

## Bacteriocin을 생산하는 장내 유산균의 분리 및 Bacteriocin 특성 조사

맹길재 · 김정상\* · 지근억\*\* · 김정환†

경상대학교 식품공학과

\*인제대학교 식품영양학과

\*\*한림대학교 식품영양학과

### Isolation of Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria from Human Intestines and the Characteristics of their Bacteriocins

Kil-Jae Maeng, Jong-Sang Kim\*, Geun-Eog Ji\*\* and Jeong-Hwan Kim†

Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

\*Dept. of Food Science and Nutrition, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

\*\*Dept. of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

#### Abstract

*Lactobacillus* strains were isolated from volunteer's feces, including from newly-born infants and adults in their 20's, by using differential MRS-BPB plates. Total 56 presumptive *Lactobacillus* strains were isolated and the bacteriocin productions by the isolates were examined by agar diffusion method. Six bacteriocin-producing strains were confirmed. Among them, two isolates, HU-1 and H22-3, showed the most outstanding antimicrobial activities, which were not affected by pH adjustments or catalase treatments of culture. HU-1 was originated from a two-years old boy and H22-3 was originated from a newly-born infant. HU-1 and H22-3 had the same morphology (short rod) when examined by scanning electron microscope, and the same biochemical traits including growth temperature range, salt tolerance and sugar-fermenting abilities. But the growth-inhibition spectrum and plasmid profiles of HU-1 and H22-3 were different. Both strains inhibited the growth of various Gram (+) microorganisms including *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, and *Staphylococcus aureus* in addition to many species of lactic acid bacteria, indicating the production of broad-spectrum bacteriocins. Bacteriocins produced by HU-1 and H22-3 were stable up to 90°C, 15 min heat treatments. Their activities were not affected by pepsin or trypsin treatments but destroyed by proteinaseK or pronase treatments.

**Key words:** bacteriocins, human intestines, lactic acid bacteria

#### 서 론

식품의 안전성을 위협하는 여러 요인들 중 *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Listeria* 등 각종 유해균에 의한 식품 오염은 심각한 문제이며 특히 각종 냉장식품, 편이식품들의 대규모 유통, 소비와 비례해 적절한 예방책 수립의 필요성이 커지고 있다(1). 이는 많은 냉장식품들이 품미나 조직 등 관능적 품질 유지의 목적으로 최소한의 열처리만을 거친 후 저장, 유통되거나 가공 후 비위생적인 처리로 미생물 오염이 일어날 수 있고, 오염된 식품의 저온 유지가 실패할 경우

오염균이 급속히 증식하여 식중독 사고로 연결될 수 있기 때문이다(2). 냉장온도에서 증식하는 여러 저온균(psychrotrophs)들의 존재와 이들 중 *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* 등에 의한 발병 사례는 이들 유해균에 의한 식중독 사고의 위험이 상존함을 말해준다(3). 유해균 증식을 억제하는 방법 중 하나는 유산균, 초산균, 효모와 같은 식용 미생물들로부터 천연 항균물질을 찾아서 이들을 보존제로 사용하는 것이다. 최근 활발한 연구의 대상이 되는 유산균은 사람이나 동물의 장내에서 성공적으로 증

†To whom all correspondence should be addressed

식할 경우 각종 유해균 증식을 억제하고 숙주의 면역능력을 증강시키며, 대장암 등 암 발생을 억제하는 여러 기작에 의해 숙주의 건강을 개선하는 소위 "probiotic" 효과를 지닌이 과학적으로 규명되고 있다(4). 기작 중 하나는 유산균이 Nisin과 같은 bacteriocin들을 생산하여 장내에서 *Clostridium perfringens*와 같은 유해균 증식을 억제하는 것으로 밝혀져 있다(5) 유산균이 생산하는 bacteriocin들 중 가장 잘 알려진 것은 Nisin으로 현재 세계 여러나라에서 각종 가공식품들의 보존제로 활용되고 있다.

국내에서도 장내 미생물에 관한 연구가 최근 많이 진행되고 있으나 아직은 세균들의 분류나 식이가 장내 균총 변화에 미치는 영향 정도만이 연구되고 있고 균들간의 길항작용이나 장내균이 생산하는 bacteriocin 등 저해물질에 관한 연구는 거의 전무한 상태이다. 유산균이 타균의 생육을 저해하는 주요 수단 중의 하나가 bacteriocin 생산이므로 장내 유산균들을 조사하면 새로운 bacteriocin 생산균주들을 찾을 수 있을 것이다. 본 연구에서는 장내 유산균들 중 숫적으로 가장 많고 중요한 위치를 차지하는 *Lactobacillus* 속 균들을 자원자들의 대변에서부터 분리한 다음 bacteriocin 생산균주들을 탐색하여 이들이 만드는 bacteriocin들의 특성을 조사함으로써 궁극적으로는 천연 식품보존제로의 개발 가능성을 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 대변으로부터 유산균의 분리

유아와 성인들의 대변에서 *Lactobacillus*들을 분리하였다. 한 등이 보고한 분별배지인 MRS-BPB(Bromophenolblue, 0.002% w/v) 배지를 사용하였다(6). 균원 시료로는 경상대학교 식품공학과에 재학중인 20대 남, 여 20명과 진주 가야자모 병원에서 태어난 신생아 및 1~2세 유아 50여명의 대변을 사용하였다. 배변 후 최단

시간에 대변을 채취하여 실험실로 무균적으로 옮긴 후 1g씩을 멸균 희석용액 9ml가 들어있는 시험관에 넣고 현탁시킨 후  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  배로 희석시켰다. 희석액의 조성은 Table 1과 같다. 희석액 100μl를 MRS-BPB plate에 도말하여 37°C에서 24~48시간 배양시켜 나타나는 여러 종류의 colony들 중 크고 원형이며 불룩하게 융기하며 색상이 담황색인 것들을 선발하여 이들을 다시 MRS broth(7)에 접종하여 37°C에서 12시간 정지 배양하였다. Gram 염색 후 현미경으로 검정하여 Gram (+)이고 간균으로 확인되는 것들을 잠정적으로 *Lactobacillus* 속이라 보고 Bacteriocin 생산여부를 조사할 실험균주로 사용하였다. 분리균주들에 대해 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1986)에 준해서 생육온도, 당발효성, 효소역가 등 여러 생화학적 특성을 조사하였다(8). 당이용성은 각 탄소원을 1%(w/v)되게 MRS배지에 첨가한 후 이를 이용하여 신속히 자랄수 있는지를 조사했다. 당을 발효하여 여러 유기산들을 생산하는 것을 확인하기 위해 Bromocresolpurple를 indicator로 배지에 소량(0.04%) 첨가하였다. 37°C에서 12~14시간 배양 후 노란색의 균락을 형성하면 positive로 그렇지 못하면 해당 당을 이용하지 못하는 것으로 판단하였다.

### 분리균주의 전자현미경 관찰

Bacteriocin을 생산하는 두 분리균주(HU-1, H22-3)에 대해 전자현미경으로 자세한 형태와 크기를 조사하였다. MRS 배지 1ml에 잘 분리된 균락 1개씩을 접종하여 12시간 배양한 다음 5,000rpm, 10분간 원심분리하여 cell pellet을 얻었다. 1ml, 4% neutral buffered paraformaldehyde(NBP)를 pellet에 가해 현탁하고 다시 원심분리하여 pellet을 얻어 3차 증류수로 2회 더 세척한 다음 pellet에 1ml NBP를 가해서 4°C, 48시간 고정시켰다. 0.015M phosphate buffered saline 1ml를 가해 진탕하면서 2회 세척하고 무수알콜로 진탕 후 탈수하고

Table 1. Composition of diluent used for the isolation of *Lactobacillus* strains from human feces

Chemicals		Amount(per liter)
Salt solution I	$K_2HPO_4$ (0.78%, w/v)	37.5ml
Salt solution II	$KH_2PO_4$ (0.47%), NaCl(1.18%) $CaCl_2$ (0.12%), $(NH_4)_2SO_4$ (0.20%) $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (0.25%)	37.5ml
Resazurin	0.1% solution	1.0ml
L-cystein	$(C_3H_7NO_2S \cdot HCl)$	0.5g
L-ascorbic acid	25% solution	2.0ml
$Na_2CO_3$	8% solution	50.0ml
Agar		0.5g
Distilled water		860ml

임계점 전조기로 건조 후 촬영하였다. 주사형 전자현미경은 일본 JEOL사의 JSM-6400을 사용하였다.

### Bacteriocin 생산 확인

Agar diffusion method를 사용하여 분리균들의 bacteriocin 생산여부를 조사하였다(9). 분리균을 MRS 배지에 접종해 37°C에서 하룻밤 배양한 배양액 3μl씩을 MRS 한천배지에 접종하고 2~3시간 두어 배지에 흡수시킨 다음 indicator균 100μl와 top agar(agar 0.7%, w/v) 4ml를 섞어 overlay하였다. 37°C에서 48시간 배양 후 접종 부위를 중심으로 저해환 생성을 조사하고 저해환 직경을 측정하였다. Indicator로는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KFR1 876과 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363을 주로 사용하였다. 또 Nisin 생산균인 *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454는 (+) 대조구로 사용하였다(10). *Lactococcus*속 균주들은 M17 배지(11)에 접종, 30°C에서 배양하였다. Indicator들은 MRS나 M17 배지에서 흡광도(600nm) 0.5~0.7까지 자라게 한 다음 100μl 취해서 미리 온도를 45°C로 조정된 top agar(0.7%) 4ml와 섞었다. 유산균들은 bacteriocin 외에도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 유산, 초산 등의 다른 저해물질을 만들기 때문에 bacteriocin에 의한 저해를 확인하기 위해 배양액의 pH를 중성으로 조정한 후 저해실험에 사용하였고, 또 배양액을 catalase(Sigma C-9322, from Bovine Liver)로 처리한 다음 저해 여부를 조사하였다.

### Bacteriocin 저해 spectrum 조사

선발된 bacteriocin 생산균주들의 저해 spectrum을 조사하였다. 실험실에 보관 중인 여러 유산균주들(유가공균주 및 장내균)과 이외에 *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis* 등 여러 Gram(+)균과 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 등 Gram(-)균을 대상으로 하였다. *Lactobacillus* 속 균주들은 MRS 배지에서 37°C 정지 배양하였고 *Lactococcus*들은 M17 배지에서 30°C 정지 배양했으며 그외 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis*, *Staphylococcus carnosum* 등은 LB 배지(tryphton 10gr, yeast extract 5gr, NaCl 5gr per liter, pH 7.2)에서 37°C 진탕 배양하였다. Top agar(0.7% agar, w/v) 역시 시험균에 따라 MRS, M17 또는 LB를 사용하였고 시험균과 섞은 후 굳기 전에 MRS 한천배지(1.5% agar, w/v) 위에 overlay하였다.

### Bacteriocin 특성 조사

#### 열 안정성

60°C에서 121°C 범위의 여러 온도에서 배양액을 15분간 열처리한 다음 3μl씩을 MRS plate에 접종하고 indicator에 대한 저해 여부를 조사함으로써 열처리 안정성을 보았다.

#### 단백질 가수분해 효소 처리

배양액을 trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma T-8918), pepsin(Sigma P-6887), protease(Sigma P-5147, Type XIV, pronase), proteinaseK(Sigma P-2308) 등의 proteolytic 효소들로 각각 처리한 다음 bacteriocin 역가에 미치는 영향을 조사하였다. 배양액 3μl씩을 MRS plate에 spot한 다음 효소액 1μl를 spot의 한쪽면에 첨가하였다. 동결건조된 효소들은 5mM 인산완충용액(pH 7.0)에 녹여 사용했으나 pepsin은 0.02N HCl에 녹였다. 첨가된 효소량은 plate 당 pepsin은 12 unit, trypsin은 24 unit, proteinaseK는 0.32 unit, 그리고 protease는 0.6 unit를 사용하였다.

### Bacteriocin 생산 최적 조건 조사

Bacteriocin 생산균인 H22-3에서 bacteriocin 생산 최적 배양조건을 조사하였다. 배지 조성 중 탄소원으로 포도당, 유당, 자당이 각각 1%(w/v) 첨가된 MRS 배지에서 얻어지는 bacteriocin의 역가를 측정 비교하였다. 배지의 초기 pH가 bacteriocin 생산에 미치는 영향을 보기 위해 MRS 배지의 pH를 HCl과 NaOH로 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0으로 조정된 후 syringe-type filter를 사용해 제공하고 여기에 H22-3을 접종하여 16시간까지 배양한 후 생성된 bacteriocin 역가를 측정하였다. 또한 배양 온도도 25, 30, 및 37°C로 달리 해 배양하고 온도로 별로 bacteriocin의 역가를 비교하였다.

### Plasmid DNA preparation and curing

분리균 HU-1과 H22-3으로부터 plasmid DNA의 조제는 O'Sullivan과 Klaenhammer의 방법에 준했다(12). Plasmid DNA의 확인을 위해 TAE buffer(Tris-acetate 40mM, EDTA 1mM)를 사용하여 agarose gel(0.8%) 전기영동을 행하였다(13). Plasmid curing을 위해서는 MRS 배지에 ethidium bromide(1μg/ml)와 novobiocin(0.5μg/ml)을첨가하여 37°C에서 매일 깨대배양을 계속하였다.

### 결과 및 고찰

대변으로부터 *Lactobacillus*속 균주 분리

재료 및 방법에 언급된 방법에 따라 MRS-BPB 배

지를 사용하여 대변으로부터 *Lactobacillus*속으로 추정되는 56개 균주를 분리하였다. MRS-BPB 배지상에서 *Lactobacillus*들은 균락이 크고 진한 청색을 띠며 (6,14) 층 균락 중 5~10% 비율로 검출되었다. 유아에서 보다는 성인에서 높은 빈도로 검출되었다. MRS-BPB 배지에 나타나는 균락 중 70% 이상은 작고 흰색인 *Streptococcus*속 균들이었고 10~20% 정도는 *Leuconostoc*으로 균락이 크고 주변이 하늘색이었다. *Pediococcus*들은 plate상에서 *Lactobacilli*와 구별이 힘들었다. 분리

조건이 호기적이어서 대변의 주된 균총을 이루는 혐기성균들은 자라지 못하였다. *Lactobacillus*로 추정되는 균락들을 먼저 현미경으로 형태를 관찰한 다음 plate 당 잘 분리된 3개만 선발하였다. 이렇게 선발한 총 56개의 분리균주들을 MRS 배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 다음 glycerol을 30%(v/v) 첨가하여 stock으로 -20°C에 보관하고 실험에 이용하였다. Bacteriocin 생산을 확인하기 전 적어도 1회 이상 MRS 배지에서 배양을 거쳐 활력을 회복시킨 후 사용하였다.

Table 2. Six isolated strains producing bacteriocins

Indicator strains	Isolates					
	ME-3	HU-1	H16-1	H12-2	H22-3	H44-1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KFRI 876	++ <sup>1)</sup>	++	+	+	++	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MG 1363	+	-+	+	+	+++	++

<sup>1)</sup>Inhibition zone size: +, 0.5<sup>2)</sup> to 2mm; ++, 2 to 4mm; +++, more than 4mm

<sup>2)</sup>The value equals to (diameter of an inhibition zone in mm-diameter of a colony)/2

Table 3. Inhibition-spectrum of bacteriocins produced by isolated strains, HU-1 and H22-3

Test strains	Isolated strains		
	HU-1	H22-3	Control <sup>1)</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> YIT 9018	+ <sup>2)</sup>	+	++
<i>L. acidophilus</i> NCFM	++	+	+++
<i>L. acidophilus</i> (human origin)	++	++	++
<i>L. acidophilus</i> IAM 1084	+	+	++
<i>L. acidophilus</i> ACID	++	++	++
<i>L. thermophilus</i>	++	+ -	++
<i>L. bulgaricus</i> CH2	-	++	++
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KFRI 442	+	+	++
<i>L. pentosus</i> KFRI 481	-	++	++
<i>L. plantarum</i> KFRI 464	+	-	++
<i>L. fermentum</i> KFRI 145	+	+	++
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KFRI 876	++	++	++
<i>L. helveticus</i> KFRI 347	+ - +	++	+++
<i>L. amylovorus</i> B4540	-	++	++
<i>Bacillus subtilis</i> DB 104	++	++	+++
<i>B. cereus</i>	+	+	+ - +
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	-
<i>Listeria monocytogenes</i> (ScotLA)	+++	++	+++
<i>Micrococcus luteus</i>	+++	++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	++	++
<i>Sta. epidermidis</i>	-	++	+
<i>Sta. carnosum</i>	+	+	++
<i>Streptococcus bovis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	+	-
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> K-12	-	-	-

<sup>1)</sup>*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454(nisin producer)

<sup>2)</sup>Inhibition zone size. +, 0.5<sup>3)</sup> to 2mm; ++, 2 to 4mm; +++, more than 4mm

<sup>3)</sup>The value equals to (diameter of an inhibition zone in mm-diameter of a colony)/2

## Bacteriocin 생산균주 확인

56개의 분리균주에 대해 bacteriocin 생산여부를 조사하였다.(+) 대조균으로 Nisin 생산균인 *L. lactis* ATCC 11454(10)를 사용하였고 Nisin은 보고된 바처럼 대부분의 Gram(+)균들을 뚜렷히 저해하였다(15). 11454에 의한 저해환을 보이는 plate상에서 역시 저해환을 보이는 6개의 분리균주를 찾아내어 분리균들 중 약 11%가 bacteriocin을 생산함을 확인하였다. 분리한 6균주에 의한 저해환 크기를 측정하였고 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 이 중 ME-3로 명명된 것은 성인에서 유래한 것이고 나머지 4균주는 출생 후 7일 이내의 신생아에서 그리고 HU-1은 2세된 남자 아이로부터 분리되었다. 여러 indicator들을 대상으로 6개 분리균의 저해를 조사한 결과 HU-1과 H22-3의 저해정도와 범위가 가

장 우수하게 나왔다. Indicator로 *Lactobacillus helveticus* subsp. *lactis* KFRI 347을 사용한 실험에서 HU-1의 저해효과는 *L. lactis* ATCC 11454와 거의 대등한 것을 볼 수 있었다(results not shown). H22-3의 저해효과는 다소 떨어지나 bacteriocin들은 사용하는 indicator에 따라 저해 정도의 차이가 크다(9). Indicator들의 생육저해가 분리균이 생산하는 유기산들이나 hydrogen peroxide에 의한 것이 아님을 보이기 위해서 배양액의 pH를 중성으로 조정 한 후, 그리고 배양액을 catalase로 처리한 다음 저해실험을 반복했으나 저해환 형성에는 변화가 없었다. 그러나 배양액을 단백질 가수분해효소들로 처리한 경우에는 저해환 형성이 억제되어(아래 참조) 분리균에 의한 저해가 bacteriocin 생산에 의한 것임을 보여주었다.

Table 4. Morphological and biochemical properties of HU-1 and H22-3

Tested properties	Strains	
	HU-1	H22-3
Free Cell		
Cell shape	Short rod	Short rod
Arrangement	Single or short chain	Single or short chain
Gram stain	+	-
Mobility	-	-
Colony form	Circular	Circular
Colony color	White	White
Growth Temperature range	15~45°C	15~45°C
Growth pH range	5.0~11.0	5.0~11.0
NaCl tolerance	≤8%	≤8%
Gas production from glucose	-	-
Catalase test	-	-
Sugar metabolism		
Arabinose	-	-
Cellobiose	+	+
Esculin	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Glucose	+	+
Glycerol	+	-
Inulin	-	-
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Mannose	+	+
Mannitol	+	+
Melbiose	-	-
Raffinose	-	-
Rhamnose	-	-
Ribose	+	+
Salicin	+	+
Sorbitol	+	+
Starch	-	-
Sucrose	+	+
Trehalose	+	+
Xylose	-	-

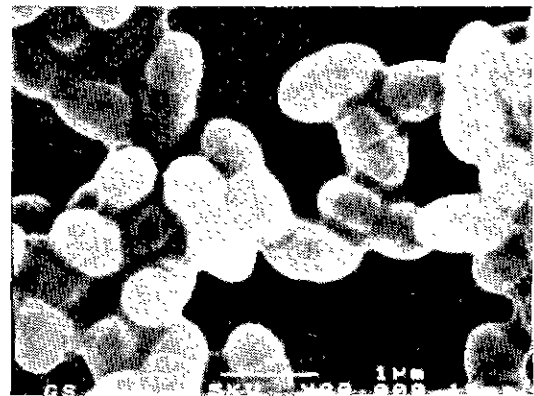
### Bacteriocin 저해 spectrum 조사

Bacteriocin 생산이 가장 우수한 분리균 HU-1과 H22-3을 선발하여 이들의 저해 spectrum을 조사하였다. 저해여부를 조사할 균 배양액 100 $\mu$ l를 Top Agar 4ml와 섞어 MRS 배지에 overlay하여 37°C에서 12~14시간 배양해서 조사하였고 그 결과를 Table 3에 나타내었다. HU-1은 *L. bulgaricus* CH2와 *L. pentosus* KFRI 481 등 8 균주를 제외한 나머지 시험균들을 그리고 H22-3은 *Streptococcus bovis* 등 3 균주를 제외한 모든 균들을 저해하였으며 (+) 대조구인 *L. lactis* ATCC 11454 역시 *Streptococcus bovis* 등 5 균주를 제외한 나머지 균들을 저해하였다. 저해정도, 즉 저해환 크기는 전반적으로 11454가 가장 컸으나 민감한 *Lactobacillus* 균주들에 대한 HU-1과 H22-3의 저해 효과는 11454와 거의 대등한 수준이었다. Nisin과 마찬가지로 HU-1과 H22-3이 만드는 bacteriocin은 대장균과 같은 Gram(-) 균에 대해서는 효과가 없었다. 대부분의 알려진 유산균 bacteriocin들은 Gram(-) 균을 저해하지 못하며 이는 Gram(+) 균과(-) 균의 세포벽 구조 차이에 기인한다(16). 주요 식중독균인 *Listeria monocytogenes*에 대해서는 HU-1의 저해정도는 nisin 생산균인 11454와 비슷하고 H22-3은 이들 보다는 작으나 뚜렷한 저해를 보였다.

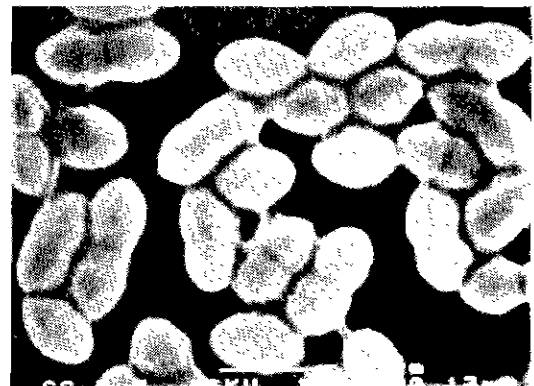
### 분리균주들의 형태학적, 생화학적 특성 조사

HU-1과 H22-3은 Gram(+), 짧은 형태의 간균(short rod)으로 포자를 형성하지 않고 운동성이 없으며 colony는 백색의 원형이었다(Table 4). 두균의 전자현미경 사진을 Fig. 1에 나타내었다. 사진에서 보는 것처럼 두균은 거의 동일한 형태의 short rod type임을 알 수 있다. 길이는 대략 1.0~1.5 $\mu$ m이고 폭은 0.5~0.7 $\mu$ m이다. 많은 *Lactobacillus*들은 *L. acidophilus*나 *L. fermentum*처럼 폭에 비해 길이가 긴 rod 형태(long rod)이나 *L. sake*처럼 cocci에 가까운 형태를 지니거나 *L. curvatus*처럼 구부러지거나 나선형을 보이는 것들도 있다(17). HU-1과 H22-3의 배양학적 특성을 Table 4에 나타내었다. 생육 온도와 pH 범위는 각각 15~45°C와 pH 5.0~11였으며 NaCl 농도 8%(w/v)까지는 생육하나 그 이상의 염농도에서는 생육이 억제되었다. Catalase 반응은 음성이었고 glucose로부터 gas 생성은 없었다. MRS broth에서 초기 pH 7.0, 배양온도 37°C에서 최대 생육을 보였다. 탄소원 발효실험결과도 Table 4에 수록하였다. HU-1과 H22-3은 glycerol 이용에서 차이가 있을 뿐 나머지 탄소원들의 이용은 일치하였다. 실험한 탄소

원들 중에서 arabinose, inulin, melibiose, raffinose, rhamnose, starch, xylose 등은 이용하지 못했으나 다른 기질들은 이용하여 발효에 의한 유기산을 생성하였다. *Lactobacillus* 속의 알려진 균들과 비교하면 facultative heterofermenter인 *L. casei*, *L. rhamnosus*와는 일치하고 *L. maltaromicus*와는 한계 기질에서 그리고 *L. curvatus*나 *L. sake*와는 두개 기질에서 차이를 보인다(17). 그리고 obligate heterofermenter인 *L. minor*와는 한계 기질에서 차이를 보인다. 이상의 결과들, 분별배지에서 형태적 관찰을 통한 선발, 생육온도, 당발효성, 효소역가 측정들을 종합할 때 분리균 HU-1과 H22-3은 *Lactobacillus*속으로 추정되나 자세한 종의 판별은 16s rRNA 분석이나, DNA hybridization, 또는 이들이 만드는 lactic dehydrogenase 효소 특성 등을 조사해야 가능할 것이다(18).



(A)



(B)

Fig. 1. Electron micrographs of H22-3(a) and HU-1(b). Magnification,  $\times 20,000$ . The bar in the photo represents 1 $\mu$ m. See the materials and methods section for detailed description.

## Bacteriocin 특성

### 열 안정성

HU-1과 H22-3 배양액을 60°C에서 121°C 범위내의 여러 온도에서 15분간 열처리한 후 indicator인 *L. lactis* MG1363에 대한 저해 효과를 조사하였다. 그 결과 60, 70, 80, 및 90°C 처리에서는 저해환을 보였으나 그 이상 온도에서는 저해 효과가 상실되었다. 일반적으로 분자량이 작은 peptide 계통의 bacteriocin들은 열처리에 대해서 높은 안정성을 보이는 것이 알려져 있고 심지어 121°C, 15분 처리에도 안정하다는 보고들도 있다(19,20) 반면 분자량이 큰 bacteriocin들은 열저항성이 약한 것으로 알려져 있어 이 결과만 볼때는 HU-1이나 H22-3이 만드는 bacteriocin들은 분자량이 비교적 큰 단백질이라 추정된다. 보다 자세한 것은 이들 bacteriocin의 정제를 통해 규명되어야 할 것이다.

### 단백질 분해효소 처리

배양액을 MRS plate에 먼저 spot하고 spot의 한쪽 면에 단백질 가수분해효소를 떨어뜨려 잠깐 둔 다음 indicator인 *L. lactis* MG1363 100μl를 Top Agar와 같이 overlay하여 30°C에서 12시간 배양하여 저해환을 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 것처럼 proteinaseK와 직접 접촉된 HU-1과 H22-3 세포 부근에서는 저해환이 나타나지 않으나(Fig. 2; 2번, 4번) 접촉되지 않은 부위 주위로는 저해환이 뚜렷함을 볼 수 있다. Indicator를 달리해 실험한 경우 나머지 4개의 bacteriocin 생산균주들에 대해서도 동일한 결과를 얻었다. 한편 배양액을 pronase로 처리했을 때도 동일한 결과를 얻었다. 즉, proteinaseK와 마찬가지로 pronase와 직접 접촉된 부위

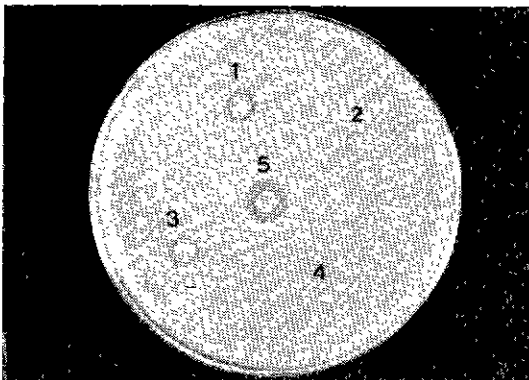


Fig. 2. The effect of proteinaseK treatments of cultures of HU-1 and H22-3 on the inhibition of indicator strain, *L. lactis* MG1363.

1: HU-1 cells, 2: HU-1 cells treated with proteinaseK, 3: H22-3 cells, 4: H22-3 cells treated with proteinaseK, 5: *L. lactis* ATCC 11454 cells(positive control).

에는 저해환이 사라짐을 볼 수 있었다. 반면 pepsin이나 trypsin 처리는 저해환의 형태와 크기에 아무런 영향을 주지 않았다(results not shown). 이런 차이는 pepsin과 trypsin은 비특이적인 proteinaseK나 pronase와는 달리 절단부위에 대한 특이성이 높기 때문에 HU-1과 H22-3이 만드는 bacteriocin을 절단하지 못하기 때문이라 생각된다. ProteinaseK와 pronase 처리에 의해 저해효과가 상실되는 점에서 HU-1과 H22-3에 의한 저해는 이들이 생산하는 단백질성 bacteriocin에 기인함을 알 수 있다.

### Bacteriocin 생산 최적조건

H22-3을 MRS 배지에서 여러 조건하에서 배양하면서 배양조건이 bacteriocin 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Bacteriocin 생산정도는 indicator인 *L. lactis* MG1363의 저해환 직경을 측정하여 비교하였다. 배양 온도는 37°C가 25°C나 30°C보다 bacteriocin 생산에 유리하였고 25°C보다는 30°C가 유리하였다. 이는 균의 생육속도와 bacteriocin 생산 및 분비가 비례적인 관계임을 보여준다. 배지의 pH는 중성인 6~7 영역이 산성인 pH 5보다 우수하였다. 탄소원으로 glucose, lactose, sucrose를 각각 1% 첨가한 MRS 배지들을 비교했을 때 glucose와 sucrose 배지가 lactose 배지보다 우수하였고 glucose와 sucrose 간의 차이는 거의 없었다. MRS broth에서 배양 시간대별로 H22-3의 생육과 pH 및 저해활성 변화를 측정할 실험에서 pH는 생육이 진행됨에 따라 산 생산이 증가하여 점차 감소하였으며 저해활성은 배양후 12~13시간에서 최대치를 나타내다가 그 이후는 점차 감소하는 것으로 나타났다. 그 결과를 Fig.

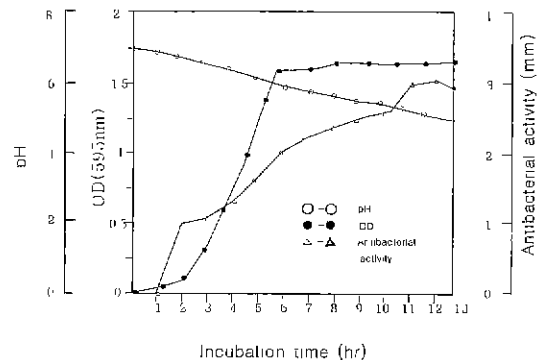


Fig. 3. Changes in cell densities, pHs and antibacterial activities during the batch culture of H22-3 on MRS broth.

1% of overnightly grown H22-3 culture was inoculated into fresh MRS medium and incubated at 37°C for 13 hours.

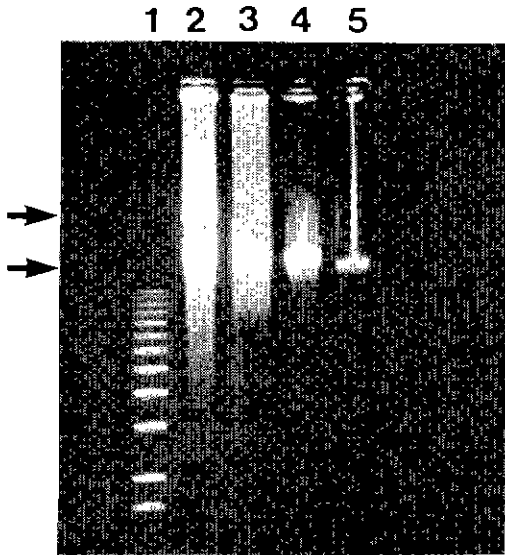


Fig. 4. Plasmid-profile of H22-3 and HU-1, determined by agarose gel electrophoresis.

0.8% agarose gel and 1 X TAE buffer was used for electrophoresis. lane 1, 1kb DNA ladders(BRL) as size markers; lane 2, plasmid prep from HU-1; lane 3, plasmid prep. from H22-3; lane 4, linear form of lambda DNA(48.5kb, Promega) as a size marker, and lane 5, circular form of lambda DNA. Top arrow on the left indicates a large-sized plasmid of HU-1 and the bottom arrow indicates chromosomal DNAs

3에 나타내었다. 이상 결과들은 대체적으로 H22-3에서는 균체의 최적 생육조건과 bacteriocin 최적 생산조건이 일치함을 보여준다.

#### HU-1과 H22-3의 plasmid profile

HU-1과 H22-3을 MRS 배지에서 12시간 배양 후 O'Sullivan과 Klaenhammer(12)의 방법으로 plasmid DNA를 얻어 agarose gel 전기영동으로 확인하였다(13) 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. HU-1과 H22-3은 세포형태와 생화학적 특성이 일치하여 동일 종으로 생각되었으나 plasmid profile은 일치하지 않았다. 저해 spectrum의 차이, plasmid profile의 차이 등은 HU-1과 H22-3이 동일 속의 가까운 종일 가능성을 보여준다. 물론 plasmid의 유무만으로 동일 종(species) 여부를 판단하기는 힘들 것이다. 이는 자연상태에서도 세포들간에 plasmid의 수평적 전이가 일어나기 때문이고 특히 크기가 큰 접합형(conjugative) plasmid의 경우 빈도가 높은 것으로 보고되어 있기 때문이다(21). 따라서 두 분리균주의 차이를 확인하기 위해서는 앞서 언급한 방법들, 즉 16s rRNA 염기서열 비교, DNA hybridization 등이 요구된다. Fig. 4에서 2번 lane은 HU-1에서 얻은 시료

로 최소 70~80kb(kilo base pair) 크기의 plasmid(위쪽 화살표) 하나가 존재함을 보여주나 3번 lane인 H22-3에서는 plasmid를 볼 수 없다. 아래 화살표는 plasmid DNA와 함께 얻어진 염색체 DNA들을 나타낸다. 1번, 4번 및 5번은 크기 비교를 위해 사용된 size marker들로 1번은 1kb ladder(BRL)로 가장 위의 band 크기가 12kb이다 4, 5번 lane의 marker는 대장균 파지 lambda DNA (48.5kb, unmethylated form, Promega)이며 4번 lane에는 직선형태의 그리고 5번 lane에는 환상형의 lambda DNA를 사용하였다. Fig. 4에서 보는 것처럼 HU-1의 plasmid는 lambda보다 훨씬 큰, 최소 70~80kb 이상임을 알 수 있다. H22-3은 plasmid를 지니고 있지 않으며 따라서 H22-3에서는 bacteriocin 생산에 관련된 유전자들이 염색체에 위치한다. HU-1의 경우도 bacteriocin 유전자들이 염색체에 존재하는 것으로 판명되었다. 이는 ethidium bromide curing을 통해 얻은, plasmid를 상실한 HU-1의 유도주가 모균주인 HU-1과 동일한 bacteriocin 생산능력을 보였기 때문이다(results not shown).

#### 요 약

MRS-BPB 분별배지를 사용하여 갓난 아이를 포함한 20대 자원자들의 대변으로부터 *Lactobacillus*속 균주들을 분리하였다. *Lactobacillus*속으로 추정되는 56개의 균주들을 분리하여 agar diffusion method를 사용하여 bacteriocin 생산 여부를 조사하였다. 그 결과 11%에 해당하는 6개의 bacteriocin 생산균주를 확인할 수 있었다. 두 분리균주, HU-1과 H22-3의 저해효과가 가장 우수하였고 이들의 저해효과는 배양액의 pH 조정이나 catalase 처리에는 영향을 받지않았다. HU-1은 2세된 남아에서 그리고 H22-3은 태어난지 1주일 미만의 신생아에서 유래한 것이다. 두균은 주사형 전자현미경으로 관찰시 짧은 rod 형태이며 생육온도범위, 내염성 그리고 당 이용성 등 여러 생화학적 특성이 일치하였다. 그러나 두균주의 bacteriocin 저해 spectrum과 plasmid-profile은 차이가 있었다. 분리균주 HU-1과 H22-3은 여러 유산균들 외에도 *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* 등 여러 Gram (+)들을 저해하여 이들이 만드는 bacteriocin은 광범위 저해 bacteriocin임을 보여준다. HU-1과 H22-3의 bacteriocin들은 90°C 15분 열처리에는 안정하나 그 이상의 열처리에서는 불활성화되었다. 두균이 생산하는 bacteriocin은 pepsin이나 trypsin 처리에는 영향이 없지만 proteinaseK나 pronase 처리에 의해서는 저해효



과가 상실되었다.

### 감사의 글

본 연구는 1995년도 한국학술진흥재단 자유공모과제 연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- Shibasaki, I. : Food preservation with non-traditional antimicrobial agent. *J. Food Safety*, **4**, 35(1982)
- Palumbo, S. A. : Is refrigeration enough to restrain food-born pathogens. *J. Food Protec.*, **12**, 1003(1986)
- Kornacki, J. L. and Gabis, D M : Microorganisms and refrigeration temperatures. *Dairy Food Environ. Sanit.*, **10**, 192(1990)
- O'Sullivan, M. G., Thornton, G., O'Sullivan, G. C. and Collins, J. K. : Probiotic bacteria: myth or reality *Trends in Food Sci. Tech.*, **3**, 309(1992)
- Havenaar, R. and Huis Veld, J. H. J. : Probiotics . A general view In "The lactic acid bacteria in health and disease" Wood, B. J. B (ed.), Elsevier Applied Science, p.151(1992)
- 한홍익, 박현근 : Bromophenol blue 배지상에서 유산균들의 분별측정. 인하대학교 기초과학연구소 논문집, **12**, 89(1991)
- de Man, J C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. : A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130(1960)
- Kandler, O and Weiss, N. : Genus *Lactobacillus* In "Bergey's manual of systematic Bacteriology" Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E and Holt, J. G.(eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 2, p.1208(1986)
- Daeschel, M. : Procedures to detect antimicrobial activities of microorganisms In "Food biopreservatives of microbial origin" B. Ray and Daeschel, M (eds) CRC Press, Boca Raton, p57(1992)
- Buchman, G. W., Banerjee, S and Hansen, J N : Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.*, **263**, 16260(1988)
- Terzaghi, B. E. and Sandine, W. E. : Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages *Appl Microbiol*, **29**, 807(1975)
- O'Sullivan, D. J. and Klaenhammer, T. : Rapid mini-prep isolation of high quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ. Microbiol.*, **59**, 2730(1993)
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : *Molecular cloning*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor., 6.3(1989)
- 최무영, 최은정, 이은, 차배천, 박희준, 임태진 : 솔잎즙의 첨가가 김치의 발효속성에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지, **25**, 899(1996)
- Taylor, L. Y., Cann, D. D. and Welch, B. J. : Antibotulinal properties of nisin in fresh meat packaged in an atmosphere of carbon dioxide. *J. Food Prot.*, **53**, 953(1990)
- Ray, B. Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as a food biopreservative. In "Food biopreservatives of microbial origin" B Ray and Daeschel, M (eds.) CRC Press, Boca Raton, p.207(1992)
- Hammes, W. P., Weiss, N. and Holzapfel, W. : The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In "The prokaryotes" Balows, A., Truper, H G., Dworkin, M, Harder, W. and Schleifer, K.-H.(eds.), 2nd ed., Springer-Verlag, New York, p.1535(1992)
- Fujisawa, T., Benno, Y., Yaeshima, T. and Mitsuoka, T. : Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group. with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsoni* sp nov and Synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3(Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus*(Nakamura 1981). *Int. J. Syst. Bacteriol*, **42**, 487(1992)
- Joerger, M. C. and Klaenhammer, T. R. : Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin *J. Bacteriol.*, **172**, 6339(1990)
- Kawai, Y, Sato, T, Toba, T., Samant, S K., Itoh, T. : Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin(Gasserin A) from *Lactobacillus gasserii* LA39. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1218(1994)
- Gasson, M J. and Fitzgerald, G. F. : Gene transfer systems and transposition. In "Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria" Gasson, M. J. and de Vos, W M (eds ), Blackie Academic & Professional, London, p.1(1994)

(1997년 7월 21일 접수)