

신생아 태변에서 젖산세균인 *Lactococcus lactis* HK-9의 분리 및 항균활성

백현 · 안혜란 · 조윤석 · 오계현*

순천향대학교 생명공학과

Antibacterial Effects of *Lactococcus lactis* HK-9 Isolated from Feces of a New Born Infant

Hyun Baek, Hye-Ran Ahn, Yun-Seok Cho, and Kye-Heon Oh*

Department of Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Republic of Korea

(Received May 12, 2010/Accepted June 5, 2010)

The purpose of this work was to investigate the antibacterial activity derived from a lactic acid bacterium, *Lactococcus lactis* HK-9, isolated from the feces of a 2-day newborn infant. We characterized the physiological and biochemical properties of this strain. Both the BIOLOG system and phylogenetic analysis using 16S rRNA sequencing were utilized for identification, and the strain was assigned to the *Lactococcus lactis* species, designated as *L. lactis* HK-9, and registered in GenBank as [GU936712]. We monitored growth rate, production of lactic acid and acetic acid as metabolites, and pH during growth. The maximum concentrations of lactic acid and acetic acid reached 495.6 mM and 104.3 mM, respectively, and the initial pH of the cultures decreased from 7.0 to 4.1 after incubating for 60 h. HPLC was used to confirm the production of lactic acid and acetic acid. Significant antibacterial activity of the concentrated supernatant was demonstrated against Gram-positive (e.g., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, MRSA) and Gram-negative (e.g., *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*) bacteria by the plate diffusion method. The antibacterial activity was sensitive to protease, and the molecular weight of the presumed bacteriocin molecule was estimated to be about 4 kDa by tricine-SDS-PAGE.

Keywords: antibacterial activity, bacteriocin, *L. lactis* HK-9

현대 사회는 급속한 산업의 발전으로 환경이 심하게 오염되었을 뿐 아니라, 우리가 먹고 마시는 음식에도 환경오염의 잔해들이 깊숙이 침투되어 있는 실정이다. 그로 인해 사람의 면역기능이 약화되고, 감염 경로가 다양해지며 체내에 유해 세균이 침투하여 질병 등에 노출이 불가피해졌다. 이를 예방하기 위하여 사람들은 건강기능식품을 개발하여 몸에 이로울 물질이 포함된 음식들을 섭취하기 시작했다. 그 중 가장 대표적인 건강기능식품인 프로바이오틱(probiotics)에 관심이 집중되어왔다. 프로바이오틱은 일반적으로 사람과 동물에게 투여되어 여러 가지 건강 증진 효과를 나타내며 숙주에게 해를 끼치지 않는 안전한 미생물 혹은 살아있는 미생물이 함유된 식품을 의미한다(1, 2, 13). 프로바이오틱으로서 잘 알려진 대표적인 미생물은 젖산균(lactic acid bacteria)으로서 자연계에 널리 존재하

며, 자연계 뿐만 아니라 사람의 장, 특히 신생아의 경우 초유 수유를 하는 동안 장내 세균총의 90% 이상이 젖산균으로 구성 되어있으며, 발효식품 등에서도 쉽게 발견되는 미생물로 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 최종 대사산물인 젖산을 생산한다. 발효식품을 통하여 인체 내로 흡수된 젖산균은 장내로 유입되어 장내 균총의 성질을 개선시켜 장내 균총의 안정화, 유해 세균의 정착 억제에 따른 질병 예방, 면역 활성화 작용, 항암작용, 콜레스테롤 저하 등의 숙주 동물에 유익한 역할을 한다(4, 7, 9, 11, 12). 이러한 젖산균이 생산하는 물질 중 박테리 오신(bacteriocin)은 세균이 생산하는 천연 항균성 단백질 또는 단백질체의 물질로 병원성 미생물에 효과적인 살균력이 있는 것으로 알려져 있다(6, 15, 16, 18). 젖산균이 생산하는 박테리 오신의 종류는 다양하며 서로 다른 항균범위를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 그 작용 기전은 크게 상대 균주의 증식을 억제하는 기작(bacertiostatic)과 사멸시키는 기작(bacteriocidal),

* For correspondence. E-mail: kyeheon@sch.ac.kr; Tel: +82-41-530-1353; Fax: +82-41-530-1350

그리고 세포벽의 용해 기작(bacteriolytic)이 있으며, 지금까지 보고된 대부분의 박테리옌(bacteriocin)은 사멸작용을 가지는 것으로 보고되고 있다(7). 따라서 천연 항균물질을 생산하는 젖산균을 기능성 식품으로 섭취한다면, 유해균의 증식을 억제하고 숙주의 면역기능을 증진시키며, 암 발생을 억제하는 프로바이오틱 효과를 볼 수 있다(4, 13, 19). 현재 프로바이오틱 시장은 국내를 포함하여 미국, 아시아, 전 유럽에 걸쳐 광범위하게 형성되어 있으며, 그 규모도 상당히 크다. 현재 박테리옌을 생산하는 프로바이오틱에 관한 연구는 천연식품보존제의 개발 및 사료 항생제 대체제로서 그 활용 가능성이 매우 높다.

본 연구에서는 신생아의 태변으로부터 *Lactococcus lactis* HK-9를 분리하여 균주에 대한 생리화학적 특성조사와 16S rRNA 염기서열 분석을 하였으며, HPLC를 통하여 분리세균의 유기산 분석을 하였다. 또한 여러 가지 병원균에 대한 항균활력을 조사하였으며, 이 항균활성에 기여하는 물질을 확인하였다.

재료 및 방법

균주확보와 배양조건

본 연구에서 사용된 균주는 2009년 5월부터 8월까지 충남 천안 인근 지역에서 태어난 지 2일된 신생아의 태변으로부터 농화배양 기법을 통하여 분리하였다. 시료를 1 ml의 멸균된 생리식염수(physiological saline)가 담긴 튜브에 넣고 30°C의 진탕배양기에서 10분간 교반시킨 후 꺼내어 실온에서 10분간 정지시켰다. 시료 상등액 100 µl를 0.002%의 BPB (bromophenol blue)가 첨가된 MRS (Difco, USA) 고체평판배지에 도말하고, 혐기성 가스팩(Gas Pak, BBL, USA)을 사용하여 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 균주의 성장과정에서 산을 생성하여 노란색을 띠는 균주를 선별하여 MRS 고체평판배지에 평판도말법을 통한 순수배양으로 세균을 분리하였다.

분리 세균의 생리 화학적 특성 조사

분리세균 HK-9은 MRS 고체평판배지에서 단일 집락의 모양을 확인하고 그람염색 후 세균의 형태학적 특징을 조사하였다. 분리 세균의 생리 화학적 특성은 이전에 알려진 방법에 따라 실시하였다(5). BIOLOG 분석 시스템을 이용한 다양한 기질 이용능력에 근거하여 생리화학적 특성을 조사하였다. 분리세균을 BUG (Biolog Universal Growth) 고체 평판 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양된 세균현탁액을 Biolog Turbidimeter (BIOLOG, USA)를 이용하여 20%까지 맞추고, GP2 Microplate™ (BIOLOG)에 150 µl씩 접종하여 24시간 배양시킨 후, 그 결과를 Biolog's automated MicroStation™ instrument로 확인하였다(3).

16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

분리 세균 HK-9의 유전학적 계통수(phylogenetic tree)를 작성하기 위하여 16S rRNA PCR을 수행하였다. HK-9로부터 genomic DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자를 PCR을 통하여 증폭하였고, 16S rRNA 유전자의 증폭을 위하여 8F (5'

-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer를 사용하였으며, genomic DNA를 주형으로 하여 PCR Premix (GenDEPOT, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR의 수행조건은 denaturation (94°C, 30초), annealing (60°C, 30초), elongation (72°C, 45초) 단계를 33회 반복한 후, 72°C에서 15분 동안 배양하였다. PCR에 의하여 증폭된 DNA 단편을 전기영동한 다음, agarose gel extract kit (Intron, Korea)를 이용하여 gel 상에서 회수하고, 부분적인 염기서열을 결정하였다(2).

분리세균의 생장에 따른 pH 변화

MRS 액체배지에 분리세균인 HK-9을 접종하고, 37°C에서 배양시키면서 세균의 성장과 배양기간 중에 생산되는 유기산의 양 및 pH 변화를 12시간 간격으로 측정하였다. 세균의 생장은 MRS 고체평판배지에 100 µl씩 평판 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양한 후, 성장한 집락수를 측정하여 성장곡선을 작성하였다.

HPLC를 이용한 유기산 분석

분리세균에 의해 생성되는 유기산을 분석하기 위하여 HPLC를 사용하였다. 분석에 사용된 HPLC 시스템은 SPD-10A UV/Vis 검출기가 부착된 Shimadzu 사의 LC-10AT 제품을 사용하였으며, Supelco 사의 Supelcogel C-610H 컬럼(300 mm×7.8 mm, 입자크기 9 µm)을 이용하였다. 이동상은 0.1% phosphoric acid를 공극의 직경이 0.45 µm 막여과지로 여과하여 사용하였다. HPLC 작동조건에서 이동상의 유속 0.5 ml/min이었으며, UV 검출기의 파장은 210 nm으로 맞추어 사용하였다. 유기산은 분석용 표준품과 배양액으로부터 채취한 시료를 대상으로 분석하였다. Lactic acid와 acetic acid를 각각 1:1의 비율로 혼합하여 표준품을 만들었으며, 0.45 µm 주사기 여과지로 여과한 후, 20 µl Hamilton syringe를 사용하여 HPLC 주입기 내에 주사하였다. 배양액 내에 생성된 유기산을 정량하기 위하여 채취한 시료는 4,000×g에서 5분간 원심분리한 후 0.45 µm 주사기 여과지로 여과하여 분석하였다(3).

분리세균의 배양상등액 제조

분리세균을 MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 4,000×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 균체가 제거된 배양상등액은 0.5 N NaOH를 사용하여 pH를 7.0으로 조정하고, 0.2 µm 주사기 여과지로 여과한 후, 동결건조기를 사용하여 25배로 농축하였다.

농축 배양상등액의 항균활성 조사

농축 배양상등액의 항균력은 평판확산 검정법(plate diffusion assay)을 통하여 확인하였다(3, 17). 대상세균으로는 그람양성 세균인 *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*와 그람음성 세균인 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*를 이용하

였다. 대상세균들을 액체 영양배지(nutrient broth)에 각각 접종하여 배양한 배양액을 고체 영양배지(nutrient agar)에 멸균된 면봉으로 도말하고, paper disc를 올려놓은 후, 농축 배양상등액 15 μ l를 흡수시켜 37°C 배양기에서 24시간 배양시킨 후 disc 주변에 생성된 투명대의 크기로 항균활성을 측정하였다.

단백질 분해효소에 대한 안정성

pH 7.0으로 조정된 농축된 배양상등액에 protease (type I, Sigma, USA)와 trypsin (Sigma)을 100 μ g/ml의 농도로 처리한 후 항균활성을 측정하였다. 잔존 활성측정은 배양상등액의 항균력 조사와 동일한 방법인 평판확산 검정법으로 확인하였다.

Tricine-SDS-PAGE

농축된 배양상등액에 포함된 항균활성 단백질을 확인하기 위해 tricine SDS-PAGE를 실시하였다. 배양상등액과 tricine sample buffer를 1:1로 혼합한 후 18% acrylamide gel을 사용하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 2장의 gel 중 한 장은 Coomassie brilliant blue R250으로 염색한 후 탈색하였으며, 나머지 gel은 고정액(25% isopropanol, 10% acetic acid)에 넣고 2시간 동안 고정 후 증류수로 1시간 동안 세척하였다. 세척한 gel은 염색된 gel의 band와 비교하여 주요 band를 잘라 NB 고체배지 위에 놓고 그 위에 NB soft agar (0.7%)와 *S. aureus* (1×10^4 CFU/ml)가 함께 섞인 것을 중층하여 37°C에서 18시간 배양시킨 후, 생육 저해 활성을 보이는 투명대를 확인하였다.

결과 및 고찰

세균의 분리 및 특성

생후 2일이 지난 신생아의 태변으로부터 항균활성물질을 생성하는 세균들을 농화배양 기법을 통하여 총 4개의 세균을 분리하였다. 이들 세균 중 0.002%의 BPB가 첨가된 MRS 고체 평판배지에서 균주의 성장과정 중, 생성되는 산에 의해 노란색 집락을 형성하는 균주를 선별하여 MRS 고체평판배지에서 총 3회에 걸친 평판도말법을 통한 순수배양으로 HK-9를 분리하였다.

분리세균은 그람염색을 통하여 형태학적 분석을 실시하였으며, 현미경으로 관찰한 결과 그람양성의 구균으로 관찰되었다. 인돌(indole) 형성여부에서는 음성으로 나타났으며, methyl red 시험과 Voges-Proskauer 시험에서는 양성반응을 나타내었다. Klingler iron agar 배지에서 나타난 disulfhydrase에 의한 H₂S의 형성은 음성으로 확인되었으며, gelatinase와 catalase의 존재 여부 시험에서도 음성으로 나타났다. Oxidase 반응은 음성으로 나타났으며, starch 분해는 양성반응을 나타내었다. Simmon's citrate 이용여부와 litmus milk 시험에서 펩톤화(peptonization)는 반응은 양성으로 확인되었다.

분리세균의 동정

분리세균의 동정을 위하여 HK-9 균주가 다양한 탄소원을

이용하는지 여부를 BIOLOG 분석시스템을 통해 조사하였으며, MicroLog™ database software를 이용하여 확인한 결과, HK-9는 *Lactococcus lactis*로 동정되었고, *Lactococcus lactis* HK-9로 명명하였다. BIOLOG 분석시스템을 사용하여 얻어진 생화학적 특성들은 Table 1에 나타내었다.

16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

L. lactis HK-9 균주의 유전학적 계통수(phylogenetic tree)를 작성하기 위하여 PCR을 통해 16S rRNA 유전자를 증폭하고, 1,166 bp의 부분적인 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 NCBI의 BLAST 분석 프로그램을 사용하여 상동성을 비교한 결과 *L. lactis*와 99%의 유전적 상동성을 보였다. HK-9과 *Lactococcus* 중에 속하는 다른 균주들과의 계통학적 비교를 하여 그 유사성을 Fig. 1에 나타냈으며, 이 균주의 16S rRNA 염기서열을 GenBank에 [GU936712]로 등록하였다.

분리세균의 생장에 따른 pH 변화와 유기산 분석

신생아의 태변에서 분리한 균주 *L. lactis* HK-9를 pH 7.0으로 조절된 MRS 액체배지에 접종하고 세균의 성장과 유기산의 생성, 그리고 배양기간 중의 pH 변화를 12시간 간격으로 측정하였다(Fig. 2). 배양 12시간 이내에 성장속도가 급격히 증가하였으며 이에 따라 배지 내 pH도 7.0에서 5.0 이하로 감소하였다. HK-9는 60시간까지 지속적으로 성장하였으며, 이와 비례하여 pH는 감소되어 72시간이 지난 후, 최종 pH는 4.1로 측정되었다.

HPLC를 이용하여 배양상등액 시료 속의 유기산을 분석한 결과, lactic acid와 acetic acid가 혼합된 authentic standard와 비교하여 14.66 min과 17.46 min에서 동일한 peak가 탐지되었다(Fig. 3). 따라서 이들 두 peak는 각각 lactic acid와 acetic acid로 확인되었으며, 분리세균인 HK-9의 배양 후 72시간이 경과하였을 때, lactic acid와 acetic acid는 각각 495.6 mM과 104.3 mM이 생성되었다. HK-9는 이들 유기산을 배지 내로 분비하여 pH 감소에 직접적인 영향을 미치는 것이 확인되었다. 모유나 분변에서 분리한 *Lactobacillus*와 *Lactococcus* 종들에서 lactic acid를 생성시켜 pH를 감소시킨다는 연구 결과가 있으며(1, 2, 8), Chun 등(3)은 새우양식장에서 분리한 *Lactobacillus* sp. JK-8에서 배양기간 중에 192 mM lactic acid와 43.6 mM acetic acid를 생성하는 것을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 얻어진 HK-9 균주의 유기산 생산은 이와 비교하여 볼 때, 매우 탁월한 것임이 확인되었다.

농축 배양상등액의 항균활성 조사

분리세균 HK-9의 항균활성시험은 plate diffusion assay 방법을 이용하여 농축 배양상등액을 그람양성 세균인 *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, MRSA와 그람음성 세균인 *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. sonnei* 등 10가지 세균에 노출시키고 24시간 동안 배양한 후, 디스크 주변에 형성되는 투명대를 통하여 항균활성을 확인하였다(Table 2). HK-9에서 생성되는 항균물질을 확인하기 위

Table 1. Biochemical characteristics of the isolate, *L. lactis* HK-9 using the BIOLOG analysis system

Biochemical tests					
Water	-	α -Methyl D-galactoside	+	L-Malic acid	-
α -Cyclodextrin	-	β -Methyl D-galactoside	+	Methyl pyruvate	-
β -Cyclodextrin	-	3-Methylglucose	+	Mono-methyl succinate	-
Dextrin	+	α -Methyl D-glucoside	-	Propionic acid	-
Glycogen	-	β -Methyl D-glucoside	-	Pyruvic acid	-
Inulin	-	α -Methyl D-mannoside	-	Succinamic acid	-
Mannan	-	Palatinose	-	Succinic acid	-
Tween 40	-	D-Psicose	+	N-Acetyl-L-glutamic acid	-
Tween 80	-	D-Raffinose	+	Alaninamide	-
N-Acethyl-D-glucosamine	+	L-Rhamnose	-	D-Alanine	-
N-Acethyl-D-mannosamine	-	D-Ribose	+	L-Alanine	-
Amygdain	-	D-Salicin	+	L-Alanyl glycine	-
L-Arabinose	-	Sedoheptulosan	-	L-Asparagine	-
D-Arabitol	-	D-Sorbitol	+	L-Glutamic acid	-
Arbutin	-	Stachyose	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
Cellobiose	+	Sucrose	-	L-Pyroglutamic acid	-
D-Fructose	+	D-Tagatose	+	L-Serine	-
L-Fucose	+	D-Trehalose	+	Putrescine	-
D-Galactose	-	Turanose	+	2,3-Butanediol	-
D-Galacturonic acid	-	Xylitol	-	Glycerol	+
Gentiobiose	+	D-Xylose	+	Adenosine	+
D-Gluconic acid	+	Acetic acid	+	2-Deoxy adenosine	+
α -D-Glucose	+	α -Hydroxy butyric acid	-	Inosine	-
m-Inositol	-	β -Hydroxy butyric acid	-	Thymidine	+
α -D-Lactose	+	γ -Hydroxy butyric acid	+	Uridine	-
Lactulose	+	β -Hydroxy phenyl acetic acid	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
Maltose	+	α -Keto glutaric acid	-	Thymidine-5'-monophosphate	-
Maltotriose	-	α -Keto valeric acid	+	Uridine-5'-monophosphate	-
D-Mannitol	+	Lactamide	-	Fructose-6-phosphate	+
D-Mannose	+	D-Lactic acid methylester	-	Glucose-1-phosphate	-
D-Melezitose	+	L-Lactic acid	-	Glucose-6-phosphate	-
D-Melibiose	-	D-Malic acid	-	D-L- α -Glycerol phosphate	-

+, positive reaction; -, negative reaction; \pm , variable

하여 pH를 7.0으로 조절한 농축 배양상등액과 pH를 조절하지 않은 농축 배양상등액을 평판확산 검정법으로 비교하였다. 대 상세균에 대하여 pH를 조절하지 않은 농축 배양상등액에서는 그람양성과 그람음성 세균 모두에서 투명대가 형성되었고, pH를 7.0으로 조절한 농축 배양상등액에서는 그람양성 세균인 *S. aureus*, MRSA, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*에서만 투명대를 형성하였다. pH를 조절하지 않은 배양상등액의 항균활성은 HK-9의 생장시 생성된 유기산에 의한 활성임을 확인하였다. 배양상등액의 항균활성물질이 단백질로 구성됨을 확인하고자 배양상등액에 단백질 분해효소를 첨가하여 반응시킨 후 잔존 항균활성을 측정된 결과 배양상등액의 항균활성은 소멸되었다(Table 2). 따라서 HK-9의 배양상등액에 존재하는 항균활성물질은 단백질 또는 단백질과 관련된 물질임을 확인하였다. Cotter 등(4)은 젖산균에서 생성되는 대부분의 항균활성 물질들은 열에 안정적인 펩티드 계열의 저분자인 박테리옌

Table 2. Inhibition of various pathogens by bacteriocin produced from *L. lactis* HK-9

Test strains	Antibacterial activity		
	pH non-adjustment	pH adjustment	Treatment of protease
Gram (-)			
<i>Escherichia coli</i>	+++	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	+++	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	+++	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	+++	-	-
Gram (+)			
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+++	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+/-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+++	+	-
MRSA	+++	++	-

Inhibition zone (mm) : +++ , >10 mm; ++ , 10-5 mm; +, 5-1 mm; -, no inhibition; +/- , variable

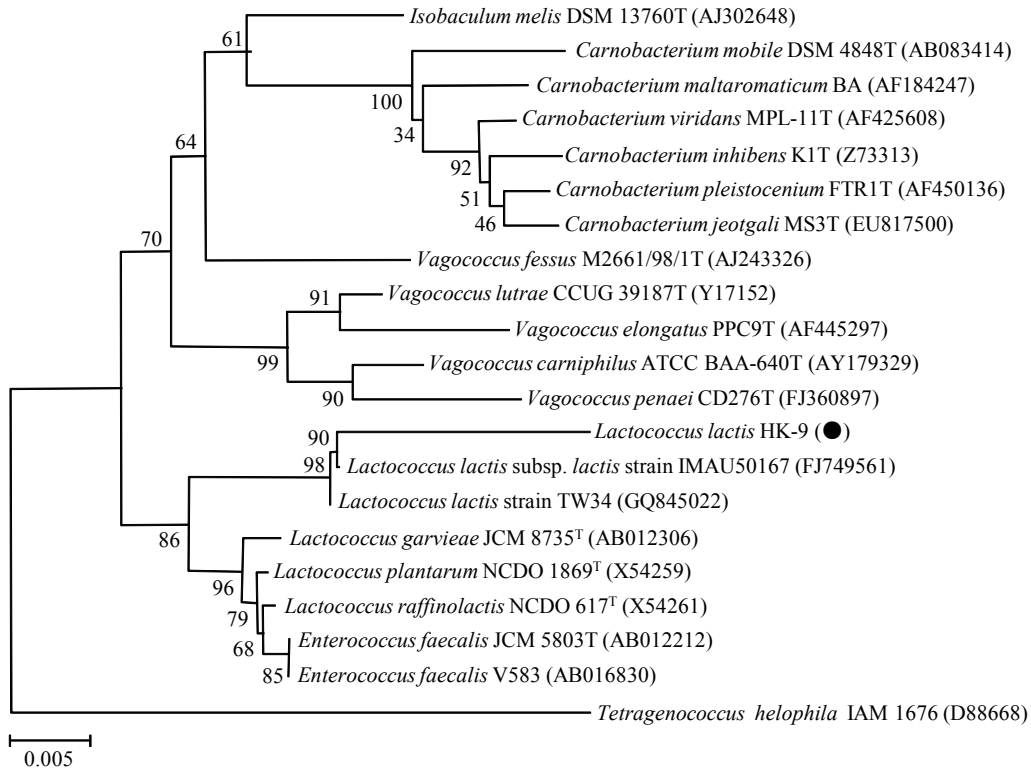


Fig. 1. Phylogenetic tree of the stain, *L. lactis* HK-9 based on 16S rRNA gene sequences. The tree was constructed by the neighbor-joining method. Numbers at nodes are bootstrap percentage based on 1,000 resampled datasets. GenBank accession no. are given in parentheses. Bar, 0.005 changes per nucleotide.

(bacteriocin)이라고 보고하였으며, 특히 *L. lactis*에서 생성되는 박테리옌인 nisin에 대하여 많은 연구결과가 보고된 바 있다 (2, 10, 14, 20).

항균활성물질의 분자량 측정

HK-9의 배양상등액에 존재하는 항균활성물질의 분자량을 확인하기 위해 tricine-SDS-PAGE를 통하여 확인하였다(Fig.

4). HK-9의 배양기간에 따른 항균활성물질의 생성을 확인한 결과, 배양 12시간 이후부터 항균활성물질인 박테리옌이 생성됨을 확인하였으며 그 분자량은 표준시료와 비교했을 시, 약 4 kDa의 분자량을 가지는 것을 확인하였다. 또한 전기영동한 gel을 증류수로 세척한 후 *S. aureus*가 포함된 NB soft agar를 증충하여 박테리옌의 활성을 확인한 결과 염색한 gel에서의 band와 일치하는 위치에서 투명대가 생겨 HK-9의 배양상등액에 존재하는 항균활성 물질은 박테리옌임을 확인하였다. *L. lactis*에서 생성되는 대표적인 박테리옌은 nisin으로서, 그 분자량은 약 4 kDa으로 보고되었으며(10, 20), Park 등(14)은 김치에서 분리한 *L. lactis*에서 분자량 4 kDa인 nisin을 확인하였다. 따라서 향후 *L. lactis* HK-9의 연구는 이 균주에서 생성되는 박테리옌의 N-말단의 아미노산 서열분석 연구를 수행을 통하여, 지금까지 보고된 *Lactococcus* 종들이 생성하는 박테리옌들과의 상동성과 차이점을 비교하는 방향으로 진행될 것이다.

적요

본 연구는 신생아 태변에서 분리된 *Lactococcus lactis* HK-9의 다양한 생리적 특성과 항균활성을 조사하기 위하여 실시하였다. 균주 HK-9을 MRS 배지에서 배양하였고, 형태 및 생리학적 특성에 대하여 조사하였으며, BIOLOG 시험과 16S

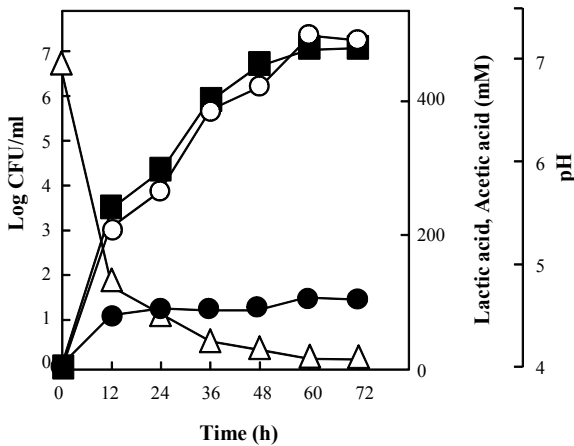


Fig. 2. Growth of the strain *L. lactis* HK-9, measured as viable cell count (■) and compared with the parallel formation of lactic acid (○), acetic acid (●), and pH changes (△).

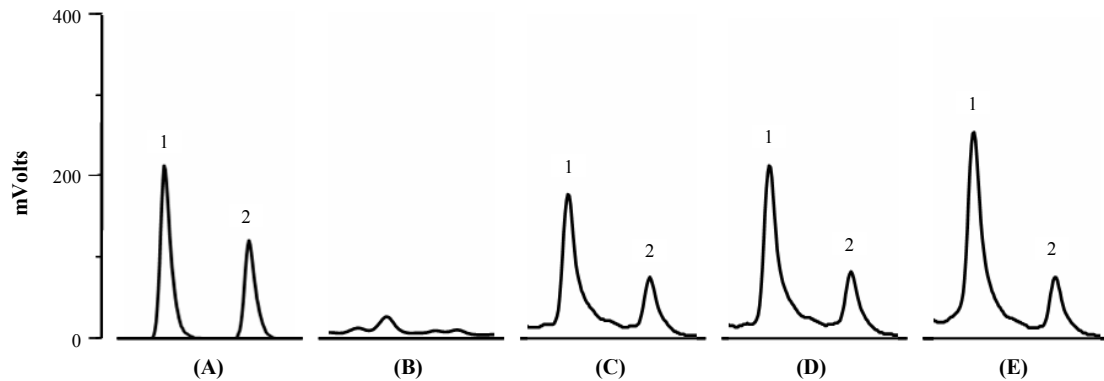


Fig. 3. HPLC chromatograms of a mixture of authentic standards, lactic acid, and acetic acid (A) and of culture samples of *L. lactis* HK-9 at the beginning (B) and after 24 h (C), 36 h (D), and 60 h of incubation (E); peak 1, lactic acid; peak 2, acetic acid.

rRNA 염기서열 분석을 통해 균주를 동정하였다. 그 결과 *Lactococcus lactis*으로 동정되었고, *L. lactis* HK-9로 명명하였으며, 이 균주의 계통수 분석을 통해 GenBank에 [GU936712]로 등록하였다. 배양기간에 따른 *L. lactis* HK-9의 성장과 중간 대사산물로서 lactic acid와 acetic acid의 생산 및 pH의 변화를 조사하였으며, 이들 유기산의 생성은 HPLC를 통하여 확인하였다. 유기산의 생성은 *L. lactis* HK-9의 성장에 따라 증가하는 것을 확인하였으며, 배양 60시간이 지난 후 생성된 lactic acid와 acetic acid의 농도는 각각 495.6 mM, 104.3 mM이었다. 배양 초기의 pH는 7.0이었으며 배양 기간 동안 4.1로 감소하였다. 다양한 그람양성 세균과 그람 음성 세균을 대상으로 농축된 HK-9 배양상등액의 항균력을 조사하였으며, 그 결과 항균범위가 그람양성 세균에서만 나타나는 것이 관찰되었다. 농축된 배양상등액을 protease를 처리한 후 항균활성은 소멸하였으며, 상등액의 박테리옌 추정 분자의 분자량은 tricine-SDS-PAGE를 통하여 약 4 kDa으로 확인되었다.

참고문헌

1. Arakawa, K., Y. Kawai, K. Fujitani, J. Nishimura, H. Kitazawa, K. Kom, K. Kai, and T. Saito. 2008. Bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from human feces in milk-based media. *Anim. Sci. J.* 79, 634-640.
2. Beasley, S.S. and P.E. Saris. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5051-5053.
3. Chun, J.W., C.W. Ma, and K.H. Oh. 2005. Physiological characterization of *Lactobacillus* sp. JK-8 isolated from shrimp aquaculture pond. *Kor. J. Microbiol.* 41, 18-23.
4. Cotter, P.D., C. Hill, and R.P. Ross. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777-788.
5. Gerhart, P., R.J. Fellows, D.C. Cataldo, R.M. Nester, W.A. Wood, N.R. Kreig, and G.B. Phillips. 1981. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, USA.
6. Holo, H., Q. Nilssen, and I.F. Nes. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173, 3879-3887.
7. Jack, R.W., J.R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.
8. Kawai, Y., Y. Ishii, K. Arakawa, K. Uemura, B. Saitoh, J. Nishimura, H. Kitazawa, Y. Yamazaki, Y. Tateno, T. Itoh, and T. Saito. 2004. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2906-2911.
9. Kojic M., J. Svircevic, A. Banina, and L. Topisirovic. 1991. Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1835-1837.
10. Liu, W. and J.N. Hansen. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2551-2558.
11. Maeng, K.J., J.S. Kim, G.E. Ji, and J.H. Kim. 1997. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from human intestines and the characteristics of their bacteriocins. *J. Kor. Food Sci. Nutr.* 26, 1228-1236.
12. Marie, A., R. Junelles, and G. Lefebvre. 1996. Purification and N-terminal amino acid sequence of dextransin 24, a bacteriocin of *Leuconostoc* sp. *Curr. Microbiol.* 33, 136-137.
13. Martin, R., E. Jimenes, M. Olivares, M.L. Marin, L. Fernandez, J. Xaus, and J.M. Rodriguez. 2006. *Lactobacillus salivarius*

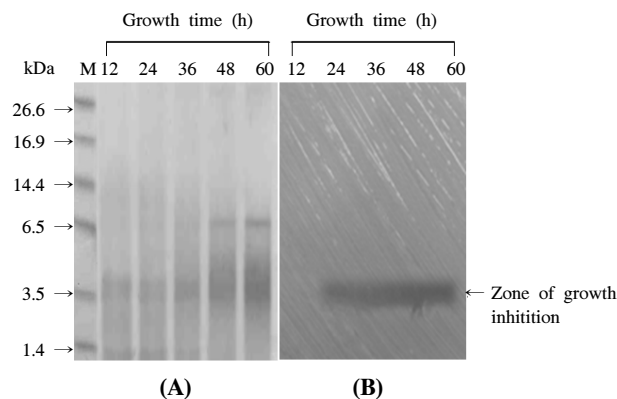


Fig. 4. Tricine-SDS-PAGE of concentrated supernatant from the *L. lactis* HK-9 and direct detection of antibacterial activity. (A) Gel stained with Coomassie brilliant blue R250. (B) The zone of growth inhibition was shown by overlaid the gel with NB soft agar containing the *S. aureus*.

- CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 35-43.
14. Park, S.H., K. Itoh, E. Kikuchi, H. Niwa, and T. Fujisawa. 2003. Identification and characteristics of nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from kimchi *Curr. Microbiol.* 46, 385-388.
 15. Petersen, F.C., G. Fimland, and A.A. Scheie. 2006. Purification and functional studies of a potent modified quorum-sensing peptide and a two-peptide bacteriocin in *Streptococcus mutans*. *Mol. Microbiol.* 61, 1322-1334.
 16. Schillinger, U. and F.K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901-1906.
 17. Tagg, J.R. and A.R. McGiven. 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21, 943.
 18. Todorov, S.D. and L.M.T. Dicks. 2005. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol.* 45, 312-322.
 19. Yu, K.H., S.N. Kang, and S.Y. Park. 2005. Physicochemical characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KH-1 isolated from the feces of a breast-fed infant. *J. Food Sci Nutr.* 10, 333-339.
 20. De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.* 138, 571-578.