

보 문

Lactobacillus brevis BK11의 증식과 항균물질 생산을 위한 최적 배양조건 및 prebiotics의 영향

임은서*

동명대학교 식품영양학과

Optimal conditions and effects of prebiotics for growth and antimicrobial substances production of *Lactobacillus brevis* BK11

Eun-Seo Lim*

Department of Food Science and Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Republic of Korea

(Received August 20, 2015; Accepted September 23, 2015)

ABSTRACT: *Lactobacillus brevis* BK11 obtained from Baikkimchi was selected to study the effects of culture medium, initial pH, atmosphere composition, incubation temperature and time, and prebiotics on growth and production of antimicrobial substances. Growth and antimicrobial substances production of *L. brevis* BK11 were significantly higher in MRS broth than in BHI or M17 broth. The production of cell mass, lactic acid, and bacteriocin by BK11 strain was at maximum in MRS broth adjusted to pH 6.0. Aerobic and microaerobic conditions were favored cell growth and antimicrobial substances production than anaerobic condition. Biomass and lactic acid production and antimicrobial substances activity of BK 11 were significantly better at 30 and 37°C than at 25°C. Growth of the strain BK11 entered the stationary growth stage at 24 h after inoculation, and decreased after 36 h. Antimicrobial activities of cell-free culture supernatant and bacteriocin solution were highest when cultured in MRS broth with an initial pH 6.0 for 24-30 h at 37°C. In addition, the highest cell number and lactic acid and bacteriocin production were recorded in the presence of 1 and 2% (w/v) fructooligosaccharide (FOS), however, inulin and raffinose did not affect biological and physicochemical characteristics and antimicrobial activities of *L. brevis* BK11 cultures. According to these results, production of antimicrobial substances by *L. brevis* KB11 was closely associated with cell density. Under optimal conditions for antimicrobial substances production, *L. brevis* BK11 effectively inhibited the growth of *Helicobacter pylori* ATCC 43504.

Key words: *Helicobacter pylori*, antimicrobial activity, bacteriocin, prebiotic, probiotic

위장 내에 분비되는 위산은 호흡이나 음식물을 통해 외부로부터 들어온 각종 세균을 사멸시킬 정도로 산성이 강하므로 위장은 일반적인 세균이 서식하기 어려운 인체 장기이다. 하지만 1982년 Barry Marshall과 Robin Warren은 위장 점막으로부터 병원성 세균인 *Helicobacter pylori*를 분리 배양하는데 성공하였다(Marshall and Warren, 1984). *H. pylori*의 세포는 나선형이며, 편모를 가지고 있어서 위장 점막을 뚫고 쉽게 침투할 수 있을 뿐만 아니라, 특히 우레아제에 의해 요소를 분해시켜 생산한 암모니아로 위산을 중화시킴으로써 위장 내에 정

착하여 위장 점막을 손상시킨다(Kusters *et al.*, 2006). 게다가 *H. pylori*의 세포외막에 존재하는 *BabA*, *OipA* 및 *SabA*와 같은 단백질과 지다당체에 의해 위장 상피세포에 부착한 뒤 상주하면서, *CagA*와 *VacA* 등의 독성인자들에 의해 위염, 위궤양 및 위암 등 심각한 위장질환을 유발하게 된다(Kusters *et al.*, 2006).

일반적으로 이용되는 *H. pylori* 세균 방법으로는 양성자 펌프 억제제(proton pump inhibitor, PPI), 제산제(bismuth subsalicylate) 및 amoxicillin, clarithromycin 혹은 metronidazole 등의 항생제를 병용 처리하는 3제요법(triple therapy)이 있으나(Vakil and Megraud, 2007), 이러한 치료약제의 사용으로 인하여 메스꺼움, 복통 등의 부작용이 동반되기도 하고, 항생

*For correspondence. E-mail: limsm020@tu.ac.kr;
Tel.: +82-51-629-1714; Fax: +82-51-629-1709

제 사용에 따른 내성 균주의 출현으로 제균 효과가 감소되는 것으로 알려져 있다(Megraud *et al.*, 2013). 최근 연구결과에 따르면, 장내 미생물의 균형을 유지하면서 부작용 발생 우려가 적고 건강 증진에 도움을 주는 프로바이오틱 유산균이 *H. pylori* 제균에 효과적이므로 이들 병원성균으로 인해 유발된 위장 질환 치료를 위한 대체요법으로 관심이 집중되고 있다(Vitor and Vale, 2011).

프로바이오틱이란 인간이나 동물의 성장을 촉진시키고 건강을 이롭게 하는 살아있는 미생물로서 *Lactobacillus* 속이나 *Bifidobacterium* 속 균주들이 여기에 속한다(Fuller, 1989). 이들 유용 미생물들은 항균물질 생산, 상피세포의 수용체나 영양분에 대한 *H. pylori*와의 경쟁, 위점막 보호를 위한 뮤신 분비 촉진 및 케모카인이나 사이토카인과 같은 면역반응 조절인자를 분비함으로써 *H. pylori*를 제거하거나 위장 내에 부착되는 것을 저해한다(Lesbros-Pantoflickova *et al.*, 2007). 유산균은 유기산 및 과산화수소 등과 같은 항균물질을 생산하는데, 특히 *Weissella confuse*나 *Lactobacillus lactis* 등과 같은 유산균은 *in vitro* 상에서 *H. pylori*에 대한 항균활성을 나타내는 박테리오킨을 생산하는 것으로 밝혀졌다(Nam *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003).

박테리오킨은 단백질성 물질이므로 체내 단백질 가수분해 효소에 의해 쉽게 분해되므로 인체 무독성이고 잔류성이 없으며, 다양한 식중독균에 대한 증식 억제 및 사멸 효과로 인해 생물학적 보존제나 생물제어제로서의 적용이 가능하며, 특히 *H. pylori*에 대한 제어효과로 인해 의약품으로서의 효용 가치도 기대되고 있다(Deegan *et al.*, 2006; Rattanachaiakunsopon and Phumkhachorn, 2010; Tongtawee *et al.*, 2015). Lesbros-Pantoflickova 등(2007)의 보고에 따르면, 항생제 및 PPI의 단독 처리시보다 프로바이오틱 유산균과 혼용한 경우 항생제 사용에 따른 부작용 발생률은 감소시킨 반면, *H. pylori* 제균율은 유의하게 증가되었으며, 이는 유산균이 생산하는 유산이나 박테리오킨과 같은 항균물질의 작용에 기인한다고 하였다(Egan *et al.*, 2007).

박테리오킨 생산을 위해 유산균은 우유나 우청이 함유된 천연배지나 MRS, M17 및 LAPTg 등의 합성배지에서 일반적으로 배양한다. 하지만 복합 배지 상에서 배양된 유산균의 배양 상등액으로부터 박테리오킨을 분리하기 위해선 이온교환이나 겔 및 액체크로마토그래피 등을 이용하여 복잡한 정제 단계를 거쳐야만 한다(Mahrous *et al.*, 2013). 정제 단계가 복잡해질수록 생산 단가 상승으로 인하여 건강기능식품이나 의약품 산업분야 적용에 부담이 가중되므로 원가 절감을 위해 박테리오킨 생산량을 증가시킬 수 있는 최적의 배지 성분 검색 및 배양

조건 개선에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Jozala *et al.*, 2007). Audisio 등(2001)은 bifidobacteria와 lactobacilli와 같은 프로바이오틱 균주를 비롯하여 장내세균의 증식을 촉진하여 장 건강 향상에 도움을 주는 비소화성 영양성분인 프리바이오틱 fructooligosaccharide (FOS)가 *Enterococcus faecium*의 성장뿐만 아니라 박테리오킨 생합성을 촉진한다고 보고한 바 있다.

전보(Lim, 2014)에서 숙성된 백김치로부터 분리된 *Lactobacillus brevis* BK11은 위산에 대한 내성이 강하며, *H. pylori* (ATCC 43504)에 대한 항균활성이 확인되어 프로바이오틱스 균주로서의 기본 조건을 일부 충족하는 것으로 확인한 바 있다. 본 연구에서는 유산균의 증식 및 항균물질 생산량 증가를 위한 최적의 배지, 초기 pH, 공기 조성, 배양 온도와 시간 등의 배양 조건과 프리바이오틱스의 영향을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양 조건

L. brevis BK11 균주는 Lactobacilli MRS broth (Difco)에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 얻은 배양액을 20% (v/v) 글리세롤 용액에 넣어 -80°C에 보관하면서 실험하였다.

한편, American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 분양 받은 *H. pylori* ATCC 43504는 5% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 0.2% (w/v) 2,6-di-*o*-methyl- β -cyclodextrin (CD) 및 항생제(cefsulodine, vancomycin, trimethoprim, and amphotericin B, Sigma-Aldrich)가 첨가된 Brucella agar (Difco) 평판배지에 접종 후 미호기적 조건(10% CO₂, Anoxomat system, MART Co.) 하에 37°C, 48시간 배양하였다.

유산균수 및 대사산물 생성량 측정

배양액을 무균적으로 채취하여 MRS agar (Difco) 배지 상에서 표준한천평판배양법으로 유산균의 생균수를 측정하였다. 또한 pH meter (Metrohm 744, The Netherlands)를 이용하여 배양액의 pH를 측정하였다. 적정산도는 배양액에 동량의 증류수를 가하여 1% (w/v) phenolphthalein을 첨가한 후 0.1 N NaOH 용액으로 적정한 다음, 미홍색의 종말점에 도달한 소비량을 측정하여 계산식 [적정산도(%) = (0.1 N NaOH 소비량 × 0.1 N NaOH 역가 × 0.9) / 시료양]에 대입하였다. 한편, 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C) 하여 배양 상등액만을 모은 다음 0.22 μ m membrane filter (Millipore)로 여과 제균한 뒤 HClO₄ (1 M)를 첨가하여 단백질을 침전시켰다. High-pressure

liquid chromatography (HPLC, Shimadzu)의 컬럼은 Aminex HPX-87H (300×7.8 mm: Bio-Rad)이며, 검출기는 refractive index (GBC Scientific Equipment Pty Ltd.), 이동상은 H₂SO₄ (5 mM), 유속은 0.5 ml/min이었고, 컬럼 온도 35°C하에서 분석하였다. 220 nm에서 흡광도를 측정하여 표준용액의 검량곡선으로부터 유산 함량을 정량하였다. 한편, 잔당의 함량 측정을 위해 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)한 후 상등액을 0.22 μm membrane filter로 여과 제균한 다음 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 컬럼은 RS pack KC-811 (8 mm I.D. × 300 mm)을 사용하였고 이동상은 1 ml/min 유속으로 0.25% (v/v) H₂SO₄ 용액을 사용하였다. 시료의 일회 주입량은 50 μl이었으며, refractive index 검출기를 사용하였다.

배양 상등액의 항균 활성 측정

다양한 조건 하에서 배양한 후 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)한 후 세포를 제거한 상등액만을 회수하였다. 배양 상등액 내에 존재하는 세균의 세포를 제거하기 위해 0.45 μm membrane filter로 여과제균하였다. 한편, Brucella broth 내에서 48시간 배양한 후 얻은 *H. pylori* 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 회수한 다음, 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.0)으로 2회 세척하였다. Brucella broth 내에 *H. pylori*의 세포수를 1.0×10^5 CFU/ml로 조정된 다음 유산균 배양 상등액 5.0% (v/v)를 첨가하고, 37°C에서 48시간 배양한 후 Brucella agar 상에서 표준한천평판배양법으로 생균수를 측정하여 배양 상등액의 항균 활성을 조사하였다.

조박테리오신 용액 제조 및 박테리오신 활성 측정

유산에 의한 영향을 제거하기 위해 1 N NaOH를 이용하여 배양 상등액의 pH를 6.5로 조정하였으며, 과산화수소에 대한 영향을 배제하기 위해 카탈라아제(1 mg/ml, Sigma-Aldrich)를 처리하였다. 배양 상등액에 50% (w/v) 황산암모늄을 처리한 후 4°C 내에서 교반한 다음 원심분리(12,000 × g, 30분, 4°C)하여 얻어진 침전물은 20 mM PBS (pH 6.5)에 현탁시켰다. 그런 다음 4°C, 24시간 동안 동일한 buffer 내에서 투석막(molecular weight cut-off = 1,000 Da, Spectrum Medical Industries, Inc.)으로 투석시켜 조박테리오신 용액을 조제하였다.

박테리오신 용액의 활성은 *H. pylori* ATCC 43504를 대상으로 microtiter plate 방법(Hole *et al.*, 1991)으로 측정하였다. *H. pylori*는 Brucella broth 내에서 37°C, 48시간 배양 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포만을 모은 다음 PBS (pH

7.0)로 2회 세척하였다. Brucella broth 내에 *H. pylori*의 세포수는 1.0×10^5 CFU/ml로 맞추었고, 일정한 비율로 희석한 조박테리오신 용액을 혼합한 후 microtiter plate well (Falcon)에 가한 다음 37°C에서 24시간 배양하였다. Microplate reader (BioTek, Inc.)를 통해 600 nm에서 흡광도를 측정하여 조박테리오신 용액 대신 buffer를 처리한 대조구에 비해 혼탁도가 50% 저해된 최대 희석배수의 역수를 측정하여 박테리오신 활성(arbitrary units, AU/ml)으로 환산하였다.

배양 조건에 따른 유산균수, 대사산물 생성량 및 항균 활성 측정

유산균의 증식 속도와 증식에 따른 대사산물의 생성량 및 항균 활성 변화에 대한 배지 종류, 배양 조건 및 프리바이오틱스의 영향을 살펴보았다.

배지 종류: 실험 균주는 BHI, MRS 및 M17 broth에 접종한 다음 37°C, 24시간 호기적 조건하에서 배양한 후 배양액을 채취하여 생균수, 대사산물의 생성량 및 배양 상등액과 박테리오신 용액의 항균 활성을 측정하였다.

초기 pH: 실험 균주는 1 N HCl 혹은 NaOH를 이용하여 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 및 9.0으로 조정된 MRS broth에 접종하여 37°C, 24시간 호기적 조건하에서 배양한 후 배양액을 채취하여 생균수, 대사산물의 생성량 및 배양 상등액과 박테리오신 용액의 항균 활성을 측정하였다.

공기 조성: 실험 균주를 MRS broth (pH 6.0)에 접종하여 37°C, 24시간 동안 호기성, 미호기성(85% N₂, 5% O₂, 10% CO₂) 및 혐기성(85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) 조건 하에서 배양한 후 배양액을 채취하여 생균수, 대사산물의 생성량 및 배양 상등액과 박테리오신 용액의 항균 활성을 측정하였다.

배양 온도: 실험 균주는 MRS broth (pH 6.0)에 접종하여 25, 30, 37 및 45°C, 24시간 호기적 조건 하에서 배양한 후 배양액을 채취하여 생균수, 대사산물의 생성량 및 배양 상등액과 박테리오신 용액의 항균 활성을 측정하였다.

배양 시간: 실험 균주는 MRS broth (pH 6.0)에 접종하여 37°C, 12-48시간 호기적 조건 하에서 배양하는 동안 일정한 시간 간격으로 배양액을 채취하여 생균수, 대사산물의 생성량 및 배양 상등액과 박테리오신 용액의 항균 활성을 측정하였다.

프리바이오틱스: 실험 균주는 MRS broth (pH 6.0)에 0.5, 1.0 및 2.0%의 농도로 FOS, 라피노오스 및 이눌린 등의 프리바이오틱스를 첨가하여 제조한 배지에 접종한 다음 37°C, 24시간 호기적 조건 하에서 배양한 후 배양액을 채취하여 생균수, 대사산물의 생성량 및 배양 상등액과 박테리오신 용액의 항균 활성을 측정하였다.

통계처리

실험 항목별 총 3회 실시 후 얻어진 측정값은 평균±표준편차로 나타내었고, 통계처리는 Statistical Package for Social Science (SPSS)를 이용하여 유의수준 $P<0.05$ 에서 일원배치 분산분석(one-way ANOVA) 하였다. Duncan's multiple range test를 통해 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

배지 종류에 따른 유산균수, 대사산물 생성량 및 향균 활성

MRS, BHI 및 M17 배지에 접종한 후 37°C, 24시간 동안 호기적인 조건 하에서 배양한 후 유산균수, 대사산물 생성량 및 유산과 박테리오신에 의한 *H. pylori* ATCC 43504에 대한 향균활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 유산균수는 MRS와 M17 배지 상에서 10^9 CFU/ml에 이르렀으나, BHI 배지 내에서는 이보다 낮은 10^8 CFU/ml로 나타났고, 모든 배지 내에 글루코오스 성분은 검출되지 않았다. 유산의 생성량도 MRS 배지 내에서 가장 높게 나타났으나(125.9±4.5 mM), BHI (76.3±3.9 mM)와 M17 (99.1±6.2 mM) 내에서는 MRS 배지보다 유의하게 낮게 측정되었다. 배양액의 pH는 MRS (3.54±0.14)와 M17 (3.76±0.28) 배지 내에서 유의한 차이가 없었으나, BHI (4.15±0.05) 배양액의 pH 보다 유의하게 낮았고, 산도의 경우도 MRS (1.46±0.14%)와 M17 (1.34±0.13%) 배지가 BHI (0.80±0.09%) 배지 내에서 생성된 산도보다 유의하게 높았다. 한편, *H. pylori*에 대한 MRS (22.4±2.1%) 배지로부터 얻은 배양 상등액(5%)의 향균 활성이 BHI (13.2±0.4%)와 M17 (17.1±0.7%)의 배양 상등액 보다 유의하게 높았으며, MRS (512 AU/ml) 배지로부터 얻어진 박테리오신의 향균 활성도 가장 높게 나타났다. 이와 같은 결과에서 볼 때, *L. brevis* BK11의 균주는 MRS 배지에서 배양한 경우 증식속도가 가장 높았고, 이에 따른 대사산물 생성량도 BHI와 M17 배지에서 배양했을 때보다 유의하게 증가되었으며, 배양액 내의 유산과 박테리오신에 의해

*H. pylori*의 증식 억제 효과도 크게 나타난 것으로 사료된다.

프로바이오틱 유산균이 탄수화물 대사 과정 중 생산한 유기산에 의해 pH를 낮춰 *H. pylori*의 증식을 억제하거나, 단백질성 천연 향균물질인 박테리오신에 의해 *H. pylori*에 대한 향균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 및 *Pediococcus* 속에 의해 생산된 유산(50-156 mM)은 *H. pylori*에 대한 저해활성과 상관관계가 있다고 보고되고 있다(Gotteland *et al.*, 2006). *Lactobacillus salivarius*와 *Lactobacillus casei*가 생산한 유산은 *H. pylori* 세포에 직접적인 영향을 줄 뿐만 아니라 그들의 우레아제 효소 활성에도 영향을 준다고 밝혀져 있다(Aiba *et al.*, 1998; Sgouras *et al.*, 2004). *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259의 성장은 MRS 보다 LAPTg (1.5% peptone, 1% tryptone, 1% glucose, 1% yeast extract, 0.1% Tween 80) 배지 상에서 더 높게 나타났지만, 유산의 생성량은 MRS 배지에서 더 높았다(Juarez Tomas *et al.*, 2003).

한편, Coconnier 등(1998)에 의해 *Lactobacillus johnsoii* LA1과 *L. acidophilus* LB가 생산한 박테리오신의 anti-*H. pylori* 활성에 대해 이미 보고된 바 있다. 유산균이 생산한 박테리오신은 anti-*H. pylori* 활성을 가진 화합물로서 분자량이 적고 열에 안정한 펩타이드성 물질로서 일부 *Lactobacillus* 속 균주들이 생산하는 것으로 보고되고 있으며, 프로바이오틱 *E. faecium*도 항생제에 저항성이 있는 *H. pylori*의 성장을 저해할 수 있는 열에 안정한 단백질성 향균물질을 생산한다고 알려진 바 있다(Tsai *et al.*, 2004).

박테리오신은 MRS, tryptone glucose extract (TGE), all-purpose with tween (APT), BHI, trypticase soy broth (TSB) 및 trypticase soy broth yeast extract (TSBYE) 등과 같은 복합 배지 내에서 생산되며, 박테리오신 생산은 배지 내 구성성분에 의존한다고 알려져 있다(Guerra *et al.*, 2001). 이미 보고된 여러 연구 결과에 따르면, MRS 배지는 다른 배지에 비해 유산균의 성장과 박테리오신 생산을 위해 효과적이라고 알려져 있다(Biswas *et al.*, 1991; Daba *et al.*, 1993). *Lactobacillus*

Table 1. Effects of culture media on biological and physicochemical characteristics and antimicrobial activities of *L. brevis* BK11 cultures

Medium	Viable cell counts (CFU/ml)	Final glucose concentration (g/L)	Lactic acid concentration (mM)	pH	Titability (%)	Antimicrobial activity of CFCS (%)	Bacteriocin activity (AU/ml)
MRS	6.1±3.5×10 ^{9b}	0	125.9±4.5 ^c	3.54±0.14 ^a	1.46±0.14 ^b	22.4±2.1 ^c	512
BHI	2.8±0.8×10 ^{8ab}	0	76.3±3.9 ^a	4.15±0.05 ^b	0.80±0.09 ^a	13.2±0.4 ^a	64
M17	2.9±3.2×10 ^{9a}	0	99.1±6.2 ^b	3.76±0.28 ^a	1.34±0.13 ^b	17.1±0.7 ^b	256

Each value shown was the mean±standard deviation of the three experiments. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($P<0.05$).

fermentum, *L. acidophilus*, *L. pentosus* 등의 박테리옌은 MRS 배지에서 가장 높은 생산량을 보여 주었다(Mahrous *et al.*, 2013). *L. salivarius* CRL 1328 증식에 따라 유산 생성에 따라 배양액의 pH는 감소되었고, 박테리옌 생산량은 증가하였는데, 특히 세포량과 증식 속도는 MRS broth 상에서 더 높은 반면, LAPTg 배지 상에서 pH는 더 낮아졌고, 박테리옌 양은 높게 나타났다(Juarez Tomas *et al.*, 2002). Audisio 등 (2001)의 보고에 따르면, *E. faecium* CRL1385는 탄소원을 함유하지 않은 LAPTg broth 내 잔당이나 효모 추출물이나 육가수분해물 등의 영양성분을 이용함으로써 균은 성장할 수 있었으나, 배지 내 성분 만으로는 박테리옌을 생합성하기 어렵다고 하였다.

유산균의 박테리옌 생산은 탄소원, 질소원, 무기염류, 계면활성제 및 저해제의 종류와 양에 주로 영향을 받는다. 특히 박테리옌은 다양한 탄소원을 포함하는 배지로부터 생산되는 것으로 알려져 있으며, nisin Z는 글루코오스, 슈크로오스, 자일로오스를 함유한 배지 내 *L. lactis* IO-1 균주에 의해 생산된다(Matsusaki *et al.*, 1996). 또한 글루코오스, 슈크로오스, 자일로오스 및 갈락토오스는 pediocin AcH의 생산량을 증가시키는 탄소원으로 확인되었다(Biswas *et al.*, 1991). 한편, 유산균은 영양요구성이 까다로운 균으로서, 생산균의 성장과 박테리옌 생산은 탄소원보다 유기질소원에 영향을 받는다(Parente and Ricciardi, 1999). Kim 등(1997)에 의하면, nisin의 최대 농도는 배지 내 유기질소원의 함량이 증가될 때 나타났다고 하였으며, 유기질소원의 종류에 따라 박테리옌의 생산량이 다르다고 하였다. De Vuyst and Vandamme (1993)는 nisin의 최대 활성은 면실박에 의해 나타났으며, 효모추출물과 어분(fish meal)에 의해서도 비교적 높은 활성의 박테리옌을 생산하였는데 효모 추출물은 박테리옌 생합성의 저해제를 불활성화시키는 것으로 알려져 있다(Fukushima *et al.*, 1983). 무기염류도 박테리옌 생산에 영향을 줄 수 있고 이들

의 영향은 균주 특이성이 있다고 알려져 있다(Parente and Ricciardi, 1999). 무기인산은 *Lactobacillus lactis* subsp. *lactic* NIZO22186의 nisin 생산을 증가시키며, 특히 K_2HPO_4 에 의해 최대의 활성을 나타내었다고 밝혀졌다(De Vuyst and Vandamme, 1993). Mg^{2+} 은 pediocin AcH 생산을 증가시키는데 도움을 주었으며(Biswas *et al.*, 1991), $CaCl_2$ 은 최대의 nisin Z를 생산하였고 균 증식 속도 증가에도 효과적이라고 하였다(Matsusaki *et al.*, 1996). Tween 80 등의 계면활성제도 일부 박테리옌 생산에 영향을 주는데 이는 생산 균주의 세포 표면으로부터 박테리옌 분리를 용이하게 하여 항균물질의 역할을 증가시킨다고 하였다(Joosten and Nunez, 1995).

유산균수, 대사산물 생성량 및 항균 활성에 대한 배지 초기 pH의 영향

L. brevis BK11의 균수, 대사산물 생성량 및 항균 활성에 대한 배지 초기 pH의 영향을 살펴본 결과는 Table 2와 같다. 초기 pH를 조정하지 않은 MRS (6.84±0.05) 배지(대조구)와 초기 pH를 5.0-9.0로 조정한 배지에 *L. brevis* BK11를 접종한 후 37°C, 24시간 동안 호기적인 조건 하에서 배양한 결과, 유산균수는 대조구와 pH 6.0과 7.0인 배지 내에서는 10^9 CFU/ml로 유의한 차이가 없었으나, pH 8.0인 경우는 10^8 CFU/ml이었으며, pH 5.0 (10^7 CFU/ml)와 9.0 (10^6 CFU/ml)인 경우는 이보다 더 낮게 나타났다. 배지 내 글루코오스는 유산균의 증식에 필요한 에너지원과 대표적인 대사산물인 유산 생산을 위해 사용된다. 초기 pH 5.0과 9.0인 배지 내에서 37°C, 24시간 배양한 후 잔존하는 글루코오스의 양은 각각 5.5±1.4 g/L와 11.7±0.5 g/L으로 나타났다. 그러나 pH 6.0, 7.0 및 8.0인 경우는 글루코오스 성분이 검출되지 않았다. 그 중에서 pH 8.0 보다 6.0과 7.0일 때 최종 균수가 약 1 log cycle 이상 높게 측정되었는데 이는 글루코오스가 전부 소비되었을 때 유산균은 증식을 위해 배지

Table 2. Effects of initial pH on biological and physicochemical characteristics and antimicrobial activities of *L. brevis* BK11 cultures

pH	Viable cell counts (CFU/ml)	Final glucose concentration (g/L)	Lactic acid concentration (mM)	pH	Titability (%)	Antimicrobial activity of CFCS (%)	Bacteriocin activity (AU/ml)
Control	6.1±3.5×10 ^{9a}	0 ^a	125.9±4.5 ^d	3.54±0.14 ^a	1.46±0.14 ^{cd}	22.4±2.1 ^d	512
5.0	4.5±0.8×10 ^{7b}	5.5±1.4 ^b	63.5±5.3 ^b	4.30±0.09 ^c	0.67±0.13 ^b	14.1±0.8 ^b	ND
6.0	8.2±3.6×10 ^{9a}	0 ^a	147.5±6.6 ^c	3.24±0.06 ^a	1.64±0.13 ^d	27.5±2.0 ^c	512
7.0	5.7±2.1×10 ^{9a}	0 ^a	130.8±8.3 ^d	3.36±0.16 ^a	1.50±0.06 ^{cd}	23.5±3.1 ^d	512
8.0	2.3±0.2×10 ^{8b}	0 ^a	87.0±3.2 ^c	3.89±0.22 ^b	1.36±0.08 ^c	18.6±1.3 ^c	128
9.0	6.6±4.1×10 ^{6b}	11.7±0.5 ^c	20.4±5.0 ^a	5.65±0.23 ^d	0.33±0.12 ^a	5.3±0.9 ^a	ND

Each value shown was the mean±standard deviation of the three experiments. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($P<0.05$).

내에 함유된 육추출물이나 효모추출물과 같은 질소원을 이용하는 것으로 추정하였다.

한편, 유산 생성량은 pH 6.0인 배지 상에서 가장 높게 나타났고, 대조구와 pH 7.0에서는 거의 비슷한 수준으로 나타났으며, pH 5.0, 8.0 및 9.0인 경우는 이보다 낮게 나타났다. 유산 생성량에 따라 산도는 초기 pH 6.0 배지에서 가장 높았고, 배양 후 최종 pH도 초기 pH 6.0에서 가장 낮게 나타났다. 초기 pH 6.0인 경우 *H. pylori*에 대한 배양 상등액의 항균 활성이 유의하게 가장 높았고(27.5±2.0), 대조구와 pH 7.0인 경우는 이보다 낮게 나타났으며, pH 9.0에서 배양하여 얻은 상등액의 항균 활성이 가장 낮게 나타났다. 박테리옌 활성은 대조구와 pH 6.0과 7.0에서 512 AU/ml이었고, pH 8.0에서 얻은 박테리옌은 128 AU/ml으로 나타났지만, pH 5.0과 9.0에서는 박테리옌 활성이 측정되지 않았다. 배지 성분인 글루코오스는 배양 과정 중 pH 5.0인 MRS 배지 내에서 배양한 경우, *L. casei*의 성장 곡선과 세포량은 pH 5.5와 6.0보다 다소 낮게 나타났으며, 배지 내 당을 완전하게 이용할 수 없었으므로 유산 생성량도 낮게 나타났다(Yoo *et al.*, 1996). *Lactobacillus* sp. LMI8 균주의 최대 유산량(52.37 g/L)은 pH 5.9에서 얻어졌다(De Lima *et al.*, 2010). 배지의 pH는 유산균의 성장 및 박테리옌 생산에 영향을 미치는 인자 중에 하나로 알려져 있는데 일반적으로 최대량의 박테리옌 생산은 pH 5.5-6.0 범위로서 이는 균 성장을 위한 최적의 pH 보다 다소 낮은 것으로 보고되고 있다(Parente and Ricciardi, 1999). pH를 조정하지 않은 MRS 배지 내에서 *L. lactis* NK24를 접종하여 배양한 경우, lacticin NK24는 배양 2시간 이후부터 검출되기 시작하였고, 최대의 균수는 8시간만에 도달했으며, 12시간 배양 후 pH는 4.8로 나타났다. 반면, 초기 pH를 6.0, 6.5 및 7.0으로 조정할 경우 균 성장과 lacticin NK24 활성보다 유의하게 증가하였는데, 최대의 박테리옌 활성은 pH 6.0에서 나타났으며, 이는 pH 6.5와 7.0 하에서 생성된 활성의 4배 더 높았다(Lee *et al.*, 2004). *L. lactis* subsp. *lactis* ST1이 생산한 박테리옌의 최대 활성(640 AU/ml)은 pH 6.5에서 나타났으며, pH 7.0과 7.5에서는 pH 6.5 보다 낮

게 측정되었고, pH 8.5에서는 가장 낮은 활성이 나타나 초기 pH가 높을수록 균수와 박테리옌 활성이 낮았다고 하였다(Taheri *et al.*, 2012). Verellen 등(1998)에 따르면, *Lactobacillus plantarum* 423이 생산한 plantarcin 423의 최대 활성은 pH 4.0에서 관찰되었고, 배양시간이 경과할수록 plantarcin 활성 증가는 생산 균주의 세포벽에 대한 펩타이드의 결합력이 감소되기 때문인 것으로 추정하였다. *Lactobacillus sake* CTC 494의 균 성장률은 pH 5.5와 6.5에서 최대에 이르렀고, 이들이 생산한 박테리옌 sakacin K는 pH 5.0에서 가장 높게 나타났으며, pH가 높아질수록 박테리옌 불활성 속도는 증가하는데, 이는 생산 균주 세포에 대한 흡착 정도가 더 높아졌기 때문인 것으로 추정하였다(Leroy and De Vuyst, 1999). Pre-pediocin은 성장하는 세포로부터 활성형 박테리옌 분비나 번역 후 변형을 위해 낮은 pH를 요구한다(Cho *et al.*, 1996).

반면, pre-nisin, pre-leuconocin 및 pre-sakacin의 번역 후 과정은 세포 성장 과정 중 보다 더 높은 pH에서 발생하고, 비해리된 유산과 낮은 pH는 유산균의 성장을 저해한다. 따라서 생성된 유산을 제거하게 되면 균 성장률을 높일 수 있고 성장에 따른 대사산물 생성을 효과적으로 높일 수 있다고 본다(Yoo *et al.*, 1992). *L. lactis* CM1의 증식과 nisin의 활성은 pH 6.5보다 pH 11.0에서 더 높게 나타났다고 하였다(Mitra *et al.*, 2007).

유산균수, 대사산물 생성량 및 항균 활성에 대한 공기 조성의 영향

MRS 배지의 초기 pH를 6.0으로 조정한 후 37°C, 24시간 동안 호기적, 미호기적 및 혐기적 조건 하에서 배양한 다음, *L. brevis* BK11의 증식과 대사산물의 생성량 및 항균 활성 변화를 살펴본 결과는 Table 3과 같다. 호기적 및 미호기적 조건 하에서 배양한 경우 유산균수에는 차이가 없었으나, 혐기적 조건에서 배양한 경우는 이보다 약 2 log cycle 낮은 최종 균수가 얻어졌다. 게다가 혐기적 조건 하에서 배양한 배양액 내에서 글루코오스가 잔존하였고, 유산의 생성량도 호기적 혹은 미호기적 조건에서 배양했을 때보다 유의하게 낮았다. 배양액의

Table 3. Effects of atmosphere composition on biological and physicochemical characteristics and antimicrobial activities of *L. brevis* BK11 cultures

Incubation condition	Viable cell counts (CFU/ml)	Final glucose concentration (g/L)	Lactic acid concentration (mM)	pH	Titability (%)	Antimicrobial activity of CFCS (%)	Bacteriocin activity (AU/ml)
Aerobic	8.2±3.6×10 ^{9a}	0	147.5±6.6 ^b	3.24±0.06 ^b	1.64±0.13 ^b	27.5±2.0 ^b	512
Microaerobic	7.8±1.8×10 ^{9a}	0	144.5±8.7 ^b	3.18±0.16 ^b	1.77±0.13 ^b	28.2±2.6 ^b	512
Anaerobic	4.8±2.0×10 ^{7b}	4.2±0.8	84.3±9.0 ^a	3.96±0.14 ^a	1.04±0.20 ^a	14.4±3.6 ^a	32

Each value shown was the mean±standard deviation of the three experiments. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA (*P*<0.05).

pH는 미호기적 조건에서 배양했을 때 가장 낮았으며, 이는 호기적 조건과는 유의할만한 차이가 없었으나, 혐기적 조건에서 배양했을 때보다 유의하게 낮았다. 이에 따라 산도도 혐기적 조건에서 배양했을 때 가장 낮았고, 배양 상등액의 항균 활성도 혐기적 조건이 불리하게 나타났으며, 박테리오신 활성도 혐기적 조건 하에서 가장 낮게 측정되었다.

산양유에서 분리된 *L. lactis* subsp. *lactis*를 미호기적 혹은 혐기적 조건 하에서 배양했을 때 세포수, 배양액의 pH 및 박테리오신 생산량에는 유의한 차이가 없었고, 이들 공기 조성은 호기적 배양 조건보다 균의 성장과 박테리오신 생산에 유리한 것으로 나타났다고 하여 본 결과와는 다소 차이가 있었다. 즉, MRS 배지 내에서 20시간 동안 호기적 조건에서 배양했을 때 생균수는 8.89 CFU/ml인 반면, 미호기적 조건과 혐기적 조건 하에서는 각각 9.62 CFU/ml과 9.42 CFU/ml로 나타났고, 12시간 배양했을 때 미호기적 조건과 혐기적 조건에서 박테리오신 활성은 320 AU/ml이었고, 호기적 조건 하에서는 160 AU/ml로 나타났다. 일반적으로 유산균은 미호기성 균으로서 산화적 스트레스는 성장을 더디게 하고 대사산물인 박테리오신 생산량에도 감소시킨다고 보고되었다(Taheri *et al.*, 2012). Hirsch (1951)는 유산균의 박테리오신 생산 최적 조건은 혐기적 조건이라고 한 반면, Leroy 등(2003)은 *E. faecium* RZS C5의 증식과 박테리오신 생산을 위해 산소가 저해 요인이라고 볼 수 없다고 보고한 바 있다. Cabo 등(2001)은 산소는 박테리오신 생산에 필수적이라고 하였고, Sousa 등(2010)은 혐기적인 조건이 오히려 항균물질 생산을 방해한다고 하였으므로 박테리오신 생산을 위해 배양 과정 중 최적의 공기 조성은 균주에 따라 다른 것으로 확인되었다.

유산균수, 대사산물 생성량 및 항균 활성에 대한 배양 온도와 시간의 영향

MRS 배지의 초기 pH를 6.0으로 조정 한 후 호기적 조건 하에서 25, 30, 37 및 45°C, 24시간 동안 배양한 다음, *L. brevis*

BK11의 증식과 대사산물의 생성량 및 항균 활성 변화를 살펴본 결과는 Table 4와 같다. 30°C와 37°C에서 배양한 경우는 10^9 CFU/ml 정도로 나타났으나, 45°C에서 배양한 경우는 10^8 CFU/ml이었고, 25°C에서는 10^6 CFU/ml 정도에 그쳤다. 또한 25°C와 45°C에서 배양한 경우 배양액 내에 글루코오스가 일부 잔존하였고, 유산 생성량과 산도는 균수가 가장 많은 30°C와 37°C 배양 온도대에서 가장 높았고, 그에 따른 배양액의 pH는 25°C와 45°C에 비해 유의하게 낮았다. 특히 배양 상등액의 *H. pylori*에 대한 항균력은 37°C (27.5±2.0%)에서 배양했을 때 가장 높았고, 30°C (19.0±2.8%)에서 배양한 경우는 이보다 다소 낮았으며, 25°C (9.2±0.9%)에서 얻어진 배양 상등액의 항균력은 가장 낮았다. 한편, 박테리오신의 활성도 30°C와 37°C에서 512 AU/ml로 가장 높게 나타난 반면, 45°C에서 배양한 경우는 128 AU/ml 정도의 활성을 보였으며, 25°C에서 배양했을 때는 박테리오신을 생산할 수 없었다.

한편, MRS 배지의 초기 pH를 6.0으로 조정 한 후 호기적 조건 하에서 37°C, 12-48시간 동안 배양한 다음, *L. brevis* BK11의 증식과 대사산물의 생성량 및 항균 활성 변화를 살펴본 결과는 Table 5와 같다. 최대의 균수는 24-30시간(10^9 CFU/ml) 배양하는 동안에 나타났고, 36시간 이후부터는 생균수가 서서히 감소하는 사멸 단계임을 확인하였다. 배양액 내에 글루코오스는 대수증식기 중반인 12시간 배양한 경우 일부 존재하였고, 유산 생성량과 산도는 대수증식기 후반인 24시간 배양했을 때 최대에 이르렀으며, 이때 배양액의 pH는 가장 낮게 나타났다. 30-48시간 배양했을 때 유산 생성량, 산도 및 pH는 24시간 배양했을 때와 유의적인 차이가 없었다. 하지만 배양 상등액의 *H. pylori*에 대한 항균력은 30시간 배양했을 때 가장 높았지만, 이는 24-48시간 배양했을 때의 상등액 항균력과 유의한 차이가 없었고, 박테리오신 활성은 24-30시간(512 AU/ml) 동안 최대에 이르렀으나, 36시간 이후부터는 활성이 감소되었는데 이는 단백질 분해효소의 영향을 받은 것으로 추정된다.

Lactobacillus sp. RKY2는 글루코오스, 효모 추출물, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Table 4. Effects of atmosphere composition on biological and physicochemical characteristics and antimicrobial activities of *L. brevis* BK11 cultures

Temperature (°C)	Viable cell counts (CFU/ml)	Final glucose concentration (g/L)	Lactic acid concentration (mM)	pH	Titability (%)	Antimicrobial activity of CFCS (%)	Bacteriocin activity (AU/ml)
25	2.9±2.0×10 ^{6b}	10.1±1.3 ^b	39.4±9.1 ^a	4.97±0.27 ^c	0.56±0.19 ^a	9.2±0.9 ^a	ND
30	5.0±4.6×10 ^{9ab}	0 ^a	138.6±6.3 ^c	3.34±0.07 ^a	1.39±0.22 ^b	19.0±2.8 ^b	512
37	8.2±3.6×10 ^{9a}	0 ^a	147.5±6.6 ^c	3.24±0.06 ^a	1.64±0.13 ^b	27.5±2.0 ^c	512
45	1.4±0.6×10 ^{8b}	8.3±1.2 ^b	55.0±2.8 ^b	4.09±0.05 ^b	0.84±0.29 ^a	11.4±2.1 ^a	128

Each value shown was the mean±standard deviation of the three experiments. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($P<0.05$).

Table 5. Effects of the length of incubation on biological and physicochemical characteristics and antimicrobial activities of *L. brevis* BK11 cultures

Time (h)	Viable cell counts (CFU/ml)	Final glucose concentration (g/L)	Lactic acid concentration (mM)	pH	Titability (%)	Antimicrobial activity of CFCS (%)	Bacteriocin activity (AU/ml)
12	8.8±5.1×10 ^{6a}	8.7±2.0	49.6±11.4 ^a	4.72±0.07 ^b	0.71±0.22 ^a	12.8±3.0 ^a	64
24	8.2±3.6×10 ^{9b}	0	147.5±6.6 ^b	3.24±0.06 ^a	1.64±0.13 ^b	27.5±2.0 ^c	512
30	5.6±1.1×10 ^{9b}	0	154.0±5.2 ^b	3.30±0.11 ^a	1.81±0.16 ^b	30.3±4.6 ^c	512
36	6.0±0.9×10 ^{8a}	0	150.5±5.7 ^b	3.31±0.09 ^a	1.55±0.27 ^b	25.9±2.8 ^c	256
48	9.4±2.3×10 ^{7a}	0	156.3±9.0 ^b	3.27±0.15 ^a	1.40±0.31 ^b	19.6±3.4 ^b	32

Each value shown was the mean±standard deviation of the three experiments. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($P<0.05$).

및 $MnSO_4$ 등으로 구성된 초기 pH 6.0인 배지 중에서 36°C의 온도에서 배양한 경우 균 성장은 최적이었으며, 이때 최대량의 유산(153.9 g/L)을 생산하였다(Wee *et al.*, 2005). *Lactobacillus gasseri* Chen과 *L. plantarum* 18의 배양상등액 내에 존재하는 유산 114–150 mM 농도 하에서 anti-*H. pylori* 효과를 발휘하였다(Chen *et al.*, 2011). 배양온도는 배지 내 산소 용해성, 분자의 운동 에너지 및 세포 내 반응 속도에 영향을 미쳐 결국 박테리 오신 생산에도 영향을 주게 된다(Al-Jumaily *et al.*, 2014). *L. acidophilus*가 생산한 acidocin은 30°C와 37°C에서 가장 높은 활성을 보인 반면, 25°C에서 배양한 경우는 이보다 낮은 활성을 나타내었는데 이는 생산 균주의 성장속도가 늦어짐에 따른 결과라고 보고하였다(Al-Jumaily *et al.*, 2014). 30°C에서 배양했을 때 *L. plantarum* Y21의 균 성장속도가 가장 빠르고, 가장 많은 양의 박테리 오신(plantaricin Y)을 생산하였다(Chin *et al.*, 2001). *L. salivarius* CRL1328은 초기 pH 6.5인 MRS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 배양한 경우, 균 성장은 최대에 이르렀고 이때 박테리 오신 생산을 위한 최적의 조건이었으며 30°C인 경우 유도기가 연장되고 균 증식속도는 낮아졌다. 또한 44°C에서 배양했을 때 균 성장은 가능하였으나, 박테리 오신은 생산되지 않았으므로 높은 배양 온도 상에서는 박테리 오신 생합성과 분리가 어렵다는 사실을 확인하였다(Juarez Tomas *et al.*, 2002).

유산균의 박테리 오신 생산량과 생산 균주의 성장 속도와는 비례 관계이며, 배양시간이 경과할수록 활성이 증가하고 주로 대수증식기 후반에 최대 활성에 이른다고 알려져 있다. 최대의 박테리 오신 생산은 균종마다 차이가 있으며 생산균의 성장 단계에 따라 상이하하다(Al-Jumaily *et al.*, 2014). 박테리 오신은 초기에 전구 단백질로서 리보솜에 의해 합성된 다음 변형 후 변형되어 온전한 활성형태의 단백질이 된다. Nisin의 전구체 유전자(*nis A*) 전사와 pre-nisin의 생합성은 대수증식기 초기 단계에서부터 발생하고 정지기까지 유지된다. 활성이 높은 증식 단계의 후반부에 nisin 생산량이 증가한 것은 필수적인

pre-nisin 변형 효소 형성이 지연되기 때문이라고 알려져 있다(De Vuyst and Vandamme, 1992). 게다가 많은 종류의 박테리 오신이 정지기 이후에 활성이 감소되는 것은 단백질간의 응집, 세포 표면에 흡착되거나, 피드백 조절 및 특이적 혹은 비특이적 단백질분해효소에 의한 분해로 활성을 잃게 된다(Parente and Ricciardi, 1999).

L. lactis subsp. *lactis*가 생산한 박테리 오신은 배양 18시간 후에 최대에 이르렀고, 최대 활성은 24시간까지 유지되었으나, 그 이후부터는 서서히 감소되었다(Aslam *et al.*, 2012). *L. acidophilus*가 생산한 acidocin은 24시간 배양 후 최대의 활성을 나타낸 반면, 24시간 이후 48시간 배양하는 동안 활성이 서서히 감소하였다. *L. plantarum* Y21은 MRS 배지에 접종 후 4시간 이후부터 서서히 증가하기 시작하여 20시간 만에 정지에 도달했고 그 이후에는 서서히 감소되었다. 배양 중 산 생성량은 16시간 만에 최대에 이르렀고, 20시간까지 계속 유지된 후 다시 서서히 감소되었다. 박테리 오신(plantaricin Y)은 배양 10시간 만에 활성이 나타나기 시작하여 16시간만에 최대에 이르렀고 20시간 이후부터는 감소되었다(Chin *et al.*, 2001). 산양유로부터 분리한 *L. lactis* subsp. *lactis* ST1은 MRS 배지에서 배양 2시간만에 대수증식기에 도달하였고, 세포수는 14시간 배양 후 최대에 이르렀다. 이때 배양액의 pH는 대수증식기 동안 급격히 감소되어 정지에 도달했을 때 일정한 수준으로 유지되었고, 박테리 오신은 대수증식기 때 검출되기 시작하여 12–14시간 때 최대에 이르러 균의 성장과 비례적으로 박테리 오신이 생산되어 생산 균주의 1차 대사산물임을 확인하였다. 하지만 정지기 이후에는 활성이 감소되었는데 이는 박테리 오신 생산을 위한 영양분의 고갈, 단백질 분해효소에 의한 분해 및 생산 균주의 세포 표면에 흡착되어 활성이 낮게 측정된 것으로 보고하였다(Taheri *et al.*, 2012). *L. brevis* OG1은 대수증식기 초기부터 박테리 오신을 생산하기 시작하여 정지기 이후에 활성이 최대에 이르러 2차 대사산물로서 항균물질을 생산하였으며, 그 이후부터 균의 성장 단계에서 유도된

단백질 분해효소에 의해 박테리오신의 활성이 감소되었다고 하였다(Ogunbanwo *et al.*, 2003). Sakacin K 활성은 *L. sake* CTC 494 성장에 의존하는데 세포가 대수증식기에 있는 동안 박테리오신의 활성은 증가하여 생성된 세포량이 감소하기 시작하면 박테리오신의 활성도 감소되었다. 이러한 감소 현상은 배양액 내에 유산의 축적과 당과 필수 아미노산의 고갈에 기인한다고 하였다(Leroy and De Vuyst, 1999).

유산균수, 대사산물 생성량 및 항균 활성에 대한 프리바이오틱스의 영향

MRS 배지에 프리바이오틱스를 농도별로 첨가하고 초기 pH를 6.0으로 조정된 후 호기적 조건 하에서 37°C, 24시간 동안 배양한 다음, *L. brevis* BK11의 증식과 대사산물의 생성량 및 항균 활성을 측정된 결과는 Table 6과 같다. FOS, 이눌린 및 라피노오스를 0.5-2.0%의 농도로 첨가한 경우 최종 균수는 대조구(무첨가구)와 유의한 차이가 없었으며, 배양액 내에 잔존하는 글루코오스 성분은 검출되지 않았다. FOS 1.0%와 2.0%를 첨가한 경우 유산 생성량은 대조구에 비해 다소 높게 나타난 반면, 이눌린과 라피노오스 0.5%를 첨가한 경우는 대조구보다 다소 낮게 나타났으나 유의할만한 차이는 없었다. 배양액의 산도는 FOS를 1%와 2% 첨가했을 때 대조구에 비해 유의하게 높게 나타났으며, *H. pylori*에 대한 배양 상등액의 항균 활성은 FOS 첨가 농도에 따라 서서히 증가하여 2% 첨가구는 대조구에 비해 유의한 증가를 보였다. 게다가 *L. brevis* BK11의 박테리오신 생산에 대하여 이눌린과 라피노오스는 아무런 영향을 미치지 않았으나, FOS를 1%와 2% 첨가한 경우는 2배 증가되었음을 확인하였다. 하지만 FOS 0.5%와 2.5% (자료 미

제시) 첨가에 의해선 박테리오신 활성 증가가 나타나지 않았다. 이와 같은 결과에서 미뤄볼 때, 일정한 농도의 FOS는 *L. brevis* BK11의 박테리오신 생산을 증가시켰지만, 이눌린이나 라피노오스는 영향을 미치지 않았으므로 프리바이오틱스 종류에 따라 특정한 균이 생산한 박테리오신 활성에 미치는 영향이 상이한 것으로 추정된다.

프리바이오틱은 장내 세균의 증식에 필요한 영양원으로 작용함으로써 이들의 증식을 촉진하고 미생물의 증식 과정 중 프리바이오틱을 이용하여 생성한 대사산물이나 필수 미량영양소는 숙주에게 에너지원으로 제공된다(Gibson and Roberfroid, 1995). 특히 프리바이오틱 균주의 성장을 촉진함으로써 장내 유용 미생물이 장벽에 정착 및 증식하는 동안 단쇄지방산을 생산하여 장내 낮은 pH 환경에 의해 유해 세균의 증식이 억제되고, 단백질 대사를 막아 부패산물인 아민, 인돌 및 스카톨 생성을 억제시킨다(Crittenden, 1999).

일반적으로 배지 내에 프리바이오틱스를 첨가하게 되면 *L. acidophilus*와 *Bifidobacterium bifidum* 등의 유산균수와 산 생성량이 유의하게 증가하게 되며, 배지 내에 당이 부족할 경우 프리바이오틱스 성분을 이용하는 것으로 보고되었다(Goderska *et al.*, 2008). FOS가 장내 유래 *Lactobacillus* sp. 균의 성장에 도움을 주었고, 세포량 증가는 이눌린이 첨가된 배지에서 가장 낮았다. 또한 FOS가 첨가된 MRS 배지 내에서 유산 생성량은 유산균의 종류에 따라 유의한 차이를 보였으며 그 양은 1.06-6.25 g/L 정도였으나, 이는 단당이나 이당류가 첨가된 배지(8.42-10.09 g/L)내에서 생성된 양보다 낮았다(Goderska *et al.*, 2008).

Audisio 등(2001)에 따르면, 브라운 슈가와 화이트 슈가의

Table 6. Effects of prebiotics on biological and physicochemical characteristics and antimicrobial activities of *L. brevis* BK11 cultures

Prebiotic	Concentration (%)	Viable cell counts (CFU/ml)	Glucose content (g/L)	Lactic acid concentration (mM)	pH	Titability (%)	Antimicrobial activity of CFCS (%)	Bacteriocin activity (AU/ml)
Control	0	8.2±3.6×10 ^{9a}	0	147.5±6.6 ^{bc}	3.24±0.06 ^a	1.64±0.13 ^a	27.5±2.0 ^{ab}	512
	0.5	7.7±4.0×10 ^{9a}	0	148.5±1.3 ^c	3.29±0.07 ^a	1.62±0.06 ^a	29.0±3.8 ^{ab}	512
FOS	1.0	9.2±1.9×10 ^{9a}	0	152.1±3.0 ^c	3.11±0.10 ^a	1.77±0.02 ^c	32.5±2.9 ^{bc}	1,024
	2.0	9.9±2.3×10 ^{9a}	0	150.6±3.4 ^c	3.13±0.05 ^a	1.76±0.03 ^{bc}	34.9±1.1 ^c	1,024
Inulin	0.5	8.0±5.2×10 ^{9a}	0	136.8±4.0 ^a	3.30±0.02 ^a	1.61±0.05 ^a	26.9±4.0 ^a	512
	1.0	7.4±3.4×10 ^{9a}	0	140.2±2.1 ^{ab}	3.28±0.21 ^a	1.63±0.05 ^a	25.8±3.6 ^a	512
Raffinose	2.0	6.8±3.1×10 ^{9a}	0	139.6±5.2 ^{ab}	3.36±0.30 ^a	1.70±0.03 ^{abc}	28.1±2.0 ^{ab}	512
	0.5	8.0±4.4×10 ^{9a}	0	135.6±6.2 ^a	3.29±0.09 ^a	1.66±0.06 ^{ab}	27.1±1.9 ^{ab}	512
Raffinose	1.0	7.9±5.6×10 ^{9a}	0	136.8±1.9 ^a	3.31±0.11 ^a	1.65±0.04 ^a	29.2±2.3 ^{ab}	512
	2.0	8.3±1.9×10 ^{9a}	0	141.4±5.7 ^{ab}	3.25±0.08 ^a	1.67±0.02 ^{abc}	25.1±3.4 ^a	512

Each value shown was the mean±standard deviation of the three experiments. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($P<0.05$).

존재 하에서 *E. faecium* CRL1385는 배양 3시간만에 박테리옌을 생산하였고, 사탕수수 추출물에서 얻은 프리바이오틱 성분이 함유된 배지 내에서는 배양 5시간 만에 향균물질을 생산하였다고 보고하였다. 또한 박테리옌은 탄소원으로부터 생합성되며 향균물질의 활성은 탄소원의 종류에 따라 다르며 특히 박테리옌 활성은 프락토오스 및 슈크로오스 농도에 의존한다고 보고하였다. Farinha 등(2015)에 따르면, MRS과 FOS, 폴리덱스트로오스 및 이눌린 등의 프리바이오틱스(20 g/L)를 각각 첨가한 MRS 배지에서 배양하여 *L. lactis* CECT 4434의 세포량을 측정된 결과, 프리바이오틱을 첨가한 배지에서 균 성장량이 유의하게 증가되었으므로 FOS가 유산균의 대사와 세포량 증가에 도움을 주는 것으로 보고하였다. Kondepudi 등(2012)은 FOS와 galactooligosaccharide 등의 프리바이오틱스는 *Bifidobacterium* 프로바이오틱 균주 배양용으로 적합한 성분이라고 하였다. Munoz 등(2012)은 옥수수 사일리지와 당밀로부터 추출한 FOS가 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* 및 *Leuconostoc*속 균주들의 증식에 도움을 주었다고 하였다. Makelainen 등(2010)은 FOS와 xylooligosaccharides와 같은 프리바이오틱스는 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus* 균주들의 증식을 위한 적합한 탄소원이며, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Salmonella* 및 *Staphylococcus* 등의 병원성균에 대한 항균활성에도 도움을 준다고 하였다. Chen 등(2007)은 FOS와 트리할로오스가 *L. lactis* subsp. *lactis* C101910의 증식과 박테리옌 생산을 촉진하는 탄소원이라고 보고하였다. Devriese 등(1993)은 FOS, 트리할로오스 및 라피노오스는 *Lactobacillus animalis* C060203의 박테리옌 생산을 증가시켰다고 하였다. 탄소원의 종류와 농도는 박테리옌 생산에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. *L. lactis* A164가 생산한 nisin의 높은 활성은 최적의 영양분과 대사적 조절에 의한 과정효소(processing enzyme) 작용의 저해 혹은 활성 때문이며, 탄소원은 pre-nisin 변형, 면역성 혹은 신호전달과 관련된 효소의 형성을 조절함으로써 nisin 생산을 조절한다고 알려져 있다(De Vuyst and Vandamme, 1992).

이상의 결과를 요약하면, 유산균의 유산이나 박테리옌은 영양원의 종류와 농도, 공기 조성, 초기 pH 및 온도 등 배양 조건 등에 따라 생산량에 차이가 있음을 확인하였다. 특히 크로마토그래피 컬럼으로 박테리옌을 정제할 경우 생산 단가가 상승하고 처리 과정 중 일부 활성이 소실될 수도 있다. 따라서 생산량을 증가시킬 수 있는 최적의 배양 조건에서 향균물질을 생산하여 건강보조식품, 의약품이나 사료 등 산업적으로 이용하게 된다면 생산 비용을 절감시킬 수 있고 독성이 없는 안전

한 천연물질로서 병원성 미생물을 제어하는데 효과적일 것으로 사료된다.

적 요

숙성된 백김치로부터 얻은 *Lactobacillus brevis* BK11의 증식과 향균물질 생산에 대한 배양용 배지 종류, 공기 조성, 초기 pH, 배양온도 및 시간과 프리바이오틱스의 영향을 조사하였다. *L. brevis* BK11의 증식과 향균물질 활성은 BHI와 M17 배지 보다는 MRS 배지 상에서 더 높게 나타났으며, 배지의 초기 pH 6.0에서 생산량이 최대에 이르렀다. 혐기적 조건보다는 호기적 및 미호기적 조건에서 배양했을 때와 25°C 보다는 30°C와 37°C 온도에서 배양했을 때 균 성장과 향균물질 생산에 유리하였다. BK11 균주는 배양 24시간 만에 정지기에 도달하였고, 36시간 후부터는 생균수가 감소되었고, 배양상등액과 박테리옌 용액의 향균 활성은 37°C, 24-30시간 배양했을 때가 가장 높았다. 세포수와 유산 및 박테리옌 생산은 프락토올리고당 1-2% 첨가한 경우에 가장 높았으나, 이눌린과 라피노오스는 균 증식에 별다른 도움을 주지 못했다. 결과적으로 *L. brevis* BK11의 향균물질 생산은 세포수와 관계 있었으며, 이러한 최적 조건 하에서 배양한 경우 *Helicobacter pylori* ATCC 43504의 성장을 효과적으로 저해할 수 있다.

References

- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M., Takagi, A., and Koga, Y. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.* **93**, 2097-2101.
- Al-Jumaily, E., Raheema, R.H., and Abdul-Ratha, H.A. 2014. Optimal conditions for acidocin production from *Lactobacillus acidophilus* isolate. *World J. Pharm. Res.* **3**, 1773-1785.
- Aslam, M., Shahid, M., Ur Rehman, F., Murtaza, M.A., Sharif, S., Ata, A., and Noor, S. 2012. Production optimization and characterization of a low molecular weight bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Afr. J. Microbiol. Res.* **6**, 5924-5933.
- Audisio, M.C., Oliver, G., and Apella, M.C. 2001. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.* **63**, 235-241.
- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1265-1267.
- Cabo, M.L., Murado, M.A., Gonza'lez, M.P., and Pastoriza, L. 2001.

- Effects of aeration and pH gradient on nisin production. A mathematical model. *Enzyme Microb. Tech.* **29**, 264–273.
- Chen, X., Liu, X.M., Tian, F., Zhang, Q., Zhang, H.P., Zhang, H., and Chen, W.** 2011. Antagonistic activities of lactobacilli against *Helicobacter pylori* growth and infection in human gastric epithelial cells. *J. Food Sci.* **71**, M9–M14.
- Chen, Y.S., Sriornual, S., Onda, T., and Yanagida, F.** 2007. Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 190–193.
- Chin, H.S., Shim, J.S., Kim, J.M., Yang, R., and Yoon, S.S.** 2001. Detection and antibacterial activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Sci. Biotechnol.* **10**, 461–467.
- Cho, H.Y., Yousef, A.E., and Yang, S.T.** 1996. Continuous production of pediocin by immobilized *Pediococcus acidilactici* PO2 in a packed-bed bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 589–594.
- Coconnier, M.H., Lievin, V., Hemery, E., and Servin, A.L.** 1998. Antagonistic activity against *Helicobacter infection in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4573–4580.
- Crittenden, R.G.** 1999. Prebiotics, Probiotics: A Critical Review, pp. 141–156. In Tannock, G.W. (ed.), Horizon Scientific Press, Wymondham.
- Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang, J., and Lacroix, C.** 1993. Detection and activity of a bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3450–3455.
- De Lima, C.J.B., Coelho, L.F., and Contiero, J.** 2010. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: Focus on medium supplementation, temperature and pH control. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 175–181.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J.** 1992. Influence of the phosphorus and nitrogen source of nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 17–22.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J.** 1993. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 17–22.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, P.** 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* **16**, 1058–1071.
- Devriese, L.A., Pot, B., and Collins, M.D.** 1993. A review. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species group. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 399–408.
- Egan, B.J., Katicic, M., O'connor, H.J., and O'Morain, C.A.** 2007. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **12**, 31–37.
- Farinha, L.L., Sabo, S.S., Porto, M.C., Souza, E.C., Oliveira, M.N., and Oliveira, R.P.S.** 2015. Influence of prebiotic ingredients on the growth kinetics and bacteriocin production of *Lactococcus lactis*. *Chem. Eng.* **43**, 313–318.
- Fukushima, H., Kelstrup, J., Fukushima, S., Umamoto T., and Sagawa, H.** 1983. Isolation, partial purification and preliminary characterization of a bacteriocin from *Streptococcus mutants* Rm-10. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 41–50.
- Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365–378.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B.** 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**, 1401–1412.
- Goderska, K., Nowak, J., and Czarniecki, Z.** 2008. Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. *Acta. Sci. Pol. Tehcnol. Aliment.* **7**, 5–20.
- Gotteland, M., Brunser, O., and Cruchet S.** 2006. Systematic review: Are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Aliment Pharmacol. Ther.* **23**, 1077–1086.
- Guerra, N.P., Rua, M.L., and Pastrana, L.** 2001. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *Int. J. Food Microbiol.* **70**, 267–281.
- Hirsch, A.** 1951. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* **5**, 208–221.
- Hole, H., Nilssen, O., and Nes, I.F.** 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**, 3879–3887.
- Joosten, H.M.L.J. and Nunez, M.** 1995. Adsorption of nisin and enterocin 4 to polypropylene and glass surface and its prevention by Tween 80. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 389–392.
- Jozala, A.F., De Andrade, M.S., De Arauz, L.J., Pessoa, A.J., and Penna, T.C.** 2007. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **137**, 515–528.
- Juarez Tomas, M.S., Bru, E., Wiese, B., De Ruiz Holgado, A.A.P., and Nader-Macias, M.E.** 2002. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 714–724.
- Juarez Tomas, M.S., Ocana, V.S., Wiese, B., and Nader-Macias, M.E.** 2003. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **52**, 1117–1124.
- Kim, W.S., Hall, R.J., and Dunn, N.W.** 1997. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **136**, 1591–1599.
- Kim, T.S., Hur, J.W., Yu, M.A., Cheigh, C.I., Kim, K.N., Hwang, J.K., and Pyun, Y.R.** 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* **66**, 3–12.
- Kondepudi, K.K., Ambalam, P., Nilsson, I., Wadstrom, W., and Ljungh, A.** 2012. Prebiotic-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. *Anaerobe* **18**, 489–497.

- Kusters, J.G., Van Vliet, A.H.M., and Kuipers, E.J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 449–490.
- Lee, N.K., Kim, K.T., Kim, C.J., and Paik, H.D. 2004. Optimized production of lactacin NK24, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Sci. Biotechnol.* **13**, 6–10.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 974–981.
- Leroy, F., Vankrunkelsven, S., De Greef, J., and De Vuyst, L. 2003. The stimulating effect of a harsh environment on the bacteriocin activity by *Enterococcus faecium* RZS C5 and dependency on the environmental stress factor used. *Int. J. Food Microbiol.* **83**, 27–38.
- Lesbros-Pantofflickova, D., Corthesy-Theulaz, I., and Blum, A.L. 2007. *Helicobacter pylori* and probiotics. *J. Nutr.* **137**, 812S–818S.
- Lim, S.M. 2014. Anti-*Helicobacter pylori* activity of antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria isolated from baikkimchi. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **57**, 621–630.
- Mahrous, H., Mohamed, A., El-Mongy, A., El-Batal, A.I., and Hamza, H.A. 2013. Study bacteriocin production and optimization using new isolates of *Lactobacillus* spp. isolated from some dairy products under different culture conditions. *Food Nutr. Sci.* **4**, 342–356.
- Makelainen, H., Saarien, M., Stowell, J., Rautonen, N., and Ouwehand, A.C. 2010. Xylo-oligosaccharides and lactitol promote the growth of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* species in pure cultures. *Benef. Microbes* **1**, 139–148.
- Marshall, B.J. and Warren, J.R. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**, 1311–1315.
- Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., and Ishikazi, A. 1996. Lantibiotics nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 36–40.
- Megraud, F., Coenen, S., Versporten, A., Kist, M., Lopez-Brea, M., Hirsch, A.M., Andersen, L.P., Goossens, H., and Glupczynski, Y. 2013. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* **62**, 34–42.
- Mitra, S., Chakrabarty, P.K., and Biswas, S.R. 2007. Production of nisin A by *Lactococcus lactis* isolated from Dahi. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **143**, 41–53.
- Munoz, M., Mosquera, A., Almezciga-Diaz, C.J., Melendez, A.P., and Sanchez, O.F. 2012. Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe* **18**, 321–330.
- Nam, H., Ha, M., Bae, O., and Lee, Y. 2002. Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4642–4645.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., and Onilude, A.A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr. J. Biotechnol.* **2**, 179–184.
- Parente, E. and Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 628–638.
- Rattanachaiakumsopon, P. and Phumkhachorn, P. 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Ann. Biol. Res.* **1**, 218–228.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and Mentis, A. 2004. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 518–526.
- Sousa, M.N.B., Mendes, E.N., Apolonio, A.C.M., Farias, L.D.M., and Magalha, E.S. 2010. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhea. *APMIS* **118**, 125–135.
- Taheri, P., Samadi, N., Ehsani, M.R., Khoshayand, M.R., and Jamalifar, H. 2012. An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST1 isolated from goat milk. *Braz. J. Microbiol.* **43**, 1452–1462.
- Tongtawe, T., Dechsukhum, C., Leeanansaksiri, W., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Loyd, R.A., Matrakool, L., and Panpimanmas, S. 2015. Effect of pretreatment with *Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus* on tailored triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: A prospective randomized controlled clinical trial. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 4885–4890.
- Tsai, C.C., Huang, L.F., Lin, C.C., and Tsen, H.Y. 2004. Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection *in vitro* by a strain of *Enterococcus faecium* TM39. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 1–12.
- Vakil, N. and Megraud, F. 2007. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **133**, 985–1001.
- Verellen, T.L.J., Bruggeman, G., Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., and Vandamme, E.J. 1998. Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 147–179.
- Vitor, J.M. and Vale, F.F. 2011. Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: probiotics and phytochemistry. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63**, 153–164.
- Wee, Y.J., Kim, J.N., Yun, J.S., and Ryu, H.W. 2005. Optimum conditions for the biological production of lactic acid by a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. RKY2. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **10**, 23–28.
- Yoo, I.K., Chang, H.N., Lee, E.G., Chang, Y.K., and Moon, S.H. 1996. Effect of pH on the production of lactic acid and secondary products in batch cultures of *Lactobacillus casei*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 482–486.
- Yoo, J.Y., Lee, I.S., Chung, K.S., Choi, S.Y., Koo, Y.J., and Kwon, D.J. 1992. Cultural conditions of *Lactococcus* sp. 112-1 for production of bacteriocin-like substance. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 183–189.