

가임기 여성의 질에서 분리한 젖산 세균인 *Lactobacillus plantarum* UK-3의 특성 및 항균활성

안혜란¹ · 소재성² · 오계현^{1*}

¹순천향대학교 생명공학과, ²인하대학교 생물공학과

Characterization and Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Vaginas of Women of Childbearing Age

Hye-Ran Ahn¹, Jae-Seong So², and Kye-Heon Oh^{1*}

¹Department of Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Republic of Korea

²Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea

(Received November 10, 2011 / Accepted December 14, 2011)

The purpose of this work was to examine the antimicrobial activity derived from the lactic acid bacterium, UK-3 isolated from the vaginas of women of childbearing age. Various physiological and biochemical properties of this strain were characterized. Both the BIOLOG system and phylogenetic analysis using 16S rRNA sequencing were utilized for identification, and the strain was designated as *Lactobacillus plantarum* UK-3, and registered in GenBank as [JK266589]. Growth rate, production of organic acids (e.g., lactic acid and acetic acid), and pH during growth were monitored. The maximum concentrations of lactic acid and acetic acid were approximately 684.11 mM and 174.26 mM, respectively, and pH changed from 7.0 to 3.7 after 72 h of incubation. High performance liquid chromatography was used to confirm lactic acid and acetic acid production. Significant antimicrobial activity of the concentrated supernatant was demonstrated against various Gram-positive (e.g., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria* species., *Listeria monocytogenes*), Gram-negative bacteria (e.g., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), and yeast (e.g., *Candida albicans*) by the plate diffusion method. As a result, the concentrated *L. plantarum* UK-3 cultures had lower acidity and inhibited the growth of all microorganisms tested, whereas the growth of *L. acidophilus* was not affected.

Keywords: *L. plantarum* UK-3, antimicrobial activity, lactic acid bacteria

인체에서 피부와 접촉은 생리적 및 물리적 방어벽으로, 여기에 분포하는 정상균총은 외부에서 침입하는 병원균들의 정착과 증식을 비특이적으로 억제한다. 사람의 방광자체는 전형적으로 무균 상태이지만, 요도를 덮고 있는 상피세포는 통성 호기성의 그람음성 간균 및 구균에 의해서 집락형성이 일어난다. 요도 점막, 질, 회음부 등에서 기존의 정상균총과 병원균이 경쟁관계를 형성하고 있다(8). 이들 미생물들은 비노기 감염의 빈번한 원인균들로서 특히 여성에서 여러 가지 문제를 일으킨다. 여성의 생식기 주변에서 감염을 일으키는 병원성 미생물로는 산모의 질에서 신생아의 패혈증 및 뇌막염을 일으키는 *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*,

Enterococcus faecalis 등과 질염을 일으키는 세균으로서 *Escherichia coli*와 *Proteus mirabilis*, 그리고 효모인 *Candida albicans* 등이 있다. 신생아의 패혈증 및 뇌막염은 신생아 사망의 주요 원인이 되며, 특히 뇌막염의 경우 신경학적 후유증을 남기게 되는 경우가 많아 예방과 치료가 중요하다. 또한 세균성 질증은 점액화농성 자궁경부염 및 골반염의 위험을 증가시키고, 유산이나 자궁절제, 제왕절개 같은 산부인과 수술 후 감염 같은 합병증과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(4, 9, 17). 기존의 세균은 숙주의 수용체와 결합하여 새로운 세균의 부착을 방해하고, 환경에 의해 제공된 제한된 영양분을 얻기 위해 서로 생존을 위한 경쟁을 한다. 여성의 질 내에 존재하는 자연 미생물군인 젖산균은 정상균총으로 존재하고 있기 때문에, 이러한 질병을 일으키는 미생물로부터 감염을 방지할 수

* For correspondence. E-mail: kyeheon@sch.ac.kr; Tel.: +82-41-530-1353; Fax: +82-41-530-1350

있다(8).

젖산균(lactic acid bacteria)은 프로바이오틱(probiotic)으로 널리 이용되고 있는 대표적인 세균으로 자연계에 널리 존재하고, 사람이나 동물의 장(腸)과 발효식품 등에서도 쉽게 발견되며, 미국식품의약국(Food and Drug Administration)에서 안전하다고 인정한 미생물이다(13, 15, 16). 젖산균은 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 최종 대사산물인 젖산을 생산한다. 또한 장내 상피세포에 부착하여 기생하게 되어 장내 균총의 성질을 개선시켜 장내 균총의 안정화, 유해세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 질병 예방, 면역 활성화 작용, 항암작용, 콜레스테롤 저하 등 숙주동물에 많은 도움을 준다. 젖산균이 여러 부패성 미생물 및 병원성 미생물에 대하여 생육억제 작용을 갖는 것은 몇 가지 대사적인 특성 때문인데 젖산균은 대사산물로서 항균활성 인자인 organic acid, hydrogen peroxide, reuterin, diacetyl, acetaldehyde, bacteriocin 등을 생산한다(2, 11, 12, 14, 16).

가임기 여성의 질은 약산성이며 다당류인 글리코젠을 많이 지니고 있다. 이것은 여성의 질 내에 존재하는 토착 미생물인 *Lactobacillus* 속(genus)의 젖산균이 글리코젠을 발효하여 젖산을 생산하여 산성조건을 유지하기 때문이다. 젖산균은 그람 양성균의 포자를 형성하지 않는 통성혐기성으로 포도당을 발효시켜 젖산을 생성하여 질 내 산도를 pH 4.5 이하로 유지하여 병원체로부터의 질 감염을 방지하고 건강한 질 상태를 유지하는 역할을 한다(4). 외부로부터 침입하는 병원체로부터의 보호는 병원체에 직접적으로 작용하거나, 간접적으로 숙주의 방어 기전을 자극하여 이루어진다. 따라서 젖산균은 여성의 질 내에서 감염을 예방하고 병원체에 의해 파괴된 질 내 환경의 균형을 회복시킬 수 있다(4, 17).

본 연구는 가임기 여성의 질로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum* UK-3 균주에 대한 생리 화학적 특성조사와 이 균주가 생산하는 유기산이 여성의 질에서 감염의 가능성이 있는 여러 가지 병원성 미생물에 대하여 항균활성을 갖는지에 대하여 조사하였다. 또한 이 분리세균을 16S rRNA 염기서열 분석을 하였으며, HPLC를 통하여 항균활성에 기여하는 물질을 확인하였다.

재료 및 방법

균주의 확보와 배양조건

본 연구에서 사용된 균주는 가임기 여성의 질로부터 농화 배양 기법을 이용하여 분리하였다(3). 시료를 1 ml의 멸균된 생리식염수(physiological saline)가 담긴 튜브에 넣고 30°C의 분당 170회로 회전하는 진탕배양기에서 10분간 교반시킨 후 꺼내어 실온에서 10분간 정치시켰다. 시료 상등액을 10⁻⁴로 희석한 후 100 µl를 0.002% BPB (bromophenol blue)가 첨가된 MRS (Difco, USA) 고체평판배지에 도말하고, 30°C 배양기에서 혐기적 조건으로 48시간 동안 배양하였다(5). 균주의 생육 과정에서 산을 생성하여 노란색을 띠는 균주를 선별하여 MRS 고체평판배지에 3회에 걸친 도말평판법을 통한 순수배

양으로 세균 UK-3을 분리하였다. 분리세균을 MRS 액체배지에 접종하고, 30°C에서 분당 170회로 회전하는 진탕배양기에 배양 유지시키면서 본 연구에 이용하였다.

분리 균주의 형태학적 관찰 및 생화학적 특성조사

분리된 세균 UK-3은 MRS 고체평판배지에 도말하여 단일 집락의 형태를 확인하고, 그람염색을 실시하여 위상차 현미경으로 형태학적 특성을 관찰하였다. 또 분리세균 UK-3에 대한 여러가지 생화학적 특성을 조사하기 위하여 이전에 알려진 방법에 따라 glucose 이용여부, methyl red-voges proskauer (MR-VP) 시험, citrate와 녹말의 이용여부, indole 생성유무, Klinger iron agar (KIA) 시험, gelatin 이용여부, litmus milk 시험 등을 실시하였다. 탄소원으로 1% glucose가 포함된 액체배지에 분리된 균을 접종한 후, 색의 변화를 관찰하였으며, 0.5% glucose가 포함된 MR-VP 배지에 분리 세균인 UK-3를 접종한 후 MR 배지에서는 pH 지시약인 methyl red 3방울을 떨어뜨리고, VP 배지에는 α-naphthol 12방울과 40% KOH 6방울을 첨가 후 색 변화를 관찰하였다. 분리세균이 citrate를 탄소원과 에너지원으로 이용하는지 조사하기 위하여 Simmon's citrate 고체평판배지(Difco)에 접종한 후 배지의 색 변화를 관찰하였고, 녹말의 분해여부를 알아보기 위하여 녹말 고체평판배지에 균을 접종하고 배양한 후 그람 요오드 용액을 첨가하여 집락 주위에 투명구역의 형성유무를 관찰하였다. Indole 생성 시험은 1% peptone이 포함된 tryptone 액체배지에 균을 접종한 후 20방울의 Kovac 시약을 첨가하여 시험관을 가볍게 흔들어 주면서 배지의 색 변화를 관찰하였다. H₂S의 생성여부는 Klinger iron agar (Difco)에 균을 접종한 후 배지의 색 변화를 관찰하였으며, gelatin 평판배지에 균을 점적접종한 후 HgCl₂를 첨가하여 집락 주위에 투명구역 형성유무를 관찰하였다. Litmus milk 시험은 litmus milk (Difco)에 균을 접종하여 37°C배양기에서 48시간 동안 배양한 후 펩톤화를 관찰하였다 (3, 6).

분리 세균의 동정

분리 세균들의 동정을 위해서 BIOLOG 분석시스템을 통하여 다양한 탄소원 이용 능력에 근거한 특성을 조사하였다. 세균을 BUGTM (biolog universal growth) (BIOLOG, USA) 고체평판배지에 도말하여 각각 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세균을 멸균된 면봉을 이용하여 GP inoculating fluid (BIOLOG) 용액에 옮겨 현탁시키고, Biolog Turbidimeter (BIOLOG)를 사용하여 탁도를 20-28%까지 맞춘 후, GP2 MicroplateTM (BIOLOG)의 96개의 well에 각각 150 µl씩 접종하여 24-48시간 동안 배양하였다. 배양된 Microplate의 결과는 Biolog MicrostationTM을 사용하여 확인하였으며, MicroLogTM database software를 통해 동정하였다(10).

16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

분리 세균 UK-3의 유전학적 계통수(phylogenetic tree)를 작성하기 위하여 16S rRNA sequencing을 수행하였다. UK-3

으로부터 genomic DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자를 PCR을 통하여 증폭하였고, 16S rRNA 유전자의 증폭을 위하여 8F와 1492R primer를 사용하였으며, genomic DNA를 주형으로 하여 PCR Premix (GenDEPOT, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR의 수행조건은 denaturation (94°C, 30초), annealing (60°C, 30초), elongation (72°C, 45초) 단계를 33회 반복한 후, 72°C에서 15분 동안 유지하였다. PCR에 의하여 증폭된 DNA 단편을 전기영동한 후, agarose gel extraction kit (Intron, Korea)를 이용하여 젤 상에서 회수하고, 부분적인 염기서열을 결정하였다(1).

분리 세균의 생장에 따른 pH 변화

배양 초기에 pH 7.0인 MRS 액체배지 100 ml가 담긴 삼각 플라스크에 분리세균 UK-3을 접종하고, 30°C에서 배양시키면서 세균의 생장과 배양기간 중에 생산되는 젖산(lactic acid)과 아세트산(acetic acid)과 같은 유기산 및 pH 변화를 12시간 간격으로 72시간 까지 측정하였다. 세균의 생장은 12시간마다 배양액을 채취하여 MRS 고체평판배지에 100 µl씩 평판 도말하여 30°C에서 48시간 동안 배양한 후, 성장한 집락의 수(CFU, colony forming unit)를 측정하여 성장곡선을 작성하였다(5). pH 변화는 12시간 마다 배양액을 10 ml씩 채취하고, 4,000×g에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액의 pH를 측정하였다(3).

HPLC를 이용한 유기산 분석

분리 세균에 의해 생성되는 유기산을 분석하기 위하여 HPLC를 사용하였다. 분석에 사용된 HPLC system은 UV/VIS-151 detector와 321 pump로 구성된 HPLC (Gilson, Inc., USA)를 사용하였으며, Supelco사의 Supelcogel C-610H 컬럼(300 mm × 7.8 mm, 입자크기 9 µm)을 이용하였다. Mobile phase는 0.1% phosphoric acid를 공극직경이 0.45 µm인 membrane filter (Pall-Gelman, USA)에 여과하여 사용하였다. HPLC 작동조건에서 mobile phase의 flow rate는 0.5 ml/min이었으며, UV detector의 파장은 210 nm로 맞추어 사용하였다. 유기산은 분석용 표준품과 배양액으로부터 채취한 시료를 대상으로 분석하였다. 젖산(lactic acid)과 아세트산(acetic acid)을 각각 1:1의 비율로 혼합하여 표준품을 만들었으며, pore size 0.45 µm인 syringe filter로 여과한 후, Hamilton syringe를 사용하여 HPLC injector 내에 20 µl를 주사하였다. 배양액 내에 생성된 유기산을 정량하기 위하여 채취한 시료는 13,000×g에서 1분간 원심분리한 후 pore size 0.45 µm인 시린지 필터로 여과하여 분석하였다(18).

분리 세균의 배양상등액 제조

분리 세균 UK-3가 나타내는 항균활성이 생장기간 동안 생성되는 유기산에 기인하는 것인지 확인하기 위해 UK-3을 MRS 액체배지에 접종하여 30°C에서 48시간동안 배양한 후 4,000×g에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 상등액을 취하여 pore size 0.2 µm인 시린지 필터로 여과하여 세균

을 완전히 제거하였다. 얻어진 무균의 배양상등액을 -70°C의 초저온냉동고에서 24시간 동안 동결시킨 후, 동결건조기를 사용하여 건조한 후 건조된 분말을 멸균된 증류수에 녹여 25배로 농축하였다. 또한 항균활성이 유기산이 아닌 박테리옌 또는 박테리옌 유사물질과 같은 단백질인지에서 기인하는 것인지를 확인하기 위해 동일한 방법으로 준비된 배양상등액을 0.1 N NaOH를 첨가하여 중성 pH인 pH 7.0으로 조절한 후 동결 후 농축하였다(10).

농축 배양상등액의 항균활성 조사

농축된 배양상등액의 항균활성은 평판 확산 검정법(plate diffusion assay)을 통하여 확인하였다(3). 조사대상으로는 질 감염의 원인균으로 보고된 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, MRSA, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria* 종, *Listeria monocytogenes* 등의 그람양성 세균과 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* 등의 그람음성 세균, 그리고 효모인 *Candida albicans*를 이용하였다. 대상 미생물들을 액체 영양배지(nutrient broth)에 각각 접종하여 37°C의 분당 170회 회전하는 진탕배양기에서 24시간 동안 배양한 후, 고체영양배지(nutrient agar)에 멸균된 면봉으로 촘촘히 도말하고, 멸균된 paper disc (Advantec, Japan)를 올려놓은 후, pH 비조절 또는 pH 조절 농축 배양상등액 15 µl를 흡수시켜 37°C 배양기에서 24시간 배양시켜 disc 주변에 생성된 투명대의 형성유무 및 그 크기를 측정하였다. 대조구로서 *Lactobacillus* 속(genus)의 젖산균인 *Lactobacillus acidophilus*에 대해서도 MRS 고체평판배지에서 동일한 방법으로 항균활성을 실시하였다(3, 10, 18).

결과 및 고찰

세균의 분리 및 배양

가임기 여성의 질로부터 항균활성물질인 유기산을 생성하는 세균들을 농화배양(enrichment culture) 기법을 통하여 분리하였다. 0.002%의 BPB가 첨가된 MRS 고체평판배지에서 균주의 생장 과정에서 산을 생성하여 노란색 집락을 형성하는 균주를 선별하여 MRS 고체평판배지에서 총 3회에 걸친 도말 평판법을 통한 순수배양으로 UK-3를 순수분리하였다. 이 분리세균 UK-3를 MRS 액체배지에 접종하고 30°C, 분당 170회 회전하는 진탕배양기에 배양 유지시키면서 본 연구에 이용하였다.

분리 세균의 형태학적 및 생리 화학적 특성조사

그람염색을 실시하여 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 그람양성의 간균으로 나타났다. 분리 세균 UK-3에 대한 여러 가지 생리 화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1에서 보여주는 바와 같다. 인돌(indole) 생성 시험에서는 녹색 고리를 생성하여 음성으로 나타났고, glucose를 발효하여 붉은색 배지가 노랗게 변했으며 기체는 포집되지 않았다. Methyl red 시험에서는 양성을 나타내었으며, voges-proskauer 시험에서는 음성을

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolate, *L. plantarum* UK-3

Morphological characteristics	
Cell Shape	Rod
Gram stain	Positive
Physiological characteristics	
Indole production	-
Glucose	+
Methyl red	+
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	-
Oxidase	+
Simmon's citrate	-
H ₂ S (KIA)	-
Litmus milk (peptonization)	-

+: Positive reaction, -: Negative reaction.

나타내었다. 녹말과 gelatin 분해여부 시험에서는 투명구역을 생성하지 않아 모두 가수분해가 일어나지 않았음을 확인하였다. Oxidase 시험에서 균의 색이 보라색으로 변화되어 양성결과를 나타내었고, catalase 시험에서는 기포를 생성하지 않아 음성결과를 나타내었다. Simmon's citrate 이용여부와 disulfhydase에 의한 H₂S의 형성은 모두 음성으로 확인되었고, litmus milk 시험에서 펩톤화(peptonization)는 일어나지 않았다. 이

균주의 집락에 대한 형태학적 관찰을 통해 집락의 색깔은 진한 노란색을 나타냈으며, 입면의 형태는 볼록형으로 관찰되었다.

균주 UK-3의 동정 및 16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

분리 세균의 동정을 위하여 UK-3가 각종 탄소원을 이용하는지의 여부를 BIOLOG 분석시스템을 통해 조사하였으며, 그람양성 세균의 동정에 사용되는 GP2 MicroPlate™를 이용하여 분석하였다. 분석된 결과를 MicroLog™ database software를 통해 확인한 결과, UK-3은 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었으며, 얻어진 결과를 바탕으로 *Lactobacillus plantarum* UK-3로 명명하였다. BIOLOG 분석시스템을 사용하여 얻어진 생화학적 특성들은 Table 2에 나타내었다. 분리세균 UK-3의 유전학적 계통수(phylogenetic tree)를 작성하기 위하여 PCR을 통해 16S rRNA 유전자를 증폭하고, 1,017 bp의 부분적인 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 NCBI의 BLAST 분석 프로그램을 사용하여 상동성을 비교한 결과 이 균주는 *Lactobacillus* 속(genus)에 속하였으며, *Lactobacillus plantarum* 과 98%의 유사성을 나타내었다. 얻어진 결과를 바탕으로 분리세균은 *Lactobacillus plantarum* UK-3으로 명명하였으며, GenBank에 [JK266589]로 등록하였다. 이 균주와 *Lactobacillus* 속(genus)에 속하는 다른 균주들과의 유사성을 Fig. 1에 나타내었다.

분리 세균의 생장에 따른 pH 변화

가임기 여성의 질로부터 분리한 균주 UK-3을 MRS 액체배

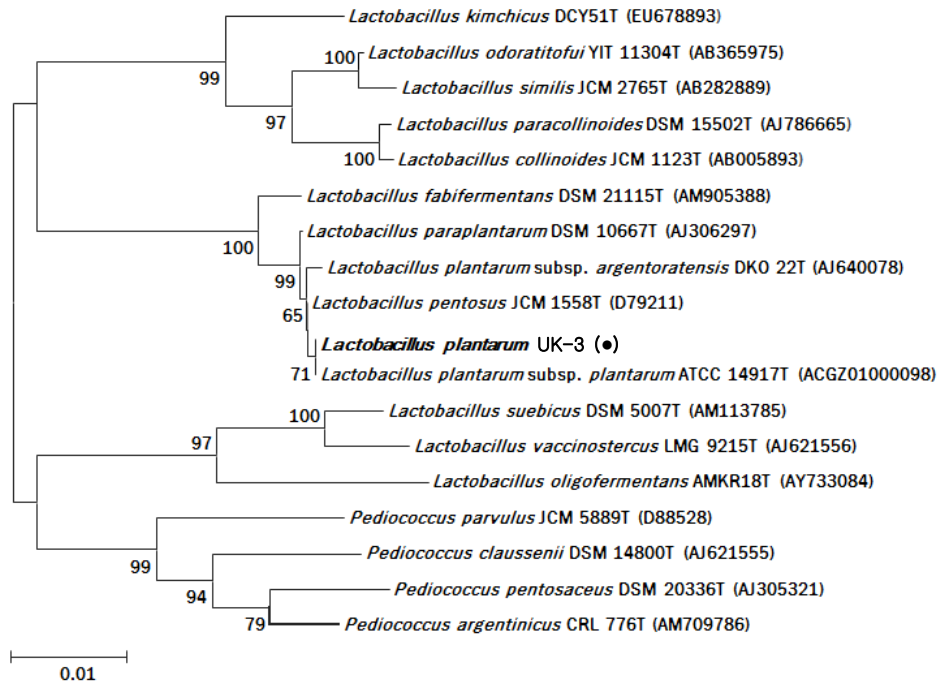


Fig. 1. Phylogenetic tree of the strain, *L. plantarum* UK-3 (●) based on 16S rRNA gene sequences. The tree was constructed by the neighbor-joining method. Numbers at nodes are bootstrap percentage based on 1000 resampled data sets. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bar, 0.01 changes per nucleotide.

지에 접종하고 세균의 성장과 유기산의 생성, 그리고 배양기간 중의 pH 변화를 12시간 간격으로 측정하였다(Fig. 2). 분리 세균은 배양 이후부터 12시간까지 급격히 성장하고, 36시간까지 지속적으로 성장하였으며, 이와 관련하여 배지내의 pH는 감소되었다. 배양 후 36시간 이후부터는 생장이 점차 느려

Table 2. Biochemical characteristics of the isolate, *L. plantarum* UK-3 using the BIOLOG analysis system

Biochemical tests			
Water	-	D-tagatose	+
α -cyclodextrin	-	D-trehalose	+
β -cyclodextrin	-	Turanose	+
Dextrin	+	Xylitol	-
Glycogen	+	D-xylose	-
Inulin	-	Acetic acid	+
Mannan	-	α -Hydroxy butyric acid	-
Tween 40	-	β -Hydroxy butyric acid	-
Tween 80	-	γ -Hydroxy butyric acid	+
<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine	+	β -Hydroxy phenyl acetic acid	-
<i>N</i> -acetyl-D-mannosamine	-	α -Keto glutaric acid	-
Amygdain	-	α -Keto valeric acid	+
L-arabinose	-	Lactamide	-
D-arabitol	-	D-lactic acid methylester	-
Arbutin	-	L-lactic acid	+
Cellobiose	+	D-malic acid	-
D-fructose	+	L-malic acid	-
L-fucose	+	Methyl pyruvate	-
D-galactose	-	Mono-methyl succinate	-
D-galacturonic acid	-	Propionic acid	+
Gentiobiose	+	Pyruvic acid	+
D-gluconic acid	+	Succinamic acid	-
α -D-glucose	+	Succinic acid	+
m-inositol	-	<i>N</i> -acetyl-L-glutamic acid	-
α -D-lactose	+	Alaninamide	-
Lactulose	+	D-alanine	-
Maltose	+	L-alanine	-
Maltotriose	-	L-alanylglycine	-
D-mannitol	+	L-asparagine	-
D-mannose	+	L-glutamic acid	-
D-melezitose	+	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-melibiose	-	L-pyroglutamic acid	-
α -methyl-D-galactoside	+	L-serine	-
β -methyl-D-galactoside	+	Putrescine	-
3-methylglucose	+	2,3-butanediol	-
α -methyl-D-glucoside	-	Glycerol	+
β -methyl-D-glucoside	-	Adenosine	+
α -methyl-D-mannoside	-	2-deoxy adenosine	+
Palatinose	-	Inosine	-
D-psicose	+	Thymidine	+
D-raffinose	+	Uridine	-
L-rhamnose	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
D-ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	-
D-salicin	+	Uridine-5'-monophosphate	-
Sedoheptulosan	-	Fructose-6-phosphate	+
D-sorbitol	+	Glucose-1-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	-
Sucrose	-	D-L- α -glycerolphosphate	-

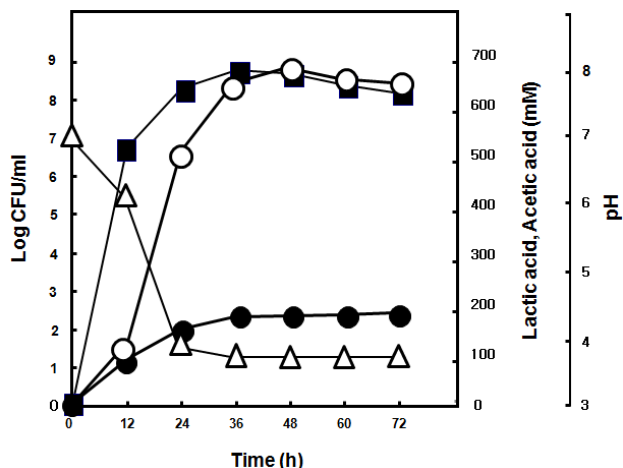


Fig. 2. Growth of the strain *L. plantarum* UK-3, measured as viable cell count (■) and compared with the parallel formation of lactic acid (○), acetic acid (●), and pH changes (△).

졌으며 72시간까지 완만하게 감소하였고, 그에 따라 pH도 거의 일정해졌다. 배양초기의 배지의 pH는 7.0이었으나 72시간이 지난 후, 최종 pH는 3.7로 측정되었다. Tomás 등(19)은 건강한 여성의 질 분비물로부터 분리한 *Lactobacillus* 균주들이 pH를 6.5 정도로 감소시키고, Boskey 등(7)은 가임기와 폐경기의 여성에서 *Lactobacillus* 속(genus)의 *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. crispatus*, *L. jensenii* 등의 균주들에 의한 pH 변화를 보고하였다. 본 연구에서 사용된 가임기 여성의 질로부터 분리한 *L. plantarum* UK-3 균주도 상기의 결과와 유사하게 생장기간 동안 유기산을 생산하여 pH를 3.7로 감소시키는 것이 확인되었다.

HPLC에 의한 유기산 분석

분리세균인 UK-3의 배양기간 동안 대사물질로서 배양액에서 생성되는 유기산을 분석하였다. 배양초기에는 거의 존재하지 않았던 유기산이 배양이 진행됨에 따라 UK-3 균주의 생장과 비례하여 생성되었다. 얻어진 배양상등액 시료는 HPLC를 이용하여 분석하였으며, 젯산과 아세트산이 혼합된 표준품과 비교하여 15.28 min과 17.97 min에서 동일한 peak가 탐침되었다(Fig. 3). 따라서 이들 두 peak는 각각 젯산과 아세트산으로 확인되었다. 분리세균인 UK-3의 배양 후 48시간이 경과했을 때, 젯산과 아세트산은 각각 684.11 mM 174.26 mM이 생성되었다.

농축 배양상등액의 항균활성 조사

분리세균 UK-3의 항균활성 확인은 plate diffusion assay 방법을 이용하여 25배로 농축한 배양상등액을 질 감염의 가능성이 있는 병원성 미생물에 대하여 실시하였다. 그람양성 세균인 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, MRSA, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria* 중, *Listeria monocyto-*

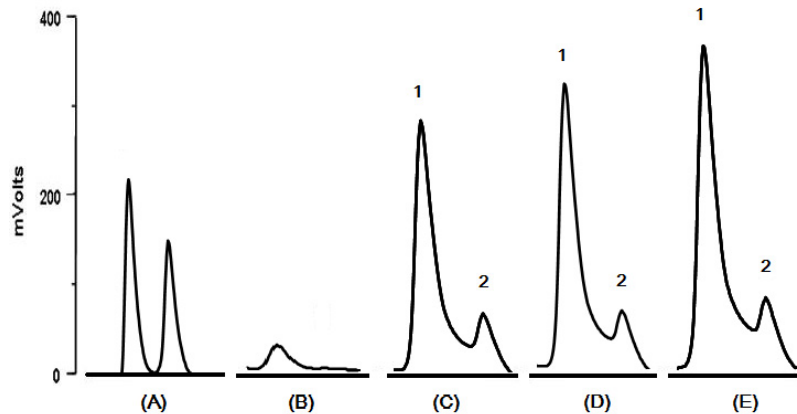


Fig. 3. HPLC chromatograms of a mixture or authentic standards, lactic acid and acetic acid (A) and of culture samples of *L. plantarum* UK-3 at the beginning (B) and after 24 h (C), 36 h (D) and 48 h of incubation (E). The retention times for lactic acid (peak 1) and acetic acid (peak 2) are 15.28 and 17.97 min., respectively.

genes와 그람음성 세균인 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*와 효모인 *Candida albicans* 등에 노출시키고, 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, paper disc 주변에 형성되는 투명대를 통하여 항균활성 여부를 확인하였다(Fig. 4 및 Table 3). 각 균주마다 항균활성의 정도는 차이가 있었으며, pH를 조절하지 않은 농축 배양상등액을 처리한 실험에서 그람양성과 그람음성 세균뿐 아니라 효모인

*Candida albicans*에 대해서도 광범위하게 항균활성을 나타냈다. 그러나 질 내에 존재하며 산도를 유지시키는 토착 미생물로 알려진 *Lactobacillus acidophilus*에 대해서는 전혀 활성이 나타나지 않았다. 또한 pH를 7.0으로 조절한 농축 배양상등액을 처리한 실험에서는 투명대가 전혀 생성되지 않았다. 이로 인해 UK-3가 나타내는 항균활성은 성장기간 동안 생산하는 유기산에 기인하는 것임을 확인하였다. Tomás 등(19)은 가임

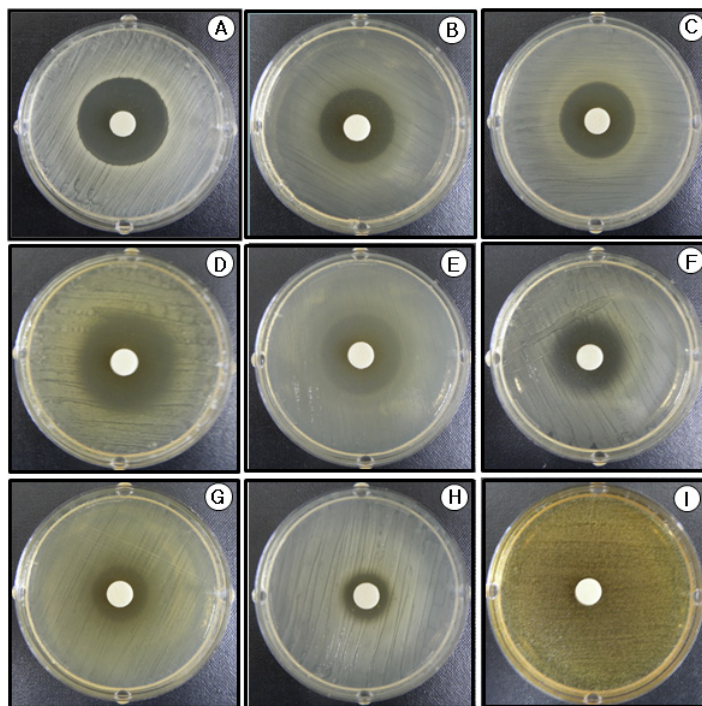


Fig. 4. Antibacterial activity by 25-fold concentrated culture supernatant from *L. plantarum* UK-3. Paper discs soaked with the supernatants were placed onto lawn plates of *Candida albicans* (A), *Escherichia coli* (B), *Klebsiella pneumoniae* (C), *Neisseria* species (D), *Proteus mirabilis* (E), *Staphylococcus aureus* (F), *Listeria monocytogenes* (G), *Staphylococcus epidermidis* (H), *Lactobacillus acidophilus* (I). All strains grew on nutrient agar plates, whereas *L. acidophilus* grew on MRS agar plate.

Table 3. Inhibition of various pathogens by 25-fold concentrated culture supernatant from *L. plantarum* UK-3

Test strains	Antibacterial activity	
	not adjusted pH	adjusted pH
Gram (+)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-
MRSA	++	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+++	-
<i>Neisseria species</i>	+++	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	++	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-
Gram (-)		
<i>Escherichia coli</i>	++	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	-
<i>Proteus mirabilis</i>	++	-
Yeast		
<i>Candida albicans</i>	+++	-

Inhibition zone (mm): +++, > 20 mm; ++, 20-15 mm; +, < 15-10 mm; -, no inhibition.

기의 건강한 여성의 질 분비물로부터 분리한 4종의 *Lactobacillus* 균주가 pH를 감소시키고 *E. coli*, *Klebsiella* 종, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoeae* 등의 7개 균주에 대해 생장을 억제한다고 보고한 바 있다.

Dahiya 등(12)과 Daeschel 등(11)은 젖산균이 여러 부패성 미생물 및 병원성 미생물에 대하여 생장억제 작용을 갖는 것은 젖산균이 갖는 대사적인 특성 때문이며 젖산균이 생산하는 유기산은 중성 및 알칼리성에서 잘 성장하는 미생물에 대하여 살균 작용을 가지며 강한 항균활성을 나타낸다고 보고하였다. 질 내에 침입한 병원체로부터 보호는 병원체에 직접적으로 작용하거나, 간접적으로 숙주의 방어기전을 자극하여 이루어진다. 이 연구에서 여성의 질에서 분리된 *L. plantarum* UK-3가 분비하는 젖산과 아세트산 등의 유기산은 pH를 낮추고 질에서 감염의 가능성이 있는 다양한 병원성 세균과 효모에 대하여 생장을 억제하는 항균물질을 확인하였다. 본 연구는 향후 *L. plantarum* UK-3가 생산하는 항균물질이 질 감염의 가능성이 있는 병원성 미생물에 대해 나타내는 비특이적 방어기전을 조사하는 방향으로 진행될 것이다.

적요

본 연구는 가임기 여성의 질로부터 젖산균인 *Lactobacillus plantarum* UK-3를 분리하여 다양한 생리화학적 특성조사와 여러 가지 병원균들에 대한 항균활성을 확인하고자 실시하였다. 균주 UK-3는 MRS 배지에서 배양되었으며, 형태학적 관찰 및 생화학적 특성을 조사하였으며, 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 균주를 동정하여, *Lactobacillus plantarum* UK-3로 명명하였으며, GenBank에 [JK266589]로 등록하였다. 배양기간 동안에 *L. plantarum* UK-3의 생장과 유기산의 생성, pH 변화를 조사하였으며, HPLC를 사용하여 대사산물로서 생성

된 젖산(lactic acid)과 아세트산(acetic acid)을 정량 및 정성분석 하였다. 이들 유기산의 생성은 *L. plantarum* UK-3의 생장과 비례하였고, 배양 48시간 경과 후에 젖산과 아세트산의 농도는 각각 약 684.11 mM과 174.26 mM이었으며, 초기 pH 7.0은 배양기간 동안 3.7로 감소하였다. 여성의 질에서 감염의 가능성이 있는 10가지의 그람양성 세균, 그람음성 세균, 그리고 효모에 대하여 25배로 농축된 배양상등액을 처리하여 plate diffusion assay 방법으로 항균활성을 측정하였다. 그 결과 본 연구에 사용된 10가지 미생물에 대해서 광범위하게 항균효과가 있는 것이 관찰되었으며, 정상균총으로서 다른 젖산세균인 *Lactobacillus acidophilus*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다.

참고문헌

- Ahn, D.K., T.W. Han, H.Y. Shin, I.N. Jin, and S.Y. Ghim. 2003. Diversity and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 191-196.
- Aly, S., C.A.T. Ouattara, I.H.N. Bassole, and A.S. Traore. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan J. Nutri.* 3, 174-179.
- Baek, H., H.R. Ahn, Y.S. Cho, and K.H. Oh. 2010. Antibacterial effect of *Lactococcus lactis* HK-9 isolated from feces of a new born infant. *Kor. J. Microbiol.* 46, 127-133.
- Barb ers, C. and S. Boris. 1999. Potential role of Lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens. *AIDS Patient Care and STDs.* 13, 747-751.
- Jang, S.Y. and Y.J. Jeong. 2005. Effect of chitosan-liquid calcium addition on the quality of kimchi during fermentation. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutri.* 34, 715-720.
- Benson, H.J. and A.E. Brown. 2006. Benson's Microbiological Applications (General microbiology, complete version), p. 251-289. 10th ed. McGraw-Hill College, New York, USA.
- Boskey, E.R., K.M. Telsch, K.J. Whaley, T.R. Moench, and R.A. Cone. 1999. Acid production by vaginal flora *in vitro* is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *J. Infect. Immun.* 67, 5170-5175.
- Cho, Y.H. 2006. Introduction to urinary tract infections. *Kor. J. Urol.* 47, 559-567.
- Cho, T.H., J.D. Koo, I.S. Lee, and H. Yoo. 1989. A study of Group B Streptococcal infection in the vagina of pregnant women and mucous membrane of newborn infants. *Kor. J. Obstet. Gynecol.* 32, 229-237.
- Chun, J.W., C.W. Ma, and K.H. Oh. 2005. Physiological characterization of *Lactobacillus* sp. JK-8 isolated from shrimp aquaculture pond. *Kor. J. Microbiol.* 41, 18-23.
- Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as preservatives. *J. Food Technol.* 43, 164-167.
- Dahiya, R.S. and M.L. Speck. 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 51, 1568-1572.
- Datta, R., S.P. Tsai, P. Bonsignore, S.H. Moon, and J.R. Frank. 1995. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 221-231.
- Fuller, K. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.
- Leal-Sánchez, M.V., R. Jiménez-Díaz, A. Maldonado-Barrag an, A. Garrido-Fernández, and J.L. Ruiz-Barba. 2002. Optimization

- of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4465-4471.
16. Orrhge, K. and C.E. Nord. 2000. *Bifidobacteria* and lactobacilli in human health. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 26, 95-111.
 17. Park, M.Y., H.M. Park, J.S. So, and S.C. Kim. 2004. Microbiologic and molecular genetic analysis of *Lactobacillus* spp. isolated from vagina of korean women and a pilot clinical study on the treatment of vaginitis using the best *Lactobacillus* strain KLB 46. *Kor. J. Obstet. Gynecol.* 47, 1154-1164.
 18. Song, Y.J., S.H. Park, J.Y. You, Y.S. Cho, and K.H. Oh. 2009. Antibacterial activity against food-poisoning causing bacteria and characterization of *Lactobacillus plantarum* YK-9 isolated from kimchi. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 24, 273-278.
 19. Tomás, M.S.J., V.S. Ocaña, B. Wiese, and M.E. Nader-Macias. 2003. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 52, 1117-1124.