

## Lactobacillus sp. GM7311에 의한 박테리오신의 생산 조건

이명숙 · 장동석\* · 강지희  
부경대학교 미생물학과, \*식품공학과

### Cultural Conditions of *Lactobacillus* sp. GM7311 for the Production of Bacteriocin

Myung Suk LEE, Dong Suck CHANG\* and Ji-Hee KANG

Dept. of Microbiology, \*Dept. of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

A lactic acid bacteria which showed antimicrobial activity was isolated from dairy products and identified as *Lactobacillus* sp. according to the morphological, physiological and biochemical properties, which was named *Lactobacillus* sp. GM 7311.

The bacteriocin of *Lactobacillus* sp. GM 7311 showed a broad range of inhibitory spectrum against some gram positive and negative bacteria. Especially, *Proteus mirabilis* was highly sensitive to bacteriocin and used as indicator strain for further investigation. The optimal condition for the production of bacteriocin was showed on MRS broth at 37°C and pH 6.0. Bacteriocin production of this strain cultured under optimal condition was increased late logarithmic phase to early stationary phase. This bacteriocin was fully active at the pH range 2.0~5.0, also was stable at 100°C for 60 min. at pH 5.0. But about 40% of bacteriocin activity was diminished by the treatment of acetone, ethanol, iso-butanol and ethyl ether during 2 hours at 4°C.

Key words : *Lactobacillus* sp. GM7311, bacteriocin, inhibitory spectrum

## 서 론

젖산균에 의한 길항작용은 그 대사산물에 존재하는 유기산, 과산화수소, diacetyl, 그리고 박테리오신 또는 박테리오신 유사물질 (bacteriocin like substance)에서 유래하고 있다 (Tramer and Fowler, 1964; Gilliland and Speck, 1977; Barefoot and Nattles, 1993). 박테리오신은 미생물이 생산하는 항균성 물질로서 젖산균에 의한 박테리오신의 생산은 1947년 *Lactococcus lactis*에서 처음 발견된 이래 현재까지 *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., 그리고 *Streptococcus* sp. 등에서 생산 분리된 박테리오신에 관한 연구가 꾸준히 발표되고 있다 (Tagg et al., 1975; Taraha et al., 1992; Skytte et al., 1993). 그중에서도 *L. lactis*가 생산한 nisin은 유럽 등에서 아질산을 대신하는 식품보존제로 통조림등에 사용이 되고있다 (Hurst, 1981; Kone and Fung, 1992).

어육 연제품은 서민들의 애호식품으로 연근해 어종을 이용한 냉동 연육을 이용하기 때문에 어민소득 증대에 크게 이바지하고 있는 식품이다. 그런데 어육 연제품은 그 특성상 100°C 이상의 고온살균 처리가 불가능하여 내열성 포자형성세균에 의한 부패를 방지하기가 어렵고 또한 제조 공정중에 오염된 곰팡이에 의한 변패도 큰 문제점으로 남아있다 (박 등, 1995; 相磯, 1976). 이로 인하

여 특히 하절기에는 생산제품의 10~20% 정도가 반품 또는 폐기되고 있어 연간 150억 원에 달하는 손실을 보고 있는 실정이다. 따라서 인체에 해가 없는 천연 보존료를 개발하면 연제품의 수명 연장과 동시에 소비자들의 욕구를 만족시킬 수 있는 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 젖산균이 생산하는 항균성 물질인 박테리오신을 검색하여 어육 연제품에 응용하기 위한 전 단계 실험으로 시판 발효 식품에서 분리한 젖산균의 박테리오신 생산성을 검토하여 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1) 젖산균의 분리 및 동정

시판 발효 유제품 (고형 요쿠르트 10종, 치즈 3종)과 김치 (5종)를 수집하여 잘 마쇄한 다음, 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup>까지 단계별로 희석하여 이들 각 0.1 ml를 MRS agar plate 에 도말하여 37°C에서 48~72시간 각각 호기, 혐기상태로 배양한 다음 형성된 집락을 형태별로 분리하여 MRS slant 에 배양 보관하였다. 분리 균주의 동정은 형태, 배양 특성과 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's manual of systematic bacteriology (Kandler and Weiss, 1986)와 The Prokaryotes (Hammes et al., 1994)에 준하여 동정하였다.

## 2) 조박테리오신의 생산

분리된 젖산균을 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양한 후 이를 원심분리 (4,000×g, 30분)한 다음, 상등액을 rotary evaporatory (EYELA N-1, Japan)로 초기량의 1/10으로 감압 농축하여 (55°C, 100 rpm) -80°C의 동결고 (RE-VCO, ULT 2586-7-D12)에 보관한 것을 조박테리오신으로 하여 실험에 사용하였다.

## 3) 항균력 측정방법

① Disk method (Sobrinho et al., 1992 ; Jepperson and Huss, 1993)

MRS broth에서 37°C, 24시간 전배양한 *P. mirabilis*를 10<sup>5</sup>/ml정도가 되도록 4 ml의 MRS agar (0.7% agar)에 접종한 후, 이를 MRS agar (1.5% agar)를 부어 굳힌 평판에 걸쳐 붓고 박테리오신 25 µl를 함유한 disk (ø8 mm, Toyo)를 평판위에 얹어 37°C에서 18시간 배양한 후 disk 주위에 형성된 저해환의 직경을 측정하였다.

② Microdilution method (Toba et al., 1991)

96 well microdilution plate를 이용하여 2진 희석한 박테리오신 100 µl에 *P. mirabilis*를 20 µl, 그리고 Tryptic Soy Broth (TSB) 80 µl를 넣어 37°C에서 6시간 배양한 후 ELISA reader (Bio-Tek, CERES UV 900C, Pharmacia)를 사용하여 620 nm에서의 OD값을 측정하였다. 박테리오신 시료액 대신 멸균 증류수를 사용한 것을 대조구로 하여 대조구의 1/2에 해당하는 흡광도를 나타내는 값에 희석 배수를 곱한 값을 bacteriocin unit (BU)로 표시하였다.

## 4) 박테리오신의 생성 최적조건 검토

시험균주의 배양조건과 배지조성에 따른 박테리오신의 생성 최적조건을 검토하기 위하여 MRS를 기본배지로, 배양조건 (온도, pH)과 배지조성 (탄소원, 질소원, NaCl, 무기염류, 그리고 비타민)을 변화시키면서 균의 증식에 따른 박테리오신의 생산성을 비교하였다. 이때 젖산균의 증식은 spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron Instruments)로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었고, 박테리오신의 항균력은 microdilution method로 측정하였다.

## 5) 박테리오신의 특성 조사

조박테리오신의 pH 안정성은 50 mM sodium acetate buffer (pH 2.0~5.0)와 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0~13.0)로 조정하여 각 pH에서 4°C, 24시간 방치 후 항균력을 측정하였다. 온도의 경우, 박테리오신을 pH 5.0의 50 mM sodium acetate buffer 또는 0.02N-HCl (pH 2.3)로 녹여 이를 60~121°C에서 일정시간 열처리한 후

잔존활성을 측정하였다. 그리고 유기용매에 대한 안정성은 박테리오신을 유기용매와 동량 혼합한 후 4°C에 1시간 방치 후 잔존활성을 측정하여 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 1) 젖산균의 분리 및 동정

발효제품에서 분리한 30균주를 대상으로 어육 연제품의 부패 원인균으로 널리 알려진 *Bacillus cereus*, *B. steothermophilus* (Frazier and Westhoff, 1988), 위생지표세균인 *Escherichia coli*, 그리고 저온성 식중독균인 *Listeria monocytogenes* 등의 4종의 시험균을 대상으로 disk method로 항균력을 측정한 결과 (결과 미제시), 4종의 젖산 분리균이 강한 항균력을 나타내었다. 이 4종의 유산균 대사산물을 이용하여 항균력을 실험한 결과를 Table 1에 나타내었다.

본 실험에서 사용된 4균주는 Gram 양성·음성균에 대하여 다양한 항균력을 나타내었으나 젖산균에는 항균력이 없는 것으로 나타났다. 시험 4균주중 A균주가 젖산균을 제외한 다른 세균에 대하여 골고루 항균력을 나타내고 있어, 이 균주를 공시균주로하여 다음 실험을 행하였다. 그리고 항균력 시험 지표균으로는 시험균주중 가장 박테리오신에 민감한 *Proteus mirabilis*를 사용하였다. 그러나, 곰팡이와 효모 그리고 세균포자에 대해서는 항균력을 나타내지 않았다.

지금까지의 발견된 젖산균 박테리오신 (*L. lactis*의 nisin, *Lb. sake*의 sakacin, *Streptococcus cremoris*의 diplococin)은 항균범위가 좁아 주로 Gram 양성균에만 항균력이 있는 것으로 나타났다 (Davey and Richardson, 1981; Scott and Taylor, 1981; Sobrinho et al., 1992). 그러나 최근 *Pediococcus*와 *Leuconostoc*이 생산한 박테리오신은 Gram 음성균에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Park and Jo, 1986). 이러한 결과로 미루어 젖산균종에 따라 박테리오신의 항균 활성은 차이가 있는 것으로 사료된다.

위의 A 공시균주를 MRS slant에 계대보관하면서 균의 형태적, 생화학적 실험을 한 결과, 이 균주는 비운동성으로 포자를 형성하지 않는 Gram 양성균의 통성 혐기성 균 (1×5~7µm)이었다. 그리고 catalase와 oxidase test는 음성이었고 glucose배지에서 산을 잘 생성하였고, 15°C에서 증식하여 gluconic acid 자화성이 있는 것으로 미루어 *Lactobacillus* sp.로 분류할 수 있었다 (Hammes et al., 1994). API 50CH kit를 사용하여 당발효 실험을 한 결과 *Lb. plantarium* ATCC 14917과 잘 일치하였으나 공시균

Table 1. Inhibitory spectrum of the culture supernatant from bacteriocin-producing strains

Indicator bacteria	A	B	C	D
<b>Gram Positive Bacteria</b>				
<i>Bacillus cereus</i> IAM 1110	18*	18	12	18
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 10149	18	13	12	17
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20	20	16	20
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	9	12	—	16
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043	18	14	—	18
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	—	—	12	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	—	—	14	—
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	23	18	17	22
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	23	20	16	19
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	24	17	20	25
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	16	18	18	18
<i>Pediococcus acidilactici</i> NCDO1895	—	—	14	—
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	14	13	10	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	15	12	11	11
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	—	—	15	—
<b>Gram Negative Bacteria</b>				
<i>Aeromonas sobria</i> ATCC 9071	21	19	—	18
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	16	20	—	18
<i>Escheria coli</i> ATCC 9001	23	18	10	20
<i>Klebsiella pneumonia</i> NCTC 5047	26	22	12	10
<i>Proteus mirabilis</i> NCTC 5887	32	13	10	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	26	16	—	17
<i>Proteus vulgaris</i> NCTC 4175	18	15	—	13
<i>Salmonella typhimurium</i> LMG 3266	20	13	10	15

\* diameter (mm) of clear zone with disk ( $\phi$ 8mm)  
 — ; no inhibition zones

주와는 L-arabinose, rhamnose 그리고 lactose 발효성의 차이가 있어 이를 *Lactobacillus* sp. GM 7311로 명명하여 실험에 사용하였다.

## 2) 대사산물 생성최적조건 검토

### ① 배양조건

배양시간에 따른 박테리오신의 생산성을 알아보기 위하여 공시균주를 MRS broth (pH 6.0)에 접종하여 37°C에서 일정 시간 배양하면서 균의 증식과 박테리오신 생성능을 실험한 결과 (Fig. 1), 대수증식기 초기에 박테리오신이 생성되기 시작하여 정상기 초기에 최대 (170 BU/ml)에 도달한 후 약간 감소하기 시작하였다.

배양온도의 영향은 MRS broth (pH 6.0)에 균을 접종하여 4~45°C로 조절된 배양기에서 24시간 배양하여 얻은 결과 (Table 2), 25~40°C범위에서 박테리오신이 생성되었으며 이 중에서도 37°C에서 가장 좋은 결과를 나타내었다.

그리고 초기 pH에 따른 박테리오신의 생성능을 실험한 결과 (Table 3), pH 5.5~6.5에서 생성되었고 그 중에

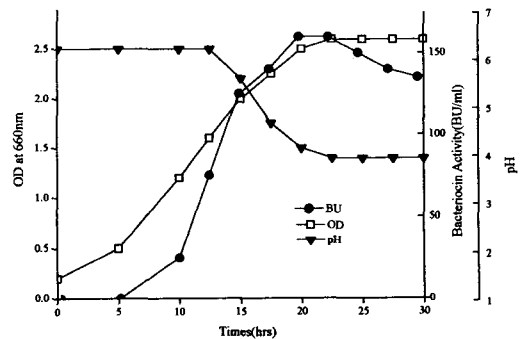


Fig. 1. Change of cell density and activity of bacteriocin produced from *Lactobacillus* sp. GM 7311.

서 pH 6.0에서 가장 우수하였다.

*L. acidophilus*는 대수증식기 초기부터 박테리오신이 생성되기 시작하여 대수기 중기와 후기에 최대에 도달한 후 정상기 이후부터 급속히 감소된다고 보고되고 있다 (Chung et al., 1989). 그리고 *Leuc. mesenteroides*에 의한

**Table 2. Effect of temperature on the production of bacteriocin by *Lactobacillus* sp. GM7311 incubated in MRS broth (pH 6.0) during 24 hrs**

Temp. (°C)	Final pH	OD at 660 nm	Bacteriocin activity (BU/ml)	Relative activity (%)
15	5.62	0.21	—	—
25	5.27	0.73	52	30.6
35	3.98	2.42	162	95.3
37	3.82	2.65	170	100.0
40	4.61	1.90	87	51.2

**Table 3. Effect of pH on the production of bacteriocin by *Lactobacillus* sp. GM7311 incubated in MRS broth during 24 hrs at 37°C**

Temp. (°C)	Final pH	OD at 660 nm	Bacteriocin activity (BU/ml)	Relative activity (%)
4.0	4.04	0.57	97	57.1
5.0	3.76	2.43	149	87.6
5.5	3.78	2.48	160	94.1
6.0	3.82	2.65	170	100.0
6.5	3.82	2.56	155	91.2
7.0	3.90	2.56	120	70.6
7.5	3.93	2.47	111	65.3
8.0	4.00	2.47	102	60.0

박테리오신의 생산 양상도 위의 결과와 비슷하였는데 이는 젖산균이 사멸하면서 생성된 단백질 분해효소의 작용에 기인하는 것으로 보고 (Daba et al., 1991) 하였다.

이상의 결과에서 젖산균 균종에 따른 박테리오신의 생산 조건은 약간씩 차이가 있었고, *Lactobacillus* sp. GM7311은 초기 pH 6.0으로 조절한 MRS broth에서 37°C에서 22~24시간 배양한 경우 박테리오신의 생성이 가장 좋았다.

② 배지조성

배지조성에 따른 박테리오신의 생산성을 알아보기 위하여 MRS broth를 기본배지로 하여 각종 영양원을 첨가하면서 실험하였다. 이때, 각각의 배지는 pH 6.0으로 조절하고 37°C에서 24시간 배양한 후 박테리오신의 생산성을 비교하였다.

먼저 MRS broth 중의 탄소원을 빼고 다른 탄소원을 2% 첨가하여 배양한 결과 (Table 4), glucose를 첨가했을 때 생산성이 가장 좋았고, 그 다음 maltose와 mannose 순으로 나타났다. 그래서 glucose와 maltose, mannose를 1%씩 혼합하여 실험하여 보았으나 상승효과는 볼 수 없었다. 그리고 glucose농도별로 실험한 결과, 2~3% 첨가시 효과가 비슷하게 나타나 (Table 5), 탄소원으로는 2% glucose가 가장 양호하였다.

**Table 4. Effect of carbon source on the production of bacteriocin by *Lactobacillus* sp. GM7311 incubated in MRS broth (pH 6.0) eliminated glucose at 37°C during 24 hrs**

Carbone	Final pH	OD at 660 nm	Bacteriocin activity (BU/ml)	Relative activity (%)
Glucose <sup>1</sup>	3.80	2.65	170	100.0
Maltose	3.81	2.75	153	90.2
Mannose	3.93	2.53	149	87.9
Galactose	4.15	2.24	129	76.1
Fructose	3.91	2.30	113	66.4
Sucrose	4.82	1.63	77	45.4
Xylose	5.19	0.53	49	29.0
Glucose + Maltose <sup>2</sup>	3.79	2.65	158	93.1
Glucose + Mannose	3.84	2.59	131	77.3
Maltose + Mannose	3.82	2.66	142	83.7

<sup>1</sup>concentration was 20 g/ℓ

<sup>2</sup>concentration of the mixed carbon source was 10 g + 10 g/ℓ

**Table 5. Effect of glucose concentration on the production of bacteriocin by *Lactobacillus* sp. GM7311 incubated in MRS broth (pH 6.0) eliminated glucose at 37°C during 24 hrs**

Concn (g/ℓ)	Final pH	OD at 660 nm	Bacteriocin activity (BU/ml)	Relative activity (%)
10	3.96	2.55	128	75.2
20	3.82	2.65	170	100.0
30	3.82	2.63	171	100.3
40	3.82	2.61	157	92.6
50	3.80	2.56	131	76.8

MRS broth에서 질소원 (peptone, yeast extract, beef extract, triammonium citrate)을 빼고 각종의 질소원을 2%가 되도록 첨가한 경우 (Table 6), 모두 MRS 배지보다 수율이 낮았고 다만 proteose peptone과 lab lemco powder가 80% 이상의 수율을 나타내어 무기 질소원에서는 균 증식과 박테리오신 생성이 거의 불가능한 것으로 나타났다.

MRS broth에 NaCl을 0~10%까지 단계별로 첨가하여 실험한 결과 (Table 7), 박테리오신 생성은 NaCl 0%에서 가장 좋았으나, 2% 이상에서는 급격히 감소되었으며, 4% 이상에서는 균의 증식과 박테리오신의 생성도 거의 나타나지 않음을 알 수 있었다. 그리고 MRS broth에 첨가되어 있는 5종의 무기염류를 하나씩 빼고 실험한 결과 (Table 8), MnSO<sub>4</sub>가 없는 경우 약 20%의 박테리오신 생성이 감소되었고, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>가 박테리오신 생성에 미치는 영향이 가장 적었다. 그리고 MRS broth에 각종 비타민

**Table 6. Effect of nitrogen source on the production of bacteriocin by *Lactobacillus* sp. GM7311 incubated in MRS broth (pH 6.0) eliminated yeast and beef extract, peptone and ammonium citrate at pH 6.0, 37°C during 24 hrs**

Nitrogen source	Final pH	OD at 660 nm	Bacteriocin activity (BU/ml)	Relative activity (%)
NH <sub>4</sub> Cl <sup>1</sup>	5.86	0.16	30	17.6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.62	0.17	29	17.1
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5.66	0.20	24	14.1
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.90	0.18	66	38.8
KNO <sub>3</sub>	5.87	0.17	22	12.9
Ammonium citrate	5.97	0.08	42	24.7
Proteose peptone	3.43	2.42	143	84.1
Lab lemco powder	3.57	2.36	138	81.2
Casein	5.87	0.43	28	16.5
Phytone peptone	3.71	1.69	108	63.4
Bacto beef extract	4.15	1.62	102	60.6
Bacto yeast extract	3.54	2.70	111	65.4
Urea	9.12	0.21	43	25.3
Proteose peptone+ Lablemco powder <sup>2</sup>	3.47	2.59	157	92.4
None	5.57	0.12	30	17.6
Control <sup>3</sup>	3.82	2.65	170	100

<sup>1</sup> concentration was 20 g/l

<sup>2</sup> concentration of the mixed nitrogen source was 10 g+10 g/l

<sup>3</sup> MRS broth

**Table 7. Effect of sodium chloride on the production of bacteriocin by *Lactobacillus* sp. GM 7311 incubated in MRS broth (pH 6.0) at 37°C, pH 6.0 during 24 hrs**

NaCl (g/l)	Final pH	OD at 660 nm	Bacteriocin activity (BU/ml)	Relative activity (%)
0	3.82	2.65	170	100.0
2	4.02	2.20	131	82.1
4	5.47	0.18	39	22.3
6	5.59	0.16	12	7.1
8	5.62	0.16	—	—
10	5.55	0.16	—	—

**Table 8. Effect of lack of inorganic salt from the MRS broth on the production of bacteriocin by *Lactobacillus* sp. GM7311**

Carbone source	Final pH	OD at 660 nm	Bacteriocin activity (BU/ml)	Relative activity (%)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.01	2.42	159	93.6
MgSO <sub>4</sub>	3.97	2.54	158	93.0
Sodium acetate	3.84	2.38	143	84.2
Ammonium citrate	4.26	1.93	141	82.9
MnSO <sub>4</sub>	4.32	1.90	138	81.4
Control*	3.82	2.65	170	100

\* MRS broth

을 1 ppm씩 첨가한 경우 (Table 9), 박테리오신의 생성은 전반적으로 감소되었고 특히 nicotinic acid와 inositol을 첨가한 경우 약 35% 정도 감소되었다.

김치에서 분리한 *Lactococcus* sp. JJ2001은 MRS broth에 4%의 NaCl을 첨가하여 25°C에서 배양한 경우 박테리오신의 생산성이 가장 우수하다고 보고하였으나 (Joh, 1996), 본 실험에 사용된 *Lactobacillus* sp. GM7311은 MRS broth 원래의 조성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

**Table 9. Effect of vitamins on the production of bacteriocin by *Lactobacillus* sp. GM7311**

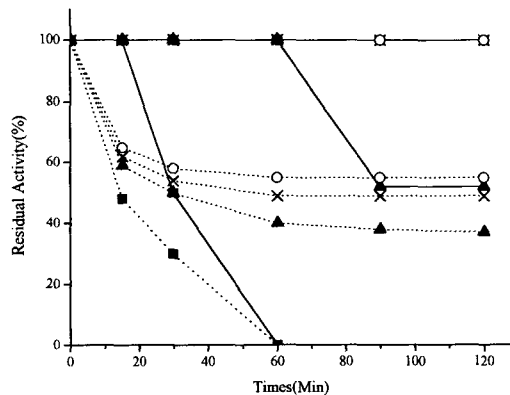
Vitamin	Final pH	OD at 660 nm	Bacteriocin activity (BU/ml)	Relative activity (%)
Folic acid	3.93	2.63	103	60.6
Thiamine	3.88	2.53	138	81.2
Nicotinic acid	3.88	2.61	102	60.0
Pyridoxine	3.88	2.58	120	70.6
Riboflavin	3.84	2.59	132	77.6
Biotin	3.84	2.62	135	79.4
Inositol	3.88	2.62	101	59.4
Control*	3.82	2.65	170	100

\* MRS broth

### 3) 박테리오신의 특성조사

#### ① pH 안정성

박테리오신의 pH 안정성을 상대 잔존활성으로 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. pH 5.0 이하에서 안정하였으나 pH 5.0 이상에서는 항균력이 급격히 감소하기 시작하여 pH 6.0에서는 잔존활성이 50% 정도였으며 알칼리 쪽으로 갈수록 항균력이 감소하였다.



**Fig. 2. Change of the activity of bacteriocin suspended in 0.02N HCl (pH 2.3, ...) and 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0, —) during heat treatment at different temperature (○, 60°C; ×, 80°C; △, 100°C; ■, 121°C).**

Streptocin (Tagg et al., 1976)의 경우 pH 2.0~6.5에서 안정하였고 알카리쪽에서는 불안정하였다고 보고하였으며, bulgarican의 경우 (Reddy et al., 1986), pH 6.0 이상에서는 항균력을 소실한다고 한다. 한편, pediocin SJ-1과 (Schved et al., 1993) casecin 80 (Rammelsberg and Radler, 1990)은 pH 3.0~9.0사이에서 안정하다고 보고한 것으로 미루어 박테리오신의 pH 안정성은 젖산균종에 따라 상당한 차이가 있는 것을 알 수 있었다.

② 온도 안정성

온도에 대한 안정성을 Fig. 3에 나타내었다. 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)의 경우, 60~80°C에서는 처리시간에 관계없이 안정하였고, 100°C의 경우 90분 이상, 121°C의 경우 30분 처리에 각각 50%의 활성이 소실되어 열에 상당히 안정한 것으로 나타났다. 그러나, 0.02N-HCl에 용해한 경우 60~100°C에서는 초기 15분 만에 40% 정도의 활성이 감소하였다가 그 이후는 서서히 감소하여 120분 동안 활성 변화가 거의 없었으나, 121°C에서는 초기 15분 가열에 50% 이상의 활성이 소실되었고, 그 후 지속적으로 감소하여 60분 가열에 활성이 완전히 소실되었다.

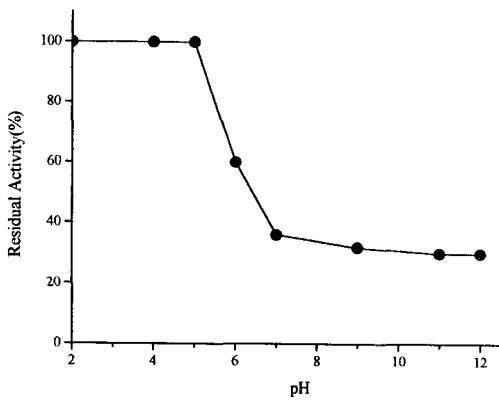


Fig. 3. Change of the activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp. GM7311 at various pH condition. (pH 2.0~5.0 ; 50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0~13.0 ; 50 mM sodium phosphate buffer)

지금까지 알려진 박테리오신의 열 안정성은 종류에 따라 차이가 커서 bulgaricin은 120°C 60분 처리에도 안정하였으며 (Reddy et al., 1986), bacteriocin S-50 (Kojic et al., 1991)은 100°C 60분에서 안정하였으나, helveticin V-1829 (Vaughan et al., 1992)와 lactacin F (Muriana and Klaenhammer, 1991)는 50°C에서 각각 20분과 30분만에

불활성된다고 보고되고 있다. 이상의 결과에서 본 시험균주가 생산한 박테리오신은 내열성이 상당히 강한 것을 알 수 있었다.

③ 유기용매의 영향

유기용매에 대한 안정성을 실험한 결과 (Table 10), acetone, ethanol, iso-butanol 그리고 ethyl ether에 의해서는 약 40%의 활성이 감소되었고 n-propanol과 methanol에 의해서는 약 60%의 활성이 감소하여 대체로 유기용매에 대해서는 안정성이 적은 것으로 나타났다.

Table 10. Effect of organic solvent on the activity of bacteriocin that produced by *Lactobacillus* sp. GM7311

Organic solvent	Bacteriocin activity (BU/ml)	Relative activity (%)
Acetone	106	62.4
Ethanol	108	63.5
n-Propanol	61	35.9
iso-Butanol	110	64.7
Ethyl Ether	113	66.5
Methanol	67	39.4

요 약

항균성 물질인 박테리오신을 생산하는 젖산균을 시판 유제품에서 분리하여 그의 형태적, 생리·생화학적 특성을 실험한 결과, *Lactobacillus* sp. 와 유사한 성질을 나타내어 이를 *Lactobacillus* sp. GM7311 로 명명하여 본 실험의 공시 균주로 사용하였다.

본 균이 생산한 박테리오신은 Gram 양성균과 음성균에 고른 항균력을 나타내었고 그중 *Proteus mirabilis*에 대해 강한 항균력을 나타내어 이를 항균 지표세균으로 선정하여 실험하였다. *Lactobacillus* sp. GM7311은 초기 pH를 6.0으로 조정한 MRS broth에서 37°C 배양한 경우가 박테리오신 생산 최적조건이었고, 이 조건에서 박테리오신은 대수기 말기부터 정상기 초기에 걸쳐 최대 생산되었고 그 이후에는 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 생산된 박테리오신의 활성은 산성측 (pH 2.0~5.0)에서는 안정하였으나, pH 6.0 이상에서는 활성이 급격히 감소되는 경향을 나타내었다. 열에 대한 안정성은, pH 5.0의 sodium acetate buffer에 녹인 박테리오신은 100°C에서 60분 가열에도 활성 변화가 없었으나, 0.02N-HCl (pH 2.3)에 녹인 박테리오신은 60~121°C의 가열로 초기 15분 동안 활성이 40~50% 정도 감소하였고, 그 이후 100°C 이하의 온도에서는 가열시간의 증가에도 활성 변화는 거의 나타나지 않았다. 그리고 유기용매에 대해서는 대체로 불완

정하여 acetone, ethanol, iso-butanol, 그리고 ethyl ether을 박테리옌과 동량 혼합하여 4°C에서 2시간 방치한 결과 초기 활성의 약 40%가 감소하였다.

## 사 사

본 연구의 일부는 1995년도 농림부 현장으로 기술개발 연구비의 지원에 의해 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Barefoot, S. F. and C. G. Nettles. 1993. Antibiosis revisited: Bacteriocin produced by dairy starter cultures. *J. dairy Sci.*, 76, 2366~2379.
- Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1808~1815.
- Chung, Y. G., J. Y. Ahn, O. J. Kwon and C. W. Kang. 1989. Properties of a *Lactobacillus acidophilus* Bacteriocin. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 17, 94~99.
- Daba, H., S. Pandian, J. F. Gosselien, R. E. Simard, J. Huang and C. Lacroix. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteriodes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3450~3455.
- Davey, G. P. and B. C. Richardson. 1981. Purification and some properties of diplococci from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 84~89.
- Frazier, W. C. and D. C. Westhoff. 1988. Contamination, Preservation, and spoilage of Fish and other Seafoods In *Food Microbiology*, McGraw-Hill, 4th ed., pp. 253~254.
- Gilliland, S. E. and M. L. Speck. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food Protec.*, 40, 820~823.
- Hammes, W. P., N. Weiss and W. Holzapfel. 1994. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* In *The Prokaryotes*. ed. by A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer. 2nd Ed., Springer-Verlag, pp.1535~1574.
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27, 85~123.
- Jepperson, V. F. and H. H. Huss. 1993. Characteristics and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products, *Inter. J. Food Microbiol.*, 18, 305~320.
- Joh, W. J. 1996. Study on bacteriocin produced by *Lactobacillus JJ2001*. Pusan National University, master Thesis,
- Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Regular nonsporing Gram-positive Rods, In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, ed. by J.G. Holt, P.A. Sneath, N.S. Mair and M.E. Sharpe. vol. 2, Williams & Wilkins, pp.1208~1234.
- Kojic, M., J. Svircevic, A. Banina and L. Topisirovic. 1991. Bacteriocin producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1835~1837.
- Kone, K. and D. Y. C. Fung. 1992. Understanding bacteriocins and their uses in foods. *Dairy Food and Environ. Sani.*, 12, 282~285.
- Muriana, P. M. and T. R. Klaenhammer. 1991. Purification and partial characterization of lacticin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 114~121.
- Nielson, J. W., J. S. Dickson and J. D. Crouse. 1990. Use of a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protec.*, 55, 497~502.
- Park, Y. H. and D. H. Jo. 1986. Microbial inhibition by isolate of *Pediococcus* from Kimchi. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 29, 207~211 (in Korean).
- Rammelsberg, M. and F. Radler. 1990. Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 177~184.
- Reddy, G. V., K. M. Shahani, B. A. Friend and R.C.Chandan. 1986. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. *Cult. Dairy Prod. J.*, 18, 15~19.
- Schved, F., A. Lalazar, Y. Henis and B. J. Juven. 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 67~77.
- Scott, V. N. and S. L. Taylor. 1981. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci.*, 46, 121~126.
- Skyttä, E., A. Haikara and T. Mattila-Sandholm. 1993. Production and characterization of antibacterial compounds produced by *Pediococcus damnosus* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 134~142.
- Sobrinho, O. J., J. M. Rodriguez, W. L. Moreira, L. M. Cintas, M. F. Fernandez, B. Sanz and P. E. Hernandez. 1992. Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Inter. J. Food Microbiol.*, 16, 215~225.
- Toba, T., S. K. Samant and T. Itoh. 1991. Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells. *Lett. Appl. microbiol.*, 13, 102~104.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker. 1975. Bacteriocin of a group B *Streptococcus*: Partial purification and characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7, 764~772.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40, 722~756.

- Tahara, T., K. Kanatani, K. Yoshida, H. Miura, M. Sakamoto and M. Oshimura. 1992. Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1212~1215.
- Tramer, J. and G. G. Flower. 1964. Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agric.*, 15, 522~528.
- Vaughan, E. E., C. Daly and G. F. Fitzgerald. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.*, 73, 299~308.
- 박영호, 김선봉, 장동석. 1995. 수산 가공 이용학, 형설출판사, 서울, pp. 833~836.
- 相磯和嘉. 1976. 食品微生物學. 醫齒藥出版柱式會社. 東京, 255pp.
- 
- 1997년 5월 2일 접수  
1997년 9월 4일 수리