

항암활성을 지닌 *Streptococcus pyogenes*의 적정 살균조건에 관한 연구

(제 1 보) 사멸속도에 미치는 열 처리의 영향

유주현, 김성욱, 배종찬*, 변유량
연세대학교 공과대학 식품공학과
*제일제당주식회사 식품연구소
(1981년 11월 10일 수리)

Studies on the Optimal Conditions of Sterilization for *Streptococcus pyogenes*

(Part I) Effect of Heat Treatment on Typical Death Rate

Ju Hyun Yu, Sung Uk Kim, Jong Chan Bae*, Yu Ryang Pyun

Department of Food Engineering, Yon Sei University

*Cheil Sugar Co., Ltd.

(Received November 10, 1981)

Abstract

Studies were made on the optimal conditions of sterilization for *Streptococcus pyogenes* treated with heat.

The results were as follows:

The optimal temperature on growth of *Streptococcus pyogenes* was 37°C and mean generation time was 20 minutes in the logarithmic growth phase.

The suspension of *Streptococcus pyogenes*, adjusted to pH 6-9 and treated with heat at 50°C, showed logarithmic death rate.

Specific death rate constant(k) values at pH 6-9 were 0.1448, 0.1194, 0.1273 and 0.1707 minute⁻¹, respectively.

서 론

성홍열, 단독, 패혈증의 원인균인 *Streptococcus pyogenes*가 β -hemolytic 활성과 항암활성을 갖고 있다는 사실은 오래전부터 보고되어 왔으며⁽¹⁻⁶⁾ Okamoto⁽⁷⁾는 *in vitro*에서 RNA를 첨가한 배지에 Streptolysin S를 생산하는 *Streptococcus pyogenes*를 배양시키면 Streptolysin S의 형성능력이 현저하게 증대된다는 것을 발견하였다. 그 후 Bernheimer⁽⁸⁾에 의하여 합성배지에 RNA를 첨가했을 때

도 Streptolysin S 형성능력이 증대된다는 것이 알려졌다. Koshimura 등⁽⁹⁾은 Ehrlich carcinoma 세포에 살아있는 *Streptococcus pyogenes*를 작용시키면 carcinoma 세포의 侵襲能은 소실되지만, 열에 의해 완전히 사멸된 *Streptococcus pyogenes*는 항암 효과가 없다는 것을 보고하였다.

한편, Okamoto 등⁽¹⁰⁾은 RNA를 첨가하여 *Streptococcus pyogenes*를 배양하고 penicillin으로 전처리하면 Ehrlich carcinoma 세포의 侵襲能이 저해된다는 것을 보고하였다. 또한 Okamoto 등⁽¹¹⁾은 Stre-

*ptococcus pyogenes*를 Bernheimer's basal medium(BBM)에 현탁시키면 45℃에서 30분동안 가열해도 Streptolysin S의 형성능력이 소실되지 않고 열처리를 받지 않은 Streptococci보다도 Streptolysin S형성 능력이 증가되며, penicillin을 함유한 BBM 내에서 Streptococci를 열 처리하면 Streptolysin S의 형성 능력은 완전히 소실되나 동물에 대한 독성이 상당히 감소된다는 것을 보고하였다.

이와 같이 *Streptococcus pyogenes*의 생균체가 항종양 활성을 가지고 있다는 사실은 이미 알려져 있으나, 균체내 항종양성 물질은 물리·화학적 조건에 따라 매우 불안정하고⁽¹²⁾균 자체가 병원균이기 때문에 생균 상태로 체내에 접종하면 체내에서 질병이 유발되기 쉬우며, 이 균을 강한 조건에서 살균하면 균은 완전히 사멸되나 항종양 활성은 失活되므로 활성이 그대로 유지되고 발병이 되지 않는 농도에서 접종하는 것이 효과적이라 생각된다.

따라서 본 연구에서는 實驗動物에 대해 항암효과가 있는 *Streptococcus pyogenes*의 적정 살균 조건을 선정하기 위하여 항암효과 동물실험의 선행 연구로서 균의 생존에 미치는 온도의 영향에 대하여 검토하여 보았다.

실험재료 및 방법

항암활성 측정법

6 주동안 생육시킨 ICR Mouse (20~25g) 6 마리를 1 개 실험군으로 하여 Ehrlich 암 세포 (1×10^5 /ml)를 복강내에 주입시킨 후 Sakurai방법⁽⁶⁾에 의하여 배양 처리한 세포를 24시간마다 0.2mg/ml씩 4 일간 계속 주사한 후 생존율에 대한 경시적 변화를 대조군과의 생존일수 비교로 항암효과를 검토하였다.

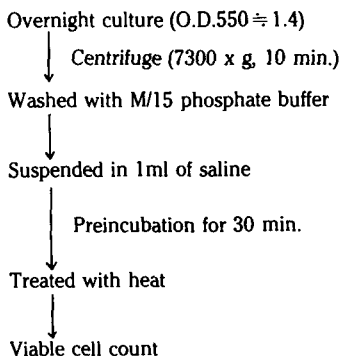


Fig. 1. Procedure for Heat Treatment

선정 균주의 보존과 균체의 조제

항암효과가 있는 균주를 선정하여 Brain heart-infusion (Difco)배지에 이식하여 37℃에서 24시간 배양한 후 4℃ 냉장고에 보존하면서 실험에 사용하였으며, 보존 균주를 Okawa등⁽¹³⁾의 방법에 의하여 배양하고 배양액은 Fig. 1의 방법에 따라 7,300 x g에서 10분간 원심분리한 균체를 0.9% 생리식염수로 현탁하여 균수를 $2 \sim 5 \times 10^8$ /ml되게 조절하였다.

완충액의 조제

M/15 Sodium phosphate (dibasic)와 M/15 Potassium phosphate (Monobasic)를 사용하여 pH를 6~9로 조절하였다.

열 처리

새로운 배지 1.9ml에 균체 0.1ml를 희석한 후 vortex mixer로 혼합시켜 각 온도에서 열처리를 행하고 10분 간격으로 생존율을 검토하였다.

생균수 측정

균체액을 적당히 희석한 후 0.1ml를 취하여 spread plate method⁽¹⁴⁻¹⁵⁾를 이용하여 생균수를 구하였다.

실험결과 및 고찰

항암제 생산균의 선정과 배양조건

항암성 균주의 선정 : 항암활성이 높은 균주를 선정하기 위하여 연세대학교 식품공학과 보존균 *Streptococcus pyogenes*중 비교적 Ehrlich 암세포에 대한 항암활성이 높은 2 균주를 배양하여 Sakurai방법⁽⁶⁾으로 처리한 균체를 Ehrlich 암세포를 접종한 mouse에 매일 1회씩 3회 접종하여 경시적으로 생존 일수를 검토하여 Fig. 2에 나타내었다.

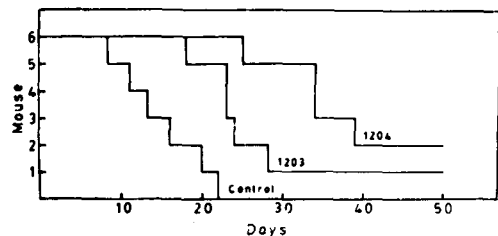


Fig. 2. Diagram of Lethal Periods of Mouse Injected Ehrlich Cell

Control : Not treated *Streptococcus pyogenes*

1203

1204 : Treated *Streptococcus pyogenes*

그림에 나타낸 바와 같이 Sakurai방법⁽⁶⁾으로 처리한 균을 접종하지 않은 mouse균은 22일이면 모두 죽었으나 *Streptococcus pyogenes* 1203과 1204를 접종한 mouse균은 일부의 mouse가 생존하였고 그 중에서도 1204의 항암효과가 좋았으므로 이 균주를 사용하여 연구하였다.

생육에 미치는 온도의 영향: *Streptococcus pyogenes*를 온도를 달리하여 배양하였을 때의 생육 곡선을 Fig. 3에 나타내었다. 생육의 최적 온도는 37°C이었으며 50°C와 60°C에서는 균의 생육이 저해되었다.

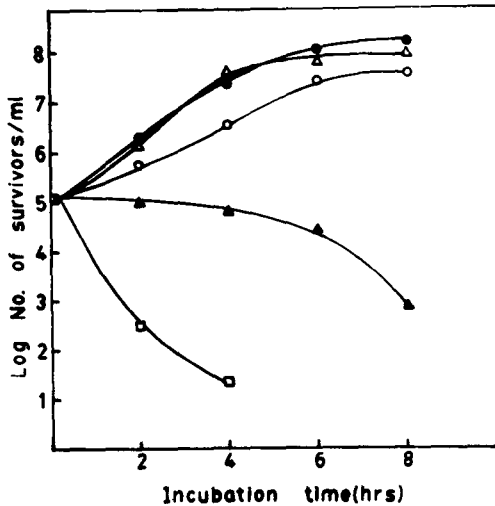


Fig. 3. Effect of Temperature on Growth

- : 37°C ▲-▲: 50°C
- △-△: 42°C □-□: 60°C
- : 30°C

적정 살균조건의 선정

열 처리와 생존율과의 관계: 일반적으로 미생물의 생육 속도와 사멸 속도는 배지의 pH, 온도등의 환경조건에 따라 달라지므로 *Streptococcus pyogenes* 생존균의 현탁액을 각 pH로 조절한 다음 이 현탁액을 각 온도에서 처리하여 생존율과 처리시간과의 관계를 검토하였다.

균의 현탁액을 50°C에서 처리하였을 경우 Fig. 4와 같이 처리시간에 따라 생존율이 대수적으로 감소하였다. 균의 사멸이 대수적으로 일어나는 경우 임의시간에서의 살균 속도는 그때의 생존수에 비해하므로 이것을 수식으로 표시하면 다음과 같다.⁽¹⁶⁾

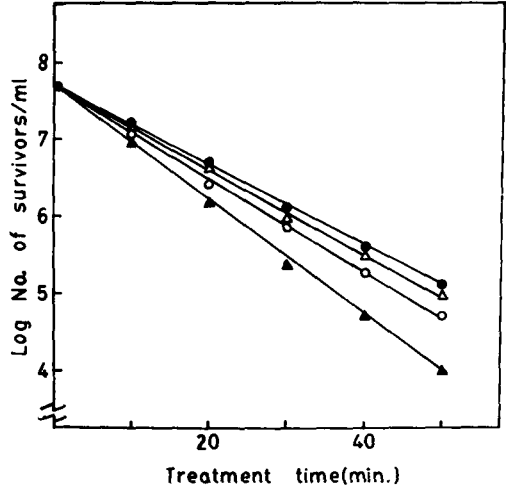


Fig. 4. Thermal Death Rate Curves at 50°C

- : pH 7 △-△: pH 8
- : pH 6 ▲-▲: pH 9

$$t = \frac{1}{k} \ln \frac{a}{b}$$

- a : 가열전의 생존수
- b : 시간 t에서의 잔존 생존수
- k : 사멸속도상수

윗 식에서 k를 구하면

$$k = 2.303 \frac{1}{t} (\log a - \log b)$$

이때 처리한 균 현탁액의 pH에 따른 k 값은 pH 6, 7, 8, 9일 때 각각 0.1448, 0.1194, 0.1273, 0.1707 (min.⁻¹)이었다. (Fig. 4).

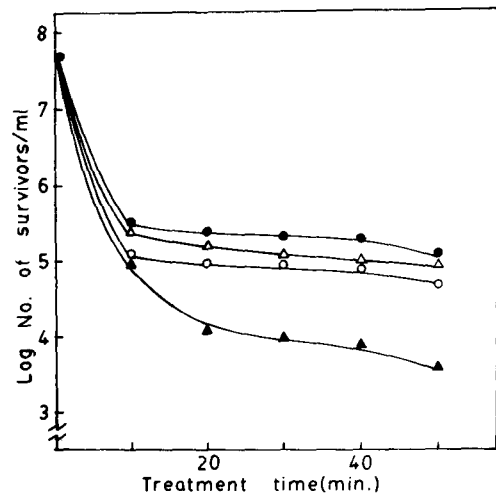


Fig. 5. Thermal Death Rate Curves at 60°C

- : pH 7 △-△: pH 8
- : pH 6 ▲-▲: pH 9

60°C에서 가열 처리하여 생존균을 검토한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 50°C로 처리한 경우와는 달리 어느 pH에서도 사멸율이 직선적으로 나타나지 않았고, 생존균 수도 급격히 감소되어 10분 처리시 생존율은 1% 미만이었으며 그 후의 생존균 수는 완만하게 감소하였다.

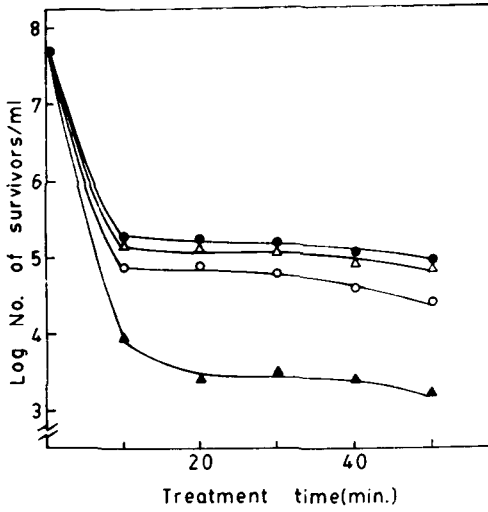


Fig. 6. Thermal Death Rate Curves at 70°C

●-● : pH 7 △-△ : pH 8
○-○ : pH 6 ▲-▲ : pH 9

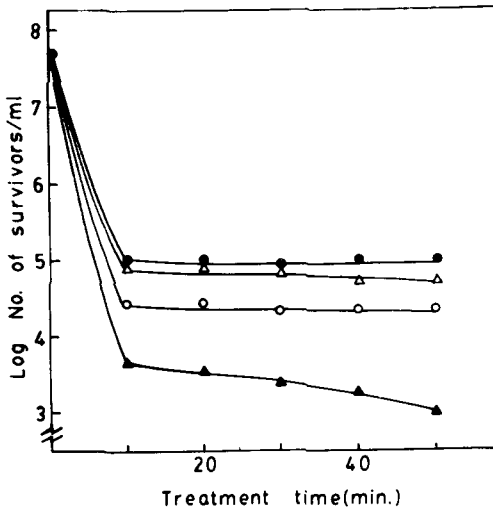


Fig. 7. Thermal Death Rate Curves at 80°C

●-● : pH 7 △-△ : pH 8
○-○ : pH 6 ▲-▲ : pH 9

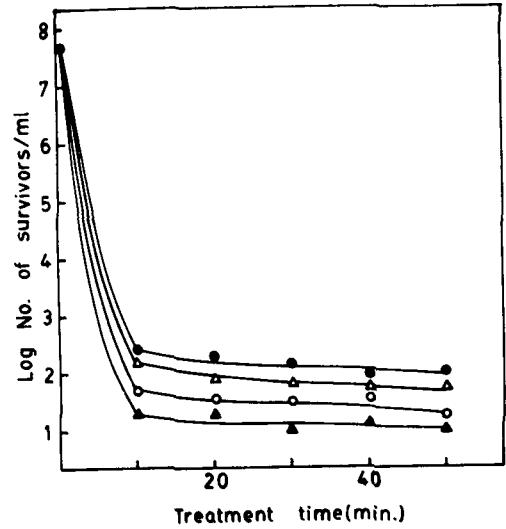


Fig. 8. Thermal Death Rate Curves at 90°C

●-● : pH 7 △-△ : pH 8
○-○ : pH 6 ▲-▲ : pH 9

균 현탁액을 70, 80, 90°C로 처리한 경우에도 Fig. 6, 7, 8에 나타낸 바와 같이 60°C에서처럼 생존균 수는 10분만에 급격히 감소하여 1%미만이었으며, 100°C에서 10분 처리할 경우 생존균은 없었다.

또한 사멸에 미치는 온도와 pH영향을 알아보기

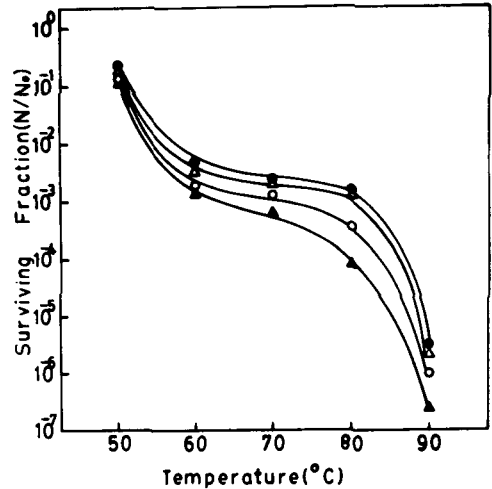


Fig. 9. Effect of Temperature on Typical Death Rate after Heat Treatment for 10 min.

●-● : pH 7 △-△ : pH 8
○-○ : pH 6 ▲-▲ : pH 9

위하여 균 현탁액을 각각 pH별로 조절하여 각 온도에서 10분간 처리한 후 생존율과 온도, pH의 관계를 Fig. 9, Fig. 10에 나타내었다.

그림에서 보는 바와 같이 처리 온도 50°C 이상에서는 온도가 높아질수록 사멸이 촉진되었으며, 균 현탁액의 pH에 따라 생존율에 커다란 차이가 있었

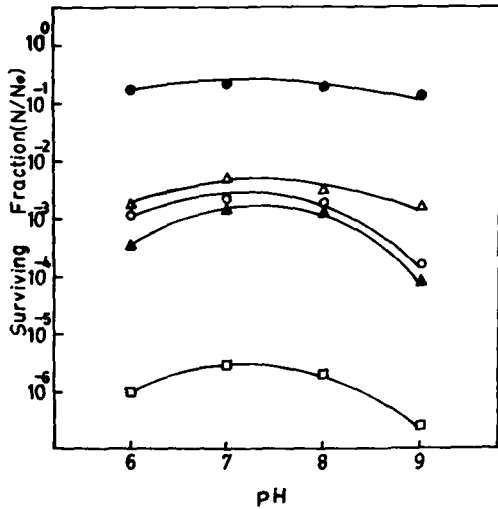


Fig. 10. Effect of Initial pH on Typical Death Rate after Heat Treatment for 10 min.

●-●: 50°C ▲-▲: 80°C
 △-△: 60°C □-□: 90°C
 ○-○: 70°C

으나, 어느 처리 온도에서나 생육 최적 pH인 7.0에서 안정성이 가장 높았고 산성이나 알칼리부근에서는 생존률이 낮았다.

이처럼 생존균 수는 시간, 온도 및 pH의 영향을 받았으며 처리 조건이 같은 경우, 각 세포가 노출되는 온도가 높을수록 사멸이 더 급속하게 일어났다.

이와같이 미생물을 가열 처리할 경우 사멸 속도는 대수적 사멸을 따르는 것이 일반적이나, 미생물의 종류나 생육환경에 따라 Sigmoid 형태를 나타낸다는 연구 결과가 Alderton등⁽¹⁷⁾에 의하여 보고되어져 있다.

세균의 사멸 속도가 대수 또는 비대수적 형태를 나타내는 이유에 대하여 Rahn⁽¹⁸⁾은 대수적 사멸을 나타내는 균은 어떤 단일 분자의 파괴 또는 불활성화에 의하여 사멸된다고 보고하고 있는 반면, Stumbo⁽¹⁹⁾는 이러한 대수적 과정을 따르지 않는 경우의 영향 인자로서 내열성이 다른 집단의 혼합, 과상을

이루고 있는 세포군의 존재, 가열 처리 중의 세포 응집, 가열 중의 解凝集, 가열처리후 배양에 사용하는 배지의 물리·화학적 성질에 영향을 받는다고 보고하고 있다.

한편, 가열에 의한 세균의 사멸 기작에 대하여 많은 연구 결과가 보고되어져 있지만⁽²⁰⁻²³⁾ 아직까지 정확한 기작은 밝혀져 있지 않다.

일반적으로 미생물은 외부로부터 지방과 단백질로 구성된 세포막을 투과하여 영양분을 섭취하고, 균체내에 있는 각종 효소 작용에 의하여 대사나 균체 성분을 생합성하면서 증식한다. 이러한 균체내 고분자 물질들은 가열 처리에 의하여 변성되고 생리활성이 있는 고분자물질은 그 활성이 저하된다는 결과가 보고되어져 있다.⁽²⁴⁾

본 실험 결과에 나타난 바와 같이 *Streptococcus pyogenes*의 균체는 60°C에서 처리하였을 때 생존균수가 급격히 감소되었으나 일정시간 지난후부터 사멸율이 완만한 것은 가열처리하는 동안 균괴(菌塊)를 형성하였거나 또는 균체내 고분자 물질들이 변성되어 일부의 활성이 저하되고 일부는 열 안정성이 있는 상태로 변성되어 사멸이 늦어진다고 생각된다.

그러나 100°C에서는 모든 고분자 물질의 구조가 급격히 변성되고 활성이 완전히 상실되어 10분 처리 후에는 생존균이 나타나지 않는 것으로 추정된다.

요 약

성홍열, 단독, 패혈증의 원인균인 *Streptococcus pyogenes*중에서 항암효과가 좋은 균주를 선정하여 항암제 생산을 위한 기초실험으로서 열 처리에 따른 적정 살균조건을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

*Streptococcus pyogenes*의 생육 최적온도는 37°C이었고 대수기에서 평균 세대시간은 20분이었으며, 50°C 이상으로 열 처리하면 생존균이 감소하였다.

균 현탁액을 pH 6, 7, 8, 9로 조절한 후, 50°C에서 열 처리하였을 때는 대수적으로 사멸하였고, 사멸속도상수 k값은 각각 0.1448, 0.1194, 0.1273, 0.1707(min.⁻¹)이었으나 60, 70, 80, 90°C로 열 처리하면 10분만에 99% 이상이 사멸되었으며 100°C에서는 완전히 사멸되었다.

Reference

- 1) Stanier, R. Y., E. A. Adelberg and J. L. Ingraham : The microbial world, Prentice Hall, P. 813 (1976).
- 2) 이종훈 : 병원 미생물학 수문사, P. 248 (1971).
- 3) 石田名香雄, 日沼頼夫 : 病原微生物學, 金原社, P. 116 (1955).
- 4) Ginsburg, I. and N. Grosswicz : *J. Path. Bact.*, 80, 111 (1960).
- 5) Havas, H. F., A. J. Donnelly and A. V. Porreca : *Cancer Res.*, 23, 700 (1963).
- 6) Sakurai, Y. : *Cancer Chemother. Rep.*, 56, 9 (1972).
- 7) Okamoto, H. : *Japan. J. Med. Sci.*, IV. *Pharmacol.*, 12, 167 (1940).
- 8) Bernheimer, A. W. : *J. Exp. Med.*, 90, 373 (1949).
- 9) Koshimura, S., K., Murasawa E. Nagasawa, M., Ueda, Y. Bando and R. Hirata : *Japan. J. Exp. Med.*, 25, 93 (1955).
- 10) Okamoto, H. and S. Shoin : *Japan. J. Exp. Med.* 35 (4), 249 (1965).
- 11) Okamoto, H., S. Shoin and M. Minami : *Japan. J. Exp. Med.*, 36 (2), 161 (1966).
- 12) 岡本繁 et al : 일본특허공보 昭48-43841.
- 13) 小川春樹 et al : 일본특허공보 昭49-6096.
- 14) Norris, J. R. and D. W. Ribbons : *Methods in Microbiology*, Vol. 1, Academic Press, P.615 (1969).
- 15) 유주현, 양응, 양한철, 정동효 : 식품공학 실험서 II, 탐구당, P. 179 (1975).
- 16) Wang, D. I., C. L. Cooney and A. L. Demain : *Fermentation and Enzyme Technology*, Wiley Interscience, P. 139 (1979).
- 17) Alderton, J. and N. Snell : *Appl. Microbiol.*, 19, 565 (1970).
- 18) Rahn, O. : *Bact. Rev.*, 9, 1 (1945).
- 19) Stumbo, O. R. : *Thermobacteriology in food processing*, Academic Press, P. 60 (1965).
- 20) Edwards, O. F. and L. F. Rettger : *J. Bact.*, 34, 489 (1937).
- 21) Lawrence, N. L. : *J. Bact.* 70, 577 (1955).
- 22) Heden, C. and W. G. Wyckoff : *J. Bact.*, 58, 153 (1949).
- 23) Sugiyama, H. : *J. Bact.*, 62, 81 (1951).
- 24) 변유량, 문순옥, 유주현 : *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 6 (2), 65 (1978).