Curr. Top. Lactic Acid Bac. Probio. 2016;4(2):14-18
ISSN 2287-853X 2016.4.2.14

신생아 분변에서 분리한 *Enterococcus faecalis*의 내산성 및 내담즙산성 비교

김성준 · 오세종*
전남대학교 동물자원학부

Comparison of Acid and Bile Tolerances for *Enterococcus faecalis* isolated from Infant Feces

Seongjun Kim and Sejong Oh*
Division of Animal Science, Chonnam National University

Abstract

In this study, we investigated the probiotic candidates of *Enterococcus faecalis* isolated from infant feces. Fecal samples were inoculated on modified MRS (pH 5.4) agar and Blood-liver containing antibiotics agar. Total 10 isolates were identified through Gram stain, KOH test, catalase test, and 16S rDNA analysis. And these isolates compared to resistance against artificial gastric juice (pH 2.5, 1,000 unit pepsin) and bile salts (0.3% Oxgall). Especially, strain SJ10 survives at a level of 7.84 log CFU/ mL under 0.3% bile salts. Strains SJ1, SJ6, SJ7 and SJ10 were found to be the least acid resistance with a viable cells (SJ1: 6.97 log CFU/mL, SJ6: 7.19 log CFU/mL, SJ7: 7.02 log CFU/mL and SJ 10: 7.07 log CFU/mL, respectively). Further *in vitro* and *in vivo* studies should be evaluated with these isolates before claiming probiotic characteristics.

Keywords

Enterococcus faecalis, *probiotics, bile tolerance, acid tolerance*

서 론

Probiotics는 유효한 양을 섭취하였을 때 숙주에 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물로 정의되는데, 이는 Fuller가 1989년 발표한 논문에서 제시한 것을 기반으로 하는 것이다(Fuller, 1989; FAO/ WHO, 2001). 그러나 일부 제품을 제외한 대다수의 probiotics 제품들은 한 가지 유산균만을 함유한 것이 아니라, 여러 종의 유산균으로 구성되어 있는데, 이러한 경우엔 각 유산균에 대한 효능과 유효한 수준을 밝혀야 하지만, 유산균의 전체 균수만을 제시하고 있는 실정이다.

최근에는 probiotics를 통한 비만 및 당뇨와 같은 비만 관련 질환 예방 및 치료에 관련한 연구들이 활발하게 이루어지고 있다. Song 등(2015)의 연구보고에 의하면 고지질 식이로 유도된 비만 mouse에 *Lactobacillus acidophilus*를 10^9 CFU/mL 수준으로 투여한 경우, 체중이 유의적으로 감소하였고, 혈중 콜레스테롤 수준은 정상식이군 수준으로 감소하였다고 보고하였다(Song *et al.*, 2015).

Received: 6월 1일, 2016
Revised: 6월 10일, 2016
Accepted: 6월 15일, 2016

*Corresponding author :
Sejong Oh,
Division of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea
Tel: +82-62-530-2116,
Fax: +82-62-530-2129,
E-mail: soh@jnu.ac.kr

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. All rights reserved.

위에서 분비되는 위산은 pH가 1.4~2.0 정도로 대부분의 미생물을 사멸시킬 수 있으며, 또한 지방을 소화하는데 필요한 담즙산은 미생물의 세포막을 붕괴시킨다. 이로 인해 매우 극소수의 미생물만이 살아서 장에 도달할 수 있다.

섭취된 Probiotics가 숙주의 장내에서 유익한 기능을 수행하기 위해서는 위산과 담즙산에 대한 내성이 있어 살아서 위와 십이지장을 통과해야 한다. 그 후 장내에 정착하여 증식 하는데, 이 과정에서 이미 존재하는 미생물과 경쟁을 하기도 한다. 비록 투여된 미생물이 장내에 정착하지 않는 transients 일지라도 대장을 통과하는 동안에 증식을 지속적으로 할 수 있어야 한다. 따라서 probiotics를 선발하고자 할 때는 1차적으로 위산과 담즙산에 대한 사멸 여부를 조사해야 하며, 2차적으로 장상피 부착성이나 장내 생존성을 평가해야 한다. Gilliland 등(1984)은 *L. acidophilus*는 0.3% oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있기 때문에 장까지 도달하여 대장균의 감염을 억제시킬 수 있다고 보고하였다. Probiotics로 이용되는 미생물로는 *Lactobacillus*속(genus) 및 *Enterococcus*속에 포함되는 여러 유산균을 포함하여 *Bifidobacterium* 속, *Clostridium* 속, *Bacillus* 속, 그리고 *Saccharomyces* 속 미생물들도 산업적으로 사용되고 있다(Oh, 2009). 특히, *Enterococcus* 속 미생물은 사료 첨가제에 많이 사용되는 대표적인 probiotics로 토양, 채소, 발효 식품, 가축 및 인체 분변 등에 존재하며, 일부 발효 식품에 특유의 맛과 풍미에 기여한다(Foulquié Moreno 등, 2007).

Enterococcus 속은 Gram 양성 구균으로 51 종(species)이 보고되었지만 *E. faecium*과 *E. faecalis*를 포함한 몇몇 종만이 probiotics에 사용된다. 그 이유는 일부 종은 요도감염(urinary tract infection), 세균성 심내막염(bacterial endocarditis), 수막염(meningitis) 등을 일으키는 원인균이며, vancomycin 내성 유전자를 가지고 있는 경우도 있기 때문이다(Gilmore 등, 2002).

박테리오신을 생산하는 *E. faecium*과 *E. faecalis*는 소, 돼지, 닭 등의 사료에 첨가되어 이들 동물에게 설사를 줄이기 위한 probiotics로 사용되기도 한다(Gilmore 등, 2002). *Enterococcus*가 생성하는 박테리오신은 enterocin A, enterocin B, enterocin P, enterocin Q, enterocin CRL 35 및 enterocin 150A와 150B 등이 알려져 있는데, 이들은 *Clostridium botulinum, Cl. perfringens, Salmonella choleraesuis, Vibrio cholerae, Listeria monocytogenes* 등 pathogen의 생육을 억제시키는 것으로 알려져 있다(Franz 등, 2007).

본 연구에서는 신생아 분변에서 분리한 통성혐기성 유산균을 대상으로 내산성과 내담즙산성을 비교하여 probiotics로써 이용 가능성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

유산균의 분리

건강한 신생아 분변을 멸균 phosphate buffered saline으로 희석하여 pH 5.4로 조정된 MRS 배지에 도말하여 37℃, 48시간 혐기적으로 배양하여 유백색의 집락을 분리한 다음, bromocresol purple이 0.004% 첨가된 MRS agar에 재도말하여 집락 주변이 노란색으로 변하는 집락들을 선발하였다. 선발된 균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology(1986) 및 Bergey's manual of determinative bacteriology(1994)에 따라 Gram 염색, catalase 및 gas 발생 여부 등을 조사하였다. Gas 발생 여부는 발효관(Durham tube)이 있는 0.5% peptone-0.3% beef extract-0.5%, lactose broth에서 37℃, 48시간 배양하여 평가하였다.

생균수 측정

분변 중의 유산균의 총균수는 NPNL 배지(Teraguchi 등, 1978)와 MRS 배지(pH 5.4)에서 37℃에서 48시간 혐기배양한 후 측정하였다.

내담즙산성 평가

내담즙산성 평가는 oxgall 용액을 0.3%(w/v)가 되도록 MRS 배지에 첨가하여 준비한 다음, 준비한 유산균 현탁액을 접종하여 37℃에서 36시간 배양한 후 생존율을 평가하였다. 생존율은 접종수준과 비교하여 1 log 이하 감소한 경우를 —, 접종 수준과 유사한 경우를 +, 접종수준보다 1 log 이상 증가한 경우를 ++, 접종수준보다 2 log 이상 증가한 경우를 +++로 각각 표시하였다(Song 등, 2015).

내산성 평가

선발 유산균의 내산성은 pepsin이 첨가된 MRS 배지(1,000 unit pepsin/ mL MRS, pH 2.5)를 사용하여 비교하였다. 접종 수준과 2시간 후의 생균수를 비교하여 3 log 이상 감소한 경우를 —, 2~3 log 감소한 경우를 +, 1 log 이하 감소한 경우를 ++, 접종수준을 유지한 경우를 +++로 각각 표시하였다(Song 등, 2015).

16S rDNA 추출

16S rDNA 추출은 다음과 같은 과정으로 수행하였다. 선발 유산균 배양액 1 mL를 10,000 rpm으로 1분 동안 원심 분리를 한 후, 멸균 생리식염수로 3회 수세한 다음 lysozyme(10 mg/mL) 2 μL

를 첨가하여 37℃, 1시간 동안 반응시켰다. NGDI 3 μL, RNase 2 μL, Protease K(10 mg/mL) 4 μL를 순차적으로 넣고 60℃에서 10분 동안 배양한 다음, 동량의 Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25:24:1)을 첨가하였다. 이를 원심분리(14,000 rpm, 5 min, 4℃)한 후 3 M Ammonium acetate (pH 4.8)와 100% ethanol 을 첨가하고 -40℃에서 1시간 정치하였다. 그 후 침전물을 회수하여(14,000rpm, 5 min, 4℃) 80% ethanol 1 mL를 첨가한 다음 다시 원심분리하여(14,000 rpm, 5 min, 4℃), 최종적으로 DNA를 추출하였다.

유산균의 동정

16S rDNA를 분석하기 위하여 forward primer(27f): (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 reverse(1492r):(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분간 처리 후, 94℃에서 1분, 62℃에서 40초, 72℃에서 40초로 30 cycles을 반복하였으며, 72℃에서 40초로 반응을 종료하였다. PCR 반응 산물을 0.8% agarose gel로 전기영동을 실시하여 확인하였다. 16S rDNA 유전자 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program을 이용하여 비교하였다.

결과 및 고찰

유산균의 분리

Teraguchi 등의 방법은 유제품 중에서 bifidobacteria를 선별하는 선택배지로 BL 배지에 neomycin, paramomycin, nalidixic acid 및 lithium chloride를 모두 첨가하여 제조한다. 본 실험에서도 BL-NPNL 배지를 사용하여 분변 중의 bifidobacteria 수를 평가하고자 하였다. 건강한 신생아의 분변을 시료로 하여 BL-NPNL 배지를 사용하여 평가한 결과, 분변 g당 2.09×10^8 CFU 수준으로 나타났으며, pH 5.4로 조정된 MRS 배지에서는 1.06×10^9 CFU/g feces로 각각 측정되었다(Table 1). BL-NPNL 배지 및 pH 5.4로 조정된 MRS 배지는 전부 혐기적으로 배양한 후 집락을 채취하였으나, 호기적으로도 생육이 가능한 통성혐기성 유산균 만을 선별하였다. 통성혐기성 유산균만을 선별하고자 했던 이유는 bifidobacteria 보다는 lactobacilli 혹은 enterococci가 대량배양시 용이하기 때문이다. 또한 streptococci나 enterococci와 같은 구균들은 장기보관시 간균보다 생존성이 좋다. 대량 배양의 용이성과 저장시 높은 생존성은 probiotics의 산업적 이용에 많은 장점을 부여한다. 본 실험에서도 혐기적 및 호기적 생육을 하며, Gram 양성이고 catalase 음성이며 가스를 발생시키지 않는 미생물을 10집락을 분리하여 SJ1부터 SJ10까지 명명하였다(Table 2, Fig. 1).

Table 1. Viable cells of fecal bacteria on BL-NPNL agar and MRS agar

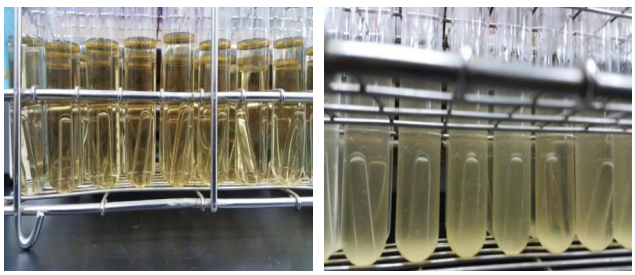
	BL-NPNL	MRS (pH 5.4)
Means	2.09×10^8	1.06×10^7
S.D	±0.21	±0.113

내담즙산성 비교

내담즙성을 평가한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. SJ4와 SJ9 균주는 0.3% oxgall 함유 MRS 배지에서 접종수준보다 감소하여 내산성이 없는 것으로 확인되었으며, SJ10 균주는 초기균수보다 약 2 log 이상 증가하여 0.3% oxgall 함유 배지에서도 높은 성장을 하는 것으로 나타났다.

Table 2. Gram staining, KOH test, and catalase test results for isolates

	Gram test	KOH	Catalase
SJ1	+	-	-
SJ2	+	-	-
SJ3	+	-	-
SJ4	+	-	-
SJ5	+	-	-
SJ6	+	-	-
SJ7	+	-	-
SJ8	+	-	-
SJ9	+	-	-
SJ10	+	-	-



Time (0 h) Time (24 h)

Fig. 1. Gas-forming test for isolates.

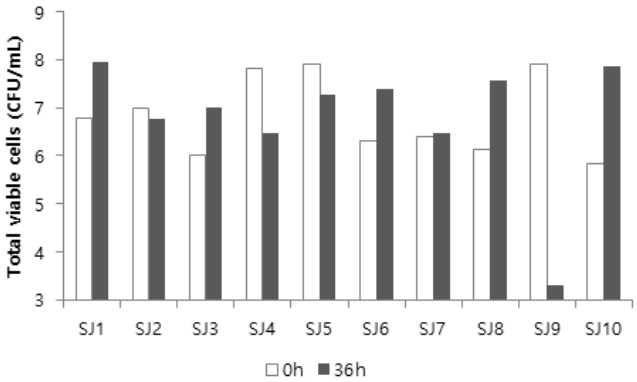


Fig. 2. Bile tolerance of 10 isolates from infant feces.

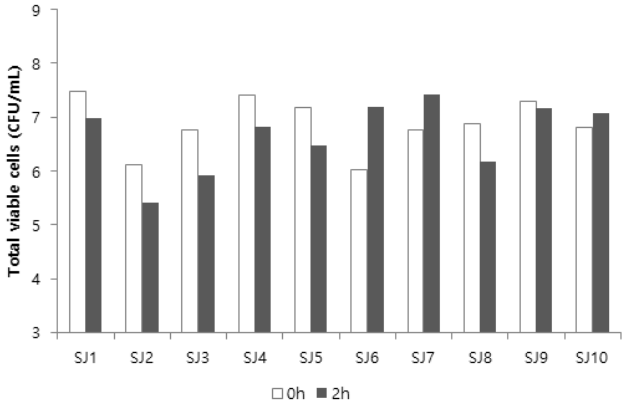


Fig. 3. Acid tolerance of 10 isolates from infant feces.

내산성 비교

Fig. 3은 pH 2.5로 조정된 MRS 배지에 1% pepsin을 첨가하여 인공위액을 제조하여 선발 유산균을 접종하여 2시간 후의 생균 수를 나타낸 결과이다.

SJ6, SJ7, SJ9 및 SJ10 균주는 초기 생균수 대비 유사하거나, 다소 높은 생균수를 보여 내산성이 매우 높은 것으로 확인되었으나, 그 외의 균주들은 이들 균주와 비교하여 다소 낮은 내산성을 나타내었다. Song 등(2015)은 김치에서 분리한 유산균 중의 40% 정도는 내담즙산성을 가지고 있지 않았으며 약 20%의 균주들은 매우 높은 내담즙산성 보였고, 일부 유산균은 인공위액(pH 2.5)에서 초기 접종생균수 대비 약 1 log 정도만 감소하였다고 보고하였다. 따라서 본 실험에 사용된 균주들은 대부분 1 log 감소 또는 그 이하 감소만이 나타나, 내산성이 있는 유산균임을 확인할 수 있었다.

유산균의 동정

본 실험에 사용된 유산균의 16S rDNA sequence를 분석하여 동정한 결과는 Table 3에 나타내었다. 공교롭게도 SJ1~SJ10 균주들 모두 *E. faecalis*로 동정 되었다. 그러나 내담즙산성과 내산성을 비교한 결과, SJ6, SJ7 및 SJ10 균주만이 probiotics로서의 이용이 가능한 것으로 확인되었다(Table 2). Gilmore 등(2002)은 인간의 장내에 인간의 장내에 존재하는 *Enterococcus* 중에서 *E. faecalis*가 약 90~95% 정도이며, *E. faecium*은 약 5~10%를 차지한다고 보고하였다. 본 실험에서도 전부 *E. faecalis*로 동정된 것은 인간의 장내에 *Enterococcus* 중에서 대다수가 *E. faecalis* 이기 때문일 것으로 생각되었다.

요약

본 실험에 사용한 신생아 분변을 BL-NPNL 배지와 MRS(pH 5.4) 배지로 생균수를 조사한 결과, 각각 2.09×10^{8} CFU/g feces와

Table 3. Result of probiotic characteristics

Strain	Bile tolerance	Acid tolerance	Accession	Identification
SJ 1	++	++	NC_004668	*Enterococcus faecalis*
SJ 2	+	++	NC_019770	*Enterococcus faecalis*
SJ 3	++	++	NC_018221	*Enterococcus faecalis*
SJ 4	-	++	NC_004668	*Enterococcus faecalis*
SJ 5	+	++	NC_018221	*Enterococcus faecalis*
SJ 6	++	+++	NC_017576	*Enterococcus faecalis*
SJ 7	+	+++	NC_019284	*Enterococcus faecalis*
SJ 8	++	++	NC_019770	*Enterococcus faecalis*
SJ 9	-	+++	NC_018221	*Enterococcus faecalis*
SJ 10	+++	+++	NC_019770	*Enterococcus faecalis*

1.06×10^9 CFU/g feces로 조사되었으며, 통성혐기성 유산균을 선발하여 내담즙산성과 내산성을 비교한 결과, SJ3, SJ6, SJ7, SJ-10균주들이 높은 활성을 보였다. 이들 유산균은 모두 *E. faecalis*로 동정되었으며, 향후 항생제 내성과 virulence factor에 대한 연구가 진행된다면 유산균 정장제와 사료 첨가제와 같은 probiotics 제품에 적용이 될 수 있을 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 2016년 전라남도 전남테크노파크의 지역수요맞춤형연구개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

1. De Man JC, Rogosa M and Sharpe NE (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135.
2. FAO/WHO (2001) Report of joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, pp 1-21.
3. Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
4. Gilliland SE, Staley TE and Bush LJ (1984) Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* **67**, 3045-3051.
5. Gilmore M, Coburn P, Nallapareddy S and Murray B (2002) Enterococcal virulence, p 301-354. *In* Gilmore M, Clewell D, Courvalin P, Dunny G, Murray B and Rice L (ed), *The Enterococci*. ASM Press, Washington, DC.
6. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT and Williams ST (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology.* Baltimore, Williams & Wilkins. 9thed. pp. 527-538
8. Holzapfel WH (1998) Overview of gut flora and probiotics et al. *Int. J. Food Microbiol.* **41**, 85-101.
9. Oh S (2008) Probiotics and prolongation of life. *Kor. J. Dairy Sci. Technol.* **26**, 31-37.
10. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 1325-1329.
11. Teraguchi S, Uehara M, Ogasa K and Misuoka T (1978) Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int. J. Dairy Technol.* **33**, 753-761.
12. Song SY, Lee HJ, Kim JH and Oh S (2015) Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from home-made *kimchi* and infant feces. *Curr. Top. Lactic Acid Bac. Probio.* **3**, 1-5.
13. Moreno MRE, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, Vuyst LD (2006) The role and application of enterococci in food and health *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 1-24.
14. Moreno MRF, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E. Belkum V, Holzapfel WH, Abriouel H and Gálvez A (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 293-310.