

Lactobacillus acidophilus Bacteriocin의 성장에 관한 연구

정영건¹·안장연^{1*}·권오진¹·강주희²

¹영남대학교 식품가공학과 ²대구대학교 식품공학과

Properties of a *Lactobacillus acidophilus* Bacteriocin

Chung, Young-Gun¹, Jang-Yeon Ahn^{1*}, Oh-Jin Kwon¹, and Choo-Whoi Kang²

¹Department of Food Science and Technology, Yeungnam University

²Department of Food Technology, Taegu University, Taegu, Korea

Seven strains of *Lactobacillus* produce bacteriocin being active for *L. acidophilus*. All strains producing bacteriocin were found to be *L. acidophilus* except with one strain of *L. gasseri*. The maximum activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* strains was obtained at a middle or late stage of the log phase, or a early stage of the stationary phase. After the maximum was reached, however, the activity was rapidly decreased. The bacteriocins were inactivated easily by the treatment with proteolytic enzymes but not with nucleolytic enzymes, suggesting that the bacteriocin was proteinaceous. The bacteriocins were different from the other previously reported lactobacillus bacteriocins in their flexibility to the treatment at 100°C. Bacteriocins of *L. acidophilus* ATCC 9857 and 4357 decreased in activity by the treatment with diethylether, presumably the bacteriocin contained of a lipid component. It seems likely that *L. acidophilus* A4 bacteriocin adsorb to a regularly arrayed layer of the cell wall.

많은 세균은 近緣의 세균의 발육을 저지하는 단백질성의 고분자물질인 bacteriocin을 생산한다. 그럼 양성균에 있어서도 많은 균종이 bacteriocin을 생산하는 것으로 알려져 왔으나(1), *Lactobacillus* 속균에 있어서 bacteriocin 생산은 겨우 *L. fermentum* (2, 3), *L. helveticus* (4, 5) 및 *L. acidophilus*의 계균주(6-9)에 관해서 보고되고 있는 것 뿐이다. 또 *L. acidophilus*를 지시균으로 하는 *Lactobacillus*속균이 생산하는 bacteriocin에 관해서는 Barefoot와 Kleanhammer(8)의 보고만 있을 뿐 그 성장에 관해서는 연구되고 있지 않다.

본 연구에서는 *L. acidophilus*를 지시균으로 하는 bacteriocin을 생산하는 *Lactobacillus* 속균을 검색하고, 이들이 생산하는 bacteriocin의 성장에 관해서 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주와 배양

주로 사용한 *Lactobacillus*속 균은 본 대학 식품미생물학교실 보존균의 80주에 관해서 bacteriocin 검색결과에서 Table 2에 나타낸 것과 같이 bacteriocin 생산균주로서 6균주, 지시균으로서 *L. acidophilus*의 5균주이다. 균은 ILS 배지(10)에 37°C로 정치 배양하였다.

L. acidophilus 균주에 대한 bacteriocin 생산균주의 검색

ILS 한천 평판배지에 지시균인 *L. acidophilus* 균주를 약 5×10^8 개 함유한 ILS 한천배지를 중층한론상에 ILS 액체배지로 24시간 배양한 *Lactobacillus*

Key words: *Lactobacillus acidophilus*

*Corresponding author

속의 계균주의 배양상등액을 1.5 μ l spot한 후, 37°C로 하룻밤 배양하여 발육저지원을 만든 균주들 bacteriocin 생산주로 하였다.

조bacteriocin의 조제

L. acidophilus ATCC 9857(9857주로 약함), A4(A4주로 약함) 및 ATCC 4355(4355주로 약함)는 9시간, *L. acidophilus* RIV-11(RIV-11로 약함) 및 A3(A3주로 약함)는 12시간, *L. gasseri* ATCC 332는 13.5시간 배양액을 6,000 \times g로 30분간 원심분리하여 얻은 상등으로부터 조bacteriocin을 조제하였다.

RIV-11주는 0~30%, *L. gasseri*는 0~40%, A4주는 30~40% 및 4355주는 30~50%의 ammonium sulfate 포화도 침전하는 획분을 모아, 소량의 10 mM 인산완충액(pH 7.0)에 용해하여 동원충액에 대하여 투석하여 ammonium sulfate를 제거하여 조bacteriocin 표준으로 하였다. A3주의 경우는 상등의 bentonite를 3g/l의 비율로 가해 30분간 교반한 후, 원심분리하여 침전시킨 bentonite를 50 mM Tris HCl 완충액(pH 8.0)으로 세정하여 pH 5.5에 조정된 10% pyridine으로 추출하여 추출액에 ammonium sulfate를 15/30 ml의 비율로 가하여 용해한 후 20,000 \times g, 30분간 원심분리하여 형성된 油狀의 상등액을 취하여, 10 mM 인산완충액(pH 7.0)에 투석하여 조bacteriocin을 얻었다. 상기의 조작은 모두 약 4°C에서 행하였다.

Bacteriocin에 미치는 각종 인자의 영향

조bacteriocin을 최종농도 20 μ g/ml의 trypsin 및 pronase E, 10 μ g/ml의 deoxyribonuclease(DNase) I 및 ribonuclease(RNase)로 37°C, 60분간 처리한 후 bacteriocin 활성을 측정하였다. 1/5용량의 diethylether 혹은 chloroform을 조bacteriocin액에 가하여 5분 후 격하게 혼든 후 水層을 분리하여 용존하는 유기용매를 질소가스를 통하여 제거한 후, bacteriocin 활성을 측정하였다. 또 가열의 영향은 100°C 30분간 및 121°C (autoclave) 10분간의 처리를 행하여 검토하였다.

세포벽 획분의 조제

L. acidophilus VPI 1754(1754주로 약함) 및 PN-RI-2-3(PN-RI 주로 약함)의 10시간 배양균으로부터 Masuda와 Kawata(11)의 방법에 의해, Braun Cell Hoogenizer로 세포를 파괴한 후 분별원심과 Triton X-100 처리로 세포벽을 조제하였다. 이 2균주는 세포벽 외층에 규칙적 배열구조(RA)를 보유하

고 있음이 알려져 있으므로(12), 세포벽을 Masuda와 Kawata의 방법(13)에 준하여 6M 염산 guanidine 처리로 RA와 RA 이탈세포벽을 조제하였다.

세포벽 획분에서의 bacteriocin 흡착

조bacteriocin액 0.5 ml와 RA 약 3mg의 혼합물 및 조bacteriocin 0.5 ml와 RA 이탈세포벽 8mg의 혼합물을 37°C로 30분간 incubate한 후, 원심분리로 RA 혹은 RA 이탈세포벽을 제거한 상등에 대해서 bacteriocin 활성을 측정하였다.

Bacteriocin 활성의 측정

활성측정은 한천 2중층상에서 행하였다. petri dish 중의 ILS 평판배지 위에 약 5×10^8 개의 지시균을 함유한 액체배양액을 놓고, 1% 한천을 함유한 ILS 배지 약 3 ml를 가하여 잘 혼합하였다. 이 평판배지에는 연속 2배 희석한 배양 상등 혹은 조bacteriocin액을 1.5 μ l씩 spot하여 37°C로 하룻밤 배양한 후, 지시균의 발육을 저지한 최대 희석배수의 역수를 AU(arbitrary units)/ml로 나타내었다.

결과 및 고찰

L. acidophilus 균주에 작용하는 bacteriocin 생산 *Lactobacillus*속 균주의 검색

교실보존의 *L. acidophilus* 41 균주를 지시균으로 하여 *L. acidophilus*를 함유한 *Lactobacillus*속 80균주의 bacteriocin 생산을 검색하였다(Table 1).

본 연구에서 행한 조건하에서는 7주의 bacteriocin 생산주가 발견되었다. 그중 6주는 *L. acidophilus*였고, 1주가 *L. gasseri*였다. 지시균으로 나타낸 5주 중 A 207-1, CDC, 1754 및 PN-RI의 4주는 3종의 균주가 생산하는 bacteriocin에 감수성이 있고, 이중 A 201-7주와 CDC주는 동일한 감수성을 나타내었으므로, A 201-7주와 CDC주는 bacteriocin의 receptor에 관해서 표층구조가 아주 닮았다고 생각된다. 사실, Johnson 등(14)의 DNA-DNA 상동성에 근거를 둔 *L. acidophilus*의 분류에서는 이 2균주는 모두 A-2群에 속하고 있다. 또 9857 및 *L. gasseri*가 생산하는 bacteriocin은 비교적 광범한 항균 spectrum을 가지고 있고 각기 A 201-7, CDC, 1754 및 PN-RI 및 A 21주의 발육을 저지하였다. 한편 지시균 A 21주는 *L. gasseri*가 생산하는 bacteriocin에만 감수성이 있었다. 이하의 실험은 Table 2에 나타낸 bacteriocin 생산균(6주)과 각개의 지시균(5주)과 짝

Table 1. Detection of *Lactobacillus* strains which produce bacteriocin acting on *L. acidophilus*.

Indicator strains	Bacteriocin producer strains
<i>L. acidophilus</i> A201-7	<i>L. acidophilus</i> ATCC 9857 <i>L. acidophilus</i> RIV-11 <i>L. acidophilus</i> A3 (VPI 11844) ^{a)}
<i>L. acidophilus</i> CDC (VPI 0607-1B) ^{a)}	<i>L. acidophilus</i> ATCC 9857 <i>L. acidophilus</i> RIV-11 <i>L. acidophilus</i> A3 (VPI 11844) ^{a)}
<i>L. acidophilus</i> VPI 1754	<i>L. acidophilus</i> ATCC 9857 <i>L. acidophilus</i> A4 (VPI 11845) ^{a)}
<i>L. acidophilus</i> PN-RI-2-3	<i>L. gasseri</i> ATCC 332 (VPI 0325) ^{a)} <i>L. acidophilus</i> A-11 <i>L. acidophilus</i> ATCC 4311 (VPI 0328) ^{a)} <i>L. gasseri</i> ATCC 332 (VPI 0325) ^{a)}
<i>L. acidophilus</i> A21 (VPI 11846)	<i>L. gasseri</i> ATCC 332 (VPI 0325) ^{a)}

a) Indicates another names.

Table 2. Bacteriocin producing strains used and their indicator strains.

Bacteriocin producer strains	Indicator strains	Bacteriocin designation
<i>L. acidophilus</i> ATCC 9857	<i>L. acidophilus</i> A201-7	lactoacidocin 9857
<i>L. acidophilus</i> RIV-11	<i>L. acidophilus</i> A201-7	lactoacidocin RIV-11
<i>L. acidophilus</i> A4	<i>L. acidophilus</i> VPI 1754	lactoacidocin A4
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4355	<i>L. acidophilus</i> PN-RI-2-3	lactoacidocin 4357
<i>L. acidophilus</i> A3	<i>L. acidophilus</i> CDC	lactoacidocin A3
<i>L. gasseri</i> ATCC 332	<i>L. acidophilus</i> A21	gasseccin 322

을 맞추어 행하였다. 또 각개의 bacteriocin을 Table 2와 같이 명명하였다.

세균의 생육과 bacteriocin 생산의 관계

Bacteriocin 생산과 균의 생육과의 관계를 조사하기 위하여 균의 증식을 탁도(A660)로 측정하는 것과 함께 경시적으로 배양액을 채취하여, 원심상등의 bacteriocin 활성을 측정하였다(Fig. 1).

9857, 4355 및 A4주는 대수증식기 초부터 bacteriocin 생산이 시작되고, 대수발육기 중기부터 후기에 걸쳐 bacteriocin 활성은 최대로 되었으나, 후기부터 정상기에 걸쳐서 급속히 감소하였다. RIV-11주 및 *L. gasseri*는 대수발육 후기부터 정상기의 초기에 걸쳐서 bacteriocin 활성의 피크가 보였으나 그 후 급격히 활성이 감소하였다. A3주는 bacteriocin 활성이 극히 낮았으나, 활성은 48시간 배양 후에도 같은 level을 보유하였다.

일반적으로 배양중에 방출된 많은 bacteriocin은

정상기에 들어서도 안정하게 활성을 보유하고 있는데 반해서, 여기서 조사한 5균주가 산생하는 bacteriocin은 대수 후기 혹은 정상기에 걸쳐서 신속하게 그 활성을 잃는 것이 특징적이다. *L. acidophilus* N2가 생산하는 bacteriocin인 lactacin B에 관해서도 같은 양상의 현상이 일러지고 있다(9).

Lactacin B는 배양액의 pH를 6.0으로 유지할 때 아주 많이 생산되었으나, pH 5.4 이하에서는 그 생산량은 아주 적었다(9).

본 연구에서의 bacteriocin도 같은 현상이 있는지를 관찰하기 위해서 배지에 5% 비율로 탄산칼슘을 가하여 배양할 때의 bacteriocin 활성을 가하지 않은 경우의 그것과 비교하였다(Table 3).

전균주에 있어서 탄산칼슘 첨가균은 생긴 젖산이 어느 정도 중화되어 pH는 대조의 그것보다 높았다.

Lactoacidocin RIV-11, A4 및 4357은 탄산칼슘 첨가배지로 배양하였을 때 배지의 pH가 상승함에 따라 생산량이 많았으나, 타 3개의 bacteriocin은 변화

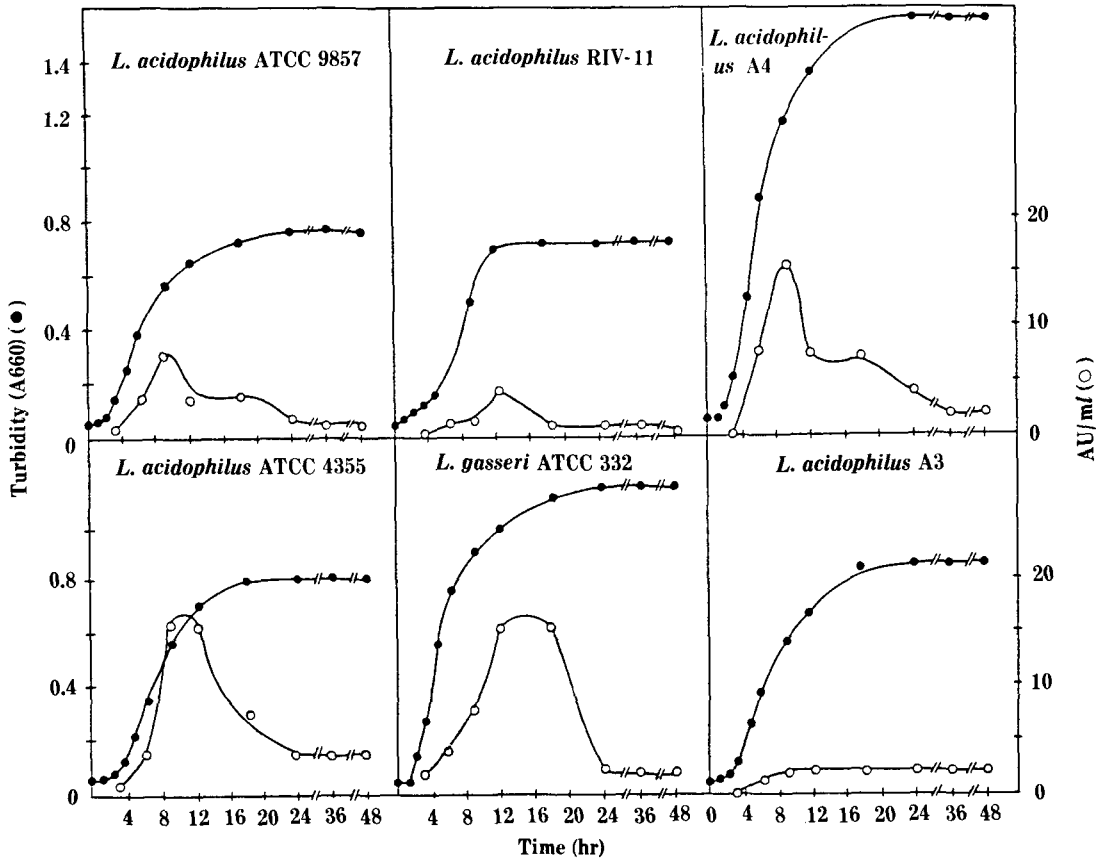


Fig. 1. Bacterial growth and bacteriocin production.
 Cell growth is represented by the optical density at 660nm(●).
 Bacteriocin activity is expressed as units of bacteriocin activity (○).

Table 3. Effect of CaCO₃ on the bacteriocin production.

Bacteriocin	Incubation time	- CaCO ₃		+ CaCO ₃ ^{a)}	
		pH of culture supernatant	^{b)} AU/ml	pH of culture supernatant	AU/ml
lactoacidocin 9857	9	4.63	< 4	5.02	< 4
lactoacidocin RIV-11	12	4.10	4	5.08	16
lactoacidocin A4	9	4.03	16	4.97	32
lactoacidocin 4357	9	4.54	16	5.37	32
lactoacidocin A3	12	4.38	< 4	5.33	4
gasseccin 332	13.5	4.08	< 4	5.02	< 4

a) Autoclaved ILS medium was added with sterile CaCO₃ at a final concentration of 5%.

b) AU; arbitrary units

가 없었다.

Bacteriocin 활성에 미치는 각종 인자의 영향

Table 4에는 bacteriocin 활성에 미치는 각종 인자

의 영향을 나타내었다. 모든 bacteriocin은 trypsin 및 pronase E 처리에 의하여 완전히 실활하였고, 이들이 단백질성인 것을 나타내고 있다. DNase I 및 RNase A는 영향을 주지않았다. lactoacidocin 9857

Table 4. Effect of enzymes, drugs and heat on the activity of bacteriocins produced by various strains of lactobacilli.

Treatment	AU/ml					
	Lactoacidocin					Gassecin 332
	9857	RIV-11	A4	4357	A3	
Trypsin(20 µg/ml)	0	0	0	0	0	0
Pronase E(20 µg/ml)	0	0	0	0	0	0
DNase I(10 µg/ml)	16	16	16	16	32	64
RNase A(10 µg/ml)	16	16	16	32	32	64
Diethyl ether	8	16	16	4	32	64
Chloroform	2	0	16	4	0	4
100°C	0	0	1	1	8	8
121°C	0	0	0	0	2	2
Untreat control	16	16	16	32	32	64

Table 5. Adsorption of lactoacidocin A4 and 4355 to the cell wall.

	AU/ml	
	Lactoacidocin A4	Lactoacidocin 4355
	RA	4
RA removed cell walls	32	64
Untreated	32	64

및 4357은 Diethylether 처리로 활성이 감소하였는데 그 2개의 bacteriocin은 지질을 함유하고 있을 가능성이 크다. 100°C의 가열에 대하여는 lactoacidocin A3와 gassecin 332가 어느 정도의 저항성을 나타내었다.

*Lactobacillus*속 균이 생산하는 bacteriocin으로 그 성상이 조사되고 있는 전부의 것 즉 *L. acidophilus* ATCC 4357이 생산하는 lactocin A 4357(7), *L. helveticus* LP 27이 생산하는 lactocin LP 27(5), *L. fermentum* F1이 생산하는 lactocin 466(3) 및 lactocin B(9)는 96°C 혹은 100°C의 가열에 내성이 있었다. 그러나 본 연구에서 조사한 모든 bacteriocin은 정도의 차는 있으나, 100°C의 가열에 감수성이 있었다.

본 연구에서의 모든 lactoacidocin 및 gassecin은 100,000×g, 60분의 원심에서도 침전하지 않았으므로 가용성 단백질이라고 생각된다.

세포벽 획분에서의 lactoacidocin A4 및 4355의 흡착
Lactoacidocin A4 및 4355의 각기 지시균인 1754

및 PN-RI주는 세포벽 외층에 RA가 존재하기 때문에(12), 이들 지시균주로부터 분리된 RA와 RA 이탈세포벽에의 양 lactoacidocin의 흡착실험을 행하였다(Table 5).

Lactoacidocin A4의 활성은 VPI 1754주의 RA와 incubate한 후에 아주 감소하였으나, RA 이탈세포벽에서는 영향을 보이지 않았다. 이 사실은 1754주의 RA가 lactoacidocin A4의 흡착부위였으며, peptidoglycan 및 다당체를 함유한 세포벽 하층은 흡착에는 무관계를 시사하고 있다. 또 lactoacidocin 4355는 RA에 의한 흡착이 약간 보였으나, 본질적인 것인지 아닌지는 불명하고, RA 이탈세포벽에도 흡착되지 않았으므로 lactoacidocin 4355에 대한 지시균의 흡착부위는 세포벽에는 존재하지 않음을 시사하고 있다.

요 약

1. *L. acidophilus* 균주에 작용하는 bacteriocin을 생산하는 *Lactobacillus*속 균 7주를 발견하였다. bacteriocin 생산균주는 1주가 *L. gasseri*였고, 그 외에는 모두 *L. acidophilus*였다.

2. 조사한 bacteriocin 생산 6균주중 5균주는 대수발육 중기 혹은 후기 내지 정상기의 초기에 최대의 bacteriocin 활성을 나타내었으나, 그후 급속히 활성이 감소하였다.

3. 이들의 bacteriocin은 단백분해효소 처리로 용이하게 실효하는 단백질성임을 나타내었으나, 핵산분해효소에는 저항성이었다. 또 이들의 bacteriocin은 지금까지 보고되고 있는 *Lactobacillus*속의 bacteriocin과 다르며, 정도의 차는 있으나 전부 100°C 가열에 감수성이 있었다.

4. *L. acidophilus* ATCC 9857 및 *L. acidophilus* ATCC 4357이 생산하는 bacteriocin은 diethylether 처리에 활성이 감소하므로 지질을 함유함을 시사하였다.

5. *L. acidophilus* A4가 생산하는 bacteriocin은 지시균의 세포벽 외층의 규칙적 배열구조에 흡착함을 시사하였다. 또 *L. acidophilus* ATCC 4355가 생산하는 bacteriocin은 지시균의 세포벽에는 흡착하지 않음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Tagg, I.R., A. S. Dajani and L.W. Wannamaker: *Bacteriol. Rev.*, **40**, 722-756 (1976).
2. Deklerk, H.C., *Nature (London)*, **214**, 609 (1967).

3. Deklerk, H.C.: *J. Gen. Microbiol.*, **48**, 309-316 (1967).
4. Upreti, G.C. and R.D. Hinsdill: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **4**, 487-494 (1973).
5. Upreti, G.C. and R.D. Hinsdill: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7**, 139-145 (1975).
6. Matsuo, Y. and S. Utsunomiya: *Hiroshima, J. Med. Sci.*, **24**, 59-63 (1975).
7. 宇都宮節夫: *廣島醫誌*, **25**, 275-293 (1977).
8. Barefoot, S.F. and T.R. Kloenhammer: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1808-1815 (1983).
9. Barefoot S.F. and T.R. Kloenhammer: *Antimicrob. Agent Chemother.*, **26**, 328-334 (1984).
10. Efthymiou, G. and P.A. Hansen: *J. Infect. Dis.*, **110**, 258-267 (1962).
11. Masuda, K. and T. Kawata: *Microbiol. Immunol.*, **23**, 941-953 (1979).
12. 安庄連, 増田邦義, 川田十三夫; 未發表.
13. Masuda, K. and T. Kawata: *Microbiol. Immunol.*, **24**, 299-308 (1980).
14. Johnson, J.L., C.F. Phelps, C.S. Cummins, J. London and F. Gasser; *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **30**, 53-68 (1980).

(Received November 15, 1988)