

김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* Lp2의 항균작용

박연희* · 송현주

아주대학교 생물공학과

Antimicrobial Activity of *Lactobacillus plantarum* Lp2 Isolated from Kimchi

Park, Yun-Hee* and Hyun-Joo Song

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 441-749, Korea

Abstract — The inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* Lp2 isolated from Kimchi was investigated against *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Str. faecalis*, *P. aeruginosa* and psychrotrophic strain Pc1. The addition of ether extract from Lp2 culture broth completely inhibited the growth of *E. coli*, *P. aeruginosa* and Pc1, but the inhibitory action was weak against *S. aureus* and *Str. faecalis*. The inhibitory substance(s), soluble in methanol, acetone and ethyl ether, was active in the pH range of 5 and 6, but the activity was lost above pH 6. The activity was retained after heating at 121°C for 15 min. By dialysis, the molecular weight of the inhibitory substance(s) was estimated under 1000. The TLC analysis of Lp2 ether extract revealed the presence of three bands and the inhibitory activity was found in that of R_f value 0.73.

젖산균의 다른 미생물에 대한 생육저해 작용에 대한 연구는 1930년대부터 보고되었으며, 특히 1970년대에는 이러한 젖산균을 이용하여 식품 유해균 및 식품관련 병원균의 생육을 억제시키려는 연구가 활발히 진행되었다(1).

채소류의 발효에 관련된 젖산균의 생육저해 작용에 관하여 Fleming 등(2)은 오이 절임에서 분리한 *Pediococcus cerevisiae*의 *Staphylococcus aureus*를 비롯한 몇몇 그람 양성세균에 대한 생육억제작용을 밝혔다.

또한 *Pediococcus cerevisiae*와 *Lactobacillus plantarum* 등이 냉장육류에 존재하는 *Pseudomonas*속 등 호냉성균에 대해 생육억제 능력이 있다는 보고가 있었으며(1), *Pediococcus cerevisiae*가 냉장식품에서 *Pseudomonas fragi* 등 호냉성균의 생육을 저해시켰으며(3, 4), *Staphylococcus* spp.의 생육과 enterotoxin의 생성을 억제시켰다는 연구결과가 보고되었다(5).

이와같은 사실은 김치발효에 여러 종류의 젖산균이 관련되어 있으므로 젖산발효를 이용한 김치를 주요

부식으로 하는 우리에게 큰 관심의 대상이 되고 있다.

우리 나라에서 연구보고된 바로는 박(6) 등이 김치에서 분리한 젖산균 *Pediococcus cerevisiae* A7와 *Leuconostoc* sp. C4가 *E. coli*, *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus*에 대하여 생육억제작용이 있음을 밝혔으며 *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* 및 *Lactobacillus plantarum*은 *E. coli*, *S. faecalis*, *Vibrio parahaemolyticus*와 호냉성 *Pseudomonas* spp.에 대해 생육억제작용을 나타낸다고 보고하였다(7).

이와같이 김치에서 분리한 여러 젖산균에서도 다른 미생물에 대해 생육억제작용이 나타나며 이는 여러 종류의 생육억제 물질이 그 원인이 되는 것으로 확인되었으나 그 억제물질의 특성에 대하여는 거의 밝혀진 바가 없었다. 본 실험에서는 김치로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum*의 식품관련 미생물에 대한 생육억제작용과 그 억제물질의 특성을 규명코자 하였다.

재료 및 방법

Key words: Antimicrobial activity, *Lactobacillus plantarum*

*Corresponding author

사용균주

본 실험에 사용한 젖산균인 *Lactobacillus plantarum*의 분리는 발효 중인 김치에서 김치국물을 멸균수에 희석한 후 ROGOSA agar(8)를 사용하여 분리하였다. 분리한 균주는 MRS broth에 각각 접종하여 24~48시간 배양한 후 4°C에 보관하였으며 Bergey's manual of Systematic bacteriology(9)에 의하여 동정하여 *L. plantarum*을 선발하였다.

젖산균의 생육저해 실험에 사용한 test organism으로는 *Escherichia coli* 11229-17과 *Streptococcus faecalis*는 각각 녹십자연구소와 성균관대학교 낙농미생물 실험실로부터 분양받았으며 *Pseudomonas aeruginosa* B771S과 *Staphylococcus aureus* B313는 NRRL (Northern Regional Research Laboratory)에서 구입하여 사용하였다. 또한 냉장 육류로부터 호냉성균을 분리하여 사용하였다.

생육억제 균주의 선발 및 저해작용 조사 실험

*L. plantarum*의 생육억제 능력여부를 조사하기 위해 seeded agar screening technique(2)을 사용하였다. 즉, 분리한 *L. plantarum*을 MRS agar에 접종하여 35°C에서 2일간 배양하고, trypticase soy soft agar(0.5% agar)를 가열하여 녹인 후 각 test organism 배양액 1%를 첨가하여 균일하게 혼합하여 *L. plantarum*을 배양한 MRS agar 위에 균일하게 덮어준 다음 다시 35°C에서 배양하였다. 24시간 후 colony 주위에 생육저해대가 생기는 경우 가장 큰 것을 선발하여 실험에 사용하였다.

*L. plantarum*의 혼합배양에 의한 생육저해작용은 *E. coli*를 동시에 100 ml의 MRS broth에 1%씩 접종하여 혼합배양하며, 비교측정을 위한 *E. coli*를 각각 같은 조건에서 배양하였으며 시간경과에 대한 균수변화를 selective media를 이용하여 생육저해 작용을 측정하였다. 이때 젖산균과의 혼합배양시 생성되는 유기산에 의해 *E. coli*의 생육억제 영향을 배제하기 위해 lactic acid로 같은 수준의 pH로 조절하였으며 *E. coli*의 selective media로는 sodium desoxycholate agar를 사용하였다.

*L. plantarum*의 농축배양 여액은 *L. plantarum*을 MRS broth에 1% 접종하여 35°C에서 2일 배양시켜 3700×g로 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 rotary evaporator를 사용하여 1/5로 감압농축한 후 membrane filter(pore size : 0.45 μm)로 여과하여 얻었

으며 배양여액의 Methanol-Acetone 처리는 Shahani 등(10)의 방법에 의하였다. 즉 농축 배양여액에 동량의 methanol을 혼합하여 1시간 동안 4°C에서 방치한 후 1000×g에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 methanol soluble fraction이라 하고, 이를 40°C에서 감압농축하였다. 이것을 증류수에 녹여 동량의 acetone을 첨가한 다음 4°C에서 1시간 동안 처리한 뒤 1000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 rotary evaporator를 이용하여 acetone을 완전히 제거하였다. 이 농축물을 증류수에 녹여 methanol-acetone(MA) soluble fraction을 얻었다.

배양여액의 ether extract를 얻기 위하여 *L. plantarum*의 농축 배양여액에 3배의 ethyl ether를 첨가하여 잘 흔든 후 ether층을 수거하여 rotary evaporator에서 ether를 날려보내고 남은 residue에 동량의 증류수를 가하였다.

생육억제 효과는 농축여액, MA soluble fraction과 ether extract를 trypticase soy broth에 10% 첨가하고 test organism을 1% 접종하여 35°C에서 배양하면서 생육정도는 분광광도계(Spectronic 21, Bauch & Lomb)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 Optical Density로 나타내었다. Ether extract의 첨가실험시 식품관련 유해균에 대한 pH의 영향을 배제하기 위하여 전체 pH를 5.3으로 맞추어 시행하였다.

생육억제 물질의 특성 실험

Ether 추출물의 생육억제작용에 미치는 pH의 영향을 보기 위하여 ether 추출물을 trypticase soy broth에 첨가한 후 pH를 5.0, 5.3, 5.6, 6.0으로 조정하였으며 control로는 균을 접종하지 않은 MRS broth를 같은 방법으로 ether 추출하여 배지에 동량 첨가한 후 lactic acid로 동일 pH으로 조정하여 생육억제 효과를 비교하였다.

Ether 추출물의 열처리 후 영향을 알아보기 위하여 autoclave로 121°C, 15분간 열처리한 여액을 TS broth에 첨가한 후 test organism 1% 접종하여 35°C에서 배양하였으며 ether 추출물에서 억제물질의 분자량을 추정하기 위하여 Dialysis Membrane(Spectra Por, MW Cutoff 1000)을 사용하여 증류수에서 투석시킨 후에 남은 여액을 사용하였다.

Thin layer chromatography에 의한 생육억제

물질의 분리 및 확인

L. plantarum 배양여액의 생육억제 물질을 분리하기 위하여 ether extraction시킨 후 남은 residue에 ether 1 ml를 가한 뒤 0.05 ml를 취하여 TLC plate(silicagel G w/254 nm fluorescent indicator)에 spot하여 건조시킨 후 TLC plate를 chloroform : methanol : H₂O가 65 : 25 : 4로 혼합된 용매에서 전개하였다.

전개된 TLC plate는 자연 건조시킨 후 UV light로 확인하였으며 전개 후 나타난 모든 fraction에 대해 생육억제 효과를 알아보기 위하여 각 fraction을 다시 긁어내어 ether 1 ml로 재추출하여 얻은 ether extract를 배지에 첨가하여 각각에 대하여 생육억제 효과를 알아보았으며, control로는 균을 접종하지 않은 MRS broth를 같은 방법으로 ether extraction시킨 후 TLC를 전개시켜 나타난 동일한 R_f값의 fraction을 이용하였다.

결과 및 고찰

***E. coli* 및 식품관련 유해세균에 대한 생육저해작용**

김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* 15주를 Seeded Agar Screening technique으로 *E. coli*에 대한 생육억제작용을 조사하여 그 중 생육저해대가 가장 크게 나타난 *L. plantarum* Lp2를 선발하였다.

이 *L. plantarum* Lp2를 *E. coli*와 혼합배양하여 *E. coli*의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 초기 8시간까지는 차이가 적었으나 그 후부터는 *L. plantarum* Lp2를 혼합배양한 경우

*E. coli*의 생균수가 급격히 감소하였다. 이 결과로 *E. coli*의 생육감소는 젖산외의 *L. plantarum* Lp2가 생성한 물질에 의한 것이며 이 물질은 생육저해 뿐만 아니라 살균작용을 가지고 있는 것으로 나타났다.

L. plantarum Lp2의 농축 배양여액, 배양여액의 Methanol-Acetone soluble fraction과 배양여액의 Ether extract를 배양액에 각각 첨가하여 *E. coli*의 생육에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 세 경우 모두 *E. coli*의 생육이 완전히 억제되었다. 이와같이 Lp2의 배양여액을 각각 다른

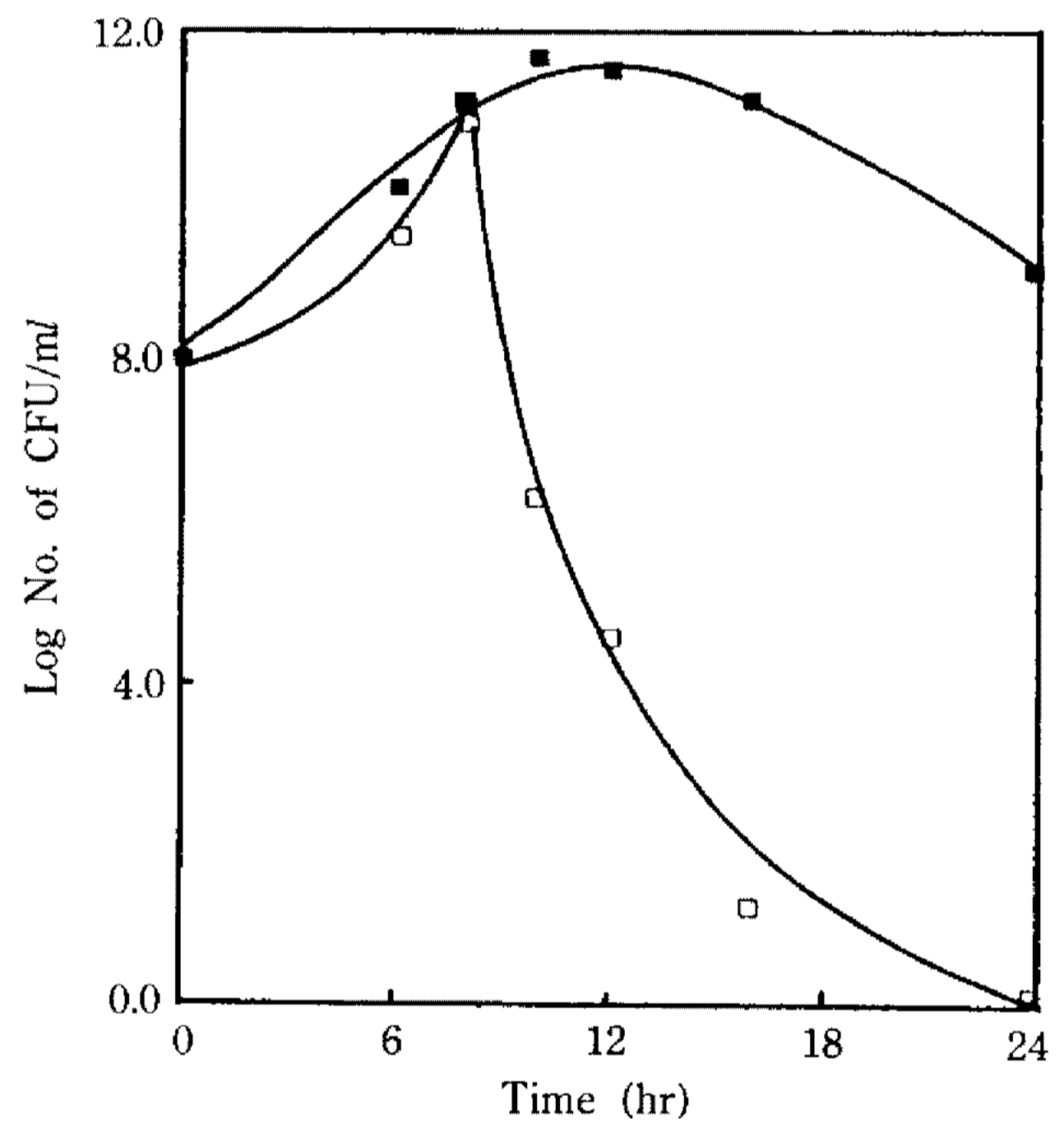


Fig. 1. Growth of *E. coli* in mixed culture with *L. plantarum* Lp2 in MRS broth at 35°C; *E. coli* alone (■), *E. coli* + *L. plantarum* Lp2 (□).

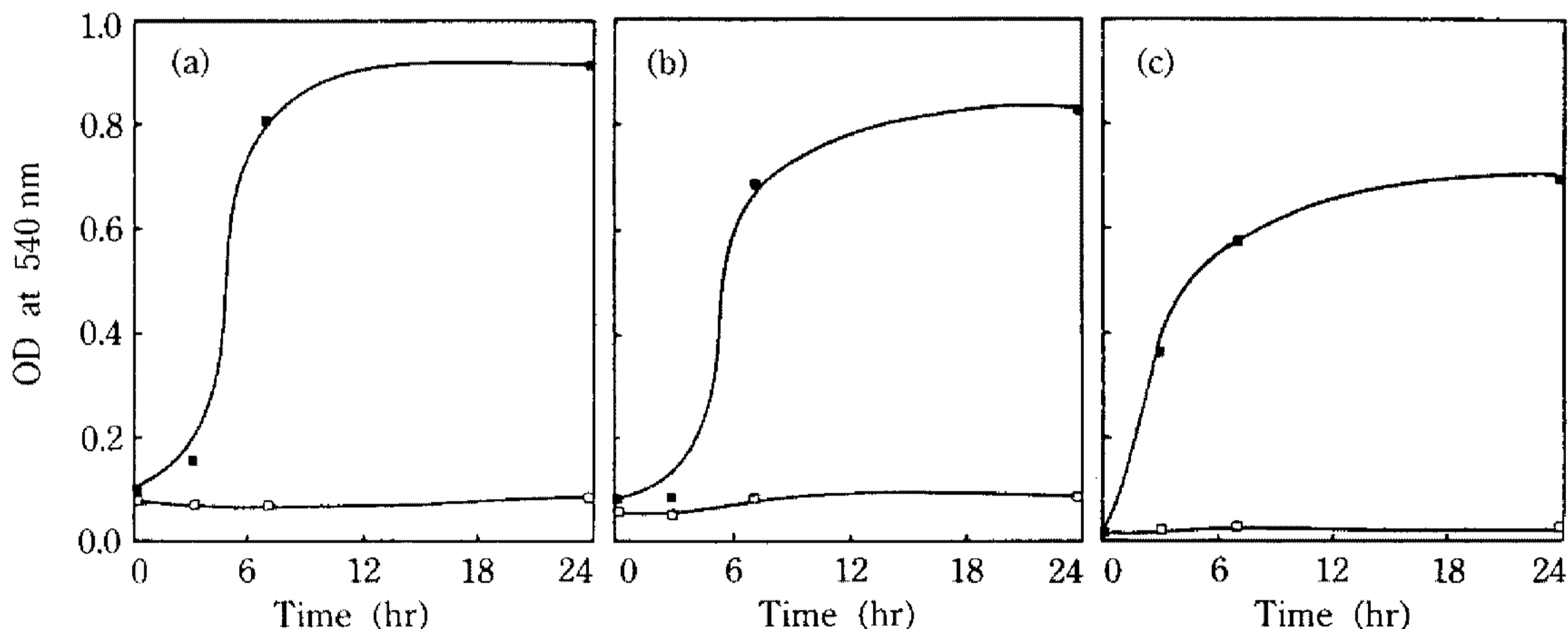


Fig. 2. Effect of *L. plantarum* Lp2 culture filtrate (a), methanol-acetone soluble fraction (b), and ether extract (c) on the growth of *E. coli* in the TS broth at 35°C; control (■).

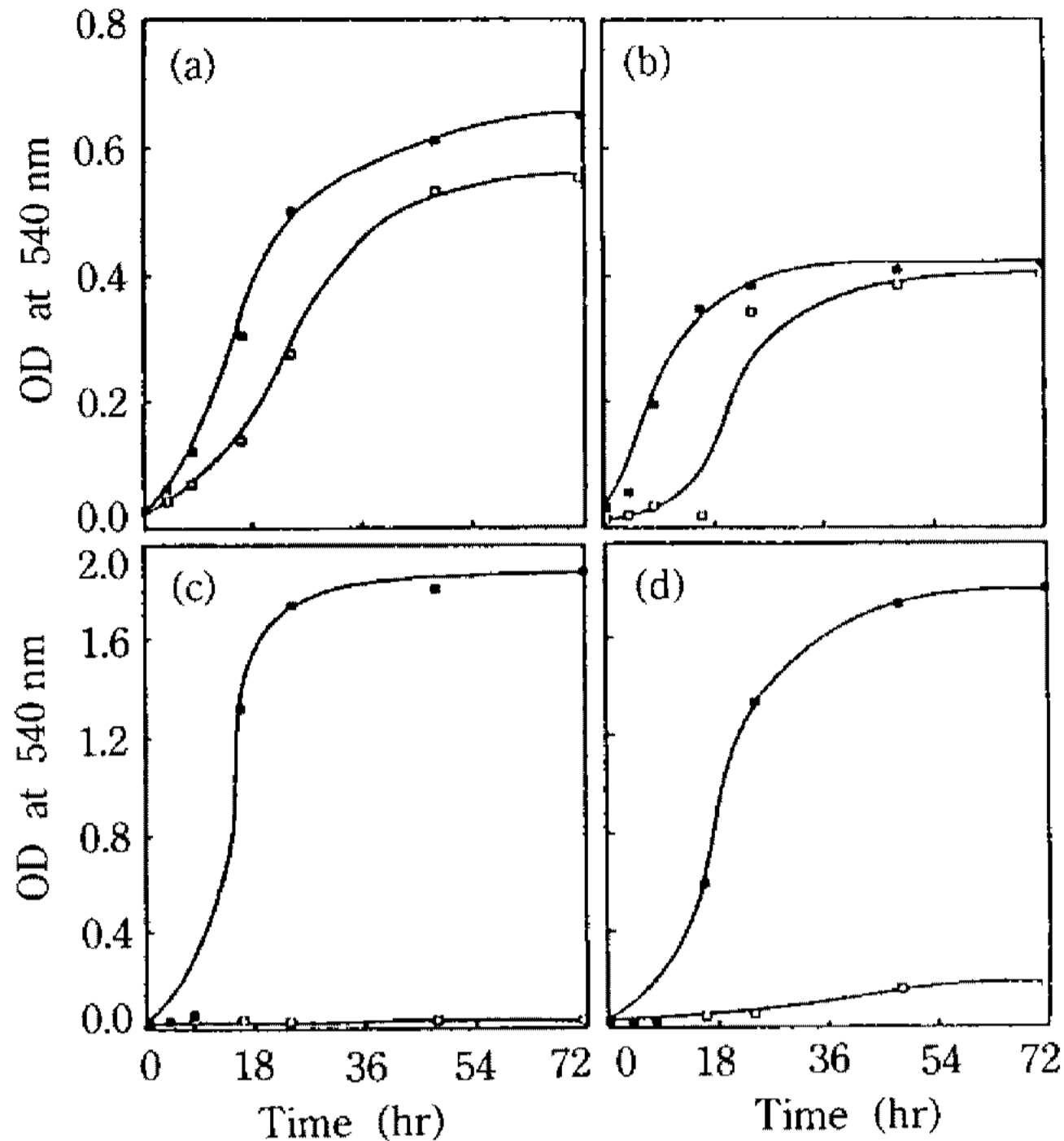


Fig. 3. Effect of ether extract from Lp2 culture filtrate on the growth of *Staphylococcus aureus* (a), *Streptococcus faecalis* (b), *Pseudomonas aeruginosa* (c), and psychrotrophic strain Pc1 (d) in TS broth.

Pc1 was incubated at 15°C; control (■), Lp2 ether extract added (□).

방법으로 처리하여 첨가했을 때 모두 그 억제효과를 나타내었으므로 *L. plantarum* Lp2가 생성하는 생육 저해물질은 methanol, acetone 및 ether에 가용성인 물질로 밝혀졌다.

김치에서 분리한 젖산균 중 *E. coli*에 대하여 생육 억제작용을 가진 균주는 이미 수년 전부터 보고된 바 있다. 박(6) 등은 *Pediococcus* sp.와 *Leuconostoc* spp.에 속하는 균주의 배양여액이 *E. coli*의 생육을 매우 효과적으로 억제시킨다는 사실을 밝혔으며, 역시 김치에서 분리한 *Pediococcus pentosaceus*와 *Pediococcus acidilactici* 균주 중 몇 주도 *E. coli*에 대한 억제작용을 나타낸다고 보고하였다(11). 또한 류(7)는 김치에서 분리한 *L. plantarum* 25주 중에서 15주가 *E. coli*에 대하여 생육억제작용이 있다고 보고하였다. 이와같은 결과로 김치발효에 관련된 젖산균의 상당수가 *E. coli*에 대한 생육억제 능력을 가지고 있는 것으로 볼 수 있다.

L. plantarum Lp2의 *E. coli*에 대한 생육억제작용을 확인하고 *Staphylococcus aureus*를 비롯한 4종의 식품관련 유해세균에 대하여도 억제작용을 가지고 있

는지를 조사하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 Lp2 배양액의 ether extract를 첨가하여 *Staphylococcus aureus*를 배양한 결과 초기에는 비교적 억제효과가 크게 나타났으나 점차 그 효과가 감소되었다.

*Streptococcus faecalis*의 경우는 *S. aureus*와 같이 처음 8시간까지는 그 억제효과가 큰 것으로 나타났으나 그 후에는 그 효과가 적었으며 24시간 후에는 control에 가까운 생육을 나타내었다. 그러나 *Pseudomonas aeruginosa*에 대하여는 *E. coli*의 경우와 같이 그 생육이 완전히 억제되었다. 또한 냉장중인 쇠고기에서 분리한 호냉성 균주 Pc1의 경우에도 Lp2 배양액의 ether extract를 첨가했을 때 완전한 생육억제 효과를 나타내었다.

이와같이 Lp2 배양액의 ether extract에 포함된 물질은 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*와 같은 Gram-positive에 대하여는 그 억제작용이 약한 반면 *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 Gram-negative인 호냉성 세균 Pc1에 대하여는 대단히 강한 작용을 가지고 있는 것으로 큰 차이를 보였다. 그러므로 이러한 억제효과의 차이는 보다 많은 종류에 대하여 확인을 해야 될 것이나 일단 Gram-negative 균주에 대하여 강한 작용을 가진 물질로 추측을 할 수 있다. 또한 이 결과는 식품 저장 중에 문제가 되는 호냉성 세균의 억제에 대한 *L. plantarum* Lp2의 이용 가능성을 보여주고 있다.

생육억제 물질의 특성

L. plantarum Lp2가 생성하는 생육억제 물질은 이미 ether 가용성 물질로 밝혀졌으므로 Lp2 배양액의 ether 추출물을 배지에 첨가한 후 열처리를 하여 생육억제 물질의 열안정성을 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 Lp2가 생성하는 생육억제 물질은 121°C에서 15분간의 열처리로는 그 억제작용에 아무 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 지금까지 각종 젖산균이 생성하는 생육 물질의 열안정성은 그 종류에 따라 차이가 많은 것으로 보고되었다. *Lactobacillus acidophilus*의 lactacin B의 경우 100°C, 60분 열처리하여도 그 작용에 영향을 받지 않는 안정한 물질이라고 보고되었으나(12), *Streptococcus cremoris*에서 분리한 diplococcin은 100°C에서 1분간 처리로 그 저해능력이 상실된다고 보고하였다(13, 14). 또한 김치

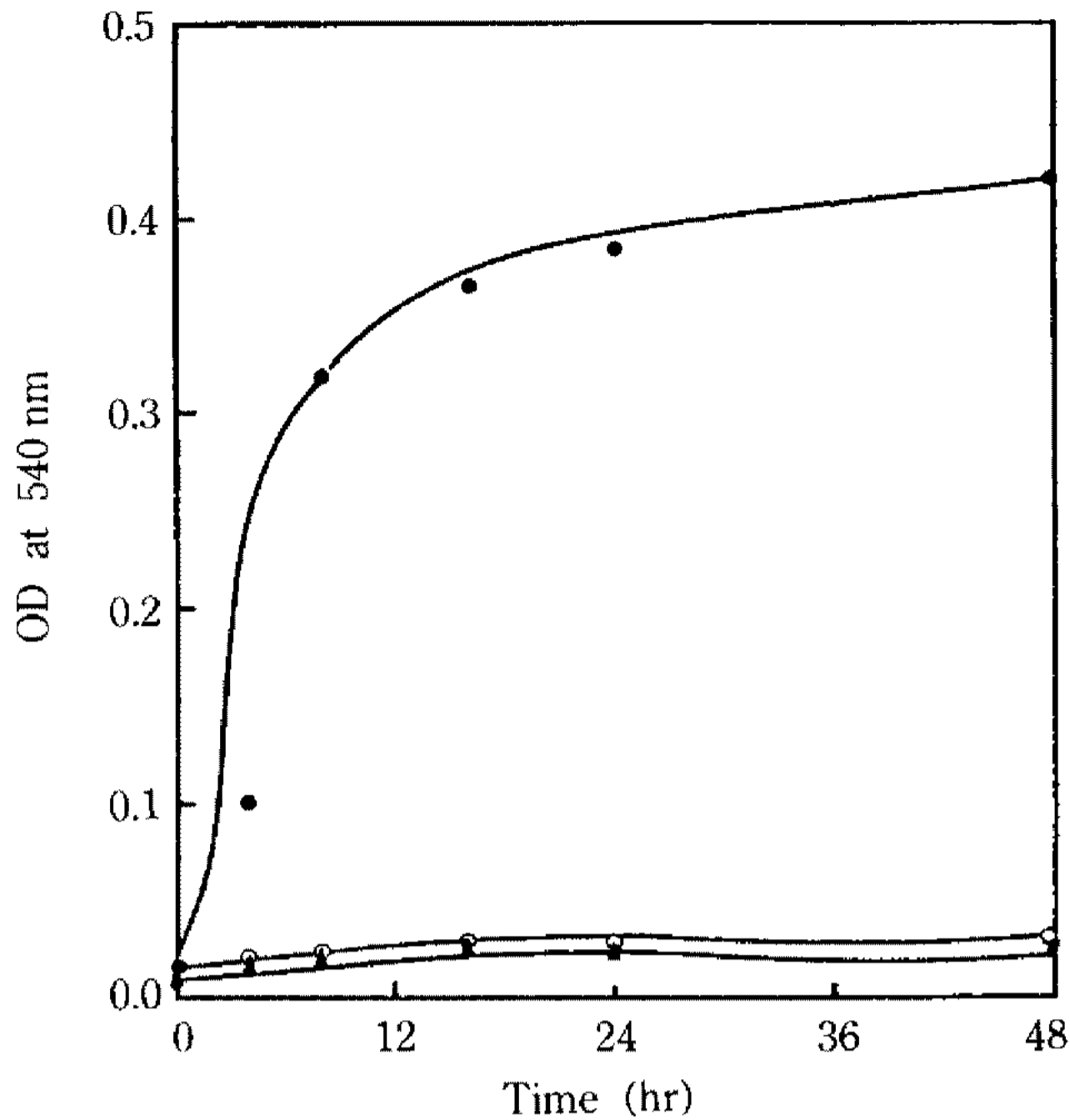


Fig. 4. Effect of ether extract from Lp2 culture filtrate on the growth of *E. coli* in Ts broth after heat treatment.
Control (●), filter-sterilized Lp2 culture added (○), heat treated (121°C, 15 min) Lp2 culture added (▲)

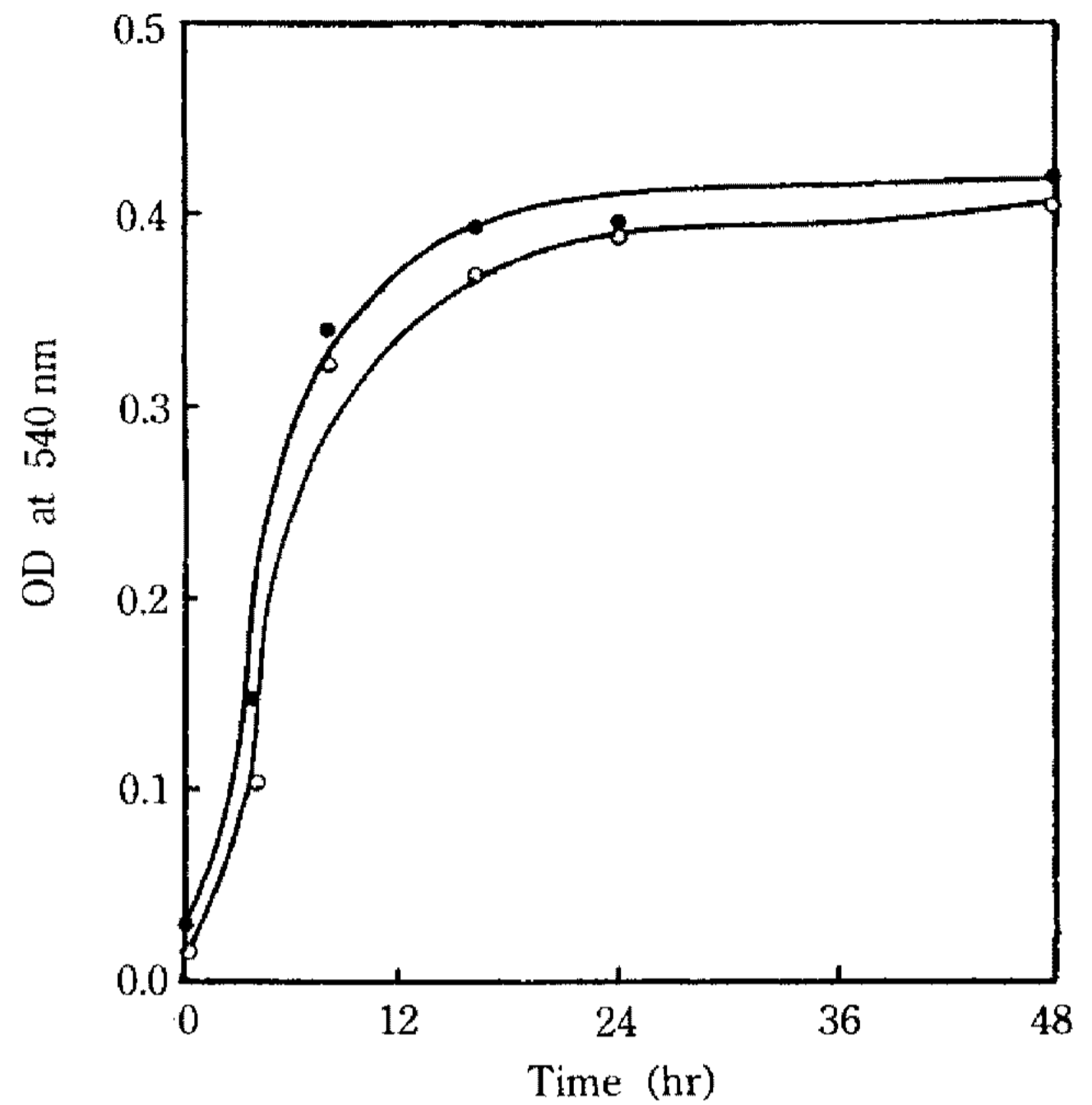


Fig. 6. Effect of retentate on the growth of *E. coli*. Control (●), Lp2 ether extract (○) Spectra/Por MWCO 1000 was used for dialysis of ether extract from Lp2 culture filtrate

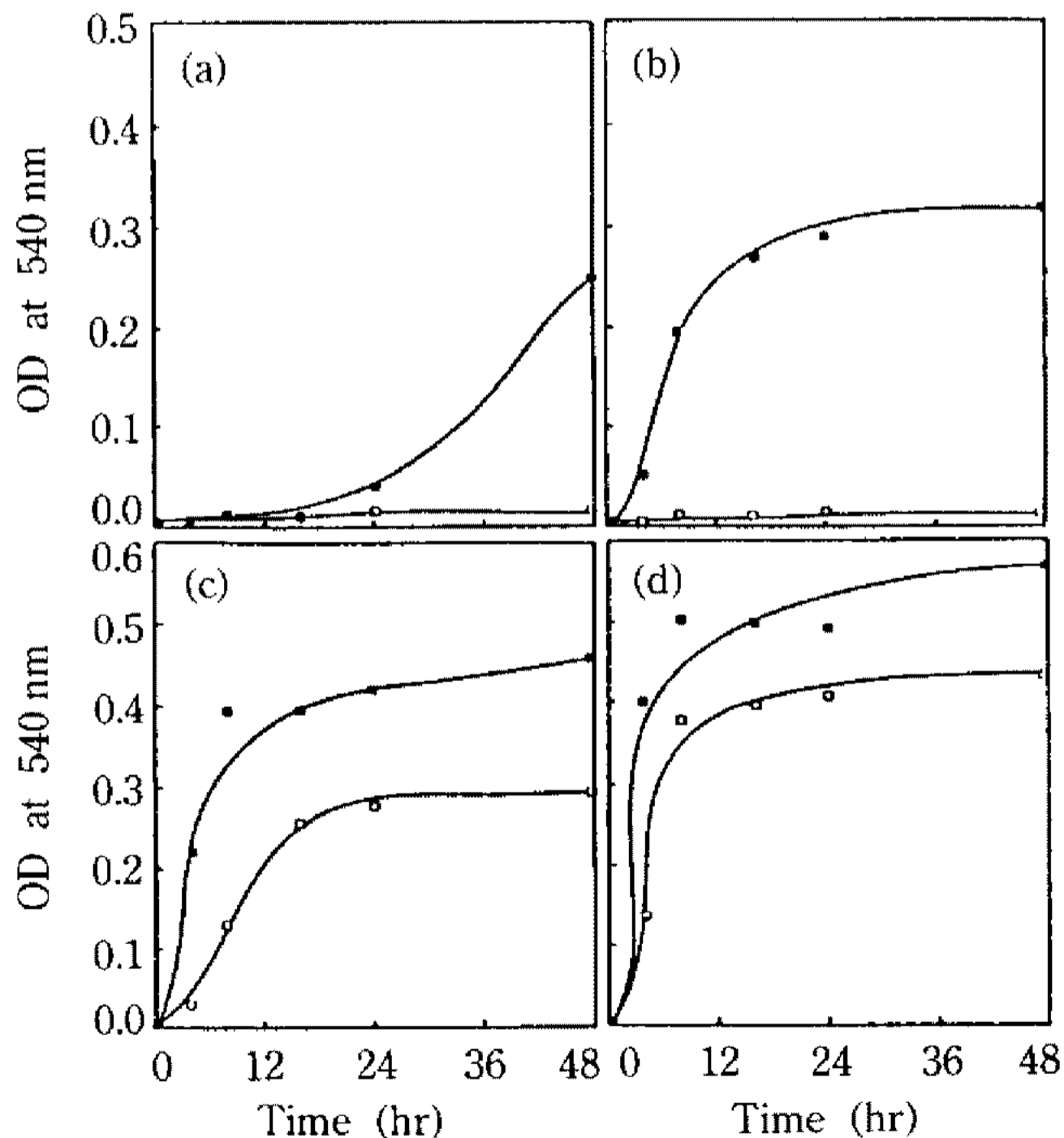


Fig. 5. Influence of pH on the inhibitory activity of ether extracted Lp2 culture filtrate.
E. coli was grown in TS broth at 35°C with Lp2 ether extract (□) and MRS broth for control (■); (a) pH 5.0, (b) pH 5.3, (c) pH 5.6, (d) pH 6.0

리로그 능력이 상실되었으나 *Pediococcus pentosaceus* AN12의 경우에는 열에 안정한 물질로 나타났다(7). 이와 같이 젖산균이 생성하는 미생물 생육억제작용을 갖는 물질들의 열에 대한 안정성은 종류에 따라 크게 차이가 있으나 본 실험에서 분리한 젖산균 Lp2의 생육억제 물질은 열에 매우 안정한 물질인 것으로 밝혀졌다.

한편 이 생육억제 물질의 작용에 미치는 pH의 영향을 *E. coli*에 대하여 조사한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 5 및 pH 5.3에서는 그 억제효과가 크게 나타났으나 pH가 높아질수록 그 효과가 감소하였다. 이러한 생육억제 물질의 작용에 대한 pH의 영향은 젖산균이 생산하는 여러 종류의 bacteriocin에서도 유사한 경향을 볼 수 있다. 즉 *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*에서 분리한 Lactostrepcin(15), *L. acidophilus*가 생성하는 lactocidin(16), *Bifidobacterium longum*이 생성하는 bifilong(17) 등이 낮은 pH에서 활성을 나타내며 중성으로 갈수록 활성이 감소하는 것으로 나타났다.

한편 억제물질의 대략적인 분자량 추정을 위하여 ether extract를 dialysis 후 그 생육억제작용을 조사하였다. Fig. 6에서 나타난 바와 같이 dialysis시킨 결과 생육억제작용이 없어졌으며 사용 membrane의

에서 분리한 젖산균의 경우에도 *L. plantarum* BM10 이 생산하는 생육억제 물질은 120°C에서 20분간 처

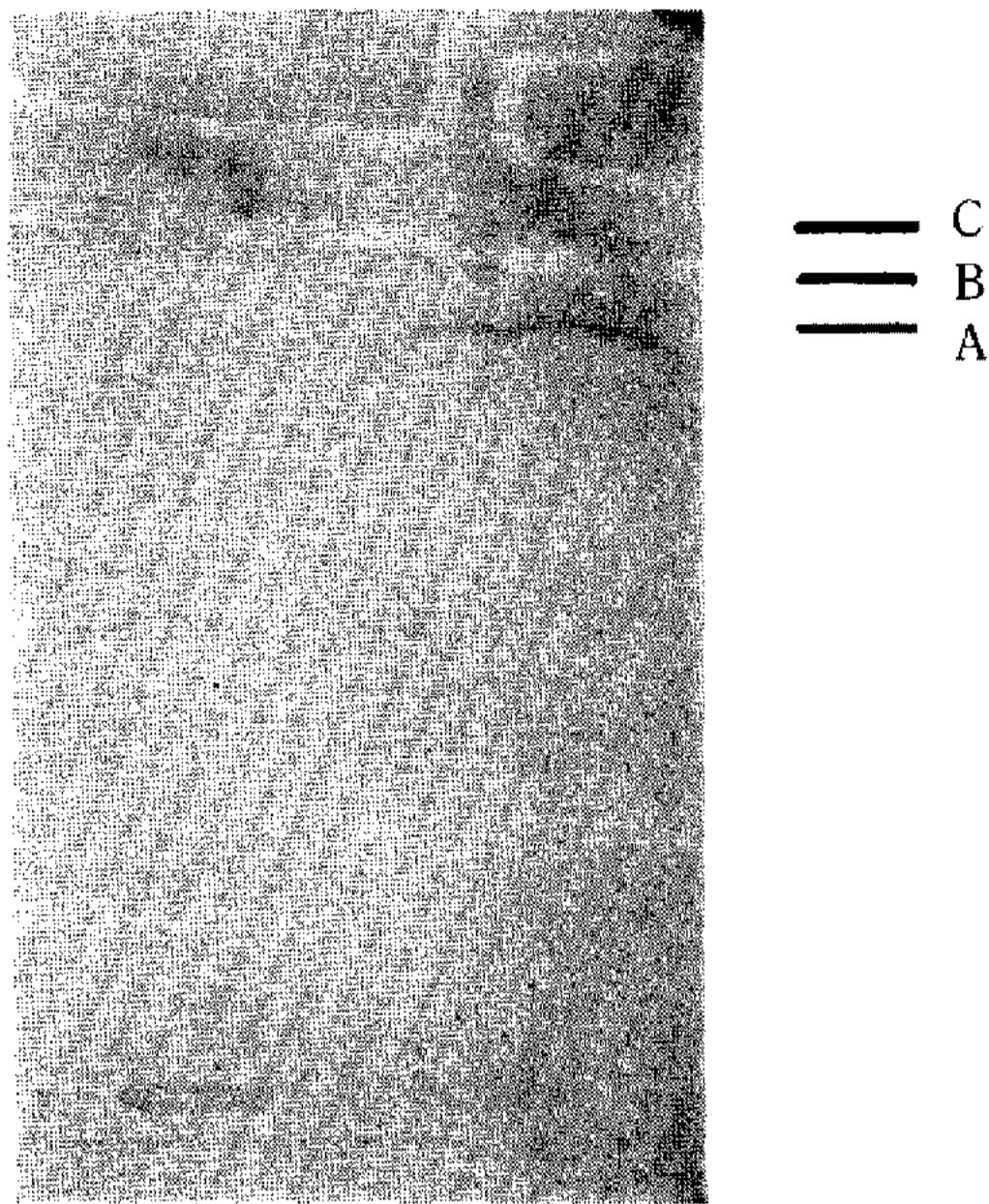


Fig. 7. Separation of ether extract from Lp2 culture filtrate by Thin Layer Chromatography.

Solvent; chloroform:methanol:D.W = 65:25:4.

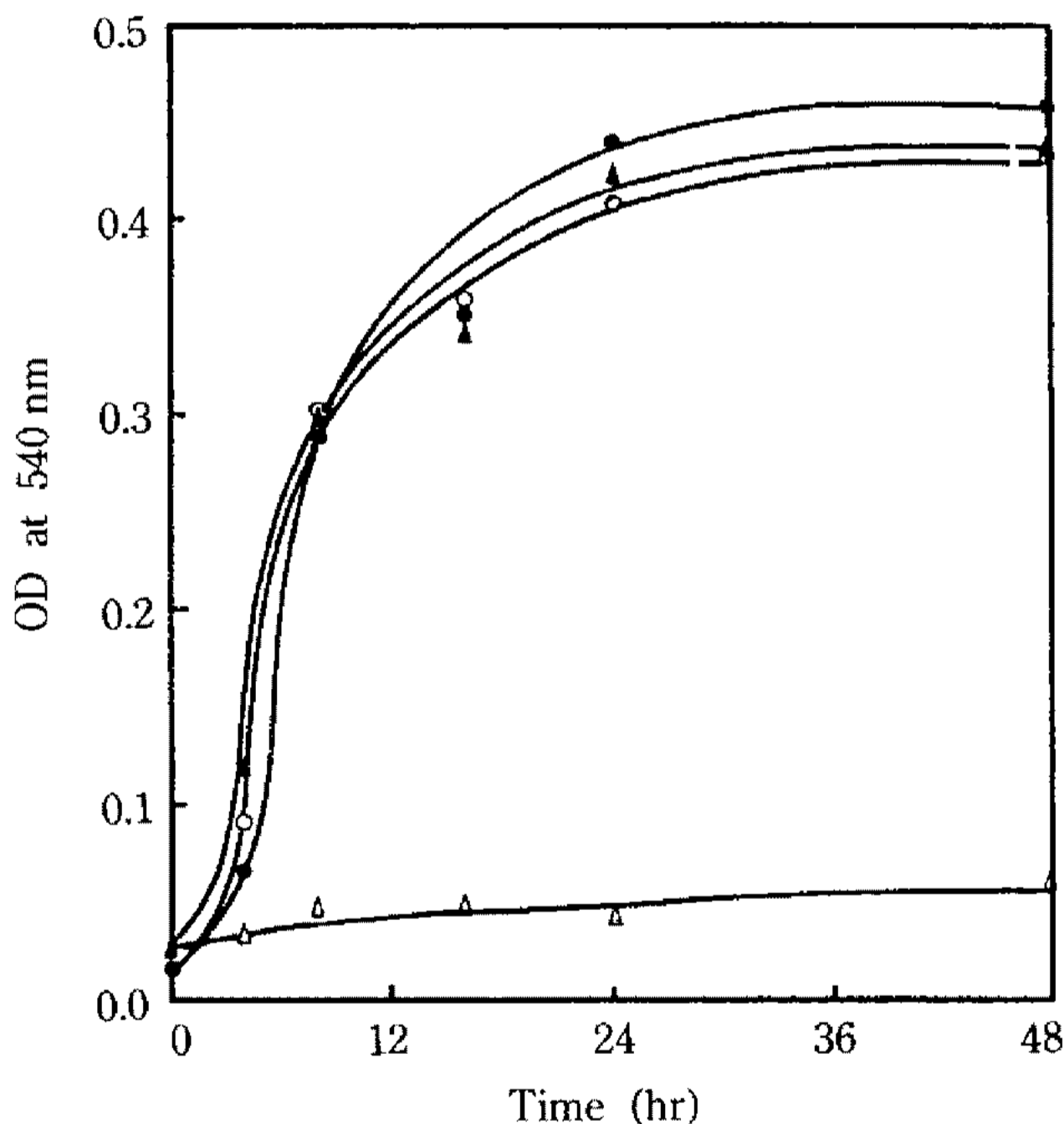


Fig. 8. Effect of TLC fractions of ether extract from Lp2 culture filtrate on the growth of *E. coli*.

Fraction A (Δ), fraction B (\bullet) from Lp2 culture, fraction a (\blacktriangle), fraction b (\circ) from MRS broth without inoculation for control

MW. Cutoff가 1000이었으므로 Lp2가 생산하는 억제 물질은 그 분자량이 1000 이하로 추정할 수 있다.

Lp2가 생산하는 생육억제 물질을 분리하기 위하여 배양액의 ether extract를 Thin Layer Chromatography로 분석한 결과는 Fig. 7와 같다. Lp2 배양액의

ether extract에는 배지의 ether extract에서는 나타나지 않은 세개의 밴드 A, B, C가 확인되었으며 각각의 R_f 값은 0.73, 0.77, 0.82였다. 이 세 밴드 중에서 억제물질이 존재하는 밴드를 찾아내기 위하여 가장 뚜렷이 나타난 band A부분(Fraction A)과 흐리게 나타난 B, C 두 band 부분(Fraction B)으로 나누어 그 작용을 조사한 결과는 Fig. 8와 같다. 이 결과로 A band에 억제물질이 존재함은 확인하였다. 그러나 이 물질의 자세한 특성은 아직 밝혀내지 못하였으므로 보다 많은 연구가 계속 되어야 할 것이다.

요 약

김치에서 *Lactobacillus plantarum* Lp2를 분리하여 *E. coli*, *Staphylococcus aureus* 등 5종의 식품관련 세균에 대한 억제작용과 억제물질의 특성을 조사하였다. Lp2 배양액의 ether extract는 *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 호냉성 균주 Pc1에 대하여는 매우 강한 억제작용을 보였으나, *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus faecalis*에 대하여는 그 작용이 미약하였다. 이 물질은 methanol, acetone 및 ether에 가용성이며 pH가 5~6 사이에서 억제작용을 나타내었으며 중성 부근에서는 그 작용이 상실되었다. 이 물질은 열에 비교적 안정하며 분자량은 1000 이하인 것으로 밝혀졌고 TLC에 의한 분리 결과는 R_f 값이 0.73인 band에 억제물질이 함유된 것으로 확인하였다.

감사의 말

본 연구를 위해 많은 조언을 주신 아주대학교 생물공학과 조도현 박사님께 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

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

6. 박연희, 권정주, 조도현, 김수일: *J. Kor. Agric. Chem. Society*, **26**, 35 (1983)
7. 류욱상: 아주대학교 생물공학과 석사학위 논문 (1989)
8. Harrigan, W.F. and McCance, M.E.: *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic press (1976)
9. Krieg, N.R. and Sneath, P.H.A.: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* (9th ed.), Williams and Wilkins (1984)
10. Shahani, K.M., J.R. Vakil and A. Kilara: *Cultured Dairy Products J.*, **11**, 14 (1976)
11. 박연희, 류욱상, 조도현: *J. Kor. Agric. Chem. Society*, **31**, 33 (1988)
12. Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R.: *Appl. Env. Microbiol.*, **45**, 1808 (1983)
13. Branen, A.L., H.C. Go and R.P. Genske: *J. Food. Sci.*, **40**, 446 (1975)
14. Zajdal, J.K., Ceglowski, P. and Dobrzanski, W.T.: *Appl. Env. Microbiol.*, **49**, 969 (1985)
15. Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrianski, W.T.: *J. Dairy Res.*, **45**, 247 (1978)
16. Vincent, J.G., Veomett and R.F. Riley: *J. Bacteriol.*, **78**, 477 (1959)
17. 강국희, 신현정, 박연희, 이택수: *Kor. J. Dairy Sci.*, **11**, 204 (1989)

(Received October 10, 1991)