

Lactobacillus brevis DK25의 박테리오신과 안식향산칼륨과의 혼용에 의한 Hurdle Technology 적용 가능성

임성미

동명대학교 식품공학과

Application Potential of Hurdle Technology by Combination of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus brevis* DK25 and Potassium Benzoate

Sung-Mee Lim

Department of Food Science & Technology, Tongmyong University, Busan 608-735, Republic of Korea

(Received October 31, 2011 / Accepted November 30, 2011)

Lactobacillus brevis DK25 isolated from *Dongchimi* was identified by physiological and biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis. Bacteriocin of *L. brevis* DK25 exhibits inhibitory activity against *Enterococcus faecalis* and *Listeria monocytogenes* when using agar well diffusion method. Maximal production of bacteriocin was reached in the beginning of the stationary phase, and inhibitory activity declined after the late stationary phase. This result suggested that bacteriocin was produced in a growth-associated manner. Complete inactivation of bacteriocin activity was observed after treatment with protease, but the activity was stable between pH 4-9 and heat resistant (30 min at 100°C). Bacteriocin showed a concentration-dependent antimicrobial activity against *L. monocytogenes* KCTC 3569. Moreover, the application experiment showed that combination of bacteriocin (320 AU/ml) with potassium benzoate (0.05%) could significantly reduce the counts of *L. monocytogenes* KCTC 3569 in mayonnaise during storage at 4 or 25°C for 10 days. Thus, bacteriocin from *L. brevis* DK25 may be used for hurdle technology by combination with potassium benzoate in order to increase pathogenic bacteria inactivation in food processing and food safety control.

Keywords: *Lactobacillus brevis*, *Listeria monocytogenes*, bacteriocin, potassium benzoate

지구온난화로 인하여 기온이 점점 상승하고 각 국가들간 국제 교역은 날로 활발해지며 단체급식이 확대 보급됨에 따라 전세계적으로 식중독 사고는 끊임없이 계속해서 발생하여 막대한 경제적 피해와 공중보건을 위협하고 있다. 1981년 캐나다 노바스코샤주에서 오염된 샐러드를 먹은 41명의 환자로부터 *Listeria monocytogenes*를 확인한 이후 해마다 리스테리아균에 의한 식중독 사고는 끊이지 않고 있으며 얼마 전 미국 보건당국의 발표에 따르면, 리스테리아균에 오염된 델론을 먹고 100여 명이 식중독에 걸렸고 이중에서 총 18명이 사망한 것으로 보고된 바 있다(33). 음식물을 통해 체내에 유입된 리스테리아균은 혈류를 따라 중추신경계 장애를 일으켜 설사, 발열, 근육통 및 두통을 동반하며 특히 임산부들에게는 유산이나 사산을 유발하고 신생아들에게는 뇌수막염을 일으킬 뿐

만 아니라 면역력이 약한 노인들과 에이즈나 암 환자, 알코올 중독자 및 면역억제제를 복용하는 장기 이식수술 환자들에게 위험성이 높은 것으로 알려져 있다(28). 리스테리아균은 저온 하에서도 증식이 가능한데 이는 세포막을 구성하는 지방산의 조성을 변화시켜 세포막의 유동성을 유리한 조건으로 만들고 저온에 강한 단백질(cold shock proteins, Csps)을 생산하며 glycine betaine 및 carnitine과 같은 동해방지물질을 생산하여 자신의 세포를 보호할 수 있기 때문이다. 한편 리스테리아균은 대식세포에 포식된 후에도 사멸되지 않을 뿐만 아니라 강산인 위액에도 견딜 수 있는 것으로 알려져 있는데 산성 영역에서 GroEL 단백질 및 ATP synthase와 glutamate decarboxylase 효소를 유도하고 pH 항상성 유지 능력이 있어서 생존 가능하며, GbuA 단백질을 유도하고 proline betaine, acetyl carnitine, γ -butyrobetaine 등의 삼투압 보호물질을 생산함으로써 높은 삼투압에서도 견딜 수 있고, penicillin이나

* For correspondence. E-mail: limsm020@tu.ac.kr; Tel.: +82-51-629-1714; Fax: +82-51-629-1309

tetracycline 등 다양한 항생제에 대해서도 강한 내성을 보이는 것으로 보고되고 있다(13).

주로 가공육, 훈연생선, 생야채, 사과주스, 우유, 치즈, 버터와 같은 유제품 등 다양한 식품에서 흔히 발견되므로 식품의 제조, 유통, 보관 및 조리 과정 중 각별한 주의가 필요하며, 학계나 식품 제조업체에서는 식품의 관능학적 및 영양학적 성분 변화없이 리스테리아균을 제어할 수 있는 식품 저장 기술 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(39). 식중독균의 오염으로부터 안전한 식품 제조를 위해 철저한 위해요소 분석 및 제품의 광범위한 미생물 조사, 식품제조 시설의 관리 감독 및 식품제조업자의 위생교육 강화 등의 위해요소중점관리기준(Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP) 제도 도입을 적극 권장하고 있다. 또한 미생물의 증식을 억제할 수 있는 다양한 방법을 여러 단계에 걸쳐 적용시킴으로써 식품의 변질을 방지하고 저장기간을 향상시키는 hurdle technology 적용에 관한 관심이 집중되고 있다(5). 최근 이 기술에 적용될 수 있는 hurdle로는 일부 세균들이 생산하는 단백질성 항균물질인 박테리오킨이 있으며, 이것은 병원성 세균에 대한 항균 작용이 뛰어날 뿐만 아니라 체내 소화효소에 의해 쉽게 분해되어 인체에 무해하며 식품 자체 고유의 성분 변화도 유발하지 않아 식품첨가물로서의 이용 가치가 높다. *L. monocytogenes* 세포에 박테리오킨(nisin)을 단독으로 처리한 경우 2 log cycle의 균수가 감소되었으며, 이를 이산화탄소와 혼합 처리했을 때에는 4 log cycle 이상 감소되어 항균효과가 크게 상승하였다(27). 또한 가열에 의해 *L. monocytogenes* 세포막의 유동성을 변화시킨 후 nisin을 처리한 경우 세포막이 완전히 파괴됨을 알 수 있었고(23), 가열 처리함으로 인해 식품의 성분 변화를 초래할 수 있는 난백이나 유제품의 경우에는 비가열처리 기술인 Pulsed Electric Fields (PEF)과 박테리오킨을 혼용했을 때 상승효과가 나타난 것으로 보고되었다(7). 게다가 그람 음성균에 대한 항균력이 다소 낮은 nisin은 2가 양이온 킬레이트제인 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)가 세포외막에 분포하는 lipopolysaccharide를 파괴함으로써 nisin이 세포막을 쉽게 투과할 수 있었다고 하였다(4). 이외에도 hurdle technology 적용을 위해 박테리오킨과 함께 고압이나 방사선처리, 수분활성도 조절, 산화환원전위 조절, 가스치환 혹은 저온저장법 등을 단계적으로 처리하여 식품의 신선도 유지, 미생물 세포 불활성화 및 교차오염을 방지시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(11, 12).

따라서 본 연구에서는 숙성된 동치미로부터 분리된 *Lactobacillus brevis* DK25가 생산하는 박테리오킨의 항균 스펙트럼과 물리화학적 안정성을 조사하고, 또한 박테리오킨과 화학합성품인 안식향산칼륨과의 혼합 처리가 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 증식에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

실험균주 배양조건

본 실험에 사용된 유산균은 가정에서 담귀 숙성시킨 동치

미를 무균적으로 수거하여 0.85% (w/v) NaCl 용액과 1:9의 비율로 혼합한 후 약 3분간 분쇄한 시료를 1% (w/v) CaCO₃이 첨가된 *Lactobacilli* MRS (Difco Co., USA) 평판배지 상에서 배양(37°C, 48시간)하여 집락 주위에 투명한 환을 생성한 DK25 균주를 분리하여 사용하였다. 분리된 균주를 MRS broth에서 배양(37°C, 24시간)하여 얻은 배양액을 20% glycerol과 1:1의 비율로 혼합하여 -80°C에서 보관하는 동안 실험에 사용하기 직전 MRS agar 사면배지에서 3회 계대 배양하여 사용하였다. 항균스펙트럼 측정에 사용된 *Bacillus subtilis* ACTCC 35421, *L. monocytogenes* KCTC 3569, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13480 및 *Salmonella enteritidis* ATCC 13076는 Brain Heart Infusion agar (BHI) (Difco Co.) 배지에서 배양하였다. 게다가 *Enterococcus faecalis* KCTC 3206, *L. brevis* KCTC 3102 및 *L. plantarum* KCTC 1048는 MRS agar 상에서 그리고 *Vibrio vulnificus* KCTC 2982는 Marine agar (Difco Co.) 배지에서 계대 배양하여 실험하였다.

생화학적 특성 및 염기서열 분석에 의한 동정

실험 균주 DK25의 형태학적 및 배양학적 특성은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (24)에 따라 그람염색, 향산성염색 및 포자염색, 편모, blood agar상에서의 용혈능, amylase, protease, catalase, oxidase, urease, 아미노산 탈탄산효소 등의 생성능, tryptophan 분해능, 생육 가능한 온도, pH 및 염농도 범위 등을 조사하였다. 게다가 API 50 CHL kit (bioMérieux, France)를 이용하여 당 분해능을 조사하였다. 한편, 염기서열 분석을 위해 16S rDNA는 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3')과 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR, Biorad Laboratories Ltd., Canada)로 증폭시켜 얻은 PCR 산물은 QIA quick PCR kit (QIAGEN, Germany)로 정제하고 Macrogen Co. (South Korea)사에 의뢰하여 DNA sequencing하였다. 염기서열은 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 database와 비교한 후 BLASTN program으로 상동성을 검색하였고, sequence alignment는 CLUSTER W 알고리즘으로 정렬한 후 MEGA 5.05 program으로 Neighbor-joining tree (Bootstrap method, Replication : 1,000)에 의해 계통도를 작성하여 유전적 유사성을 확인하여 동정하였다(19).

총산도 및 과산화수소 활성 측정

실험 균주를 MRS broth에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하는 동안 정해진 시간에 일정량의 배양액을 채취한 다음 원심분리(7,000×g, 4°C, 20분간)하여 회수한 상등액은 pH meter (Hanna Instruments, Sarmeola di Rubano, PD, Italy)로 pH를 측정하였다. 총산도는 Mante 등 (21)의 방법에 따라 배양액 (10 ml)에 증류수를 첨가해서 250 ml로 정용하고 난 후 여과(Whatman, No. 2)하여 0.1% 페놀프탈레인 지시약을 첨가한 다음 0.1 N NaOH로 적정해서 총산도를 측정하였다 (총산도 = {[0.009×NaOH 소비량(ml)×NaOH 역가×회석배수]/

시료의 무게(g)×100). 한편, Otero과 Nader-Macias (30)의 방법에 따라 과산화수소 활성을 측정하였는데 즉, 실험 균주를 1 mM 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB)와 2 U/ml peroxidase (Sigma-Aldrich)가 첨가된 MRS agar 평판배지에서 37°C, 혐기적인 조건(anoxomat system, MART, Netherlands)으로 48시간 배양한 후 20분 동안 공기 중에 산소와 접촉시킨 다음 집락의 색깔 변화를 조사하였다. 이때 청색(+++), 짙은 갈색(++), 옅은 갈색(+) 및 백색(-)으로 구분하여 활성을 측정하였다.

항균물질 제조

DK25 균주를 Lactobacilli MRS broth (10 ml)에 접종하여 37°C, 24시간 전 배양한 배양액 1.0% (v/v)을 MRS broth (1 L)에 접종하여 동일한 조건에서 본 배양한 다음 얻어진 배양액을 7,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 배양 상등액을 회수하였다. 유기산의 영향을 제거하기 위해 pH 7.0으로 조정 한 다음 황산암모늄(55%, w/v)을 첨가하여 4°C에서 overnight 교반하면서 단백질을 침전시켰다. 염석한 용액을 12,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리한 다음 얻어진 pellet은 20 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 6.0)로 용해시켜 황산염 제거를 위해 투석막(molecular weight cut-off: 500 Da, Spectrum Medical Industries Inc., USA)으로 4°C에서 6시간 동안 투석시켰다. 탈염된 용액은 과산화수소를 제거하기 위하여 catalase (1 mg/ml, Sigma-Aldrich)를 처리하여 25°C에서 30분간 반응시킨 후 80°C에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시켜 박테리오신 용액을 조제하였다.

한편, 안식향산칼륨(Sigma-Aldrich)은 물에 용해시켜 농도를 맞춘 다음 여과 제균(0.45 µm, Milipore Corp., USA) 하여 실험에 사용하였다.

박테리오신의 항균 스펙트럼

박테리오신 활성은 Parente 등(31)의 방법에 따라 agar well diffusion method를 일부 수정하여 측정하였다. 즉, *B. subtilis* ATCC 35421, *L. monocytogenes* KCTC 3569, *S. aureus* ATCC 6538, *E. aerogenes* ATCC 13480 및 *S. enteritidis* ATCC 13076는 BHI broth, *E. faecalis* KCTC 3206, *L. brevis* KCTC 3102 및 *L. plantarum* KCTC 1048는 MRS broth 및 *V. vulnificus* KCTC 2982는 Marine broth에 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하고 난 뒤 각각의 균수를 1.0×10^5 CFU/ml로 조정 한 다음 반고체 배지(agar 0.8%, w/v)에 접종한 후 평판배지 위에 증충하고 일정 시간 방치하여 응고시켰다. 응고된 평판배지 위에 well (Ø 8 mm)을 뚫어 단계적으로 희석한 박테리오신 용액 50 µl를 well 내에 주입한 후 37°C에서 24시간 배양한 다음 저해환을 생성하는 최대의 희석배수에 20을 곱하여 박테리오신 활성(arbitrary unit, AU/ml)을 측정하였다.

박테리오신의 안정성 조사

실험 균주가 생산한 박테리오신의 열에 대한 안정성을 조

사하기 위해 박테리오신 용액을 100°C에서 30분 및 121°C에서 15분간 각각 가열 처리한 후 대조구와의 활성과 비교하였다. 한편, pH에 대한 안정성을 살펴보기 위해 박테리오신 용액을 pH 4.0-10.0의 범위에서 1.0의 간격으로 조정하여 1시간 동안 반응시킨 후 다시 pH 7.0으로 되돌린 후 박테리오신의 활성 변화를 조사하였다. 또한 효소(Sigma-Aldrich)의 영향을 알아보기 위해 amylase는 50 mM sodium acetate (pH 6.0), trypsin은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), pepsin은 10 mM citrate (pH 2.0), protease는 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 및 lipase는 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)에 용해한 효소액(1 mg/ml)을 조제한 후 박테리오신 용액과 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 80°C에서 10분간 가열 처리하여 효소를 불활성화시켜 잔존하는 박테리오신의 활성을 측정하였다.

박테리오신의 분자량 측정

DK25 균주가 생산한 박테리오신의 분자량은 Laemmli (20)의 방법에 따라 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE)를 사용하여 측정하였다. 즉, 박테리오신 용액을 sample buffer와 동량 혼합하여 95°C에서 3분간 가열 처리한 후 protein marker (3.5-205 kDa, KOMA Biotech., Korea)와 함께 gel (Tris-Tricine SDS-PAGE)의 각 well 내에 loading한 다음 100V 전압 하에서 2시간 동안 전개시켰다. 전기영동 후 gel은 Coomassie brilliant blue R-250 (Tokyo Chemical Industry Co., Japan) 용액으로 2시간 동안 염색하고 난 다음 40% (v/v) 메탄올과 10% (v/v) 빙초산 혼합용액으로 탈색하고 나서 분자량을 측정하였다. 한편 20% (v/v) 이소프로판올과 10% (v/v) 빙초산 용액에 gel을 담궈 상온에서 2시간 고정시킨 후 탈이온수에 넣어 30분 마다 교체하면서 세척하였다. 세척된 gel은 *L. monocytogenes* KCTC 3569 (1.0×10^5 CFU/ml)가 접종된 BHI 평판배지 위에 올려 놓고 37°C에서 24시간 배양하여 항균 활성을 확인하였다.

혼합 배양 및 항균물질 농도에 따른 항균 효과

실험 균주와 *L. monocytogenes* KCTC 3569를 MRS와 BHI broth 각각의 배지에 37°C, 24시간 배양시킨 후 원심분리(7,000×g, 4°C 20분)하여 세포만을 회수한 다음 PBS로 2회 washing하였다. PBS에 현탁된 세포들의 균수를 각각 1.0×10^5 CFU/ml로 조정 한 다음 BHI broth에 접종하여 37°C에서 배양하는 동안 Oxford agar (Difco Co.)를 사용하여 표준한천평판배양법으로 *L. monocytogenes* KCTC 3569생균수를 측정함으로써 실험 균주와의 혼합배양에 의한 식중독균의 균수 변화를 조사하였다. 한편, 항균물질의 단독 및 혼합에 의한 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 증식에 미치는 영향을 살펴보기 위해 *L. monocytogenes*를 1.0×10^5 CFU/ml로 맞춘 후 BHI broth에 접종한 다음 실험 균주의 배양 상등액 50과 100 µl/ml, 박테리오신 용액 320과 640 AU/ml 및 안식향산칼륨 용액 0.05와 0.1% 각각을 단독으로 첨가하고, 또한 배양 상등액 50 µl/ml와 안식향산칼륨 용액 0.05% 및 박테리오신 용액 320 AU/ml 혹은 640 AU/ml와 안식향산칼륨 용액 0.05%를 혼합

첨가하여 30시간 배양하는 동안 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 균수 변화를 관찰하였다.

마요네즈에 박테리옌신과 안식향산칼륨 혼합 처리에 의한 저장 효과

샐러드 드레싱(마요네즈)에 실험 균주가 생산한 박테리옌신과 안식향산칼륨 용액을 첨가하여 저장하는 동안 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 균수 변화를 관찰하였다. 우선 얼음이 담긴 용기 내에 볼(bowl)을 넣고 계란 노른자에 머스타드를 혼합한 후 식용유를 소량씩 첨가하여 한쪽 방향으로 계속해서 저어주면서 마요네즈를 제조하였다. 여기에 *L. monocytogenes* KCTC 3569 (1.0×10^5 CFU/ml)를 접종하고 박테리옌신 용액 320 AU/ml 및 안식향산칼륨 용액 0.05%를 각각 단독 및 혼합 첨가하여 밀봉한 다음 4°C와 25°C의 온도대에서 저장하면서 2일 간격으로 시료를 채취하여 Oxford agar (Difco Co.) 배지에서 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 균수를 조사하였다.

통계처리

박테리옌신과 안식향산칼륨 처리에 의한 *L. monocytogenes*

KCTC 3569의 균수를 측정하여 얻은 실험값은 SPSS (version 12.0) 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석법 (one-way ANOVA)의 Duncan's test로 유의수준 $p < 0.05$ 에서 측정값들 간의 유의적인 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

실험 균주의 생화학적 특성 및 염기서열 분석

본 실험에 사용한 DK25 균주의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. DK25 균주는 그람양성 간균이며, 포자를 형성하지 않고, 항산성 염색결과 음성이며, 운동성이 없는 균이다. 포도당으로부터 산을 생성하며, 생성된 젖산의 이성질체는 DL형이고, 황화수소 생성능은 없고, 질산염 환원력도 나타내지 않았으며 포도당으로부터 acetoin 생성능도 없었다. Horse 혈액천배지 상에서 적혈구 용혈능은 보이지 않았고, amylase, protease 및 oxidase 등은 생성하였으나, catalase와 urease 생성능은 없었다. 또한 ornithine과 lysine는 가수분해할 수 있었으나, arginine 가수분해능은 나타내지 않았고, tryptophan으로부터 indole 생성능도 음성으로 나타났다. 호기적 및 혐기적 조건에서 모두 증식 가능하고

Table 1. Physiological and biological characteristics and pattern of carbohydrate fermentation of the *L. brevis* DK25

Contents	Results	Sugar	Results	Sugar	Results
Cell shape	Rod	Glycerol	-	Salicine	-
Gram staining	+	Erythritol	-	Cellobiose	-
Spores staining	-	D-Arabinose	-	Maltose	+
Acid-fast staining	-	L-Arabinose	+	Lactose	-
Motility	-	Ribose	+	Melibiose	+
Gas from glucose	+	D-Xylose	+	Saccharose	-
H ₂ S production	-	L-Xylose	-	Trehalose	-
Isomer of lactic acid	DL	Adonitol	-	Inuline	-
Nitrate reduction	-	β-Methyl-xyloside	+	Melezitose	-
Methyl red	+	Galactose	+	D-Raffinose	-
Voges-Proskauer	-	D-Glucose	+	Amidon	-
Horse blood hemolysis	-	D-Fructose	+	Glycogene	-
Amylase	+	D-Mannose	-	Xylitol	-
Protease	+	L-Sorbose	-	β-Gentiobiose	-
Catalase	-	Rhamnose	-	D-Turanose	-
Oxidase	+	Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Urease	-	Inositol	-	D-Tagatose	-
Arginine hydrolysis	-	Mannitol	+	D-Fucose	-
Ornithine hydrolysis	+	Sorbitol	-	L-Fucose	-
Lysine hydrolysis	+	α-Methyl-D-Mannoside	-	D-Arabitol	-
Indole production	-	α-Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
Growth in aerobic and anaerobic condition	+	N-Acetyl glucosamine	+	Gluconate	-
Growth at 10-45°C	+	Amygdaline	-	2-ceto-gluconate	-
Growth at pH 4.0-10.0	+	Arbutine	-	5-ceto-gluconate	-
Growth in 0-10% NaCl	+	Esculine	-		
20% NaCl	-				

+, positive reaction; -, negative reaction; DL, configuration of lactic acid produced from glucose.

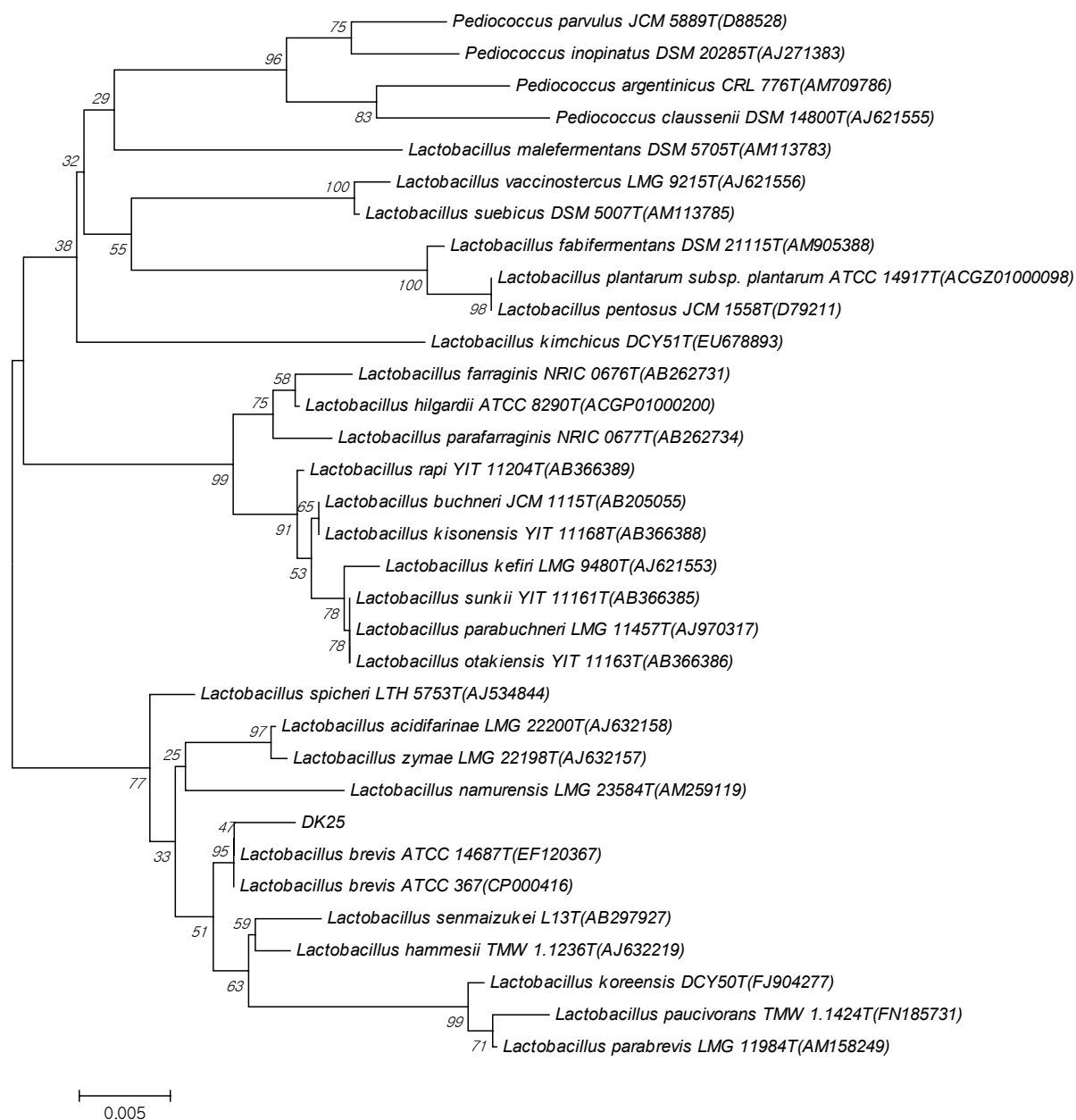


Fig. 1. Neighbor-joining tree based on 16S rDNA gene sequences, showing relationships between DK25 and the strains having high homogeneity with the selected bacteria. Bar, 0.005 nucleotide substitutions per position.

10-45°C와 pH 4.0-10.0 및 염 농도 0-10% 범위에서도 성장 가능하였으나, 20%의 식염 존재 하에서는 증식이 불가능하였다. 게다가 API kit를 이용한 당 분해능을 조사한 결과, L-arabinose, ribose, D-xylose, β -methyl-xyloside, galactose, D-glucose, D-fructose, mannitol, α -methyl-D-glucoside, N-acetyl glucosamine, maltose 및 melibiose 등의 당을 발효할 수 있었던 반면, 그 외에 D-arabinose, D-mannose, rhamnose, inositol, sorbitol, amygdaline, esculine, cellobiose, saccharose 및 inuline 등의 당은 분해할 수 없었다. 이와 같은 당분해능 결과 DK25 균주는 *L. brevis*와 99.9% 일치하였고 이때 T-index

는 0.62로 나타났다. 한편, DK25의 16S rDNA 염기서열 분석 결과는 Fig. 1과 같다. Neighbor-joining tree에 의해 계통도를 작성하여 유전적 유사성을 확인했을 때 *L. brevis* ATCC 14687^T와 98.7% 상동성을 나타내었다.

Ha 등(14)의 보고에 따르면, 김치로부터 분리한 *L. brevis* DU0241과 0242 균주의 배양학적 특성 결과, *L. brevis* DK25 균주와는 달리 esculine 분해능이 있었으며 45°C에서는 증식이 불가능 하였지만, 그 외의 효소 생성능, 가수분해능 및 증식 가능한 온도, pH, 염농도 범위 등은 거의 유사한 것으로 나타났다. 또한 Kang과 Kim (18)도 동치미로부터 분리된

Table 2. Antimicrobial spectrum of the bacteriocin produced by strain *L. brevis* DK25 against some strains

Indicator strains	Incubation temperature (°C)	Medium	Bacteriocin activity (AU/ml)
<i>B. subtilis</i> ATCC 35421	37	BHI	ND
<i>L. monocytogenes</i> KCTC 3569	37	BHI	1,280
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	37	BHI	ND
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13480	37	BHI	ND
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	37	BHI	ND
<i>E. faecalis</i> KCTC 3206	37	MRS	320
<i>L. brevis</i> KCTC 3102	37	MRS	ND
<i>L. plantarum</i> KCTC 1048	37	MRS	ND
<i>V. vulnificus</i> KCTC 2982	37	MA	ND

BHI, Brain Heart Infusion agar; MRS, Lactobacilli MRS agar; MA, Marine agar.

Bacteriocin activity was estimated by agar well diffusion method.

ND; not detected.

DF01 균주를 API 50 CHL kit에 의한 당 분해능을 조사한 결과 99.4%의 상동성을 나타낸 *L. brevis* DF01로 확인하였고, 16S rRNA 염기서열 분석으로 동정하여 보고한 바 있다. *L. brevis*는 김치 후발효에 관여하는 hetero형 유산균으로써 체내 위산이나 담즙산에도 생존율이 높고 장관 상피세포에 부착하여 장 기능을 향상시키며 면역기능 증진에도 도움을 주는 것으로 알려져 있고, 또한 항균물질 생산에 의하여 *B. cereus*와 같은 식중독균이나 진균독(mycotoxin)을 생성하는 곰팡이에 대한 항균효과도 보고되고 있으며, vancomycin과 같은 항생제에 대한 저항성도 높은 것으로 확인되어 probiotic strain (생균제)로서의 이용 가능성이 높다고 보고되고 있다(22, 34, 40).

박테리오킨 활성 및 항균 스펙트럼

L. brevis DK25 균주의 배양 상등액으로부터 제조한 박테리오킨 용액의 항균활성과 항균 스펙트럼을 agar well diffusion method에 따라 측정한 결과는 Table 2와 같다. *L. brevis* DK25가 생산한 박테리오킨의 항균활성은 *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. aerogenes*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *S. enteritidis* 및 *V. vulnificus*에 대해서는 전혀 나타나지 않은 반면, *E. faecalis*에 대한 항균 활성은 320 AU/ml로 나타났고, *L. monocytogenes* KCTC 3569에 대해서는 이 보다 더 높은 항균활성(1,280 AU/ml)을 나타내었다. 따라서 *L. brevis* DK25의 박테리오킨은 일부 특정한 균에 대해서만 항균 효과를 보여 항균 스펙트럼은 비교적 좁은 범위로 나타났다.

Kang과 Kim (18)이 보고한 *L. brevis* DF01의 박테리오킨은 *L. curvatus* KFRI 166, *P. acidilactici* IFO 3884, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *S. enteritidis* KCCM 12021, *S. typhimurium* KCTC 1925, *Shigella flexneri* ATCC 12022 및 *S. mutans* ATCC 25175 등 그람양성균 뿐만 아니라 그람음성균에 대해 광범위한 항균 스펙트럼을 나타내어 본 결과와는 다소 차이가 있었다. 하지만 Ha 등(14)이 보고한 *L. brevis* DU0241과 0242의 박테리오킨은 *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. 및 *Leuconostoc* spp. 등의 유산균에 대해서만 항균 효과를 나타내었다.

박테리오킨의 항균 스펙트럼은 균종에 따라 큰 차이가 있는데 대표적인 박테리오킨인 nisin은 staphylococci, streptococci, bacilli, clostridia 및 mycobacteria 등에 항균효과를 나타내고, pedocin AcH도 많은 그람양성균에 대해 넓은 범위의 항균력을 나타내었으나, lactococcin A는 *L. lactis* 등 일부 세균에만 작용하는 것으로 알려져 있다(15). 또한 항진균 활성을 가지는 *L. lactis* subsp. *lactis*의 박테리오킨도 보고되고 있으며, 이들 유산균은 세포에 곰팡이의 독소를 부착시켜 aflatoxin의 활성을 억제시키는 효과도 알려져 있다(36). 박테리오킨 생산균들은 박테리오킨에 대한 특이적 면역 단백질(Lan I) 덕분에 세포에 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있고, 일반적으로 그람음성균은 그람양성균과는 달리 세포벽과 세포막의 구조에 의해 박테리오킨에 대한 방어력이 커서 저항성이 더 높은 것으로 보고되고 있다(15).

L. brevis DK25가 생산한 박테리오킨의 특성

L. brevis DK25가 생산한 박테리오킨의 가열, pH 및 효소에 대한 안정성을 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다. 박테리오킨을 100°C에서 30분간 가열 처리한 후 *L. monocytogenes* KCTC 3569에 대한 항균활성을 측정했을 때 대조구와 같은 수준을 유지하였으나, 121°C에서 15분간 가열한 경우에는 87.5%의 활성이 감소되어 160 AU/ml의 값을 나타내었다. 한편, pH 4-9의 범위에서도 활성에 변함에 없었으나, pH 10에서 *L. brevis* DK25의 박테리오킨 활성은 절반으로 감소되었다. 또한 amylase, pepsin 및 lipase 처리에 대해서는 활성에 영향을 받지 않았으나, trypsin에 의해선 75% 감소되었고 protease 처리에 의해서는 활성이 완전히 소실되었다. 따라서 *L. brevis* DK25의 박테리오킨은 일반적인 가열 처리 공정이나 산성식품 등 광범위하게 이용될 수 있을 것으로 사료되며, 특히 pepsin에 대해선 안정하여 위장을 통과하는 동안에도 영향을 받지 않고 소장에도 도달하면 trypsin의 작용에 의해 분해되어 체내에 잔류하지 않을 것으로 여겨진다. 한편, *L. brevis* DK25 균주가 생산한 박테리오킨의 분자량을 측정한 결과 약 9.4 kDa으로 확인되었다(Fig. 3).

Batish 등(3)은 유산균이 생산한 박테리오킨은 proteinase

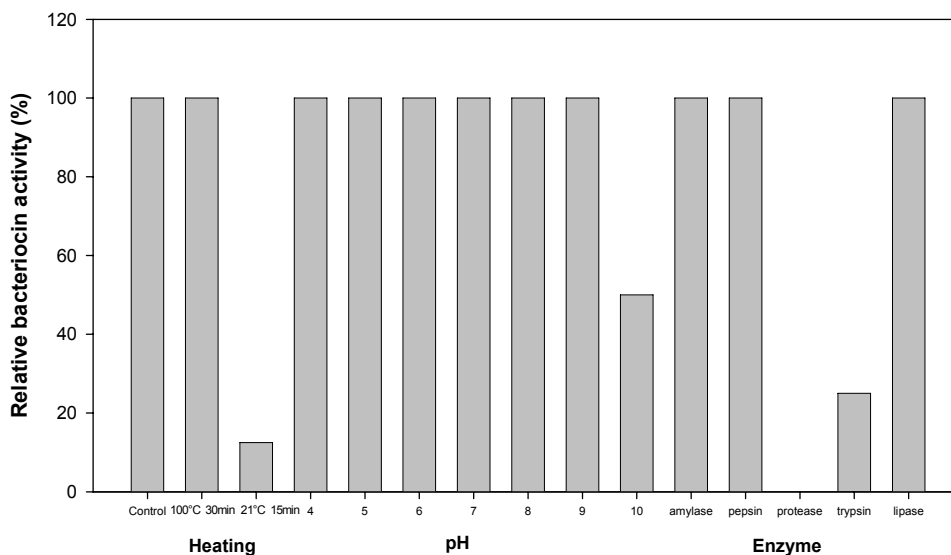


Fig. 2. Stability of bacteriocin isolated from *L. brevis* DK25 against enzyme, heat, and pH conditions.

처리에 의해 항균활성이 완전히 사라져 이는 단백질성 물질임을 확인하였다. *L. lactis* JW3이 생산한 박테리오킨은 protease I, protease IX, protease XII, α -chymotrypsin, β -chymotrypsin, trypsin 및 pepsin 등의 단백질 분해효소에 대해선 전혀 영향을 받지 않았으나, protease IV에 의해선 활성이 완전히 파괴되었고 특이하게도 α -amylase에 의해서도 항균 활성이 일부 소실되어 단백질과 일부 당으로 구성된 박테리오킨임을 확인하였다. 그리고 121°C에서 15분간 가열 처리에도 일부의

활성이 유지되었는데 박테리오킨의 열에 대한 안정성은 크기가 작은 구형 단백질의 형성, 강한 소수성 영역의 존재, 안정한 교차결합 및 높은 glycine 함유량에 기인하는 것으로 보고되고 있다(17). 그리고 *L. brevis* DF01의 박테리오킨은 α -chymotrypsin, pronase E, proteinase K, trypsin 등에 의해 활성을 잃었으나, pH 2-12의 범위와 121°C에서 15분간의 가열 처리에도 활성은 그대로 유지하였다. 또한 이 박테리오킨의 분자량 크기는 8.2 kDa으로 나타나 본 실험의 *L. brevis* DK25가 생산한 박테리오킨과는 분자량의 크기와 물리화학적 처리에 대한 안정성이 다소 다른 것으로 나타났다(18).

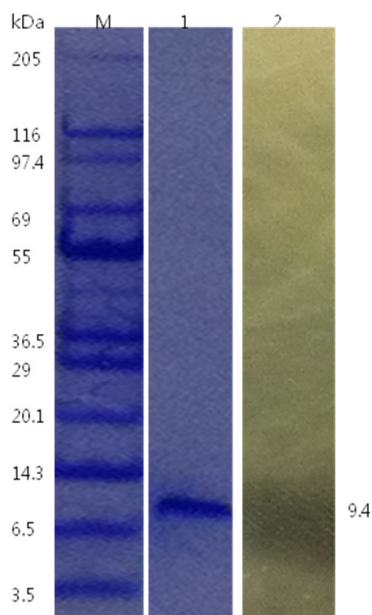


Fig. 3. Tris-Tricine SDS-PAGE of the partially purified bacteriocin from *L. brevis* DK25. Lanes: 1, molecular weight markers; 2, the bacteriocin of *L. brevis* DK25; 3, gel overlaid with a lawn of *L. monocytogenes* KCTC 3569.

배양시간에 따른 *L. brevis* DK25가 생산한 항균물질

MRS broth 배지 내에서 30시간 배양하는 동안 *L. brevis* DK25가 생산한 항균물질의 종류와 활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. *L. brevis* DK25 균주의 배양액 pH는 시간이 지남에 따라 감소된 반면 총 산도의 양은 비례적으로 증가하여 배양 30시간 만에 $1.07 \pm 0.08\%$ 를 나타내었는데 이는 유기산 생성에 의한 것이다. 한편, 박테리오킨의 활성도 대수기에 나타나기 시작하여 배양 시간이 지날수록 급격하게 증가하여 18-24시간 동안 최대의 활성을 나타내었다. 하지만 정지기 이후에는 자가용해효소 작용에 의한 박테리오킨의 분해로 인하여 항균활성은 다시 급격하게 저하되었다. 그리고 *L. brevis* DK25 균주는 과산화수소를 생성하지 않는 것으로 확인되었다(자료 미제시).

Kang과 Kim (18)의 보고에 따르면, 동치미에서 분리한 *L. brevis* DF01은 MRS broth에서 37°C, 34시간 배양하는 동안 초기 균수 8×10^6 CFU/ml에서 2×10^9 CFU/ml로 증가하였고, pH는 6.29에서 4.30으로 감소하였으며, 박테리오킨 활성은 초기 대수 증식기 즉 배양 4시간째부터 생성되기 시작하여 대수 증식기 후반에 최대의 활성(640 AU/ml)를 보였고 정지기 동

안 일정한 박테리오킨 활성을 계속 유지하였다고 하여 *L. brevis* DK25의 배양액 특성과 박테리오킨 활성에 다소 차이가 있음을 알 수 있었다. 하지만 *L. mesenteroides* KCCM 11324에 대한 항균 효과를 나타내는 *L. lactis* JW3이 생산한 박테리오킨은 정지기 초기에 최대의 활성에 도달한 후 정지기 후반 이후에는 활성이 급격하게 감소되었다 하여 본 결과와 유사하였으며, 이는 세포의 단백질 분해효소 등 저해제의 작용에 의해 분해되거나, 세포 표면에 박테리오킨을 흡착시키거나 혹은 기타 세포의 대사산물과 복합체를 형성함으로써 불활성화 되는 것으로 보고되었다(17).

유산균은 유기산, diacetyl, acetoin, 과산화수소 및 박테리오킨 등 매우 다양한 항균물질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 유기산은 대표적인 유산균의 대사산물로서 pH를 감소시켜 많은 미생물의 증식을 억제하는데 비해리된 산은 소수성으로 세포막 내로 확산되어 세포 내부를 분리시키고 H⁺이온을 증가시켜 세포막을 산성화시킬 뿐만 아니라 전기 화학적 양성자 구배를 붕괴시켜 세포를 죽게 만든다. 특히, 이상발효형 젖산균이 생산하는 acetic acid나 propionic acid는 pKa가 높아서 비해리성 산의 비율이 더 높은 것으로 알려져 있다(36). *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*가 생산한 유기산에 의해 *S. aureus*의 군수는 99% 이상 감소되었다(9). 한편 유산균들은 flavoprotein oxidase를 가지고 있어서 산소 존재하에서 과산화수소를 생산하는데 대부분의 유산균들은 catalase를 생산하지 않으므로 과산화수소가 분해되지 않고 축적됨으로서 다른 세포들에게 강력한 산화작용을 유발하고 세포 단백질의 분자적 구조를 파괴시켜 항균효과를 발휘한다(8). Nisin, subtilin, epidermin, gallidermin 및 SA-FE22와 같은 lantibiotic 박테리오킨은 에너지를 변환하는 세포막에 주로 작용하여 생합성 과정을 수행하는데 필요한 에너지를 고갈시키고, DNA,

RNA, 단백질 및 다당류의 생합성을 저지하거나, 세포막에 구멍을 뚫어 ATP를 유출시켜 세포를 사멸시킨다(35). 한편, lanthionine을 함유하지 않는 박테리오킨인 pediocin PA-1이나 lactacin F는 세포막의 침투력을 증가시켜 세포 내로 저분자 화합물을 유입시키고 아미노산, K⁺이나 *o*-nitrophenol과 같은 UV 흡수 물질들을 유출시키며 양성자구동력(proton motive force, PMF)을 소멸시켜 결국 세포를 죽게 만든다(15).

L. brevis DK25의 박테리오킨과 안식향산칼륨 처리에 의한 항균 효과

L. monocytogenes KCTC 3569와 *L. brevis* DK25를 BHI broth에 접종하여 37°C에서 30시간 동안 혼합 배양하는 과정에서 *L. monocytogenes*의 군수 변화를 관찰하였고, 아울러 *L. brevis* DK25의 배양 상등액(50과 100 µl/ml)과 박테리오킨 용액(320과 640 AU/ml), 안식향산칼륨 용액(0.05와 0.1%)의 단독 및 이들의 혼합 처리에 의한 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 항균효과를 살펴본 결과는 Table 3과 같다. *L. brevis* DK25와 혼합 배양할 때 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 초기 군수는 점진적으로 감소하여 24시간 후 초기군수에 비해 약 2 log cycle 정도 감소되었는데 이는 배양과정 동안 생성된 유기산과 박테리오킨의 영향인 것으로 추정된다. 또한 *L. brevis* DK25의 배양 상등액 50 µl/ml 처리 시 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 초기 군수는 유도기가 대조구에 비해 다소 연장 되었으나, 그 이후에는 서서히 증가되기 시작하였고, 배양 상등액 100 µl/ml 처리한 경우 12시간까지는 초기 군수가 감소된 반면 이후에는 조금씩 증가되었다. 게다가 *L. brevis* DK25가 생산한 박테리오킨 320 AU/ml 처리시에는 배양 18시간 만에 초기 군수가 약 1 log cycle 감소되었고, 640 AU/ml 처리시에는 약 2 log cycle 정도의 감소되었는데 320 AU/ml

Table 3. Change of pH and production pattern of the titratable acidity and bacteriocin by *L. brevis* DK25 during incubation in MRS broth at 37°C and effect of different antimicrobial substances on the viability of *L. monocytogenes* KCTC 3569

Incubation Time (h)	pH	Titratable acidity (%)	Bacteriocin activity (AU/ml)	Viable cell counts (Log CFU/ml) of <i>L. monocytogenes</i> KCTC 3569										
				Control	Co-incubation ¹⁾	CFCS ²⁾ 50 µl/ml	CFCS 100 µl/ml	Bacteriocin 320 AU/ml	Bacteriocin 640 AU/ml	Potassium benzoate 0.05%	Potassium benzoate 0.1%	CFCS 50 µl/ml+ Potassium benzoate 0.05%	Bacteriocin 320 AU/ml+ Potassium benzoate 0.05%	Bacteriocin 640 AU/ml+ Potassium benzoate 0.05%
0	6.84±0.04	ND ³⁾	ND	5.02±0.31 ^a	5.08±0.29 ^a	5.10±0.33 ^a	5.13±0.58 ^a	5.04±0.46 ^a	5.28±0.35 ^a	5.12±0.25 ^a	5.37±0.19 ^a	5.20±0.24 ^a	5.14±0.30 ^a	5.22±0.11 ^a
6	6.11±0.05	0.09±0.08	ND	6.13±0.40 ^e	3.72±0.33 ^a	5.76±0.60 ^{de}	4.76±0.41 ^{bc}	4.67±0.26 ^{bc}	4.13±0.80 ^{ab}	5.56±0.37 ^{cde}	5.06±0.66 ^{bcd}	4.64±0.52 ^{abc}	4.20±0.46 ^{ab}	3.80±0.55 ^a
12	5.17±0.05	0.51±0.09	320	8.14±0.27 ^e	3.10±0.56 ^a	6.57±0.55 ^d	4.41±0.37 ^{bc}	4.35±0.33 ^{bc}	3.81±0.27 ^{ab}	6.32±0.45 ^d	4.75±0.72 ^{bc}	5.23±0.67 ^c	4.15±0.58 ^b	3.03±0.43 ^a
18	4.82±0.03	0.68±0.06	1,280	8.89±0.63 ^g	2.67±0.48 ^a	7.46±0.71 ^f	5.07±0.29 ^{cde}	4.09±0.62 ^{bc}	3.26±0.61 ^{ab}	6.98±0.63 ^f	5.22±0.59 ^{de}	5.72±0.50 ^c	4.28±0.61 ^{bcd}	2.84±0.27 ^a
24	4.38±0.06	0.90±0.10	1,280	9.35±0.44 ^e	3.01±0.66 ^{ab}	7.59±0.66 ^d	5.78±0.39 ^c	5.72±0.51 ^c	3.57±0.36 ^b	7.23±0.58 ^d	5.67±0.78 ^c	5.99±0.46 ^c	4.86±0.38 ^b	2.30±0.61 ^a
30	3.99±0.05	1.07±0.08	640	9.11±0.52 ^e	3.80±0.70 ^b	8.03±0.87 ^e	6.24±0.51 ^d	5.89±0.74 ^{cd}	4.14±0.44 ^b	7.94±0.77 ^e	6.05±0.60 ^d	6.38±0.70 ^d	4.54±0.56 ^{bc}	2.58±0.40 ^a

Values are mean±standard deviation of triplicate determinations and means with the different letters in the same row are significantly different ($p<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

¹⁾ After co-incubation with *L. brevis* DK25 (1.0×10^5 CFU/ml) and *L. monocytogenes* KCTC 3569 (1.0×10^5 CFU/ml) at 37°C in BHI broth, viable cell counts of *L. monocytogenes* KCTC 3569 was estimated in Oxford medium by standard pour plate method.

²⁾ CFCS; Cell-free culture supernatant.

³⁾ ND; Not detected.

첨가했을 때 보다는 균 증식 억제효과가 크게 나타나 박테리 오신의 항균 활성은 농도의존적인 것을 확인하였다. 그리고 배양 상등액 50 µl/ml와 안식향산칼륨 용액(0.05%)을 혼합 처리한 경우에는 배양 초기에 균수가 뚜렷하게 감소되었고, 박테리 오신 320 AU/ml와 안식향산칼륨 용액 0.05%를 혼합 처리한 경우에는 12시간 만에 초기 균수가 약 1 log cycle 감소되었고, 이후에도 균수는 크게 증가하지 않았다. 박테리 오신 640 AU/ml와 안식향산칼륨 용액 0.05%를 혼합했을 때에는 배양 초기부터 급격하게 균수가 감소하여 24시간 후에는 초기 균수로부터 약 3 log cycle 정도의 균수가 감소되어 다른 처리구 보다 유의하게 높은 항균 효과가 나타났다. 한편 각 배양 시간별 항균 물질의 종류에 따른 항균 효과를 비교해 볼 때, 배양 24시간 후 모든 항균 물질 처리구는 대조구에 비해 항균 효과가 유의적으로 높았으며 ($p<0.05$), 그 중에서 특히 박테리 오신 640 AU/ml와 안식향산칼륨 0.05%를 혼합 처리했을 때 가장 항균 효과가 높게 나타났고, 그 다음으로는 박테리 오신 640 AU/ml의 단독 처리 및 박테리 오신 320 AU/ml와 안식향산칼륨 0.05%의 혼합 처리 순으로 나타났다. Garcia 등(10)에 따르면 *E. faecalis* EJ97이 생산한 enterocin EJ97은 안식향산 나트륨(0.2%)과의 혼합 처리에 의해 상승효과가 전혀 나타나지 않았다고 하여 본 연구 결과와 다소 차이를 보였다.

L. brevis DK25의 박테리 오신과 안식향산칼륨 처리가 마요네즈의 저장기간에 미치는 영향

샐러드 드레싱은 대표적인 식중독 주요 원인식품으로 *L. monocytogenes*를 비롯한 *S. enteritidis*, *S. aureus* 및 enterohemorrhagic *Escherichia coli* 등의 병원성 식중독균이 자주 검출되고 이로 인해 많은 환자가 발생하고 있다(38). 직접 제조한 마요네즈에 *L. brevis* DK25가 생산한 박테리 오신과 안식향산칼륨의 단독과 혼합처리에 의한 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 4와 같다. *L. monocytogenes* KCTC 3569를 제조한 마요네즈에 접종 후 4°C에 저장한 대조구의 경우 10일 후에는 초기 균수 보다 약

1 log cycle 이상 증가되었다. 여기에 박테리 오신 320 AU/ml와 안식향산칼륨 용액 0.05%를 각각 단독으로 처리한 경우 2-4일까지는 감소 경향을 보이다가 다시 서서히 증가하였다. 하지만 이들을 혼합 처리한 경우에 10일 후 초기 균수보다 약 1 log cycle 적은 균수를 나타내었는데 이는 대조구나 안식향산칼륨 단독 처리구 보다 유의적으로 낮은 수준이었다($p<0.05$). 한편, 25°C에 저장한 경우 대조구의 균수 증가율은 4°C 보다 훨씬 높아 저장 4일째에는 초기 균수로부터 약 3 log cycle 이상 증가되었다. 박테리 오신과 안식향산칼륨 용액을 각각 단독으로 처리한 경우에는 저장하는 동안 대조구에 비해 유의적으로 낮은 균수를 유지하였으나($p<0.05$), 저장 10일째에는 박테리 오신 용액만을 처리했을 때 대조구와 유의적인 차이가 없을 정도로 균수가 높게 나타났고 안식향산칼륨 단독처리구 보다 균수는 더 높게 검출되었다. 하지만 박테리 오신과 안식향산칼륨 용액을 혼합 처리했을 때에는 이들을 단독으로 처리한 경우보다 유의하게 낮은 균수를 유지할 수 있었다($p<0.05$). Jung 등(16)에 따르면, 식품 내에 존재하는 지방은 nisin의 균 일한 분포를 방해하여 항균 활성이 낮아진다고 보고한 바 있어 본 결과에서도 액체배지에서 보다 마요네즈 내에서 박테리 오신의 항균 활성이 안식향산칼륨 용액에 비해 다소 낮게 나타났다는데 이는 마요네즈에 함유된 지방의 영향인 것으로 추정된다.

Nielsen 등(26)은 신선육에 존재하는 *L. monocytogenes*의 저해를 위해 *P. acidilactici*에 의해 생산된 박테리 오신이 효과적이라고 보고하였고, Park 등(32)도 같은 쇠고기에 있는 *L. monocytogenes*에 대한 lacticin NK24의 항균 작용을 보고한 바 있다. Neetoo 등(25)에 의하면 훈연 연어를 4°C에 저장할 때 nisin 0.00125%와 potassium sorbate 0.15% 혹은 sodium diacetate 0.125%를 혼합 처리한 경우 2주 동안 대조구보다 유의하게 낮은 균수를 유지하였다. 또한 nitrite, pentasodium tripolyphosphate, sodium benzoate 혹은 potassium sorbate와 *E. faecalis*가 생산한 enterocin AS-48의 혼합 처리는 항리스테리아 효과를 크게 향상시켰다고 하였다(1).

Table 4. Effect of *L. brevis* DK25 bacteriocin combined with potassium benzoate on the viability of *L. monocytogenes* KCTC 3569 in a manufactured mayonnaise stored at 4°C or 25°C

Storage time (days)	Viable cell counts (Log CFU/ml) of <i>L. monocytogenes</i> KCTC 3569							
	4°C				25°C			
	Control	Potassium benzoate 0.05%	Bacteriocin 320 AU/ml	Bacteriocin 320 AU/ml+ Potassium benzoate 0.05%	Control	Potassium benzoate 0.05%	Bacteriocin 320 AU/ml	Bacteriocin 320 AU/ml+ Potassium benzoate 0.05%
0	5.17±0.11 ^a	5.21±0.28 ^a	5.02±0.30 ^a	5.30±0.40 ^a	5.33±0.35 ^a	5.16±0.35 ^a	5.05±0.10 ^a	4.99±0.25 ^a
2	5.36±0.25 ^b	4.27±0.55 ^a	4.59±0.22 ^a	4.03±0.47 ^a	7.74±0.62 ^a	6.05±0.48 ^b	5.81±0.56 ^b	5.69±0.41 ^b
4	5.72±0.41 ^b	4.51±0.45 ^a	4.22±0.58 ^a	4.26±0.51 ^a	8.55±0.45 ^c	6.62±0.40 ^{ab}	7.04±0.73 ^b	6.03±0.52 ^a
6	5.97±0.56 ^b	4.78±0.36 ^a	4.34±0.41 ^a	3.99±0.74 ^a	8.62±0.51 ^b	6.99±0.50 ^a	7.13±0.61 ^a	6.82±0.42 ^a
8	6.05±0.49 ^c	5.17±0.51 ^b	4.82±0.39 ^{ab}	4.22±0.60 ^a	8.99±0.52 ^c	7.24±0.63 ^{ab}	8.02±0.84 ^b	6.50±0.71 ^a
10	6.28±0.64 ^c	5.23±0.82 ^b	5.11±0.66 ^{ab}	4.45±0.53 ^a	9.29±0.20 ^c	7.71±0.56 ^b	8.11±0.92 ^{bc}	6.34±0.30 ^a

Values are mean±standard deviation of triplicate determinations and means with the different letters in the same row are significantly different ($p<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

식품 유해균에 대해 한가지 제어 방법만을 처리한 경우 그 농도가 치사량에 도달하지 못했거나 세포가 포자를 형성하여 저항성이 높은 상태라면 균들이 생존할 가능성이 매우 높아지게 되며, 만약 세포의 일부가 손상되었다고 하더라도 미생물 세포는 면역력을 활성화시키고 적응 메커니즘을 발달시켜 손상된 부분을 복구하고 항균물질에 대한 저항성을 더욱 높게 된다. 하지만 다수의 제어 방법들을 계속해서 처리하게 되면 세포의 손상 강도는 높아지게 되고 세포는 복구를 위해 더 많은 에너지를 소모하고 결국 한계를 이르러 사멸할 수 밖에 없게 된다. 게다가 다수의 항균 요소들에 의한 상승효과로 인해 각각의 항균 물질 소요량도 감소시킬 수 있으므로 hurdle technology 방법은 식품 제조 가공 공정 및 보관과정 중 널리 이용될 수 있다. 박테리옌신과 함께 hurdle technology에 적용 가능한 방법으로는 무기염, 킬레이트, 유기산, 지방산 분해물, 페놀화합물, 라이소자임 및 락토펙틴 등의 항균물질과 혼용하거나 물리적인 방법으로는 pH, 온도, 수분활성도, 산화환원전위 조절과 가스치환 및 방사선 조사 등의 허들을 조합하여 적용할 수 있다. 또한 화학 합성품과 병용 처리함으로써 돌연변이, 발암 등의 유발 위험이 높은 이들 합성품의 사용량을 감소시킬 수 있을 것이다(11). 효과적으로 *L. monocytogenes*를 제어할 수 있다고 보고되는 허들은 enterocin EJ97과 nitrite (10), nisin과 lactate (6), nisin과 sorbate (2), nisin과 lactoperoxidase system (41) 등의 처리 방법들이 알려져 있다.

박테리옌신을 식품보존제로 이용할 경우, 식품의 저장기간 연장을 비롯하여 적절하지 않은 저장 조건에 보관된 식품의 품질 보호, 식중독 사고 위험성 감소, 교차오염 방지, 식품이 부패와 변패되어 폐기할 때 발생하는 경제적 손실 방지, 화학 합성품 사용량 감소, 비가열 처리로 인한 비타민과 같은 영양 성분 파괴 감소 및 향미 유지, 새로운 저장 기술 적용으로 인한 판매 효과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 독성이 낮은 천연 보존제로서 소비자들의 만족도 제고 등의 유리한 잇점이 있으므로 향후 박테리옌신의 적용 가능성은 매우 확대될 것으로 전망된다(37).

하지만 박테리옌신을 식품보존제로 적용하기 위해선 GRAS (generally recognized as safe)에 등재될 수 있을 만큼 독성이 전혀 없어야 하고 *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* 및 그 외 병원성균 등에 대한 항균활성이 뛰어나야 할뿐만 아니라 가열 처리에도 활성을 유지해야 하며 식품에 첨가할 때 품질이나 향미 및 성분 변화를 초래하지 않아야 하는 등의 조건이 충족되어야 한다(29). 일반적으로 오랫동안 많은 사람들이 섭취한 식품에서 유래된 유산균이 생산한 박테리옌신의 경우는 독성 유발 가능성이 적은 것으로 알려져 있으며 *L. brevis* DK25는 동치미에서 분리되었으므로 인체에 미치는 유해성은 적을 것으로 사료된다. 또한 *L. brevis* DK25의 박테리옌신은 산이나 열에 안정하였으므로 산성식품이나 가열처리 식품에도 적용 가능하며, *L. brevis* DK25 균주를 발효식품 스타터로서 사용할 경우 발효과정 중 생성된 유기산이나 박테리옌신에 의한 항균활성 효과로 인하여 식품의 저장기간 연장 및 식품의 변질을 억제할 수 있을 것으로 판단된다. *L. brevis*

DK25의 박테리옌신과 안식향산칼륨을 복합적으로 사용할 경우 합성보존료의 사용량을 줄여 인체의 위해 발생 위험을 감소시키고, 최소 가공식품을 선호하는 소비자들의 요구를 충족시킬 수 있으며, 항균 활성에 대한 상승효과를 얻을 수 있을 것이다. 향후 식품보존제로서 박테리옌신을 적용하기 위해선 동물 독성시험을 통해 박테리옌신의 안전성이 우선 입증되어야 하며, 식품에 적용하거나 가공 및 보존 과정 중 박테리옌신의 활성 유지 방법 모색, 박테리옌신의 활성을 높일 수 있는 배양 방법, 유전자 재조합 기술을 통한 박테리옌신의 대량 생산 기술 및 박테리옌신과 함께 적용할 수 있는 다양한 허들을 개발하여 식품첨가물로서의 이용 가치를 향상시켜야 할 것이다.

적요

동치미에서 분리된 *Lactobacillus brevis* DK25 균주는 생화학적 특성, 당 분해능 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 동정하였다. *L. brevis* DK25가 생산한 박테리옌신의 항균활성은 *Enterococcus faecalis*와 *Listeria monocytogenes*에 대해서만 나타나 항균 스펙트럼은 비교적 좁은 것으로 확인되었다. 배양과정 동안 *L. brevis* DK25의 박테리옌신은 정지기 초기에 최대의 활성(1,280 AU/ml)을 나타내었으나, 그 이후에는 급격하게 감소되었으므로 박테리옌신은 생산균이 증식하는 과정 동안 생성됨을 알 수 있었다. 박테리옌신의 활성은 protease 처리에 의해 완전히 소실되었으나 pH 4-9의 범위에서는 활성에 변함이 없었고, 100°C에서 30분간 가열처리에도 활성을 유지하였으므로 열에 비교적 안정하였다. 박테리옌신의 *L. monocytogenes* KCTC 3569에 대한 항균활성은 농도의존적으로 나타났고 특히, 4°C와 25°C에 저장하는 동안 마요네즈 내에 존재하는 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 증식을 억제하기 위해선 박테리옌신과 안식향산칼륨 용액을 단독으로 처리하는 것보다는 이들을 혼합하여 처리했을 때 유의적으로 더 높은 항균 효과를 얻을 수 있었다. 따라서 *L. brevis* DK25가 생산한 박테리옌신은 안식향산칼륨과 함께 식품의 제조 공정 중 식중독균 제어를 위해서 hurdle technology에 적용될 수 있다고 판단된다.

참고문헌

1. Ananou, S., A. Banos, M. Maqueda, M. Martinez-Bueno, A. Galvez, and E. Valdivia. 2010. Effect of combined physicochemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. *Food Control* 21, 478-486.
2. Avery, S.M. and S. Buncic. 1997. Antilisterial effects of a sorbate-nisin combination *in vitro* and on packaged beef at refrigeration temperature. *J. Food Protect.* 60, 1075-1080.
3. Batish, V.K., S. Grover, and R. Lal. 1989. Screening lactic starter cultures for antifungal activity. *Cult. Dairy Prod. J.* 24, 21-25.
4. Branen, J.K. and P.M. Davidson. 2004. Enhancement of nisin,

- lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetracetic acid and lactoferrin. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 63-74.
5. Bryan, F.L. 2002. Where we are in retail food safety, how we got to where we are, and how do we get there? *J. Environ. Health* 65, 29-36.
 6. Buncic, S., S. Fitzgerald, C.M. Bell, and R.G. Hudson. 1995. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperatures. *J. Food Safety* 15, 247-264.
 7. Calderon-Miranda, M.L., G.V. Barbosa-Canovas, and B.G. Swanson. 1999. Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 51, 7-17.
 8. Condon, S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 269-280.
 9. Daly, C., W.E. Sandine, and P.R. Elliker. 1970. Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: *Streptococcus diacetylactis* versus food pathogens. *J. Milk Food Technol.* 35, 349-357.
 10. Garcia, M.T., M.M. Canamero, R. Lucas, N.B. Omar, R.P. Pulido, and A. Galvez. 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 161-170.
 11. Galvez, A., H. Abriuel, R.L. Lopez, and N.B. Omar. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51-70.
 12. Galvez, A., H. Abriuel, N. Benomar, and R. Lucas. 2010. Microbiol antagonistic to food-borne pathogens and biocontrol. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 142-148.
 13. Gandhi, M. and M.L. Chikindas. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 1-15.
 14. Ha, D.M., D.S. Cha, and S.G. Han. 1994. Identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from *Kimchi* and partial characterization of their bacteriocin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4, 305-315.
 15. Jack, R.W., J.R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.
 16. Jung, D.S., F.W. Bodyfelt, and M.A. Daeschel. 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J. Dairy Sci.* 75, 387-393.
 17. Jung, M.Y. and H.D. Paik. 2000. Identification and partial characterization of lacticin JW3, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* JW3 isolated from commercial Swiss cheese products. *Food Sci. Biotechnol.* 9, 116-123.
 18. Kang, T.K. and W.J. Kim. 2010. Characterization of an amylase-sensitive bacteriocin DF01 produced by *Lactobacillus brevis* DF01 isolated from *Donchimi*, Korean fermented vegetable. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 30, 795-803.
 19. Koh, S.K., J.E. Lee, H.W. Kim, S.S. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, and K.H. Koh. 2004. Identification and deacidification of lactic acid bacteria in Korean red wine. *Food Sci. Biotechnol.* 13, 96-99.
 20. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
 21. Mante, E.S., E. Sakyi-Dawson, and W.K. Amoa-Awua. 2003. Antimicrobial interactions of microbial species involved in the fermentation of cassava dough into agbelima with particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 41-50.
 22. Mauch, A., F. Dal Bello, A. Coffey, and E.K. Arendt. 2010. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to *in vitro* inhibits the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 116-121.
 23. Modi, K.D., M.L. Chikindas, and T.L. Montville. 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 249-253.
 24. Mundt, J.O. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, pp. 577-592. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
 25. Neetoo, H., M. Ye, and H. Chen. 2008. Potential antimicrobials to control *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged cold-smoked salmon pate and fillets. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 200-227.
 26. Nielsen, J.W., J.S. Dickson, and J.D. Crouse. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2142-2145.
 27. Nilsson, L., Y. Chen, M.L. Chikindas, H.H. Huss, L. Gram, and T.J. Montville. 2000. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 769-774.
 28. Ooi, S.T. and B. Lorber. 2005. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin. Pract.* 40, 1327-1332.
 29. O'Sullivan, L., R.P. Ross, and C. Hill. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593-604.
 30. Otero, M.C. and M.E. Nader-Macias. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 35-46.
 31. Parente, E., C. Brienza, M. Moles, and A. Ricciardi. 1995. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *J. Microbiol. Methods* 22, 95-108.
 32. Park, H.J., N.K. Lee, J.O. Choi, J.U. Ha, and H.D. Paik. 2001. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactococcal bacteriocins. *Food Sci. Biotechnol.* 10, 199-203.
 33. Rocourt, J. 1996. Risk factors for listeriosis. *Food Control* 7, 195-202.
 34. Ronka, E., E. Malinen, M. Saarela, M. Rinta-Koski, J. Aarnikunnas, and A. Palva. 2003. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 63-74.
 35. Sahl, H.G. 1991. Pore-formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics, pp. 347-358. In G. Jung and H.G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.
 36. Schnurer, J. and J. Magnusson. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 70-78.
 37. Thomas, L.V., M.R. Clarkson, and J. Delves-Broughton. 2000. Nisin, pp. 463-524. In A.S. Naidu (ed.), Natural food antimicrobial systema. CRC Press, Boca-Raton, FL, USA.
 38. Unicomb, L., P. Bird, and C. Dalton. 2003. Outbreak of *Salmonella* potsdam associated with salad dressing at a restaurant. *Commun. Dis. Intell.* 27, 508-512.
 39. Wing, E.J. and S.H. Gregory. 2002. *Listeria monocytogenes*: Clinical and experimental update. *J. Infect. Dis.* 185, S18-S24.
 40. Yakabe, T., E.L. Moore, S. Yokota, H. Sui, Y. Nobuta, M. Fukao, H. Palmer, and N. Yajima. 2009. Safety assessment of *Lactobacillus brevis* KB290 as a probiotic strain. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2450-2453.
 41. Zapico, P., M. Medina, P. Gaya, and M. Nunez. 1998. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 35-42.