

김치에서 분리한 *Lactococcus* sp. J-105가 생산하는 Bacteriocin의 특성

곽규숙 · 구재관 · 배경미 · 전홍기[†]

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Characterization of Bacteriocin Production by *Lactococcus* sp. J-105 Isolated from Kimchi

Kyu-Suk Kwark, Jae-Gwan Cu, Kyung-Mi Bae and Hong-Ki Jun[†]

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

A bacteriocin-producing strain, J-105, was isolated from Kimchi and identified as *Lactococcus* sp. The optimum conditions for the bacteriocin production from the isolated microorganism were evaluated. For maximum yield of bacteriocin from *Lactococcus* sp. J-105, the cell should be harvested at the early stationary phase and temperature, pH and NaCl concentration should be 25°C, pH 8.0 and without the addition of NaCl, respectively. Maltose should be used as a carbon source and organic nitrogen such as polypeptone should be used as a nitrogen source for the best yield. The bacteriocin from isolate was inhibitory against *Acetobacter aceti*, *Bacillus subtilis* and several strains of lactic acid bacteria. The bacteriocin of J-105 was sensitive to pepsin, but stable for heat treatment. It was stable even at autoclaving temperature for 15 min.

Key words : Isolation, *Lactococcus* sp. J-105, bacteriocin, kimchi,

서 론

유산균은 당을 발효해서 다량의 젖산을 생산하는 세균으로 유산(균) 음료, 치즈, 장유, 된장, 술 등 전통적인 발효식품의 제조에 이용되어 식품의 보존성을 높여 왔다. 또한 여러 가지의 김치류, 발효 조미료 등 젖산 발효에 의한 양호한 텍스처와 맛을 제공해 왔다[27,31,35]. 이처럼 우리 인류는 유산균 자체를 알지 못하면서도 많이 이용해 왔던 것이다. 젖산균의 식품보존효과는 젖산 발효에 있어서 pH

저하가 제 1요인이지만, 그것 이외에 유산균이 생산하는 다양한 증식 저해물질이 식품 오염 균의 생육을 억제 또는 저해하고 있다는 것이 근련에 와서 밝혀지게 되었다. 이들 증식 저해물질에는 젖산들의 유기산, 과산화수소(H₂O₂), diacetyl 및 저분자의 단백질성 물질인 bacteriocin 등이 있으며, 이들 물질이 발효 식품중의 안정된 군총(microflora) 형성에 관여하고 있다[7,9].

특히 bacteriocin은 일반적으로 생산균에 가까운 그람양성균에 대해서 항균작용을 나타내는 내열성의 물질로써

[†] Corresponding author

1947년 Mattic와 Hirsch에 의하여 유산균인 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*로부터 처음 발견되었다[25,28]. Bacteriocin은 Jacob 등이 명명한 바와 같이 여러 가지 특성에서 일반 항생 물질과는 구분이 되는 natural antibiotic이며 다양한 세균에 의해 생산되고 그 대부분이 저분자량의 단백질로 구성되어 있으며, 주로 유사한 종에 작용을 한다[32,37]. 그 중에는 식중독의 원인이 되는 식품 오염균인 *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* 등을 비롯한 그람양성균 전반에 걸쳐 널리 항균작용을 나타내는 것도 있다[13,14,26,30,34]. 이와 같이 사람의 장관에 있는 소화 효소에 의해 분해될 뿐만 아니라 유산균이 옛날부터 널리 식품에 이용되어서 안정성이 높다는 점에서 bacteriocin은 천연의 식품보존제로서 기대가 되고 있다[3,15,33].

최근 들어 bacteriocin을 식품의 보존성 향상에 이용하려는 연구가 활발해 지고 있다. Bacteriocin중에서 산업적으로 실용화되어 있는 대표적인 것은 nisin이다[8,11, 24]. Nisin은 가공식품에 있어서 중대한 식품오염균인 *Clostridium botulinum*에 대해서 항균 작용이 있기 때문에 유럽에서는 아질산을 대신하는 식품보존료로서 통조림 등에 사용되고 있다. 또한 미국에서는 FDA(Food and Drug Administration)로부터 nisin을 GRAS(Generally Recognized As Safe)로 인정되어 현재 약 50개국에서 식품보존료로서 가공치즈, 야채, 과일, 통조림, 우유, 마요네즈 등에 사용되고 있다[10,12].

Bacteriocin의 작용기작은 bacteriocin의 종류와 성질에 따라 다양하지만 대략 3가지로 요약할 수 있다. 첫째, 대부분의 bacteriocin은 phospholipid나 glycoprotein과 같은 세포성분과 응집체를 형성하여 세포막의 수용체와 결합함으로써, 세포막에 ion channel을 만들어 세포내 전해질을 유출시키거나 pH 균형을 파괴함으로써 세포막에 손상을 준다[38,39]. 둘째, 일부 bacteriocin은 세포막을 통과해서 nuclease로 작용함으로써 내부단백질에 영향을 미친다. 셋째, bacteriocin이 target cell의 immune gene에 의해 생산되는 면역단백질과 가역적으로 결합하여 복합체를 형성한 다음 target cell의 receptor에 흡착한다. 이후 면역단백질이 bacteriocin을 해리시켜 활성화시키면 해리된 bacteriocin이 target cell내로 들어가 작용한다.

한편, 우리나라에서도 대개 젓산균과 관련된 식품인 발효유제품과 채소발효식품 등으로부터 bacteriocin 생성균

의 screening을 통한 bacteriocin 생성균주의 검색이 이루어져 bacteriocin에 관한 활발한 연구가 이루어지고 있다 [16-23]. 김치는 다양한 유산균이 관여하여 발효 숙성되는 살아 있는 식품으로, 발효 중에 일어나는 여러 가지 생화학적 변화와 영양학적 변화를 수반하여 각종 유기산, 비타민 및 무기질을 골고루 가지며 이들에 의해 김치의 독특한 맛을 형성하게 된다. 그러나 김치 발효의 상품성을 저하시키는 요인으로 김치 발효과정에 관여하는 유산균들에 의한 과도한 유기산의 생산이 주된 요인으로 알려져 있다. 따라서 각종 유기산의 생산에 직접 관여하는 유산균들의 생육을 조절할 수 있다면 김치의 저장성을 높이고 신선도를 오랫동안 유지할 수 있을 것으로 기대된다. 이처럼 bacteriocin과 같이 동종간의 생육 저해 활성이 뛰어난 항균물질 생산균주를 김치발효의 starter로 사용한다면, 김치의 숙성기간을 연장하고 김치의 급속한 산패를 방지할 수 있어 김치의 저장성 및 상품성을 높일 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 우리 고유의 전통 발효 식품인 김치로부터 bacteriocin 생산균주를 분리, 동정하였으며, 본 균주의 생육과 bacteriocin 생성에 대한 최적조건을 설정하고 각종 세균들에 대한 항균 활성을 검토하였다.

재료 및 방법

Bacteriocin의 생성능 측정

김치에서 분리한 유산균의 bacteriocin 생성능은 agar well diffusion method[29]로 검토하였다. 즉, MRS agar plate에 MRS broth에서 37°C, 6시간 동안 전배양된 indicator strain(*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*)의 배양액 80 μ l를 섞은 0.5% top agar를 중층하였다. 중층된 plate에 punch(Φ 0.7cm)로 well을 만들고 적당량의 0.5% top agar로 well 밑부분을 봉하였다. MRS broth에서 37°C, 16시간 동안 배양한 배양액을 4°C에서 원심분리하여 bacteriocin 이외에 생육저지물질인 유기산, 과산화수소 등을 제거하기 위하여 pH를 중성으로 맞추고, catalase를 처리하였다. 처리된 상등액 30 μ l 점적하여 37°C, 16시간 동안 배양한 후 형성된 생육저지환의 크기로 bacteriocin 생성능을 판정하였다.

Bacteriocin의 활성 측정

Bacteriocin 활성은 분리균주의 배양상등액 50 μ l와 전배

양한 indicator strain인 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*(O.D₆₆₀ = 0.1~0.4)를 50 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 30분간 반응 후 MRS 배지를 900 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5시간 배양한다. 이 배양액을 660nm에서 측정하여 bacteriocin의 activity를 계산하였다. 대조구는 분리균의 배양상등액 대신 MRS broth를 첨가하였다. Bacteriocin 활성은 bacteriocin unit(BU)로 표시하였으며, 1 BU는 indicator strain의 증식을 50% 저해하는 bacteriocin의 양으로 정의하였다.

Bacteriocin activity (BU) =

$$(\text{control O.D}_{660} - \text{sample O.D}_{660}) / \text{control O.D}_{660} \times 100 / 50 \times \text{희석배수} \times 1000 / 50$$

분리균주의 동정

분리균주를 전자현미경으로 형태학적 특성을 관찰하고 각종 배지에서의 배양상의 특성을 검토하여, 분리균주의 생리학적 및 생화학적 특성을 Bergey의 Determinative Bacteriology Manual 제8판과 Bergey의 Systematic Bacteriology Manual Vol. 2에 준하여 동정하였다[5,6].

Bacteriocin 생성 조건

공시균의 생육과 bacteriocin의 생성능 최적 조건을 검토하기 위해, 각종 탄소원, 질소원, 배양온도, 배양시간, NaCl 및 초발 pH 등에 따른 균의 생육도와 bacteriocin 생성능을 측정하였다. 접종 균체량은 MRS broth에서 16시간 전배양한 배양액을 본배양 배지에 0.5%씩 되도록 일정하게 접종하였다.

배양시간에 따른 영향

공시균의 전배양액을 MRS 배지에 0.5% 농도로 접종하여 25 $^{\circ}$ C에서 2시간 간격으로 24시간 동안 균의 생육도, pH 변화 및 bacteriocin 생성능을 검토하였다.

탄소원의 영향

기본 배지인 MRS 배지에 glucose를 제외한 각종 탄소원을 각각 2%씩 첨가하여 공시균의 생육과 bacteriocin 생성능을 검토하였다.

질소원의 영향

기본 배지인 MRS 배지에 질소원인 peptone, beef extract, yeast extract 그리고 ammonium citrate를 제외한 각종 질소원을 각각 2%씩 첨가하여 공시균의 생육

및 bacteriocin 생성능을 검토하였다.

온도별에 따른 영향

배양 온도를 10, 20, 25, 30, 37, 40, 45 $^{\circ}$ C로 달리하여 배양온도에 따른 공시균의 생육과 bacteriocin 생성능을 검토하였다.

초발 pH에 따른 영향

MRS broth의 초발 pH를 pH 2.0에서 pH 10.0까지 단계별로 조절하여 공시균의 생육과 bacteriocin 생성에 미치는 영향을 검토하였다.

NaCl에 따른 영향

기본 배지인 MRS 배지에 NaCl의 농도를 0, 2, 4, 6, 8, 10%씩 각각 첨가하여 NaCl 농도에 따른 공시균의 생육과 bacteriocin 생성능을 검토하였다.

Bacteriocin의 성질 검토

공시균이 생산하는 bacteriocin의 pH, 열, 효소에 대한 안정성 및 항균 활성 범위를 검토하였다.

pH에 대한 안정성

공시균의 bacteriocin 상등액을 pH 2.0~10.0까지 맞추어 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 방치하여 bacteriocin의 잔존 활성을 검토하였다.

열에 대한 안정성

공시균의 열에 대한 안정성을 검토하기 위하여 bacteriocin 상등액을 4 $^{\circ}$ C에서 24시간, 100 $^{\circ}$ C에서 1시간, 110 $^{\circ}$ C에서 10분, 그리고 121 $^{\circ}$ C에서 15분 가열하여 bacteriocin의 잔존활성을 검토하였다.

효소에 대한 안정성

여러 효소들이 공시균이 생산하는 bacteriocin의 항균 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 bacteriocin의 상등액 200 μ l와 각종 효소액 200 μ l를 섞어서 37 $^{\circ}$ C, 2시간 반응시킨 후 bacteriocin의 잔존활성을 검토하였다.

항균활성 검토

공시균의 bacteriocin의 항균 활성 범위를 알기 위하여 여러 균주를 indicator strain으로 하여 soft agar에 섞어 MRS plate에 증충한 후 agar-well diffusion method로 생성된 생육 저지환의 크기를 비교하였다.

결과 및 고찰

Bacteriocin 생성 균주의 분리 및 선정

김치에서 분리한 유산균을 agar-well diffusion method로 bacteriocin 생성능을 검토하였다. Bacteriocin을 생성하는 균주들 중 indicator strain인 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*에 대한 저해능이 가장 뛰어난 균주를 선정하였다(Fig. 1). 김치에서 분리한 bacteriocin 생성능이 가장 높은 균주를 J-105라 명명하여 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

공시균의 동정

공시균주 J-105의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 제반 특성은 Table 1과 같다. 그 결과 공시균 J-105는 구균이며 운동성이 없고 통성 혐기성으로 크기가 $2.0 \times 2.0 \mu\text{m}$ 인 gram 염색 양성의 세균이었으며 전자 현미경상(Fig. 2)에서 포자를 형성하지 않았고, 포도당 배지에서 gas 생성을 하지 않는 반면 산은 잘 생성하는 특성을 나타내었다. 또한 colony는 둥근형이고, wetted하며 중앙부가 볼록한 convex 형이며, 색깔은 불투명한 흰색이었다. Bergey의 Systematic Bacteriology Manual Vol. 2에 의하면 그람 양성 구균으로 포자를 형성하지 않으면서 운동성이 없는 화학 종속 영양 균인 통성 혐기성균들로, glucose에서 CO_2 를 생성하지 않고 catalase 음성이며 45°C 와 6.5% NaCl에서는 생육하지 않는 반면 4% NaCl, 0.1% methylene blue 및 0.1% bile agar에서 생육하며 arginine으로부터 암모니아를 생성하

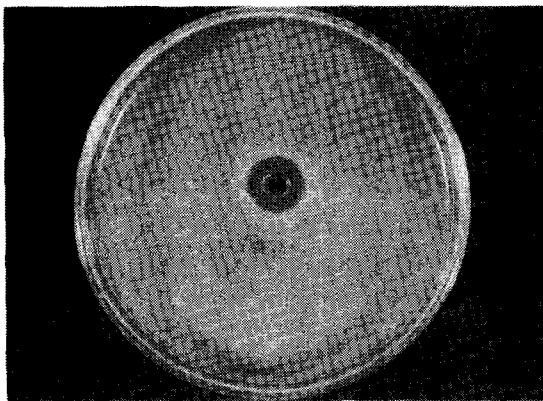


Fig. 1. Antagonistic activity of *Lactococcus* sp. J-105 overlaid with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*.

Table 1. Taxonomical characteristics of the isolated strain J-105

1. Morphological characteristics	
Shape	coccus
Cell size	$2.0 \times 2.0 \mu\text{m}$
Mortality	nonmortality
Gram stain	positive
2. Cultural characteristics	
Colonies	circular, convex
Colony surface	smooth
Colony color	white
Colony opacity	opaque
3. Biochemical characteristics	
Ammonia from arginine	+
β -Glucosidase	-
α -Galactosidase	+
β -Galactosidase	-
Alcaline phosphatase	-
Pyroglutamic acid Acrylamidase	-
N-Acetyl- β -Glucosaminidase test	+
Glycyl-Tryptophane Acrylamidase test	-
Catalase test	-
Urease test	-
β -Mannosidase test	-
Hydrolysis of hippurate	-
Hydrolysis of methyl-6-D-glucopyranoside	+
Fermentation	Homofermentative
Growth 10°C	-
Growth 45°C	-
Growth in broth with 4% NaCl	+
Growth in broth with 6.5% NaCl	+
Growth in milk with 0.1% methylene blue	+
Growth on 40% bile agar	+
Survive 60°C for 30min	-

는 homofermentative lactic acid bacteria를 *Lactococcus*속으로 정의하고 있다. 본 실험에 사용된 공시균 J-105는 상기의 *Lactococcus*속의 특징을 가지고 있었고, 그 외 배양적, 생화학적인 여러 가지 특성을 조사하여 Bergey의 Determinative Bacteriology Manual 제8판과 Bergey의 Systematic Bacteriology Manual Vol. 2와 비교 검토한 결과, *Lactococcus*속으로 동정되어 편의상 *Lactococcus* sp. J-105라고 명명하였다.

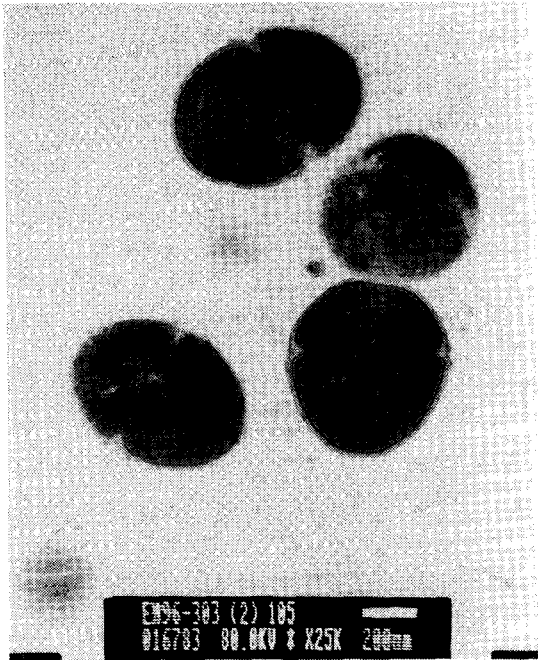


Fig. 2. TEM(Transmission Electron Micrograph) of the isolated strain J-105.

Bacteriocin의 최적 생산 조건 검토

배양시간에 따른 *Lactococcus* sp. J-105의 생육 및 bacteriocin 생성

Lactococcus sp. J-105를 전배양액 0.5% 농도로 접종하여 2 시간 간격으로 균의 생육 및 pH 변화와 bacteriocin의 생성능을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. 대수 증식기는 배양 후 6시간째부터 시작되었으며 배양 후 12 시간째부터 정지기로 접어들었다. *Lactococcus* sp. J-105의 bacteriocin의 생성은 대수 증식기 중기에서부터 서서히 증가하여 배양 후 16 시간째 가장 높은 생성능을 보였고 그 이후 bacteriocin의 생성능이 차츰 줄어들었다. pH의 변화는 배양 후 6~12 시간째 급격히 줄어든 후 배양 24 시간까지 pH 4.4~4.8을 유지하였다.

탄소원의 영향

본 실험에 사용한 MRS 배지에 들어있는 탄소원인 glucose 대신 각종 탄소원(lactose, levan, maltose, galactose, mannitol, starch, tryptose, dextrose, raffinose, inositol, fructose, sucrose, inulin 그리고 arabinose)을 2%씩 첨가

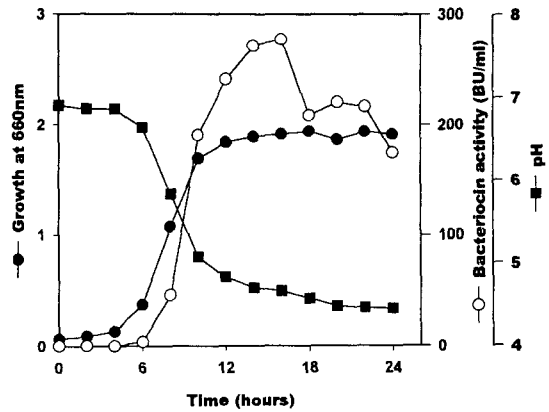


Fig. 3. Time course experiment of the cell growth, pH and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. J-105. MRS broth used as culture medium. Cultivation was carried out at 25°C.

하여 *Lactococcus* sp. J-105의 생육도와 bacteriocin 생성능을 조사하였다. 그 결과 탄소원으로 levan, dextrose 및 arabinose가 첨가된 경우에는 균의 생육은 양호한 반면 bacteriocin 생성은 저조하였다. 이에 반해 sucrose, mannitol, maltose 및 lactose를 탄소원으로 사용했을 경우에는 대조군에 비해 균체의 생육이 촉진될 뿐만 아니라 bacteriocin 생성도 증가되어 1,000 BU/ml 이상의 활성을 나타내었다. 이들 중 *Lactococcus* sp. J-105의 생육 및 bacteriocin 생성능의 최적 탄소원은 maltose로서 이 때의 bacteriocin activity는 1,239.87 BU/ml였고 균의 생육 OD 값은 1.85였다.

질소원의 영향

MRS 배지에 탄소원으로 2% maltose를 첨가하고 배지 중 질소원인 peptone, beef extract, yeast extract 및 ammonium citrate 대신에 각종 유기 질소원(tryptone, bactopeptone, peptone, yeast extract, beef extract, yeast extract와 beef extract, yeast extract와 polypeptone 그리고 beef extract와 polypeptone) 및 무기 질소원(NH_4Cl , KNO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)을 2% 되게 첨가하여 *Lactococcus* sp. J-105의 생육도와 bacteriocin 생성능을 조사하였다. 그 결과 무기 질소원에서는 모두 균의 생육이 저조하였으며 bacteriocin은 생성되지 않았다. 이와는 달리 거의 모든 유기질소원에서는 균의 생육과 bac-

teriocin 생성능이 양호하였으며 그 중에서 polypeptone이 332.24 BU/ml로 가장 우수한 bacteriocin 생성능을 보였다.

배양 초기 pH의 영향

기본 배지인 MRS 배지에 포함되어 있는 탄소원과 질소원 대신에 2% maltose와 2% polypeptoen을 탄소원과 질소원으로 첨가하여 초발 pH를 2~10까지 단계적으로 변화시켜 *Lactococcus* sp. J-105의 생육도와 bacteriocin 생성능을 검토하였다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 본 균주는 pH 6에서부터 pH 10까지 범위에서 잘 생육하였으며 생육 최적 pH는 pH 8 부근이었다. Bacteriocin 생성 또한 pH 8 부근에서 가장 높게 나타났다. 산성 영역인 pH 2~6까지의 영역에서는 균체 증식과 bacteriocin 생성은 매우 미약하였으며 중성영역과 알칼리 영역에서 bacteriocin의 생성능 뿐만 아니라 균체 생육이 매우 높게 나타났다.

배양온도의 영향

10, 20, 25, 30, 37, 40, 45℃로 배양 온도를 변화시켜서 배양 온도가 *Lactococcus* sp. J-105의 생육 및 bacteriocin의 생성에 미치는 영향을 검토한 결과, Fig. 5와 같이 37℃에서 가장 양호한 균의 생육을 나타내는 반면 bacteriocin의 생성은 25℃에서 가장 높았다. 45℃인 경우 균체 증식 및 bacteriocin 생성은 전혀 나타나지 않았다.

NaCl에 따른 영향

NaCl이 bacteriocin 생성에 미치는 영향을 검토하기 위

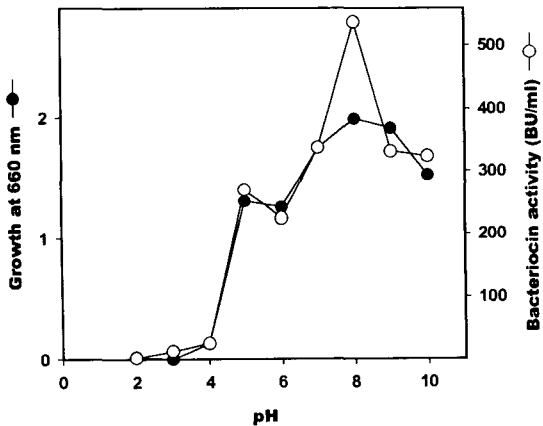


Fig. 4. Effect of initial pH of the cell growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. J-105.

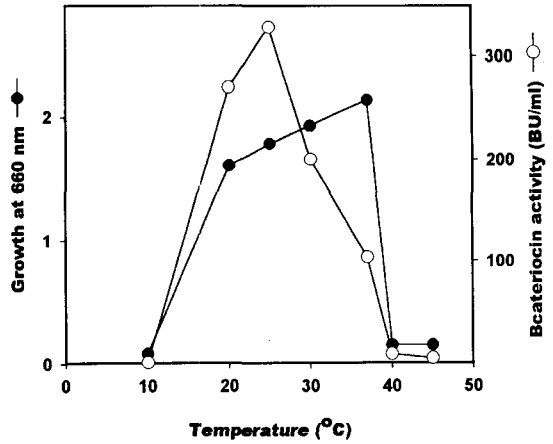


Fig. 5. Effect of temperature on the cell growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. J-105.

해 기본 배지인 MRS 배지에 NaCl을 0, 2, 4, 6, 8, 10%가 되게 첨가하여 *Lactococcus* sp. J-105의 생육 및 bacteriocin의 생성능을 조사하였다. NaCl이 적당한 농도로 첨가되었을 때 bacteriocin 생성능이 비례적으로 증가한다는 보고 [2]와는 달리 Fig. 6에서와 같이 NaCl의 첨가 농도가 증가할수록 생육과 bacteriocin 생성이 감소되었으며 6%이상의 농도에서는 균체 증식과 bacteriocin 생성이 전혀 나타나지 않았다.

이상의 배양 조건을 검토한 결과, bacteriocin의 최적 생산 조건을 Table 2와 같이 설정하였다.

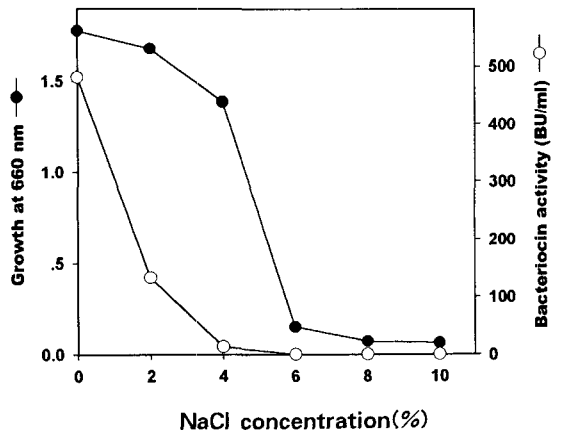


Fig. 6. Effect of NaCl on the cell growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. J-105.

Table 2. Optimum condition for the bacteriocin production

Medium (%)	Maltose	2.0
	Polypeptone	2.0
	Magnesium sulfate	0.5
	Maganes sulfate	0.01
	Dipotassium phosphate	0.2
	Tween 80	0.1
	pH	8.0
	Temperature	25℃
	Culture time	16 hour

Bacteriocin의 안정성 및 항균활성 검토

pH와 열에 대한 안정성

J-105의 bacteriocin 상등액을 pH를 달리하여 잔존 활성을 검토한 결과 pH 2~4까지는 안정하였으며 pH 3에서 가장 활성이 높은 반면, pH 5부터 급격히 떨어져 pH 9부터는 bacteriocin의 활성이 완전히 소실되었다(Fig. 7). Bavarin A[3], carnocin UI49[36] 등의 bacteriocin에서도 동일한 결과를 보였으며, 이것은 염기성에서 실활되는 bacteriocin의 전형적인 성질중의 하나이다. 한편 J-105의 bacteriocin 상등액을 4℃에서 24시간, 100℃에서 1시간, 110℃에서 10분, 121℃에서 15분으로 가열하여 bacteriocin의 잔존 활성을 검토한 결과(Table 3) 비교적 모두 높은 활성을 나타내었다. 대부분의 bacteriocin은 고온에서 활성

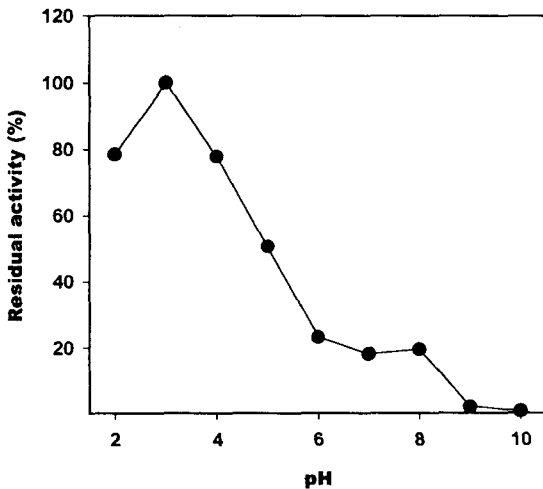


Fig. 7. pH stability of the bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. J-105.

Table 3. Heat stability of the bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. J-105

Temperature	Time	Bacteriocin activity (BU/ml)
4℃	24 hour	3831.26
100℃	1 hour	3966.50
110℃	10 min	3310.96
121℃	15 min	3677.85

이 유지되며 J-105가 생산하는 bacteriocin 뿐만 아니라 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* UL720이 생산하는 diacetin B[1] 또한 autoclaving하여도 활성이 유지되는 성질을 나타내었다. 따라서, J-105가 생산하는 bacteriocin은 산성에서 안정하고 열에 강한 bacteriocin의 일반적인 성질을 갖고 있음을 알 수 있었다.

효소에 대한 안정성

J-105가 생산하는 bacteriocin의 효소에 대한 안정성을 알아보기 위해서 각종 분해효소와 bacteriocin의 상등액을 37℃, 2시간 반응시킨 후 bacteriocin의 잔존 활성을 측정하였다(Table 4). 그 결과 *Lactococcus* sp. J-105가 생산하는 bacteriocin은 trypsin, protease와 같은 peptide 분해효소에 대해서는 안정한 반면, pepsin에 의해서는 활성이 상실되는 독특한 성질을 나타내었다. 대부분의 bacteriocin은 단백질이거나 단백질성이기 때문에 단백질 분해 효소에 의해 분해되는데 *Streptococcus* sp. J-C1에 의해 생산되는

Table 4. Effect of various enzymes on bacteriocin activity of the *Lactococcus* sp. J-105

Enzyme	Inhibitory activity
Control	++
α -Amylase	++
β -Amylase	+++
Lysozyme	+++
Trypsin	++
Lipase	++
Pepsin	-
Protease	+
Trypsinogen	+

Lactobacillus delbrueckii ssp. *delbrueckii* was used halo was expressed as the degree of inhibition as indicator strain. Halo size: -, 0~0.05cm; +, 0.05~0.1cm; ++, 0.1~0.25cm; +++, 0.25~0.45cm; +++++, above 0.45cm

bacteriocin[19] 또한 protease와 같은 단백질 분해효소에 완전히 항균력을 상실하였다. 반면에 J-105가 생산하는 bacteriocin은 peptide 분해효소에 대해서도 비교적 안정한 성질을 나타내었다.

항균 활성 검토

여러 가지 균주를 indicator strain으로 하여 *Lactococcus* sp. J-105가 생산하는 bacteriocin에 대한 항균 활성을 검토하였다. 그 결과 Table 5와 같이 다양한 그람 양성균에 대해서 항균 활성을 두드러지게 보였으며, 그람 음성균인 *Acetobacter aceti*에 대해서는 항균 활성을 나타내었으나 *E. coli*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다. J-105가 생산하는 bacteriocin도 기존에 연구된 bacteriocin과 마찬가지로 근접한 종들에게 주로 항균 활성을 나타내었다.

Table 5. Inhibitory spectrum of bacteriocin from *Lactococcus* sp. J-105 using agar well diffusion test

Strain	Inhibitory activity
<i>Acetobacter aceti</i> IFO3281	++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC21697	++
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13058	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC9637	-
<i>Lactobacillus brevis</i> IFO13109	+
<i>Lactobacillus casei</i> KCRZ 1121	+++
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> IFO3534	+++
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 1096	++
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 1094	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC10830	+++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC10830	+++
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC 3101	+++
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25922	-

Lactobacillus delbrueckii ssp. *delbrueckii* was used halo was expressed as the degree of inhibition as indicator strain. Halo size: -, 0~0.05cm; +, 0.05~0.1cm; ++, 0.1~0.25cm; +++, 0.25~0.45cm; + + + +, above 0.45cm

요 약

우리 고유의 전통 발효 음식인 김치로부터 bacteriocin 생성능이 우수한 *Lactococcus* sp. J-105균주를 분리하였다. *Lactococcus* sp. J-105의 생육 및 bacteriocin 생성에 대한 최적 조건을 검토한 결과 bacteriocin 생성은 대수 증식기

말기에서 정지기 초기에 가장 많이 생성되었다. *Lactococcus* sp. J-105의 생육 및 bacteriocin 생성 최적 탄소원 및 질소원은 각각 maltose와 polypeptone이었다. 균의 생육 및 bacteriocin 생성 최적 온도는 25℃였으며 생육 최적 pH는 pH 8 부근이었다. bacteriocin 생성 또한 pH 8에서 최고를 나타내었다. 한편 NaCl은 오히려 균체 증식과 bacteriocin 생성을 저해하였다.

Lactococcus sp. J-105가 생산하는 bacteriocin의 pH 및 열에 대한 안정성을 검토한 결과 pH 2~4, 121℃ 15분에서 각각 안정하였다. 또한 J-105의 항균 spectrum을 검토한 결과 *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., 그리고 *Bacillus subtilis* 등의 Gram 양성균에 대해서 항균활성 나타내었으며 Gram 음성균인 *Acetobacter aceti*에 대해서도 항균 활성을 나타내었으나 *E. coli*에 대해서는 항균 활성을 나타내지 않았다. 본 bacteriocin은 trypsin, protease와 같은 peptide 분해효소에 대해서는 안정한 반면, pepsin에 의해서는 활성이 상실되는 특이한 성질을 나타내었다

감사의 글

본 연구는 (1998)년 한국학술진흥재단의 학술 연구비와 부산대학교 기성회재원 연구비에 의한 연구결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Ali, D., Lacroix, C., Thuault, D., Bourgeois, C. M. and Simard, R. E. 1995. Characterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* UL720, *Can. J. Microbiol.* **41**, 832.
2. Amechi, O. and Montville, T. J. 1991. Bacteriocin-Mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid at refrigeration and abuse temperatures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3423.
3. Anderson, R. E., Daeschel, M. A. and Hassen, H. H. 1988. Antimicrobial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*, *Biochimie.*, **70**, 381.
4. Anette, G., Larsen, F. K., Vogensen and Josephsen, J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs : purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced

- by *Lactobacillus bavaricus* MI401, *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 113.
5. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th ed, The William and Wilkams Co., U.S.A. 1974.
 6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2. The Wilkams Co., U.S.A. 1984.
 7. Barnby-Smith, F. M., Roller, S. D., Woods, L. F., Barker, M., Nightingale, M. and Gibbs, P. A. 1989. Production of antimicrobial compounds by lactic acid bacteria, *The British Food Manufacturing Industries Research Association. Research Reports no. 662*. Leatherhead Food RA.
 8. Buchman, G. W., Banerjee, S. and Hansen, J. N. 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic, *J. Biol. Chem.*, **263**, 16260.
 9. Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives, *Food Technology*, **43**, 164.
 10. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative, *Food Technology*, **44**, 100.
 11. Dodd, H. M., Horn, N. and Gasson, M. J. 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin, *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 555.
 12. FDA. Nisin preparation. 1988. Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Food and Drug Admin., *Fed. Reg.*, **53**, 11247.
 13. Farber, J. M. and Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen, *Microbiological Reviews*, **55**, 476.
 14. Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E. and Klaenhammer, T. R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Protection*, **52**, 384.
 15. Hiller, A. J. and Davidson, B. E. 1991. Bacteriocins as food preservatives, *Food Research Quarterly*, **51**, 60.
 16. Jo, Y. B., Kim, H. J., Kim, S. K., Baik, H. S., and Jun, H. K. 1996. Characteristics of a Interspecific Protoplast Fusant from *Lactobacillus acidophilus* 88 and *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**, 150.
 17. Jo, Y. B., Kim, H. J., Kim, S. K., Baik, H. S. and Jun, H. K. 1996. Studies on the Electrofusion between *Lactobacillus acidophilus* 88 and *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**, 143.
 18. Jo, Y. B., Bae, K. M., Kim, S. K. and Jun, H. K. 1996. Evaluation of Optimum Conditions for Bacteriocin Production from *Lactobacillus* sp. JB-42 Isolated from Kimchi, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **6**, 63.
 19. Jo, Y. B., Cho, Y. I., Baik, H. S. and Jun, H. K. 1996. Bacteriocin Production by *Streptococcus* sp. J-C1 Isolated from Kimchi, *Korean J. Life Science*, **6**, 270.
 20. Jo, Y. B., Choi, H. J., Bae, K. M. and Jun, H. K. 1997. Morphological and Physiological Properties of Interspecific Electrofusants, Bacteriocin Producer, from *Lactobacillus* sp. JC-7 and *Lactobacillus acidophilus* 88, *Journal of Korean Society Food Science and Nutrition*, **26**, 1237.
 21. Jo, Y. B., Choi, H. J., Cho, Y. I., Baik, H. S. and Jun, H. K. 1997. Evaluation of Optimum Conditions for the Electrofusion between *Lactobacillus* sp. JC-7 Isolated from Kimchi and *Lactobacillus acidophilus* 88, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 121.
 22. Jo, Y. B., Heo, K., Kim, S. K., Baik, H. S. and Jun, H. K. 1997. Properties of the Fusants of *Lactobacillus acidophilus* 88 and *Lactobacillus casei* subsp. *casei* KCTC 1121, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 25.
 23. Jo, Y. B., Joh, W. J., Cho, Y. I., Lee, E. J., Kim, S. K. and Jun, H. K. 1997. A study on Bacteriocin Produced by *Lactobacillus* sp. JJ-2001 Isolated from Kimchi, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 73..
 24. Kaletta, C. and Entian, K. D. 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product, *J. Bacteriol.* **171**, 1597.
 25. Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochimie.*, **70**, 337.
 26. Lewus, C. B., Kaiser, A. and Monteville, T. J. 1991. Inhibition of food-borne pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 1683.
 27. Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, *FEMS Microbiology Reviews.*, **87**, 149.
 28. Mattick, A. T. R. and Hirsch, A. 1947. Ferther observation on an inhibitory substance(nisin) from *lactis streptocci*, *Lancetii.*, **5**.
 29. Mayr-Harting, A., Hedges, A. J. and Berkely, R. C. W. 1972. Methods for studying bacteriocin. p. 315-422. In J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed).
 30. Nielsen, J. W., Dickson, J. S. and Crouse, J. D. 1990. Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat, *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 2142

31. Piard, J. C. and Desmazeaud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances, *Le lait.*, **72**, 113.
32. Ralph, W. J., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria, *Microbiol. Rev.*, **59**, 171
33. Spelhaug, S. R. and Harlander, S. K. 1989. Inhibition of food-borne pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*, *Journal of Food Protection*, **52**, 856.
34. Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A. and Klaenhammer, T. R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 3613.
35. Stiles, M. E. and Hastings, J. W. 1991. Bacteriocin producing by lactic acid bacteria : potential for use in meat preservation, *Trends Food Sci. Technol.*, **2**, 24.
36. Stoffels, G., Nissen-Meyer, A., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H. and Nes, I. F. 1992. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1417.
37. Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Bacteriol. Rev.*, **40**, 722.
38. Van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N. and Abee, T. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membrane in a voltage-independent, protein-mediated manner, *J. Bacteriol.*, **173**, 7934.
39. Venema, K. T., Abee, A. J., Haandrikman, K. J., Leenhouts, J., Kok, W. N., Konings and Venema, G. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1041.