

대장균 억제 유산균의 Superoxide Dismutase 활성

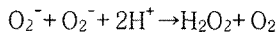
함준상 · 정석근 · 채현석 · 김현수 · 정다와 · 노영배* · 강대경¹ · 김현욱²

축산연구소 축산물이용과

¹ (주)이지바이오시스템, ² 서울대학교 동물자원과학과

서 론

Superoxide dismutase는 잠재적인 산소의 독성에 대항하는 필수적 방어기작과 관련하여 널리 알려지고 있으며, 이 효소는 다음과 같은 반응을 촉매하여 과산화수소를 생성한다.



함 등(2003)은 agar-well diffusion method를 이용하여 배양액의 중화액이 살모넬라와 대장균 같은 그람 음성 유해균을 억제하는 유산균을 선발하였는 바, 선발된 균주의 배양액에서 다량의 과산화수소가 검출되었다.

본 실험에서는 그람 음성 세균을 억제하는 유산균의 superoxide dismutase 활성을 비교하였으며, activity staining을 통해 분자량을 확인하였다.

재료 및 방법

미생물

대장균과 살모넬라에 억제효과를 나타낸 CSII2-2, CSII12-1와, *L. plantarum* ATCC 49445, ATCC 27588, *L. casei* KCTC 3109, *L. delbruekii* ATCC 11977가 사용되었으며, MRS broth에 배양하였다.

효소 활성 측정

MRS broth에 배양한 미생물은 원심분리로 회수하여 동량의 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 세척후 30mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 분산하고 sonication으로 cell을 파쇄후 원심분리(10,000g, 20분)하여 상등액을 효소 활성 측정에 이용하였다. 단백질 함량은 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 측정하였다. Superoxide dismutase 활성은 RANSOD kit(RANDOX Laboratories Ltd. UK)를 이용하였다.

Activity staining

Beauchamp와 Fridovich(1971)의 방법을 변형하여 수행하였다. SDS를 첨가하지 않은

polyacrylamide gel(7% stacking, 12% running)을 2반복으로 loading하여 100V에서 run 하였다. 한 장의 gel은 coomassie blue R-250으로 염색하여 7% acetic acid로 탈색하였다. 다른 한 장의 gel은 2.45mM nitro blue tetrazolium 용액에 20분간 침지후 36mM potassium phosphate(pH 7.8) 용액(28mM tetramethylenediamine, 0.028mM riboflavin 함유)에 15분간 침지후 꺼내어 변색될 때까지 광을 조사하였다.

결과 및 고찰

선발된 균주 CSII2-2와 CSII12-1은 그람음성 세균을 억제하는 특성을 나타내었으며(함 등, 2003), 그 원인 물질은 과산화수소로 생각되고 있다. 대사과정에서 과산화수소 생성에는 NADH oxidase(Niel et al, 2002), pyruvate oxidase(Risse et al, 1992) 등 다양한 oxidase와 superoxide dismutase(Beauchamp and Fridovich, 1971)가 관련되어 있다. 배양된 균주를 파쇄하여 단백질을 분석한 결과 0.45mg/mL부터 3.91mg/mL로 나타났으며, 이들의 superoxide dismutase 활성은 0.03U/mg protein부터 4.80U/mg protein으로 나타났다. 일반적인 유산균의 SOD 활성이 1이하로 보고되는 것에 비해 선발된 균주 CSII2-2는 SOD 활성이 대단히 높게 나타났으며, 이는 activity staining에서도 확인할 수 있다.

배양후 중화액의 agar-well diffusion method에 의해 선발된 그람 음성균 억제 유산균의 억제효과는 과산화수소가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 유산균의 항미생물질로 고려되는 산, 과산화수소, 박테리오신 중에서 박테리오신은 세포벽의 차이로 그람 음성균에는 작용하지 못한다는 점(Abee et al, 1995), 선발된 균주들(CSII2-2 및 CSII12-1)의 배양 후 중화액에서 억제(Ham et al. 2003) 효과가 나타나는 점, 그리고 배양액에서 높은 과산화수소 함량으로 미루어 대사과정에서 생성되는 과산화수소가 그람음성균 억제에 효과적으로 작용할 수 있다고 생각되며, 이중 CSII2-2의 과산화수소 생산에 superoxide dismutase가 상당부분 기여함을 알 수 있다. CSII2-2의 16S rDNA 염기서열은 *Enterococcus* spp.와 일치하나 당이용성 면에서는 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*와 대단히 높은 상동성(99.5%)을 나타내었다. Caridi(2002)는 225종의 유산균에서 *E. coli*를 억제하는 것은 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 뿐이었으며 그 억제효과는 bacteriocin-like

Table 1. Protein concentration and SOD activity of the lactic acid bacteria

	Protein concentration (mg/ml)	SOD activity (U/mg protein)
2. CSII2-2	0.45	4.80
3. CSII12-1	1.88	0.03
4. <i>L. plantarum</i> ATCC 49445	1.51	0.57
5. <i>L. casei</i> KCTC 3109	2.26	0.11
6. <i>L. delbrueckii</i> ATCC 11977	3.14	0.07
7. <i>L. bulgaricus</i> ATCC 27588	3.91	0.03

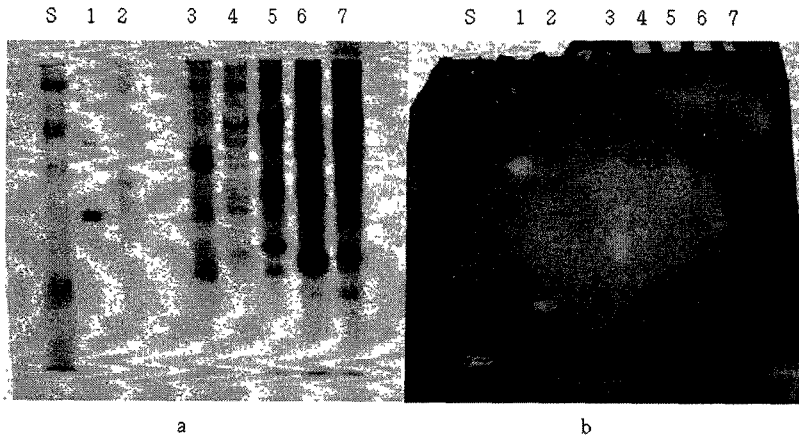


Fig. 1. Cell bound protein of the lactic acid bacteria(a) and their superoxide dismutase activity staining(b).

S : Protein standard(BIO-RAD, Kaleicoscope Prestained)

1 : Superoxide dismutase 20 μ l of 5U/mL

compounds라고 보고한 바 있다.

요 약

본 연구는 자돈 설사의 원인이 되는 대장균, 살모넬라 등 그람음성균을 억제할 수 있는 유산균의 이용을 위해 선발된 균주의 과산화수소 대사를 구명하기 위해 수행하였다. 대장균 억제유산균중 superoxide dismutase 활성이 우수한 균주가 관찰되었으며, 과산화수소 이외에 그람음성균 억제에 유효한 bacteriocin-like compounds의 존재 유무, 대사과정에서 과산화수소 생성과 관련된 다른 효소 활성, superoxide dismutase 유전자 클로닝에 관한 연구가 진행중이다.

참 고 문 헌

1. Abee, T., Krockel, L., and Hill, C. (1995) *Inter. J. Food Microbiol.* 28:169-185.
2. Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) *Anal. Biochem.* 44:276-287.
3. Caridi, A. (2002) *J. Indust. Microbio. & Biotech.* 29:303-308.
4. Ham, J. S. et al. (2003) *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16(10):1550-1554.
5. Niel, Ed W.J. et al. (2002) *Appl. Environ. Microbiology.* 68(9):4350-4356.
6. Risse, B. et al. (1992) *Protein Sci.* 1:1699-1709.