헴철이 풍부한 영양원이 혐기성 세균의 성장과 생존에 미치는 영향: 락토바실러스 가세리 모델연구

이승기, 김 필*
가톨릭대학교 생명공학과

Received: February 22, 2021 / Revised: March 6, 2021 / Accepted: March 15, 2021

Effect of Heme-rich Nutrient on Anaerobic Bacterial Growth and Survival: A Model Study on *Lactobacillus gasseri*

Seungki Lee[#] and Pil Kim^{*}

Department of Biotechnology, The Catholic University of Korea, Bucheon 14662, Republic of Korea

[#]Current address: SL: Dibiome Co., Anyang, Gyeonggi 14102, Korea

Lactic acid bacteria (LAB), belonging to the Firmicutes phylum, lack heme biosynthesis and, thus, are characterized as fermentative and catalase-negative organisms. To verify the hypothesis that heme-rich-nutrients might compensate the heme-biosynthesis incapability of non-respiratory LAB in animal gut, a heme-rich-nutrient was fed to a dog and its fecal microbiome was analyzed. Firmicutes abundance in the feces from the heme-rich-nutrient-fed dog was 99%, compared to 92% in the control dog. To clarify the reason of increased Firmicutes abundance in the feces from the heme-rich-nutrient-fed dog, *Lactobacillus gasseri* were used as model anaerobic LAB to study a purified heme (hemin). The anaerobic growth of *L. gasseri* in the medium with 25 μ M hemin supplementation was faster than that in the medium without hemin, while the growth in the 50 μ M hemin-supplemented medium did not vary. Cellular activities of the cytochrome *bd* complex were 1.55 ± 0.19 , 2.11 ± 0.14 , and 2.20 ± 0.08 U/g_{cell} in the cells from 0, 25, and 50 μ M hemin-supplemented medium, while intracellular ATP concentrations were 7.90 ± 1.12 , 11.95 ± 0.68 , and 12.56 ± 0.58 μ mol_{ATP}/g_{cell}, respectively. The ROS-scavenging activities of the *L. gasseri* cytosol from 25 μ M and 50 μ M hemin-supplemented medium were 68% and 82% greater than those of the cytosol from no hemin supplemented-medium, respectively. These findings indicate that external hemin could compensate the heme-biosynthesis incapability of *L. gasseri* by increasing the cytosolic ROS-scavenging and extra ATP generation, possibly through increasing the electron transfer. Increase in the number of anaerobic bacteria in heme-rich-nutrient-fed animal gut is discussed based on the results.

Keywords: Heme-rich-nutrient, lactic acid bacteria, anaerobic bacteria, gut microbiome, dog

서론

소화기 말단인 대장(large intestine)은 동물 내 관으로써 역할 외에는 크게 주목받지 못하다가 최근 들어서 장에는 많은 수의 뉴런이 존재하고, 95% 이상의 세로토닌을 생성한다는 결과가 알려지면서 제2의 뇌라고 지칭할 정도로 중요성이 심화되어 인식되기 시작했다[1]. 인간 대장의 길이와 표면적은 각각 1.5 m와 300 m²로 알려져 있으며, 인간의 대장

관(track)에 존재하는 전체 미생물 군집(flora)의 수는 약 10¹³⁻¹⁴개 이상 존재한다[2]. 이러한 장내 균총은 차세대 염기서열 분석(NGS, next generation sequencing) 기술이 발전함에 따라서 서식하는 미생물들의 다양성에 대해서 많은 연구가 활발히 진행 중이다[3]. 인간의 장내균총은 후벽균문(Firmicutes), 의간균문(Bacteroidetes), 프로테오박테리아문(Proteobacteria), 방선균문(Actinobacteria) 등의 여러 문(phylum)으로 구성되어 있으며, 그 종(species)은 400여종 이상인 것으로 알려져 있다[4]. 또한 분변 고형물의 약 30% 이상을 차지할 정도로 비율이 높으며 이러한 장내 균총의 활성은 인체의 면역, 약효, 소화대사 등 많은 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다[5]. 이러한 장내 균총의 연구 중에서 후

*Corresponding author

Tel: +82-2-2164-4922; F: +82-2-2164-4865

E-mail: kimp@catholic.ac.kr

벽균(Firmicutes)에 속하는 *Lactobacillus* 종들과 동물과의 상관관계에 대한 연구들이 많이 진행되고 있는데, 대표적으로 외부의 알레르겐과 바이러스로부터 인체를 보호하는 기능이 알려진 *Lactobacillus johnsonii* [6], 제 2형 당뇨병과 연관성이 있다고 알려진 *Lactobacillus acidophilus* [7], 유산균 종들의 지방대사 연관관계에 따른 항 비만 역할[8] 등을 예로 들 수 있다. 이러한 인체 건강의 영향력 때문에 유산균들은 여러 프로바이오틱스 제품들에 포함되어 관련 시장이 확대되고 있는 추세이며, 국내 프로바이오틱스 시장규모는 2019년 기준으로 약 1898억 원 규모인 것으로 알려지고 있다[9].

헴철(heme or haem)은 동물, 식물, 미생물 등 모든 호흡 대사(respiratory metabolism) 생명체에서 발견되는 분자로서, 포르피린(porphyrin)과 철 이온(iron)의 배위결합 구조를 기본으로 하여 다양한 곁사슬(side chain)을 갖는 분자들의 총칭이다. 헴철은 보결분자단(prosthetic group)으로서 단백질과 결합된 여러 종류의 헴단백(hemoprotein = heme-conjugated protein)의 형태로 자연계에 폭 넓게 분포하며, 산소 분자(O_2)의 전달(적혈구 내 헤모글로빈, 근육 내 미오글로빈, 콩과식물의 레그헤모글로빈), 전자의 전달(여러 종류의 시토크롬류, 리덕타제, 옥시게나제 등), 독성 산소의 제거(카탈라제, 페옥시다제 등)와 같은 생명체의 에너지 생산 과정이나 활성산소종(ROS: reactive oxygen species)에 대한 제거에 필수적인 역할을 담당한다. 유산균류와 같이 헴철 생합성 능력이 결실된 혐기성 미생물들은 호흡 대사(respiration)를 수행할 수 없으므로 발효 대사(fermentation)만을 유일한 에너지 생성대사로 이용하게 되며, 또한 호기적 환경에서 자연적으로 발생하는 활성산소종에 대하여 취약한 공통된 특성을 나타낸다. 따라서 생태학적 적소(ecological niche)도 동물의 장관과 같은 혐기적 환경(anaerobic environment)으로 제한되는 특징을 보인다.

본 연구에서는 헴철이 풍부한 영양원을 공급받는 경우에 동물의 분변으로부터 혐기성 미생물 군집의 변화를 확인하고, 단일 성분의 헴철(헤민, hemin: 소 혈액에서 분리한 heme B의 염소 착염분자)을 혐기성 유산균으로서 *Lactobacillus gasseri*에 공급하였을 때의 생장특성과 유산균 세포에서의 에너지와 활성산소 방어능을 조사하여 동물 장관에 분포하는 전체 혐기성 세균들의 변화를 추론하였다.

재료 및 방법

동물식이에 따른 분변채취와 균총분석

헴철 영양원의 식이 실험을 위한 동물로는 동일한 실내생활로 인간과 장내 미생물 군집이 유사할 것으로 추정되는 소형 반려견을 사용하였다. 4세령 소형견 2 기(암컷 푸들, 체

중은 모두 3.5 kg)에 동일한 시중 사료(Ultragrainfree for adult dog, Natural Balance Korea Inc., Korea)를 하루에 체중 1 kg당 25 g씩 공급하면서 4주간 동일한 실내 환경(전라도 광주 소재 실험자 거주 아파트 실내)에서 28일 동안 순화(domestication) 과정을 통해 장내 균총을 동기화(synchronization)하였다. 순화과정동안 동물에게는 정량의 사료와 음용수(자유 급식) 이외에는 추가적인 식이를 공급하지 않았고, 실험자 이외에는 다른 사람과의 접촉을 제한하였다. 29일부터 소형견 2 기는 분리된 별실로 이동하여 시험기간 동안 상호 접촉이 없도록 유지하였다. 거주공간 분리 이후 6일 동안 1 기에게는 1 g의 헴철이 포함된 사료 과립을 매일 1회씩 일반 사료와 함께 공급하였고, 다른 1 기에게는 일반 사료 이외에는 헴철 포함 사료 과립을 공급하지 않았다. 헴철이 포함된 사료 과립(HemoP, Hemolab Co., Korea)을 구입하여 동물의 헴철이 풍부한 식이로 사용하였고, 이 과립의 헴철 함량은 1 g당 16.9 mg(철분함량 1.5 mg/g)이었다.

소형견의 체중은 시험기간 동안 2일마다 1회씩 측정하였고, 특이한 행동이나 건강상의 변화를 실험자가 지속적으로 관찰하였다. 7일차에 동물의 분변시료는 배출 즉시 50 ml 튜브에 넣고 밀봉상태로 -20℃로 동결하였다. 분변시료의 균총 변화는 마이크로비움 분석기관(CheonLab Co., Korea)에서 16S rRNA 유전자의 서열분석을 통해 확인하였다.

모델 유산균과 배양방법

각각 후벽균문(Firmicutes)과 방선균문(Actinobacteria)에 속한 유산균으로써 *Lactobacillus gasseri* KCTC3163와 *Bifidobacterium bifidum* KCTC3418 표준균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 표준균주의 유전체 정보는 미국 국립생명공학정보사이트(www.nlm.ncbi.gov)를 통해 검색하였다.

유산균의 배양에는 복합배지(MRS Broth, KisanBio Co., Seoul, Korea)를 사용하였다. 헴철의 표준으로 사용한 헤민(hemin, Merck Inc., Germany)은 1 M NaOH 용액에 헤민 25 mM가 되도록 용해시킨 표준용액을 제조한 후 실험에 사용하였다. 150 ml-시림바이얼(Bellco Glass Inc., USA)에 MRS 배지와 헤민 표준용액 또는 동일 부피의 1 M NaOH 용액을 100 ml에 맞추어 넣고, 알루미늄 캡을 씌운 고무마개로 밀봉하였다. 주사바늘을 연결한 진공펌프로 40초간 용기 내 헤드스페이스의 공기를 제거한 후 고순도 질소를 30초간 주입하기를 3회 반복하여 용기 내 잔존 산소를 제거한 후 고압멸균기에서 121℃로 15분간 멸균하였다. 활발히 생장중인 유산균 전배양액(seed culture)은 초기 흡광도가 $OD_{600nm} = 0.1$ 이 되도록 10 ml 주사기로 산소의 접촉 없이 멸균된 배지에 접종하였고, 세포 침강을 막기 위해 낮은 진탕속도(100 rpm)의 진탕배양기에서 37℃를 유지하며 배양하였다.

배양액 시료는 일정 시간 간격으로 주사기를 이용하여 1 ml 씩 채취하여 분석에 사용하였다. 세균의 생장은 분광광도계 (BioSpectrometer, Eppendorf Inc., Germany)를 이용하여 흡광도를 측정하였고, $1 \text{ OD}_{600\text{nm}} = 0.265 \text{ g of cell/l}$ 의 세포 농도로 환산하여 계산에 사용하였다.

시토크롬 *bd* 복합체 활성도의 측정

시토크롬 *bd* 복합체의 활성도는 TMPD(N,N,N',N' -tetramethyl-*p*-phenylene diamine 또는 Wuster's blue) 산화법을 사용하였다[10–12]. 이 방법은 TMPD로부터의 전자가 세균 표면의 시토크롬 *bd* 복합체 내부에 결합된 보결분자단 heme B₅₉₅나 heme D로 전달되는 경우 산화된 TMPD가 정량적으로 발색되는 원리를 이용한 것이다. 접종 후 4시간 동안 배양한 유산균의 배양액을 채취한 후 원심분리(4°C, 2600 g, 10분)하여 균체를 분리하고 0.9 % NaCl 용액으로 2회 세척하였다. 획득한 세포 펠렛은 100 μl 의 0.9% NaCl 용액에 분산시킨 후 1.4 ml의 인산완충용액(100 mM, pH 7.0)과 5 μl 의 TMPD 표준 용액(0.54 M TMPD, Merck Inc.)를 혼합하고 상온에서 10분 동안 520 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 산화된 TMPD의 환산계수는 $1 \text{ OD}_{520\text{nm}} = 6.1 / \text{mM} \cdot \text{cm}$ 로 사용하였고, 시토크롬 *bd* 복합체의 활성 1 단위(unit)는 일정 세포량에 의해 1분 동안 산화되는 TMPD의 mmol수($U = \text{mmol of oxidized TMPD formation/min}$)로 정의하여 사용하였다[13].

세포질 ATP 농도의 측정

세포질에 존재하는 ATP 농도는 비드비터(beadbeater Model 607, Biospec Inc., Bartlesville, USA)를 사용하여 물리적으로 세포를 파쇄한 후 용출된 세포질 시료로부터 결정하였다. 배양액 1 ml로부터 원심분리(4°C, 3,000 g, 15분) 후 펠렛을 증류수 800 μl 에 현탁하고 0.2 g의 글래스비드(glass beads 212–300 micron, Merck Inc.)를 첨가했다. 현탁액을 포함한 1.5 ml-튜브는 비드비터를 이용하여 30초 진동(700 W)과 1분 냉각 과정을 총 6회 운전하여 세포를 파쇄시켰다. 파쇄액은 원심분리(4°C, 12,000 g, 5분)로 잔여물을 제거한 이후의 상등액을 채취하여 포함된 ATP 농도를 ATP assay kit (Merck Inc.)의 시료로 사용하였고, 제조자가 공급한 매뉴얼에 따라 발광광도기(Turner BioSystems Luminometer, Thermo Fischer Scientific Inc., USA)를 이용하여 시료의 발광 정도를 측정하였다.

세포질 라디칼 소거능의 측정

세포질의 라디칼 소거능은 세포 파쇄액으로부터 DPPH 라디칼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) 분자가 세포질로부터 전자를 획득하여 중화되면 정량적으로 발색되는 원

리를 사용하였다[14, 15]. 접종 후 2시간과 4시간의 배양액 1 ml의 원심분리(4°C, 3,000 g, 10 min) 후 얻어진 펠렛을 $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ 이 되도록 인산완충용액(100 mM, pH 7)에 현탁한 후 위에 기술한 방법으로 세포를 파쇄시켰다. 원심 분리(4°C, 12,000 g, 5분) 이후 상등액 500 μl 를 채취한 후 동일 부피의 ethyl acetate를 혼합하고 강하게 섞어 주었다. 혼합물을 다시 원심분리(4°C, 12,000 g, 5분)하여 층분리를 유도한 후 ethyl acetate 층만을 분리하여 잔여물을 필터(0.22 μm pore size syringe filter, Merck Inc.)를 이용하여 제거하였다. 필터액에서 20 μl 를 채취하여 280 μl 의 DPPH 표준용액(5 mg DPPH를 100 ml ethanol에 용해)과 혼합시킨 후 96-well 플레이트에 옮기고 상온에서 커버를 씌워 빛을 차단하고 30분 동안 정치하였다. 96-well 플레이트는 다중플레이트 검출기(Multiplate reader, Biorad Inc., USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 라디칼 소거능은 표준 DPPH 용액에서 얻은 표준곡선과 비교하여 다음 공식을 통해 전환하였다.

$$\text{ROS-scavenging activity (\%)} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}} \times 100}$$

결 과

헴철 영양원을 공급받은 동물 분변의 분석

28일의 순화과정 이후 헴철미생물 사균체 과립 총 6 g (16.9 mg_{heme}/g 포함)을 6일동안 공급받은 소형견 1 기와 공급받지 않은 소형견 1기는 모두 시험 기간 6일 동안 특이한 행동, 활동성의 변화나 발진과 같은 이상 징후들이 관찰되지 않았고, 체중의 급격한 변화도 관찰되지 않았다(Fig. 1A). 헴철 영양원 공급개시 후 7일차에 발생한 동물의 분변은 분석 기관에서 16S rRNA 서열분석을 통해 균총변화를 추적하였다(Fig. 1B, Table S1). 헴철미생물 사균체 과립을 공급받지 않은 대조군의 분변에서는 총 172 종(species)이 발견되었으며, 91.9%의 비중으로 후벽균문(Firmicutes)에 속한 세균 109종(species)과, 8.0%의 비중으로 프로테오박테리아문(Proteobacteria)에 속한 세균 34종이 메이저 비중으로 발견되었다. 이 외에도 의간균문 Bacteroidetes 12종, 방선균문(Actinobacteria) 13종, 사카리박테리아문(Saccharibacteria) 1종, 시너지스테츠문(Synergistes) 1종, 베투코마이크로비아문(Verrucomicrobia) 2종, 푸소박테리아문(Fusobacteria) 1종에 속한 종들이 각각 1% 미만의 마이너 비중으로 발견되었다(Table S1 A). 반면 헴철미생물 사균체를 공급받은 시험군의 분변에는 전체 202종류의 종 중에서 99.1%의 비중으로 후벽균문(Firmicutes)에 속한 세균이 145종 발견되었다. 프로테오박테리아문(Proteobacteria) 17종의 비중은

Fig. 1. Variations of weight and fecal microbiomes in bacterial phylum from a heme-rich-nutrient-fed dog.

Panel A indicates the graph for weight variation of dogs (white bar for control-nutrient-fed and black bar for the heme-rich-nutrient-fed dog). Panel B indicates the fecal microbiomes of a control and heme-rich-nutrient-fed dogs.

The variation of fecal microbiome in bacterial species is listed in detail at supplementary Table S1.

0.5%로 감소하였다. 이외에도 방선균문(Actinobacteria) 19종, 의간균문(Bacteroidetes) 15종, 사카리박테리아문(Saccharibacteria) 4종, 시피로체츠문(Spirochaetes) 1종, 푸소박테리아문(Fusobacteria) 1종이 1% 미만의 마이너 비중으로 발견되었다(Table S1 B).

따라서 헴철이 풍부한 식이 1 g씩 6일동안 공급받은 개의 분변은 공급받지 않은 개의 분변보다 후벽균문(Firmicutes)의 균총 비중이 증가되면서 프로테오박테리아문(Proteobacteria)의 균총 비중이 감소하는 양상을 나타냈고, 발견되는 장내균총의 종류도 172종에서 202종으로 다양성이 증가하였다.

헴인 공급에 의한 *L. gasseri*의 성장 변화

헴철미생물 사균체 과립 공급에 의해 개의 장내균총에서 유산균류가 다수 포함된 후벽균문(Firmicutes)이 증가된 Fig. 1의 결과로부터 식이에 포함된 헴철 분자가 후벽균문에 속한 혐기성 유산균류의 균총의 비중을 증가시키는데 기여했을 것으로 추정되었다. 그러나 상기 실험에 사용된 헴철미생물 사균체 과립에는 헴철 분자뿐만 아니라 여러 가지 세포 조성물질들이 함께 혼재되어 있었으므로, 헴철 분자가 유효물질임을 명확하게 증명하기 위하여 헴철의 염소(Cl) 착염 분자인 헴인(hemin, Merck Inc.)을 단일 성분으로 하고, 헴

Fig. 2. Growth curves of *L. gasseri* in media with and without hemin supplementation.

Panel A indicates the anaerobic conditional growth curve and panel B the aerobic conditional growth curve. Legends are in the graph panels.

기성 유산균류의 모델로 결정한 *Lactobacillus gasseri*의 배양에 농도별로 추가하면서 헤민 첨가가 유산균 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 혐기성 유산균류의 모델은 프로바이오틱스로써의 기능성과 전체 유전체 서열정보가 알려진 후

벽균문에 속한 종을 기준으로 선택하였다.

MRS를 기본 배지 성분으로 하여 다른 농도의 헤민을 포함한 시럼바이알 내부를 혐기조건으로 유지하면서 *L. gasseri*를 접종하여 생장을 비교하였다(Fig. 2A). 최대 비성장속도 (specific growth rate, 1/h)에는 헤민 첨가에 따라 큰 차이가 없었으나, 헤민 25 μM 첨가 배지에서 생장한 *L. gasseri*는 헤민을 무첨가한 대조군보다 지연기(lag phase)가 단축되면서 빠르게 생장했다. 반면 헤민 50 μM 첨가 배지에서는 *L. gasseri*의 생장이 다시 느려져서 헤민 무첨가 배지에서의 생장곡선과 크게 차이가 없었다. *L. gasseri*는 낮은 농도범위의 헤민이 존재하는 배지에서는 헤민 무첨가의 경우보다 일찍 생장이 시작되었고, 높은 농도범위의 헤민이 존재하는 배지에서는 생장의 시작시간이 느려졌다. 헤민 첨가 농도에 따른 호기조건(고무 쉘터로 막은 시럼바이알 용기 대신에 면전으로 막은 250 ml-플라스크 용기에서의 배양, 그 외 배양 조건은 혐기조건 배양과 동일)의 *L. gasseri* 생장곡선도 헤민 추가에 따라 혐기조건에서와 유사한 양상을 보였다(Fig. 2B). 즉, 헤민 25 및 50 μM 첨가 배지에서는 무첨가 배지의 경우보다 빠르게 생장이 시작되었고, 100 μM 이상의 헤민 첨가 조건에서는 생장의 시작시간이 점차 느려져서 헤민 300 μM 첨가 배지에서는 생장이 거의 일어나지 않았다. 따라서 낮은 농도구간의 헤민 첨가에 의해 *L. gasseri*의 생장 지연기가 단축됨에 의한 생장이 빨라졌고, 산소 접촉의 정도에 따라서 생장이 촉진되는 헤민의 적절한 농도범위가 다르게 나타났다.

헤민 공급에 의한 *L. gasseri*의 시토크롬 *bd* 복합체 활성도 변화

*L. gasseri*는 호흡대사를 하지 않음에도 불구하고 유전체 검색에서는 다른 호흡대사 종에서 발견되는 전자전달계의 단백질 성분인 시토크롬 *bd* 복합체를 구성하는 단백질들의 유전자(*cydABCD*)가 존재한다[16]. 따라서 *L. gasseri*는 시토크롬 *bd* 복합체를 불활성 상태인 아포단백질(apoproteins: 보결분자단이 포함되지 않은 단백질부분) 형태로 포함하고 있으며, 외부로부터 공급된 헴철에 의해 생물학적으로 활성 상태인 헴-접합단백질(heme-conjugated protein)로 바뀔 수 있음을 암시하였다. 이 가설을 확인하기 위해 혐기배양 중

Table 1. Activity of cytochrome *bd* complex and cytosolic ATP concentration of *L. gasseri* grown in hemin supplemented medium.

Growth conditions	No hemin supplementation	25 μM hemin supplementation	50 μM hemin supplementation
A. Activity of cytochrome <i>bd</i> complex ^a (U/g of cell)	1.55 ± 0.19	2.11 ± 0.14	2.20 ± 0.08
B. ATP concentration in cytosol (μmol/g of cell)	7.90 ± 1.12	11.95 ± 0.68	12.56 ± 0.59

^aOne unit of cytochrome *bd* complex activity was defined as the amount of oxidized TMPD formation per minute by whole cell (U = mmol of oxidized TMPD/min). Actively growing cells in MRS-basal medium were sampled from anaerobic culture at 4 h after inoculation. Data are represented as mean ± SD from three biological repeats.

활발히 성장하는 시기의 세포(접종 후 4시간)를 채취하여 호기조건에서 시토크롬 *bd* 복합체의 전자흐름을 측정하였다 (Table 1A). 헤민 무첨가 MRS 배지에서 혐기적으로 성장하던 대조군 *L. gasseri*는 외부에서 공급된 TMPD를 1.55 ± 0.19 mmol/min·g of cell의 속도로 산화시켰다. 반면 25 및 50 μ M 헤민이 첨가된 MRS 배지에서 혐기적으로 성장하던 *L. gasseri*는 더 높은 속도로 (각각 2.11 ± 0.14 및 2.20 ± 0.08 mmol/min·g of cell) TMPD를 산화시켰다. 따라서 외부에서 공급된 헴철이 포함된 배지에서 성장한 *L. gasseri*의 시토크롬 *bd* 복합체의 전자전달 활성이 증가하였다.

헤민 공급에 의한 *L. gasseri*의 세포 내 ATP 농도 변화

세포 표면에 존재하는 시토크롬 *bd* 복합체의 전자전달 활성에 따라 세포내 ATP 변화를 추적하기 위하여 위 시료의 세포를 물리적으로 파쇄하였다(Table 1B). 혐기적 환경에서 성장한 대조군 *L. gasseri*의 세포질에 존재하는 ATP는 7.90 ± 1.12 μ mol/g of cell인 반면 25 및 50 μ M 헤민이 첨가된 배지에서 혐기적으로 성장하던 *L. gasseri*의 세포질에는 각각 11.95 ± 0.68 과 12.56 ± 0.59 μ mol/g of cell이 측정되었다. 따라서 헤민이 무첨가된 배지에서 성장하던 세포의 세포질보다 헤민이 공급된 배지에서 성장하던 세포의 세포질에는 대조군보다 50% 가량 높은 에너지 상태를 나타냈다.

헤민 공급에 의한 *L. gasseri* 세포질의 라디칼 소거능 변화

외부 헤민 공급에 의해 *L. gasseri*에서 시토크롬 *bd* 복합체의 전자전달활성이 높아지고 동시에 세포질 내부의 ATP가 높아진 것을 확인하였으나, 절대 혐기환경인 동물의 장관에서 후벽균문에 속한 유산균류가 헴철 식이에 의해 에너지 증가로 인한 개체수 증가를 설명하기에는 충분하지 않았다. 호기성 생물 종에서의 헴철은 전자전달과정의 산화·환원효소들 뿐 아니라 활성산소 방위에 필요한 카탈라제, 페옥시다제에 필요하므로, 외부에서 공급된 헴철이 *L. gasseri* 세포질에서 불활성 아포단백질로 존재하는 ROS-방어효소들을 활성화시킬 수도 있었다. 이 가설을 증명하기 위해 헤민 첨가에 따라 혐기적 환경에서 성장하는 *L. gasseri* 세포질의 라디칼 소거능의 변화를 측정하였다(Fig. 3). 25 및 50 μ M 헤민 첨가 조건에서 혐기적으로 성장한 *L. gasseri* 세포질 시료(접종 후 2시간)는 헤민 무첨가 조건의 세포질 시료보다 각각 68%와 82%가 상대적으로 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 접종 후 4시간의 *L. gasseri* 세포질 시료들도 접종 후 2시간대의 라디칼 소거능과 동일한 경향을 보였다. 4시간대의 헤민 무첨가 조건에서의 대조군 시료보다 25 및 50 μ M 헤민 첨가 조건의 시료는 라디칼 소거능이 각각 13% 및 10% 더 높았다. 또한 *L. gasseri*의 유전체 정보에서는 헴철 의존성 카탈라제의 유전 정보가 확인되었다[17]. 그러므

Fig. 3. Cytosolic radical scavenging activity of *L. gasseri* grown in media with and without hemin supplementation. The DPPH radical scavenging by the cytosol from MRS medium is in white bar, the cytosol from hemin 25 μ M supplementation is in shade bar, and the cytosol from hemin 50 μ M supplementation is in black bar. Cells were taken from anaerobic culture at 2 and 4 h of cultivation and set to OD_{600nm} = 1 before disruption to release cytosol. The error bars indicate the SD from three biological repeats.

로 *L. gasseri* 세포질에 아포단백질 형태로 존재하는 헴철의 존성 폐옥시다제 또는 카탈라제가 외부 헴철 공급에 의해 활성형인 헴-접합형태로 전환되어 세포질의 전체 활성산소에 대한 방어능력이 증대되었으며 이로 인해 성장 개체에 필요한 세포질의 적정 환원도에 일찍 다다른 것으로 생각되었다.

고찰

1일당 16.9 mg씩의 헴철을 6회 추가로 공급받은 개의 분변에서 유산균류가 다수 포함된 후벽균문(Firmicutes)의 균총 비중이 증가된 것(Fig. 1)은 헴철 생합성이 결핍된 혐기성 세균의 호흡성 에너지 생성이나 활성산소에 방위에 관계되는 아포단백질들(apoproteins)에 보결분자단(prosthetic group)인 heme이 외부로부터 공급되어 활성형인 헴-결합단백(heme-conjugated proteins) 형태로 전환되어 활성을 가지으로써 생장이나 생존성이 증대된 것으로 사료되었다. 비록 본 연구에서 사용한 2 기의 개 분변에서의 미생물 군집의 변화는 통계적으로 유의미하지는 않았으나, 타 동물의 사양시험 결과들(헴철 사균체 과립을 전체 식이량의 1%인 사료를 5일간 공급받은 마우스 5 기의 분변 균총에서 후벽균문의 비중이 증가했던 결과나 동일 과립이 전체 식이량의 0.5%인 사료를 1개월간 공급받은 닭들 200 기의 맹장 및 분변에서의 MRS 배지에서 성장하는 전체 유산균류의 생균수가 증가

했던 결과)와 유사하였다[18]. 또한 소 혈액 유래의 헴철을 배지에 첨가하는 경우 *Lactobacillus lactis*의 균체량이 증가나[16] 사멸기의 지연[19]을 보고한 논문들도 본 논문에서의 결론과 일치한다. *Lactobacillus plantarum*이 담즙산(bile acid)에 의해 용해된 *B. subtilis*의 헴철-포함 세포질 용출물에 의해 과산화수소수(H_2O_2)에 대한 해독능력이 증가되었던 논문도 본 연구의 결론을 지지하였다[20].

헴철 공급의 영향을 연구하기 위해 본 논문의 혐기성 유산균으로 사용한 *L. gasseri*는 1980년대에 Lauer and Kandler가 여성의 질에서 처음 분리한 유산균[21]으로, 인체 섭취 결과 지방의 약 8%를 감소시키는 효과나[22] 자궁 내 막증, 생리통 및 월경통 등의 완화기능[23] 등의 기능성이 보고된 유산균이다. 후벽균문(Firmecutes)에 속한 *L. gasseri* 이외에도 방선균문(Actinobacteria)에 속한 혐기성 유산균인 *Bifidobacterium bifidum*에서도 헤민 첨가에 따라 정도의 차이가 있으나 소규모의 성장촉진효과(Fig. S1)나 세포질의 라디칼 소거능력 증대(Fig. S2)가 발견되었다. 따라서 여러 프로바이오틱스 제품들에 사용되는 유산균류에 헴철을 공급하는 경우 에너지 추가생산에 의한 성장 증대나 산소 접촉 환경에서의 활성산소 방어력 증대에 의한 생존성 증대가 가능할 수 있을 것이다. 단지, 공급되는 헴철의 농도에 따른 *L. gasseri*의 성장결과(Fig. 2)가 암시하듯이 공급되는 헴철의 농도가 과도한 경우에는 오히려 생장이나 생존력이 감소할 가능성도 존재하기 때문에, 유산균의 종에 따라 적절한 헴철 공급 농도 범위가 별도로 결정되는 후속 연구들이 필요할 것이다.

Acknowledgment

The authors appreciate Dibiome Co. for the helps testing dogs and collecting feces samples.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Kim DY, Camilleri M. 2000. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am. J. Gastroenterol.* **95**: 2698.
- Savage D. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal track. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 107-133.
- Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O'Keefe S, Mitchel T, et al. 2016. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Front. Microbiol.* **7**: 459.
- D'Argenio V, Salvatore F. 2015. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta* **451**: 97-102.
- Cummings JH, Macfarlane GT. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 443-459.
- Fujimura KE, Demoor T, Rauch M, Faruqi AA, Jang S, Johnson CC, et al. 2014. House dust exposure mediates gut microbiome *Lactobacillus enrichment* and airway immune defense against allergens and virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 805-810.
- Halawa MR, El-Salam MA, Mostafa BM, Sallout SS. 2019. The gut microbiome, *Lactobacillus acidophilus*; relation with type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rev.* **15**: 480-485.
- Arora T, Singh S, Sharma RK. 2013. Probiotics: interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition* **29**: 591-596.
- Korean Ministry of Food and Drug Safety. 2019. KFDA Press release https://www.mfds.go.kr/brd/m_99/down.do?brd_id=ntc0021&seq=43656&data_tp=A&file_seq=43651.
- Lorence R, Carter K, Gennis RB, Matsushita K, Kaback HR. 1988. Trypsin proteolysis of the cytochrome *d* complex of *Escherichia coli* selectively inhibits ubiquinol oxidase activity while not affecting N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine oxidase activity. *J. Biol. Chem.* **263**: 5271-5276.
- Jünemann S, Wrigglesworth JM. 1994. Antimycin inhibition of the cytochrome *bd* complex from *Azotobacter vinelandii* indicates the presence of a branched electron transfer pathway for the oxidation of ubiquinol. *FEBS Lett.* **345**: 198-202.
- Fujimoto M, Yamada A, Kurosawa J, Kawata A, Beppu T, Takano H, Ueda K. 2012. Pleiotropic role of the Sco1/SenC family copper chaperone in the physiology of *Streptomyces*. *Microb. Biotechnol.* **5**: 477-488.
- Frangipani E, Haas D. 2009. Copper acquisition by the SenC protein regulates aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS Microbiol. Lett.* **298**: 234-240.
- Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. 2001. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol. Pharm. Bull.* **24**: 1202-1205.
- Afify AE-MM, Romeilah RM, Sultan SI, Hussein MM. 2012. Antioxidant activity and biological evaluations of probiotic bacteria strains. *Int. J. Acad. Res.* **4**: 131-139.
- Brooijmans R, Smit B, Santos F, Van Riel J, de Vos WM, Hugenholtz J. 2009. Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* **8**: 28.
- Maresca D, Zotta T, Mauriello G. 2018. Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains. *Front. Microbiol.* **9**: 157.
- Hemolab Inc., 2020. Development of heme-iron containing non-GMO feed from breeding. IPET project final report. Registered number: 11-15430001003152-1543001.
- Lechardeur D, Cesselin B, Fernandez A, Lamberet G, Garrigues C, Pedersen M, et al. 2011. Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**: 143-149.
- Yu T, Kong J, Zhang L, Gu X, Wang M, Guo T. 2019. New crosstalk between probiotics *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*.

- Sci. Rep.* **9**: 13151.
21. Lauer E, Kandler O. 1980. *Lactobacillus gasseri* sp. nov., a new species of the subgenus *Thermobacterium*. *Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*. **1**: 75-78.
 22. Kadooka Y, Sato M, Ogawa A, Miyoshi M, Uenishi H, Ogawa H, et al. 2013. Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* **110**: 1696-1703.
 23. Itoh H, Uchida M, Sashihara T, Ji Z-S, Li J, Tang Q, et al. 2011. *Lactobacillus gasseri* OLL2809 is effective especially on the menstrual pain and dysmenorrhea in endometriosis patients: randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Cyto-technology* **63**: 153-161.