

Lactobacillus casei subsp. 및 *Streptococcus faecium*이 생산한 항균성물질의 성상

강 경 구·마 점 술
서울대학교 수의과대학
(1993년 5월 12일 접수)

Characteristics of the antibacterial substances produced by *Lactobacillus casei* subsp. and *Streptococcus faecium*

Kyoung-koo Kang, Jum-sool Mah
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received May 12, 1993)

Abstract : Antibacterial substances produced by *Lactobacillus casei* subsp. and *Streptococcus faecium* were examined for its antibacterial effects against some pathogenic bacteria. They were partially purified with ammonium sulfate precipitation, methanol-acetone extraction, G-50 gel filtration and examined its characteristics.

When *L. casei* subsp. and *Str. faecium* were cultivated in MRS broth, stationary phase of *L. casei* is until 24 hours and *Str. faecium* is 20 hours. pH change of the cultured medium was both decreased after 12 hours and then constant at pH 4.5~4.6 after 28 hours.

MRS broth culture fluids of *L. casei* subsp. and *Str. faecium* appeared the antibacterial effects by the spot-on-the-lawn method against ETEC, *Sal. pullorum* and *Sta. aureus*. Culture filtrates of *L. casei* subsp. and *Str. faecium* also appeared the antibacterial effects by the disc diffusion method.

Culture filtrates of *L. casei* subsp. *rhamnosus* 7469 produced 0.032M of lactic acid and 0.01M of acetic acid. *Str. faecium* 27273 also produced 0.027M of lactic acid and 0.01M of acetic acid. Protein concentrations of culture filtrates produced by *L. casei* subsp. *rhamnosus* 7469 and *Str. faecium* 27273 was 495 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 594 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

Antibacterial substances which are partially purified by ammonium sulfate precipitation, methanol-acetone extraction and G-50 gel filtration inhibit the growth of ETEC, *Sal. pullorum* and *Sta. aureus*.

Characteristics of purified antibacterial substances was examined. Its molecular weight was about 31 Kd, stabilized at 100°C/20 min. and some of proteolytic enzyme treatment.

Key words : *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium*, culture filtrates, antibacterial effect, spot on the lawn, disc diffusion.

서 론

*Lactobacillus casei*는 lactic acid bacteria(LAB ; *Lactoba-*

cillus, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*)에 속하며 Orl-a-Jensen이 1904년 치즈로부터 분리한 세균으로 사람 및 동물의 구강과 소화관의 상재균이며, *Streptococcus fa-*

rium도 LAB에 속하는 세균으로 Orla-Jensen이 1919년 분변으로부터 처음 분리하였으며 사람 및 동물의 소화관내 상재균으로 흔하게 존재한다.¹

LAB는 Metchnikoff가 처음으로 유해한 장내미생물에 대한 예방과 치료에 활용^{2,3} 이래 많은 연구자들이 LAB로부터 생산되는 항균성물질에 관하여 보고⁴⁻⁶ 하였으며, *Lactobacillus casei* 및 *Streptococcus faecium*이 생산한 항균성물질은 병원균의 감염 예방목적으로 많이 이용되었다.⁷

LAB가 생산하는 물질의 항균효과는 organic acid, hydrogen peroxide, diacetyl, bacteriocin, bacteriocin-like substance 등의 여러 항균성물질에 의한 것으로 알려졌다.^{5,10}

Deklerk 등⁹은 *L. fermenti*가 생산한 배양액중의 bacteriocin을 정제하고 그 성상을 밝혔다. *L. helveticus*^{10,11}, *L. bulgaricus*¹², *L. acidophilus*^{8,13}, *L. plantarum*^{14,15}, *L. reuteri*¹⁶, *P. acidilactici*¹⁷, *P. pentosaceus* 등 LAB가 산생하는 항균성물질에 관한 보고는 많다.

Kramer 등¹⁹은 *Str. faecium*이 생산하는 항균성물질을 정제하였으며, Harasawa 등²⁰은 ammonium sulfate 침전법으로 정제한 항균성물질의 성상을 밝혔다. Kramer 등¹⁹은 *Str. faecium* E1이 생산하는 bacteriocin을 물리화학적 성상에 따라 분자량 약 10 Kd인 trypsin에 예민한 물질과 분자량 약 100 Kd인 trypsin에 저항하는 물질의 두가지로 구분하였으며, Harasawa 등²⁰은 분자량 약 50 Kd의 trypsin에 예민한 항균성물질을 정제하였다.

Reid 등²¹은 *L. casei*가 생산하는 항균성물질은 균주에 따라 생산성과 성상이 다양하다고 하였다. *L. casei* GR-1이 생산하는 항균성물질은 병원성 *E. coli*의 발육억제력이 있는 단백질성물질로서 분자량이 12~14Kd 이상으로 chloroform에 안정하고 열처리에 의해 항균성은 소실된다^{22,23}고 하였다. Kato 등²⁴은 *L. casei*의 생체내에서의 항균작용을 보고하였으며, 이와같은 성질을 이용하여 *Sal typhimurium*과 ETEC^{3,25}, *Mycobacterium*²⁶, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*^{27,28} 그리고 기타 기회감염성병원균^{26,29,30} 등의 감염에 대하여 이용가치가 있음을 보고 하였다.

본 실험에서는 *Lactobacillus casei* subsp. 및 *Streptococcus faecium*이 생산하는 항균성물질의 성상을 규명하기 위하여 항균성물질의 생산여부, 생산된 항균성물질의 병원성세균에 대한 항균성을 실험하고 항균성물질을 ammonium sulfate 침전법 및 methanol-acetone 추출법으로 정제하여 항균성 및 성상을 조하였다.

재료 및 방법

사용균주 : 본 실험에 사용된 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 7469, *Lactobacillus casei* ATCC 393 및 *Lactobacillus casei* ATCC 4646은 한국야쿠르트연구소로부터, *Streptococcus faecium* ATCC 27270 및 *Streptococcus faecium* ATCC 27273은 유전공학연구소로부터 분양받았다. 항균물질감수성시험에 사용한 enterotoxigenic, *E. coli* (ETEC, 0157 : K88.), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella pullorum* (TA 3000) 등은 서울대학교 수의과대학 미생물학교실에서 보관중인 것을 사용한다.

세균배지 및 배양 : *Lactobacillus casei* subsp. 및 *Streptococcus faecium*은 MRS broth에 접종하여 37°C에서 24~48시간 배양한 후 균수를 측정하여 사용하였으며 항균물질 감수성시험에 사용한 세균들은 BHI broth에 16~18시간 배양하여 사용하였다. MRS agar(MRS broth, agar 2%)는 spot-on-the-lawn method에, BYE agar(BHI broth, yeast extract 2%, agar 1.5%)는 disc diffusion method에 이용하였다.

세균의 증식성 및 배지의 pH 변화 : *Lactobacillus casei* subsp. 및 *Streptococcus faecium*을 MRS broth에 접종하여 37°C에서 48시간 배양하면서 4시간 마다 시료를 채취하여 생균수를 plate counting 방법으로 조사하는 동시에 세균증식에 따른 배지의 pH 변화를 검사하였다.

항균성 검사 Spot-on-the-lawn method : spot-on-the-lawn method는 Lewus 등³²의 방법에 준하여 실시하였다. MRS agar에 *Lactobacillus casei* subsp. 및 *Streptococcus faecium* 배양균액을 10 μ l 씩 적하하여 37°C에서 16~24시간 배양한 다음, 감수성시험 대상세균을 함유한 agar 8ml를 overlay하였다. 감수성시험 대상세균은 미리 BHI broth에서 16~18시간 배양한 후 PBS로 세균수 10⁷/ml로 조절하여 45~50°C의 BHI agar 7ml에 잘 혼합하고 최종균수 10⁵~10⁶/ml로 조절하여 overlay 하였다. agar를 overlay한 petri-dish는 37°C의 호기상태에서 24시간 배양한 다음 감수성시험 대상세균의 발육억제대의 크기를 측정하여 발육억제 정도를 판정하였다.

overlay한 petri-dish의 배양조건을 혐기성으로 하여 발육억제력에 미치는 영향을 보았으며, 발육억제대의 크기를 시간대별로 측정하였다.

대조로서 pH 저하로 인한 감수성시험 대상세균의 증식억제상태를 관찰하기 위하여 lactobacillus 및 streptococcus가 최고발육상태에 이르렀을 때의 배지 pH 4.6과 같은 조건으로 MRS 배지만을 pH 4.6으로 하여 위에서와 같은 방법으로 발육억제상태를 검사하였다.

Disc diffusion method : disc diffusion method는 McGoarty 등²²의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 감수성시험 대상세균을 BHI broth에서 16~18시간 배양하여 세

균수를 $10^5 \sim 10^6 / \text{ml}$ 로 조절한 다음, BYE agar에 streaking 하였다. *Lactobacillus casei* subsp. 및 *Streptococcus faecium* 배양액을 pore size $0.45 \mu\text{m}$ 의 여과지로 여과한 다음, 여과액 $10 \mu\text{l}$ 씩을 흡수시킨 항균성물질을 함유하는 disc(filter paper, pore size : $1.2 \mu\text{m}$, 직경 : 6mm)를 감수성 시험 대상세균을 streaking 한 agar에 밀착하여 실온에서 1~2시간 정치한 후 37°C 에서 18시간 배양하여 disc 주위에 형성된 발육억제대의 크기를 측정하여 발육억제정도를 판정하였다.

배양액의 단백질량 측정 및 유기산 검출 : 배양액에 함유한 단백질량 측정은 Lowry method로 하였으며 측정시 BSA(bovine serum albumin)를 기준으로 삼았다. 세균의 glucose 이용으로 인한 배양액중의 organic acid를 검출하기 위하여 HPLC 하였다⁸. 즉, 배양액을 pore size $0.25 \mu\text{m}$ 의 여과지로 여과한 여과액 $10 \mu\text{l}$ 씩을 Aminex HPX-87H column($300 \times 7.8\text{mm}$)에 주입하여 $0.6 \mu\text{l}/\text{min}$ 의 유출속도로 HPLC하였다. 이때 mobile phase는 0.005N sulfuric acid로 하였으며, 이것을 UV detector(210nm)로 검출하였다. standard solution은 0.01N sulfuric acid에 lactic acid 0.047M , acetic acid 0.048M 로 하였다.

항균성물질의 분리 및 정제 : 항균성물질 분리재료는 Barefoot 등³³의 방법에 준하여 처리하였다. 즉, *Lactobacillus casei* subsp. 및 *Streptococcus faecium* 배양액을 $3,000\text{-rpm}$ 에서 30분간 원심분리하여 세균을 제거하고 상청액을 취하여 3N NaOH로 pH 6.0으로 맞춘 다음, $0.45 \mu\text{m}$ filter paper로 여과하여 -20°C 에 보관하고 항균성물질 분리용 재료로 하였다.

Ammonium sulfate precipitation : *L. casei* subsp. 및 *Str. faecium* 중에서 ETEC에 대하여 가장 뚜렷한 발육억제력이 있는 항균성물질 생산균주를 선택하여 ammonium sulfate precipitation법으로 항균성물질을 정제하였다. 즉, *L. casei sub. rhamnosus* 7469 및 *Str. faecium* 27273 배양 여과액 200ml 에 ammonium sulfate를 소량씩 첨가하여 80% 농도(w/v)로한 다음, 4°C 에서 12시간 정치후 $14,000\text{rpm}$ (8000g)으로 15분간 원심분리하였다. 침전물을 취하여 Tris/HCl buffer(0.01M Tris/HCl pH 8.0) 10ml 로 부유액을 만들고 PBS(pH 7.0)로 24시간 투석(cut-off- 12Kd 이하) 하여 ammonium sulfate를 제거한 다음, disc diffusion method로 발육억제시험을 하였다.

Solvent extraction : *L. casei sub. rhamnosus* 7469 및 *Str. faecium* 27273을 MRS broth에 48시간 배양한 균액 50ml 를 동결건조한 다음, $4 \sim 10^\circ\text{C}$ 로 냉각한 methanol 50ml 를 가하여 유리병으로 저어서 완전히 용해되도록 하였다. 이것을 $12,000\text{rpm}$ 으로 10분간 원심분리하여 상청을 모

았다. 침전물은 같은 방법으로 두번 반복하여 methanol로 추출하여 상청액 150ml 를 모았으며, 침전물은 버렸다. 수집한 150ml 의 methanol 추출물은 $40^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 의 로타리증발기에 넣어 감압 농축하였다. 더 이상 증발이 일어나지 않는 황갈색 추출물에 증류수를 가하여 15ml 가 되도록 하고 여기에 $4 \sim 10^\circ\text{C}$ 로 냉각한 acetone 50ml 를 첨가하여 30분간 정치한 다음, $15,000\text{rpm}$ 으로 15분간 원심분리하여 상청액을 모았다. 침전물은 acetone으로 반복 추출하여 상청액 150ml 를 모았으며 침전물은 버렸다. 수집한 150ml 의 methanol-acetone(M-A)추출물은 Whatman paper로 여과하여 $40^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 의 로타리증발기로 methanol-acetone이 완전히 증발할 때까지 감압 농축하였다. 이와같이 처리한 methanol-acetone 추출물은 소량의 증류수를 가하여 disc diffusion method에 의한 발육억제시험에 사용하였다.

L. casei sub. rhamnosus 7469 및 *Str. faecium* 27273 배양 여과액 25ml 에 chloroform 및 propanol 25ml 씩을 가하여 잘 혼합한 다음, solvent와 water soluble phase로 완전히 분리될 때까지 실온에 방치하였다. 분리된 solvent 부분을 조심스레 뽑아내어 이것을 disc diffusion method에 의한 발육억제시험에 사용하였다.

Gel filtration : gel filtration은 Joerger 등¹¹의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, *Str. faecium* 27273 배양 여과액의 M-A 추출물 및 *L. casei sub. rhamnosus* 7469 배양 여과액의 ammonium sulfate 침전물 2.5ml 및 2ml 를 Sephadex G-50(Sigma Co.) column($25\text{cm} \times 2.5\text{cm}$, bed volume 160ml)에 넣어 sodium acetate buffer(0.1M , pH 5.3)로 증수압을 이용하여 $0.8\text{ml}/\text{min}$ 의 유출속도로 실시하여 5ml 씩 35개의 분획을 얻었다. 각 분획은 280nm 에서 흡광도를 측정하였으며, 분획별로 얻은 gel 여액은 동결 건조하여 disc diffusion method로 발육억제시험을 하였다.

정제항균성물질의 성상검사 : HPLC는 Talarico 등¹⁶의 방법에 준하였다. 즉, gel filtration한 각 분획중 항균성이 있는 분획을 모두 혼합한 것 10ml 씩을 C18 column($300 \times 7.8\text{mm}$)에 주입하여 $0.8\text{ml}/\text{min}$ 의 유출속도로 HPLC하였다. mobile phase는 acetonitrile 65%와 증류수 35%로 혼합하여 사용하였으며, UV detector로 280nm 에서 검출하였다.

L. casei sub. rhamnosus 7469 및 *Str. faecium* 27273 배양 여과액을 gel filtration한 각 분획중 항균성이 있는 분획을 모두 혼합한 것을 Laemmli³⁴방법에 준하여 SDS-PAGE하였다. 즉, stacking gel 12.5% 및 separating gel 10%로 30mA 에서 6시간 전기영동하였다. gel의 두께는 0.75-mm , molecular marker(Bio-Rad, USA)는 low range를 사

용하였다.

항균성물질의 온도에 대한 영향을 관찰하기 위하여 gel filtration한 각 분획중 항균성이 있는 분획을 모두 합한 것을 100°C에서 5, 10, 15, 20분간씩 처리한 다음, disc diffusion method로 발육억제시험을 하였다.

효소에 대한 항균성물질의 영향을 관찰하기 위하여 gel filtration한 각 분획중 항균성 분획을 모두 합한 것을 lysozyme, trypsin, pepsin, lipase로 처리한 다음, 항균성시험을 하였다. 각 효소는 potassium phosphate buffer (5mM, pH 7.0)로 용해하고, gel filtrate에 최종효소농도 500 µg/ml로 하여, 37°C에서 30분에서 2시간 30분간까지 30분 간격으로 처리한 다음, 95°C 수조에서 5분간 처리하여 효소작용을 정지시켰다. 이와같이 처리한 것을 disc diffusion method로 발육억제시험을 실시하였다.

결 과

세균의 증식 : *L. casei* subsp. 및 *Str. faecium*을 MRS broth 200ml에 $10^8 \sim 10^9$ /ml개의 세균부유액 2ml를 접종하고 37°C에서 48시간 배양하면서 4시간 마다 배양액을 채취하여 생균수와 세균발육에 따른 배지의 pH 변화를 측정하여 세균의 증식성을 조사하였다(Fig 1). *L. casei*는 접종 후 8시간부터 세균수가 급격히 증가하기 시작하여 24시간까지 대수증식기였고, 36시간까지 정지기를 유지하다가 세균수는 감소하였다(Fig 1). *Str. faecium*은 접종 후 16시간까지는 대수증식기를, 20시간 이후부터는 세균수가 가장 많은 상태의 정지기에 도달하였으며 40시간 이후부터 세균수는 감소하였다(Fig 1).

세균증식에 따른 배지의 pH 변화는 두 세균 모두 8시간 이후부터 급격히 낮아지기 시작하여 28시간 이후에는 초기의 pH 7.0으로부터 pH 4.5~4.6으로 낮아졌으나 그 후부터는 큰 변동없이 그대로 유지하였다(Fig 1).

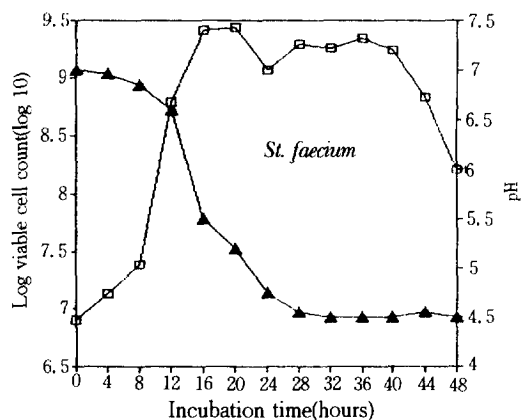
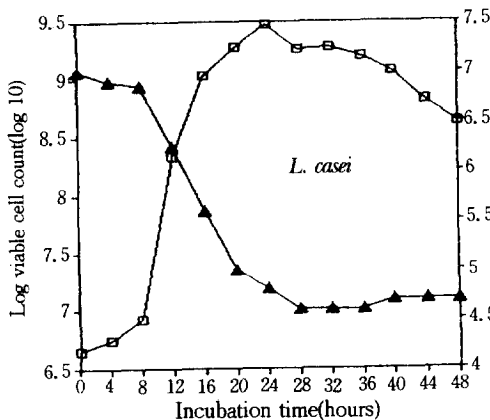


Fig 1. Growth curve and pH changes in MRS broth culture(□—□ : growth curve, ▲—▲ : pH at 37°C).

항균성물질의 세균에 대한 감수성

1) Spot-on-the-lawn method에 의한 항균성 : *L. casei* subsp. 및 *Str. faecium*에 의하여 생산된 항균성물질의 감수성 대상세균에 대한 발육억제성을 조사하기 위하여 이들 세균을 MRS broth에 24~48시간 배양하여 세균수 $10^8 \sim 10^9$ /ml로 증식하였을 때의 배양액으로 spot-on-the-lawn method에 의하여 세균발육억제 여부를 조사하였다.

Table 1. Susceptibility of antibacterial substances tested by the spot-on-the-lawn method

Antibacterial substances produced by	Antibacterial activity to		
	ETEC	<i>Sal pullorum</i>	<i>Sta aureus</i>
<i>L. casei</i> 393	++	++	++
<i>L. casei</i> 4646	++	+	+
<i>L. casei</i> sub. <i>rhamnosus</i> 7469	+++	+++	+++
<i>Str. faecium</i> 27270	++	+	++
<i>Str. faecium</i> 27273	+++	+++	+++
MRS broth(pH 4.6)	-	--	-

Note : + : <3mm ++ : 3-5mm +++ : >5mm

Lactobacillus casei sub. *rhamnosus* 7469 및 *Str. faecium* 27273의 배양액은 ETEC, *Sal pullorum* 및 *Sta aureus*에 대하여 5mm 이상의 발육억제대를 나타내어 이들 세균에 대한 강한 항균성이 있음을 알 수 있었다(Table 1, Fig 2). 다른 종류의 *L. casei* subsp. 및 *Str. faecium* 27270의 배양액도 5mm이하의 발육억제대를 나타냄으로써 항균성물질이 있음을 알 수 있었다. 감수성시험에서 배양 조건을 혐기성 및 호기성상태로 각기 달리하여도 발육억제대의 크기는 큰 차이가 없었다.

Str. faecium 27273에 의한 ETEC의 발육억제대의 크기를 시간대별로 조사한 결과 ETEC에 대한 발육억제성은 배양 후 6시간부터 나타나기 시작하여 22시간에 최

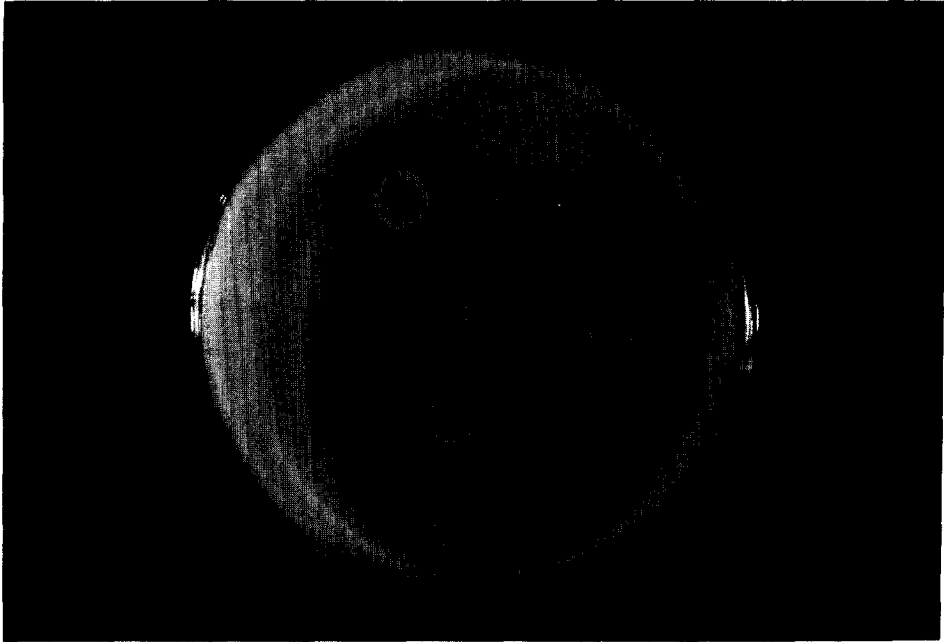


Fig 2. Inhibition of ETEC by *L. casei sub. rhamnosus* 7469 culture fluid tested by spot-on-the-lawn method.

고에 이르렀고, 그 후부터는 변동이 없었다.

대조로서 MRS broth를 lactic acid로 pH 4.6으로 조절하여 같은 방법으로 감수성시험을 한 결과, 감수성대상세균에 대하여 발육억제성은 나타나지 않았다. 그러므로 *L. casei* subsp. 및 *Str. faecium*의 증식으로 인한 배지의 pH 저하가 발육억제 원인이 아님을 알 수 있었다.

2) Disc diffusion method에 의한 항균성: *L. casei* subsp. 및 *Str. faecium*의 24~48시간 배양액을 0.45 μ m filter paper로 여과한 것으로 disc diffusion method에 의하여 감수성시험을 실시하였으며 배양여과상청액을 단계 2진 희석하여 동일방법으로 ETEC, *Sal pullorum* 및 *Str. aureus*에 대하여 발육억제시험을 하였다.

ETEC에 대하여는 4배 희석까지 *Sal pullorum* 및 *Sta aureus*에 대하여는 8배 희석까지 발육억제대가 나타났다. 감수성 대상세균의 발육억제대의 크기는 3mm이하로서 좁게 나타났으며, *L. casei* 4646 및 *L. casei sub. rhamnosus* 7469의 배양상청여과액은 *Sal pullorum*에 대한 항균성을 관찰할 수 없었다(Table 2).

배양액의 단백질: 배양 상청여과액에 존재하는 단백질인 bacteriocin이 항균성에 미치는 영향을 고려하여 배양 상청여과액에 존재하는 단백질량을 Lowry method로 정량하였다. 즉, *L. casei* subsp. 및 *Str. faecium*을 MRS broth에 24~48시간 배양한 후 세균수 $10^8 \sim 10^9$ /ml로 세균

Table 2. Antibacterial activity of filtrates of bacterial culture fluids tested by disc diffusion method

Antibacterial substances produced by	Antibacterial activity to		
	ETEC	<i>Sal pullorum</i>	<i>Sta aureus</i>
<i>L. casei</i> 393	+	+	+
<i>L. casei</i> 4646	+	-	+
<i>L. casei sub. rhamnosus</i> 7469	+	-	+
<i>Str. faecium</i> 27270	+	+	+
<i>Str. faecium</i> 27273	+	+	+

Note: + : <3mm

이 증식하였을 때 pore size 0.45 μ m의 filter paper로 여과한 것의 단백질 농도를 측정된 결과 각 균주중에서 가장 높은 것은 *Str. faecium* 27273이 594 μ g/ml, *L. casei sub. rhamnosus* 7469가 495 μ g/ml으로 ETEC에 대한 발육억제대가 큰 균주에서 단백질농도도 높게 나타났다. *Str. faecium* species 배양 여과액은 *L. casei* subsp. 배양 여과액보다 전반적으로 높게 나타났다(Table 3).

배양액의 유기산: 세균증식으로 배양액중에 생성된 유기산이 항균성에 미치는 영향을 고려하여 세균증식시 glucose분해로 생산된 organic acid를 HPLC로 검출하였다. 그 결과 *L. casei sub. rhamnosus* 7469 배양 여과액에는 lactic acid 0.032M, acetic acid 0.01M이었으며, *Str. faecium* 27273 배양 여과액에는 lactic acid 0.027M, acet-

Table 3. Protein concentrations of the culture filtrates of *L. casei* subsp. and *Str. faecium*

Bacteria cultured	<i>L. casei</i> 393	<i>L. casei</i> 4646	<i>L. casei</i> 7469	<i>Str. faecium</i> 27270	<i>Str. faecium</i> 27273	Control MRS medium
O.D.	0.11	0.30	0.3	0.335	0.35	0.05
Protein ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	217	594	594	663	693	99

ic acid 0.01M이었다. 또 lactic acid 및 acetic acid를 검출량과 동일한 농도로 조절한 후 ETEC에 대하여 발육억제시험을 실시한 결과 이들 organic acid는 발육억제성이 미약하였다.

분리정제한 항균성물질의 감수성 : *L. casei* subsp. 및 *Str. faecium* 중에서 세균배양액의 항균효과가 크고 단백질 농도가 높은 *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469 및 *Str. faecium* 27273을 항균물질 분리 및 정제 재료로 선택하였다. 즉, 두 세균을 MRS broth에 접종하여 24~48시간 배양한 후 세균수를 조사한 결과 *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469는 $1.65 \times 10^9/\text{ml}$, *Str. faecium* 27273은 $2.82 \times 10^8/\text{ml}$ 이었다. 이 배양액을 항균물질 분리재로 처리방법에 준하여 처리한 후 ammonium sulfate precipitation 및 solvent extraction 방법으로 추출, 정제하여 항균성을 시험하였다.

1) **Ammonium sulfate로 침전한 항균성물질 :** ammonium sulfate 80%로 침전한 항균성물질을 disc diffusion method에 의하여 발육억제시험을 하였다. *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469로부터의 정제 항균성물질은 ETEC 및 *Sta. aureus*에 대하여 발육억제성이 있었으므로 이 균주가 생산하는 항균물질은 ammonium sulfate에 침전됨을 알 수 있었다.

Str. faecium 27273의 정제 항균성물질은 *Sal pullorum* 및 *Sta. aureus*에 대하여 항균성이 있었으나 ETEC에 대한 항균성은 나타나지 않았다(Table 4).

ammonium sulfate 침전물에서 나타난 항균성은 cut off 12 Kd의 투석에서 소실되지 않는 것으로 보아 H_2O_2 나 lactic acid 같은 저분자물질은 아니며 분자량은 최소한 12 Kd 이상의 물질임을 알 수 있었다.

2) **Methanol-acetone 추출로 정제한 항균성물질 :** *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469 및 *Str. faecium* 27273의 배양 여과액을 methanol-acetone으로 추출하여 disc diffusion method에 의하여 발육억제시험을 한 결과 *Str. faecium* 27273으로부터 얻은 추출물은 ETEC 및 *Sal pullorum*에 대하여 발육억제성을 나타내었으나 *Sta. aureus*에 대하여는 항균성이 없었다. *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469로부터 얻은 추출물은 모든 감수성대상세균에 대하여 항균성이 나타나지 않아 항균성물질이 추출되지 않음을 알 수 있었다(Table 5).

Table 4. Antibacterial activity of culture fluids purified by the ammonium sulfate precipitation method

Antibacterial substances produced by	Antibacterial activity to		
	ETEC	<i>Sal. pullorum</i>	<i>Sta. aureus</i>
<i>L. casei</i> sub. <i>rhamnosus</i> 7469	++	-	+
<i>Str. faecium</i> 27273	-	+	+

Note : + : <3mm ++ : 3-5mm

Table 5. Antibacterial activities of culture fluids purified by the methanol-acetone extraction

Antibacterial substances produced by	Antibacterial activity to		
	ETEC	<i>Sal. pullorum</i>	<i>Sta. aureus</i>
<i>L. casei</i> sub. <i>rhamnosus</i> 7469	-	-	-
<i>Str. faecium</i> 27273	++	+	-

Note : ++ : <3mm ++ : 3-5mm

3) **Chloroform 및 propanol 추출로 정제한 항균성물질 :** *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469 및 *Str. faecium* 27273 배양 여과액으로부터 chloroform으로 추출한 항균성물질은 ETEC에 대한 항균성이 있었으나 propanol로 추출한 것은 항균성이 없어 이들 균이 생산한 항균성물질은 chloroform으로는 추출되지만 propanol에는 추출되지 않았다.

4) **Gel column으로 정제한 항균성물질 :** *Str. faecium* 27273의 M-A 추출 항균성물질 및 *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469의 ammonium sulfate 추출 항균성물질을 Sephadex G-50 column으로 분획하였다. 분획별로 얻은 물질의 각 분획의 흡광도를 측정하여 분획에 들어 있는 항균성물질의 농도를 조사하였으며, 분획별로 disc diffusion method로 ETEC에 대한 항균성을 시험하였다.

L. casei sub. *rhamnosus* 7469로부터의 분획 9, 11, 12 및 13번은 ETEC에 대한 발육억제성이 있었으며, 각 분획의 흡광도는 0.14, 0.30, 0.26, 0.24이었다. 11번 분획은 흡광도 최고치 0.305이었으며, gel 여과하여 얻은 35개 분획을 280nm에서 유출한 결과는 그림 3과 같다(Fig 3).

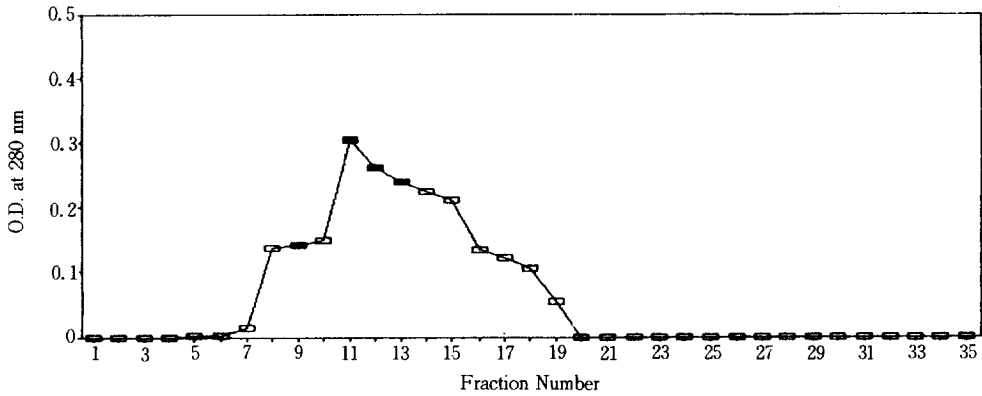


Fig 3. Gel(Sephadex G-50) chromatography profiles of the *L. casei sub rhamnosus* 7469 culture fluid partially purified by the ammonium sulfate precipitation method(■ : growth inhibition fraction).

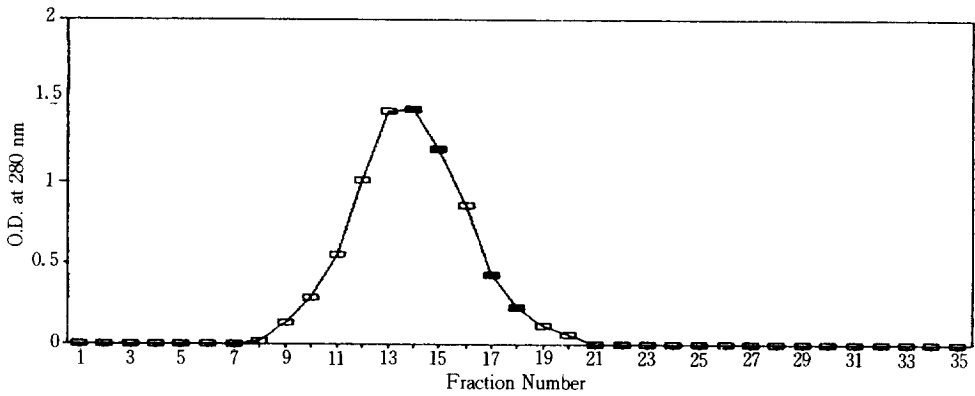


Fig 4. Gel chromatography profiles of the *Str. faecium* culture fluid partially purified by the methanol-aceton extraction method(■ : growth inhibition fraction).

Table 6. Antibacterial activities of culture fluids partially purified by the gel filtration

Antibacterial substances produced by	Antibacterial activity to		
	ETEC	<i>Sal pullorum</i>	<i>St. aureus</i>
<i>L. casei sub. rhamnosus</i> 7469	+++	-	++
<i>Str. faecium</i> 27273	++	+	-

Note : + : <3mm ++ : 3-5mm +++ >5mm

Str. faecium 27273으로 부터의 분획 14, 15, 17 및 18번에서 항균성이 나타났으며, 흡광도는 각각 1.44, 1.20, 0.42, 0.22이었다. *Str. faecium* 27273으로 부터 얻은 35개 각 분획의 흡광도는 14번 분획이 1.445로 가장 높았으며, 항균성은 14번 분획 이후에서 나타났다(Fig 4). gel 여과하여 얻은 35개 분획을 280nm에서 유출한 결과는 그림 4에서와 같다.

gel filtration한 각 분획중 ETEC에 대한 항균성이 있는 분획을 모두 합한 것으로 disc diffusion method에 의하여 발육억제시험을 실시하였다. *L. casei sub rhamnosus* 7469로 부터의 eluate는 ETEC 및 *St. aureus*에 대하여 발육억제능이 강하게 나타났으며, *Str. faecium* 27273으로 부터 얻은 eluate도 ETEC 및 *Sal pullorum*에 대하여 발육억제성을 나타내었으나 *St. aureus*에 대해서는 항균성이 나타나지 않았다(Table 6, Fig 5).

정제 항균성물질의 성상 :

1) 항균성물질의 HPLC : gel filtration한 분획중 ETEC에 대한 항균성이 있는 분획을 모두 합한 것을 HPLC하여 retention time(RT)을 조사한 결과 *L. casei sub rhamnosus* 7469가 생산한 항균성물질은 RT 1.36. *Str. faecium* 27273이 생산한 항균성물질은 RT 1.82 및 2.21이었다(Fig 6).

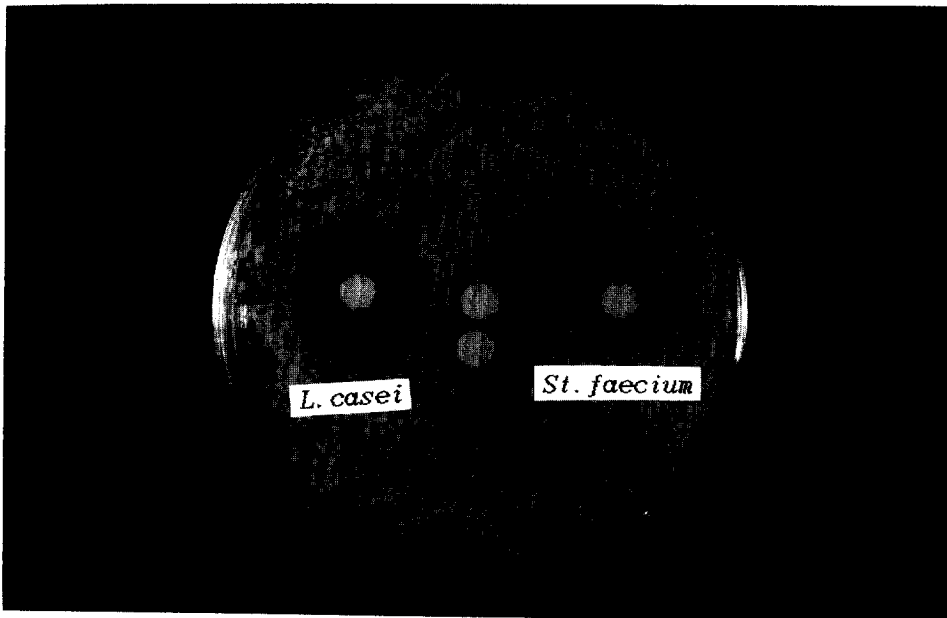


Fig 5. Inhibition of ETEC by *L. casei sub. rhamnosus* 7469 and *Str. faecium* 27273 culture fluids partially purified by the gel filtration via the disc diffusion method.

2) SDS-PAGE : gel filtration 한 분획중 ETEC에 대한 항균성이 있는 분획을 모두 합한 것을 Laemmli³⁴방법에 준하여 SDS-PAGE하여 분획상을 비교한 결과 *L. casei sub. rhamnosus* 7469가 생산한 항균성물질은 약 31 kD 부근에서 diffuse한 하나의 밴드로 나타났다. 그러나 *Str. faecium* 27273이 생산한 항균성물질은 gel상에서 전개되지 않았다(Fig 7).

3) 온도 및 효소처리에 대한 활성 : gel filtration 한 분획중 항균성이 있는 분획을 모두 합하여 100℃에서 20분간 처리하여도 항균작용은 소실되지 않았다(Table 9). gel filtration 한 분획중 항균성이 있는 분획을 모두 합한 것을 lysozyme, trypsin, pepsin, lipase 등의 효소 처리한 후 항균성을 조사한 결과 *Lactobacillus casei sub. rhamnosus* 7469가 생산한 물질은 lysozyme 및 trypsin으로 30분 또는 2시간 처리하여도 활성이 소실되지 않았으나 pepsin에는 30분간 처리에서도 항균성이 소실되었다.

Str. faecium 27273이 생산한 항균성물질은 세가지 단백질 분해효소 모두 30분간 처리로서 항균성이 소실되었다. lipase에 대하여는 두 세균이 생산하는 항균성물질 모두 항균성에 아무런 변화가 일어나지 않았다(Table 10).

고 찰

LAB가 생산하는 항균성물질에 대한 연구는 이 물질을 이용하여 동물의 사료효율을 증진시키고 질병에 대

한 저항력을 높히려는 목적으로 이루어지고 있다. LAB를 이용한 질병치료에 대하여 많은 연구^{3, 12, 22, 25, 26, 35, 36}가 이루어 졌으며, 이것은 세균이 생산하는 anti-*E. coli* 물질, 내독소 중화물질, lactate 등의 항균성물질 생산에 의한 것으로 알려져있다^{7, 8, 31}. 항균성물질의 활용을 목적으로 많은 LAB를 대상으로 실험하였으며 효율성이 높은 균종으로서 *Lactobacillus* species중에서 *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei* 등을, *Streptococcus* species 중에서 *Str. faecium*, *Str. lactis*, *Str. thermophilus*, *Str. diacetylactis* 등을 이용하였다³¹.

항균성물질 생산성은 균주의 선택도 중요하지만 배지의 조건도 좋아야 한다. *L. casei* 및 *Str. faecium*의 배지로서는 MRS medium, BHI, BYE, MHB, skin milk, nutrient medium, tryptose broth 등 여러가지가 있으나 MRS broth가 항균성물질 생산성이 가장 좋다고 알려져 있다.²²

항균성물질 생산배지로 MRS broth를 이용하여 *L. casei* subsp. 및 *Str. faecium* 배양액으로 병원성세균에 대하여 발육억제성을 조사한 결과 모두 ETEC, *Sal. pullorum*, *Sta. aureus* 등에 대하여 발육억제성이 있었으며 특히 *L. casei sub. rhamnosus* 7469 및 *Str. faecium* 27273 배양액은 ETEC에 대하여 발육억제대 5mm이상으로서 항균성이 높았다. 발육억제작용은 6시간 이후에 출현하기 시작하여 22시간까지 최대발육억제대를 형성하였다. 이러한 현상은 세균증식에 따라 생산된 항균성물질의 양적차이

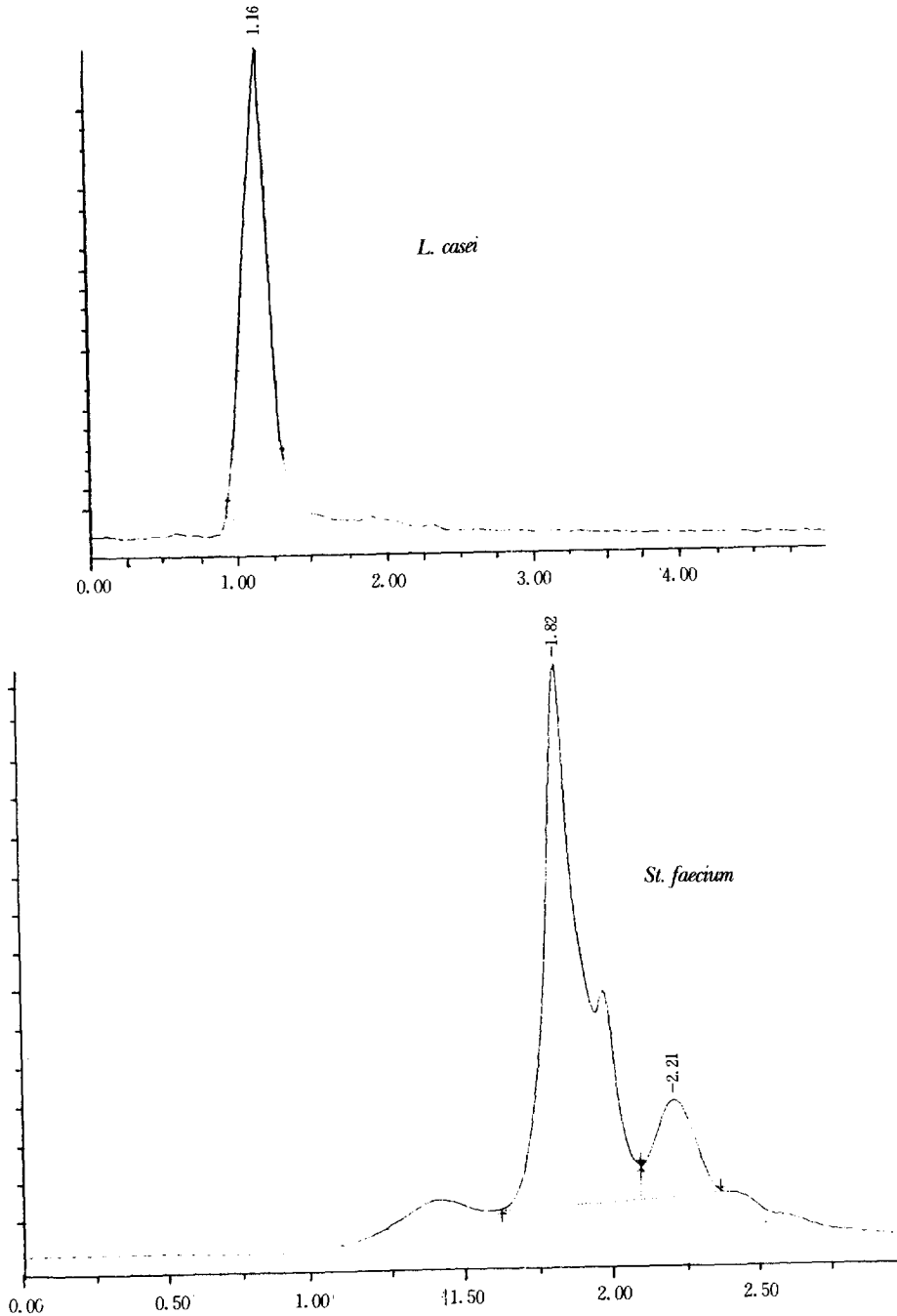


Fig 6. HPLC chromatograms of gel filtrated fraction of bacterial culture fluids.

또는 유산생성으로 인한 산성환경 등이 영향을 미친 것이다.^{8,14}

배양 여과액으로 발육억제시험을 한 결과 *L. casei* 4646 및 *L. casei sub.rhannusis* 7469의 *Sal pullorum*에 대한 항균

성이 소실되었다. Harting 등³⁷은 배양액을 0.3~0.5 μm filter로 여과하면 배양액에 존재하던 항균성이 소실되기도 한다고 하였으며, Barefoot 등³⁸과 Hoogkamp-Korstanje 등³⁹은 *L. acidophilus* 및 *Str faecium* 배양액을 여과한

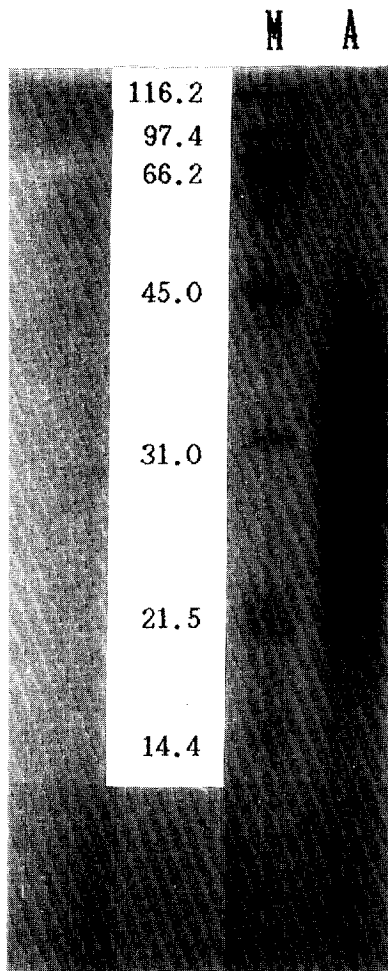


Fig 7. SDS-PAGE patterns of antibacterial substance.

M : molecular markers. A : *L. casei sub. rhamnosus* 7469.

후에는 항균성을 관찰할 수 없었다고 하였다. 그러나 Harasawa 등²⁰은 *Str faecium*의 배양 여과액에서 항균성을 관찰할 수 없었지만 이것을 ammonium sulfate 50~80%로 추출한 것은 항균성이 있었다고 하였다.

세균배양액중의 항균성에 관계되는 인자로서 H₂O₂, lactic acid 및 항균성물질이 있다.^{4,6,8}

LAB는 발육초기에 H₂O₂를 산생하여 다른 세균의 발육을 억제한다¹⁴. 그러나 H₂O₂는 휘발성물질이므로 농축과정, 투석과정 등 정제과정에서 제거되므로 H₂O₂에 의한 항균성은 인정할 수 없다.

L. casei subsp. 및 *Str faecium*은 MRS broth 성분인 glucose를 이용하여 lactic acid를 생산^{40,41}함으로써 배지의 pH 저하를 초래하여 항균성이 나타날 수 있다⁴⁰. 본 실험에서 pH 저하가 항균성에 미치는 영향을 보기 위하여 MRS broth 만으로 pH 4.6으로 조절한 후 발육억제시험

Table 9. Antibacterial effect of heat treated antibacterial substances produced by *L. casei sub. rhamnosus* 7469 and *Str faecium* 27273

Antibacterial substances produced by	Antibacterial activity to								
	ETEC			<i>Sal pullorum</i>			<i>Sta aureus</i>		
	5	10	15 20	5	10	15 20	5	10	15 20
	(min.)								
<i>L. casei sub. rhamnosus</i> 7469	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Str faecium</i> 27273	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Table 10. Antibacterial effect of enzyme treated antibacterial substances against ETEC

Enzymes	Antibacterial substances produced by									
	<i>L. casei Sub. rhamnosus</i> 7469					<i>Str faecium</i> 27273				
	0.5 hrs	1.0	1.5	2.0	2.5	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Lysozyme	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Trypsin	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Pepsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

을 실시한 결과 발육억제능은 없었으며, pH 4.6인 BHI broth에서 *Sta aureus*, ETEC, *Sal pullorum*의 발육여부를 본 결과 24시간후 모두 증식하였다. 그러므로 pH 저하만으로 인한 세균발육억제능을 인정할 수 없었으며 이와같은 결과는 Prescott 등⁴²과 Hinton 등⁴⁰의 결과와 유사하였다.

배양여과액 내의 organic acid도 항균성에 영향을 미치는 인자다⁴⁰. organic acid 생산량은 *L. casei sub rhamnosus* 7460 배양액 내에는 lactic acid 0.032M, acetic acid 0.01M 이었으며 *Str faecium* 27273 배양액내에는 lactic acid 0.027M, acetic acid 0.01M 이었다. 유기산의 이와 같은 농도에서 ETEC에 대한 발육억제능은 지극히 미약하였으며 투석으로 유기산이 제거된 상태에서도 항균력은 소실되지 않았다. 그러므로 lactic acid나 acetic acid가 항균성에 미치는 영향은 미약하고, 항균성은 배양액중의 12 Kd 이상의 분자량이 큰 항균물질에 의한 것이다. McGroarty 등²²은 *L. casei* GR-1 배양여과액의 *E. coli*에 대한 항균성물질은 단백질의 일종이라고 하였다.

항균성물질 분리는 ammonium sulfate 침전법^{11,15} 및 methanol-acetone 추출법^{43,44}을 이용하였다.

L. casei sub rhamnosus 7469의 배양여과액을 ammonium sulfate 80%로 추출하여 항균성을 조사한 결과 ETEC 및 *Sta aureus*에 대하여 항균성이 있는 물질을 침전시킬

수 있었다. 그러나 McGroarty 등²²은 *L. casei* GR-1이 생산하는 항균성물질이 ETEC에 대하여 항균성은 있으나 80% 이상의 ammonium sulfate로도 추출되지 않는다고 하여 대조를 이루었으며, Kim 등¹⁵은 *L. plantarum*의 배양여과액을 ammonium sulfate 70%로 추출하여 *Sta. aureus*에 대하여 항균성이 있는 물질을 정제하였다. Joerger 등¹¹도 *L. helveticus*가 생산한 항균성물질은 50%의 ammonium sulfate로 추출 가능하다고 보고하였다. *Str. faecium* 27273은 ammonium sulfate 80%로 추출한 것에서 *Sal. pullorum* 및 *Sta. aureus*에 대하여 항균성이 있는 물질을 추출하였다. 그러나 ETEC에 대하여는 배양액에 존재하던 항균성이 나타나지 않았다.

Mikolajcik 등⁴⁵, Kodama⁴⁵ 및 Shahani 등⁴⁴은 *L. acidophilus*가 생산한 항균성물질을 methanol-acetone으로 추출하였다. *Str. faecium* 27273 배양여과액을 methanol-acetone으로 추출한 것은 ammonium sulfate 침전법으로 추출한 것보다 ETEC에 대하여 항균성이 높게 나타나 ETEC만을 기준할 때 본 방법이 더 유용함을 알 수 있었다. *L. casei sub. rhamnosus* 7469의 배양여과액 추출물은 모든 감수성대상세균에 대한 항균성이 나타나지 않아 ammonium sulfate 침전법이 본 방법보다 더 바람직하다고 생각된다.

ammonium sulfate 및 methanol-acetone으로 추출한 항균성물질은 Sephadex G-50으로 분획한 다음, 각 분획으로 ETEC에 대한 항균성을 조사한 결과 *L. casei sub. rhamnosus* 7469는 9~12번, *Str. faecium* 27273은 14~18번 분획이 항균성이 있었으며 항균성이 있는 분획은 흡광도가 높게 나타났다. 그러나 항균성이 있는 분획과 흡광도와는 정비례하지 않았으며 항균성 분획이 연속되지 않아 gel 여과시 각 분획의 양을 조정해야하는 점이 문제로 지적될 수 있었다. DeKelck 등⁹, Barefoot 등³³, Joerger 등¹¹ 및 Dufour 등⁶은 항균성이 있는 분획은 없는 것보다 흡광도가 높게 나타났다고 하였다.

항균성물질은 cut off 12 Kd의 투석한 후에도 항균성이 소실되지 않는 것으로 보아 항균성물질은 최소한 12 Kd 이상의 분자량을 지닌 물질이라고 생각할 수 있는데 전기영동에서 약 31 Kd 부근에서 diffuse한 band로 나타났다. 전기영동에서 나타난 diffuse한 band는 이 물질이 순수 단백질이 아니라 복합체를 시사하고 있다. Austin-Prather 등⁴⁷은 배양액에 생선된 항균성물질은 세포 성분과 결합하여 고분자성 물질로 존재한다고 하였으며, Upreti 등¹⁰도 배양상청액에 고존재하는 항균물질은 탄수화물-단백질로 구성된 저분자성물질로 생산되어 세포성분인 지질과 결합함으로써 nondialyzable하며 lipoprotein-carbohydrate complex의 고분자량 물질로 존재

한다고 하였다. 이와같은 성적은 staphylococin 462⁴⁸ c-oligins⁴⁹에서도 알려져 있다. Barefoot 등³³ 및 Joerger 등¹¹은 lactacin B나 lactocin 27 같은 항균물질은 순수정제되지 않은 상태에서는 복합체로 존재하여 분자량이 크고 diffuse하게 나타나지만 순수정제후에는 분자량이 각각 2.5~6.5 Kd 및 12.4 Kd인 순수단백질로 단일분획으로 나타난다고 하였다. 그러나 Juven 등⁸은 *L. acidophilus*가 생산한 항균성물질(LA-147)은 SDS-PAGE상에서 분자량 약 38.5 Kd의 물질이라고 하여 위의 결과와 차이가 있는 성적으로 보고하였다.

Str. faecium 27273이 생산한 항균성물질은 전기영동에서 전개되지 않았다. 항균성물질의 저분자량물질일 가능성도 있으므로 저분자량 단백질의 전기영동법인 urea-SDS-PAGE를 하였으나 역시 분획되지 않았다. Deklerk 등⁹은 *L. fermenti*가 생산한 항균성물질은 지질로 단백질이 둘러싸여 단백질의 정전기적 힘을 약화시킴으로 분획전개가 어렵다고 하였으며, Barefoot 등³³은 lactacin B를 SDS-PAGE한 후 marker protein은 검출가능하였으나 lactacin B는 단백밴드를 확인할 수 없는 이유를 단백질량이 적거나 사용한 silver stain법으로 검출할 수 없는 물질이라고 하였다.

항균성물질은 100°C에서 20분간 처리후에도 안정하며 그 항균성을 소실하지 않았다. 이는 100°C에서 1시간 처리후에도 항균성물질이 활성을 상실하지 않는다는 lactacin B³³, 96°C에서 30분 열처리로 항균성에 영향이 없다는 *L. fermenti*로 실험한 보고⁹ 121°C에서 15분 열처리로 안정하다는 *L. plantarum*에 의한 성적¹⁵ 등과는 유사하였다. 그러나 *L. helveticus*¹¹ 및 *L. casei* GR-1²²이 생산하는 항균성물질은 열처리에 대하여 민감하여 항균성을 소실한다고 한것과는 차이가 있었다.

항균성물질의 효소에 대한 안정성을 조사한 결과 *Lactobacillus casei sub. rhamnosus* 7469에 의한 항균성물질은 lysozyme과 trypsin으로 30분 처리때 활성이 소실되지 않았지만 pepsin은 그 항균성을 소실시켰다. 한편 lysozyme 및 trypsin에는 2시간까지는 항균성이 소실되지 않았으나 2시간 30분 처리시에는 활성이 소실되었다. *Str. faecium* 27273에 의한 항균성물질은 세 단백질분해효소 모두 30분 처리로 활성이 소실되었다. *L. fermenti*⁹, *L. helveticus*¹¹, *L. plantarum*¹⁵이 생산한 항균성물질은 trypsin, pepsin에 파괴되고 lysozyme에 안정하다고 하여, lysozyme 처리결과에서 *Str. faecium* 27273에 의한 항균성물질과 차이를 보였다. 두 세균이 생산한 항균성물질은 lipase에 대하여 안정하여 helveticin J의 성질과는 유사하였으나 plantacin B와는 차이가 있었다. 단백질분해효소에 의하여 항균활성이 소실된다는 것은 항균성물질을 단백질성 물

질로 추정할 수 있다.^{11, 13, 50, 51}

결 론

Lactobacillus casei subsp. 및 *Streptococcus faecium*이 생산하는 항균성물질의 성상을 규명하기 위하여 MRS broth에 배양하여 세균의 발육상태, 항균성물질의 생산성, 생산한 항균성물질의 병원성세균에 대한 항균성을 조사하였으며, 항균성물질을 ammonium sulfate 침전법 및 methanol-acetone 추출법으로 정제하여 성상 및 항균성을 조사하였다.

L. casei subsp. 및 *Str. faecium*을 MRS broth에 배양하여 증식성을 조사한 결과 *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469는 24시간에, *Str. faecium* 27273은 20시간에 최고증식기에 도달하였으며, 배지의 pH는 두 세균 모두 12시간 이후부터 급격히 저하하여 28시간 후에는 pH 4.5~4.6으로 유지하였다.

L. casei subsp. 및 *Str. faecium*을 MRS broth에 배양한 배양액으로 몇가지 세균을 대상으로 spot-on-the-lawn method로 발육억제시험을 한 결과 항균성은 균주에 따라 차이가 있었으며, *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469 및 *Str. faecium* 27273이 생산한 항균성물질은 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), *Sal pullorum* 및 *Sta aureus* 등에 대하여 발육억제대가 나타났다. 이때 *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469 배양액의 단백질량은 495 µg/ml, *Str. faecium* 27273의 배양액은 594 µg/ml이었다. organic acid의 생산량은 *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469 배양으로 lactic acid 0.032M, acetic acid 0.01M이었으며, *Str. faecium* 27273은 lactic acid 0.02M, acetic acid 0.01M이었다.

L. casei sub. *rhamnosus* 7469의 배양여과액을 ammonium sulfate로 추출한 항균성물질은 ETEC 및 *Sta aureus*에 대하여 항균성이 있었으며, *Str. faecium* 27273이 생산한 항균성물질은 ammonium sulfate로 추출한 것보다 methanol-acetone법으로 추출한 것이 ETEC에 대하여 항균성이 높았다.

L. casei sub. *rhamnosus* 7469 및 *Str. faecium* 27273이 생산한 항균성물질을 gel 여과한 각 분획의 분획별 흡광도를 조사한 결과 9번 및 14번 분획이 가장 높았으며, ETEC에 대한 발육억제성은 9~13번 분획 및 14~18번 분획에서 나타났다. 항균성이 있는 분획을 보아서 실시한 발육억제시험에서 *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469가 생산한 항균성물질은 ETEC 및 *Sta aureus*에 대하여, *Str. faecium* 27273이 생산한 항균성물질은 ETEC 및 *Sal pullorum*에 대하여 항균성이 인정되었다.

정제한 항균성물질은 SDS-PAGE상에서 약 31 Kd 부근에서 매우 diffuse한 band로 나타났다. 정제한 항균

성물질은 100°C 20분간 처리에서도 항균성이 소실되지 않았다. *L. casei* sub. *rhamnosus* 7469가 생산한 항균성물질은 lysozyme, trypsin 및 lipase에 대하여 안정하였으나 pepsin에는 불안정하였으며 *Str. faecium* 27273이 생산한 항균성물질은 모든 단백질효소에 대하여 불안정하였다.

참 고 문 헌

1. Parker MT. "Topley and Wilson's Principle of bacteriology, virology and immunity", 7th ed. volume 2 "Systematic bacteriology". Edward Arnold.1984 : 198~210.
2. Metchnikoff E. The prolongation of life. G.P. putnam's sons, New York. 1908.
3. Perdigon G, Nader de Macias ME, Alvarez S, et al. Prevention of gastrointestinal infection using immunological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Research*. 1990 ; 57 : 255~264.
4. Geis A, Singh J, Teuber M. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *App Environ Microbiol*. 1983 ; 45 : 205~211.
5. Daeschel MA. Antibacterial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol*. 1989 ; January : 164~167.
6. Dufour A, Thuault D, Boulliou A, et al. Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide. *J Gen Microbiol*. 1991 ; 137 : 2423~2429.
7. Fuller R. A review probiotics in man and animals. *J App Bacteriol*. 1989 ; 66 : 365~378.
8. Juven BJ, Schved F, Lindner P. Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. *J Food Prot*. 1992 ; 55 : 157~161.
9. Deklerk HC, Smit JA. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. *J Gen Microbiol*. 1967 ; 48 : 309~316.
10. Upreti GC, Hinsdill RD. Production and mode of action of Lactocin 27: Bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1975 ; 7 : 139~145.
11. Joerger CJ, Klaehammer TR. Characterization and purification of Helveticin J and evidence for a chro-

- mosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol.* 1986 ; 167 : 439~446.
12. Mitchell I DE G, Kenworthy R. Investigations on a metabolite from *Lactobacillus bulgaricus* which neutralizes the effect of enterotoxin from *Escherichia coli* pathogenic for pig. *J App Bact.* 1976 ; 41 : 163~174.
 13. Muriana MP, Klaenhammer TR. Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *App Environ Microbiol.* 1987 ; 53 : 553~560.
 14. Price RJ, Lee JS. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing Lactobacilli. *J Milk and Food Technol.* 1970 ; 33 : 13~18.
 15. Kim WJ, Ha DM, Ray B. Characteristics of bacteriocin and mucin production phenotypes in *Lactobacillus plantarum* 27. *J Microbiol Biotechnol.* 1991 ; 1 : 96~101.
 16. Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989 ; 33 : 674~679.
 17. Gonzalez CF, Kunka BS. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici* App *Environ Microbiol.* 1987 ; 53 : 2534~2538.
 18. Graham DC, Mckay LL. Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. *App Environ Microbiol.* 1985 ; 50 : 532~534.
 19. Kramer J, Brandis H. Purification and characterization of two bacteriocins from *Streptococcus faecium*. *J Gen Microbiol.* 1975 ; 88 : 93~100.
 20. Harasawa R, Suzuki K, Mitsuoka T. *Streptococcus faecium* derived antibacterial substance antagonistic to Bifidobacterial. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980 ; 18 : 58~62.
 21. Reid G, Cook RL, Bruce AW. Examination of strains of Lactobacilli for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract. *J Urol* 1987 ; 138 : 330~335.
 22. McGroarty JA, Reid G. Detection of a lactobacillus substance that inhibits *Escherichia coli*. *Can J Microbiol.* 1988 ; 34 : 974~978.
 23. Reid G, McGroarty JA, Angotti R, et al. Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can J Microbiol.* 1988 ; 34 : 344~351.
 24. Kato I, Kobayashi S, Yokokura T, et al. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann* 1981 ; 72 : 517~523.
 25. Perdigon G, Alvarez S, Aida Pesce De Ruiz Holgado. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei* ; influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *J Dairy Research.* 1991 ; 58 : 485~496.
 26. Saito H, Tomioka H, Nagashima K. Protective and therapeutic efficiency of *Lactobacillus casei* against experimental murine infections due to *Mycobacterium fortuitum* complex. *J Gen Microbiol.* 1987 ; 133 : 2843~2851.
 27. Sato K. Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei* ; role of macrophages. *Inf Imm.* 1984 ; 44 : 445~451.
 28. Miake S, Nomoto K, Yokokura T, et al. Protective effect of *Lactobacillus casei* or *Pseudomonas aeruginosa* Infection in mice. *Inf Imm.* 1985 ; 48 : 480~485.
 29. Saito H, Watanabe T, Horikawa Y, et al. Resistance of mice treated with *Lactobacillus casei* against infections with *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Candida albicans*. *Medicine and Biology.* 1980(a) ; 101 : 29~32.
 30. Saito H, Watanabe T, Tomioka H, et al. Protection of mice against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* with *Lactobacillus casei*. *Medicine and Biology.* 1980(b) ; 100 : 285~288.
 31. Fox SM. Probiotics : Intestinal Inoculants for production animals. *Vet Med.* 1988 ; august : 806~830.
 32. Lewus CB, Montville TJ. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods.* 1991 ; 13 : 145~150.
 33. Barefoot SF, Klaenhammer TR. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother* 1984 ; 26 : 328~334.
 34. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 ; 227 : 680~685.
 35. Lewenstein A, Frigerio G, Moroni M. Biological properties of SF 68, a new approach for the treatment of diarrhea disease. *Current Therapeutic Research.*

- 1979 ; 26 : 967~981.
36. Underdahl NR, Torres-Medina A, Doster AR. Effects of *Streptococcus faecium* C64 in control of *Escherichia coli*-induced diarrhea in gnotobiotic pig. *Am J Vet Res.* 1982 ; 43 : 2227~2232.
 37. Harting AM, Hedges AJ, Berkeley RCW. Methods for studying bacteriocins. *Methods in Microbiol.* 1972 ; Vol 7a : 314~422.
 38. Barefoot SF, Klaenhammet TR. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *App Environ Microbiol.* 1983 ; 45 : 1808~1815.
 39. Hoogkamp-Korstanje JAA, Linder, JGEM, Marcelis JH, et al. Composition and ecology of the human intestinal flora. Antonie van Leeuwenhoek *J Microbiol Serol.* 1979 ; 45 : 35~40.
 40. Hinton A, JR, Corrier DE, Deloach JR. *In vitro* inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* 0157 : H7 by an anaerobic gram-positive coccus isolated from the cecal contents of adult chickens. *J Food Protection.* 1992 ; 55 : 162~166.
 41. Szylił O, Dabard J, Durand M, et al. Production of volatile fatty acids as a result of bacterial interaction in the cecum of gnotobiotic rats and chickens fed a lactose-containing diet. *Reprod Nutr Develop.* 1988 ; 28 : 1455~1464.
 42. Prescott LM, Harley JP, Klein DA "Microbiology". Wm.C. Brown Publishers 1990 ; pp : 110~130.
 43. Hamdan LY, Mikolajcik EM. Acidolin an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. *J Antibiotic* 1974 ; 27 : 631~636.
 44. Shahani KM, Valki JR, Chandan RC. Antibiotic acidophilin and process of preparing the same. *U.S.patent.* 1972 ; No. 3, 689, 640.
 45. Mikolajcik EM, Hamdan IY. *Lactobacillus acidophilus*, 2. Antimicrobial agents. *Cultured Dairy Prod.* 1975 ; 10 : 18.
 46. Kodama R. Studies on lactic acid bacteria. 2. Lactolin new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria, 1952.
 47. Austin-Prateher SL, Booth SJ. Evidence for a membrane-bound form of a bacteriocin of *Bacteroides uniformis* T1-1. *Can J Microbiol.* 1984 ; 30 : 268~272.
 48. Hale EM, Hinsdill RD. Characterization of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* strain 462. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1973 ; 4 : 634~640.
 49. Reeves P. *Molecular biology, biochemistry and biophysics.* Vol. 11. Springer-Verlag, New York. 1972 ; p. 1~80.
 50. Ban Belkum MJ, Hayema BJ, Geis A, et al. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *App Environ Microbiol.* 1989 ; 55 : 1187~1191.
 51. West CA, Warner PJ. Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiol Lett.* 1988 ; 49 : 163~165.