

여러 분리원으로부터 유용 미생물의 분리와 산업적으로 유용한 박테리오신의 탐색

백현동 · 허지운

(경남대학교 공과대학 식품공학과)

Screening of novel bacteriocins produced by isolates of various food and feed sources

Hyun-Dong Paik · Ji-Woon Hur

Dept. of Food Engineering, College of Engineering, Kyungnam Univ., Masan 631-701, Korea

적 요

박테리오신(bacteriocin)은 미생물로부터 생산되는 천연의 무독성 방부제(natural preservative)로서 주목받고 있는 항균성 단백질이다. 단백질로 구성되어 있기 때문에 인체에 섭취되면 소화기관의 단백질 가수분해효소에 의해 분해되므로써, 인체에 무독하고 잔류성이 없다는 점에서 식품, 화장품, 농약 및 기타 분야에서의 천연 항생물질로서의 효용성이 증대되고 있다. 대부분의 박테리오신은 생산균주와 매우 가까운 그람 양성균만을 억제하는 매우 제한된 항균범위(narrow spectrum of activity)를 가지고 있어, 우수한 내열성에도 불구하고, 산업화하는데 큰 문제점으로 지적되어 왔다.

따라서 본 연구에서는 여러 식품 및 사료로부터 GRAS로 인정받고 있는 유용 미생물을 분리하고, 이 균주들로부터 항균범위가 넓은 유용 박테리오신을 탐색하였으며 현재까지의 결과는 다음과 같다.

1. 각종 분리원에서 propionibacteria를 선택적으로 분리하기 위한 배지(PAGSA)를 확립하였다.
2. 50종의 김치시료로부터 150종의 젖산균을 분리하였으며, 3종의 균주가 항균범위가 넓은 것으로 확인되었다. 그러나 주 항균효과가 젖산에 의한 가능성에 대해 향후 추가 실험이 필요하다.
3. 치즈로부터 15종의 미생물을 분리하고, 이중 3종의 다른 propionibacteria를 확인하였고 많은 그람음성균에 항균효과가 있음이 확인되었다.
4. Silage로부터 propionibacteria와 젖산균을 15종 분리하였으며, JWS15균주가 가장 항균범위가 넓은 균주로 밝혀졌고, 그람음성균인 *E. coli*, *Pseudomonas*균주에 항균효과가 있었다.
5. 각종 식품으로부터 35종의 바실러스균주를 분리하였으며, 이 중 SS704균주는 테스트한 대부분의 바실러스균주와 대부분의 그람음성균에 매우 큰 활성을 보였고, 주요 식물병원균인 *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*에 뚜렷한 항균활성을 보여 이 들 식물병원성균의 선택적인 방제에 활용이 가능하리라 판단된다.

I. 서 론

식품의 저장성을 향상시키기 위한 방법으로는 가열, 동결

및 건조등 물리적인 방법, 미생물 발효에 의한 방법, 그리고 화학합성 방부제(chemical preservatives)첨가가 대표적이다. 대표적인 화학합성 방부제로는 benzoic acid, sodium benzoate, sorbic acid, propionate, sulfites, acetates,

nitrate 및 epoxide 등이 있다. 이들 대부분은 자체독성 때문에 사용량이 제한되어 있으며, 소비자들(consumers)로부터 외면받고 있는 실정이다. 소비자들은 최근들어 식품의 안전성(food safety)에 매우 관심이 크며, 인공적인 방부제나 식품첨가물이 적게 들어가거나 첨가되지 않은 자연식품(natural food)을 선호하고 있다. 따라서 화학물질인 방부제나 식품첨가물을 줄일수 있는 방법이 시급히 요청되고 있다.

광범위한 항균범위(antimicrobial spectrum of activity)를 가지면서도 고등생물에 대해 무독한 물질에 대한 탐색이 전세계적으로 지속되고 있으며, 그 중에 가장 활발한 분야가 박테리오신(bacteriocin)이다. 박테리오신은 미생물로부터 생산되는 천연의 무독성 방부제(natural biopreservative)로서 주목받고 있는 항균성 단백질이다¹⁶⁾. 단백질로 구성되어 있기 때문에 인체에 섭취되면 소화기관의 단백질 가수분해효소에 의해 분해되므로써, 인체에 무독하고 잔류성이 없다는 점에서 식품등에서의 천연방부제(biopreservative)로서의 효용성이 증대되고 있다. 박테리오신은 비교적 고온에서 불활성화되지 않으며, 광범위한 pH에서 안정성을 갖는 것이 큰 특징이고 무독, 무색, 무취이므로 화학합성 방부제를 대체할 수 있는 천연방부제로서 광범위한 용도개발이 기대된다. 즉, 고추장, 된장, 두부, 유산균 발효제품등에서의 보존 수명연장과 김치, 약주, 탁주등 전통식품의 산패 및 변질방지등이다.

현재 박테리오신은 국내에서 항생물질로 분류되어 있어 식품에 첨가하는 것이 법적으로 허용되고 있지 않다. 그러나 미국, 유럽등 많은 국가에서 nisin이 무독한 식품첨가물로 인정되어 있고 국내 과학자들의 연구개발에 힘입어 이미 상당한 산업화 수준에 와 있고 법개정에 노력을 하고 있는 실정이다. 그러므로 조만간 우리나라에서도 GRAS균주에 의한 박테리오신의 안전성이 인정되어 천연방부제로서 식품에 첨가되어 국민 보건에 크게 도움이 되리라 기대한다.

한편, 이러한 식품에서의 응용뿐만 아니라 고급 화장품에 첨가하는 천연 항생물질로서의 활용도 가능하다. 사료에 첨가하는 무독성 항생물질로의 활용을 위해 축산사료에 공급되는 silage로부터 유용 미생물을 분리하고 유용한 박테리오신을 탐색하는것도 큰 의미가 있다. 또다른 용도로서 농작물에 큰 피해를 주는 식물 병원성균을 선택적으로 방제하기 위한 무독성농약으로의 개발도 생각할 수 있는데 시장성도 큰 데다 GRAS균주에 의한 박테리오신인 경우 법적인 문제에서

식품보다 유리한 점이 있다. 또한 박테리오신 생산 젖산균은 대부분 장내 병원성균을 사멸시키므로 생균제 또는 종균제(probiotics)로서의 사용도 가능하다.

현재 젖산균에서 생산되는 박테리오신의 대부분은 생산균주가 매우 가까운 그람 양성균만을 억제하는 매우 제한된 항균범위를 가지고 있어, 우수한 내열성에도 불구하고 산업화하는데 큰 문제점으로 지적되어 왔다

따라서 본 연구에서는 여러 식품 및 사료로부터 GRAS로 인정받고 있는 유용 미생물들을 분리하고, 이 균주들로부터 항균범위가 넓은 산업성 있는 박테리오신을 탐색하고자 한다.

II. 재료 및 방법

균주 및 배지

여러 분리원에서 분리된 균주들은 항균활성이 확인된 후 최적배지에서 배양한 후, 20%(v/v) glycerol 용액을 첨가하여 -70°C deep freezer에서 보존하였다. 대상균주(indicator organism)로 사용된 균주는 여러 균주보존기관으로부터 분양받았으며, 최적배양조건 및 배지에서 배양하여 사용하였다.

Propionibacteria의 선택배지확립

Propionibacteria 선택배지로 사용된 PAGSA배지의 조성은 Table 1과 같으며 제조방법은 다음과 같다. 즉, 1L의 배지를 제조하기 위하여 용액(I)에 용액(II) 100ml를 혼합한 후, pH를 7.0으로 조정하고, 용액(III)을 첨가한다. 그리고 121°C에서 16분간 가압살균한 후, 55°C 항온수조에서 냉각시킨다. 마지막으로 용액(IV) 10 ml, 용액(V) 10 ml, 용액(VI) 1ml을 혼합한 후, 0.45µm filter membrane을 사용하여 여과살균한 후, 나머지 배지와 무균적으로 혼합하여 PAGSA배지를 만든다.

각종 분리원으로부터의 젖산균분리

수집된 김치, 치즈, silage등으로부터 lactobacilli MRS 배지를 이용하여 젖산균을 분리하였는데, 미생물학적인 형태, 균락, 크기, 색깔등을 고려하여 선발하였으며, 분리된 균

주들은 glycerol stock법으로 -70℃에서 보관한다.

각종 분리원으로부터의 propionibacteria 분리

치이즈, 사료등으로부터 propionibacteria를 분리하기 위해 선택배지인 PAGSA배지를 이용하고 Difco Lab.에서 구입한 anaerobic jar를 이용한 혐기적인 조건하에서 분리한다.

각종 분리원으로부터의 바실러스균 분리

여러 분리원으로부터 바실러스속 균주를 분리하되, TSB배지 또는 선택배지를 사용하고 분리원을 열처리하여 분리효율을 극대화하였다.

Cell-free supernatant의 조제

항균물질의 생산균을 최적배지에서 균주에 따라 24-48시간 배양한 후, 배양액을 7,000 x g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻은후, 0.22 μ m-pore-size cellulose acetate filter를 사용해 얻은 여과액을 2N NaOH용액으로 pH 6.5로 조정하고 catalase를 최종농도가 1 mg/ml가 되게끔 첨가하여 37℃에서 30분간 incubation하여 박테리오신 활성을 측정하기 위한 cell-free supernatant를 조제하였다¹⁵⁾.

항균활성의 측정법

여러 다양한 분리원으로부터 분리된 분리균주에 대한 항균활성을 측정하기 위해 deferred method를 확립하여 사용하였다. 항균물질의 생산을 확인하기위해 여러 분리균주들을 액체배양하여 각각 최적배지 agar plate위에 spot한 후, 콜로니를 형성할 수 있게 최적온도에서 24시간 배양한다. 대상균주를 약 10^7 cells을 포함하는 5ml의 soft agar로 overlay하여 다시 배양하여 저지환(halo)을 확인하여 직경(mm)을 측정한다.

박테리오신 활성 측정법

여러 분리원으로부터 분리된 분리균주의 박테리오신 활성

을 측정하기 위하여 2가지 방법을 확립하여 사용하였다. 첫 번째 방법은 spot-on-lawn method로서 방법은 다음과 같다³⁾. 즉, 분리균주를 액체배지(10ml)에 접종하여 최적온도에서 24시간을 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상등액 5 μ l를 고체배지에 loading한 후 건조시킨다. 그리고 대상균주 10^7 cells을 포함하는 5ml의 soft agar로 overlay하여 다시 12시간 incubation하여 생긴 저지환으로 판단하였다. 박테리오신 활성은 항균물질을 함유한 원액을 적절한 완충용액으로 2배로 희석한 후 각각의 희석액을 spot하여 확실한 저해를 보인 최대희석배수를 역으로 취해 계산하였다. 두 번째 방법인 modified well-diffusion method는 배양상등액으로부터 박테리오신 활성을 보다 정확히 측정하기 위해 well diffusion assay를 변형하여 다음과 같은 측정법을 확립하였으며 방법은 다음과 같다²⁾. 분리균주를 최적배지(MRS배지, NLB배지 또는 TSB배지)에서 24-48시간 배양한 후 4℃에서 7,000 x g 로 원심분리하여 상등액을 얻는다. 배양상등액(또는 부분정제된 시료) 200 μ l를 5mm의 깊이를 가진 base agar에 만든 직경 7mm의 well에 첨가한다. 이때 base agar의 조성은 2.5% agar, 0.85% NaCl, 그리고 0.1% Tween 80 이다. 배양상등액이 agar로 diffuse된 후 agar layer를 뒤집은 후 5ml의 대상균주를 위한 배지 soft agar로 층을 만든다. 이때 soft agar는 0.7% agar와 0.1% Tween 80의 성분으로 되어 있으며 대상균주 10^7 cells을 포함하고 있다. 이 plate들은 저지환이 확인되도록 최적온도에서 약 12-24시간 incubation한다. 박테리오신 활성단위(activity units, AU)는 최소의 분명한 저지환을 보인 희석액(dilutions)의 역(reciprocal)으로 계산된다. 모든 데이터는 2 반복(duplicate)으로 행하여 그 평균값을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

Propionibacteria의 선택배지의 확립 및 분리 효율성 검증

스위스치즈(swiss cheese)등에서 분리되어 GRAS균주로 인정되어 있는 dairy propionibacteria에서의 박테리오신 연구가 최근에 관심을 끌고 있다. 그 이유는 아이오와 주립 대학교(Iowa State Univ.)에서 연구되어온 propionic PLG-1이 그람양성균, 그람음성균, 일부효모 및 곰팡이에도

항균효과가 있다는 것이 보고되어 있으며, 미국 산업계에서 큰 관심을 보여 실용화에 근접해 있다^{6,8,9,11,12,14}. 따라서 국내 여러 발효식품으로부터 propionibacteria를 분리하고 박테리옌 생산을 검토하는 것은 매우 의미있다고 할 수 있다.

일반적으로 propionibacteria를 배양시키기 위하여

NLB(sodium lactate broth)배지를 사용하는데, 이 배지에서는 젖산균 등 다른 균주들이 함께 자라기 때문에 선택적으로 propionibacteria를 분리하기 위한 선택배지를 확립하는 것이 큰 과제였다.

대부분의 분리원에서 propionibacteria를 분리하기 위해서는 다른 균주(젖산균 등)와의 배양특성, 배지, 배양조건을 고

Table 1. Composition of selective medium (PAGSA) for classical

Group	Ingredients	Propionibacteria
I	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.6g	Mix all ingredients together
	Biotin 0.025g	
	Adenosine 1.34g	
	Aspartate 1.0g	
	Cysteine 0.6g	
	Methionine 0.2g	
	Serine 0.2g	
	Agar 12.0g	
	Sodium lactate syrup 20.0ml	
Deionized distilled H ₂ O 879.0ml		
II	Phosphate buffer :	Adjust pH to 7.0. Sterilize in the autoclave. (final vol : 500ml)
	0.2M KH ₂ PO ₄ 97.5ml	
	0.2M K ₂ HPO ₄ 152.5ml Deionized distilled H ₂ O 250.0ml	
III	Sodium propionate 10.0g	
IV	Minerals :	Mix and dissolve; immediately add 0.25ml conc. HCl. Do not sterilize
	MgSO ₄ 7H ₂ O 1.0g	
	MnSO ₄ 4H ₂ O 0.03g	
	FeCl ₃ 6H ₂ O 0.01g	
	CoCl ₂ 6H ₂ O 0.01g Deionized distilled H ₂ O 100.0ml	
V	Vitamins :	Dissolve; filter sterilize
	Thiamine HCl 0.168g	
	Calcium pantothenate 0.24g Deionized distilled H ₂ O 100.0ml	
VI	Gentamicin :	Dissolve; filter sterilize
	Gentamicin sulfate 500mg Deionized distilled H ₂ O 50.0ml	

Table 2. Selectivity of PAGSA medium on some propionibacteria and lactic acid bacteria

Strain	Medium		
	MRS agar	NLA	PAGSA
<i>P. acidipropionici</i> P9	-	2.1 x 10 ⁸ /ml	1.8 x 10 ⁸ /ml
<i>P. freudenreichii</i>	-	4.6 x 10 ⁸ /ml	4.2 x 10 ⁸ /ml
<i>L. delbrueckii</i> ATCC 4797	2.4 x 10 ⁹ /ml	-	< 1 x 10 ⁴ /ml
<i>Lactobacillus</i> sp. P1	7.8 x 10 ⁸ /ml	-	< 1 x 10 ⁴ /ml
<i>Lactococcus</i> sp. P14	7.1 x 10 ⁸ /ml	-	< 1 x 10 ⁴ /ml

려해야만 한다. 그 중에서도 선택적으로 propionibacteria의 분리효율을 높이기 위한 방법으로 아이오와 주립대학교에서 개발되어 있는 선택배지(selective medium)³⁾를 변형하여 가격이 비교적 저렴한 선택배지를 확립하였다. 이 배지에는 sodium propionate와 gentamicin, 여러 vitamins과 minerals이 함유되어 있어 propionibacteria의 생육을 촉진(vitamins & minerals 때문)하고 다른 균주들의 생육을 억제(sodium propionate & antibiotics 때문)하게 된다. 2종의 propionibacteria와 3종의 젓산균을 대상으로 예비실험한 결과 검토된 젓산균에 대해 강력한 억제작용을 하여 선택적으로 propionibacteria만을 자라게 함을 확인할 수 있었다(Table 1).

김치로부터의 유용 미생물분리 및 유용 박테리옌 탐색

우리나라의 대표적인 전통발효식품인 김치는 소금에 절인 배추나 무우, 오이등에 여러 채소류 및 조미료를 첨가하여 일정시간 발효시키는 일종의 채소발효식품이다. 김치발효에 관여하는 미생물의 변화는 호기성세균이 초기에 증가하다가 감소하게 되며, 이어 혐기성세균이 많이 번식하여 젓산, 이산화탄소, 알코올등을 생성하여 김치를 혐기상태 및 산성화하여 호기성세균을 생육억제하는 것으로 알려져 있으며, 김치 발효 중반이후에는 *L. plantarum*이 급격히 증가하여 김치 산패에 관여하는 것으로 알려지고 있다^{7,10)}.

김치에서 분리된 박테리옌에 관한 연구는 1983년 박 등¹⁸⁾의 연구에서 시작되었다. 즉, 분리된 두 균주(*Pediococcus cerevisiae* A7와 *Leuconostoc* sp. C4)가 *Streptococcus faecalis*등에 항균효과를 가지고 있다고 보고하였다. 한편, 하 등⁴⁾은 유용 박테리옌 생산균주로서 *Enterococcus faecalis* DU 0267을 분리하여 *Listeria monocytogenes*등

Table 3. Antimicrobial spectrum of activity of strain KD-19-1 isolated from kimchi by deferred method (Inhibition diameter: mm)

Indicator strain	Isolates		
	KD-17-2	KD-19-1	KD-50-3
Gram-positive bacteria			
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	5.5	6.5	6.0
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC 1626	5.0	4.0	5.0
<i>Lactococcus</i> sp. BH5	17.0	18.0	12.0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCCM 11324	9.8	8.0	11.0
<i>Leuconostoc curvatus</i> CA170-12	8.0	7.0	6.5
<i>Bacillus cereus</i>	25.0	25.0	23.0
<i>Bacillus pumilis</i>	41.0	42.0	42.0
<i>Bacillus subtilis</i>	28.0	29.0	28.0
<i>Propionibacterium acidipropionici</i> P5	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 32359	34.0	34.0	28.0
Gram-negative bacteria			
<i>E. coli</i> KCCM 32396	29.0	25.5	34.0
<i>E. coli</i> JM 109	32.0	31.0	33.0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	54.0	>40.0	>40.0
<i>Pseudomonas cepacia</i> (SBA 9613)	26.0	46.0	22.0
<i>Pseudomonas cepacia</i> (SBA 9611)	42.0	36.0	28.0
<i>Pseudomonas fluorescence</i>	43.0	32.0	28.0
<i>Pseudomonas putida</i>	42.0	>40.0	>40.0
<i>Xanthomonas maltophila</i>	31.0	39.0	24.0
<i>Chryseomonas luteola</i>	62.0	64.0	42.0
<i>Sphmonas paucimobilis</i>	40.0	40.0	40.0
Yeast and Molds			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 11201	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i> KCCM 11239	0	0	0
<i>Aspergillus oryzae</i> KCCM 11371	0	0	0
<i>Penicillium chrysogenum</i> KCTC 6933	0	0	0

Table 4. Antimicrobial spectrum of activity of isolated from cheese by deferred method (Inhibition diameter:mm)

Indicator strain	Isolates		
	KS-17-2	KD-19-1	KD-50-3
Gram-positive bacteria			
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	0	0	0
<i>Lactococcus</i> sp. BH5	2.0	2.0	2.0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCCM 11324	0.5	1.0	0
<i>Leuconostoc curvatus</i> CA170-12	0	0	0
<i>Bacillus pumilis</i>	0	0.5	0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0
Gram-negative bacteria			
<i>E. coli</i> KCCM 32396	0	2.0	1.0
<i>E. coli</i> JM 109	0	+/- (hazy)	3.0
<i>Pseudomonas cepacia</i> (SBA 9613)	8.0	NC	NC
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	8.0	11.0	6.0
<i>Xanthomonas maltophila</i>	4.0	1.0	4.0
<i>Chryseomonas luteola</i>	6.0	12.0	11.0
<i>Sphmonas paucimobilis</i>	10.0	10.0	11.5

NC; Not checked.

Table 5. Antimicrobial spectrum of activity of isolated from silage by deferred method (Inhibition diameter:mm)

Indicator strain	Isolates			
	JWS-6	JWS-8	JWS-9	JWS-15
Gram-positive bacteria				
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	0.5	0.5	0	0.5
<i>Lactococcus</i> sp. BH5	3.0	4.0	0	6.0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCCM 11324	2.0	3.0	0	3.0
<i>Leuconostoc curvatus</i> CA170-12	3.0	2.0	0	4.0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus pumilis</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	28.0	0	0	0
Gram-negative bacteria				
<i>E. coli</i> KCCM 32396	2.5	0	0	3.0
<i>E. coli</i> JM 109	4.0	3.0	2.0	0.5
<i>Pseudomonas cepacia</i> (SBA 9613)	0	0	0	0
<i>Pseudomonas cepacia</i> (SBA 9611)	0	0	0	0.5
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	0	0	0	1.0
<i>Xanthomonas maltophila</i>	2.0	1.0	0	0
<i>Chryseomonas luteola</i>	14.0	18.0	22.0	12.0
<i>Sphmonas paucimobilis</i>	8.0	10.0	6.5	2.0

의 유해균에 효과있음을 보고한바가 있다.

경남대 식품공학과 3학년에 재학중인 학생들에게 의뢰하여 수집한 김치시료 및 시판중인 시료 50종에서 총 150균주를 분리하여 보존하고 있으며, 각각의 분리균주에 대해 항균활성을 측정하였다. 1차적으로 2종의 대상균주에 대해 43종의

분리균주가 항균효과가 있음을 확인하였고, 다시 2차시험으로 4종의 대상균주에 대해 3 균주(KD-17-2, KD-19-1, KD-50-3)가 항균효과가 있음을 확인한 후, 이 3균주에 대해 항균범위를 검토하였다(Table 3). 3균주 모두 deferred method를 이용해 항균활성을 측정하였는데 매우 비슷한 항

Table 6. Antimicrobial spectrum of activity of a *Bacillus* isolated(SS704) by spot-on-lawn and modified well-diffusion method

Indicator	Growth medium	Temp. (°C)	Inhibition diameter zone (mm)	
			spot-on-lawn	modified well-diffusion
Gram positive bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	NB	30	-	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14593	NB	30	-	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051a	NB	30	-	0
<i>Bacillus megaterium</i> IAM 1245	NB	30	+	38.0
<i>Bacillus sphaericus</i> KCTC 1184	NB	30	+	31.0
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	NB	37	+	25.0
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1013	NB	30	+	24.5
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1014	NB	30	+	21.0
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1823	NB	45	+	8.0
<i>Bacillus polymyxa</i> KCTC 1099	NB	30	-	0
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	NB	37	+	12.0
Gram negative bacteria				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9492	NB	37	+	14.0
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2191	NB	37	+	15.0
<i>Erwinia herbicola</i> (an isolate)	NB	30	+	23.5
<i>Pseudomonas syringae</i> (an isolate)	NB	30	+	22.0
<i>Pseudomonas syringae</i> KCTC 2440	NB	30	+	14.0
<i>Xanthomonas campestris</i> (an isolate)	NB	26	+	25.0
Yeast and Molds				
<i>Saccharomyces uvarum</i> IAM 4727	YM	24	-	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2346	YM	24	-	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	YM	24	-	0

균범위를 보였다. 검토된 대상균의 대부분의 그람양성균, 그람음성균에 항균효과가 있었으나, 효모 및 곰팡이에는 효과가 없었다. 3균주의 항균범위가 너무 유사하기 때문에 동일한 균주일 가능성도 생각할 수 있겠다. 그리고 이 들 균주가 젖산등 항균물질을 생산한다면, 주 항균효과가 젖산에 의한 생육저해때문 일 수 있으므로 앞으로 확인이 필요하겠다.

치이즈로부터의 유용 미생물분리 및 유용 박테리오신 탐색

치이즈로부터 분리된 15종의 분리균주 중 3종의 서로 다른 propionibacteria를 확보하였으며, 이 들 균주들이 서로 다른 종류임을 형태학적 성질, 생화학적인 특성등을 검토하여 확인하였다(Data not shown). 세 균 모두 *L. delbrueckii* ATCC 4797와 *Leuconostoc curvatus* CA170-2에 대해 항

균효과가 없었으며, 대부분의 그람음성균 (*E. coli*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Chryseomonas*, *Sphmonas*)에 항균효과가 확인되었다. 좀 더 많은 균주에 대해서 항균효과를 검토하는 것이 필요하겠다(Table 4).

Silage로부터의 유용 미생물분리 및 유용 박테리오신 탐색

축산사료에 공급되는 3종의 silage로부터 propionibacteria 및 젖산균을 15균주를 분리하였다. 3종의 시료는 모두 P회사의 우유공급목장에서 채취하였는데, 시료 A는 배합사료(TMR)로 개인이 여러 가지로 혼합하여 먹이기 위한 것이었는데, 4종의 균주(JWS1, JWS2, JWS9, JWS10)를 분리하였다. 시료B는 역시 같은 목장에서 채취된 사탕수수 건초에서 었는데, 7종의 균주(JWS3, JWS4,

JWS5, JWS11, JWS12, JWS13, JWS14)를 분리하였다. 시료C는 착유용 아람사료로서 사용되는 것이었는데 4종의 균주(JWS6, JWS7, JWS8, JWS15)를 분리하였다. 1차적으로 2종의 대상균주(*L. delbrueckii* ATCC 4797와 *E. coli* JM 109) 중 한 균주 이상에서 항균효과가 확인된 균주는 4종으로 밝혀졌다(Data not shown). 4종의 분리균주에 대해 항균범위를 측정 한 결과, JWS15균주가 가장 항균범위가 넓은 것으로 밝혀졌는데, 검정된 *E. coli* 2균주(KCCM 32396와 JM 109)모두와 *Pseudomonas* 3균주중 2균주에 대해 항균활성을 가지고 있었다. 선발된 4종의 분리균주들은 바실러스균주에 대해서는 전혀 항균활성을 보이지 않았다(Table 5).

바실러스속 미생물의 분리 및 유용 박테리옌 탐색

바실러스속 균주들은 산업적으로 매우 중요한 의미를 가지고 있으며, 식품 및 농업분야에서 비교적 안전하게 이용되어 왔다. 현재 바실러스속 균주의 미생물발효에 의하여 각종 효소, 항생물질, 아미노산, 미생물 살충제 및 비스판균에 의한 정장제 등이 산업화되어 있는 실정이다. 그러나, 이 바실러스속 균주에 의한 박테리옌 생산에 관한 보고는 제한되어 있는 형편이다^{2,5,17)}. 본 연구에서 분리된 바실러스균주는 35종이었으며, 1차 스크리닝을 통해서 6균주가 항균효과가 있는 것으로 확인되었으며(Data not shown), 그중 SS704균주는 spot-on-lawn method와 modified well-diffusion method에 의해 double check하였다. 대상균주중 *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* 및 효모, 곰팡이에 대해서는 항균활성을 보이지 않았지만, 대부분의 바실러스 균주에 대해 항균활성을 나타내었고, 대부분의 그람음성균에 매우 큰 활성을 보였다. 특히 주요 식물병원균으로 꼽히는 *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*에 대해 뚜렷한 항균활성을 보여 식물병원균의 방제를 위한 무독성 항생물질로의 활용을 고려할 수 있겠다.

참고문헌

- Cheigh, H.S. and K.Y. Park. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi(Korean fermented vegetable products). Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 34:175-203.
- Favret, M.E. and A.A. Youston. 1989. Thuricin: the bacteriocin produced by *B. thuringiensis*. J. Invert. Pathol. 53:206-216.
- Fisher, G. 1991. Selective medium for isolation of classical propionibacteria. MS Thesis, Iowa State University, Ames.
- 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.
- Hansen, J.N., Y.J. Chung, W. Liu, and M.T. Steen. 1991. Biosynthesis and mechanism of action of nisin and subtilin, p. 287-302. In G. Jung and H.-G. Sahl (ed.), nisin and novel lantibiotics. Escom. Publishers, Leiden, The Netherland.
- Hsieh, H., H.D. Paik and B.A. Glatz. 1996. Improvement of detection and production of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. J. Food Prot. 59:734-738.
- Lee, D.S. and H.D. Paik. 1997. Use of pinhole to develop an active packaging system for kimchi, a korean fermentaed vegetable product. Packaging Technol. Sci. 10:33-43
- Lyon, W.J. and B.A. Glatz. 1991. Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. Appl. Environ. Microbiol. 57:701-706.
- Lyon, W.J. and B.A. Glatz. 1993. Isolation and purification of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*. Appl. Environ. Microbiol. 59:83-88.
- Mheen, T.I. and T.W. Kwon. 1984. Effect of temperature and salt content on kimchi

- fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 16:443-450.
11. Paik, H.D. 1995. Enhanced production, purification, and characterization of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii* P127. Ph.D. Dissertation, Iowa State University, Ames.
 12. Paik, H.D. and B.A. Glatz. 1995. Purification and partial amino acid sequence of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii* P127. Lait 75:367-377.
 13. Paik, H.D. 1996. Bacteriocins: Assay, biochemistry, and mode of action. J. Food Sci. Nutr. 1:269-277.
 14. Paik, H.D. and B.A. Glatz. 1997. Enhanced bacteriocin production by *Propionibacterium thoenii* in fed-batch fermentation. J. Food Prot. In Press.
 15. Sudirman, I., F. Mathieu, M. Michel and G. Lefebvre. 1993. Detection and properties of curvaticin 13, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus curvatus* SB13. Curr. Microbiol. 27:35-40.
 16. Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40:722-756.
 17. Von Tersch, M.A. and B.C. Carlton. 1983. Bacteriocin from *Bacillus megaterium* ATCC 19213: Comparative studies with megacin A-216. J. Bacteriol. 155:866-871.
 18. 박연희, 권정주, 조도현, 김수일. 1983. 김치에서 분리한 젖산균의 미생물 생육저해. 한국농화학회지 26:35-40.