

## 김치로부터 *Lactobacillus plantarum* 생육저해 박테리오신 생산균주의 분리 및 박테리오신 생산의 유도효과

양은주 · 장지윤 · 이형주<sup>1</sup> · 김정환<sup>2</sup> · 정대균<sup>3</sup> · 이종훈<sup>4</sup> · 장해춘\*  
조선대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>서울대학교 식품공학과, <sup>2</sup>경상대학교 식품공학과,  
<sup>3</sup>경희대학교 유전공학과, <sup>4</sup>경기대학교 식품생물공학과

### Charaterization of the Antagonistic Activity against *Lactobacillus plantarum* and Induction of Bacteriocin Production

Eun Ju Yang, Ji Yoon Chang, Hyong Joo Lee<sup>1</sup>, Jeong Hwan Kim<sup>2</sup>,  
Dae Kyun Chung<sup>3</sup>, Jong Hoon Lee<sup>4</sup> and Hae Choon Chang\*

Department of Food and Nutrition, Chosun university

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Seoul National University

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

<sup>3</sup>Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University

<sup>4</sup>Department of Food and Biotechnology, Kyunggi University

A new bacteriocin producing lactic acid bacteria having antagonistic activity against *Lactobacillus plantarum*, was isolated from Kimchi. It was identified as *Leuconostoc mesenteroides*, and designated as *Leuconostoc mesenteroides* B7. The bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides* B7 named as bacteriocin B7 was stable in the pH range 2.5~9.5. Bacteriocin B7 was active over a wide temperature range from 4°C to 120°C. It was inactivated by proteinase K, trypsin, α-chymotrypsin, and protease treatments indicating its proteinous nature. Tricine-SDS-PAGE of the purified bacteriocin B7 showed the presence of a single band, having a molecular mass of about 3,500 dalton. Mixed culture of the producer and the indicator, *Lb. plantarum* KFRI 464 or *Lb. delbrueckii* KFRI 347, increased production of bacteriocin B7. This result suggested the presence of bacteriocin inducing factor in the indicator strain. The inducing factor was localized in cell debris and intracellular fraction of the indicator cell, *Lb. plantarum* KFRI 464. Treatment of the inducing factor with proteinase K destroyed inducing activity. This result strongly suggested that the inducing factor is a protein.

**Key words:** *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, bacteriocin inducing factor, Kimchi

## 서 론

김치는 숙성과정중 미생물 상호작용에 의해 자연적으로 발효되는 식품으로 미생물군의 천이의 양상과 군집발달은 김치 품질을 결정하는 중요한 인자가 된다. 김치로부터 분리동정된 미생물들은 유산균들을 포함하여 200여종 이상으로 매우 다양하다<sup>(1-3)</sup>.

김치는 발효초기에 *Leuconostoc mesenteroides* 등과 같은 이상젖산균(heterofermentative lactic acid bacteria)의 번식에 의하여 발효가 시작되며 김치가 가장 먹기 좋은 완숙기에 이

상젖산균의 성장은 그 최고치를 나타낸다. 이것은 김치의 맛과 이상젖산균은 밀접한 관계가 있음을 시사하고 있다. 그러나 발효중기 이후 pH가 4.0 이하로 낮아지면 내산성이 강한 정상젖산균(homofermentative lactic acid bacteria)인 *Lactobacillus plantarum* 속이 빨리 증식하면서 많은 산을 생성하여 김치의 산패를 일으킨다<sup>(2)</sup>.

이와 같은 김치의 산패현상을 억제함으로써 가식기간을 연장시키려는 목적으로 저온살균, 방사선조사, 방부제 처리, 완충제 첨가, 염혼합물의 첨가 등 물리화학적 방법이 시도되었으나, 품질저하 및 소비자의 거부감 등이 지적되어 실용화단계에 이르지 못하였다. 김치산패균인 *Lb. plantarum*의 생육억제를 위하여 산초유, 계피유, 호프, 부추, 자몽씨, 대나무잎 추출물, 키토산 등과 같은 천연보존제 첨가에 대한 연구 역시 시도되었으나<sup>(2,4,5)</sup>, 현재까지 이상적인 천연보존제의 개발은 이루어지지 못한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 관능적으로 우수한 김치발효에 관

\*Corresponding author : Hae Choon Chang, Department of Food & Nutrition, Chosun University, Seosuck-dong, Gwangju 501-759, Korea

Tel: 82-62-230-7345

Fax: 82-62-225-7726

E-mail: hcchang@chosun.ac.kr

여하는 *Leu. mesenteroides*의 박테리오신 생산 대사체계를 이용하여 *Lb. plantarum*의 생육을 제어할 수 있는 시스템을 구축하고자 하였다. 즉 *Lb. plantarum*에 대해 항균활성을 지니는 *Leu. mesenteroides*를 김치로부터 분리하고, 이 박테리오신 특성규명과 동시에 감수성균주인 *Lb. plantarum*을 이용하여 박테리오신 생산균주인 *Leu. mesenteroides*로부터 박테리오신 생산을 촉진시키고 이러한 박테리오신 생산촉진 현상의 원인을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

김치의 최적발효를 주도하는 김치 유산균을 분리하기 위해서, 가정에서 식용되는 김치 중 담근 지 1~2주정도 되어 가장 맛이 좋은 최적숙성기의 김치를 수집하여 내용물 전체를 마쇄한 후, 멸균여과하고 희석수로 적정배율로 희석하여, CaCO<sub>3</sub>가 2% 첨가된 MRS배지에 30°C에서 평판배양하여, 투명한 형을 형성하는 colony를 유산균으로 잠정적으로 분리하였다. 분리된 균 중 *Lb. plantarum* 속에 대하여 생육저지를 시키는 박테리오신 생산균주를 분리한 후 현미경하에 형태학적 관찰, 그람염색과 16s rRNA sequencing에 의하여 최종 *Leu. mesenteroides* B7으로 동정된 균을 선택하였다.

분리된 유산균의 박테리오신 생산능 검증용 지시균으로 *Lactobacillus plantarum* KFRI 464, *Lactobacillus delbrueckii* KFRI 347, *Leuconostoc mesenteroides* 218, *Lactobacillus acidophilus* 150, *Leuconostoc mesenteroides* 1628을 한국식품개발연구원과 경상대학교 식품공학과 김정환교수로부터 각각 분양 받아 사용하였다.

### 박테리오신 생성능 검증

분리유산균의 박테리오신 생산여부를 조사하기 위하여 균체를 직접 가하는 direct method<sup>(6)</sup>와 배양상정액을 paper disk에 가하여 생육저지환을 관찰하는 agar diffusion method<sup>(7)</sup>를 병행하여 시행하였다. Direct method는 5 mL MRS 액체배지에서 혐기적으로 24시간 전 배양된 *Leu. mesenteroides* B7과 지시균을 30°C에서 24시간 동안 혐기배양하면서 지시균주에 대한 저지환을 관찰하였다. *Leu. mesenteroides* B7을 5 mL MRS 액체배지에 30°C에서 24시간 배양한 후, 원심분리(9,950 ×g, 4°C, 15 min)하여 회수한 상정액을 membrane filter (0.45 μm pore size, Millipore, Beverly, USA)로 제균하고, agar diffusion method를 이용하여 지시균주에 대한 생육저지환을 검토하면서 항균생성력의 여부를 관찰하였다.

### 조항균물질의 제조

항균물질을 생산하는 분리균주(B7)를 30°C에서 24시간 전 배양한 후 100 mL MRS broth에 1% 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 원심분리(9,500 ×g, 10 min)하여 0.45 μm membrane filter(Millipore)로 제균하였다. 제균한 상정액은 동결건조(Labconco., Kansas, USA)하여 50 mM Tris-HCl(pH 8.3) 또는 3차 증류수 4 mL에 녹여서 조항균물질로 사용하였다.

### 항균물질 생산균주의 생육시기에 따른 항균활성

항균물질을 생산하는 *Leu. mesenteroides* B7의 성장곡선에 따른 항균활성을 조사하기 위하여 30°C에서 24시간 전배양한 B7을 100 mL의 MRS 액체 배지에 1% 접종한 후 36시간 정지배양하면서 O.D. 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양시간에 따른 조항균물질을 동결건조에 의해 제조하여 agar diffusion method<sup>(7)</sup>에 의해 감수성균인 *Lb. plantarum* KFRI 464와 *Lb. delbrueckii* KFRI 347에 대한 생육저지환을 조사하면서 항균물질을 생산하는 최적시기를 조사하였다.

### 항균물질의 안정성

**온도의 영향:** 항균물질의 활성에 대한 온도의 영향을 알아보기 위하여 동결건조에 의해 제조한 조항균물질을 4, 30, 50 및 70°C에서 24시간동안 열처리하였으며 100°C에서는 30분, 121°C에서 15분동안 열처리한 후 항균력을 측정하였다.

**pH의 영향:** 항균물질의 활성에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 pH 2.5(50 mM Glycine-HCl), pH 4.5(50 mM Sodium acetate), pH 6.0(50 mM Sodium citrate), pH 7.0(50 mM Phosphate), pH 8.0(50 mM Tris-HCl), pH 9.5(50 mM Glycine-NaOH)완충용액을 1 N HCl과 1 N NaOH로 보정하여 만든 다음 항균물질 농축물을 각각의 pH에 해당하는 완충용액에 용해시켜 25°C에서 24시간동안 4시간마다 그 상대활성을 측정하였다.

### 각종 효소의 영향

Trypsin(EC 3.4.21.4 type I, Sigma, Missouri, USA), lipase(EC 3.1.1.3 type VII, Sigma), protease(type I, Sigma), lysozyme을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5), pepsin(EC 3.4.23.1 type I, Sigma)은 50 mM citrate 완충액(pH 2.0), proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma)는 10 mM Tris-HCl-50 mM NaCl-5 mM EDTA(pH 7.5), α-amylase(EC 3.2.1.1 type VIII-A, Sigma)는 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 20 mg/mL가 되도록 준비하였다. 동결건조된 농축 박테리오신 B7에 준비된 각종효소를 최종 4 mg/mL 농도로 37°C에서 12시간동안 반응시켜 활성의 변화를 관찰하였다. 대조구로는 모든 동일한 조건에서 효소액만 빼고 처리한 것으로 사용하였다.

### 항균물질의 정제 및 분자량 산출

*Leu. mesenteroides* B7 배양액으로부터 조항균물질을 위 방법으로 제조하였다. 준비된 조항균물질은 50 mM Tris-HCl 완충액으로 평형화된 DEAE sephacel column(250 mm × 24 cm)에 loading하여 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.3)하에서 flow rate를 0.5 mL/min로 하여 한 분획당 5 mL씩 받았다. A<sub>280</sub>에서 단백질량을 측정하였고 이로부터 얻어진 분획을 모아, 동결건조하여 항균활성을 확인하였다.

항균활성을 나타내는 정제물의 분자량은 Tricine-SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 방법<sup>(8)</sup>을 통하여 결정하였다. Gel 조성은 4% stacking gel과 15.5% separating gel로 사용하였다. Sample buffer는 2×(0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β-mer-

captoethanol, 0.2% bromophenol blue, DW)로 제조하여 사용하였다. 정제 시료를 sample buffer와 1 : 1의 비율로 혼합하여 끓는 물에서 3분간 가열하여 전기영동하였다. 전기영동 완충용액으로 5× anode buffer(0.2 M Tris pH 8.9와 5× cathode buffer(0.1 M Tris, 0.1 M Tricine, 0.1% SDS, pH 8.25)를 1/5 배 희석시켜 사용하였다. 전기영동장치로는 ATTO GEL(JAPAN)을 사용하였으며, 전기영동후 gel을 coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 destaining solution(30% methanol, 10% acetic acid)으로 처리하였다. 이 때 표준분자량 물질로는 polypeptide standards marker(Bio-rad, CA, USA)를 사용하였다.

**감수성균(Lb. plantarum KFRI 464, Lb. delbrueckii KFRI 347)에 의한 항균물질의 induction효과**

항균물질 생산균주에 대한 감수성균주의 inducing 작용의 유무 및 그 효과의 확인을 위하여 감수성균주와 항균물질 생산균주를 공동배양하였다. 100 mL MRS 액체배지에 24시간 전 배양된 분리균주 B7을 1% 접종하고 일정배양시간 경과 후 감수성균주인 Lb. plantarum KFRI 464와 Lb. delbrueckii KFRI 347를 각각 1%씩 접종하여 24시간까지 배양하여 항균활성을 비교하였다. Inducing factor로 작용하는 물질이 감수성균주의 세포내 위치와 그 inducing 효과를 살펴보기 위하여, 감수성균주의 세포내·외의 물질을 분획하여 항균물질 생산균주 배양에 첨가한 후 그 활성을 비교하였다. Inducing factor를 분획하기 위하여 100 mL MRS 액체배지에 30°C에서 24시간 배양된 감수성균주 Lb. plantarum KFRI 464와 Lb. delbrueckii KFRI 347를 각각 원심분리(9,950×g, 4°C, 15 min)하여 균체와 상정액을 분리하였다. 균체는 50 mM Tris-HCl(pH 8.3)완충용액을 20 mL 가하여 sonication(Ampi : 60, Pulse : 2sec, Time : 10 min, Sonics VC 130, Newtown, USA)한 후 원심분리하여(9,950×g, 4°C, 25 min)하여 세포내 분획(intracellular extract)과 세포외 분획(extracellular extract), 그리고 cell debris로 분리하였다. 세포내 분획은 membrane filter(0.45 μm, Millipore)로 제균하여 사용하였으며 cell debris는 20 mL MRS 액체배지에 풀어 박테리옌 induction 실험에 사용하였다.

**Inducing factor/단백질분해효소 처리**

Lb. mesenteroides B7에 대해 박테리옌 생산촉진 유도효과를 나타내는 Lb. plantarum KFRI 464으로부터 세포내 분획을 준비하고 여기에 단백질분해효소처리를 한 후 이 inducing factor가 여전히 박테리옌 생산을 촉진시킬 수 있는지 조사하였다. Inducing factor가 포함되어 있는 세포내 분획에 proteinase K를 최종 2 mg/mL 농도로 37°C에서 5시간 반응시킨 후 protease inhibitor인 AEBSF(4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride)를 100 mM 농도가 되도록 첨가하여 37°C에서 12 시간 처리하였다. 대조구로는 proteinase K를 처리하지 않은 inducing factor를 B7에 첨가하여 항균활성을 비교하였다.

**결과 및 고찰**

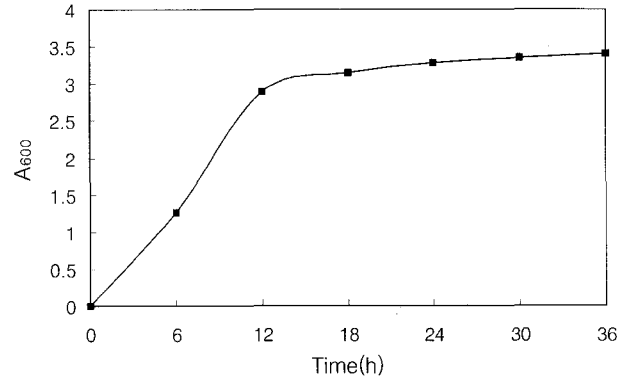
**박테리옌 생산균주 및 감수성균주의 선정**

김치로부터 분리한 Lb. mesenteroides B7으로부터 박테리

**Table 1. Strains examined for antibacterial activity from Lb. mesenteroides B7**

Sensitive indicator	Activity <sup>1)</sup>
<i>Lb. plantarum</i> KFRI 464	++
<i>Lb. delbrueckii</i> KFRI 347	++
<i>Leu. mesenteroides</i> 218	+
<i>Lb. acidophilus</i> 150	-
<i>Leu. mesenteroides</i> 1628	+

<sup>1)</sup>Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition; 1.4~1.5 cm: ++, 1.2~1.3 cm: +, No clear zone: -



**Fig. 1. Growth of Lb. mesenteroides B7 in MRS media at 30°C.**

옌 생산여부를 조사하기 위하여 균체를 직접 가하는 direct method<sup>6)</sup>와 제균된 배양액을 paper disk에 가하여 agar diffusion method<sup>7)</sup>를 시행한 결과 감수성균주 Lb. plantarum KFRI 464, Lb. delbrueckii KFRI 347, Leu. mesenteroides 218, Leu. mesenteroides 1628에 대한 Leu. mesenteroides B7의 항균활성을 확인할 수 있었다(Table 1). Leu. mesenteroides B7이 생산하는 박테리옌을 박테리옌 B7으로 명하였다.

**생육시기에 따른 항균물질의 활성**

Lb. mesenteroides B7을 30°C에서 36시간 혐기배양하여 매 6시간마다 흡광도와 항균활성의 변화를 조사하였다(Fig. 1, Table 2). B7은 배양 24시간쯤에 생육정지기에 이르렀으며 생육초기에는 항균활성을 나타내지 않았으나 대수기 중반에 이르는 12시간 때부터 생육저지환이 조금씩 나타나기 시작하여 대수중식기 후기에 이르는 18시간부터 정지기 초기 24시간까지 최대활성을 보였으나 생육 24시간 이후부터는 항균활성이 조금 감소하기 시작하였다.

이러한 현상으로 Daba 등<sup>8)</sup>도 보고한 바 있어, Leu. mesenteroides를 MRS 배지에서 배양하여 mesenteroides 5를 생산할 때 24시간 이상이 경과하면 90%이상의 활성이 소실되는 것으로 보고하였다. 이것은 항균물질이 영양원이 고갈된 상태에서 생산되기 때문에 일반적으로 생육시기별로 보면 정지기 때 축적되었다가 정지기 이후 균이 사멸되기 시작하면서 배양액내에 증가되는 단백질 분해효소의 작용에 의한 것으로 생각되어진다.

**Table 2. Bacteriocin B7 production from *Leu. mesenteroides* B7**

Cultivation Time(h) <sup>1)</sup>	Activity <sup>2)</sup>
6	-
12	+
18	+++
24	+++
30	++
36	++

<sup>1)</sup>*Leu. mesenteroides* B7 was cultured in MRS medium at 30°C for each indicated time.

<sup>2)</sup>*Lb. delbrueckii* KFRI 347 was used as an indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition; 1.6~1.7 cm: +++, 1.4~1.5 cm: ++, 1.2~1.3 cm: +. No clear zone: -

**Table 3. Effect of temperature on the antibacterial activity of bacteriocin B7**

Temperature °C (time of heat treatment)	Activity <sup>1)</sup>
4 (24 h)	+++
30 (24 h)	+++
50 (24 h)	+++
70 (24 h)	+++
100 (30 min)	+++
121 (15 min)	+++

<sup>1)</sup>*Lb. delbrueckii* KFRI 347 was used as an indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition; 1.6~1.7 cm: +++, 1.4~1.5 cm: ++, 1.2~1.3 cm: +. No clear zone: -

### 항균물질의 안정성

**온도의 영향:** 박테리오신 B7을 -70~121°C 범위에서 열 안정성을 살펴보았다(Table 3). 본 항균물질은 -70~70°C까지 24시간 이상 처리 시에도 100%의 활성을 나타내었을 뿐 아니라, 100°C에서 30분, 121°C에서 15분간 열처리 후에도 원래의 활성을 100% 그대로 유지하여 열에 매우 안정한 것으로 나타났다.

**pH의 영향:** 박테리오신 B7의 pH 안정성을 알아보기 위하여 pH 2.5에서 pH 9.5까지의 범위에서 25°C에서 24시간 처리하여 상대활성을 측정하였다. 그 결과 Table 4와 같이 pH 2.5~9.5까지 24시간 동안 항균활성의 변화가 없어, 넓은 pH 구간에서 매우 안정함을 알 수 있었다.

대부분의 유산균이 생산하는 박테리오신은 낮은 pH에서 활성을 보이거나, 매우 국한된 범위의 pH에서만 안정한 것으로 보고되고 있는데, 그 예로 *Lb. plantarum* C-11이 생산하는 plantaricin A는 pH 4~6.5 사이의 범위에서만 활성을 나타내었으며<sup>(10)</sup>, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 균주가 생산하는 mesenteroides 52는 pH 7.0까지 비교적 안정하나 80°C에서 6시간 처리 시 pH 7.0보다는 pH 4.5에서 더 안정한 것으로 나타났다<sup>(11)</sup>. 또한 *Lactococcus lactis*가 생산하는 박테리오신으로 현재 사용중인 nisin은 알칼리 용액에서 낮은 용해성을 보인 것으로 나타났다<sup>(12)</sup>. 이에 반해 유산균이 생성하는 박테리오신 중 소수에 불과하지만 넓은 pH 영역에서도 안정한 경우도 있는데 *Lb. brevis* B37이 생산하는 brevicin 37은 pH 2~10에 걸쳐 항균활성을 갖고 있었으며<sup>(13)</sup>, *Lactococcus lactis* CNRZ 481이 생산하는 lacticin 481

**Table 4. Effect of pH on the antibacterial activity of bacteriocin B7**

pH	Activity <sup>1)</sup>
2.5	+++
4.5	+++
6.0	+++
7.0	+++
8.0	+++
9.5	+++

<sup>1)</sup>*Lb. delbrueckii* KFRI 347 was used as an indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition; 1.6~1.7 cm: +++, 1.4~1.5 cm: ++, 1.2~1.3 cm: +. No clear zone: -

**Table 5. Effect of various enzymes on the antibacterial activity of bacteriocin B7**

Enzyme	Activity <sup>1)</sup>
control (non-enzyme treated sample)	+++
proteinase K	-
trypsin	-
$\alpha$ -chymotrypsin	-
protease	-
pepsin	+++
$\alpha$ -amylase	+++
lysozyme	+++
lipase	+++

<sup>1)</sup>*Lb. delbrueckii* KFRI 347 was used as an indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition; 1.6~1.7 cm: +++, 1.4~1.5 cm: ++, 1.2~1.3 cm: +. No clear zone: -

은 pH 2~11의 넓은 범위에서도 활성을 유지하는 것으로 보고되었다<sup>(14)</sup>.

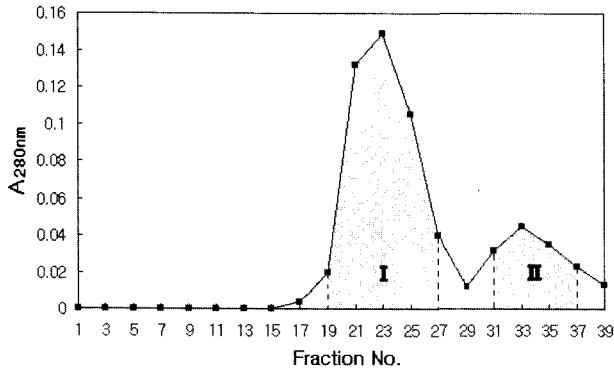
본 연구에서의 *Leu. mesenteroides* B7으로부터의 박테리오신 B7도 거의 전 pH 영역(pH 2.5~9.5)에서 이처럼 pH의 영향을 받지 않아 pH에 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다.

### 각종 효소의 영향

*Leu. mesenteroides* B7으로부터 분리된 박테리오신의 각종 효소처리에 의한 영향을 살펴보았다(Table 5). Lipase나 lysozyme 또는  $\alpha$ -amylase의 처리시에는 항균활성이 그대로 유지되어, 지질이나 당이 항균활성을 나타내는 물질에 관여하지 않음을 추측할 수 있었다. 그러나 protease, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, proteinase K에 의해 항균활성이 소실되는 것으로 보아 이 항균활성 물질은 단백질성 물질로 이루어짐을 확인하였다.

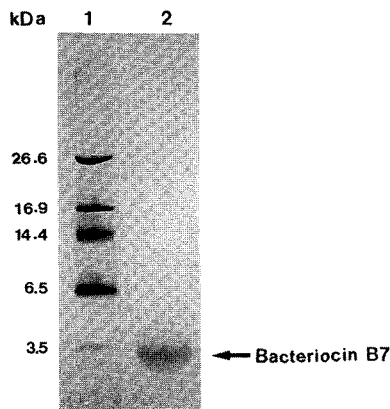
### B7 박테리오신의 정제

*Leu. mesenteroides* B7이 생산하는 박테리오신 B7을 정제하였다. 조항균물질로 준비된 박테리오신 B7은 DEAE-sephacel 음이온 교환수지 크로마토그래피를 실시하였을 때 resin에 결합치 않고 50 mM Tris-HCl에 의해 용출되어져 나온 2개의 단백질 peak을 얻을 수 있었으며(Fig. 2), 이 분획들을 크게 둘로 나누어(I, II) 각각 동결건조한 후 agar diffusion method<sup>(7)</sup>에 의해 항균활성을 측정한 결과 peak II에서만 항



**Fig. 2. Elution profile of purified bacteriocin B7 from a DEAE-sephacel column equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.3).**

The bacteriocin activity of peak I or II was assayed by agar diffusion method.



**Fig. 3. Tricine-SDS-PAGE of purified bacteriocin B7 from *Leu. mesenteroides* B7.**

Lane 1: polypeptide standards marker (Bio-Rad, USA), 2: purified bacteriocin B7.

균활성이 관찰되었다. DEAE-sephacel 음이온 교환수지 크로마토그래피에서 항균활성을 나타낸 peak II를 Tricine-SDS-PAGE를 한 결과 단일 밴드를 얻을 수 있었으며, 그 분자량은 약 3,500 dalton 정도로 추정되었다(Fig. 3).

**Inducing activity의 확인**

항균물질 생산균주 *Leu. mesenteroides* B7과 감수성균주인 *Lb. plantarum* KFRI 464 또는 *Lb. delbruekii* KFRI 347를 각각 혼합배양(mixed culture)하여 항균활성을 비교하여 보았다. 감수성균과의 혼합배양 결과 B7만을 단독 배양한 것에 비해 항균활성이 증가되어 감수성균주와의 혼합배양에 의해 박테리옌 생산이 inducing됨을 확인하였다(Table 6). 감수성균주에 따라 박테리옌 inducing activity는 서로 달라서 *Lb. delbruekii* KFRI 347에 비해 *Lb. plantarum* KFRI 464가 더 높은 박테리옌 B7 inducing activity를 나타내었다(Table 6). 이로부터 감수성균주에 존재하는 어떤 물질을 *Leu. mesenteroides* B7은 박테리옌 inducing factor로 인지하고 이 inducing factor가 존재 시 박테리옌 B7의 항균활성이 더 증대됨을 알 수 있었다.

**Table 6. Bacteriocin B7 production by pure or mixed cultures**

Culture Condition <sup>1)</sup>	Activity <sup>2)</sup>
Producer alone (B7 pure culture)	++
B7 with <i>Lb. delbruekii</i> KFRI 347 (mixed culture)	+++
B7 with <i>Lb. plantarum</i> KFRI 464 (mixed culture)	++++

<sup>1)</sup>The bacteriocin B7 producer, *Leu. mesenteroides* B7 was cultured alone or associatively with the sensitive indicator, *Lb. delbruekii* KFRI 347 or *Lb. plantarum* KFRI 464 in MRS broth. For the assay of antibacterial activity, the MRS plate was overlaid with MRS soft agar(0.7%) containing *Lb. delbruekii* KFRI 347 as an indicator strain. <sup>2)</sup>*Lb. delbruekii* KFRI 347 was used as an indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition; 1.8~2.0 cm: +++, 1.6~1.7 cm: +++, 1.4~1.5 cm: ++, 1.2~1.3 cm: +. No clear zone: -

이에 항균물질 생산에 inducing factor로 작용하는 물질의 감수성균주의 세포내 위치(cellular location)를 알아보기 위하여 감수성균, *Lb. plantarum* KFRI 464 또는 *Lb. delbruekii* KFRI 347의 세포외(extracellular extract), 세포내(intracellular extract), cellular debris 분획을 나누어 *Leu. mesenteroides* B7 배양액에 첨가하여 균주배양에 따른 박테리옌 inducing 효과를 살펴보았다. 세포외 분획에서는 박테리옌 생산 inducing 효과는 관찰되지 않았으나(data not shown), 세포내 분획 및 cellular debris 분획으로부터는 확실한 박테리옌 생산 inducing 효과를 볼 수 있었다. 특히 세포내 분획보다 cell debris 분획에서 보다 큰 박테리옌 B7의 inducing 효과가 나타났다(Fig. 4). 이는 감수성균주인 *Lb. plantarum* KFRI 464 또는 *Lb. delbruekii* KFRI 347과 *Leu. mesenteroides* B7의 혼합배양 시 확실하게 박테리옌의 생산증가 효과가 나타남(Table 6)과 일치하는 결과로, 즉 *Lb. plantarum* KFRI 464 또는 *Lb. delbruekii* KFRI 347의 세포 벽에 존재하는 inducing factor가 감수성균주와 박테리옌 생산균주인 *Leu. mesenteroides* B7과의 혼합배양을 통해 B7 세포에 자극을 주므로(signaling) 박테리옌 생성이 촉진되는 결과로 생각되어진다. 즉 항균물질 생성균이 감수성균주가 분비하는 어떤 물질을 인지하고 이를 inducer로 받아들여 감수성균주에 대해 우세하게 환경을 지배하려는 미생물의 본능적 생리에 따라 훨씬 강력한 항균물질을 분비한다는 추측을 가능케 하였다.

박테리옌 생산균과 그 특성에 관한 보고는 수없이 많을 뿐 아니라, 박테리옌 생산균주내에서 박테리옌 생산조절 기작에 관한 다양한 연구가 이루어지고 있으나 명확한 규명이 이루어지지 않고 있는 실정이다. 현재까지 보고된 내용 중 많은 부분이 'peptide-based induction of bacteriocin production'을 설명하고 있는데, 즉 박테리옌 유전자의 발현을 histidine protein kinase와 response regulator로 구성된 two-component signal transduction pathway에 의해 조절된다는 것이며<sup>(15,16)</sup>, *L. lactis*에 의한 nisin 생산이 이 경우에 해당된다. 또 다른 경우에는 *Lactobacillus plantarum* C11<sup>(17)</sup>와 *Lactobacillus plantarum* sake LTH 673<sup>(18)</sup>에서 보고된 경우로 이들의 박테리옌의 유도효과는 항균활성을 지니지 않는 19개에서 26개의 아미노산으로 구성된 peptide에 의해 일어난다는 것

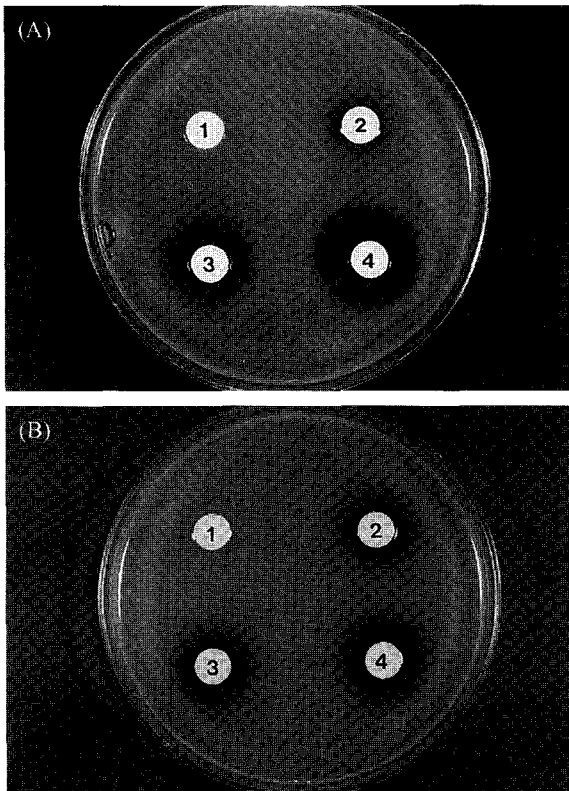


Fig. 4. Inducing effect of *Lb. plantarum* KFRI 464(A) or *Lb. delbrueckii* KFRI 347(B) on the antibacterial activity of bacteriocin B7.

Cellular location of inducing factor was determined by fractionation of each indicator cell. The MRS plate was overlaid with MRS soft agar (0.7%) containing *Lb. delbrueckii* KFRI 347 as an indicator strain. 1: cell free extract of *Leu. mesenteroides* B7 culture, 2: concentrated cell free extract of *Leu. mesenteroides* B7 culture, 3: concentrated cell free extract of *Leu. mesenteroides* B7 culture with intracellular extract of KFRI 464(A) or KFRI 347(B), 4: concentrated cell free extract of *Leu. mesenteroides* B7 culture with cellular debris of KFRI 464(A) or KFRI 347(B).

이다. 이렇듯 박테리옌 생산의 induction에 대해 박테리옌 생산조절이 박테리옌 생산균주 자체내의 어떠한 peptide에 의해서 일어나며 이 peptide의 발현정도에 따라 박테리옌의 발현정도가 정해진다는 보고가 대부분이다.

따라서 본 연구결과와 같이 박테리옌 생산균주로부터가 아닌 감수성균주로부터 inducing agent에 대한 연구는 Barefoot 등에<sup>(19)</sup> 의한 박테리옌 생성균주인 *Lb. acidophilus*로부터의 Lactacin B에 대해 *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4792의 inducing agent의 존재가 확인된 바가 있는 것 외에는 현재까지 보고된 바 없다.

박테리옌을 실제 식품이나 관련산업에 적용 시 문제점은 박테리옌 생산균주내에서 박테리옌 합성제어(repression)가 발생하여 항상 일정한 항균활성을 지니지 못하고 높아졌다 낮아졌다하는 현상이 발생한다는 것이다<sup>(20)</sup>. 그러므로 박테리옌 생산 조절기작에 대한 정확한 이해가 박테리옌 생산 최적화를 위해서는 무엇보다 중요하다 할 수 있다. 즉 궁극적으로 박테리옌 생산균주의 항균활성이 일정하게 나타나지 않음은 산업적 양산 체제에서 적용이 불가능하므로

Table 7. Effect of proteinase K on inducing activity of in the filter-sterilized indicator cell extract

Enzyme Treatment <sup>1)</sup>	Activity <sup>3)</sup>
Bacteriocin B7 alone	+++
Bacteriocin B7 with inducing agent	++++
Bacteriocin B7 with inducing agent treated with proteinase K (2 mg/mL) and then AEBSF (100 mM) <sup>2)</sup>	+++

<sup>1)</sup>Enzyme or AEBSF was added to filter sterilized extracts from disrupted cells of *Lb. plantarum* KFRI 464. Treated and untreated extracts were held for 1h at 37°C and then examined for proteinase K and inducing activities.

<sup>2)</sup>The serine protease inhibitor, AEBSF was added after the inducer was treated with proteinase K for 5 hour at 37°C and then held for additional 12 hour at 37°C.

<sup>3)</sup>*Lb. delbrueckii* KFRI 347 was used as an indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition; 1.8~2.0 cm: +++, 1.6~1.7 cm: +++

또 이러한 현상이 왜 일어나는지 체계적이고 과학적인 설명이 요구되었다. 아직까지 박테리옌 생산조절 기작에 대해서 명확하게 설명이 가능한 것은 아니며 현재까지 받아들여지고 있는 이론도 모두 박테리옌 생산균주 자체내 박테리옌 조절에 관계된 유전자가 존재하고 이것의 발현 정도에 따라 박테리옌 생산량이 달라진다고 설명하고 있다. 그러므로 그 해결책을 박테리옌 생산 및 그 조절유전자의 조작을 통해 얻으려하고 있다.

그러나 본 연구에서 감수성균주 *Lb. plantarum* KFRI 464나 *Lb. delbrueckii* KFRI 347에 의한 *Leu. mesenteroides* B7의 박테리옌 생산촉진(inducing)의 효과는 박테리옌 생산균주의 박테리옌 생성과 작용기작을 미생물 생리·생태학적 측면에서 이해하였고, 박테리옌 생산을 항상 일정하면서 그 활성을 크게 향상시킬 수 있는 획기적인 방법이라 생각된다.

#### Inducing factor

*Leu. mesenteroides* B7에 대해 박테리옌 생산촉진 유도효과를 나타내는 *Lb. plantarum* KFRI 464로부터 세포내 추출물(intracellular extract)을 준비하고 여기에 단백분해효소처리한 후 이 inducing factor가 여전히 박테리옌 생산을 촉진시킬 수 있는지 조사하였다. 즉 inducing factor인 intracellular extract에 proteinase K를 반응시킨 후 protease inhibitor인 AEBSF를 처리하였다. Proteinase K를 처리하지 않은 inducing factor를 첨가한 B7의 항균활성은 증가하였으나 proteinase K로 처리한 inducing factor를 첨가한 B7의 박테리옌은 inducing factor를 첨가하지 않고 B7만을 배양하여 얻은 박테리옌과 항균활성이 같게 나왔다(Table 7). 이로부터 inducing factor는 proteinase K에 의해 가수분해되어 박테리옌 생성에 영향을 주지 않는 것으로 보아 단백질성 물질임을 알 수 있었다.

본 연구에서는 *Lb. plantarum*을 효과적으로 억제하는 박테리옌 생산 *Leu. mesenteroides* 균주를 적숙상태의 김치로부터 분리하였다. 이 *Leu. mesenteroides* B7이 생산하는 박테리옌은 거의 전 pH 영역에서 안정하고 100°C 이상의 고온에서도 안정하였고, 단백질성 물질로 이루어짐을 알 수 있었

다. 이러한 특성은 김치산업을 포함한 식품산업에 적용할 수 있는 생물학적 식품보존제로의 개발가능성을 시사한다.

또한 효율적인 박테리옌 생산체계를 구축할 수 있는 박테리옌 생산촉진 inducing factor를 박테리옌생산 유산균에 대한 감수성균주로부터 찾았으며, 이 induction factor의 세포내 분포 위치와 이것이 단백질성 물질임을 규명하였다. 감수성균주로부터 얻게되는 inducing factor 첨가에 의한 박테리옌의 생산촉진방법은 비유전자조작방법(non genetically modified method)에 의해 박테리옌 생산을 극대화시킬 수 있을 뿐 아니라 항균활성을 일정하게 유지할 수 있는 방법이다. 또한 이 때 사용하는 감수성균주 역시 GRAS(generally recognized as safe)로 인정되는 김치유산균(*Lb. plantarum*, *Lb. delbruekii*)이므로 식품에 사용 시 안전성이 확보되면서 관련 법규의 규제 없이 당장 실용화가 가능하므로 경제적 효과를 클 것이다.

본 연구팀은 박테리옌 생성균이 아니라 이에 감수성을 나타내는 균으로부터 박테리옌 생성을 유도시킬 수 있는 물질(inducing factor)을 확인하였고, 분자생물학적 수준에서 그 특성을 규명하기 위하여 이를 분리정제하고 이로부터 그 유전자를 클로닝하여 기존의 박테리옌 생성균내에서의 조절기작과 어떠한 차이점이 있는지를 규명하고자 현재 그 연구가 진행되고 있다.

이러한 일련의 연구는 기존의 수많은 박테리옌 관련연구와는 시각을 조금 달리한 것으로써 '항균물질 발현 및 조절 기작'의 이론에 기여된 아주 중요한 정보를 제공할 것이며, 본 박테리옌 생성균주와 김치발효시스템조절분야뿐만 아니라 다른 항균물질 생성균에서와 이를 활용한 식품 및 관련산업부분에 적용될 수 있는 'model system'을 제공하게 될 것이다.

## 요 약

*Lactobacillus plantarum*에 대해 항균활성을 지니는 유산균을 김치로부터 분리하였다. 이 균은 *Leuconostoc mesenteroides*으로 동정되었으며 *Leuconostoc mesenteroides* B7으로 명명하였다. *Leuconostoc mesenteroides* B7이 생산하는 박테리옌은(박테리옌 B7) pH 및 열 안정성이 뛰어나 pH 2.5~9.5 그리고 4°C~120°C 열처리에서도 항균활성을 안정하게 유지하였다. 박테리옌 B7은 proteinase K, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, 그리고 protease 처리에 의해 항균활성이 실패하므로 peptide나 단백질로 이루어진 구조임을 알 수 있었다. 정제된 박테리옌 B7은 Tricine-SDS-PAGE를 통하여 분자량이 약 3,500 dalton임을 확인하였다. *Leuconostoc mesenteroides* B7과 이에 감수성인 균주, *Lb. plantarum* KFRI 464 혹은 *Lb. delbruekii* KFRI 347와의 혼합배양에 의하여 박테리옌 B7 생산이 증가됨을 확인하였고, 이는 박테리옌 생산 유도물질(inducing factor) 감수성균주내에 존재함을 시사한다. 감수성균주의 세포분획을 통하여 inducing factor는 감수성균주의 세포벽과 세포내에 존재함을 알았다. 이 inducing factor가 proteinase K처리로 박테리옌 유도활성을 상실함으로써 이는 단백질성물질임을 시사하였다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특장기초연구비(2000-2-22000-004-3)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. So, M.H. and Kim, Y.B. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. Korean J. Food Sci. Technol. 27(4): 495-505 (1995)
2. Kang, S.M., Yung, W.S., Kim, Y.C., Joung, E.Y. and Han, Y.G. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for *Kimchi* fermentation and effect of starter. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23(4): 461-471 (1995)
3. Lee, C.W., Ko, C.Y. and Ha, D.M. Microfloral of the lactic acid bacteria during *Kimchi* fermentation and identification of the isolates. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20(10): 102-109 (1992)
4. Kim, O.M., Kim, M.K., Lee, K.R. and Kim, S.D. Selective serial antimicrobial effects of spice extracts against *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from *Kimchi*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26(5): 373-378 (1998)
5. Kim, M.H., Oh, S.W., Hong, S.P. and Yoon S.K. Microbiology/fermentation: antimicrobial characteristics of chitosan and chitosan oligosaccharides on the microorganism related to *Kimchi*. Korean J. Food Sci. Technol. 30(6): 1439-1447 (1998)
6. Kim, S.I., Kim, I.C. and Chang, H.C. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28(3): 526-553 (1999)
7. Tagg, J.R. and Mcgiven, A.R. Assay system for bacteriocin. Appl. Microbiol. 21: 943 (1971)
8. Schagger, H. and von Jagow, G. Tricin-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379 (1987)
9. Daba, H.S., Pandian, J.F., Gosselin, R.E., Simard, J.H. and Lacroix, C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3450-3455 (1991)
10. Daschel, M.A., Mckenney, M.C. and McDonald, L.C. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 7: 91-98 (1990)
11. Mathieu, F., Suwandhi, I.S.N., Rekhif, J.F. and Lefebvre, G. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* sp. *mesenteroides* FR52. J. Appl. Bacteriol. 74: 372-379 (1993)
12. Liu, W. and Hansen, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2551-2558(1990)
13. Rammelsberg, M. and Radler, F. Antibacterial polypeptide of *Lactobacillus* species. J. Appl. Bacteriol. 69: 177-184 (1990)
14. Piard, J.C., Delorme, F., Giraffa, G., Commissaire, J. and Desmazeud, M. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. Neth. Milk Dairy J. 44: 143-158 (1990)
15. Quadri, L.E.N., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., Roy, K.L., Veras, J.C. and Stiles, M.E. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV 1713 involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. J. Bacteriol. 179: 6163-6179 (1997)
16. Axelsson, L. and Askild, O. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb 706. J. Bacteriol. 177: 2125-2137 (1995)
17. Diep, D.B., Havarstein, L.S. and Nes, I.F. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *L. plantarum* C11. Mol.

- Microbiol. 18: 631-639 (1995)
18. Eijsink, V.G.H., Bruberg, M.B., Middelhoven, P.H. and Nes, I.F. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. J. Bacteriol. 178: 2232-2237 (1996)
19. Barefoot, S.F., Chen, Y-R., Bodine, T. A., Shearer, M. Y. and Hughes, M. D. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lactacin B. Appl. Microbiol. 60: 3522-3528 (1994)
20. Saucier, L., Poon, A. and Stiles, M.E. Induction of bacteriocin in *Cartobacterium piscicola* LV17. J. Appl. Bacteriol. 78: 684-690 (1995)
- 

(2002년 4월 1일 접수)