

# Lactobacillus bulgaricus가 생산한 抗菌物質에 관한 연구

金東伸 · 鄭丞仁

慶北大學校 農科大學 酪農學科

Studies on Antibacterial Substance from *Lactobacillus bulgaricus*

Kim, Dong Shin · Jung, Sung In

Dept. of Dairy Science, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

## Summary

This study was carried out to confirm the agent responsible for the antibacterial activity in milk culture or *Lactobacillus bulgaricus* to extract and purify it.

The following results were summarized as followings :

The antibacterial agent was extracted from the cultured skim milk with methanol and acetone and was purified by Sephadex G-50 gel filtration and thin layer chromatography on silica gel.

The antibacterial substance other than lactic acid was confirmed by turbidimetric technique using the neutralized culture filtrate which inhibited the growth of *Bacillus subtilis*.

The purified agent showed inhibitory activity against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* and *Shigella dysenteriae*<sup>2</sup>

The agent obtained from thin layer chromatography was free from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or lactic acid.

## 緒 論

*Lactobacillus bulgaricus*는 yoghurt 혹은 Bulgarian buttermills 그리고 치즈를 제조하는데 넓게 이용되는 乳酸菌으로서 Metchnikoff(1908)는 높은 酸도를 올리는 이 菌株는 인간의 큰 창자에서 毒素를 생

산하는 菌株를 억제하며 個体에 따라 腐敗 및 中毒의 유발을 방지할 수 있다는 장수설을 주장하였다. 그러나 微生物學 및 醫學이 발달에 따라 *Lactobacillus bulgaricus*는 腸管內에 造林되지 않으나 各種乳酸菌의하여 제조된 醱酵物中에는 病院菌 및 腐敗菌을 억제 시킬 수 있는 抗菌物質이 포함되어 있

음을 발표하였다.(Shahani 등 1972, 1976, 1977, 1983).

Mikolajcik와 Hamdan(1975a 1975b)은 Lactobacillus acidophilus를 이용한 醱酵乳 칼처로 부터 病原性 場內細菌과 芽胞形成細菌에 대하여 抗菌 효과를 가진 低分子量의 抗菌物質인 acidolin을 精製하였으며 Mattick 등(1947) 그리고 Hirsch(1951)는 Streptococcus lactis로 부터 nisin이라는 抗生物質을 精製하여 치즈원료유에 있는 腐敗菌 그리고 芽胞形成細菌등을 억제하는데 이용되고 있다. Daly 등(1970)은 Streptococcus diacetylactis로부터 pulusani 등(1979)는 Streptococcus thermophilus의 칼처로부터 각각 抗菌物質을 확인하고 分離하였다. 最近 Anand 등(1981, 1985)은 Bifidobacterium bifidum으로 부터 bifidin이라는 抗菌物質을 分離하였다.

本 研究은 Lactobacillus bulgaricus를 이용하여 牛乳를 醱酵시키고 그 醱酵物로 부터 抗菌物質을 分離 및 精製하여 試驗菌에 대한 抗菌效果를 조사하였다.

## 材料 및 方法

### 菌株 및 칼처

本 研究에 이용된 Lactobacillus bulgaricus(Visbyvac Series 50)는 서독의 Weisby 회사로부터 凍結乾造 칼처의 狀態로 購入되었다.

凍結乾造칼처는 脫脂還元乳(Difco, T. s. 1190)를 965°C에서 0分間 열처리한후 45°C로 냉각시켜 1%의 칼처를 接種시켜 3回繼代培養하였다.

抗菌力을 調査하는데 이용되는 試驗菌은 Bacillus Subtilis ATCC6633으로서 미국 American Type Culture Collection 회사로부터 購入된 것이다.

### 칼처의 抗菌試驗

Lactobacillus bulgaricus 칼처 濾液이 試驗菌인 Bacillus subtilis에 대한 發育抑성을 調査하기 위하여

첫째 Lactobacillus bulgaricus를 脫脂還元乳(Difco, T. S. 11 2/0)에서 45°C, 48시간 배양한후 3,000r. p. m.에서 15分間 遠心分離시켜 얻은 濾液 0.5ml와 nutrient broth 4.5ml를 混合하여 滅菌한 Cuvette에 넣고 여기에 다시 Bacillus subtilis부유액 0.1ml를 接種하여 30°C에 배양하면서 2시간 간격으로 660 nm(CE 393, Digital grating Spectrophotometer Series 2)에서 吸光度를 측정하였다.

둘째, 칼처濾液을 10N NaOH로 pH가 6.7이 되도록 중화시키고 이 中和된 濾液 0.5ml와 nutrient broth 4.5ml를 혼합하여 Cuvette에 넣고 다시 Bacillus subtilis부유액 0.1ml를 接種하여 30°C에서 2시간 간격으로 吸光度를 측정하였다.

셋째, 對照로서 nutrient broth 4.5ml에 Bacillus subtilis부유액 0.1ml를 接種하여 30°C에서 배양하면서 2시간 간격으로 吸光度를 측정하였다.

## 抗菌物質의 抽出 및 精製

### Methanol-acetone 抽出(Hamdan 등 1974)

Lactobacillus bulgaricus 칼처 1%를 脫脂還元乳(Difco, T. S. 11%) 1,000ml에 接種하여 45°C에서 48시간 배양한후 凍結乾造(Edwards EF4 Modulyo freeger dryer)하였다. 이 凍結乾造物을 4-10°C로 冷却된 methanol 1,000ml에 넣어 1시간 동안 방치하면서 가끔 유리봉으로 교환하였다. 이것을 5°C의 高速冷凍遠心分離器(MSE Coolspin 2 centrifuge)에서 12,000r. p. m.으로 10분간 遠心分離하여 上澄液을 모았다. 沈澱物은 같은방법으로 2回 反復하여 上澄液 3,000ml를 40-50°C의 로타리증발기로 減壓濃縮하여 더 이상 蒸發이 일어나지 않는 黃褐色 物質을 Methanol 抽出物이라고 한다.

이 抽出物에 蒸溜水를 첨가하여 100ml이 되게 하여 4-10°C acetone 1,000ml에 넣어 1時間동안

방치한후 5°C를 15,000r. p. m에서 15分間 遠心分離하여 上澄液은 모으고 沈澱物은 다시 두번 반복하여 上澄液 3,000ml를 얻어 여과(Toyo2)하여 40-50°C의 로타리 증발기에서 더 이상 蒸發이 일어나지 않을 때까지 減壓濃縮하여 褐色의 粘濁한 methanol-acetone 抽出物(M-A extract)을 얻었다.

Sephadex G-50 gel filtration Chromatography  
Methanol-acetone 抽出物을 蒸溜水와 1:10으로 희석한 5ml를 Sephadex G-50 column chromatography로 分割하였다.

이때 gel filtration column(30×1.6cm)은 5°C로 冷却한 0.1M NaCl-0.02N HCl(pH 2.5-3.0) buffer에 6g의 Sephadex G-50을 가하였다. 分割은 靜水壓을 利用하여 流出速度를 약 0.6ml/min로 하고 12ml씩 40개의 分割을 얻었다.

40개의 分割%는 275nm(Model 8800 double beam

spectrophotometer)에서 吸光度를 測定하였으며 各 分割의 抗菌效果를 調査하기 위하여 各 濃縮하여 試驗菌 *Bacillus subtilis*를 利用하였다.

이들중 抗菌效果가 있는 分割은 모두 混合하여 다음 精製에 試料로 使用하였다.

Thin layer chromatography (Hamdan, 1974).

Sephadex G-50 Filtration chromatography의 分割中 抗菌力있는 分割들은 濃縮하여 0.4ml를 Silica gel sheet(No. 6061 Eastman kodak Co.)에 밴드모양으로 分布하였다.

塗布物이 乾造된후 Thin layer chromatography (TLC)板을 chloroform-methanol(90:10) 溶媒에서 展開하였다. TLC板을 등기로 건조시키고 紫外線 光線아래서 吸先帶를 찾았다. Rf치가 다른 吸先帶를 잘라서 *Bacillus subtilis*에 대하여 抗菌力을 調査하였다.

抗菌物質의 抽出 및 精製課程은 Fig. 1과 같다.

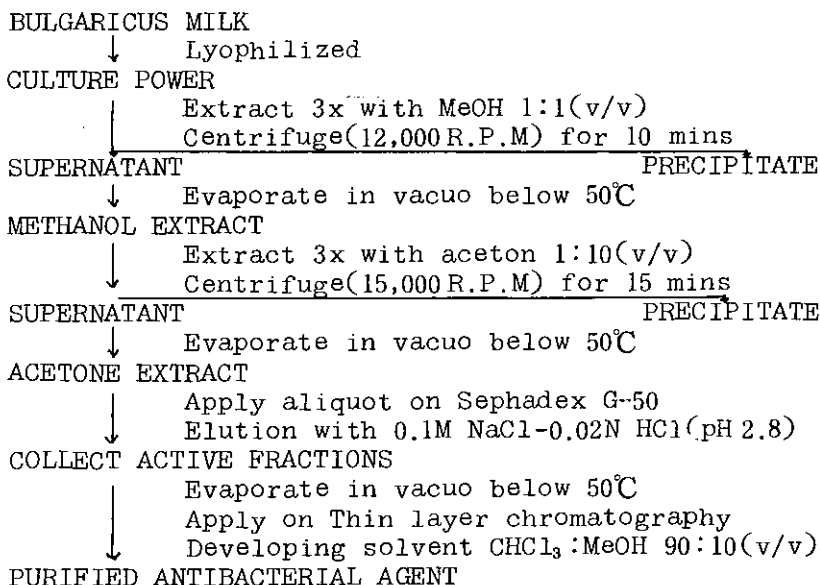


Fig.1. Purification procedure for antibacterial agent from *L. bulgaricus*

精製物の 抗菌試驗

Disc法(1972) : Disc法은 methanol-acetone 抽出物 그리고 Sephadex G-50 處理物 TLC精製物을 各種細菌에 대하여 抗菌效果를 調査하는데 적용하였다.

試驗菌으로는 *Bacillus subtilis* Aticc6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6583 *Pseudomonas fluorescens* KFCC 32394, *Proteus vulgaris* 및 *Shigella dysenteriae*를 사용하였다.

滅菌한 nutrient agar(Difco)를 抗溫水槽에서 液狀으로 유지시키면서 broth culture를 1%가 되도록 接種하고 잘 混合한후 이 nutrient agar 8ml를 petri-dish에 붓고 固化化시켰다.

Methanol-acetone 抽出物, Sephadex G-50 處理物 및 TLC分離物들을 각각 12.7mm disc에 스며들게한 후 Petri dish 培地위에 놓고 5-10°C에서 1시간 이상 靜置하며 試料가 disc로부터 培地에 후 1시간 이상 靜置하여 試料가 disc로부터 培地에 잘 스며들게한 이후 各 細菌들의 適正發育溫度에 16시간 배양한후 抗菌帶의 直径을 측정하였다.

結果 및 考察

1. 갈치의 抗菌效果,

濁度法으로 culture의 濾液이 試驗菌인 *Bacillus subtilis*에 發育을 抑制하는가를 調査한 결과 Fig 2와

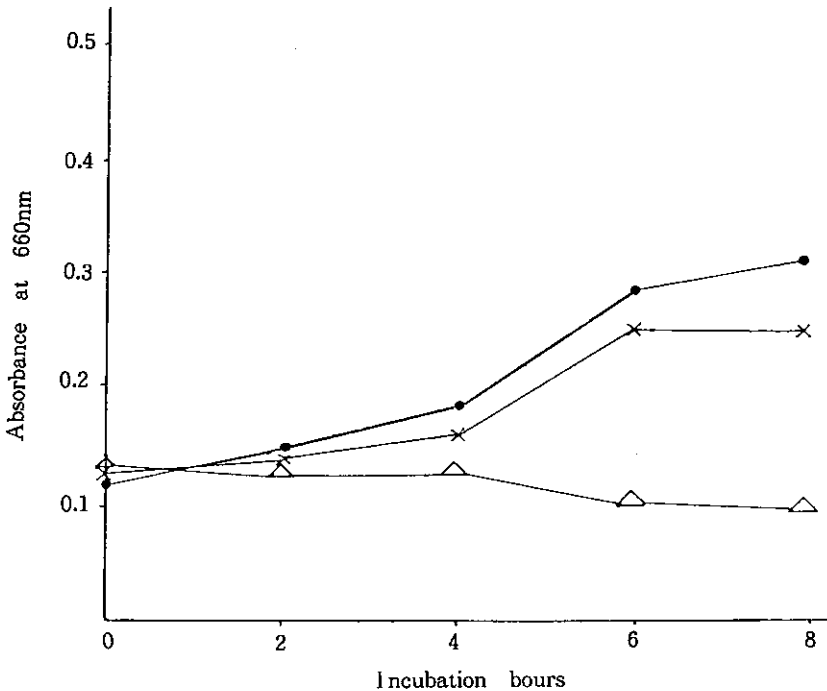


Fig. 2. Effect of cell-free filtrate of skim milk(T.S. 11%) medium on the growth of *B. subtilis* in nutrient broth : (●.....● : control, x.....x : neutralized cell-free filtrate, △.....△ : cell-free filtrate)

같이 보였다.

*Lactobacillus bulgaricus* culture의 濾液을 첨가한 實驗區에서 試驗菌인 *Bacillus subtilis*의 發育을 抑制하였으나 이는 culture 濾液에 있는 酸의 pH의 基因될 수 있으므로 濾液을 中和시켜 試驗菌에 利用한 결과 역시 濾液을 첨가하지 않는 境地에서 發育시킨 對照區보다 試驗菌의 發育을 抑制시켰다. 이는 칼쳐 濾液에 酸외에 다른 抗菌物質이 存在함을 認定할 수 있으므로 칼쳐의 抗菌物質이 存在함을 認定할 수 있으므로 칼쳐의 抗菌物質精製의 必要性을 갖게하였다.

## 2. 精製物の 抗菌効果

Methanol-acetone 抽出物이 試驗菌등에 미치는 抗菌効果는 Table 1과 같다.

病原菌인 *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* 그리고 腐敗菌인 *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*

*fluorescens*, *Proteus vulgaris* 등에 똑같이 抗菌效果를 보였음은 Shahani(1983)와 Hamdan과 Mikolajcik (1974)이 廣範圍한 抗菌效果를 보인다는 보고와 類似하다.

Sephadex gel filtration 分割中 8, 9 그리고 10 變分割에서 抗菌效果를 보였다(Table 2)

TLC板에 抗菌效果가 있는 Sephadex gel 精製物 0.4ml를 band모양으로 塗布하고 chloroform methanol용매로 전개한다음 U. V. 光線아래서 Fig3과 같은 Rf值가 다른 3개의 Band를 관찰하였다. 그중 Rf值가 0.57인 Origin에서 가장먼쪽 band가 抗菌效果를 보였다.

Table 3은 TLC 精製物을 蒸溜水로 20배 희석하여 抗菌效果를 調査한것으로 *Sigella drgsenterae* 같은 病原菌에 가장큰 抗菌效果를 보였다.

Table 1. Antibacterial activity of methanol-acetone extract prepared from bulgaricus milk against 6 different organisms using disc assay method.

Test organisms	Strains	Inhibition zone(mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	47
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KFCC 32394	47
<i>Proteus vulgaris</i>	CU	46
<i>Shigella dysenteriae</i>	CU	45
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	44
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	48

\* Included diameter of disc(12.7 mm)  
 Injected 0.05 ml of M-A extract.

Table 2. Antibacterial activity of fraction eluates, prepared by L. bulgaricus in skim milk medium(T.S. 11%), fractionated through Sephadex G-50.

Fraction number	Inhibitor	Absorbance at 275 nm
1	-	0.079
2	-	0.088
3	-	0.111
4	-	0.127
5	-	0.155
6	-	0.243
7	-	0.519
8	+	0.626
9	+	3.411
10	+	3.411
11	-	1.798
12	-	0.464
13	-	0.339
14	-	0.224
15	-	0.168
16	-	0.177
17	-	0.164
18	-	0.128
19	-	0.129
20	-	0.113
21	-	0.121
22	-	0.132
23	-	0.092
24	-	0.104
25	-	0.100
26	-	0.107
27	-	0.117
28	-	0.100
29	-	0.096
30	-	0.119
31	-	0.092
32	-	0.080
33	-	0.095
34	-	0.103
35	-	0.091
36	-	0.097
37	-	0.114
38	-	0.118
39	-	0.087
40	-	0.077

Table 3. Antibacterial activity of TLC preparation of *L. bulgaricus* culture in skim milk(T.S.11%) against 6 different organisms using disc assay method.

Test organisms	Strains	Inhibition zone (mm) (dil. 1/20)
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	
<i>Ps. fluorescens</i>	KFCC 32394	
<i>P. vulgaris</i>	CU	
<i>S. dysenteriae</i>	CU	
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	
<i>Sta. aureus</i>	ATCC 6538	

\* Included diameter of disc(12.7mm)  
 Injected 0.05ml of TLC preparation.

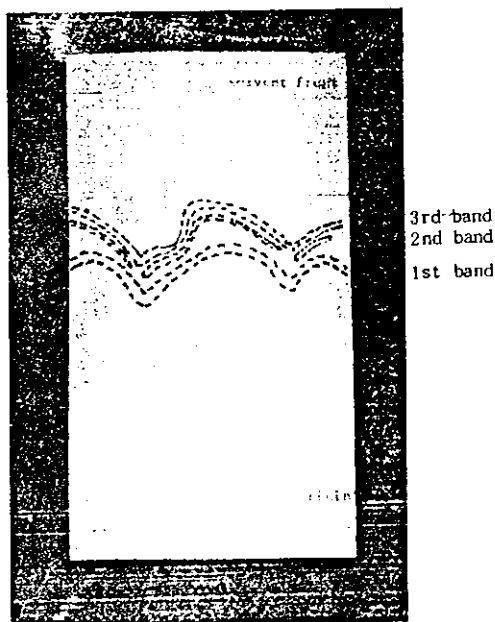


Fig. 3. Band of antibacterial active components developed on TLC and lactic acid detected by bromocresol green staining  
 1st band : lactic acid  
 2st band : unidentified  
 3st band : antibacterial agent.

### 摘 要

本實驗은 *Lactobacillus bulgaricus*의 우유 培地에서 抗菌物質을 抽出 및 精製하여 抗菌效果를 調査하였으며 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

갈처의 抗菌物質을 methanol-acetone으로 抽出하고 Sephadex G-50 gel filtration 그리고 thin layer chromatography로 精製하였다.

갈처의 酸中和濾液이 濁度法에 의하여 *Bacillus subtilis*의 發育을 抑制하였으며 酸외에서 抗菌物質이 있음을 확인할 수 있었다.

精製된 抗菌物質은 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* 및 *Shigella dysenteriae*의 發育을 抑制하였다.

Thin layer chromatography로 精製한 抗菌物質은 抗菌作用을 나타내는  $H_2O_2$ 나 乳酸을 함유하지 않는 것이다.

## 引用文献

1. Anadn, S. K., R. A. Srinivasan and L. K. Rao : 1981, Antibacterial activity associated with Bifidobacterium bifidum I. Cultured Dairy Pro. J., 16 : 6-8.
2. Anadn, S. K., R. A. Srinivasan and L. K. Rao : 1985, Antibacterial activity associated with Bifidobacterium bifidum II. Cult. Dairy pro. J., 20 : 21-23.
3. Daly, C., W. E. Sandine and P. R. Elliker : 1970, Associative growth and inhibitory properties of Streptococcus diaetylactis. J. Dairy Sci., 53 : 21-23.
4. Handan, L. Y. and E. m. Mikolajcik : 1974, Acidolin : An antitibiotic, 27 : 631-636.
5. Hirsch, A. : 1951, Growth and nisin production of a strain of Streptococcus lactis. J. Gen. Microbial., 5 : 208.
6. Mattick, A. T. R. and A. Hirsch : 1947, Further observations on an inhibitory substance(nisin) from lactic streptococci. Lancet, 253 : 5.
7. Metchnikoff, E. : 1908, Prolongation of life. G. P. Putnams Song, New York.(1908) pp2-33.
8. Mikolajcik, E. M. and I. Y. Hamdan : 1975a, Lactobacillus acidophilus I. Growth characteristics and metabolic products. Cultured Dairy Prod. J., 10 : 10.
9. Mikolajcik, E. M. and I. Y. Hamdan : 1975b, Lactobacillus acidophilus II. Antibacterial agents. Cultured Dairy Prod. J., 10 : 18.
10. Pulusani, S. R. D. R. Rao and G. R. Sunk : 1979, Antibacterial activity of lactic cultures : Partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by Streptococcus thermophilus. J. Food Sci., 44(2) : 575-578,
11. Shahani, K. M., J. R. Vakil and R. C. Chandan : 1972, Antibiotic acidophilin and process of preparing the same. U. S. patent No. 3, 689, 640.
12. Shahani, K. M., J. R. Vakil and A. Kilara : 1976, Natural antibiotic activity of Lactobacillus acidophilus and bulgaricus. I. Cultural conditions for the production of antibiotic. Cultured Dairy Prod. J., 11(4) : 14-17.
13. Shahani, K. M., J. R. Vakil and A. Kilara : 1977, Natural antibiotic activity of Lactobacillus acidophilus and bulgaricus. II. Isolation of acidophilin from L. acidophilus. Cultured Dairy Prod. J., (1292) : 8-11.
14. Shahani, K. M., G. V. Reddy, R. A. Friedn and R. C. Chandan : 1983, Natural antibiotic activity of Lactobacillus acidophilus and bulgaricus. III. Production and partial purification of bulgarican from Lactobacillus bulgaricus. Cultured Dairy Prod. J., 18 : 15-19.