

## 젓갈에서 분리한 *Lactococcus lactis* SA72에 의한 Lacticin SA72의 생산 최적화

백현동\* · 구경모 · 김진곤 · 이나경  
경남대학교 생명과학부

**Optimization for Lacticin SA72 Production by *Lactococcus lactis* SA72 Isolated from Jeot-gal.** Paik, Hyun-Dong\*, Kyoung-Mo Koo, Jin-Gon Kim, and Na-Kyoung Lee. Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea - *Lactococcus lactis* SA72 from Jeot-gal (Korean traditional fermented fish foods) produces lacticin SA72. The influence of several parameters on the fermentative production of lacticin SA72 by *Lactococcus lactis* SA72 was studied. MRS medium among several media was selected for enhanced bacteriocin production. The mean growth rate and bacteriocin productivity of *L. lactis* SA72 increased as the initial pH of the media increases. The highest lacticin SA72 activity was detected 3,200 AU/ml at pH 6.0, 32°C, and 1% (inoculum size, v/v) in the jar fermenter. Enhanced production of lacticin SA72 was investigated by a fed-batch cultivation with the intermittent feeding of the concentrated glucose solution. Under the optimized conditions, lacticin SA72 activity finally reached to 6,400 AU/ml.

**Key words:** *Lactococcus lactis* SA72, bacteriocin, lacticin SA72, fed-batch culture, optimization

유산균은 대표적인 저장식품인 요구르트, 버터, 치즈 같은 유제품 및 김치 등의 발효과정에서 식품의 맛을 개선하는 풍미(flavor)를 부여함과 동시에 식품의 부패를 방지하는 것으로 알려져 있다. 또한, 각종 동물의 장관 내에 서식하며 소화관 내에서 점막의 보호 및 장내 이상발효의 개선, 칼슘의 체내흡수 촉진 등 여러 가지 유익한 생리작용을 나타내기 때문에 정장제와 같은 의약품과 사료첨가제로도 이용되고 있다. 최근에는 유산균에 의한 혈중 cholesterol 저하작용, 면역기능 부활효과가 밝혀졌으며, 특히 면역기능 부활작용은 병원성 세균에 대한 감염 방어 효과, 항암 효과 등의 약리 효능을 갖는다고 알려져 있다. 또한 유산균은 항균력이 있는 것으로도 알려져 있다. 즉, 유산균이 젓산, 초산 등의 유기산의 pH 감소와 과산화수소, diacetyl 및 박테리옌을 포함한 항균성 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다[5].

박테리옌은 미생물이 생산하는 천연의 항균성 단백질(antimicrobial polypeptide)로서 기존의 항생제가 2차 대사산물인데 비해 자신의 유전자로부터 직접 생합성(ribosomal translation)되는 것이 특징이다[6, 9]. 단백질로 이루어져 있는 덕분에 인체에 섭취되는 즉시 소화기관의 단백질가수분해효소에 의해 분해됨으로써 인체에 무독성이고 잔류성이 없다는 측면에서 그 효용이 크게 기대되고 있다. *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* 및 *Carnobacterium* 속의 미생물로부터 많은 박테리옌의 생산

이 보고되고 있다. 박테리옌의 생산은 생육 배지, pH, 온도 등의 배양 조건에 의해 크게 영향을 받는다[13]. 특히 배지의 pH는 박테리옌의 생산에 있어 가장 큰 영향을 주는 인자로 알려져 왔다[3]. 그러나 박테리옌 생산에 미치는 배지의 조성에 대해서 상세하게 연구된 바는 부족하지만, 일반적으로 탄소원으로 glucose, xylose를, 질소원으로 yeast extract 또는 beef extract를 사용하거나, 계면활성제인 Tween 80을 첨가하면 박테리옌의 생산이 증가되는 것으로 알려져 있다[4, 8, 10]. 이밖에도 박테리옌의 유가식 배양과 연속 배양의 결과가 보고되어진 바 있다[2, 7, 11].

젓갈에서 분리된 유산균인 *Lactococcus lactis* SA72에 의해 생산되는 lacticin SA72는 병원성균인 *Listeria monocytogenes*, 식중독균인 *Staphylococcus aureus*와 같은 병원성 및 부패성 그람 양성균에 대해 비교적 넓은 항균 범위를 보였으며, 열(~100°C), 유기용매, pH(2~9)에 대해 안정성이 높은 것으로 보고 되었다[12]. 이 연구는 lacticin SA72를 효율적으로 생산하기 위해, 발효공학적인 면에서 배지, 배양조건 등을 최적화 하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양조건

*Lactococcus lactis* SA72는 lacticin SA72의 생산 균주로 사용되었고, *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 4797은 대상 균주로 사용되었다. 이 균주들은 glycerol stock법으로 -70°C에서 보존하였고, working culture는 15일마다 계대 배양하여 사용하였다. 배양 배지로 MRS medium(Difco, U.S.A.)을 이용하였으며, 32°C에서 배양하였다.

\*Corresponding author  
Tel. 82-55-249-2689, Fax. 82-55-249-2995  
E-mail: hdpaik@kyungnam.ac.kr

### 분석방법

균 농도를 측정하기 위해서 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 당 농도의 측정을 위해서 배양액을 8,000×g(4°C)에 20 분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액으로 glucose analyzer(YSI, U.S.A.)를 이용하여 당 농도를 측정하였다. Lacticin SA72의 활성은 spot-on-lawn method를 이용하여 측정하였다[14]. Spot-on-lawn method는 MRS배지 10 ml에 *L. delbrueckii* ATCC 4797를 접종하여 32°C, 12시간 배양하고, 이 배양액을 0.75% soft agar에 100 µl씩 접종, 혼합한 후 건조된 MRS plate에 overlay하여 실온에 방치하여 건조시켰다. 상등액은 twofold로 희석한 후, overlay한 plate에 5 µl씩 각각 loading하여 32°C, 24시간 배양하여 활성을 확인하였다.

### 실험실용 배지, 초기 당 첨가, 초기 pH의 영향

Lacticin SA72의 생산 최적화를 위해, 실험실용 배지, 초기 당 첨가, 초기 pH의 영향을 200 ml 플라스크 배양을 통해 검토하였다. 일반적으로 유산균 배양에 사용되는 실험실용 배지인 brain heart infusion medium(Difco, U.S.A.), lactobacilli MRS medium(Difco, U.S.A.), M17 medium(Difco, U.S.A.)을 이용하였다. 초기 당 농도의 영향은 0, 0.5, 1.0, 1.5% glucose를 초기에 첨가하여 그 영향을 확인하였다. 초기 pH는 3N NaOH와 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 조절하여 pH 4, 5, 6, 7, 8로 조정한 후 그 영향을 검토하였다.

### 회분식 배양

종균 배양은 보존 중인 균주를 플라스크의 MRS 배지에 한 백금이 접종하고, 32°C, 12시간 배양하였다. 발효조(Korea Fermenter Co., Korea)에서의 배양조건은 발효조의 총 용량은 5 l, 실용량은 MRS 배지 3 l를 넣고 121°C에서 15분간 살균한 후 종배양액을 1%되게 접종한 다음, 배양온도 32°C, 교반속도 200 rpm으로 하였다. 발효조의 pH 조절은 3 N NaOH과 3 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 조절하였고, 시료는 1시간 마다 취하여 균 농도와 박테리오신의 활성을 측정하였다.

### 유기식 배양

유기식 배양은 실용량은 MRS 배지 3 l, 배양온도 32°C, 교반속도 200 rpm, pH 6.0 조절하에서 실시하였고, 포도당의 배지내 농도가 10 g/l가 되게 농축 살균된 포도당 용액을 주기적으로 주입하였다. 시료는 회분식 배양과 마찬가지로 1시간 마다 취해 균 농도, 당 농도, 그리고 박테리오신의 활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 유산균 배양용 배지에서의 lacticin SA72의 생산

박테리오신의 생산은 균주, 배지(탄소원, 질소원, 미량원

소 등), 발효 조건(pH, 온도, 산소의 공급 등)에 의해 영향을 받는다[17].

일반적으로 유산균의 대표적인 배양 배지로는 MRS, M17, BHI 배지가 있다. Lacticin SA72 생산을 위한 최적 배지를 선정하기 위하여 32°C에서 10 ml의 broth에 *L. lactis* SA72를 12시간 전배양하고 이 전배양액을 200 ml 삼각 플라스크에 1% 접종하여 32°C, 12시간, 정치배양으로 최적 배지를

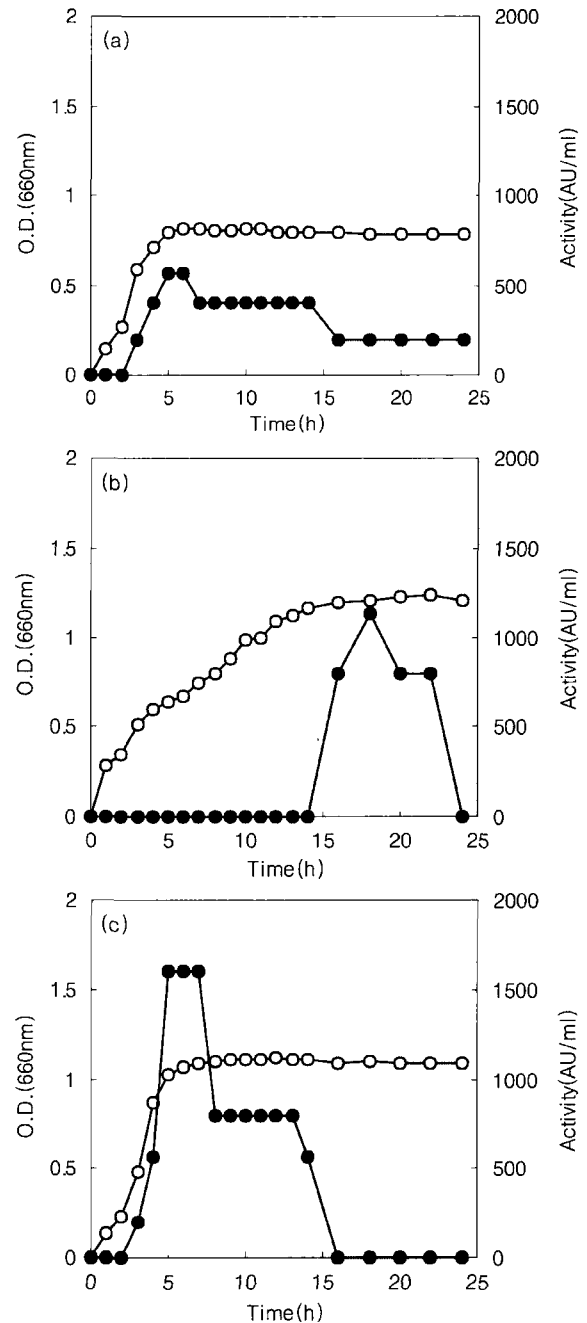
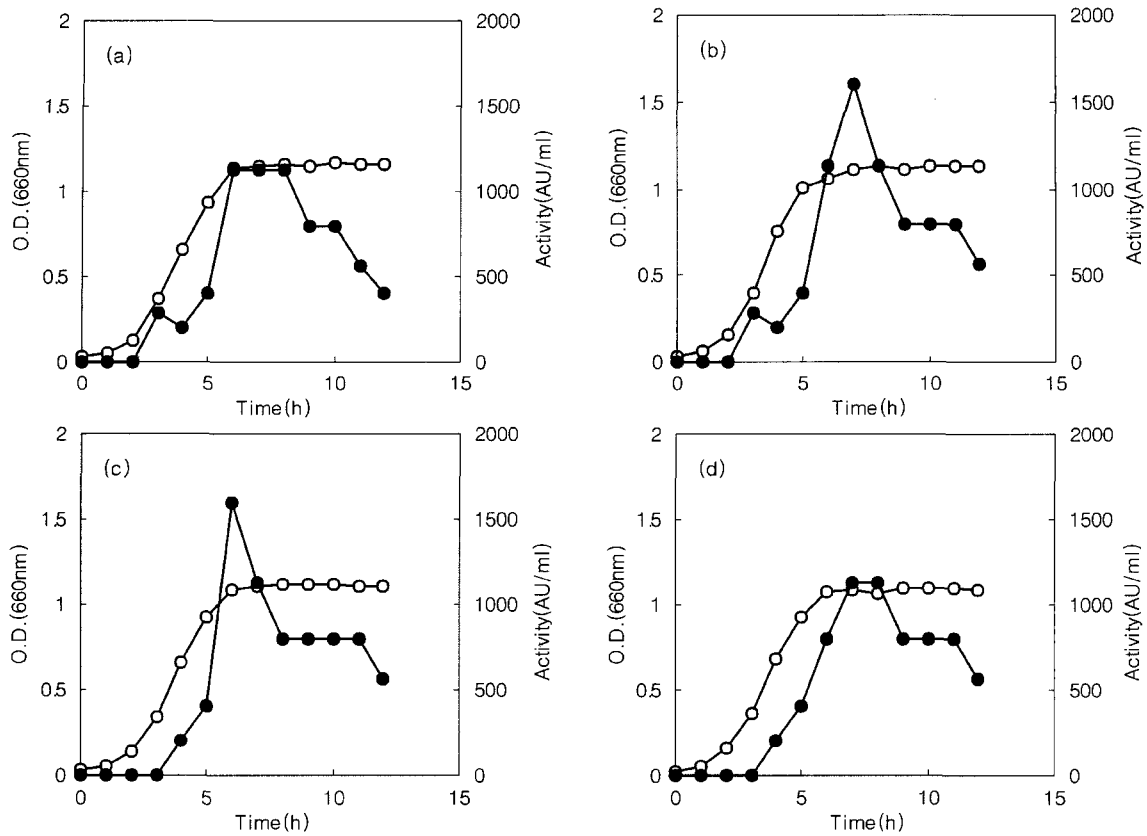


Fig. 1. Effect of medium on cell growth and lacticin SA72 production by *L. lactis* SA72 in flask fermentation. (a) BHI medium; (b) M17 medium; (c) MRS medium. -○- Cell growth; -●- Bacteriocin activity.



**Fig. 2.** Effect of carbon concentration on cell growth and lacticin SA72 production by *L. lactis* SA72 in flask fermentation. (a) MRS medium; (b) MRS+0.5% glucose; (c) MRS+1.0% glucose; (d) MRS+1.5% glucose. -○- Cell growth; -●- Bacteriocin activity.

선정하였다. 균 농도는 M17 배지에서 최고 값을 얻을 수 있었으나, 박테리오신의 생산성의 면에서는 MRS 배지가 최적이었다(Fig. 1). MRS 배지에서 최대 활성은 배양 5시간에 1,600 AU/ml을 나타내었다. 이에 반해, M17 배지에서는, 18 시간에 1,200 AU/ml을 나타내었다. 실험 결과 MRS 배지에서 가장 활성이 높고 균체의 생산 또한 빨라 *L. lactis* SA72 균주의 최적 배지로 MRS배지를 선정하였다(Fig. 1). 실험실용 배지를 이용한 유산균 박테리오신의 생산에 관한 실험은 여러 차례 보고된 바 있다. 가령 *L. lactis* subsp. *lactis* A164는 M17 배지를, *L. lactis* subsp. *lactis* H-559는 MRS 배지를 최적 배지로 보고한 바 있다[5, 13].

#### Lacticin SA72생산을 위한 최적 배지에 첨가할 glucose의 최적농도 선정

첨가할 탄소원의 최적농도를 선정하기 위해, MRS 배지를 기본 배지로 하여 32°C에서 200 ml 삼각 플라스크에서 배양하였다. 대조군은 MRS 배지를, glucose의 농도를 각각 0.5, 1.0, 1.5%로 첨가하여 배양하였다. 실험 결과, 탄소원의 농도에 관계 없이 균체 증식하였고 박테리오신 활성은 MRS 배지에 0.5, 1.5% glucose가 첨가된 배지에서 동일하게 1,200 AU/ml의 활성을 보였다. 이들 결과로, 0.5% glucose를 최적농도로 선정하였다(Fig. 2).

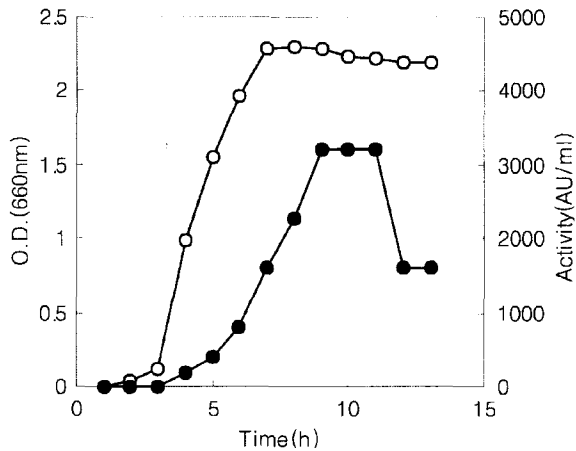
#### Lacticin SA72생산을 위한 초기 pH의 영향

*L. lactis* SA72의 생육 및 박테리오신 생산을 위한 최적의 초기 pH를 결정하기 위하여, 배지의 초기 pH를 각각 4, 5, 6, 7, 8로 조절하고, 32°C에서 정지배양을 하였다. 배지는 MRS배지에 0.5% 포도당이 첨가된 배지를 사용하였다. 실험 결과, pH 4, 5에서는 박테리오신의 생산을 확인할 수 없었다. 균체의 증식은 pH 8에서 가장 높았으며, 다음으로 pH 7, 6순으로 나타났다. 그리고 lacticin SA72의 활성은 pH 7에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 1). 이들의 최종 pH는 약 4.0까지 떨어졌다.

유산균에서 pH의 효과는 잘 알려져 있다. 일반적으로 박테리오신 생산을 위한 최적 pH는 5.5-6.0이다[5, 13, 17]. 이들 대부분은 배양기간 동안 조절하는 경우가 박테리오신의 활성이 더 높은 것으로 보고되어 있다. 이와 마찬가지로, 발효조에서 배양의 경우, lacticin SA72는 초기 pH 7로 배양기간 동안 조절하지 않았을 경우보다 pH 6으로 배양기간 동안 조절하였을 때 활성이 더 높았다. 초기 pH 7에서의 최대 lacticin SA72의 활성은 2,260 AU/ml이었고, pH 6으로 조절하였을 때는 3,200 AU/ml이었다. 이는, 배양 후기에 유기산의 생성에 의한 낮은 pH와 젖산은 유산균의 증식에 저해를 가져오므로 박테리오신의 활성에 영향을 미치는 것으로 보여진다[16].

**Table 1. Effect of initial pH on cell growth and bacteriocin production**

Initial pH	Time of exponential growth (h)	Maximum absorbance at 660 nm	Time for maximum bacteriocin activity (h)	Maximum bacteriocin activity (AU/ml)	Productivity (AU/ml/h)
4	ND <sup>a</sup>	0.1155	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	-
5	ND <sup>a</sup>	0.3498	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	-
6	7	1.1144	9	1,600	178
7	4	1.3858	11	2,260	205
8	4	1.5583	9	1,600	178

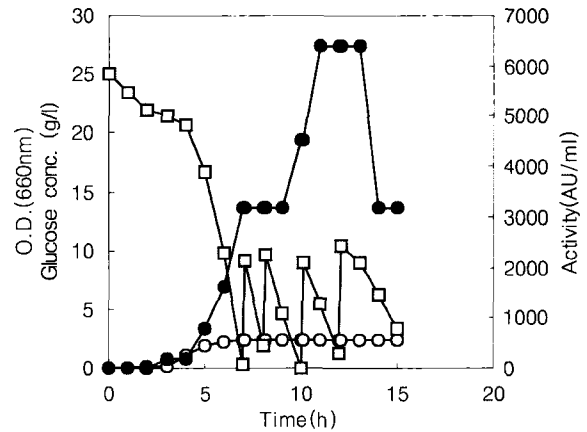
<sup>a</sup>Not determined.**Fig. 3. Cell growth and lacticin SA72 production by *L. lactis* SA72 in jar fermenter.** -○- Cell growth; -●- bacteriocin activity.

#### 발효조에서의 회분식 배양

Lacticin SA72의 생산을 위한 최적의 조건은 MRS 배지에 0.5% glucose를 첨가하고, 32°C, pH 6으로 배양하는 것이었다. 이때 박테리오신의 활성은 8시간째에 3,200 AU/ml로 최대에 도달한 후 감소하였다(Fig. 3). 갑자기 감소한 이유는 영양분의 고갈과 박테리오신을 분해하는 효소를 분비하는 것으로 보여진다[1]. 이와 유사한 결과는 몇몇의 유산균 유래 박테리오신인 nisin, lacticin DP1, sakacin A, sakacin P 등의 생산에서 볼 수 있다[15].

#### 유가식 배양

유가식 배양은 지속적으로 기질을 공급함으로써 기질 저해 또는 이화 생성물 억제를 극복하는데 사용되어진다. 이를 통해 균체 농도를 증가시킬 수 있다. 박테리오신의 생산은 균체 농도와 관련이 있으므로, 높은 박테리오신의 활성을 얻을 수 있을 것이다. 본 실험에서는 10 g/l glucose를 지속적으로 공급함으로써 탄소원이 고갈되지 않도록 저농도를 유지함으로써 6,400 AU/ml의 활성을 얻을 수 있었다(Fig. 4). Lacticin SA72와 마찬가지로, amylovorin L471은 glucose와 CNS를 공급함으로써 2배의 박테리오신 활성을 얻을 수 있었다[2]. 다른 연구의 결과를 볼 때, 박테리오신의 생산이 탄소원보다는 질소원의 공급에 영향을 더 받는 것으로 알려

**Fig. 4. Fed-batch fermentation of *L. lactis* SA72 in jar fermenter.** -○- Cell growth; -●- bacteriocin activity; -□- glucose concentration.

져 있기 때문에 향후 질소원에 대한 검토도 필요하리라 생각된다.

#### 요 약

젓갈에서 분리된 *Lactococcus lactis* SA72 균주로부터 유용 박테리오신인 lacticin SA72의 생산을 최적화하기 위해 배양용 배지 및 배양조건을 검토하였다. 유산균의 대표적인 배양 배지인 BHI, MRS, M17 배지에 대해서 검토한 결과, 이중 MRS 배지가 최적 배지로 결정되었다. 이 MRS배지에 0.5% glucose를 첨가한 경우, 더 높은 활성을 얻을 수 있었다. pH의 영향을 검토하였을 때는, 초기 pH에서는 pH 7이었고, 발효조에서의 배양기간 동안 pH 6으로 조절할 때가 높은 활성을 보였다. 배양온도는 32°C로 유지할 때가 활성이 우수하였다. 회분식 배양에서는 최대 3,200 AU/ml을 얻을 수 있었으며, 유가식 배양으로 10 g/l glucose를 주기적으로 공급하였을 때, 약 6,400 AU/ml로 가장 높은 활성을 얻을 수 있었다.

#### 감사의 글

본 연구는 2002학년도 경남대학교 학술논문게재연구비 지

원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Bruno Bárcena, J.-M., F. Sineriz, G. De Llano, A. Rodriguez, and E. S. Juan. 1998. Chemostat production of plantaricin C by *Lactobacillus plantarum* LL441. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3512-3514.
2. Callewaert, R. and L. De Vuyst. 2000. Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 606-613.
3. Chihib, N.-E., L. Monnerat, J. M. Membré, and J.-L. Tholosan. 1998. Nisin, temperature and pH effects on growth and viability of *Pectinatus fringsingensis*, a Gram-positive, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 438-446.
4. Chinachoti, N., H. Matsusaki, K. Sonomoto, and A. Ishizaki. 1998. Nisin Z production by *Lactococcus lactis* IO-1 using xylose as a carbon source. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1022-1024.
5. Choi, H.-J., C.-I. Cheigh, S.-B. Kim and Y.-R. Pyun. 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 563-571.
6. Choi, H.-J., H.-S. Lee, S. Her, D.-H. Oh, and S.-S. Yoon. 1999. Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 175-181.
7. Cho, H.-Y., A. E. Yousef, and S.-T. Yang. 1996. Continuous production of pediocin by immobilized *Pediococcus acidilactici* PO2 in a packed-bed bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 589-594.
8. De Vuyst, L. and E.-J. Vandamme. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 571-578.
9. 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.
10. Himelbloom, B., L. Nilsson, and L. Gram. 2001. Factors affecting production of an antilisterial bacteriocin by *Carnobacterium piscicola* strain A9b in laboratory media and model fish systems. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 506-513.
11. Kaiser, A. L. and T. J. Montville. 1993. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 536-540.
12. Koo, K.-M., N.-K. Lee, Y.-I. Hwang, and H.-D. Paik. 2000. Identification and partial characterization of lacticin SA72 isolated from Jeot-gal. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 488-495.
13. Lee, H.-J., C.-S. Park, Y.-J. Joo, S.-H. Kim, J.-H. Yoon, Y.-H. Park, I.-K. Hwang, J.-S. Ahn, and T.-I. Mheen, 1999. Identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 282-291.
14. Lee, N.-K. and H.-D. Paik. 2001. Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Microbiol.* **18**: 17-24.
15. Møet, T., I.-M. Aasen, I. Storro, and L. Axelsson. 2000. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 536-545.
16. Parente, E., E. Brienza, A. Ricciardi, and G. Addario. 1997. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* **18**: 62-67.
17. Yang, R. and B. Ray. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **11**: 281-291.

(Received Oct. 29, 2002/Accepted Jan. 24, 2003)