

젖산균과 그 대사산물이 *Staphylococcus aureus*의 생육에 미치는 억제효과

김성효 · 성현주 · 신용서 · 김동한* · 이갑상
원광대학교 농화학과, *목포대학교 식품영양학과

Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria and its Metabolites on the Growth of *Staphylococcus aureus*

Sung-Hyo Kim, Hyun-Ju Sung, Yong-Seo Shin,
Dong-Han Kim* and Kap-Sang Lee

Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University
*Department of Food and Nutrition, Mokpo National University

Abstract

Lactic acid bacteria(LAB) and its metabolites were tested for their inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus* in vitro. When *S. aureus* and LAB were incubated simultaneously in MRS broth, the growth of *S. aureus* began to be suppressed after 12 hour of incubation, completely inactivated within 24 hour of incubation by *L. lactis* and 48 hour by *L. casei*, *L. acidophilus*, and *Sc. thermophilus*. The pH values of media incubated by *S. aureus* and LAB were about 4.5 at 12 hour of incubation and 3.5 at 48 hour. The metabolites of the four LAB all exerted antibacterial activity on the growth of *S. aureus* in TS broth, but it got lost the antibacterial activity by heating (100°C, 20 min). On treating metabolites with catalase, only *L. lactis* were lost its antibacterial activity. Organic acids (acetate, lactate) showed more active inhibition than inorganic acid (HCl) at pH 3.5, 4.5 but there is no significant difference at pH 5.5, 6.5.

Key words: Lactic acid bacteria, *Staphylococcus aureus*, growth inhibition

서 론

젖산균은 발효 유제품과 발효 채소류에 널리 분포하고 있으며, 식품 부패미생물과 다른 병원성 미생물의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다^(1,2).

이러한 유해미생물에 대한 생육억제 기작은 젖산균의 경쟁적 성장 그리고 젖산, 초산과 같은 유기산 생성과 그에 따른 pH저하에 의한 항균작용, H₂O₂와 diacetyl 등의 항균성 대사산물의 생산 그리고 단백질성 고분자 물질인 bacteriocin의 생성 등에 기인한 것으로 보고되고 있다⁽³⁾. 즉 Gilliland와 Speck⁽⁴⁾는 MRS broth에서 *Lactobacillus acidophilus* NCFM가 *Clostridium perfringens*의 생육을 억제하여 37°C에서 6시간 만에 거의 모든 균을 사멸시켜다고 보고하였으며, Wong과 Chen⁽⁵⁾은 0.1 M의 젖산, 초산, 포름산이 pH 6.1, 6.0, 5.6에서 *B. cereus*의 증식을 억제한다고 보고하였다. Price 등⁽⁶⁾은 *Lactobacillus Plantarum*의 배양액이 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus* species의 생육을 억제하였고, 그 억제물질 중에

H₂O₂의 MIC는 2~8 mg/ml였으며, lag time을 1~7시간까지 연장시키는 억제효과가 있다고 보고하였다. 이와같은 젖산균과 그 대사산물들은 식품의 효과적인 저장성 향상이라는 관점에서 볼 때 상당히 중요함에도 불구하고 국내의 연구는 아직 미미한 실정이다.

한편 *Staphylococcus aureus*는 gram양성의 무포자 세균으로 공기, 물, 우유와 동물의 장관 및 호흡기 등에 광범위하게 존재하면서 enterotoxin이라는 독소를 생성하는 식중독의 원인균이다. 또한 *S. aureus*는 내염성이 강하여 염지식품에서도 잘 생육하며, 반건조 식품 등과 같이 수분활성도가 낮은 식품 뿐만 아니라 육, 유가공품 등 거의 모든 식품에서 식중독을 일으키는 것으로 보고되어지고 있다⁽⁷⁾.

따라서 본 연구에서는 식품보존제로써 이용 가능한 젖산균과 그 대사산물이 *S. aureus*의 생육에 미치는 억제효과를 in vitro 상에서 조사하였다.

재료 및 방법

시험균주

본 실험에 사용한 공시균주는 본 대학 미생물학 교실에 보관중인 것으로 실험에 사용하기 전에 3회 계대하였으

Corresponding author: Kap-Sang Lee, Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iri, Chonbuk, 570-749, Korea

Table 1. List of strains and media for subculture

Strain	Media
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356 MRS broth(Difco) ¹⁾
<i>Lactobacillus lactis</i>	ATCC 4797 MRS broth(Difco)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	KCTC 2185 MRS broth(Difco)
<i>Lactobacillus casei</i>	IFO 3533 MRS broth(Difco)
<i>Staphylococcus aureus</i>	KFCC 11764 Nutrient broth(Difco)

¹⁾Lactobacilli MRS broth(Difco)

며, 그 목록과 계대배지는 Table 1과 같다.

사용배지

S. aureus 단독 배양 또는 젖산균과의 혼합배양에 사용한 액체배지는 Lactobacilli MRS broth(Difco)였으며, 배양액의 *S. aureus* 생균수 측정에 사용한 선택배지는 Manitol salt agar(Difco)였다. 배양액의 항균성 실험에 사용한 배지는 Trypticase soy broth(Difco)였다.

젖산균과 혼합배양시 *S. aureus*의 생육억제 및 pH변화

젖산균과 *S. aureus*가 모두 잘 생육하는 Lactobacilli MRS broth 100 ml에 젖산균(4종)과 *S. aureus*을 각각 4 ml씩 접종하고, 대조구는 *S. aureus*만 접종하여 37°C에서 48시간 배양하면서 경시적으로 배양액을 채취하고 saline solution(0.85% NaCl)에 희석하여 0.1 ml씩 선택배지인 MS agar에 도포하였다. 도포한 평판배지를 항온기에서 24시간 배양시킨 후 각 배지에 나타난 균락을 계수하여 비교 측정하였다. pH는 pH meter(ORION 720, U.S.A.)로 측정하였다.

젖산균 대사산물에 의한 *S. aureus*의 생육억제

젖산균의 대사산물 조제는 Fig. 1과 같이 행하였다. 즉 10% 환원탈지우유에 젖산균을 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 발효액을 3000×g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이들을 멸균된 membrane filter (pore size: 0.45 µm, Millipore Co.)로 여과하여 제균하고 대사산물로 하였다. 준비된 대사산물을 TS broth에 10% (v/v) 첨가하고 *S. aureus*를 접종하여 37°C에서 배양하면서 MS agar를 이용 계수하였다.

젖산균 대사산물의 특성실험

대사산물의 *S. aureus* 생육억제 물질중에 하나로 추정되는 H₂O₂의 영향을 측정하기 위해 catalase(EC. 1.11.1.6 from bovine liver, Sigma Chemical Co.)를 0.05 M phosphate buffer에 녹인 다음 membrane filter(pore size: 0.45 µm)로 여과시켜 대사산물에 42 µg/ml(800

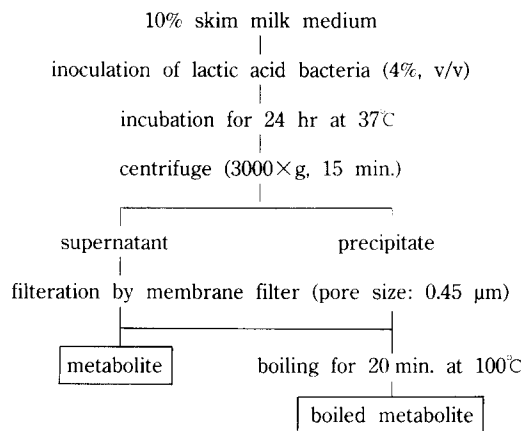


Fig. 1. Preparation of metabolites of lactic acid bacteria.

unit/ml)가 되도록 첨가하여 30°C에서 20분간 반응시킨 후 TS broth에 10%(v/v) 첨가하였으며, 배양액의 열처리 후 생육억제효과를 측정하기 위해 배양액을 100°C에서 20분간 가열한 후 TS broth에 10%(V/V) 첨가하고 *S. aureus*를 접종하여 37°C에서 배양하면서 경시적으로 계수하였다.

유기산 및 pH에 의한 *S. aureus* 생육억제

젖산균에 의해 생성된 각종 유기산과 그에 따른 pH 저하에 의한 *S. aureus* 생육의 억제효과를 측정하기 위해 TS broth를 젖산, 초산, 그리고 무기산인 HCl로 pH를 3.5, 4.5, 5.5, 6.5로 조정하고 *S. aureus*를 접종하여 배양하면서 경시적으로 균의 생육을 측정 비교하였다.

결과 및 고찰

***S. aureus*의 생육에 미치는 젖산균의 억제효과**

젖산균과 *S. aureus*을 MRS broth에 각각 4 ml씩 접종하여 혼합 배양하면서 경시적으로 측정된 *S. aureus*의 균수는 Fig. 2와 같다.

즉 *S. aureus* 단독배양(대조구)시에 균수는 접종 후 12시간 까지 대수적으로 증가하여 그 이후 48시간 까지 일정한 수준을 유지하였다. 젖산균과 혼합배양시에서는 4종의 젖산균 모두가 배양 초기에 *S. aureus* 증식을 억제하지 못하여 *S. aureus* 단독배양과 같은 경향을 나타내었으나, 12시간 이후 *S. aureus* 증식을 현저하게 저해하기 시작하여 *L. casei*와 혼합배양의 경우에는 배양 24시간만에 모든 *S. aureus*가 사멸하였으며, *L. lactis*, *Sc. thermophilus* 그리고 *L. acidophilus*와 혼합 배양한 경우에는 배양 48시간만에 완전히 사멸하였다. 이 때 배양액의 pH변화는 Fig. 3과 같이 *S. aureus* 단독배양의 경우 48시간 동안 일정한 수준(약 pH 6.40)을 유지하였으나,

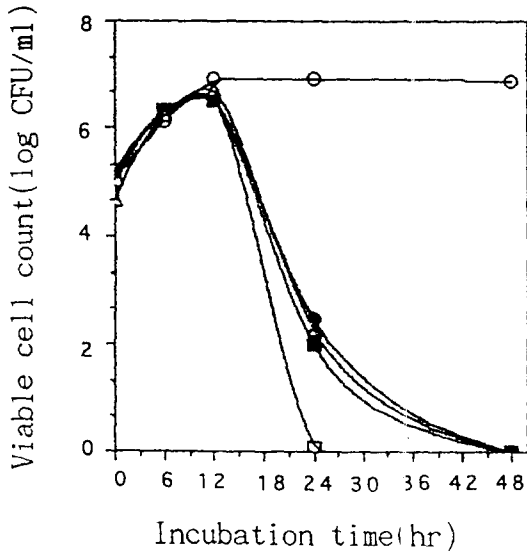


Fig. 2. Inhibition effect of lactic acid bacteria on the growth of *Staphylococcus aureus* in MRS broth medium

○; *S. aureus* alone (Control), ●; *L. acidophilus*+*S. aureus*, □; *L. casei*+*S. aureus*, ■; *Sc. thermophilus*+*S. aureus*, △; *L. lactis*+*S. aureus*.

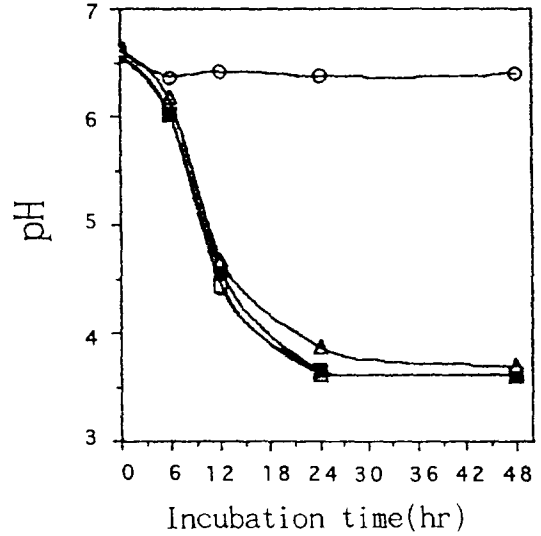


Fig. 3. Changes of pH in MRS broth fermented by lactic acid bacteria and *Staphylococcus aureus*.

○; *S. aureus* alone (Control), ●; *L. acidophilus*+*S. aureus*, □; *L. casei*+*S. aureus*, ■; *Sc. thermophilus*+*S. aureus*, △; *L. lactis*+*S. aureus*.

젖산균과 혼합배양시에 균이 사멸하기 시작한 배양 12 시간의 경우 pH는 4.50이었으며, 균이 완전히 사멸한 24, 48시간의 pH는 3.50이었다. 백과 배⁹⁾는 유기산 생성균과 *E. coli*를 BL broth에서 혼합배양할 때 배양 8시간째 부터 *E. coli*가 사멸하기 시작하였으며, 이 때 배양액의 pH가 4.5이하였다고 보고하였고, Schaack와 Marth¹⁰⁾는 *L. bulgaricus*와 *Listeria monocytogenes*를 혼합 배양시켰을 때 15시간만에 모든 *L. monocytogenes*가 사멸하였으며, 그 때 배양액의 pH가 4.0이하였다고 보고하고 있어 본 실험의 결과와 유사하였다.

젖산균의 대사산물에 의한 *S. aureus*의 생육억제 효과와 그 특성비교

10% 환원탈지유에서 젖산균에 의해 생성된 대사산물의 여액을 TS broth에서 *S. aureus* 생육을 억제시키는 효과와 그 억제효과의 열안정성을 측정하고, 젖산균이 생성하는 대사산물 중 H₂O₂의 관련여부를 조사하기 위해 catalase를 처리하여 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 이 때 TS broth의 초기 pH는 모두 6.8로 조정하였다.

대사산물 여액 첨가시 배양 12시간 이후에는 *S. aureus* 생균수가 급격히 감소하는 경향을 보여 배양 24시간만에 3.0 log cycle수준으로 대조구(발효되지 않은 10% 탈지우유 첨가구)의 6.0 log cycle에 비해 상당히 감소하여 큰 억제효과를 나타내었다. 이는 젖산균이 생성한 유기산(젖산, 초산 등), H₂O₂, diacetyl 등의 항균성 대사산물과

단백질성 bacteriocin의 생성 등에 기인한 것으로 사료된다. 대사산물의 여액을 100°C에서 20분간 열처리하였을 때 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*의 경우는 그 억제능력이 상실되었으나 *Sc. thermophilus*의 경우는 억제효과가 어느정도 유지되어 열안정성이 있는 것으로 나타났다. *Lactobacillus plantarum* LP2가 생성하는 생육억제물질은 120°C에서 15분간 열처리로 그 억제작용이 소실되지 않았으나¹¹⁾, *Lactobacillus helveticus*가 생성하는 항균성물질은 50°C에서 30분간 열처리로 인해 그 항균활성이 소실¹¹⁾된 것으로 나타나 젖산균이 생성하는 항균성물질의 열안정성은 다양한 것으로 보고되어지고 있다. 대사산물 여액 중 H₂O₂의 관련여부를 조사하기 위해 catalase를 처리하여 측정한 항균활성은 *L. acidophilus*, *L. casei*, *Sc. thermophilus*의 경우 catalase처리 후에도 그 억제능력이 상실되지 않아 이들 젖산균의 대사산물에 의한 항균능력은 H₂O₂의 영향이 아님이 확인되었으나, *L. lactis*의 경우에는 catalase처리 후 항균활성이 일부 소실되어 그 억제작용 중 H₂O₂ 영향도 있을 것으로 사료된다. 한편 H₂O₂의 항균작용은 H₂O₂의 hydroxyl radical이 세포막의 지질이나 DNA와 같은 필수적인 세포성분과 직접 반응해서 나타나는 것으로 보고되어지고 있다¹²⁾.

유기산 및 pH에 의한 *S. aureus*의 생육억제

젖산균에 의해 생성된 항균성 물질 중 유기산과 그 생성에 따른 pH저하에 의한 *S. aureus* 생육억제 효과를

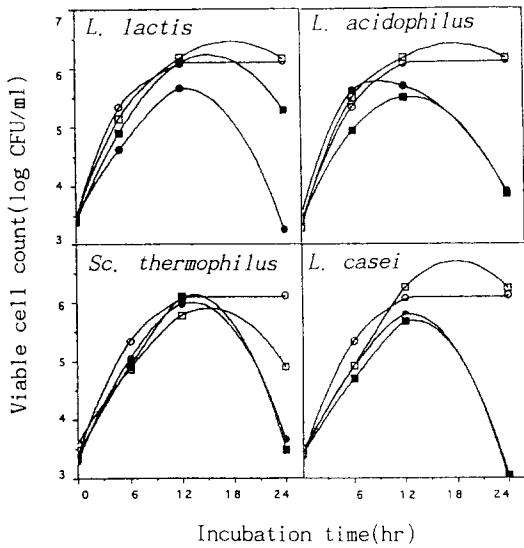


Fig. 4. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* in Tryptocase soy broth containing metabolites of lactic acid bacteria

○; 10% non-fermented skim milk (control), ●; metabolite, □; boiled metabolite, ■; metabolite reacted with catalase.

측정한 결과는 Fig. 5와 같다.

pH 3.5로 조정된 TS broth에서 *S. aureus*는 거의 생육하지 못하였고, 유기산(lactate, acetate)이 무기산인 HCl보다 더 높은 항균활성을 나타내었다. pH 4.5에서 *S. aureus* 생육은 약간 저해 받는 것으로 나타났으며, pH를 HCl로 조정할 것 보다 유기산으로 조정된 TS broth에서 그 저해작용이 더 큰 것으로 나타났다. pH 5.5, 6.5로 조정된 TS broth에서 *S. aureus*의 생육은 거의 영향을 받지 않았으며, 유기산과 HCl간에도 큰 차이가 없었다. 또한 초산과 젖산간의 항균능력 차이는 큰 유의성이 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보면 *S. aureus*는 유기산 생성에 따른 pH저하에 의해서 생육이 억제되기도 하지만 유기산 그 자체만으로도 그 생육이 억제되는 것으로 생각된다. 백과 배⁽⁸⁾는 lactate와 HCl로 pH를 조정된 BL broth에서 *E. coli*의 생육은 pH 5.5에서 미약했으며, pH 4.5에서는 항균능력이 뚜렷하고 HCl보다는 lactate가 더 높은 살균활성을 나타냈었다고 보고하였으며, Palumbo⁽¹⁵⁾ 등은 유기산이 BHI broth에서 무기산(HCl, H₂SO₄)보다 더 높은 pH값에서 항균효과를 나타낸다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하였다. 한편 이러한 현상은 배양액 내의 젖산균에 의해 유기산이 축적되기 시작하면 proton (H⁺)의 농도와 불해리상태의 유기산의 농도가 증가되어 정상적인 pH gradient를 형성하기 위해 proton과 유기산은 세포내로 이동하게 되며 세포내로 이동된 유기산과 proton은 pH를 낮추게 되고 세포막, periplasmic 공간 그리고 세포내의 소기관의 막에 있는 효소를 변성시켜

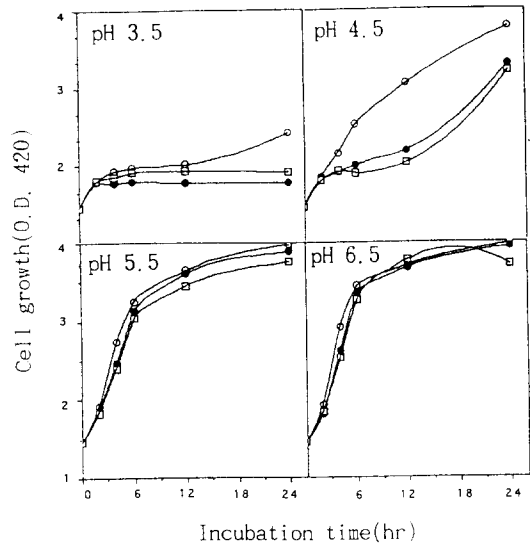


Fig. 5. Effect of different acids (HCl, lactate, acetate) on the growth of *S. aureus* in Tryptocase soy broth at pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5

○; HCl, ●; lactate, □; acetate

막 투과성을 불안정화 하므로써 항균력을 발휘하게 되는 것으로 보고되어져 있다^(13,14).

요 약

*Staphylococcus aureus*에 대한 젖산균과 그 대사산물의 항균효과와 그 항균물질의 특성을 조사하였다. MRS broth에서 *S. aureus*와 젖산균을 혼합배양시켰을 때 모든 젖산균은 배양 12시간째 부터 *S. aureus*의 생육을 억제하기 시작했으며, *L. lactis*는 24시간만에, *L. casei*, *Sc. thermophilus* 그리고 *L. acidophilus*는 48시간 만에 모든 균을 사멸하였다. *S. aureus*가 사멸하기 시작한 12시간째 혼합배양액의 pH는 4.50이었으며 완전히 사멸한 24, 48시간의 pH는 3.50이었다. TS broth에 젖산균의 대사산물을 첨가하고 *S. aureus*를 배양하였을 때 4종의 젖산균 대사산물 모두가 항균활성을 나타내었으며, 대사산물을 열처리하였을 때 *L. casei*, *L. acidophilus* 및 *L. lactis*는 그 항균활성이 소실되었으나, *Sc. thermophilus*의 경우는 어느정도 그 활성을 유지하였다. H₂O₂의 영향을 확인하기 위해 catalase를 처리하였을 때는 *L. lactis*만 그 항균활성이 소실되었다. 유기산(acetate, lactate)이 무기산(HCl)보다 pH 3.5, 4.5에서 *S. aureus*에 대한 살균활성이 더 높았으며, pH 5.5, 6.5에서는 큰 차이가 없었다.

문 헌

1. Daly, C., Sandine, W.E. and Elliker, P.R.: Interactions

- of food starter cultures and foodborne pathogens: *Streptococcus diacetilactis* versus food pathogens. *J. Milk Food Technol.*, **35**, 349(1972)
2. Smith, J.L. and Samuel, A.P.: Microorganisms as food additives. *J. Food Prot.*, **44**, 936(1981)
 3. Wood, B.J.B.: *The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease*, Vol.1. Elsevier Applied Science Publishers, London, UK. p.211(1992)
 4. Gilliland, S.E. and Speck, M.L.: Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food. Prot.*, **40**, 820(1977)
 5. Wong, H.C. and Chen, Y.L.: Effect of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2179 (1988)
 6. Price, R.J. and Speck, M.L.: Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J. Milk Food Technol.*, **33**, 13(1970)
 7. Ro, S.J. and Han, Y.W.: Microbial food-borne disease. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **6**, 135(1978)
 8. 백영진, 배동석: 유기산 생성균에 의한 병원성 *Escherichia coli* A₂와 *Escherichia coli* G₇의 생육억제. 한국산업미생물학회지, **16**, 111(1988)
 9. Schaack, M.M. and Marth, E.H.: Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk and in yogurt mix during fermentation by *thermophilic* lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, **51**, 607(1988)
 10. 박연희, 송현주: 김치에서 분리한 *Lactobacillus Plantarum* LP2의 항균작용. 한국산업미생물학회지, **19**, 637 (1991)
 11. Vaughan, E.E., Daly, C. and Fitzgerald, G.F.: Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus halveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 299(1992)
 12. Block, S.S.: Peroxygen compounds, In Block, S. S.(ed) *Disinfection Sterilization, and Preservation*, Lea & Febiger, Philadelphia. p.169(1991)
 13. Baird-Parker, A.C.: Organic acid, In *Microb. Ecology of Foods*, Vol.1. Academic Press, London(1980)
 14. Booth, J.R.: Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microb. Rev.*, **49**, 359(1983)
 15. Palumbo, S.A. and Willams, A.C.: Growth of *Aeromonas hydrophila* K144 as affected by organic acids. *J. Food Sci.*, **57**, 233(1992)

(1994년 8월 29일 접수)