J. Fd Hyg. Safety, 13(2), 83 - 86(1998)

우유내의 LP system의 생리기능 및 항균성에 관한 연구
2. *Listeria monocytogenes*에 대한 항균효과

정충일† · 남은숙 · 김대원 · 이원창 · 정동관*
건국대학교 동물자원 연구센터, *고신대학교

Studies on the Biological Function and Antibacterial Effect of Lactoperoxidase System in Raw Milk
2. Antibacterial Effect of Lactoperoxidase System Against *Listeria monocytogenes*

Choong-Il Chung†, Eun-Sook Nam, Dae-won Kim, Won-Chang Lee and Dong-Kwan Jeong*
Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University, Seoul 143-701, Korea
**Koshin University, Pusan 606-701, Korea*

ABSTRACT — This study was carried out to measure the antibacterial effect of lactoperoxidase system against *L. monocytogenes*. When the initial inoculum levels (10^2, 10^4, 10^7 cfu/m*l*), concentration of LP (10 ppm, 20 ppm, 30 ppm), culture media (TSB-YE, UHT milk) and storage temperatures (5°C, 10°C, 15°C) were set up differently for the experiment and the antibacterial effect was compared, the highest antibacterial effect of LP system was shown at 10^2 cfu/m*l* of initial inoculum level, 10 ppm of LP concentration and 5°C of incubaction temperature. The antibacterial effect of LPS in UHT milk was similar to that in Tryptic soy broth.

Key words □ *Listeria monocytogenes*, Latoperoxidase system, Antibacterial effect

식중독의 원인균으로 알려진 *L. monocytogenes*는 식물, 토양, 표층수 등 자연계에 널리 분포되어 있다. Corynebateriaceae과에 속하는 미생물로 그람양성, 통성혐기성균으로 20~25°C에서 포자와 capsule을 형성하지 않으며, 길이가 짧은 간균으로 운동성을 가진다. 이균은 가축과 사람에게 인수공통질병을 일으키는 원인균으로 균의 성장온도 범위는 -0.4°C에서 50°C까지 상당히 넓으며, 35°C 정도에서 최적 성장을 나타낸다. 특히 최근의 연구에서 *L. monocytogenes*는 미생물의 생육을 억제시키는 항미생물질에 대한 저항성이 매우 강하며 6.5% NaCl와 bile salt의 함량이 높은 배지뿐만 아니라 일반 살균온도에서도 생존할수 있는 것으로 알려져 있다.[1,2]

대분부의 식중독균과 부패성세균은 냉장, 살균, 유산균의 첨가나 항미생물제제를 첨가하여 억제시켜왔다. 그러나 대부분의 다른 식중독균과는 달리 *L. monocytogenes*는 냉장온도에서도 잘 자란다.[3]

최근 Pucci[4] 등은 *Pediococcus acidilactici*가 생성한 bacteriocin에 의해 이균의 성장이 억제됨을 보고하였으며, 다른 학자들은 lysozyme,[5] hydrogen peroxide,[6] sodium benzoate[7] 등이 성장 억제효과가 있다고 하였다. *L. monocytogenes*에 대한 Lactoperoxidase(LP) system의 항균효과에 대한 연구는 미비하다. LP system은 lactoperoxidase, hydrogen peroxidase와 thyocyante으로 되었으며, 이 system의 항균효과는 H_2O_2에 의한 SCN-의 산화를 촉매하는 Lactoperoxidase의 작용에서 나온 것으로 보고되었다.[8] LP에 의해서 촉매된 SCN^-의 산화는 생명이 짧은 중간산화물 $OSCN^-$을 생성하고,[9] 이러한 중간산화물은 세포체계의 기능을 변형시키며 세포의 원형질막의 전체적인 당의 이동과 아미노산의 전환체계를 역전시켜 Hexokinase, Aldolase와 같은 해당효소의 활성을 억제한다고 하였으며,[10] 이 LP system은 몇몇의 그람음성균에 치사효과가 있으며,[11,12] 몇몇 그람 양성균에 대해 정균효과가 있다고 하였다.[10,13,14]

따라서 본 연구에서는 병원성균이나 부패균에 대해 항균효과가 있는 LP system을 이용하여 식중독세균인 *L. monocytogenes*의 항균효과를 측정하고자 하였다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에서 LP system의 항균효과를 측정하기 위해 사용된 균주는 건국대학교 낙농학과에 보존중인 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313을 사용하였고, 실험에 들어가기전에 Tryptic Soy Agar 사면배지에 저장되어 있는 균주를 1백금이 취하여 0.6%의 Yeast Extract가 첨가된 10 m*l*의 Tryptic Soy Broth에 접종하여 35°C로 24시간 동안 1차 증균시킨후, 배양액 0.1 m*l*를 TSB-YE에 접종하여 35°C로 20~24시간 2차 증균하여 최종 균수를 10^9 cfu/m*l*으로 하여 사용 하였다.

LP system의 준비

Lactoperoxidase는 (Sigma Chemical Co. U.S.A)로부터 구입하여 사용전에 0.45 um filter로 여과멸균하여 사용하였으며, LP의 농도는 10, 20, 30 ppm로, Sodium thiocyanate (Hayashi Pure Co.)와 Hydrogen Peroxide(Yakuri Pure Co.)는 각각 0.25 mM의 농도로 조정하여을 사용하였다.

*L. monocytogenes*의 접종수준과 LP의 농도에 따른 항균성조사.

실험균주의 접종수준에 따른 항균효과를 조사하였다. TSB-YE 100 m*l*에 전배양된 *L. monocytogenes*을 초기 접종수준을 10^4, 10^7 cfu/m*l*으로 만든후 1% 수준으로 접종하고 LP의 농도를 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm으로 각각 첨가 하고, 0.25 mM의 NaSCN과 0.25 mM의 H_2O_2를 각각 첨가한 다음 35°C에서 배양을 하면서 2시간 간격으로 시료를 채취하여 생균수를 측정하였다.

배양온도, 배지에 따른 항균성조사

*L. monocytogenes*을 TSB-YE와 음용되고 있는 UHT 우유에 초기 접종수준을 10^2, 10^4 cfu/m*l*으로 하여, 1% 수준으로 접종하고 LP는 10 ppm, 0.25 mM의 NaSCN과 0.25 mM의 H_2O_2를 각각 첨가한 다음 5°C, 10°C, 15°C에서 배양을 하면서 2시간 간격으로 시료를 채취하여 TSA-YE배지에 접종, 35°C에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

Lactoperoxidase의 농도에 따른 항균성 조사

Fig. 1, 2는 초기 접종을 10^4 cfu/m*l*과 10^7 cfu/m*l*로 하고 LP의 농도를 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm으로 하여 항균성을 조사한 것이다. 초기 접종수준에 관계없이 LP의 농도가 10 ppm일 때 항균효과가 높게 나타났으며, 배양 4시간 후(유도기후))부터 정상적으로 성장하여 항균효과가 별로 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Kamau 등[15]의 우유에 9.2 mg의 LP와 2.4 mM의 SCN^-과 0.6 mM의 H_2O_2를 첨가하고 35°C에서 초기접종수준을 10^4 cfu/m*l*로 한 실험에서 *L. monocytogenes*에 대한 항균효과가 배양 8시간까지 지속이 되었다는 보고와는 다소의 차이는 있었으나, Purdy 등[16]의 Gram양성균인 *S. typhimurium*에 대한 LP system의 항균효과가 균의 유도기에서 균의 정체기보다 항균효과가 더 있다는 보고와 유사하였다.

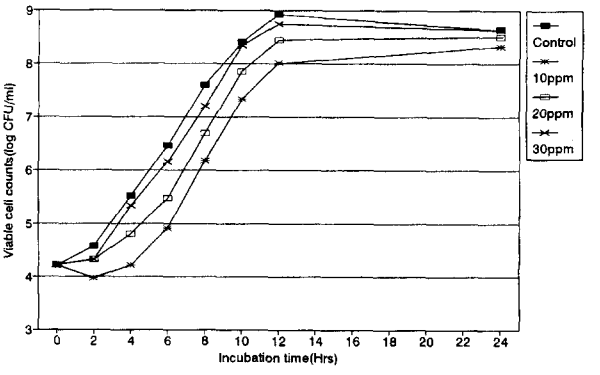

Fig. 1. The antibacterial effect of LP system according to the concentration of LP in TSB-YE inoculated with initial level of 10^4 cfu/m*l* *L. monocytogenes*.

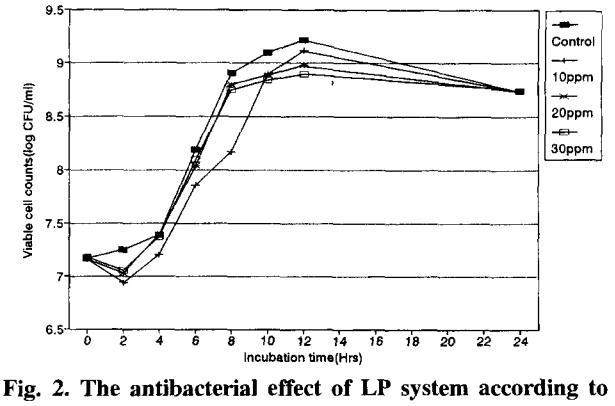

Fig. 2. The antibacterial effect of LP system according to the concentration of LP in TSB-YE inoculated with initial level of 10^7 cfu/m*l* *L. monocytogenes*.

배양온도 및 배지에 따른 항균성 조사

LPS을 구성하는 물질중에서 LP의 농도중 가장 효과가 높은 10 ppm으로 고정을 하고 SCN^-과 H_2O2를 0.25 mM로 동량으로 처리를 하고 초기 접종수준을 10^2, 104 cfu/m*l*으로 하고 배양온도를 5°C, 10°C, 15°C로 하면서 항균력을 측정하였다.

TSB-YE에서 초기 접종수준을 10^2 cfu/m*l*으로 하고 항균력을 조사한 결과, 5°C와 10°C에서 배양했을 경우에 6시간까지 균의 성장이 억제 되었다가 그후 서서히 성장하여 24시간에는 대조구와 큰 차이가 없었다. 또한 15°C에서 배양을 했을 경우에도 온도가 낮은 때 만큼은 아니더라도 균

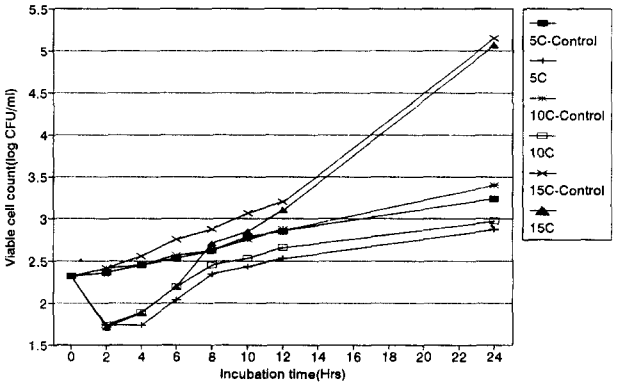

Fig. 3. The antibacterial effect of LP system when *L. monocytogenes* was cultured on TSB-YE with initial levels of 10^2 cfu/m*l* and stored at 5°C, 10°C, and 15°C.

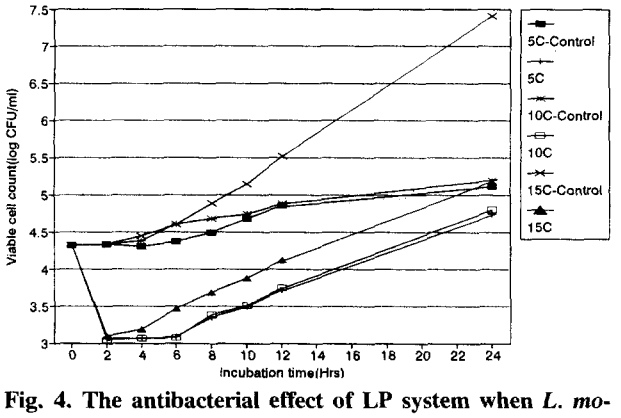

Fig. 4. The antibacterial effect of LP system when *L. monocytogenes* was cultured on TSB-YE with initial levels of 10^4 cfu/m*l* and stored at 5°C, 10°C, and 15°C.

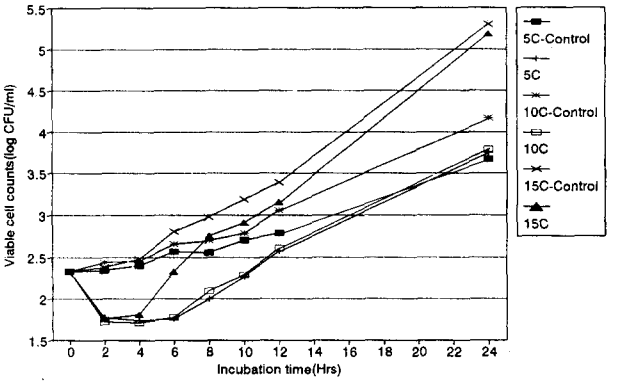

Fig. 5. The antibacterial effect of LP system when *L. monocytogenes* was cultured on UHT milk with initial levels of 10^2 cfu/m*l* and stored at 5°C, 10°C, and 15°C.

의 성장을 억제하였다(Fig. 3).

초기 접종수준을 10^4 cfu/m*l*로 하고, 5°C와 10°C에서 배양했을 경우에는 배양 2시간부터 6시간까지 균수가 크게 감소하였다. 15°C에서는 배양 4시간까지 균의 성장을 억제하였으나 그 후에는 균이 정상적인 성장을 시작하였다(Fig. 4).

위의 결과로 보아 LP system에 대한 *Listeria*의 항균효과는 초기 접종수준 보다는 배양온도에 따라 다소 차이를 보이며, 이는 온도가 높아질수록 항균효과가 낮아진다는 Zajac[17]의 실험결과와 유사하였다. Fig. 5는 UHT우유에서 초기 접종수준을 10^2 cfu/m*l*으로 하고 배양온도를 5°C, 10°C, 15°C로 각각 배양을 하면서 항균력을 조사한 것으로, 5°C, 10°C에서 배양을 했을경우에는 배양 2시간부터 균의 성장이 억제를 받기 시작해서 배양 6시간까지 항균력을 나타내었고 그 후에 서서히 증가를 시작하였으며, 15°C의 경우는 4시간후 급격히 성장하기 시작하였다.

그러므로 *Listeria* spp.에 대한 LP system의 항균효과는 LP의 농도가 10 ppm일 때 가장 항균효과가 높게 나타났으며, 배양온도에 의해 크게 달라짐을 알수 있었다.

국문요약

본 연구의 목적은 *L. monocytogenes*에 대한 LP system의 항균효과를 측정하기 위하여 수행되었다. 초기 접종수준(10^2, 10^4, 10^7 CFU/m*l*), LP의 농도는(10, 20, 30 ppm), 그리고 저장온도(5, 10, 15°C), 배지종류(TSB-YE, UHT milk)에 따라 *L. monocytogenes*에 대한 항균효과를 측정 비교한 결과 초기접종수준을 10^2 cfu/m*l*로 하였을 때와 LP농도는 10 ppm 및 5°C로 배양에서 항균력이 높게 나타났다. UHT milk를 이용한 LP system의 항균효과는 Tryptic soy agar를 이용한 시험결과와 비슷하게 나타났다.

참고문헌

1. Doyle, M. P., K.A. Glass, J.T. Beery, G.A. Garcia, D.J. Pollard and R.D. Schultz.: Survival of *L. monocytogenes* in milk during high temperature, short time pasterurization. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1433-1438 (1987).
2. Michelle M. Scahaack and Elmer H. March.: Survival of *L. monocytogenes* in refrigerated cultured milks and yoghurt. *J. Food Prot.* **51**, 848-854 (1988).
3. Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S. and Vandenbergh, P.A.: Inhibition of Listeria monocytogenes by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2349-2353 (1988).
4. Donnelly, C.W. and Briggs, E.H.: Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *L. monocytogenes* as a function of milk composition. *J. Food Prot.* **49**, 994-998 (1986).
5. Hughey, V.I. and Johnson, E.A.: Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl. Environ. Microbio.* **53**, 2165-2170 (1987).
6. Domini, L., Garayazabai, J.F.F., Ferri, E.R., Vazquez, J. A., Gomez-Lucia, E., Ambrosio, C. and Suarez, G.: Viability of *L. monocytogenes* in milk treated with hydrogen peroxidase. *J. Food Prot.* **50**, 636-639 (1987).
7. El-Shenawy, M.A. and Marth, E.H.: Sodium benzoate inhibits growth of or inactivactes *L. monocytogenes. J. Food Prot.* **51**, 525-530 (1988).
8. Reiter, B.A., Pickering, J.D., Oram, J.D. and J. Tramer, J.: *J. Dairy Res.* **25**, 104.z (1958).
9. Aune, T.M. and Thomas, E.L.: The oxidation of protein sulfhydryls by products of peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Biochemistry.* **17**, 1005-1010 (1978).
10. Oram, J.D. and Reiter, B.: The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. II. The oxidation of thiocyanate and the nature of of the inhibitory compound. *J. Biochem.* **100**, 382-388(1966).
11. Beumer, R.R., Noomen. A, Marijs, J.A. and Kampelmacher, E.H.: Antibacterial action of the lactoperoxidase system on *Camphylobacter jejuni* in cow's milk. *Neth. Milk Dairy J.* **39**, 107-114 (1985).
12. Bjorck, L., Rosen, C.G., Marshall, V. and Reiter, B.: Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk agaist Pseudomonos and other gram-negative bacteria. *Appl. Microbiol.* **30**, 199-204 (1975).
13. Mickelson, M.N.: Antibacterial action of lactoperocidase-thiocyanate-hydrogen peroxidase on *Streptococcus agalactiae. Appl. Environ. Microbio.* **38**, 821-825(1979).
14. Reiter, B.: Protective proteins in milk. Biological significance and exploitation. *Int. Dairy Fed.*, Bull. N. **191**, B-Brussels.
15. Kamau, D.N., Doores, S. and Pruitt, K.M.: Activaction of the lactoperoxidase system prio to pasturizatiooon for shelf-life extension of milk. *Milchwissenschaft* **46**(4), 213-214 (1991).
16. Purdy, M.A., Tenovuo, J., Praitt, K.M. and White, W.E.: Effect of growth phase and cell envelope struture on subceptibility of *S. typhimurium* to the lactoperoxidase-thiocyanate-hyrogen peroxidase system. *Infect. Immune.* **39**, 1187-1190 (1983).
17. Zajak. M., Bjorck, L. and Claesson, O.: Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Bacillus cereus. J. Milchwissenschaft.* **36**(7), (1981).