

## 사료첨가용 생균제 개발을 위한 마늘 내성 유산균의 배양 조건

김유진<sup>1,2</sup> · 장서정<sup>1,2</sup> · 박정민<sup>2</sup> · 김창욱<sup>3</sup> · 박영서<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경원대학교 식품생물공학과, <sup>2</sup>한국미생물보존센터, <sup>3</sup>(주)티제이바이오

### Culture Conditions of Garlic Resistant Lactic Acid Bacteria for Feed Additives

Yu-Jin Kim<sup>1,2</sup>, Seo-Jung Jang<sup>1,2</sup>, Jung-Min Park<sup>2</sup>, Chang-Uk Kim<sup>3</sup>, and Young-Seo Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University

<sup>2</sup>Korean Culture Center of Microorganisms

<sup>3</sup>TJ Bio Co., Ltd.

#### Abstract

Culture conditions of *L. plantarum* TJ-LP-002, the garlic resistant strain isolated from *pakimchi* (green onion kimchi), were investigated for the use of feed additives. Acetic acid, citric acid, lactic acid, and tartaric acid were detected in the culture supernatant, and especially the concentrations of lactic acid and acetic acid significantly increased during cultivation. The antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002 was not affected by proteases, catalase or cellulase, which showed that the antimicrobial activity might be due to the production of acids rather than proteinaceous antimicrobial substances. *L. plantarum* TJ-LP-002 was resistant to neomycin sulfate, spectinomycin dihydrochloride, and lincomycin hydrochloride, sensitive to streptomycin sulfate, and intermediate resistant to ampicillin trihydrate, chloramphenicol, erythromycin, tetracycline hydrochloride, and kanamycin sulfate. The optimum initial pH of medium, fermentation temperature and time for the cell growth and antibacterial activity were pH 7.0, 30°C and 24hr, respectively. The optimal composition of culture medium for the cell growth and antimicrobial activity was 3%(w/v) glucose as a carbon source, 3%(w/v) yeast extract as a nitrogen source, and manganese sulfate and ammonium citrate as inorganic salts. The combinatorial supplementation of these inorganic salts, rather than sole addition as an inorganic salt, resulted in better antibacterial activity.

**Key words:** garlic resistant lactic acid bacteria, culture condition, antimicrobial activity

## 서 론

마늘은 탄수화물과 단백질이 풍부하고, 각종 비타민류를 함유하고 있으며, cysteine, histidine, lysine 등의 필수 아미노산과 linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid 등의 지방산을 함유하고 있다(Hwang et al., 2004; 이용정, 1983). 마늘의 유효 성분으로는 allin과 allicin이 알려져 있는데, allin은 allinase라는 효소의 작용에 의하여 allicin으로 전환되며, allicin을 비롯한 여러 종류의 황화합물들이 항균 작용 등의 생리활성을 지니고 있다(Wi, 2003).

마늘은 *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*,

*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* 등의 미생물에 항균력을 나타내어 증식을 억제한다고 보고되었으며 (Shokrzhadeh & Ebadi, 2006), 병원성 세균에 대한 증식 억제율이 유산균에 대한 증식 억제율보다 높고(Chung et al., 2003), 유산균 중에서는 *Lactobacillus mesenteroides*와 *L. plantarum*에 대해 높은 항균력을 나타내는 것으로 보고되었다(Kim et al., 1998). 마늘 추출물의 높은 항균력에도 불구하고 마늘 추출물이 첨가된 배지에서 생육 가능한 마늘 내성 유산균이 전통발효식품인 김치, 젓갈, 장아찌로부터 본 연구진에 의해 분리된 바 있다(Kim et al., 2009). 한편, 마늘 추출물의 유효성분이 김치에서 분리한 일부 유산균의 생장을 촉진시킨다는 연구 결과도 보고된 바 있다(Hong, 2005). 폐기되는 마늘부산물을 활용하여 고기능성 사료첨가제를 개발하기 위해서는 마늘 부산물과 혼합 시에 생육이 가능하도록 마늘의 항균력에 저항성을 나타내는 유산균주를 확보하여야 한다.

Corresponding author: Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam, Gyeonggi-do 461-701, Korea

Tel: +82-31-750-5378; Fax: +82-31-750-5273

E-mail: ypark@kyungwon.ac.kr

Received January 9, 2010; revised February 13, 2010; accepted February 17, 2010

생균제는 숙주에게 투여되어 장내 미생물 균형을 향상시킴으로써 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물 첨가제를 말한다. 생균제는 병원성 세균이 장 내에 부착되는 것을 억제하며, 장 내의 제한된 영양소를 병원성 세균과 경쟁적으로 이용하여 병원성 세균의 증식을 억제시킨다(Fuller, 1989; Hinton et al., 1991; Shahani et al., 1976). 또한 과산화수소, 유기산, 박테리오신 등의 항균성 물질을 생성하고, 유산과 같은 유기산 생성에 의해 장내 pH를 저하시켜 병원성균의 생육을 억제시키며(Dary et al., 1971; White et al., 1969), 면역호르몬 생성을 유도하여 장내 면역체계를 자극시킴으로써 감염에 대한 저항력을 증가시킨다(Perdigon et al., 1988).

가축에 투여 시에 사료의 이용효율 촉진, 성장 촉진, 질병에 대한 면역기능 향상, 유해균의 증식억제, 폐사를 감소 및 분변의 발효억제, 악취, 유독가스의 생성 억제 등의 효과를 나타내며, 사육 시 문제가 되는 항생제를 대체할 수 있는 대안으로서 생균제의 수요가 최근 증가하고 있다(Chang et al., 2000; Francis et al., 1978; Hong et al., 1996; Lee, 2008; Yoo et al., 2007).

유용 미생물의 산업화에 있어서 유용 균주의 탐색 및 분리뿐만 아니라, 최적생산배지의 개발이 중요하다. 미생물의 배양에 이용되는 배지 성분의 선별 시에는 균체성장 효율의 극대화에 미치는 영향, 세균 대사산물 생산 효율의 극대화에 미치는 영향, 원료 수급의 용이성, 배지의 제조과정 중 물리화학적 특성 변화의 최소화, 배양과정 중 배양액의 유체역학적 저해요인 최소화에 미치는 영향 등이 조사되어야 한다(Bae, 2008). 배양조건과 영양요구성이 비교적 까다로운 유산균의 특성과 이용되는 기질의 종류, 균체의 양, 균의 증식 속도에 따라 대사산물의 생성에 차이가 있는 유산균의 특성에 따라 유산균의 균체성장과 대사물질의 생산에 영향을 미치는 배지조성과 배양조건에 대한 조사가 필요하다.

본 연구에서는 선행연구를 통해 마늘과 생균제의 유익한 효과를 동시에 낼 수 있는 고기능성 사료첨가제 개발을 위하여 마늘의 항균력에 대한 저항성을 갖는 유산균을 분리하였으며, 생균제로서의 이용 가능성이 높은 *Lactobacillus plantarum* TJ-LP-002를 선별 및 동정하였다(Kim et al., 2009). 본 연구에서는 생균제의 생산성 향상을 위해서 *L. plantarum* TJ-LP-002의 균체생육과 항균활성에 영향을 미치는 배양조건과 배지조건을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 전통발효식품인 김치, 젓갈, 장아찌로부터 분리한 마늘 내성 유산균 중 생균제적 특성이 우수한 *L. plantarum* TJ-LP-002를 선정하여 사용하였다

(Kim et al., 2009). 선정 유산균의 배양과 최적배지조성 확인 실험의 비교배지로 *Lactobacilli* MRS broth(protease peptone No. 3 10 g/L, beef extract 10 g/L, yeast extract 5 g/L, glucose 20 g/L, tween 80 1 g/L, ammonium citrate 2 g/L, sodium acetate 5 g/L, dipotassium phosphate 2 g/L, magnesium sulfate 0.1 g/L, manganese sulfate 0.05 g/L)를 사용하였고, 37°C에서 2일간 통성 혐기적으로 배양하였다. 항균활성을 측정하기 위한 검정균주로는 *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* KCCM 32586을 nutrient broth(Difco Co., USA)에 접종하여 37°C에서 1일간 호기적으로 배양하여 사용하였다.

### 유기산 함량 분석

선정 유산균이 생산하는 유기산을 분석하기 위하여 선정 유산균의 전배양액을 MRS broth에 2%(v/v) 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 배양 상등액의 유기산 함량을 HPLC(ACME 9000, Young Lin Instrument, Co., Ltd. Anyang, Korea)를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 Shodex RSpak KC-811 (8.0×300 mm)를 사용하였고, 분석온도는 40°C, 이동상은 0.1%(w/v) perchloric acid, 유속은 1.0 mL/min로 하였으며, 시료는 10 L를 주입하여 검출기(RI750F)로 측정하였다. 유기산 표준물질은 acetic acid, citric acid, lactic acid, malic acid, succinic acid, tartaric acid를 0.1%(w/v) perchloric acid 용액에 최종 농도가 1%(w/v)가 되도록 조제하였으며, 선정 유산균의 배양 상등액은 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였다. 표준물질의 retention time과 peak area를 이용하여 대조구인 MRS broth와 선정 유산균 배양 상등액의 유기산 함량을 mg/kg 단위로 계산하였다.

### 마늘 추출물의 항균력에 대한 저항성 조사

선정 유산균이 마늘의 항균력에 저항성을 갖는지를 확인하기 위하여 선정 유산균과 유산균 표준균주 *Lactobacillus plantarum* KCCM 12116, *L. acidophilus* KCCM 32820, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* KCCM 11357 배양액이 각각 1%(v/v) 증충된 MRS agar 위에 paper disc를 사용하여 마늘 추출물을 0, 10, 20, 50, 100, 200 μL씩 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 저해환 형성 여부를 비교하였다.

### 각종 효소의 처리

선정 유산균이 생산하는 항균 물질의 항균활성에 미치는 효소의 영향을 확인하기 위하여 선정 유산균 배양 상등액에 각종 효소를 20%가 되도록 첨가하고 37°C에서 24시간 반응시킨 후 검정균인 *A. hydrophila* KCCM 32586에 대한 항균활성을 확인하였다. Trypsin, proteinase K, protease VIII, lysozyme, α-chymotrypsin은 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0), cellulase와 catalase는 50 mM sodium phosphate

완충용액(pH 7.0)에 0.1%(w/v)가 되도록 효소액을 준비하여 사용하였다.

**항생제 감수성 조사**

선정 유산균이 OD<sub>625</sub>=0.1±0.01 균체수로 접종된 mueller hinton broth에 neomycin sulfate, ampicillin trihydrate, spectinomycin dihydrochloride, chloramphenicol, erythromycin, tetracycline hydrochloride, streptomycin sulfate, kanamycin sulfate, bacitracin, lincomycin hydrochloride를 농도를 달리하여 각각 첨가한 후 37°C에서 24시간 배양시킨 다음 균체가 생육하지 않는 최소 농도를 확인하였다. 항생제의 최소 억제범위는 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)의 판정기준과 비교하여 결정하였다(Shryock et al., 2004).

**배양 시간, 초기 pH, 온도에 의한 균체생육 및 항균활성 조사**

선정 유산균의 균체생육과 항균활성에 영향을 미치는 배양 조건을 확인하기 위하여 MRS broth에 선정 유산균 전배양액을 2%(v/v) 접종하고 일정 간격으로 배양액을 취해서 균체생육 및 항균활성을 측정하여 배양 시간에 의한 변화를 확인하였다. 초기 pH에 의한 변화는 1 N NaOH와 1 N HCl 용액을 사용하여 MRS broth의 pH를 4.0-10.0으로 조정하여 비교하였고, 배양 온도에 의한 변화를 확인하기 위하여 배양 온도를 25, 30, 37, 40, 50°C로 달리하여 배양한 후 균체생육과 항균활성을 비교하였다. 균체생육은 625 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 항균활성은 검정균주인 *A. hydrophila* KCCM 32586이 1%(v/v) 중층된 nutrient agar 위에 paper disc를 사용하여 유산균 배양액 100 µL를 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 저해환의 직경을 측정하여 나타내었다.

**탄소원의 종류 및 농도에 의한 균체생육 및 항균활성**

선정 유산균의 균체생육 및 항균활성에 영향을 미치는 배지조건을 확인하기 위하여 탄소원을 제거한 MRS broth에 rhamnose, fructose, glucose, galactose, mannose, xylose, maltose, sucrose, lactose, cellobiose, raffinose, starch, cellulose, pectin, dextran, mannitol, sorbitol를 각각 2%(w/v)씩 첨가하고, 선정 유산균 전배양액을 2%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 균체생육과 항균활성을 측정하였다. 가장 우수한 균체생육과 항균활성을 나타내는 탄소원을 0, 1, 2, 3, 4, 5%(w/v) 농도로 첨가하여 선정 유산균

전배양액 2%(v/v)를 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 균체생육과 항균활성을 측정하였다.

**질소원의 종류 및 농도에 의한 균체생육 및 항균활성**

질소원을 제거한 MRS broth에 beef extract, casitone, malt extract, meat peptone, neopeptone, peptone, polypeptone, proteose peptone, soytone, tryptone, yeast extract와 같은 유기태 질소원과 urea, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 같은 무기태 질소원을 각각 2%(w/v)씩 첨가하고, 선정 유산균 전배양액을 2%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 균체생육과 항균활성을 측정하였다. 가장 우수한 균체생육과 항균활성을 나타내는 질소원을 0, 1, 2, 3, 4, 5%(w/v) 농도로 첨가하여 선정 유산균 전배양액 2%(v/v)를 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 균체생육과 항균활성을 측정하였다.

**무기염류에 의한 균체생육 및 항균활성**

균체생육과 항균활성이 우수한 탄소원과 질소원이 첨가된 배지에 MRS broth의 무기염류인 ammonium citrate, sodium acetate, magnesium sulfate, manganese sulfate, dipotassium phosphate를 각각 단독으로 제거하고, 선정 유산균 전배양액 2%(v/v)를 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 균체생육과 항균활성을 측정하였다. 제거 시에 많은 영향을 주는 무기염류들을 각각 단독 첨가, 혼합 첨가, 5가지 무기염류 모두 첨가하여 선정 유산균 전배양액 2%(v/v)를 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 균체생육과 항균활성을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**유기산 생성 특성**

선정 유산균 *L. plantarum* TJ-LP-002가 나타내는 항균활성과 관련하여 선정 유산균이 생성하는 유기산을 분석하기 위하여 HPLC를 이용하여 MRS broth와 선정 유산균 배양상등액의 유기산 함량을 비교하였다(Table 1). 대조구로 사용한 MRS broth는 저해능이 없는 발효 전 상태이지만, 배지 내에 tartaric acid, acetic acid, citric acid, lactic acid의 순으로 유기산이 이미 존재하였다. 선정 유산균을 MRS broth에 24시간 배양한 배양상등액 내에는 acetic acid, citric acid, lactic acid, tartaric acid가 함유된 것으로 조사

**Table 1. Organic acid content in culture supernatant of *L. plantarum* TJ-LP-002 (mg/kg)**

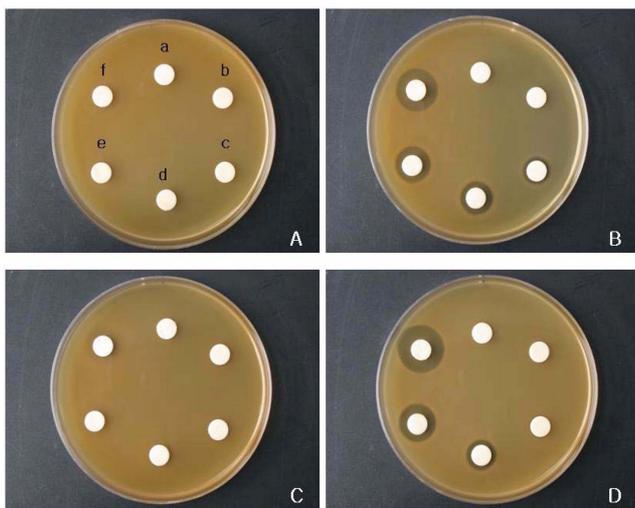
	Acetic acid	Citric acid	Lactic acid	Malic acid	Succinic acid	Tartaric acid
Control (MRS)	3,425	2,264	286	868	- <sup>1)</sup>	13,318
TJ-LP-002	17,628	2,939	43,739	-	-	6,900

<sup>1)</sup> Not detected.

되었으며, 이 중 lactic acid의 함량이 43,739 mg/kg으로 대조구인 MRS broth와 비교하여 약 150배 정도로 크게 증가하여 선정 유산균의 발효에 의해 lactic acid가 다량 생성됨을 확인할 수 있었다. Acetic acid의 함량도 17,628 mg/kg으로 측정되어 대조구인 MRS broth의 3,425 mg/kg과 비교하여 약 5배 증가하는 것으로 나타났다. 반면에, malic acid와 tartaric acid는 배양 후 감소한 것으로 나타났는데, 이것은 선정 유산균의 유기산 대사 과정에 의해 malic acid와 tartaric acid로부터 lactic acid가 생산되었을 것으로 추측된다(정창민, 2001). 이러한 유산균의 산 생성 특성에 따라 선정 유산균의 항균활성이 산 생성에 의한 pH 저하로 인한 것으로 추측할 수 있다. 항균활성을 나타내는 특정 유기산에 대한 다양한 연구 보고가 있는데, GC-MS로 유산균이 생성한 유기산 프로파일을 분석하고, 각 유기산의 항균특성을 조사하여 2OH-isocaproic, phenyllactic, 4OH-phenyllactic acid에 의한 *H. pylori*의 저해효과에 대해서 보고된 바 있으며(Park, 2003), *L. pentosus* K34가 생성하는 phenyllactic acid의 항균활성에 대한 연구 보고도 있다(Lee, 2005).

#### 마늘 추출물의 항균력에 대한 저항성

선정 유산균의 마늘의 항균력에 대한 저항성을 확인하기 위하여 선정 유산균과 유산균 표준균주들이 각각 중층된 배지에 마늘 추출물을 0, 10, 20, 50, 100, 200  $\mu$ L 접종하여 배양한 후 저해환 형성 여부를 확인하여 마늘 추출물의 항균력에 대한 저항성을 비교하였다(Fig. 1). 선정 유산균 *L. plantarum* TJ-LP-002는 마늘 추출물이 첨가된 배지에서



**Fig. 1.** Antimicrobial activity of the garlic extract against *L. plantarum* TJ-LP-002 and type strains of LAB.

A, *L. plantarum* TJ-LP-002; B, *L. plantarum* KCCM 12116; C, *L. acidophilus* KCCM 32820; D, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* KCCM 11357; Garlic extract: a, 0  $\mu$ L; b, 10  $\mu$ L; c, 20  $\mu$ L; d, 50  $\mu$ L; e, 100  $\mu$ L; f, 200  $\mu$ L

**Table 2.** Effect of various enzymes on the antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002

Enzyme	Antimicrobial activity
Catalase	+ <sup>1)</sup>
Cellulase	+
Lysozyme	+
Trypsin	+
Proteinase K	+
Protease VIII	+
$\alpha$ -Chymotrypsin	+

<sup>1)</sup>+, Positive activity.

배양되어 분리한 균주이므로, 200  $\mu$ L의 마늘 추출물을 접종하여도 생육이 저해되지 않음을 확인할 수 있었다. *L. plantarum*과 *L. delbrueckii* subsp. *lactis*의 경우에는 각각 20, 50  $\mu$ L부터 생육이 저해되는 것을 볼 수 있었으며, 200  $\mu$ L 접종 시에는 뚜렷하게 생육이 저해됨을 볼 수 있었다. *L. acidophilus*의 경우에는 200  $\mu$ L 접종 시에 약한 저해환을 나타내었다. 선정 유산균은 유산균 표준균주들과 비교하였을 때, 마늘 추출물의 항균력에 저항성이 있음을 확인할 수 있었으며, 마늘과의 혼합 배양 시에 생육이 저해되지 않아 사료용 첨가제로 사용할 경우 마늘의 유용한 효과와 선정 유산균의 유용한 효과를 동시에 낼 수 있을 것으로 기대된다.

#### 각종 효소의 영향

선정 유산균의 항균활성에 미치는 효소의 영향을 확인하기 위하여 유산균의 배양 상등액에 각종 효소를 처리하여 반응시킨 후 항균활성을 조사하였다. 선정 유산균의 배양 상등액은 효소처리에 의한 영향을 받지 않아 항균활성을 소실하지 않음을 알 수 있었다(Table 2). 단백질분해효소인 trypsin, proteinase K, protease VIII,  $\alpha$ -chymotrypsin 처리에 의해 항균활성이 영향을 받지 않아 선정 유산균이 생산하는 항균성 물질이 bacteriocin과 같은 단백질성 물질이 아니거나 단백질분해효소의 영향을 받지 않는 구조의 물질일 것으로 추정된다. *L. paraplantarum* C7 유래 bacteriocin은 proteinase K, protease와 같은 단백질분해효소 처리 시에 효소의 영향으로 잔존활성이 소실되었지만(Lee et al., 2007), 본 연구에서는 선정 유산균의 항균활성이 단백질분해효소 처리 시에도 그대로 유지되었다. 또한, catalase나 cellulase 또는 lysozyme에 의해서도 항균활성이 영향을 받지 않아 선정 유산균의 항균활성은 과산화수소나 당과 관련된 작용이 아닐 것으로 추측되었다.

#### 선정 유산균의 항생제 감수성

생균제와 항생제의 병용 가능성을 확인하기 위하여 여러 가지 항생제에 대한 내성과 감수성을 조사하여 선정 유산균이 생육하지 않는 항생제 농도를 최소억제농도(minimum

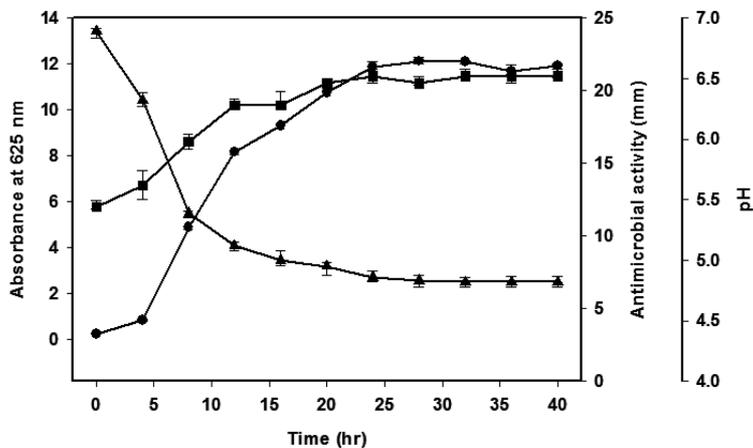
**Table 3. Antibiotic susceptibility test of *L. plantarum* TJ-LP-002**

Antibiotics	Minimum inhibitory concentration (µg/mL)								
	0	2.5	5	10	25	50	100	200	
Neomycin sulfate	+	+	+	+	+	+	-	-	
Ampicillin trihydrate	+	+	+	-	-	-	-	-	
Spectinomycin dihydrochloride	+	+	+	-	-	-	-	-	
Chloramphenicol	+	+	+	+	+	+	-	-	
Erythromycin	+	+	+	-	-	-	-	-	
Tetracycline hydrochloride	+	+	+	+	-	-	-	-	
Streptomycin sulfate	+	+	-	-	-	-	-	-	
Kanamycin sulfate	+	+	+	+	+	+	-	-	
Bacitracin	+	+	+	+	-	-	-	-	
Lincomycin hydrochloride	+	+	+	+	+	+	+	-	

<sup>1)</sup>+: Growth, -, no growth.

inhibitory concentration, MIC)로 표시하였다(Table 3). 세균의 세포벽 합성을 저해하는 β-lactam 계열의 항생제인 ampicillin trihydrate는 신장 유산균의 최소억제농도범위가 0.3125~0.625 µg/mL였으며, NCCLS 판정 기준에 비교하였을 때 중간 내성을 나타내었다. 세균의 ribosome에 작용하여 RNA의 정상적 결합을 차단해 단백질 합성을 저해하는 작용을 하는 aminoglycoside 계열의 항생제인 kanamycin sulfate는 최소억제농도범위가 10~50 µg/mL였고, 중간 내성을 나타내었다. Streptomycin sulfate에는 2.5~5 µg/mL로 감수성을 나타내었고, neomycin sulfate와 spectinomycin

dihydrochloride에는 내성을 나타내었다. 그 외 ribosome의 30S subunits에 결합하여 protein 대사를 억제하는 tetracycline hydrochloride는 5~10 µg/mL, 50S subunits에 결합하여 peptidyltransferase를 억제하는 chloramphenicol은 12.5~25 µg/mL로 중간 내성을 나타내었다. 또한, 50S subunits에 결합하여 protein 합성을 억제하는 lincomycin hydrochloride에는 12.5~25 µg/mL의 최소억제농도범위로 내성을 나타내었으며, erythromycin은 0.625~1.25 µg/mL로 중간 내성을 나타내었다. 국립수의과학검역원은 2009년 9월 23일부터 시행하는 배합사료에 첨가하는 항생물질제제 및



**Fig. 2. Time course of the cell growth and the antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002 in MRS broth. - ● -, cell growth; - ■ -, antimicrobial activity; - ▲ -, pH**

항균제 등의 사용기준을 개정 고시하였다(국립수의과학검역원 고시 제2009-10호, '09.09.23). 고시에는 배합사료에 첨가할 수 있는 항생제를 규제하고 있으나, 국내 축산 농가에서는 여전히 자가 치료 및 예방 목적으로 사료에 허용되지 않은 다양한 계열의 항생제를 사용하고 있다. 그러므로 생균제로 적용 시에 감수성을 나타내는 항생제는 억제농도범위를 고려하여 사용해야 할 것이며, 내성을 나타내는 항생제는 선정 유산균의 내성이 확산되지 않도록 주의하여 사용해야 할 것이다.

배양 시간에 의한 영향

선정 유산균의 배양 시간에 의한 변화를 확인하기 위하여 4시간 간격으로 균체생육과 항균활성을 측정하여 나타내었다(Fig. 2). 배양 4시간 이후부터 균체생육이 급격히 증가하여 24시간에서 최대 증식을 나타내었고, 항균활성은 균체생육과 비슷한 증가 양상을 보였으며, 20시간 이후부터는 항균활성을 지속적으로 유지하였다. 배양액의 pH는

균체가 증식됨에 따라 저하되었는데 균체생육에 따른 산생성에 의한 것으로 추정된다. 기존에 보고된 김치에서 분리한 *L. plantarum* AF1의 생육곡선과 생육에 따른 항진균 활성 조사 결과와 비교했을 때, 생육 8-12시간에 대수기를 지나 20시간 정도에서 생육 정지기에 이르고, 생육에 따라 pH가 감소하여 pH 3.9 이후 그대로 유지되며, 항진균 활성 또한 20시간에 최대 활성을 나타낸 후 그대로 유지된 결과와 패턴이 매우 유사하였다(Yang & Chang, 2008).

초기 pH와 배양 온도에 의한 영향

균체생육 및 항균활성 향상을 위한 배양 배지의 최적 초기 pH를 결정하기 위하여 MRS broth의 초기 pH를 달리 하여 균체생육과 항균활성을 측정하였다(Fig. 3). 균체생육을 위한 적정 pH 범위는 6-9이며, 최적 pH는 7로 나타내었으며, 항균활성은 pH 5-8 범위에서 높았고, pH 7에서 가장 높게 나타났다. pH 4에서는 균체생육이 저해되었지만 비교적 높은 수준의 항균활성을 나타내었고, pH 8 이상에

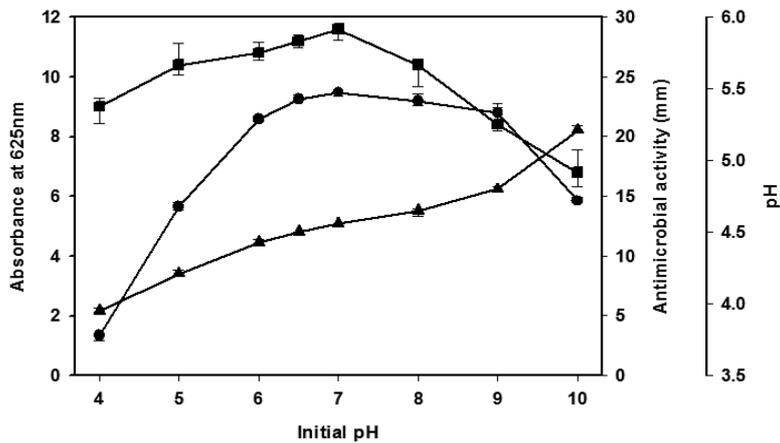


Fig. 3. Effect of initial pH on the cell growth and the antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002 during cultured in MRS broth.

- ● -, cell growth; - ■ -, antimicrobial activity; - ▲ -, pH

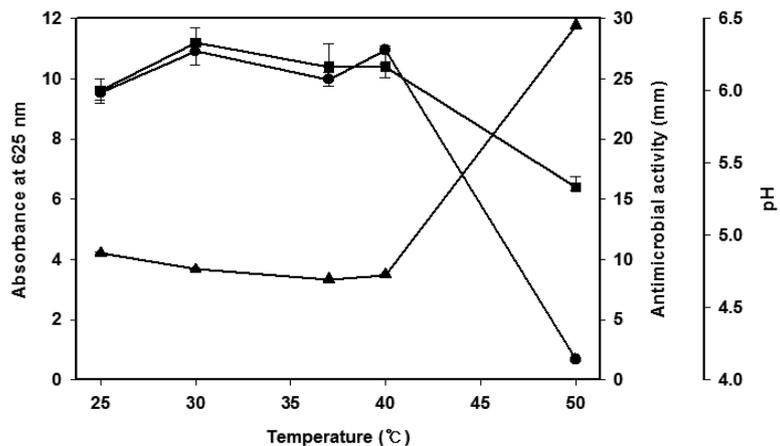


Fig. 4. Effect of fermentation temperature on the cell growth and the antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002 during cultured in MRS broth.

- ● -, cell growth; - ■ -, antimicrobial activity; - ▲ -, pH

서는 항균활성이 현저하게 낮아졌다. 최적 배양 온도를 결정하기 위하여 배양 온도를 달리하여 균체생육과 항균활성을 측정 한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 균체생육과 항균활성 모두 25-40°C에서 비교적 높게 나타났으며, 50°C에서는 균체생육과 항균활성이 현저하게 저하되었다. 균체생육과 항균활성 향상을 위한 최적온도는 30°C로 확인되었다. 전통발효식품인 가자미식해에서 분리한 *L. plantarum* Y21은 pH 6.5, 30°C에서 최대 균체생육과 항균활성을 나타낸다고 보고하였으며(Chin et al., 2001), 동치미에서 분리한 *Lactobacillus* sp. FF-3은 pH 7.0, 37°C에서 최대 항균활성을 나타낸다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다(Park et al., 2003).

**Table 4. Effect of carbon sources on the cell growth and antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002**

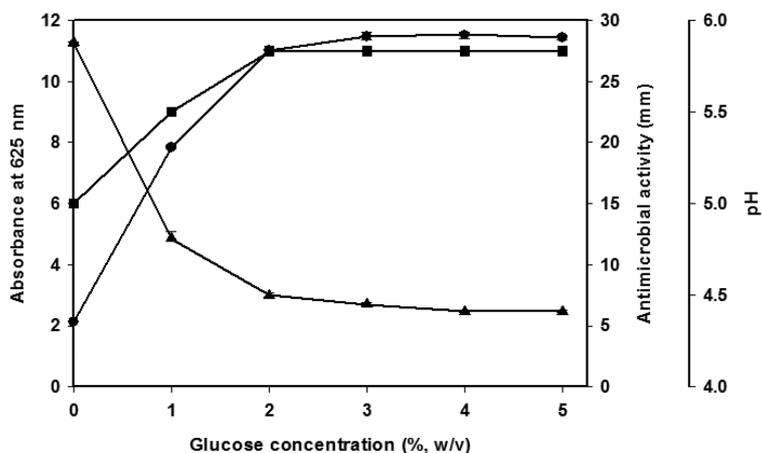
Carbon source	Cell growth (Absorbance at 625 nm)	Antimicrobial activity (mm)	pH
Rhamnose	2.36	15.0	4.81
Fructose	8.53	25.0	3.80
Glucose	10.80	24.5	3.73
Galactose	7.97	24.5	3.86
Mannose	9.60	23.5	3.74
Xylose	1.83	10.0	4.87
Maltose	11.70	24.0	3.77
Sucrose	9.95	23.5	3.74
Lactose	9.99	23.5	3.80
Cellobiose	10.25	22.0	3.76
Raffinose	8.45	20.5	3.93
Starch	1.83	9.0	5.42
Cellulose	2.00	9.5	5.41
Pectin	1.73	11.5	4.83
Dextran	1.66	9.0	5.43
Mannitol	7.80	21.0	3.85
Sorbitol	7.30	19.0	3.92

탄소원에 의한 영향

균체생육과 항균활성 향상을 위한 최적배지조성을 결정하기 위하여 탄소원의 종류와 농도에 따른 영향을 조사하였다. 탄소원의 종류를 달리하여 균체생육과 항균활성을 측정 한 결과(Table 4), 균체생육은 maltose, glucose, cellobiose 순으로 높았으며, 항균활성은 fructose, glucose, galactose 순으로 우수하였다. 균체 생육 후의 최종 pH나 당류의 확보 용이성 및 경제성 등을 고려할 때 탄소원은 glucose가 가장 적합한 것으로 판단되었다. Glucose를 농도 별로 조사한 결과(Fig. 5), glucose의 첨가량이 증가됨에 따라 균체생육은 증가하였으며, 3%(w/v) 첨가하였을 때 가장 우수한 균체 생육도를 나타내었다. 항균활성은 2%(w/v) 이상 첨가하였을 때 가장 우수하였다. 탄소원의 과다 첨가가 항균활성을 저해하는 영향을 준다는 연구 결과가 있으나(Park et al., 2003), 본 연구의 선정 유산균은 5%의 높은 탄소원 농도에도 크게 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다. 가자미식해 유래 *L. plantarum* Y21은 탄소원으로 glucose를 첨가했을 때, 균체생육과 항균활성이 가장 높았다고 하였으며(Chin et al., 2001), 동치미에서 분리한 *Lactobacillus* sp. 는 glucose를 3%(w/v) 첨가하였을 때 bacteriocin의 최대 생산량을 나타내었다고 보고하였다(Park et al., 2003). 반면, 맥주에서 분리한 *L. plantarum* ST13BR은 maltose 2~3% 첨가 시에 최대 항균활성을 나타내었으며, glucose 첨가 시에 maltose 첨가 시의 50% 정도의 낮은 활성을 나타내어(Todorov et al., 2004), 같은 균종이더라도 생산되는 항균 물질에 따라서 다른 영양요구성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

질소원에 의한 영향

질소원의 종류에 따른 균체생육과 항균활성의 영향을 확인하기 위하여 각종 유기태 질소원과 무기태 질소원을 첨가하여 조사한 결과 Table 5에 나타낸 바와 같이 균체생육



**Fig. 5. Effect of glucose concentration as a carbon source on the cell growth and antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002. - ● -, cell growth; - ■ -, antimicrobial activity; - ▲ -, pH**

**Table 5. Effect of nitrogen sources on the cell growth and antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002**

Nitrogen source	Cell growth (Absorbance at 625 nm)	Antimicrobial activity (mm)	pH
Beef extract	2.91	30.5	4.21
Casitone	7.27	30.5	3.83
Malt extract	0.73	25.0	4.68
Meat peptone	7.05	29.0	3.74
Neopeptone	5.40	22.5	3.89
Peptone	6.95	29.5	3.72
Polypeptone	4.23	23.5	4.04
Proteose peptone	9.17	26.5	3.65
Soytone	7.40	32.0	3.80
Tryptone	6.58	29.0	3.78
Yeast extract	9.39	30.5	3.72
Urea	0.15	- <sup>1)</sup>	6.41
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.09	-	4.78
KNO <sub>3</sub>	0.46	-	4.55
NaNO <sub>3</sub>	0.13	-	6.49
NH <sub>4</sub> Cl	0.43	-	4.47
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.33	-	5.44
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.38	10.0	5.43
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.39	11.0	4.72

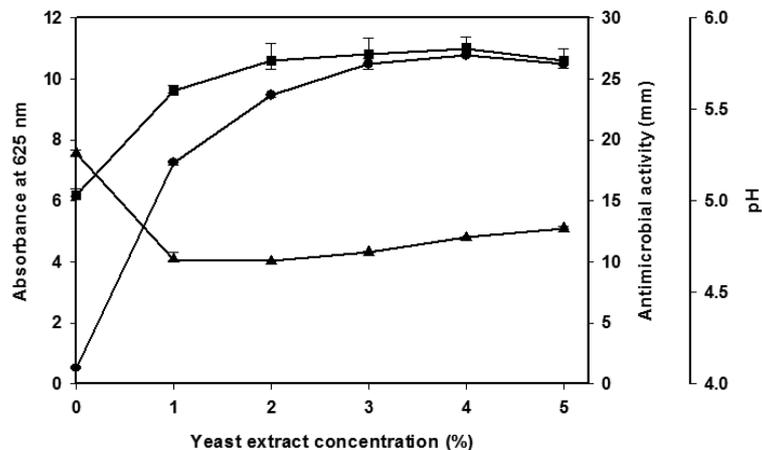
<sup>1)</sup>-, Not detected.

은 yeast extract, proteose peptone, soytone 순으로 높았으며, 항균활성은 soytone, yeast extract, beef extract가 우수하였다. 균체생육 및 항균활성이 가장 우수한 질소원은 yeast extract로 확인되었으며, 대체적으로 유기태 질소원은 무기태 질소원보다 균체생육과 항균활성에 좋은 영향을 주었으며, 무기태 질소원은 질소원으로서 균체생육에 이용되지 못하였다. Yeast extract를 농도별로 조사한 결과(Fig. 6) yeast extract의 첨가량이 증가됨에 따라 균체생육은 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 항균활성은 탄소원과 마찬가지로 2%(w/v) 이상 첨가하였을 때 일정한 수준을 유지하였

다. 국내 논문 중에서 김치에서 분리한 *L. plantarum* SK1305의 항균활성과 성장을 위한 주요 배지 성분 중 질소원으로 yeast extract를 선발하였다는 보고가 있으며, 균주별로 *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Bukholderia* sp.에 대한 항균력에 우수한 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다(Bae, 2008).

#### 무기염류에 의한 영향

MRS broth에 첨가되는 5가지 무기염류인 ammonium citrate, sodium citrate, potassium phosphate, magnesium sulfate, manganese sulfate 중에서 한가지 씩 단독으로 무기염류를 제거하여 균체생육과 항균활성에 가장 큰 영향을 주는 무기염류를 확인하였다. 그 결과 Table 6에서와 같이 제거 시에 가장 영향을 많이 주는 무기염류는 manganese sulfate였고, 다음으로 ammonium citrate의 영향이 컸다. Sodium acetate, potassium phosphate, magnesium sulfate는 제거 시에도 균체생육과 항균활성에 크게 영향을 주지 않았다. 단독 제거 시에 균체생육과 항균활성에 크게 영향을 주는 manganese sulfate와 ammonium citrate를 각각 단독 첨가, 혼합 첨가, 5가지 무기염류 모두 첨가했을 때의 영향을 MRS broth에 비교한 결과를 Table 7에 나타내었다. Ammonium citrate를 단독 첨가하였을 때 균체생육과 항균활성이 MRS broth와 비교하여 절반 수준으로 낮았으며, 단독으로 제거되거나 단독으로 첨가되었을 때 모두 균체생육과 항균활성이 낮게 나타났다. Manganese sulfate도 단독으로 첨가되었을 때 MRS broth에 비해서 활성이 모두 낮았으나, ammonium citrate의 단독 첨가 시보다는 높게 나타났다. 이것은 ammonium citrate와 manganese sulfate가 균체생육과 항균활성에 비교적 영향을 많이 미치는 배지 성분이지만, 단독으로 첨가되었을 때는 좋은 효과를 나타내지 못하는 것으로 판단된다. Ammonium citrate와 manganese sulfate를 혼합 첨가하였을 때의 균체생육은



**Fig. 6. Effect of yeast extract concentration as a nitrogen source on the cell growth and antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002. -●-, cell growth; -■-, antimicrobial activity; -▲-, pH**

**Table 6. Effect of removal of inorganic salt on the cell growth and the antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002**

Salt omitted	Cell growth (Absorbance at 625 nm)	Antimicrobial activity (mm)	pH
Control <sup>1)</sup>	5.61	22	4.70
Ammonium citrate	9.63	25	4.63
Sodium acetate	10.20	26	4.57
Potassium phosphate	10.31	26	4.73
Magnesium sulfate	10.44	26	4.75
Manganese sulfate	5.72	22	4.95

<sup>1)</sup>Control, removal of all salts

**Table 7. Effect of addition of inorganic salt on the cell growth and the antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002**

Salt added	Cell growth (Absorbance at 625 nm)	Antimicrobial activity (mm)	pH
Ammonium citrate	5.14	22	4.86
Manganese sulfate	8.04	24	4.66
Ammonium citrate + manganese sulfate	9.91	27	4.65
All added <sup>1)</sup>	10.17	29	4.67
Control(MRS)	10.11	27	4.69

<sup>1)</sup>All added, ammonium citrate + sodium acetate + potassium phosphate + magnesium sulfate + manganese sulfate

MRS broth보다 낮았지만 항균활성은 비슷함을 볼 수 있었으며, 각각 단독으로 첨가되었을 때보다 혼합 첨가 시에 좋은 영향을 나타냈다. 5가지 무기염류를 모두 첨가하였을 때는 MRS broth와 비교하여 균체생육과 항균활성이 모두 높게 나타났다. 종합적으로 무기염류는 단독 첨가 시보다 혼합 첨가 시에 좋은 영향을 나타내었으며, 제거되었을 때 영향을 많이 주는 manganese sulfate와 ammonium citrate를 첨가하여 혼합하는 것이 균체생육과 항균활성 향상에 좋은 영향을 나타내는 것으로 확인되었다. 김치에서 분리한 *L. plantarum* SK1305 배지 조성의 경우, *Sal. typhimurium*, *Sal. gallinarum*과 *Bukholderia* sp.에 대한 항균활성에 영향을 주는 무기염류는 sodium acetate이고, *Listeria monocytogenes*에 대한 항균활성에는 MgSO<sub>4</sub>, *Enterococcus faecalis*에 대한 항균활성에는 FeSO<sub>4</sub>가 우수한 영향을 나타낸다고 보고되었다(Bae, 2008).

## 요 약

파김치에서 분리한 마늘 내성 유산균인 *Lactobacillus plantarum* TJ-LP-002 균주의 균체생육과 항균활성에 영향을 미치는 배양조건 및 배지조건을 조사하였다. 선정 유산균의 배양 상등액 내에는 acetic acid, citric acid, lactic acid, tartaric acid와 같은 유기산이 존재하였고, 배양 중에 lactic acid와 acetic acid의 생성이 크게 증가하는 것으로 확인되었다. 단백질을 분해 효소를 비롯한 각종 효소 처리에

의해 항균활성이 소실되지 않아, 선정 유산균이 생산하는 항균활성은 단백질성 물질이 아닌 산 생성에 의한 작용일 것으로 판단되었다. 항생제와 생균제의 병용 가능성을 확인하기 위하여 선정 유산균의 항생제 감수성을 조사한 결과, neomycin sulfate, spectinomycin dihydrochloride, lincomycin hydrochloride에 내성을 나타내었고, streptomycin sulfate에는 감수성을 나타내었으며, ampicillin trihydrate, chloramphenicol, erythromycin, tetracycline hydrochloride, kanamycin sulfate에는 중간 내성을 나타내었다. *L. plantarum* TJ-LP-002는 배양온도 30°C, 초기 pH 7.0, 24시간의 배양 조건에서 최적의 균체생육과 항균활성을 나타내었으며, 탄소원은 glucose 3%(w/v), 질소원은 yeast extract 3%(w/v) 첨가 시에 균체생육과 항균활성이 높게 나타났다. 무기염류는 manganese sulfate와 ammonium citrate가 항균활성에 많은 영향을 주는 것으로 나타났으며, 각 성분을 단독 첨가하는 것보다 혼합 첨가하는 것이 더 우수한 영향을 나타내는 것으로 확인되었다.

## 감사의 글

이 연구는 2009년도 경원대학교 지원에 의한 결과임.

## 참고문헌

- Bae C. 2008. Antagonistic effect of *Lactobacillus plantarum* SK1305 and optimum media composition determined by Plackett-Burman Design. MS thesis. Konkuk University, Seoul, Korea.
- Chang YH, Kim JK, Kim HJ, Kim WY, Kim YB, Park YH. 2000. Probiotic effects of *Lactobacillus reuteri* BSA-131 on piglets. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 8-13.
- Chin HS, Shim JS, Kim JM, Yang R, Yoon SS. 2001. Detection and antibacterial activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Food Sci. Biotechnol. 10, 461-467.
- Chung KS, Kang SY, Kim JY. 2003. The antibacterial activity of garlic juice against pathogenic bacteria and lactic acid bacteria. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 31, 32-35.
- Dary CW, Sandine E, Elliker FR. 1971. Influence of pH on inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Streptococcus diacetylactis*. J. Dairy Sci. 54, 755.
- Francis C, Janky DM, Arafa AS, Harms RH. 1978. Interrelationship of *Lactobacillus* and zinc bacitracin in diets of turkey poults. Poult. Sci. 57, 1687-1689.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animal. J. Appl. Bacteriol. 66, 365-378.
- Hinton MG, Mead C, Impey CS. 1991. Protection of chicks against environmental challenge with *Salmonella enteritidis* by competitive exclusion and acid-treated feed. Lett. Appl. Microbiol. 12, 69-71.
- Hong SH. 2005. Partial purification of lactic acid bacteria growth factor from *Allium sativum* extract and the activation effect on murine immune cells. MS thesis. Seoul National University,

- Seoul, Korea.
- Hong SW, Kim WJ, Cha SK, Lee BH. 1996. Growth of *Lactobacillus acidophilus* in whey-based medium and preparation of cell concentrate for production of probiotics. J. Microbiol. Biotechnol. 6, 128-131.
- Hwang JB, Ha JH, Park WS, Lee YC. 2004. Changes of component on green discolored garlic. Korean J. Food Sci. Technol. 36, 1-8.
- Kim MK, Chung HJ, Kim OM, Oh YA, Kim SD. 1998. Antimicrobial activity of extract from spices on lactic acid bacteria related to kimchi fermentation. Kor. J. Post-harvest Sci. Technol. Agri. Products 5, 81-87.
- Kim YJ, Jang SJ, Park JM, Kim CU, Park YS. 2009. Isolation of garlic resistant lactic acid bacteria for feed additives. Food Eng. Prog. 13, 352-359.
- Lee EY. 2008. Problems and verification system of probiotics as livestock-environment improving agent produced and circulated. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 36, 87-95.
- Lee JY. 2005. Screening of probiotic lactic acid bacteria inhibiting enteropathogenic bacteria. MS thesis. Suwon University, Suwon, Korea.
- Lee KH, Park JY, Jeong SJ, Kwon GH, Lee HJ, Chang HC, Chung DK, Lee JH, Kim JH. 2007. Characterization of Paraplantaricin C7, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paraplantarum* C7 Isolated from kimchi. J. Microbiol. Biotechnol. 17, 287-296.
- Park JC, Cha JY, Kwon OC, Cho YS. 2003. The optimal producing conditions of bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp. FF-3 isolated from Korean *dongchimi*. Korean J. Food Preser. 10, 554-559.
- Park YS. 2003. Isolation of lactic acid bacteria inhibiting *Helicobacter pylori* and characterization of the inhibition substance. MS thesis. Suwon University, Suwon, Korea.
- Perdigon G, de macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. 1988. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. Immunology 63, 17-23.
- Shahani KM, Valki JR, Kilara A. 1973. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: I. Cultured conditions for the production of antibiotic. J. Cul. Dairy Prod. 11, 14-17.
- Shokrzadeh M, Ebadi AG. 2006. Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum* L.) on *Staphylococcus aureus*. Pakistan J. Biol. Sci. 9, 1577-1579.
- Shryock TR, Apley M, Berson M, Gray JT, Jones RN, Papich MG, Shuster DE, Thornsberry C, Walker RD, Wu CC. 2004. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement, NCCLS 24, 8-21.
- Todorov SD, van Reenen CA, Dicks LMT. 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. J. Gen. Appl. Microbiol. 50, 149-157.
- White F, Wenham G, Sharman GA, Jones AS, Rattray EA, McDonald I. 1969. Stomach function in relation to a scour syndrome in the piglet. Br. J. Nutr. 23, 847-858.
- Wi SU. 2003. Isolation of alliin in garlic and its quantitative determination by high performance liquid chromatography and studies on the antimicrobial effects of alliin and ethanol extracts from Korean garlic (*Allium sativum* L.). Korean J. Food Nutr. 16, 296-302.
- Yang EJ, Chang HC. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 36, 276-284.
- Yoo JS, Chen YJ, Kim IH. 2007. Effect of dietary complex probiotics on growth performance nutrient digestibility and blood characteristics in growing pigs. J. Korea Acad. Ind. Coop. Soc. 8, 1266-1272.
- Yoo JY, Lee IS, Chung KS, Choi SY, Koo YJ, Kwon DJ. 1992. Cultural conditions of *Lactococcus* sp. 1112-1 for production of bacteriocin-like substance. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, 183-189.
- 이용정. 1983. 광주산 마늘의 성분에 관한 연구. 명지대학교 자연과학 논문집 1, 63-73.
- 정창민. 2001. 유산균의 산업적 이용(III): 유산균의 유기산 대사. 생물산업 14(1), 36-38.