

김치 서식처에서 *Listeria monocytogenes*를 억제하는 lactococci의 분리와 16S rDNA 분석에 의한 동정

박은주 · 한홍의 · 민봉희*

인하대학교 이과대학 생물해양학부, 대구대학교 자연과학대학 생물학과*

적 요: 김치 발효 초기에 bacteriocin 생성 유산균을 분리하고자 하였다. 분리 유산균은 형태, 배양 및 생리화학적 특징과 16S rDNA의 부분적인 염기서열로부터 *Lactococcus lactis*로 동정되었다. 분리균주가 생성한 bacteriocin은 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*와 같은 그람 양성 병원성 세균과 몇몇 유산균에 대해 항균활성이 있었고, 그람음성균인 *Yersinia*에는 활성이 없었다. bacteriocin의 활성은 protease, protease XIV, α -chymotrypsin과 pepsin에 대해서 활성이 소실되었으나, lipase, trypsin, lysozyme에 대해서는 활성이 유지되었다. bacteriocin의 활성은 pH 2~11에서 안정적이며 100°C에서 10분간 열처리시에도 변하지 않았다. 따라서 *L. monocytogenes*는 발효초기에 *L. lactis*에 의하여 억제될 수 있다.

검색어: 김치, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, Bacteriocin, 16S rDNA 염기서열.

서 론

김치류는 여러 종류의 야채를 소금에 절여 자연적으로 발효시킨 식품이다. 임(1991)은 최초로 김치를 미생물 생태학적인 측면에서 일종의 미시적인 소생태계이며 미생물과 환경과의 관계를 규명하는 model system으로 간주할 수 있음을 제시하였다. 이를 통하여 김치내의 미생물군총의 주된 종의 구조와 미생물 군집의 발달과정 즉 천이과정을 연구하였다. 최근에 문제시 되고 있는 식중독균인 *Listeria monocytogenes*가 김치에 오염되었을 때, 이 균에 의하여 김치유산균의 천이과정을 파괴하고 서식할 수 있는지가 의문시 될 수 있다.

김치내 유산균 중에서 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus brevis*는 bacteriocin을 분비하여 다른 균의 증식을 억제할 수 있다는 보고가 있다(Cha and Ha 1996, Ha et al. 1994). 그러나 이들 유산균이 김치 유산균의 천이과정에 미치는 영향은 검토된 바가 없다.

따라서 본 연구는 *L. monocytogenes*가 김치에서 증식이 억제될 수 있는지를 확인하고자 하였다. 연구를 통하여 김치에서 이 식중독균을 억제할 수 있는 유산균을 분리하였고 Bergey's manual(Hardie 1986)에 의한 이분동정법(임 1991)과 16S rDNA서열 분석에 의하여 *Lactococcus lactis*로 동정되었다. 그리고 이 유산균은 천이과정의 초기에 증식하므로 김치 서식처를 방어하는 능력을 갖고 있다고 볼 수 있다. 앞으로 방어기작에 대한 연구가 계속될 것이다.

재료 및 방법

Bacteriocin 생성유산균의 분리

김치는 본 연구실에서 사용되고 있는 방법에 의하여 제

조하였으며(양 1998), 15°C에서 발효시키면서 24시간 간격으로 시료를 채취하였다. 적당히 희석된 시료를 MRS평판 배지에 도말하여 균분리와 동시에 총생균수를 측정하였다. 시험균주(indicator)인 *Listeria monocytogenes* ATCC-19116에 대한 bacteriocin을 생성하는 유산균을 분리하기 위하여, agar well diffusion방법을 사용하였다. 즉 0.7%한천이 포함된 BHI(Difco) 배지를 121°C에서 살균한 후에 배지를 45°C정도로 냉각시킨 후 지시균주를 약 10⁷CFU/ml되게 접종하였다. 이 배지 10 ml를 미리 준비된 MRS 평판고체배지에 증충하였다. 그 다음 평판배지를 cork borer로 구멍을 뚫고 여기에 시험균주의 bacteriocin용액을 넣어 25°C에서 24시간 배양하여 투명환(clearing zone)이 생성되는 집락을 선별하여 MRS 평판배지에서 순수 분리하였다(Ha et al. 1994, Tagg and Mcgiven 1971).

이분동정법

Bergey's manual(Hardie 1986)에 의하여 작성된 이분동정법을 사용하였으며(임 1991), 분리균주들은 그람염색, 세포형태, 포자형성, 카탈라제를 시험하여 유산균의 진위를 확인하였고, 그 외에 각 pH, 온도, NaCl 농도에서의 성장 시험, 산생성, 가스생성, arginine으로 부터 NH₃ 생성 및 가수분해, dextran 생성, esculin 가수분해시험을 수행하여 생리 및 생화학적 성질은 조사하였다(Gerhardt et al. 1994).

16S rDNA의 염기 배열의 분석

분리균주를 10 ml MRS 액체배지로 30°C에서 20시간 배양하여 대수기에 도달한 균체를 DNA추출에 사용하였다. DNA추출은 Ausubel et al.(1995)의 방법에 의하여 실시하였으며, PCR장치를 사용하여 전체 DNA중에서 16S rDNA절편을 증폭시켰다. Primer는 5'-GAGTTGATCCT-

GGCTCAG와 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC를 사용하였다(Suzuki and Yamasato 1993, Vogel *et al.* 1994).

중폭시킨 16S rDNA의 염기배열분석은 T7 sequence PCR product sequencing kit(version 2.0, UBS)를 사용하여 공급자의 지침서(protocols sequenase ver 2.0 DNA polymerase for sequencing PCR products, 2nd Ed. UBS)에 따라 dideoxy chain termination 법으로 시험하였다. 판독된 염기배열은 BLAST search program에 의한 염기배열과 비교하여 종을 동정하였다.

Bacteriocin의 부분정제

분리된 집락을 MRS 액체 배지에 접종한 후 혐기성 배양기에 넣어 25℃ 항온기에서 배양하여 정상기의 배양액을 회수하였다. 그후 5000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포를 제외한 배양액을 얻어 삼각 플라스크에 따라낸 후 고체 ammonium sulfate를 천천히 첨가시키면서 회수액의 50%(w/w)까지 포화시킨 후 4℃에서 교반기로 천천히 돌리면서 하룻밤 두었다. 침전된 현탁액을 4℃ 10,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 한 후 상층액은 버리고 회수한 단백질은 5 mM 인산 완충용액(pH 6.6)에 넣어 녹였으며 완충용액의 양은 초기 배양액의 10%가 되게 하였다. 그후 Spectra-Por 투석막(MWCO, 3,500 ; spectrum)에 넣어 같은 완충용액 1 l에서 4℃에 보관하면서 하룻밤 투석하였다. 투석액을 막여과(pore size, 0.2 μm)한 후 4℃에 보관하여 사용하였다(Piard *et al.* 1992).

Bacteriocin의 특성실험

항균활성의 측정: 부분정제된 bacteriocin을 5 mM 인산완충용액(pH 6.6)으로 2배수로 희석한 용액에 대하여 agar well diffusion법으로 시험균주 17개를 25℃, 30℃에서 24시간 배양한 후 최소억제부위를 나타낼 때의 희석배수를 곱하여, ml당의 임의 단위 AU(arbitray unit)로 항균활성도를 나타내었다.

용균 시험: 분리 균주 PL1에 의해 생성된 bacteriocin의 작용 기작을 알아보기 위하여 BHI 액체배지에서 미리 활성화 된 *L. monocytogenes* ATCC 19116을 4.5×10^5 CFU/ml 되게 접종한 후 부분 정제된 bacteriocin(1,280 AU/ml)을 첨가하였다. 25℃ 항온기에 배양하면서 1시간마다 멸균증류수로 10배수 희석하여 BHI 평판배지에 2개의 반복수로 도말하여 생균수를 측정하고 610 nm 에서 광학 밀도를 측정하였다(Schillinger and Lücke 1989).

pH 안정성: 부분 정제된 bacteriocin을 0.1N NaOH와 0.1N HCl을 이용하여 pH를 2.0에서 12까지 pH 1간격으로 조정한 후 막여과(pore size: 0.2 μm)하여 상온에서 3시간 방치한 후 활성의 변화를 측정하였다.

열내성: 부분 정제된 bacteriocin을 열판을 이용하여 100℃에서 10, 30, 60분간 처리하고 121℃에서 10, 30, 60분간 처리한 후 바로 얼음에 보관한 다음 bacteriocin의 활성을 측정하였다(Ha *et al.* 1994).

효소처리: 분리균주의 bacteriocin의 효소처리의 활성 변

화를 조사하기 위해 α-amylase(Junsei Chemical Co.), α-chymotrypsin(bovine pancreas, Sigma), lipase(porcine pancreas, Sigma), lysozyme(chicken egg white, Sigma), protease(*Streptomyces griseus*, Sigma), protease XIV(*Streptomyces griseus*, Sigma), trypsin(bovine pancreas, Sigma)은 5 mM 인산 완충용액에, pepsin(porcine stomach, Sigma)은 0.02N HCl에 녹인 후 부분정제된 bacteriocin에 대해 최종농도가 1 mg/ml가 되도록 첨가하고 대조구로는 동량의 5 mM 인산완충용액을 첨가한 후, α-chymotrypsin과 trypsin을 25℃에서 나머지 효소는 37℃에서 2시간 반응시켰다. 그다음 pepsin 처리액은 중화하고 효소의 남은 활성을 제거하기 위하여 100℃에서 5분간 끓인 후 활성을 측정하였다(이해주 1997).

결 과

Bacteriocin 생성 유산균의 분리 및 동정

15℃에서 발효시킨 김치에서 시험균주인 *L. monocytogenes*에 대해 투명환을 형성하는 균주는 발효 4일까지 34균주가 분리되었으나 분리된 유산균을 배양하여 회수된 액에서 bacteriocin을 부분정제하여 항균활성을 측정한 결과, 담근 즉시 분리된 균주에 의해서만 활성이 측정되었다(Table 1). 그들의 빈도는 7.8×10^5 CFU/ml 중 1.3×10^5 CFU/ml로 약 17% 정도 되었다(이때 pH는 5.0이었고 총산도는 18%이었다).

분리균주의 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성은 Table 1과 같다. 이들 성질을 이분동정법에 의하여 동정한 결과 13개 분리균주는 모두 *Lactococcus*속으로 동정되었다. 13개 분리균주중 생장이 좋은 1개 균주를 택하여 16S rDNA의 염기서열 약 300 bp를 direct sequencing법에 의하여 분석하여 Genebank의 자료와 비교분석한 결과 *Lactococcus lactis*와 100% 일치하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 Bergey's manual에 의한 속동정결과와 일치하였으며 따라서 분리균주들은 모두 *Lactococcus lactis*로 동정되었다. 이들을 *Lactococcus lactis* PL1 균주로 명명하였다.

Bacteriocin의 특성

항균활성: 이중층 고체배지 상에서 14개의 그람 양성균주와 3개의 그람음성 균주에 대한 항균 활성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. *L. lactis* PL1은 병원성균인 *L. monocytogenes*와 *S. aureus*에 대해서 억제환을 형성하였으며 그람 음성 병원균인 *Y. enterocolitica*, *E. coli*와 유산균인 *L. citreum*, *L. lactis*에 대해서는 억제환을 나타내지 않았다. 이는 *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *L. brevis*, *L. mesenteroides*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서는 항균 능력이 더 좋은 *L. lactis* PL1에 의해 생성되는 bacteriocin에 대한 특성을 조사하였다.

pH: Bacteriocin의 활성이 pH 2에서 8까지는 비교적 안정하였으나 pH 9~11까지는 활성이 점차 감소하다가 pH 12에서는 활성을 완전히 소실하였다(Fig. 2). 이는 비교적

Table 1. Morphological and physiological characteristics of *L. lactis* isolated from kimchi and *L. lactis* subsp. *lactis* KCCM 32406

Characteristics	<i>L. lactis</i> PL1 (13 strains)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KCCM 32406
Cell shape	cocci	cocci
Cell arrangement	pairs, chains	pairs, chains
Gram reaction	+	+
Spore formation	-	-
Motility	-	-
Gas production	-	-
Dextran formation	-	-
Catalase	-	-
Growth at 10°C	+	+
at 40°C	+	+
at 45°C	-	-
Growth at pH 4.2	+	+
at pH 7.5	+	+
at pH 8.5	+	+
Growth at 4% NaCl	+	+
NH ₃ from arginine	+	+
Esculin hydrolysis	+	+
Arginine hydrolysis	+	+
Acid from		
Arabinose	+	-
Cellobiose	+	+
Fructose	+	+
Glucose	+	+
Gluconate	-	-
Galactose	+	-
Inulin	-	-
Lactose	+	-
Mannitol	+	-
Mannose	+	+
Maltose	+	+
Melezitose	-	-
Ribose	+	-
Rhamnose	-	-
Raffinose	-	-
Sorbitol	-	-
Salicin	+	+
Starch	-	-
Sucrose	+	-
Trehalose	+	-
Xylose	+	-

Symbols: +, positive; -, negative

넓은 범위의 pH에서 분리균주의 활성이 안정적임을 보여 주었다.

열안정성: 100°C에서 10분 처리한 경우 bacteriocin의 활

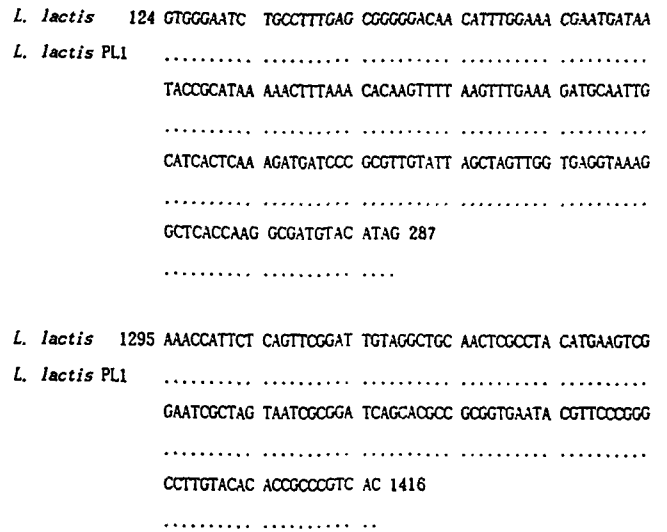


Fig. 1. The aligned sequence of 298 bp segment of the 16S ribosomal DNA for *L. lactis* PL1 which was isolated from kimchi fermentation at 15°C. Dots indicate the identity to the sequence of *L. lactis*.

Table 2. Antimicrobial activity of the bacteriocin produced by *L. lactis* PL1

Indicator strains	Activity (AU/ml)
	PL1
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3498	20
<i>L. plantarum</i> KFCC 11322	160
<i>L. viridescence</i> KCTC 3504	80
<i>Lactococcus lactis</i> KCCM 32406	0
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC 3524	0
<i>L. dextranicum</i> KCTC 3530	1,280
<i>L. lactici</i> KCTC 3528	640
<i>L. mesenteroides</i> KCCM 11325	80
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 2011	40
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC 1626	40
<i>Bacillus subtilis</i>	320
<i>B. macerans</i>	320
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19116	40
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 65389	80
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	0
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1116	0
<i>E. coli</i> KCTC 10793	0

Bacteriocin activity was measured by agar well diffusion assay against indicator *L. dextranicum* KCTC 3530.

성은 그대로 유지되었으며 100°C에서 30, 60분 처리한 경우는 활성이 50% 감소하였다. 121°C에서 10분 처리한 경우는 75%, 30분 처리한 경우는 87%, 60분 처리한 경우 94%의 활성이 감소하였다(Table 3). 본 연구 결과에 의

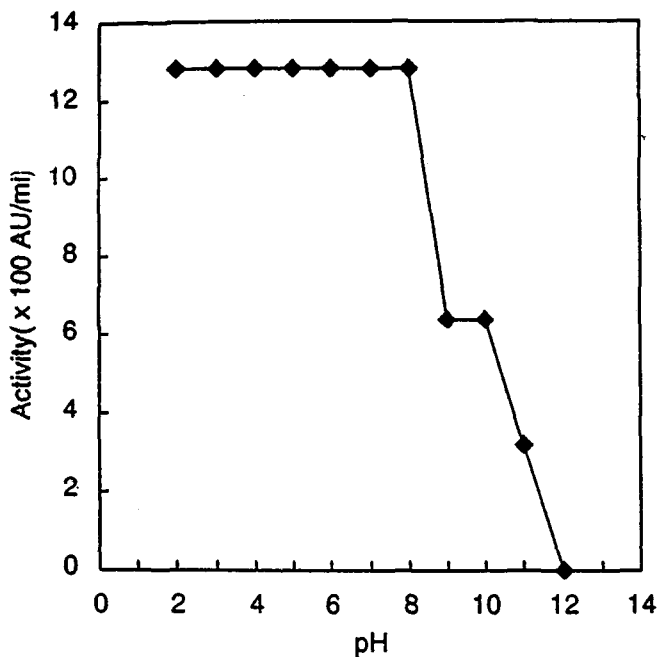


Fig. 2. Effect of pH on the activity of partially purified bacteriocin produced by *L. lactis* PL1. Bacteriocin activity was measured by agar well diffusion assay against indicator *L. dextranicum* KCTC 3530. Each pH was adjusted by 0.1N NaOH and 0.1N HCl.

Table 3. Effect of various enzymes and heat treatments on the antimicrobial activity of partially purified bacteriocin from *L. lactis* PL1

	<i>L. lactis</i> PL1
Pepsin	0
Trypsin	100
α -Chymotrypsin	0
α -Amylase	50
Protease	0
Protease XIV	0
Lipase	100
Lysozyme	100
Heating at	
100°C 10 min	100
30 min	50
60 min	50
121°C 10 min	25
30 min	13
60 min	6

The number refers to the percentage of an activity of partially purified bacteriocin after treatment. Bacteriocin activity was measured by the agar well diffusion assay using *L. monocytogenes* ATCC 19116, *L. dextranicum* KCTC 3530 as indicator strain.

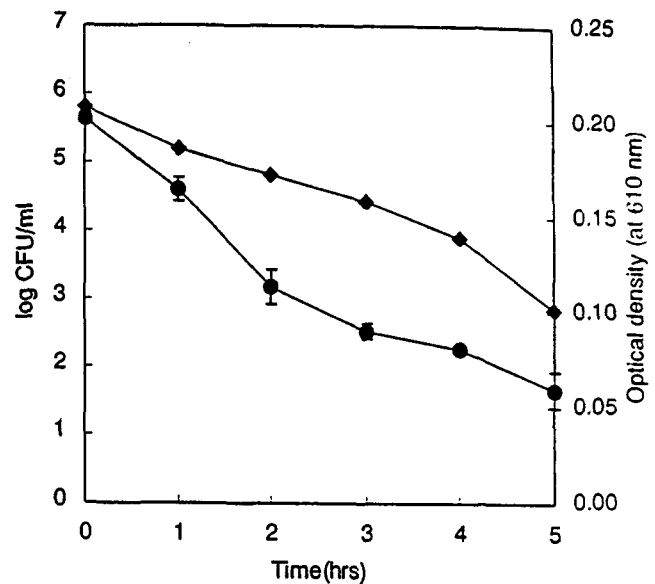


Fig. 3. Bactericidal effect of partially purified bacteriocin produced by *L. lactis* PL1 against indicator *L. monocytogenes* ATCC 19116 (◆ : optical density at 610 nm, ● : viable count in BHI media). Initial cell concentration was 4.5×10^5 CFU/ml. Growth temperature was 25°C.

하면 분리균주의 bacteriocin은 비교적 열에 대한 안정성을 보여주었다.

효소처리: 분리된 bacteriocin은 protease, protease XIV, α -chymotrypsin, pepsin처리시 활성이 소실되었으나 trypsin, lysozyme, lipase에 의해서는 전혀 영향을 받지 않았다(Table 3). Protease, protease XIV, α -chymotrypsin에 대해 활성이 소실된 것으로 보아 이 물질은 단백질성 물질 즉 bacteriocin임을 확인할 수 있었다.

***L. monocytogenes*에 대한 효과:** Bacteriocin이 함유된 BHI 액체배지에 *L. monocytogenes*를 접종하여 시간별 생균수와 광학밀도(OD)를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 생균수는 급격히 감소하여 접종 5시간 이후에는 생균수가 40 CFU/ml 이하로 99.98%가 감소하였으며 OD값도 감소하였다. 이 결과로 볼 때 분리균주 *L. lactis* PL1에 의해 생성되는 bacteriocin이 살세균제임을 알 수 있었다.

고 찰

김치 발효 초기에 분리된 분리균주들은 배양적, 형태적, 생리적 특성을 조사한 결과 Bergey's manual of systematic bacteriology(Hardie 1986)를 기초로 만들어진 이분동정표에 의하여 *Streptococcus* 속으로 동정되었으며, 유산을 생성하므로 *Lactococcus* 속으로 동정하였다(Holt et al. 1994). 종동정을 위해 16S rDNA의 부분 염기서열을 분석한 결과 분리균주 모두는 *Lactococcus lactis*로 동정되었다.

본 연구에서 bacteriocin 생성 *L. lactis* 모두 김치 발효 초기에 분리되었는데 *Lactococcus* sp.는 대부분의 김치 발효에서 검출되는 혐기성 세균으로 알려져 있으며 다른 젖산균과 함께 김치 발효에 관여하고 있다. 그러나 김치 발효에 관여하는 *Lactococcus*는 중온성 균으로 저온에서 생장율이 좋지 못하다(박 등 1990, 신 1994). 따라서 본 연구에 사용된 김치는 15°C에서 발효시키면서 진행되어 bacteriocin 생성 *Lactococcus*가 초기에만 검출된 것으로 사료된다.

부분 정제된 bacteriocin은 *L. monocytogenes*, *S. aureus*와 같은 식품 유래 그람양성 병원성 세균에 대해서는 억제 효과가 있었으나 그람음성 세균에 대해서는 억제 효과가 없었다. 이는 *L. lactis*에 의해 생성된 nisin 및 대부분의 그람양성 세균에 의해 생성된 bacteriocin 이 그람 음성세균에 대해서 억제 효과가 없는 것과 같은 결과를 보였다.

*L. lactis*에 의해 생성된 nisin은 pH가 낮아질수록 용존성과 안정성이 증가하는 특성이 있다. 또한 pH가 2인 상태에서 고압살균에 의해서도 파괴되지 않으나 pH가 중성 이상이 되면 불용성이 되고 활성이 없어진다고 보고되었다(Hurst 1983, Liu and Hansen 1990). 이에 대한 정확한 기작은 알려져 있지 않지만 중성이상의 pH에서 nisin의 구조의 화학적 변형의 결과라고 추정되고 있다(Liu and Hansen 1990). 그러나 본 연구에서 분리된 bacteriocin은 nisin에 비해 비교적 넓은 범위의 pH에서 활성이 유지되었으며 이는 천연 식품 보존제로 산성 식품은 물론 약알칼리 식품에서 항균작용을 할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 100°C에서 10분간 열처리시 활성이 100% 유지되어 비교적 열에 안정한 것으로 판단된다. 이러한 열에 대한 안정성은 bacteriocin의 치밀한 구조에서 비롯된다(Yildirim and Johnson 1998).

분리균주의 bacteriocin은 protease, protease XIV, α -chymotrypsin, pepsin 처리시 활성이 소실되었으며 α -amylase에 의해서는 활성이 50%정도 감소하였고, trypsin, lysozyme, lipase에 의해서는 영향을 받지 않았다. 그러나 이들 결과는 bacteriocin 내의 지질 부위나 탄수화물이 항균활성에는 영향을 주지 않는 것으로 생각되며 nisin은 단백질 분해 효소인 pepsin에 의해 활성이 소실되지 않으나 분리균주의 bacteriocin은 활성이 소실되었으며 또한 *L. lactis* subsp. *cremoris*에 의해 생성된 lactococin R(Yildirim and Johnson 1998)은 protease, pepsin, α -chymotrypsin에 민감하며 lipase, amylase, trypsin 등에 저항성을 가져, 본 분리균주와 같은 활성을 나타내었다. 그러나 lactococin R의 분자량은 2.5 KDa으로 본 연구에서 bacteriocin을 부분 정제하기 위해 사용된 투석망의 pore size가 3.5 KDa이므로 효소의 활성은 같지만 분자량은 다르다고 추측된다.

Nisin은 유럽의 많은 국가에서 식품 첨가용으로 사용이 허가되고 있으며 치즈, 육류의 pH에서 불활성화 되거나 제한된 활성을 갖는다. 또한 실제 김치에 nisin을 첨가한 경우 김치 발효에 있어 유산균의 생육을 저해한다는 보고가 있으나(최 등 1990), 실제 *L. lactis*가 성장하여 bacteriocin을 생성할 수 있는 김치내 환경은 pH, 인, 질소원등의 bacteriocin의 생성에 영향을 줄 수 있는 조건들이 부적합하다고 판단되며 이를 보완할 수 있는 조건의 탐색이 요구된다.

인용문헌

- 박현근, 임종락, 한홍의. 1990. 각 온도에서 김치발효 중 미생물의 천이과정. 인하대학교 기초과학연구소 논문집 11: pp.161-169.
- 신동화. 1994. 공장김치의 발효 온도 및 포장방법별 성분과 미생물의 변화. 김치의 과학 pp. 82-136.
- 양창남. 1998. 배지 성분에 의한 *Lactobacillus brevis*의 형태 변화와 열내성. 인하대학교 석사학위 논문.
- 이해주. 1997. 김치에서 분리한 *Lactococcus* sp. H-599가 생산하는 Bacteriocin의 정제 및 특성. 서울대학교 박사학위 논문.
- 임종락. 1991. 김치에 대한 내적 물질 흐름에 의한 미생물의 천이. 인하대학교 박사학위 논문.
- 최신양, 이인선, 유진영, 정건섭, 구영조. 1990. 김치발효에 대한 Nisin의 저해효과. 산업미생물학회지 18: 620-623.
- 최홍식. 1995. 김치의 생화학적 특성. 동아시아식생활학회지 5: 89-101.
- Ausubel, F. 1995. Short protocols in molecular biology(3rd ed.). John Wiley & Sons. Inc. p 2-11-2, 12.
- Cha, D.S. and D.M. Ha. 1996. Isolation of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* DU-0608 with antibacterial activity from kimchi and characterization of its bacteriocin. J. Microbiol. Biotechnol. 6: 270-277.
- Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood and N.R. Krieg. 1994. In Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. p. 350, 607-654.
- Ha, D.M., D.S. Cha and S.G. Han. 1994. Identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kimchi and partial characterization of their bacteriocin. J. Microbiol. Biotechnol. 4: 305-315.
- Hardie, J.M. 1986. *Streptococcus*. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt(ed.), Bergey's Manual for Systematic Bacteriology. Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney. pp. 1043-1070.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S. T. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology(9th ed). Williams & Wilkins.
- Hurst, A. 1983. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In Alfred Larry Branen, P. Michael Davidson(ed.), Antimicrobials in Foods. Marcel Dekker INC, New York and Basel. pp.

- 327-351.
- Liu, W. and N. Hansen. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2551-2558.
- Piard, J.C., P.M. Muriana, M.J. Desmazeaud and T. R. Klaenhammer. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Appl. Environ. Microbiol. 58: 279-284.
- Schillinger, U. and Friedrich K. Lücke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901-1906.
- Suzuki, T. and K. Yamasato. 1993. Physiology of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. FEMS Microbiol. Lett. 115: 13-18.
- Tagg, J.R. and A.R. Mcgivan. 1971. Assay system for bacteriocins. Appl. Microbiol. 21: 943.
- Vogel, R.F., G. Bocker, P. Stolz, M. Ehrmann, D. Fanta, W. Ludwig, B. Pot, K. Kersters, K.H. Schleifer and W.P. Hammes. 1994. Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 223-229.
- Yildirim, Z. and M.G. Johnson. 1998. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from radish. Lett. Appl. Microbiol. 26: 297-304.

(1998년 12월 21일 접수)

Isolation of Lactococci Inhibiting *Listeria monocytogenes* from Kimchi Habitat and Its Identification by 16S rDNA Analysis

Park, Eun-Joo, Hong-Ui Han and Bong-Hee Min*

Division of Biology and Oceanography, Inha University

Department of Biology, Taegu University*

ABSTRACT: A bacteriocin-producing strain was isolated from kimchi at the early stage of kimchi fermentation. It was identified as *Lactococcus lactis* by morphological, cultural and physiological characteristics and partial sequence of 16S rDNA. The bacteriocin from isolate had antimicrobial activity against gram positive pathogenic bacteria, such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and several strains of lactic acid bacteria but not to gram negative bacteria, *Yersinia enterocolitica*. The bacteriocin was sensitive to protease, protease XIV, α -chymotrypsin and pepsin but not to lipase, trypsin and lysozyme. The bacteriocin activity was stable at pH 2-11 and temperature of 100°C for 10 min. Thus, *Listeria monocytogenes* could be inhibited by *Lactococcus lactis* at early stage of fermentation.

Key words: Bacteriocin, Kimchi, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, Sequence of 16S rDNA.
