

김치에서 분리한 *Pediococcus*의 미생물 생육 저해

朴淵姬·曹道鉉

亞洲大學校 生物工學科

(1986년 5월 2일 수리)

Microbial Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from *Kimchi*

Yun-Hee Park and Do-Hyun Jo

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon, Korea

Abstract

Lactic acid bacteria isolated from *Kimchi* were tested for inhibitory activity against *E. coli*, *Streptococcus faecalis* and *Lactobacillus bulgaricus*. The inhibitory strains appeared most frequently around the middle stage of fermentation during two weeks of observation, and the majority of them were identified as *Pediococcus cerevisiae*. The agent(s) responsible for the inhibitory activity of *P. cerevisiae* was inactivated by heat treatment at moderate temperature, but resistant to proteolytic enzymes. The production of the inhibitory compound(s) decreased when the pH of the medium was maintained at about 7 with phosphate buffer.

서론

낙농발효에 관련된 젖산균이 다른 미생물의 생육을 저해한다는 사실은 이미 오래전부터 알려졌다¹⁾ 이와 같은 특성은 주로 *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* 등 병원성세균^{2,3,4,5,6)} 및 호냉성균에 대하여^{7,8,9)} 연구 보고되었다.

한편 Fleming등¹⁰⁾은 "cucumber brine"에서 분리한 *pediococcus spp.*가 *S. aureus*를 비롯한 수종의 gram⁺세균의 생육 저해작용을 나타내는 것을 밝혔으며 그 후 이와 같은 채소 발효에 관련된 젖산균의 작용을 냉장식품의 shelf-life 연장에 이용하려는 예가 많이 보고되었다. Gilliland¹¹⁾ 등은 *Pediococcus cerevisiae*가 냉장식품에서 호냉균의 생육을 억제시켰다고 보고하였으며 Racchach등¹²⁾과 Bartholomew등¹³⁾도 *P. cerevisiae*와 *Lactobacillus plantarum* 두 균주를 사용하여

냉장육류에서 호냉균 및 병원성 세균의 생육 억제효과가 있음을 보고하였다. 이와 같은 사실은 *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* 등 낙농 발효 젖산균 뿐만 아니라 채소류 발효의 젖산균도 유사한 작용을 가지고 있음을 보여주는 것으로 젖산발효식품인 김치를 주요부식으로 사용하고 있는 우리에게 큰 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 우리나라에서는 유산균발효음료에 사용하는 균주 *Lactobacillus casei*의 병원성 세균과 *E. coli*에 대한 생육억제 효과가 보고된 바 있으나^{14,15)} 그외의 젖산균의 작용에 대하여는 연구된 바 없었으므로 저자들은 김치에서 분리한 *P. cerevisiae*와 *Leuconostoc spp.*가 *E. coli*, *S. aureus* 등의 생육저해 작용이 있음을 보고한 바 있다.¹⁶⁾ 본 실험에서는 김치발효 중 생육저해능력이 있는 균주의 population의 변화를 조사하고 생육저해작용물질의 특성을 구명코자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

Lactic acid bacteria는 발효중인 김치에서 분리하였고 test organism으로 사용한 *E. coli* ATCC 10536과 *Lactobacillus bulgaricus* KFCC 21202는 “한국중균협회”에서 분양받았으며 *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* SKD 1007은 성균관대학교 낙농미생물 실험실로부터 분양받아 사용하였다.

2. 젖산균의 분리 동정

常法으로 담근 김치를 15°C에서 보관하면서 Rogosa agar¹⁷⁾를 사용하여 젖산균을 분리하였다. 분리한 균주는 trypticase soy (TS) broth¹⁸⁾를 사용하여 30°C에서 배양하였고 TS agar에 옮겨 배양후 4°C에서 보관하였다. 분리한 젖산균의 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology¹⁹⁾에 의하였다.

3. 젖산균의 screening

Fleming등¹⁰⁾에 의한 seeded agar screening technique을 사용하여 생육저해작용을 가진 젖산균을 screening하였다.

4. 생육저해작용에 미치는 영향조사

열처리 및 단백질 분해효소 처리 실험: 젖산균이 생성하는 생육저해 물질의 특성을 알아보기 위하여 열처리와 단백질분해효소의 작용을 Scherwitz 등²⁰⁾의 방법으로 실험하였다. 젖산균을 TS agar에 접종, 30°C에서 2일 배양후 배지를 뒤집어서 각각 처리하고 그 위에 trypticase soy soft agar¹⁰⁾에 접종한 test organism을 덮어서 배양후 생육저해 여부를 관찰하였다. 열처리는 50°C에서 70°C까지 10분부터 40분까지 처리하였으며 단백질분해효소는 효소액(1mg/ml의 농도로 0.1 M Sodium phosphate Buffer pH 7.0에 녹임) 0.5 ml를 뒤집은 agar 위에 가한뒤 37°C에서 1시간 처리하였다. 사용한 효소는 trypsin(from bovine pancreas, Calbiochem. Co.) alpha-chymotrypsin(Sigma Chemical Co.) pronase(Sigma Chemical Co.) pepsin(from hog stomach mucosa, Sigma Chemical Co.)이었다. 단, pepsin

은 다른 효소와 동일한 농도로 NaCl 0.2%와 K₂HPO₄ 0.25% 용액을 pH 2로 조절하여 사용하였다.

배지의 pH의 영향: TS agar를 각각 0.1M, 0.3 M, 0.5M, sodium phosphate buffer 용액(pH 7.0)을 사용하여 만들고 여기에 젖산균을 점종 배양하여 동일한 방법으로¹⁹⁾ 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 생육저해 균주의 screening

김치 발효중 측정된 젖산균 수의 증가와 총산도 pH의 변화는 Fig. 1과 같다. 젖산균의 수는 5일까지 증가한 후 약 3일간 균수의 증가가 거의 없다가 다시 증가 하였다. 이는 자연발효에서 볼 수 있는 젖산균 종류의 교대 현상에 의한 것으로 볼 수 있다. Fig. 1에서 나타나는 초기 젖산균 수의 증가하는 경향은 Etchells²¹⁾등이 “cucumber brine”의 자연 발효시 20°C에서 조사한 균수의 증가와 유사하게 나타났다. 한편 발효 기간중 분리한 젖산균중 생육 저해 작용이 있는 젖산균의 비율을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 총 젖산균중 생육 저해 균주의 비율은 발효 1일 후에는 *E. coli*와 *S. faecalis*에 대하여 각각 20%, 10% 정도를 보였으나 8일째에는 최후에 달하며 분리한 젖산균의 50%가 *E. coli*에 대하여 생육저해작용을 보였으며 *S. faecalis*에 대하여는 60% 이상의 균주가 생육저해 능력을 가지고 있었으며 이 비율은 시간이 경과함에 따라 감소하였다. 따라서 생육저해

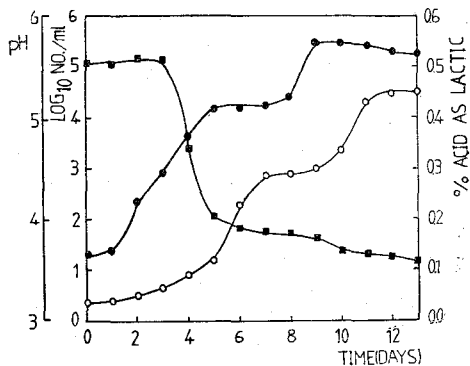


Fig. 1. Changes in the number of lactic acid bacteria (●), total acidity (○) and pH (■) during “Kimchi” fermentation at 15°C.

에 대한 안정성에 있어 상이한 결과를 보이는 여러 종류가 있음이 보고되었다. 즉 Reddy등²²⁾은 *L. bulgaricus*로 부터 열에 대하여 안정한 생육 저해물질인 bulgarican을 분리하였다고 보고 하였으며, Barefoot등²³⁾도 *L. acidophilus*에서 열에 안정하며 단백분해 효소의 작용을 받는 bacteriocin을 분리하였다. 또한 *Streptococcus lactis*도 열에 안정하고 단백분해 효소의 작용을 받아 생육저해 능력을 상실하는 bacteriocin을 생성한다고 보고하였다.^{20, 24)} 그러나 Davey등²⁵⁾은 *S. cremoris*에서 열에 불안정하고 단백분해 효소에 의해 생육 저해작용이 없어지는 물질을 얻었으며 Pinheiro등⁷⁾은 열에 대하여는 불안정하거나 단백분해 효소에 의해 아무 영향을 받지 않는 물질을 *S. citrovorus*와 *S. diacetylactis*에서 얻었다고 보고 하였다. 본 연구에서 조사한 *P. cerevisiae* B20에 의한 생육 저해작용은 열에 상당히 불안정한 반면 단백분해 효소에는 영향을 받지 않음으로 현재까지 알려진 것과는 다른 성분의 미생물 생육억제 물질을 생성하는 것으로 추측된다. 한편 B20의 생육저해 능력에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 phosphate buffer 용액으로 만든 T.S. agar를 사용하여 colony 부위의 pH의 저하를 감소 또는 방지했을 경우 대상 균주에 따라 차이가 있으나 대체적으로 buffer의 농도가 증가함에 따라 생육 저해효과가 감소되는 것으로 나타났다. B20을 보통 T.S. agar에 2일간 배양했을 경우 배지를 뒤집어서 측정할 colony 부위의 pH는 5.0~5.5로 저하 되었으나 0.5M phosphate buffer 용액 (pH 7.0)으로 만든 T.S. agar에 배양했을 경우는 초기 pH에서 변화가 없이 pH가 7이 유지되었다. 따라서 *S. faecalis*와 *L. bulgaricus*에 대한 생육저해능력이 phosphate buffer의 농도가 높아짐에 따라 감소하는 것은 배

지의 pH가 B20의 생육 저해물질의 생성에 영향을 미쳐 중성으로 될수록 생성되는 양이 감소하였다고 볼 수 있다. 이에 대하여는 윤¹⁵⁾등이 *L. casei*에서 배지의 pH를 달리했을 경우 낮은 pH에서 생육억제 물질의 생성이 더 많았다고 보고 하였다. 또한 B20을 보통 T.S. agar에 배양후 뒤집어서 0.5M phosphate buffer 용액 (pH 7.0)을 가하여 침윤시킨후 *E. coli* 등에 대하여 조사한 결과 생육 억제작용에 아무런 영향을 미치지 않았다. 따라서 배지의 pH는 B20의 생육 저해물질이 test organism에 대하여 작용하는데 영향을 주는 것 보다는 생성에 영향을 주었다고 볼 수 있다. 그러나 Table 2에서 보는 바와 같이 *E. coli*에 대하여는 phosphate buffer가 0.1M이상 포함되어 있을 경우 생육 저해효과가 나타나지 않은 것은 *E. coli*에서는 생육저해를 나타내는 threshold 농도가 다른 균주보다 높은 것으로 추측할 수 있으며 이는 *E. coli*가 gram \ominus 인점으로 미루어 다른 균주와는 sensitivity의 차이를 보이는 것으로 추측되나 이에 대하여 보다 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

초 록

김치 발효 경과에 따라 젖산균을 분리하여 *E. coli*와 *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus bulgaricus*에 대해 생육 저해능력이 있는 균주를 screening하였다. 젖산균중 생육 저해균의 비율을 조사한 결과 이들은 2주의 발효기간 중 중기에 가장 많이 나타났으며 대부분 *Pediococcus cerevisiae*로 동정되었다. 이 *P. cerevisiae*의 생육억제 작용은 열에 불안정하고 단백분해 효소의 작용을 받지 않는 물질에 의한 것이며 이 물질은 배지의 pH를 중성으로 유지했을때는 산성인 경우보다 생명이 저하되는 것으로 나타났다.

사 의

본 연구는 아주대학교 교내연구비(1983)로 수행하였으며 실험 끝까지 격려와 토론을 하여 주신 서울대학교 농과대학 김수일 박사에게 감사드립니다.

Table 2. Effect of the concentration of the phosphate buffer(pH 7.0) on the inhibitory activity of B20

Test organism	Normal TS agar	TS agar with phosphate buffer		
		0.1M	0.3M	0.5M
<i>E. coli</i>	##	--	--	--
<i>S. faecalis</i>	##	##	##	+
<i>L. bulgaricus</i>	##	##	--	--

참 고 문 헌

1. Whitehead, H.R. and Riddet, W.: N.Z.J. Agric., 46 : 225(1938).
2. Sorells, K.M. and Speck, M.L.: J. Dairy Sci., 53 : 239(1970).
3. Daly, C., Sandine, W.E. and Elliker, P.R.: J. Dairy. Sci., 54 : 755(1971).
4. Gilliland, S.E. and Speck, M.L.: J. Milk Food. Technol., 35 : 307(1972).
5. Haines, W.C. and Harmon, L.G.: Appl. Microbiol., 25 : 436(1973).
6. Mitchell, DE G. and Kenworthy, R.: J. Appl. Bacteriol., 41 : 163(1976).
7. Pinheiro, A.J.R., Liska, B.J. and Parmelee, C.E.: J. Dairy. Sci., 51 : 183(1968).
8. Juff, H.S. and Babel, F.J.: J. Dairy. Sci., 58 : 1612(1975).
9. Collins, E.B. and Aramaki, K.: J. Food Sci., 63 : 353(1980).
10. Fleming, H.P., Etchells, J.L. and Costilow, R.N.: Appl. Microbiol., 30 : 1040(1975).
11. Gilliland, S.E. and Speck, M.L.: J. Food Sci., 40 : 903(1975).
12. Racchach, M., Baker, R. C., Regenstein, J.M. and Mulnix, E.J.: J. Food Sci., 44 : 43(1979).
13. Bartholomew, D.T. and Blumer, T.N.: J. Food Sci., 45 : 420(1980).
14. 강국희, 이수원, 백영진, 강영찬, 윤영호, 김기원 : 한국축산학회지, 19 : 227(1977).
15. 윤영호, 윤배병, 김현욱 : 한국축산학회지, 23 : 213(1981).
16. 박연희, 권정주, 조도현, 김수일 : 한국농화학회지, 26 : 35(1983).
17. Hanigan, W.F. and McCance, M.E.: In "Laboratory methods in Food and Dairy Microbiology", Academic Press (1976).
18. American Public Health Association: In "Standard Methods for the examination of Water and Wastewater" 16th ed.(1985).
19. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: "Bergey's manual of determinative bacteriology", 8th edition, Williams Wilkins(1974).
20. Scherwitz, K.M., Baldwin, K.A. and McKay, L.L.: Appl. Environ. Microbiol., 45 : 1506(1983).
21. Etchells, J.L., Fleming, H. P. and Bell, T.A.: In "Lactic acid bacteria in Beverages and Food" 4th Long Ashton Symposium, Academic Press (1975).
22. Reddy, G.V., Shahani, K.M., Friend, B.A. and Chandan, R.C.: Cultured Dairy Prod. J., 18(5) : 15(1983).
23. Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R.: Appl. Environ. Microbiol., 45 : 1808(1983).
24. Kozak, W., Bardowski, J. and Dobranski, W.T.: J. Dairy Res., 45 : 247(1978).
25. Davey, G.P. and Richardson, B.C.: Appl. Environ. Microbiol., 41 : 84(1981).