

## 식품중에 함유된 *Leuconostocs* 균주의 새로운 선택배지 개발

최학중 · 신영재 · 유주현\* · 윤성식

연세대학교 생물자원공학과, \*연세대학교 식품생물공학과

### A New Selective Medium for the Isolation and the Detection of *Leuconostocs* in Foodstuffs

Hak-Jong Choi, Young-Jae Shin, Ju-Hyun Yu\* and Sung-Sik Yoon

Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University

\*Department of Food and Biotechnology, Yonsei University

#### Abstract

To develop a selective medium for the isolation and the detection of *leuconostocs* from the various samples including fermented vegetables, ten strains of *leuconostocs* and seven strains of *lactobacilli* were tested for their sensitivity to various antibiotics. The basal-medium containing 5 µg/ml of novobiocin inhibited the growth of *lactobacilli* completely, but not that of *leuconostocs*. On the basis of this result, a new selective medium was developed and to be named NLS medium. This medium contains 1% Tryptone (Difco), 0.1% Yeast Extract (Difco), 2% sucrose, 0.1% Beef Extract (BBL), 0.5% sodium acetate, 0.2% ammonium sulfate, 0.01% magnesium sulfate, 0.2% dipotassium phosphate, 0.05% sorbic acid, 75 ppm sodium azide (Sigma), 0.1% (vol/vol) Tween 80, 30 µg/ml of Vancomycin (Sigma), 5 µg/ml of Novobiocin (Sigma), 0.5 mg/ml of cysteine HCl, and 1.5% Agar (Difco). All of the eighty six isolates obtained from some foodstuffs were identified as members of the genus *Leuconostoc*. Comparative counts with the MRS, PES, LUSM, and NLS medium indicated that the recovery percent was lower than other selective media. Therefore, this result suggested that NLS medium was suitable for the isolation of *leuconostocs*, but not for counting or enumerating.

Key words: *Leuconostoc*, Novobiocin, selective medium, fermented vegetables

#### 서 론

*Leuconostocs*는 원래 Orla-Jesen에 의해 *Betacoccus*로 불리던 식물체의 표면에 서식하는 그람양성, 이형 발효형 젖산균으로 *Deinococcaceae* 과에 속하며 이들은 glucose를 분해시켜 lactic acid 뿐 아니라 acetic acid, ethanol, CO<sub>2</sub> gas를 생성한다<sup>(1)</sup>. 또한 *leuconostocs*는 우유 및 유제품과 김치, sauerkraut, cabbage pickle과 같은 침채류 및 silage, herbage, 그리고 포도주 등에서 분리할 수 있다. *Leuconostocs*는 치즈나 fermented butter milk와 같은 유제품에서 starter로 사용되어 왔으며, 특히 침채류에서는 발효 초기에 왕성하게 증식하여 이상발효 억제와 저장성에 영향을 주면서, 방향성 C<sub>6</sub> 화합물인 diacetyl과 acetoin을 생산

하여 풍미를 증진시키는 것으로 알려져 있다<sup>(2)</sup>. 최근 들어 *leuconostocs*에 대한 연구가 다각적으로 수행되면서 선택배지의 중요성이 깊이 인식되어져 왔다. 그러나 효율적으로 *leuconostocs*만을 순수분리하는 데에는 2주일 정도의 긴 시간이 소요되므로 경제적 손실과 아울러 효율적인 연구 수행을 가로막는 주된 요인으로 인식되어져 왔다.

1960년대부터 *leuconostocs*만을 선택적으로 신속하게 분리할 수 있는 선택배지의 개발이 수행되어 왔다. Mayeux와 Colmer<sup>(3)</sup>는 탄소원을 sucrose로 한 기본배지에 sodium azide를 0.005% 첨가하여 선택배지를 개발하였고, Mayeux 등<sup>(4)</sup>은 배지에 sodium azide를 75 ppm 첨가하여 선택배지를 제조하였으며, McDonough 등<sup>(5)</sup>은 배지에 tetracycline을 최종 농도 0.15 µg/ml가 되게 첨가하여 조제하였다. Garvie<sup>(6)</sup>, Teuberd와 Geis<sup>(7)</sup>, 그리고 Cogan<sup>(8)</sup>은 *leuconostocs*이 탄소원으로서 citrate를 이용할 수 있는 특성에 착안하여 불용성 calcium ci-

Corresponding author: Sung-Sik Yoon, Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Wonju, Kangwondo 222-710, Korea

trate가 첨가된 배지에서 균락의 주위가 투명해지는 균락을 *leuconostocs*으로 분리하기도 하였다. Miyao와 Ogawa<sup>(9)</sup>는 *leuconostocs*이 sucrose를 이용할 수 있는 점에 착안하여 배지의 당원을 sucrose로 대체하고, 그람 음성균의 DNA 합성을 저해하는 phenylethyl alcohol<sup>(10)</sup>을 0.25% 첨가하여 PES 배지를 제조하였다. 또한 Benkerroum 등<sup>(12)</sup>은 *leuconostocs*이 vancomycin에 대한 내성이 다른 젖산균속 보다 60배 이상 강하다는 성질<sup>(13-15)</sup>에 초점을 맞추어 배지를 제조하였다. 그러나 위와 같은 선택배지로는 *leuconostocs*을 순수하게 분리할 수 없는 결점이 있었다. 발효 침채류에 서식하는 *Lactobacillus plantarum* 및 이형발효형 *lactobacilli*는 탄소원으로 citrate를 이용할 수 있으며<sup>(16)</sup>, 몇몇 *lactococci* 균주 역시 이 물질을 이용할 능력이 있는 문제가 있다<sup>(12)</sup>. 또한 *L. plantarum*과 이형발효형 *lactobacilli* 역시 vancomycin 저항성이 2,000 µg/ml 이상이므로 효과적으로 *leuconostocs*만을 분리할 순 없었다<sup>(15)</sup>.

따라서 본 연구는 여러가지 식품시료로부터 *leuconostocs* 균주를 효율적으로 분리 검색할 수 있는 *leuconostocs*의 선택배지를 개발하고, 이 배지의 분리 효율을 기존의 배지들과 상호비교한 결과이다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용된 각종 항생제는 Sigma사로부터 구입하여 사용하였으며, 여러 종류의 배지 성분들은 Difco사와 BBL사로부터 각각 구입하여 사용하였다.

### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 Table 1과 같으며, 모든 균주는 MRS 배지에서 2일마다 계대배양하여 사용하였다. 각 균주는 20% glycerol이 함유된 MRS 배지에 접종하여 -70°C deep freezer (ISE)중에서 보존하였다.

### 항생제 저항성 조사

항생제 저항성 조사는 Bauer-Kirby 방법<sup>(17)</sup>을 약간 변형하여 disk susceptibility test로 실시하였다. 액체배지에서 4~5시간 배양한 시험균주를 고체배지에 약  $5.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^8$  CFU/ml가 되게 도말한 후, paper disk (5.0 mm diameter)에 항생제를 농도별로 적서 고체배지에 올려놓은 다음 20~24시간 배양하여 저해 여부를 측정하였다. 이때 bacitracin, tetracycline은 Muller-Hinton agar (Difco)를 사용하였으며, 나머지 다른 항생제는 MRS 고체배지를 사용하여 실시하였다.

Table 1. Bacterial strains in this study

Organism	Source <sup>1)</sup>	Novobiocin MIC (µg/ml) <sup>2)</sup>
<i>Leuconostoc</i>		
<i>mesenteroides</i> subsp.		
<i>mesenteroides</i> KCTC 3541	DSIT	10
<i>mesenteroides</i> KCTC 12030	DSIT	10
<i>mesenteroides</i> KCCM 11324	KCCM	10
<i>dextranicum</i> KCCM 35046	KCCM	10
<i>cremoris</i> YSD 11	Our laboratory	10
<i>cremoris</i> ATCC 19254	ATCC	10
<i>lactis</i> KCCM 12204	KCCM	<0.2
<i>paramesenteroides</i> KCCM 40114	KCCM	10
<i>Leuconostoc</i> sp. J2	This study	10
<i>Leuconostoc</i> sp. PHJ3	This study	30
<i>Leuconostoc</i> sp. LHJ'A1	This study	10
<i>Leuconostoc</i> sp. LH79	Our laboratory	10
<i>Leuconostoc</i> sp. LH24	Our laboratory	10
<i>Lactobacillus</i>		
<i>plantarum</i> KCCM 12116	KCCM	<0.2
<i>plantarum</i> KCCM 11322	KCCM	<0.2
<i>plantarum</i> KCCM 11542	KCCM	<0.2
<i>plantarum</i> KCCM 40013	KCCM	1
<i>brevis</i> KCCM 11904	KCCM	2.5
<i>brevis</i> KCCM 35464	KCCM	1
<i>brevis</i> KCCM 11509	KCCM	1

<sup>1)</sup>DSIT, Dusan Institute of Technology; KCCM, Korean Culture Center of Microorganism; ATCC, American Type Culture Collection

### 선택배지의 제조

선택배지의 성분은 Table 2와 같다. 기본배지를 제조하여 고온가압살균하고 약 50°C로 식힌 후 0.25 µm membrane filter (Millipore)로 제균한 novobiocin, vancomycin, cysteine HCl을 무균적으로 각각 5 µg/ml, 30 µg/ml, 0.5 mg/ml가 되게 첨가하여 petri dish에 약 20 ml씩 분주하고 상온에서 굳힌 후 사용하였다.

### 균주의 분리

전국 각지에서 수집한 김치, 원유, cheese 시료를 생리적 식염수에 적당히 희석한 후 선택배지에 도말하여 30°C에서 24~30시간 배양하고, 생성된 집락을 모두 MRS 고체배지에 이식하였다. 이 균주들은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>(1)</sup>에 준하여 CO<sub>2</sub> gas 형성실험, esculin 가수분해 실험 및 당발효성 검사 등을 통하여 동정하였다.

### 혼탁도 측정

Novobiocin의 농도를 각각 2.5~25 µg/ml로 첨가한 선택배지 액체배양액에 각 시험균주를 1% 접종하여

**Table 2. Composition of NLS medium**

Component	Amount per liter
Basal medium	10 g
Tryptone(Difco)	1 g
Yeast extract(Difco)	1 g
Beef extract(BBL)	20 g
Sucrose	5 g
Sodium acetate	0.1 g
Magnesium sulfate	2 g
Ammonium sulfate	2 g
Dipotassium phosphate	0.5 g
Sorbic acid	0.0075 g
Sodium azide	1 g
Tween 80	15 g
Agar(Difco)	
Filter-Sterilized	30 µg/ml
Vancomycin(Sigma)	5 µg/ml
Novobiocin(Sigma)	0.5 mg/ml
Cysteine HCl	

24시간 배양하고, spectrophotometer (Shimazu UV-1201)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 생육여부를 조사하였다.

**선택배지의 분리 효율성**

MRS<sup>(18)</sup>, PES<sup>(9)</sup>, LUSM<sup>(12)</sup> 고체배지와 본 실험에 쓰인 선택배지를 제조하고, *leuconostocs* 표준균주를 생리적 식염수에 순차적으로 희석하여 각 배지에 도말하고, 30°C에서 24~30시간 배양하였다. 각 배지별로 생성된 집락의 수를 비교하여 분리율을 검토하였다.

**결과 및 고찰**

**항생제 저항성 조사**

선택배지 첨가용 항생제를 탐색하고자 각 젖산균주에 대하여 여러가지 항생제를 농도별로 첨가하여 sensitivity를 조사하였다. Tetracycline, neomycin, erythromycin, streptomycin, bacitracin은 통성 이형발효형인 *L. plantarum*과 이형발효형인 *L. brevis* 및 *leuconostocs* 속 균주의 생육을 모두 저해하는 것으로 MIC가 비교적 동일하게 나타났지만 Table 1에서 보는 바와 같이 novobiocin은 농도를 5 µg/ml로 하였을 경우 선택적으로 *L. plantarum*과 *L. brevis*의 생육을 저해하면서 *leuconostocs*의 생육은 저해하지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 novobiocin을 기본배지에 최종 농도 5 µg/ml가 되게 첨가함으로써 *L. plantarum*, *L. brevis*와 *leuconostocs*가 혼합된 김치 및 유제품, 혼합 starter에서 *leuconostocs*의 선택배지의 제조시 사용할

수 있을 것으로 생각되었다.

**Novobiocin과 vancomycin을 이용한 선택배지**

Vancomycin은 *Streptomyces orientalis*가 생산하는 glycopeptide계 항생제로서, 그람양성균에 대하여 세포벽 생합성을 방해함으로써 생육을 저해하지만 그람 음성균에는 저해작용이 없다<sup>(19)</sup>. *Lactococcus*, *Enterococcus*와 같은 젖산균주에 대하여도 vancomycin은 큰 생육저해능을 나타내지만<sup>(12,14)</sup> *leuconostocs*의 경우, vancomycin에 대한 MIC가 500 µg/ml 이상으로 다른 젖산균주에 비해 매우 큰 것이 특징이다. 위와 같은 성질을 이용하여 Simpson 등<sup>(15)</sup>은 주류의 가공에 이용되는 각 젖산균주들을 효과적으로 분리하고자 vancomycin을 배지에 50 µg/ml 첨가하여 배지를 제조하였으며, Benkerroum 등<sup>(12)</sup>은 vancomycin을 배지에 30 µg/ml 첨가하여 *leuconostocs*의 선택배지를 제조하였다. 그러나 침채류에 서식하는 *L. plantarum*과 *L. brevis*는 vancomycin에 대한 MIC 역시 2,000 µg/ml 이상으로 높기 때문에<sup>(15)</sup> vancomycin만을 첨가한 배지는 침채류의 경우에 *leuconostocs*에 대한 선택적 효과가 매우 낮다는 문제가 있다. 따라서 본 연구에서는 vancomycin을 30 µg/ml 첨가하였다. 또한 *Pediococcus* 속 균주 역시 vancomycin에 대하여 저항성이 있으나<sup>(14,15)</sup>, 탄소원으로 sucrose를 이용할 수 없다<sup>(14)</sup>. 따라서 본 연구에서는 탄소원을 sucrose로 하여 선택적 효과를 높였다. Novobiocin은 DNA gyrase subunit에 대한 ATP의 결합을 방해하여 DNA의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있는 항생제로서<sup>(20)</sup>, 기본배지에 최종농도 5 µg/ml 첨가시 *L. plantarum*과 *L. brevis*의 생육을 선택적으로 저해하였다. 일반적으로 sorbic acid는 효모와 곰팡이의 생육을 선택적으로 저해하는 성질을 나타내며, 오히려 *leuconostocs*의 생육을 촉진하는 역할을 나타낸다<sup>(21,22)</sup>. Sodium azide는 대부분의 젖산균과 그람음성균에 대하여 생육저해력이 있으며<sup>(4)</sup>, cysteine HCl은 일반적으로 생육속도가 늦은 *leuconostocs*의 생육을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>(1)</sup>. 위와 같은 결과를 바탕으로 *leuconostocs*만을 순수하게 분리할 수 있는 선택배지를 제조하였으며 NLS (novobiocin *leuconostoc* selective medium) 배지라 명명하였다(Table 2).

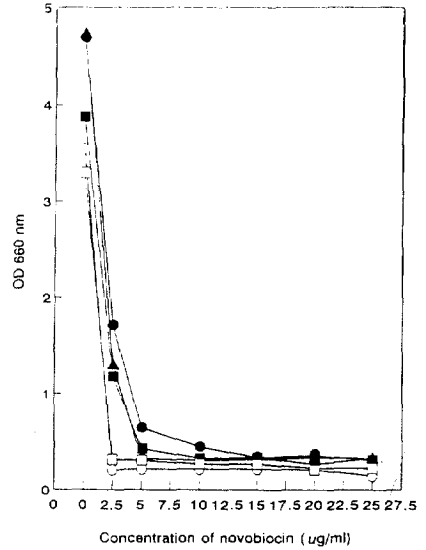
**균주의 분리 및 동정**

NLS 배지를 이용하여 김치, 원유 및 cheese로부터 총 86균주를 분리하였다. 이들은 모두가 그람양성, catalase 양성이었고, MRS 배지에서 간구균 형태를 나타

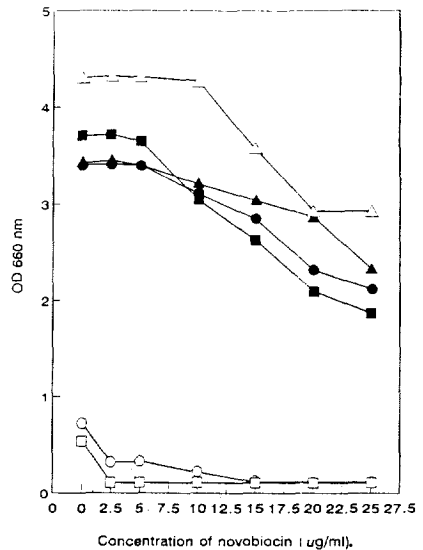
**Table 3. Differential characteristics of the isolated leuconostocs**

Characteristic	<i>Leuconostoc</i> sp. J2	<i>Leuconostoc</i> sp. PHJ3	<i>Leuconostoc</i> sp. LHJ'A1
Acid from;			
Arabinose	+	-	-
Cellobiose	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Dextrin	+	+	+
Fructose	+	+	+
Galactose	-	+	+
Glucose	+	+	+
Inositol	-	-	-
Lactose	-	-	-
Maltose	+	+	+
Mannitol	-	-	-
Melibiose	+	+	+
Raffinose	+	-	-
Rhamnose	-	-	-
Saccharose	+	+	+
Sorbitol	-	-	-
Sucrose	+	+	+
Trehalose	-	-	+
Xylose	-	-	-
Dextran formation	+	-	+
Hydrolysis of esculin	-	-	-
CO <sub>2</sub> gas formation	+	+	+
Final pH in MRS broth	4.3	4.3	4.5

내었으며, glucose로부터 CO<sub>2</sub> gas를 생성하였고, esculin 가수분해는 하지 못하는 것으로 나타났다. 또한 MRS 배지에서 정지기까지 배양시 배지의 최종 pH를 4.3~4.5까지 낮추었다. 당발효실험을 통하여 본 결과 Table 3에서 나타난 바와 같이 모든 균주가 *Leu. mesenteroides*, *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leu. paramesenteroides*와 비교적 일치하였으나 분리 균주 모두 lactose 분해능은 없는 것으로 나타났다. 특히 leuconostocs 중 *Leu. mesenteroides*와 *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*의 특징으로는 sucrose를 이용하여 dextran을 형성하는데<sup>(1)</sup> 분리균주중 82균주가 dextran을 형성하였다. Dextran 형성 균주의 경우 *Leu. mesenteroides*와 *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*과 당발효형식이 거의 일치하였으며, dextran을 형성하지 못한 4균주는 *Leu. paramesenteroides*와 비교적 일치하였으나, *Leu. lactis*와 *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*와 일치하는 균주는 검출할 수 없었다. *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*의 경우 sucrose를 탄소원으로 이용할 수 없으며<sup>(1)</sup>, *Leu. lactis*의 경우 novobiocin에 sensitive하여(Table 1) sucrose와 novobiocin을 사용한 NLS 배지로는 분리가 불가능하다고 판단되었다. 위와 같은 결과로 NLS 배지는 leu-



**Fig. 1. Effect of novobiocin level on lactobacilli grown in NLS broth for 24 hr, ●—●; *L. plantarum* KCCM 12116, ■—■; *L. plantarum* KCCM 11322, ▲—▲; *L. plantarum* KCCM 40013, ○—○; *L. brevis* KCCM 35464, □—□; *L. brevis* KCCM 11904**



**Fig. 2. Effect of novobiocin level on leuconostocs in NLS broth for 24 hr, ●—●; *Leu. mesenteroides* KCTC 3541, ■—■; *Leu. mesenteroides* KCCM 11324, ▲—▲; *Leu. dextranicum* KCCM 35046, ○—○; *Leu. cremoris* ATCC 19254, □—□; *Leu. lactis* KCCM 12204, △—△; *Leuconostoc* sp. J2**

conostocs의 균총이 *Leu. lactis*, *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* 및 *Leu. mesenteroides*인 원유, 유제품<sup>(1,8)</sup>보다 균총이 *Leu. mesenteroides*, *Leu. mesen-*

**Table 4. Comparative counts of leuconostocs in several selective media**

Organism	Different media <sup>1)</sup>			
	MRS	PES	LUSM	NLS
<i>Leu. mesenteroides</i> KCTC 3541	28 × 10 <sup>7</sup>	24 × 10 <sup>7</sup> (86) <sup>2)</sup>	17 × 10 <sup>7</sup> (60)	12 × 10 <sup>7</sup> (43)
<i>Leu. mesenteroides</i> KCCM 11324	34 × 10 <sup>7</sup>	29 × 10 <sup>7</sup> (85)	26 × 20 <sup>7</sup> (75)	19 × 10 <sup>7</sup> (56)
<i>Leu. dextranicum</i> KCCM 35046	32 × 10 <sup>7</sup>	32 × 10 <sup>7</sup> (100)	21 × 10 <sup>7</sup> (66)	16 × 10 <sup>7</sup> (50)
<i>Leu. cremoris</i> ATCC 19254	13 × 10 <sup>7</sup>	0 (0)	7 × 10 <sup>7</sup> (54)	0 (0)
<i>Leu. lactis</i> KCCM 12204	14 × 10 <sup>7</sup>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Leuconostoc</i> sp. J2	43 × 10 <sup>7</sup>	41 × 10 <sup>7</sup> (95)	33 × 10 <sup>7</sup> (77)	22 × 10 <sup>7</sup> (51)
<i>Leuconostoc</i> sp. LH79	54 × 10 <sup>7</sup>	54 × 10 <sup>7</sup> (100)	42 × 10 <sup>7</sup> (78)	39 × 10 <sup>7</sup> (72)

<sup>1)</sup>MRS, lactobacilli MRS medium<sup>(18)</sup>; PES, phenylethyl alcohol sucrose medium<sup>(9)</sup>; LUSM, leuconostocs selective medium<sup>(12)</sup>; NLS, novobiocin leuconostoc selective medium, this study

<sup>2)</sup>Recovery percent

*teroides* subsp. *dextranicum* 및 *Leu. paramesenteroides* 인 김치와 같은 침채류<sup>(1,23)</sup>에서의 이용이 더욱 적합한 것으로 나타났다. 따라서 토양이나 원유 및 유제품 등 각종 시료로부터 leuconostocs의 모든 균주를 분리하기 위하여는 NLS 배지의 분리 한계를 극복할 수 있는 배지의 개발이 요구된다.

**NLS broth의 효율성**

NLS 배지의 broth 상태에서의 효율성을 조사하기 위하여 novobiocin의 최종농도를 각각 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 µg/ml가 되게 첨가하여 각 시험균주의 생육 여부를 실험하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 novobiocin을 2.5 µg/ml 첨가시에는 *L. plantarum*과 *L. brevis*의 생육을 완전히 저해하지는 못하였으나 5 µg/ml 첨가시에는 lactobacilli의 생육을 완전히 저해하는 것으로 나타났다. 또한 Fig. 2에서 보는 바와 같이 novobiocin의 농도를 높일수록 leuconostocs의 생육은 점차 감소하는 추세를 나타냈다. McDonough 등<sup>(9)</sup>도 본 실험과 마찬가지로 tomato juice 액체배지에서 tetracycline 농도를 0.15 µg/ml로 하였을 경우 leuconostocs의 생육에는 거의 영향을 주지 않으면서 streptococci의 생육을 거의 저해하였으나 tetracycline의 농도를 높일수록 leuconostocs 역시 생육이 점차 감소하는 추세를 나타냈다. 그러나 novobiocin을 같은 농도로 첨가한 한천배지 상에서는 leuconostocs의 생육 감소현상이 액체 배지 보다 적게 나타났다(data not shown).

**선택배지의 분리 효율성**

MRS 배지를 기준으로 하여 각 leuconostocs 선택배지에 leuconostocs 표준균주들을 도말한 결과 회복율은 Table 4에 나타내었다. MRS 배지의 회복율을 100%로 하였을 때 회복율은 PES 배지<sup>(9)</sup>가 가장 높았으며, NLS 배지가 가장 낮았다. 그러나 PES 배지의 경우 탄

소원으로 sucrose를 사용하였기 때문에 *Leu. lactis*와 *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*의 분리 및 계수는 불가능하였다. NLS 배지 역시 마찬가지였다. 반면 leuconostocs가 비교적 고르게 생육할 수 있는 배지는 LUSM 배지<sup>(12)</sup>로서 대부분의 leuconostocs가 생육하는 것으로 나타났다. 지금까지 연구된 leuconostocs 선택 배지는 주로 유제품에 관련된 것이었다. 반면 phenylethyl alcohol을 첨가한 PES 배지의 경우는 fermented pickle에서 leuconostocs의 분리를 위한 것이나, phenylethyl alcohol의 가격이 너무 비싸면서 leuconostocs만을 순수하게 분리할 수 없다는 결정적인 단점이 있으며, LUSM 배지의 경우 유제품의 분리 계수용 배지로는 적합하나, 침채류에 있어서는 *L. plantarum* 및 이형발효형 lactobacilli의 생육을 저해하지 못하므로 부적합하다. Table 4에서 보듯이 NLS 배지는 분리 효율성이 43~72%로 다른 선택배지에 비하여는 상대적으로 낮으므로 leuconostocs의 계수를 위한 배지로는 적합하지 않으나, 김치와 같은 침채류 시료로부터 leuconostocs만을 단독으로 분리할 수 있었다. 따라서 NLS 배지는 침채류, 원유 및 토양 등에 존재하는 leuconostocs를 신속하게 분리할 수 있는 새로운 선택 배지로서의 응용성이 크게 기대될 수 있을 것이다.

**감사의 글**

본 연구는 1995년 매지학술연구비의 부분적인 지원에 의하여 이루어진 내용의 일부로서 이에 감사를 드립니다.

**요 약**

*Leuconostocs*는 김치를 비롯한 침채류의 발효에 중요한 세균이나 phenylethyl alcohol이나 vancomycin을

첨가하는 기존의 분리방법은 leuconostocs만을 순수분리할 수 없었을 뿐 아니라 가격이 비싼 것이 단점이었다. 여러가지 식품시료로부터 leuconostocs 균주를 저렴하고도 효과적으로 분리할 수 있는 선택배지를 개발하기 위하여 모두 17균주의 leuconostocs와 lactobacilli에 대한 항생제 내성을 조사한 결과 leuconostocs의 novobiocin에 대한 MIC가 lactobacilli에 비해 5배 이상 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과를 기초로 하여 novobiocin이 첨가된 leuconostocs의 선택배지를 조제한 바 그 조성은 다음과 같다; 1% Tryptone (Difco), 0.1% Yeast Extract (Difco), 2% sucrose, 0.1% Beef Extract (BBL), 0.5% sodium acetate, 0.2% ammonium sulfate, 0.01% magnesium sulfate, 0.2% dipotassium phosphate, 0.05% sorbic acid, 75 ppm sodium azide (Sigma), 0.1% (vol/vol) Tween 80, 30 µg/ml Vancomycin (Sigma), 5 µg/ml Novobiocin (Sigma), 0.5 mg/ml cysteine HCl, 1.5% Agar (Difco). 이 leuconostocs의 선택배지를 이용하여 여러가지 종류의 김치, 원유, cheese에서 총 86균주의 미생물을 분리하였다. 분리된 균들은 몇 가지 biochemical test를 통하여 동정한 결과 모두 *Leuconostoc* 속으로 확인되었으나 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*와 *Leuconostoc lactis*는 검출할 수 없었다. 특히 이 배지는 분리 효율성이 MRS 배지에 비해 상대적으로 낮으므로 계수용 배지보다는 순수분리용 선택배지로의 이용이 적합하다 판단되었다.

## 문 헌

- Garvie, E.I.: Genus *Leuconostoc*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.(ed.), The Williams & Wilkins, Baltimore, Vol.2, p.1071 (1986)
- Sorells, S.G., Hendrickson, R.L. and Olson, H.C.: Inhibition of *Salmonella gallinorum* by cultured filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *J. Dairy Sci.*, **53**, 239 (1970)
- Mayeux, J.V. and Colmer, A.R.: Selective medium for *Leuconostoc* detection. *J. Bacteriol.*, **81**, 1009 (1961)
- Mayeux, J.V., Sandine, W.E. and Elliker, P.R.: A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, **45**, 655 (1962)
- McDonough, F.E., Hargrove, R.E. and Tittsler, R.P.: Selective plating medium for *Leuconostoc* in mixed-lactic cultures. *J. Dairy Sci.*, **46**, 386 (1963)
- Garvie, E.I.: Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Methods Microbiol.*, **16**, 147 (1984)
- Teuber, M. and Geis, A.: The family *Streptococcaceae* (nonmedical aspects). In *The Prokaryotes*, Starr, M.P. (ed.), Springer-Verlag, New York, Vol. 2, p.1614 (1981)
- Cogan, T.M.: The leuconostocs: milk products. In *Bacterial Starter Cultures for Foods*, Gilliland, S.E.(ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla, p.25 (1985)
- Miyao, S. and Ogawa, T.: Selective media for enumerating lactic acid bacteria groups from fermented pickles. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **36**, 610 (1988)
- Berrah, G. and Konetzka, W.A.: Selective and reversible inhibition of the synthesis of bacterial deoxyribonucleic acid by phenethyl alcohol. *J. Bacteriol.*, **83**, 738 (1962)
- Dowell, Jr., V.R., Hill, E.O. and Altemeier, W.A.: Use of phenethyl alcohol in media for isolation of anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.*, **88**, 1811 (1964)
- Benkerroum, N., Misbah, M., Sandine, W.E. and Elaraki, A.T.: Development and use of a selective medium for isolation of *Leuconostoc* spp. from vegetables and dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 607 (1993)
- Orberg, P.K. and Sandine, W.E.: Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 1129 (1984)
- Facklam, R., Hollis, D. and Collins, M.D.: Identification of gram-positive coccid and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 724 (1989)
- Simpson, W.J., Hammond, J.R.M. and Miller, R.B.: Avoparcin and vancomycin: useful antibiotics for the isolation of brewery lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **64**, 299 (1988)
- Kennes, C., Dubourguier, H.C., Albagnac, G. and Nyns, E.J.: Citrate metabolism by *Lactobacillus plantarum* isolated from orange juice. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 380 (1991)
- Barry, A.L. and Thornsberry, C.: Susceptibility testing: Diffusion test procedures. In *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed., Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, Jr., W.J. and Truant, J.P.(ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.463 (1980)
- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130 (1960)
- Perkins, H.R.: Vancomycin and related antibiotics. *Pharmacol. Ther.*, **16**, 181 (1982)
- Lancini, G. and Parenti, F.: *Antibiotics: An Integrated View.*, Springer-Verlag, New York, p.154 (1982)
- Emard, L.O. and Vaughn, R.H.: Selectivity of sorbic acid media for the catalase negative lactic acid bacteria and clostridia. *J. Bacteriol.*, **63**, 487 (1952)
- Beuchat, L.R.: Synergistic effects of potassium sorbate and sodium benzoate on thermal inactivation of yeasts. *J. Food Sci.*, **46**, 771 (1981)
- Fleming, H.P., McFeeters, R.F. and Daeschel, M.A.: The lactobacilli, pediococci, and leuconostocs: Vegetable products. In *Bacterial Starter Cultures for Foods*, Gilliland, S.E.(ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla, p.97 (1985)