

## 김치 발효에 관여하는 젖산균에서의 Bacteriocin의 검색

조재선 · 정성제 · 김영목 · 전역한\*  
경희대학교 식품가공학과

### Detection of the Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria Involved in Kimchi Fermentation

Cho, Jae-Sun, Sung-Je Jung, Young-Mok Kim and Uck-Han Chun\*

Department of Food Technology and Science, Kyunghee University,  
Kyungki-do 449-701, Korea

**Abstract** — Lactic acid bacteria in Kimchi fermentation were tested for inhibitory activity against Gram positive bacteria and Gram negative bacteria. The *Lactobacillus brevis* (KCCM 35464) was found to produce an antimicrobial substance. It showed relatively wide range of inhibition spectrum against gram positive and gram negative bacteria and maintained the inhibitory activity between pH 4.0 and pH 9.0. The antimicrobial substance was obtained in the stationary growth phase and was purified by gel chromatography. The inhibitory effect of the antimicrobial substance on sensitive bacterial strains was determined by filter paper test. The activity of antimicrobial substance was stable at 75°C. On the basis of its electrophoretic pattern is SDS-PAGE, antimicrobial substance appeared as a single band of 59 KDalton.

*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* 등의 젖산균은 우유, 육류, 과일, bakery product와 채소를 포함한 다양한 천연 식품에서 젖산발효로 보존성을 증가시켜 주는 역할을 한다. 젖산균에 의해서 생성되는 항균성 물질에는 유기산 이외에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diacetyl 및 bacteriocin 등이 알려져 있다.

Bacteriocin은 다른 항생제와 구별이 되는 항균 활성을 가지고 있는 천연 항생 물질로서 gram 양성균과 gram 음성균의 생육에 영향을 미치는 단백질성 항생 물질이다(1).

젖산균에서 생산되는 bacteriocin의 생리화학적 성질과 유전학적 특성, 그리고 식품의 적용 조절과 안정성에 대해서 Dueschel과 Klaenhammer(2)는 pediocin A라 명명된 bacteriocin이 gram 양성균에 폭 넓은 저해 작용을 나타낸다고 보고하였다. 특히, pediocin A 생성균주를 사용하므로써 소세지 발효 중 *Staphylococcus*의 문제점을 해결하고 또한 채소 발효를 위한 순수 배양에 유용하게 사용될 수 있다고 하였다. 최근에 Foegeding 등(3)은 pediocin PA-1이 소세지발효와 건조 공정에서 *Lis. monocytogene*의 균수를 줄이는 데 효율적인 것을 보고하였다. Mu-

riana와 Klaenhammer(5)는 *Lb. acidophilus* 88로부터 lactacin F의 생산을 보고하였다. 이것은 lactacin B와 유사한 내열성, 단백질성 성질, 항균 범위, 혐기성 상태에서 pH에 의존한 생산성 등을 나타내었고(5) 또한, lactacin F는 민감한 균의 막에 계면 활성제와 같이 작용하여 세포 기능을 파괴시킨다(6). Anderson (7)은 발효 당근으로부터 분리한 *Lb. plantarum* SIK-83의 bacteriocin 생산을 보고하였다. 내열성을 가진 순수 항균 물로(100 KDa) *Stph. aureus*를 포함한 다른 gram 양성균의 성장을 저해하였다. 비록, 완전한 gram 음성 세포에서는 항균 작용이 나타나지 않았지만, gram 음성 세포의 spheroplast가 소멸되었을 때에는 항균 작용이 나타났다. 그는 *Lb. plantarum* SIK-83은 *Lactobacillus*, *Leuconostoc streptococcus*와 *Pediococcus*를 포함하여 폭 넓은 항균 범위를 나타내므로 채소와 목초와 같은 식물 재료의 젖산균 발효 조절에 적용하기를 제외하였다(8). 1991년에 cheddar cheese로부터 분리한 *Leu. mesenteroides* UL5에서 여러 *Lis. monocytogene*에 항균성을 나타내는 mesenterocin 5를 발견하였지만 *lactobacilli*에는 영향을 끼치지 않았다. 그것은 상대적으로 열에 안정하고(100°C for 30 min) 부분적으로 chloroform에 의해 변성되었고, 후기 지수기의 성장에서 발견되었고 정지기에서는 활성이 크게 줄었다(9).

**Key words:** Bacteriocin, lactic acid bacteria, antimicrobial activity

\*Corresponding author

Bacteriocin은 상대적으로 큰 분자 크기로 인하여 사람의 순환계에서 용해와 확산에 문제가 있고 소화계의 다양한 proteolytic 효소에 의해 분해되며 좁은 항균 범위 때문에 medical antibiotic 만큼 많은 효율성을 갖고 있지는 않지만 다양한 발효 식품에서 *Listeria*나 *Clostridium*과 같은 병원균을 포함한 microflora의 bioregulator로서 중요하다. 최근 발효 식품의 풍부함과 다양함은 bacteriocin 연구에 박차를 가하여 새로운 bacteriocin을 발견하고 그것의 생산물은 발효 식품의 원료로서 전통적인 식품 저장물에 대체할 수 있는 천연 bioregulator 또는 biopreservative로서 급속하게 발전되고 있다.

본 실험에서는 김치 발효에 관여하는 bacteria인 젖산균을 가지고 gram 양성 및 음성균주에 대한 생육 저해 작용 여부를 관찰하였고 젖산균 중에서 *Lactobacillus brevis* KCCM 35464에서 분리한 항균 물질의 이화학적 특성과 분자량을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Leucostoc mesenteroides* KCCM 3547, *Lactobacillus brevis* KCCM 35464, *Pediococcus acidilactici* KCCM 11728, *Bacillus subtilis* 1914, *Corynebacterium xerose* 9105, *Micrococcus luteus* 3063, *Mycobacterium phlei* 2192 등의 gram 양성균과 *E. coli* JM 109, *E. coli* LE 392, *E. coli* Y 1090, *E. coli* C 600, *E. coli* JM 101, *Proteus vulgaris* 2433, *Pseudomonas aeruginosa* 1636, *Serratia marcescens* 1299 등의, gram 음성균을 이용하여 저해 작용 여부에 관한 실험을 하였다. 젖산균과 *E. coli*는 본 실험실에서 보관 중인 것을 사용하였고 나머지 균주는 수원대학교 생물학과 실험실로부터 분양 받았다. 젖산균은 MRS 액체 배지에서 2일 간격으로 30°C에서 계대배양하여 사용하였고 *E. coli*는 LB 액체 배지에서 같은 방법으로 배양하여 사용하였고 나머지 균주는 nutrient 액체 배지에서 배양하였다. 또한 균주를 MRS 배지 및 LB 배지에 배양한 후 배양액에 80% glycerol을 40 : 60으로 혼합한 다음 냉동고에 보관하여 사용하였다.

### 배지

*Lb. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *Lb. brevis*, *P. acidilactici*는 MRS 액체 배지에서 2일간 30°C에서 계대 배양하여 각각 10%를 MRS 액체 배지에 접종하여 사용하였다. MRS 배지의 pH는 6.2로 조정하였

Table 1. Composition of MRS media

Components	Concentration
Proteose peptone No. 3	10.0 g
Beef extract	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g
Diammonium citrate	2.0 g
Glucose	20.0 g
Tween 80	1.0 ml
Sodium acetate	5.0 g
Magnesium sulfate	0.5 g
Manganese sulfate	0.25 g
Distilled water to 1 l	

고 LB 배지의 pH는 7.0, 그리고 nutrient 배지의 pH는 7.0으로 조정하여 사용하였다.

### 실험 방법

생육 저해 작용을 조사한 방법은 다음과 같은 여과지법에 따라 사용하였다.

MRS agar 위에 30°C에서 24시간 배양한 시험균액을 soft agar(0.75% agar)에 1% 접종하여 덮은 후 S & S paper(Schleicher and Schuell, 1/2 in) disc로 젖산균을 묻혀 30°C에서 24시간 배양한 후 paper disc 주위에 2 mm 이상 생육 저지대가 생긴 경우 저해 작용이 있는 것으로 판정하였다. *Lb. brevis*를 30°C에서 18시간 배양한 후 5,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 나온 배양액에서 pellet을 버리고 다시 동일 시간과 회전속도로 원심 분리하여 나온 floating pellet과 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.3) 10 ml에 녹여 Sephadex G-100(Pharmacia Fine Chemicals) column(25.4×910 mm)에 유속 0.24 cm/min로 시료를 통과시키면서 50 방울씩 분획하여 여과지법에 따라 생육 저해 작용을 조사하고 각 분획 별로 Lowry assay(10)에 따라서 단백질 양을 조사하였다.

Gel chromatography로 분리한 시료에서 활성이 가장 잘 나타난 13~21번까지의 시료를 Novex에서 정한 protocol에 따라 변성시킨 상태에서 SDS-PAGE(12%)를 시행하였다. Marker로는 Novex사의 Wide-range protein standard를 사용하였다. 분획한 시료의 pH에 대한 안정성은 시료를 pH 3~9까지 조정된 완충 용액 1.5 ml와 혼합한 뒤 다른 젖산균에 대한 항생활성을 측정하였다.

열 안정성 조사는 35°C로부터 10°C 간격으로 85°C까지, 그 이상은 autoclave(15 min at 121°C)로 각각 처리하여 생육 저지대를 관찰하였다.

결과 및 고찰

젖산균의 생육 저해 작용

지금까지 김치 발효에 관련된 젖산균을 사용하여 gram 양성균 및 gram 음성균에 대하여 생육 저해 작용을 조사하였다(Table 2). 이들 젖산균의 생육 저해 작용은 같은 젖산균에서는 활성이 강하게 나타나지 않았지만 *E. coli*의 경우는 활성이 크게 나타났다.

*L. lactis* subsp.에 의해 생산되는 nisin은 gram 양성균에는 항균 작용이 크게 나타나지만 gram 음성균에는 활성이 나타나지 않았다고 보고되었다. Nisin이 존재할 때 세균 포자의 성장을 저해하며 nisin은 산에 안정성이 있고 pH가 낮을 때 강한 활성을 보인다.

*Pediococcus acidilactici*에 의해 생산되는 pediocin AH는 gram 양성 세균의 표면에 흡착하여 칼륨과 다른 세포 구성분의 손실을 일으키는 원인이 되게 한다. *Lactobacillus acidophilus*가 생산하는 lactacin B는 *Enterococcus faecalis* 뿐만 아니라 다른 *Lactobacillus* 종에 항균 작용을 나타낸다.

Fig. 1은 *Lb. brevis*의 성장 곡선과 각 시간대의 항균 활성을 나타낸 결과이며 정지기의 성장기인 18 h에서 활성이 가장 강하게 나타났다.

Fig. 2는 젖산균에 의한 *E. coli*의 생육 저해 결과를 나타내었다. 사진 1은 0.75%의 soft agar에 1%의 *E.*

*coli* C 600을 접종하여 a: *Lb. brevis*, b: *Leu. mesenteroides*, c: *Lb. plantarum*, d: *P. acidilactici*의 각 배양액을 S & S paper disc에 묻혀 저지대를 나타낸 것이고 사진 2는 *E. coli* LE 392, 사진 3은 *E. coli* Y 1090을 사진 4는 *E. coli* JM 109 사진 5는 *E. coli* JM 101에 위에서 서술한 a, b, c, d의 배양액을 각각 paper disc에 묻혀 생성된 생육 저지대를 나타내었다.

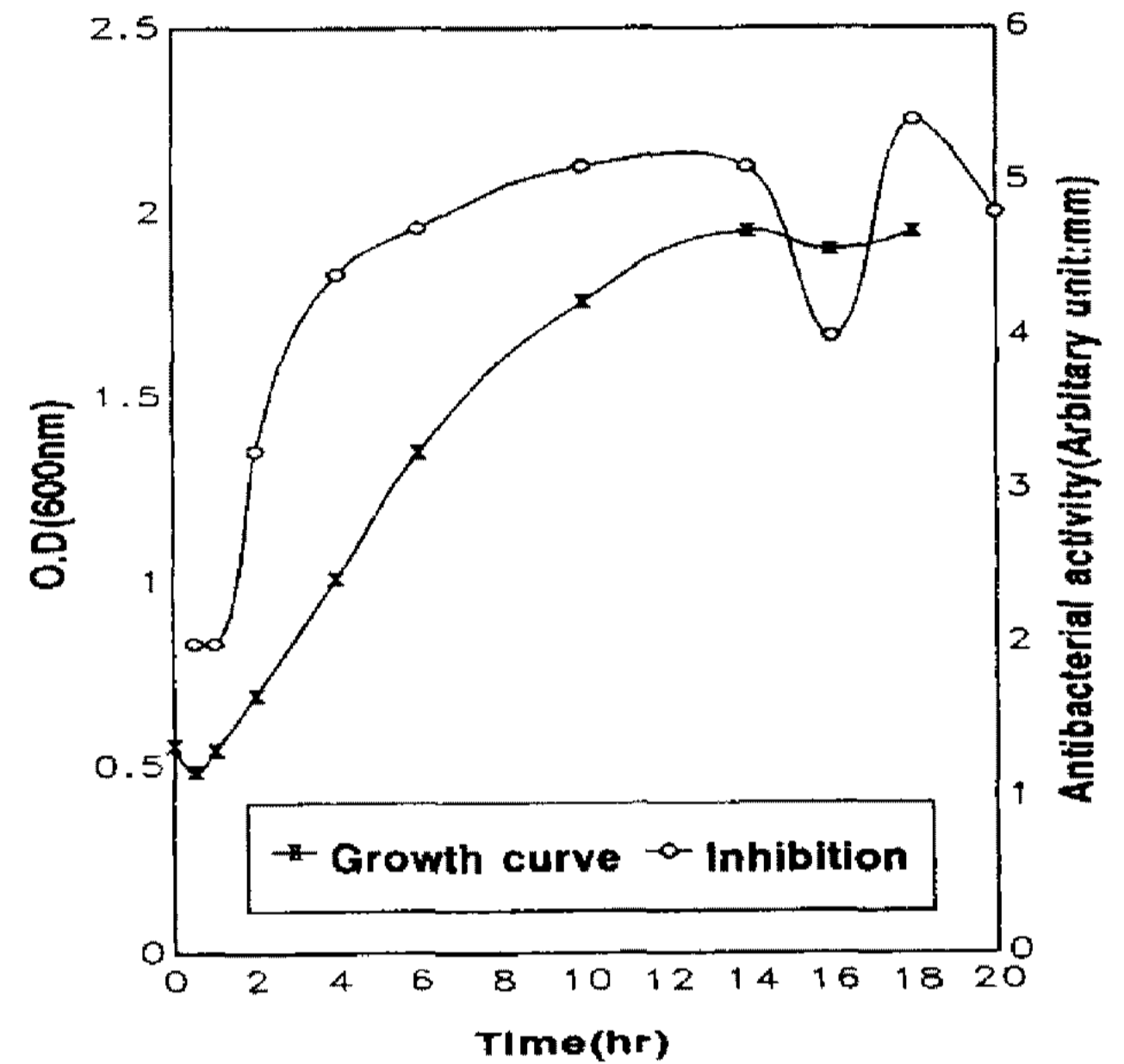


Fig. 1. Growth curve and antibacterial activity of *Lactobacillus brevis* from cultured medium.

Table 2. Antibiotic spectrum of lactic acid bacteria

Indicator strains	Bacteriocin-producing bacteria			
	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lb. brevis</i> KCCM 35464	<i>P. acidilactici</i> KCCM 11728	<i>Leu. mensenteroides</i> KCCM 3547
<i>E. coli</i> JM109	+++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> LE392	++++	++++	+++	++++
<i>E. coli</i> Y1090	+++	++	+++	++
Gram(-) <i>E. coli</i> C600	++++	+++	+++	+++
bacteria <i>E. coli</i> JM101	++	++	++	++
<i>Proteus vulgaris</i> 2433	++++	++++	++++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1636	+++	+++	+++	++
<i>Serratia marcescens</i> 1299	+++	+++	++++	++++
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	-	+	+	++
<i>Lb. brevis</i> KCCM 35464	+	-	+	+
<i>Leu. mensenteroides</i> KCCM 3547	++	++	++	-
Gram(+) <i>P. acidilactici</i> KCCM 11728	+	+	-	+
bacteria <i>Bacillus subtilis</i> 1914	++++	++++	++++	++++
<i>Corynebacterium xerose</i> 9105	+	+	+	+
<i>Micrococcus luteus</i> 3063	+++	+++	+++	+++
<i>Mycobacterium phlei</i> 2192	+++	+++	+++	+++

+ refers to antibiotic activity; 2 to 4 mm diameter; ++, 4 to 8 mm; +++, 8 to 15 mm; +++++.

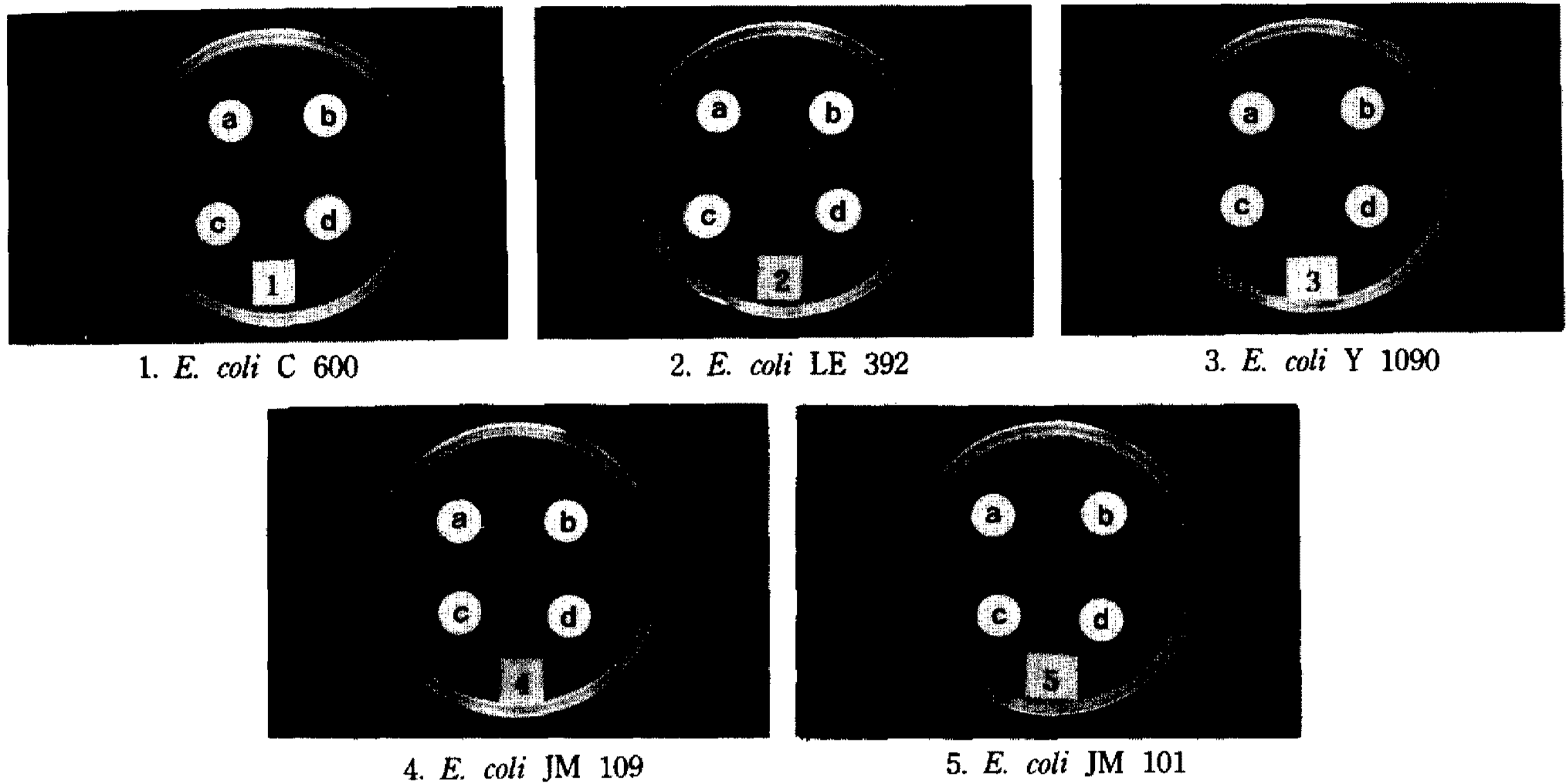


Fig. 2. Antibacterial activity of various lactic acid bacteria on *E. coli*.  
 a: *Lb. brevis*, b: *Leu. mesenteroides*, c: *Lb. plantarum*, d: *P. acidilactici*

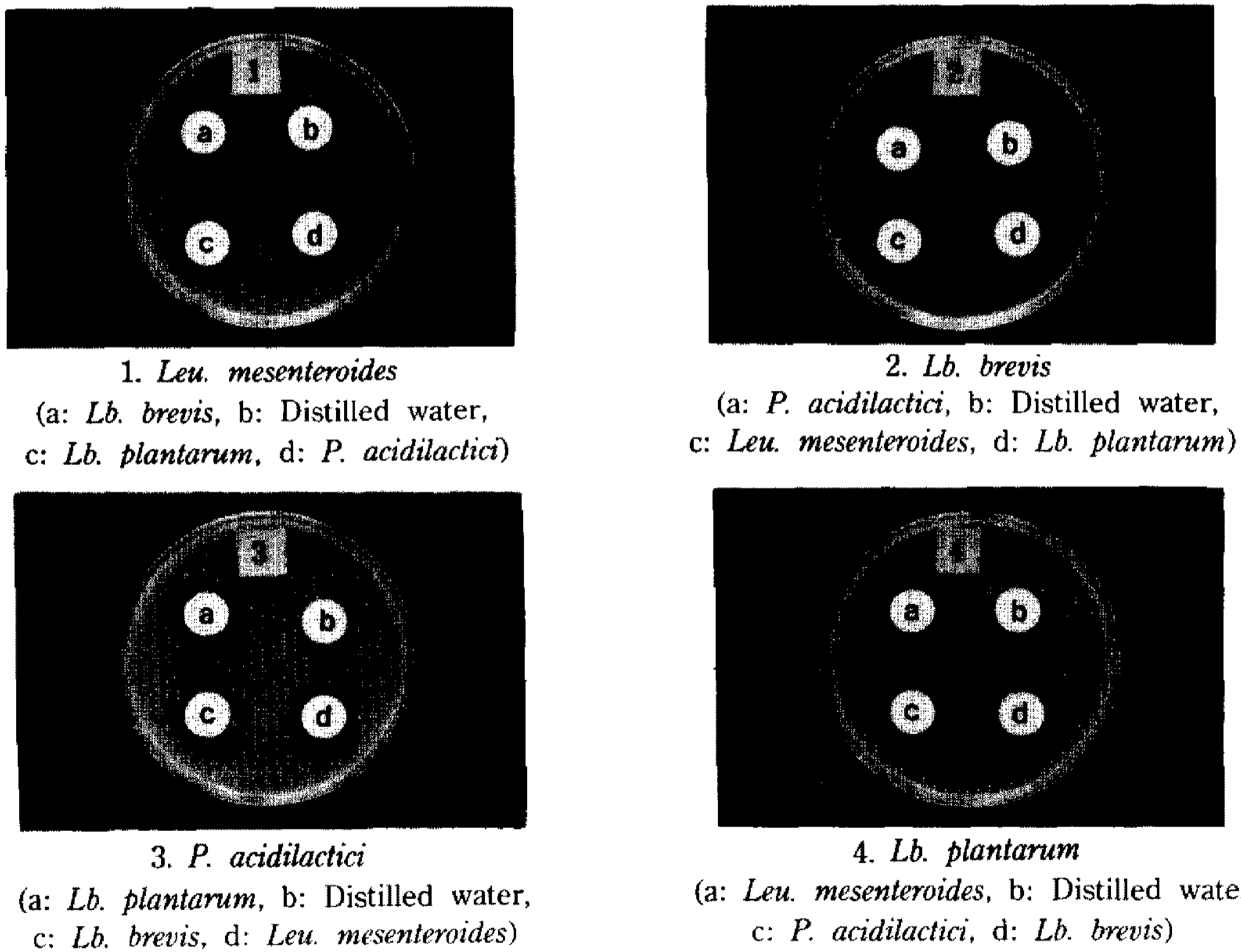
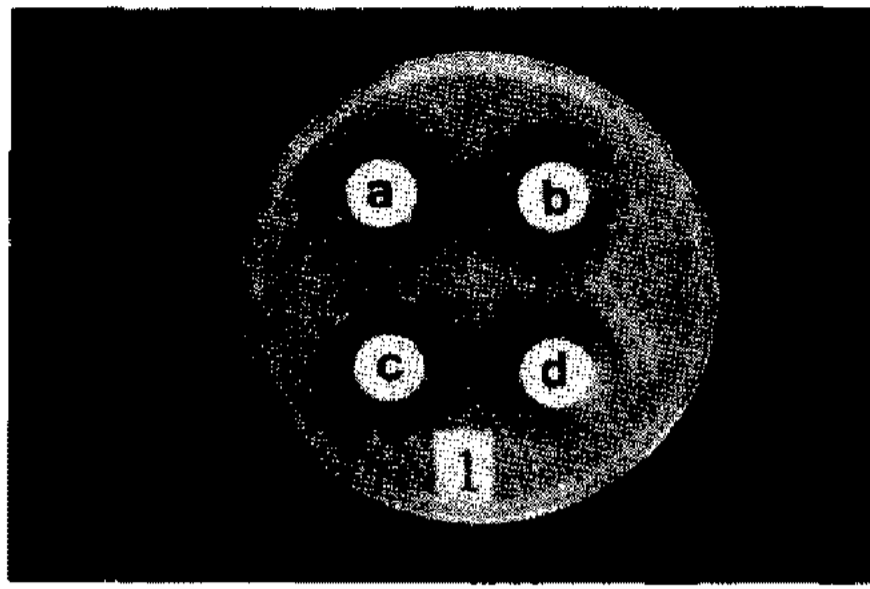


Fig. 3. Antibacterial activity of various lactic acid bacteria.

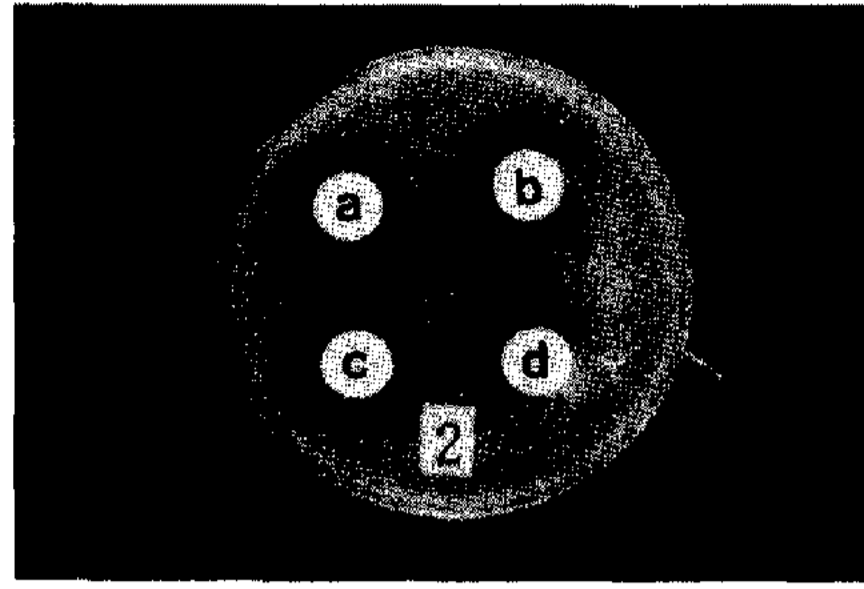
사진에서 보듯이 *E. coli*에 대한 젖산균의 생육 저지대가 뚜렷하게 관찰되었으며, 사용한 젖산균의 대부분이 *E. coli*에 항균 활성을 보였다.

Fig. 3은 젖산균의 서로 간에 항균 작용을 조사한

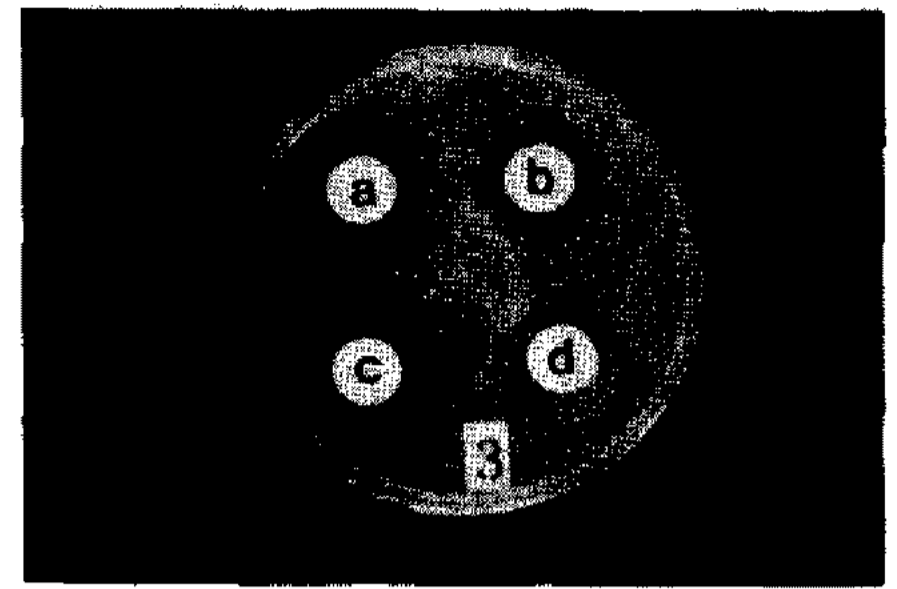
것이다. *E. coli*와 같은 큰 항균 범위를 나타내지는 않았지만 서로간에 저지대를 보인 것을 관찰할 수 있었다. 사진 1은 soft agar에 1%의 *Leu. mesenteroides*를 접종하여 a에는 *Lb. brevis*, b에는 증류수를, c

1. *B. subtilis*

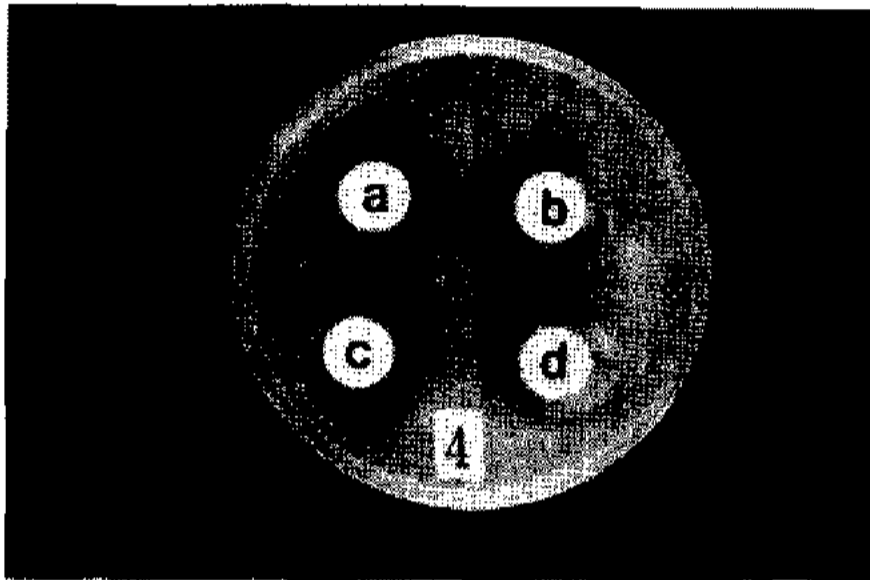
(a: *Lb. brevis*, b: *Leu. mesenteroides*,  
c: *Lb. plantarum*, d: *P. acidilactici*)

2. *M. luteus*

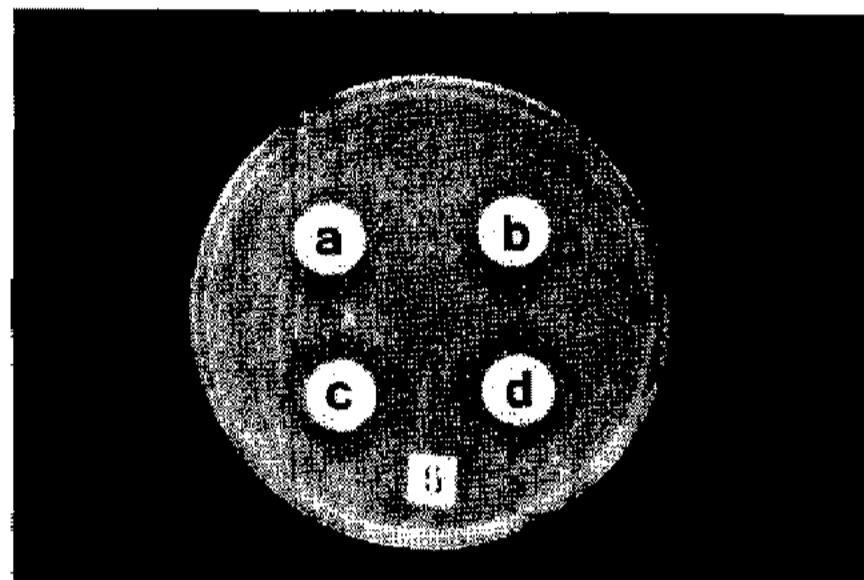
(a: *Lb. brevis*, b: *Leu. mesenteroidesc*,  
c: *Lb. plantarum*, d: *P. acidilactici*)

3. *P. aeruginosa*

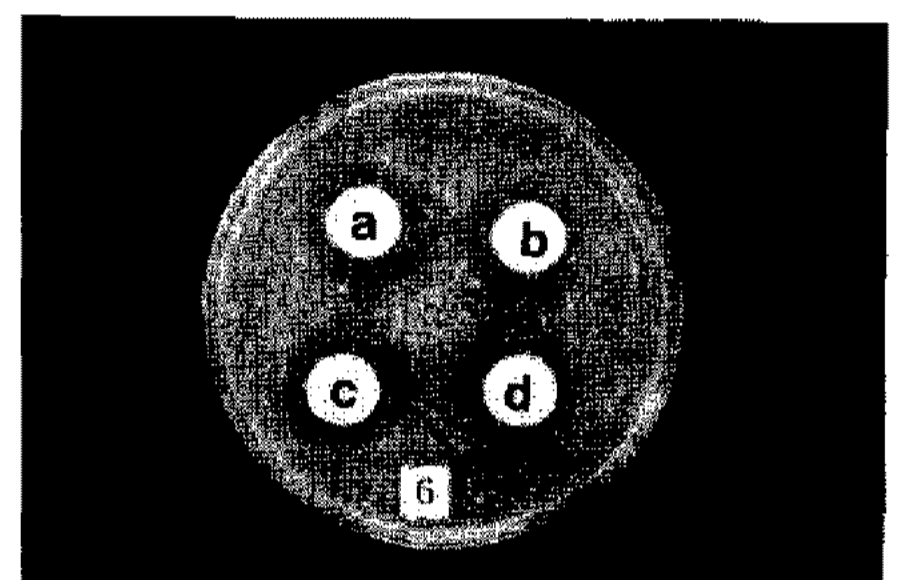
(a: *Lb. brevis*, b: *Leu. mesenteroides*,  
c: *Lb. plantarum*, d: *P. acidilactici*)

4. *S. marcescens*

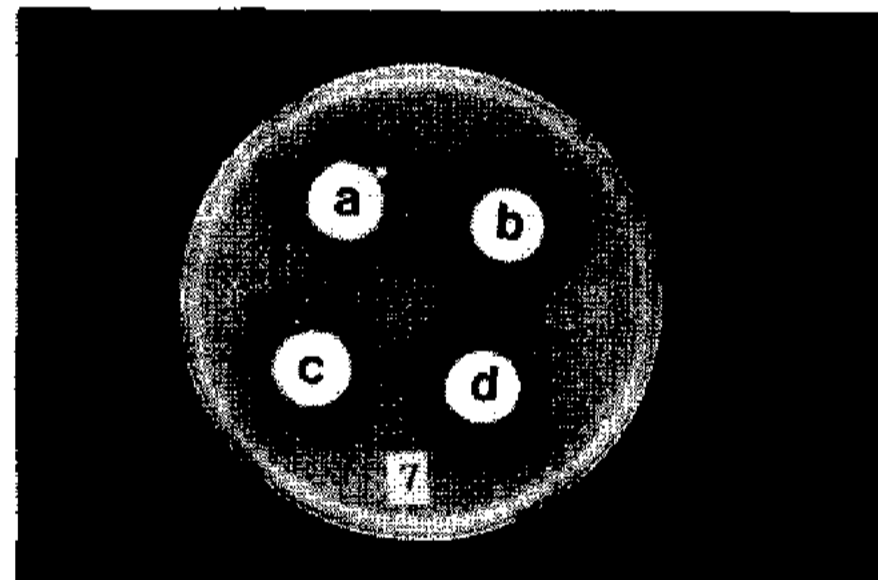
(a: *Lb. brevis*, b: *Leu. mesenteroides*,  
c: *Lb. plantarum*, d: *P. acidilactici*)

5. *C. xerosis*

(a: *Lb. brevis*, b: *Leu. mesenteroides*,  
c: *Lb. plantarum*, d: *P. acidilactici*)

6. *M. phlei*

(a: *Lb. brevis*, b: *Leu. mesenteroides*,  
c: *Lb. plantarum*, d: *P. acidilactici*)

7. *P. vulgaris*

(a: *Lb. brevis*, b: *Leu. mesenteroides*,  
c: *Lb. plantarum*, d: *P. acidilactici*)

Fig. 4. Antibacterial activity of lactic acid bacteria on other bacteria.

에는 *Lb. plantarum*를, d에는 *P. acidilactici*를 S & S paper disc에 묻혀 저지대를 나타낸 것이다. 사진 2, 3, 4도 사진 1과 같은 방법으로 젖산균간의 생육 저지대를 나타내었다.

Fig. 4는 젖산균과 다른 균과의 항균 활성을 나타내었다. 사진 1은 soft agar에 1%의 *B. subtilis*를 접종하여 a에는 *Lb. brevis*, b에는 *Leu. mesenteroides*, c에는 *Lb. plantarum*, 그리고, d에는 *P. acidilactici*를 S & S paper disc에 묻혀 저지대를 나타낸 것이다. 사진 2, 3, 4, 5, 6, 7은 사진 1과 같은 방법으로 젖산균을 묻혀 생육 저지대를 나타내었다. 전반적으로 높은 항균 활성을 나타내었고 특히, *Bacillus subtilis*에서는 4종류의 젖산균 모두에서 강한 생육 저지

대를 나타내었고 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Serratia marcescens*에서는 *Lb. brevis*와 *Lb. plantarum*에 의해서 강한 생육 저지대를 보였다.

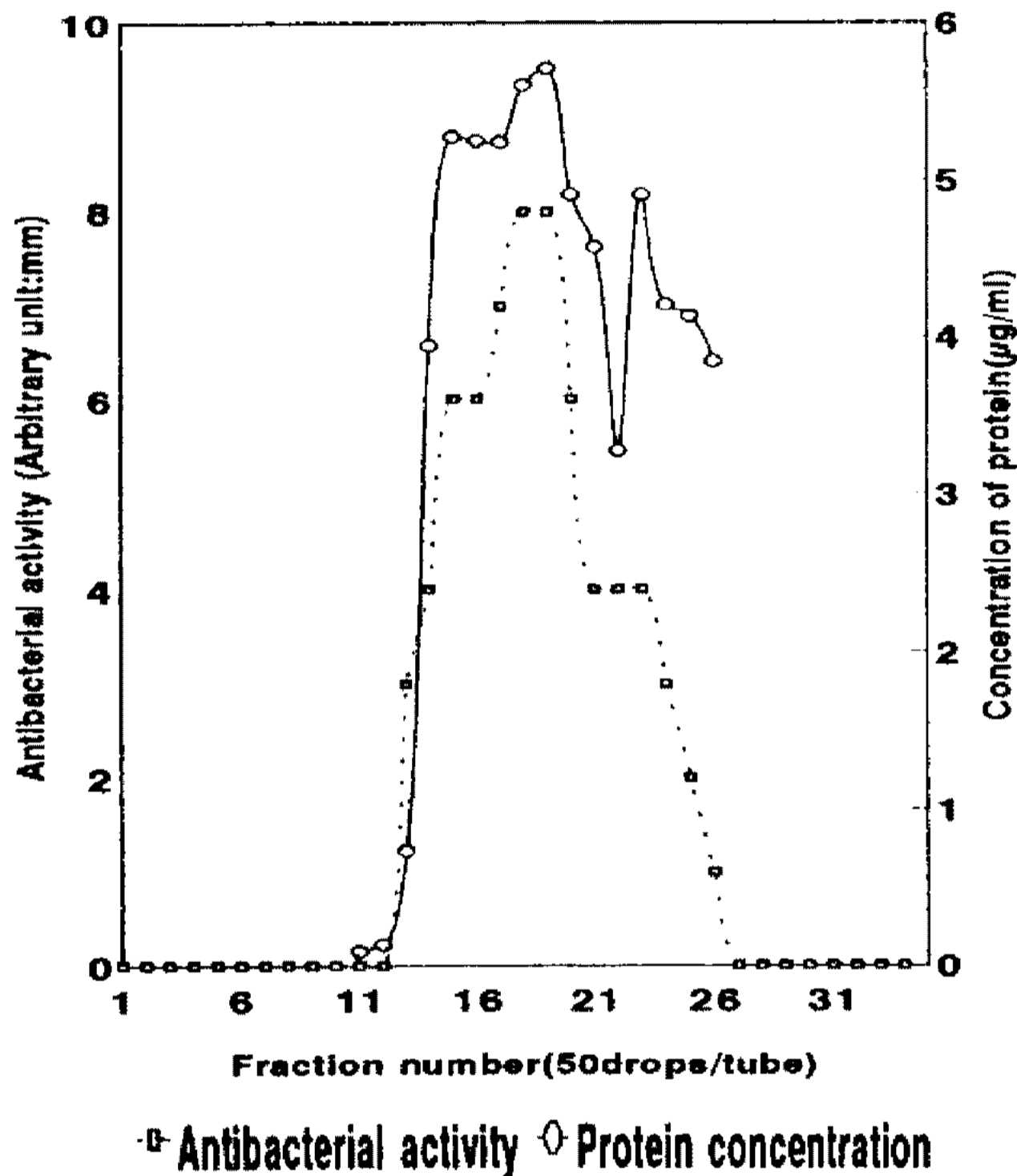
#### 항생물질의 이화학적 특성

*Lb. brevis* floating pellet으로부터 정제된 시료를 이용하여 pH 및 열 안정성을 조사하였다. pH 4~9까지는 활성이 그대로 유지되었지만 pH 3.0 이하에서는 활성이 감소되었다. 열 안정성 조사 결과 75°C까지는 항생활성을 나타냈지만 121°C에서는 활성이 나타나지 않았으며 대체적으로 열에 대해서도 안정하게 나타났다(Table 3).

**Table 3. Effect of Temperature and pH on the antimicrobial activities of *Lb. brevis* floating pellet extract**

	Antibacterial activity						
	30	45	55	65	75	85	121
Temperature	++	++	++	++	++	+	-
pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
	+	++	++	++	++	++	++

+ refer to antibiotic activity: 1 mm: +, 2 to 4 mm: ++.



**Fig. 5. Antibacterial activity of *Lb. brevis* on *E. coli* and protein concentration.**

**Gel chromatography 분획별 분석**

*Lb. brevis*의 floating pellet 용해액을 각 분획별로 용출한 용액을 여과지법에 의해 항균 활성을 조사하여 본 결과 *E. coli*의 경우에는 13번째 분획부터 25번째 까지 생육 저지대 현상을 보였다. 젖산균의 경우는 시험 균인 *Leu. mesenteroides*에서 13번째 분획부터 26번째 분획까지 생육 저지대를 보였다.

Fig. 3에 *Lb. brevis*의 floating pellet 용해액을 Gel chromatography로 분리한 후 fraction 별로 나온 시료를 *E. coli*에 여과지 법을 사용하여 얻은 항균 활성과 단백질 농도와의 관계를 나타내었다. 그림에서 보듯이 fraction 13번째부터 생육 저지대가 나타나기 시작하였으며 19번째 분획에서 최대의 활성을 나타내었다.



**Fig. 6. Coomassie blue-stained membrane containing protein blotted from a SDS-PAGE gel.**

**분자량 측정**

Gel chromatography로 분리된 시료를 SDS-PAGE로서 분자량을 확인한 결과는 59 KDa 위치에서 단일 band가 얻어졌다(Fig. 6).

**요 약**

지금까지 실험은 김치에 관여하는 젖산균인 *Lb. plantarum* ATCC 8014, *Leu. mesenteroides* KCCM 3547, *Lb. brevis* KCCM 35464, *P. acidilactici* KCCM 11728을 가지고 서로간의 항균 작용 및 *E. coli*에 대한 항균 작용을 살펴 본 결과 다른 젖산균과는 달리 gram 음성균인 *E. coli*에 대한 항균 효과가 크게 나타났다.

여기에서는 *Lb. brevis*에 국한하여 gel chromatography로 분리하여 생육 저지대를 관찰하였다. 항균 활성을 나타내는 물질의 분자량은 59 KDa으로 나타났다고 pH에 대한 안정성은 pH 3.0인 강산성에서는 활성이 약하게 나타났지만 pH 4.0부터 pH 9.0까지 활성이 강하게 나타났다. 열에 대한 안정성을 조사하여 본 결과 35°C에서부터 75°C까지는 활성이 강하게 나타났지만 121°C에서는 활성이 없었다.

**참고문헌**

1. Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* **43**: 164-166.
2. Daeschel, M.A. and T.R. Klaenhammer. 1985. Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1538-1541.
3. Fogeding, P.M., A.B. Thomas, and T.R. Klaenhammer. 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced Pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 884-890.
4. Upreti, G.C. and R.D. Hinsdill. 1973. Isolation and

- characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicro. Agents Chemother.* **4**: 487-494.
5. Muriana, P.M. and T.R. Klaehnammer. 1987. Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 553-560.
  6. Muriana, P.M. and T.R. Klaehnammer. 1991. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *lactobacillus* sp. *J. Bacteriol.* **173**: 1779-1788.
  7. Anderson, R. 1986. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplast of gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Inter. J. Food Microbiol.* **3**: 149-160.
  8. Anderson, R.E., M.A. Daeschel, and H.M. Hassan. 1988. Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Biochimie.* **70**: 381-390.
  9. Daba, H., S. Pandian, J.F. Gosselin, R.E. Simard, J. Huang, and C. Lacroix. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3450-3455.

(Received October 31, 1994)