

Lactobacillus spp., *Bifidobacterium* spp. 및 *Bacillus coagulans*의 과산화수소 저항성과 과산화수소 생성 능력

이 종 혁 · 윤 영 호
중앙대학교 산업과학대학 동물자원학과

Resistant Activity to Hydrogen Peroxide of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacillus coagulans* and Hydrogen Peroxide Generation Capability of *Lactobacillus* spp.

J. H. Lee and Y. H. Yoon
Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University

ABSTRACT

Studies on the resistance of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. and *Bacillus coagulans* to hydrogen peroxide were conducted by determination of the viable cells after the test cells in 2mM hydrogen peroxide solution for a predetermined time; *L. acidophilus* CU4111 and *L. casei* CU4114 were most resistant to the hydrogen peroxide among the fifteen test lactobacilli strains, whereas *L. brevis* CU4206 was the strain which was the most susceptible to hydrogen peroxide. *Bifidobacterium longum* CU4131 was one of the resistant strains. A prominent tendency found out that *Bacillus coagulans* possessed a strong resistance to hydrogen peroxide. The results of level of hydrogen peroxide determination in the cell extracts showed all the test strains contained hydrogen peroxide in the cytoplasm, the amount varied depending on the strain and species of lactic acid bacteria. *Bifidobacterium bifidum* CU 4134 and *L. casei* CU 4114 were potent hydrogen peroxide producer strain.

(Key words : Hydrogen peroxide, Resistance, Generation, Lactobacilli, *Bacillus coagulans*, *Bifidobacterium*)

I. 서론

과산화수소는 식품 포장재료에 오염된 미생물을 효과적으로 살멸하기 위한 소독제로 널리 사용하지만 유익한 미생물로 이용도가 높은 lactobacilli, streptococci 및 pediococci 등 유산균은 catalase와 cytochrome system이 없어 중요한 대사산물로서 과산화수소를 생

성한다 (Dahiya 등, 1968; Eschenbach 등, 1989).

미생물 세포 내에서 과산화수소 생성 과정에는 flavoprotein oxidase와 superoxide dismutase(SOD) 등 효소작용에 의하여 생성되며 과산화수소의 미생물 억제 능력은 반응성이 강한 세포독성을 나타내는 hydroxyl(OH)기와 superoxide기 (O_2^-)에 기인되는 것으로 알려져 있다 (Badwey 등, 1979; Balow 등, 1969; Garcia-Mendoza, 1993; Perticone 등, 2003). 산화적인 stress는 세포 내에 비정상적으로 높은 수준의 반응성 산소가 생성되었을 때 일어나게 되어 세포의 DNA 단백질 및

Corresponding author : Y. H. Yoon, Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea.

지질에 손상을 일으켜 치사상태로 이르게 한다.

우유에서 나타나는 과산화수소의 세균억제작용은 lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system에 의하여 나타나며 lactoperoxidase 효소는 천연적인 방어 기능을 담당하며 우유 중에는 높은 농도로 함유되는 것으로 알려져 있으며 이 효소는 thiocyanate를 과산화수소에 의하여 hypothiocyanate로 산화축매작용을 하게 되며 이 물질은 세균의 대사작용에 있어 필수적인 효소의 amino group이나 thiol group에 산화 반응을 일으켜 미생물 억제효과를 나타낸다 (Smart와 Thomas,

1987).

본 연구에서는 산업적인 활용도가 높은 *Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* 및 *Bacillus* spp.의 항산화 활성을 측정하기 위하여 과산화수소에 노출되었을 때 나타내는 저항성과 균주별 과산화수소 생성 정도를 측정하기 위하여 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 배지 및 배양방법

Table 1. Sources of strains of used in this investigation

Species	Strains	Source
<i>Bacillus coagulans</i>	CU4101	중앙대학교 낙농미생물학실험실
<i>B. coagulans</i>	CU4102	"
<i>B. coagulans</i>	CU4103	"
<i>B. coagulans</i>	CU4104	"
<i>B. coagulans</i>	CU4105	"
<i>B. coagulans</i>	CU4106	"
<i>B. coagulans</i>	CU4107	"
<i>B. coagulans</i>	CU819	"
<i>Bacillus polypermenticus</i> SCD	CU4108	"
<i>Lactobacillus sporogenes</i>	CU4109	"
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	CU4110	"
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CU4201	"
<i>L. rhamnosus</i>	CU4202	"
<i>L. helveticus</i>	CU4231	"
<i>L. plantarum</i>	CU4203	"
<i>L. brevis</i>	CU4205	"
<i>L. brevis</i>	CU4206	"
<i>L. acidophilus</i>	CU4111	"
<i>L. rhamnosus</i>	CU4112	"
<i>L. acidophilus</i>	CU4113	"
<i>L. casei</i>	CU4114	"
<i>L. casei</i>	CU4126	"
<i>L. acidophilus</i>	CU4127	"
<i>L. acidophilus</i>	CU4128	"
<i>Bifidobacterium iongun</i>	CU4131	"
<i>Bifidobacterium infantis</i>	CU4132	"
<i>Bifidobacterium lactis</i>	CU4133	"
<i>Bifidobacterium longum</i>	CU4134	"

본 연구에 사용한 *Lactobacillus* spp. 및 *Bacillus coagulans*는 Table 1에 제시된 바와 같다.

Lactobacillus spp.의 배양은 37°C MRS(DeMan-Rogosa-Sharpe, Difco, USA) broth를 사용하였고, 보존은 0.75M adonitol을 함유한 11% skim milk의 동해방지제와 원심분리한 cell을 1:1로 혼합 후 -70°C에서 냉동 보존하였다. *Bacillus coagulans*는 *Bacillus coagulans* broth(Difco, USA)에서 배양을 하였고, cell의 보존은 배양액과 80% glycerol을 7:3의 비율로 혼합하여, -70°C에서 보관하였다.

2. 과산화수소에 대한 사용균주의 저항성 측정

Lactobacillus 균주와 *Bifidobacterium*은 MRS 배지에, *Bacillus* 균주는 BCB 배지에 각각 24시간 배양하고 배양된 균주들을 원심분리하여 균체를 pellet화한 후 상층액은 버리고 isotonic saline(sodium chloride 0.85%)을 이용하여 2~3회 세척한다. 세척 후 isotonic saline으로 재부유를 하여 spectrophotometer로 OD값을 측정하여 균주들을 10⁷ CFU/ml로 일정하게 한다. 이 균주들을 2mM의 hydrogen peroxide(30 wt.% solution in water)가 들어 있는 isotonic saline에 접종 후 37°C에서 incubation하고 60min 간격으로 MRS 및 BCB agar를 이용하여 plate count하여 생존수 측정을 한다.

3. 균주의 과산화수소 생성능력 측정

과산화수소 생성능력의 측정은 Ou and Wolff(1996)의 방법을 이용하였다. 균을 MRS 배지에 12시간 배양 후 배양된 균 0.075ml와 FOX 1 reagent (composed of 250uM ammonium ferrous sulphate, 100uM xylenol orange, 100mM sorbitol in 25mM H₂SO₄) 1.425ml와 혼합한 후 실온에서 30분간 배양한다. 배양 후 protein과 cell을 제거하기 위해 원심분리 하고 상층액을 채취하여 UV/VIS Spectrophotometer 560nm에서 흡광도를 측정한다(FOX1 : Peroxoquant, aqueous compatible formulation, Pierce, IL).

III. 결과 및 고찰

1. Lactobacilli에 대한 효과

Lactobacillus 15균주에 대한 과산화수소 저항성 측

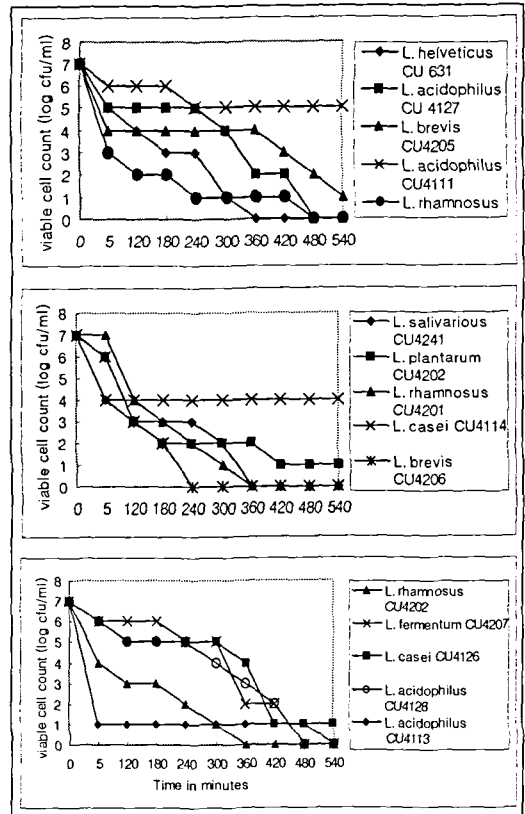


Fig. 1. Resistance of lactobacilli to hydrogen peroxide.

정 결과는 Fig. 1에 제시된 바와 같다.

15균주중 3균주만이 2mM의 Hydrogen peroxide에 대하여 저항성을 나타내었고 540분간 시험기간 중 사멸되는 결과를 나타내었으며 낮은 저항성을 보인 균주는 *L. brevis* CU4206, *L. rhamnosus* CU4201, *L. rhamnosus* CU4202인 것으로 확인되었다.

가장 높은 저항성을 나타낸 균주는 *L. acidophilus* CU4111로 540분 경과 이후에도 생존균수가 log 5 수준을 유지하였다. *L. casei* CU4114는 생존균수 log 4 수준을 나타내어 매우 저항성이 높은 균주로 확인되었고 *L. plantarum* CU4202 *Lactobacillus brevis* CU4205도 저항성이 비교적 높은 균주인 것으로 나타났다.

Kullisa(2002) 등은 항산화 활성이 강한 균주는 과산화수소에 대한 저항성이 비례적으로 높은 것으로 보고한 바 있으며 이 현상은 *L. casei* CU 4114에서도 동일한 성향이 있는 것으로 확인되었다.

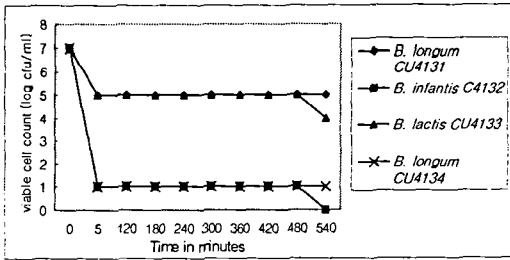


Fig. 2. Resistance of *Bifidobacterium* to hydrogen peroxide.

2. Bifidobacterium spp.와 Bacillus coagulans.의 과산화수소 저항성

Bifidobacterium spp.의 과산화수소 저항성은 Fig. 2에 제시되었고 *Bacillus coagulans*를 포함한 spore 형성 유산균의 과산화수소 저항성은 Fig. 3에 제시되었다. 사용된 *Bifidobacterium* spp. 4균주 중에서 *Bifidobacterium longum* CU4131이 가장 높은 과산화수소 저항성을 나타내었다. *Bacillus coagulans* 시험균주 9균주는 전반적으로 높은 과산화수소 저항성을 나타내었고 *Bacillus coagulans* CU4106이 가장 높은 저항성을 나타내었으며 이는 catalase 생합성 체계를 세포 내에 함유하고 있어 과산화수소를 분해함으로써 저항성을 나타낸 것으로 보인다. 포자형성균에 의한 과산화수소 저항성이 나타나는 기작은 포자 내부에 비특이성인 DNA 결합 단백질이 고농도로 존재한다는 것과 또한 포자 중심부에 수분함유율이 낮다는 사실에 근거한다. 또한 과산화수소에 의한 포자의 사멸은 포자의 germination 과정에서 한 단계 혹은 여러 단계에서 억제 혹은 불활성화하거나 포자의 내부막에 대한 심한 손상을 야기함에 기인된 것으로 밝혀진 바 있다 (Melly 등, 2002).

3. Lactobacillus spp. 및 Bifidobacterium spp.의 과산화수소 생성 능력

Lactobacilli spp. 및 *Bifidobacterium* spp.의 과산화수소 생성 능력 측정 결과는 Fig. 3에 제시된 바와 같다. 측정균주 19균주중 세포추출액 중에 함유된 과산화수소 농도가 가장 높은 균주는 *Bifidobacterium bifidum* CU 4134인 것으로 나타났고 *lactobacilli* 중에서 가장

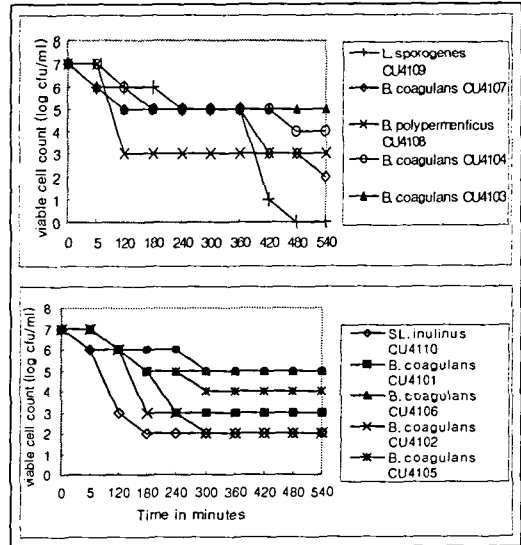


Fig. 3. Resistance of *Bacillus coagulans* to hydrogen peroxide.

높은 균주는 *L. casei* CU 4114인 것으로 나타났으며 측정균주 전체에서 나타나는 공통적인 현상은 균체 추출액 중에 과산화수소가 중이나 균주의 차이에 따라 차이를 보이면서 존재하고 있었다.

*Lactobacilli*는 과산화수소를 생성하는 균주로서 질 내에서 질염을 일으키는 질염 병원균의 감염을 억제하는 수준까지 과산화수소를 생성하는 것으로 보고된 바 있으며(Wiks 등, 2004) 과산화수소는 광범위한 균주의 *Lactobacillus* spp.에 의하여 생산되며 그 미생물 억제 효과가 탁월한 것으로 알려져 있다(Davidson, 1983).

유산균의 성장과 대사과정에서 산소의 효과는 수십 년간 연구대상이 되어 왔으며 유산균은 산소를 이용할 수 있는 능력이 있고 (Anders 등, 1970; Gilliland와 Speck, 1969; Smart와 Thomas, 1987) flavin type의 oxidase를 함유하고 있으며 (Anders 등, 1970, Bruhn과 Collins, 1970) NADH peroxidase와 superoxide dismutase도 함유하는 것으로 보고된 바 있다(Anders, 등 1970; Hansson과 Häggström, 1984; Zitzelsberger, 등, 1984).

Catalase가 없으므로 과산화수소가 축적될 수 있으며 산소가 존재하는 조건에서는 이 물질이 세포를 파괴하는 주 원인물질이 되는 것이다. 과산화수소의 축적은 특히 영양소 함유율이 불충분한 우유 등의 배지

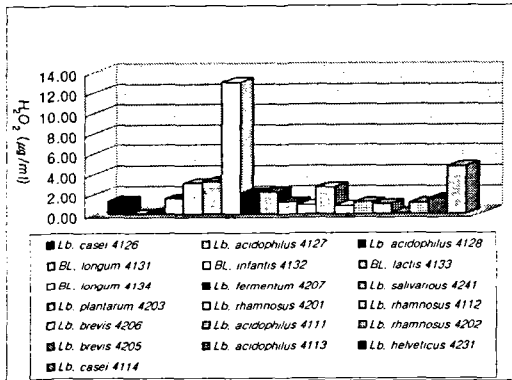


Fig. 4. Hydrogen peroxide content of cell extracts of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.

와 생장이 제한되는 조건에서 과산화수소의 생성이 촉진되며 배지에 catalase와 yeast extract 및 환원제를 첨가함으로써 저지할 수 있다(Anders 등, 1979; Gilliland와 Speck, 1969; Selby Smith, 1975).

과산화수소의 생성과정은 다음 반응이 관여되어 진행되는 것으로 확인되었다(Smart와 Thomas, 1987; Thomas와 Pera, 1983; Imlay와 Fridovich, 1991).

NADH oxidase 효소체계를 갖는 유산균은 $2\text{NADH} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$ 반응을 일으키며 통상 NADH peroxidase도 작용하여 최종산물로 물을 생성한다. 부차적인 반응으로 $\text{NADH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^-$ 반응도 일어난다. Rabe와 Hillier(2003)는 magnesium-sulfate, manganese sulfate 및 horse serum의 첨가는 과산화수소 생성을 촉진하는 효과가 있는 것으로 보고하였다.

IV. 요약

과산화수소 형태의 반응성 산소에 대한 *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. 및 *Bacillus coagulans*의 저항성과 세포 내에서 생성능력을 측정하기 위하여 본 연구가 수행되었다. *Lactobacillus* spp. 중에서 높은 과산화수소 저항성을 나타낸 균주는 *L. acidophilus* CU4111와 *L. casei* CU4114인 것으로 나타났고 가장 낮은 저항성을 보인 균주는 *L. brevis* CU4206이었다. *Bifidobacterium longum* CU4131은 높은 수준의 저항성을 나타내며 *Bacillus coagulans*를 포함하는 포자형성 유산균주들은 전반적으로 과산화수소에 대한 저항성

이 높은 것으로 나타났다. 세포질 추출액 중의 과산화수소 함유 농도는 *Bifidobacterium bifidum* CU 4134가 가장 높고 *Lactobacilli* spp.의 세포질 추출액 중의 과산화수소 함유 농도는 *L. casei* CU 4114가 가장 높은 것으로 나타났다.

V. 참고문헌

- Anders, R. F., Hogg, D. M. and Jago, G. R. 1970. Formation of hydrogen peroxide by group N streptococci and its effect on their growth and metabolism. *Appl. Microbiol.* 19:608-612.
- Badwey, J. A. and Karnovsky, M. L. 1979. Production of superoxide and hydrogen peroxide by an NADH-oxidase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 254:11530-11537.
- Balou, D., Palmer, G. and Massey, V. 1969. Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36:898-904.
- Bruhn, J. C. and Collins, E. B. 1970. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase of *Streptococcus diacetilactis*. *J. Dairy Sci.* 53:857-860.
- Dahiya, R. S. and Speck, M. L. 1968. Hydrogen peroxide formation by *lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 51:1568-1572.
- Davidson, P. M., Post, L. S., Baren, A. L. and McCurdy, A. R. 1983. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In *Antimicrobials in Foods*, ed. Baren A. L., P. M. Davidson. Marcel Dekker Inc., New York, USA. pp.385-92.
- Eschenbach, D. E., Davick, P. R., Williams, B. L., Klenbanoff, S. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M. and Holmes, K. K. 1989. Prevalence of hydrogen peroxide producing *Lactobacillus* species in normal women and women with or without bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 27:251-256.
- Garcia-Mendoza, A., Liebana, J., Castillo, A., Higuera, de la and Gutierrez, J. 1993. Post-hydrogen peroxide effect in peroxidogenic oral streptococci. *Microbial Ecol. Health and Disease.* 1993.

9. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1969. Biological response of lactic streptococci and lactobacilli to catalase. *Appl. Microbiol.* 17:797-800.
10. Hansson, L. and Häggström, M. H. 1984. Effects of growth conditions on the activities of superoxide dismutase and NADH-oxidase/NADH-peroxidase in *Streptococcus lactis*. *Curr. Microbiol.* 10:345-352.
11. Imlay, J. A., and Fridovich, I. 1991. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266:6957-6965.
12. Kullissar, T., Zilmer, M., Mikelasaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C. and Kilk, A. (2002) Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Intl. J. Food Microbiol.*, 72:215-224.
13. Melly, E., Cowan, A. E. and Setlow, P. 2002. Studies on the mechanism of killing of spores of *Bacillus subtilis* by hydrogen peroxide. *J. Appl. Microbiol.* 93(2):316-325.
14. Ou, P. and Wolff, S. P. 1996. A discontinuous method for catalase determination at near physiological concentrations of H₂O₂ and its application to study of H₂O₂ fluxes within cells. *J. Biochem. Biophys. Methods* 31:59-67.
15. Perticone, C. D., Park, S. and Imary, A. J. 2003. Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Str. pneumonia* include pyruvate oxidase and avoidance of the toxic effects of the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* 185(23):6815-6825.
16. Rabe, L. K. and Hillier, S. L. 2003. Optimization of media for hydrogen peroxide production by lactobacillus species. *J. Clin. Microbiol.* 41(7):3260-3264.
17. Smart, J. B. and Thomas, T. D. 1987. Effect of oxygen on lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:533-541.
18. Selby Smith, J., Hillier, A. J. and Lees, G. J. 1975. The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. *J. Dairy Res.* 42:123-138.
19. Thomas, E. L. and Pera, K. A. 1983. Oxygen metabolism of *Streptococcus mutans*: uptake of oxygen and release of superoxide and hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 154:1236-1244.
20. Wiks, M., Wiggins, R., Wiley, A., Henessy, E., Warwick, S., Porter, H., Corfield, A. and Millar, M. 2004. Identification and hydrogen peroxide production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *J. Clin. Microbiol.* 42(2):713-717.
21. Zitzelsberger, W., Götz, F. and Schleifer, K. H. 1984. Distribution of superoxide dismutases, oxidases, and NADH peroxidase in various streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 21:243-246.