

## *Lactobacillus salivarius* LCH1230 으로부터 생산된 *Listeria* 균 억제물질의 특성

신유리 · 임공분 · 채종표 · 강대경\*

단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

### Characterization of Anti-Listerial Substance Produced by *Lactobacillus salivarius* LCH1227

Yu-Ri Shin, Kong Boon Lim, Jong Pyo Chae, and Dae-Kyung Kang\*

Department of Animal Resources Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

#### Abstract

In this study, a LCH1227 bacterial strain that possesses anti-listerial activity was isolated from fermented food and identified as *Lactobacillus salivarius* LCH1227 based on its morphological and biochemical properties, as well as its 16S rRNA gene sequences. Anti-listerial substance also inhibited the growth of various Gram-positive bacteria, such as vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus fermentum*. The highest level of production of antimicrobial substances from *L. salivarius* LCH1227 occurred during the early stationary phase. The anti-listerial activity was found to be stable over a broad range of pH values (2.0-12.0) and after heat treatment. However, it was inactivated by proteolytic enzymes, indicating its proteinaceous nature. The apparent molecular mass of the partially purified anti-listerial substance, as measured by Tricine-SDS-PAGE, was approximately 5 kDa.

**Key words:** anti-listerial substance, *Lactobacillus salivarius*, *Listeria monocytogenes*

#### 서 론

*Listeria monocytogenes*는 토양, 물, 사료 또는 동물의 분변 등 자연환경에 널리 분포되어 있어 신선육, 채소 및 각종 가공식품에 오염되어(Faber *et al.*, 1989; Karaioannoglou and Xenos, 1980) Listeriosis를 유발시키는 병원성 미생물로 알려져 있다. *L. monocytogenes*는 Murry 등(1926)에 의해서 실험 동물에 대한 병원성 균으로 처음 소개된 이래, 특히 식품 가공 및 저온저장 중에 생존하여 식중독을 일으키는 것으로 알려져 있으며(Laura and Elmer, 1990), 이러한 점 때문에 최근의 냉장 유통제품의 급격한 증가에 따라 문제시 되고 있다(Johnson *et al.*, 1990; Vasavada, 1988).

젖산균은 각종 동물의 장관 내에 서식하며 소화관 내에서 점막 보호 및 장내 이상발효의 개선(Tagg *et al.*, 1976), 칼슘의 체내 흡수 촉진(Cavard and Lazdunski, 1979) 등 여러 가지 유익한 생리작용을 나타내기 때문에 식품, 의

약품, 사료 첨가제 등으로 이용되고 있다(Fredericq, 1958). 또한 젖산균에 의한 박테리오신(bacteriocin)의 생산이 보고된 이래로 젖산균 유래의 박테리오신에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 박테리오신이란 미생물이 생산하는 항균성 물질로서 저분자의 항균성 펩타이드나 단백질로 구성되어 있으며, 유사한 세균의 생육을 주로 저해하는 물질이다(Reevs, 1965; Tagg *et al.*, 1976). 박테리오신에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 대표적인 젖산균으로는 *Lactobacillus* 속의 *L. fermentum*(De Klerk and Smit, 1967), *L. helveticus*(Jeoger and Klaenhammer, 1986), *L. acidophilus*(Muriana and Klaenhammer, 1991), *L. plantarum*(Ruiz-Barba *et al.*, 1991) 등과 *Pediococcus* 속의 *P. acidilactici*(Ray *et al.*, 1989)와 *P. pentosaceus*(De Sad and De Nadra, 1993) 등이 있다. 박테리오신은 소화기계의 여러 단백질 분해효소에 의해 분해되어 인체에 무해하고 잔류성이 없는 장점이 있기 때문에, 최근에는 천연 식품보존제로 활용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Cleveland *et al.*, 2001). 현재 산업적으로 실용화되고 있는 유일한 박테리오신으로는 nisin이 있으며, 약 50개국에서 가공치즈, 발효유제품, 야채, 과일의 통조림 등의 보존제로서 사용되고 있다(Delves-Broughton, 1990). 발효유제품에서 분리한

\*Corresponding author: Dae-Kyung Kang, Department of Animal Resources Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea. Tel: 82-41-550-3655, Fax: 82-41-564-3655, E-mail: dkkang@dankook.ac.kr

*Lactococcus lactis*에 의해 생산된 lacticin 3147을 젖소의 유방염 치료에 효과적으로 적용한 경우가 있으며(Ryan *et al.*, 1998), *Escherichia coli*에 의해 생산되는 colicin과 microcin을 가금류 또는 소에 투여하여 *Salmonella* 및 *E. coli* O157:H7의 생육을 억제했다는 보고가 있다(Diez-Gonzalez, 2007; Gillor *et al.*, 2004).

본 연구는 축산식품의 주요 식중독균의 하나인 *Listeria monocytogenes*에 대하여 강력한 항균 활성을 지닌 균주를 선발하고, 선발된 균주가 생산하는 항균물질의 특성을 규명하기 위하여 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

0.02% sodium azide를 첨가한 de Man-Rogosa-Sharp (MRS) 배지(Difco, USA)에 전통발효식품과 축분 등을 도말하여 유산균을 분리하였다. 분리된 젖산균은 MRS broth에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 4°C에서 보관하면서 사용하였다. 항균활성을 측정하기 위하여 사용한 지시균들은 ATCC(American Type Culture Collection), CCARM (Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes), KFRI(Korea Food Research Institute), KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms), KCTC(Korean Collection for Type Culture)로부터 분양 받아 사용하였으며, *Lactobacillus fermentum* SB02, *Lactobacillus salivarius* CPM7, *Lactobacillus johnsonii* PF01은 본 실험실에서 분리하여 보관중인 균주를 사용하였다(Table 4).

### 항균 활성의 측정

분리한 균주를 MRS 액체배지에서 2일간 배양한 다음, 배양액의 항균활성을 검증하기 위해 agar well diffusion method(Tagg and Mcgiven, 1971)를 사용하였다. 1.5% 환천을 함유한 Tryptic Soy Broth(TSB, Difco, USA) 위에 지시균 배양액을 도말하여 Bioassay plate를 제조하였다. 1차 선발된 균주들의 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 10 min)하고, membrane filter(0.45 µm, Advantec Co., Japan)를 이용하여 제균한 다음, 5N NaOH를 사용하여 배양상등액을 pH 7.0로 중화시켰다. 지시균이 접종된 TSB 평판배지에 흡을 관 후 200 µL의 배양상등액을 분주하고 37°C에서 배양한 후에, 억제환 형성여부를 관찰함으로써, 항균물질 생성균주를 최종적으로 선발하였다(Lim *et al.*, 2007).

### 미생물의 동정

항균물질 생산균주를 동정하기 위하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 따라 조사하였다(Holt *et al.*, 1994). 그람염색, catalase test 및 균주의 생화학적 특성을 조사하기 위해 API 50 CHL kit(Biomérieux, France)

를 사용하였으며, 분리한 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하기 위해서는 Pavlova 등(2002)의 방법을 이용하였다. 분리한 균주의 형태학적인 특성은 Sohn 등(2004)의 방법을 준하여 주사전자현미경(Scanning Electron Microscopy, SEM)으로 관찰하였다.

### 배양시간에 따른 항균물질의 생산

선발된 항균물질 생산균주를 MRS broth에 접종하고 37°C에서 48시간 동안 배양하면서 일정시간 별로 배양액을 취하여 생균수, pH 및 항균 활성을 측정하였다. 항균물질의 활성 변화를 측정하기 위하여, 배양액을 pH 7.0으로 조정하고 membrane filter(0.45 µm, Advantec Co., Japan)로 여과한 다음 spot-on-lawn 방법(Mayr *et al.*, 1972)으로 항균활성을 측정하였다. 즉, *L. monocytogenes* ATCC 19114가  $1.7 \times 10^7$  CFU/mL로 첨가된 soft agar 위에 배양상등액을 떨어뜨리고 37°C에서 12시간 배양한 다음, clear zone 형성여부를 관찰하였다. 활성 역가는 배양액 mL당 AU(activity unit)로 표시하였다. 즉, 배양액을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역수를 취하고, 이 값에 1 mL에 대해서 환산해 주는 환산계수를 곱하여 AU/mL로 나타내었다(Paik *et al.*, 2003).

### 항균물질의 pH 및 온도 안정성

항균물질의 pH 안정성을 조사하기 위하여, 배양 상등액을 pH 2.0-12.0으로 조정하고 agar well diffusion assay를 통해 활성을 측정하였다. 온도에 따른 항균물질의 안정성을 알아보기 위하여, 배양상등액을 4, 20, 37, 40, 50, 100, 120°C에서 각각 30분간 열처리한 후에 잔존활성을 측정하였다(Chang *et al.*, 2001).

### 가수분해효소 및 계면활성제에 대한 내성

각종 가수분해효소에 대한 영향을 알아보기 위하여, 항균물질이 포함된 배양상등액에 가수분해효소 proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma Co., USA), trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma Co.), lysozyme(EC 3.2.1.17, Sigma Co.), α-chymotrypsin(EC 3.4.21.1, type I-S, Sigma Co.), pepsin(EC 3.4.23.1, Sigma Co.), lipase(EC 3.1.1.3, type VII, Sigma Co.), α-amylase(EC 3.2.1.1, Type VIII, Sigma Co.), catalase(EC 1.11.1.6, Sigma Co.)를 2 mg/mL 농도로 각각 첨가한 후에 잔존 항균활성을 측정하였다. 계면활성제에 대한 내성을 확인하기 위해, Tween 80(DAEJUNG Chemicals & Metals Co Ltd., Korea), Triton X-100(Pharmacia Biotech., Sweden)을 배양상등액과 같은 비율(v/v)로 혼합하고 상온에서 5시간 반응한 후, 잔존 항균활성을 측정하였다(Kim *et al.*, 2003). 잔존활성 측정은 agar well diffusion assay 방법을 사용하였다.

### 항균스펙트럼 조사

항균물질 생산균주를 37°C, 24시간 배양한 뒤, 배양액을 천천히 교반하면서 황산암모늄을 첨가하여 단백질을 침전시킨 후, 4°C에서 24시간 염석하여 원심분리(12,000 g, 25 min, 4°C)하였다. 침전물을 회수하여 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0)에 녹이고, Dialysis Cassette(MWCO 3,500, Thermo SCIENTIFIC, USA)을 사용하여 4°C에서 동일한 투석한 후에 항균스펙트럼 실험에 사용하였다(Lee *et al.*, 1999). 항균활성 측정은 agar well diffusion assay 방법을 사용하였고, 사용된 지시균은 Table 2에서 보는 바와 같다.

### Tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(Tricine-SDS-PAGE)

항균물질의 분자량을 측정하기 위하여, 선발균주의 배양 상등액을 사용하여 Tricine-SDS-PAGE를 실시하였다(Schgger and Von Jagow, 1987). 16.5% acrylamide gel을 사용하였고, 표준 분자량 물질로는 Precision Plus Protein Dual Xtra SDS-PAGE Standards(Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하였다. 전기영동을 실시한 후, 0.12% Coomassie Brilliant Blue G250(Bio-Rad Laboratories)으로 염색하였으며, 멸균된 증류수로 세척하였다. 세척한 gel을 TSB 고체배지 위에 놓고, 그 위에 *L. monocytogenes* ATCC 19114( $1.7 \times 10^7$  CFU/mL)이 함유된 TSB soft agar(agar 0.8%)를 증층한 다음 37°C에서 24시간 배양하였으며, 지시균 억제환이 형성되는 band와 염색한 gel상에서의 band를 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리균주의 동정

*Listeria monocytogenes* 억제균주로 최종 선발된 LCH1227 균주를 주사현미경으로 측정한 결과 간균이었으며(Fig. 1), 그람 양성, catalase 음성, 비운동성 및 유기산을 생성하는 등 젖산균의 전형적인 특성을 지니고 있었다. API CHL kit(Biomere, France)를 사용하여 탄소원 이용성을 조사한 결과, D-glucose, D-fructose, lactose, sucrose, raffinose 등은 이용할 수 있었으나, glycerol, starch, xylitol 등은 분해할 수 없었다(Table 1). 정확한 동정을 위하여 LCH1227 균주의 genomic DNA를 분리한 후에 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정하였으며, GenBank에 등록된 다른 균주들의 염기서열과 비교한 결과 *L. salivarius*와 99.7%의 상동성을 나타내었다. 따라서 선발된 균주를 *L. salivarius*로 동정하였으며, *L. salivarius* LCH1227이라 명명하였다.

### 배양시간에 따른 항균물질의 생산

*L. salivarius* LCH1227 균주의 배양시간에 따른 생장곡선을 측정한 결과, 배양 24시간째에 최대 균수  $1.6 \times 10^8$

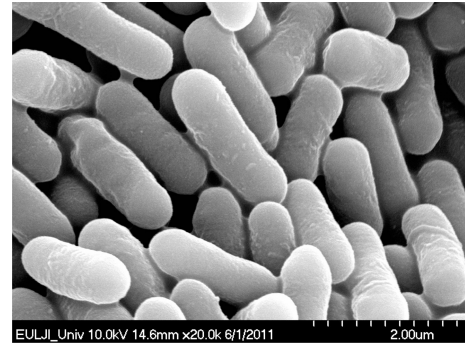


Fig. 1. Scanning electron micrograph observation of *L. salivarius* LCH1227 ( $\times 20,000$ ). Under an electron microscope, the cells are observed to be rod-shaped.

Table 1. Biochemical characterization of *Lactobacillus salivarius* LCH1227 by carbon source utilization pattern

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Shape	rod		
Gram stain	+	Arbutin	-
Catalase	-	Esculin	-
Control	-	Salicin	-
Glycerol	-	Celiobiose	-
Erythritol	-	Maltose	+
D-Arabinose	-	Lactose	+
L-Arabinose	-	Melibiose	+
Ribose D-ribose	-	Sucrose	+
D-Xylose	-	Trehalose	+
L-Xylose	-	Inulin	-
D-Adonitol	-	Melezitose	-
Methyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	-	Raffinose	+
D-Galactose	+	Starch	-
D-Glucose	+	Glycogen	-
D-Fructose	+	Xylitol	-
D-Mannose	+	Gentiobiose	-
L-Sorbose	-	D-Turanose	-
Rhamnose	-	D-Lyxose	-
Dulcitol	-	D-Tagatose	-
Inositol	-	D-Fucose	-
Mannitol	+	L-Fucose	-
Sorbitol	+	D-Arabitol	-
$\alpha$ -Methyl, D-Mannopyranside	-	L-Arabitol	-
$\alpha$ -Methyl, D-glucoside	-	Gluconate	-
N-Acetyl-glucosamine	+	2-Keto-gluconate	-
Amygdalin	-	5-Keto-gluconate	-

1) +, positive result; -, negative result

2) API 50CHB kit was used.

CFU/mL까지 성장하였으며, 이때의 pH는 3.83이었다(Fig. 2). 최대 균수를 나타낸 정체기 초기에 최대 항균활성을 나타내었으며, 배양 후기로 갈수록 항균활성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 젖산균이 생산하는 항균물질의 활성이 정체기를 지나 사멸기에 도달하면서 저하되는 특성은 기 보고된 박테리오신과 매우 유사하였다(Aasen *et al.*,



**Fig. 2. Antibacterial activity of the supernatant of *L. salivarius* LCH1227 against *Listeria monocytogenes* ATCC 19114.** Antibacterial activity was assayed by spot-on-lawn method. The cultures were incubated at 37°C using static culture and were taken in designated times.

2000). Lactococcin 140의 경우 대수기 후반부터 급격히 활성이 저해되었으며(Parente *et al.*, 1994), Mesenterocin 5도 배양 24시간 후부터 90% 이상의 항균활성 감소를 나타내었다(Daba *et al.*, 1991).

#### 항균물질의 pH 및 온도 안정성

pH가 항균물질 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 시료를 pH 2.0에서 pH 12.0의 범위에 해당하는 완충액을 사용하여 37°C에서 반응한 후 잔존 활성을 측정된 결과, 광범위한 영역에서 항균활성을 그대로 유지하는 것으로 나타났다(Table 2).

젖산균이 생산하는 대부분의 박테리오킨은 낮은 pH에

**Table 2. Effect of pH and temperature on the antimicrobial activity of the supernatant from *L. salivarius* LCH1227**

Treatment	Residual activity (%)
None (control)	100
pH 2.00	100
3.00	100
4.00	100
5.00	100
6.00	100
7.00	100
8.00	100
9.00	100
10.00	100
11.00	100
12.00	100
Temperature (°C)	
4	100
20	100
37	100
40	100
50	100
100	100
120	100

서 활성을 보이거나, 매우 국한된 범위의 pH에서만 안정한 것으로 알려져 있는데, 그 예로 *L. plantarum* C-11이 생산하는 plantaricin A는 pH 4.0-6.5 사이의 범위에서만 활성을 유지하였으며(Daeschel and Mckenney, 1990), nisin의 경우에도 pH 2.0에서는 활성을 유지하지만 pH 8.0-12.0에서는 활성이 감소하는 것으로 보고되었다(Liu and Hansen, 1990). 이에 반해 젖산균이 생성하는 박테리오킨 중 소수에 불과하지만 넓은 pH 영역에서도 안정한 경우도 있는데, *L. brevis* B37이 생산하는 brevicin 37은 pH 2-10 사이의 폭넓은 항균활성을 갖고 있으며(Rammelsberg and Radler, 1990), *Lactococcus lactis* CNRZ 481이 생산하는 lacticin 481은 pH 2-11의 넓은 범위에서도 활성을 유지하는 것으로 보고되었다(Piard *et al.*, 1990). 한편 항균물질의 온도에 대한 안정성을 조사한 결과, 120°C의 고온에서도 항균활성을 유지함으로써 내열성 또한 강함을 알 수 있었다(Table 2).

*L. salivarius* LCH1227로부터 생산되는 항균물질은 pH 2-12의 폭넓은 pH 범위뿐만 아니라 고온에서도 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다.

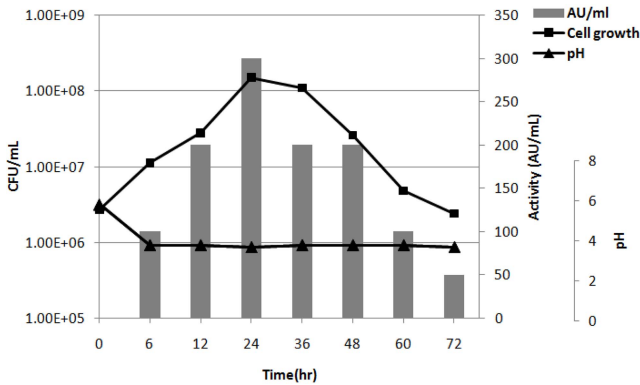
#### 가수분해효소 및 계면활성제에 대한 내성

*L. salivarius* LCH1227의 배양 상등액에 여러 종류의 가수분해효소를 2 mg/mL의 농도가 되도록 첨가하여 반응시킨 후 항균물질의 잔존활성을 측정된 결과, proteinase K, trypsin, pepsin 그리고  $\alpha$ -chymotrypsin에 의해서는 항균 활성이 완전히 소실되었으며, catalase,  $\alpha$ -amylase, lipase와 lysozyme에 대해서는 아무런 영향도 받지 않았다(Table 3). 한편, Tween 80, Triton X-100을 배양상등액에 동량 첨가하고 상온에서 5시간 동안 배양한 후에도 항균활성에 전혀 영향을 미치지 않았기 때문에, 계면활성제에 대한 내성도 매우 강한 것으로 나타났다(Table 3).

따라서 *L. salivarius* LCH1227이 생산하는 항균물질은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 아닐 뿐만 아니라 탄수화물이 포함되지 않은 단백질 또는 펩타이드로 이루어진 물질임을 추정할 수 있었다.

**Table 3. Sensitivity of supernatant from *L. salivarius* LCH1227 towards different enzymes and surfactants**

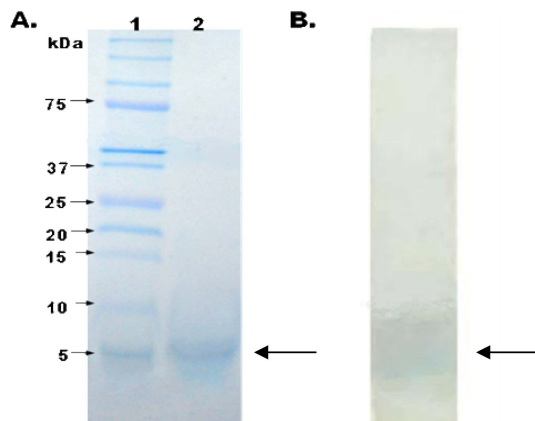
Treatment	Residual activity (%)
None (control)	100
Enzymes	
Proteinase K	0
Pepsin	0
Trypsin	0
$\alpha$ -Chymotrypsin	0
Lipase A	100
$\alpha$ -Amylase	100
Surfactants	
Tween 80	100
Triton X-100	100



**Fig. 3.** Cell growth and antimicrobial activity of *L. salivarius* LCH1227 in MRS broth. Symbols: ■, viable cell count; ▲, pH; black bar, antimicrobial activity. The cultures were incubated at 37°C using static culture and were taken in designated times.

### Tricine-SDS-PAGE

*L. salivarius* LCH1227가 생산하는 단백질성 항균물질의 분자량을 추정하기 위하여, 배양농축액을 사용하여 Tricine-SDS-PAGE를 실시하였다(Fig. 4). *L. monocytogenes*를 지시균으로 하여 항균 실험을 실시한 결과, 약 5kD 정도의 분자량 위치에서 투명한 억제환을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 박테리오신 분류상 Class IIa에 속하는 sakacin P, leucocin A, pediocin AcH, 그리고 enterocin A 같은 박테리오신의 평균 분자량이 3.4-4.9 kDa인 것으로 알려져 있다(Ennahar *et al.*, 2000). *L. salivarius* LCH1227 균주가 생산하는 항균물질의 분자량은 Class IIa 박테리오신과 유사하였으나, 항균물질의 특성을 구체적으로 확인하기 위해서는 항균물질의 순수분리 및 아미노산서열의 분석 등이 필요할 것이다.



**Fig. 4.** Tricine-SDS-PAGE of supernatant from *L. salivarius* LCH1227. A. Tricine-SDS-PAGE from the supernatant of *L. salivarius* LCH1227 and Coomassie brilliant blue G staining. Lane 1, Precision Plus Protein Dual Xtra SDS-PAGE; Lane 2, Supernatant of *L. salivarius* LCH1227. B. Antimicrobial activity of the supernatant of *L. salivarius* LCH1227.

### 항균 스펙트럼

*L. salivarius* LCH1227의 배양농축액을 사용하여, Gram 양성균 13종과 Gram 음성균 6종을 대상으로 항균 스펙트럼을 조사하였다. Table 4에서 보는 바와 같이, *L. salivarius* LCH1227가 분비하는 항균물질은 *L. monocytogenes* ATCC 19114, *Enterococcus faecalis* CCARM0011 (vancomycin resistant *Enterococcus*)에 대해 가장 강력한 항균활성을 나타내었으며, 그람 양성균인 *L. fermentum* SB02, *L. delbruekii* KCCM11357, *L. salivarius* CPM7, *L. johnsonii* PF01에 대해서도 항균활성이 관찰되었다. 이 외에도 *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Bacillus cereus* KCTC1661, *Bacillus licheniformis* KCCM12145에 대해서도 항균활성이 관찰되었다. 그러나 Gram 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* CCARM 2003, *Salmonella* Enteritidis KCCM 12021, *Salmonella* Typhimurium KCCM 40253, *Shigella flexneri* KCCM 40414, *Escherichia coli* K88에 대해서는 항균활성이 관찰되지 않았다. 기 보고된 *L. salivarius* K7의 항균 스펙트럼은 *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus sakei*만을 억제하였으며(Pilasombut *et al.*, 2006), *L. salivarius* UCC118이 생산하는 항균물질의 경우, *E. faecalis*, *L. fermentum*, *Listeria innocua* 등을 억제하였으며, *S. aureus*를 억제하지 못하는 경향을 나타내었다(Barrett *et al.*, 2007). 본 연구를 통해 선별된 *L. salivarius* LCH1227은 *L. fermentum* SB02, *L. delbruekii* KCCM11357, *L. salivarius* CPM7, *L. johnsonii* PF01 뿐만 아니라 *L. monocytogenes* ATCC 19114, *S. agalactiae* ATCC 13813, *B. cereus* KCTC1661, *B. licheniformis* KCCM12145, *E. faecalis* CCARM0011(VRE)와 같이 모든 그람양성지시균을 억제하는 등 기 보고된 박테리오신과는 다른 특성을 나타내었으며, 추후에 이 물질의 정확한 구조 및 특성 규명 등의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

*L. salivarius* LCH1227 균주가 생산하는 항균물질은 단백질성임을 확인하였으며, Class IIa로 분류된 박테리오신의 특징인 *Listeria*에 대한 항균효과가 있는 특징과 일치하였으나(Ennahar *et al.*, 2000), 항균스펙트럼에는 차이가 있었다. 이처럼 미생물이 생산하는 항균물질의 하나인 박테리오신의 장점은 단백질이나 펩타이드 물질로 이루어져 인체의 소화기관 내에서 단백질분해효소에 의해 분해됨으로써 인체에 무독성이고 잔류성이 없다는 것이다(Galvez *et al.*, 2007).

현재 리스테리아증의 원인이 되는 *L. monocytogenes*에 오염된 축산식품은 치즈, 우유 등의 유제품, 채소, 코울슬로우, 닭고기나 핫도그 등의 가공육제품 등 매우 광범위하며(Ramaswamy *et al.*, 2007), 원재료인 축산물에 존재하기도 하고, 인스턴트 식품의 가공과정 도중에 오염되어 유통되기도 한다. 하지만 안전한 재료를 구입하였다더라도 음식을 조리하는 과정에서도 오염될 가능성이 있다(Oravcov

**Table 4. Inhibitory spectrum of the concentrated antimicrobial compound from *L. salivarius* LCH1227**

Microorganism	Indicator species	Medium <sup>1)</sup>	Temperature	Inhibition <sup>2)</sup>
Gram positive	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	TSB	37°C	++
	<i>E. faecalis</i> CCARM 0011 (VRE)	TSB	37°C	++
	<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	TSB	37°C	+
	<i>S. aureus</i> KFRI 00188	NB	37°C	-
	<i>S. aureus</i> KCCM 40510 (MRSA)	NB	37°C	-
	<i>L. fermentum</i> SB02	MRS	37°C	+
	<i>L. delbruekii</i> KCCM 11357	MRS	37°C	+
	<i>L. salivarius</i> CPM7	MRS	37°C	+
	<i>L. johnsonii</i> PF01	MRS	37°C	-
	<i>L. acidophilus</i> KCCM 32820	MRS	37°C	++
	<i>L. plantarum</i> KCCM 11322	MRS	37°C	+
	<i>B. licheniformis</i> KCCM 12145	NB	37°C	++
	<i>B. cereus</i> KCTC 1661	NB	30°C	+
Gram negative	<i>P. aeruginosa</i> CCARM 2003	NB	37°C	-
	<i>S. enteritidis</i> KCCM 12021	NB	37°C	-
	<i>S. typhimurium</i> KCCM 40253	NB	37°C	-
	<i>S. flexneri</i> KCCM 40414	NB	37°C	-
	<i>E. coli</i> K88	NB	37°C	-

<sup>1)</sup>Abbreviations: TSB, Tryptic soy broth; NB, Nutrient broth; MRS, de Man-Rogosa-Sharppe; BHI, Brain heart infusion; LB, Luria-Bertani broth

<sup>2)</sup>Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: -, no inhibition zone; +, below 13.5 mm; ++, 13.5-15.5 mm

et al., 2008). 이러한 이유로 *L. salivarius* LCH1227가 분비하는 항균물질은 축산식품의 생산 및 가공, 유통단계에서 *L. monocytogenes* 억제제로서의 응용가능성이 높을 것으로 사료된다.

## 요 약

전통발효식품으로부터 *L. monocytogenes* ATCC 19114에 강한 항균활성을 보이는 균주를 분리하였다. 분리된 균주의 형태학적 및 생화학적 특성과 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 *Lactobacillus salivarius* LCH1227으로 동정되었다. *L. salivarius* LCH1227이 분비하는 항균물질은 *L. monocytogenes* 뿐만 아니라 vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus fermentum* 등과 같은 그람양성 세균에 대해 폭 넓은 항균 활성을 나타내었다. *L. salivarius* LCH1227의 생육에 따른 항균 활성을 측정된 결과, 성장정체기 초기에 최대 활성(300 AU/mL)을 나타내었고, 성장정체기 이후부터 활성이 점차 감소하였다. 항균물질의 활성은 pH 2-12 구간에서 비교적 안정하였으며, 열처리에 의해서도 활성이 소실되지 않아 열에 안정한 물질임을 알 수 있었다. *L. salivarius* LCH1227이 생산하는 항균물질은 단백질 분해효소 처리 후에 활성이 실활됨으로써 단백질성 물질인 것으로 추정되었으며, Tricine-SDS-PAGE 실험을 통하여 항균물질의 분자량은 약 5 kDa 정도임을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ00812701)의 지원에 의하여 수행된 결과로 이에 감사사를 드린다.

## 참고문헌

- Aasen, I. M., Moretro, T., Katla T., Axelsson, L., and Storro, I. (2000) Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42678. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 159-166.
- Barrett, E., Hayes, M., O'Connor, P., Gardiner, G., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., Ross, R. P., and Hill, C. (2007) Salivaricin P, one of a family of two-component antilisterial bacteriocins produced by intestinal isolates of *Lactobacillus salivarius*. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 3719-3723.
- Cavard, D. and Lazdunski, C. J. (1979) Purification and molecular properties of a new colicin, *Eur. J. Biochem.*, **96**, 519.
- Chang, J. Y., Lee, H. H., Kim, I. C., and Chang, H. C. (2001) Characterization of bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* CY2. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 410-414.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 1-20.
- Daba, H., Panadian, S., Gosselin, J. F., Simard, R., Huang, J., and Lacroix, C. (1991) Detection and activity of a bacterio-

- cin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microb.* **57**, 3450-3455.
7. Daeschel, M. A. and Mckenney, M. C. (1990) Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C11. *Food Microbiol.* **7**, 91-98.
  8. De Klerk, H. C. and Smit, J. A. (1967) Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin, *J. Gen. Microb.* **48**, 1309.
  9. Delves-Broughton, J. (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**, 100-117.
  10. De Sad, A. M. S. and De Nadra, M. C. M. (1993) Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 406.
  11. Diez-Gonzalez, F. (2007) Applications of bacteriocins in livestock. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* **8**, 15-24.
  12. Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 85-106.
  13. Faber, J. M., Sanders, G. W., and Johnston, M. A. (1989) A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *J. Food Prot.* **52**, 456-458.
  14. Fredericq, P. (1958) Colicins and colicinogenic factors. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12**, 104.
  15. Galvez, A., Abriouel, H., Lopex, R. L., and Ben Omar, N. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Microbiol.* **30**, 51-70.
  16. Gillor, O., Kirkup, B. C., and Riley, M. A. (2004) Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**, 129-146.
  17. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (1994) Regular, nonsporing gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins. Baltimore, USA. pp. 565-570.
  18. Jeoger, M. and Klaenhammer, T. R. (1986) Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 418. *J. Bacteriol.* **167**, 439.
  19. Johnson, J. L., Doyle, M. P., and Cassens, R. G. (1990) *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products (a review). *J. Food Prot.* **53**, 81-91.
  20. Karaioannoglou, P. G. and Xenos, G. C. (1980) Survival of *Listeria monocytogenes* in meatballs. *Hell. Vet. Med.* **23**, 111-117.
  21. Kim, H. T., Park, J. Y., Lee, G. G., and Kim, J. H. (2003) Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from Kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* **12**, 166-170.
  22. Laura, J. P. and Elmer, H. M. (1990) *Listeria monocytogenes* threat to a safe food supply; A review. *J. Dairy Sci.* **37**, 912-928.
  23. Lee, H. J., Joo, Y. J., Park, C. S., Kim, S. H., Hwang, I. K., Ahn, J. S., and Mheen, T. I. (1999) Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from Kimchi. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 153-159.
  24. Lim S. J., Jang, S. S., and Kang, D. K. (2007) Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* CPM-7 isolated from chicken feces. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 98-103
  25. Liu, W. and Hansen, J. N. (1990) Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microb.* **56**, 2551-2558.
  26. Mayr, H. A., Hedges, A. J., and Berkeley, R. C. W. (1972) Methods for studying bacteriocin. In: *Methods in Microbiology*, Bergen, T. and Norris, J. R. (eds) Academic Press, New York, pp. 313-342.
  27. Muriana, P. W. and Klaenhammer, T. R. (1991) Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gen for lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* **55**, 1779.
  28. Murry, E. G. D., Webb, R., and Swann, M. B. R. (1926) Disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacterium *Bacillus monocytogenes*(n. sp.). *J. Pat. Bact.* **29**, 407-439.
  29. Oravcov, K., Trnckov, T., Kuchta, T., and Kacik, E. (2008) Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 429-37.
  30. Paik, H. D., Koo, K. M., Kim, J. G., and Lee, N. K. (2003) Optimization for lactacin SA72 production by *Lactococcus lactis* SA72 isolated from Jeot-gal. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 46-50.
  31. Parente, E., Ricciardi, A., and Addario, G. (1994) Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140 NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 388-394.
  32. Pavlova, S. I., Kilic, A. O., Kilic, S. S., So, J. S., Nader-Macias, M. E., Simoes, J. A., and Tao, L. (2002) Genetic diversity of vaginal *Lactobacillus* from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 451-459.
  33. Piard, J. C., Delorme, F., Giraffa, G., Commissaire, J., and Desmazeud, M. (1990) Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk Dairy J.* **44**, 143-158.
  34. Pilasombut, K., Sakpuaram, T., Wajjwalku, W., Nitisingpraser, S., Swetwathana, A., Zendo, T., Fujita K., Nakayama, J. and Sonomoto, K. (2006) Purification and amino acid sequence of a bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine. *J. Sci. Technol.* **28**, 121-131.
  35. Ray, S. K., Kim, W. J., Johnson, M. C., and Ray, B. (1989) Conjugal transfer of a plasmid encoding bacteriocin production and immunity in *Pediococcus acidilactici* H. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 393.
  36. Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Rejitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P., and Vijila, H. M. (2007) *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **40**, 4-13.
  37. Rammelsberg, M. and Radler, F. (1990) Antibacterial polypeptide of *Lactobacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 177-184.
  38. Reeves, P. (1965) The bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **29**, 24.
  39. Ruiz-Barba, J. L., Piard, J. C., and Jimenez-Diaz, R. (1991) Plasmid profile and curing of plasmid in *Lactobacillus plan-*

- tarum* strains isolated from green olive fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 417.
40. Ryan, M. P., Meaney, W. J., Ross, R. P., and Hill, C. (1998) Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2287-2290.
41. Schgger, H. and Von Jagow, G. (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.
42. Sohn, J. H., Lee, J. H., Yi, H., Chun, J., Bae, K. S., Ahn, T. Y., and Kim, S. J. (2004) *Kordia algicida* gen. no., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from red tide. *Int. J. Syst. Environ. Microbiol.* **54**, 675-680.
43. Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**, 722.
44. Tagg, J. R. and Mcgiven, A. R. (1971) Assay system for bacteriocin. *Appl. Microbiol.* **21**, 943.
45. Vasavada, P. C. (1988) Pathogenic bacteria in milk (a review). *J. Dairy Sci.* **71**, 2809-2816.

---

(Received 2011.6.22/Revised 2011.8.22/Accepted 2011.8.23)