

## 고지방식을 섭취한 C57BL/6J 마우스에서 혼합유산균(*Lactobacillus casei* WK3, *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, *Lactobacillus plantarum* K-1)의 콜레스테롤 및 내장지방 저하 효과

박호은<sup>1</sup> · 도경호<sup>1</sup> · 정진웅<sup>2</sup> · 정용현<sup>2</sup> · 이완규<sup>1</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 수의과대학  
<sup>2</sup>(주)바이오리듬

### Cholesterol and Visceral Fat Lowering Effects of Combined Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus casei* WK3, *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, and *Lactobacillus plantarum* K-1) in High Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice

Ho-Eun Park<sup>1</sup>, Kyung-Hyo Do<sup>1</sup>, Jin-Woong Jeong<sup>2</sup>, Yong-Hyun Jung<sup>2</sup>, and Wan-Kyu Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University  
<sup>2</sup>Biorhythm Co., Ltd.

**ABSTRACT** We investigated the serum cholesterol and visceral fat lowering effects of combined lactic acid bacteria (*Lactobacillus casei* WK3, *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, and *Lactobacillus plantarum* K-1) in high fat diet-fed mice. To investigate the hypocholesterolemic effects of lactic acid bacteria (LAB), six-week old male C57BL/6J high fat-diet fed mice were orally administered WK3 ( $2.0 \times 10^9$  CFU/mouse) alone or mixed with WK5, WK9 and K-1 (Combined LAB,  $5.0 \times 10^8$  CFU/mouse) for 6 weeks. The normal diet control group and high fat-cholesterol diet control group (HFC) were given PBS instead of LAB. After 6 weeks, pathological and biochemical blood analyses were conducted. Upon blood lipid analysis, the levels of total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol were significantly decreased in mice in the Combined LAB group ( $135.2 \pm 19.18$  and  $50.3 \pm 0.97$  mg/dL, respectively) compared to the HFC group ( $154.3 \pm 15.60$  and  $64.1 \pm 0.73$  mg/dL, respectively). However, treatments had no effects on the serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels. In H&E stained liver sections, HFC mice showed accumulation of lipid droplets, but they were rare in livers of Combined LAB fed mice. The increased epididymal adipose tissue of high fat diet-fed mice was significantly reduced by Combined LAB supplementation. These results suggested that administration of Combined LAB had serum cholesterol and visceral fat lowering effects and could be useful probiotics for cholesterol and visceral fat lowering products.

**Key words:** cholesterol, hypercholesterolemia, visceral fat, *Lactobacillus casei* WK3, *Lactobacillus plantarum* K-1

## 서 론

혈중 콜레스테롤이나 내장지방의 증가는 동맥경화나 심장병을 포함한 심혈관계 질환을 일으키는 중요한 위험인자로 잘 알려져 있으며, WHO는 향후 2030년까지 전 세계에서 약 2,360만 명이 고콜레스테롤혈증으로 인한 심혈관계 질환으로 사망하게 될 것이라고 예측하였다(1). 우리나라의 경우 2009년부터 2015년까지 실시된 국민건강영양조사 결과에 따르면 30세 이상 성인의 고콜레스테롤혈증 유병률은 약 19.5%로 밝혀졌으며, 향후 인구 고령화와 비만환자 증가

로 인해 고콜레스테롤혈증 유병자 수는 지속해서 증가할 것으로 예측하고 있다(2). 이에 콜레스테롤의 합성을 억제하거나 중성지방의 농도를 낮추기 위한 기능성 식품 개발을 위한 많은 연구들이 진행되고 있다.

일반적으로 과다한 콜레스테롤 및 지방산의 섭취, 과식, 음주 등과 같은 식이요인이 고콜레스테롤혈증으로 인한 심혈관계 질환을 일으키는 요인으로 알려져 있다(3). 혈중 총콜레스테롤 수치와 LDL-콜레스테롤 수치는 심혈관계 질환과 밀접한 관계가 있으며, LDL-콜레스테롤이 혈중 콜레스테롤을 증가시킴으로써 동맥경화를 유발하는 것으로 알려져 있다(4,5). 따라서 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 고콜레스테롤혈증을 낮추기 위한 많은 연구가 다각적으로 이루어지고 있다. 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추기 위해서는 식이요법, 규칙적인 운동 및 약물치료가 권장되고 있다(6). 약물치료를 통한 콜레스테롤 저하 효과는 뛰어나지만 치료제는

Received 20 September 2018; Accepted 22 October 2018

Corresponding author: Wan-Kyu Lee, Laboratory of Veterinary Bacteriology, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea  
E-mail: wklee@cnu.ac.kr, Phone: +82-43-261-2960

고가에 판매되고 있을 뿐만 아니라 심각한 부작용 등이 문제점으로 알려져 있다(7). 따라서 최근에는 약물치료를 대체할 새로운 방법으로 콜레스테롤 저하 효과를 갖는 건강식품인 생균제(probiotics)에 대한 연구가 각광을 받게 되었다.

Probiotics는 1998년 Fuller에 의해 “장내미생물총의 균형을 개선함으로써 숙주동물에게 유익하게 작용하는 살아 있는 미생물 첨가물”로 정의되고 있으며(8), 현재 probiotics로 많이 사용되고 있는 유산균(lactic acid bacteria)은 체내에서 장내 세균총의 균형을 안정화시키고(9), 장내 병원성 세균의 발육을 억제시키며(10), 면역력이 저하된 숙주의 면역시스템을 개선시키는(11,12) 등 사람이나 동물에게 많은 유익한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(13). 또한 최근 진행된 연구에서는 probiotics의 투여가 비만이 유도된 마우스의 혈장 콜레스테롤 수치를 감소시킴으로써 유산균의 고콜레스테롤혈증에 대한 예방 효과를 보고하고 있다(1). 현재까지 유산균의 콜레스테롤 저하 효과에 관한 명확한 작용 기전은 밝혀지지 않았지만, 몇 가지 제안되고 있는 기전으로는 유산균의 높은 bile salt hydrolase(BSH) 활성이 혈청 내에 콜레스테롤 수치를 감소시키는 것이며(14), BSH의 활성이 담즙 내성에 중요한 요인이 될 것이라고 발표하였다. 또한 Gilliland 등(15)은 유산균이 담즙산을 탈포합시켜(deconjugation) 콜레스테롤과 담즙산을 침전시킴으로써 혈장 내 콜레스테롤을 감소시킨다는 연구 결과를 보고한 바 있다.

본 연구에서는 *Lactobacillus(L.) casei* WK3, *Enterococcus(E.) faecium* WK5, *Bifidobacterium(B.) longum* WK9, *Lactobacillus(L.) plantarum* K-1의 4균주를 대상으로 BSH 활성과 콜레스테롤 저하능력을 예비 실험한 결과 가장 활성이 우수한 WK3 균주를 단독유산균군으로 설정하였다. 또한 4균주 모두를 혼합한 균을 혼합유산균군으로 구성하여 6주간 투여한 후 비만이 유도된 C57BL/6J 마우스에서 혈장 내 콜레스테롤 및 내장지방의 저하 효과를 확인함을 실험의 목적으로 하였다

## 재료 및 방법

### 생균제의 배양 및 제조

본 실험에서는 건강한 사람의 장관에서 분리한 유산균 3균주 *L. casei* WK3, *E. faecium* WK5, *B. longum* WK9와 (주)바이오리듬(Cheongju, Korea)에서 생균제로 시판하고 있는 김치유래의 유산균 1균주 *L. plantarum* K-1균주를 생균제로 사용하였다. 동물실험을 위해 WK3, WK5, K-1 균주는 De Man, Rogosa and Sharpe(MRS) broth(BD, Sparks, MD, USA), WK9 균주는 BL broth(MB Cell, Seoul, Korea)를 사용하여 Steel wool method(16)로 37°C에서 혐기배양 하였다. 배양액은 4°C에서 12,000 rpm으로 원심 분리 하여 상층액은 버리고 균체만을 멸균된 phosphate buffered saline(PBS; pH 7.2)으로 세척하였다. MRS 및 BL 평판배지를 이용하여 균수를 측정 후 유산균 단독투여

군에 사용할 WK3 균주는  $2.0 \times 10^9$  CFU/mouse, 혼합투여군에 사용할 WK3, WK5, WK9, K-1 균주는  $5.0 \times 10^8$  CFU/mouse로 각각 멸균 PBS로 희석하여 실험에 사용하였다.

### 실험동물과 사육환경

사용한 실험동물로는 생후 5주령의 male C57BL/6J(중앙실험동물, Seoul, Korea)를 1주간 순화기간을 거쳐 사용하였으며, 온도  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 10\%$ , 12시간의 명암의 조건 등은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 일반적인 사육조건에 따라서 사육하였다. 또한 모든 동물실험은 충북대학교 실험동물 윤리위원회로부터 승인을 받아 진행하였다(승인번호: CBNVA-840-15-01). 동물실험의 음성대조군에는 기본식이(No. EEGJ36060, Furina Inc., Seongnam, Korea)만을 급여하였으며, 양성대조군과 처치군에는 기본 식이에 lard(20%), 콜레스테롤(1.97%)을 첨가한 고지방식이(No. D12451, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA)를 6주간 급여하면서 고콜레스테롤혈증과 비만을 유도하였다.

### 실험군의 구성

실험군의 구성은 대조군인 normal diet control(NC)군, high fat diet-fed control(HFC)군, 그리고 처치군인 유산균 단독투여군(WK3), 유산균 혼합투여군(Combined LAB)의 총 4군으로 구성하였다. NC군과 HFC군은 멸균 PBS 0.2 mL를 경구투여 하였으며, 단독투여군은 WK3 균주를  $2.0 \times 10^9$  colony forming units(CFU)/mouse, 혼합투여군은 한 마리당 WK3, WK5, WK9, K-1 균주를 각각  $5.0 \times 10^8$  CFU/mouse로 혼합한 0.2 mL를 6주간 경구투여 하였다.

### 혈액화학 분석 및 동맥경화지수 분석

실험기간인 6주간의 투여를 종료한 후 diethyl ether로 마취하고 개복을 실시하였으며, 마우스의 복대정맥에서 혈액을 채취하였다. 원심분리 후 얻어진 혈청에서 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), total cholesterol(T-CHO), high density lipoprotein cholesterol(HDL-C), low density lipoprotein cholesterol(LDL-C) 및 triglyceride(TG)를 측정하였다. LDL-C 함량은 Friedwald식인  $[T-CHO - (HDL-C - TG/5)]$ 에 따라서 계산하였으며(17), Non-HDL-C 함량은  $(T-CHO - HDL-C)$ 에 따라서 계산하였다(18). 또한 임상진단에서 순환계와 관련된 진단 지수인 동맥경화지수(atherogenic index, A.I.)를 아래와 같이 산출하였다(19).

$$A.I. = \frac{\text{Total cholesterol} - \text{HDL-cholesterol}}{\text{HDL-cholesterol}}$$

### 사료효율 및 장기중량 측정

실험군 간의 사료효율(feeding efficiency ratio: FER)은 6주간의 체중 증가량(weight gain)을 사료섭취량(food in-

take)으로 나누어 계산하였다. 혈액채취 후 부검을 실시하여 병리학적 관찰을 실시하였으며, 간장과 부고환 지방조직을 적출하여 중량을 측정하였다. 장기중량은 개체 체중에 따른 절대적인 편차를 방지하기 위하여 동물의 개체 체중에서 차지하는 상대적인 장기 무게(relative organ weight)를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

### 조직의 형태학적 분석

마우스에서 적출한 간과 부고환 지방조직을 10% neutral buffered formalin 용액에 1일 이상 고정시킨 후 파라핀으로 포매(embedding)하고 microtome으로 파라핀 블록을 4 µm 두께로 박절하였다. Xylene을 이용하여 파라핀을 제거시킨 후 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화시켜 hematoxylin-eosin(H&E) 염색 후 400배의 배율에서 광학 현미경으로 관찰하였다. 또한 부고환 지방조직은 지방세포 크기를 측정하기 위하여 ImageJ 1.50i software(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 실험군별 평균 지방구 크기를 산출하였다.

### 통계처리

실험에서 얻어진 결과는 SPSS 12.0(Statistical Package for Social Science, Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계 분석하였다. 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 한 후  $P < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 상호 검정하였다.

## 결 과

### 체중 및 사료효율

실험군의 6주간 체중측정 결과는 Table 1에 나타내었다. 고지방사료만을 섭취한 HFC군은 1주째부터 6주째까지 NC군에 비해 유의적인 체중 증가 결과를 나타내어 성공적으로 비만이 유도되었음을 확인할 수 있었다. WK3군과 Combined LAB군도 2주째부터 6주째까지 NC군에 비해 유의적인 체중 증가를 보였으며, HFC군에 비해서는 대부분 체중 감소 결과를 나타내었으나 유의적인 차이는 확인할 수 없었다. 본 실험에서 HFC군은 6주간  $5.3 \pm 0.74$  g의 체중 증가와  $0.3 \pm 0.04$ 의 사료효율을 나타내었다. WK3군은  $0.2 \pm 0.05$  사료효율로서 HFC군에 비해 감소하였지만 유의적인 감소

**Table 1.** Effect of lactic acid bacteria on the body weight of high fat diet-fed C57BL/6J mice

Weeks	Groups <sup>1)</sup>			
	NC	HFC	WK3	Combined LAB
0	20.7±0.78 <sup>a2)</sup>	20.8±0.67 <sup>a</sup>	20.9±0.67 <sup>a</sup>	20.4±0.14 <sup>a</sup>
1	20.7±0.84 <sup>a</sup>	21.9±0.66 <sup>b</sup>	21.4±0.45 <sup>ab</sup>	21.3±0.47 <sup>ab</sup>
2	20.8±1.03 <sup>a</sup>	22.5±0.72 <sup>b</sup>	21.9±0.17 <sup>b</sup>	23.0±0.67 <sup>b</sup>
3	21.5±1.05 <sup>a</sup>	23.7±0.83 <sup>b</sup>	23.0±0.29 <sup>b</sup>	23.6±1.02 <sup>b</sup>
4	22.1±1.15 <sup>a</sup>	24.3±1.01 <sup>b</sup>	23.8±0.90 <sup>b</sup>	24.5±1.49 <sup>b</sup>
5	22.4±1.05 <sup>a</sup>	25.7±1.15 <sup>b</sup>	24.8±1.00 <sup>b</sup>	25.9±2.11 <sup>b</sup>
6	22.9±1.00 <sup>a</sup>	26.1±1.23 <sup>b</sup>	25.2±1.03 <sup>b</sup>	25.9±2.10 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>NC, normal diet control group; HFC, high fat diet control group; WK3, *Lactobacillus casei* WK3; Combined LAB, WK3 mixed with *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, and *Lactobacillus plantarum* K-1.

<sup>2)</sup>Different letters (a,b) indicate statistical differences as determined by ANOVA ( $P < 0.05$ ).

결과는 확인할 수 없었다(Table 2).

### 혈액화학 분석 및 동맥경화지수 분석

실험군의 혈청 내 AST, ALT, HDL-C, LDL-C, T-CHO, Non-HDL-C, 동맥경화지수 및 TG 측정 결과는 Table 3에 나타내었다. 유산균 투여군의 AST, ALT 측정 결과 HFC군에 비해 유의적인 감소 결과는 확인할 수 없었다. 그러나 T-CHO 측정 결과 Combined LAB군에서  $135.2 \pm 19.18$  mg/dL로서 양성대조군인 HFC군의  $154.3 \pm 15.60$  mg/dL에 비해 유의적인 T-CHO 감소 효과를 확인할 수 있었다. 또한 LDL-C의 경우에도 HFC군의  $64.1 \pm 0.73$  mg/dL에 비해 Combined LAB군에서는  $50.3 \pm 0.9$  mg/dL의 유의적인 감소 결과를 나타내었고, Non-HDL-C 계산 결과에서도 Combined LAB군이 HFC군보다 유의적으로 감소하는 결과를 확인할 수 있었다. 혼합유산균 투여는 혈청 내 T-CHO 및 LDL-C의 감소 효과가 있는 것으로 확인되었다. 혈액 중 지질성분의 분석을 이용하여 동맥경화지수를 산출하여 Table 3에 나타내었다. 체내 고밀도 지단백질에 대한 중성지질의 농도를 대표하는 값으로 사용되는 동맥경화지수는 3.0을 넘을 경우 동맥경화의 위험이 있다고 판단하고 있다(19). 본 실험에서는 고지방식을 급이한 모든 그룹에서 NC군보다 동맥경화지수가 유의적으로 증가하였으며, HFC군보다 Combined LAB군의 동맥경화지수가 유의적으로 낮게 측정되었다.

**Table 2.** Effect of lactic acid bacteria on the feed efficiency ratio of high fat diet-fed C57BL/6J mice

Variable	Groups <sup>1)</sup>			
	NC	HFC	WK3	Combined LAB
Weight gain (g)	1.9±1.18 <sup>a</sup>	5.3±0.74 <sup>b</sup>	4.6±1.21 <sup>b</sup>	4.9±1.15 <sup>b</sup>
Food intake (g)	22.7±2.06 <sup>b</sup>	19.5±1.24 <sup>a</sup>	20.7±2.42 <sup>ab</sup>	19.4±1.29 <sup>a</sup>
Feed efficiency ratio	0.1±0.05 <sup>a</sup>	0.3±0.04 <sup>b</sup>	0.2±0.05 <sup>b</sup>	0.3±0.05 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>NC, normal diet control group; HFC, high fat diet control group; WK3, *Lactobacillus casei* WK3; Combined LAB, WK3 mixed with *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, and *Lactobacillus plantarum* K-1.

<sup>2)</sup>Different letters (a,b) indicate statistical differences as determined by ANOVA ( $P < 0.05$ ).

**Table 3.** Effect of lactic acid bacteria on the biochemical blood index and atherogenic index of high fat diet-fed C57BL/6J mice

Index	Groups <sup>1)</sup>			
	NC	HFC	WK3	Combined LAB
AST <sup>2)</sup> (IU/L)	43.1±11.86 <sup>a4)</sup>	42.8±3.68 <sup>a</sup>	46.0±11.67 <sup>a</sup>	42.7±4.04 <sup>a</sup>
ALT (IU/L)	25.6±2.93 <sup>b</sup>	20.1±2.76 <sup>ab</sup>	21.5±5.75 <sup>ab</sup>	19.2±5.02 <sup>a</sup>
T-CHO (mg/dL)	97.8±15.52 <sup>a</sup>	154.3±15.60 <sup>b</sup>	151.5±25.52 <sup>b</sup>	135.2±19.18 <sup>a</sup>
HDL-C (mg/dL)	60.9±11.45 <sup>a</sup>	83.1±5.96 <sup>b</sup>	82.7±13.21 <sup>b</sup>	78.6±7.66 <sup>b</sup>
LDL-C (mg/dL)	26.2±0.25 <sup>a</sup>	64.1±0.73 <sup>b</sup>	61.0±0.87 <sup>b</sup>	50.3±0.97 <sup>a</sup>
Non-HDL-C (mg/dL)	36.9±3.52 <sup>a</sup>	71.3±3.52 <sup>c</sup>	68.8±4.81 <sup>c</sup>	56.7±7.01 <sup>b</sup>
TG (mg/dL)	53.6±20.38 <sup>b</sup>	36.0±7.33 <sup>ab</sup>	39.3±11.12 <sup>ab</sup>	33.1±11.13 <sup>a</sup>
AI <sup>3)</sup>	0.6±0.06 <sup>a3)</sup>	0.9±0.06 <sup>c</sup>	0.8±0.01 <sup>c</sup>	0.7±0.07 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>NC, normal diet control group; HFC, high fat diet control group; WK3, *Lactobacillus casei* WK3; Combined LAB, WK3 mixed with *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, and *Lactobacillus plantarum* K-1.

<sup>2)</sup>AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; T-CHO, total cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride.

<sup>3)</sup>Atherogenic index = (Total cholesterol - HDL cholesterol) / HDL cholesterol.

<sup>4)</sup>Different letters (a-c) indicate statistical differences as determined by ANOVA ( $P < 0.05$ ).

**Table 4.** Relative organ weight of high fat diet-fed C57BL/6J mice (%)

Groups <sup>1)</sup>	Relative organ weight <sup>2)</sup>	
	Liver	Epididymal fat
NC	3.1±0.12 <sup>a3)</sup>	1.3±0.13 <sup>a</sup>
HFC	3.8±0.41 <sup>b</sup>	2.8±0.65 <sup>b</sup>
WK3	3.5±0.36 <sup>ab</sup>	2.7±0.39 <sup>b</sup>
Combined LAB	3.4±0.23 <sup>ab</sup>	2.6±0.42 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>NC, normal diet control group; HFC, high fat diet control group; WK3, *Lactobacillus casei* WK3; Combined LAB, WK3 mixed with *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, and *Lactobacillus plantarum* K-1.

<sup>2)</sup>Relative organ weight (%) = [Organ weights (g) / Body weight (g)] × 100.

<sup>3)</sup>Different letters (a,b) indicate statistical differences as determined by ANOVA ( $P < 0.05$ ).

### 장기중량 측정

6주간 투여 후 측정된 간장과 부고환 지방조직의 상대적 장기 무게 결과는 Table 4에 나타내었다. 유산균 단독투여군과 혼합투여군의 상대적 간장 무게는 각각 3.5±0.36%

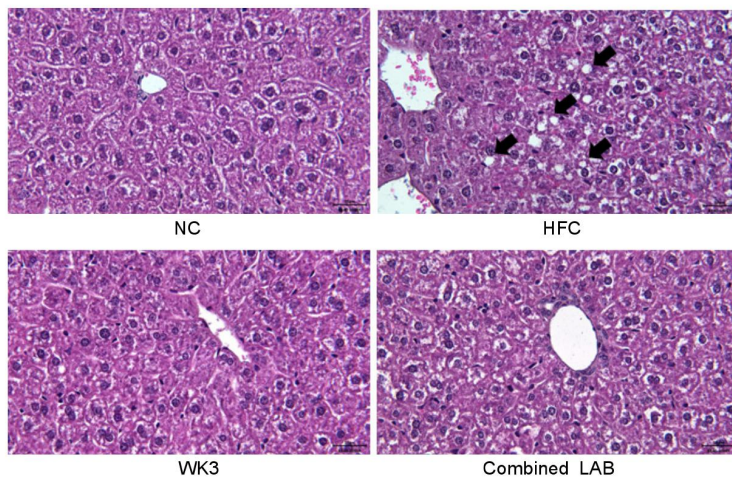
및 3.4±0.23%로 HFC군의 3.8±0.41%보다 감소한 결과가 나타났지만 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 상대적인 부고환 지방조직의 무게 측정 결과에서도 유산균 투여군과 HFC의 통계적 유의성은 확인할 수 없었다.

### 간 조직의 병리조직학적 관찰

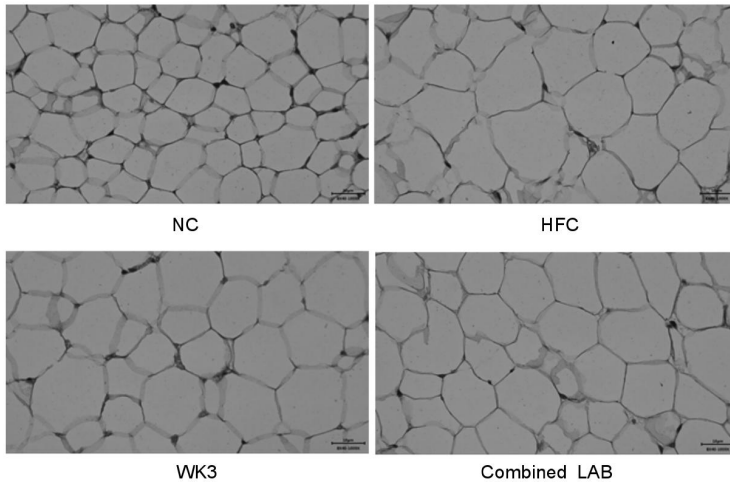
부검 시 채취한 간장 조직을 H&E 염색한 후 400배율에서 관찰한 조직병리학적 관찰 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 고지방사료만을 섭취한 HFC군은 NC군에 비해 세포 크기의 다양성을 동반하는 간세포의 팽윤과 세포질 내의 공포화 (cytoplasmic vacuolation)를 동반하는 지방변성 (fatty degeneration)이 관찰되었다. 그러나 이와 같은 지방성 변성 결과는 WK3군과 Combined LAB군에서 현저히 감소하여 간장 내 지질 축적이 완화되었음을 확인할 수 있었다.

### 부고환 지방조직 크기

부고환 지방조직을 H&E 염색하여 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 2에 나타내었으며, 실험군의 지방세포 크기 측정



**Fig. 1.** Effects of lactic acid bacteria on liver tissue in high fat diet-fed C57BL/6J mice (magnification; 400×). NC, normal diet control group; HFC, high fat diet control group; WK3, *Lactobacillus casei* WK3; Combined LAB, WK3 mixed with *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, and *Lactobacillus plantarum* K-1.



**Fig. 2.** Effects of lactic acid bacteria on size of epididymal white adipose tissue in high fat diet-fed C57BL/6J mice. Section of epididymal adipose tissue stained with hematoxylin and eosin are shown (magnification; 100×). NC, normal diet control group; HFC, high fat diet control group; WK3, *Lactobacillus casei* WK3; Combined LAB, WK3 mixed with *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, and *Lactobacillus plantarum* K-1.

**Table 5.** The size of adipocytes in epididymal adipose tissues of high fat diet-fed C57BL/6J mice ( $\mu\text{M}$ )

Groups <sup>1)</sup>	Size of adipocyte
NC	8.6±2.17 <sup>a2)</sup>
HFC	19.3±2.65 <sup>c</sup>
WK3	15.0±2.36 <sup>b</sup>
Combined LAB	13.8±2.50 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>NC, normal diet control group; HFC, high fat diet control group; WK3, *Lactobacillus casei* WK3; Combined LAB, WK3 mixed with *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, and *Lactobacillus plantarum* K-1.

<sup>2)</sup>Different letters (a-c) indicate statistical differences as determined by ANOVA ( $P < 0.05$ ).

결과는 Table 5에 제시하였다. Fig. 2에서와 같이 HFC군의 지방세포 크기는 NC군에 비교하여 매우 현저한 증가를 보였으며, 이와 같은 지방세포 크기의 증가는 유산균 투여에 의하여 감소하고 있음을 확인할 수 있었다. Image Analysis System을 사용하여 측정된 실험군별 지방세포 크기는 HFC군에서  $19.3 \pm 2.65 \mu\text{M}$ , WK3 및 Combined LAB군에서 각각  $15.0 \pm 2.36 \mu\text{M}$  및  $13.8 \pm 2.50 \mu\text{M}$ 로 측정되었으며, 유산균 단독, 혼합투여군에서 유의적인 지방세포 크기 감소가 나타났다.

## 고 찰

최근 생균제의 유익한 효능에 대한 관심이 증가하면서 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 등과 같은 유산균들이 주로 probiotics용 균주로 많이 사용되고 있으며(20), probiotics가 갖춰야 하는 특성으로 내산성, 내담즙성, 내열성, 장내정착능, 병원성 미생물 억제능 등과 같은 다양한 특성이 요구되고 있다(21). 또한 면역활성능, 항암 효과, 혈중 콜레스테롤 저하능 등과 같은 기능성을 지닌 균주들이 우수한 probiotics로서 많이 이용되고 있다(13). 본 연구에서도 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacte-*

*rium*속 유산균주들이 혈장 내 콜레스테롤 및 내장지방의 저하 효과가 있는지 조사하여 기능성 probiotics로의 이용이 적합한지 확인하였다.

입자 크기가 큰 LDL-C는 동맥 내로 들어가게 되면 외부로 배출되는 것이 어렵기 때문에 혈관내벽에 침착되어 동맥 경화를 유발한다. 반대로 입자 크기가 작은 HDL-C는 동맥 벽을 쉽게 통과하여 외부로 빠져나올 수 있으며 HDL-C가 외부로 빠져나갈 때 헤로운 LDL-C도 같이 배출시킨다. 따라서 혈중 LDL-C 함량이 높고 HDL-C 함량이 낮을수록 고지혈증, 심근경색, 뇌출혈 등과 같은 질환에 걸리기 쉽다(22,23). 본 연구에서는 *L. casei* WK3, *E. faecium* WK5, *B. longum* WK9, *L. plantarum* K-1 4균주를 이용하여 고지방사료 급여로 비만이 유도된 마우스에서의 혈장 내 콜레스테롤의 저하 효과를 먼저 조사하였다. 그 결과 4개의 혼합 유산균을 투여하였을 때 혈중 내 T-CHO 함량, LDL-C 수치 및 Non-HDL-C 수치가 고지방식이만 투여한 대조군(HFC)보다 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이와 유사한 연구 결과로 *L. plantarum* PHO4를 마우스에게 2주 투여하여 혈중 콜레스테롤 수치를 대조군에 비해 7%로 감소시킨 Nguyen 등(24)의 연구와 고지혈증질환을 앓고 있는 환자에게 *L. acidophilus* L1이 포함된 발효유를 섭취하게 하였을 때 혈중 내 총 콜레스테롤을 줄이는 데 효과가 있었다고 발표한 연구 결과가 있다(25). 또한 Abd El-Gawad 등(26)은 *B. longum* Bb-46 균주를 첨가한 milk-yoghurt를 rat에게 35일간 투여한 결과 유산균을 투여한 rat의 콜레스테롤 수치가 50.3%, LDL-C 수치가 56.3%, TG가 51.2%로 대조군에 비해 감소하였다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 나타냈다. 그러나 혈중 HDL-C와 TG 수준은 HFC군과 비교하여 모든 유산균 투여군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 고콜레스테롤 사료를 급여한 돼지에게 *L. acidophilus* LA16으로 제조한 발효유를 급여한 결과, 혈중 내 T-CHO와 LDL-C 수치를 저하시켰으나 혈중 HDL-C 및 TG 함량에는 영향이 나타나지 않는 것으로

나타난 Danielson 등(27)의 연구 결과와 유사하다. Lim 등(28)의 연구 결과에서도 고콜레스테롤 식이를 급여한 rat에 유산균을 6주간 투여한 결과 혈중 내 T-CHO와 LDL-C 함량이 PC군에 비해 감소하였으나, TG 함량에는 영향이 없다고 보고하여 본 연구 결과와 유사함을 알 수 있었다. 또한 본 실험에서 유산균의 혼합투여가 동맥경화지수를 감소시켜 동맥경화에 대한 위험성 또한 감소시켰다. 이와 같은 결과는 *L. plantarum*을 고지방식을 투여한 마우스에게 급여하였을 때 T-CHO, LDL-C 및 동맥경화지수를 개선시켰다는 Wang 등(29)의 연구 보고와 일치하였다. 따라서 4종 혼합유산균의 투여는 혈중 콜레스테롤과 LDL-C 함량을 감소시킴으로써 혈중 콜레스테롤의 개선을 유도하고, 나아가 동맥경화 억제작용에 따른 심혈관계 질환 예방에 도움을 줄 것으로 판단된다.

지방세포의 수와 크기는 어렸을 때 체중의 증가나 비만이 되어 증가하지만 성인이 된 후 형성된 지방세포 수를 줄이는 것은 어려움이 있으며 세포 크기는 조절이 가능하다고 알려져 왔다(30). White adipose tissue에 속하는 부고환 지방조직이 비정상적으로 커지게 되면 심각한 정도의 대사장애를 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 고지방식이의 장기간 섭취는 지방세포의 증대를 유도하기 때문에 부고환 지방조직세포의 크기 측정은 항비만 효능을 입증하는 효과적인 방법으로 잘 알려져 있다(31). 본 연구에서는 NC군(8.6±2.17 μM)에 비해 HFC군(19.3±2.65 μM)의 부고환 지방조직의 세포 크기가 유의적으로 증가함으로써 6주간 고지방사료 투여에 의한 비만이 잘 유도되었음을 확인할 수 있었다. 그리고 유산균 단독투여군(15.0±2.36 μM)과 혼합투여군(13.8±2.50 μM) 모두 HFC군에 비해 지방세포 크기가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 비만이 유도된 C57BL/6J 마우스에게 *L. gasseri* BNR17을 투여하고 부고환 지방세포의 크기를 측정할 결과, PC군에 비해 유의적으로 감소함을 확인함으로써 유산균의 항비만 효과를 보고한 Kang 등(32)의 연구 결과와 *L. plantarum* LG42를 투여한 비만이 유도된 마우스의 부고환 지방조직 크기가 유의적으로 감소한 것이 확인된 Park 등(33)의 연구 결과와 유사한 것으로 확인되었다. 혈중에 존재하는 leptin의 생성은 지방세포 크기에 따라 달라지며(34), 유산균 투여에 의한 혈중 leptin이 감소하여 지방세포 비대화를 억제한다는 연구 결과들이 보고되고 있다(35,36). 본 연구에서도 부고환 지방세포 크기의 유의적 감소 결과는 혼합유산균의 투여에 의한 혈중 leptin이 감소하여 지방세포의 비대화를 억제시킨 것으로 추측되고 있다. 따라서 본 실험 결과 유산균을 단독 또는 혼합투여하였을 경우 고지방 식이에 의한 체지방의 증가를 감소시키고, 비정상적인 지방조직세포의 비대화를 감소시키는 유용한 효과가 있는 것으로 판단되었다.

연구 결과를 종합하면 4종류의 유산균인 *Lactobacillus casei* WK3, *Enterococcus faecium* WK5, *Bifidobacterium longum* WK9, *Lactobacillus plantarum* K-1 균주의 혼합

또는 단독투여는 고지방식을 6주간 급여한 C57BL/6J 마우스의 혈청 내 T-CHO와 LDL-C 함량을 저하시키며, 부고환 지방조직세포의 크기를 감소시킴으로써 지방조직세포의 비대화를 억제시키는 유용한 효과를 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 4종 혼합 유산균은 고지방식으로 인한 지방간 및 내장지방 축적을 개선시켜 고지혈증 질환 예방에 효과적일 것으로 사료된다. 또한 향후 4종류 유산균의 산업화를 위한 추가연구가 진행된다면 사람 및 동물용 생균제로서의 활용 가능성은 매우 높을 것으로 판단되었다.

## 요 약

본 연구에서는 혼합유산균의 기능성 탐색을 위한 연구의 일환으로 고지방식이 유도 마우스에 혼합유산균을 급여시켜 콜레스테롤 및 내장지방 저하 효과를 알아보았다. 실험군은 정상식이를 급여한 정상대조군, 고지방식을 급여한 실험대조군(HFC), *Lactobacillus casei* WK3만 단독으로 투여한 단독유산균군(WK3), 4종 유산균을 급여한 혼합유산균 투여군(Combined LAB)으로 나누어 실험을 진행하였다. HFC군의 최종체중과 식이섭취량은 WK3군과 Combined LAB군보다 높았으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 혈청 내 혈액화학을 분석한 결과 AST, ALT의 유산균 투여로 인한 유의적인 감소는 확인되지 않았으나 혈청 내 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 함량, 동맥경화지수는 HFC군보다 Combined LAB군이 유의적으로 감소하였다. 간장과 부고환 지방조직의 장기 무게를 측정할 결과 WK3군과 Combined LAB군의 간장 무게가 HFC군보다 유의적으로 감소하였다. 또한 간장 조직을 병리학적으로 관찰한 결과 정상적인 간 조직에 비해 HFC군의 간 조직에서 간세포의 팽윤과 지방변성을 관찰할 수 있었다. 하지만 유산균을 투여한 WK3군과 Combined LAB군에서 간세포의 팽윤 및 지방변성이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었다. 부고환 지방조직을 관찰할 결과 HFC에 비해 WK3와 Combined LAB군이 지방세포 크기를 유의적으로 감소시키는 것이 확인되었다. 따라서 4종 혼합 유산균은 고지방식이동물에서 혈중 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 함량을 감소시켜 지질 농도를 개선하는 효과를 보였으며, 또한 부고환 지방조직과 같은 내장지방세포의 비대화를 억제시키는 효과를 갖고 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 4종 혼합유산균이 내장지방의 축적과 지방간을 개선시킬 수 있을 것으로 평가되며, 고지혈증, 동맥경화 등과 같은 심혈관계 질환의 예방과 개선에 효과적일 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 논문은 중소벤처기업부에서 지원하는 2014년도 산학연 협력 기술개발사업(No. C0237480)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

## REFERENCES

- Ooi LG, Liang MT. 2011. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Int J Mol Sci* 11: 2499-2522.
- Jeong JS, Kwon HS. 2017. Prevalence and clinical characteristics of dyslipidemia in Koreans. *Endocrinol Metab* 32: 30-35.
- Glowinska B, Urban M, Koput A. 2002. Cardiovascular risk factors in children with obesity, hypertension and diabetes: lipoprotein(a) levels and body mass index correlate with family history of cardiovascular disease. *Eur J Pediatr* 161: 511-518.
- Hammad S, Pu S, Jones PJ. 2016. Current evidence supporting the link between dietary fatty acids and cardiovascular disease. *Lipids* 51: 501-517.
- Lichtenstein AH. 2014. Dietary trans fatty acids and cardiovascular disease risk: past and present. *Curr Atheroscler Rep* 16: 433.
- Dunn-Emke S, Weidner G, Ornish D. 2001. Benefits of a low-fat plant-based diet. *Obes Res* 9: 731.
- Bliznakov EG. 2002. Lipid-lowering drugs (statins), cholesterol, and coenzyme Q10. The Baycol case—a modern Pandora's box. *Biomed Pharmacother* 56: 56-59.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66: 365-378.
- Lidbeck A, Edlund C, Gustafsson JA, Kager L, Nord CE. 1987. Impact of *Lactobacillus acidophilus* on the normal intestinal microflora after administration of two antimicrobial agents. *Infection* 16: 329-336.
- Collins EB, Aramaki K. 1980. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 63: 353-357.
- Choi HJ, Shin MS, Lee SM, Lee WK. 2012. Immunomodulatory properties of *Enterococcus faecium* JWS 833 isolated from duck intestinal tract and suppression of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiol Immunol* 56: 613-620.
- Park HE, Kang KW, Kim BS, Lee SM, Lee WK. 2017. Immunomodulatory potential of *Weissella cibaria* in aged C57BL/6J mice. *J Microbiol Biotechnol* 27: 2094-2103.
- Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Analysis* 26: 927-939.
- De Smet I, Van Hoorde L, Vande Woestyne M, Christiaens H, Verstraete W. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 79: 292-301.
- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 49: 377-381.
- Mitsuoka T. 1980. *The world of anaerobic bacteria: A color atlas of anaerobic bacteria*. Sobun Press, Tokyo, Japan. p 13-65.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
- van Deventer HE, Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, Dziekonski A, Edwards S, Kimberly MM, Korzun WJ, Leary ET, Nakajima K, Nakamura M, Shamburek RD, Vetrovec GW, Warnick GR, Remaley AT. 2011. Non-HDL cholesterol shows improved accuracy for cardiovascular risk score classification compared to direct or calculated LDL cholesterol in a dyslipidemic population. *Clin Chem* 57: 490-501.
- Rosenfeld L. 1989. Lipoprotein analysis. Early methods in the diagnosis of atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 113: 1101-1110.
- Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. 2013. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 5: 1869-1912.
- Lee YK, Salminen S. 1995. The coming age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 6: 241-245.
- Small DM, Shipley GG. 1974. Physical-chemical basis of lipid deposition in atherosclerosis. *Science* 185: 222-229.
- Levy RI. 1981. Cholesterol, lipoproteins, apoproteins, and heart disease: present status and future prospects. *Clin Chem* 27: 653-662.
- Nguyen TD, Kang JH, Lee MS. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int J Food Microbiol* 113: 358-361.
- Anderson JW, Gilliland SE. 1999. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Nutr* 18: 43-50.
- Abd El-Gawad IA, El-Sayed EM, Hafez SA, El-Zeini HM, Saleh FA. 2005. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing *Bifidobacteria* in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *Int Dairy J* 15: 37-44.
- Danielson AD, Peo ER Jr, Shahani KM, Lewis AJ, Whalen PJ, Amer MA. 1987. Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J Anim Sci* 67: 966-974.
- Lim HJ, Kim SY, Na SH, Huh CS, Lee SM, Lee WK. 2006. The hypocholesterolemic effects of lactic acid bacteria isolated from human intestine and rutin extracted from buckwheat in SD rats fed high cholesterol diet. *Lab Anim Res* 22: 401-407.
- Wang LX, Liu K, Gao DW, Hao JK. 2013. Protective effects of two *Lactobacillus plantarum* strains in hyperlipidemic mice. *World J Gastroenterol* 19: 3150-3156.
- Sisk M, Azain MJ, Hausman DB, Jewell DE. 1998. Effect of conjugated linoleic acid on fat pad weights and cellularity in Sprague Dawley and Zucker rats. *FASEB J* 12: A536.
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121: 2094-2101.
- Kang JH, Yun SI, Park MH, Park JH, Jeong SY, Park HO. 2013. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PLoS One* 8: e54617.
- Park JE, Oh SH, Cha YS. 2014. *Lactobacillus plantarum* LG42 isolated from gajami sik-hae decreases body and fat pad weights in diet-induced obese mice. *J Appl Microbiol* 116: 145-156.
- Guo KY, Halo P, Leibel RL, Zhang Y. 2004. Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocyte size in anatomically distinct fat depots in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R112-119.
- Takemura N, Okubo T, Sonoyama K. 2010. *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Exp Biol Med* 235: 849-856.
- Sato M, Uzu K, Yoshida T, Hamad EM, Kawakami H, Matsuyama H, Abd El-Gawad IA, Imaizumi K. 2008. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr* 99: 1013-1017.