J. Fd Hyg. Safety
Vol. 23, No. 2, pp. 113~120 (2008)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

동치미에서 분리된 *Lactobacillus plantarum* K11의 박테리오신 생산에 영향을 미치는 배양 조건

임성미* · 이군자 · 박선미[1] · 임동순[2]
동명대학교 식품공학과, [1]신라대학교 생물과학과, [2]부산대학교 약학대학

Incubation Conditions Affecting Bacteriocin Production of *Lactobacillus plantarum* K11 Isolated from Dongchimi

Sung-Mee Lim*, Gun-Ja Lee, Sun-Mee Park[1], and Dong-Soon Im
Department of Food Science & Technology, Tongmyong University, Busan 608-735, Korea
[1]Department of Biological Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
[2]College of Pharmacy and Research Institute for Drug Development, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
(Received May 10, 2008/Accepted June 21, 2008)

ABSTRACT – The influence of incubation temperature, pH and media components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* K11 were investigated. The highest activity was observed in MRS broth, but no bacteriocin activity was obtained in TSB. The bacteriocin was produced from the exponential growth phase and its activity also reached a maximum in MRS broth, but then dropped after 16 hr because of degradation by extracellular proteolytic enzymes or exhaustion of medium nutrients. The optimal temperature and pH for production of bacteriocin were 37°C and pH 7.0 in MRS broth, respectively. The addition of 0.5 or 1.0% glucose and 0.5~1.5% lactose to MRS resulted in the increase of the bacteriocin production. With 0.5% NaCl and K_2HPO_4, the activities were significantly higher than that of control, respectively. However, increasing nitrogen sources such as beef extract, casein, and tryptone and salts such as NH_4PO_4, $MgSO_47H_2O$, and $MnSO_4H_2O$ had detected a negative influence upon the bacteriocin production. Consequently, because the bacteriocin produced by *L. plantarum* K11 was affected by various incubation conditions, the bacteriocin activity of *L. plantarum* K11 applied in food as a novel starter will be dependent on environmental factors such as fermentation conditions and food ingredients.

Key words : *Lactobacillus plantarum*, bacteriocin, incubation condition

서 론

*Escherichia coli*에서 미생물의 성장을 억제하는 박테리오신 (colicin)이 처음으로 발견된 이후 지금까지 많은 종류의 박테리오신이 보고되고 있다[1]. 박테리오신이란 특정 미생물 세포의 에너지 대사와 생리적 기능 상실을 초래하여 미생물을 사멸시키는 단백질 혹은 펩타이드성 물질이다[2]. Lantibiotics에 속하는 subtilin, Pep5, lacticin 481, lacticin S, carnocin UI49 및 SAFF22 등은 그람양성균들의 양자 운용력 (proton motive force, pmf)을 파괴하기도 하고 아미노산 수송을 저해한다[3]. *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*가 생산하는 nisin은 세균의 막전위(transmembrane potential, ΔΨ)와 pH 구배 (ΔpH) 및 pmf의 구성성분을 파괴하는데, 특히 pmf는 ATP 합성, 물질 수송과 세포의 대사과정에 중요한 역할을 하므로 이것의 파괴는 세포내 ATP 고갈 및 아미노산 흡수의 방해를 유발한다[4,5]. 또한 pediocin PA-1는 *Listeria* 세포에 아미노산뿐만 아니라 칼륨과 무기인산을 유출시킨다[6].

여러 박테리오신들의 항균 스펙트럼은 매우 다양한 것으로 알려져 있는데 nisin Z의 경우 methicillin에 대한 내성균 *Staphylococcus aureus*의 균수를 감소시켰고[7], *Streptococcus thermophilus* 81이 생산한 박테리오신은 *Bacillus* sp., *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium, E. coli, Yersinia pseudotuberculosis* 및 *Y. enterocolitica* 등의 주요 식중독균들에 대한 광범위한 항균 효과를 나타내었다[8]. 치즈에서 분리된 *L. plantarum*이 생산한 박테리오

*Correspondence to: Sung-Mee Lim, Department of Food Science & Technology, Tongmyong University, Busan 608-735, Korea
Tel: 82-51-629-1714, Fax: 82-51-629-1709
E-mail: limsm020@tu.ac.kr

신인 plantaricin C는 *Lactobacillus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Clostridium tyrobutyricum* 등과 같은 식품 부패균에 대한 억제 작용이 있는 것으로 알려져 있다[9].

박테리오신 활성에 영향을 주는 요인으로서 *L. lactis* ATCC 11454가 생산하는 박테리오신 생산을 위한 배지 성분으로는 sucrose, soybean peptone, yeast extract, KH_2PO_4인 것으로 밝혀졌다[10]. 또한 *Micrococcus* sp. GO5가 생산하는 micrococcin GO5는 lactose, sucrose, tryptone, yeast extract, K_2HPO_4 혹은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 등이 첨가된 MRS 배지 상에서 가장 높은 활성을 나타냈으며[11], *E. faecium* ST311LD가 생산하는 박테리오신은 BHI나 M17 broth에서는 낮은 활성을 나타내었으나, tryptone, saccharose 혹은 vitamine C가 첨가된 MRS broth에서 최대의 활성을 나타내었다고 보고하였다[12].

동치미에서 분리된 *L. plantarum* K11이 생산한 박테리오신은 *E. coli* O157에 대한 항균 효과가 있는 것으로 이미 보고한 바 있다[13]. 따라서 본 연구에서는 *L. plantarum* K11이 생산하는 박테리오신의 최대 활성을 얻기 위한 배양 조건 및 배지 성분에 관하여 알아보고자 한다.

재료 및 방법

박테리오신 용액 조제 및 균주 선택

동치미에서 분리한 *L. plantarum* K11 균주는 액체배지 10 mL에 1 백금이 접종하여 37°C에서 12시간 전 배양한 배양액을 액체배지 1 L에 옮겨 본 배양한 배양액을 원심분리 (10,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 얻어진 상등액은 1N NaOH로 최종 pH 7.0으로 조정한 후에 50% 농도의 황산암모늄 [$(NH_4)_2SO_4$]을 천천히 첨가하고 4°C에서 overnight 동안 교반한 다음 원심분리 (10,000 rpm, 20 min, 4°C) 하였다. 침전물을 회수하여 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 50 mL에 현탁하여 spectra-por dialysis membrane (molecular weight cut-off, 1,000; Spectrum Labs., LA, USA)에 넣어 ice box 내에서 동일한 buffer (1 L)로 3회 교환하면서 4°C에서 overnight 동안 투석시켰다. 투석한 박테리오신 용액은 membrane filter (0.45 μm pore size, Millipore Corp., Billerica, USA)로 여과 제균하여 실험에 사용하였다.

박테리오신 활성 측정

L. plantarum K11 균주가 생산한 박테리오신 용액의 항균활성은 microtitre plate assay[14]으로 측정하였다. 즉, microtitre plate (BD Falcon, Franklin Lakes, USA)의 각 well에 액체배지 200 μL와 2진법으로 희석한 박테리오신 용액 50 μL 및 *E. coli* O157 ATCC 43889 배양액 100 μL (약 1.0×10^6 CFU/mL)을 접종하였다. 37°C에서 12시간 배양한 후 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Spectrocount, Packard Instruments, Meriden, CT, USA)로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구 흡광도의 절반에 해당하는 박테리오신 용액의 최대 희석배수의 역수에 20 (1 mL/50 μL)을 곱하여 구한 값을 bacteriocin unit (BU)/mL로 표시하였다.

배양 조건에 따른 박테리오신 활성

(1) 배양용 배지

L. plantarum K11 균주가 생산하는 박테리오신의 최대 활성을 나타내는 배지의 종류를 알아보기 위해 MRS, M17, BHI 및 TSB 배지에 균주를 접종한 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 박테리오신의 활성과 흡광도 (660 nm)를 측정하여 균의 생육곡선을 조사하였다.

(2) 배양 온도

L. plantarum K11 균주를 최적의 액체배지에 접종한 다음 15, 25, 37 및 45°C에서 24시간 동안 배양하면서 배양액을 회수하여 박테리오신 용액을 제조한 후 항균 활성을 측정하여 최고의 활성을 나타내는 배양 온도를 결정하였다.

(3) 배지 pH

최적의 액체배지를 6N HCl 혹은 NaOH으로 pH 5.0, 7.0 및 9.0으로 조정하고 난 후 *L. plantarum* K11 균주를 접종하고 최적의 온도에서 배양하는 동안 배양액으로부터 박테리오신 활성을 측정하여 최대의 항균 활성을 나타내는 배지의 pH를 결정하였다.

(4) 배지 성분

탄소원으로는 glucose, galactose, fructose, maltose 및 lactose을 사용하였고, 질소원으로는 beef extract, casein, peptone, tryptone 및 yeast extract를 사용하였으며, 염류로는 NaCl, NH_4PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 등을 최적의 액체배지에 약 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0%의 농도로 첨가한 다음 *L. plantarum* K11 균주를 접종하여 최적의 온도에서 배양한 후 대조구와의 활성을 비교하여 탄소원, 질소원 및 염류의 종류와 첨가량에 따른 박테리오신 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

배지 종류에 따른 박테리오신 활성

L. plantarum K11의 박테리오신 활성에 대한 배지의 영향을 살펴본 결과는 Fig. 1과 같다. MRS 액체배지에서 *L. plantarum* K11 균주는 배양시작 후 16시간 만에 정지기에 도달하였고, 이때 박테리오신의 활성은 12800 BU/mL로 최대에 이르렀으나, 이후에는 활성이 급격히 감소하였다. M17 액체배지에 배양한 경우 최대 활성이 16시간째 나타나긴 하였으나, MRS 배지 상에서 보다 훨씬 낮은 3200 BU/mL 정도의 활성을 나타내었고 균의 증식속도도

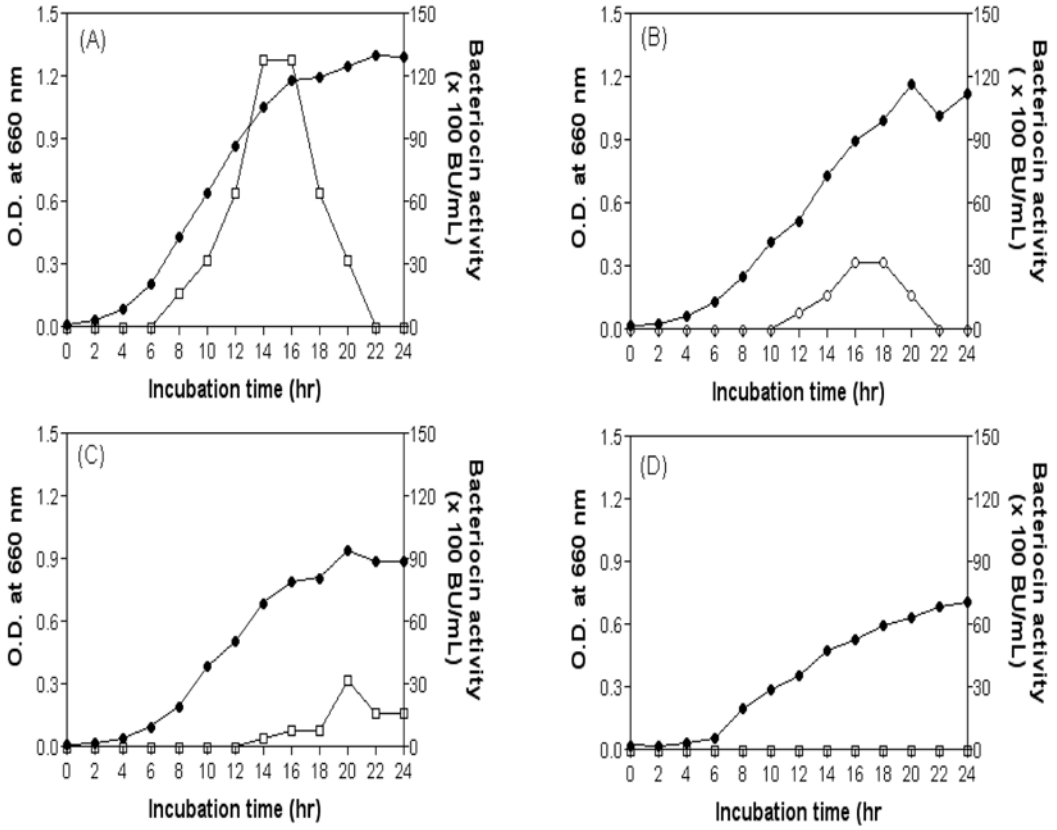

Fig. 1. The effect of variouw media on the production of the bacteriocin by *L. plantarum* K11. The *L. plantarum* K11 was cultured at 37°C and the bacteirocin activity was estimated by microtitre plate assay with *E. coli* O157. - ● -, Bacterial growth; - □ -, Bacteirocin activity. (A), MRS; (B), M17; (C), BHI; (D), TSB.

MRS 배지보다 낮았다. BHI 액체배지에서는 배양 20시간 만에 3200 BU/mL의 박테리오신 활성을 나타내었고, TSB 액체배지의 경우에는 다른 액체배지들 보다 유도기가 길고 균 증식 속도가 가장 느렸고, 박테리오신의 활성은 배양 시간 동안 내내 전혀 나타나지 않았다. 본 결과에서와 같이 박테리오신의 생산은 균의 증식에 의존하는데 세포수가 대수적으로 증가함에 따라 활성은 비례적으로 증가하다가 배양 산물인 유산의 생성, 당이나 필수 아미노산의 고갈 등에 의해 세포수가 감소함에 따라 활성도 떨어지게 된다[15]. 이와 같이 대체적으로 정지기 이후에 박테리오신의 활성이 감소하는 것은 생산 균주 세포에 박테리오신이 흡착하였거나 세포가 용해함으로서 방출된 특이적 혹은 비특이적 단백질 분해 효소에 의해 박테리오신이 불활성화 되는 것으로 여겨진다[16].

Cheigh 등[17]에 의하면, 김치에서 분리된 *L. lactis* subsp. *lactis* A164가 생산한 박테리오신 활성을 위해서 0.5% lactose가 첨가된 M17 (M17L) 액체배지가 최적의 배지인 것으로 확인되었고, MRS와 APT 액체배지는 M17L과 유사한 세포질량을 나타내었으나, 박테리오신 활성은 낮게 나타났다고 보고하여 본 실험의 결과와 다소 차이가 있었다. 한편, 생산 균주의 최적 증식 조건에서 반드시 최대의 박테리오신을 생산하는 것은 아니라고 보고하는 연구 결과도 있다[18]. 많은 유산균들은 대수기 부터 박테리오신이 생합성 되기 시작하는 초기 대사산물로 알려져 있으나, 몇몇 연구에 의하면 정지기 후반단계에 특이적인 2차 박테리오신 생산 피크를 형성하는데 이는 대사산물의 축적, 영양분 부족과 같은 자극적인 요인에 대한 반응으로 생성된다고 알려져 있다[19,20].

배양 온도에 따른 박테리오신 활성

L. plantarum K11의 박테리오신 활성을 최대로 나타내는 MRS 액체배지 상에서 8～20시간 배양하는 동안 배양 온도의 영향을 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다. 25°C, 30°C 및 37°C 순으로 온도가 증가함에 따라 박테리오신의 활성은 비례적으로 증가하였으나, 45°C에서는 오히려 활성이 감소하였다. 최대 활성 (12800 BU/mL)은 37°C에서 배양한 경우 14～16시간 만에 나타났고, 30°C에서는 18시간 만에 나타났다.

이 등[21]은 *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산하는 박테리오신은 25～40°C의 범위에서 생성되었으나, 그 중 37°C에서 가장 높은 활성을 나타내어 본 결과와 유사하였다. 또한 *E. casseliflavus* IM416K의 박테리오신은 18～45°C의 광범

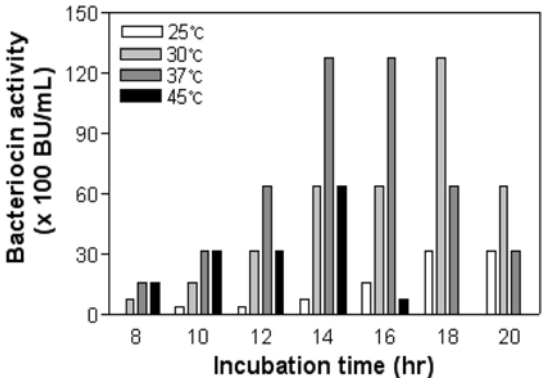

Fig. 2. The effect of incubation temperature on the bacteriocin production of *L. plantarum* K11 during cultured in MRS broth.

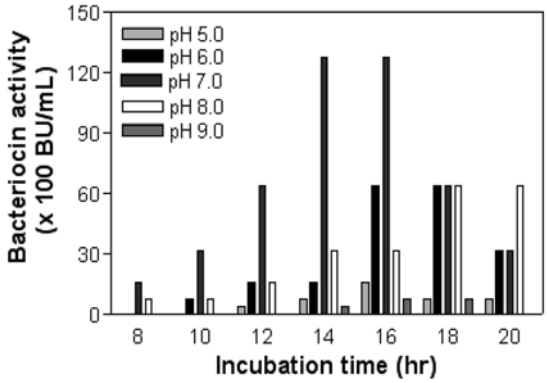

Fig. 3. The effect of initial pH on the bacteriocin production of *L. plantarum* K11 during cultured in MRS broth.

위한 온도 대에서 최대의 활성을 나타내었다[22]. 배양 온도 범위는 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52의 생물량 (biomass)에는 큰 변화를 주지 않았으나, 박테리오신 생산에 중요한 영향 인자로서 mesenterocin 52A는 20°C, mesenterocin 52B는 25°C가 최적 온도인 것으로 나타나 비교적 낮은 온도에서 최대량을 생성하였다[23]. 이처럼 유산균의 증식 속도와 유산 생성량 및 박테리오신 생산을 위한 최적 조건은 다소 차이가 나는데 이는 일정한 온도까지 높아질수록 균주의 증식 속도는 빨라지지만 그와 동시에 균주가 생산하는 단백질 분해 효소의 활성도 증가하기 때문에 박테리오신의 분해된다고 보고하고 있다[24]. 여러 결과와 비교해 볼 때 박테리오신의 종류에 따라 최적의 배양 온도가 다른 이유는 박테리오신의 분자량과 구성 성분 및 구조 등 생화학적 특성이 다르기 때문인 것으로 알려져 있다[25].

배지 pH에 따른 박테리오신 활성

L. plantarum K11의 박테리오신 활성을 최대로 나타내는 MRS 액체배지 중에 37°C에서 8～20시간 배양하는 동안 배지의 초기 pH 영향을 살펴본 결과는 Fig. 3과 같다. 배양 8시간 만에 박테리오신 활성은 pH 7.0과 8.0에서 나타나기 시작하여 배양이 계속될수록 pH 7.0에서 활성이 급격히 증가하였다. 하지만 배양 16시간째 pH 8.0에서의 활성은 pH 6.0이나 7.0 보다 낮은 활성을 나타내었으며, pH 5.0과 9.0에서는 배양 동안 내내 매우 낮은 활성을 보였다. 따라서 *L. plantarum* K11의 박테리오신의 최대 활성은 MRS 액체배지 초기 pH 7.0으로 조정하여 37°C에서 14～16시간 배양하는 동안 나타나는 것으로 확인하였다.

Lactobacillus sp. GM7311이 생산하는 박테리오신은 pH 5.5～6.5의 범위에서 생성되었으나, 그 중 pH 6.0에서 가장 높게 활성을 나타났다고 하여 본 실험의 균주와는 다소 차이가 있었다[21]. *L. lactis* subsp. *lactis* 140NWC의 성장과 유산 생산을 위한 최적의 pH는 6.0～6.5이었지만, 박테리오신(lactococcin 140) 생산은 pH 5.5에서 배양 7시간 만에 최고 (15.4×10^6 AU)로 나타났다[26]. 또한 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52의 mesenterocin 52A는 pH 5.5, mesenterocin 52B는 pH 5.0의 약산성 영역에서 최대량의 박테리오신을 생성하였다[23]. *E. faecium* P13 균주의 증식 속도나 glucose 소비는 pH 7.0에서 최대일지라도 enterocin P의 가장 높은 활성은 pH 5.3과 6.0에서 나타났고, 가장 낮은 활성은 pH 8.5에서 나타났다고 하였다[27]. *L. lactis* IO-1에 의해 생산된 nisin Z의 가장 높은 활성 생산을 위한 최적의 pH는 5.0과 5.5이었고[24], *E. faecium* BFE900의 박테리오신 활성은 MRS 배지 pH 6.0～9.0에서 최고치를 얻었고[28], *Lactococcus* sp. J-105의 박테리오신 활성은 pH 8.0 부근에서 가장 높았다고 보고하여 박테리오신을 생산하는 균주들의 최적 pH는 세균마다 다양하게 나타났다[29].

배지 성분에 따른 박테리오신 활성

L. plantarum K11의 박테리오신 활성에 대한 배지 성분들의 영향을 살펴본 결과는 Fig. 4, 5 및 6과 같다. Glucose 0.5, 1.0%와 lactose 1.0%, 1.5%를 첨가한 경우 대조구에 비해 박테리오신 활성은 2배 증가하였고, 특히 lactose 0.5% 첨가 시에는 무려 4배 증가되었다. 그러나 galactose 0.5%, fructose 0.5%, maltose 0.5와 1.0% 및 lactose 2.0% 첨가 시에는 대조구와 동일한 12800 BU/mL의 활성을 나타내었으며, 그 이상의 탄소원을 첨가한 경우에는 오히려 활성이 감소되었다. 질소원으로써 beef extract 0.5%, peptone 0.5와 1.0%, tryptone 0.5% 및 yeast extract 0.5와 1.0% 첨가한 경우에는 대조구와 동일한 활성을 나타내었으나, 그 이상의 농도로 첨가했을 때에는 활성이 감소되었음을 확인하였다. 염류로써는 NaCl 0.5%와 K_2HPO_4 0.5% 첨가한 경우 박테리오신의 활성이 대조구보다 2배 증가한 반면, NaCl 2.0%, NH_4PO_4 2.0% 이상, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5% 이상 및 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.0% 이상을 첨가했을 때에는 대조구 활성의 50% 이하로 감소하였다.

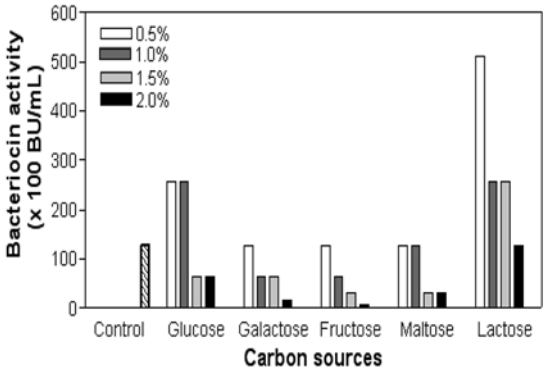

Fig. 4. The effect of carbon sources on the bacteriocin production of *L. plantarum* K11. The *L. plantarum* K11 was cultured at 37°C for 14 hr in MRS adjusted to pH 7.0 and the bacteriocin activity was determined by microtitre plate assay.

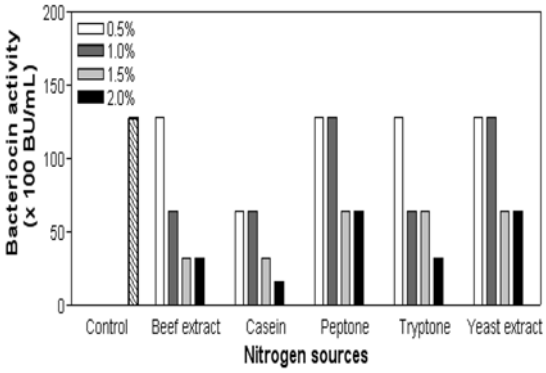

Fig. 5. The effect of nitrogen sources on the bacteriocin production of *L. plantarum* K11. The *L. plantarum* K11 was cultured at 37°C for 14 hr in MRS adjusted to pH 7.0 and the bacteriocin activity was determined by microtitre plate assay.

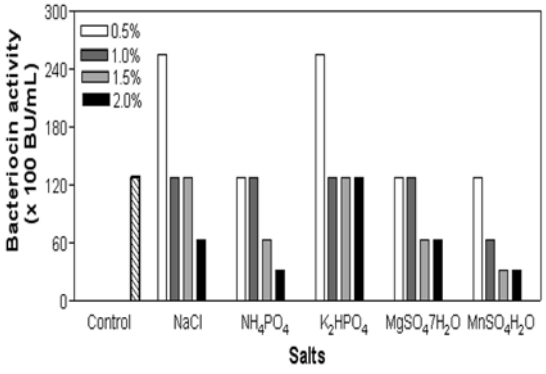

Fig. 6. The effect of salts on the bacteriocin production of *L. plantarum* K11. The *L. plantarum* K11 was cultured at 37°C for 14 hr in MRS adjusted to pH 7.0 and the bacteriocin activity was determined by microtitre plate assay.

L. lactis subsp. *lactis* A164가 생산한 박테리오신 활성에 대한 탄소원의 영향을 살펴본 결과, 0.5%의 sucrose와 lactose 둘 다 세포의 성장을 위해서는 적합한 당이었으나, sucrose 보다 lactose에 의해 8배 더 높은 박테리오신 활성을 얻을 수 있었다. 하지만 0.5%의 glucose와 raffinose를 첨가하여 생산된 박테리오신 활성은 오히려 낮게 나타났다고 보고하였다. 또한 질소원의 경우, 1.0% yeast extract를 첨가한 M17L에서 최대의 박테리오신 활성이 나타났는데 이것은 tryptone, soytone 보다 2배, peptone 보다는 16배, casein의 경우보다 무려 32배 더 높게 나타났다. 이와 같이 yeast extract에 의해 활성이 높은 이유는 더 많은 양의 유리 아미노산과 작은 펩타이드를 제공해주고 다른 단백질 가수분해물에 비해 더 많은 성장 인자를 공급하기 때문이라고 고찰하였다[17,30]. *E. faecium* CRL 1385는 glucose 보다 황설탕에 의해 더 많은 박테리오신을 생산하였고 황설탕이나 당밀을 첨가하여 배양한 경우 *S. pullorum* M97의 저해하는데 효과적이었다고 보고하였다[31].

L. sakei CCUG 42687의 박테리오신(sakacin P)은 glucose가 증가함에 따라 생성량이 감소하는 경향을 보였는데 초기 glucose 농도가 45 혹은 60 g/L로 배양한 경우 생산된 유산(250 mmol/L)에 의해 박테리오신 생산이 중지되었다. 한편 yeast extract의 농도가 증가할수록 균의 증식 속도와 sakacin P의 최대 농도 및 특이적인 생산 속도도 함께 증가되었으며, 또한 tryptone 농도도 증가함에 따라 박테리오신 생산에 도움을 주었다고 보고하였다[32]. Sanni 등[33]은 *Lactobacillus* sp.가 생산하는 박테리오신의 최대 활성은 MRS 배지 내에 glucose와 peptone이 0.25%와 0.5% 존재할 경우에 나타났으나, 2%의 농도에서는 활성이 나타나지 않았다고 보고하였다. *L. lactis* IO-1에 의해 생산된 nisin Z는 glucose, sucrose 및 xylose 존재 하에서 생성되었고, cystine 첨가에 의해 활성이 증가된 반면, 0.01 mM Mg^{2+} 혹은 Mn^{2+}의 첨가에 의해 박테리오신의 활성은 약 ⅔ 가량 감소되었다[24].

Nisin은 배양 초기 pre-peptide로 합성되어지고 그 후에 mature bioactive peptide로 변형 되는데 구조적인 nisin precursor gene (*nis* A)의 전사와 prenisin의 합성은 대수기 초기에 시작되어 정지기까지 계속 이어진다고 하였다. 특히 탄소원은 prenisin의 변형, 면역성이나 신호전달과 관련된 효소의 형성을 조절함으로서 nisin의 생성에 관여한다고 보고하였다[34]. 한편 일반적으로 유산균의 영양요구성이 까다롭기 때문에 균의 증식이나 박테리오신 생산에 있어서 탄소원 보다는 유기 질소원에 더 많은 영향을 받는다고 알려져 있다[35]. Nisin의 최대 농도는 유기 질소원의 함량이 증가될수록 얻어졌다고 보고되었다[36]. Nisin, sakacin P 및 curvacin A 등의 활성은 casein (1 g/L)에 의해 감소되는 것으로 나타났는데[37], 세균의 단백질 분해 효소 생산은 casein이나 gelatin과 같은 복합 유기질소원에 의해 종종 유도 된다고 보고하고 있다[38].

Lactobacillus sp. GM7311이 생산하는 박테리오신에 대한 NaCl의 영향을 살펴본 결과 NaCl 0%에서 가장 높았으나,

2% 이상에서는 급격히 감소하였으며 4% 이상에서는 균의 증식과 박테리오신 생성이 거의 나타나지 않았다고 보고하였다[21]. 그러나 *E. faecium* P13의 enterocin P 생산에서 NaCl은 박테리오신 활성의 저해 요인으로 밝혀졌다[27]. 하지만 *E. coli* O157 : H7에 대한 항균 효과가 있는 nisin과 curvacin A의 박테리오신 활성은 NaCl 0～6% 농도 하에서 NaCl의 양이 증가할수록 항균 효과가 증가되었다[37]. 또한 nisin, sakacin P 및 curvacin A 등은 Ca^{2+}, Mg^{2+} 및 Mn^{2+} (10 mmol/L)와 같은 2가 양이온에 의해 저해되는 것으로 나타났으나, MRS 배지 내에 존재하는 정도의 양이온들의 양으로는 아무런 영향을 받지 않는 것으로 나타났다[37]. 이와 같이 양이온에 의한 항균 효과의 감소는 음이온의 인지질과 Mg^{2+}가 결합함으로써 원형질막의 강도를 높이고 원형질막에 대한 nisin의 친화력을 감소시키기 때문이라고 설명하고 있다[39]. 그러나 또 다른 결과에 의하면 Mg^{2+}는 pediocin AcH의 생산을 증가시키는 효과가 있다고 밝히고 있다[19]. *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산하는 박테리오신이나 *L. lactis* subsp. *lactic* NIZO22186의 nisin 생산에 대하여 K_2HPO_4은 활성을 증가시키는데 도움을 준다고 보고하였다[21,40].

이와 같은 여러 연구결과에서 보고되었듯이, 탄소원, 질소원 및 염류들은 박테리오신 생산을 위해 중요한 인자로서 이들 성분들의 농도와 종류는 박테리오신을 생산하는 균주에 따라 다양하다. Bizani와 Brandelli[41]는 *B. cereus* 8A의 박테리오신을 생산하기 위해서도 질소원, 비타민 및 무기질 등을 함유하는 복합배지가 요구되는데 이처럼 다양한 성분을 필요로 할 경우 산업적으로 생산 단가를 증가시키고 또한 박테리오신의 분리 정제에 더 많은 어려움을 초래하게 된다고 하였다[42].

많은 연구 결과와 비교해 볼 때 박테리오신 생산의 최적 조건은 균주 특이성이 있고 유산균이 생산하는 박테리오신의 활성은 배양 온도, 초기 pH, 배지 성분 등과 같은 환경적인 요인에 중요한 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 박테리오신 생산균을 발효식품 제조에 이용할 경우 식품 내에 함유된 여러 가지 영양 성분과 발효 조건에 따라 박테리오신 생성량이 달라져 항균 활성도 증가되거나 감소될 수 있다는 것을 고려해야 된다. 향후 *L. plantarum* K11 균주를 요구르트 발효스타터로 사용하여 항균 활성의 변화를 조사하고, 크로마토그래피로 박테리오신을 순수 분리 정제하여 유전자의 구조를 해석하고자 한다.

요 약

우리의 전통 발효식품인 동치미로부터 *E. coli* O157에 대한 항균 활성을 나타내는 *L. plantarum* K11 균주가 생산하는 박테리오신의 활성에 영향을 미치는 배양 조건에 관하여 살펴보았다. 본 균주가 생산하는 박테리오신은 MRS 배지 상에서 가장 높은 활성을 나타내었고 M17, BHI 및 TSB 보다 균의 증식속도도 빠르게 나타났다. 대수기 초기부터 활성이 점점 증가하기 시작하여 정지기 때 최대에 이르렀고 이후에는 급격히 감소하였다. 배양온도의 영향으로는 온도가 상승함에 따라 박테리오신의 활성도 증가하여 최대 활성은 37°C 상에서 나타났고 45°C에서는 오히려 활성이 감소하였다. 배지의 초기 pH 영향을 살펴본 결과 배양 8시간부터 pH 7.0과 8.0에서 활성이 나타나기 시작하여 배양이 진행될수록 pH 7.0에서 최대로 나타났으나, pH 5.0과 9.0에서는 활성이 매우 약하게 나타났다. Glucose 0.5, 1.0%와 lactose 0.5～1.5%를 첨가한 경우 대조구에 비해 박테리오신 활성이 2배 이상 증가하였으나, galactose 1.0%, fructose 1.0% 및 maltose 1.5% 이상 첨가 시에는 대조구 보다 오히려 활성이 감소되었다. 질소원은 0.5%의 beef extract나 tryptone 혹은 0.5와 1.0%의 peptone이나 yeast extract에 의해 대조구와 동일한 활성을 나타내었으나, 그 이상의 농도로 첨가했을 때에는 활성이 감소되었다. 또한 NaCl 0.5%와 K_2HPO_4 0.5% 첨가한 경우 박테리오신의 활성이 대조구보다 2배 증가한 반면, NaCl 2.0%, NH_4PO_4 2.0% 이상, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5% 이상 및 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.0% 이상을 첨가했을 때에는 대조구 활성의 50% 이하로 감소하였다.

참고문헌

1. Monk, M. and Clowes, R. C.: The regulation of colicin synthesis and colicin factor transfer in *Escherichia coli* K12. J. *Gen. Microbiol*., **36**, 385-392 (1964).
2. Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L.W.: Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev., **40**, 722-756 (1976).
3. Abee, T.: Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol*., **129**, 1-10 (1995).
4. Bruno, M. E. C. and Montville, T. J.: Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*., **59**, 3003-3010 (1993).
5. Montville, T. J. and Chen, Y.: Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **50**, 511-519 (1998).
6. Chen, Y. and Montville, T. J.: Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Bacteriol*., **79**, 684-690 (1995).
7. Rilla, N., Martinez, B. and Rodriguez, A.: Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z-producing strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 729. *J. Food Prot*., **67**, 928-933 (2004).
8. Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S., Moncheva, P., Nikolova, I., Dousset, X., and Boyaval, P.: Characterization of a bacteirocin produced by

Streptococcus thermophilus 81. *Int. J. Food Microbiol*., **21**, 147-158 (1998).
9. Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B. and Suarez, J. E.: Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol*., **60**, 2158-2163 (1994).
10. Li, C., Bai, J., Cai, Z. and Ouyang, F.: Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *J. Biotechnol*., **93**, 27-34 (2002).
11. Kim, M. H., Kong, Y. J., Baek, H. and Hyun, H. H.: Optimizatin of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* sp. GO5. *J. Biotechnol*., **121**, 54-61 (2006).
12. Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T.: Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. *J. Microbiol*., **43**, 370-374 (2005).
13. Lim, S. M. and Im, D. S.: Bactericidal effect of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from Dongchimi on *Escherichia coli* O157. *J. Food Hygiene Safety.*, **22**, 151-158 (2007).
14. Holo, H., Nilssen, O. and Nes, I. F.: Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol*., **173**, 3879-3887 (1991).
15. Loubiere, P., Cocaign-Bousquet, M., Matos, J., Goma, G. and Lindley, N.D.: Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Appl. Micriobiol*., **82**, 95-100 (1997).
16. Lejeune, R., Callewaert, R., Crabbe, K and De Vuyst, L.: Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *J. Appl. Microbiol*., **84**, 159-168 (1998).
17. Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S. B., Kook, M. C., Kim, T. S., Hwang, J. K. and Pyun, Y. R.: Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bateriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *J. Biotechnol*., **95**, 225-235 (2002).
18. Kim, W. S., Hall, R. J. and Dunn, N. W.: The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **50**, 429-433 (1997).
19. Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C. and Ray, B.: Influence of growth condition on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol*., **57**, 1265-1267 (1991).
20. Yang, R., Johnson, M. C. and Ray, B.: Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*., **58**, 3355-3359 (1992).
21. 이명숙, 장동석, 강지희: *Lactobacillus* sp. GM7311에 의한 박테리오신의 생산 조건. *한국수산학회지*, **30**, 834-841 (1997).
22. Sabia, C., Manicardi, G., Messi, P., Niederhausern, S. and Bondi, M.: Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflauvs* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *Int. J. Food Microbiol*., **75**, 163-170 (2002).
23. Krier, F., Revol-Junelles, A. M. and Germain, P.: Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. mesenteroides FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **50**, 359-363 (1998).
24. Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K. and Ishizaki, A.: Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **45**, 36-40 (1996).
25. Maisnier-Patin, S., Forni, E. and Richard, J.: Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Int. J. Food Microbiol*., **30**, 255-270 (1996).
26. Parente, E., Ricciardi, A. and Addario, G.: Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **41**, 388-394 (1994).
27. Herranz, C., Martinez, J. M., Rodriguez, J. M., Hernandez, P. E. and Cintas, L. M.: Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **56**, 378-383 (2001)
28. Franz, C. M., Schillinger, U. and Holzapfel, W. H.: Produced and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol*., **29**, 255-270 (1996).
29. 곽규숙, 구재관, 배경미, 전홍기: 김치에서 분리한 *Lactococcus* sp. J-105가 생산하는 Bacteriocin의 특성. *생명과학회지*, **9**, 111-120 (1999).
30. De Vuyst, L.: Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO22186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol*., **78**, 28-33 (1995).
31. Audisio, M. C., Oliver, G. and Apella, M. C.: Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. Int. *J. Food Microbiol*., **63**, 235-241 (2001).
32. Aasen, I. M., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., and Storro, I.: Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **53**, 159-166 (2000).
33. Sanni, A. I., Onilude, A. A., Ogunbanwo, S. T. and Simth, S. I.: Antagonistic activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from ogi, an indigenous fermented food. *J. Basic Microbiol*., **39**, 189-195 (1999).
34. De Vuyst, L. and Vandamme, E. J.: Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentation. *J. Gen. Microbiol*., **138**, 571-578 (1992).
35. Parente, E. and Ricciardi, A.: Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **52**, 628-638 (1999).

36. Kim, W. S., Hall, R. J. and Dunn, N. W.: The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **48**, 449-453 (1997).
37. Ganzle, M. G., Weber, S. and Hammes, W. P.: Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol*., **46**, 207-217 (1999).
38. Beg, Q. K., Saxena, R. K. and Gupta, R.: De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mejavensis* under fed-batch operations. *Process Biochem*., **37**, 1103-1109 (2002).
39. Crandall, A. D. and Montville, T. J.: Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ*, *Microbiol*., **64**, 231-237 (1998).
40. De Vuyst, L. and Vandamme, E. J.: Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **40**, 17-22 (1993).
41. Bizani, D. and Brandelli, A.: Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **65**, 158-162 (2004).
42. Carolissen-Mackay, V., Arendse, G. and Hastings, J. W.: Purification of bacteriocin of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol*., **34**, 1-16 (1997).