



한국인 모유영양아로부터 분리한 *Enterococcus faecium* ID9201의 콜레스테롤 저하효과

이승훈 · 김영후 · 김민구 · 강재훈 · 강대중*
일동제약(주) 중앙연구소

Cholesterol Lowering Effect of *Enterococcus faecium* ID9201 Isolated from Breast Milk-Fed Korean Infant

Seung-Hun Lee, Young-Hoo Kim, Min-Goo Kim, Jae-Hoon Kang, and Dae-Jung Kang*

Bioprocess Engineering Team, Research Laboratories, ILDONG pharmaceutical Co., Ltd., Hwaseong 445-170, Korea

Abstract: We selected lactic acid bacteria to reduce cholesterol levels *in vitro* and *in vivo*. Among the 140 strains tested, a strain ID9201 was shown to reduce cholesterol in the spent medium over 30% and to increase cholesterol in cell pellet. A strain ID9201 isolated from breast milk-fed Korean infant feces was identified as *Enterococcus faecium* on the basis of morphological analysis, biochemical analysis (API kit), and 16S rDNA sequence analysis. A freeze-dried powder of the strain was fed to Sprague-Dawley (SD) rats with high cholesterol diet for 6 wk. In the control group fed cholesterol enriched diet without probiotics, the serum cholesterol increased by 1.9 times in comparison with the initial value. Among the test group, ID9201 group showed the lowest cholesterol increase, 1.5 times of initial serum cholesterol, as in the blank group fed normal diet without probiotics. Based on these data, we assumed that ID9201 inhibited intestinal absorption of dietary cholesterol.

Keywords: *Enterococcus faecium* ID9201, cholesterol, conjugated bile acid, deconjugated bile acid, bile salt hydrolase

서 론

인체 내 콜레스테롤 함량의 약 80%는 체내에서 생합성되고 20%는 외부로부터 섭취한 지방에 함유되어 있다. 지방은 그 자체로는 혈액 중에 용해되기 어렵기 때문에 단백질과 결합하여 지질단백질(lipoprotein)으로 변환된 후, 혈액 중으로 녹아들어간다. 지질단백질은 구형상으로 외부는 단백질과 인지질의 수용성 피막으로 되어 있으며, 내부는 중성지방(TG, triglyceride)과 콜레스테롤의 소수성, 중성 핵으로 구성되어 있다. 이러한 지질단백질은 입자의 크기에 따라 chylomicron, VLDL(very low density lipoprotein), LDL(low density lipoprotein), HDL (high density lipoprotein)등으로 나뉜다(Levy, 1981). LDL은 입자가 크기 때문에 동맥 내부로 들어가면 외부로 빠져 나오기 어

렵다. 따라서 혈관내벽에 침착되어 동맥경화를 유발시키는 해로운 콜레스테롤이다. 반면, HDL은 입자가 작기 때문에 동맥벽을 통과하여 외부로 빠져나갈 수 있다. 장내 유익균 중 하나인 유산균(lactic acid bacteria)에 의한 콜레스테롤 흡수의 저하기작은 보통 세가지로 설명된다(Eyssen *et al.*, 1977; Lichtenstein, 1990; Zhuang *et al.*, 2012). 첫째, 유산균이 장내에 정착증식하면서 콜레스테롤을 흡착하여 배설시키는 것이고(Sadzikowski *et al.*, 1977), 두번째, 유산균이 담즙산을 흡착하여 배설시키는 것이다. 이런 경우 콜레스테롤은 담즙산의 전구체(precursor)이므로 부족한 담즙산을 보충하기 위해 콜레스테롤을 이용하게 되어 결과적으로 체내 콜레스테롤 농도를 감소시킬 수 있다(Gilliland *et al.*, 1985). 마지막 세번째는 유산균이 포함담즙산(conjugated bile acid)을 탈포합시키는 작용이다(Ooi *et al.*, 2010). 간에서 생성된 자유 담즙산(free bile acid)은 소장에서 타우린 또는 글라이신과 결합하여 포함담즙산이 된다. 포함담즙산은 지질 용해도가 높아 소장에서 콜레스테롤 등의 지질 흡수를 용이하게 한다. 그러므로 포함담즙산이 많은 경우 혈중으로 흡수되는 콜레스테롤 양이 많아져 혈중 콜레스테롤 농도가 높아진다. 그러나 탈포합된 담즙산(deconjugated bile acid)은 지질용해도가 낮아 콜레

*Corresponding author: Dae-Jung Kang
Bioprocess Engineering Team, Research Laboratories, ILDONG pharmaceutical Co., Ltd., Hwaseong 445-170, Korea
Tel: 82-31-371-2881, Fax: 82-31-371-2900
E-mail: dj kang@ildong.com
Received October 5, 2015; Revised November 1, 2015;
Accepted November 4, 2015

스테롤 등 지질의 혈중 이행을 저하시키는 작용을 한다 (Walker *et al.*, 1993). 따라서 포합담즙산을 탈포합시키는 담즙산 분해효소(bile salt hydrolase)를 갖는 균주는 지질 용해도를 낮추어 소장에서 콜레스테롤의 흡수를 저하시킬 수 있다. 본 연구에서는 세계 10대 건강기능식품으로 선정될 만큼 인류의 건강과 밀접한 유산균 중, 콜레스테롤 분해·흡착효과가 높고 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 유산균을 한국인의 유아분변에서 신규로 분리·동정하였으며, 동물실험을 통해 그 기능성을 확인함으로써 고지혈증 예방 및 완화능을 갖는 기능성 프로바이오틱스 균주를 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

서울, 경기 소재 산후 조리원에서 사전 동의 후, 생후 2주 이내의 건강한 모유영양아의 분변 기저귀에서 분변샘플을 무균 면봉으로 채취하여 프로바이오틱스 균주를 분리하는데 균원시료로 이용하였다. 균원시료를 phosphate buffered saline (PBS) 완충용액 (pH 7.2)에 넣고 균질화시킨 후, pH 3.0로 보정한 0.5% (w/v) bile이 함유된 de Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Becton, Dickinson and Company, USA) agar plate에 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 발현된 140 균주를 1차 순수분리하였다.

콜레스테롤 저하균주의 선별

시험관 내에서 콜레스테롤 저하 효능을 갖는 균주를 선별하기 위하여 1차로 분리한 140주를 대상으로 0.3% oxgall과 콜레스테롤원으로 10% bovine calf serum (BCS)가 함유된 MRS broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양종료액을 10,000×g, 5분동안 원심분리하고 상등액을 취하여 남아있는 콜레스테롤 농도를 측정하였다. 콜레스테롤 농도는 O-phthalaldehyde method를 변형하여 측정하였다(Danielson *et al.*, 1989). 유산균 배양상등액 400 µL와 5% KOH 용액 200 µL, 95% ethanol용액 300 µL를 첨가하고 혼합하여 60°C에서 10분간 반응시켰다. 반응액은 실온에서 냉각한 후, hexane 500 µL를 넣고 혼합한 후, 실온에서 10분간 방치하였다. 층분리가 일어나면 hexane층을 취하고 evaporator를 이용하여 hexane용매를 증발시켰다. 완전히 증발시킨 후, O-phthalaldehyde 용액(0.5 mg O-phthalaldehyde/acetic acid 1 mL) 300 µL를 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, 진한 황산 200 µL를 첨가하고 10분간 방치하였다. 붉은 색의 발색 정도를 550 nm에서 측정하여 흡광도(O.D.)가 대조군에 비하여 30% 이상 낮은 균주를 선별하였다. 콜레스테롤 저하율은 다음과 같다.

콜레스테롤 저하율 (%) = (1 - 시험군 O.D._{550 nm} / 대조

군 O.D._{550 nm}) × 100 (%)

콜레스테롤 흡착균주의 선별

균체에 흡착된 콜레스테롤 농도 측정을 위해 유산균 배양액 4 mL를 10,000×g, 5분동안 원심분리하고 상등액을 버리고 균체를 회수한 후, PBS 완충용액으로 3회 세척하여 균체에 묻어있는 콜레스테롤을 제거하였다. 세척된 균체에 증류수 400 µL를 넣고 균질화시켰다. 균질화된 용액을 O-phthalaldehyde method를 이용하여 콜레스테롤 농도를 측정하였다. 배양상등액에서 콜레스테롤을 30% 이상 재현성 있게 저하시키고 균체에서 추출된 콜레스테롤 흡광도가 0.3 이상인 균주를 최종 선별하였다.

균주의 동정

최종 선별된 ID9201의 동정하기 위해 Bergey's Manual of systematic bacteriology와 전계방출형 주사전자현미경 (FE-SEM, Carl Zeiss, Germany)을 이용한 형태학적 동정, API kit 프로그램(API Strep 20 kit, Biomerieux, France)을 이용한 이화학적 동정과 16S rDNA 염기서열 분석을 기초로 한 분자생물학적 동정법의 3단계 동정방법을 적용하였다.

형태학적 동정

순수분리한 ID9201를 crystal violet 용액으로 염색한 후 그람염색 유무를 확인하였으며, FE-SEM을 이용하여 형태 및 크기를 측정한 후 Bergey's Manual of systematic bacteriology를 참고하여 형태학적 동정을 하였다.

이화학적 동정

ID9201의 이화학적 동정을 위해 API kit를 이용하여 이화학적 특징을 판별하여 동정하였다. ID9201 균주를 MRS broth에서 37°C, 16시간 배양한 후 10,000×g, 5분동안 원심분리하고 균체만을 수득하였다. PBS 완충용액으로 2회 세척한 다음 O.D._{600 nm} 값이 1.0이 되도록 보정하여 균액을 만들었다. 균액을 API kit 사용법에 따라 API Strep 20 배지에 접종하고 스트립을 만든 다음 37°C, 48시간 배양한 후, 반응 변화를 관찰하였으며 실험결과를 토대로 API LAB PLUS 프로그램을 사용하여 이화학적 동정을 하였다.

분자생물학적 동정

ID9201의 분자생물학적 동정을 위해 16S ribosomal DNA 염기서열 분석을 기초로 한 계통유전학적 시험을 실시하였다. 이를 위해, *Escherichia coli*의 16S rDNA 서열을 바탕으로 primer (Forward primer 5'-GGGGGATCCAGAGTTT GATCCTGGCTCA-3', Reverse primer 5'-GGGCTCGAGT ACCTTGTTACGACTTCACC-3')를 제작한 후 ID9201 genomic DNA를 추출하고 PCR로 16S rDNA를 증폭하여 염

기서열을 결정하였다. 이 서열을 기반으로 NCBI의 BLAST program으로 유사성이 높은 *Enterococcus* 속 균주들의 서열들을 선별하고 Clustal X (Des Higgins, Germany)로 다중 정렬을 실시한 후 계통유전수를 작성하고 neighbor-joining 방법으로 그 위치를 확인하였다(Saito *et al.*, 1987). 또한 BLAST 2 program을 이용한 쌍정렬을 실시함으로써 동일 종에 속하는 서열들과의 상동성을 비교하였다.

In vivo 혈중 콜레스테롤 저하능

E. faecium ID9201의 생체내 환경에서 혈중 콜레스테롤 농도 저하율을 확인하기 위해 동물실험을 진행하였다 (Grunewald *et al.*, 1982). 실험동물은 5주령 female SD rat을 사용하였으며, 군당 5마리씩 사육하였다. 대조군의 사료는 콜레스테롤이 0.5% 함유된 사료를 사용하였으며, 음용수는 시험군이 들어있지 않은 2.0% 탈지분유를 사용하였다. 실험군의 사료는 콜레스테롤이 0.5% 함유된 사료를 사용하였으며 음용수는 6×10^8 CFU/rat/day, 6주간 투여하였다. 혈중 콜레스테롤 농도를 측정하기 위해 매주 rat의 꼬리정맥에서 혈액을 채취하고 2시간 동안 실온에 방치시킨 후 $4,000 \times g$, 20 분동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 20 μ L에 콜레스테라임(에이젠 화학, Japan) 300 μ L를 넣고 37°C, 10분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 이용하여 콜레스테롤 농도를 측정하였다.

결 과

유산균의 선발

서울, 경기 소재 산후 조리원에서 생후 2주 이내의 한국인 모유 영양아로부터 분변을 채취하고 MRS 평판배지에 도말하여 총 140주의 형태가 상이한 유산균을 분리하였다. 분리된 유산균 중에서 배양액에서 콜레스테롤을 30% 이상 재현성 있게 저하시키고 균체에서 추출된 콜레스테롤의 550 nm의 흡광도가 0.3 이상인 듀얼효과를 가진 우수균주 ID9201을 선발하였다(Table 1).

균주의 동정

ID9201은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 그람양성의 구균(cocci type)형태이고 비운동성으로 특히, *Streptococcus* 속 검출배지인 SF배지(Becton, Dickinson and Company, USA),

Table 1. The screening of probiotics with lowering and adsorbing cholesterol

No. of strains	Activities for cholesterol	
	Reduction	Adsorption
316	15	0.12
551	32	0.25
ID9201	43	0.48

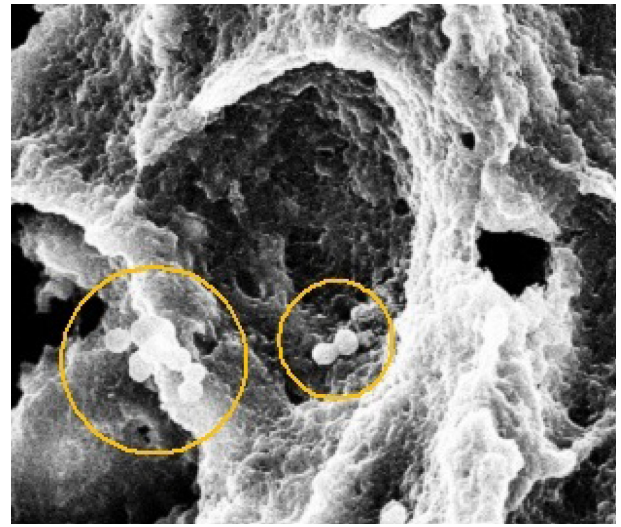


Fig. 1. Scanning Electron Microscopy (SEM, ×5K) of selected strain ID9201.

45°C의 상대적 고온환경에서 생육이 가능하며, *Enterococcus* 속의 유산균과 형태·생리학적 유사성을 나타내었다(Table 2).

이화학적 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 기준과 비교하여(Sneath, 1986), *Enterococcus* 속의 종(species)을 확인하기 위해 API Strep20 kit로 분석한 결과, *E. faecium*과 98.4%로 일치하였다(Table 3).

분자생물학적 동정은 16S rDNA 염기서열분석에 기반하여 진행하였다. 결정된 1,459 bp 크기의 염기서열을 NCBI의 BLAST program을 이용하여 상동성을 비교한 결과, 99.8%의 신뢰도로 *E. faecium*으로 동정되었다(Fig. 2). 따라서 본 연구에서 선발한 ID9201균주를 *E. faecium* ID9201로 최종 명명하였다(GenBank AY057055).

In vivo 콜레스테롤 저하작용

각 시험군별 6주 후, *E. faecium* ID9201의 혈중 콜레스테롤 저하작용을 확인한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이, 대조군은 6주경에 초기 농도 대비 증가율이 90%까지 상승하였으며, ID9201 투여군은 50% 정도 상승하여 약 40%의

Table 2. Morphological characteristics of isolated strain ID 9201

Characteristic	Strain ID9201	<i>E. faecium</i>
Gram stain	+	+
Shape	Cocci	Cocci
Catalase	—	—
Gas formation	—	—
pH 9.6 growth	+	+
NaCl 6.5% growth	+	+
10% growth	+	+
45°C SF agar growth	+	+

Table 3. Biochemical characterization of strain ID9201

API test	Strains		
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	ID9201
Acetoin from pyruvate	+	+	+
Hippurate hydrolysis	±	±	+
β-glucosidase	+	+	±
Pyrrrolidonyl arylamidase	+	+	+
α-galactosidase	—	±	—
β-glucuronidase	—	—	—
β-galactosidase	—	+	+
Alkaline phosphatase	—	—	—
Leucin arylamidation	+	+	+
Arginine dihydrolysis	+	+	+
Ribose	+	+	+
L-arabinose	—	±	+
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	+	—	±
Lactose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Inulin	—	±	—
Raffinose	—	—	—
Starch	+	±	±
Glycogen	—	—	—
β-hemolysis	—	—	—

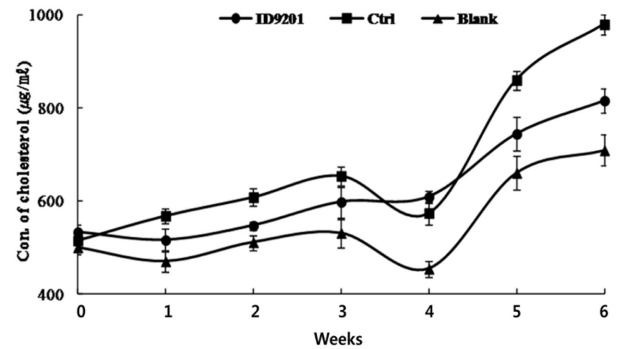


Fig. 3. *In vivo* efficacy of ID9201 on cholesterol lowering effect. Sprague-Dawley (SD) rats with high cholesterol diet for 6 wk. ● ID9201, group fed cholesterol enriched diet with probiotics; ■ control, group fed cholesterol enriched diet without probiotics; ▲ blank, group fed normal diet without probiotics. Data are shown mean±S.D., n=5. *p* values (<0.05) are represented.

이 다른 균주보다 탁월하게 우수하였기 때문이라 판단된다 (Angelovicova *et al.*, 2013).

고 찰

대표적 프로바이오틱스로 알려진 유산균은 장내 세균총 (intestinal microflora)에서 유익균과 유해균의 균형을 유지 시킴으로써 인간의 장 건강을 촉진시킨다. 최근 프로바이오틱스가 기본적인 장 건강 뿐만 아니라, 인체 내 대사성 질환에 관여한다는 연구결과가 보고되어지고 있다. 이 대사성 질환 중, 고지혈증 및 동맥경화와 관련있는 성분인자인 콜레스테롤과 장내 세균과의 상호작용에 대한 연구가 밝혀지고 있으며, 유산균이 콜레스테롤의 분해와 흡착배설에 관련이 있다. 유산균에 의한 콜레스테롤 흡수의 저하 기작은 보통 세 가지로 설명된다. 첫번째, 유산균이 장내에 정착 증식하면서 콜레스테롤을 흡착하여 배설시키는 것이고 두번째, 유산균이 담즙산을 흡착하여 배설시키는 것이다. 이런 경우 콜레스테롤은 담즙산의 전구체(precursor)이므로 부족한 담즙산을 보충하기 위해 콜레스테롤을 이용하게 되어 결과적으로 체내 콜레스테롤 농도를 감소시킬 수 있다. 마지막 세번째는 유산균이 포합담즙산(conjugated bile acid)을 탈포합시키는 작용이다. *E. faecium* ID9201은 0.5% bile과 pH 3.0의 강산 조건에서 선발된 균주로 기존의 BSH 활성도가 우수한 균주 선발기준보다 콜레스테롤 흡착율이 높은 균주로 선발되었으며 *in vivo* 실험에서 고콜레스테롤 식이를 rat에 투여하였을 때 콜레스테롤 저하 효과가 유의성있게 나타났다. 이는 기존의 BSH에 의한 탈포합(deconjugation)반응을 장관 내에서 일으키기 위해서는 유산균이 위장관에서 살아서 장까지 도달하여 장 점막에 부착되고 증식되는 과정이 먼저 요구된다. 따라서 *in vitro* 시험에서

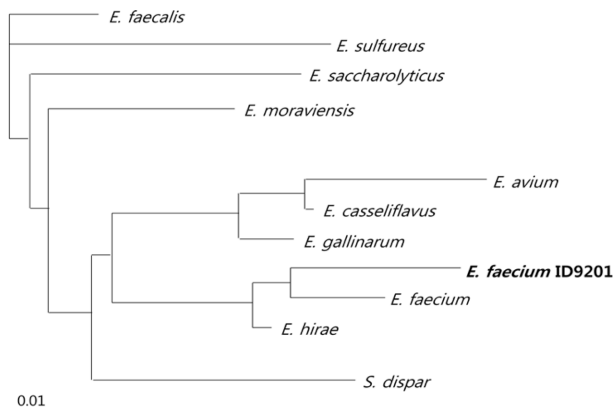


Fig. 2. Phylogenetic position of strain ID9201 in the genus *Enterococcus* based on the 16S rDNA sequence. The tree was rooted with *E. coli* and constructed using the neighbor-joining method. The bar represents 0.01% sequence divergence.

콜레스테롤 감소효과를 나타내어, 대조군보다 유의성 있게 낮은 콜레스테롤 증가를 보였다($p < 0.05$ 대조군과의 유의성).

이와 같은 결과에서 *E. faecium* ID9201은 고콜레스테롤 식이를 하는 집단에서 예방적 차원에서 효과가 있을 것으로 판단되며 이러한 효능은 *E. faecium* ID9201이 프로바이오틱스의 기본 특성인 위장관 통과성·내산성·내담즙산성이 우수하고 장에서의 정착성이 우수하고(data not shown), BSH에 의한 콜레스테롤 분해작용 뿐만 아니라 흡착작용

BSH활성이 높은 균주라 할지라도 콜레스테롤 저하작용이 낮게 분석되는 것은 상기 조건을 충족시키지 못했기 때문이다. 따라서 *E. faecium* ID9201은 콜레스테롤의 흡착율을 선별기준으로 하였으며, 140주 중 콜레스테롤 흡착율이 가장 높은 균주였다. 이러한 선별기준에 따라 *in vivo* 실험에서도 유의적인 혈중 콜레스테롤 저하효과를 나타내었다. 최근 장내 미생물과 콜레스테롤과의 연구에 있어 생균(live cells) 뿐만 아니라 사균(heat-killed cells)도 혈중 콜레스테롤을 낮춘다는 연구결과들이 있다(Kim *et al.*, 2006). 선행 연구를 통해, BSH에 의한 콜레스테롤 저하작용보다는 흡착에 의한 배설 효과가 설득력을 얻고 있다. 따라서 이와 같은 연구결과들을 체계화하기 위해서는 유산균의 세포벽 성분 중 콜레스테롤과의 결합에 관여하는 인자를 규명하는 노력과 함께 생균과 사균의 효율성 연구가 필요할 것으로 보여진다.

요 약

모유 영양아의 분변으로부터 내산성·내담즙산성이 우수하고 콜레스테롤 분해능과 흡착능이 우수한 ID9201을 분리하여 3단계 동정법을 통해 *E. faecium*임을 최종 확인하고 *E. faecium* ID9201로 명명하였다(GenBank AY057055). 또한 고콜레스테롤 식이로 유도한 동물모델을 대상으로 한 *in vivo* 연구에서 대조군보다 40% 이상 혈중 콜레스테롤 수치를 낮춤으로써 고지혈증, 동맥경화증 등 콜레스테롤이 연관된 질병 예방에 효율적 방안을 도출함으로써 이와같은 결과들로부터 향후 유산균이 정장작용뿐만 아니라 이상지질관련 질환에서의 유효성을 확대시킬 수 있을 것이라 기대된다.

참고문헌

Angelovicova M, Kral M, Alfaig E, and Tkacova J. (2013) Effect of *Enterococcus faecium* M74 strain on egg yolk fat and cholesterol. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **46**, 5-11.

- Danielson AD, Peo ER, Shahani KM, Lewis AJ, Whalen PJ, and Amer MA. (1989) Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J. Ani. Sci.* **67**, 966-974.
- Eyssen H, and Parmentier G. (1977) Biohydrogenation of sterols and fatty acids by intestinal microflora. *Gut.* **14**, 490-493.
- Gilliland SE, Nelson CR, and Maxwell C. (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 377-381.
- Grunewald KK. (1982) Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* **47**, 2078-2079.
- Kim HY, and Ji GE. (2006) Effect of viability and integrity of Bifidobacterium on suppression of allergy in mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 1-7.
- Levy RI. (1981) Cholesterol, lipoproteins, apoproteins, and heart disease: Present status and future prospects. *Clin. Chem.* **27**, 653-662.
- Lichtenstein AH. (1990) Intestinal cholesterol metabolism. *Ann. Med.* **22**, 49-52.
- Ooi LG, and Liong MT. (2010) Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 2499-2522.
- Sadzikowski MR, Sperry JF, and Wilkins TD. (1977) Cholesterol-reducing bacterium from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 355-362.
- Saito N, and Nei M. (1987) A neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Sneath PHA. (1986) Endospore-forming gram-positive rods and cocci, pp. 1104-1139. In: Sneath, P.H.A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (2nd eds.), *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
- Walker DK, and Gilliland SE. (1993) Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **76**, 956-961.
- Zhuang G, Liu XM, Zhang QX, Tian FW, Zhang Hm Zhang HP, and Chen W. (2012) Mechanism of the cholesterol-lowering effects of probiotics. *Clin. Lipidol.* **7**, 501-507.