



## 돼지의 장에서 분리한 유산균의 항세균 활성물질에 관한 연구

서정용, 정명희, 김영준<sup>†</sup>

가톨릭대학교 생명환경공학부 환경공학전공

(2009년 12월 2일 접수, 2009년 12월 28일 채택)

### Study on the Antimicrobial Substances of Lactic Acid Bacteria Isolated from Pig's intestine

Jeong-Yong Seo, Myung-Hee Chung, Young-Jun Kim<sup>†</sup>

School of Biotechnology and Environmental Engineering, The Catholic University, Bucheon, Korea

#### ABSTRACT

The antimicrobial activity-possessing materials were screened in the cell free supernatant (CFS) of fourteen lactic acid-fermenting strains isolated from pig's intestine. Each cell free supernatant of cultured strains was treated with various proteinases, heat, and/or alkali (NaOH). The antimicrobial activities were remained even after the enzyme and heat treatment, but disappeared after neutralization with 1M NaOH, implying that the materials would be organic acids rather than proteins. Further purification of CFS through solid phase extraction using Sep-pak C<sub>18</sub> Cartridges and high performance anion exchange chromatography using Bio-LC system revealed that four organic acids, such as oxalic acid, citric acid, lactic acid, and acetic acid, were the main materials for the activity. Lactic acid was the highest amount in all organic acids, ranging from 54% to 77%. This strongly implies that the lactic acid would be the primary material for the antimicrobial activity in all tested strains.

Keywords : Antimicrobial activity, Lactic acid bacteria, Organic acids, Purification

#### 초 록

돼지의 장 및 분변에서 분리한 14종의 유산균으로부터 항세균 활성물질을 분석하였다. 각 균주의 세포배양액을 대상으로 여러 종류의 단백질 분해효소와 열, 알칼리 처리 등을 수행한 후 활성도를 조사한 결과, 효소 및 열처리 시료에서는 활성도가 유지되었으나, 1M의 NaOH로 중화 처리한 시료에서는 활성도가 사라짐에 따라, 항세균 활성물질이 단백질성이라기보다 유기산일 가능성이 큰 것으로 나타났다. Sep-pak C<sub>18</sub>

<sup>†</sup>Corresponding author : YJunkim@catholic.ac.kr

Cartridges을 이용한 음이온 추출실험과 Bio-LC system을 이용한 high performance anion exchange chromatography를 실시하여 물질을 정제한 결과, 주요 활성물질로 옥살산, 구연산, 젖산 및 초산 등, 4종류의 유기산이 검출되었다. 이중 젖산은 각 균주에 따라 전체 유기산의 54~77%를 차지하는 것으로 나타나 유기산 중에서도 일차적인 항세균 활성물질일 것으로 추정된다.

핵심용어 : 항세균활성, 유산균, 유기산, 물질정제

## 1. 서론

유산균은 자연계뿐만 아니라 인간 및 동물의 건강한 장내에 주로 서식을 하고 있는 유용한 세균으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 유산균은 또한 유제품을 비롯하여 각종 채소 및 육류의 발효식품에 광범위하게 분포되어 있으며, 이들 식품속에 존재하는 유해한 병원성미생물에 대하여 강력한 항세균활성을 발휘하는 것으로 잘 알려져 있다<sup>2)</sup>. 유산균의 이와 같은 항세균활성 및 유용한 물질의 생산능력에 힘입어 인간의 건강 및 다양한 식품산업에의 활용은 물론, 가축에게 유익한 생균사료(probiotics)로서도 각광을 받아오고 있다<sup>3),4),5)</sup>. 생균사료란 숙주 또는 가축의 장내 미생물 균형을 향상시킴으로써 숙주에게 유익한 영향을 미치는 살아있는 미생물 사료 첨가제로서 건조된 세포의 형태나 발효산물의 형태로 급여되어 숙주의 장내균총을 개선하여 건강을 도모하여 주는 단일 또는 복합균주 형태의 생균을 말한다.

한편, 현대의 가축사육실태를 살펴보면 가축의 질병을 예방하고 치료하기 위한 목적으로 다량의 항생제를 투여하고 있는 것으로 알려져 있는데, 이는 오히려 가축의 면역기능 및 질병저항력을 약화시키는 원인으로 작용하는 것으로 나타나고 있다<sup>6)</sup>. 또한 최근의 지구환경오염 및 기후변화 등에 따른 각종 국제적 협약에 의하여 축산분뇨와 같은 유기성폐기물의 해양투기가 금지됨에 따라 이를 퇴비화하거나 혐기소화를 통하여 바이오가스 등으로 전환하는 자원화기술이 주목을 받고 있는데, 항생제의 과다사용으로 가축분뇨에 항생제가 잔존함에 따라 미생물에 의한 가축분뇨의 초기 분해과정을 억제하여 자원화과정에 악영향을 끼치고 있는 것

으로 나타나고 있다.

항생제의 남용에 따른 이러한 부작용을 차단하기 위한 일환으로 정부에서는 항생제를 대체할 수 있는 천연물질의 개발 및 연구에 심혈을 기울이고 있는 실정이다<sup>6)</sup>. 따라서, 유산균 생균사료(probiotics)는 가축의 면역기능을 강화하는 물질을 생성함은 물론 병원균에 대한 강력한 항세균활성을 지니고 있는 바, 항생제를 대체할 매우 유용한 대안이라 할 것이다. 유산균에 의한 항세균활성은 병원성세균에 대한 다양한 억제산물의 생성, 장 점막내 우점종으로서의 선점효과, 또는 침투한 병원성미생물에 대한 응집효과 등으로 나타난다. 유산균이 분비하는 항세균활성물질로서 유산을 비롯한 각종 유기산, 과산화수소, 다양한 형태의 박테리옌 등이 잘 알려져 있다<sup>7), 8)</sup>. 박테리옌은 단백질성 물질로서 가장 많이 연구가 진행된 항세균물질이며 현재까지 다양한 유산균들로부터 여러 형태의 박테리옌이 분리 및 정제된 바 있다<sup>9),10),11)</sup>.

본 연구에서는 음식물사료를 주입한 건강한 돼지의 장 및 분변으로부터 강력한 항세균활성을 지닌 유산균을 대상으로 항세균활성물질을 분석하여 가축에 있어 항생제를 대체할 물질을 개발하려는 목적과 분리된 유산균을 생균사료화 하여 가축의 건강을 도모함은 물론, 발생된 가축분뇨에 대한 자원화효율을 제고하려는 일환으로 본 연구를 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 사용균주 및 배지

본 실험에서 사용된 유산균주는 서 등(2006)이 음식물사료를 섭취한 건강한 돼지의 장 및 분변에

서 분리한 항세균활성이 강한 것으로 나타난 균주로서 14균주를 사용하였다<sup>12)</sup>. 유산균주의 배양에 사용된 배지는 MRS agar 배지와 MRS 액체배지를 사용하였으며 공시세균 및 병원성세균의 배양을 위한 배지는 LB agar 또는 LB 액체배지를 사용하였다. 공시세균 및 병원성세균으로는 *Bacillus subtilis* ATCC 14807, *E. coli* ATCC 35607의 공시세균과 *Staphylococcus aureus* subsp., *Listeria monocytogen* KACC 10550, 및 *Salmonella typhimurium* 의 병원성세균을 사용하였다.

## 2.2 항세균활성 측정

항세균활성의 측정은 paper disc법을 이용하였다. 우선 2종의 공시세균 및 3종의 병원성세균을 LB agar plate에서 배양한 다음, 멸균 loop로 적당량을 취하여 250mL 삼각플라스크내 100mL의 LB액체배지에 접종한 후, 37°C에서 12시간 진탕 배양 하였다. 이후 각 배양액으로부터 1mL을 취하여 50~60°C로 식힌 멸균된 LB배지와 혼합한 후 약 30초간 교반시켜 충분히 균질화시킨 뒤에 Petridish에 부어 공시세균 및 병원성세균의 lawn을 제조하였다. 제조된 세균의 lawn 위에 paper disc(Toyo Roshi Kaisha, Ltd., 8 mm)를 올려 놓고 분석대상 시료를 50 $\mu$ l 또는 100 $\mu$ l 분주한 뒤, 37°C에서 overnight 배양하여 paper disc 주변에 생성된 투명대의 형성유무로 항세균 활성여부를 판단하였다.

## 2.3 분리 유산균주의 항세균 활성물질 분석

### 2.3.1 항세균 활성물질의 Localization

항세균 활성물질의 세포 내·외성 물질 여부를 확인하고자 유산균주를 37°C에서 overnight culturing 한 후 이를 12,000xg에서 10분간 원심 분리하여 침전된 세포를 sonicator(Sonics & Materials, INC., USA)를 이용하여 세포를 파괴한 후 세포내 물질을 용출시켰다. 이를 다시 10,000 rpm  $\times$  5 min으로 원심분리한 후, 상등액을 취하여 항세균활성을 위한 시료로 사용하였다.

### 2.3.2 항세균 활성 물질의 단백질성 및 유기산 여부 확인

항세균물질의 단백질성 여부를 확인하기 위한 실험으로 일차적으로 온도에 의한 영향을 알아보기 위해 유산균의 배양상등액을 90°C, 100°C, 120°C의 온도에서 각각 30분 가온처리하여 사용하였으며, 2차적으로 효소에 의한 처리로는 100배 희석한 Saccharated pepsin(Junsei, Japan ), 1 mg/mL Proteinase K (Sigma, USA), 10 mg/mL Lysozyme (Sigma, USA) 농도로 조제한 시약을 1 mL의 배양 상등액에 1 mL 첨가한 후 37°C에서 1시간 정치 배양한 뒤 항세균활성 여부를 확인하였다. 유기산여부를 확인하기 위한 실험으로 유산균의 배양상등액을 0.2  $\mu$ m membrane filter에 여과하여 무균처리한 후 이를(Cell free supernatant, CFS) 1 M NaOH로 중성(pH 7.0) 처리하여 항세균활성을 측정하였다.

### 2.3.3 유기산의 정제 및 항세균활성 분석

100 mL의 MRS 액체배지에 배양한 유산균을 원심분리 (12,000g  $\times$  10min) 한 후, 상등액을 취하여 membrane filter(Millipore, 0.20  $\mu$ m, 13 mm)에 여과하여 유산균을 제거한 후, 이를 Sep-pak C<sub>18</sub> Cartridges (Waters, USA)를 이용하여 solid phase extraction을 하였다. 카트리지의 활성화를 위하여 초기에 메탄올 6 mL를 주입하였고 이후 3 mL의 증류수로 메탄올을 제거하였다. 준비된 시료 1 mL를 활성화된 카트리지에 분주 한 후, 친수성 용매인 증류수와 소수성 용매인 메탄올을 80%와 90%로 농도를 달리하여 3 mL씩 카트리지에 통과 시켜가며 카트리지에 충전된 시료로부터 각각 친수성 물질과 소수성 물질을 분리하여 유기산을 포함한 친수성 물질을 추출하였다. 추출된 시료 3 mL를 Ependorf tube로 옮긴 후 speed vac을 이용하여 농축하였다. 농축된 시료 50  $\mu$ l를 취하여 항세균활성 실험에 사용하였다.

### 2.3.4 음이온 교환크로마토그래피(HPAEC)를 이용한 Bio-LC system에 의한 유기산 분석

Sep-pak C<sub>18</sub> 카트리지를 이용하여 용출된 유기산은 Bio-LC system(Dionex, Canada)을 이용하여 음이온교환 크로마토그래피(High performance anion exchange chromatography, HPAEC) 방법으로 분석하였다. 본 방법에 사용된 컬럼은 음이온 분리에 적합한 Dionex IonPac ICE-AS6(250 × 9 mm)를 이용하였다. 음이온 분리를 위한 용매로는 0.4 mM Heptafluorobutylic acid를 사용하였고 용매내 수소이온에 의한 음이온의 검출감도가 저하되는 것을 방지하기 위하여 Anion Micromembrane suppressor (Dionex Inc., USA)를 처리하였다. 컬럼내 용매의 유속은 1 mL/min로 조절하였다. 시료를 컬럼에 주입하기전 전처리로 0.45 μm CA filter를 이용하여 이물질 제거 후, 20 μl의 시료를 주입하였다. 시료내 유기산의 분석은 전도율(Retention time)에 따라 표준 유기산 시료와 비교하여 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 항세균 활성물질의 Localization

항세균 활성물질이 유산균의 세포내에 존재하는 물질인지 또는 세포외부로 분비하는 물질인지를 확인하기 위하여 배양된 유산균의 세포를 파쇄한 후, 내용물을 추출하여 항세균 활성실험을 실시해 본 결과, 배양액을 사용한 경우와 달리 공시세균 및 병원성세균의 lawn에 대하여 투명대가 전혀 형성되지 않는 결과(data not shown)를 보임에 따라 항세균 활성물질이 세포외로 분비하는 물질임을 확인할 수 있었다.

#### 3.2 항세균 활성물질의 단백질성 여부 확인

유산균의 대표적인 항세균 활성물질은 박테리옌이라 불리는 단백질성 물질로서 지금까지 많은 연구가 발표된 바 있다<sup>8)-11)</sup>. 따라서, 본 연구에서도 사용된 유산균의 항세균 활성물질이 박테리옌류의 단백질성 물질인지를 확인하기 위하여 배양상등액을 대상으로 단백질 분해효소 및 열 등의 물리적인 처리를 하여 물질의 변성을 유도한 후 활성실험을 진행하였다. 처리결과, 투명대가 형성되

유기물자원화, 제17권, 제4호, 2009

어 항세균활성이 유지되고 있음을 관찰하였으며, 여러 종류의 단백질 분해효소와 고온의 열처리에도 불구하고 활성이 변하지 않는 것으로 나타나 본 물질이 비단백질성은 물론 열에도 안정적인 물질일 것으로 판단되었다 (data not shown).

#### 3.3 항세균 활성물질의 유기산 여부 확인

대부분의 경우, 유산균에 의한 항세균 활성작용이 유산균의 발효산물인 다양한 유기산에 기인한 것으로 알려져 있다<sup>7),13)</sup>. 따라서, 본 실험에서도 유기산에 의한 항세균 활성여부를 조사하였다. 일차적으로 알칼리 용액(1M NaOH)을 이용하여 배양상등액을 pH 7.0으로 중화처리한 후 활성실험을 진행한 결과, 공시세균 및 병원성세균의 lawn에 대하여 투명대를 형성하지 않는 것으로 나타났다. 이로써 본 유산균주들에 의한 항세균 활성물질의 주성분이 유기산의 종류임을 추측할 수 있었다 [Table 1]. Gilliland와 Speck(1977) 등을 비롯하여 많은 연구자들이 유산균이 생성한 젖산과 과산화수소 등이 장내 pH를 저하시켜 병원성 미생물이 생존하기 어려운 환경을 만든다고 보고하고 있으며<sup>13)</sup>, 본 연구에서도 항세균활성의 주요 기작이 분리된 유산균이 만들어낸 유기산에 의한 pH의 저하일 것으로 추측된다.

#### 3.4 항세균 활성물질의 분리 및 정제

본 유산균의 항세균 활성물질이 주로 유기산에 기인한 것으로 추측됨에 따라 유기산의 종류 및 활성을 측정하기 위하여 분리 및 정제실험을 진행하였다. 일차적으로 유산균의 배양상등액을 대상으로 Sep-pak C<sub>18</sub> Cartridges를 거쳐 분리된 음이온 추출물을 이용하여 활성실험을 시도한 결과 공시균주와 병원성세균의 lawn에서 골고루 투명대가 형성됨을 관찰하였다 [Table 2]. 특히, CJY 11균주와 CJY 13균주에서 가장 높은 활성도를 보였는데, 이는 이후 분리실험을 통한 시료의 분석결과 두 균주의 배양액에서 유기산의 함량이 제일 높은 것으로 조사되어 유기산에 의한 항세균 활성기작 가능성을 크게 하였다 [Table 3].

유기산의 정량적, 정성적 분석을 위하여 음이온

**[Table 1]** Antimicrobial Activities of CFS(Cell Free Supernatant) of the Isolated Bacteria after Neutralization

Isolated strains	Test bacteria				
	Pathogenic bacteria			Typical bacteria	
	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogen</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i> (G <sup>+</sup> )	<i>E. coli</i> (G <sup>-</sup> )
CJY 1	-	-	-	-	-
CJY 2	-	-	-	-	-
CJY 3	-	-	-	-	-
CJY 4	-	-	-	-	-
CJY 5	-	-	-	-	-
CJY 6	-	-	-	-	-
CJY 7	-	-	-	-	-
CJY 8	-	-	-	-	-
CJY 9	-	-	-	-	-
CJY 10	-	-	-	-	-
CJY 11	-	-	-	-	-
CJY 12	-	-	-	-	-
CJY 13	-	-	-	-	-
CJY 14	-	-	-	-	-

pH was adjusted to pH 7.0 with 1M NaOH. -, no clear zone.

**[Table 2]** Antimicrobial Activities in the Hydrophilic Effluents of Solid Phase Extraction using Sep-pak C18 Cartridges in Fourteen Isolated Strains

Isolated strains	Test bacteria				
	Pathogenic bacteria			Index bacteria	
	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogen</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
CJY 1	+	+	+	+	++
CJY 2	+	++	+	+	++
CJY 3	++	++	++	+	++
CJY 4	++	++	+	+	++
CJY 5	++	++	+	+	++
CJY 6	++	++	+	++	+
CJY 7	++	+	+	++	+
CJY 8	+	++	+	++	++
CJY 9	++	++	++	+	++
CJY 10	++	+	+	+	++
CJY 11	++	+++	+++	+++	+++
CJY 12	++	++	++	++	++
CJY 13	++	+++	+++	++	+++
CJY 14	++	++	++	++	++

+, clear zone below 0.5 mm  
 ++, clear zone of 0.5 mm to 1.5 mm  
 +++, clear zone above 1.5 mm

**[Table 3]** The Amount of Various Organic Acids in the Effluent of HPAEC by Bio-LC System in Fourteen Isolated Strains

Isolated strains	Amount (nmol) *				Total organic acid
	Oxalic acid	Citric acid	Lactic acid	Acetic acid	
CJY 1	7.18	4.10	60.96	38.05	110.315
CJY 2	7.18	4.10	60.96	38.05	110.315
CJY 3	12.59	6.17	96.20	45.25	160.222
CJY 4	15.67	7.931	118.3	60.71	202.648
CJY 5	17.48	7.929	121.6	36.72	183.787
CJY 6	15.77	7.184	102.9	45.82	171.753
CJY 7	11.38	5.687	78.19	49.24	144.508
CJY 8	9.632	4.694	74.35	43.42	132.112
CJY 9	8.550	4.625	80.61	40.59	134.387
CJY 10	11.29	5.277	67.47	40.93	124.979
CJY 11	23.10	10.62	234.3	36.04	304.155
CJY 12	11.93	6.657	151.9	49.38	219.884
CJY 13	20.42	10.33	239.7	41.90	312.350
CJY 14	11.47	6.657	143.0	44.24	205.427

\* ; The quantity of each organic acid was analyzed by comparing its retention time with that of the standard sample.

추출물을 대상으로 Bio-LC system을 이용하여 음이온 교환크로마토그래피를 실시한 결과 4가지 주요 유기산인 oxalic acid, citric acid, lactic acid, acetic acid 등이 검출되고 있음을 확인할 수 있었다. 유산균이 분비하는 각각의 유기산의 양은 유산균의 종류에 따라 차이가 있었으나, 모든 균주에서 lactic acid의 함량이 가장 많은 것으로 분석되었다 [Table 3]. 조사된 모든 균주에서 lactic acid의 농도는 전체 유기산중 55~77%를 차지하고 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서 사용된 유산균의 주요 항생균 활성물질은 lactic acid 일 것으로 추정된다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 음식물사료를 주입한 건강한 돼지의 장 및 분변에서 분리된 유산균으로부터 항생균 활성을 지닌 물질을 분리 및 정제하고자 하였으며 다음과 같은 결론을 도출하였다.

유기물자원화, 제17권, 제4호, 2009

1. 분리된 균주의 항생균 활성물질은 세포외로 분비한 배양상등액내에 존재하였으며 세포내에 축적되지 않고 있었다.
2. 단백질 분해효소 및 열, 중화처리 결과 항생균 활성물질은 단백질성이 아닌 유기산일 가능성이 큰 것으로 조사되었다.
3. 유기산으로 추측되는 항생균 활성물질을 분리 및 추출하기 위하여 Sep-pak C<sub>18</sub> 카트리지를 이용한 음이온 추출실험과 Bio-LC system을 이용한 high performance anion exchange chromatography를 수행하였다. 항생균 활성물질의 분리 및 추출 결과 옥살산, 구연산, 젖산 및 초산 등, 4종류의 유기산이 검출되었다.
4. 검출된 유기산중 젖산은 각 균주에 따라 전체 유기산의 54%에서 77%로 분포되어 있는 것으로 나타나 주요 항생균 활성물질일 것으로 추정되었다.

**사사**

본 연구는 2008년도 가톨릭대학교 교비연구비의 지원으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Gilliland, S. E., "Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria", FEMS Microbiol. vol 57. pp. 1169~1173, pp. 175~188 (1990).
2. 장정순, 이영덕, 박종현, "새롭게 출현한 *Arcobacter butzleri*의 유기산과 trisodium phosphate 처리에 의한 생육저해효과". 한국 식품과학회지, 35, pp. 1169~1173 (2003).
3. Fuller, R., "Probiotics : in man and animals" J. Appl. Bacteriol., 66, pp. 365~378 (1989).
4. 조광근, "유산균 Probiotics와 위장 건강", J. Kor. Public Health Assoc., 27, pp. 181~192 (2001).
5. 정후길, "프로바이오틱 유산균의 선발기준 및 산업적 응용", 생물 산업, 14, pp. 39~48 (2001).
6. 농림부, "항생제 등 항균물질 사용절감 대책", (2005)
7. Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes and M. L. Chikindas, "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation", Int. J. Food Microbiol., 71, pp. 1~20 (2001).
8. Deraz, S. F., E. N. Karlsson, M. Hedstrom, M. M. Andersson and Bo. Mattiasson, "Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM20079", J. Biotechnol., 117, pp. 343~354 (2005).
9. Ehrmann, M. A., P. Kurzak, J. Bauer and R. F. Vogel, "Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry", J. Appl. Microbiol., 92, pp. 966~975 (2002).
10. Delgado, A., D. Brito, C. Peres, F. Noe-Arroyo and A. Garrido-Fernandez, "Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration", Food Microbiol., 22, pp. 521~528 (2005).
11. Rodriguez, E., J. L. Arques, R. Rodriguez, M. Nunez and M. Medina, "Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits", Lett. Appl. Microbiol., 37, pp. 259~263 (2003).
12. 서정용, 송인근, 이대규, 이기영, 김영준, "음식물류폐기물의 자원화를 위한 항세균 활성 유산균의 개발", 유기물자원화, 14(2), pp. 112~120 (2006).
13. Gilland, S. E. and M.L. Speck, "Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli", Appl. Environ. Microbiol., 33, pp. 15~18 (1977). ☺