



ARTICLE

락토바실러스 존소니 PF01 균주 유래 항균 활성

김상훈 · 박혜균 · 황인찬 · 강대경*

단국대학교 동물자원학과

Antimicrobial Substance of *Lactobacillus johnsonii* PF01

Sang Hoon Kim, Hye Kyun Park, In-Chan Hwang, and Dae-Kyung Kang*

Dept. of Animal Resource Science, Dankook University, Cheonan, Korea



Received: March 26, 2020

Revised: March 31, 2020

Accepted: March 31, 2020

*Corresponding author :

Dae-Kyung Kang

Dept. of Animal Resource Science,
Dankook University, Cheonan, Korea

Tel : +82-41-550-3655

Fax : +82-41-550-6220

E-mail : dkkang@dankook.ac.kr

Copyright © 2020 Korean Society of Dairy Science and Biotechnology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Sang Hoon Kim

<https://orcid.org/0000-0001-9811-2972>

Hye Kyun Park

<https://orcid.org/0000-0003-3695-7480>

In-Chan Hwang

<https://orcid.org/0000-0001-8268-989X>

Dae-Kyung Kang

<https://orcid.org/0000-0001-9241-1250>

Abstract

Culture concentrate of probiotic *Lactobacillus johnsonii* PF01 inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, which was confirmed by agar well diffusion method. Protease treatment of PF01 culture concentrate indicated that the antimicrobial substance of PF01 was a bacteriocin. Investigation of PF01 genome revealed the existence of a gene similar to that of helveticin, which showed 34.9% and 41.0% identity with those of *L. helveticus* 481 and *L. crispatus* K313, respectively, thereby suggesting that the bacteriocin produced by strain PF01 is a helveticin homolog.

Keywords

lactic acid bacteria, *Lactobacillus johnsonii*, bacteriocin

서론

유제품을 비롯한 각종 식품의 보존성을 높이기 위해 살균조건 조절, 냉장 또는 냉동 보관, 식품첨가물 사용 등의 다양한 방법이 활용되고 있으며, 유산균 유래의 항균물질을 이용하여 유제품의 보존성을 향상시키는 연구도 활발히 이루어지고 있다[1, 2]. 유산균 유래의 항균물질에는 박테리옌, 젖산, 초산, diacetyl, 과산화수소 등 다양한 물질이 보고되었다[3]. 그 중에서도 박테리옌은 항생물질과는 달리 자신의 유전자로부터 직접 생합성되는 단백질로서, 그동안 다양한 종류의 박테리옌이 유산균으로부터 발견되었다[2, 4]. 특히, 박테리옌은 사람이나 동물이 섭취하게 될 경우에 소화기관에서 가수분해됨으로써 잔류성이 없기 때문에 식품보존제로서 매우 유망한 소재이기도 하다[5]. 전세계적으로 가장 많이 연구된 박테리옌 중의 하나는 nisin으로서, 미국 식품의약국에서 GRAS 식품첨가물로 인정한 바 있으며, 여러 국가에서 실제로 식품에 사용하고 있다[6]. 또한, 박테리옌은 식품산업뿐만 아니라, 충치 예방, 항생물질 내성균 억제, 염증 억제, 피부질환 치료 등 다양한 분야에서의 응용에 관한 연구가 세계 각국에서 활발히 이루어지고 있다[3, 7, 8].

Lactobacillus johnsonii PF01은 장관 흡착능 및 내산성, 내담즙성이 우수한 특성을 가진 균주로서[9], 그 유전체에 관한 정보가 보고된 바 있다[10]. 본 연구에서는 *L. johnsonii* PF01 균주가 박테리옌 특성을 가진 항균물질을 분비하며, PF01 균주의 유전체에 박테리옌 유전자가 존재함을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약

유산균의 배양을 위해 *Lactobacilli* MRS broth(BD, USA)와 Bacto™ Agar(BD, USA)를 사용하

였다.

2. 사용균주 및 배양조건

항균물질 생산균주로 사용된 *L. johnsonii* PF01(NCBI Accession No.: PRJNA67469)을 37°C에서 3회 계대배양한 후에 본 실험에 사용하였다. 이후 활성이 유지된 균주를 MRS 액체배지에 0.1%(v/v) 접종하고 24시간 동안 배양하였으며, 8,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 제거하였다. 상등액을 회수한 후에 농축하여 항균실험에 사용하였다. 항균실험을 위한 지시균으로는 *Staphylococcus aureus* KFRI 00188 균주를 사용하였다.

3. 항균물질의 농축

L. johnsonii PF01 배양액 1리터에 100 mesh 수준으로 분쇄한 황산암모늄(DAEJUNG, Korea)을 70%까지 서서히 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 용액을 4°C에서 12시간 동안 저장한 후에, 8,000 g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 회수하였으며, 50 mM Tris-Cl buffer(pH 7.0)에 용해시켰다. 용해된 시료를 dialysis membrane(Pre-wetted RC tubing [MWCO: 1 kD], Spectra/Por®, USA)에 투입한 후에 4°C에서 12시간 동안 투석하여 염을 제거하였으며, 항균실험에 사용하였다.

4. 항균실험

L. johnsonii PF01 배양농축액의 항균실험은 agar well diffusion assay 방법[7]을 사용하였다. PF01 균주가 배양농축액을 0.45 μm pore size의 필터(BioFACT, Korea)를 사용하여 멸균한 후에 실험에 사용하였다. 먼저, 지시균인 *Staphylococcus aureus* KFRI 00188 배양액 0.1%(v/v)를 soft agar medium(0.75% agar)과 접종한 후에 MRS 고체배지 표면에 분주하였다. 1시간 후에 멸균된 glass cylinder를 사용하여 MRS 고체배지에 구멍을 뚫었으며, PF01 균주의 배양농축액 200 μL 를 주입하였다. 이를 30°C에서 2-3일간 배양한 후에 well 주위의 투명한 생성 여부를 확인하였다.

5. 항균물질 유전자의 아미노산 서열 비교분석

PF01 유전체로부터 항균물질 유전자를 탐색하고, 아미노산 서열을 분석하기 위해 Bioedit 프로그램[11]과 Ezbiocloud[12]를 사용하였다. National Center for Biotechnology Information(NCBI) 데이터베이스를 활용한 유사성 분석을 위해서는 Basic Local Alignment Search Tool(Blastx/Blastn) 프로그램을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. *L. johnsonii* PF01 유래의 항균물질

Fig. 1은 *L. johnsonii* PF01 균주의 전자현미경 사진으로서, 전형적인 락토바실러스 속의 형태를 띠고 있었다. *L. johnsonii* PF01 배양상등액을 황산암모늄으로 농축한 후에 agar well diffusion 방법으로 항균력을 관찰한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. PF01 균주의 배양상등액 농축액은 지시균인 *Staphylococcus aureus* KFRI00188의 성장을 억제하는 활성을 나타내었다. PF01 균주가 분비하는 항균물질은 단백질분해효소(proteinase K)에 의해 항균활성이 소실되지 않는 특성을 나타냄으로써, 항균물질이 박테리오파지 가능성을 시사하였다(data not shown). 향후에는 PF01 균주가 분비하는 항균물질이 KK01 이외의 다른 그람양성 및 음성균의 생장억제 여부에 대해서도 조사할 필요가 있을 것으로 사료되었다.

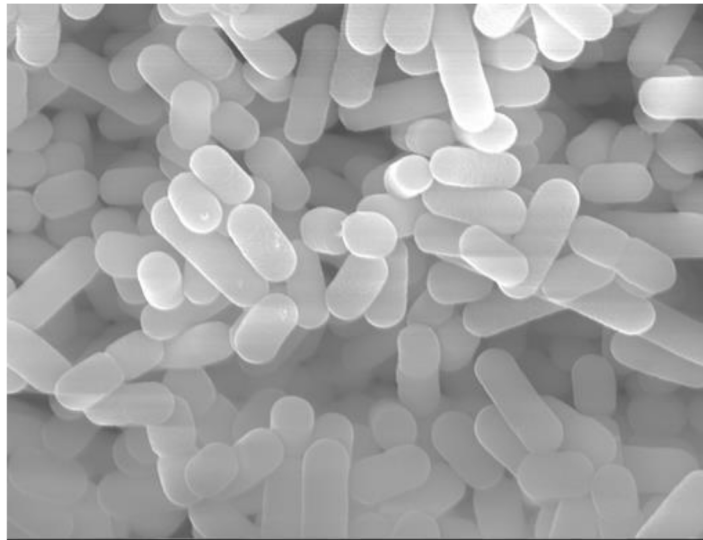


Fig. 1. Scanning electron microscope observation (magnification×10 k) of *Lactobacillus johnsonii* PF01.



Fig. 2. Inhibition of *Staphylococcus aureus* KFR100188 by *Lactobacillus johnsonii* PF01 via agar well diffusion method. Culture supernatant of *L. johnsonii* PF01 was concentrated using ammonium sulfate. 0.2M HCl was used as positive control (PC).

2. *L. johnsonii* PF01 유전체로부터 항균물질 유전자의 분석

Lee 등[10]이 보고한 *L. johnsonii* PF01 유전체에서 항균물질 유전자를 검색한 결과, 37.02 kb 크기의 helveticin J와 상동성이 매우 높은 유전자가 검색되었다. Helveticin J homologue를 아미노산으로 번역한 후에 상동성 검색을 실시한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. *L. johnsonii* PF01 유래의 helveticin J homologue는 각각 *L. heveticus* 481 유래의 helveticin과 34.9%, *L. crispatus* K313 유래의 helveticin과 41.0%의 상동성을 나타내었다. 뿐만 아니라, *L. heveticus* 481 및 *L. crispatus* K313 유래의 helveticin과의 상동성이 34.1%로서, PF01 균주의 유전체에 존재하는 유전자가 helveticin 유전자일 가능성이 높을 것으로 추측되었다.

Helveticin J 박테리오퓌린은 *L. helveticus*에서 발견되었으며[13], class III에 해당하는 항균단백질로 알려져 있다[14]. Joerger 등[15]은 *L. helveticus* 481 균주로부터 helveticin J 유전자를 클로닝한 바 있다. Sun 등[16]은 *Lactobacillus crispatus*로부터 helveticin M을 분리하였으며, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *Enterobacter cloacae* 등에 대해 항균능을 나타내었다. Stoyancheva

```
Helv J MKHLNETTNRILSCFDMDTGYQAVVCKGNVGSKYVYGLQLRKGATT--ILRGYRGSKINN-----FILELSGQA 68
Helv M ----MVKNYDGLQSGRINGMHVVAQVGAVIDNHIFALQLLHSSHG---FRGARKQEGLTKNVDY----SEPHLVMTG 67
Helv PF01 ----MIGRETQICLVNKLNIHHVVVQASAIIDGNSVVFALQLLHKQSDVVVYQTPNDSETVTFDEDPILYLRGPNASGTA 79
*****
GGHTCTWEEFAGDRKDINGEERAGCWFEGVIGKPKSIEGSKI IWARQIARVDLRNQMGPYNS-TDFPRLSYLNRAGSNFFAG 147
FGHTCTWVPANDKD-----EYFVGAKPN-SGN---WTTQIARVKYPKLLSENYTSNTQLPRLSRLNRATDVFDG 133
GGHTCTWICSGENN-----KWFVGTGKPKRCGNT--YWTTQIARVTVPGYQTCVFNANTDLRPLSYLNRAGAGYGDG 145
-----NKMTHAEAAVSPDYTRFLIATVENNCIGHFTIYNLDTINEKLDE-KGNSEDVNLVTKYEDSFIIDNLYG- 216
-----HNHLHRVEASVSPNGKYFMIAAIWDDSGHFALYDLNEVNCQLD--ENGTNTPTITDLHCLSAFHIDNFDHF 207
GTVYFGRDLVRVEATVSPNGHYFLIASIDINHTGYFALYDLNEVNNKLDAAEKAEDINVENLTCLGAFKVPFHFND- 221
- DDNSIVNSIQGYDLNDGNIYISSCKAPDFDGSYYAHKQIVKIPYYARSKESQWRAVNLSEFGGLDIPGKHSEVE 295
SEEAFCMIDSVQSYAIDDDKNIYISNQLSPKIDHATGEVTTWSRKIVKFPWGETNPNWQVAMIDG---IDLDPRISEVE 284
-----CKIVSIQGYIDDNKDIYISSQSPHPTFLGFRQCKPREIVKIPWGMVDPDKWSVVNLDNSLKLDAFDCTEFE 296
SIQIIGENHCYLTVAHYHKNKAG---ENKTTLNEIYELSWN- 333
SIHVCAFDDIYLTVAHYHQRKYVRDGEFKLRTLENGIFHISDLG 326
SIQVTS-DCLYLTVAHYHCRNSD-----LTTLMNRIYQVEK- 331
```

Fig. 3. Alignment of the helveticin homologue from *Lactobacillus johnsonii* PF01 with helveticins from GenBank database. Helveticin contained three highly conserved motifs G-H-T-Q-T-W, T-Q-I-A-R and L-P-R-L-S [16], marked with an asterisk (*). The helveticin sequences are as the followings; Helv J from *Lactobacillus helveticus* 481 (AAA63274.1), Helv M from *Lactobacillus crispatus* K313 (ASV46239.1) and Helv PF01 from *Lactobacillus johnsonii* PF01 (EGP13559.1).

[17]는 다수의 *L. crispatus* 로부터 helveticin 유전자의 존재를 보고한 바 있다.

현재까지, 박테리옌 생산균주의 탐색, 유산균 유래의 박테리옌 정제 및 특성 조사 등 많은 기초연구가 진행된 바 있다. 본 연구에 사용된 *L. johnsonii* PF01 균주의 유전체 분석을 통하여 PF01 균주가 분비하는 항균물질은 helveticin과 매우 유사한 박테리옌일 것으로 추측되었다. 향후에는 *L. johnsonii* PF01의 유전체부터 helveticin homologue 유전자의 클로닝 및 발현실험을 통하여 항균물질의 특성을 추가적으로 규명할 필요가 있을 것으로 사료되었다.

요약

장관 흡착능 등을 비롯한 프로바이옌 활성이 우수한 *Lactobacillus johnsonii* PF01의 배양상 등액을 황산암모늄으로 70% 농축한 후에 항균능을 조사한 결과, 황색포도상구균을 억제하는 활성을 나타내었다. PF01 균주가 분비하는 항균물질은 단백질분해효소 proteinase K에 의해 항균활성이 소실되지 않는 특성을 나타냄으로써, 항균물질이 박테리옌일 가능성을 시사하였다. *L. johnsonii* PF01 유전체에서 박테리옌을 코딩하는 유전자를 검색한 결과, helveticin과 상동성이 높은 유전자가 존재함을 확인하였다.

Conflict of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(세부과제번호: PJ 01322303)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. Gould GW. Biodeterioration of foods and an overview of preservation in the food



- and dairy industries. *Int Biodeterior Biodegradation*. 1995;36:267-277.
2. Benmechrene Z, Fernandez-No I, Kihal M, Böhme K, Calo-Mata P, Barros-Velazquez J. Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Pat DNA Gene Seq*. 2013;7:66-73.
 3. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Ann Biol Res*. 2010;1:218-228.
 4. Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J*. 2006;16:1058-1071.
 5. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*. 2007;120:51-70.
 6. Sobrino-López A, Martín-Belloso O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int Dairy J*. 2008;18:329-343.
 7. Hwang IC, Oh JK, Kim SH, Oh S, Kang DK. Isolation and characterization of an anti-listerial bacteriocin from *Leuconostoc lactis* SD501. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 2018;38:1008-1018.
 8. Wannun P, Piwat S, Teanpaisan R. Purification, characterization, and optimum conditions of fermencin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016;179:572-582.
 9. Chae JP, Valeriano VD, Kim GB, Kang DK. Molecular cloning, characterization and comparison of bile salt hydrolases from *Lactobacillus johnsonii* PF01. *J Appl Microbiol*. 2013;114:121-133.
 10. Lee JH, Chae JP, Lee JY, Lim JS, Kim GB, Ham JS, et al. Genome sequence of *Lactobacillus johnsonii* PF01, isolated from piglet feces. *J Bacteriol*. 2011;193:5030-5031.
 11. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999;41:95-98.
 12. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017;67:1613-1617.
 13. Joerger MC, Klaenhammer TR. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol*. 1986;167:439-446.
 14. Thompson JK, Collins MA, Mercer WD. Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. *J Appl Bacteriol*. 1996;80:338-348.
 15. Joerger MC, Klaenhammer TR. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J Bacteriol*. 1990;172:6339-6347.
 16. Sun Z, Wang X, Zhang X, Wu H, Zou Y, Li P, et al. Class III bacteriocin helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2018;45:213-227.
 17. Stoyancheva G. Study of helveticin gene in *Lactobacillus crispatus* strains and evaluation of its use as a phylogenetic marker. *Arch Microbiol*. 2020;202:205-208.