

연구노트

*Lactobacillus reuteri*의 고정화 세포를 이용한 루테린 생산

염은미¹ · 노봉수² · 지근익^{1,3,*}

¹서울대학교 식품영양학과, ²서울여자대학교 식품미생물공학과, ³(주)비피도 기술연구소

Production of Reuterin by Immobilized *Lactobacillus reuteri*

Eun Mi Yum¹, Bong Soo Noh², and Geun Eog Ji^{1,3,*}

¹Department of Food and Nutrition, Seoul National University

²Department of Food and Microbial Technology, Seoul Woman's University

³Research Center, Bifido Co.

Lactobacillus reuteri residing in human and animal intestines converts glycerol into reuterin (antimicrobial substance) in anaerobic condition. Attempt was made to increase production efficiency of *L. reuteri* by employing immobilized cells. *L. reuteri* was immobilized in agarose beads, which were then reacted with 250 mM glycerol solution. Batch-type production of reuterin with immobilized cells (0.5% agarose beads) lasted for about 36 h, although reuterin production decreased with passage of time. In continuous-type production, period of reuterin production with immobilized cells was extended about twofold and production ratio increased 1.5-fold (502 mM) compared with suspended cells (315 mM). Maximum concentration of reuterin reached 47 mM at 80 min after reaction with glycerol solution. Results of this study indicate that immobilization of *Lactobacillus reuteri* in agarose beads increased reuterin production.

Key words: *Lactobacillus reuteri*, reuterin, immobilized cell, batch-type, continuous-type

서 론

프로바이오틱스 중에서도 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*은 사람과 온혈동물의 장관 내 복잡한 미세 환경속에서 중요한 역할을 담당하는 미생물들이며 이들은 숙주의 장관 내 면역적, 혹은 비 면역적 방어벽 형성을 촉진하고 유해균들의 부착을 차단한다. 또한 유해균들을 억제하는 작용을 가진 대사 산물들, 즉, 유기산, 과산화수소, 박테리오신 등을 생산하는 것으로 알려져 있다(1,2). 어떤 종류의 유산균들은 항균력을 나타내는 박테리오신을 생산하지만, 생산되는 박테리오신들의 대부분은 좁은 항균 스펙트럼을 나타낸다. 또한 박테리오신은 그 구조가 폴리펩타이드이기 때문에 단백질 분해효소에 의해 저해능이 약 해지거나 파괴되어 버리기도 한다(1,3). 그에 비해 *L. reuteri*가 분비하는 항균물질인 루테린은 타 유산균의 항균물질과는 달리 장관 내 pH 또는 단백질 분해효소에 의해 영향을 받지 않는다. 또한 루테린은 세균뿐만 아니라 효모, 곰팡이, 원생동물 등에 대한 항균력을 보유하고 있어 항균 스펙트럼이 넓은 특

성을 갖고 있다(4).

*L. reuteri*에 의한 루테린의 생산은 Talarico 등에 의해 처음으로 보고 되었다(5). 즉, 루테린은 일종의 수용성 알데히드 저분자물질이며 *L. reuteri*에 의해 글리세롤이 대사되면 1,3-propandiol(1,3-PDL), β -hydroxypropionic acid와 함께 루테린이 생성되는데, 비타민 B₁₂를 조효소로 사용하는 glycerol dehydratase는 반응의 첫 번째 단계에, 1,3-PDL:NAD+ oxidoreductase는 두 번째 단계에 관여하는 것으로 알려져 있다(5). 루테린의 화학명은 β -hydroxypropionaldehyde(β -HPA)로 분자량은 148이며, 수용액상에서는 β -HPA의 monomeric, hydrated monomeric, cyclic dimeric form의 3가지 형태가 평형상태로 존재한다고 알려져 있다(5,6). 그동안 루테린과 *L. reuteri*-glycerol system을 식품산업 및 의학치료에 적용하려는 연구들이 진행되어 왔다(7-11). 그동안의 루테린 생산은 주로 글리세롤의 영향에 대한 연구가 주로 이루어졌을 뿐, 루테린의 생산에 대한 다양한 환경적 인자 및 생산 방법에 대한 연구는 아직 미비하다고 할 수 있다. Yum 등(12)은 *L. reuteri*의 혼탁 세포를 회분식 또는 연속식 공정에 적용하여 루테린의 생산성을 연구한 결과, 연속식 생산 공정이 회분식 공정에 비하여 루테린 생산성이 높은 것으로 보고하였다. 그러나 루테린의 활용성을 높이기 위하여는, 루테린 생산의 기초 연구가 더욱 필요한 실정이며 루테린의 경제적인 생산 방법의 개발이 필요하다.

본 실험에서는, 고정화된 *L. reuteri*를 이용하여 연속식 공정으로 루테린의 생산성 향상을 시도하였기에 보고하는 바이다.

*Corresponding author: Geun Eog Ji, Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Shillim-Dong, Kwanak-Ku, Seoul 151-742, Korea
Tel: 82-2-880-8749
Fax: 82-2-884-0305
E-mail: geji@bifido.com

재료 및 방법

사용균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 균주는 ATCC에서 구입한 *L. reuteri* ATCC 53608 균주를 사용하였다. 본 배양시에는 MRS broth에 접종하여 계대 배양한 배양액을 3% 접종하였고 37°C 배양기에서 15-18시간동안 혼기상태로 배양하였다. 세포의 증식정도는 상법에 의하여 O.D. 570 nm(Beckman spectrophotometer DU530, CA, USA)에서 투도를 측정하거나 건조 균체량 측정을 위하여 4,000 ×g에서 원심 분리하여 수세한 세포 pellet을 건조하여 항량을 구하였다. 루테린의 항균성을 실험하기 위한 지시균 *Escherichia coli* K12는 LB 배지에 배양하였다.

항균력 검사

E. coli K12 균주는 overnight culture를 통해 약 6×10^8 CFU/mL로 배양하였고 4000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 사용하였다. 루테린의 활성이 높은 경우는 연속된 2-fold 희석식 방법을 사용하여 지시균의 성장 저해능을 측정하였다.

루테린 정량법

루테린(β -hydroxypropionaldehyde, β -HPA) 함량의 분석법은 Luthi-Peng 등의 분석법에 준하였고 acrolein을 표준물질로 사용하였다(13). 실험을 위하여 0.05 N HCl 용매에 tryptophan(Trp)을 넣어 최종 10 mM의 Trp-HCl 용매를 만들었다. 그리고 50 mL의 시료에 10 mM Trp-HCl 용매를 38 mL를 가했다. 그 다음에 37% HCl를 150 mL 위의 혼합액에 더하고 37°C 배양기에서 20분간 반응시켰다. 그 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 반응액의 absorbance를 측정하였다. 필요에 따라 시료를 증류수를 사용하여 희석하여 실험하였다.

고정화 세포를 이용한 회분식 생산

Agarose beads의 경우, agarose를 분말 상태로 121°C, 15분간 살균하였고 30 mL의 살균수와 혼합하였다. 준비된 3 mL의 cell-glycerol 용액과 미리 55°C로 식힌 5 mL의 agarose 용액을 직경 5 mL의 petri dish에서 혼합한 다음 10~20분 정도 무균상 안에서 굳혔다. 마지막으로 직경이 0.4 cm 크기인 구멍 뚫린 튜브로 agarose bead를 만들고 phosphate buffer(pH 7.0)로 두 번 세척하였다. 제조된 beads의 최종 agarose 농도는 각각 0.5%, 1%, 1.5% 이었다. 제조된 각각의 agarose beads는 250 mM glycerol 용액(5 mL)을 함유한 10 mL 용기에 각각 넣고 rubber lid와 aluminum cap으로 용기의 입구를 막은 다음, 용기 안의 공기를 빼내어 진공 상태로 만들었다. 그리고 각각의 용기를 37°C 배양기에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응 후 주사기를 사용해 용기 안의 용액을 꺼내어 시료를 수집하고 다시 250 mM glycerol 용액(5 mL)을 용기 안으로 주입하여 다시 반응을 시켰다. 같은 방법으로 72시간 동안 매 12시간 간격으로 실험을 진행하였다.

고정화 세포를 이용한 연속식 생산

Nalgene disposable filterware(115 mL)의 여과막(0.45 μ m) 상층에 고정화된 세포의 beads를 넣고 유속은 0.45 mL/min로 일정하게 유지한 상태에서 250 mM 글리세롤 용액을 40 mL 반응조 상층부에 투입하였다. 반응조 내의 beads와 magnetic bar가 부딪혀서 beads가 부서지는 것을 막기 위해 최대한 낮은 속도로 magnetic bar를 회전시켰다. 연속적으로 루테린을 생산시키며 하층으로 유출되는 반응액은 튜브를 통해서 pump에 의해 일정

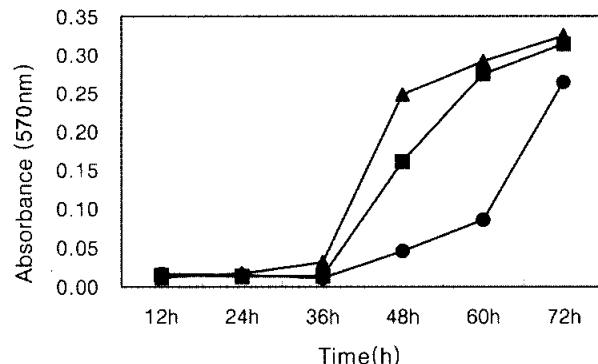


Fig. 1. Cell growth (O.D. at 570 nm) of *E. coli* K12 after treatment with reuterin produced by batch-type system with immobilized cells.

●: 0.5% agarose beads, ■: 1.0% agarose beads, ▲: 1.5% agarose beads.

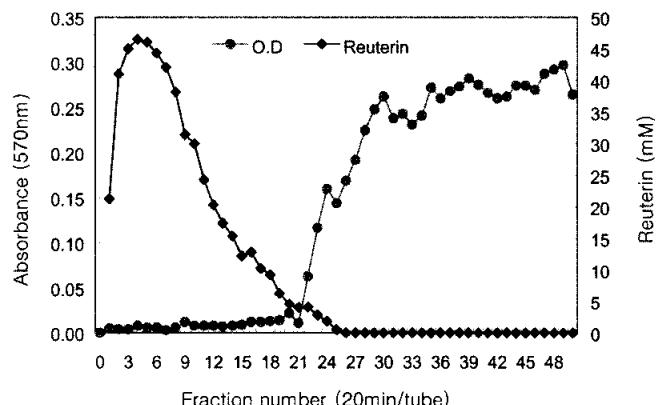


Fig. 2. Amount of reuterin and antibacterial activity of different fractions obtained from continuous-type system of agarose bead-immobilized cells.

●: cell growth (O.D. at 570 nm) of *E. coli* K12 after treatment with reuterin produced at different fractions, ◆: concentration of reuterin.

속도로 fraction collector(Amersham Bioscience RediFrac fraction collector, Sweden)의 시험관에 수집되었다. 시험관 한 개당 수집된 반응액의 용량은 9 mL이며 수집시간은 한 개당 20분으로 설정하였다.

결과 및 고찰

고정화 세포를 이용한 회분식 생산

*L. reuteri*를 agarose에 약 10^{10} CFU/g 농도를 고정화하여 루테린의 생산성을 조사하였다. 반응시간이 경과할수록 루테린의 생산은 차츰 줄어들었지만 0.5%의 agarose를 함유한 bead의 경우 60시간 동안 반응한 bead에서도 루테린의 생산에 의하여 *E. coli* K12의 성장이 상당히 억제되는 것으로 관찰되었다(Fig. 1). Yum 등(12)의 보고에서 혼탁세포를 이용한 회분식 루테린 생산 공정에서 약 9시간 안에 루테린의 생산이 거의 중단되는 것에 비하여 고정화 세포를 이용하였을 때 루테린의 생산 가능 시간이 현저히 연장되는 결과였다. 1.0%와 1.5%의 agarose를 함유한 bead의 경우에는 루테린 생산이 약 36시간 동안 지속되다가 그 후 생산정도가 급격히 약화되는 경향을 보였다. 따라서 0.5%의 agarose를 함유한 beads가 루테린의 생산에 가장 적합하다고 판단되었다. 그러나, 0.5% agarose bead의 경우 쉽

Table 1. Comparison of reuterin production between continuous- and batch-type with immobilized- or suspended-cells

Reuterin produced	Batch-type		Continuous-type	
	Suspended cells ^a	Immobilized cells	Suspended cells ^a	Immobilized cells
Peak concentration (mM)	6.7	ND ^b	35	47
Accumulated concentration (mM)	40	ND	315	502
Duration of production (h)	9	36	3.7	7

^aYum et al. (2004).^bNot determined.

계 부숴지는 경향이 있어 bead가 담긴 용매를 교반할 경우 세포들이 bead에서 떨어져 나가는 현상이 일어났다(data not shown). 따라서, 연속식 공정에 의한 루테린 생산을 위하여 agarose 함량을 0.7%로 상향 조정하여 bead를 제조하였다.

고정화 세포를 이용한 연속식 생산

루테린 생산을 조사하기 위하여 연속식 생산을 고안한 이유로서는 생산된 루테린이 계속 반응조에 머물러 있을 경우 *L. reuteri* 또한 항균작용의 영향을 받게되는 문제점을 감소시키고자 하는데 있었다. 이러한 점은 Yum 등(12)이 혼탁 세포를 이용한 회분식과 연속식의 비교에서, 연속식 생산 공정이 루테린 생산이 높은 것으로 보고한 결과로부터 유추할 수 있다. 따라서 지속적인 항균물질의 생산과 균의 활력 유지를 위하여는, 루테린을 포함하는 용액을 계속 새로운 용액으로 교체하는 것이 필요하다고 생각하였다. 고정화 균체를 이용한 연속식 생산에서 시간에 따른 각각의 분획을 1/2 회석하여 항균력을 측정한 결과, 약 7시간, 즉 fraction collector의 21번째 튜브까지 수집된 분획이 *E. coli* K12를 증식 억제시키는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 그리고 8 시간 이후, 즉 22 번째 튜브 이후부터의 루테린 분획은 *E. coli* K12 증식을 억제하는 능력이 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 이를 분획물에 대하여 루테린을 정량 분석한 결과, 루테린의 최대 생산은 최종 반응한지 80분만에 도달하였으며 그 후의 루테린 생산은 점차적으로 감소되었다. Yum 등(12)의 보고에서 혼탁세포를 이용한 연속식 생산에서 루테린 생산의 지속 시간이 4시간이었던 결과와 비교하여, 고정화 세포를 이용한 연속식 생산 공정이 혼탁세포를 이용한 연속식 생산에 비하여 루테린 생산의 지속 시간이 2배로 연장되는 효과가 있었다(Fig. 2). 또한 고정화 세포를 이용한 연속식 생산 공정의 최대 루테린 생산량은 47 mM로서 혼탁세포를 이용한 연속식 공정에서의 35 mM과 비교하여 상당히 높은 것으로 나타났다. 이러한 이유로 연속식 생산에서는 루테린의 축적 생산농도가 502 mM로서 혼탁 세포를 이용하여 얻어진 315 mM에 비하여 약 1.5배 증가하였다(Table 1). 이는 agarose를 이용한 세포 고정화가 혼탁 세포와 비교하여 루테린 생산 시간이 연장되어 결과적으로 보다 많은 양의 루테린을 생산하였으며 고정화 세포를 이용한 방법이 루테린의 효율적 생산에 적용될 수 있음을 의미한다고 볼 수 있다.

요 약

*Lactobacillus reuteri*는 사람과 동물의 장관 내에 존재하는 유산균의 일종으로서 협기적 조건에서 glycerol을 대사하여 항균물질인 루테린을 생산한다. 본 연구의 목적은 고정화된 *L. reuteri*를 이용하여 회분식 또는 연속식 생산 공정을 이용하여 루테린 생산의 반응 조건을 조사하는데 있었다. Agarose를 사용하여 고정화된 *L. reuteri*는 250 mM glycerol과 반응시켜 루테린

을 생산하였다. Agarose 농도를 0.5%로 조정한 회분식 생산 공정에서는 약 36시간 동안 루테린 생산이 지속되었고 시간 경과에 따라 루테린의 생산이 점차 감소하였다. 연속식 공정에서는 고정화 균이 혼탁세포에 비하여 루테린 생산 시간이 약 2 배 정도 연장되었으며 총 루테린의 생산 또한 502 mM로 혼탁세포에 비하여 약 1.5배 증가하였다. 본 연구의 결과는 고정화 세포를 이용한 루테린 생산의 증가 가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 연구비 지원(02-PJ1-PG1-CH08-0002)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. 71: 1-20 (2001)
- Ahn C, Kim CH, Shin HK, Lee YM, Lee YS, Ji GE. Antibiosis of pediocin-producing *Pediococcus* sp. KCA1303-10 against *Listeria monocytogenes* in mixed cultures. J. Microbiol. Biotechnol. 13: 429-436 (2003)
- Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70: 337-349 (1988)
- Dobrogosz WJ, Lindgren SE. Method of determining the presence of an antibiotic produced by *Lactobacillus reuteri*. U.S. patent 5,352,586 (1994)
- Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 674-679 (1989)
- Ganzle MG, Holtzel A, Walter J, Jung G, Hammes WP. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4325-4333 (2000)
- El-Ziney MG, Debevere JM. The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. J. Food Prot. 61: 1275-1280 (1998)
- Lindgren SE, Dobrogosz WJ. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev. 87: 149-163 (1990)
- Daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 4: 164-167 (1989)
- Speck ML, Dobrogosz WJ, Casas I. *Lactobacillus reuteri* in food supplementation. Food Technol. 7: 90-94 (1993)
- Chen CC, Chen JY, Lee SR. Growth inhibition of glycerol metabolites of *Lactobacillus reuteri* on microorganisms and human cancer cell lines. J. Chin. Agric. Chem. Soc. 37: 117-125 (1999)
- Yum EM, Kim JY, Shin HK, Ji GE. Production of reuterin by batch and continuous reactor and antimicrobial characteristics of reuterin. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 111-115 (2004)
- Luthi-Peng Q, Scherer S, Puhan Z. Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 73-80 (2002)