈으며 *S. aureus*에 대하여는  $11.72 \pm 0.73$  mm, *E. coli*에서는  $11.01 \pm 0.21$  mm의 억제환을 나타내었다. 또한 *S. sonnei*, *S. typhimurium*에 대하여 각각  $11.51 \pm 0.74$  mm,  $12.69 \pm 0.11$  mm의 항균활성을 가지는 것으로 확인되었다. 그리고 균류인 *A. niger*, *C. albicans*에 대하여도 각각  $12.05 \pm 0.35$

Table 2. Haemolytic activity and production of harmful enzymes and metabolites in *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070

	<i>E. coli</i> <sup>1)</sup>	BCNU 9070
Heamolysis <sup>2)</sup>	-	-
$\beta$ -glucosidase	+	-
$\beta$ -glucuronidase	+	-
Tryptophanase	+	-
Urease	-	-
Gelatinase	-	-
Indole	+	-
Phenylpyruvic acid	-	-

<sup>1)</sup>Positive control: *E. coli* ATCC 10798

<sup>2)</sup>+: Positive reaction, -: negative reaction

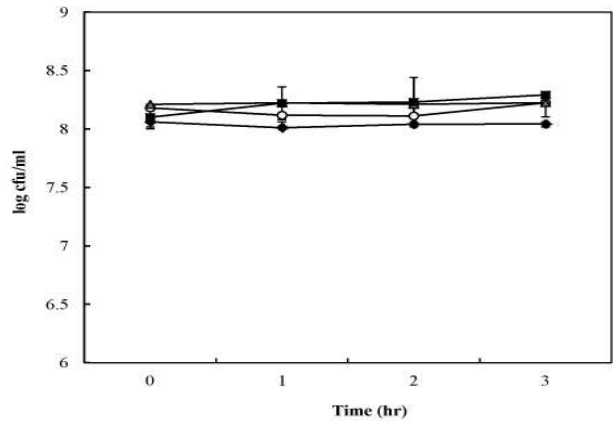


Fig. 3. Acid tolerance of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070. Colony forming unit of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070 in pH 2.5, 3.0, 4.0 or 5.0. ◆: pH 2.5, ○: pH 3.0, ▲: pH 4.0, ■: pH 5.0.

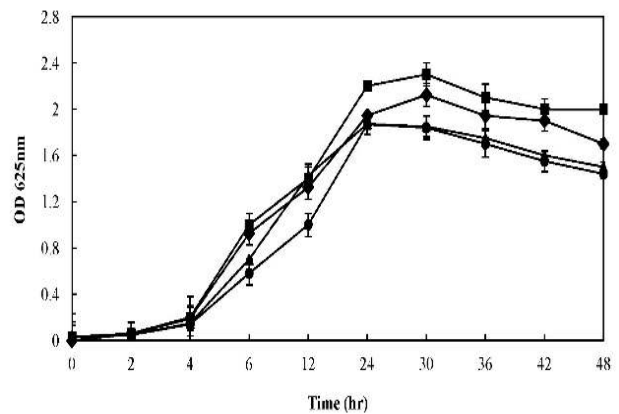


Fig. 4. Bile acid tolerance. Bile acid tolerance was measured by cultivating *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070 in MRS broth containing 0%, 0.3%, 0.6% or 1.0% oxgall at 37°C for 48 hr. ■: control, ◆: 0.3%, ▲: 0.6%, ●: 1.0%.

mm,  $14.31 \pm 1.20$  mm의 억제환을 나타내어 세균을 대상으로 한 실험결과와 동일하게 항균활성을 나타내었다(Table 3).

**항생제감수성**

BCNU 9070 균주는 다양한 항생제 중에서 다섯개의 항생제에 대하여 감수성을 보였다. 즉 세포벽 합성저해제인 penicillin G, ampicillin과 aminoglycoside계 항생제인 gentamicin에 대하여는 내성을 나타내었으나 tetracycline, erythromycin, clindamucin, lincomycin 및 chloramphenicol에 대하여는 감수성을 가지는 것으로 나타났다(Table 4).

**소수성 및 응집능조사**

선발균주의 세포표면특성을 상세히 알고자 용매에 부착되는 용매부착능으로 표시하는바 xylene, ethylacetate, chloroform의 용매에서 각각 90%, 88%, 52%의 부착능을 나타내었다

Table 3. Antimicrobial activities of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070 against food-borne pathogens and fungal strains

Strains	Inhibition zone (mm) <sup>1)</sup>
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	11.87±0.71 <sup>2)</sup>
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	14.21±0.52
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	11.72±0.73
<i>E. coli</i> ATCC 10798	11.01±0.21
<i>S. sonnei</i> ATCC 25931	11.51±0.74
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	12.69±0.11
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	14.31±1.20
<i>A. niger</i> KACC 40280	12.05±0.35

<sup>1)</sup>paper disc 8 mm

<sup>2)</sup>Each value in the table represents the mean value±standard deviation (SD) from three trials.

Table 4. Antibiotics susceptibility of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070

	Disc conc.	BCNU 9070 <sup>1)</sup>
Ampicillin	10 µg	R
Chloramphenicol	10 µg	S
Clindamucin	2 µg	S
Gentamicin	10 µg	R
Lincomycin	2 µg	S
Penicillin G	2 µg	R
Streptomycin	10 µg	S
Tetracycline	30 µg	S

<sup>1)</sup>R: resistant, S: sensitive.

Table 5. Aggregation activity of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070

Strain	Aggregation (%)				
	Time				
	1	2	3	4	5
BCNU 9070	15.7±0.8	21.4±4.2	37.0±2.8	44.5±5.8	61.4±3.7

(Fig. 5). 그리고 응집능조사 결과 본 시험균주인 *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070는 1시간째에 15.7%의 자가응집능을 보였으며 2시간째에는 21.4%로 나타났다. 최종적으로 5시간 후 BCNU 9070 균주의 자가응집능은 61.4%로 측정 되었다 (Table 5).

**Bile salt hydrolase (BSH)활성 및 콜레스테롤 동화능**

BSH indicator agar에서 48시간 배양한 결과, 흰색 침전환의 생성이 확인되었으므로 BCNU 9070 균주는 BSH활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 경시적으로 잔존 콜레스테롤 양을 측정하여 콜레스테롤 동화능(%)을 산정하였으며 균주의 증식율을 조사하였다. BCNU 9070 균주는 24시간째에 64.5%의 가장 높은 콜레스테롤 동화능을 나타냈으며 균의 증식과

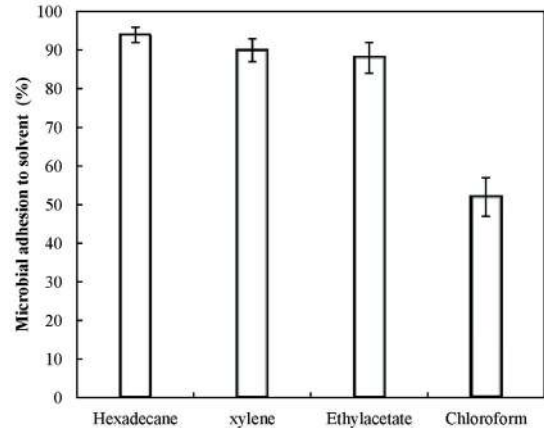


Fig. 5. Cell adhesion capacities were measured by cultivating *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070 in PBS buffer containing 50% hexadecane, 50% xylene, 50% ethylacetate or 50% chloroform.

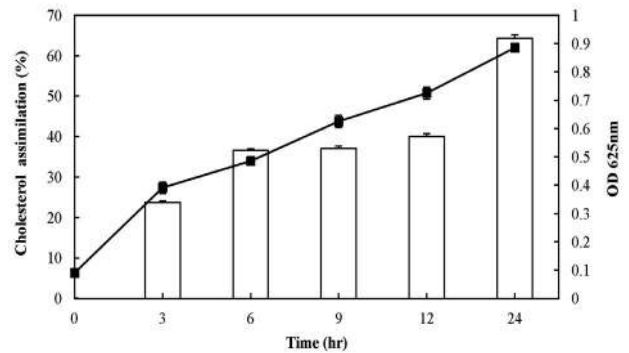


Fig. 6. Cholesterol assimilation. □: cholesterol assimilation (%), ■: cell growth (OD 625 nm).

함께 동화능도 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

**고 찰**

*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* 그리고 *Pediococcus*와 같은 유산균은 대부분 식품첨가물로써 미국 식품의약품 안전청(USA Food and Drug Administration)의 승인을 받은 GRAS (generally recognized as safe)균주이다[7,14]. BCNU 9070 균주는 한국의 김치로부터 분리한 *Pediococcus*속 균주로서 GRAS에 속하며 인체유해성 평가 결과에서도 안전한 것으로 확인되었지만 동물실험을 통한 보다 정확한 안전성확인 요구된다.

이러한 식품에 첨가되는 유산균은 1차적으로 강산의 위액과 담즙산에서 견딜 수 있는 능력을 가지고 있어야 하는데, pH 3.5에서 87.74%의 생존률을 보였으며 0.3% 농도의 담즙산에서 114.01%의 생존률을 나타낸다고 보고된 *Pediococcus* sp. GS4 [7]의 경우와 유사하게 *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070는 안정성이 높은 균주로 조사되었다. 또한 유산균인 *L.*

*acidophilus*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*가 pH 3.0에서 0.01%~68.3%의 생존률과 0.15% 농도의 담즙산에서 10.3%~57.4%의 생존률을 가지고 있음[3,18]과 비교하여 다소 우수한 안정성을 나타내었다. 그러므로 선발된 BCNU 9070 균주는 장 산과 담즙산에서 높은 생존능력을 가지고 있는 것으로 판단 되므로 인체에서의 사용에서 안정성 확보가 가능할 것으로 예상된다.

본 연구에서 사용 된 *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070은 식중독균인 3종의 그람양성세균 *B. cereus*, *L. monocytogene*와 *S. aureus* 그리고 3종의 그람음성세균 *E. coli*, *S. sonnei*와 *S. typhimurium*에 대하여 항균활성을 가지고 있었다. 이들 유산균이 생산하는 1차 대사산물인 과산화수소와 유기산 등이 병원균의 생육을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 대부분의 유산균이 생산하는 다양한 bacteriocin에 관한 연구는 친환경식품 생산을 위한 식품산업 분야에서 오래전부터 관심을 가지고 연구되어 온 분야이다. *Pediococcus*속 균주 중 *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* 및 *P. parvulus* 등이 다양한 bacteriocin을 생산하며[4], 특히 *P. acidilactici*가 생산하는 열에 안정한 pediocin AcH (PA-1)가 대표적인 bacteriocin이다[8]. 이와같이 BCNU 9070 균주도 유기산과 bacteriocin 등을 생산하여 세균증식을 억제하는 것으로 판단되므로 항균활성 물질의 규명을 위한 물질정제와 구조해석에 관한 심층적인 추가연구가 요망된다.

*Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070은 3가지 항생제에 내성을 가지고 있는 것으로 확인되었고 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* sp.에서 vancomycin에 대한 내성을 고유한 특징으로 가지는 경향이 보고된 바 있다[18]. 그런데 항생제 감수성이 유산균에 필요하다는 보고도 있으나, 항생제의 섭취는 종종 장내 정상균총의 균형을 혼란시켜 불균형을 유발하는 부작용이 있다. 이에 항생제내성 프로바이오틱스 미생물의 투여로 장내 정상균총 비율유지에 도움을 주거나 또는 항생제 치료를 받은 후의 장내균총의 빠른 복원에 도움을 줄 수도 있다. 그러므로 BCNU 9070 균주가 가지는 항생제내성 특성은 실제 항생제 투여환자의 선택적인 프로바이오틱스 제제로서 개발에서 유용한 인자가 될 수도 있는 것으로 예상된다.

또한 미생물의 세포 표면의 특성 중 높은 소수성은 장내 세포 표면의 부착능과 연관성이 높다는 연구가 보고 되었으며, 자가응집능 역시 부착을 위한 바이오필름형성을 형성해 미생물의 군집화에 주요한 요인이 된다[18]. *L. rhamnosus* GG는 53.3%의 소수성을 가지며 caco-2 세포에 대한 부착능은 11.3%로 보고된 바 있다. 뿐만 아니라 51.3%의 소수성을 가지며 1시간 뒤의 자가응집능이 8.3%인 *P. acidilactici* ET 34의 caco-2세포 부착능은 13.7%로 이는 프로바이오틱스 상품인 *L. rhamnosus* GG보다 우수한 것으로 나타났다[19]. 따라서 위와 비교할 때 종합적으로 BCNU 9070 균주는 높은 소수성과 응집능을 가져 장내부착능이 우수할 것으로 판단된다.

유산균의 BSH는 담즙산을 분해함으로써 장내환경에서 유산균의 생존률을 높여주며 BSH활성을 가지는 유산균은 체내 콜레스테롤 농도를 감소시킴으로써 인체에서도 유용한 것으로 보고되고 있다[11]. BCNU 9070 균주도 BSH활성을 가지며 콜레스테롤 농도를 감소시키고 내산성 및 내담즙산에 대한 안정성이 우수한 균주이므로 실제 섭취 시 프로바이오틱스 균주로서 혈중 콜레스테롤 감소의 기능성도 나타낼 것으로 예상된다.

본 연구에서는 김치로부터 분리한 *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070의 항생제 내성, 항균활성, 콜레스테롤동화능에 관하여 조사하였으며, 낮은 pH와 담즙산에서 내성 및 자가응집능력을 확인한 결과 신규 프로바이오틱스 균주로서 적합함을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국연구재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과임.

## References

- Alexander, D. L. and Fisher, F. 1995. A convenient synthesis of 7 $\alpha$ -hydroxycholest-4-en-3-one by the hydroxypropyl- $\beta$ -cyclo-dextrin-facilitated cholesterol oxidase oxidation of 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -cholest-5-en-3, 17 - diol. *Steroids* **60**, 290-294.
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chen, C. G., Richmond, W. and Paul, C. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**, 470-475.
- Bang, J. H., Shin, H. J., Choi, H. J., Kim, D. W., Ahn, C. S., Jeong, Y. K. and Joo, W. H. 2012. Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates. *J. Life Sci.* **22**, 251-258.
- Bennick, M. H. J., Verheul, A., Abee, T., Naaktgeboren-Stoffels, G., Forris, L. G. M. and Smid, E. J. 1997. Interactions of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity. *Appl. Environ. Microb.* **63**, 36280-3636.
- Chenfeng, L., Yixin, T., Longgang, W., Wenming, J., Yili, C. and Shenli, Y. 2002. Bioconversion of yolk cholesterol by extracellular cholesterol from *Brevibacterium* sp. *Food Chem.* **77**, 457-463.
- Chengtao, W., Yanping, C., Baoguo, S., Baoping, J., Robert Nout, M. J., Ji, W. and Yonghuan, Z. 2008. Preparation and some properties of cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. R142. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 2149-2157.
- Cowri, S. and Asit, R. G. 2010. *Pediococcus* spp. - A potential probiotic isolated from Khadi (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequence analysis. *Afr. J. Food. Sci.* **4**, 592-602.
- Diep, D. B., Godager, L., Brede, D. and Nes, I. F. 2006. Dataminig and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus*

- ATCC 25745. *Microbiology* **152**, 1649-1659.
9. Eijin, V. G. H., Seie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B. and Nes, I. F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microb.* **64**, 3275-3281.
  10. Garvie, E. I. 1986. Genus *Pediococcus*. pp. 1075-1079, In Sneath, P. H. A., Mair, M. E., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, *Williams & Wilkins*, Baltimore.
  11. Maire, B., Colin, H. and Cormac, G. M. G. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1729-1738.
  12. Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C. M. A. P., Kutima, P. M., Mbugua, S., Shin, H. K. and Holzapfel, W. H. 2008. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 57-64.
  13. Mercenier, A., Pavan, S. and Pot, B. 2003. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 99-100.
  14. Ozlem, O., Fadime, K. and Ingolf, F. N. 2011. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceus* OZF, isolated from human breast milk produces pediocin ACh/PA-1. *Afr. J. Food Sci.* **10**, 2070-2079.
  15. Reid, G., Jass, J. Sebulsky, M. T. and McCormick, J. K. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 658-672.
  16. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **79**, 426-434.
  17. Shin, H. J., Bang, J. H., Choi, H. J., Kim, D. W., Ahn, C. S., Jeong, Y. K. and Joo, W. H. 2012. Probiotic potential of indigenous *Bacillus* sp. BCNU 9028 isolated from *meju*. *J. Life Sci.* **22**, 605-612.
  18. Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. 2008. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. *Ann. Microbiol.* **58**, 661-670.
  19. Todorov, S. D., Furtado, D. N., Saad, S. M. I., Tome, E. and Franco, B. D. G. M. 2010. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 971-986.
  20. Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y. and Ahn, J. 2009. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Let. Appl. Microbiol.* **49**, 434-442.

**초록 : 프로바이오틱 *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070 균주**

신화진<sup>1</sup> · 최혜정<sup>1</sup> · 김동원<sup>2</sup> · 안철수<sup>3</sup> · 이영근<sup>4</sup> · 정영기<sup>5</sup> · 주우홍<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>창원대학교 생물학과, 생명공학협동과정, <sup>2</sup>창원대학교 미생물학과, <sup>3</sup>조아제약, <sup>4</sup>부산대학교 식품공학과, <sup>5</sup>동아대학교 생명공학과)

유산균은 일반적으로 프로바이오틱스 균주로 알려져 있다. 가능성이 있는 프로바이오틱스 균주는 세포결합과 부착능 즉, 장상피세포 부착능 및 세포표면의 소수성이 기초적으로 구비되어야 한다. 본 연구에서는 김치로부터 몇몇의 토착 유산균을 분리하였으며, 세포표면 소수성에 근거한 가능성이 있는 프로바이오틱스로서 유산균 한종을 선발하였다. 프로바이오틱스균주로서 선별한 분리균주(BCNU 9070)의 16S 리보솜DNA 염기서열을 분석한 결과 *Pediococcus pentosaceus*에 속하는 균주임이 확인되었다. *P. pentosaceus* BCNU 9070 균주는 위액과 담즙산에 대하여 내성을 가졌으며 또한 *Listeria monocytogenes* 및 *Shigella sonnei*를 포함하는 6종의 식중독 병원균에 대하여 생육저해활성도 나타내었다. 게다가 *P. pentosaceus* BCNU 9070 균주는 담즙산 가수분해활성 및 콜레스테롤 동화능도 있음이 확인되었다. 이들 결과를 기초로, *P. pentosaceus* BCNU 9070은 기능성 식품에 적용가능한 천연 프로바이오틱스 특성을 가지고 있다고 판단된다.