

## 병원성 미생물에 대한 *Lactobacillus bulgaricus* SP5의 항균활성

김완섭\*\* · 양아름\*

### Antibacterial Activity by *Lactobacillus bulgaricus* SP5 against Pathogenic Bacteria

Kim, Woan-Sub · Yang, A-Reum

This study was carried out to get basic resources for the industrial use of *Lactobacillus bulgaricus* SP5. The antibacterial activity of the supernatant obtained from *Lactobacillus bulgaricus* SP5 was tested against the pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* KCCM 11234, *Salmonella enteritidis* KCCM 3313, *Salmonella enteritidis* KCCM 12021, and *Salmonella typhimurium* KCCM 40253. The supernatant of *L. bulgaricus* SP5 showed antibacterial activity against tested pathogenic bacteria. The antibacterial activity was examined after adjusting pH and heat treatment of supernatant. Heat treatment of supernatant had antibacterial activity against pathogenic bacteria at all temperature. However, pH changes showed no antibacterial activity. Antibacterial activity of the supernatant was confirmed to be due to organic acids (lactic, acetic, phosphoric, succinic, pyroglutamic, citric, malic, and formic acid).

Key words : antibacterial activity, lactic acid bacteria, organic acid, probiotics

## I. 서 론

유산균(lactic acid bacteria)은 사람을 포함한 동물의 소화기관, 각종 발효식품과 음료 등 자연계에 널리 분포되어 부패미생물의 억제, 풍미와 향의 개발에 이용되어 왔다(Pfeiler and klaenhammer, 2007). 유산균은 당류를 에너지원으로 이용하고 아미노산과 비타민을 필요로

\* 환경대학교 동물생명환경과학과

\*\* Corresponding author, 환경대학교 동물생명환경과학과(kimws@hknu.ac.kr)

한다. 또한 유산균은 인류생활에 광범위하게 이용되고 있는데, 향미증진을 위한 대사산물, 인체에 건강증진을 위한 유용물질의 생산, 식품 보존성의 향상을 위한 유산균 발효, 의약품 및 가축의 사료 첨가제 등에 이르고 있다(Lee et al., 1999). 장내에는 약 100여 종류 이상의 세균이 존재하고 있는데, 이들 미생물의 균형을 바람직하게 유지시켜 주는 것은 유산균이 난소화성 올리고당을 이용하여 유산과 유용한 물질을 생산하기 때문이다. 유해균들은 모유를 섭취하는 유아에 매우 적은 수가 존재하나, 나이가 들면서 그 수가 증가하고 부패산물을 분비시켜 인체에 해로운 작용을 한다(Homma, 1998). 한편, 유산균은 유기산 및 유용물질의 생산으로 유해세균의 생장을 억제시켜 식품에 있어서는 저장성 향상에 크게 기여하고, 인류에 있어서는 건강하게 장수 할 수 있다고 보고되어 있다(Fukushima et al., 1998; Kim et al., 2011). 최근, 장내에서 이러한 유용물질을 생산하여 저장작용과 면역작용을 나타내는 유산균을 probiotics로 불리고 있다. Probiotics는 유산균과 같이 살아있는 균뿐만 아니라 사멸된 유산균의 세포도 유용하게 이용되고 또한 장내의 유해물질을 흡착하여 체외로 배설시키는 작용을 하는 것을 말한다(Yoshitaka et al., 2006). 따라서 유산균은 장내 상피 세포에 정착하여 정상적인 장관 내 미생물의 생존, 유당불내증의 완화, 혈중 콜레스테롤의 감소, 항암작용, 면역 조절작용, 식품의 영양학적 가치의 증진 등의 유익한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Peres et al., 2012). 유산균의 이로운 작용은 인간뿐만 아니라 동물에게도 유용하게 이용되고 있다. 가축의 포유기 또는 어린 새끼에 있어서 유산균의 투여 또는 초유의 유산발효에 의한 생육발육과 설사의 치료에 많이 이용되고 있다(Lee et al., 1999, Nakae, 1986). 유산 균주의 하나인 *Lactobacillus bulgaricus* SP5는 이전 연구에서 통증완화, 혈압강하, 이뇨작용, 신경안정효과, 항산화 작용 등의 생리활성 기능이 있는 GABA (Gamma-Amino Butyric acid)를 쌀 함유 산양발효유에서 가장 많이 생산한다고 보고하였다(Woo and Kim, 2014). 따라서 본 연구는 *Lactobacillus bulgaricus* SP5의 GABA 생산력 이외에 병원성 미생물에 대한 항균활성과 항균물질에 대하여 탐색하였다. 또한 얻어진 항균물질의 pH 및 열 안정성에 대한 특성도 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 균주

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SP5 (*L. bulgaricus* SP5)는 Sacco (Italy)사로부터 구입하였고, *Escherichia (E) coli* KCCM 11234, *Salmonella (S) enteritidis* KCCM 3313, *S. enteritidis* KCCM 12021, *S. typhimurium* KCCM 40253은 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 구입하여 사용하였다.

## 2. 시약 및 재료

유산균인 *L. bulgaricus* SP5 균을 배양하기 위해 MRS 배지(Difco, USA)를 사용하였고, *E. coli* KCCM 11234는 LB (Luria-Bertani) 배지(Difco, USA)를 사용하였으며, *S. enteritidis* KCCM 3313, *S. enteritidis* KCCM 12021, *S. typhimurium* KCCM 40253을 배양하기 위해 Tetrathionate 배지(Difco, USA)를 사용하였다.

전기영동에 사용된 30% acrylamide, Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250은 TNT Research (Korea) 것을 사용하였고, Tris-base, Sodium dodecyl sulfate (SDS), Ammonium persulfate (APS), Tetramethylethylenediamine (TEMED)는 AMRESCO (USA) 것을 사용하였다. 2-Mercaptoethanol는 SIGMA (USA) 것을 사용하였으며, Glycerol, Acetic acid, Methanol은 DAEJUNG CHEMICALS & METALS (Korea) 것을 사용하였고, 1-Butanol은 (주)서울화성공업(Korea) 것을 사용하였다. pH 측정은 pH meter (Horiba, Ltd., Japan)과 pH test paper (Advantec, Japan)를 이용하여 측정하였다.

## 3. *L. bulgaricus* SP5의 배양

*L. bulgaricus* SP5는 MRS 배지에 접종 후, 37°C 배양기에서 24시간 호기 배양하였다. 배양이 끝난 배양액은 얼음 위에서 20분간 정치 후, 원심분리기(Hanil, Korea)에서 4,000 rpm/20 min/4°C로 원심분리하여 상정액을 회수하였다. 상정액은 0.2 µm와 0.4 µm Syringe filter (Advantec, Japan)를 이용하여 여과하였다. 그리고 여과된 상정액은 -20°C 보관하여 실험에 이용하였다.

## 4. 항균활성 측정

병원균 억제능력은 paper disc를 이용한 agar diffusion법과 96-well plate법을 이용하여 확인하였다. Paper disc 방법은 각각의 20 ml LB agar와 Tetrathionate agar는 125°C에서 20분 멸균하였고, 배지 온도를 50°C까지 냉각 후, *E. coli*와 *Salmonella*를 각각 1% 접종하여 petri dish에 부어 굳혔다. 각각의 균이 접종된 배지표면에 *L. bulgaricus* SP5로부터 얻어진 상정액을 100%, 50%, 그리고 25%의 농도로 멸균된 paper disc에 흡착시켜 37°C incubator에 배양하면서 항균활성을 측정하였다. 한편, 96-well microplate법은 LB 배지와 Tetrathionate 배지에 각각 준비된 *L. bulgaricus* SP5 상정액을 1%와 2% 농도로 첨가하여 최종 200 µl가 되도록 하였으며, 반응 well에 예비 배양된 대장균과 살모넬라를 각각 1% 접종하였다. 접종된 균들은 37°C 배양기에서 24시간동안 호기 배양하면서 3시간마다 microplate reader (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 655 nm의 흡광도로 미생물의 생육을 측정하였다.

## 5. 전기영동

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Tris-HCl glycine buffer를 이용하여 수행하였다(Laemmli, 1970). 즉, *L. bulgaricus* 상징액을 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter (Millipore, USA)을 이용하여 분자량 5,000 Dalton (Da) 이상과 이하로 분리한 후, 각각 전기영동을 수행하였다. Protein standard marker는 Bio-Rad사의 low marker (USA)를 이용하였다. 은염색은 Silver staining kit (GE Healthcare, Sweden)의 매뉴얼에 따라 수행하였다.

## 6. Tricine-SDS-PAGE에 의한 항균물질 검출

병원성균에 대한 *L. bulgaricus*로부터 얻어진 배양액의 항균활성이 박테리오신에 의한 것인지를 확인하기 위하여 Tricine-전기영동 후, 겔로부터 항균활성을 확인하고 항균단백질을 검출하고자 하였다. 전기영동 Gel상에서 항균활성을 나타내는 물질의 band확인 방법은 direct detection 방법(Bhunja et al., 1987)으로 수행하였다. *L. bulgaricus* 상징액을 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter (Millipore, USA)를 이용하여 분자량 5,000 Da 이상과 이하로 분리한 후, 전기영동을 수행하였다. 그 이유는 박테리오신의 분자량은 대부분 5,000 Da 이하라는 이전의 연구자들의 보고가 있기 때문이며, 혹시 5,000 Da 이상의 분자량을 가지는 단백질도 항균활성을 나타낼 가능성이 있기 때문에 항균활성시험은 양쪽 시료 모두에서 실시하였다(Drider et al., 2006). 전기영동 후, gel은 25% (v/v) isopropanol과 10% (v/v) glacial acetic acid 용액에 담가 30분간 고정시켰다. 그리고 멸균 증류수로 90분간 세정하였다. 세정된 gel은 준비된 LB agar와 Tetrathionate agar 위에 각각 놓은 후, 균이 접종된 각각의 top agar (0.7%, w/v)를 분주하여 균했다. 그리고 난 후, 37°C incubator에 배양하면서 생육저해 밴드가 생성되는지 확인하였다.

## 7. pH 안정성

*L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액의 항균물질이 pH 변화에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 1 N NaOH를 이용하여 상징액(control : pH 4.6)을 각각 pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 조정 한 후, 병원성 균에 대한 항균시험을 수행하였다. 항균시험은 96-well microplate법으로 수행하였다. 즉, 96-well plate에 다양한 pH로 조정된 2% 상징액을 LB 배지와 Tetrathionate 배지에 첨가하여 최종 200  $\mu$ l가 되도록 하였으며, 예비 배양된 대장균과 살모넬라를 각각 1% 접종하였다. 접종된 균들은 37°C 배양기에서 24시간 동안 호기 배양하면서 3시간마다 microplate reader를 이용하여 655 nm의 흡광도로 미생물의 생육을 측정하였다.

## 8. 열 안정성

*L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액의 항균물질이 열에 대해서 안정성이 있는지를 알아보기 위해 각각 65°C/30 min, 75°C/5 min, 75°C/10 min, 85°C/5 min, 85°C/10 min, 120°C/20 min의 조건으로 상징액을 열처리 하였다. 항균시험은 96-well microplate법으로 수행하였다. 즉, 96-well plate에 다양한 열처리로 조정된 2% 상징액을 LB 배지와 Tetrathionate 배지에 첨가하여 최종 200 µl가 되도록 하였으며, 반응 well에 예비 배양된 대장균과 살모넬라를 각각 1% 접종하였다. 접종된 균들은 37°C 배양기에서 24시간동안 호기 배양하면서 3시간마다 microplate reader를 이용하여 655 nm의 흡광도로 미생물의 생육을 측정하였다.

## 9. HPLC를 이용한 유기산분석

유기산의 정량 분석은 Shodex RS pak KC-LG column (8.0 mm의 ID × 50 mm)과 두 번째 KC-811 column (8.0 mm의 ID × 300 mm)과 다중 파장 검출기가 장착된 Agilent 1100 model HPLC system을 사용하여 수행하였다. 이동상 A 용액(용출액)은 3 mM perchloric acid, 그리고 이동상 B용액(반응 시약)은 0.2 mM의 BTB, 15 mM의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM NaOH의 혼합물을 사용하였다. 유속은 A용액과 B용액 모두 0.7 ml/min으로 조정하였다. Column의 온도는 80°C 이었고, 유기산의 검출파장은 440 nm로 설정하였다. Sample의 주입량은 10 µl이다.

## 10. 통계처리

분석된 결과에 대한 통계처리는 SAS (Statistical Analysis System)(2001)를 이용하여 평균과 표준편차를 나타내었다. 각 시험구간의 유의성 검증을 위하여 ANOVA로 분석하였으며, 사후 검증으로 Duncan의 다중검정을 통하여 유의성 검증( $p < 0.05$ )을 실시하였다.

# Ⅲ. 결과 및 고찰

## 1. *Lactobacillus bulgaricus*가 분비하는 항균물질

본 연구에서는 *L. bulgaricus* SP5의 24 hr 배양 후, 상징액을 회수하여 여과멸균 후 병원균에 대한 성장 억제 능력을 paper disc를 이용한 agar diffusion법과 96-well microplate법으로 확인하였다. 병원균(*E. coli* 11234, *S. enteritidis* 3313, *S. enteritidis* 12021, *S. typhimurium* 40253)에 대한 항균여부를 측정하기 위하여 *L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액을 원액, 1/2

희석, 그리고 1/4희석액으로하여 agar diffusion법으로 측정하였고, 그 항균활성 여부는 Fig. 1에 나타내었다.

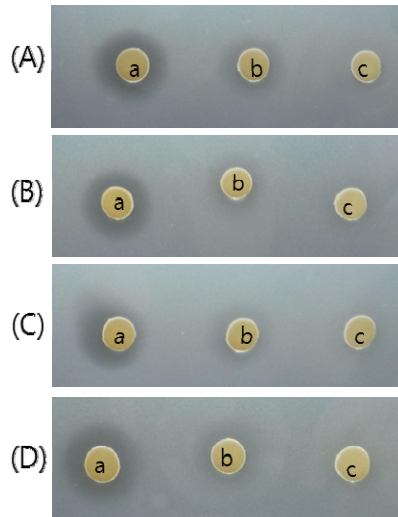


Fig. 1. Antibacterial activity against pathogenic bacteria using the supernatant cultured for 24hours of *L. bulgaricus* SP5.

A: *E. coli* 11234, B: *S. enteritidis* 3313, C: *S. enteritidis* 12021, D: *S. typhimurium* 40253.

a: 100% supernatant, b: 50% supernatant, c: 25% supernatant.

Fig. 1-A는 *E. coli* 11234에 대한 *L. bulgaricus* 상징액의 항균 활성 결과로 원액에서는 강한 억제 환을 나타낸 반면, 원액을 희석할수록 억제 환은 감소하였다. 이러한 결과는 *S. enteritidis* 3313 (Fig. 1-B), *S. enteritidis* 12021 (Fig.1-C), 그리고 *S. typhimurium* 40253 (Fig. 1-D)에서도 같은 결과를 보여주었다. 따라서 *L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액은 이용된 병원성균에 대해서 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 한편, agar diffusion법 보다 병원성균에 대해 *L. bulgaricus* 상징액의 정확한 항균활성 농도를 측정하기 위하여 96-well microplate법으로 항균활성 분석을 실시하였다. 즉, 배양상징 원액의 첨가 농도를 1%와 2%로 배양배지에 첨가하여 각 병원성균에 대한 항균활성을 측정하여 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

*E. coli* 11234에 대한 *L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액의 항균측정 결과는 Fig. 2-A에서 보는 바와 같이 2% 농도에서는 현저한 항균활성을 나타내었고, 1%의 농도에서는 배양 6시간까지는 생육이 억제되었다가 이후 점차 생육이 증가하였다. 이와 같은 결과는 *S. typhimurium* 40253 (Fig. 2-D)에서도 동일하게 관찰되었다. 그리고 *S. enteritidis* 3313 (Fig. 2-B)과 *S. enteritidis* 12021 (Fig. 2-C)는 *E. coli*의 결과와 동일하게 2% 농도에서는 전혀 생육을 하지 못하였고, 1% 농도에서는 배양 3시간까지는 생육이 억제되었다가 이후 점차 증가하였다. 따라서 *L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액의 병원성 미생물에 대한 최소억제농도는 2%의

농도로 확인되었다.

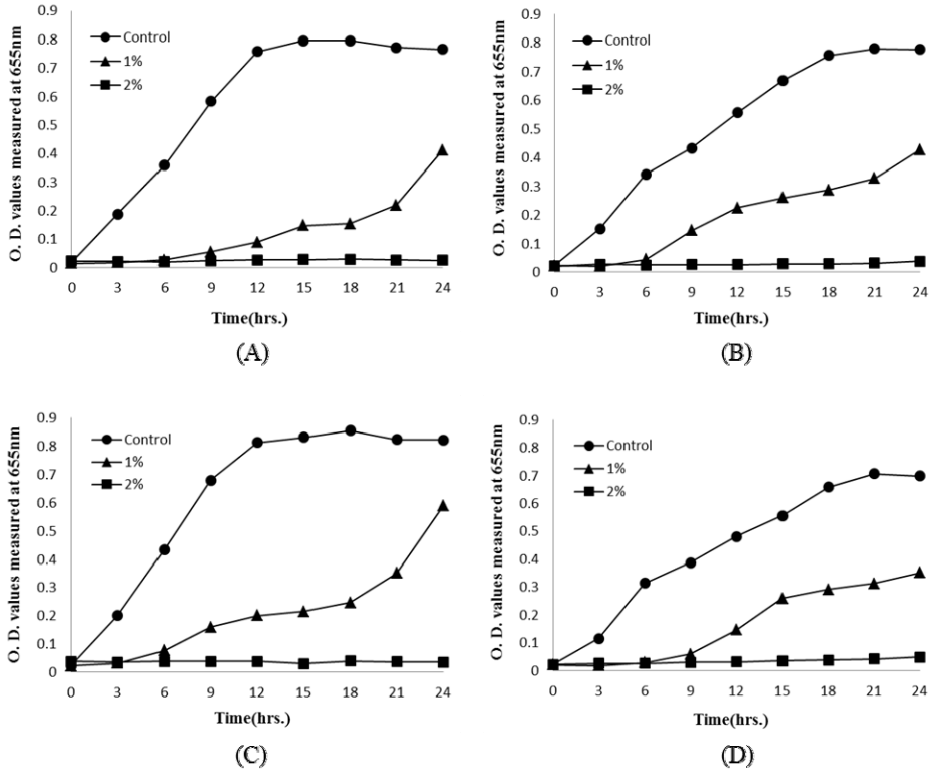


Fig. 2. Antibacterial activity against pathogenic bacteria using the supernatant cultured for 24 hours of *L. bulgaricus* SP5.

A : *E. coli* 11234, B : *S. enteritidis* 3313, C : *S. enteritidis* 12021, D : *S. typhimurium* 40253.

## 2. 전기영동과 Tricine-SDS-PAGE에 의한 항균물질 검출

*L. bulgaricus*로부터 얻어진 배양액의 항균활성이 박테리옌에 의한 것인지를 확인하기 위하여 상정액을 5,000 Da 이상과 이하로 분리하여 전기영동한 두 시료의 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3-A에서 보는 바와 같이 5,000 Da 이상의 시료에서는 분자량 45 kDa 부근에서 단백질들이 검출되었으나, 반면에 5,000 Da 이하의 시료에서는 작은 분자량에서 단백질들이 확인되었다.

한편, Daba 등(1991)에 의하면 미생물에 의한 박테리옌 분비는 배양 정지기에 많이 분비된다는 연구결과에 따라, Tricine-SDS-PAGE에 의한 항균물질 검출 실험은 배양 24, 48,

그리고 76시간 후 배양액으로부터 얻은 상징액으로부터 수행하였다. 상징액을 Tricine-SDS-PAGE 후 겔(gel)로부터 항균활성을 측정된 결과 항균밴드는 모든 시간대와 분자량에서 확인되지 않았다(data not shown). 따라서 Tricine-SDS-PAGE 후 겔(gel)로부터 항균활성 실험은 대상 미생물에 대한 다양한 검토가 필요하다고 사료된다. 그 이유에 대해서 Ray (1986, 1992)의 연구그룹의 연구 결과를 살펴볼 필요가 있다. 그들은 유산균이 분비하는 박테리오파지는 Gram 음성균에 대해서 항균효과가 없다고 하였는데, 그 이유로는 Gram 양성균과 세포벽의 구조가 다르기 때문이라고 하였다. 즉 외막이 존재하는 Gram 음성균은 유산균이 생산하는 박테리오파지가 proton motive force를 유발하지 못하기 때문에 항균활성을 나타낼 수 없다고 하였다.

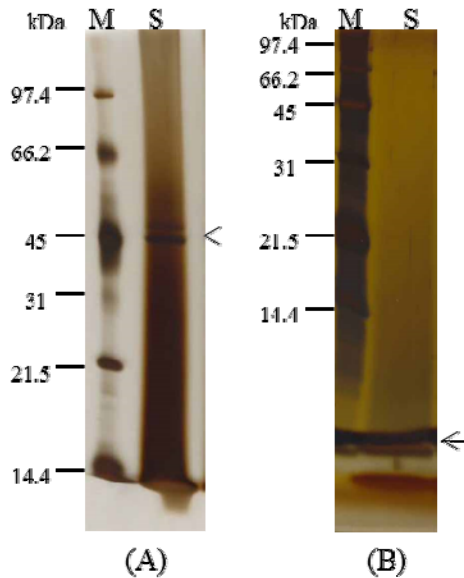


Fig. 3. Silver staining of the supernatant cultured for 24 hours of *L. bulgaricus* SP5.

A: protein > 5,000 Da (10% gel), B: protein < 5,000 Da (15% gel), M: low molecular weight marker, S: supernatant.

### 3. pH 안정성

*L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액의 항균물질이 pH에 의한 안정성 여부를 확인하기 위하여, 상징액을 다양한 pH로 조정하여 병원성 균에 대한 항균활성 여부를 측정하였다. 즉, *L. bulgaricus*의 배양이 끝난 직후, 얻어진 상징액의 pH는 4.6을 나타내었다. 그리고 상징액의 pH를 1 N NaOH 용액으로 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 조정하여 병원성 균에 대한 항균활성을 확인하였다. Fig. 4에서처럼 *L. bulgaricus*의 24시간 배양 후 얻어진 배양액을 각각 pH를 조



절한 후, 병원성균에 대한 항균활성을 측정한 결과, pH 4.6 (control)에서 *E. coli* 11234은 배양 6 hr 그리고 12 hr까지 성장이 현저히 억제되는 것을 확인하였으나, pH를 중성으로 조정 시 병원성 균의 성장에 대한 항균활성이 현저히 낮았다. 특히 pH 8에서 억제효과가 가장 낮았으며, pH 9는 pH 6과 같이 pH 8보다는 낮은 성장을 보여주었다(Fig. 4-A). 한편, *Salmonella* 균들은 pH 4.6 (control)에서는 완전한 항균활성을 나타내었으나, pH 7에서 높은 성장을 나타내었다(Fig. 4, B-D). 그리고 pH 8이상의 범위에서는 생육이 약간 저하되었다. 따라서 *L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액은 산성 pH와 알칼리성 pH범위에서 항균활성을 나타내었고, 중성 pH 범위에서는 항균활성이 매우 낮은 수준을 나타내었다. 이러한 결과는 Anderson과 Marshall (1990)이 유기산이 육의 표면 미생물에 대한 억제효과를 나타내기 위해서는 pH 5.5 이하가 되어야 한다는 결과와 일치하였다. 결과적으로 병원성미생물에 대한 *L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액의 항균물질은 pH 변화가 항균활성에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

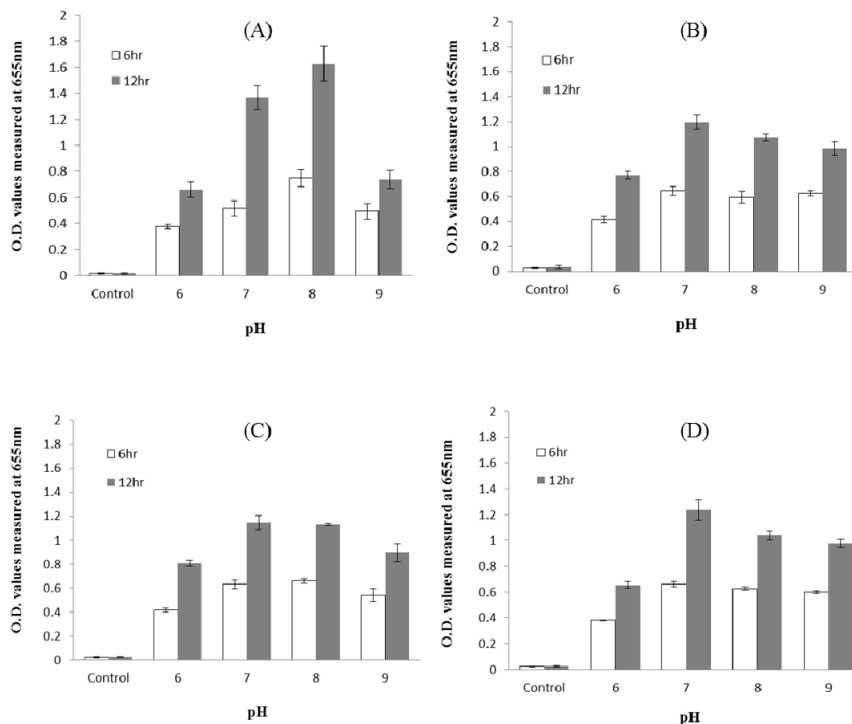


Fig. 4. Antibacterial activity against pathogenic bacteria for pH exchanges of the supernatant cultured for 24 hours of *L. bulgaricus* SP5.

A: *E. coli* 11234, B: *S. enteritidis* 3313, C: *S. enteritidis* 12021, D: *S. typhimurium* 40253.

Control: pH 4.6.

4. 열 안정성

*L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액의 병원성 균에 대한 항균물질이 열에 대해서 안정성을 가지는지를 확인하기 위하여, 다양한 온도와 시간대에서 열처리하였다. 상징액을 각각 대조구(non-heated), 65°C/30 min, 75°C/5 min, 75°C/10 min, 75°C/15 min, 85°C/5 min, 85°C/10 min, 그리고 120°C/20 min 열처리 후, 병원성 균에 대한 항균활성은 Fig. 5에 나타내었다. *E. coli* 11234에 대해서 항균활성을 측정한 결과, 모든 열 처리구는 열처리하지 않은 대조구와 유사한 항균활성을 보여주었다(Fig. 5-A). 이와 같은 결과는 *S. enteritidis* 3313 (Fig. 5-B), *S. enteritidis* 12021 (Fig. 5-C), 그리고 *S. typhimurium* 40253 (Fig. 5-D)에서도 유사한 항균활성을 보여주었다. 따라서 *L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액의 항균물질은 열에 대하여 매우 안정하였다.

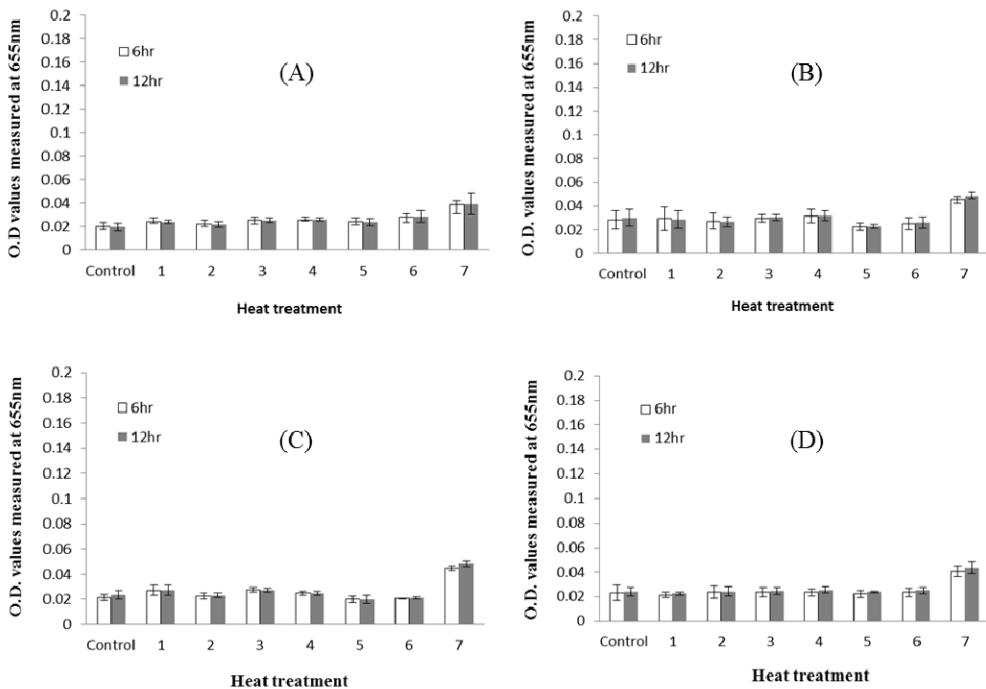
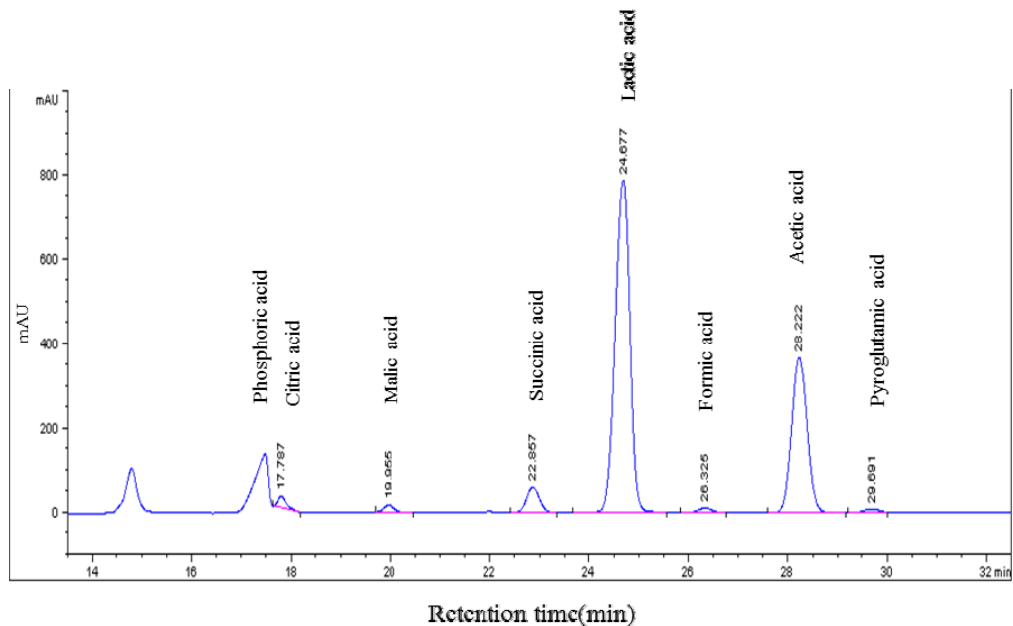


Fig. 5. Antibacterial activity against pathogenic bacteria in the heat treatment of the supernatant cultured for 24 hours of *L. bulgaricus* SP5.

A : *E. coli* 11234, B : *S. enteritidis* 3313, C : *S. enteritidis* 12021, D : *S. typhimurium* 40253. Heat treatment conditions ; 1 : 65°C/30 min, 2 : 75°C/5 min, 3 : 75°C/10 min, 4 : 75°C/15 min, 5 : 85°C/5 min, 6 : 85°C/10 min, 7 : 120°C/20 min.

## 5. HPLC를 이용한 유기산 분석

병원성 미생물의 성장에 영향을 미치는 *L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액의 항균물질 중 유기산들의 분석을 수행하였다. 분석된 유기산들은 Fig. 6에 나타내었다. 각각의 검출된 유기산은 phosphoric acid (1192.9 mg/L), citric acid (197.7 mg/L), malic acid (154.9 mg/L), succinic acid (574.9 mg/L), lactic acid (13849.7 mg/L), formic acid (85.1 mg/L), acetic acid (4312.5 mg/L), pyroglutamic acid (239.5 mg/L)로 확인되었다. 유기산의 함량은 lactic > acetic > phosphoric > succinic > pyroglutamic > citric > malic > formic acid 순으로 나타내었다.



Contents of acid (mg/L)							
Phosphoric	Citric	Malic	Succinic	Lactic	Formic	Acetic	Pyroglutamic
1192.9	197.7	154.9	574.9	13849.7	85.1	4312.5	239.5

Fig. 6. Chromatogram and content of organic acids on the supernatant of *L. bulgaricus* SP5 at 440 nm.

유기산의 병원성 미생물에 대한 항균활성 연구는 여러 문헌들이 증명하고 있다. Gill과 Newton (1982)의 보고에 의하면 lactic acid는 낮은 pH에 의하여 미생물의 생육이 억제되고, acetic acid는 해리되지 않은 분자의 독성에 의해서 미생물의 생육이 억제된다고 하였다. Jung과 Lee (1991)는 저온저장 우유에 유기산(acetic, citric, 그리고 lactic acids)을 각각 처리

하면 부패미생물수가 억제되고, 부패취가 감소하였다고 보고하였다. 그리고 Jang 등(2003)은 유산균 *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. lactics*, *L. acidophilus*의 배양액으로부터 얻어진 상징액을 *Arcobacter butzleri*에 처리한 결과, *L. bulgaricus*와 *L. casei*가 항균활성이 가장 높은 반면, *L. lactics*는 생육억제효과가 없었다고 보고하였다. 이러한 결과는 Ray (1986)가 보고한 유기산에 의한 미생물의 억제효과는 산의 종류, 농도, 온도와 미생물의 종류에 따라 다르다는 결과와 일치한다.

최근 유용한 미생물의 항균력을 이용하여 유해한 미생물의 증식을 억제하는 bio-preservation이 주목 받고 있다. Bio-preservation은 인류가 오랫동안 식품으로 섭취하여 온 동물, 식물, 미생물 등의 생물이 발현하는 천연의 항균능력을 이용하여 유해미생물의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Deegan et al., 2006). 이 방법은 식품의 가열 또는 가압 등의 물리적 처리방법과 첨가물첨가 등의 화학적 처리방법 대용의 생물학적 방법을 말한다. 가축과 사람에게 있어서 많은 미생물이 기생 또는 공존하고 있고, 특히 유산균은 구강, 소화관, 질 등에 유용하게 이용되고 있다. 가축에 있어서 소화관의 유산균의 존재는 유해한 미생물을 억제하는 역할을 가지고 있다. 특히 포유기와 어린 새끼에 있어서 유산균과 유산균이 분비하는 항균물질의 역할이 매우 중요하다고 할 수 있다. 가축의 먹이가 되는 목초와 사료작물에 유산균의 발효, 또는 첨가는 충분히 Bio-preservation의 역할을 할 것으로 기대된다. 본 실험에서 이용된 *L. bulgaricus* SP5로부터 얻어진 상징액은 병원성 균인 *E. coli*와 *Salmonella*에 강한 항균활성을 보여주었다. 그 이유는 배양액 속에 함유된 다양한 유기산에 의한 결과로 사료된다. 따라서 이 균주를 이용한 사료내 첨가는 각종 바이러스와 병원균에 내성을 가질 것으로 기대되며, 또한 우유에 접종시켜 발효유를 제조하여 어린 송아지 또는 자돈에 투여할 경우, 발육개량, 면역력 증강 및 설사치료 등의 효과가 있을 것으로 기대된다.

#### IV. 적 요

본 연구는 *Lactobacillus bulgaricus* SP5 분비물의 항균물질 탐색과 특성을 조사하고 병원성 미생물에 대한 억제효과를 얻고자 실시하였다. *L. bulgaricus*로부터 얻어진 상징액에 대한 항균활성은 시험에 이용된 모든 병원성 미생물인 *E. coli* 11234, *Salmonella enteritidis* 3313, *S. enteritidis* 12021, 그리고 *S. typhimurium* 40253에 대해서 항균활성을 가지는 것으로 나타났다. 상징액 중의 항균활성 성분을 확인하기 위하여 다양한 pH 조정과 열처리 후, 병원성 미생물에 대한 항균활성을 측정하였다. 상징액의 열처리 후, 병원성미생물에 대한 항균활성은 비열처리와 같은 항균활성을 나타내었으나, 상징액의 pH를 4.6에서 중성이상으로의 변화는 항균활성이 현저히 감소하였다. 따라서 상징액의 항균활성은 pH 변화에 대해서 불안정하였으나, 열에 대해서는 매우 안정한 것으로 밝혀졌다. 이상의 결과를 통해 상징액

의 병원성균에 대한 항균작용은 박테리오신 같은 peptide 보다는 lactic, acetic, phosphoric, succinic, pyroglutamic, citric, malic, 그리고 formic acid 등 다양한 유기산의 작용에 의한 것으로 확인되었다.

[Submitted, April. 25, 2016; Revised, June. 3, 2016; Accepted, July. 11, 2016]

## References

1. Anderson, M. E. and R. T. Marshall. 1990. Reducing microbial populations on beef tissues: Concentration and temperature of an acid mixture. *J. Food Sci.* 55: 903-905.
2. Bhunia, A. K., M. C. Johnson, and B. Ray. 1987. Direct detection and antimicrobial of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2: 319-322.
3. Daba, H. S., J. F. Pandian, R. E. Gosselin, J. H. Simard, and C. Lacroix. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3450-3455.
4. Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill, and P. Ross. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.
5. Drider, D., G. Fimland, Y. Héchar, L. M. McMullen, and H. Prévost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564-582.
6. Fukushima Y., H. Kawta, A. Hara, and T. Mitsuoka. 1998. Effect of a probiotic in healthy children. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 39-44.
7. Gill, C. O. and K. G. Newton. 1982. Effect of lactic acid concentration on growth on meat of gram-negative psychrotrophs from a meatworks. *App. Environ. Microbiol.* 43: 284-288.
8. Homma, N. 1998. Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobact. Microfl.* 7: 35-43.
9. Jang, J. S., Y. D. Lee, and J. H. Park. 2003. Growth inhibition of newly emerging *Arcobacter butzleri* by organic acids and trisodium phosphate. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 1169-1173.
10. Jung, H. M. and H. H. Lee. 1991. Effects of organic acids on the storability of chilled beef. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 379-387
11. Kim, S. Y., J. D. Kim, J.S. Son, S.K. Lee, K. J. Park, and M. S. Park., 2011. Biochemical

- and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 43: 446-452.
12. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 227: 680-686.
  13. Lee, J. L., C. S. Huh, and Y. J. Baek. 1999. Utilization of fermented milk and its health promotion. Korean Dairy Techno. 17: 58-71.
  14. Nakae, T. 1986. Utilization of lactic acid bacteria in animal industry: recent outlook, Jpn. J. Zootech. Sci. 57: 279-287.
  15. Peres, C. M., C. Peres, Hernández-Mendoza, A., and F. X. Malcata. 2012. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria-with an emphasis on table olives. Trends in Food Sci. Technol. 26: 31-42.
  16. Pfeiler, E. A. and T. R. Klaenhammer. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. Trends in Microbiology, 15: 546-553.
  17. Ray, B. 1986. Impact of bacterial injury and repair in food microbiology: Its past, present and future. J. Food Prot. 49: 651-670
  18. Ray, B. 1992. Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as a food biopreservative. In: Food biopreservatives of microbial origin. Ray, B. and Daeschel, M. (Eds) CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p. 207.
  19. SAS. SAS User's Guide. 2001. Statistical Analysis System Institute. Cary, NC, USA.
  20. Yoshitaka, H., M. Shinji, Y. Yoshihiro, Y. Yasunobu, and T. Tomomi. 2006. Daily intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 augments acquired immunity in healthy adults. J. Nutr. 136: 3069-3073.