

신생아 분변 및 동치미에서 분리한 젖산균 대사산물의 항균특성

이지영 · 박영수 · 김용석 · 신동화*

전북대학교 응용생물공학부(식품공학 전공) 및 농업과학기술연구소

Antimicrobial Characteristics of Metabolites of Lactic Acid Bacteria Isolated from Feces of Newborn Baby and from *Dongchimi*

Ji-Young Lee, Yeong-Soo Park, Yong-Suk Kim and Dong-Hwa Shin*

Faculty of Biotechnology (Food Science and Technology Major), Chonbuk National University

The antimicrobial effects of metabolites from isolated strains from feces of Korean newborn baby and from *Dongchimi* against six food-borne microorganisms, and characteristics of the metabolites were investigated. The metabolites from isolated strains adjusted pH to 3.5, 4.0, and 4.5 showed strong growth inhibition against *S. Typhimurium*, and *S. Enteritidis*. The metabolites has kept its inhibition activities to the pathogens after catalase, trypsin or pepsin treatment. In addition, antimicrobial activity of metabolites was not decreased by heat treatment at 121°C for 15 min. D2 and F35-2 strains were confirmed homofermentative and F20-3 was heterofermentative bacteria identified by final organic acid and gas production. The amount of lactic acid produced by D2 and F35-2 strains after 24 h of incubation was 1.84 and 1.85% respectively, but F20-3 strain produced acetic acid (0.22%) and lactic acid (0.91%).

Key words: metabolites, antimicrobial characteristics, lactic acid bacteria, acid contents

서 론

젖산균은 요구르트, 치즈, 버터 등의 유제품이나 발효소제지 같은 육제품 뿐만 아니라 우리나라의 전통 발효 식품인 김치류, 젓갈류, 장류 등에 존재하며, 사람이나 동물의 장에서 유익한 균주로 존재하고 있다.

*Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*속 중의 일부 미생물은 probiotics로 인식되어져 요구르트 제조에 많이 이용되고 있으며, 이 균주들의 섭취로 인한 젖산균의 장내증식에 의한 효과로 정장작용, 장내 균총의 개선, 혈청콜레스테롤의 감소, 젖당소화의 촉진 그리고 대장암 발생을 억제 등 매우 다양하게 나타나고 있다고 보고되었다^(1,2).

Probiotics의 조건으로는 소화기관을 통과하여 장내에서 생존할 수 있도록 내산성과 내담즙성이 요구되며, 유해 미생물에 대한 억제 작용 등이 있어야 한다⁽³⁾.

*Bifidobacteria*속 등은 *Campylobacter*와 *Escherichia coli*의

증식을 저해시키고⁽⁴⁾, *B. longum*의 대사산물은 분변에서 유래된 *Streptococcus* 균주의 증식을 저해한다고 보고되었다⁽⁵⁾. 저온 살균된 우유에 *L. monocytogenes*와 *Lactobacillus bulgaricus* 혹은 *L. plantarum*을 37°C에서 20시간에서 혼합 배양한 경우 *Listeria monocytogenes*의 증식이 완전히 저해되었으며⁽⁶⁾, *L. lactis*에 의해 *Salmonella*속과 *Escherichia coli* O157:H7의 증식이 억제되었다고 보고하였다⁽⁷⁾.

이들 젖산균은 유기산, 과산화 수소 및 bacteriocin 등을 생성하여 다른 미생물의 증식을 저해한다고 알려져 있다. 유기산은 그 자체가 항균력을 나타내며⁽⁸⁾, pH를 감소시켜 식중독 미생물이나 유해 미생물의 증식을 억제하는 작용을 한다⁽⁹⁾. 과산화 수소는 *Lactobacillus*속에 의해서 생성되는 물질로 식중독 미생물과 저온성 미생물의 증식을 억제하거나 사멸시킨다고 보고되었다^(10,11). 대부분의 bacteriocin은 단백질성 물질이나, 비단백성 물질인 acidolin⁽¹²⁾, acidophilin⁽¹³⁾, diacetyl⁽¹⁴⁾, lactoperoxidase system⁽¹⁵⁾ 등도 항균작용을 한다고 보고되었다.

저자는 probiotics로서 가능성이 있으며, 식중독 미생물의 증식을 억제하는 젖산균을 탐색하고자, 각종 젖산균이 주종을 이루는 신생아 분변(61명)과 동치미(3시료)에서 내산성과 내담즙성이 있는 균주를 분리하였고, 항균활성이 우수한 균주는 *Lactobacillus*속으로 동정되었다고 보고하였다⁽¹⁶⁾. 본 실험에서는 분리 젖산균의 대사산물의 특성과 몇 가지 대표적인 식중독 미생물에 대한 증식억제 기작을 알아보고자 하였다.

*Corresponding author : Dong-Hwa Shin, Faculty of Biotechnology (Food Science and Technology Major), Chonbuk National University, Dukjin-Dong, Jeonju, Chonbuk 561-756, Korea
Tel: 82-63-270-2570
Fax: 82-63-270-2572
E-mail: dhshin@moak.chonbuk.ac.kr

재료 및 방법

실험 균주

신생아 분변과 동치미에서 분리되어 16S rDNA gene sequencing에 의해 D2와 F35-2는 *Lactobacillus plantarum* (99.9%)로, F20-3은 *Lactobacillus fermentum*(99.6%)으로, K1은 *Lactobacillus plantarum*(96.0%)으로 동정⁽¹⁶⁾된 젖산균의 기원과 동정결과는 Table 1에서 보여주는 것과 같다. 항균활성을 측정하기 위해 사용한 식중독 미생물의 종류와 배양조건은 Table 2와 같다. 6종의 식중독 미생물 1백급이를 액체배지 10 mL에 접종하여 24시간 배양시킨 후 배양액 0.1 mL를 취해 새로운 배지 10 mL에 접종하여 18시간동안 2차 배양한 다음 그 배양액을 실험에 사용하였다.

사용 배지 및 시약

젖산균의 배양배지는 Lactobacilli MRS broth(Difco, MD, USA)를 사용하였고, 젖산균 대사산물의 항균 특성을 살펴보기 위해서 catalase(from bovine liver), pepsin(from porcine stomach mucosa), trypsin(from porcine pancreas) 효소를 Sigma Chemical Co.(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

젖산균이 생성하는 유기산을 분석하기 위해 high performance liquid chromatography(HPLC, Shimadzu, LC-10AD, Japan)를 이용하였고 HPLC용 정제수는 Duksan Pure Chemical사(Korea), H₂SO₄는 Merck사(Germany) 제품을 사용하였으며, 유기산 정량을 위한 표준품으로 젖산과 초산은 Sigma Chemical Co.(MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

분리 균주 대사산물의 생산

항균활성을 측정하기 위한 분리 균주의 대사산물은 다음과 같이 만들었다. 즉, MRS broth에 분리 균주를 접종하여 37°C에서 24시간동안 혐기 배양한 발효액을 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 상정액을 얻고, 이 상정액을 멸균된 0.22 μm membrane filter(Millipore Co. Ireland)로 제균한 것을 대사산물로 하였다.

분리균주 대사산물 첨가 농도별 식중독 미생물의 증식억제

멸균된 배지에 분리 균주의 대사산물을 5%, 10% 및 20%(v/v)를 각각 첨가하고, 활성시킨 식중독 미생물 1%(v/v)를 접종하여 총량을 10 mL로 조정한 후 배양하였으며, 균주의 초기농도는 10⁶~10⁷ CFU/mL수준이 되도록 하였다. Bioscreen C(Labsystem, Helsinki, Finland)의 well에 준비된 시료

Table 1. Origins and characteristics of selected isolates after screening for stability to bile salt (0.15%) and acidic environment (pH 3.0)

Isolate	Identified as	Origin
D2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Dongchimi
F20-3	<i>L. fermentum</i>	Feces of newborn baby
F35-2	<i>L. plantarum</i>	Meconium of newborn baby
K1	<i>Lactobacillus</i> spp.	Korean Food Research Institute

를 0.3 mL씩 분주 후 각 식중독 미생물을 Table 2와 같은 최적온도에서 배양하면서 600 nm에서 72시간동안 12시간 간격으로 흡광도를 측정하였다. 대조구는 멸균된 배지에 분리 균주 대사산물만을 첨가하였다. 증식 저해 효과는 식중독 미생물의 증식 곡선 면적과 식중독 미생물에 상정액을 첨가한 증식곡선 면적의 비로 식중독 미생물의 억제 비율을 나타내었다.

분리 균주 대사산물의 pH와 적정산도의 측정

분리 균주를 MRS broth에서 24시간 발효한 액 10 mL와 제균하여 얻은 대사산물을 배지에 10% 및 20%(v/v) 농도로 첨가한 경우의 pH와 적정산도를 측정하였다. 적정산도는 젖산균의 주 발효산물인 젖산량으로 계산하였다.

분리 균주 대사산물의 항균 특성 실험

분리 균주 대사산물의 항균특성을 알아보기 위해 pH의 영향, catalase 효소의 영향, 단백질 분해 효소의 영향 및 열 안정성을 조사하였다.

pH에 대한 영향을 확인하기 위하여 대사산물의 pH를 1 N HCl로 pH가 5, 6 및 7이 되도록 조절하였다. 열 안정성 조사는 대사산물을 50, 60, 70, 80 및 90°C의 온도에서 30분간 가열처리 하였고, 121°C 경우에는 15분간 처리하였다.

H₂O₂의 영향을 측정하기 위해 catalase 효소를 사용하였고, 대사산물에 catalase를 30 unit/mL가 되도록 첨가한 후 30°C에서 20분간 반응시켰다. 단백질 분해효소처리에는 trypsin과 pepsin을 대사산물에 각각 100 unit/mL가 되도록 첨가한 후, 30°C에서 60분간 반응시켰다. 각 효소들은 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시킨 후 0.22 μm membrane filter로 제균한 후 사용하였다.

대사산물의 항균활성은 멸균된 식중독 미생물 배양 배지(TSB 혹은 NB)에 처리한 대사산물 일정량과 식중독 미생물 배양액 1%를 첨가한 후, Bioscreen C를 사용하여 식중독 미생물의 증식억제 정도를 측정하여 증식 억제율로 나타내었다.

Table 2. List of food pathogens and media used for antimicrobial experiment

Microorganisms tested	Media used	Temp. (°C)
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111 TSB & TSA ¹⁾	30
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778 NB & NA ²⁾	30
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028 NB & NA	30
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43894 TSB & TSA	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923 TSB & TSA	37
<i>Salmonella</i> Enteritidis	KCCM 12021 TSB & TSA	37

¹⁾TSB & TSA: Tryptic soy broth and Tryptic soy agar (Difco).

²⁾NB & NA: Nutrient broth and Nutrient agar (Oxoid).

Table 3. HPLC condition for organic acid analysis

Detector	UV detector(SPD-10A)
Absorbance	210 nm
Temperature	60°C
Column	Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm, Bio-Rad, Richmond, USA)
Mobile phase	0.05 M H ₂ SO ₄
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	10 µL

pH와 젖산 농도에 따른 식중독 미생물의 증식억제

식중독 미생물의 초기 pH에 따른 증식양상을 살펴보기 위하여, 배지에 1 N HCl을 이용하여 각 배지의 pH를 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 및 6.5로 조정하였다. 1 N HCl로 pH를 조정된 배지에 식중독 미생물을 접종한 후, Bioscreen C를 사용하여 식중독 미생물의 증식 억제율을 측정하였다.

식중독 미생물의 젖산농도에 따른 증식양상을 살펴보기 위하여 표준품 젖산을 배지에 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 및 1.5%(v/v) 농도가 되도록 첨가한 후 식중독 미생물을 접종하였고, Bioscreen C를 사용하여 식중독 미생물의 증식 억제율을 측정하였다.

HPLC에 의한 유기산 분석

분리된 젖산균을 배양하는 동안의 유기산 생성량을 측정하기 위하여 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 시료를 취했다. 배양된 시료는 원심분리하여 상정액을 얻었고, 0.22 µm membrane filter로 제균한 후 Oasis HLB Extraction cartridges(USA)를 통과시킨 것을 HPLC 분석용 시료로 사용하였고, 분석조건은 Table 3과 같다.

유기산 정량을 위해 표준용액으로는 젖산과 초산을 사용하였으며, 젖산은 0.5-4% 범위에서 분석을 실시하여 젖산의 검량식($Y = -2.53 \times 10^5 + 4.05 \times 10^6 \times X, R = 0.999$)을 얻었고, 초산은 0.1-3% 범위에서 분석을 실시하여 초산의 검량식($Y = 2.95 \times 10^5 + 2.80 \times 10^6 \times X, R = 0.999$)을 얻었다. 젖산 발효액 분석은 표준용액으로 실시한 조건과 같은 조건으로 HPLC를 사용하였고, 이미 얻어진 검량식을 이용하여 생산된 유기산의 양을 계산하였다.

결과 및 고찰

항균활성에 미치는 pH의 영향

항균활성에 미치는 pH의 영향을 측정하기 위해 대사산물을 1 N HCl로 pH가 5, 6 및 7이 되도록 조절하였고, pH가

Table 4. Influences of neutralized pH on the antimicrobial activities of metabolites from lactic acid bacteria isolate

Microorganisms tested	Isolate	Metabolites (20%)	pH		
			5	6	7
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	K1 ²⁾	99.14 ¹⁾	27.57	15.05	13.64
	D2	99.11	27.19	15.97	13.59
	F20-3	77.89	21.75	10.90	6.89
	F35-2	98.84	32.39	15.48	12.28
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	K1	98.36	97.02	38.28	27.77
	D2	99.57	97.94	25.20	21.61
	F20-3	98.87	78.61	19.71	6.89
	F35-2	99.03	97.45	41.96	18.18
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	K1	99.86	95.99	38.34	36.67
	D2	99.98	97.37	44.24	37.30
	F20-3	99.46	93.24	24.97	20.95
	F35-2	98.66	98.21	43.26	38.16
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	K1	99.02	38.37	31.47	19.99
	D2	98.78	50.00	38.59	22.70
	F20-3	63.83	26.22	21.21	17.80
	F35-2	98.74	41.85	33.19	21.67
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	K1	98.84	19.27	15.39	5.85
	D2	98.80	22.70	15.44	3.64
	F20-3	67.37	18.63	15.23	6.63
	F35-2	98.74	19.60	18.37	7.45
<i>S. Enteritidis</i> KCCM 12021	K1	98.79	34.15	28.40	23.54
	D2	98.91	37.67	27.20	24.31
	F20-3	72.17	19.73	13.80	13.09
	F35-2	98.86	32.87	27.56	21.62

¹⁾Growth inhibition rate(%)=[1-(T1/T2)]×100.

T1: Total area of growth curve of treatment by Bioscreen C for 72 h incubation at 30°C or 37°C.

T2: Total area of growth curve of control by Bioscreen C for 72 h incubation at 30°C or 37°C.

²⁾K1: *Lactobacillus* spp., D2: *L. plantarum*, F20-3: *L. fermentum*, F35-2: *L. plantarum*..

Table 5. Influences of catalase, pepsin or trypsin on the antimicrobial activities of metabolites from lactic acid bacteria isolate

Microorganisms tested	Isolate	Metabolites (20%)	Catalase (30 U/mL)	Pepsin (100 U/mL)	Trypsin (100 U/mL)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	K1 ²⁾	99.14 ¹⁾	99.11	98.52	98.61
	D2	99.11	99.08	97.94	98.67
	F20-3	77.89	57.84	73.35	70.18
	F35-2	98.84	98.80	97.80	98.36
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	K1	98.36	98.22	97.19	95.86
	D2	99.57	99.34	98.86	97.95
	F20-3	98.87	57.53	97.38	95.48
	F35-2	99.03	99.34	97.76	96.86
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	K1	99.86	99.63	98.04	97.78
	D2	99.98	99.65	98.42	98.54
	F20-3	99.46	58.85	98.42	94.30
	F35-2	98.66	98.63	98.77	97.87
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	K1	99.02	98.34	98.10	98.10
	D2	98.78	98.26	98.93	98.24
	F20-3	63.83	51.28	59.49	45.52
	F35-2	98.74	98.04	98.61	97.97
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	K1	98.84	98.77	98.59	98.73
	D2	98.80	98.75	98.93	98.73
	F20-3	67.37	55.79	60.81	65.40
	F35-2	98.74	98.58	98.59	98.73
<i>S. Enteritidis</i> KCCM 12021	K1	98.79	98.77	98.94	98.81
	D2	98.91	98.07	98.91	99.13
	F20-3	72.17	59.04	75.12	79.25
	F35-2	98.86	98.80	98.82	98.81

^{1,2)}See footnote on Table 4.

조정된 대사산물 일정량과 식중독 미생물을 접종한 후 Bio-screen C를 사용하여 식중독 미생물의 증식 억제율을 나타낸 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서 보면 *B. cereus*와 *S. Typhimurium*의 경우에 pH 5에서는 항균효과가 유지되었으나, 그 이상의 pH에서는 항균효과가 감소하였다. 다른 식중독 미생물에서도 pH가 증성으로 갈수록 항균효과가 감소하는 경향을 나타내었다.

이와 같이 pH가 산성에서 증식억제 작용이 강하고, 중성으로 갈수록 그 작용이 소실되는 것은 이미 보고된 바가 있다. Shahani 등⁽¹³⁾은 *Lactobacillus acidophilus*가 생산하는 항균물질인 acidophilin은 알칼리성에서 안정하지 않다고 하였다. Kuhnen 등⁽¹⁹⁾이 분리한 *Streptococcus faecalis* var *liquefaciens* K4의 항균물질 LIQ4도 pH 8.0이상에서는 활성이 소실되었다. 또한 Kozak 등⁽²⁰⁾도 *S. lactis*에서 분리한 lactostrep-cin도 pH 7.0-8.0에서는 활성이 소실되며, pH 4.2-5.0에서는 활성을 나타낸다고 하였다. 따라서 본 대사산물은 산성 pH에서 항균활성을 나타내며, pH의 영향을 받는 것으로 추정된다.

항균활성에 미치는 catalase 효소의 영향

대사산물의 항균성물질이 H₂O₂일 가능성을 시험하기 위해 catalase 효소를 사용하였고, 대사산물에 catalase를 30 unit/mL가 되도록 첨가한 후 30°C에서 20분간 반응시켰다. 그 결과는 Table 5에서 보는 바와 같이 K1, D2, F35-2 대사산물에서는 항균력이 소실되지 않았으므로, 대사산물은 catalase 효소에 안정하며 H₂O₂는 존재하지 않는 것으로 추정된다. 그

러나 F20-3은 항균력이 일부 소실되어, 억제작용 중 H₂O₂ 영향도 있을 것으로 추정된다.

L. acidophilus, *L. casei*, *S. thermophilus*의 경우에는 대사산물에 catalase 처리 후에도 항균활성은 유지되었고⁽²¹⁾, *L. plantarum*의 대사산물⁽²²⁾과 *Bifidobacterium bifidum* 경우에도 항균활성에 영향을 주지 않았으나⁽²³⁾, *L. lactis*의 경우에는 catalase처리 후에 항균활성이 일부 소실된다고 보고되었다⁽²¹⁾. 이것으로 볼 때 젖산균의 종류에 따라 H₂O₂생성 여부도 달라진다고 추정된다.

젖산균은 일반적으로 catalase 활성을 가지고 있지 않으므로 H₂O₂를 배지 내에 축적할 수 있으며, H₂O₂는 superoxide ion과 반응하여 hydroxy radical을 형성하게 되고, 이 hydroxy radical이 세포막의 지질부분이나 DNA같은 세포 구성물질과 반응하여 항균작용을 나타내게 된다고 한다⁽²⁴⁾.

항균활성에 미치는 단백질분해 효소의 영향

젖산균이 분비하는 bacteriocin은 주로 polypeptide로 밝혀졌으므로⁽²⁵⁾, 대사산물의 항균성 물질이 단백질성 물질인지 알아보기 위해 단백질 분해효소인 trypsin과 pepsin의 영향을 실험하였다. 그 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 단백질 분해효소를 처리한 후에도 대조구와 비교하여 볼 때 항균활성의 소실이 거의 관찰되지 않았다.

*Bifidobacterium bifidum*의 경우에는 단백질 분해 효소(protease IV, pronase E, proteinase K, trypsin 및 pepsin 등) 처리에도 항균활성에 영향을 주지 않아, 단백질 분해 효소에

Table 6. Influences of heat treatment on the antimicrobial activities of metabolites from lactic acid bacteria isolate

Microorganisms tested	Isolate	Heat treatment (°C), 30 min				
		50	60	70	80	90
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	K1 ²⁾	99.27 ¹⁾	99.22	99.15	99.13	98.87
	D2	99.25	99.10	99.03	98.97	98.83
	F20-3	75.77	76.04	73.94	76.91	76.70
	F35-2	98.94	98.87	98.78	98.70	98.56
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	K1	96.61	97.04	96.93	96.61	96.77
	D2	97.84	98.28	98.17	97.79	98.06
	F20-3	95.85	92.13	95.53	96.07	96.71
	F35-2	97.36	97.09	96.44	96.44	96.93
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	K1	99.14	99.06	98.85	99.20	98.45
	D2	99.22	99.01	98.72	98.90	98.15
	F20-3	97.91	97.56	97.38	97.78	97.38
	F35-2	98.74	98.88	98.42	98.34	97.97
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	K1	98.87	98.87	98.54	98.32	98.65
	D2	99.03	98.84	98.59	98.45	98.73
	F20-3	45.07	44.77	35.42	39.19	36.45
	F35-2	98.56	98.40	98.29	98.15	98.43
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	K1	99.28	99.30	99.07	99.27	99.15
	D2	99.30	99.28	99.03	99.12	99.10
	F20-3	62.58	63.66	61.88	62.58	65.11
	F35-2	98.93	98.98	98.92	98.77	98.88
<i>S. Enteritidis</i> KCCM 12021	K1	99.30	99.17	99.04	98.96	99.30
	D2	99.35	99.19	99.09	98.98	99.28
	F20-3	68.51	74.00	73.24	78.48	79.30
	F35-2	99.01	99.07	98.89	98.67	99.07

^{1,2)}See footnote on Table 4.

영향을 받지 않는다고 보고되었다⁽²³⁾. 김치에서 분리한 젖산균 A7(*Pediococcus cerevisiae*)의 대사산물의 경우에는 trypsin의 처리에는 저해 효과가 감소되었으나, pepsin을 처리했을 때 저해 효과에 아무런 영향을 주지 않아, trypsin에 분해되는 단백질성의 증식 저해 물질에 의한 것으로 보고하였다⁽²⁵⁾. 이러한 결과로 볼 때, 본 실험에서 분리된 젖산균 대사산물은 단백질성 물질이 아니며, 단백질 분해 효소에 안정한 물질이라고 추정된다.

항균활성에 미치는 가열처리의 영향

분리 젖산균 대사산물의 가열 처리에 대한 안정성을 알아보기 위하여 대사산물을 50, 60, 70, 80 및 90°C의 온도에서 30분간 가열처리 하였고, 121°C 경우에는 15분간 처리하였다. Table 6에서와 같이 본 대사산물은 모든 온도에서 안정하였으며, 항균력의 소실이 거의 없었다. 따라서, 대사산물은 열에 대해서 매우 안정한 물질이라고 추측된다.

이와 비슷한 결과로는 *Lactobacillus plantarum* Lp2가 생성하는 증식억제 물질은 120°C에서 15분간 열처리에도 억제 작용이 소실되지 않았고⁽²⁶⁾, plantaricin A도 100°C에서 30분 열처리에도 안정하여 내열성이 크게 나타났다⁽²⁷⁾. 그러나, 김치에서 분리한 젖산균 A7(*Pediococcus cerevisiae*) 대사산물은 80°C에서 15분간 열처리에 항균효과가 소실⁽²⁵⁾된 것으로 나타나 젖산균이 생성하는 항균성물질의 열 안정성은 다양한 것으로 추정된다.

분리 균주와 그 대사산물의 pH와 적정산도의 측정

분리 균주를 MRS broth에서 24시간 발효한 액 10 mL 자체, 그리고 제균하여 얻은 대사산물을 배지에 10% 및 20%(v/v) 첨가한 경우의 pH와 적정산도를 측정하였다. 적정산도는 젖산균의 주 발효산물인 젖산량으로 계산하였다.

젖산균을 24시간 발효한 액과 대사산물을 배지에 10% 및 20%(v/v) 첨가한 경우의 pH와 적정산도를 측정한 결과는 Table 7에 나타내었다. 젖산균을 24시간 발효한 액의 pH는 3.71-4.26이었으며, 이때의 적정산도의 값은 1.16-1.96%이었다. NB배지에 대사산물 10%를 첨가한 경우 pH는 5.70-6.47이었고, 20%를 첨가한 경우 pH는 4.22-4.83이었다. TSB배지에 대사산물 10%를 첨가한 경우 pH는 5.77-6.53이었고, 20%를 첨가한 경우 pH는 4.83-5.38이었다. 이때의 대사산물 10%를 첨가한 경우 적정산도의 값은 0.16-0.26%이었으며, 20%를 첨가한 경우는 0.32-0.44%이었다.

pH의 감소와 산의 생성은 젖산균이 생산하는 유기산(젖산과 초산 등)에 의한 것으로 추정된다.

항균활성에 미치는 pH의 영향

항균활성에 미치는 pH의 영향을 살펴보기 위하여, 배지(TSB 혹은 NB)에 1 N HCl을 이용하여 배지의 pH를 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 및 6.5로 조정 한 후, 식중독 미생물을 접종하여 배양하였다. Bioscreen C를 사용하여 식중독 미생물의 증식 억제율을 측정한 항균활성의 결과는 Table 8에서

Table 7. Changes in pH and titratable acidity in MRS broth, NB and TSB added with metabolites (10% or 20%) from each isolate

Strains	pH				Titratable acidity (% as lactic acid)			
	MRS	NB		TSB		MRS	TSB	
		10%	20%	10%	20%		10%	20%
Control	6.49	6.80	6.80	7.48	7.48	-	-	-
K1	3.71	6.01	4.22	6.07	4.83	1.95	0.26	0.44
D2	3.71	6.05	4.22	6.11	4.83	1.96	0.24	0.43
F20-3	4.26	6.47	4.79	6.53	5.38	1.16	0.16	0.32
F35-2	3.71	5.70	4.23	5.77	4.83	1.96	0.23	0.43

Table 8. Inhibitory effects of initial pH against food-borne microorganisms

Microorganisms tested	Initial pH						
	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	99.90 ¹⁾	93.02	80.05	66.54	42.88	41.88	10.48
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	99.28	98.38	98.33	54.80	41.30	38.77	37.96
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	99.14	93.80	88.34	63.07	54.41	38.42	12.49
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	99.25	99.01	93.01	61.67	52.14	37.64	24.00
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	99.57	98.00	73.64	53.67	30.01	21.59	11.70
<i>S. Enteritidis</i> KCCM 12021	99.53	88.55	77.81	66.33	52.85	37.70	18.47

¹⁾See footnote on Table 4.

Table 9. Inhibitory effects of lactic acid concentration against food-borne microorganisms

Microorganisms tested	Lactic acid (% v/v)						
	0.01	0.05	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	9.60 ¹⁾	9.74	9.78	58.37	84.62	99.82	99.97
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	84.55	88.89	91.92	95.71	98.99	100	100
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	4.19	17.01	62.98	92.08	93.47	95.70	96.81
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	19.98	28.38	20.02	64.64	78.05	99.19	99.32
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	9.07	9.60	10.58	43.53	86.13	99.44	99.50
<i>S. Enteritidis</i> KCCM 12021	9.79	12.53	17.44	73.02	86.75	99.38	99.53

¹⁾See footnote on Table 4.

와 같다.

Table 8에서 보는 바와 같이 *B. cereus*와 *S. aureus*는 pH가 4.5 일 때 증식 억제율이 90% 이상으로 나타났으며, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*과 *E. coli* O157:H7은 pH가 4.0 수준에서 증식 억제율이 90% 이상으로 나타났고, *S. Enteritidis*는 pH 3.5 수준에서 증식이 억제되었다. 김 등⁽²¹⁾의 연구에서도 pH 4.5에서 *S. aureus*의 증식은 약간 저해를 받고, pH 3.5에서는 거의 증식하지 못했다고 보고하였다. 이를 통해 식중독 미생물의 증식을 억제하기 위해서는 pH 3.5이하가 되어야 한다고 판단된다.

항균활성에 미치는 젖산농도의 영향

식중독 미생물의 젖산농도에 따른 증식양상을 살펴보기 위해, 젖산을 배지에 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 및 1.5% (v/v) 농도가 되도록 한 후 식중독 미생물을 접종하였다. Bioscreen C를 사용하여 식중독 미생물의 증식 억제율을 측정 한 결과는 Table 9와 같다.

본 실험에서도 젖산의 첨가농도가 증가됨에 따라 식중독 미생물의 증식도 억제되었으며, *B. cereus*와 *S. Typhimurium*의 경우에는 0.3-0.5% 젖산농도에서 증식이 억제되었고, *L.*

monocytogenes, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7과 *S. Enteritidis*에서는 1% 젖산농도에서 증식 억제되었다. 문헌에 따르면 젖산농도에 따른 *L. monocytogenes*(초기 접종농도 10³ CFU/mL)의 증식양상은 0.5% 농도에서 72시간 배양 후에는 완전히 균의 증식이 억제되었다고 보고되었다⁽²⁸⁾.

본 실험에서는 *B. cereus*와 *S. Typhimurium*은 K1, D2 및 F35-2 등의 대사산물 10% 농도에서 증식이 90%이상 억제되었으며, 이때의 pH는 5.70-6.01, 적정산도는 0.23-0.26%로 나타났다(Table 7). *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7과 *S. Enteritidis*는 K1, D2 및 F35-2 등의 대사산물 20% 농도에서 증식이 90%이상 억제되었는데, 이때의 pH는 4.83-4.87이었고, 적정산도는 0.41-0.44%로 나타났다.

Garrote 등⁽²⁹⁾의 실험에서도 Kefir 상징액이 식중독 미생물의 증식을 억제한다고 보고하였으며, 이때의 젖산 농도는 0.47% 정도로 동일농도의 젖산보다 항균효과가 우수하였다. 이를 통해 Kefir 상징액의 증식억제 물질은 유기산과 함께 젖산발효 중 생성된 대사산물이 관계될 것으로 추정하였다.

이러한 결과를 종합하여 보면, 분리한 대사산물은 유사한 pH와 젖산 농도에서보다 식중독 미생물의 증식 억제가 우수하게 나타났으므로 분리된 균주의 증식억제 물질은 유기산

Table 10. Organic acid production in MRS broth fermented by isolated strains

Isolates	Fermentation time (h)	Organic acid (%)	
		Lactic acid	Acetic acid
D2	24	1.84	-
	48	2.28	-
	72	2.32	-
F20-3	24	0.91	0.22
	48	1.12	0.24
	72	1.72	0.25
F35-2	24	1.85	-
	48	2.29	-
	72	2.33	-

과 다른 대사산물이 같이 관계하는 것으로 추정된다.

HPLC에 의한 유기산 분석

분리된 젖산균을 배양하는 동안의 배양액 중 유기산 생성량을 측정하기 위하여, D2, F20-3 및 F35-2 균주를 MRS broth에서 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 시료를 취하여 HPLC로 유기산의 함량과 종류를 분석하였고, 그 결과는 Table 10과 같다.

분리 균주 D2, F20-3 및 F35-2의 발효액은 발효가 진행되어 감에 따라 유기산 함량도 증가하였다. K1과 F35-2에서는 발효 24시간에 1.84, 1.85%의 젖산만이 생성되었고, F20-3에서는 발효 24시간에 0.91% 젖산과 0.22%의 초산이 생성되었다.

*L. plantarum*은 젖산만을 생성하는 homo형 발효를 하고, *L. fermentum*은 젖산과 초산을 형성하는 hetero형의 발효를 한다⁽³⁰⁾고 알려져 있으며, D2와 F35-2(*L. plantarum*)는 homo형, F20-3(*L. fermentum*)은 젖산과 소량의 초산이 형성되는 hetero형의 발효를 하는 것으로 확인하였다. 이를 통해 동정된 젖산균 발효형태는 HPLC로 유기산을 분석하여 얻은 결과와 일관된 결과를 나타냄을 알 수 있었다.

*L. plantarum*은 식중독 미생물 및 호냉성 균주들에 대해 증식억제 작용을 나타낸다고 보고^(22,27)되었으며, 항균물질로는 이 균주가 생산하는 젖산이외에 plantaricin A, B, C, F, S, T, BN, C19 및 SA6 등의 bacteriocin도 생성한다고 알려져 있다⁽³¹⁾.

*L. fermentum*의 경우에도 장내 부패 세균에 대해 증식억제 효과가 있다고 보고되었다^(32,33).

본 실험에서도 *L. plantarum*(D2와 F35-2)과 *L. fermentum*(F20-3)으로 동정된 분리균주의 대사산물은 121°C에서 15분간의 열처리에도 안정했으며(Table 6), 대사산물은 젖산이외의 다른 물질이 항균작용에 기여하는 것으로 보여지므로(Table 7-9), 항균작용에 기여하는 물질을 구명하고 분리하는 연구가 계속 되어야 할 것이다.

요 약

식중독 미생물의 증식을 억제하며, probiotic으로 작용할 수 있는 균주로서 가능성이 있는 젖산균을 신생아 분변과 동치

미서 젖산균을 분리(0.15%의 담즙산염과 pH 3.0인 산성조건) 하였고, 항균활성이 우수한 젖산균을 선발하였다. D2와 F35-2 균주는 *Lactobacillus plantarum*, F20-3 균주는 *L. fermentum*으로 동정되었다. 젖산균 대사산물의 특성과 항균 기작을 알아보기 위해 몇 종의 식중독 미생물(*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis*)을 사용하였으며, 항균활성 Bioscreen C로 측정하였다. 젖산균의 대사산물의 특성을 확인한 결과 pH가 중성으로 갈수록 항균효과가 감소하는 경향을 나타내었다. Catalase 효소처리 후에는 F20-3 균주만 항균활성이 소실되어 항균활성의 원인으로 H₂O₂의 영향이 있을 것으로 추정되었다. 단백질을 분해 효소(trypsin, pepsin)처리에는 항균활성에 영향이 없었고, 121°C 15분간 열처리에도 안정한 물질로 추정되었다. 분리 균주 대사산물은 유사한 pH와 젖산 농도보다 식중독 미생물의 증식 억제에 우수하여 분리된 균주의 증식억제 물질은 유기산 및 대사산물과 관계가 있을 것으로 추정되었다. 분리 균주가 생성하는 유기산을 HPLC로 정량 한 결과, D2와 F35-2는 발효 24시간에 각각 1.84, 1.85%의 젖산만이 생성되었고, F20-3은 발효 24시간에 0.91%의 젖산과 0.22%의 초산을 생성하였다. 이것으로 볼 때 젖산발효형태는 D2와 F35-2는 homo형이고, F20-3은 hetero형의 발효를 하는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

- Gilliand, S.E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.* 72: 2483-2494 (1989)
- Gilliand, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 337-343 (1985)
- Shortt, C. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in Food Sci. Technol.* 10: 411-417 (1999)
- Loucif, F. and Melzi, A. In vitro study of antagonistic activity of *Bifidobacteria* against *Campylobacter* and *Escherichia coli* causing gastroenteritis in children. *Archives. Institut. Pasteur d'Algerie.* 62: 63-76 (1998)
- Harasawa, R., Suzuki, K. and Mitsuoka, T. *Streptococcus faecium*-derived antibacterial substance antagonistic to *Bifidobacteria*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 18: 58-62 (1980)
- Pitt, W.M., Harden, T.J. and Hull, R.R. Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 63: 916-920 (1999)
- Brashears, M.M. and Durre, W.A. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during growth and refrigerated storage. *J. Food Prot.* 62: 1336-1340 (1999)
- Lee, M.K., Park, B.K., Jeong, C.K. and Oh, D.H. Antimicrobial activity of glycerol monolaurate and organic acids on the survival of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Sci. Nutr.* 6: 6-9 (2001)
- Buchanan, R.L. and Golden, M.H. Interaction of citric acid concentration and pH on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *J. Food Prot.* 57: 567-570 (1994)
- Dahiya, R.S. and Speck, M.L. Hydrogen peroxide formation by

- Lactobacilli* and its effects on *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 51: 1568-1573 (1968)
11. Gilliland, S.E. and Ewell, H.R. Influence of combinations of *Lactobacillus lactis* and potassium sorbate on growth of psychrotrophs in raw milk. J. Dairy Sci. 66: 974-980 (1983)
 12. Hamdan, I.Y. and Mikolajcik, E.M. Acidolin: an antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus*. J. Antibiotics 27: 631-636 (1974)
 13. Shahani, K.M., Vakil, J.F. and Kilara, A. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus* and isolation of acidophilin from *Lactobacillus acidophilus* culture. J. Dairy Prod. 12: 8-11 (1977)
 14. Jay, J.M. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol. 44: 525-530 (1982)
 15. Paul, K. and Ohlsson, A. The Chemical Structure of Lactoperoxidase in the Lactoperoxidase System, pp. 14-22. Marcel Dekker, New York, USA (1985)
 16. Lee, J.Y. Growth inhibition of some food-borne microorganisms by lactic acid bacteria isolated from feces of newborn baby and *dongchimi*. M.S. thesis, Chonbuk National University, Jeonju (2002)
 17. Mitsuoka, T. Intestinal Bacteriology, pp. 477-480. Asakura Shoden, Tokyo, Japan (1990)
 18. Gorbach, S.L. and Goldin, B.R. *Lactobacillus* strains and methods of selection. U.S. Patent 4,839,281 (1989)
 19. Kuhnen, E., Sahl, H.G. and Brandis, H. Purification and properties of LIQ4, and antimicrobial substance produced by *Streptococcus faecalis* var liquefaciens K4. J. Gen. Microbiol. 131: 1925-1932 (1985)
 20. Kozak, W., Bardowski, J. and Dobranski, W.T. Lactostrepcin - acid bacteriocin produced by lactic streptococci. J. Dairy Res. 45: 247-249 (1978)
 21. Kim, S.H., Sung, H.J. Shin, Y.S., Kim, D.H. and Lee, K.S. Inhibition effect of lactic acid bacteria and its metabolites on the growth of *Staphylococcus aureus*. Korean J. Food Sci. Technol 26: 644-648 (1994)
 22. Chin, H.S., Shim, J.S., Kim, J.M., Yang, R. and Yoon, S.S. Detection and antibacterial activity of a bacteriocin produced *Lactobacillus plantarum*. Food Sci. Biotechnol. 10: 461-467 (2001)
 23. Ildrim, Y.Z. and Johnson, M.G. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. J. Food Prot. 61: 47-51 (1998)
 24. Block, S.S. Peroxygen Compounds in Disinfection, Sterilization and Preservation, 4th ed. pp. 169-180. Lea & Feabiger, Philadelphia, USA (1991)
 25. Kweon, J.J. Microbial inhibition by some lactic bacteria from *kimchi*. M.S. thesis, Chung-Ang University, Seoul (1983)
 26. Park, U.H. and Song, H.J. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* Lp2 isolated from Kimchi. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 637-643 (1991)
 27. Daeschel, M.A., McKenny, M.C. and McDonald, L.C. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 7: 91-98 (1990)
 28. Ahamad, M. and Marth, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. J. Food Prot. 52: 688-695 (1989)
 29. Garrote, G.L., Abraham, A.G. and Antoni, G.L. Inhibitory power of Kefir: the role of organic acids. J. Food Prot. 63: 364-369 (2000)
 30. Shin, Y.S. Studies on the survival of lactic acid bacteria and its effects in the condition of intestine. Ph.D. dissertation, Wonkwang University, Iksan (2000)
 31. Olasupo, N.A. Bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods. J. Folia Microbiologica. 41: 130-136 (1996)
 32. Heinemann, C., Vlieg, J.E.T., Janssen, D.B., Busscher, H.J., Mei, H.C. and Reid, G. Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. FEMS Microbiology Letters 190: 177-180 (2000)
 33. Gutierrez, R.C., Santos, V. and Nadermacias, M.E. Protective effect of intranasally inoculated *Lactobacillus fermentum* against *Streptococcus pneumoniae* challenge on the mouse respiratory tract. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 31: 187-195 (2001)
 34. Smeianov, V., Scott, K. and Reid, G. Activity of cecropin P1 and FA-LL-37 against urogenital microflora. Microbes and Infection 2: 773-777 (2000)

(2002년 1월 24일 접수)