

*Lactobacillus helveticus*의 자연항생작용에 관한 연구

최 상 훈 · 김 동 신
경북대학교 동물자원학과

Natural Antibiotic Activity of *Lactobacillus helveticus*

S. H. Choi and D. S. Kim

Department of Animal Science, Kyungpook National University

ABSTRACT

The objective of this study was to extract and purify the antibacterial agent from the fermented milk with *Lactobacillus helveticus* CH-1. The extraction and purification of antibacterial agent from the *Lb. helveticus* fermented milk were carried out by methanol extraction, acetone extraction, Sephadex G-200 gel filtration and thin layer chromatography and the results were as followings. The antibacterial activity of methanol-acetone extraction showed antibacterial activity against test organisms, *B. subtilis*, *E. coli*, *Pseu. fluorescens*, *Sal. typhimurium*, *Shi. flexneri*, and *Sta. aureus*. Sephadex G-200 gel chromatography showed only antibacterial activity from 33 to 37th fractions of 60 fractions. The agent purified from TLC plate confirmed the antibacterial activity by the means of bioautography.

I. 서 론

유산균은 자연발효유가 좋은 건강음식이 될 수 있도록 각종 오염균의 성장을 억제하며 사멸하는데 기여하는 항균물질을 생산한다^(1,3).

Mikolajcik과 Hamdan⁽⁴⁾은 *Lactobacillus acidophilus*로부터 acidolin이라는 항균물질을 분리하였으며 그리고 김⁽⁵⁾은 토마토쥬스 배지에서 성장 *Lactobacillus acidophilus*로부터 acidolin과 비슷한 항균물질을 분리하였다. 그리고 *Bifidobac-*

*terium bifidum*과 *Bifidobacterium longum*에서 bifidin과 bifilong이 분리되었다^(6,7).

*Lactobacillus helveticus*는 고온성 퀵처로서 스위스 치즈, 이탈리아 치즈의 생산에 응용되고 있다. 이 균의 세포내 peptidase효소는 치즈숙성에 대단히 중요하며 숙성하는 동안 오염균은 자연항생물질에 의하여 억압될 수 있다.

본 연구는 *Lactobacillus helveticus*를 우유배지에 성장시킨 후 항균물질을 분리하였으며 병원균 및 부패균에 대한 항생효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 컬처 제조

동결건조컬처 *Lactobacillus(Lb.) helveticus* CH-1(Chr. Hansen's Lab. Denmark)을 멸균한 탈지환원유(T.S. 11%, Difcoco., U.S.A.)에 접종하여 42°C에서 24시간 배양한 후 1% 접종량으로 하여 3회 계대배양하여 mother culture를 제조하였다.

2. 항균물질의 추출 및 추출물의 항균성

1) Methanol-Acetone(M-A) extraction

1,000ml의 탈지환원유에 *Lb. helveticus* CH-1의 mother culture를 3% 접종하여 42°C에서 32시간 배양한 후 동결건조(Freeze-Dryer, Modulyo, Edwards EF4., England)하였다. 이상의 동결건조물 전체를 5°C로 냉각된 1,000ml의 methanol을 넣어 1시간동안 정치하면서 때로는 교반하였다. 이것을 원심분리기(Vision Co. Korea)를 이용하여 4°C, 12,000 rpm으로 원심분리후 상층액을 수확하고 침전물은 위와 동일한 방법으로 2회 연속하여 상층액 총 3,000ml를 획득하였다. 상층액 3,000ml를 여과지(Whatman filter paper #1)에 여과한 다음 45°C물의 rotary evaporator(Eyela rotary evaporator, Rikakikai Co., Japan)로 감압 농축하여 황갈색의 농축물을 얻었으며 이에 100ml의 증류수를 첨가하여 다음 acetone extraction하는데 이용하였다.

Methanol 추출물을 1,000ml의 acetone에 넣고 4°C에서 1시간 교반후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 수확하고 침전물을 다시 위와 같은 방법으로 2회 반복하여 acetone상층액 3,000ml를 rotary evaporator로 45°C에서 감압하여 증발이 더 이상 일어나지 않을때까지 농축하였다. 이 추출물을 Methanol-Acetone(M-A) 추출물이라고 하였다.

M-A 추출물의 항생효과를 측정하기 위하여 *Bacillus subtilis* ATCC 1023, *Escherichia coli* 6-PE-4, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 21541, *Salmonella typhimurium* 0901, *Shigella flexneri* 9199-NIH, *Staphylococcus aureus* 7473를 접종한 agar plates에 well방법으로 시험하였다.

2) Sephadex G-200 permeation chromatography

Methanol-acetone 추출물을 증류수와 1:5(w/v)의 비율로 희석한 다음 그것의 3ml를 Sephadex G-200(Pharmacia Chemicals, Sweden) column(1.6 × 80 cm) 위에 넣고 0.05N HCl (pH 2.5) buffer를 사용하여 7.5ml/hr의 속도로 5ml씩 60개를 분획하였다. 각 분획은 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며 well방법으로 항균성을 조사하였다.

3) Thin-layer chromatography

Sephadex G-200 gel chromatography에서 항균성을 나타낸 추출물 0.5ml를 TLC plate(Merk Co., Germany)에 도포하여 건조시키고 chloroform-methanol(90:10, v/v)을 용매로 전개한 다음 UV광선아래 흡광대를 조사하였다. 흡광대의 gel을 긁어모아 acetone으로 용출시켜 원심분리하여 상층액을 건조시키고 항균효과를 Bioautography로 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Lb. helveticus* CH-1의 배양온도, 산 생산 및 항생물질의 생산

미생물의 성장활성과 직접적인 관련이 있으므로 적정산도와 배양온도의 관계를 조사하였다. *Lb. helveticus* CH-1을 37°C와 42°C에서 적정산도의 변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양후 10~16시간동안 급격한 산도증가를 보였으며 특히 42°C의 배양온도가 37°C때보다 더 높은 산도의 증가를 보였다.

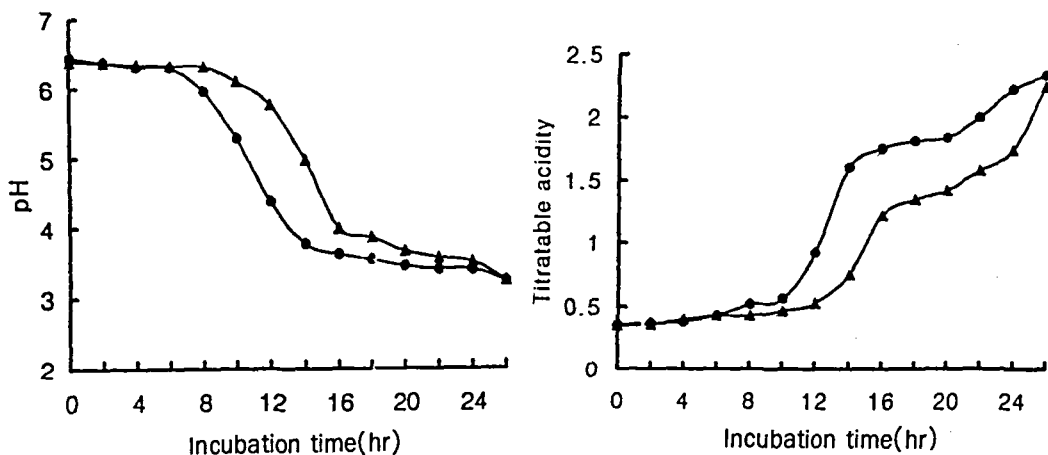


Fig. 1. pH and T.A changes of media when *Lb. helveticus* CH-1 was incubated in skim milk at different temperatures. (37°C : ▲-▲, 42°C : ●-●)

2. Methanol-acetone 추출물의 항균성

Lb. helveticus 발효유의 항균물질을 Methanol-Acetone으로 추출한 후 각 시험균에 대한 항균성을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 보였다. 여섯 종류의 시험균 중 *Bacillus subtilis* ATCC 1023에

대한 항균성을 가장 높게 나타내 보였다.(Table 1)

3. Sephadex G-200 gel 여과물의 항균성

M-A 추출물을 Sephadex G-200 gel chromatography로 얻은 분획중 33~37번째에서 항균효

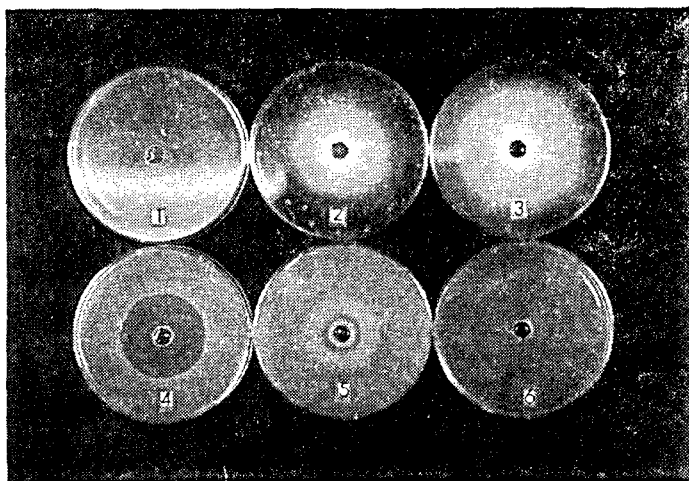


Fig. 2. Inhibition zones of Methanol-Acetone extract of *Lb. helveticus* CH-1 culture against test organisms. (1. *B. subtilis*, 2. *E. coli*, 3. *Pseu. fluorescens*, 4. *Sal. typhimurium*, 5. *Shi. flexneri*, 6. *Sta. aureus*)

Table 1. Antibacterial activity of methanol-acetone extract prepared from helveticus milk

Test organism*	Inhibition zone(mm)**
<i>B. subtilis</i> ATCC 1023	49.0
<i>E. coli</i> 6-PE-4	36.0
<i>Pseu. fluorescens</i> ATCC 21541	41.0
<i>Sal. typhimurium</i> 0901	26.0
<i>Shi. flexneri</i> 9199-NIH	26.0
<i>Sta. aureus</i> 7473	36.0

* Incubated at 30°C for 24 hr.

** Included diameter of well (10.0 mm), Injected 0.1 mm of M-A extract

과가 나타났다.(Table 2)

4. Thin-layer chromatography 정제물의 항균성

Sephadex G-200 gel 정제물에서 항균성을 지닌 분획물을 TLC에 도포하여 UV선에서 관찰한 결과 Rf가 서로 다른 3개 band가 나타났다.(Fig. 3) 세 개의 band를 *B. subtilis*에 대하여 auto-graphy를 한 결과 Rf치가 0.50인 두 번째 band에서 항균력을 보였으므로 정제된 단일물질로 사료된다.

Table 2. Antibacterial activities of fraction elutes obtained from Sephadex G-200 gel filtration

Fraction	O.D*	Act.**	Fraction	O.D	Act.	Fraction	O.D	Act.
1	0.019	-	21	0.010	-	41	0.768	-
2	0.031	-	22	0.008	-	42	0.506	-
3	0.015	-	23	0.009	-	43	0.317	-
4	0.012	-	24	0.011	-	44	0.201	-
5	0.008	-	25	0.007	-	45	0.123	-
6	0.015	-	26	0.009	-	46	0.089	-
7	0.102	-	27	0.026	-	47	0.068	-
8	0.020	-	28	0.055	-	48	0.066	-
9	0.016	-	29	0.099	-	49	0.050	-
10	0.008	-	30	0.200	-	50	0.044	-
11	0.012	-	31	0.349	-	51	0.042	-
12	0.015	-	32	0.556	-	52	0.032	-
13	0.007	-	33	0.829	+	53	0.031	-
14	0.009	-	34	1.141	+	54	0.028	-
15	0.017	-	35	1.413	+	55	0.023	-
16	0.015	-	36	1.627	+	56	0.024	-
17	0.013	-	37	1.730	+	57	0.021	-
18	0.012	-	38	1.626	-	58	0.018	-
19	0.007	-	39	1.404	-	59	0.019	-
20	0.008	-	40	1.080	-	60	0.019	-

* Absorbance at 280 nm,

** Inhibition activity

+ Inhibition observed,

- No inhibition observed

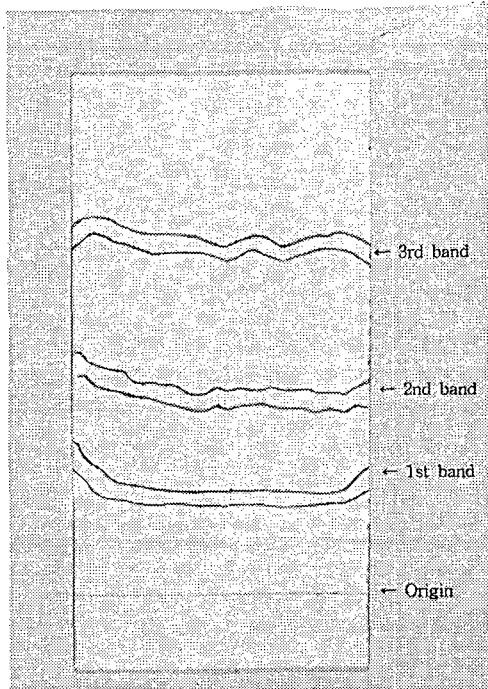


Fig. 3. Band of antibacterial active components developed on TLC plate.

IV. 요약

이 연구의 목적은 *Lactobacillus helveticus*의 발효유로부터 항균성 물질을 추출 및 정제하는 것이다. *Lactobacillus helveticus*의 발효유로부터 항균성물질 추출하기 위하여 methanol 추출, acetone 추출, Sephadex G-200 gel chromatography 그리고 thin layer chromatography를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Methanol-acetone 추출물이 시험균인 *B. subtilis*, *E. coli*, *Pseu. fluorescens*, *Sal. typhimurium*, *Shi. flexneri*, 그리고 *Sta. aureus*에 대하여 항생력을 보였다. Sephadex G-200 chromatography의 60개 분획중 오직 33번부터 37번째까지 항균효과를 보였다. TLC plate로부터 얻은 정제물을 bioautography방법을 실시한 결과 항균성을 나타냈다.

V. 참고문헌

1. Shahani, K. M., Vakil, J. R. and Chandan, R. C. Antibiotic acidolin and process for preparing the same. U. S. Pat. 3689640. (1972).
2. Shahani, K. M., Vakil, J. R. and Kilara, A. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bugaricus*. I. Cultural conditions for the production of antibiotics. *Cult. Dairy Prod. J.* 11(4):14. (1976).
3. Shahani, K. M., Vakil, J. R. and Kilara, A. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. II. Isolation of acidophilin from *L. acidophilus*. *Cult. Dairy Prod. J.* 12(2):8. (1977).
4. Mikolajcik, E. M., and Hamdan, I. Y. *Lactobacillus acidophilus*. I. Growth characteristics and methabolic products. *Cult. Dairy Prod. J.* 10(1):10. (1975).
5. 김동신, *Lactobacillus acidophilus*가 생산한 항균물질에 관한 연구. 대한수의학회. 24(2):149. (1984).
6. Anand, S. K. Stinivasan, R. A., and Rao, L. K. Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*. *Cul. Dairy Prod. J.* 2:6. (1984).
7. Jao, Y. C., Mikolajcik, E. M., and Hansen, M. T. Growth of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* in laboratory media supplemented with amino sugars and spent broth from *E. coli*. *J. Food Sci.* 43:1257. (1978).