Korean J. Food Sci. Ani. Resour.
Vol. 31, No. 6, pp. 952~959(2011)
DOI http://dx.do.org/10.5851/kosfa.2011.31.6.952

ARTICLE

Pediococcus damnosus JNU 534가 생산하는 박테리오신의 특성 및 정제

이재원 · 한수민 · 윤보현 · 오세종*
전남대학교 동물자원학부

Characteristics and Partial Purification of a Bacteriocin Produced by *Pediococcus damnosus* JNU 534

Jaewon Lee, Sumin Han, Bohyun Yun, and Sejong Oh*
Division of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract

A new bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) which has been isolated from kimchi was identified as *Pediococcus damnosus* by use of API kit and 16S rDNA sequencing, and designated as *P. damnosus* JNU 534. The bacteriocin produced by *P. damnosus* JNU 534 markedly inhibited the growth of some of LAB and *Listeria monocytogenes*, whereas other pathogens including Gram negative bacteria were not susceptible. The production of bacteriocin started at the beginning of exponential phase and reached maximum activity at the early stationary phase. The bacteriocin was stable on the wide pH range of 2-9 and heat treatment up to 100°C for 15 min. The antimicrobial compound was inactivated by treatments of proteolytic enzymes indicating its proteinaceous in nature. The bacteriocin was purified by 30% ammonium sulfate precipitation followed by hydrophobic interaction column and C_{18} column chromatography. The estimated molecular weight of the bacteriocin using tricine SDS-PAGE was approximately 3.4 kDa and the identified N-terminal amino acid sequence was NH_2-ILLEELNV.

Key words: bacteriocin, *Pedidococcus damnosus* JNU 534, purification

서 론

최근 국민 생활 여건이 향상됨에 따라 소비자들은 축산식품의 안전성에 매우 관심이 커졌으며, 특히, 식육가공제품에서 인공적인 방부제나 식품첨가물이 적게 들어가거나 첨가되지 않은 제품들의 개발이 필요한 실정이다. 따라서 화학물질인 방부제나 식품첨가물의 사용을 줄일 수 있는 방법이 시급히 요구되고 있다.

유산균들은 다양한 발효식품의 생산과 저장성 향상 및 사람을 포함한 각종 동물의 장내에 서식하여 미생물총을 조절하고 건강을 증진시키는 등의 중요한 역할을 담당한다. 특히 유산균이 생산하는 항균물질 중 bacteriocin은 천연 단백질성 물질로 유전적 조작을 통해 생산이 조절될 수 있고 다양한 식품 내 존재하는 병원성 및 부패성 균들의 성장을 억제할 수 있어 bacteriocin을 이용한 천연 식품 보존제 개발에 관련된 연구들이 점차 증가되고 있는 추세이다(Nes and Johnsborg, 2004).

Bacteriocin은 미생물이 생산하는 천연의 무독성 방부제로 주목받고 있는 항균성 단백질이며 인체에 섭취되면 소화기관의 단백질가수분해효소에 의해 분해됨으로써, 인체에 무독하고 잔류성이 없다는 점에서 식품 등의 천연 방부제로서의 효용성이 증대되고 있다(Tagg *et al.*, 1976).

지금까지 알려진 bacteriocin은 수십 여종이 있으며, 같은 유산균 속의 균종일지라도 활성 범위가 서로 다른 형태의 bacteriocin을 생산하는 것으로 알려져 있다. 최근 연구보고에 의하면 bacteriocin을 생산하는 *Lactobacillus acidophilus* 30SC의 genome 분석결과 5개의 알려진 bacteriocin 유전자를 갖고 있는 것으로 확인되었다(Oh *et al*., 2011).

Lactococcus lactis subsp. *lactis*가 생산하는 대표적 bacteriocin인 nisin은 아미노산 34개로 구성된 폴리펩타이드로 섭취되었을 때 인체 내의 효소에 의해 분해되어 독성이 없는 것으로 나타나 식품보존제로 그 적용이 확대되

*Corresponding author: Sejong Oh, Division of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea. Tel: 82-62-530-2116, Fax: 82-62-530-2129, E-mail: soh@chonnam.ac.kr

어 왔고, 영국, 미국, 프랑스, 이탈리아 등 여러 나라에서 식품 첨가제로 허용되고 있다(Kim *et al*., 1993). 그러나 국내에서는 nisin이 항생제로 분류되어 있어 nisin을 포함한 순수한 bacteriocin의 식품첨가는 현실적으로 불가능하다. 그러나 bacteriocin을 생산하는 유산균 배양액의 사용은 허용하고 있기 때문에 식품의 천연 보존제로서의 bacteriocin 연구가 많이 진행되고 있다.

본 연구는 여러 천연 자원에서 분리한 유산균들을 대상으로 bacteriocin 생산 유산균을 선발하여 bacteriocin에 대한 항균 범위와 안정성 및 분자량과 아미노산 서열을 분석함으로써 축산식품 및 생물 산업에의 적용 가능성을 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

원유, 발효유, 김치 등의 식품과 사람 및 가축의 분변으로부터 분리하여 전남대학교 동물자원학부 미생물공학 연구실에 보관중인 유산균 균주들을 대상으로 항균활성 측정하였다. 유산균은 MRS broth에, Gram 양성 및 Gram 음성의 병원성 균은 tryptic soy broth(TSB; Difco, USA)에 접종하여 같은 조건으로 배양하였다.

박테리오신 생산균주의 선발 및 동정

Bacteriocin 생산균주의 선발은 각 유산균을 배양하여 상등액을 회수하였고 이를 각각 pH 6.5로 조정한 후 0.45 μm-pore size membrane filter(Advantec MFS, USA)로 여과하여 bacteriocin 활성을 확인하기 위한 시료로 사용하였다. 배양된 지시균을 1% 농도로 접종한 tryptic soy soft agar (0.85%)를 MRS 고체배지에 중층하여 각 유산균 배양액에 대한 항균 활성을 평가하였다. 항균활성은 37ºC에서 18시간 동안 배양한 후 나타나는 억제환의 크기와 희석배수와 통해 지시균의 생육 억제 여부를 관찰하여 bacteriocin 활성은 상대적 활성도(Arbitrary Units, AU)로 표시하였다.

최종적으로 선발된 유산균은 Gram stain을 통해 형태학적 특징을 확인하고 API 50 CH carbohydrate test kit(Bio Merieux, France)를 이용한 당발효성을 조사하였다. 또한, 16S rDNA 분석을 통하여 최종적으로 선발 유산균을 동정하였으며 분석에 사용된 16S primer는 5'-TAC GGG AGG CGA-3'(341f)과 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'(534r)이다.

선발 박테리오신의 특성

선발된 bacteriocin을 생산하는 유산균을 약 10^5 CFU/mL 농도로 MRS 배지에 접종한 후 37ºC에서 48시간 동안 배양하면서 3시간 간격으로 생균수와 pH를 측정하였다. 또한 각 시간대의 배양액을 상기 방법과 동일하게 처리하여 얻은 상등액을 이용하여 critical dilution method(Hoover and Harlander, 1993)에 의해 bacteriocin 활성의 변화를 측정하였다. Bacteriocin의 활성은 억제환이 나타난 최대 희석배수를 역수로 취하여 AU로 표현하였다.

박테리오신의 정제

P. damnosus JNU 534의 상등액을 회수한 다음 30% ammonium sulfate로 침전시켜 얻어진 활성 bacteriocin 용액을 -20ºC에 보관하며 사용하였다. Oh 등(2003)의 방법에 따라 직선적으로 증가하는 ethanol gradient(0-75%)에 의해 강한 소수성을 나타내는 단백질이 용출되는 원리를 이용하여 수행하였다. 이를 통해 얻은 분획에 대하여 214 nm에서의 흡광도를 측정하고 지시균에 대한 항균물질 생산 여부를 확인한 후 항균활성을 나타낸 분획만을 회수하여 각각의 bacteriocin 활성을 측정하였다. 가장 높은 bacteriocin 활성을 보인 분획을 동결건조시켜 다음단계의 분석시료로 사용하였다.

전기영동, Western blotting 및 N-terminal 아미노산 서열분석

Schägger와 Von Jagow(1987)의 방법으로 tricine-SDS-PAGE를 실시하였으며 전기영동이 완료된 gel은 Candiano 등(2004)의 방법으로 제조한 blue silver micellar solution (0.12% Coomassie Blue G-250, 10% ammonium sulfate, 10% phosphoric acid, 20% methanol)으로 염색하여 poly-peptide SDS-PAGE standards(Bio-Rad, USA)와 이동도를 비교하여 분자량을 추정하였다.

전기영동이 완료된 gel을 Mini Trans-Blot Cell(Bio-Rad, USA)을 이용하여 4ºC에서 50 V constant로 3시간 동안 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane에 blotting하였다. Blotting이 완료된 membrane을 Blue silver micellar solution으로 염색한 후 활성밴드를 membrane으로부터 잘라내어 Edman degradation(Worobo *et al*., 1995)에 의한 N-terminal 아미노산 서열분석을 하였다.

결과 및 고찰

Bacteriocin 생산균주의 선발 및 동정

9종의 유산균 균주를 대상으로 지시균들에 대한 항균활성을 평가한 결과 pH에 관계없이 안정적으로 bacteriocin을 생산하는 균주를 선발할 수 있었다(결과 미제시). Gram stain을 통해 Gram 양성의 구균 형태를 확인하였으며 당발효성을 조사한 결과(Table 1) *P. damnosus*와 96.8%의 상동성을 나타났다. 16S rDNA 실험결과에서도 동일한 미생물로 나타나 *P. damnosus* JNU 534로 명명하였다.

Table 1. Carbohydrate fermentation patterns of the bacteriocin producer on API 50 CH kit

No.	Substrate	Inhibition	No.	Substrate	Inhibition
0	Control	-	25	Esculin	+
1	Glycerol	-	26	Salicin	+
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	+
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	-
4	L-Arabinose	-	29	Lactose	-
5	Ribose	-	30	Melibiose	-
6	D-Xylose	-	31	Sucrose	-
7	L-Xylose	-	32	Trehalose	-
8	Adonitol	-	33	Inulin	-
9	β-Methyl-D-xyloside	-	34	Melezitose	-
10	Galactose	+	35	Raffinose	-
11	Glucose	+	36	Starch	-
12	Fructose	+	37	Glycogen	-
13	Manose	+	38	Xylitol	-
14	Sorbose	-	39	Gentiobiose	-
15	Rhamnose	-	40	D-Turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatose	-
18	Mannitol	-	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	-	44	L-Fucose	-
20	α-Methyl-D-mannoside	-	45	D-Arabitol	-
21	α-Methyl-D-glucoside	-	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetyl glucosamine	-	47	Gluconate	-
23	Amygdalin	-	48	2-Keto-gluconate	-
24	Arbutin	-	49	5-Keto-gluconate	-

+, positive; -, negative

선발균주의 항균범위

Table 2는 선발 균주를 이용하여 34종의 미생물에 대한 생육 저해활성을 평가한 결과를 나타낸 것이다. 대부분의 유산균 및 *L. monocytogenes*와 같은 Gram 양성균에 대해서는 항균활성을 나타냈으나, *E. coli, Salmonella* Typhimurium, *Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes* 등 Gram 음성균의 생육은 저해하지 못했다.

일반적으로 유산균 bacteriocin들은 Gram 음성균을 저해하지 못하며 이는 Gram 양성균과 음성균의 세포벽 구조 차이 때문인 것으로 보고되고 있다(Ray, 1992). Bhunia 등(1991)은 Gram 음성균에는 pedocin AcH에 대한 수용체가 존재하지 않는다고 보고하여 Gram 음성균이 bacteriocin에 대해 저항성을 가지는 이유 중의 하나로 생각되고 있다(Kim, 2002). 또한 유산균이 생산하는 bacteriocin은 proton motive force의 붕괴를 유발하여 세균의 성장을 저해하므로 outer membrane이 존재하는 Gram 음성균에는 작용하지 못하는 것으로 알려져 있다(Bhunia *et al*., 1987). 반면에 특정한 유산균 bacteriocin은 제한적으로 Gram 음성세균에 대해 생육 억제 활성을 나타낸다는 보고들도 있다(Bhunia *et al*., 1991). 일반적으로, 유산균이 생산하는 bacteriocin은 자신과 유연관계가 가까운 세균에 대해 활성을 나타내므로, 많은 유산균 bacteriocin은 *Listeria*와 같은 Gram 양성균의 생육을 억제할 수 있다(Oh *et al*., 2003). *L. monocytogenes*를 억제하는 bacteriocin을 생산하는 유산균의 능력은 발효식품 내 병원성 균의 제어를 위한 대안이 될 수 있다(Moon *et al*., 2002). 최근에는 class IIa에 속하는 bacteriocin은 항균범위가 좁지만 *Listeria*속의 세균을 사멸시키는 데 효과적이라는 연구 결과가 보고된 바 있다(Jack *et al*., 1995).

배양시간별 세포의 생장 및 박테리오신 생산

Fig. 1은 *P. damnosus* JNU 534를 37°C에서 48시간 동안 배양하면서 pH, 생균수, bacteriocin 활성을 평가한 결과이다. Bacteriocin의 활성은 균체의 생장과 산생성이 활발하게 이루어지는 3시간 이후부터 증가하기 시작하여 정지기 초반인 9-12시간에 최대(200 AU/mL)에 이른 뒤 감소하여 정지기 이후에는 100 AU/mL로 일정한 수준을 유지하였다.

Green 등(1997)의 보고에 따르면 pediocin PD-1의 생산은 대수기 초반에 시작되어 대수기 후반에 최대에 이른 후 정지기에 중단되었으며 plantaricin C(Gonzalez *et al*., 1994), pediocin SJ-1(Schved *et al*., 1993) 및 reutericin 6 (Toba *et al*., 1991) 등에서도 유사한 양상이 나타났다. 이러한 현상은 항균물질이 영양원이 고갈된 상태에서 생산

Table 2. Inhibition spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* JNU 534 against pathogenic bacteria and lactic acid bacteria

Indicator strains	Inhibition
Listeria monocytogenes	+
Listeria monocytogenes KCTC 3569	+
Listeria ivanovii	-
Listeria innocua	-
Staphylococcus aureus	+
Escherichia coli O157:H7 ATCC 43889	-
Escherichia coli O157:H7 ATCC 43894	-
Escherichia coli O157:H7 ATCC 43895	-
Salmonella Typhimurium	-
Klebsiella pneumoniae	-
Enterobacter aerogenes	-
Lactobacillus plantarum	+
Lactobacillus plantarum L167	+
Lactobacillus acidophilus NOCKS	+
Lactobacillus plantarum L165	+
Lactobacillus helveticus CH1	-
Lactobacillus gasseri KCTC 3163	+
Lactobacillus acidophilus KCCM 32820	+
Lactobacillus helveticus CH5	+
Lactobacillus crispatus KCCM 41620	+
Lactobacillus brevis KCCM 35464	+
Lactobacillus plantarum L155	+
Lactobacillus acidophilus GP1B	+
Lactobacillus plantarum KCCM 11322	+
Lactobacillus casei YIT9029	+
Lactobacillus plantarum L117	+
Lactobacillus rhamnosus GG	+
Lactobacillus paracasei ssp. *paracasei* P113	-
Lactobacillus casei	+
Lactobacillus casei YIT9018	+
Lactococcus sp. HY 449	-
Lactococcus lactis KCCM 40104	-
Leuconostoc mesenteroides KCCM 35471	+
Pediococcus pentosaceus KCCM 40464	-

+, Inhibited; -, not inhibited

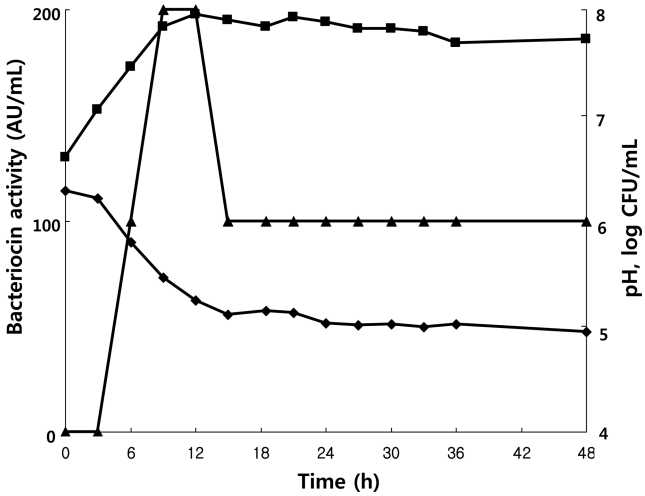

Fig. 1. Growth kinetics, pH and antibacterial activity of *P. damnosus* JNU 534 grown in MRS broth at 37°C. -▲-, bacteriocin activity; -◆-, pH; -■-, log numbers of viable cells

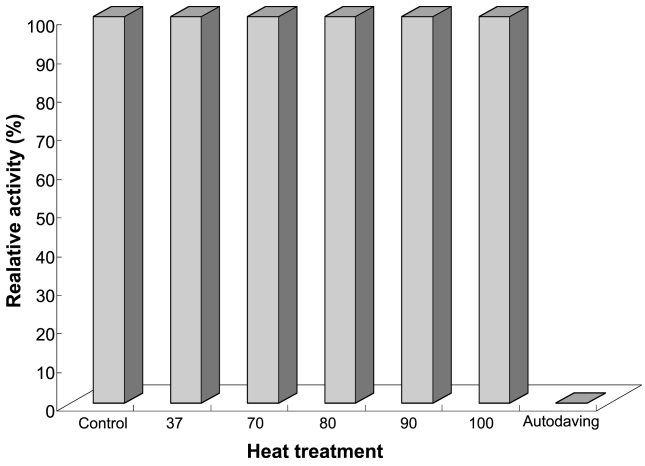

Fig. 2. Effect of temperature on the antibacterial activity of the bacteriocin produced by *P. damnosus* JNU 534.

되기 때문에 일반적으로 생육시기별로 보면 정지기 때 축적되었다가 정지기 이후 균이 사멸되기 시작하면서 배양액 내에 증가되는 단백질 분해효소의 작용에 의한 것으로 생각된다.

열처리, pH, 및 효소에 대한 안정성

Fig. 2는 열처리에 따른 bacteriocin의 안정성을 평가한 결과로 37, 70, 80, 90, 및 100°C로 각각 15분간 열처리한 경우에는 bacteriocin의 활성이 소실되지 않고 유지되었으나 121°C에서는 완전히 불활성되었다.

일반적으로 분자량이 작은 peptide 계통의 bacteriocin들은 열처리에 대해서 높은 안정성을 보이는 것으로 알려져 있고 심지어 121°C, 15분 처리에도 안정하다는 보고들도 있다(Kawai *et al*., 1994).

Fig. 3은 pH 조정에 따른 bacteriocin의 안정성을 평가한 결과이다. pH 2-9의 범위에서는 원래의 bacteriocin 활성을 유지하였으나 pH 10에서는 50%, pH 11에서는 25%로 감소하였으며, pH 12에서는 bacteriocin의 활성이 나타나지 않았다. pH에 의하여 항균물질이 활성을 상실하는 이유는 pH가 높을 경우 hydroxides ions, deprotonated amines 및 deprotonated hydroxy group들이 존재하게 되는데 이들과 서로 반응하여 bacteriocin의 구조적 변화로 인한 활성저하가 나타나게 된다(Liu and Hansen, 1990). 따라서 본 연구에서 선발된 bacteriocin은 다른 연구자들에 의해 보고된 bacteriocin들에 비해 비교적 pH 안정성이 우수한 것으로 나타났다.

효소 반응에 따른 bacteriocin의 안정성을 평가한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 세포벽의 다당류 사슬을 분해

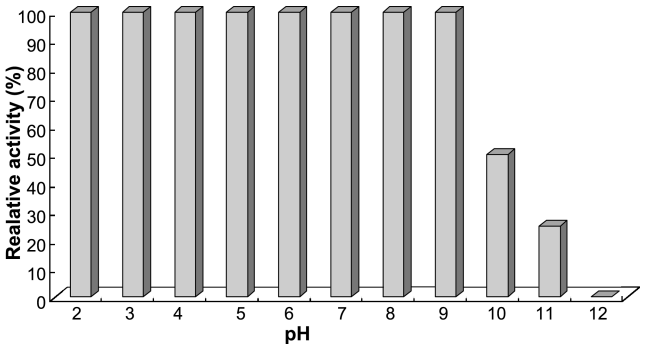

Fig. 3. Effect of pH on the antibacterial activity of the bacteriocin produced by *P. damnosus* JNU 534.

하는 효소인 lysozyme에 의해서는 bacteriocin 활성이 유지되었으나 단백질 가수분해효소인 trypsin, pepsin, protease, 및 proteinase K에 의해서는 bacteriocin 활성이 제거됨으로써 단백질성 물질임을 확인할 수 있었다.

본 연구 결과 나타난 가열에 대한 내성과 단백질분해효소에 대한 감수성은 class II bacteriocin의 전형적인 성질이다(Klaenhammer, 1993). Elegado 등(1997)은 HPLC에 의해 정제된 *P. acidilactici* M으로부터 정제된 pediocin은 pH 2-12의 범위, 121°C에서 15분과 같은 강력한 열처리에 대해서도 안정하다고 보고한 바 있다. 이는 부분 정제된 pediocin은 고도로 정제된 것보다 상대적으로 불안정하다는 점을 시사한다. 또한 정제된 pediocin은 무작위로 꼬인 구조에 기인하여 극단의 pH, 고온에도 안정하다(Elegado and Kwon, 1998). Random coil 내에서는 단백질의 변성된 구조 역시 고온이나 극단의 pH와 같은 조건에서도 역시 random coil을 유지한다. 따라서 그러한 구조는 pediocin이 극단의 pH와 고온에서도 활성을 유지하는 원인으로 제안되어 왔다(Kwon *et al.*, 2002). 한편, Bhunia 등(1991)은 HPLC에 의해 정제된 pediocin에 비해 그렇지 않은 것은 안정성이 낮다고 보고했다. 이는 bacteriocin의 정제도에 기인하는 것으로 보이며, 부분 정제된 bacteriocin 내의 불순물이나 다른 단백질의 오염은 단백질 구조를 유지하는 데 방해가 될 수 있다(Kwon, 1992). Elegado 등(1997)은 고도로 정제된 bacteriocin에 비해 부분 정제된 bacteriocin의 불순물이 살균작용에 부정적인 영향을 초래한다고 보고한 바 있다.

박테리오신의 정제

Fig. 5는 조박테리오신 용액을 hydrophobic interaction column chromatography로 분석한 결과이다. 각 분획 별로 bacteriocin 활성을 평가한 결과, 2개의 활성 peak가 나타났으며 이중 400 AU/mL를 보이는 분획을 회수하여 C_{18} column 분석 시료로 사용하였다. C_{18} column으로 분석한 결과 단일 peak로 확인되었고(Fig. 6) 2개의 peak 간에는 차이가 없었다. 따라서 이 단일 peak를 회수하여 동결건조 시킨 후 아미노산 서열분석 시료로 사용하였다. Hydrophobic interaction column chromatography나타난 2개의 활성 peak는 post-translation 과정 중에서 변형이 생긴 것으로 추정되며 실제로 N-terminal 아미노산 서열은 동일하게 나타났다.

활성 분획을 이용하여 전기영동을 수행한 다음 염색한

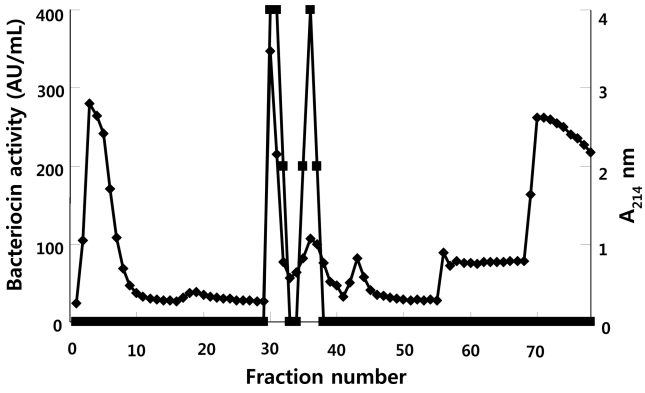

Fig. 5. Elution profile of ammonium sulfate precipitate of ihhibitory activity produced by *P. damnosus* JNU 534 on Octyl-Sepharose CL4B column. -■-, bacteriocin activity; -◆-, A_{214nm}

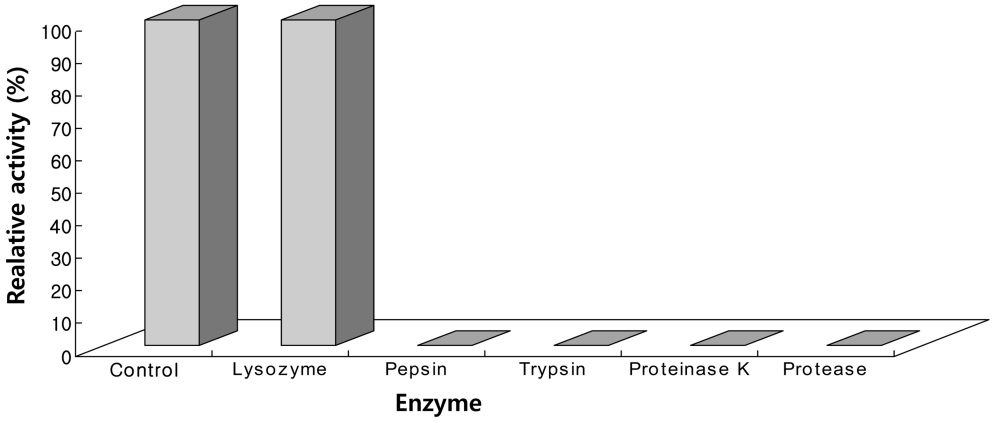

Fig. 4. Effect of various enzymes on the antibacterial activity of the bacteriocin produced by *P. damnosus* JNU 534.

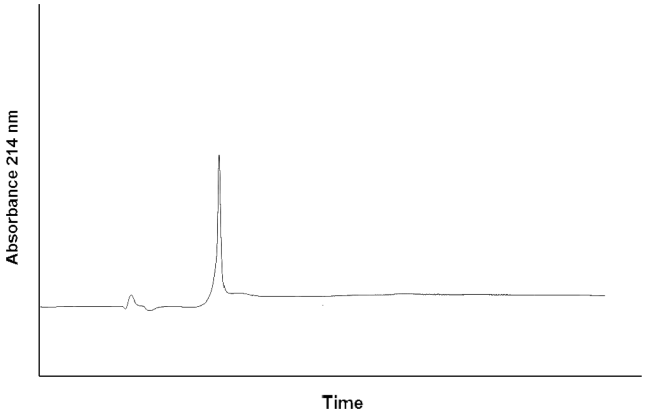

Fig. 6. Elution profile of purified bacteriocin on reverse-phase chromatography using RPC column. Elution with 0.05% TFA at a flow rate of 1.0 mL/min

결과 밴드형태로는 나타나지 않았다. 그러나 지시균을 중층한 결과 확산된 형태의 생육억제밴드를 확인할 수 있었으며 분자량은 약 3.4 kDa로 추정되었다(Fig. 7). 또한 pH 6.5로 조정한 배양 상등액에서 병원성 균인 *L. monocytogenes*에 대해 항균활성을 확인하고 전기영동을 수행한 후 soft agar에 접종된 *L. monocytogenes*를 중층한 결과 band와 같은 위치에서 생육이 저해되는 현상을 나타냈다(결과 미제시). 본 실험에서 분리된 bacteriocin은 단백질 보다는 분자량이 적은 peptide에 속하며 소수성 아미노산으로 구성되어 있기 때문에 CB 염색이 적절하지 않은 것으로 추정되었다. 일반적인 Class IIa bacteriocin의 분자량이 12 kDa 이하이고 특히 대부분은 3-5 kDa 범위에 속하며 *Listeria*를 강하게 저해한다는 사실과 관련시켜 볼 때 본

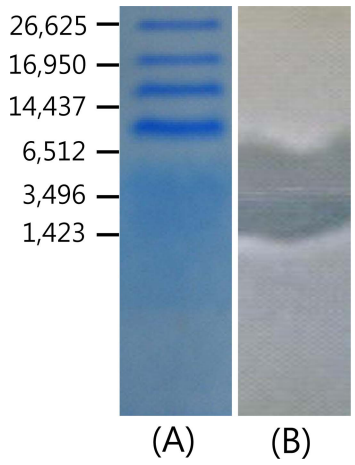

Fig. 7. Stained gel and inhibition on tiricine-SDS-PAGE of purified bacteriocin produced by *P. damnosus* JNU 534. (A) Gel stained with Coomassie Brilliant Blue G-250; lane 1, low molecular mass protein standards (Bio-Rad, USA); lane 2, blank; lane 3, purified bacteriocin. (B) Gel overlayed with cells of an indicator strain *(Lactobacillus plantarum*) inoculated into MRS agar

연구에서 정제한 bacteriocin은 Class IIa group에 속할 것으로 추정되었다(Bhunia *et al*., 1987). 이는 Green 등(1997)이 pediocin PD-1을 이용하여 tricine-SDS-PAGE를 수행한 결과 얻은 3개의 band 중에서 지시균에 대한 inhibition zone과 일치하는 band의 분자량은 약 3.5 kDa이었다고 보고한 바와 매우 유사한 결과이다.

한편 gel에 나타난 밴드가 확산되는 현상은 bacteriocin 분자의 강한 소수성(hydrophobicity)에 기인하며 이는 다른 많은 bacteriocin과 유사한 특성이다(Green *et al*., 1997). 다수의 항균성 peptide들은 지시균의 세포막과의 상호작용을 촉진할 수 있도록 하는 상당한 수준의 소수성을 나타낸다. 많은 항균성 peptide들에 의해 나타나는 소수성은 membrane-related interaction과 관계된 성질을 뒷받침한다(Ennahar *et al*., 1999).

Oh(2001)는 lactococin CU216, acidocin 30SC, leucocin W65와 같이 ClassII에 속하는 박테리오신들을 hydrophobic interaction column을 사용하여 정제할 수 있었다고 보고한 바 있다.

N-Terminal 아미노산 서열 분석

Edman degradation에 의해 아미노산 서열을 분석한 결과 최초의 8개 아미노산만 NH_2-Ile-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val(ILLEELNV) 판독되었으며 9번째 서열부터는 blocking되어 분석하지 못하였다. 본 연구에서 정제한 bacteriocin의 생산균주, 항균범위, 분자량 및 *L. monocytogenes*에 대한 생육 억제 활성 등은 class IIa bacteriocin에 속하는 pedocin의 특성과 일치했지만 기존에 보고된 전형적인 class IIa bacteriocin의 서열인 Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys(YGNGVXC)의 서열을 나타내지 않았다. 이중에서 소수성 아미노산인 Ile, Leu, Val이 높은 비중을 차지하고 있는 점은 본 연구에서 정제한 bacteriocin의 작용특성과 연관이 있을 것으로 판단된다.

Class II에 속하는 antilisterial bacteriocin(bavaricin A, carnobactriocin B2, leucocin A, pediocin AcH, mesentericin Y105, piscicocin V1a 및 V1b)들은 YYGNGV과 같은 아미노 말단 서열을 가지고 있다(Klaenhammer, 1993; Rheem *et al*., 2002). 이 서열은 cell membrane의 receptor에 결합하는 부위로 bacteriocin이 target cell 표면에 부착하도록 하는 역할을 수행한다(Oh, 2001). 일반적으로 target cell 표면은 negative charge를 띠기 때문에 cationic charge를 지닌 bacteriocin의 특정 부위가 정전기적 결합을 하여 cell에 부착되는 것으로 보인다(Ennahar *et al*., 2000).

Class IIa bacteriocin은 1차적으로 대상 미생물의 막을 투과하여 세포 내 물질의 누출과 막의 이온 불균형을 초래하는 작용을 하는 살균성 peptide이다. 이 bacteriocin은 생산 균주에 따라 항균 범위가 다소 차이를 보이지만, 가장 공통적인 특징은 YGNGV의 서열을 가진 강력한 anti-

listerial activity이다(Bhugaloo-Vial *et al*., 1996; Klaenhammer, 1993).

요 약

여러 원천에서 분리한 유산균을 대상으로 신규 bacteriocin 생산 유산균을 선발하고 API 당 발효성과 16S rDNA를 분석한 결과 *P. damnosus* 로 동정되어 JNU 534로 명명하였다. *P. damnosus* JNU 534에 의해 생산된 bacteriocin은 다수의 유산균과 *L. monocytogenes*의 생육을 억제하였지만, Gram음성균을 포함한 다른 병원성균들은 저항성을 나타냈다. Bacteriocin의 생산은 대수기 초반에 시작되어 정지기 초기에 최대 활성에 이르렀다. Bacteriocin은 pH 2-9의 넓은 범위와 100°C에서 15분간의 열처리에 대해서도 안정성을 유지하였다. 또한 각종 단백질 분해효소에 의해 활성을 상실함으로써 본 연구에서 정제한 항균 물질이 단백질성 물질임을 확인할 수 있었으며 30% ammonium sulfate 침전과 C_{18} chromatography를 통하여 bacteriocin을 정제 할 수 있었다. Tricine-SDS-PAGE에 의해 bacteriocin의 분자량을 약 3.4 kDa으로 추정하였으며, 지시균의 생육 저지환의 위치가 bacteriocin band와 일치하였다. 정제된 bacteriocin으로부터 분석한 N-terminal 아미노산 부분 서열은 NH_2-ILLEELNV로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 농림기술사업의 지원(2005-0190) 및 한국연구재단(구 학술진흥재단)의 지원을 받아 수행된 연구(F00051)로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bhugaloo-Vial, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P., and Marion, D. (1996) Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4410-4416.
2. Bhunia, A. K., Johnson, M. C., and Ray, B. (1987) Direct detection and antimicrobial of *Pediococcus acidilatici* in sodium dodecyl sulfate-polyacryamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol. Biotchnol.* **2**, 319-322.
3. Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B., and Kalchayanand, N. (1991) Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 25-33.
4. Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P. G. (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327-1333.
5. Elegado, F. B. and Kwon, D. Y. (1998) Primary structure and conformational studies of pediocin AcM, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* M. *Phil. J. Biotechnol.* **9**, 19-26.
6. Elegado, F. B., Kim, J. W., and Kwon, D. Y. (1997) Rapid purification, partial characterization and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *Int. J. Food Microbiol.* **37**, 1-11.
7. Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ayaaki, I. (2000) Class II a bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 85-106.
8. Ennahar, S., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (1999) Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 705-716.
9. Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B., and Suarez, J. E. (1994) Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2158-2163.
10. Green, G., Dicks, L. M. T., Bruggeman, G., Vandamme, E. J., and Chikindas, M. L. (1997) Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 127-132.
11. Hoover, D. G. and Harlander, S. K. (1993) Screening methods for detecting bacteriocin activity. In: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Hoover, D. G. and Steenson, L. R. (eds) Academic Press, NY, pp. 23-39.
12. Jack, R. W., Tagg, J. R., and Ray. B. (1995) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**. 171-200.
13. Kawai, Y., Sato, T., Toba, T., Samant, S. K., and Itoh, T. (1994) Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (Gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1218-1221.
14. Kim, D. S. (2002) Characteristics of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. Oh-B3. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 181-188.
15. Kim, W. J. (1993) Bacteriocins of lactic acid bacteria: Their potentials as food biopreservative. *Food Rev. Int.* **9**, 299-313.
16. Klaenhammer, T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39-85.
17. Kwon, D. Y. (1992) Synthesis of stereoisomeric trifluoroethylmandelates and their stereospecificity for the uses as the substrate of lipases in organic solvent. *J. Korean Chem. Soc.* **36**, 125-129.
18. Kwon, D. Y., Koo, M. S., Ryoo, C. R., Kang, C., H., Min, K. H., and Kim, W. J. (2002) Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in kimchi and its characteristics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 96-105.
19. Liu, W. and Hansen, J. N. (1990) Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2551-2558.
20. Moon, G. S., Kim, W. J., and Kim, M. H. (2002) Synergistic effects of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* K10 and organic acids on inhibiting *Escherichia coli*

O157:H7 and applications in ground beef. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 936-942.
21. Nes, I. F. and Johnsborg, O. (2004) Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Curr. Opin. Biotechnol*. **15**, 100-104.
22. Oh, S. (2001) Characteristics of class II bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* **19**, 133-146.
23. Oh, S., Kim, M. H., Churey, J. J., and Worobo, R. W. (2003) Purification and Characterization of an antilisterial bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. W65. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 680-686.
24. Oh, S., Roh, H., Ko, H. J., Kim, S., Kim, K. H., Lee, S. E., Chang, I. S., Kim, S. H., and Choi, I. G. (2011) Complete genome sequencing of *Lactobacillus acidophilus* 30SC isolated from swine intestine. *J. Bacteriol*. **10**, 1128-1133
25. Ray, B. (1992) Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as a food biopreservative. In: Food biopreservatives of microbial origin. Ray, B. and Daeschel, M. (eds) CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 207.
26. Rheem, S., Oh, S., Han, K. S., Imm, J. Y., and Kim, S. H. (2002) New response surface approach to optimize medium composition for production of bacteriocin by *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 449-496.
27. Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
28. Schved, F., Lalazar, Y., Henis, Y., and Juven, B. J. (1993) Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol*. **74**, 67-77.
29. Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**, 722-756.
30. Toba, T., Samant, S. K., Yoshioka, E., and Itoh, T. (1991) Reutericin 6, a new bactriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**, 281-286.
31. Worobo, R. W., van Belkum, M. J., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C., and Stiles, M. E. (1995) A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* **177**, 3143-3149.

(Received 2011.10.23/Accepted 2011.12.12)