pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 5, pp. 328~331 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.5.328

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

프로바이오틱스 *Lacticaseibacillus rhamnosus* LRH020의 미생물막 형성 평가

김혜림[1†] · 서은솔[1,2†] · 서민영[3] · 김병용[1*]

[1](주)씨에이치랩스, [2]서울대학교 농업생명과학대학 바이오모듈레이션학과, [3]㈜신우코퍼레이션

Assessment of biofilm formation of *Lacticaseibacillus rhamnosus* LRH020

Hye Rim Kim[1†], Eunsol Seo[1,2†], Min Yeong Seo[3], Byung-Yong Kim[1*]

[1]*CH Labs Corp., Chong Kun Dang Health care Labs, Seoul, Korea*
[2]*WCU Biomodulation Major, Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea*
[3]*ShinWoo Co., Ltd, Anyang-si, Korea*

(Received June 30, 2022/Revised August 03, 2022/Accepted October 13, 2022)

ABSTRACT - Biofilms are complexly structured communities of microorganisms composed of surface-attached microorganisms, where their effects on the host have been controversial. In this study, we investigated the potential biofilm-forming capacity of *Lacticaseibacillus rhamnosus* LRH020 (DSM25568) by detecting genes known to promote biofilm formation. It was shown that the aggregation substance gene (asa 1) was presented in the LRH020 strain. Therefore, we investigated the phenotypic activities of the gene asa1 via two methods: biofilm formation and auto-aggregation activity. It was shown that the strain LRH020 had significantly less ability to form biofilm compared to the positive control strain *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. Furthermore, LRH020 exhibited biofilm-forming activity comparable to *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG), widely used probiotics. The auto-aggregation activity of LRH020 was also within the safe range similar to that of LGG. In conclusion, this study shows that both biofilm-forming and auto-aggregation activities of the LRH020 are comparable to one of the most studied probiotics strains, LGG.

Key words: Probiotics, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, Asa1, Biofilm, Auto-aggregation

미생물막(Biofilm)은 미생물들이 생산하는 세포 외 생산물이며, 미생물의 표면에 부착되어 성장하는 특징을 보인다[1]. 미생물막을 형성하는 세균은 다당류(Polysaccharides), 단백질(Proteins), 핵산(Nucleic acids), 지방질(Lipids), 지질다당류(Lipopolysaccharides)와 같은 세포 밖 고분자 물질(exopolysaccharides: EPS)로 구성된 자가 생산 슬라임 매트릭스를 형성하며, 대부분의 미생물에서 이러한 점액질이 자연적으로 발생한다[2]. 생물막은 미생물에게 이점을 제공하는데 그 중 하나는 표면에 단단히 부착된 점액층이 형성됨에 따라 외부의 장애로부터 미생물을 보호할 수 있는 기능을 제공할 수 있다. 또한 외부에서 침투하는 병원균에 의한 집단 군락을 방지해 미생물을 보호한다는 장점을 가진다. 즉, 프로바이오틱스에 의한 미생물막 형성은 숙주 점막에 군집을 형성하고 오랜 기간 달라붙을 수 있는 장벽을 형성하기 때문에 병원성 세균의 군집 형성을 막을 수 있는 이점으로 여겨짐과 동시에, 병원성 세균에서는 부정적인 현상으로 여겨져 왔다[2]. 낭포성 섬유증의 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 감염, 표피포도구균(*Staphylococcus epidermidis*) 및 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) 등은 임플란트 감염, 요로 감염 및 치주 질환을 유발하여 인체의 건강에 부정적인 영향을 미치는 사례가 보고된 바 있다[3]. 또한 미생물막을 형성하는 세균의 경우 미생물막을 형성하지 않는 세균인 플랑크톤성 세균 보다 항생제에 100-1000배 내성이 있다고 알려져 있기에 미생물막 형성

*Correspondence to: Byung-Yong Kim, CH Labs, Chong Kun Dang Health care Labs, Seoul 07249, Korea
Tel: +82-10-2236-6044, Fax: +82-2-6676-6399
E-mail: greg6044@gmail.com

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

능력에 따라 세균의 생리학적 특성을 변경할 수 있다[2,3]. 또한, 위장관에 서식하는 장구균(*Enterococcus*)은 인간의 기회감염 및 병원 내 감염의 주요 원인으로 알려져 있으며, 장구균의 병인은 독성인자(virulence factors, VFs)의 응집 물질(aggregation substance, AS)이 숙주의 군집화, 미생물막 형성에 기여한다[4]. 본 연구에서는 aggregation substance gene에 해당하는 asa1이 검출된 프로바이오틱스 *Lacticaseibacillus rhamnosus* LRH020 균주에서 미생물막 형성능과 자가응집능(Auto-aggregation) 활성을 확인하고자 하였다. 이를 위해, 다른 균주와 비교해 미생물막 형성능이 높은 것으로 알려진 *Enterococcus faecalis*를 양성대조군으로[6], 오랜 기간 복용하여 안전성이 확보된 *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG)를 비교 균주로 설정한 후[7], 이들 2개 균주와 비교·분석하여 LRH020의 프로바이오틱스로서의 안전성을 입증하고자 한다.

Materials and Methods

사용 균주

본 연구에 사용한 균주는 SynBalance Srl (Origgio VA, Italy)로부터 제공받은 *Lacticaseibacillus rhamnosus* LRH020이다. 실험에 사용하기 위하여 *E. faecalis* ATCC 19433는 Tryptic soy broth (TSB, Becton Dickinson, Sparks, Md., USA)에 접종하여 배양하였다. 한편, 전 세계에서 가장 많이 사용되는 프로바이오틱스인 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*은 발효식품이나 유제품에서 오랜 기간 동안 안전성을 보이고 있다. 해당 이유를 근거로 이미 인체에서 안전성이 입증되어 널리 쓰이고 있는 *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG)를 비교균주로 설정하였고, 본 논문에서 안전성을 입증하기 위해 사용한 균주 LRH020은 de Man Rogosa Sharpe (MRS, Becton Dickinson, Sparks, Md., USA.) 액체배지에 접종하여 37°C, 24시간, 혐기조건으로 배양하였다. 균주의 활성화를 위해 고체배지에 선상도말평판법으로 도말하여 배양하였고, 단일집락을 선발한 다음 동일한 방법으로 2회 계대 배양하였다[8].

독성 유전자 분석

LRH020의 전장 유전체 (Whole-genome sequencing)는 Prokka (version 1.12)를 이용하여 분석하였고, KEGG (KEGG Mapper, https://www.genome.jp/kegg/mapper) pathway를 기반으로 독성물질 생성 인자 (Virulence Factor Data Base)를 확인하였다.

미생물막 형성능 확인

LRH020의 미생물막 형성능을 확인하기 위해 참고문헌 Eladawy et al.에 따른 Qualitative Detection of Biofilm with the Tube 실험법[10]을 변형하여 사용하였다. 10 mL의 TSB에 1%의 glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가한 TSBG 액체배지에 양성대조군에 해당하는 *E. faecalis*, 비교균주로 사용한 LGG, 본 논문에서 보고자 하는 균주 LRH020 총 3가지 균주의 단일집락을 접종하여 37°C, 24시간, 혐기 조건으로 배양하였다.

음성대조군으로는 균이 접종되지 않은 TSBG 배지, 양성대조군으로 *E. faecalis* ATCC 19433, 비교균주로는 LGG를 사용하였다. 24시간 배양 후, 시험관의 배양물을 조심스럽게 흘려보내고 생성된 미생물막을 인산완충생리식염수(Phosphate-Buffered Saline, Bioneer Co., Daejeon, Korea)으로 2회 세척하였다. 시험관을 완전히 말린 후 1% crystal violet (YD diagnostics Co., Yongin, Korea)으로 15분 동안 염색하였다. 염색된 시험관은 증류수(Bioneer Co., Daejeon, Korea)로 충분히 헹구어 시험관을 완전히 말린 후, methanol (99.8%, Duksan, Ansan, Korea)로 염료를 녹여 96 well plate (Corning, NY, USA)에 100 μL씩 분주하였다. Microplate reader (EPOCH2 microplate reader, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다.

자가응집력 활성 분석

세포 간 상호작용으로 알려진 자가응집력 활성을 분석하기 위해서 Nath et al.[10]의 실험법을 변형하여 사용하였다. 24시간 동안 액체 배지(TSB 또는 MRS)에서 배양된 각 균주를 2,800×g, 10분 동안 원심분리기(Eppendorf, Hamburg, Germany)로 원심분리하였다. 그 후 인산완충생리식염수로 2회 세척하였다. 동일 용액으로 재현탁한 뒤 초기 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 균주 현탁액은 37°C, 혐기조건으로 2시간 동안 배양하고, 최종 흡광도는 상층액으로 측정하였다. 다음의 계산식을 이용하여 자가응집률을 확인하였다.

$$\text{Auto-Aggregation rate (\%)} = \frac{OD_{initial} - OD_{final}}{OD_{initial}} \times 100$$

통계분석

실험결과는 3반복 실험을 실시하여 얻어진 측정값으로 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 실험결과에 대한 통계처리는 Student's t-test로 비교하였으며, p 값이 0.05 미만일 경우 ($p<0.05$) 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

Results and Discussion

독성 유전자 분석 확인

Functional annotation 방법을 통해 LRH020 균주의 Blast 검색 결과, aggregation substance gene인 asa1이 검출됨을 확인하였다(Table 1).

Table 1. Presence of aggregation substance genes in LRH020[11]

Toxin	Toxin genes	Presence of gene (Y or N)
Aggregation substance	agg	N
	asa1	Y
	asp1	N
	acs10	N

Y: Yes, N: No

Table 2. Biofilm and auto-aggregation activities by *E. faecalis* ATCC 19433, LRH020, and LGG

	Biofilm OD at 595 nm	Auto-aggregation activity (%)
NC	0.12±0.016	-
E. faecalis ATCC 19433	0.80±0.127	24.33±0.4
LRH020	0.36±0.022**	12.32±0.2***
LGG	0.33±0.093*	14.12±1.7**

Experiments were repeated 3 times. Values are Mean±SD.
Asterisk means significant difference ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ vs. *E. faecalis* ATCC 19433)
NC: Broth only

미생물막 형성능 확인

균주의 미생물막 형성능 확인 결과 LRH020은 양성대조균주 *E. faecalis* ATCC 19433 대비 유의적으로 미생물막 형성능이 적고($p<0.05$) 비교균주 LGG와는 유의적으로 차이가 없음을 확인하였다(Table 2).

*Enterococci*는 다재내성균으로써 대표적으로 *E. faecalis*와 *E. faecium*를 예로 들 수 있다. 이들 두 종류는 모두 장내 표면에 부착해 미생물막을 형성하면 미생물막이 형성되기 이전의 온전한 상태로 되돌릴 수 없다는 특징을 가져, 여러 가지 항생제에 대해 내성을 갖는 다제내성을 일으키거나, 세균의 부착 및 정착 등에 관여하는 중요한 병원성 인자로 장내 발병기전의 원인이 되는 것으로 보고된다[12]. 반대로, *Lactobacillus* spp. 같은 유산균이 만들어 내는 미생물막은 체내에 유익한 영향을 주는 특징을 가진다[13]. 따라서 본 연구에서는 안전성 평가 확인을 목적으로 *E. faecalis* ATCC 19433를 양성대조균주로 사용하여 LRH020의 미생물막 형성능을 확인하였다. 그 결과, *E. faecalis* ATCC 19433 대비 LRH020 균주에서 유의적으로 미생물막 형성능이 적어, 프로바이오틱스 균주로서 안전하게 사용할 수 있다고 판단된다[14].

자가응집력 활성 분석

미생물 응집이란 부유하는 미생물들이 액체 배지에 침전되어 축적되는 과정으로 같은 균주끼리 덩어리를 형성하는 자가응집(auto-aggregation)과 서로 다른 두 종류의 균주끼리 상호결합(cell-to-cell recognition)을 형성하는 공동응집(co-aggregation) 두 가지 종류를 포함한다[15]. 유산균의 자가응집능은 부착(adhesion)으로 정의되며, 유산균이 위장관내에 부착되어 응집을 형성함에 따라 감염을 일으키는 병원체로부터 방어 능력을 가지게 되는 것을 말한다[16].

자가응집력 활성 분석 결과 LRH020은 이미 안전성이 확인되어 상용화되고 있는 균주 LGG와 유사한 활성을 보였고, 양성대조군 *E. faecalis*는 LGG 및 LRH020에 비해 높은 활성을 보이는 것으로 확인하였다(Table 2).

국문요약

병원성 미생물에 의한 감염을 일으키는 주요 독성인자 중 하나인 응집 물질은 자가응집 및 미생물막 형성으로 인체 건강에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 본 연구에서 *Lacticaseibacillus rhamnosus* LRH020 (DSM25568) 균주의 독성 유전자 분석을 통해 asa1 유전자를 확인하였고, 표현형으로의 발현 여부 확인을 위하여 미생물막 형성능과 자가응집능 활성실험을 진행하였다. 실험결과 LRH020은 양성대조군 *Escherichia. faecalis* ATCC 19433과 비교하였을 때 유의적으로 미생물막 형성능이 낮으며, 비교균주 *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG)와 자가응집능에 차이가 없음을 확인하였다. 균주 LRH020은 asa1 유전자는 가지고 있으나, 표현형으로는 상업균주 LGG와 유사함으로 잠재적인 프로바이오틱스로서의 안전성을 확인하였다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Hye Rim Kim	https://orcid.org/0000-0002-7125-1590
Eunsol Seo	https://orcid.org/0000-0002-1585-8048
MinYeong Seo	https://orcid.org/0000-0002-1164-1423
Byung-Yong Kim	https://orcid.org/0000-0002-4229-8859

References

1. Lewis, K., Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, **45**, 999-1007 (2001).
2. Meroni, G., Panelli, S., Zuccotti, G., Bandi, C., Drago, L., Pistone, D., Probiotics as therapeutic tools against pathogenic biofilms: have we found the perfect weapon?, *Microbiol, Res.*, **12**, 916-937 (2021).
3. Olsen, I., Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur, J, Clin, Microbiol Infect Dis.*, **34**, 877-886 (2015).
4. Kiruthiga, A., Padmavathy, K., Shabana, P., Naveenkumar, V., Gnanadesikan, S., Malaiyan, J., Improved detection of esp, hyl, asa1, gelE, cylA virulence genes among clinical isolates of Enterococci. *BMC Res Notes.,* **13**, 170 (2020).
5. Anderson, A.C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., Arweiler, N., Vach, K., Wittmer, A., Al-Ahmad, A., *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Mirobiol*, **6**, 1534 (2015).
6. Tsegahun Asfaw, Biofilm Formation by *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium*: Review. *IJRBS.*, **7**, 5-10 (2019).
7. 이상길, 양경민, 천재희, 김태일, 김원호, Lipopolysaccharide로 유도된 HT-29 세포주의 염증에서 *Lactobacillus rhamnosus* GG의 항염증 작용과 기전, *Korea J Gastroenterol*, **60**(2), 86-93
8. E.Nwachukwu, O.K. Achi, I.O. Ijeoma., Lactic acid bacteria in fermentation of cereals for the production of indigenous Nigerian foods. *Afr. J. Food Sci.*, **2**(1), 1-6 (2011).
9. Chen, L.H., Zheng, D.D., Liu, B., Yang, J.A., Jin, Q., VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis-10 years on., *Nucleic Acids Res.* **44**, 694-697 (2016).
10. Eladawy, M., El-Mowafy, M., El-Sokkary, M.M.A., Barwa, R., Effects of Lysozyme, Proteinase K, and Cephalosporins on Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa. Interdiscip Perspect Infect Dis.*, **2020**, 9 (2020).
11. Waters, C.M., Wells, C.L., Dunny, G.M., The Aggregation Domain of Aggregation substance, Not the RGD Motifs, Is Critical for Efficient Internalization by HT-29 Enterocytes. *Infect Immun.*, **71**(10), 5682-5689 (2003).
12. Nath, S., Sikidar, J., Roy, M., Deb, B. *In vitro* screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product. *Qual, Assur, Saf, Crop, Foods.,* **4**, 213-223 (2020).
13. Mohamed, J.A., Huang, D.B., Biofilm formation by enterococci. *J, Med, Microbiol.*, **56**, 1581-1588 (2007).
14. Salas-Jara, M.J., Ilabaca, A., Vega, M., Garcia, A., Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics., *Microorganisms,* **4**(3) 35 (2016).
15. Campana, R., Hermert, S.V., Baffone, W., Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog.*, **9**, 12 (2017).
16. Janković, T., Frece, J., Abram, M., Gobin, I., Aggregation ability of potential probiotic Lactobacillus plantarum strains. *IJSER.,* **6**, 19-24 (2012).