Korean Dairy Tecchnol. 12 (2):1~10, 1995

박테리오신의 탐색과 *Lactococcus sp.* HY449가 생산하는 박테리오신에 대하여

한국야쿠르트 유업(주) 연구소
김 상 교

1. 서 론

1925년 Gratia가 *Escherichia coli*로 부터 미생물의 생장을 억제하는 단백질(colicin)을 발견한 (Davis 등,1990)후부터 박테리오신에 대한 관심은 고조되어 수많은 단백질성의 화학물질(bacteriocin)들이 보고되어 왔으며 (Tagg등,1976) 이 박테리오신들은 항균물질 생산균주 자신과 계통 분류학적으로 근접한 균종으로 제한된 좁은 항균 범위를 나타내며 항생물질과 유사한 특성을 가지고 있다.

Tagg등 (1976)은 그람양성 박테리아가 생산하는 항균단백질을 정의할 수 있는 6개의 기준을 제안하였으나 6개의 정의를 모두 만족시키는 박테리오신은 거의 없으며 예외인 박테리오신이 너무 많아 Konisky(1982)는 박테리오신의 정의를 새로하여 박테리오신이란 "단백질로 되어 있으며 그들을 생산하는 미생물을 사멸시키지 않는 것"으로 결론지었으며, Tagg(1991)는 위 성질을 가진 물질을 박테리오신 유사물질(Bacteriocin-like inhibitory substances)로 제안하기도 하였다.

박테리오신은 대부분 좁은 항균 범위를 가지고 있지만 몇몇 박테리오신의 경우는 비교적 광범위한 항균범위를 가지고 있어 우유제품(champagne 등, 1990: Suzuki 등, 1991), 육제품 (Stiles와 Hastings, 1991: Lewus 등, 1991), 사료제품(Lindgren과 Dobrogosz, 1990), 곡류(Enkner, 1992) 등 여러가지 식품및 사료의 저장성 향상에 사용될 수 있으며 listeria(Parenre와 Hill, 1992: Nielsen 등, 1990: Winkowski 등, 1993), fungi(Piard와 Desmazeaud, 1992: SuzuKi 등, 1991) 및 박테리아 포자(Scott와 Taylor, 1981a: Scott와 Taylor, 1981b), 저온성균(Champagne 등, 1990), 병원성균(Lewus 등, 1991: Spelhaug와 Harlander, 1989), 부패미생물(Champagne 등, 1990: Stiles와 Hastings, 1991)의 제어에도 사용될수 있다.

최근에 와서 식품에 대한 소비자의 욕구는 신선하고 천연 지향적이며 방부제의 기피현상을 나타내고 있다. 수년전 까지만 해도 이 모든 욕구는 오직 적당한 살균과 저온유통으로 해결될수 있었다. 그러나 영양손실을 고려하여 열처리 조건을 완화시킨 식품의 경우에 저온성 병원균인 *Listeria monocytogenes*가 발견됨으로서 이 방법만으로는 식품의 안정성을 보장할 수 없게 되었고 다른 방법이 필요하게 되었다. 박테리오신은 천연적인 단백질이기 때문에 식품에 있어서 최소의 열처리와 저온 유통으로 안정성을 확보할 수 있는 수단이기도 하다. 이러한 목적하에 사용되는 박테리오신 중에서 nisin은 광범위한 항균 범위를 나타내며 살균력이 강하여 세계각국에서 이미 오래 전부터 여러 식품에 사용이 허용되어 왔으며(Hurst 1981), 미국에서도 1988년 부터 FDA가 GRAS(generally recognized as safe)식품 첨가물로 인정하게 되었다.(Kone과 Fung, 1992)

2. 박테리오신의 명명

박테리오신의 명칭은 그들을 생산하는 박테리아의 속(또는 종)의 이름을 따르는 것이 일반적이며 경우에 따라서는 그들이 속한 그룹의 명칭을 사용하기도 한다. (Kone과 Fung, 1992)

예를들면

*Lactococcus lactis*가 생산하는 *Nisin*
E. cooli 가 생산하는 colicin
Enterococci 가 생산하는 enterocin
Pediococcus acidilactici 가 생산하는 pediocin A
Pediococcus pentosaceus 가 생산하는 pediocin AcH
Lactobacillus sake 가 생산하는 sakacin
Lactobacillus casei 가 생산하는 caseicin등이 있다.

3. 박테리오신 생산에 영향을 주는 요인 (Kim, 1994)

유산균에 의한 박테리오신의 생산은 고체배지와

액체배지 모두에서 가능하다. 고체배지는 억제현상을 가시화시키기는 좋지만, 정제나 최적 생산조건 등을 확립하는데 있어서 제한요소를 많이 내재하고 있다. 따라서 여기서는 *Lactococcus* 속의 유산균 배지인 M17 액체배지를 기준으로 박테리오신 생산에 미치는 영향 인자에 대하여 살펴 보았다.

① 배지의 조성

일반적으로 합성배지에서 유산균의 증식에 큰 영향을 미치는 배지 성분은 glucose와 yeast extract이다. 즉 glucose와 yeast extract의 농도가 높을수록 유산균의 증식은 활발해진다. 박테리오신의 생산에 가장 큰 영향을 주는 배지 성분도 이 두가지이지만 내용적으로는 차이를 나타내서 yeast extract는 농도가 낮은 경우에 박테리오신의 생산이 더 많아지는 현상을 우리의 실험 결과 관찰 할 수 있었다.

② 배지의 pH

우리의 실험결과에 의하면 박테리오신의 최적 생산을 위한 pH는 중성 부근임을 알 수 있었다.

③ Growth phase

박테리오신의 생산은 대수증식기 중반에서 시작하여 정지기 초까지 계속된다. 그러나 그 이후는 박테리오신 생산균의 protease나 배지성분 또는 pH 등에 의하여 오히려 감소하는 경향을 나타내기도 한다.

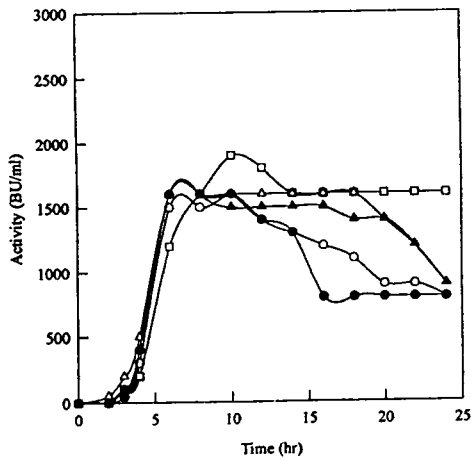

Fig. 1. Bacteriocin production by *Lactococcus* sp. HY 449 in different culture media.
—○— LTB —□— MRS —△— TGE —●— M17G
—▲— Elliker's

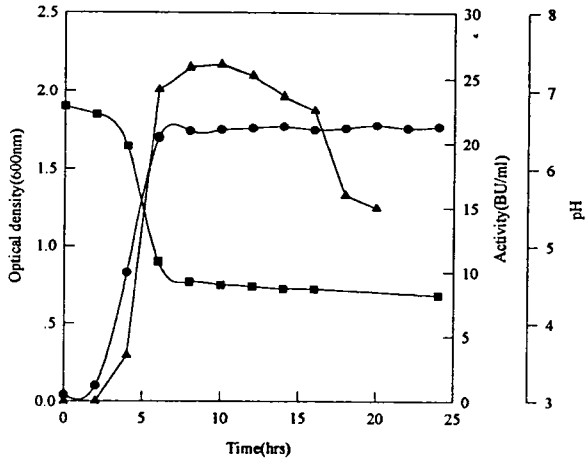

Fig. 2. Growth and bacteriocin production by *Lactococcus* sp. HY 449 in M17G broth. Symbols; —●—: Optical density at 600nm, —■—: pH, —▲—: bacteriocin activity(BU/ml) determined by the microwell dilution method.

4. 박테리오신의 검색방법 (Spooner 와 sykes, 1972)

① Agar diffusion techniques

Agar plate에 그림과 같이 일정한 크기의 구멍을 만들어 박테리오신을 생산할 것으로 예상되는 미생물 또는 그 배양액의 cell free supernatant를 일정량 투여하여 agar media를 통하여 diffusion시켜 indicator lawn에 대한 억제여부를 검색하는 방법으로 이때 구멍대신 멸균된 paper disk를 사용할 수도 있다. 이때, 생산균주, 또는 그의 cell free supernatant의 투여 시기에 따라 deferred method와 simultaneous method로 구분한다.

ⓐ Deferred method

생산균주를 직접 사용하는 경우에 박테리오신의 생산과 세포 외부로의 분비가 대수증식기 중반이후부터 일어난다. 따라서 생산균을 미리 접종하여 일정시간 배양하므로서 생산된 박테리오신이 배지에 축적되게 한후 여기에 지시균(indicator strain)을 적정농도 (약10^7cfu/ml)로 희석한 soft agar 2-3㎖을 이중층하여 지시균의 최적 배양조건에서 24-48시간 배양한 후 억제환의 크기를 관찰하므로 생산유무를 관찰할수 있다.

배양 완료된 생산균주의 직접적인 억제의 영향을 최소화시키기 위하여 클로로포름 개스를 이용하여 생산균을 사멸시키기도 하며 생산균의 Cell

free supernatant를 중화하여 사용하기도 한다. cell free supernatant를 사용하는 경우에는 구멍에 투여된 cell free supernatant가 완전히 diffusion될수 있도록 하룻밤 냉장고에 보관한 후에 지시균이 희석된 soft agar를 이중층한다.

ⓑ Simultaneous method

이 방법은 박테리오신의 생산 균주와 지시균을 동일한 고체 배지에서 동일한 조건으로 배양한다. 지시균은 고체배지의 표면에 spread시키며 이위에 박테리오신 생산균을 점적 (spot)한다. Deferred method에서와 마찬가지로 cell free supernatant를 이용하는 방법도 있다.

단, 생산균주로부터의 박테리오신의 생산이나 분비가 growth cycle의 후기에서 나타나는 경우에는 이 방법의 사용이 불가능하다.

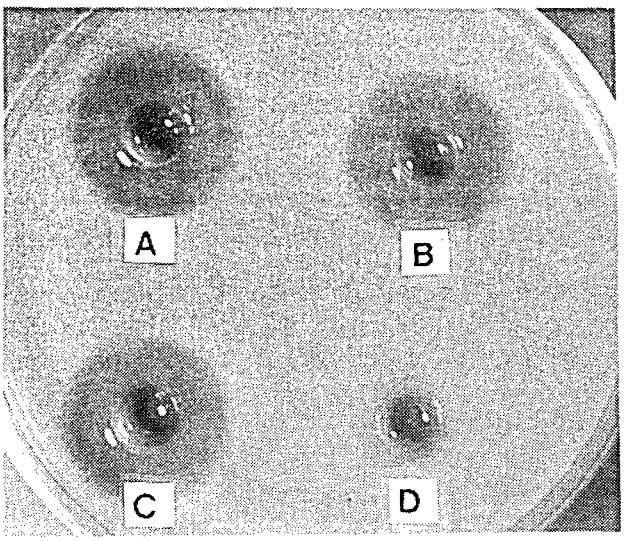

Fig. 3. Inhibition zone of cell-free superna tant of *Lactococcus* sp. HY 449 against *Lactobacillus fermentum* IFO 3023 on agar plate.
(A) Supernatant, (B) pH adjusted to 7.0, (C) Catalase treated, (D) Protease IV treated.

ⓒ Flip streak method(flip spot method) (Spelhaug와 Harlander, 1989)

약 18시간 정도 배양한 시험균을 agar plate에 1 loop streaking하여 24시간 배양한다. 배양이 완료된 후 배지를 plate의 뚜껑에 쏟고 1 loop의 지시균을 세균주 정도 시험균과 수직으로 streaking하여 추가 배양한다. 이때 억제현상은 시험균과 평행한 clear zone의 형성여부로 측정한다.

Agar diffusion assay에서는 생산균주와 지시균의 배양특성(배지 및 배양조건), 시료의 수, 시료의 정제단계에 따라 알맞는 방법을 선택하여 사용하는 것이 바람직하다.

② Liquid media

Agar diffusion method에 비하여 일반적인 방법은 아니지만 앞의 방법으로 좋은 결과를 얻을 수 없는 경우, 예를 들면 지시균의 성장이 너무 느리거나 지시균의 박테리오신에 대한 감수성이 매우 낮은 경우 유용하다. 이 방법은 박테리오신 생산균주의 cell free supernatant를 막여과하여 완전히 제균한 후, 유기산의 영향을 최소화시키기 위하여 중화시킨 후 사용하는 것이 일반적이다.

ⓐ Microdilution well method(Kim, 1994)

Toba 등(1991) 의 방법을 변형한 것으로 96 well microdilution plate를 사용하여 2진희석한 시료액 100㎕에 지시균을 약 10^5cfu/ml 첨가하여 일정시간 배양한후 ELISA reader를 사용하여 620nm에서의 흡광도를 측정하여 시료액 대신 멸균 증류수를 사용한 대조구의 1/2이상 흡광도가 감소한 경우를 억제 효과로 판정한다.

ⓑ Automated turbidometry method (Diep 등, 1994)

Automated turbidometer를 사용하여 antimicrobial activity를 측정하는 방법으로 박테리오신 시료액(대조구의 경우는 멸균 증류수)과 지시균 희석액을 혼합하여 배양하면서 12시간과 24시간에서의 흡광도를 시간 vs 흡광도의 그래프로 표시한 후 곡선의 하부면적을 계산하고 대조구의 대한 면적 감소율을 계산하다. 미리 작성한 standard curve로부터 박테리오신 활성을 계산한다.

ⓒ ATP-Bioluminometry를 이용하는 방법 (Waites 와 Ogden, 1987)

세포내 ATP의 농도와 첨가된 항균물질의 농도 사이에는 반비례의 관계가 있다. 최근의 ATP-bioluminometry 연구에서 *Lactobacillus* 와 *Pediococcus*의 배양액에 nisin을 첨가하면 세포내 ATP의 함량이 급격히 감소하는 동시에 배지상으로 ATP가 누출됨이 밝혀졌다. 또한 이러한 현상은 nisin의 농도와 비례함으로서 이 원리를 이용하여 nisin의 신속하고 신빙성있는 assay방법이 고안되었다.

5. 박테리오신의 정제

액체합성 배지로부터 박테리오신을 생산하여 정제하는 방법은 펩타이드의 정제 방법과 같다.

액체배지에서 박테리오신은 대부분 균체외부로 분비되므로 정제의 시작은 우선 배양액으로부터 균체를 원심분리하여 제거한 후 이 배양 상등액(cell free supernatant, CFS)을 농축시켜 부피를 줄이는 것으로 시작된다. CFS를 농축하는 방법에는 농축, salt precipitation($(NH_4)_2SO_4$, NaCl), acid precipitation, organic solvent precipitation (acetone, alcohol류), 투석 및 한외여과 방법이 있다.

그러나 농축의 경우에는 목적하지 않는 다른 단백질들이 그대로 농축되므로 침전방법이 많이 사용되며 그중에서도 조건이 온화하며 salt의 농도에 따라 분획이 가능한 ammonium sulfate를 많이 사용하나 박테리오신의 분자 크기나 특성에 따라 한외여과나 solvent precipitation이 사용되기도 한다.

그러나 위의 정제단계만 가지고는 배지로부터 유입되거나 미생물의 대사로부터 생긴 단백질들을 모두 제거할 수 없으므로 겔여과 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피 및 고속액체 크로마토그래피 등이 단독 및 연결되어 사용된다. 이렇게 획득한 박테리오신은 SDS-electrophoresis를 통하여 정제의 순도를 확인하게 된다.

이 밖에도 배양액의 pH를 변경시켜 박테리오신 생산균의 세포벽에 흡착시킴으로서 간단하게 정제하는 방법도 있으나 보편적이지는 않다. (Tramer와 Fowler, 1964;Davis등, 1990).

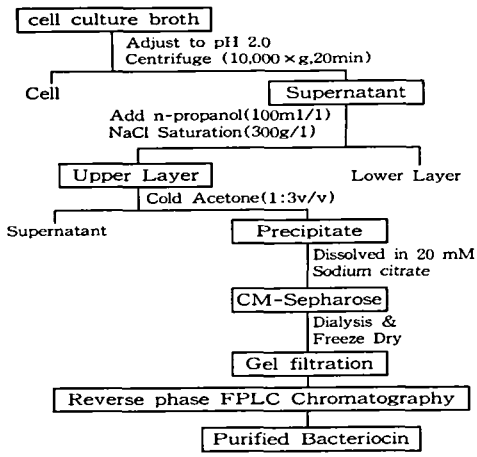

Fig. 4. Flow process for purification of Bacteriocin from *Lactococcus* sp. HY 449

Table 1. Purification of bacteriocin produced by Lactococcus sp. HY 449.

purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (BU)	Specific activity	Yield (%)	Purification fold
Supernatant	1,800	254.16	15,735,600	61,912	100	1
Acetone precipitate	24	13.56	11,292,114	832,753	71.8	13.4
Ion exchange chromatography	307	1.27	5,560,627	4,378,446	35.3	70.7
Gel filtration chromatography	45	0.17	1,152,000	6,939,759	7.3	112
Reversed phase chromatography	5	0.02	512,000	25,600,000	3.25	413.5

6. 박테리오신 역가의 측정

2진 희석한 박테리오신 시료액을 growth indicator 균을 약 1 x 10^7 농도로 접종한 MRS agar 평판배지에 점적한 후 37℃에서 24시간 배양한 후 억제환이 생성되는 최대 희석배수의 역수를 AU(arbitrary unit)로 정의하여 사용하는 것이 가장 일반적으로 사용되며, Toba등(1991)의 방법도 여러 박테리오신의 활성을 측정하는 경우에 자주 사용된다. 즉 96 well microdilution plate를 사용하여 2진 희석한 박테리오신 시료액 100㎕에 growth indicator 균을 약 1 x 10^7농도로 접종한 MRS broth 200 ㎕를 넣어 37℃에서 6시간 배양한 후 ELISA reader(Titertek Multiskan, Labsystem, Finland)를 사용하여 620nm에서의 OD값을 측정한다. 박테리오신 시료액 대신 멸균 증류수를 사용한 것을 대조구로 하여 대조구의 1/2에 해당하는 흡광도 값을 나타내는 희석배수에 200을 곱한 값을 bacteriocin unit(BU)로 표시한다.

7. 박테리오신의 성질과 작용형태

1) 박테리오신의 항균 spectrum

박테리오신의 억제범위에 대한 보고 중 Davey와 Richardson(1981)은 *St. cremoris* 346 균주로 부터 분리한 diplococcin이 *St. cremoris*와 *St. lactis*에 국한된 좁은 항균범위를 나타내는가 하면, Mehta 등(1983)은 Lb. *acidophilus* AC1이 생산하는 lactacin F가 그람양성 및 그람음성 박테리아에 대해 억제활성을 가지며 약품이나 항생제에 내성을 가진 몇몇의 박테리아에 대해 억제활성을 가진다고 보고하기도 하였다. Lactacin F보다는 좁은 항균 범위를 나타냈지만 *Lactococcus* sp. HY449가 생산하는 박테리오신은 비교적 항균범위가 광범위한 것으로 생각되었다.

Table 2. Inhibition spectrum of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY449

Microorganisms tested	Inhibition
Lactobacillus delbrueckii IFO 3202	+
Lactobacillus fermentum IFO 3023	+
Lactobacillus brevis IFO 3029	+
Lactobacillus jurguti IFO 3048	+
Lactobacillus helveticus IAM 1042	-
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	-
Lactobacillus casei YIT 9018	-
Lactobacillus lactis subsp. lactis ML 3	+
Leuconostoc mesenteroides KFCC 11324	+
Streptococcus faecalis IFO 3971	+
Bacillus subtilis ATCC 6633	-
Escherichia coli HB 101	+
Escherichia coli A2	+
Pseudomonas fluorescens	+
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	+
Staphylococcus aureus	+
Staphylococcus epidermidis KFCC 35494	+
Salmonella typhimurium ATCC 14028	-
Listeria monocytogenes ATCC 15313	+
Listeria monocytogenes ATCC 35152	+
Klebsiella aerogenes	-
Hansenula anomala	-

2) pH에 대한 안정성

Daeschel등 (1990)이 보고한 Lb. *plantarum* C-11이 생산하는 plantaricin A는 pH 4-6.5 사이의 좁은 범위에서만 활성을 나타냈으며, nisin의 경우에도 pH 2에서의 용해성이 57mg/ml인 반면 PH 8-12에서는 0.25mg/ml의 낮은 용해성을 보여 알칼리 영역에서의 불안정성이 보고된 바 있다. (Liu와 Hansen, 1990).

Gross와 Morell(1971)은 pH가 높을 경우 hydroxide ions, deprotonated amines, deprotonated hydroxyl group과 같은 nucleophile이 dehydro residue와 반응하여 분자간 혹은 분자내 cross-linkage를 형성하여 화학적 변형을 일으킨다고 보고하였다.

dehydro 잔기가 존재하는 nisin의 경우에도 위와 같은 반응이 일어나 여러 종류의 반응 산물이 생성되고 nisin의 항균력은 급격하게 소실되었다고 Liu등(1990)이 보고하였다.

반면 *Lactobacillus casei* 가 생산하는 박테리오신인 caseicin 80 (Rammelsberg와 Radler, 1990)의 경우에는 pH 3-9의 범위에서도 활성을 유지하였고 *Lactobacillus carnis*가 생산하는 박테리오신 (Ahn과 Stiles, 1990)도 pH 2-11의 넓은 범위에서 안정하다고 보고되었다. 또 Schved등 (1993)이 *Ped. acidilactici* SJ-1에서 생산한 pediocin SJ-1도 pH3-9까지 안정성을 가지며 낮은 pH에서 훨씬 안정하다고 하였다.

Lactococcus sp. HY 449가 생산하는 박테리오신도 pH 3-9사이에서 안정하며 활성이 거의 일정하다는 점에서는 이상의 박테리오신과 유사한 특성을 보였다.

3) 열처리의 영향

지금까지 알려진 박테리오신의 열안정성은 종류에 따라 차이가 커서 bulgarican은 120℃ 60분열처리에서도 변화가 없었으며(Reddy등 ,1983) bacteriocin S 50 (Kojic등, 1991)과 plantaricin A (Daeschel 등, 1990)는 100℃에서 각각 60분과 30분 열처리시에도 안정하여 내열성이 크게 나타난 반면, Kato 등(1993)이 *Ent. faecium*에서 생산한 박테리오신은 끓는 물에서 열처리한 결과 5분 경과시까지는 활성에 영향이 없었지만 10분 후에는 50%가 , 30분 후에는 거의 모든 활성이 사라짐을 보고한 바 있고, helveticin V-1829(Voghan 등,1992)와 lactacin F(Muriana와 Klaenhammer, 1991)는 50℃에서 각각 20분과 30분만에 불활성화 되어 열에 아주 민감한 것으로 보고되었다. 또 Davey와 Richardson (1981)이 보고한 diplococcin은 실온에서도 불안정하였고 100℃에서 1분간의 열처리로 75%의 활성이 감소하였다.

이와 비교할때 *Lactococcus sp.* HY 449가 생산하는 박테리오신은 산성 pH에서는 100℃ 30분에도 활성의 절반이상이 유지되어 열안정성이 비교적 높은 것으로 나타났다.

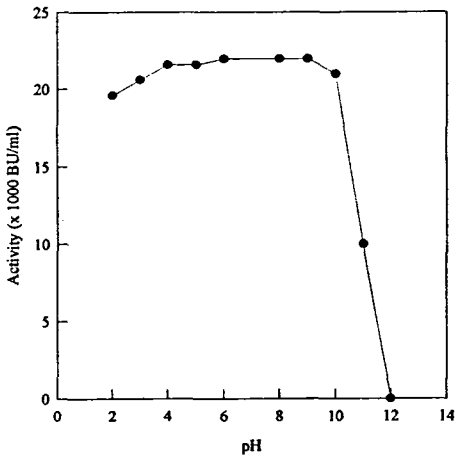

Fig. 5. Effect of pH on the activity of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 and patially purified with 60 % saturated $(NH_4)_2SO_4$.

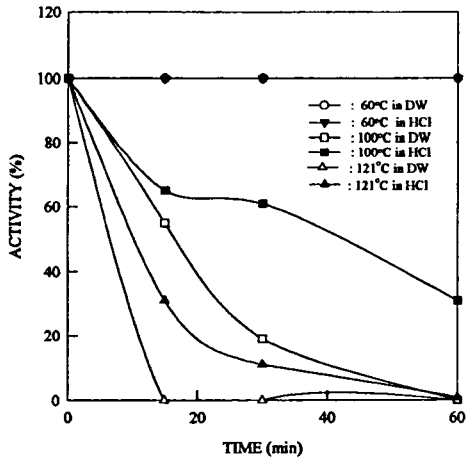

Fig.6. Effect of heating temperature and time on the activity of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 strain.

4) 박테리오신의 첨가 시기에 따른 영향

Schved등(1987)은 *Pediococcus acidilactici* 가 생산하는 박테리오신인 SJ1에 관한 연구결과 대수증식기에 SJ1을 처리하였을 때보다 정지기의 지시균에 처리하였을 때 균수의 감소가 더 큰 것으로 보고하였다. 이러한 현상은 박테리오신의 거의 공통된 특징으로서 *Lactococcus sp. HY* 449의 박테리오신도 지시균 접종 직후, 2시간 및 4시간 배양 후 박테리오신을 첨가한 시험구에서는 모두 첨가 즉시 생균수가 급격하게 감소하여 첨가 후 10시간 이내에 균락을 형성하지 못하는 수준까지 사멸하는 현상을 나타내었다.

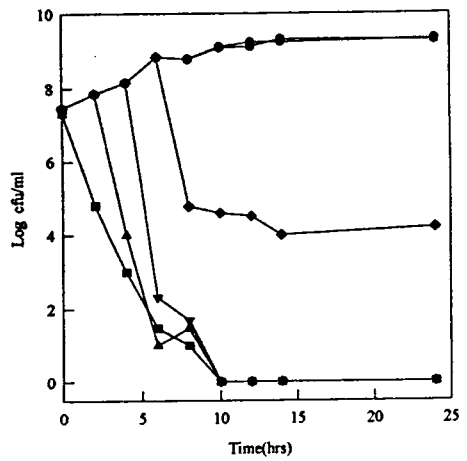

Fig. 7. Survival curves of *Lactobacillus fermentum* IFO3023 at different addition time of bacteriocin to growing culture of MRS broth. —●— Untreated, —■— Initial addition, —▲— After 2 hrs, —▼— After 4 hrs, —◆— After 6 hrs, —●— After 10 hrs

이와 같은 현상은 흡광도 변화에서도 유사하여 10시간 배양후 박테리오신을 처리한 경우의 흡광도 변화는 처리하지 않은 대조구와 거의 일치해서 박테리오신의 영향은 거의 없는 것으로 보였지만 0, 2, 4 및 6시간 배양 후 처리한 경우에 흡광도가 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

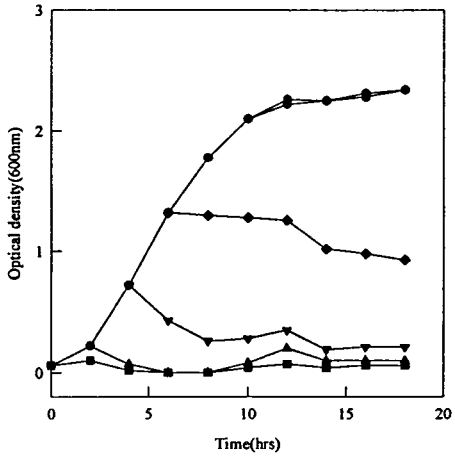

Fig. 8. Growth curves of *Lactobacillus fermentum* IFO 3023 at different addition time of bacteriocin.
—●— Untreated, —■— 0 hr addition, —▲— After 2 hrs, —▼— After 4 hrs, —◆— After 6 hrs, —●— After 10 hrs

5) 작용 형태

대부분의 박테리오신은 억제대상 미생물의 outer membrane(OM)에 있는 receptor에 다른 세포성분, 또는 단백질들과 공동작용에 의하여 결합하므로서 세포막에 이온 채널을 형성하게 되며 이로 인하여 세포내 전해질이 유출되고 pH 균형이 깨진다.

몇몇 박테리오신들은 nuclease활성을 나타내기도 하며 대상 미생물의 세포내 단백질에 영향을 주기도 한다. 이 경우는 박테리오신과 면역 단백질이 가역적인 결합을 하여 대상미생물에 있는 receptor에 부착하게 되며 그후 다시 떨어져 박테리오신이 효소적 활성을 가지게 되고 세포내로 들어가게 된다. (Davis 등, 1990)

자주 나타나는 작용은 아니지만 세번째 작용 기작은 감수성이 강한 미생물들의 세포를 용균시키는 작용이다.

위의 현상과 HY449 균주가 생산하는 박테리오신의 작용기작을 비교하여 보기 위하여 감수성이

가장 예민한 대수증식기의 미생물들을 회수하여 2회 수세하고 멸균 펩톤수에 현탁시킨 후 조 박테리오신을 처리하여 두 시간 동안 생균수와 OD_{600} 값을 측정하여 작용형태를 조사하여 본 결과 생균수는 박테리오신을 처리하지 않은 경우 거의 변화없이 10^8cfu/ml수준을 유지하였지만 박테리오신을

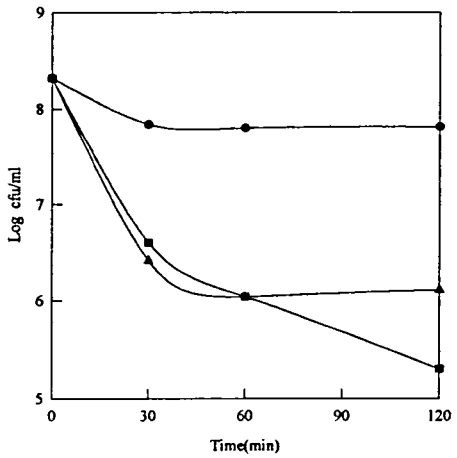

Fig. 9. Effects of bacteriocin concentration on the viable cells of indicator strains which were grown for 4 hours at 37°C in MRS broth, washed twice and resuspended in peptone solution. —●— Untreated, —■— 320 BU/ml, —▲— 1,000 BU/ml.

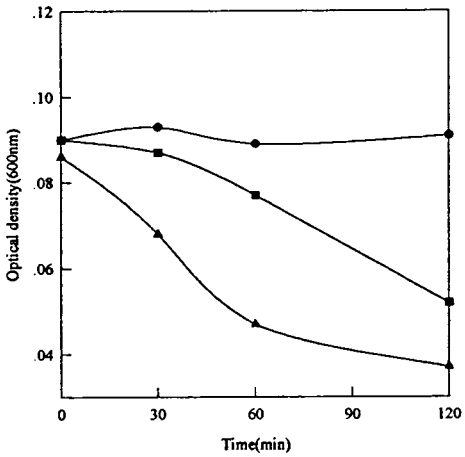

Fig. 10. Effects of bacteriocin concentration on the cell density of sensitive indicator strains which were grown for 4 hours at 37°C in MRS broth, washed twice and resusp -ended in peptone solution. —●— Untreated, —■— 320 BU/ml, —▲— 1,000 BU/ml.

처리한 두시료는 처리후 불과 30분 내에 99% 정도가 사멸하는 것으로 나타나 강한 bacteriocidal activity를 나타내었다. 또한 이 현상은 펩톤수 현탁지시균에서도 나타나 감수성이 큰 균주에 대해 용균활성을 가지는 것을 예상할 수 있었다.

지금까지 보고된 박테리오신들은 대부분이 bacteriocidal action을 보이고 bacteriolytic action을 가진 것은 많지 않았다.

Bacteriolytic action에 대한 연구 중에서 *Halobacterium mediterranei* 이 생산한 halocin H4(111)는 여러 농도로 sensitive strain인 *Halobacterium halobium* 에 처리할때 single hit Kinetics를 보이며 전자현미경 관찰에서 lytic현상을 나타내었다.

Pediococcus acidilactici 가 생산하는 pediocin AcH(Bhunia등, 1991)는 감수성이 큰 균주에 대해서만 용균활성을 가진다고 보고되어 있다. 즉, Pediocin AcH를 *Leuconostoc mesenteroides* Ly와 Lactobacillus plantarum NCDO 955이 각각 10^7 cfu/ml의 농도로 현탁되어 있는 CG broth에 첨가하여 30℃에서 2시간 배양 후의 OD600을 측정하였을때 Lb. *plantarum* NCDO 955 strain은 흡광도가 변하지 않고 일정하여 단순히 bacteriocidal action을 보인 반면 *Leu. mesenteroides* Ly strain은 흡광도가 감소하여 bacteriolytic action을 나타내는 등 같은 박테리오신의 경우도 지시균에 따라 작용형태의 차이를 보였다.

8. 결 론

최근 박테리오신의 연구는 매우 활발한 것으로 보인다. 그러나 아직도 식품 등에 사용 가능한 박테리오신은 nisin 한 가지 뿐으로 그 종류를 확대시키기 위해서는 새로운 박테리오신에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 본다. 국내의 경우는 nisin 마저도 식품에의 사용이 허용되지 않고 있는 실정이므로 신속한 관련법의 개정이 앞으로의 관련 연구를 활성화시킴은 물론 이 방면에 대한 국제적인 경쟁력의 제고에도 이바지할 것으로 생각된다.

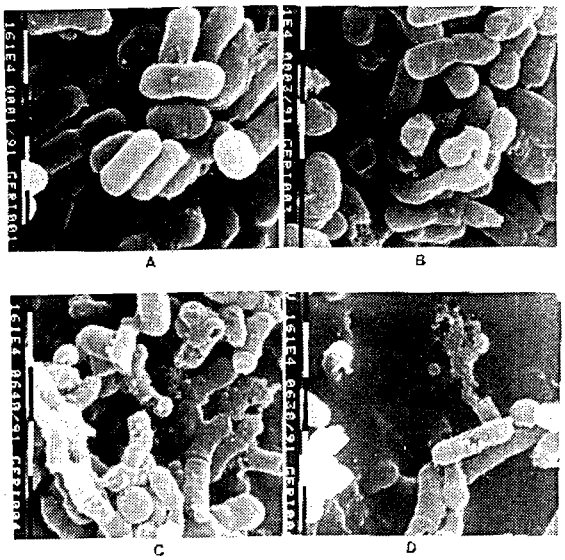

Fig. 11 Scanning electron micrographs of *Lactobacillus fermentum* IFO 3023 treated with bacteriocin. Bacteriocin concentration : 1,000 BU/ml, treated time : 20 hrs in MRS broth, (A) untreated, (B) stationary phase cells, treated, (C),(D) exponential phase cells, treated.

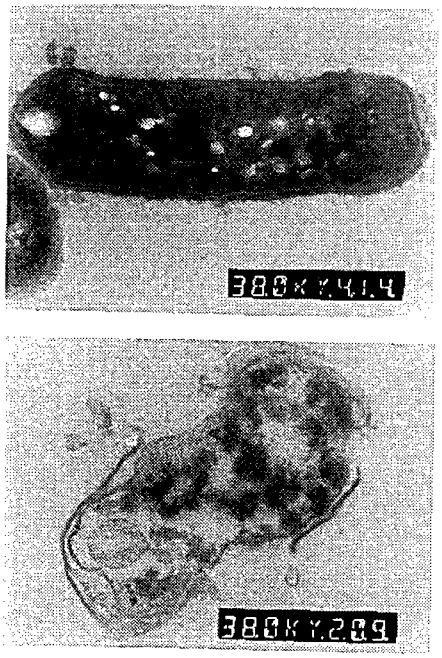

Fig. 12 Transmission electron micrographs of *Lactobacillus fermentum* IFO 3023 treated with bacteriocin. Bacteriocin concentration: 1,000 BU/ml, treated time 8 hrs in MRS broth, (A) untreated, (B) treated cells.

References

Ahn, C., and M.E. Stiles, plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 25 03-2510 (1990)

Bhunia, A.K., M.C. Johnson, B. Ray, and N. Kalchayanand, Mode of action of pediocin AcH from Pediococcus a cidilactici H on sensitive bacterial strains. J. Appl. Bacteriol. 70, 25-33(1991)

Champagne, C.P., F. Girard, and N. Morin, Inhibition of the psychrotrophic bacteria of raw milk by addition of lactic acid bacteria. *J. Food Protec.* 53, 400-403(1990)

Daeschel, M.A., M.C. McKenney, and L.C. McDonald, Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol.* 7, 91-98 (1990)

Davey, G.P., and B.C Richardson, purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus*

cremoris 346. Appl. Environ. Microbiol. 41, 84-89 (1981)

Davis, D. B., R. Dulbecco, N.H. Eisen, and S. H. Ginsberg, *Microbiology*. 4th ed. Lippincott company, E.Wachington Square, Philadelphia. PA(1990)

Diep, D. B., L.S. Havarstein, J. Nissen-Meyer, and I.F. Nes, The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus Plantaricin* Cll, is located on the same transcription unit *as agr* - 1like regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 160-166 (1994)

Eckner, K. F., Bacteriocins and food applications. *Dairy, Food and Environ. Sani.* 12, 204-209 (1992)

Gross, E., and J.L. Morell, Peptide with a-, B-unsaturated acids. *Peptides*, In E. Scoffone(ed), 356-360 (1971)

Hurst, A., Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27, 85-123 (1981)

Kato, T., T Matsuda, Y. Yoneyama, H. Kato, and R. Nakamura, Isolation of Enterococcus faecium with antibacterial and characterization of its bacteriocin. *Biosci Biotech. Biochem.* 57 551-556 (1993)

Kim, S.G Lactococcus sp. HY 449가 생산하는 박테리오신에 관한 연구. 아주대학교 박사학위 논문 (1994)

Kojic, M., J. Svircevic, A. Banina, and L. Topisirovic, Bacteriocin producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. diacitilactis S50. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1835-1837 (1991)

Kone, K., and D.Y.C Fung, Understanding bacteriocins and their uses in foods. *Dairy, Food and Environ. Sani.* 12, 282-285

Lewus, C. B., A. Kaiser, and T.J. Montville, Inhibition of food-bornebacterial pathogens by bacteriocins from lactivacid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1683~1688 (1991)

Lindgren, S. E., and W.J. Dobrogosz, Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 149-164 (1990)

Liu, W., and J.N. Hansen, Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol.* 56. 2551-2558 (1990)

Mehta, A.M., K.A patel, and P.L Dave, Purification and properties of the inhibitory protein isolated from *Lactibacillus acidophilus* AC. Microbios. 38, 73-81 (1983)

Muriana, P.M. and T.R. Klaenhammer, purification and partial characterization of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl Environ. Microbiol. 57. 114-121 (1991)

Nielsen, J.W., J.S. Dickson, and J.D. Crouse, Use of a bacteriocin produced by *pediococcus acidilactici to inhibit Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Appl. *Environ. Microbiol.* 56, 2142-2145(1990)

Parente, E., and C. Hill, Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. J. Food Protec. 55, 497-502 (1992)

Piard, J.C., and M. Desmazeaud, Inhibiting factors produced by lactic bacteria. 2. Bacteriocis and other antibacterial substances. Lait 72, 113-142 (1992)

Rammelsberg, M., and F. Radler, Antibacterial Polypeptides of *Lactobacillus* species. J. *Appl. Bacteriol* 69, 177-184 (1990)

Reddy, G.V., K. M. Shahani, B.A. Friend, and R.C. Chandan, Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophils and bulgaricus. Cult. Dairy Prod. J.*, 15-19 (1983)

Schved, F., A. Lalazar, Y. Henis, and B.J. Juven, purification, partial characterization and plasmid-likage of pediococcus acidilactci. J. Appl. Bacteriol.74, 67-77 (1993)

Scott, V. N., and S.L. Taylor, Temperature, pH, anc spores. J. Food Sci. 46, 117-120 (1981)

Scott, V. N., anss S.L. Taylor, Effect of nisin on the outgrowth of Clostridium botulinum spores. J. Food Sci 46, 117-120 (1980)

Spelhaug, S. R., and S. K. Harlander, Inhibition of foodborne bacterial phathogen by bacteriocins from *Lactococcus lactis and Pediococcus Pentosaceus. J. Food Protec.* 52. 856 (1989)

Spooner, D. F. and G. Sykes, Laboratory. In "Methods in microbiology" (J. R. Norris and D. W. Ribbons, eds.), vol. 7B, pp. 211-233. Academic

press, Inc., New York(1972)
Stilles, M. E., and J. W. Hastings, Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. Trenss Food Sci. Technol 247-251 (1991)
Suzuki, I., M. Nomura, and T. Morichi, Isolation of lactic acid bacteria which suppress mold growth and show antifungal action *Milchwissenschaft.* 46, 635-639 (1991)
Tagg, J. R., Bacterial BLIS. *ASM News*,57, 611(991)
Tage, J. R., A. S. Dajani, and L.W. Wannamaker, Bacteriocins of Gram-positive bacterial BLIS. ASM Mews, 57, 611 (1991)
Tagg, J. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker, Bacteriocins of Gram-positive bactera, Bacteriol. Rev., 40, 722-756 (1976)
Toba, T., S. K. Samant, anc T. Itoh, Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 102-104 (1991)
Tramer, J., and G.G Fowler, Estimation of nisin in foods. J. Sci. *Food Agric.* 15. 522-528 (1964)
Vaughan, E. E., C. Daly, and G. F. Fitzgerald, Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacterocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. J. Appl. Bacteriol. 73, 299-308 (1992)
Waites, M. J., and K. Ogden, The estimation of nisin using ATP-Bioluminometry. *J. Inst. Brew.* 93, 30 (1987)
Winkowski, K., A. D. Crandall, and T. J. Montville, Inhibition of Listeria monocytogenes by Lactobacillus bavaricus MN in beef systems at remperatures. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2552-2557 (1993)