

새우양식장에서 분리한 *Lactobacillus* sp. JK-8의 생리적 특성

천재우 · 마채우 · 오계현*

순천향대학교 생명과학부

이 연구는 새우양식장에서 분리된 *Lactobacillus* sp. JK-8의 생리적 특성을 규명하기 위하여 실시되었다. 균주 JK-8을 MRS 배지에서 배양하였고, 형태 및 생리학적 특성에 대하여 조사하였으며, BIOLOG 시험을 통하여 이 세균은 *Lactobacillus* 속으로 동정되었다. 배양기간 동안에 균주 JK-8의 성장과 pH 변화를 조사하였으며, 생성되는 유기산(lactic acid와 acetic acid)은 JK-8 배양의 성장과 비례하는 것을 확인하였다. Lactic acid와 acetic acid의 농도는 각각 192.8 mM과 43.6 mM이었으며, 초기 pH 7.0은 배양기간동안 3.8로 감소하였다. 8가지 대상 세균에 대하여 5배로 농축된 배양 상등액에 처리하여 살균효과를 조사하였으며, 이 연구에서 모든 대상 세균들은 배양 3시간 이내에 완전히 살균되었다. pH 조절을 하지 않은 JK-8 배양에서 대상 세균들에 대한 항균효과가 있는 것이 관찰되었으나, pH가 조절된 배양에서는 거의 관찰되지 않았다. 대사산물로서 lactic acid와 acetic acid의 분리하기 위하여 HPLC를 사용하였으며, GC-MS를 이용하여 이들 대사산물을 확인하였다.

Key words □ killing effect, *Lactobacillus* sp. JK-8, marine bacterium, organic acid

양식 산업은 오늘날 급속히 성장하는 수산업의 한 분야로서, 건강에 대한 인식의 전환에 따라 수산물의 수요가 지속적으로 증가하여 경제적인 중요성이 인정되고 있다. 우리나라는 삼면이 바다로서 연안의 대부분의 면적이 바다 양식업으로 이용되고 있으며, 내륙에도 많은 수계가 분포하고 있어 내수면 양식업에도 관심이 모아지고 있다(11).

양식은 제한된 구역에서 고밀도로 사육하거나 수질환경의 악화 등으로 양식어류의 면역력이 저하되고 병원성 세균이나 기생충에 의한 감염이 쉬운 환경에 직면하는 경우가 많다(8, 17). 현재 국내에서는 질병치료 및 감염예방을 위해서 단독 또는 사료에 첨가되어 여러 종류의 항생제들이 사용되고 있다(11). 이러한 항생제의 지속적인 사용은 내성을 갖는 미생물의 증가를 초래하게 되고 내성균은 사람에게 전염될 수 있어 양식이 자체의 장내 세균총의 파괴와 함께 항생제의 축적으로 생육에 지장으로 초래하거나 식용 시 악영향을 미칠 수 있다. 특히 항생제의 지속적인 사용은 장내에서 서식하는 유익 세균들의 생물학적 균형을 깨뜨려 감염 방어기작에 이상이 생겨 병원성 미생물의 침입이 용이하게 된다(8, 19). 따라서, 항생제 남용을 억제하고 질병을 예방할 수 있는 probiotics의 개발이 필수적으로 대두되고 있다.

Probiotics는 사람 또는 동물에 대해 장내 균총의 성질을 개선시켜 숙주에게 유익한 효과를 주는 살아있는 미생물의 단독 또는 혼합 배양물을 의미하며, 이들 세균은 장내 균총의 안정화, 유해세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 질병 예방, 면역활성화 작용, 항암작용, 콜레스테롤 저하 등의 기능을 갖고

있는 것으로 알려져 있다(7, 16). 오늘날 probiotics의 이점이 확대되면서 여러 산업분야에서 널리 응용되고 있다. 이러한 다양한 산업분야 가운데, 최근에 노르웨이나 벨기에를 포함하는 양식 산업의 선진국들에서는 환경 친화적인 양식 생산과 양식장 수질 환경의 개선을 위한 항생제를 대체할 대안으로 probiotics의 연구가 활발히 진행되어지고 있다. 또한 일본에서는 갑각류 양식에서 미생물학적 질병 통제에 대한 연구를 수행해오고 있다(8, 19, 22).

Probiotics로서 널리 이용되고 있는 대표적인 미생물은 유산균(lactic acid bacteria)으로 *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* 등이 있다(7, 17, 19). 특히 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*은 probiotics로 가장 많이 이용되고 있는데, *Lactobacilli*는 자연계뿐만 아니라 동물의 장과 발효식품 등에서도 쉽게 발견되고, 탄수화물을 최종 대사산물인 젖산으로 전환시키는 생리적 특성을 가지고 있다(10,16). 또한 *Lactobacillus* 종은 다양한 세균에 대한 항균활성에 관한 연구가 많이 진행되고 있는데, 항균활성 인자로서 organic acid, hydrogen peroxide, reuterin, diacetyl, acetaldehyde 그리고 bacteriocin 등이 보고되고 있다(1, 21). *Lactobacillus* 종이 생산하는 bacteriocin은 그람 양성, 음성 세균에 대해 넓은 항균 스펙트럼을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(5, 13, 18, 20). Beatriz 등(3)은 *Lactobacillus plantarum* LL441에 의해서 생성되는 plantaricin C의 항균활성 실험에서 세포막에 구멍이 뚫어져 그람 음성 세균 생장이 억제된다고 보고한 바 있다. 또한 Michael 등(12)의 연구에서 *Lactobacillus reutei* LTH2584에 의해 생성되는 reutericyclin은 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus cereus*에 대해 항균활성을 갖고 내생포자의 발아를 억제한다고 보고하였다.

우리나라에서 양식새우의 생산량은 2001년도에 3,250톤이었던

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-530-1353, Fax: 041-530-1350
E-mail: kyeheon@sch.ac.kr

것이 2003년도에 약 2,100톤으로 크게 감소되었는데 이는 양식 기간중에 발생한 수질환경 악화와 질병이 주요 원인으로서 많은 경제적 손실을 입고 있는 실정이다(11).

본 연구에서는 새우양식장에서 분리한 *Lactobacillus* 종에 대한 생리학적 특성조사를 하였으며, 이 균주를 이용하여 해양에 존재 하면서 어류에 질병을 일으키는 여러 가지 병원체에 대한 살균력을 조사하고, 또한 분석기기를 이용하여 살균 물질을 확인하였다.

재료 및 방법

균주의 확보와 배양조건

충남 태안군 소재 순천향대학교 부설 해양수산연구소 새우양식장에서 채취한 물시료를 0.3% CaCO₃가 포함된 MRS (Difco, Detroit, USA) 고체 평판배지에 도말하고 25°C에서 배양하여 투명대 형성이 탁월하고, sheep blood agar 배지에 도말하여 비용혈성이 확인된 단일세균을 선택 분리하고 JK-8으로 명명하였다. 배지는 인공해수(aquarium system, Instant Ocean, Sarrebourg, France)를 사용하여 제조하였다. 세균의 생장은 분광광도계(V-550 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco, Japan)를 사용하여 파장 660 nm에서의 흡광도로 나타내었다. 세균 JK-8은 배지에 접종하여 25°C에서 분당 160 회로 회전하는 진탕 배양기에서 배양하였다.

분리 세균의 생리 화학적 특성 조사 및 등정

분리세균 JK-8은 MRS 고체평판배지에서 단일 집락의 모양을 확인하고, 그람 염색 후 위상차 현미경으로 세균의 형태학적 특성을 조사하였다. 분리 세균의 생리 생화학적 특성은 알려진 방법에 의하여 실시하였다(9).

분리 세균 JK-8의 동정은 여러 가지 생리생화학적 시험과 GP2 Microplate™ Identification System (BIOLOG, Hayward, USA)를 이용하여 동정하였다. 사용된 배지는 BUG agar와 5%의 sheep blood를 혼합하여 만들었다. 세균 현탁액을 Biolog Turbidimeter (BIOLOG, Hayward, USA)를 이용하여 20%까지 맞추고 GP2 MicroPlate의 96개의 well에 각각 150 µl씩 분주하였고, 30°C에서 4-6시간 동안 배양하였다. 배양된 MicroPlate의 결과는 직접 확인하였으며, MicroLog™ database software를 통해 동정하였다.

분리세균 JK-8의 배양상등액 제조

배양상등액의 다른 병원성 세균에 대한 살균력을 조사하기 위하여 먼저 Schellinger(21) 방법에 따라 배양 상등액을 제조하였다. 분리세균 JK-8을 MRS broth에 접종하여 25°C에서 48시간 동안 배양 한 후 2,000 × g에서 10분간 원심 분리하여 세균을 제거하고 0.2 µm syringe filter로 여과한 후 동결건조기를 이용하여 5배 농축하였다.

농축 배양 상등액의 살균 측정

대상세균인 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Vibrio*

parahaemolyticus, *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda*를 각각 액체배지에 접종한 후 대수생장기를 거치면서 파장 660 nm에서 O.D. 값이 0.8일 때, 원심분리용 튜브에 넣고 2,000 × g에서 10분간 원심분리를 실시하였다. 상등액은 버리고 얻어진 균체를 10 ml phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척 하였다. 각각의 대상세균을 미리 제조된 5배의 농축 배양상등액에 세균의 최종 농도가 10⁷-10⁸ cells/ml 되게 접종하였다. 농축된 배양상등액으로 처리된 이들 대상세균을 각각 30분 간격으로 고체배지에 100 µl를 평판 도말하여 25°C에서 배양한 후 형성된 집락을 계수하여 농축액의 농도와 노출시간에 따른 각 세균의 사멸율을 측정하였다.

항균력 확인

배양상등액에서 얻어진 농축배양상등액의 항균력은 plate diffusion assay 방법을 통하여 확인하였다. 대상세균을 영양배지와 brain heart infusion (Difco, Detroit, USA) 고체배지에 도말하고 paper disc를 올려놓은 후, 농축배양상등액 50 µl를 흡수시켜 37°C에서 24시간 생장시켜 disc 주변에 생성된 투명대의 크기를 측정하였다.

HPLC에 의한 유기산 분석

분리세균 JK-8에 의해 생성되는 유기산 분석을 위하여 HPLC로 분석하였다. 분석에 사용된 HPLC system은 SPD-10A UV/Vis detector가 부착된 Shimazu 사의 LC-10AT 제품을 사용하였으며, Supelco 사의 Supelcogel C-610H 컬럼(300 mm × 7.8 mm, 입자크기 9 µm)을 이용하였다. Mobile phase는 0.1% phosphoric acid를 공극직경이 0.45 µm membrane filter (Pall-Gelman, East Hills, USA)에 여과하여 사용하였다. HPLC 작동조건에서 mobile phase의 flow rate는 0.5 ml/min이었으며 UV detector의 파장은 210 nm으로 맞추어 사용하였다.

유기산은 분석용 표준품과 배양액으로부터 채취한 시료를 대상으로 정량분석하였다. Lactic acid와 acetic acid를 각각 1:1의 비율로 혼합하여 표준품을 만들었으며, 0.45 µm syringe filter로 여과하고, 10 µl Hamilton syringe를 사용하여 HPLC injector 내에 주사하여 정량분석을 위한 표준곡선을 작성하였다. 배양액내에 생성된 유기산을 정량하기 위하여 채취한 시료는 2,000 × g에서 10분간 원심분리한 후 0.45 µm syringe filter로 여과하여 분석하였다.

GC-MS에 의한 유기산 확인

분리세균 JK-8에 의해 생성된 유기산은 GC-MS 분석을 통하여 구조를 확인하였다. 사용된 GC-MS 시스템은 electron ionization detector가 장착된 Shimazu 사의 GCMC-QP5050 제품이었으며, 컬럼은 Shimazu 사의 CBP5-M25 capillary 컬럼(25 m × 0.22 mm, 입자크기 0.25 µm)을 사용하였다. GC-MS 작동조건에서 carrier gas는 헬륨이었으며, flow rate는 1.5 ml/min이 되도록 하였고, injection volume은 1 µl, injector temperature는 250°C, oven temperature에서 80°C로 시작하여 10°C/min 상승시켜 최종 온도가 270°C가 될 때까지 총 15분간 분석하였다. MS

data는 Shimazu 사의 library (NIST, Shimazu Co., Japan)를 이용하여 분석하였다. 시료 준비는 배양액으로부터 채취한 시료를 2000 × g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 동결건조하여 수분을 제거하고, dimethyl sulfoxide (Sigma Co., St. Louis, USA)에 녹여 0.45 μm syringe filter로 여과하여 사용하였다.

결과 및 고찰

세균의 분리 및 특성

새우양식장에서 채취한 물시료로부터 0.3% CaCO₃가 포함된 MRS 고체평판 배지에서 투명대를 형성하는 3개의 유산균을 선별하였다. 선별된 유산균들 가운데 용혈성 시험을 통해 비용혈성으로 확인된 균주인 JK-8을 선정하여 본 연구에 사용하였다.

분리 세균은 그람 염색을 통하여 형태학적 분석을 실시하였으며, 위상차 현미경으로 관찰한 결과 그람 양성세균의 간상형으로 관찰되었다. 집락의 색깔은 흰색으로 불투명하였다. Table 1에서 보여주는 바와 같이, indole 형성여부에 있어서 음성으로 나타났으며, methyl red 시험에서는 양성, 그리고 Voges-Proskauer 시험에서는 음성으로 조사되었다. Klingler iron agar 배지에서 조사한 disulfhydrase에 의한 H₂S의 형성은 음성으로 나타났으며, gelatinase와 catalase의 존재 여부 시험에서도 음성으로 확인되었다. Oxidase 존재 여부와 starch 분해 여부 시험에서도 음성으로 확인되었고, urease 존재여부에서도 음성으로 확인되었다. Simmon's citrate 이용여부에서는 양성으로 나타났으며, lithmus milk 시험에서 펩톤화(peptonization)는 이루어지지 않았다.

분리세균의 동정

형태학적 및 생리학적 특성을 관찰한 유산균 JK-8에 대하여 동정을 실시하였다. JK-8에 대하여 다양한 탄소원 이용여부를 동정하는 BIOLOG system을 사용하였고, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. MicroLog™ database software를 이용하여 분석한 결과, JK-8은 *Lactobacillus plantanum*으로 동정되었으며, 본 연구

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the strain JK-8

| Morphological characteristics | |
|-------------------------------|-------------------------|
| Cell shape | Long rod (approx. 5 μm) |
| Gram staining | Positive |
| Physiological characteristics | |
| Indole production | - |
| Methyl red | + |
| Voges-Proskauer | - |
| Starch hydrolysis | - |
| Gelatin hydrolysis | - |
| Catalase | - |
| Oxidase | - |
| Simmon's citrate | + |
| H ₂ S(KIA) | - |
| Litmus milk (peptonization) | - |
| Phenylalanine deaminase | - |

Table 2. Physiological and biochemical characterization of the strain, JK-8 using the BIOLOG Analysis System

| Physiological & biochemical tests | | | |
|-----------------------------------|---|-----------------------------|---|
| Water | - | D-Tagatose | + |
| α-Cyclodextrin | - | D-Trehalose | + |
| β-Cyclodextrin | - | Turanose | + |
| Dextrin | + | Xylitol | - |
| Glycogen | - | D-Xylose | + |
| Inulin | - | Acetic acid | + |
| Mannan | - | α-Hydroxybutyric acid | - |
| Tween 40 | - | β-Hydroxybutyric acid | - |
| Tween 80 | - | γ-Hydroxybutyric acid | + |
| N-Acetyl-D-glucosamine | + | ρ-Hydroxyphenyl acetic acid | - |
| N-Acetyl-D-mannosamine | - | α-Ketoglutaric acid | - |
| Amygdain | - | α-Ketovaleric acid | + |
| L-Alabinose | - | Lactamide | - |
| D-Arabitol | - | D-Lactic acid methylester | - |
| Arbutin | - | L-Lactic acid | - |
| Cellobiose | + | D-Malic acid | - |
| D-Fructose | + | L-Malic acid | - |
| L-Fucose | + | Methylpyruvate | - |
| D-Galactose | - | Mono-methylsuccinate | - |
| D-Galacturonic acid | - | Propionic acid | - |
| Gentiobiose | + | Pyruvic acid | - |
| D-Gluconic acid | + | Succinamic acid | - |
| α-D-Glucose | + | Succinic acid | - |
| m-Inositol | - | N-Acetyl L-glutamic acid | - |
| α-D-Lactose | + | Alaninamide | - |
| Lactulose | + | D-Alanine | - |
| Maltose | + | L-Alanine | - |
| Maltoriose | - | L-Alanyl-glycine | - |
| D-Mannitol | + | L-Asparagine | - |
| D-mannose | + | L-Glutamic acid | - |
| D-Melezitose | + | Glycyl-L-glutamic acid | - |
| D-Melibiose | - | L-Pyroglutamic acid | - |
| α-Methyl D-galactoside | + | L-Serine | - |
| β-Methyl D-galactoside | + | Putrescine | - |
| 3-Methyl glucose | + | 2,3-Butanediol | - |
| α-Methyl D-glucoside | - | Glycerol | + |
| β-Methyl D-glucoside | - | Adenosine | + |
| α-Methyl D-mannoside | - | 2-Deoxyadensine | + |
| Palatinose | - | Inosine | - |
| D- Psicose | + | Thymidine | + |
| D-Raffinose | + | Uridine | - |
| L-Rhamnose | - | Adenosine-5'-monophosphate | - |
| D-Ribose | + | Thymidine-5'-monophosphate | - |
| D-Salicin | + | Uridine-5'-monophosphate | - |
| Sedohepulosan | - | Fructose-6-phosphate | + |
| D-Sorbitol | + | Glucose-6-phosphate | - |
| Stachyose | - | Glucose-6-phosphate | - |
| Sucrose | - | D-L-α-Glycerolphosphate | - |

에서는 *Lactobacillus* sp. JK-8로 명명되었다.

분리세균의 성장에 따른 pH 변화와 항균활성

새우 양식장에서 분리한 *Lactobacillus* sp. JK-8을 MRS 액체 배지에 접종하고 세균의 성장과 유기산 생성, 그리고 배양기간중의 pH 변화를 6시간 간격으로 측정하였다(Fig. 1). *Lactobacillus* sp. JK-8은 배양 12시간 이후부터 36시간까지 빠르게 성장하였으며, 이와 관련하여 pH도 급격하게 감소되었다. 배양초기의 pH는 7.0이었으나 48시간이 지난 최종 pH는 3.8로 측정되었다. JK-8의 성장에 따른 유기산 생성은 HPLC를 이용하여 정량 분석한 결과, 배양시간이 경과됨에 따라 pH는 감소하였으며 이에 반비례하여 lactic acid와 acetic acid는 증가하는 것으로 나타났다. 접종한지 48시간 지난 후 lactic acid와 acetic acid는 각각 192.8 mM과 43.6 mM이 생성되었다. 이 분리균주는 이들 유기산을 배지 내로 분비하여 pH 감소에 직접적인 영향을 미치는 것이 확인되었다. Elisabeth 등(6)은 우유에서 분리한 *Lactobacillus* 종과 *Lactococcus* 종이 lactic acid를 생성시켜 배양 24시간 이후에 pH를 5 이하로 감소시키고 *Bacillus cereus*의 성장을 억제한다고 보고한 바 있다. 또한 Schillinger 등(21)은 *Lactobacillus*는 탄수화물로부터 lactic acid와 acetic acid를 형성해 pH를 감소시키고 항균활성을 나타낸다고 보고하였다.

분리 균주 JK-8의 항균활성 확인은 plate diffusion assay 방법을 이용하여 배양상등액을 대상세균에 노출시켜 항균활성을 확인하였으며, 배양기간이 경과함에 따라 disc 주변에 투명대가 커지는 것이 관찰되었다. Ogunbanwo 등(14, 15)은 *Lactobacillus* sp. OG1에 의한 항균물질 생성에 대한 연구에서 대수성장기부터 항균물질을 생성하고 정지기에 항균물질을 최대로 생성하며 대수성장기 후반기에 강한 항균활성을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구와 병행하여 동일한 조건에서 분리한 *Lactobacillus* sp. JK-11는 JK-8에서 생성되는 유기산과 비교하여 현저히 적은 양의 45.7 mM lactic acid와 11.8 mM acetic acid를 생성하였으며, 배양 48시간 이후에 pH는 7.0에서 5.4로 감소하였다. 그러나 JK-11 배양에서 살균효과를 가지는 4 kDa의 bacteriocin이 생성되는 것을 확인하였다(JK-11의 결과는 본 논문에 포함하지 않음).

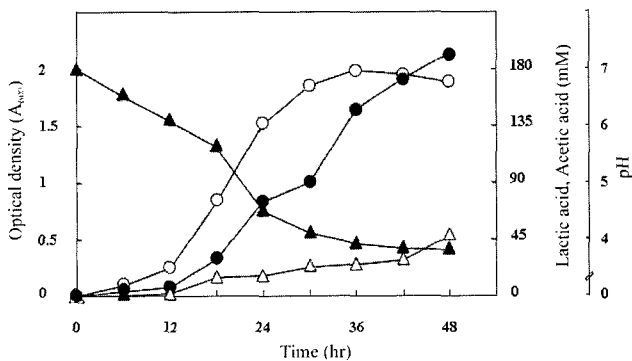


Fig. 1. Growth of the strain JK-8, measured as optical density (○), associated with the parallel formation of lactic acid (●) and acetic acid (△), and pH changes (▲).

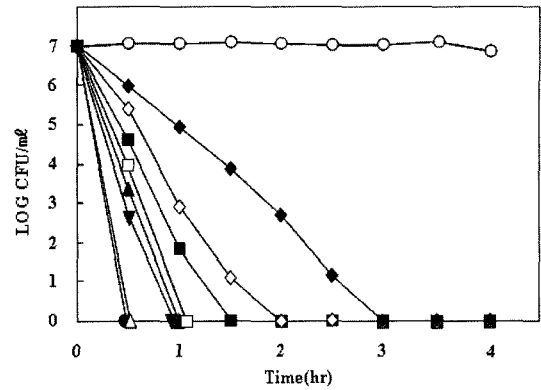


Fig. 2. Killing of pathogens by 5x culture supernatant of the strain JK-8; control (○), *Vibrio parahaemolyticus* (●), *V. harveyi* (△), *Staphylococcus aureus* (■), *Salmonella typhimurium* (□), *Shigella sonnei* (▲), *Escherichia coli* (◇), *Streptococcus pyogenes* (◆), *Edwardsiella tarda* (▼). At each time interval, the number of colony-forming units per ml of culture was determined.

농축 배양상등액에 대한 병원성 세균의 살균율

배양상등액에 의한 병원성 세균의 살균율을 측정하기 위해서 분리세균 JK-8의 배양상등액을 5배 농축시킨 후, 이 농축상등액을 새우양식에서 잠재 병원성 세균(potentially pathogenic bacteria)으로 간주되는 8가지 세균에 대하여 노출시키고, 30분 간격으로 평판도말하여 살균율을 관찰하였다(Fig. 2). *Vibrio parahaemolyticus*와 *Vibrio harveyi*는 30분 이내에 모두 사멸되어 *Lactobacillus* sp. JK-8에 가장 민감한 것으로 나타났다. *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*와 *Edwardsiella tarda*는 배양상등액에 노출된지 1시간이 지나면서 집락을 관찰할 수 없었으며, *Escherichia coli*는 2시간 이내에 집락을 관찰되지 않았다. 그람양성 세균인 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus pyogenes*는 농축액에 덜 민감하여서 노출된 후 각각 1시간 30분과 3시간 이내에 모두 사멸되었다.

JK-8의 항균물질을 확인하기 위하여 catalase를 처리하고 pH를 중성으로 만든 농축 배양액과 처리하지 않은 상등액을 plate diffusion assay 방법으로 비교하였다(Fig. 3). 병원균 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda*에 대한 항균활성 실험에서 pH가 조절되지 않은 농축상등액은 뚜렷한 투명대가 형성되었지만, pH가 조절된 농축 배양액에서는 종류에 따라 희미한 투명대가 형성되거나 거의 형성되지 않았다. 이러한 결과를 통해서 볼때, JK-8의 살균력은 주로 배양기간동안 생성되는 유기산에 기인하는 하는 것으로 사료된다.

HPLC와 GC-MS에 의한 유기산 분석

Lactobacillus sp. JK-8의 배양 기간동안 대사물질로서 배양액에서 생성되는 유기산을 조사 분석하였다. 배양초기에는 거의 존재하지 않았던 유기산이 배양이 진행됨에 따라 JK-8 균주의 성장과 비례하여 생성되었다. 얻어진 배양액 시료는 HPLC를 이용하여 분석하였으며, lactic acid와 acetic acid가 혼합된 authentic

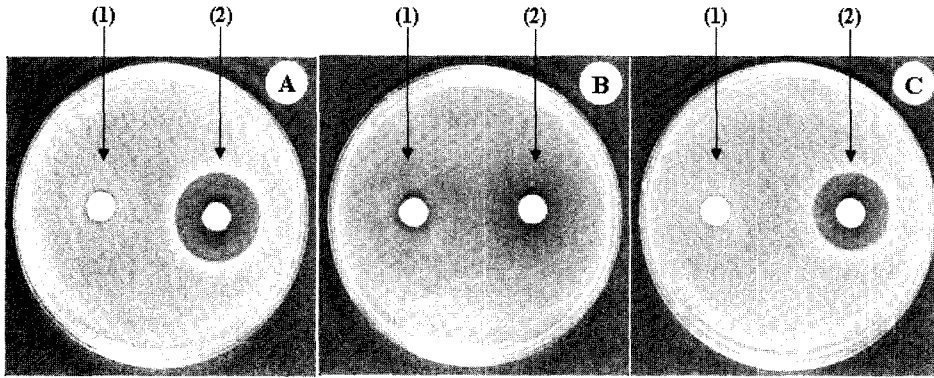


Fig. 3. Inhibition of target pathogens by 5x culture supernatant of the strain JK-8. Filter discs soaked with the supernatants were placed onto lawn plates of *Vibrio parahemolyticus* (A), *V. harveyi* (B), and *Edwardsiella tarda* (C), respectively; pH of the supernatants were adjusted to 7.0 (1) or non-adjusted (pH 3.8) (2).

standard와 비교하여 16.326 min과 19.301 min에서 동일한 peaks가 탐침되었다(Fig. 4). 이들 두 peaks는 잠정적으로 각각 lactic acid와 acetic acid로 명명하였다.

배양중에 생성된 유기산을 확인하기 위하여 48시간이 경과한 배양액을 동결건조하고 물 층을 제거한 후 DMSO에 녹여서 1 μl를 GC-MS에 injection하여 분석하였다(Fig. 5). GC-MS로 분석한 결과, retention time이 2.850 min인 peak A는 acetic acid였으며 6.492 min인 peak C는 lactic acid로 확인되었다. Retention time이 5.517 min인 peak B는 분석을 위한 용매로 사용된 DMSO였으며 이들 peak는 각각 MS library를 통해 확인되었다.

젖산 형성 세균에 의한 병원성 미생물의 살균효과는 많은 연구가 진행되고 있으며 이에 대한 많은 관심이 집중되고 있다. Aslim 등(2)은 치즈 제조장에서 분리한 유산균 19종은 *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, 그리고 *Escherichia coli*에 대해 항균효과를 가진다고 보고하였다. 또한 Bemet-Camard 등(4)은 사람에서 분리한 *Lactobacillus acidophilus* LA1이 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi-murium*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, 그리고 *Enterobacter cloacae*와 같은 병원성 세균에 대해 살균효과를 나타

내는 것으로 보고하였다. 그러나 lactic acid 생성세균이 해양에서 분리되어 양식장에서 발생하는 질병을 조절할 목적으로 연구하는 사례는 거의 발표된 바 없다. 본 연구는 향후 이 분리세균을 호염성 프로바이오틱스로 활용하는 방향으로 진행될 것이다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부의 수산특정연구개발사업의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

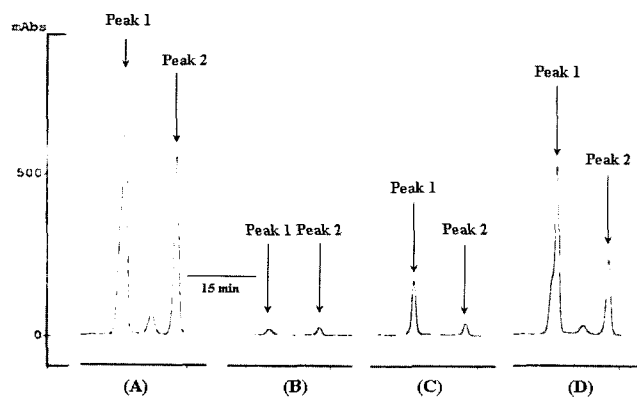


Fig. 4. HPLC chromatograms of a authentic mixture (A) and of culture samples of JK-8 at the beginning (B) and after 24 hrs (C) and 48 hrs of incubation (D).

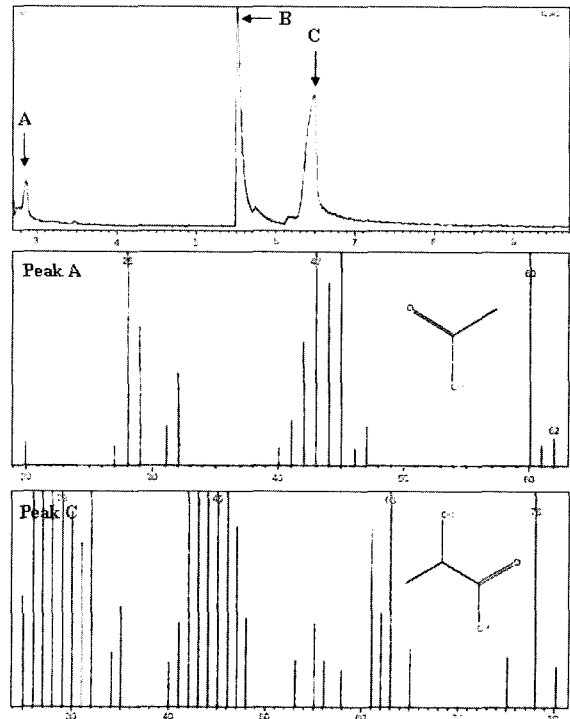


Fig. 5. GC-MS data for the culture analyzed after 48 hrs of incubation. MS fragmentation patterns of the compounds representing the two peaks (A and C) in the TIC are indicated and the respective chemical structures of the compounds are also given. Peak B was DMSO used as a solvent.

참고문헌

1. Aly, S., A.T. Cheik, H.N. Imael, and S.T. Alfred. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from burkina faso fermented milk. *J. Nutri.* 3, 174-179.
2. Aslim, B. Z.N. Yuksekdog, E. Sarikaya, and Y. Beyatli. 2004. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *Swiss Soc. Food Sci. & Techno.* 37, 663-667.
3. Beatriz, G., G. Erwin, R.S. Edmund, J.M. Arnold, E.S. Juan, and N.K. Wil. 1996. Bacteriocidal mode of action of plantaricin C. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2701-2709.
4. Bernet-Camard, M.R., V. Lievin, D. Brassart, J.R. Neeser, A.L. Servin, and S. Hudault. 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2427-2753.
5. Chung, W. B., W. S. Soe, J. Y. Cha and Y. S. Cho. 2003. Isolation and characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for probiotics production from korean dongchimi. *Kor. J. Food. Presevation* 3, 406-410.
6. Elisabeth, R., G. I. Andersen-Borge, T. Langsrud, and T. Sorhaug. 2003. Inhibition of *Bacillus cereus* by strains *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 205-212.
7. Fuller, K. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 1365-378.
8. Gatesoups, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
9. Gerhart, P., R.J. Fellows, D.C. Cataldo, R.M. Nester, W.A. Wood, N.R. Kreig, and G.B. Phillips. 1981. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology. USA.
10. Leal-Sanchez, M.V., R. Jimenez-Diaz, A. Maldonado-Barragan, A. Garrido-Fernandez and J. L. Ruiz-Barba. 2002. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4465-4471.
11. Lim, H.J., J.H. Park and I.K. Jang. 2004. Effect of probiotics on water quality in the shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) ponds. *J. Kor. Fish. Soc.* 37, 91-97.
12. Michael, G.G., H. Alexandra, W. Jens, J. Gunther and P.H. Walter. 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4325-4333.
13. Mortvedt, C.I., J. Nisen-Meyer, K. Sletten, and I.F. Nes. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, A bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* 145. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1829-1834.
14. Ogunbacwo, S.T., A.L. Sanni, and A.A. Onilude. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr. J. Biotechnol.* 2, 179-184.
15. Ogunbacwo, S.T., A.L. Sanni, and A.A. Onilude. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr. J. Biotechnol.* 2, 219-227.
16. Orrhge, K. and C.E. Nord. 2000. *Bifidobacteria* and lactobacilli in human health. *Drugs Exp. Clin. Res.* 26, 95-111.
17. Paek, N.S., Y.B. Lim, and Y.M. Kim. 2001. Antibacterial activity and growth promotion in aquacultured fish by probiotics. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 56-61.
18. Park, K.J. and Y.W. Ryu. 1995. Antibacterial activity of *Lactobacillus* sp. KJ-5 isolated from pig feces. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 10, 553-560.
19. Ringo, E. and F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177-203.
20. Rufino, F.D., L.R. Jose, P.C. Declan, H. Helge, F.N. Ingolf, H.S. Jnut, and J.W. Philip. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4459-4463.
21. Schillinger, U., F.K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(8), 1901-1906.
22. Yang, B.G., J.G. Lee, and M.S. Heo. 2003. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* BK19 against fish pathogenic bacteria. *Kor. J. Microbiol.* 39, 56-61.

(Received February 18, 2005/Accepted March 11, 2005)

ABSTRACT : Physiological Characterization of *Lactobacillus* sp. JK-8 Isolated from Shrimp Aquaculture Pond

Jae-Woo Chun, Chae-Woo Ma, and Kye-Heon Oh* (Department of Life Science, Soonchunghyang University, Asan, Chungnam 336-745, Korea)

The purpose of this work was to investigate the physiological characteristics of *Lactobacillus* sp. JK-8 isolated from a shrimp aquaculture pond. The strain JK-8 was grown on MRS media, and morphological and physiological characteristics of the strain were examined. The bacterium was identified as a strain of the genus *Lactobacillus* on the basis of BIOLOG test. Strain JK-8 produced both lactic acid and acetic acid, which were responsible for the pH decrease during growth. Concentrations of lactic acid and acetic acid increased to 192.8 mM and 43.6 mM, respectively, and the initial pH 7.0 of the cultures decreased to 3.8 at the end of incubation. The bacteriocidal effect against eight target bacteria was examined with 5-fold concentrated culture supernatants. All bacteria tested in this work were completely killed within 3 hrs after treatment with the culture supernatant. The bacteriocidal effects were clearly observed, only when the pH of the culture supernatants were not adjusted. HPLC was used to resolve lactic acid and acetic acid in the culture solution, and GC-MS was used to verify the metabolites.