

케피어그레인으로 제조한 요쿠르트로부터 *Enterococcus faecalis* OA18 균주의 분리 및 특성규명

유진주 · 김수곤 · 서경원 · 오석흥*
우석대학교 대학원 생명공학과

Isolation, Identification, and Characterization of Ornithine-Producing *Enterococcus faecalis* OA18 from Kefir Grain

Jin-Ju Yu, Su-Gon Kim, Kyoung-Won Seo, and Suk-Heung Oh*

Department of Biotechnology, Woosuk University Graduate School, Jeonju 565-701, Republic of Korea

(Received July 26, 2011 / Accepted September 14, 2011)

Lactic acid bacteria (LAB) OA18 was isolated from yogurt prepared by using Kefir Grain as a starter. The OA18 strain was a Gram-positive, cocci-type bacterium, and able to grow anaerobically with CO₂ production. The OA18 strain grew well on MRS broth supplemented with 50 mM arginine at 30-37°C and pH of 7.0-9.0. The optimum temperature and pH for growth are 37°C and pH 7.0. The isolate fermented ribose, D-glucose, cellobiose, D-trehalose, but not L-xylose, D-melibiose, and inositol. The 16S rRNA gene sequence of the isolate showed 99.8% homology with the *Enterococcus faecalis* 16S rRNA gene (Access no. AB012212). Based on the biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis data, it was identified and named as *E. faecalis* OA18. The *E. faecalis* OA18 strain showed a high ornithine-producing capacity in the presence of arginine and also showed an antimicrobial activity against *Streptomyces* strains such as *Streptomyces coelicolor* subsp. *Flavus*, *S. coeruleorubidus*, *S. coeruleoaurantiacus*, *S. coelicolor*, *S. coeruleoprunus*. The cell growth of *E. faecalis* OA18 strain was maintained in MRS broth with a NaCl concentration of 0-7%.

Keywords: *E. faecalis*, anti-microbial activity, Kefir grain, ornithine

티벳버섯은 일명 케피어그레인(Kefir Grain)이라고도 하며, 전자현미경으로 살펴보면 원형의 다당류 집락에 골이 파여 있고, 이곳에 주요 종균들이 분포되어 있는 형태를 하고 있다. Kefir Grain에 함유되어 있는 미생물로는 *Lactobacillus caucasicum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 등의 젖산균과 *Torula keffir*와 *Saccharomyces kefi* 등의 효모가 주를 이루고 있는 것으로 알려져 있다(13, 14, 15, 21).

코카시안(Caucasian) 산악지대에서 유래된 것으로 알려진 케피어(Kefir)는 Kefir Grain으로 발효를 시켜서 만드는데 산과 알코올 발효가 함께 일어나서 발효가 끝나면 0.6-0.9%의 젖산과 0.6-1.1% 정도의 에탄올, 그리고 다량의 탄산가스가 함유되어 있어서 독특한 향취를 갖는다(9). Kefir 발효유는 필수 아미노산을 함유하고 있으며 일반 유산균 발효 유제품과 달리 효모와 유산균에 의하여 생산된 biotin, niacin, pyridoxine,

folic acid와 같은 비타민 B군을 풍부하게 함유하고 있다(13, 14, 18).

L-오르니틴은 비단백태 아미노산으로 담수성 쌍각류 조개류(29), 와인과 치즈(1, 22), 김치(16) 등에서 발견되고 있다. 예를 들면, 재첩엑기스 100 g 중에 유리 오르니틴 함량은 159.9 mg이며(29), 김치 100 g 중에는 58-294 mg이 함유되어 있는 것으로 조사되고 있다(16). L-오르니틴은 성장호르몬 분비, 근육의 합성 증가, 비만 예방(8, 12), 간기능 개선(23), 주름살 개선(28) 등의 기능성을 갖는 것으로 밝혀지고 있다. 이에 오르니틴 함유 식품에 대한 관심이 증대되고 있으며(16, 31, 32), 오르니틴 생산 능력을 갖는 젖산균을 이용하여 영양 기능성이 증진된 발효식품을 제조하려는 시도가 진행되고 있다(16).

따라서, 본 연구는 식용 식품자원인 티벳버섯으로부터 오르니틴 생성능력이 있는 젖산균 *Enterococcus faecalis* OA18를 분리하여 특성을 조사함으로써 티벳버섯 유래 젖산균의 정보를 파악하고, 그 활용 가능성을 제안하고자 한다.

* For correspondence. E-mail: shoh@woosuk.ac.kr; Tel.: +82-63-290-1433; Fax: +82-63-290-1429

재료 및 방법

Enterococcus 속 균주의 분리

균주 분리에 사용한 티벳버섯은 경북 경산시 진량읍 소재 가정에서 배양된 것을 인터넷을 통해 구매하여 사용하였다. 구매한 티벳버섯을 요구르트 제조를 위한 스타터로 사용하였고, 제조한 요구르트는 오르니틴 생산능이 있는 젖산균을 분리하는데 시료로 사용하였다. 요구르트의 제조는 티벳버섯 스타터 1스푼(약 5 g)을 우유 100 ml에 넣고 통성 혐기적인 조건의 37°C 배양기에서 24-36시간 동안 정치 발효 하여 제조하였다. 요구르트 시료는 펩톤수로 10^1 - 10^8 범위로 희석하였고, 젖산균을 선택적으로 분리하기 위해 희석액을 0.002% bromocresol purple (BCP) (Sigma Chemical Co., USA)가 첨가된 DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) 한천 배지 (Difco, USA)에 1 ml씩 분주하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다(25, 32). 콜로니 중에서 단일 콜로니를 형성하면서 노랑색을 띄는 것을 후보 균주로 분리하였고, 이들 후보 균주의 오르니틴 생성능을 확인하였다. 오르니틴 생성능은 50 mM 아르기닌이 첨가된 MRS 배지(pH 7.0)에 균주를 접종(1%, v/v)하고 37°C에서 48시간 배양한 후 TLC를 이용하여 조사하였다. TLC는 silica gel F₂₅₄ (Merck, Germany)과 표준 오르니틴(Merck)을 이용하여 실시하였다(32).

E. faecalis OA18 균주의 동정

오르니틴 생성능을 갖는 후보 균주로부터 genomic DNA를 분리 정제하여 PCR 증폭을 시행하였다. DNA의 분리는 DNeasy[®] Blood & Tissue kit (QIAGEN, Germany)를 이용하였고, 정제는 제조사의 지침을 따랐다. 16S rRNA gene의 클로닝을 위한 Primer는 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Forward)와 5'-ACGGGCGGGTGTGTRC-3' (Reverse)를 이용하였다. 1% 아가로스 겔 전기영동으로 확인 된 PCR 산물을 PCR purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제한 후, T4 ligase를 이용하여 pGEM T-easy vector (Promega, USA)에 ligation하였으며, 16S rRNA gene sequencing을 통해 OA18의 염기서열 정보를 얻었다. 16S rRNA gene의 염기서열 정보는 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록하고, DNA의 상동성 조사에 활용하였으며, CLUSTAL X 프로그램을 통해 공시균주의 염기서열과의 상동성을 비교·분석하였다.

E. faecalis OA18 균주의 특성

분리된 균주의 당 발효패턴과 생화학적인 특성은 API 50 CHL kit (bioMérieux, France)를 이용하여 조사하였고 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 카탈라아제 활성은 3%(v/v) 과산화 수소를 이용한 기포생성 여부로 판단하였고, 이산화탄소 생성 여부는 Durham 관을 이용하여 판단하였다(19). 균주의 성장에 대한 pH의 영향을 측정하기 위해 100 mM sodium acetate/100 mM acetate 완충액(pH 4.0, 5.0, 6.0), 100 mM Na₂HPO₄/100 mM HCl 완충액(pH 7.0, 8.0, 9.0) 및 100 mM Na₂HPO₄/100 mM NaOH 완충액(pH 10)으로 MRS 배지를

조제하였고, 균주를 37°C에서 12시간 배양 한 후 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 온도의 영향을 조사하기 위하여 MRS 배지(pH 7.0)를 이용하여 4, 10, 25, 30, 37, 40°C 범위에서 12시간 동안 균주를 배양 한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 내염성을 측정하기 위하여 0, 1, 3, 5, 6, 7, 8%(w/v)의 NaCl이 첨가된 MRS 배지(pH 7.0)에서 균주를 배양한 후(37°C, 24시간) 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다(31, 32). 선발된 균주의 오르니틴 생성능을 측정하기 위하여 50 mM 아르기닌이 첨가된 MRS 배지(pH 7.0)에 균주를 접종하고 37°C에서 48시간 배양하였고, 5,000×g에서 20분간 원심분리 한 후 세포와 배양액을 분리하여 각각 오르니틴을 분석하였다.

E. faecalis OA18 균주의 오르니틴 생성 분석

균주가 생성한 오르니틴 함량은 TLC와 HPLC 분석을 통하여 측정하였다. TLC는 '*Enterococcus* 속 균주의 분리'에서와 같이 실시하였다. HPLC는 Baum 등(2)이 사용한 아미노산 분석방법을 기본으로 하고 Park과 Oh(25)의 분석방법을 약간 수정하여 사용한 Yu 등의 방법(32)에 따라서 실시하였다. HPLC (Waters, Milford, USA) 분석을 위해 시료는 6-amino-quioly-N-hydroxysuccinimidyl carbonate (AQC)로 유도체화하였고, 3.9×150 mm AccQ·Tag[™] (Nova-Pak[™] C₁₈, Waters) 컬럼으로 유도체들을 분리하였다. 오르니틴 함량은 표준 오르니틴의 분석결과를 토대로 작성한 표준곡선을 이용하여 산출하였다(31, 32).

E. faecalis OA18 균주의 항균능 측정

항균능 측정 대상 균주에 대한 *E. faecalis* OA18 균주의 항균능력은 paper disc법(4)으로 측정하였다. 항균능 측정에 사용한 OA18 균주 시료는 MRS 배지에 배양(37°C, 48 h)한 OA18 균주 배양액(cultured medium), 배양액을 원심분리 하여 얻은 세포(cell), 세포를 제거한 배양 상등액(spent culture)으로 하였다. 항균능 측정 대상 균주 *Vibrio parahaemolyticus* (KCCM 11965), *Bacillus cereus* (KCCM 11204), *Clostridium perfringens* (KCCM 12098), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (KCCM 11335), *Listeria monocytogenes* (KCCM 40307), *Streptomyces coelicolor* subsp. *Flavus* (KCCM 41303), *Streptomyces coeruleorubidus* (KCCM 40535), *Streptomyces coeruleaurantiacus* (KCCM 12609), *Streptomyces coelicolor* (KCCM 11394), *Streptomyces coeruleoprunus* (KCCM 41264)은 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양 받아 사용하였다(Table 2). 대상 균주는 5 ml의 액체배지에서 24시간(30°C 또는 37°C) 배양하였으며, 배양된 대상 균주를 0.1 ml씩 1.5% agar가 첨가된 고체 배지에 도말하여 항균성 시험용 평판배지를 조제하였다. 이어 멸균된 paper disc (Advantec[®], 10 mm, Toyo Roshi Kaisha, Japan)를 대상 균주가 도말 된 평판배지 표면에 놓아 밀착 시킨 후 OA18 균주 시료를 50 µl를 천천히 흡수시켜 30°C 또는 37°C에 24-48시간 배양 후 disc 주변에 생성된 생육저해환(clear zone, mm)

Table 1. Biochemical characteristics of *E. faecalis* OA18

Characteristics	<i>E. faecalis</i> OA18	<i>E. faecalis</i> K-4 ^a	<i>E. faecalis</i> strain ^b
Gram stain	+ ^c	+	+
Catalase	- ^d	-	-
Cell shape	cocci	cocci	cocci
CO ₂ producton	+	+	ND ^e
Spore formation	-	-	-
D-adonitol	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-
D-Fructose	+	+	+
D-Galactose	+	+	+
D-Glucose	+	+	+
D-Manitol	+	+	+
D-Manose	+	+	+
D-Melibiose	-	ND	-
D-Melezitose	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+
D-Tagatose	+	+	+
D-Trehalose	+	+	ND
L-Arabinose	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-
L-Xylose	-	-	-
N-Acetylglucosamine	+	+	+
Amygdalin	+	+	+
Arbutin	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Esculin	+	+	+
Gentiobiose	+	ND	+
Inositol	-	+	ND
Glycerol	+	+	ND
Lactose	+	+	ND
Maltose	+	+	+
Ribose	+	+	+
Salicin	+	+	+
Sucrose	+	ND	+
Growth in the presence of NaCl			
1% NaCl	+	ND	+
3% NaCl	+	ND	+
6% NaCl	+	ND	+
7% NaCl	+	ND	-
8% NaCl	-	ND	-

^a Eguchi et al. (7); ^b Du Toit et al. (6); ^c Positive reaction; ^d Negative reaction; ^e Not Determined

의 크기를 측정하여 항균 활성을 비교 분석하였다(17).

결과

Enterococcus 속 후보 균주의 분리

케피어그레인을 이용하여 제조한 요쿠르트로부터 젖산균을 분리하기 위해 bromocresol purple이 첨가된 MRS 한천 배지

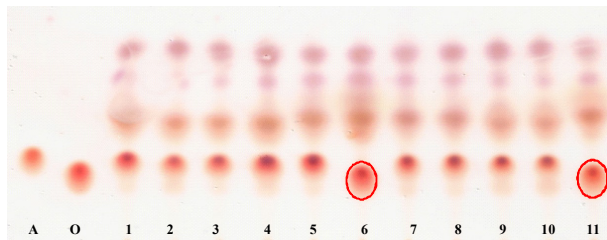


Fig. 1. TLC analysis of lactic acid bacteria cultures for ornithine production. The strains were cultured in an MRS liquid medium with 1% arginine. The strains with circles are selected as candidate lactic acid bacteria for the ornithine production. Lanes: A, spot of standard arginine; O, spot of standard ornithine; 1-11, spots of OA13-OA23 strains, respectively. The spots with circles are in the same location as the standard ornithine.

에서 노랑색을 띄는 25개의 단일 콜로니를 젖산균 후보 균주로 선발하여 OA1-OA25 균주로 각각 표기하였다. 후보 균주들 중에서 오르니틴 생성 가능성을 갖는 균주를 선발하기 위해 TLC를 이용하여 조사하였으며, TLC 상에서 표준 오르니틴 spot과 비교했을 때 뚜렷하게 오르니틴 spot을 나타낸 OA18 균주를 선발하여(Fig. 1) *Enterococcus* 속 후보 균주로 삼았고, 이 균주의 동정과 생화학적 특성을 조사하였다.

E. faecalis OA18 균주의 동정

16S rRNA gene 염기서열 분석을 통해 OA18 균주와 유전 자은행에 등재되어 있는 균주와 유사성을 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 DNA의 상동성으로 조사하였다. CLUSTAL X 프로그램을 통해 공시균주 *Enterococcus faecalis* (AB012212)의 염기서열과 OA18 균주의 염기서열이 99.8% 유사함을 확인 하였다. 형태학적 및 생화학적 특성과 염기서열 분석 결과를 종합하고, Sharpe 등(27)의 젖산균 동정방법을 참고로 균주를 *E. faecalis* 균주로 동정하고, *E. faecalis* OA18로 명명하였으며, 분리된 균주의 16S rRNA gene 서열을 NCBI에 등록을 하였다(등록번호: JN628990).

E. faecalis OA18 균주의 특성

OA18 균주의 형태학적 및 생화학적 특성을 조사한 결과 그람 양성균의 구균이었으며, 혐기적 조건에서 이산화탄소를 생성하였다. 분리된 OA18 젖산균주는 D-글루코오스, cellobiose, D-trehalose 등을 분해하여 산을 생성하였고, L-xylose, D-melibiose, inositol은 분해하지 못하였다(Table 1). 분리된 균주는 MRS 배지에서 30-37°C 범위와 pH 7.0-9.0 범위에서 자랐으며 성장을 위한 최적 온도와 pH는 각각 37°C와 pH 7.0이었다(Fig. 2). 또한 비교적 높은 염 농도(7.0%)에서도 증식이 가능한 것으로 조사되었다(Table 1). 이러한 특성은 Eguchi 등(7)과 Du Toit 등(6)이 분리한 *E. faecalis* 균주들의 특성과 비교 시 매우 유사하였으나, inositol의 분해능, 내염성 등에 있어서는 차이가 있는 것으로 조사되었다(Table 1).

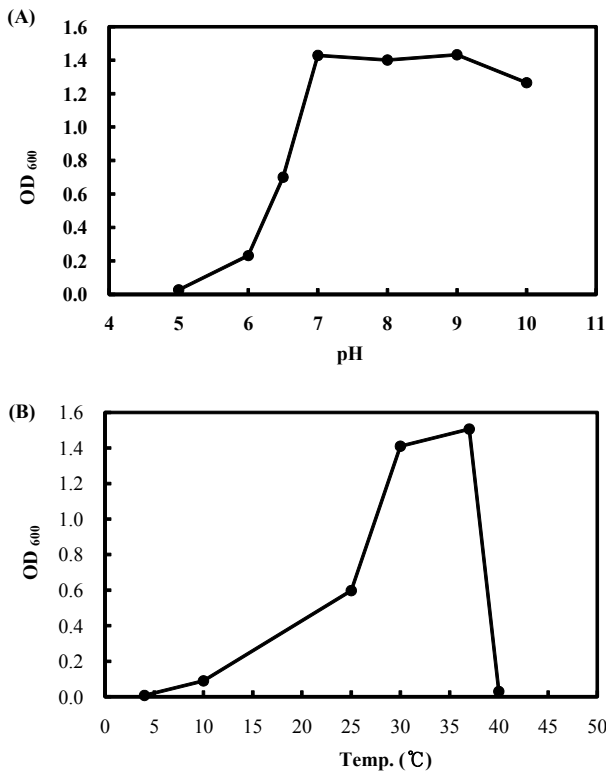


Fig. 2. Effects of pH (A) and temperature (B) on the growth of *E. faecalis* OA18. Growth was estimated by monitoring at the OD₆₀₀ after 12 h cultivation.

***E. faecalis* OA18 균주의 오르니틴 생성능 분석**

E. faecalis OA18의 오르니틴 생성능을 조사하기 위하여 50 mM 아르기닌이 첨가된 MRS 배지에서(pH 7.0, 37°C) 균주를 48시간 동안 배양하였다. *E. faecalis* OA18 균주의 오르니틴 생성 정도는 TLC와 HPLC를 이용하여 분석하였다. *E. faecalis* OA18 균주는 50 mM 아르기닌이 첨가된 MRS 배지에서 오르니틴을 생성하였고, 생성된 오르니틴의 함량은 49.99 mM로 첨가한 아르기닌을 모두 오르니틴으로 전환하는

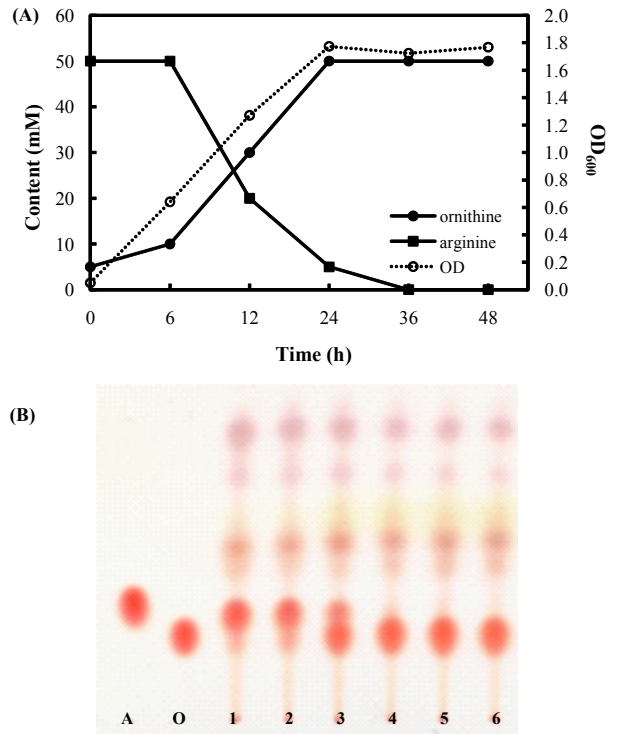


Fig. 3. Production of ornithine in the cultured medium during the growth of the selected *E. faecalis* OA18(A). The *E. faecalis* OA18 was cultured in MRS medium supplemented with 50 mM arginine as described in ‘Materials and Methods’. (B) TLC analysis of ornithine production: Lanes: A, spot of standard arginine; O, spot of standard ornithine; 1-6, spots of *E. faecalis* OA18 culture at 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h cultivation, respectively.

것으로 조사되었다(Fig. 3).

***E. faecalis* OA18 균주의 항균능 측정**

E. faecalis OA18의 항균능을 조사하기 위해 항균능 측정 대상 균주의 평판배지 disc에 OA18 균주로부터 얻은 세가지

Table 2. List of test strains and culture conditions used for antimicrobial experiments

Strains	KCCM No.	Media ^a	Temp. (°C)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11965	NB+3% NaCl	37
<i>Clostridium perfringens</i>	12098	RCM	37
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	11335	TSB	37
<i>Listeria monocytogenes</i>	40307	BHIB	37
<i>Bacillus cereus</i>	11204	NB	30
<i>Streptomyces coelicolor</i> subsp. <i>Flavus</i>	41303	YMEB	30
<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	40535	YMEB	30
<i>Streptomyces coeruleoaurantiacus</i>	12609	YMEB	30
<i>Streptomyces coelicolor</i>	11394	YMEB	30
<i>Streptomyces coeruleoprunus</i>	41264	YMEB	30

^a NB, Nutrient broth (Difco); RCM, Reinforced clostridial medium (Difco); TSB, Tryptic soy broth (Difco); BHIB, Brain heart infusion broth (Difco); YMEB, Broth with yeast extract 0.4%, malt extract 1%, and dextrose 0.4%

Table 3. Antimicrobial activity of *E. faecalis* OA18

<i>Streptomyces</i> strain	Cell ^a	Spent culture	Cultured medium
KCCM 41303 ^b	18.60±0.14 ^c	13.20±0.13	13.20±0.14
KCCM 40535	19.11±0.13	11.00±0.13	19.75±0.12
KCCM 12609	17.82±0.13	12.50±0.13	17.00±0.10
KCCM 11394	18.31±0.18	20.20±0.18	21.70±0.19
KCCM 41264	20.08±0.13	16.80±0.13	22.00±0.11

^a Cell, cells obtained from the cultured medium of *E. faecalis* OA18. Spent culture, the spent culture supernatant of *E. faecalis* OA18. Cultured medium, the cultured medium with cells of *E. faecalis* OA18.

^b KCCM 41303, *Streptomyces coelicolor* subsp. *Flavus*; KCCM 40535, *S. coeruleorubidus*; KCCM 12609, *S. coeruleoaurantiacus*; KCCM 11394, *S. coelicolor*; KCCM 41264, *S. coeruleoprurus*.

^c Activity was expressed as the diameter (mm) of inhibition zone against each strain. Data expressed as Mean±SD from three independent experiments.

시료 cell, spent culture, cultured medium을 흡수시켜 투명환의 크기로 대상 균주에 대한 항균능을 측정하였다. *Enterococcus* 균주는 enterocin A, B, P, Q 등 다양한 박테리오신을 생산하여 *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholera* 및 *Listeria monocytogenes* 등의 식중독균에 대한 항균 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(20). 본 연구에서 분리한 오르니틴을 생성하는 *E. faecalis* OA18 균주에서는 이들 식중독 균에 대한 항균능이 나타나지 않았다. 또한 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*와 *Bacillus cereus*에 대하여도 항균능을 보이지 않았다(자료 미제시). 이전의 연구에서는 Du Toit 등(6)이 태국의 grass silage에서 분리한 *E. faecalis* 균주가 식중독균에 대한 항균능이 나타나지 않았으나, Eguchi 등(7)이 pig faeces에서 분리한 *E. faecalis* SE-K4는 박테리오신을 생산해 *Listeria monocytogenes* 균주에 대해 항균능이 있는 것으로 보고 한 바 있어 균주에 따른 항균 특성이 상이함을 보여주고 있다.

식중독균들 이외의 *Streptomyces coelicolor* subsp. *Flavus* (KCCM 41303), *Streptomyces coeruleorubidus* (KCCM 40535), *Streptomyces coeruleoaurantiacus* (KCCM 12609), *Streptomyces coelicolor* (KCCM 11394), *Streptomyces coeruleoprurus* (KCCM 41264) 균주들에서는 *Enterococcus faecalis* OA18 균주가 강한 항균 활성을 보였다(Table 3). 특히 *Streptomyces coelicolor* (KCCM 11394)에 대한 투명환의 크기는 cell, spent culture, cultured medium에서 각각 18.31±0.18 mm, 20.20±0.18 mm, 21.70±0.19 mm로 나타났고, *Streptomyces coeruleoprurus* (KCCM 41264) 균주에 대한 투명환의 크기는 cell, spent culture, cultured medium에서 각각 20.08±0.13 mm, 16.80±0.13 mm, 22.00±0.11 mm로 항균력이 높게 나타났다(Table 3).

고찰

Enterococcus 균주는 그람-양성 젖산균으로 발효 식품, 어류, 채소류, 태아의 분변 등 다양한 원료에서 분리되고 있다

(20, 24). *Enterococcus* 균주는 단백질이나 지질 가수분해 능력이 뛰어나서 지중해안의 치즈나 black olives의 독특한 맛과 향에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 사람이나 동물의 장내 세균 총의 균형 유지와 장장 작용에도 효과가 있어 일부 국가에서는 probiotic로 이용되고 있다(20, 24). 또한 *E. faecalis* strain의 투여가 diarrhea를 경감시키는 것으로 알려지면서 chicken/pig/cattle의 설사를 줄이기 위한 probiotics로 사용되기도 하였다(10). 본 연구에서는 케피어그레인으로 제조한 요쿠르트로부터 *E. faecalis* OA18를 분리하여 동정하고 ornithine 생산능, 항균능 등의 특성을 조사하였다. *E. faecalis* OA18 균주는 arginine이 50 mM 첨가된 배지에서 arginine을 ornithine으로 전환하는 능력이 우수하였다(Fig. 3). 젖산균 중에는 arginine deiminase (ADI) pathway를 가지고 있어서 arginine를 분해하여 ornithine을 생성하는 능력을 보유하고 있는 것들이 있다. 예를들면, 포도주의 *Lactobacillus hilgardii* X₁B, 맥주의 *L. brevis* TMW1.465, 천일염의 *Weissella koreensis* MS1-3 균주가 ADI pathway를 이용하는 것으로 알려져 있다(1, 3, 31). 지금까지 ornithine 생산능을 갖는 젖산균의 효능이나 이들 젖산균에 의해 생성된 ornithine의 기능에 대한 보고는 매우 미미하다. 그 중에서 *L. hilgardii* X₁B 균주가 생산한 ornithine은 yeast에 의한 알코올 발효를 저해하거나 *Hansenula minuta*와 같은 부패효모의 생육을 저해하여 포도주에 생물학적 안정성을 부여해 줄 수 있는 것으로 제안되고 있다(1). 또한 arginine의 분해에 의한 ornithine의 생성은 ATP의 형성을 수반하기 때문에 arginine은 세포의 성장을 위한 에너지원으로 간주되기도 한다(1). 따라서 본 연구를 통해 분리된 *E. faecalis* OA18 균주가 티벳버섯 사용 요쿠르트에서 ornithine을 생성하고 요쿠르트의 발효와 기능성뿐만 아니라 안전성에 영향을 주는 젖산균일 가능성이 있을 것으로 판단되어 이에 대한 심도 있는 연구가 필요하다.

E. faecalis OA18 균주는 *Streptomyces* 균주에 대한 항균능도 우수한 것으로 조사 되었다(Table 3). *Streptomyces* 균주는 bleomycin, clorobiocin 등 다양한 항생물질을 생성하는 균주로 알려져 있는 바(5, 30) *E. faecalis* OA18가 이들 *Streptomyces* 균주에 대한 항균능을 보인다는 것은 흥미로운 것이다. *Enterococcus* 균주는 enterocin A, B, P, Q 등 다양한 박테리오신을 생산하여 *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella choleraesuis*, *Vibrio cholera* 및 *Listeria monocytogenes* 등의 식중독균에 대한 항균 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(20). 또한 Nam 등(24)은 infant feces로부터 *Helicobacter pylori*에 대한 항균성을 보이는 *E. faecalis* PL9003 균주를 분리하여 보고한 바 있다. *E. faecalis* PL9003 균주는 *H. pylori*의 성장을 저지할 뿐 아니라 human gastric cell line MKN-45에 결합하여 *H. pylori*가 결합하는 것을 방해하는 것으로 조사 되었다(24). *E. faecalis* OA18 균주가 어떤 작용 메커니즘에 의해서 *Streptomyces* 균주에 대한 항균능을 보이는지에 대한 연구와 박테리오신의 종류 등에 대한 심도 있는 연구가 향후 이루어 진다면 *E. faecalis* OA18 균주의 활용폭을 넓힐 수 있을 것이다. 박테리오신 생

산 능력이 있는 *Enterococcus* 균주는 비교적 높은 염 농도에서도 증식이 가능한 것으로 알려져 있어 외국에서는 발효소시지의 리스테리아 균의 제어에 활용되고 있다(20, 26). 우리나라에서도 김치 유산균이 생산하는 박테리오신을 이용하여 혼제연어 등의 리스테리아 균을 제어하려는 시도가 진행되고 있다(11). 따라서, 본 연구를 통해 분리한 *E. faecalis* OA18 균주가 비교적 높은 염 농도에서도 증식이 가능한 것으로 확인되어(Table 1) 염도가 높은 식품에도 활용될 수 있을 것으로 판단되므로 이에 대한 심도 있는 연구도 향후 과제이다.

적요

케피어그레인을 이용하여 제조한 요구르트로부터 젓산균 OA18을 분리하여 그 특성을 조사하였다. 분리된 균주는 그람 양성, 구균이었으며, 혐기적 조건에서 이산화탄소를 생성하였다. 균주는 MRS 배지에서 30-37°C 온도 범위와 pH 7.0-9.0 범위에서 잘 자랐으며, 성장을 위한 최적 온도와 pH는 각각 37°C와 pH 7.0이었다. 분리된 젓산균은 리보오스, D-글루코오스, cellobiose, D-trehalose 등을 분해하여 산을 생성하였고, L-xylose, D-melibiose, inositol은 분해하지 못하였다. 16S rRNA gene 염기서열 분석을 통해 OA18 균주는 유전자은행(NCBI)에 등재되어 있는 *Enterococcus faecalis* (AB012212)의 염기서열과 99.8% 동질성이 있음을 확인하였다. 이와 같은 생화학적 특성과 염기서열 분석 결과를 토대로 분리된 균주를 *Enterococcus faecalis* OA18로 명명하였다. *E. faecalis* OA18 균주는 오르티틴 생성능력과 *Streptomyces coelicolor* subsp. *Flavus*, *S. coeruleorubidus*, *S. coeruleoaurantiacus*, *S. coelicolor*, *S. coeruleoprurus* 대한 항균 활성을 보유하고 있었으며, 0-7% NaCl을 함유하는 MRS 배지에서 증식이 가능한 것으로 조사되었다.

감사의 말

본 연구는 2011학년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며 지원에 감사 드립니다.

참고문헌

- Arena, M.E., F.M. Saguir, M.C. Manca, and M. Nadra. 1999. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Int'l. J. Food Microbiol.* 52, 155-161.
- Baum, G., L.Y. Simcha, Y. Fridmann, T. Arazi, H. Katsnelson, and M. Zik. 1996. Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J.* 15, 2988-2996.
- Behr, J., M.G. Ganzle, and R.F. Vogel. 2006. Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6483-6492.
- Davidson, P.M. and M.E. Parish. 1989. Method for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.* 43, 148-155.
- Demain, A.L. 1988. Contribution of genetics to the production and discovery of microbial pharmaceuticals. *Pure Appl. Chem.* 60, 833-836.
- Du Toit, M., C.M. Franz, L.M. Dicks, and W.H. Holzapfel. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J. Appl. Microbiol.* 88, 482-494.
- Eguchi, T., K. Kaminaka, J. Shima, S. Kawamoto, K. Mori, S.H. Choi, K. Doi, S. Ohmomo, and S. Ogata. 2001. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 247-253.
- Evain-Brion, D., M. Donnadieu, M. Roger, and J. Job. 1982. Simultaneous study of somatotrophic and corticotrophic pituitary secretions during ornithine infusion test. *Clin. Endocrinol.* 17, 119-122.
- Garrote, G.L., A.G. Abraham, and G.L. De Antoni. 1998. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. *J. Dairy Res.* 65, 149-154.
- Gilmore, M.S., D.B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B.E. Murray, and L.B. Rice. 2002. Nonhuman reservoirs of *Enterococci*, pp. 56-100. In M.S. Gilmore (ed.), *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA.
- Jang, S.H. 2011. Control of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon by antimicrobial effect of lactic acid bacteria. *Food Industry Nutr.* 16, 1-4.
- Jeevanandam, M., N.I. Holaday, and S.R. Petersen. 1996. Ornithine α -ketoglutarate (OKG) supplementation is more effective than its component salts in traumatized rats. *J. Nutrition* 126, 2141-2150.
- Jeong, K.H., J.H. Choi, J.M. Lee, J.H. Lee, S.Y. Jang, and Y.J. Jeong. 2002. Fermentation characteristic of kefir beverage added fruit juice. *Food Ind. Nutrition* 7, 35-38.
- Kandler, O. and P. Kunath. 1983. *Lactobacillus kefir* sp., component of microflora of kefir. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 286-294.
- Kemp, N. 1984. Kefir, the champagne of cultured dairy products. *Cultured Dairy Products J.* 19, 29-30.
- Kim, M.J. 2010. Preparation and characterization of kimchi using lactic acid bacteria having GABA and ornithine producing capacity and its some functional properties. MS thesis, Chonbuk Nat'l. Univ., Jeonju.
- Kim, J.Y., J.A. Lee, K.L. Kim, W.J. Yoon, W.J. Lee, and S.Y. Park. 2007. Antioxidative and antimicrobial activities of *Sargassum muticum* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36, 663-669.
- Kim, D.S., S.K. Park, H.S. Kwak, and K.W. Lee. 1994. Isolation, identification and characterization of lactose non-fermenting yeast from kefir cultures. *Korean J. Food Sci. Resour.* 14, 175-178.
- Lee, J.S., K.C. Lee, J.S. Ahn, T.I. Mheen, Y.R. Byun, and Y.H. Park. 2002. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1257-1261.
- Lim, S.M. 2005. Synergistic effect of physico-chemical treatment and bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* MJ-14. *J. Fd. Hyg. Safety* 20, 217-224.
- Lim, Y.S., S.Y. Kim, and S.K. Lee. 2008. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from kefir made of goat milk. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 28, 82-90.
- Liu, S.Q., R. Holland, and V.L. Crow. 2003. The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 257-269.

23. Muting, D. and J.F. Kalk. 1992. Long-term effectiveness of highdosed ornithine-aspartate on urea synthesis rate and portal hypertension in human liver cirrhosis. *Amino Acids* 3, 147-153.
24. Nam, H.R., M.S. Ha, E.J. Lee, and Y.H. Lee. 2002. Effect of *Enterococcus faecalis* strain PL9003 on adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 746-752.
25. Park, K.B. and S.H. Oh. 2006. Isolation and characterization of *Lactobacillus buchneri* strains with high γ -aminobutyric acid producing capacity from naturally aged cheese. *Food Sci. Biotechnol.* 15, 86-90.
26. Sabia, C., S. Niederhausern, P. Messi, G. Manicardi, and M. Bondi. 2003. Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages ("cacciatore"). *Int. J. Food Microbiol.* 87, 173-179.
27. Sharpe, M.E., T.F. Fryer, and D.G. Smith. 1996. Identification of lactic acid bacteria, pp. 65-79. In B.M. Gibbs and F.A. Skinner (eds.). Identification Methods for Microbiologists: part A. Academic Press, Inc., New York, USA.
28. Shi, H.P., R.S. Fishel, D.T. Efron, J.Z. Williams, M.H. Fishel, and A. Barbul. 2002. Effect of supplemental ornithine on wound healing. *J. Surgical Res.* 106, 299-302.
29. Uchisawa, H., A. Sato, J. Ichita, H. Matsue, and T. Ono. 2004. Influence of low-temperature processing of the brackish water bivalve, *Corbicula japonica*, on the ornithine content of its extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1228-1234.
30. Wolpert, M., B. Gust, B. Kammerer, and L. Heide. 2007. Effects of deletions of *mbtH*-like genes on clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* 153, 1413-1423.
31. Yu, J.J. and S.H. Oh. 2010. Isolation and characterization of lactic acid bacteria strains with ornithine producing capacity from natural sea salt. *J. Microbiol.* 48, 467-472.
32. Yu, J.J., H.J. Park, S.G. Kim, and S.H. Oh. 2009. Isolation, identification, and characterization of *Weissella* strains with high ornithine producing capacity from kimchi. *Korean J. Microbiol.* 45, 339-345.