전통누룩에서 분리한 *Saccharomyces cerevisiae* var. Boulardii-03 효모의 Probiotic 특성 연구

이은정^{1,3} · 김재호² · 이장은^{1,3}

¹한국식품연구원 식품융합연구본부 전통식품연구단

²한국식품연구원 식품산업연구본부 기업솔루션연구센터

³과학기술연합대학원대학교 식품생명공학

Research on the Probiotic Yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. Boulardii-03 Derived from Traditional Nuruk

Eunjung Lee^{1,3}, Jae-Ho Kim², and Jang-Eun Lee^{1,3}

¹Research Group of Traditional Food and

²Industrial Support Research Center, Korea Food Research Institute

³Department of Food Biotechnology, Korea University of Science and Technology

ABSTRACT In the present study, we isolated *Saccharomyces cerevisiae* boulardii-03 from the traditional Nuruk called Gongbyungnok and then analyzed its probiotic characteristics. The isolated yeast showed non-galactose assimilation, acid tolerance in pH 2.0, and an active growth rate at a high temperature of 37°C, which reveals this boulardii-03 strain has not only the ability to produce alcohol, but also resistance to gastrointestinal conditions. As a result of an *in vivo* study, the yeast supplementation showed significant anti-inflammatory properties in a mouse model of DSS (dextran sulfate sodium)-induced intestinal inflammation. In addition, after the live-cell administrations, the *S. cerevisiae* RNA concentration in the mouse cecum was significantly higher than that of the control and the DSS treatment group, which suggests that the boulardii-03 yeast has a superior intestinal survival rate. Thus this opens up the new prospects for the into the development of fermented probiotic food using *S. cerevisiae* boulardii-03 strain as a starter culture.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae* var. boulardii, probiotics, yeast, nuruk, makgeolli

서 론

Probiotics는 장내 건강에 유익한 영향을 주는 미생물을 의미하며, 주로 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*와 같은 유산균(lactic acid bacteria)이 높은 probiotic 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근 유산균뿐 아니라 진균류인 효모(yeast) 역시 probiotic 기능을 갖고 있는 것으로 보고되면서 효모를 활용한 probiotics 제제 개발 및 장내 불균형 해소를 위한 치료전략으로 일부 효모에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Pais 등, 2020). 현재까지 가장 널리 알려진 probiotic 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* var. boulardii(Goktas 등, 2021)이지만, 일부 *Debaryomyces*, *Wickerhamomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* 등의 효모 속 역시 probiotic 잠재 기능을 가지고 있다고 알려져 있다(Lara-Hidalgo 등, 2017).

이러한 probiotic 효모는 생균 형태로 섭취 시 장관 내 생존율이 높고 세균성 항생제에 대한 내성이 있으며(Nayak, 2011), 염증성 장 질환(Sen과 Mansell, 2020) 및 장내 균총에 바람직한 영향을 미친다는 연구 결과가 보고되면서(Villar-Garcia 등, 2017), 유산균 중심의 probiotics 시장이 최근에는 효모 균주까지 점차 확장되고 있다(Lazo-Velez 등, 2018).

이와 같은 *S. cerevisiae* var. boulardii에 대한 높은 관심은 다양한 분야의 기능성 연구로 이어지고 있다. 지금까지 보고된 바에 의하면 *Clostridium*, *Vibrio* 등에 의한 식인성 위장염과 병원성 미생물 감염에 의한 만성 설사 증상에 bou-

Received 3 November 2021; Revised 16 November 2021; Accepted 16 November 2021

Corresponding author: Jang-Eun Lee, 245 Nongsaengmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju, Jeonbuk 55365, Korea, E-mail: jelee@kfri.re.kr

Author information: Jang-Eun Lee (Researcher)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

lardii 생균 섭취의 임상 효과가 입증되었고(Consoli 등, 2016), 이러한 세균성 또는 장 독소로 유발되는 급성 장염 증상에서 boulardii 효모는 간 대식세포 증가로 인한 면역 활성화와 사이토카인 조절에 의한 면역 균형을 유지함으로써 장염 증상을 완화시킨다고 보고되어 있다(Stier와 Bischoff, 2016). 또한 *Helicobacter*에 의해 유발된 gastric lymphoid follicles 형성 억제 효과가 밝혀짐으로써 위염 유발성 pylori의 치료 및 부작용 완화에 *S. cerevisiae* var. boulardii를 사용하고 있다(Zhou 등, 2019). 이와 같이 probiotic 효모로 활용되고 있는 boulardii 균주는 *S. cerevisiae*의 일반 특이인 높은 알코올 내성과 알코올 발효력을 갖고 있으며, *S. cerevisiae*와 매우 높은 유전적 상동성을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 야생 효모를 다수 함유하고 있는 전통누룩으로부터 *S. cerevisiae* 효모를 분리하고, 이들 중 probiotic 기능이 있는 boulardii 균주를 선발하고자 하였다.

누룩은 밀, 보리, 쌀 등의 전분질 원료를 자연 배양한 발효제로 주로 막걸리, 약주와 같은 전통주 제조 시 첨가하는 발효제이다. 자연 배양된 누룩에는 곰팡이, 효모, 유산균 등 다양한 야생 미생물이 존재하는데(Bal 등, 2015; Bal 등, 2016), 이는 호화된 쌀에 특정 균주를 접종하는 입국과 분명한 차이를 갖는다. 누룩에는 다양한 미생물이 자생하고 있기 때문에 양조에 누룩을 사용했을 경우에는 입국과 달리 효모와 젖산을 첨가하지 않는데, 이는 누룩이 당화와 동시에 알코올 발효제의 역할을 수행할 수 있는 유일한 발효제이기 때문이다. 그러나 이 같은 전통누룩의 미생물 다양성에도 불구하고, 현재까지 누룩은 주류 제조를 위한 첨가물 또는 일부 발효식품 등의 원료 등 매우 제한적으로 활용되고 있다. 즉, 다양한 미생물을 포함하고 있는 전통누룩은 유용 미생물 자원을 발굴할 수 있는 우수한 매체이며, 전통누룩에서 유용 미생물을 발굴하고 이를 활용하는 일은 전통누룩의 활용성 확장 측면에서 매우 중요한 일이라 할 수 있다. 이에 본 연구에서는 전통누룩에서 *Saccharomyces cerevisiae* var. boulardii 균주를 선발하고, 본 효모 균주가 갖는 probiotic 기능성을 평가하여 발효식품의 기능성 종균으로서 활용 가능성을 시사하였다.

재료 및 방법

효모 균주 분리 및 배양

고문헌 제조 방법에 따라 제조 및 수집된 전통누룩 60종(Lee 등, 2017)으로부터 약 200여 *Saccharomyces* 속 콜로니(colony)를 분리하였다. 분리된 200여 개의 효모 콜로니는 YM agar(yeast malt extract agar)에 보관하면서, PDB(potato dextrose agar, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 배지에서 25°C, 48시간 배양하여 효모 선발을 위한 스크리닝 및 probiotic 특성 분석에 사용하였다.

Boulardii 효모 선발

Boulardii 효모 선발을 위해 분리된 *Saccharomyces* 속 콜로니의 galactose 발효능, 내산성, 고온에서의 생육 여부를 조사하였다. Galactose 발효능 분석을 위해 galactose 10%가 함유된 yeast nitrogen base W/O AA(Difco 2919 40) 배지 10 mL에 각 효모 배양액 100 µL를 접종한 후 25°C에서 발효하면서 두람관 내의 탄산가스 생성 유무를 확인하였다. Galactose 발효능을 기반으로 선발된 10종의 효모 콜로니를 대상으로 내산성 및 고온에서의 생육 여부를 확인하여 최종 probiotic 효모 *S. cerevisiae* var. boulardii를 선발하였다. 0.1 M HCl을 첨가하여 pH 2.0으로 맞춘 YM 배지에 선발된 효모 콜로니를 100 µL 접종한 후 37°C에서 3일간 배양한 다음, PDA agar 배지에 도말하여 균주의 사멸 및 생육 여부를 확인하였다.

균주동정

선발된 효모 균주의 동정을 위해 18S rRNA gene sequencing을 진행하였다. 사용된 primer는 ITS1(5'-TCCG TAGGTGAACCTGCGG-3') 및 ITS4(5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3')였으며 18S rRNA 염기서열을 sequencing(ABI PRISM, 3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) 하여 분석된 염기서열을 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 프로그램을 이용하여 균주를 동정하였다.

효모 생균 시료 제조

S. cerevisiae var. boulardii-03 효모의 probiotic *in vivo* 효능평가를 위한 생균 시료 제조 방법은 다음과 같다. PDB 배지에서 28°C, 60시간 배양된 각 효모배양액을 원심 분리(6,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 효모 pellet을 수거하였다. 수거된 효모 균체는 20% glycerol(0.85% NaCl) 용액으로 1.0×10^8 CFU/mL 생균수 농도로 희석하여 투여 전까지 -80°C에서 냉동 보관하였다. 냉동 보관한 생균체는 투여 직전 실온에서 해동하여 0.85% NaCl 용액으로 2회 세척한 후 마우스에 경구 투여하였다.

시료의 투여 및 대장염 유발 동물모델

실험동물은 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스(Orient Bio, Seongnam, Korea)로 체중은 24 g 내외의 것을 사용하였다. 마우스는 온도 22±2°C, 습도 55±5%, 12시간의 dark-light cycle로 조절되는 시설에서 사육하였으며 실험 기간에는 표준사료(Harlan 2019S, Harlan Teklad, Madison, WI, USA)와 음수를 자유롭게 섭취할 수 있도록 급여하였다. 마우스는 1주일의 적응기간 후, 무작위로 5개의 그룹(그룹당 8마리)으로 나누었으며, 이들 간의 무게를 기준으로 유의적 차이가 나타나지 않음을 확인하였다. 5개의 그룹은 정상군(Cont), 대장염을 유발하는 대조군(DSS), *S. cerevisiae* var. boulardii-03(Boulardii-03) 균주를 투여 후 DSS로 대장염

을 유도한 실험군(Boulardii-03, n=8), probiotic 효능을 가지고 있음이 알려져 있는 의약품으로 판매되고 있는 비오플(Bioflor®)의 *S. cerevisiae* boulardii 균주를 투여 후 DSS로 대장염을 유도한 그룹(Bi, n=8)과 *S. cerevisiae* S288C 균주를 American Type Culture Collection(ATCC 204508; ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 배양 후 투여한 음성대조군(S288c, n=8)으로 설정하였다. 1주일의 적응기간 후 마우스는 1.0×10^8 cfu 농도의 효모 생균을 0.2 mL의 PBS에 혼탁시킨 후 매일 경구 투여하였으며 대조군과 DSS 투여 그룹은 vehicle인 PBS만 경구 투여하였다. 2주 후 3%의 DSS(dextran sulfate sodium salt, 36,000~50,000 DA; MP Biomedicals, Solon, OH, USA)를 음수에 섞어 6일간 투여하면서 Disease Activity Index(DAI)를 점수화하여 기록하였으며 DAI 측정은 Gommeaux 등(2007)의 기준에 따라 수행하였다. 효모와 vehicle의 경구투여 또한 계속 수행하였으며 6일째 되는 날 음수는 모두 정상 물로 교체하고 3일 뒤에 15시간 공복 후 마우스를 마취하여 희생하였다. 채혈 후 대장을 적출하여 길이와 무게를 측정하고 맹장 내용물을 수집하였다. 본 연구의 동물실험은 한국식품연구원 동물실험윤리위원회의 승인 후 수행되었다(IACUC 승인번호: KFRI-M-19009).

맹장에서의 효모 생균수 측정

장내 살아있는 효모의 정량은 Everard 등(2014)이 제시한 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. 맹장 내용물의 total RNA는 RNeasy PowerMicrobiome kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 준비하였으며, 정량은 Varioskan Flash(Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA)의 μ Drop plate를 이용하여 수행하였다. 그 후 총 RNA 1 μ g을 iScript cDNA Synthesis kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 cDNA로 합성하였으며, 이러한 과정은 모두 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. 표준곡선 측정을 위하여 S288C 효모 1×10^9 CFU/mL 농도의 배양액을 제조하고 이의 total RNA를 동일한 방법으로 추출 후 cDNA로 합성하여 사용하였다. Yeast cell의 정량을 위한 primer는 Yeast-F(5'-GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGC-3'), Yeast-R(5'-TCTCTTTCCAAAGTTCTTTTCATCTTT-3')을 사용하였으며, *Saccharomyces* cell의 정량을 위한 primer는 SC-F(5'-GAAACTCCACAGTGTGTTG-3'), SC-R(5'-GCTTAAGTGCGCGGTCTTG-3')을 사용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction)을 StepOnePlus real-time PCR system(Applied Biosystems®)과 Fast SYBR Green master mix(Applied Biosystems®)를 사용하여 수행하였다. S288C 효모를 표준곡선으로 정량화하여 맹장 내용물 g당 효모의 $\log_{10}$ 으로 표시하였으며, 3번 이상 반복하여 평균값과 표준편차로 나타내었다.

통계 분석

S. cerevisiae boulardii-03 효모의 알코올 발효능 실험은 3회 개별 담금 하였으며 모든 데이터는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계분석은 SPSS statistics(ver. 20.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA) 후 다중범위 검정(Duncan's multiple range test)을 수행하여 평균값 간의 차이를 확인하였다.

결과 및 고찰

Galactose 이용률 분석을 통한 *S. cerevisiae* var. *boulardii* 균주 선발

Boulardii 균주를 *S. cerevisiae*와 구분하기 위한 대표적인 표현형 특성은 높은 온도에서의 생장도, 낮은 pH에 대한 내성 그리고 낮은 galactose 이용률 등이다(Liu 등, 2018). 본 연구에서는 전통누룩으로 분리한 약 200 여종의 *S. cerevisiae* 콜로니로부터 boulardii 특성을 갖는 효모를 선발하기 위하여 상기 3가지 균주 특성을 기반으로 probiotic 효모를 선발하였다. 전통누룩 60종에서 분리한 *S. cerevisiae* 콜로니 237종을 대상으로 galactose 이용률을 확인하여, 상대적으로 낮은 galactose 이용률을 보이는 10종의 콜로니를 선발하였다. 선행연구에서 보고된 바에 의하면 boulardii 효모는 galactose 이용 및 발효 gene을 가지고 있음에도 불구하고 galactose를 탄소원으로 사용하지 못하는 것으로 알려져 있으며(Liu 등, 2018; Mitterdorfer 등, 2001), 일부 연구에서는 에너지로 활용하기 위해 galactose를 이용하는 하나 발효능이 없는 것으로 보고된 바 있다(Khatrı 등, 2013). 이 같은 boulardii 효모의 낮은 galactose 이용률은 PGM2 gene의 변이에 기인한 것으로 알려져 있는데, 낮은 galactose 이용률에 대한 보상 효과로 boulardii 효모가 높은 온도에서 glucose를 이용한 높은 생장률을 가질 수 있다고 제시된 바 있다(Liu 등, 2018). 현재까지 boulardii의 낮은 galactose 이용 메커니즘은 정확히 밝혀지지 않았지만, 실제 표준균주로 사용되는 *S. boulardii*(ATTC MYA-796)의 galactose 이용률을 다양한 배양조건에서 시험하였을 때 해당균주는 galactose를 발효할 수 있지만 그 효율이 *S. cerevisiae*보다 현저히 낮은 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이 같은 galactose 발효 특성을 기반으로 10종의 후보 콜로니를 선발하였는데, 본 방법은 비교적 간단하면서 정확하게 균주 특성을 시험할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 boulardii 균주의 galactose 비발효 메커니즘과 일부 boulardii 균주에서 높은 galactose 발효능을 보일 수 있는 사항에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

내산성 및 고온생육 활성 분석을 통한 *S. cerevisiae* var. *boulardii* 균주 선발

1차로 선발된 10종의 효모 콜로니를 대상으로 내산성 및 고온에서의 생장률을 기반으로 최종 probiotic 효모 *S. cer-*

Table 1. pH and high temperature resistances of *S. cerevisiae* isolated traditional Nuruk

Yeast no.	Nuruk name	Strains	Fermentation time (days) [pH 2.0, 25°C]			Survival after 12 days (at 37°C)
			1	3	11	
1	Backgok	<i>S. cerevisiae</i>	—	+	+	—
2	Nebubigeongok	<i>S. cerevisiae</i>	—	+	+	—
3	Kongnbyungok	<i>S. cerevisiae</i>	—	+	+	++
4	Nokdugok	<i>S. cerevisiae</i>	—	+	+	—
5	Gok	<i>S. cerevisiae</i>	—	+	+	—
6	Myungok	<i>S. cerevisiae</i>	—	—	+	—
7	Myungok	<i>S. cerevisiae</i>	—	+	+	—
8	Myungok	<i>S. cerevisiae</i>	—	—	+	—
9	Myungok	<i>S. cerevisiae</i>	—	+	+	—
10	Wheat Nuruk	<i>S. cerevisiae</i>	—	+	+	—

—, no growth; +, low-growth rate; ++, high-growth rate.

evisiae var. *boulardii*를 선발한 결과는 Table 1과 같다. 1차 선발된 10종의 효모 콜로니를 pH 2.0, 온도 37°C에서 배양한 후 콜로니 생성 여부를 확인한 결과 공병곡에서 분리된 *S. cerevisiae* 03번 균주만이 강한 내성을 보여 최종 probiotic 후보 균주로 선발하였다. Boulardii 효모의 pH 내성과 높은 온도에서의 생존율은 더 많은 균수가 생존 형태로 장에 도달할 수 있도록 하여 생리적으로 매우 중요한 요소이며, 이미 많은 연구에서 이러한 boulardii 특성이 보고된 바 있다(Edwards-Ingram 등, 2007; Fietto 등, 2004). Goktas 등(2021)은 pH 3.0 이하에서 *Saccharomyces* 속 효모의 생육이 크게 저하됨을 확인하여 boulardii 효모의 내산 특성을 시사하였으며, Graff 등(2008)은 pH 3.0을 boulardii 균주의 성장 임계값으로 제안하였다. 또한 pH 1.5~2.0에서는 boulardii 효모의 성장이 관찰되지 않았다고 보고하여, pH 2.0 부근의 낮은 pH에서의 생존 가능성은 특정 효모 균주의 우수성으로 중요할 수 있다고 시사하였다. 본 연구에서는 선발된 10종의 후보 효모 균주가 모두 pH 2.0에서 발효력을 보였으나 그 속도가 다소 느렸으며, No. 6, No. 8 두 균주는 다른 균주에 비교하여 발효력이 현저하게 떨어졌음을 알 수 있었다. 낮은 pH 스트레스에 노출되었던 10종의 균주는 그

후 37°C에서 재배양하여 활성을 시험하였으며, 그 결과 공병곡에서 분리한 *S. cerevisiae* 03 효모 균주만이 PDA agar에서 콜로니를 형성하였다. 따라서 낮은 pH, 높은 온도에서의 활성이 가장 우수한 *S. cerevisiae* 03 균주를 probiotic 효모로 선정하였으며, *S. cerevisiae* boulardii-03 (KFCC11826P)으로 명명하였다. 선발된 *S. cerevisiae* boulardii-03(Boulardii-03) 효모의 phylogenetic tree를 Fig. 1에 제시하였다. Boulardii 효모는 *S. cerevisiae*와 높은 유전적 상동성을 갖고 있음에도 불구하고 이전에는 boulardii 균주를 *Saccharomyces* 속의 별도 종으로 분류하였다. 그러나 그 후 두 균주의 draft genome sequence 분석 결과, 두 균주는 99% 이상의 게놈 정보를 공유하고 있으며 boulardii 균주는 계통도상 와인효모에 가까운 클러스터로 분류된다고 밝혔다(Khatri 등, 2017). 이와 같은 *S. cerevisiae*와의 높은 상동성 때문에 boulardii 효모는 분류학상 *S. cerevisiae*로 분류되고 있으나, probiotic 기능성이 두 균주 간의 차별화된 특성을 부여하고 있으므로 유산균과 같이 정장 기능이 뛰어난 *S. cerevisiae* 균주를 *S. cerevisiae* var. *boulardii*로 분류하고 probiotic 효모로 활용하고 있다.

Fig. 1. Phylogenetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* boulardii-03.

S. cerevisiae boulardii-03 효모의 장 염증 개선 효과

Boulardii-03 균주의 probiotic 활성 보유 여부를 확인하기 위해 DSS로 대장염을 유도한 C57BL/6 마우스 모델에서의 장 염증 개선 효능을 평가하였다. DSS 투여에 의하여 DAI 스코어는 투여 1일만에 0.76에서 6일 후에는 2.71까지 상승하였으며, 투여 6일째 정상 음수로 교체한 뒤 3일 후에도 스코어는 2.21 수준으로 장 염증 유도가 잘 되었음을 확인하였다(Fig. 2A). Boulardii-03 균주를 경구 투여한 그룹에서는 DSS 처리에도 1일차에는 DAI 스코어가 0.17에서 6일 후에는 2.55까지 상승하였으나, 정상 음수로 교체한 후에는 1.93으로 나타났다. 이러한 DAI 스코어의 전반적인 수준을 비교 분석하기 위하여 총 9일간의 DAI를 area under curve (AUC)로 계산하여 확인한 결과, Boulardii-03과 양성대조군인 Bi 처리군에서는 DSS 그룹 대비 AUC가 감소하는 유의적 경향을 확인하였으나, 음성대조군인 S288c 처리 그룹은 DSS만 처리한 그룹과 유의적 감소를 유도하지 못하였다(Fig. 2B). 이러한 결과는 DSS로 유도되는 대장 내의 염증이 효모 투여 자체에 의하여 완화된 것이 아닌, 비오플(Bi)과 Boulardii-03 효모 투여에 의해서만 나타나는 것임을 의미한다. 대장 내 염증 수준을 확인하기 위한 간접적인 지표로 대장의 길이와 무게를 측정하여 그 비율을 확인한 결과에서도 DSS 대비 Boulardii-03과 Bi를 경구 투여한 그룹에서

유의적인 감소를 보였다(Fig. 2C). 이러한 결과들은 Boulardii-03의 섭취가 DSS로 유도되는 장 염증을 감소시키고 그 효능이 의약품으로 처방되고 있는 Bi와 유사한 수준의 효능임을 의미한다.

S. cerevisiae boulardii-03 효모의 장내 생존율 분석

Boulardii-03 균주에 의하여 장 염증이 완화되는 probiotic 활성을 확인한 후, 실제 효모를 경구로 섭취 시에도 장까지 고농도로 생존할 수 있는지를 *in vivo*로 확인하기 위하여 마우스의 맹장 내용물의 RNA를 추출한 후 *Saccharomyces* 속을 특이적으로 검출할 수 있는 primer를 사용하여 qPCR을 통해 정량하였다. 그 결과, Boulardii-03 균주 및 Bi와 S288c를 투여한 그룹은 맹장 내의 yeast cell과 *Saccharomyces*의 생균수 농도가 투여하지 않은 Cont과 DSS 그룹 대비하여 유의적으로 상승하는 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 세 그룹 모두 투여한 균주 중 일부가 장 내에서 비슷한 수준의 생균 상태로 존재하였으며, 그럼에도 S288c와 달리 Boulardii-03과 Bi 투여 그룹에서는 장 염증을 억제하는 효능이 있음을 의미한다. 종합적으로 이러한 결과들은 Boulardii-03 균주가 경구투여 후에도 장 내에 살아있는 상태로 도달할 수 있으며, 이는 Boulardii-03 균주를 probiotic 효모로서 활용이 가능함을 시사한다.

Fig. 2. Effect of administration of yeast cells on DSS-induced colitis in mice. (A) Disease activity index (DAI) scores of the 5 groups (Cont, DSS, boulardii-03, Bi, and S288c group) for 9 days. (B) Area under curve (AUC) of DA. (C) The ratio of colon weight and length. Data are presented as mean±SE (n=8). ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ are compared to DSS according to one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test.

Fig. 3. Boulardii-03 administration increases the number of live yeast cells in the cecum. The abundance of total yeast cells (A) and total *Saccharomyces* cells (B) were measured in cecal contents of C57BL/6 mice treated with boulardii-03, Bi, S288c or vehicle (Cont and DSS). Data are mean±SE (n=8). ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ (compared with DSS) according to one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test.

Table 2. Brewing characteristics of Boulardii-03

Yeast	Characterization of Takju			
	°Brix	pH	Total acidity (%)	Alcohol (%)
Brewing yeast-1 (<i>S. cerevisiae</i>)	11.2±0.9	4.1±0 ^{ab}	0.5±0 ^b	16.8±0.4 ^{ab}
Brewing yeast-2 (<i>S. cerevisiae</i>)	10.4±0.3	4.0±0 ^{ab}	0.5±0 ^b	17.3±0.4 ^a
<i>S. cerevisiae</i> boulardii-03 (Boulardii-03)	10.6±0.2	4.1±0 ^{ab}	0.5±0 ^b	16.9±0.2 ^{ab}
<i>S. cerevisiae</i> boulardii (Bioflor [®])	10.3±0.4	4.0±0 ^{ab}	0.5±0 ^b	15.8±0.4 ^b
<i>S. cerevisiae</i> S288c (S288c)	10.5±0.4	4.0±0.1 ^b	0.6±0 ^a	16.1±0.8 ^{ab}

¹⁾All values are mean±SD (n=3).

²⁾Different letters (a,b) represent significant differences at $P<0.05$ Duncan's multiple range test.

S. cerevisiae boulardii-03 효모의 알코올 발효능 평가

Boulardii 효모는 37°C 부근 높은 온도와 낮은 pH에 내성을 가지며, 이러한 특성은 생균을 식후 섭취하여도 좀 더 많은 양의 균이 살아있는 상태로 장에 도달할 수 있는 가능성을 부여한다. 특히 효모는 구성성분의 약 1/4이 prebiotics로 잘 알려진 베타글루칸을 비롯하여 다양한 다당 성분으로 이루어져 있어 boulardii 효모 섭취 시 probiotic 기능과 함께 prebiotic 효과를 동시에 부여할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 발효식품의 종균으로서 boulardii 균주의 활용 가능성을 알아보기 위해 본 균주의 알코올 발효 특성을 분석하였다. 생균 섭취에 가장 효율적인 발효주인 탁주 제조에 *S. cerevisiae* boulardii-03 균주를 적용하여 양조효모와의 알코올 발효 특성을 분석한 결과, 양조 전용 효모와 매우 유사한 알코올 발효능 및 일반특성을 보이는 것으로 나타났다(Table 2). 따라서 본 효모 균주는 알코올 발효를 목적으로 하는 발효식품의 종균으로 사용하기에 매우 적합한 것으로 사료되며, 이를 이용한 건강 기능성이 부여된 발효식품 및 발효주의 종균으로서 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

요 약

본 연구는 전통누룩에서 *Saccharomyces cerevisiae* var.

boulardii-03 균주를 선발하고 이의 probiotic 기능성을 평가하여 발효식품 기능성 종균으로서의 활용 가능성을 시사하였다. 선발된 boulardii-03 효모는 galactose를 탄소원으로 이용하지 못하며 pH 2.0에서 생육이 가능하고, 37°C의 고온 환경에서 높은 발효능을 보이는 것으로 나타났다. *S. cerevisiae* var. boulardii-03 균주의 probiotic 기능성 분석 결과, 본 균주를 생균 형태로 경구 투여했을 때 DSS 처리로 유도된 대장염 증상에 개선 효과가 있었으며, 맹장 내 *S. cerevisiae* RNA 농도가 비교군 및 DSS 처리군에 비해 유의적으로 증가하여 boulardii-03은 높은 장내 생존율을 갖는 것으로 나타났다. 이러한 *S. cerevisiae* var. boulardii-03 균주는 특히 양조효모의 특성을 동시에 가져 probiotic 소재 및 건강 기능성이 부여된 탁주 등 다양한 발효식품 산업에서 종균으로서 널리 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부에서 추진하는 포스트게놈 다부처 유전체사업의 일환인 농림축산식품미생물유전체전략연구사업(Project No. 918007-4)의 지원으로 수행되었음.

REFERENCES

- Bal J, Yun SH, Choi MS, Yeo SH, Kim JM, Kim DH. Pyrosequencing reveals bacterial diversity in Korean traditional wheat-based *nuruk*. *J Microbiol*. 2015. 53:812-819.
- Bal J, Yun SH, Yeo SH, Kim JM, Kim DH. Metagenomic analysis of fungal diversity in Korean traditional wheat-based fermentation starter *nuruk*. *Food Microbiol*. 2016. 60:73-83.
- Consoli MLD, da Silva RS, Nicoli JR, Bruna-Romero O, da Silva RG, de Vasconcelos Generoso S, et al. Randomized clinical trial: impact of oral administration of *Saccharomyces boulardii* on gene expression of intestinal cytokines in patients undergoing colon resection. *J Parenter Enteral Nutr*. 2016. 40:1114-1121.
- Edwards-Ingram L, Gitsham P, Burton N, Warhurst G, Clarke I, Hoyle D, et al. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2007. 73:2458-2467.
- Everard A, Matamoros S, Geurts L, Delzenne NM, Cani PD. *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic *db/db* mice. *mBio*. 2014. 5:1-9.
- Fietto JLR, Araujo RS, Valadao FN, Fietto LG, Brandao RL, Neves MJ, et al. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can J Microbiol*. 2004. 50:615-621.
- Goktas H, Dertli E, Sagdic O. Comparison of functional characteristics of distinct *Saccharomyces boulardii* strains isolated from commercial food supplement. *LWT*. 2021. 136:110340. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110340>
- Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, et al. Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol*. 2007. 27:2215-2228.
- Graff S, Chaumeil JC, Boy P, Lai-Kuen R, Charrueau C. Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast. *J Gen Appl Microbiol*. 2008. 54:221-227.
- Khatri I, Akhtar A, Kaur K, Tomar R, Prasad GS, Ramya TNC, et al. Gleaning evolutionary insights from the genome sequence of a probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Gut Pathog*. 2013. 5:30. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-30>
- Khatri I, Tomar R, Ganesan K, Prasad GS, Subramanian S. Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Sci Rep*. 2017. 7:371. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00414-2>
- Lara-Hidalgo CE, Hernández-Sánchez H, Hernández-Rodríguez C, Dorantes-Álvarez, Lago HD. Yeasts in fermented foods and their probiotic potential. *Austin J Nutr Metab*. 2017. 4:1-9.
- Lazo-Velez MA, Serna-Saldivar SO, Rosales-Medina MF, Tinoco-Alvear M, Briones-Garcia M. Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review. *J Appl Microbiol*. 2018. 125:943-951.
- Lee JE, Lee AR, Kim HR, Lee E, Kim TW, Shin WC, et al. Restoration of traditional Korean nuruk and analysis of the brewing characteristic. *J Microbiol Biotechnol*. 2017. 27:896-908.
- Liu JJ, Zhang GC, Kong II, Yun EJ, Zheng JQ, Kweon DH, et al. A mutation in *PGM2* causing inefficient galactose metabolism in the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Appl Environ Microbiol*. 2018. 84:e02858-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02858-17>
- Mitterdorfer G, Kneifel W, Viernstein H. Utilization of prebiotic carbohydrates by yeasts of therapeutic relevance. *Lett Appl Microbiol*. 2001. 33:251-255.
- Pais P, Almeida V, Yilmaz M, Teixeira MC. *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic?. *J Fungi*. 2020. 6:78. <https://doi.org/10.3390/jof6020078>
- Sen S, Mansell TJ. Yeasts as probiotics: mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genet Biol*. 2020. 137:103333. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103333>
- Stier H, Bischoff S. Influence of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on the gut-associated immune system. *Clin Exp Gastroenterol*. 2016. 9:269-279.
- Villar-Garcia J, Guerri-Fernandez R, Moya A, Gonzalez A, Hernandez JJ, Lerma E, et al. Impact of probiotic *Saccharomyces boulardii* on the gut microbiome composition in HIV-treated patients: A double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *PLoS One*. 2017. 12:e0173802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173802>
- Zhou BG, Chen LX, Li B, Wan LY, Ai YW. *Saccharomyces boulardii* as an adjuvant therapy for *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis. *Helicobacter*. 2019. 24:e12651. <https://doi.org/10.1111/hel.12651>