

Lactobacillus acidophilus GP4A가 생산하는 박테리오신의 특성 및 정제

한경식 · 주관석 · 김세현
고려대학교 자연자원대학 응용동물과학과

Characteristics and Purification of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* GP4A

K. S. Han, K. S. Joo and S. H. Kim

Department of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University

ABSTRACT

A bacteriocin produced by *Lab. acidophilus* GP4A isolated from fecal contents of pig was characterized. *Lab. acidophilus* GP4A produced a heat-stable and pH-resistant bacteriocin, which was hydrolyzed by trypsin and pepsin and active against various microorganisms. *Lab. acidophilus* GP4A produced bacteriocin at maximum rate when grown in MRS broth (pH 6.5~7.5) at 37°C or 40°C. The bacteriocin produced by *Lab. acidophilus* GP4A inhibited the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 4797 in early logarithmic phase. The bacteriocin was purified by ammonium sulfate precipitation and Octyl sepharose CL-4B column chromatography. The purification resulted in a final yield of 21.7% and a 13.6-fold increase in the specific activity.

(Key word : *Lactobacillus acidophilus* GP4A, bacteriocin, Octyl sepharose CL-4B column chromatography)

I. 서 론

유산균들은 다양한 발효식품의 생산과 저장성 향상 및 사람을 포함한 각종 동물의 장내에 서식하여 미생물총을 조절하고 건강을 증진시키는 등의 중요한 역할을 담당한다^{8,22)}. 특히, 유산균이 생산하는 항미생물성 물질 중 박테리오신은 천연

단백질성 물질로 유전적 조작을 통해 생산이 조절될 수 있고 다양한 식품내 존재하는 병원성 및 부패성 균들의 성장을 억제할 수 있어 박테리오신을 이용한 천연식품보존제 개발에 관련된 연구들이 점차 증가되고 있는 추세이다^{4,7,10,21)}. 현재 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 균주가 생산하는 박테리오신인 nisin은 FDA(Food & Drug Administration)가 식품 첨가물로 인정하여 약 50

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단의 박사후 연수과정 연수비지원에 의하여 연구되었음.

여개국의 나라에서 가공치즈, 캔식품 등의 식품 보존제로 사용되고 있다^{12,14)}. 그러나 식품의 저장성 향상을 위하여 박테리오신 및 박테리오신 생산유산균을 사용할 때 식품내 존재하는 단백질분해효소에 의한 박테리오신 활성 저하, 대상균주의 저항성 증가 등 복잡한 요소를 고려해야 하며⁹⁾ 사용될 박테리오신의 생화학적 특성, 구조, 작용기작 및 높은 활성회수율의 정제방법 등을 조사해야 한다. 지금까지 연구되어진 결과를 토대로 박테리오신은 크게 4개의 그룹 즉, antibiotics로 불려지는 박테리오신(Class I), 비교적 열에 안정한 hydrophobic peptides인 박테리오신(Class II), 일반적으로 열에 불안정한 큰 분자량의 박테리오신(Class III) 및 지방, 당 등과 결합된 박테리오신(Class IV) 등으로 구분할 수 있다¹⁷⁾. 이러한 박테리오신 생산 유산균 중 lactobacilli 균주의 경우, De Klerk와 Coetzee¹¹⁾가 최초로 11개의 homofermentative 균주와 1개의 heterofermentative 균주로부터 다른 *Lactobacillus*(*Lab.*) sp. 균주에 대해 항균작용을 보이는 박테리오신을 분리하였으며 그 후 *Lab. plantarum*, *Lab. helveticus*, *Lab. casei*, *Lab. sake* 등의 다양한 균주가 생산하는 박테리오신에 관한 연구결과가 보고되어 왔다^{1,15,20,24)}. 본 연구는 돼지의 장으로부터 분리하여 동정된 *Lab. acidophilus* GP4A 균주가 생산하는 박테리오신의 특성과 정제방법을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주

돼지의 장에서 분리하여 고려대학교 유가공학 연구실에 보관중인 *Lab. acidophilus* GP4A 균주를 사용하였으며 지시균으로는 *Lab. delbrueckii* subsp. *lactis* 4797과 다양한 병원성 균주 및 유산균주를 사용하였다.

2. 박테리오신 활성을 함유한 cell free spent broth의 제조

MRS 배지에 *Lab. acidophilus* GP4A 균주를 37°C에서 18시간동안 3차 계대배양시키고 원심분리(8,000×g, 10 min)하여 상정액을 회수하였다. 이렇게 회수된 상정액을 10N NaOH를 사용하여 pH를 6.5로 조정하고 다시 acrodisc filter (Geman, Ann Arbor, MI)로 여과하여 무균상태인 screw cap test tube에 주입하였다. 이 상정액은 사용할 때까지 4°C에서 보관, 저장하였다.

3. 박테리오신 항균활성의 검출

박테리오신 활성을 함유한 시료를 무균상태의 증류수를 사용하여 연속 2진식 희석을 행하고 각 희석된 액을 지시균이 접종된 평판배지 표면에 접종하여 배양하는 연속희석식 박테리오신 활성 검출(serial dilution assay)방법을 사용하였다. 평판배지는 지시균이 접종된 MRS agar를 무균상태의 petri dish에 붓고 고형화시킨 후 사용하였으며 37°C에서 24시간동안 배양시킨 다음 배지상의 박테리오신 저해작용을 보이는 투명부위의 존재 유무를 판명하였다. 배양 후 지시균의 성장을 저하시키는 가장 높은 희석률을 측정하였으며 그 희석배수의 역수를 취해 상대적 활성도(Arbitrary units or inhibitory activity units, AU)로 표현하였다.

4. 효소처리와 고온고압처리에 의한 항균 활성 변화 조사

Cell free spent broth내 항균효과를 보이는 물질이 단백질성 물질인지 여부를 알아보기 위하여 Ferreira와 Gilliland¹³⁾가 사용하였던 방법으로 Trypsin(pH 7.6; Type II, crude)과 Pepsin(pH 2.0; E.C. NO. 3.4.23. I)을 처리하였으며 과산화수소에 의한 영향을 배제시키기 위하여 Catalase(pH 7.0; E.C. NO. I. II. I.6)를 처리하였다. 또한 121°C에서 15분동안 고온고압처리하여 항균활성의 변화를 조사하였다.

5. pH 및 열 안정성

Cell free spent broth를 1N HCl과 1N NaOH를 사용하여 각각 pH 2에서 12까지 pH 1씩 증가시킨 후 24시간동안 4℃에서 보관하고 다시 pH를 6.5로 조정 한 후 박테리오신 활성을 측정하였다. 또한 상정액을 다양한 온도(65℃, 95℃, 121℃)에서 20분, 40분, 60분동안 가열하고 상온으로 냉각시킨 후 박테리오신 활성을 조사하였다.

6. 배양온도에 따른 박테리오신 활성 조사

Lab. acidophilus GP4A 균주를 MRS 배지에 접종하여 다양한 온도(31℃, 34℃, 37℃, 40℃)에서 18시간동안 배양시킨 후 원심분리하고 상정액의 박테리오신 활성을 조사하였다.

7. 배지 pH에 따른 박테리오신 활성 조사

MRS 배지를 pH 5.0에서 9.0까지 0.5씩 증가시킨 후 *Lab. acidophilus* GP4A 균주를 접종시키고 37℃, 18시간동안 배양하였다. 원심분리하여 상정액을 회수하고 박테리오신 활성을 조사하였다.

8. Sensitive strain에 대한 항균작용 특성 조사

MRS 배지에 *Lab. delbrueckii* subsp. *lactis* 4797을 접종시키고 초기부터 2시간 간격으로 8시간까지 박테리오신 활성을 함유한 cell free spent broth를 두가지 농도(1%, 5%)로 첨가하여 595nm에서 지시균 성장배지의 흡광도를 측정하였다. 또한 약 2×10^8 CFU/ml로 지시균이 접종된 MRS broth에 박테리오신 활성을 함유한 cell free spent broth를 다양한 농도(Control, 1%, 5%, 10%)로 첨가하고 0.5, 1, 2, 3, 4시간에 MRS agar을 사용하여 지시균의 생존균수를 측

정하였다.

9. 저장기간에 따른 박테리오신 활성 변화 조사

Lab. acidophilus GP4A균주를 MRS 배지에서 37℃, 18시간동안 3차 계대배양시킨 후 원심분리하여 상정액을 회수하고 멸균상태로 4℃에서 약 2달동안 저장하면서 박테리오신 활성의 변화를 측정하였으며 SAS program을 사용하여 분산분석하였다.

평균간 차이 검정은 LSD(Least Significant Difference)방법을 사용하였다.

10. 박테리오신의 분별 및 정제

1) 단백질 정량

각 시료의 단백질 함량은 Brad-ford법을 사용하여 측정하였다⁶⁾.

2) Ammonium sulfate를 이용한 조박테리오신의 조제

MRS broth에서 37℃, 18시간동안 배양시킨 *Lab. acidophilus* GP4A 균주의 배양액을 10,000 ×g, 30분동안 원심분리하여 cell을 제거하고 남은 상정액에 50% 농도가 되도록 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가하여 교반시킨 후 다시 원심분리하여 침전물을 회수하였다.

3) Octyl sepharose CL-4B 수지를 이용한 column chromatography

Phosphate buffer(0.05M, pH 7.0) 200ml와 ammonium sulfate(1.7M)를 첨가한 phosphate buffer 200ml를 gradient 용액으로 사용하여 시료를 흡착시키고 다시 증류수와 100% ethyl alcohol 용액 각각 200ml를 gradient 용액으로 사용하여 400ml를 용출시켰다. 용출속도는 80ml/h로 유지하였으며 10ml씩 총 800ml를 회수하였으며 각 fraction은 280nm에서 OD값을 측정한다. 다음 serial dilution assay를 사용하여 활성을

측정하고 박테리오신 분획을 회수하여 다음 실험에 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

돼지의 장에서 분리, 동정된 *Lab. acidophilus* GP4A 균주는 *Lab. delbrueckii* subsp. *lactis* 4797을 지시균으로 사용한 평판배지 검사법을 실시하였을 때 지시균의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 항균작용이 박테리오신에 기인한 것인지 여부를 조사하기 위하여 cell free spent broth를 제조한 다음 pH를 6.5로 조정하고 단백질 분해효소와 과산화수소분해효소를 처리하였으며 121℃에서 15분간 고온고압처리를 실시하였다. 그 결과 trypsin과 pepsin에 의해 항균활성이 소실되었으나 catalase 처리에 의해 항균활성의 변화는 발생하지 않았고 고온고압에서도 항균활성이 완전히 소실되지 않았기에 일반적으로 이러한 특성을 보이는 단백질성 물질인 박테리오신에 의해 항균작용이 나타남을 알 수 있었다. 다른 연구자들의 보고에 따르면 *Lab. plantarum* SIK-83이 생산하는 박테리오신의 경우 trypsin과 pepsin 효소를 처리하였을 때 본 연구와 동일한 결과가 산출되었으며²⁾ *Lab. curvatus* LTH1174가 생산하는 curvacin A는 proteinase K와 trypsin에 의해 활성이 소실된 반면 pepsin에 의해서는 활성의 소실이 발생하지 않았고 *Lab. acidophilus* LA-PT1060이 생산하는 박테리오신인 acidophilucin A와 *Lab. reuteri* LA6가 생산하는 reutericin 6는 actinase E와 trypsin에 민감한 단백질성 물질임이 보고되었다²⁴⁻²⁶⁾. 또한, *Lab. acidophilus* LF 221이 생산하는 박테리오신은 trypsin, pepsin, pronase 및 proteinase K 등 다양한 효소에 민감한 것으로 나타났다⁵⁾.

Lab. acidophilus GP4A 균주의 항균작용범위를 알아보기 위하여 병원성 균주를 포함한 총 17종의 균주들을 대상으로 조사한 결과는 Table 1과 같다. 총 9종의 균주에 대하여 항균작용을 나타냈으며 *Lactococcus* sp. K2 균주와 *Acinetobacter*

Table 1. Inhibitory spectrum of bacteriocin produced by *Lab. acidophilus* GP4A

Indicator organism	GP4A
<i>E. coli</i> O157-89	-
<i>E. coli</i> O157-93	-
<i>E. coli</i> O157-94	-
<i>E. coli</i> O157-95	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Yersinia enterocolita</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Listeria ivanovii</i>	-
<i>Listeria innocua</i>	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	++
<i>Bacillus cereus</i>	+
<i>Bacillus subtilis</i>	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	++
<i>Lactococcus</i> sp. K2	+++
Fecal Streptococci	+

+ indicates the presence of zone of inhibition; - indicates the absence of zone of inhibition on the agar seeded with indicator culture.

baumannii, *Bacillus subtilis*, *Lab. plantarum*에게 비교적 강한 성장억제작용을 나타내었다. *Lab. sake* LTH673이 생산하는 sakacin P는 *Carnobacterium* sp., *Enterococcus faecalis*, *Listeria* sp. 균주 등의 성장을 억제하였다고 보고되었으며²⁰⁾ *Lab. acidophilus* TK9201이 생산하는 acidocin A는 조사되어진 5종의 *Listeria monocytogenes* 모두와 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* 속에 속하는 많은 균주들의 성장을 억제할 수 있었다고 보고되었다⁶⁾. 또한, *Lab. acidophilus* LF221이 생산하는 박테리오신은 *Bacillus cereus*, *Clostridium* sp., *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* D. 등 다양한 균주들에 대하여 항균작용을 나타내었다⁵⁾. 본 연구에 사용되어진

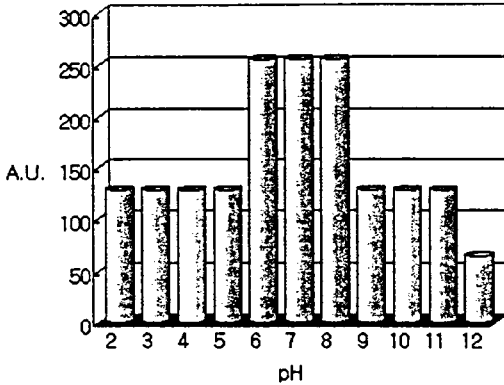


Fig. 1. Effect of pH on the bacteriocin activity produced by *Lab. acidophilus* GP4A

박테리오신도 일반적으로 생산균주와 가까운 종에게만 억제작용을 나타내는 다른 박테리오신에 비해 비교적 넓은 범위의 항균작용을 나타냄을 알 수 있었으며 현재 더 많은 병원성균들을 대상으로 검색 중에 있다.

다양한 범위의 pH가 생산된 박테리오신의 활성에 미치는 효과를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 중성 pH에 가까운 pH 6과 8 사이에서는 어떠한 활성의 소실도 보이지 않았으며 pH 2~5와 pH 9~11 범위에서는 활성이 50% 소실되었고 pH 12에서는 75% 소실되는 것으로 나타났다. 이와는 다르게 *Lab. acidophilus* AC1이 생산하는 박테리오신은 pH 4.0~7.5사이에서만 활성을 유지하였으며¹⁸⁾ *Lab. acidophilus* M46과 *Lab. reuteri* LA6이 생산하는 박테리오신은 각각 pH 2.0~12.0 및 pH 4.0~10.0에서 안정한 것으로 나타나 같은 latobacilli 속 균주들이 생산하는 박테리오신도 산성 및 알칼리성에 대한 민감성 정도가 상이함을 알 수 있었다^{23,25)}. 따라서 본 실험에 사용된 박테리오신은 지금까지 조사되어진 다른 박테리오신에 비해 비교적 넓은 범위의 pH에 노출되어도 그 활성을 유지하는 것을 알 수 있었다.

다양한 온도 즉 65℃, 95℃, 121℃에서 20분, 40분 60분 동안 열처리한 후 박테리오신의 활성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 그 결과, 65℃에서 20분동안 열처리하여도 어떠한 활성의 변화도

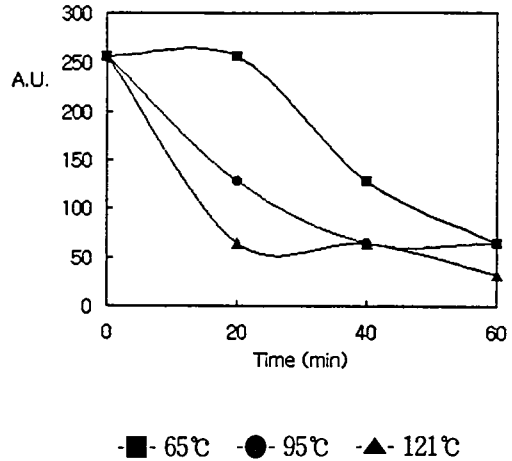


Fig. 2. Changes of the bacteriocin activity produced by *Lab. acidophilus* GP4A during heat treatment at different temperatures.

발생하지 않았으며 121℃, 60분 열처리시에도 완전하게 활성이 소실되지 않았다. 반면, *Lab. casei* B80이 생산하는 caseincin 80은 60℃에서 10분만 가열하여도 그 활성이 완전히 소실되었고²⁰⁾ *Lab. acidophilus* AC1이 생산하는 박테리오신도 50℃에서 20분만 가열하여도 그 활성을 나타내지 못하였다¹⁸⁾. 그러나 *Lab. sake*가 생산하는 lactocin S는 100℃에서 1시간동안 가열시 약 50%정도만의 활성이 소실되는 것으로 보고되었다¹⁹⁾. 따라서 지금까지 연구되어 온 lactobacilli 균주의 박테리오신들에 비해 본 연구에 사용한 박테리오신은 넓은 범위의 열처리 조건에서도 비교적 높은 열안정성을 보이는 것으로 나타났다.

박테리오신의 적정 생산조건을 탐색하기 위하여 가장 높은 활성의 박테리오신을 생산하는 배양온도를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 18시간동안 4종류의 온도에서 배양시킨 후 박테리오신의 활성을 조사한 결과 31℃와 34℃에 비해 37℃와 40℃에서 가장 높은 활성의 박테리오신을 생산하는 것으로 나타났다. 각 온도간의 균 성장면에서의 차이는 나타나지 않았지만 31℃와 34℃에서는 박테리오신의 생산이 미비한 것을 알 수 있었다. 또한 최대 활성의 박테리오신 생산을 위한 적정

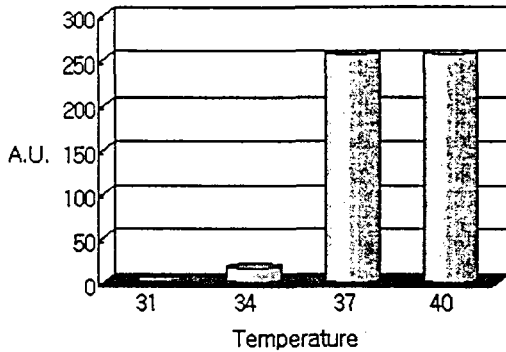


Fig. 3. The activity of bacteriocin produced by *Lab. acidophilus* GP4A in MRS broth at different incubation temperatures.

배지 pH를 조사하기 위하여 배지 pH를 5.0~9.0 사이에서 0.5씩 증가시키어 조정 한 후 생산된 박테리오신의 활성을 조사한 결과 pH 6.5~7.5에서 가장 높은 활성의 박테리오신이 생산되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 그러나 *Lab. acidophilus* TK9201이 생산하는 acidocin A는 pH 6.0, 6.5 또는 7.0에 비해 pH 5.0의 배지에서 12시간동안 배양하였을 때 가장 높은 활성을 함유한 박테리오신을 생산하는 것을 알 수 있었으며¹⁶⁾ salivacin 140을 생산하는 *Lab. salivarius* subsp. *salivarius* T140은 박테리오신의 생산을 위하여 초기

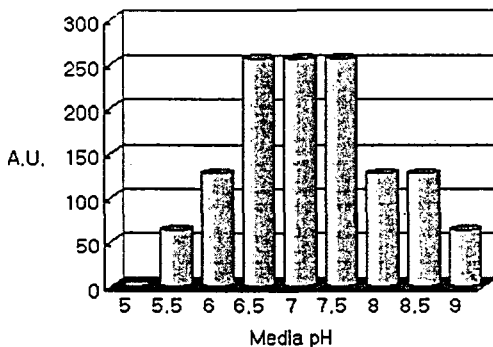


Fig. 4. The activity of bacteriocin produced by *Lab. acidophilus* GP4A at different pH MRS broths.

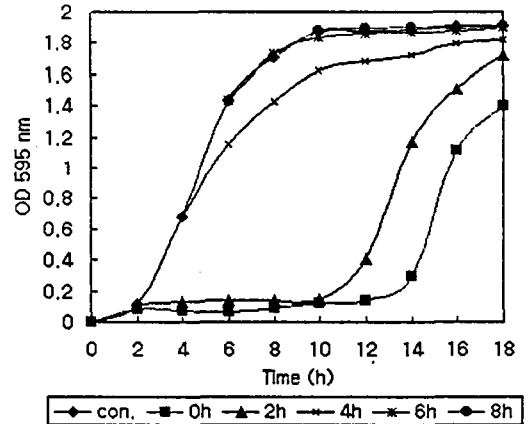


Fig. 5. Growth curves of *Lab. delbrueckii* subsp. *lactis* 4797 in MRS broth. Bacteriocin produced by *Lab. acidophilus* GP4A was added (1%) to growing cultures at different phases.

에 높은 pH(7.5~8.5)를 요구한다고 보고되었다³⁾.

Lab. acidophilus GP4A가 생산하는 박테리오신이 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 4797 지

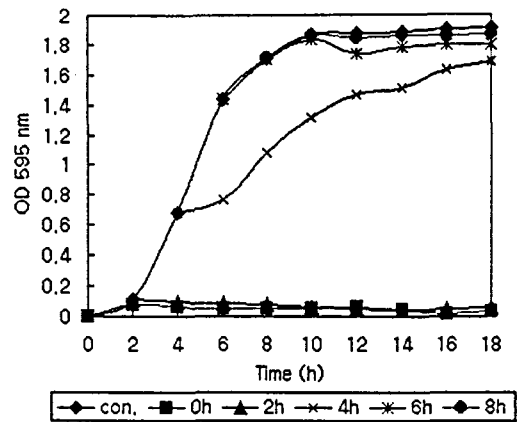


Fig. 6. Growth curves of *Lab. delbrueckii* subsp. *lactis* 4797 in MRS broth. Bacteriocin produced by *Lab. acidophilus* GP4A was added (5%) to growing cultures at different phases.

시균의 성장에 미치는 억제 양상을 조사하기 위하여 cell free spent broth를 지시균이 접종된 배지에 각각 1%와 5% 농도로 초기, 2시간후, 4시간후, 6시간후, 8시간후 첨가한 뒤 595nm에서 지시균 성장 배지의 흡광도를 측정된 결과 5%로 첨가시 초기와 2시간 후에 첨가하였을 때 지시균의 성장이 18시간까지 억제되었으나 1%로 첨가시에는 12~14시간 이후에 다시 급성장하여 그 항균능력이 저하됨을 알 수 있었다(Fig. 5와 6). 또한 두 농도 모두 4시간 이후에 첨가되었을 때는 그 성장 양상과 최종농도는 다르지만 항균능력이 저하되었다. 그리고 약 2×10^8 CFU/ml로 지시균이 접종된 MRS broth에 cell free spent broth를 각각 1%, 5%, 10%로 첨가하고 지시균의 생존균수를 조사한 결과 1%에서는 항균작용

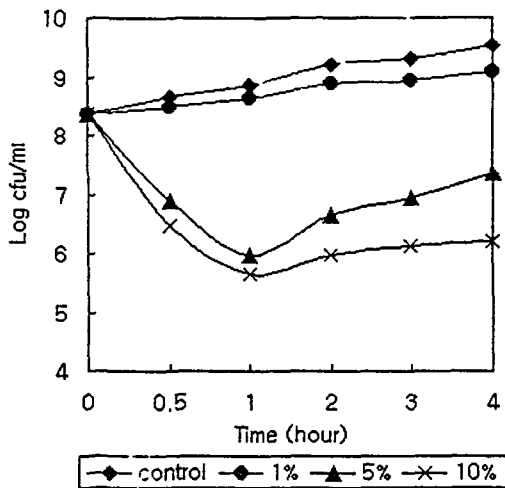


Fig. 7. Survival curves of *Lab. delbrueckii* subsp. *lactis* 4797 in MRS broth. Bacteriocin produced by *Lab. acidophilus* GP4A was added to growing cultures in different concentrations.

이 미비하였으나 5%와 10%로 첨가시 억제작용이 높아지는 것을 알 수 있었고 4시간후의 지시균의 최종 농도는 각각 약 10배와 100배씩 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 7).

박테리오신이 함유된 cell free spent broth를 4°C에 저장하면서 그 활성의 변화를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 그 결과 약 30일까지는 박테리오신 활성이 유지되었고 그 이후부터는 유의적으로 감소하는 경향을 보여주었다($p < 0.05$).

Lab. acidophilus GP4A가 생산하는 박테리오신을 ammonium sulfate를 사용하여 침전시키고 이 침전물을 시료로 사용하여 hydrophobic 특성을 이용한 Octyl sepharose CL-4B column chromatography를 실시한 결과는 Table 3에 요약되어 있다. 약 21.7%의 활성 회수율을 보여주었으며 13.6배의 정제도를 나타냈다. Fig. 8과 같이 용출양상은 ammonium sulfate가 첨가된 phosphate buffer를 사용하여 시료를 흡착시키는

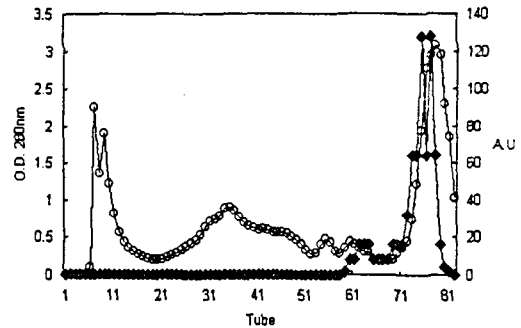


Fig. 8. Elution profile of ammonium sulfate precipitate of inhibitory activity produced by *Lab. acidophilus* GP4A on Octyl sepharose CL-4B. Each 10ml fraction was monitored at 280nm and was assayed for inhibitory activity.

Table 2. Changes of the bacteriocin activity produced by *Lab. acidophilus* GP4A during storage periods.

Strain	Days							
	0	5	10	20	30	40	50	60
GP4A	128.0 ^a	106.7 ^a	106.7 ^a	128.0 ^a	106.7 ^a	32.0 ^b	26.7 ^b	32.0 ^b

^{a, b} The values followed by the same letters within a column are not significantly different at the probability of 5% level.

Table 3. Purification of bacteriocin produced by *Lab. acidophilus* GP4A

	Spent broth	Precipitate	Octyl sepharose CL-4B
Volume(ml)	920	7.5	50
Protein concent. (mg/ml)	0.17	3.39	0.05
Total protein (mg)	156.4	25.4	2.5
Bacteriocin activity(AU/ml)	32	2,048	128
Total activity (A.U.)	29,440	15,360	6,400
Specific activity (AU/mg)	188.2	604.7	2560.0
Activity recovered (%)	100	52.2	21.7
Purification(fold)	1.0	3.2	13.6

단계에서는 어떠한 박테리오신도 용출되지 않았으며 후반부에 ethyl alcohol 용액을 gradient로 사용하여 분별을 실시하였을 때 박테리오신 활성을 함유한 2개의 첨예한 peak가 용출되었다. Tichaczek 등²⁰⁾은 ammonium sulfate, cation exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography법 등을 사용하여 curvacin A를 정제하였으며 약 3,000Da의 분자량을 가진 박테리오신임을 입증하였다. 또한, Rammelsberg와 Radler²⁰⁾는 caseicin 80을 ultrafiltration과 cation exchange chromatography를 사용하여 농축하였으며 그 결과 40,000~42,000Da의 박테리오신이었음을 보고하였다. 그리고 *Lab. acidophilus* TK9201이 생산하는 acidocin A의 정제를 위하여 ammonium sulfate와 carboxymethyl-cellulose 수지, sep-pak cartridge 및 aquapore RP-300을 이용한 다양한 column chromatography 법을 실시하였을 때 약 10%의 활성 회수율과 3,000배의 정제도를 나타내었으며 6,400Da의 박테리오신임을 알 수 있었다. 본 실험에 사용된 박테리오신은 centricon (microconcentrator)를 사용하여 분자량을 추정 한 결과 최소한 30,000이상의 큰 분자량의 박테리오신임을 알 수 있었으며 현재 다양한 column chromatography법과 전기영동을 실시하여 최대 활성을 유지할 수 있는 정제방법 및 분자량을 조사 중에 있다.

IV. 요약

돼지의 장에서 분리된 *Lab. acidophilus* GP4A가 생산하는 박테리오신은 trypsin과 pepsin에 민감한 단백질성 물질이며 조사되어진 총 17종의 균주들 중 *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Yersinia* 속 등에 대하여 항균작용을 나타내었다. 또한 넓은 pH 조건에서도 안정하였으며 65℃에서 20분 가열시에는 어떠한 활성의 변화도 보이지 않았고 특히 121℃에서 60분 가열시에도 완전하게 활성이 소실되지 않았다. 최대 활성의 박테리오신을 생산하기 위하여 적정 배양온도와 배지 pH를 조사한 결과 37℃ 및 40℃에서 그리고 MRS 배지 pH가 6.5~7.5 사이인 경우, 가장 높은 활성의 박테리오신이 생산되었다. 또한 *Lab. delbrueckii* subsp. *lactis* 4797이 접종된 배지에 접종 초기와 2시간 후에 5% 농도로 cell free spent broth를 첨가시 18시간까지 성장을 억제할 수 있었으며 2×10⁸ CFU/ml로 지시균이 접종된 배지에 5%와 10%로 첨가시에는 4시간 후 지시균의 생균수가 각각 약 10배 및 100배 정도 감소됨을 알 수 있었다. 그리고, 박테리오신은 cell free spent broth에서 냉장온도에 저장시 약 30일까지 활성이 유지되었으며(p<0.05) ammonium sulfate를 50%농도로 처리하고 침전물을 회수하여 Octyl sepharose CL-4B column chromatography를

실시한 결과 21.7%의 활성 회수율과 13.6배의 정제도를 보여주었다.

V. 참고문헌

1. Andersson, R. : Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of Gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. Int. J. Food Microbiol. 3:149-160 (1986).
2. Andersson, R.E., Daeschel, M.A. and Hassan, H.M. : Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Biochimie. 70:381-930 (1988).
3. Arihara, K., Ogihara, S., Mukai, T., Itoh, M. and Kondo, Y. : Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* T140 active against pathogenic bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 22:420-424 (1996).
4. Berry, E.D., Liewen, M.B., Mandigo, R. W. and Hutkins, R.W. : Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. J. Food Prot. 52:194-197 (1990).
5. Bogovic-Matijasic, B., Rogelj, I., Nes, I. F., and Holo, H. : Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:606-612 (1998).
6. Bradford, M. : Anal Biochem. 72:248 (1976).
7. Daeschel, M.A. : Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages, p. 63-91. In D. G. Hoover and L. R. Steenson(cd.), Bacteriocin of lactic acid bacteria. Academic Press, Inc., New York (1993).
8. Daeschel, M.A. : Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43:164-167 (1989).
9. Davies, E.A. and Adams, M.R. : Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin, nisin. Int. J. Food Microbiol. 21:341-347 (1994).
10. De Vuyst, L. and Vandammen, E.J. : Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and Professional, London, England (1994).
11. De Klerk, H.C. and Coetzee, J.N. : Antibiosis among lactobacilli. Nature. 192:340-341 (1961).
12. Delves-Broughton J., Blackburn, P. Evans, R.J. and Hugenholtz. J. : Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie Van Leeuwenhoek. 69:193-202 (1996).
13. Ferreira, C.L. and Gilliland, S.E. : Bacteriocin involved in premature death of *Lactobacillus acidophilus* NCFM during growth at pH 6. J. Dairy Sci. 71:306 (1988).
14. Hurst, A. : Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. p327 in antimicrobials in food. A.L. Branen and P. M. Davidson, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY (1983).
15. Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R. : Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 167:439-446 (1986).
16. Kanatani, K., Oshimura, M. and Sano, K. : Isolation and Characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. Appl. En-

- viron. Microbiol. 61:1061-1067 (1995).
17. Klaenhammer, T.R. : Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press, New York. pp151-180(1993).
 18. Mehta, A.M., Patel, K.A. and Dave, P.J. : Purification and properties of the inhibitory protein isolated from *Lactobacillus acidophilus* AC1. Microbios. 38:73-81 (1983).
 19. Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K. and Nes, I.F. : Purification and amino acid sequence of latocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environ. Microbiol. 57:1829-1834 (1991).
 20. Rammelsberg, M. and Radler, F. : Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus species*. J. Appl. bacteriol. 69:177-184 (1990).
 21. Ray, B. and Daeschel, M.A. : Bacteriocins of starter culture bacteria, p. 133-165. In V.M. Dillon and R.G. Board(cd.), Natural antimicrobial systems and food preservation. CAB Interactional, Wallingford, United Kingdom (1994).
 22. Sandine, W.E. : Role of *Lactobacillus* in the intestinal tract. J. Food Protect. 42: 259 (1979).
 23. Ten Brink, B., J. Huisin't Veld, H.J. and Minekus, M. : Antimicrobial activity of *Lactobacillus* M46: optimization of production and partial characterization. FE-MS Microbiol. Rev. 87. p91 (1990).
 24. Tichaczek, P.S., J. Nissen-Meyer, I.F., Vogel, R.F. and Hamme, W.P. : Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. System. Appl. Microbiol. 15:460-468 (1992).
 25. Toba, T., Samant, S.K., Yoshioka, E. and Itoh, T. : Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. Lett. Appl. Microbiol. 13:281-286 (1991a).
 26. Toba, T., Yoshioka E. and Itoh, T. : Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. Lett. Appl. Microbiol. 12:106-108 (1991b).