

폴리리신을 함유한 *Streptomyces albulus* 배양액의 김치미생물
성장억제 효과

Effects of Crude ϵ -poly-L-lysine in *Streptomyces albulus* Broth on
Suppression of Microbial Growth in Korean Kimchi

김광섭* 이갑배** 선홍석*** 안치민**** 박찬영*****
Kwang-sub Kim Garpee Lee Heung-suk Sun Chi-min Ahn Chanyoung Park

<Abstract>

The *Streptomyces albulus* broth, when the polylysine in the broth, that has powerful growth inhibiting effect for many microbes, is its maximum, had filtered off the cells, to use the broth as preservative for keeping favorable taste of Korean Kimchi. Some microorganisms in their specific growth medium, known to deteriorate the useful nutrient of the Kimchi, has grown with different amounts of the inhibiting broth, to determine the minimum growth inhibition concentration. The ϵ -poly-L-lysine had been identified from the IR spectroscopic analysis of the purified polylysine of the broth from ion exchange chromatographic separation. The content of the polylysine had been determined by methyl orange decoloration effect. Though the minimum inhibition concentration, evaluated by the naked eye based on the conventional method measuring the turbid feature after 18 hours of culture, has different values each other, the observed effects confirmed that the crude broth could be used as a natural preservative for the Kimchi in extending the fair taste.

key words : *Streptomyces albulus*, ϵ -poly-L-lysine, Kimchi

*학생회원, 전남대학교 응용화학공학부 석사
전남대학교 공업화학과 졸업
500-757 광주광역시 북구 용봉동 300번지
E-mail kgs007@hanmail.net

**학생회원, 전남대학교 정밀화학공학과 공학사
전남대학교 정밀화학공학과 졸업

***학생회원, 전남대학교 정밀화학공학과 공학사
전남대학교 정밀화학공학과 졸업

****정회원, 전남대학교 응용화학공학부 工博
전남대학교 공업화학공학과 졸업

*****정회원, 전남대학교 응용화학공학부 교수, 工博
고려대학교 화학공학과 졸업
500-757 광주광역시 북구 용봉동 300번지
E-mail cypark@chonnam.ac.kr

Faculty of applied chemical engineering
Chonnam national Univ.
300 youngbongdong, Bukku, Kwangju, Korea.

Dept of Fine chemicals and process engineering
Chonnam national Univ.

Dept of Fine chemicals and process engineering
Chonnam national Univ.

Faculty of applied chemical engineering
Chonnam national Univ.

Faculty of applied chemical engineering
Chonnam national Univ.
300 youngbongdong, Bukku, Kwangju, Korea.

1. 서론

김치는 우리나라 전통발효 식품의 일종으로 독특한 방향과 질감, 감칠맛 상쾌한 산미등의 조화된 맛을 가지고 있어 식욕을 증진시킬뿐만 아니라 각종 비타민을 비롯한 풍부한 영양소를 함유하고 있다. 그러나 김치에 존재하는 각종 미생물이 풍부한 영양소로 말미암아 활발히 증식하여 과다가스발생, 과다산미, 또는 연화나 부패를 일으켜 김치의 품질저하를 초래한다. 이러한 김치의 산패 및 연부현상은 김치중의 *Bacillus*, *Flabobacterium*, *Pseudomonas*속 등의 호기성세균과 *Penicillium* 등의 곰팡이류, *Pichia membranefaciens* 와 같은 산막효모 및 *Lactobacillus plantarum* 등의 젖산균이 관여하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 김치보존성 증대 또는 향미기간 연장을 위해서 감마선 조사¹⁾, 염처리, 염혼합물첨가²⁾, Sorbic acid 또는 benzoic acid 등의 합성보존제³⁾, 녹차, 오미자, 대나무잎추출물⁴⁾⁵⁾⁶⁾ 등의 천연보존제와 포장방법⁷⁾ 등을 사용하고 있다. 그러나 이들 방법중 합성보존제는 화학물질의 안전성 등에 대한 우려등으로 인해 그 사용이 제한되고, 천연항균제는 대부분이 저급지방산 에스테르, 유기산, 글리신, 에틸알콜 등을 중심으로한 혼합물로 합성보존제에 비해 그 효과가 떨어진다. 또한 생약제 성분, 향신료, 정유 및 식용식물체 추출물은 김치 맛자체에 영향을 주거나 항균활성이 미약하기 때문에 실용화가 어려운 실정으로 김치의 보존성증대를 위한 천연보존제 개발은 여전히 해결되어야 할 과제로 남아있다.

본 실험실에서는 김치의 저장기간을 연장하기 위해 식물의 생리활성을 촉진시키고 항균력을 가지고 있는 세라믹⁸⁾을 충전시킨 포장재를 사용하여 저장기간을 약간 연장할수 있었으나⁹⁾ 김치미생물에 대한 직접적인 성장지연효과가 미약하여 새로운 천연보존제 개발을 시도하게 되었다. 이러한 실험의 일환으로 김치의 효과적인 선도유지를 위한 천연항균물질검색을 위해 일본등 선진국가에서 사용되고 있는 식품보존제인 ϵ -poly-L-lysine을 생산하는 *Streptomyces albulus* 균주를 구입하여 배양하였다. 균주를 배양한 배양액에서 ϵ -poly-L-lysine을 IR로 분석확인 한후 김치세균에 대한 ϵ -poly-L-lysine함유된 배양액의 최소 저해농도를 결정하여 김치의 맛을 오랫동안 보존할 수 있는 김치 천연 보존제로서 사용 가

능성을 검토하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 일본 국립 생명 공학 연구소(National Institute of bioscience and Human technology, NIBH, Tsukuba, Japan)에서 분양받은 *Streptomyces albulus* spp. *lysinopolymerus*[No. 346]를 사용하였으며 김치균주는 한국미생물보전협회에서 구입한 오염의 지표균인 동시에 부패 세균인 *Escherichia coli* (KCCM 11835)와 유전공학연구소 유전자은행에서 구입한 김치의 초기 숙성균인 *Leuconostoc mesenteroides*(KCTC 3100), 김치의 숙성에 관여하는 *Lactobacillus brevis* (KCTC 3102), *Lactobacillus plantarum*(KCTC 3104) 및 김치의 산패에 관여하는 *Streptococcus faecalis*(KCTC 3195), *Pediococcus cerevisiae* (KCTC 1628)를 사용하였다. *St. albulus*균 배양에 사용한 배지는 Shima¹⁰⁾등이 제시한 Glycerol 50g, (NH₄)₂SO₄ 10g Yeast extract 5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, FeSO₄ · 7H₂O 0.03g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.04g을 사용하였으며 *E.coli*는 L.B 배지(Trypton 10.0g, Yeast extract 5.0g, NaCl 10.0g, Agar 15.0g Adjusted PH to 7.0)에 *L. mesenteroides*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *S. faecalis*, *P. cerevisiae*는 M.R.S 배지(Peptone 10g, Meat extract 5g, Yeast extract 5g, Glucose 20g, Tween 80 1g, K₂HPO₄ 2g, Sodium acetate 5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, MnSO₄ · 4H₂O 0.05g, Triammonium citrate 2g, Distilled water 1L pH=7.0)에 접종하여 30℃에서 48시간 2번 계대배양하여 5℃에서 보관하였으며 실험을 하기전에 12시간 적응 배양후 실험을 하였다.

2.2 *St. albulus* 배양액중의 ϵ -Poly-L-lysine(ϵ -PL)에 대한 IR 분석

St. albulus 균주로 생합성된 배양액에 있는 ϵ -PL의 구조 성분을 분석하기 위해 생성물을 양이온 교환수지(CM-Sephrose CL-6B[Na⁺])를 사용하여 분리하고, 정제하여 냉동 건조 시킨 후 KBr 중에 미량을 넣어서 IR로 분석하였다. 정확한 비교 분석을 위해 Sigma사에서 구입한 표준 폴리리신을 함께 분석하였다.

2.3 *St. albulus* 배양액중의 ϵ -Poly-L-lysine(ϵ -PL)의 검량곡선

배양액중의 폴리리신량을 정량분석하기 위해 Itzhaki의 분석방법을 이용하여 검량곡선을 만들었다.¹¹⁾ 시료는 시그마사(Sigma Co.)에서 구입한 폴리리신을 증류수에 녹여 준비하였다. 증류수 2ml안에 ϵ -PL량이 각각 50 μ g, 100 μ g, 150 μ g, 200 μ g, 250 μ g 함유되게 하여 1mM 메틸오렌지 2ml씩 첨가해 실온에서 30분간 방치하였다. 이때 양의 하전을 띠는 폴리리신은 음이온 염색체인 메틸오렌지와 결합하여 복합체를 형성하게 된다. 복합체는 3000rpm으로 10분간 원심분리하여 침전시키고 상등액을 취한 후 분광광도계(Spectronic 20, Miltron Co.)를 이용하여 465nm 파장에서 흡광도 변화를 측정하여 검량곡선을 만들었다. 배양액 내에 존재하는 ϵ -PL량은 이 검량곡선을 이용하여 계산하였다.

2.4 *St. albulus* 배양액의 최소저해 농도(MIC) 측정

St. albulus 배양액의 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 정량적으로 측정하기 위해 시험관 희석법(Tube dilution technique)을 사용하였다.¹²⁾ 먼저 30ml 유리시험관 10개에 각각 Nutrient broth(Difco)를 10ml씩 채운다음 각 시험관에 ϵ -PL을 배지 1ml당 0 μ g, 0.4 μ g, 0.8 μ g, 1.2 μ g, 1.6 μ g, 2 μ g, 2.4 μ g, 3.2 μ g, 3.6 μ g씩 순서대로 넣어서 멸균하였다. 멸균된 배지 10ml에 *E. coli*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *S. faecalis*, *P. cerevisiae* 균주를 약 7×10^4 cfu/ml 이내로 접종하여 12시간동안 30°C, 120rpm으로 진탕 배양한후 18시간이 경과한 후 육안으로 시험관의 탁도를 관찰하며 탁도 변화가 없는 곳을 최소저해농도로 판단하였다. 또한 탁도 변화가 없는 배양액을 Nutrient agar에 평판 도말하여 30°C 항온기(Incubator 2930, Dong Yang Science Co.)에서 24시간 배양한후 균집이 형성되지 않는 농도를 최소 저해 농도로 결정하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1 *St. albulus* 배양액중의 ϵ -PL에 대한 IR 분석

물질을 구성하고 있는 성분들과 그 성분들의 결합관계를 예측할 수 있는 분석기기인 IR기기

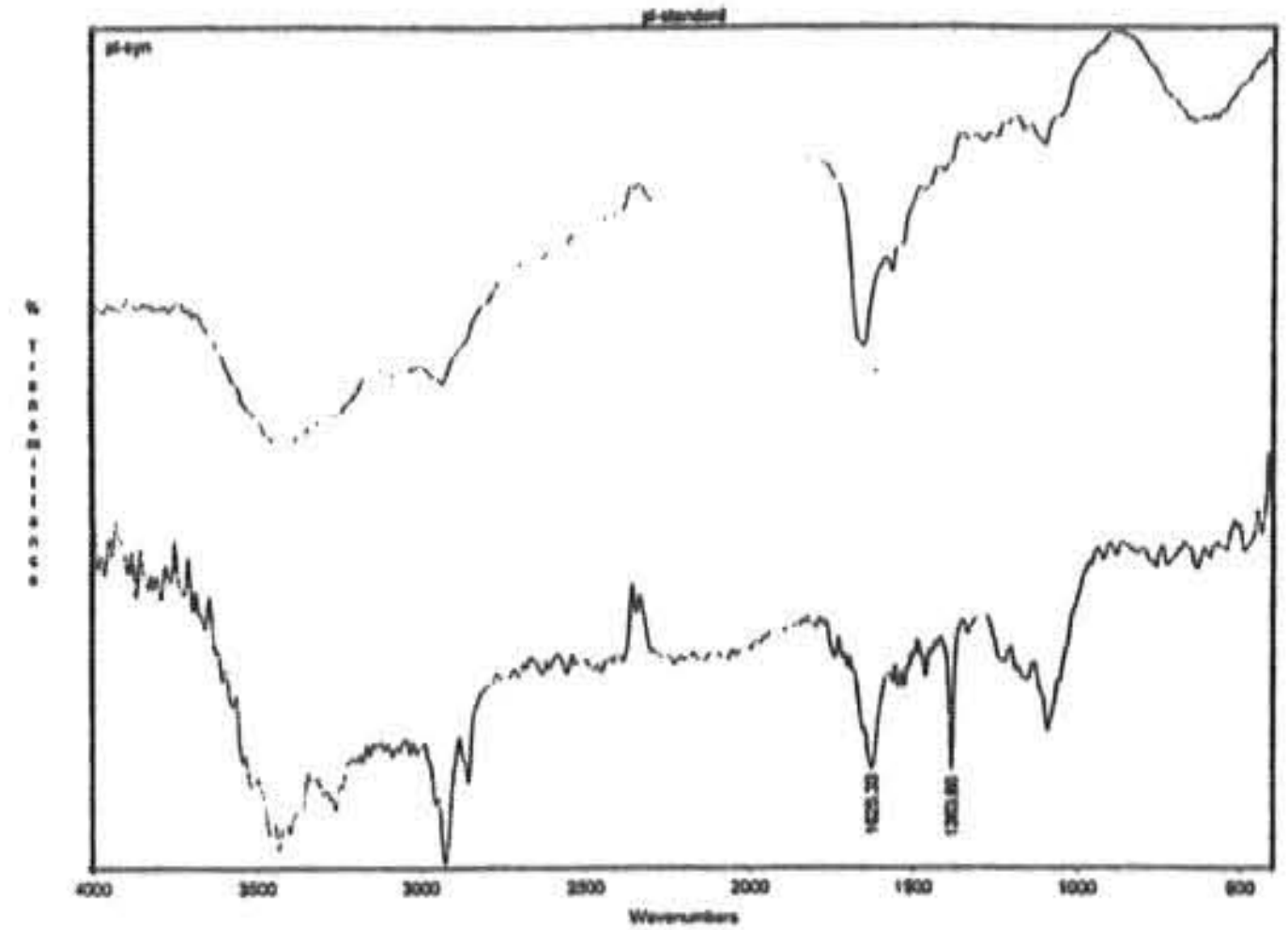


Fig.1 Comparison of IR spectra ϵ -poly - L - lysine (Sigma Co.)

를 사용하여 배지에서 분리하여 정제한 ϵ -PL과 Sigma사에서 구입한 표준 ϵ -PL의 IR 분석 결과를 Fig.1에 나타내었다. ϵ -PL을 구성하는 성분들에는 C, O, N, H들이고 이 성분들이 이루고 있는 결합에는 C=O, N-H, C-N 등이 있다. IR data에서 C=O, N-H, C-N의 각각 결합 피크는 $1640 \sim 1680\text{cm}^{-1}$, $1520 \sim 1580\text{cm}^{-1}$, $1350 \sim 1000\text{cm}^{-1}$ 에서 나온다. 배지에서 분리한 ϵ -PL과 Sigma사에서 구입한 표준 ϵ -PL의 IR spectrum 결과에서도 C=O, N-H, C-N 결합의 피크들을 볼 수 있었다. 따라서 배양액 내에 측정된 ϵ -PL을 정성적으로 확인할 수 있었다.

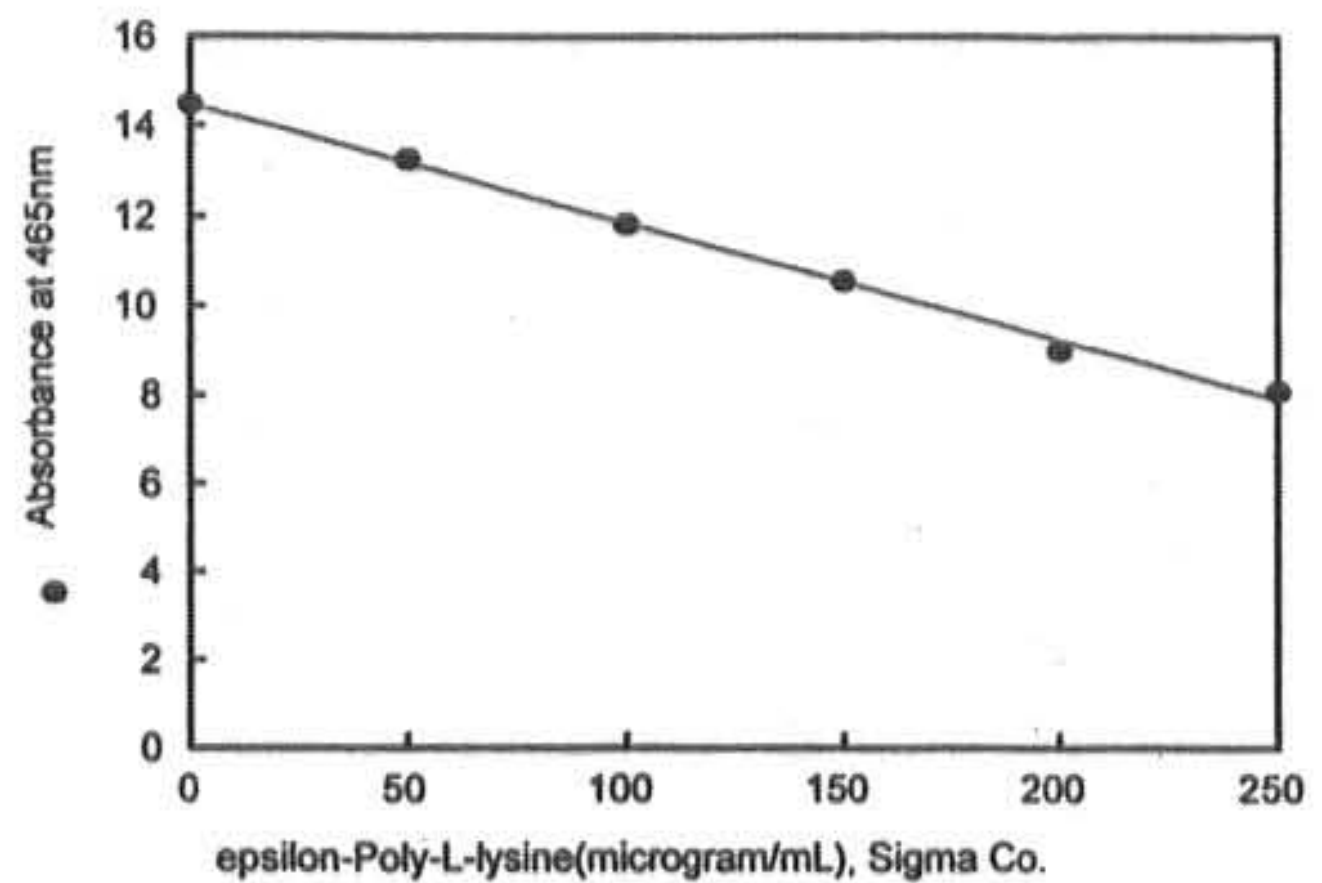


Fig.2 Calibration curve of standard ϵ -poly-L-lysine concentration

3.2 *St. albulus* 배양액중의 ε-PL의 검량곡선

배양액중의 폴리리신양은 Itzhaki의 분석방법을 이용하였다. 먼저 균체를 제거한 배양액과 메틸오렌지(MeO)를 반응시킨 후 복합체를 제거한 후 분광광도계(Spectronic 20, Miltron Co.)를 이용하여 465nm 파장에서 흡광도 변화를 측정하였다. 배양액내의 폴리리신양의 계산은 Sigma사에서 구입한 표준 폴리리신 시료로 미리 작성해 놓은 검량곡선을 이용하였다. 표준 ε-PL과 메틸오렌지(MeO)의 관계식은 다음과 같다.

y축 : 흡광도 (A), x축 : 폴리리신 양(PL),
 기울기 : -0.0263, 절편 : 14.492
 $y = -0.0263x + 14.492$

따라서, 폴리리신 양의 산출은 다음과 같은 식으로부터 얻을 수 있다.

$$\epsilon\text{-PL} = -(A - 14.492) / 0.0263$$

ε-PL양 변화에 따른 흡광도(Absorbance)를 측정하여 Fig.2에 나타내었다.

본 실험에서 배양한 배양액의 흡광도는 0.215였고 따라서 윗식으로 정량한 폴리리신의 양은 224μg/ml였다. (Fig.2)

3.3 *St. albulus* 배양액중 ε-PL의 최소저해농도(MIC) 측정 결과

St. albulus 배양액의 최소저해농도(MIC)결정은 시험관에 채워진 배지에 *St. albulus* 배양액을 첨가해서 멸균한 다음 대장균을 접종하여 12시간동안 진탕 배양한 후 육안으로 시험관의 탁도를 관찰한 결과 배양액을 1.2μg첨가한 곳에서부터 변화가 없었다. 탁도변화가 없는 곳의 배양액을 고형배지에 도말하여 30℃로 조정된 항온기에서 21시간 배양해서 균집이 형성되지 않음을 보고 확인하였다. 결과적으로 대장균

7×10^4 cfu/ml에 항균력을 나타내는 폴리리신의 양은 1.2μg/ml였는데, 이것은 Shima¹⁰⁾ 등이 보고한 결과와 비슷한 양이었다. 김치의 발효, 연부 및 부패에 관여하는 미생물에 대한 *St. albulus* 배양액중 폴리리신의 최소저해농도는 Table 1에 나타내었다.

폴리리신은 김치미생물에 항균능력이 있음을 보였으며 특히 *Escherichia coli*에 가장 강한

Table1. The minimum inhibitory concentration (MIC) of ε-PL in broth of *St. albulus*

Strains	Amount of initial inoculation (10 ⁷ cfu/ml)	MIC μg/ml	Content of polylysine (%)
<i>Escherichia coli</i>	0.007	1	0.1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	250	6	0.6
<i>Lactobacillus brevis</i>	306	9	0.9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	106	55	5.5
<i>Streptococcus faecalis</i>	51	90	9.0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	113	6	0.6

항균력을 나타내었다. *Lactobacilli*에 대한 폴리리신의 항균능력은 문¹³⁾등이 밝힌 합성 보존제 Acetic acid 0.05% Ethyl alcohol 2.0% 첨가시 각각 470, 260 C.F.U(10⁷/ml) 정도로 *Lactobacilli*의 성장을 억제하였으나 폴리리신 1%이내 첨가시 균집이 형성되지 않았다.

또한 김치의 보존성 향상을 위해서는 산성 영역에서 항균성이 유지되어야 하는데 현재 낮은 pH에서 항균력이 가장 우수한 것으로 알려진 합성 보존제 sorbic acid가 김치의 식품 보존제로 널리 사용되고 있으며 그 첨가 범위는 0.5-1wt%인데 반해 폴리리신은 강한 양이온이 하전된 양쪽성 이온으로 낮은 pH에서는 오히려 그 항균력이 더욱 높게 나타날 것으로 기대된다.

따라서 합성 보존제의 경우 안전성이 문제가 되고, 천연 추출물의 경우 중성 영역에서만 항균력이 있는 점을 감안할 때, 폴리리신은 김치 보존료로서 사용하기에 적합하며 실용화 가능성이 높아 김치의 위생적인 측면 뿐만 아니라 숙성 및 향미 기간의 연장에 직접적으로 기여함으로써 김치 산업에 이용되는 천연 보존제로 사용될 수 있으리라 사료된다.

4. 결론

본연구는 김치의 선도유지를 위한 천연보존제개발을 위한 연구로 현재 식품첨가제로 등록되어 있는 polylysine의 김치미생물에 대한 최소저해 농도를 조사하였다.

1) *St. albulus*을 배양하여 폴리리신을 생산하였

으며 생산된 폴리리신을 ion exchange chromatographic separation으로 분리한후 IR로 분석하여 polylysine이 있음을 확인하였다.
 2) polylysine의 김치미생물에 대한 최소저지농도를 조사해본결과 대장균에 가장 큰 항균효과를 나타내었으며 다른 산패균이나 젖산균에도 1%이하의 함량으로도 큰 억제효과가 있음을 보여주었다.
 3)이러한 결과로 미루어보아 polysine은 김치미생물의 성장을 조절할수 있어 김치저장시 오랫동안 좋은 맛을 유지할수 있음을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 첨단농업 기술개발 연구협약과제 "환경친화성 신선도유지형 포장재개발" 연구비와 (주)태성식품의 지원에 의한 연구결과의 일부이며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 차보숙, 김우정, 변명우, 권중호, 조한옥, 김치의 저장성연장을 위한 gamma선조사. 한국식품과학회지, 21, 109(1989)
2. 김우정, 강근옥, 정규향, 신재익, 김치의 저장성향상을 위한 염혼합물의 첨가, 한국식품과학회지, 23, 188(1991)
3. Fabian. F.W., and Graham. H.T., Viability of thermophilic bacteria in the presence of varying concentrations of acids, sodium chloride and sugars. *Food Technol.*, 7, 212(1953)
4. Dae Kyun Chung, Rina Yu, Antimicrobial activity of bamboo leaves extract on microorganisms related to kimchi fermentation. *Korean J, Food Sci. Technol.* 27, 1035-1038, (1995)

5. Seon-Jae kim, Keun-Hyung Park, Retardation of kimchi fermentation by the extract of allium tuberosum and growth inhibition of related microorganisms, *Korean J, Food Sci. Technol.*, 27, 813-818(1995)
6. Kwang-deog Moon, Jung-a Byun, Seok-joong Kim, and Daesuk Han, Screening of natural preservatives to inhibit kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27, 257-263(1995).
7. Shin-Ho Lee, Yong-suk Im Effect of Omija(schizandra chinensis) Extract on the growth of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol* 25, 224-228(1997).
8. Kwang-sub Kim, Heung-suk Sun, Kyung-Wun Bae, and Canyoung Park, Disinfecting effect and growth enhancement of silver coated ceramic powder in vegetables. *Korean J, Biotechnol. Bioeng.* 12.35-39(1997)
9. 김광섭, 강용구, 김종대, 은종방, 박찬영, 항균세라믹 충전 LDPE필름의 김치저장성, 한국식품과학회지, 30, 811-816(1998)
10. S. Shima, H. Matsuoka and T.Iwamoto, J.of Antibiotics, 37, 1449-1454, (1995)
11. R. F. Itzhaki, *Anal. Biochem.*, 50, 569(1972),
12. Hiraki, J. and Morita, H. U.S. Patent, No.5434060(1995)
13. 신동화. 천연항균성물질의 연구현황과 식품가공에의 이용, 식품과학과 산업, 23, 68(1990)

(1999년 2월25일 접수, 1999년 4월15일 채택)