

## 신규 *Lactobacillus gasseri* G2균주가 생산한 박테리오신의 안정성 및 항균특성 평가

김중희 · 이은선 · 김부민 · 함준상 · 오미화\*  
국립축산과학원 축산물이용과

### Evaluation of Stability and Antimicrobial Properties for a Bacteriocin from a Newly Isolated *Lactobacillus gasseri* G2

Jong-Hui Kim, Eun-Seon Lee, Bu-Min Kim, Jun-Sang Ham, and Mi-Hwa Oh\*

National Institute of Animal Science, Rural Development Administration

#### Abstract

Probiotic-derived bacteriocins have attracted considerable attention as an alternative to synthetic preservatives in the food industry, as synthetics are harmful to health. *Lactobacillus gasseri* G2 isolated from infant feces has been demonstrated to possess probiotic properties such as bile salt and acid tolerance, antibiotic resistance, and broad antimicrobial activity. Bacteriocin was partially purified by acetone precipitation and characterized for several properties. It was found to be highly thermostable and resistant to heating at 120°C for 15 min. Bacteriocin activity remained unaffected with changes in the pH range from 2.0 to 10.0 and by solvents such as acetone, methanol, ethanol, and butanol. The antimicrobial activity was not affected by  $\alpha$ -amylase, lysozyme, and lipase, but was reduced after treatment with protease, trypsin, and proteinase K, suggesting that it has a proteinaceous nature. Bacteriocin inhibited a broad range of target bacteria belonging to both Gram-positive and Gram-negative groups: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Enterobacter sakasaki*, *Salmonella* Enteritidis, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. Bacteriocin appeared as a smear of the protein band with a molecular weight between 2-5 kDa, which showed a clear zone of inhibition after bioassay. The high thermostability and acid/alkali stability of bacteriocin reflect its potential commercial significance.

**Key words:** Bacteriocin, Antimicrobial activity, *Lactobacillus*

## 서 론

박테리오신(bacteriocin)은 리보솜에서 합성되는 단백질 또는 펩타이드 계통의 항균성 물질로서 구조에 따라 항균 활성이 다양하며 좁은 항균 스펙트럼 혹은 넓은 항균 스펙트럼을 가진 박테리오신들이 존재한다. 이러한 항균성 펩타이드의 생산은 박테리아 경쟁에서 중요한 역할을 하며 생산 균주에 생존 이점을 제공한다(Ruiz-Barba et al., 1994). 지난 몇 년 동안 박테리오신은 인간의 위장관에 의해 쉽게 소화되기 때문에 식품 방부제로의 사용을 위해 많은 관심을 끌었다(Mills et al., 2011). 천연 식품 방부제로

박테리오신을 사용하면 화학 방부제를 사용하지 않고도 고 품질의 안전한 식품에 대한 소비자의 요구를 충족시킬 수 있다. 그러나 식품 첨가제로서 박테리오신의 적용은 병원체 제거 효과와 높은 가격과 같은 이유로 제한될 수 있다(Chen & Hoover, 2003) 따라서 많은 연구자들은 생물학적 및 경제적 문제를 모두 해결할 수 있는 새롭고 더 효과적인 박테리아 유래 박테리오신을 탐색하기 위한 연구를 진행하였다.

Cotter 등(2005)에 따르면, 박테리오신은 2개의 주요 군(Class)으로 분류된다. Class I은 lantibiotic으로 분자량이 5 kDa 미만의 작은 펩타이드로 구성되어있고, Class II는 lantibiotic을 가지고 있지 않으며 약 10 kDa 미만의 작은 크기를 가지고 있어 열에 대한 안정성이 높다. Class II는 Class IIa (pediocin-like), Class IIb (two-peptide), Class IIc (cyclic), Class IId (non-pediocin single linear) 등 4개의 하위 그룹으로 나뉜다(Cotter et al., 2005; Pei et al., 2018).

박테리오신을 생산하는 다양한 세균들이 있지만,

\*Corresponding author: Mi-Hwa Oh, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea  
Tel: +82-63-238-7379; Fax: +82-63-238-7397  
E-mail: moh@korea.kr  
Received September 9, 2020; revised October 28, 2020; accepted November 9, 2020

*Lactobacillus*에 의해 생산된 박테리오신은 식품산업에서 많은 관심을 받고 있다(Egan et al., 2016). 박테리오신은 위장관에서 쉽게 소화될 수 있기 때문에, 박테리오신 자체보다는 박테리오신 생산 미생물의 투여가 보다 효과적인 접근일 수 있다(Lagha et al., 2017). *Lactobacillus*는 유당을 젖산으로 전환하고 other organic acids, diacetyl, acetoin, hydrogen peroxide, antifungal peptides, bacteriocin 등과 같은 항균성 분자를 추가적으로 생성함으로써 다양한 식품 발효에 오랫동안 사용되어왔다(Egan et al., 2016). 그 결과 대부분의 *Lactobacillus*는 미국식품의약국(FDA)이 승인한 ‘일반적으로 안전하다고 인정되는 물질’(generally recognized as safe, GRAS)로 간주된다. *Lactobacillus*속의 미생물은 정상 또는 건강한 장의 특징으로 잘 알려져 있으며, 외래종 및 잠재적으로 유해한 미생물로부터 장 환경을 보호하는 데 중요한 역할을 한다(Giraffa et al., 2010). 현재 상업적으로 이용되고 있는 박테리오신은 *Lactococcus lactis* 균주가 생산하는 니신(nisin), *Pediococcus* spp. 균주가 생산하는 페디오신(pediocin)이 있으며, 많이 보고된 박테리오신으로는 *Enterococcus* spp. 균주가 생산하는 엔테로신(enterocins), *Lactococcus lactis* 균주가 생산하는 락티신(lacticins)이 있다(Kamarajan et al., 2015; Garsa et al., 2014; Silva et al., 2018). 한편, 사람의 장내 토착 미생물 이면서 대표적인 프로바이오틱스 균주인 *L. gasseri* 균주로부터 보고된 박테리오신은 4종류이다(Giraffa et al., 2010). 가장 잘 알려진 것은 *L. gasseri* LA39의 gassericin A이며, acidocin LF221A와 acidocin LF221B은 *L. gasseri* LF221에서 분리되었고, gassericin T는 *L. gasseri* SBT 2055에서 분리되었다(Toba et al., 1991; Bogovič-Matijašić et al., 1998; Kawai et al., 2000). 그러나 *L. gasseri* 균주에 의해 생산되는 박테리오신에 관한 정보는 여전히 부족하며, 상업적 용도로서 사용되기 위해선 새로운 *L. gasseri* 균주로부터 생성된 다양한 박테리오신들에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 신생아 분변으로부터 식품 병원성 균주에 대하여 광범위한 항균활성을 가진 유산균을 분리 및 동정하였다. 또한 항균활성이 가장 우수한 *L. gasseri* G2의 프로바이오틱스 잠재성을 확인하고 이 균주가 생산하는 박테리오신의 특성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 박테리오신 생산 유산균의 분리 및 배양

건강한 신생아(생후 2주 이내) 10명의 분변 기저귀를 회수한 후 각각 10회에 걸쳐 채취한 분변 1g을 희석용 완충 용액으로 희석하여 0.4%(w/v) bromocresol purple이 함유된 MRS 배지에 각각 도말하고 37°C에서 24시간동안 배양한 후, 노란색을 띠는 집락의 colony를 선별하였다. 모양, 크기에 따라 상이한 균주를 임의적으로 선택한 뒤, MRS

액체 배지에서 37°C에서 48시간동안 배양하였다. 배양 후, 상등액을 원심분리(10,000×g, 10분, 4°C) 및 membrane filter (0.2 µm, Dismic, Advantec)로 여과 멸균하였다. 멸균 여과한 상등액을 이용하여, 25 mL TSB soft agar (0.8%, w/v)에 각각 배양한 5종 감수성 균주(*B. cereus* KCCM 40935, *Staphylococcus aureus* ATCC 40510, *Salmonella* Enteritidis KCCM12021, *Listeria monocytogenes* CCARM 0214, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC43888)에 대해 저해환(diameter) 형성을 조사하였다. 5종 모두에서 가장 높은 저해환을 형성하는 분리 균주를 선별하여 박테리오신 실험에 사용하였다.

### 박테리오신 검출 및 확인

분리균주들의 박테리오신 생산 여부는 well diffusion assay 방법을 사용하여 판별하였다(Tagg & Mcgiven, 1971). 선별된 유산균을 18시간 이상 MRS 배지에서 배양한 다음 원심분리(15,000 rpm, 10분, 4°C) 및 membrane filter (0.2 µm, Dismic, Advantec)로 여과 멸균하여, 상등액을 회수하였다. 100 mL의 TSB soft agar (0.8%, w/v)에 5종 감수성 균주를 각각 혼합하였다. 혼합한 배지용액을 25 mL씩 분주하여 완전히 굳은 후, 살균된 cork borer을 이용하여 직경 5 mm의 구멍을 내고, 분리 균주의 상등액 50 µL를 접종하였다. 4°C에서 2-3시간 정도 방치하여 상등액이 확산되게 한 후 감수성 균주의 생육 최적 온도에서 18시간 이상 배양하여 저해환 생성여부를 확인하였다. 박테리오신 활성은 생육저해환의 반경(mm)으로 나타내었다.

### 박테리오신 생산 균주 동정

박테리오신 생산 균주의 동정은 16S rRNA gene을 증폭하여 분리 균주를 동정하였다. Genomic DNA는 Walter 등의 방법에 따라 분리하였으며(Walter et al., 2000), primers로는 27F primer (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R primer (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')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 gene 염기서열 확인은 Solgent사(Daegeon, Korea)에 의뢰하여 확인하였다.

### 균주 생장곡선과 박테리오신 생산

항균물질을 생산하는 분리균주 *L. gasseri* G2의 생장곡선에 따른 항균활성을 조사하기 위해 37°C에서 24시간 전배양한 G2를 100 mL의 MRS 액체배지 1% 접종한 후 48시간 정지배양하면서 6시간 마다 배양액을 회수하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 나머지 배양액을 원심분리하여 얻은 배양 상등액은 pH와 지시균인 *L. monocytogenes* CCARM 0214에 대한 항균활성을 well diffusion method로

측정하였다.

#### 박테리오신 생산균주의 프로바이오틱스 특성

프로바이오틱스 특성으로서 내산성, 내담즙성, 항생제 감수성을 확인하였으며, 대조구로 *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103)를 사용하였다. 내산성은 10N HCl를 이용하여 pH 2.5 및 pH 7.0으로 각각 조절된 완충액에 분리 유산균 현탁액( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL)을 접종한 후 37°C에서 배양하면서 0, 0.5, 1, 2, 3시간 동안 잔존하는 생균수를 측정하였다. 내담즙성은 MRS broth에 0.3% (w/v) bile salts (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 인공 담즙액(10 mL)을 제조한 다음 인공 위액에서 잔존하는 균수로 조정된 균 현탁액( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL)을 접종하고 37°C에서 배양하면서 1시간 간격으로 잔존하는 생균수를 측정하였다. 항생제 감수성은 디스크 확산법을 사용하였다. 항생제가 포함된 11종의 Sensi-Disc (OXOID, Hampshire, UK) 접종된 MRS 평판배지 위에 올려놓고 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양이 종료된 후, 각 항생제에 대한 저해환의 크기를 측정하고 제조사 가이드라인에 따라 감수성과 내성을 (R: resistant, I: intermediate, S: susceptible) 판정하였다.

#### 조항균성 물질의 제조

분리균주 *L. gasseri* G2가 생산하는 박테리오신을 부분 정제하기 위하여 200 mL의 MRS 액체배지에서 37°C에서 12시간 전 배양한 후, MRS 배지 2 L에 1% (v/v)를 접종하여 37°C에서 24시간 배양을 수행하였다. 배양액을 원심분리(15,000 rpm, 30분, 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(Jeong et al., 2011). 농축된 시료를 동결 건조하여 -70°C에서 보관하면서 필요시 3차 증류수에 용해하여 추후 실험의 시료로 사용하였다.

#### 박테리오신의 안정성 조사

분리균주 *L. gasseri* G2가 생산하는 박테리오신의 특성을 확인하기 위하여 pH, 열, 유기용매, 가수분해 효소처리 조건하에서 안정성을 확인하였다.

**pH에 대한 안정성:** pH에 대한 박테리오신의 안정성을 조사하기 위하여 동결건조된 항균물질 0.2 g에 1 mL의 각각의 pH에 적합한 완충용액을 사용하여 잘 녹여주었다. pH 2-11까지 각각 완충용액 pH 2.0 (0.1 M glycine-HCl), pH 4.0 (0.1 M sodium acetate), pH 6.0 (0.1 M sodium citrate), pH 7.0 (0.1 M sodium phosphate buffer), pH 9.5 (0.1 M glycine-NaOH), pH 11.0 (0.1 M carbonate buffer)으로 항균물질을 희석하여 7°C에서 2시간 방치 한 후 잔존하는 박테리오신의 항균활성을 측정하였다.

**열에 대한 안정성:** 열에 대한 안정성의 조사는 동결건조된 항균물질 0.2 g에 1 mL의 sodium phosphate buffer (pH 7.0) 용액을 사용하여 잘 녹여준 후 4°C, 25°C, 30°C, 37°C, 50°C, 70°C에서는 24시간동안 방치하였고, 100°C는 30분, 121°C에서 15분간 방치 한 후 잔존하는 항균활성을 측정하였다.

**유기용매에 대한 안정성:** 유기용매에 대한 안정성 실험은 acetone, methanol, ethanol, 및 butanol을 동결건조된 항균물질과 같은 무게 비율로 혼합(1:1)하여 상온(25°C)에서 1시간 방치한 후, 잔존하는 박테리오신의 항균활성을 측정함으로써 여러 유기용매에 대한 박테리오신의 안정성을 조사하였다.

**가수분해효소에 대한 영향:** 효소에 대한 안정성 조사는 항균물질에 가수분해 효소 protease lipase, proteinase, trypsin, lysozyme, α-amylase를 최종농도 1 mg/mL로 각각 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 잔존 항균활성을 측정하였다.

#### 박테리오신 항균범위

분리균주 *L. gasseri* G2가 생산하는 박테리오신의 항균범위를 알아보기 위해 다양한 유산균 및 식품유래 병원성균주 *Lactobacillus plantarum* ATCC 49445, *L. acidophilus* ATCC 4162, *L. sakei* ATCC 15521, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 9135, *B. cereus* KCCM 40935, *L. monocytogenes* CCARM 0214, *S. aureus* ATCC 40510, *Clostridium perfringens* KCCM 40946, *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, *Enterobacter sakazakii* KCTC 2749, *S. Enteritidis* KCCM 12021, *Shigella flexneri* KCCM 40948, *Shigella boydii* KCCM 41649, *Vibrio parahaemolyticus* KCCM 11965, *Vibrio vulnificus* ATCC 29306에 대하여 항균력을 확인하였다. 각 지시균주의 최적 생육온도에서 24시간 이상 배양하여 저해환의 생성 여부를 well diffusion assay 방법을 사용하여 확인하였다(Tag & Mcgiver, 1971).

#### 박테리오신 분자량 측정

항균물질의 분자량을 측정하기 위하여 아세톤 침전법으로 부분 정제한 박테리오신 시료를 사용하여 tricine-SDS-PAGE를 실시하였다(Wang et al., 2000). Gel 농도는 16.5%로 사용하였고, 표준 분자량 물질로 Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards marker (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하였다. 부분 정제한 시료를 Tricine-SDS-PAGE sample buffer와 1:1의 비율로 혼합하여 끓는 물에서 3분간 가열하여 전기영동하였다. 전기영동 완충용액으로 TGS running buffer (Bio-Rad)를 사용하였다. 전기영동이 끝난 gel은 EzWay Protein-silver staining kit (Komabiotech, Seoul, Korea)로 염색을 하였고, 다른 gel은 멸균수로 4시간 동안 세척한 다음 이 gel

을 plate 위에 무균적으로 건조시키고 그 후 지시균(*L. monocytogenes*,  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL)이 포함된 TSA soft (0.8%) 5 mL을 증충하였다. 37°C에서 12시간 배양한 후 저해환을 관찰하여 박테리오신의 위치를 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**균주의 선별과 동정**

신생아 분변으로부터 형태학적 특성에 따라 상이한 219 균주의 유산균을 분리하였으며, 식품 부패미생물 *B. cereus*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *E. coli*

O157:H7에 대한 항균활성을 측정하였다. 5균주 모두에서 생육저해활성이 가장 우수한 G2균주를 선별하였고(Fig. 1), 분자생물학적 동정을 실시하였다. 16S rRNA gene 염기서열을 BLAST 프로그램을 이용한 GenBank의 데이터베이스와 비교한 결과 99%의 신뢰도로 *Lactobacillus gasseri*로 동정되었고(Fig. 2), G2 균주를 *L. gasseri* G2로 명명하였다.

**프로바이오틱스 특성**

본 연구에서 선별된 *L. gasseri* G2의 내산성을 조사하기 위해 초기 접종균수와 비교한 결과, pH 2.5에서 3시간 배

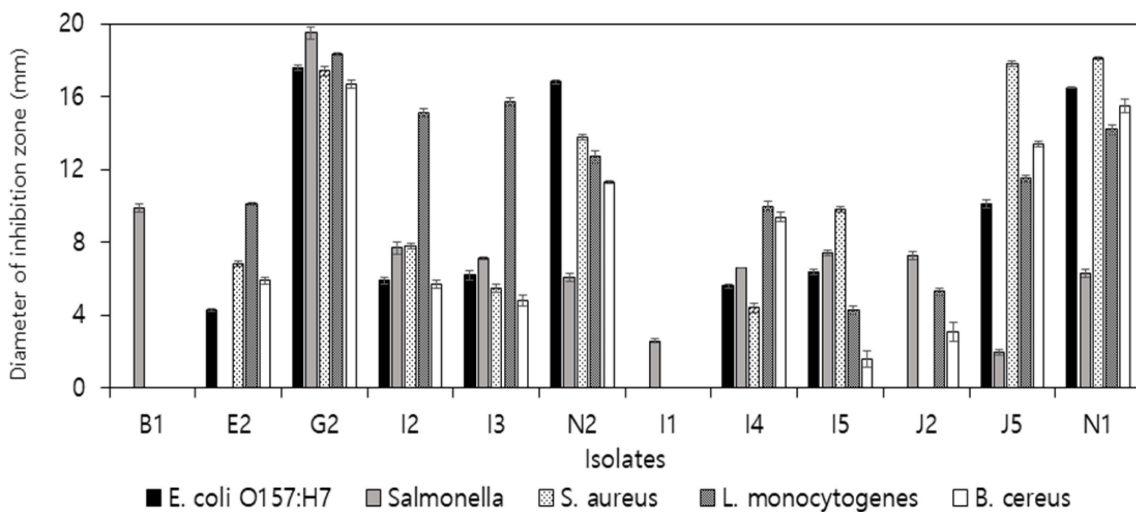


Fig. 1. Comparative antimicrobial activity of isolated LABs against five pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7 *Salmonella* Enteritidis, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*.

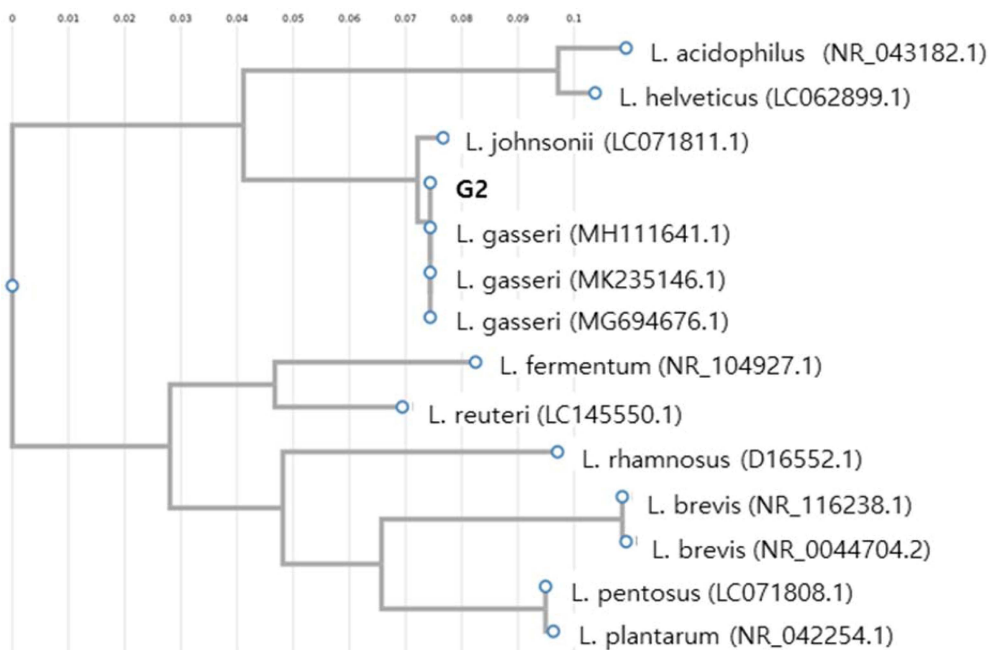


Fig. 2. Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of isolated strain G2 from infant feces.

**Table 1. Acid-bile tolerance of *Lactobacillus gasseri* G2 and the reference strain *Lactobacillus rhamnosus* GG**

Treatments	<i>L. gasseri</i> G2		<i>L. rhamnosus</i> GG	
	log CFU/mL	Survival rate (%)	log CFU/mL	Survival rate (%)
Initial	8.449 ± 0.025		8.863 ± 0.017	
pH 7.0 (3 h)	8.751 ± 0.014	103.6	8.889 ± 0.029	100.3
pH 2.5 (3 h)	8.348 ± 0.036	98.8	8.626 ± 0.139	97.3
pH 1.5 (3 h)	7.478 ± 0.319	92.3	3.028 ± 0.249	34.2
Bile salt 0.3% (4 h)	7.219 ± 0.017	85.4	7.023 ± 0.649	79.2

양하였을 때 98.8% 생존율로 거의 영향을 받지 않은 것으로 나타났다. 이어서 산성 처리된 균주는 회수되어 bile salt 0.3%를 첨가한 MRS 액체배지에서 4시간 배양하였다. 최종적으로 G2 균주는 85.4%의 생존율을 나타냈으며, 이 결과는 프로바이오틱스 균주로 잘 알려진 *L. rhamnosus* GG 표준 균주보다 6.2% 높은 생존율이었다. 또한 G2균주는 pH 1.5로 보정한 MRS 액체 배지에서도 92.3%의 생존율을 보임으로서 매우 우수한 내산성을 보여주었다(Table 1). 공복시 위내는 pH 2.0이하의 강산성이지만 음식물 섭취 후 2-3시간 동안은 음식물에 희석되어 pH 2.0이상인 점을 감안할 때 *L. gasseri* G2는 산과 담즙산염에 대한 강한 내성이 있어 위장관에서의 생존가능성이 높을 것으로 사료된다(Wang et al., 2000).

선발 미생물의 항생제 감수성을 조사하기 위해 11종의 항생제가 포함된 Sensi-Disc를 사용하였다. 그 결과, oxacillin, ciprofloxacin, clindamycin, gentamicin, penicillin, streptomycin 등의 항생제에 대해 강한 저항성을 보였고, ampicillin, cephalothin, erythromycin, tetracycline에 대해 감수성을 나타냈다(Table 2). 예상치 못하게 vancomycin에서 약간의 영향을 받았다. 일반적으로 대부분의 유산균은 vancomycin과 같은 핵산 합성 억제제에 대해 내성을 보이

**Table 2. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus gasseri* G2 and the reference strain *Lactobacillus rhamnosus* GG**

Antibiotics	<i>L. gasseri</i> G2	<i>L. rhamnosus</i> GG
VA 30 µg	21.7(I)	0.0(R)
OX 1 µg	14.9(R)	7.4(R)
AMP 10 µg	29.8(S)	17.8(R)
KF 30 µg	34.6(S)	14.5(R)
CIP 5 µg	0.0(R)	11.0(R)
DA 2 µg	13.8(R)	16.7(R)
E 15 µg	34.6(S)	17.9(R)
CN 10 µg	7.4(R)	8.3(R)
P 10 µg	7.4(R)	15.5(R)
S 10 µg	11.3(R)	6.9(R)
TE 30 µg	30.7(S)	21.1(I)

Susceptibility expressed as: 0 < mm < 19 (R) Resistant, 20 < mm < 24 (I) Intermediate, mm > 25 (S) Susceptible. VA: vancomycin, OX: Oxacillin, AMP: Ampicillin KF:Cephalothin, CIP:Ciprofloxacin, DA:Clindamycin, E: Erythromycin, CN:Gentamicin, P:Penicillin, S:Streptomycin, TE: Tetracyclin

며, chloramphenicol, macrolides, lincosamides, tetracycline 과 같은 단백질 합성 억제제에 대해 저농도에서 영향을 받기 쉽다(Delcour et al., 1999). 그 밖에 erythromycin과 tetracycline에 대한 저항성은 균주에 따라 다양하다(Gueimonde et al., 2013). 한편, 항생제 저항성이 있는 프로바이오틱스는 항생제 치료 후 장내 microflora를 복원하는데 유용할 수 있다(Gueimonde et al., 2013). 그러나 tetracycline 내성 유전자와 같은 이동 가능한 유전 요소를 지니는 특정 항생제 내성 프로바이오틱스는 장내 병원균에 대한 잠재적 저장소를 구성하여 심각한 안전 문제를 야기하기도 한다(Gueimonde et al., 2013). 본 연구에서 분리한 *L. gasseri* G2는 비교적 우수한 항생제 내성을 보유하고 있으며 특히, tetracycline에 대해 매우 민감하여 인체에 안전하게 사용가능 할 것으로 사료된다.

**균주 생장곡선과 박테리오신 생산**

선발미생물의 생장에 따른 박테리오신 생산 수준 및 pH 변화는 G2균주의 배양 시간에 따라 단계별로 모니터링하였다(Fig. 3). *L. gasseri* G2의 생육은 37°C에서 배양 9시간에 유도기 단계에 도달하고, 18시간까지 대수 증식기였으며, 그 후 정체기에 들어갔다. *L. monocytogenes*에 대한 항균활성은 배양 6시간부터 생성되기 시작하여 30시간에 최대 높은 활성에 도달하였고(저해환 크기 18.6 mm), 48시간 때까지 일정한 활성을 유지하였다. 균주가 성장하는 동안 pH는 배양 초기 pH 6.8에서 48시간 배양 후 pH 4.1로 감소하였다. 박테리오신 활성은 대수 증식기에 검출되기 시작하여 12-24시간에 최대에 이르렀고, 이는 균의 성장과 비례적으로 박테리오신이 생산되어 생산균주의 1차 대사산물임을 확인하였다. 유사한 결과는 *Lactococcus lactis* ET45 균주, *Lactobacillus curvatus* LB65 균주, *L. rhamnosus* 1K 균주에서도 보고되었다(Jeong et al., 2011; Marie et al., 2011; Abdelbasset et al., 2014).

**박테리오신의 안정성**

선발균주 *L. gasseri* G2의 부분 정제 박테리오신에 대한 pH, 열, 효소, 유기용매에 대한 안정성 조사는 Table 3에 나타내었다. pH 안정성을 시험한 결과, pH 2.0-10.0까지 어떠한 활성의 소실 없이 안정하였고, pH 11.0에서는 약간

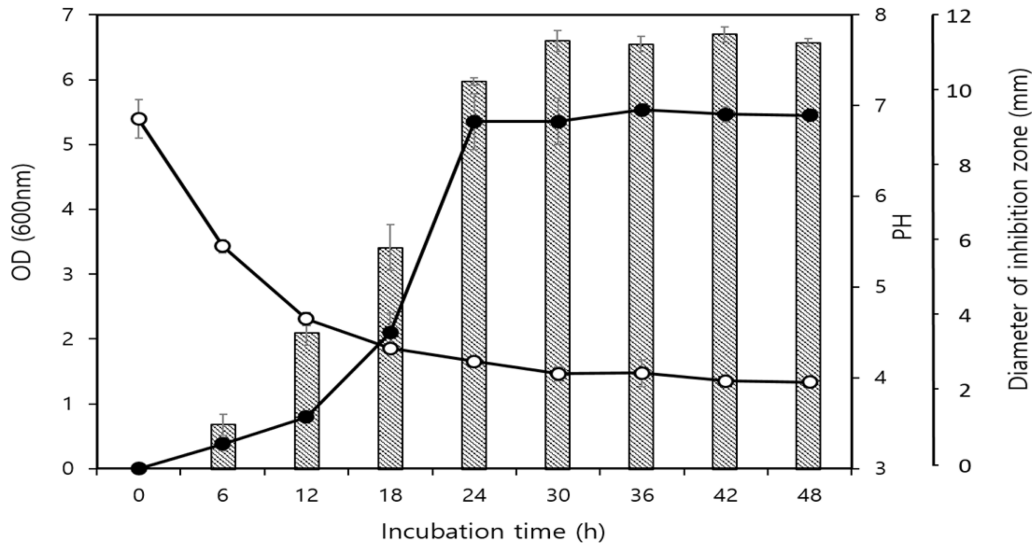


Fig. 3. Growth response of *Lactobacillus gasseri* G2 in the MRS medium (●), Change in pH (○), and antimicrobial activity (▨) against indicator strain *Listeria monocytogenes*.

Table 3. Effect of pH, heat, and enzyme treatment on the antibacterial activity of crude bacteriocin of *Lactobacillus gasseri* G2

	Treatment	Residual activity
pH	2	++++
	4	++++
	6	++++
	7	++++
	8	++++
	9	++++
	10	++++
	11	+++
Heat (temperature, °C)	4 (24 h)	++++
	25 (24 h)	++++
	30 (24 h)	++++
	37 (24 h)	++++
	50 (24 h)	++++
	70 (24 h)	++++
	100 (30 min)	++++
	121 (15 min)	++++
Enzymes	$\alpha$ -Amylase	++++
	Lipase	++++
	Lysozyme	++++
	Proteinase K (2 mg/mL)	-
	Protease (2 mg/mL)	-
Organic solvents	Trypsin (2 mg/mL)	-
	Culture broth	++++
	Acetone	++++
	Methanol	++++
	Ethanol	++++
	Butanol	++++

- : no clear zone; + :  $\leq 6$  mm; ++ :  $6.1 \text{ mm} \leq \text{clear zone} \leq 10.1 \text{ mm}$ ; +++ :  $10.1 \leq \text{clear zone} \leq 14.1 \text{ mm}$ , ++++  $\geq 14.2 \text{ mm}$

활성이 감소하는 경향을 보였으나 우수한 잔존 활성(70% 이상)을 확인하였다. 유산균이 생산하는 박테리오신의 pH 안정성은 *L. gasseri* KT7, *Lactobacillus brevis* CM22, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 등에서 많이 보고되었다 (Zhu et al., 2000; Rahmeh et al., 2019; Aslam et al., 2012). 본 연구에서 선발된 균주의 박테리오신 또한 pH 안정성이 매우 우수한 것으로 나타났다. 열안정성 조사 결과에서 *L. gasseri* G2균주의 박테리오신은 모든 열처리 조건에서 안정성을 보였으며, 특히 120°C, 15분에서도 항균 활성 소실이 전혀 없어 열에 대한 안정성도 아주 우수한 것으로 확인되었다. 일반적으로 각종 유산균이 생산하는 박테리오신의 열 안정성은 균주에 따라 상이한 것으로 알려져 있는데, *L. gasseri* KT7의 gassericin KT7의 경우 100°C에서 30분 반응시켰을 때 100% 활성을 보였지만 120°C에서 15분 반응시켰을 때에는 항균활성이 완전히 소실되었다 (Zhu et al., 2000).

*L. gasseri* G2균주의 부분 정제 박테리오신에 대한 가수분해 효소 안정성을 보기 위해 여러 종류의 가수분해 효소를 1 mg/mL의 농도로 첨가하여 반응시킨 후 항균물질의 잔존활성을 측정된 결과,  $\alpha$ -amylase, lipase, lysozyme에 의해서는 항균활성에 전혀 영향을 받지 않았으나, 단백질 가수분해 효소인 proteinase K, protease, trypsin에 대해서는 항균활성이 감소함을 확인하였고, 2 mg/mL 처리시에는 활성을 완전히 상실하였다. 따라서 *L. gasseri* G2가 생산하는 항균물질은 단백질성 물질임을 확인하였다. 마지막으로 유기용매에 대한 안정성 시험을 위해 acetone, methanol, ethanol, butanol을 사용하였으며 사용한 모든 유기용매에 대해서 높은 안정성을 나타내었다.

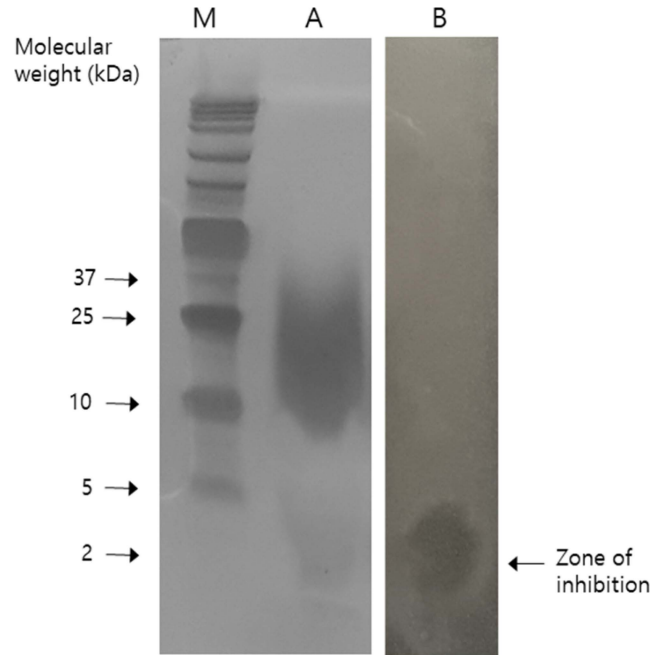
**Table 4. Inhibitory spectrum of bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* G2**

Micro-organisms	Indicator species	Antibacterial activity
Gram-positive bacteria	<i>Bacillus cereus</i> KCCM 40935	++
	<i>Listeria monocytogenes</i> CCARM 0214	++++
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 40510	+++
	<i>Clostridium perfringens</i> KCCM 40946	++
	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 49445	+++
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4162	+++
	<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521	+++
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 9135	++++
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43888	++++
	<i>Enterobacter sakazakii</i> KCTC 2749	++
	<i>Salmonella</i> Enteritidis KCCM 12021	++++
	<i>Shigella flexneri</i> KCCM 40948	++
	<i>Shigella boydii</i> KCCM 41649	++++
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCCM 11965	+++
	<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 29306	-

-: no clear zone; +: ≤ 6 mm; ++: 6.1 mm ≤ clear zone ≤ 10.1 mm; +++: 10.1 ≤ clear zone ≤ 14.1 mm, ++++ ≥ 14.2 mm

**박테리오신의 항균범위**

분리 균주 *L. gasseri* G2가 생산하는 박테리오신의 항균 범위를 알아보기 위해 11종의 식품유래 병원성균주 및 4종의 유산균을 사용하여 항균활성을 확인하였다 (Table 4). G2균주의 부분 정제 박테리오신은 그람 양성균 8종, *B. cereus* KCCM 40935와 *L. monocytogenes* CCARM 0214, *S. aureus* ATCC 40510, *C. perfringens* KCCM 40946, *Lactobacillus plantarum* ATCC 49445, *L. acidophilus* ATCC 4162, *L. sakei* ATCC 15521, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 9135에 대해 항균활성을 확인하였고, *V. vulnificus* ATCC 29306을 제외한 6종의 그람 음성균 *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, *E. sakazakii* KCTC 2749, *S. Enteritidis* KCCM 12021, *S. flexneri* KCCM 40948, *S. boydii* KCCM 41649, *V. parahaemolyticus* KCCM 11965에 대해 항균활성을 나타냈다. 특히, *L. monocytogenes* CCARM 0214, *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, *S. Enteritidis* KCCM 12021, *S. boydii* KCCM 41649에 대하여 강력한 항균활성을 나타내었다. 결과적으로 신생아 분변에서 분리한 G2균주는 그람 양성균 뿐만 아니라 음성균에서도 광범위한 항균활성을 나타내었다. 본 연구 결과와 마찬가지로 광범위한 항균활성을 가진 박테리오신은 *L. gasseri* K7과 *L. gasseri* LF221균주에서도 보고되었는데 이들은 *B. cereus*, *C. tyrobutyricum*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *Streptococcus thermophilus*에 대하여 넓은 억제 스펙트럼을 가진 박테리오신을 생산했다(Matijašić & Rogelj, 1999; Matijašić & Rogelj, 2000). 반면에 *L. casei*, *L. sakei*, *L. viridescens*, *L. plantarum*에 의해 생산되는 plantaricin A의 항균 스펙트



**Fig. 4. Direct detection of bacteriocin activity on 16.5% Tris-Tricine SDS-PAGE.** A: 24 h culture supernatant and B: Part of the polyacrylamide gel overlaid by the indicator organism, *L. monocytogenes*.

럼은 비교적 좁다고 보고되었다(da Silva Sabo et al., 2014).

**박테리오신의 분자량**

부분 정제된 박테리오신의 분자량을 추정하기 위하여 농축된 박테리오신으로 tricine-SDS-PAGE를 실시하였다. 해당 단백질이 잘 분리되어 나타나지는 않았지만 박테리오신으로 유추할 수 있는 억제 구역은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 지시균으로 *L. monocytogenes*를 사용하여 항균활성을 확인하였을 때 대략 2 kDa에 위치하고 있는 band에서 나타났다.

본 연구에서 *L. gasseri* G2균주가 생산하는 박테리오신의 특성은 class II에 속하는 것으로 예상되며, 특히 subclass IIc속의 원형 박테리오신에 가깝다고 사료된다. 이들은 분자량이 10 kDa 이하이며, 일반적으로 *Clostridium* spp., *Listeria* spp.와 같은 일반적인 식품 매개 병원균에 대해 광범위한 항균활성을 나타내고, 높은 열 및 pH에 안정할 뿐만 아니라 많은 단백질 분해 효소에 대한 내성이 있다고 알려져 있다(Chung et al., 2011). 이러한 특징은 다른 그람 양성 박테리오신과 명확하게 구별되며, 별도의 그룹으로 간주될 만큼 높은 동질성(homogenous)을 가지고 있다고 보고되었다(Chung et al., 2011; Gabrielsen et al., 2014; Maqueda et al., 2008; Kemperman et al., 2003) *L. gasseri* G2가 생산하는 박테리오신은 이러한 특징과 매우 유사한 특성을 보임으로서 산업적 용도로서 잠재성이 매우 높다고 판단된다.



## 요 약

유산균으로부터 생산되는 박테리오신은 천연 보존제로서 식품산업에서 합성보존제의 대안으로 많은 관심을 끌고 있다. 본 연구에서는 신생아분변에서 분리한 *Lactobacillus gasseri* G2의 프로바이오틱스 특성과 이 균주로부터 생산되는 박테리오신에 대한 일부 특성을 규명하였다. G2 균주는 내담즙성, 내산성, 항생제 내성 및 광범위한 항균활성과 같은 프로바이오틱스로서 잠재성을 확인하였다. 아세톤 침전에 의한 부분 정제된 박테리오신은 높은 온도(100°C 30분, 121°C 15분)와 광범위한 pH (pH 2.0-10.0) 뿐만 아니라 다양한 유기용매(아세톤, 메탄올, 에탄올, 부탄올)에 대해 항균 활성 소실이 전혀 없이 매우 우수한 안정성을 보여주었고, 가수분해 효소처리의 경우  $\alpha$ -amylase, lipase, lysozyme에 대해서는 안정하였으나 proteinase K, protease, trypsin 처리에서 활성이 감소하여 *L. gasseri* G2가 생산하는 항균물질이 단백질성 물질임이 확인되었다. 부분 정제된 박테리오신은 시험한 그람양성 4종 및 그람 음성 6종 균주에 대하여 항균활성을 나타냈다. Tricine-SDS-PAGE를 이용한 박테리오신의 분자량은 대략 2 kDa으로 확인되었다. *L. gasseri* G2가 생산하는 박테리오신의 높은 열안정성과 산·알칼리 안정성은 효소의 잠재적 산업화 가능성을 시사한다.

## 감사의 글

본 연구는 2020년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원 과정 지원사업 및 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호 : PJ01423802)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## References

- Abdelbasset M, Manel D, Djamilia K. 2014. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LB65, isolated from Algerian traditional fresh cheese (Jben). *Adv. Environ. Biol.* 8: 1222-1233.
- Chen H, Hoover DG. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. F* 2: 82-100.
- Aslam M, Shahid M, ur Rehman F, Murtaza MA, Sharif S, Ata A, Noor S. 2012. Production optimization and characterization of a low molecular weight bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6: 5924-5933.
- Bogovič-Matijašić B, Rogelj I, Nes IF, Holo H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 606-612.
- Chung DM, Kim KE, Jeong SY, Park CS, Ahn KH, Kim DH, Kim DH, Kang DO, Chun HK, Yoon BD, Koh HB, Kim HJ, Choi NS, Kim HJ. 2011. Rapid concentration of some bacteriocin-like compounds using an organic solvent. *Food Sci. Biotechnol.* 20: 1457.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777-788.
- da Silva Sabo S, Vitolo M, González JMD, de Souza Oliveira RP. 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* 64: 527-536.
- Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P. 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. In *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*. Springer, Dordrecht. pp. 159-184.
- Egan K, Fiueld D, Rea MC, Ross RP, Hill C, Cotter PD. 2016. Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems?. *Front. Microbiol.* 7: 461.
- Gabrielsen C, Brede DA, Salehian Z, Nes IF, Diep DB. 2014. Functional genetic analysis of the GarML gene cluster in *Lactococcus garvieae* DCC43 gives new insights into circular bacteriocin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 196: 911-919.
- Garsa AK, Kumariya R, Sood SK, Kumar A, Kapila S. 2014. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiotics Antimicrob.* 6: 47-58.
- Giraffa G, Chanishvili N, Widyastuti Y. 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol.* 161: 480-487.
- Gueimonde M, Sánchez B, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A. 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.* 4: 202.
- Jeong SY, Park CS, Choi NS, Yang HJ, Kim CY, Yoon BD, Kang DO, Ryu YW, Kim MS. 2011. Characteristics of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ET45 isolated from kimchi. *Korean J. Microbiol.* 47: 74-80.
- Kamarajan P, Hayami T, Matte B, Liu Y, Danciu T, Ramamoorthy A, Worden F, Kapila S, Kapila Y, Nisin ZP. 2015. a bacteriocin and food preservative, inhibits head and neck cancer tumorigenesis and prolongs survival. *PLoS One* 10: e0131008.
- Kawai Y, Saitoh B, Takahashi O, Kitazawa H, Saito T, Nakajima H, Itoh T. 2000. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2201-2208.
- Kemperman R, Kuipers A, Karsens H, Nauta A, Kuipers O, Kok J. 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1589-1597.
- Lagha AB, Haas B, Gottschalk M, Grenier D. 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Vet. Res.* 48: 22.
- Maqueda M, Sanchez-Hidalgo M, Fernandez M, Montalban-Lopez M, Valdivia E, Martinez-Bueno M. 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 2-22.
- Marie KP, François ZN, Florence FA, Victor SD, Félicité TM. 2011. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1K isolated from traditionally fermented milk in the western highlands region of Cameroon. *J. Sci.* 4: 8-7.
- Matijašić BB, Rogelj I. 1999. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. *Food Technol. Biotechnol.* 37: 93-100.
- Matijašić BB, Rogelj I. 2000. *Lactobacillus* K7-a new candidate



- for a probiotic strain. Food Technol. Biotechnol. 38: 113-119.
- Mills S, Stanton C, Hill C, Ross RP. 2011. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2: 299-329.
- Pei J, Feng Z, Ren T, Sun H, Han H, Jin W, Dang J, Tao Y. 2018. Purification, characterization and application of a novel antimicrobial peptide from *Andrias davidianus* blood. Lett. Appl. Microbiol. 66: 38-43.
- Rahmeh R, Akbar A, Kishk M, Al-Onaizi T, Al-Azmi A, Al-Shatti A, Shajan A, Al-Mutairi S, Akbar B. 2019. Distribution and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from raw camel milk. New Microbes. New Infect. 30: 100560.
- Ruiz-Barba JL, Cathcart DP, Warner PJ, Jiménez-Díaz, R. 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2059-2064.
- Silva CC, Silva SP, Ribeiro SC. 2018. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. Front. Microbiol. 9: 594.
- Tagg J, Mcgiven AR. 1971. Assay system for bacteriocin. Appl. Environ. Microbiol. 21: 943-948.
- Toba T, Yoshioka E, Itoh T. 1991. Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin. Lett. Appl. Microbiol. 12: 228-231.
- Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatosava T. 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.
- Wang CY, Lin PR, Ng CC, Shyu YT. 2000. Probiotic properties of lactobacillus strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. Anaerobe 16: 578-585.
- Zhu WM, Liu W, Wu DQ. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. J. Appl. Microbiol. 88: 877-886.

### Author Information

- 김종희: 국립축산과학원 축산물이용과 박사후연구원  
 이은선: 국립축산과학원 축산물이용과 농업연구사  
 김부민: 국립축산과학원 축산물이용과 농업연구사  
 함준상: 국립축산과학원 축산물이용과 농업연구관  
 오미화: 국립축산과학원 축산물이용과 농업연구관