Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 37, No. 2, 125-132(2009)

돼지 장관으로부터 분리한 *Lactobacillus* sp. HN 235 균주가 생산하는 항균물질의 특성

신명수[1,2] · 한선경[2] · 최지현[2] · 지애란[1] · 김경수[1] · 이완규[2]*
[1](주)오비티 한국생명과학연구소, [2]충북대학교 수의과대학

Characterization of Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus* sp. HN 235 Isolated from Pig Intestine. Shin, Myeong-Su[1,2], Sun-Kyung Han[2], Ji-Hyun Choi[2], Ae-Ran Ji[1], Kyeong-Su Kim[1], and Wan-Kyu Lee[2]*. *[1]Korea Bio Science Research Institute of Organic Bio Tech Co. Ltd., Jincheon, Chungbuk 365-861, Korea, [2]College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea* - In order to develop probiotics which may be a viable alternative of antibiotic use in pig industry, five bacterial strains (*Lactobacillus* sp. HN 52, 92, 98, 235 and AP 116) possessing antimicrobial properties were selected from 500 strains isolates of pig intestines. The bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp. HN 235 displayed a relative broad spectrum of inhibitory activity against all *Enterococcus* strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* using the spot-on-lawn method. The production of antimicrobial substance started in the middle of the exponential growth phase, reached maximum levels (6,400 AU/mL) in the stationary phase, and then declined. Bacteriocin activity remained unchanged after 30 min of heat treatment at 95°C and stable from pH 2.0 to 10 for 1 h, or exposure to organic solvents; however, it diminished after treatment with proteolytic enzymes. The molecular weight of the bacteriocin was about 5 kDa according to a tricine SDS-PAGE analysis.

Key words: Antimicrobial substance, bacteriocin, lactic acid bacteria, probiotics, pig

서 론

항생제는 1950년대부터 가축의 질병 치료 및 성장촉진을 목적으로 돼지, 가금류 등의 가축사양에 광범위하게 사용되어 왔다. 준치료적 수준의 낮은 농도로 항생제를 가축사료에 혼합하여 축산업에 사용하면서, 가축의 질병방제, 성장촉진, 사료효율 개선 등의 생산성이 향상되었으며[36], 양축농가의 소득 증가에 기여하였다. 그러나, 최근에는 항생물질의 오남용으로 인한 내성균주의 출현과 축산물내 잔류 항생물질로 인한 안전성 문제의 야기로 점차 규제되고 있는 추세이다[25]. EU에서는 2006년부터 가축의 성장촉진을 목적으로 사용되는 항생제 이용을 전면 금지한 바 있으며, 우리나라에서도 2005년부터 사료에 첨가할 수 있는 항생제의 종류를 53종에서 25종으로 감소시켰다. 이러한 축산환경의 변화 외에도 안전한 축산물에 대한 소비자들의 관심과 무항생제 사용 축산물에 대한 요구가 높아짐에 따라 항생제 대체물질에 대한 개발 필요성은 더욱 커지고 있다.

항생제 대체물질로는 생균제(probiotics), 산성화제(acidifer), 면역증강제, 사료첨가용 복합효소제, 기능성 천연추출물 등[9]이 있으나, 장내미생물의 균형을 개선하여 숙주동물에게 유익한 작용을 하는 생균제가 가장 각광을 받고 있다[16]. 가축용 생균제는 인체용과 달리 가축의 생산성 향상을 목적으로 사용되고 있으며, 기대되는 주요 기작으로는 장내 병원성 미생물들에 대하여 유기산, 과산화수소(H_2O_2), 박테리오신(bacteriocin) 같은 항병성 인자의 생성과 경쟁적 배제(competitive exclusion) 등을 통하여, 장내 유해세균 및 부패관련 균주들을 감소시킴으로써 가축의 성장촉진 및 사료효율 등의 상승 효과를 유발하는 것이다. 또한 분뇨 배설량 감소 및 악취성 유해가스 발생의 억제를 통하여 가축의 사육환경을 개선하기도 한다. 박테리오신은 세포 외로 분비되는 단백질 또는 펩타이드계 항균물질로서 생산균주와 근연관계에 있는 미생물을 죽이거나 생육을 억제하는 물질이라고 알려져 있다[24]. 또한 소화기계의 여러 단백질 분해효소에 의해 분해됨으로 인체에 무해하고 잔류성이 없는 장점이 있기 때문에, 최근에는 천연의 식품보존제로서 활용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[6]. 현재, 산업적으로 실용화되고 있는 유일한 박테리오신으로는 nisin이 있으며, 약 50개국에서 가공치즈, 야채, 과일의 통조림, 발효유 제품 등에 식품보존제로서 사용되고 있다[10]. 박테리오신 또는 박테리오신 생산균주를 가축에 적용한 예로는, 발효유식품에서 분리한 *Lactococcus lactis*에 의해 생산된 lacticin 3147을 젖소의 유방염 치료에 효과적으로 적용한 경우가 있으며[31],

*Corresponding author
Tel: 82-43-261-2960, Fax: 82-43-267-3150
E-mail: wklee@cbu.ac.kr

*Escherichia coli*에 의해 생산되는 colicin과 microcin을 가금류 또는 소에 투여하여 *Salmonella* 및 *E. coli* O157:H7의 생육을 억제했다는 보고가 있다[12, 17]. 양돈용 생균제를 개발하기 위하여 돼지의 분변 및 소화기관으로부터 병원성 미생물에 대하여 항균특성을 지닌 유산균들을 분리하였다는 보고는 있으나, 대부분 박테리오신이 아닌 유기산, 과산화수소, 또는 저분자성 물질인 것으로 알려져 있다[4, 20, 30]. 아직까지는 돼지로부터 박테리오신을 생산하는 유산균들을 분리하여 특성 및 작용기작을 밝히고, 박테리오신 또는 박테리오신 생산균주를 이용하여 양돈용 생균제을 개발하고자 하는 논문들은 매우 적은 편이다.

본 연구에서는 항생제 대체물질로서 양돈용 생균제를 개발하기 위하여, 돼지의 소장 및 대장으로부터 장내 병원성 세균들에 대하여 강력한 항균활성을 지닌 박테리오신 생산균주들을 선발하고, 균주특성 및 박테리오신의 이화학적 특성을 조사하여 생균제 개발의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 항균물질 생산균주는 돼지의 소장 및 대장으로부터 분리한 5개 유산균(HN 52, 92, 98, 235, AP 116)이며, 항균활성을 측정하기 위하여 사용한 지시균들은 KCTC(The Korean Collection for Type Cultures)와 KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms)에서 28 균주를 분양받아 사용하였다(Table 3). 유산균 배양 배지로는 MRS 배지(Difco, USA)를 사용하였으며, 그 밖의 호기성 균주들은 BHI 배지(brain heart infusion, Difco, USA)를 이용하여 37°C에서 배양하였다.

미생물 분리 및 선발

한냉의 도축 생산라인에서 돼지의 내장부위(소장 및 대장)를 수거하고 냉장상태로 실험실로 옮겨온 후, 즉시 항균물질 생산균주 분리실험에 사용하였다. 소장 및 대장 부위를 절단한 다음, 1 g 정도의 내용물을 혐기성 희석액에 넣고 적당량 희석한 후, MRS 한천배지에 도말하고, 37°C에서 혐기적으로 48시간 배양하였다. 각 배지에서 성장한 집락들을 무작위로 1 mL의 MRS 액체배지가 담긴 eppendorf tube에 접종하고, 1-2일 간 배양한 다음, 10 μL의 배양액을 MRS 또는 BHI 고체배지에 점적하여 1시간 동안 건조하였다. 그리고 지시균이 접종된 BHI 또는 MRS soft agar(0.7%)를 첨가한 다음, 1일 정도 배양 후, 상기 배지 위에 나타난 clear zone을 확인함으로써 병원성균주 억제능을 지닌 균주로 1차 선발하였다. 이때 사용한 지시균으로는 *E. coli* KCTC 1467, *Salmonella typhymurium* KCTC 2515, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, 그리고 *Lactobacillus sake* KCCM 40264를 사용하였다. 유산균이 생성하는 다양한 항균물질(유기산, 아세틸, H_2O_2 등) 중에서 유산(lactic acid)에 의한 항균효과를 제거하기 위하여, 1차 선발된 균주들에 대하여 약간 변형된 spot-on-lawn 방법[26]을 실시하여 2차 선발과정을 실시하였다. 즉 1차 선발된 균주들의 배양액을 원심분리하고, 0.45 μm 필터를 이용하여 제균한 다음, 10N NaOH를 사용하여 cell-free supernatant를 pH 6.5정도로 중화시켰다. 상기 여액을 지시균이 1.0×10^7 cfu/mL로 첨가된 soft agar 위에 떨어뜨린 후, 37°C에서 24시간 배양한 다음, clear zone 형성여부를 관찰함으로써 박테리오신 생성균주로 최종 선발하였다.

미생물의 동정

항균물질 생산균주를 동정하기 위하여 형태 및 생화학적 특성을 Bergey's Manual of Determinative bacteriology에 따라 조사하였다[19]. 그람염색, 운동성, catalase test, CO_2 생성 유무 및 API 50 CHL kit(Biomérieux, Lyan, France)를 사용한 탄수화물 발효 양상 등을 조사하였으며, 최종적인 균주 동정을 위해서 분리균의 16S rDNA 염기배열을 결정하여 알려진 균주들의 염기배열과 비교하였다.

배양시간에 따른 항균물질의 생산

선발된 박테리오신 생산균주를 MRS broth에 접종하여 37°C에서 40시간 동안 배양하면서 일정시간별로 배양액을 채취하여 생균수 및 항균물질의 활력변화를 측정하였다. 항균물질의 활력변화를 측정하기 위하여 배양액을 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 얻어진 상등액을 1 N NaOH를 이용하여 최종 pH 6.5로 조정한 후에, membrane filter(0.2 μm pore size)로 여과하여 cell-free supernatant를 조제한 다음 spot-on-lawn 방법으로 항균활성을 측정하였다.

pH-mediated adsorption & desorption 방법에 의한 박테리오신의 추출

Lactobacillus sp. HN 235로부터 생산되는 박테리오신을 추출하기 위하여 Yang 등[35]의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. HN 235 균주를 1 L의 MRS 액체배지에서 16시간 동안 배양한 다음, 80°C에서 30분간 가열하여 세포를 살균처리함으로써, 배양액에 남아 있는 단백질 분해효소를 불활성화 하였다. 배양액의 pH를 5 N NaOH를 사용하여 pH 6.5로 중화시킨 후, 실온에서 약 30분간 천천히 혼합함으로써 배양액에 존재하는 박테리오신들이 세포에 부착하도록 유도하였다. 원심분리 실시(4,000×g, 20분) 후, 회수한 균체를 5 mM sodium phosphate(pH 6.5)로 2회 세척한 다음 50 mL의 10 mM NaCl에 현탁하고, 5% phosphoric acid로 pH 2.0으로 조정하였으며 4°C에서 2시간 이상 천천히 혼합함으로써 세포에 붙어 있는 박테리오신이 다시 떨어지도록 유도하였다. 현탁액을 원심분리하여 상층액을 회수한 다음, 1 kDa 크기의 membrane(Spectrum Medical Inc., Los Angeles,

CA, USA)을 이용하여 4°C에서 하룻밤 동안 투석을 실시한 다음, 동결건조를 실시하였다. 동결건조 상태의 박테리오신 분말을 멸균된 증류수에 녹여 -20°C에서 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

항균물질의 이화학적인 특성 조사

항균물질의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pH-mediated adsorption 방법에 따라 부분정제된 박테리오신을 10 N NaOH와 10 N HCl로 pH 2.0에서 10.0까지 조정한 후, 상온에서 1시간 방치 후, 박테리오신 활성을 spot-on-lawn 방법으로 측정하였다. 열 안정성은 박테리오신을 60°C, 95°C에서 30분, 그리고 121°C에서 15분 동안 각각 처리한 후, 박테리오신 활성을 측정하였다. 효소처리에 따른 박테리오신의 활성변화를 측정하기 위하여 각각의 효소를 최종농도가 1 mg/mL이 되도록 첨가한 후, 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, 80°C에서 10분간 열처리하여 효소활성을 불활성화 한 다음 박테리오신 활성을 측정하였다. 효소로는 proteinase K, protease type IV, pepsin, trypsin, α-amylase, β-amylase, 그리고 catalase(Sigma Chemical Co., St Louise, USA) 등을 사용하였다. 유기용매 처리가 항균물질 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 부분정제된 박테리오신과 유기용매를 동량 혼합한 후, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 박테리오신 활성을 측정하였다. 이때 사용한 유기용매의 종류는 ethanol, methanol, chloroform, acetone, acetonitrile, hexane, ethyl acetate, acetate 등 이다.

항균범위 조사

선발된 *Lactobacillus* sp. HN 235 균주 및 부분 정제한 박테리오신의 그람 양성 및 음성 지시균들에 대한 항균범위를 확인하기 위하여 spot-on-lawn 방법 및 약간 수정된 deferred antagonism 방법[33]을 사용하였다. 부분정제된 박테리오신을 지시균(1.0×10^7 cfu/mL)이 함유된 soft agar에 떨어뜨린 후, 지시균의 최적 성장온도에서 하룻밤 배양한 다음, 5 mm 이상의 투명한 억제환 생성 유무를 조사하였다. 항균물질의 활성은 지시균의 성장을 억제시키는 가장 높은 희석배수의 역수를 취해 상대적 활성도(AU/mL, arbitrary unit)로 표현하였다.

SDS-PAGE에 의한 항균물질의 분자량 측정

항균물질의 분자량을 측정하기 위하여 pH-mediated adsorption & desorption 방법에 의해 부분 정제된 박테리오신을 사용하여 tricine-SDS-PAGE를 실시하였다[32]. Gel의 농도는 16.5%이였으며, 표준 분자량 물질로는 polypeptide SDS-PAGE standards(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA.)를 사용하였다. 전기영동을 실시한 후, 한쪽 부분은 0.1% Coomassie Brilliant Blue G250으로 염색하였으며, 다른 쪽 부분은 methanol-acetic acid-water(3:1:6)으로 고정시킨 다음 멸균된 증류수로 세척하였다. 세척한 gel은 BHI 고체배지 위에 놓고, 그 위에 *L. monocytogenes*(1.0×10^7 cfu/mL)이 함유된 BHI soft agar를 중층한 다음 37°C에서 하룻밤 동안 배양한 후, 지시균 억제환이 형성되는 band와 염색한 gel상에서의 band들을 상호비교하였다.

결과 및 고찰

박테리오신 생산균주의 분리 및 선발

돼지의 소장 및 대장으로부터 500 균주의 미생물을 분리하였으며, 5개의 지시균에 대하여 2주 이상 억제환을 형성하는 145개의 균주를 1차로 선발하였다. 1차 선발된 미생물의 60% 이상이 2개 이상의 지시균에 대하여 성장억제효과를 지닌 것으로 나타났다. 유기산에 의한 미생물 억제효과를 제거하기 위하여 spot-on-lawn 방법을 실시하였으며, 2차 검증실험을 통하여 최종적으로 5개의 균주(HN 52, 92, 98, 235, AP 116)를 선발하였다.

선발미생물의 동정

선발된 5주 미생물들은 형태적으로 모두 간균이었으며, 그람양성, catalase 음성, 비운동성 및 유기산을 생성하는 등 유산균의 특성을 지니고 있었다(Fig. 1). API CHL kit를 사용하여 탄소원 이용성에 따른 미생물의 동정을 실시한 결과, 5균주 모두 당이용성에 있어서 다른 양상을 보였으나(data not shown), *Lactobacillus* 속(genus) 수준에서만 동정이 가능하였다. 즉, HN 235균주의 경우, *Lactobacillus acidophilus*와 비슷한 당발효양상을 나타냈으나(Table 1), 낮은 상동성을 유지하였다. 5개의 선발균주 중에서 지시균에 대한 억제환의 크기가 크고 활성이 높은 것으로 나타난 HN 235 균주를 선택하여 16S rDNA 염기서열과 항균물질 특성을 분석하였다. NCBI의 BLAST program을 이용하여 HN 235 균주의 16S

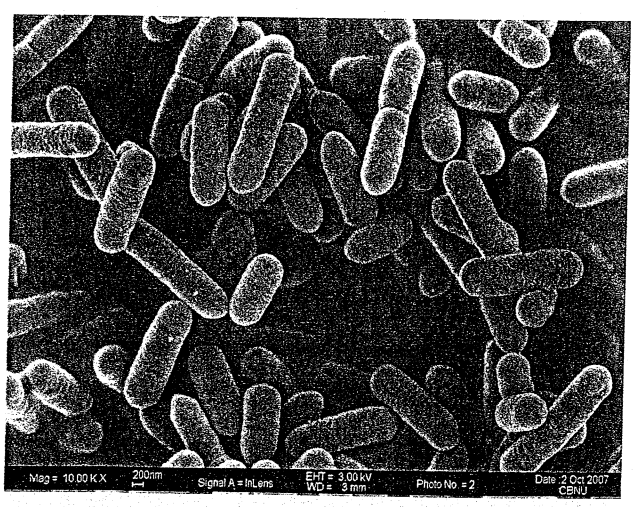

Fig. 1. Scanning electron micrograph of *Lactobacillus* sp. HN 235.

Table 1. General characteristics of the HN 235 strain.

Characteristics	Result
Morphology	
Shape	rod
Gram stain	+
Spores	-
Motility	-
Acid-fast staining	-
Culture characteristics	
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	+
Growth at 25°C	+
45°C	+
Growth pH range	4.0 - 8.0
Growth in NaCl	3%
Physiological characteristics	
Catalase	-
Gas from glucose	-
Acid from	
L-Arabinose	-
Galactose	+
Glucose	+
Fructose	+
Mannose	+
Mannitol	-
Sorbitol	-
Arbutine	+
Esculine	+
Salicine	+
Cellobiose	-
Lactose	-
Raffinose	+
Turanose	+
Tagatose	+
Arabitol	-

rDNA 염기서열에 대한 상동성을 비교한 결과, 99% 이상의 신뢰도로 *Lactobacillus agilis*(M58803)와 *Lactobacillus salivarius*(AF089108)로 분류되는 것으로 나타났다. 따라서 HN 235의 정확한 균주명을 명명하기 위해서는 다른 생리적 특성 및 분자생물학적 기법에 따른 동정작업이 요구되었다.

HN 235 균주의 성장곡선에 따른 항균물질 생산

HN 235 균주의 배양시간에 따른 성장곡선을 MRS 액체 배지에서 실험한 결과, 18시간째에 최대 균수 3.5×10^9 cfu/mL까지 성장하였으며, 이때의 pH는 3.8이었다(Fig. 2). 유기산에 의한 항균효과를 제거하기 위하여 채취한 배양액의 pH를 중화한 후, spot-on-lawn 방법으로 항균물질의 활력을 측정한 결과, 유도기부터 지시균에 대한 억제활성을 보이기 시작하였으며, 정체기에 6,400 AU/mL의 최대 항균활성을 나타내었다. 그리고 18시간 이후부터 급격하게 항균활성이 떨

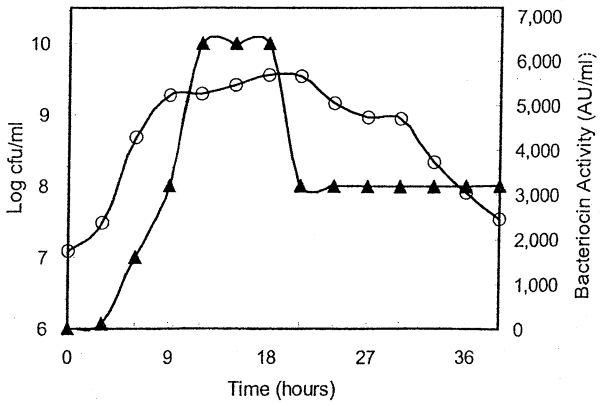

Fig. 2. Cell growth and bacteriocin production of *Lactobacillus* sp. HN 235 in MRS broth. ○, viable cell growth; ▲, antimicrobial activity against *L. monocytogenes*.

어지기 시작하였으며, 사멸기부터는 일정 수준을 유지하였다. 항균물질의 활성이 정체기를 지나 사멸기에 도달하면서 급격하게 저하되는 현상은 유산균이 생산하는 박테리오신의 배양특성과 매우 유사하였다[2, 3, 8, 28, 33]. 항균활성이 급격하게 상실되는 이유로는 단백질 분해효소에 의한 박테리오신 물질의 분해, 단백질간의 응집, 그리고 박테리오신 생산균주 세포에 대한 흡착 등으로 알려져 있다[2, 11, 27].

항균물질의 부분정제 및 이화학적 특성

항균물질인 박테리오신을 분리정제하기 위하여 일반적으로 ammonium sulfate로 단백질을 침전시킨 후, gel filtration, ion exchange chromatography, HPLC 등의 복잡하고 많은 시간을 요구하는 방법을 사용하고 있다[5, 18]. 초기 단계인 ammonium sulfate 침전시에는 단백질 뿐만아니라 배지 내에 함유된 탄수화물 같은 갈색의 끈적한 물질까지 침전되어 다음 단계로의 정제과정에 어려움이 있다고 알려져 있다[33]. pH 변화에 따른 박테리오신의 생산균주에 대한 흡착과정으로 간단하게 박테리오신을 배양액으로부터 분리하는 방법이 알려진 이후, 박테리오신의 종류 또는 박테리오신 생산균주별로 유효하게 사용되고 있다[13, 35]. HN 235 균주로부터 생산되는 항균물질도 Yang 등[35]의 방법을 사용한 결과, 매우 높은 순도로 분리되었으므로 부분정제된 박테리오신으로 사용할 수 있었다.

돼지의 장관으로부터 선발된 HN 235 균주로부터 부분정제된 항균물질에 대한 효소 처리, 열처리, pH 및 유기용매 처리에 대한 박테리오신의 안정성을 조사한 결과를 Table 2에 표시하였다. HN 235 균주로부터 부분정제된 항균물질은 단백질 분해효소인 proteinase K, protease type IV, 그리고 pepsin 등에 의하여 완전히 항균 특성이 불활성화되어 역가가 상실되었으나, amylase와 catalase에 대해서는 아무런 영향도 받지 않았다(Fig. 3). 따라서 이러한 항균물질은 H_2O_2나 탄수화물이 포함되지 않은 단백질 또는 peptides로 이루

Table 2. Effects of enzymes, organic solvents, pH, and heat treatment on the activity of the bacteriocin partially purified from *Lactobacillus* sp. HN 235.

Treatment		Relative antimicrobial activity (%)
Enzymes	proteinase K	0
	protease type IV	0
	pepsin	0
	trypsin	50
	α-amylase	100
	β-amylase	100
	catalase	100
Heating	60°C, 30 min	100
	95°C, 30 min	100
	121°C, 15 min	50
pH	2.0	100
	3.0	100
	4.0	100
	5.0	100
	6.0	100
	7.0	100
	8.0	100
	9.0	100
	10.0	100
Organic solvents	ethanol	100
	methanol	100
	chloroform	100
	acetone	100
	acetonitrile	50
	hexane	100
	ethyl acetate	100
	acetate	100

어진 박테리오신임을 알 수 있었다. HN 235의 박테리오신 활성은 내열성이 강하여 95°C에서도 항균활성을 유지하였으며, pH 2~10 범위에서 안정하였으나, 유기용매 처리에 대해서는 유기용매 종류별로 활성의 차이를 보였다.

분리균주의 항균범위

HN 235 균주의 배양액 및 부분정제한 항균물질에 대한 항균범위를 조사한 결과, 그람 양성 및 음성균주들에 대하여 폭넓은 항균력을 지니고 있었다(Table 3). 배양액을 사용한 deferred antogonism 방법에서는 그람음성균을 포함한 대부분의 지시균들의 성장이 억제되었다. 부분정제한 항균물질을 이용한 spot-on-lawn 방법에서는 특히 *L. monocytogenes* 균주에 대하여 매우 강력한 활성이 나타났으나, 그람음성 균주인 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해서는 약한 활성을 보였다. 따라서 *E. coli*와 *Salmonella*와 같은 그람음성균주들의 성장이 억제된 이유는 유기산 등의 축적에 따른 pH 저하 효과인 것으로 판단되었다. HN 235 균주가 생산하는 항균물질은 정확하게 분류되지는 않았으나, Class IIa로 분류된 박테리오신의 특징 중 하나인 *Listeria*에 대한 강력한 항균효과 뿐만아니라, *Clostridium perfringens* 균주에 대해서도 항균효과를 지니고 있었다. *L. monocytogenes*는 토양, 물, 동물 및 사람 등 자연계에 널리 분포되고 있는 그람양성균이며[15, 22], 특히 냉장 유통되고 있는 식품에서 사람에게 치명적인 식중독을 발생시키는 것으로 알려져 있다[21]. 또한, 돼지 및 가금류의 도축과정과 식육을 제조하는 과정에서 *L. monocytogenes* 균주가 오염되어 식품안전성에 심각한 문제점으로 부각되고 있다[1, 29, 34]. *Cl. perfringens*는 가금류에서 괴사성 장염을 일으키기도 하고, 포유 및 이유자돈에서도 심각한 설사를 유발시키는 것으로 밝혀졌다[7, 9, 23]. 따라서, 인수공통으로 장염 등을 유발하는 *L. monocytogenes*와 *Cl. perfringens*에 대하여 직접적으로 성장을 억제시키는 항균물질을 생산하는 HN 235 균주를 가축용 생균제로 사용했을 경우, 가축내 병원성 균주들의 감소뿐만 아니라 도축과정에서 오염되는 식품유래 병원성 세균들에 대한 예방효과도 기대할 수 있을 것이다.

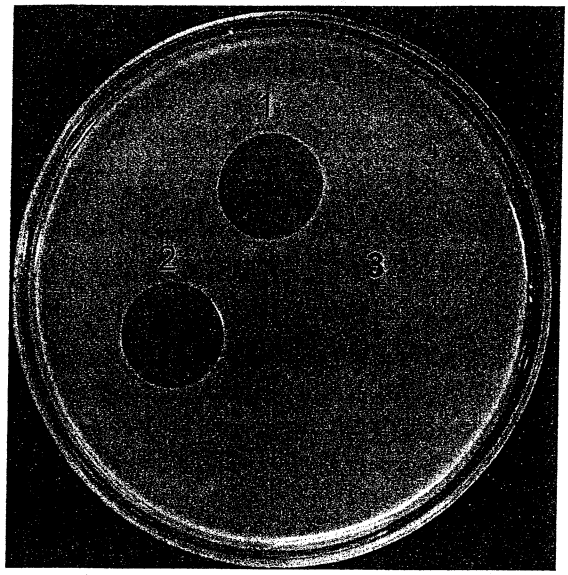

Fig. 3. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp. HN 235 using the spot-on-lawn method. 1, partially purified bacteriocin; 2, catalase-treated bacteriocin; 3, proteinase K-treated bacteriocin.

SDS-PAGE에 의한 분자량

부분 정제된 박테리오신을 SDS-PAGE로 단백질 전기영동을 하였을 때 2개 부위에서 band를 형성하였다(Fig. 4). 지시균으로 *L. monocytogenes*를 사용하여 항균효과를 비교한 결과, 10 kDa 정도의 분자량 위치에서는 투명한 억제환을 볼 수 없었으나, 대략 5 kDa에 위치하고 있는 band에서 항균활성을 나타내었다. 박테리오신 분류상 Class IIa에 속하는 sakacin P, leucocin A, pediocin AcH, 그리고 enterocin A

Table 3. Antimicrobial activity of the bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp. HN 235.

Indicator	Medium	Modified deferred method	Spot-on-lawn method
Bacillus cereus KCTC 1012	BHI	+	-
Clostridium perfringens KCTC 3269	BHI	+[1)]	400[2)]
Escherichia coli KCTC 1467	BHI	+	-
Escherichia coli KCTC 11682	BHI	+	-
Enterobacter aerogenes KCTC 2190	BHI	+	-
Enterococcus durans KCTC 3121	MRS	+	1,600
Enterococcus faecalis KCTC 2011	MRS	+	1,600
Enterococcus faecalis KCTC 3206	MRS	+	1,600
Enterococcus faecium KCTC 3513	MRS	+	1,600
Klebsiella pneumoniae KCTC 2208	BHI	+	-
Lactobacillus acidophilus KCTC 3111	MRS	-	-
Lactobacillus casei KCTC 3109	MRS	-	-
Lactobacillus delbrueckii KCTC 1047	MRS	-	-
Lactobacillus fermentum KCTC 3112	MRS	-	-
Lactobacillus plantarum KCTC 3108	MRS	-	-
Lactobacillus sake KCCM 40264	MRS	-	-
Leuconostoc mesenteroides KCTC 3505	MRS	-	-
Listeria monocytogenes KCTC 3569	BHI	+	25,600
Listeria monocytogenes KCTC 3710	BHI	+	25,600
Listeria innocua KCTC 3586	BHI	+	12,800
Pediococcus acidilactici KCTC 1626	MRS	+	400
Pediococcus dextrinicus KCTC 3506	MRS	+	3,200
Proteus mirabillis KCTC 2566	BHI	+	-
Pseudomonas aeruginosa KCTC 1750	BHI	+	100
Salmonella typhimurium KCTC 2515	BHI	+	-
Staphylococcus aureus KCTC 1621	BHI	+	-
Staphylococcus aureus KCTC 1916	BHI	+	-
Staphylococcus epidermidis KCTC 1917	BHI	+	-

1) +, clear inhibition zone; -, no inhibition zone
2) bacteriocin activity (AU/mL).

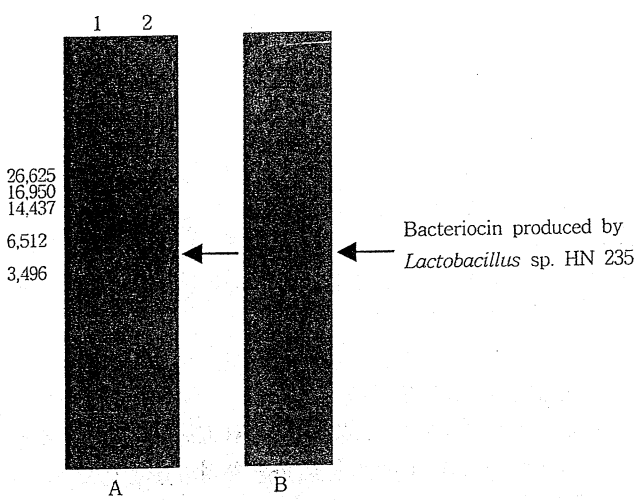

Fig. 4. SDS-PAGE and detection of antimicrobial activity of the partially purified bacteriocin from *Lactobacillus* sp. HN 235. A. Gel stained with Coomassie Brilliant Blue G250. Lane 1, molecular weight standards; lane 2, partially purified bacteriocin by pH-mediated adsorption & desorption. B. Gel overlaid with *Listeria monocytogenes* inoculated into a BHI soft agar.

같은 박테리오신의 평균 분자량이 3.4~4.9 kDa인 것으로 알려져 있다[14]. *Lactobacillus* sp. HN 235 균주가 생산하는 박테리오의 분자량은 Class IIa 박테리오신과 유사하였으나, 정확한 분류 및 분자량 등의 특징을 파악하기 위해서는 박테리오신의 순수분리 및 단백질 염기서열의 분석 작업 등이 필요하다.

요 약

항생제 대체물질로서 양돈용 생균제를 개발하기 위하여, 돼지의 소장 및 대장으로부터 500균주의 미생물을 분리하였으며, 항균물질인 박테리오신을 생산하는 5균주를 최종적으로 선발하였다. 선발균주들은 모두 *Lactobacillus* 속으로 동정되었으며, 생균제를 개발할 목적으로 상기 균주 중 *Lactobacillus* sp. HN 235 균주에 대한 균주 및 박테리오신 특성을 조사하였다. HN 235 균주의 성장시간에 따른 생균수 및 항균활성을 측정한 결과, 18시간째 최대 3.5×10^9 cfu/mL까지 성장하였으며, 항균활성은 유도기에 나타나기 시작

하여 정체기에 6,400 AU/mL로 최고의 활성을 보이다가 급격하게 활성을 상실하였다. HN 235 균주가 생산하는 박테리오신은 병원성 균주로 알려진 *L. monocytogenes*와 *Cl. perfringens*에 대하여 강한 항균능력을 나타냈으며, 상기 박테리오신의 항균활성은 단백질 분해효소 처리시 활성을 상실하였다. 또한 95°C에서도 활성을 유지하였으며, pH 2~10 범위 및 유기용매에 대해서도 비교적 안정한 항균활성을 나타내었다. SDS-PAGE를 실시하여 분자량을 측정한 결과, 대략 5 kDa으로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 충북대학교 교내연구비 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Aarnisalo, K., E. Vihavainen, L. Rantala, R. Maijala, M-L. Suihko, S. Hielm, P. Tuominen, J. Ranta, and L. Raaska. 2008. Use of results of microbiological analyses for risk-based control of *Listeria monocytogenes* in marinated broiler legs. *Int. J. Food Microbiol.* **121**: 275-284.
2. Aasen, I. M., T. Moretro, T. Katla, L. Axelsson, and I. Storro. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42678. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 159-166.
3. Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**: 328-334.
4. Byun, J. W., G. T. Kim, H. S. Bae, Y. J. Baek, and W. K. Lee. 2000. *In vitro* selection of lactic acid bacteria for probiotic use in pigs. *Korea J. Vet. Res.* **40**: 701-706.
5. Carolissen-Mackay, V., G. Arendse, and J. W. Hastings. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* **34**: 1-16.
6. 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.
7. Czanderlova, L., P. Hlozek, D. Chmelar, and P. Lany. 2006. *Clostridium perfringens* in suckling piglets with diarrhoea and its PCR typing and prevalence in the Czech Republic in 2001-2003. *Veterinarni Medicina.* **51**: 461-467.
8. Daba, H., S. Panadian, J. F. Gosselin, R. Simard, J. Huang, and C. Lacroix. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57:** 3450-3455.
9. Dahiya, J. P., D. C. Wilkie, A. G. Van Kessel, and M. D. Drew. 2006. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Anim. Feed Sci. Technol.* **129**: 60-88.
10. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**: 100-117.
11. De Vuyst, L., R. Callewaert, and K. Crabbe. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin under unfavourable growth conditions. *Microbiology.* **142**: 817-827.
12. Diez-Gonzalez, F. 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* **8**: 15-24.
13. Elegado, F. B., W. J. Kim, and D. Y. Kwon. 1997. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *Int. J. Food Microbiol.* **37**: 1-11.
14. Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto, and A. Ishizaki. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 85-106.
15. Farber, J. M. and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**: 476-511.
16. Fuller, R. 1992. History and development of probiotics, pp. 1-8. *In* R. Fuller (ed.)., *Probiotics. The scientific basis*, Chapman and Hall, London.
17. Gillor, O., B. C. Kirkup, and M. A. Riley. 2004. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**: 129-146.
18. Guyonnet, D., C. Fremaux, Y. Cenatiempo, and J. M. Berjeaud. 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1744-1748.
19. 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.* 9th ed. Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
20. Hong, J. W., I. H. Kim, Y. K. Han, S. H. Lee, O. S. Kwon, J. H. Kim, and K. H. Kang. 2002. Probiotic properties of *Enterococcus durans* LP44 isolated from pigs feces. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 939-944.
21. Johansson, T. 1998. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. *Int. J. Food Microbiol.* **40**: 77-85.
22. Jung, B. Y., H. S. Lim, and B. H. Kim. 2003. Prevalence of *Listeria* spp. in cecal contents of livestock. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* **27**: 41-46.
23. Kim, N. Y., E. H. Oh, K. P. Houng, G. C. Kang, I. H. Chung, and S. J. Park. 1998. Studies on the *Clostridium perfringens* isolated from piglets with diarrhea in western area of Chonnam province. *Kor. J. Vet. Serv.* **21**: 141-148.
24. Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**: 337-349.
25. Mateu, E. and M. Martin. 2001. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? *J. Vet. Med.* **48**: 569-581.
26. Mayr, H. A., A. J. Hedges, and R. C. W. Berkeley. 1972. Methods for studying bacteriocin. pp. 313-342. *In* Bergen, T. and J. R. Norris (ed.), *Methods in Microbiology*, Academic Press, New York.
27. Parente, E. and A. Ricciardi. 1994. Influence of pH on the

production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Lett. Appl. Mcirobiol.* **19**: 12-15.
28. 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.
29. Petersen, L. and M. Madsen. 2000. *Listeria* spp. in broiler flocks: recovery rates and species distribution investigated by conventional culture and the EiaFoss method. *Int. J. Food Microbiol.* **58**: 113-116.
30. Rodríguez, E., J. L. Arqués, R. Rodríguez, M. Nuñez, and M. Medina. 2003. Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**: 259-263.
31. Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross, and C. Hill. 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2287-2290.
32. Schägger, H. and G. Von 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.
33. Shin, M. S., S. K. Han, J. S. Ryu, K. S. Kim, and W. K. Lee. 2008. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* **105**: 331-339.
34. Thévenot, D., A. Dernburg, and C. Vernozy-Rozand. 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J. Appl. Microbiol.* **101**: 7-17.
35. Yang, R., M. C. Johnson, and B. Ray. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3355-3359.
36. Zimmerman, D. R. 1986. Role of subtherapeutic antimicrobials in pig production. *J. Anim. Sci.* **62**: 6-17.

(Received April 14, 2009/Accepted May 18, 2009)