

케피어 유래 박테리오신 생산 *Enterococcus faecium* 균주 선발

서숙진 · 문기성*

한국교통대학교 생명공학과

Isolation of a Bacteriocin Producing *Enterococcus faecium* Strain from Kefir

Souk-Jin Seo and Gi-Seong Moon*

Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

A bacteriocin producing lactic acid bacterium was isolated from kefir which is functional fermented milk. The CJNU 2008 strain was identified as *Enterococcus faecium* by 16S rRNA gene sequence analysis and the strain named *E. faecium* CJNU 2008. Antibacterial spectrum of *E. faecium* CJNU 2008 has shown that several strains including pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* were inhibited by the cell and culture supernatant. Optimal culture conditions for production of the bacteriocin from *E. faecium* CJNU 2008 were MRS broth as a medium, 30°C, and pH 7.0.

Keywords

Kefir, bacteriocin, *Enterococcus faecium*, antimicrobial activity, *Listeria monocytogenes*

서 론

박테리오신(bacteriocin)은 박테리아가 생산하는 항균성 단백질(펩타이드)로써 주로 생산 균주와 분류학적으로 가까운 종의 생육을 억제한다(Bali *et al.*, 2016). 특히, 유산균이 생산하는 박테리오신은 안전성과 활용성이 우수하여 많은 연구가 진행되고 있다(Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). 나isin(nisin)은 *Lactococcus lactis* 균주가 생산하는 박테리오신으로써 정제된 형태로 상업화된 최초의 사례이며, 전 세계적으로 천연항균보존제로서 활용되고 있다(Gharsallaoui *et al.*, 2016). 앞으로도 유산균으로부터 생산되는 박테리오신 중에서 산업적 적용성이 우수한 박테리오신의 상업화 가능성이 클 것으로 기대된다. 케피어는 북부 코카서스 지역에서 유래된 발효유로써 유산균을 비롯하여 초산균 및 효모 등에 의한 혼합 발효를 통해 생산된다(Leite *et al.*, 2015). 케피어(케피어 유래 물질 포함)는 지금까지 많은 연구를 통해서 그 기능성이 검증되었으며, 다른 발효유의 기능성과 마찬가지로 항균활성, 장 건강, 면역조절, 항알레르기, 콜레스테롤 대사, 상처 치료, 항암 활성 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Bourrie *et al.*, 2016).

따라서 본 연구에서는 기능성이 우수한 케피어로부터 분리된 유산균을 대상으로 박테리오신 생산 균주를 선발하였으며, 선발된 균주의 박테리오신 생산을 위한 배양학적 특성을 관찰하였다.

Received: Dec 14, 2016

Revised: Dec 17, 2016

Accepted: Dec 23, 2016

* Corresponding author :

Gi-Seong Moon

Department of Biotechnology, Korea
National University of Transportation,
Jeungpyeong 27909, Korea

Tel: +82-43-820-5251,

Fax: +82-43-820-5272

E-mail: gsmoon@ut.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배양

Bacillus subtilis SCB, *Enterococcus faecium* MK3, *Escherichia coli* DH5 α , *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* CJNU 0588, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3679, *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, *Pediococcus acidilactici* K10, *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 균주들이 항균 스펙트럼 확인을 위한 지시균주(indicator)로 사용되었다. 유산균과 *Listeria*는 MRS broth(Difco, Sparks, MD, USA)에서 배양하였으며, *Bacillus*와 *Staphylococcus*는 Nutrient broth(Difco)에서, *E. coli*는 LB broth(Difco)에서 배양하여 사용하였다.

2. 박테리옌 생산 유산균주 선발

케피어로부터 분리된 유산균주들로부터 박테리옌 생산 균주를 선발하기 위해 한천확산법(agar diffusion method)을 이용하였으며, 지시균으로 *L. monocytogenes* KCTC 3569 균주를 사용하였다. 즉, MRS soft agar[0.7%(w/v) agar]에 *L. monocytogenes* KCTC 3569 배양액 1%를 접종하여 유산균주들의 콜로니가 형성된 MRS agar 고체배지 위에 부어 37°C에서 12 h 배양하였다. 배양 후 콜로니 주변으로 생육 저해환(inhibition zone)이 나타나는지 확인하여 박테리옌 생산 유무를 판단하였다. 또한 박테리옌 생산 추가 검증을 위해 선발 균주의 배양 상등액의 pH를 10 N NaOH를 이용하여 7.0으로 보정 후 0.22 μ m 주사필터(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하였다. 이를 아세톤 추출법(Chung *et al.*, 2011)으로 부분정제하고 농축하여 지시균이 깔려 있는 MRS agar 고체배지 위에 2 μ L를 점적하여 37°C에서 12 h 배양 후 생육 저해환을 관찰하였다.

3. 박테리옌 생산 선발 균주에 대한 동정

박테리옌 생산을 확인한 균주에 대하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 균주 동정을 실시하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열은 생명공학 벤처회사(Macrogen Co., Daejeon, Korea)를 통해 분석하였으며, 염기서열에 대한 상동성 분석은 미국립생물정보센터(NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램을 이용하여 수행하였다.

4. 항균 스펙트럼

항균 스펙트럼 조사를 위해 사용한 지시균주는 앞서 언급한 내용과

같으며, 각각의 최적배지에서 배양한 후 한천확산법으로 선발균주의 배양액과 부분정제 농축액을 이용하여 항균활성을 측정하였다.

5. 박테리옌 생산 최적 조건 조사

선발된 유산균주의 박테리옌 생산 최적조건을 확인하기 위하여 배지(MRS, BHI broth), 배양온도 (25, 30, 37°C) 및 초기 pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0)를 달리하여 경시적(0, 3, 6, 9, 12, 24 h)으로 OD₆₀₀ 및 박테리옌 활성(AU/mL)을 측정하여 상호 비교하였다. 단, 최적화 순서는 배지, 배양온도, 초기 pH 순으로 하였다. AU (arbitrary unit)/mL 값은 원액을 2배씩 희석하여 활성을 나타내는 최대 희석배수의 역을 취하고, 1 mL에 대한 환산 값을 곱하여 나타내었다(Ray and Daeschel, 1992).

결과 및 고찰

1. 박테리옌 생산 유산균주 선발

케피어에서 분리한 유산균 112개 균주를 대상으로 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 생육을 저해하는 박테리옌 생산균주를 확인한 결과, 6개의 유산균주에서 항균활성이 관찰되었으며, 이 중 CJNU 2008 균주에서 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다. 산(acid)에 대한 저해효과를 배제하기 위하여 CJNU 2008 균주의 배양 상등액을 중화(pH 7.0)한 후, 이를 아세톤 추출법(Chung *et al.*, 2011)으로 부분정제하여 사용한 경우에도 활성이 관찰되었다(Fig. 1).

2. 박테리옌 생산 선발 균주에 대한 동정

L. monocytogenes KCTC 3569 균주에 대하여 항균활성이 우수한 CJNU 2008 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 동정 결과, *Enterococcus faecium* strain IDCC 2103(GenBank accession no., EU003447.1) 균주와 가장 높은 상동성(99%)을 나타내어 CJNU 2008 균주를 *E. faecium* CJNU 2008

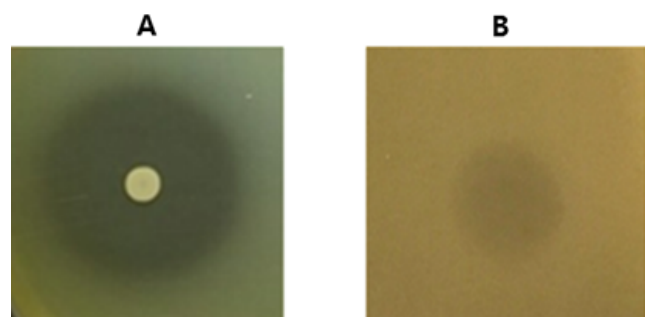


Fig. 1. Antimicrobial activity of CJNU 2008 cell culture (A) and partially purified bacteriocin concentrate (B) against *Listeria monocytogenes*.

로 명명하였다.

3. 항균 스펙트럼

E. faecium CJNU 2008 균주의 배양액과 부분정제 박테리옌 농축액을 이용하여 항균 스펙트럼을 조사하였다. 균 배양액의 경우, *L. reuteri*와 *L. casei* 균주를 제외한 나머지 균주에 대해서 항균활성을 나타낸 반면, 부분정제 박테리옌 농축액의 경우, *L. acidophilus*, *Leu. mesenteroides*, *Lis. monocytogenes*, *S. aureus* 균주에 대해서만 항균활성을 나타내었다(Table 1). 배양액과 부분정제 박테리옌 농축액의 항균 스펙트럼에서 차이가 나는 것은 배양액 상에 존재하는 산에 의한 저해효과에 기인하는 것으로 추론되었다. 유산균이 생산하는 대부분의 박테리옌은 그람음성 세균에 대한 항균활성이 약한 것으로 알려져 있다(Molloy *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2002). 특히, *E. faecium* CJNU 2008 균주가 생산하는 박테리옌이 *Lis. monocytogenes*에 대하여 강한 항균활성을 보이는 것으로 보아, class II 박테리옌 그룹에 속할 가능성이 높다고 판단된다(Rodríguez *et al.*, 2002).

4. 박테리옌 생산 최적 조건 조사

E. faecium CJNU 2008 균주의 박테리옌 생산 최적 조건을 확인하기 위하여 배지, 배양온도 및 초기 pH를 달리하여 항균활성을 비교하였다. MRS broth와 BHI broth에서 각각 배양했을 때 생육 속도에서는 큰 차이가 없었으나, MRS broth에서 정지기(stationary phase)의 흡광도(OD₆₀₀)가 더 높게 관찰되었다(Fig. 2A). 항

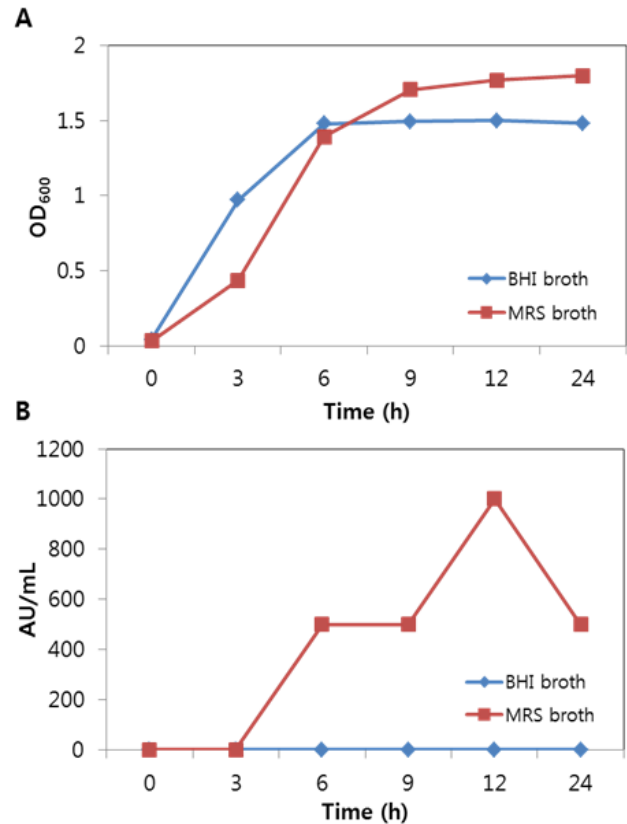


Fig. 2. Optimal medium for production of the bacteriocin from *Enterococcus faecium* CJNU 2008. A: optical density at 600 nm; B: bacteriocin activity (AU/mL).

Table 1. Antimicrobial spectrum of *E. faecium* CJNU 2008 cell culture and partially purified bacteriocin concentrate

Target strain	Cell culture	Partially purified bacteriocin concentrate
<i>Bacillus subtilis</i> SCB	+	-
<i>Enterococcus faecium</i> MK3	+	-
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+
<i>Lactobacillus casei</i> CJNU 0588	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC 3679	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CJNU 0147	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3569	+	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> K10	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	+	+

균활성의 경우, BHI broth에서는 전혀 관찰되지 않은 반면, MRS broth의 경우 12 h에서 가장 높은 항균활성(1,000 AU/mL)을 나타내었고, 6, 9, 24 h에서는 500 AU/mL의 활성을 나타내었다 (Fig. 2B). 최적 배지로 선택된 MRS broth를 이용하여 *E. faecium* CJNU 2008 균주의 박테리옌 생산 최적 온도를 확인한 결과, 30°C와 37°C에서 최고의 활성(2,000 AU/mL)이 관찰되었으며, 25°C의 경우 1,000 AU/mL까지 활성이 관찰되었다(Fig. 3B). 생장속도의 경우에도 37 > 30 > 25°C 순으로 나타나 *E. faecium* CJNU 2008 균주의 박테리옌 생산은 생장속도에 영향을 받는 것으로 나타났다(Fig. 3A). MRS broth의 초기 pH(5.0, 6.0, 7.0, 8.0)를 달리하여 30°C에서 *E. faecium* CJNU 2008 균주를 배양하면서 박테리옌 생산 정도를 확인한 결과, pH 5.0을 제외하고 비슷한 활성 양상을 보였으나, 24 h에서 pH 6.0과 8.0은 활성이 50% 감소하였다(Fig. 4B). 초기 pH가 증가할수록 균의 생장속도도 증가하는 경향을 보였는데, 이는 배양액의 pH가 상대적으로 느리게 떨어지는 것에 기인하는 것으로 추론되었다(Fig. 4A). 본 논문에서는 박테리옌 생산 유산균주의 분리 및 배양학적 특성만을 다루었다. 향후 추가연구를 통해 생화학 및 분자생물학적

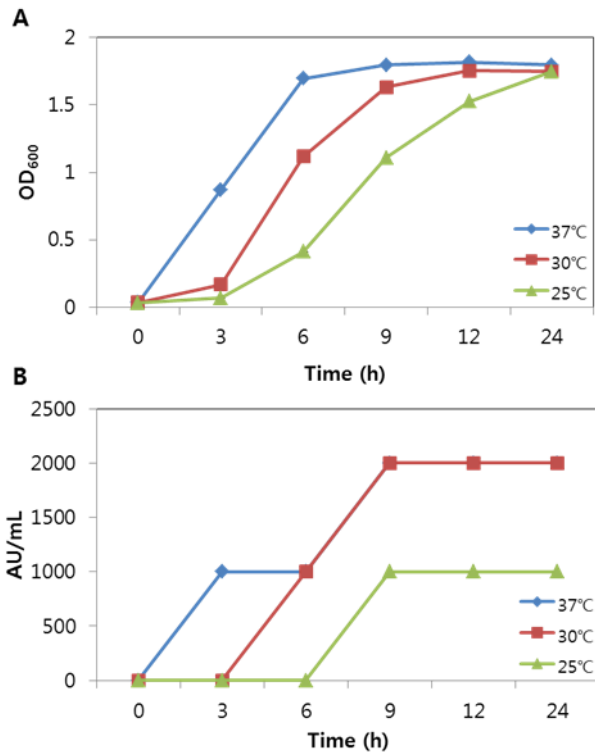


Fig. 3. Optimal temperature for production of the bacteriocin from *Enterococcus faecium* CJNU 2008 in MRS broth. A: optical density at 600 nm; B: bacteriocin activity (AU/mL).

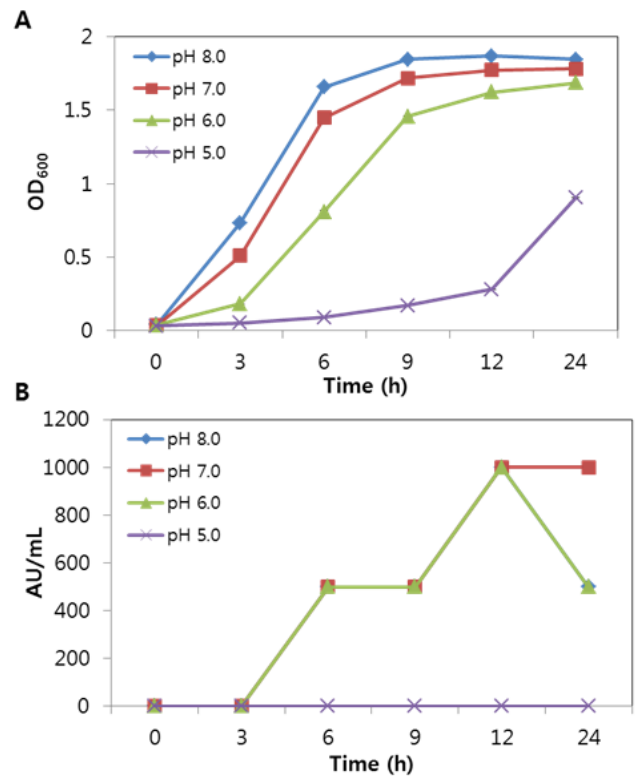


Fig. 4. Optimal initial pH for production of the bacteriocin from *Enterococcus faecium* CJNU 2008 in MRS broth at 30°C. A: optical density at 600 nm; B: bacteriocin activity (AU/mL).

특성이 규명된다면 상업적인 측면에서의 활용 가능성을 기는해 볼 수 있을 것이다.

요 약

기능성 발효유로 알려진 커피어로부터 박테리옌 생산 유산균주 (CJNU 2008)를 선별하였다. CJNU 2008 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 *Enterococcus faecium*으로 동정되어 *E. faecium* CJNU 2008로 명명하였다. *E. faecium* CJNU 2008 균주의 배양액 및 부분정제 농축액은 *Listeria monocytogenes*와 *Staphylococcus aureus*와 같은 병원성 세균을 포함하여 몇몇 균주들에 대해서 항균활성을 나타내었다. *E. faecium* CJNU 2008 균주의 박테리옌 생산을 위한 배양 최적조건은 MRS broth, 30°C 및 pH 7.0으로 확인되었다.

참고문헌

1. Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, and Kui-

- pers OP. (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2939-2951.
2. Bali V, Panesar PS, Bera MB, and Kennedy JF. (2016) Bacteriocins: Recent trends and potential applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 817-834.
3. Bourrie BC, Willing BP, and Cotter PD. (2016) The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Front. Microbiol.* **7**: 647.
4. Chung DM, Kim KE, Jeong SY, Park CS, Ahn KH, Kim DH, Kang DO, Chun HK, Yoon BD, Koh HB, Kim HJ, and Choi NS. (2011) Rapid concentration of some bacteriocin-like compounds using an organic solvent. *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 1457-1459.
5. Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, and Degraeve P. (2016) Nisin as a food preservative: Part 1: Physico-chemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 1262-1274.
6. Leite AM, Miguel MA, Peixoto RS, Ruas-Madiedo P, Paschoalin VM, Mayo B, and Delgado S. (2015) Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J. Dairy Sci.* **98**, 3622-3632.
7. Molloy EM, Field D, O' Connor PM, Cotter PD, Hill C, and Ross RP. (2013) Saturation mutagenesis of lysine 12 leads to the identification of derivatives of nisin A with enhanced antimicrobial activity. *PLoS One* **8**: e58530.
8. Ray B and Daeschel M. (1992) Food biopreservatives of microbial origin. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 64-70.
9. Rodríguez JM, Martínez MI, and Kok J. (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **42**, 91-121.