

## Lactobacillus sakei BK19의 어류 병원성 세균에 대한 항균활성

양병규 · 이제희 · 허문수\*  
제주대학교 해양생산과학부

본 실험의 목적은 Gram 양성균 뿐만 아니라 Gram 음성세균에 대한 넓은 항균활성 및 내산성 그리고 항생제 내성을 갖고 있는 유용한 probiotic 후보균주를 선발하여 어류의 세균성 질병 예방 혹은 치료를 함으로써 양식산업의 효율성을 증대시키고자 한다. 20 균주의 유산균을 김치, 양식 넙치의 장 그리고 각종 젓갈류 등에서 분리하여 어류 병원성 세균에 대한 항균능을 MRS agar 상에서 agar spotted method에 의해 조사하여 *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda* 그리고 *Streptococcus* sp.에 대해 항균활성이 있는 7 균주를 1 차 선발 하고 이들 중 항균스펙트럼이 넓은 BK19를 최종선발하여 동정한 결과 *Lactobacillus sakei* BK19로 나타났다. *L. sakei* BK19의 cell free supernatant를 pH 중화 및 catalase 처리한 후 어병세균에 대하여 항균활성을 확인하였다. *L. sakei* BK19의 supernatant의 *V. anguillarum* 및 *V. alginolyticus*에 대한 항균성 기작은 주사전자현미경 관찰을 통하여 확인하였고 세포벽을 붕괴 시킴으로써 성장을 저해하고 사멸시키는 것으로 확인되었다.

**Key words** □ fish diseases, lactic acid bacteria, probiotic, *Vibrio anguillarum*

Probiotics란 숙주동물의 장내균총(intestinal microbes)을 개선시킴으로써 숙주에게 유익한 영향을 주는 미생물 첨가제를 말한다(3). Probiotics로서 많이 이용되어 온 미생물은 유산균(lactic acid bacteria, LAB)이다(9). 유산균은 그람양성, 비운동성, 비포자성 및 catalase 음성인 세균으로서 자연계에 널리 분포하고 있을 뿐만 아니라 동물의 장이나 발효식품 등에서도 쉽게 발견된다(9). 이들 유산균들이 항균활성 등에 의해 장내균총을 개선시키는 중요한 미생물이라는 것은 이미 많이 알려져 있으며 이러한 유산균의 항균활성 인자는 유기산과 과산화수소 및 bacteriocin (8) 등에 의한다. 유산균의 병원성 세균에 대한 항균활성에 대한 연구는 *Listeria monocytogenes* (2), *Escherichia coli* (1), *Salmonella typhimurium* (4), *Vibrio anguillarum* (7) 등의 미생물에 대한 항균활성이 있다고 보고되어 있다. 그러나 probiotics로서 유산균은 대부분의 어병세균 및 병원성 세균이 그람음성인데 반하여 그 항균활성은 계통적으로 유사한 그람양성 세균에 대해서만 항균활성을 나타낸다는 한계점이 있다(11). 따라서 probiotics 균주로서 산업적으로 응용하기 위해 분리된 균주는 그람양성 세균 뿐만 아니라 그람음성 세균의 성장까지도 저해할 수 있는 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있어야 한다.

따라서 본 논문은 어병세균에 대한 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있는 probiotics 균주를 어류의 장내와 한국의 전통 발효식품인 김치와 젓갈 등에서 선발하여 항균특성을 밝히고 어류의 세균성 질병 예방 혹은 치료를 증대시키기 위한 기초 실험이다.

### 재료 및 방법

#### 유산균의 분리 및 선정

김치 및 각종 젓갈류는 생리식염수로 단계 희석시켜 사용하였고 양식어류는 장내를 생리식염수로 세척 후 단계 희석시킨 후 배양하여 20 여종의 유산균을 분리하였다. 유산균 배양배지로는 1%의 CaCO<sub>3</sub>를 첨가한 mann, rogosa and sharpe broth 및 agar (MRS, Difco, Detroit, USA)를 사용하였다. 분리된 균은 면양 혈청배지에 도말하여 용혈성을 확인하여 비용혈성 유산균을 선택하였다.

#### 피검균의 분리

어병세균인 *Vibrio anguillarum* KCTC 2711(이하 *V. anguillarum*)는 한국유전자은행(The Korean Collection for Type Cultures)에서 분양 받아 사용하였고, *Edwardsiella tarda* (이하 *E. tarda*) 및 *Streptococcus* sp.는 병에 걸린 넙치의 두신 및 비장에서 직접 분리하였다. 병원세균의 배양은 *V. anguillarum*인 경우 trypticase soy broth (TSB, Difco, Detroit, USA), *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp.인 경우 brain heart infusion broth (BHIB, Difco, Detroit, USA)를 이용하여 32°C에서 배양하였다.

#### 피검균 길항 유산균의 분리 및 선정

유산균에 의한 항균활성은 *V. anguillarum*, *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp.에 대한 길항능을 확인하여 후보균주를 선발하였다. Bacteriocin 유사물질에 의한 항균활성을 갖고 있는 균주를 선발하기 위하여 nutrient agar (NA, Difco, Detroit, USA) 배지 상에서 spotted method (2,10)로 검토하였다. Agar spotted

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-64-754-3473, Fax: +82-64-756-3493  
E-mail: msheo@cheju.cheju.ac.kr

method는 전 배양된 probiotic 후보균주 5 µl를 NA 한천배지 표면에 적하시킨 후 37°C에서 24 시간 배양하여 집락이 형성된 표면에 10<sup>5</sup> CFU/ml의 피검균이 첨가된 연 한천배지(0.7% agar) 10 ml를 중층하여 4°C에서 4 시간 방치한 후 32°C에서 24 시간 배양하여 저지환을 확인함으로써 항균활성을 측정하였다.

### 공시균주의 선정 및 동정

항균활성이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선발하여 그람염색, 포자유무, 운동성 및 전자현미경 관찰 등 형태학적 특성을 확인하였다. 생화학적 성상은 Api 50CHL (Biomérieux, France)을 이용하여 상법에 따라 시행하였고 16S rRNA PCR을 통한 동정은 전 배양된 균체를 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)을 이용하여 상법에 따라 선발균주의 total DNA를 분리하여 TE buffer에 희석 시킨 후 PCR 반응을 하였다. PCR 반응은 총 부피 50 µl에 genomic DNA 3 µl, Taq DNA polymerase (Bioneer, Changwon, Korea) 2.5 µl, 10×reaction buffer 5 µl, deoxy nucleoside triphosphates 2 µl, TE buffer 32.5 µl, 각각의 primer (forward primer 5'-GCC GCG TGA GTG AAT AAG G-3'와 reverse primers 5'-ACA TGC TCC ACC GCT TGT G-3') 2.5 µl를 첨가하여 반응하였다. 증폭은 프로그래밍 된 DNA mini cycler (PTC-150, MJ Research, USA)에서 수행하였다. PCR 반응 조건은 먼저 94°C에서 5 분간 denaturation하고, 30 주기 동안 94°C에서 45 초간 denaturation, 50°C에서 45 초 annealing, 72°C에서 45 초간 extension 하여 마지막으로 72°C에서 10 분간 extension을 수행하였다. 증폭된 PCR product는 1% agarose gel을 0.5 µg/ml ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

### L. sakei BK19 supernatant 제조

L. sakei BK19를 MRS broth로 37°C에서 24 시간 동안 전 배양 한 후 7000×g에서 10 분간 원심 분리하여 세균을 제거하고 유기산과 과산화수소에 의한 항균력을 배제하기 위하여 0.1 N NaOH로 pH를 6.5로 중화시키고 catalase (5 mg/ml)를 5 분간 처리한 후 얻어진 상등액을 evaporator로 5 배 농축하였다.

### L. sakei BK19의 항균 스펙트럼

L. sakei BK19의 항균 스펙트럼을 확인하기 위하여 agar spotted method를 이용하였다. 피검균으로는 병원성 세균인 V. alginolyticus KCTC 2928, V. mimicus KCTC 2737, V. parahaemolyticus KCTC 2471, V. vulnificus KCTC 2962, V. salmonicida KCTC 2726 및 V. harveyi KCTC 2717를 10<sup>5</sup> CFU/ml의 농도로 희석시킨 연 한천배지(0.7% agar)를 BK19가 성장해있는 배지 표면에 중층한 후 앞에서 기술한 바와 같이 저지환을 확인하였다. 최소억제농도(minimum inhibition concentration, MIC) 측정은 microtitre plate assay를 통하여 확인하였다. 피검균에 따라 200 µl의 적정 배양액과 상등액을 2 배 희석법으로 희석, 혼합한 후 피검균을 10<sup>5</sup> CFU/ml의 농도로 2 µl 접종하여 32°C에서 24 시간 배양하면서 시간대별(4, 6, 12, 24 시간) 흡광도를 630 nm에서 확인하였다.

### Scanning electron microscope (SEM) 관찰

Supernatant의 항균기작 확인을 위해 병원균의 확인 및 병원균의 형태적 변화를 SEM을 통하여 관찰하였다. 각각 V. anguillarum과 V. alginolyticus를 접종한 BHI broth에 중화시킨 L. sakei BK19 supernatant를 첨가한 후 3 시간 동안 상온에서 배양한 후 간계희석법에 의해 생균수를 확인하고, 동시에 원심 분리하여(8000×g, 5 분) pellet을 모은 후 인산 완충액(PBS, pH 7.2)으로 15 분씩 2 회 세척하였다. 모아진 cell은 2.5% glutaraldehyde로 2 시간 동안 처리하여 전고정 하고 PBS (pH 7.2)로 15 분씩 2 회 세척하였다. 후고정을 위해 1 시간 동안 1% osmium tetroxide (OsO4)로 처리한 후 PBS로 다시 세척하였다. 세척된 cell은 50~100% 까지 조절된 에탄올에 침적하여 탈수하고 60~100% 까지 조절된 isoamylacetate를 이용하여 치환시키고 critical point dryer (HITACHI, HCP-2, Japan)를 이용하여 CO<sub>2</sub> dry를 하고 gold 코팅(HITACHI, E-1010, 10 N sputter, Japan)한 후 전자현미경(HITACHI, S-2460N, Japan)으로 관찰을 하였다.

## 결과 및 고찰

### 유산균의 분리 및 선정

20 균주의 유산균을 Table 1과 같이 김치, 어류의 장 그리고 젓갈류 등에서 분리하고 병원성 세균인 V. anguillarum, E. tarda 및 Streptococcus sp. 등에 대한 항균활성이 있는 probiotic 후보 균주 중에서 V. anguillarum에 대한 항균활성은 BK1(김치), BK4(넙치 장), BK6(넙치 유문수), BK15(멸치젓), BK18(오징어 젓) 및 BK19(창란젓)에서 확인되었고(Fig. 1a), BK4와 BK19에서는 Streptococcus sp.에 대한 항균활성이 확인되었으나(Fig. 1b) E. tarda에 대한 항균활성은 BK19에서만 관찰되었고(Fig. 1c) E. tarda 및 Streptococcus sp.에 대한 항균활성은 김치에서 분리된 모든 균주에서 항균 스펙트럼이 좁았다(Fig. 1d).

Choi 등(1)의 보고에 의하면 김치에서 분리된 Pediococcus 속과 Leuconostoc 속 등에서도 E. coli에 대한 항균활성이 확인되

Table 1. Isolated strains and isolation source

Strain No.	Isolation source	Strain No.	Isolation source
BK1	Kimchi	BK11	Flounder rectum
BK2	Kimchi	BK12	Puffer intestine
BK3	Kimchi	BK13	Rotifer tank
BK4	Flounder intestine	BK14	Fermented octopus
BK5	Flounder esophagus	BK15	Fermented anchovy
BK6	Flounder esophagus	BK16	Fermented shrimp
BK7	Flounder pylorus	BK17	Fermented coralfish
BK8	Flounder pylorus	BK18	Fermented cuttlefish
BK9	Flounder stomach	BK19	Fermented pollack viscera
BK10	Flounder genitals	BK20	Fermented rice wine

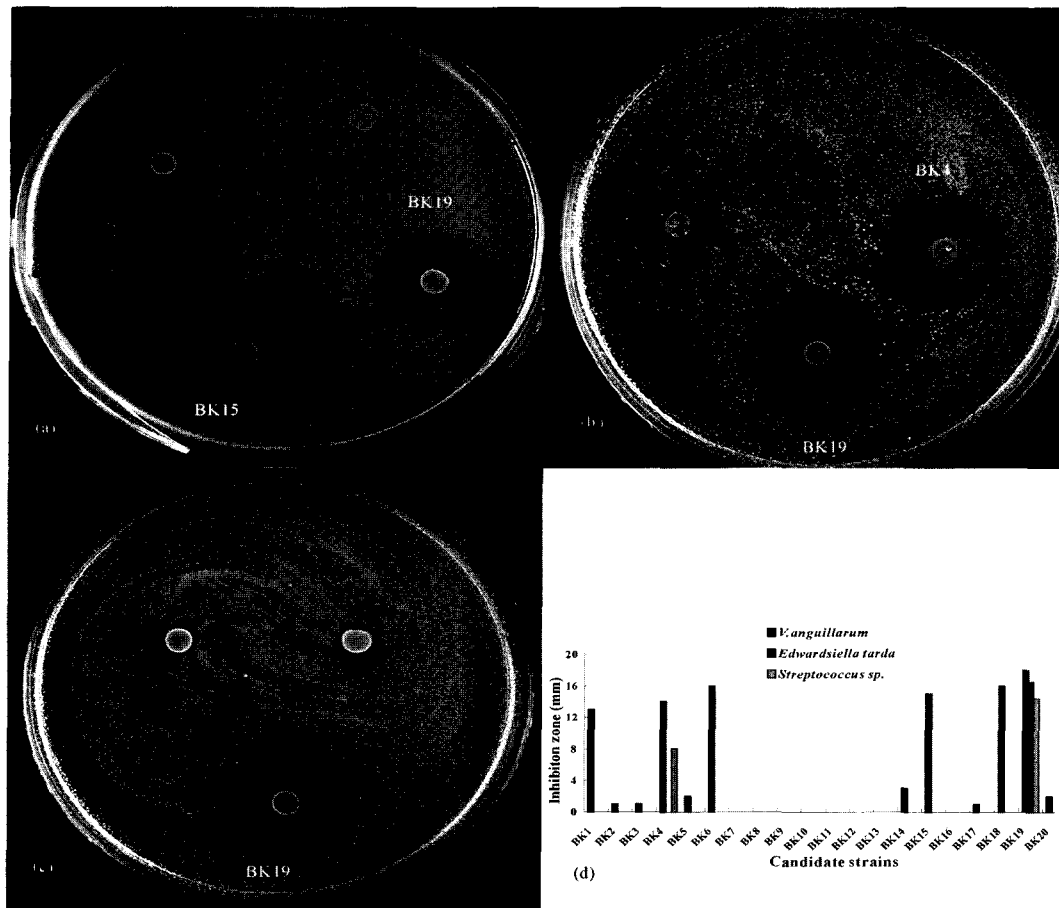


Fig. 1. Antibacterial activity of the isolated LAB against *V. anguillarum* (a), *Streptococcus sp.* (b), *E. tarda* (c), and inhibition zone of diameters (d). Overlaid on nutrient agar and cultured at 32°C.

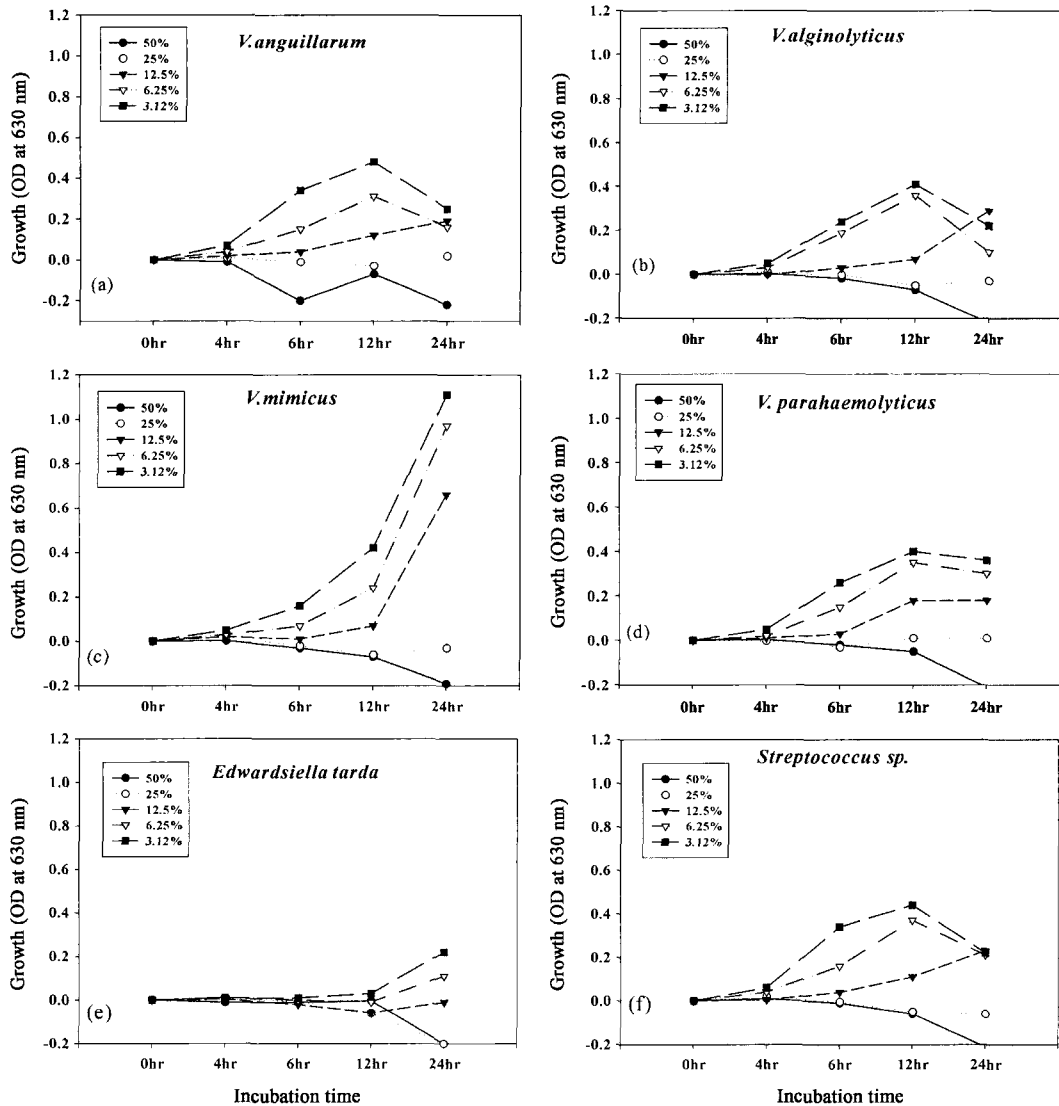


Fig. 2. Alignment of 16S rRNA of the isolated LAB, BK19 from fermented pollack viscera.

었다. 그러나 본 실험에서 분리된 김치 유산균의 항균활성은 BK1에서만 *V. anguillarum*에 대한 항균활성이 관찰되었고 BK2 및 BK3에서는 항균활성이 관찰되지 않았다. NA배지 상에서 관찰된 저지환은 병원세균에 대한 특이적 항균활성이 확인되었는데 이는 NA배지의 구성 성분이 단백질원 중심으로 되어있고 발효를 위한 탄소원이 결핍되어 유기산을 생산하지 못하기 때문이며 NA배지에서 관찰되는 저지환의 영향은 유기산이 아닌

Table 2. Inhibitory effect of *L. sakei* BK19 against the growth of various pathogenic bacteria

Test organism	Inhibition zone (mm)
<i>V. anguillarum</i>	18
<i>V. alginolyticus</i>	13.6
<i>V. mimicus</i>	8.6
<i>V. parahaemolyticus</i>	8.1
<i>V. vulnificus</i>	7.7
<i>V. harveyi</i>	6.8
<i>V. salmonicida</i>	7.6
<i>E. dwardsiella tarda</i>	15
<i>Streptococcus sp.</i>	12



**Fig. 3.** Growth of pathogenic bacteria by the addition of *L. sakei* BK19 supernatant (%). (a) *V. anguillarum*, (b) *V. alginolyticus*, (c) *V. mimicus*, (d) *V. parahaemolyticus*, (e) *E. tarda* and (f) *Streptococcus sp.*

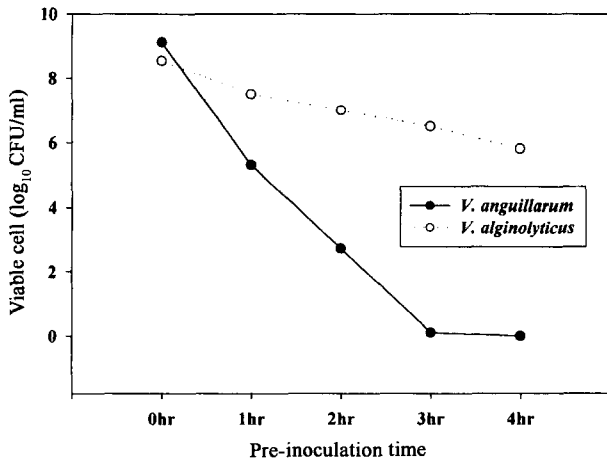
**Table 3.** MIC of *L. sakei* BK19 supernatant against various pathogenic bacteria

Strains	Supernatant concentration (%)							
	100	50	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.7
<i>E. tarda</i>	---	---	--	-	++	+++	+++	+++
<i>Streptococcus sp.</i>	---	---	-	+	+++	+++	+++	+++
<i>V. anguillarum</i>	---	--	--	++	+++	+++	+++	+++
<i>V. alginolyticus</i>	---	--	+	++	+++	+++	+++	+++
<i>V. mimicus</i>	---	--	-	+	++	+++	+++	+++
<i>V. parahaemolyticus</i>	--	-	+	+++	+++	+++	+++	+++

---, NO growth; --, <math>10^1</math> CFU/ml; -, <math>10^2</math> CFU/ml; +, <math>10^3</math> CFU/ml; ++, <math>10^4</math> CFU/ml; +++, <math>10^6</math> CFU/ml; +++, >math>10^8</math> CFU/ml.

bacteriocin-like substance에 의한 것이라고 판단된다. 또한 탄소원이 없는 배지에서는 유산균의 성장이 극히 제한되기 때문에 항균성 물질을 분리할 수 없다고 판단된다. 대부분의 bacteriocin

생산 유산균들은 좁은 항균 스펙트럼을 갖고 있으며 계통적으로 유사한 그람양성 세균에 대해서만 저해를 하는 것이 대부분인데 본 실험에서 분리된 probiotic 후보균주 중 BK4와 BK19는 그람



**Fig. 4.** Viable cells of the indicator strains *V. anguillarum* and *V. alginolyticus* treated with supernatant of *L. sakei* BK19.

음성 세균인 *V. anguillarum* 및 그람양성 세균인 *Streptococcus* sp.에 대해서도 항균활성을 보여 비교적 항균 스펙트럼이 넓다고 여겨진다.

**공시균주의 선정 및 동정**

상기의 결과를 토대로 항균 스펙트럼이 넓어 probiotic 균주로서 적합한 균을 창란젓에서 분리하여 BK19로 간히 명명하고 동

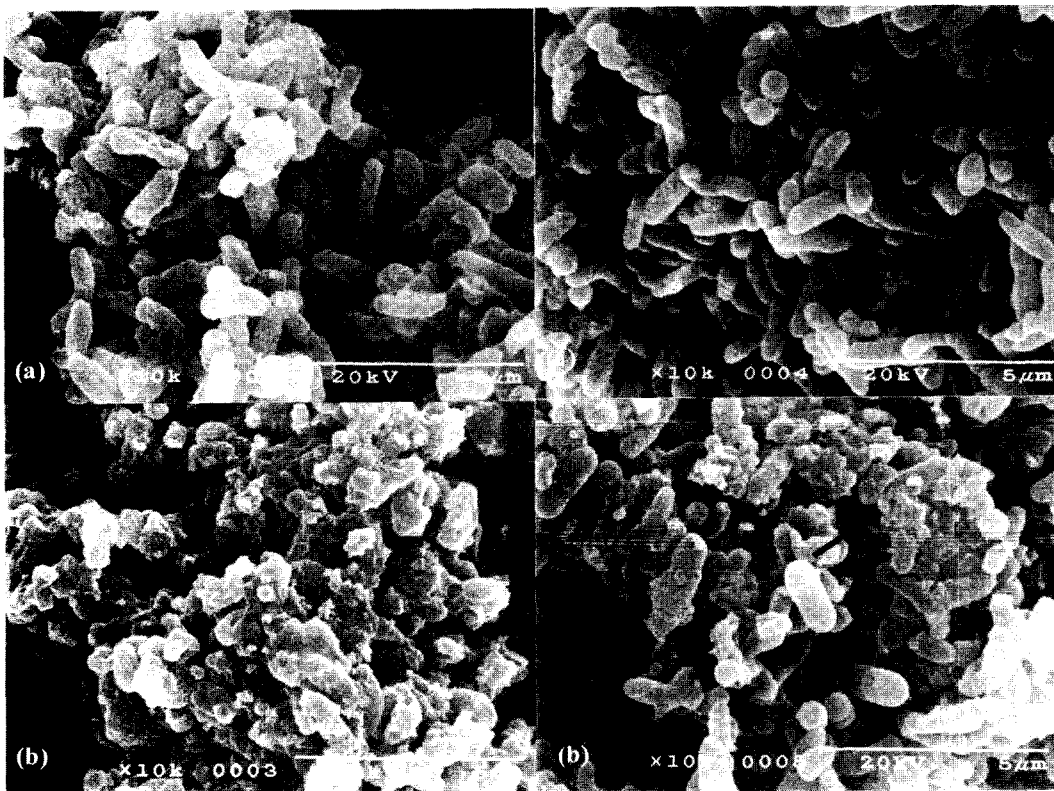
정하였다. 창란젓에서 분리된 BK19 균주는 그람양성, 비 운동성, catalase 음성인 유산균으로서 16S rRNA PCR 증폭을 통한 555 bp의 oligo nucleotides를 sequence하여 GeneBank의 database에 있는 *Lactobacillus* spp.와 alignment한 결과(Fig. 2) *Lactobacillus sakei*와 100% 유사하여 본 공시균을 *Lactobacillus sakei* BK19로 명명하였다.

***L. sakei* BK19의 항균 스펙트럼**

병원성 vibrio인 *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*에 대해서도 항균활성이 관찰되었다. 그러나 *V. alginolyticus*, *V. salmonicida*, *V. harveyi* 및 *V. vulnificus*에 대해서는 항균활성이 관찰되지 않았다(Table 2). 흡광도(OD<sub>630nm</sub>) 관찰을 통한 *L. sakei* BK19 supernatant의 최소억제농도(MIC)는 spotted method의 결과와 유사하게 확인되었고(Table 3) *L. sakei* BK19 supernatant 첨가농도 12~25%에서 병원 세균인 *V. anguillarum*, *E. tarda*, *Streptococcus* sp. 및 *V. mimicus*의 성장을 억제하였다(Fig. 3).

**Scanning electron microscope (SEM) 관찰**

*L. sakei* BK19 supernatant의 항균성 기작은 병원 균주의 확인 및 주사전자현미경(SEM) 관찰을 통하여 관찰하였다. 각각 *V. anguillarum*과 *V. alginolyticus*를 접종한 BHI broth에 *L. sakei* BK19 supernatant를 첨가한 후 세균의 형태와 생균수를 확인한 결과(Fig. 4) *V. anguillarum*인 경우 초기 1×10<sup>8</sup> CFU/ml에서 3



**Fig. 5.** Scanning electron micrographs of *L. sakei* BK19 supernatant treated 3 hr. *V. anguillarum* (left) and *V. alginolyticus* (right). (a) Untreated, (b) Treated.

시간의 supernatant 처리에 의해 그 수가 전멸한 반면, *V. alginolyticus*인 경우  $1 \times 10^7$  CFU/ml의 균수가 확인되어 *V. anguillarum*에 비해 상대적으로 감수성이 낮았다. 형태적 관찰을 통한 항균성 기작은 병원성 세균들의 세포벽이 붕괴됨으로써 항균활성이 확인되었다(Fig. 5). 특히, *V. anguillarum*의 세포벽은 3 시간의 supernatant 처리에 의해 완전히 붕괴된 반면, *V. alginolyticus*는 상대적으로 *V. anguillarum*에 비해 생균수의 감소도 적었고 세포벽의 붕괴현상이 없는 세균도 관찰되었다.

Kang 등(5)에 의하면 유산균의 그람양성 세균과 그람음성 세균에 대한 항균활성은 세포벽을 파괴함으로써 관찰하였다고 보고하고 있어 본 실험과 일치함을 보였다. Nissen 등(6)의 보고에 의하면 유산균의 항균성 인자인 10 kDa 미만의 저분자 내열성 bacteriocin은 barrel-stave mechanism을 통하여 cell membrane channel를 형성함으로써 pore-forming toxin으로 작용하는데 *L. sakei* BK19의 항균성 인자 또한 cell membrane과 상호 작용하여 pore형성 및 cell wall을 파괴함으로써 항균활성을 보이는 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 논문은 학술진흥재단의 2002년도 신진교수연구과제(과제번호 : KRF-2002-003-F00028) 지원에 의한 연구로 연구비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

### 참고문헌

1. Choi, H.J., H.S. Lee., S. Her, D.H. Oh, and S.S. Yoon. 1999. Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 86, 175-180.
2. Corsetti, A., M. Gobbetti, and E. Smacchi. 1996. Antimicrobial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocinlike inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiol.* 13, 447-456.
3. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.
4. Hudault, S., V. Lievin, M.F. Bernet-Camard, and A.L. Servin. 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 513-518.
5. Kang, J.H. and M.S. Lee. 1998. Mode of action of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. GM7311 against gram positive bacteria. *J. Korean Fish. Soc.* 31(4), 560-566.
6. Nissen-Meyer, J., H. Holo, L.S. Havarstein, K. Sletten, and I.F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174, 5685-5692.
7. Olsson, J.C., A. Westerdahl, P.L. Conway, and S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot *Scophthalmus maximus* and dab *Limanda limanda*-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 551-556.
8. Piard, J.C. and M. Desmazeaud. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* 72, 113-142.
9. Ringo, E. and F.J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture.* 160, 177-203.
10. Schillinger, U. and F.K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 901-906.
11. Suma, K., M.C. Misra, and M.C. Varadaraj. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *L. plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 17-25.

(Received January 17, 2003/Accepted March 12, 2003)

**ABSTRACT: Antibacterial Activity of *Lactobacillus sakei* BK19 against Fish Pathogenic Bacteria**  
**Byung-Gyoo Yang, Jehee Lee, and Moon-Soo Heo\*** (Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju-do 690-810, Korea)

The purpose of the present study was to screen the effective of lactic acid bacteria (LAB), as probiotics which are able to protect bacterial fish diseases and investigate their characteristics. Twenty strains of lactic acid bacteria were isolated from fish intestine, fermented fish foods and kimchis. These bacteria were screened for antagonistic activity against fish pathogenic bacteria. Seven tested LAB strains were able to inhibit the fish pathogenic bacteria, including *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus* sp. Of the probiotic candidates, BK19 strain which from fermented pollack viscera indicated the largest inhibition activity. This particular probiotic bacteria was identified and named as *Lactobacillus sakei* BK19. In the scanning electron microscope observation, *L. sakei* BK19 supernatant treated *V. anguillarum* cell wall had been destroyed incubate after 3 hr.