KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 34, No. 2, pp. 249~254 (2002)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

항균성 물질을 생산하는 *Lactobacillus amylovorus* IMC-1의 배양학적 특성

목종수* · 송기철 · 김영목[1] · 장동석[1]
국립수산과학원 서해수산연구소 · [1]부경대학교 식품공학과

Cultural Characteristics of *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 Producing Antibacterial Substance

Jong-Soo Mok*, Ki-Cheol Song, Young-Mog Kim[1] and Dong-Suck Chang[1]
West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute
[1]Department of Food Science & Technology, Pukyong National University

To determine the abilities as both lactic starter and probiotics for fermented foods, we investigated the potency of acid production, proteolytic activity and lactose metabolism of *Lactobacillus amylovorus* IMC-1. And the strain was cultured with lactococci in 10% skim milk medium. It was also examined the bactericidal action of antibacterial substance, produced by the strain IMC-1, against pathogenic bacteria. *L. amylovorus* IMC-1 showed excellent production of acid in 10% skim milk supplemented with yeast extract, and produced 0.8 and 2.7% of acid at 12 and 72 h incubation, respectively. It was found that the activity of β-galactosidase, about 39 μM/minute/dry cell weight (mg), was stronger than that of phospho-β-galactosidase in the strain IMC-1. The strain showed weak proteolytic activity in 10% skim milk, thus it produced 6 and 69 μg/mL of free tyrosine at 12 and 72 h cultivation, respectively. It was known that the strain utilized mainly α-casein than β-casein from patterns of SDS-PAGE. Mixed culture produced more acid than single cultures of *L. amylovorus* IMC-1 and *Streptococcus thermophilus* NIAI 510. Single culture of *Str. thermophilus* and mixed culture showed increasing cheese flavor with incubation times. Optimal fermentation time of mixed culture for the acid production and flora of lactic starter was 16 and 12 h by adding 0.1 and 0.5% of yeast extract to 10% skim milk, respectively. Antibacterial substance produced by the strain IMC-1 reduced about 2 log of the viable cell counts of both *Escherichia coli* O157 and *Shigella flexneri* after 24 and 4 h incubation, and they were not detected after 48 and 6 h incubation, respectively.

Key words: *Lactobacillus amylovorus*, lactic starter, probiotics, mixed culture, bactericidal action

서 론

유산균은 이미 오래전부터 발효식품의 제조에 starter 미생물로서 이용되어져 왔으며, 발효유, 치즈, 주류, 된장, 간장, 김치 및 육제품 등의 제조에 있어서 중요한 역할을 담당해 왔다. 즉, 유산균은 유산발효, 단백질분해 및 지방분해 등에 관여하여 발효식품에 풍미를 향상시킴은 물론 보존성 향상에도 기여하는 것으로 알려져 있다[1,2]. 특히 식품중의 병원성 및 부패성 세균에 대하여 starter 유산균이 각종 길항작용을 나타내는 것이 밝혀져 starter 유산균의 항균성에 관한 관심이 높아지고 있다[3-9].

*Corresponding author: Jong-Soo Mok, West Sea Fisheries Research Institute, #98-36, Bukseong-Dong 1 Ga, Jung-Gu, Incheon 400-201, Korea.
Tel: 82-32-763-4308
Fax: 82-32-761-0466
E-mail: mjs@nfrda.re.kr.

발효유에 사용되는 유산균은 크게 2 종류로 나눌 수 있다. 첫 번째는 발효유에 풍미 형성의 주체로서 사용되고 있는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*를 혼합 배양하는 것으로 국제규격에서의 요구르트는 적어도 이 두 종류의 유산균이 포함되어야 한다. 그러나 이들 균종은 장내에서 생육이 불가능하다고 알려져 있어, probiotics로서의 효과를 기대하기 위해서는 제 2의 그룹인 *Lactobacillus acidophilus* group 유산균, *Bifidobacteria* 및 *Lactobacillus casei* 등이 사용되어지고 있다[10]. Probiotics 균주가 가져야할 가장 큰 특성은 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로서 사람이나 동물의 장내에서 생존력이 우수해야하며, 병원성 대장균 및 살모넬라 등의 유해 미생물의 생육을 억제시킬 수 있어야 한다[11]. *L. acidophilus* group 유산균은 사람의 장관중 소장하부에서 대장에 걸쳐 생육하는 것으로 알려져 있으므로 항균성 물질을 생산하는 이들 group의 유산균은 정장작용에 기여함은 물론 probiotics 균주로서도 기대된다.

저자들은 내몽골산 치즈에서 항균성 물질을 생산하는 *L. acidophilus* group 유산균인 *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 균주를 분리하였으며, 이 균주가 생산하는 항균성 물질의 성질 및 항균특성에 관하여 보고한 바 있다[12,13]. 본 연구에서는 발효식품의 제조에 유용한 starter 개발 및 probiotics로서 이용 가능성을 타진하기 위하여 항균성 물질을 생산하는 *L. amylovorus* IMC-1 균주를 이용한 skim milk medium에서의 산 생성력, 단백질 분해활성, lactose 분해활성 및 유산구균과 혼합발효 그리고 병원성 세균에 대한 살균력 등을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

본 실험에 사용된 공시균주는 내몽골산 치즈에서 분리한 것으로 *Lactobacillus acidophilus* group 유산균 중의 하나인 *Lactobacillus amylovorus* IMC-1로서 항균성 물질을 생산하는 균주이다[12]. 또한 혼합배양을 위하여 사용된 유산구균은 *Streptococcus thermophilus* NIAI 510(National Institute of Animal Industry, Tsukuba, Japan)이었다. 두 균주는 1% glucose와 1% yeast extract를 함유한 10% skim milk medium에서 보존하였으며, lactose 분해효소의 활성을 측정하기 위하여 TY medium(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.1% Tween 80 및 0.01% L-cystein-HCl)에 탄소원으로서 glucose, galactose 또는 lactose를 0.5% 첨가하여 사용하였다. 이때 사용된 모든 배지는 Difco사 제품이었다.

병원성 세균인 *Escherichia coli* O157과 *Shigella flexneri*는 오까야마대학 의학부(일본)로부터 분양받아 −70°C(15% glycerol)에 보존하였으며, 배지로는 tryptic soy broth(Difco)를 사용하였다.

산도 측정

필요한 배지성분을 공급한 10% skim milk medium에 공시균주 배양액을 1% 접종한 후 37°C에 배양하면서 시간 경과에 따른 산도를 측정하였다. 즉, 배양액의 10 g을 40 mL 증류수로 희석한 후 페놀프탈레인 용액을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 용액으로 적정한 다음 산도(%)를 다음의 식에 의하여 구하였다.

$$\text{산도}(\%) = \frac{0.1\text{ N NaOH 적정치(mL)} \times \text{Factor} \times 0.009}{\text{시료의 중량 (g)}} \times 100$$

Lactose 분해효소 활성 측정

Lactose 분해효소인 β-galactosidase(β-Gal) 및 phospho-β-galactosidase(P-β-Gal)의 활성은 Kanatani 등의 방법에 준하여 측정하였다[14]. 즉, IMC-1 균주를 5회 계대 배양한 후 0.5% 당을 첨가한 10 mL TY medium에 접종하여 37°C에서 20시간 배양하였다. 배양액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 균체를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.2)로 3회 세정한 후 동일한 buffer 5 mL로 현탁한 다음, 몇 방울의 acetone-toluene(9 : 1) 용매를 가하여 37°C에서 10분간 가온시켰다. 처리된 균체 현탁액 1 mL에 대하여 기질 12 mM o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG, Sigma) 용액 또는 o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside-6-phosphate(ONPG-6-P, Sigma) 용액을 0.2 mL 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그후 0.5 M sodium carbonate 용액을 2.0 mL 가하여 반응을 정지시킨 다음 원심분리하여 균체를 제거한 후 유리된 ONP를 420 nm에서 흡광도(Hitachi U-1100)로 측정하였다. β-Gal 및 P-β-Gal의 활성은 건조 균체 중량 1 mg당 1분간 유리된 ONP 양으로 나타내었다. ONP 양은 미리 작성한 ONP 검량선으로부터 얻은 $Y = 0.937X + 0.0048$($r = 0.9991$)에 의하여 구하였다.

단백질 분해 활성 측정

유리 tyrosine 함량 측정: Glucose를 0.5% 첨가한 10% skim milk medium에 IMC-1 균주 배양액을 1% 접종한 후 37°C에 배양하면서 유리 tyrosine 함량을 측정하였다. 즉, 배양액 5 mL에 10% trichloroacetic acid(TCA)를 동량 가하고, 혼합하여 2~3분간 방치한 후 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 그리고 별도의 시험관에 상층액 2 mL를 취하여 0.55 M sodium carbonate 용액 5 mL를 가하여 혼합하였다. 그 후 phenol 시약 3배 희석액 1 mL를 가하여 혼합한 후 30°C에서 30분간 발색시킨 다음 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosine 함량은 표준곡선($Y = 0.167X + 0.014$, $r = 0.9993$)에 의하여 mL당 μg으로 나타내었다.

Casein 분해양식 측정: Glucose와 lactose를 각각 0.5% 첨가한 10 mL TY medium에 IMC-1 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양시킨 다음 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 균체를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.2)로 3회 세정한 후 동일한 buffer 1 mL로 현탁하였다. 균체 현탁액 0.5 mL에 1% casein(sigma)용액을 0.5 mL 첨가하여 혼합한 후 37°C에서 24시간 배양시켰다. 그후 원심분리(12,000 rpm, 10분간)하여 균체를 제거한 다음 배양액을 시료로 SDS 전기영동상에서의 casein 분해양식을 살펴보았다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli와 Favre의 방법에 준하여 실시하였다[15]. 즉, 12.5%의 separating gel을 미리 설치된 전기영동용 glass plate에 흘려 넣어 실온에서 중합시킨 다음 4.75%의 stacking gel을 separating gel위에 흘려 넣어 중합시켰다. 작성된 gel plate는 electrode buffer(0.35 M Tris, 1.92 M glycine, 1% SDS)가 들어있는 전기 영동조에 설치하고, 효소 반응액 0.1 mL에 동량의 sample buffer (12.5% 0.5 M-Tris-HCl solution containing 0.4% SDS, pH 6.8; 2.25% SDS; 5% 2-mercaptoethanol; 10% glycerol; 0.002% bromophenol blue)를 혼합한 후 100°C에서 3분간 가온하여 시료로 사용하였다. 시료를 sample well에 주입하여 30 mV에서 6시간 영동한 다음 gel을 staining solution(10% acetic acid, 25% isopropanol, 0.2% coomassie brilliant blue)에 1시간 동안 염색시키고, destaining solution(10% acetic acid, 10% isopropanol)에 넣어 탈색시켰다.

유산구균과 혼합 배양

유산간균인 IMC-1 균주와 유산구균의 혼합배양이 발효유 제조에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *St. thermophilus* NIAI 510과 혼합배양을 실시하였다. 즉, 공시균주들을 단독 또는 혼합하여 10% skim milk에 각각 10^6~10^7 CFU/mL 정도 접

종하여 37°C에 배양하면서 시간 경과에 따른 pH 및 산도의 변화를 살펴보았다. 또한, 10% skim milk에 질소원으로서 yeast extract를 그리고 탄소원으로서 glucose를 농도별로 첨가한 배지에서 두 균주를 혼합하여 배양하면서 pH, 산도 및 생균수의 변화를 경시적으로 조사하였다.

병원성 세균에 대한 살균력 측정

발효유가 병원성 세균의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 yeast extract를 0.5% 첨가한 10% skim milk medium에 IMC-1 균주 배양액을 1% 접종하고, 37°C에서 72시간 배양한 다음 항균성 물질을 분리하기 위하여 pH 4.5로 조정한 후 원심분리(15,000 rpm, 20분)하였다. 원심분리한 상등액에 냉에탄올을 10배량 가하여 4°C에서 2시간동안 교반한 후 원심분리(5,000 rpm, 20분)하여 상등액을 40°C에서 evaporator(Heidolph, WB 2001)로 에탄올을 증발시킨 뒤 증류수로 용해시켜 최초 배양액의 1/5양으로 정용하였다. 그리고 정용한 에탄올 가용성 획분을 pH 6.5로 조정하여 살균력 시험에 사용하였다. 살균력 시험은 에탄올 가용성 획분 50 mL에 각 시험균을 10^5 CFU/mL정도 되도록 접종하여 37°C에 배양하면서 시간 경과에 따른 생균수 변화를 조사하여 mL당 집락수(CFU, Colony Forming Unit)로 나타내었다. 이 때 대조구로서는 동일한 배지를 같은 조건으로 제조하여 사용하였다.

결과 및 고찰

배지성분이 산생성에 미치는 영향

우유는 pH를 4.6 부근으로 낮추면 우유 단백질의 약 78%를 차지하는 casein이 등전점에 도달하기 때문에 콜로이드상으로 분산해 있던 casein은 칼슘을 유리하여 응고 침전한다. 이것으로부터 skim milk medium에 유산균을 접종할 경우 산생성 정도를 시각적으로 어느 정도 판단할 수 있다. IMC-1 균주는 예비실험에서 기본적인 영양소만 함유하고 있는 액체배지(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% lactose)에서는 거의 증식을 하지 못하였으나, 계면활성제인 Tween 80이나 cystein을 첨가하면 증식이 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 10% skim milk에서 배양하였을 때에는 배양 5일째에 이르러서야 겨우 배지가 응고되었다.

따라서 IMC-1 균주의 산 생성력을 촉진시키기 위하여 10% skim milk에 탄소원으로서 glucose, 계면활성제로서 Tween 80 및 질소원으로서 yeast extract를 첨가하여 pH 및 산도의 변화를 경시적으로 조사하였다(Fig. 1). Glucose 및 Tween 80을 첨가한 경우에는 대조구와 거의 유사한 수준의 pH 변화를 보였지만, yeast extract를 첨가한 경우에는 급격하게 pH가 저하하여 배양 12시간째에 배지를 응고시켰다. 산생성 활성 측면에서도 yeast extract를 첨가한 경우에는 우수한 산 생성력을 보여 배양 12시간째에 산도 0.8%이었으며, 72시간째 최종산도는 2.7%까지 상승하였다.

일반적으로 발효유 제조에 있어 좋은 유산균 starter는 우선 lactose 분해활성이 높아 유산 생성력이 우수하여야 하며, 또한 우유의 단백질을 저분자 peptide 및 amino acid로 분해할 수 있어야 하는 등의 조건을 갖추어야 한다. 이 결과에서

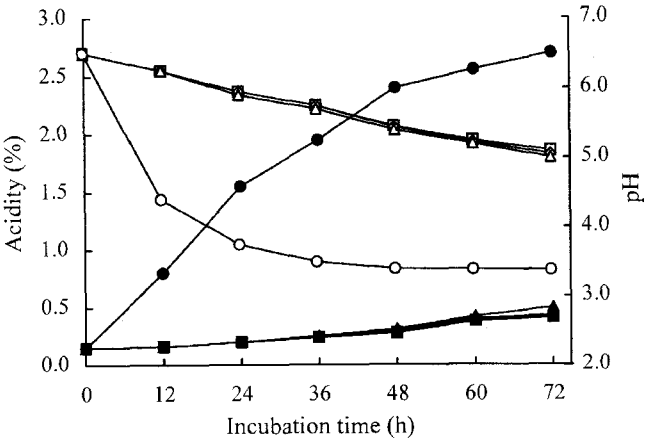

Fig. 1. Changes of pH and acidity in skim milk medium incubated with *Lactobacillus amylovorus* IMC-1.
Acidity: ■, 10% skim milk; ◆, 10% skim milk +0.5% glucose; ▲, 10% skim milk +0.1% Tween 80; ●, 10% skim milk +0.5% yeast extract. pH: □, 10% skim milk; ◇, 10% skim milk +0.5% glucose; △, 10% skim milk +0.1% Tween 80; ○, 10% skim milk +0.5% yeast extract.

yeast extract 첨가에 의해 산 생성력이 향상된 것은 IMC-1 균주는 단백질 분해활성이 낮기 때문에 yeast extract중의 저분자 peptide 및 amino acid 등이 생육을 촉진시키는 역할을 한 것으로 추정된다.

Lactose 분해효소의 활성

Lactose 분해에는 β-galactosidase(β-Gal)에 의해 대사되는 경로와 phospho-β-galactosidase(P-β-Gal)에 의해 대사되는 경로가 있으며, 공시균주가 어떤 경로를 통하여 lactose를 이용하는지를 알아보기 위하여 두 효소의 활성을 조사하여 Table 1에 나타내었다. IMC-1균주의 β-galactosidase의 활성은 균체 1 mg당 약 39 μM/minute로 매우 강한 반면, phospho-β-galactosidase의 활성은 낮았다. 따라서 이 균주는 주로 permease계에 의하여 lactose를 이용하는 것으로 사료된다. Itoh[10]의 보고에 의하면 유산균 발효유를 음용하면 장내에서 유산균이 증식하여 섭취한 우유의 lactose를 분해하는 것을 돕기 때문에 유당불내증이 있는 사람에게 매우 유용하므로 강한 lactose 분해력은 발효유 starter로서 요구된다고 하였다. 그리

Table 1. β-Galactosidase and phospho-β-galactosidase activities in sugar metabolism of *Lactobacillus amylovorus* IMC-1

Carbon source for growth[1)]	Activity (μM/minute/mg)[2)]	
	β-Galactosidase	Phospho-β-galactosidase
Glucose	38.984	2.221
Galactose	39.434	2.749
Lactose	38.254	3.676

[1)]The strain was incubated for 20 h at 37°C in TY medium with 0.5% of glucose, galactose or lactose as a carbon source.
[2)]Activities of lactose-hydrolyzing enzymes were expressed as micromoles of o-nitrophenol released from o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG) or ONPG-6-phosphate per minute per milligram of dry cell weight.

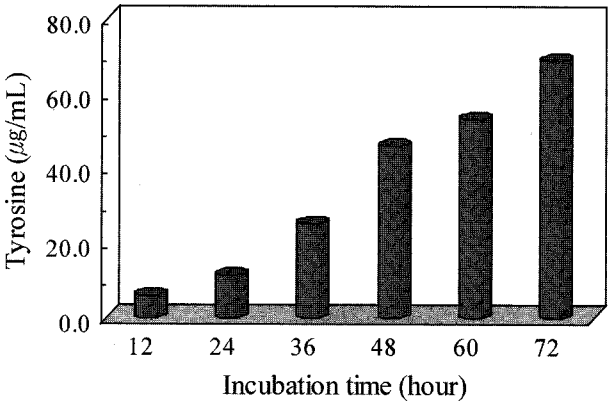

Fig. 2. Proteolytic activities in 10% skim milk cultured with *Lactobacillus amylovorus* IMC-1.

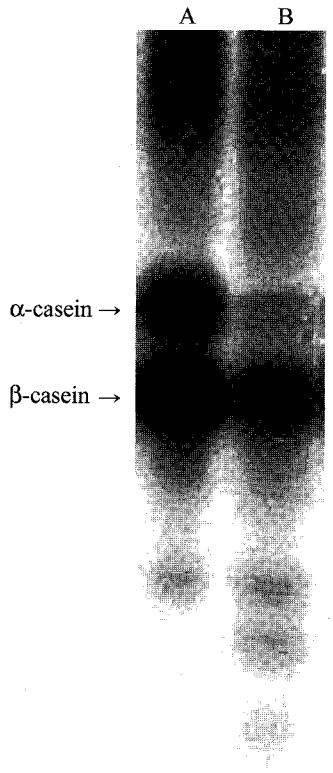

Fig. 3. Casein hydrolysis patterns by *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
Lane A, casein standard; Lane B, casein treated with the strain IMC-1.

고 *L. acidophilus* group 유산균 6종 36균주의 lactose 분해효소에 대한 시험에서 A group 4종과 B group인 *L. johnsoni*는 lactose를 직접 분해하는 β-galactosidase의 활성이 우수하였으나, B group인 *L. gasseri*는 phospho-β-galactosidase의 활성이 높은 것이 특징이었다고 보고하였다. 본 실험에 사용된 A group에 속하는 IMC-1 균주도 β-galactosidase의 활성이 phospho-β-galactosidase의 활성보다 월등히 높아 위의 결과와 일치하였다. 또한 lactose 분해력에 있어서 배지성분 등 배양조건에 따라 편차가 나므로 절대적 비교는 할 수 없으나, 위의 36 균주보다 10~100배정도 높아 발효유 starter로서

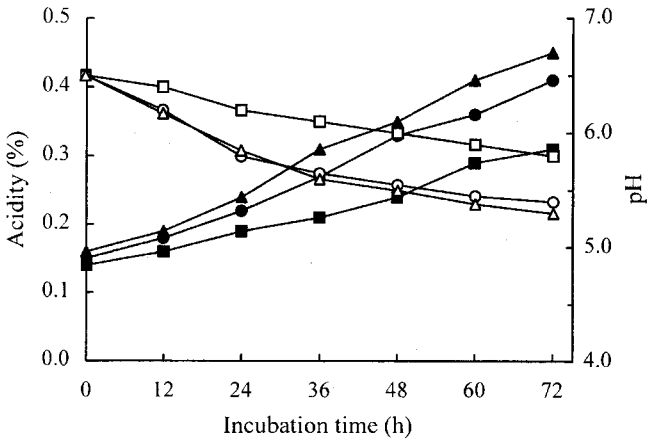

Fig. 4. Symbiotic relationship between *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 and *Streptococcus thermophilus* NIAI 510 in 10% skim milk.
Acidity: ●, IMC-1; ■, NIAI 510; ▲, mixed culture.
pH: ○, IMC-1; □, NIAI 510; △, mixed culture.

우수함은 물론 *L. acidophilus* group 유산균은 소장하부에 분포하고 있는 것으로 알려져 있어 probiotics 유산균으로서도 유용할 것으로 기대된다.

단백질 분해활성

공시균주의 단백질 분해활성을 알아보기 위하여 우유 단백질인 casein을 기질로 하였을 때 생성되는 유리 tyrosine의 함량을 측정하였다(Fig. 2). IMC-1 균주는 0.5% glucose가 첨가된 10% skim milk medium에서 tyrosine양은 12시간째에 6 μg/mL이었으며, 72시간째에는 69 μg/mL으로 단백질 분해활성이 매우 낮았다. 반면, Rajagopal과 Sandine[16]의 보고에 의하면 발효유인 요구르트 제조에 상용되고 있는 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus* 각 9균주의 tyrosine 생산량은 배양 4시간째에 각각 61.0~144.6 및 2.4~14.8 μg/mL으로 IMC-1 균주보다 높은 단백질 분해활성을 나타내었다. 이것은 IMC-1 균주가 질소원을 단백질 분해에 의해서 얻기 힘들다는 것을 시사하며, 배지에 질소원으로서 yeast extract를 첨가함으로서 생육이 촉진되는 이유를 간접적으로 확인할 수 있었다.

IMC-1 균주의 우유 단백질인 casein의 분해 pattern을 SDS 전기영동으로 조사하여 Fig. 3에 나타내었다. IMC-1 균주는 전기영동 band의 pattern으로부터 casein 중 α-casein을 주로 이용하며, β-casein은 거의 이용하지 못함을 알 수 있었다.

유산구균과 혼합발효

유산 발효제품의 제조에 있어 유산간균 및 구균의 서로 다른 발효기작에 의한 제품의 품질에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10% skim milk에서 유산간균인 IMC-1, 유산구균인 *St. thermophilus* NIAI 510의 단독 또는 두균의 혼합배양에 따른 pH 및 산도의 변화를 경시적으로 조사하여 Fig. 4에 나타내었다. 혼합배양, 유산간균인 IMC-1 및 *St. thermophilus* 순으로 산도 증가 및 pH 감소의 폭이 컸으며, IMC-1 단독배양과 혼합배양에서는 72시간 경과 후 배지를 응고시켰다. 그리고 유산구균 단독배양 및 혼합배양에서는 시간이 경과

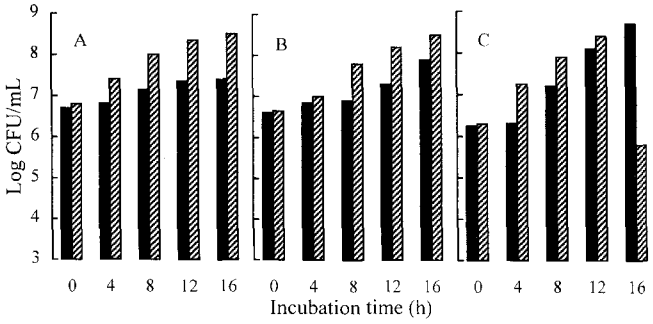

Fig. 5. Changes of viable cell counts during mixed cultivation with both *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 (■) and *Streptococcus thermophilus* NIAI 510 (▨) in 10% skim milk containing yeast extract (A, 0%; B, 0.1%; C, 0.5%).

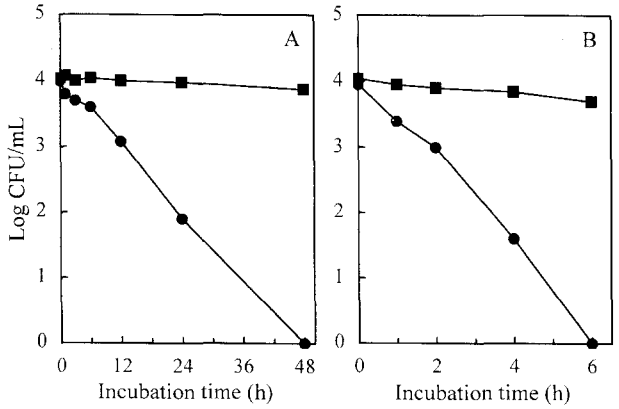

Fig. 6. Bactericidal effect of *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 against *Escherichia coli* O-157 (A) and *Shigella flexneri* (B) in the ethanol soluble fraction.
■, control; ●, antibacterial substance.

함에 따라 치즈 향기가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

10% skim milk에 질소원으로서 yeast extract를 그리고 탄소원으로서 glucose를 농도별로 첨가한 배지에서 두 균주를 혼합하여 배양하면서 pH, 산도 및 생균수 변화를 경시적으로 조사하였다. Glucose 첨가에 의한 유산발효의 촉진효과는 거의 보이지 않았으나, yeast extract 첨가에서는 0.1% 첨가로 16시간째, 0.5% 첨가로는 12시간째 배지를 응고시켰다. pH 및 산도 측정에 의한 산 생성력에서도 yeast extract 첨가구에서는 첨가량에 비례하여 산 생성력이 우수하였다(Data is not shown). 또한 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 배양 16시간 이후 yeast extract 무첨가구에서는 유산구균의 균수가 유산간균에 비하여 약 10배 많았으나, yeast extract 첨가량이 많아짐에 따라 유산구균에 비하여 유산간균이 차지하는 비율이 증가하였으며, 0.5% 첨가하여 16시간 배양하였을 때에는 유산간균이 유산구균에 비하여 오히려 많았다. 이것은 유산간균인 IMC-1 균주가 생산한 항균성 물질에 의하여 유산구균의 균수가 감소한 것으로 추정된다. 일반적으로 혼합배양에 의한 치즈의 제조에 있어서 산응고 단계에서 유산구균이 감소하는 것은 바람직하지 않기 때문에 적절한 유산발효를 위해서는 yeast extract 0.1% 첨가시에는 16시간, 0.5% 첨가시에는 12시간 배양하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

병원성 세균에 대한 살균효과

IMC-1 균주가 생산한 항균성 물질의 병원성 세균에 대한 살균효과를 알아보기 위하여 장관출혈성 대장균인 *E. coli* O157과 이질균인 *S. flexneri*에 대하여 살균력 시험을 실시하여 Fig. 6에 나타내었다. *E. coli* O157은 대조구에 비하여 배양 24시간째 2 log정도 감소하였고, 48시간 배양 후에는 검출되지 않았으며, *S. flexneri*는 배양 4시간째 2 log이상 감소하였고, 6시간 배양 후에는 검출되지 않아 IMC-1 균주가 생산한 항균성 물질은 강한 살균작용을 나타냄을 알 수 있었다.

따라서 사람의 장관중 소장하부에서 대장에 걸쳐 생식하는 것으로 알려져 있는 *L. acidophilus* group 유산균인 *L. amylovorus* IMC-1은 우수한 lactose 이용성과 병원성 세균에 대한 강한 항균작용 등을 가지고 있으므로 유용한 발효 starter로서 정장작용에 기여함 물론 probiotics 균주로서도 기대된다.

요 약

발효식품의 제조에 유용한 starter 개발 및 probiotics로서 이용 가능성을 타진하기 위하여 항균성 물질을 생산하는 *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 균주를 이용한 skim milk medium에서의 산생성, 단백질 분해활성, lactose 분해활성 및 유산구균과 혼합발효 그리고 병원성 세균에 대한 살균력 등을 검토하였다.

L. amylovorus IMC-1은 10% skim milk에 yeast extract를 첨가하여 12시간 배양하였을 때 산도 0.8%이었고, 72시간째에는 2.7%로 우수한 산 생성력을 보였다. IMC-1 균주의 β-galactosidase 활성은 균체 1 mg당 약 39 μM/minute로 매우 강한 반면, phospho-β-galactosidase의 활성은 매우 낮았다. 또한 이 균주는 10% skim milk에서 배양 12시간째 6 μg/mL, 72시간째에 69 μg/mL의 유리 tyrosine을 생산하여 단백질 분해활성이 낮았다. 전기영동상의 band pattern으로부터 casein 중 α-casein을 주로 이용하며, β-casein은 거의 이용하지 못함을 알 수 있었다.

10% skim milk에서 IMC-1 균주 및 *St. thermophilus* NIAI 510의 단독 또는 혼합배양을 실시한 결과, 혼합배양, IMC-1 균주 및 *St. thermophilus* 순으로 산 생성력이 높았으며, 유산구균 단독배양 및 혼합배양에서는 시간이 경과함에 따라 치즈 향기가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 10% skim milk medium에서 혼합배양에 의한 최적의 유산발효 시간은 산 생성력 및 공존 균수 등을 고려할 때, yeast extract 0.1% 첨가시에는 16시간, 0.5% 첨가시에는 12시간 배양하는 것이었다.

IMC-1이 생산한 항균성 물질은 *Escherichia coli* O157을 배양 24시간째 2 log정도 감소시켰고, 48시간 배양 후에는 피검균이 검출되지 않았다. 또한 *Shigella flexneri*는 배양 4시간째 2 log이상 감소하였고, 6시간 배양 후에는 검출되지 않아 항균성 물질은 강한 살균작용을 나타냄을 알 수 있었다.

문 헌

1. Itoh, T. Functional benefits from lactic acid bacteria used in cultured milk. Japanese J. Zootechnical Sci. 63: 1276-1289 (1992)
2. Nakae, T. Utilization of lactic acid bacteria in animal industry:

recent outlook. Japanese J. Zootechnical Sci. 57: 279-287 (1986)
3. Abdel-Bar, N., Harris, N.D. and Rill, R.L. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. J. Dairy Food Sci. 52: 411-415 (1987)
4. Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59: 171-200 (1995)
5. Klaenhammer, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 70: 337-349 (1988)
6. Kociubinski, G.L., Pereze, P.F., Anon, M.C. and De Antoni, G.L. A method of screening for highly inhibitory lactic acid bacteria. J. Food Prot. 59: 739-745 (1996)
7. Paik, H.D. and Glatz, B.A. Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 22-27 (1994)
8. Pinheiro, A.J., Liska, B.J. and Parmalee, C.E. Properties of substances inhibitory to *Pseudomonas fragi* produced by *Streptococcus citrovorus* and *S. diacetylactis*. J. Dairy Sci. 51: 183-187 (1968)
9. Vandenbergh, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol. Rev. 12: 221-238 (1993)
10. Itoh, T. Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. Japanese J. Dairy Food Sci. 43: 7-15 (1994)
11. Park, H.S., Lee, S.H. and Uhm, T.B. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 433-440 (1998)
12. Mok, J.S., Miyamoto, T. and Kataoka, K. Properties of antibacterial substance produced by wild *Lactobacillus strain* IMC-1 from Inner Mongolian cheese. Animal Sci. Technol. (Japan) 69: 768-778 (1998)
13. Mok, J.S., Miyamoto, T., Kataoka, K., Araki, M., Yoneya, T. and Sewaki, T. Antibacterial action of an antimicrobial substance from *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 against foodborne spoilage and pathogenic organisms. Milk Sci. (Japan) 48: 79-85 (1999)
14. Kanatani, K., Yoshima, K., Tahara, T., Miura, H. and Sakamoto, M. Isolation and characterization of plasmid DNA in *Lactobacillus acidophilus*. Agric. Biol. Chem. 55: 2051-2056 (1991)
15. Laemmli, U.K and Favre, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. DNA packaging events. J. Mol. Biol. 80: 575-590 (1973)
16. Rajagopal, S.N. and Sandine, W.E. Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. J. Dairy Sci. 73: 894-899 (1990)

(2001년 7월 26일 접수)