

회분식과 연속식에 의한 루테린 생산 및 루테린의 항균 특성

염은미¹ · 김지연¹ · 신현경² · 지근억^{1,3,*}

¹서울대학교 식품영양학과, ²한림대학교 식품영양학과, ³(주)비피도 기술연구소

Production of Reuterin by Batch and Continuous Reactor and Antimicrobial Characteristics of Reuterin

Eun Mi Yum¹, Ji Yeun Kim¹, Hyun Kyung Shin², and Geun Eog Ji^{1,3,*}

¹Department of Food and Nutrition, Seoul National University

²Department of Food and Nutrition, Hallym University

³Research Center, Bifido Co.

Reuterin production efficiency of *Lactobacillus reuteri*, which converts glycerol into reuterin (antimicrobial substance) under anaerobic condition, was examined. When compared at 32, 37, and 42°C, production rate and total amount produced increased with increasing incubation temperature. Reuterin production terminated earlier at 42°C than at 32 and 37°C. Presence of various amino acids in the reaction mixture generally decreased reuterin production, whereas proline did not inhibit reuterin production. A continuous-type reactor in which glycerol was passed through the chamber containing *L. reuteri* cells produced greater amount of reuterin than when batch-type process was used.

Key words: *Lactobacillus reuteri*, reuterin, batch-type, continuous-type

서 론

유산균들은 식품의 제조 및 유통 과정 중에서 유해 세균의 증식을 억제하며 숙주의 장관내에서 효과적으로 정착할 경우 장관내의 유익한 환경을 조성하여 준다. 유해균들을 억제하는 작용을 갖는 유산균의 대사 산물들로서는 유기산, 과산화수소, 박테리옌 등이 알려져 있다(1,2). 일반적으로는 유산균의 항균 물질로서 가장 연구가 많이되고 있는 것은 단백질성 항균 물질인 박테리옌인데 대부분의 경우 박테리옌의 항균 범위는 매우 한정적이다. 또한 박테리옌의 경우 그 구조가 폴리펩타이드이기 때문에 단백질 분해효소에 의하여 저해능이 약해지거나 파괴되어 버리기도 한다(1,3). *Lactobacillus reuteri*는 항균물질로서 루테린을 분비하는데 Talarico 등(4)에 의하여 처음으로 보고되었으며 그 구조가 폴리펩타이드가 아니어서 열이나 단백질 분해효소에 의해 영향을 거의 받지 않는다. 또한 루테린은 그람 양성 및 음성 세균뿐만 아니라 효모, 곰팡이, 원생동물 등 매우 광범위한 미생물에 대한 항균력을 나타낸다(5). 루테린은 일종의 수용성 알데히드 저 분자물질이며 *L. reuteri*

에 의해 글리세롤이 대사되면 1,3-propandiol(1,3-PDL), β -hydroxypropionic acid와 함께 루테린이 생성되는데 비타민 B₁₂를 조효소로 사용하는 glycerol dehydratase는 반응의 첫 번째 단계에, 1,3-PDL:NAD⁺ oxidoreductase는 두 번째 단계에 관여하는 것으로 알려져 있다(4). 루테린의 화학명은 β -hydroxypropionaldehyde(β -HPA)로 분자량은 148이며 수용액 상에서는 β -HPA의 monomeric, hydrated monomeric, cyclic dimeric form의 3가지 형태가 평형상태로 존재한다고 알려져 있다(4,6). 그동안 루테린과 *L. reuteri*-glycerol system을 식품산업 및 의학치료에 적용하려는 연구들이 진행되어 왔으며 현재 국내에 루테린 생산 균주를 이용한 요쿠르트 제품이 판매되고 있다(7-11). 따라서 루테린의 인체 안전성에 대한 보다 면밀한 검토가 요구된다. *In vitro*에서 mouse 유래의 3T3 fibroblasts 세포주로 MTT 분석을 한 결과, 루테린의 MTT₅₀은 19.5 ppm으로 보통의 세포 고정액으로 사용하는 glutaraldehyde의 4.5 ppm과 비교하여 약한 세포 독성을 나타내고 있으나 식품 또는 장관내에 존재하는 루테린의 양이 인체의 안전에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 추가 연구도 필요할 것이다. 그 동안의 루테린 생산은 주로 글리세롤의 영향에 대한 연구가 주로 이루어졌을 뿐 루테린의 생산에 대한 다양한 환경적 인자 및 생산 방법에 대한 연구는 아직 미비하다고 할 수 있다. 따라서 본 연구의 루테린 생산에 대한 배양적 및 환경적 검토와 항균 스펙트럼에 대한 추가적 분석은 루테린의 산업적 활용 및 안전성 검사에 기초 자료를 제공할 것이다.

*Corresponding author : Geun Eog Ji, Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
Tel: 82-2-880-8749
Fax: 82-2-884-0305
E-mail: geji@bifido.com

재료 및 방법

사용균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 균주는 ATCC에서 구입한 *L. reuteri* ATCC 53608 균주를 사용하였다. 본 배양시에는 MRS broth에 접종하여 계대 배양한 배양액을 3% 접종하였고 37°C 배양기에서 15-18 시간동안 혐기적인 상태로 배양하였다. 세포의 증식정도는 상법에 의하여 spectrophotometer(O.D. 600 nm)에서 탁도를 측정하거나 건조 균체량 측정을 위하여 4,000×g에서 원심 분리하여 수세한 세포 pellet을 건조하여 항량을 구하였다. 루테린의 항균성을 실험하기 위한 지시균 배양을 위하여 *Escherichia coli* K12, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*는 LB 배지에, *Staphylococcus aureus*는 TSB 배지에 *Propionibacterium acnes*는 RCM 배지에 배양하였다.

항균력 검사

항균력 검사에 사용된 각각의 지시균들은 overnight culture를 통해 약 6×10^8 CFU/mL로 배양하였고 4000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 사용하였다. 항균성은 각 지시균의 성장 저해 정도를 흡광도 또는 MIC(minimal inhibition concentration assays) 검사를 수행하여 관찰하였다. MIC는 연속된 2-fold 희석식 방법을 사용하여 지시균의 성장을 확인 할 수 없을 때까지의 최소 루테린의 함량이라고 정의하였다(12). 루테린의 상대적 활성은 MIC까지 도달할 때의 희석배수를 AU(activity unit) 단위로 나타내었다. 아미노산 존재하에서의 루테린 생산 실험에서는 각 아미노산을 50 mM과 100 mM을 cell-glycerol 현탁용액에 넣었고 대조구는 아미노산을 넣지 않았다. 모든 시료는 루테린을 생성하도록 37°C 배양기에서 24시간 보존하였다.

루테린 정량법

루테린(β -hydroxypropionaldehyde, β -HPA) 함량의 분석법은 Luthi-Peng 등의 분석법에 준하였고 acrolein을 표준물질로 사용하였다(13). 실험을 위하여 0.05 N HCl 용매에 tryptophan(Trp)를 넣어 최종 10 mM의 Trp-HCl용매를 만들었다. 다음은 10 mM Trp-HCl 용매를 38 μ L, 루테린 시료 50 μ L, 37% HCl 150 μ L를 혼합하여 37°C 배양기에서 20분간 반응시켰다. 그 후, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 반응액의 absorbance를 측정하였다. 필요에 따라 시료를 증류수를 사용하여 희석하여 실험하였다.

회분식에 의한 루테린 생산

본 실험에서는 루테린 생산법으로 two-step fermentation process-homologous method를 사용하였다(5). MRS broth에서 15-18 시간 배양된 *L. reuteri* 세포는 4,000×g, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 회수되었다. 회수된 균은 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5로 두 번 수세하고 1시간 starvation time을 주었다. 수세된 세포는 배양액 부피의 5%에 해당하는 250 mM 글리세롤 용액에 재현탁하여 37°C 배양기에서 혐기적으로 유지하며 일정 시간별로 시료를 채취하였다. 반응 시료는 8,000×g, 4°C에서 25분 동안 원심분리한 다음, 상등액을 회수하여 0.22 μ m 여과기를 사용하여 여과한 후에 분석에 이용하였다. 온도 별 루테린 생산 실험에서는 1시간 단위로 반응액을 회수하고 다시 동량의 글리세롤 용액을 가하여 실험하였다.

연속식 공정에 의한 루테린 생산

연속식 생산을 위하여는 생산 균주가 흐르는 용매와 함께 반

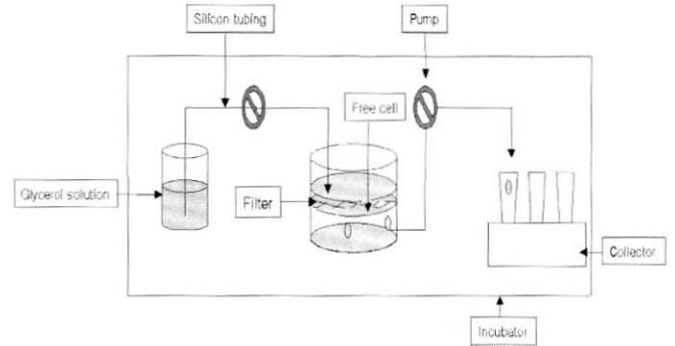


Fig. 1. Continuous type process for reuterin production by *L. reuteri*.

응조의 밖으로 유실되는 것을 막기 위한 장치가 필요하였다. 따라서 본 실험에서는 루테리 균의 세포를 보유하기 위한 반응조 설계를 위하여 Nalgene disposable filterware(115 mL)를 사용하였는데 이 제품의 경우 0.45 μ m의 여과막이 중간에 장착되어 있으며 상층과 하층으로 구획되어 있는 것을 이용하였다. 준비한 세포 현탁액을 상층에 넣고 magnetic bar를 돌리면 일정속도로 세포가 포함되지 않은 반응액이 밑으로 떨어지게 되고 하층의 반응액은 tube를 통해 collector에 모으는 방식으로 실험을 설계하였다. 여과기에서 떨어지는 반응액의 속도는 하층 반응액의 유입, 유출압이 맞게되면 일정 속도로 전체적 용매의 흐름이 유지되었다. 전체적인 반응조의 구조는 Fig. 1과 같다. 원심분리된 세포는 배양액의 10%에 해당하는 250 mM 글리세롤 용액에 현탁하여 40 mL를 반응조 상층부에 투입하였다. 그 다음, 글리세롤 용액이 pump(ISCO pump)에 의해서 살균된 silicon tube를 통해 free cell-glycerol mixture를 포함하는 여과기의 상층부로 유입되었다. 유속은 0.45 mL/min로 일정하게 유지시켰고 free cell-glycerol mixture의 용액은 여과기(0.45 μ m)를 통해서 일정 속도로 아래로 떨어졌다. 최종적으로 하층부의 반응액은 튜브를 통해서 pump에 의해 일정속도로 fraction collector(Amersham bioscience redifrac fraction collector)의 시험관에 수집되었다. 시험관 한 개당 수집된 반응액의 용량은 9 mL이며 수집시간은 한 개당 20분으로 설정하였다.

결과 및 고찰

회분식에 의한 루테린 생산 및 루테린의 항균 특성

본 실험에서는 루테린 생산에 대한 온도의 영향을 조사하였으며 각 시간별로 새로운 글리세롤 용액으로 대체하여 시간에 따른 추가적인 루테린 생산성을 조사하였다(Fig. 2). 서로 다른 3가지의 온도에서 실험한 결과, 32°C에서는 8시간까지 루테린이 꾸준히 생산되었으나 시간당 생산량은 비교적 적었다. 37°C에서는 총 9시간 동안 루테린이 생성되었으며 5시간 반응 시료에서는 최고 6.7 mM까지 생성되었다. 42°C에서는 4시간까지 시간 당 거의 20 mM 정도의 루테린이 생성되는 것으로 조사되었으며 다른 온도 조건에 비해서 단 시간 안에 많은 양의 루테린이 생산되는 것으로 나타났다. 그러나 4시간 이후에는 생산성이 급격히 저하되는 것으로 나타났는데 이것은 효소의 불활성화에 의한 것인지 또는 반응에 관련되는 비타민 B₁₂ 등의 조효소 또는 다른 관련 인자의 소실에 의한 것인지는 추가적으로 조사하는 것이 흥미로울 것이다. 다른 하나의 관련 요인은 생산 세포의 활성과도 관련이 있을 것이다. 루테린을 생

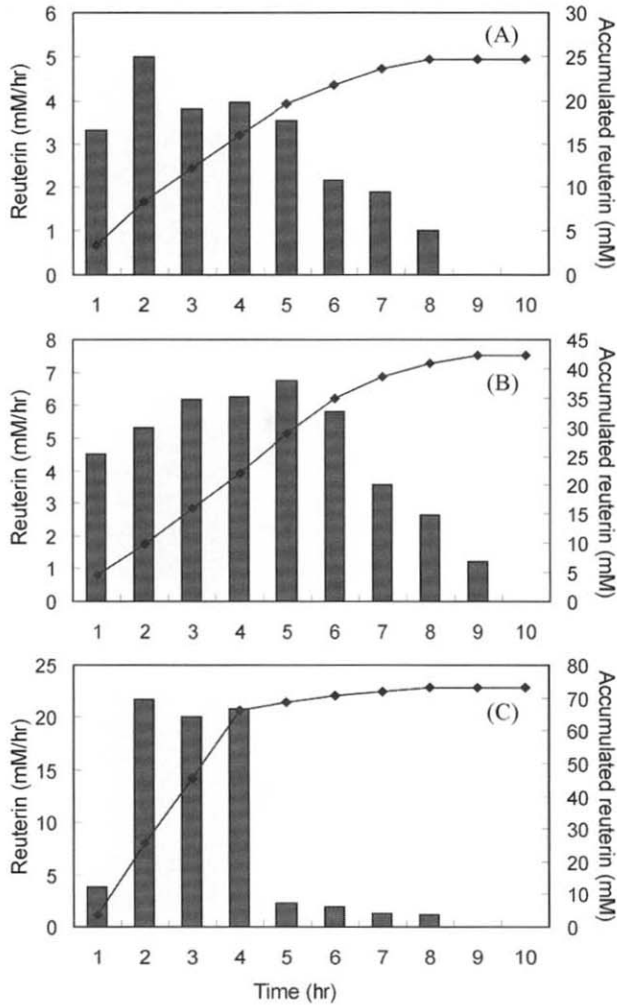


Fig. 2. Batch-type production of reuterin using free cell of *L. reuteri* at various temperature ((A) 32°C, (B) 37°C, (C) 42°C). Bar: left axis, represents reuterin produced per hour. Line and dot: right axis, represents cumulative reuterin production.

산하는 세포 자신도 생산되는 루테린에 의하여 사멸된다. 따라서 초기에 활발하게 생산되는 루테린은 시간의 경과에 따라 생산 균주를 사멸시켜 결국 일정 시간 후에 루테린 생산성을 급격히 저하시키는 또 하나의 요인으로 작용할 가능성이 있다. 생산되는 총량은 42, 37, 32°C의 순으로 나타났다. 온도 이외의 반응 조건을 달리하면 온도별 생산성의 또 다른 변화가 일어날 수도 있을 것이다. 온도에 따라 생산성에 관여하는 요인

이 다양할 것으로 생각되며 하나의 반응 인자를 변화시켰을 때 그 반응 인자가 반응 효소의 열 안정성, 세포의 사멸률, 보조 인자의 농도 등에 서로 다른 영향을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

생산된 루테린을 이용하여 다양한 균들에 대한 항균력을 조사하였다. 항균력은 10 AU의 루테린을 함유하는 각각의 배지 (재료 및 방법)에 *E. coli* K12, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. acnes*을 접종하여 10시간 동안 배양하여 탁도를 조사하였으나 모든 균주에서 성장이 전혀 관찰되지 않았고 또한 디스크법에 의한 검사에서도 모두 항균환을 나타내었다(자료 제시 없음). 루테린 존재하에서 생존하는 균수를 조사하기 위하여 *E. coli* K12, *S. typhimurium*, *S. aureus*를 지시균으로 사용하였을 때(Table 1), 루테린을 10 AU 함유한 LB배지의 경우에 2시간 또는 4시간내 접종된 균이 모두 사멸하여 생균수가 관찰되지 않았다. 반면 루테린을 함유하지 않은 대조군의 경우, 균이 접종된지 2시간 이후에 모든 균이 급격히 분열하여 6시간에는 10⁸ CFU/mL 이상으로 현저히 증식한 것으로 나타났다.

루테린 생성에 미치는 아미노산 첨가의 영향

본 실험에서는 몇 종류의 아미노산 첨가가 루테린 생성 반응에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 3). Glutamine을 함유한 시료의 경우 항균효과는 대조구와 비교하여 약 50% 정도 감소한 것으로 나타났고 arginine과 glycine의 경우에는 생성된 루테린의 활성이 매우 미약하였다. 그러나, proline의 경우에는 영향이 거의 나타나지 않았다. 첨가된 아미노산의 종류에 따른 루테린 활성 차이가 나타난 이유는 아직 명확하지 않다. 각 아미노산의 아미노기 구조 특성에 따라 생산되는 루테린의 알데하이드 간에 반응성에 차이가 나는 것이 하나의 이유가 될 수 있을 것이다. Proline은 실험에 사용된 다른 아미노산과 구조적으로 다른 형태를 보인다. 예를 들어 proline의 경우 고리형 구조에 연결된 이미노기(-NH₂)를 가지고 있는 특징이 있다. 이와 같은 proline의 분자 특성이 루테린의 활성에 영향을 나타내었을 것으로 추정된다. 본 실험의 결과는 루테린을 식품에 적용할 경우 식품내에 존재하는 아미노산의 종류에 따라 루테린 활성이 달리 나타날 수 있음을 시사한다.

연속식 공정에 의한 루테린 생산

연속식 공정을 이용한 루테린 생산을 시도한 이유는 다음과 같다. 첫째, 생산된 루테린이 계속 반응기내에 머물러 있을 경우 *L. reuteri* 또한 항균작용의 영향을 받게되므로 지속적인 항균물질의 생산과 균의 활력을 꾸준히 유지하기 위해서는 루테린을 포함하는 용액을 계속 새로운 용액으로 교체하는 것이 필

Table 1. Number of survival cells of pathogenic bacteria during incubation in the presence of reuterin

	Incubation time (hr)											
	0		2		4		6		8		10	
	Control	Reuterin ¹⁾	Control	Reuterin	Control	Reuterin	Control	Reuterin	Control	Reuterin	Control	Reuterin
<i>E. coli</i>	4.0 × 10 ⁶	4.0 × 10 ⁶	6.0 × 10 ⁶	1.0 × 10 ³	2.0 × 10 ⁷	0	6.0 × 10 ⁸	0	6.0 × 10 ⁸	0	9.0 × 10 ⁸	0
<i>S. typh</i>	1.8 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁷	2.4 × 10 ⁷	4.0 × 10 ³	6.2 × 10 ⁸	0	5.6 × 10 ⁸	0	7.0 × 10 ⁸	0	7.5 × 10 ⁸	0
<i>S. aureus</i>	3.0 × 10 ⁷	3.0 × 10 ⁷	4.0 × 10 ⁷	2.0 × 10 ⁶	2.0 × 10 ⁸	1.0 × 10 ⁶	3.0 × 10 ⁸	0	4.0 × 10 ⁸	0	4.0 × 10 ⁸	0

¹⁾Reuterin at the concentration of 10 AU.

²⁾*E. coli*: *Escherichia coli* K12.

³⁾*S. typh*: *Salmonella typhimurium* KCCM 40253.

⁴⁾*S. aureus*: *Staphylococcus aureus* KCCM 11335.

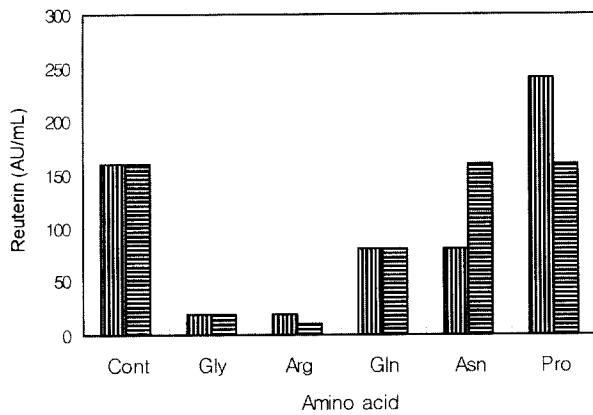


Fig. 3. Comparison of reuterin production in the presence of various amino acids.

Bars with vertical line, 50 mM amino acid. Bars with horizontal line, 100 mM amino acid. Cont: Control, Gly: glycine, Arg: arginine, Gln: glutamine, Asn: asparagine, Pro: proline.

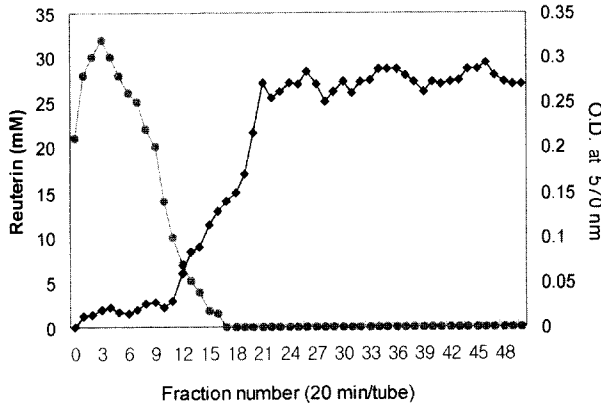


Fig. 4. Amount of reuterin and antibacterial activity of different fractions produced by continuous-type process.

-●-: Amount of reuterin, -◆-: Cell growth (OD at 570 nm) of *E. coli* K12 after treatment with reuterin produced at different fractions.

요할 것으로 생각하였다. 두 번째로는 연속식 생산 공정을 통하여 일정한 반응 조건에서 루테린이 생산되므로 루테린 생산의 패턴을 보다 효과적으로 분석할 수 있는 장점이 있기 때문이었다.

실험은 37°C에서 수행되었으며 실험의 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 연속식 공정에서 수집된 각 분획시료는 1/2 희석된 시료를 이용하여 항균능력을 측정 한 결과, 약 3시간 40분, 즉 fraction collector의 11번째 tube까지 수집된 시료가 *E. coli* K12의 증식을 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 이 때까지 루테린 생산농도가 대부분 20 mM 이상으로 유지되어 37°C 회분식 배양의 약 5 mM 농도에 비하여 4배 정도의 농도로 생산되는 것으로 나타났다. 사용된 균주의 현탁 농도도 회분식이 연속식에 비하여 2배에 해당하는 것을 고려하면 실제로는 회분식에 비하여 연속식은 생산되는 루테린의 양을 현저히 증가시키는 것으로 조사되었다. 이는 회분식에 비하여 연속식에서는 생산되는 루테린이 정지되어 있는 시간을 현저히 줄여 주어 루테린에 의한 생산균의 활성 저하를 감소시켜 준 효과에 기인한 것으로 생각된다. 루테린의 생산성을 보다 더 증진시키기 위하여는 생산되는 루테린을 생산균주로부터 보다 효과적으로

격리시키는 방법을 고안하는 것이 추후 필요할 것이다. 또한 생산 균주의 안정화에 대한 연구도 필요할 것이다. 본 연구에서는 루테린의 β -HPA의 monomeric, hydrated monomeric and cyclic dimeric form의 3가지 형태에 대한 자세한 분석은 이루어지지 않았다. 회분식과 연속식 또는 기타의 각기 다른 반응에서 생산되는 루테린의 형태별 비율이 상이할 가능성이 있고 이 또한 루테린 항균활성의 극대화 연구를 위한 추가 연구에서 분석되면 좋을 것이다.

요 약

*Lactobacillus reuteri*는 혐기적 조건에서 글리세롤을 대사하여 강력한 항균물질인 루테린을 생산한다. 본 연구의 목적은 다양한 조건에서 루테린의 생산성을 비교 연구하는 것이었다. 회분식 배양에서 32, 37, 42°C에서 비교하였을 때 온도가 높을수록 시간당 생산되는 양은 많았고 생산이 더 빠른 시간내에 둔화되었으며 생산되는 총량이 더 많았다. 다양한 아미노산을 첨가한 상황에서 생산된 루테린 활성을 조사하였을 때 proline을 제외하고 대부분의 아미노산은 루테린 활성을 저하시켰다. 생산된 루테린은 다양한 식중독균의 사멸을 유도하였다. 생산성을 증가시키기 위하여 *L. reuteri* 세포를 반응기에 현탁시키고 글리세롤 용액을 연속적으로 통과시켰다. 회분식에 비교하여 연속식 공정으로 루테린 생산성은 현저히 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 연구비 지원(01-PJ1-PG1-01-CH14-0001)에 의하여 수행되어 이에 감사드립니다.

문 헌

- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food. Microbiol.* 71: 1-20 (2001)
- Ahn C, Kim CH, Shin HK, Lee YM, Lee YS, Ji GE. Antibiosis of pediocin-producing *Pediococcus* sp. KCA1303-10 against *Listeria monocytogenes* in mixed cultures. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 429-436 (2003)
- Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337-349 (1988)
- Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 674-679 (1989)
- Dobrogosz WJ, Lindgren SE. Method of determining the presence of an antibiotic produced by *Lactobacillus reuteri*. US patent. 5,352,586 (1994)
- Ganzle MG, Holtzel A, Walter J, Jung G, Hammes WP. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4325-4333 (2000)
- El-Ziney MG, Debevere JM. The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 in milk and cottage cheese. *J. Food Prot.* 61: 1275-1280 (1998)
- Lindgren SE, Dobrogosz WJ. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-163 (1990)
- Daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 4: 164-167 (1989)
- Speck ML, Dobrogosz WJ, Casas I. *Lactobacillus reuteri* in food supplementation. *Food Technol.* 7: 90-94 (1993)
- Chen CC, Chen JY, Lee SR. Growth inhibition of glycerol metabolites of *Lactobacillus reuteri* on microorganisms and human cancer cell lines. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.* 37: 117-125 (1999)

12. Chen CN, Sung HW, Liang HF, Chang WH. Feasibility study using a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* in sterilizing and crosslinking biological tissues. J. Biomed. Mater. Res. 61: 360-369 (2002)
13. Luthi-Peng Q, Scharer S, Puhon Z. Production and stability of 3-

hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 73-80 (2002).

(2003년 12월 5일 접수; 2003년 12월 30일 채택)