

Lactobacillus acidophilus GP4A 박테리오신의 정제, Bacteriolytic 작용 및 생산 관련 Plasmid의 선별

한경식 · 전우민* · 김영훈 · 김세현
고려대학교 식품과학부 · *삼육대학교 응용동물학과

Purification, Bacteriolytic Action and Plasmid Isolation of Acidocin 4A Produced by *Lactobacillus acidophilus* GP4A

K. S. Han · W. M. Jeon* · Y. H. Kim · S. H. Kim
Division of Food Science, Korea University
*Department of Applied Animal Science, Sahmyook University

ABSTRACT

Acidocin 4A produced by *Lactobacillus acidophilus* GP4A was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation and sequential chromatographies containing Octyl sepharose CL-4B column, C₁₈ Sep-Pak Cartridge, C₁₈ RP HPLC and HPLC gel filtration. Tricine SDS-PAGE resulted in a single band with estimated molecular mass of 4.1 kDa corresponding to the polypeptide weight marker. Electron microscopy of acidocin-treated indicator cells (*L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797) confirmed that acidocin 4A presented bacteriolytic effect, resulting in cell lysis. Curing trial using ethidium bromide (EtBr) was carried out to examine whether acidocin 4A determinant was encoded either by chromosome or on plasmid. The plasmid designated as pLA4A, being about 20 kb in size, was responsible for acidocin 4A production and immunity to host cells.

(**Keyword** : *Lactobacillus acidophilus*, Purification, Bacteriolytic, Curing, Plasmid)

I. 서론

유산균의 박테리오신 생산능력은 소화기관내 미생물들간의 경쟁관계에서 유리한 위치를 확보할 수 있는 장점을 부여하여 probiotic 균주의 중요한 조건이라 할 수 있으며 박테리오신을 이용한 생물학적 식품보존제로의 개발 가능성이 점차 부각됨에 따라 그 중요성이 증대되고 있다(Banks 등, 1986; Naidu 등, 1999).

박테리오신의 표적세포에 대한 항균작용은 크게 3가지로 구분되는데 표적세포의 증식만을 억제하는 bacteriostatic 작용과 이들을 사멸시키는 bacteriocidal 작용 그리고 사멸 뿐 아니라 세포벽을 용해시키는 bacteriolytic 작용이 그것이다(Jung과 Sahl, 1991). 일반적으로 *Lactobacillus* 균주 박테리오신들의 bacteriocidal 현상은 bacteriolytic 현상이 수반되며 궁극적으로 세포투과성이나 DNA 복제 및 번역과 같은 기본적인 세포기능에 영향을 미쳐 나타난다(Yang과 Konisky, 1984; Vizan 등, 1991). Class I과 II에 속하는 박테리

Corresponding author : S. H. Kim, Division of Food Science, Korea University, 5-1, Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul, 136-701, Korea

오신은 대부분 표적세포의 세포막에 “barrel-stave” 기작을 통해 pore를 형성하나 class I에 속하는 일부 lantibiotic 박테리오신(type II)은 세포성장에 필요한 효소의 작용을 방해함으로써 사멸효과를 유도한다(Ojcius와 Young, 1991; Brotz 등, 1997).

박테리오신 생합성에 관련된 유전자를 선별하는 과정은 동종 혹은 이종내 박테리오신 발현을 비롯한 유전자 수준에서의 연구에 필수적인 단계라고 할 수 있으며 일반적으로 균주별 특이적인 경향을 나타내지는 않지만 여러 종의 *Lactobacillus*속, *Bifidobacterium*속, *Carnobacterium*속, *Pediococcus*속 등의 균주들이 plasmid에 박테리오신 생산 유전자를 보유하고 있음이 밝혀졌다(Gonzalez와 Kunka, 1987; Muriana와 Klaenhammer, 1987; Hoover 등, 1988; Ahn과 Stiles, 1990; Yildirim 등, 1999).

Lactobacillus acidophilus 균주가 생산하는 대부분의 박테리오신들은 열에 안정하고 낮은 분자량을 가지며 nonlantibiotic 펩타이드로서 분류상 class II 박테리오신에 포함된다(Tahara 등, 1996; Tahara와 Kanatani, 1996; Zamfir 등, 2000). 본 실험에 사용된 *L. acidophilus* GP4A 박테리오신인 acidocin 4A는 *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* 균주를 비롯한 여러 병원성균들과 다양한 유산균들에게 항균작용을 나타내며 열에 안정한 박테리오신으로 알려져 있다(한 등, 1999). 본 연구는 다양한 단백질 정제 방법을 통해 acidocin 4A를 분리, 정제하여 분자량을 조사하고 전자현미경 관찰을 통한 표적 세포의 성장억제 양상과 생산 관련 유전자의 위치를 파악하고자 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. Acidocin 4A의 정제

3회 계대배양시킨 *L. acidophilus* GP4A 균주를 1 l MRS 배지에 37°C, 18시간동안 배양시킨 다음 원심분리하여 회수된 상정액에 50% 농도로 ammonium sulfate를 첨가하였다. 침전물을 2-(4-morpholino)-ethane sulfonic acid(Fisher Biotech, USA) buffer(50 mM, pH 7.0)로 현탁시킨 후 Octyl sepharose CL-4B(Pharmacia Biotech AB, Sweden) column chromatography를 실시한 다음

활성 peak를 회수한 후 다시 C₁₈ Sep-Pak cartridge (Waters Co., USA)에 흡착시켜 20, 40, 60 및 80% 농도의 methanol로 용출, 활성을 조사하였다. 활성 분획을 C₁₈ RP column(Sephasil peptide C₁₈ SC 2.1/10)이 장착된 HPLC(Pharmacia Biotech SMART System)에서 0.1% TFA 함유 acetonitrile buffer로 용출시켰으며 활성 peak를 회수한 다음 다시 HPLC gel filtration(3.2×300 mm, Superdex Peptide PC 3.2/30 column)을 실시하여 순수한 박테리오신 peak를 회수하였다.

2. 전기영동

HPLC gel filtration에서 분리된 활성 peak를 동결건조하고 tricine SDS-PAGE를 실시하였다(Schägger와 Jagow, 1987). 두 장의 gel을 멸균증류수로 세척한 후 한 장은 지시균(*L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797)이 접종된 MRS soft agar로 활성을 확인하는데 사용하였고 나머지 한 장은 silver stain(Bio-rad, USA)을 실시하여 polypeptide SDS-PAGE standard (Bio-rad, USA)와 이동도를 비교하여 분자량을 추정하였다.

3. 조박테리오신의 생산 및 활성 측정

MRS 배지에 *L. acidophilus* GP4A 균주를 1% 접종하고 37°C, 18시간동안 배양한 다음 원심분리(3,000×g, 15 min)하여 상정액을 회수하였다. 회수된 상정액을 pH 6.5로 조정하고 멸균 membrane filter(0.45µm)를 사용하여 여과시킨 후 활성을 측정하였다. 활성 측정은 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797이 접종된 MRS agar위에 연속 2진 희석된 시료를 점적하여 억제 환 여부를 관찰하고 억제환이 나타난 최대 희석배수를 역수로 취하여 Activity Unit(AU)로 나타냈다.

4. TEM 관찰을 통한 표적세포의 사멸양상 조사

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* ATCC 4797 균주를 MRS 배지에 2% 접종하고 37°C, 4시간 배양시킨 후 조박테리오신(acidocin 4A)을 1,600 AU/ml 농도로 첨가하였다. 동일한 온도에서 1시간 추가 배양시킨 후 원심분리하여 회수된 균체를 4°C에서 2.5% glutaraldehyde가 함유된 0.1M cacodylate buffer (pH

7.0)에 고정시키고 0.1M cacodylate buffer로 두 번 세척한 후 2% osmium tetroxide가 함유된 동일 buffer로 4℃, 4시간 처리하였다. 다시 0.1M cacodylate buffer로 세척한 후 acetone를 이용하여 탈수시킨 다음 spurr medium으로 고정된 균체를 3% uranyl acetate와 lead citrate로 염색, 절단하여 TEM(H-600, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

5. Plasmid의 curing 및 분리

Lactobacillus acidophilus GP4A 균주를 EtBr이 함유된 MRS 배지(25 µg/ml)에 3번 연속 계대 배양시키고 성장된 균주를 희석하여 MRS agar에 spread plating 하였다. 약 50~100개의 colony가 관찰된 plate에 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797이 접종된 MRS soft agar(0.8%)를 overlay시키고 억제환이 형성된 균락과 형성되지 않은 균락을 각각 선별하였다. 선별된 균주의 plasmid는 O'sullivan과 Klaenhammer(1993)의 방법을 변형하여 분리하였으며 lysozyme과 mutanolysin을 사용하여 세포벽을 제거하고 isopropanol 처리과정과 EtBr을 함유한 ammonium acetate를 사용하여 분리 순도를 향상시켰으며 분리된 plasmid는 agarose gel(0.8%) 전기영동을 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Acidocin 4A의 정제

일반적으로 많은 항균성 단백질 혹은 펩타이드들이 구조내 소수성을 보유하고 있으며 이러한 특성은 표적 세포의 세포막과의 상호작용을 촉진하는 역할을 한다. Acidocin 4A의 분리를 위해 일련의 단백질 정제과정을 적용하였으며 순도를 향상시키고자 C₁₈ Sep-Pak cartridge로 소수성 물질을 농축하는 단계가 추가되었고 활성은 60%와 80% methanol 분획에서 나타났다. 활성 분획을 다시 C₁₈ RP column이 장착된 HPLC로 분별하였으며 용출을 위해 사용된 acetonitrile에 의해서는 어떠한 박테리오신 활성도 저해되지 않았다. 또한, 유사한 분자량의 물질들로부터 순수 분리하고자 HPLC gel filtration을 실시하여 단일 성분의 acidocin 4A를 정

제할 수 있었으며(Fig. 1) 분자량은 약 4.1 kDa으로 나타났다(Fig. 2). 지금까지 보고된 *L. acidophilus* 균주 박테

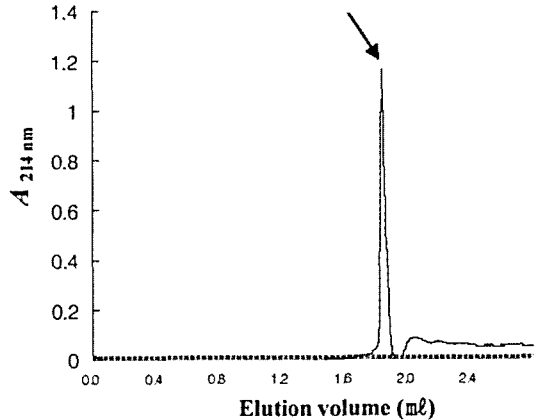


Fig. 1. Elution profile of acidocin 4A eluted from HPLC gel filtration. Effluents were monitored at 214 nm and assayed for bacteriocin activity. Arrow indicates the bacteriocin activity.

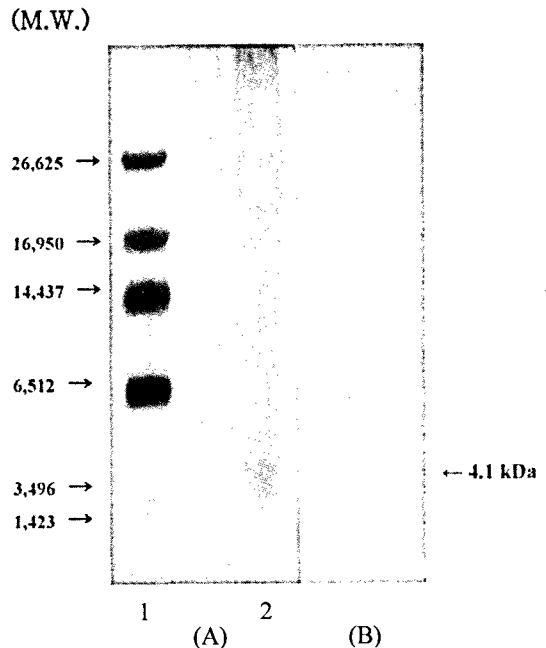


Fig. 2. Tricine SDS-PAGE of acidocin 4A obtained from HPLC gel filtration. (A) Silver stained gel; Lane 1, Polypeptide SDS-PAGE standard (Bio-rad, USA); Lane 2, Bacteriocin activity, (B) Gel overlaid with MRS soft agar (0.8%) inoculated with cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797.

리오신의 분자량은 Tahara 등(1992)이 보고한 acidocin 8912(5.4 kDa)에서 Barefoot과 Klaenhammer(1984)가 보고한 lactacin B(6.5 kDa)까지 다양하게 나타났으나 대부분이 약 6.5 kDa이하의 작은 분자량을 나타냈다. 또한, 몇몇 *L. acidophilus* 박테리오신은 LF221A와 LF221B와 같이 활성을 나타내기 위해 두 개의 펩타이드가 발현되기도 한다(Bogovic-Matijasic 등, 1998). 본 논문에서는 acidocin 4A가 다른 *L. acidophilus* 균주 박테리오신과 유사하게 작은 분자량을 나타냈으며 소수성을 보유하고 있고 한 등(1999)이 보고한 바와 같이 열에 안정함으로 인해 분류상 class II 박테리오신에 해당되리라 판단된다.

2. TEM 관찰을 통한 표적세포의 사멸 양상 조사

Acidocin 4A의 항균 작용기작은 Fig. 3에서와 같이 표적세포의 세포벽 구조에 변화를 일으켜 여러 곳의 해리된 세포벽사이로 세포내용물의 유출을 유도하고 cell lysis를 유발, 사멸시키는 bacteriolytic 양상을 나타내었다. 이러한 현상은 대부분의 유산균 박테리오신에서 발견되어진다. Class I과 II 박테리오신의 항균작용기작의 차이는 전자의 경우 박테리오신에 대한 수용체의 존재 없이 표적세포에 부착되어 나타나는 반면 후자의 경우 세포막내 침투에 앞서 특이적인 수용체와의 결합이 선행되리라 추정되고 있으나 종종 수용체의 존재 없이도 항균작용을 나타내는 박테리오신이 발견됨에 따라 같은 분류에 속해 있더라도 박테리오신간에는 확립된 작용기작이 적용되지 않음을 알 수 있다(Chikindas

등, 1993; Driessen 등, 1995; Chen 등, 1997; Marjon 등, 1998). 현재 식품보존제로 사용되고 있는 박테리오신인 nisin은 세포벽 precursor lipid II라는 물질에 의해 세포벽과의 결합효율이 증진되는 것으로 알려져 있으며 또한, 이 물질은 항생제인 vancomycin의 표적 부위이기도 하다(Breukink 등, 1999).

3. 박테리오신 생산 Plasmid의 선별

Ethidium Bromide를 함유한 MRS 배지에서 성장시킨 균주를 대상으로 박테리오신 활성 균주와 비활성 균주를 각각 선별하고 plasmid를 분리한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조구로 사용한 *L. acidophilus* GP4A wild type 균주의 경우 4개의 plasmid를 보유하고 있었으며 curing 과정을 거치고 활성을 나타냈던 균주(VA2)는 약 20 kb의 plasmid만을 보유하고 있었다. 반면, curing 과정에서 활성을 소실한 균주(VA1)의 경우 활성 보유 균주(VA2)와는 달리 plasmid가 전혀 존재하지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 약 20 kb 크기의 plasmid에 박테리오신 생산에 관련된 유전자가 존재함을 알 수 있었다. 여러 박테리오신 생산 균주의 경우 자체 면역에 관련된 유전자도 생산유전자와 밀접하게 구성되어 있음이 보고되어진 바(Kanatani 등, 1992) 생산 관련 plasmid가 소실되어진 비활성 균주를 다시 지지균으로 사용하여 acidocin 4A를 첨가(1,600 AU/ml)하고 그 성장을 조사한 결과 성장억제 현상이 나타남으로 약 20 kb plasmid에는 생산과 자체 면역에 관련된 유전자가 모두 존재하고 있음을 추정할 수 있었다(data not shown). 그러나

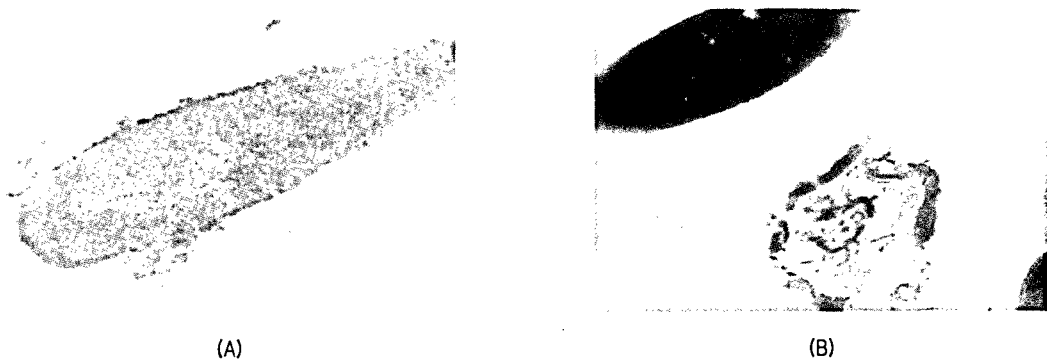


Fig. 3. Electron photomicrographs of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797 treated with acidocin 4A. (A) Disintegrated cell with loss of the cytoplasmic material through a damaged cell wall, (B) Disintegrated cell.

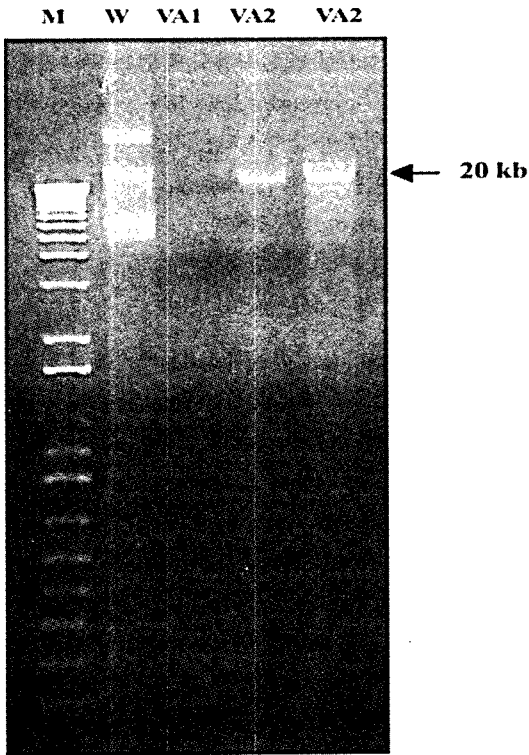


Fig. 4. Plasmid profiles of wild type and variants of *Lactobacillus acidophilus* GP4A. M, 1kb DNA ladder marker (BRL, USA); W, wild type; VA1, acidocin 4A-nonproducing variant; VA2, acidocin 4A-producing variant.

Kelly 등(1996)에 따르면 Plantaricin KW30 박테리옌의 생산 능력을 소실시켰을 때에도 균주에 대한 자체 면역능이 계속 보유되어 본 연구와는 반대의 결과를 나타내었다. 본 실험에서는 EtBr을 이용한 curing 방법이 acriflavin, novobiocin 등 다양한 항생제를 사용하였을 때 보다 효과적으로 이루어짐을 알 수 있었다.

IV. 요약

Lactobacillus acidophilus GP4A 균주가 생산하는 acidocin 4A를 정제하고자 ammonium sulphate 침전법, Octyl-sepharose CL-4B column chromatography, C₁₈ Sep-Pak cartridge, C₁₈ RP HPLC, HPLC gel filtration을 실시하였고 tricine SDS-PAGE를 통해 약 4.1 kDa의 박테리옌을 확인하였다. Acidocin 4A의 항균작용 기작을 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC

4797을 대상으로 TEM을 이용해 관찰한 결과 세포벽이 해리되고 세포벽사이로 세포내용물이 용출되어 궁극적으로 cell lysis가 일어나는 bacteriolytic 현상을 확인하였다. 또한, acidocin 4A의 생산에 관련된 유전자의 존재 위치를 파악하고자 EtBr을 이용한 curing 방법을 실시하였으며 그 결과 약 20 kb 크기의 plasmid에 acidocin 4A 생산과 자체 면역에 관련된 유전자가 존재함을 알 수 있었다.

V. 참고문헌

1. Ahn C. and M.E. Stiles. 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2503-2510.
2. Banks, J.G., R.G. Board, and N.H.C. Sparks. 1986. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. *Biotech. Appl. Biochem.* 8, 103-147.
3. Barefoot, S.F. and T.R. Klaenhammer. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl. Environ. Microbiol.* 26, 328-334.
4. Bogovic-Matijasic, B., I. Rogelj, I.F. Nes, and H. Holo. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 606-612.
5. Breukink, E.J., I. Wiedemann, C. van Kraaij, O.P. Kuipers, H.G. Sahl, and B. de Kruijff. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic, *Science* 286, 2361-2364.
6. Brotz, H., G. Bierbaum, P.E. Reynolds, and H.-G. Sahl. 1997. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur. J. Biochem.* 246, 193-199.
7. Chen, Y., R. Shapira, M. Eisenstein, and T.J. Montville. 1997. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 524-531.
8. Chikindas, M.L., M.J. Garcia Garcera, A.J.M. Driessen, A.M. Ledebner, J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, T. Abee,

- W.N. Konings, and G. Venema. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3577-3584.
9. Driessen, A.J.M., H.W. Vandenhooven, W. Kuiper, M. Vandekamp, H.G. Sahl, R.N.H. Konings, and W.N. Konings. 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochem.* 34, 1606-1614.
10. Gonzalez, C.F. and B.S. Kunka. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 532-534.
11. Hoover, D.G., M. Walsh, K.M. Kolaetis, and M.M. Daly. 1988. A bacteriocin produced by *Pediococcus* spp. associated with a 5.5 Mda plasmid. *J. Food Protect.* 51, 29-31.
12. Jung, G. and H.G. Sahl. 1991. Nisin and novel antibiotics, ESCOM, Leiden, The Netherlands.
13. Kanatani, K., T. Tahara, K. Yoshida, H. Miura, M. Sakamoto, and M. Oshimura. 1992. Plasmid-associated bacteriocin production by and immunity of *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 648-651.
14. Kelly, W.J., R.V. Asmundson, and C.M. Huang. 1996. Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 657-662.
15. Marjon H.J., B. Vanloo, R. Brasseur, L.G.M. Gorris, and E.J. Smid. 1998. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochi. Biophys. Acta.* 1373, 47-58.
16. Muriana, P.M and T.R. Klaenhammer. 1987. Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 553-560.
17. Naidu, A.S., W.R. Bidlack, and R.A. Clemens. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Technol.* 38, 13-126.
18. Ojcius, E. and J.D.-E., Young. 1991. Cytolytic pore-forming proteins an peptides: is there a common structural motif. *Trends Biochem. Sci.* 16, 225-229.
19. O'sullivan, D.J. and T.R. Klaenhammer. 1993. High- and low-copy-number *Lactococcus* shuttle cloning vectors with features for clone screening. *Gene* 137, 227-231.
20. Schägger, H. and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
21. Tahara, T. and K. Kanatani. 1996. Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 669-677.
22. Tahara, T., K. Kanatani, K. Yoshida, H. Miura, M. Sakamoto, and M. Oshimura. 1992. Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacetriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1212-1215.
23. Tahara, T., S. Yoshioka, R. Utsumi, and K. Kanatani. 1996. Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 892-897.
24. Vizan, J.L., C. Hernandez-Chico, I. del Castillo, and F. Moreno. 1991. The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *EMBO J.* 10, 467-476.
25. Yang, C.C., and J. Konisky. 1984. Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J. Bacteriol.* 158, 757-759.
26. Yildirim Z., D.K. Winters and M.G. Johnson. 1999. Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Appl. Microbiol.* 86, 45-54.
27. Zamfir, M., R. Callewaert, P.C. Cronea, and L.D. Vuyst. 2000. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *FEMS Microbiol. Lett.* 190, 305-308.
28. 환경식, 주관석, 김세현. 1999. *Lactobacillus acidophilus* GP4A가 생산하는 박테리옌의 특성 및 정제. *한국유가공기술과학회지.* 17, 1-10.