

Enterococcus faecium MJ5-14가 생산한 박테리오신의 항리스테리아 활성

임성미[†] · 이종갑 · 박미연* · 장동석*
동명대학 호텔조리과, *부경대학교 식품공학과

Antilisterial Activity of Bacteriocin Produced by Enterococcus faecium MJ5-14

Sung-Mee Lim[†], Jong-Gab Lee, Mi-Yeon Park* and Dong-Suck Chang*

Department of Hotel Culinary Arts, Tongmyong College, Busan, 608-740, Korea

*Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

ABSTRACT – *Enterococcus faecium* MJ5-14 isolated from Meju produced a bacteriocin, which was antagonistic towards *Listeria monocytogenes*. Bacteriocin activity reached a maximum (640 BU/mL) after incubation for 12 hr, the early stationary phase, then dropped after the late stationary phase. Bacteriocin of *E. faecium* MJ5-14 was extremely active against a wide range of *Listeria* species, including *L. monocytogenes* with sensitivities up to about 640 BU/mL. In case of mixed culture with 105 CFU/mL *L. monocytogenes* and 105 CFU/mL *E. faecium* MJ5-14, the inhibitory effect against *L. monocytogenes* at 37°C was higher than at 25°C. The mode of action was identified as bactericidal, because the addition of 100 BU/mL this bacteriocin to cell suspensions of *L. monocytogenes* KCTC 3569, led to a marked decrease in the number of viable cells. Further, when held in contact with bacteriocin of *E. faecium* MJ5-14 for 12 hr, *L. monocytogenes* KCTC 3569 displayed the disruption of the cells and an important efflux of the intracellular material.

Key words: *E. faecium*, Bacteriocin, Antilisterial activity

서 론

1925년 *Escherichia coli*로부터 미생물의 성장을 억제하는 단백질 성분의 박테리오신(colicin)¹⁾이 처음으로 발견된 이후 현재까지 많은 종류의 미생물로부터 생산된 박테리오신이 밝혀지고 있으며, 그들의 항균 활성과 특성 및 범위도 매우 다양하다. 부패균,²⁾ 식중독균,³⁾ 전염병균⁴⁾ 및 포자형성 세균⁵⁾의 증식을 억제하거나 사멸시킬 뿐 아니라 pediocin PA-1, bavaricin A, lactococcin A 등은 치즈 제조 시에 *Lactobacillus buchneri*에 의한 histamine의 과도한 생성을 억제하는 것에도 효과적인 것으로 알려져 있다.⁶⁾

지금까지 밝혀진 박테리오신 중에서 식품보존제로서 상용화된 박테리오신으로는 Mattick and Hirsh⁷⁾가 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 균주에서 발견된 Nisin이다. Nisin은 자체 독성이 없고, 장내세균이나 소화효소에 의해 쉽게 분해되고, 생리적 pH 범위 내에서 안정하며, 독성시험 결과에 의해 안전한 물질임이 입증되어 1969년 FAO/WHO에서 ADI를 33,000 IU/kg으로 인준되었고, 현재 약 47개국에서 육류

가공품, 통조림 식품 및 알코올음료 등 여러 분야에 식품첨가물로 사용되고 있다.⁸⁾ 하지만 nisin은 발효에 관여하는 유용한 유산균의 생육에도 영향을 미칠 수 있기 때문에 유제품의 발효과정 중에 문제점이 있다. 그러므로 식중독균이나 부패미생물만을 억제할 수 있는 박테리오신을 이용하는 것이 효과적이는데, *Enterococcus faecium* DPC 1146에 의하여 생합성 되는 enterocin 1146은 열에 비교적 안정한 박테리오신으로서 유산균 스타터 배양에는 전혀 영향을 미치지 않고 *L. monocytogenes*에 대해서만 억제 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다.⁹⁾

*E. faecium*으로부터 분리된 박테리오신으로는 enterocin A, enterocin B, enterocin P, enterocin Q, enterocin CRL 35 및 enterocin L50A와 L50B 등이 보고되었는데 이들은 *Listeria* sp. 뿐만 아니라 *Clostridium* sp. 및 일부 그람음성균에 대해서도 항균효과가 있는 것을 알려져 있다.¹⁰⁾ 또한 *E. faecalis*가 생산한 bacteriocin 31은 pediocin와 유사한 박테리오신이며, enterocins 1071A와 1071B는 감수성 세균의 세포막을 투과하여 항균활성을 나타내며, enterocin AS-48는 *Bacillus cereus*의 균체의 성장 속도를 감소시키고, 균체내 독소 및 포자 생성을 억제시키는 것으로 알려져 있다.^{11,12)}

[†] Author to whom correspondence should be addressed.

박테리옌은 자신의 유전자로부터 직접 생합성 되므로 유전적 조작에 의해 박테리옌 생산 기능을 유용한 다른 균주에 옮겨 표현시키거나, 박테리옌 단백질의 분자 구조 및 그 기능을 조작하여 광범위하게 산업적으로 응용이 가능하다.¹³⁾ 미국이나 유럽 각국에서는 박테리옌에 관한 연구가 활발하게 이루어져 다양한 기술력을 특허 출원하고 산업화 적용 단계에까지 이르고 있으나, 국내의 박테리옌 연구는 아직 초기단계에 이르는 수준으로 향후 박테리옌의 응용에 관한 지속적인 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 기존의 화학보존료를 대체할 수 있는 생물학적 보존제(biopreservative)의 개발을 위한 목적으로 우리나라 전통 발효식품인 메주에서 항 리스테리아 활성을 나타내는 균주를 분리 및 동정하였고, 분리 균주로부터 박테리옌을 생산하여 *L. monocytogenes*의 증식 억제 효과에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

유산균 분리

사용한 실험 재료는 2001-2003년 이른 봄에 경남 일대의 농가에서 제조된 재래식 메주 11종과 부산 시내에 소재하고 있는 할인 마트와 재래식 시장에서 판매하는 메주 10종을 수집하여 사용하였다. 수집한 메주는 표면부 시료 25 g과 절단한 내부 시료 25 g을 무균적으로 채취하여 450 mL의 0.85% NaCl 용액을 첨가하여 blender에서 2분간 마쇄한 후 10-1-10-6까지 단계별로 희석한 뒤 Brain Heart Infusion (BHI, Difco, USA) 평판배지에 접종하여 37°C에서 48시간 동안 정치 배양하였다. 배양 후 상이한 특징적인 집락을 형성한 균주를 순수 분리한 다음 1% CaCO₃가 첨가된 MRS agar (Difco, USA) 평판배지에서 37°C에서 48시간 배양하여 집락 주위에 투명환(clear zone)을 생성한 균주를 유산균으로 간주하였다. MRS broth에서 분리한 유산균의 배양액과 20% (vol/vol) glycerol과 1:1의 비율로 혼합하여 -70°C에서 보관하였고, 실험에 사용하기 직전에 MRS broth에 2회 계대 배양하여 활성을 높인 후 사용하였다.

박테리옌의 분리 조제

분리된 유산균은 MRS broth 10 mL에 1 백금이 접종하여 37°C에서 10시간 전 배양한 배양액을 MRS broth 1 L에 옮겨 37°C에서 18시간 동안 본 배양하였다. 본 배양액을 일정량 채취한 다음 원심분리(10,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 균체를 제거하고, 얻어진 상등액은 1N NaOH로 최종 pH (6.5-7.0)를 조정 한 후에 membrane filter (0.45 μm pore size)로 여과하여 이를 박테리옌(crude bacteriocin)

용액으로 하였다.

박테리옌 생산 균주 선발 및 동정

분리한 유산균은 spot-on-the lawn method¹⁴⁾을 사용하여 항리스테리아 활성을 나타내는 박테리옌 생산 균주를 선발하였다. 지시 균주로는 *L. monocytogenes* KCTC 3569를 사용하였으며, BHI broth에 배양하여 배양액의 균수를 약 10⁷ CFU/mL에 맞춰 soft agar (0.8% agar) 10 mL에 접종한 다음 평판배지(1.5% agar) 위에 증충 응고시킨 후 박테리옌 20 μL을 점적하여 37°C에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 지시 균주에 대해 선명하고 지름의 크기가 가장 큰 저해환(clear zone)을 생성한 균주를 선택하였다. 선택된 균주는 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology¹⁵⁾ 및 The Prokaryotes¹⁶⁾의 방법에 준하여 배양학적 및 생화학적 특성을 조사하였고, API 50CHL(API, BioMerieux, France)으로 당발효능을 조사하여 동정하였다.

박테리옌의 활성 측정

분리 동정된 균주를 MRS broth에서 배양하는 동안 2시간 간격으로 배양액을 채취하여 박테리옌을 조제한 다음 critical dilution method¹⁷⁾에 의해 박테리옌의 항균 활성을 측정하였다. 즉 조제한 박테리옌 시료액은 2진법으로 희석한 후 50 μL씩 paper disk (Toyo, Φ 10 mm)에 loading 하였다. Paper disk는 *L. monocytogenes* KCTC 3569 배양액 100 μL (약 10⁷ CFU/mL)가 접종된 BHI 평판배지 위에 증충한 뒤 37°C에서 18시간 배양하여 paper disk 주위에 저해환을 생성한 최대 희석배수의 역수에 20을 곱한 값을 bacteriocin unit (BU)/mL로 표시하였다. 박테리옌 활성 측정시 배양액의 pH (654 pH-Meter, METROHM)와 O.D. (at 600 nm, UV-1601, SHIMAZU) 값도 동시에 측정하여 박테리옌 생산 균주의 생육곡선을 조사하였다.

Listeria 균종에 대한 박테리옌의 활성

L. monocytogenes KCTC 3569, *L. monocytogenes* KCTC 3710, *L. innocua* KCTC 33090, *L. ivanovii* KCTC 19119, *L. grayi* KCTC 3581, *L. seeliger* KCTC 3591 및 *L. welshimeri* KCTC 3587 등의 다양한 *Listeria* 균종에 대한 *E. faecium* MJ5-14 박테리옌의 항균 활성을 비교하였다.

박테리옌 생산 균주와 *L. monocytogenes*의 혼합 배양

BHI broth와 MRS broth 100 mL에 각각 *L. monocytogenes* KCTC 3569와 *E. faecium* MJ5-14의 전 배양액 1% (vol/vol)을 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 본 배양액을 원심

분리(5,000×g, 10분, 4°C)하여 pellet을 모은 후 멸균한 인산 완충용액(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.2)으로 cell을 washing한 후 균수를 10^5 CFU/mL를 맞춰 BHI broth 500 mL에 혼합 접종하였다. 이들은 37°C에서 배양하면서 일정한 시간대별로 배양액을 채취하여 평판에 분주한 후 Oxford agar(Difco, USA)와 MRS agar 배지를 사용하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 *L. monocytogenes* KCTC 3569와 *E. faecium* MJ5-14 각각의 균수를 표준천평판배양법으로 측정하였다.

박테리옌 첨가량에 따른 *L. monocytogenes*의 감균 효과

L. monocytogenes KCTC 3569의 초기 균수를 약 10^3 , 10^4 , 10^5 및 10^6 CFU/mL로 맞춰서 각각의 BHI broth 100 mL에 접종하고 박테리옌의 최종 농도가 25 BU/mL, 50 BU/mL 및 100 BU/mL 되도록 첨가한 다음 37°C에서 24시간 배양하는 동안 시간별로 배양액을 채취하여 Oxford agar 배지에서 표준천평판배양법으로 생균수를 측정하여 박테리옌 첨가량에 따른 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 감균 효과를 조사하였다.

박테리옌 첨가시기에 따른 *L. monocytogenes*의 증식 억제 효과

BHI broth 100 mL에 *L. monocytogenes* KCTC 3569 전 배양액 1% (vol/vol) 접종 직후부터 37°C에서 24시간 동안 배양하는 과정 중에 2시간 간격으로 박테리옌 용액의 최종 농도가 70 BU/mL이 되도록 첨가한 다음, *L. monocytogenes* KCTC 3569의 균수를 조사하여 박테리옌 첨가시기에 대한 항리스테리아 효과를 측정하였다.

박테리옌에 의한 *L. monocytogenes*의 세포 형태 변화

박테리옌 처리에 의한 *L. monocytogenes* KCTC 3569 균주의 세포 형태 변화를 전자현미경(TEM)으로 관찰하였다. BHI broth에서 배양한 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 배양액(약 10^6 CFU/mL)에 박테리옌 용액 25, 50 및 100 BU/mL을 처리하여 37°C에서 12시간 배양하였다. 반응 후 원심분리(3,000 rpm, 10min, 4°C)하여 세포만을 모은 후 2.5% glutaraldehyde로 1차 고정(4°C, 2-4시간)하고 난 다음 1% osmium tetroxide로 이중 고정(4°C, 2시간)하였다. Phosphate buffer(0.1 M, pH 7.2)로 3번 세척한 후에 세포는 각 농도(50, 70, 80, 90, 95 및 100%)의 ethanol로 15분간 탈수시키고 propylene oxide로 30분간 2회 치환하고, Epon 812로 포매 및 열중합한 후 LKB ultramicrotome (Nova, Sweden)을 이용하여 세절(두께 0.5-1 μ m)하였다. 그

런 다음 구리 grid를 부착한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 것을 가속 전압 80 kV 하에서 JEM-1200EX II (JEOL, Japan) 전자 현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

박테리옌 생산 균주의 분리 및 동정

메주(21종)에서 분리된 유산균은 총 307종이며, 이 중에서 *L. monocytogenes* KCTC 3569에 대한 항균 활성을 나타내는 MJ5-14 균주를 선발하여 생화학적 특성을 조사한 결과, 그람양성 구균이며, 포자를 형성하지 않고, 운동성이 없었으며 catalase, oxidase 및 urease 음성이며, arginine의 가수분해능이 있었다. 호기적 또는 혐기적 조건하에서 증식이 가능하며, 10-45°C의 온도 범위와 pH 5.0-9.0 및 NaCl 3-5%의 농도 하에서 증식할 수 있었다. 또한 horse 및 sheep blood agar 상에서 용혈현상은 나타나지 않았으며, glucose로부터 황화수소는 생성하지 않았으며, MRS broth에서 37°C, 24시간 배양 후 배양액의 pH는 약 4.8로 나타났다. 한편 당발효능을 조사한 결과, 표준균주 *E. faecium* KCCM 12118 균주와는 D-xylose, amygdaline, rhamnase 및 gluconate의 발효능에만 차이가 있을 뿐 그 외의 당발효능은 표준균주와 일치하였다. 이와 같은 생화학적 특성 및 당발효능 조사 결과 98.0%의 신뢰도를 나타내어 분리 균주는 *E. faecium* MJ5-14로 명명하였다(Data not shown).

E. faecium EFM01,¹⁸⁾ *E. faecium* CCM 4231,³⁾ *E. faecium* 6T1a¹⁹⁾ 및 *E. faecalis* EJ 97²⁰⁾가 생산한 박테리옌 신도 항리스테리아 활성이 있는 것으로 보고되고 있으며, 소의 장관에서 분리한 *E. hirae*²¹⁾와 이탈리아 소시지에서 분리한 *E. casseliflavus* IM 416K1,²²⁾ 타조의 장관 내에서 분리한 *E. gallinarum*²³⁾ 및 목초액에서 분리된 *E. mundtii* NFRI 7393²⁴⁾ 등도 리스테리아 증식 억제효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다.

박테리옌의 생산과 항리스테리아 활성

E. faecium MJ 5-14를 MRS broth 상에서 배양하는 동안 균의 생육과 pH 변화 및 *L. monocytogenes* KCTC 3569에 대한 박테리옌의 항균 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

E. faecium MJ5-14는 4시간 이후부터 대수증식기가 시작하여 12시간 만에 정지기에 이른 뒤 일정한 O.D.(약 1.2) 값을 유지하였으며, 배양 과정 중에 pH 변화는 배양 후 4-12시간 동안 급격히 줄어들었고, 이후에는 pH 4.7-4.8 수준을 일정하게 유지하였다. 박테리옌의 항균 활성은 배양 6시간 이후부터 항균 활성이 나타나기 시작하여 시간이 경과

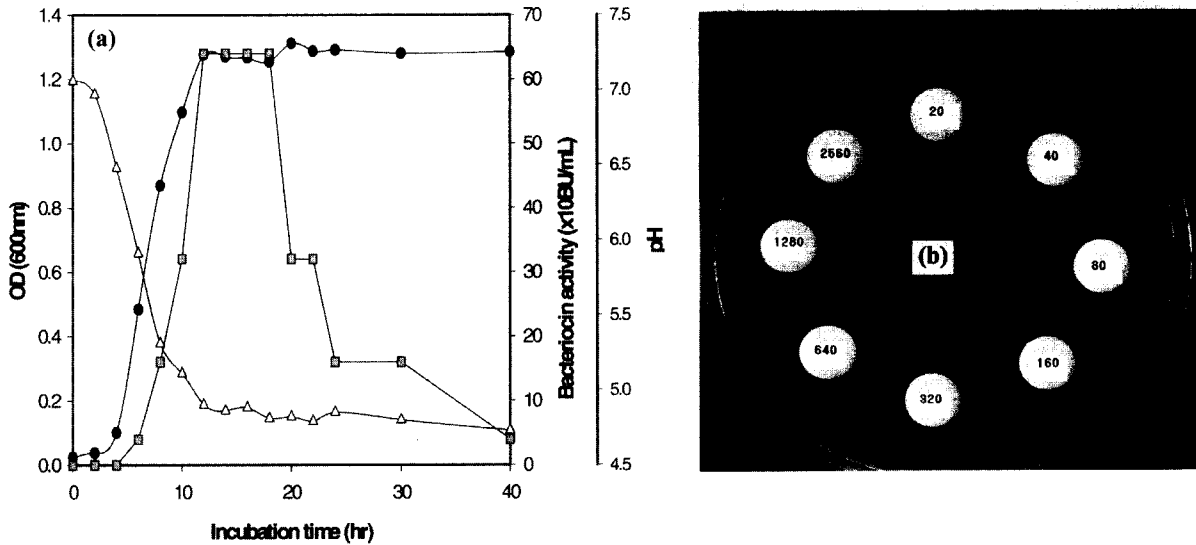


Fig. 1. Growth kinetics (-●-), pH (-△-) and antilisterial activity (-■-) of *E. faecium* MJ5-14 grown in MRS broth at 37°C [A]. Antilisterial activity of crude bacteriocin prepared after incubation 16 hr was assayed by an critical dilution method using *L. monocytogenes* KCTC 3569 as indicator microorganisms [B].

함에 따라 균의 증식과 함께 항균 활성도 급격하게 증가하였다. 정지기 초기 단계인 배양 12시간 만에 박테리오신의 활성은 640 BU/mL로 최대에 이르렀으며, 배양 18시간까지 계속해서 최대 활성을 유지하였다. 그러나 정지기 중반부터는 활성이 다시 감소되기 시작하여 40시간 후에는 40 BU/mL의 미미한 항균 활성만이 나타났다. 이처럼 정지기 후반부터 항균 활성이 감소되는 것은 단백질 가수분해 효소 생성으로 인해 단백질 성분인 박테리오신이 분해되어 활성이 낮아지는 것으로 보고 되고 있다.^{25,26)}

E. casseliflavus IM416K1는 배양 4시간부터 박테리오신 활성이 나타나기 시작하여 정지기 초기 배양 14시간 만에 최대 활성(1280 AU/mL)에 이르렀으며, 최대 활성은 60시간 동안 일정하게 유지되었다고 보고한 바 있다.²⁷⁾ 이에 반해 enterocin 226은 배양 10시간에 최대 활성이 이른 직후 바로 항균활성이 급격하게 감소되었다고 한 바 있어²⁸⁾ 박테리오신의 최대 활성에 이르는 시기와 최대 활성 유지시간은 생산 균주에 따라서 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

Listeria 균종에 대한 박테리오신의 활성

한편 *Listeria* sp.의 균주에 대한 박테리오신의 항균 활성 값을 비교한 결과는 Table 1과 같다. *L. monocytogenes* KCTC 3569와 KCTC 3710 및 *L. welshimeri* KCTC 3587에 대한 *E. faecium* MJ5-14 박테리오신의 활성은 640 BU/mL이고, *L. innocua* ATCC 33090, *L. ivanovii* ATCC 19119, *L. grayi* KCTC 3581 및 *L. seeliger* KCTC 3591에 대한 활성은 1280 BU/mL으로 나타났으므로 *E. faecium*

Table 1. Antilisterial activity of crude bacteriocin produced by *E. faecium* MJ5-14

<i>Listeria</i> sp.	Bacteriocin activity (×10 ⁶ BU/mL)
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3569	64
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3710	64
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	128
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	128
<i>Listeria grayi</i> KCTC 3581	128
<i>Listeria seeliger</i> KCTC 3591	128
<i>Listeria welshimeri</i> KCTC 3587	64

MJ5-14가 생산한 박테리오신의 항균 활성은 *Listeria* 균종에 따라 다소 차이가 있는 것을 확인하였다.

Ennahar과 Deschamps¹⁸⁾의 보고에 의하면, *L. monocytogenes* 13종에 대한 *E. faecium* EFM01에 의해 생산한 박테리오신인 enterocin A의 항균 활성을 조사한 결과, 8×10⁵ AU/mL으로 나타났으나, *L. monocytogenes* SA, *L. innocua* LIN3 및 *L. seeligeri* LS1 및 LT36B는 미약한 저해만이 나타났으며, *L. monocytogenes* V7 및 *L. innocua* LIN4, LIN12 및 LB1 균주에 대해서는 증식 억제 효과가 전혀 나타나지 않았다고 알려져 있어 enterococci가 생산하는 박테리오신은 지시 균주의 종에 따라서 항균 활성에 차이가 있음을 알 수 있었다.

박테리오신 생산 균주와 *L. monocytogenes*의 혼합 배양
L. monocytogenes KCTC 3569와 *E. faecium* MJ5-14

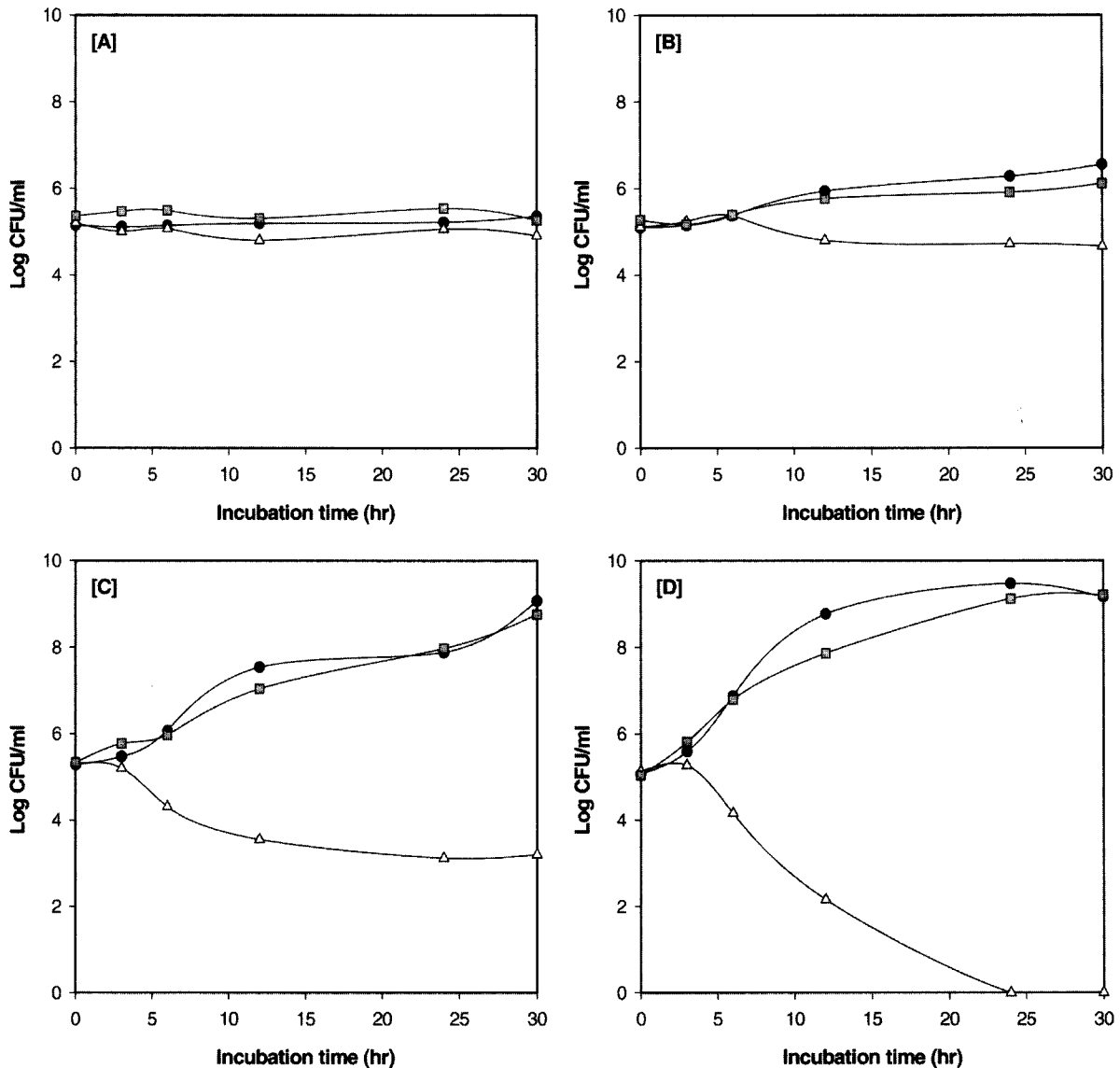


Fig. 2. Effect of *E. faecium* MJ5-14 (10^5 CFU/mL) on growth of *L. monocytogenes* KCTC 3569 (10^5 CFU/mL) in BHI broth cultured at 4°C [A], 15°C [B], 25°C [C] and 37°C [D]. -●- : *L. monocytogenes* KCTC 3569 in control, -■- : *E. faecium* MJ5-14 in mixed culture, -△- : *L. monocytogenes* KCTC 3569 in mixed culture. Data represent the means of three experiments.

균 배양액의 균수를 각각 10^5 CFU/mL로 맞춰 혼합한 후 4°C, 15°C, 25°C 및 37°C에서 배양하면서 균수 변화를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다.

L. monocytogenes KCTC 3569 10^5 CFU/mL와 *E. faecium* MJ5-14 10^5 CFU/mL을 혼합하여 4°C에서 배양했을 때 30시간까지 *L. monocytogenes* KCTC 3569 및 *E. faecium* MJ5-14 둘 다 배양시간 동안 균수 증가 없이 초기 수준을 일정하게 유지되었다. 15°C에서 배양한 경우 6시간까지는 모두 초기 균수를 일정하게 유지하다가 12시간째에

E. faecium MJ5-14는 약 1 log unit 증가한 반면에 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 균수는 초기 균수에 비해 약 0.5 log unit 감소되었다. 25°C 중에 배양하는 동안, *E. faecium* MJ5-14의 균수는 점진적으로 증가되기 시작하여 30시간 만에 약 3 log unit 증가되었고, *L. monocytogenes* KCTC 3569는 24시간 만에 약 10^2 CFU/mL까지 감소되었고 이후에는 일정하게 유지하였다. 한편, 37°C에서 혼합 배양한 경우, 24시간까지 *E. faecium* MJ5-14의 균수는 급격하게 증가하여 최대 균수인 10^9 CFU/mL에 이르렀으나, *L.*

monocytogenes KCTC 3569는 12시간 만에 초기 균수보다 약 3 log unit 감소되었고, 24시간 이후에는 생균이 검출되지 않았다.

따라서 *L. monocytogenes*와 *E. faecium*을 혼합 배양할 때, *L. monocytogenes*의 감소는 온도가 높아질수록 현저하게 나타났는데, 이것은 *E. faecium*의 증식이 활발한 온도에서 박테리옌을 생산하여 *L. monocytogenes*에 대해 항균 작용이 나타나는 것으로 사료된다.

Garcia 등²⁰⁾의 보고에 따르면, *E. faecalis* EJ97 10⁸

CFU/mL일 때 37°C에서 배양했을 때 배양 4시간 후에 박테리옌 활성이 나타나서, 8시간 만에 최대에 이르렀고, 24시간 동안 안정하게 유지되었는데, *listeria*의 초기 균수가 10⁶ CFU/mL일 때 8시간 만에 일부의 균수가 감소되었으나, 초기 균수가 10⁵ CFU/mL 이하일 경우에는 완전히 저해되었다고 하였다. 또한 enterocin EJ97을 20 AU/mL의 농도로 첨가한 후 37°C에서 배양하는 과정 중에 1.65 log unit 감소되었고, 15°C에서는 1.2 log unit 감소되었으며, 4°C에서 배양하여 얻어진 세포수는 오히려 서서히 증가되었다고 보

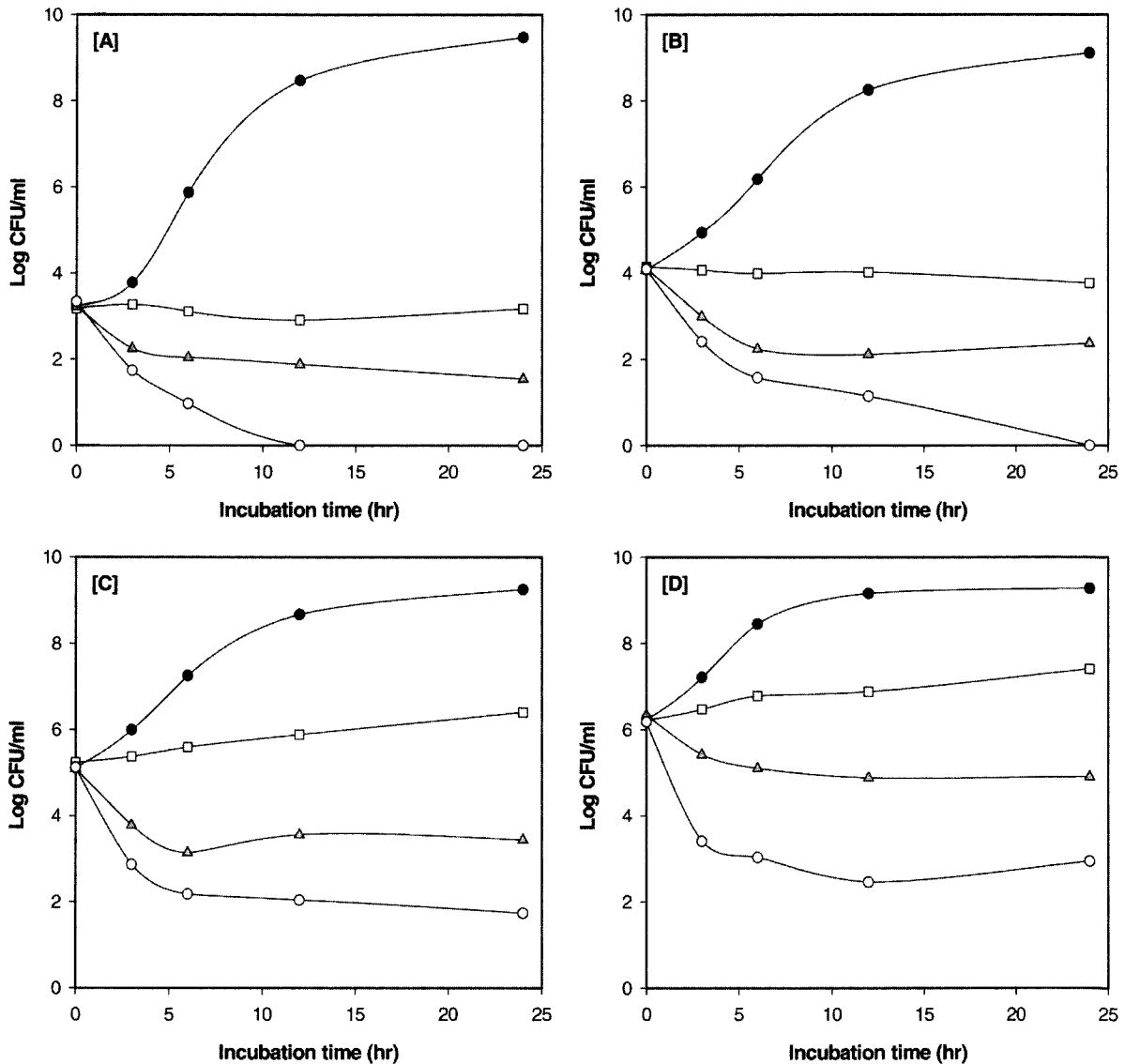


Fig. 3. Effect of different concentration of crude bacteriocin produced by *E. faecium* MJ5-14 on their growth *L. monocytogenes* KCTC 3569 10³ CFU/mL [A], 10⁴ CFU/mL [B], 10⁵ CFU/mL [C] and 10⁶ CFU/mL [D] in BHI broth at 37°C. -●-, control; -□-, 25 BU/mL, -▲-, 50 BU/mL and -○-, 100 BU/mL. Data points represent the average of at least three experiments run duplicate.

고하여 이들은 본 실험의 결과와 유사하게 37°C에서 가장 항균 효과가 뛰어난 것을 알 수 있었다.

박테리오신 첨가량에 따른 *L. monocytogenes*의 감균 효과

E. faecium MJ5-14가 생산한 박테리오신의 첨가량에 따른 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 항균 효과를 조사하기 위해 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 초기 균수를 10^3 - 10^6 CFU/mL로 조정하고 박테리오신의 농도를 25, 50 및 100 BU/mL로 첨가하여 배양하는 과정 중에 균수 변화를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다.

L. monocytogenes KCTC 3569 초기 균수가 10^3 CFU/mL일 때 박테리오신 25 BU/mL 첨가 시에는 24시간 동안 내내 초기 균수의 변화 없이 일정하게 유지하였으나, 50 BU/mL을 첨가할 경우에는 배양하는 동안에 균수를 서서히 감소되어 24시간 후에는 초기 균수 보다 약 1 log unit 이상 감소되었고, 100 BU/mL 첨가할 때에는 12시간 만에 초기 균수가 모두 사멸되었다. 한편, *L. monocytogenes* KCTC 3569 초기 균수가 10^4 CFU/mL일 때 25 BU/mL의 박테리오신을 첨가할 경우 24시간 동안 내내 초기 균수와 비슷한 수준의 균수가 검출되었고, 50 BU/mL 첨가했을 때에는 배양 12시간 만에 초기 균수 보다 약 2 log unit 감소되었으며, 100 BU/mL을 가했을 때에는 24시간 이후에 생균이 검출되지 않았다.

L. monocytogenes KCTC 3569 초기 균수가 10^5 CFU/mL일 때 박테리오신 25 BU/mL 첨가 시에는 배양 시간에

경과 될수록 균수는 오히려 증가되어 12시간 만에 초기 균수와 거의 일정한 수준이었으나 그 이후부터는 서서히 증가되어 24시간 만에 약 1 log unit 증가되었다. 그러나 50 BU/mL 첨가한 경우에는 6시간 만에 초기 균수보다 약 2 log unit 감소되다가 이후로는 일정하게 유지되었고, 100 BU/mL의 박테리오신 농도에서는 배양 6시간까지는 급격하게 감소되다가 24시간 만에 초기 균수 보다 약 3 log unit 감소되었다. 한편, 초기 균수가 106 CFU/mL일 경우 박테리오신 농도가 25 BU/mL이면 배양 초기부터 균수가 조금씩 증가되어 24시간 만에 약 1 log unit 증가되었으나, 50 BU/mL와 100 BU/mL의 박테리오신을 첨가한 경우에 배양 24시간 만에 각각 1 log unit와 3 log unit 정도의 균수가 감소하였다. 따라서 *E. faecium* MJ5-14의 박테리오신 항균 효과는 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 초기 균수와 첨가한 박테리오신의 양에 따라 좌우되어 항균 활성은 초기 균수가 적고, 박테리오신의 첨가량이 많을수록 *L. monocytogenes*의 항균효과가 높아짐을 확인하였다.

E. faecium EFM01이 생산한 박테리오신인 enterocin A는 80 BU/mL을 첨가 후 6시간 만에 *L. monocytogenes*를 약 3 log unit 감소되었으며, 6400 BU/mL 첨가한 경우에는 2시간 만에 5 log unit 감소되었다. 또한 *L. innocua* LIN를 약 2 log unit 감소시키는데 enterocin A은 60 BU/mL, enterococcin EFS2은 6.4 BU/mL, nisin은 12 BU/mL, pediocin AcH은 50 BU/mL 및 sakacin A은 500 BU/mL의 양이 필요하다고 보고한 바 있다.¹⁸⁾

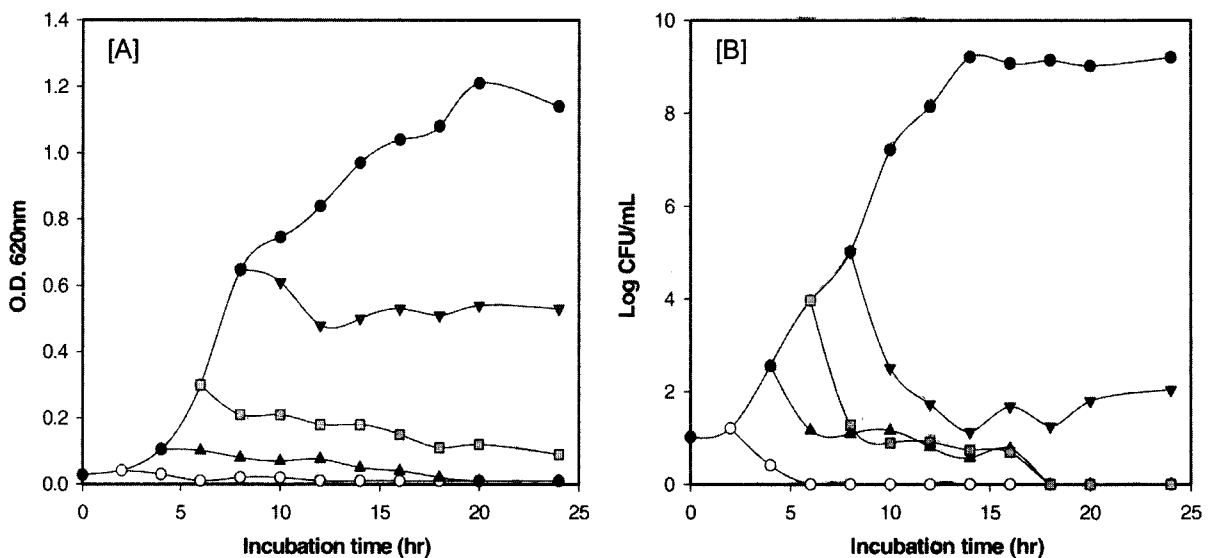


Fig. 4. Survival curves of *L. monocytogenes* KCTC 3569 by the addition of crude bacteriocin (70 BU/mL) produced by *E. faecium* MJ5-14 to growing cultures at different phase. [A] O.D. at 620 nm, [B] viable cell counts.

박테리옌 첨가시기에 따른 *L. monocytogenes*의 증식 억제 효과

L. monocytogenes KCTC 3569을 37°C에서 배양하는 과정 중에 2시간 간격으로 *E. faecium* MJ5-14의 박테리옌 70 BU/mL을 첨가하여 배양하는 동안에 흡광도와 생균수 변화를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

접종 직후부터 2시간 동안에는 유도기 단계로서 흡광도와 생균수의 큰 변화는 없었으며, 2시간 배양 직후에 첨가된 박테리옌에 의해서 초기 균수는 6시간 만에 모두 사멸되었다. 또한 배양 4시간 후에 첨가된 박테리옌으로 인해 흡광도도 서서히 낮아지고, 생균수는 2시간 만에 급격하게 감소되었으며, 배양 6시간 후에는 대수증식기 중반부에 접어들었고, 박테리옌 첨가에 의해서 생균수가 2시간 만에 약 3 log unit 감소되었고, 배양 8시간 만에 박테리옌을 첨가한 경우에는 첨가 직후에 약 3 log unit 감소되었으며 이후에는 일정한 수준으로 균수를 유지하였다.

따라서 박테리옌 첨가 직후에 생균수와 흡광도가 동시

에 감소되었으므로 이는 세포의 용해에 의한 것으로서, 균 증식 단계별에 있어서 박테리옌의 효과는 균 증식이 활발한 대수증식기 중반 이후 보다는 유도기 내지는 대수증식기 초반부에 항균 효과가 더 큰 것을 알 수 있었다.

Pucci 등¹⁷⁾은 대수증식기에 도달한 *L. monocytogenes*에 *Ped. acidilactici* PAC 1.0가 생산한 박테리옌 200 AU/mL 첨가 시에 용해속도(1/2로 탁도가 감소되는데 요구되는 시간)는 0.19/h이었으며, 500 AU/mL 첨가 시에는 0.17/h이라고 보고하였다. 한편 강과 이²⁹⁾에 의하면, *L. monocytogenes*의 균 접종 직후와 6시간 배양 후 *Lactobacillus* sp. GM7311가 생산하는 박테리옌 100 BU/mL을 첨가했을 때 초기 균수를 일정하게 계속해서 유지하였으나, 15시간 배양 후 첨가했을 때 2 log unit 감소되었고, 24시간 및 72시간 배양 후 박테리옌을 첨가한 경우 약 5 log unit의 균수가 급격히 감소하였다고 하여 이들의 결과는 본 실험의 결과와는 상반되게 대수증식기 중반 이후에 첨가된 박테리옌의 항균 효과가 더 높게 나타났다고 보고하였다.

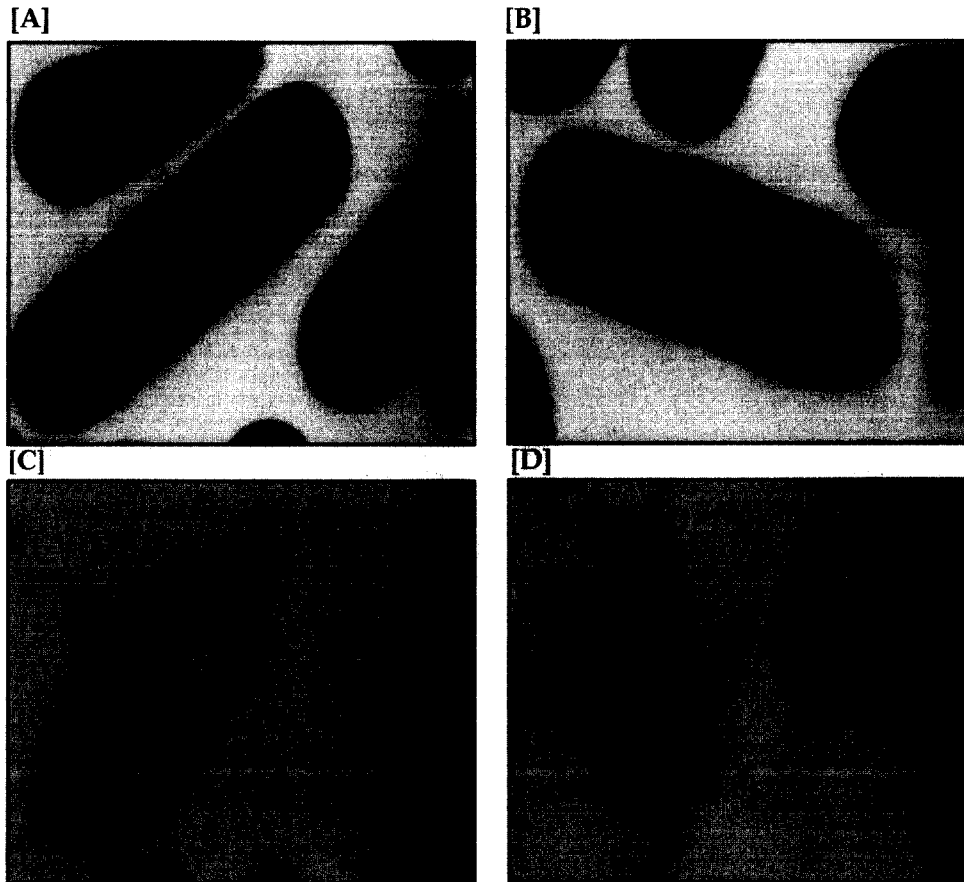


Fig. 5. Transmission electron micrographs of *Listeria monocytogenes* KCTC 3569 treated with crude bacteriocin produced by *E. faecium* MJ5-14. Cells were left untreated [A] and were treated with 25 [B], 50 [C] and 100 BU/mL [D] of crude bacteriocin for 12 hr at 37°C.

박테리오신 처리에 의한 *L. monocytogenes*의 세포 형태 변화

박테리오신을 25, 50 및 100 BU/mL 첨가하여 37°C에서 12시간 처리한 후 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 세포 형태 변화를 TEM으로 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다.

박테리오신 25 BU/mL을 첨가하여 *L. monocytogenes* KCTC 3569 세포를 대조구와 비교했을 때, 세포벽의 일부가 얇아진 것을 확인하였고, 50 BU/mL 처리했을 때 세포막 일부 끝이 파괴되면서 세포 내용물의 일부가 유출되는 현상이 나타났으며, 또한 100 BU/mL을 첨가한 경우에는 50 BU/mL 첨가했을 때보다 더 많은 부분의 세포막이 파괴되면서 세포 형태가 거의 남아있지 않고 내용물이 완전히 흘러짐을 알 수 있었다. 따라서 *E. faecium* MJ5-14가 생산한 박테리오신에 의한 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 생육 저해는 박테리오신의 bacteriolytic action에 의한 세포벽 파

괴와 세포내 물질의 유출 때문인 것을 알 수 있었다.

Ennahar 등³⁰⁾은 *L. monocytogenes*에 enterocin 81을 13,500 AU/mL 처리한 후 30분 만에 세포의 형태가 변형되고 세포 내용물이 유출되었으며, 세포 표면에 가는 섬유모양의 세포 잔해가 엉켜 있는 모양이 나타났다고 하여 본 실험의 결과와 유사한 형태가 관찰되었다. 또한 Maisnier-Patin 등³¹⁾에 의하면, *E. faecalis*가 생산한 enterococin EFS2 80 AU/mL에 의해 *L. innocua* LIN11의 세포는 용해되어 ghost cell이 나타났고, 많은 양의 세포 파편이 세포 주위에 흩어진 것이 관찰되었다고 보고한 바 있다.

사 사

본 연구는 동명대학 학술연구소 학술연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

우리나라 고유의 전통발효 식품인 메주로부터 항리스테리아 활성을 나타내는 유산균을 분리한 후 동정한 결과 *E. faecium* MJ5-14로 명명되었으며, 이들의 박테리오신은 MRS broth 중에 37°C에서 12-18시간 배양하는 동안 최대의 활성을 나타내었다. *L. monocytogenes* KCTC 3569와 KCTC 3710 및 *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*에 대한 박테리오신의 활성은 640 BU/mL이었고, *L. innocua* ATCC 33090, *L. ivanovii* ATCC 19119, *L. grayi* KCTC 3581 및 *L. seeliger* KCTC 3591에 대한 활성은 1280 BU/mL으로 나타났다. *L. monocytogenes* KCTC 3569와 *E. faecium* MJ5-14를 혼합 배양한 경우 *L. monocytogenes*의 감소 효과는 25°C 이하 보다는 *E. faecium* MJ5-14의 박테리오신 생산 최적 온도인 37°C에서 더 높게 나타났으며, *E. faecium* MJ5-14의 박테리오신 항균 효과는 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 초기 균수와 첨가한 박테리오신의 양에 따라 좌우되어 *L. monocytogenes*의 초기 균수가 적고, 박테리오신의 첨가량이 많을수록 항균효과가 높아짐을 확인하였다. 또한 박테리오신 70 BU/mL 첨가에 의한 항균 효과는 균 증식이 활발한 대수증식기 중반 이후 보다는 유도기 내지는 대수증식기 초반부에 더 크게 나타났다. 한편, 박테리오신 25 BU/mL을 첨가에 의해서 *L. monocytogenes* KCTC 3569 세포벽의 일부가 얇아지고, 50 BU/mL 이상의 농도에 의해서 세포막이 파괴되면서 세포 내용물의 유출 현상이 관찰되었다.

참고문헌

- Lazdunski, C. J.: Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. *Biochimie*, **70**, 1291-1296 (1988).
- 김혜정, 이나경, 조상문, 김기태, 백현동: 젓갈 유래 박테리오신 Lacticin NK24에 의한 식품부패 및 병원성 세균의 생육 저해. *한국식품과학회지*, **31**, 1035-1043 (1999).
- Laukova, A. and Czikova, S.: The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, **87**, 1852-186 (1999).
- 권남훈, 김소현, 배원기, 김지연, 임지연, 노경민, 김준만, 안종삼, 허진, 박용호: *Lactobacillus reuteri*의 *Bacillus anthracis* Sterne 34 F2 대한 항균효과. *한국축산공중보건학회지*, **25**, 277-287 (2001).
- Meghrou, J., Lacroix, C. and Simard, R. E.: The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, **16**, 105-114 (1999).
- Joosten, H. L. J. and Manuel, N.: Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1178-1181 (1996).

7. Mattick, A. T. R. and Hirsch, A.: Further observation on an inhibitor (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, **2**, 5-6 (1947).
8. Delves-Broughton, J.: Nisin and its use as a food preservative. *Food Technol.*, **44**, 100-117 (1990).
9. Parente, E. and Hill, C.: Inhibition of *Listeria* in buffer, broth and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *J. Food Prot.*, **55**, 503-508 (1992).
10. Moreno, M. R. F., Callewaert, R., Devreese, B., Beeumen, J. V. and Vuyst, L. D.: Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 214-229 (2003).
11. Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. and Ike, Y.: Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pY117. *J. Bacteriol.*, **178**, 3585-3593 (1996).
12. Abriouel, H., Maqueda, M., Galvez, A., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E.: Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1473-1477 (2002).
13. Allison, G. E., Woboro, R. W., Stiles, M. E. and Klaenhammer, T. R.: Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1371-1377 (1995).
14. Mayr, H. A., Hedges, A. J. and Berkeley, R. C.: Methods for studying bacteriocin. In: *Methods in Microbiology*. Norris, J. R. and Ribbons, D. W., eds., Academic Press, New York, pp. 313-342 (1972).
15. Mundt, J. O.: Enterococci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Peter, H. A. Sneath, eds., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1063-1065 (1986).
16. Devriese, L. A., Collins, M. D. and Wirth, R.: The Genus *Enterococcus*. In: *The Prokaryotes*. Albert, B., Hans, G. T., Martin, D., Wim, H. and Karl, H. S., eds., Springer-Verlag, New York, pp. 1465-1481 (1992).
17. Pucci, M. J., Vedamuthu, E. R., Kunka, B. S. and Vandergergh, P. A.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2349-2353 (1988).
18. Ennahar, S. and Deschamps, N.: Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 449-457 (2000).
19. Floriano, B., Barba, R. and Jim, J.: Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4883-4890 (1998).
20. Garcia, M. T., Canamero, M. M., Lucas, R., Omar, N. B., Pulido, R. P. and Galez, A.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ 97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Int. J. Food Microbiol.*, **90**, 161-170 (2004).
21. Siragusa, G. R.: Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3508-3513 (1992).
22. Sabia, C., Manicardi, G., Messi, P., Niederhausern, S. and Bondi, M.: Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, **75**, 163-170 (2002).
23. Jennes, W., Dicks, L. M. T. and Verwoerd, D. J.: Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 349-357 (2000).
24. Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K. and Sameshima, T.: Biochemical and genetic characterization of Mundticin KS, and Antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3830-3840 (2002).
25. Torri, T. G., Carminati, D. and Giraffa, G.: Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from diary enterococci. *Food Microbiol.*, **11**, 243-252 (1994).
26. Kim, S. K., Lee, E. J., Park, K. Y. and Jun, H. G.: A bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* SE1 isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 657-663 (1998).
27. Sabia, C., Manicardi, G., Messi, P., Niederhausern, S. and Bondi, M.: Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, **75**, 163-170 (2002).
28. Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P. and Coppola, S.: Enterocin 26NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 380-387 (1993).
29. 강지희, 이명숙: *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산하는 박테리오신의 Gram 양성균에 대한 작용형태. *한국수산학회지*. **31**, 560-566 (1998).
30. Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O. and Hasselmann, C.: Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE81 isolated from cheese. *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 521-526 (1998).
31. Maisnier-Patin, S., Forni, E. and Richard, J.: Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **30**, 255-270 (1996).