Curr. Top. Lact. Acid Bact. Probiotics 2022;8(2):103-107
https://doi.org/10.35732/ctlabp.2022.8.2.103
ISSN 2287-853X

Note

Leuconostoc mesenteroides CJNU 0147 균주를 적용한 발효 자몽추출물의 장내 유해세균 억제 및 비피도박테리아 증식 효과

오승준[1†] · 김자이[1†] · 김혜련[2] · 문기성[1*]

[1]한국교통대학교 생명공학전공
[2]한국식품연구원 전통식품연구단

Effect of Fermented Grapefruit Extract with *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 on the Growth Inhibition of Gut Harmful Bacteria and Stimulation of Bifidobacteria

Seung-Jun Oh[1†], Ja-I Kim[1†], HyeRyun Kim[2] and Gi-Seong Moon[1*]

[1]Major of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Republic of Korea
[2]Research Group of Traditional Food, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Republic of Korea

Received: Dec. 14, 2022
Revised: Dec. 19, 2022
Accepted: Dec. 23, 2022

†These authors are equally contributed to this work.

*Corresponding author :
Gi-Seong Moon
Major of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Republic of Korea.
Tel: +82-43-820-5251,
Fax: +82-43-820-5272,
E-mail: gsmoon@ut.ac.kr

ORCID
Seung-Jun Oh
https://orcid.org/0000-0002-5118-8600
Ja-I Kim
https://orcid.org/0000-0002-9427-9211
HyeRyun Kim
https://orcid.org/0000-0002-5308-7838
Gi-Seong Moon
https://orcid.org/0000-0003-3033-5250

Abstract

Grapefruit extract rich in functional substances adjusting pH 5.0 and adding sucrose (final concentration, 2%) was fermented by *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 strain, consequently prepared a fermented grapefruit extract containing dextran. As a result of analyzing the growth inhibitory effect on gut harmful bacterium *Clostridium difficile* strain using the prepared fermented grapefruit extract, the viable cell count was significantly reduced (p<0.05 vs. control for 0.5 brix as a final concentration; p<0.001 vs. control for 1.0 brix). On the other hand, the proliferative ability of the extract for *Bifidobacterium breve* strain, which is one of the species of the genus *Bifidobacterium* well known as human gut beneficial bacteria, was confirmed (p<0.001 vs. control for both 0.5 and 1.0 brix). These results indicate fermented grapefruit extract with *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 strain inhibits the growth of gut harmful bacterium *C. difficile* and promotes the proliferation of beneficial bacterium *B. breve* and is expected to be used as a functional food material for gut health.

Keywords

fermented grapefruit extract, *Leuconostoc mesenteroides*, dextran, bifidobacteria, gut health

서 론

자몽은 다른 감귤류와 마찬가지로 구연산과 같은 유기산이 풍부하며(Ivanova *et al.*, 2018), naringin, neohesperedin 같은 플라보노이드와 gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid 및 ferulic acid

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.

Copyright © Korean Society for Lactic Acid Bacteria and probiotics

등 항산화 물질이 다량 함유되어 있다(Xi *et al.*, 2015). 자몽의 pH는 약 3.0으로 비교적 낮고(Juven, 1976), 플라보노이드와 gallic acid, chlorogenic acid 등 phytochemicals가 풍부하여 일반적인 미생물들이 생장하기 어렵다.

덱스트란(dextran)은 복잡한 분지형 글루칸이며, C-1 → C-6의 당결합 효소인 dextransucrase를 가지고 있는 미생물에서 유래된 poly-α-d-glucoside이다(Du *et al.*, 2020; Moss *et al.*, 1995). *Leuconostoc mesenteroides* 균주가 생산하는 덱스트란은 비피도박테리아와 같은 장내 유익균과 상호작용하여 성장을 촉진한다(Kim *et al.*, 2022). 또한 장내 미생물 균총에 의한 덱스트란의 이용은 장내 pH를 낮추는 단쇄지방산(short chain fatty acid, SCFA)을 생성하며, 이는 장내 병원성 세균의 성장을 억제하여 장내 유익균을 활성화시킨다(Kim *et al.*, 2022; Kothari *et al.*, 2015; Mussatto *et al.*, 2007).

본 연구에서는 항산화 활성 등 기능성이 우수한 자몽추출물에 선행연구를 통하여 분리한 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주를 적용하여 덱스트란 생산 조건을 확립하였으며 발효 자몽추출물의 장내 유해세균 억제 및 유익균 증식능을 검증하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

Leu. mesenteroides CJNU 0147 균주는 선행연구를 통하여 분리하였고(Eom and Moon, 2010) 덱스트란 생산을 위한 발효 자몽추출물 제조에 사용하였다. 장내 유해세균 억제능 평가를 위해서 사용한 *Clostridium difficile* KCTC 5009 균주는 한국생명공학연구원 산하 생물자원센터(정읍시 소재)에서 분양받아 사용하였다. 비피도박테리아 증식능 확인을 위한 균주로는 *Bifidobacterium breve* KCTC 3220 균주(생물자원센터 분양)를 사용하였다. 유산균용 배양 배지는 MRS 배지(BD, Sparks, MD, USA)를 사용하였고 *B. breve* 균주와 *C. difficile* 균주는 RCM 배지(BD)를 이용하여 혐기챔버(DG250; Don Whitley Scientific Ltd., Bingley, UK)에서 배양하였다.

자몽추출물 배지

레드자몽농축액(63brix, HCS-4056, 이스라엘)을 (주)내츄럴코어(전북 고창 소재)로부터 제공받아 1차 증류수로 희석하고 sodium carbonate solution(33.3%)을 사용하여 pH 5.0으로 조정하였다. 액체배지(10 brix)는 sucrose 2%, 고체배지(10, 20 brix)는 sucrose 2%와 agar 1.5%를 첨가한 후 80℃, 30 min으로 살균하여 자몽추출물 배지로 사용하였다.

자몽추출물 고체배지에서 덱스트란 생산 확인

제조된 자몽추출물 고체배지(10, 20 brix)에 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주 배양액을 2 μL 점적한 후 25℃, 24 h 배양하여 콜로니 상에 점질물이 형성되는지 유무로 덱스트란 생성 여부를 확인하였다.

발효 자몽추출물의 유해세균 생육 억제능

자몽추출물 액체배지(10 brix, pH 5.0) 5 mL에 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주 배양액을 1% 접종한 후 25℃, 12 h 조건으로 배양하였다. 발효 자몽추출물을 80℃, 30 min 살균처리한 후 MRS agar plate에 도말하여 생균 유무를 확인하였다. 발효 자몽추출물의 장내 유해세균에 대한 생육 억제능을 확인하기 위하여 *C. difficile* KCTC 5009 균주를 사용하였다. *C. difficile* KCTC 5009 균주를 최적배지인 RCM broth 5 mL에 접종한 후 대조군(비 발효 자몽추출물)과 함께 발효 자몽추출물을 최종농도 0.5 brix와 1 brix로 첨가하였다. 이후 37℃에서 혐기배양하면서 경시적으로(0, 6, 12 h) 생균수를 측정하여 *C. difficile* KCTC 5009 균주의 생육 억제 유무를 판단하였다.

발효 자몽추출물의 비피도박테리아 증식능

상기의 방법으로 제조된 발효 자몽추출물을 대조군(비 발효 자몽추출물)과 함께 RCM broth 5 mL에 최종농도 0.5 brix, 1 birx로 각각 첨가하였다. 여기에 *B. breve* KCTC 3220 균주를 접종한 후 37℃에서 혐기 배양하면서 경시적으로(0, 6, 12 h) 생균수를 측정하여 비피도박테리아 증식 유무를 판단하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복실험을 진행하여 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS ver. 25(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 통계분석에 이용하였다. 일원분산분석(one-way ANOVA)으로 유의성을 검증하였으며, Dunnett t3 test ($p<0.05$)로 사후검정하였다.

결과 및 고찰

자몽추출물 고체배지에서 덱스트란 생산 확인

자몽추출물 고체배지(10, 20 brix)에 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주 배양액 2 μL를 점적한 후 25℃에서 24 h 동안 배양했을 때, 자몽추출물 10 brix 배지의 경우 12 h 이후에 점질물(덱스트란)이 생성되었고(Fig. 1A), 20 brix 배지는 24 h 이후에 점질물이 생성되었다(Fig. 1B). 이는 20 brix 배지에서 *Leu. mesenteroides*

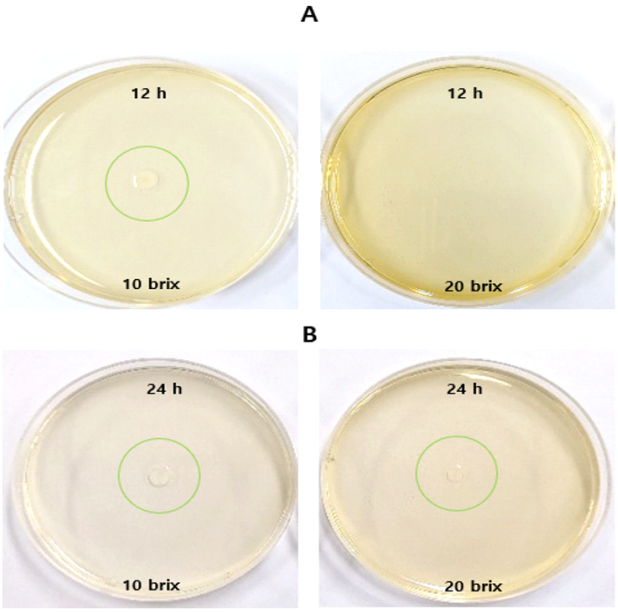

Fig. 1. Production of dextran when *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147 strain was cultured on 10 brix (A) and 20 brix (B) grapefruit extract agar plates.

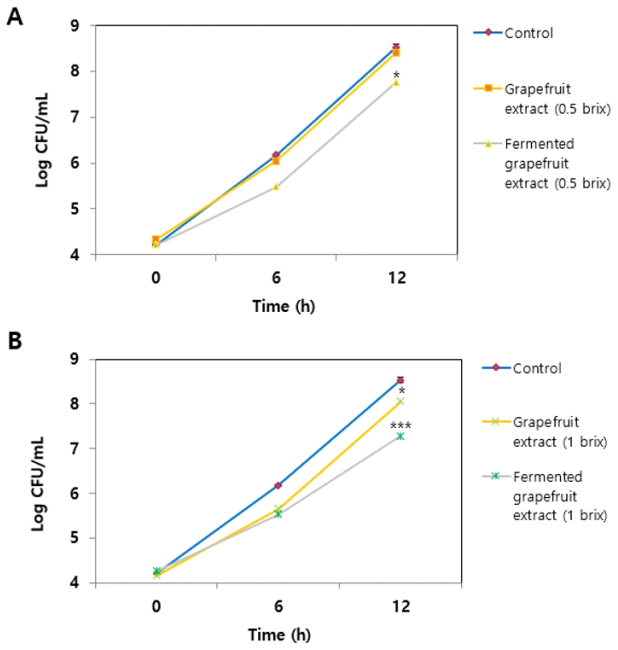

Fig. 2. Growth inhibition of *Clostridium difficile* KCTC 5009 by fermented grapefruit extract with *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147. A, 0.5 brix of final concentration of samples; B, 1.0 brix of final concentration of samples ($^{*}p<0.05$ vs. control (no addition); $^{***}p<0.001$ vs. control).

CJNU 0147 균주의 생육속도가 상대적으로 느려 점질물의 생성이 지연된 것으로 추론되었다. 본 연구에서 제조된 자몽추출물 배지는 다른 영양성분의 첨가없이 덱스트란 생성에 필요한 sucrose만 첨가하여 산업적인 측면에서 경제적이다. *Leu. mesenteroides* 균종은 dextransucrase(a glucosyltransferase; E. C. 2.4.1.5)라는 효소를 가지고 있어 sucrose(β-D-fructofuranosyl α-D-glucopyranoside)의 glucose 분자를 이용하여 덱스트란을 합성하고, fructose를 유리시킨다(Dols *et al.*, 1998). *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주 역시 sucrose를 이용하여 덱스트란을 생성하는 것으로 확인되었다. 생성된 덱스트란의 분자량 및 구조는 추가연구를 통하여 분석할 예정이다.

발효 자몽추출물의 유해세균 생육 억제능

발효 자몽추출물의 장내 유해세균 생육 억제능을 확인하기 위하여 *C. difficile* KCTC 5009 균주를 사용하였다. 최종농도 0.5 brix에서 자몽추출물(대조군)의 경우, *C. difficile* KCTC 5009 균주의 생균수가 무첨가군에 비해 거의 감소하지 않은 반면, 발효 자몽추출물은 12 h에 무첨가군 대비 0.78 log CFU/mL로 통계적으로 유의하게($p<0.05$) 감소하였다(Fig. 2A). 최종농도 1.0 brix에서 자몽추출물(대조군)은 *C. difficile* KCTC 5009 균주가 12 h에 무첨가군 대비 0.49 log CFU/mL($p<0.05$)로 감소하였고, 발효 자몽추출물은 12 h에 무첨가군 대비 1.25 log CFU/mL($p<0.001$)로 감소하여 대조군보다 발효 자몽추출물이 *C. difficile* KCTC 5009 균주에 대한 억제능이 더 우수하였다(Fig. 2B). 이는 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주를 적용한 자몽추출물의 발효과정에서 유기산을 포함한 *C. difficile* 생육 억제 대사산물들이 생산되었음을 의미한다.

발효 자몽추출물의 비피도박테리아 증식능

자몽추출물(대조군)과 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주 적용 발효 자몽추출물의 *B. breve* KCTC 3220 균주에 대한 증식능을 비교하였다. RCM broth 5 mL에 대조군 및 발효 자몽추출물의 최종농도가 0.5 brix, 1 brix 되도록 첨가한 후 12 h 배양하여 *B. breve* KCTC 3220 균주의 생균수를 비교한 결과, 무첨가군의 경우 5.60 log CFU/mL에서 시작하여 6, 12 h에 각각 7.16, 7.86 log CFU/mL 증가하였고, 최종농도 0.5 brix가 되도록 첨가한 대조군은 5.67 log CFU/mL로 시작하여 6, 12 h에 각각 7.31, 8.65 log CFU/mL로 증가하였다. 반면, 최종농도 0.5 brix가 되도록 첨가한 발효 자몽추출물은 5.79 log CFU/mL로 시작하여 6, 12 h에

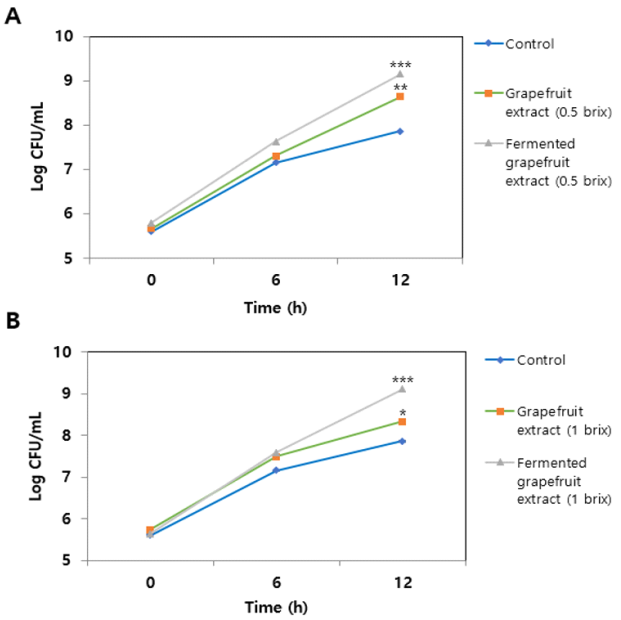

Fig. 3. Growth stimulation of *Bifidobacterium breve* KCTC 3220 by fermented grapefruit extract with *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147. A, 0.5 brix of final concentration of samples; B, 1.0 brix of final concentration of samples (**p*<0.05 vs. control (no addition); ***p*<0.005 vs. control; ****p*<0.001 vs. control).

각각 7.64, 9.15 log CFU/mL로 증가하여 12 h 기준 무첨가군 대비 1.29 log CFU/mL, 대조군 대비 0.50 log CFU/mL의 생균수 차이를 보였다(Fig. 3A). 시료의 최종농도를 1 brix로 첨가한 실험에서도 비슷한 경향이 관찰되었다(Fig. 3B). 이러한 결과는 자몽추출물 자체도 비피도박테리아 증식능을 가지고 있음을 의미하며 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주를 적용할 경우 증식능이 더 향상됨을 의미한다. 즉, 자몽추출물의 발효 과정에서 덱스트란을 비롯한 비피도박테리아 증식인자가 생산되었음을 추론할 수 있다. 서론에서 언급한 바와 같이 덱스트란은 비피도박테리아의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 선행연구에서 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주와 *Lactobacillus casei* CJNU 0588 균주를 동시에 접종하여 생산한 유청발효물의 비피도박테리아(*Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*) 증식능이 확인된 바 있다(Kim *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2011; Moon, 2013). 이러한 결과들을 종합해 볼 때 자몽추출물의 발효과정에서 생산되는 미생물 대사산물과 생물전환물이 복합적으로 비피도박테리아 증식능에 관여하였을 것으로 판단된다. 다만, 보다 정밀한 분석이 이루어지기 위해서는 발효 전 · 후 대사체 분석을 통하여 해석하는 것이 합리적일 것이다.

요 약

기능성 물질이 풍부한 자몽추출물의 pH를 5.0으로 조정하고 sucrose (최종농도, 2%)를 첨가한 후 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주를 적용하여 덱스트란이 함유된 발효 자몽추출물을 제조하였다. 제조된 발효 자몽추출물을 이용하여 장내 유해세균인 *C. difficile* 균주에 대한 생육저해 효과를 분석한 결과, 생균수가 유의적으로 감소하였다(0.5 brix, p<0.05 vs. control; 1.0 brix, p<0.001 vs. control). 반면, 인체 유익균으로 잘 알려진 비피도박테리움 속 균종 중에 하나인 *B. breve* 균주에 대해서는 증식능(0.5 brix, 1.0 brix, p<0.001 vs. control)이 우수하였다. 이러한 결과는 *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주 적용 발효 자몽추출물이 장내 유해세균의 성장을 억제하면서 동시에 유익균인 비피도박테리아의 증식을 촉진하는 것을 의미하며 향후 장내 건강기능성 소재로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Dols M, Remaud-Simeon M, Willemot RM, Vignon M, and Monsan P (1998) Characterization of the different dextransucrase activities excreted in glucose, fructose, or sucrose medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1298-1302.
2. Du R, Zhou Z, and Han Y (2020) Functional identification of the dextransucrase gene of *Leuconostoc mesenteroides* DRP105. *Int. J. Mol. Sci.* **21,** 6596.
3. Eom JE and Moon GS (2010) *Leuconostoc mesenteroides* producing bifidogenic growth stimulator via whey fermentation. *Food Sci. Biotechnol.* **19,** 235-238.
4. Hong KP (2011) Optimum conditions for production of fermented grapefruit extract using *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **21,** 661-668.
5. Ivanova NN, Khomich LM, Perova IB, and Eller KI (2018) Grapefruit juice nutritional profile. *Vopr. Pitan.* **87,** 85-94.
6. Juven BJ (1976) Bacterial spoilage of citrus products at pH lower than 3.5. *J. Milk Food Technol.* **39,** 819-822.
7. Kim G, Bae JH, Cheon S, Lee DH, Kim DH, Lee D, Park SH, Shim S, Seo JH, and Han NS (2022) Prebiotic activities of dextran from *Leuconostoc mesenteroides*

SPCL742 analyzed in the aspect of the human gut microbial ecosystem. *Food Funct.* **13,** 1256-1267.

8. Kothari D, Tingirikari JMR, and Goyal A (2015) *In vitro* analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* **6,** 55-61.
9. Lee JK, Eom JE, Shin HS, Shin WS, Moon GS (2011) Optimal production of fermented whey presenting bifidogenic growth stimulator activity. *Food Sci. Biotechnol.* **20,** 1451-1455.
10. Moon GS (2013) Comparison of bifidogenic growth stimulation activities of fermented whey prototypes. *Prev. Nutr. Food Sci.* **18,** 292-295.
11. Moss GP, Smith PAS, and Tavernier D (1995) Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995). *Pure Appl. Chem.* **67,** 1307-1375.
12. Mussatto SI and Mancilha IM (2007) Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* **68,** 587-597.
13. Xi W, Zhang G, Jiang D, and Zhou Z (2015) Phenolic compositions and antioxidant activities of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfadyen) varieties cultivated in China. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **66,** 858-866.