

김치에서 분리한 *Lactococcus lactis* ET45가 생산하는 박테리오신의 특성

정성엽¹ · 박찬선¹ · 최낙식¹ · 양희종¹ · 김차영¹ · 윤병대¹ · 강대욱² · 유연우³ · 김민수^{1*}

¹한국생명공학연구원 생물산업공정센터, ²창원대학교 보건위생학과, ³아주대학교 분자과학기술학과

Characteristics of Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* ET45 Isolated from *Kimchi*

Seong-Yeop Jeong¹, Chan-Sun Park¹, Nack-Shick Choi¹, Hee-Jong Yang¹, Cha-Young Kim¹,
Byoung-Dae Yoon¹, Dae-Ook Kang², Yeon-Woo Ryu³, and Min-Soo Kim^{1*}

¹Bioindustry Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
Jeonbuk 580-185, Republic of Korea

²Department of Biochemistry and Health Science, Changwon National University, Changwon 641-773, Republic of Korea

³Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 443-749, Republic of Korea

(Received January 5, 2011 / Accepted March 2, 2011)

Bacteriocin-producing lactic acid bacterium having antagonistic activity against *Bacillus cereus*, was isolated from *Kimchi*. The selected strain was identified as *Lactococcus lactis* by the Bergey's manual and 16S rDNA analysis, and named as *L. lactis* ET45. The bacteriocin was stable in the pH range 3.0-11.0. The bacteriocin was active over a wide temperature range from 40°C to 121°C. Optimal culture condition for producing bacteriocin was obtained by growing the cells on MRS medium at pH 7.5 and 30°C for 18 h. Antibacterial activity of the bacteriocin was completely disappeared by proteinase K, and this means that bacteriocin is a proteinous substance. The molecular weight of bacteriocin was estimated to be about 4.5 kDa by tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (TSDS-PAGE).

Keywords: *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis*, bacteriocin, tricine-SDS-PAGE

유산균(lactic acid bacteria)은 자연계에 널리 존재하며, 탄수화물을 이용하여 젖산을 생성하는 미생물로서 유제품, 육류, 채소 등의 발효가공에 종균으로 널리 사용되고 있으며, 식품의 보존성 향상 및 향기 등의 관능적 특성과 영양학적 가치에도 기여하고 있다(6, 22, 30). 이러한 유산균이 생산하는 박테리오신은 세포표면의 특정 혹은 비특정 수용체에 부착하여 항균작용을 나타내며 표적 세포의 세포질 막의 투과성을 변화시켜 막 수송을 방해하거나 PMF (proton motive force)에 영향을 줌으로써 에너지 생산과 단백질이나 핵산의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다(1).

박테리오신은 리보솜에서 합성되는 단백질 또는 펩타이드 계통의 항균성 물질로 특정 생물환경에서 박테리오신을 생산하는 균주들이 비슷한 종류의 다른 균의 생육을 저해할 목적으로 분비하는 것으로 알려져 있다(14, 16, 17). 또한, 박테리오신은 인체내의 단백질 가수분해효소들에 의해 쉽게 분해되

기 때문에 인체내 잔류성이 없어 안전하다.

이러한 박테리오신과 관련하여 신규 박테리오신의 탐색, 특성분석, 작용 기작, 구조 유전자 클로닝 및 박테리오신 구조 변경을 통한 항균효과 개선, 대량 생산 기술 개발과 같은 식품에서의 응용에 필요한 연구들이 지속적으로 이루어지고 있다(7, 29).

지금까지 밝혀진 박테리오신 중에서 식품보존제로서 산업적으로 실용화되고 있는 박테리오신은 Mattick and Hirsch (24)가 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 균주에서 발견한 nisin이다. Nisin은 자체 독성이 없고, 장내세균이나 소화효소에 의해 쉽게 분해되고, 생리적 pH 범위 내에서 안정하며, 독성 시험 결과에 의해 안전한 물질임이 입증되었다. 또한 미국 FDA (food and drug administration)로부터 GRAS (generally recognized as safe)로 인정되어 현재 약 50개국에서 가공치즈, 과일 및 야채통조림, 발효유 제품, 육류가공품 등에 식품보존제로서 사용되고 있다(8, 9, 10, 13, 32).

최근 소비자들의 건강 및 식품 안전성에 대한 관심이 증가

* For correspondence. E-mail: ms5732@kribb.re.kr; Tel: +82-63-570-5220; Fax: +82-63-570-5219

되면서 식품 중의 유해균 증식을 억제할 목적으로 식품에 첨가되는 인공합성 식품보존제 보다는 천연 식품보존제를 선호하는 경향이 높으며(3, 20, 21), 우리나라의 경우 김치, 장류 등과 같이 전통적으로 자연 미생물을 이용한 발효식품이 풍부할 뿐만 아니라 이들 식품이 국민건강을 좌우하는 기초식품이라고 할 수 있다. 특히, 전통발효식품 중 김치는 밥과 더불어 한국인의 식생활에 있어서 중요한 위치를 차지하고 있는 음식으로 배추, 무 등의 여러 가지 채소류를 소금에 절인 후, 여러 가지 부재료를 혼합하여 발효시켜 만든 전통발효식품이다(2, 19). 이러한 김치는 숙성과정 중 미생물 상호작용에 의하여 자연적으로 발효되는 식품으로서, 이러한 김치 중에는 유산균이 많이 함유되어 있다(34).

본 연구에서는 전통발효식품인 김치로부터 식품 병원성 균 중의 하나인 *Bacillus cereus*에 대한 항균활성이 우수한 유산균을 분리 및 동정하였으며, 분리균주인 *Lactococcus lactis* ET45가 생산하는 박테리오신을 부분 정제하여 저해범위와 안정성 그리고 분자량을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 항균활성 물질 생산균주는 가정용 및 시판용 김치 등으로부터 분리하였으며, 항균활성의 측정에 사용된 감수성균주는 미생물자원 센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받은 표준균주를 사용하였다. 유산균 배양배지는 MRS Broth (Difco, USA)와 세균의 배양은 Nutrient Broth (NB, Difco)를 이용하여 배양하였다.

박테리오신 생산 유산균의 분리

각종 김치시료를 단계적으로 희석하여 MRS 고체배지에 도말하였다. 30°C에서 48시간 배양하여 자란 colony 중에서 모양, 크기에 따라 상이한 균주를 임의적으로 선택한 뒤 MRS 액체배지에서 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 원심분리(15,000 rpm, 25 min, 4°C) 및 membrane filter (0.2 µm, Dismic, Advantec)로써 여과 멸균하여, 상등액을 회수하였다. 25 ml NB soft agar (0.8%, w/v)에 감수성 균주 (*B. cereus* KCTC 3624, 1×10⁶ CFU/ml)를 같이 혼합하여 고체배지 상에서 저해환 형성을 조사하였다. 저해환을 형성하는 분리 균주를 선별하여 박테리오신 실험에 사용하였다.

박테리오신 검출 및 활성 확인

분리균주들의 박테리오신 생산 여부는 well diffusion assay 방법을 사용하여 판별하였다(15, 31). 선별된 유산균을 18시간 이상 MRS 배지에서 배양한 다음 원심분리(15,000 rpm, 25 min, 4°C) 및 membrane filter (0.2 µm, Dismic, Advantec)로 여과 멸균하여, 상등액을 회수하였다. 100 ml의 NB soft agar (0.8%, w/v)에 감수성 균주(*B. cereus* KCTC 3624, 1×10⁶ CFU/ml)를 섞어서 혼합하였다. 혼합한 배지용액을 25 ml씩 분주하여 완전히 굳은 후, 살균된 tip을 이용하여 직경 5 mm

의 구멍을 내고, 분리 균주의 상등액 100 µl를 접종하였다. 4°C에서 2-3시간 정도 방치하여 상등액이 확산되게 한 후 감수성 균주의 생육 최적 온도에서 18시간 이상 배양하여 저해환 생성여부를 확인하였다. 저해환을 생성하는 균주들의 박테리오신 생성 확인은 상등액을 proteinase K (20 mg/ml)로 처리하여 확인하였다. 박테리오신 역가는 AU (activity unit)로 표시하였고 상등액을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환 형성하는 최대 희석배수의 역수를 취하고, 이 값에 1 ml에 대한 환산계수를 곱하여 AU/ml로 나타내었다.

박테리오신 생산 균주 동정

박테리오신 생산 균주의 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 따라 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다(12). 최적 생육 온도, 그람 염색, 운동성, catalase test, CO₂ 생성 유무를 확인하였다. 최종적으로 16S rRNA gene을 증폭하여 분리 균주를 동정하였다. Genomic DNA는 Walter 등의 방법(33)에 따라 분리하였으며, primers로는 27F primer (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)와 1492R primer (TACGGYTACCTTGTT ACGACTT)를 사용하였고, PCR 조건은 initial denaturation 5분, 그리고 94°C에서 45초간 denaturation, 55°C에서 60초간 annealing 및 72°C에서 60초간 extension의 cycle을 35회 하였다. 16S rRNA 염기서열 확인은 솔젠트(주)사에 의뢰하여 확인하였다(11).

조항균성 물질의 제조

분리균주 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신을 부분정제하기 위하여 200 ml의 MRS 액체배지에서 30°C에서 12시간 전 배양한 후, MRS 배지 2 L에 1% (v/v)를 접종하여 30°C에서 24시간 본 배양을 수행하였다. 배양액을 원심분리 (15,000 rpm, 30 min, 4°C) 및 0.2 µm 여과막을 이용하여 제균하였다. 제균한 상등액과 차가운 아세톤 용매를 1:3의 비율로 혼합하여 -80°C에서 10분간 방치한 후 원심분리 및 감압 농축하였다. 농축된 시료를 동결 건조하여 -70°C에서 보관하면서 필요시 3차 증류수에 용해하여 추후 실험의 시료로 사용하였다.

박테리오신의 특성 확인

분리균주 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신의 특성을 확인하기 위하여 pH, 열, 유기용매, 가수분해 효소처리 조건하에서 안정성을 확인하였다.

pH에 대한 안정성: pH에 대한 박테리오신의 안정성을 조사하기 위하여 pH 3.0 (0.1 M citrate buffer), pH 5.0 (0.1 M acetate buffer), pH 7.0 (0.1 M phosphate buffer), pH 9.0 (0.1 M borate buffer) 및 pH 11.0 (0.1 M carbonate buffer)의 완충용액과 확보된 박테리오신 용액을 1:1의 비율로 혼합하여 상온(25°C)에서 24시간 방치 한 후 잔존하는 박테리오신의 항균활성을 측정하였다.

열에 대한 안정성: 열에 대한 안정성의 조사는 제조된 박

테리오신 용액을 40°C, 60°C, 80°C, 100°C 및 121°C에서 각각 30분 또는 60분간 열처리 한 후 잔존하는 박테리오신의 항균활성을 측정하였다.

유기용매에 대한 안정성: 유기용매에 대한 안정성 실험은 chloroform, isopropanol, hexane, ethanol, acetone 및 acetonitrile 등을 제조된 박테리오신 용액과 같은 부피 비율로 혼합(1:1)하여 상온(25°C)에서 1시간 방치한 후, 잔존하는 박테리오신의 항균활성을 측정함으로써 여러 유기용매에 대한 박테리오신의 안정성을 조사하였다.

각종 가수분해효소에 대한 영향: 각각의 buffer에 녹여 최종 농도 2 mg/ml로 맞춘 trypsin (13,500 U/mg, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5), protease (1.0 U/mg, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5), α -chymotrypsin (83.9 U/mg, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0), pepsin (800-2500 U/mg, 10 mM citrate, pH 6.0), α -amylase (519 U/mg, 0.1 M sodium phosphate, pH 7.0), subtilisin A (12 U/mg, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 그리고 proteinase K (30 U/mg, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.9, 0.005 M EDTA, 0.5% SDS)를 배양상등액과 37°C에서 3시간 반응시킨 다음 80°C에서 2분간 가열하여 효소를 불활성화 시켰다. 그리고, proteinase K는 45°C에서 12시간 반응시켰다. 박테리오신 활성은 *B. cereus* KCTC 3624에 대한 저해환의 생성 유무로 확인하였다. 또한 동일한 조건에서 효소액만을 처리하지 않은 것을 대조구로 사용하였다.

항균범위 측정

분리균주 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신의 항균범위를 알아보기 위해 식품유래 병원성균 및 다양한 표준균주 *Leu. mesenteroides* KCTC 3100, *Leu. carnosum* KCTC 3525, *Leu. lactis* KCTC 3528, *L. plantarum* KCTC 3099, *L. plantarum* KCTC 3104, *L. confusus* KCTC 3499, *L. parabuchneri* KCTC 3503, *L. viridescens* KCTC 3504, *P. dextrinicus* KCTC 3506, *P. pentosaceus* KCTC 3507, *E. faecium* KCTC 3095, *L. monocytogenes* KCTC 3444, *B. cereus* KCTC 1013, *B. cereus* KCTC 1014, *B. cereus* KCTC 3624, *S. aureus* 209 KCTC 1916, *S. aureus* R209 KCTC 1928, *S. typhimurium* KCTC 1926, *E. coli* KCTC 1924, *E. coli* KCTC 2191 및 *C. albicans* KCTC 1940 등에 대하여 항균력을 확인하였다. 각 지시균주의 최적 생육 온도에서 24시간 이상 배양하여 저해환의 생성 여부를 확인하였다.

배양조건이 박테리오신 생산에 미치는 영향

배양 온도의 영향: 분리균주의 생육(growth)과 배양온도가 박테리오신의 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 전 배양된 분리균주를 MRS 액체배지에 1.0% (v/v) 접종하고 25°C, 30°C, 및 37°C의 진탕 배양기에서 48시간 동안 배양하면서 일정한 시간 간격으로 배양 상등액을 회수하여 박테리오신 활성과 흡광도(OD 600)를 측정하여 균의 생육 곡선과 최대 항균활성을 나타내는 배양 온도를 결정하였다.

초기 배양 pH의 영향: 배지의 초기 pH가 분리균주의 생육과 박테리오신 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 1 N HCl과 1 M NaOH로 pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 및 pH 9.5으로 맞춘 MRS 액체배지에 전 배양한 분리균주를 1.0% (v/v) 접종하고 접종하고 30°C에서 24시간 배양 한 후 배양액 으로부터 상등액을 회수하여 박테리오신 활성과 흡광도(OD 600)를 측정하여 균의 생육곡선과 최대 항균활성을 나타내는 배지의 pH를 결정하였다.

Tricine-SDS-PAGE에 의한 항균물질의 분자량 측정

항균물질의 분자량을 측정하기 위하여 아세톤 침전법으로 부분 정제한 박테리오신 시료를 사용하여 tricine-SDS-PAGE를 실시하였다(28). Gel 농도는 16.5%로 사용하였고, 표준분자량 물질로 BIO-RAD사의 precision plus protein dual extra standards marker를 사용하였다. 부분 정제한 시료를 tricine-SDS-PAGE sample buffer와 1:1의 비율로 혼합하여 끓는 물에서 3분간 가열하여 전기영동하였다. 전기영동 완충용액으로 anode buffer (0.2 M Tris, pH 8.9)와 cathode buffer (0.1 M Tris, 0.1 M tricine, 0.1% SDS, pH 8.25)를 사용하였다. 전기영동 이 끝난 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색을 하였고, 다른 gel은 50% methanol과 10% acetic acid에서 30분간 고정시키고, 멸균수로 4시간 동안 세척한 다음 이 gel을 plate 위에 무균적으로 건조시키고 그 후 지시균(*B. cereus*, 1.0×10^6 CFU/ml)이 포함된 NB soft agar (0.8%) 10 ml을 증충한 다음 30°C에서 하룻밤 동안 배양한 후, 지시균에 대해 억제환이 형성되는 band와 염색한 gel 상

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of strain ET45 from Kimchi

Characteristics	Strain ET45	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Gram stain/Shape	+ / C ^a	+ / C
Spores	- ^b	-
Motility	-	-
Growth in air	+	+
Growth anaerobically	+	+
Catalase	-	-
Oxidase	-	-
Glucose (acid)	+	+
O/F ^c test	F	F
Growth at 40°C	+	+
Growth with 4% NaCl	+	+
Arginine hydrolysis	D ^d	+
Carbohydrates, acid from		
Lactose	+	+
Mannitol	W ^e	-
Raffinose	D	-

^a C, Coccus

^b Negative, -; positive, +

^c O/F, Oxidation / Fermentation

^d D, Different reactions in different strain

^e W, Weak reaction

에서의 band를 상호비교하였다.

결과 및 고찰

균주의 선발과 동정

김치 시료로부터 형태학적인 특성에 따라 상이한 200균주의 유산균을 분리 하였으며, well diffusion method를 이용하여 *B. cereus* KCTC 3624에 대한 항균활성을 측정하였다. *B. cereus*의 생육 저해활성이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선택하여 ET45로 명명하고 본 실험에 사용하였다. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 따라 *L. lactis* 표준균주와 생화학적 특성을 비교·분석한 결과, mannitol과 raffinose 이용 여부 및 arginine hydrolysis 제외한 대부분은 표준균주와 동일한 특성을 나타냄을 확인하였다(Table 1). 최종적으로, NCBI의 BLAST program을 이용하여 ET45의 16S rRNA 염기서열에 대한 상동성을 분석한 결과, 99%의 신뢰도로 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*로 동정되었다.

박테리오신의 이화학적 특성

분리균주 *L. lactis* ET45가 생산하는 항균활성 물질의 단백질성 여부를 확인하기 위하여 용액에 각종 단백질분해효소를

Table 2. Stability of bacteriocin against various treatments

Treatment	Residual activity unit (AU/ml)
Control	160
Heat treatment	
40°C, 30 min	160
40°C, 60 min	160
60°C, 30 min	160
60°C, 60 min	160
80°C, 30 min	160
80°C, 60 min	160
100°C, 30 min	160
100°C, 60 min	160
121°C, 30 min	160
121°C, 60 min	160
Solvents ^a	
Hexane	160
Chloroform	160
Acetonitrile	160
Ethanol	160
Acetone	160
Isopropanol	160
pH ^b	
3	160
5	160
7	80
9	80
11	80

^a Final concentration of solvent was 50% (v/v)

^b No pH treatment; 160 AU/ml, Bacteriocin samples were treated with buffers at each pH, 25°C for 24 h.

2 mg/ml의 농도가 되도록 첨가하여 반응시킨 후 잔존활성을 측정한 결과, proteinase K, trypsin, chymotrypsin, 및 subtilisin A에 의해서는 항균활성이 소실되었으며, pepsin, protease, α-amylase에 의해서는 항균활성이 소실되지 않았다 (Table 2). 대부분의 박테리오신은 단백질이거나 단백질성이기 때문에 단백질 분해효소에 의해 분해되는데 ET45가 생산하는 박테리오신은 pepsin, protease에 대해서 안정한 성질을 나타내었다. 그리고 α-amylase는 활성에 전혀 영향을 주지 않는 것으로 보아 탄수화물 부분이 박테리오신 분자 내에는 없거나 활성과는 무관한 것으로 생각된다. *Lactococcus* sp. J-105가 생산하는 박테리오신의 경우에는 peptide 분해효소 중 pepsin에 의해서만 항균활성이 소실된다고 하였으며(18), *L. lactis* WNC 20이 생산하는 박테리오신은 papain, pepsin, trypsin, lipase, α-amylase에 의해서는 항균활성이 영향을 받지 않지만 proteinase K, α-chymotrypsin에 의해서 항균활성이 소실된다고 하였다(26). 또한 *L. lactis* NK34가 생산하는 박테리오신의 경우도 비교적 peptide 분해효소에 비교적 안정하였다.

pH에 대한 안정성 여부를 조사하기 위하여 부분 정제된 항균물질 용액에 완충용액을 가하여 pH를 조절한 뒤 잔존활성을 측정한 결과, 분리 균주가 생산하는 박테리오신은 pH 3.0-5.0에서 어떠한 활성의 소실 없이 안정하였고 그 밖의 범위에서는 점차 활성이 감소하는 경향을 나타내었으나 그 활성이 완전하게 소실되지는 않았다(Table 3).

Choi 등(5)이 보고한 *L. Lactis* YH-10가 생산하는 박테리오신의 경우 pH 2.0-11.0까지 넓은 범위에서도 안정하다고 보고하였다. 반면 *L. lactis* WNC 20가 생산하는 박테리오신의 경우 pH 2.0-7.0까지는 안정하였으나 pH 8.0-10.0에서는 박테리오신 활성이 불안정하고 보고된 바 있다(26). 따라서, 본 연구에서 선발된 박테리오신은 다른 연구자들에 의해 보고된 박테리오신들에 비해 비교적 pH 안정성이 우수한 것으로 나타났다.

일반적으로 각종 유산균이 생산하는 박테리오신의 열 안정성은 그 종류에 따라 상이한 것으로 알려져 있는데 Noonpakdee 등이 보고한 *L. lactis* WNC 20 균주가 생산하는

Table 3. Effect of various enzyme treatments on the bacteriocin activity of the bacteriocin partially purified from *L. lactis* ET45

Treatment	Residual bacteriocin activity
Control ^a	+
Proteinase K	-
Trypsin	-
Chymotrypsin	-
Pepsin	+
α-Amylase	+
Subtilisin A	-
Protease	+

^a Non enzyme treated sample

B. cereus KCTC 3624 was used as an indicator.

Degree of clear zone by growth inhibition; +, positive; -, negative

Culture supernatant was mixed with enzyme solutions at a final concentration of 2 mg/ml.

박테리오신의 경우, 121°C, 15분 열 처리시에도 그 항균활성이 안정하였다고 보고되었으나(26), *L. Lactis* YH-10가 생산하는 박테리오신의 경우 100°C, 60분간 열 처리시 약 50%의 항균활성을 나타낸다고 보고하였다(5). 본 연구에서 분리한 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신은 40°C-121°C에서 열 처리시에도 매우 안정하였다(Table 3). 그러나 박테리오신의 구조를 포함한 분자 생물학적 특성을 알기 위해서는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

유기용매에 대한 안정성의 경우 hexane, chloroform, acetone, acetonitrile, isopropanol, ethanol을 최종 농도 50% (v/v)로 처리할 경우 항균활성에 변화가 없는 것으로 보아 유기 용매에 매우 안정함을 확인 할 수 있었다(Table 3).

항균범위확인

분리균주 *L. lactis* ET45가 생산하는 박테리오신의 항균범위를 알아보기 위해 식품유래 병원성균 및 다양한 표준균주 *L. mesenteroides* KCTC 3100, *L. carnosum* KCTC 3525, *L. lactis* KCTC 3528, *L. plantarum* KCTC 3099, *L. plantarum* KCTC 3104, *L. confusus* KCTC 3499, *L. parabuchneri* KCTC 3503, *L. viridescens* KCTC 3504, *P. dextrinicus* KCTC 3506, *P. pentosaceus* KCTC 3507, *E. faecium* KCTC 3095, *L. monocytogenes* KCTC 3444, *B. cereus* KCTC 1013, *B. cereus* KCTC 1014, *B. cereus* KCTC 3624, *S. aureus* 209 KCTC 1916, *S. aureus* R209 KCTC 1928, *S. typhimurium* KCTC 1926, *E. coli* KCTC 1924, *E. coli* KCTC 2191 및 *C. albicans* KCTC 1940 등 총 21개의 표준균주를 이용하여 항균 활성을 확인한 결과, Table 4와 같이 *L. monocytogenes* KCTC 3444, *S. aureus* 209 KCTC 1916, *S. aureus* R209 KCTC 1928, *S. typhimurium* KCTC 1926, *E. coli* KCTC 1924, *E. coli* KCTC 2191 및 *C. albicans* KCTC 1940을 제외한 다양한 미생물에 대한 항균활성을 나타내었다. 특히 발효식품의 주요 식품유해균으로 알려진 *B. cereus*에 대해서는 강한 항균 활성을 나타냄으로써 향후 식품산업의 천연 식품보존제로서의 활용가능성도 기대할 수 있을 것이다.

배양조건이 박테리오신 생산에 미치는 영향

배양 온도의 영향: 분리균주 *L. lactis* ET45의 생육 및 박테리오신 생산에 대한 최적 배양온도를 결정하기 위하여, 배양 온도를 25°C, 30°C, 37°C로 하여 48시간 진탕 배양하였다. 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 25°C, 30°C에서 배양하였을 때에는 18시간 이후부터 항균활성이 나타나기 시작하여 48시간 때까지 일정한 활성을 유지하였다. 37°C에서는 12시간부터 항균활성이 나타나기 시작하여 49시간 때까지 일정한 활성을 유지하였지만, 25°C, 30°C에서의 박테리오신 최대역가의 약 50% 수준을 나타내었다.

Moonchai 등(25)이 보고한 *L. lactis* C7 균주가 생산하는 박테리오신의 경우 22°C가 최적 온도인 것으로 나타나 비교적 낮은 온도에서 박테리오신 최대활성을 나타내었다고 보고하였고, *L. lactis* YH-10이 생산하는 박테리오신의 경우에는

Table 4. Antibacterial spectrum of bacteriocin produced by *L. lactis* ET45

Strains	Antimicrobial activity
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	+
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCTC 3525	+
<i>Leuconostoc lactis</i> KCTC 3528	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3099	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	+
<i>Lactobacillus confusus</i> KCTC 3499	+
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> KCTC 3503	+
<i>Lactobacillus viridescens</i> KCTC 3504	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC 3101	-
<i>Pediococcus dextrinicus</i> KCTC 3506	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC 3507	+
<i>Enterococcus faecium</i> KCTC 3095	+
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3444	-
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1013	+
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1014	+
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 KCTC 1916	-
<i>Staphylococcus aureus</i> R209 KCTC 1928	-
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1926	-
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1924	-
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2191	-
<i>Candida albicans</i> KCTC 1940	-

Degree of clear zone by growth inhibition: +, positive; -, negative

25°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다고 보고하였다(5). 여러 결과와 비교해 볼 때 박테리오신의 종류에 따라 최적 배양 온도가 상이하였다. 이렇게 차이가 나는 이유는 박테리오신의 분자량과 구성성분 및 구조 등 생화학적 특성의 다르기 때문인 것으로 알려져 있다(23).

초기 배양 pH의 영향

분리균주 *L. lactis* ET45의 생육 및 박테리오신 생산에 대한 최적의 초기 pH를 결정하기 위하여, MRS를 기본배지로 하여 배지의 초기 pH를 각각 pH 3.5-9.5로 조절하고, 30°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 균체의 증식은 pH 9.5에서 가장 높았으며, 다음으로 pH 8.5, 7.5순으로 나타났다. 박테리오신의 활성은 pH 7.5에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2). 따라서 *L. lactis* ET45의 박테리오신의 최대 활성은 MRS 액체배지 초기 pH 7.5으로 조정하여 30°C에서 18-24시간 배양하는 동안 나타나는 것으로 확인하였다.

Parante 등(27)이 보고한 *L. lactis* 140NWC 균주가 생산하는 박테리오신의 경우에는 pH 5.5에서 최대 활성을 가진다고 보고하여 본 실험의 균주와는 다소 차이가 있었다. 또한, *L. lactis* A164가 생산하는 박테리오신은 pH 6.0에서 가장 높은 활성이 나타났다고 하였고(4), *Lactococcus* sp. J-105이 생산하는 박테리오신 활성은 pH 8.0 부근에서 가장 높았다고 보고하였다(18). 이와 같이 박테리오신을 생산하는 균주들의 최적

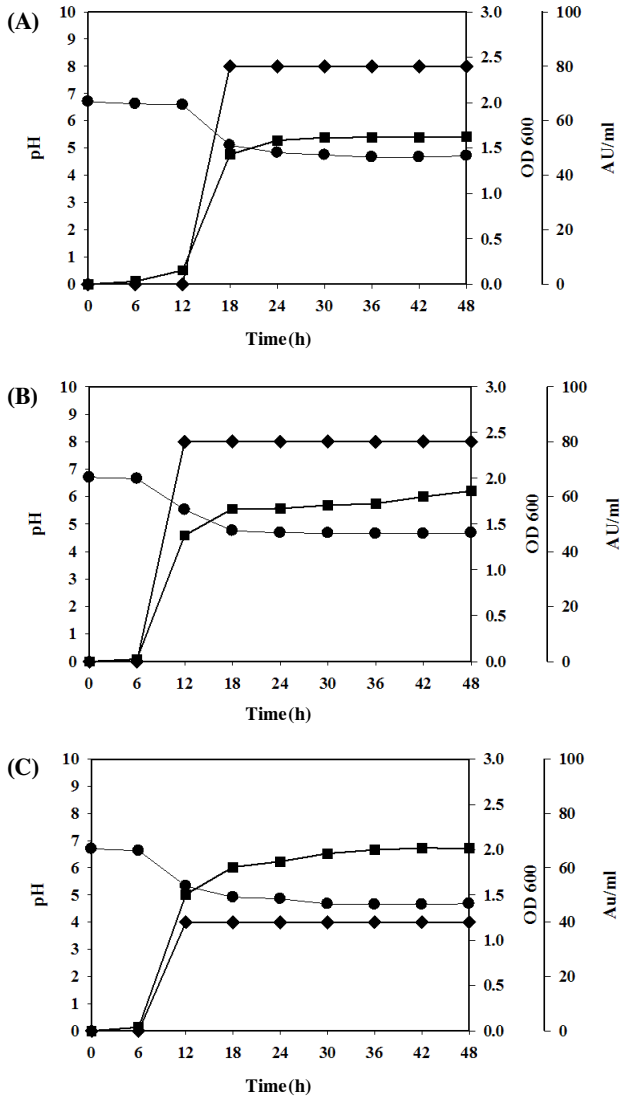


Fig. 1. Cell growth and bacteriocin production of *L. lactis* ET45 at different temperatures. One milliliter of culture was sampled at 6 h interval. Optical density at 600 nm was measured and the rest was centrifuged to recover supernatant from cell culture. The symbols: ■ cell growth; ◆ bacteriocin activity unit (AU/ml); ● final pH. The temperatures: (A) 25°C, (B) 30°C, (C) 37°C.

pH는 세균마다 다양하게 나타나는 것으로 보고되어있다.

Tricine-SDS-PAGE에 의한 항균물질의 분자량 측정

부분 정제된 박테리오신의 분자량을 추정하기 위하여 전기영동을 실시하였다. 지시균으로 *B. cereus*를 사용하여 항균효과를 비교한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이, 대략 4.5 kDa에 위치하고 있는 band에서 항균활성을 나타내었다.

본 *L. lactis* ET45 균주가 생산하는 박테리오신은 유산균이 생산하는 박테리오신 중 열에 안정하며, 분자량이 5 kDa 이하의 박테리오신이 속하는 Class I 박테리오신으로 추정되며, 정확한 분류 및 분자량 등의 특징을 파악하기 위해서는 박테리

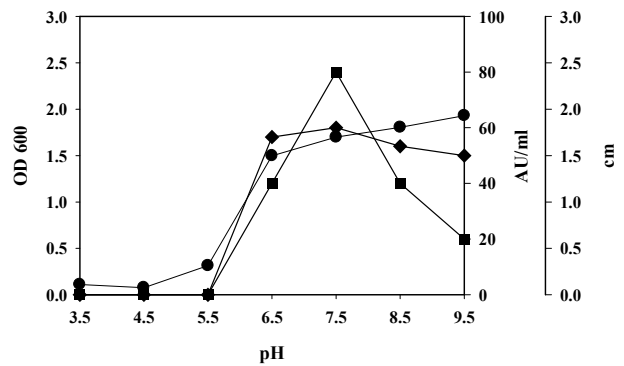


Fig. 2. Effects of pH on cell growth and bacteriocin production of *L. lactis*. One milliliter of culture was sampled. Optical density at 600 nm was measured and the rest was centrifuged to recover supernatant from cell culture. The symbols: ● cell growth; ◆ inhibition activity; ■ bacteriocin activity unit (AU/ml).

오신의 순수분리 및 단백질 염기서열의 분석 작업 등이 필요하다.

적요

*Bacillus cereus*에 항균활성을 갖는 박테리오신을 생산하는 유산균을 김치로부터 분리하였다. 선별한 균주는 Bergey's manual, 16S rDNA 분석을 통하여 *Lactococcus lactis*로 동정되었으며, *L. lactis* ET45로 명명하였다. ET45가 생산하는 박테리오신은 pH 3.0-11.0까지 안정하였고, 열 안정성 테스트

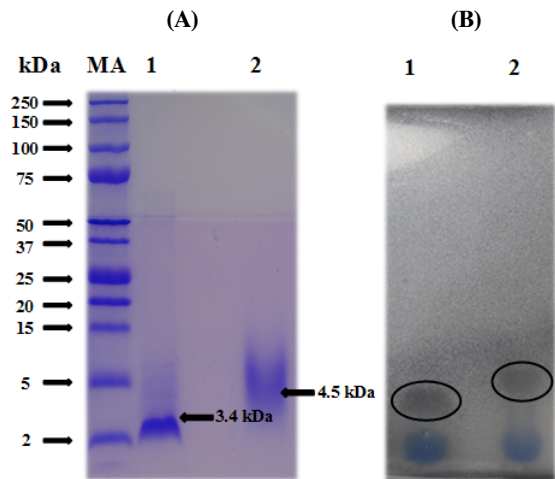


Fig. 3. Tricine-SDS-PAGE and detection of antibacterial activity of the partially purified bacteriocin from *L. lactis* ET45. (A) Coomassie blue stained tricine-SDS-PAGE gel. MA, The size marker (precision plus protein dual xtra standards marker, BIO-RAD #161-0377); Lanes: 1, Nisin (Sigma #N5764); 2, purified bacteriocin (B) Gel overlaid with 0.8% NB agar containing indicator organism, 1% of *B. cereus* KCTC 3624. Lanes: 1, Nisin; 2, purified bacteriocin.

결과 40-121°C까지 안정함을 확인하였다. 박테리오신의 생산을 위한 최적 조건으로 MRS 액체배지에서 초기 pH 7.5, 30°C에서 18시간 배양하였을 때 최대생산을 보였다. 박테리오신의 항균활성이 proteinase K의 처리로 활성이 소실되어, 박테리오신이 단백질성 물질임을 확인하였다. 박테리오신의 분자량은 tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (TSDS- PAGE)를 통하여 약 4.5 kDa임을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 농림수산식품부의 식품기술개발사업의 연구결과로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Atrih, A., N. Rekhif, M. Michel, and G. Lefebvre. 1993. Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. *Microbios* 75, 117-123.
- Bang, B.H., J.S. Seo, and E.J. Jeong. 2008. A method for maintaining good *Kimchi* quality during fermentation. *Kor. J. Food. Nutr.* 21, 51-55.
- Cho, M., E.K. Bae, S.D. Ha, and J. Park. 2005. Application of natural antimicrobials to food industry. *Food Sci. Indus.* 38, 36-45.
- Choi, H.J., C.I. Cheigh, S.B. Kim, and Y.R. Pyun. 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from *Kimchi*. *J. Appl. Microbiol.* 88, 563-571.
- Choi, E.M., Y.H. Kim, S.J. Park, Y.I. Kim, Y.M. Ha, and S.K. Kim. 2004. Characterization of bacteriocin, lacticin YH-10, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YH-10 isolated from *Kimchi*. *J. Life Science* 14, 683-688.
- Choi, H.J., H.S. Lee, S. Her, D.H. Oh, and S.S. Yoon. 1999. Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable *Kimchi*. *J. Appl. Microbiol.* 86, 175-181.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes, and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1-20.
- Delve, B.J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44, 100-117.
- Dodd, H.M., N. Horn, Z. Hao, and M.J. Gasson. 1992. A lactococcal expression system for engineered nisins. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3683-3693.
- FDA. Nisin preparation. 1988. Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Food Drug Admin. Fed. Reg.* 53, 11247.
- Felske, A. and A.D.L. Akkermans. 1998. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. *Microb. Ecol.* 36, 31-36.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. Regular, nonsporing gram-positive rods, pp. 565-570. *In* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9thed. Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27, 85-123.
- Jack, R.W., J.R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.
- Kim, D.S. 2002. Characteristics of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. Oh-B3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 184-188.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.* 12, 39-86.
- Klaenhammer, T.R. 1998. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349.
- Kwark, K.S., J.G. Cu, K.M. Bae, and H.K. Jun. 1999. Characterization of bacteriocin production by *Lactococcus* sp. J-105 isolated from *Kimchi*. *Kor. J. Life Science* 9, 111-120.
- Lee, M.K., K.K. Rhee, J.K. Kim, S.M. Kim, J.W. Jeong, and D.J. Jang. 2007. A survey of research papers on Korean *Kimchi* and R&D trends. *Kor. J. Food Culture* 22, 104-114.
- Lim, S.M. and D.S. Im. 2007. Bactericidal effect of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from *Dongchimi* on *Escherichia coli* O157. *J. Food Hyg. Safety* 22, 151-158.
- Lind, H., H. Jonsson, and J. Schnurer. 2005. Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 157-165.
- Lingren, S.E. and W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 149-163.
- Maisnier, P.S., E. Forni, and J. Richard. 1996. Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 255-270.
- Mattick, A.T.R. and A. Hirsch. 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* 2, 5-8.
- Moonchai, S., W. Madlhoo, K. Jariyachavalit, H. Shimizu, S. Shioya, and S. Chauvatcharin. 2005. Application of a mathematical model and differential evolution algorithm approach to optimization of bacteriocin production by *Lactococcus lactis* C7. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 28, 15-26.
- Noonpakdee, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit, K. sonomoto, and S. Panyim. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented *Sausage*. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 137-145.
- Parente, E., A. Ricciardi, and G. Addario. 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.
- Schägger, H. and G.V. Jagow. 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.
- Settanni, L. and A. Corsetti. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 123-138.
- Steiles, M.E. and J.W. Hastings. 1991. Bacteriocin producing by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.* 2, 247-251.
- Tagg, J.R. and A.R. McGiven. 1971. Assay systems for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21, 943.
- U. S. Food and Drug Administration. 1999. Nisin preparation, Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Food & Drug Admin. Fed. Reg.* 54, 6120-6123.
- Walter, J., G.W. Tannock, T. Tilsala, A. Isjarvi, S. Rodtong, D.M. Loach, K. Munro, and T. Alatosava. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 297-303.
- Yang, E.J., J.Y. Chang, H.J. Lee, J.H. Kim, D.K. Chung, J.H. Lee, and H.C. Chang. 2002. Characterization of the antagonistic activity against *Lactobacillus plantarum* and induction of bacteriocin production. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 42, 311-318.