

세균 배양액과 반응한 *Lactobacillus plantarum*의 성장속도 및 항균 활성에 대한 연구

하은미*

대구가톨릭대학교 약학대학

Received: May 8, 2015 / Revised: June 9, 2015 / Accepted: June 9, 2015

Growth Rate and Antimicrobial Activity of *Lactobacillus plantarum* Reacting with Bacterial Culture Supernatant Eun-Mi Ha*

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Daegu 712-702, Republic of Korea

In this study, *L. plantarum*, when reacting with the culture media of potential pathogenic bacteria, exhibited an increase in growth rate and antimicrobial activity. In order to examine the characteristics and the nature of the reaction with the bacteria, this study carried out experiments involving culturing the test bacteria in M9 minimal media. Subsequently, the supernatant was increased by the decompression-drying method. Through colony forming unit assay, it was confirmed that *L. plantarum* had the function of growth inhibition to various bacteria. After culturing *L. plantarum* with bacterial media, the growth rate of *L. plantarum* was measured by absorbance (OD₆₀₀), the results showed that the growth rate (*E. coli* treatment group: OD₆₀₀ = 0.848, *S. typhimurium* treatment group: OD₆₀₀ = 0.848) increased, as compared with the non-treated control group (OD₆₀₀ = 0.48). In contrast, the concentrate itself did not induce the growth of *L. plantarum*. These results were observed as a universal phenomenon of the *Lactobacillus* species. Moreover, the increase in antimicrobial activity was observed in *L. plantarum*, which reacted with the culture media of *E. coli* and *S. typhimurium*, through a disc diffusion assay, and the result of growth inhibition against various bacteria was induced. Finally, based on the analysis results of the characteristics of bacteria culture media, which increased the growth rate of *L. plantarum* and antibacterial activity, the bacterial media had a tolerance for catabolic enzymes, pH 2–8 and heat. Therefore, this substance can be said to be a small molecule which is highly stable under various conditions.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, growth rate, antimicrobial activity, pathogen, M9 minimal media

서론

인간의 위장관(gastrointestinal tract)은 매우 복잡한 장내 균총(gut microbiota)으로 이루어져 있으며[6, 32], 장내균총은 영양소 합성, 소화, 병원균 정착 저해 및 항생능력, 숙주의 선천성 및 후천성 면역시스템의 성숙과 증진 등과 같은 인간의 생리기능에 있어 매우 중요한 역할을 담당하고 있다[13, 14, 37]. 또한 장내균총은 조절 T 세포(regulatory T cells)를 유도함으로써 T helper 1 (Th1) cells과 T helper 2 (Th2) cells의 균형을 조절하여 면역학적 관용과 면역 활성화에 기여한다[5, 33].

그런데 장내균총의 정착 및 발달은 유아기(infancy)부터 시작되고 태아기의 환경, 출산시기, 출산방법(자연분만 혹은 제왕절개), 수유 방법(모유 혹은 분유), 프로바이오틱스(probiotics) 및 항생제의 복용에 따른 환경적 요인과 유전자 유형 등에 따라 결정된다[8, 15]. 정상적인 분만 과정을 겪은 유아와 건강한 영·유아의 장(gut)에는 유익 균으로 알려진 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*가 우세하게 발견되며, 병원성 균은 적거나 발견하기가 어렵다[4]. 하지만 반대로 출생과정 중에 겪게 되는 조기분만, 제왕절개, 또는 분유 섭취와 항생제 처방과 같은 환경적 요인은 병원균의 감염을 초래한다[2, 25, 35, 38]. 이때 유아기의 장내에 가장 먼저 침입하는 잠재적 병원성 세균은 *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*와 *Clostridium* 속에 해당하는 균들이며[11, 39], 이러한 세균에 감염된 장에서는 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*가 극히 적게 발견

*Corresponding author

Tel: +82-53-850-3612, Fax: +82-53-850-3602

E-mail: haem@cu.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

된다[3, 11]. 특히 초년시기에 정착한 균총의 유형은 유년기 병원균의 감염여부와 환경적 위험요인(environmental antigen)에 따라 그 감수성에 영향을 미치고[16, 17], 궁극적으로 성인시기의 장내균총을 결정하게 된다[23, 29].

장내 균총의 불균형은 유아기의 면역연관 질병(알레르기 관련 질환, 아토피 피부 질환, 염증성 장질환, 과민성 대장증후군, 신생아 괴사성 장염, 제1형 당뇨병 등)을 일으키는 요인[1, 9, 17, 18, 31]이 되기도 하는데, 따라서 유아기의 장내 균총 형성과정은 매우 중요하며, 궁극적으로는 생애전반의 건강과 삶의 질과 밀접하다고 할 것이다[20]. 이러한 이유로 최근에는 면역 연관 질병의 예방 및 치료를 위해 probiotics가 유용하게 활용되는 경향을 보이고 있다[21]. 또한 *in vitro*와 *in vivo*로 진행된 최근 연구는 유아기에 *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*)을 이용한 probiotics 복용이 장점막 장벽의 안정화, 병원균으로부터의 방어 능력 향상, 항생 물질 분비 및 알레르기 질환 완화에 대한 효과를 보고하고 있다[10, 24, 30, 34]. 최근 수년간 소아 염증질환의 치료 목적으로 사용한 probiotics 및 synbiotics의 주요 균종은 *Bifidobacterium*와 *Lactobacillus*인데, 특히 *L. plantarum*은 probiotics 처방 후, 영유아의 장에 10일 내에 안정적으로 정착하지만, *Bifidobacterium* spp.은 30일 이상 소요된다는 결과가 보고되고 있다[12]. 따라서 *Lactobacillus*은 유아기에 병원균 보다 먼저 장내에 우점종으로서 정착해야 면역시스템의 형성과 발달을 결정짓고 항생물질의 분비를 통한 방어 시스템이 가능하지만[28, 36], 아직 *Lactobacillus*가 장의 우점종으로 정착하기 위한 환경적 요인과 항생물질 분비 조절에 대한 이해는 부족한 실정이다.

이에 본 연구는 *Lactobacillus* spp.를 병원성 세균의 배양 배지와 반응시켰을 때 *Lactobacillus* spp.의 성장속도를 알아보고자 한다. 이를 통하여 증가된 성장속도가 항생물질의 활성을 유도함으로써 항균효과가 증대시킬 것이라는 연구문제를 증명하고자 하며, 동시에 *L. plantarum*의 성장속도 및 항균물질 활성의 증가를 유도하는 병원균의 배양액 물질에 대한 특성을 검토하고, 분해효소, pH와 열에 강한 소분자 물질이라는 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주의 배양 조건

본 실험에서 사용한 *Lactobacillus*는 항생제내성균주은행(CCARM, Seoul Women's University)에서 분양을 받았으며, 종류는 *L. plantarum* (CCARM 0067), *Lactobacillus brevis* (CCARM 0061), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (CCARM 0106), *Lactobacillus acidophilus* (CCARM 0059)이다. 이들 *Lactobacillus*는 Difco™ *Lactobacilli* MRS

broth (Becton Dickinson, USA) 배지를 사용하여 37°C에서 24시간동안 정치 배양하였다.

Lactobacillus spp.의 성장속도와 항균능력을 관찰하기 위해 사용된 잠재적 병원성 세균은 *Escherichia coli* (ATCC 23736), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 29336), *Salmonella typhimurium* (CCARM 0125), *Staphylococcus aureus* (CCARM 3709)이며, Difco™ Nutrient broth (Becton Dickinson, USA)의 배지를 사용하여 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 이 병원성 세균들은 항생제내성균주은행과 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)에서 분양받았다.

균 배양액의 농축

균의 정상배지에는 많은 영양요소가 함유되어 있으며, 균의 생장에 필요한 환경을 제공하기 때문에, 이러한 환경적 요인을 배제하기 위해 최소배지인 M9 minimal media를 선택하고 균을 배양하였다. 뿐만 아니라 실험을 통해 균이 분비한 물질에서 효과가 있음을 확인하였고, 정상배지의 요소를 배제하고 균이 분비한 물질의 효과에 초점을 두고 실험하기 위해 M9 minimal media를 선택했다. 시험 균주가 배양된 상층액은 균일한 농도로 실험하기 위해 농축하여 분말화 한 후 수용성인 부분만 취하였고 자세한 방법은 아래에 기술하였다.

Lactobacillus M9: MRS 배지에 키운 OD₆₀₀ = 8의 *Lactobacillus* spp. 균은 M9 minimal broth(MB cell)의 1 L에 5% (v/v)로 접종하여 37°C에서 36-48시간동안 정치 배양한다. OD₆₀₀ = 1의 *Lactobacillus*를 10,000 × g, 10분간 원심 분리하여 pellet을 제거한 후 상층액을 취한다. 이 상층액은 10 N NaOH를 이용하여 M9 배지의 pH를 6.8-7 사이로 맞춘다. 0.22 μm filter (Millipore, USA)로 잔여의 균을 제거하고 감압 건조하여 분말화한다. 이 분말의 무게(Dry cell weight, DCW)는 0.5 g/l로서 ultrapure water 5 ml에 녹여 최종 농도를 0.1 mg/ml로 준비한다. 이 농축액을 *Lactobacillus* (spp.) M9이라 한다.

세균 M9: Nutrient broth 배지에서 키운 병원성 세균들은 OD₆₀₀ = 1까지 키우고, M9 minimal Broth의 1 L에 1% (v/v)로 접종하여 37°C에서 24시간동안 배양한다. 이와 같은 조건에서 OD₆₀₀ = 1의 균을 10,000 × g, 10분간 원심 분리하여 pellet을 제거한 후 상층액을 취한다. 이 상층액은 0.22 μm filter (Millipore, USA)로 제균 후 감압 건조하여 분말화한다. 이 분말의 무게는 1 g/l로서 ultrapure water 10 ml에 녹여 최종 농도를 0.1 mg/ml로 준비한다. 이 농축액을 세균 M9 bacterial M9이라 한다.

세균 M9과 반응시킨 Lactobacillus M9: 농축된 세균 M9이 처리된 *Lactobacillus* (spp.) M9으로서 MRS에서 배양된 *Lactobacillus* 균주를 M9에 접종할 때 세균 M9의 40 μg

을 동시 첨가하여 37°C에서 36–48시간동안 정치 배양하고 위와 설명한 동일한 방법으로 분리한다. 이 농축액을 세균 M9 + *Lactobacillus* M9이라고 표현한다.

대조군 M9: M9 minimal broth의 1 L를 감압 건조하여 ultrapure water의 10 ml에 녹여 대조군 처리 시약으로 사용한다. 이 농축액을 M9이라고 한다.

세균 M9과 반응시킨 *Lactobacillus* spp.의 성장속도 측정

*Lactobacillus*의 OD₆₀₀ = 0.1 (M9, 1 ml)에 각 세균 M9을 40 µg씩 처리한 후 37°C에서 3, 6, 12시간동안 배양하는 동안 spectrophotometer (Optizen nano bio, Mecasys, Korea)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 도출하였다. 실험은 3회 이상 실시하고, 평균값을 분석하였다.

항균활성 측정

Colony Forming Unit (CFU) assay: *Lactobacillus* (spp.) M9을 이용하여 항균활성을 측정하였다. 측정은 시험 균주의 OD₆₀₀ = 0.1(Nutrient broth의 1 ml)에 *Lactobacillus* spp. M9을 10, 25, 50 µg의 농도로 처리하여 37°C에서 24 시간동안 반응시킨 후 Nutrient agar plate에 도말하여 병원균의 생균수(CFU/ml)를 측정하여 확인하였다. 실험은 3회 평가 평균값을 결과로 도출하고, 대조군의 CFU를 100%로 하여 상대적인 값을 분석하였다.

Disc diffusion assay: *Lactobacillus* M9의 항균활성은 시험 세균을 대상으로 disc diffusion assay[19]로 측정하였다. 병원균은 Nutrient broth에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 각각의 균은 OD₆₀₀ = 0.1, 100 µl를 Nutrient agar 평판배지에 도말한다. *Lactobacillus* M9의 25 mg가 함유된 멸균 disc paper(지름 5 mm, Whatman No.2)를 시험 세균이 도말된 평판배지에 올린 후 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 결과는 생육저해환의 크기를 측정하여 항균활성을 평가하였다. 대조군으로서는 ampicillin의 5 mg/disc를 사용하였으며, 생육저해환의 크기는 지름 mm 단위로 측정하여, 3회 평가 평균값을 결과로 도출하였다.

세균 M9의 특성 분석

*L. plantarum*의 성장속도와 항균활성의 증가를 유도하는 세균 M9 유래 물질의 특성을 분석하기 위해 *S. typhimurium* M9 (St M9)을 준비하고 아래와 같은 조건으로 반응시켰다.

(1) 각종 효소에 대한 영향을 측정하기 위해 St M9의 40 µg에 α-amylase (EC 3.2.1.1 Type VIII, Sigma), lipase (EC 3.1.1.3 Type VII, Sigma), lysozyme (EC 3.2.1.17, Sigma), proteinase K (EC 3.4.21.64, Sigma)를 2 mg/ml의 농도로 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다.

(2) St M9의 pH 안정성을 측정하기 위해 pH 2.0–4.0은

0.1 M glycine-HCl 완충용액, pH 4.0–6.0은 0.1 M sodium acetate 완충용액, pH 6.0–8.0은 0.1 M sodium phosphate 완충용액, pH 8.0–10.0은 Tris-HCl 완충용액을 사용하여 St M9의 pH를 조절하고, 37°C에서 12시간동안 반응하였다.

(3) 온도안정성에 대한 측정은 St M9를 95°C에서 30분간 반응한 후 항균물질의 잔존활성을 측정하였다.

각각의 요소로 처리한 St M9는 배양중인 *L. plantarum*에 첨가하여 반응시키고 *L. plantarum* M9를 분리하여 시험 균주에 대한 항균활성을 생균수를 측정하여 확인하였다.

통계분석

모든 실험의 측정값은 평균±표준편차로 나타냈고, SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 프로그램으로 통계처리 하였다. 유의한 차이($p < 0.05$)는 일원배치 분산분석법(one-way ANOVA)의 Turkey 다중범위검정(Turkey's multiple range test)으로 결정하였다.

결과 및 고찰

Lactobacillus spp.의 항균활성

Lactobacillus spp. 균주로부터 *Lactobacillus* spp. M9 농축액을 확보하고 25 µg을 *Escherichia coli* (*E. coli*)에 처리하여 CFU assay를 시행하였다. 사용한 *Lactobacillus* spp.는 *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*), *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (*L. lactis*), *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)이다. 실험결과는 대조군 M9을 처리한 *E. coli*의 CFU를 100%로 설정하고, 상대적인 값을 측정하여 비교하였다.

L. brevis M9가 처리된 *E. coli*의 평균 CFU는 42.98%, *L. lactis* M9 처리군은 33.37%, *L. acidophilus* M9 처리군은 61.14%였고, *L. plantarum* M9 처리군의 평균값은 12.14%였다. 그러므로 본 실험으로 확보한 *Lactobacillus* spp. M9에는 *Lactobacillus* spp. 유래 항균물질이 존재함을 확인 할 수 있었으며, *L. plantarum* M9은 다른 *Lactobacillus* spp. M9과 비교하여 항균활성이 가장 높은 것으로 확인되었다(Fig. 1). 이러한 결과를 바탕으로 본 연구는 항균활성이 가장 높은 *L. plantarum* M9를 선택하여 그 특성을 연구하였다.

다양한 세균에 대한 *L. plantarum* M9의 항균능력

L. plantarum M9의 농도에 따른 살균능력을 확인하기 위하여 사용된 표적 시험균주는 *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)이다.

실험에 적용된 *L. plantarum* M9의 농도는 각각 10, 25,

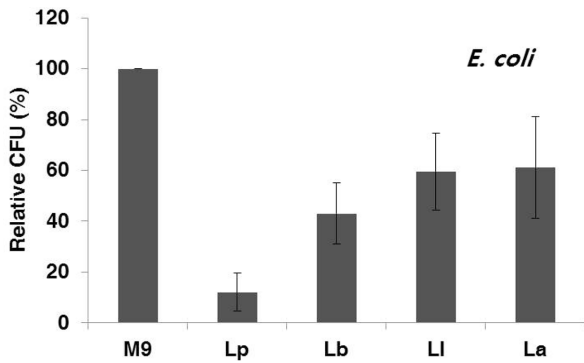


Fig. 1. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. against *E. coli*. M9: M9 only treatment, Lp: *Lactobacillus plantarum* M9, Lb: *Lactobacillus brevis* M9, LI *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* M9, La: *Lactobacillus acidophilus* M9. CFU of *Escherichia coli* (*E. coli*) is expressed as a relative value based on 100% of the treated M9 only into the each sample. Data are mean \pm SD (Standard Deviation) from triplicate determinations and the significant difference of means was estimated by Turkey's multiple range test ($p < 0.05$).

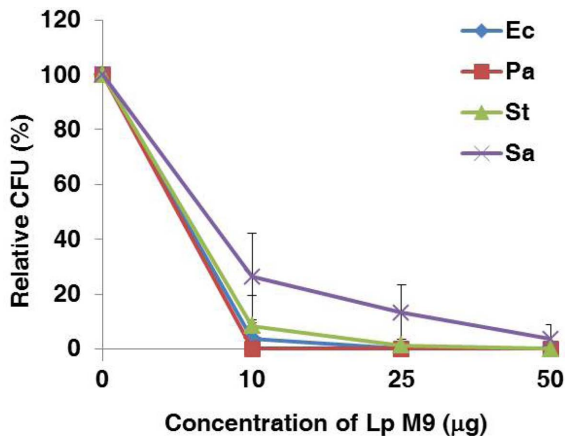


Fig. 2. Concentration-dependent antibacterial activity of *L. plantarum* M9 against the various bacteria. CFU of bacteria is expressed as a relative value based on 100% of the treated M9 only into the each sample. Ec: *Escherichia coli*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, St: *Salmonella typhimurium*, Sa: *Staphylococcus aureus*. Data are mean \pm SD from triplicate determinations and the significant difference of means was estimated by Turkey's multiple range test ($p < 0.05$).

50 μg 으로 선정하였다. 실험을 통하여 농도 의존적인 항균 능력이 확인되었으며(Fig. 2), 다양한 균에 대한 *L. plantarum* M9의 성장억제 기능을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 *L. plantarum* M9의 항균활성 관련 실험은 그 농도를 25 μg 으로 고정하여 연구를 진행하였다.

세균 M9이 처리된 *L. plantarum*의 성장 속도 증가

일반적으로 장내 침입한 유해세균은 숙주의 장 세포에 상

처와 스트레스를 유발하고 염증을 일으키는 endo-, entero-, exo-toxin 및 enzyme 등을 분비한다[7, 22, 26, 27]. 본 연구에서는 *L. plantarum*의 항균능력에 대항하는 병원균의 독성활성을 검토하였다. 즉, *L. plantarum*에 대한 세균 M9의 살균능력을 확인하였다. 이 실험을 위해 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus*의 M9을 확보하고 각 세균 M9의 40 μg 을 *L. plantarum*에 처리하여 함께 배양한 후, *L. plantarum*의 성장속도를 확인하였다.

흥미롭게도 모든 세균의 M9은 *L. plantarum*의 성장속도를 증가시켰다. 세부적으로는, M9 대조군($\text{OD}_{600} = 0.48$, 6시간 배양 기준)과 비교하여, *E. coli* M9 처리군($\text{OD}_{600} = 0.848$), *S. typhimurium* M9 처리군 ($\text{OD}_{600} = 0.85$), *P. aeruginosa* M9 처리군 ($\text{OD}_{600} = 0.654$)과 *S. aureus* M9 처리군 ($\text{OD}_{600} = 0.721$) 이 모두 *L. plantarum*의 확인한 성장증가를 유도하였다(Fig. 3). 반면 *L. plantarum* M9를 처리한 실험군에서는 *L. plantarum* ($\text{OD}_{600} = 0.47$)의 생육증가가 관찰되지 않았다. 그러므로 *L. plantarum*은 세균 배양액을 특이적으로 인지하고 성장속도를 증가시킴으로써 병원균에 대한 방어를 준비하는 것으로 추측할 수 있다. 이 결과를 바탕으로 본 연구에서는 세균 M9의 처리 실험에서 가장 확인한 결과를 보였던 *E. coli*와 *S. typhimurium*의 M9을 사용하여 추후 실험을 진행하였다.

***S. typhimurium* M9와 반응한 *Lactobacillus* spp.의 성장 증가 유도**

S. typhimurium M9이 처리된 *L. plantarum*의 성장증가 효과가 *Lactobacillus* spp.의 보편적 현상인지를 확인하기 위하여 *Lactobacillus* spp.의 생육증가를 확인하였다. 즉, *S.*

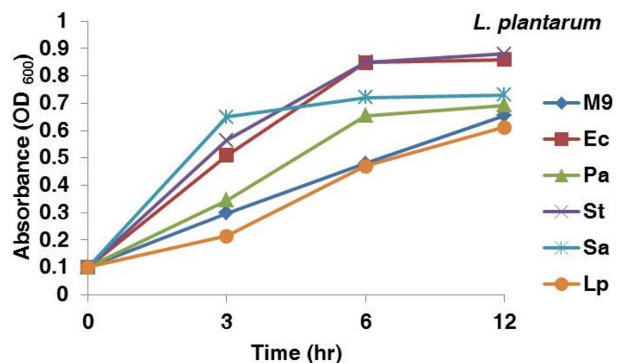


Fig. 3. Increase the growth rate of *L. plantarum* by bacterial M9. Each M9 was treated to *L. plantarum* and the absorbance (OD_{600}) of *L. plantarum* was measured after 3, 6 and 12 h. M9: M9 only treatment, Ec: *Escherichia coli* M9, Pa: *Pseudomonas aeruginosa* M9, St: *Salmonella typhimurium* M9, Sa: *Staphylococcus aureus* M9, Lp: *Lactobacillus plantarum* M9. The data represent average values of three independent determinations.

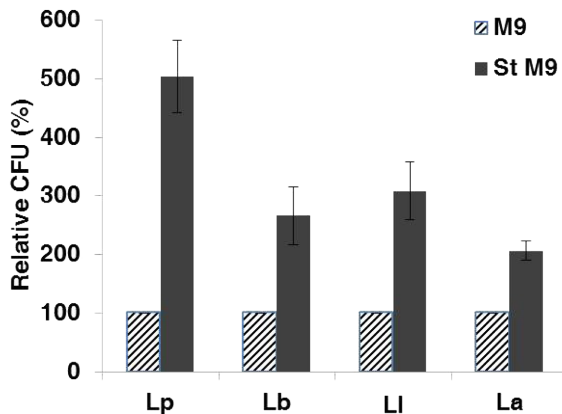


Fig. 4. Increase the growth rate of the *Lactobacillus* spp. through the reaction of *S. typhimurium* M9. M9: M9 only treatment, St M9: *S. typhimurium* M9 treatment to the *Lactobacillus* spp. Lp: *Lactobacillus plantarum*, Lb: *Lactobacillus brevis*, Ll: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* M9. La: *Lactobacillus acidophilus*. CFU of *Lactobacillus* spp. is expressed as a relative value based on 100% of the treated M9 only into the each sample. Data are mean \pm SD from triplicate determinations and the significant difference of means was estimated by Turkey's multiple range test ($p < 0.05$).

typhimurium M9의 40 μ g을 *Lactobacillus* spp.에 처리하여 함께 배양한 후 *Lactobacillus* spp.의 CFU를 분석하였다. 실험결과, M9이 처리된 대조군을 100%라고 할 때, *S. typhimurium* M9을 처리한 *L. plantarum*의 CFU는 503%, *L. brevis*는 266%, *L. lactis*는 275%, *L. acidophilus*는 206%로서 균주 모두 *S. typhimurium* M9에 의해 성장속도가 증가한 것으로 관찰되었고, 특히 *L. plantarum*의 증가량이 가장 큰 것으로 나타났다(Fig. 4).

세균 M9과 반응한 *L. plantarum*의 항균 활성 증가

이상의 결과를 종합해볼 때, 다양한 세균을 비롯한 *S. typhimurium* M9은 *L. plantarum*의 성장속도를 증가시키는 것으로 관찰되었다(Fig. 3, 4). 이를 바탕으로 본 연구는 *S. typhimurium* M9의 자극이 *L. plantarum* 성장증가 뿐만 아니라 항균 활성에도 영향을 주는지 확인하기 위해 아래와 같은 실험을 진행했다.

M9만 세균에 처리한 대조군(Cont.), M9을 처리한 *L. plantarum* M9 (M9 + Lp), *E. coli* M9과 반응시킨 *L. plantarum* M9 (Ec + Lp), *S. typhimurium* M9과 반응시킨 *L. plantarum* M9 (St + Lp)을 시험균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus*에 처리하여 각 균의 생육저해환 정도를 측정하였다.

L. plantarum M9은 모든 시험세균에 대한 항균활성을 보였고, *E. coli* M9과 *S. typhimurium* M9와 반응시킨 *L.*

Table 1. Increase the antimicrobial activity of *L. plantarum* through the stimulation of bacterial M9.

Condition	Sample	Growth inhibition zone (mm)			
		Target strain			
		Ec	Pa	St	Sa
Bacterial	Cont	-	-	-	-
M9 + Lp M9	M9 + Lp	13	12	14	10
	Ec + Lp	19	18	22	15
	St + Lp	20	19	25	16
Antibiotics	Ampicillin	18	13	16	25

Cont.: M9 only treatment, M9 + LP: *L. plantarum* M9 incubated with 40 μ g of M9 only, Ec + Lp: *L. plantarum* M9 incubated with 40 μ g of *E. coli* M9, St + Lp: *L. plantarum* M9 incubated with 40 μ g of *S. typhimurium* M9.

Ec: *Escherichia coli*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, St: *Salmonella typhimurium*, Sa: *Staphylococcus aureus*.

-: No inhibition.

The concentration of the M9 sample used was 25 μ g/disc and ampicillin was 5 mg/disc, respectively. The growth inhibition zone was included of size of disc paper. The data represent average values of three independent determinations.

plantarum M9의 항균활성은 *L. plantarum* M9 자체와 비교하여 큰 생육저해환이 관찰되었다(Table 1). 이 실험을 통해 세균 M9의 자극은 *L. plantarum*의 성장과 항균활성을 촉진한다는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과를 통해 세균은 *L. plantarum*의 성장 및 항균능력을 자극하는 유도물질이 있음을 암시하며, *Lactobacillus*는 병원균 유래물질을 인지함으로써 항균능력이 향상되는 것으로 추정된다. 그러므로 본 연구에서는 세균 M9 내에 존재하는 *L. plantarum*의 자극 유도물질에 관심을 갖고 그 특성을 분석하였다.

세균 M9의 특성 분석

*L. plantarum*의 성장과 항균능력을 유도하는 세균 M9의 특성을 파악하기 위해 분해효소, pH와 열에 대한 안정성을 조사하였다. 실험에 사용된 세균 M9은 *S. typhimurium*이며, 본 연구에서 사용되었던 다른 세균의 M9도 유사한 특성이 관찰되었다(data not shown). M9과 반응시킨 *L. plantarum* M9 (M9 + Lp), *S. typhimurium* M9과 반응시킨 *L. plantarum* M9 (St + Lp), 분해효소, pH와 열을 각각 *S. typhimurium* M9과 반응시킨 후, 이 *S. typhimurium* M9을 처리한 *L. plantarum* M9 (Treated St + Lp)를 준비하고, 이들 M9을 *E. coli*에 처리하여 항균활성을 CFU로 확인하였다(Fig. 5).

결과는 다음과 같다.

첫 번째, 세균 M9의 활성이 분해효소(α -amylase, lipase, lysozyme, proteinase K)에 저해되는지 확인하였다. M9 + Lp (*E. coli* CFU: 100%) 보다 St + Lp (*E. coli* CFU: 19.07%)

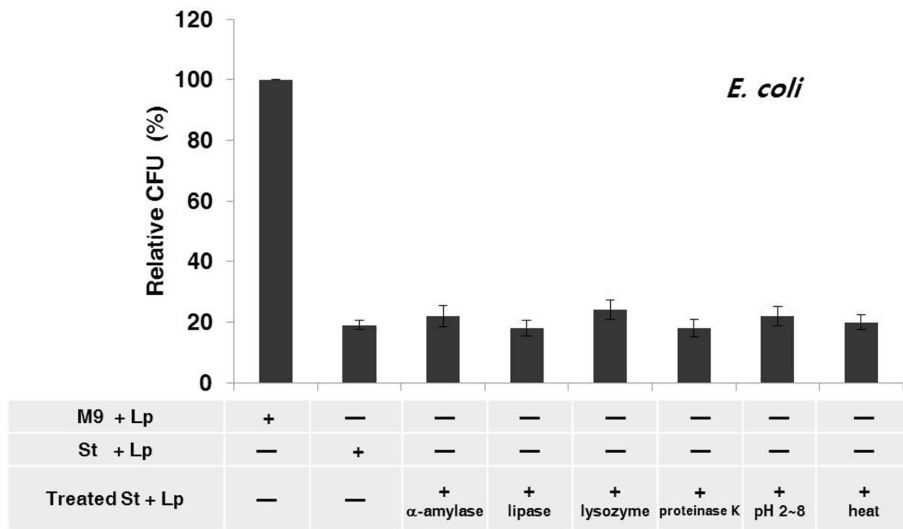


Fig. 5. Characteristics of bacterial M9 as the potential growth and antimicrobial inducer for *L. plantarum*. Antibacterial activity (CFU) of *L. plantarum* M9 was referred only against *E. coli*. M9 + Lp: *L. plantarum* M9 incubated with 40 µg of M9 only, St + Lp: *L. plantarum* M9 induced with 40 µg of *S. typhimurium* M9, Treated St + Lp: *L. plantarum* M9 induced with 40 µg of pre-treated *S. typhimurium* M9 by enzymes, pH and heat. +: The sample is added, -: The sample-free. Data are mean ± SD from triplicate determinations and the significant difference of means was estimated by Turkey's multiple range test ($p < 0.05$).

의 항균능력이 높은 것으로 관찰되며, 각종 효소를 처리한 St + Lp (Treated St + Lp 처리군의 CFU; α-amylase 처리: 22%, lipase 처리: 18%, lysozyme 처리: 24%, proteinase K 처리: 18.2%)의 항균활성도 St + Lp와 유사하게 보존되었다. 그러므로 세균 M9은 다양한 분해 효소에 대해 안정한 것으로 나타났다.

두 번째, pH의 영향을 알아보기 위해 다양한 pH 범위에서 반응시킨 *S. typhimurium* M9의 특성을 분석하였다. pH 2-8의 산도에서 St + Lp와 비슷한 생육저해현상(CFU: 22%)이 관찰된것으로 미루어, 세균 M9은 넓은 pH 구간에서 매우 안정함을 알 수 있었다.

세 번째, 온도에 대한 안정성을 검토하기 위해 95°C에서 30분간 반응시킨 후 항균실험을 실시했다. 열처리된 *S. typhimurium* M9 역시 *L. plantarum*의 항균능력(CFU: 20%)을 유도하였으며, 이 결과는 *S. typhimurium* M9의 내열성을 제시한다.

추가로 다양한 세균 M9의 첨가 시 증가된 항균활성을 생육저해현상의 결과로 도출하고 그 결과 사진은 Fig. 6에 나타내었다.

따라서 이상의 결과는 세균 M9에 존재하는 분비대사체 중에서 *L. plantarum*의 성장과 항균능력에 영향을 주는 물질이 존재하며, 이 물질은 다양한 조건에서도 매우 안정성을 보유한 small molecule일 가능성을 제시한다. *Lactobacillus*는 유아기에 병원균 보다 먼저 장내에 우점종으로서 정착하는 것이 중요한 만큼, 병원균의 침입을 빠르게 인지하여 생

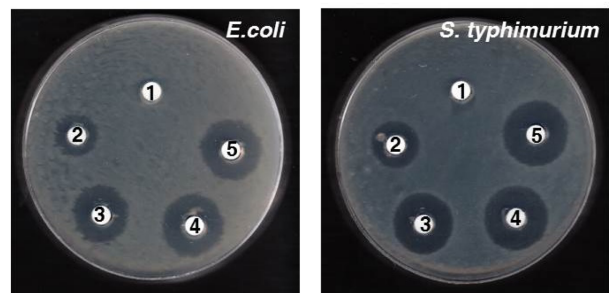


Fig. 6. Photography of cell growth inhibition in *L. plantarum* M9 incubated with bacterial M9 against *E. coli* and *S. typhimurium*. 1: M9 control, 2: *L. plantarum* M9 incubated with 40 µg of M9 only, 3: *L. plantarum* M9 incubated with 40 µg of *E. coli* M9, 4: *L. plantarum* M9 incubated with 40 µg of *S. typhimurium* M9, 5: *L. plantarum* M9 induced with 40 µg of heat-treated *S. typhimurium* M9. The concentration of the sample used was 25 µg/disc, respectively. The antimicrobial activity was demonstrated by clear zone of growth inhibition around the paper disc.

장속도를 조절함으로써 항생물질의 분비를 통한 방어 시스템을 가동해야한다. 아직까지 *Lactobacillus*가 장의 우점종으로 정착하기 위한 환경적 요인과 항생물질 분비조절에 대한 이해는 부족한 실정이므로 본 연구는 이 질문에 대한 대답을 제공했다고 사료된다. 뿐만 아니라 probiotics는 항생제의 기능을 가짐과 동시에 항생제의 단점인 잔류량 및 내성 문제가 없기 때문에 병원성 미생물을 효과적으로 억제 할 수 있다면 현재로서는 가장 바람직한 대안이다. 그러므로 본 연

구를 통해 관찰된 세균 감염에 의존적인 *Lactobacillus*의 항균활성증가는 관련 산업개발연구에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한 향후 *Lactobacillus*의 성장속도와 항균능력을 유도하는 세균유래물질의 발굴은 probiotics의 활용효과를 기대할 수 있을 것이다.

요 약

인간의 위장관은 매우 복잡한 장내균총으로 이루어져 있으며, 장내균총은 인간의 생리 기능에 있어 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 특히 유아기의 장내균총의 불균형은 면역연관 질병을 일으키는 요인이며 치료 목적으로 probiotics가 유용하게 활용되고 있다. Probiotics의 대표 균종은 *L. plantarum*으로서 영유아기에 병원균보다 가장 먼저 정착해야 면역 질환을 예방할 수 있다. 그러나 아직 *Lactobacillus*가 장의 우점종으로 정착하기 위한 환경적 요인과 항생물질 분비 조절에 대한 이해는 부족한 실정이다.

이에 본 연구는 세균의 배양액과 반응한 *L. plantarum*은 성장 속도와 항균활성이 증가되는 것을 관찰하였다. 본 연구는 균의 특성과 반응을 살펴보기 위해 시험 균을 M9 minimal media에 배양한 후 상층액을 감압건조 방법으로 농축하여 실험을 진행하였다. Colony forming unit assay 방법을 통해, 다양한 잠재적 병원성 세균에 대한 *L. plantarum*의 생장억제 기능을 확인하였다. 세균을 *L. plantarum*에 처리하여 함께 배양한 후, *L. plantarum*의 성장속도를 흡광도(OD₆₀₀)로 측정된 결과, 처리하지 않은 대조군(OD₆₀₀ = 0.48)과 비교하여 성장속도(*E. coli* 처리 군: OD₆₀₀ = 0.848, *S. typhimurium* 처리 군: OD₆₀₀ = 0.848)가 증가되었다. 반면 *L. plantarum* 농축액 자체는 *L. plantarum*의 생육증가를 유도하지 않았다. 이러한 결과는 *Lactobacillus* species의 보편적 현상으로 관찰되었다. 뿐만 아니라 *E. coli*와 *S. typhimurium*의 배양액과 반응한 *L. plantarum*은 항균활성이 증가되었으며, disc diffusion assay를 통해 다양한 세균에 대한 생육저해결과가 관찰되었다. 마지막으로, *L. plantarum*의 성장속도와 항균활성을 증가시킨 세균 배양액의 특성을 분석해본 결과, 병원균은 분해효소(α -amylase, lipase, lysozyme, proteinase K), pH 2-8와 열(95°C)에 내성이 있음이 관찰되었으므로, 이 물질은 다양한 조건에서도 매우 안정한 small molecule일 가능성을 제시한다.

Acknowledgments

This work was supported by research grants from the Catholic University of Daegu in 2013 (Project No. 20131115).

References

1. Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. 1999. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and experimental allergy. J. Allergy Clin. Immunol.* **29**: 342-346.
2. Blakey JL, Lubitz L, Barnes GL, Bishop RF, Campbell NT, Gilliam GL. 1982. Development of gut colonisation in pre-term neonates. *J. Med. Microbiol.* **15**: 519-529.
3. Butel MJ, Suau A, Campeotto F, Magne F, Aires J, Ferraris L, et al. 2007. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J. Pediatr Gastroenterol. Nutr.* **44**: 577-582.
4. Duncan SH, Flint HJ. 2013. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas* **75**: 44-50.
5. Dupaul-Chicoine J, Dagenais M, Saleh M. 2013. Crosstalk between the intestinal microbiota and the innate immune system in intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease. *Inflam. Bowel Dis.* **19**: 2227-2237.
6. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**: 1635-1638.
7. Endt K, Stecher B, Chaffron S, Slack E, Tchitchek N, Benecke A, et al. 2010. The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal *Salmonella* diarrhea. *PLoS Pathog.* **6**: e1001097.
8. Fallani M, Amarri S, Uusijarvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, et al. 2011. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology* **157**: 1385-1392.
9. Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Aiba Y, Nakashima K, Cheng L, et al. 2004. Allergic symptoms and microflora in schoolchildren. *J. Adolesc. Health* : official publication of the Society for Adolescent Medicine **35**: 156-158.
10. Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E, Malagelada JR. 2001. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut* **48**: 503-507.
11. Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. 1999. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal. Ed.* **80**: F167-173.
12. Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**: 19-25.
13. Hooper LV, Macpherson AJ. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews. Immunology* **10**: 159-169.
14. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* **22**: 283-307.
15. Iebba V, Aloisi M, Civitelli F, Cucchiara S. 2011. Gut microbiota

- and pediatric disease. *Dig. Dis.* **29**: 531–539.
16. Kalliomaki M, Isolauri E. 2002. Pandemic of atopic diseases—a lack of microbial exposure in early infancy? Current drug targets. *Infectious Disorders* **2**: 193–199.
 17. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**: 129–134.
 18. Kelly D, King T, Aminov R. 2007. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat. Res.* **622**: 58–69.
 19. Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina SS. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J. Microbiol. Methods* **81**: 121–126.
 20. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, *et al.* 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108** Suppl **1**: 4578–4585.
 21. Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, *et al.* 2007. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**: 192–198.
 22. Luyer MD, Buurman WA, Hadfoune M, Speelmans G, Knol J, Jacobs JA, *et al.* 2005. Strain-specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. *Infect. Immun.* **73**: 3686–3692.
 23. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 1035S–1045S.
 24. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, *et al.* 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* **121**: 580–591.
 25. Magne F, Abely M, Boyer F, Morville P, Pochart P, Suau A. 2006. Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57**: 128–138.
 26. Matsumoto T, Furuya N, Tatada K, Miyazaki S, Ohno A, Ishii Y, *et al.* 1999. Effect of passive immunotherapy on murine gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **48**: 765–770.
 27. Nowrouzian FL, Dauwalder O, Meugnier H, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, *et al.* 2011. Adhesin and superantigen genes and the capacity of *Staphylococcus aureus* to colonize the infantile gut. *J. Infect. Dis.* **204**: 714–721.
 28. O'Connor EM, O'Herlihy EA, O'Toole PW. 2014. Gut microbiota in older subjects: variation, health consequences and dietary intervention prospects. *Proc. Nutr. Soc.* **73**: 441–451.
 29. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* **5**: e177.
 30. Parassol N, Freitas M, Thoreux K, Dalmaso G, Bourdet-Sicard R, Rampal P. 2005. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Res. Microbiol.* **156**: 256–262.
 31. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, *et al.* 2007. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA birth cohort study. *Gut* **56**: 661–667.
 32. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, *et al.* 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**: 59–65.
 33. Rautava S, Isolauri E. 2002. The development of gut immune responses and gut microbiota: effects of probiotics in prevention and treatment of allergic disease. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **3**: 15–22.
 34. Sanz Y. 2011. Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. *Am. J. Clin. Nutr.* **94**: 2000S–2005S.
 35. Thum C, Cookson AL, Otter DE, McNabb WC, Hodgkinson AJ, Dyer J, *et al.* 2012. Can nutritional modulation of maternal intestinal microbiota influence the development of the infant gastrointestinal tract? *J. Nutr.* **142**: 1921–1928.
 36. Toward R, Montandon S, Walton G, Gibson GR. 2012. Effect of prebiotics on the human gut microbiota of elderly persons. *Gut Microbes* **3**: 57–60.
 37. Tremaroli V, Backhed F. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**: 242–249.
 38. Wagner CL, Taylor SN, Johnson D. 2008. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **34**: 191–204.
 39. Westerbeek EA, van den Berg A, Lafeber HN, Knol J, Fetter WP, van Elburg RM. 2006. The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature. *Clin. Nutr.* **25**: 361–368.