

ARTICLE

김치에서 분리한 *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23의 다제내성 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균 및 항생물막 활성 평가

국 무 창* · 박 소 연

배화여자대학교 식품영양학과

Evaluation of the Antimicrobial and Anti-Biofilm Activities of *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23 isolated from Kimchi against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Moochang Kook*, So-Yeon Park

Department of Food & Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 03039, Korea

Received: December 15, 2025

Revised: December 19, 2025

Accepted: December 29, 2025

*Corresponding author :

Moochang Kook

Department of Food & Nutrition, Baewha

Women's University, 34, Pirundae-ro

1-gil, Jongno-gu, Seoul, 03039, Korea.

Tel : +82-2-399-0765

E-mail : bmse153@gmail.com

Copyright © 2026 Resources Science Research Institute, Kongju National University. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://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.

ORCID

Moochang Kook

<https://orcid.org/0000-0003-4098-8298>

So-Yeon Park

<https://orcid.org/0009-0003-9694-1410>

Abstract

In this study, *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23 isolated from kimchi was evaluated for its biochemical characteristics, safety, antioxidant activity, and antibacterial and antibiofilm effects against multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa*. The strain BMSE-K23 was identified by 16S rRNA gene sequencing, typical enzymatic activities and carbohydrate utilization profiles of *L. paracasei*. The strain BMSE-K23 showed no resistance to clinically important antibiotics based on international guidelines, confirming its safety as a probiotic candidate. The cell-free supernatant of strain BMSE-K23 demonstrated significant antioxidant activities in DPPH, ABTS, and SOD-like assays. Moreover, the strain BMSE-K23 exhibited inhibitory effects on the growth of MDR *P. aeruginosa* and suppressed biofilm formation by more than 90% in a concentration-dependent manner. These results indicate that *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23 is a promising food-derived probiotic strain with antioxidant properties and strong antibiofilm activity against MDR *P. aeruginosa*, suggesting its potential application as a complementary strategy to control biofilm-associated infections.

Keywords

Lacticaseibacillus paracasei subsp. *paracasei* BMSE-K23, Antibiofilm activity, Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

1. 서론

항생제의 과도한 사용과 오남용으로 인해 다제내성(multidrug-resistant, MDR) 세균의 출현이 가속화되고 있으며, 이는 전 세계 공중보건에 심각한 위협으로 인식되고 있다(Ventola, 2015; World Health Organization, 2014). 특히 *Pseudomonas aeruginosa*는 높은 내재적 항생제 내성과 적응 능력을 지닌 대표적인 기회감염균으로, 병원 환경에서의 만성 감염 및 치료 실패의 주요 원인으로 보고되고 있다(Lister et al., 2009; Moradali et al., 2017).

*P. aeruginosa*의 병원성은 표면 부착 후 형성되는 생물막(biofilm)과 밀접하게 연관되어 있으며, 생물막은 항생제 침투를 저해하고 숙주 면역 반응을 회피함으로써 세균의 생존과 지속 감염을 촉진한다(Costerton et al., 1999; Flemming et al., 2016). 실제로 생물막 상태의 *P. aeruginosa*는 부유 상태

(planktonic state)에 비해 항생제에 대해 최대 수백 배 이상의 내성을 나타내는 것으로 보고되었다(Mah and O'Toole, 2001). 이러한 한계를 극복하기 위한 대안으로, 유산균(lactic acid bacteria, LAB)을 포함한 식품 유래 미생물의 항균 및 항생물막 활성이 주목받고 있다(Cotter *et al.*, 2013; Lebeer *et al.*, 2008).

유산균은 유기산, 박테리옌, 과산화수소 및 다양한 저분자 대사산물을 생성하여 병원성 세균의 성장과 생물막 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Ouwehand and Vesterlund, 2004; Zacharof and Lovitt, 2012). 특히 *Lacticaseibacillus paracasei*는 장내 및 발효식품 유래 프로바이오틱 균주로서, 항균 활성, 면역 조절 효과, 그리고 병원성 세균의 생물막 억제 능력을 보유한 것으로 다수의 연구에서 보고되었다. 이와 관련하여 *Lactobacillus* 및 *Lacticaseibacillus* 속 균주들이 *P. aeruginosa*의 생물막 형성과 quorum sensing 시스템을 억제할 수 있음이 입증된 바 있다.

한편, 김치는 다양한 유산균의 천연 저장고로 알려져 있으며, 김치 유래 유산균은 내염성, 내산성 및 강한 항균 활성을 지닌 독특한 생리적 특성을 보유하고 있다(Jung *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2014). 최근 연구에서는 김치 유래 유산균이 식중독균 및 병원성 그람 음성균에 대해 항균 및 항생물막 활성을 나타낼 수 있음을 보고하며, 기능성 미생물 자원으로서의 활용 가능성이 제시되고 있다. 그러나 현재까지 김치에서 분리한 *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*의 다제내성 *P. aeruginosa*에 대한 항균 및 항생물막 활성을 체계적으로 평가한 연구는 제한적인 실정이다(Moradi *et al.*, 2020).

따라서 본 연구에서는 김치 유래 *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23의 다제내성 *P. aeruginosa*에 대한 항균 및 항생물막 억제 효과를 규명하고, 이를 통해 천연 유래 미생물을 활용한 새로운 생물막 제어 전략의 가능성을 제시하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 사용 균주

연구에 사용된 *Pseudomonas aeruginosa* CCARM 0223, *Pseudomonas aeruginosa* CCARM 0224 균주는 항생제내성균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, CCARM)에서 분양 받아 사용하였다.

2. 시료 준비

분리 균주를 배양한 배양액을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취해 0.2 µm membrane filter(Hyundai micro Co.)로 여과하여 회전증발농축기를 이용하여 3배 농축한 후 0.1M NaOH로 pH를 7.0으로 조정된 것을 시료로 사용하였다.

3. 김치 유래 유산균의 분리 및 동정

김치 시료를 Lactobacilli MRS broth(Difco Co., Sparks, MD, USA) 5 mL에 10% (v/v)로 접종한 후 30°C에서 24시간 종균 배양하였다. 이후 MRS broth 5 mL에 10% (v/v)로 재 접종한 후 30°C에서 24시간 본 배양하였다. 배양 후 유산균 감별 배지인 Bromo Cresol Purple(BCP) plate count agar(EIKEN chemical, Tokyo, Japan)에 평판 도말한 후 30°C에서 48시간 배양하였고, 산을 생성하여 노란색 환을 형성한 colony를 취해 순수 분리하였다. 분리한 균주의 생화학적 특성을 확인하기 위해 API ZYM kit와 API 50 CHL kit(BioMérieux, Craponne, France)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 효소 활성 및 탄수화물 발효 여부를 검토하였으며, 이후 16S rRNA 염기 서열을 분석하여 최종 동정하였다(BIOFACT Co., Daejeon, Korea). 염기서열 분석을 위해 사용한 primer는 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 및 1492R (5'-TACGGTACCTTGTTACGACTT-3')이며, 분석한

염기서열은 EZBioCloud website(www.ezbiocloud.net)의 16S database tool을 기반으로 표준 균주의 염기서열과 비교하여 분리 균주를 동정하였다. 계통수(phylogenetic tree)는 MEGA11 프로그램의 neighbor-joining 방법을 사용하여 작성하였다.

4. 항생제 내성 평가

분리 균주의 항생제 내성 특성을 파악하기 위해 유럽식품안전청(EFSA)의 가이드라인에 따라, E-test strip(Kisan Bio Co., Seoul, Korea)을 사용하여 MIC 값을 판독하였다. 이후 측정된 MIC 값은 EFSA 가이드라인의 cut-off value와 비교하였다.

5. DPPH Radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Gang 등(2021)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 양성대조군으로는 0.5% ascorbic acid를 사용하였으며, 100% 에탄올을 사용하여 0.2 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) solution (OD₅₂₀=1)을 조제하였다. DPPH solution 180 µL와 시료 및 양성대조군을 각각 20 µL씩 혼합하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 분광 광도계(BioTek, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였고, 다음의 계산식을 통해 DPPH radical 소거능을 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{control}})] \times 100$$

6. ABTS Radical 소거능 측정

ABTS radical 소거능은 7 mM ABTS와 5 mM potassium persulfate를 혼합하고 실온에서 차광하여 16시간 동안 반응시킨 후 ABTS⁺ radical을 형성시켰으며, 실험에 사용할 ABTS solution은 100% 에탄올을 이용하여 734 nm에서 흡광도가 0.7이 되도록 조정하여 사용하였다. 양성대조군으로는 0.5% ascorbic acid를 사용하였으며 ABTS solution 100 µL와 시료 및 양성대조군을 각각 100 µL씩 혼합하여 37°C 암실에서 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였고, 다음의 계산식을 통해 ABTS radical 소거능을 계산하였다(Shahidi and Zhong, 2015).

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{control}})] \times 100$$

7. Superoxide Dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund 와 Marklund (1974)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 양성대조군으로는 0.5% ascorbic acid를 사용하였으며 0.5 M Tris-HCl과 멸균수를 혼합하여 buffer를 조제한 후 buffer 130 µL, 시료 10 µL 및 7.2 mM Pyrogallol (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) solution 10 µL를 혼합하여 암실에서 10분간 반응시키고 1 M HCl 50 µL를 넣어 반응을 종결시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음의 계산식을 통해 SOD 유사활성을 계산하였다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = [1 - (\text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{control}})] \times 100$$

8. 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 및 최소살균농도(Minimum Bactericidal Concentration, MBC) 확인

Wiegand 등(2008)의 broth dilution method를 이용하여 실험을 진행하였다. 다제내성 *P. aeruginosa*는 Tryptic Soy broth (TSB, Difco Co., Sparks, MD, USA) 5 mL에 2% (v/v)로 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 멸균수를 사용하여 균수를 10⁵ CFU/mL로 조정하여 실험에 사용하였다. 96-well

microplate(cell culture plate, SPL life sciences Co., Ltd, Korea)에 TSB broth와 시료를 각각 125 μ L씩 첨가하여 2-fold serial dilution한 후 균수를 조정된 다제내성 균액을 50 μ L 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 이후 배양액을 TSB agar plate에 희석도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 집락 생성 여부를 확인하였다. 집락 생성이 저해되는 농도를 최소저해농도(MIC), 집락 생성이 확인되지 않는 농도를 최소살균농도(MBC)로 설정하였다.

9. Congo Red 지시약을 활용한 생물막 정성 분석

생물막 형성 억제 효과를 확인하기 전 다제내성 *P. aeruginosa*의 생물막 형성 여부를 확인하기 위하여 Congo red 지시약을 사용하여 실험을 수행하였다. Microtube에 Congo red 지시약을 첨가한 2% glucose TSB broth 1 mL에 균주 배양액 200 μ L를 접종하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다(Cho *et al.*, 2022).

10. 생물막 형성 억제 효과

다제내성 *P. aeruginosa*가 생성하는 생물막에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 Drumond 등(2023)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 다제내성 *P. aeruginosa*를 멸균수를 사용하여 균수를 10^5 CFU/mL로 조정된 균액을 실험에 사용하였다. 96-well microplate에 2% glucose를 첨가한 TSB broth와 시료를 각각 125 μ L씩 첨가하여 2-fold serial dilution한 후 50 μ L의 균액을 접종하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 각 well을 멸균수로 3회 세척하여 건조하였으며, 0.1% crystal violet (Sigma-Aldrich Inc, Seoul, Korea) solution을 첨가하여 30분간 염색하고 멸균수로 3회 세척한 후 건조하였다. 건조된 well에 33% acetic acid를 첨가하여 염색된 생물막을 용해시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11. 통계분석

본 실험에서 얻은 결과 값의 통계학적 분석은 Graphpad Prism 8(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 평균(mean) 및 표준편차(standard deviation, SD)로 표기하였다. 또한 두 그룹 간의 통계적 차이는 Student's *t* test를 사용하여 평가하였으며 $p < 0.05$ 수준에서 통계적 유의성을 판단하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 김치 유래 유산균의 동정 및 생화학적 특성 분석

본 실험에서 분리한 균주 BMSE-K23의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *L. paracasei* subsp. *paracasei*^T와 99.79%의 유사성을 나타내어 BMSE-K23 균주를 *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23으로 명명하였다(Fig. 1). BMSE-K23은 API ZYM 분석에서 phosphatase, esterase, arylamidase 및 glucosidase 계열 효소 활성을 나타내었다(Table 1). BMSE-K23에서 alkaline phosphatase 및 acid phosphatase 활성이 동시에 관찰된 점은 인산 화합물 대사와 관련된 효소 시스템이 활성화되어 있음을 시사하며, 이는 유산균의 생존력 및 환경 적응성과 연관된 특성으로 보고된 바 있다. 또한 esterase 및 esterase, lipase 활성이 검출된 결과는 유산균이 지질 성분을 포함한 다양한 기질을 부분적으로 분해할 수 있음을 의미하며, 이는 발효 식품 및 장내 환경에서의 기능성 유지와 관련되어 논의되고 있다(Chen *et al.*, 2021). BMSE-K23에서 β -glucuronidase 활성이 검출되지 않은 점은 프로바이오틱 후보 균주 평가에서 안전성 측면에서 긍정적인 지표로 간주되며, 다수의 유산균 선별 연구에서도 동일한 기준이 적용되고 있다(Gueimonde *et al.*, 2004; Montegudo-Mera *et al.*, 2019). API 50 CHL 분석 결과(Table 2), BMSE-K23은 glucose,

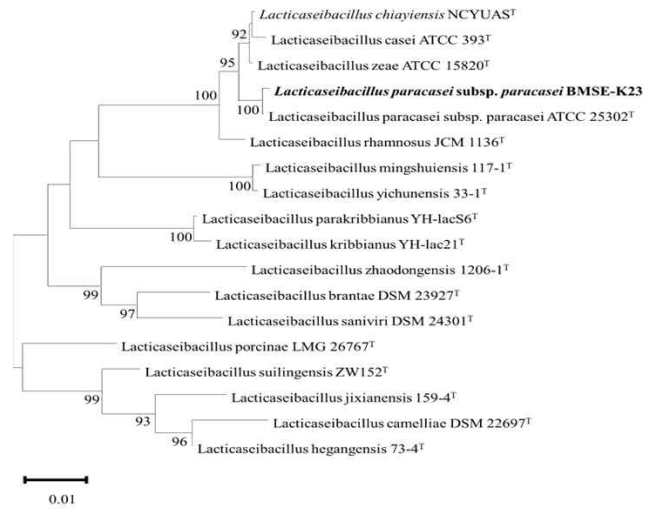


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree of BMSE-K23. Bootstrap values (expressed as a percentage of 1,000 replications) >65% are shown at the branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

Table 1. Enzyme activity of BMSE-K23 using API ZYM kit

Enzymes	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BMSE-K23
Alkaline phosphatase	+ ¹⁾
Esterase (C4)	w ²⁾
Esterase lipase (C8)	+
Lipase (C14)	+
Leucine arylamidase	- ³⁾
Valine arylamidase	+
Crystine arylamidase	+
Trypsin	w
α -Chymotrypsin	-
Acid phosphatase	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+
α -Galactosidase	-
β -Glucuronidase	-
β -Glucosidase	-
α -Glucosidase	+
β -Glucosidase	+
N-Acetyl- β -glucosaminidase	-
α -Mannosidase	-
α -Fucosidase	-

¹⁾ +; positive, ²⁾ -; negative, ³⁾ w; weak positive.

Table 2. Carbohydrate utilization activity of BMSE-K23 using API 50 CHL kit

Substrate	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BMSE-K23	Substrate	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BMSE-K23	Substrate	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BMSE-K23
Glycerol	- ¹⁾	Mannitol	+	Melezitose	+
Erythritol	-	Sorbitol	-	Raffinose	-
D-Arabinose	-	α -Methyl-D-mannoside	-	Starch	-
L-Arabinose	+ ²⁾	α -Methyl-D-glucoside	-	Glycogen	-
D-Ribose	-	N-Acetyl-glucosamine	+	Xylitol	-
D-Xylose	-	Amygdalin	-	Gentiobiose	-
L-Xylose	-	Arbutin	-	D-Turanose	+
D-Adonitol	-	Esculin	+	D-Lyxose	-
Methyl- β -xylopyranosicle	+	Salicin	+	D-Tagatose	+
D-Galactose	+	Cellobiose	+	D-Fucose	-
D-Glucose	+	Maltose	-	L-Fucose	-
D-Fructose	+	Lactose	+	D-Arabitol	-
D-Mannose	-	Melibiose	-	L-Arabitol	-
L-Sorbose	-	Sucrose	+	Gluconate	w ³⁾
Rhamnose	-	Trehalose	+	2-Keto-gluconate	-
Dulcitol	-	Inulin	+	5-Keto-gluconate	-
Inositol	-				

¹⁾ -; negative, ²⁾ +; positive, ³⁾ w; weak positive.

fructose, galactose, lactose, sucrose 및 trehalose를 포함한 다양한 탄수화물을 이용할 수 있었으며, 이는 *L. paracasei*가 당 이용성 측면에서 높은 대사 유연성을 갖는 종임을 보여주는 선행 보고들과 부합한다 (Hammes and Hertel, 2009). 특히 inulin 및 N-acetyl-glucosamine 이용성은 프리바이오틱 기질 존재 하에서 균주의 증식과 대사 활성 유지에 기여할 수 있는 특성으로 해석되며, 이러한 기질 이용성은 프로바이오틱 기능성 평가에서 중요한 요소로 제시되어 왔다. 반면 ribose, mannose 및 일부 이당류를 이용하지 못한 결과는 *L. paracasei* 종 내에서도 균주 간 탄수화물 대사 경로에 차이가 존재함을 시사하며, 이러한 표현형적 다양성은 식품 유래 유산균에서 빈번하게 보고된다(Zheng *et al.*, 2020). 종합적으로 BMSE-K23의 효소 활성 및 탄수화물 이용성 프로파일은 발효식품 유래 *L. paracasei* 균주의 전형적인 대사적 특성을 반영하면서도 일부 균주 특이적 특성을 함께 나타내어, 기능성 미생물 자원으로서의 활용 가능성을 뒷받침한다.

2. 항생제 내성 확인

유산균의 항생제 내성 평가는 프로바이오틱스의 인체 적용 안전성과 내성 유전자 전이 위험을 배제하기 위해 필수적인데, *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23은 ampicillin, erythromycin, clindamycin 및 tetracycline에 대해 MIC 값이 모두 국제 가이드라인에서 제시한 cut-off 기준 이하로 나타나 항생제 내성이 없음(Table 3, Fig. 2)을 확인할 수 있었다(FAO/WHO, 2002; EFSA, 2012). 유산균 항생제 내성 평가에서 임상적으로 중요한 macrolide 및 lincosamide 계열에 대한

Table 3. Antibiotic susceptibility values for *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23 obtained by MIC test

Antibiotics ¹⁾	AMP	GEN	ERY	CLI	TET
MIC cut-off value (mg/mL)	4	32	1	1	4
Detection value (mg/mL)	2	32	0.75	0.5	1.5

¹⁾ AMP; ampicillin, GEN; gentamicin, ERY; erythromycin, CLI; clindamycin, TET; tetracycline.

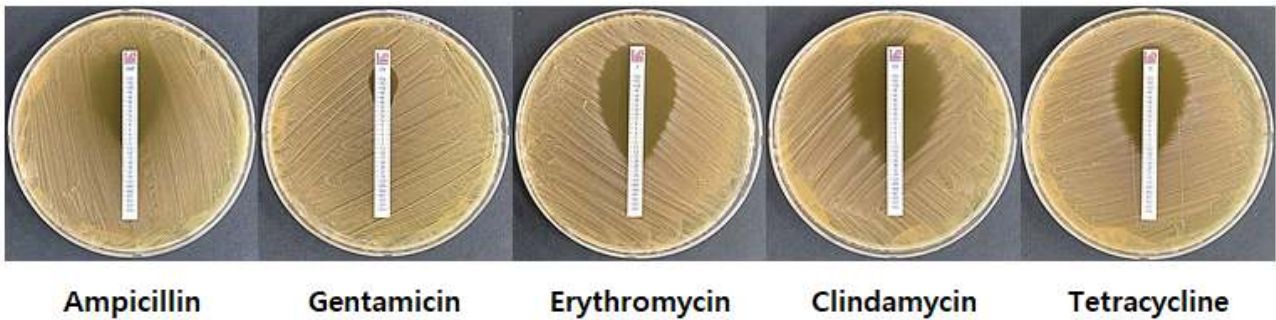


Fig. 2. Comparison of MIC test of *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23 using various antibiotic.

감수성은 특히 중요하게 고려되는데, BMSE-K23은 erythromycin과 clindamycin에 대해 낮은 MIC 값을 나타내어 전이 가능한 내성 유전자를 보유하지 않을 가능성이 높다고 판단된다(EFSA, 2012; Sanders *et al.*, 2010). 또한 gentamicin에 대한 높은 MIC 값은 *Lactobacillus* 및 *Lactocaseibacillus* 속에서 공통적으로 보고되는 내재적(intrinsic) 특성으로, 항생제 내성 획득이나 수평적 유전자 전이와는 무관한 현상으로 해석된다(Danielsen and Wind, 2003; Sanders *et al.*, 2010).

따라서 유산균의 항생제 내성 평가는 안전성 검증의 핵심 요소이며, BMSE-K23은 내재적 특성을 제외하고 임상적으로 중요한 항생제에 대해 내성을 나타내지 않아 안전한 프로바이오틱스 후보 균주로 간주될 수 있다(FAO/WHO, 2002; EFSA, 2012).

3. 항산화 활성 평가

유산균의 항산화 활성 평가는 활성산소종 제거를 통한 기능성 잠재력을 평가하는 핵심 지표인데, *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23의 배양 상등액은 DPPH radical 소거능 분석에서 76.07%의 소거 효과를 보여 잘 알려진 항산화제인 ascorbic acid(93.15%)와 비교하여도 유의미한 radical 제거 활성을 나타내었다(Fig. 3). ABTS radical 소거능 분석에서 BMSE-K23은 84.55%의 높은 소거 활성을 보여 양성대조군인 0.5% ascorbic acid(94.3%)에 근접한 수준을 나타내었다(Fig. 4). DPPH 및 ABTS 분석에서 관찰된 항산화 활성은 세포 외로 분비된 펩타이드, 유기산 및 환원성 저분자 대사산물에 의해 매개될 수 있으며, 이러한 메커니즘은 발효식품 유래 유산균을 대상으로 한 다수의 선행 연구에서도 보고된 바 있다(Xing *et al.*, 2015).

SOD 유사 활성 평가에서 BMSE-K23의 배양 상등액은 40.05%의 활성을 나타내어 0.5% ascorbic acid(89.22%) 대비 다소 낮은 수준이었으나(Fig. 5), 이는 미생물 유래 항산화 효과가 효소 활성보다는 초과산화물 음이온 제거 능력을 갖는 대사산물에 의해 부분적으로 발현될 수 있음을 반영하는 결과로 해석될 수 있다(Liu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020). 유산균 유래 SOD 유사 활성은 숙주 내 산화 스트레스 완화에 간접적으로 기여할 수 있는 특성으로 평가되며, 특히 다른 radical 소거능과

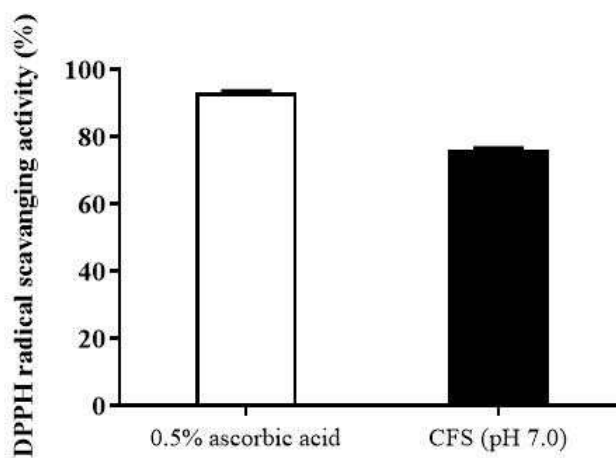


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23.

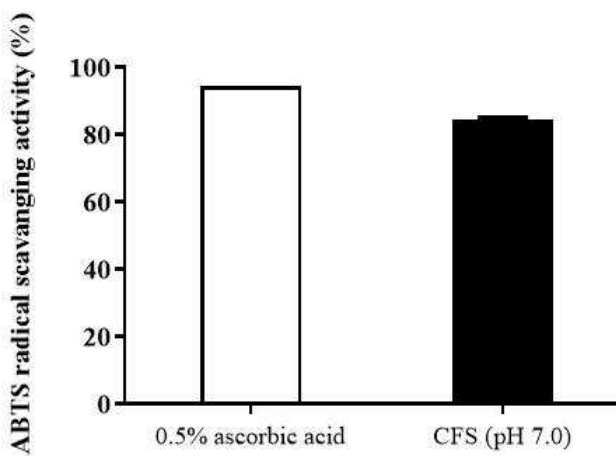


Fig. 4. ABTS radical scavenging activity of *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23.

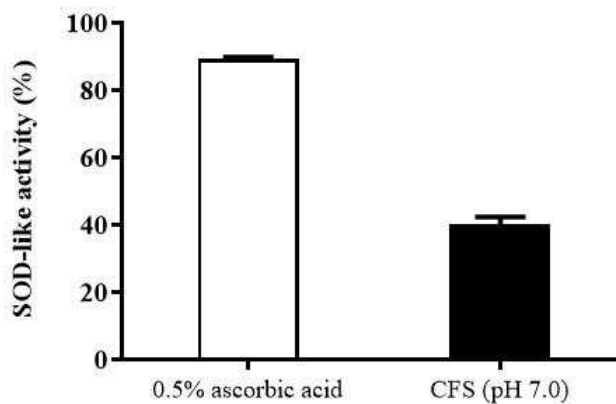


Fig. 5. SOD-like activity of *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23.

병행될 경우 항산화 방어 체계 전반에 대한 기여 가능성이 강조되고 있다(Xing *et al.*, 2015). 본 연구에서 관찰된 BMSE-K23 유래 물질의 항산화 활성은 독립적인 기능적 특성에 그치지보다, 다제내성 *P. aeruginosa*의 생물막 형성 및 병원성 발현을 제어하려는 본 연구의 주요 목적과 연계하여 해석될 수 있다. 산화 스트레스(reactive oxygen species, ROS) 및 미생물의 redox 환경은 생물막의 발달·유지 및 항스트레스 적응과 관련된 주요 요인으로 보고되며, quorum sensing(QS) 역시 산화 스트레스와 상호작용하면서 생물막 형성 및 병원성 관련 표현형에 영향을 미칠 수 있다(García-Contreras *et al.*, 2015). 또한 최근 연구에서는 항산화제(N-acetylcysteine 등)가 *P. aeruginosa* 생물막 환경에서의 항생제 반응 또는 내성 관련 현상에 영향을 줄 수 있음이 보고된 바 있어, 본 연구의 항산화 결과는 BMSE-K23 유래 물질이 비항생제 기반의 다기능적 제어 전략으로 활용될 가능성을 보조적으로 뒷받침하는 근거로 제시될 수 있다(Higazy *et al.*, 2024).

4. MIC 및 MBC 농도 확인

다제내성 *P. aeruginosa*는 기존 항생제 치료 실패 사례가 빈번하여 대체 항균 전략의 필요성이 지속적으로 제기되고 있는데, *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23은 다제내성 *P. aeruginosa* CCARM 0223 및 CCARM 0224 균주에 대해 각각 ≥ 15.42 mg/mL 및 ≥ 7.71 mg/mL의 MIC 값을 나타내어 유산균 유래 물질이 해당 병원균의 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 유산균의 항균 활성은 유기산에 의한 pH 저하, 막 투과성 증가, 저분자 항균 대사산물 생성 등 복합적인 기전에 의해 발현되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 기전은 그람음성균인 *P. aeruginosa*에 대해서도 성장 억제 효과를 나타낼 수 있음이 보고되고 있다(Alakomi *et al.*, 2000). 특히 CCARM 0224 균주에서 15.42 mg/mL의 MBC 값이 확인된 반면, CCARM 0223에서는 MBC가 관찰되지 않은 점은 병원균의 특성에 따라 상이한 항균 반응을 유도할 수 있음을 나타낸다. 본 연구에서 확인된 MIC 및 MBC 값은 mg/mL 수준으로, 일반적인 저분자 항생제의 MIC 범위($\mu\text{g/mL}$)와 직접 비교하기에는 한계가 있다. 이는 연구에 사용한 시료가 단일 정제 화합물이 아닌, 유산균 배양 상등액 유래의 복합 대사산물 혼합물이라는 점에 기인하며 기존 연구들에서도 유산균 유래 항균 물질의 MIC 값은 mg/mL 범위로 보고되는 경우가 많다. 따라서 이러한 결과로 볼 때, BMSE-K23은 다제내성 *P. aeruginosa*에 대해 의미 있는 성장 억제 효과와 부분적인 살균 효과를 나타내어, 유산균 유래 물질을 활용한 비항생제 기반 항균 전략의 가능성을 뒷받침하는 결과로 해석될 수 있다(Table 4). BMSE-K23 유래 물질은 다제내성 *P. aeruginosa* 균주에 대해 의미 있는 성장 억제 효과를 나타내어, 유산균 유래 항균 물질이 기존 항생제 내성 문제를 보완할 수 있는 잠재적 대안이 될 수 있음을 시사하였다. 그러나 본 항균 활성은 제한된 수의 균주를 대상으로 한 *in vitro* 실험 결과에 기반하고 있으며, 균주에 따라 살균 효과(MBC)가 일관되게 관찰되지 않았다는 점에서, 해당 물질의 항균 작용이 보편적인 살균 효과보다는 균 성장 억제에 더 크게 기여할 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 본 결과는 BMSE-K23이 단독 항균제로 즉각적인 임상 적용이 가능함을 의미하기보다는, 균 증식 억제 또는 기존 치료 전략을 보조하는 비항생제 기반 접근법으로서의 가능성을 제시하는 기초 자료로 해석되어야 한다.

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23 against multidrug-resistant *P. aeruginosa*

BMSE-K23	Multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i>	
	<i>P. aeruginosa</i> CCARM 0223	<i>P. aeruginosa</i> CCARM 0224
MIC (mg/mL)	≥ 15.42	≥ 7.71
MBC (mg/mL)	-	15.42

5. Congo Red Broth를 통한 생물막 형성 평가

Congo red 지시약을 이용한 생물막 분석은 생물막의 주요 구성 성분인 세포 외 고분자 물질 (extracellular polymeric substances, EPS)과 염료 간의 결합 특성을 기반으로 생물막 형성 경향을 정성적으로 평가하는 방법이다. Congo red는 β -결합을 가진 다당류 및 아밀로이드성 단백질 구조와 친화성을 가지는 음이온성 염료로, 생물막을 형성한 세균이 생산하는 exopolysaccharides, amyloid-like fibers 및 단백질 성분 등에 결합함으로써 색 침착 양상의 변화를 유도한다. 일반적으로 생물막 형성이 상대적으로 많은 경우 Congo red에 의해 더 진한 적색 또는 흑색 침착이 관찰되는 것으로 보고되고 있다. 이러한 원리에 따라 Congo red 배지를 이용한 정성적 분석을 수행한 결과, 배지만 포함된 무처리 대조군과 비교하였을 때 다제내성 *P. aeruginosa* CCARM 0223 및 CCARM 0224 균주를 접종한 조건에서 상대적으로 강한 색 침착 경향이 관찰되었다(Fig. 6). 또한 CCARM 0224 균주는 CCARM 0223에 비해 더 진한 색 변화 양상을 보여 균주 간 생물막 형성 능력에 차이가 존재할 가능성을 시사하였다. 다만, 본 분석은 정성적 평가 방법에 해당하므로, 해당 결과는 생물막 형성 정도를 정량적으로 비교하기보다는 형성 경향을 참고적으로 제시하는 수준에서 해석하는 것이 적절하다.

6. 생물막 형성 억제능 확인

다제내성 *P. aeruginosa*의 생물막 형성은 항생제 치료 실패의 주요 원인으로 알려져 있는데, *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23의 배양 상등액(CFS)은 CCARM 0223 균주에서 15.42 및 7.71 mg/mL 처리 시 무처리 대조군 대비 생물막 형성을 90% 이상의 유의한 항생물막 억제 효과를 나타내었다(Fig. 7A). CCARM 0224 균주에서도 BMSE-K23의 CFS는 모든 처리 농도에서 무처리 대조군 대비 유의적인 생물막 억제 효과를 보였다(Fig. 7B). Drumond 등(2023)은 약 5~20 mg/mL 범위의 배양 상등액을 처리하였을 때 *P. aeruginosa*의 생물막 형성이 유의적으로 감소함을 보고하였으며, 본 연구의 결과 경향성과 비슷한 것을 확인하였다.

유산균 유래 항생물막 활성은 병원균의 quorum sensing 교란, 세포 외 다당류 합성 저해 및 표면 부착 억제 등 복합적인 기전에 의해 발현되는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서 관찰된 농도 의존적

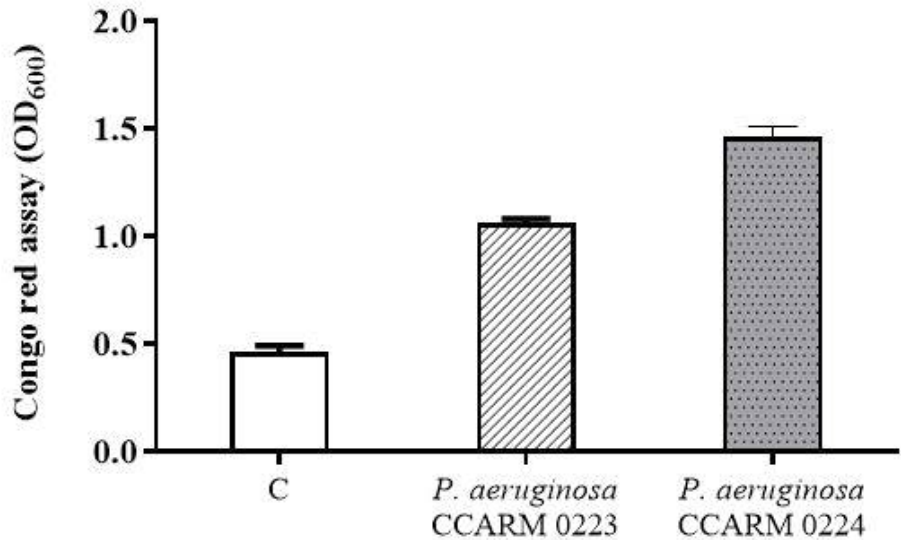
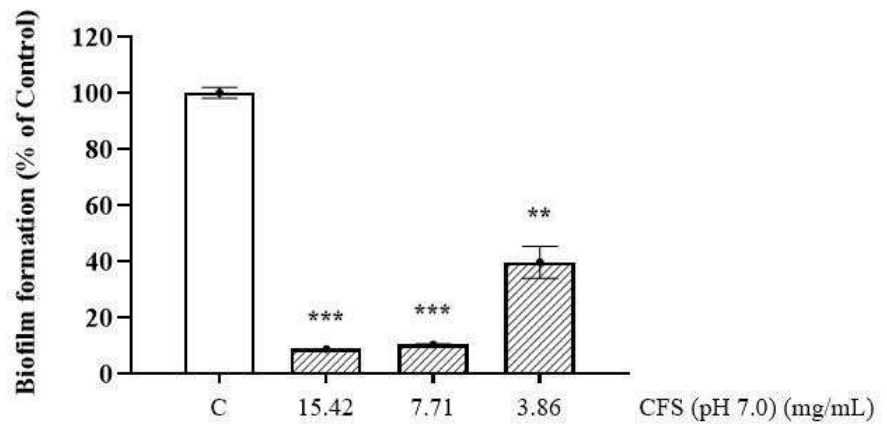


Fig. 6. Bacterial biofilm formation in Congo red broth. C; untreated control (2% glucose TSB broth).

(A)



(B)

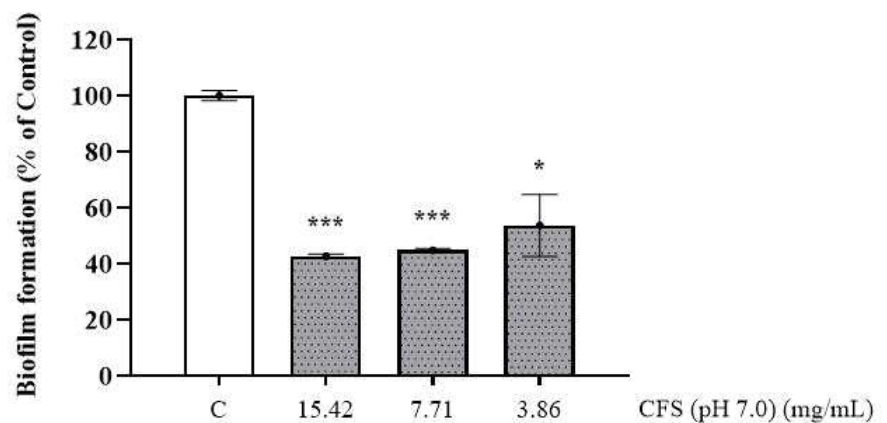


Fig. 7. Inhibitory activity of *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23 against multidrug-resistant *P. aeruginosa* biofilm formation. (A) *P. aeruginosa* CCARM 0223, (B) *P. aeruginosa* CCARM 0224. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test; *** $p < 0.001$ vs. the untreated control.

억제 양상은 이러한 다중 작용 기전의 가능성을 뒷받침한다. BMSE-K23의 배양 상등액은 다제내성 *P. aeruginosa* 균주에서 농도 의존적인 생물막 형성 억제 효과를 나타내어, 생물막 형성이 항생제 치료 실패의 주요 원인으로 작용하는 병원균 제어에 있어 의미 있는 접근 가능성을 제시한다. 특히 비교적 낮은 농도(3.86 mg/mL)에서도 유의한 생물막 억제 효과가 관찰된 점은 예방적 또는 보조적 활용 측면에서 긍정적인 시사점을 제공한다. 다만 본 연구에서 평가된 항생물막 활성은 초기 생물막 형성 단계에 초점을 맞춘 것으로, 이미 형성된 성숙 생물막에 대한 제거 효과까지를 포함하여 일반화 하기에는 한계가 있다. 또한 본 연구는 단일 균종 조건에서 수행되었으므로, 실제 감염 환경에서 관찰 되는 다균종 생물막 또는 숙주 요인의 영향을 반영하지 못한다는 제한점이 존재한다. 따라서 BMSE-K23의 항생물막 효과는 감염 치료보다는 생물막 형성 억제 또는 재형성 방지를 위한 보조적 전략으로 해석하는 것이 타당하며, 향후 성숙 생물막 모델 및 복합 미생물 환경에서의 추가 연구가 요구된다.

IV. 요약

본 연구에서는 김치에서 분리한 *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23의 생화학적 특성, 안전성, 항산화 활성 및 다제내성 *P. aeruginosa*에 대한 항균 및 항생물막 활성을 종합적으로 평가하였다. BMSE-K23은 16S rRNA 유전자 분석을 통해 *L. paracasei* subsp. *paracasei*로 동정되었으며 API ZYM 및 API 50 CHL 분석 결과 발효식품 유래 *L. paracasei* 균주의 전형적인 효소 활성 및 탄수화물 이용성 프로파일을 나타내어 기능성 미생물로서의 생리적 적합성을 확인하였다. 또한 BMSE-K23은 국제 가이드라인 기준에서 임상적으로 중요한 항생제에 대해 내성을 나타내지 않아 안전성이 확인되었으며, 항산화 활성 평가에서 BMSE-K23의 배양 상등액은 DPPH, ABTS 및 SOD 유사 활성 분석 전반에서 효과적인 항산화 효과를 보여, ascorbic acid와 비교하였을 때에도 생물학적으로 의미 있는 항산화 기능을 보유함을 확인하였다. 특히 BMSE-K23은 다제내성 *P. aeruginosa*에 대해 유의한 성장 억제 효과와 부분적인 살균 효과를 나타내었으며, 해당 다제내성 균주가 만들어내는 생물막을 농도 의존적으로 최대 90% 이상 억제할 수 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 *L. paracasei* subsp. *paracasei* BMSE-K23 균주가 항산화 기능성과 더불어 다제내성 *P. aeruginosa*에 대한 항균 및 항생물막 활성을 동시에 보유한 유망한 식품 유래 생물막 형성 억제 균주임을 시사하며, 특히 병원 환경에서 문제시되는 *P. aeruginosa*의 생물막 형성을 제어함으로써 항생제 내성으로 인한 치료 한계를 보완할 수 있는 보조적 생물학적 제어 전략 또는 예방적 적용 소재로 활용될 가능성을 제시한다.

V. 감사의 글

이 논문은 2025년도 배화여자대학교 학술연구비를 지원 받아 수행된 연구임.

VI. 참고문헌

- Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 66:2001-2005.
- Cho JA, Roh YJ, Son HR, Kim YS, Lee SH, Kim JH, Park YK. 2022. Assessment of the biofilm-forming ability on solid surfaces of periprosthetic infection-associated pathogens. *Sci Rep* 12:18669.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
- Cotter PD, Ross RP, Hill C. 2013. Bacteriocins: A viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* 11:95-105.
- Danielsen M, Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* 82:1-11.
- Drumond MM, Tapia-Costa AP, Neumann E, Nunes AC, Barbosa JW, Kassuha DE, Mancha-Agresti P. 2023. Cell-free supernatant of probiotic bacteria exerted antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*: A novel biotic therapy. *Front Pharmacol* 14:1152588.
- EFSA Panel on additives and products or substances used in animal feed. 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* 10:2740.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working

- Group Report. London, Ontario, Canada.
9. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14:563-575.
 10. Gang Y, Eom TY, Marasinghe SD, Lee Y, Jo E, Oh C. 2021. Optimising the DPPH assay for cell-free marine microorganism supernatants. *Mar Drugs* 19:256.
 11. García-Contreras R, Nuñez-López L, Jasso-Chávez R, Kwan BW, Belmont JA, Rangel-Vega A, Wood TK. 2015. Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating. *ISME J* 9:115-125.
 12. Gueimonde M, Noriega L, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S. 2004. Ability of *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol* 101:341-346.
 13. Hammes WP, Hertel C. 2009. Genus *Lactobacillus*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 3. p. 465-510. Springer, New York.
 14. Higazy D, Ahmed MN, Ciofu O. 2024. The impact of antioxidant-ciprofloxacin combinations on the evolution of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *npj Biofilms Microbiomes* 10:156.
 15. Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae JW, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO. 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl Environ Microbiol* 77:2264-2274.
 16. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:728-764.
 17. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22:582-610.
 18. Liu Y, Tang H, Lin Z, Xu P. 2015. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnol Adv* 33:1484-1492.
 19. Mah TF, O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9:34-39.
 20. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469-474.
 21. Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. 2019. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:6463-6472.
 22. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7:39.
 23. Moradi M, Kousheh SA, Almasi H, Alizadeh A, Guimarães JT, Yilmaz N, Lotfi A. 2020. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18:1020-1045.
 24. Ouwehand AC, Vesterlund S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Food Sci Technol* 139:375-396.
 25. Park KY, Jeong JK, Lee YE, Daily JW. 2014. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J Med Food* 17:6-20.
 26. Sanders ME, Akkermans LMA, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, Huys

- G, Levy DD, Lutgendorff F, Mack D, Phothirath P, Solano-Aguilar G, Vaughan E. 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 1:164-185.
27. Shahidi F, Zhong Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* 18:757-781.
 28. Ventola CL. 2015. The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. *PT* 40:277-283.
 29. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3:163-175.
 30. World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance.
 31. Xing J, Wang G, Zhang Q, Liu X, Gu Z, Zhang H, Chen YQ, Chen W. 2015. Determining antioxidant activities of lactobacilli cell-free supernatants by cellular antioxidant assay: A comparison with traditional methods. *PLoS One* 19:10(3):e0119058.
 32. Zacharof MP, Lovitt RW. 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia* 2:50-56.
 33. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 70:2782-2858.