

김치의 *Pediococci*에 존재하는 Plasmid DNA 분리

박연희 · 류육상 · 조도현

아주대학교 생물공학과

Isolation of Plasmid DNA in *Pediococci* from Kimchi

Yun-Hee Park, Uk-Sang Ryu and Do Hyun Jo

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon, Korea

Abstract

Three species of *Pediococci*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus halophilus* were isolated from Kimchi. *P. pentosaceus* and *P. acidilactici* showed inhibitory activity against *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas* sp., P20 and *Vibrio parahaemolyticus*. However, the growth of all test organisms was not inhibited by *P. halophilus*. Ten strains contained one to seven plasmids, ranging in size from 1 to 60 megadaltons.

서 론

젖산균의 미생물 생육저해 작용은 낙농발효의 젖산균뿐만 아니라 채소류의 젖산 발효에 관련된 *Pediococcus* spp.^{1,2,3,4,6)} *Leuconostoc* spp.¹⁾ *Lactobacillus plantarum* 등^{4~6)}에서도 밝혀졌으며 우리나라의 김치에서 분리한 젖산균에서도 이와 같은 작용이 있는 것으로 밝혀졌다.^{7,15)}

이러한 생육 저해 사용을 나타내는 원인 물질에 대하여는 *streptococcus lactis*를 비롯한 여러 종류의 젖산균에서 특성이 다른 항균성 물질을 생성하는 것이 알려졌다.^{8,9,10,11,12,13,14,17,24)} 항균성 물질의 본질은 *Lactobacillus acidophilus*가 생성하는 Lipid 계통의 물질인 경우도 있으나¹²⁾ 대부분은 단백질 계통의 물질인 것으로 나타났으며^{9,10,13,14,16,24)} 전보에서는¹⁵⁾ 김치에서 분리한 *Pediococcus* 가 생성하는 물질이 열에 대단히 불안정한 성질을 가지고 있음을 확인하였다. 한편 Mckay 등과^{16,17)} Davey는¹⁸⁾ 각각 *Streptococcus lactis*와 *Streptococcus cremoris*에서 bacteriocin 생성이 plasmid DNA에 연관됨을 밝혔으며 Graham과 Mckay는¹⁹⁾

*Pediococcus cerevisiae*에서도 bacteriocin과 유사한 물질생성이 Plasmid DNA에 관련됨을 보고하였다.

본 연구에서는 김치 발효의 젖산균 중에서 *Pediococcus* spp.를 분리정하고 이의 저해작용의 원인 물질 생성기구를 규명하기 위한 기본적 실험으로 이 균주들에서 plasmid DNA의 존재를 확인하고 대략적인 분자량을 측정하였다.

실험 재료 및 방법

사용 균주

본 실험에서 사용한 *Pediococci*는 발효중인 김치에서 분리하였다. 이 *Pediococci*의 생육저해 작용을 조사하기 위하여 test organism으로 사용한 *E. coli* ATCC 10536과 *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* SKD 1007은 각각 “한국 종균 협회”와 성균관 대학교 낙농 미생물 실험실로부터 분양받았다. *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 27519는 경기도 보건연구소로부터 분양받았으며 *Pseudomonas* sp., P20은 본 실험실에서 분리 보관중인 것을 사용하였다.

Plasmid DNA의 분자량 측정에 standard로 사

1987년 12월 30일 수리

Corresponding author: Y.H. Park

본 연구는 아주대학교 교내연 구비의 보조로 수행되었음.

용한 *Streptococcus lactis* ML3는 미국 Minnesota 대학 Dept. of Food Science and Nutrition의 Dr. Mckay로부터 분양받아 사용하였다.

젖산균의 분리 및 동정

젖산균의 분리는 전보와 같은¹⁵⁾ 방법을 사용하였으며 분리한 젖산균의 동정은 Bergey's manual of Systematic bacteriology²⁰⁾에 의하였다.

생육 저해 작용의 조사

Fleming 등¹¹⁾에 의한 seeded agar screening technique를 사용하였다. 즉, 분리한 젖산균을 trypicase soy(TS) agar²⁷⁾에 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 다음 그위에 trypicase soy soft agar¹¹⁾에 30°C에서 24시간 배양한 test organism 균액을 0.5% 접종하여 덮은 후 30°C에서 24~48시간 배양하여 젖산균 colony 주위에 0.5mm이상 생육 저해대가 생긴 경우 생육 저해작용이 있는 것으로 판정하였다.

Plasmid DNA의 분리

Plasmid DNA의 분리는 Meyers 등,²⁰⁾ Guerry 등²¹⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, lysis broth²⁸⁾ 40ml에 2차 계대한 젖산균 배양액을 1% 접종하여 32°C에서 24시간 배양한 다음 Sorvall SS34 rotor로 8000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 균체를 10ml TES buffer(30mM Tris, 50mM NaCl, 5mM Na₂EDTA, pH8.0)로 쟁은 후 1ml Sucrose buffer(25% W/V sucrose, 50mM Tris, 1mM Na₂EDTA, 0.299g NaCl/500ml, pH8.0)로 재현탁한 후 여기에 lysozyme 용액(0.25M Tris에 lysozyme 10mg/ml을 용해) 0.25ml를 가하여 37°C에서 5~7분 방치하였다가 0°C에 보관한 0.25M EDTA (0.25M Na₂EDTA, 0.05M Tris, pH8.0)와 5% SDS를 0.4ml를 가하여 조용히 흔들어 균체를 용해시켜 5M NaCl 용액 0.7ml를 가하여 얼음에 5~10분 방치한 다음 4°C에서 27000×g로 30분간 원심분리한 후에 조심하여 상동액을 옮겼다. 이 상동액에 같은 양의 chloroform(chloroform : isoamylalcohol=24 : 1)을 가하여 10번 정도 거꾸로 반전하면서 혼합한 후 얼음에 5분간 방치하였다가 4°C에서 11000rpm으로 원심분리하여 상층액을 마이크로 피펫으로 시험판에 옮겼다. 이 상층용액의 부피에 대하여 1/10배의 3M Na-acetate와 2배의

95% Ethanol(-30°C에 보관)를 가한 후 잘섞어 -30°C에서 4시간 이상 방치하였다. 이것을 -10°C에서 12000×g로 20분간 원심분리하여 상동액을 버리고 원심 tube를 완전히 말린 다음 전조 DNA를 TES buffer 100μl에 녹였다. 여기에 RNase 10μl(RNase를 1000μg/ml 되게 50mM Na-acetate, pH5.0에 녹이고 90°C에서 10분간 가열)를 가하여 37°C에서 1시간 이상 둔 다음, 전기영동 하였다.

Agarose gel 전기영동

Plasmid DNA sample 2~25μl을 작은 tube에 옮기고 염색용액(bromophenol blue 0.07%, SDS 7%, glycerol 33%를 물에 용해) 5μl을 가한 다음 0.625% agarose gel(전기영동 완충액—89mM Tris, 2.5mM Na₂EDTA, 89mM Boric acid, pH 8.0—에 녹인 것)에 옮겨 80V, 22mA에서 약 6~7시간 정도 전기영동시킨 다음, Ethidium bromide 5μg/ml에서 30분간 처리한 후, 증류수에 1시간 담그었다가 polaroid camera로 촬영하였다.²¹⁾

결과 및 고찰

*Pediococci*의 생육저해작용

지금까지 김치발효에 관련된 *Pediococcus*로는 *Pediococcus cerevisiae*만이 알려져있었으나²³⁾ 본 실험에서 분리한 균주를 동정한 결과 3종의 *Pediococci*를 얻었다.

즉, *Pediococci* 36주 중에서 *P. pentosaceus*가 28주로 가장 많았으며 *P. acidilactici*가 4주, *P. halophilus*도 1주 발견되었다. 이 *Pediococci*를 대표적 indicator organism으로 사용되는 *E. coli*, *Streptococcus faecalis*와 우리나라에서 많은 식중독을 일으키는 *Vibrio parahaemolyticus*, 또한 식품의 대표적 호狞성 부페세균인 *Pseudomonas* sp., P20에 대하여 생육저해작용을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 이들 *Pediococci*의 생육저해작용은 같은 종에서도 균주에 따라 상당한 차이를 보여 *P. pentosaceus*는 8주 모두 *S. faecalis*와 *Pseudomonas* sp., P20의 생육을 저해하였으나 *E. coli*와 *V. parahaemolyticus*에 대한 작용은 균주에 따라 생육 저해 여부가 다르게 나타났다. *P. acidilactici*는 3주 모두 *S. faecalis*와 *V. parahaemolyticus*의 생육을 저해하였으나 AN2는 *E.*

Table 1. Inhibition of test organisms by *Pediococci* strains grown on agar surface

Test Organisms <i>Pediococci</i> strains	<i>E. coli</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Pseudomonas</i> sp., P20
<i>P. pentosaceus</i>				
AN 6	—	+	+	+
AN 7	—	+	—	+
AN 12	+	+	—	+
AN 15	—	+	—	+
AN 16	+	+	—	+
AN 20	+	+	+	+
AS 3	+	+	—	+
AS 24	+	+	+	+
<i>P. acidilactici</i>				
AN 2	+	+	+	—
AS 2	—	+	+	+
AS 15	—	+	+	+
<i>P. halophilus</i>				
AN 3	—	—	—	—

*coli*의 생육저해 작용을 가진 반면 *Pseudomonas* sp., P20의 생육을 저해시키지 못하였고, 다른 두 균주는 그와 반대로 *E. coli*에 대하여 저해작용이 없었고, *Pseudomonas* sp., P20의 생육을 저해시켰다. 그러나 *P. halophilus*는 4종의 test organism에 대하여 아무런 저해작용이 없었다.

Pediococcus spp.의 생육저해작용은 이미 오래 전부터 알려져 1975년 Fleming 등은¹⁾ *P. cerevisiae*가 *S. faecalis* 등 수종의 Gram 양성균에 대한 작용을 가지나 *E. coli*, *Pseudomonas* 등 Gram 음성균에 대하여는 저해작용이 없다고 보고하였다. 그러나 Racchach 등은²⁾ *P. cerevisiae*가 *Pseudomonas fluorescens* 등 수종의 *Pseudomonas*에 대해 생육 저해 작용을 한다고 보고하였으며 저자들이 전보에서³⁾ 조사한 *Pediococcus* spp.도 대부분 *E. coli*나 *Pseudomonas aeruginosa*의 생육을 저해하였다.

*Pediococci*의 Plasmid DNA 확인

Table 2에서 보는 바와 같이 3종의 *Pediococci*에는 plasmid가 존재하지 않는 균주도 있으며 가장 많은 것은 7개의 Plasmid를 가진 균주도 있는 것이 밝혀졌다. *P. pentosaceus*는 10주 중에서 3주는 plasmid가 발견되지 않았으며 7주는 한개의 plasmid를 가진 것부터 7개의 Plasmid를 가지고

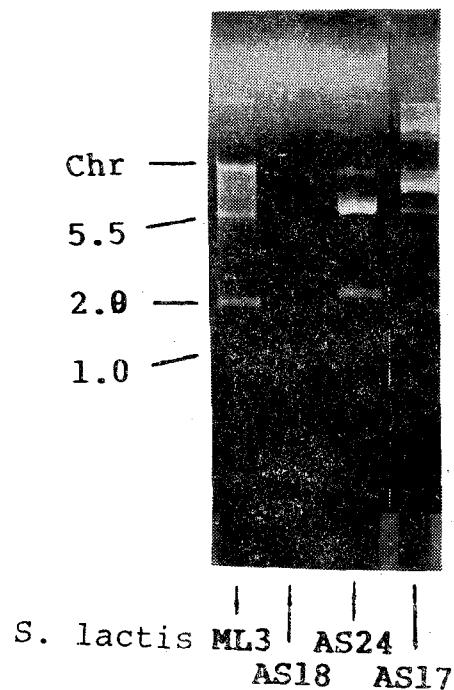


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns of ethanol-precipitated DNA from *P. pentosaceus* strains

S. lactis ML3 was used as molecular mass standard. The molecular mass of *P. pentosaceus* plasmids is shown in Table 2.

Table 2. *Pediococci* strains and Plasmid DNA size

Strain	Plasmid Composition(Mdal)						
<i>P. pentosaceus</i>	AS 3	None					
	AS 14	5.5	2.0				
	AS 17	60.0	50.0	8.0	5.8	5.3	3.1
	AS 18	5.5	2.0				
	AS 24	60.0	5.8	2.4	1.8		
	AN 7			None			
	AN 12	30.0	8.1	4.7	3.6		
	AN 15			None			
	AN 16	7.0	3.9				
	AN 20	40.0	6.2	5.0	4.7	3.9	3.3
<i>P. acidilactici</i>	AS 2		None				
	AS 15	30.8	8.0	5.0	3.8	2.8	1.1
	AN 2	5.5	3.3				
<i>P. halophilus</i>	AN 3	9.2	5.5	4.2	2.2		

있었다(Fig. 1). Plasmid DNA의 분자량은 10Mdal 이하의 작은 plasmid가 많으나 균주에 따라서 차이가 있어 AN12에는 30Mdal plasmid, AN20에는 40Mdal plasmid가 존재하였고 AS24에는 60Mdal의 큰 plasmid가 발견되었으며 AS17에는 50Mdal, 60Mdal의 plasmid가 있는 것으로 나타났다.

*P. acidilactici*에는 3주 중에서 1주는 plasmid가 없었으며 AS15에는 6개의 plasmid가 존재하여 1.1Mdal에서 30.8Mdal까지 분자량이 측정 되었다. 4종의 test organism에 대하여 생육저해 작용이 없었던 *P. halophilus*에서도 4개의 plasmid가 확인되었다.

*Pediococci*에서는 이미 Gonzalez 등이²⁵⁾ *P. pentosaceus*와 *P. acidilactici*에서 각각 3개와 2개의 Plasmid DNA가 존재함을 보고하였으며 Graham 등은¹⁹⁾ *P. pentosaceus*에서 3개 내지 5개의 Plasmid DNA를 분리하여 보고하였다. 그러나 이들 Plasmid DNA의 특성에 대하여는 극히 일부가 밝혀지기 시작하여 *P. cerevisiae*에서 bacteriocin 생성,¹⁹⁾ *P. pentosaceus*에서 raffinose의 발효가²⁶⁾ plasmid DNA에 연관된 것임을 시사하였다. 본 실험에서 분리한 Plasmid DNA의 특성은 아직 확인하지 못하였으므로 앞으로 더 많은 연구가 기대된다.

초 록

김치에서 분리한 *Pediococci*를 동정한 결과 *Pe-*

diococcus pentosaceus, *Pediococcus acidilactici* 및 *Pediococcus halophilus*의 세종으로 밝혀졌다. 이 *Pediococci*의 미생물 생육저해 작용을 조사한 결과 *P. pentosaceus*는 모두 *Streptococcus faecalis*와 *Pseudomonas* sp., P20에 대하여 생육저해작용을 나타내었다. *P. acidilactici*는 *S. faecalis*와 *Vibrio parahaemolyticus*의 생육을 저해하였으나 *P. halophilus*는 4종의 test organism에 대하여 저해작용이 없었다. 이들 *Pediococci*는 균주에 따라 한개로부터 일곱개의 plasmid DNA를 가지고 있으며 그 분자량은 약 1 Mdal에서부터 약 60 Mdal 사이의 여러 크기의 plasmid DNA가 존재함이 밝혀졌다.

참 고 문 헌

1. Fleming, P.H., Etchells, J.L. and Costilow, R.N.: Appl. Microbiol., 30(6) : 1040(1975)
2. Gilliland, S.E. and Speck, M.L.: J. Food Sci., 40 : 903(1975)
3. Haines, W.C. and Harmon, L.G.: Appl. Microbiol., 25 : 436(1973)
4. Dubois, G., Baumier, H. and Charbonneau, R.: J. Food Sci., 44 : 1649(1979)
5. Racchach, M., Baker, R.C., Regenstein, J.M. and Mulnix, E.J.: J. Food Sci.; 44 : 43(1979)

6. Bartholomew, D.T. and Blumer, T.N.: *J. Food Sci.*, 45 : 420(1980)
7. 박연희, 권정주, 조도현, 김수일: *한국농화학회지*, 26, 35(1983)
8. Hurst, N.: *Advanced Appl. Microbiol.*, 27 : 85(1981)
9. Reddy, G.V., Shahani, K.M., Friend, B.A. and chandan, R.C.: *Cultured Dairy Prod. J.*, 18(5) : 15(1983)
10. Barefoot, S.F. and Klaehammer, T.R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 1808(1983)
11. Ernst Kuhnhen, Hans-Georg Sahl and Henning Brandis: *J. Gen. Microbiol.*, 131 : 1925(1985)
12. Shahani, K.M., Vakil, J.R. and Kilara, A.: *Cultured Dairy Prod. J.*, 11 : 14(1976)
13. Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrranski W.T.: *J. Dairy Res.*, 45 : 247(1978)
14. Davey, G.P. and Richardson B.C.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 1808(1983)
15. 박연희, 조도현: *한국농화학회지*, 29 : 207(1986)
16. Larsen L.D. and Mckay, L.L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 36 : 944(1978)
17. Scherwitz, K.M., Baldwin K.A. and Mckay, L.L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 1506 (1983)
18. Davey, G.P.: *App. Environ. Microbiol.*, 48 : 895(1984)
19. Graham, D.C. and Mckay, L.L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 50 : 532(1985)
20. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: "Bergey's manual of Systematic bacteriology," 9 edition, Williams Wilkins(1984)
21. Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P., Falkow, S.: *J. Bacteriol.*, 127 : 1529(1976)
22. Guerry, P., Leblanc, D.J. and Falkow, S.: *J. Bacteriol.*, 116 : 1064(1973)
23. Tae-Ick Mheen and Tai-Wan Kwon: *Korean J. Food Sci. Technol.*, 16 : 443(1984)
24. Geis, A., Singh, J. and Teuber, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 205(1983)
25. Gonzalez, C.F. and Kunka, B.S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 : 81(1983)
26. Gonzalez, C.F. and Kunka, B.S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 51 : 105(1986)
27. American Public Health Association: In "Standard Methods for the examination of water and Wastewater" 16thed. (1985)
28. Klaenhammer, T.R., Mckay L.L., and Baldwin K.A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 35 : 592~600(1978)