

Lactococcus sp. HY 449가 생산하는 Bacteriocin의 *Lactobacillus fermentum* IFO 3023에 대한 억제작용

김상교* · 이상준 · 백영진 · 박연희¹

한국야쿠르트연구소, ¹아주대학교 공과대학 생물공학과

Mode of Action of Bacteriocin Produced by *Lactococcus* sp. HY 449 against *Lactobacillus fermentum* IFO 3023

Kim, Sang-Kyo*, Sang-Jun Lee, Young-Jin Baek and Yun-Hee Park¹

Hankuk Yakult Institute, Ewiwang-shi, Kyunggi-do, 437-020, Korea

¹Department of Biotechnology A-Jou University, Suwon, 441-749, Korea

Abstract — A bacteriocin was isolated from the supernatant fluid of M17G broth culture of *Lactococcus* sp. HY 449 strain, which showed strong inhibitory activity against the growth of selective indicator strain, *Lactobacillus fermentum* IFO 3023. When the bacteriocin was added to the growing indicator cells or cell suspensions, viable cells and optical density were decreased, indicating bacteriolytic mode of action. Electron microscopic observation of indicator cells treated with bacteriocin revealed apparent damages on the cell surface and eventual lysis of cell walls.

Lactic acid bacteria(LAB)는 식품이나 사료의 발효에 사용되는 경제적으로 중요한 의미를 지닌 미생물이다. 이들은 hydrogen peroxide, diacetyl, 및 각종 유기산을 생산하기도 하며(1) 유산균에 따라서는 저분자의 펩타이드성 물질인 bacteriocin을 생산하여 자신과 밀접한 종들의 증식을 억제하기도 한다. 이들 LAB가 생산하는 bacteriocin들은 다양한 부패균이나 병원성균에 대하여 나타내는 항균작용 때문에 식품의 저장에 사용되고 있으며 앞으로 더욱 관심이 커질 것으로 기대되며 bacteriocin의 susceptible cell에 대한 작용기작을 미리 이해하는 것은 이들을 식품의 저장에 이용하는데 중요한 기초자료가 될 것으로 생각한다.

Bacteriocin의 susceptible cell을 억제하는 형태는 크게 세종류로 나뉘어 진다. 즉, susceptible cell의 증식만을 억제하는 bacteriostatic action과, 이들을 사멸시키는 bacteriocidal action 그리고 사멸 뿐 아니라 세포벽을 용해시키는 bacteriolytic action 등이 있다. 그러나 대부분의 bacteriocin은 bacteriocidal action을 가지고 있으며 몇몇 종류는 특이하게 세포벽을 용해시키는 경우도 보고되고 있으나 이들의 작

용기작은 확실하지 않고 다만 lactococcin A(2-4)와 nisin(5-7)에 대한 것이 비교적 상세히 알려져 있다. Nisin의 1차적인 작용목표는 susceptible cell의 세포질막이다. 이러한 사실은 nisin이 비특이적이며 신속한 아미노산, 양이온들의 유출이나 막전위차의 붕괴를 유발시키며 궁극적으로 사멸에 도달시키는 것으로부터 알 수 있다(6).

본 연구는 *Lactococcus* sp. HY449가 생산하는 bacteriocin을 분리하여 이들의 작용 형태를 규명함으로써 앞으로의 이용 가능성을 알아보기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

Bacterial culture 및 bacteriocin의 조제

Bacteriocin 생산 균주인 *Lactococcus* sp. HY 449는 유제품으로부터 분리 사용하였고 지시균인 *Lactobacillus fermentum* IFO 3023은 한국야쿠르트 연구소에 보관중인 것을 사용하였다.

모든 균주는 -76°C의 질소 탱크에 보관하고 실험에 사용하기 직전 각각 M17G broth(Biolife, Italy plus 1% dextrose, pH 7.0)와 MRS broth(Difco, lactobacilli MRS broth)에서 2회 계대하여 사용하였다.

Crude bacteriocin의 조제는 M17G broth에서 16

Key words: Bacteriocin, inhibitory activity, bacteriolytic

*Corresponding author

시간 배양한 것을 10,000×g에서 30분 원심분리하여 (Dupont, Sorvall RC 28S, GSA rotor) cell을 제거하고 남은 상등액에 60% 포화 (NH₄)₂SO₄ 용액을 사용하여 4°C에서 overnight시킨 후 전과 동일한 조건으로 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이것을 상등액의 1/10 부피의 이온 교환수에 다시 용해시켜 MWCO 1,000 dalton의(Spectrum, Spectra/Por) 투석막을 이용하여 24시간 투석한 후 냉동건조(LABCONCO, Freeze Dryer 18)하였다.

Sensitive indicator의 생육에 미치는 영향

Lactococcal bacteriocin의 *L. fermentum* IFO 3023 균주의 생육에 대한 영향은 MRS broth와 peptone 수에서 조사하였다. MRS broth의 경우 지시균을 약 10⁷ cfu/ml로 접종하고 여기에 상기의 조 bacteriocin을 최종 농도 1,000 AU/ml로 0, 2, 4, 6, 및 10시간 growing culture에 각각 첨가하여 24시간에 걸쳐 생균수와 흡광도(600 nm)를 측정하였다.

Peptone 수의 경우 37°C의 MRS broth에서 4시간 배양한 것을 원심분리, cell을 회수한 후 멸균 peptone 수로 2회 수세하여 최종 cell 농도가 10⁷ cfu/ml이 되도록 peptone 수에 희석하여 bacteriocin을 320 AU/ml과 1,000 AU/ml의 두가지 농도로 첨가하여 2시간에 걸쳐 생균수와 O.D₆₀₀을 측정함으로써 실시하였다.

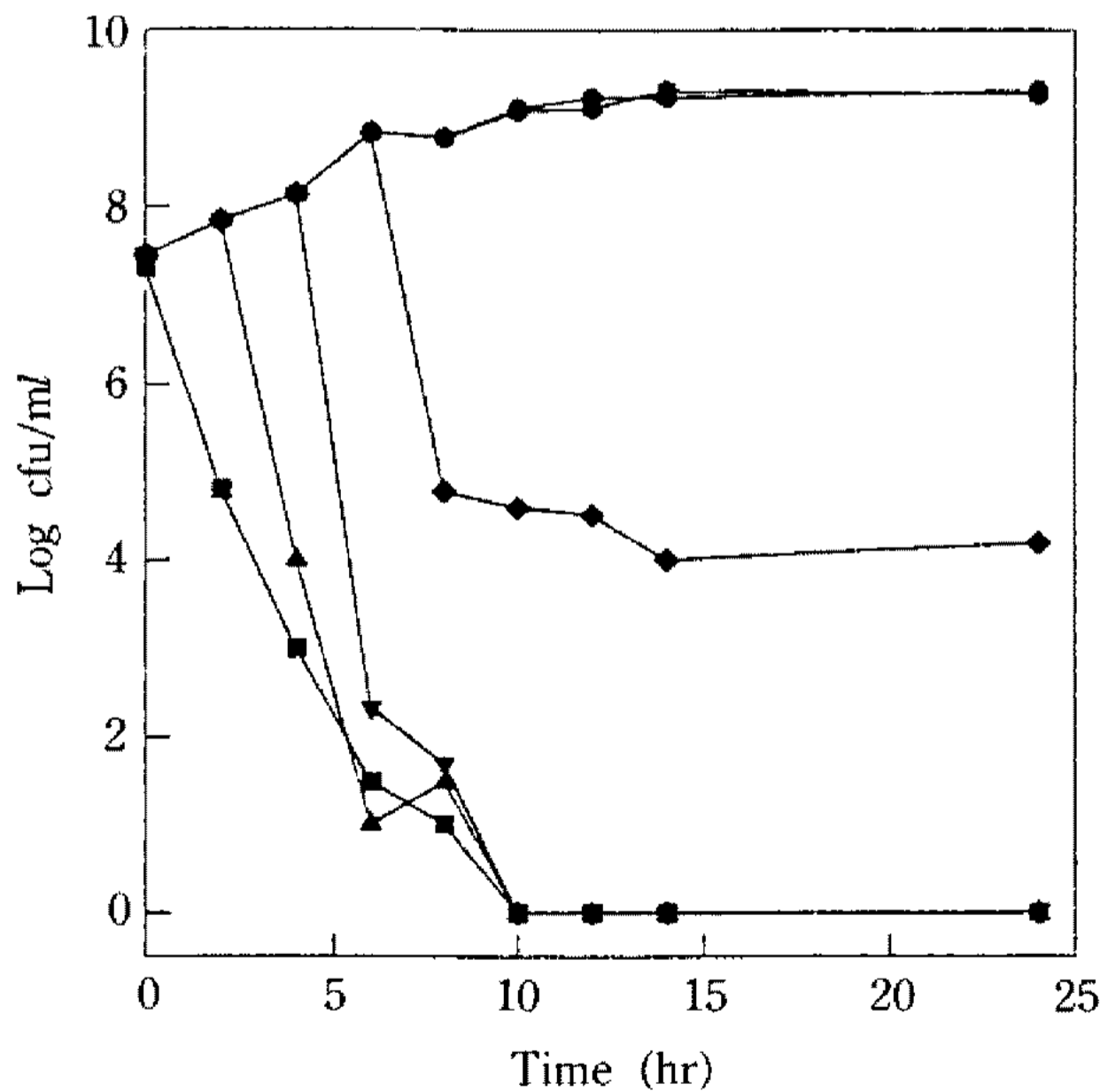


Fig. 1. Survival curves of *Lactobacillus fermentum* IFO 3023 at different addition time of bacteriocin to growing culture of MRS broth.
 -●- Untreated, -■- Initial addition, -▲- After 2 hrs, -▼- After 4 hrs, -◆- After 6 hrs, - - After 10 hrs

Scanning(SEM) and transmission(TEM) electron microscopy

Bacteriocin 처리구와 원래의 cell과의 cell의 상태 변화를 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. SEM의 경우 MRS broth에서 4시간(대수증식기), 및 8시간(정지기) 배양한 지시균에 각각 1,000 AU/ml의 bacteriocin을 첨가하여 20시간 동안 배양한 후 cell을 회수하고 20% glutaraldehyde로 고정한 후 탈수하여 gold spottering(250~300 Å)하여 Philips SEM 515로 가속 전압 20 KV에서 촬영하였다. 이때 대조구로는 같은 시간 배양한 bacteriocin 비처리 지시균을 사용하였다.

TEM은 SEM의 경우와 같이 회수된 cell을 먼저 2% agar 용액과 혼합하여 굳힌 다음 glutaraldehyde로 고정한 후 탈수하여 Epon 812로 embedding 하여 ultramicrotome을 이용하여 세절한 후 2% uranyl acetate와 1% lead citrate로 이중 염색하여 Philips CM 20 전자 현미경으로 가속전압 80 KV에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

Bacteriocin 첨가 시기에 따른 영향

MRS broth 5개에 지시균을 10⁷ cfu/ml로 접종하여 37°C 항온 수조에서 0, 2, 4, 6 및 10시간씩 배양한 후 bacteriocin을 1,000 AU/ml의 농도로 첨가하여 24

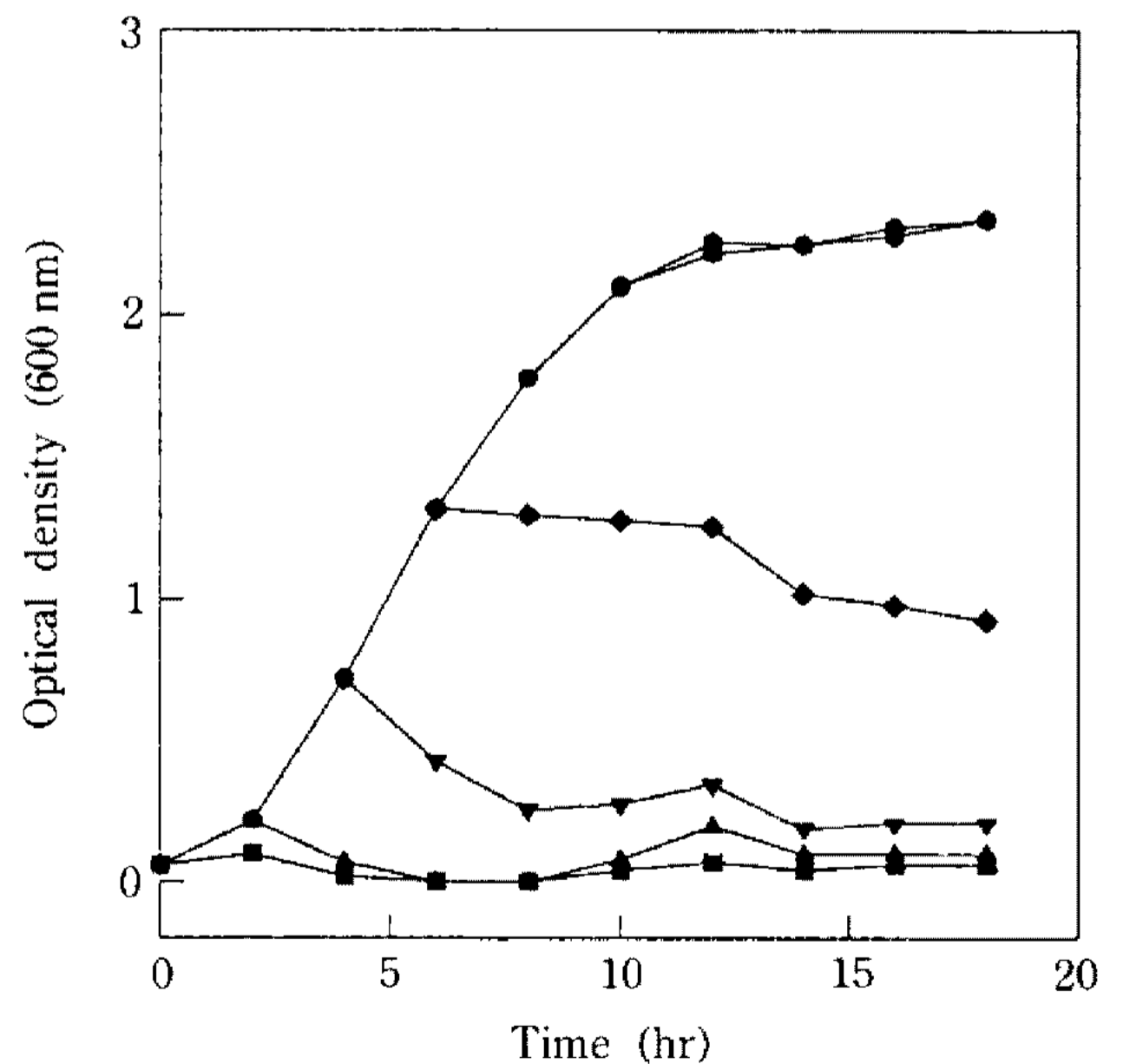


Fig. 2. Growth curves of *Lactobacillus fermentum* IFO 3023 at different addition time of bacteriocin.
 -●- Untreated, -■- 0 hrs addition, -▲- After 2 hrs, -▼- After 4 hrs, -◆- After 6 hrs, - - After 10 hrs

시간까지의 세포의 증식을 생균수와 O.D₆₀₀으로 비교하여 본 결과 Fig. 1 및 Fig. 2와 같았다. 균 접종 직후, 2시간 및 4시간 배양 후 bacteriocin을 첨가한 시험구에서는 모두 첨가 즉시 생균수가 급격하게 감소하여 첨가 후 10시간 이내에 균락을 형성하지 못하는 수준까지 사멸하는 현상을 나타내었으며, 10시간 배양 후 bacteriocin을 첨가한 경우에는 bacteriocin을 첨가하지 않은 대조구와 일치하여 영향이 없는 것으로 나타났다. 그러나 6시간 배양 후 bacteriocin을 첨가한 경우에 있어서는 차이를 보여 생균수가 10⁴ cfu/ml의 수준까지만 감소하였을 뿐 그 이후엔 일정하였다. Schved 등(8)은 *Pediococcus acidilactici*가 생산하는 bacteriocin인 SJ1에 관한 연구결과 정지기의 지시균에 SJ1을 처리했을 때는 3.7 log cycle의 균수 감소를 보였지만 대수증식기 지시균의 경우 2 log cycle의 감소만 일어났다고 보고하여 본 실험과 반대 현상을 나타냈다. 이와 같은 현상은 흡광도 변화에서도 유사하게 나타났다(Fig. 2). 10시간 배양 후 bacteriocin을 처리한 경우의 흡광도변화는 처리하지 않은 대조구와 거의 일치해서 bacteriocin의 영향은 거의 없는 것으로 보였지만 0, 2, 4 및 6시간 배양 후 처리한 경우에 흡광도가 다소 감소하는 경향을 나타냈다.

작용 형태

앞의 실험 결과 HY449 균주가 생산하는 bacterio-

cin은 대수 증식기의 지시균에 대해 민감하게 작용하므로 대수증식기의 cell을 회수하여 2회 수세하고 멸균 펩톤수에 현탁시킨 후 crude bacteriocin을 처리하여 두시간 동안 생균수와 O.D₆₀₀ 값을 측정하여 작용형태를 조사하였다.

Fig. 3에서 보듯이 생균수는 bacteriocin을 처리하지 않은 경우 거의 변화없이 10⁸ 수준을 유지하였다. 그러나 bacteriocin을 처리한 두 시료는 처리 후 불과 30분 내에 99% 정도가 사멸하는 것으로 나타나 강한 bacteriocidal activity를 나타내었다. 또한 Fig. 2에서도 나타난 바와 같이 O.D₆₀₀ 값의 감소는 peptone 수 현탁 cell에서도 나타나 이 bacteriocin이 *Lactobacillus fermentum* IFO 3023 균주에 대해 용균활성을 가지는 것을 예상할 수 있었다. 지금까지 보고된 bacteriocin들은 대부분이 bacteriocidal action을 보이고 bacteriolytic action을 가진 것은 많지 않았다.

Bacteriolytic action에 대한 보고는 *Halobacterium mediterranei*로부터 생산된 halocin H4(9), *Carnobacterium piscicola*가 생산하는 canocin UI49(10)등이 있으며 *Pediococcus acidilactici*가 생산하는 Pediocin AcH(11)는 몇몇 sensitive strain에 대해서만 용균활성을 가진다고 보고되어 있다.

한편 Bhunia 등(11)은 pediocin AcH를 *Leuconostoc mesenteroides* Ly와 *Lactobacillus plantarum* NCDO 955에 첨가하여 O.D₆₀₀으로 생육억제 정도를 측정할

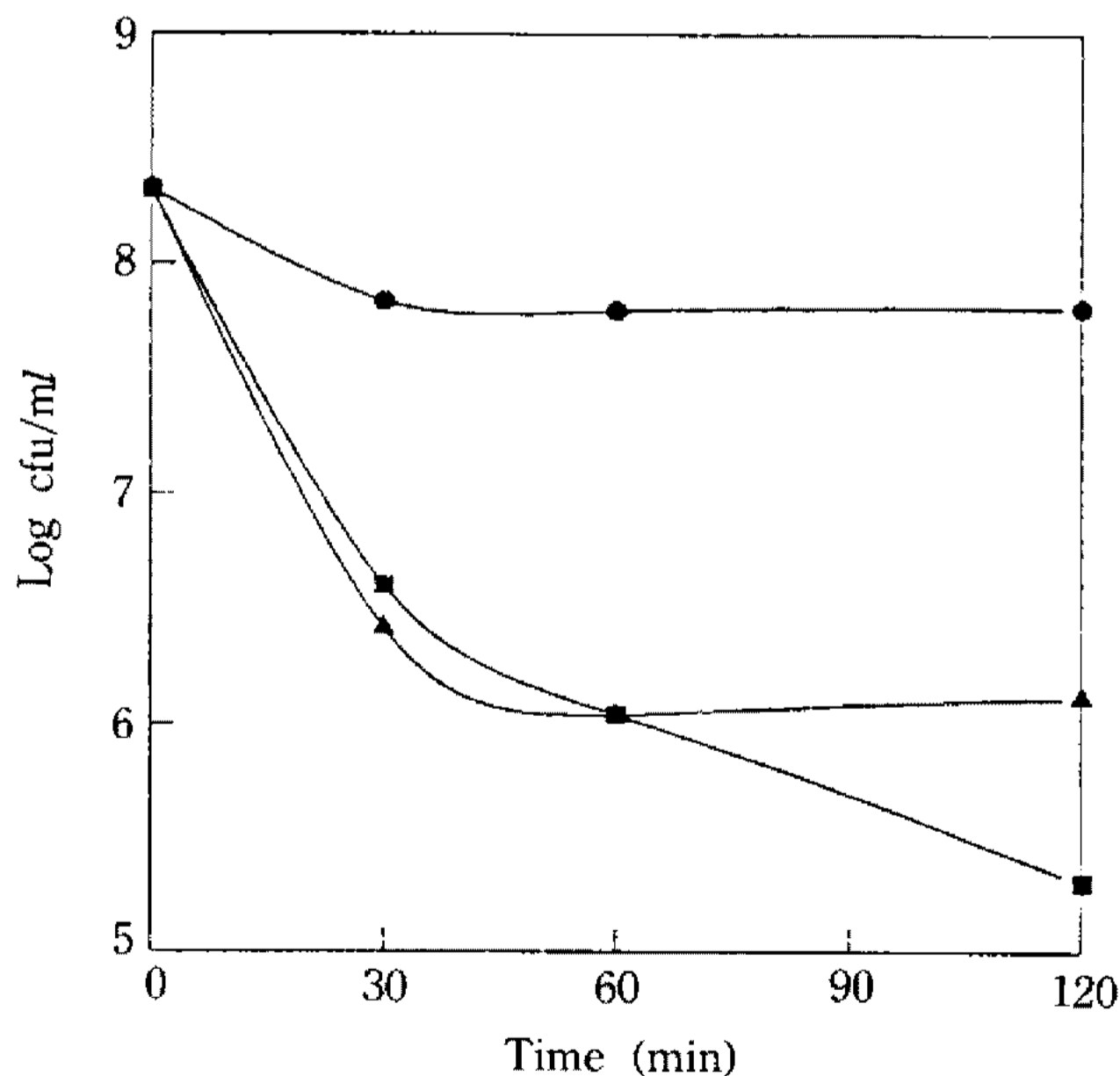


Fig. 3. Effects of bacteriocin concentration on the viable cells of indicator strains which were grown for 4 hours at 37°C in MRS broth, washed twice and resuspended in peptone solution.
 -●- Untreated, -■- 320 AU/ml, -▲- 1,000 AU/ml

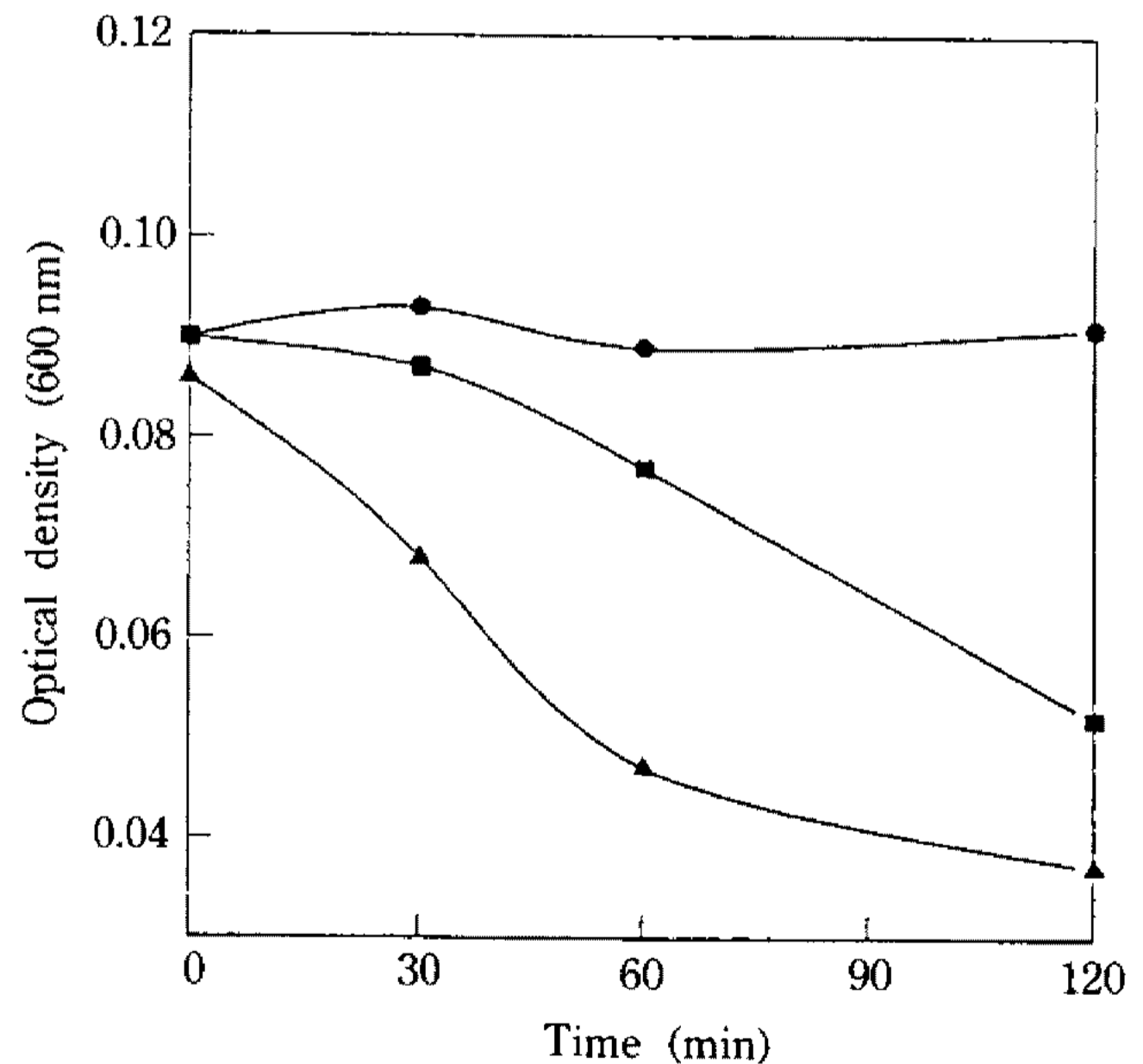


Fig. 4. Effects of bacteriocin concentration on the cell density of sensitive indicator strains which were grown for 4 hours at 37°C in MRS broth, washed twice and resuspended in peptone solution.
 -●- Untreated, -■- 320 AU/ml, -▲- 1,000 AU/ml

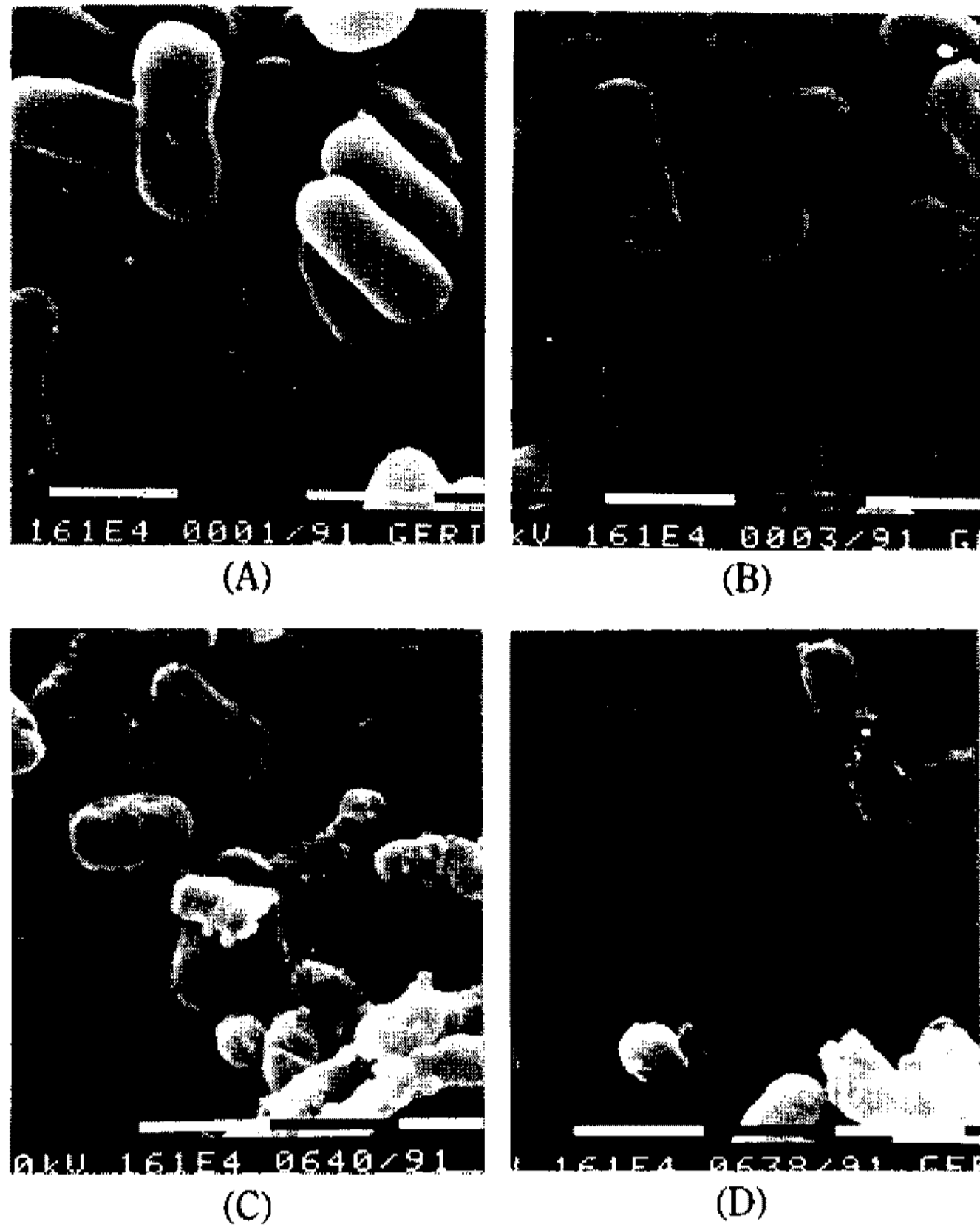


Fig. 5. Scanning electron micrographs of *Lactobacillus fermentum* IFO 3023 treated with bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449. (A) Untreated control, (B) stationary phase cells, treated, (C) exponential phase cells, treated, (D) same as (C)

때 *L. plantarum* NCDO 955 strain은 흡광도가 변하지 않고 일정하여 단순히 bacteriocidal action을 보인 반면 *Leu. mesenteroides* Ly strain은 흡광도가 감소하여 bacteriolytic action을 나타내는 등 같은 bacteriocin의 경우도 지시균에 따라 작용형태의 차이를 보였다고 보고하였다.

본 실험에서도 위의 Fig. 1과 Fig. 2에서 알 수 있듯이 *Lactococcus* sp. HY449가 생산하는 bacteriocin은 *L. fermentum* IFO 3023에 대해 대수 증식기까지는 강한 억제작용을 나타냈지만 정지기 이후의 지시균 세포에 대해서는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보였다. 그러나 *Lactobacillus acidophilus* IAM 1084에 대하여 똑 같이 실험해 본 결과 bacteriocidal activity만 보여 앞에서 지적했던 Bhunia 등(11)의 보고와 같이 지시균에 따라 작용 형태의 차이를 보임을 알 수 있었다.

전자현미경의 관찰

앞의 결과에서 예측됐던 용균작용을 보다 명확히

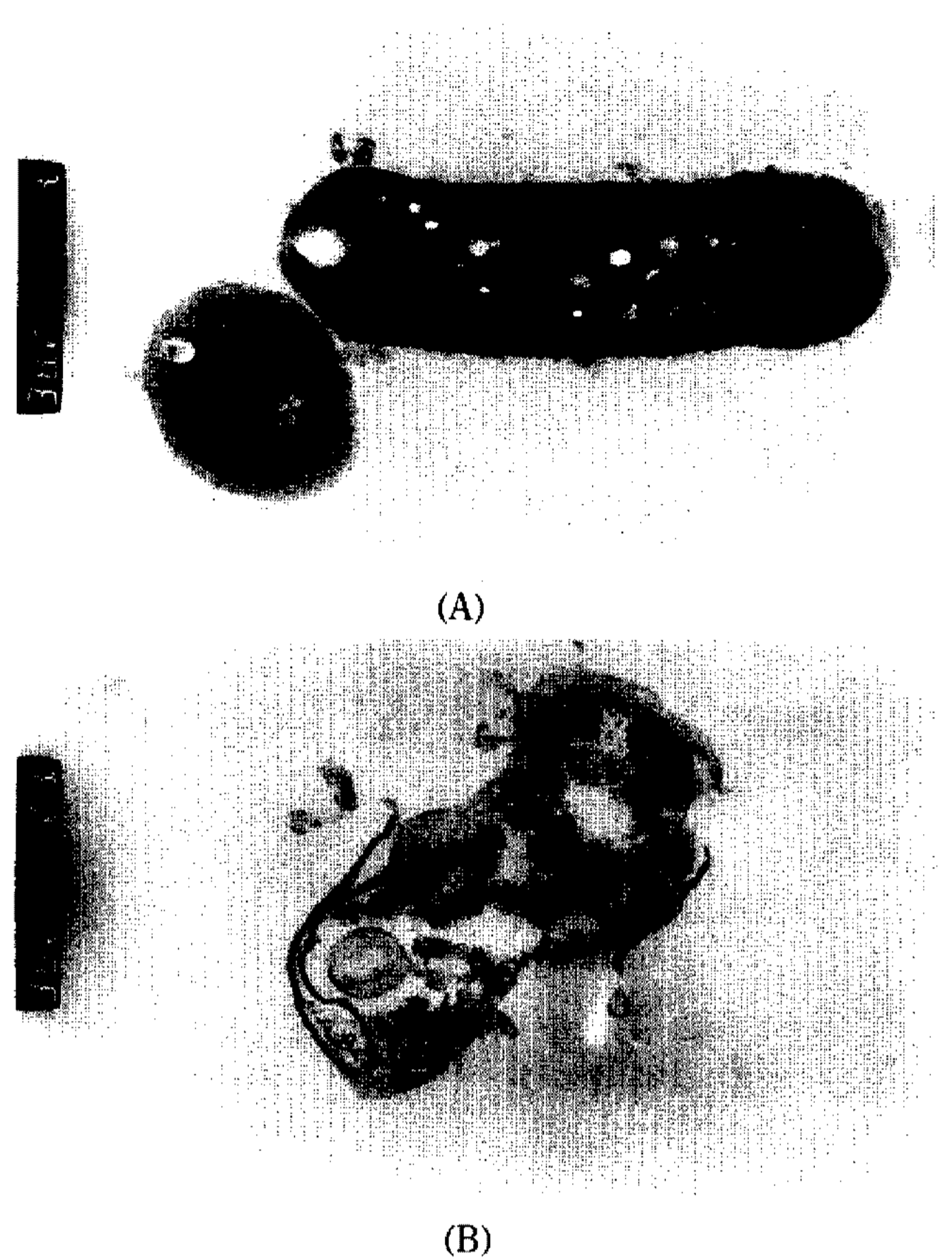


Fig. 6. Transmission electron micrographs of *Lactobacillus fermentum* IFO 3023 treated with bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449. (A) Untreated control, (B) exponential phase cells, treated

규명하기 위하여 bacteriocin을 처리한 지시균의 scanning 및 transmission electron micrographs를 처리하지 않은 지시균의 것과 비교하여 보았다.

SEM 사진(Fig. 5)에서 볼 수 있듯이 bacteriocin을 처리하지 않은 cell들은 세포막의 표면이 매끄러워 보였으나(A), 대수증식기에서 bacteriocin을 처리한 cell들은 표면이 손상되어 구멍이 형성되고 심한 경우에는 용균 현상까지도 관찰되었다(C, D). 그러나 정지기에서 bacteriocin을 처리한 지시균들은 표면에 약간의 변형만이 관찰(B)되었을 뿐 구멍이나 용균은 관찰되지 않았다.

Bhunia 등(11)은 pediocin AcH가 *Leu. mesenteroides* Ly에 대해 cell wall lysis를 유발하고 ghost cell을 형성함을 보고하였다. Motlagh 등(12)도 pediocin AcH에 민감하게 작용하는 7 균주의 *Listeria monocytogenes* strain중 세균주만이 용균을 일으켰으며 균주별 상대적 민감도가 용균과 직접 관계있는 것은 아니라고 하였다.

세포막의 변화를 TEM을 이용하여 관찰해 본 결과 bacteriocin을 처리하지 않은 cell(Fig. 6(A))은 세포벽과 세포막이 잘 정돈되어 있었지만 bacteriocin을 처리한 cell(Fig. 6(B))은 세포벽의 일부 또는 전체가 벗겨져 나가거나 세포의 모양이 크게 변형된 용균을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로부터 *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 bacteriocin은 *Lactobacillus fermentum* IFO 3023에 대하여 생균수와 흡광도 모두를 감소시켰으며 전자현미경 관찰 결과도 bacteriolytic action을 가진 것으로 볼 수 있었다.

요 약

Lactococcus sp. HY449가 생산하는 bacteriocin의 *Lactobacillus fermentum* IFO 3023에 대한 작용형태를 조사하였다.

1. Growing culture에서의 bacteriocin의 영향을 관찰한 결과 대수증식기까지의 지시균은 강하게 억제하지만 정지기 이후의 분열이 왕성하지 못한 세포들은 억제하지 못했다.

2. Cell 현탁액에 bacteriocin을 처리하여 생균수와 흡광도의 변화를 조사해 본 결과 두 경우 모두 크게 감소하여 *Lactococcus* sp. HY449가 생산하는 bacteriocin은 *L. fermentum* IFO 3023에 대하여 bacteriocidal 또는 bacteriolytic 활성을 나타냈다.

3. 전자현미경으로 정상 세포와 bacteriocin으로 처리된 세포의 형태를 비교 관찰하여 본 결과 이 bacteriocin의 bacteriolytic action을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 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**: 1041-1048.
2. Holo, H., O. Nilssen, and I. 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.
3. Gao, F.H., T. Abee, and W.N. Konings. 1991. Mechanism of action of peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome *c* oxidase-containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **7**: 2164-2170.
4. Ray, B. and D.G. Hoover. 1993. Pediocins, In D. G. Hoover and L.R. Steenson (eds.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Academic press, Inc., New York.
5. Hirsch, A. 1951. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* **5**: 208.
6. Ruhr, Elke, and Hans-G. Sahl. 1985. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**: 841-845.
7. Morris, S.L., R.C. Walsh, and J.N. Hansen. 1984. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic antibiotic action. *J. Biol. Chem.* **259**: 13590-13594.
8. Schved, F., A. Lalazar, Y. Henis, and B.J. Juven. 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 67-77.
9. Meseguer, I. and F. Rodriguez-Valera. 1986. Effect of halocin H4 on cells of *Halobacterium halobium*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3061-3068.
10. Stoffels, G., I.F. Nes, and A. Guomundsdottir. 1992. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 309-316.
11. 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.
12. Motlagh, A.M., H.S. Johnson, M.C. Ray, and R.A. Field. 1992. Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food system by pediocin AcH, a bacteriocin of *Pediococcus acidilactici* H. *J. Food Protec.* **55**: 337-343.

(Received March 28, 1994)