

## 젓갈유래 박테리오신 Lacticin NK24에 의한 식품부패 및 병원성 세균의 생육저해

김혜정 · 이나경 · 조상문\* · 김기태\*\* · 백현동  
경남대학교 공과대학 식품공학과, \*경남보건환경연구원, \*\*프로코 바이오텍(주)

### Inhibition of Spoilage and Pathogenic Bacteria by Lacticin NK24, a Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* NK24 from Fermented Fish Food

Hae-Jung Kim, Na-Kyoung Lee, Sang-Moon Cho\*, Kee-Tae Kim\*\* and Hyun-Dong Paik

Department of Food Engineering, Kyungnam University,

\*Kyungsangnam-do Provincial Government Institute of Health and Environment,

\*\*PROCO Biotech Co.

#### Abstract

Bacteriocins are natural antimicrobial compounds produced by many microorganisms associated with foods, so that there is currently much interest in their use as food biopreservatives. Goal of this study was to partially evaluate lacticin NK24 as a food biopreservative by showing antimicrobial activity of *L. lactis* NK24 and lacticin NK24 against food-borne spoilage and pathogenic bacteria, respectively. Lactic acid bacteria NK24 isolated from jeot-gal, Korean fermented fish foods, was tentatively identified as *Lactococcus lactis* and showed broad spectrum of activity against all of spoilage and pathogenic bacteria tested by deferred method. Bacteriocin production in jar fermenter was detected at the mid-log growth phase, and reached the maximum at the early stationary phase, but decreased after the stationary phase. Lacticin NK24 was partially purified by 75% ammonium sulfate precipitation followed by subsequent dialysis. This partially purified lacticin NK24 showed antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium perfringens*, some *bacilli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Sphin-gomonas pausimobilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Thus, lacticin NK24 examined in this study show promise as a biopreservative be-cause of their broad spectrum of activity.

Key words: bacteriocin, fermented fish food, lactic acid bacteria, food pathogen, inhibition

#### 서 론

인간은 오래 전부터 식품의 변질을 막고 저장성을 향상시키기 위해 끊임 없이 다양한 방법을 시도하여 왔다. 가열, 동결과 건조 등 물리적인 방법, 미생물 발효에 의한 방법, 식품의 산성화 방법, 소금·설탕을 이용한 절임방법 및 화학합성방부제 첨가 등의 방법을 사용하였다. 그러나 이러한 방법은 모든 식품에 적용되지 않고 특히 화학합성방부제의 사용은 대부분이 자체 독성 때문에 사용량이 제한되어 있고 소비자들이 기피하고 있는 실정임에도 불구하고 보다 효율적인 대체방안이 없으므로 인해 지금까지 계속 사용되고 있다<sup>(1,2)</sup>.

최근 들어 소비자들은 식품의 안전성에 매우 관심이 크며, 인공적인 방부제나 식품첨가물이 적게 들어가거나 첨가되지 않은 자연식품을 선호하고 있다. 따라서 화학물질인 방부제나 식품첨가물의 사용을 줄일 수 있는 방법이 시급히 요구되고 있다.

박테리오신은 미생물이 생산하는 천연의 무독성 방부제로 주목받고 있는 항균성 단백질이며 인체에 섭취되면 소화기관의 단백질 가수분해효소에 의해 분해되므로써, 인체에 무독하고 잔류성이 없다는 점에서 식품 등의 천연방부제로서의 효용성이 증대되고 있다<sup>(3)</sup>. 이것은 또한 비교적 고온에서 불활성화 되지 않으며, 광범위한 pH에서 안정성을 갖는 것이 특징이고 무색, 무취이므로 화학합성방부제를 대체할 수 있는 천연방부제로서 광범위한 용도개발이 기대된다. 즉, 발효유, 발효알콜음료, 통조림, 냉장·냉동제품에서의

Corresponding author: Hyun-Dong Paik, Department of Food Engineering, Kyungnam University, 449 Wolyoung-Dong, Habpo-Gu, Masan 631-701, Korea

저장성 향상 외에도 고추장, 된장, 두부, 유산균 발효 제품 등의 저장연장 및 김치, 약주, 탁주 등 전통식품의 산패 및 변질방지, 어패류의 신선도 유지와 콩나물 등 과실 및 야채류의 저장성을 향상시킬 수 있다.

박테리오신에 대한 연구는 대장균이 생산하는 항균성 단백질을 colicin이라 명명함으로써 시작되었고, 치즈의 starter로서 널리 사용되고 있는 *Lactococcus lactis*(이전의 *Streptococcus lactis*)가 유산균 *Lactococcus bulgaricus*의 생육을 저해한다는 사실이 Rogers (1928)에 의해 처음으로 보고되었고, 1947년 Mattick와 Hirsch가 이 항균물질을 nisin이라 최초로 명명하고, Hirsch에 의해 처음으로 식품보존제로서 사용되었으며, 지속적인 연구개발을 통해 산업화되어 있는 대표적인 박테리오신이 되었다<sup>(4)</sup>.

식품 중의 단백질, 탄수화물, 지질 등이 식품 부패 미생물의 증식 및 효소의 작용으로 분해 또는 파괴되어 식품가치를 잃어버리고 미생물 대사산물 등에 의하여 인체에 해로운 경우가 많으므로 식품위생상 급성 또는 만성중독을 일으키게 된다. 식품매개질환의 발생은 그 사회의 생활환경 변화와 밀접한 관계를 가지고 있다. 가족중심 도시락에서 학교집단급식으로, 관혼상제의 자가음식집대에서 식당음식집대로, 음식점의 증가, 산업화에 따른 단체급식의 일반화, 교통수단의 발달에 따라 전국적인 식품연결망의 다양화, 다양한 음식의 개발 및 수입, 패스트푸드점 이용 증가 등으로 현대인들은 식품을 매개로 하는 식중독에 의한 사고가 계속적으로 증가하고 있다. 한편 우리나라의 식생활이 채식 위주에서 동물성 식품 위주로 식생활이 변화함으로써 식품매개 병원성 세균도 다양해지고 있다. 최근에 대두되고 있는 대표적인 식중독 병원성 세균은 *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* 및 *Escherichia coli* O157:H7 등이다.

본 연구에서는 그동안 탐색되지 않았던 시판 중인 젓갈로부터 탐색된 박테리오신의 식품유래 주요 부패 세균 및 병원성 세균에 대한 항균효과를 검정하여 식품 및 생물산업에 사용될 무독성 방부제로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

젓갈로부터의 박테리오신 생산균주의 분리

균 분리원인 젓갈은 마산지역의 백화점 등지에서 구입하였으며 젓갈의 종류는 오징어젓, 굴젓, 창란젓, 멸치젓 등이었다. 박테리오신 생산균주의 분리방법은 일

반적인 도말법과는 달리 agar plate에서 직접 항균물질을 생산하는 균주를 분리할 수 있는 방법인 triple agar layer method<sup>(5)</sup>를 이용하여 *Lactococcus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797, *Leuconostoc mesenteroides* KCCM 11324, *Lactococcus lactis* KCCM 40104, *Pediococcus acidilactici* KCTC 1626, *Escherichia coli* KCCM 32396, *Escherichia coli* JM109, *Bacillus cereus* 및 *Bacillus pumilis* 균주를 대상균주로 박테리오신 생산균주를 분리하였으며, 사용된 배지는 MRS 배지 (Difco Laboratories, USA)였고 배양온도는 32°C 이었다. 여러 종류의 박테리오신 생산균주 중 넓은 항균범위와 높은 활성을 지닌 박테리오신을 생산하는 젓산균주를 최종적으로 선발하였으며 LAB NK24라 명명하였다.

박테리오신 생산균주의 동정

박테리오신 생산균의 전자현미경 사진은 FEG-SEM (model S-4200, Hitachi, Japan)을 이용하여 얻었다. 그람염색법 및 API 50 CHL kit(BioMerieux Co., Ltd., France)에 의해 여러 탄소원에 대한 박테리오신 생산균의 이용성을 검토하여 동정하였다.

대상균주 및 배양조건

박테리오신의 생육저해 시험에 사용된 그람양성균은 *L. monocytogenes* ATCC 15313 등 13균주, 그람음성균은 *E. coli* O157:H7 등 27균주, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 11201 1균주, 곰팡이는 *Aspergillus oryzae* KCCM 11371 등 3균주를 사용하였다. 이들 균주 중 *Clostridium perfringens* ATCC 3624 등 19균주는 국립보건원에서 동결건조 상태로 분양받았으며, *Salmonella typhi* 등 8균주는 사람, 해수 및 생선에서 직접 분리하여 그람염색 후 현미경 (Axiphot, Carl Zeiss Co., Ltd., Germany) 관찰하였다. 분리균주의 동정은 motility test, API 20E kit 및 ATB expression(BioMerieux Co., Ltd., France)을 사용하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 기술된 일반적인 방법에 준하여 동정하였다<sup>(6)</sup>. 세균은 37°C 또는 30°C, tryptic soy broth(Difco Laboratories, USA)배지에서, 효모와 곰팡이는 30°C에서 각각 YPD배지, PDB배지에서 24시간 3회 계대배양하여 사용하였다. *C. perfringens* ATCC 3624는 anaerobic envelope를 넣은 anaerobic jar(Difco Laboratories, USA)를 사용하여 혐기성 조건에서 배양하였다. 배지 조제에 사용된 증류수는 Millipore사의 3차 증류수를 사용하였고, pH 측정은 Orion사의 pH meter를 사용하여 측정하였다.

### 박테리옌 생산조건 및 방법

*L. lactis* NK24의 종균은 순수분리되어 MRS agar plate에 보존 중인 균주를 10 mL test tube의 MRS배지에 한 백금이 접종하여 37°C에서 정치배양하였다. 발효조에서의 본배양은 5 L jar fermenter(Korea Fermenter Co., Korea)를 사용하여 배양하였으며, 배양조건은 다음과 같다. 즉, 온도 32°C, pH는 6.0±0.1, 교반속도는 200 rpm, 접종비는 1%(v/v), working volume은 3.5 L, 공기는 공급되지 않았다.

### 박테리옌 항균활성 측정법

박테리옌 생산균주의 항균활성을 측정하기 위해 deferred method<sup>7)</sup>를 사용하였다. 즉, *L. lactis* NK24를 MRS broth 10 mL에 각각 한 백금이 접종하여 최적 배양온도에서 12시간 배양한 후 건조된 MRS agar plate 표면에 배양액 5 µL를 spot하고 37°C에서 24시간 배양한다. 대상균주 중 그람음성균과 그람양성균은 TSB배지, 효모는 YPD배지, 곰팡이는 PDB배지, 최적온도에서 12시간 배양한다. 이 배양액 100 µL를 각각 7 mL의 soft TSA(0.75%)에 접종하여(약 10<sup>7</sup> cells/mL를 포함) 박테리옌 생산균주가 자란 plate에 overlay하고 최적온도에서 24시간 배양하여 활성을 측정한다. 항균활성은 antibiotic zone reader(Fischer Scientific Co., USA)를 사용하여 측정된 직경(mm)으로 나타내었다.

박테리옌 활성을 측정하기 위해 spot-on-lawn method를 확립하여 사용하였으며, 방법은 다음과 같다. TSB 배지 10 mL에 대상균주를 각각 접종하여 37°C, 24시간 배양하고, 이 배양액을 각각 준비된 0.75% soft TSA에 100 µL씩 접종, 혼합한 후 건조된 TSA plate에 overlay하여 실온에 방치하여 건조시켰다. 박테리옌 생산균주는 cell-free supernatant와 황산암모늄침전법에 의해 부분정제된 박테리옌을 조제하여 대상균주를 overlay한 plate에 5 µL씩 각각 loading하여 각각 최적의 배양온도에서 24시간 배양하여 생육활성 저해를 조사하였다. 박테리옌 활성(AU/mL)은 박테리옌을 함유한 원액을 인산완충용액으로 2배씩 희석한 후 각각의 희석액을 spot하여 확실한 저해를 보인 최대희석배수를 역으로 취해 계산하였다.

*C. perfringens* ATCC 36245는 절대혐기성균으로 산소에 의해 급격히 균수의 감소가 일어남으로 위 과정을 30분 이내에 실시하여 혐기적 조건에서 배양하였고, *Listeria* spp., *Yersinia* spp., *Pseudomonas* spp., 효모인 *S. cerevisiae* KCCM 11201, *A. oryzae* KCCM 11371 등 곰팡이는 30°C에서 24시간 배양하였다.

### Cell-free supernatant의 조제

박테리옌 생산균주는 주어진 조건에서 배양하여 8,000×g에서 15분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 얻어진 배양상등액을 0.22 µm pore-size cellulose acetate filter로 여과하여 여액을 얻고, 3N NaOH용액 및 3N HCl용액으로 pH를 조정하고, catalase를 최종농도 1 mg/mL로 첨가하여 37°C에서 30분간 incubation하여 hydrogen peroxide를 제거한 후 박테리옌 활성을 측정하기 위한 cell-free supernatant를 조제하였다<sup>8)</sup>.

### 황산암모늄침전법에 의한 부분정제

조제된 cell-free supernatant에 고체상태의 황산암모늄을 서서히 넣어 녹이면서 75% 포화상태에 도달하면 4°C에서 천천히 교반하면서 2시간 더 방치한다. 24,000×g로 20분간 원심분리하여 침전물 만을 회수하여 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0)에 재현탁하여 12시간마다 연속적으로 2회 투석하여 부분정제된 박테리옌을 조제하였다<sup>9)</sup>.

## 결과 및 고찰

### 젓갈로부터 박테리옌 생산균주의 분리

LAB NK24는 창란젓에서 triple agar layer method를 통해 분리되어 새로운 MRS agar plate에서 보존하였다. 보존된 균주의 배양액을 얻은 후 원심분리하여 배양상등액을 얻고 pH를 6.5로 조정하여 spot-on-lawn method로 대상균주에 대한 항균활성을 조사하여 항균활성이 우수한 유용균주임을 재확인하였다.

Fig. 1. Scanning Electron Microscopic (SEM) observation of *Lactococcus lactis* NK24.

Table 1. Microbiological identification of LAB NK24 by carbon source utilization pattern

Carbohydrate	Isolate NK24	Carbohydrate	Isolate NK24
Glycerol	- <sup>a</sup>	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	-
D-Xylose	+	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
β Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Amidon	+
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N Acetyl glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdaline	+	2 ceto-gluconate	-
Arbutine	+	5 ceto-gluconate	-
Esculine	+		

<sup>a</sup>data obtained by API 50CHL kit, + : positive, - : negative

#### 박테리오신 생산균주의 동정 및 박테리오신 특성

전자현미경으로 관찰한 결과, 전형적인 *lactococci*균으로 판단되었으며(Fig. 1), 그람양성균이었으며, API 50 CHL kit를 이용하여 탄소원의 이용성을 확인, 동정한 결과, 99.9%의 유의성으로 *L. lactis* subsp. *lactis* 균주로 확인되었다(Table 1). 따라서 LAB NK24는 *Lactococcus lactis* NK24로 잠정적으로 동정되었으며, 이 균주에 의해 생산되는 박테리오신은 lacticin NK24로 명명되었다. Lacticin NK24는 protease XI, pepsin, α-chymotrypsin, proteinase K, α-amylase, lipase에 대해서는 활성에 변화가 없고 protease XIV에 의해서는 소실되었다. pH 2~9의 범위에서 매우 안정하였고, 90°C에서 30분 가열시 활성변화가 없었으나, 100°C에서 30분 가열시 87.5% 활성을 잃었고 121°C에서 15분간 가열시 완전히 활성이 소실되었다. Ethanol, methanol, acetone, toluene, isopropyl alcohol, chloroform 등과 같은 각종 유기용매에 매우 안정하였으며, lacticin NK24가 bactericidal한 양상을 보이는 지 bacteriostatic한 양

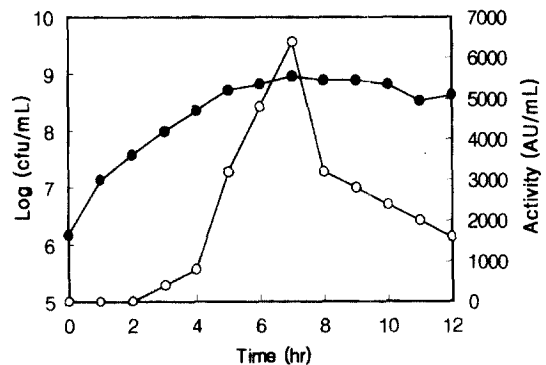


Fig. 2. Production of lacticin NK24 in jar fermenter. ●—● : log(cfu/mL), ○—○ : activity (AU/mL)

상을 보이는 지를 검토하기 위해 대상균주인 *L. mesenteroides* KCCM 11324를 액체배양하여 log growth phase에서 회수하여 0.1M 인산완충용액에 현탁한 후 두 가지 박테리오신 농도(320AU/mL와 1,280AU/mL)로 첨가한 경

**Table 2. Inhibition of spoilage and pathogenic microorganisms by *Lactococcus lactis* NK24 by deferred method**

Spoilage and pathogenic organisms	Culture medium <sup>2)</sup>	Incubation temp.	Inhibition zone diameter (mm)
<b>Gram positive bacteria</b>			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	TSB	37°C	6.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSB	37°C	24.0
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 32359	TSB	37°C	ND <sup>3)</sup>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	TSB	37°C	21.0
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3624 <sup>1)</sup>	TSB	37°C	32.0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	TSB	37°C	16.0
<i>Bacillus cereus</i> HTD-2	TSB	37°C	ND
<i>Bacillus pumilis</i> HTD-1	TSB	37°C	ND
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 12113	TSB	37°C	ND
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TSB	37°C	24.0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	TSB	37°C	13.0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	TSB	30°C	40.0
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	TSB	30°C	12.0
<b>Gram negative bacteria</b>			
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 6902	TSB	30°C	>40.0
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 27729	TSB	30°C	>40.0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	TSB	37°C	>40.0
<i>Vibrio vulnificus</i>	TSB	37°C	>40.0
<i>Vibrio cholerae</i> O139	TSB	37°C	24.5
<i>Aeromonas hydrophila</i> SBA 9612	TSB	37°C	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	TSB	37°C	20.0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29522	TSB	37°C	17.5
<i>Escherichia coli</i> KCCM 32396	TSB	37°C	ND
<i>Escherichia coli</i> JM 109	TSB	37°C	ND
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	TSB	37°C	19.5
<i>Salmonella typhi</i>	TSB	37°C	16.0
<i>Salmonella paratyphi</i> A	TSB	37°C	21.5
<i>Salmonella typhimurium</i>	TSB	37°C	30.0
<i>Salmonella enteritidis</i>	TSB	37°C	16.0
<i>Shigella flexneri</i>	TSB	37°C	20.0
<i>Shigella boydii</i>	TSB	37°C	32.0
<i>Shigella sonnei</i>	TSB	37°C	21.5
<i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 12855	TSB	30°C	15.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	TSB	30°C	31.5
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBB 9631	TSB	30°C	ND
<i>Pseudomonas putida</i> SBB 9633	TSB	30°C	ND
<i>Chrysenomonas luteola</i> SBA 9634	TSB	37°C	ND
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> BNJ 9664	TSB	37°C	ND
<i>Xanthomonas maltophilia</i> SBC 9611	TSB	37°C	ND
<b>Yeasts and Molds</b>			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 11201	YPD	30°C	ND
<i>Aspergillus oryzae</i> KCCM 11371	PDB	30°C	ND
<i>Aspergillus niger</i> KCCM 11239	PDB	30°C	ND
<i>Penicillium chrysogenum</i> KCCM 6933	PDB	30°C	ND

<sup>1)</sup>Incubated in anaerobic GasPak jar.

<sup>2)</sup>TSB, tryptic soy broth; YPD, yeast extract peptone detrose; PDB, potato dextrose broth. <sup>3)</sup>Not detected.

우 모두 bactericidal한 양상을 보였다. 320AU/mL인 경우에는 처리 5시간만에 99%의 사멸률을 보였으며, 1,280AU/mL인 경우는 99.99%의 사멸률을 보였다<sup>(10)</sup>.

발효조에서의 lacticin NK24 생산 박테리오신 생산균주를 발효조에서 배양하여 생산을 검토하였는 데, 배양시간에 따른 박테리오신의 생

산을 알아보기 위해 32°C에서 일정시간 배양하면서 젖산균의 증식과 박테리오신의 활성을 측정하였다(Fig. 2). 박테리오신 활성은 배양된 지 2시간, 즉 mid-log growth phase에서 처음 검출되었으며 early stationary phase(7시간)에서 최대에 도달되었다. 그 이후에는 활성이 급속히 감소되었다. 이러한 현상은 다른 많은 박테리오신에서도 보여지는 현상으로 젖산균이 사멸하면서 생성된 단백질분해효소의 작용에 기인하는 것으로 알려져 있다<sup>(11)</sup>. 한편 최대 박테리오신 활성에 도달되는 시간이 다른 박테리오신에 비해 비교적 짧은 것으로 확인되었는데, 이는 박테리오신의 생산성을 높이는 데 기여하게 된다.

#### Lacticin NK24의 부분정제

박테리오신 생산균주를 발효조에서 생산하여 최대 활성을 보이는 배양액을 얻어 원심분리 후 배양상등액을 75% 황산암모늄침전법으로 단백질 침전시키고 12시간마다 2회에 걸쳐 투석(MWCO 1,000)을 행하여 염을 제거하여, 부분정제된 박테리오신을 얻었다. 그 활성을 측정할 결과, 활성은 51,200AU/mL이었으며 배양상등액(2,400 AU/mL)에 비해 21배 정도 증가되었고, 회수율은 96%이었다.

#### *L. lactis* NK24 및 lacticin NK24에 의한 주요 부패 및 병원성 세균의 생육저해

*L. lactis* NK24의 항균활성은 그람양성균 13균주, 그람 음성균 25균주, 효모 1균주 및 곰팡이 3균주 등 총 42균주의 식품주요 부패 및 병원성 세균에 대해 측정되었다.

Deferred method에 의한 *L. lactis* NK24의 생육저해 활성은 모든 대상균주에 대하여 항균활성을 보였다(Table 2). 그람양성균 중 *L. monocytogenes* ATCC 15313는 생육저해 halo가 40.0 mm 이상이었으며, 그람음성균인 *Y. pseudotuberculosis* ATCC 6902, *Y. enterocolitica* ATCC 27729, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 및 *V. vulnificus*는 생육저해 halo가 40.0 mm 이상이었다. 그리고 그람양성균인 *C. perfringens* ATCC 36245는 32.0 mm, *S. aureus* ATCC 25923와 *B. subtilis* ATCC 6633는 24.0 mm의 halo를 보였으며, *S. epidermidis* ATCC 12228는 21.0 mm의 halo를 보였다. 그람음성균인 *P. aeruginosa* ATCC 15442는 31.5 mm, *Salmonella typhimurium*은 30.0 mm, *V. cholerae* O139는 24.5 mm, *Salmonella paratyphi* A와 *Shigella sonnei*는 21.5 mm의 halo를 보였으며, *E. coli* ATCC 8739는 20.0 mm의 halo를 나타내었다. 이러한 대상균주들에 대한 항균효과는 본 연구의 *L. lactis* NK24가 생산하는 항균물질이 박

테리오신의외에도 젖산 등이 주로 항균효과에 기여했을 것으로 판단한다.

이러한 *L. lactis* NK24의 *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *Y. enterocolitica* ATCC 27729, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. vulnificus*, *V. cholerae* O139, *E. coli* O157:H7, *S. paratyphi* A, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*, *P. syringae* ATCC 12855 및 *P. aeruginosa* ATCC 15442에 대한 항균효과는 김치유래 박테리오신인 lacticin BH5 또는 A164의 생산균주에 비해 높은 항균활성을 나타내었다(결과 미제시).

#### 젓갈 박테리오신 lacticin NK24에 의한 주요 부패 및 병원성 세균의 생육저해

Spot-on-lawn assay로 박테리오신의 항균활성을 측정한 결과, 그람양성균 중 *S. aureus* KCCM 32359, *S. epidermidis* ATCC 12228, *C. perfringens* ATCC 3624, *B. cereus* ATCC 11778, *B. pumilis* HTD-1, *B. subtilis* IFO 12113 및 *L. monocytogenes* ATCC 15313은 cell-free supernatant와 부분정제된 박테리오신에 대하여 모두 항균활성을 나타내었고, 그람음성균 중에서는 *E. coli* KCCM 32396, *P. aeruginosa* ATCC 15442 및 *S. paucimobilis* BNJ 9664가 cell-free supernatant와 부분정제된 박테리오신에 대하여 모두 항균활성을 보였다(Table 3).

*E. faecalis* ATCC 19433, *B. subtilis* ATCC 6633 및 *L. ivanovii* ATCC 19119는 cell-free supernatant에서는 약간의 항균활성을 보였고, 부분정제된 박테리오신에서는 뚜렷한 항균활성을 나타냈다. *S. aureus* ATCC 25923은 cell-free supernatant에서는 항균활성을 나타내지 않았으나 부분정제된 박테리오신에서 약간의 항균활성을 나타내었다. 이와 같이 박테리오신의 농도에 의해서 항균활성 여부가 결정되는 경우도 발견되었다. *S. cerevisiae* KCCM 11201, *A. oryzae* KCCM 11371, *A. niger* KCCM 11239 및 *P. chrysogenum* KCCM 6933 등 실험에 사용된 모든 효모와 곰팡이 균주에 대해서는 cell-free supernatant와 부분정제된 박테리오신 모두에서 항균활성을 보이지 않았다.

젖산균이 생산하는 박테리오신에 대한 부패 및 병원성 세균에 대한 항균효과는 여러 논문에 의해 보고되어 있다. *Carnobacterium piscicola*가 생산하는 carnosin U149는 *Lactococcus lactis*에 대해서 높은 항균활성을 보였으나 *Listeria* spp.에 대해서는 거의 항균효과가 없었고<sup>(12)</sup>, *Enterococcus faecium* 7C5가 생산하는 박테리오신이 *Listeria monocytogenes*와 *L. innocua*에 항균효

**Table 3. Inhibition of spoilage and pathogenic microorganisms by lacticin NK24 by spot-on-lawn method**

Spoilage and pathogenic organisms	Culture medium <sup>2)</sup>	Incubation temp.	Inhibition	
			Supernatant <sup>3)</sup>	Partially purified bacteriocin <sup>4)</sup>
<b>Gram positive bacteria</b>				
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	TSB	37°C	+/- <sup>5)</sup>	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSB	37°C	-	+/-
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 32359	TSB	37°C	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	TSB	37°C	+	+
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3624 <sup>1)</sup>	TSB	37°C	+	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	TSB	37°C	+	+
<i>Bacillus cereus</i> HTD-2	TSB	37°C	-	-
<i>Bacillus pumilis</i> HTD-1	TSB	37°C	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 12113	TSB	37°C	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TSB	37°C	+/-	+
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	TSB	37°C	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	TSB	30°C	+	+
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	TSB	30°C	+/-	+
<b>Gram negative bacteria</b>				
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 6902	TSB	30°C	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 27729	TSB	30°C	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	TSB	37°C	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	TSB	37°C	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O139	TSB	37°C	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> SBA 9612	TSB	37°C	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	TSB	37°C	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29522	TSB	37°C	-	-
<i>Escherichia coli</i> KCCM 32396	TSB	37°C	+	+
<i>Escherichia coli</i> JM 109	TSB	37°C	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	TSB	37°C	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	TSB	37°C	-	-
<i>Salmonella paratyphi</i> A	TSB	37°C	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	TSB	37°C	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	TSB	37°C	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	TSB	37°C	-	-
<i>Shigella boydii</i>	TSB	37°C	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	TSB	37°C	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 12855	TSB	30°C	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	TSB	30°C	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBB 9631	TSB	30°C	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> SBB 9633	TSB	30°C	-	-
<i>Chrysenomonas luteola</i> SBA 9634	TSB	37°C	-	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> BNJ 9664	TSB	37°C	+	+
<i>Xanthomonas maltophilia</i> SBC 9611	TSB	37°C	-	-
<b>Yeasts and Molds</b>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 11201	YPD	30°C	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i> KCCM 11371	PDB	30°C	-	-
<i>Aspergillus niger</i> KCCM 11239	PDB	30°C	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i> KCCM 6933	PDB	30°C	-	-

<sup>1)</sup>Incubated in anaerobic GasPak jar.

<sup>2)</sup>TSB, tryptic soy broth; YPD, yeast extract peptone dextrose; PDB, potato dextrose broth.

<sup>3)</sup>2,400 AU/mL.

<sup>4)</sup>51,200 AU/mL.

<sup>5)</sup>Not clearly inhibited.

과가 있었으며 이는 본 연구의 lacticin NK24와 유사하였다. 특히 soft cheese제조시 모델균주로 *L. innocua*를 사용하여 박테리오신 생산균주와 혼합배양하여 항균효과를 검토하였을 때, 유기산 또는 박테리오신 단독 항균효과만으로는 *Listeria*의 완전한 불활성화를 이룰 수 없으나 복합 항균효과로 *L. innocua*의 완전한 저해를 이룰 수 있었다<sup>(13)</sup>. 따라서 향후 lacticin NK24 생산균주를 식품에 응용할 때 생균제로 활용하는 것도 항균효과를 극대화시키는 좋은 방법이 될 수 있다. 한편, *Leuconostoc carnosum* LA54A가 생산하는 carnocin 54가 *Listeria innocua* WS 2257에 대해 bactericidal한 양상으로 항균효과가 있으며, 1분 이내에 99.99%의 사멸률을 보고하였다. 이 연구에서 주어진 박테리오신의 농도에서는 사멸률은 초기균수에는 영향을 받지 않았다<sup>(14)</sup>. Meat fermentation에서 분리된 *Micrococcus varians*가 생산하는 variacin이 *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. 등에 뚜렷한 항균활성이 있음이 역시 보고되어 있다<sup>(15)</sup>. 그리고 Diaz 등은 green olive fermentation에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* LPCO10이 생산하는 plantaricin S가 *Clostridium tyrobutyricum*(2/2), *E. faecalis*(6/6), *Propionibacterium* spp.(2/2)에 대해 항균효과를 가지고 있는 반면, *Bacillus* spp.(0/4), *Clostridium sporogenes*(0/1), *Listeria monocytogenes*(0/8), *L. innocua*(0/9), *Pseudomonas* spp.(0/4)에는 항균효과가 없다고 보고하였는데 이는 본 연구의 lacticin NK24에 비해 매우 항균범위가 좁은 박테리오신으로 판단되며, 대상균주인 *L. plantarum* 128/2에 대해 bactericidal한 양상을 보이고 있지만 lysis는 보이지 않았다<sup>(16)</sup>. 한편, Kanatani 등은 식품 부패 및 병원성 세균에 대하여 *Lactobacillus acidophilus* TK-9201이 생산하는 분자량이 6,500Da인 acidocin A이 *Listeria monocytogenes*(5/5), *Propionibacterium* spp.(2/3), *E. faecalis*(1/5)에 대해 항균효과가 있고, *Bacillus subtilis*(0/6), *Staphylococcus aureus*(0/2)에는 전혀 항균효과가 없는 것으로 보고하였다<sup>(17)</sup>. Contreras 등은 *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139가 생산하는 lactobin A가 *E. faecalis*(2/2)에 대해 항균효과를 보인 반면, *Bacillus* spp.(0/3)와 *Listeria monocytogenes*를 비롯한 여러 *Listeria* spp.에 대해서는 항균효과가 없었다고 보고하였다<sup>(18)</sup>. 끝으로 Tahara 등은 *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132가 생산하는 박테리오신인 acidocin J1132가 *L. acidophilus*(5/14)와 같은 박테리오신 생산균주와 매우 가까운 균주의 일부 균주(*L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*)에 대해서만 항균효과를 보였고, *Bacillus*

spp.(0/7), *Staphylococcus* spp.(0/2), *L. monocytogenes* spp.(0/4) 및 *E. coli*(0/3)에 대해서는 전혀 항균효과를 보이지 않았다고 보고하였다<sup>(19)</sup>.

한편 본 연구에서 사용된 젓갈 박테리오신 lacticin NK24는 젓산균이 생산하는 대부분의 박테리오신에서 볼 수 있는 것처럼 대부분의 그람 음성균에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았지만, *Staphylococcus aureus*(3/3), *Clostridium perfringens*(1/1), *Bacillus* spp.(4/5), *Listeria* spp.(2/2), *Escherichia coli*(1/5), *Pseudomonas* spp.(1/4), *Sphingomonas* spp.(1/1)에 대해 항균활성을 보이므로 현재까지 보고된 젓산균 유래 박테리오신들에 비해 비교적 항균범위가 넓은 특징을 가지고 있었다. 따라서 젓갈유래 박테리오신 및 생산균주를 젓갈에 첨가하여 식품부패 및 병원성 세균을 억제시킴으로 이러한 균들에 대한 안전성을 높이는 효과를 기대할 수 있을 것이다. 그러나 젓갈에 존재하는 단백질분해효소에 의한 박테리오신의 분해 가능성이 있으므로 공정을 충분히 검토하여야 한다.

## 요 약

김치, 젓갈 등 전통 발효식품에서 분리한 유용 박테리오신 생산균주 및 이 균주가 생산하는 박테리오신에 의한 식품에서 발생하기 쉬운 주요 부패 및 병원성 세균에 대한 항균효과를 검토하여, 무독성 천연 방부제로서의 향후 식품 및 생물산업에서의 활용 가능성을 검토하였다. 젓갈에서 분리한 LAB NK24는 *Lactococcus lactis* NK24로 잠정적으로 동정되었으며, 이 박테리오신 생산균주는 deferred method에서는 모든 대상균주에 대해서 항균활성을 보였으며, 김치에서 분리한 *L. lactis* BH5, *L. lactis* A164 균주에 비해 대체적으로 높은 항균활성을 나타내었다. 젓갈유래 박테리오신인 lacticin NK24는 75%황산암모늄침전법으로 부분정제되었으며, 부분정제된 lacticin NK24는 *E. faecalis* ATCC 19433 등 그람양성균 10균주, 그람 음성균은 *E. coli* KCCM 32396, *P. aeruginosa* ATCC 15442 및 *S. paucimobilis* BNJ 9664 등 3균주에 대하여 항균활성을 보였으며, 효모와 곰팡이에는 활성을 보이지 않았다. 따라서 전통 발효식품인 젓갈에서 분리한 본 박테리오신은 비교적 항균범위가 넓고 식품에서 발생하기 쉬운 주요 부패 및 병원성 세균에 대해 뚜렷한 항균효과를 보이고 있으므로 향후 무독성 천연방부제로서 활용이 가능하리라 판단된다.



문 헌

1. Paik, H.D. and Hur, J.W. Screening of novel bacteriocins produced by isolates of various food and feed sources. *Daesan Nonchong* 5: 145-153 (1997)
2. Montville, T.J. and Kaiser, A.L. Antimicrobial proteins: Classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins, pp. 1-22. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (eds.). Academic Press, Inc., San Diego, USA (1993)
3. Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756 (1976)
4. Hansen, J.N. The molecular biology of nisin and its structural analogues, pp. 93-120. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (eds.). Academic Press, Inc., San Diego, USA(1993)
5. Kim, W.J. Screening of bacteriocinogenic lactic acid bacteria and their antagonistic effects in sausage fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 461-467 (1996)
6. Brenner, D.J. Facultative anaerobic Gram-negative rods, Vol. 1, pp. 408-548. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1984)
7. Ahn, C. and Stiles, M.E. Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2503-2510 (1990)
8. Hoover, D.G. and Harlander, S.K. Screening methods for detecting bacteriocin activity, pp. 23-29. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (eds.). Academic Press, Inc., San Diego, USA (1993)
9. Paik, H.D. and Glatz, B.A. Purification and partial amino acid sequence of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii* P127. *Lait* 75: 367-377 (1995)
10. Lee, N.K., Hur, J.W., Lee, S.C., Hwang, Y.I. and Paik, H.D. Production and partial characterization of lacticin NK24, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from fermented fish food. Abstract No. B502 presented at the Korean Society of Biotechnology and Bioengineering, Ansan, Korea (1998)
11. Daba, H., Pandian, S., Gosselien, J.F., Simard, R.E., Huang, J. and Lacroix, C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3450-3455 (1991)
12. Geesje, S., Sahl, H.G. and Gudmundsdottir, A. Carnocin U149, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: Large scale purification and activity against various Gram-positive bacteria including *Listeria* sp. *J. Food Microbiol.* 20: 199-210 (1993)
13. Giorgio, G., Carminati, D. and Tarelli, G.T. Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. *J. Food Prot.* 58: 621-623 (1995)
14. Schillinger, U., Becker, B. and Holzapfel, W.H. Antilisterial activity of carnocin 54, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. *J. Food Microbiol.* 12: 31-37 (1995)
15. Pridmore, D., Rekhif, N., Pittet, A.C., Suri, B. and Mollet, B. Variacin, a new lanthionine-containing bacteriocin produced by *Micrococcus varians*: Comparison to lacticin 481 of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1799-1802 (1996)
16. Diaz, R.J., Sanchez, R.M.R., Desmazeaud, M., Barba, J.L.R. and Piard, J.C. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LP-CO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1416-1424 (1993)
17. Kanatani, K., Oshimura, M. and Sano, K. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1061-1067 (1995)
18. Contreras, B.G.L., Devuyst, L., Devreese, B., Busanyova, K., Raymaeckers, J., Bosman, F., Sablon, E. and Vandamme, E.J. Isolation, purification and amino acid sequence of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 13-20 (1997)
19. Tahara, T., Oshimura, M., Umezawa, C. and Kanatani, K. Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin JCM 1132, a two-component bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 892-897 (1996)

---

(1999년 1월 18일 접수)