

Isolation and Characterization of Lactic acid bacteria *Leuconostoc mesenteroides* DB3 from *Camellia japonica* Flower

Sam Woong Kim¹, Da Hye Shin¹, Sang Wan Gal^{1,2}, Kyu Ho Bang², Da Som Kim³ and Won-Jae Chi^{3*}

¹Gene Analysis Center, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

³Species Diversity Research Division, National Institute of Biological Resources, Incheon 22689, Republic of Korea.

Received September 18, 2023 /Revised October 17, 2023 /Accepted October 17, 2023

Lactic acid bacteria (LAB) are widespread in a variety of environments including fermented dairy products, gastrointestinal and urogenital tracts of human and animals, plant, soil and water. *Leuconostoc mesenteroides* DB3 was detected by the strongest antibacterial activities among 24 *Leuconostoc* strains isolated from *Camellia japonica* flowers. Acid tolerance of *L. mesenteroides* DB3 existed up to pH 2.5, but the resistance did not show at pH 2.0, which relatively excellent acid resistance existed. Bile acid tolerance was very stable within the test range to 1.2%. *L. mesenteroides* DB3 exhibited the optimal growth at 30°C, and showed a slight slow growth when compared with *L. mesenteroides* KCTC3505, which reached a stationary phase at 18 hr. The pH was changed along with the growth curve, but was maintained above pH 3.98. *L. mesenteroides* DB3 had higher initial antibacterial activities when compared to *L. mesenteroides* KCTC3505, but it showed similar activities with the standard strain after the latter part of the logarithmic growth phase. Although lactic acid production in *L. mesenteroides* DB3 was induced by lower amount in the initial part to the standard strain, it was exhibited by similar amounts after the late logarithmic growth phase. Muicin adhesion of *L. mesenteroides* DB-3 maintained superior to *L. mesenteroides* KCTC3505. Both strains showed excellent emulsification ability for kerosene. In summary, we evaluate that *L. mesenteroides* DB-3 has a high potential for application as probiotics owing to its excellent antibacterial activity, acid resistance, bile acid resistance, and muicin adhesion.

Key words : Acid tolerance, *Camellia japonica* flower, *Leuconostoc*, lactic acid bacteria, mucin

서 론

Lactic acid bacteria (LAB)는 다양한 환경, 즉, 식물, 곤충, 토양, 물, 유제품, 발효물, silage, 동물의 위장관, 호흡기관 등에서 발견된다[10, 30]. 이들의 광범위한 서식지는 다양한 스트레스 조건과 영양적 조건들을 유도하는데, protease 및 lipase의 특이 생리적 및 생화학적 특성, 식물에 phytoalexins에 대한 내성, 위장관에 생존을 위한 담즙산 내성 등과 같은 특수성을 부여한다. 따라서 LAB는 발효식품, 음료, silage 등의 3,500 종 이상의 발효에 관여하여 필수적인 역할을 수행한다[27].

미생물은 식물의 지상부, 잎, 줄기, 꽃, 과실, 뿌리, 뿌리

부근 등에 서식한다[16]. 특히 식물의 지상부에서는 $10^3 \sim 10^8$ CFU/g 정도 서식하지만, 지하부에서는 10^{11} CFU/g 정도 유지된다[3, 24, 25]. 일반적으로 채소와 과실의 미생물 군집은 $10^5 \sim 10^7$ CFU/g 인데, 그 중에서 효모가 가장 많은 부분을 차지하지만($10^2 \sim 10^6$ CFU/g), LABs는 전체 군집에서 차지하는 비율이 적다[7]. 최근까지 식물 유래 LAB는 과실 및 야채에서 주로 분리하였지만[2-5, 21, 29, 30], 꽃에서 분리된 LAB에 대한 보고는 많지 않다[9, 15, 16, 26]. 식물에서 주로 분리되는 LAB는 *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weissella* 속 등이 알려져 있다[30]. 특히, *Leuconostoc*과 *Lactococcus*는 로메인 상추 계통에서 가장 빈번하게 분리되는 균주이다[28].

본 연구는 우리나라에 서식하는 동백꽃에서 분리된 *Leuconostoc* 속 24균주의 항균 활성을 평가해 우수 균주를 선발하고, 선발된 균주에 대해 유기산 생산능력, 최적 온도 조건, 내산성 및 내담즙성 등을 분석하여 프로바이오틱스로서의 가능성을 조사하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-32-590-7371, Fax : +82-32-590-7230

E-mail : wjchi76@korea.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.

재료 및 방법

미생물 분리 및 시료 준비

전라남도 영광군 불갑면 모악리 불갑산(불갑사)에서 채집한 동백나무의 꽃(동백꽃) 한 송이를 균주 분리를 위한 시료로 사용하였다. 시료를 500 ml 멸균수로 3회 세척하고 물기가 제거된 시료에 20 ml 멸균수를 첨가하여 막자사발에서 완전히 으갠 후, 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 연속희석법으로 10^{-1} ~ 10^{-5} 으로 희석하였으며, 10^{-5} 희석액 1 ml에서 200 μ l을 분취하여 MRS 고체배지에 도말하고 30°C에서 24시간 동안 호기 조건에서 배양하였다. 생성된 24개의 콜로니를 새로운 MRS 고체배지에 옮겨 희석식 계대법으로 순수배양하여 단일 균주를 확보하였다. 단일 균주로 확보된 균부터 MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 1 ml씩 분취하여 12,000 x g에서 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상등액은 채취하여 0.2 μ m syringe filler로 여과한 후 -20°C에 보관하여 추출물을 확보하였다. 표준균주로 사용된 *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3505는 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양 받아 이용하였다.

항균 활성 평가

항균 활성 평가를 위하여 그람 음성균인 *Salmonella* Typhimurium (KCTC 12401), *E. coli* (ATCC 10536)와 그람 양성균인 *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) 그리고 효모인 *Candida albicans* (KCTC 7122)를 이용하여 disc 또는 microtiter plate 방법으로 1차 스크리닝을 수행하였다. 항균 분석을 위해 24시간 전배양된 균주는 10^6 CFU/ml로 맞추어 연구에 사용되었다. 반응액을 microtiter plate에 첨가하거나 disc에 점적 한 후 37°C에서 24시간 배양하면서 반응 성상을 관찰하고 600 nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 평가하였다.

최적 성장 온도 조사

L. mesenteroides DB3 균주와 표준균주 *L. mesenteroides* KCTC 3505는 25, 30, 37°C에서 24시간 배양하면서 5, 16, 24시간에서 샘플링한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 온도에 따른 성장을 비교하였다.

내산성 및 내담즙성 분석

내산성 및 내담즙성은 이전에 수행된 연구 방법을 약간 수정하여 분석을 수행하였다[13, 20]. 간략히 서술하면, 9 ml MRS (Sigma-Aldrich, Korea) 액체배지의 pH를 HCl을 이용하여 pH 2.5와 3.5로 조정된 후, overnight 배양된 1 ml의 유산균을 첨가하였다. 처리된 용액은 37°C에서 4시간 배양하면서, 각 시간별 생존 개체수 조사를 수행하였다.

내담즙성 분석은 위의 내산성 분석과 유사하게 수행하였으며, 0.3%와 0.6% oxgall (Oxoid, Bstingstoke, UK)를 사용하여 실시하였다.

성장 곡선 측정

최종 선발된 DB3 균주를 100 ml 배지에 1/100로 접종하였다. 접종된 DB3 균주는 30°C에서 배양하면서 6시간 간격으로 샘플링을 수행하였다. 샘플링된 용액은 600 nm에서 흡광도를 측정하는 것에 의해 유산균의 성장도를 평가하였다. 항균력은 위에서 서술된 MIC 측정 방법에 의해 수행되었다.

유기산 함량 분석은 HPLC로 수행하였으며, Aminex 87H column (300×10 mm, Bio-Rad, USA)을 이용한 Ultimate3000 (Thermo Dionex, USA)로 분석하였다. RI (ERC, RefractoMAX520, Japan)로 UV 210 nm에서 검출하였고, 이동상은 0.01 N H₂SO₄를 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 30 분간 수행하였다. 표준품으로 lactic acid sodium salt (Merck, USA)와 acetic acid (Merck, USA)을 사용하였다.

뮤이신 부착 능력 평가

돼지 위 type III 뮤이신(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)는 10 mg/ml로 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5)에 용해시켰다. 제조된 뮤이신 용액은 이전 수행된 연구 방법을 약간 수정하여 수행하였다[23]. 간략히 서술하면, 1 mg/ml 뮤이신을 microtiter plate에 처리하여 37°C에서 30분 처리 후, 4°C에서 16시간 방치하여 부착하였다. PBS 완충액(pH 7.4)으로 3회 세척 후 10^7 CFU/ml 대상 미생물을 첨가하여 실온에서 3시간 또는 37°C에서 24시간 반응하였다. 부착되지 않은 균주는 PBS 완충액(pH 7.4)으로 3회 세척하여 제거한 후, 100 μ l 0.1% crystal violet를 첨가하여 실온에서 30분 반응한 후, PBS 완충액으로 3회 세척하였다. 100 μ l 30% 초산을 첨가하여 미생물에 부착된 crystal violet를 용출하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 뮤이신 결합력을 평가하였다.

방울붕괴실험(drop-collapse test) 및 유화 실험

방울붕괴실험(drop-collapse test)은 Jain et al. (1991)에 의해 서술된 방법으로 수행된 방법을 부분적으로 변형하여 실시하였다[6]. 간략히 서술하면, 무세포배양액 25~50 μ l을 파라필름의 소수성 표면으로 점적하여 1분 후에 방울의 양상을 관찰하여 대조구 대비하여 증가된 직경(cm)을 대조구 대비 증가률로 산정하였다.

유화력은 유화지수(E24)로서 평가되었으며, 약간 변형하여 실시하였다[12]. 간략히 서술하면, 증류수와 등유(kerosene)를 각각 6 ml과 4 ml을 혼합하여 2분 동안 vortexing을 실시하였다. 반응된 용액은 24시간 실온에 방치한 후, 유화된 양상을 관찰하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{유효력(E24)} = \frac{\text{유화층(cm)}}{\text{전체 용액 길이(cm)}} \times 100$$

통계분석

반복 실험을 통하여 얻은 결과는 SAS program (V. 9.2, Cary, NC, USA)를 사용하여 분산분석 하였으며, 시료에 대한 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료의 분석결과에 대한 유의성 검정은 분산분석을 한 후 p<0.05 수준에서 Duncan’s multiple range test (DMRT)를 실시하였다.

결과 및 고찰

균주 분리 및 항균활성

식물 지상부 중에서 꽃은 미생물 발굴을 위한 좋은 시료임에도 불구하고 그동안 많은 연구가 보고되어 있지 않았다. 특히 우리나라 자생 식물 꽃 유래 미생물에 대한 연구 논문은 전무한 상태이다. 식물의 종류에 따라 꽃의 구성성분이 다르기 때문에 이를 이용할 수 있는 다양한 유산균이 존재할 수 있어, 유산균 발굴을 위한 좋은 시료가 될 수 있을 것으로 고려된다. 본 연구에서는 이와 같은 목적을 달성하기 위해, 전라남도 불갑산에서 채집한 동백꽃 한 송이로부터 MRS 고체배지에서 총 24개의 콜로니가 자라는 것을 확인하였으며, 자라난 모든 콜로니를 3번 이상 계대하여 순수배양하였다. 24개 균주의 16S rDNA 유전자 염기서열 분석을 통해 모든 균주가 *Leuconostoc* 속의 균주임을 확인하였다. 24개 균주의 액체배양액을 이용하여 *S. aureus* 에 대한 항균활성을 측정하여 활성이 가장 우수한 DB3 균주를 다음 실험을 위한 미생물로 선발하였다. 이 균주의 16S rDNA 유전자 염기서열을 바탕으로 NCBI BLAST를 수행한 결과, *L. mesenteroides* 균주들과 99% 이상(<99.79%)의 높은 상동성을 보였다. 특히, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 및 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* DSM 20484와 99.60%, *L. mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchi* DRC 1506 및 *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* JCM 20044와 99.53%의 상동성

을 보였다. 따라서 DB3 균주를 *L. mesenteroides*의 한 균주로 동정하여 *L. mesenteroides* DB3으로 명명하였다.

DB3 균주의 항균활성은 그람음성 균주인 *E. coli*와 *S. Typhimurium*, 그람양성 균주인 *B. cereus*과 *S. aureus*, 진균인 *C. albicans*에 대해 평가해 보았다. 배양여액 12.5 ul에 대해서는 *B. cereus*가 가장 우수한 것으로 나타난 반면에, *E. coli*가 가장 낮은 것으로 나타났다(Fig. 1). 그러나 25 ul에 대해서는 *E. coli*가 가장 우수하고, *S. aureus*가 가장 낮은 것으로 평가되었다. 따라서 일정 수준 이상의 배양여액 농도에서 *E. coli*는 급격히 항균활성이 상승되는 것으로 추정된다.

본 결과에서 그람양성, 그람음성 및 효모에 대한 항균활성의 특이성을 나타내지는 않았다. 또한, 효모인 *C. albicans*에 대한 항균활성은 *S. aureus*에 유사하거나 약간 높게 나타났다. *L. mesenteroides* MJM60376는 구강 프로바이오틱스로서 *Streptococcus mutans* 균주에 대한 항균활성을 보였다, 뿐만 아니라 *Porphyromonas gingivalis* 및 곰팡이 등에도 항균활성이 존재한다[11, 17, 19]. 따라서 본 연구 결과에서 나타난 바와 같이 그람양성, 그람음성 및 효모 등에 미생물에 대한 다양한 항균 활성을 나타내는 범용적인 항균물질들을 보유하고 있을 가능성이 높은 것으로 추정된다.

***Leuconostoc mesenteroides* DB3의 내산성 및 내담즙성 분석**

위액에 대한 내산성과 담즙산에 대한 내성은 프로바이오틱스 미생물이 갖춰야 할 기본적인 특성 중 하나이다. 보통 위에서 분비되는 염산은 pH 0.78~0.9를 유지하지만 음식물이 유입되면 pH 2.0~3.0으로 상승하는데, 미생물의 생존은 pH에 대한 저항성에 따른 것으로 알려져 있다. 실험 결과, pH 3.0~4.0의 조건에서는 DB3 균주와 표준균주 *L. mesenteroides* KCTC 3505의 생존 개체수에서 큰 차이가 없었으나, pH 2.5의 조건에서는 DB3 균주의 생존 개체수가 5.2×10⁷ CFU/ml, 표준균주의 생존 개체수가 5.6×10⁶ CFU/ml로, DB3 균주의 생존 개체수가 표준균주의

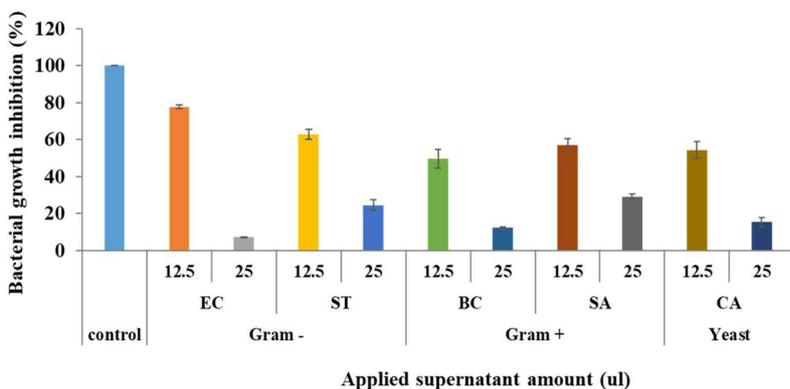


Fig. 1. Results of antibacterial assay. *Leuconostoc mesenteroides* DB3 was cultured for 24 hr at 30°C, recovered supernatant, and then filtered with 0.2 mm syringe filter. The treated fluid was applied by the indicated amounts in Figure. X- and Y-axes indicate applied supernatant amount and bacterial growth inhibition, respectively. EC; *E. coli* (ATCC 10536), ST; *Salmonella* Typhimurium (KCTC 12401), BC; *Bacillus cereus* (ATCC 11778), SA; *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), CA; *Candida albicans* (KCTC 7122).

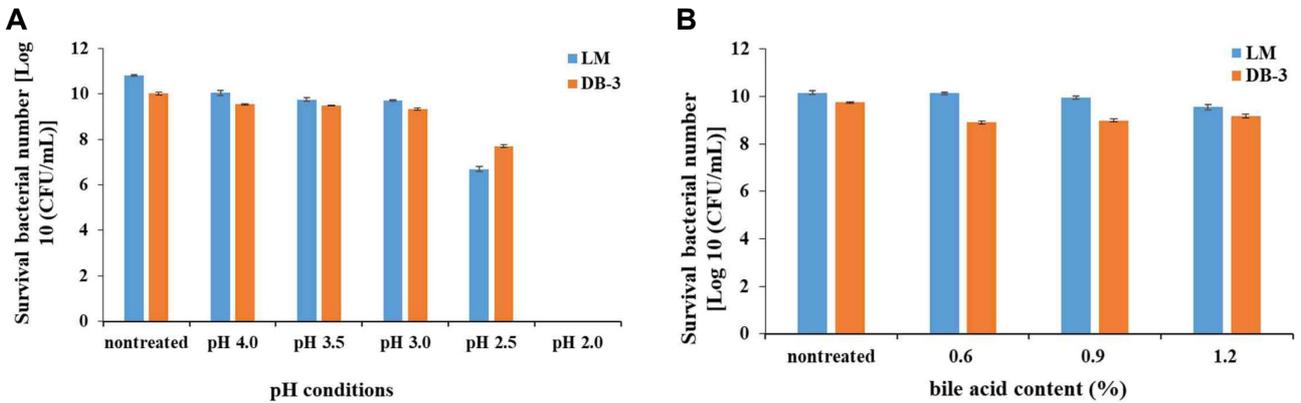


Fig. 2. Acid and bile acid tolerances. The bacterial strain was centrifuged for harvesting the bacterial cells, and then resuspended by 10^8 CFU/ml. The acid and bile acid treatments were done for 4 hr by the indicated pHs and bile acid concentrations. After treatment with each pH and bile acid, the bacterial cells were serially diluted with 10-fold, smeared at MRS agar medium, and then calculated for survival cells after cultivation. LM; *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3505, DB; *Leuconostoc mesenteroides* DB3.

생존 개체수에 비해 상당히 높은 것으로 나타났다(Fig. 2A). 이는 pH 2.5의 산성 조건에서 DB3 균주가 보다 잘 생존할 수 있다는 것을 의미하며, 이에 따라 산성 조건의 위를 지나 장까지 안전하게 도달하는데 보다 유리할 것으로 판단된다.

담즙산은 소장의 상부에서 분비되어 장내 음식물의 소화와 흡수를 촉진할 뿐만 아니라 외부 미생물을 침입을 막는 살균작용을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 프로바이오틱스 미생물을 선별하는데 담즙산 내성을 평가하고 있으며, 그 농도는 장내 담즙산 농도 0.3%를 기준으로 하고 있다. DB3 균주의 담즙산 내성은 처리된 모든 oxgall 농도에서 표준 균주 *L. mesenteroides* KCTC 3505와 비슷한 수치를 보였으며, 최종 농도 1.2%에서도 높은 생존률을 보였다(Fig. 2B). DB3 균주가 장내 담즙의 농도인 0.3%보다 훨씬 높은 1.2% oxgall의 농도에서 높은 생존률을 보인 내담즙성 결과를 토대로, DB3 균주는 소장을 통과할 때 담즙산의 영향을 받지 않고 대장으로 이동할 수 있을 것으로 판단된다.

L. carnosum KCTC 3525와 *L. citreum* KCTC 3526는 pH 2.0에서 생존률이 각각 0.0%와 0.01%이었고, 0.3%의 oxgall 존재하에서 각각 33.1%와 47.5%의 생존률을 보였다 [14]. 이를 토대로 DB3 균주는 *Leuconostoc* 속 다른 균주들보다 프로바이오틱스로서 적용가능성이 높을 것으로 기대된다.

***Leuconostoc mesenteroides* DB3의 성장 특성 분석**

DB3 균주에 대한 생육적응을 분석하기 위해 표준균주인 *L. mesenteroides* KCTC 3505와 비교 분석하여 보았다. 그 결과 DB3 균주는 표준균주에 비교하여 전반적으로 성장이 낮은 것으로 평가되었다(Fig. 3). DB3 균주는 표준균

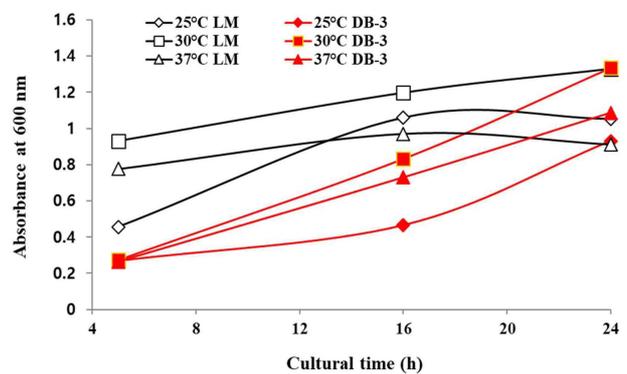


Fig. 3. Evaluation of optimal growth temperature for *Leuconostoc mesenteroides* DB3. Each strain was incubated for the indicated times at 25°C, 30°C and 37°C. The grown bacteria were measured at 600 nm in wavelength. X- and Y-axes indicate cultural time and absorbance at 600 nm, respectively. LM; *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3505, DB; *Leuconostoc mesenteroides* DB3.

주에 비교하여 25°C에서 매우 저조한 초기 성장 특성을 보였다. 또한, 30°C와 37°C는 25°C보다 약간 낮은 경향성을 보였지만, 초기 성장력이 표준 균주에 비교하여 낮았다. 그러나 최종 24시간에서 성장력은 표준균주에 유사한 정도로 모두 나타났다. 따라서 DB3 균주는 초기 낮은 성장력을 보이지만, 배양 중반 이후에 성장력이 점차 개선되는 것으로 추정되며, 30°C에서 가장 우수한 것으로 평가되었다.

30°C에서 배양 시간에 따른 성장력을 분석해 본 결과, DB3 균주는 성장력이 표준균주에 비교하여 지연되는 양상을 보였으며, 18시간에 정지기에 접어드는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 표준균주는 배양시간 12시간째에 정지기

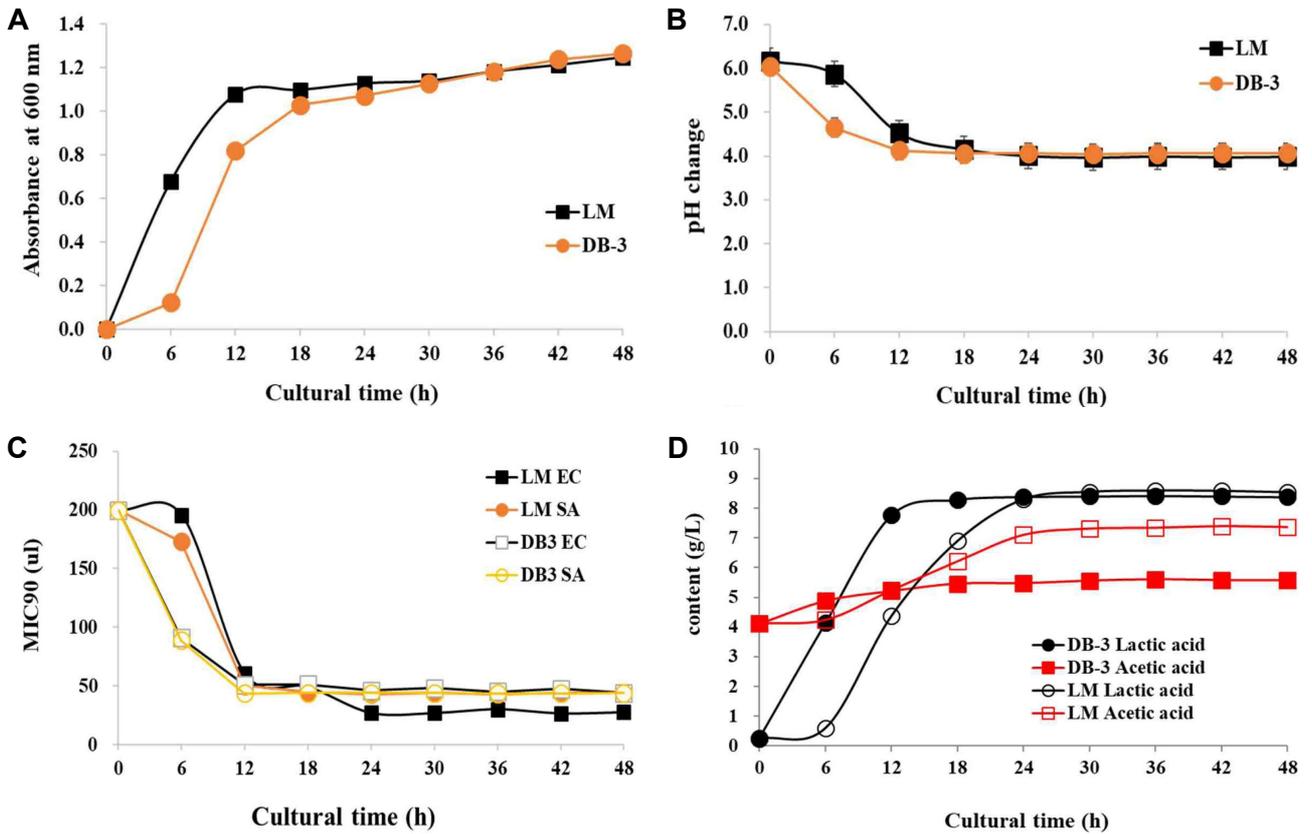


Fig. 4. Evaluation of bioactive properties depending on growth curve. (A) growth curve, (B) pH change, (C) antibacterial assay and (D) assays of short organic acid. The bacterial strains were incubated for the indicated times at 30°C. The harvested samples at the indicated time were evaluated for absorbance, pH, antibacterial, and short organic acid. LM; *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3505, DB; *Leuconostoc mesenteroides* DB3. LM EC; the supernatant of *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3505 against *E. coli* (ATCC 10536), LM SA; the supernatant of *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3505 against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), DB3 EC; the supernatant of *Leuconostoc mesenteroides* DB3 against *E. coli* (ATCC 10536), DB3 SA; the supernatant of *Leuconostoc mesenteroides* DB3 against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

에 도달되는 것으로 관찰되어 DB3 균주와 비교하여 매우 빠른 시간에 정지기에 도달되는 것으로 관찰되었다. 배양 시간에 따른 pH 변화는 DB3 균주의 pH가 표준 균주에 비교하여 더 빠르게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 4B). 따라서 DB3 균주의 pH의 빠른 감소와 성장력 지연은 연관성이 있는 것으로 추정된다.

DB3 균주의 항균활성은 초기에 표준 균주보다 우수하였지만, 정지기 이후에는 유사한 것으로 나타났다(Fig. 4C). 다른 한편으로 DB3 균주의 유기산 중 유산은 초기에 표준균주보다 빠른 속도로 상승되는 경향성을 보였다(Fig. 4D). 초산은 초기에 4 g/l에서 시작되었으며, 이것은 MRS 배지에 포함되어 있는 sodium acetate trihydrate에 기인되는 것으로 판단된다. DB3 균주는 초산 함량이 소량 상승된 후 지속적으로 유지되는 것으로 나타난 반면에, 표준균주는 DB3 균주에 비교하여 보다 높게 상승되는 것으로 나타났다. 본 결과로 볼 때 DB3 균주의 유산 생성 변화는 pH 변화 및 항균력 변화와 동반되는 것으로 판단

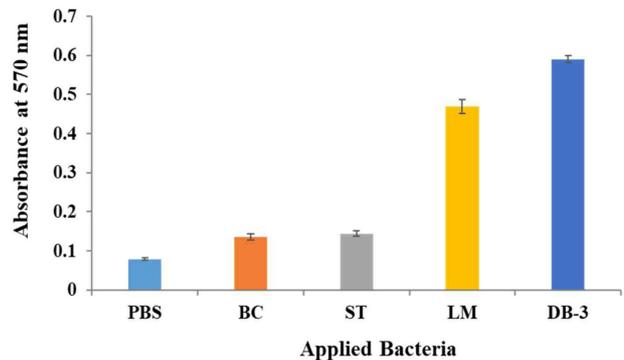


Fig. 5. Adhesion on mucin. Mucin was treated by 1 mg/ml, and each strain was applied by 10^7 CFU/ml. Adhesion was colored with crystal violet and evaluated by elution with acetic acid. PBS; PBS buffer, pH 7.4, BC; *Bacillus cereus* (ATCC 11778), ST; *Salmonella Typhimurium* (KCTC 12401), LM; *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3505, DB; *Leuconostoc mesenteroides* DB3.

되며, 최종적으로 본 균주의 초기 성장 지연과 연계되는 것으로 추정된다.

Parona leatherjacket (*Parona signata*)로부터 분리된 *L. mesenteroides* ssp. *Jonggajibkimchii*는 성장최적온도가 30~32°C, pH3.5~6.0 정도의 범주에서 나타났다[20]. 이와 같은 결과는 본 연구에서 나타난 *L. mesenteroides* DB3와 유사한 양상인 것으로 관찰되었다. 그러나, *L. mesenteroides* ssp. *Jonggajibkimchii* 최적성장온도에서 정지기에 도달되는 시간이 48시간 정도 소요되었기 때문에 본 연구에서 나타난 *L. mesenteroides* DB3에 비교하여 매우 성장력이 낮은 것으로 추정된다. 또한, *Agave salmiana*에서 분리된 *L. mesenteroides*는 *L. plantarum* 299v와 유사한 정도로 일부 병원성 세균에 대한 항균활성이 존재하는 것으로 관찰되었다[8]. 본 연구에서 *L. mesenteroides* DB3는 대수증식기 말부터 정지기까지 높은 활성의 항균활성이 관찰되었기 때문에 항균활성에 연관된 물질을 생산할 수 있는 것으로 추정되었다.

뮤이신 단백질 부착 능력 및 계면활성 능력 평가

뮤이신 부착능 평가 결과, DB3 균주는 비교 균주로 사용된 *S. Typhimurium*과 *B. cereus* 보다 약 4배 이상 부착능이 높았으며, 표준 균주 *L. mesenteroides* KCTC 3505와 비교하여 약 1.25배 부착능이 우수한 것으로 나타났다. 뮤이신 부착력은 장내에서 미생물의 거동에 있어서 중요한 지표가 된다. 부착력이 높을수록 장내에 지속 시간이 장기간 유지되어 프로바이오틱스로써의 기능성을 증가시킬 수 있는 가능성이 높다. *Agave salmiana*에서 분리된 *L.*

*mesenteroides*는 *L. plantarum* 299v와 유사한 mucin 결합능력을 나타내는 것으로 관찰되었다[8]. 따라서 본 연구에서도 나타난 바와 같이 *L. mesenteroides* DB3는 기본적으로 장내 정착성이 유지되는 것으로 관찰되어 프로바이오틱스로써 가능성이 충분히 있는 것으로 추정되었다.

파라필름을 이용한 바이오 계면활성능력의 평가 결과, *L. mesenteroides* KCTC3505와 DB-3는 유사한 범위의 활성을 보였다(Fig. 6A). Tween X-100과 SDS에 의한 결과에서 보여지는 바와 같이 HLB 값이 높은 계면활성제인 tween X-100이 파라필름에서 값이 높은 특성이 나타나는 것으로 보아 파라필름에서 보여지는 유효력은 보다 친수성이 강한 바이오계면활성제가 생성되는 것을 나타내었다. 이와 같은 특성은 *Bacillus licheniformis*의 경우에 파라필름 위에서 tween X-100과 유사한 바이오 계면활성제의 값이 나타나는 현상을 관찰할 수 있었다(data not shown).

다른 한편으로, 등유에 대한 유효력을 평가해 본 결과, 1.0% sodium dodesyl sulfate (SDS)에 유사한 정도로 두 균주는 우수한 것으로 평가되었고, 특히, DB-3가 *L. mesenteroides* KCTC3505에 비교하여 약간 낮은 것으로 나타났다(Fig. 6B). SDS는 HLB 값이 낮은 계면활성제이며, 이와 유사한 값을 나타내는 것은 본 *Leuconostoc* 균주들이 나타내는 계면활성제는 소수성이 높을 것으로 추정된다. *L. mesenteroides*는 바이오계면활성제를 생산하여 병원성 미생물에 대항한다[1]. 따라서, 본 결과에 따라 *L. mesenteroides* DB3의 항균활성의 일부는 바이오 계면활성제와 연관성이 있을 것으로 추정된다.

종합하면, 본 연구에서는 동백꽃에 *Leuconostoc* 속 유산

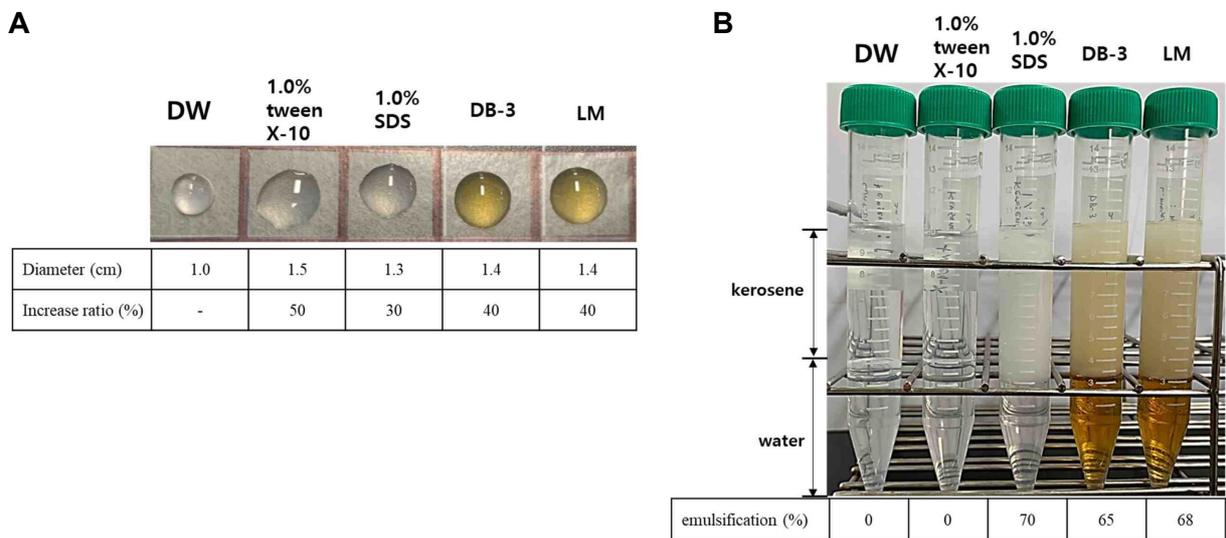


Fig. 6. Results of parafilm drop-collapse (A) and kerosene emulsification (B). The cultural broths were separated with bacterial cells, and then filtered with 0.2 mm syringe filter. Parafilm drop-collapse was evaluated by each 20 ml solution. Kerosene emulsification was done by 6 ml kerosene and 4 ml each solution. DW; distilled water, LM; *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3505, DB; *Leuconostoc mesenteroides* DB3.

균이 서식하는 것을 확인하였으며, 이들 중에서 항균활성이 강한 DB3 균주를 선발하여 *L. mesenteroides* DB3로 동정하였다. DB3 균주는 *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus*, *C. albicans* 등에 대한 항균활성을 보일 뿐만 아니라 내산성(pH 2.5)와 내담즙산(1.2% oxgall)을 갖고 있는 것으로 확인되었다. 또한 류이신에 대한 강한 부착력을 보였다. 따라서 본 연구에서 발굴된 *L. mesenteroides* DB3 균주는 향후 식물 유래 프로바이오틱스 적용을 위해 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 정부(환경부)의 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행하였습니다(NIBR202304106).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Ahmaed, A. S. and Awad, A. I. 2019. Antimicrobial activity of *Leuconostoc mesenteroides* biofilm against different microorganisms. *J. Biotech. Res. Center* **13**, 63-67.
- Bae, S., Fleet, G. and Heard, G. 2006. Lactic acid bacteria associated with winegrapes from several Australian vineyards. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 712-727.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J. and Bakker, P. A. H. M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* **17**, 478-486.
- Chen, Y. S., Wu, H. C. and Yanagida, F. 2010. Isolation and characteristics of lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan. *Braz. J. Microbiol.* **41**, 916-921.
- Chambel, L., Chelo, I. M., Zé, L., Pedro, L. G., Santos, M. A. and Tenreiro, R. 2006. *Leuconostoc pseudoficulneum* sp. nov., isolated from a ripe fig. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1375-1381.
- Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G. 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 224-229.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. and Gobbetti, M. 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* **33**, 1-10.
- Diana, C. R., Humberto H. S. and Jorge, Y. F. 2015. Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics Antimicro. Prot.* **7**, 107-117.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Sakamoto, M., Kitahara, M. and Dicks L. M. T. 2010. *Lactobacillus florum* sp. nov., a fructophilic species isolated from flowers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2478-2482.
- George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F. J., Revol-Junelles A-M., Barges, F. and Foligne, B. 2018. Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. *Front. Microbiol.* **9**, 2899.
- Gu, M., Nguyen, H. T., Cho, J. H., Suh, J. W. and Cheng, J. 2023. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* MJM60376 as an oral probiotic and its antibiofilm activity. *Mol. Oral. Microbiol.* **38**, 145-157.
- Jain, D., Collins-Thompson, D., Lee, H. and Trevors, J.T. 1991. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **13**, 271-279.
- Ji, K., Jang, N. Y. and Kim, Y. T. 2015. Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1568-1577.
- Kang, M. R., Kim, D. R., Kim, T. W., Park, S. H., Kim, H. J., Jang, J. Y. and Han, E. S. 2012. Selection of probiotic bacteria from yulmoo kimchi using a stimulated human intestinal model system. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nut.* **41**, 396-401.
- Kawasaki, S., Kurosawa, K., Miyazaki, M., Sakamoto, M., Ohkuma, M. and Niimura, Y. 2011. *Lactobacillus ozensis* sp. nov., isolated from mountain flowers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 2435-2438.
- Kawasaki, S., Kurosawa, K., Miyazaki, M., Yagi, C., Kitajima, Y., Tanaka, S., Irisawa, T., Okada, S., Sakamoto, M., Ohkuma, M. and Niimura, Y. 2011. *Lactobacillus floricola* sp. nov., lactic acid bacteria isolated from mountain flowers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 1356-1359.
- Lee, S. H. and Chang, H. C. 2016. Isolation of antifungal activity of *Leuconostoc mesenteroides* TA from kimchi and characterization of its antifungal compounds. *Food Sci. Biotechnol.* **25**, 213-219.
- Leveau, J. H. J. 2007. Microbial communities in the phyllosphere. In Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle: Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 334-367.
- Luan, C., Yan, J., Jiang N., Zhang, C., Geng, X., Li, Z. and Li, C. 2022. *Leuconostoc mesenteroides* LVBH107 antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* and anti-inflammatory activity against *P. gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Nutrients* **14**, 2584.
- Mohd Yusof, H., Mohamad, R., Zaidan, U. H. and Rahman, N. A. 2020. Sustainable microbial cell nanofactory for zinc oxide nanoparticles production by zinc-tolerant probiotic *Lactobacillus plantarum* strain TA4. *Microb. Cell Fact.* **19**, 10.
- Nyanga, L. K., Nout, M. J., Gadaga, T. H., Theelen, B., Boekhout, T. and Zwietering, M. H. 2007. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 159-166.
- Parada, R. B., Sosa F. M., Marguet E. R. and Vallejo, M. 2022. Isolation of a *Leuconostoc mesenteroides* ssp. jong-

- gajibkimchii strain from Parona leatherjacket (*Parona signata*): behavior in vegetal matrices fermentation. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* **75**, 9867-9876.
23. Radziwill-Bienkowska, J. M., Le, D. T., Szczesny, P., Duviau, M. P., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Loubière, P., Mercier-Bonin, M., Bardowski, J. K. and Kowalczyk, M. 2016. Adhesion of the genome-sequenced *Lactococcus lactis* subsp. cremoris IBB477 strain is mediated by specific molecular determinants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 9605-9617.
 24. Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J. J., Suslow, T. V., Coaker, G. L. and Leveau, J. H. J. 2012. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *ISME J.* **6**, 1812-1822.
 25. Remus-Emsermann, M. N. P., Lücker, S., Müller, D. B., Potthoff, E., Daims, H. and Vorholt, J. A. 2014. Spatial distribution analyses of natural phyllosphere-colonizing bacteria on *Arabidopsis thaliana* revealed by fluorescence in situ hybridization. *Environ. Microbiol.* **16**, 2329-2340.
 26. Ruiz Rodriguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M. and Mozzi, F. 2019. Diversity and functional properties of Lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. *Front. Microbiol.* **10**, 1091.
 27. Tamang, J. P., Watanabe, K. and Holzapfel, W. H. 2016. Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front. Microbiol.* **7**, 377.
 28. Williams, T. R., Moyne, A. L., Harris, L. J. and Marco, M. L. 2013. Season, irrigation, leaf age, and *Escherichia coli* inoculation influence the bacterial diversity in the lettuce phyllosphere. *PLoS One* **8**, e68642.
 29. Yanagida, F., Sriornual, S. and Chen, Y. S. 2008. Isolation and characteristics of lactic acid bacteria from kosho vineyards in Japan. *Let. Appl. Microbiol.* **47**, 134-139.
 30. Yu, A. O., Leveau, J. H. J. and Marco, M. L. 2020. Abundance, diversity and plant-specific adaptations of plant-associated lactic acid bacteria. *Environ. Microbiol. Rep.* **12**, 16-29.

초록 : 동백꽃으로부터 분리한 *Leuconostoc mesenteroides* DB3의 특성

김삼웅¹ · 신다혜¹ · 갈상완^{1,2} · 방규호² · 김다솜³ · 지원재^{3*}

(¹경상국립대학교 유전자분석센터, ²경상국립대학교 제약공학과, ³국립생물자원관 생물종다양성연구과)

동백꽃으로부터 분리된 24 *Leuconostoc* spp. 균주들에 대한 항균활성 분석 결과, *Leuconostoc mesenteroides* DB3가 *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* 등에 대해 우수한 것으로 나타났다. 내산성 분석결과 pH 2.5까지는 내성이 존재하고, pH 2.0에서는 내성이 존재하지 않았지만, 비교적 우수한 내산성이 존재했다. 담즙산에 대해서는 시험 구간내에서는 모두 안정한 것으로 관찰되었다. *L. mesenteroides* DB3는 표준균주인 *L. mesenteroides* KCTC3505에 비교하여 성장력이 낮은 것으로 나타났고, 생육적온은 30°C로 관찰되었다. 30°C에서 성장곡선의 관찰결과, *L. mesenteroides* DB-3는 *L. mesenteroides* KCTC3505에 비교하여 성장이 지연되었고, 18시간 이후에 정지기에 도달되었다. pH 변화는 성장곡선에 연동하여 변화되었지만, pH 3.98 이상에서 유지되었다. *L. mesenteroides* DB-3는 *L. mesenteroides* KCTC3505에 비교하여 초기 항균활성이 높았지만, 대수증식기 후반부 이후에는 유사한 것으로 나타났다. 유산 함량은 성장 곡선에 연동되어 나타났으며, 초기에는 *L. mesenteroides* DB-3가 낮게 생성되었지만, 대수증식기 후반부 이후에는 유사하였다. 뮤이신 부착력은 *L. mesenteroides* DB-3가 *L. mesenteroides* KCTC3505보다 우수한 것으로 평가되었다. 등유에 대한 유화 능력은 *L. mesenteroides* KCTC3505와 DB-3 모두 우수한 것으로 나타났으며, 소수성이 강한 바이오계면활성제인 것으로 추정된다. 이상의 결과로 볼 때, 본 연구에 사용된 *Leuconostoc mesenteroides* DB3는 우수한 항균력, 내산성, 내담즙성 및 뮤이신 부착력에 기인하여 프로바이오틱스로써 활용 가능성이 높은 것으로 평가된다.