

ARTICLE

Lactobacillus plantarum KI134의 생리적 특성 및 이 균에 의한 우유 발효물의 항비만효과

김슬기 · 임상동*

한국식품연구원

Physiological Characteristics and Anti-Obesity Effect of Milk Fermented by *Lactobacillus plantarum* KI134

Seulki Kim and Sang-Dong Lim*

Korea Food Research Institute, Wanju, Korea



Received: December 10, 2020
Revised: December 14, 2020
Accepted: December 15, 2020

*Corresponding author :
Sang-Dong Lim
Korea Food Research Institute, Wanju,
Korea
Tel : +82-63-219-9082
Fax : +82-63-219-9288
E-mail : limsd@kfri.re.kr

Copyright © 2020 Korean Society of Dairy Science and Biotechnology.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID
Seulki Kim
<https://orcid.org/0000-0002-0064-9366>
Sang-Dong Lim
<https://orcid.org/0000-0002-1500-4413>

Abstract

This study aimed to investigate the physiological characteristics and anti-obesity effects of milk fermented by *L. plantarum* KI134. The lipase, α -amylase, and α -glucosidase inhibitory activities of milk fermented by *L. plantarum* KI134 was $94.57 \pm 1.25\%$, $9.44 \pm 2.85\%$, and $2.74 \pm 1.24\%$ (10 fold dilution), respectively. *L. plantarum* KI134 showed higher sensitivity to clindamycin and erythromycin in comparison to sixteen different antibiotics. It demonstrated the highest resistance toward ampicillin and vancomycin. The strain showed higher β -galactosidase, leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, β -glucosidase, and N-acetyl- β -glucosaminidase activities compared to other enzymes. It also did not produce carcinogenic enzymes, such as β -glucuronidase. The survival rate of *L. plantarum* KI134 in 0.3% bile was 96.90%. Moreover, the strain showed a 91.45% survival rate at a pH of 2.0. *L. plantarum* KI134 has resistance to *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* at the rates of 70.00%, 68.18%, 59.05%, and 40.63%, respectively. *L. plantarum* KI134 (23.01%) showed higher adhesion ability than the positive control (16.32%) *L. rhamnosus* GG. These results demonstrated that milk fermented by *L. plantarum* KI134 demonstrated an anti-obesity effect under *in vitro* conditions, with confirmed potential as a probiotic.

Keywords

Lactobacillus plantarum, physiological characteristics, anti-obesity, fermented milk products

서론

비만은 지난 수십 년 동안 성인과 어린이 모두에서 꾸준히 증가해 왔는데, 특히 우리나라 성인 남성의 비만유병률은 지난 20년간 25.1%에서 42.8%로 17.7% 증가하였다[1]. 비만은 식욕 조절 및 에너지 대사의 복잡한 장애로 유전적, 환경적, 심리적 요인의 상호 작용에 의해 조절된다[2-4]. 특히 비만은 심혈관 질환, 뇌졸중, 제2형 당뇨병 및 다양한 형태의 암과 같은 질병을 유발하게 된다[5,6]. 비만 및 합병증의 유병률은 치료 및 사회경제적 손실 비용이 막대한 세계적인 문제로서 비만 예방을 위한 관심이 증가하고 있다[7,8].

비만 치료 및 예방에 있어 지난 몇 년 동안 프로바이오틱스가 효과가 있음을 입증된 연구들이 있다 [9]. Lee 등[10]은 8주에 걸쳐 수행된 *Lactobacillus rhamnosus* PL60은 에너지 섭취를 줄이지 않고 체중을 줄이며 백색 지방 조직을 현저하게 감소시켰다고 하였으며, apoptosis 및 uncoupling protein-2(UCP-2) mRNA 수준의 신호는 지방 조직에서 증가한 반면, 지방산 합성 효소와 혈청

렙틴은 동시에 감소하였다고 하였다. 이는 프로바이오틱스에 의한 t10, c12 결합 리놀레산의 생산에 기인한다고 하였다. *Lactobacillus gasseri* 및 *paracase*와 같은 몇 가지 다른 *Lactobacillus* 균주는 항 비만 및 항 염증 효과에 대해 연구되었는데, 24주 동안 진행된 연구에 따르면 10% 지방식이 섭취 마우스에 *Lactobacillus gasseri* SBT2055를 투여하면 지방 조직에서 CCL2 및 CCR2와 같은 전 염증성 유전자의 발현이 감소하고, 체중 증가 및 지방 축적이 방지되었다고 보고하였다[11]. Sato 등[12]은 *L. gasseri* SBT2055를 환원유를 먹인 쥐는 평균 지방 세포 크기가 현저히 감소하고, 렙틴과 콜레스테롤이 감소하였다고 하였다. 항 비만 효과가 있는 또 다른 *Lactobacillus gasseri* 균주인 BNR17은 12주 동안 매일 두 번 투여했을 때 고 탄수화물 식단을 먹인 생쥐에서 체중, 백색 지방 조직 중량, 혈청 렙틴 및 인슐린 수치가 감소하였다[13].

젖산균을 이용한 발효산물이 항비만에 관한 연구로는 김치에서 분리한 *L. plantarum* DK211을 농축유청단백으로 제조된 발효유청음료가 고지방식이를 섭취한 수컷 쥐에 급여 후 항 비만 활성을 평가한 결과, 식이 조절, 체중 조절, 지방 구성 및 혈청 지질 감소에 유의한 효과가 있었다고 보고하였다[14]. 또한 식이 유발 비만 쥐에서 *Lactobacillus plantarum* Q180으로 발효시킨 요구르트의 항 비만 효과를 조사한 결과, 고지방식이를 섭취한 수컷 쥐는 체중, 중성지방, 혈청렙틴, aspartate aminotransferase(AST), 부고환 지방무게, 지방세포 크기 감소가 있었다고 하였다[15].

최근 인구감소, 수입 유제품 증가 및 다양한 대체 음료 등으로 우유가 남아돌아 분유로 생산하게 되어 가공비 및 제품가격 하락으로 인해 낙농가 및 유업체에 심각한 경제적 어려움을 주고 있는 문제점이 있어 가능성이 부가된 고부가가치 소재로 개발할 필요성이 대두되었다.

본 연구는 비만억제 효능 있는 우유소재를 개발하기 위하여 우유에 *Lactobacillus plantarum* KI134를 발효시킨 산물이 항비만 효과가 있는지 여부 탐색과 *L. plantarum* KI134 균주의 생리적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 젖산균 분리 및 발효능 균주 선발

각각 지역과 종류가 다른 김치와 전국 원유검사소에서 목장별 원유를 채취하여, 브롬크레졸 퍼플(Bromocresol purple)과 소듐아자이드(sodium azide)를 첨가한 변형 MRS 배지[16]에서 순수 분리한 다음 노란색으로 변한 균락을 선발하였다. 탈지분유 10 g과 증류수 90 g을 첨가하여 10% 환원유로 제조하였다. 각 균주를 10% 환원유에 1% 접종한 후 37°C에서 18시간 및 24시간 배양 후 응고 여부를 확인하여 선발하였다.

2. 발효물 제조

10% 환원유를 80°C에서 1분 살균한 다음 선발된 균주를 1% 접종하고, 37°C에서 24시간 배양한 후 사용하였다.

3. Lipase 억제 활성 측정

Lee 등[17]의 방법을 변형하여 lipase 활성 저해능을 측정하였다. p-Nitrophenyl laurate(PNL)를 1% triton X-100이 포함된 5 mM sodium acetate에 0.1% 농도로 녹인 후 기질 용액으로 사용하였다. Porcine pancreatic lipase는 5 mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 16,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 효소 용액으로 사용하였다. 다음과 같은 농도로 reaction mixture를 만들어 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다(Table 1). 반응 후 405 nm에서 absorbance를 측정하며 blank는 enzyme를 증류수로, control은 발효시키지 않은 10% 환원유로 대체하였다. 각각 시료마다 enzyme

**Table 1.** Composition of reaction solution

Buffer	Volume (μ L)
Sample	100
Enzyme(porcine pancreatic lipase)	150
100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2)	200
Substrate (PNL)	250
Total volume	700

을 뺀 blank의 absorbance를 측정하여 시료의 색상을 보정하였다.

$$\text{Lipase inhibition activity(\%)} = \{1 - (A / B)\} \times 100$$

A : 시료의 absorbance

B : control의 absorbance

4. α -Amylase 억제활성 측정

α -Amylase 활성 저해능 측정은 Xiao 등[18]의 방법을 변형시켜 본 실험에 이용하였다. α -amylase를 0.1 g/10 mL 농도로 증류수를 이용해 희석시키고, 기질인 가용성 전분은 증류수로 0.5%로 제조한 후 시료와 혼합하여 25°C에서 10분간 반응시켰다. 0.1N HCl 용액으로 반응을 정지시킨 후 iodine 용액을 이용하여 30분간 발색하여 660 nm로 흡광도를 측정하였다. 결과는 α -amylase만을 처리하였을 때와 시료를 혼합하여 처리하였을 때의 흡광도를 비교하여 나타내었다.

$$\alpha\text{-amylase inhibitory activity(\%)} = \{1 - (A / B)\} \times 100$$

A : 시료의 absorbance, B : control의 absorbance

5. α -Glucosidase 억제 활성 측정

α -Glucosidase 활성억제 효과 측정은 Si 등[19]의 방법을 이용하여 측정하였으며, 효소는 효모로부터 얻어진 α -glucosidase(Sigma-Aldrich, USA)를, 기질은 p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(Sigma-Aldrich)를 사용하였다. α -Glucosidase는 증류수에 0.5 U/mL가 되도록 녹여서 효소 용액으로 사용하였고, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside는 100 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 3 mM이 되게 녹여서 기질 용액으로 사용하였다. 각 시료를 50 μ L씩을 첨가하고 α -glucosidase 효소를 25 μ L 및 200 mM potassium phosphate buffer(pH 6.5) 25 μ L에 취한 다음 37°C에서 10분간 incubation시킨다. 그 후 기질 용액 50 μ L 첨가하여 37°C에서 15분간 incubation시킨다. 반응을 정지시키기 위해 0.1 M Na₂CO₃ 375 μ L 첨가한 후 microplate reader(SpectraMax[®]i3, Molecular DEVICES, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 저해율을 산출하였다.

$$\alpha\text{-Glucosidase inhibitory activity(\%)} = \{1 - (A / B)\} \times 100$$

A : 시료의 absorbance, B : control의 absorbance

6. 3T3-L1 cell을 이용한 비만 세포 분화 억제능

1) 세포배양

3T3-L1 세포배양 방법은 Hemati 등[20]의 방법을 변형하여 사용하였다. Anti-adipogenic 활성

을 측정하기 위해 3T3-L1 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 5 % CO₂ 조건에서 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA)와 1% P/S를 첨가한 DMEM에서 배양되었다. 세포 분화를 지방 세포 유사 표현형으로 유도하기 위해, 세포를 6-well 조직 배양 플레이트의 well당 1.25×10^5 세포를 접종하였다. 2일마다 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx, Sigma-Aldrich), 1 μ M dexamethasone(Dex, Sigma-Aldrich) 및 10% FBS가 보충된 DMEM에 5 μ g/mL 인슐린(Sigma-Aldrich)을 포함하는 지방 세포 분화 배지를 2일 동안 첨가하였다. 6일 후 세포 분화가 완료되었다.

2) 시료 준비 및 처리

L. plantarum KI134를 MRS 배지에서 37°C, 18시간 배양한 후, 4°C에서 15분간 원심 분리(1,500 × g)하여 회수하고, 증류수로 3회 세척하여 남은 MRS 배지를 제거하였다. 이어서 균주를 동결 건조하고 10 mg/mL 농도로 증류수에서 재 현탁한 다음 초음파기를 사용하여 50초 동안 균질화 한 후 3분 동안 정치하는 과정을 3회 반복하였다. 최종적으로, *L. plantarum* KI134(10^9 CFU/mL) mL당 3T3-L1 세포가 100 μ g으로 처리하였다.

3) 3T3-L1 지방 세포의 Oil Red O 염색

세포 내 축적된 지질은 세포 내 지질과 특이적으로 결합하고 반응하는 Oil Red O(Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. Ramirez-Zacarias 등[21]의 방법을 변형하여 사용하였다. 분화된 세포를 PBS로 3회 세척한 후 10% 포르말린으로 고정하고 Oil Red O 용액으로 30분간 상온에서 염색하였다. 용액은 이소프로판올 mL당 Oil Red O 3.5 mg을 함유하고, 작업 용액은 60% Oil Red O stock 용액과 40% 증류수로 구성하였다. 염색 후 증류수로 3회 세척하여 염색액을 제거하였다. 그런 다음 2 mL의 이소프로판올을 건조된 well에 첨가하고 Oil Red O 용액으로 추출하고, 520 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포내 지방축적 정도를 측정하였다.

7. 선발 균주의 동정

분리 · 선정된 KI134 균주는 MRS 액체배지에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등[22]의 방법에 의하여 실시하였다. 순수 분리된 균주는 Gram 염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 생장, Catalase 생성, 15°C 및 45°C에서의 생장, glucose로부터 가스 생성, arginine으로부터 ammonia 생성을 측정하였으며, 현미경 관찰과 API 50 CHL kit(API bioMerieux, France)를 이용한 당 발효 실험을 실시하였다. 젖산균의 DNA sequence 분석에는 universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, Big Dye cycle sequencing 키트 v3.1(Applied Biosystems, USA)를 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭과정은 95°C, 5분을 한 후 95°C, 30초; 55°C, 2분; 68°C, 1분 30초를 30회 시행하였으며, 68°C, 10분으로 마무리 하였다. 서열 분석은 PCR product를 Montage PCR Cleanup kit(Millipore)로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer(Applied Biosystems, USA)로 자동 분석하였다.

8. 항생제 내성 시험

항생제 내성 시험은 MRS 액체배지에 *L. plantarum* KI134 균주를 접종하고 37°C에서 18시간 배양한 후, 각 항생제가 각 농도 별로 포함된 LAB susceptibility test 배지(Iso-Sensi test broth 90% + MRS broth 10% + 0.3 g/L L-cysteine)에 10^5 - 10^6 CFU/mL 수준으로 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후, 육안으로 관찰하여 생장 여부를 결정하였다. 항생제 내성 측정은 2배 희석방법을



사용하였으며, 억제된 가장 낮은 농도를 MIC(minimal inhibitory concentration) 값으로 결정하였다. 항생제는 Sigma-Aldrich로부터 구매하여 사용하였다. 항생제는 amikacin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, ampicillin, penicillin-G, oxacillin, bacitracin, polymyxin B, ciprofloxacin, tetracycline, clindamycin, erythromycin, rifampicin, vancomycin 및 chloramphenicol을 시험에 사용하였다.

9. 효소활성 시험

MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 동안 배양한 *L. plantarum* KI134 균주를 생리식염수로 희석하여 10^5 - 10^6 CFU/mL 수준의 시료를 조제한 후, API ZYM kit(API bioMerieux)를 이용하여 37°C에서 5시간 배양한 다음 효소반응시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0-5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의 alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase, β -fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

10. 내담즙성 실험

Gilliland와 Walker[23]의 방법에 따라 MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 배양된 *L. plantarum* KI134 균주를 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 배지와 대조구로서 oxgall을 첨가하지 않은 배지에 각각 1% 접종하였다. 37°C의 incubator에서 7시간까지 혐기 배양하면서 시간별로 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 혐기 배양하여 계수하였다.

11. pH 내성

Clark 등[24]의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 2, 3, 4 용액과 대조구로서 pH 6.4 용액을 제조하였고, 제조된 pH 용액 10 mL에 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에서 37°C, 24시간 배양된 *L. plantarum* KI134 균주(약 10^9 CFU/mL)를 1 mL씩 섞은 후 37°C에서 혐기 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 혐기 배양한 다음 계수하였다.

12. 항균력 실험

Gilliland와 Speck[25]의 방법에 따라 항균력 측정에 사용한 지시균인 *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*는 한국식품연구원으로부터 분양 받았으며, 지시균의 증식배지로서 *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*는 nutriunt 액체배지에서 호기적으로 37°C, 24시간 배양하였다. 혼합배양 및 대조군에 사용된 배지는 MRS 액체배지로서 젖산균과 지시균을 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 선택배지로서 *Escherichia coli*는 EMB agar, *Salmonella* Typhimurium은 Bismuth sulfite agar, *Listeria monocytogenes*는 Supplement(X123)가 함유된 Listeria Isolation Agar, *Staphylococcus aureus*는 Baird parker agar를 사용하여 37°C에서 6시간 배양하였다. 젖산균에 의한 지시균의 억제율은 다음의 식으로 구하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{대조군의 균수 CFU/mL} - \text{혼합배양 후의 균수 CFU/mL})}{\text{대조군의 균수 CFU/mL}}$$

13. 장내 부착성

실험에 사용한 HT-29 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)을 통하여 구입하였고, Kim 등[26]의 방법에 따라 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin(P/S; Gibco)이 첨가된 RPMI 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂/95% air가 공급되는 조건의 항온기(incubator)에서 배양하였다. HT-29 세포를 배양하기 위하여 세포를 12 well plate의 각 well에 10⁶ cells/well로 분주하고 2일에 한번씩 배지를 교체해 주며 실험 전날, 95%까지 세포가 자랄 때 serum free medium으로 교체하여 cell이 더 이상 자는 것을 막아주었다. 균주의 장내 부착능을 실험하기 위해 2차 계대배양한 균주 1 mL를 취해 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 serum free medium을 이용해 두 번 세척하였다. 세척한 균주를 RPMI 배지로 희석하여 O.D_{600nm}가 0.5가 나오도록 맞춘 후 0.1% peptone 용액으로 희석한 다음 BCP plate count agar에 pouring 하여 초기 균수를 측정하였다. OD값을 맞춘 균체 100 mL를 well에 분주 한 후 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양한 뒤 PBS를 이용해 붙지 않은 균을 5번 세척해 준다. Trypsin-EDTA 1 mL를 첨가하여 cell-bacteria를 떼어낸 후 0.1% peptone 용액으로 희석한 다음 BCP plate count agar에 pouring하여 균수를 측정하였다.

14. 통계분석

결과는 평균±표준편차(SD)로 나타내고, 통계분석은 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, SPSS Inc., USA)로 실시하였다. 유의차는 one-way ANOVA로 통계처리하였고, Duncan's multiple range tests를 사용하여 유의성 5% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 젖산균 분리 및 발효능 균주 선발

각 지역의 김치 50종과 전국 원유검사소에서 목장별 원유 180종을 채취한 후, Modified MRS 배지를 사용하여 노란색 집락 158개와 194개의 단일 균락을 분리하였다. 이때 10% 환원유에 각각의 균주를 접종한 결과, 김치 유래 158종 중 98종이 응고하였고, 원유 유래 194종 중 157종이 응고하거나 총 255종의 발효능 균주를 선발하였다.

2. 바이오컨버전 산물에 대한 비만억제능 평가

10% 환원유를 80°C에서 1분 살균한 다음 선발된 젖산균을 대상으로 1% 접종하고, 37°C에서 24시간 배양한 후 사용하였다. 10% 환원유 배양액의 lipase 억제활성, α -amylase 억제활성과 α -glucosidase 억제활성을 측정한 결과 KI134 균주에 의해 발효된 배양액이 각각 94.57±1.25%, 9.441±2.85%와 2.74±1.24%(10배 희석한 결과임)로서 지방분해억제 활성이 높게 나타내었다 (Table 2). 또한 지방세포 분화 억제능을 측정한 결과, 대조군 100%, KI134 균주에 의한 배양액은 76.40%로서 23.6%의 억제효과가 있었다(Fig. 1).

3. 선발 균주의 동정 및 DNA sequence

선발된 KI134 균주의 genus와 species를 결정하기 위하여 생리적, 생화학적 시험을 하였다. 선발된 KI134 균주는 Gram 양성을 나타내었고, 현미경으로 관찰시 rod 형태의 homo균이며, 산소 유무와 상관없이 잘 성장하였고, catalase와 운동성은 음성으로 나타났다. 45°C와 15°C에서는 생장

Table 2. Anti-obesity effects of milk fermented by KI134 strain

Strain	Lipase inhibition (%)	α -Amylase inhibition (%)	α -Glucosidase inhibition ¹⁾ (%)
KI134	94.57±1.25	9.44±2.85	2.74±1.24

1) Measurement after 10-fold dilution.

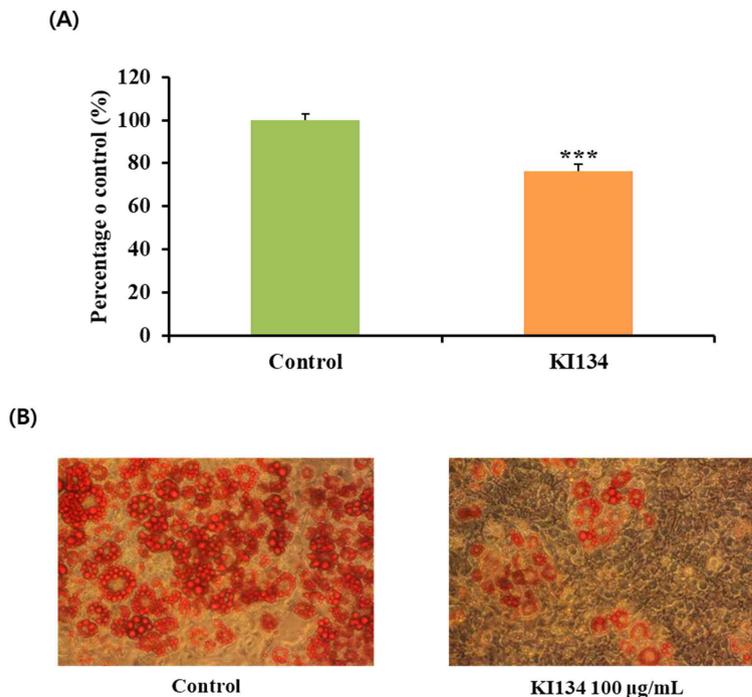


Fig. 1. The effects of skim milk fermented by *L. plantarum* KI134 on oil red O stained in 3T3-L1 adipocyte: (A) quantification of oil red O staining, *** significant difference from control at $p < 0.001$; (B) photograph of oil red O staining.

하지 않았으며, glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니아를 생성하지 않아 genus *Lactobacillus*에 속하였다(Table 3). Species를 정하기 위하여 API 50 CHL kit(BioMereux)를 이용하여 49종의 당 발효 시험을 실시한 결과(Table 4), KI134 균주는 L-Arabinose 등 21종으로

Table 3. Physiological characteristics of of *Lactobacillus plantarum* KI134

Strain	<i>Lactobacillus plantarum</i> KI134
Gram reaction	+
Cell type	rod
Spore forming	-
Motility	-
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	+
Catalase reaction	-
Growth at 15°C	-
Growth at 45°C	-
Gas forming from glucose	-
Ammonia production from arginine	-

+, positive; -, negative.

Table 4. Carbohydrate utilization of the *Lactobacillus plantarum* KI134 using the API 50 CHL system

Carbohydrate	Reaction	Carbohydrate	Reaction
Control	-	Esculin	+
Glycerol	-	Salicin	+
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	+	Starch	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β Gentiobiose	\pm
Rhamnose	\pm	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α -Methyl-D-mannoside	\pm	D-Arabitol	-
α -Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	+	2-Keto-gluconate	-
Arbutin	+	5-Keto-gluconate	\pm

+, positive; -, negative.

부터 산을 생성하였다. 16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열 분석하였다. 분석된 염기서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과, *L. plantarum*(I.D. 99%)으로 동정되었고, *Lactobacillus plantarum* KI134로 명명하였다.

4. *L. plantarum* KI134의 항생제 내성

내인성 항생제 내성을 가진 일부 probiotics 균주가 항생제 치료 후 장내 미생물을 복원하는 데 유용할 수 있다. 그러나 테트라사이클린 내성 유전자와 같은 이동성 유전적 요소에 전달되는 특정 항생제 내성 결정 인자는 흔히 전형적인 probiotics 균주 속에서 발견되며, 잠재적인 식품 또는 장내 병원균에 대한 내성 저장소를 구성하므로 심각한 안전 문제를 나타낸다[27].

따라서 시중에서 이용되고 있는 총 16가지의 항생제에 대해 *L. plantarum* KI134 균주가 내성이 있는지를 Table 5에 나타내었다. 그 결과, ampicillin과 vancomycin에 대한 항생제 내성의 MIC 농도가 4,096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로서 가장 내성이 높은 반면, clindamycin과 erythromycin에 대한 MIC 농도는 각각 0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로서 가장 감수성이 높은 것으로 나타났다. EFSA[28] 기준에 따르면 *L. plantarum*의 경우, ampicillin 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gentamicin 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kanamycin 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, erythromycin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, clindamycin 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tetracycline 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, chloramphenicol 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 감수성 여부 판단 기준이라고 설정함에 따라 *L. plantarum* KI134 균주는 ampicillin과 tetracycline이 내성이 있는 것으로 나타났다.



Table 5. Antibiotics susceptibility of *Lactobacillus plantarum* K1134

Anti-microbial agents	Minimal inhibitory concentrations ($\mu\text{g/mL}$)
Amikacin	8
Gentamycin	2
Kanamycin	32
Streptomycin	32
Ampicillin	>4,096
Penicillin-G	1
Oxacillin	4
Bacitracin	128
Polymyxin B	256
Ciprofloxacin	64
Tetracycline	64
Clindamycin	0.0625
Erythromycin	0.125
Rifampicin	4
Vancomycin	>4,096
Chloramphenicol	4

5. *L. plantarum* K1134의 효소활성

L. plantarum K1134의 효소활성 결과는 Table 6에서 보는 바와 같다. β -Galactosidase는 5을 나타내어 유당을 분해하여 유당을 소화시켜주는 잇점을 가지고 있어 유당불내증 해소에 도움이 될 것이라고 보이며, Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Acid phosphatase, β -glucosidase와 N-acetyl- β -glucosaminidase 역시 효소활성이 5를 나타내었다. 반면, 발암효소인 β

Table 6. Enzyme patterns of *Lactobacillus plantarum* K1134

Enzyme	<i>L. plantarum</i> K1134
Alkaline phosphatase	2
Esterase (C4)	1
Esterase Lipase (C8)	2
Lipase (C14)	1
Leucine arylamidase	5
Valine arylamidase	5
Cystinearylamidase	4
Trypsin	0
α -Chymotrypsin	0
Acid phosphatase	5
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	4
α -Galactosidase	0
β -Galactosidase	5
β -Glucuronidase	0
α -Glucosidase	4
β -Glucosidase	5
N-Acetyl- β -glucosaminidase	5
α -Mannosidase	0
α -Fucosidase	0

A value ranging from 0 to 2 is assigned to the standard color: zero represents a negative; 5 represents a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength: 1 corresponds to the liberation of 5nanomoles, 2 to 10 nanomoles, 3 to 20 nanomoles, 4 to 30 nanomoles, and 5 to 40 nanomoles or more.

-glucuronidase는 효소활성이 0으로 나타나 안전성이 있는 것으로 나타났다. Colombo 등[29]은 원유 및 낙농장 주변에서 500종의 균주를 분리하였고, 이중 15종의 젖산균을 분리하였는데, 모든 균주들이 leucine arylamidase, acid phosphatase와 naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에 양성을 보였고, 대부분의 균주들이 lipase, trypsin 및 β -glucuronidase 활성은 없었다고 한 결과와 유사하였다.

6. *L. plantarum* KI134의 내담즙성

담즙 내성은 소장에서 생존능력 즉 프로바이오틱스로서 꼭 지녀야 하는 특징 중 하나이다[30]. 소장에서 분비되는 담즙은 지질과 지방산을 주성분으로 하는 세포막을 파괴하여 박테리아의 생존을 감소시키기 때문에 probiotics로의 기능을 하기 위해서는 담즙에 대한 내성을 지니고 있어야 한다 [31,32]. 또한 적어도 0.3% 농도의 담즙산에서 생존해야지만 인간의 위 장간에서도 생존할 수 있다고 보고 있다[33]. *L. plantarum* KI134 균주의 담즙 내성 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 7시간 동안 배양 후 생균수를 비교해 보았을 때, 0.3% oxgall을 첨가하지 않았을 때의 생균수는 8.89 log CFU/mL, 0.3% oxgall을 첨가하였을 때의 생균수는 8.62 log CFU/mL로서 생존율은 96.90%로 나타났다.

7. *L. plantarum* KI134의 pH 내성

좋은 probiotics가 되기 위해서는 위장 이동 중에 생존해야 하며, 위액은 주로 펩신과 chlorhydric acid로 구성되어 공복 시 pH 1.5이지만 음식을 섭취하였을 경우 위의 pH는 pH 3-5까지 증가한다[34,35].

산에 대한 *L. plantarum* KI134의 내성 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 대조구인 pH 6.4에서의 균수와 비교한 결과, *L. plantarum* KI134 균주는 pH 3과 pH 4에서 3시간 경과시 8.29 log CFU/mL와 8.26 log CFU/mL로서 생존률 감소가 없었다. pH 2에서는 1시간 경과시 8.15 log CFU/mL로서 생존률이 98.7%이었고, 2시간 및 3시간 경과시 공히 8.13 log CFU/mL로서 98.5%의 생존률을 보여 거의 감소가 없었다.

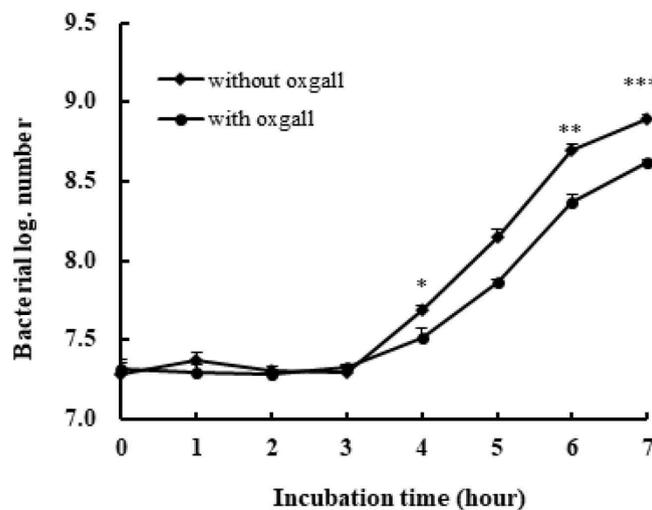


Fig. 2. Growth of *Lactobacillus plantarum* KI134 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with/without 0.3% oxgall. All values are within the mean \pm SD of the three replicates; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between with ox gall and without oxgall (t -test).

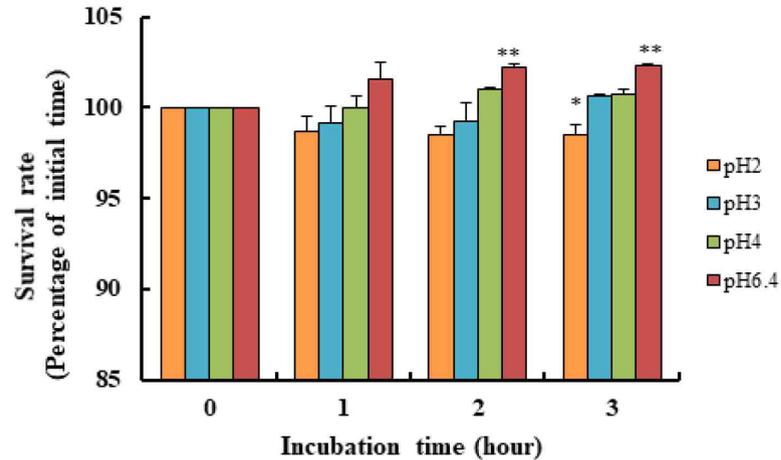


Fig. 3. Survival of *Lactobacillus plantarum* KI134 after three hours in HCl solution (pH 2.0, 3.0, 4.0, and 6.4). All values are within the mean±SD of the three replicates; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with initial time (*t*-test).

Hamon 등[36]의 실험에서 *L. plantarum* 균주 10종을 대조구 펩톤수(pH 6.5)와 pH 2.0에서 20분간 노출한 결과, 95.6%~98.9%의 생존율을 보인 결과와 비교해 보았을 때, *L. plantarum* KI134 균주는 내산성 실험에서 우수한 결과를 보였다.

8. *L. plantarum* KI134의 항균력

L. plantarum KI134가 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 7과 같다. *L. plantarum* KI134는 *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 70.00%, 68.18%, 59.05%, 40.63%로서 *Escherichia coli*와 *Salmonella* Typhimurium에 대해 억제효과가 높은 것으로 나타났다. 배양 후 pH의 변화를 보았을 때, 대조구인 식중독균은 pH 5.58~6.09이며, 혼합배양액은 pH 4.75~4.83으로서 pH가 약간 감소하였지만 pH의 저하가 식중독균의 억제에 큰 영향은 미치지 않은 것으로 보인다. 균주의 항균력은 같은 종의 균주라 하더라도 병원균에 따라 각기 다른 정도를 보인다 [37,38]. Daeschel[39]과 Havinaar 등[40]은 pH 강하, 산화 환원 전위의 감소, 유해균과의 경쟁적 영양성분 소비, 과산화수소의 생성, 젖산균이 생산하는 유기산과 박테리오신의 살균작용과 강한 항균 활성물질 분비에 의해 젖산균의 항균효과가 나타난다고 보고하였다. 본 실험에서 *L. plantarum* KI134에 의한 *Escherichia coli*와 *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*,

Table 7. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus plantarum* KI134 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ¹⁾		KI134+pathogens ¹⁾		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.00±0.27×10 ⁵	5.96	3.00±0.35×10 ⁵	4.75	70.00
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1.10±0.14×10 ⁷	6.09	3.50±0.70×10 ⁶	4.76	68.18
<i>Listeria monocytogenes</i>	7.00±2.80×10 ⁴	6.07	2.90±0.20×10 ⁴	4.83	59.05
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.20±0.26×10 ⁶	5.58	1.90±0.36×10 ⁶	4.82	40.63

All values are within the mean±SD of the three replicates.

Initial count of *Lactobacillus plantarum* KI134: 6.90±0.28×10⁶ CFU/mL.

¹⁾ Determined after 6 h of incubation at 37°C.

*Staphylococcus aureus*의 생육 억제에는 이러한 억제 요소들의 작용에 기인하는 것으로 사료된다.

9. *L. plantarum* KI134의 장내 부착성

숙주의 장 상피세포 부착능은 프로바이오틱 균주 선발의 주요 기준 중 하나이다. 프로바이오틱스의 점막 부착시간 연장은 위장 면역계와 숙주의 균총에 영향을 끼칠 수 있다. 따라서 장 표면의 부착능은 프로바이오틱 균주의 효율성과 일치하는 것으로 사료된다[41]. Fig. 4에서 보는 바와 같이 *L. plantarum* KI134는 23.01%가 HT-29 cell에 부착된 반면, 양성 대조구로 사용된 *L. rhamnosus* GG 균주는 16.32%가 부착되었다. Apostolou 등[42]에 따르면 사람 분변에서 분리된 10종의 *L. rhamnosus* 부착능이 0.64%-21.26%라고 한 결과와 비교해 볼 때 *L. plantarum* KI134 균주는 상피세포 표면에 부착능이 우수한 것으로 나타났다.

요약

본 연구는 각 지역의 김치와 목장 원유로부터 분리된 젖산균에 의한 우유발효물의 비만 억제능력을 평가하고, 이 균주의 생리적 특성을 규명하여 상업적으로서의 이용가능성을 검토하고자 실시하였다. 이를 위해 Modified MRS 분별배지를 사용하여 노란색 집락을 형성하는 균주를 대상으로 각각 10% 환원유에 배양한 발효물에 대해 lipase inhibitory activity, α -amylase inhibitory activity와 α -glucosidase inhibitory activity를 평가한 결과, KI134 균주가 최종 선발되었다. KI134 균주에 의한 발효물의 lipase 억제활성은 $94.57 \pm 1.25\%$, α -amylase 억제활성 $9.44 \pm 2.85\%$, α -glucosidase 억제활성 $2.74 \pm 1.24\%$ (10배 희석한 결과치임)이 나타났으며, 동정결과 *Lactobacillus plantarum*으로 판명되었고, *Lactobacillus plantarum* KI134로 명명하였다. *L. plantarum* KI134는 담즙산과 산성의 pH에서 모두 우수한 생존력을 나타내었고, 효소활성은 β -galactosidase, leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, β -glucosidase와 N-acetyl- β -glucosaminidase에 대해 높은 효소 활성을 나타내었다. 항생제 내성 실험 결과, ampicillin과 vancomycin에 내성이 있는 반면, clindamycin과 erythromycin에 감수성을 나타냈으며, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 70.00%, 68.18%, 59.05%와 40.63%의 억제 효과를 지니고 있는 것으로 나타났다. 장부 착성은 대조구인 *L. rhamnosus* GG보다 우수하였다.

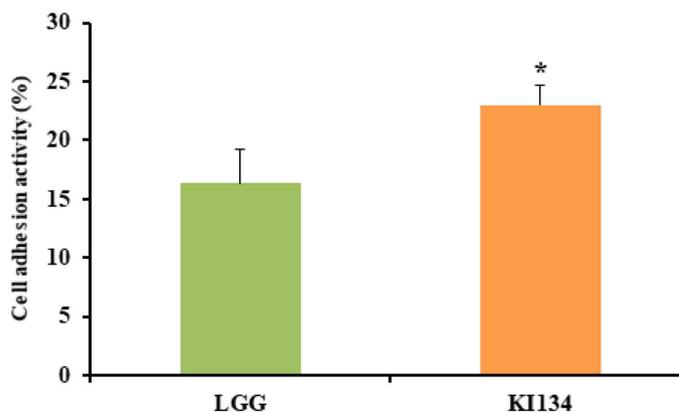


Fig. 4. Adhesion ability of *Lactobacillus plantarum* KI134 to HT-29 cell. All values are within the mean \pm SD of the three replicates. * $p < 0.05$ compared with control strain (t -test).



Conflict of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치 식품 기술 개발 사업의 지원을 받아 이루어진 것으로 이에 감사드립니다(No. 318091-03).

References

1. Korea Disease Control and Prevention Agency. Korea Health Statics 2018: Korea National health and Nutrition Examination Survey (KNAHANES VII-3). Cheongju: Korea Disease Control and Prevention Agency.
2. Sharma AM, Padwal R. Obesity is a sign-over-eating is a symptom: an etiological framework for the assessment and management of obesity. *Obes Rev.* 2009;11:362-370.
3. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000;404:635-643.
4. Nguyen MD, El-Serag BH. The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am.* 2010;39:1-7.
5. Cope MB, Allison DB. Critical review of the World Health Organization's (WHO) 2007 report on 'evidence of the long-term effects of breastfeeding: systematic reviews and meta-analysis' with respect to obesity. *Obes Rev.* 2008;9:594-605.
6. Dixon JB. The effect of obesity on health outcomes. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316:104-108.
7. Finkelstein EA, Trogdon JG, Brown DS, Allaire BT, Dellea P, Kamal BS. The lifetime medical cost burden of overweight and obesity: implications for obesity prevention. *Obesity.* 2008;16:1843-1848.
8. Cawley J, Meyerhoefer C. The medical care costs of obesity: an instrumental variables approach. *J Health Econ.* 2012;31:219-230.
9. Kang Y, Cai Y. The development of probiotics therapy to obesity: a therapy that has gained considerable momentum. *Hormones.* 2018;17:141-151.
10. Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ, Lee KE, et al. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761:736-744.
11. Miyoshi M, Ogawa A, Higurashi S, Kadooka Y. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice. *Eur J Nutr.* 2014;53:599-606.
12. Sato M, Uzu K, Yoshida T, Hamad EM, Kawakami H, Matsuyama H, et al. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr.* 2008;99:1013-1017.

13. Kang JH, Yun SI, Park HO. Effects of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on body weight and adipose tissue mass in diet-induced overweight rats. *J Microbiol.* 2010;48:712-714.
14. Hong SD, Chung EC, Kim CH. Anti-obesity effect of fermented whey beverage using lactic acid bacteria in diet-induced obese rats. *Korean J Food Sci An.* 2015;35:653-659.
15. Park S Y, Seong K S, Lim S D. Anti-obesity effect of yogurt fermented by *Lactobacillus plantarum* Q180 in diet-induced obese rats. *Korean J Food Sci An.* 2016;36:77-83.
16. Lim SD, Kim KS, Do JR. Physiological characteristics and production of vitamin K2 by *Lactobacillus fermentum* LC272 isolated from raw milk. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2011;31:513-520.
17. Lee YP, Chung GH, Rhee JS. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Acta.* 1993;1169:156-164.
18. Xiao Z, Storms R, Tsang A. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Anal Biochem.* 2006;351:146-148.
19. Si MM, Lou JS, Zhou CX, Shen JN, Wu HH, Yang B, et al. Insulin releasing and alpha-glucosidase inhibitory activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol.* 2010;128:154-159.
20. Hemati N, Ross SE, Erickson RL, Groblewski GE, MacDougald OA. Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP- α) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes: correlation with CLUT4 gene expression. *J Biol Chem.* 1997;272:25913-25919.
21. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochem.* 1992;97:493-497.
22. Hammes WP, Weiss N, Holzapfel W. The genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. In: Martin D, Stanley F, Eugene R, Karl-Heinz S, Erko S, editors. *The prokaryotes*. 2nd ed. Vol. 4. New York, NY: Springer-Verlag; 1992. p. 1563-1578.
23. Gilliland SE, Walker DK. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J Dairy Sci.* 1990;73:905-911.
24. Clark PA, Cotton LN, Martin JH. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult Dairy Prod J.* 1993;28:11-14.
25. Gilliland SE, Speck ML. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl Environ Microbiol.* 1977;33:15-18.
26. Kim SJ, Cho SY, Kim SH, Song OJ, Shin IS, Cha DS, et al. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT-Food Sci Technol.* 2008;41:493-500.
27. Gueimonde M, Sanchez B, de los Reyes-Gavilan CG, Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol.* 2013;4:202.



28. EFSA. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 2012;10:2740.
29. Colombo M, Castilho NPA, Todorov SD, Nero LA. Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. *BMC Microbiology.* 2018;18:219.
30. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol.* 2000;84:197-215.
31. Hirayama K, Rafter J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* 2000;2:681-686.
32. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002;82:279-289.
33. Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J Dairy Sci.* 1984;67:3045-3051.
34. Araya M, Morelli L, Reid G, Sanders ME, Stanton C. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting the guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, UK: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2002.
35. Shulkesa A, Baldwin GS, Giraud AS. Regulation of gastric acid secretion. In: Johnson LR, Barret KE, Gishan FK, Merchant JL, Said AM, Wood JD, editors. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 4th ed. Burlington, MA: Academic Press; 2006. p. 1223-1258.
36. Hamon E, Horvatovich P, Marchioni E, Aoudé-Werner D, Ennahar S. Investigation of potential markers of acid resistance in *Lactobacillus plantarum* by comparative proteomics. *J Appl Microbiol.* 2013;116:134-144.
37. Jacobsen CN, Nielsen VR, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:4949-4956.
38. Larsen AG, Vogensen FK, Josephsen J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J Appl Bacteriol.* 1993;75:113-122.
39. Daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *J Food Technol.* 1989;43:164-167.
40. Havinaar R, Brink BT, Veid JHJI. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R, editor. *Probiotics.* Dordrecht: Springer-Science Business Media; 1992. p. 209-224.
41. Juge N. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol.* 2012;20:30-39.
42. Apostolou E, Kirjavainen PV, Saxelin M, Rautelin H, Valtonen V, Salminen SJ, et al. Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001;31:35-39.