

항균성 보존물질 생산을 위한 미생물의 분리 및 특성

유진영

(미생물연구실)

I. 서론

식품의 보존에는 전래적으로 가열이나 동결, 건조 등 물리적 방법으로서 보존 하거나 식품의 산성화, 소금이나 설탕을 이용한 절임 및 훈연 등의 방법이 이용되어 왔으며 합성 보존제로서 Benzoic acid, sorbic acid, propionate, sulfite, acetate, nitrate 등도 사용되어 왔다. 식품변패에 관련된 미생물을 저해하는 물질로서는 항균성 물질이 있는데 보존용으로 이용되었을 경우 부차적인 부작용을 주지 않는 것은 많지 않다. 그러나 미생물이 생산하는 항균성물질 중에는 효소에 의하여 쉽게 분해되는 독성이 많지 않은 것들이 알려져 왔으며 이들중 하나가 bacteriocin이라는 이름으로 보고되어 있다. 이 Bacteriocin은 Jacob등이 명명한 바와 같이 여러가지 특성에서 일반 항생 물질과는 구분되는 natural antibiotic이다. Bacteriocin은 여러가지 세균에 의하여 생산되고 그 대부분이 저 분자량의 단백질로 구성되어 있으며, 오직 유사한 종에만 작용을 한다고 알려져 있다(1, 2). 지금까지 알려진 bacteriocin의 종류는 colicins, alveicins, cartovoricins, arzonacins, cloacins, marcescins, pneumocins, aerocins, fluocins, pyocins, pesticins, megacins, monocins, cercicins, enterococcins, staphylococcin등이 있으며(3), 같은 family의 균일 지라도 활성 spectra가 서로 다른 형태의 bacteriocin을 생산하는 것으로 알려져 있다.

이와 같은 여러가지 bacteriocin중 식품의 가공 및 저장과 관련되는 균에 의하여 생성되는 bacteriocin이 있는데 대표적으로 *Pediococcus* sp.(4, 5), *Lactobacillus* sp.(6, 7, 8), *Leuconostoc* sp.(9), 및 *Strepto-*

coccus sp.(10, 11) 등의 젖산균이 생산하고 있다. 이들 bacteriocin은 bulgarican, lactobrevin, lactolin, diplococcin, nisin 등으로 명명되어 부패 세균 및 식품 위해균에 대한 항균작용이 검토된 바 있으나 실제 식품산업에 응용되고 있는 것은 nisin뿐으로 이미 구미에서는 긍정적으로 인정한 사례가 있다(12). Nisin은 주로 유제품 및 육류의 품질보존, 통조림 제품의 살균 등의 여러식품에서 가능성이 조사되어 있다(13-15).

한편 국내에서는 박 등(16)이 생육저해 작용이 있는 젖산균을 김치에서 분리하여 여러 균에 대한 저해 양상을 조사하였으며 이 균(*pediococcus* sp.)의 plasmid DNA를 분리한 바 있다(17). 정 등(18)은 *Lactobacillus acidophilus*의 bacteriocin특성에 관하여 유 등(19)은 nisin생산의 kinetics에 대하여 연구 보고하였으나 전체 연구현황은 미미한 편이다.

이와같이 bacteriocin은 식품 보존에 이용될 수 있는 가능성이 시사되고 있으며 저분자의 단백질로 구성되어 체내 흡수시 쉽게 분해될 수 있는 등 일반 항생물질이나 보존제보다 안전성의 측면에서 잇점을 지닐 수 있다. 따라서 본 연구에서는 원유등으로부터 bacteriocin유사물질을 생산하는 균주를 screening하여 선발 균주의 몇가지 특성을 조사하였기에 결과를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 채취 및 균주 분리

항균성물질 생산미생물의 분리를 위하여 우유가 공공장에서 집하되는 원유를 채취, 0.1% peptone

희석수에 단계적으로 희석한 후 MRS 한천평판위에 고루 도말하여 35°C에서 24-48 시간 배양한 후 젖산균을 중심으로 순수분리 하였다. 분리균주는 MRS 한천사면배지에 접종, 16시간 배양하여 4°C 냉장고에 보관하였다.

2. 항균성물질 생산균주의 검색

분리균을 MRS broth에 접종. 35°C에서 20시간 배양시킨 후 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014에 대한 항균력의 유무를 agar diffusion assay(20)를 이용하여 검색하였다. 비교 물질로서는 Aplin & Barrett 사의 Nisin(10⁶ IU/ml)을 사용하였으며, 항균물질의 농도와 저지원의 직경을 비교하여 상대적인 값으로 표현하였다.

3. 분리균주의 동정

분리균의 형태는 gram 염색 후 현미경(Nikkon APOPHOT H, Nippon Kogaku K. K., Japan)으로 관찰하였다. 분리균주의 동정은 Bergey's manual of Determinative Bacteriology(21), Manual of Methods for General Bacteriology(22) 및 The Prokaryotes(23)에 기술된 일반적인 방법에 준하였다.

4. 분리물질의 분리 및 특성 조사

물질의 특성 조사를 위한 시료는 12시간 배양한 발효액에 염산을 가하여 추출한 후 세포를 제거하고 이 추출액에 methanol을 1 volume을 넣어 침전물을 제거하였으며 다시 상등액에 acetone을 첨가하여 4 volume에서 7 volume 사이의 침전물을 얻었다. 이 물질은 우선 0.05N 염산에 용해한 다음 UV spectrum을 조사하였고 일부는 분취하여 Amicon YM-2(Cut-off: Mw1,000)로 분별한후 활력이 있는 분자량 1,000 이상인 부분에 대하여 전기영동을 실시하였다. 효소에 의한 활력의 소실여부는 추출된 물질에 Sigma 사의 효소를 모두 200 unit/ml의 농도로 첨가하여 반응시켜 조사하였다. 반응시간은 pronase와 lysozyme은 28°C에서 18시간, 기타효소는 37°C에서 2시간, 반응 pH는 phosphatase 8.5 기타는 6.5 이었다. 이때 분리물질 및 nisin의 역가는 2,561 및 2,000 IU/ml 이었다.

III. 결과 및 고찰

1. 항균성 물질 생산 미생물의 검색 및 분리균주의 항균 spectrum 조사

원유로부터 분리한 젖산균 3172균주중에서 항균성을 나타내는 균 1112-1을 분리하였는데 gram 양성 및 음성균에 대한 항균 spectrum을 얻은 결과 분리된 균은 시험에 사용된 gram 양성 및 음성균에 대하여 넓은 항균 spectrum을 보였으며 간균 및 구균에 대하여 높은 항균력을 보여 주었다. 가장 민감한 저해를 받는 미생물은 gram 음성균의 *Aeromonas hydrophila*와, gram 양성균인 *M. luteus*, *L. helveticus*, *B. subtilis*이었으며 intoxication에 의한 식중독원인균인 *Staphylococcus aureus*가 저해를 받는 것은 특이한 관심의 대상이었다. *Streptococcus lactis*가 생산하는 nisin *Neisseria* sp.의 몇 균주를 제외하고는 gram 음성균에 저해작용을 나타내지 않으나(10) *Leuconostoc citrovorum*(9), *Streptococcus thermophilus*(24) 등은 gram 양성 및 음성균에 함께 저해작용을 하는 물질을 생산한다고 보고되어 있다.

2. 분리균주의 항균력 및 비증식 속도

분리된 미생물을 포도당배지에 배양하면서 specific growth rate와 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014에 대한 항균력을 조사한 결과 inhibition zone의 직경은 2.32cm, specific growth rate는 0.92 h⁻¹로 우수하였다. 한편 1112-1 균주의 발효액에 catalase를 첨가한 후 항균력을 조사하여 본 결과 항균력이 소실되지 않았으므로 생성된 물질이 hydrogen peroxide에 의한 것이 아님을 확인하였다.

3. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014의 증식에 미치는 저해 정도

선발한 1112-1 균주가 생산하는 항균성물질이 피검균의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 항균성물질을 MRS broth에 230 IU/ml의 농도로 첨가한 후 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014의 배양액을 5%되게 접종한 다음 배양시간에 따른 증식의 차이를 비교한 결과 Fig.1과 같다. 즉 대조구는 배양 9시간 후에 흡광도가 1.348, 20.5시간 후에 3.824를

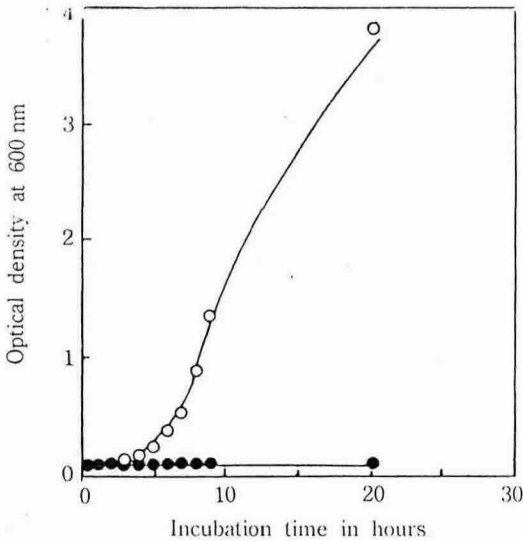


Fig. 1. Growth curve of *Lactobacillus plantarum* at 35°C as affected by culture extract of isolate 1112-1(Activity : 230IU/ml).

(○) *Lactobacillus plantarum*; (●) *Lactobacillus plantarum* + culture extract

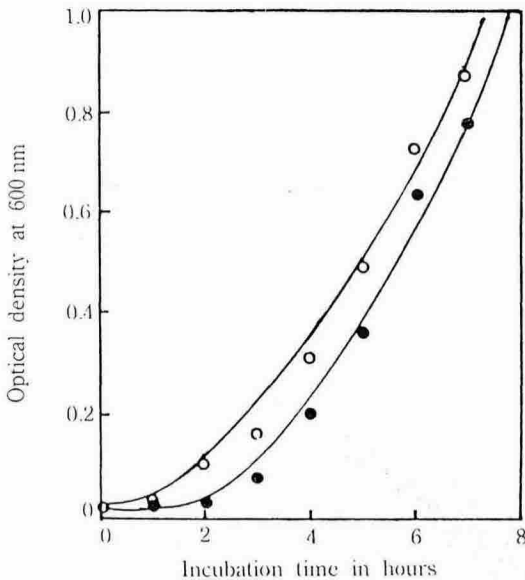


Fig. 2. Growth curve of *Escherichia coli* k-12 at 37°C as affected by culture extract of isolates 1112-1(Activity : 500IU/ml).

(○) *E. coli* K-12; (●) *E. coli* K-12 + culture extract

나타낸 반면 항균성물질을 첨가하면 증식이 완전히 억제됨을 보여 주었다. 한편 gram 음성균인 *E. coli*에 대한 증식 저해에 대한 결과는 Fig.2와 같다. 즉 항균성물질을 500 IU/ml의 농도로 첨가한 경우, 배양 후 약 7시간을 기준으로 대조구에 비해 11% 정도의 증식 저해를 받는 것으로 나타났으나 *Lactobacillus plantarum*에 비하여 저해 농도는 미약하였다.

4. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014에 대한 항균물질의 작용특성

1112-1균주가 생산하는 항균성물질의 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014에 대한 작용특성을 조사하기 위하여 2561 IU/ml의 culture extract를 pH 6.5로 조절한 후 시험관에 5ml씩 분주하고, 피검균을 현탁시킨 다음 경시적으로 흡광도의 변화를 조사하였다. Fig.3에 나타난 바와 같이 시간이 경과함에 따라 균체 현탁액의 흡광도는 감소하는 경향으로 나타나 피검균이 항균물질에 의하여 용균되는 것으로 판단되었다(4, 25). *Pediococcus acidilactici*가 생산하는 bacteriocin은 ATP나 단백질, 핵산 등의 합성저해를 하는 것으로 보고되어 있으며(26, 27) 기타요인으로는 transportation system의 저해 및 원

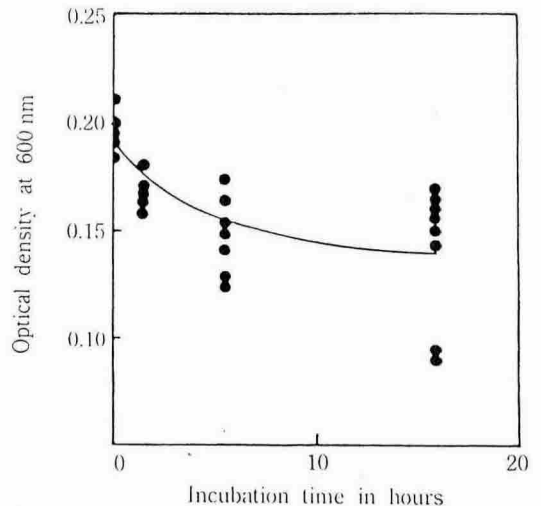


Fig. 3. Mode of action of culture extract of isolate 1111-2 against *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 as reflected by optical density at 600nm(Activity : 2561IU/ml).

형질막의 투과성 저해가 보고되어 있다.

5. 분리물질의 특성

1112-1 균주가 생산하는 항균성물질의 특성을 조사하기 위하여 culture extract를 염산처리에 의하여 얻은 후 methanol과 acetone으로 처리하여 부분 정제물을 얻고, 이 물질을 0.05N Hcl에 녹여 UV spectrum을 얻은 결과 230-290nm에서 absorption을 보여 이 물질이 단백질의 물질임을 시사하고 있어 1112-1 균주가 생산하는 항균성 물질이 bacteriocin 유사물질임을 시사하여 주었다.

선발된 1112-1 균주가 생산하는 항균물질의 효소에 대한 민감도를 조사하기 위하여 발효가 종료된 발효액을 acid extraction 및 원심분리에 의하여 유효성분을 얻고, 이 용액에 효소를 200 unit/ml가 되게 첨가하여 반응시킨 후 *Lactobacillus plantarum*

ATCC 8014에 대한 inhibition을 검토한 결과는 Table 1과 같다. 즉 carboxypeptidase A (Bovine Pancreas), elastase(Porcine pancreas) alpha amylase (*Asp.oryzae*), amyloglucosidase (*Rhizopus* sp.), pronase (*Streptomyces griseus*), protease IV(*Streptomyces caespitosus*), alpha chymotrypsin (Bovine pancreas) ficin(Fig tree latex), cellulase (*Aspergillus niger*), phosphatase (Bovine intestinal mucosa), lipase (*Candida cylindracea*)에 의하여 항균력이 상실되었고, alpha amylase(human saliva), catalase (*Aspergillus niger*), trypsin (Bovine pancreas), lysozyme(Egg white)에 의하여는 영향을 받지 않았다. 한편 Aplin & Barrett사의 Nisaplin(2000IU/ml)을 이용하여 비교한 결과 alpha chymotrypsin, phosphatase, lipase에 의하여 분해되는 것이 상이하였다. Bacteriocin은 일반적으로 단백질 유사물질로서 정의되고 있으나 *E. coli*나 *Lactobacillus fermentii*(6) 에서는 지방질과 탄수화물이 함유된 bacteriocin이 보고된 바 있다.

SDS-PAGE에 의해 지방 분자량을 검토해 본 결과는 Fig. 4와 같으며 본 물질의 분자량은 5,900으로

Table 1. Effect of various enzyme on the antimicrobial activity of Bacteriocin 1112-1

Enzyme	1112-1	Nisin	
		This study	Ref.
Carboxypeptidase	-	-	+*
Elastase	-	-	+*
Alpha amylase	-	-	+**
Alpha amylase	+	+	nd
Amyloglucosidase	-	-	nd
Pronase	-	-	**
Protease IV	-	-	nd
Catalase	+	+	nd
Alpha chymotrypsin	-	+	+**
Ficin	-	-	**
Cellulase	-	-	nd
Trypsin	+	+	+**
Phosphatase	-	+	+**
Lipase	-	+	nd
Lysozyme	+	+	nd

Activity was measured by disc assay method using *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Enzyme concentration: 200 unit/ml

Activity: 2561 IU/ml, (-) means the loss of activity *Hurst, A(1981)⁽¹²⁾

**Carminati, et al. (1989)⁽²⁸⁾, nd: not determined

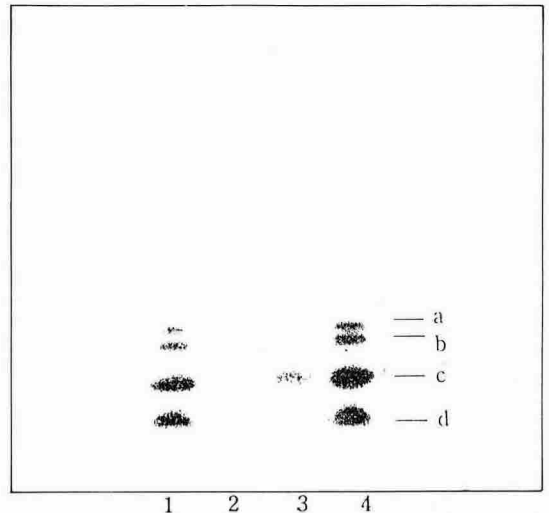


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of MW markers and partially purified bacteriocin 1112-1.

Lane 1, 4: MW marker (LKB 1860-101) a, 16950; b, 14400; c, 8160; d, 2510

Lane 2, 3: Partially purified bacteriocin 1112-1 (Retenate of MeOH/Acetone ppt on YM-2 membrane, cut-off; 1000)

추정되어, Aplin & Barrett사의 Nisaplin(MW 3000-4000)보다 큰것으로 나타났다.

6. 분리균주의 특성확인

항균성물질을 생산하는 분리균주, 1112-1의 특성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 즉, 현미경으로 고찰한 결과 모두 elongated cell인 gram 양성 구균으로서 homo-fermenter이며, 2-6개의 chain으로 되어 있는 *Lactococcus*속으로 판단되었다. 한편 본 분리균은 galactose와 fructose에 대한 반응이 late positive이며, 또한 *Streptococcus lactis*와 비교할 때 1112-1균주는 lactose가 음성, sucrose와 maltose가 late positive, mannitol이 양성, salicin이 양성인 점에서 같지 않았으므로 본 1112-1균은 *Lactococcus*속의 균으로 추정될 뿐 완전한 종은 구분할 수 없었다.

IV. 요약

원유로부터 bacteriocin을 생산하는 미생물을 분리하고 이 균주들을 중심으로 *Lactobacillus plantarum*을 target organism으로 하여 항균력을 비교하였다. 분리된 항균성물질들은 gram 양성 및 음성균에 대하여 넓은 항균 spectrum을 보였으며 선발균주중 최종적으로 항균력이 가장 높은 1112-1을 우량균주로 선발하였다. 선발한 1112-1 균주의 항균성물질 230 IU/ml첨가시에 *Lactobacillus plantarum*의 생육은 완전히 억제되었으며 500 IU/ml첨가시 *E. coli*의 생육은 대조구에 비하여 11%억제되었다. 분리된 물질은 단백태 물질로 판단 되었고, 아세톤 부분 정제물은 alpha amylase(human saliva), catalase, trypsin, lysozyme등의 효소에 내성이 있었고, 분자량은 5, 900 정도로 추정되었다. 분리된 1112-1 균주는 형태학적으로 2-6개의 사슬을 만드는 gram양성 구균으로서 정상 젖산발효균인 *Lactococcus* sp.인 것으로 판단되었다. 이 균의 생화학적 특성은 maltose 및 sucrose가 late positive, lactose가 음성, mannitol 및 salicin이 양성인 것이 *Streptococcus lactis*와 다른 특징 이었다.

Table 2. Differential characteristics of the isolate 1112-1

Strain	1112-1	<i>S. lactis</i>
Gram reaction	+	+
Cell in chain and pairs elongated	+	+
Catalase	--	-
Anaerobiosis	+	**
Growth at 10°C	+	+
Growth at 42°C	-	**
Growth at 45°C	-	-
Gas from glucose	-	-
Growth at pH 9.6	-	-
Growth at 4.0% NaCl	+	+
Growth at 6.5% NaCl	--	--
0.1% Methyleneblue	+	**
Hippurate hydrolysis	+	d
Esculin hydrolysis	-	d
Arginine dihydrolase	+	+
Voges Proskauer	-	**
Acid from		
Rhamnose	--	-
Sorbitol	--	**
Mellibiose	--	-
Sorbitol	--	--
Trehalose	--	--
Ribose	+	+
Inulin	-	-
Mannose	+	**
Raffinose	-	-
Arabinose	-	-
Mellezitose	-	**
Lactose	-	+
Maltose	+	+
Mannitol	+	-
Sucrose	+	-
Salicin	+	-
Galactose	+	+
Fructose	+	**

** : not determined, +* : late positive d : variable reaction

참 고 문 헌

1. Foulds, J. 1972. *J. Bacteriol.*, **110**, 1001
2. Klaenhammer, 1988, T.R.: *Biochimie.*, **70**, 337
3. Reeves, P. 1965. *Bacteriological Review*, **29**, 24
4. Bhunia, A.K., M.C. Johnson and B. Ray: 1988, *J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 261
5. Fleming, H.P., J.L. Etchell and R.N. Costilow, 1975. *Appl. Environ. Microbiol.*, **30**, 1040
6. de Klerk, H.C. and J.A. Smit, 1967. *J. Gen. Microbiol.* **48**, 309
7. Shahani, k.M., J.R. Vakil and A. Kilara. 1977. *Cultured Dairy Products J.* **12**, 8
8. Reddy, G.V., K.M. Shahani, B.A. Friend and R.C. Chanfra; 1983. *Cultured Dairy Products J.* **18**, 15
9. Branen, A.L., H.C. Go and P.P. Genske, 1975, *J. Food Sci.*, **40**, 446
10. Mattick, A.T.R. and A. Hirsch, 1947. *Lancet*, **ii**, 5
11. Davey, G.P. and B.C. Richardson; 1981. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 84
12. Hurst, A., 1981. *Adv. Appl. Microbiol.*, **27**, 85
13. Hirsch, A., 1951. *J. Gen. Microbiol.* **5**, 208
14. Rayman, M.K., B. Aris and A. Hurst, 1981. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 375
15. Gupta, R.K. and D.N. Prasad, 1988. *Cultured Dairy Products J.*; **8**, 17
16. 박연희, 권정주, 조도현, 1983. 한국농화학회지, **26**, 35
17. 박연희, 류옥상, 조도현, 1988. 한국농화학회지, **31**, 33
18. 정영건, 안장연; 권오진, 강주희, 1989. 한국산업미생물학회지, **17**, 94
19. 유진영, 최신양, 진영옥, 구영조, 정건섭, 1989. 한국산업미생물학회지, **17**, 504
20. Tramer, J. and G.G. Fowler, 1964. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 522
21. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, 1986. *Bergey's manual of Sytematic bacteriology, Williams & Wilkins, Vol. 2*, 1045
22. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips, 1981. *Manual of Methods for General bacteriology*, American Society for Microbiology, 416
23. Starr, M.P., Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schleggel, 1981. *The Prokaryotes*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, Vol. II, 1667
24. Pulusani, S.R., D.R. Rao and G.R. Sunki, 1979. *J. Food Sci.*, **44**, 575
25. Barefoot, S.F. and T.R. Klaenhammer, 1983. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1808
26. Zajdel, J.K., P. Ceglowski and W.T. Dobrzanski, 1985. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 969
27. Galvez, A., E. Valdivia, M. Martinez and M. Maqueda, 1989. *Can. J. Microbiol.*, **35**, 318
28. Carminati, D., Giraffa, G. and Bossi, M.G., 1989. *J. Food Prot.*, **52**, 9, 614.