pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 6, pp. 516~520 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.6.516

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Enterococcus faecium CJNU 2008 균주 생산 박테리오신의 특성 규명

서숙진 · 양정모 · 문기성*
한국교통대학교 생명공학과

Characterization of the Bacteriocin from *Enterococcus faecium* CJNU 2008

Souk-Jin Seo, Jung-Mo Yang, and Gi-Seong Moon*
Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong, Korea
(Received November 26, 2018/Revised December 5, 2018/Accepted December 12, 2018)

ABSTRACT - Bacteriocin is a proteinaceous compound produced by microorganisms showing antimicrobial activities. In this study, the physicochemical properties of the bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CJNU 2008 strain were characterized. Partially purified bacteriocin showed stabilities against heat treatments at 100°C for 30 min and 121°C for 15 min and against solvents treatments such as methanol, ethanol, acetone, acetonitrile and chloroform. The bacteriocin also exhibited stabilities against lipase and α-amylase treatments but the stability was abolished at protease treatment, indicating that the antimicrobial agent from *E. faecium* CJNU 2008 was a proteinaceous bacteriocin. The bacteriocin also showed bactericidal mode of action against *Listeria monocytogenes*. The molecular mass of the bacteriocin was estimated to be under 6.5 kDa by a tricine-SDS-PAGE analysis. The bacteriocin was purified by HPLC. Further studies toward biochemical analysis of the bacteriocin are needed in near future.

Key words : Bacteriocin, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, Bactericidal activity, Purification

캐피어(Kefir)는 유산균, 효모 등의 복합발효에 의해 제조되는 발효유 중 하나로 세계적인 장수 지역으로 알려진 코카서스 지방에서 유래된 전통식품이며 그 지역 사람들과 수천 년 동안 함께 해왔다[1]. 캐피어는 미네랄, 비타민, 필수 아미노산 등 인체에 필요한 다양한 영양소들을 포함하고 있다[2]. 캐피어 1 mL당 10^{7-10}개의 미생물들이 서식하고 있으며[3], 유산균과 효모를 포함하여 초산균 등이 주 균총을 이루고 있다[4]. 캐피어의 미생물학적 분석 외에도 기능성 관련 많은 연구들이 진행되어 왔다[5].

박테리오신(Bacteriocin)은 박테리아에 의해 분비되는 항균성 단백질로서 안전성 등의 이유로 유산균이 생산하는 박테리오신에 대한 연구가 활발하다[6]. 박테리오신은 유전자 발현 과정을 통해 리보솜에서 단백질로 합성되며[7], Riley와 Wertz[8]는 많은 수의 미생물 균종들이 박테리오신을 생산하고 있다고 제안하였다. 박테리오신의 항균활성은 구조에 따라 다양하며 좁은 항균스펙트럼 혹은 넓은 항균스펙트럼을 가진 박테리오신들이 존재한다[9]. 박테리오신의 분류는 학자마다 다소의 차이는 있으나[10], 주로 단백질의 크기, 열 안정성 또는 분비 기작에 따라 Class I-III로 구분된다[9]. 그 중에서 구조적인 안정성으로 인해 Class I과 Class II에 대한 학자들의 관심이 높으며 Class I은 lanthionine 및 3-methyllanthionine이 함유된 5 kDa 미만의 작은 펩타이드로 구성 되어 있고[11], class II는 class I과 달리 lanthionine을 가지고 있지 않으며 약 10 kDa 미만의 작은 크기를 가지고 있어 열에 대한 안정성이 높다[12]. Class III는 분자량이 10 kDa 이상이며 열에 대한 안정성이 떨어진다[13].

최근에는 박테리오신을 활용하여 식품보존제, 차세대 항생제 및 암 치료제 등의 개발을 위한 연구들이 활발하게 진행되고 있다[14]. 본 연구에서는 선행연구[15]를 통하여 캐피어로부터 분리한 *E. faecium* CJNU 2008 유래 박테리오신의 일부 특성을 규명하였으며 그 결과를 보고하고자 한다.

Materials and Methods

사용균주 및 배양

박테리오신 생산 *E. faecium* CJNU 2008 및 지시균 *L. monocytogenes* KCTC 3569는 MRS 배지(BD, Sparks, MD, USA)에서 배양하였으며 작용 양상(mode of action)

*Correspondence to: 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

시험을 위해서는 Peptone (BD, Sparks, MD, USA)이 사용되었다.

박테리오신 안정성 조사

박테리오신이 포함된 *E. faecium* CJNU 2008의 배양상등액을 아세톤추출법[16]으로 부분 정제한 후 이를 열처리, 유기용매 및 효소에 대한 안정성 시험에 사용하였다. 부분 정제 박테리오신의 조제는 *E. faecium* CJNU 2008 균주를 37°C에서 12시간 배양한 후 원심분리(4°C, 8000 rpm, 20분)하여 상등액을 회수하였다. 상등액은 10 N NaOH를 이용하여 중화(pH 7.0)시키고 membrane filter (0.22 μm; Sartorius Co., Göttingen, Germany)로 제균하였다. 상등액 100 mL에 아세톤 300 mL을 혼합한 다음 –20°C에서 3시간 동안 방치하면서 30분 간격으로 교반하였으며 이후 원심분리(4°C, 9,000 rpm, 30분)하여 상등액 회수 후 회전식 감압 농축기(Eyela, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 이렇게 조제된 부분 정제 박테리오신의 열 안정성 시험은 60°C, 80°C, 100°C에서 각각 15분, 30분, 60분 및 121°C에서 15분 동안 방치 후 잔존하는 박테리오신 활성을 측정하였다. 박테리오신 활성은 한천확산법(agar diffusion method)으로 실시하였으며 활성의 크기는 임의단위(AU/mL)를 사용하여 나타내었다. 즉, 시료원액을 2배씩 연속해서 희석한 다음 활성을 나타내는 최고 희석배수의 역수를 취하여 그 값으로 하였다[17]. 항균활성 시험의 지시균은 *L. monocytogenes* KCTC 3569를 사용하였으며 MRS 배지, 37°C에서 12시간 배양한 균 배양액을 5 mL MRS 배지(0.7% agar 함량)에 섞고 현탁한 다음 MRS 고체배지 위에 부었다. 이를 30분간 방치한 다음 박테리오신 시료 2 μL를 그 위에 점적한 후 배양하면서 생육저해환(inhibition zone)을 관찰하였다. 유기용매에 대한 박테리오신의 안정성을 확인하기 위해 메탄올(Honeywell B & J, Ulsan, Korea), 에탄올(Honeywell B & J), 아세톤(Honeywell B & J), 아세토니트릴(Honeywell B & J) 및 클로로포름(Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA)을 사용하였으며 박테리오신 용액 100 μL와 유기용매 100 μL를 섞은 다음 37°C에서 2시간 반응 후 잔존 활성을 측정하였다. 마지막으로 효소에 대한 안정성 시험은 Protease (Tokyo chemical, Tokyo, Japan), Lipase (Tokyo chemical) 및 α-Amylase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였으며, 박테리오신 용액 50 μL에 1 uint의 효소를 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 잔존 활성을 측정하였다. 측정 전에 처리액을 100°C에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화시켰다.

박테리오신 작용 양상

E. faecium CJNU 2008로부터 생산된 박테리오신의 작용 양상을 *L. monocytogenes* KCTC 3569를 지시균으로 사용하여 시험하였다. 즉, 30 mL 펩톤수(0.1%, w/v)에 지시균을 1% 접종하고 박테리오신 용액을 각각 0, 10, 50, 100 AU/mL되게 첨가한 후 2시간 동안 배양하면서 지시균의 생균수(Log CFU/mL)를 MRS 고체배지 상에서 측정하였다.

박테리오신 분자량 측정

부분 정제된 박테리오신의 분자량 확인을 위하여 Tricine-SDS-PAGE (tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하였으며 15% 겔을 사용하여 110 V에서 1시간 30분간 전기영동 한 후 bioassay를 수행하였다[18,19]. 즉, 전개된 겔을 적당한 크기로 자른 후 증류수에서 2시간 동안 세척하였다. 세척한 겔을 MRS 고체배지에 올리고 그 위에 지시균(*L. monocytogenes*)이 포함된 5 mL의 MRS 배지(0.7% agar 함량)를 부었다. 37°C에서 12시간 배양 후 생육저해환을 관찰하여 박테리오신의 위치를 확인하였다.

박테리오신 정제

E. faecium CJNU 2008 균주로부터 생산된 박테리오신의 부분정제를 위해 앞서 언급한 아세톤추출법[16]을 이용하였으며 이를 HPLC (high performance liquid chromatography) 정제에 사용하였다. HPLC 정제를 위해 ACE 5 C_{18} (4.6 × 150 mm) 컬럼(Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, UK)을 사용하였으며 이동상 A용매(물 + 0.1% TFA)와 B용매(아세토니트릴 + 0.1% TFA)를 조합하여 60분 동안 0-10분 A용매 100%, 10-50분 A용매 100% → B용매 100%, 50-60분 B용매 100%의 농도기울기를 적용하였다. 유속은 1 mL/분으로 유지시켰으며 1 mL씩 분획하여 동결건조하였다. 분획에서의 박테리오신 활성은 각각의 분획을 20 μL 3차 증류수에 녹인 다음 앞서 언급한 한천확산법으로 확인하였다.

Results and Discussion

박테리오신 안정성 조사

E. faecium CJNU 2008 균주의 부분정제 박테리오신에 대한 열 안정성을 시험한 결과, 100°C, 60분 열처리를 제외한 모든 열처리 조건에서 안정성을 보였다(Table 1). 특히, 멸균 조건인 121°C, 15분에서도 박테리오신 활성 소실이 전혀 없어 열에 대한 안정성이 아주 우수한 것으로 확인되었다. 유기용매에 대한 안정성 시험을 위해 메탄올, 에탄올, 아세톤, 아세토니트릴 및 클로로포름을 사용하였으며 사용한 모든 유기용매에 대해서 안정성을 나타내었다. 마지막으로 효소(Protease, Lipase 및 α-Amylase)에 대한 안정성을 시험한 결과 Lipase와 α-Amylase 처리에서는 박테리오신의 활성이 유지된 반면 Protease 처리에서는 활성이 완전히 소실되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이 결과

Table 1. Stability of the partially purified bacteriocin of *E. faecium* CJNU 2008

Treatments	Time (min)	Residual activity (AU/mL)
Control (no treatment)		4,000
Heat (°C)		
60	15	4,000
	30	4,000
	60	4,000
80	15	4,000
	30	4,000
	60	4,000
100	15	4,000
	30	4,000
	60	2,000
121	15	4,000
Solvent		
Methanol		4,000
Ethanol		4,000
Acetone		4,000
Acetonitrile		4,000
Chloroform		4,000

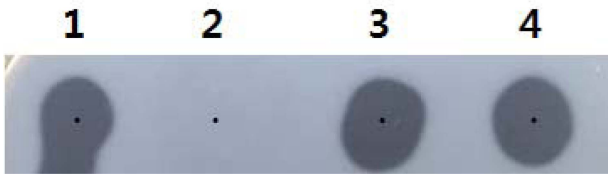

Fig. 1. Stability of the partially purified bacteriocin of *E. faecium* CJNU 2008 for enzymes. 1: Control (no treatment); 2: Protease; 3: Lipase; 4: α-Amylase. For antimicrobial activity test, samples were loaded on MRS agar plate which was overlaid with the indicator strain (*L. monocytogenes* KCTC 3569).

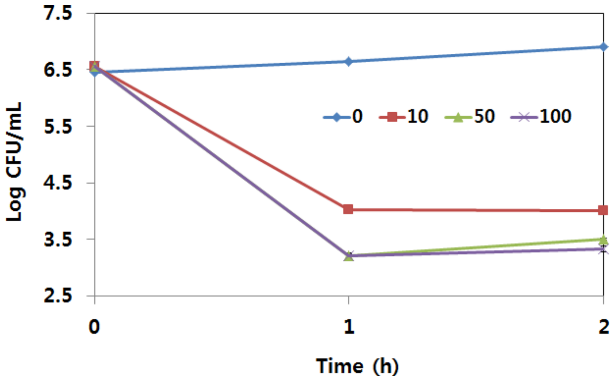

Fig. 2. Bactericidal activity of partially purified bacteriocin from *E. faecium* CJNU 2008 against *L. monocytogenes*. The bacteriocin of 10, 50, or 100 AU/mL was used for the test.

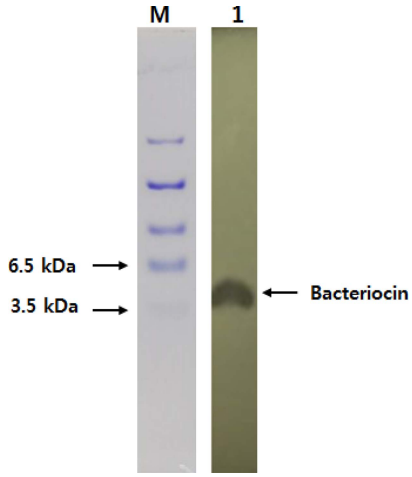

Fig. 3. Tricine-SDS-PAGE of partially purified bacteriocin of *E. faecium* CJNU 2008. M: Size marker (Ultra Low Range Molecular Weight Marker, Sigma-Aldrich, USA); 1: Bioassay for the bacteriocin (indicator: *L. monocytogenes* KCTC 3569).

는 *E. faecium* CJNU 2008 균주가 생산하는 항균물질이 단백질성의 박테리오신임을 추가적으로 증명하는 것이다.

박테리오신 작용 양상

E. faecium CJNU 2008 균주가 생산하는 박테리오신의 작용 양상(정균 혹은 살균)을 확인하였다. 지시균으로 병원성 세균인 *L. monocytogenes* 균주를 사용하여 작용 양상을 시험한 결과, 박테리오신 처리 시 생균수가 감소하는 것을 확인하였으며 박테리오신 농도가 높을수록 감소율이 증가하였다(Fig. 2). 다만, 최종농도 50과 100 AU/mL 사이에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 *E. faecium* CJNU 2008 균주가 생산하는 박테리오신의 작용 양상은 정균(bacteriostatic)이 아닌 살균(bactericidal)작용을 나타내고 있음을 의미하는 것이다. 선행연구[15]에서 *E. faecium* CJNU 2008 균주가 생산하는 박테리오신은 *L. monocytogenes* 균주를 포함하여 *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus* 및 *Leuconostoc mesenteroides* 균주에 대한 항균활성을 보인 반면 *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pediococcus acidilactici* 균주 등에 대해서는 항균활성을 보이지 않았다.

박테리오신 분자량 측정

부분 정제된 박테리오신의 분자량 확인을 위하여 Tricine-SDS-PAGE를 실시하였다. 분석 결과, 분자량이 작아 염색액(Coomassie Brilliant Blue G, Daejung, Siheung, Korea)으로 염색한 겔에서는 단백질 밴드(band)의 확인이 어려웠으며 동시에 수행한 bioassay에서만 특정 위치에서 생육저해환(inhibition zone)이 확인되었다. 이 생육저해환은 박테리오신에 기인하는 것으로 추정되며 그 위치는 6.5 kDa

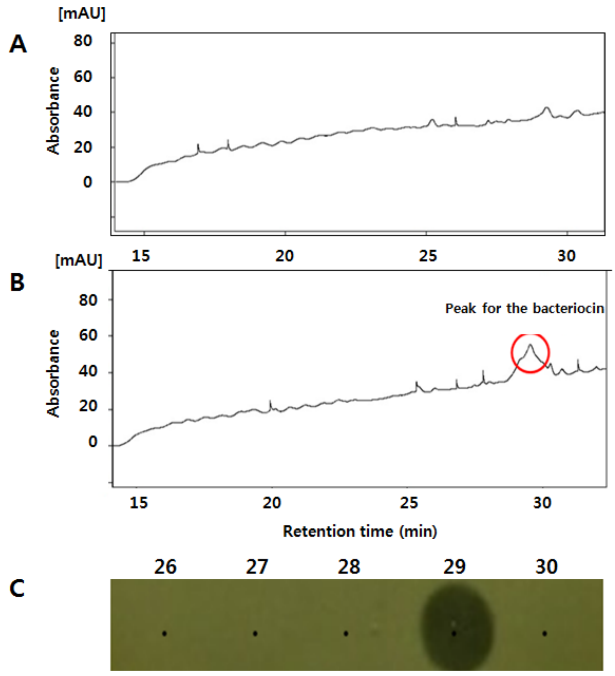

Fig. 4. Purification of the bacteriocin of *E. faecium* CJNU 2008. A: HPLC chromatogram for solvent; B: HPLC chromatogram for partially purified bacteriocin; C: Bacteriocin activity of the fractions from 26-30 min.

이하로 나타났다(Fig. 3).

박테리오신 정제

E. faecium CJNU 2008 균주가 생산하는 박테리오신을 정제하기 위해 아세톤추출법[16]으로 부분정제 한 후 HPLC에 적용하였다. HPLC 분석 결과, 29분대에서 단백질 피크(peak)가 확인되었으며 그 분획(fraction)은 사용한 지시균(*L. monocytogenes* KCTC 3569)에 대하여 항균활성을 나타내었다(Fig. 4). 이렇게 정제된 박테리오신은 앞으로 생화학적인 분석 등에 활용할 계획이다.

지금까지 *Enterococcus* 속 균주가 생산하는 다양한 박테리오신에 대한 특성이 규명되었다[20]. 대부분 분자량이 작은 class II에 속하는 박테리오신이며 일부 lantibiotics와 열에 약한 분자량이 큰 박테리오신이 포함된다. 특히 class II에 속하는 환형(circular)의 박테리오신인 enterocin AS-48은 그람 양성 및 음성 세균 모두에 항균활성을 가지며 화학보존제(오일, 페놀화합물) 및 물리화학적 처리와 병용했을 때 그 효과를 극대화 할 수 있다[21]. 현재까지 케피어에서 분리된 *Enterococcus* 속 균주가 생산하는 박테리오신에 대한 연구는 극히 드물다. 본 연구에서 규명한 *E. faecium* CJNU 2008 균주가 생산하는 박테리오신은 안정성이 우수한 특성(class I 혹은 class II)을 나타내고 있어 천연보존제로서 산업적 활용도가 클 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 부분적인 지원을 받아 연구되었음(과제번호 117060032HD040).

국문요약

박테리오신은 미생물이 생산하는 단백질성의 항균물질이다. 본 연구에서는 *Enterococcus faecium* CJNU 2008 균주로부터 생산되는 박테리오신에 대한 일부 특성을 규명하였다. 부분 정제 박테리오신은 열처리(100°C 30분, 121°C 15분) 및 유기용매(메탄올, 에탄올, 아세톤, 아세토니트릴, 클로로포름)에 대한 안정성이 우수하였으며 효소처리의 경우 Lipase와 α-Amylase에 대해서는 안정하였으나 Protease 처리에서 활성이 소실되었다. 이는 *E. faecium* CJNU 2008 균주가 생산하는 항균물질이 단백질성의 박테리오신임을 추가적으로 증명하는 것이다. 병원성 세균인 *Listeria monocytogenes* 균주를 지시균으로 사용했을 때 박테리오신은 살균(bactericidal)의 작용양상을 보였다. Tricine-SDS-PAGE를 이용한 박테리오신의 분자량은 6.5 kDa 이하로 확인되었다. 부분 정제된 박테리오신을 이용하여 HPLC법을 활용한 정제를 수행하였으며 크로마토그램 상에서 단일 피크를 얻었을 수 있었다. 앞으로 정제된 박테리오신은 생화학적 분석 등에 활용할 계획이다.

References

1. Otes, S., Cagindi, O.: Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan J. Nutr.*, **2**, 54-59 (2003).
2. Guzel-Seydim, Z.B., Kok-Tas, T., Greene, A.K., Seydim, A.C.: Review: functional properties of kefir.*Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**, 261-268 (2011).
3. Altay, F., Karbancıoglu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., Heperkan, D.: A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: microbiota, fermentation process and quality characteristics.*Int. J. Food Microbiol.* **167**, 44-56 (2013).
4. Seydim, Z.B.: Studies on fermentative, microbiological and biochemical properties of kefir and kefir grains. Ph.D. Dissertation, Clemson Uiversity, Clemson, SC, USA (2001).
5. Chon, J.W., Kim, H.S., Song, K.Y., Kim, D.H., Kim, H.S., Yim, J.H., Choi, D.S., Hwang, D.G., Kim, Y.J., Lee, S.K., Seo, K.H.: Functional characterictics of kefir as a fermented dairy product: A Review. *J. Milk Sci. Biotechnol.* **31**, 99-108 (2013).
6. López-Cuellar, M.R., Rodríguez-Hernández, A.I., Chavarría-Hernández, N.: LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnol. Biotechnologic. Equip.* **30**, 1039-1050

(2006).
7. Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C.: Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 95-105 (2013).
8. Riley, M.A., Wertz, J.E.: Bacteriocins: evolution, ecology, and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 117-137 (2002).
9. Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P.: Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 777-788 (2005).
10. Perez, R.H., Perez, M.T.M., Elegado, F.B.: Bacteriocins from lactic acid bacteria: A review of biosynthesis, mode of action, fermentative production, uses, and prospects. *Int. J. Philippine Sci. Technol.* **8**, 61-67 (2015).
11. McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C.: Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 285-308 (2001).
12. Klaenhammer, T.R.: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 337-349 (1988).
13. Bastos, M.C.F., Coutinho, B.G., Coelho, M.L.V.: Lysostaphin: A staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals* **3**, 1139-1161 (2010).
14. Yang, S.C., Lin, C.H., Sung, C.T., Fang, J.Y.: Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.* **5**, 241 (2014).
15. Seo, S.J., Moon, G.S.: Isolation of a bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strain from kefir. *Curr. Top. Lactic Acid Bac. Probio.* **4**, 54-58 (2016).
16. Chung, D.M., Kim, K.E., Jeong, S.Y., Park, C.S., Ahn, K.H., Kim, D.H., Kang, D.O., Chun, H.K., Yoon, B.D., Koh, H.B., Kim, H.J., Choi, N.S.: Rapid concentration of some bacteriocin-like compounds using an organic solvent. *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 1457-1459 (2011).
17. Daeschel M.A.: Procedures to detect antimicrobial activities of microorganisms. In: Food biopreservatives of microbial origin. Ray, B. and Daeschel, M. (eds) CRC Press, FL, pp. 57-80 (1992).
18. Moon, G.S., Pyun, Y.R., Park, M.S., Ji, G.E., Kim, W.J.: Secretion of recombinant pediocin PA-1 by *Bifidobacterium longum*, using the signal sequence for bifidobacterial α-amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5630-5632 (2005).
19. Eom, J.E., Moon, S.K., Moon, G.S.: Heterologous production of pediocin PA-1 in *Lactobacillus reuteri*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1215-1218 (2010).
20. Ness, I.F., Diep, D.B., Ike, Y.: Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds.) Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary (2014).
21. Grande Burgos, M.J., Pulido, R.P., Del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., Lucas, R.: The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 22706-22727 (2014).