

## *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*가 생산하는 Bacteriocin의 특성

이장혁 · 장효일\*

고려대학교 자연자원대학 유전공학과

### Characteristics of the Bacteriocin Produced from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Lee, Jang-Hyuck and Hyo-Ihl Chang\*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Resource,  
Korea University, Seoul 136-701, Korea

**Abstract** — One bacterial strain, that had made the largest inhibition zone at the antagonism assay and also that lost the inhibition activity by the protease treatment, was isolated from raw milk. That strain was identified as *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. The specific growth rate of this strain was maximum at 45°C. However, at this temperature the strain produced no bacteriocin. The bacteriocin activity was quite stable even at high temperature. Moreover, the activity of the bacteriocin was sensitive to proteases, but not to  $\alpha$ -amylase, DNase I, or RNase.

저장성 및 안전성이 뛰어난 유산균 발효식품에서 유산균에 의한 다른 세균의 생육 억제 기작은 유산균이 생성하는 유기산에 의한 pH 저하와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성(1)에 의한 것으로 알려졌으나 bacteriocin을 포함한 항균물질의 생성에 의한 작용(2)도 인정되고 있다. Bacteriocin은 다른 항생제와 구별되는 성질을 갖는 natural antibiotic이다. Reeves(3)는 여러 종(種)의 bacteria에 의해서 생산이 되며 유사한 계통의 종에만 작용하는 단백질성 항생물질이라 정의를 내렸으나 nisin(2)과 같이 항균 범위가 생산균과 다른 속의 세균까지 큰 경우도 있어서 일반적인 정의가 되지 못하고 있다. 현재까지 대부분의 유산균 속(屬)의 여러 종(種)에서 항균 물질의 검출이 보고되고 있다(4). 지금까지 bacteriocin에 관한 연구는 크게 4가지 방향으로 진행되고 있다(4). 첫째는 bacteriocin의 생산이나 생육 저해 여부에 근거한 세균의 아종(亞種) 분류에 이용하는 것이다. 둘째는 bacteriocin 생산과 작용 방식에 관한 연구이며 셋째는 bacteriocin 생산과 면역성을 부여하는 plasmid DNA의 구조와 기능에 관한 연구이다. 마지막으로 새로운 특성을 갖는 bacteriocin을 찾아내려는 노력이다. 본 연구에서는 새로운 bacterio-

cin을 생산하는 유산균에 대한 연구를 목적으로 우유에서 항균물질을 생산하는 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*를 분리하여 항균물질의 특성등을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지

Bacteriocin 생산균주는 서울 및 경기도 일원의 목장들과 원유 처리 공장에서 수거한 원유로부터 분리하였다. 항균물질 생산 균주의 선발 및 계대 배양 시에 M17 medium(5)과 lactic medium(6)을 사용하였다. Bacteriocin 생산균의 선발 지시균으로는 실험실에 보관중인 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* KBL 111를 사용하였고 항균활성 측정용 균주로는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 사용하였다.

#### 항균물질 생산균주의 선발

원유를 생리 식염수(0.85%[w/v])로 희석한 후 lactic agar(6)에 도말하여 32°C 배양기에서 배양하였다. 순수분리한 균주들 중에서 Gram 염색(7)반응 양성, catalase test(8) 음성, oxidase test(8) 음성이며 chain 또는 pair를 형성하는 구형 또는 난형의 균을 선발하였다. 항균물질 생산균주를 선발하기 위하여 M17

**Key words:** *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, bacteriocin

\*Corresponding Author

배지를 사용하여 Geis 등(9)의 antagonism assay를 수행하였다. 억제환이 antibacterial peptide인 bacteriocin에 의한 것임을 증명하기 위하여 단백질 분해 효소에 의한 균 성장억제의 불활성화를 조사하였다(10). 효소로는  $\alpha$ -chymotrypsin(Sigma Co, type II), protease(Sigma Co., type XIV)를 사용하였다.

### 항균물질 생산균주의 동정

분리균의 동정은 Bergey's manual(11)에 근거한 이분 동정 과정에 준하여 수행하였으며 Biochemical tests for identification of medical bacteria(7)에 기술된 방법을 따라 실시하였으며 API 20 STREP system(API System S.A., France)을 이용하여 생화학적 성질을 조사하였다.

### 분리균주의 bacteriocin 생산역가 측정

*B. subtilis* ATCC 6633의 spore(12)를 사용하여 surface-spotting dilution test(13)를 수정 이용하여 항균물질의 활성을 결정하였다. 균을 제거한 배양액을 25 mM Tris·Cl(pH 8.0)로 serial dilution한 뒤에, 포자가  $5.9 \times 10^6$  C.F.U./ml로 접종된 assay plate(11, streptomycin assay agar)에 배양액을 4  $\mu$ l 점적한 뒤 37°C 배양기에서 18시간 가량 배양시킨 후 억제환 형성을 관찰하였다. 억제환을 형성하는 최종 희석액의 활성을 1 Arbitrary Unit(1 AU/ml)으로 정의하였고 희석배수의 역수를 원 배양액의 unit으로 결정하였다.

Bacteriocin 생산균주를 각 온도 별로 배양하면서 일정 시간 간격으로 균질화하여 채취한 후 흡광도를 측정하여 성장곡선을 작성하였다. 동시에 배양액을 취하여 원심분리하여 균을 제거한 상등액만을 취하여 끓는 물 안에서 10분 동안 boiling한 후 surface-spotting dilution test를 하였다.

### Bacteriocin 특성 연구

Bacteriocin의 항균 범위를 조사하기 위하여 균주 선발에 사용한 antagonism assay(9) 및 균 배양여액을 이용한 surface-spotting dilution test를 동시에 수행하였다. 열처리가 bacteriocin의 활성에 미치는 영향을 알기 위하여 균 배양여액을 일련의 Diaflo ultrafilter system에(YM10과 YM2 filter, Amicon Corp., USA) 통과시켜(14) YM10과 YM2 filter 사이에서 농축시킨 bacteriocin 부분 정제물을 같은 부피의 50 mM Tris·Cl(pH 8.0)과 섞은 후 끓는 물(100°C)에 정치한 다음 시간 별로 채취하여 sample의 활성을 surface-spotting dilution test하였다. 효소 처리가 bacteriocin의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 bacteriocin

부분 정제물 40  $\mu$ l에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.9)에 녹인  $\alpha$ -amylase(5 mg/ml, Sigma Co., Type X-A)를 10  $\mu$ l를 가한 다음 25°C 에서 2시간 반응시켰다(15). Control로  $\alpha$ -amylase 대신에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.9)를 가하였다. Bacteriocin 부분 정제물 40  $\mu$ l에 각각의 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.8, 7.0, 7.5)에 5 mg/ml의 농도로 녹인  $\alpha$ -chymotrypsin(Sigma Co., Type II), trypsin (Sigma Co., Type II), protease(Sigma Co., Type XIV)를 10  $\mu$ l 씩 가하여 25°C 에서(protease의 경우 37°C) 2시간 처리하였다(16). 대조구로 효소 대신 bovine serum albumin(5 mg/ml, Sigma Co.)을 동량 첨가한 후 25°C 에서 2시간 반응시켰다. DNase I(Boehringer Mannheim, Grade 2), RNase(Sigma Co., Type II-A) 등은 0.2 M Tris·Cl(pH 8.0)에 녹인 10 mg/ml의 stock 용액을 각각 final 농도가 100  $\mu$ g/ml, 500  $\mu$ g/ml이 되게 처리하여 37°C 에서 1시간 반응시켰다. 효소 처리한 부분 정제물을 끓는 물에서 10분간 방치하여 효소를 불활성화시킨 후 surface-spotting dilution test하여 활성의 저해효과를 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 항균물질 생산 균주의 분리

원유로부터 분리된 Gram 염색 양성, catalase test 음성, oxidase test 음성이며 chain 또는 pair를 형성하는 구형의 219종 균주 중에서 항균활성이 비교적 크며(colony 주변의 억제환의 직경 1 cm 이상) antagonism assay시 단백질 가수분해 효소들에 의해 억제환이 상실되는 균주 12종을 얻었다(9). 단백질 가수분해 효소에 의해 억제환이 상실된 항균현상이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 유기산 등의 물질에 의한 것이 아니며 peptide성 항균물질인 bacteriocin에 의한다는 것을 암시한다. 대조구로 bovine serum albumin을 처리하여 확산에 의한 항균활성의 감소의 가능성을 배제하였다. 선발된 균주들 중에서 산업적으로 유용한 *Lactococcus lactis* subspecies나 *Streptococcus thermophilus*의 분류기준(즉, 6.5% NaCl, pH 9.6의 조건에서 성장 못함)에 벗어나지 않으며 항균범위가 상대적으로 넓은 한 균주를 최종 선발하였다.

### 균주의 동정

최종 선발균주의 분류학적 특성은 Table 1에서 보는 바와 같다. 선발균주의 형태적 특성을 조사한 결과 37°C 에서는 대부분 dimer 상태로 자라며 45°C 에서는 대부분 chain을 형성하며 자라는 구형의 세균이었다

Table 1. Morphological, cultural and some biochemical characteristics of isolated strain

Characteristics	Results
Morphology of colony	Circular form, convex elevation, and entire margin
Pigmentation of colony	No or yellowish white
Arrangement of cells	Chains, pairs
Facultative anaerobe or microaerophile	+
Catalase reaction	-
Cytochrome present	-
Major fermentation products from carbohydrate anaerobically	Lactate
Growth at 10°C	-
Growth at 45°C	+
Growth at 6.5% NaCl	-
Growth at pH 9.6	-
Voges-Proskauer reaction	+
Hippurate hydrolysis	-
Esculin hydrolysis	-
Pyrrolidonyl 2 naphthylamide hydrolysis	-
6-Bromo-2-naphthyl $\alpha$ -D-galactopyranoside hydrolysis	-
Naphthol AS-BI $\beta$ -D-glucuronate hydrolysis	-
2-Naphthyl $\beta$ -D-galactopyranoside hydrolysis	-
2-Naphthyl phosphate hydrolysis	-
L-leucine-2-naphthylamide hydrolysis	+
Arginine hydrolysis	-
Acidification from	
Ribose	-
L-Arabinose	-
Mannitol	-
Sorbitol	-
Lactose	+
Trehalose	-
Inulin	-
Raffinose	-
Starch	+
Glycogen	-

(Fig. 1). 분리균주는 형태적, 배양적, API 20 STREP test를 포함한 생화학적 검사에 의해 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*라고 동정되었다.

#### 세균 성장에 따른 bacteriocin 생산역가 조사

균주를 각 온도 별로 배양하면서 측정된 specific growth rate 및 항균활성은 Table 2에 나타내었다. 균주는 온도 별 성장속도와 항생물질 생산능력은 서로 반비례하는 경향을 나타내었다. 즉 균주는 배양온도가 상승함에 따라 성장속도가 점차 증가하였으나 항생

물질 생산은 45°C 에서는 전혀 생산하지 못하였고 저온으로 갈수록 오히려 증가하는 경향을 보여 주었다. 항생물질을 생산하는데 대한 원인은 생물 사이의 경쟁, 대사의 조절등으로 크게 나눌 수 있으나(17) 제한된 환경에서 성장하는데 대한 대응책으로서의 항생물질 생산이 일반적이다. 생육 적은 이하에서 다른 미생물과 경쟁하기 위하여 본 균주의 경우에는 저온에서 생산이 증가되고 고온에서는 불필요한 항균물질의 생산이 저해되는 방식의 합성조절 기작을 갖는다고 볼 수 있다. 18시간 배양한 균주를 Lactic 배지(6)



Fig. 1. Phase-contrast photomicrograph of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Table 2. Specific growth rates and antimicrobial activities of the isolate at various culture temperatures.

Growth Temperature	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
Specific growth rate(h <sup>-1</sup> )	1.03	1.26	1.37	1.67	NG <sup>†</sup>
Antimicrobial Activity(AU/ml) <sup>a)</sup>	2,000	2,000	1,000	0	NT*

<sup>a)</sup> Spot assay of the supernatant of 16 hour-grown culture in Lactic medium.

<sup>†</sup> No growth.

\* Not tested.

에 1% 접종한 후 35°C 에서 배양하면서 시간 별로 growth와 bacteriocin의 생산역가를 조사하였을 때 그림(Fig. 2)과 같이 균주는 접종 이후 6시간째부터 stationary phase로 들어가며 동시에 bacteriocin 생산이 관측되기 시작하여 22시간째에 가장 높은 생산량을 보여 주었으며 26시간 이후부터 감소하기 시작하였으며 균성장도 22시간 이후부터 death phase로 접어들었다.

#### Bacteriocin용액의 항균 범위

여러 종류의 Gram 양성세균과 Gram 음성세균에 대하여 antagonism assay(9)를 실시하였다(Table 3). *Streptococcus* 계통의 조사한 균주는 모두 민감하게 억제환을 보여 주었으며 *Leconostoc mesenteroides* 계통의 균주도 역시 성장이 억제되었다. *Lactobacillus*의 경우 *L. casei* YIT 9018는 성장이 억제되었으나 *L. plantarum* ATCC 8014는 영향을 받지 않았다. *Bacillus*와 *Staphylococcus* 계통의 균주에도 모두 작용하였다. Gram 음성균주 중에서는 *E. coli*와 *Proteus mirabilis*등에 특이하게 작용하였으며 이는 그람양성

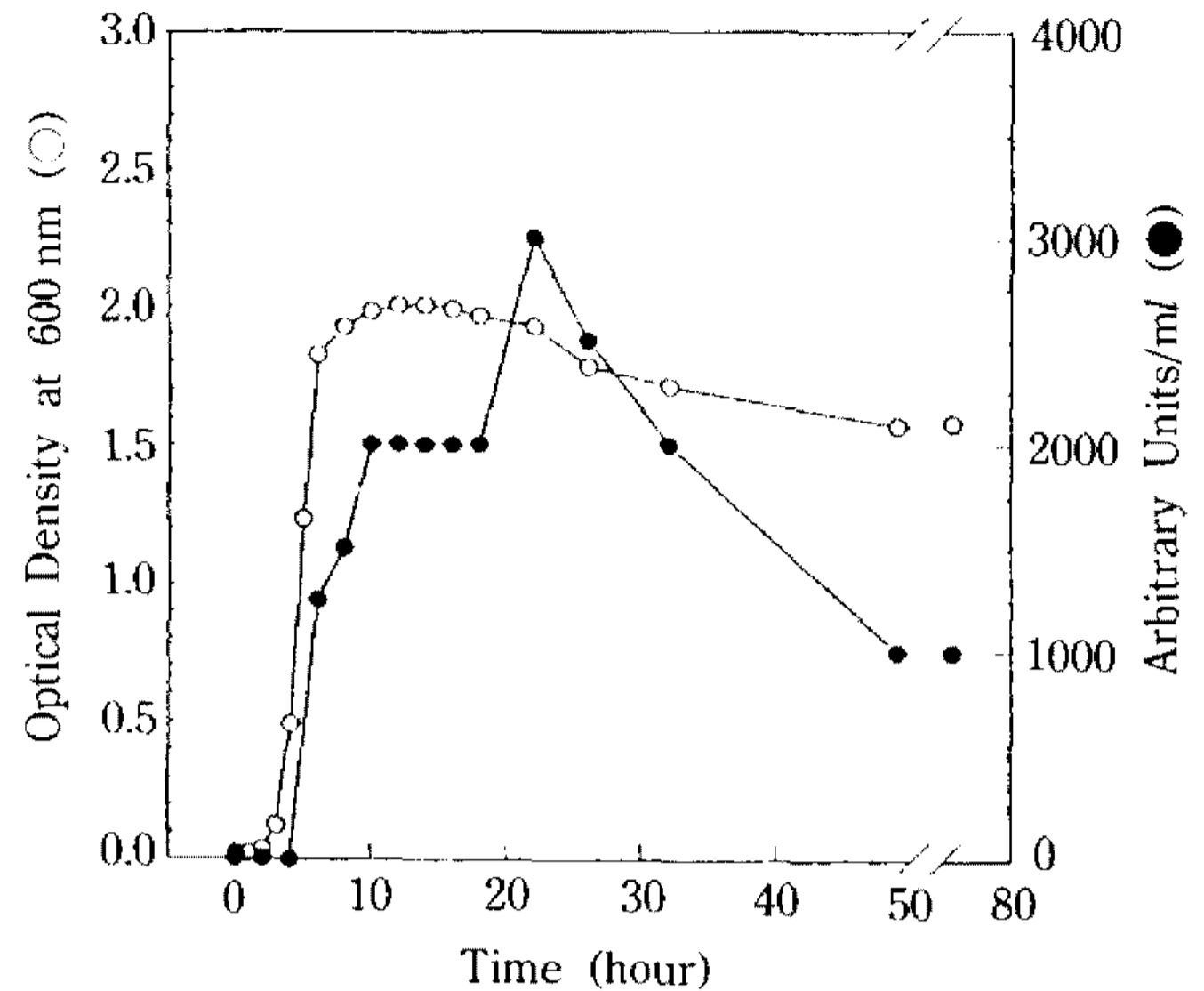


Fig. 2. Measurement of growth and bacteriocin production in Lactic medium by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

균주인 유산균이 생산하는 bacteriocin이 그람음성균 주에도 작용하는 드문 경우로 추후의 연구를 필요로 한다. 반면에 *Salmonella typhimurium*에는 작용하지 않았다.

#### Bacteriocin의 열 안정성 및 효소처리 안정성

균주가 생산하는 bacteriocin은 열에 상당히 안정하였다. 부분 정제물(YM10과 YM2 filter 사이의 농축물)을 끓는 물(100°C)에 방치한 후 surface-spotting dilution test를 수행하였을 때 30분 처리한 표본은 활성의 감소를 발견할 수 없었다. 반면 40, 50분 처리한 표본의 경우 50%, 60분 처리한 표본의 경우 25%로 잔여활성이 나타났다. 부분 정제물을 효소처리하여 활성의 감소를 조사한 결과 Table 4에서 보는 바와 같다. 단백질 가수분해 효소 외의 다른 효소는 활성에 전혀 영향을 끼치지 못하였으므로 항균활성을 나타내는 물질은 peptide bond를 갖는 peptide antibiotic인 bacteriocin임을 알 수 있었다. Surface-spotting dilution test시 배양여액을 Tris buffer로 중화시켜 사용하여 유기산에 의한 항균현상의 가능성을 배제하였다. 또한 ultrafilter를 사용하여 얻은 bacteriocin 부분농축물의 부분(YM10과 YM2 filter)은 항균현상이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 bacteriophage에 의한 것이 아니라는 것을 간접적으로 설명한다. 대조구로 bovine serum albumin을 처리하여 확산에 의한 항균활성의 감소의 가능성을 배제하였다.

유산균이 생산하는 peptide antibiotics들 중 많은 경우가 단백질 합성과정과 같은 방식으로 생산된다

**Table 3. Activity spectrum of the bacteriocin produced from *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* against tested bacteria.**

Indicator microorganisms	Inhibition
<i>Bacillus brevis</i> IFO 3331	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+
<i>Bacillus megaterium</i> NRRL B-1368	+
<i>Enterococcus faecalis</i> DS-5	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> KBL 502	+
<i>Lactobacillus casei</i> YIT 9018	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KCTC 1913	+
<i>cremoris</i> KBL 103	+
biovar. <i>diacetylactis</i> KBL 112	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> KBL 111	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p	+
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> KBL 703	+
<i>Enterococcus aerogenes</i> IFO 3317	+
<i>Escherichia coli</i> K-12	+
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	-

KBL : department strain collection

**Table 4. Effect of enzyme treatments on the activity of the bacteriocin.**

Treatment	Activity
α-Amylase	+
α-Chymotrypsin	-
Trypsin	-
Protease	-
DNase I	+
RNase	+

(14,18)는 사실이 밝혀진 후 이러한 항생물질에 관한 연구가 많이 진행되었다. 지금까지 가장 잘 연구된 nisin에 관한 연구는 클로닝 및 염기서열의 결정(19, 20)단계를 지나 protein engineering 수준에서 변형된 특성을 갖는 nisin유도체를 만들어 내어 구조와 기능 사이의 관계를 연구하는 단계에 이르렀다(21). Bacteriocin이 일반 단백질과 같이 전사, 번역되어 합성이 된다는 사실은 유전공학적 수준에서 새로운 활성을 갖는 항생물질을 합성해 낼 수 있는 가능성을 시사하며 새로운 bacteriocin을 찾아내려는 노력과 함께 장래 중요한 연구목표가 될 수 있으리라 사료된다.

**요 약**

Antagonism assay를 하여 원유에서 억제환의 크기가 가장 크며 단백질 가수분해 효소에 의해 항균 능력이 상실되는 균을 분리하여 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*로 동정하였다. 이 균주는 45 °C에서 specific growth rate가 가장 높은 반면 bacteriocin을 생산하지 않았다. 이 bacteriocin은 고온에서도 상당한 열안정성을 보였으며 단백질 가수분해 효소에 의해 활성이 상실되었으나 α-amylase, DNase I, RNase는 bacteriocin활성에 영향을 주지 못하였다.

**참고문헌**

1. Dahiya, R.S. and M.L. Speck. 1968. Hydrogen peroxide formation by *Lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* **51**: 1568-1572.
2. Reeves, P. 1965. The Bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **29**: 24-45.
3. Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* **27**: 85-123.
4. Klaenhammer, T. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**: 337-349.

5. Terzaghi, B. and W.E. Sandine. 1975. Improved medium for the lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**: 807-813.
6. Elliker, P.R., A.W. Anderson, and G. Hannesson. 1956. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.* **39**: 1611-1612.
7. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, H.R. Krieg, and G.B. Phillips. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. ASM.
8. MacFaddin, J.F. 1980. *Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed. Williams & Wilkins.
9. Geis, A., J. Singh, and M. Teuber. 1983. Potential of Lactic Streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 205-211.
10. Van Belkum, M.J., B.J. Hayema, A. Geis, J. Kok, and G. Venema. 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1187-1191.
11. Sneath, P.A., H.A. Mair, and M.E. Sharpe. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2. Williams & Wilkins.
12. Difco Laboratories. 1984. *Difco Manual*. Pp. 78-85. 10th ed. Difco Laboratories.
13. Davey, G.P. and B.C. Richardson. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 84-89.
14. Joerger, M.C. and T.R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **167**: 439-446.
15. Lewus, C.B., Sun S. and T.J. Montville. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteriodes* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 143-149.
16. Lee, K.W., Y.H. Jang, and H.U. Kim. 1990. A study on *Lactococcus Lactis* KCTC 2184 producing the antibiotic, nisin. *Korean J. Anim. Sci.* **32**: 619-627.
17. Lancini, G. and F. Parenti. 1982. *Antibiotics*, Pp. 239-241. Springer-Verlag New York, Inc.
18. Scherwitz, K.M., K.A. Baldwin, and L.L. McKay. 1983. Plasmid linkage of a bacteriocin-like substance in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* strain WM4: Transferability to *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1506-1512.
19. Buchman, G.W., S. Bannergee, and J.N. Hansen. 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263**: 16260-16266.
20. Kaletta, C., and K. Entian. 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* **171**: 1597-1601.
21. Dodd, H.M., N. Horn, Z. Hao, and M.J. Gasson. 1992. A lactococcal expression system for engineered nisins. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3683-3693.

(Received November 20, 1992)