

# 유산균에 의한 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*의 생육억제에 관한 연구

김은아·백승천·정운현

서울우유 기술연구소

## A Study on Growth Inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by Lactic Acid Bacteria

E. A. Kim, S. C. Baick and W. H. Chung

Institute of Dairy Food Research, Seoul Dairy Cooperative

### ABSTRACT

The inhibitory effect of lactobacilli and bifidobacteria on the growth of typical intestinal pathogens, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* was studied. The degree of inhibition was measured by well disc assay and turbidimetry method. The strains which showed the higher antimicrobial activity were *L. acidophilus* La-5, *L. acidophilus* NCFM, *L. casei* Lc-01 on the average by using two different methods. The associative cultures were performed with selected 3 lactobacilli and 2 enteropathogens *E. coli* and *S. typhimurium*, respectively. Inhibition of pathogen began at 9hr after culturing so that viable counts was decreased rapidly. After 30hr incubation, there were no viable pathogens from the mixed culture. Under this experimental condition, the antimicrobial activity of lactic acid bacteria was not due to pH alone and supposed to different to the strains.

(Key words : Lactobacilli, Bifidobacteria, Antimicrobial activity, Associative culture)

### I. 서 론

Lactobacilli와 bifidobacteria는 정상인 intestinal microbialflora의 주요한 균총으로서 이 유산균은 acetic acids와 lactic acids를 생성하여 intestinal pH를 낮추어 장내 병원성균의 생육을 억제한다. 이러한 유산균의 항균작용은 pH effects 이외에도 여러 항균성 대사산물의 생성

에 기인한다(Apella 등, 1992; Gonzalez 등, 1993; Kim 등, 1997). 또한 여러 발효산물들에 의한 항암효과 및 면역증강작용이 있다고 보고되어 있다(Kroger와 Kurmann, 1989; Itoh, 1999). 유산균이 생산하는 항균성 대사산물로는 organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl,  $\beta$ -hydroxypropionaldehyde, bacteriocins 등이 보고되었으며(Adams와 Hall, 1988; 1993; Plockova

Corresponding author : E. A. Kim, Institute of Dairy Food Research, 1059 Shingil-Dong, Ansan-City, Kyunggi-Do, Korea. Tel : 031-491-3867 E-mail : eakim@seoulmilk.co.kr

등, 1997) 그 중 bacteriocin은 다른 항생제와 구별이 되는 항균활성을 가지고 있는 천연물질로서 그람양성균과 그람음성균의 생육에 영향을 미치는 단백질성 항생물질로 알려져 있다 (Abdel-Bar 등, 1987; ten Brink 등, 1994). 각종 병원균과 유해미생물에 대한 유산균의 항균작용에 관한 많은 연구가 국내외적으로 계속되고 있지만(Frank, 1991; Gilliland와 Speck, 1977; Lewus 등, 1991; 김 등, 1997) 유산균의 발효산물 중 어떤 물질이 인체에 유익한 작용을 하는지 명확히 규명되어 있지 않다(Mcfarland와 Elmer, 1995; Sanders, 1999).

따라서 본 실험은 상업적으로 사용되고 있는 유산균 8종과 비피더스균 2종을 사용하여 대표적인 유해 장내균총이며 식중독 유발균종인 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*의 성장억제 측정방법을 비교하였으며 유산균과 병원성균을 혼합배양하여 배양시간에 따른 성장억제를 시험하여 산업적 이용면에서 유산균의 항균활성에 관한 기초지식을 얻고자 시행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 미생물

장내 유해세균으로는 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Salmonella typhimurium* ATCC 13311을 시험대상 균주로 사용하였으며 유산균은 상업적으로 사용되는 균주인 Christian Hansen사 (Denmark)의 *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Lactobacillus casei* Lc-01, *Lactobacillus bulgaricus* Lb-12, *Bifidobacterium bifidum* Bb-12와 Rodia 사(U.S.A.)의 *Lactobacillus acidophilus*

NCFM, *Lactobacillus casei* LC911, *Lactobacillus helveticus* LH-166, *Bifidobacterium longum* BBL 및 *Lactobacillus reuteri* KCTC 3678, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3679를 사용하였다.

### 2. 배양조건

*E. coli* ATCC 25922와 *S. typhimurium* ATCC 13311는 tryptic soy broth(Difco Lab., U.S.A.)에 3회 연속 계대 배양하여 시험에 사용하였으며 균주보존은 tryptic soy agar(Difco Lab., U.S.A.) slant를 사용하여 1개월 마다 3회 연속 계대한 후 냉장 보존하여 사용하였다. 두 균주의 배양 조건은 37°C에서 16시간이었다. 유산균 Direct Vat System(DVS)는 0.5% yeast extract를 포함한 10% reconstituted skim milk에 3회 연속 계대하여 활성화 시켰으며 2주일에 한번씩 활성 유지를 위해 3회 연속 계대 배양하였다. 항균 활성측정용 시료제조(Biffi 등, 1997)에는 0.05% L-cystein-HCl(Sigma Chem. Co., U.S.A.)을 포함한 MRS-C broth(Difco Lab., U.S.A.)에 2% 접종하여 37°C에서 배양한 것을 사용하였다.

### 3. 생육억제물질 활성측정용 시료 제조

*Lactobacilli* 8균주와 *bifidobacteria* 2균주를 MRS-C broth에 2% 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 유산균 배양액을 원심분리(10,000×g, 15분)하여 균체 침전물을 제거한 후 상등액을 2N NaOH, 2N HCl을 사용하여 pH 6.0으로 중화하였다. 중화한 배양상등액을 0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과하고 water bath에서 10분간 열처리 한 후 4°C 이하에서 저장하였다(김 등, 1997).

#### 4. 생육억제물질의 항균활성측정법

##### (1) Well disc assay 방법

*E. coli* ATCC 25922와 *S. typhimurium* ATCC 13311의 active culture를 tryptic soy agar(TSA) 20 mL에  $1 \times 10^4$  CFU/mL 수준으로 첨가한다. 1 회용 배양접시에 멸균된 metal boring cylinder (직경 8 mm)를 세워둔 다음 seeded tryptic soy agar 20 mL를 배양접시에 부어 굳힌 후 실린더를 제거하여 천공평판을 만든다. TSA 50  $\mu$ L로 아래 쪽을 sealing한 후 agar plate를 4°C에서 2~3시간 완전히 굳힌다. 생육억제물질 시료 150  $\mu$ L를 흡에 주입하고 agar plate를 4°C에서 2시간 시료가 흡수되도록 방치한 후 32°C에서 16시간 배양하여 각각의 억제환을 관찰하였다 (Tramer와 Fowler, 1964).

##### (2) Turbidimetry 방법

생육억제물질 활성측정용 시료를 tryptic soy broth(TSB)에 20%(v/v) 첨가하고 공시험 용액은 열처리(121°C, 20 min)한 배양 상등액을 첨가하여 사용하였다. 대상시험균주를 초기농도  $1 \times 10^5$  CFU/mL로 접종한 후 32°C에서 16시간 배양한 다음 spectrophotometer (Agilent Technologies 8453 UV-Vis System, U.S.A.)로 660 nm에서 흡광도(O.D.)를 측정하였다. 유산균 배양액의 생육저해율 계산은 다음과 같이 하였다.

Inhibition rate(%) =

$$\frac{\text{O.D. in control} - \text{O.D. in culture with spent broth}}{\text{O.D. in control}} \times 100$$

#### 5. *E. coli* 및 *S. typhimurium*과 유산균의 혼합배양에 의한 생균수의 측정

동시접종배지 MRS-C broth에 유산균  $1 \times 10^7$  CFU/mL, enteropathogen  $1 \times 10^7$  CFU/mL 농도로 각각 접종하였다. 37°C 항온기에서 배양하며 시간별로 생균수를 duplicate로 측정하였고 pH는 pH meter(Orion, model 520A, U.S.A.)로 측정하였다. *E. coli*와 *S. typhimurium*은 TSA에 pouring method로 37°C 18시간 배양하여 전형적 장내세균 군락을 생균수로 측정하였으며 *L. acidophilus* La-5, *L. acidophilus* NCFM과 *L. casei* Lc-01은 MRS + 0.02%  $\text{NaN}_3$  agar를 이용하여 37°C에서 72시간 혐기성배양(Difco Anaerobic System, U.S.A.) 한 후 측정하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 생육억제물질의 항균활성 측정

##### (1) Well disc assay법에 의한 유산균의 생육억제능 측정

대표적인 장내 유해세균인 *E. coli*와 *S. typhimurium*에 대한 유산균 배양액의 항균활성을 well disc assay법에 의해 3회 측정한 평균치는 Fig. 1과 같다. *E. coli*는 25°C 16시간 배양한 후 억제환을 관찰하였는데 *L. acidophilus* La-5의 억제환이 18.67mm로 항균력이 가장 컸으며 *L. casei* Lc-01 18.00mm, *L. acidophilus* NCFM 17.67mm, *B. longum* BBL 16.83mm의 순으로 억제효과가 나타났다. *S. typhimurium*의 경우는 *L. acidophilus* La-5와 *L. acidophilus* NCFM이 18.00mm로 억제능이 동일했으며 다음은 *B. longum* BBL 17.67mm, *L. casei* Lc-01 16.67mm로 생육저해능이 높았다. 최근 관심의 대상이 되고 있는 *L. reuteri*의 경우는 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 다른 균주에 못 미치는 낮은 억제활성을 나타내었다. 또한 lactobaci'

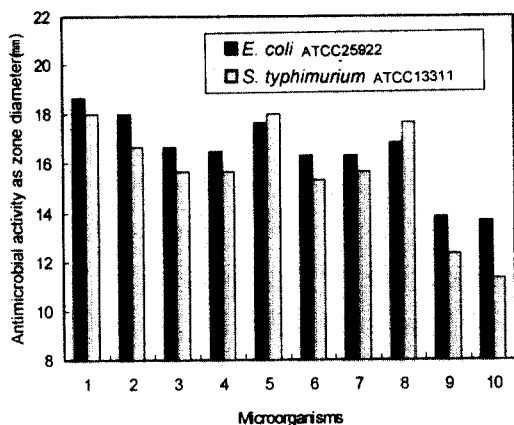


Fig. 1. Antimicrobial activity of lactobacilli and bifidobacteria strains on the growth of *E. coli* ATCC25922 and *S. typhimurium* ATCC13311 as measured by well disc assay

1. *L. acidophilus* La-5
2. *L. casei* Lc-01
3. *L. bulgaricus* Lb-12
4. *B. bifidum* Bb-12
5. *L. acidophilus* NCFM
6. *L. casei* LC911
7. *L. helveticus* LH166
8. *B. longum* BBL
9. *L. reuteri* KCTC3678
10. *L. reuteri* KCTC3679.

와 bifidobacteria의 발효대사산물로 항균작용의 주요 원인물질로 여겨지는 0.1 M lactic acid (pH 2.51), 0.1 M acetic acid(pH 2.75)의 경우는 거의 inhibition zone이 나타나지 않거나 미미하였다. 박(1980)의 보고에 의하면 유산균의 사멸 효과가 pH 때문만이 아니고 유산균이 생성하는 다른 억제물질 때문이라는 연구결과와 일치하였다. 따라서 유산균의 항균활성의 원인은 앞에서 언급한 바와 같이 여러 발효생성물이 작용하며 유산균의 종류에 따라 생육억제물질 활성이 차이가 있는 것으로 생각되며 유기산의 생성으로 인한 pH의 저하와 더불어 다른 항균물질이 역할을 한다고 볼 수 있다.

(2) Turbidimetry법에 의한 유산균의 생육저해를 측정

유산균 생육억제물질의 antimicrobial activity

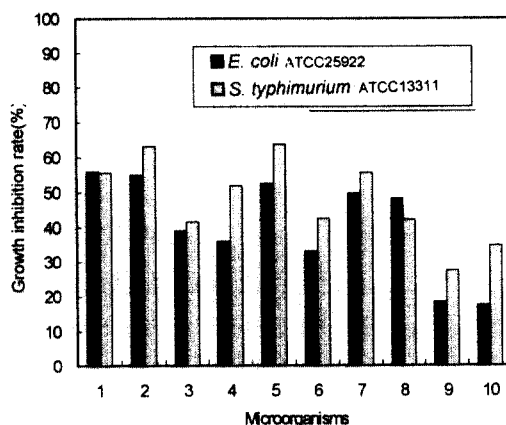


Fig. 2. Antimicrobial activity of lactobacilli and bifidobacteria strains on the growth of *E. coli* ATCC25922 and *S. typhimurium* ATCC13311 as measured by turbidimetry procedure.

1. *L. acidophilus* La-5
2. *L. casei* Lc-01
3. *L. bulgaricus* Lb-12
4. *B. bifidum* Bb-12
5. *L. acidophilus* NCFM
6. *L. casei* LC911
7. *L. helveticus* LH166
8. *B. longum* BBL
9. *L. reuteri* KCTC3678
10. *L. reuteri* KCTC3679.

를 turbidimetry법으로 생육억제율을 3회 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. *E. coli*에 대한 생육저해율이 가장 높은 유산균은 *L. acidophilus* La-5로 55.79% 였고 *L. acidophilus* NCFM은 52.45%이고 *L. casei* Lc-01은 55.02%로 높게 나타났다. *S. typhimurium*에 대한 저해율은 *L. acidophilus* NCFM이 63.64%로 가장 저해율이 높았는데 이 결과는 Gilliland와 Speck(1977)의 연구결과와 일치하였으며 *L. casei* Lc-01은 62.98%, *L. acidophilus* La-5는 55.70%로 나타났다. *E. coli*와 *S. typhimurium* 각각에 대한 생육억제율은 *L. acidophilus* La-5과 *L. acidophilus* NCFM이 가장 높았으나 두 유해균에 대한 평균억제율은 *L. casei* Lc-01이 가장 높은 것으로 나타났다. 유해세균에 대한 유산균의 증식억제능을 두 가지 항균활성 측정법으로 시험한 결과 well disc assay는 결과측정이 용이하였으나 turbidimetry

법이 정확하게 측정이 가능하였고 재현성이 더 좋은 것으로 나타났다.

2. *E. coli*와 *S. typhimurium*의 유산균 혼합 배양에 의한 경쟁시험

상기한 두 가지 방법으로 유산균 배양액의 항균활성을 측정된 결과 *E. coli* ATCC 25922에 대한 증식억제능이 제일 뛰어난 유산균은 *L. acidophilus* La-5이었고 *S. typhimurium* ATCC13311에 대한 증식억제능이 가장 우수한 균주는 *L. acidophilus* NCFM이었다. 또한 *L. casei* Lc-01는 평균적으로 증식억제능이 높은 것으로 나타났다. 항균물질을 함유한 유산균 배양액에 의한 항균활성이 경쟁배양시험 시 동일한 억제효과를 내는지 혼합배양시간에 따른 유해균의 사멸속도를 측정하였다. 각각의 생균수와 pH를 측정된 결과는 Fig. 3부터 8과 같이 나타났다.

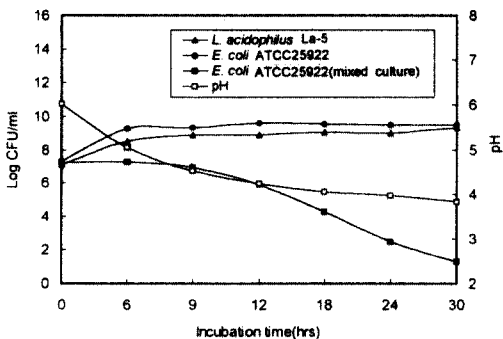


Fig. 3. Changes of viable cell counts and pH during associative cultivation of *L. acidophilus* La-5 with *E. coli* ATCC 25922.

Fig. 3은 *L. acidophilus* La-5와 *E. coli* 혼합배양 결과로 pH가 감소하는 시점인 6시간부터 균수가 감소하였고 12시간(pH 4.23) 배양 시는  $7.94 \times 10^5$  CFU/mL, 24시간(pH 3.97)에는  $3.09 \times$

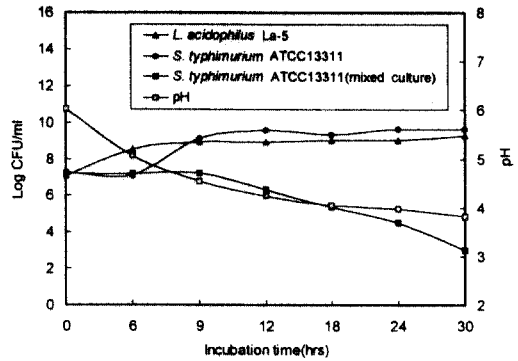


Fig. 4. Changes of viable cell counts and pH during associative cultivation of *L. acidophilus* La-5 with *S. typhimurium* ATCC13311.

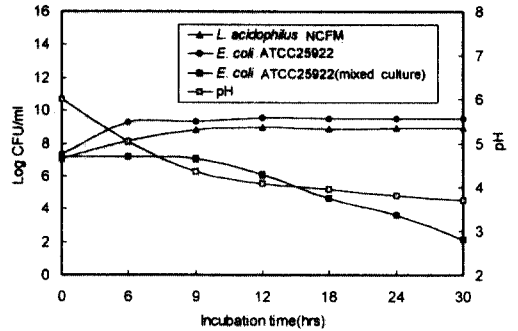


Fig. 5. Changes of viable cell counts and pH during associative cultivation of *L. acidophilus* NCFM with *E. coli* ATCC25922.

$10^2$  CFU/mL로 생균수가 급격히 감소하였다. Fig. 4는 *L. acidophilus* La-5와 *S. typhimurium* 혼합배양 결과로 배양 9시간까지 생균수가 유지되었으며 12시간 배양 시는  $2.09 \times 10^5$  CFU/mL, 18시간에는  $2.4 \times 10^4$  CFU/mL로 생균수가 감소하였다.

Fig. 5은 *L. acidophilus* NCFM과 *E. coli* 혼합배양 결과로 배양 9시간까지는 균수가 감소하지 않았으며 12시간(pH 4.07) 배양시에는  $1.32 \times 10^6$  CFU/mL, 18시간(pH 3.95)에는  $4.47 \times 10^4$  CFU/mL로 생균수가 감소하였다. Fig. 6는 *L.*

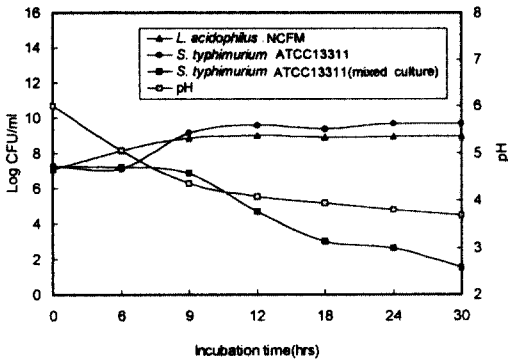


Fig. 6. Changes of viable cell counts and pH during associative cultivation of *L. acidophilus* NCFM with *S. typhimurium* ATCC13311.

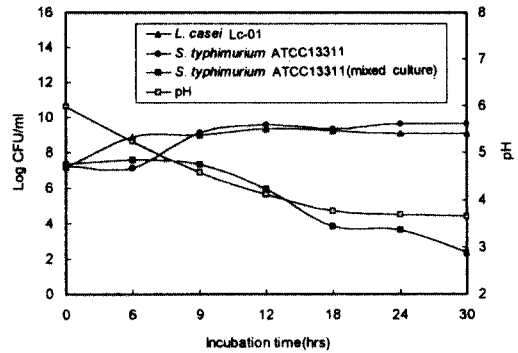


Fig. 8. Changes of viable cell counts and pH during associative cultivation of *L. casei* Lc-01 with *S. typhimurium* ATCC13311.

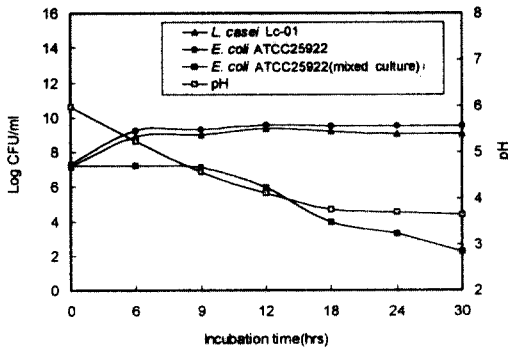


Fig. 7. Changes of viable cell counts and pH during associative cultivation of *L. casei* Lc-01 with *E. coli* ATCC25922.

*acidophilus* NCFM와 *S. typhimurium* 혼합배양 결과로 9시간(pH 4.36)부터 생균수가 감소하여 배양 12시간(pH 4.07)에는  $4.898 \times 10^4$  CFU/mL로 급격히 감소하는 경향을 나타냈다. 안 등 (1997)의 연구 결과와 같이 *S. typhimurium*은 유산균이 증식하여 pH가 변함에 따라 *E. coli*에 비해 생균수가 더 급격히 줄어들어 배양 24시간 후에는 생균수가  $4.57 \times 10^2$  CFU/mL로 감소하였다.

Fig. 7은 *L. casei* Lc-01과 *E. coli* 혼합배양 결과로 배양 12시간(pH 4.11) 배양시는  $8.91 \times$

$10^5$  CFU/mL, 18시간(pH 3.76)에는  $9.33 \times 10^3$  CFU/mL로 생균수가 감소하였다. Fig. 8은 *L. casei* Lc-01과 *S. typhimurium* 혼합배양 결과로 9시간(pH 4.57)에는 pH가 감소하여도 생균수가 유지되었으며 12시간(pH 4.11) 배양시는  $9.12 \times 10^5$  CFU/mL, 18시간(pH 3.76)에는  $7.08 \times 10^3$  CFU/mL로 생균수가 급격히 감소하였다. 혼합배양의 경우는 pH가 감소함에 따라 유해세균의 생육이 억제되는데 배양 24시간 이상 경과함에 따라 생균수가 거의 존재하지 않았다. 유산균 세 종류와 2종의 유해세균의 경쟁적 억제 작용을 살펴본 결과 well disc assay 및 turbidimetry법에 의한 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었으며 공통적으로 일정한 배양시간 9시간 이후부터 유해세균에 증식억제효과를 나타내어 생균수가 급격히 줄어들었다. *E. coli*와 혼합배양시는 *L. acidophilus* La-5과 *L. casei* Lc-01이 *L. acidophilus* NCFM보다 저해 경향이 우수하였고 *S. typhimurium*에 대해서는 *L. acidophilus* NCFM이 생육억제능이 우수하였다. 결과적으로 유해세균과 혼합배양시 유산균의 종류에 따라 상이한 생육억제 효과를 나타낸다고 사료된다.

#### IV. 요약

본 실험에서는 lactobacilli와 bifidobacteria에 의한 *E. coli*와 *S. typhimurium*에 대한 생육 억제능을 조사 하였다. 생육억제활성은 well disc assay와 turbidimetry method로 측정하여 비교하였다. 시험균주 10종 중에서 두 가지 방법 모두 평균적으로 높은 항균 활성을 나타낸 균주는 *L. acidophilus* La-5, *L. acidophilus* NCFM와 *L. casei* Lc-01인 것으로 나타났다. 선택된 3가지 유산균과 대표적 enteropathogen인 *E. coli*와 *S. typhimurium*을 각각의 혼합 배양하여 생균수를 측정 한 결과 병원성균 생육억제는 생균수가 급격히 감소하는 배양 9시간 이후부터 나타났으며 30시간 혼합배양 후에는 병원성균의 생균수는 거의 존재하지 않았다. 실험결과 유산균의 항균활성은 pH 저하 만에 의한 것이 아니었고 유산균의 종류에 따라 생육억제활성에 차이가 있었다.

#### V. 인용 문헌

1. Abdel-Bar, N., Harris, N. D. and Rill, R. L. 1987. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. J. Food Sci. 52(2):411-415.
2. Adams, M. R. and Hall, C. J. 1988. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acid and their mixtures. International J. Food Sci. Technol. 23:287-292.
3. Apella, M. C., Gonzalez, S. N., Nader de Macias, M. E., Romero, N. and Oliver, G. 1992. *In vitro* studies on the inhibition of the growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lact. acidophilus*. J. Appl. Bacteriol. 73:480-483.
4. Biffi, A., Coradini, D., Larsen, R., Riva, L. and Fronzo, G. Di. 1997. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. Nutr. Cancer. 28(1):93-99.
5. ten Brink, B., Minekus, M., van der Vossen, J. M. B. M., Leer, R. J. and Huis In't Veld, J. H. J. 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: Preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. J. Appl. Bacteriol. 77:140-148.
6. Frank, J. F. 1991. Mechanism of pathogen inhibition by lactic acid bacteria, The 7<sup>th</sup> International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Human Health, Seoul, Korea, p. 3-10.
7. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative cultures. J. Food Prot. 40:820-823.
8. Gonzalez, S. N., Apella, M. C., Romero, N. C. and Oliver, G. 1993. Inhibition of enteropathogens by *Lactobacilli* strains used in fermented milk. J. Food Protect. 56(9):773-776.
9. Itoh, K. 1999. Lactic acid bacteria and intestinal microflora, The 11<sup>th</sup> International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Human Health, Seoul, Korea, p. 23-25.
10. Kim, S. H., Kim, Y. K. and Gilliland, S. E. 1997. Screening and partial purification of bacteriocins by strains of *Lactobacillus acidophilus* isolated from human origin. Kor. Dairy Technol. 15(1): 21-26.
11. Kroger, M. and Kurmann, J. A. 1989. Fermented milks - past, present and future. Food Technol. 43:92-99.
12. Lewus, C. B., Kaiser, A. and Monteville, T. J. 1991. Inhibition of food-born bacterial pathogens by bacteriocins from Lactic Acid Bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 57(6):1683-1688.
13. Mcfarland, L. V. and Elmer, G. W. 1995. Biotherapeutic agents: Past, present and future. Microecol. Ther. 23:46-73.
14. Plockova, M., Chumchalova, J. and Tomanova, J. 1997. Antifungal activity of *Lactobacillus acidophilus*. CH5 metabolites. Potrav. Vedy. 15(1):39-48.

15. Sanders, M. E. 1999. Probiotics. Food Technol. 53(11):67-77.
16. Tramer, T. and Fowler, G. G. 1964. Estimation of nisin in foods. J. Sci. Food Agric. 15:522-528.
17. 김지란, 유제현, 이낙형, 이윤희, 이원창. 1997. 병원성 대장균 O157:H7에 대한 유산균발효유의 발육억제효과에 관한 실험적 연구. 한국유가공기술과학회지. 15(1):11-20.
18. 안영태, 신필기, 김현옥. 1997. 젖산균과 비피더스균에 의한 *Escherichia coli* O157:H7과 *Salmonella typhimurium*의 성장억제. 한국식품위생안전성학회지. 12(3):181-187.
19. 박은천. 1980. 유산균과 장내병원성 세균의 길항 작용에 관한 연구. 건국대학교 석사학위논문. (접수일자 : 2002. 4. 22 / 채택일자 : 2002. 7. 19)