

Lactobacillus sp. GM7311이 생산하는 박테리오신의 Gram 음성균에 대한 작용형태

강지희 · 이명숙
부경대학교 미생물학과

Mode of Action of the Bacteriocin from *Lactobacillus* sp. GM7311 against Gram Negative Bacteria

Ji-Hee KANG and Myung-Suk LEE

Dept. of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

The antimicrobial action of bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp. GM7311 against three Gram negative bacteria, *Proteus mirabilis*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Escherichia coli*, was investigated. When the bacteriocin was added to the culture at different stages, viable cells of all of the indicator strains tested were decreased, even though the most inhibited indicator cell growth stages were different.

Transmission electron microscopic observation of indicator strains treated with bacteriocin revealed cell lysis, indicating the cell membrane appears to be the primary site of action. The amino acids concentration of indicator strains treated with bacteriocin were diminished and fatty acids compositions were changed as compared with controls.

Key words: bacteriocin, *Lactobacillus* sp. GM7311, *Proteus mirabilis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, cell lysis

서 론

젖산균이 생산하는 박테리오신은 다양한 활성 범위와 작용 기작, 분자량 및 유전적 배경을 가진 비교적 저분자량의 anti-bacterial protein으로써, 섭취시 체내에서 쉽게 분해될 수 있는 등 일반 항생물질이나 보존제보다 안전성의 측면에서 이점을 가지고 있다. 박테리오신은 여러 종류의 미생물에 의해 생산되는데, 이미 GRAS (General Recognized As Safe)로 인정받아 실제 첨가가 허용되어 있는 nisin을 포함한 몇몇 박테리오신의 작용기작에 대해 활발한 연구가 진행중이다 (Abee et al., 1995; Bruno et al., 1992; Hurst, 1981).

박테리오신은 항균 범위가 좁아 Gram 양성균이나 그 생산 균주와 밀접한 관계가 있는 미생물에 주로 효과가 있으며, Gram 음성균에는 거의 효과가 없는 것으로 보고되고 있는데, 그 이유는 Gram 음성균에는 phospholipids와 proteins 및 lipopolysaccharides (LPS)로 구성된 outer membrane이 있어 이것이 외부물질의 침입을 막는 barrier로 작용하기 때문인 것으로 알려져 있다 (Abee et al., 1995; Nikaido and Vaara, 1987). 또한, 대부분의 박테리오신은 식품내에서 증식하는 미생물에 대해 bactericidal (Venema et al., 1993)로 작용한다고 알려져 있으나 최근에는 bacteriostatic (Gonzalez and Kunka, 1987) 및 bacteriolytic effect (Kim et al., 1994; Bhunia et al., 1991)를 가진 박테리오신에 대해서도 보고되고 있다.

본 연구에서는 시판 유제품에서 분리·동정 (Lee et al., 1997)한 *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산하는 박테리오신의 Gram 음성 균주에 대한 작용기작을 알아보기 위해 세가지 Gram 음성 균주의 TSB (Tryptic Soy broth) 배양액에 일정 시간 간격별로 박테리오신을 첨가하여 균수 변화와 함께 전자현미경 사진과 아미노산 및 지방산 조성 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1) 조박테리오신의 생산과 항균력 측정 방법

전보 (Kang and Lee, 1998)와 동일한 방법을 사용하여 조박테리오신을 얻었으며, microdilution method (Toba et al., 1991)에 의해 항균력을 측정하였다.

2) 박테리오신의 첨가시기에 따른 생균수 측정

TSB에 *Proteus mirabilis*와 *Vibrio parahaemolyticus*, 그리고 *Escherichia coli*를 약 10^2 cfu/ml로 접종한 후, 여기에 *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산하는 박테리오신을 최종농도 100 BU/ml가 되도록 배양이 진행중인 각 균주에 일정한 시간 간격별로 첨가하였다. 첨가 후 각각 37°C, 24시간 배양한 다음 APHA (American Public Health Association, 1992) 방법에 따라 잔존 생균수를 측정하였다.

3) 전자현미경 (TEM) 관찰

원래의 cell과 박테리오신 처리 cell의 상태 변화를 transmission electron microscope (TEM)를 사용하여 관찰하였다. 2)항의 실험 결과 박테리오신 처리에 의해 각 균주별로 가장 균수 감소가 큰 시기를 선택하여 실험하였는데, 세 균주 모두 9시간째 배양액에 각각 100 BU/ml의 박테리오신을 첨가하여 24시간 배양한 후 cell을 회수하였다. 회수된 cell은 역시 전보 (Kang and Lee, 1998)와 같은 방법으로 전처리하여 전자현미경 관찰하였다.

4) 아미노산 및 지방산 분석

Lactobacillus sp. GM7311이 생산하는 박테리오신이 균체의 아미노산 및 지방산 조성에 끼치는 영향을 알아보기 위해 3)항과 같은 방법으로 균체를 회수한 후 아미노산 및 지방산 분석을

실행하였으며, 전처리 방법은 모두 전보 (Kang and Lee, 1998)와 동일하게 하였다.

결 과

1) 박테리오신의 첨가시기에 따른 균수 변화

박테리오신 첨가에 따른 세 균주의 증식 시기별 영향에 대해 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

먼저 *P. mirabilis*의 경우 (Fig. 1A), 균 접종 직후 및 3시간, 9시간 배양한 다음 박테리오신을 첨가한 시험구에서는 첨가 후 각각 21시간, 12시간, 18시간 이내에 균락 형성이 어려운 수준까지 생균수가 감소하였다. 한편, 15시간 및 24시간 배양한 후 박테리오신을 첨가한 경우는 첨가 후 12시간 동안은 균수 감소를 보였으나 이후로는 10^3 및 10^6 cfu/ml의 균수를 유지하였다. *V. parahaemolyticus* (Fig. 1B)와 *E. coli* (Fig. 1C)도 유사한 양상을 보였는데, 균 접종 직후 및 3시간, 9시간, 12시간 배양액에 박테리오신을 첨가했을 경우, 첨가 즉시 급격한 균수 감소를 보여 6~9시간 이내에 모두 균락을 형성하지 못하는 수준까지 감소하였다. 그러나 21시간 배양한 다음 박테리오신을 첨가했을 경우, *E. coli*는 첨가 후 24시간만에야 거의 사멸하였으며, *V. parahaemolyticus*는 10^3 cfu/ml까지만 감소하는 것으로 나타나 정지기에 있어서는 박테리오신의 항균 효과가 감소하였다.

2) 박테리오신 처리 cell의 형태 변화

박테리오신을 처리한 *P. mirabilis*, *V. parahaemolyticus* 및 *E. coli*의 형태 변화를 TEM을 이용하여 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다.

세 균주 모두 박테리오신을 처리하지 않은 대조군 (a)에 비하여 박테리오신을 처리했을 경우 (b), 세포벽 일부의 파괴로 세포 내용물이 유출되는 것이 관찰되어 본 박테리오신의 bacteriolytic action을 보여주었으며, 특히 *E. coli*와 *V. parahaemolyticus*는 세포벽의 손상 정도가 심한 것으로 나타났다.

3) 박테리오신 처리 cell의 아미노산 조성 변화

Lactobacillus sp. GM7311이 생산하는 박테리오신에 의한 균체의 아미노산 조성 변화를 살펴본 결과 (Table 1), *P. mirabilis*는 methionine의 함량이 크게 감소하였고 그 외의 아미노산 성분은 이보다 감소폭이 적었으며, proline은 오히려 증가하는 경향을 보였다. *V. parahaemolyticus*는 methionine과 tyrosine이 미비한 증가를 보였지만 대부분의 아미노산 성분이 감소하였으며, *E. coli*의 경우는 모든 아미노산 성분의 함량이 감소하는 것으로 나타났다.

4) 박테리오신 처리 cell의 지방산 조성 변화

박테리오신을 처리하기 전·후의 시험균주에 대해 지방산 조성 변화를 분석하여 Table 2에 나타내었다.

*P. mirabilis*의 경우는 C17:0 cyclo, C17:0, C18:0이 50% 이상의 감소를 보인 반면, C16:1 w7c/15 iso 2OH와 C18:1 w9c, C18:1 w7c/w9t/w12t가 증가한 것으로 나타났다. *V. parahaemolyticus*는

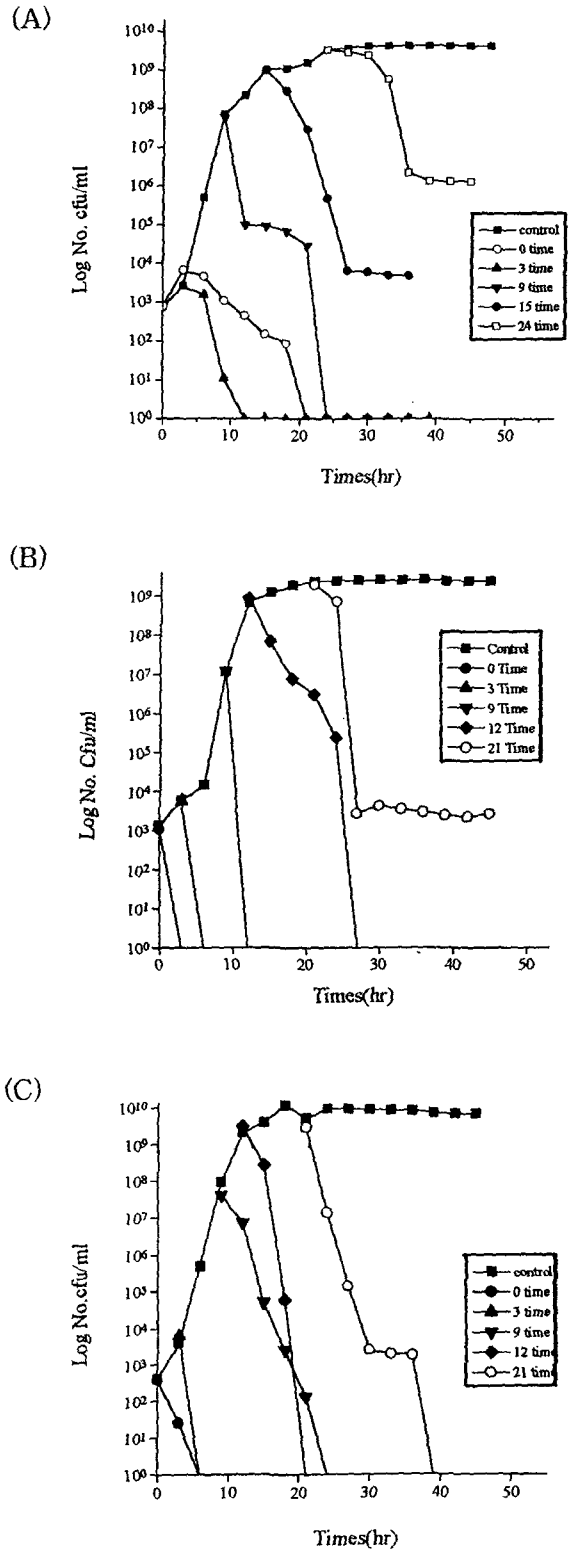


Fig. 1. Survival curves of Gram negative bacteria by the addition of bacteriocin (100 BU/ml) to growing cultures at different phase. (A) *Proteus mirabilis* (B) *Vibrio parahaemolyticus* (C) *Escherichia coli*.

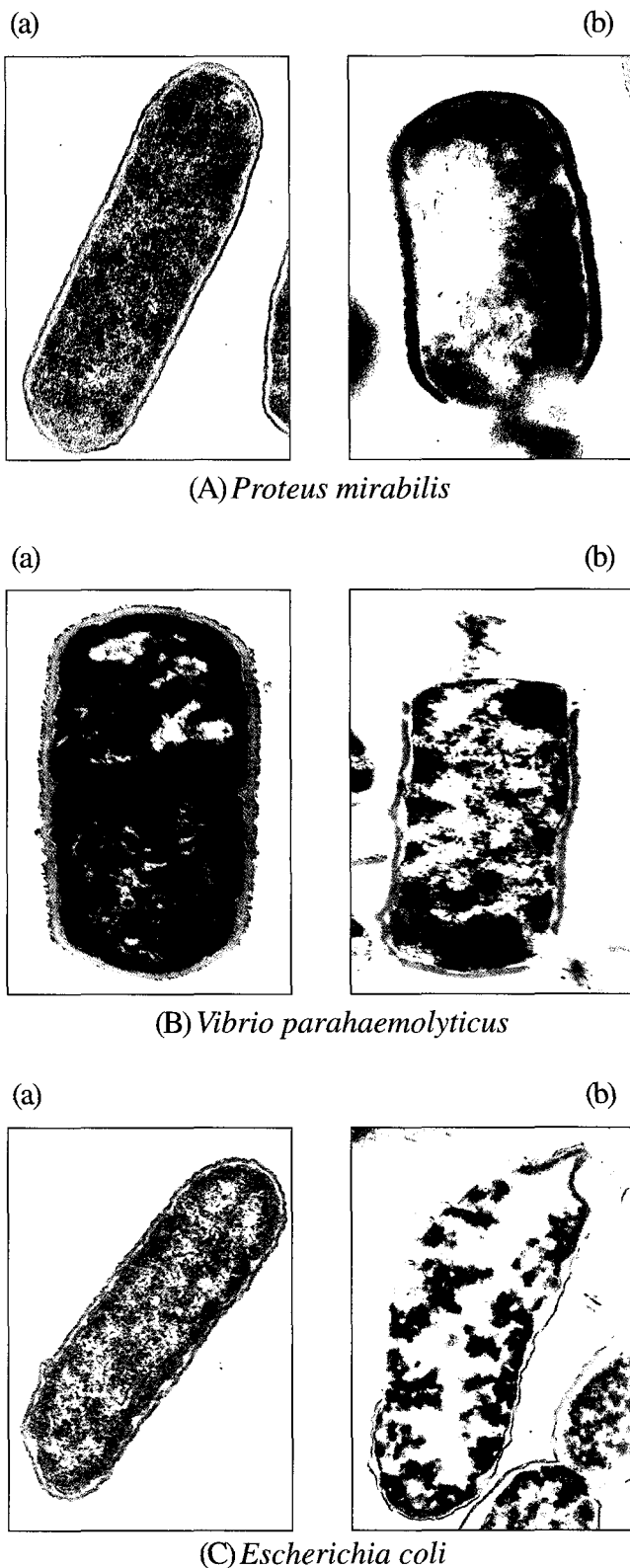


Fig. 2. Transmission electron micrographs of Gram negative bacteria treated with bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp. GM7311. (a) Untreated cells (b) Treated cells.

Table 1. Amino acids composition (nM) of Gram negative bacteria treated with the bacteriocin (100 BU/ml, 24 hrs) from the *Lactobacillus* sp. GM7311

Amino Acid	<i>P. mirabilis</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>E. coli</i>	
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
Aspartic acid	5313	4129	3951	3479	5312	3248
Threonine	2791	2.1	2333	2045	3056	1.747
Serine	2487	1.91	2114	1.775	2868	1.561
Glutamic acid	5386	4.203	7.119	5.468	7.185	3.999
Proline	—*	2008	2.573	1.974	1.207	0.786
Glycine	4.866	3.569	4.197	3.038	5.046	2.859
Alanine	5.327	3.906	4.608	3.577	5.611	3.486
Cystine	0.177	0.147	0.359	0.224	0.427	0.276
Valine	3.365	2.527	3.261	2.868	3.757	2.359
Methionine	1.159	0.231	0.587	0.937	1.360	0.885
Isoleucine	2.581	1.984	2.398	2.177	3.051	1.749
Leucine	3.939	2.889	3.522	3.057	4.840	2.823
Tyrosine	1.947	1.442	0.490	0.524	0.802	0.519
Phenylalanine	2.184	1.461	2.186	1.564	2.496	1.666
Histidine	1.077	0.668	1.021	0.806	1.184	0.678
Lysine	3.473	2.388	2.816	2.512	3.442	2.331
Ammonia	24.558	2.938	8.739	8.840	7.580	5.948
Arginine	2.364	1.729	1.789	1.585	2.280	1.435

* — ; not detected

C14:0, C15:0 iso 2OH/16:1 w7c, C16:1 w7c/15 iso 2OH, C16:0이 감소하였으며, C15:0과 C18:1 w9c, C18:1 w7c/w9t/w12t 및 C18:0이 크게 증가하였다. *E. coli*는 C12:0과 C14:0, C15:0 iso, C17:0 cyclo, C18:1 w9c/w12t/w7c가 감소하였으며, 반면 C15:0, C16:1 iso 2/14:0 3OH와 C16:0, C18:1 w9c, C18:1 w7c/w9t/w12t, C18:0에서는 큰 증가를 보였다.

고 찰

Lactobacillus sp. GM7311이 생산하는 박테리오신의 Gram 음성균에 대한 작용 특성을 알아보기 위해 배양이 진행중인 *P. mirabilis*, *V. parahaemolyticus* 그리고 *E. coli*의 배양액에 최종농도 100 BU/ml가 되도록 각각 박테리오신을 첨가하여 균수 변화를 관찰한 결과, *P. mirabilis*에 대해서는 균 접종 직후 및 유도기, 대수증식기 중기에 박테리오신을 첨가했을 때 가장 급격한 균수 감소를 나타내었다. *V. parahaemolyticus*와 *E. coli*도 상당히 급격한 균수 감소를 보여 대수증식기 후기까지는 박테리오신 첨가 후 6~9시간 이내에 거의 사멸하였으며, 그러나 정지기에 첨가했을 경우는 항균력이 다소 감소하였다.

한편, 박테리오신을 처리한 세가지 시험 균주의 전자현미경 사진에서는 세 균주 모두 bacteriolytic action작용에 의해 세포 증식이 저해됨을 뚜렷이 관찰할 수 있었다.

대부분의 Gram 음성 균주는 박테리오신에 대해 저항적인 것으로 알려져 있으며, 이는 Gram 음성균에 존재하는 outer membrane이 antibiotics나 detergents의 침입을 막기 때문이라고 보고되어 있다 (Abee et al., 1995, Nikaido and Vaara, 1987). 그러나 최근 몇몇 보고에서는 cheating agent인 EDTA처리나 osmotic

Table 2. Fatty acids composition (%) of Gram negative bacteria treated with the bacteriocin (100 BU/ml, 24 hrs) from the *Lactobacillus* sp. GM7311

Fatty acid	<i>P. mirabilis</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>E. coli</i>	
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
C12:0	3.91	4.16	2.72	2.12	4.66	2.77
C12:0 iso	—*	—	1.40	1.69	—	—
C12:0 3OH	—	—	0.35	—	—	—
C13:0	0.53	0.65	—	—	—	—
C13:0 iso	—	—	5.71	5.69	—	0.78
C13:0 anteiso	—	—	1.43	1.59	—	—
C13:0 3OH/15:1;I/H	0.27	—	—	—	—	—
C14:0	3.55	4.00	11.51	8.45	11.01	7.37
C14:0 iso	—	—	2.79	3.13	—	0.37
C15:0	2.44	2.98	0.73	2.10	—	1.22
C15:0 iso	—	—	6.58	6.19	1.93	1.00
C15:0 anteiso	0.29	—	1.82	1.94	—	0.34
C15:0 iso 2OH/16:1 w7c	—	—	1.75	—	—	—
C16:0	34.66	30.63	41.45	37.81	32.64	35.01
C16:0 iso	—	—	1.62	1.53	—	—
C16:1 iso I/14:0 3OH	6.60	6.29	0.71	—	—	5.39
C16:1 w7c/15 iso 2OH	13.81	27.81	10.81	8.15	2.97	3.81
C17:0	2.88	1.95	—	—	—	0.56
C17:0 cyclo	16.46	5.15	—	—	20.35	12.61
C17:0 iso	—	—	1.54	1.34	—	—
C17:0 anteiso	0.40	—	0.41	—	—	—
C17:1 w8c	0.69	0.84	—	—	—	—
C18:0	3.70	0.71	1.58	3.34	—	4.63
C18:1 w9c	1.28	4.80	—	10.51	—	5.19
C18:1 w9c/w12t/w7c	—	—	—	—	4.60	—
C18:1 w7c/w9t/w12t	4.99	7.93	3.40	4.43	—	9.53
C18:2 w6, 9c/18:0 ante	1.03	0.51	—	—	—	1.13
C19:1 w12t	0.69	0.44	—	—	—	—
C19:0 cyclo w8c	0.65	—	—	—	6.36	7.11

*— ; not detected

shock를 통해 먼저 outer membrane의 LPS layer 구조를 변형시키므로써 박테리옌에 대한 감수성을 증가시켰다고 하였으며, 이러한 과정을 식품 산업에 이용할 수 있을 것으로 보고하였다 (Kordel and Sahl, 1986; Kordel et al., 1989; Stevens et al., 1991; Stevens et al., 1992). 하지만 본 박테리옌의 경우, 그러한 특별한 전처리를 거치지 않은 Gram 음성 균주에 대해서도 대단히 효과적인 항균 작용을 나타내었으며, 따라서 Gram 음성 균주에 대한 본 박테리옌의 구체적인 작용 기작에 대해서는 계속적인 실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

박테리옌 처리 균주의 세포내 아미노산 성분들의 함량은 박테리옌을 처리하지 않은 대조구에 비하여 크게 감소하는 것으로 나타났으나, 지방산 성분의 변화 정도는 아미노산보다 적은 것으로 나타나 각 성분들의 함량이 골고루 증감하였는데, 이는 본 박테리옌의 Gram 양성 균주에 대한 작용 형태를 실험 (Kang and Lee, 1998)한 결과와 유사하였다.

요 약

Lactobacillus sp. GM7311이 생산하는 박테리옌의 작용 특

성을 알아보기 위하여, 배양이 진행 중인 세 가지 시험균주의 TSB 배양액에 일정한 시간 간격별로 최종 농도 100 BU/ml가 되도록 박테리옌을 첨가한 후 그 균수 변화와 작용 특성을 살펴 보았다.

시험 균주의 증식 시기별로 박테리옌을 첨가한 경우 *Proteus mirabilis*의 경우는 대수증식기 중기 이전까지의 지시균에 대해서 강한 억제작용을 보이는 반면, *Vibrio parahaemolyticus*와 *Escherichia coli*는 첨가 시기 모두에서 급격한 균수 감소를 보였으며 다만 정지기에 있어서는 저해 효과가 적었다.

또한 박테리옌을 처리한 세 가지 시험 균주를 전자현미경으로 관찰했을 때, *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산하는 박테리옌은 시험 균주의 세포벽 파괴와 함께 세포 내용물을 유출시키는 bacteriolytic action 형태를 보였다.

증식 시기별로 박테리옌을 첨가하여 각 균주별로 가장 큰 영향을 받은 증식시기를 선택해서 박테리옌을 처리한 후, 아미노산 및 지방산 조성을 분석하여 박테리옌을 처리하지 않은 대조구와 비교하였다. 이 실험에서 아미노산의 경우는 세 균주 모두에서 대부분의 성분이 크게 감소하는 경향을 보였으며, 지방산은 크게 감소하는 성분은 없었지만 각 성분들의 함량이 대체적으로 증가하거나 감소하는 변화를 나타내었다.

참 고 문 헌

- Abee, T., L. Krockel and C. Hill. 1995. Bacteriocins : modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Inter. J. Food Microbiol.*, 28, 169~185.
- Bhunia, A.K., M.C. Johnson, B. Ray and N. Kalchayanand. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 25~33.
- Bruno, M.E.C., A. Kaiser and T.J. Montville. 1992. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (7), 2255~2259.
- Gonzalez, C.F. and B.S. Kunka. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2534~2538.
- Kang, J.H. and M.S. Lee. 1998. Mode of action of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. GM7311 against gram positive bacteria. *J. Korean Fish. Soc.*, 31 (4), 560~566.
- Kim, S.K., S.J. Lee, Y.K. Baek and Y.H. Park. 1994. Mode of action of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY449 against *Lactobacillus fermentum* IFO 3023. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22 (3), 266~270.
- Kordel, M., F. Schuller and H.G. Sahl. 1989. Interaction of the pore forming-peptide antibiotics Pep 5, nisin and subtilin with non-energized liposomes. *FEBS Lett.*, 244, 99~102.
- Kordel, M. and H.G. Sahl. 1986. Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep 5 and nisin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 34, 1786~1788.
- Lee, M.S., D.S. Chang and J.H. Kang. 1997. Cultural conditions of *Lactobacillus* sp. GM7311 for the production of bacteriocin. *J. Korean Fish. Soc.*, 30 (5), 834~841.

- Nikaido, H., and M. Vaara. 1987. Outer membrane, p7~22. In F. C. neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*; cellular and molecular biology, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Stevens, K.A., B.W. Sheldon, N.A. Klapes and T.R. Klaenhammer. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (12), 3613~3615.
- Stevens, K.A., N.A. Klapes, B.W. Sheldon and T.R. Klaenhammer. 1992. Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (5), 1786~1788.
- Toba, T., S.K. Samant and T. Itoh. 1991. Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells. *Lett. Appl. Microbiol.*, 13, 102~104.
- Venema, K., T. Abee, A.J. Haandrikman, K.J. Leenhouts, J. Kok, W.N. Konings and G. Venema. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (4), 1041~1048.

1998년 11월 16일 접수

1999년 2월 12일 수리