

김치에서 항균활성 유산균의 분리 및 동정

김수영¹ · 김종두¹ · 손지수¹ · 이시경² · 박갑주³ · 박명수*

안양과학대학 호텔조리과, ¹건국대학교 생명과학과, ²건국대학교 응용생명과학부, ³건국대학교 기초과학연구소

Biochemical and Molecular Identification of Antibacterial Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi

Soo Young Kim¹, Jong Doo Kim¹, Ji Soo Son¹, Si Kyung Lee², Kab Joo Park³, and Myeong Soo Park*

Department of Hotel Culinary Arts, Anyang Science University

¹Department of Biological Sciences, Konkuk University

²Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University

³Research Institute for Basic Sciences, Konkuk University

Abstract Total 480 lactic acid-producing bacteria were isolated from five kinds of kimchi, and their antibacterial activity was tested against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas aeruginosa* using an agar diffusion assay. Among them, 340 isolates showed a halo on MRS agar against one or more indicator strains, which were identified using multiplex PCR, an API 50CHL kit, and a 16S rDNA sequence analysis. As a result, 169 *Lactobacillus plantarum*, 20 *Lactobacillus fermentum*, two *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, two *Lactobacillus* sp., and 15 *Pediococcus* sp. were identified. This may be the first report on the isolation of antibacterial *Lactobacillus fermentum* from kimchi.

Keywords: antibacterial activity, kimchi, lactic acid bacteria, identification

서 론

유산균은 자연계에 광범위하게 분포하며, 전통적으로 다양한 발효식품에 이용되어 왔고, 일반적으로 안전하다고 인식되는 미생물(GRAS, generally recognized as safe)로서(1), Bergey's Manual(2)에서는 그람양성 구균과 그람양성 간균에서 다루고 있다. 유산균은 G+C 50 mol% 이하의 그람 양성, non-spore-forming의 구균, 간균, 혹은 구간균이다. 많은 유산균은 프로바이오틱스(probiotics)로서 소화 흡수를 돕고 장내부패를 억제하고, 설사 변비의 치료 효과, 장내 유해균의 억제, 비타민의 생성, 혈중 콜레스테롤 저하능, 항암 효과, 인체의 면역 능력 증강 등 다양한 기능이 보고되고 있다(3). 한 예로 *Lactobacillus* strain의 경우 immunoglobulin의 생산 자극(4), 대식세포에 interferon 유도(5), 신체 부분적 산성화(6), hypocholesterolemic 효과(7), mutagenic 물질과의 반응(8), 항균물질인 박테리옌의 생성(9), 그리고 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium과 *Neisseria gonorrhoea*와 같은 병원성 세균의 흡착 저해 등의 기능이 밝혀진 바 있으며, 이와 같이 유산균의 숙주에 대하여 이로운 작용을 하는 probiotics로서의 기능이 밝혀져 한때 영양적 측면에서 가치 없는 식품으로 오인 받

았던 발효 식품들은 오늘날에 이르러서는 가장 과학적인 식품으로 인정받고 있다.

식품에서 유산균은 발효식품의 맛과 발효산물의 특징을 결정하고, 유기산 및 박테리옌 등의 항균활성물질을 생성하여 식품의 저장성에 기여한다. 박테리옌은 다양한 그람 양성균에서 생산되는 항균활성 단백질 또는 펩타이드이며, 유산균에서 유래한 박테리옌의 경우 식품산업에서 천연 보존제(natural preservative)로 이용할 수 있는 응용성과 항생제를 대체할 수 있는 물질로서 관심을 끌고 있다. Klaenhammer(9)는 유산균이 생산하는 박테리옌을 분자 및 생리학적 특성에 따라 다음과 같이 분류하였다. Class I bacteriocin(lantibiotics)은 post-translational modification 결과 lanthionine 같은 특이한 아미노산을 포함한다. Class II는 lanthionine을 함유하지 않는 박테리옌으로 분자량이 작고 (<13 kDa), 작은 분자량으로 인하여 3차 구조를 형성하지 않으므로 비교적 열에 안정하며, 일반적으로 20개 정도의 소수성 아미노산으로 이루어진 transmembrane helix를 가지는 것을 특징으로 한다. Class III는 분자량이 크고(>30 kDa) 열에 불안정한 항균활성 단백질이다. *Lactococcus lactis*가 생산하는 nisin의 경우 Class I에 속하며 비교적 넓은 antimicrobial spectrum을 가지고 대부분의 그람 양성균의 증식을 억제한다. Nisin은 열에 안정하고 낮은 pH에서도 활성을 나타내며 천연 식품보존제로 사용되고 있다. 또한 대부분의 박테리옌의 활성이 약산성에서 강하고 혐기성 환경에서 불안정한 것으로 알려져 있어 산을 생성하는 *Lactobacillus* 속의 배양액으로부터 박테리옌의 생산 여부를 알아보기 위해 광범위하게 적용할 수 있는 실험적 방법의 확립에 어려움이 있다(10). 최근에는 박테리옌은 식품보존제로서 뿐 아니라 유산균종의 개량을 위한 발현벡터 시스템의 선발유전자로 이용되기도 한

*Corresponding author: Myeong Soo Park, Department of Hotel Culinary Arts, Anyang Science University, Anyang, Gyeonggi 430-749, Korea

Tel: 82-31-441-1347

Fax : 82-31-441-1347

E-mail: mspark@ianyang.ac.kr

Received April 7, 2011; revised June 1, 2011;

accepted June 6, 2011

다(11).

본 연구에서는 항균활성이 우수한 유산균주를 탐색하고 이를 식품용 유전자 발현시스템용 마커로서 개발하기 위한 기초연구로서, 김치로부터 항균활성을 나타내는 유산균을 분리·선발하고 이들 균주를 생화학적·유전학적 방법으로 동정하였다.

재료 및 방법

배지 및 시약

*Lactobacillus*속 미생물의 분리를 위하여 *Lactobacillus* selection media(LBS-media, Difco, St. Louis, MO, USA)와 MRS media(Difco)에 acetic acid(Shinyo Pure Chemical Co., Ltd. Osaka, Japan)를 첨가하여 사용하였고 계대배양에는 MRS media(Difco)를 사용하였다. 혐기배양을 위하여 AnaeroGen™ gas pack(Oxoid Inc., Cambridge, UK)를 사용하였다. 균주의 보존을 위하여 균배양액에 glycerol(Shinyo)이 15%(v/v)가 되도록 조성하여 -70°C Deep Freezer(Ilshin lab Inc., Seoul, Korea)에 보관하며 사용하였다.

분리한 균주의 생화학적 특성 검사를 위해서는 Gram stain sets(Difco), hydrogen peroxide(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), oxidase reagent(BioMérieux Inc., Marcy l'Etoile, France), API 50CHL kit(BioMérieux)를 사용하였다.

균주의 분리

전통적인 방법으로 일반 가정집에서 만든 5종류의 김치를 수집하여 mixer로 균질화 한 후 180 mL의 LBS 및 MRS배지에 10%(w/v)로 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하여 증균하였다. 증균액을 0.85% 멸균 생리식염수를 이용하여 10⁶-10⁷까지 희석한 액 100 µL를 0.1%(w/v) CaCO₃를 함유하는 MRS 고체배지에 도달한 후 AnaeroGen™ gas pack(Oxoid Inc.)을 사용하여 혐기적인 조건에서 37°C로 3일간 배양한 후 산 생성에 의해 투명환을 형성한 콜로니 중 48개씩을 MRS 고체 배지에 도달하여 순수 분리하였다. 분리한 균주는 MRS액체 배지에서 배양한 후 15% glycerol로 조성하여 -70°C에서 보관하며 동정과 박테리옌 활성 시험에 사용하였다. 본 연구에 사용된 분리균주 및 표준균주는 Table 1에 표시하였다.

균주의 염색 및 생화학적 특성 검사

분리균주는 MRS 액체배지에서 37°C로 24시간 배양한 후 그람염색(12)을 통하여 그람양성 균주를 판별하고, 분리균주의 크기와 형태를 광학현미경으로 관찰하였다.

분리한 균주의 생화학적 특성은 Cowan과 Steel(13) 그리고 MacFaddin(14)의 방법에 따라 균주의 특성을 조사한 후 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(2)에 준하여 분류 및 동정하였다. Catalase test는 배양 평판에 3% hydrogen peroxide(H₂O₂)를 첨가한 후 O₂ 발생 유무를 관찰하였고, oxidase test는 콜로니를

비금속성 막대를 사용하여 filter paper에 묻힌 후 Oxidase reagent(BioMérieux)를 한 방울 떨어뜨려 변색 여부를 관찰 하였다.

항균활성 검사

항균활성 검사를 위하여 blank disc를 이용한 agar diffusion assay를 수행 하였다. 24 well 배양 접시에 멸균된 MRS 액체배지를 2 mL씩 분주하여 분리균주를 접종하고 혐기 조건에서 48-72시간 배양하였으며, 배양액 1.5 mL를 취하여 멸균된 eppendorf tube에 옮긴 후 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 5분) 한 후 상층액 1 mL를 조심스럽게 취하여 박테리옌 조추출액으로 하여 -20°C에 보관하고, 1회 해동하여 냉장보관 하며 agar diffusion assay를 수행 하였다. 균 배양액의 상등액은 3 N NaOH를 사용하여 pH 6.5-7.0으로 조정된 후 상등액에 ammonium sulfate를 첨가하여 70%가 되도록 하였다. 항균활성은 멸균된 agar 배지를 적당히 식힌 후 예비실험을 통해 결정된 희석 비율을 사용하여 indicator 균주 배양액을 최종 1×10⁶ CFU/mL 이상, 1×10⁷ CFU/mL 이하가 되게 접종한 다음 페트리디쉬에 10 mL씩 분주하여 균화 후 건조를 위하여 37°C에서 4시간 배양 하였다. 건조된 indicator plate에 blank disc를 떨어뜨린 후 20 µL의 박테리옌 조추출액을 점적하고 37°C에서 12시간 배양 후 투명 환의 형성 여부를 판단하여 항균활성을 갖는 균주를 선발하였다.

균주의 동정

최초 분리한 480균주의 신속한 동정을 위하여 Multiplex PCR(15)을 수행하였다. 주형으로 사용할 genomic DNA는 Puregene™ DNA Isolation kit(Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 준비 하였다. 분리균주의 그룹을 나누기 위한 multiplex PCR-G에서는 10X reaction buffer(with MgCl₂) 2.5 µL, 1 µL의 dNTPs(2.5mM each), 10 pmol/µL로 희석한 primer Ldel-7, LU-5, LU-3', LU-1', Lac-2를 1 µL씩을 넣고, 최종 25 µL의 반응 용액에 0.25U의 HanTaq XL polymerase(Genemed Inc., Seoul, Korea)를 포함하게 조성하였으며, PTC-100 Peltier Thermal Cycler(MJ Research Inc. Waltham, MA, USA)를 사용하여 PCR 반응을 수행 하였다. PCR은 95°C에서 5분간 반응 후에 95°C에서 20초, 55°C에서 2분의 반응을 총 35회 수행한 후 72°C에서 5분간 최종 신장하였다. Multiplex PCR-G의 결과에 따라 multiplex PCR 를 수행하였다. Multiplex PCR-IV는 primer로 Lsal-1, Lreu-1, Lpla-3, Lfer-3, Lsal-2, Lreu-4, Lpla-2, Lfer-4를 10 pmol로 희석하여 각 1 µL씩을 사용 하였으며, 나머지 성분은 multiplex PCR-G와 동일하게 조성한 후 95°C에서 5분간 반응한 후에 95°C에서 20초, 58°C에서 2분의 반응을 총 35회 수행한 후 72°C에서 5분간 최종 신장한 후 2% 아가로스 겔 전기영동으로 확인 하였다.

Multiplex PCR-G와 multiplex PCR-IV에 의한 증폭 산물을 형성하지 않은 균주 중 간균 9종을 선별하여 API 50CHL kit을 사용하여 당 분해능, arginine과 esculin 분해능을 배지의 색 변화로 관

Table 1. Bacterial strains used in this study.

| Strains | Relevant characteristics | Source or reference |
|--|---|---------------------|
| Isolates L101-L548 | 240 Isolates from 5 kinds of kimchi by LBS enrichment | This study |
| Isolates M101-M548 | 240 Isolates from 5 kinds of kimchi by MRS enrichment | This study |
| <i>B. subtilis</i> KCTC 3716 | Indicator strain for antibacterial activity | KCTC ¹⁾ |
| <i>P. aeruginosa</i> KCTC 2651 | Indicator strain for antibacterial activity | KCTC |
| <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028 and ATCC 12023 | Indicator strain for antibacterial activity | ATCC ²⁾ |

¹⁾KCTC: Korean Collection for Type Culture

²⁾ATCC: American Type Culture Collection

Table 2. PCR primers used in this study

| Target | Primers | Nucleotide sequences (5'→3') | Usage | Amplicon size (bp) | Reference |
|-----------------------|------------------|--|------------------|--------------------|-----------|
| Group I | Ldel-7 Lac-2 | ACAGATGGATGGAGAGCAGA CCTCTTCGCTCGCCGCTACT | Multiplex PCR-G | 450 | 15 |
| Group II | LU-5 Lac-2 | CTAGCGGGTTCGACTTTGTT CCTCTTCGCTCGCCGCTACT | Multiplex PCR-G | 300 | 15 |
| Group III | LU-1' Lac-2 | ATTGTAGAGCGACCGAGAAG CCTCTTCGCTCGCCGCTACT | Multiplex PCR-G | 400 | 15 |
| Group IV | LU-3' Lac-2 | AAACCGAGAACACCGCGTT CCTCTTCGCTCGCCGCTACT | Multiplex PCR-G | 350 | 15 |
| <i>Lb. salivarius</i> | Lsal-1 Lsal-2 | AATCGCTAAACTCATAACCT CACTCTCTTTGGCTAATCTT | Multiplex PCR-IV | 411 | 15 |
| <i>Lb. reuteri</i> | Lreu-1 Lreu-4 | CAGACAATCTTTGATTGTTTAG GCTTGTGGTTTGGGCTCTTC | Multiplex PCR-IV | 303 | 15 |
| <i>Lb. plantarum</i> | Lpla-3 Lpla-2 | ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT CCTGAACTGAGAGAATTTGA | Multiplex PCR-IV | 248 | 15 |
| <i>Lb. fermentum</i> | Lfer-3 Lfer-4 | ACTAACTTGACTGATCTACGA TTCACTGCTCAAGTAATCATC | Multiplex PCR-IV | 192 | 15 |
| 16S rDNA | 27F 920R | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GTCAATTCCTTTGAGTTT | Identification | 893 | 16 |
| 16S rDNA | 350F 920R | TACGGGAGGCAGCAG GTCAATTCCTTTGAGTTT | Identification | 570 | 16 |
| 16S rDNA | 27F 1492R | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT | Identification | 1465 | 16 |
| 16S rDNA | 350F 1492R | TACGGGAGGCAGCAG GGTTACCTTGTTACGACTT | Identification | 1142 | 16 |

찰하여 apiweb program(<http://apiweb.biomerieux.com>, Biomerieux)을 이용하여 동정하였다.

Multiplex PCR-G와 multiplex PCR-IV에 의한 증폭 산물을 형성하지 않은 균주 중 9균 18종을 선별하여 16S rDNA 서열을 분석하여 동정하였다. 염기서열 결정용으로 27F, 350F, 920R, 1492R primer를 사용하였으며, 각각의 결과를 보정하여 BLASTN program(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 사용하여 해당균주를 동정하였다. Multiplex PCR에 사용된 primer는 Table 2에 표시하였다.

결과 및 고찰

김치 유산균 분리 및 항균활성 균주 선발

5종류의 김치로부터 산 생성, 그람 양성, catalase 음성, oxidase 음성을 기준으로 480종의 균주를 분리한 후 재료 및 방법에 의하여 이들 중 426균주에 대한 박테리옌 조 추출액을 제조하여 항균활성 실험에 사용하였다. *S. enterica* serovar Typhimurium, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*을 항균활성에 대한 지표 균주로 사용하여 시험한 결과 340균주가 한 가지 이상의 균주에 대하여 항균활성을 나타내었다. 이중 *S. enterica* serovar Typhimurium 균주에 대해서만 항균활성을 갖는 것은 L420이었으며, *P. aeruginosa*에 대해서만 항균활성을 갖는 것이 35균주, *B. subtilis*에 대해서만 항균활성을 나타내는 균주가 71균주이었으며, *S. enterica* serovar Typhimurium과 *P. aeruginosa*에 대하여 항균활성을 나타낸 것은 3균주, *P. aeruginosa*와 *B. subtilis* 두 균주에 대한 항균활성을 나

타내는 것은 165균주, *S. enterica* serovar Typhimurium과 *B. subtilis*에 대해서 항균활성을 나타낸 것은 6균주이고, 59균주가 *S. enterica* serovar Typhimurium, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* 세 균주 모두에 대하여 항균활성을 나타내었다(Table 3).

Multiplex PCR을 이용한 균주의 동정

Song 등(15)의 *Lactobacillus* 속의 신속한 동정법을 이용하여 1차 선별한 340균주에 대하여 multiplex-G PCR을 수행한 결과 204균주에서 group IV(*Lb. salivarius* ssp. *salivarius*, *Lb. salivarius* ssp. *salicinius*, *Lb. reuteri*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*)에 해당하는 PCR 증폭산물(350bp)을 형성하였으며, 이들에 대하여 multiplex-PCR을 수행하여 162균주를 *Lb. plantarum*, 20균주를 *Lb. fermentum*으로 확인 하였다(Table 3).

API 50CHL Kit을 이용한 균주의 동정

Multiplex PCR-G와 multiplex PCR-IV에 의한 증폭 산물을 형성하지 않은 균주 중 9종(L328, L331, L521, L538, L543, M305, M307, M311, M317)에 대하여 API 50CHL Kit을 이용한 실험결과를 웹 프로그램(<http://apiweb.biomerieux.com/>)을 이용하여, 표준균주에 대한 상대적 근접성을 나타내는 %ID, 각 균주에 대하여 전형적인 생화학 특성에 대한 근접성을 나타내는 T-index를 이용하여 동정결과 L328(%ID=99.9%, T-index 0.58), L331(99.9%, 0.69), L521(99.9%, 0.59), L538(99.9%, 0.35), L543(99.9%, 0.44), M305(94.3%, 0.25), M317(99.7%, 0.38)를 나타내어 각각 *Lb. plantarum*으로 동정하였다. M307균주는 %ID의 합

Table 3. Biochemical and bactericidal characteristics of isolates from kimchi and identification of several strains by API50CHL, 16S rDNA sequencing and multiplex PCR

| Strain No. | API50CHL | 16S rDNA | Multiplex PCR | | Bactericidal activity (diameter, mm) | | | Strain No. Strain No. | API50CHL | 16S rDNA | Multiplex PCR | | Bactericidal activity (diameter, mm) | | |
|------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------------|------------------|------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|---------------|----|--------------------------------------|------|----|
| | | | G | IV | Sa ¹⁾ | Ps ²⁾ | Ba ³⁾ | | | | G | Sa | Ps | Ba | |
| L101 | - | <i>P. acidilactici</i> | - ⁴⁾ | ND ⁵⁾ | 0 | 10 | 0 | M327 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 12 |
| L147 | - | <i>P. acidilactici</i> | - | ND | 0 | 10 | 0 | M328 | - | - | IV | P | 0 | 11.5 | 12 |
| L204 | - | - | IV | P ⁶⁾ | 0 | 11 | 0 | M329 | - | - | IV | P | 0 | 11.5 | 12 |
| L210 | - | <i>P. pentosaceus</i> | - | ND | 0 | 11 | 0 | M330 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 12 |
| L246 | - | <i>Lb. plantarum</i> | - | ND | X ⁸⁾ | 11 | 0 | M331 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 13 |
| L301 | - | - | IV | F ⁷⁾ | 0 | 8 | 0 | M332 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 12 |
| L302 | - | - | IV | F | 0 | 9 | 0 | M334 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 9 |
| L315 | - | - | IV | F | 0 | 10 | 0 | M340 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 12 |
| M311 | <i>Lb. paracasei or plantarum</i> | - | IV | ND | 0 | 10 | 0 | M341 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 11 |
| M312 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 0 | M342 | - | - | IV | P | 0 | 11.5 | 11 |
| L409 | - | - | IV | P | 0 | 8.5 | 0 | M343 | - | - | IV | P | 0 | 12.5 | 12 |
| L416 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 0 | M345 | - | - | IV | P | 0 | 11.5 | 12 |
| L421 | - | - | IV | P | 0 | 8 | 0 | M46 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 12 |
| L422 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 0 | L410 | - | - | IV | P | 0 | 8.5 | 7 |
| L432 | - | - | IV | P | 0 | 8 | 0 | L423 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 9 |
| L443 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 0 | L425 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 8 |
| L444 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 0 | L426 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 8 |
| L445 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 0 | L436 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 8 |
| L446 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 0 | L438 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 11 |
| L447 | - | - | IV | P | 0 | 9 | X | L442 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 8 |
| M401 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 0 | M441 | - | - | IV | P | 0 | 10.5 | 9 |
| M421 | - | - | IV | P | 0 | 8 | 0 | M443 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 11 |
| M440 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 0 | M444 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 9 |
| L515 | - | - | IV | F | 0 | 9.5 | 0 | M446 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 11 |
| L546 | - | - | IV | F | 0 | 7 | 0 | M447 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 11 |
| L547 | - | - | IV | F | 0 | 9 | 0 | L506 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 12 |
| M532 | - | - | IV | F | 0 | 7 | 0 | L507 | - | - | IV | P | 0 | 11.5 | 12 |
| M533 | - | - | IV | F | 0 | 8 | 0 | L516 | - | - | IV | F | 0 | 8 | 7 |
| M540 | - | - | IV | F | 0 | 7 | 0 | L520 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 11 |
| L145 | - | <i>P. acidilactici</i> | - | ND | 0 | 0 | 10 | L521 | <i>Lb. plantarum</i> | - | - | ND | 0 | 12 | 11 |
| M120 | - | <i>P. pentosaceus</i> | - | ND | 0 | 0 | 12 | L522 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 11 |
| L319 | - | - | IV | F | 0 | 0 | 9 | L523 | - | - | IV | P | 0 | 7 | 11 |
| L329 | - | - | IV | P | 0 | X | 12 | L524 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 12 |
| L348 | - | - | IV | P | 0 | 0 | 11 | L533 | - | - | IV | P | 0 | 13 | 11 |
| L402 | - | - | IV | P | 0 | 0 | 8 | L539 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 12 |
| L404 | - | - | IV | P | 0 | 0 | 7 | L540 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 10 |
| L412 | - | - | IV | P | 0 | 0 | 10 | L528 | - | <i>Lb. plantarum</i> | - | P | 0 | 11 | 12 |
| L413 | - | - | IV | P | 0 | 0 | 8 | L542 | - | - | IV | P | 0 | 13 | 12 |
| L418 | - | - | IV | P | 0 | 0 | 11 | L543 | <i>Lb. plantarum</i> | - | - | P | 0 | 12 | 12 |
| L420 | - | - | IV | P | 9 | 0 | 0 | L545 | - | - | - | P | 0 | 12 | 11 |
| L430 | - | - | IV | P | 0 | 0 | 8 | L548 | - | - | IV | P | 0 | 12.5 | 11 |
| M448 | - | - | IV | P | 0 | 0 | 9 | M109 | - | <i>P. pentosaceus</i> | - | ND | 8 | 0 | 11 |
| L505 | - | - | IV | F | 0 | 0 | 8 | M111 | - | <i>P. acidilactici</i> | - | ND | 7 | 0 | 12 |
| L525 | - | - | IV | F | 0 | 0 | 8 | L307 | - | - | IV | P | 8 | X | 9 |
| L527 | - | - | IV | F | 0 | 0 | 8 | L411 | - | - | IV | P | 9 | 0 | 10 |
| M505 | - | - | IV | F | 0 | 0 | 8 | M417 | - | - | IV | P | 11 | 0 | 9 |
| M529 | - | - | IV | F | 0 | 0 | 8 | M428 | - | - | IV | P | 10 | 0 | 10 |
| M530 | - | - | IV | F | 0 | 0 | 7 | L202 | - | - | IV | P | 8 | 13 | 12 |
| M536 | - | - | IV | F | 0 | 0 | 7 | L203 | - | - | IV | P | 8 | 12.5 | 11 |
| M545 | - | - | IV | F | 0 | 0 | 7 | L224 | - | - | IV | P | 8 | 13 | 11 |
| M546 | - | - | IV | F | 0 | 0 | 7 | L313 | - | - | IV | P | 8 | 10 | 12 |
| L245 | - | <i>P. pentosaceus</i> | - | ND | 8 | 11 | 0 | L314 | - | - | IV | P | 9 | 10 | 9 |
| L415 | - | - | IV | P | 10 | 9 | 0 | L321 | - | - | IV | P | 8 | 12 | 12 |

Table 3. Continued

| Strain No. | API50CHL | 16S rDNA | Multiplex PCR | | | Bactericidal activity (diameter, mm) | | | Strain No. Strain No. | API50CHL | 16S rDNA | Multiplex PCR | | Bactericidal activity (diameter, mm) | | |
|------------|---|------------------------|---------------|----|----|--------------------------------------|------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|----------|---------------|----|--------------------------------------|----|----|
| | | | G | P | IV | Sa ¹⁾ | Ps ²⁾ | Ba ³⁾ | | | | G | IV | Sa | Ps | Ba |
| M432 | - | - | IV | P | 11 | 11 | 0 | L322 | - | - | IV | P | 9 | 13 | 12 | |
| L115 | - | <i>P. acidilactici</i> | - | ND | 0 | 9 | 11 | L328 | <i>Lb. plantarum</i> | - | IV | - | 10 | 11 | 13 | |
| L146 | - | <i>P. acidilactici</i> | - | ND | 0 | 10 | 10 | L330 | - | - | IV | P | 8 | 10 | 12 | |
| L206 | - | - | IV | P | 0 | 13 | 13 | L331 | <i>Lb. plantarum</i> | - | IV | - | 10 | 11 | 12 | |
| L209 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 8 | L332 | - | - | IV | P | 9 | 10 | 12 | |
| L211 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 11 | M301 | - | - | IV | P | 8 | 10 | 9 | |
| L213 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 11 | M302 | - | - | IV | P | 8 | 8 | 10 | |
| L214 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 12 | M336 | - | - | IV | P | 10 | 12 | 11 | |
| L216 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 9 | M337 | - | <i>P. pentosaceus</i> | - | ND | 9 | 11 | 11 | |
| L222 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 11 | M338 | - | - | IV | P | 9 | 12 | 12 | |
| L238 | - | <i>P. pentosaceus</i> | - | ND | 0 | 14 | 10 | M339 | - | - | IV | P | 9 | 12.5 | 13 | |
| M223 | - | <i>P. acidilactici</i> | - | ND | 0 | 13 | 8 | L414 | - | - | IV | P | 9 | 9 | 8 | |
| L303 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 13 | L424 | - | - | IV | P | 9 | 9 | 10 | |
| L304 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 12 | L448 | - | - | IV | P | 11 | 11 | 9 | |
| L305 | - | - | IV | P | 0 | 13 | 12 | M403 | - | - | IV | P | 9 | 10.5 | 8 | |
| L306 | - | - | IV | P | 0 | 13 | 11 | M404 | - | - | IV | P | 9 | 11 | 11 | |
| L308 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 9 | M408 | - | - | IV | P | 11 | 11 | 9 | |
| L310 | - | - | IV | P | 0 | 12.5 | 11 | M409 | - | - | IV | P | 11 | 11 | 13 | |
| L316 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 9 | M412 | - | - | IV | P | 9 | 11 | 8 | |
| L317 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 11 | M413 | - | - | IV | P | 9 | 12 | 8 | |
| L318 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 9 | M414 | - | - | IV | P | 10 | 11 | 8 | |
| L311 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 8 | M415 | - | - | IV | P | 12 | 11 | 11 | |
| L323 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 8 | M416 | - | - | IV | P | 9 | 11 | 13 | |
| L324 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 8 | M418 | - | - | IV | P | 9 | 9 | 12 | |
| L325 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 12 | M425 | - | - | IV | P | 9 | 10.5 | 7 | |
| L326 | - | - | IV | P | 0 | 9.5 | 12 | M426 | - | - | IV | P | 10 | 11 | 11 | |
| L333 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 11 | M427 | - | - | IV | P | 10 | 11.5 | 12 | |
| L335 | - | - | IV | P | 0 | 10.5 | 11 | M429 | - | - | IV | P | 12 | 12 | 12 | |
| L336 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 13 | M430 | - | - | IV | P | 12 | 12 | 8 | |
| L337 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 13 | M431 | - | - | IV | P | 12 | 12 | 8 | |
| L338 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 13 | M434 | - | - | IV | P | 11 | 13 | 12 | |
| L340 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 11 | M435 | - | - | IV | P | 11 | 12 | 12 | |
| L341 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 12 | M436 | - | - | IV | P | 10 | 11 | 12 | |
| L342 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 11 | M437 | - | <i>P. pentosaceus</i> | IV | - | 11 | 9 | 10 | |
| L343 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 12 | M438 | - | - | IV | P | 12 | 11 | 11 | |
| L344 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 12 | L502 | - | <i>Lb. plantarum</i> | IV | P | 10 | 10 | 12 | |
| L345 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 12 | L504 | - | - | IV | P | 11 | 10.5 | 12 | |
| L346 | - | - | IV | P | 0 | 8 | 12 | L508 | - | - | IV | P | 10 | 11.5 | 11 | |
| L347 | - | - | IV | P | 0 | 9 | 13 | L509 | - | - | IV | P | 11 | 12 | 13 | |
| M303 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 10 | L510 | - | - | IV | P | 9 | 12 | 12 | |
| M304 | - | - | IV | P | 0 | 10 | 11 | L512 | - | - | IV | P | 12 | 11 | 11 | |
| M305 | <i>Lb. plantarum</i> | - | IV | - | 0 | 12 | 12 | L514 | - | - | IV | P | 10 | 13 | 11 | |
| M307 | <i>Lb. paracasei</i> or <i>plantarum</i> | - | IV | - | 0 | 12 | 12 | L526 | - | - | IV | P | 11 | 11.5 | 12 | |
| M309 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 12 | L529 | - | - | IV | P | 12 | 11 | 11 | |
| M310 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 11 | L530 | - | - | IV | P | 9 | 11 | 11 | |
| M313 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 12 | L531 | - | - | IV | P | 10 | 12 | 11 | |
| M314 | - | - | IV | P | 0 | 13 | 12 | L534 | - | - | IV | P | 9 | 13 | 12 | |
| M317 | <i>Lb. plantarum</i> | - | IV | - | 0 | 8 | 11 | L535 | - | - | IV | P | 9 | 13 | 12 | |
| M320 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 11 | L536 | - | - | IV | P | 10 | 12.5 | 12 | |
| M323 | - | - | IV | P | 0 | 11 | 12 | L537 | - | - | IV | P | 10 | 12 | 12 | |
| M325 | - | - | IV | P | 0 | 12.5 | 12 | L538 | <i>Lb. plantarum</i> | - | - | P | 10 | 12 | 12 | |
| M326 | - | - | IV | P | 0 | 12 | 11 | L541 | - | - | - | P | 9 | 13 | 11 | |

¹⁾*Salmonella enterica* serovar Thyphimurium, ²⁾*Pseudomonas aureuginosa*, ³⁾*Bacillus subtilis*, ⁴⁾No detectable multiplex PCR-G product, ⁵⁾No detectable multiplex PCR-IV product, ⁶⁾*Lactobacillus plantarum*, ⁷⁾*Lb. fermentum*, ⁸⁾Not tested.

86.1%, T index 평균 0.25를 보여 *Lactobacillus* 속으로 동정하였다. M311균주는 *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*에 대하여 %ID=71.9%, T index 평균 0.16를 보였다.

16S rDNA sequencing을 이용한 균주의 동정

Multiplex PCR에서 증폭 산물을 형성하지 않은 구균 혹은 구간균 17종을 선택하여 16S rDNA를 27F, 1492R primer를 사용하여 PCR로 증폭한 후 27F, 350F, 920R, 1492R primer를 사용하여 염기서열 중 일부를 결정하였다. 이들 primer 중 특히 1492R primer가 가장 좋은 결과를 보였으며 920R primer를 사용한 경우 대부분의 균주가 반응을 나타내지 않았는데, 이는 920R primer의 부착부위인 16S rDNA의 보존 서열에 primer 부착이 저해 될 정도의 변이가 있을 가능성을 나타낸다. 이렇게 얻어진 부분적인 16S rDNA 염기서열을 BLASTN program으로 데이터베이스와 비교한 결과 L210, L238, L245, M109, M120, M337, M437의 7균주가 *P. pentosaceus*와 99% 이상의 상동성을 나타냈으며, L101, L115, L145, L146, L147, M111, M223은 *P. acidilactici*와 99% 이상의 상동성을 나타냈고, L246, L502와 L528은 *Lb. plantarum*과 99% 이상의 상동성을 보였다.

김치에는 30종 이상의 유산균종이 보고되고 있다. 그 중에서 *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Ent. faecalis*, *Leu. mesenteroides*, *P. pentosaceus* 등이 우점종으로 알려지고 있다. 기존의 연구를 통하여 김치에서 박테리옌을 생산하는 *Ent. faecium*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. paramesenteroides*, *Lc. lactis*, *Lb. brevis* 등에 대해 보고가 된바 있다(17). 그러나 *Lb. fermentum*에서 박테리옌에 대한 연구는 매우 미비한 편이다. Yan과 Lee(18)는 *Lb. fermentum*에서 항균활성범위가 매우 좁은 박테리옌을 부분정제하고 fermenticin B로 명명하였다. 또한 Wells 등(19)은 소의 위에서 *Streptococcus bovis*에 대한 항균활성을 가지는 *Lb. fermentum*을 분리하여 보고하였다. Fazeli 등(20)은 이란의 전통빵의 제조에 사용되는 sourdough에서 곰팡이의 성장을 억제하여 유통기한을 연장할 수 있는 *Lb. fermentum*을 분리하여 보고하였다. 최근의 연구에 의하면 *Lb. fermentum*은 구강에서 충치균을 억제하는 것으로 나타났으며(21), 훈제연어에서 분리된 *Lb. fermentum*의 경우 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균활성과 함께 장상피세포에 대한 우수한 부착능을 보였다(22).

본 연구에서 분리된 *Lb. fermentum* 균주들은 *P. aeruginosa* 혹은 *B. subtilis*에만 활성을 나타내었다(Table 3). *Lb. fermentum*의 경우, *Lb. acidophilus*와 함께 인체 장내에서 probiotics로서의 활성이 보고되고 있어(23) 본 연구를 통해 분리한 균주들의 효율적인 활용을 위해서는 보다 광범위한 균주에 대한 활성 검사와 이들이 생산하는 박테리옌의 특성규명에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

요 약

항균활성을 나타내는 야생형 유산균을 분리·동정하기 위하여 김치에서 480종의 유산균을 분리하였으며, *S. enterica* serovar Typhimurium, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*에 대한 항균활성을 agar diffusion 법을 사용하여 검사하였다. 이들 중 항균활성을 나타내는 균주 340종에 대하여 multiplex PCR과 API 50CHL Kit을 이용한 생화학적 특성검사 및 16S rDNA sequencing을 통해 *Lb. plantarum* 169균주, *Lb. fermentum* 20균주, *Lb. paracasei* spp. *paracasei* 2균주, *Lactobacillus* 속 2균주와 *Pediococcus* 속 15균주를 동정하였다. 이들 균주 중 *Lb. fermentum*의 경우는 프로바이

오틱스로서의 활성이 보고되고 있는 균으로 추가적인 연구가 필요하다

감사의 글

이 논문은 2010년도 건국대학교 학술진흥연구비 및 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호:PJ008005) 지원에 의한 논문임

문 헌

- Sandine WE, Muralidhara KS, Elliker PR, England DC. Lactic acid bacteria in food and health: A review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *J. Milk Food Technol.* 35: 691-702 (1972)
- Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA. pp. 1209-1234 (1986)
- Gilliland SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 7: 175-188 (1990)
- Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG Vaccine 13: 310-312 (1995)
- Kitazawa H, Matsumura K, Itoh T, Yamaguchi T. Interferon induction in murine peritoneal macrophage by stimulation with *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol. Immunol.* 36: 311-315 (1992)
- Zheng HY, Alcorn TM, Cohen MS. Effects of H₂O₂-producing lactobacilli on *Neisseria gonorrhoeae* growth and catalase activity. *J. Infect. Dis.* 170: 1209-1215 (1994)
- Fernandes CF, Shahani KM, Amer MA. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Lett.* 46: 343-356 (1987)
- Orrhage K, Sillerström E, Gustafsson JA, Nord CE, Rafter J. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat. Res.* 311: 239-248 (1994)
- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-85 (1993)
- Kim SH. Screening and characterization of bacteriocin from *Lactococcus* sp. HY449. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* 12: 1-10 (1995)
- Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biot.* 68: 705-717 (2005)
- Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR. *Methods for general and molecular bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington DC, USA. pp. 31-32 (1994)
- Cowan ST, Steel KJ. *Manual for the identification of medical bacteria*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 147-161 (1974)
- MacFaddin JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Williams and Wilkins. Baltimore, MD, USA. pp. 345-370 (1980)
- Song Y, Kato N, Liu C, Matsumaya Y, Kato H, Watanabe K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiple PCR assays using group- and species-specific primers derived from 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 187: 167-173 (2000)
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703 (1991)
- Kwon DY, Koo MS, Ryoo CR, Kang CH, Min KH, Kim WJ. Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in kimchi and its characteristics. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 96-105 (2002)
- Yan TR, Lee CS. Characterization of a partially purified bacteriocin, Fermenticin B, from *Lactobacillus fermentum*. *Biotechnol. Lett.* 19: 741-744 (1997)
- Wells JE, Krause DO, Callaway TR, Russell JB. A bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus*

- bovis*. FEMS Microbiol. Ecol. 22: 237-243 (1997)
20. Fazeli MR, Shahveri AR, Sedaghat B, Jamalifar H, Samadi N. Sourdough-isolated *Lactobacillus fermentum* as a potent anti-mould preservative of a traditional Iranian bread. Eur. Food Res. Technol. 218: 554-556 (2004)
 21. Botina SG, Chervinets IuV, Klimina KM, Koroban NV, Chervinets VM, Gavrilova OA, Lebedev DV, Mironov Alu. Genetic identification of antagonistically active lactobacillus strains isolated from the oral cavity of healthy individuals. Klin. Lab. Diagn. 11: 43-46 (2010)
 22. Todorov SD, Furtado DN, Saad SM, Tome E, Franco BD. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. J. Appl. Microbiol. 110: 971-986 (2011)
 23. Pascual LM, Daniele MB, Giordano W, Pájaro MC, Barberis IL. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. Curr. Microbiol. 56: 397-402 (2008)