J. Fd Hyg. Safety 13(1), 1 - 5(1998)

우유내의 LP system의 생리기능 및 항균성에 관한연구

1. *Escherichia coli* O157:H7에 대한 항균효과

정충일† · 남은숙 · 김대원 · 전형일*

*건국대학교 동물자원 연구센터, *帶廣畜産大學*

Studies on the Biological Function and Antibacterial Effect of Lactoperoxidase System in Milk

1. Antibacterial Effect of Lactoperoxidase System Against *Escherichia coli* O157:H7.

Choong-Il Chung†, Eun-Sook Nam, Dae-Won Kim and Hyeng-Il Cheun*

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University, Seoul 143-701, Korea

**Lab. of Food Sci. & Technol. Obihiro University, Obihiro 〒080, Japan*

ABSTRACT—This study was carried out to measure the antibacterial effect of lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system (LP system) against *E. coli* O157:H7. When the initial inoculum levels (10^2, 10^4, 10^7 cfu/m*l*), concentration of LP (10 ppm, 20 ppm, 30 ppm), culture media (TSB-YE, UHT milk, raw milk) and storage temperatures (5°C, 10°C, 15°C) were set up differently for the experiment and the antibacterial effect was compared, the highest antibacterial effect of LP system was shown at 10^2 cfu/m*l* of initial inoculum level, 10 ppm of LP concentration and 5°C of incubation temperature.

Key words □ Lactoperoxidase system, *Escherichia coli* 0157:H7, Antibacterial effect

Peroxidases는 우유에 있는 자연적인 비면역체계의 일부분이고 침샘, 눈물샘과 같은 외 분비선에서 분비되거나 장내에서 분비되는 효소이다.[1,2] 우유에서 분비되는 peroxidase는 주로 젖산균의 반응을 억제하는 기능이 있으며, 유청단백질의 1%에 해당하는 양이 함유되어 있으며, 분자량이 약 78,000으로 80°C/3초간 가열시 불활성화된다.[3,4]

Lactoperoxidase(LP)는 독자적으로는 어떠한 항균성 작용을 가지고 있지 않지만 특이적인 co-factor가 존재하면 LP는 강한 방어체계를 구성한다. 이러한 co-factor에는 Hydrogen peroxide(H_2O_2)와 Thiocyanate(SCN^-)가 있다. LP와 co-factor와의 일련된 작용의 체계를 LP system(Lactoperoxidase-Thiocyanate-Hydrogen peroxide system)이라 한다. LP system의 첫번째 인자인 LP효소는 우유에서 Xanthine-oxidase다음으로 많이 나타난다. 우유 1 L 중에 LP의 함유량은 10～30 ppm 정도이다. LP가 가지고 있는 다양한 작용들은 Hydrogen 수용체 산화에 소비된 기질들의 종류에 따라 다르게 나타난다. LP는 낮은 pH 값에서 더욱 활력이 있다고 한다.[5]

†Author to whom correspondence should be addressed.

LP system의 두 번째 인자인 SCN^-은 동물의 조직과 분비선에 넓게 분포되어 있다.[6] Bovine milk의 SCN^-의 양은 1～10 ppm 정도 이지만, 체세포(Somatic cell)의 수가 많은 우유에서 보다 많은 함유량이 보고된 적도 있다.[7]

LP system의 세번째 인자인 H_2O_2는 세균이 없는 우유에서 천연적으로 나타나지 않는것이 일반적인 견해이다.[8] 그러나 *Lactobacilli, Lactococci, Streptococci*는 LP systemdl 활성화되는 호기적인 조건하에서 충분한 H_2O_2를 생성한다.[9,10]

Lactoperoxidase에 의해서 촉매된 SCN^-의 산화는 생명이 짧은 중간산화물 $OSCN^-$을 생성하고,[11] 이러한 중간산화물은 세포체계의 기능을 변형시키며 세포의 원형질막의 전체적인 당의 이동과 아미노산의 전환체계를 역전시켜 hexokinase, aldolase와 같은 해당효소의 활성을 억제한다. 그 결과로 세포의 원형질막은 미생물이 LP system에 접하는즉시 K^+이온, 아미노산, peptide 등이 배지내로 배출되기 때문에 구조적으로 완전하게 해를 입거나 변형된다.[12]

또한, Farrage 등[13]의 연구에서는 원유에서의 *Y. entrocolitica*와 *E. coli* 0157:H7이 억제가 된다고 보고하였다. 또한 LP system가 원유내의 저온성균의 성장을 억제시켜, 저장

시간을 연장시킬수 있고 더불어 다른 식품의 shelf-life도 연장시킨다고 보고하였다.

본 연구의 목적은 천연의 항균물질로 알려진 LP system이 여러 가지 조건(배지, 온도, 초기접종수준, lactoperoxidase의 농도)에서 병원균인 *E. coli* O157:H7에 대한 항균효과를 조사하는 것이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

LP system의 항균효과를 조사하기 위한 균주는 건국대학교 낙농학과에 보존중인 *E. coliO* 157:H7을 사용하였고, 실험에 들어가기전에 Tryptic Soy Agar(TSA) 사면배지에 저장되어 있는 원균주에서 1백금이 취하여 10 m*l*의 Tryptic Soy Broth(TSB)에 접종하여 30°C로 24시간 1차 증균시킨 후, 배양액의 0.1 m*l*를 TSB에 접종하여 30°C로 24시간 동안 2차 증균하여 최종 균수를 10^9 cfu/m*l*으로 하여 사용하였다.

LP system의 준비

LP system은 Lactoperoxidase, Sodium thiocyanate와 Hydrogen peroxide로 구성되었으며, Lactoperoxidase는 (Sigma Chemical Co. U.S.A)로부터 구입하여 사용전에 0.45 um filter로 여과멸균하여 사용하였으며, LP의 농도는 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm로, Sodium thiocyanate(Hayashi Pure Co.)와 Hydrogen peroxide(Yakuri Pure Co.)는 각각 0.25 mM의 농도로 조정하여 사용하였다.

*E. coli*의 접종수준과 LP의 농도에 따른 항균성조사

실험균주의 접종수준에 따른 항균효과를 조사하였다. TSB 100 m*l*에 전배양된 *E. coli* O157:H7을 초기접종수준을 10^2, 10^4, 10^7 cfu/m*l*으로 만든후 1% 수준으로 접종하고 LP의 농도를 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm으로 각각 첨가하고, 0.25 mM의 NaSCN과 0.25 mM의 H_2O_2를 각각 첨가한 다음 30°C에서 배양을 하면서 2시간 간격으로 시료를 채취하여 생균수를 측정하였다.

배양온도 및 배지에 따른 항균성조사

E. coli O157:H7을 TSB, UHTmilk raw milk에 초기접종수준을 10^2, 10^4 cfu/m*l*으로 하여, 1%수준으로 접종하고 LP는 10 ppm, 0.25 mM의 NaSCN과 0.25 mM의 H_2O_2를 각각 첨가한 다음 5°C, 10°C, 15°C에서 배양을 하면서 2시간 간격으로 시료를 채취하여 TSA를 30°C에서 24시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

Lactoperoxidase의 농도에 따른 항균성조사

Fig. 1, 2는 초기접종수준과 lactoperoxidase의 농도에 따른 LP system이 병원성균인 *E. coli* 0157:H7에 대한 항균효과를 조사한 것으로 SCN^-과 H_2O_2가 0.25 mM로 각각 첨가된 TSB에 *E. coli* O157:H7를 10^4/m*l*, 10^7/m*l* 수준으로 첨가하고, lactoperoxidase를 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm 수준으로 접종하여 30°C에서 배양하면서 2시간 간격으로 균의 항균효과를 조사한 것이다.

초기접종균수가 10^4/m*l* 경우, lactoperoxidase의 농도가 10 ppm은 12시간, 20 ppm은 10시간후 초기접종수준에 도달 하였으나 30 ppm은 6시간이 지난후 초기접종수준에 도달 하여 LP의 농도가 10 ppm일 때 항균효과가 가장 높게

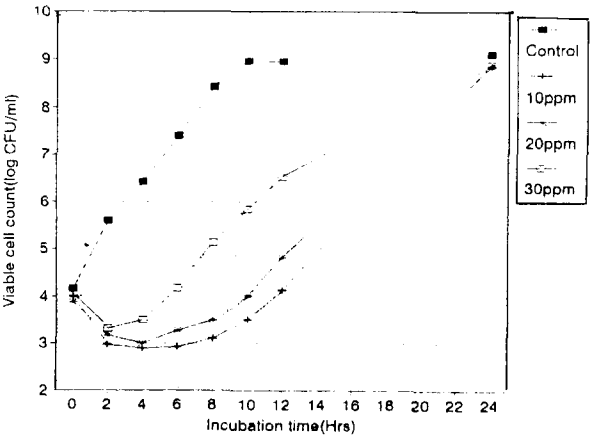

Fig. 1. The antibacterial effect of LP system according to the concentration of LP in TSB inoculated with 10^4 cfu/m*l* *E. coli* O157:H7.

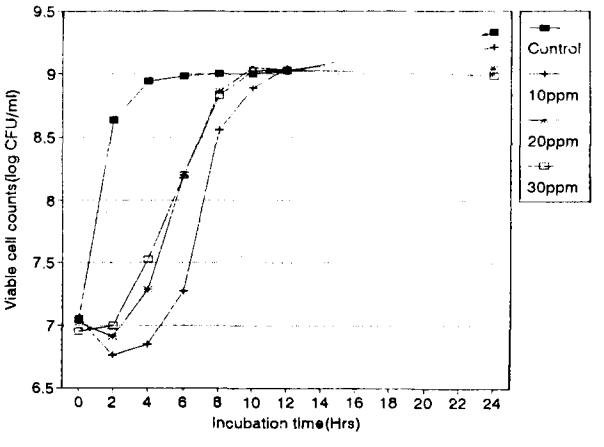

Fig. 2. The antibacterial effect of LP system according to the concentration of LP in TSB inoculated with 10^7 cfu/m*l* *E. coli* O157:H7.

나타났다(Fig. 1).

반면 초기접종수준이 10^7/m*l* 경우, 10^4/m*l*에 비해 항균효과가 낮은 것으로 나타났으며, LP가 10 ppm일 때 5시간후 초기접종수준에 이르렀으나, 20 ppm과 30 ppm에서는 항균효과가 거의 없게 나타났다(Fig. 2). 이는 *E. coli* O157:H7에 LP 5 ppm, SCN^-과 H_2O_2는 0.25 mM로 첨가를 한 후, 초기접종수준을 10^4 cfu/m*l*로 하고 30°C에서 배양한 결과 배양 12시간대까지 항균효과를 나타낸다는 Farrage 등[13]의 연구와는 비슷한 결과를 나타났으며, LP system의 효과는 균의 성장기 보다는 유도기에서 효과가 더 있다는 것을 알 수 있었다.

배양온도 및 배지에 따른 항균성조사

LP system을 구성하는 물질중에서 가장 항균효과가 높았던 LP의 농도를 10 ppm으로 고정을 하고, NaSCN과 H_2O_2를 각각 0.25 mM로 처리를 하고 *E. coli* 0157:H7의 초기접종수준을 10^2, 10^4 cfu/m*l*로 접종을 하고 배양온도를 5°C, 10°C, 15°C로 하면서 항균력을 조사하였다.

Fig. 3은 TSB 배지에 초기 접종수준을 10^2 cfu/m*l*으로 하고 배양온도가 5°C의 경우, 24시간까지 배양해도 초기 접종수준에 이르지 못하였고, 10°C 역시 초기 접종수준으로 성장하지 못하였으나, 15°C 경우는 18시간 배양후 초기 접종수준에 도달하였다.

Fig. 4는 초기 접종수준이 10^4 cfu/m*l*이고, 5°C에서 24시간 배양후 균수 2.7×10^2 cfu/m*l*, 10°C 3.7×10^3 cfu/m*l*, 15°C에는 17시간 정도 배양후 초기 접종수준까지 성장하였다.

위의 결과로 보아 LPS의 항균성 효과는 배양온도에 따라 큰 차이를 보이며, 온도가 높아질수록 항균효과가 낮아진다

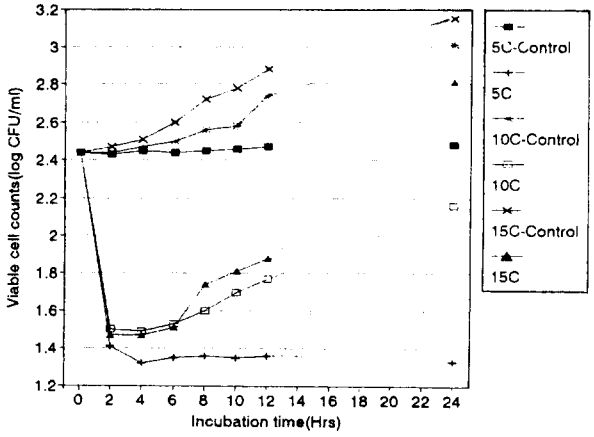

Fig. 3. The antibacterial effect of LP system when *E. coli* O157:H7 was cultured on TSB with initial level of 10^2 cfu/m*l* and stored at 5°C, 10°C and 15°C.

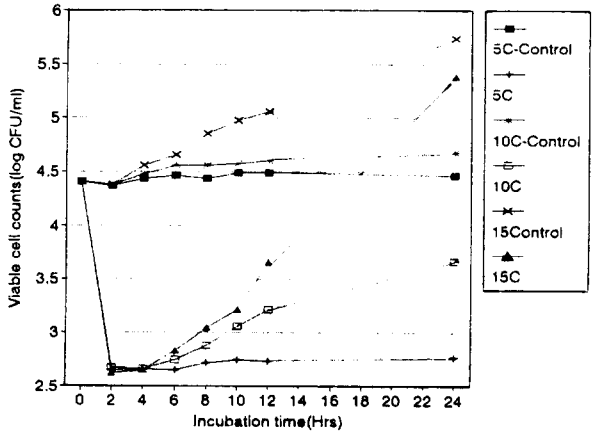

Fig. 4. The antibacterial effect of LP system when *E. coli* O157:H7 was cultured on TSB with initial level of 10^4 cfu/m*l* and stored at 5°C, 10°C and 15°C.

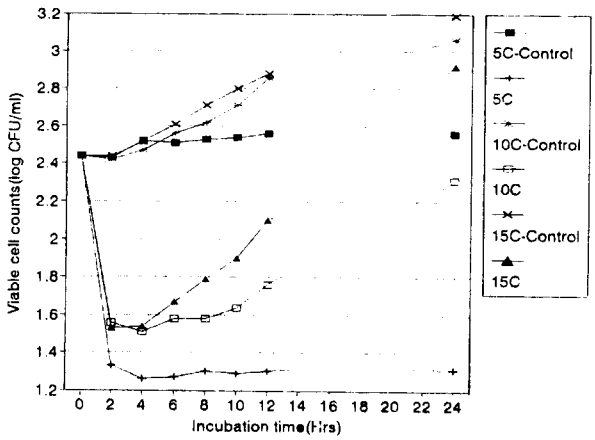

Fig. 5. The antibacterial effect of LP system when *E. coli* O157:H7 was cultured on UHT milk with initial level of 10^2 cfu/m*l* and stored at 5°C, 10°C and 15°C.

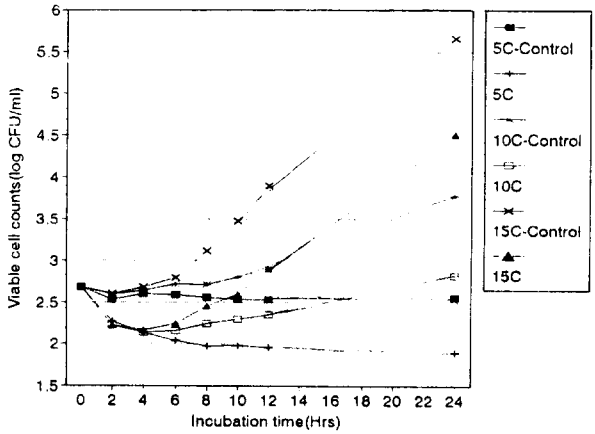

Fig. 5. The antibacterial effect of LP system when *E. coli* O157:H7 was cultured on UHT milk with initial level of 10^2 cfu/m*l* and stored at 5°C, 10°C and 15°C.

는 Zajac[15]의 실험결과와 비슷하게 나타났다.

Fig. 5, 6은 배지조건에 따른(UHT milk, raw milk), 초기 접종수준은 10^2/m*l*, 온도를 5°C, 10°C, 15°C하여 항균효과를 조사하였다. 배지조건에 있어 UHT milk에서와 TSB 배지에서 항균효과는 비슷하게 나타났으나, UHT milk에서는 배양후 균수가 급격히 감소한 반면 raw milk에서는 배양후 각 온도에서 균수가 서서히 감소하였으며, 5°C의 경우는 24시간후에도 초기 접종수준으로 성장하지 못하였으며, 10°C는 20시간 배양후 초기접종수준으로 성장하였는데, 15°C의 경우 10시간 배양후 초기 접종수준에 도달하였다.

배지조건의 경우는 UHT milk에서 항균효과가 다소 높게 나타났다. 따라서 *E. coli* O157:H7에 대한 LP system의 항균효과는 lactoperoxidase가 10 ppm이고, 초기접종수준이 10^2/m*l*이고, 배양온도가 5°C일 때 항균효과 가장 높게 나타났다. 이는 Wolfson과 Sumner[15] 등의 그람음성, catalase 양성인 *Pseudomonas, Coliforms, Salmonella, Shigella* 등에 대한 LP system의 효과 측정조사에서 배지의 pH, 온도, 배양시간, 세포농도에 따라 억제효과가 다르게 나타난다는 보고와 상당부분 일치하였다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 건국대학교 학술 연구비지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 *E. coli* O157:H7에 대한 LP system(lactoperoxidae/thiocyanate/hydrogen peroxide)의 항균효과를 측정하기 위해 수행되었다. 초기 접종수준(10^2, 10^4, 10^7 cfu/m*l*), LP의 농도(10 ppm, 20 ppm, 30 ppm), 배지종류(TSB, UHT milk, raw milk), 배양온도(5°C, 10°C, 15°C) 등에 따라 *E. coli* O157:H7에 대한 항균효과를 측정, 비교한 결과, 초기 접종수준을 10^2/m*l*으로 하였을 때와 LP의 농도를 10 ppm 및 5°C 배양에서 항균력이 가장 높게 나타났다.

참고문헌

1. Perraudin J.P.: Lactoperoxidase, natural food preservation system. *Dairy Industries International.*, **56**, 12-16 (1991).
2. Hogg, D.M., and Jago, G.R.: The antibacterial action of lactoperoxidase the nature of the bacterial inhibitor. *J. Biochem.*, **117**, 779-790 (1970).
3. Sanddeep, M., Saudamini, S. Behere, V. and Samarech, M.: Lactoperoxidasecatalyzed oxidation of thiocynate by hydrogen peroxide; necleal magnetic resonance and optical spectral studies. *J. Biochem.*, **30**, 118-124 (1991).
4. Pruitt, K.M. and Tenovno, J.: Kinetics of hypothiocyanite production during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate. *Biochem. Biophys. ACTA.*, **704**, 204-214 (1982).
5. Wever, R., Kastm W.M., Kasinoedin, J.M. and Boelens, R.: The peroxidation of thiocynate catalysed by myeloperoxidase and lactoperoxidase. *Biochem:Biophys. Acta.*, **709**, 212-219 (1982).
6. Moister, F.C. and Freis, E.D.: The metabolism of thiocynate after prolonged administration in man. *Am. J. Med. Sci.* **218**, 549-555 (1949).
7. Korhonen, H.: Unterstchungen zur Bakterixidie der milch und Immunisierung der bovinenmikhdr se. ph. D. Thesis, university of Helsinki. Fin land (1973).
8. Korhonen, H.: The potential role of the lactoperoxidase-thiocynate-hydrogen peroxide system against mastitis. pp. 421-440(1981). in L. Bassalik-chabielska and Z. Ryniewicz (eds) Registant factors and genetic aspects of mastitis control. Proc. Intl. Conf. Jabloma, Ossolineum, wroclaw, Poland.
9. Collins, E. and Aramaki, K.: Production of hydrogen peroxide by Lactobacillus acidphillus. *J. Dairy Sci.* **63**, 353-357 (1980).
10. Dabiya, R.S. and Speck, M.L.: Hydrogen Peroxide formation by lactobacilli and its effect on Staphylococcus aureus. *J. Dairy Sci.* **51**, 1568-1572 (1968).
11. Aune, T.M. and Thomas, E.L.: Acummulation of hypothiocyanate ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Eur. J. Biochem.* **80**, 209-214 (1977).
12. Oram, J.D. and Reiter, B.: The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. II. The oxidation of thiocyanate and the nature of of the inhibitory compound. *J. Biochem.* **100**, 382-388 (1966).
13. Farrag, S.A., EL-Gazzar, F.E. and Marth, E. H.: Use of

the LPS to inactivate *E. coli* O157:H7 in a semi-synthetic medium and raw milk. *Milchwissenschaft.* **47**(1), 15-17 (1992).

14. Zajak. M., Bjorck, L. and Claessonm O.: Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Bacillus cereus*. *Milchwissenschaft.*, **36**(7), 20-25 (1981).
15. Wolfson, L.M. and Summer, S.S.: Antibactertal activity of the lactoperoxidase system; A review. *J. Food Prot.* **56**, 887-892 (1993).