

# Crude bacteriocin첨가 김치발효에서의 *L. monocytogenes* Scott A의 소장

최 신 양  
생물공학연구부

## I. 서 론

김치는 우리나라의 대표적인 전통발효식품으로서 배추, 무, 파 등 재료면에서 볼 때 토양미생물의 오염가능성이 크다. 그중에서도 *Listeria monocytogenes*는 토양, 하천, 채소 등 자연에 널리 분포되어 있는 gram양성의 식중독 미생물로서 최근 몇년간 미국에서 발생한 사례로부터 그 중요성이 강조되고 있다. *Listeria monocytogenes*는 여러연구자들에 의해 고기, 채소, 낙농제품 및 어패류에 존재하는 것으로 밝혀졌다(Beuchat 등 1986, Conner 등 1986, Glass와 Doyle 1989, Ryser와 Marth 1987, Sabel 등 1991, Shelif 1989). Wilkins 등(1972)은 *Listeria monocytogenes*가 3~45°C에서 생육하며 최저생육온도는 3.3°C임을 보고하였다. Rosenow와 Marth(1987)는 멸균된 탈지유와 초코우유 등에 *Listeria monocytogenes*를 접종하여 생존시험을 행하였으며, Conner 등(1986)은 *Listeria monocytogenes*를 cabbage juice에 접종시 2%의 NaCl농도에서 생육하나 5%에서는 생육하지 못함을 보고한 바 있다. McClure 등(1989)은 nutrient agar에 식염농도구배를 만들어 pH4.5, 25°C에서 배양시 3% NaCl에서는 42시간만에 6%에서는 44시간만에 *Listeria monocytogenes*의 생장이 확인되었다고 한다. Schaack와 Marth(1988)는 *Listeria monocytogenes*접종 탈지유에 starter로 젖산균을 접종하고 21~42°C, 15시간 발효후 4°C에 저

장하면 *Listeria monocytogenes*은 생육이 억제되지만 생존하는 것을 보고하였다. Beuchat 등(1986)은 채썰은 양배추에 *Listeria monocytogenes*접종시 5°C에서 25일만에 10<sup>4</sup>에서 10<sup>8</sup>CFU/g으로 생육하였으나 64일 저장후에는 약간 감소함을 보고하였다. 이와 같이 *Listeria monocytogenes*는 낮은 온도와 pH환경에서도 생육할 수 있음을 알 수 있다.

젖산균은 김치발효에 있어서 각종 유기산, 탄산가스, 알코올 등을 생성하는데 작용, 김치의 상쾌한 맛을 내는 중요한 균으로 알려져 있다(민태익, 권태완 1984, 구영조, 최신양 1991). 젖산균중 bacteriocin의 생산 및 특성에 관한 구체적인 연구가 많이 되어 있으며 그 중 Harris 등(1989)이 여러 젖산균들의 *Listeria monocytogenes*에 대한 생육저해를 조사한 것을 비롯하여 많은 연구자들이 젖산균이 생산하는 bacteriocin을 이용한 *Listeria monocytogenes*의 생육저해를 시도하였다. Benkerroum과 Sandine(1988)은 nisine에 의한 *Listeria monocytogenes*의 생육저해 작용을, Carminati 등(1989)은 *Streptococcus lactis*가 생산하는 물질을 이용하여 *Listeria monocytogenes*의 생육저해를 조사하였으며 Degnan 등(1992)을 비롯한 많은 연구자들이 *Pediococcus acidilactici*가 생산하는 pediocin을 이용하여 *Listeria spp.*의 생육저해를 연구한 경우도 상당하다(Foegeding 등 1992, Liao 등 1993, Motlagh 등 1992, Nielsen 등 1990, Pucci 등 1988, Yousef 등 1991). Schillinger와 Lucke

(1989), Schillinger 등(1991)은 *Lactobacillus sake*가 생산하는 bacteriocin을 이용하여 고기에서 *Listeria monocytogenes*의 생육을 조사하였다. 한편 국내에서는 김치의 위생학적 측면에서의 연구가 미비한 실정이다. 박 등(1983)은 김치에서 젖산균을 분리하여 *E. coli*, *B. cereus* 및 *Staphylococcus aureus*에 대한 저해양상을 조사하였으며, 계속된 연구에서 이 균 (*Pediococcus* sp.)의 plasmid DNA를 분리한 바 있다 (박 등 1988). 박과 송(1991)은 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* Lp2의 *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 등의 식품관련 세균에 대한 억제작용과 특성을 조사한 바 있다. 또한 최 등(1992)은 저장 김치중 *Leuconostoc* spp.와 nisin의 첨가에 의한 *E. coli*의 소장을 살펴 본 바 있다. 본 연구에서는 김치제조시 crude bacteriocin을 첨가하여 김치발효중의 *L. monocytogenes* Scott A의 소장을 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 김치의 제조

김치제조는 시판용 결구배추를 약 3~4cm 크기로 절단한 다음 15% NaCl용액의 염수에 첨가하고 15°C에서 2시간반 동안 절였다. 배추와 염수의 비율은 1:1.5(wt:vol)로 하였으며 15분간 세척하고 1시간 자연탈수하였다. 절인배추에 고추가루 2.5%, 파 4.5%, 마늘 2.0% 및 생강 0.8%의 비율로 미리 제조한 양념혼합물을 골고루 섞어 김치를 제조하였다. 제조한 김치는 150g씩 계량하여 Mason병에 넣고 *Listeria monocytogenes* Scott A균액을 첨가한 후 잘 혼합하여 14±1°C에서 16일까지 발효시키면서 미생물학적 분석을 행하였다.

### 2. 미생물균수의 측정

김치발효중의 저온세균수, 젖산균수와 *Listeria*균수의 측정은 경시적으로 채취한 김치를 Stomacher blender에서 2분간 혼합시킨 후 0.1M 멸균 인산완

충용액(pH 7.0)으로 단계적으로 희석시킨 다음 0.1 ml씩을 취해 젖산균수 측정은 MRS 한천평판배지(Oxide, Columbia, MD)를 사용하여 30°C 48시간 배양하여 형성된 colony를, 저온일반세균수 측정은 PCA 평판배지(Difco, Detroit, MI)를 이용하여 14±1°C에서 5일간 배양하여 생성된 colony를, *Listeria*균수는 *Listeria* 선택한천평판배지(Oxoid, Unipath LTD., Hampshire, England)를 사용하여 30°C에서 48시간 배양하여 형성된 colony를 계수하였다.

### 3. *Listeria monocytogenes* Scott A균액의 조제

5°C에서 Tryptic soy agar(TSA: Difco, Detroit, MI) 사면배지에 보관한 *Listeria monocytogenes* Scott A를 tryptic phosphate broth(pH 7.3)에 접종, 30°C에서 24시간 배양시킨 후 2.7~10<sup>6</sup>CFU/ml 되도록 희석한 다음 1시간이내에 김치병(150g)에 현탁액 1ml를 무균적으로 접종하고 잘 혼합하였다.

### 4. Crude bacteriocin의 조제

Crude bacteriocin의 제조는 Bhunia(1991) 등이 pediocin 정제에 사용한 방법을 약간 수정하여 제조하였다. *Lactobacillus sake* Lb 706과 *Pediococcus acidilactici* M균주를 MRS broth에 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(Beckman J2-MI centrifuge, 15,300~g, 15min, 4°C)하여 균체를 분리하였다. 균체를 제거한 상등액에 동량의 95% ethanol을 첨가하고 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리하였다. 침전물을 멸균 증류수에 현탁하고 동결건조(Freeze-dryer, Sentry The VITRIS Co. Inc., Gardiner, New York)하여 crude bacteriocin으로 하였다. 분말화한 crude bacteriocin은 멸균증류수에 재현탁(1mg/ml)시켜 10ml을 김치병(150g)에 넣고 잘 혼합시켰다. Antagonistic activity 측정은 *Lactobacillus plantarum* No.9와 *Listeria monocytogenes* Scott A를 지표균으로 하고 Schillinger와 Lucke(1989)가 사용한 방법을 수정한 paper disc 방법을 사용하여 균력을 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

Crude bacteriocin을 첨가한 김치를  $14 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 발효시키면서 미생물의 변화를 살펴보았다. 저온 세균수에 대한 crude bacteriocins의 영향은 Fig.1에서 보는 바와 같이 발효 6일에 최고증식을 보여주었으며 처리구별 큰 차이를 보여주지 않았다. 젖산균수에 대한 crude bacteriocins의 영향도 Fig.2와 같이 큰 차이를 보여주지 않았으나 crude bacteriocins의 *Listeria monocytogenes* Scott A 생육에 미치는 영향은 의미있는 차이를 보여주었다(Fig.3). 즉 대조구와 *Lactobacillus sake* Lb 706이 생산하는 crude bacteriocin은 *Listeria monocytogenes* Scott A의 생육에 억제현상을 보여주지 않았으나 *Pediococcus acidilactici* M이 생산하는 crude bacteriocin은 *Listeria monocytogenes* Scott A의 생육을 2~3 log cycle정도 억제시켰다.

Schillinger 등(1991)은 *Lactobacillus sake* Lb 706이 MRS배지와 pasteurized minced meat에서 *Listeria monocytogenes* 17a에 대해 bacteriocin inhibitory를 보였다고 보고하였으며 Sobrino 등(1991)은 Spanish

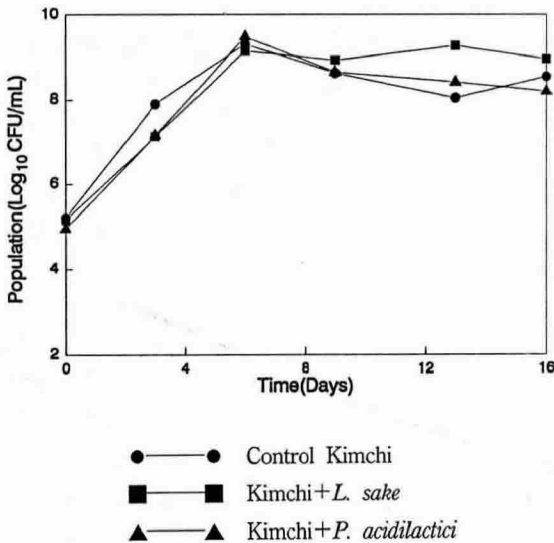


Fig.1. Population of psychrotrophic bacteria in Kimchi fermentation by the bacteriocins at  $14 \pm 1^\circ\text{C}$

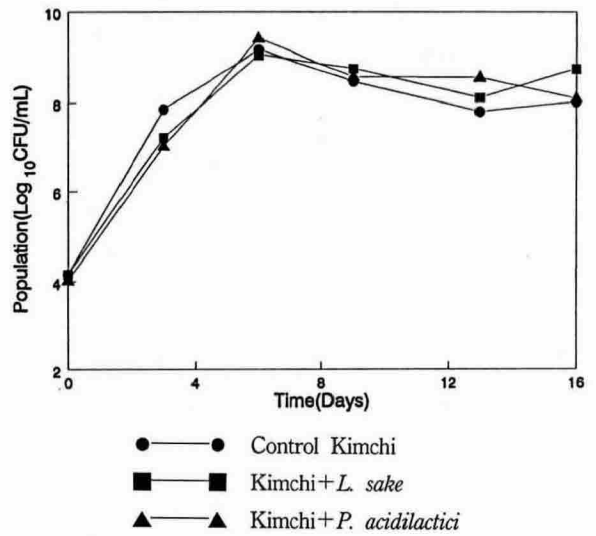


Fig.2. Population of lactic acid bacteria in Kimchi fermentation by the bacteriocins at  $14 \pm 1^\circ\text{C}$ .

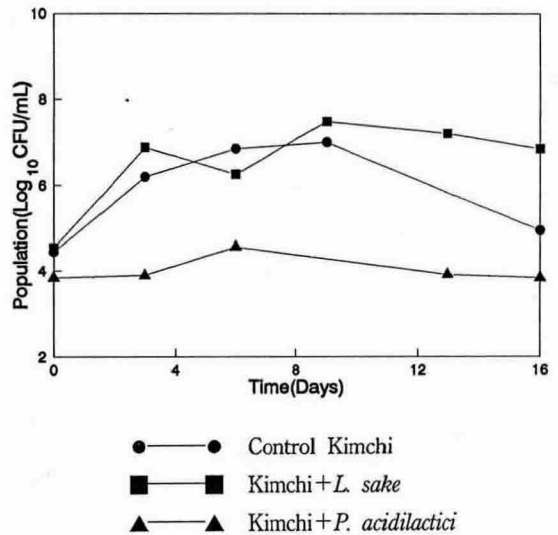


Fig.3. Population of *L. monocytogenes* Scott A in Kimchi fermentation by the bacteriocins at  $14 \pm 1^\circ\text{C}$ .

dry fermented sausages에서 분리한 *Lactobacillus sake* 148이 *Listeria monocytogenes* Scott A에 저해력을 갖고 있었다고 한 결과는 본 시험결과와 다른 경향을 보여주었다.

Sabel 등(1991)은 *Listeria monocytogenes*가 sausages를 75시간 발효시킬 때 1.57 log<sub>10</sub> CFU/g까지 증가하지만 *Pediococcus starter* 배양액을 사용하면 균의 생육을 억제함을 보고하였다. 또한 Nielsen 등(1990)은 *Pediococcus acidilactici*가 생산하는 bacteriocin이 신선육에서 있는 *Listeria monocytogenes*의 생육에 저해 효과가 있었다고 하였으며 *Pediocin* PO<sub>2</sub>-rich dairy ingredient powder는 25°C에서 20시간 열처리한 우유에서 *Listeria monocytogenes* Scott A의 생육을 억제시켰다고 한다(Liao 등 1993). 한편, Degnan 등(1992)은 *Pediococcus acidilactici* JBL(*pediocin* Ach 생산균)을 진공포장된 wieners에 접종시킨 후 25°C에서 8일간 저장하였을 때 평균 2.7 log<sub>10</sub> CFU/g의 *Listeria monocytogenes* 생육감소를 보인다고 하였으며 *Pediococcus acidilactici*가 생산하는 *pediocin* Ach는 4°C에서 29일 동안에 0.61~3.8 log<sub>10</sub> CFU/ml의 *Listeria monocytogenes*를 감소시켰다고(Yousef 등 1991)고 하여 이들 결과는 본 실험과 비슷한 결과를 보여주었다. 그러나 *Pediococcus acidilactici* H이 생산하는 bacteriocin은 멸균 ground beef, sausage mix, milk와 아이스크림에 있는 *Listeria monocytogenes* Scott A에 매우 미약한 저해작용을 보였다(Motlagh 등 1992).

#### IV. 요약

Crude bacteriocin을 첨가한 김치를 14±1°C에서 발효시키면서 미생물의 변화를 조사한 결과 저온 세균수와 젖산균수에 대한 crude bacteriocins의 영향은 큰 차이를 보여주지 않았으나 *Listeria monocytogenes* Scott A의 생육에는 의미있는 차이를 보여주었다. 즉 대조구와 *Lactobacillus sake* Lb 706이 생산하는 crude bacteriocin은 *Listeria monocytogenes* Scott A의 생육에 억제현상을 보여주지 않았으나 *Pediococcus acidilactici* M이 생산하는 crude bacteriocin은 *Listeria monocytogenes* Scott A의 생육을 2~3 log cycle정도 억제시켰다.

#### 참고 문헌

1. Beuchat, L.R., Brackett, R.E., Hao, D.Y.-Y. and Conner, D.E. : Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage

- juice, *Can. J. Microbiol.*, 32, 791(1986)
2. Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. : Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*, *J. Appl. Bacteriol.*, 65, 261(1988)
3. Benkerroum, N. and Sandine, W.E. : Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*, *J. Dairy Sci.*, 71, 3237(1988)
4. Carminati, D., Giraffa, G. and Bossi, M.G. : Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*, *J. Food Prot.*, 52, 614(1989)
5. 최신양, 이한웅, 정건섭 : 저장김치의 *Leuconostoc mesenteroides* IFO 12060 및 nisin 첨가에 의한 *Escherichia coli*의 소장, 한국영양식량학회지, 21, 414(1992)
6. Conner, D.E., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. : Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 59(1986)
7. Degnan, A.J., Yousef, A.E. and Luchansky, J.B. : Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum packaged wieners, *J. Food Prot.*, 55, 98(1992)
8. Foegeding, P.M., Thomas, A.B., Pilkington, D.H. and klaenhammer, T. R. : Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 884(1992)
9. Glass, K.A. and Doyle, M.P. : Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1565(1989)
10. Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. and Klaenhammer, T.R. : Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*, *J. Food Prot.*, 52, 384(1989)
11. 구영조, 최신양 : 김치의 과학기술(2판), 한국식품개발연구원(1991)
12. Liao, C.-C., Yousef, a.E., Richter, E.R. and Chism, G.W. : *Pediococcus acidilactici* PO2 bacteriocin production in whey permeate and inhibition of *Listeria monocytogenes* in foods, *J. Food Sci.*, 58, 430(1993)

13. McClure, P.J., Roberts, T.a and Oguru, P.O. : Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium, *Lett. Appl. Microbiol.*, (1989)
14. 민태익, 권태완 : 김치발효에 미치는 온도 및 식염농도의 영향, *한국식품과학회지*, 16, 443 (1984)
15. Motlagh, A.M., Holla, S., Johnson, M.C., Ray, M. and Field, R.A. : Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food systems by pediocin AcH, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H, *J. Food Prot.*, 55, 337(1992)
16. Nielsen, J.W., Dickson, J.S. and Crouse, J.D. : Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2142 (1990)
17. 박연희, 권정주, 조도현, 김수일 : 김치에서 분리한 젓산균의 미생물 생육저해, *한국농화학회지*, 26, 35(1983)
18. 박연희, 송현주 : 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* Lp2의 항균작용, *한국산업미생물학회지*, 19, 637(1991)
19. 박연희, 류옥상, 조도현 : 김치의 *Pediococci*에 존재하는 Plasmid DNA 분리, *한국농화학회지*, 31, 33(1988)
20. Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S. and Vandenbergh, P.A. : Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2349(1988)
21. Rosenow, E.M. and Marth, E.H. : Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C, *J. Food Prot.*, 50, 452 (1987)
22. Ryser, E.T. and Marth, E.H. : Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese *J. Food Prot.*, 50, 7(1987)
23. Sabel, D., Yousef, A.E. and Marth, E.H. : Behavior of *Listeria monocytogenes* during fermentation of beaker sausage made with or without a starter culture and antioxidant food additives, *Lebensm.-Wiss. u. -Techno.*, 24, 252(1991)
24. Schaack, M.M. and Marth, E.H. : Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk and in yogurt mix during fermentation by thermophilic lactic acid bacteria, *J. Food Prot.*, 51, 607(1988)
25. Schillinger, U., and Lucke, F.-K. : Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1901(1989)
26. Schillinger, U., Kaya, M. and Lucke, F.-K. : Behavior of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain *Lactobacillus sake*, *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 473(1991)
27. Shelef, L.A. : Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef or liver during storage at 4 and 25°C, *J. Food Prot.*, 52, 379(1989)
28. Sobrino, O.J., Rodriguez, J.M., Moreira, W.L., Fernandez, M.F., Sanz, B. and Hernandez, P.E. : Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages, *Intl. J. Food Microbiol.*, 13, 1(1991)
29. Wilkins, P.O., Bourgeois, R. and Murray, R.G.E. : Psychrotrophic properties of *Listeria monocytogenes*, *Can. J. Microbiol.*, 18, 543(1972)
30. Yousef, A.E., Luchansky, J.B., Degan, A.J. and Doyle, M.P. : Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1461 (1991)