



복합 박테리오신의 항균활성 및 축산식품 저장성 증진 효과

한경식 · 오세종* · 문용일** · 김세현

고려대학교 식품과학부, * (주)한국야쿠르트 중앙연구소, **우석대학교 생명자원과학부

Antimicrobial Effects of a Bacteriocin Mixture from Lactic Acid Bacteria against Foodborne Pathogens

Kyoung-Sik Han, Se-Jong Oh*, Yong-II Moon** and Sae-Hun Kim

Division of Food Science, Korea University

*R&D Center, Korea Yakult Co. Ltd., **Division of Life Resource Sciences, Woosuk University

Abstract

The purpose of this study was to evaluate inhibitory activity of a bacteriocin mixture from lactic acid bacteria(LAB) against foodborne pathogens. Each bacteriocin solutions were prepared by growing nine strains of bacteriocin producers in MRS broth for 18~24 h followed by centrifugation(8000×g, 20 min, 4°C). Bacteriocins were purified from ammonium sulfate precipitation and were resuspended in 50 mM phosphate buffer(pH 7.0). Nine bacteriocins were mixed together and then allowed to freeze at -20°C. The mixture of nine bacteriocins showed enhanced inhibitory activity compared to each of bacteriocins and inhibited the Gram negative pathogens including *Escherichia coli* 0157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas chlororaphis* and *Shigella sonnei*. The mixture of bacteriocin solutions was active over a wide pH range and stable of heat treatment. After 28 days of storage, total bacteria counts were significantly lower than controls when a freeze-dried bacteriocin mixture was added to frank sausage, Mozzarella cheese and pork loin. With addition of bacteriocin mixture, total mesophilic bacteria in pork loin were constant over storage period, whereas total mesophilic bacteria in Mozzarella cheese and frank sausage slightly increased. Total viable cells of control group increased during storage without bacteriocin treatment. Volatile base nitrogen content of pork loin during storage also increased significantly without bacteriocin treatment. The bacteriocin mixture was capable of inhibiting pathogenic and spoilage microorganisms and extending the shelf-life of cheese and meat products during storage.

Key words : bacteriocin mixture, foodborne pathogen, inhibitory activity, volatile base nitrogen.

서 론

유산균이 생산하는 박테리오신은 인체에 무해하고 잔류성이 없으며 plasmid나 chromosome으로부터 직접 생합성되어 유전자조작 등에 의한 생물공학적인 응용이 쉽다는 장점이 있어 기존의 화학적 식품보존제를 대체할 수 있는 새로운 생물학적 보존제로서의 가능성이 제시되고 있다. 국내외적으로 이미 많은 박테리오신들이 연구되어 그 성질과 구조 그리고

유전자 정보들이 밝혀졌으나 실제 식품에의 적용에 있어서는 nisin을 제외하고는 매우 한정적으로 시도되고 있다(Ahn and Stiles, 1990; Kim, 1993; Klaenhammer, 1993).

박테리오신은 크게 class I, II 및 III의 3종류로 구분할 수 있는데, class I은 lantibiotics라고도 하며 lanthionine, β -methylanthionine과 같은 변형된 아미노산을 함유하고 있으며 열에 안정하다. Class II에 속하는 박테리오신은 열에 안정하고 분자량이 작은점(<10 kDa)에서는 class I과 유사하지만 lanthionine을 함유하지 않은 점이 다르다. 그리고, Class III 박테리오신은 분자량이 비교적 크고(>30 kDa) 열에 약한 것이 특징이다(Klaenhammer, 1993).

Nisin은 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*가 생산하는 대표적인

Corresponding author : Sae-Hun Kim, Division of Food Science, Korea University, 5-1, Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea. Tel: 82-2-3290-3055, Fax: 82-2-3290-3506, E-mail: saehkim@korea.ac.kr

class I 박테리오신으로 34개의 아미노산으로 이루어져 있으며 기존의 항생 펩타이드와 구별되는 lanthionone ring을 가지고 있고 활성도에 있어서 다른 펩타이드에 비하여 높은 항균활성을 보인다. 이러한 장점에도 불구하고 중성 pH에서 용해성이 낮고 인지질에 대한 흡착력이 있어 쉽게 불활성화되며 nisin에 대한 저항성 균주의 존재가 보고되고 있어 nisin의 광범위한 적용에 제한점이 되고 있다(Delves-Broughton, 1990).

반면, pediocin PA-1, leucocin A 등 class II에 속하는 많은 박테리오신들은 위와 같은 nisin의 단점을 극복할 수 있으나 항균 범위가 비교적 좁아 단일 박테리오신으로 사용하기에는 많은 어려움이 존재한다(Hastings, 1991; Marugg et al., 1992). 이러한 점들을 극복하고자 유기산의 첨가 또는 열처리, 병용 등 박테리오신의 활성을 증대시키기 위한 시도가 이루어지고 있으며 본 논문에서와 같이 둘 또는 수종의 박테리오신을 혼합하여 박테리오신 상호간의 시너지 효과를 극대화시키는 것도 항균 범위확대를 위한 하나의 방법이라 생각된다(Delves-Broughton, 1990). 이러한 박테리오신간의 상호작용은 박테리오신 활성에 있어서 상승작용(synergism)뿐만 아니라 길항작용(antagonism)도 존재하기 때문에 박테리오신에 대한 특성이 명확히 규명되는 것이 선행되어야 한다.

본 연구는 축산식품내 존재하여 식중독을 포함한 다양한 질병을 유발시킬 수 있는 병원성균 및 부패성균에 대해 항균능력을 보유한 수종의 박테리오신 생산 유산균을 선발한 다음 이를 혼합하여 보다 넓은 항균활성을 갖는 복합 박테리오신제제를 개발하는데 기초자료를 얻고자 수행되었다.

재료 및 방법

사용균주, 배양조건 및 보존

발효유, 김치, 원유, 산양유, 쇠고기 등의 비살균 식품과 사람, 돼지, 송아지 및 닭의 분변 등 다양한 원천에서 유산균을 분리, 동정하여 고려대학교 유가공학 연구실에 보관중인

균주들과 ATCC(American Type Culture Collection)와 미국 코넬대학교에서 분양받은 유산균을 대상으로 박테리오신 생산 여부를 조사하였고 그 중 항균능력이 우수한 9종의 유산균을 선별하였다(Table 1).

병원성 및 부패성 미생물은 Tryptic Soy Broth(TSB, Difco, USA) 배지를 이용하여 30℃에서 18시간 진탕배양 후 사용하였다. 모든 미생물은 각각의 배지에서 배양 후 원심분리(3,000×g, 15 min)하여 상등액을 제거하고 탈지분유(10%), lactose(2%), yeast extract(0.3%)가 함유된 배지를 혼합한 다음, 동결건조시켜 -80℃에 보관하면서 사용하였다.

복합박테리오신 용액의 제조

선발된 박테리오신 생산 유산균을 MRS(Difco, USA) 배지에 접종하여 37℃에서 18~24시간 배양시키고 원심분리(8,000×g, 20 min, 4℃)하여 상등액을 회수한 다음 10 N NaOH를 사용하여 pH를 6.5로 조정하였다. 총 9종 균주에 대한 배양액을 동량 혼합하여 지시균인 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 4797 균주에 대하여 활성 역가를 1,600 AU/ml(arbitrary units)가 되도록 복합박테리오신 배양액을 제조하여 pH 및 열안정성 실험에 사용하였다.

또한, 배양 상등액에 ammonium sulfate를 60% 농도로 첨가하면서 6시간 이상 4℃에서 서서히 교반시킨 후 8,000×g에서 30분간 원심분리를 실시하고 여기서 얻어진 침전물을 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 재현탁시켜 9종 균주의 조박테리오신 용액(active crude bacteriocin; ACBN)을 제조하였다. 이 용액들을 동량혼합 후 -20℃에 저장하면서 병원성 미생물에 대한 항균활성을 평가하였다.

박테리오신 항균활성

ACBN을 멸균 증류수로 연속 2진 희석(two-fold dilution)한 후 지시균이 1% 접종된 평판 배지 표면에 점적한 다음 30~37℃에서 18시간동안 배양시킨 후 역제환을 확인하였다. 지시균의 성장을 저하시키는 가장 높은 희석률을 측정하였

Table 1. Bacteriocin-producing strains, source and culture conditions

Strain	Type	Media (°C)	Source
<i>Lactobacillus acidophilus</i> GP4A	Bacteriocin Producer	MRS (37)	Pig
<i>Lactobacillus acidophilus</i> GP1B	Bacteriocin Producer	MRS (37)	Pig
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Bacteriocin Producer	MRS (37)	ATCC
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 30SC	Bacteriocin Producer	MRS (37)	Calf
<i>Lactobacillus plantarum</i> B1	Bacteriocin Producer	MRS (37)	Beef
<i>Lactobacillus plantarum</i> K4	Bacteriocin Producer	MRS (37)	Kimchi
<i>Lactobacillus plantarum</i> M2	Bacteriocin Producer	MRS (37)	Goat milk
<i>Lactococcus</i> sp. HY449	Bacteriocin Producer	M17G (37)	Cheese
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 11454	Nisin Producer	MRS (37)	ATCC
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 4797	Indicator	MRS (37)	ATCC

으며 그 희석배수의 역수를 취해 상대적 활성도(AU : Arbitrary Units)로 표현하였다.

pH 및 열 안정성

9종의 박테리옌용액을 혼합한 ACBN을 1 N HCl과 1 N NaOH를 사용하여 각각 pH 2에서 12까지 조정 한 후 24시간 동안 4℃에서 반응시킨 다음, pH를 6.5로 조정 한 후에 박테리옌 활성을 평가하였다. 또한 65℃, 95℃ 및 121℃에서 각각 20분, 40분 및 60분 동안 열처리를 실시하고 상온으로 냉각시킨 후 박테리옌 잔존 활성을 조사하였다. 박테리옌 활성 측정은 모두 3반복을 실시하였으며 재현성을 확인하였다.

복합박테리옌을 처리한 축산식품의 저장성 비교

현재 시중에서 판매되고 있는 프랑크소세지, 모짜렐라 치즈, 돼지고기 등심부위를 대상으로 각각 복합 박테리옌의 처리효과를 조사하였다. 복합박테리옌은 탈지분유(10%), glucose(2%), yeast extract(0.3%)가 함유된 배지에서 박테리옌 생산 유산균을 각각 배양시키고 활성을 동일하게 조정하여 혼합한 후 냉동건조하여 제조하였다.

프랑크소세지와 모짜렐라 치즈는 3×3×1.5 cm, 돼지 등심부위는 3×3×2 cm의 육방체로 절단한 뒤, 제조된 복합박테리옌을 시료 g당 1,600 AU씩 시료 표면에 분사시킨 후, 불투명한 열접착지로 진공 포장하였다. 이때 진공포장의 조건은 vacuum sealer(Bush type 021-336, Swiss)를 이용하여

진공도 5.5, 집착력 1.1로 실시하였으며 포장 시료는 4.0±0.2℃에서 저장하였다. 7일 간격으로 28일까지 저장된 시료를 채취하여 표준평판배지를 이용하여 일반세균수의 변화를 측정하였고 저장중 화학적 변화분석을 위하여 휘발성 염기태 질소(VBN: volatile base nitrogen)의 변화를 밀폐된 용기를 사용하여 Conway의 미량 확산법으로 측정하였다. 시료 1g을 취하여 증류수 5 ml를 넣고 균질한 다음 다시 20% HClO₄ 2 ml를 넣고 교반한 후 원심분리기를 이용하여 상정액을 회수하였다. 확산 용기의 내실에 봉산흡수제 1 ml을 넣고 외실에는 상정액 1 ml을 넣은 다음 확산 용기 외실에 50% K₂CO₃ 분해제를 넣는 즉시 뚜껑을 닫아 밀폐시켰다. 용기에 담긴 시료는 37℃에서 60분간 방치하였고 0.02 N 황산으로 적정하였다. 일반세균수 측정과 휘발성 염기태 질소의 측정은 모두 3반복을 실시하였다.

통계처리

통계 분석은 SAS system(1996)을 이용하여 각 저장기간별 처리구간 총균수와 휘발성 염기태 질소의 차이를 P<0.05의 수준에서 t-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

박테리옌의 항균능력

Table 2는 실험에 사용된 9종 박테리옌들의 단독 및 혼합에 따른 항균활성을 16종의 병원성 및 부패성 균주에 대한

Table 2. Inhibitory activity of individual bacteriocins and the bacteriocin mixture against pathogenic and spoilage microorganisms

Indicator strain	GP4A	GP1B	4356	30SC	B1	K4	M2	449	11454	Bacteriocin mixture ¹⁾
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> KCCM 11234	-	-	-	-	+	+	+	-	-	++
<i>Escherichia coli</i> KCCM 21052	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43889	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43893	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	-	-	-	-	+	-	+	-	+	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Listeria innocua</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	-	+	+	+	+	++	+	+
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> KCCM 11363	-	-	-	-	+	-	+	-	-	++
<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 10866	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	++	-	+	++	++	++	++	+	++
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCCM 35494	+	-	+	-	-	-	-	++	-	++
<i>Staphylococcus intermedius</i> KCCM 40149	++	++	+	++	+	+	+	++	-	+

¹⁾ the bacteriocin mixture constituted of bacteriocins produced by 9 strains of LAB.
+, inhibited by bacteriocin; - not inhibited by bacteriocin.

여 조사한 것으로 단일 박테리오신과 복합 박테리오신의 상대활성도가 유사하도록 그 농도를 조정한 후 실시하였다.

단일 박테리오신에 비하여 9종의 박테리오신을 혼합한 경우, 항균범위가 확대되었으며 박테리오신의 항균 역가는 증가되었다. 이는 특정 지시균에 대해 동일한 억제능력을 보이는 박테리오신들의 혼합에 따른 활력 상승효과와 다양한 항균범위를 갖는 수종의 박테리오신들을 혼합함으로써 나타나는 효과로 판단된다. 그러나 단일 박테리오신에 억제되지 않았던 *Enterobacter aerogenes*와 *Salmonella typhimurium* KCCM 10866은 복합 박테리오신에서도 억제되지 않았다.

일반적으로 박테리오신은 세포막의 투과성에 영향을 미치거나 혹은 DNA replication, translation 등 필수적인 세포기능을 방해하여 대상 미생물의 성장을 억제시키는 것으로 알려져 있다(Yang and Konisky, 1984; Vizan et al., 1991; Bennik et al., 1998). 이러한 기작도 박테리오신의 종류와 특성에 따라 다르게 나타나는데 박테리오신은 대상 세포의 receptor와 반응하거나 정전기적 결합을 통하여 세포막에 결합하는 것으로 추측되고 있다(Chickindas et al., 1993; Driessen et al., 1995). 이렇게 다양한 기작을 가진 박테리오신들을 혼합한 경우, 항균활성의 소실 혹은 상승효과를 보일 수 있는데 본 실험에서는 박테리오신들을 혼합시 단독으로 박테리오신을 처리하였을 때보다 향상된 항균활성을 보였으며 항균역가도 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에 사용된 박테리오신들은 상호간에 상승작용이 있음을 확인할 수 있었다.

Mulet-Powell 등(1998)은 nisin을 포함한 5종의 박테리오신을 각각 2쌍씩 조합하여 항균활성을 조사한 결과 pediocin AcH는 시너지 효과가 있었으나 다른 박테리오신의 조합에서는 역가가 상실되는 경우가 있었다고 보고하여 박테리오신 혼합에 따른 활력은 그 박테리오신의 특성에 따라 다르게 나타나는 것으로 판단된다.

박테리오신에 대하여 저항성이 있는 *Listeria monocytogenes* 6균주를 대상으로 복합박테리오신의 효과를 조사한

결과 *L. monocytogenes* D 균주의 경우 실험에 사용된 6종의 박테리오신에 대하여 모두 저항성이 있었으나 복합박테리오신에 대해서는 생육이 억제되는 것으로 확인되었다(Table 3).

따라서, 본 실험에 사용한 복합 박테리오신은 박테리오신 상호간 활력 상승 효과가 있어 한 종류의 박테리오신에 대해서 저항성이 유발될 경우에도, 복합박테리오신을 구성하고 있는 다른 박테리오신들의 작용 또는 시너지효과에 의해 항균활성이 유지될 수 있으리라 추정되나 정확한 기작을 알기 위해서는 추가적인 실험이 진행되어야 할 것이다.

Nisin에 대한 *L. monocytogenes*의 저항성은 세포막의 지방산, 인지질 조성 및 세포벽의 변화와 관련되어 있는 것으로 알려져 있으나 세포막의 조성 변화가 nisin에 대한 일차적인 저항성 기작은 아니며 nisin 저항성 균주로부터 세포벽의 제거를 통해 저항성이 상실되는 것을 보았을 때 세포벽의 차이가 저항성 형성에 많은 영향을 주는 것으로 보고되어 있다(Davies et al., 1994; Davies et al., 1996; Mazzotta and Montville, 1997).

일반적으로 nisin에 대해 저항성이 유도된 *L. monocytogenes*는 pediocin PA-1과 leuconocin S에 대해서도 어느 정도의 저항성을 갖는 것으로 나타나 한 종류의 박테리오신에 대해 저항성을 갖게 되면 다른 박테리오신들에 대해서도 cross-resistance를 나타내는 경우가 보고되어 있다(Crandall and Montville, 1998). 반면, nisin에 대해 저항성이 유도된 *L. monocytogenes* Scott A 균주는 다른 박테리오신 즉, sakacin A 및 enterocin B 등에 의해 성장이 억제되는 경우도 보고되어 있으며(Schillinger et al., 1998) 본 연구에서도 혼합된 박테리오신의 수와 종류가 다양하고 작용기작이 다른 것으로 추측되는 박테리오신들의 혼합 작용 효과를 통해 이러한 현상을 나타내는 것으로 판단된다.

복합박테리오신의 pH 및 열 안정성

복합박테리오신을 대상으로 다양한 pH 조건에서 발생할

Table 3. Inhibitory activity of individual bacteriocins and the bacteriocin mixture on some resistant *Listeria monocytogenes* strains

	Bacteriocins						
	11454	GP4A	HY449	M2	K4	B1	Mixture ¹⁾
<i>L. monocytogenes</i> Resistant A	-	+	-	+	-	+	+
<i>L. monocytogenes</i> Resistant B	-	-	+	+	-	-	+
<i>L. monocytogenes</i> Resistant C	-	-	-	+	-	-	+
<i>L. monocytogenes</i> Resistant D	-	-	-	-	-	-	+
<i>L. monocytogenes</i> Resistant E	-	-	-	+	-	-	+
<i>L. monocytogenes</i> Resistant F	-	+	+	+	-	-	+

¹⁾ the bacteriocin mixture constituted of bacteriocins produced by 9 strains of LAB.
+, inhibited by bacteriocin; - not inhibited by bacteriocin.

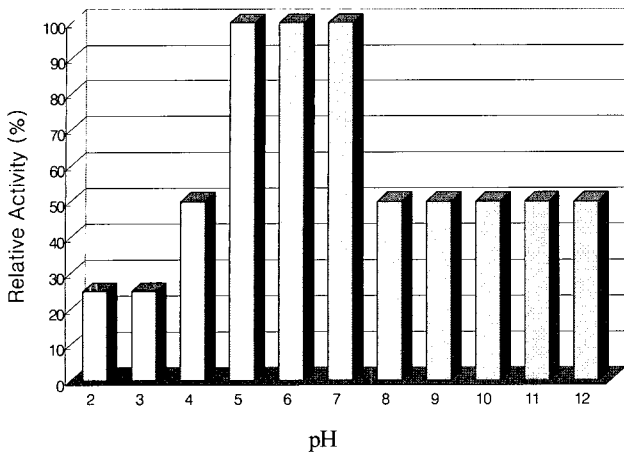


Fig. 1. Effect of pH on the antimicrobial activity of the bacteriocin mixture. Bacteriocin activity is expressed as the % of original activity.

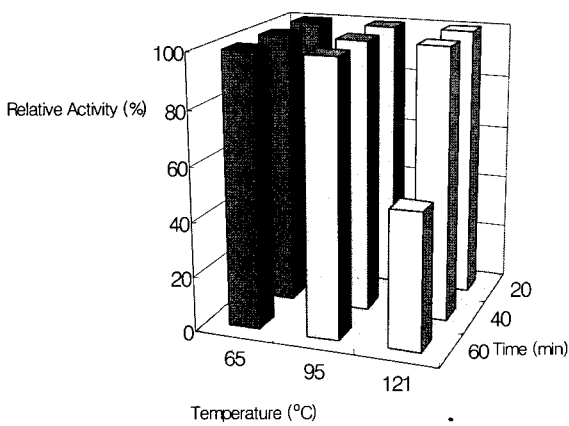


Fig. 2. Changes of the antimicrobial activity of the bacteriocin mixture during heat treatments. Bacteriocin activity is expressed as the % of original activity.

수 있는 항균능력의 변화를 조사한 결과 pH 5~7사이에서는 활력이 유지되었으나 pH 8~12 또는 pH 4에서는 50%의 활력 감소가 관찰되었고 pH 2에서는 최초 활력(1,600 AU/ml)의 25%가 유지되었다(Fig. 1). 또한, 복합박테리오신을 121°C에서 40분간 열처리한 경우에서도 활성이 유실되지 않아 열안정성이 매우 높은 것으로 나타났다(Fig. 2).

Nisin의 경우, 산성 pH에서 강한 활성을 보이나 중성의 pH에서는 활성을 소실하는데 이러한 특성으로 인해 제한적으로 식품에 적용되고 있다(Delves-Broughton, 1990). 이와 다르게 본 실험에 사용된 복합박테리오신은 중성의 pH와 121°C에서 항균활성이 유지된 점으로 미루어 볼 때 보다 다양한 식품에 응용이 가능하리라 생각된다.

복합박테리오신을 처리한 축산식품의 저장성 비교

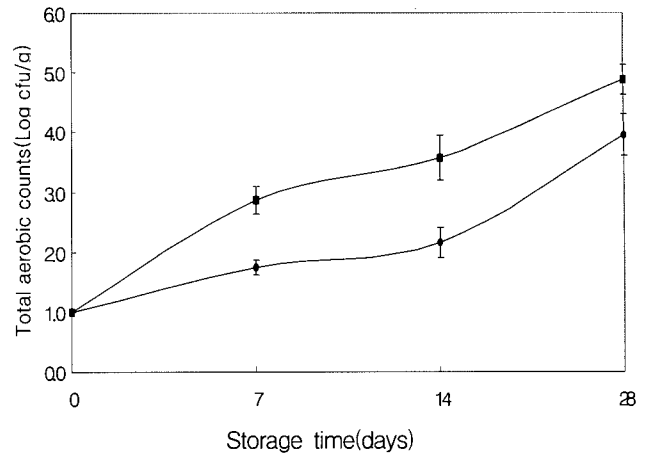


Fig. 3. Effect of the bacteriocin mixture on aerobic bacteria of frank sausage during storage. Frank sausage was added with freeze-dried bacteriocin mixture at 1,600 AU/g and stored in vacuum package at 4°C. During 28 days, total bacteria were counted on 0, 7, 14 and 28 day. ■—■ : control, ●—● : bacteriocin mixture.

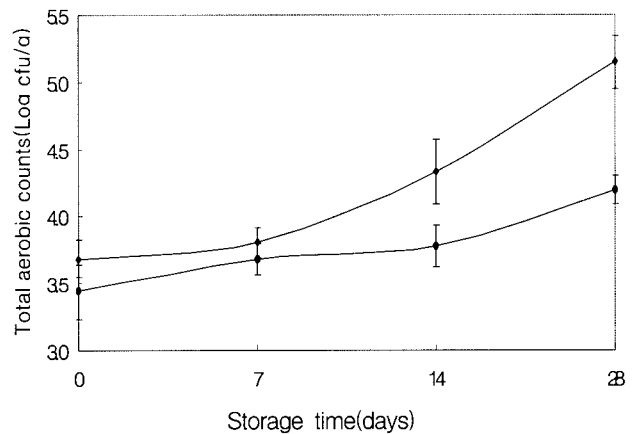


Fig. 4. Effect of the bacteriocin mixture on aerobic bacteria of Mozzarella cheese during storage. Mozzarella cheese was added with freeze-dried bacteriocin mixture at 1,600 AU/g and stored in vacuum package at 4°C. During 28 days, total bacteria were counted on 0, 7, 14 and 28 day. ■—■ : control, ●—● : bacteriocin mixture.

일반세균이 약 10 cfu/g 정도의 비교적 신선한 프랑크소세지를 시료로 사용하여 저장간 복합박테리오신의 영향을 조사한 결과 저장기간 7일부터 대조구와 복합 박테리오신 처리구간의 유의적인 차이(p<0.05)를 나타내었다(Fig. 3). 저장기간이 진행되어 28일이 경과되었을 때는 대조구와 박테리오신 처리구 모두 총세균수가 증가하였으나 박테리오신 처리구의 경우, 대조구에 비하여 약 1 log 정도 낮았다.

모짜렐라 치즈의 경우, 저장 14일 이후부터 총세균수는 유의적인 차이(p<0.05)를 나타내어 28일이 경과된 후에는 대조구의 생균수가 1.6×10⁵ cfu/g에 이르렀으나, 박테리오신

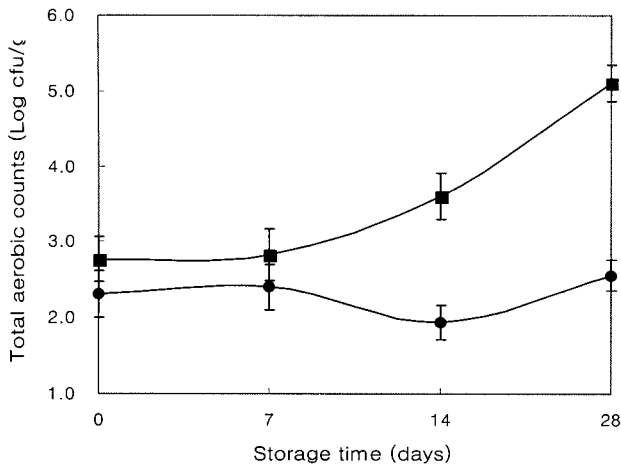


Fig. 5. Effect of the bacteriocin mixture on aerobic bacteria of pork loin during storage. Pork loin was added with freeze-dried bacteriocin mixture at 1,600 AU/g and stored in vacuum package at 4°C. During 28 days, total bacteria were counted on 0, 7, 14 and 28 day. ■ : control, ● : bacteriocin mixture.

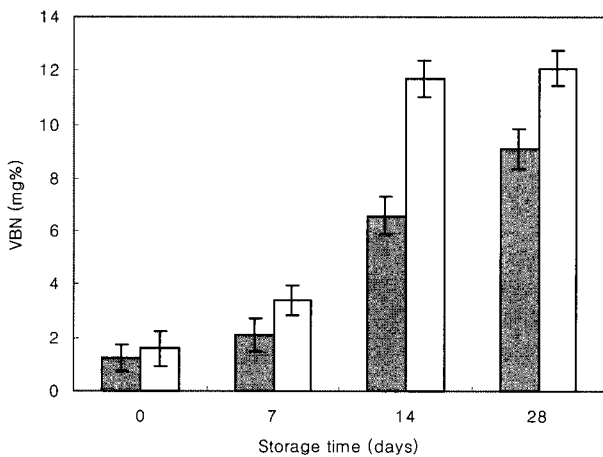


Fig. 6. Changes of volatile base nitrogen(VBN) content during storage of frank sausage. ■ : Control, □ : Bacteriocin mixture.

처리구의 생균수는 1.4×10^4 cfu/g을 나타내었다(Fig. 4). 돈육 등심근을 사용한 저장실험에서도 초기와 7일 경과 후까지는 유의적인 차이($p < 0.05$)를 보이지 않았지만 14일 이후부터 점차 대조구가 박테리오신 처리구에 비해 높은 균수를 나타내어($p < 0.05$) 저장 28일에 대조구의 경우 1.6×10^5 cfu/g으로 나타났고 박테리오신 처리구는 저장 초기균수와 유사한 2.5×10^2 cfu/g이었다(Fig. 5).

이상과 같이 프랑크소세지와 모짜렐라 치즈에서는 일반세균수가 대조구에 비해 박테리오신의 처리구에서 약 1/10 수준의 수치를 보였고, 돈육 등심근에서는 약 1/100 정도 낮은 균수를 보여 복합박테리오신에 의한 저장성이 증진됨을 알 수 있었다. 또한, 저장기간의 선도를 판정하기 위한 지표로

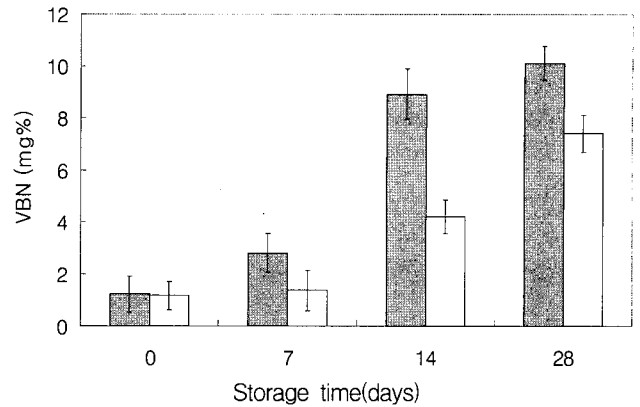


Fig. 7. Changes of volatile base nitrogen(VBN) content during storage of Mozzarella cheese. ■ : Control, □ : Bacteriocin mixture.

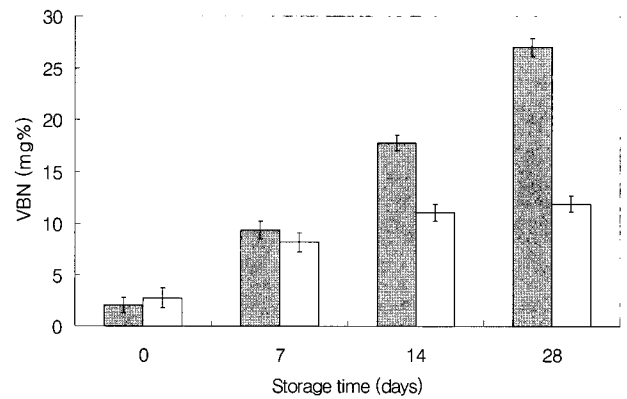


Fig. 8. Changes of volatile base nitrogen(VBN) content during storage of pork loin. ■ : Control, □ : Bacteriocin mixture.

서 휘발성 염기태질소(VBN)의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 6, 7 및 8과 같다.

저장 중 유제품 및 육제품의 변패가 진행됨에 따라 단백질이 아미노산 또는 다시 저분자의 무기태 질소로 분해되는데 무기태 질소의 함량은 생육 및 육제품의 신선도를 평가하는데 중요하며, 특히 VBN의 경우는 관능적 특성에 크게 관여한다. 일반적인 부패과정의 진행은 진공포장과 냉장저장에 의하여 지연되었으나, 돈육등심의 경우, 저장기간 14일 이후부터 유의적인 차이($p < 0.05$)를 나타내어 저장기간이 28일 경과된 후에는 박테리오신을 처리하지 않은 대조구에서 부패취가 감지되었고 VBN값이 현저히 증가하였다. 이는 복합박테리오신이 VBN값의 변화속도를 저하시킴으로써 유의적인 효과를 나타낸 것으로 추정되며 복합박테리오신을 처리한 경우 VBN값은 28일 저장 후 돈육등심에서는 12 mg% 내외로 유지되었으나 대조구의 경우는 27 mg%로 나타나 가식권 밖의 범위를 나타내었다. 이와 같은 결과는 박테리오신

처리가 미생물의 활력을 감소시킴으로써 단백질의 부패를 효과적으로 억제할 수 있음을 의미한다. 일반적으로 국내 식품공전상 신선육의 가식범위는 VBN 값이 20 mg% 이하로 규정하고 있다.

저장 중 VBN 값의 변화요인에 대하여 Davies와 Board (1998)는 근육단백질의 분해에 의한 휘발성 염기태질소의 증가와 adenosyl-monophosphate(AMP)의 분해에 따른 암모니아의 생성 그리고 nucleotide의 증가가 주원인이라고 보고하였으며 Lefebvre 등(1994)은 휘발성 염기태질소 화합물은 육류에 많이 오염되어 있는 *Pseudomonas* spp. 등과 같은 Gram-negative bacteria에 의해 요소와 아미노산이 분해됨으로써 형성된다고 하였다. Darmadji 등(1990)은 젖산발효에 의하여 건조소세지를 제조한 경우 그 대조구에 비하여 낮은 VBN 값을 나타내었고, 그 원인은 *Pseudomonas* spp.가 분비하는 단백질 분해효소의 활성 저하에 따른 것이라고 보고하였다.

프랑크소세지와 치즈의 경우는 돼지등심근에 비해 박테리오신의 처리 효과가 뚜렷하게 나타나지 않았으나 치즈의 경우 저장기간 14일부터 박테리오신 처리구에서 유의적으로 낮은 수치를 보여주었으며($p < 0.05$) 프랑크소세지의 경우는 오히려 저장기간 14일부터는 박테리오신 처리구에서 높은 수치를 보여주었다($p < 0.05$). 그러나, 치즈와 소세지의 저장 중에 나타난 VBN 값은 돈육등심보다 훨씬 완만한 증가추세를 보였으며 28일 저장 후에도 VBN의 최고치는 소세지는 약 12 mg%, 치즈는 약 10 mg%로 나타났다. 그 이유는 치즈와 소세지 같은 가공식품의 경우, 단단하고 치밀한 표면조직과 상대적으로 작은 표면적 때문에 박테리오신의 식품내 침투효과가 돈육의 경우보다 작기 때문인 것으로 판단된다. 또한, 가공제품에서는 가공처리 중 거치게 되는 살균처리와 적은 수분함량 등으로 생육보다 미생물의 작용에 대한 감수성이 낮은 데에도 일부 기인한 것으로 생각된다.

결국 복합박테리오신이 식품에 적용되기 위해서는 식품의 종류에 따라 부패에 관여하는 미생물의 종류가 다양하고 각 식품의 성분과 박테리오신제제와의 반응성이 다를 것으로 예상되기 때문에 식품에 대한 침투효과와 식품구성 요소와의 비특이성 결합에 의한 활력 변화, 활성범위에 대한 검증 등에 대해 다각적 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

박테리오신을 생산하는 9종의 유산균 배양액으로부터 ammonium sulfate를 첨가하여 제조된 각각의 조박테리오신을 혼합하여 복합박테리오신용액을 제조하였다. 복합박테리오신의 항균 활성은 단일 박테리오신보다 우수하였으며 항균 범위 또한 넓어짐을 알 수 있었고 단일 박테리오신에 대

하여 저항성을 나타내는 *Listeria monocytogenes*의 생육을 저해하는 것으로 나타났다. 또한, 복합박테리오신은 pH와 열에 강한 안정성을 보여 식품 가공 중에도 이용이 가능한 것으로 나타났다. 복합박테리오신을 프랑크소세지, 모짜렐라 치즈 및 돈육등심근에 첨가한 후 저장기간별 일반세균수의 변화를 조사한 결과, 대조구에 비해 유의적인 감소현상을 나타내었고 저장 28일 경과 후에는 모든 식품에서 1/10 또는 1/100 정도로 식품내 총세균이 억제되었다. 또한, 저장기간 중 VBN의 함량을 조사한 결과 돈육등심근과 모짜렐라 치즈의 경우 14일 이후부터 박테리오신 처리구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것이며 이에 감사드립니다(HMP-97-F-3-0010).

참고문헌

- Ahn, C. and Stiles, M. E. (1990) Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 302-310.
- Bennik, M.H.J., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L. G. M., and Smid, E. J. (1998) A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1373**, 47-58.
- Chickindas, M. L., Garcia Garcera, M. J., Driessen, A. J. M., Ledebouer, A. M. Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Abee, T., Konings, W. N., and Venema, G. (1993) Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3577-3584.
- Crandall, A. D. and Montville, T. J. (1998) Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(1), 231-237.
- Darmadji, P., Izumimoto, M., Miyamoto, T., and Katoaka, K. (1990) Lactic fermentation effect on preservative qualities of dendeng giling. *J. Food Sci.* **55**, 1523-1527.
- Davies, A. and Board, R. (1998) *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic & Professional, London, UK. p. 288.
- Davies, E. A. and Adams, M. R. (1994) Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin. *Int. J. Food Microbiol.* **21**, 341-347.
- Davies, E. A., Falahee, M. B., and Adams, M. R. (1996) Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance. *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 139-146.
- Delves-Broughton, J. (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**, 100-117.
- Driessen, A. J. M., Vandenhooven, H. W., Kuiper, W., Vande-

- kamp, M., Sahl, H. G., Konings, R. N. H., and Konings, W. N. (1995) Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **34**, 1606-1614.
11. Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Venderas, J. C., and Stiles, M. E. (1991) Characterization of leucocin A-UAL187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidium*. *J. Bacteriol.* **173**, 7491-7500.
 12. Kim, W. J. (1993) Bacteriocins of lactic acid bacteria: Their potentials as food biopreservative. *Food Rev. Intl.* **9**, 299-312.
 13. Kjaenhammer, T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39-85.
 14. Lefebvre, N., Thibault, C., Charbonneau, R., and Piette, J. P. G. (1994) Improvement of shelf-life and wholesomeness of ground beef by irradiation. 2. Chemical analysis and sensory evaluation. *Meat Sci.* **32**, 371-383.
 15. Marugg, J. D., Gonzalez, C. F., Kunka, B. S., Ledebor, A. M., Pucci, M. J., Toonen, M. Y., Walker, S. A., Zoetmulder, L. C. M., and Vandenberg, P. A. (1992) Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2360-2367.
 16. Mazzotta, A. and Montville, T. J. (1997) Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 32-38.
 17. Mullet-Powell, N., Lacoste-Armynot, A. M., Vinas, M., and Simeon De Bouchberg, M. (1998) Interaction between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* **61**, 1210-1212.
 18. SAS/STAT Software (1996) *Changes and Enhancements*. through Realease 6.11. SAS Institute Inc., Cary, NC.
 19. Schillinger, U., Chung H. S., Keppler, K., and Holzapfel, W. H. (1998) Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Microbiol.* **85**(4), 657-663.
 20. Vizán, J. L., Hernández-Chico, C., del Castillo, I., and Moreno, F. (1991) The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *EMBO J.* **10**, 467-476.
 21. Yang, C. C. and Konisky, J. (1984) Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J. Bacteriol.* **158**, 757-759.

(2001년 12월 27일 접수)