

갯김치에서 분리된 *Pediococcus pentosaceus* MLK67의 담즙산 분해능 및 콜레스테롤 동화능

임성미

동명대학교 식품공학과

Bile Salts Degradation and Cholesterol Assimilation Ability of *Pediococcus pentosaceus* MLK67 Isolated from Mustard Leaf *Kimchi*

Sung-Mee Lim

¹Department of Food Science & Technology, Tongmyong University, Busan 608-735, Republic of Korea

(Received September 1, 2011 / Accepted September 22, 2011)

The objective of this study was to evaluate the acid and bile tolerance, bile salt hydrolase (BSH) activity, and cholesterol assimilation ability of lactic acid bacteria isolated from mustard leaf *kimchi*. MLK11, MLK22, MLK27, MLK41, and MLK67 were relatively acid- and bile-tolerant strains, with more than 10^5 CFU/ml after incubation in simulated gastric juice and intestinal fluid, while MLK53 was the most sensitive strain to acid and bile. Strains MLK22 and MLK67 deconjugated the highest level of sodium glycocholate with more than 3.5 mM of cholic acid released, while deconjugation was lowest by strains MLK13 and MLK41 which released only 1.35 mM and 1.16 mM, respectively. Specially, strains MLK22 and MLK67 showed higher deconjugation of sodium glycocholate compared to sodium taurocholate and conjugated bile mixture. Although strains MLK22 and MLK67 exhibited maximal BSH activity at the stationary phase, MLK22 had somewhat higher total BSH activity compared to MLK67 towards both sodium glycocholate and sodium taurocholate. Meanwhile, cholesterol removal varied among tested strains ($p < 0.05$) and ranged from 5.22 to 39.16 $\mu\text{g/ml}$. Especially, MLK67 strain assimilated the highest level of cholesterol in media supplemented with 0.3% oxgall, cholic acid, and taurocholic acid ($p < 0.05$). According to physiological and biological characteristics, pattern of carbohydrate fermentation, and 16S rDNA sequence, strain MLK67 that may be considered as probiotic strain due to acid and bile tolerance and cholesterol-lowering effects was identified as *Pediococcus pentosaceus* MLK67.

Keywords: *Pediococcus pentosaceus*, acid and bile tolerance, bile salt deconjugation, bile salt hydrolase, cholesterol assimilation

오늘날 급변하는 사회환경의 적응과 더불어 바쁜 일상생활을 살아가는 현대인들의 신체 활동량은 감소하고 잦은 인스턴트 식품 섭취와 함께 식사패턴이 점점 서구식으로 변해가면서 야채나 곡류의 섭취량은 줄어드는 반면 육류 및 지방 섭취량이 날로 증가함에 따라 영양불균형으로 인한 비만, 당뇨, 암, 뇌졸중 및 동맥경화 등 각종 성인병의 발병률이 두드러지게 증가하여 우리의 건강을 위협하고 있다. 특히 심혈관계 질환의 주요 원인은 동물성 지방의 과다한 섭취에 기인하며 입자

가 커서 동맥 외부로 빠져 나오기 어려운 low density lipoprotein (LDL)-cholesterol이 관상동맥 내부에 침착되어 혈류를 방해하게 되고 그 결과 동맥경화, 협심증 및 심근경색 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 물론 콜레스테롤은 세포막의 주요 구성성분이며, 지방의 유화와 흡수를 담당하는 담즙산이나 스테로이드 호르몬 및 비타민 D의 전구체이므로 체내에서 필수적인 물질이긴 하나 적정량을 초과했을 때 인체에 유해물질로서 그 수치가 1 mg/dl 상승할 때마다 심장병 발생률은 2-3% 증가되는 것으로 보고되고 있다(3, 24).

체내 콜레스테롤 수치를 낮추기 위해 사용되는 약물로는

* For correspondence. E-mail: limsm020@tu.ac.kr; Tel.: +82-51-629-1714; Fax: +82-51-629-1309

간에서 콜레스테롤을 합성하는 과정에서 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase를 부분적으로 억제하여 간세포막의 LDL-수용체를 증가시켜 LDL, intermediated density lipoprotein (IDL), 및 VLDL (very low density lipoprotein)을 제거하여 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 statin이 있다. 또한 간에서 지방산 합성을 억제하고 지방산의 산화를 촉진함으로써 중성지방 생성을 억제하고 lipoprotein transfer rate를 높여 중성지방 농도를 낮춰주는 fibrate와 담즙산의 장내 재흡수를 감소시켜 간세포내의 콜레스테롤을 감소시키고 LDL-수용체의 활성도를 증가시켜 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 bile acid sequestrant 등이 있다(11). 하지만 이러한 약물들을 장기간 복용시 바람직하지 못한 부작용을 초래할 수 있으므로 평소에 콜레스테롤 함량이 적은 식품이나 저지방 식품 및 식이 섬유 섭취를 권장하고 있다(39). 한편 육류를 많이 섭취함에도 불구하고 심장질환에 잘 걸리지 않는 아프리카 Masai족들을 대상으로 조사한 결과 꾸준히 발효유를 복용하기 때문인 것으로 발효유 제조시 생산된 uric acid, orotic acid 및 hydroxymethylglutaric acid와 같은 유산균의 발효산물들이 혈중 콜레스테롤 수치를 낮춰준다고 알려져 있다(1, 13, 33).

콜레스테롤의 수용성 대사산물인 담즙산은 장간순환(enterohepatic circulation) 하는 동안 장내세균의 bile salt hydrolase (BSH, cholyglycine hydrolase; EC 3.5.1.24)의 작용에 의해 담즙산을 가수분해시켜 steroid의 일부분에서 glycine이나 taurine을 유리시키고 유리 담즙산을 생성하는데 이러한 BSH 활성은 *Lactobacillus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Clostridium perfringens* 및 *Bacteroides fragilis* 등의 세균에서 보고되고 있다(15). 복합 담즙산에 비해 재흡수 되는 양이 적은 유리 담즙산은 분변을 통해 배설되므로 새로운 담즙산을 생합성하기 위해선 전구체인 콜레스테롤의 요구량이 증가되어 체내 콜레스테롤의 수치는 낮아지게 된다(8). Klaver와 van der Meer (21)에 따르면, *L. acidophilus*와 *B. bifidum*에 의해 복합 담즙산이 분해되면서 생성된 유리 담즙산에 의해 pH가 낮아지고 (pH 5.5 이하) 이에 따라 콜레스테롤 교질입자(micelle)가 불안정해지며, 용해도가 감소하여 탈포합(deconjugation)된 담즙산과 함께 콜레스테롤이 침전되므로 콜레스테롤 농도가 낮아지는 것이라고 보고하였다. 또 다른 메커니즘으로는 *L. acidophilus*가 배양되는 동안 배지 내에 있는 콜레스테롤이 세균의 세포막에 흡착되거나 세포막의 구성성분으로 이용됨으로써 콜레스테롤 양이 감소되었다고 보고된 바 있다(29). Dambekodi와 Gilliland (7)에 의하면 lactobacilli 균주가 콜레스테롤을 동화(assimilation)하여 *in vivo* 상에서 혈중 콜레스테롤의 농도를 감소시켰는데 이들에 의한 콜레스테롤 동화는 담즙산의 존재 하에 나타났고 담즙산의 농도가 증가함에 따라 콜레스테롤의 저하 효과도 높게 나타났다고 하였으며, 복합 담즙산을 분해시키는 능력과 담즙산에 대한 내성이 뛰어난수록 동화능이 높고, 특히 세균의 배양과정 중 대수증식기 말기 내지는 정지기 초기에 동화 활성이 최대로 나타난다고 보고하였다(32).

따라서 본 연구에서는 숙성된 갓김치로부터 분리된 유산균들의 내산성 및 내담즙성을 확인하고 *in vitro* 상에서 콜레스테롤 저하 메커니즘을 이해하기 위해 복합 담즙산의 탈포합능과 sodium glycocholate와 sodium taurocholate가 첨가된 배지 하에서 BSH의 활성 및 콜레스테롤 동화능을 측정하여 콜레스테롤 저하 효과가 뛰어난 균주를 분리, 선별 및 동정하여 probiotic (생균제)로서의 이용 가능성을 확인해 보고자 한다.

재료 및 방법

실험균주 분리 및 배양조건

갓을 손질한 다음 각종 재료(고춧가루, 새우젓, 찹쌀풀, 다진마늘, 생강 및 양파)를 혼합하여 담근 후 약 3개월간 숙성시킨 갓김치 11종을 수집하였다. 시료 50 g과 멸균된 0.85% NaCl 용액 450 ml을 혼합한 후 약 2분간 마쇄하여 시료용액을 준비하였다. 시료용액 1 ml를 무균적으로 취하여 1% CaCO₃가 첨가된 Lactobacilli MRS agar (Difco Co., USA) 배지에 접종한 다음 혐기적 조건(WC-8080, MART Co., Netherlands) 하에서 37°C, 24-48시간 배양한 후 집락 주위에 투명한 환을 생성하는 균주만을 선택하여 이들의 액체 배양액을 40% glycerol에 넣어 -80°C 하에서 보관하였고, 실험 직전에 MRS agar 사면배지에서 3회 계대배양한 후 사용하였다.

인공 위액 및 담즙산에 대한 내성

유산균들의 내산성 및 내담즙산성 조사는 Lim과 Im (22)의 방법에 따라 인공 위액 및 담즙액 하에서의 실시하였다. 우선 분리된 균주는 MRS broth 내에서 37°C, 24시간 배양한 후 4°C에서 10분간 10,000×g의 속도로 원심분리(Micro17R, Hanil, Korea)하여 세포를 회수하고 멸균된 phosphate buffer solution (PBS, pH 7.2)로 2회 세척한 다음 125 mM NaCl, 7 mM KCl, 45 mM NaHCO₃ 및 1 mg/ml pepsin (Sigma Co., USA)을 첨가하여 pH 2.5로 조정하여 인공 위액 조건에 맞춘 MRS broth에 접종(5.0×10⁸ CFU/ml)하였다. 혐기적 조건하에서 37°C, 2시간 배양한 후 원심분리(10,000×g, 10분간, 4°C)하여 세포를 모으고 다시 PBS로 세척한 다음 buffer에 현탁시킨 세포 부유액은 심진회석법으로 희석하여 MRS agar 상에서 생균수를 측정하였다. 또한 인공 위액 조건에서 처리된 세포 현탁액은 1 mg/ml pancreatine과 0.3% (w/v) oxgall (Sigma Co.)을 첨가하여 pH 8.0로 조정된 MRS broth에 접종한 후 37°C, 3시간 배양한 다음 표준한천평판배양법으로 잔존하는 균수를 측정하였다.

복합 담즙산의 탈포합 효과

실험 균주에 의한 복합 담즙산의 탈포합능은 Irwin 등(17)의 방법에 따라 각 균주로부터 유리된 cholic acid의 양을 측정하여 평가하였다. MRS broth에 6 mM sodium glycocholate (Sigma Co.), 6 mM sodium taurocholate (Sigma Co.), 혹은 2.8 mM sodium glycocholate와 1.2 mM sodium taurocholate의 혼합물을 첨가하여 제조한 배지에 실험 균주의 배양액(1%,

v/v)을 접종하여 37°C에서 24시간 혐기적 조건에서 배양시켰다. 배양액을 원심분리(10,000×g, 10분간, 4°C)하여 얻은 상등액을 모아 10 M HCl로 pH 1.0으로 조정된 뒤 1 ml의 상등액에 ethyl acetate (2 ml)을 첨가하고 약 1분간 vortex (KMC-1300V, Vision Scientific, Korea)로 진탕한 뒤 ethyl acetate층을 옮겨 질소가스(60°C) 하에서 증발시켰다. 남은 잔류물은 0.01 M NaOH에 용해시킨 다음 1% (v/v) furaldehyde (1 ml)와 8 M H₂SO₄ (1 ml)를 첨가하여 다시 진탕시킨 후 65°C에서 10분간 가열처리 하였다. 냉각시킨 다음 빙초산을 첨가하고 1분간 진탕한 후 cholic acid 농도는 spectrophotometer (Spectrocount, Packard Instruments, Meriden, USA)로 흡광도(600 nm)를 측정하여 표준물질로 사용된 cholic acid (Sigma Co.)의 농도와 비교하였다.

BSH 활성 측정

Bile salt hydrolase (BSH) 활성은 Tanaka 등(37)의 방법을 사용하여 포함된 담즙산으로부터 유리된 아미노산의 양을 측정하여 확인하였다. 즉, 실험 균주를 MRS broth에서 배양 후 정해진 시간에 배양액을 회수하여 원심분리(10,000×g, 10분간, 4°C)해서 얻은 세포는 PBS (0.1 M, pH 7.0)에 현탁시켜 600 nm에서 흡광도 약 2.0로 조정된 후 3분간 초음파(Q125, Qsonica, USA)처리한 다음 다시 원심분리(10,000×g, 10분간, 4°C)하였다. 얻어진 상등액(0.1 ml)에 PBS (pH 6.0, 1.8 ml)와 담즙산(6 mM sodium glycocholate 혹은 6 mM sodium taurocholate, 0.1 ml)을 첨가하였다. 혼합물은 37°C에서 30분간 배양한 후 효소반응을 정지시키기 위해 혼합물 0.5 ml에 15%(w/v) trichloroacetic acid (0.5 ml, Junsei Chemical Co., Japan)을 첨가하고 난 후 원심분리(10,000×g, 10분간, 4°C)하여 얻은 상등액(0.2 ml)에 증류수 1 ml와 ninhydrin reagent [0.5 M citrate buffer (pH 5.5)에 용해시킨 1% (w/v) ninhydrin (Sigma Co.) 0.5 ml, 30% (v/v) glycerol 1.2 ml, 0.5 M citrate buffer (pH 5.5) 0.2 ml]을 첨가하였다. 그런 다음 진탕시킨 후 100°C에서 14분간 가열하고 난 뒤 25°C로 냉각시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 유리된 아미노산의 양은 glycine 혹은 taurine (Sigma Co.)의 표준곡선으로부터 측정하였고, BSH 활성(U/ml)의 1 U는 1분당 기질로부터 1 μM의 아미노산을 유리시킨 효소의 양으로 정의하였다. 또한 BSH 활성 측정과 동시에 배양시간별 배양액의 pH (pH210, HANNA instruments, Sarreola de Rubano, Italy) 및 표준한천평판배양법에 따라 MRS agar 상에서 생균수를 측정하였다.

콜레스테롤 동화능 측정

Rudel과 Morris (34)의 방법에 따라 콜레스테롤의 동화 능력을 측정하였다. 실험 균주는 MRS broth 내에서 대수기 말기까지 배양한 후 원심분리(10,000×g, 10분간, 4°C)하여 세포를 PBS (pH 7.2)로 세척한 다음 0.1% (w/v) pancreatin과 0.3% (w/v) 담즙산(oxgall, taurocholic acid 혹은 cholic acid) 및 콜레스테롤(100 μg/ml, Sigma Co.)이 함유된 MRS broth에 접종(5.0×10⁸ CFU/ml)하고 37°C에서 24시간 배양하였다.

배양 후 원심분리(10,000×g, 10분간, 4°C)하여 얻은 상등액에 KOH (33%, w/v)와 96% ethanol을 첨가하고 vortex로 강하게 혼합한 후 37°C에서 15분간 가온한 후 25°C로 냉각하였다. Hexane을 첨가하여 증분리한 후 hexane층을 회수하여 질소가스 하에서 증발시킨 다음 잔유물에 o-phthalaldehyde reagent (Sigma Co., 4 ml)를 첨가하여 용해시키고 진한 황산 (2 ml)을 가하여 10분간 방치한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하여 콜레스테롤의 양을 계산하였다.

유산균 동정

실험 균주 중 내산성과 내담즙성, 콜레스테롤 동화능 및 담즙산 분해능이 뛰어난 균주를 선택하여 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을 조사하였고, 또한 16S rDNA sequencing을 통해 염기서열을 분석하여 동정하였다. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (20)에 준하여 그람 및 포자염색, 운동성, 용혈능, catalase, oxidase 및 urease 등의 효소 생성능, 생육 가능한 온도, pH 범위 및 염농도 등을 조사하였다. 또한 API 50 CHL kit (bioMérieux, France)를 사용하여 당발효능을 알아보았다. 한편, 염기서열 분석을 위해 16S rDNA는 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3')과 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR, Biorad Laboratories Ltd., Canada)로 증폭시켰다. PCR 산물은 QIA quick PCR kit (QIAGEN, USA)로 정제하고 Macrogen Co. (Korea)사에 의뢰하여 DNA sequencing 하였다. 분석된 염기서열은 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 database와 비교한 후 BLASTN program으로 상동성을 검색하였다. Sequence alignment는 CLUSTER W 알고리즘으로 정렬한 후 MEGA 5.05 program으로 Neighbor-joining tree에 의해 계통도를 작성하여 유전적 유사성을 검토하였다.

통계처리

실험결과로부터 얻은 값은 SPSS (version 12.0) 프로그램을 사용하여 통계처리 하였다. 일원배치 분산분석법 (one-way ANOVA)의 Tukey's test로 유의수준 $p < 0.05$ 에서 평균값 간의 유의적인 차이를 분석하였다.

결과 및 고찰

인공 위액 및 담즙산에 대한 내성

인공 위액 및 담즙산 존재 하에서 갖김치로부터 분리된 유산균 14종의 내산성 및 내담즙성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. Pepsin을 첨가하여 pH 2.5로 맞춰 인공 위액 환경하에서 실험 균주를 2시간 배양시킨 결과, MLK11과 MLK73 균주는 다른 실험 균주에 비해 매우 높은 저항성을 나타내어 1 log cycle 이하 정도만 균수가 감소되었다. 반면 MLK53과 MLK78 균주는 3 log cycle 이상의 균수가 감소되어 낮은 pH 하에서 비교적 낮은 저항성을 보였다. 한편, 인공 위액에 반응시킨 후 곧 바로 0.3% oxgall을 함유한 배지 상에서 3시간 동

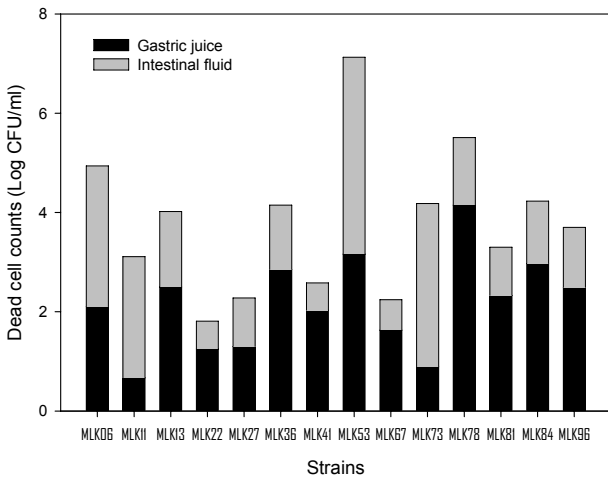


Fig. 1. Tolerance against simulated gastric juice and intestinal fluid of the lactic acid bacteria isolated from mustard leaf kimchi. Initial LAB cells (5.0×10^8 CFU/ml) were incubated in artificial gastric juice (pH 2.5) added pepsin (1 mg/ml) at 37°C for 2 h, and then maintained in artificial intestinal fluid added oxgall (0.3%) at 37°C for 3 h. Each values represents mean of three trials.

안 실험 균주를 배양시킨 결과, 인공 담즙산에 대한 내성은 MLK22, MLK27, MLK41, MLK67 및 MLK81 균주들에 의해 높게 나타나 1 log cycle 이하의 균수 정도만 감소된 반면, MLK53과 MLK73 균주는 담즙산에 민감하여 3 log cycle 이상 감소되었다. 따라서 MLK11, MLK22, MLK27, MLK41 및 MLK67 균주는 인체 내에 들어 왔을 때 위산과 담즙산 하에서도 비교적 많은 균수(10^5 CFU/ml 이상)가 생존하여 소장 에 도달할 수 있을 것으로 여겨진다.

Erkkilä와 Petäjä (12)에 의하면 육 발효 스타터 배양액으로부터 분리한 균주 중 *Pediococcus acidilactici* P2와 *L. curvatus* RM10 및 *P. pentosaceus* FF가 가장 내산성이 강했으며, 이들은 pH 6.0에서 0.3% 담즙산에 대한 내성도 강한 것으로 밝혀졌다. 유산균이 낮은 pH 하에서도 견딜 수 있는 내산성 메커니즘은 아직 완전하게 밝혀지지 않았지만, 다만 세포의 원형질막에 결합되어 있는 H^+ -ATPase의 활성화와 관련 있는 것으로 알려져 있다. 배양과정 중 유산균이 생산하는 유기산에 의해 배양액의 pH가 낮아지면 세포 내부로 다량의 양성자가 유입되는데 이때 H^+ -ATPase의 활성이 높을수록 양성자를 효과적으로 방출하여 세포내부의 pH를 일정한 수준으로 유지시켜 산에 대한 내성을 나타낸다(6). 게다가 아미노산 탈탄산 효소는 세균 세포 내의 pH유지에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌는데 lysine decarboxylase는 lysine을 cadaverine으로 전환시켜 세포 내 pH를 높여준다. 또한 산성 조건에서 받는 스트레스로 유발되는 거대분자(단백질이나 핵산)들의 손상을 막아주거나 회복하기 위해 acid shock protein (ASPs)을 합성하기도 하며, 세포막을 구성하는 지방산 성분의 변화를 유도하는데 즉, 불포화지방산을 감소시키거나 환상지방산의 함량을 증가시키는 등 지방산 함량을 변화시켜 세균 세포막의

유동성을 감소시키면 산에 대한 치사율을 낮춰 생존율이 높아진다(2).

한편, 담즙산 존재하에서 유산균의 생존 메커니즘은 포함 담즙산의 steroid 구조에 결합된 아미노산을 가수분해하는 BSH의 발현 능력에 의한 것으로 알려져 있다. 이 효소의 작용에 의해 아미노산이 제거된 steroid기는 포함된 형태보다 세균에 독성이 적은 물리적 특성을 지니게 되는 것으로 보고되었으며, 그리고 *B. animalis*의 경우 세포 내 ATP 양을 증가시키고 F_1F_0 -ATPase에 의해 양성자 펌프를 가동시킴으로써 담즙산에 대한 내성을 가지게 된다고 알려져 있다(27, 35).

본 실험의 결과 뿐만 아니라 이미 보고된 연구 결과에서도 유산균의 종류에 따라 인체 소화액에 대한 저항성이 다양하였다. Liong과 Shah (23)에 의하면, 같은 균종이라 할지라도 산에 대한 내성이 다르게 나타났는데, *L. acidophilus* ATCC4962, *L. casei* ASCC290 및 *L. casei* ASCC292는 pH 2.0에서 2시간 동안 배양해도 10^7 CFU/ml 이상의 균수를 유지한 반면, *L. casei* ASCC1520, *L. casei* ASCC152, *L. casei* ASCC279, *L. casei* ATCC15820 및 *L. casei* CSCC2607은 산에 매우 민감하다고 하였으며, 담즙산에 대한 내성도 균주별로 상이하게 나타났다고 하였다. 게다가 일부 lactobacilli는 탈포합 담즙산인 cholic acid이나 oxgall 보다는 포함 담즙산인 taurocholic acid에 의해 더 많이 저해되었는데 이는 포함된 담즙산의 높은 용해성과 계면활성 때문에 이들의 독성이 더 크게 나타나는 것으로 보고하였다. 하지만 Tannock 등(38)은 탈포합된 sodium taurocholate에 의해 세균의 증식 저해가 뚜렷하게 나타났다고 하였다.

Corcoran 등(4)에 의하면 *L. rhamnosus* GG를 낮은 pH에 노출시켰을 때 세포수가 급격히 감소하는 것은 해당작용에 관여하는 효소가 불활성화 되어 세포 성장과 생명유지에 필요한 대사 에너지를 얻을 수 없기 때문인 것으로 보고하였다. 하지만 실제 음식물과 함께 유산균을 섭취함으로써 완충작용에 의해 위액의 pH가 다소 상승하여 유산균의 생존율은 좀 더 높아질 수 있고, 유산균을 microencapsule화 하여 장관 내에 안전하게 도달할 수 있도록 하는 방법으로 개발되어 Kim 등(19)의 보고에 따르면, capsule처리한 *L. acidophilus* ATCC43121는 대조군에 비해 pH 1.2-1.5의 강산 하에서 사멸율이 유의하게 낮았고 담즙산 존재하에서도 생존율이 월등히 높았다고 보고하였다.

복합 담즙산의 탈포합능

Sodium glycocholate, sodium taurocholate 혹은 sodium glycocholate와 sodium taurocholate의 혼합물의 존재 하에서 실험 균주에 의해 유리된 cholic acid 양을 측정하여 담즙산의 탈포합능을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 실험에 사용된 총 14균주 중 6균주에서만 담즙산의 탈포합능이 나타났다. MLK22와 MLK67 균주는 sodium glycocholate로부터 각각 3.97 ± 0.20 과 3.68 ± 0.51 mM의 cholic acid를 유리시킨 반면, MLK13와 MLK41 균주는 비교적 적은 양을 생산하였다. 또한 sodium taurocholate로부터 생산된 cholic acid의 양도 MLK22 ($3.06 \pm$

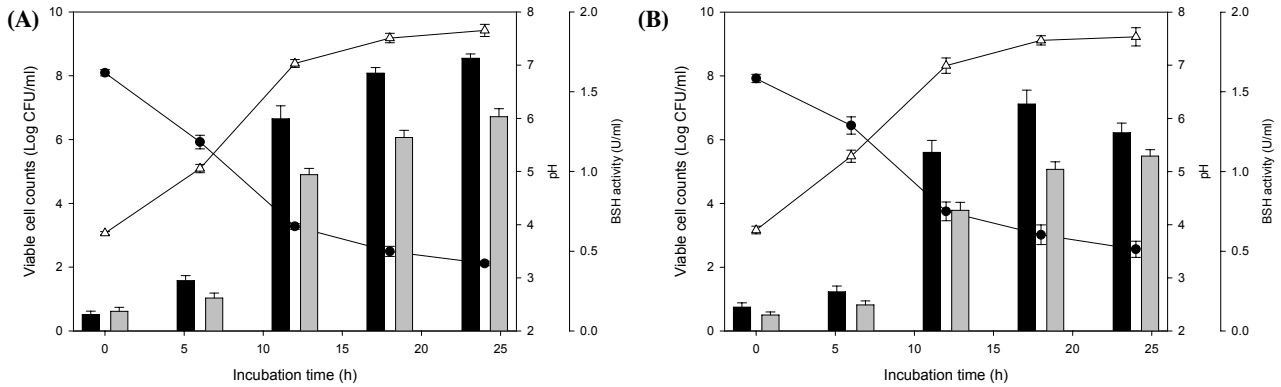


Fig. 2. Changes in cell numbers (Δ), pH (\bullet), and BSH activity of the MLK22 (A) and MLK67 (B) strain in the presence of sodium glycocholate (\blacksquare) or sodium taurocholate (\blacksquare). BSH activity was determined by measuring the amount of amino acids (glycine or taurine) released from conjugated bile (6 mM). Results are expressed as Means \pm SD of three experiments.

0.39 mM) 및 MLK67 (2.93 ± 0.36 mM)에 의해 유의하게 높게 나타났지만($p < 0.05$), 나머지 균주들은 이들 보다 낮은 약 1.0 mM 내외 정도 생산하였다. 또한 sodium glycocholate와 sodium taurocholate의 혼합물에서도 MLK67 균주가 가장 많은 양(3.11 ± 0.29 mM)의 cholic acid를 유리시켰다. 한편, 담즙산 종류별 탈포합능을 조사한 결과, MLK13은 포함 담즙산의 혼합물로부터 유의하게 높은 cholic acid를 유리시켰고, MLK22와 MLK84는 sodium glycocholate에서 더 많은 유리 담즙산을 생산하였으며, MLK27, MLK41 및 MLK67이 생산한 cholic acid의 양은 포함 담즙산의 종류에 따라 유의적인($p > 0.05$) 차이가 없었다. 여러 연구 결과에서 미루어볼 때, 유산균의 탈포합능은 균종, 배양조건, 담즙산의 종류 및 탈포합능 측정방법에 따라 다소 차이가 있으며, 담즙산에 대한 내성이 강할수록 탈포합능이 큰 것으로 알려져 있는데 본 결과에서도 담즙산에 대한 내성이 강한 MLK22, MLK27, MLK41, MLK67 및 MLK84 균주들은 탈포합능도 강한 것으로 확인되었다.

Table 1. Deconjugation of sodium glycocholate and sodium taurocholate by the lactic acid bacteria isolated from mustard leaf kimchi

Strains	Cholic acid released (mM)		
	Sodium glycocholate	Sodium taurocholate	Sodium glycocholate + sodium taurocholate
MLK13	1.35 ± 0.19^{abAB}	0.97 ± 0.17^{aA}	1.51 ± 0.26^{bA}
MLK22	3.97 ± 0.20^{aD}	3.06 ± 0.39^{bB}	2.68 ± 0.23^{bBC}
MLK27	2.15 ± 0.31^{aBC}	1.67 ± 0.49^{aA}	1.94 ± 0.51^{aAB}
MLK41	1.16 ± 0.38^{aA}	0.84 ± 0.30^{aA}	1.07 ± 0.28^{aA}
MLK67	3.68 ± 0.51^{aD}	2.93 ± 0.36^{aB}	3.11 ± 0.29^{aC}
MLK84	2.49 ± 0.33^{aC}	0.85 ± 0.15^{bA}	1.25 ± 0.42^{bA}

Bile salt deconjugation ability was determined as the amount of cholic acid released from conjugated bile salt. Results are expressed as Means \pm SD of three experiments. Means with different lowercase superscript letters in the same row and with different uppercase superscript letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Turkey's multiple range test.

Lye 등(26)에 따르면, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* 및 *L. casei*가 sodium taurocholate와 sodium glycocholate의 단독 및 혼합물과 oxgall을 탈포합시켜 유리시킨 cholic acid의 양은 0.91-5.40 mM로서 sodium glycocholate의 탈포합능이 가장 높은 반면, sodium taurocholate의 탈포합능이 가장 낮아 본 실험의 결과와 일부 일치하였는데 이는 glycine으로 포함된 담즙산이 taurine으로 포함된 담즙산 보다 더 독성이 강하기 때문이라 하였다. Moser와 Savage (27)도 포함 담즙산에 대한 lactobacilli 세포 자신을 보호하기 위해 담즙산을 탈포합시키는 것이라고 하였다. Gilliland와 Speck (15)의 결과에 따르면, *L. acidophilus* NCFM4962는 sodium taurocholate를 탈포합시킬 수 있었으며, 배양하는 동안 포함된 담즙산이 감소됨에 따라 유리 담즙산의 농도가 증가하였고, 탈포합 활성을 높이기 위해선 낮은 산화환원전위를 요구하였을 뿐만 아니라 호기적 조건에서는 유리 담즙산이 검출되지 않았다고 보고하였다.

담즙산은 콜레스테롤의 대사산물로 체내에서 콜레스테롤을 제거하는 주경로로서, 체내 콜레스테롤 대사를 조절하는 중요한 수단이다. 유산균을 비롯한 장내세균들은 복합 담즙산을 유리 담즙산으로 분해하고 장내 콜레스테롤 흡수에 필요한 복합 micelle 형성을 방해한다. 즉, 생성된 유리 담즙산은 복합 담즙산보다 용해도가 낮아서 장에 흡수되지 않고 분변으로 배출되고 그에 따라 간에서는 분변으로 배출된 양만큼의 부족한 복합 담즙산을 보충하기 위해 콜레스테롤을 이용하여 새로운 복합 담즙산을 생성하기 때문에 결국은 체내의 혈중 콜레스테롤 농도는 낮아지게 된다(36).

BSH 활성

Sodium glycocholate와 sodium taurocholate에 대해 MLK22와 MLK67균주가 유의하게 높은 탈포합능을 나타내었으므로 배양하는 동안 이들이 생산하는 BSH의 활성과 배양액의 pH 및 생균수를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. MLK22 균주는 시간이 경과함에 따라 균수는 서서히 증가하여 배양 24시간 후 최고 균수(9.42 ± 0.20 CFU/ml)에 이르렀고 이때 배양액의 pH

는 생성된 유산에 의해 3.27 ± 0.05 로 나타났다. BSH의 활성도 시간이 경과함에 따라 급격하게 증가하여 24시간 배양 후 sodium glycocholate와 sodium taurocholate에 대한 BSH의 활성은 각각 1.71 ± 0.03 및 1.34 ± 0.05 U/ml로 나타났다. MLK67 균주도 sodium glycocholate을 분해하는 BSH 활성은 배양 18시간만에 최대값(1.42 ± 0.08 U/ml)에 이르렀으나, 24시간 후에는 이보다 낮은 값을 나타내었다. 또한 기질이 sodium taurocholate 일 때 효소의 활성은 배양시간이 지날수록 점진적으로 증가하여 24시간 후에 최대값(1.10 ± 0.03 U/ml)에 도달하였다.

Cholic acid 및 chenodeoxycholic acid와 같은 1차 담즙산은 glycine이나 taurine과 같은 아미노산과 결합하여 복합 담즙산을 형성하는데 이들 복합 담즙산을 분해시켜 아미노산을 유리시키는 효소가 바로 BSH이다. BSH는 다양한 장내세균들의 세포내 효소로서 생물학적 기능은 명확하게 밝혀지진 않았지만 BSH가 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 효과가 보고됨에 따라 최근 이에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. De Smet 등(9)은 *Lactobacillus* sp.가 생산한 BSH가 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추고 이 효소의 활성으로 인해 담즙산 하에서도 생존하여 소장 하부에서 집락을 형성하면서 여러 기능을 발휘한다고 설명하였다.

일반적으로 BSH 활성은 산성 조건하에서 ethyl acetate로 추출한 후 생성물인 cholic acid 양을 측정하거나 taurocholic acid의 기질을 사용하여 방사화학 분석(radiochemical assay) 하거나 혹은 포함 담즙산으로부터 유리된 taurine과 glycine을 정량함으로써 측정한다(25). Lye 등(26)에 따르면, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* 및 *L. casei*가 생산한 BSH 활성은 0.25-0.75 U/ml로서 sodium taurocholate가 함유된 배지에서 BSH 활성이 가장 낮은 반면 가장 높은 활성은 sodium glycocholate와 oxgall 존재하에서 나타났으며, BSH 활성은 담즙산의 혼합물 보다는 포함 담즙산 단독으로 존재할 때 더 높게 관찰되었다고 하였다.

BSH 활성은 *L. acidophilus* (5), *L. johnsonii* (10), *L. gasserii* (16) 및 *L. plantarum* (9) 등 다양한 유산균에서 보고되고 있으며, Sridevi 등(12)에 따르면 *L. buchneri*의 BSH는 sucrose를 첨가한 MRS broth에서 대조구에 비해 활성이 거의 2배 가량 증가하였고, 질소원으로는 peptone (1.25%)과 동량의 yeast extract가 첨가된 배지 상에서 활성이 약 2.9배 증가되었으며, pH 7.0 및 37°C에서 정지기에 도달했을 때 최대의 활성을 나타내었다고 보고하였다. *L. plantarum* PH04의 BSH 활성도 대수증식기 보다 정지기에서 9배 더 높았으며, 그들의 활성은 포함 담즙산이 없을 때보다 이들이 함유된 배지에서 더 높았고, taurine으로 포함된 담즙산보다 glycine으로 포함된 담즙산에서 더 높았다고 하여 본 결과와 일치하였다(28).

콜레스테롤 동화능

담즙산의 탈포합능을 나타낸 6균주들의 콜레스테롤 동화능을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 0.3%(w/v) oxgall을 첨가

한 배지 상에서 콜레스테롤 동화능은 균주마다 현저한 차이를 나타냈으며, 이 중에서 MLK67 (39.16 ± 0.77 µg/ml)의 동화능이 가장 높은 반면, MLK13 (9.26 ± 0.27 µg/ml)는 가장 낮은 값을 나타내었다. Cholic acid가 첨가된 배지 상에서도 MLK67에 의해서 유의하게($p < 0.05$) 높은 값(28.12 ± 0.37 µg/ml)이 나타난 반면 MLK13 (5.22 ± 0.89 µg/ml)의 동화능은 낮았다. 또한 taurocholic acid가 함유된 MRS broth 상에서 콜레스테롤 동화능은 균주마다 유의적인($p < 0.05$) 차이가 있었으며, MLK67 균주(33.06 ± 0.41 µg/ml)가 가장 높은 동화능을 보였다. 담즙산의 종류별로 보면 MLK22, MLK41 및 MLK84는 oxgall과 taurocholic acid에서 동화능이 높았고, MLK27과 MLK67은 oxgall 존재 하에서 다른 담즙산에 비해 동화능이 유의적으로($p < 0.05$) 더 높게 나타났다. 따라서 콜레스테롤의 동화능은 균종과 담즙산의 종류에 따라 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

Dambekodi와 Gilliland (7)은 콜레스테롤 제거 효과는 담즙산의 탈포합에 의한 것이 아니라, 콜레스테롤의 동화와 관련 있다고 보고하였으며, 콜레스테롤 동화는 담즙산의 존재와 관계 있으며 담즙산의 농도가 높을수록 콜레스테롤 제거 효과가 높아진다고 하였다. Gilliland (14)에 의하면 bifidobacteria와 *L. acidophilus*는 산성 조건하에서 담즙산으로부터 콜레스테롤을 동화하거나 침전시킴으로써 혈관 내로 콜레스테롤이 흡수되는 것을 막아준다고 하였다. Liong과 Shah (23)에 따르면, 콜레스테롤 동화능은 lactobacilli 균종에 따라 유의적으로($p < 0.05$) 차이가 있었으며 oxgall 존재 시 12.03-32.25 µg/ml로 다양하게 나타났다. 특히 *L. acidophilus*와 *L. casei*는 cholic acid 존재시 더 높은 동화 활성을 보였으며 배지 내에 있던 콜레스테롤은 세포막 합성에 이용되므로 그 농도가 낮아지는 것으로 보고하였다. 또한 성장이 왕성한 세포의 콜레스테롤 제거능은 4.53-16.03 mg/g인 반면, 가열처리에 의해 사멸된 세포나 휴지기 세포(resting cell)의 제거능은 0.79-3.82 mg/g에 불과하다고 하였다. Pereira와 Gibson (30)도 콜레스테롤 동화능은 세균의 성장에 의존하여 세균의 활성이 왕성할수록 동화능은 높아졌다고 하였다.

Table 2. Assimilation of cholesterol by the selected lactic acid bacteria in the presence of different bile acid

Strains	Cholesterol assimilated (µg/ml)		
	MRS+oxgall	MRS+cholic acid	MRS+taurocholic acid
MLK13	9.26 ± 0.27^{aA}	5.22 ± 0.89^{bA}	8.21 ± 0.67^{aA}
MLK22	23.11 ± 0.56^{aB}	15.03 ± 0.32^{bB}	22.19 ± 0.35^{aB}
MLK27	30.12 ± 0.60^{aC}	20.37 ± 0.64^{bCD}	15.07 ± 0.55^{cC}
MLK41	25.46 ± 0.33^{aD}	19.52 ± 0.49^{bC}	26.28 ± 0.60^{aD}
MLK67	39.16 ± 0.77^{aE}	28.12 ± 0.37^{bE}	33.06 ± 0.41^{cE}
MLK84	35.61 ± 0.43^{aF}	21.09 ± 0.50^{bD}	27.03 ± 0.91^{aD}

Individual strains were inoculated (5.0×10^8 CFU/ml) in different media containing 0.1% pancreatin, 0.3% a bile salt, and cholesterol (100 µg/ml) and then incubated at 37°C for 24 h. Results are expressed as Means±SD of three experiments. Means with different lowercase superscript letters in the same row and with different uppercase superscript letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Turkey's multiple range test.

분리 유산균의 동정

내산성 및 내담즙성을 나타내고 담즙산에 탈포합능과 콜레스테롤 동화능 및 BSH 활성이 가장 높은 MLK67 균주의 형태학적 및 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. MLK67 균주는 그람양성의 구균, 포자를 형성하지 않고 운동성은 없으며 포도당으로부터 가스를 생성하고 황화수소 생성능은 없었다. D형의 유산을 생성하고 질산염 환원력은 없었으며 포도당으로부터 산을 생성하므로 methyl red 양성인 반면, acetoin을 생성하지 않아 Voges-Proskauer 음성을 나타내었다. 적혈구 용혈능은 전혀 나타내지 않았고 catalase를 생성하는 반면, oxidase와 urease는 생성하지 않았다. Arginine과 ornithine은 가수분해 하였으나, lysine 가수분해 능력은 없었으며 통성 혐기성균이고 10-45°C의 온도와 pH 5.0-10.0 및 염농도 20% 범위에도 생육 가능하였다. 한편 MLK67 균주는 arabinose, ribose, β-methyl-xyloside, amygdaline, esculine, cellobiose, salicine 및 saccharose 등의 당을 분해할 수 있었으나, erythritol, rhamnose, inositol, maltose, lactose, inuline 및 gluconate 등은 분해할 수 없었다. API kit에 의한 당분해능 조사 결과 *P. pentosaceus* MLK67로 동정되었다(ID=96.1%, T-index=0.59). 게다가 계통학적 위치를 검토하기 위하여 16S rDNA 유전자 염기서열(1,240 bp)을 분석하여 GenBank의 database와 비교

한 다음 BLASTN program으로 상동성을 검색한 후 Neighbor-joining tree에 의해 계통도를 작성한 결과는 Fig. 3과 같다. 그 결과 *P. pentosaceus* MLK67로 동정되었으며, *P. pentosaceus* DSM20336T (AJ305321)와 98.7%, *P. clausenii* DSM14800T (AJ621555)와 98.1%, *P. stilesii* LMG23082T (AJ973157)와 97.8% 및 *P. acidilactici* DSM20284T (GL397069)와 97.7%의 상동성을 나타내었다.

Raghavendra 등(31)도 *P. pentosaceus* CFR R123 균주가 pH 2.0와 pH 2.5에서 각각 53%와 62%의 생존율을 보였고, 0.3% oxgall에서도 견딜 수 있었으며, 콜레스테롤 감소능도 뛰어나다고 보고한 바 있다. 또한 *P. pentosaceus* NB-17는 인공 위액에 상당량 생존하고 면역기능을 활성화하며 알레르기 저해 효과가 확인되어 probiotic 균주로서의 가능성을 보여주었다(18).

갯김치에서 분리된 *P. pentosaceus* MLK67은 *in vitro* 상에서 위산과 담즙산에도 비교적 생존율이 높아 소장에 도달하여 높은 BSH 활성에 의해 담즙산을 탈포합하고 콜레스테롤을 동화하여 콜레스테롤 농도를 낮춰줌으로써 심혈관계 질환에 대한 위험을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다. 향후에는 *P. pentosaceus* MLK67 균주가 생산하는 BSH 효소를 정제하여 효소의 특성을 파악하고, *in vivo* 상에서 콜레스테롤 저하 메

Table 3. Physiological and biological characteristics and pattern of carbohydrate fermentation of the MLK67

Contents	Results	Sugar	Results	Sugar	Results
Cell shape	Cocci	Glycerol	-	Salicine	+
Gram staining	+	Erythritol	-	Cellobiose	+
Spores staining	-	D-Arabinose	+	Maltose	-
Acid-fast staining	-	L-Arabinose	+	Lactose	-
Motility	-	Ribose	+	Melibiose	-
Gas from glucose	+	D-Xylose	-	Saccharose	+
H ₂ S production	-	L-Xylose	-	Trehalose	-
Lactic acid	D	Adonitol	-	Inuline	-
Nitrate reduction	-	β-Methyl-xyloside	+	Melezitose	-
Methyl red	+	Galactose	+	D-Raffinose	-
Voges-Proskauer	-	D-Glucose	+	Amidon	-
Horse blood hemolysis	-	D-Fructose	+	Glycogene	-
Sheep blood hemolysis	-	D-Mannose	-	Xylitol	-
Catalase	+	L-Sorbose	-	β-Gentiobiose	-
Oxidase	-	Rhamnose	-	D-Turanose	-
Urease	-	Dulcitol	-	D-Lyxose	+
Arginine hydrolysis	+	Inositol	-	D-Tagatose	-
Ornithine hydrolysis	+	Mannitol	-	D-Fucose	-
Lysine hydrolysis	-	Sorbitol	-	L-Fucose	-
Growth in aerobic condition	+	α-Methyl-D-Mannoside	-	D-Arabitol	-
anaerobic	+	α-Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
Growth at 10-45°C	+	N-Acetyl glucosamine	+	Gluconate	-
Growth at pH 5.0-10.0	+	Amygdaline	+	2-Ceto-gluconate	-
Growth in 1-10% NaCl	+	Arbutine	-	5-Ceto-gluconate	-
20% NaCl	+	Esculine	+		

+, positive reaction; -, negative reaction; D, configuration of lactic acid produced from glucose.

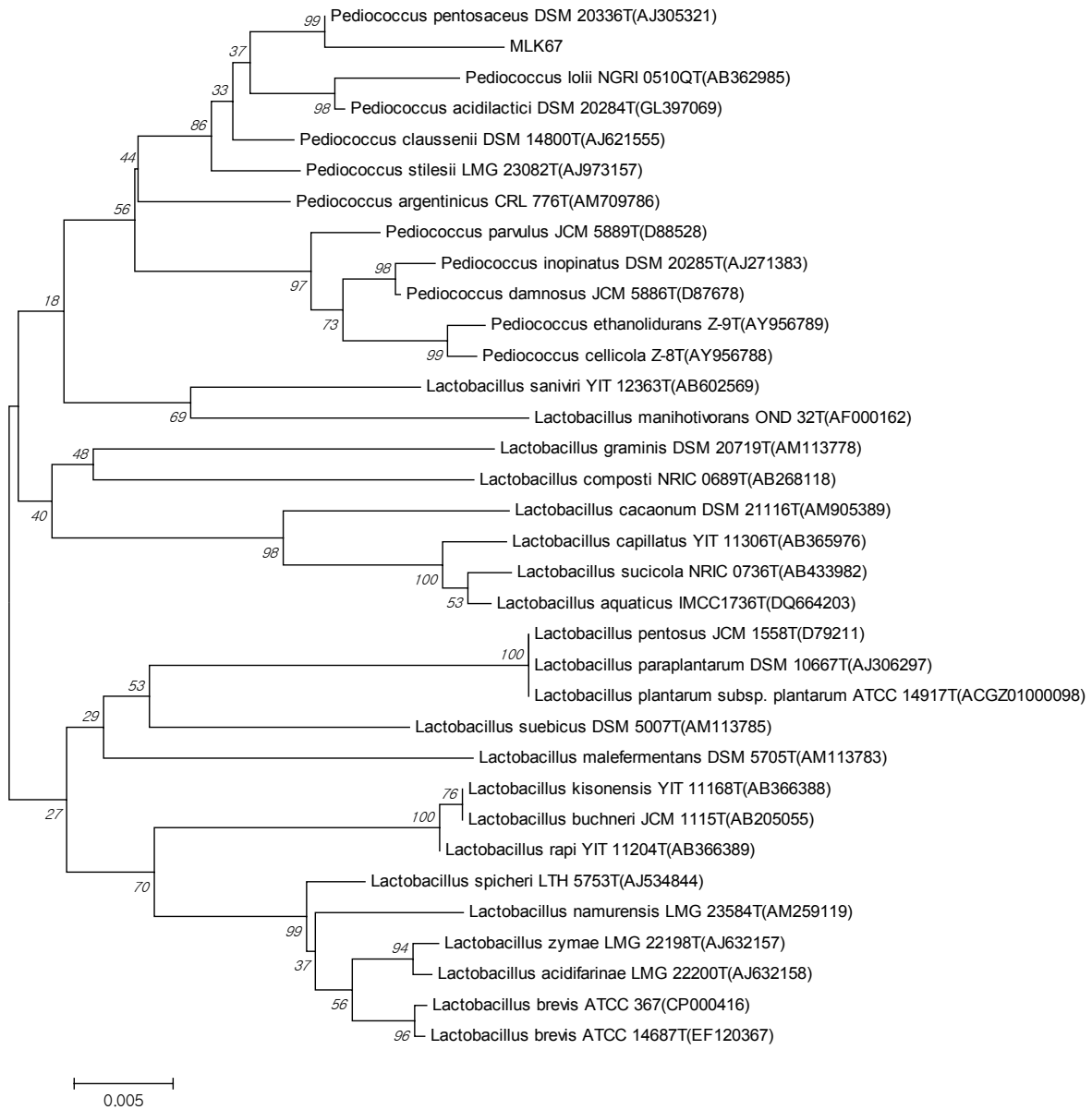


Fig. 3. Neighbor-joining tree based on 16S rDNA gene sequences, showing relationships between MLK67 and the strains having high homogeneity with the selected bacteria. Bar, 0.005 nucleotide substitutions per position.

커니즘을 규명하여 probiotic으로서의 가치를 평가하고 선발 균주를 이용한 발효식품, 건강보조식품 및 유산균 제제 제조 등 산업적으로 적용 가능성을 연구해 볼 필요가 있다.

적요

숙성된 갓김치에서 분리된 유산균을 pH 2.5에서 2시간 반응시킨 후 0.3% oxgall 존재 하에서 3시간 배양시킨 결과 MLK11, MLK22, MLK27, MLK41 및 MLK67 균주들은 10^5 CFU/ml 이상의 균수를 유지하여 높은 저항성을 보인 반면, MLK53 균주는 대부분의 균수가 사멸되어 매우 민감한 것으

로 나타났다. 담즙산에 대한 내성이 강한 균주들 대부분은 복합 담즙산의 탈포합능이 있었으며, MLK22와 MLK67 균주는 sodium glycocholate로부터 3.5 mM 이상의 cholic acid을 유리시켜 가장 높은 탈포합능을 보인 반면, MLK13과 MLK41은 각각 1.35와 1.16 mM 정도 낮은 양의 cholic acid를 유리시켰다. 특히, MLK22와 MLK67의 탈포합능은 sodium taurocholate 혹은 포함담즙산 혼합물 보다는 sodium glycocholate 존재 하에서 더 높게 나타났다. 게다가 sodium glycocholate와 sodium taurocholate으로부터 MLK22와 MLK67이 생산하는 bile salt hydrolase (BSH)의 활성은 정지기 초기에 최대를 이르고 MLK67 보다는 MLK22의 BSH 활성이 다소 높았

다. 한편, 실험 균주들의 콜레스테롤 제거능은 5.22-39.16 μ g/ml로 균주별 유의적인 차이가 있었으며($p < 0.05$), 그 중에서 MLK67 균주는 0.3% oxgall, cholic acid 및 taurocholic acid로부터 가장 높은 콜레스테롤 동화능을 나타내었다. 따라서 실험 균주 중 높은 내산성과 내담즙성을 가지며, 담즙산 탈포합능 및 콜레스테롤 동화능이 유의하게 높은 MLK67 균주는 probiotic 균주로서의 가능성이 있는 것으로 간주되어 이를 생화학적 특성과 당분해능 및 염기서열 분석에 의해 동정한 결과 *Pediococcus pentosaceus* MLK67로 확인되었다.

참고문헌

- Akalin, A.S., S. Gonc, and S. Duzel. 1997. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. *J. Dairy Sci.* 80, 2721-2725.
- Alvarez-Ordóñez, A., A. Fernández, A. Bernardo, and M. Lopez. 2010. Acid tolerance in *Salmonella typhimurium* induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiol.* 27, 44-49.
- Brown, M.S. and J.L. Goldstein. 1984. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Am.* 251, 52-60.
- Corcoran, B.M., C. Stanton, G.F. Fitzgerald, and R.P. Ross. 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3060-3067.
- Corzo, G. and S.E. Gilliland. 1999. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 82, 472-480.
- Cotter, P.D. and C. Hill. 2003. Surviving the acid test: Responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 429-453.
- Dambekodi, P.C. and S.E. Gilliland. 1998. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* 81, 1818-1824.
- De Rodas, B.Z., S.E. Gilliland, and C.V. Maxwell. 1996. Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. *J. Dairy Sci.* 79, 2121-2128.
- De Smet, I., L. van Hoorde, M. De Saeyer, M. Vande Woestyne, and W. Verstraete. 1994. *In vitro* study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. *Microb. Ecol. Health Dis.* 7, 315-329.
- Elkins, C.A. and D.C. Savage. 1998. Identification of genes encoding conjugated bile salt hydrolase and transport in *Lactobacillus johnsonii* 100-100. *J. Bacteriol.* 180, 4344-4349.
- Erkelens, D.W. 1990. Combination drug therapy with HMG CoA reductase inhibitors and bile acid sequestrants for hypercholesterolemia. *Cardiology* 77, 33-38.
- Erkkilä, S. and E. Petäjä. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci.* 55, 297-300.
- Fernandes, C.F., K.M. Shahani, and M.A. Amer. 1987. Therapeutic role of dietary lactoacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 343-356.
- Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 175-188.
- Gilliland, S.E. and M.L. Speck. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 15-18.
- Hosono, U.A. 1999. Bile tolerance, taurocholate deconjugation and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J. Dairy Sci.* 82, 243-248.
- Irwin, J.L., C.G. Johnson, and J. Kopalo. 1944. A photometric method of the determination of cholates in bile and blood. *J. Biol. Chem.* 153, 439-457.
- Jonganurakkun, B., Q. Wang, S.H. Xu, Y. Tada, K. Minamida, D. Yasokawa, M. Sugi, H. Hara, and K. Asano. 2008. *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 69-73.
- Kim, S.J., S.Y. Cho, S.H. Kim, O.J. Song, I.S. Shin, D.S. Cha, and H.J. Park. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC43121. *LWT.* 41, 493-500.
- Kitahara, K. 1986. *Pediococcus*, pp. 513-515. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. In S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin, and R.Y. Stanier. (8th eds.) William & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Klaver, F.A.M. and R. van der Meer. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile-salt deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1120-1124.
- Lim, S.M. and D.S. Im. 2009. Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 178-186.
- Liong, M.T. and N.P. Shah. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of Lactobacilli strains. *J. Dairy Sci.* 88, 55-66.
- Lora, K.R., K.L. Morse, G.E. Gonzalez-Kruger, and J.A. Driskell. 2007. High saturated fat and cholesterol intakes and abnormal plasma lipid concentrations observed in a group of 4- to 8-year-old children of Latino immigrants in rural Nebraska. *Nutr. Res.* 27, 483-491.
- Lundeen, S. and D.C. Savage. 1990. Characterization and purification of bile salt hydrolase from *Lactobacillus* sp. Strain 100-100. *J. Bacteriol.* 172, 4171-4177.
- Lye, H.S., G.R. Rahmat-Ali, and M.T. Liong. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* 20, 169-175.
- Moser, S.A. and D.C. Savage. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3476-3480.
- Nguyen, T.D.T, J.H. Kang, and M.S. Lee. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 358-361.
- Noh, D.O., S.H. Kim, and S.E. Gilliland. 1997. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci.* 80, 3107-3113.
- Pereira, D.I.A. and G.R. Gibson. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4689-4693.
- Raghavendra, P., T.S. Rao, and P.M. Halami. 2010. Evaluation of beneficial attributes for phytate-degrading *Pediococcus pentosaceus* CFR R123. *Benef. Microbes*, 1, 259-264.
- Rasic, J.L., I.F. Vujicic, M. Skrinjar, and M. Vulic. 1992. Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnol. Lett.* 14, 39-44.
- Richardson, T. 1978. The hypocholesteremic effect of milk: A review. *J. Food Protect.* 41, 226-235.
- Rudel, L.L. and M.D. Morris. 1973. Determination of cholesterol

- using o-phthalaldehyde. *J. Lipid Res.* 14, 364-366.
35. Sanchez, B., C.G. Reyes-Gavilan, and A. Margolles. 2006. The F_1F_0 -ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. *Environ. Microbiol.* 8, 1825-1833.
36. Sridevi, N., P. Vishwe, and A. Prabhune. 2009. Hypocholestermic effect of bile salt hydrolase from *Latobacillus buchneri* ATCC4005. *Food Res. Int.* 42, 516-520.
37. Tanaka, H., H. Hashiba, J. Kok, and I. Mierau. 2000. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2502-2512.
38. Tannock, G.W., G.M. Bateup, and H.F. Jenkinson. 1997. Effect of sodium taurocholate on the *in vitro* growth of lactobacilli. *Microbiol. Ecol.* 33, 163-167.
39. Theuwissen, E. and R.P. Mensink. 2008. Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiol. Behav.* 94, 285-282.