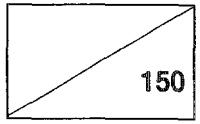


654.024
L2937

GA0048-0991

최 종
연구보고서



19916629

국산천연자원으로부터 신기능 식품 보존 물질 개발연구

Development of Food Preservatives from
Natural Resources

연구기관

한국식품개발연구원

농림부

제 출 문

농림부장관 귀하

본 보고서를 “국산천연자원으로부터 신기능 식품보존물질개발연구”의 최종 보고서로 제출합니다.

1998.12.20.

주관연구기관명:한국식품개발연구원

총괄연구책임자: 유진영

연구원: 최신양

임성일

한찬규

권동진

김현정

김현규

김기영

이대희

김유진

윤미경

성상욱

협동연구기관명:강원대학교

협동연구책임자: 안철

협동연구책임자: 함승시

협동연구기관명:동국대학교

협동연구책임자: 이용익

여 백

요 약 문

I. 제 목

국산천연자원으로부터 신기능 식품 보존 물질 개발 연구

II. 연구 개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발 목표

- 가. 미생물 항균 보존제 대량 발효 공정 개발, 안전성 및 응용성 발굴
- 나. 발효식품으로부터 새로운 미생물 및 물질 개발
- 다. 항균 물질 과량 생산 균주 및 분리기법 개발
- 라. 식물성 항균 보존 물질 개발

2. 연구개발의 중요성

식품의 가공 저장을 위하여 이용되는 물질은 지금까지 주로 합성 보존제 및 항생물질이 사용되어 왔다. 그러나 이들은 자체의 독성 문제로 사용의 한계가 있고 또한 소비자들의 기피 현상에 대면하고 있다. 이와같은 문제점의 해결 방법으로 비교적 독성이 적거나 없는 물질의 발굴이 현실적으로 시급한 실정이다. 미생물이 생산하는 물질중 항생물질과 구분되는 부류의 항균성 물질로서 Bacteriocin 이 있는데 이들 중에는 식품의 가공에 이용할 경우 섭취된후에 쉽게 분해되는 물질이 있다. 대표적인 것으로 펩타이드성 물질이 언급될 수 있는데 이는 비교적 항균 Spectrum 이 좁다고는 하지만 식품가공에서 문제를 야기하는 젖산균류, 및 포자 형성균들을 사멸 또는생육을 저지시킬 수 있는 것이 있다. 대표적인 것은 *Lactococcus lactis* 가 생산하는 Nisin 으로일부 유럽에서는 유제품 등에 이용하고 있다. 이와같은 물질은 현재 국내에서는 이용되고 있지 않으며 고려되고 있지 않다. 따라서 이와같은 물질의 생산방법 의 도입 또는 개선 뿐 만 아니라 이와 같은 부류의 물질을 발굴하고자하는 연구는 현 시점으로 보아 절실한 형편이다. 또한 이와 같은 물질의 개발은 결국 국내 식품 산업에서의 보존방법을 혁신 시킬 수 있는 전기를 마련할 수 있을 것이다. 본 연구의 주 목적은 자연계에서 식품 보존제로 이용할 물질을 생산하는 미생물을 분리 동정하고, 기히 확보된 미생물의 발효소재 및 공정을 개발하고 제제화 및 응용, 과량 생산 균주의 확보, 식물체로부터 새로운 물질의 탐색을 해보고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 자연계에서 개발 미생물의 다양한 동정 수행, 국산 재료를 이용한 발효소재 개발, 보존제 생산을 위한 영양.환경조건 검토, 발효 공정의 순차적 스케일 업(Scale-up), 세포 고정화 기법 검토, 효율적 발효 시스템 개발 및 제재화 연구, 개발 보존제의 응용성 및 독성 시험, 과량 생산균주 개발을 통한 천연 미생물 및 식물체 유래 식품보존제의 산업화 공정을 유도하고자 하는 것이 목표이며 범위는 다음과 같다.

1. 연구개발 목표

- 가. 미생물 항균 보존제 대량 발효 공정 개발
- 나. 새로운 신 기능 항균 보존제 생산 균주의 발굴
- 다. 초능력 대량 생산 균주(Super Bug) 및 대량 분리 공정 개발
- 라. 천연 식물체의 무독성 항균 물질의 신 기능 보존제로의 전환 방법 개발

2. 연구 개발 내용 및 범위

가. *Lactococcus* sp.의 발효공정

- 1) 개발 미생물의 다양한 동정 수행
 - 2) 국산 재료를 이용한 발효소재 개발
 - 3) 보존제 생산을 위한 영양.환경조건 검토
 - 4) 발효 공정의 순차적 스케일 업(Scale-up)
 - 5) 고농도 배양 및 세포 고정화 기법 검토
 - 6) 효율적 발효 시스템 개발 및 제재화 연구
 - 7) 개발 보존제의 응용성 및 독성 시험
- 나. 새로운 식품보존물질 탐색
- 1) 전통식품자원으로부터의 박테리오신 생산균주의 분리 및 동정
 - 가) 전통식품자원의 선정 및 최적 선별 배지의 탐색
 - 나) 박테리오신 생산균주의 분리
 - 다) 분리 박테리오신 생산균주의 동정
 - 2) 생산 박테리오신 및 균주의 산업적 유용특성의 규명
 - 가) 분리 박테리오신의 산업적 유용성 분석
 - 나) 유용 박테리오신의 정제
 - 3) 박테리오신을 이용한 식품보존제 및 발효조절제의 개발
 - 가) 유용 박테리오신의 유전특성 규명
 - 나) 유용 박테리오신 생산균주 개량
 - 다) 시제품 개발
- 다. 보존물질 대량생산 균주 개발 및 분리공정
- 1) 항균물질 순수분리를 위한 배양 조건 확정
 - 2) 항균물질 순수분리 및 물리생화학적 특성 구명

- 3) 항균물질의 항균특성 및 아미노산 조성 구명
 - 4) 항균물질의 분리공정 개발
 - 5) 항균물질 유전자 분리 및 Genomic library 제조
 - 6) Colony hybridization 및 균주의 분자계통학적 동정
 - 7) Shuttle vector의 제조 및 유전자 클로닝
- 라. 식물체 유래 식품 보존제 개발
- 1) 원료의 선정, 추출 분획 및 항균력 검색
 - 2) 항균 물질의 분리, 정제 및 구조 결정
 - 3) 항균 물질의 상승작용 및 항균력 비교

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

가. *Lactococcus* sp.의 발효공정

식품보존제의 개발을 목적으로 *Lactococcus* sp. BL-1(KFCC 10790)이 분비하는 antimicrobial substances의 저렴한 생산을 위하여 발효 소재를 개발하였다. 우선 소재로서 탈지우유 및 국산 대두를 선정하였으며 분해용 효소로는 단백질 분해 효소를 이용하였다. 이용된 효소로는 곰팡이나 세균 유래의 protease를 사용하였으며 대상으로 Novo Co.의 Alcalase, Neutrase 와 Amano Co.의 protease F, M, A, N, S.이다. 이들 효소 중 우선 중성부근의 반응 최적을 가지는 Neutrase 와 protease A, N, S 효소를 이용하여 온도별 분해 시험을 한 결과(효소농도 0.6%), Neutrase는 45°C, protease A는 50°C, protease N은 60°C, protease S는 70°C가 적당한 반응온도로 나타났으며 반응시간을 18시간 유지한후 glucose 20g/ℓ, yeast extract 5g/ℓ, meat extract 8g/ℓ을 첨가한후 배양할 때 탈지우유 및 대두유에서 세포수 10⁹/ml 이상이었고 항균역가가 높히 나타났다. 0.6% protease N으로 처리한 탈지우유를 이용한 결과 0.8% meat extract, 2% glucose 과 0.5% yeast extract 첨가하였을때 세포수 10⁹/ml 이상이었고 항균력이 256 AU/ml으로 높게 나타났다. 또한 1.0% protease S으로 처리한 대두유를 이용한 결과 0.8% meat extract, 2% glucose 과 0.5% yeast extract 첨가하였을때 세포수 10⁹/ml 이상이었고 항균력이 extracellular과 total이 각각 128과 256 AU/ml으로 높게 나타났다. 항균물질 생산을 위한 고정화 기법을 조사하여 보았다. Na-alginate는 high viscosity, medium viscosity, low viscosity 이상 3종류로서 이들의 농도와 점도변화에 따른 고정화 효과를 조사한 결과 Low viscosity에서는 고정화 균체가 파괴되었으며, high viscosity 경우는 고정화 균체 제조가 어려웠고, medium viscosity에서는 고농도일 경우, 균체의 고정화에 많은 시간을 요하였다. Bacteriocin 생산에 있어 크게 영향을 미치지 않은 농도는 2% medium viscosity가 적당하였다. Ca-alginate에 의해 고정화된 균체가 bacteriocin

생산에 미치는 영향을 조사한 결과, CaCl₂의 농도변화에 따른 활성변화는 없었으나, 고정화 균체의 파괴나 swelling의 변화가 적은 농도인 40mM로 선정하였다. Needle size을 달리하여 고정화 균체 크기가 bacteriocin 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 활성변화는 없는 것으로 나타났다. Ca-alginate에 고정화된 cell density을 10배, 5배, 1배, 1/10배, 1/100배로 하여 bacteriocin 활성을 조사한 결과, bacteriocin 활성은 1배 (1×10^9 CFU/ml)나 1/10배 (1×10^8 CFU/ml)에서 높게 나타났다. Cell/polymer suspension을 CaCl₂에 두는 시간의 변화에 따른 bacteriocin 활성은 1시간과 12시간에서 유지되었다. 교반 속도에 따른 bacteriocin 활성변화는 교반하지 않은 경우보다 교반한 쪽에서 활성이 높게 나타났으나 지나친 교반은 bead을 파괴할 수 있어 50rpm으로 선정하였다. 배양시 serum bottle을 이용한 경우 bead함량과 발효 시간의 변화에 따른 고정화 균체의 활성화에 소요된 시간을 조사한 결과, 활성화 소요시간은 단축되었으며, 배지에 대한 bead함량은 1:2~1:9 비에서 활성을 나타내었다. 이상과 같은 결과로부터 bacteriocin 생산을 위한 고정화 조건은 Na-alginate; 40mM, needle size; 25G, cell density; 10^9 CFU/ml, gelling time; 1hour, agitation; 50rpm, bead/medium 비율; 1:2~1:9이었다. 응용시험에서 알코올 발효시 에타놀 생성을 높이는 역할을 하는 것으로 나타났다. 독성 시험에서는 항돌연변이원성, 아급성 시험으로 안전한 것으로 나타났다.

나. 새로운 식품보존물질 탐색

전통식품자원의 선정 및 최적 선별 배지의 탐색을 위하여 겨울 김장 김치 및 물김치, 보통 김치(김장용이 아닌 일반 김치), 깍두기, 식해(食醃 젓갈) 및 우유를 선정하고 최적 선별 배지로는 젖산균 일반의 분리 및 항생성 실험, 박테리옌 생산균주의 선별에 있어서는 MRS 배지가, 젖산균의 屬別 분리에 있어서는 Modified LBS(*Lactobacillus*), M17 with BCP(*Lactococcus*), LUSM(*Leuconostoc*), Modified Enterococcus 배지(*Pediococcus*), CTAS(*Carnobacterium*) 등이 효율적임을 확인하였다. 대상식품 6종 중 5종으로부터 총 2,412균주의 젖산균을 성공적으로 분리하였으며, 이들의 항균성 범주를 대표적 피검균 6종에 대해 조사한 결과 다양한 유효성을 보였고, 총 821개의 균주가 *Lactobacillus delbrueckii* NCK235에 대해 유효 항생성(effective antibiosis)를 보였다. 이들 821개 균주의 배양액 및 배양액의 ammonium sulfate precipitate(90% saturation cut)를 최종농도 1 mg/ml의 pronase 또는 trypsin으로 처리하여 그 활성의 소실 유무를 조사한 결과 protease 처리에 의해 활성을 상실하는 박테리옌으로 판단된 균주는 총 147균주로서 이들 중 75균주가 강력한 저해환을 보였으며 나머지 72균주는 약한 활성을 보였다. 위의 147균주와 그 박테리옌에 대해 동일 indicator들에 대한 lactacin F, leucocin A, lacto-coccin A/B/M, carnobacteriocin A/B, nisin 등 주요 既知의 박테리옌의 항균활성 특성 및 범주와 비교 분석하고 해당 활성의 강

도(intensity)를 참조하여 차후 산업화가 용이하고 그 유효도가 높을 것으로 판단되는 3종의 박테리오신 생산균주인 strain LAB 238-6 (물김치), strain LAB 311-3 (깍두기), strain LAB 461-2 (김치) 최종 선정하고 각각 *Lactococcus lactis* spp. *lactis* LAB 238-6, *Lactococcus lactis* LAB 311-3, *Lactobacillus plantarum* LAB 461-2로 선정하였다. 위의 3 종류의 박테리오신의 최적 생산 조건을 분석한 결과, lactococcin K2386 및 K3113, plantaricin K4612 공히 최적 pH는 7.0이었으나, 배양온도는 lactococcin K2386 및 plantaricin K4612는 37C에서, lactococcin K3113은 25C에서 최대 생산량을 보였다. 각 박테리오신의 산업적 유용성 효소 및 pH, 열, 산업용매 별로 실험한 결과, 3종류의 박테리오신 모두 protease 외의 모든 효소에 대해 안정하였으며, pH에 대해서는 lactococcin K2386은 불안정한 반면 lactococcin K3113과 plantaricin K4612는 그 활성이 영향을 받지 아니 하였다. 열에 대해서는 lactococcin K2386과 K3113는 안정한 반면 plantaricin K4612는 매우 불안정하였다. 용매에 대해서도 lactococcin K2386과 K3113는 안정한 반면 plantaricin K4612는 불안정한 반응을 보였다. 각 박테리오신을 CM-cellulose column chromatography 및 Gel filtration column chromatography에 의하여 정제하였다. lactococcin K2386 및 K3113을 정제한 결과, lactococcin K2386의 분자량은 8,100 dalton으로, lactococcin K3113의 분자량은 10,500 dalton으로 분석되었다. 유용 박테리오신의 유전특성 규명을 위하여 acridine orange를 이용, optimal condition 보다 고온(45C for *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LAB238-6, 37C for *Lactococcus lactis* LAB311-3)에서 연속 3회 계대 배양한 후 그 희석액을 MRS 배지에 평판도말하여 indicator strain으로 박테리오신 생산능에 대한 변이균주를 탐색하고 그 plasmid profile을 조사하여 박테리오신 생산 유전인자의 소재를 추적한 결과 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LAB238-6의 경우에는 50kb residential plasmid가 curing 된 변이주를 찾았으나, bacteriocin 생산에는 변화가 없음을 확인하였다. 따라서 lactococcin KCA2386의 생산관련 유전자는 chromosome 존재하는 것으로 판단되었다. *Lactococcus lactis* LAB311-3의 경우, 3.7kb, 11.2kb, 15.5kb, 48kb 등 4개의 residential plasmid가 존재하고 있는 바 상기의 방법에 의해 박테리오신 생산 변이주를 탐색한 결과 15.5kb의 plasmid가 소실될 경우 박테리오신 생산능도 동시에 소실됨을 확인하였으며, 따라서 lactococcin K3113의 생산은 15.5kb plasmid에 의해 이루어 짐을 규명하였다. 현재까지 보고된 박테리오신 중 *Listeria monocytogenes*에 활성을 가진 class II bacteriocin molecule의 아미노산 서열 분석 결과는 Fig. 5에 요약된 바와 같이 그 아미노 말단 부위에 consensus sequence로 Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Gly의 listeria-active consensus motif를 소유하고 있는 바, 이들 consensus sequence는 아미노 말

단에서 β -turn 구조를 형성함으로써 구조적으로 중요한 기능을 하고 있는 것으로 판단된다. 따라서 lactococcin K2386 및 K3113 공히 listeria-active class II bacteriocin임을 이용하여 probe를 제작하고 이를 이용하여 PCR에서 lactococcin K2386 유전자의 직접 cloning 및 sequencing을 시행하였다. Lactococcin K2386의 생산균주인 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LAB238-6를 Acridine orange로 처리하여 56.4 Kb residential plasmid를 상실한 plasmid-free mutant를 제작하였다 이 mutant는 lactococcin의 생산에는 변화가 없는 바 추후 다른 박테리오신 유전자의 도입에 의한 super-producer 제작에 유용한 자원으로 사용될 예정이다. Lactococcin K3113의 생산균주인 *Lactococcus lactis* LAB311-3을 acridine orange로 처리하여 15.4 kb residential plasmid가 상실된 bacteriocin-negative mutant를 제작하였다. 이 mutant는 lactococcin의 cloning 및 다른 박테리오신 유전자의 도입에 의해 새로운 표현형질의 박테리오신 생산균주를 제작할 수 있는 유전 자원이 될 것으로 판단된다.

다. 보존물질 대량생산 균주 개발 및 분리공정

박테리오신 생산균주인 *Lactococcus* sp. KFCC10790으로부터 박테리오신(lactococcin Y)의 생산을 증가시키기 위한 배양조건 및 배지조성을 확립하였다. Lactococcin Y를 ammonium sulfate 분별 침전법, 양이온 교환 크로마토그래피, gel-filtration 크로마토그래피 방법으로 순수 분리하였다. Lactococcin Y는 열에 안정하였으며 pH 2 - 6의 범위에서 안정하였다. 이 박테리오신은 살균작용을 나타내었다. Lactococcin Y는 *Bacillus*를 포함한 여러 그람양성균들에 대한 항균력을 나타내었다. Lactococcin은 여러 단백질 분해효소에 의해 분해되는 것으로 보아 단백질 성분으로 구성되어 있음을 보였다. 정제된 lactococcin의 분자량은 tricin-SDS-PAGE에 의해 2.5 kDa 인 것으로 결정되었다. 아미노산 분석 결과 소수성 아미노산의 조성이 높은 것으로 나타났다. 17개의 아미노 말단 아미노산 서열이 결정되었으며 다른 박테리오신과는 유사성이 없는 것으로 나타났다. Lactococcin Y를 대량으로 정제하기 위하여 amberlite인 XAD-2 흡착 및 immobilized-mrtal affinity chromatography를 이용한 새로운 분리공정이 개발되었다. 16S ribosomal DNA 분석에 의해 KFCC10790 균주는 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*인 것으로 판명되었다. 박테리오신 활성이 없는 돌연변이주들을 분리하여 플라스미드들의 구성을 분석한 결과 박테리오신 유전자는 염색체에 존재하는 것으로 결론지었다. 결정된 아미노산 서열을 바탕으로 박테리오신 유전자를 클로닝하기 위한 탐침이 제작되었으며 Southern blot 실험으로 위치를 확인하였다. *Lactococcus* sp. KFCC10790에 존재하는 7.3 kb의 플라스미드를 분리하여 *E. coli* 벡터인 pUC19에 삽입시켜 shuttle vector(pLE57)를 제조하였고 이의 제한효소지도를 작성하였다. PCR 방법으로 박테리오신 유전자를 분리하고자 하였다.

라 .식물체 유래 식품 보존제 개발

1. 여러종류의 약용식물을 대상으로 하여 식품부패 또는 병원성미생물에 대한 강력한 항균력을 나타내는 물질을 screening 하였는데 그 중에서 황련에탄을 추출물이 가장 강력한 항균력을 나타내었으며 열에(121°C for 15 min) 매우 안정였으며 알칼리성조건하에서 더욱 강한 활성을 나타내었다. 또한 물추출물을 silica gel로 충전된 column을 사용하여 benzene, dichromethane, ethylacetate, 및 ethanol-methanol-acetate-water (1:1:0.1:1) 용매로 순차적으로 용출한 다음 농축하여 항균력을 검색한 결과 혼합용매를 사용한 분획층에서 가장강한 항균력을 나타내었다.

2. 황련 물추출물로부터 항균력을 나타내는 성분을 검색하고 활성성분의 구조를 규명하기위하여 column chromatography방법을 사용하여 항균성물질을 분리정제한 후 IR, Mass, NMR 로 분석한 결과 항균력을 나타내는 물질은 berberin-Cl의 물질로서 판명되었다. 이 물질은 황련에 많이 존재하는 성분으로 알려져 있는데 기존에 밝혀진 berberin-Cl은 물에 잘 용해되지 않고 주로 유기용매에 녹여 사용되어 왔으나 본 연구자가 정제한 berberin-Cl은 기존의 berberin-Cl에 비하여 물에 훨씬 잘 용해 됨으로 앞으로 기존의 berberin-Cl보다 응용범위가 훨씬 더 높을것으로 사료되며 현재 이 물질의 분리정제에 대한 방법은 현재 특허출원을 하였다(1998년 특허출원 제 43012호).

3. 지금까지 보고된 berberin-Cl의 생리활성에 관한연구는 항균성, 항바이러스, 항염증, 항암, 항진균, 구강치료, 안질환등 주로 약리적작용에 관하여 많은 연구가 수행되었지만 식품에 응용된 예는 거의 전무하였다. 따라서 본 연구에서는 berberin-Cl을 식품에 응용하여 단독 또는 유기산이나 monolaurin과의 혼합반응을 통하여 식품의 부패 및 식중독세균에 대한 항균작용의 상승작용 유무를 검색한 결과 in vitro에서 berberin은 유기산과는 서로 상호반응작용이 거의 없는 것으로 나타 났으며 monolaurin과는 상승작용을 나타내는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 하여 우유와 과일음료주스에 첨가제로서 사용되었을 때 식중독세균에 대한 항균작용을 검색한 결과 과일음료주스에서는 *E. coli* O157:H7에 대한 berberin 또는 monolaurin의 생육저해효과가 단독으로 처리하였을때에는 높은온도에서는 항균효과가 거의 없었으며 낮은온도에서는 항균력이 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 반면에, 두물질을 혼합하였을때에는 35°C를 제외하고는 단독처리구에 비하여 현저한 상승효과를 나타내었으며 토마토주스보다는 당근과 사과주스에서 더 생육저해효과가 증가되었다. 또한, 우유에서는 *Staphylococcus aureus*균에 대한 berberin의 생육저해효과는 거의 미약하였으나 monolaurin의 경우에는 낮은온도(4°C)에서 whole milk와 skim milk모두 현저한 항균효과를 나타내었고 혼합물질도 비슷한효과를 나타내었다. 한편, 쇠고기에 오염된 *Listeria monocytogenes*균에 대한 생육저해효과를 조사한 결과 berberin 또는 monolaurin을 단독처리 하였을때에는 생육저해효과가 미약하였으나 두물질을 혼합처리 하였을때에는현저한 생육억제 효과를 나타내었으며 진공포장의 경우 monolaurin의 항균력이 공기포장에비하여 증가함을 나타내었다.

본 실험의 결과를 바탕으로 해볼 때 berberin-Cl자체는 검색된 식품에서는 항균력효과가 미약하였지만 monolaurin과 혼합처리시에는 식품의 종류에 따라 항균력이 현저히

상승함을 나타내었다.

2. 연구결과의 활용에 대한 건의

가. 항균 보존제 발효공정 분야

본 연구에서는 기존에 분리 선정했던 *Lactococcus* sp. BL-1(KFCC 10890)의 산업적 유용성 및 공정에 대하여 연구를 하였다. 국내에서 산업적으로 이용되는 라인을 통하여 가능성을 타진하여 만족할 만한 결과를 얻었다. 특히 저가의 발효 소재의 개발이 성공됨에 따라 국산화의 토대를 이루었다. 산업계의 접촉을 통하여 식품 및 향장산업에 이용 가능성을 보았다. 앞으로 본 제재류의 규제 완화로서 그 응용성을 높일 수 있다고 판단된다. 따라서 식품 첨가물로서의 등재와 같은 노력이 있어야 될 것이다.

나. 신규 식품보존물질 개발 분야

3년간의 연구에 의해 개발된 3종의 새로운 박테리오신은 한국의 대표적 전통식품인 김치, 깍두기 및 물김치 등으로부터 분리된 것으로서 본 연구과제의 수행에 의해 그 생산 균주의 동정, 박테리오신의 부분정제 및 산업적, 유전적 특성 등이 학문적, 기술적 지평에서 종합적으로 조사되었다. 따라서 이들 자료를 국내 식품산업계에 공개하여 각 식품별, 산업현장별 수요에 맞는 박테리오신을 식품보존제로서 산업화 생산할 수 있도록 활용할 수 있으며, 사료산업계에서는 사료의 보존성을 높이는 첨가제로서 활용할 수 있고, 식품포장업계에서는 이를 항균포장재의 주성분으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

다. 보존물질 대량생산 균주 개발 및 분리공정 개발 분야

Bacteriocin 생산균주의 탐색 및 동정기술을 확립하였다. Bergey's manual에 의한 고전적 동정방법 외에도 Biolog와 같은 자동화된 동정기술을 사용하였고, 16S ribosomal RNA sequence분석과 같은 분자생물학적 동정법도 사용함으로써 bacteriocin 생산균주의 동정에 대한 know-how를 확립하였다. Bacteriocin을 순수 분리하는 방법을 수립하였으며 bacteriocin의 물리·생화학적 특성을 밝혔으며 bacteriocin의 분자 특성 및 유전학적 특성을 규명하였다. Bacteriocin을 상품화 할 경우 요구되는 대량생산을 위한 공정개발을 확립하였다. Nisin에 필적하는 bacteriocin을 외국의 기술도입에 의존하지 않고 자체적으로 대량생산할 수 있는 방법을 개발하여 경쟁력을 확보하였다. Bacteriocin은 부가가치가 높은 물질로서 이의 산업화로 발효 생물산업계를 육성할 수 있는 계기가 마련되었다. Bacteriocin은 발효첨가제나 식품 보존제 등과 같은 응용의 범위가 넓고 다양한 식품에 첨가될 수 있으므로 상업적인 전망도 매우 밝다. Bacteriocin 유전자의 클로닝은 순수 과학적인 면에서도 중요하다. Bacteriocin은 단백질의 구조와 기능과의 관계에 대한 좋은 연구대상이 될 수 있으며 단백질공학과 유전공학에 의한 bacteriocin의 분자변형으로 보다 안전하고 활성이 높으며 광범위한 항균력을 갖는 bacteriocin의 개발이 가능하다. 인체에 무해한 bacteriocin이 생물학적 보존제 (biopreservative)로 상품화되어 현재 생물산업에서 사용되고 있는 화학적 보존제를 대체 할

경우 국민건강의 향상에 크게 기여할 것으로 예상된다. Bacteriocin에 대한 일반인의 인식이 요구되며 연구개발을 위한 투자가 필요하다. 현재 우리 나라에서는 bacteriocin이 항생제로 분류되어 식품 첨가제로 허용되고 있지 bacteriocin에 대한 인식이 부족한 탓으로 천연 보존제로 분류되어야 하며 앞으로 이 문제가 우선적으로 해결되어야 할 것이다. Bacteriocin에 대한 연구 및 개발에 필요한 연구인력의 수준이나 연구장비에 있어서 국내와 외국의 차이는 없는 것으로 사료된다. Bacteriocin과 같은 새로운 신 물질 창출을 위한 노력과 투자가 증대되어야 하며 기술권 보호 노력이 요구되고 있다. Bacteriocin은 그 종류가 다양하고 같은 종의 균주들도 변종에 따라 특성이 다른 bacteriocin을 생산하므로 다양한 bacteriocin들에 대한 탐색과 연구가 계속되어야 할 것이다. 한국의 전통식품은 그 주종이 발효식품으로서 세계적으로 가장 풍부한 젖산균 자원을 갖고있으므로 새로운 유용 bacteriocin 생산 젖산균의 개발에 최적 환경을 소유하고 있다. 이러한 천혜의 연구 및 개발환경을 최대한 활용하기 위해서는 보다 조직적이며 총괄적인 연구·개발 노력이 산·학·연 합동으로 이루어져야 한다. Bacteriocin의 유일한 단점은 항균 spectrum이 좁다는 것이다. 따라서 보다 안전하고 활성이 높으며 광범위한 항균력을 갖는 bacteriocin의 개발을 위해서는 단백질공학과 유전공학에 의한 새로운 bacteriocin의 개발이 필요하다. Bacteriocin은 기존의 항생물질들이 2차 대사산물인데 반하여 ribosome에서 합성되는 단백질로서 직접적인 유전자조작에 의해 변형이 가능하다는 장점을 갖고 있다.

라. 식물체 유래 식품 보존제 개발 분야

최근 국민건강에 대한 인식이 고조됨에 따라 식품의 안전성에 관한 관심이 높아가고 있다. 이러한 가운데 신선식품을 원하는 국민의 욕구는 증가하고 합성 첨가제의 사용에 의한 안전성문제 및 소비자들의 거부가 큰 문제로 대두됨에 따라 안전성의 문제가 전혀 없는 새로운 천연첨가제의 개발이 매우 필요하게 되었다. 따라서 본 연구는 이러한 측면에서 새로운 천연보존제의 개발을 위한 기초 자료를 마련하고자 1차년도 에서는 여러 종류의 약용식물을 대상으로 하여 강력한 항균력을 나타내는 물질을 screening 하였는데 그 중에서 황련이 가장 강력한 항균력을 나타내어 이 물질에 대하여 식품 부패 및 병원성 균에 대한 항균력을 검색하였다. 2차 년도에서는 항균력을 나타내는 성분을 검색하고 활성성분의 구조를 규명함으로써 천연 보존제의 개발을 위한 보다 진보된 자료를 마련하고자 수행하였는데 IR, Mass, NMR 분석결과 항균력을 나타내는 물질은 berberin-Cl의 물질로서 판명 되었다. 이 물질은 황련에 많이 존재하는 성분으로 알려져 있는데 기존에 밝혀진 berberin-Cl은 물에 잘 용해되지 않고 주로 유기용매에 녹여 사용되어 왔으나 본 연구자가 정제한 berberin-Cl은 물에 잘용해 됨으로 앞으로 기존의 berberin-Cl보다도 응용범위가 훨씬 더 높을것으로 사료된다. 현재 이물질의 분리정제에 대한 방법은 현재 특허출원 중에 있다. 3차 년도 에서는 정제된 물질을 이용하여 식품에 응용하였을 때 천연보존제의 역할가능성을 검색하고자 수행하였다. 지금까지 보고된 황련 추출물의 생리활성에 관한 연구는 항균성, 항 바이러스, 항 염증, 항 암, 항 진균,

구강 치료, 안질환 등 주로 약리적 작용에 관하여 많은 연구가 수행되었지만 이물질을 이용하여 식품에 응용된 예는 거의 전무하였다. 따라서 본 연구에서는 황련 정제물질의 단독 또는 유기산이나 모노로린과의 혼합반응을 통하여 식품의 부패 및 식중독세균에 대한 항균작용의 상승작용 유무를 검색한 결과 in vitro에서 berberin은 유기산과는 서로 상호반응작용이 거의 없는 것으로 나타났으며 모노로린과는 상승작용을 나타내는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 하여 과일음료주스에 첨가제로서 사용되었을 때 *E. coli* O157:H7의 생육저해효과를 조사한 결과 효과가 나타났다. 따라서 위의 결과를 바탕으로 하여 종합해볼 때 황련추출물을 이용하여 약리적 식량자원은 물론 새로운 천연 식품보존제 및 항균성 의약품 개발에도 크게 활용될 수 있을 것으로 사료되며 본 연구에서 정제한 물질이 기존의 berberin-Cl보다 더 수용성임을 감안할 때 식품 및 의약품의 소재로서 그 적용 가능성이 훨씬 더 포괄적이면서 용이할 것으로 추정된다.

SUMMARY

A lactococcal strain was isolated from dairy source as a candidate for producing antimicrobial substances and deposited to KFCC. Lactococcal isolate(KFCC 10790) was reclassified using API kit and morphology, and identified as *Lactococcus lactis subsp. latis*. It is very critical factor in producing a microbial metabolite to develop an inexpensive, lean fermentation medium. Soybean and skimmilk were chosen as protein sources for preparing a low-cost culture base. Various proteases were tried for digesting soy- and milk protein. Protease N was good for digesting milk protein. Digestion was completed by treating 10 % skimmilk with 0.6 % enzyme and reacting at 55°C for 1.5 - 2 hours. Additional nutrients were 0.5% YE, 0.8 % ME and 1.0 % glucose. Proptease N and S were good for digesting soyprotein. Additional nutrients were 0.8% ME, 0.3% YE and 1.0% glucose. Digestion was completed by mixing 0.6 % enzyme with soymilk(1/9) and reacting at 55°C for 1.5 - 2 hours. When using a mixture of skimmilk and soymilk, the optimal ratio was 7/3. At this condition, it was possible to get 25,600 AU/ml and 10⁹ cfu/ml. Immobilization technique was introduced for recycling the bacteriocin producer. The optimal condition for immobilization was: calcium alginate;40mM, needle size; 25G, cell density; 10⁹CFU/ml, gelling time; 1hour. Optimal fermentation condition was: agitation; 50rpm, bead/medium ratio; 1:4. Maxmum activity was 6,400 AU/ml after 12hours of fermentation at 30°C. The strain was identified as *Lactococcus garvieae* by Biolog system and MIDI system. The substance and its producer were found to be safe based on antimutagenecity and acute and sub-acute toxicity test. The substance was also found to be of help increasing alcohol productivity during fermentation.

Bacteriocin producing bacteria were isolated from groups of traditionally prepared Korean food such as winter kimchi, mul-kimchi, non-winter kimchi, Kakduki, Sikhae and farm milks. Optimal selection media used for this study were as follows; MRS for lactic acid bacteria in general, modified LBS for *Lactobacillus*, M17 with BCP for *Lactococcus*, LUSM for *Leuconostoc*, modified Enterococcus media for *Pediococcus*, CTAS for *Carnobacterium*. 2,412 strains of lactic acid bacteria were isolated from resource foods. Among them, 821 strains exhibited effective antibiosis against 6 indicator strains. Based upon sensitivity to protease treatment on the ammonium sulfate precipitate of the culture broth, 147 strains among the 821 strains were confirmed as bacteriocin producers. After evaluation of antibacterial spectrum and effectiveness of inhibition, 3 producer strains were finally selected as best bacterioicin producers. The strains are strain LAB 238-6 from mul-kimchi, strain LAB 311-3 from Kakduki, strain LAB 461-2 from non-winter

kimchi and identified as *Lactococcus lactis* spp. *lactis* LAB 238-6, *Lactococcus lactis* LAB 311-3, *Lactobacillus plantarum* LAB 461-2, respectively. Optimal pH of bacteriocin production were 7.0 for all the 3 strains. Optimal temperature, however, were different each other, 37C for *Lactococcus lactis* spp. *lactis* LAB 238-6 and *Lactobacillus plantarum* LAB 461-2, and 25C for *Lactococcus lactis* LAB 311-3. Bacteriocins from the 3 strains were not digested by hydrolytic enzymes except proteases. Lactococcin K3113 and plantaricin K4612 were stable over pH changes, while lactococcin K2386 was unstable over pH changes. As for stability over heat treatment and solvent treatment, lactococcin K2386 and K3113 were very stable, while plantaricin K4612 was not. Bacteriocins were purified by CM-cellulose column chromatography and gel filtration column chromatography. Molecular weight of purified lactococcin K2386 and K3113 were calibrated as 8,100 dalton and 10,500 dalton, respectively, on SDS-PAGE. Genetic determinants of lactococcin K2386 were localized on the chromosome because plasmidless mutant obtained by acridine orange-induced curing showed no change in bacteriocin production. Genetic determinants of lactococcin K3113, however, were localized on the residential 15.5-kb plasmid because loss of the plasmid coincided with the loss of bacteriocin production. DNA probe for cloning and direct sequencing of the bacteriocin genes were prepared from the consensus listeria-active motif Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Gly. However, there have been no PCR products from DNA preparations of lactococcin K2386 and K3113 by the probe. Plasmidless mutant which lost 56.4-kb residential plasmid was developed for the use of recipient strain for super bacteriocin producer. Bacteriocin-negative strain of *Lactococcus lactis* LAB311-3 was prepared by acridine treatment, and developed as host strain for the selection of transformants of bacteriocin genes. Characteristics of bacteriocins studied in this research were summarized in the following table. Sample starter cultures were prepared by fermentation of each producer strains in 2 liter of MRS broth with subsequent collection of cells and freeze drying.

Culture conditions of *Lactococcus* sp. KFCC10790, a bacteriocin producing strain, were studied for enhancing its production with regard to environmental and nutritional factors. Optimal composition of culture medium for bacteriocin production was determined. The optimal pH of medium and fermentation temperature were 6.0 and 30°C, respectively. Lactococcin Y, a bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. KFCC10790, has been purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, cation-exchange chromatography, and gel-filtration chromatography. Lactococcin Y was shown to be heat tolerant and stable between pH 2 and 6. It has a bactericidal mode of action. Lactococcin Y showed broad antimicrobial spectra against various gram-positive bacteria, including *Bacillus* sp. Lactococcin Y was sensitive against a number of proteases, which reveals its

proteinaceous nature. Purified lactococcin Y was determined to be 2.5 kDa by tricine-SDS-PAGE. Amino acid analysis revealed high levels of hydrophobic amino acids which account for the hydrophobic nature of lactococcin Y. The first 17 amino acid residues were identified by N-terminal automatic amino acid sequencing of the isolated bacteriocin. No sequence homologous to the lactococcin Y N-terminal sequence was found in the protein data bases. Lactococcin Y was adsorbed to the resin, amberlite XAD-2 and to metal-affinity column. On the basis of these properties, a novel purification method was developed for large scale isolation for bacteriocin from *Lactococcus* sp. This method includes adsorption chromatography, immobilized metal affinity chromatography, cation-exchange chromatography, and reverse-phase chromatography steps. *Lactococcus* sp. KFCC10790 was identified as *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by 16S ribosomal RNA sequence analysis. A plasmid-curing experiment and analysis of bacteriocin -negative derivatives indicated that *Lactococcus* sp. KFCC10790 contains bacteriocin gene on its chromosome. Oligonucleotide probes based on the N-terminal amino acid sequence were constructed and Southern blot analysis was performed to detect the lactococcin Y structural gene. A shuttle vector was constructed that can replicate autonomously in *L. lactis* and *E. coli*. To obtain this vector(pLE57), a 7.3 kb cryptic plasmid of *Lactococcus* sp. KFCC10790 was cloned into pUC19 and a detailed restriction map was constructed. Two degenerate primers were synthesized to amplify the bacteriocin gene by PCR.

Antimicrobial activity of water or ethanol extracts from mountain edible herbs was investigated against food poisoning or foodborne disease organisms. Among them, ethanol extract of *Coptis chinensis* Franch showed the strongest antimicrobial activity. Also, silica gel column chromatography was used to isolate active antimicrobial compounds and eluted and concentrated by using benzene, dichromethane, ethylacetate, and ethanol-methanol-acetate-water(1:1:0.1:1) with step by step. The strongest antimicrobial activity was observed in ethanol-methanol-acetate-water (1:1:0.1:1) fraction. Antimicrobial activity from water extract of *Coptis chinensis* Franch was determined and natural antimicrobial component was isolated, identified using column chromatography and TLC, and structure was analyzed using ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS and IR. Active natural antimicrobial agent was identified as berberin-Cl. This compound has been known as key component showing strong antimicrobial activity in *Coptis chinensis* Franch. Previously identified berberin-Cl was slightly soluble in water and soluble in organic solvents, but berberin-Cl author identified was much more dissolved in water than previous reported berberin-Cl. Now, isolation and identification method for

berberin-Cl from *Coptis chinensis* Franch was patented (patent number:43012, 1998). Berberin-Cl has been reported as showing antimicrobial activity, anticancer, antiviral, antifungal and anticavity, etc., but it has been little reported as antimicrobial agent on food system. Thus, this study was applied to different foods (acidic fruit juices, milk, and beef) spiked with food-borne disease organisms by using purified compound either alone or combined with monolaurin in order to determine their potential of the natural antimicrobial agent. Berberin-Cl did not interact with organic acid, but it showed synergistic effect with monolaurin in vitro system. From this result, inhibitory effect of berberin-Cl and monolaurin either alone or in combination on acidic fruit juices spiked with *Escherichia coli* O157:H7 or milk spiked with *Staphylococcus aureus* was determined. The addition of berberin or monolaurin alone to acidic fruit juices showed little antimicrobial activity at higher temperature, but slightly increased antimicrobial activity was observed as temperature decreased. However, combined berberin-Cl with monolaurin significantly enhanced inhibitory effect compared to that of single treatment alone except 35°C storage. Especially, antimicrobial activity in carrot and apple juice was more increased than apple juice. Also, inhibitory effect of berberin-Cl alone on milk spiked with *Staphylococcus aureus* was very poor, but inhibitory effect of monolaurin on whole milk and skim at lower temperature was strikingly enhanced. In the meantime, combined berberin-Cl with monolaurin showed more strong inhibitory effects on beef spiked *Listeria monocytogenes* than those of berberin-Cl or monolaurin alone and antimicrobial activity of monolaurin in vacuum packaging was more increased than that of air packaging. From above results, berberin-Cl itself showed a little antimicrobial activity, but significantly enhanced inhibitory effects were observed when berberin-Cl combined with monolaurin depending on tested types of foods. Thus, it will be necessary to apply berberin-Cl on different types of foods and to find synergistic effects, then it might play a great contribution as a new natural antimicrobial agent.

CONTENTS

I. Introduction	23
1. Background	23
2. Importance of Research	25
II. Technological Trend and Prospect	28
1. Trend in Other Countries	28
2. Trend in Korea	32
III. Purpose, Goal and Scope of Research	34
1. Goal of Research	34
2. Scope of Research	34
VI. Result and Recommendation	36
1. Result and Discussion	36
1.1. Fermentation Process of <i>Lactococcus sp</i>	36
1.1.1. Assay Method of Antimicrobial Activity	36
1.1.2. Low Cost Media and Nutritional Balance	37
1.1.2.1. Fermentation Media	37
1.1.2.1.1. Fermentation Using Skimmilk	37
1.1.2.1.2. Fermentation Using Soybean	46
1.1.2.2. Nutritional Balance	55
1.1.2.2.1. Fermentation Using Skimmilk	55
1.1.2.2.2. Fermentation Using Skimmilk	59
1.1.2.3. Environmental Balance	62
1.1.2.3.1. Fermentation Using MRS broth	62
1.1.2.3.2. Fermentation Using Low Cost Media	65
1.1.3. Identification of <i>Lactococcus sp</i>	68
1.1.4. Immobilization Technology	74
1.1.4.1. Selection of Immobilization Matrix	74
1.1.4.2. Size of Glass Bead	74
1.1.4.3. Type and Concentration of Alginate	75
1.1.4.4. Concentration of CaCl ₂	77
1.1.4.5. Size of Needle	77
1.1.4.6. Initial Cell Number	79
1.1.4.7. Agitation	79
1.1.5. Scale-up of Process	84
1.1.5.1. Fermentation Using 5 L jar fermentor	84
1.1.5.2. Fermentation Using 20 L fermentor	88

1.1.5.3. Fermentation Using 30L fermentor	89
1.1.5.4. Industrial Process	90
1.1.5.5. Centrifugation and Formulation	94
1.1.5.6. Preparation of Bacteriocin	94
1.2. Application	94
1.2.1. Inhibition of <i>Listeria monocytogenes</i>	94
1.2.2. Inhibition of <i>Propionibacterium acnes</i>	95
1.2.3. Noodle	97
1.2.4. Rice Wine	98
1.2.5. Grape and Tomato Wine	99
1.3. Toxicology	101
1.3.1. Antimutagenecity	101
1.3.2. Acute Toxicity	101
1.3.3. Subacute Toxicity	103
2. Conclusion	109
3. Recommendation	110
V. References	111

Appendix

1. Development of New Food-biopreservatives from Microbial Resources of Traditional Foods	117
2. Genetic Breeding of <i>Lactococcus</i> sp. KFCC 10790 and Separation Process Development	255
3. Development of Natural Antimicrobial Agents from Medicinal Edible Plants	301

목 차

발행
일: 2019. 12. 10

제 1 장 서 론	23
제 1 절 연구의 배경	23
제 2 절 연구개발의 필요성	25
제 3 절 국내외 연구 동향	25
제 2 장 기술개발 동향 및 전망	28
제 1 절 외국의 기술개발 동향	28
제 2 절 국내 기술 개발 동향	32
제 3 장 연구개발 목표, 내용 및 범위	34
제 1 절 연구개발 목표	34
제 2 절 연구개발 내용 및 범위	34
제 4 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의	36
제 1 절 연구개발 결과	36
1. <i>Lactococcus</i> sp.를 이용한 보존제 생산 공정	36
가. 효율적인 항균력 Assay Method 선정	36
나. 저가 소재 개발 및 영양성분 균형 확립	37
1) 발효 소재 개발	37
가) 탈지 분유를 이용한 발효 시험	37
나) 대두를 이용한 발효시험	46
2) 영양 균형 확립 시험	55
가) 탈지 분유를 이용한 발효 시험	55
나) 대두를 이용한 발효 시험	59
3) 발효 환경 균형 시험	62
가) MRS broth에서의 환경 조건 시험	62
나) 저가 소재를 이용한 발효시험	65
다. <i>Lactococcus</i> sp.의 재 동정	68

라. 세포 고정화 기법 연구	74
1) 고정화 매체의 선정	74
2) Glass Bead 크기별 고정화 시험	74
3) Alginate의 종류 및 농도가 고정화에 미치는 영향	75
4) CaCl ₂ 의 농도가 고정화에 미치는 영향	77
5) Bead 제조시 주사바늘의 크기가 세포 고정화에 미치는 영향	77
6) 사용된 균수의 영향	79
7) 발효시 rpm의 영향	79
마. 발효 공정의 스케일 업	84
1) 5 L jar fermentor를 이용한 배양 시험	84
2) 20 L fermentor를 이용한 생산 시험	88
3) 30L fermentor를 이용한 생산 시험	89
4) 산업적 공정을 이용한 생산 시험	90
5) 원심 분리 및 제재화 공정 시제	94
6) Crude Bacteriocin의 조제 공정	94
2. 응용시험	94
가. BL-1 crude powder를 이용한 <i>Listeria monocytogenes</i> 억제	94
나. BL-1 crude powder를 이용한 여드름 균 억제	95
다. 향균 제재를 이용한 생면의 제조	97
라. BL-1 제재를 이용한 막걸리 제조	98
마. BL-1 제재를 이용한 포도주 및 토마토 주 제조	99
3. BL-1의 독성 시험	101
가. BL-1 조제물의 돌연변이원성	101
나. BL-1 조제품의 급성 경구독성시험	101
다. 실험동물을 이용한 원말의 아급성 독성 시험	103
제 2 절 결 론	109
제 3 절 연구결과의 활용에 대한 건의	110
제 5 장 참고문헌	111

부 록

1. 전통식품 유래 미생물자원으로부터 식품 보존 물질의 탐색 연구
(협동과제-1) 117
2. 천연식품 보존제 대량생산 균주 및 분리공정 개발(협동과제-2) 255
3. 천연식물체로부터 식품보존제 탐색에 관한 연구(협동과제-3) 301

여 백

제 1 장 서론

제 1 절 연구의 배경

식품을 보존하기 위한 노력은 인류가 집단생활을 하면서 부터 끊임없이 시도되어 왔다. 식품의 보존에는 화학적, 미생물 또는 효소적 변화를 저지하기 위한 여러 가지 수단이 있는데 옛날부터 가열이나 동결, 건조등 물리적 방법으로 식품을 보존하거나 식품의 산성화, 소금이나 설탕을 이용한 절임 및 훈연 등의 방법을 계속 이용하여 왔다. 그러나 이 방법은 모든 식품에 이용할 수 없으며 단지 부분적으로만 효과를 나타낼 뿐이다. 이들 이외에 식품을 보존하기 위하여 지금까지는 주로 화학 합성 보존제가 이용되어 왔는데 대표적인 것으로는 Benzoic acid, Sodium benzoate, Sorbic acid, Propionate, Sulfites, Acetates, Nitrate, Nitrite 및 Epoxides 및 지방산 에스터등이 있다. 이들 대부분은 자체 독성 때문에 사용량의 한계가 있으며 이용범위가 좁을 뿐 아니라 소비자들이 기피하고 있는 실정임에도 불구하고 그 대체방안이 뚜렷하지 않기 때문에 지금까지 계속 사용되고 있다(Chichester등 1972). 그러나 이러한 합성 보존제는 오랫동안 식품저장에 사용되어 왔음에도 불구하고 공중 보건상의 위해 문제에 대하여 여러 계층에서 논란이 되어온 것이 사실이며 실제로 그 자체의 독성 때문에 사용한계가 까다롭다. 그 이외에 사용되고 있는 물질로서는 항생물질을 언급할 수 있다. 자연계에는 여러 가지 종류의 항균성 물질이 존재하며 여러 가지 식물체나 미생물에 의하여 생성된다. 이와 같은 항균물질은 주로 의약용으로 이용되고 있지만 그 외의 용도로서 가축의 증식촉진 보조제, 식물 병원균 퇴치 및 식품보존제로서도 많이 이용되고있다.

자연계에는 인류가 수천 만년 섭취하여온 식물(食物)이 있는데 이들 중에는 각종 유용한 성분이 있어 항산화제, 보존제, 질병 치료의 민간 요법용으로 사용되던 것이 있으며 또한 이들 유래의 미생물로부터 유용한 보존 물질을 얻어 이용하여온 것은 주지의 사실이다.

미생물 기원의 보존제로서 식품의 보존에 이용되고있는 것으로는 통조림에 Polypeptide 태의 Subtilin, Nisin 및 Macrolide류인 Tylosin이 고온성 포자 형성균에 의한 변패방지를 위하여 이용되며, 어류의 신선도 유지 및 과일 야채류의 저장을 위하여 Tetracycline류의 항생 물질이 사용되어 왔다. 이와 같은 항생물질도 역시 식품류에 사용되었을 경우 인체에 이행되어 여러 가지 부수적인 영향을 줄 수 있어 사용에 제한이 많다.

따라서 식품보존에 사용될 물질로서 가능한 한 독성이 적고 사용한계가 넓으며 인체에 이행되었더라도 쉽게 분해되든지 영향을 주지 않는 물질의 개발이 필요하다. 이와 같은 물질로서는 알려져있는 것이 Polypeptide류의 Nisin과 같은 물질이 있는데 이는 인체에서 흡수되지 않고 분해되는 것으로 알려져 있지만 개발한 산업체에서 독점적으로 생산 판매되고 있고 국내에도 시장 개척을 위하여 외교적인 노력을 기울이고 있는 실정이므로 산업적 소유권 확보 차원에서 국내에서의 독자적 연구 개발 및 정부지원은 전무한 현실을 감안할 때 단 시간 내에 외국기업에 의한 국내 시장의 지배가 심히 우려되고 있는 실정이다.

설상가상으로 광범위한 미생물에 대한 저해작용을 하며 또 고등생물에 대한 독성이 낮 으면서 값싼 물질을 찾기란 힘든 것이다. 그러나 이러한 문제를 해결하기 위하여 전세계적

으로 지속적인 연구가 되어 왔으며 그 중 한 분야로서 미생물이 생산하는 항균성 물질의 탐색을 들 수 있다. 이들 항균성 물질은 식품 생산이나 품질보존의 목적을 갖는 식품첨가제로서 뿐만 아니라 가축의 생육 촉진이나 질병 예방에 사용함으로써 이들의 부산물인 우유, 고기 또는 계란 등에 고의성은 없지만 들어가게 된다. 항균성 물질은 대부분 의약용으로 많이 사용되며 면역학적 부작용이 있어 2차 세척공정을 거치는 원료의 단기 저장 등에 국한되어 이용하고 있을 뿐이다.

그러나 이들 중 항생물질과는 달리 비교적 독성이 적고 식품과 함께 섭취할 경우 효소에 의해 쉽게 분해될 수 있는 단백질 항균물질이 있는데 대표적 물질로 젯산균류가 생산하는 Nisin이 있다. 이 물질은 영국에서 상품화되어 FOB 가격(1998년 기준)으로 Kg 당 약 58 만 원(정제품은 그램당 58 만원)에 판매되고 있으며 1988년 4월 미국에서도 GRAS 물질로 인정받아 앞으로 시장이 많이 넓어 질 것으로 생각된다. 따라서 새로운 자원의 확보 및 산업적으로 유용한 지적 소유권의 확보 차원에서 이 분야의 연구가 필요하다고 사료되며, 개발 물질의 이용에 의한 전통 식품의 고급화 및 개발 물질의 부가가치를 통한 국산 자원의 이용도 제고는 현실적으로 매우 필요하다고 보겠다.

한편 천연식물체 성분에 의한 보존 방법에 관한 연구도 매우 바람직한 것이라 할 수 있다. 천연물에 관한 연구는 주로 식품보존에 관한 것으로서 우리가 평소에 상용하던 것들로부터 연구가 되어 왔다. 특히 마늘과 양파를 이용하여 항균 작용에 적용하려한 것이 보고되고 있고 이 성분은 매운 맛 성분인 Allin에 기인된다 하였으며 이와 비슷한 functional group으로 sulfhydryl group을 가진 화합물을 찾으려 노력하여 왔다. 이들은 또 Mycotoxin의 주역인 곰팡이류의 억제에도 큰 효과가 있다고 한다. 이와 같은 성분으로는 정향의 Eugenol, 백리향의 Thymol, 육계의 cinnaaldehyde 가 알려져 있으며 이 밖의 mustard oil, citronellal이, 재료로서는 고추, 당근 즙과 씨, 박하, 수피, 편축, 초피, 회향유, 황금, 작약, 황백, 파, 시금치, 호박 등이 대표적인 것으로 대두되고 있다.

우리 나라는 1987년 물질 특허제도가 도입되었고, 1992년 브라질 리우에서 있었던 생물 다양성협약에서 각 국가들이 고유의 생물자원을 지키려는 추세로 방향을 잡고 있으며 이와 함께 전세계가 UR/WTO체제에 돌입되면서 우리 나라도 국가경쟁력을 더 한층 높이지 않을 수 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국산 자원에서 유용한 보존 물질을 탐색하거나 국산 자원을 이용하여 국산자원을 이용하여 항균 보존제를 생산하여 국제 경쟁력을 높이고자 연구계획을 수립하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 가. 국내 발효 산업은 항생제, 유기산 및 핵산의 생산에 주력을 두고 있음.
- 나. 따라서 부가가치가 높은 생물 산업 제품의 수입이 늘고 있음.
- 다. 생물산업제품의 대부분도 외국의 기술 도입에 의존하고 있어 경비 부담이 가중되는 실정임
- 라. 자연계에는 신규한 기능성 물질이 많으며 그중 항균 보존력이 있는 것이있슴.
- 마. 외국에서는 신 물질 창출을 위한 노력과 투자가 급격히 증대되고 산업기술권 보호 노력이 가중되고 있음.
- 바. 항균 보존제의 생산 기술의 개발 노력으로 발효 분야 기술력 축척이 필요함
- 사. 유전자 조작에 의한 항균성 물질 대량 생산 체제 구축이 매우 절실한 편임.
- 아. 고기능 물질의 대량 분리 정제 공정의 습득이 필요함.
- 자. 국산 천연 자원의 이용기술 개발 축척이 필요함
- 차. 고유 천연 물질의 구조 확인과 이를 이용한 대량생산 체제 구축이 절실함

2. 경제·사회적 측면

- 가. 식품에 사용되고 있는 대부분의 보존제는 화학합성 보존제임
- 나. 소비자들의 지식수준의 향상으로 화학 합성제에 대한 기피 현상이 있음
- 다. UR/WTO체제로의 돌입으로 국제 사회는 무한 경쟁의 시대로 돌입되고 각자 고유의 자원을 이용 부가가치 제품의 개발이 절박한 실정임
- 라. 국내에는 4,200여종의 식물이 있고 식용식물만 75,000 M/T이, 약용 식물이 31,187 M/T 이 재배 생산되며 자연계의 야생을 감안하면 무궁 무진한 자원임.
- 마. 이들중 많은 식물이 기능성을 가진 것으로 알려져 있음.
- 바. 찾고자하는 보존성 물질류는 그램당 580,000 원 정도의 고가 물질이며 개발되면 국제 경쟁력이 충분히 있음.
- 사. 본 물질들은 농, 수,축산물 및 가공제품에 이용될 수 있으며 전통식품의 고유한 맛과 향을 보유할 수 있는 시스템을 구축할 수 있음.
- 아. 천연자원중 미이용 산간 자원의 이용 방안을 모색하기 위하여 절실히 필요함.

제 3 절 국내외 연구 동향

최근 구미 각국에서 새로운 분자 소재(resource-molecule)로 각광을 받고 있는 박테리옌(bacteriocin)은 미생물이 생산하는 천연의 항균성 단백질(antimicrobial polypeptide)로서, 기존의 항생제가 미생물의 2차대사산물인데 반하여 자신의 유전자로부터 직접 생합성(ribosomal translation)되는 것이 특징이며, 따라서 직접적인 유전자 조작등에 의한 생물공학

적 응용이 용이하고 그 결과 산업현장의 소요에 보다 다양하게 반응할 수 있을 뿐만 아니라, 분자가 단백질로 이루어져 있는 덕분에 인체에 섭취되는 즉시 소화기관의 단백가수분해효소에 의해 분해됨으로써 인체에 무독성이고 잔류성이 없다는 측면에서 식품등의 새로운 생물학적 보존제(biopreservative) 내지는 발효식품등의 생물제어제(bioregulator)로 그 효용이 크게 기대되고 있다.

이러한 박테리오신의 산업적 응용기술의 개발은 목하 유럽 및 미국등 식품의 안전성(safety) 및 자연성(naturality)을 식품산업의 최대 과제로 인식하고 있는 先進諸國에서 최근 학문적 산업적 주요 관심사가 되고 있는 바, 특히 김치, 장류 등 전통적으로 천연의 미생물을 이용한 발효식품이 풍부할 뿐만 아니라 국민건강을 좌우하는 주요 기초식품을 이루고 있는 한국적 상황에서는 더욱 그 과학적 산업적 응용기술의 개발 및 축적이 시급하고도 중요한 사항인 것으로 판단된다.

식품을 보존하기 위한 노력은 사실 인류가 집단생활을 하면서부터 끊임없이 시도되어 왔다. 식품의 화학적, 미생물학적 또는 효소적 변화를 저지하기 위하여 가열이나 동결, 건조등 물리적 방법으로 식품을 보존하거나, 식품의 산성화, 소금이나 설탕을 이용한 절임 및 훈연등의 방법을 사용하여 식품의 보존성을 증대시켜 왔다. 그러나 이러한 방법들은 모든 식품에 이용될 수 없으며 단지 부분적으로만 효과를 나타낼 뿐이다. 이들 외에 식품을 보존하기 위하여 지금까지는 주로 화학합성 보존제(chemical preservative)가 이용되어 왔는데 대표적인 것으로는 benzoic acid, sodium benzoate, sorbicacid, propionate, sulfites, acetates, nitrate, nitrite 및 epoxides등이 있다. 이들 대부분은 자체 독성때문에 사용량의 한계가 있으며 이용범위가 좁을 뿐만 아니라 소비자들이 기피하고 있는 실정임에도 불구하고 보다 효율적인 대체방안이 없음으로 인해 지금까지 계속 사용되고 있다(Chichester 등 1972). 그러나 이러한 합성 보존제는 오래동안 식품저장에 사용되어 왔음에도 불구하고 공중 보건상의 危害 문제로 인하여 계속적으로 논란이 되어온 것이 사실이며, 실제로 그 자체의 독성때문에 사용의 법적 제한이 까다롭다. 그 외에 사용되고있는 물질로서는 항생물질을 언급할 수 있는 바 자연계에는 여러가지 종류의 항균성물질이 존재하며 여러가지 식물체나 미생물에 의하여 생성되나 이와같은 항생물질은 주로 의약용으로 이용되고있으며 그외의 용도로서 가축의 증식 촉진 보조제, 식물병원균 퇴치에도 사용되고 있고 식품보존제로서도 일부 이용되고 있다.

식품보존제로서 이용되고 있는 분야로서는 통조림에서는 polypeptide형태의 subtilin, nisin 및 macrolide류인 tylosin이 고온성 포자 형성균에 의한 변패방지를 위하여 이용되며, 어류의 신선도 유지 및 과일 야채류의 저장을 위하여 tetracycline류의 항생물질이 사용되어 왔다. 이와같은 항생물질도 역시 식품류에 사용되었을 경우 인체에 이행되어 여러가지 부차적인 영향을 줄 수 있어 사용에 제한이 많다. 따라서 식품보존에 사용될 물질로서 가능한 독성이 적고 사용한계가 넓으며 인체에 이행되었더라도 쉽게 분해되어 인체에 영향을 주지않는 물질의 개발이 필요하다. 이와같은 물질로서는 알려져있는 것이 polypeptide류의 nisin과 같은 물질이 있는데 이는 인체에서 흡수되지 않고 분해되는 것으로 알려져 있다.

따라서 학계와 산업계는 광범위한 미생물에 대한 저해능력을 가지면서 고등생물에 대한 선택독성이 낮으며 그 생산원가가 저렴한 물질을 계속 탐색하여 그간 지속적인 연구가 되어 온 바 그중 한 분야가 박테리오신과 같은, 미생물이 생산하는 항균성 단백질의 탐색이다. 이들 박테리오신은 식품 품질보존의 목적을 갖는 식품첨가제로서 뿐만 아니라 가축의 생육촉진이나 질병예방에도 사용가능하여 설사 이들이 우유, 고기 또는 계란등을 통해 직접 혹은 간접적으로 인체에 흡수될 지라도 인체내의 효소에 의해 쉽게 분해될 수 있는 바 그 대표적 물질이 우유 기원의 젖산균류가 생산하는 nisin이다. 이 물질은 현재 영국에서 상품화 되어 FOB 가격으로 Kg 당 약 58만원에 판매되고 있으며 1988년 4월 미국에서도 GRAS(Generally Regarded As Safe)물질로 인정받아 앞으로 시장이 갈수록 넓어질 것으로 예측된다.

현재 국내에서는 박테리오신에 관한 연구가 초기 단계에 머물러 있으나 특히 식품에의 응용등 그 산업적 효용의 방대함을 감안할 때 그 개발의 potentiality는 지대하다고 판단된다. 이미 일부 연구자들은 자연계에서 박테리오신 생산 미생물을 분리하고 이 물질의 생산을 위한 실험실적 연구를 1988년 부터 실시한 바 있다. 이러한 박테리오신의 탐색 및 응용기술의 개발이 성공한다면 국내 식품보존기술 및 발효 제어기술 역사에 하나의 전환점이 될 것이며, 수출의 길을 터 외화 가득은 물론 국내 중소 발효업체의 육성에 크게 도움이 될 것이다. 그러나 발효 산물의 산업화를 위하여는 중간 단계로 scale-up 연구가 필요한데 이는 산업계와의 연관으로 해결하는 것이 절실하다. 이와같은 박테리오신의 개발은 비교적

산업화가 용이하다고 사료되며, 일부의 합성보존제를 대체함으로써 식품 보존기술의 새로운 장을 열 수 있을 뿐만 아니라 해당 산업체로서도 개발 및 생산에 직접 참여, 자체 기술을 습득할 수 있는 가치있는 기술과제라 판단된다.

제 2 장 기술개발 동향 및 전망

제 1 절 외국의 기술개발 동향

식품보존에 이용하고자 하는 항균 물질은 대부분이 의약용으로 개발된 항생제들이며 식품보존용으로 이용되는 것은 그 용도가 변경되어 이용되어 온 것이 현실인 바, 식품용으로 개발되기 위해서는 인체에 대하여 급성 또는 만성 독성이 적어야 되고 쉽게 인체 내에서 분해가 되어야하기 때문에 개발에 난점이 있다. 이와같은 물질에 대한 관심은 1947년 Mattick과 Hirsch가 nisin이라는 소위 bacteriocin 물질을 보고하면서 시작되었는데 이는 구미 각국에서 실제 이용되어 왔으나 GRAS 물질로 판명된 것이 1988년 4월로 탄생 약 40년만에 식품에의 응용이 자유로운 상품으로 등장하게 되었다.

이와 같은 물질들을 통칭하여 bacteriocin이라 하는데 세균에 의해 생산되는 항균성물질이지만 penicillin이나 streptomycin 등과 같은 항생물질과는 다른 특성을 갖는다. bacteriocin은 active component가 단백질이고 antimicrobial spectrum이 좁은 것이 특징이며 이것을 생산하는 균주와 밀접하게 관련된 세균만을 주로 저해한다(Geis 등 1983, Ivanovics 1962, Saito 등 1979, Tagg 등 1976). 일례로 *Escherichia coli*가 생산하는 colicin은 *Shigella sp.*와 같은 장내세균과 밀접한 관계가 있으므로 대다수의 장내세균에 대하여 주된 저해력을 갖고 있다. 이와 같은 bacteriocin에 대한 최초의 보고는 Gratia(1925)에 의해 이루어져 그후 많은 종류가 연구의 대상으로 보고되었는데 lactic *Streptococci*가 생산하는 bacteriocin에 대하여는 Rogers(1928), Whitehead와 Riddet (1933)이 처음 발견하여 보고하였다.

이들 lactic bacteriocin은 유제품 가공용 starter culture상의 문제점을 확인하는 과정에서 밝혀진 것들이다(Kozak et. al., 1978, Davey et al. 1981, Meanwell, 1943, Oxford, 1944). 이들 bacteriocin은 균체표면에 있는 항원특이성에 따라 구분할 수 있으며 각종 미생물에 의하여 생산되는 것으로 알려져 있다. 이들 중 Gram음성균에 의해 생성되는 물질은 비교적 좁은 항균 spectrum을 갖으며 쉽게 정제할 수 있는 단순 단백질이지만 Gram양성균이 생산하는 여러 bacteriocin들은 밀접한 관계가 없는 다른 미생물에 대해서도 작용하며 정제하기가 어려운

lipid나 carbohydrate와 회합된 단백질로 구성되어 있는 경우도 있다.

bacteriocin의 작용기작은 균체표면에 있는 특이적인 receptor에 흡착한 후 세포막을 침투하여 균체에 생화학적인 손상을 주어 사멸하게 한다(Senior 와 Holland 1971). 이렇게 특이적인 receptor에 흡착하여 막을 침투한 bacteriocin은 세포내 손상을 주는 것과 막에 손상을 주는 것으로 크게 나눌 수 있다. 세포내 손상을 주는 bacteriocin은 막결합 효소들의 활성화에 의해, 또는 직접 세포막을 침투하여 DNase나 RNase의 작용을 하여 DNA나 ribosome에 영향을 주게 된다(Schaller와 Nomura 1976). 막에 손상을 주는 bacteriocin에 관한 연구는 Plate 등(1974)의 연구를 계기로 큰 진전을 보였는데 총래 보고된 1)고분자합성의 저해 2) K⁺나 아미노산등의 능동적수송의 저해 3) ATP level의 저하등이 사실은 bacteriocin에 의한 세포막의 순일성(homogeneity) 또는 막전위차(transmembrane potential)의 파괴에 따른 제2차적 손상임이 규명되었다.

이와같은 mechanism을 가진 bacteriocin을 적절히 이용하게 되면 식품산업에도 획기적인 전기를 마련할 수 있을 것이며 이를 위하여는 인체독성의 가능성이 우선적으로 제거되어야 하는 바, 따라서 인류가 장기간 음용해 온 lactic bacterium을 대상으로 관심을 두는것이 바람직하다. 예를들어 젓산균이 생산하는 물질이 유제품에 유해한 병원균이나 미생물의 생육을 저지할 수 있다면 유익한 것이 될 것이다. 젓산균류가 생산하는 항균성 물질로는 Rogers(1928)가 *Lactobacillus bulgaricus*의 생육이 *Streptococcus lactis*에 의해 저해받음을 처음 보고하였으며 그후 분리한 물질이 100 °C에서 30분간 가열하여도 완전히 파괴되지 않음을 발견하였으며 (Whitehead and Riddet, 1933), Whitehead(1933)는 이 물질을 생산하는 균주가 *Streptococcus cremoris*임을 확인하였다. 또한 Meanwell(1943)은 *Streptococcus*가 생산하는 물질에 의해 cheese 제조시 산생성이 저해됨을 보고 하였으며 Oxford(1944)는 배양액에서 추출한 생육저해물질을 diplococcin이라 명명하였는데, 이 물질은 수용성 단백질로서 산성 배지하에서 열에 안정하였다고 보고하였다. Hirsch(1946)는 *Streptococcus lactis* 와 *S. cremoris*가 생성하는 diplococcin은 group N에 속하지 않는 균에 대해 효과가 없는 반면 *Streptococcus lactis*가 생산하는 diplococcin은 대부분의 *Streptococci*나 다른 Gram양성 구균 및 간균의 성장을 억제하므로 이들은 서로 다른 물질이라고 보고하였다.

nisin이란 명칭은 Mattick과 Hirsch(1947)에 의해 명명되었는데, Gross등(1977)이 보고한

분자구조를 보면 lanthionine과 beta methyllanthionine과 같은 희귀 아미노산을 포함하여 전체 분자량이 7000정도(Cheeseman과 Berridge 1959)이며 보통 dimer로서 존재한다(Jarvis et al. 1968). 이 nisin은 Hirsch(1951)에 의해 처음으로 식품보존제로서 사용되었다. 이들은 nisin 생성균을 사용하여 starter 를 제조한 결과 *Clostridium butyricum*과 *Cl.tyrobutyricum*에 의한 blowing현상을 방지할 수 있었다고 보고하였다.

이 nisin이 상품화된 후 산업적으로 가장 먼저 응용한 것은 process cheese이다. process cheese의 공정 중 고온에서도 생존하는 *Clostridium sp.*에 의해 가스생성, 이취 발생 및 cheese의 액화가 초래되는데 이는 제조시 향미성분으로 첨가되는 양파등 향신료등으로부터 유해균의 포자가 혼입되어 생육함으로써 초래되는 결과이다. nisin은 호열성 포자 생성균에 대해 강력한 증식 억제작용을 가지고 있으므로 혐기성 포자 형성균들, 즉 *Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. sporogenes*등에 유효하다. 따라서 nisin을 가공치즈에 사용하면 살균에 의한 외관, 풍미 또는 제품의 조직을 손상시키지 않고 품질을 유지하면서 냉장 이외의 환경에서도 신선도를 유지할 수 있게 된다.

영국에서는 아직 시유에 nisin을 첨가하는 것이 허가되어 있지 않다. 그러나 살균우유나 냉장이 아닌 상태에서 장거리 수송을 해야 할 경우 nisin 첨가를 허가하고 있는 나라도 있다. Heinemann등(1965)은 chocolate milk제조시 nisin을 첨가할 경우 저장기간을 연장할 수 있다고 보고하였으며 Goel등(1969)은 low-fat spread제품의 저장기간을 연장시킨다고 보고하였다. 또한 Mahmoud등(1976)은 살균우유에 대한 nisin의 효과에 관한 연구에서 1000 IU/ml 의농도를 사용하였을 경우 32 C에서 25일이상 저장이 가능하였고 100 IU/ml사용시에도 16일 이상 보존이 가능하다고 보고하였다. El-sadek등(1976)은 상업적 멸균우유제조시 nisin을 사용하면 열처리량을 감소시킬 수 있다고 가능하다고 보고하였다. nisin은 자체 독성이 없고 장내세균이나 소화효소에 의해 분해되며 생리적 pH에서는 불용성인 점 등의 안전성으로 인해 식품에 안전하게 사용할 수 있기 때문에 통조림식품에도 유용하다. Gupta등(1972)은 nisin이 내열성 포자형성균인 *Bacillus stearothermophilus*, *B. cereus*, *B. megaterium*의 포자발아촉진현상을 감소시킨다고 보고하였으며 Gillespy(1957)는 tomato sauce와 완두콩혼합 통조림제조시 *Cl. thermosaccharolyticum*을 접종한 inoculated pack test에서 nisin을 200 iu/ml의 농도로 첨가하였을 경우 부패현상을 발견할 수 없었다. 저산성식품의 경우 *Cl. botulinum*때문에

열처리를 해야하지만 nisin을 첨가하면 살균할 필요없이 영양가, 외관 및 조직감이 유지된다. 또한 고구마, 콩, 버섯등의 soup과 곡물 pudding같은 식품에도 적합하다. 육제품의 경우 아질산염에 의한 독성이 논의됨에 따라 여러 각도에서 새로운 첨가물에 관하여 검토되고 있으며 그 중에 nisin도 포함되어 있다.

alcohol음료에 있어서도 nisin은 유용하게 쓰여진다(Tubb와 Ogden, 1986). 오염을 일으키기 쉬운 *Lactobacillus sp.*나 *Pediococci sp.*는 100 IU/ml농도의 nisin 사용으로 살균되며 증류주에서도 젖산균에 대한 효과가 있는 것으로 나타났다. 이상과 같이 젖산균류가 생산하는 bacteriocin중 식품에의 응용에 대하여 연구가되고 있는것은 nisin이 대표적인 예이다. Jarvis와 Morisetti(1969)는 통조림제조시 nisin의 사용은 보다 광범위한 연구가 필요하다는 이유로 미국의 경우 1966년 사용이 금지되고 있다고 보고하였으나 현재 nisin이 식품보존제로서 허용을 하고 있는 나라는 37개국에 이르고 있다(Aplin & Barret Co.1986).

이와 같이 bacteriocin 대한 연구는 1925년 Gratia가 *E.coli* 유래의 colicin을 보고하면서 시작되어 1947년 Mattick과 Hirsch에 의하여 젖산균이생산하는 nisin을 발견함으로써 박차를 가해 졌다고 볼 수 있으며 1950년에는 산업적 생산에 들어갔다. 그후 이의 사용에 대하여는 사용여부 및 사용량에 대하여 논란이 많았으나 일본 및 구미에서 독성시험을 실시한 결과 안전하다고 판단되어 1969년 FAO/WHO에서 ADI를 33000 IU/Kg으로 인준되었고 실제 GRAS 기준으로 인정받은 것은 1988년 4월, 약 40여년만에 새로운 식품환경의 천연적 보존제(biopreservative) 혹은 생물학적 제어제(bioregulator)로 각광을 받는 시대가 되었다. 이들의 생산은 주로 포도당-렘코 배지로 생산하거나 우유 가수 분해물을 첨가하여 생산하며, 분리는 주로 용매 분획법에 의하여 이루어지나 이들에 대한 신규 항균물질에의 적용성 및 산업적 공정에 대한 검토는 매우 필요하다고 사료되는 바, 장치의 고안 뿐만 아니라 값싼 원료에 의한 생산비의 저렴화에 대한 검토가 필요하다고 판단된다.

제 2 절 국내 기술 개발 동향

새로운 항균성 단백질 박테리오신에 관한 연구는 새로운 식품 보존제의 발굴 및 안전하고 효율적인 식품 보존 방법의 개발 이라는 측면에서 중요함에도 불구하고 우리나라에서는 이와같은 bacteriocin의 응용적인 연구는 물론 식품산업에의 이용도 거의 고려되지 않고 있는 실정이다. 국내의 연구 현황을 살펴보면 단순한 미생물간의 길항작용의 확인 차원에서 일부 젖산균의 항생성에 대한 박연희와 조도현(1986), 박연희 등(1983)연구가 있으며 상품화된 nisin에 대한 연구로 이신호(1983), 유진영(1989)의 생산공학적 연구가 있다. 한편 정 영건 등(1989)는 *Lactobacillus acidophilus*를 저해하는 bacteriocin의 성상에 대하여 연구하고 이들이 모두 열처리에 민감하다고 보고하였다. 김 교창등(1990)은 토양에서 분리한 *Erwinia* 균의 식물 병원균 방제제 개발에 응용하기 위한 균주 육종연구 결과를 보고한바 있다. 김왕준 등(1991)은 *Lactobacillus plantarum* 27이 생성하는 Bacteriocin 및 유전적 성질을, 연구하고 *Pediococcus acidilactici*의 Bacteriocin생산이 plasmid와 관련이 있음을 보고하였다. 유진영 등(1991)은 원유에서 *Lactococcus* 속의 젖산균을 분리하여 동정(1991)후 Bacteriocin의 특성(1991)을 조사한 후 배양방법에 대하여 연구하였다(1992a, b). 이장혁과 장효일(1992, 1994)은 고온성 젖산균인 *Streptococcus thermophilus*를 분리 동정하고 Bacteriocin의 특성을 조사하였다.윤성식 등(1994)는 김치에서 분리한 *Leuconostoc sp.*가 생성하는 Leuconocin을 정제하여 특성을 구명하였다. 오세종 등(1994)은 RSM방법으로 Bacteriocin 생산 조건을 최적화하였으며 김상교 등(1994)은 *Lactococcus sp.*을 분리하고 항균특성 및 *Lactobacillus fermentum*에 대한 작용양상(1994)을 조사하였다. 하덕모 등(1994)은 김치로부터 여러 가지 젖산균을 분리 동정하고 Bacteriocin을 정제하였으며 하덕모와 차동수(1994)는 *Enterobacter faecium* 및 *Leuconostoc mesenteroides*(1996)을 이용한 김치 제조를 시 발효 현상을 조사하고 그 효과가 있음을 확인하였다. 조재선 등(1994)도 김치에서 *Lactobacillus brevis*를 분리하고 이의 특성을 조사하였다. 조용배 등(1996)은 김치에서 분리한 *Lactobacillus sp.*의 Bacteriocin을 생산하는 조건을 조사하였고 정희순과 안철(1996)은 김치에서 그람양성 및 음성균에 항균효과를 주는 젖산균을 분리하고 이의 생산 조건을 보고한바 있다. 이현주 등(1996a, b)은 김치에서 *Streptococcus sp.* 및 *Lactococcus* 분리하고 이 젖산균이 생성하는 Bacteriocin을 정제하여 특성을 보고하였으며 최학중 *sp.*를 등(1996)은 김치에서 *Leuconostoc sp.*이 생성하는 Leuconocin을 cloning하였다. 조용임 등(1996)도 김치에서 분리한 *Lactococcus sp.*를 이용하

여 Bacteriocin을 생산하고자 하였으며 정희순 등(1996a, b)은 메주의 다양한 젖산균의 Bacteriocin을 조사하였다. 고석현 등(1996)은 김치에서 분리한 *Lactococcus lactis*에 대하여 보고한 바 있다. 배성숙과 안철(1997)은 김치에서 분리한 젖산균의 Bacteriocin 생산 및 항생성을, 신중연과 안철(1997)은 *Lactococcus lactis*가 생성하는 Bacteriocin의 특성을 보고하였다. 1998년도에는 Bacteriocin에 대한 연구가 급증하였다. 즉 최찬익 등(1998)은 Lactococcin의 생산을 비롯하여 길항 미생물에 의한 aflatoxin제어(강길진 등, 1998), 김치유래 *Leuconostoc* sp.(박봉근 등, 1998), Lactococcin의 정제 특성(고석현 등, 1998), *Bacillus polyfermenticus*(이광호 등, 1998), 병원성 세균의 생육 저해(김혜정 등, 1998), *Lactococcus* sp.(허지운 등, 1998, 최학중 등, 1998), 고정화(김기영과 유진영, 1998), Bacteriocin 생성균주의 분리(박은희 등, 1998), 발효 젓갈류로부터 균주 분리(이나경 등, 1998, 김충희 등, 1998), *Enterobacter faecium*(조영임 등, 1998, 정건섭 등, 1998), *Lactobacillus curvatus*(박건영 등, 1998), Leuconosin의 아미노산서열 결정(김영신 등, 1998)이 있으며 Nisin을 이용한 김치의 시어짐 제어 및 *Listeria monocytogenes*를 제어하는 젖산균에 대한 연구(강동현과 Fung, 1998)이 진행되어 모름지기 Bacteriocin에 관한 연구의 열기가 늘어나고 있다.

현재 한국에서 박테리오신 생산균주로서 연구되고 있는 균종은 김치 젖산균, 메주 젖산균, *Enterococcus* sp, *Lactococcus* sp., *Leuconostoc*, *Lactobacillus* sp. *Carnobacterium* sp., *Pediococcus* sp, *Bacillus* sp. 등이다.

제 3 장 연구 개발 목표, 내용 및 범위

제 1 절 연구개발 목표

1. 미생물 향균 보존제 대량 발효 공정 개발
2. 새로운 신 기능 향균 보존제 생산 균주의 발굴
3. 초능력 대량 생산 균주(Super Bug) 및 대량 분리 공정 개발
4. 천연 식물체의 무독성 향균 물질의 신 기능 보존제로의 전환 방법 개발

제 2 절 연구 개발 내용 및 범위

1. *Lactococcus* sp.의 발효공정

- 가. 개발 미생물의 다양한 동정 수행
- 나. 국산 재료를 이용한 발효소재 개발
- 다. 보존제 생산을 위한 영양.환경조건 검토
- 라. 발효 공정의 순차적 스케일 업(Scale-up)
- 마. 고농도 배양 및 세포 고정화 기법 검토
- 바. 효율적 발효 시스템 개발 및 제재화 연구
- 사. 개발 보존제의 응용성 및 독성 시험

2. 새로운 식품보존물질 탐색 (별 첨)

- 가. 전통식품자원으로부터의 박테리오신 생산균주의 분리 및 동정
 - 1) 전통식품자원의 선정 및 최적 선별 배지의 탐색
 - 2) 박테리오신 생산균주의 분리
 - 3) 분리 박테리오신 생산균주의 동정
- 나. 생산 박테리오신 및 균주의 산업적 유용특성의 규명
 - 1) 분리 박테리오신의 산업적 유용성 분석
 - 2) 유용 박테리오신의 정제
- 다. 박테리오신을 이용한 식품보존제 및 발효조절제의 개발
 - 1) 유용 박테리오신의 유전특성 규명
 - 2) 유용 박테리오신 생산균주 개량
 - 3) 시제품 개발

3. 보존물질 대량생산 균주 개발 및 분리공정 (별첨)

- 가) 향균물질 순수분리를 위한 배양 조건 확정
- 나) 향균물질 순수분리 및 물리생화학적 특성 구명
- 다) 향균물질의 향균특성 및 아미노산 조성 구명
- 라) 향균물질의 분리공정 개발
- 마) 향균물질 유전자 분리 및 Genomic library 제조
- 바) Colony hybridization 및 균주의 분자계통학적 동정
- 사) Shuttle vector의 제조 및 유전자 클로닝

4. 식물체 유래 식품 보존제 개발(별첨)

- 가) 원료의 선정, 추출 분획 및 항균력 검색
- 나) 향균 물질의 분리, 정제 및 구조 결정
- 다) 향균 물질의 상승작용 및 항균력 비교

제 4 장 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의 (*Lactococcus* sp.를 이용한 식품 보존제 생산)

식품은 가공 및 저장시 외부의 물리, 화학, 생물 및 효소학적 영향을 받아 변패 현상을 유발하여 식품으로서 가치를 상실하게 된다. 이와 같은 변패를 방지하기 위하여 가열처리, 산도 조절, 항균물질과 같은 보존제를 이용하여 대책으로 이용하고 있다. 그러나 이들은 자체의 독성 문제로 사용의 한계가 있고 또한 소비자들의 이들에 대한 사용의 기피 현상에 대면하고 있다. 이와같은 문제점의 해결 방법으로 비교적 독성이 적거나 없는 물질의 발굴이 현실적으로 시급한 실정이다. 미생물이 생산하는 물질중 항생물질과 구분되는 부류의 항균성 물질로서 Bacteriocin 이 있는데 이들 중에는 식품의 가공에 이용할 경우 섭취된 후에 쉽게 분해되는 물질이 있다. 대표적인 것으로 펩타이드 성 물질이 언급될 수 있는데 이는 비교적 항균 Spectrum 이 좁다고는 하지만 식품가공에서 문제를 야기하는 젖산균류, 및 포자형성 균들을 사멸 또는생육을 저지시킬 수 있는 것이 있다. 대표적인 것은 *Lactococcus lactis*가 생산하는 Nisin 으로 일부 유럽에서는 유제품 등에 이용하고 있다. 이와 같은 물질은 현재 국내에서는 이용되고 있지 않으며 고려되고 있지도 않다. 따라서 이와 같은 물질의 생산방법의 도입 또는 개선 뿐 만 아니라 이와 같은 부류의 물질을 발굴하고자하는 연구는 현 시점으로 보아 절실한 형편이다. 또한 이와 같은 물질의 개발은 결국 국내 식품 산업에서의 보존방법을 혁신시킬 수 있는 전기를 마련할 수 있을 것이다. 본 연구의 주목적은 원유에서 분리한 항균성 젖산균의 발효소재 및 공정을 개발하고 제재화 및 응용을 해보고자 하였다.

제 1 절 연구 개발 결과

1. *Lactococcus* sp.를 이용한 보존제 생산공정

가. 효율적인 항균력 Assay Method 선정

1) 지시균의 재선정

본 *Lactococcus* sp. BL-1의 분리시 피검균으로는 *Lactococcus plantarum* ATCC 8014(KFRI 348)을 사용하였으나 그 민감도가 크지않아 정량에 어려움이 있어 *L. fermenti* ATCC 9338, *Micrococcus luteus* KFRI 645(NRRL B-1018)를 비교한 결과 *M. luteus*의 사용이 우수함을 알았다.

2) Plate Assay를 위한 Plate 제조 및 시험 방법의 비교

Plate Assay를 위하여는 피검균의 Lawn을 어떻게 조제하느냐에 따라 효율성이 다르므로, 단층 agar lawn bed, Soft top agar assay를 비교하였으며 전자의 경우 1%의 overnight culture를 함유한 20 ml MRS agar plate에 Agar well을 만든후 0.75% Soft agar로 하단을

sealing한 다음 50 ul의 시험용액을 넣는 것이 바람직하였다. Paper Disc 방법은 상기와 같이 제조한 plate에 50 ul의 시험 용액을 넣어 배양하는 방법이 시도되었으나 Paper disc 가 흡수하는 량이 많고 disc에 가리워진 halo가 있을 수 있어 바람직하지 않았다. 또 다른 방법으로는 20 ml의 MRS agar plate에 100 ul의 overnight culture를 함유한 soft agar 5 ml을 증충하는 방법을 채택하였다. 증충된 soft agar위에 시험 용액을 10 ul spot하여 항균력 유무를 확인하는 방법으로서 육안으로 항균력을 확인할 가장 바람직한 것이었다. 이때 희석액 (Critical dilution)을 제조하여 항균력을 가지는 최종 희석 배수의 역수를 Arbitrary unit으로 표기할 수 있다. 이 방법이 가장 수월한 방법으로 판단되었다.

3) Microplate를 이용한 방법

제조된 항균물질을 제균 여과하고 이를 무균적으로 희석한다. 별도로 배양한 *M. luteus* 를 MRS broth로 600 nm에서 흡광도가 0.1부근이 되도록 희석하여 96 well plate에 100 μ l 넣고 희석된 시험용액을 10 μ l 넣어 6시간 배양후 대조구의 흡광도의 1/2을 나타내는 희석배수를 찾아 역가로 나타낸다. 이 방법은 매우 민감도가 높아 시험한 방법중 가장 우수한 것으로 판명하였다. 그러나 다량의 시료를 처리하기에는 다소 불편한 점이 나타났다.

나. 저가 소재 개발 및 발효 영양성분 균형 확립

1) 발효 소재 개발

젖산균의 발효에는 주로 탈지 우유가 사용된다. 그러나 우리나라의 실정에는 그리 풍부한 소재는 아니므로 국산 대두를 병행하여 사용하고자 하였다. 우선 단백질의 분해를 촉진하여 균체의 증식을 돕도록 효소 가수 분해를 하여야된다. 이 때 이용되는 효소는 곰팡이나 세균 유래의 Protease를 사용하며 대상으로 Novo사의 Alcalase, Neutrase, Amano사의 Protease F, M, A, N, S,이다. 이들 효소중 우선 중성부근의 반응 최적을 가지는 Neutrase, Protease A, N, S 효소를 이용하여 온도별 분해 시험을 한 결과(효소 농도는 0.6%), Neutrase는 45도, Protease A는 50도, Protease N은 60도, Protease S는 70도가 적당한 반응 온도로 예비시험에서 판단되었으며 반응시간을 18시간 유지한후 포도당 20 g/L, Yeast extract 5 g/L, Meat extract 5 g/L첨가후 배양할 때 탈지유 및 대두유에서 세포수 10^8 /ml이상이고 항균 역가가 높게 나타났다. 따라서 이를 토대로 탈지 우유와 대두에 대하여 세부적으로 효소의 농도 및 혼합, 반응시간에 대한 시험이 실시되었다.

가) 탈지 분유를 이용한 발효 시험

탈지우유 10%를 증류수에 녹여(pH 5.5) 반응온도 55도, 반응시간 2시간으로 protease N 으로 가수분해하여 serum bottle에 30 ml 씩 넣고 pH 조절하지 않고 100 stroke/min.으로 발효하여 역가를 확인한 결과 효소 농도는 0.4- 0.6 %가 우수하였다. 이 때 MRS broth에서 보다는 우수하지 않았으며 역가는 12시간후 256 AU/ml, 균체량은 3.5×10^9 cfu/ml 이었다. Protease A의 경우는 0.6 %, Protease S의 경우는 0.8 %가 우수하였는데 탈지 분유에는

Protease N이 가격 및 역가 차원에서 바람직한 것으로 판단되었다.(Table 1-3)

Table 1. Effect of protease N concentration on the antimicrobial activity after 12 hours (Skimmilk 10%, 55°C, digested for 2 hours)

enzyme Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
0.2%	128	256	17.9	18.2	4.39	2.97×10^9
	128	128	17.2	18.0	4.39	2.98×10^9
0.4%	256	256	17.8	18.2	4.36	2.51×10^9
	256	256	16.7	17.9	4.38	3.31×10^9
0.6%	256	256	18.3	19.0	4.42	3.54×10^9
	256	256	17.0	18.2	4.37	3.12×10^9
0.8%	256	256	17.2	17.6	4.35	3.07×10^9
	128	256	16.7	16.9	4.37	2.09×10^9
1.0%	256	256	17.3	17.6	4.37	2.87×10^9
	256	256	17.0	17.0	4.40	3.13×10^9
MRS	128	128	17.8	18.0	4.49	1.79×10^9
	128	128	17.6	17.9	4.54	1.68×10^9

Table 2. Effect of protease A on the antimicrobial activity after 12 hours (Skimmilk 10%, 55°C, digested for 2 hours)

enzyme Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
0.2%	64	64	18.4	19.9	4.46	1.03×10^9
	64	64	18.2	18.6	4.39	1.11×10^9
0.4%	64	64	18.6	19.5	4.56	1.15×10^9
	64	64	17.5	17.7	4.44	1.25×10^9
0.6%	128	128	19.2	20.6	4.53	1.55×10^9
	64	128	17.7	19.6	4.43	1.33×10^9
0.8%	128	128	18.2	18.6	4.46	1.98×10^9
	128	128	17.1	17.4	4.44	2.13×10^9
1.0%	128	128	17.2	17.5	4.48	2.27×10^9
	128	128	17.5	17.8	4.46	2.83×10^9

Table 3. Effect of protease S concentration on the antimicrobial activity after 12 hours (Skimmilk 10%, 55°C, digested for 2 hours)

Enzyme Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
0.2%	128	128	17.2	17.9	4.31	1.21×10^9
	128	128	18.2	18.9	4.38	1.02×10^9
0.4%	128	128	18.2	18.7	4.37	1.87×10^9
	128	128	17.5	18.0	4.33	1.93×10^9
0.6%	64	128	18.0	18.4	4.49	1.80×10^9
	64	128	17.7	18.3	4.36	1.76×10^9
0.8%	256	256	17.0	17.3	4.38	2.60×10^9
	256	256	18.3	18.8	4.35	2.70×10^9
1.0%	128	128	16.5	16.9	4.33	2.22×10^9
	128	128	16.2	16.7	4.35	2.87×10^9

보존제 생성 발효 소재를 발효 배지의 고형량으로 맞추기 위하여 탈지우유 농도를 3 - 12.5 %까지 조절하여 0.6% 농도의 protease N을 처리하고 55도에서 2시간 반응후 12시간 Serum bottle에서 발효시 탈지우유의 농도는 10% 가 우수함을 알았다(Table 4)

Table 4. Effect of skimmilk concentration on the antimicrobial activity after 12 hours (Protease N: 0.6%, 55°C, 2 hours)

Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
3%	32	32	17.1	17.4	4.24	1.09×10^9
	32	32	17.5	18.9	4.22	1.15×10^9
5%	32	32	17.8	18.2	4.29	1.54×10^9
	32	32	18.3	19.2	4.31	1.18×10^9
7.5%	64	64	17.8	18.6	4.37	1.83×10^9
	64	64	17.5	18.4	4.36	1.93×10^9
10%	256	256	18.3	19.0	4.42	3.54×10^9
	256	256	17.0	18.2	4.37	3.12×10^9
12.5%	128	128	17.8	18.0	4.50	2.48×10^9
	128	128	18.2	18.8	4.45	2.51×10^9

효소반응에는 각기 효소의 최적 반응온도가 있으므로 반응 온도에 따른 가수분해의 차이를 효소별로 조사한 결과 Protease A는 65도, Protease N은 55도, Protease S는 60도가 적은이라 판단되었다(Table 5-7).

Table 5. Effect of digestion temperature of protease A on the antimicrobial activity after 12 hours(2 hours)

Temp.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
30°C	64	64	17.8	17.8	4.51	2.7×10^8
	128	128	16.9	18.4	4.46	3.4×10^8
35°C	64	64	17.8	19.3	4.40	3.9×10^8
	64	64	17.4	18.6	4.44	4.2×10^8
40°C	32	32	18.2	18.6	4.68	1.54×10^9
	32	32	18.1	18.3	4.78	1.09×10^9
45°C	32	128	17.6	18.0	4.52	1.05×10^9
	32	128	17.6	18.0	4.50	1.33×10^9
50°C	64	64	19.6	20.4	4.43	1.82×10^9
	64	64	18.7	19.3	4.43	1.73×10^9
55°C	128	128	19.2	20.6	4.53	1.55×10^9
	64	128	17.7	19.6	4.43	1.33×10^9
60°C	128	128	19.0	19.0	4.44	6.5×10^8
	128	128	19.2	19.3	4.44	5.0×10^8
65°C	256	256	16.8	17.7	4.49	8.6×10^8
	128	128	16.8	17.7	4.43	3.1×10^8

Table 6. Effect of digestion temperature of protease N on the antimicrobial activity(2 hours)

Temp.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
30°C	64	64	15.8	17.2	4.40	2.6×10^8
	128	128	18.4	19.1	4.39	3.8×10^8
35°C	64	64	17.8	19.3	4.40	3.9×10^8
	128	128	17.4	18.6	4.44	4.2×10^8
40°C	32	32	19.6	19.6	4.60	1.83×10^9
	32	64	19.5	19.7	4.57	2.10×10^9
45°C	128	128	19.1	19.3	4.41	1.58×10^9
	128	128	17.8	18.6	4.37	1.40×10^9
50°C	64	64	19.5	20.5	4.35	1.56×10^9
	64	64	19.6	20.2	4.36	1.53×10^9
55°C	256	256	18.3	19.0	4.42	3.54×10^9
	256	256	17.0	18.2	4.37	3.12×10^9
60°C	128	128	19.8	19.9	4.37	1.37×10^9
	128	128	19.5	19.9	4.37	1.74×10^9
65°C	64	64	17.3	17.6	4.40	1.5×10^8
	128	128	17.5	18.5	4.39	2.8×10^{88}

Table 7. Effect of temperature of protease S on the antimicrobial activity after 12 hours

Temp.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
30°C	64	64	16.1	16.2	4.36	3.0×10^8
	64	128	16.7	16.8	4.36	2.4×10^8
35°C	128	128	18.9	18.8	4.30	4.2×10^8
	128	128	19.0	19.1	4.33	8.1×10^8
40°C	64	64	19.4	19.5	4.51	1.93×10^9
	64	64	19.6	19.6	4.54	2.27×10^9
45°C	256	256	19.3	19.4	4.34	1.54×10^9
	256	256	18.8	19.0	4.34	1.65×10^9
50°C	64	64	18.6	19.8	4.34	1.83×10^9
	64	64	19.6	20.3	4.32	1.63×10^9
55°C	64	128	18.0	18.4	4.49	1.80×10^9
	64	128	17.7	18.3	4.36	1.76×10^9
60°C	256	256	19.4	19.4	4.34	1.57×10^9
	256	256	19.5	20.8	4.35	1.19×10^9
65°C	64	64	16.4	17.5	4.36	3.9×10^8
	128	128	17.4	18.0	4.35	4.6×10^8

단백질 가수 분해물은 반응 시간에 따라 달라진다. 따라서 반응시간에 따른 효소별 반응 후 12시간 발효시 영향을 보면 Protease A는 1-1.5시간, Protease N은 1-1.5시간, Protease S는 1-1.5 시간으로 대략 1시간 정도의 효소가수 분해가 적당하였다(Table 8-10).

Table 8. Effect of reaction time of protease A on the antimicrobial activity after 12 hours(60°C)

Time	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total	
30 minutes	64	64	18.8	19.0	1.12×10^9
	64	64	19.0	19.3	1.08×10^9
1 Hour	128	128	17.8	19.0	1.03×10^9
	128	128	17.1	17.8	1.09×10^9
1.5 Hour	128	128	19.3	20.0	1.58×10^9
	128	128	19.7	20.4	1.68×10^9
2 Hours	128	128	19.0	19.0	1.02×10^8
	128	128	19.2	19.3	1.11×10^8

Table 9. Effect of reaction time of propease N on the antimicrobial activity after 12 hours(60°C)

Time	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
30minutes	32	32	19.8	20.9	4.40	5.6×10^8
	32	32	18.2	19.1	4.37	4.8×10^8
1 Hour	256	256	20.2	20.5	4.53	1.72×10^9
	256	256	19.8	20.9	4.47	1.62×10^9
1.5 Hour	128	128	18.5	19.4	4.42	1.17×10^9
	128	128	19.7	21.3	4.42	1.31×10^9
2 Hours	128	128	19.8	19.9	4.37	1.37×10^9
	128	128	19.5	19.9	4.37	1.74×10^9

Table 10. Effect of reaction time of protease S on the antimicrobial activity after 12 hours(60°C)

Time	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
30min.	64	64	18.8	19.0	4.36	1.23×10^9
	64	64	19.0	19.3	4.37	1.08×10^9
1 hour	256	256	18.2	20.0	4.40	1.43×10^9
	256	256	18.9	19.3	4.41	1.38×10^9
1.5 hour	256	256	18.6	19.0	4.37	1.12×10^9
	256	256	18.9	20.1	4.42	1.01×10^9
2 hours	256	256	19.4	19.4	4.34	1.27×10^9
	256	256	19.5	20.8	4.35	1.39×10^9

효소들은 각기 특이성이 다르므로 이들의 혼합물을 사용하여 발효 소재를 조제하여 보았다. 각종 효소의 농도별 조합에 따른 효과를 보았는데 큰 의미가 없었으며 단일 효소를 사용하여도 무방할 것으로 판단되었다(표-11).

Table 11. Effect of combination of proteases on the antimicrobial activity after 12 hours(55°C, 1hr.)

Enzyme Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
A 0.2%	256	256	16.4	18.8	4.37	1.55×10^9
N 0.2%	256	256	16.4	18.7	4.37	1.13×10^9
S 0.2%			15.9	16.5	4.47	1.84×10^9
A 0.2%	256	256	15.9	16.7	4.43	1.99×10^9
N 0.4%	256	256	15.6	17.3	4.41	1.42×10^9
S -			15.9	17.3	4.43	1.38×10^9
A 0.4%	128	128	17.5	18.5	4.41	9.1×10^8
N 0.2%	128	128	17.9	18.1	4.41	8.9×10^8
S -			18.1	18.3	4.39	1.83×10^9
A 0.3%	256	256	18.6	19.9	4.42	1.69×10^9
N -	128	128	16.4	16.8	4.35	1.31×10^9
S 0.3%			17.4	17.7	4.34	1.27×10^9
A -	128	128	17.4	17.7	4.34	1.27×10^9
N 0.3%	128	128	17.4	17.7	4.34	1.27×10^9
S 0.3%			17.4	17.7	4.34	1.27×10^9

이상의 결과를 볼 때 탈지분유를 원료로 사용하면 Protease N을 0.6%사용하여 55 °C에서 1.5 - 2시간 가수분해하는 것이 바람직하다고 판단된다.

나) 대두를 이용한 발효시험

국내 생산 되는 대두를 단백질원으로 이용하여 보았다. 반응액의 가수량에 따른 단백질 농도 및 반응정도가 달라진다. 날콩을 가수량별로 같아서 0.6 %의 Protease N을 사용하여 효소처리후 배양하였을 때 역가는 매우 낮았는데 이는 효소의 종류 또는 단백질의 변성특성에 기인할 것이라고 판단된다(Table 12).

Table 12. Effect of soybean concentration on the antimicrobial activity after 12 hours(Protease N 0.6%, 55°C, 2시간, Enzyme digested after grinding)

soybean conc	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
1:5	4	4	9.6	9.7	4.80	6.0×10^0
	4	4	9.5	9.9	4.78	8.0×10^0
1:7	16	64	16.8	17.0	4.45	8.3×10^8
	16	32	16.2	16.9	4.49	7.6×10^8
1:9	16	32	16.3	16.6	4.44	1.27×10^9
	16	64	16.4	16.5	4.42	1.30×10^9
1:11	16	64	15.6	15.7	4.33	1.36×10^9
	32	64	14.5	15.0	4.33	1.45×10^9

가수량 1:5의 조건으로 효소의 종류별 반응 특성을 조사하였다. 그러나 효소 종류별로 시험한 결과 큰효과를 보지 못하였다(Table 13)

Table 13. Effect of type of proteases on the antimicrobial activities after 12 hours(Soybean: water= 1:5, Enzyme 0.6%, 55°C, 2 hours, Enzyme digested after grinding)

Type	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
protease A	8	8	9.9	10.0	4.83	3.1×10^1
	8	8	10.0	10.2	4.81	5.7×10^1
protease N	4	4	9.6	9.7	4.80	6.0×10^0
	4	4	9.5	9.9	4.78	8.0×10^0
protease S	8	8	9.6	9.8	4.96	4.5×10^1
	8	8	9.4	9.9	4.94	3.9×10^1

대두의 원료 처리 방법에 따라서 반응액의 특성이 변화될 것으로 판단된다. 따라서 soybean 농도 1:5, 효소농도 0.6%, 55°C, 2시간, grinding 후 효소처리 조건으로 대두의 이물질을 제거하기 위하여 원심분리후 배양한 결과 큰효과는 없었다(Table 14).

Table 14. Effect of centrifugation of digested soybean solution on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean: water= 1:5, Protease N 0.6%, 55°C, 2 hours, spun after grinding)

Enzyme	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
protease N	8	8	9.4	9.8	4.95	5.4×10^7
	8	8	9.4	10.1	4.93	4.8×10^7

Protease S를 사용한 것으로 원심 분리후 효소 처리할 때 약간 역가가 향상 되었다. 그러나 효소처리시간이 길더라도 효력이 없었다(Table 15).

Table 15. Effect of reaction time of protease S on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean: water= 1:5, Protease S 0.6%, 55°C, Enzyme digested after grinding and filtration)

Time	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
30minutes	64	64	15.5	15.8	4.67	1.68×10^9
	64	64	16.1	16.4	4.66	1.51×10^9
1 hour	64	64	16.4	16.9	4.72	1.50×10^9
	64	64	16.2	16.5	4.68	1.53×10^9
1.5 hour	64	64	15.9	16.3	4.67	1.63×10^9
	64	64	13.6	13.8	4.65	1.49×10^9
2 hours	64	64	14.9	15.2	4.68	1.64×10^9
	64	64	15.0	15.2	4.71	1.63×10^9
2.5 hours	64	64	15.1	15.2	4.70	1.56×10^9
	64	64	15.3	15.6	4.67	1.48×10^9

대두에 1:9로 가수후 Protease S를 농도 0.6%로 처리시 55°C반응한 것으로, 열처리 후 grinding하여 효소처리 후 원심분리하여 배양한 결과 2 시간 처리시 효력이 있으며 열처리효과가 있음을 나타낸다(Table 16).

Table 16. Effect of reaction time of protease S on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean:water=1:9, Protease S 0.6%, 55°C, 2 hours, Soybean was heated, ground, digested and spun)

Time	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
30 minutes	64	64	16.6	17.8	4.11	1.14×10^9
	64	64	16.4	17.7	4.12	9.5×10^8
1 hour	64	64	16.5	17.2	4.12	1.03×10^9
	64	64	16.4	17.1	4.13	1.06×10^9
1.5 hour	64	64	16.6	17.0	4.13	1.03×10^9
	64	64	16.4	16.9	4.12	1.02×10^9
2 hours	128	128	16.4	16.9	4.11	1.22×10^9
	128	128	16.2	16.8	4.10	1.30×10^9
2.5 hours	64	128	16.6	16.9	4.11	1.35×10^9
	64	128	16.3	16.7	4.10	1.11×10^9

soybean 농도 1:9, 효소 N 농도 0.6%,55°C, 가열처리 후 grinding 후 효소처리 후 원심분리할 경우 2시간 처리시 우수함으로 나타났다(Table 17).

Table 17. Effect of reaction time of protease N on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean: water= 1:9, Protease N 55°C, 2 hours, Soybean was heated, ground, enzyme digester and spun)

Time	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
30minutes	32	32	15.3	16.2	4.21	1.03×10^9
	32	32	15.2	16.5	4.22	1.01×10^9
1 hour	32	64	15.5	16.5	4.21	1.13×10^9
	32	64	15.3	16.6	4.20	1.02×10^9
1.5 hour	64	64	15.2	16.5	4.24	1.01×10^9
	64	64	15.3	16.2	4.26	1.23×10^9
2 hours	128	128	15.9	16.4	4.43	1.20×10^9
	128	128	15.5	16.1	4.45	1.33×10^9
2.5 hours	64	64	15.0	15.4	4.33	1.12×10^9
	64	64	14.9	15.3	4.31	1.31×10^9

대두농도 1:9로 가수하여 열처리후 grinding해서 호소처리할 경우 (soybean 농도 1:9, 효소농도 0.6%, 55°C, 2시간)의 경우 원심 분리를 하지 않더라도 높은 역가 나타남(Table 18).

Table 18. Effect of type of proteases on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean: water=1:9, Soybean was heated, ground and enzyme digested)

Type	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
protease A	32	64	16.4	16.7	4.19	1.61×10^9
	32	32	15.2	15.9	4.24	1.14×10^9
protease N	128	128	15.9	16.0	4.29	1.78×10^9
	128	128	16.3	16.6	4.25	1.82×10^9
protease S	128	128	16.3	16.9	4.14	1.83×10^9
	256	256	16.5	16.8	4.19	1.80×10^9

대두에 1:9로 가수하여 열처리후 효소처리하여 원심분리한액에 균을 접종하여 12시간 배양후 결과로서 열처리효과는 있으나 원심분리(soybean 농도 1:9, 효소농도 0.6%, 55℃, 2시간)할 경우 역가가 높았다(원심분리에의한 차가 크지 않음)(Table 19)

Table 19. Effect of type of enzymes on the antimicrobial activity after 12 hours Soybean:water= 1:9, enzyme 0.6% 55℃, soybean was heated, ground, enzyme digested and spun)

Type	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
protease A	64	128	17.7	18.0	4.20	2.34×10^9
	128	128	17.3	17.8	4.19	1.83×10^9
protease N	128	128	15.8	16.2	4.23	2.22×10^9
	128	128	15.9	16.3	4.21	1.78×10^9
protease S	128	256	16.8	17.0	4.11	1.86×10^9
	128	256	16.7	17.0	4.09	1.73×10^9

대두에 1:9로 가수하고 가열 후 grinding해서 착즙 후 효소처리(soybean 농도 1:9, 효소농도 0.6%, 55℃, 2시간)할 경우 역가가 낮은 것으로 대두의 유효물질이 효소 처리전 밖으로 유출되는 것으로 판단되었다(Table 20).

Table 20. Effect of type of enzymes on the antimicrobial activity after 12 hours Soybean:water= 1:9, enzyme 0.6% 55℃, soybean was heated, ground, squeezed and enzyme digested)

Type	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
protease A	64	64	15.1	15.3	4.16	2.05×10^9
	64	64	14.0	14.2	4.18	1.61×10^9
protease N	64	64	17.3	18.1	4.20	2.51×10^9
	32	64	16.2	16.9	4.20	2.84×10^9
protease S	64	64	17.0	17.2	4.15	1.81×10^9
	64	64	17.2	17.6	4.15	1.85×10^9

가열 후 grinding해서 착즙 후 효소처리 후 원심분리(soybean 농도 1:9, 효소농도 0.6%, 55℃, 2시간)의 경우 2회에 걸쳐 유효물질이 제거되는 경향인 듯함. 역가가 그리 높지 않음을 알았다(Table 21).

Table 21. Effect of type of enzymes on the antimicrobial activity after 12 hours (Soybean:water= 1:9, enzyme 0.6%, 55°C, soybean was heated, ground, enzyme digested and spun)

Type	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
protease A	64	64	17.1	17.5	4.15	1.51×10^9
	64	64	16.3	16.8	4.17	1.80×10^9
protease N	64	64	17.7	18.0	4.28	2.03×10^9
	64	128	17.6	17.7	4.25	1.38×10^9
protease S	64	128	17.9	18.3	4.10	1.43×10^9
	64	128	17.8	18.3	4.08	1.53×10^9

대두에 1:9로 가수 후 마쇄하여 착즙 후 효소종류별로 혼합하여 55°C에서 2시간 반응시킨 생 두유를 이용하여 효소 복합체로 처리한 결과 큰 효과가 없는데 이는 역시 대두를 열처리 함이 필요함을 의미함. 열처리를 재시도한 결과 약간의 역가가 향상되었으나 큰 효력이 없었 음(Table 22-23).

Table 22. Effect of mixture of proteases on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean: water=1:9, soybean was ground, squeezed and digested at 55°C for 2 hours)

Enzyme Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
A 0.2%	16	16	13.8	14.1	4.49	9.3×10^8
N 0.2%						
S 0.2%	8	8	13.1	13.3	4.53	9.3×10^8
A 0.2%	8	8	13.0	13.4	4.66	2.4×10^8
N 0.4%						
S -	8	8	12.3	12.6	4.58	3.5×10^8
A 0.4%	8	8	12.8	13.0	4.55	9.5×10^8
N 0.2%						
S -	16	16	14.8	15.3	4.59	8.7×10^8
A 0.3%	8	8	12.4	12.6	4.59	7.7×10^8
N 0.3%						
S -	8	8	13.0	13.3	4.60	5.8×10^8
A 0.3%	16	16	14.2	14.6	4.48	7.3×10^8
N -						
S 0.3%	16	16	15.8	16.2	4.48	8.5×10^8
A -	16	16	13.2	13.9	4.52	8.7×10^8
N 0.3%						
S 0.3%	16	16	14.9	15.1	4.52	9.8×10^8

Table 23. Effect of mixture of proteases on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean: water=1:9, soybean was ground, squeezed and digested at 55°C for 2 hours)

Enzyme Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
A 0.2% N 0.2% S 0.2%	16	32	14.6	15.1	4.22	7.5×10^8
	16	32	14.3	14.9	4.21	9.8×10^8
A 0.2% N 0.4% S -	16	16	13.8	14.5	4.32	6.2×10^8
	16	16	13.2	14.1	4.33	5.8×10^8
A 0.4% N 0.2% S -	16	16	14.5	15.7	4.31	7.7×10^8
	16	16	14.3	15.8	4.33	8.7×10^8
A 0.3% N 0.3% S -	16	16	13.2	14.3	4.29	6.3×10^8
	16	16	13.0	14.1	4.28	6.5×10^8
A 0.3% N - S 0.3%	32	32	15.6	15.7	4.20	9.4×10^8
	32	32	15.3	15.9	4.22	6.3×10^8
A - N 0.3% S 0.3%	32	32	15.0	15.8	4.48	7.9×10^8
	32	32	15.2	15.9	4.49	8.9×10^8

대두에 가수 1:9로하여 가열 처리후 Protease N을 농도별로 처리한 결과 사용할 경우 0.8 - 1%의 농도가 필요하다고 판단되었다(Table 24).

Table 24. Effect of proteases concentration on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean: water=1:9, soybean was heated, ground, digested and spun at 55°C for 2 hours)

enzyme	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
protease N 0.6%	128	128	15.8	16.2	4.23	2.22×10^9
	128	128	15.9	16.3	4.21	1.78×10^9
protease N 0.8%	128	128	17.6	17.9	4.46	1.93×10^9
	128	128	17.5	17.8	4.45	1.72×10^9
protease N 1.0%	128	256	18.1	18.5	4.42	2.20×10^9
	128	256	18.0	18.8	4.43	2.12×10^9
protease N 1.2%	128	256	16.5	16.8	4.43	1.34×10^9
	128	256	16.4	16.7	4.44	1.53×10^9

이상의 결과를 볼 때 대두에 가수량을 1:9로 조절후 가열하여 마쇄후 효소를 0.6-1.0%넣어 55-60도에서 2시간 가수분해하여 착즙 또는 원심분리하여 발효액으로 사용하는 것이 바람직하다고 사료되며 효소원은 Protease N, S를 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

2) 영양 균형 확립 시험

대두에는 각종 유리당이 10 % 정도이며 그 구성은 설탕이 5%, stachyose 4%, Raffinose 1%이다. 또한 탈지 분유에는 젖당이 50 % 이상이므로 이들의 농도와 탄소원으로서 포도당의 수준을 잘 조정하여야 된다. 우선 대두 및 탈지우유 10% 가수 분해물을 사용하였으나 이들의 농도별, 혼합 이용가능성등이 검토되어야된다.

가)탈지 분유를 이용한 발효 시험

skim milk를 Protease N 0.6%으로 처리할 경우, Meat extract 0.8%, Glucose 2%, 배지에서 Yeast extract 효과를 본 것으로 0.5%가 적당함을 알았다(Table25).

Table 25. Effect of yeast extract in skim milk medium on the antimicrobial activity after 12 hours

Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
yeast extract 0.1%	64	128	17.2	17.8	4.60	1.57×10^9
	64	128	17.1	17.4	4.59	1.53×10^9
yast extract 0.3%	128	128	17.3	18.1	4.61	2.23×10^9
	128	128	17.1	18.0	4.60	2.12×10^9
yeast extract 0.5%	128	256	18.1	18.5	4.60	2.51×10^9
	128	256	18.0	18.2	4.59	2.48×10^9
yeast extract 0.7%	128	128	17.9	18.0	4.59	2.27×10^9
	128	128	17.5	17.7	4.60	2.13×10^9

10 % 탈지 분유 배지에서 meat extract의 효과를 조사한 것으로 0.8 %가 우수함을 알 수 있다(Table 26).

Table 26. Effect of meat extract in skimmilk medium on the antimicrobial activity after 12 hours(skim milk 10%, Protease N 0.6%, Yeast extract 0.5%, Glucose 2%, 55°C, 2 hours)

Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
meat extract	64	64	16.1	16.9	4.53	1.70×10^9
0.2%	64	128	15.9	16.8	4.52	1.78×10^9
meat extract	128	128	17.2	17.4	4.56	1.81×10^9
0.4%	128	128	16.9	17.0	4.57	1.78×10^9
meat extract	128	128	17.7	17.9	4.54	2.08×10^9
0.6%	128	128	17.5	17.8	4.55	2.11×10^9
meat extract	256	256	18.0	18.2	4.46	2.13×10^9
0.8%	256	256	17.9	18.1	4.48	2.29×10^9
meat extract	256	256	18.3	19.0	4.42	3.54×10^9
1.0%	256	256	17.0	18.2	4.37	3.12×10^9
meat extract	256	256	17.8	18.0	4.52	2.21×10^9
1.2%	256	256	17.7	18.1	4.49	2.30×10^9

10 % 탈지 분유 배지에서 포도당의 첨가량을 결정한 것으로 1 %의 첨가가 적당하다고 판단되었다(Table 27).

Table 27. Effect of glucose concentration on the antimicrobial activity after 12 hours(skim milk 10%, Protease N 0.6%, Meat extract 0.8%, Yeast extract 0.5%, 55°C, 2 hours)

Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
glucose	256	256	16.9	18.8	4.59	2.05×10^9
1%	256	256	17.3	18.6	4.60	2.11×10^9
glucose	256	256	17.3	18.7	4.57	2.23×10^9
2%	256	256	17.9	18.5	4.59	2.10×10^9
glucose	64	64	17.0	17.5	4.62	1.53×10^9
3%	128	128	17.1	17.4	4.63	1.43×10^9
glucose	32	64	17.0	17.1	4.71	1.21×10^9
4%	32	64	16.6	16.8	4.72	1.20×10^9

나) 대두를 이용한 발효시험

콩 배지에서 Meat extract 첨가량을 결정한 것으로 0.8 %가 발효에 도움을 주는 것으로 판단되었다(Table 28).

Table 28. Effect of meat extract in soybean medium on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean:water=1:1, soybean was heated, ground and enzyme digested, Protease S 1.0%, Yeast extract 0.5%, Glucose 2%, 55°C, 2 hours)

Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
meat extract	64	128	16.3	16.9	4.23	1.80×10^9
0.2%	64	128	16.7	17.1	4.22	1.71×10^9
meat extract	64	256	16.0	16.3	4.23	1.69×10^9
0.4%	64	256	15.8	16.2	4.22	1.88×10^9
meat extract	256	256	16.5	17.4	4.26	2.24×10^9
0.6%	128	128	16.8	17.3	4.27	2.19×10^9
meat extract	256	256	17.5	18.5	4.27	2.66×10^9
0.8%	256	256	17.8	18.6	4.26	2.59×10^9
meat extract	128	256	17.6	18.3	4.25	2.19×10^9
1.0%	128	256	17.4	18.2	4.26	2.22×10^9
meat extract	128	256	17.1	17.7	4.31	2.14×10^9
1.2%	128	256	17.0	17.8	4.30	2.15×10^9

영양원으로 yeast extract의 농도별 효과를 검토하였다. 콩 배지에서 발효시 0.3 %의 yeast extract 가 있으면 발효가 원만하게 진행되었다(Table 29).

Table 29. Effect of yeast extract in soybean medium on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean:water= 1:9, Soybean was heated, ground and enzyme digested. Protease S 1.0%, Meat extract 0.8%, Glucose 2%, 55°C, 2 hours)

Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
yeast extract 0.1%	64	128	17.2	17.4	4.28	1.29×10^9
	64	128	17.1	17.5	4.27	1.35×10^9
yeast extract 0.3%	128	256	17.3	18.4	4.29	2.60×10^9
	128	256	17.5	18.3	4.30	2.53×10^9
yeast extract 0.5%	128	256	17.9	18.6	4.29	2.63×10^9
	128	256	18.0	18.4	4.28	2.61×10^9
yeast extract 0.7%	128	128	17.9	18.0	4.32	2.21×10^9
	128	128	18.0	18.1	4.33	2.03×10^9

대두 배지에서 탄소원 보충량을 결정한 시험으로 포도당 1 %이면 족한 것으로 판단되었다(Table 30).

Table 30. Effect of glucose concentration in soybean medium on the antimicrobial activity after 12 hours(Soybean:water= 1:9, Soybean was heated, ground and enzyme digested. Protase S 1.0%, Meat extract 0.8%, Yeast extract 0.5%, 55°C, 2 hours)

Conc.	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
glucose 1%	128	256	17.4	18.0	4.35	2.99×10^9
	128	256	17.5	18.2	4.36	2.83×10^9
glucose 2%	128	256	18.2	18.5	4.34	2.54×10^9
	128	256	18.0	18.1	4.33	2.66×10^9
glucose 3%	128	128	17.3	17.5	4.33	2.04×10^9
	128	128	17.0	17.4	4.34	1.99×10^9
glucose 3%	64	128	16.7	17.0	4.31	1.72×10^9
	64	128	16.5	17.1	4.32	1.63×10^9

콩과 대두를 혼합하였을 때 항균역가에 미치는 영향을 조사한 것으로 7:3 정도까지는 혼합이 가능함을 알았다. 대두가 많아 질수록 역가가 하락되었다(Table 31).

Table 31. Effect of combination of soybean and skimmilk on the antimicrobial activity after 12 hours Soybean was heated, ground and enzyme digested. Protase S 1.0%, Meat extract 0.8%, Yeast extract 0.5%, glucose 1%, 55°C, 2 hours)

Ratio (skim milk+Soybean)	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
1+9	64	64	17.0	17.3	4.40	1.61×10^9
	64	64	16.8	17.8	4.41	1.62×10^9
2+8	64	64	17.1	17.8	4.39	1.60×10^9
	64	64	17.2	17.6	4.40	1.62×10^9
3+7	64	64	17.5	17.9	4.38	1.73×10^9
	64	64	17.4	17.8	4.39	1.77×10^9
4+6	64	64	17.8	18.8	4.28	1.81×10^9
	64	64	17.7	18.7	4.29	1.89×10^9
5+5	64	64	17.8	18.2	4.41	2.56×10^9
	64	64	17.5	18.0	4.40	2.41×10^9
6+4	64	64	17.7	18.0	4.43	2.80×10^9
	64	64	17.5	17.8	4.42	2.83×10^9
7+3	128	128	18.6	19.5	4.40	3.21×10^9
	128	128	18.3	19.3	4.41	3.07×10^9
8+2	128	128	17.7	18.6	4.43	2.94×10^9
	128	128	17.5	18.4	4.45	2.86×10^9
9+1	128	128	17.7	18.7	4.42	2.48×10^9
	128	128	17.5	18.9	4.43	2.53×10^9

상업용 Bifidus promotor의 효과를 보았으나 대두와 탈지 분유 공히 효력이 없었음을 알았다(Table 32).

Table 32. Effect of growth promoter in skimmilk medium on the antimicrobial activity after 12 hours(Protase S 1.0%, Meat extract 0.8%, Yeast extract 0.5%, glucose 1% 55°C, 2 hours or Soybean was heated, ground and enzyme digested. Protase S 1.0%, Meat extract 0.8%, Yeast extract 0.3%, glucose 1%, 55°C, 2 hours)

	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
skim milk (w/o promotor)	256	256	18.3	19.0	4.42	3.54×10^9
	256	256	17.0	18.2	4.37	3.12×10^9
skim milk (w/promotor)	64	64	17.0	17.2	4.71	8.9×10^8
	64	64	16.8	17.1	4.71	8.8×10^8
soybean (w/opromotor)	128	256	16.8	17.0	4.11	1.86×10^9
	128	256	16.7	17.0	4.09	1.73×10^9
soybean (w/promotor)	64	64	15.5	16.8	4.27	6.4×10^8
	64	64	15.4	16.7	4.28	6.7×10^8

3) 발효 환경 균형 시험

가) MRS broth 에서의 환경 조건 시험

본 시험 균주는 통성 혐기성 균주로서 외부의 산소를 차단하여 줌으로서 세포 증식의 효율을 높힐 수 있다. 따라서 Inert gas purging 및 효율적인 산소 유출 방안을 모색하였다. 우선 교반 속도의 영향을 조사한 결과 pH 조절을 하지 않으면 가스를 주입하지 않는 경우 교반하지 않을 경우 Viable cell이 높고 항균역가는 큰 차이를 볼 수 없었다(Table 33,34). 교반 속도를 100 rpm으로 고정된 후 가스량을 비교한 결과 교반속도 100 rpm, 가스량 1.0 - 1.5 vvm이 적당하였다(Table 35, 36). 가스량 1.5 vvm에서 교반속도를 비교한 결과 100 rpm이 바람직한 것으로 나타났다(Table 37, 38). 추후에는 소포제 시험 등을 통하여 본 발효시 일어나는 foam-over현상을 해결하여야 된다.

Table 33. Effect of agitation rate on the growth of *Lactococcus* sp. 'BL-1 at 30°C after 12 hours of fermentation without pH control

Agitation rate	O.D _{600nm}	Dry cell weight* (g/ℓ)	Viable cell count (CFU/ml)
0rpm	2.440	2.49	1.12 x 10 ⁹
50rpm	2.586	2.64	1.97 x 10 ⁹
100rpm	1.947	1.99	9.80 x 10 ⁸
150rpm	2.719	2.78	3.20 x 10 ⁹
200rpm	2.708	2.76	5.70 x 10 ⁹
250rpm	2.132	2.18	5.00 x 10 ⁹
300rpm	1.803	1.84	3.10 x 10 ⁹

* Dry cell weight determination is calculated at $y=1.021x(r=0.99)$

Table 34. Effect of agitation rate on the antimicrobial activity after 12 hours of fermentation without pH control.

Agitation rate	Total activity (IU)	Extracellular activity (IU)
0rpm	64	32
50rpm	40	20
100rpm	64	25
150rpm	64	64
200rpm	40	25
250rpm	64	25
300rpm	64	16

* IC₅₀ inhibitory concentration

Table 35. Effect of N₂ gas flow on the growth of *Lactococcus sp. BL-1* at 30°C after 12 hours of fermentation.(pH 6.2, 100rpm)

Gas flow volume (vvm)	O.D _{600nm}	Dry cell weight (g/ℓ)	Viable cell count (CFU/ml)
0	2.969	3.03	5.05 x 10 ^y
0.5	2.712	2.77	3.61 x 10 ^y
1.0	3.865	3.95	6.05 x 10 ^y
1.5	6.321	6.45	5.80 x 10 ^y
2.0	9.552	9.75	1.33 x 10 ¹⁰
2.5	4.035	4.12	5.60 x 10 ^y

* Dry cell weight determination is calculated at $y=1.021x(r=0.99)$

Table 36. Effect of N₂ gas flow on the antimicrobial activity after 12 hours of fermentation.(pH 6.2, 100rpm)

Gas flow volume (vvm)	Total activity (IU)	Extracellular activity (IU)	IC ₅₀ * (μℓ/ml)	
			Extracellular	Total
0	128	64	140	130
0.5	128	32	130	125
1.0	256	128	135	65
1.5	200	100	25	14.3
2.0	170	100	51	29
2.5	128	32	340	185

* IC₅₀ inhibitory concentration

Table 37. Effect of agitation rate on the growth of *Lactococcus sp. BL-1* at 30°C after 12 hours of fermentation.(pH 6.2, 1.5vvm)

Agitation rate (RPM)	O.D _{600nm}	Dry cell weight (g/ℓ)	Viable cell count (CFU/ml)
50	1.094	1.12	1.24 x 10 ⁹
100	6.321	6.45	5.80 x 10 ⁹
150	7.388	7.54	2.78 x 10 ⁹
200	8.848	9.03	2.30 x 10 ¹⁰
250	9.776	9.98	5.10 x 10 ⁹

* Dry cell weight determination is calculated at $y=1.021x(r=0.99)$

Table 38. Effect of N₂ gas flow on the antimicrobial activity after 12hours of fermentation.(pH 6.2, 1.5 vvm, MRS)

Agitation rate (RPM)	Total activity (IU)	Extracellular activity (IU)	IC ₅₀ * (μℓ/ml)	
			Extracellular	Total
50	16	4	690	660
100	200	-	25	14.3
150	100	4	960	95
200	64	4	-	310
250	64	16	440	

* IC₅₀ inhibitory concentration

나) 저가 소재를 이용한 발효 시험

용량을 10 배 스케일업하여 발효조를 이용한 발효시험을 실시하였다. 발효 pH는 6.2로 조절하였다.skim milk 10%용액을 Protease N을 농도 0.6%로 처리해서 , 55°C, 2시간 반응후, 30°C에서 배양하면서 1 vvm의 질소하에서 300 ml 규모로 배양한 결과 100 rpm이 우수하였고 serum bottle배양보다 우수함을 알았다.[meat extract 0.8%, yeast extract 0.5%, glucose 1%, N₂ gas flow volumn : 1vvm]. Gas flow는 1 vvm, 온도는 30도 pH는 6.2로 조절하는 조건이 최적이었다.

(Table 39-42)

Table 39. Effect of agitation speed(Milk medium) on the antimicrobial activity(skim milk 10%, 30°C, meat extract 0.8%, yeast extract 0.5%, glucose 1% N₂ gas flow volumn : 1vvm, pH 6.2, 300 ml)

RPM	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
0	64	64	15.8	16.5	6.81	2.7×10^9
	64	64	16.0	17.0		3.3×10^9
50	32	128	16.1	17.6	6.60	3.1×10^9
	32	128	16.7	16.7		4.2×10^9
100	256	512	19.0	19.4	6.10	8.1×10^9
	256	512	19.3	19.1		7.8×10^9
150	128	256	18.3	19.1	6.65	4.9×10^9
	128	256	18.6	19.0		4.7×10^9
200	128	256	18.5	19.7	6.30	5.4×10^9
	128	256	18.4	19.0		5.9×10^9
250	64	256	18.0	19.7	6.57	5.7×10^9
	64	256	17.6	19.3		6.3×10^9
300	128	256	18.1	19.2	6.05	6.5×10^9
	128	256	18.6	19.3		7.8×10^9

Table 40. Effect of N₂ gas flow on the antimicrobial activity(skim milk 10%, 30°C, meat extract 0.8%, yeast extract 0.5%, glucose 1%, agitation rate : 100 rpm, pH 6.2 controlled, 300 ml)

vvm	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
0	64	128	16.0	17.8	6.40	2.1×10^9
	64	128	15.9	17.6		2.3×10^9
0.5	64	128	15.1	17.4	6.45	1.5×10^8
	64	128	15.7	17.3		1.7×10^8
1.0	256	512	19.0	19.4	6.10	8.1×10^9
	256	512	19.3	19.1		7.8×10^9
1.5	128	256	17.2	19.3	6.56	4.5×10^9
	128	256	17.0	19.2		4.8×10^9
2.0	64	128	16.5	18.4	6.78	2.6×10^8
	64	128	16.3	18.3		2.7×10^8

Table 41 Effect of temperature on the antimicrobial activity (skim milk 10%, meat extract 0.8%, yeast extract 0.5%, glucose 1%, agitation rate : 100 rpm, N₂ gas flow : 1 vvm, pH 6.2 controlled)

Temp	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
25°C	64	64	16.2	16.4	5.76	8.5 × 10 ^f
	64	64	16.1	16.2		8.1 × 10 ^f
30°C	256	512	19.0	19.4	6.10	8.1 × 10 ^g
	256	512	19.3	19.1		7.8 × 10 ^g
35°C	128	256	18.2	19.0	6.31	3.3 × 10 ^g
	128	256	18.3	18.9		2.8 × 10 ^g
40°C	0	4	-	11.7	6.81	3.0 × 10 ^g
	0	4	-	11.5		2.7 × 10 ^g

Table 42 Effect of pH control(skim milk 10%, 30°C, meat extract 0.8%, yeast extract 0.5%, glucose 1%, agitation rate : 100 rpm, N₂ gas flow : 1 vvm)

pH	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH	viable cell(CFU/ml)
	extracellular	total	ex.	total		
pH 조절	256	512	19.0	19.4	6.10	8.1 × 10 ^g
	256	512	19.3	19.1		7.8 × 10 ^g
pH 조절 ×	64	64	17.7	17.8	4.64	1.6 × 10 ^g
	64	64	17.5	17.6		1.4 × 10 ^g

다. *Lactococcus* sp. BL-1(KFCC 10790)의 재동정

젖산균인 *Lactococcus* sp. BL-1(KFCC 10790, 특히 115387호)의 유해성 여부에 대한 논란 (Food grade-microorganism)을 없애기 위하여 동균주를 여러 가지 방법으로 동정하였다. 본 균주는 형태학적으로 oval type의 구균이며 chain을 형성하는 그람양성 균이었다. 생리학적으로는 catalase 음성, VP양성, Ribose, galactose, glucose, fructose, mannose, esculin, salicine, maltose, sucrose가 양성이며 lactose, rhamnose, trehalose가 음성이었으며 library

상에서 *Lactococcus lactis subsp. lactis*로 동정되었다. 이들은 type culture와 세포 지방산을 비교하여 재동정으로 확인한바 이들과 유사한 성분을 가지고 있음을 확인하였다(Fig.1). 아울러 Biolog system을 이용한 동정을 실시한 결과 *Lactococcus garvieae*로 동정 되었는데 (Fig.1,2) 이는 *Lactococcus lactis subsp. cremoris*의 유사 종으로 16S ribosomal RNA분석결과와 유사한 결과이다. *Lactococcus* sp.는 Schleifer에 의하여 1985년에 제창된 새로운 속으로 GRAS 미생물로 되어 있는데 관련 종으로는 *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *L. garvieae*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. lactis subsp. cremoris*, *L. lactis subsp. hordniae* 가 있다 (Schleifer, K.H., J. Kraus, G. Dvorak, R. Kilpper-Baelz, M. D. Collins, and W. Fisher, 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 183-195.)

[한국산업미생물학회에서 1997년 춘계학술대회 발표(4월25일)되고 한국특허 취득 제 115387호, (1997년5월 19일)로 등록 되었음].

Table 43. Physiological characteristics of lactococcal isolate

Characteristics	Activity	Characteristics	Activity
Voges-Proskauer	+	β -GUR	-
Hippurate	-	β -GAL	-
PYRA	-	β -HEM	-
α -GAL	-	ADH	-
PAL	-	LAP	-
SHAPE	CHAIN,PAIR	MB	+
GRAM RX	+	CATALASE	-

Characteristics	Activity	Characteristics	Activity
Control	-	Esculine	+
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	-	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	-
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	-
Adonitol	-	Inuline	-
β -Methyl-xylose	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Amidon	+
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β -Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α -Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α -Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N-acetyl glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdaline	-	2 keto-gluconate	-
Arbutine	+	5 keto-gluconate	-

Fig.1. Gas liquid chromatograms of cellular lipids
 (1: Isolate, 2: NCDO 1402, 3: ATCC 21053, 4: IFO 12007)

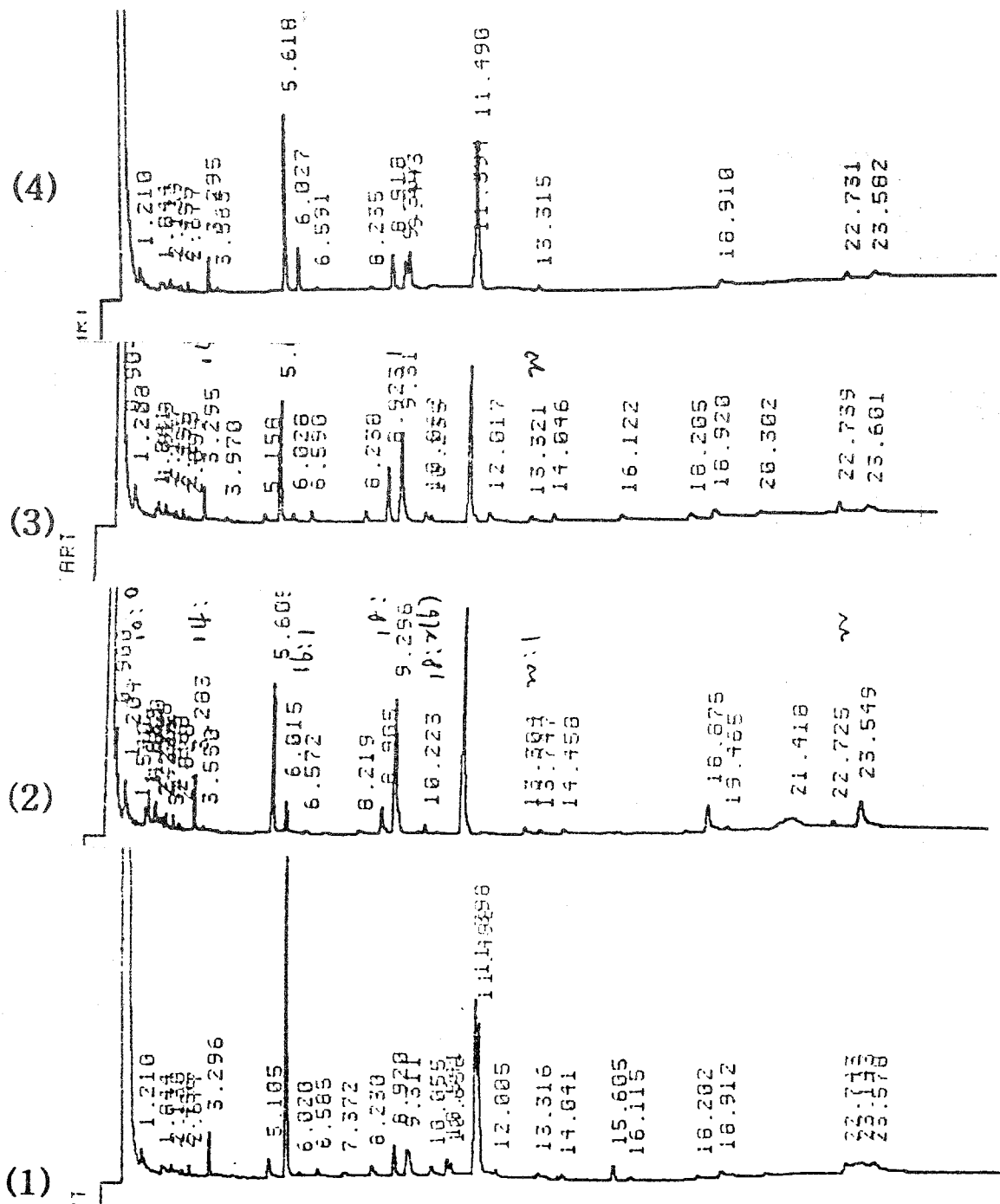
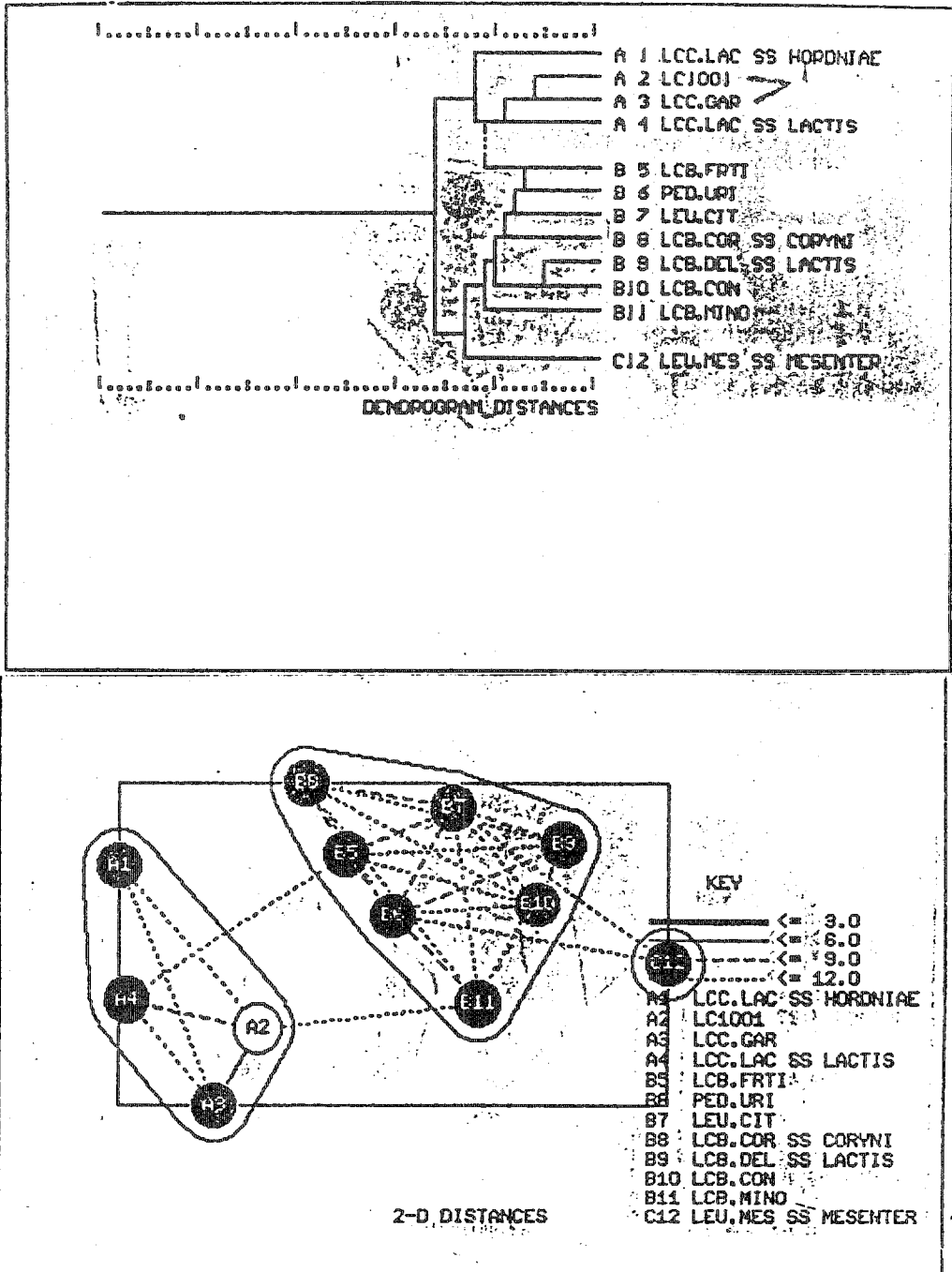


Fig. 2 Dendrogram distance and two dimensional distance of *Lactococcus* sp. BL-1 and other related strains



라. 세포 고정화 기법 연구

1) 고정화 매체의 선정

본 실험에서 나타난 결과를 보면 Alginate, Glass bead, CIL경우는 800 AU/ml로서 400 AU/ml의 역가를 나타내는 CII 및 역가가 검출되지 않는 CIII보다 우수한 것으로 나타났다. 그러나 CIL의 경우 thermal gellation을 이요하는 방법이므로 매우 취급하기가 어려워서 Alginate나 Glass bead가 우수한 Support material로 판단되었다.

Table 44. Selection of entrapping polymer for immobilization of *Lactococcus sp.* KFCC 10790

Polymer	Final pH	Bead size	Activity(AU/ml)
Alginate (MV,2%)	4.8	2 mm	800
Glass Bead	5.0	150-212 μ m	800
Carrageenan (Type I,2%)	5.1	3x3x3mm	400
Carrageenan (Type II)	5.8	3x3x3mm	-
Carrageenan +Locustbean (Type I,11:1,3%)	5.0	3x3x3mm	800
Carrageenan +Locustbean (Type II,11:1,3%)	5.8	3x3x3mm	-

*30°C, 12 hrs, 100 ml flask culture(10 Cell + 90 MRS).

2) Glass Bead 크기별 고정화 시험

고정화 매체 선정시험에서 선정된 Glass bead의 크기별 시험을 실시하였다.

고정화후 발효시 역가는 Glass Bead의 크기가 커짐에 따라 효율이 높게 나타났다(Table 3)

Table 45. Effect of size of glass bead on the Bacteriocin activity

Size		pH	Residual Glucose (%)	Free cell(C.F.U./ml)	A.U/ml (<i>Micrococcus luteus</i>)
5mm	+ PEI	4.87	1.383	5.0×10^8	1600
3mm	+ PEI	4.91	1.356	6.0×10^8	1600
710-1180 μ m	+ PEI	4.80	1.138	5.7×10^8	1600
425-600 μ m	+ PEI	4.94	1.292	5.3×10^8	1600
212-300 μ m	+ PEI	5.06	1.283	8.0×10^7	800
150-212 μ m	+ PEI	5.03	1.328	8.0×10^7	800

Culture was done at 30°C, 12 hrs.

3) Alginate의 종류 및 농도가 고정화에 미치는 영향

고정화 매체의 선정에서 우수함이 밝혀진 Alginate의 종류 및 농도가 고정화에 미치는 영향을 조사하였다(Table 4).

Table 46. Effects of types and concentration on the immobilization of *Lactococcus sp.* KFCC 10790(CaCl₂ 50mM, Initial CFU : $3.6 \times 10^8 \rightarrow 1.8 \times 10^9$ (Final), 30°C 12 hours 140rpm, Initial pH pH : 5.75, Initial Glucose : 2.249%, syringe size : 18G, Indicator : *Micrococcus luteus*)

		pH	Residual Glucose (%)	Bead size(mm)		C.F.U/ml	A.U/ml
				0hr	12hr		
Low viscosity (%)	1	5.07	1.689	2	과과	5×10^9	400
	2	5.07	1.608	2.3	2.5(반과)	2×10^9	400
	3	5.07	1.689	2.5	2.5(반과)	3×10^9	400
	4	4.96	1.610	3	3(반과)	2×10^9	400
	5	4.96	1.584	3	3(반과)	1.7×10^9	400
Medium viscosity (%)	1	5.07	1.680	2	2.2(반과)	2×10^9	400
	2	5.10	1.698	2.7	2.9	2×10^9	400
	3	4.98	1.531	3	3	1×10^9	400
	4	5.02	1.584	3	3	2×10^4	200
High viscosity (%)	1	5.09	1.715	2	2.3(반과)	1×10^9	400
	2	5.08	1.715	2.5	2.5	3×10^9	200
	3	5.00	1.558	3	3	2×10^9	200

표에서 보는 바와 같이 저 점도 Alginate로 만든 bead는 농도에 관계없이 대체로 부서짐을 보여 균들이 탈리 현상을 보였으며 중점도의 Alginate는 대체로 양호한 편이었다 그러나 농도가 높아짐에 따라 다소 점도가 높아 2%로 사용하는 것이 바람직하다고 생각되었다. 고 점도의 경우는 점도가 너무 높아서 Bead를 만들 때 매우 난점이 있었으며 결국 제조된 Bead 로의 mass transfer가 어려운 탓인지 배양액의 역가가 매우 낮은 편이었다.

4) CaCl₂의 농도가 고정화에 미치는 영향

2% Alginate용액을 이용하여 고정화에 미치는 CaCl₂의 농도 영향을 조사하였다(Table 5). 표에서 보는 바와 같이 40 mM이하에서는 bead가 생성되더라고 약하여 부서지거나 Swell현상을 보이는 듯하며 40 mM이상일 때 안정한 것으로 나타나서 40 mM이 최적이라고 생각되었다.

Table 47. Effect of CaCl₂ concentration on the immobilization of *Lactococcus sp.* KFCC 10790(Initial condition: pH 5.79, 30°C 12hr 140rpm, Initial CFU : $1.15 \times 10^9 \rightarrow 2.3 \times 10^9$, Initial Glucose 2.098%, Indicator : *Micrococcus luteus*, sylinge size : 18G)

Concentration (mM)	pH	Residual Glucose (%)	Bead size (mm)		C.F.U/ml	A.U/ml	
			0hr	12hr			
CaCl ₂	20	4.78	1.133	3	파괴	1.05×10^8	400
	30	4.84	1.394	3	3.5	8.84×10^0	400
	40	4.84	1.386	3	3	9.91×10^0	400
	50	4.83	1.355	3	3	1.14×10^1	400
	60	4.85	1.355	3	3	1.11×10^1	400

5) Bead 제조시 주사 바늘의 크기가 세포 고정화에 미치는 영향

Alginate Bead 제조시 주사 바늘의 크기는 Bead의 크기를 좌우한다. 따라서 Bead의 제조를 18 - 25 G의 크기의 바늘로 시도하여 보았다. 여기서 Gauge값이 작으면 Bead가 큰 것이다. Gauge의 크기에 따른 고정화세포의 Bacteriocin생성에는 큰차이가 없었고 Bead가 클 경우 일부의 Bead가 파손되는 현상을 보여 추후 시험은 25G로 하였다(Table 48).

Table 48. Effect of size of needle on the immobilization of *Lactococcus sp.* KFCC 10790 (Initial condition: pH : 5.77, CaCl₂ 40mM, 30°C 12hr 140rpm, Initial CFU : $1.01 \times 10^9 \rightarrow 2.03 \times 10^9$, Initial Glucose : 2.035%, Indicator : *Micrococcus luteus*)

Gauge size	pH	Residual Glucose (%)	Bead size (mm)		C.F.U/ml	A.U/ml
			0hr	12hr		
18G	4.80	1.420	2.5	2.7	1.79×10^7	400
22G	4.80	1.506	2	2.5	1.34×10^7	400
23G	4.80	1.474	2	2.2	1.31×10^7	400
25G	4.80	1.451	1.8	2.0	1.03×10^7	400

Table 49. Effect of number of cell on the Bacteriocin production by immobilized *Lactococcus sp.* KFCC 10790

(Initial condition pH : 5.78, CaCl₂ 40mM, 30°C 12hr 140rpm, Initial CFU(X) : 1.7×10^9 , syringe size : 25G, Bead size : 1.75mm, Initial Glucose: 1.926%, Indicator : *Micrococcus luteus*)

	pH	Residual Glucose (%)	Bead size(mm)	C.F.U/ml	A.U/ml
10x	4.70	1.220	2	1.7×10^7	400
5x	4.76	1.284	2	1.4×10^7	400
1x	4.82	1.299	2	9.9×10^6	400
1/10x	4.89	1.314	2	1.0×10^7	400
1/100x	4.94	1.383	2	2.8×10^6	200

6) 사용된 균수의 영향

세포의 고정화에 이용된 균수가 고정화 후 항균력에 미치는 영향을 조사하였다(Table 49). 고정화 세포 제조시 균수가 증가하면 당의 사용도 많아지고 Bacteriocin역가도 높은 것으로 나타났으며 최적 농도는 10^9 cfu/ml인 것으로 사료되었다.

7) 발효시 rpm의 영향

고정화 세포를 이용한 발효시 진탕속도의 영향을 조사하였다(Table 50). 진탕속도가 커지면 항균물질 생성이 많아졌으나 Bead의 파손 문제가 유발되어 50 rpm이 적당한 것으로 판단되었다.

Table 50. Effect of rpm on the bacteriocin production by immobilized *Lactococcus sp.* KFCC 10790(Initial pH 5.78, CaCl_2 40mM, 30°C 12hr, Initial CFU : $3.1 \times 10^8 \rightarrow 9.3 \times 10^8$, syringe size 25 G, Bead size 1.8mm, Initial Glucose 2.058%, Indicator 균 : *Micrococcus luteus*)

	pH	Residual Glucose (%)	Bead size (mm)	C.F.U/ml	A.U/ml
0rpm	4.58	1.358	2	1.8×10^9	200
50rpm	4.52	1.206	2	2.0×10^9	400
100rpm	4.53	1.135	2	1.9×10^9	400
150rpm	4.57	1.206	2	8.9×10^9	400
200rpm	4.58	1.206	2	1.1×10^9	400

Medium viscosity의 alginate를 사용하여 40 mM CaCl_2 용액에서 25 Gauge의 주사바늘로 Bead를 만들고 0.3 M KCl 용액에서 굳힘시간에 따른 효과를 조사하였다. Gelling time은 0.5 - 36 시간 으로 조절하였는데 (Table 51)에서 보는 바와 같이 1시간 정도의 시간이 가장 알맞은 것으로 나타났다.

Table 51. Effect of gelling time of alginate on the bacteriocin activity

Gelling time(hr)	Final pH	Residual glucose(%)	free cell(cfu/ml)	A.U./ml
0.5	4.75	1.129	2.67×10^6	200
1	4.75	1.253	3.50×10^6	400
12	4.77	1.303	3.17×10^6	400
24	4.85	1.361	6.51×10^6	400
36	5.82	1.806	4.00×10^6	200

Fermentation was carried in flask containing 10 g alginate bead(+ 90 ml MRS broth). (30°C, 50 rpm, 12 hrs, 1.45×10^9 cfu/ml)

MRS broth에서 12시간 배양한 세포를 농축하여 alginate에 고정화한후 별도로 멸균된 MRS broth에 넣어 12시간씩 배양하는 방식으로 고정화 세포의 재생후 사용하는 시험을 실시하였다. Flask culture를 이용하였는데 사용횟수가 늘어 감에 따라 효율은 감소되었으며 4회 사용할 때 고정화된 bead가 파손되어 더 이상 진행할 수 없었다(Table 52).

Table 52. Repeated fed batch culture of immobilized cell of *Lactococcus sp.* KFCC 10790

No. of Cycle	pH	Residual glucose(%)	Free cell(cfu/ml)	A.U./ml
1	4.80	1.345	5.59×10^6	400
2	4.66	1.407	3.33×10^6	200
3	4.70	1.433	8.16×10^7	200
4	Disrupture			

Fermentation was carried in flask containing 10 g alginate bead(+ 90 ml MRS broth). (30°C, 50 rpm, 12 hrs, 1.68×10^9 cfu/ml)

동일한 시험을 fermentor를 이용하여 실시하였다. 단 gel의 경도를 도와주기 위하여 본 시험에서는 0.1 mM CaCl₂를 보강하고 발효액의 규모를 300 ml로 하였는데 4회이상 운용이 가능하였다(Table 53).

Table 54. Repeated fed batch culture of immobilized cell of *Lactococcus* sp. KFCC 10790 in fermentor

No. of Cycle	pH	Residual glucose(%)	Free cell(cfu/ml)	A.U./ml
1	4.72	1.310	4.83×10^9	400
2	4.65	1.469	6.56×10^9	400
3	4.65	1.521	2.30×10^9	200
4	4.62	1.521	8.90×10^9	200

Fermentation was carried in fermentor containing 30 g alginate bead(+ 270 ml MRS broth), (30°C, 50 rpm, 12 hrs, 1.68×10^9 cfu/ml)

탈지 분유를 농도별로 용액을 조제하여 0.6%의 Protease N을 첨가하고 55 °C에서 2시간 분해하여 포도당 2%, yeast extract 0.5%, meat extract 0.8%를 넣어 살균하고 고정화된 세포를 접종하고 12시간 배양하였다. 3 - 12.5%의 농도로 하였을 때 5 % 정도가 적당한 것으로 나타났다(Table 55).

Table 55. Batch culture of immobilized cell of *Lactococcus* sp. BL-1 in skim milk medium

Skimmilk (%)	pH	Residual Sugar(%)	Free cell(cfu/ml)	A.U./ml
3	4.27	1.129	8.95×10^9	0
5	4.37	1.253	2.82×10^9	400
7.5	4.55	1.303	1.08×10^8	400
10	4.67	1.361	2.21×10^8	400
12.5	4.80	1.806	2.91×10^8	800

한편 포도당 첨가에 따른 Bacteriocin의 역가 수율을 조사하였다. 표에서 보는 바와 같이 2% 정도 첨가하는 것이 바람직한 것으로 밝혀졌다(Table 56)

Table 57. Effect of glucose addition on the bacteriocin activity of immobilized cell of *Lactococcus sp.* KFCC 10790.

Glucose(%)	Final pH	Glucose consumption(%)	Free cell(cfu/ml)	A.U./ml
2	4.94	31.60	1.76×10^9	200
3	4.89	24.13	1.84×10^9	0
4	4.83	19.75	1.02×10^9	0
5	4.77	16.49	1.24×10^9	0
6	4.77	19.54	6.65×10^9	0
10	4.79	14.30	4.75×10^9	0

Initial pH: 5.75, 30 °C, 50 rpm, 12 hrs.

세포의 연령에 따른 고정화시 Bacteriocin 활력에 미치는 영향을 조사하였다(Table 58). by에서 보는 바와 같이 세포를 10-12시간 배양후 세포를 회수하여 고정화하는 것이 바람직하다고 사료 되었다.

Table 58. Effect of age of cell on the immobilization of *Lactococcus* sp. KFCC 10790

Age	pH	Glucose(%)		C.F.U/ml		A.U/ml
		Initial	Final	ICFU → FCFU	RCFU	
8	5.01	1.919	1.378	$5.32 \times 10^7 \rightarrow 3.72 \times 10^7$	5.52×10^9	200
10	5.00	2.034	1.460	$4.84 \times 10^8 \rightarrow 3.39 \times 10^8$	3.20×10^9	400
12	4.88	1.952	1.353	$1.18 \times 10^9 \rightarrow 8.26 \times 10^9$	1.61×10^9	400
14	4.88	1.968	1.271	$1.97 \times 10^9 \rightarrow 1.38 \times 10^9$	4.80×10^9	200
16	4.70	1.813	1.230	$2.70 \times 10^9 \rightarrow 1.90 \times 10^9$	9.20×10^9	0
24	4.65	2.211	1.526	$1.85 \times 10^9 \rightarrow 1.30 \times 10^9$	1.82×10^7	0

(30°C, 150rpm, 1vvm, pH 6.2)

고정화된 세포를 배양하면서 시간별로 Bacteriocin 활력을 조사한 바는 (Table 59)와 같다. Bacteriocin activity는 12시간에 최대에 도달하였다.

Table 59. Time course of bacteriocin production by immobilized cell of *Lactococcus* sp. KFCC 10790(50rpm, 30°C, ICFU: $4.77 \times 10^8 \rightarrow 9.55 \times 10^8$, Indicator 균 : *Micrococcus luteus*

Culture time(h)	pH	Residual Glucose (%)	C.F.U/ml	A.U/ml
0 hr	5.74	2.179	2.70	0
6 hr	5.22	1.392	8.82	0
8 hr	5.02	1.168	1.80	200
10 hr	4.90	1.061	1.85	200
12 hr	4.82	1.040	2.10	400
14 hr	4.75	1.019	2.73	400
24 hr	4.65	0.869	1.86	400

마. 고농도 배양 방법 및 발효공정의 스케일 업

1) 5 L jar fermentor를 이용한 배양시험

Skim milk를 Protease N으로 분해하여 만든 배지에 *Lactococcus lactis*를 접종하고 배양 패턴을 본 결과(Table 60)와 같다. 배양 12시간에 도달되어 12800 AU/ml을 나타내었다. 콩배지를 Protease S, N으로 분해하여 만든 발효액의 발효 패턴은 (Table 61, 62)과 같다. 역시 배양 12시간에 최대치를 나타내었다.

Table 60. Bacteriocin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* in skimmilk digested by protease N(skim milk 10%, Protease N 0.6%, 55°C, 2 hours, meat extract 0.8%, yeast extract 0.5%, glucose 1%, agitation rate 100 rpm, N₂ gas flow 1 vvm, pH 6.2 고정, Temp: 30°C)

Culture time(h)	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH
	extracellular	total	ex.	total	
2	-	100	-	-	5.85
	-	100	-	-	
4	-	100	-	-	5.78
	-	100	-	-	
6	400	400	12.1	12.4	5.70
	400	400	12.0	12.5	
8	800	1600	15.6	15.8	5.64
	800	1600	15.5	15.7	
10	3200	3200	17.3	18.7	5.69
	3200	3200	17.2	18.8	
12	6400	12800	16.6	18.6	5.84
	6400	12800	16.9	18.8	

Table 61. Bacteriocin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* in soymilk digested by protease S(soybean 1:9, Protease S 1.0%, 55°C, 2 hours, meat extract 0.8%, yeast extract 0.5%, glucose 1%, agitation rate : 100 rpm · N₂ gas flow : 1 vvm · pH 6.2 controlled, temp. 30°C)

Culture time(h)	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH
	extracellular	total	ex.	total	
2	-	-	-	-	6.25
	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	6.23
	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	6.22
	-	-	-	-	
8	100	200	15.3	15.9	6.20
	100	200	15.0	15.7	
10	1600	6400	16.1	16.7	6.19
	1600	6400	16.0	16.9	
12	6400	12800	16.3	17.3	6.22
	6400	12800	16.5	17.6	

Table 62. Bacteriocin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* in soymilk digested by protease N(soybean 1:9, protease N 0.6%, 55°C, 2 hours, meat extract 0.8%, yeast extract 0.5%, glucose 1%, agitation rate 100 rpm, N₂ gas flow 1 vvm, pH 6.2 controlled, Temp: 30°C)

Culture time(h)	antimicrobial substance(AU/ml)		clear zone(mm)		pH
	extracellular	total	ex.	total	
2	-	-	-	-	6.15
	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	6.19
	-	-	-	-	
6	-	100	-	15.1	6.13
	-	100	-	14.8	
8	200	800	15.2	15.7	6.15
	200	800	15.8	15.9	
10	3200	3200	16.0	17.7	6.14
	3200	3200	15.9	17.4	
12	3200	12800	16.6	18.3	6.27
	3200	12800	16.4	18.5	

2) 20 L fermentor를 이용한 이용한 생산 시험

2차 년도에 실시한 5L Fermentor 배양의 결과를 Scale-up하기 위하여 20 L Fermentor를 운용하였다. 발효용 배지로는 Glucose : 5 %, 10% skim milk를 protease 0.6% 55℃에서 2시간 처리하여 Yeast extract : 0.8 %, Beef extract : 0.5 %m, 100 rpm, N₂ gas 1vvm, pH 6.0 고정으로 실시하였다(Table 63). 발효 결과 12,800 AU/ml의 Productivity를 나타냈다.

Table 63. Fermentation profile of *Lactococcus sp.* BL-1 in 20 L Fermentor

Hour	Protein(mg/ml)	Residual glucose (%)	CFU/ml	Supernatant		pH2 adjusted	
				<i>L.plant.</i>	<i>M.luteus</i>	<i>L.plant.</i>	<i>M.luteus</i>
0	41.36	7.527	0	0	0	0	0
2	42.28	7.437	3.6×10 ¹	0	0	800	0
4	44.60	7.401	1.6×10 ¹	0	0	800	200
6	42.01	7.401	1.0×10 ¹	400	400	6400	800
8	41.36	7.383	4.0×10 ⁹	1600	800	6400	800
10	43.82	7.383	3.7×10 ⁹	1600	800	6400	1600
12	42.60	7.360	3.6×10 ⁹	3200	1600	6400	3200
14	42.28	7.302	1.0×10 ¹	3200	1600	12800	3200
16	41.78	7.148	1.0×10 ¹	3200	1600	12800	3200

3) 30 L fermentor를 이용한 생산시험

같은 방법으로 30L Scale-up시험을 실시하였다. 배지로는 10% skim milk + 0.6% protease N 55°C, 2시간 반응후 역시 0.8% meat ext. 0.5% yeast ext. 3% glucose을 첨가하였으며 배양조건은 30°C, 100rpm,에서 N₂ gas 공급하지 않고 pH 6.2로 조정하여 발효하였다. 발효 결과 12,800 AU/ml의 Productivity를 보여 안정한 발효를 할 수 있었다(Table 64).

Table 64. Fermentation profile of *Lactococcus* sp. BL-1 in 30L Fermentor

Hour	Glucose (%)	Protein (mg/ml)	CFU/ml	<i>L.plantarum</i>		<i>M.luteus</i>	
				Supernatant	pH2 adjusted	Supernatant	pH2 adjusted
0	11.9	33.87	2.68×10^1	0	0	0	0
2	11.9	39.86	1.90×10^1	0	0	0	0
4	11.8	37.89	2.10×10^1	0	0	0	0
6	11.3	35.69	2.49×10^1	0	0	0	0
8	10.5	35.61	4.68×10^8	200	200	400	400
10	10.5	36.15	1.79×10^8	800	3200	800	3200
12	7.7	33.11	1.52×10^9	1600	3200	3200	12800
14	6.7	36.75	1.58×10^9	1600	6400	3200	12800
16	6.9	35.75	1.89×10^9	1600	6400	3200	12800

4) 산업적공정을 이용한 생산 시험

본 시험은 30 L 배양된 공정을 산업적으로 확인하기 위한 목적으로 수행하였다. 배지 조성으로는 5% Skim milk (p-N 0.15%), 5% glucose, 0.75% beef extract, 1% yeast extract, 0.25% soy oil을 이용하였다.

전체공정도를 보면 다음과 같다(Fig. 3).

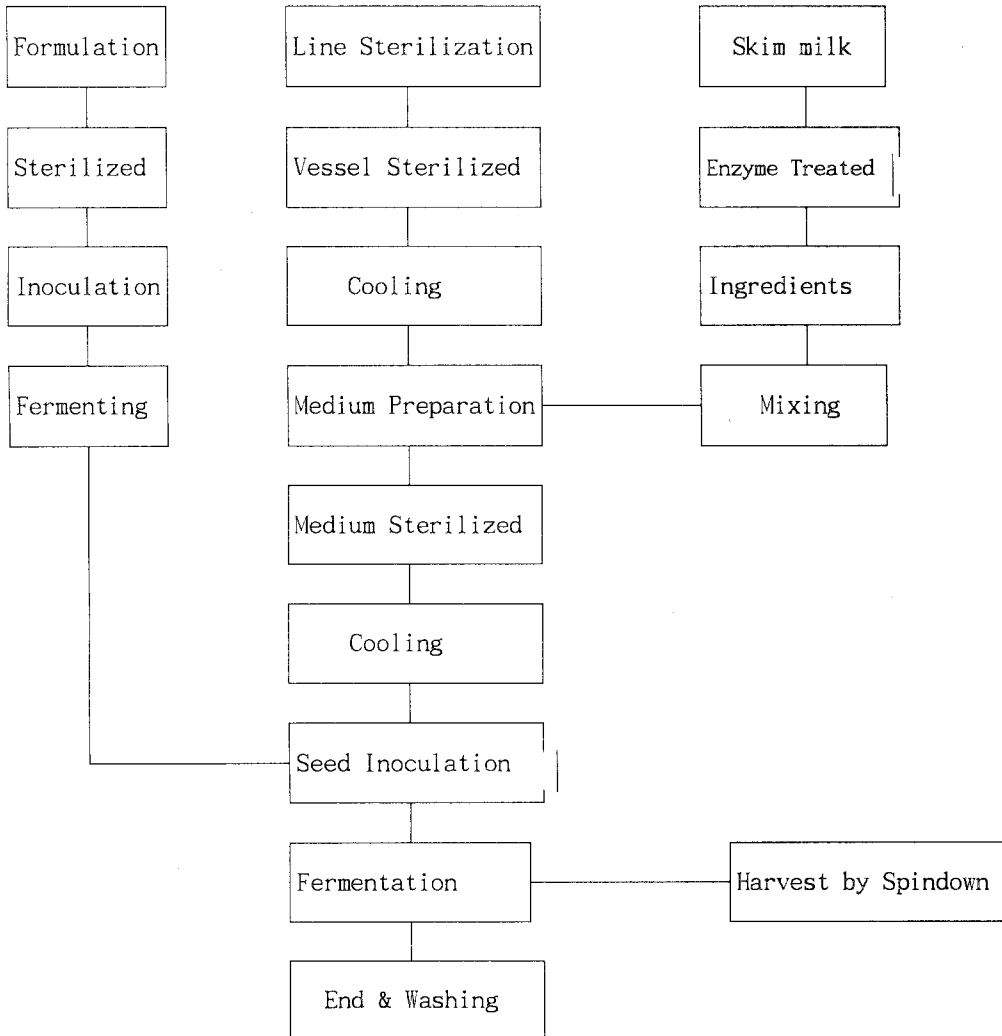


Fig.3. Flow Chart of BL-1 preparation

배양조건으로는 배양온도; 37°C, pH control을 하되 Initial pH 7.0 으로 하고 pH 6.0에서 2N NaOH용액을 이용하여 pH control을 실시(High : pH 7.15, Low : pH 6.00)하였다. Tank 용량은 200L(Working volum : 120L)이었으며 혐기적 조건을 위하여 Nitrogen purging으로 tank 내압을 1.0kg/cm²으로 유지하였다. 균의 접종비는 2%(v/v)으로 하였는데 배양 후 10hrs 30min 경에 2.5% glucose 추가당을 투입하여 탄소원을 보충하였다. 배양시간은 16시간을 종료점으로 하였다. 발효가 진행되면서 2시간 간격으로 cell growth의 경시 변화 관찰(Viable cell count 실시)하고 이화학적 분석을 실시하였다. 배양이 끝난 후 원심분리를 실시하여 pellet과 상등액을 분리하여 pellet을 Deep freezer에 넣어 동결한 후 freeze dryer를 이용하여 원말화하고 상등액은 40L를 취하여 냉동 보관하고 약 20L 정도를 동결 건조하여 원말화하였다.

시간 별로 sampling한 시료를 serial dilution method를 이용하여 viable cell count한 결과는 (Table 65)와 (Fig. 4) 에 나타내었다.

12시간 이후 pH의 변화가 느려지는 경향을 나타내어 16시간 까지 cell count를 실시하였으나 그림에서 보듯 16시간 이후에도 계속적으로 cell growth가 이루어졌다.

Original broth의 오염 여부를 알아보기 위하여 오염도 test를 실시한 결과 gram-negative, enteric bacillus 및 coliform를 detection하는 배지인 DLA, ENDO, EMB 모두에서 negative로 나타났다. Table 3 과 Fig. 2에서 보듯, 접종 후 약 3시간 동안 lag phase를 유지하다가 약 3시간에서 13시간 사이가 exponential phase 가 되며, 14시간 이후 생균수의 변화가 약해지면서 stationary phase 로 접어든다. 2.5% glucose를 121°C/15min간 autoclave를 실시하여 준비해둔 것을 10시간 30분경에 추가당 형식으로 발효조의 접종구를 통해 투입하였다. 추가당 투입의 목적은 예비 실험에서 산생성과 성장이 당에 의해 크게 좌우되므로 산생성 속도가 저하되는 시점에 추가당을 투입함으로 인해 지속적인 산생성과 성장을 유도하기 위해서이다. 최고 Cell농도는 10⁹ CFU/ml정도이었다. Bacteriocin Productivity는 16일 후 6,400 AU/ml로서 대체로 안정한 발효를 할 수 있어 제재화시험에 들어 갔다(Fig.5).

Table 65. Growth profile of *Lactococcus sp.* BL-1 in 200 L fermentor

Hours	CFU/ml
0	2.85×10^6
2	6.00×10^6
4	1.10×10^7
6	3.60×10^7
8	1.67×10^8
10	8.40×10^8
12	1.26×10^9
14	1.33×10^9
16	1.36×10^9

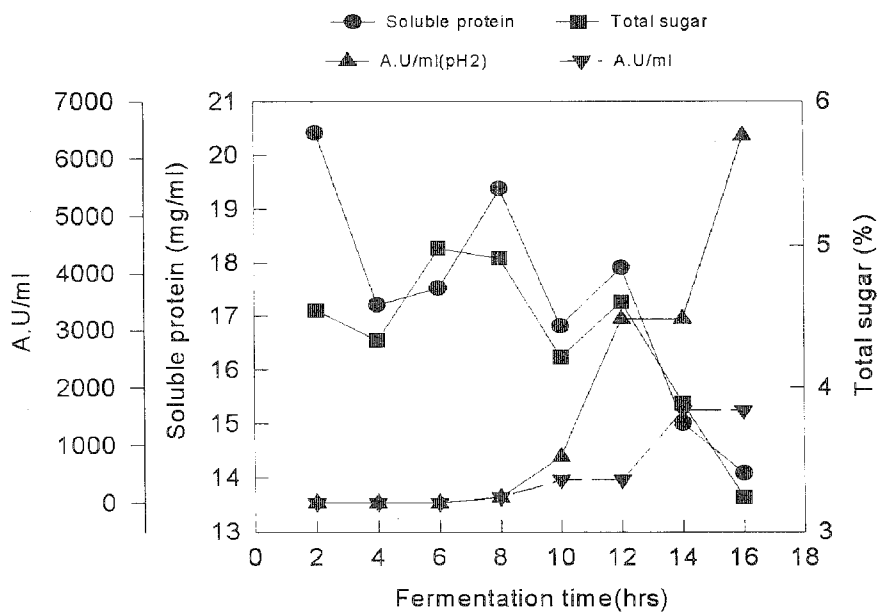


Fig.5. Fermentation profile of *Lactococcus* sp. BL-1 at 200 L scale

5) 원심분리 및 재재화 공정 시제

Kansai 연속 원심분리기를 14112rpm(12000 G-force)로 operating하고 상등액 유량은 1.4 ~ 1.6L/min으로 조절하였다. Feed 유입은 발효조 line과 연결되어 원심분리기 하부 bowl로 들어가도록 하였다(tank 압력: 0.5 ~ 10kgf/cm² 유지). 이때, bowl의 rpm은 14,112 rpm이다. 발효액이 tank압력에 밀려 원심분리기 하부로 유입되어 pellet은 내부에 침전되고 상등액은 상부로 배출된다. 이때 유량을 feed valve로 조절하여 상등액 액량을 조절하였다(1.4~1.6L/min). 발효액(120L)을 회수하는데 2시간이 소요된다. 이때의 Pellet은 2415g을 회수되었고 보호제(50% glucose, 1.7% NaCl)와 pellet을 1:1 (Pellet weight : 보호제 volume) 비율로 mixing하여 멸균된 tray에 2.4L × 2tray 로 분주하고 Deep freezer(-70℃ setting)에 예비 동결(약 2일)하여 Freeze dryer(일신 랩)의 cold trap(-70℃ setting) switch를 넣었다. Cold trap의 온도가 적정 온도 (-60 ~ 55℃)로 유지되면 시료를 넣고 vacuum switch를 넣은 후 Vacuum gauge의 눈금 바늘이 5 micron이하를 지시할 때까지 기다렸다. Vacuum이 고정되면 shelf 온도를 25℃로 fix하고 기록계의 시료, chamber 온도, shelf온도가 일치되면 종료시키다. 시료 탈착 후 총중량은 1,900g이며 이때의 생균수 2.8×10^{10} CFU/g이었다. 오염 test 결과 EMB, ENDO, DLA에서 모두 negative로 나타났다.

6) Crude Bacteriocin의 조제 공정

Crude Bacteriocin의 제조는 Skimmilk medium에 16시간 증식 시킨 발효액을 염산을 이용하여 pH 2.0으로 조절한 후 5분간 Boiling하여 냉각 후 원심 분리하였다. 상등액에 Cold methanol 1 Volume을 가하여 침전물을 제거하고 다시 4 Volume의 Acetone으로 재차 침전물을 제거하였다. 상등액에 3 Volume의 Acetone을 넣어 침전물을 회수하여 용매를 제거한 후 -70℃로 동결 후 동결 건조하여 분쇄후 재재화하였다. 상업적 공정으로서는 배양액을 염산처리하여 세포를 제거하고 60℃에서 진공 농축후 텍스트린을 넣어 20 Brix로 조절한 후 분무건조하여 제조하는 공정을 선정하였다. 한편으로 순수 정제품의 제조는 microfilter와 ultrafiltration(Mw 1,000 - 10,000 Da)을 병용하여 농축한 후 XAD-2와 copper-coupled IDA-sepharose 6B, CM-sepharose CL-6B를 거쳐 Reverse-phase HPLC(YMC-pak protein-RP column)수지를 이용한 순수 정제가 가능하였다.

2. 응용 시험

가. BL-1 Crude Powder를 이용한 *Listeria monocytogenes* Scott A 저해

발효액으로부터 염산 열 추출 및 Methanol, Acetone추출후 동결 건조한 BL-1분말을 230 IU/ml이되도록 TSBY 배지에 넣고 식중독 균으로서의 *Listeria*의 저해 효과를 본 결과를 Fig. 6. 에 나타내었다. 대조구는 7시간 정도에 대수기를 지나 정지기에 도달하였으나 첨가구는 증식을 완전히 저해하였다. 이와 같은 사실은 저온 유통 육류, 유제품등에서의 *Listeria*균이 BL-1에의하여 저지 될 수 있음을 보여 주는 결과라 하겠다.

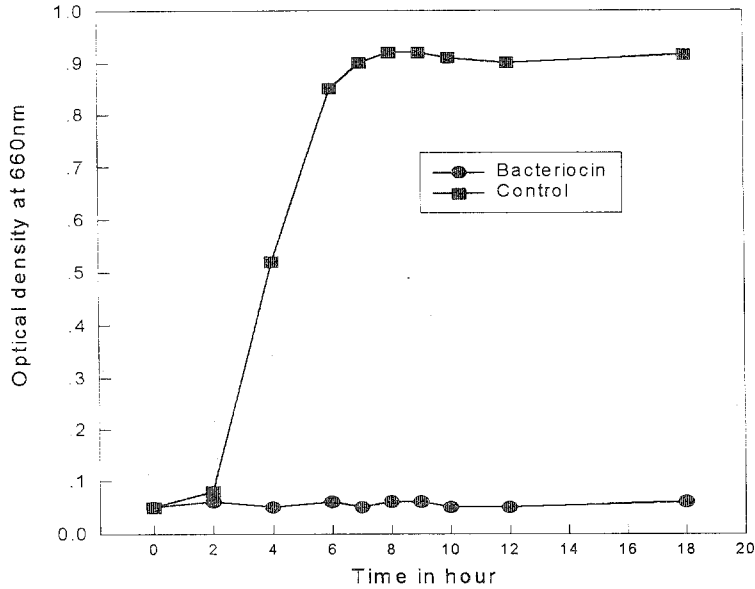


Fig. 6. Inhibition of growth of *Listeria monocytogenes* Scott A by BL-1 Crude powder

나. *Lactococcus sp.* BL-1 에 의한 여드름 균의 저해 효과

얼굴등에 기생하며 여드름을 일으키는 균은 *Propionibacteria acnes*로 알려져 있다. 현재 까지 이들의 치료는 항생물질등 Chemical or Biosynthetic Antibiotics로 치료해왔다. 그러나 이들은 부작용이 많아 치료제로서 한계를 가지고 있다. 그러나 BL-1과 같이 GRAS-grade의 항균 물질은 극히 부작용이 없다고 보아도 되겠다. 다행히 (Fig. 7)과 같이 *Propionibacterium acnes*는 BL-1에 의하여 억제가 됨을 알았다 이들은 현재 Cell-free supernatant, 또는 Cell mixture상태로의 제재화가 가능해졌으므로 Cosmetic aid로서 가능성을 타진 중이다.

Fig. 7. Inhibition of *Propionibacteria acnes* by *Lactococcus* sp. BL-1
(lawn: *P. acnes*, Producer: BL-1)



다. 항균제재를 이용한 생면의 제조 및 저장

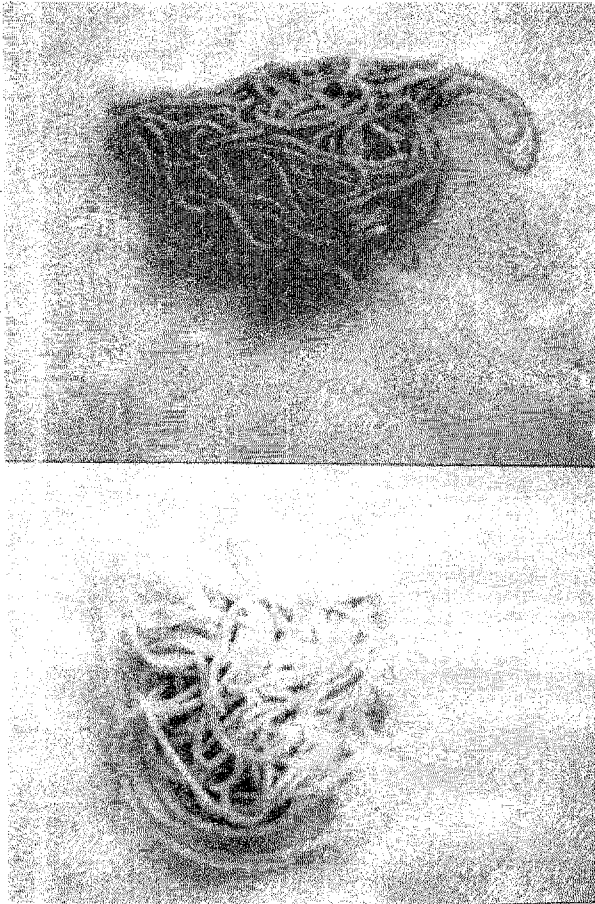


Fig. 8. Noodles with and without antimicrobials

BL-1 항균 제재를 이용하여 생면 제재를 기능성 및 보존성의 측면에서 제조하고(Fig.8) 관능 및 저장성을 조사하였다. 관능적으로는 색택의 면에서는 큰 차이를 보였으나 향 및 맛에서는 차이를 주지 않았다. 조직의 형성면에서는 첨가시 반죽형성시간이 짧았으며 반죽의 안정도는 낮은 편이었다. 15℃ 저장성면에서는 일반세균수의 증가속도가 낮았으며 곰팡이의 발현도 1일정도 늦음을 알수 있었다. 저장중 관능적 변화는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다.

라. BL-1제재를 이용한 막걸리 및 tomato wine 제조

BL-1 제재를 이용하여 막걸리 제조시 잡균의 억제에 의한 알코올 생성 촉진효과를 비교하였다. 7일 발효후 관능적 차이를 보았으나 유의성이 없어 문제가 없었으며 에탄올 함량은 10^8 cfu/ml 첨가시 2%이상 높일 수 있었으며 도마도주의 경우 2.8%이상 수율을 높일수 있었다.

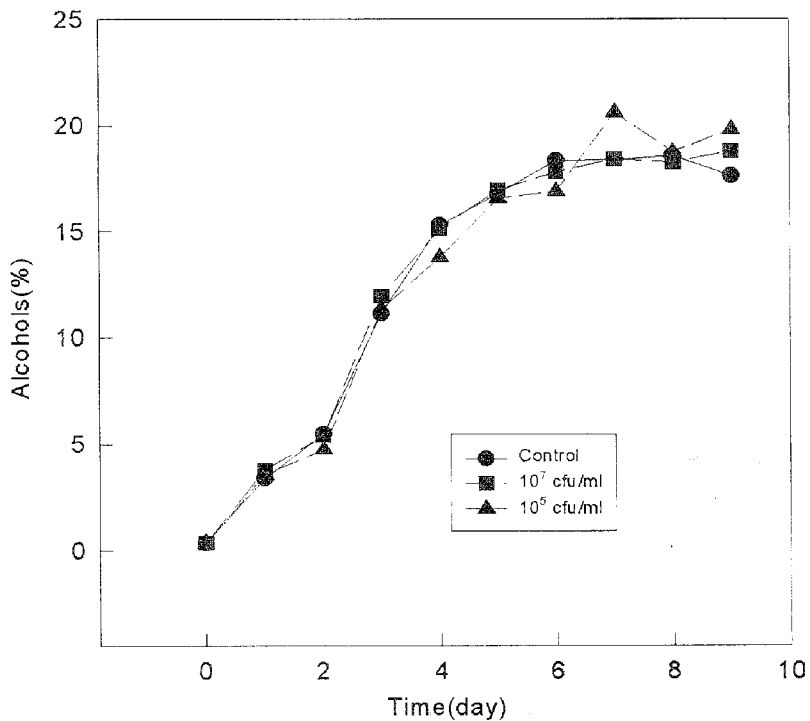


Fig. 9. Alcohol production during rice wine fermentation

마. BL-1제제를 이용한 포도주 및 토마토 wine 제조

BL-1 제제를 이용한 포도주 및 토마토주의 양조 시험을 실시한 결과 Fig 10 및 11과 같다. 즉 발효중 알코올함량의 증가를 유발할 수 있음을 알 수 있다. 한편 장류에 부패를 유발하는 균들에 억제현상을 보여주었다.

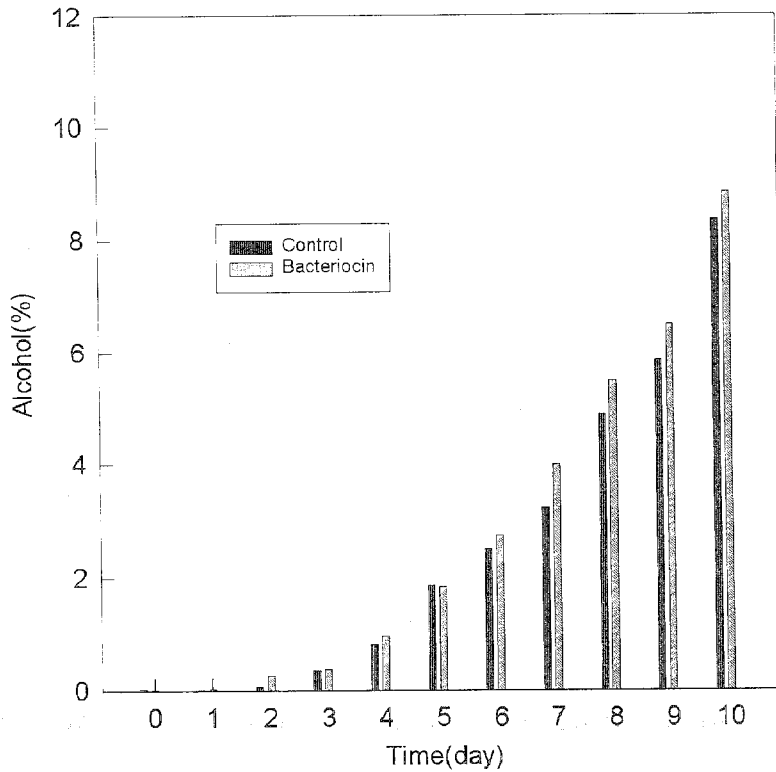


Fig. 10. Alcohol production during grape wine fermentation

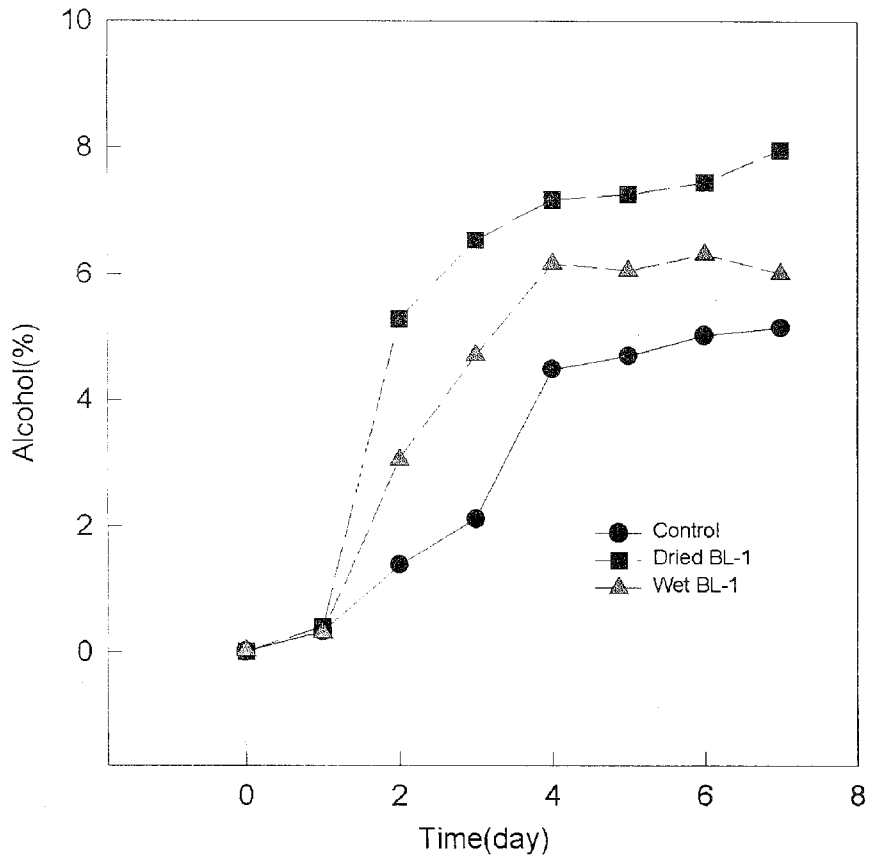


Fig. 11. Alcohol during fermentation in tomato wine

3. BL-1의 독성 시험

가. BL-1 조제품의 돌연 변이원성

Casein분해물 및 포도당을부터 발효 후 얻어진 항균물질의 돌연 변이원성을 조사하였다. 대상 균주로는 *Salmonella typhimurium* TA-98 및 TA-100을 사용하였다 이 때의 비교는 Blank와 BL-1처리구간의 Revertant의 숫자로 나타내었다. (Table 66)에서 보는 바와 같이 시료의 증가에 따른 Revertant의 변화가 없어 돌 변이적인 독성은 없을 것으로 판단되었다.

Table 66. Mutagenesis of *Salmonella typhimurium* by BL-1(Crude Powder)

Strain	Dose(microgram.plate)				
	0	50	100	200	300
TA 98	51	49	42	50	57
TA 100	123	138	146	134	125

나. BL-1조제품의 급성 경구독성 시험

위와 같이 제조한 BL-1 조 제품을 0.5%CMC(Showa Co. Ltd)에 현탁시켜 경구 투여 시험을 실시하였다. 실험 동물로는 SPF(Specific Pathogen Free) Mouse(6-7주령)을 구입하여 27±1℃, 습도 57±5%, 형광등 명암주기 12 hr cycle, 조도 300-600 Lux의 사육환경하에서 Polycarbonate (70W x 240L x 120H) Cage에서 사육하였다. 사료는 S사로부터 구입하였고 상수는 자유로이 공급하였다. 분양받은 후 1주일간의 순화 사육기간을 거쳐 육안으로 관찰하여 정상적인 동물만 시험에 공급하였다. 군 분리 방법은 순화교육을 거친 동물의 체중을 측정, 소정의 범위에 드는 동물을 무작위로 선택하여 배분하였고 각시험군의 식별은 Cage별 Tag시법으로 이용하였다. 시험 방법은 Dietrich Lorke의 Acute toxicity Method를 이용하여 각군에 3마리 또는 5마리씩을 배정하고 0.5% CMC용액에 현탁시킨 시험물질들을 10 ml/kg으로 mouse용 Jonde를 사용하여 경구 투여하여 dose-finding test를 실시하였고 LS₀와 LD₁₀₀ 사이를 5농도로 하고 한 군을 5마리 또는 10마리로 하여 경구 투여한 후 10일간 관찰하여 Litchfield와 Wilcoxon방법에 따라 PHARM/PCS software를 이용하여 결정하였다. 예비시험을 실시한 결과 초회 용량을 10, 100, 10,000 mg/kg의 기준으로 각군을 3 마리로 하여 시험한 결과 (Table 67) 와 같다.

Table 67. Preliminary test of toxicity test of BL-1 crude powder

Dose(mg/kg)	Period										Dead Animal	Lethality
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Test Animal	(%)
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3	0
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3	0

Table 67 에서 나타난 바와 같이 10, 100 mg/kg은 물론 최고 농도인 1,000mg/kg의 경우에도 전혀 사망예를 찾아볼 수 없었고, 투여 10일 후 부검하여 육안적인 해부학적 검토를 해본 결과, 간장(Liver), 비장(Spleen), 신장(Kidney)등의 중요 장기는 물론, 거의 해부학적으로 독성의 예를 관찰할 수 없었다. 또한 1차 예비시험 결과를 바탕으로 하여 Lorke method에 따른 용량계산법으로 2차 시험을 실시하였고 (Table 68) 에 나타내었다. 사용한 용량은 최고 5,000 mg/kg으로하고 2,900, 1,600 mg/kg으로 3개 용량으로 나누었으며 각 군은 5마리로 하였다.

Table 68. Secondary acute toxicity test of BL-1 crude powder

Dose(mg/kg)	Period										Dead Animal	Lethality
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Test Animal	(%)
1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	0
2,900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	0
5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	0

Table 68 에서 보는 바와 같이 1차 예비시험의 최고 용량보다 5배 증가 시킨 5,000 mg/kg에서도 사망의 예를 찾아볼 수 없었고 10일 후 해부하여 살펴본 결과 2,900 mg/kg group에서 약간의 비장(Spleen)의 비대가 관찰되었을 뿐 그 외의 동물에서는 10일 후에 해부하여도 육안적인 관찰을 시도한 결과 전 투여 군에서 신장, 간장, 비장을 포함한 주요 장기에서 거의 독성학적 유의차를 관찰할 수 없었다. 이상의 결과를 토대로 최대용량을 10,000 mg/kg으로 하여 경구 투여해 본 결과를 (Table 69)에 나타내었다. 경구 투여량을 10,000 mg/kg으로 하여 투여한 결과도 역시 독성을 나타낸 것이 없었다. 10일 후에 해부하여

육안적인 독성학적 관찰을 시도한 결과 간장, 신장, 비장등에는 물론 다른 주요 장기에서도 독성학적인 유의차를 관찰할 수 없었다. 이상의 결과를 토대로 판단하면 BL-1 Crude powder는 적어도 mouse 에서의 급성 경구 독성의 parameter인 LD₅₀은 10 g/kg 이상으로 사료되었다.

Table 69. Final acute toxicity test of BL-1 crude powder

Dose(mg/kg)	Period										Dead Animal	Lethality
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Test Animal	(%)
10,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	0

다. 실험 동물을 이용한 BL-1 원말의 아 급성 독성 시험(Subacute test)

미생물 유래 천연 항균 추출물인 BL-1의 원말 제제의 독성을 실험 동물 사료에 혼합하여 S.D rat를 대상으로 14일간 급여후 亞急性 毒性 유무를 관찰하였다.

삼육 실험동물 센터로 부터 3~4주령 S.D rat(♂) 50수를 구입하여 동물 사육실에서 온도 22±1℃, 습도 55±5%, 점등시간은 06:00~18:00의 사육 환경 하에서 polycarbonate cage에 2수씩 넣어 사육 하였다. 실험 사료는 AIN-76 purified diet(AIN,1977) 배합표를 기준으로 제조하였다.

1)시험 물질의 첨가 용량 및 시험사료 및 사육시험

이전 시험에서 본 시험 물질인 BL-1을 mouse를 대상으로 Acute toxicity method(Dietrich Lorke, 1983)에 의거 경구 투여한 결과 식품 첨가물로 개발 중인 BL-1의 mouse에서 급성 경구 독성의 지수인 LD₅₀은 10,000mg/kg 즉 10g/kg 이상으로 나타났다. 따라서 본 시험에서는 경구 투여대신 사료를 통한 독성 유무를 조사하기 위하여 4가지 다른 투여용량(0, 1, 2, 3, 4%)의 시료(검체)를 AIN-76 purified diet에 섞어 14일간 급여한 후 성장을, 임상화학적 및 병리 조직학적 검사를 실시하였다.

시험사료의 일반 성분은 Table 70과 같다.

Table 70. Composition of BL-1 diet for rats

Composition (%)	BL-1 level(%)				
	A(0)	B(1)	C(2)	D(3)	E(4)
Moisture	12.13±0.39	10.97±0.39	11.03±0.22	10.86±0.02	10.88±0.21
C.ash	2.64±0.12	2.69±0.16	2.65±0.06	2.68±0.07	2.72±0.11
C.protein	19.16±0.36	19.25±0.52	19.45±1.02	20.45±0.57	19.16±0.37
E . E	4.62±0.26	4.93±0.2	4.47±0.09	4.67±0.16	4.57±0.20
Energy (Cal/g)	3,538±44.5	3,624±73.1	3,606±53.3	3,521±98.5	3,686±147.6

측정 항목으로는 성장률, 사료 섭취량 및 음수량, 장기무게, Hematocrit치 및 Hemoglobin함량, 혈당량 및 혈중지질 함량, 기타 병리조직학적 소견을 수록하였다.

천연 추출 시험 물질인 BL-1 원말을 흰쥐 사료에 4가지 다른 용량으로 첨가하여 S.D rat에 2주간 급여한 결과는 (Table 71)과 같다. 일당 증체량의 경우 처리구간 유의한 차이는 없었다. 대조구인 A의 5.32g에 비해서 BL-3를 2%, 3%첨가한 C와 D는 각각 5.68g 및 5.59g으로 다소 높았다. 사료 섭취량은 대조구인 A가 다소 높았으며 음수량은 차이가 없었다.

Table 71. Effect of BL-1 diet on growth of rat

Index (n=10)	Level of B-1(%)				
	A(0)	B(1)	C(2)	D(3)	E(4)
BW(initial,g)	82.2±22.1	84.6±20.3	86.6±25.5	84.6±23.4	86.4±25.8
BW(final,g)	161.8±42.9	144.2±8.4	166.1±34.0	154.3±35.4	154.8±36.0
BW-gain(g) ¹	5.32±2.81	4.33±2.43	5.68±1.79	5.59±2.70	4.82±1.69
Diet fed ²	11.68±3.31	9.40±0.14	11.54±2.20	10.76±3.52	10.63±2.35
Water taken ³	14.7±4.2	13.6±0.2	15.1±2.8	14.8±2.3	14.8±3.3

1. g/day 2. g/day 3.mℓ/day, BW: body weight

한편 혈액을 대상으로한 임상 화학적인 측정 결과는 (Table 72)와 같다.

Table 72. Effect of BL-1 diet on the blood composition of rat

Items (n=10)	BL-1 level (%)					
	A(0)	B(1)	C(2)	D(3)	E(4)	
Hematocrit(%)	35.3±6.11 ^a	32.3±2.79 ^{ab}	32.8±3.17 ^{ab}	29.5±3.67 ^b	32.6±2.35 ^{ab}	
Hemoglobin(g/dl)	12.63±1.13	13.20±1.22	12.41±0.77	11.35±2.45	12.07±1.25	
Blood sugar(mg/dl)	118.0±10.0 ^a	92.7±14.4 ^{ab}	96.9±16.3 ^{ab}	102.9±33.6 ^{ab}	90.2±33.6 ^{ab}	
Blood fat* (mg/dl)	TG	56.2±16.9	53.4±14.8	46.3±14.2	46.6±15.0	54.9±9.0
	TC	93.8±9.6	106.6±25.6	94.2±25.2	102.9±19.0	116.4±24.7
	HDL	50.2±5.4 ^a	38.1±7.3 ^b	41.2±17.0 ^{ab}	43.0±10.1 ^{ab}	44.0±7.7 ^{ab}
	LDL	32.4±13.4 ^b	57.8±28.9 ^{ab}	41.1±36.7 ^{ab}	50.6±25.9 ^{ab}	61.4±18.0 ^a

Means with the same letters in the same line are not significantly different at the 5% level. TG : Triglyceride (중성 지질), TC : Total-cholesterol (총 콜레스테롤), HDL : High-density lipoprotein cholesterol (고밀도 지단백 콜레스테롤), LDL : Low-density lipoprotein cholesterol (저밀도 지단백 콜레스테롤)

Hematocrit(PCV)는 항응고제를 첨가한 전혈(whole blood)을 rpm을 증가시켜 gravity(g)를 증가시킨 microhematocrit법으로 짧은 시간내(5분이내) 원심 침전 시킨 후 전혈액(全血液)에 대해 다져진 적혈구의 용적을 %로 표시한 수치로서 본 시험에서는 처리구간 통계적인 유의성이 있었는데 BL-1을 3% 첨가한 D群이 29.5%로서 가장 낮았고 B, C 및 E군은 32.3~32.8%의 범위로 차이가 없었으며 대조군(A)은 35.3%로 나타났다.

대부분의 가축에서의 PCV는 38~45% 범위이고 평균 40%로 보고된 것과 비교해 볼 때 본 시험에서 나타난 PCV는 다소 낮은 것으로 보인다.

동물에 자극을 주면 혈구수와 PCV가 증가하고 따라서 혈액중의 Hemoglobin(Hb)량은 증가하는데 대부분의 건강한 표유 동물에서 Hb함량은 10~15g/100ml의 범위이다. 본 시험에서는 11.35~13.20g/100ml 범위로서 처리구간 차이가 없었으며 정상 범위내의 함량으로 나타났다.

혈액 중에 들어있는 탄수화물을 총칭하는 혈당(blood sugar)수준은 동물의 영양상태에 따라 달라지는데 대부분 건강한 동물체에서 혈당치는 각종 호르몬이 간장, 신장, 근육 등의 기

관에 작용하여 일정하게 유지된다. 대부분의 가축에서 80~120mg/100ml의 범위로서 본 시험에서는 대조군(A)이 118.0mg/100ml로 가장 높았고 BL-1을 4%첨가한 E군이 90.2mg/100ml로 가장 낮았다. 다른 세 처리 군은 각각 92.7, 96.9, 102.9mg/100ml로서 비슷한 혈당치를 나타내고 있다.

혈장중 지질 농도를 보면 Triglyceride(TG)는 46.3~56.2mg/100ml의 범위로 처리구간 차이가 없었고, Total-cholesterol(TC)역시 93.8~116.4mg/100ml의 범위로 처리구간 차이가 없었다. 흔히 좋은 콜레스테롤로 알려진 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)과 동맥경화를 비롯한 심혈관계 질환에 나쁜 영향을 미치는 것으로 알려진 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL)은 처리구간 통계적인 유의차가 있었는데 HDL-cholesterol은 대조군(A)이 50.2mg/100ml로 가장 높았고 BL-1을 1%첨가한 B군은 38.1mg/100ml로 가장 낮은 반면, LDL-cholesterol은 대조군(A)이 32.4mg/100ml로 가장 낮았고 BL-1을 4% 첨가한 E군이 61.4mg/100ml로 가장 높았다.

한편 도살된 흰쥐의 장기무게는 체중 100g당 무게로 환산하여 (Table 73)에 나타내었다. 간장은 처리구간 통계적인 유의차가 있었는데(P<0.05) 대조군(A)은 3.92g, B군은 3.07g로 각각 처리구간 가장 높고 가장 낮은 것으로 나타났다. 신장은 0.92~1.07g 범위로 처리구간 차이가 없었으며 정소 역시 처리구간 차이가 없었지만 대조군(A)이 0.87g으로 가장 낮았으며 BL-1처리구는 1.10~1.28g 범위로 차이가 없었다.

Table 73. Effect of BL-1 diet on the weight of intestinal organ

Organ	Level of BL-1(%)				
	A(0)	B(1)	C(2)	D(3)	E(4)
Liver	3.92±0.62 ^a	3.07±0.79 ^b	3.62±0.40 ^{ab}	3.89±0.66 ^a	3.59±1.02 ^{ab}
Kidney	1.07±0.20	1.00±0.21	0.98±0.04	1.04±0.16	0.92±0.10
Testis	0.87±0.32	1.28±0.37	1.10±0.08	1.14±0.17	1.16±0.16

Means with the same letters in the same line are not significantly different at the 5% level.

BL-1을 함유하는 식이를 투여하고 장기 검사 시험을 실시 하였다. 식품 보존 물질 대상인 BL-1 제재의 독성을 조사하기 위하여 Sprague Dawley Rat을 사용하여 14일간 급여하고 부검을 실시하였다. 부검시 육안 소견은 대조군을 비롯한 BL-1의 여러 농도 투여군 모두에서 특이한 병변을 관찰할 수 없었다.(Table 74.)

Table 74. Gross finding of the rats treated with BL-1

Group	BL-1(%)	No.	Lesion
A	0	5	NGL*
B	1	5	NGL
C	2	5	NGL
D	3	5	NGL

*No gross lesion

2) 병리조직학적 검사 결과

육안 검사 후 각 동물의 간, 신장 및 정소를 적출하여 10% 중성 포르말린에 고정하고 통상적인 병리 조직 제작 과정을 거쳐 H-E 염색을 실시한 후 병리 조직학적 검사를 실시하였다. 병리 조직학적 결과는 (Table 75)과 같으며 BL-1 4%를 투여한 E군의 한 개체에서 신장의 피질 부위의 세뇨관이 확장되어 낭포(Cyst) 모양을 형성한 부위가 인지되었고 BL-1 3%를 급여한 D군의 한 개체에서 간장의 지방변성(Fatty change)과 신장의 간질 부위에 만성 염증 세포의 침윤 및 세뇨관 확장에 의한 낭포(Cyst)형성이 국소적으로 인지되었다. 이 두 개체를 제외한 나머지 모든 동물에서 특이한 병변은 인지되지 않았다.

Table 75. Histopathological lesion of the rats treated with BL-1 for 14 days

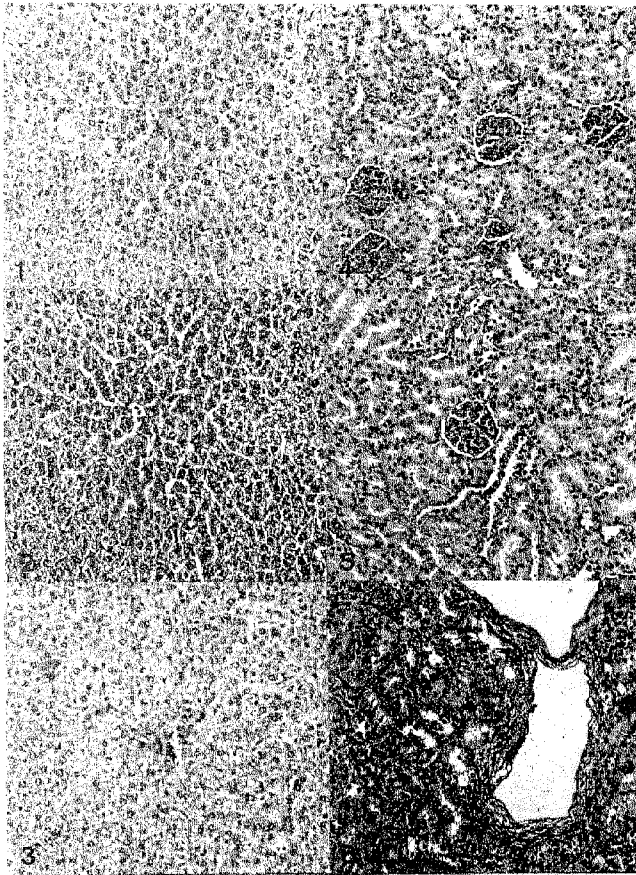
Group	A	B	C	D	E
Lesion					
BL-1	0	1	2	3	4
Head	5	5	5	5	5
Liver					
Fatty Change	0	0	0	1*	0
Kidney					
Cyst Formation	0	0	0	1*	1*

* Animal No. with pathological change

Fig. 12. Changes in organ of rats treated with BL-1

[Index]

1. Group A. 간장, 병변이 관찰되지 않았다. H&E, x200
2. Group B. 간장, 병변이 관찰되지 않았다. H&E, x200
3. Group D. 간장..중심정맥 주위에서 지방간이 관찰된다. H&E, x200
4. Group A. 신장. 병변이 관찰되지 않았다. H&E, x200
5. Group B. 신장. 병변이 관찰되지 않았다. H&E, x200
6. Group D. 신장. 신장에서 낭과 만성염 세포의 침윤이 관찰된다. H&E, x200



이와같은 결과로 볼 때 천연 추출물 BL-1을 식품첨가물로 이용하기 위한 전단계로서 S.D계통 흰쥐를 공시하여 아급성독성 유무를 확인하기 위하여 실험사료에 BL-1을 첨가하여 2주간 급여한 결과 성장율, 임상 혈액 화학적검사에서 대조군과 유의할 만한 차이가 없었으며 병리조직학적 검사에서도 특이한 병변은 나타나지 않았다.

제 2 절 결 론

식품보존제의 개발을 목적으로 *Lactococcus sp.* BL-1(KFCC 10790)이 분비하는 antimicrobial substances의 저렴한 생산을 위하여 발효 소재를 개발하였다. 우선 소재로서 탈지우유 및 국산 대두를 선정하였으며 분해용 효소로는 단백질 분해 효소를 이용하였다. 이용된 효소로는 곰팡이나 세균 유래의 protease를 사용하였으며 대상으로 Novo Co.의 Alcalase, Neutrase 와 Amano Co.의 protease F, M, A, N, S.이다. 이들 효소 중 우선 중성부근의 반응 최적을 가지는 Neutrase 와 protease A, N, S 효소를 이용하여 온도별 분해 시험을 한 결과(효소농도 0.6%), Neutrase는 45°C, protease A는 50°C, protease N은 60°C, protease S는 70°C가 적당한 반응온도로 나타났으며 반응시간을 18시간 유지한후 glucose 20g/l, yeast extract 5g/l, meat extract 8g/l 을 첨가한후 배양할 때 탈지우유 및 대두유에서 세포수 $10^9/ml$ 이상이었고 항균역가가 높히 나타났다. 0.6% protease N으로 처리한 탈지우유를 이용한 결과 0.8% meat extract, 2% glucose 과 0.5% yeast extract 첨가하였을때 세포수 $10^9/ml$ 이상이었고 항균력이 256 AU/ml으로 높게 나타났다. 또한 1.0% protease S으로 처리한 대두유를 이용한 결과 0.8% meat extract, 2% glucose 과 0.5% yeast extract 첨가하였을때 세포수 $10^9/ml$ 이상이었고 항균력이 extracellular과 total이 각각 128과 256 AU/ml으로 높게 나타났다. Na-alginate는 high viscosity, medium viscosity, low viscosity 이상 3종류로서 이들의 농도와 점도변화에 따른 결과를 보면 Low viscosity에서는 고정화 균체가 파괴되었으며, high viscosity 경우는 고정화 균체 제조가 어려웠고, medium viscosity에서는 고농도일 경우, 균체의 고정화에 많은 시간을 요하였다. Bacteriocin 생산에 있어 크게 영향을 미치지 않은 농도는 2% medium viscosity가 적당하였다. Ca-alginate에 의해 고정화된 균체가 bacteriocin 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, $CaCl_2$ 의 농도변화에 따른 활성변화는 없었으나, 고정화 균체의 파괴나 swelling의 변화가 적은 농도인 40mM로 선정하였다. Needle size 을 달리하여 고정화 균체 크기가 bacteriocin 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 활성변화는 없는 것으로 나타났다(Table 3). Ca-alginate에 고정화된 cell density을 10배, 5배, 1배, 1/10 배, 1/100배로 하여 bacteriocin 활성을 조사한 결과, bacteriocin 활성은 1배 ($1 \times 10^9 CFU/ml$) 나 1/10배 ($1 \times 10^8 CFU/ml$)에서 높게 나타났다. Cell/polymer suspension을 $CaCl_2$ 에 두는 시간의 변화에 따른 bacteriocin 활성은 1시간과 12시간에서 유지되었다. 교반 속도에 따른 bacteriocin 활성변화는 교반하지 않은 경우보다 교반한 쪽에서 활성이 높게 나타났으나 지나친 교반은 bead을 파괴할 수 있어 50rpm으로 선정하였다. 배양시 serum bottle을 이용한 경우 bead함량과 발효시간의 변화에 따른 고정화 균체의 활성화에 소요된 시간을 조사한 결과, 활성화 소요시간은 단축되었으며, 배지에 대한 bead함량은 1:2~1:9 비에서 활성을 나타내었. 이상과 같은 결과로부터 bacteriocin 생산을 위한 고정화 조건은 Na-alginate; 40mM, needle size; 25G, cell density; $10^9 CFU/ml$, gelling time; 1hour, agitation; 50rpm, bead/medium 비율; 1:2~1:9이었다. 토끼와 mouse, 항들연변이원성등을 통한 독성 시험에서 독성이 나타나지

않았으며 응용시험에서 알코올 발효시 생성 속도를 촉진 시키는 것으로 나타났다.

제 3 절 연구개발 결과의 활용 방안 및 건의

본 연구에서는 기존에 분리 선정했던 *Lactococcus* sp. BL-1(KFCC 10890)의 산업적 유용성 및 공정에 대하여 연구를 하였다. 국내에서 산업적으로 이용되는 라인을 통하여 가능성을 타진하여 만족할 만한 결과를 얻었다. 특히 저가의 발효 소재의 개발이 성공됨에 따라 국산화의 토대를 이루었다. 산업계의 접촉을 통하여 식품 및 향장산업에 이용 가능성을 보였다. 앞으로 본 제재류의 규제 완화로서 그 응용성을 높일 수 있다고 판단된다. 따라서 식품 첨가물로서의 등재와 같은 노력이 있어야 될 것이다.

제 5 장 참고 문헌

1. Anonymous, *International acceptance of Nisin as a food additive*, Aplin & Barrett Ltd. (1986)
2. Cheeseman, G.C. and Berridge, N.J., *Biochem. J.*, 71, 185-194(1959). Observations on the molecular weight and chemical composition of nisin
3. Chichester, D.F., and Tanner, Jr., F.W., in *Handbook of Food Additives*, Furia, T.E. (ed.), 2nd ed., CRC Press, 115-119(1972)
4. Davey, G.P., and Richardson, B.C., *Appl. Environ Microbiol.*, 41, 84-89(1981). Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346
5. El-Sadek, G.M., Mafmoud, S.A.Z. and Daywood, A.H.M., *Zbl. Bakt. Abt. II, Bd.*, 131, S, 285-290(1976). Effect of nisin on reducing the thermal process in commercially sterilized milk
6. Geis, A., Singh, J. and Teuber, M., *Appl. Environ Microbiol.*, 45(1) 205 - 211(1983)
Potential of lactic Streptococci to produce bacteriocin
7. Goel, M.C., Calbert, H.E. and Marth, E.H., *J. Milk Food Technol.*, 32, 312-318(1967)
Manufacture and keeping quality of low fat dairy spread
8. Gratia, A., *Comp Rend*, 93, 1040-1041(1925), Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille
9. Gross, E., and Morell, J. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 4634-4635(1971), The structure of nisin
10. Gupta, K.G., Sidhy, R. and Yadan, N.K., *J. Food Sci.*, 37, 971-972(1972). Effect of various sugars and their derivatives upon the germination of Bacillus spores in the presence of nisin
11. Heinemann, B., Voris, L. and Stumbo, C.R., *Food Technol.*, 19, 592-596(1965), Use of nisin in processing food products
12. Hirsch, A., *J. Gen. Microbiol.* 5, 208 - 221(1951), Various antibiotics from one strain of *Streptococcus lactis*
13. Hirsch, A., *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.*, 26(1946), Some general aspects of the inhibitory streptococci
14. Ivanovics, G., *Bacteriol. Review*, 26 108-118(1962), Bacteriocin and bacteriocin-like substances
15. Jarvis, B., Jeffcoat, J. and Cheeseman, G.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 168, 153-155 (1968), Molecular distribution of nisins
16. Jarvis, B., and Morisetti, M.D., *Intl. Biodeterioration Bulletin*, 5, 1448-1450(1969), Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin
17. Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrzanski, W.T., *J. Dairy Res.*, 45, 247-257(1978),

Lactostrepsin-acid bacteriocins produced by lactic streptococci

18. Mahmoud, S.A.Z., El-Sadak, G.M. and Daywood, A.H.M., *Zbl. Bakt. Abt. II, Bd.*, 131, S, 277-284(1976), Effect of nisin on prolonging the quality of pasteurized milk
19. Mattick, A.T.R., and Hirsch, A., *Lancet*, ii, 5-12(1947), Further observations on a nisin from lactic streptococci
20. Meanwell, L.J., *Proc. Soc. Agr. Bacteriol. Abstr.*, 19(1943), The influence of raw milk quality on slowness in cheese making
21. Oxford, A.E., *Biochem. J.*, 38, 178-182(1944), Diplococcin, an antibacterial protein elaborated by certain milk streptococci
22. Plate, C.A., Suit, J.L., Jetten, A.M. and Luria, S.E., *J. Biol. Chem.*, 249, 6138(1974), Effects of collicin K on mutant of *E. coli* deficient in Ca, Mg-activated ATPase
23. Reeves, P., in *Handbook of Microbiology*, Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A. (ed.), CRC Press, Vol. IV, 587-589(1974), Bacteriocins
25. Rogers, L.A., *J. Bacteriol.*, 16, 321-325(1928), The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*
26. Saito, H., Watanabe, T. and Tomioka, H., *Antimicrobial Agents Chemother.* 15, 504 - 509 (1979), Purification, properties and cytotoxic effect of bacteriocin from *Mycobacterium smegmatis*
27. Schaller, K., and Nomura, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 3989(1976), Collicin E2 is a DNA endonuclease
28. Senior, B.W., and Holland, I. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 959(1971)
29. Taggs, T. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L.W., *Bacteriol. Review*, 40 722-756(1976), Bacteriocins of gram positive bacteria
30. Tubb, R.S. and Ogden, K., *Europ. Patent Appl. EP* 0186498A2(1986), Use of nisin to prevent spoilage of alcoholic beverage
31. Whitehead, H.R., *Biochem. J.*, 27, 1793-1800(1933). A substance inhibiting bacterial growth produced by certain strains of lactic streptococci
32. Whitehead, H.R., and Riddet, W., *New Zealand J. of Agric.*, 46, 225-229(1933), Slow development of acidity in cheese manufacture
33. Park, Y. H. and D.H. Jo., *J. Kor. Agric Chem. Soc.* 29(2) 207-211(1986), Microbial Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from *Kimchi*
34. Park, Y. H., *J. Kor. Agric Chem. Soc.* 26(1) 35-40 (1983), Microbial Inhibition of Lactic strains isolated from *Kimchi*
35. Lee, S. H., Ph.D. Thesis(SNU) (1983), Studies on the antibiotic nisin produced by *Streptococcus lactis* IFO 12007
36. Chung, Y. G., Ahn, J. Y., Kwon, O. J. and Kang, J. H., *Kor. J. Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.* 17(2)94-99(1989), Properties of a *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin
37. Kim, K. C., Yuk, C. S. and Do, D. H., *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 18(1)98-102(1990), Molecular cloning of bacteriocin gene and biological control of plant
38. Yoo, J. Y., Lee, I. S., Chung, K. S. and Nam, Y. J., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19(1)8-13(1991), Isolation and properties of bacteriocin-producing microorganisms
39. Choi, S. Y., Lee, S. H., Lee, I. S., Yoo, J. Y., Chung, K. S. and Koo, Y. J., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19(3)209-214(1991), Purification and properties of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. 1112-1
40. Yoo J. Y., *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17(5)504-509(1989), Process kinetics of nisin production in batch and continuous culture
41. Yoo, J. Y., Lee, I. S., Chung, K. S., Choi, S.Y., Koo, Y. J. and Kwon, D. J., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20(2)183-189(1992). Cultural conditions of *Lactococcus* sp. 1112-1 for production of bacteriocin-like substance
42. Chung, Y. K., Ahn., J.Y., Kwon, O.J. and Kang J.H. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17(2) 94-99(1989). Properties of a *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin.
43. Kim, K. C., Yuk, C.S. and Do, D. H., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18(1) 98-102(1990). Molecular cloning of bacteriocin gene and biological control of plant pathogen.
44. Kim, W. J., Ha, D.M. and Ray, B., *J. Microbiol. Biotechnol.* 1(2) 96-101(1991). Characteristics of bacteriocin and mucin production phenotypes in *Lactobacillus plantarum* 27.
45. Kim, W. J., Ha, D. M. and Ray, B., *J. Microbiol. Biotechnol.* 1(3) 169-175(1991). Plasmid lineage of bacteriocin production and sucrose fermentation phenotypes in *Pediococcus acidilactoci* M.
46. Choi, S. Y., Lee, S.H., Lee, I. S., Yoo, J. Y., Chung, K. S. and Koo, Y. J., *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 19(3) 209-214(1991)., Purification and properties of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. 1112-1.
47. Yoo, J. Y., *J. Microbiol. Biotechnol.* 2(4)284-287(1992)., Production of lactococcal bacteriocin using repeated-batch and continuous cultures.
48. Lee, J. H. and Chang, H. I., *Proceeding of ASAM*, Spring, p196, 1992, Studies on the isolation, identification and the bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*.
49. Yoon, S.S., Choi, H.J. and Yu, J.H., *Proceeding of ASAMB*, Spring, p198, 1994, Production of a novel bacteriocin, Leuconocin LHJ2 from *Leuconostoc* sp.
50. Oh, S. J., Lee, S. J., Kim, S.K., Baik, Y. J. and Park, Y. H., *Proceeding of ASAMB*,

- Spring, p212, 1994, Optimizing conditions for the growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. HY 449 using response surface methodology.
51. Lee, J. H. and Chang, H. I., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22(1) 7-12(1994), Studies on the isolation, identification and the bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*.
52. Kim, S.K., Lee, S.J., Baek, Y.J. and Park, Y.H., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22(3) 259-265(1994). Isolation of bacteriocin-producing *Lactococcus* sp. HY 449 and its antimicrobial characteristics.
53. Ha, D.M., Cha, D.S. and Han, S.G., *J. Microbiol. Biotechnol.* 4(4)305-315(1994). Identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from *Kimchi* and partial characterization of their bacteriocin
54. Ha, D. M. and Cha, D.S., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22(5) 550-556(1994). Novel starter culture for *Kimchi*, using bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strain.
55. Cha, D.S. and Ha, D.M., *J. Microbiol. Biotechnol.* 6(4)270-277(1996). Isolation of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* DU-0608 with antimicrobial activity from *Kimchi* and characterization of its bacteria
56. Kim, S. K., Lee, S. J., Baek, Y.J. and Park, Y.H., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22(3) 266-270(1994). Mode of action of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 against *Lactobacillus fermentum* IFO 3023.
57. Kim, S. K., Oh, S.J., Lee, S. J., Baek, Y. J. and Park, Y. H., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22(5) 522-530(1994). Optimizing conditions for the growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. HY 449 using response surface methodology.
58. Cho, J.S., Chung. S. J., Kim, Y. M. and Chun, U. H., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22(6) 700-706(1994). Detection of the bacteriocin from lactic acid bacteria involved in *Kimchi* fermentation.
59. Jo, Y. B., Bae, K. M., Kim, S. K. and Jun, H. K., *J. Microbiol. Biotechnol.* 6(1) 63-67(1996). Evaluation of optimum conditions for bacteriocin production from *Lactobacillus* sp. JB-42 isolated from *Kimchi*.
60. Jeong H. S. and Ahn C., *RAB*, 248(1996). Protease-activated bacteriocin production by a lactic acid bacterium isolated from *Kimchi*.
61. Rhee, H. J., Joo, Y. J., Park, B. K., Park, C. S., Kim, S. H., Ahn, J. S. and Mheen, T. I., *RAB*, 250(1996). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus* sp. H559 isolated from *Kimchi*
62. Choi, H. J., Lee, H. S., Oh, D. H. and Yoon, S. S., *RAB* 254(1996). Partial purification and cloning of Leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconocin* J, a bacteriocin

produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from *Kimchi*

63. Cho, Y. I., Jo, Y. B., Kim, S. K. and Jun, H. K., *Proceeding, of fall symposium of KSAMB* 329(1996). Bacteriocin production by *Lactococcus* sp. J-C3 isolated from *Kimchi*.
64. Jeong, H. S., Ko, S. H., Lee, J.S., Yoo, J. S. and Ahn, C., *Proceeding, of fall symposium. of KSAMB* 350(1996). Bacteriocin production by a lactic acid bacterium isolated from traditionally fermented *meju*,
65. Ko, S. H., Kim, J. E. and Ahn, C., *Proceeding of fall symposium of KSAMB* 350(1996). Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* CA23806 isolated from white *Kimchi*.
66. Shin, J. Y., Kim, J. E. and Ahn, C., *Proceeding, of fall symposium. of KSAMB* 350(1996). Characterization of bacteriocin production by a lactic acid bacterium LAB 311-3 isolated from *Kimchi*.
67. Jeong, H. S., Ko, S. H., Lee, J. S., Yoo, J. Y. and Ahn, C., *Proceeding, of fall symposium. of KSAMB* 351(1996) Antibiosis of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented *meju*.
68. Lee, H. J., Joo, Y. J., Park, B. K., Park, C. S., Hwang, I. K., Kim, S. H., Ahn, J. S. and Mheen, *Proceeding, of fall symposium. of KSAMB* 351(1996). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. H-559 isolated from *Kimchi*.
69. Bae, S. S. and Ahn, C., *J. Food Sci. Nutr.*, 2(2) 109-120(1997). Antibiosis and bacteriocin production of lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*.
70. Shin, J. E. and Ahn, C., *J. Food Sci. Nutr.*, 2(2) 101-108(1997). Characterization of bacteriocin production by *Lactococcus lactis* LAB3113 isolated from *Kimchi*.
71. Cheigh, C. I., Choi, H. J., Pyun, Y. R., Kim, T. S. and Ye, I. H., *Proceeding of Spring symposium* of KSFST 151(1998). Effect of growth condition on the production of a bacteriocin, Lactococcin A164, by *Lactococcus lactis* A164.
72. Kang, K. J., Cho, J. I. and Choi, B. H., *Proceeding of Spring symposium of KSFST* 153(1998). Retardation of aflatoxin formation by antagonistic microorganism
73. Park, B. K., Lee, H. J., Ju, Y. J., Lee, J. Y., Park, C. S., Oh, M. J., Ahn, J. S. and Mheen, J. S., *Proceeding of Spring symposium of KSFST* 155(1998). Characterization of bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. AP-839 isolated from *Kimchi*.
74. Ko, S. H., Yoo, J. Y. and Ahn, C., *Proceeding of Spring symposium of KSFST* 160(1998). Purification and characterization of Lactococcin K2386.
75. Lee, K. H., Kim, W. S., Lee, B. C. and Paik, H. D., *Proceeding of Spring symposium of KSFST*, 161(1998). Identification and partial characterization of polyfermenticin, a bacteriocin produced by *Bacillus polyfermenticus* SCD.
76. Kim, H. J., Cho, S. M., Ha, J. W. and Paik, H. D., *Proceeding of Spring symposium*

- of KSFST161(1998). Inhibition of pathogenic bacteria by useful bacteriocin.
77. Hur, J. W., Hyun, H. H., Pyun, Y. R., Yeo, I. H. and Paik, H. D., *Proceeding of Spring symposium of KSAM*, 339(1998). Identification and partial purification of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp, lactis* BH5.
78. Kim, K. Y. and Yoo, J. Y., *Proceeding of Spring symposium of KSAM*, 339(1998). Immobilization of KFCC 10790 for bacteriocin production.
79. Park, E. H., Paik, H. D., Kim, T. S. and Paik, H. D., *Proceeding of Spring symposium of KSAM*, 338(1998). Isolation and characterization of microorganism producing bacteriocin
80. Lee, N. K., Lee, S. C., Hwang, Y. I. and Paik, H. D., *Proceeding of Spring symposium of KSAM*, 338(1998). Identification and partial characterization of a bacteriocin produced by lab islate NK24 isolated from a commercial fish fermented product.
81. Cho, Y. I., Cu, J. K., Baek, H. S. and Jun, H. K., *Proceeding of Spring symposium of KSAM*, 313(1998). Purification and characterization of enterocin J-C1, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* JCl.
82. Park, K. Y., Lee, E. J. and Kim, S. K., *Proceeding of Spring symposium of KSAM*, 338(1998). Isolation and partial purification of bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* SE1 isolated from *Kimchi*.
83. Chung, K. S., Yang, E. S., Lee, K. J., Ko, H. J. and Chung, K. S., *Proceeding of Spring symposium of KSAM*, 365(1998). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*.
84. Kim, C. H., Bae, E. Y. and Ahn, C., *Proceeding of Spring symposium of KSAM*, 359(1998). Bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* isolated from fermented flatfish
85. Choi, H. J., Cheigh, C. I. and Pyun, Y. R., *Proceeding of Spring symposium of KSAM*, 357(1998). Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis subsp. lactis* isolated from *Kimchi*.
86. Choi, H. J. and Pyun, Y. R., *Proceeding of Spring symposium of KSAM*, 357(1998). Identification of dorminant lactic acid bacteria in early stage of *Kimchi* fermentation.
87. Ryu, H. J., Chung, C. H. and Kyung, K.H., *Food Sci. Biotechnol.* 7(3)205-208(1998). Evaluation of nisin as a preservative to prevent over-acidification.
88. Kang, D. H. and Fung, D. Y. C., *Food Sci. Biotechnol.* 7(3) 172-176(1998). Isolation and characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocin active against *Listeria monocytogenes* with microtiter plate method.

전통식품 유래 미생물자원으로부터
식품보존물질 탐색 연구(협동과제-1)

Development of Food Preservatives from Microbial
Resources in the Traditional Foods

1998. 12. 20

협동연구책임자: 안 철
연 구 원: 정희순
고석현
신종연
김진응
김영신

강 원 대 학 교
Kangweon National University

여 백

제 출 문

한국식품개발연구원장 귀하

본 보고서를 “국산 천연자원으로부터 신기능 식품보존물질 개발 연구” 과제
(세부과제 “전통식품 유래 미생물자원으로부터 식품보존물질 탐색 연구”)의
최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 안 철

연 구 원 : 정희순

고석현

신종연

김진웅

김영신

여 백

요 약 문

I. 제 목:

전통식품 유래 미생물자원으로부터 식품보존물질의 탐색 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성:

본 연구의 최종 목표는, 식품의 자연성을 훼손하지 않으면서도 효율적으로 식품의 변패와 유해균의 번식을 제어함으로써 식품의 보존성과 유통성을 증진시킬 수 있는 첨단기술의 천연 항균성 분자소재인 박테리오신을 한국 고유의 전통식품자원으로부터 분리, 정제하여 이를 식품산업에서 이용할 수 있는 제제로 개발함에 있으며, 이러한 한국 고유의 전통식품으로부터의 새로운 박테리오신의 탐색 및 개발은 이들을 산업적 규모로 생산하는 기술의 개발과 이 분야에 있어서의 세계시장에서의 경쟁력 획득에 매우 중요한 기술적 기반이 될 것으로 판단된다.

III. 연구개발 내용 및 범위:

위의 연구개발목표를 달성시키기 위해 본 연구는 3년차 연구로 시행되었다. 각 연도별 연구개발목표 및 세부 연구내용은 다음과 같다.

- 제1차년도 연구개발 목표: 전통식품자원으로부터의 박테리오신 생산균주의 분리 및 동정
 1. 전통식품자원의 선정 및 최적 선별 배지의 탐색
 2. 박테리오신 생산균주의 분리
 3. 분리 박테리오신 생산균주의 동정
- 2차년도 연구개발목표: 생산 박테리오신 및 균주의 산업적 유용특성의 규명
 4. 분리 박테리오신의 산업적 유용성 분석
 5. 유용 박테리오신의 정제
- 3차년도연구개발 목표: 박테리오신을 이용한 식품보존제 및 발효조질제의 개발
 6. 유용 박테리오신의 유전특성 규명
 7. 유용 박테리오신 생산균주 개량
 8. 시제품 개발

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의:

상기의 연구 계획에 의거 항목별로 수행된 연구 결과는 다음과 같다.

1. 전통식품자원의 선정 및 최적 선별 배지의 탐색

· 연구대상 전통 농수산물/축산 식품자원으로서 다양한 젖산균 microfora가 반영될 수 있도록 전통적 방법에 의해 제조, 발효되는 식품群을 대상으로 하여

- 전통적 방법에 의해 제조·숙성된 일반 민가의 겨울 김장 김치 및 물김치,
- 전통적 방법에 의해 제조된 일반 민가의 보통 김치(김장용이 아닌 일반 김치),
- 전통적 방법에 의해 제조·숙성된 일반 민가의 깍두기,
- 재래적 방법에 의해 제조된 식해(食醃 젓갈),
- 일반 낙농가에서 채취된 살균전의 우유를 선정, 이를 미생물 자원으로 이용하였다.

· 최적 선별 배지로는 젖산균 일반의 분리 및 항생성 실험, 박테리오신 생산균주의 선별에 있어서는 MRS 배지가, 젖산균의 屬別 분리에 있어서는 Modified LBS(*Lactobacillus*), M17 with BCP(*Lactococcus*), LUSM(*Leuconostoc*), Modified Enterococcus 배지(*Pediococcus*), CTAS(*Carnobacterium*) 등이 효율적이었다.

2. 박테리오신 생산균주의 분리

· 대상식품 6종 중 5종으로부터 총 2,412균주의 젖산균을 성공적으로 분리하였으며, 이들의 항균성 범주를 대표적 피검균 6종에 대해 조사한 결과 다양한 유효성을 보였고, 총 821개의 균주가 *Lactobacillus delbrueckii* NCK235에 대해 유효 항생성(effective antibiosis)를 보였다.

· 이들 821개 균주의 배양액 및 배양액의 ammonium sulfate precipitate(90% saturation cut)를 최종농도 1 mg/ml의 pronase 또는 trypsin으로 처리하여 그 활성의 소실 유무를 조사한 결과 protease 처리에 의해 활성을 상실하는 박테리오신으로 판단된 균주는 총 147균주로서 이들 중 75균주가 강력한 저해환을 보였으며 나머지 72균주는 약한 활성을 보였다.

· 위의 147균주와 그 박테리오신에 대해 동일 indicator들에 대한 lactacin F, leucocin A, lacto-coccin A/B/M, carnobacteriocin A/B, nisin 등 주요 既知의 박테

리오신의 항균활성 특성 및 범주와 비교 분석하고 해당 활성의 강도(intensity)를 참조하여 차후 산업화가 용이하고 그 유효도가 높을 것으로 판단되는 3종의 박테리오신 생산균주를 다음과 같이 최종 선정하였다.

- strain LAB 238-6 (물김치)
- strain LAB 311-3 (깍두기)
- strain LAB 461-2 (김치)

3. 분리 박테리오신 생산균주의 동정

· 상기의 3균주를 생리특성 및 BioMerieux 분석시스템에 의해 동정한 결과는 다음과 같다.

Food resources	Strain selected	Strain identified as	Bacteriocin named as	Presentation at
물김치	LAB 238-6	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	Lactococcin K2386	미국미생물학회 보고 (97. 5. 4) 산업미생물학회 보고 (98. 5. 30)
깍두기	LAB 311-3	<i>Lactococcus lactis</i>	Lactococcin K3113	Journal of Food Science and Nutrition 2:10 1-108
일반김치	LAB 461-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricin K4612	산업미생물학회 보고 (97. 4. 25)

4. 분리 박테리오신의 산업적 유용성 분석

· 위의 3 종류의 박테리오신의 최적 생산 조건을 분석한 결과, lactococcin K2386 및 K3113, plantaricin K4612 공히 최적 pH는 7.0이었으나, 배양온도는 lactococcin K2386 및 plantaricin K4612는 37C에서, lactococcin K3113은 25C에서 최대 생산량을 보였다.

· 각 박테리오신의 산업적 유용성 효소 및 pH, 열, 산업용매 별로 실험한 결과, 3 종류의 박테리오신 모두 protease 외의 모든 효소에 대해 안정하였으며, pH에 대해서는 lactococcin K2386은 불안정한 반면 lactococcin K3113과 plantaricin K4612는 그 활성이 영향을 받지 아니 하였다. 열에 대해서는 lactococcin K2386과 K3113는 안정한 반면 plantaricin K4612는 매우 불안정하였다. 용매에 대해서도 lactococcin K2386과 K3113는 안정한 반면 plantaricin K4612는 불안정한 반응을 보였다.

5. 유용 박테리오신의 정제

· 각 박테리오신을 CM-cellulose column chromatography 및 Gel filtration column chromatography에 의하여 정제하였다. lactococcin K2386 및 K3113을 정제한 결과, lactococcin K2386의 분자량은 8,100 dalton으로, lactococcin K3113의 분자량은 10,500 dalton으로 분석되었다.

6. 유용 박테리오신의 유전특성 규명

· acridine orange를 이용, optimal condition 보다 고온(45C for *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LAB238-6, 37C for *Lactococcus lactis* LAB311-3)에서 연속 3회 계대 배양한 후 그 희석액을 MRS 배지에 평판도말하여 indicator strain으로 박테리오신 생산능에 대한 변이균주를 탐색하고 그 plasmid profile을 조사하여 박테리오신 생산 유전인자의 소재를 추적한 결과,

· *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LAB238-6의 경우에는 50kb residential plasmid가 curing 된 변이주를 찾았으나, bacteriocin 생산에는 변화가 없음을 확인하였다. 따라서 lactococcin KCA2386의 생산관련 유전자는 chromosome 존재하는 것으로 판단되었다.

· *Lactococcus lactis* LAB311-3의 경우, 3.7kb, 11.2kb, 15.5kb, 48kb 등 4개의 residential plasmid가 존재하고 있는 바 상기의 방법에 의해 박테리오신 생산 변이주를 탐색한 결과 15.5kb의 plasmid가 소실될 경우 박테리오신 생산능도 동시에 소실됨을 확인하였으며, 따라서 lactococcin K3113의 생산은 15.5kb plasmid에 의해 이루어 짐을 규명하였다.

· 현재까지 보고된 박테리오신 중 *Listeria monocytogenes*에 활성을 가진 class II bacteriocin molecule의 아미노산 서열 분석 결과는 Fig. 5에 요약된 바와 같이 그 아미노 말단 부위에 consensus sequence로 Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Gly의 listeria-active consensus motif를 소유하고 있는 바, 이들 consensus sequence는 아미노 말단에서 β -turn 구조를 형성함으로써 구조적으로 중요한 기능을 하고 있는 것으로 판단된다. 따라서 lactococcin K2386 및 K3113 공히 listeria-active class II bacteriocin임을 이용하여 probe를 제작하고 이를 이용하여 PCR에서 lactococcin K2386 유전자의 직접 cloning 및 sequencing을 시행하였다.

7. 유용 박테리오신 생산균주 개량

· Lactococcin K2386의 생산균주인 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LAB238-6를 Acridine orange로 처리하여 56.4 Kb residential plasmid를 상실한 plasmid-free mutant를 제작하였다 이 mutant는 lactococcin의 생산에는 변화가 없는 바 추후 다른 박테리오신 유전자의 도입에 의한 super-producer 제작에 유용한 자원으로 사

용될 예정이다.

· Lactococcin K3113의 생산균주인 *Lactococcus lactis* LAB311-3을 acridine orange로 처리하여 15.4 kb residential plasmid가 상실된 bacteriocin-negative mutant를 제작하였다. 이 mutant는 lactococcin의 cloning 및 다른 박테리오신 유전자의 도입에 의해 새로운 표현형질의 박테리오신 생산균주를 제작할 수 있는 유전자원이 될 것으로 판단된다.

8. 시제품 개발

· 본 연구과제에서 진행된 연구 결과를 세 박테리오신에 대해 요약하면 Table 6과 같다. 이에 의거, 각 박테리오신을 2l fermenter에 의해 발효시킨 후 이를 배양액과 균체로 분리하여 동결 건조 후 분말화하여 제제화 하였다.

Bacteriocin studied	Industrial applicability	calibration of optimal production	Molecular stability	Purification	location of genes
Lactococcin K2386	broad	37C, pH7.0	excellent	partially purified	chromosome
Lactococcin K3113	very specific	25C, pH7.0	excellent	partially purified	plasmid
Plantaricin K4612	narrow	37C, pH7.0	medium	partially purified	n.d.

1. 연구된 분자/우전속성 중 일부만 요약하였음. 세부사항은 최종 보고서 본문 내용 참조 요망

2. n.d., not determined

9. 연구결과의 활용 방안 건의

· 본 연구과제에 의해 개발된 3종의 새로운 박테리오신은 한국의 대표적 전통식품인 김치, 깍두기 및 물김치 등으로부터 분리된 것으로서 본 연구과제의 수행에 의해 그 생산 균주의 동정, 박테리오신의 부분정제 및 산업적, 유전적 특성 등이 학문적, 기술적 지평에서 종합적으로 조사되었다. 따라서 이들 자료를 국내 식품산업계에 공개하여 각 식품별, 산업현장별 수요에 맞는 박테리오신을 식품보존제로서 산업화 생산할 수 있도록 활용할 수 있으며, 사료산업계에서는 사료의 보존성을 높이는 첨가제로서 활용할 수 있고, 식품포장업계에서는 이를 항균포장재의 주성분으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

SUMMARY

I. Title of the research:

Screening of food preservatives from traditional food-originated microbial resources

II. Objectives and importance of the research:

The objectives of the research is development and characterization of bacteriocins from traditional Korean foods which may serve as natural food preservatives and which can protect foods from spoilage microflora without damaging naturalness of the food itself.

III. Scope of the research

This research comprised 8 research steps within 3 years.

- 1st year of the research: isolation and identification of bacteriocin-producing strains from traditional foods
 1. Selection of the target traditional foods and optimal media
 2. Isolation of bacteriocin producers
 3. Identification of the producer strains
- 2nd year of the research: characterization of bacteriocins and their industrial usefulness
 4. Evaluation of industrial usefulness of the bacteriocins
 5. Purification of the bacteriocins
 6. Genetic characterization of the bacteriocins
- 3rd year of the research: Development of the food preservatives using bacteriocins
 7. Improvement of the producer strain
 8. Production of sample starters

IV. Results and recommendations

1. Selection of the target traditional foods and optimal media

· Groups of traditionally prepared Korean food which had been selected as resource samples of this research were as follows;

- Traditionally prepared winter kimchi and mul-kimchi
- Traditionally prepared non-winter kimchi
- Traditionally prepared Kakduki
- Traditionally prepared Sikhae
- Farm milks before heat treatment

· Optimal selection media used for this study were as follows; MRS for lactic acid bacteria in general, modified LBS for *Lactobacillus*, M17 with BCP for *Lactococcus*, LUSM for *Leuconostoc*, modified Enterococcus media for *Pediococcus*, CTAS for *Carnobacterium*.

2. Isolation of bacteriocin producers

· 2,412 strains of lactic acid bacteria were isolated from resource foods. Among them, 821 strains exhibited effective antibiosis against 6 indicator strains.

· Based upon sensitivity to protease treatment on the ammonium sulfate precipitate of the culture broth, 147 strains among the 821 strains were confirmed as bacteriocin producers.

· After evaluation of antibacterial spectrum and effectiveness of inhibition, 3 producer strains were finally selected as best bacteriocin producers. The strains are as follows;

- strain LAB 238-6 from mul-kimchi
- strain LAB 311-3 from Kakduki
- strain LAB 461-2 from non-winter kimchi

3. Identification of the producer strains

Results of identification on the selected 3 strains were summarized in the following table.

Food resources	Strain selected	Strain identified as	Bacteriocin named as	Presentation at
Mul-kimchi	LAB 238-6	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	Lactococcin K2386	Annual Meeting of American Society for Microbiology (Miami, 97. 5. 4) Korean Society of Applied Microbiology (98. 5. 30)
Kakduki	LAB 311-3	<i>Lactococcus lactis</i>	Lactococcin K3113	Journal of Food Science and Nutrition 2:101-108
Non-winter kimchi	LAB 461-2	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i>	Plantaricin K4612	Korean Society of Applied Microbiology (97. 4. 25)

4. Evaluation of industrial usefulness of the bacteriocins

· Optimal pH of bacteriocin production were 7.0 for all the 3 strains. Optimal temperature, however, were different each other, 37C for *Lactococcus lactis* spp. *lactis* LAB 238-6 and *Lactobacillus plantarum* LAB 461-2, and 25C for *Lactococcus lactis* LAB 311-3.

· Bacteriocins from the 3 strains were not digested by hydrolytic enzymes except proteases. Lactococcin K3113 and plantaricin K4612 were stable over pH changes, while lactococcin K2386 was unstable over pH changes. As for stability over heat treatment and solvent treatment, lactococcin K2386 and K3113 were very stable, while plantaricin K4612 was not.

5. Purification of the bacteriocins

Bacteriocins were purified by CM-cellulose column chromatography and gel filtration column chromatography. Molecular weight of purified lactococcin K2386 and K3113 were calibrated as 8,100 dalton and 10,500 dalton, respectively, on SDS-PAGE.

6. Genetic characterization of the bacteriocins

· Genetic determinants of lactococcin K2386 were localized on the chromosome because plasmidless mutant obtained by acridine orange-induced curing showed no change in bacteriocin production.

· Genetic determinants of lactococcin K3113, however, were localized on the residential 15.5-kb plasmid because loss of the plasmid coincided with the loss of bacteriocin production.

· DNA probe for cloning and direct sequencing of the bacteriocin genes were prepared from the consensus listeria-active motif Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Gly. However, there have been no PCR products from DNA preparations of lactococcin K2386 and K3113 by the probe.

7. Improvement of the producer strain

· Plasmidless mutant which lost 56.4-kb residential plasmid was developed for the use of recipient strain for super bacteriocin producer.

· Bacteriocin-negative strain of *Lactococcus lactis* LAB311-3 was prepared by acridine treatment, and developed as host strain for the selection of transformants of bacteriocin genes.

8. Production of sample starters

Characteristics of bacteriocins studied in this research were summarized in the following table. Sample starter cultures were prepared by fermentation of each producer strains in 2 liter of MRS broth with subsequent collection of cells and freeze drying.

Bacteriocin studied	Industrial applicability	calibration of optimal production	Molecular stability	Purification	location of genes
Lactococcin K2386	broad	37C, pH7.0	excellent	partially purified	chromosome
Lactococcin K3113	very specific	25C, pH7.0	excellent	partially purified	plasmid
Plantaricin K4612	narrow	37C, pH7.0	medium	partially purified	n.d.*

* n.d., not determined

9. Recommendations

Methodological approaches and research results developed in this study will be directly applied to food and feed industry as preservatives. They can be used as antibacterial component of biofilms for food packaging.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	133
1. Perspectives of the research	133
2. Objectives of the research	134
3. Contents and scope of the research	136
Chapter 2. Current tendency of the research	138
Chapter 3. Methods and results	140
1. Methods	140
2. Results	145
1) Selection of the target traditional foods and optimal media	145
2) Isolation of bacteriocin producers	147
3) Identification of the producer strains	166
4) Evaluation of industrial usefulness of the bacteriocins	170
5) Purification of the bacteriocins	187
6) Genetic characterizatio of the bzcteriocins	196
7) Improvement of the producer strain	197
8) Production of sample starters	198
Chapter 4. Achievements and contributions	204
1. Evaluation criteria on the research achievements	204
2. Research achievements	205
3. Contributions	207
Chapter 5. Applications	209
Appendix Table 1	210

목 차

제 1 장 서 론	133
제1절 연구개발의 배경 및 필요성	133
제2절 연구개발의 목적 및 중요성	134
제3절 연구개발 내용 및 범위	136
제 2 장 국내외 기술개발 현황	138
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	140
제1절 연구내용 및 방법	140
제2절 연구결과	145
1. 전통식품자원의 선정 및 최적 선별 배지의 탐색	145
2. 박테리오신 생산균주의 분리	147
3. 분리 박테리오신 생산균주의 동정	166
4. 분리 박테리오신의 산업적 유용성 분석	170
5. 유용 박테리오신의 정제	187
6. 유용 박테리오신의 유전특성 규명	196
7. 유용 박테리오 생산균주 개량	197
8. 시제품 개발	198
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	204
제1절 연구개발목표 및 평가의 착안점	204
제2절 연구개발 목표의 달성도	205
제3절 대외 기여도	207
제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획	209
부 록 표 1	210

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 배경 및 필요성

최근 구미 각국의 식품산업의 동향은 소비시장의 새로운 성향, 즉 식품의 안정성(safety)과 자연성(naturality)에 대한 소비자들의 급증하는 요구에 민감하게 반응하고 있다. 이는 기존의 화학적 식품첨가제의 유해성과 가열살균 등에 의한 식품의 영양성의 파괴 등이 학문적으로 규명되고 정론화됨에 따라 소비자들이 화학적 첨가제가 사용되지 않은 식품(chemical-preservative-free food)과 가공적이면 덜 가공된 식품(less-processed food)을 선호하게 된 때문이다. 그러나 이러한 추세는 식품의 소량 생산 및 즉각적 소비를 전제로 하는 소규모 식품산업에는 적절하나, 대량 생산과 장기간의 유통 구조를 근간으로 하고 있는 기존의 식품산업계로서는 매우 충격적인 변화로서 이에 따라 현재 구미 각국의 식품산업계는,

- 1) 식품의 자연성을 훼손하지 않으면서
- 2) 항균성이 뛰어나 식품의 유해균 및 변패균을 효과적으로 제어하여 식품의 보존성 및 유통성을 증진시킬 수 있고
- 3) 인체내에서 분해되어 무잔류성, 무독성이며
- 4) 산업적인 필요에 따라 언제든지 분자의 조작(manipulation)이 가능한

새로운 식품보존제를 개발하기 위하여 많은 노력을 경주하고 있는 바, 그 유력한 분자소재로 박테리오신(bacteriocin)을 주목하고 이에 대해 집중적인 연구를 하고 있다.

이러한 박테리오신은 미생물이 생산하는 천연의 항균성 단백질(antibacterial polypeptide)로서, 그 항균성이 우수할 뿐만 아니라 분자가 단백질로 이루어져 있는 덕분에 인체내에서 즉시 분해되므로 무독성이고 무잔류성이며, 기존의 항생제와는 달리 자신의 유전자로부터 직접 생합성(ribosomally translated from its own gene)되는 것이 특징인 바, 따라서 유전공학적인 방법에 의한 분자 변환이 용이하고 그 결과 다양한 산업적 소요(所要)에 효율적으로 부응할 수 있다는 장점 등이 이를 새로운 식품보존제 분자소재로서 최적의 후보물질로 간주되게 하고 있다.

특히 식품의 자연성과 관련하여, 이들 박테리오신 생산균주의 대부분이 인류가 지난 수천년간 주식으로 사용해 왔던 식품의 발효 및 숙성에 주요 역할을 담당하고

있는 젓산균임이 밝혀짐에 따라 현재 구미 각국은 자신의 고유 식품群으로부터 새로운 박테리오신 생산 젓산균을 발견하기 위해 경쟁적 연구를 하고 있는 실정인 바, 이는 WTO 체제하에 이미 세계적으로 식품 시장이 개방된 현재 새로운 식품보존제 물질특허의 선점은 곧 세계시장의 선점을 의미하기 때문인 것으로 사료된다.

이에 본 연구는 한국이 세계적으로 가장 풍부한 발효식품群을 보유하고 있음에 착안, 우리의 전통 발효식품群이야말로 현재 세계적으로 식품산업계의 주요 관심의 대상이 되고 있는 새로운 젓산균 박테리오신의 보고(寶庫)임을 확신하고, 이를 과학적·체계적으로 탐색, 분리하며 그중 산업적으로 유용하다고 판단되는 박테리오신을 선별하여 이를 새로운 식품보존제로 산업화하는 연구를 계획, 시행하였다.

제2절 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구의 최종 목적은, 식품의 자연성을 훼손하지 않으면서도 효율적으로 식품의 변패와 유해균의 번식을 제어함으로써 식품의 보존성과 유통성을 증진시킬 수 있는 첨단 천연 항균성 분자소재인 박테리오신을 한국 고유의 전통식품자원으로부터 분리, 정제하여 이를 식품산업에서 이용할 수 있는 제제로 개발함에 있다.

前述한 바와 같이 박테리오신은 천연 항균단백질로서 인체내에서의 무독성, 무잔류성 및 그 항균성의 선택적 특이성으로 인해 새로운 천연의 생물학적 보존제(biopreservative) 내지 새로운 생물학적 제어제(bioregulator)로서 기존의 식품첨가제 등을 효율적으로 대체할 수 있는 분자소재로 이미 선진제국의 식품산업계의 첨예한 연구 경쟁의 대상이 되고 있는 바, 그 탐색 및 응용기술은 구미에 비해 월등히 풍부한 발효식품자원을 갖고 있는 한국적 상황에서 산업적으로 매우 유용한 기술 자원이 될 것으로 분석된다.

그러나 여러 식품의 미생물자원으로부터의 박테리오신을 탐색하고 동정하는 기술은 가장 기본적인 기술이면서도 동시에 가장 난이도가 높은 핵심 기술로서 각 식품 특유의 환경과 목적균주의 특성에 따른 배지 선정의 어려움, 피검균(indicator) 선정의 합리성, 활성 유무 판단시의 경험적 요소, 생산된 항균성 물질이 박테리오신임(authenticity of bacteriocinogenicity)을 증명하는데 필요한 과정의 복잡성, 고체 혹은 액체 배지에서의 생산성의 변화, 생산의 향상성과 최적성의 유지 등 많은 변수

가 존재하며, 또한 박테리오신 생산균주의 동정 기술 역시 기초생리학적 접근 기술 외에 첨단인 분자동정(molecular identification)기술 등과 각 연구실의 knowhow가 조합되어야 하는 복합적 기술이다. 따라서 이러한 기초 첨단기술의 개발과 축적은 새로운 물질소재의 선점을 통한 세계 시장에서의 적극적 접근이라는 측면에서 산업적으로 중요하며, 이에 본 연구의 기술적 필요성이 있다고 판단되었다.

특히 박테리오신의 분자적 특성, 즉 그 구조유전자(structural gene)으로부터 직접 생합성(transcription-translation)됨에 근거하여, 현재까지 가능한 모든 첨단의 분자공학(molecular technology)과 유전공학(genetic technology)의 방법론이 적용될 수 있다는 점을 고려할 때 한국 전통식품 미생물자원에서부터의 박테리오신 탐색 및 이의 산업적 응용 연구는 그 기술적 수요의 방대함과 기술적 잠재력의 지대함에 비추어 한국 식품 산업에 주요한 기술자원이 될 것으로 예측된다.

상기의 기술적 측면 외에 본 연구의 시의적 당위성은 새로운 물질소재로서의 박테리오신이 갖는 산업·경제적 요소로서, 현재 세계의 농수산 및 낙농·축산 식품시장이 WTO체제로 개방·운영되게됨에 따른 발효시장의 방대성을 감안할 때 새로운 천연성 식품보존제의 선도적 개발이 초래할 경제적 이득은 심히 다대할 것으로 예상되며, 특히 한국 특유의 풍부한 발효식품자원 및 그 당연한 결과로서의 미생물자원의 풍부함과 특유성을 고려할 때 어떠한 분자소재보다도 성공적 개발의 가능성이 높은 것으로 사료된다.

따라서 본 연구의 최종 목표는, 前述한 바와 같이 식품의 자연성을 훼손하지 않으면서도 효율적으로 식품의 변패와 유해균의 번식을 제어함으로써 식품의 보존성과 유통성을 증진시킬 수 있는 첨단의 천연 항균성 분자소재인 박테리오신을 한국 고유의 전통식품자원에서부터 분리, 정제하여 이를 식품산업에서 이용할 수 있는 제제로 개발함에 있는 바, 이러한 한국 고유의 전통식품으로부터의 새로운 박테리오신의 탐색 및 개발은 이들을 산업적 규모로 생산하는 기술의 개발 및 이 분야에 있어서의 세계시장에서의 경쟁력 획득에 매우 중요한 기술적 기반이 될 것으로 판단된다.

제3절 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 연구내용 및 범위를 연구연차별로 요약하면 다음과 같다.

○ 제1차년도 연구개발 목표: 전통식품자원으로부터의 박테리오신 생산균주의 분리 및 동정

1. 전통식품자원의 선정 및 최적 선별 배지의 탐색
 - 대상 농·수산/ 축산식품의 선정
 - 최적선별배지의 탐색 및 표준화
2. 박테리오신 생산균주의 분리
 - 식품별 既知 박테리오신 생산균주의 탐색
 - 식품별 新박테리오신 생산균주의 탐색 및 분리
 - 일반 indicator에 의한 분리
 - 유해 indicator에 의한 분리
3. 분리 박테리오신 생산균주의 동정
 - 기초생리특성의 검색
 - 분자생리학적 특성의 검색
 - 유전생리학적 특성의 검색

○ 2차년도 연구개발목표: 생산 박테리오신 및 균주의 산업적 유용특성의 규명

4. 분리 박테리오신의 산업적 유용성 분석
 - 식품별 microflora와의 길항성
 - 식품별 발효/숙성 관련 역할
 - 유해균과의 길항성 규명
 - 생산 최적 조건 탐색
 - 균주의 안정성 분석
 - 박테리오신 분자 안정성 분석
5. 유용 박테리오신의 정제
 - 식품별 유용 박테리오신의 정제
 - 정제 분자의 분자특성 규명
 - 아미노말단 서열분석

○ 3차년도연구개발 목표: 박테리오신을 이용한 식품보존제 및 발효조절제의 개발

6. 유용 박테리오신의 유전특성 규명

- 유용 박테리오신 유전자 클로닝
- 염기서열의 결정
- 유전자 구조분석
- 유전자 표현구조 분석
유용 박테리오신 유전자 클로닝

7. 유용 박테리오신 생산균주 개량

- 고표현주의 제작
- 새로운 표현 벡터의 개발
- Food-grade 벡터의 개발
- Super-producer의 제작

8. 시제품 개발

- 분말성 보존제의 제작
- 생균발효제어제의 제작

제 2 장 국내외 기술개발 현황

최근 국내외의 박테리오신 관련 논문은 주로 새로운 박테리오신의 발견, 그 구조 및 작용기작의 규명, 정제, 산업적 응용, 유전자 표현 기작의 규명 및 그 조절에 관한 것으로 大別할 수 있는 바 현재까지의 박테리오신 관련 연구보고 내용을 종합하면 박테리오신 생산 현상은 이미 미생물 일반의 현상일 뿐만 아니라(Jack, R.W., *et al.*, Microbiological Reviews 59:171-200, 1995) 사람과 같은 고등세포에서도 분비되는(Harder, J., *et al.*, Nature 387:861-862, 1997) 생명세포 일반의 항균기작(generalized antibacterial mechanism in the living cells)으로 인식되고 있다.

따라서 세계 식품산업을 선도하는 국가들의 연구진은 自國의 전통식품群으로부터 새로운 박테리오신의 탐색 및 개발에 연구력을 집중하고 있는 바, 캐나다 연구진에 의한 Bean-sprout로부터의 nisin 생산균주의 분리(Cai, Y., *et al.*, Journal of Applied Microbiology 83:499-507, 1997), 노르웨이 및 스페인의 연구진에 의한 fermented green olive juice로부터의 enterocin P 및 I 생산균주의 분리(Cintas L.M., *et al.*, Applied and Environmental Microbiology 63:4321-4330, 1997, Floriano B., *et al.*, Applied and Environmental Microbiology 64:4883-4890, 1998), 일본 발효식품으로부터 two-component bacteriocin 생산균주의 분리(Tahara T.T. and K. Kanatani, Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61:884-886, 1997) 등 自國 外의 연구진이 접근하기 힘든 고유의식품群으로부터 광범위한 항균력을 갖고 있는 기존의 nisin에 버금가는 박테리오신의 개발과 이의 분자 특성연구에 연구력을 집중하고 있는 실정이다.

이러한 새로운 박테리오신의 탐색과 더불어 이들 및 기존의 박테리오신을 식품 환경에 적응하여 식품보존제로서의 가능성을 개발하고 이를 산업적 현실성에 맞도록 응용하고자 하는 연구도 병행되고 있다. 유제품에 있어서는 냉장우유의 보존성 증진을 위해 박테리오신 생산 젖산균과 lactoperoxidase system의 상승 효과를 이용하여 *Listeria monocytogenes*의 생육을 성공적으로 억제할 수 있음이 보고되었으며(Rodriguez, E., *et al.*, Journal of Applied Microbiology 83:389-395, 1997), 독일에서는 soft cheese의 *Listeria*류의 성장을 박테리오신 생산능력이 있는 *Brevibacterium*을 이용하여 성공적으로 저해하기도 하였다(Eppert, I., *et al.*, Applied and Environmental Microbiolog 63:4812-4817, 1997). 이외에도 cheese에 있어서는 nisin 혹은 enterocin 등을 이용한 *Listeria monocytogenes*의 저해 성공에

가 보고되어 천연식품보존제로서의 박테리오신을 이용한 대규모 응용법의 개발이 목전에 있는 것으로 판단된다.

유제품 외의 식품에 있어서 박테리오신의 응용성 개발은 구미 각국의 식생활 특성상 가장 천연상태의 보존이 어려운 식품 중의 하나로 지적되어 온 식육(fresh meat or packaged meat)으로서 주로 nisin을 주 박테리오신으로 하여 여기에 다른 박테리오신을 같이 사용하거나 다른 유기산을 첨가하여 사용하는 방법을 이용하였다. 한 연구에서는 nisin과 pediocin을 병행하여 식육 중의 *Listeria monocytogenes*를 성공적으로 퇴치하였으며(Ming, X., et al., Journal of Food Science 62:413-415, 1997), nisin과 sorbic acid(Avery, S.M. and S. Buncic, Journal of Food Protection 60:1075-1080, 1997), nisin과 sodium citrate/sodium lactate(Scannell, A.G.M., et al., Journal of Applied Microbiology 83:407-412, 1997)의 병용에 의해 각각 packaged beef와 fresh porj sausage의 보존기간을 연장시킬 수 있음이 보고되었다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 연구내용 및 방법

본 연구는 3차년도에 걸쳐 8단계의 세부연구로 이루어져 진행되었으며 각 단계별 연구내용 및 연구방법을 요약하면 다음과 같다.

1. 전통식품자원의 선정 및 최적 선별 배지의 탐색

① 대상 식품의 선정: 연구대상 전통 농수산/축산 식품자원으로서는, 연구목표인 천연식품보존제의 식품내 응용을 전제로 GRAS(generally regarded as safe) 균주로 분류되고 있을 뿐만 아니라 다양한 박테리옌을 생산하는 것으로 알려진 젖산균 microfora가 다양하게 반영될 수 있도록 전통적 방법에 의해 제조되어 젖산 발효에 의해 숙성되는 식품群을 대상으로 선정하였다.

② 최적선별배지의 탐색 및 표준화: 일차적으로 박테리옌을 생산하는 젖산균을 선택적으로 대량 분리하기 위한 배지를 기존의 MRS/APT/BHA 등의 배지를 이용·선별하고, 이들 젖산균 중 항생성(antibiosis)을 보이는 균주를 신속·정확하게 대량으로 분리할 수 있는 배지를 선정하며, 이들 중 박테리옌 생산균주를 확정짓기 위한 최적 배지를 탐색하고, 이들의 屬(genera)을 선택적으로 구분하기 위한 배지를 선별하기 위하여 여러 가지 배지와 배양조건을 검토하였다.

2. 박테리옌 생산균주의 분리

① 항생성(antibiosis) 보유 젖산균주의 분리: 上記의 최적선별배지(MRS)를 이용, 최적 선별조건 (25C/37C/pH7.0)에서 대량으로 젖산균총을 분리한 후 tooth-pick를 이용, 무작위로 각 2개의 master plate를 만든 후 이중 1개를 다시 6개로 replica-plating하여 *Lactobacillus delbrueckii* NCK235, *Lactobacillus curvatus* CA170-12, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*을 각각 1% 함유한 soft agar로

overlay한 후, 각각 25C와 37C에서 배양, 저해환(clear zone) 형성 유무로 1차적 항생성을 파악하였다.

② 박테리오신 생산균주의 분리: 항생성을 보인 균주의 배양액 및 배양액의 ammonium sulfate precipitate를 pronase 또는 trypsin으로 처리하여 그 활성의 소실 유무로 항생성 원인 물질의 박테리오신임을 확인하였다.

③ 박테리오신 항생성 범주(antibacterial spectrum)의 확인: 박테리오신 생산균주로 확인된 젖산균주들에 대해 12종의 그람양성균 및 3종의 그람 음성균에 대한 항생성을 각각 deferred method와 spot-on-the-lawn method로 조사하여 유용성 여부를 판단하였다.

④ 既知 또는 新 박테리오신의 판별 및 유망 박테리오신 생산균주의 선정: 上記의 실험에서 사용된 indicator에 대한 既知의 박테리오신의 활성 특성을 비교 분석하였으며, 그 활성 판별에 의거, 기존의 박테리오신과 구분되며 활성이 우수한 박테리오신 생산균주를 최종적으로 선별하였다.

3. 분리 박테리오신 생산균주의 동정

선별된 박테리오신 생산균주에 대해 다음의 3종류의 방법을 사용, 종합적·입체적인 동정을 행하였다.

① 기초생리특성 검색: 선별된 박테리오신 생산균주에 대해 형태학적 특성(microscopic morphology, gram test), 배양학적 특성(온도, 내염성, pH 영향), 대사생리학적 특성(gas formation, ammonia formation 등)에 대해 검색하였다.

② 분자생리학적 특성의 검색: 선별된 박테리오신 생산균주에 대해 효소학적 특성(catalase test, VP test, oxidase test) 및 발효생리학적 특성(fermentation profile)을 조사하였다.

③ 유전생리학적 특성의 검색: 선별된 박테리오신 생산균주에 대해 plasmid profile을 규명하여 既知의 생산菌種과 비교 검색함. 변이주 제작에 의한 cured mutant의

유전적 생리특성을 비교 검색하여 박테리오신 생산의 유전적 특성을 함께 규명, 동정 참조자료로 활용하였다.

4. 분리 박테리오신의 산업적 유용성 분석

① 식품별 microflora와의 길항성: 1차년도에 선발된 3균주의 배양액으로부터 조제한 crude bacteriocin에 대해 10종의 젓산균 및 8종의 식품유해균과의 상호길항성을 조사하였다. 上記의 3균주외에 김치 기원의 광범위 박테리오신생산균주로 판단된 LAB184-2, 184-6, 185-3, 185-11 균주에 대해서도 deferred test, supernatant test, ammonium sulfate-precipitate test를 행하였다.

② 유해균과의 길항성 규명: Lactococcin KCA2386, K3113, Plantaricin KCA4612에 대해 산업 현장에서 분리한 식품유해균 9종(gram-positive 2종, gram-negative 7종)과의 상호길항성을 조사하였다.

③ 생산 최적 조건 탐색: *Lactococcus lactis* spp *lactis* LAB238-6, *Lactococcus lactis* LAB311-3 및 *Lactobacillus plantarum* LAB461-2의 박테리오신 생산 최적 조건을 각각 배양 온도(15C, 25C, 37C) 및 pH(4.0, 5.0, 6.0, 7.0)에 대해 실험하였다.

④ 균주의 안정성 분석: 박테리오신 생산균주의 생산성의 항일성을 시험하기 위해 상기의 최적 조건하에서 세 균주를 연속 10회 계대하며 박테리오신 생산성(AU/ml of culture supernatant) 및 plasmid pattern을 관찰하였다.

⑤ 박테리오신 분자 안정성 분석: *Lactococcus lactis* spp *lactis* LAB238-6, *Lactococcus lactis* LAB311-3 및 *Lactobacillus plantarum* LAB461-2의 상등액으로부터 조제한 crude bacteriocin에 대해 단백질가수분해효소 등의 hydrolytic enzyme, pH, 열, 유기용매에의 안정성을 실험하였다.

5. 유용 박테리오신의 정제

① Column 의 선택: Lactococcin KCA2386을 정제하기 위하여 우선 batch adsorption(pH4, 5, 6, 7, 8, 9)을 하여 적절한 column을 선택한 후 CM-cellulose와

DEAE-cellulose를 가지고 pH를 맞춰준 다음 bacteriocin과 30분 동안 반응시킨 후 원심분리하여 그 상등액의 activity를 조사하였다.

② Column chromatography: Batch adsorption 결과 확인된 bacteriocin의 cation 성질을 이용하여 0.01M pH8 Tris-Cl buffer에서 CM-cellulose를 이용 chromatography를 시행하였다.

③ One-step purification by ethanol treatment: Bacteriocin 배양액을 ethanol 10%에서 90%까지의 농도로 처리하여 3시간동안 반응시킨 다음 원심분리하여 supernatant 와 protein pellet의 activity를 측정하고, protein pellet의 OD를 측정하여 정제도를 조사하였다.

6. 유용 박테리오신의 유전특성 규명

① 박테리오신 유전자의 소재 규명: acridine orange를 이용, optimal condition 보다 고온에서 연속 3회 계대 배양한 후 그 희석액을 MRS 배지에 평판도말하여 indicator strain으로 박테리오신 생산능에 대한 변이균주를 탐색하고 그 plasmid profile을 조사하여 박테리오신 생산 유전인자의 소재를 추적하였다.

② 박테리오신 유전자의 클로닝: Lactococcal replication origin을 소지하고 있는 rolling circle mode 의 vector pGKV210의 EcoRI site에 lactococcin K3113 의 15.5kb bac-plasmid의 EcoRI digest를 shotgun cloning하여 *bac⁻ Lactococcus lactis* KCA3113N 균주에 electrotransformation하였다.

③ 염기서열의 결정 및 유전자 구조분석, 유전자 표현구조 분석: lactococcin K3113 의 15.5kb bac-plasmid를 gel로부터 분리하고 이를 random primer에 의해 증폭한 후 직접 염기서열을 결정하였다.

7. 유용 박테리오신 생산균주 개량

① plasmid-free mutant 제작: Lactococcin KCA2386의 생산균주인 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LAB238-6를 Acridine orange로 처리하여 56.4 Kb residential

plasmid를 상실한 plasmid-free mutant를 제작하였다.

② Bacteriocin-negative mutant의 제작: Lactococcin KCA3113의 생산균주인 *Lactococcus lactis* LAB311-3을 acridine orange로 처리하여 15.4 kb residential plasmid가 상실된 bacteriocin-negative mutant를 제작하였다.

8. 시제품 개발

본 연구과제에서 개발되어 최종적으로 유용 박테리오신으로 선정된 Lactococcin K2386, Lactococcin K3113 및 Plantaricin K4612 등 세 박테리오신에 대해 각 박테리오신을 2ℓ fermenter에 의해 발효시킨 후 이를 배양액과 균체로 분리하여 동결 건조 후 분말화하여 제제화 하였다.

제2절 연구결과

1. 전통식품자원의 선정 및 최적 선별 배지의 탐색

가. 연구대상 전통식품자원의 선정

연구대상 전통 농수산/축산 식품자원으로서는 다양한 젖산균 microfora가 반영될 수 있도록 전통적 방법에 의해 제조, 발효되는 식품群을 대상으로 하여

- 전통적 방법에 의해 제조·숙성된 일반 민가의 겨울 김장 김치 및 물김치,
- 전통적 방법에 의해 제조된 일반 민가의 보통 김치(김장용이 아닌 일반 김치),
- 전통적 방법에 의해 제조·숙성된 일반 민가의 깍두기,
- 재래적 방법에 의해 제조된 식해(食醃 젓갈),
- 일반 낙농가에서 채취된 살균전의 우유를 선정,

이를 미생물 자원으로 이용하였다.

나. 최적 선별 배지의 탐색 및 표준화

일차적으로 박테리오신을 생산하는 젖산균을 선택적으로 분리하고, 이들 젖산균 중 항생성(antibiosis)을 보이는 균주를 분리하며, 이들 중 박테리오신 생산균주를 확정짓기 위한 최적 배지를 탐색하고, 이들의 屬(genera)을 선택적으로 구분하기 위한 배지를 선별하기 위하여 여러 가지 배지와 배양조건을 검토한 결과,

- 젖산균 일반의 분리 및 항생성 실험, 박테리오신 생산균주의 선별에 있어서는 MRS 배지가 가장 효율적이었고
- 젖산균의 屬別 분리에 있어서의 효율성 및 정확성 판단을 위해 既知의 젖산균 *Lactobacillus acidophilus* NCK88, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc gelidum* UAL187, *Pediococcus acidilactici*, *Carnobacterium divergenes* 등을 기준으로하여 기존의 여러 선택배지를 조사한 결과
- *Lactobacillus*: Modified LBS가 BPB(bromophenol blue)를 첨가한 MRS 배지(MRS with BPB)보다 효율적이었으며
- *Lactococcus*: M17 with BCP(bromocresol purple)의 선택성이 우수하였고

- *Leuconostoc*: LUSM과 MRS with BPB가 PES(phenylethyl sucrose) 배지보다 월등한 선택성을 보였으며
- *Pediococcus*: Modified Enterococcus 배지(with or without TTC)가 MRS에 NaCl을 첨가한 배지(MRS with NaCl)보다 선택성에 있어 효율적이었고
- *Enterococcus*: modified Enterococcus 배지가 가장 효율적이었으며,
- *Carnobacterium*: CTAS(cresol red acetate sucrose) 배지가 시도되었으나, *Enterococcus*와의 변별이 불가능을 확인하였다.

2. 박테리오신 생산균주의 분리

분리 결과 요약

'96. 1.부터 上記 1항의 식품자원으로부터 채취된 시료에 대해 上記 2항의 최적배지를 이용, 박테리오신 생산균주의 광범위한 탐색 작업을 시행한 결과는 Table 1에 요약된 바와 같이

- 대상식품 6種중 5種으로부터 성공적으로 총 2,412균주를 개별 분리하였으며
- 대상식품 중 일반 낙농가로부터 수거한 살균전 우유로부터의 미생물 분리는 유동성균의 밀집(motile bacteria/mold) 현상으로 인해 대상에서 제외하였다.
- 분리된 균주 중 고체배지에서 *Lactobacillus delbrueckii* NCK235에 대해 유효 항생성(effective antibiosis)을 보인 균주 821 균주를 선별하였으며, 다시 이들 중 박테리오신 생산성 보유주를 체계적으로 분별하여 최종적으로 147株의 박테리오신 생산균주를 성공적으로 분리하였다.
- 따라서 분석된 2,412균주 중 34.0%가 타균주에 대해 한종류 이상의 항생성 기작(antibiosis mechanism)을 소유하고 있는 것으로 판단되며,
- 이중 17.9%가 그 항생성기작으로 박테리오신을 생산하는 것으로 판단되었다.
- 이들 박테리오신 생산균주 147株에 대해 식품유해균에 대한 길항성을 조사, 가장 유망한 박테리오신으로 판단되는 3균주를 1차적으로 선별하여 이들을 각각 균주동정 및 생산 박테리오신의 기초 분자 특성연구 대상으로 확정하였다.

Table 1. 전통식품 유래 젖산균의 분리 및 박테리오신 생산 젖산균주의 검색 결과 요약

Food resources	lactic acid bacteria isolated ¹	effective against NCK235 ²	bacteriocin producers ³		
			strong	weak	Sum total
김장 김치	600	126(21)	3	25	28
일반 김치	492	88(7)	7	15	22
물김치	240	14(1)	1	-	1
깍두기	600	279(4)	46	21	67
식혜	480	314(44)	18	11	29
sum total	2,412	821(77)	75	72	147

1. MRS 배지에서 분리된 젖산균 중 박테리오신 생산능력 검증을 위해 무작위적으로 선별한 젖산균주의 수.
2. MRS agar 배지에서 *Lactobacillus delbrueckii* NCK235에 대해 항생성 물질을 생산하는 젖산균의 수 (performed by deferred methods). 괄호 안의 숫자는 clear zone이 매우 현저한 균주의 숫자임.
3. 항생성물질을 생산하는 균주 중 protease 처리에 의해 그 항생성이 소실되는 단백질 항생물질, 즉 박테리오신을 분비하는 균주의 수. 각 균주의 상등액을 ammonium sulfate로 90% saturation cut까지 침전시킨 후 bacteriocin activity를 측정하여 다시 protease로 처리한 것임. strong bacteriocin과 weak bacteriocin의 구분은 clear zone의 크기, 생산량에 의한 객관적 판단과 경계구분의 명확성 등 경험적 판단이 모두 반영된 것임

가. 항생성(antibiosis) 보유 젖산균주의 분리

최적선별배지(MRS)를 이용, 최적 선별조건(25C/37C/pH7.0)에서 대량으로 젖산균 총을 분리하고 tooth-pick를 이용, 이들 중 무작위로 선별한 2,412 균에 대해 각 2개의 master plate를 만든 후 이중 1개를 다시 6개의 MRS agar plate에 replica-plating하여 *Lactobacillus delbrueckii* NCK235, *Lactobacillus curvatus* CA170-12, *Listeria monocytogenes* ATCC1911, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis* ATCC19433, *E. faecium* ATCC11576을 각각 1% 함유한 soft agar로 overlay한 후, 각각 25C와 37C에서 배양, 저해환(clear zone) 형성능을 조사한 결과, 이들 2,412 균주의 각 indicator strain에 대한 저해능의 분포는 Table 2와 같으며, 각 균주별 세부 저해능 분포는 Appendix Table 1에 수록하였

다.

Table 2. 전통식품 유래 미생물의 항생성 분포

Indicator strain 식품	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NCK235	<i>Lactobacillus curvatus</i> CA170-12	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC1911	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC11576	합계
김장김치	126	12	344	343	134	111	1,070
일반김치	88	3	0	0	0	0	91
물김치	14	1	1	1	1	1	19
각두기	279	7	520	535	337	163	1,841
식해	314	0	415	391	284	268	1,672
합계	821	23	1,280	1,270	756	543	4,693

나. 박테리옌 생산균주의 분리

Table 2 및 Appedix Table 1에 요약된 바 *Lactobacillus delbrueckii* NCK235에 대해 항생성을 보인 928균주의 배양액 및 배양액의 ammonium sulfate precipitate(90% saturation cut)를 최종농도 1 mg/ml의 pronase 또는 trypsin으로 처리하여 그 활성의 소실 유무를 조사한 결과는 Table 3과 같다. *Lactobacillus delbrueckii* NCK235에 대해 항생성을 보인 928균주 중 protease 처리에 의해 활성을 상실하는 박테리옌으로 판단된 균주는 총 147균주로서 이들 중 75균주가 강력한 저해환을 보였으며 나머지 72균주는 약한 활성을 보였다. *Lactobacillus curvatus* CA170-12를 indicator로 한 실험 결과는 Table 3에 제시된 바와 같이 그 변별력이 저조하였다.

다. 박테리옌 항생성 범주(antibacterial spectrum)의 확인

박테리옌 생산균주로 확인된 젖산균주들의 antibacterial spectrum을 조사하기 위

해 15種의 indicator(그람양성균 12種 및 그람음성균 3種)에 대한 항생성을 각각 solid surface상에서 (deferred method)와 배양액의 ammonium sulfate precipitate(resuspended in phosphate buffer/pH7.0, 10mM)를 이용한 부분정제 단백질 형태로 조사(spot-on-the-lawn method)한 결과는 Table 4와 같으며, 이때 사용된 indicator strain 및 주요 특성은 다음과 같다.

- IS11: *Lactobacillus acidophilus* VPII1088(NCK88), Lactacin F producer
- IS13: *Lactobacillus delbrueckii-lactis* ATCC4797(NCK235), Lactacin F indicator
- IS15: *Lactobacillus gasseri* VPII1092
- IS16: *Lactobacillus brevis*(LB)50
- IS21: *Lactococcus lactis* LM0230, nisin indicator
- IS41: *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2
- IS51: *Carnobacterium piscicola* LV17(UAL8), Carnobacteriocin producer
- IS53: *Carnobacterium divergens* LV13(UAL9), Carnobacteriocin indicator
Leucocin A indicator
- IS61: *Listeria monocyogenes* ATCC1911
- IS71: *Staphylococcus aureus* ATCC25923
- IS81: *Enterococcus faecalis* ATCC19433
- IS82: *Enterococcus faecium* ATCC11576
- IS91: *Escherichia coli* ATCC25922
- IS101: *Salmonella typhimurium* ATCC14028
- IS112: *Pseudomonas fluorescense* ATCC21541

라. 既知 또는 新 박테리오신의 판별 및 유망 박테리오신 생산균주의 선정

특정 indicator에 의한 구분 및 유망 박테리오신 선정: 上記의 실험에서 사용된 indicator에 대한 lactacin F, leucocin A, lactococcin A/B/M, carnobacteriocin A/B, nisin 등 주요 既知의 박테리오신의 항균활성 특성 및 범주와 비교 분석하고 해당 활성의 강도(intensity)를 참조하여 차후 산업화가 용이하고 그 유효도가 높을 것으로 판단되는 3종의 박테리오신 생산균주를 다음과 같이 최종 선정하였다.

- strain LAB 238-6 (물김치)
- strain LAB 311-3 (깍두기)
- strain LAB 461-2 (김치)

Table 3. Effect of protease treatment on the activity of antagonistic substances produced by microorganisms from traditional food resources.

Abbreviations used for the table are as follows: *NCK235*, *Lactobacillus delbrueckii-lactis* ATCC4797; *170-12*, *Lactobacillus curvatus* CA170-12; *Sup*, activity displayed by cell-free supernatant of culture; *Sup-T*, activity of the supernatant treated with trypsin(1mg/ml); *AmS*, activity of ammonium sulphate precipitate of culture; *Supernatant A+T*, activity of ammonium sulphate precipitate after trypsin treatment; *Defer*, activity by deferred method(activity on the MRS agar); *D+T*, activity on the MRS agar treated with trypsin.

Sample#	against NCK235						against 170-12						
	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T	
252-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
253-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
256-3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	⊕ ¹³	+	⊕ ¹³	+	-	-	-	-	-	-	-
258-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
260-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
261-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
262-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
264-4	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	⊕	-	⊕	-	-
9	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	⊕	-	⊕	-	-
265-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
266-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Sample#	against NCK235						against 170-12						
	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T	
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
267-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
268-5	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	⊕	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
269-1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
269-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
271-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
272-4	+	+	+	+	⊕ ¹³	⊕ ¹²	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	⊕ ¹⁵	+	⊕ ¹⁶	⊕ ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	+	⊕ ¹⁰	⊕ ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
273-2	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	⊕ ¹⁴	⊕ ¹²	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
274-2	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	⊕ ¹⁴	⊕ ¹³	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	+	⊕ ¹⁴	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
275-1	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	⊕ ¹⁴	⊕ ¹¹	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	+	+	⊕ ¹³	⊕ ¹²	-	-	-	-	-	-	-
4	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	⊕ ¹²	+	⊕ ¹⁵	⊕ ¹³	-	-	-	-	-	-	-

Sample #	against NCK235						against 170-12						
	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T	
275-8	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	+	+	⊕ ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	+	+	⊕ ¹⁴	⊕ ¹²	-	-	-	-	-	-	-
276-11	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
278-3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
279-2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
281-1	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
282-5	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
283-3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
284-2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
285-1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
286-6	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
287-3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
289-6	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
294-4	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
297-1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
300-6	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Sample #	against NCK235						against 170-12						비교
	Sup	Sur+T	AmS	A+T	Defer	D+T	Sup	S+T	AmS	A+T	Def	D+T	
301-1	+	-	⊕ ¹³	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	⊕ ¹¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
302-5	+	-	⊕ ⁹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	⊕ ⁹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
303-2	+	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	⊕ ¹⁴	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
306-1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	⊕ ¹¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
307-7	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	⊕ ¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
309-3	+	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	⊖	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	⊕ ¹⁴	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
310-1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	⊕	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	⊖	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	⊕ ¹⁴	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	⊕ ¹³	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
311-1	⊕	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	⊕	-	⊕ ¹¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	⊕	-	-	-	+	-	-	-	⊕ ¹	-	-	-	-
6	⊕	-	⊕ ¹⁴	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	⊕	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	⊕	-	⊖	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	⊕	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Sample #	against NCK235						against 170-12						비교
	Sup	Sur+T	AmS	A+T	Def	D+T	Sur	Sur+T	AmS	A+T	Def	D+T	
10	⊕	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
12	⊕	-	⊕ ^{1b}	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
312-3	⊕	-	⊕ ¹¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	⊕	-	-	-	+	-	⊕ ¹⁸	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
10	⊕	+	⊕ ¹¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
12	⊕	+	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
313-2	⊕ ^{1b}	-	⊕ ^{1b}	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
8	⊕ ¹⁴	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
12	⊕ ¹³	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
314-1	⊕ ¹¹	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
2	⊕ ¹¹	-	⊕ ¹³	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	⊕ ⁵	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
5	⊕ ¹²	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	⊕ ¹²	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
8	⊕ ¹⁰	-	⊕ ¹¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	⊕	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	⊕ ¹³	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
315-1	⊕ ¹³	-	⊕ ¹²	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
316-11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
317-2	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
318-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
319-4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	

Sample #	against NCK2A+35						against 170-12						비고
	Sup	Sup+T	AmS	A+T	Def	D+T	Sup	Sup+T	AmS	A+T	Def	D+T	
320-4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
322-8	⊕ ¹²	-	⊕ ⁹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
323-1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	⊕ ¹¹	-	⊕ ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	⊕ ⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	⊕ ^{1b}	-	⊕ ^{1b}	-	⊕ ²¹	L	-
7	⊕ ¹¹	⊕ ¹²	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
324-1	⊖	⊕ ¹²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	⊕ ¹⁰	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	⊕ ¹⁰	-	⊕ ⁶	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
338-4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
341-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	NG	NG	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
342-1	-	-	-	-	NG	NG	-	-	-	-	NG	-	-
3	-	-	-	-	NG	NG	-	-	-	-	NG	-	-
5	-	-	-	-	NG	NG	-	-	-	-	NG	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	NG	NG	-	-	-	-	NG	-	-
8	-	-	-	-	NG	NG	-	-	-	-	NG	-	-

Sample #	against NCK235						against 170-12						비교
	Sup	Sup+T	AmS	A+T	Def	D+T	Sup	Sup+T	AmS	A+T	Def	D+T	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	⊕ ¹¹	⊕ ¹¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
343-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	⊕ ¹²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	⊕ ¹¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	⊕ ¹²	-	⊕ ¹²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	⊕ ⁹	-	⊕ ⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
344-1	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	⊕ ¹¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
8	⊕ ¹²	-	⊕ ¹²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	⊕ ¹¹	-	⊕ ¹⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
345-1	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
346-1	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	⊕ ¹⁰	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	⊕ ¹¹	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	⊕ ¹⁴	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
347-11	-	-	⊕	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
348-6	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	⊕	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
350-1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	⊕	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Sample #	against NCK235						against 170-12						비교
	Sup	Sup+T	AmS	A+T	Def	D+T	Sup	Sup+T	AmS	A+T	Def	D+T	
350-7	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	⊕	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	⊕	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Sample#	against NCK235					
	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T
352-10	+	-	+	-	+	-
355-1	-	-	+	-	+	+
3	+	-	-	-	+	-
356-7	+	-	-	-	+	-
357-8	+	-	+	-	+	-
12	+	-	+	-	+	±
359-1	+	-	-	-	+	-
2	+	-	-	-	+	-
3	+	-	-	-	+	-
4	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	+	+
6	+	-	-	-	+	-
7	+	-	-	-	+	-
8	+	-	-	-	+	-
9	+	-	+	-	+	+
10	+	-	+	-	+	+
11	+	-	+	-	+	+
12	+	-	-	-	-	-
362-7	-	-	-	-	-	-
364-12	+	-	+	-	+	-
366-6	+	-	-	-	+	±
10	+	-	-	-	+	-
369-6	+	-	+	-	+	-
371-2	+	-	-	-	+	-
7	+	-	+	-	+	-
11	+	-	+	-	+	-
372-1	-	-	+	-	+	+
4	+	-	-	-	+	+
10	+	-	+	-	+	+
373-3	+	-	+	-	+	-
9	+	-	+	-	+	-
376-12	+	-	+	-	+	-
378-12	+	-	-	-	-	-
379-1	+	-	+	-	+	-
3	+	-	+	-	+	-
6	+	-	-	-	+	+
380-10	+	-	+	-	+	-
12	+	-	+	-	+	-
382-2	+	-	+	-	+	-
5	+	-	+	-	+	-
384-5	+	-	+	-	+	-
386-5	+	-	+	-	+	-
387-5	+	-	+	-	+	-
388-2	-	-	+	-	+	-

Sample #	against NCK235						against 170-12					
	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T
431-12	+		+	⊕	-	⊕	-		-	-	-	-
432-11	-		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
435-3	-		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
5	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
437-4	+		+	⊖	+	⊕	-		-	-	-	-
6	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
8	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
438-2	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
4	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
6	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
10	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
439-9	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
440-2	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
5	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
441-6	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
8	+		+	+	+	+	-		-	-	-	-
12	-		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
442-11	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
443-8	-		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
444-4	-		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
7	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
11	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
445-3	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
7	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
446-4	+		+	+	+	+	-		-	-	-	-
7	+		+	+	+	+	-		-	-	-	-
449-4	-		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
5	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
6	+		-	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
450-2	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
5	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
7	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
11	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
451-3	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
452-1	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
453-2	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
6	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
9	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
454-1	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
2	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
11	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
455-3	+		+	-	+	-	-		-	-	-	-
8	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
457-1	-		+	-	+	-	-		-	-	-	-
2	+		+	-	+	-	-		-	-	-	-

Sample #	agamst NCK235						against 170-12					
	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T	Defer	D+T	Sup	S+T	Ams	A+T
3	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
5	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
9	+		+	⊕	+	⊕	+		+	+	+	+
458-1	+		+	-	+	-	-		-	-	-	-
3	+		+	⊕	+	⊕	+		+	+	+	+
459-4	-		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
5	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
6	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
460-1	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
9	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
461-1	+		+	-	+	-	-		-	-	-	-
2	+		+	+	+	-	-		-	-	-	-
3	+		+	-	+	-	-		-	-	-	-
6	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
7	+		+	-	+	-	-		-	-	-	-
462-1	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
2	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
7	+		+	-	+	-	-		-	-	-	-
463-2	-		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
3	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
4	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
7	+		+	+	+	+	-		-	-	-	-
12	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
464-1	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
2	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
8	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
465-1	+		+	+	+	+	-		-	-	-	-
6	+		+	+	+	⊕	+		+	+	+	+
466-2	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
8	-		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
467-2	-		+	-	+	-	-		-	-	-	-
5	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
10	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
468-2	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
10	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
11	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
469-3	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
8	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
9	+		+	⊕	+	⊕	-		-	-	-	-
11	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
12	+		+	+	+	+	-		-	-	-	-
470-1	+		+	-	+	+	-		-	-	-	-
6	+		+	+	+	+	-		-	-	-	-

Table 4. Activity spectrum of bacteriocins produced by microorganisms from traditional food resources. For the abbreviations used in this table, please refer to the text.

A. Results obtained by deferred method

	IS11	IS13	IS15	IS16	IS21	IS41	IS51	IS53	IS61	IS71	IS81	IS82	IS91	IS101	IS111
301-12	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
302-5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
303-2	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
306-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
307-8	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
309-3	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
12	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
310-1	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
311-1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
312-3	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
313-2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
12	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	IS11	IS13	IS15	IS16	IS21	IS41	IS51	IS53	IS61	IS71	IS81	IS82	IS91	IS101	IS111
314-1	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
315-1	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
8	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
322-8	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
323-3	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
324-1	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
324-9	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
342-12	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
343-4	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
344-7	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
438-2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
440-2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
453-2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
454-1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
455-3	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
457-1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
2	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
458-1	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+		
461-1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-		
6	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-		
7	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+		
462-1	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-		
7	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-		
463-3	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+		
4	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
12	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
467-2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+		
468-10	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+		
470-1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		

B. Results obtained by spot-on-the-lawn method

	IS11	IS13	IS15	IS16	IS21	IS41	IS51	IS53	IS61	IS71	IS81	IS82	IS91	IS101	IS111
301-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
302-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
303-2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
306-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
307-8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
309-3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
310-1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
311-1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
312-3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
313-2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
314-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
315-1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
322-8	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
323-3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
324-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	IS11	IS13	IS15	IS16	IS21	IS41	IS51	IS53	IS61	IS71	IS81	IS82	IS91	IS101	IS111
324-9	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
342-12	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
343-4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
344-7	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
438-2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
440-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
453-2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
454-1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
455-3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
457-1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
458-1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
461-1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
462-1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
463-3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
467-2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
468-10	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
470-1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3. 분리 박테리오신 생산균주의 동정

가. 동정결과의 요약

上記 2項의 3균주를 생리특성 및 BioMerieux 분석시스템에 의해 동정한 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. 박테리오신 생산균주 147균주 중 1차 선정된 3개 생산균주의 동정 결과 요약

Food resources	Strain selected	Strain identified as	Bacteriocin named as	Presentation at
물김치	LAB 238-6	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	Lactococcin K2386	미국미생물학회 보고 (97. 5. 4) 산업미생물학회 보고 (98. 5. 30)
각두기	LAB 311-3	<i>Lactococcus lactis</i>	Lactococcin K3113	Journal of Food Science and Nutrition 2:101-108
일반김치	LAB 461-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricin K4612	산업미생물학회 보고 (97. 4. 25)

나. LAB 238-6의 동정

· LAB 238-6는 4℃와 15℃, 45℃에서도 생육되며 pH3.9에서도 생육 가능하나 염농도가 7%, 10% 일 때는 자라지 못하였다. LAB238-6의 탄수화물 발효특성은 Table 6과 같은 바, BioMerieux의 분석 시스템에 의해 *Lactococcus lactis subsp. lactis*로 동정되었다. 국내에서 *Lactococcus lactis subsp. lactis*로부터 박테리오신 생산 능력이 확인·보고된 것은 본 연구가 최초인 것으로 사료된다.

· LAB238-6(*Lactococcus lactis subsp. lactis*)가 생산하는 박테리오신 Lactococcin KCA2386의 항균 범주(activity spectrum) 및 분자 특성:

- LAB238-6이 생산하는 박테리오신(이하 lactococcin KCA2386)은 Table 7에서 보이는 바와 같이 광범위한 activity를 가지고 있는바 여러 가지 젖산균(*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*,

Carnobacterium)은 물론 병원성 미생물인 *Listeria*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* 그리고 특히 *Staphylococcus*에 대해서도 탁월한 activity를 보여 식품보존제로의 유용성이 매우 좋을 것으로 예측된다.

- LAB238-6을 대량배양하여 그 supernatant를 ammonium sulfate로 침전시킨 후 다시 sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 dialysis 한후 얻어진 bacteriocin을 동결건조하여 약 200배 농축된 부분정제 bacteriocin은
 - 열에 비교적 안정하여 120C에서 autoclave를 행하여도 그 activity가 유지되었으며,
 - 여러 가지 protease를 처리해본 결과 trypsin 보다는 pronase가 이 bacteriocin을 더 잘 분해 하였고
 - 광범위한 pH 변화에도 안정된 activity profile을 나타내었다.

Table 6. LAB238-6, LAB311-3 및 LAB461-2의 탄수화물 발효특성

Carbohydrate	LAB 238-6	LAB 311-3	LAB4 61-2	Carbohydrate	LAB2 38-6	LAB3 11-3	LAB4 61-2
Control	-	-	-	Esculine	+	+	+
Glycerol	-	-	-	Salicine	+	-	+
Erythritol	-	-	-	Cellobiose	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-	Maltose	+	-	+
L-Arabinose	+	+	+	Lactose	±	-	+
Ribose	+	+	+	Melibiose	-	+	+
D-Xylose	+	-	-	Sacchrose	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	Trehaliose	+	+	+
Adonitol	-	-	-	Inuline	-	-	-
β Methyl-xylose	-	-	-	Melezitose	-	-	+
Galactose	+	+	+	D-Raffinose	-	-	+
D-Glucose	+	+	+	Amidon	±	-	-
D-Fructose	+	+	+	Glycogen	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	Xylitol	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	β Gentiobiose	±	+	+
Rhamnose	-	-	-	D-Turanose	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-
Inositol	-	-	-	D-Tagatose	-	-	-
Mannitol	±	-	+	D-Fucose	-	-	-
Sorbitol	-	-	+	L-Fucose	-	-	-
α Methyl D-mannose	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-
α Methyl D-glucose	-	-	-	L-Arabitol	-	-	-
N-Acetylglucosamine	+	+	+	Gluconate	±	-	+
Amygdaline	±	-	+	2 ceto-gluconate	-	-	-
Arbutine	+	-	+	5 ceto-gluconate	-	-	-

Table 7. Strain LAB238-6이 생산하는 박테리오신의 activity spectrum

indicator strain	deferred test	deferred test + protease	spot-on-the lawn test
<i>Lactobacillus acidophilus</i> VPI11088	+	-	+
<i>L. delbrueckii-lactis</i> ATCC4797	+	-	+
<i>L. gasseri</i> VPI11092	+	-	+
<i>L. brevis</i> LB50	+	-	+
<i>L. curvatus</i> CA170-12	+	-	+
<i>Pediococcus pentocaceus</i> FBB61-2	+	-	+
<i>Lactococcus lactis</i> LM0230	+	-	+
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17	+	-	+
<i>C. divergens</i> LV13	+	-	+
<i>C. piscicola</i> UAL26	+	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC1911	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	+	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	+	-	+
<i>E. faecium</i> ATCC11576	+	-	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	+	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	+	-	-
<i>P. fluorescence</i> ATCC21541	-	+	-

다. LAB311-3의 동정 및 분자 특성

- LAB 311-3의 동정 특성은 Table 6에 요약되어 있는 바, BioMerieux의 분석 시스템에 의해 *Leuconostoc mersenteroides*로 동정되었다.
- LAB311-3이 생산하는 박테리오신은 LAB238-6이 생산하는 lactococcin에 비해 그 activity spectrum은 협소하나
 - 살균기작이 bactericidal mode이며,
 - 열에 매우 안정하며(121C/ 30min 처리에도 활성 불변)
 - pH의 변화에 영향을 받지 않고,
 - 산업적 유기용매의 처리에도 그 활성이 유지되는 등산업적 활용 또는 유용성이 탁월한 것으로 판단됨.
- LAB 311-3이 생산하는 박테리오신의 분자량은 SDS-PAGE상에서 14.4 kdal으로 추정되었으며 leucocin KCA3113으로 명명하였다.

라. LAB461-2의 동정 및 분자 특성

- LAB 461-2의 동정 특성은 Table 6에 요약되어 있는 바, *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었으며 그 박테리오신은 Plataricin KCA4612로 명명되었다.

4. 분리 박테리오신의 산업적 유용성 분석

전통적인 방법으로 발효된 김장김치, 물김치, 깍두기, 식해로부터 분리한 2,412균주의 젖산균 중 박테리오신 생산균주로 확인된 147균주 가운데 1차년도에서 선발한 3균주(*Lactococcus lactis* spp. *lactis* LAB238-6, *Lactococcus lactis* LAB311-3, *Lactobacillus plantarum* LAB461-2와 이후의 연구에서 광범위 박테리오신 생산균주로 판단된 LAB184-2, LAB184-6, LAB185-3, LAB185-11 균주 등 7균주를 대상으로 하여 연구를 진행하였다.

가. 식품별 microflora와의 길항성

1차년도에 선발된 3균주의 배양액으로부터 조제한 crude bacteriocin의 식품분리 균주들과의 길항성은 Table 8에 요약된 바와 같으며, LAB184-2, LAB184-6, LAB185-3, LAB185-11 균주의 길항성은 Table 9-1 및 Table 9-2와 같다. *Lactococcus lactis* spp *lactis* LAB238-6로부터 생산되는 박테리오신인 Lactococcin

KCA2386의 항균성은 매우 광범위하여 시험균에 대해 nisin 못지 않은 활성을 보였으며, *Lactococcus lactis* LAB311-3 및 *Lactobacillus plantarum* LAB461-2가 생산하는 박테리오신인 Lactococcin K3113 및 Plantaricin KCA4612는 매우 선택적인 항균범위를 보였다. LAB 184-2, 184-6, 185-3 균주가 생산하는 박테리오신은 Plantaricin KCA4612와 유사한 범주의 항균성을 보였으나 LAB 185-11이 생산하는 박테리오신은 *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*의 두 균종 및 *Salmonella typhimurium*에 유효하여 보존제로서의 유용 가능성을 보였다. Lactococcin KCA2386 및 K3113이 생산하는 박테리오신의 항균활성은 Fig. 1 및 Fig. 2에 도시된 바와 같다.

Lactococcin K3113의 항균 길항기작을 김치기원의 *Lactobacillus curvatus* KCA170-12에 대해 조사한 결과 bactericidal mode에 의해 진행됨을 확인하였다 (Fig. 3)

Table 8. Antibacterial spectrum of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* spp *lactis* LAB238-6, *Lactococcus lactis* LAB311-3, and *Lactobacillus plantarum* LAB461-2

Indicator strain \ Bacteriocin ¹	Lactococcin KCA2386	Lactococcin K3113	Plantaricin KCA4612
<i>Lactobacillus acidophilus</i> VPI11088	+ ²	+	-
<i>L. delbrueckii-lactis</i> ATCC4797	+	+	+
<i>L. gasseri</i> VPI11092	+	+	+
<i>L. brevis</i> LB50	+	-	-
<i>L. curvatus</i> CA170-12	+	+	-
<i>Pediococcus pentocaceus</i> FBB61-2	+	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> LM0230	+	-	-
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17	+	-	-
<i>C. divergens</i> LV13	+	-	-
<i>C. piscicola</i> UAL26	+	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC1911	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	+	-	-
<i>E. faecium</i> ATCC11576	+	-	+
<i>Esherichea coli</i> ATCC25922	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	-	-	-
<i>P. fluorescense</i> ATCC21541	-	-	-

1. Bacteriocins were prepared by ammonium precipitation of culture supernatant followed by dialysis in the phosphate buffer(50mM, pH7.0)
2. Positivity means effective inhibition of microbial growth by the bacteriocin applied on the indicator lawn.

Table 9-1. Antibacterial activity exhibited by lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Kimchi.

Indicator strain \ Producer strain	LAB 184-2			LAB 184-6		
	Deferred	supernatant	Amn. sulf. precipitated	Deferred	supernatant	Amn. sulf. precipitated
<i>Lactobacillus. acidophilus</i> VPI11088	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus. delbrueckii-lactis</i> ATCC4797	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus. gasseri</i> VPI11092	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus. brevis</i> (LB)50	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus.l. actis</i> LM0230	+	+	-	+	+	+
<i>Leuconostoc.gelidum</i> UAL187	+	-	-	+	-	-
<i>Pediococcus. pentocaceus</i> FBB61-2	-	-	-	-	-	-
<i>Carnobacterium. piscicola</i> LV17	+	-	-	+	-	-
<i>Carnobacterium. dirvergens</i> LV13	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria. monocytogenes</i> ATCC1911	+	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus.aureus</i> ATCC25923	+	-	-	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	+	±	-	+	±	-
<i>Enterococcus. faecium</i> ATCC11576	+	+	±	+	-	±
<i>Escherichia. coli</i> ATCC25922	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonells. typhimurium</i> ATCC14028	+	+	-	+	+	-

1. Antibacterial activity checked on the solid agar media('deferred' method), or by culture supernatant('supernatant'), or by crude bacteriocin prepared by ammonium precipitation upto 90% saturation cut ('amn. sulf. precipitated')

Table 9-2. Antibacterial activity exhibited by lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Kimchi.

Indicator strain \ Producer strain	LAB 185-3			LAB 185-11		
	Deferred	supernatant	Amn. sulf. precipitated	Deferred	supernatant	Amn. sulf. precipitated
<i>Lactobacillus. acidophilus</i> VPI11088	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus. delbrueckii-lactis</i> ATCC4797	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus. gasseri</i> VPI11092	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus. brevis</i> (LB)50	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus.l. actis</i> LM0230	+	+	-	+	+	+
<i>Leuconostoc.gelidum</i> UAL187	+	-	-	+	-	-
<i>Pediococcus. pentocaceus</i> FBB61-2	-	-	-	-	-	-
<i>Carnobacterium. piscicola</i> LV17	+	-	-	+	-	-
<i>Carnobacterium. dirvergens</i> LV13	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria. monocytogenes</i> ATCC1911	+	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus.aureus</i> ATCC25923	+	+	±	+	+	±
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	+	±	-	+	±	+
<i>Enterococcus. faecium</i> ATCC11576	+	+	-	+	-	±
<i>Escherichia. coli</i> ATCC25922	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonells. typhimurium</i> ATCC14028	+	+	-	+	+	±

1. Antibacterial activity checked on the solid agar media('deferred' method), or by culture supernatant('supernatant'), or by crude bacteriocin prepared by ammonium precipitation upto 90% saturation cut ('amn. sulf. precipitated')

Fig. 1. Antibacterial activity of lactococin KCA2386 produced by *Lactococcus lactis ssp lactis* KCA2386. One of the clear zone was treated with protease to confirm its authenticity as proteinaceous bacteriocin.

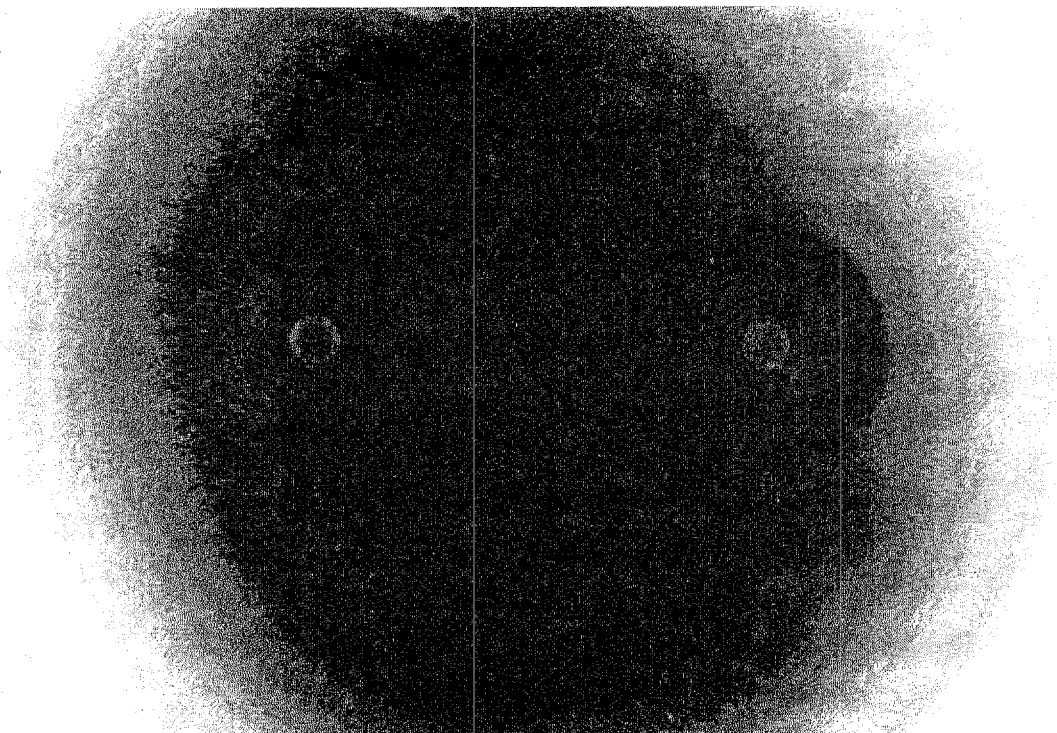


Fig. 2. Antibacterial activity of lactococin K3113 produced by *Lactococcus lactis* KCA3113. One of the clear zone was treated with protease to confirm its authenticity as proteinaceous bacteriocin.

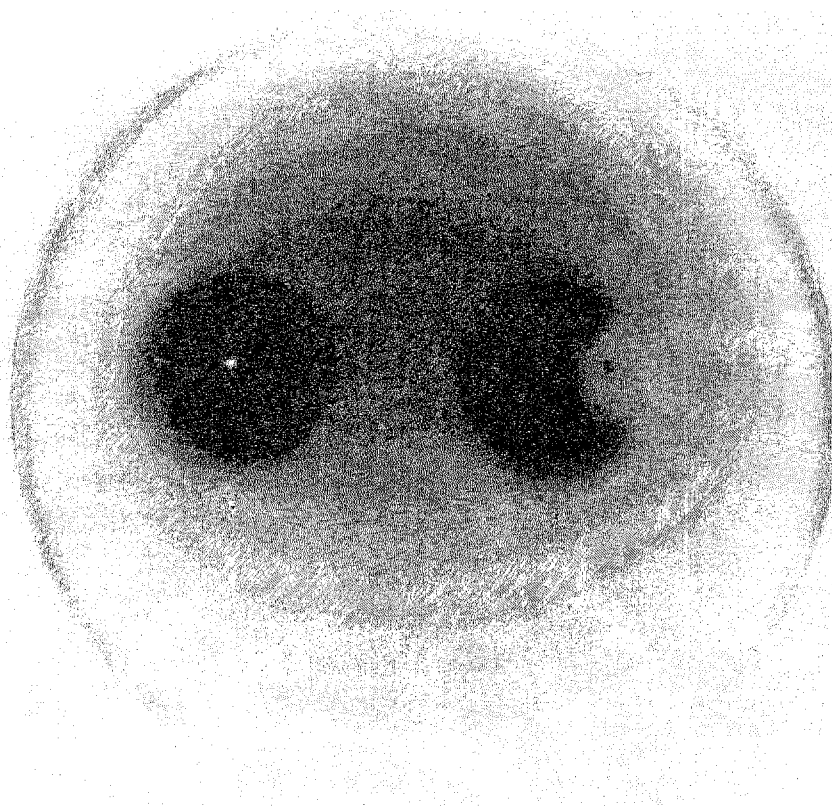
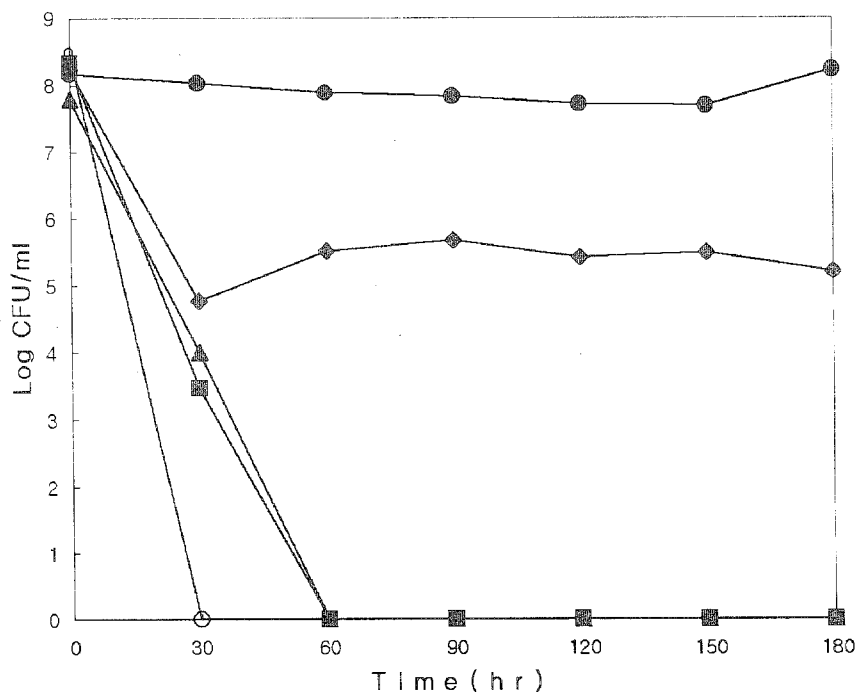


Fig. 3. Mode of action of bacteriocin of *Lactococcus lactis* LAB311-3 against *Lactobacillus curvatus* KCA170-12 in phosphate buffer(10mM, pH7.0) at various concentrations of bacteriocin. (■) 3AU/ml, (▲) 6AU/ml, (○) 25AU/ml, (◆) 6AU/ml with protease treatment at 30min-point, (●) experimental control without bacteriocin treatment.



나. 유해균과의 길항성 규명 및 실제 김치에서의 식품보존성 증진 실험

Lactococcin KCA2386, Leucocin KCA3113, Plantaricin KCA4612의 산업적 식품 유해균과에 대한 길항성을 조사한 결과, 고체배양에서는 세종류의 박테리오신 모두 두류 식품 유해균인 *Bacillus pumilis*와 *Bacillus cereus*의 성장을 저해하였으나, ammonium sulfate 침전에 의한 crude bacteriocin만의 실험에서는 Lactococcin KCA2386만이 유효하였다(Table 10 참조). 이러한 결과는 그람음성균에 대한 박테리오신 일반의 inactivity 결과와 일치하고 있다.

Lactococcin KCA2386을 실제 산업현장에서의 식품보존제로 응용하기 위한 예비실험으로 buffer 상태에서의 *Listeria monocytogenes* 저해를 확인하였다(Fig. 4). 각각 30AU, 60AU, 90AU의 bacteriocin을 처리한 결과, 90AU일 때 60분, 60AU는 90분, 30AU는 150분 후에 모두 *Listeria monocytogenes*를 저해하였다. Control은 150분 후에도 cell density의 변화가 거의 없었고, 30분 후에 pronase를 처리해 준 경우는 bacteriocin이 불활성 되어 더 이상의 저해가 일어나지 않았다.

위 실험결과를 토대로 실제 백김치 상등액에다 *Listeria monocytogenes*를 약 10^6 CFU/ml 되게 접종한 후 각각 50AU, 250AU의 bacteriocin을 첨가해 준 후 37°C에서 10시간동안 배양하면서 cell population의 변화를 관찰하였다(Fig. 5). 그 결과 50 AU 일때와 250AU일 때 모두 2시간이 지난 후 *Listeria*가 10^4 /ml 정도로 감소함을 확인하였다. 이후 50AU의 bacteriocin을 처리해 준 sample은 다시 세포가 증식하기 시작하였으나, 250AU의 bacteriocin을 처리해준 sample은 세포가 적정수준에서 억제되었다. 배양액에서 bacteriocin의 활성은 배양기간동안 내내 일정하게 유지되었다. 이러한 실험 결과 실제 김치에 있어 박테리오신에 의해 식품보존성이 증진될 수 있음이 증명된 것으로 사료된다.

다. 생산 최적 조건 탐색

Lactococcus lactis spp *lactis* LAB238-6, *Lactococcus lactis* KCA311-3 및 *Lactobacillus plantarum* LAB461-2의 박테리오신 생산 최적 조건을 각각 배양 온도 (15C, 25C, 37C) 및 pH(4.0, 5.0, 6.0, 7.0)에 대해 실험한 결과는 각각 Table 11 및 Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8과 같다. 세 균주 공히 pH 7.0에서 최대의 박테리오신 생산량을 보임에는 동일하였으나, 배양 온도 및 최대 생산에 이르는 소요시간에 있어서는 차이를 보였다. 단위당 생산량은 Lactococcin K3113이 가장 높아 Lactococcin

KCA2386 생산량의 16배에 이르렀다,

라. 균주의 안정성 분석

박테리오신 생산균주의 생산성의 항일성을 시험하기 위해 상기의 최적 조건하에서 세 균주를 연속 10회 계대하며 박테리오신 생산성(AU/ml of culture supernatant) 및 plasmid pattern을 관찰한 결과, 변화가 없었다. 따라서 상기의 세 균주의 박테리오신 생산성은 유전자 소재에 관계없이 실험조건하에서 매우 안정된 것으로 판단되었다.

마. 박테리오신 분자 안정성 분석:

Lactococcus lactis spp *lactis* LAB238-6, *Lactococcus lactis* LAB311-3 및 *Lactobacillus plantarum* LAB461-2의 상등액으로부터 조제한 crude bacteriocin에 대해 단백가수분해효소 등의 hydrolytic enzyme, pH, 열, 유기용매에의 안정성을 실험한 결과는 Table 12와 같다.

3종의 박테리오신 모두 단백가수분해효소에 의해 불활성화되었으며 기타의 분해효소에는 안정하였다. Lactococcin KCA2386은 pH의 변화에 민감한 반응을 보여 중성 pH부근에서 가장 안정된 활성을 보였으나 pH 2.0에서 5.0 사이에서와 pH 8.0에서 10.0 사이에서 활성의 75% 이상을 소실하였다(Fig. 9). Lactococcin KCA2386과 K3113은 열에도 매우 안정하여 autoclaving 조건에서도 활성의 일부가 잔류하였다. Plantaricin KCA4612는 pH에 매우 안정하였으나 유기용매 중 특히 acetonitrile에 취약성을 보였다.

Table 10. Antibacterial activity by bacteriocin producers on the solid agar and by crude bacteriocins

Indicator		<i>Lactococcus lactis</i> spp <i>lactis</i> LAB238-6	<i>Leuconostoc mersenteroides</i> LAB311-3	<i>Lactobacillus plantarum</i> LAB461-2
Gram positives	<i>Bacillus pumilis</i>	+/+ ¹	+/-	+/-
	<i>B. cereus</i>	+/+	+/-	+/-
Gram negatives	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-/-	-/-	-/-
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	-/-	-/-	-/-
	<i>P. fluorescence</i>	-/-	-/-	-/-
	<i>P. putida</i>	-/-	-/-	-/-
	<i>Xantomonas maltophila</i>	-/-	-/-	-/-
	<i>Sphmonas paucimobilis</i>	-/-	-/-	-/-
	<i>Chryseomonas luteola</i>	-/-	-/-	-/-

1. a/b: a indicating antibacterial activity on the solid agar, b indicating antibacterial activity by crude bacteriocin prepared by ammonium sulfate precipitation of culture supernatant

Table 11. Optimal conditions for production of bacteriocins by *Lactococcus lactis* spp *lactis* LAB238-6, *Leuconostoc mersenteroides* LAB311-3, and *Lactobacillus plantarum* LAB461-2

Producer strain	Optimal temperature (C)	Optimal pH	Incubation period for maximal activity(hr)	Maximum activity (AU/ml)
<i>Lactococcus lactis</i> spp <i>lactis</i> LAB238-6	37	7.0	9	1,600
<i>Leuconostoc mersenteroides</i> LAB311-3	25	7.0	12	25,600
<i>Lactobacillus plantarum</i> LAB461-2	37(25)*	7.0	9(12)	6,400

* Values in the parenthesis indicates conditions showing same amount of bacteriocin activity at 25C/initial pH 7.0

Fig.6. Calibration of optimal conditions of lactococcin KCA2386 production

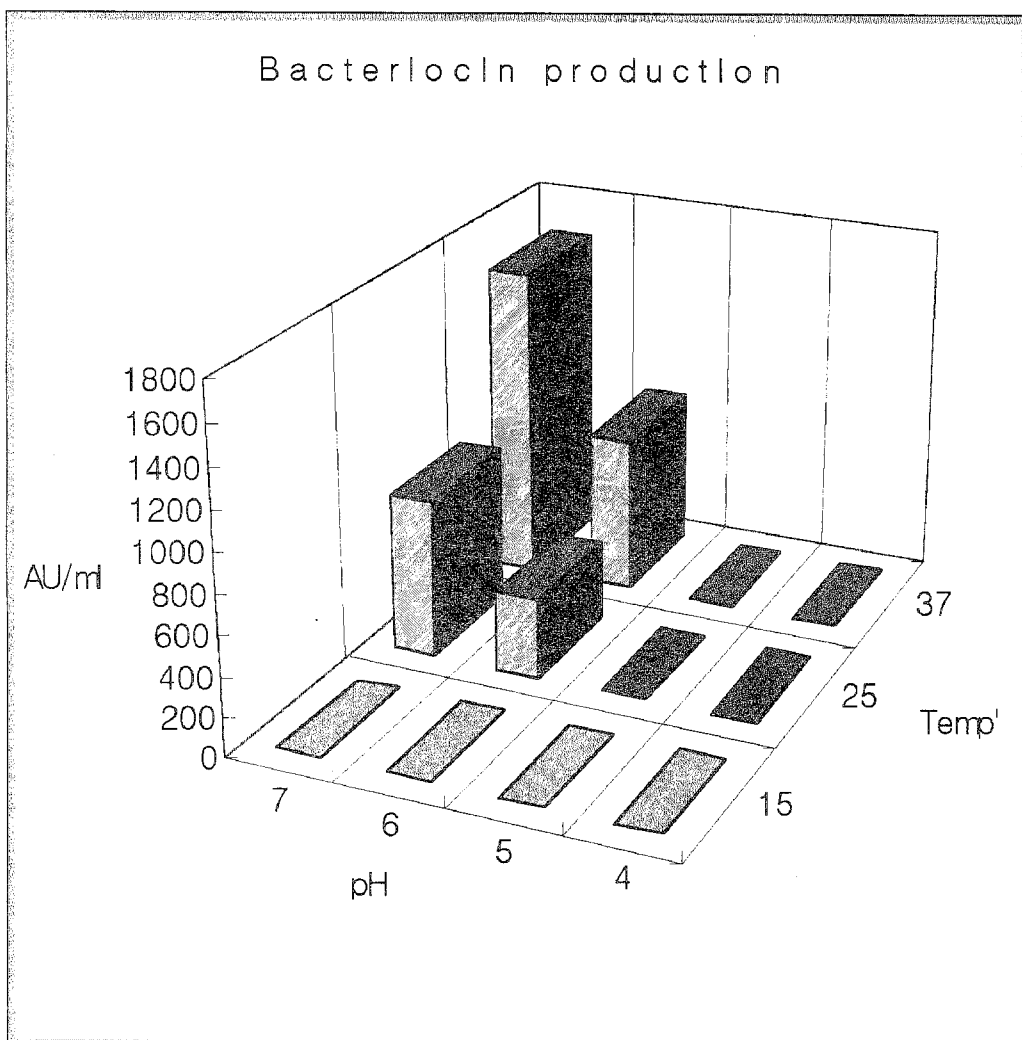


Fig. 7. Mode of bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA3113. Effect of pH and temperature on the production of bacteriocin was illustrated in time-dependent manner. (x) pH 7.0, (▲) pH 6.0, (■) pH 5.0, (◆) pH 4.

- A : bacteriocin production at 37°C with different pHs,
- B : bacteriocin production at 25°C with different pHs,
- C : bacteriocin production at 15°C with different pHs.

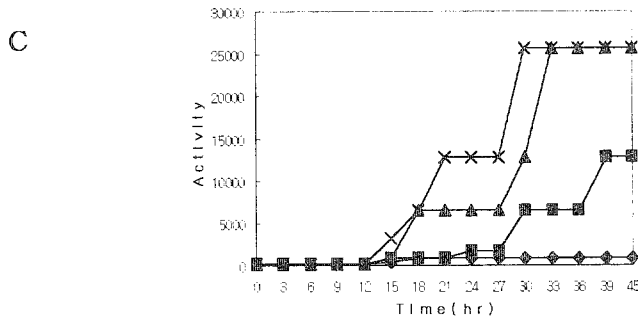
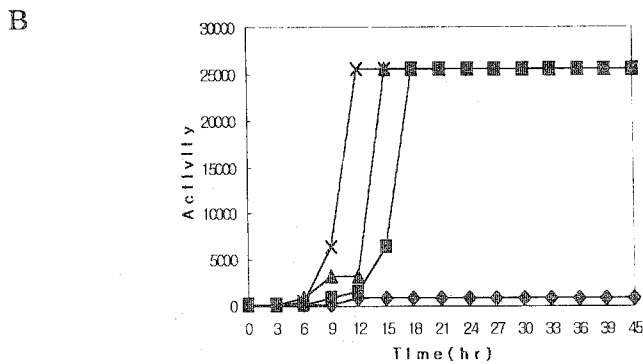
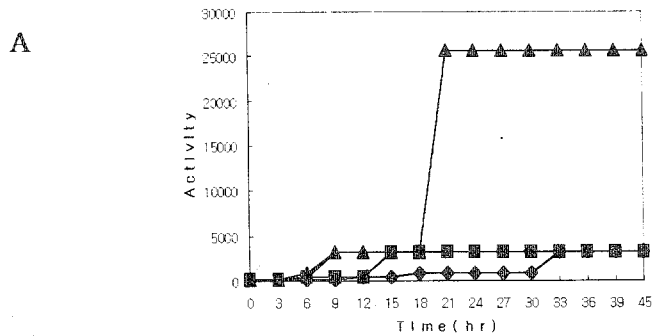


Fig. 8. Effect of different culture conditions on the maximal production of bacteriocin in *Lactococcus lactis* KCA3113

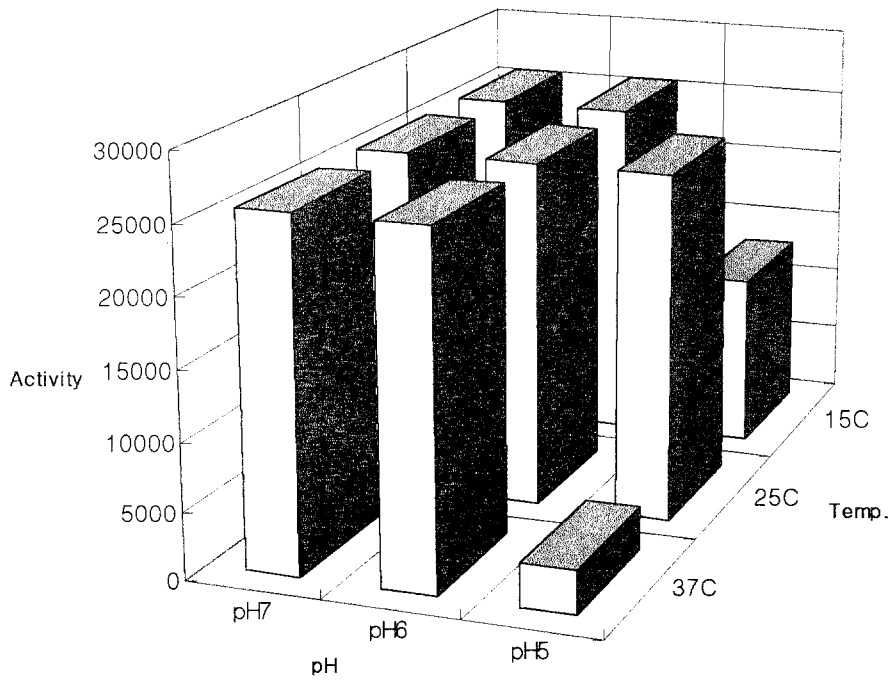
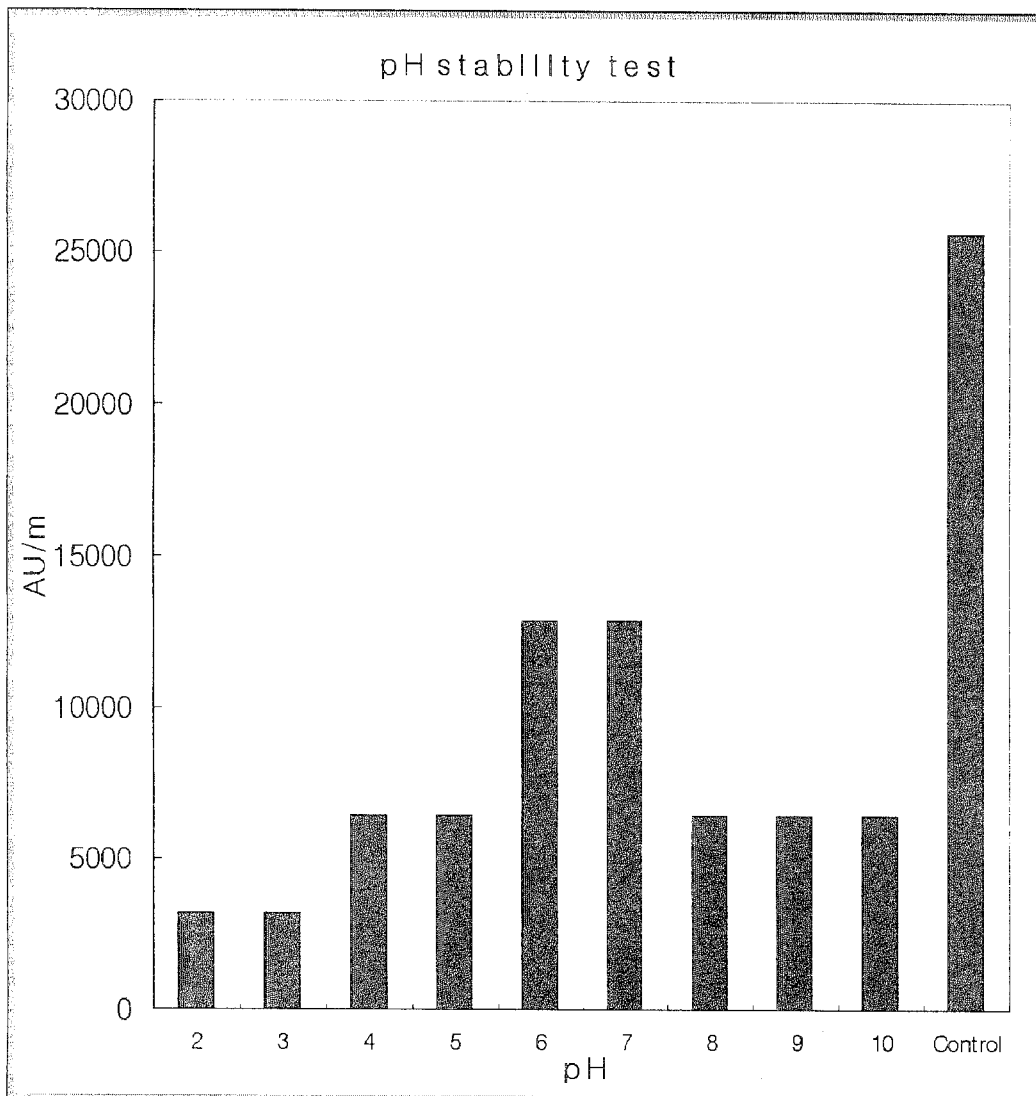


Table 12. Stability of bacteriocins to degraditive enzymes, pHs, heat, and solvent treatment.

Treatment		Lactococcin KCA2386(AU/ml)	Leucocin3113 (AU/ml)	Plantaricin4612 (AU/ml)
Control(without any tretment)		100*	100	100
Degraditive enzymes (final conc. 1mg/ml)	Pronase	0	0	0
	Pepsin	25	0	0.195
	Trypsin	100	0	50
	Lysozyme	100	100	100
	β -amylase	100	100	50
	Lipase	100	100	100
	RNase A	100	100	ND
pH	2.0 to 10.0	12.5 to 50	100	100
Heat	60C/30min	100	50	ND
	100C/30min	100	25	ND
	121C/15min	6.25	3.125	ND
Solvents	Ethanol	100	100	25
	Methanol	100	100	25
	Aceton	100	50	50
	Acetonitrile	100	100	3.125
	Chloroform	ND	25	ND
	Toluene	100	100	50
	Ethyl acetate	100	100	25

* Values expressed as percentage to non-treated bacteriocins in the same condition

Fig. 9. Stability of lactococcin KCA238-6 over different pH



5. 유용 박테리오신의 정제

가. 식품별 유용 박테리오신의 정제

1) Column 의 선택: Lactococcin KCA2386을 정제하기 위하여 우선 batch adsorption(pH4, 5, 6, 7, 8, 9)을 하여 적절한 column을 선택하였다. CM-cellulose와 DEAE-cellulose를 가지고 pH를 맞춰 준 다음 bacteriocin과 30분 동안 반응시킨 후 원심분리하여 그 상등액의 activity를 조사한 결과 pH8과 pH9에서 CM-cellulose에 흡착하였다.

2) Column chromatography 및 SDS-PAGE:

· Lactococcin KCA2386의 정제: Batch adsorption 결과 확인된 bacteriocin의 cation 성질을 이용하여 0.01M pH8 Tris-Cl buffer에서 CM-cellulose를 이용하여 chromatography를 한 결과 protein은 gradient가 0.2M에서 0.5M사이에서 검출되었고, bacteriocin activity는 protein peak의 뒷부분 즉, 0.3M에서 0.5M gradient fraction에서 검출되었다(Fig. 10). 그러나 이의 SDS-PAGE 결과 그 정제도가 미흡하여 Lactococcin KCA2386 및 KCA3113의 유전자 클로닝에 필수적인 probe 제작을 위해 lactococcin KCA2386 및 KCA3113을 2차에 걸쳐 정제하였다. Ammonium sulfate 70% fraction으로부터 획득한 부분정제물을 10 mM glycine-NaOH buffer(pH8.0)로 CM cellulose column으로 분획한 후 활성 fraction을 Sepadex G50에 의해 분획한 결과는 Fig. 11(KCA2386) 및 Fig. 12(KCA2386)에 도시된 바와 같다. 이들 active fraction을 농축하여 SDS-PAGE에 의해 8,100 dalton에 상당하는 부위에 정제된 박테리오신 활성을 확인하였다(Fig. 13).

· Lactococcin K3113의 정제 및 SDS-PAGE: Lactococcin K3113을 상기의 방법과 동일하게 정제하여 SDS-PAGE를 시행한 결과는 Fig. 14와 같다. 이에 의해 lactococcin K3113의 분자량은 10,500 dalton으로 계산되었다.

3) One-step purification by ethanol treatment: Bacteriocin이 ethanol에 안정한 특징을 이용해 crude bacteriocin에 포함된 protein을 침전시켜 순수한 bacteriocin을 얻기 위해 ethanol을 10%에서 90%까지의 농도로 처리하여 3시간동안 반응시킨 다음 원심분리하여 supernatant와 protein pellet의 activity를 측정하고, protein pellet의 OD를 측정하였다. 그 결과, ethanol 50%에서 대부분의 protein이 침전된다는 것

이 OD측정을 통해 확인되었으며 supernatant의 activity는 20%에서 4000AU/ml로 가장 높았고, 40%이상에서는 1000AU/ml의 activity를 보였다. 그러나 90%에서는 activity를 보이지 않았다. 반면에 pellet의 activity는 정반대의 현상을 보였다. 즉, 30%에서부터 activity를 보였고, 80%에서 최대의 activity를 보였다(Fig. 15).

나. 정제분자의 분자특성 규명

1) 분자량의 산정: Lactococcin K3113을 상기에 서술된 방법에 의하여 정제하고 SDS-PAGE를 시행한 후 이를 Lactobacillus curvatus KCA170-12를 이용하여 activity-staining한 결과(Fig. 14), lactococcin K3113의 분자량은 10,500 dalton으로 계산되었다.

2) 정제 박테리오신의 서로 다른 heat-treatment 조건에서의 pH 안정성: 정제된 lactococcin KCA2386을 서로 다른 가열 조건 및 pH 조건하에서 그 활성의 변화를 추적한 결과는 Fig. 16와 같다.

다. 아미노말단의 서열 분석

Lactococcin KCA2386과 Lactococcin K3113에 대해 정제된 박테리오신의 band(Fig. 13 및 Fig. 14)를 membrane으로 transfer한 후 이를 기초과학연구소에 의뢰하여 아미노말단의 아미노산 서열을 분석하였으나 유효한 결과를 얻지 못하였다. 이는 박테리오신 구조 상의 分枝 또는 membrane transfer 특성에 기인한 것으로 판단된다.

Fig. 10. Elution profile of CM-cellulose chromatography on lactococcin KCA2386

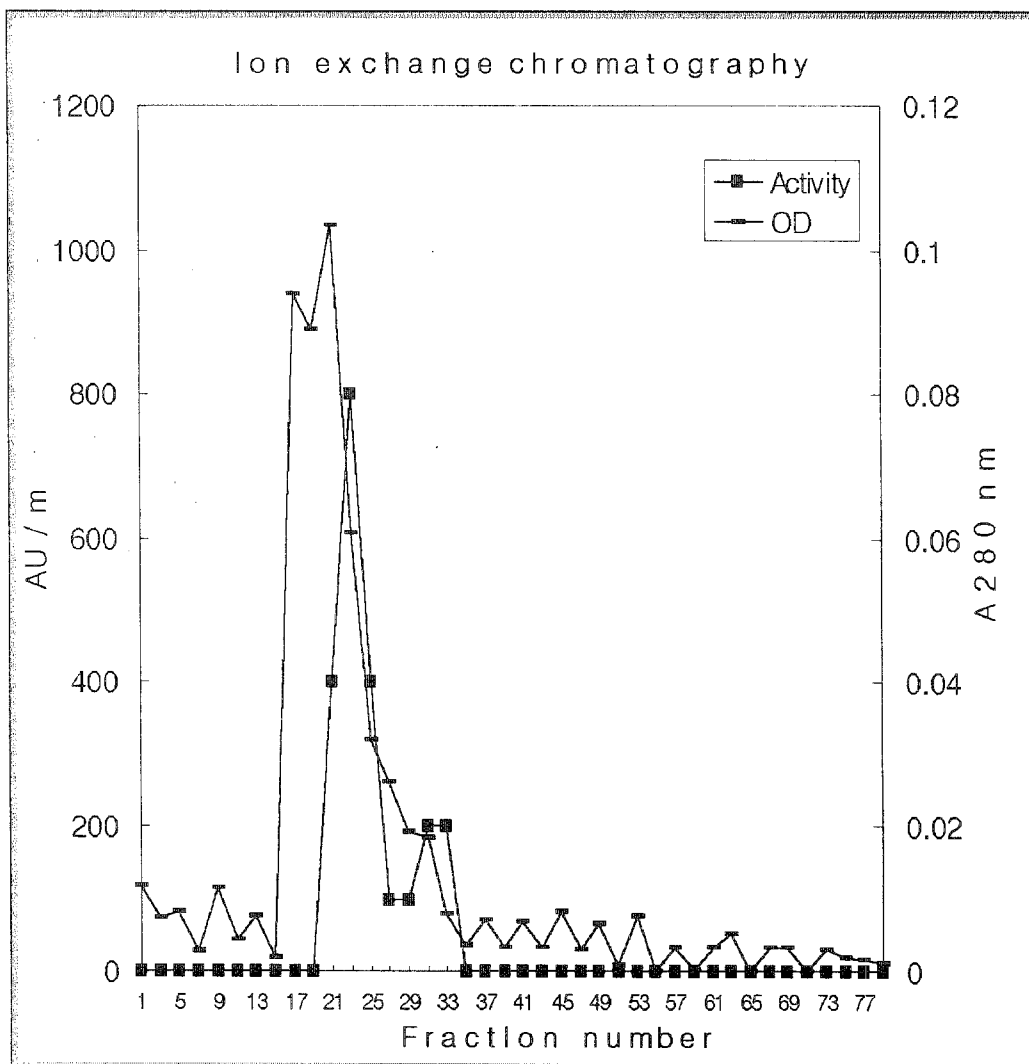


Fig. 11. Elution profile of partially purified lactococcin KCA2386 by CM-cellulose column equilibrated with 10 mM glycine-NaOH buffer(pH 8.0)

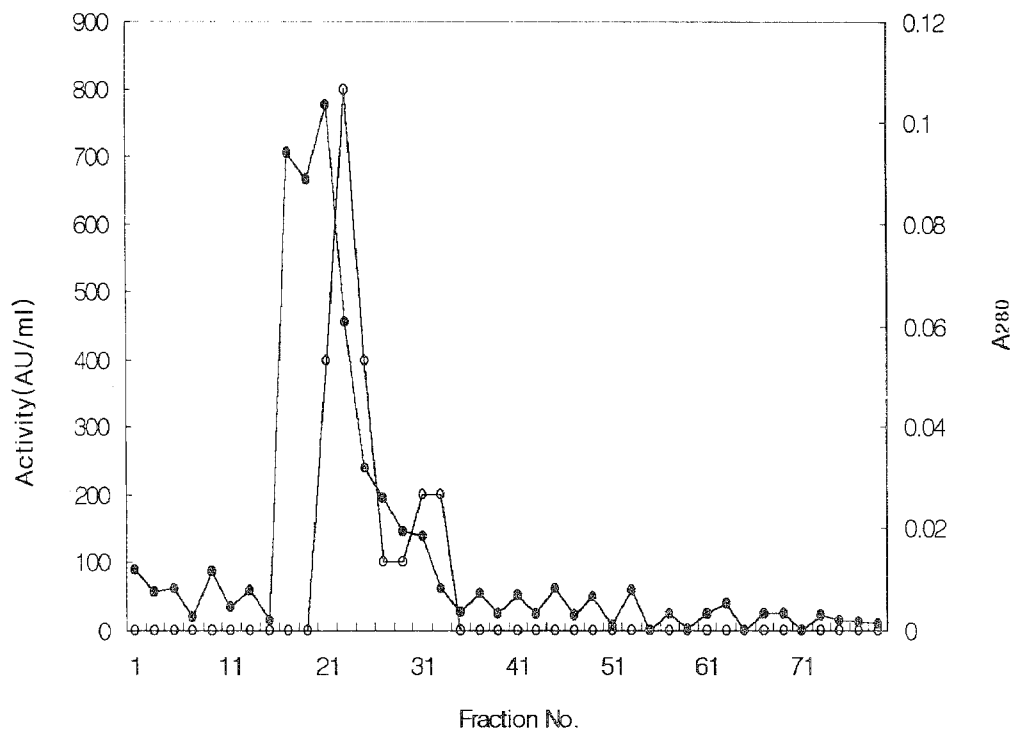


Fig. 12. Elution profile of lactococcin KCA2386 by Sephadex G50 column

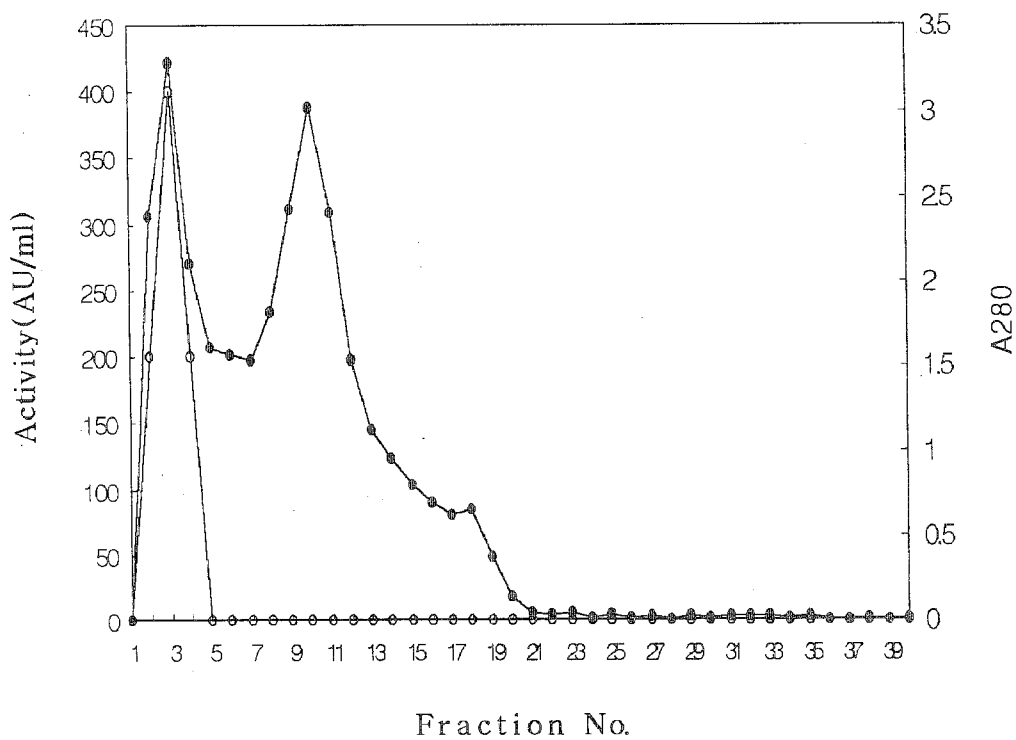


Fig. 3. Electrophoretic profile of lactococin KCA2386 on SDS-PAGE
A: stained by Coomassie brilliant blue,
B: activity-stained with *Lactobacillus delbrueckii-lactis* NCK235

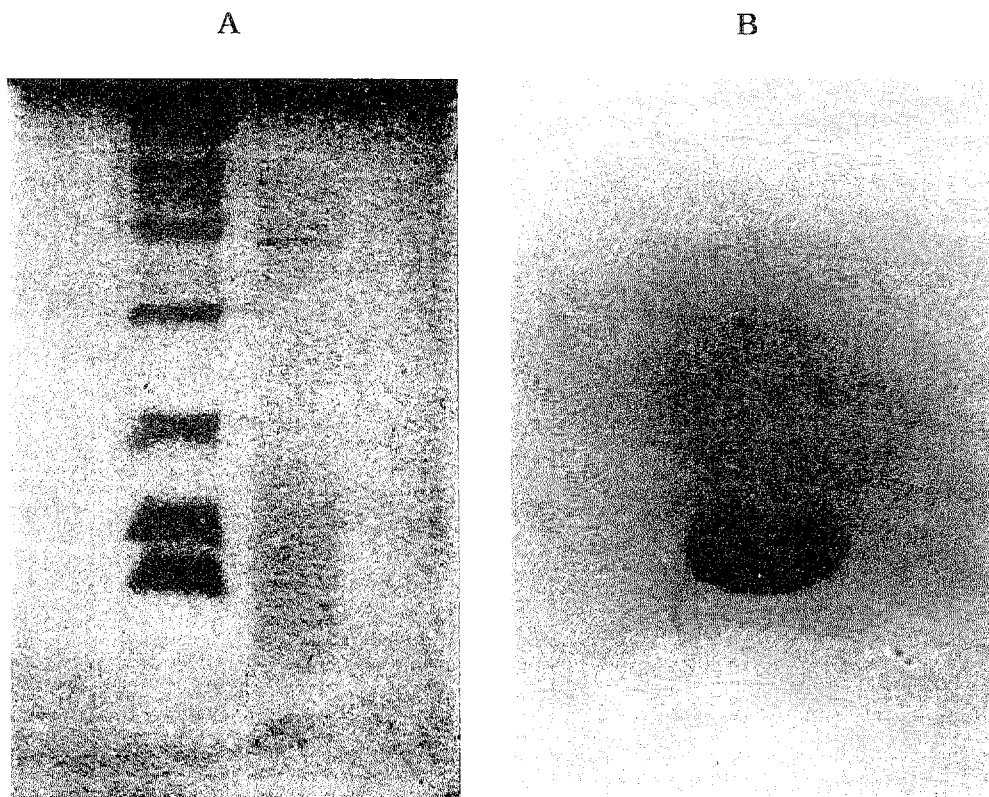


Fig. 14. Electrophoretic profile of lactococcin KCA3113 on SDS-PAGE

A: stained by Coomassie brilliant blue,

B: activity-stained with *Lactobacillus delbrueckii-lactis* NCK235

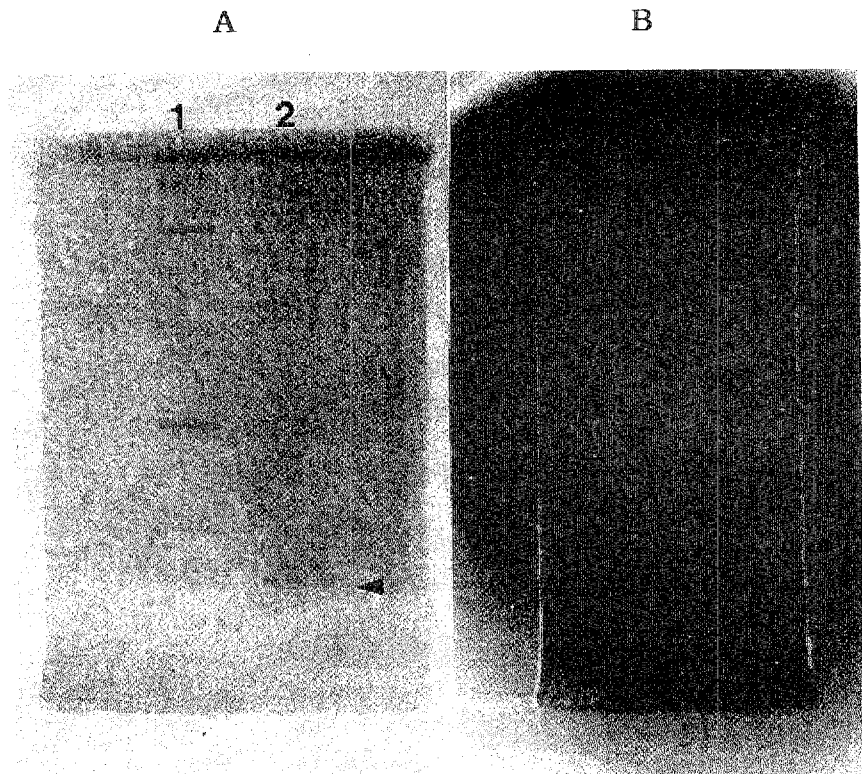


Fig. 15. Comparison of activity of lactococcin KCA2386 between ethanol phase and precipitate

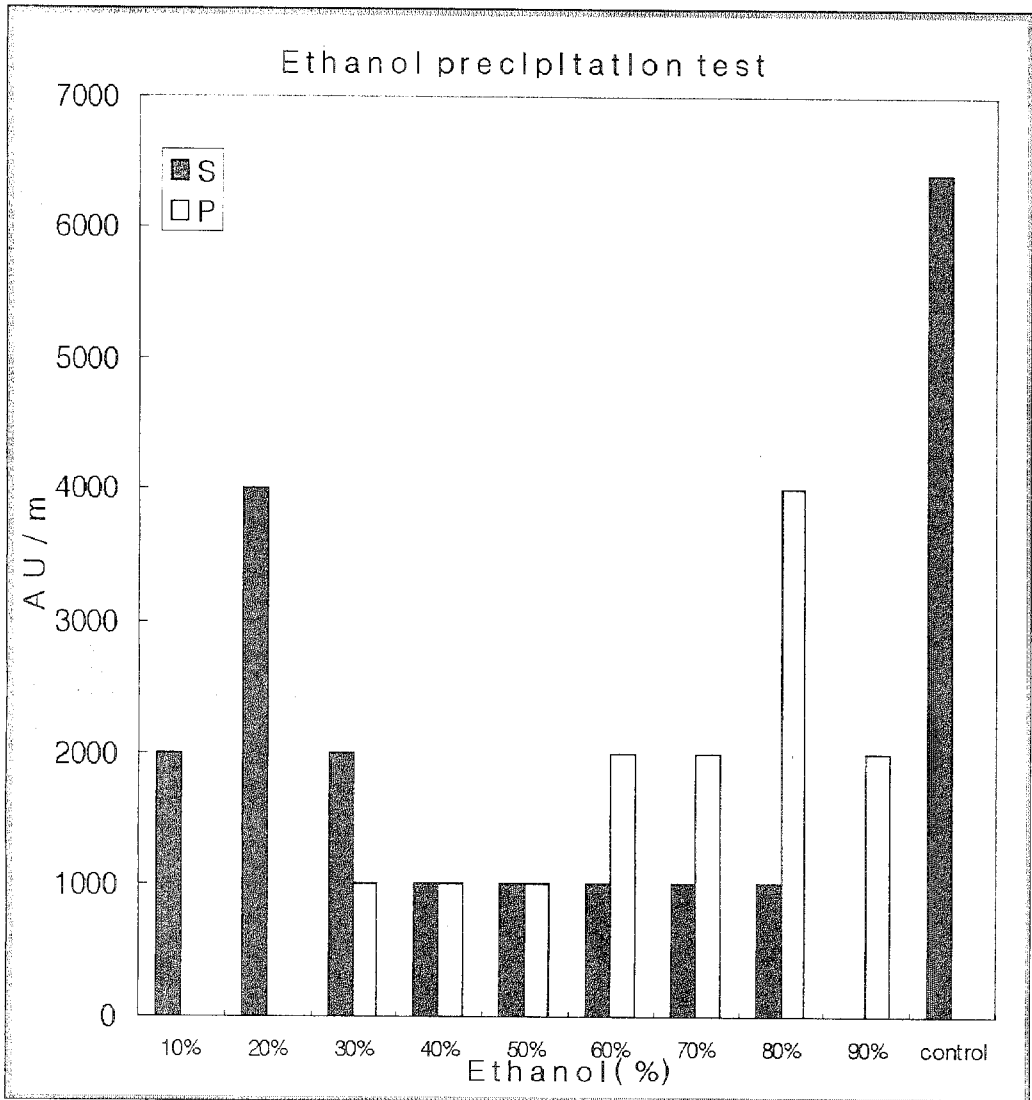
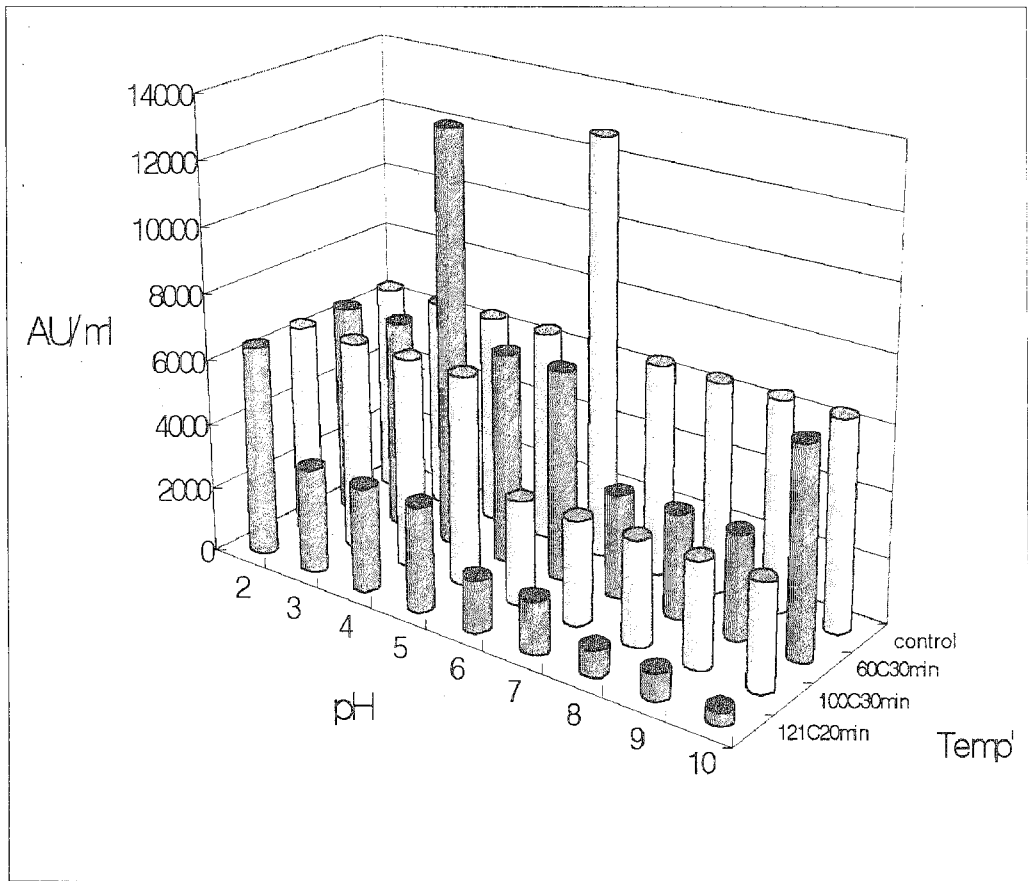


Fig. 16. Molecular stability of purified lactococcin KCA2386 over different pHs at various heat treatment



6. 유용 박테리오신의 유전특성 규명

가. 박테리오신 유전자의 소재 규명

Acridine orange를 이용, optimal condition 보다 고온(45C for *Lactococcus lactis* ssp *lactis* LAB238-6, 37C for *Lactococcus lactis* LAB311-3)에서 연속 3회 계대 배양한 후 그 희석액을 MRS 배지에 평판도말하여 indicator strain으로 박테리오신 생산능에 대한 변이균주를 탐색하고 그 plasmid profile을 조사하여 박테리오신 생산 유전인자의 소재를 추적한 결과,

- *Lactococcus lactis* ssp *lactis* LAB238-6의 경우에는 50kb residential plasmid가 curing 된 변이주를 찾았으나(Fig. 17), bacteriocin 생산에는 변화가없음을 확인하였다. 따라서 lactococcin KCA2386의 생산관련 유전자는 chromosome 존재하는 것으로 사료된다.

- *Lactococcus lactis* LAB311-3의 경우, 3.7kb, 11.2kb, 15.5kb, 48kb 등 4개의 residential plasmid가 존재하고 있는 바(Fig. 18) 상기의 방법에 의해 박테리오신 생산 변이주를 탐색한 결과 15.5kb의 plasmid가 소실될 경우 박테리오신 생산능도 동시에 소실됨을 확인하였으며(Fig. 19), 따라서 lactococcin K3113의 생산은 15.5kb plasmid에 의해 이루어 짐을 규명하였다.

나. 박테리오신 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

1) Consensus-sequence dependent cloning/PCR sequencing: 현재까지 보고된 박테리오신 중 *Listeria monocytogenes*에 활성을 가진 class II bacteriocin molecule의 아미노산 서열 분석 결과는 Fig. 20에 요약된 바와 같이 그 아미노 말단 부위에 consensus sequence로 Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Gly의 listeria-active consensus motif를 소유하고 있으며(Olivier Marcise *et al.*, Journal of Biological Chemistry 272: 14277-14284, 1997), 이들 consensus sequence는 아미노 말단에서 β -turn 구조를 형성함으로써 구조적으로 중요한 기능을 하고 있는 것으로 예측되나 변이시 박테리오신 활성 및 receptor binding에는 영향이 없는 것으로 밝혀지고 있는 바(Yuhuan Chen *et. al.*, Appl. Environ. Microbiol. 63:4770-4777, 1997), lactococcin K2386 및 K3113 공히 listeria-active class II bacteriocin임을 이용하여 Fig. 21에 도시된 바와 같이 probe를 제작하고 이를 이용하여 PCR에서 각 박테리오신의 유전

자의 직접 cloning 및 sequencing을 시도하였다. 그러나 lactococcin K2386(chromosomal DNA) 및 K3113(plasmid DNA) 모두 상기의 probe에 PCR detection이 되지 않았다. 이는 lactococcin K2386 및 K3113 박테리오신에 상기의 consensus motif가 없거나 해당 유전자 부위의 구조적 특이성에 의한 annealing 장애 등에 기인하는 것으로 판단된다.

2) Transposon-dependent sequencing: 상기의 두가지 접근 외에 lactococcin KCA2386의 유전자가 chromosom에 소재함을 이용, 최근 mutacin 1140에 적용된 원리(J.D. Hillman *et al.*, Infection and Immunity 66:2743-2749, 1998)를 응용하여 Tn-917로 lactococcin KCA2386을 inactivation 시킨 후 Tn-917의 sequence로부터 직접 박테리오신의 염기서열을 sequencing하기 위한 작업을 진행하였으나 Tn917에 의한 Bac-negative 균주를 얻지 못하였다. 이는 lactococcin K2386의 생산균주인 *Lactococcus*에 대한 Tn917dml transposition specificity의 부재 때문인 것으로 판단된다.

7. 유용 박테리오신 생산균주 개량

가. Plasmid-free mutant 제작

Lactococcin KCA2386의 생산균주인 *Lactococcus lactis ssp. lactis* LAB238-6를 Acridine orange로 처리하여 56.4 Kb residential plasmid를 상실한 plasmid-free mutant를 제작하였다(Fig. 17, lane 3). 이 mutant는 lactococcin의 생산에는 변화가 없는 바 다른 박테리오신 유전자의 도입에 의한 super-producer 제작에 유용한 자원으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

나. Bacteriocin-negative mutant의 제작

Lactococcin KCA3113의 생산균주인 *Lactococcus lactis* LAB311-3을 acridine orange로 처리하여 15.4 kb residential plasmid가 상실된 bacteriocin-negative mutant를 제작하였다(Fig. 18, Fig. 19). 이 mutant는 lactococcin의 cloning 및 다른 박테리오신 유전자의 도입에 의해 새로운 표현형질의 박테리오신 생산균주를 제작할 수 있는 유전 자원으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

8. 시제품 개발

본 연구과제에서 진행된 연구 결과를 세 박테리오신에 대해 요약하면 Table 13과 같다. 이에 의거, 각 박테리오신을 2l fermenter에 의해 발효시킨 후 이를 배양액과 균체로 분리하여 동결 건조 후 분말화하여 제제화 하였다.

Table 13. 박테리오신별 연구 성과 요약표¹

Bacteriocin studied	Industrial applicability	calibration of optimal production	Molecular stability	Purification	location of genes
Lactococcin K2386	broad	37C, pH7.0	excellent	partially purified	chromosome
Lactococcin K3113	very specific	25C, pH7.0	excellent	partially purified	plasmid
Plantaricin K4612	narrow	37C, pH7.0	medium	partially purified	n.d.

1. 연구된 분자/유전속성 중 일부만 요약하였음. 세부사항은 최종 보고서 본문 참조 요망

2. n.d., *not determined*

Fig. 17. Plasmid-free mutant of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LAB238-6.
Lane 1: molecular size marker, lane 2: wild type, lane 3: plasmid-free mutant

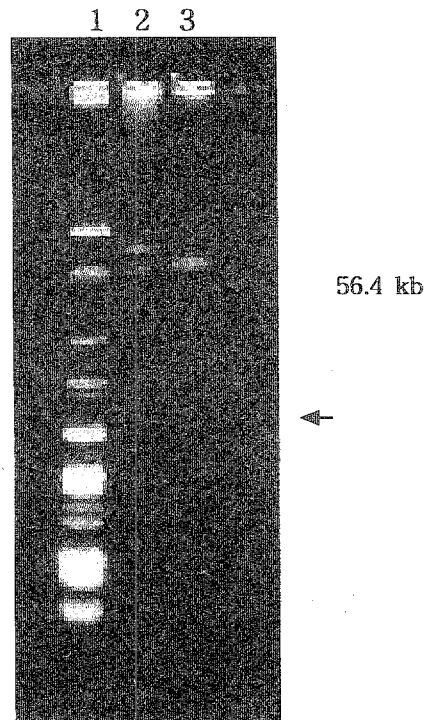


Fig. 18. Plasmid profile of bacteriocin-negative mutant of *Lactococcus lactis* LAB311-3. Lane 1: molecular size markers, lane 2: wild type, lane 3: bac^- mutant. Bacteriocin plasmid of 15.5 kb in size was marked as an arrow.

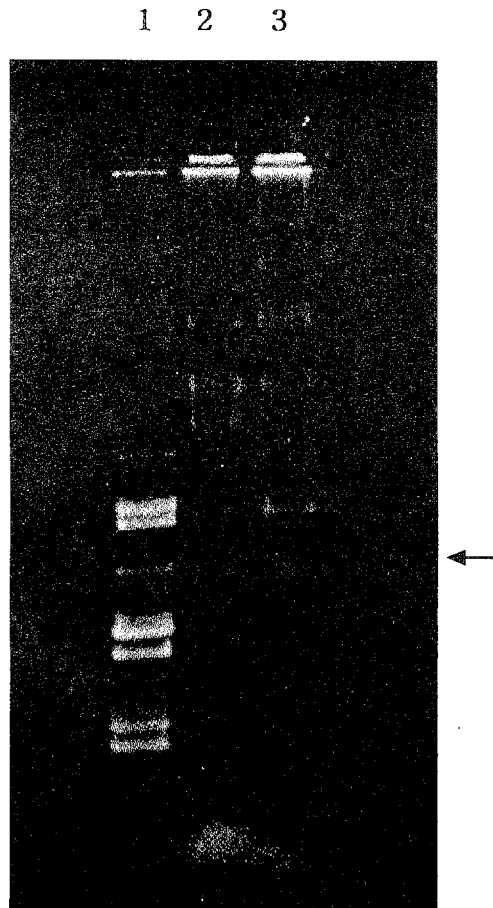


Fig. 19. Bacteriocin-negative mutant of *Lactococcus lactis* LAB311-3 on solid surface. a: wild type, b: bac⁻ mutant.

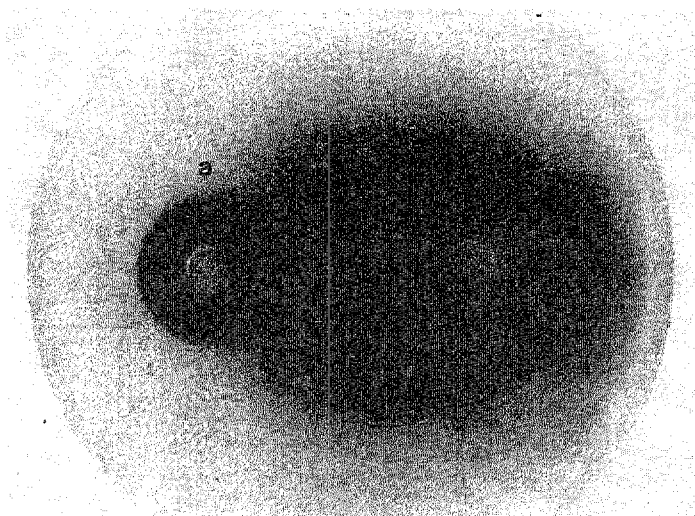


Fig. 20. Sequence comparison of *Listeria*-active bacteriocin polypeptides at the first 30 amino acids of N-terminal

Carnobacteriocin B	VN	YGNGV	S	C	SKIKCSVNWGQAFQERYTAGI
Curvacin A	ARS	YGNGV	Y	C	NNKKCWVNRGEATQSSIGGM
Sakacin P	KY	YGNGV	H	C	GKHHSXTVDWGIAIGNIGNNA
Pediocin PA-1	KY	YGNGV	T	C	GKHSCSVDWGKATTCI INNGA
Leucocin A	KY	YGNGV	H	C	TKSGCSVNWGEAFSAG VHRLA
Mesentericin Y105	KY	YGNGV	H	C	TKSGCSVNWGEAASAG VHRLA

Fig. 21. Nucleotide sequence of probe based upon YGNGV listeria-active consensus sequence

amino acid sequence	Tyr - Gly - Asn - Gly - Val
oligonucleotide sequence	TAY GGX AAY GGX GTX
	(X for A, G, T, or C ; Y for T or C)

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제1절 연구개발목표 및 평가의 착안점

1. 연구개발 목표

본 연구의 최종 목표는 식품의 자연성을 훼손하지 않으면서도 효율적으로 식품의 변패와 유해균의 번식을 제어함으로서 식품의 보존성과 유통성을 증진시킬 수 있는 천연 항균성 분자소재인 박테리오신을 한국 고유의 전통식품자원으로부터 분리, 정제하여 그 항균특성을 규명하고 이를 식품산업에서 이용할 수 있도록 산업 특성을 규명하여 궁극적으로는 산업화 제체에 이를 수 있는 기술적 기반을 마련함에 있다. 따라서 3개년차로 구분되어 진행된 연구의 연도별 목표 및 8개 세부연구목적은 다음과 같다.

- 제1차년도 목표: 전통식품자원으로부터의 박테리오신 생산균주의 분리 및 동정
 - 1) 전통식품자원의 선정 및 최적 선별 배지의 탐색
 - 2) 박테리오신 생산균주의 분리
 - 3) 분리 박테리오신 생산균주의 동정
- 제2차년도 목표: 생산 박테리오신 및 균주의 산업적 유용특성의 규명
 - 4) 분리 박테리오신의 산업적 유용성 분석
 - 5) 유용 박테리오신의 정제
 - 6) 유용 박테리오신의 유전특성 규명
- 제3차년도 목표: 박테리오신을 이용한 식품보존제의 개발
 - 7) 유용 박테리오신 생산균주 개량
 - 8) 시제품 개발

2. 평가의 착안점

상기의 연도별 연구목표와 세부 목적에 기초하여 그 성과의 평가시 각 세부연구 목적별로 우선적으로 고려해야 할 평가의 착안사항은 다음과 같다.

- 1) 박테리오신 생산 균주는 성공적으로 분리되었는가: 1차년도 연구의 목표인 박테

리오신 생산균주의 성공적 분리가 가장 중요한 평가 기준인 것으로 사료됨.

- 2) 분리된 박테리오신 생산균주의 박테리오신 특성은 산업적으로 유효한가: 분리된 균주가 생산하는 박테리오신의 항생성 범주, pH 및 열 안정성 등, 그 산업적 유효성을 판단하기 위한 연구의 진행 여부
- 3) 분리된 균주는 합리적으로 동정되었는가: 분리된 박테리오신 생산균주의 기초생리특성 및 분자/유전학적 생리특성에 의한 동정의 연구 진행 여부
- 4) 산업화 대상 박테리오신 선정은 합리적으로 이루어졌으며 선정된 박테리오신의 유용성은 체계적으로 분석되었는가
- 5) 해당 박테리오신의 정제과정은 합리적이며 그 결과는 유효하게 증명되었는가
- 6) 유효 박테리오신의 유전자 클로닝은 효율적으로 이루어 졌으며 그 과정은 논리적으로 시행되었는가.
- 7) 산업화에 유효한 균주의 개량은 적절하게 이루어 졌는가
- 8) 산업화 및 제품화에 합당한 박테리오신이 합리적으로 선정되었으며 현실적 가능성은 유효하게 증명되었는가.

제2절 연구개발 목표의 달성도

각 연도별로 설정된 8개 세부연구목적별 달성도 평가는 다음과 같은 바 전체적으로 평가할 때 전통식품 5종으로부터 유효 박테리오신 생산균주 147주를 확보하고 이중 3균주에 대해 그 동정 및 박테리오신의 분리 정제, 그리고 분자특성 및 산업화 특성을 체계적으로 규명함으로써 소기의 목적을 달성한 것으로 평가된다. 본 연구과제의 업적을 요약하면 다음의 요약표 1 및 2로 정리될 수 있다.

(요약표 1) 본 연구과제에서 개발된 대표적 균주 3종 및 그 박테리오신 요약표

Food resources	Producer microorganism	Bacteriocin produced	Presentation at
불김치	<i>Lactococcus lactis</i> spp <i>lactis</i> (LAB238-6)	Lactococcin KCA2386	미국미생물학회 보고 (97. 5. 4) 산업미생물학회 보고 (98. 5. 30)
깍두기	<i>Lactococcus lactis</i> * (LAB311-3)	Lactococcin K3113	Journal of Food Science and Nutrition 2:101-108
일반김치	<i>Lactobacillus plantarum</i> (LAB461-2)	Plantaricin KCA4612	산업미생물학회 보고 (97. 4. 25)

(요약표 2) 박테리오신별 연구 성과 요약표¹

Bacteriocin studied	Industrial applicability	calibration of optimal production	Molecular stability	Purification	location of genes
Lactococcin KCA2386	broad	37C, pH7.0	excellent	partially purified	chromosome
Lactococcin K3113	very specific	25C, pH7.0	excellent	partially purified	plasmid
Plantaricin KCA4612	narrow	37C, pH7.0	medium	partially purified	on-going

1. 연구된 분자/유전속성 중 일부만 요약하였음. 세부사항은 보고서 참조 요망

각 세부연구목표별 달성도를 위의 평가 착안점에 의해 자체 평가한 결과는 다음과 같다.

- 1) 전통식품중 균총이 다양할 것으로 판단된 식품 5종을 선발하여 이로부터 2,412 균주를 분리하였으며, 이들중 고체 배지에서 유효 항생성(effective antibiosis)를 보인 균주 821 균주를 선별, 다시 이들 중 박테리오신 생산성을 체계적으로 분별하여 최종적으로 147株의 박테리오신 생산균주를 성공적으로 분리하였음(달성도 100%).
- 2) 이들 박테리오신 생산균주 147株에 대해 식품유해균에 대한 길항성을 조사, 가장 유망한 박테리오신으로 판단되는 3균주를 1차적으로 선발하여 동정 및 생산 박테리

오신의 기초 분자 특성연구를 시행하였으며 각각 Lactococcin KCA2386, Leucocin KCA3113, Plantaricin KCA4612로 명명하였음. 이들중 특히 Lactococcin KCA2386은 그 항생성에 있어 *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*에 유효하는 등 nisin에 버금가는 광범위한 항생성을 보이고 있을 뿐만 아니라 그 안정성에 있어서는 nisin보다 월등하여 산업적으로 매우 유용한 박테리오신인 것으로 판단됨.(달성도 100%)

3) 1차년도 연구 결과 1차적으로 선정된 박테리오신 생산균주는 상기의 요약표 1에 명기된 바와 같이 동정되었으며 박테리오신 중 Lactococcin K2386 및 Leucocin K3113에 대해서는 96년도 추계 산업미생물학회(96. 10. 25)에 보고하였음.(달성도 100%)

4) 산업화 대상 박테리오신 선정의 합리성과 선정된 박테리오신의 유용성: 上記 3종의 박테리오신은 전통식품으로부터 분리된 총 2,412 균주로부터 검색된 147종의 박테리오신 중에서 항생성의 광범위성, 유효성, 안정성 등의 측정을 거쳐 선택된 것으로서, 유해균과의 길항성, 생산최적조건의 선정, 균주 안정성, 박테리오신 분자의 열·pH·용매 안정성 등의 실험을 시행하여 그 산업적 유용성을 합리적으로 검증한 것으로 판단됨(목표 100% 달성)

5) 박테리오신의 정제도와 정제 공정의 산업화 유효도: 3종의 박테리오신 중 2종의 lactococcin에 대해서는 산업적 규모에 적합한 수준의 부분정제가 시행되었음(달성도 95% 이상)

6) 유전 특성 규명: 박테리오신 생산관련 유전인자의 mutation study에 의해 2종의 lactococcin 중 KCA2386의 유전자는 chromosome에 소재하며 K3113의 유전인자는 15.5kb plasmid에 소재함을 밝혀 내었음. 박테리오신 유전자의 구조적 특성으로 인하여 유전자 분리에는 성공치 못하였으나 그 접근 방법은 합리적이었으며 산업적으로 유용한 결과를 획득한 것으로 사료됨(달성도 90%)

7) 산업화에 유효한 균주의 개량: lactococcin K2386의 plasmid-free 변이주와 lactococcin K3113의 bac-negative 변이주 제작에 성공함으로써 차후 super producer의 연속 연구 혹은 개발이 가능토록 하였음(달성도 95% 이상)

8) 산업화 및 제품화에 합당한 박테리오신의 합리적으로 선정 및 유효성: 상기 3개 박테리오신의 대량 배양 및 분말화에 성공하였음(달성도 95% 이상)

제3절 대외 기여도

본 연구과제에서 개발된 새로운 박테리오신은 차후 국내 발효식품 및 천연식품

의 보존성 증진을 위한 새로운 분자소재의 하나로 산업계 및 학계가 공유하는 귀중한 연구자산이 될 것으로 기대되며 또한 이의 개발과정의 방법적 접근 방법은 차후 국내에서 새로운 박테리오신을 개발하고 연구함에 있어 소중한 공유자산으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

본 연구과제에 의해 개발된 3종의 새로운 박테리오신은 한국의 대표적 전통식품인 김치, 깍두기 및 물김치 등으로부터 분리된 것으로서 본 연구과제의 수행에 의해 그 생산균주의 동정, 박테리오신의 부분정제 및 산업적, 유전적 특성 등이 학문적, 기술적 지평에서 종합적으로 조사되었다. 따라서 이들 자료를 국내 식품산업계에 공개하여 각 식품별, 산업현장별 수요에 맞는 박테리오신을 식품보존제로서 산업화 생산할 수 있도록 활용할 수 있으며, 사료산업계에서는 사료의 보존성을 높이는 첨가제로서 활용할 수 있고, 식품포장업계에서는 이를 항균포장재의 주성분으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

Appedix Table 1. Screening results for microoganisms producing antagonistic substances from traditional food resources.

Abbreviations of indicator strains are as follows: NCK235, *Lactobacillus delbrueckii-lactis* ATCC4797; 170-12, *Lactobacillus curvatus* CA170-12; IS61, *Listeria monocytogenes* ATCC1911; IS71, *Staphylococcus aureus* ATCC25923; IS81, *Enterococcus faecalis* ATCC19433; IS82, *Enterococcus faecium* ATCC11576.

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
252-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
253-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
256-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	++	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
257-1	-	-	-	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	-	-	-	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-
12	-	-	-	+	-	-
258-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
259-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
260-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
260-8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
261-1	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	-	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
262-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
263-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
264-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
264-4	-	++	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	++	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
265-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
266-1	+	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	-
5	+	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	+	-
10	-	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	+	-	+	+	+	-
267-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	+	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
267-9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	+	++	+	+	+	-
268-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	++	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
269-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
270-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	++	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
271-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
272-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	-	-	+	-	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
273-1	+	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
274-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
274-7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
275-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	-
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	-
8	-	-	+	+	+	-
9	-	-	+	+	+	-
10	-	-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	-
12	-	-	+	+	+	-
276-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	++	-	++	-	+	+
12	-	-	++	-	+	+
277-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
278-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	+	+	++	+	+	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	++	+	++	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-
279-1	-	-	-	-	-	-
2	+	+	++	+	+	+
3	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	++	+	+	+
7	+	-	-	-	-	-
8	+	-	++	+	+	-
9	-	-	-	-	-	+
10	++	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	++	+	+	+
280-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
281-1	++	-	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-
3	++	-	+	+	+	+
4	++	-	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
281-7	++	-	+	+	+	+
8	++	-	+	+	+	+
9	++	-	-	-	-	-
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
282-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	++	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	++	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
283-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	+	-	++	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	++	-	++	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
284-1	-	-	-	-	-	-
2	++	-	++	+	+	+
3	-	-	+	-	-	+
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
285-1	++	-	+	+	+	+
2	++	-	+	+	+	+
3	-	-	++	+	-	-
4	++	+	+	-	+	+
5	-	-	-	+	-	-
6	-	-	+	-	+	+
7	++	-	+	+	+	+
8	-	-	+	-	+	+
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-
286-1	-	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	+	-	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	++	-	+	+	+	+
7	-	-	+	-	-	-
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	-	-	-
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
287-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	+	-	++	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	+	+
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
288-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	+	+	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
288-7	-	-	+	-	-	-
8	-	-	+	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-
289-1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	++	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	+	+
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
290-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
291-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	+	-	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
292-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+	-	+
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	+	+
293-1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-
294-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	++	+	+	+	+	+
5	-	-	-	+	-	-
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+	-
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
295-1	-	-	+	-	+	-
2	-	-	-	-	-	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
295-7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
296-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	-
4	-	-	-	-	-	+
5	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
297-1	++	-	+	+	+	+
2	-	-	+	-	-	-
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	-	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	-	+
12	+	-	+	+	+	+
298-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
299-1	-	-	-	+	+	+
2	-	-	-	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+
5	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	-	-	-
9	-	-	+	-	-	-
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
300-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+
6	++	-	+	+	+	+
7	-	-	+	-	-	-
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	+
301-1	+	-	+	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	+	-	++	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
302-1	+	-	+	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
302-7	+	-	+	+	-	-
8	-	-	+	-	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	-	-	-	+	-	-
12	-	-	-	-	-	-
303-1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	+	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	-	-	-	+	-	-
304-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-
3	+	-	-	+	-	-
4	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	+	-	-
6	-	-	-	+	+	-
7	-	-	-	+	-	-
8	+	-	-	+	-	-
9	-	-	-	+	-	-
10	+	-	-	+	+	-
11	+	-	-	+	+	-
12	+	-	-	+	+	-
305-1	+	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	-	+	-	-
7	+	-	-	+	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	-	+	-	-
12	-	-	-	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
306-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	-	+	-	-
307-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
308-1	-	-	+	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+	-	-
4	-	-	+	-	-	-
5	+	-	+	-	-	-
6	+	-	+	-	-	-
7	-	-	+	-	-	-
8	+	-	+	-	-	-
9	+	-	+	-	-	-
10	+	-	+	-	-	-
11	+	-	+	-	-	-
12	+	-	+	-	-	-
309-1	-	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	++	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
309-7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
310-1	+	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	-	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
311-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	++	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
312-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
313-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	-
4	+	-	+	+	-	-
5	-	-	+	-	-	-
6	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	+	-	+	+	+	-
314-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	-
5	+	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	+	-	+	+	+	-
315-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	-
5	+	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	-	-	+	+	+	-
9	-	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	-	-	+	+	+	-
316-1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	-
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
309-1	-	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	++	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
317-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	-
5	-	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	++	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	-	-	+	+	+	-
318-1	-	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	-
5	+	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	+	-	+	+	+	-
319-1	+	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	-
5	-	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	-
12	+	-	+	+	+	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
320-1	+	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	-
5	+	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	-	-	+	+	+	-
9	-	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
321-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
322-1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	-
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	-
8	-	++	++	+	++	++
9	-	-	+	+	+	-
10	-	-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	-
12	-	-	+	+	+	-
323-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	++	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
323-7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
324-1	+	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	+	-	+	-	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
325-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
326-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
328-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-
5	-	-	-	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
330-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	-	-
11	-	-	+	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
331-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	-	-	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	-	-	+
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	-	+	+
10	-	-	+	-	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
332-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
332-7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
333-1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	-
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	-
8	-	-	+	+	+	-
9	-	-	+	+	+	-
10	-	-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	-
12	-	-	+	+	+	-
334-1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	-
12	-	-	+	+	+	-
335-1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	-
12	-	-	+	+	+	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
336-1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	-
9	-	-	+	+	+	-
10	-	-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	-
12	-	-	+	+	+	-
337-1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
338-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	++	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
339-1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
339-7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
340-1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
341-1	+	+	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	+
7	++	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	-
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
342-1	+	-	+	+	-	+
2	-	-	+	+	-	+
3	++	-	+	+	-	+
4	++	-	++	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	++	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
343-1	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
344-1	+	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	-	+
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
345-1	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	+	-	-	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	++	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	-	+	+	+
9	+	-	-	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	-	+
12	-	-	+	+	+	+
346-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	-
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	-

	IS61	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
346-7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	-	+	+
9	+	-	++	+	+	+
10	+	-	+	+	+	-
11	++	-	++	+	+	-
12	+	-	+	+	+	+
347-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	+	+
4	+	-	+	+	-	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	+
8	+	-	+	+	-	+
9	+	-	+	+	-	+
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	+
12	+	-	+	+	-	+
348-1	-	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
349-1	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	-	+
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	++	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
350-1	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	-
5	+	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	+	-	+	+	+	-
351-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	++	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
352-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	++	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	++	-	++	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	-	-
353-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	+	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
353-7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	+	-	+	+	+	-
354-1	+	-	++	+	-	-
2	+	-	++	+	-	-
3	+	-	++	+	+	-
4	+	-	+	+	+	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	++	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	-	-	-
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	++	+	+	-
355-1	++	-	++	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	++	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	+	-	+	+	+	-
356-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	-
4	+	-	++	+	+	-
5	+	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	-
7	++	-	++	+	-	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	-
12	+	-	+	+	+	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
357-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	+
8	++	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	+	+	-	-
12	++	-	+	+	-	-
358-1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	-	++	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	-	-	+	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	-	++	+	+	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	-
11	+	-	++	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
359-1	++	-	-	-	-	-
2	++	-	-	-	-	-
3	++	-	-	-	-	-
4	++	-	-	-	-	-
5	++	-	-	-	-	-
6	++	-	-	-	-	-
7	++	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	++	-	-	-	-	-
10	++	-	-	-	-	-
11	++	-	-	-	-	-
12	++	-	-	-	-	-
360-1	+	-	++	+	-	-
2	+	-	++	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	-	-	+	-	-	-
6	+	-	++	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
360-7	+	-	+	-	-	-
8	+	-	+	-	-	-
9	+	-	+	-	-	-
10	+	-	+	-	-	-
11	+	-	+	-	-	-
12	+	-	+	-	-	-
361-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	+	+	-
3	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	-	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	-
10	-	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	-
12	-	-	+	-	+	-
362-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	+	-	-
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-
7	++	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	-	+
12	-	-	+	+	+	+
363-1	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	+	-	-	+	-	+
4	+	-	+	+	-	+
5	+	-	+	+	-	+
6	+	-	+	-	-	+
7	+	-	-	+	+	+
8	+	-	+	+	-	+
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
364-1	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	-	+
3	+	-	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+
7	+	-	-	+	+	+
8	+	-	+	-	+	+
9	+	-	-	+	-	-
10	+	-	+	+	-	+
11	+	-	-	+	+	+
12	++	-	+	+	+	+
365-1	-	-	-	-	+	-
2	-	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+
7	-	-	-	+	-	+
8	-	-	+	+	-	+
9	-	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	-	+
366-1	+	-	-	+	+	+
2	+	-	-	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	+	-	+
5	+	-	+	+	-	+
6	++	-	+	+	+	+
7	+	-	-	-	-	-
8	+	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	++	-	+	+	+	+
367-1	+	-	+	+	-	-
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	+	-	-	-
4	+	-	+	-	-	-
5	+	-	+	-	-	-
6	+	-	+	+	+	+

	NCK2351	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
367-7	+	-	+	-	-	-
8	+	-	+	-	+	+
9	+	-	+	-	-	-
10	+	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	-	+
12	+	-	+	+	-	+
368-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
369-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	-	+	-
3	+	-	+	+	+	+
4	+	-	+	-	-	-
5	+	-	+	+	-	+
6	++	-	+	-	+	+
7	-	-	+	+	-	+
8	-	-	+	-	-	-
9	-	-	+	+	-	+
10	+	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	-	+
12	+	-	+	+	-	+
370-1	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	-	+	-	-
5	-	-	-	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	+	-	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	-	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
371-1	+	-	-	-	-	-
2	++	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	-	+
4	-	-	+	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-
6	-	-	+	+	+	+
7	++	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	++	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
372-1	++	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	++	-	+	+	+	+
5	-	-	+	-	-	-
6	+	-	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+
10	++	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
373-1	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	++	-	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	++	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	-	-	+	-	-	-
12	-	-	+	-	-	-
374-1	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	+	-	+	-	-	-
4	-	-	-	+	+	+
5	-	-	-	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
374-7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
375-1	-	-	+	-	-	-
2	+	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
376-1	-	-	+	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-
3	+	-	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+
5	-	-	+	-	-	-
6	-	-	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	-	-	+	-	-	-
10	+	-	++	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	++	-	++	+	+	+
377-1	+	-	+	-	-	-
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	+	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+
7	-	-	+	-	-	-
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
378-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-
3	+	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	+	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	+
12	++	-	+	+	+	+
379-1	++	-	+	+	+	+
2	-	-	+	-	-	-
3	++	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	++	-	+	+	+	+
7	+	-	+	+	-	-
8	-	-	+	-	-	-
9	+	-	+	+	-	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
380-1	+	-	+	-	-	-
2	-	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	-	-
4	-	-	+	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-
6	+	-	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	-	-	+	-	-	-
9	-	-	+	-	-	-
10	++	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	++	-	+	+	+	+
381-1	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	+	-	+	-	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	+	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
381-7	-	-	+	+	-	+
8	-	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
382-1	-	-	+	+	+	+
2	++	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	-
4	-	+	+	+	+	+
5	++	+	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
383-1	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+
3	-	-	+	-	-	-
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
384-1	+	-	+	+	-	+
2	+	-	+	+	-	+
3	-	-	+	-	-	+
4	-	-	+	-	+	+
5	++	-	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	-	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	-	+	-	-
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
385-1	+	-	+	+	-	+
2	+	-	+	+	-	+
3	-	-	+	-	-	-
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	+	-	-
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
386-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	-	+
3	-	-	+	+	-	+
4	-	-	+	+	-	-
5	++	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	+
7	-	-	+	+	-	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
387-1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	++	-	+	+	+	+
6	-	-	-	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
388-1	-	-	-	-	-	-
2	++	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	-	-

	NCK235	170-12	IS61	IS71	IS81	IS82
388-7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
389-1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
390-1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+

	NCK235	170-12		NCK235	170-12
430-1	-	-	434-1	-	-
2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	-	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	-	-	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-
431-1	-	-	435-1	-	-
2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	++	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	++	-
6	-	-	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	++	-	12	-	-
432-1	-	-	436-1	-	-
2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	-	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	-	-	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	+	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-
433-1	-	-	437-1	-	-
2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	-	-
4	-	-	4	++	-
5	-	-	5	-	-
6	-	-	6	++	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	++	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-

	NCK235	170-12		NCK235	170-12
438-1	-	-	442-1	-	-
2	+	-	2	-	-
3	-	-	3	-	-
4	++	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	++	-	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	++	-	10	-	-
11	-	-	11	+	-
12	-	-	12	-	-
439-1	-	-	443-1	-	-
2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	-	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	-	-	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	++	-
9	+	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	++	-	12	-	-
440-1	-	-	444-1	-	-
2	+	-	2	-	-
3	-	-	3	-	-
4	-	-	4	+	-
5	+	-	5	-	-
6	-	-	6	-	-
7	-	-	7	+	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	+	-	11	++	-
12	-	-	12	-	-
441-1	-	-	445-1	-	-
2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	+	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	++	-	6	-	-
7	-	-	7	+	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	++	-	12	-	-

	NCK235	170-12		NCK235	170-12
446-1	-	-	450-1	-	-
2	-	-	2	+	-
3	-	+	3	-	-
4	++	-	4	-	-
5	-	-	5	+	-
6	-	-	6	-	-
7	++	-	7	++	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	+	-
12	-	+	12	-	-
447-1	-	-	451-1	-	-
2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	++	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	-	-	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-
448-1	-	-	452-1	+	-
2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	-	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	-	-	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	+	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-
449-1	-	-	453-1	-	-
2	-	-	2	+	-
3	-	-	3	-	-
4	+	-	4	-	-
5	+	-	5	-	-
6	+	-	6	+	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	++	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-

	NCK235	170-12		NCK235	170-12
454-1	+	-	458-1	+	-
2	+	-	2	-	-
3	-	-	3	++	++
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	-	-	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	++	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-
455-1	-	-	459-1	-	-
2	-	-	2	-	-
3	+	-	3	-	-
4	-	-	4	++	-
5	-	-	5	++	-
6	-	-	6	++	-
7	-	-	7	-	-
8	+	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-
456-1	-	-	460-1	++	-
2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	-	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	-	-	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	+	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-
457-1	+	-	461-1	+	-
2	+	-	2	+	-
3	++	-	3	+	-
4	-	-	4	-	-
5	++	-	5	-	-
6	-	-	6	+	-
7	-	-	7	+	-
8	-	-	8	-	-
9	++	++	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-

	NCK235	170-12		NCK235	170-12
462-1	+	-	466-1	-	-
2	+	-	2	++	-
3	-	-	3	-	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	-	-	6	-	-
7	+	-	7	-	-
8	-	-	8	+	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	-	-
12	-	-	12	-	-
463-1	-	-	467-1	-	-
2	++	-	2	+	-
3	+	-	3	-	-
4	+	-	4	-	-
5	-	-	5	++	-
6	-	-	6	-	-
7	+	-	7	-	-
8	-	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	++	-
11	-	-	11	-	-
12	+	-	12	-	-
464-1	++	-	468-1	-	-
2	++	-	2	++	-
3	-	-	3	-	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	-	-	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	++	-	8	-	-
9	-	-	9	-	-
10	-	-	10	+	-
11	-	-	11	+	-
12	-	-	12	-	-
465-1	+	-	469-1	-	-
2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	++	-
4	-	-	4	-	-
5	-	-	5	-	-
6	++	++	6	-	-
7	-	-	7	-	-
8	-	-	8	++	-
9	-	-	9	++	-
10	-	-	10	-	-
11	-	-	11	+	-
12	-	-	12	+	-

천연식품 보존제 대량생산균주 및 분리공정 개발(협동과제-2)

Genetic Breeding of *Lactococcus* sp. 10790 and
Separation Process Development

1998.12.20.

협동연구책임자 : 이 용 역
연구 원 : 주 남 역
박 종 성
김 유 리
이 기 영
방 성 권
김 형 석
김 미 현

동 국 대 학 교

Dongguk University

여 백

제 출 문

한국식품개발연구원 장 귀하

본 보고서를 세부과제 “천연 식품 보존제 대량 생산균주 및 분리공정 개발”
의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

협동연구기관명 : 동국대학교
협동연구책임자 : 이 용 역
연 구 원 : 주 남 역
박 종 성
김 유 리
이 기 영
방 성 권
김 형 석
김 미 현

여 백

요 약 문

I. 제 목

천연 식품 보존제 대량 생산균주 및 분리공정 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

박테리오신은 젖산균에서 생산되는 항균작용을 가진 단백질 성분의 천연물질로서 인체에 무해하며 몸 안에서 쉽게 분해된다. 박테리오신과 같은 신 생물소재의 항균성 물질에 관한 연구는 새로운 식품보존제의 발굴 및 안전하고 효율적인 식품 보존방법의 개발이라는 측면에서 중요하다. 본 연구개발의 목적은 이러한 박테리오신을 산업적으로 대량 생산하기 위한 균주개발의 기초를 마련하며 박테리오신의 순수분리에서 축적된 기술을 바탕으로 대량 생산에 적합한 분리공정을 개발하여 박테리오신의 실용화에 사용될 수 있는 기술을 확립하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

박테리오신 생산균주인 *Lactococcus* sp. KFCC10790으로부터 박테리오신 (lactococcin Y)의 생산을 증가시키기 위한 배양조건 및 배지조성을 확립하였다. Lactococcin Y를 ammonium sulfate 분별 침전법, 양이온 교환 크로마토그래피, gel-filtration 크로마토그래피 방법으로 순수 분리하였다. Lactococcin Y는 열에 안정하였으며 pH 2 - 6의 범위에서 안정하였다. 이 박테리오신은 살균작용을 나타내었다. Lactococcin Y는 *Bacillus*를 포함한 여러 그람양성균들에 대한 항균력을 나타내었다. Lactococcin은 여러 단백질 분해효소에 의해 분해되는 것으로 보아 단백질 성분으로 구성되어 있음을 보였다. 정제된 lactococcin의 분자량은 tricin-SDS-PAGE에 의해 2,5 kDa 인 것으로 결정되었다. 아미노산 분석 결과 소수성 아미노산의 조성이 높은 것으로 나타났다. 17개의 아미노 말단 아미노산 서열이 결정되었으며 다른 박테리오신과는 유사성이 없는 것으로 나타났다. Lactococcin Y를 대량으로 정제하기 위하여 amberlite인 XAD-2 흡착 및 immobilized-mrtal affinity chromatography를 이용한 새로운 분리공정이 개발되었다. 16S ribosomal DNA 분석에 의해 KFCC10790 균주는 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*인 것으로 판명되었다. 박테리오신 활성이 없는 돌연변이주들을 분리하여 플라스미드들의 구성을 분석한 결과 박테리오신 유전자는 염색체에 존재하는 것으로 결론지었다. 결정된 아미노산 서열을 바탕으로 박테리오신 유전자를 클로닝하기 위한 탐침이 제작되었으며 Southern blot 실험으로 위치를

확인하였다. *Lactococcus* sp. KFCC10790에 존재하는 7.3 kb의 플라스미드를 분리하여 *E. coli* 벡터인 pUC19에 삽입시켜 shuttle vector(pLE57)를 제조하였고 이의 제한효소지도를 작성하였다. PCR 방법으로 박테리오신 유전자를 분리하고자 하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

한국의 전통 발효식품에 존재하는 다양한 젖산균 자원을 바탕으로 새로운 유용 박테리오신에 대한 탐색과 연구가 계속되어야 할 것이다. 단백질공학과 유전공학적인 방법을 이용하여 보다 안전하고 활성이 높으며 광범위한 항균범위를 나타내는 박테리오신의 개발이 필요하다. 박테리오신을 항생제가 아닌 천연 보존제로의 분류가 요망되며 박테리오신과 같은 신 물질 창출을 위한 노력과 투자가 증대되어야 할 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

Culture conditions of *Lactococcus* sp. KFCC10790, a bacteriocin producing strain, were studied for enhancing its production with regard to environmental and nutritional factors. Optimal composition of culture medium for bacteriocin production was determined. The optimal pH of medium and fermentation temperature were 6.0 and 30°C, respectively. Lactococcin Y, a bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. KFCC10790, has been purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, cation-exchange chromatography, and gel-filtration chromatography. Lactococcin Y was shown to be heat tolerant and stable between pH 2 and 6. It has a bactericidal mode of action. Lactococcin Y showed broad antimicrobial spectra against various gram-positive bacteria, including *Bacillus* sp. Lactococcin Y was sensitive against a number of proteases, which reveals its proteinaceous nature. Purified lactococcin Y was determined to be 2.5 kDa by tricine-SDS-PAGE. Amino acid analysis revealed high levels of hydrophobic amino acids which account for the hydrophobic nature of lactococcin Y. The first 17 amino acid residues were identified by N-terminal automatic amino acid sequencing of the isolated bacteriocin. No sequence homologous to the lactococcin Y N-terminal sequence was found in the protein data bases. Lactococcin Y was adsorbed to the resin, amberlite XAD-2 and to metal-affinity column. On the basis of these properties, a novel purification method was developed for large scale isolation for bacteriocin from *Lactococcus* sp. This method includes adsorption chromatography, immobilized metal affinity chromatography, cation-exchange chromatography, and reverse-phase chromatography steps. *Lactococcus* sp. KFCC10790 was identified as *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by 16S ribosomal RNA sequence analysis. A plasmid-curing experiment and analysis of bacteriocin -negative derivatives indicated that *Lactococcus* sp. KFCC10790 contains bacteriocin gene on its chromosome. Oligonucleotide probes based on the N-terminal amino acid sequence were constructed and Southern blot analysis was performed to detect the lactococcin Y structural gene. A shuttle vector was constructed that can replicate autonomously in *L. lactis* and *E. coli*. To obtain this vector(pLE57), a 7.3 kb cryptic plasmid of *Lactococcus* sp. KFCC10790 was cloned into pUC19 and a detailed restriction map was constructed. Two degenerate primers were synthesized to amplify the bacteriocin gene by PCR.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	267
I . Object of research	267
II . Necessity of research	268
III . Scope of research	269
Chapter 2. Present States of Technology	271
I . Achievements of research up to now	271
II . Weakness of present technology	271
III . Future prospect	272
Chapter 3. Contents and Results of Research	273
I . Purification and characterization of bacteriocin	273
II . Development of separation process for large scale production	281
III . Bacteriocin-producing strain development by genetic engineering	289
Chapter 4. Achievement of Research Objective and Contribution	294
I . Achievement of Research Objective	294
II . Contribution	294
Chapter 5. Plan for Application of the Research Results	295
I . Outcome of research	295
II . Imperfect point of research	295
III . Suggestions for research application	296

여 백

목 차

제 1 장 서 론	267
제1절 연구개발의 목적	267
제2절 연구개발의 필요성	268
제3절 연구개발의 범위	269
제 2 장 국내외 기술개발 현황	271
제1절 지금까지의 연구개발 실적	271
제2절 현 기술상태의 취약성	271
제3절 앞으로의 전망	272
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	273
제1절 박테리오신 정제 분야	273
제2절 대량생산을 위한 분리공정 개발 분야	281
제3절 유전자조작에 의한 박리오신 생산균주 개발 분야	289
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	294
제1절 연구개발 목표 달성도	294
제2절 대외 기여도	294
제 5 장 연구개발 결과 및 활용계획	295
제1절 연구개발의 성과	295
제2절 연구개발의 미비점	295
제3절 연구개발의 활용에 대한 건의	296
제 6 장 참고문헌	298

여 백

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적

식품의 보존에는 화학적, 효소적 변화 및 미생물들에 의한 변성을 방지하기 위한 여러 가지 수단이 이용되는데 저온에서의 보관 및 열처리 같은 환경 적인 제어방법도 이용되기는 하지만 benzoic acid나 sorbic acid 등과 같은 화학보존제나 방부제가 많은 부분을 차지하고 있다. 그러나 화학보존제는 오랫동안 식품 저장에 사용되어 왔음에도 불구하고 공중보건 상의 위해문제 때문에 여러 계층에서 논란이 되어온 것이 주지의 사실이며 실제로 그 자체의 독성 때문에 사용 한계가 까다롭다. 그 이외의 물질로서 식품에 사용되고 있는 물질로서는 항생물질이 있으나 이 역시 식품류에 사용되었을 경우 인체에 이행되어 병원균들에 대한 내성을 증가시키는 등 사용에 문제가 있으며 현재 우리 나라에서는 식품첨가제로 허용되지 않고 있다. 따라서 식품보존에 사용될 물질로서 가능한 한 독성이 적고 사용한계가 넓으며 인체에 이행되었을 때 쉽게 분해되거나 무해한 물질의 개발이 필요하다. 이와 같은 물질로서 알려져 있는 것이 젖산균 등으로부터 생성되는 단백질 성분의 길항물질인 bacteriocin류가 있는데 이는 인체에 무해하며 몸 안에서 쉽게 분해되는 것으로 알려져 있다.

Bacteriocin은 항균작용을 가진 단백질 성분의 천연물질로서 분자량이 작고 안정하며 *Lactococcus*, *Lactobacillus* 및 *Pediococcus* 등의 여러 젖산균들로부터 생성된다(Klaenhammer 1988, Ralph 등 1995). 이들 젖산균이 생산하는 bacteriocin은 현재 그 분자특성에 따라 4개의 군(class)으로 분류되며, *Lactococcus*가 생산하는 nisin과 같이 lanthionine ring을 가지고 있는 bacteriocin (lantibiotic)을 class I bacteriocin으로, 작고 열에 안정하나 lanthionine을 가지고 있지 않은 bacteriocin을 class II bacteriocin으로, helveticin과 같이 분자가 크고 열에 약한 bacteriocin은 class III bacteriocin으로, lactocin 27처럼 주성분인 단백질 분자가 탄수화물 및 지질 분자와 결합되어 있는 복합 bacteriocin을 class IV bacteriocin으로 각각 분류하고 있다(Klaenhammer 1993). 기존의 항생제는 미생물의 2차 대사산물인데 반하여 bacteriocin은 ribosome에서 생합성되는 단백질로서 인체에 섭취되는 즉시 소화기관의 단백질 가수분해효소에 의해 분해됨으로써 인체에 무해하고 잔류성이 없어 내성을 일으킬 염려가 없어 새로운 생물학적 보존제 내지는 발효식품의 생물 제어제로 그 효용이 크게 기대되고 있다.

현재까지 여러 종류의 bacteriocin들이 분리되어 보고되어 왔으나 가장 연구가 많이 된 것은 *Lactococcus lactis*로부터 생성되는 nisin이다(Hurst 1981). Nisin은 Mattick과 Hirsch(1947)에 의해 처음 발견되었으며 Gross등(1971)이 보고한 분자구조를 보면 lanthionine과 β -methylanthionine과 같은 희귀 아미노

산을 포함하고 있으며 모두 34개의 아미노산으로 구성되어 있다. Nisin은 현재 영국에서 상품화되어 세계 47개국에서 사용되고 있으며 1988년 미국에서도 GRAS(Generally Regarded As Safe)물질로 인정받아 FDA의 승인을 획득하였으며 앞으로 그 시장이 갈수록 커질 전망이다.

Bacteriocin과 같은 항균성 물질에 관한 연구는 새로운 식품보존제의 발굴 및 안전하고 효율적인 식품 보존방법의 개발이라는 측면에서 중요함에도 불구하고 우리 나라에서는 이와 같은 항균물질의 응용적인 연구는 물론 기초적인 연구도 미약한 실정이다. 지금까지 발표된 bacteriocin 관련 논문들은 bacteriocin 생성 미생물들을 자연계로부터 분리, 검색하여 이들 균주의 특성 및 발효조건, 항균 spectrum 등을 조사한 것이 대부분이며 아직까지 bacteriocin을 순수 정제하여 그 물리, 생화학적 특성 및 아미노산 서열을 결정한 것은 매우 적다. 최근에는 bacteriocin 생성 유전자의 cloning 같은 분자생물학적 연구가 진행되고 있으나(Dodd등 1990, Muriana등 1991) 이 역시 단지 몇 종류의 bacteriocin 생성 유전자에 대한 염기서열이 밝혀져 있을 뿐이다. Bacteriocin은 생성 균주에 따라 그 종류가 다양하고 항균 spectrum 및 작용기작 등이 서로 다르므로 새로운 bacteriocin의 발굴 및 이들에 대한 계속적인 연구가 필요하다.

본 연구개발의 목적은 이러한 bacteriocin을 산업적으로 대량 생산하기 위한 균주개발의 기초를 마련하며 bacteriocin의 순수분리에서 축적된 기술을 바탕으로 대량 생산에 적합한 분리공정을 개발하여 bacteriocin의 실용화에 사용될 수 있는 기술을 확립하는데 있다.

제2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

Bacteriocin은 종류에 따라 특정 미생물들에 대해서만 성장억제 효과를 나타내므로 이들 물질의 구조와 항균 spectrum과의 관계 같은 기초과학 적인 연구가 필요하다. Bacteriocin은 인체 내에서 쉽게 분해되는 단백질로 이루어진 천연의 항균물질로서 식품보존제로 사용할 경우 인체에 무해하며 식품의 저장기간 및 안전성을 증진시킬 수 있다. 현재 국내에서는 식품보존 및 저장을 위한 첨가제로 항생제, 유기산 등의 화학물질을 사용하고 있으며 이에 대한 유해성은 인식하고 있으나 아직 이를 대체할만한 물질을 개발하지 못하고 있는 실정이다.

한국의 전통식품은 그 주종이 발효식품으로서 세계적으로 가장 풍부한 젖산균 자원을 갖고있으며 새로운 유용 bacteriocin생산 젖산균의 개발에 최적 환경을 소유하고 있다. 이러한 점을 감안할 때 상대적으로 풍부한 bacteriocin 생산균 자원을 갖고 있는 한국에서 nisin에 버금가는 혹은 그 이상의 산업적 효용성이 있는 bacteriocin을 개발할 경우 그 산업적 이득은 국내 김치 등 세계화 가능 품목의 시장확대 뿐만 아니라 인체 무독의 새로운 항균성 천연 보존제 혹은 제

어제로서 세계 시장을 석권함으로써 다대하고도 광범위한 것으로 판단된다.

2. 경제·산업적 측면

현재 식품보존제로 사용되고 있는 bacteriocin은 *Lactococcus lactis*로부터 생성되는 nisin 하나 뿐이며 그 생산과 판매가 특정회사에 의해서만 이루어지고 있고 우리 나라에서도 수입되고 있다. 국내에서는 생물산업 관련 제품들의 대부분이 수입되고 있거나 외국의 기술도입에 의존하고 있는 실정이므로 이에 따른 경비 부담이 가중되고 있다. 따라서 nisin에 버금가는 bacteriocin의 국내개발이 시급하다. 새로운 신물질의 개발 면에서 볼 때 bacteriocin은 의약 및 식품 등 생물산업에 응용성이 뛰어난 소재로서 한국이 세계적으로 풍부한 젖산발효식품을 보유하고 있는 점을 감안할 때 새로운 식품보존제로서 세계시장에 진출할 수 있는 가능성이 높다.

Nisin은 자체의 항균 spectrum에 제한이 있어 그 사용범위가 좁다는 문제점이 있다. 따라서 국가 경쟁력 강화의 일환으로 항균범위가 넓은 새로운 bacteriocin의 개발이 시급하며 또 김치 등과 같은 우리 나라 고유의 식품에 적합한 bacteriocin의 발굴 및 개발이 요구된다. Bacteriocin의 특성과 안전성으로 볼 때 다양한 항균 spectrum의 bacteriocin들이 개발된다면 거의 모든 분야의 식품류에 적용이 가능하고 또한 발효식품에 사용할 경우 균일성을 향상시킬 수 있다. bacteriocin을 식품보존제로 사용할 경우 냉동고 같은 특수한 저장시설이 없어도 장기간 보존이 가능하므로 막대한 경제적 이익을 가져올 것으로 기대된다.

3. 사회·문화적 측면

요즘 사회적으로 문제가 되고 있는 식품 제조 연월일의 조작이나 유효기간의 변조 등은 장기간 보관이 어려운 식품들에서 자주 발생하는 문제이다. Bacteriocin이 실용화되고 그 안전성 및 효과가 입증된다면 이러한 문제는 줄어들 것이고 소비자들도 안심하고 식품을 구입할 수 있게 될 것이다. 현재 전세계적으로 식품가공 및 보존에 사용되는 항생제, 아미노산, 유기산과 같은 화학보존제는 그 인위성과 발암성 등으로 인하여 소비자로부터 강한 거부감을 일으키고 있으므로 천연의 식품보존제이자 다양한 식품에의 응용이 가능한 bacteriocin은 이러한 소비자 층의 욕구와 현대사회의 경향에 부합되는 훌륭한 분자소재이다. 여러 종류의 bacteriocin들이 나타내는 항균spectrum의 다양성과 bacteriocin의 광범위한 응용성으로 볼 때 bacteriocin에 대한 연구는 우리 사회에 그 파급효과가 매우 클 것으로 기대된다.

제3절 연구개발의 범위

천연식품 보존제로 이용될 수 있는 새로운 길항물질의 대량생산을 위한 균주 개발의 첫 단계는 bacteriocin의 최적생산을 위한 배양조건을 확립하고 bacteriocin을 순수 정제하여 물리·생화학적 특성을 밝히고, 항균범위 및 작용 기작을 측정하며, 아미노산 서열을 결정하는 것이다. 이를 위하여 bacteriocin 생산균주인 *Lactococcus* sp. KFCC10790의 배양조건 즉, 배지의 조성 및 pH, 배양온도 및 배양시간, 배양방법 등을 확립한다. 배양액에 존재하는 bacteriocin의 순수분리를 위해 여러 가지 chromatography 방법들을 시도하며, 정제된 bacteriocin을 이용하여 분자량 및 최적활성 pH 및 온도, pH와 온도에 대한 안정성을 조사하고 항균범위를 결정하며 항균기작(mode of action)을 밝힌다. 최종적으로 bacteriocin의 아미노기 말단의 아미노산 서열을 결정하여 다른 bacteriocin의 아미노산 서열과 비교하며, bacteriocin 유전자의 클로닝을 위한 탐침의 제조에 필요한 정보를 얻는다.

Bacteriocin의 산업화를 위해서는 bacteriocin의 대량생산에 필요한 균주개발 및 분리공정의 개발이 중요하다. 이를 위해 bacteriocin 생산균주의 성장과 bacteriocin의 생산에는 영향을 주지 않으면서 값이 저렴한 배지를 조제하고, bacteriocin의 대량 정제에 적합한 분리공정 방법을 개발하며 이를 바탕으로 생산된 bacteriocin의 정제 정도를 파악한다. 유전자 조작에 의한 bacteriocin 생산균주의 개발을 위해 bacteriocin 생산균주인 *Lactococcus* sp. KFCC10790와 다른 bacteriocin 생산균주들과의 분류학적 관계를 분자생물학적인 방법으로 파악하고, 아미노산 서열로부터 얻어진 정보를 바탕으로 제작된 탐침을 사용하여 bacteriocin 유전자의 위치를 파악한다.

천연식품 보존제로 이용될 수 있는 새로운 길항물질인 bacteriocin을 대량 생산할 수 있는 균주개발을 위한 노력의 일환으로 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KFCC10790으로부터 bacteriocin 생성 유전자를 분리하여 분자생물학적 분석을 통해 유전자조작에 필요한 정보를 알아낸다. Bacteriocin 유전자의 발현을 위해 *E. coli*와 *Lactococcus* 간에 상호교환이 가능한 shuttle vector를 제조하고 이의 유전자지도를 작성하며 이를 *E. coli*와 *Lactococcus*로 도입하여 안정하게 복제되는지의 여부를 조사하며 bacteriocin유전자를 여기에 삽입시켜 *Lactococcus*로 형질전환시켜서 bacteriocin 유전자를 발현시킨다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 지금까지의 연구개발 실적

Bacteriocin에 대한 국내의 연구현황을 살펴보면 단순한 미생물간의 길항작용의 확인차원에서 일부 젓산균에 대한 박연희 등 (1983)의 연구가 있으며 김치발효에 대한 nisin의 저해효과에 대한 연구로 최신양 등 (1990)의 연구가 있다. 한편 정건영 등 (1989)은 *Lactobacillus acidophilus*를 저해하는 bacteriocin의 성상에 대하여 연구하고 이들이 모두 열처리에 민감하다고 보고하였다. 또한 최신양 등 (1991)의 *Lactococcus* sp. 1112-1에서 생성되는 bacteriocin의 정제 및 성질에 대한 보고가 있으나 아미노산 서열의 분석이나 작용기작에 대한 언급이 없고, 최근에는 조재선 등 (1994)의 김치발효에 관여하는 젓산균에서의 bacteriocin의 검색과 하덕모 등 (1994)의 bacteriocin 생성 젓산균의 분리가 있으나 모두 bacteriocin의 순수정제에 대한 연구는 아니며 bacteriocin 생성 유전자의 cloning과 같은 분자생물학적 연구는 국내에서는 발표되지 않았다.

외국에서의 연구현황은 새로운 항균 spectrum을 가진 미생물의 탐색과 같은 미생물학적 연구와 bacteriocin의 정제 및 생화학적 특성조사에 관한 연구 그리고 bacteriocin 생성 유전자의 cloning 및 염기서열의 결정, bacteriocin 유전자의 발현 및 조절기작과 같은 분자생물학적 연구로 나눌 수 있다. 최근 유럽 및 구미 각국에서는 bacteriocin에 관한 연구가 극대화되고 이의 산업화가 현실화 단계에까지 이르러 그 개발 및 소재 기술이 물질특허 등의 기술 및 소재 독점 수준에까지 도달하였다. Bacteriocin 중 가장 연구가 많이 된 nisin은 Gross 등 (1971)이 최초로 구조를 밝힌 이후에 많은 응용적인 연구가 보고되어 있다. *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* 등과 같은 많은 젓산균들은 bacteriocin 생성 유전자를 plasmid에 가지고 있지만(Davey 1984, Kaletta 등 1989, Muriana 등 1991) 일부 젓산균들은 이들 bacteriocin 생성 유전자를 chromosomal DNA에 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Barefoot 등 1983, Dodd 등 1990, Joerger 등 1986). 현재까지 cloning되어 그 염기서열이 밝혀진 bacteriocin 들은 매우 적으며 3차 구조가 밝혀진 것은 없고 bacteriocin의 작용기작이나 bacteriocin의 생성에 대한 조절기작 등에 관한 연구는 아직도 미비한 편이다.

제2절 현 기술상태의 취약성

국내의 bacteriocin에 대한 연구는 외국의 선발 연구팀들의 실적에 비해 아

직 초기 단계이긴 하지만 연구 및 개발에 필요한 연구인력의 수준이나 연구장비에 있어서 국내와 외국의 차이는 그리 크지 않는 것으로 사료된다. 현재 국내에서 진행되는 bacteriocin에 관한 연구는 김치, 원유 등에서 스크리닝한 젖산균들에서 생산되는 bacteriocin에 대한 기초과학적인 연구가 대부분을 차지하고 있으며 응용 및 산업화를 위한 연구는 발표되지 않고 있다. 아직 bacteriocin에 대한 일반인의 인식이 매우 낮고 산업체에서의 bacteriocin 이용의 산업적 장점과 응용가능성에 대한 인식 및 연구개발을 위한 투자가 부족한 편이다. 현재 식품공전에는 bacteriocin이 항생물질로 분류되어 있어 이의 재분류가 요망된다. Bacteriocin은 기존의 식품보존제를 대체할 수 있는 천연보존제로서 또한 다른 미생물의 오염을 방지하여 균일한 발효를 진행시키는 발효첨가제로서 그 응용성이 다양하므로 각 특성에 적합한 bacteriocin의 발굴 및 개발이 시급하며 bacteriocin을 상품화 할 경우 요구되는 대량생산을 위한 공정개발이 필요하다.

제3절 앞으로의 전망

현재 우리 나라에서는 bacteriocin이 식품첨가제로 허용되고 있지 않으나 이는 bacteriocin에 대한 인식이 부족한 탓으로 앞으로 bacteriocin에 대한 연구가 활발히 진행되면 이 문제는 해결되리라 사료된다. Bacteriocin은 그 종류가 다양하고 같은 종의 균주들도 변종에 따라 특성이 다른 bacteriocin을 생성하므로 다양한 bacteriocin들에 대한 계속적인 연구가 진행되어야 할 것이다. 현재 국내에서는 김치의 젖산균이 생산하는 bacteriocin에 대한 다양한 연구가 진행되고 있어 그 성과가 기대되며 한국 전통 발효식품의 풍부함과 소재의 다양성에 비추어 비교적 단기간에 세계적 수준에 돌입할 것으로 예상된다. Bacteriocin은 발효첨가제나 식품보존제 등과 같은 응용의 범위가 넓고 다양한 식품에 첨가될 수 있으므로 상업적인 전망도 매우 밝다. 순수 과학적인 면에서도 bacteriocin은 단백질의 구조와 기능과의 관계에 대한 좋은 연구대상이 될 수 있으며 bacteriocin이 가지고 있는 희귀 아미노산들의 형성과정과 이들의 역할 및 bacteriocin에 저항성을 나타내게 하는 면역기작에 대한 연구도 흥미 있을 것이다. 앞으로 bacteriocin에 관한 연구는 유전공학과 단백질공학적인 방법에 의한 bacteriocin 분자구조의 변형이 될 것이며 궁극적 목표는 보다 안전하고 활성이 높으며 선택성이 뛰어나면서도 광범위한 항균력을 갖는 이상적인 bacteriocin의 개발이다. Bacteriocin들에 대한 순수 과학적인 연구와 함께 응용을 위한 연구가 계속되어 bacteriocin이 실용화된다면 식품산업과 국민건강에 미치는 파급효과가 매우 클 것으로 전망된다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 Bacteriocin 정제분야

1. Bacteriocin 생산균주의 배양조건 및 항균력 측정방법의 확립

Bacteriocin 생산균주인 *Lactococcus* sp. KFCC10790은 glucose가 첨가되지 않은 MRS배지에서 비교적 좋은 bacteriocin 생성을 (1,280 AU/ml)을 나타내었다. Bacteriocin의 생성을 위해서는 배지의 초기 pH를 6.0으로 조절하는 것이 중요하였다. 배양장치로는 2 liter 용량의 culture flask를 사용하였으며 하룻밤 키운 *Lactococcus* sp. 배양액을 2%되게 접종하였다. 배양조건은 30℃의 배양온도로 교반(shaking)하지 않고 18~ 24시간 배양하였을 때 최대의 bacteriocin활성을 나타냈다. Bacteriocin의 정제를 위해 tween-80를 제거한 변형된 MRS배지를 사용하였을 때도 bacteriocin활성에는 변화가 없었다.

Bacteriocin의 항균력을 측정하기 위한 피검미생물로는 *Micrococcus luteus* KCTC1056 또는 *Lactobacillus plantarum* ATCC8014를 사용하였으며 항균력은 agar diffusion assay방법(Tagg등 1976)으로 측정하였다. Bacteriocin의 활성은 Barefoot 등(1983)에 따라 생육저지환을 나타낸 마지막 희석배율의 역수로 결정하였고 단위는 milliliter 당 activity unit(AU)로 나타내었다. 단백질의 농도는 Lowry (1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin(BSA)을 표준시료로 사용하여 측정하였다.

2. Bacteriocin의 순수분리

모든 실험조작은 실온에서 행하였다. 얻어진 배양액은 8,000 x g에서 20분간 원심분리하여 세포들을 제거한 후 상등액을 모아 정제에 사용하였다. 배양액에 존재하는 bacteriocin을 회수하여 농축시키기 위한 방법으로 ammonium sulfate에 의한 분별 침전법을 사용하였다. 배양액에 ammonium sulfate를 최종농도가 60%되게 가하여 생긴 침전물을 12,000 x g에서 45분간 원심분리하여 회수한 다음 최소량의 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 녹인 후 dialysis membrane (MWCO = 2,000)에 넣어 동일 완충액에 하룻밤 투석하여 ammonium sulfate를 제거하였다. Ammonium sulfate 분별 침전법에 의한 bacteriocin의 회수율은 bacteriocin의 작은 분자량 때문에 32% 정도로 낮은 편이었으나 이 과정만으로 bacteriocin의 specific activity가 8배 증가하였다 (Table 1).

일반적으로 bacteriocin들은 hydrophobic한 특성을 가지고 있어 ion-exchange chromatography에 CM-Sephadex C-25(Pharmacia)를 사용하였다. Column에 결합된 bacteriocin은 NaCl 농도구배(0 - 1 M)을 이용하여 용출하였으며 약 0.6 M NaCl의 농도에서 용출되었다(Fig. 1). Ion-exchange chromatography 후에 bacteriocin의 specific activity가 약 14배 정도 증가하였으나

Tricine-SDS-PAGE(Schagger 등 1987)를 수행한 결과 아직도 많은 다른 단백질들이 존재하는 것으로 나타났다.

Table 1. Purification of bacteriocin from *Lactococcus* sp. KFCC10790.

Purification step	Total activity (AU)	Total protein (mg)	Specific activity (AU/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture supernatant	80,000	17,000	4.7	100	1
Ammonium sulfate precipitation	25,600	680	37.6	32	8
Cation-exchange chromatography	12,800	24	533.3	16	113
Gel-filtration chromatography	3,200	1.2	2666.7	4	567

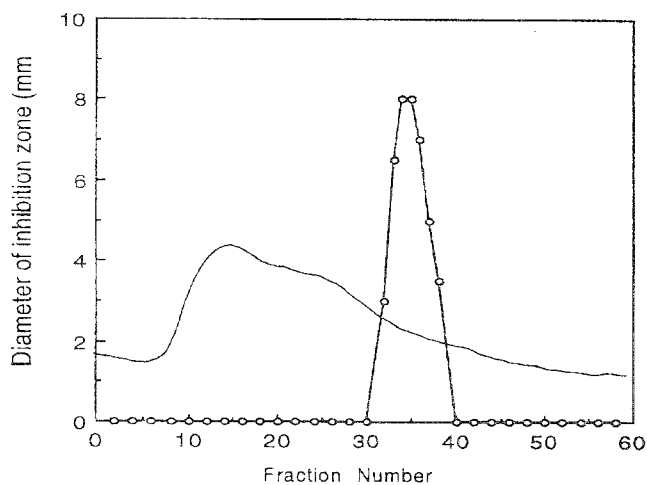


Fig. 1. Elution of bacteriocin from CM-Sephadex C-25 cation-exchange chromatography. Bacteriocin was eluted with a linear gradient of 0 to 1M NaCl. The A₂₈₀ was monitored, and bacteriocin activity was determined by the agar well diffusion method.

Ion-exchange chromatography에서 얻어진 활성분획들을 농축한 뒤 Sephacryl S-200를 사용하여 gel-filtration chromatography를 수행하였다. Bacteriocin은 이 column에 강하게 결합되어 3M의 NaCl로도 용출되지 않았다. 완충액에 0.2% SDS를 첨가함으로써 bacteriocin의 용출이 가능하였는데 이때 비교적 빠른 시간에 용출되는 것으로 보아 bacteriocin은 - charge의 SDS와 complex 형태로 결합되어 용출되는 것으로 생각된다. Gel-filtration에서는 크게 3개의 peak가 나타났는데 이 중 bacteriocin은 두 번째 peak에서 activity를 나타내었다(Fig. 2). Gel-filtration 결과 bacteriocin의 specific activity가 5배 증가하였으며 (Table 1) SDS-PAGE에서도 높은 정제 정도를 확인할 수 있었다.

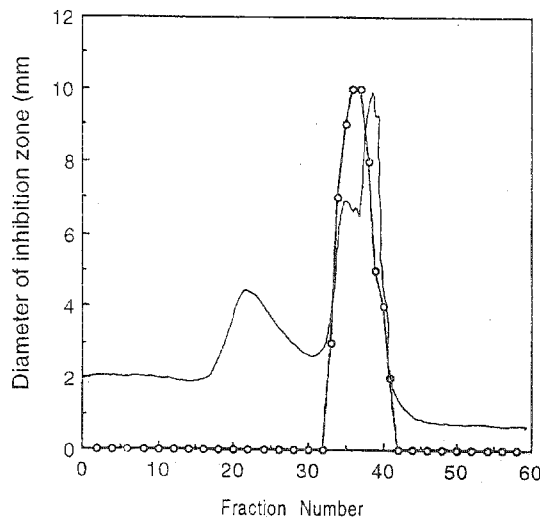


Fig. 2. Elution of bacteriocin from a Sephacryl S-200 gel-filtration column equilibrated with 0.2% SDS, 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0).

3. Bacteriocin의 물리·생화학적 특성 분석

Lactococcus sp. KFCC10790에서 생성되는 bacteriocin(lactococcin Y)은 분자량이 약 2,500 정도로 나타났으며 열에 매우 안정하였다. Lactococcin Y의 열에 대한 안정성을 측정하기 위하여 정제된 lactococcin Y를 100°C에서 1시간동안 가열하면서 시간별로 분취하여 잔여활성을 측정하였다. Lactococcin Y는 100°C에서 10분의 반감기(half-life)를 나타내었으며 15분간의 고압멸균 후에도 활성

이 남아있었다(Table 2). 열에 대한 안정성과 작은 분자량으로 보아 lactococcin Y는 class I 또는 class II bacteriocin에 속하는 것으로 사료된다(Joerger등 1986, Muriana등 1987).

Lactococcin Y의 pH 안정성은 정제된 lactococcin Y를 pH 2에서 11까지의 0.1 M 완충액과 혼합하여 상온에서 24시간 방치한 후 잔류활성을 측정하여 결정하였다. Lactococcin Y는 pH 11에서도 활성을 나타내었으며 pH 2 ~ 6의 범위에서는 매우 안정하였고 pH 7 이후에서는 활성이 점차 감소하였다(Fig. 3).

Table 2. Heat stability of lactococcin Y activity

Treatment	Activity (AU/ml)
None (control)	82,000
Heat treatment at 100°C	
10 min	41,000
30 min	10,200
60 min	2,600
15 min, 121°C (autoclaving)	2,600

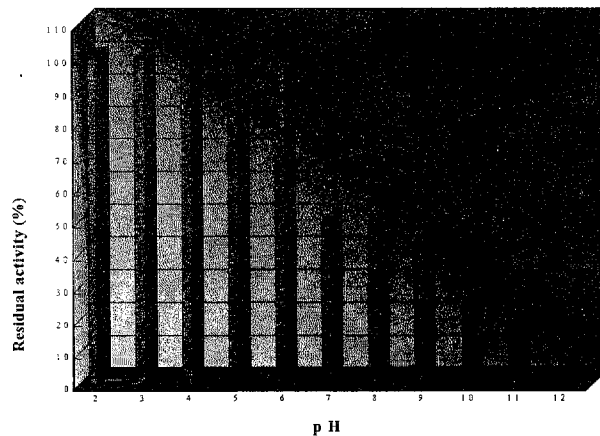


Fig. 3. Stability of lactococcin Y with respect to pH

Lactococcin Y의 여러 단백질 가수분해효소들에 대한 감수성(sensitivity)를 결정하기 위하여 정제된 lactococcin Y(16 AU/ml)를 10 μ g/ml 농도의 proteinase K, subtilisin, α -chymotrypsin, pronase E, trypsin, pepsin과 30°C에서 2시간 반응시킨 후 잔류활성을 측정하였다. 또한 100 μ g/ml 농도의 α -amylase, lysozyme, catalase, lipase 및 10 μ g/ml 농도의 DNase, RNase와 37°C에서 2시간 반응시켰다. 그 결과 lactococcin Y는 proteinase K, subtilisin, α -chymotrypsin, pronase E에 의해 활성이 소실되었으며 trypsin, pepsin에 의해서는 분해되지 않았다(Table 3). 따라서 lactococcin Y는 단백질 성분으로 구성된 물질임을 확인할 수 있었다. lactococcin Y는 lysozyme, catalase, lipase, DNase, RNase에 의해서는 영향을 받지 않았으나 α -amylase(Sigma)에 의해서는 활성이 소실되는 것으로 나타났다. 이는 control로 사용한 nisin의 경우도 마찬가지여서 아마도 구입한 α -amylase에 proteinase가 오염되어 있기 때문으로 추정된다.

Table 3. Effects of various enzymes on lactococcin Y and nisin activities

Enzyme	Residual Activity (AU)	
	Lactococcin Y	Nisin
None	16	16
Proteinase K	0	0
Subtilisin	0	0
α -Chymotrypsin	0	2
Pronase E	0	0
Trypsin	16	16
Pepsin	16	16
α -Amylase	0	0
Lysozyme	16	16
Catalase	16	16
DNase	16	16
RNase	16	16
Lipase	16	16

4. Bacteriocin의 항균범위 및 작용기작

위에서 언급한 well diffusion 분석방법을 사용하여 여러 그람양성균 및 그람 음성균들에 대한 *Lactococcus* sp. KFCC10790에서 생성되는 bacteriocin의 항균 범위(spectrum)을 조사하였다. Lactococcin Y는 비교적 광범위한 항균범위를 가지고 있는 것으로 나타났으며 젖산균들은 물론 일부 *Bacillus* sp. 에도 항균력을 나타내었다. 그람 음성균에는 *Pseudomonas fluorescens*를 제외하고는 항균력을 나타내지 않았는데 전반적으로 nisin과 유사한 항균 spectrum을 나타내었다 (Table 4).

Lactococcin Y의 항균작용 기작을 알아보기 위해 early log phase (optical density = 0.15, 660nm)의 피검미생물(indicator strain)인 *Lactobacillus plantarum*에 정제된 bacteriocin (2,000 AU)을 가하고 660nm에서 매 시간마다 optical density를 측정하여 bacteriocin을 가하지 않은 control과 비교하였다. 그 결과 bacteriocin을 가하지 않은 control은 정상적인 growth curve를 나타낸 데 비해 bacteriocin을 가한 것은 가한 시점부터 점차적으로 시간이 지남에 따라 optical density가 감소하였다(Fig. 4). 이것으로 보아 *Lactococcus* sp. KFCC10790에서 생성되는 bacteriocin의 항균기작은 bacteriolytic 인 것으로 사료된다.

5. Bacteriocin의 아미노산 조성분석

정제된 lactococcin Y의 아미노산 조성을 분석한 결과(Table 4), 주로 hydrophobic한 아미노산들로 구성되어 있는 것으로 나타났다. 이는 일반적인 bacteriocin의 특징이나 nisin과는 다른 조성으로 되어 있는 것으로 보아 nisin과는 다른 bacteriocin인 것으로 사료된다. Lactococcin Y가 antibiotics를 포함하고 있는지의 여부는 확인할 수 없었다.

Table 4. Inhibitory spectra of lactococcin Y and nisin.^a

Indicator strain	Inhibition zone diam (mm) ^b	
	lactococcin Y	nisin
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1012	0	2
<i>Bacillus licheniformis</i> KCTC1026	4	6
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1028	1	4
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC8739	14	15
<i>Micrococcus luteus</i> KCTC1056	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	5	6
<i>Staphylococcus epidermis</i> KCTC1917	0	5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	7
<i>Alcaligenes faecalis</i> KCTC1004	3	4
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC2190	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	0	0
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC2208	0	1
<i>Morganella morganii</i>	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0
<i>Proteus vulgaris</i> KCTC2512	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC1750	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC1645	5	6
<i>Salmonella typhi</i>	0	3
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0

^a Inhibitory activity was measured by the well diffusion assay.

^b Shown are susceptibilities to pure lactococcin Y and commercial nisin (50 μ l, 40,000 AU/ml).

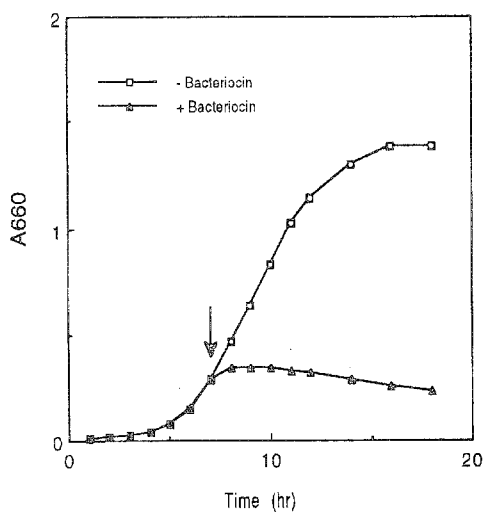


Fig. 4. Bactericidal effect of pure lactococcin Y on *L. plantarum*

Table 4. Amino acid composition of lactococcin Y.
(단위: nmol)

Amino acid	
Aspartic acid(D)/Asparagine(N)	0.96
Glutamic acid(E)/Glutamine(Q)	3.29
Serine (S)	1.94
Glycine (G)	1.02
Histidine (H)	2.08
Arginine (R)	0.34
Threonine (T)	1.04
Alanine (A)	1.31
Proline (P)	4.75
Valine (V)	1.46
Methionine (M)	1.03
Cysteine (C)	1.53
Isoleucine (I)	0.67
Leucine (L)	2.34
Phenylalanine (F)	1.56
Lysine (K)	1.33

제2절 대량생산을 위한 분리공정 개발 분야

1. Bacteriocin 생산 배지의 조성확립

*Lactococcus*의 배양에 흔히 사용되는 배지인 MRS 배지(Difco)는 많은 peptide를 포함하고 있어 정제과정에 적합하지 않은 단점이 있다. 또한 MRS 배지성분의 하나인 Tween 80는 nonionic detergent로서 단백질의 응집을 일으키는 등 chromatography 과정을 방해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 bacteriocin의 생성에는 영향을 주지 않고 peptide의 양이 적은 배지를 조성하고자 MRS배지 성분들의 peptide양을 조사하였다. MRS 배지의 성분들 중 proteose peptone에 peptide가 주로 많이 존재하였으며 이를 tryptic soy broth로 대체한 결과 bacteriocin의 생성에는 영향이 없이 peptide의 양을 줄일 수 있었다. 이를 바탕으로 bacteriocin의 정제를 위한 배지로는 MRS배지 대신 proteose peptone을 tryptic soy broth로 대체하고 tween 80를 뺀 table 5과 같은 조성의 배지(Tween 80 free modified MRS)를 제조하여 사용하였다. 또한 대량 생산을 위한 배지로서 skin milk(10%), 포도당(5%), Yeast extract(0.5%), beef extract(0.5%)를 함유한 배지를 protease로 처리하여 사용하였다. 이들 배지에서 생산된 bacteriocin의 활성은 모두 1,280 AU/ml로서 MRS배지를 사용한 것과 동일하였다.

Table 5. Composition of tween 80 free modified MRS medium

Media component	g per liter
Tryptic soy broth	10g
Beef extract powder	10g
Bacto yeast extract	5g
Dextrose	20g
Ammonium citrate	2g
Sodium acetate	5g
Magnesium sulfate	0.1g
Manganese sulfate	0.05g
Dipotassium phosphate	2g
(pH 6.0)	

2. Bacteriocin의 분리공정 개발

Bacteriocin의 순수분리를 위해 일반적으로 분별침전, ion-exchange chromatography, gel-filtration chromatography, HPLC 등의 경로를 가장 많이 사용하고 있으나 회수율이 낮고 과정이 복잡하며 비용이 많이 들어 대량생산을

위한 정제방법으로는 적합하지 않다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 bacteriocin의 hydrophobic한 특성을 이용하여 amberlite에 흡착시켜 회수하는 방법을 개발하였다.

Lactococcus lactis sp. KFCC10790로부터 생성되는 bacteriocin은 분자량이 약 2,500으로 매우 작아 ammonium sulfate precipitation에 의한 회수율이 저조하고 ammonium sulfate를 제거하기 위해 투석(dialysis)을 할 때 일부가 membrane을 빠져나가는 등의 문제점이 있다. 또한 ammonium sulfate precipitation은 많은 양의 ammonium sulfate를 필요로 하고 시간이 많이 소요되는 등 대량생산 시 문제점을 안고 있다. Acetone 또는 ethanol과 같은 용매에 의한 침전방법은 회수율은 좋으나 역시 많은 양의 용매를 필요로 하고 공해를 일으키는 등의 단점이 있다. *Lactococcus* sp.로부터 생성되는 bacteriocin은 hydrophobic한 특성을 지니고 있어 amberlite에 의한 흡착이 가능하다. 여러 종류의 amberlite들 중 XAD-2(Sigma)가 가장 적합한 것으로 나타났으며 XAD-1180 및 XAD-2000(Supelco)도 좋은 결과를 나타냈다. Amberlite XAD-2를 column(5.0 x 30 cm)에 충전시키고 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)로 세척한 후 원심분리로 cell을 제거한 배양액을 서서히 투입하여 흡착시켰다. 다시 0.1% TFA로 흡착되지 않은 성분들을 제거한 후 흡착된 bacteriocin은 0.1% TFA를 포함한 80% ethanol로 용출시킨다음 rotary evaporator를 이용하여 ethanol을 제거하였다. Amberlite에 의한 bacteriocin의 정제방법은 scale-up이 용이하고 빠르며 80 ~ 90%의 높은 회수율을 나타냈다.

Lactococcin Y는 금속이온 (특히 구리이온)에 붙는 특성을 나타내었다. 이러한 특성을 이용하여 immobilized metal affinity chromatography (IMAC)를 수행하였다. Column(2.5 x 8 cm)에 iminodiacetic acid (IDA) Sepharose 6B를 충전시킨 후 50mM sodium acetate (pH 5.0)로 세척하고 copper sulfate(CuSO_4)로 포화된 sodium acetate buffer를 통과시켜 copper를 resin에 chelation시켰다. 다시 50mM sodium acetate buffer로 부착되지 않은 copper를 제거한 후 여기에 XAD-2로 회수된 bacteriocin을 통과시켜 부착시킨 다음 완충액으로 세척하였다. Copper와 결합된 bacteriocin은 0.2 M imidazole buffer (pH 7.0)로 용출시켜 회수하였다.

IMAC으로 정제된 bacteriocin은 CM-Sepharose chromatography를 수행하여 정제하였다. 50mM sodium acetate buffer (pH 5.0)로 세척된 column(2.5 x 18 cm)에 IMAC으로 정제된 bacteriocin을 투여하고 동일 완충액으로 세척한 후 0-1 M NaCl 농도구배를 이용하여 용출시키고 활성분획만 회수하여 speed vac으로 진공 농축시켰다.

최종적으로 bacteriocin의 순수정제를 위하여 Sep-Pak C_{18} cartridge (Waters)를 사용하였다. 활성화된 Sep-Pak을 0.1% TFA로 세척한 후 CM-Sepharose로부터 정제된 bacteriocin을 투여하고 40% methanol + 0.1% TFA으로 세척한 후 80% methanol + 0.1% TFA로 bacteriocin을 회수하였다. 회수된 bacteriocin은 speed vac으로 methanol을 제거한 후 소량의 deionized water에 녹여 보관하였다. 이상

의 분리공정을 figure 5에 나타내었으며 새로운 분리공정에 의한 bacteriocin 정제 결과를 table 6에 요약하였다. 정제된 bacteriocin을 Tricin-SDS-PAGE를 수행한 뒤 silver staining으로 염색한 결과 단일 band를 나타내었다(Fig. 6).

이들 공정들은 scale-up이 가능하며 column의 크기도 필요에 따라 조절이 가능하고 column resin 및 용매도 재활용이 가능하여 bacteriocin의 대량생산에 적합하다. 또 사용목적에 따라 이들 과정의 일부를 생략할 수도 있어 비용 절감을 기대할 수 있다.

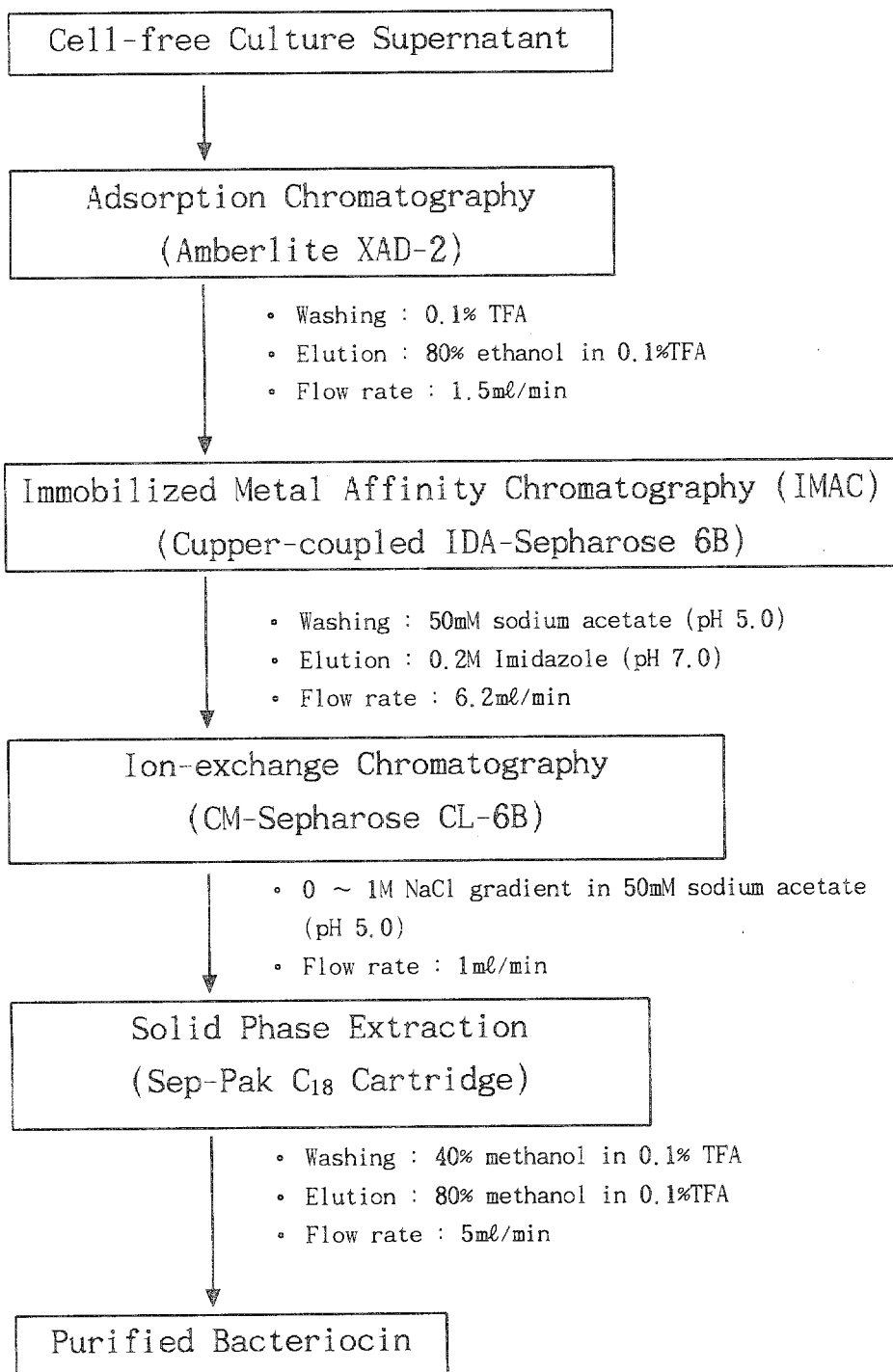


Figure 5. Schematic diagram for the purification of Lactococcin Y from *Lactococcus lactis* sp.

Table 6. Summary of chromatography steps for large scale purification of lactococcin Y.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (AU)	Specific activity (AU/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture supernatant	5131	620800	121	100	1.0
Amberlite XAD-2	2560	473600	185	76.3	1.5
IMAC	97.7	337920	3459	54.4	28.6
CM-Sepharose	4.6	293120	63721	47.2	526.6
Sep-Pak(C ₁₈ column)	0.16	51200	320000	8.2	2644.6

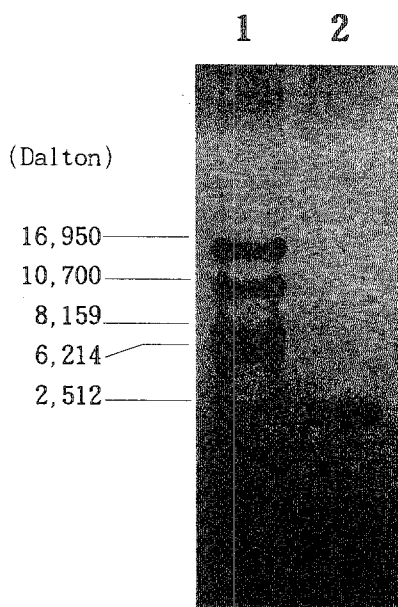


Fig. 6. Tricine-SDS-PAGE of purified bacteriocin from *Lactococcus* sp. KFCC10790. The gel was stained with silver staining kit (Bio-Rad). Lanes: 1, molecular size standards (Pharmacia); 2, purified bacteriocin.

3. Bacteriocin 유전자의 분리를 위한 탐침(probe)의 준비

Lactococcus lactis sp.로부터 생성되는 bacteriocin의 N-terminal amino acid sequence를 결정하기 위해 순수 정제된 lactococcin Y를 대덕에 있는 기초과학 지원센터의 고분자분석실에 의뢰하여 분석하였다. Lactococcin Y의 N-terminal amino acid sequence는 Applied Biosystems Protein Sequencer (Model 471A)를 사용하여 Edman degradation 방법으로 결정되었다. 그 결과 다음과 같이 모두 17개의 아미노산 서열이 결정되었다:

N-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Xaa-His-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-Gln.

이들 아미노산 서열을 바탕으로 bacteriocin 유전자의 염기서열을 유추하여 bacteriocin 유전자의 cloning을 위한 탐침(probe)으로 사용하기 위해 아래와 같은 염기서열의 oligonucleotide (degenerate primers)들의 sequence를 (주)제노텍에 의뢰하여 제작하였다.

Probe 1 sequence : 5'-ACNGTNATGTTYCCNCCNCARCAR-3'

Probe 2 sequence : 5'-CAYCARCCNCAYCARCCNCUN-3'

(* R=A, G; Y=C, T; N=A, G, C, T)

4. Bacteriocin 유전자의 위치 확인

젖산균에서 생성되는 bacteriocin은 젖산균의 종류에 따라 plasmid에서 생성되는 것과 chromosomal DNA에서 생성되는 것의 두 종류가 있다. *Lactococcus lactis* sp. KFCC10790에서 생성되는 bacteriocin이 plasmid에서 유래된 것인지 chromosomal DNA에서 만들어지는 것인지를 가리기 위해 curing 실험을 진행하였다. *Lactococcus* sp.로부터 plasmid를 제거하기 위한 curing agent로는 acridine orange(100 µg/ml)와 novobiocin(5 µg/ml)을 사용하였다. Acridine orange와 novobiocin을 처리한 균주들을 MRS배지에 도말 하여 형성된 콜로니들을 MRS배지와 indicator strain인 *Lactobacillus plantarum*을 도말 시킨 MRS배지에 멸균된 이쑤시개를 이용하여 replica plating한 후 억제환을 형성하지 않는 균주들을 1차 선별한 후 MRS 액체배지에서 배양한 용액을 well-diffusion 방법으로 확인하여 bacteriocin을 생성하지 않는 돌연변이주들을 선별하였다. 이들 선별된 돌연변이주들에서부터 plasmid DNA를 Anderson 등(1983)의 방법으로 추출하여 0.8% agarose gel로 전기영동하여 plasmid pattern을 조사한 결과 공통적으로 없어진 plasmid가 존재하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 *Lactococcus lactis* sp. KFCC10790에서 생성되는 bacteriocin은 chromosomal DNA에 존재하는 유전자로부터 만들어지는 것으로 판단되었다.

5. Chromosomal DNA의 분리 및 정제

Bacteriocin생성유전자를 cloning하기 위한 방법의 일환으로 *Lactococcus lactis* sp. KFCC10790의 chromosomal DNA를 다음과 같은 변형된 Marmur(1961)방

법으로 분리 정제하였다.

Lactococcus sp.를 1 liter의 MRS배지에 하룻밤 배양한 후 원심분리로 cell을 회수하였다. 50ml의 phosphate-buffered saline (8 g of NaCl, 1.4 g of Na_2HPO_4 , 1.2 ml of 1 N HCl/liter)로 cell을 세척한 후 30 mg/ml의 lysozyme이 첨가된 15 ml의 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)에 현탁시키고 37°C에서 1시간 동안 서서히 흔들면서 배양하였다. 여기에 5 ml의 STEP 용액 (0.5% sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris-HCl in 0.4 M EDTA, and 1 mg/ml proteinase K)을 가하고 37°C에서 2시간 반응시킨 후 동일 volume의 phenol, phenol:chloroform, 그리고 chloroform을 차례로 처리하여 단백질을 제거하였다. 단백질이 제거된 DNA 용액에 1/10 volume의 3 M sodium acetate와 2 volume의 ethanol을 가하여 침전시킨 후 유리막대로 DNA를 회수하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 RNase가 첨가된 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 보관하였다. 분리된 chromosomal DNA의 농도와 정제정도를 spectrophotometer로 결정한 결과 1 liter의 배양액으로부터 10 mg의 DNA를 얻었으며 정제정도도 매우 좋은 것으로 나타났다.

6. Southern blot hybridization

탐침으로 제조된 oligonucleotide가 제대로 제작되었는지와 chromosomal DNA 상의 bacteriocin유전자의 대략적인 위치를 파악하기 위해 Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 Southern hybridization을 실시하였다. 앞에서 분리된 *Lactococcus lactis* sp. KFCC 10790의 chromosomal DNA를 EcoRI, HindIII, PstI 세 종류의 제한효소로 완전히 절단한 후 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel 상의 DNA 단편들을 알칼리용액에서 변성시킨 후 1M Tris-buffer로 중화시켰다. Southern blot 방법을 사용하여 gel 상의 DNA 단편들을 nylon membrane (Hybond, Amersham Co.)으로 옮기고 UV transilluminator를 사용하여 3분간 cross-linking하였다. Hybridization에 이용한 probe는 앞서 제작된 oligonucleotide를 T4 DNA kinase를 사용하여 동위원소인 γ - ^{32}P ATP로 표지시켰다. Water bath에서 50°C로 2시간 prehybridization을 실시한 후 표지된 탐침을 첨가하여 50°C에서 16시간 hybridization을 실시하였다. 여러 차례의 세척과정을 거친 후 건조된 membrane을 X-ray film(Kodak)에 노출시켜 감광하였다. 그 결과 비교적 강한 band가 몇 개 나타났으며(Fig. 7), EcoRI으로 절단된 DNA 단편에서 클로닝하기에 비교적 적당한 크기의 band들을 나타내어 이 DNA 단편들을 gel에서 elution하여 genomic library를 작성하였다.

7. Genomic library의 제조

분리된 *Lactococcus* sp.의 chromosomal DNA로부터 bacteriocin 생성유전자를 cloning하기 위하여 plasmid vector인 pUC19을 사용하여 다음과 같이 genomic library를 제조하였다. 먼저 pUC19 vector DNA를 제한효소인 HindIII로 절단한 후 vector의 self-ligation을 방지하기 위하여 alkaline phosphatase로 dephosphorylation시켰다. Chromosomal DNA는 동일한 제한효소인 HindIII로 절

단한 후 0.8%의 agarose gel에 전기영동하여 Southern blot hybridization에서 확인된 DNA 단편들을 electroelution 방법으로 회수하였다. HindIII로 절단된 pUC19과 electroelution으로 회수된 chromosomal DNA를 T4 DNA ligase로 결합시켜 recombinant DNA를 만든 후 *E. coli* DH5 α competent cell로 형질전환 (transformation)시켰다. 형질전환시킨 *E. coli* DH5 α 들은 X-gal과 IPTG, ampicillin이 첨가된 LB 배지에 도말 하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 재조합 DNA가 포함되어 있는 흰색의 콜로니만을 모아 library를 만들었다. 그 결과 약 2,400개의 recombinant를 확보하였다.

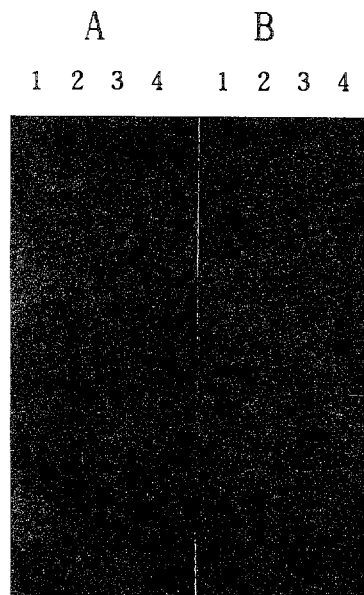


Figure 7. Southern hybridization analyses of *Lactococcus lactis* sp. KFFC 10790 genomic DNA digests with a ^{32}P -labeled primer 1. (A) Agarose gel (0.8%) stained with ethidium bromide. (B) Autoradiogram of nylon membrane hybridized with probe. Lanes: 1, molecular size marker (λ DNA digested with EcoRI & HindIII); 2, EcoRI digest; 3, HindIII digest; 4, PstI digest.

제3절 유전자조작에 의한 bacteriocin 생산균주 개발 분야

1. Bacteriocin 생산균주의 분자계통학적 동정

Bacteriocin 생산균주인 *Lactococcus* sp. KFCC10790의 정확한 분류학적 위치는 bacteriocin 유전자를 생산균주로 도입하기 위한 형질전환 방법을 결정하는데 매우 중요하다. *Lactococcus* sp. KFCC10790의 정확한 분류학적 이름(species 및 subspecies name)을 알아내기 위하여 현재 널리 사용되고 있는 방법의 하나인 16S ribosomal RNA 염기서열의 비교에 의한 동정법(Johnson 1994)을 사용하기로 하고 PCR로 *Lactococcus* sp. KFCC 10790의 ribosomal RNA 유전자를 다음과 같은 방법으로 분리하였다.

PCR을 위한 oligonucleotide primers는 *E. coli* 16S ribosomal RNA의 +27 ~ +46에 해당되는 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'의 forward primer (27f)와 -1522 ~ -1501에 해당되는 5'-AAGGAGGTGATCCA(AG)CCGCA-3'의 reverse primer (1522r)를 이용하였다. PCR은 100 ng의 *Lactococcus* chromosomal DNA와 forward 및 reverse primer를 각각 400 pmol 씩 첨가하고 PCR buffer 및 Taq polymerase (1 unit)와 섞어 증류수로 최종 부피를 50 μ l로 하여 Thermal cycler (Perkin Elmer)로 다음 조건에 따라 PCR을 수행하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C 5분으로 1 과정, 94 $^{\circ}$ C 1분, 50 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C 3분으로 35 과정을 수행하였다. PCR 후 얻어진 DNA를 전기영동하여 예상한 크기를 나타낸 DNA 조각만을 Elutrap 도구(Schleir & Schell)를 사용하여 electroelution 방법으로 회수하였다.

이렇게 얻어진 16S ribosomal RNA 유전자를 plasmid vector인 pUC19에 삽입시킨 후 *E. coli* DH5 α 로 형질전환시켜 재조합체를 얻은 후 recombinant DNA를 분리하였다. Sanger(1977)의 dideoxy-mediated chain termination 방법에 의해서 Silver Sequence kit(Promega)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 이렇게 결정된 염기서열을 Blast program으로 data base에 입력되어 있는 염기서열들과 비교하여 상동성을 확인하였다. 그 결과 *Lactococcus* sp. KFCC 10790의 16S ribosomal RNA 염기서열은 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*의 16S ribosomal RNA 염기서열과 100% 동일성(identity)을 나타내었다(Fig. 8). 따라서 *Lactococcus* sp. KFCC 10790은 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*임이 확인되었다.

KFCC 10790: 1 GCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAGCCCGGTTGAATACGTTTC 60
 L. lactis: 1836 GCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAGCCCGGTTGAATACGTTTC 1895
 KFCC 10790: 61 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTTGGGAGTACCCGAAGTAGGTTG 120
 L. lactis: 1896 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTTGGGAGTACCCGAAGTAGGTTG 1955
 KFCC 10790: 121 CCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTCTTAAGGTAAGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA 180
 L. lactis: 1956 CCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTCTTAAGGTAAGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA 2015
 KFCC 10790: 181 AGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT 218
 L. lactis: 2016 AGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT 2053

Figure 8. Comparison of the 16S ribosomal RNA sequences of *Lactococcus* sp. KFCC 10790 and *Lactococcus lactis* subsp. cremoris.

2. Colony hybridization

Genomic library로부터 bacteriocin 유전자를 포함하고 있는 recombinant를 찾아내기 위하여 다음과 같은 방법으로 colony hybridization을 실시하였다. 먼저 recombinant들을 ampicillin이 첨가된 LB agar배지에서 배양한 후 petri dish 크기로 절단된 nylon membrane(Hybond, Amersham Co.)으로 옮기고 NaOH와 SDS가 첨가된 lysis buffer로 포화된 filter paper 위에서 5분간 방치하여 colony로부터 DNA가 노출되게 한 후 1M Tris-buffer (pH 8.0)로 포화된 filter paper 위에서 증화시켰다. 증화된 membrane들은 다시 2X SSC buffer로 포화된 filter paper 위에서 10분간 세척한 후 공기 중에 건조시켰다. 건조된 membrane들은 UV transilluminator를 사용하여 3분간 cross-linking시키고 동위원소로 표지된 탐침을 사용하여 Southern hybridization에서와 동일한 방법으로 hybridization을 실시하였다. 그 결과 강한 signal을 나타낸 10개의 recombinant를 확인하고 이들로부터 재조합 plasmid DNA를 추출하여 여러 제한효소로 절단하여 동일한 band를 나타내는지의 여부를 조사하였고, bacteriocin 유전자를 가지고 있는지를 확인하기 위해 이들 DNA의 염기서열을 Silver Sequence DNA sequencing system (Promega)을 사용하여 결정하였다. 그 결과 bacteriocin 유전자는 찾지 못하였고 이들 중 대부분이 bacteriocin의 세포 밖으로의 secretion에 관여하는 secY 유전자임을 확인하였다.

3. Shuttle vector의 제조

Bacteriocin 대량생산을 위한 숙주세포(host cell)의 제조를 위해 plasmid가 없는 *Lactococcus* sp.를 만들기 위해 acridine orange 및 novobiocin으로 curing실험을 진행하였다. Bacteriocin 생산균주인 *Lactococcus* sp. KFCC10790에는 50 kb, 7.3 kb, 6.8 kb, 4.3 kb 크기의 4 종류의 plasmid가 존재하였다. Curing 실험에서 얻어진 변이주 중에서 bacteriocin활성이 없고 immunity는 존재하는 균주(strain 8M)를 선별하였다. 이 변이주는 7.3 kb의 plasmid가 없는 것으로 확인되었다. 변이주 strain 8M을 bacteriocin유전자를 클로닝하기 위한 host organism으로 사용하기로 하고 curing된 7.3 kb plasmid를 이용하여 *E. coli*와 *Lactococcus* 모두에서 복제될 수 있는 shuttle vector를 제조하기로 하였다.

Bacteriocin 생산균주인 *Lactococcus* sp. KFCC10790로부터 plasmid를 분리하여 전기영동한 후 7.3 kb의 plasmid만을 electroelution 방법으로 추출하였다. 분리된 7.3 kb plasmid를 제한효소인 HindIII로 절단하여 역시 HindIII로 절단된 *E. coli* vector pUC19과 ligation 시켰다. 그 결과 얻어진 재조합 plasmid를 *E. coli*로 형질전환시켜 안정적으로 복제되는 plasmid를 분리하였다. 분리된 plasmid는 *Lactococcus* plasmid의 일부가 deletion으로 제거되어 크기가 5.7 kb이었으며 이를 pLE57이라 명명하고 여러 제한효소를 사용하여 이 shuttle vector의 제한효소지도(restriction map)를 작성하였다(Fig. 9).

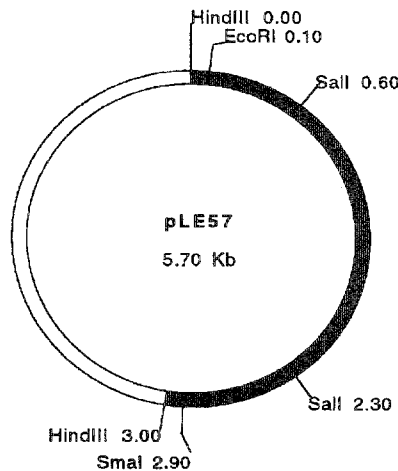


Figure 9. Restriction map of shuttle vector pLE57.

E. coli vector pUC19 (□), *Lactococcus* plasmid (■)

4. Inverse PCR에 의한 bacteriocin 유전자의 클로닝

Inverse PCR은 단백질의 일부 아미노산 서열이 알려진 경우 이를 바탕으로 반대 방향의 두 시발체(primer)를 제조하여 유전자의 양쪽의 염기서열을 알아낸 뒤 이를 이용하여 안쪽의 유전자를 PCR로 증폭하여 클로닝하는 방법이다. 결정된 bacteriocin의 아미노산 서열을 바탕으로 반대 방향의 두 degenerate primer를 제작하였다. 제작된 primer들의 염기서열은 다음과 같다:

primer 1: 5'-ACNGTNATGTTYCCNCCNCAR-3', primer 2: 5'-NAGNGGYTGRTGNGGYTG-3'

증폭된 PCR product들은 plasmid vector인 pUC19에 삽입시켜 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 바탕으로 nondegenerate primer를 아래와 같이 제작하였다 :

primer 1A: 5'-GTGATGTTCCCGCCTCAGATA-3',

primer 2A: 5'-TGGTTGATGCGGCTGTTGCTG-3'

제작된 nondegenerate primer를 이용하여 위와 같이 inverse PCR을 다시 진행하여 bacteriocin 양쪽의 DNA를 증폭하였다(Fig. 5). 증폭된 DNA들을 PCR로 증폭된 DNA를 위한 vector인 pGEM-T vector에 삽입시켜 재조합체를 선별하였으며 현재 이들의 염기서열을 결정하고 있다.

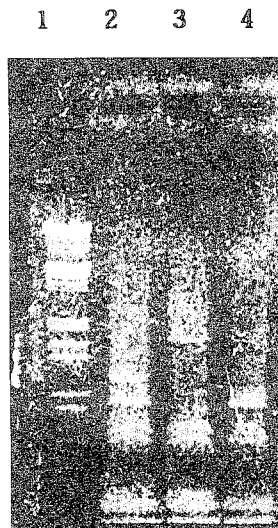


Figure 10. Agarose gel electrophoresis of PCR products.

lane 1, size marker (λ DNA digested with EcoRI + HindIII); lane 2, PCR products from EcoR I digested DNA; lane 3, PCR products from HindIII digested DNA; lane 4, PCR products from Sau3A I digested DNA

5. *Lactococcus* sp.를 위한 형질전환 조건의 확립

Lactococcin Y 유전자가 클로닝되면 이를 bacteriocin 생산균주인 *Lactococcus* sp. KFCC10790으로 형질전환하여 발현시켜야 한다. 이를 위해 *E. coli*, *Bacillus*, *Lactococcus*에서 모두 복제 가능한 promoter=selection vector인 pGKV210(Jos 등 1987)을 사용하여 형질전환 조건을 확립하고자 하였다. Host strain으로는 *Lactococcus* sp. KFCC10790의 bacteriocin-negative 변이주인 strain 8M을 사용하였다. Protoplast를 만들기 위한 방법은 Kondo 등(1982)의 방법을 사용하였고 Holo 등(1989)의 방법에 따라 electrophoration을 진행하였다. 형질전환체의 선별을 위한 선택배지로는 erythromycin (5 μ g/ml)이 첨가된 MRS배지를 사용하였다.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제1절 연구개발 목표 달성도

- Bacteriocin의 생산에 필요한 배지조성, 배양방법 및 배양조건을 수립하였다.
- Bacteriocin의 물리·생화학적 특성을 파악함으로써 bacteriocin의 응용기술 개발에 필요한 기초과학적인 정보를 확보하였다.
- 본 연구과제를 통하여 유용 bacteriocin의 탐색 및 동정기술을 확립하였다.
- Bacteriocin을 대량으로 정제하는데 적합한 분리공정을 개발하여 bacteriocin의 산업화에 필요한 기초를 마련하였다.
- 국내 bacteriocin에 관한 연구는 김치, 원유 등에서 균주 스크리닝 및 김치의 저장성 연장 실험 등에 머무르고 있는바 산업화를 위한 균주개발의 일환으로 유전공학적인 방법을 시도함으로써 이에 대한 학술적 연구능력이 나 기술능력을 향상시킬 수 있었다.

제2절 대외 기여도

- 연구결과를 국내외 학회에 발표함으로써 bacteriocin에 대한 인식을 증가시키고 기술정보를 교환하는 계기가 되었다.
- 새로운 분자소재로서의 bacteriocin 산업화를 위한 기초를 마련 하였으며 산업화 시 nisin의 수입대체 효과를 기대할 수 있다.
- 확립된 bacteriocin 스크리닝과 동정법을 바탕으로 다양한 bacteriocin 생산균주를 확보한다면 식품보존 및 저장성 증진제로서의 용도뿐만 아니라 화장품의 방부제, 피부연고제와 같은 의약품과 같은 다양한 응용성이 기대된다.

제 5 장 연구개발 결과 및 활용계획

제1절 연구개발의 성과

- Bacteriocin 생산균주의 탐색 및 동정기술을 확립하였다. Bergey's manual에 의한 고전적 동정방법외에도 Biolog와 같은 자동화된 동정기술을 사용하였고, 16S ribosomal RNA sequence 분석과 같은 분자생물학적 동정법도 사용함으로써 bacteriocin 생산균주의 동정에 대한 know-how를 확립하였다.
- Bacteriocin을 순수 분리하는 방법을 수립하였으며 bacteriocin의 물리·생화학적 특성을 밝혔으며 bacteriocin의 분자 특성 및 유전학적 특성을 규명하였다.
- Bacteriocin을 상품화 할 경우 요구되는 대량생산을 위한 공정개발을 확립하였다. Nisin에 필적하는 bacteriocin을 외국의 기술도입에 의존하지 않고 자체적으로 대량생산할 수 있는 방법을 개발하여 경쟁력을 확보하였다.
- Bacteriocin은 부가가치가 높은 물질로서 이의 산업화로 발효 생물산업계를 육성할 수 있는 계기가 마련되었다. Bacteriocin은 발효첨가제나 식품 보존제 등과 같은 응용의 범위가 넓고 다양한 식품에 첨가될 수 있으므로 상업적인 전망도 매우 밝다.
- Bacteriocin 유전자의 클로닝은 순수 과학적인 면에서도 중요하다. Bacteriocin은 단백질의 구조와 기능과의 관계에 대한 좋은 연구대상이 될 수 있으며 단백질공학과 유전공학에 의한 bacteriocin의 분자변형으로 보다 안전하고 활성이 높으며 광범위한 항균력을 갖는 bacteriocin의 개발이 가능하다.
- 인체에 무해한 bacteriocin이 생물학적 보존제(biopreservative)로 상품화 되어 현재 생물산업에서 사용되고 있는 화학적 보존제를 대체 할 경우 국민 건강의 향상에 크게 기여할 것으로 예상된다.

제2절 연구개발의 미비점

- Bacteriocin은 기존의 식품 보존제를 대체할 수 있는 천연보존제로서 또한

다른 미생물의 오염을 방지하여 균일한 발효를 진행시키는 발효첨가제로서 그 응용성이 다양하므로 각 특성에 적합한 bacteriocin의 발굴 및 개발이 시급하다.

- 정제된 bacteriocin을 사용한 응용실험이 부족하였다. Bacteriocin을 실제로 식품첨가제로 사용하였을 때 나타나는 효과와 문제점을 파악하기 위한 노력이 부족하였으며 독성실험과 같은 안전성 실험이 필요할 것으로 판단된다.
- Bacteriocin 유전자의 클로닝에 대한 연구결과가 미비하였다. Bacteriocin의 가장 큰 장점 중의 하나는 bacteriocin은 단백질로서 자신의 유전자를 가지고 있다는 점이며, 따라서 유전적 조작에 의해 bacteriocin 생산기능을 산업적으로 유용한 다른 균주에 옮겨 발현시키거나, 혹은 유전공학적인 방법에 의해 bacteriocin 유전자를 임의로 변화시킴으로써 bacteriocin의 분자구조 및 그 기능을 원하는 대로 변화시킬 수 있다는 점이다. 이러한 목적으로 본 연구에서는 bacteriocin 유전자를 클로닝하고 그 염기서열을 규명하고자 하였으며 현재 이에 대한 실험을 계속 진행 중에 있다.

제3절 연구결과의 활용에 대한 건의

- Bacteriocin에 대한 일반인의 인식이 요구되며 연구개발을 위한 투자가 필요하다. 현재 우리나라에서는 bacteriocin이 항생제로 분류되어 식품 첨가제로 허용되고 있지 않으나 이는 bacteriocin에 대한 인식이 부족한 탓으로 천연 보존제로 분류되어야 하며 앞으로 이 문제가 우선적으로 해결되어야 할 것이다. Bacteriocin에 대한 연구 및 개발에 필요한 연구인력의 수준이나 연구장비에 있어서 국내와 외국의 차이는 없는 것으로 사료된다. Bacteriocin과 같은 새로운 신 물질 창출을 위한 노력과 투자가 증대되어야 하며 기술권 보호 노력이 요구되고 있다.
- Bacteriocin은 그 종류가 다양하고 같은 종의 균주들도 변종에 따라 특성이 다른 bacteriocin을 생산하므로 다양한 bacteriocin들에 대한 탐색과 연구가 계속되어야 할 것이다. 한국의 전통식품은 그 주종이 발효식품으로서 세계적으로 가장 풍부한 젖산균 자원을 갖고있으므로 새로운 유용 bacteriocin 생산 젖산균의 개발에 최적 환경을 소유하고 있다. 이러한 천혜의 연구 및 개발환경을 최대한 활용하기 위해서는 보다 조직적이며 총괄적인 연구·개발 노력이 산·학·연 합동으로 이루어져야 한다.
- Bacteriocin의 유일한 단점은 항균 spectrum이 좁다는 것이다. 따라서 보다

안전하고 활성이 높으며 광범위한 항균력을 갖는 bacteriocin의 개발을 위해서는 단백질공학과 유전공학에 의한 새로운 bacteriocin의 개발이 필요하다. Bacteriocin은 기존의 항생물질들이 2차 대사산물인데 반하여 ribosome에서 합성되는 단백질로서 직접적인 유전자조작에 의해 변형이 가능하다는 장점을 갖고 있다.

제 6 장 참고문헌

1. Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**:337-349.
2. Ralph, w. J., R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**:171-200.
3. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:39-86.
4. Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* **27**:85-123.
5. Mattick, A. T. R., and Hirsch, A. 1947. Further observation on a nisin from lactic *Streptococci*. *Lancet* **2**:5-12.
6. Gross, E., and J. L. Morell. 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **93**:4634-4635.
7. Dodd, H. M., N. Horn, and M. J. Gasson. 1990. Analysis of the genetic determinant for the production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* **136**:555-566.
8. Muriana, P. M., and T. R. Klaenhammer. 1991. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* **173**:1779-1788.
9. 박연희, 권정주, 조도현, 김수일. 1983. 김치에서 분리한 젖산균의 미생물 생육 저해. *한국농화학회지* **26**:35-40.
10. 최신양, 이인선, 유진영, 정건섭, 구영조. 1990. 김치발효에 대한 nisin의 저해효과. *한국산업미생물학회지* **18**:620-623.
11. 정건영, 안장연, 권오진, 강주희. 1989. *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin의 성장에 관한 연구. *한국산업미생물학회지* **17**:94-99.
12. 최신양, 이상호, 이인선, 유진영, 정건섭, 구영조. 1991. *Lactococcus* sp.

1112-1균주가 생산하는 bacteriocin의 정제 및 성질. 한국산업미생물학회지 19:209-214.

13. 조재선, 정성제, 김영목, 전억한. 1994. 김치발효에 관여하는 젖산균에서의 bacteriocin 검색. 한국산업미생물학회지 22:700-706.
14. 하덕모, 차동수. 1994. *Enterococcus faecium* bacteriocin 생산균주를 starter로 이용한 김치의 제조. 한국산업미생물학회지 22:550-556.
15. Davey, G. P. 1984. Plasmid associated with diplococin production in *Streptococcus cremoris*. Appl. Environ. Microbiol. 48:895-896.
16. Kaletta, C., and K.-D. Entian. 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisaA* gene and posttranslational processing of its peptide product. J. Bacteriol. 171:1597-1601.
17. Barefoot, S. F., and T. R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45:1808-1815.
18. Joerger, M. C., and T. R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 167:439-446.
19. Tagg, J. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40:722-756.
20. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
21. Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166:368-379.
22. Anderson, D. G., and L. L. McKay. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic Streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 46:549-552.

23. Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* **3**:208-218.
24. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
25. Johnson, J. L. 1994. Similarity analysis of rRNAs. pp. 683-700. In *Methods for general and molecular bacteriology* (Gerhardt P. ed.) American Society for Microbiology.
26. Jos, M. B. M., van der Vossen, D. Lelie, and G. Venema. 1987. Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2452-2457.
27. Kondo, J. K., and L. L. McKay. 1982. Transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:1213-1215.
28. Holo, H., and I. F. Nes. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3119-3123.

천연식물체로부터 식품보존제 탐색에 관한
연구(협동과제-3)

Development of Natural Antimicrobial Agents from
Medicinal Edible Plants

1998.12.20.

협동연구책임자 : 함 승 시
연 구 원 : 오 덕 환
 최 근 표
 최 세 훈
 민 경 태
 정 성 원
 이 명 기

강 원 대 학 교

Kangweon National University

여 백

제 출 문

한국식품개발연구원장 귀하

본 보고서를 “국산 천연자원으로부터 신기능 식품보존물질 개발연구” 과제 (세부과제 “천연식물체로부터 식품보존제 탐색에 관한연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 함 승 시

연 구 원 : 오 덕 환

최 근 표

최 세 훈

민 경 태

정 성 원

이 명 기

여 백

요 약 문

I. 제 목

천연식물체로부터 식품보존제 탐색에 관한연구

- 1차년도 : 천연약용식물로부터 항균성물질의 탐색에 관한연구
- 2차년도 : 항균성물질의 분리정제 및 특성규명
- 3차년도 : 정제물질의 천연보존제역활에 관한 식품의 응용

II: 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구의 최종 목표는 기존의 합성 첨가물질의 사용에 의한 독성의 체내축적등의 위협으로부터 소비자를 보호하고 효율적으로 식품의 부패 및 병원성을 일으키는 유해 미생물의 생육을 억제함으로써 식품의 선도를 증진시키고 그들의 shelf life 를 연장시키기 위하여 안전성의 위협이 없는 천연 식물소재로 부터 천연 항균성 물질을 분리, 정제하여 이를 식품산업에서 이용할 수 있는 천연 보존제의 개발을 주 목적으로 한다. 또한 이러한 천연 항균성물질들의 단독사용에 의한 항균력의 제한성을 극복하여 혼합반응에 의한 상승작용을 검색함으로써 천연 식품보존료로서 응용, 개발될 천연항균제의 적용범위를 더욱 확대시킬 수 있으므로 각종 식품의 품질을 향상시키고자 하는데 본 연구의 중요성이 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

상기의 목적을 달성 하기위하여 본 연구는 3차년도를 계획하여 아래와 같이 각각 수행 하였다.

- 1. 1차년도 : 여러종류의 약용식물을 대상으로 하여 물추출물 또는 유기용매 추출물을 이용하여 항균력을 검색하였으며 그중 가장 항균력이 우수한 시료를 선정하여 각각의 유기용매로 분획한 후 분획물질에 대한 열처리 및 pH 안정성을 검색하였다.
- 2. 2차년도 : 1차년도에서 선정된 천연항균성물질을 분리, 정제하고 그 물질의 구조를 규명하기 위하여 각종 Column Chromatography 와 TLC방법을 사용하여 물질을 정제 하였으며 정제물질의 구조를 규명하기 위하여 H-NMR, C-NMR, MS, IR 등을 사용하여 규명하였다.
- 3. 3차년도 : 2차년도에서 정제된 물질을 사용하여 천연보존제로서의 역할을 규명하고자 식품(산성음료, 우유 및 소고기)에 첨가하여 병원성 미생물의 생육저해효과를 검색하였으며 또한 정제물질 단독사용에 의한 항균력의 제한성을 극복하기 위하여 모노로린과의 혼합반응에 의한 상승작용을 검색함으로써 이들 식품에서의 천연 식품보존료로서 응용가능성을 검토 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 여러종류의 약용식물을 대상으로 하여 식품부패 또는 병원성미생물에 대한 강력한 항균력을 나타내는 물질을 screening 하였는데 그 중에서 황련에탄을 추출물이 가장 강력한 항균력을 나타내었으며 열에(121°C for 15 min) 매우 안정였으며 알칼리성조건하에서 더욱 강한 활성을 나타내었다. 또한 물추출물을 silica gel로 충전된 column을 사용하여 benzene, dichromethane, ethylacetate, 및 ethanol-methanol-acetate-water (1:1:0.1:1) 용매로 순차적으로 용출한 다음 농축하여 항균력을 검색한 결과 혼합용매를 사용한 분획층에서 가장 강한 항균력을 나타내었다.

2. 황련 물추출물로부터 항균력을 나타내는 성분을 검색하고 활성성분의 구조를 규명하기 위하여 column chromatography방법을 사용하여 항균성물질을 분리정제한 후 IR, Mass, NMR로 분석한 결과 항균력을 나타내는 물질은 berberin-Cl의 물질로서 판명 되었다. 이 물질은 황련에 많이 존재하는 성분으로 알려져 있는데 기존에 밝혀진 berberin-Cl은 물에 잘 용해되지 않고 주로 유기용매에 녹여 사용되어 왔으나 본 연구자가 정제한 berberin-Cl은 기존의 berberin-Cl에 비하여 물에 훨씬 잘 용해 됨으로 앞으로 기존의 berberin-Cl보다 응용범위가 훨씬 더 높을것으로 사료되며 현재 이 물질의 분리정제에 대한 방법은 현재 특허출원을 하였다(1998년 특허출원 제 43012호).

3. 지금까지 보고된 berberin-Cl의 생리활성에 관한연구는 항균성, 항바이러스, 항염증, 항암, 항진균, 구강치료, 안질환등 주로 약리적작용에 관하여 많은 연구가 수행되었지만 식품에 응용된 예는 거의 전무하였다. 따라서 본 연구에서는 berberin-Cl을 식품에 응용하여 단독 또는 유기산이나 monolaurin과의 혼합반응을 통하여 식품의 부패 및 식중독세균에 대한 항균작용의 상승작용 유무를 검색한 결과 in vitro에서 berberin은 유기산과는 서로 상호반응작용이 거의 없는 것으로 나타 났으며 monolaurin과는 상승작용을 나타내는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 하여 우유와 과일음료주스에 첨가제로서 사용되었을 때 식중독세균에 대한 항균작용을 검색한 결과 과일음료주스에서는 *E. coli* O157:H7에 대한 berberin 또는 monolaurin의 생육저해효과가 단독으로 처리하였을때에는 높은온도에서는 항균효과가 거의 없었으며 낮은온도에서는 항균력이 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 반면에, 두물질을 혼합하였을때에는 35°C를 제외하고는 단독처리구에 비하여 현저한 상승효과를 나타내었으며 토마토주스보다는 당근과 사과주스에서 더 생육저해효과가 증가되었다. 또한, 우유에서는 *Staphylococcus aureus*균에 대한 berberine의 생육저해효과는 거의 미약하였으나 monolaurin의 경우에는 낮은온도(4°C)에서 whole milk와 skim milk모두 현저한 항균효과를 나타내었고 혼합물질도 비슷한효과를 나타내었다. 한편, 쇠고기에 오염된 *Listeria monocytogenes*균에 대한 생육저해효과를 조사한 결과 berberin 또는 monolaurin을 단독처리 하였을때에는 생육저해효과가 미약하였으나 두물질을 혼합처리 하였을때에는현저한 생육억제 효과를 나타내었으며 진공포장의 경우 monolaurin의 항균력이 공기포장에비하여 증가함을 나타내었다.

본 실험의 결과를 바탕으로 해볼 때 berberin-Cl자체는 검색된 식품에서는 항균력효과가 미약하였지만 monolaurin과 혼합처리시에는 식품의 종류에 따라 항균력이 현저히 상승

함을 나타내었다. 따라서 berberin-Cl을 식품에 적용할때는 식품종류별로 다양하게 조사한 후 항균력을 나타내는 대상식품에 적용하거나 또는 monolaurin과의 혼합반응시 상승작용을 나타내는 식품에 적용을 하면 새로운 천연식품 보존제로서의 역할을 수행할 수 있을것으로 사료된다.

여 백

SUMMARY

I. Title

Development of Natural Antimicrobial Agents from Medicinal Edible Plants

1st Year : Screening of the Antimicrobial Agents From Natural Plants

2nd Year : Identification and Structural Analysis of Antimicrobial Agents

3rd Year : Application of Purified Compound Either Alone or In combination With Monolaurin On Food System

II. Objectives and Significance of Research

The final objectives of this study is to isolate and identify new natural antimicrobial agents, which is non-toxic, from natural edible plants and to apply them on food industry in other to increase the food quality and to extend their shelf-life by inhibiting the growth of food-poisoning or food borne disease organisms and by prohibiting the use of toxic chemical preservative. Also, synergistic effects by combining each other might be overcome the limitation of antimicrobial activity with single compound alone. Thus, it is essentially needed to improve the food quality by extending the natural antimicrobial activity using determining synergistic effects.

III. Scope and Contents of Research

Three Year research proposal was carried out to accomplish the above objectives.

1. 1st Year : Antimicrobial activity of water or ethanol extracts from mountain edible herbs was investigated and the most strong antimicrobial agent was selected among those herbs, then fractionated with several organic solvents and determined the stability of heat and pH, respectively.

2. 2nd Year : Natural antimicrobial component was isolated, identified using column chromatography and TLC, and structure was analyzed using $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS and IR.

3. 3rd Year : Purified compound identified from 2nd year research was applied to different foods (acidic fruit juices, milk, and beef) spiked with food-borne disease organisms by using purified compound either alone or combined with monolaurin in other to determine their potential of the natural antimicrobial agent.

IV. Results and Recommendations

1. Antimicrobial activity of water or ethanol extracts from mountain edible herbs was investigated against food poisoning or foodborne disease organisms. Among them,

ethanol extract of *Coptis chinensis* Franch showed the strongest antimicrobial activity. Also, silica gel column chromatography was used to isolate active antimicrobial compounds and eluted and concentrated by using benzene, dichromethane, ethylacetate, and ethanol-methanol-acetate-water(1:1:0.1:1) with step by step. The strongest antimicrobial activity was observed in ethanol-methanol-acetate-water (1:1:0.1:1) fraction.

2. Antimicrobial activity from water extract of *Coptis chinensis* Franch was determined and natural antimicrobial component was isolated, identified using column chromatography and TLC, and structure was analyzed using $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS and IR. Active natural antimicrobial agent was identified as berberin-Cl. This compound has been known as key component showing strong antimicrobial activity in *Coptis chinensis* Franch. Previously identified berberin-Cl was slightly soluble in water and soluble in organic solvents, but berberin-Cl author identified was much more dissolved in water than previous reported berberin-Cl. Now, isolation and identification method for berberin-Cl from *Coptis chinensis* Franch was patented (patent number:43012, 1998).

3. Berberin-Cl has been reported as showing antimicrobial activity, anticancer, antiviral, antifungal and anticancer, etc., but it has been little reported as antimicrobial agent on food system. Thus, this study was applied to different foods (acidic fruit juices, milk, and beef) spiked with food-borne disease organisms by using purified compound either alone or combined with monolaurin in order to determine their potential of the natural antimicrobial agent. Berberin-Cl did not interact with organic acid, but it showed synergistic effect with monolaurin in vitro system. From this result, inhibitory effect of berberin-Cl and monolaurin either alone or in combination on acidic fruit juices spiked with *Escherichia coli* O157:H7 or milk spiked with *Staphylococcus aureus* was determined.

The addition of berberine or monolaurin alone to acidic fruit juices showed little antimicrobial activity at higher temperature, but slightly increased antimicrobial activity was observed as temperature decreased. However, combined berberin-Cl with monolaurin significantly enhanced inhibitory effect compared to that of single treatment alone except 35°C storage. Especially, antimicrobial activity in carrot and apple juice was more increased than apple juice. Also, inhibitory effect of berberin-Cl alone on milk spiked with *Staphylococcus aureus* was very poor, but inhibitory effect of monolaurin on whole milk and skim at lower temperature was strikingly enhanced. In the meantime, combined berberin-Cl with monolaurin showed

more strong inhibitory effects on beef spiked *Listeria monocytogenes* than those of berberin-Cl or monolaurin alone and antimicrobial activity of monolaurin in vacuum packaging was more increased than that of air packaging.

From above results, berberin-Cl itself showed a little antimicrobial activity, but significantly enhanced inhibitory effects was observed when berberin-Cl combined with monolaurin depending on tested types of foods. Thus, it will be necessary to apply berberin-Cl on different types of foods and to find synergistic effects, then it might role great contribution as new natural antimicrobial agent.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Development of Natural Antimicrobial Agents from Medicinal Edible Plants	317
Section 1. Introduction	317
Section 2. Materials and Methods	319
1. Experimental Materials and Preparation of Extracts	319
2. Test Organisms and Media	319
3. Antimicrobial Activity and MIC of Extracts	319
1) Stability of Ethanol Extract of <i>Coptis chinensis</i> Franch on Heat and pH	320
2) Inhibitory Effect of Partially Purified Compound	320
4. Isolation, Identification and Structural Analysis	320
1) Isolation and Identification	320
2) Structural Analysis and crystallization	322
3) Antimicrobial activity of purified component	322
5. Antimicrobial Activity of Berberine on Food System	322
1) Preparation of bacteria cells	322
2) Preparation of Antimicrobial Agents	322
3) Minimal Inhibitory Concentration with Combind Reaction	322
4) Preparation of Liquid Food and Inoculation	322
5) Preparation of Beef and Inoculation	323
6) Packaging	323
7) Antimicrobial Activity	323
Section 3. Results and Discussion	324
1. Antimicrobial Activity of Ethanol Extracts of Medicinal Herbs	324
2. MIC, Heat and pH Stability of Ethanol Extract of <i>Coptis Chinensis</i> Franch	324
3. Inhibitory Effect of Partially Purified Compound	325
4. Isolation, Identification and Structural Analysis	330

1) Isolation and Identification	330
2) Structural Analysis and crystallization	330
3) Antimicrobial activity of Purified Component	332
5. Antimicrobial Activity of Berberine on Food System	344
1) MIC of Partially Purified Compound, Organic Acids and Monolaurin on Food-borne Disease Bacteria In Vitro	344
2) Inhibitory Effect of Berberine and Monolaurin Either Alone or in Comination on Acidic Fruit Juices Spiked with <i>E. coli</i> 0157:H7.....	345
3) Inhibitory Effect of Berberine and Monolaurin Either Alone or in Combinnation on Mikk Spiked with <i>S. aureus</i>	346
4) Inhibitory Effect of Berberine and Monolaurin Either Alone or in Combination on Beef Spiked with <i>L. monocytogenes</i>	346
Section 4. Conclusions	370
References	371

목 차

제 1 장 천연식물체로부터 식품보존제 탐색에 관한 연구	317
제1절 서 설	317
제2절 재료 및 방법	319
1. 실험재료 및 추출물의 조제	319
2. 사용균주 및 배지	319
3. 추출물의 항균력 및 MIC검색	319
1) 황련에탄올 추출물의 열처리 및 pH에 대한 안정성	320
2) 부분정제물질의 생육저해효과	320
4. 항균물질의 분리, 정제 및 구조분석	320
1) 분리 및 정제	320
2) 구조분석 및 결정	322
3) 정제물질의 항균력 측정	322
5. 각종식품에의 정제물질(berberine)의 항균력효과	322
1) 세포현탁액 준비	322
2) 항균제 준비	322
3) 액상시료 준비 및 접종	322
4) 혼합반응에 의한 최소저해농도	322
5) 쇠고기절편 준비 및 접종	323
6) 포 장	323
7) 항균력 검색	323
제3절 결과 및 고찰	324
1. 한약재 에탄올추출물의 항균력검색	324
2. 황련 에탄올추출물의 MIC, 열안전성 및 pH의 영향	324
3. 부분정제 물질의 항균력 및 생육억제효과	325
4. 항균물질의 분리, 정제 및 구조분석	330
1) 분리 및 정제	330
2) 구조분석	330
3) 정제물질의 특성 및 결정	332
4) 정제물질의 항균력 측정	332
5. 각종식품에의 정제물질(berberin)의 항균력효과	344
1) 식중독세균에 대한 부분정제물질, 유기산 및 모노로린의 MIC in vitro	344
2) <i>E. coil</i> 0157:H7에 오염된 산성과일쥬스에서의 berberine과 monolaurin의 항균작용	345
3) <i>S. aureus</i> 에 오염된 우유에서의 berberine과 monolaurin의 항균작용	346
4) <i>L. monocytogenes</i> 에 오염된 쇠고기에서의 berberine과 monolaurin의 항균작용	346
제4절 결 론	370
제5절 참고문헌	371

여 백

제 1 절 서 설

오늘날 산업문명이 고도로 발달함에 따라 생활환경도 날로 복잡해지고 식생활도 급격히 변화되어 왔다. 최근 식품산업의 급격한 발전과 식품의 세계화 및 인스턴트 식품의 대량화 등으로 식품저장기간을 연장하고 상품가치를 높이기 위한 수단으로 식품보존료의 사용이 증가하고 있으나 대부분의 식품보존료는 화학합성품으로 안전한 첨가량 농도 범위내에서는 항균효과가 적으므로 높은농도를 사용할 경우 안전성에 심각한 영향을 나타낸다. 따라서 대부분의 소비자들은 합성첨가제를 이용한 식품의 사용을 꺼려하고 있다. 그러므로 안전성의 문제가 없는 천연 첨가제 물질의 개발과 이용은 각종 가공식품의 저장성 향상 및 저온 식품의 안전성 확보 라는 면에서 필연적이라 하겠다. 지금까지 미국, 일본, 유럽등의 대학 및 산업체에서는 인체에 유해성이 없고 안전한 천연식품보존료의 개발과 특허획득에 막대한 투자를 아끼고 있지않고 있다. 현재까지 연구된 대부분의 천연항균성 물질은 동물 또는 식물체내에 함유되어 있는 특정 성분을 추출하여 이용되었으며 또한 단백질, 특정효소, 유기산, 젖산균에 의해 분비되는 bacteriocin 등이 항균성을 나타내는 것으로 알려지고 있다. 예를들면 단백질및 효소 성분으로서, 달걀에 함유된 conalbumin, avidine, lysozyme등과 우유에 있는 lactoferon이 항균성을 갖고있으며, 유기산중에는 benzoic acid, citric acid, malic acid 등이 천연물에 함유되어 미생물의 증식을 억제하고 있는 것으로 보고되고있다. 또한 탄소수가 12-18의 중급 지방산들이 가장 효과적인 항균성을 보이지만 대부분 정균작용으로 알려지고 있고 polyhydric alcohol의 fatty acid ester 도 항균성을 갖는 것으로 보고되고 있으며, 젖산균에서 분리되는 많은 bacteriocin 중 nisin, diplococcin, acidophilin, colicin 등이 항균성을 갖는것으로 보고되고 있다. 한편 식물 추출물로서 마늘 및 양파 추출물에서 부패미생물의 생육 및 곰팡이 독소성분의 생합성 저해효과를 나타내었으며, 정향등의 향신료 및 그 정유성분이 항균성을 있으며 식물의 색소 물질도 항균성이 인정되고 있어 flavanol 및 proanthocyanidins 또는 anthocyanin에 관한 연구가 보고 되었다.

최근 우리나라도 새로운 분석기기들의 활용으로 천연물 성분과학에 대한 연구가 급진전하여, 한방의약에서 사용되고 있는 약용식물을 비롯하여 각종 야채류, 산채류 및 수산자원에 이르기까지 다양한 소재로부터 항균활성물질에 대한 탐색을 활발하게 진행 해오고 있다. 예를들면, 편축, 초피나무등의 항진균 작용이 밝혀졌으며 생약재로 쓰이는 황백, 오배자, 자초, 갓, 알로에등은 광범위한 항균성을 나타내었다. 한편, 일반 식용야채인 김치재료 성분들이 젖산균에 대한 생육억제 효과를 보였으며 grapefruit 및 영지버섯은 광범위한 항균력을 나타내었다. 한편, 수산자원 중에서 갯생이모자반, 구멍쇠미역, 참빗풀, 산말등은 강한 항균력을 나타내었다. 이상과같이, 항균성분을 함유하는 대부분의 천연항균성물질들은 대부분 배지상에서의 유해미생물의 생육억제 효과면에 치중하여 왔으며 식품에직접 응용하여 그천연 항균성물질의 보존력 효과에 관한 연구나 살균작용을 하는 유효성분 및 작용기작을 규명하기위한 기초연구는 활발하게 진행되지 못하고 있는 상황이었다.

지금까지 알려진 식중독균은 *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vivrio*, *Clostridium botulism*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas*

*hydrophila*균 등이 있는데 이중 *Listeria monocytogenes*균 같은 저온성 세균은 다른 병원성 세균에 비하여 치사율이 매우높고 모든 환경조건에 광범위하게 분포되어 있으며 저온에서 생육이 가능하기 때문에 특히 냉장식품에 심각한 안정성의 문제가 되두되고 있다. 일반적으로 대부분 식중독균은 산성조건에서는 생육이 어려우나 *L. monocytogenes*나 *E. coli* O-157:H7 같은균은 산성 조건하에서 강한 내성이 있어 생육이 가능 하기 때문에 특히 산성식품에 관한 안전성이 심각한 우려가될 수 있다. O-157균이 pH 3.6-4.0인 사과 사이더에서 생육이 가능 하였다는 보고는 최근 가공 식품의 섭취가 증가되고있는 현실에서 특히 각종 산성식품이나 음료수에 대한 심각한 안전성의 문제를 제기하기에 충분하다. 또한 많은 식중독세균들은 불충분하게 가열된 우유, 쇠고기, 가금류 및 과채류등에서 많이 오염되어 국민건강에 심각한 안전성의 위협을 야기하기 때문에 이러한 식중독균을 제어할 수 있는 새로운 기술개발이 절실한 실정이다. 한편, monolaurin은 미국에서 천연 식품유화제로 사용되는 GRAS (Generally Recognized as Safe)로 승인된 물질로서 유화제 이외에 그람음성균에는 미약하지만 그람양성 세균, 곰팡이, 효모에는 강한 항균성을 나타낸다. 그러나 이물질은 식품에 적용될때는 단백질 또는 전분등에 의하여 길항작용을 나타내는데 Oh등은(1993) monolaurin이 유기산과 혼합반응시 항균작용이 상승한다고 보고하였다. 그러므로 *L. monocytogenes*나 *E. coli* O-157:H7균의 산저항성이 강한 성질을 나타내므로 산성조건 하에서 이균의 생육억제에 대한 monolaurin의 사용은 매우 흥미로운 연구라고 사료된다.

따라서 본 연구의 궁극적인 목적은 여러종류의 천연산약초 중에서 가장 강력한 항균작용을 나타내는 물질을 screening하여 그물질의 활성성분을 규명함으로써 천연 보존제의 개발에 실질적인 기여를 하고자 함에 있다. 일반적으로 사용되고 있는 천연보존제는 단독으로 식품에 첨가 되었을때 식품속에 있는 일부성분에 의하여 길항작용을 받는 것으로 보고되었다. 이와같은 관점에서 볼때 끊임없는 천연항균성의 물질개발을 통하여 항균활성을 나타내는 천연물질 또는 기존의 알려진 천연 보존제를 이용하여 서로 혼합하여 사용하였을때 상승작용을 나타내는 물질을 탐색한다면 많은 노력과 시간을 절약할수 있고 비용을 줄일 수 있으며 안전성의 위협이없는 식품보존료로서 응용, 개발될 천연항균제의 적용범위를 확대 시킬 수 있다. 따라서 각종 식품의 저장성 향상 및 저온 유통식품의 안전성 확보라는 견지에서 이러한 연구의 중요성은 매우 크다고 하겠다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출물의 조제

본 실험에 사용된 9종의 한약재(Table 1)는 황련을 제외하고는 모두 자가기준 및 규격을 정하여 제조 또는 가공식품의 원료로 사용할 수 있는 것으로서 서울 경동시장에 있는 한약전문 상가에서 구입하여 실험에 사용하였다. 한약재의 추출은 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 flask에 시료 10배의 에탄올을 사용하여 45°C의 수욕상에서 24시간 동안 추출한 후 여과하여 (3X) rotatory vaccum evaporator (Rikakikai Co., Japan)로 감압 농축한 다음 농축물을 동결건조기 (Taitec Co., Japan)를 사용하여 건조한 후 4°C 냉장에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 1. List of medicinal herbs used for antimicrobial studies

Name of medicinal herbs		Effective part
Scientific name	Korean name	
<i>Crataegus pinnatifida Bunge</i>	Sansa (산사)	Flower
<i>Coptis chinensis Franch</i>	Hwangryeon (황련)	Root
<i>Thuja orientalis L.</i>	Cheubaek (측백)	Leaf
<i>Rehmannia glutinosa Libos.</i> <i>var. purpurea Makino</i>	Sukjihwang (숙지황)	Root
<i>Atractylodes japonica koidzumi</i>	Changchul (창출)	Flower, Root
<i>Acorus graminens Soland</i>	Seokchangpo (석창포)	Root
<i>Quisqualis indica L. var.</i> <i>villosa clarke</i>	Sakunja (사군자)	Fruit
<i>Caragana Koreana Nakai</i>	Tosaja (토사자)	Root
<i>Angelica dahurica Benth et Hook</i>	Baekji (백지)	Root

2. 사용균주준비 및 배지

본 실험에 사용되는 세균류는 Tryptic soy broth 또는 MRS broth배지에 접종하여 30-37°C에서 24시간 배양한 후 배양액을 공시균으로 사용하였고 곰팡이는 YM agar 사면배지를 사용하여 25°C에서 120시간 충분히 포자를 형성시킨후 생리식염수를 넣고 현탁액을 만든후 공시균으로 사용하였고 효모는 YM broth 배지를 사용하여 25°C에서 48시간 배양한 후 배양액을 공시균으로 각각 사용하였다.

3. 추출물의 항균력 및 MIC 검색

항균성 시험은 멸균된 각각의 생육배지를 petridish에 15 mL씩 분주하여 응고시키고,

중층용 배지를 각각 5 mL씩 시험관에 분주하여 멸균한후, 50°C 수욕상에 보관하면서 전배양한 각종 시험균액을 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 후 기층용 배지위에 분주하여 2종의 평판배지를 만들었다. 한약재 추출물을 멸균된 paper disk에 일정량씩 흡수시킨후 시험용 평판배지 표면에 올려 놓은 다음 30°C incubator에서 24-48 시간동안 배양한 다음 disk 주변의 clear zone(mm)을 측정하여 항균력을 검색하였다. Minimal Inhibitory Concentration(MIC) 측정은 에탄올 추출물을 0.45 μ m membrane filter (Nalgene Co., USA)로 제균시킨 후 전 배양한 배양액으로부터 10mL의 TSB배지 (Difco Co., USA)를 함유하는 시험관에 10^5 CFU/mL의 농도로 분주하였고 각각 적당량 농도의 황련에탄올 추출물을 넣은 후 30°C에서 24시간 배양하여 탁도를 나타내지 않는 최소저해농도를 MIC로 나타내었다.

1) 황련 에탄올 추출물의 열처리 및 pH에 대한 안정성

황련 에탄올 추출물을 100°C에서 30분과 60분, 121°C에서 15분동안 가열한 후 즉시 ice box에서 냉각시켜 1000 μ g 의 가열 추출물을 멸균된 paper disk에 흡수시켜 위의 방법으로 항균력을 조사하였다. 한편, 배양액 배지의 pH가 황련 에탄올 추출물의 항균력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 TSB 배지(Difco Co., USA)의 pH를 5.5 to 9.0 까지 조정한 다음 250ml 삼각플라스크에 각각 50 mL씩 분주하여 121°C에서 15분동안 살균하였다. 전배양한 *Listeria monocytogenes*균 배양액으로부터 최종농도가 10^5 CFU/mL이 되게 무균적으로 접종하였고 0.45 μ m membrane filter (Nalgene Co., USA)로 제균시킨 황련 에탄올 추출물의 적당농도를 무균적으로 배지에 접종한 다음 30°C에서 48시간 배양하여 추출물의 MIC 농도를 측정 하였다.

2) 부분정제물질의 생육저해효과

황련 에탄올추출물을 silica gel로 충전된 column을 사용하여 benzene, dichromethane, ethylacetate, 및 ethanol-methanol-acetate-water (1:1:0.1:1) 용매로 순차적으로 용출한 다음 각각의 용출액을 농축하여 위의 방법으로 항균력을 검색하였다. 또한 부분정제물질의 생육저해효과를 측정하기 위하여 Tryptic soy broth 배지(Difco Co., USA)를 250 ml 삼각 플라스크에 각각 50ml씩 분주하여 121°C에서 15분동안 살균한 다음 0.45 μ m membrane filter (Nalgene Co., USA)로 제균시킨 부분정제물질을 적당한 농도씩 무균적으로 배지에 분주한 후 전배양한 *Listeria monocytogenes*와 *Staphylococcus aureus* 배양액으로 부터 각각 최종농도가 10^3 CFU/mL 이 되게 무균적으로 접종하였다. 각 플라스크는 35°C에서 72시간동안 배양하였고 추출물의 농도별 생육저해 효과를 측정하기 위하여 배양하는 동안 각 시료는 시간별로 spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 21D)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였고 추출물이 함유된 액체배지를 blank로 사용하였다.

4. 항균물질의 분리 및 정제

1) 분리 및 정제

황련뿌리를 열수추출하여 활성성분이 함유된 물질을 추출하고 추출물에 물을 가하여 용해되는 부분만을 취하고, 각종 칼럼크로마토그래피와 TLC 방법을 이용하여 활성성분이 있는 99% 이상의 단일물질로 단정되는 미황색의 결정분말을 얻었으며 그 과정을 Fig.1에 표시하였다.

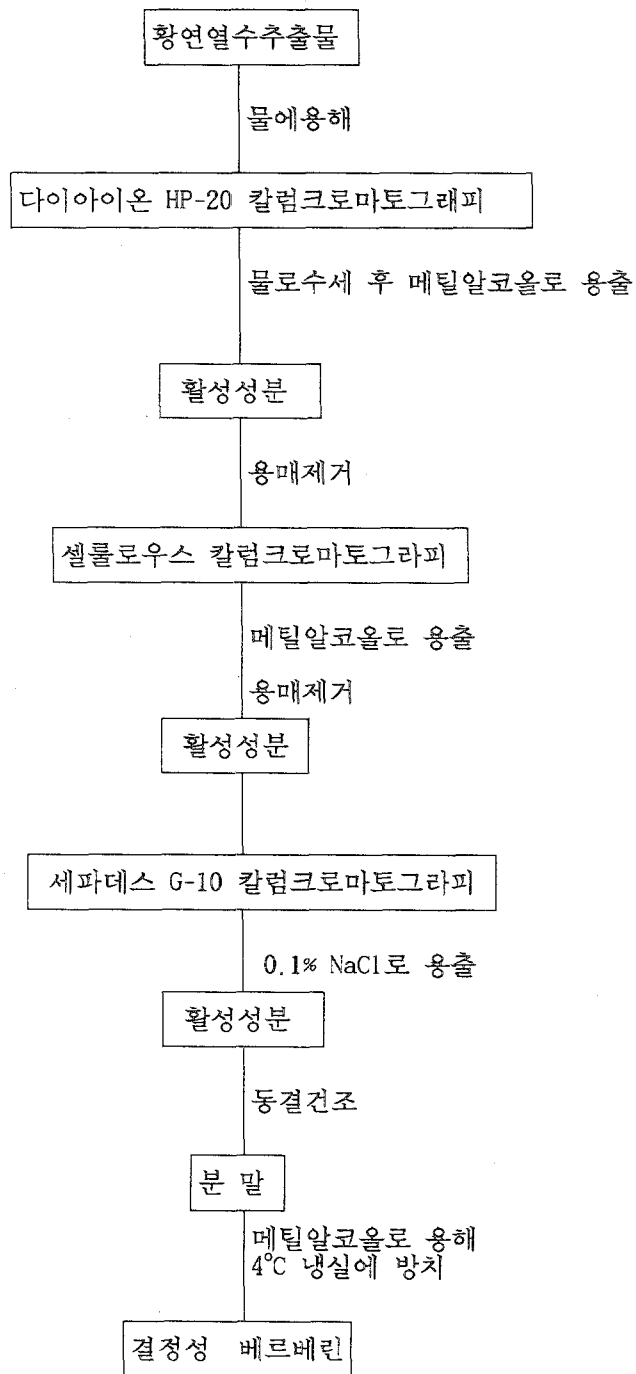


Fig. 1. Isolation and Purification of Antimicrobial components from water extract of *Coptis chinensis* Franch

2) 항균물질의 구조분석 및 결정

단일물질로 순수분리된 항균성물질 화합물을 IR, NMR, MS를 사용하여 항균성물질을 다음과 같이 각각 분석하였다. IR spectrum은 항균성물질의 고체시료와 KBr을 막자사발에서 분쇄하여유압기로 압축시켜 pellet.으로만들어 JASCO Model IR Report-100 spectrophotometer로 측정하였다. NMR spectrum은 tetramethylsilane(TMS)가 내부기준물질로 첨가된 CD₃OD에 녹여 Bruker DPX-400 FT NMR spectrometer를 이용하여 1H-NMR, 13C-NMR spectrum을 얻었다. 화학적 이동값은 (ppm)로 표시하였다. 질량분석기는 JEOL AX505WA mass spectrometer를 사용하였으며 이온화 방법은 EI mass (electron impact, 70eV)를 사용하여 분자량을 확인 하였다.

3) 정제물질의 항균력 측정

순수분리된 물질의 항균성 시험은 위에서 언급한 바와같이 검색하고자 하는 균배양액을 함유하는 평판배지를 사용하여 순수분리된 물질을 paper disk에 일정농도로 흡수시킨후 시험용 평판배지 표면에 올려 놓은 다음 30°C incubator에서 24-48 시간동안 배양 한 후 disk 주변의 clear zone(mm)을 측정하여 항균력을 검색하였다.

5. 각종식품에의 정제물질(berberine)의 항균력효과

1) 세포 현탁액의 준비

본실험에 사용된 공시균주는 E. coli 0157:H7균 (Georgiat대학 식품공학과), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111균을 사용하였으며 각각의 시험균들은 4°C에서 매일 Tryptic soy 사면배지에 분주하여 보존하였다. 각균들은 35°C에서 24시간 동안 tryptic soy broth에서 전배양 한 다음 본실험에 사용하기위하여 각각의 세포농도를 적정농도로 조정하여 6,000 × g에서 5분동안 원심분리한 후 0.1% peptone수로 재현탁 하여 본 실험의 시험균으로 사용하였다.

2) 항균제의 준비

Berebrin-Cl과 유기산은 증류수에 용해하여 표준용액을 만들고 모노로린은 에탄올에 용해하여 표준용액을 만든다음 membrane filter (Sigma, 0.45 um)로 각각 여과하여 제균한 후 4°C에 보관하면서 사용전에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

3) 혼합반응에 의한 최소저해농도

각 항균제를 적정농도로 하여 멸균된 250 ml 삼각 플라스크에 무균적으로 각각 100 ml의 tryptic soy broth supplemented with 0.6% yeast extract를 분주한 다음 각각의 항균제를 적정농도로 하여 단독 또는 혼합처리하여 분주한 후 위에서 전배양한 배양액을 사용하여 최종농도가 10³ CFU/ml이 되도록 접종 한 후 35°C에서 24시간 배양하여 최소저해농도를 측정하였다.

4) 액상시료의 준비 및 접종

산성음료주스는 시내 슈퍼마켓에서 구입하였으며 본 실험을 수행하기 전에 원자력연구소 식품조사실에 의뢰하여 감마선처리를 하여 주스에 존재하는 미생물을 완전 멸균한 후 멸균된 250

ml 삼각 플라스크에 무균적으로 각각 100 ml씩 분주한 다음 위에서 전배양한 배양액을 사용하여 최종농도가 10^5 CFU/ml이 되도록 접종 한 후 적당한 농도로 조정된 berberin-Cl과 monolaurin을 단독 또는 혼합처리하여 삼각플라스크에 분주하였다. Whole milk는 시내 슈퍼마켓에서 구입하여 살균처리된 250ml 삼각플라스크에 50ml씩 분주한 후 100℃에서 20분간 3×간헐살균하였고 Skim milk(Difco, USA)는 배지의 조성비로 조제하여, 250ml 삼각플라스크에 50ml씩 분주한 후 121℃에서 15분간 멸균하여 위의 현탁액을 일정량 취하여 준비된 각 우유에 접종하였다.

5) 쇠고기 절편준비 및 접종

쇠고기를 춘천 시내 정육점으로부터 각각 5×5cm의 크기로 소고기를 절단하여 구입하였으며 본 실험에 사용할 때까지 -20℃에서 냉동저장하였고 해동 후 무균처리한 Cheese gauze로 쇠고기 절편을 싸서 적절하게 준비된 농도의 berberine과 monolaurin이 담겨진 각 용기에 3분간 침지한 다음 살균한 종이 위에 옮겨 탈수시킨 후 포장하였고 *Listeria monocytogenes*에 오염된 쇠고기를 준비하기 위하여 10^5 CFU/ml의 혼합세포액을 포함하는 용기에 5분 동안 담근 후 살균한 종이위에 즉시 옮겨 놓은 다음 탈수한 다음 적절히 준비된 각 농도의 berberine과 monolaurin 용액에 3분간 침지한 후 물기를 제거하여 각각 포장했다.

6) 포장

berberine과 monolaurin의 단독 또는 혼합처리한 시험구와 처리하지 않은 대조구로 나는 각각의 쇠고기 절편을 무균적으로 살균된 비닐 백에 넣었다. 공기 포장구는 가스 유입없이 열처리하여 밀봉하였으며 진공으로 포장된 시료는 진공포장기계(VAC-STAR 2000)를 사용하여 진공포장하여 밀봉했다.

7) 항균력 조사

접종된 각시료중 산성음료주스와 우유는 여러온도 (4, 20, 35℃)에서 저장한 일정한 시간 간격으로 각 시료들을 채취하여 0.1% peptone buffer를 사용하여 10진법 희석법으로 희석하였으며 생균수의 측정은 Standard plate count방법을 사용하여 TSA plate에 도말하여 35℃에서 24-48시간 배양한 후 colony를 count(생균수 CFU/ml)하였고 3회 반복하여 본 실험을 수행하였다. 한편, 쇠고기 시료는 4℃에 저장하고 저장된 시료들은 0, 3, 7, 10, 15일 간격으로 측정하였으며 *Listeria monocytogenes*를 접정하지 않은 시료의 생균수 측정은 modified Standard Plate Count 방법을 이용하여 Plate Count Agar 평판배지에 도말하여 35℃에서 24시간동안 배양한 후 균수를 측정 하였고 *Listeria monocytogenes*를 오염시킨 시료들은 *Listeria* 선택배지인 LAB M Palcam agar 배지를 사용하여 30℃에서 48시간동안 배양한 다음 균수를 측정하였다. 본 실험은 3회 반복 실시하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 한약재 에탄올 추출물의 항균력 검색

9종의 한약재에 에탄올을 가하여 45°C에서 24시간동안 추출한 물질의 항균력을 조사한 결과는 Table 1와 같다. 산사, 황련, 측백, 창출 및 석창포 에탄올 추출물은 그람양성 또는 음성세균 모두에 대하여 강한 항균성을 나타내었고 토사자 에탄올 추출물은 그람음성 세균인 *Pseudomonas fluorescense*, *Salmonella typhimurium*와 *Escherichia coli* 균에서만 항균성을 나타내었고 그람양성 세균에는 항균력을 나타내지 않았다. 한편 사군자 에탄올 추출물은 *Pseudomonas fluorescense*균, 숙지황 에탄올 추출물은 *Pseudomonas fluorescense*과 *Escherichia coli*균을 제외하고는 항균성검색에 사용된 다른 모든 그람양성 및 음성세균에 대하여 항균력을 나타내지 않았으며 백지 에탄올 추출물은 모든 시험균에 대하여 항균력이 없었다. 본 연구에 사용된 천연 식물재료의 에탄올 추출물중 황련의 에탄올 추출물이 모든 시험균주에 대하여 가장 강한 항균성을 나타내었기 때문에 이추출물에 대한 특성 및 성질에 대하여 구체적으로 아래 실험을 수행하였다.

2. 황련에탄올 추출물의 MIC, 열안정성 및 pH의 영향

황련의 에탄올추출물은 기존에 보고된 많은 한약재의 에탄올추출물과 비교하여 볼 때 적은 농도에서도 매우 다양하고 강한 항균력을 나타내었으며 특히 그람양성 또는 음성세균 모두 강한 항균력을 보였다. Table 2는 여러종류의 미생물에 대한 황련에탄올 추출물의 MIC를 나타내었다. 황련에탄올 추출물은 *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* 및 *Staphylococcus aureus* 같은 세균성 식중독균에 매우 강한 항균력을 나타내었다. 본 실험 결과에 의하면 황련 에탄올추출물이 다른 균에 비하여 *Listeria monocytogenes*균에 매우 강한 항균활성을 나타내었고 기타 다른 식중독균에 대하여 넓은 항균활성을 나타내었다는 사실은 새로운 천연 항균물질로서의 가능성을 제시하고 있다. 한편, 황련 에탄올 추출물에 함유되어있는 항균활성 물질의 열안정성을 조사하기 위하여 황련추출물을 100°C에서 각각 30분 또는 1시간 동안, 121°C에서 15분간 열처리한 후 *Listeria monocytogenes*균에 대한 생육저해환을 측정한 결과 상기의 모든 열처리에 의해서도 이균주의 생육저해환의 크기가 대조구와 비교하여 볼 때 변화가 없는 것으로 보아 황련 에탄올추출물은 열에 매우 안정 하였다 (Table 3). 또한 생육배지의 pH 변화가 *Listeria monocytogenes*균의 생육억제에 대한 황련 에탄올 추출물의 항균활성에 대하여 미치는 영향을 Table 4에 나타내었다. 이 균의 strain간에는 pH에 의한 영향이 각각 조금씩 달랐으며 모든 strain에 있어서 배양 배지의 pH가 중성에서 알칼리성으로 갈수록 황련 에탄올 추출물의 항균활성은 더욱 증가되었고 약산성으로 갈수록 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 황련 에탄올추출물은 알칼리성 조건하에서 더욱 강한 항균력을 나타내었다.

3. 부분정제물질의 항균력 및 생육억제효과

황련의 에탄올추출물을 silica gel로 충전된 column을 사용하여 benzene, dichromethane, ethylacetate, 및 ethanol-methanol-acetate-water (1:1:0.1:1) 용매로 순차적으로 용출한 다음 농축하여 항균력을 검색한 결과 혼합용매를 사용한 분획층에서 항균력을 나타내었다 (data not shown). 이 혼합 분획층으로부터 2차 silica gel column에 충전하여 분획한 결과를 Table 5에 나타내었다. 이 물질은 검색된 미생물중 그람양성세균, 그람음성세균, 효모 및 곰팡이균 모두에 항균력을 나타내었으나 *Candida utilis*, *Rhizopus javanicus*에는 억제효과를 나타내지 않았다. 식중독세균인 *Listeria monocytogenes*과 *Staphylococcus aureus*에 대한 부분정제물질의 항균력을 조사하기 위하여 tryptic soy broth에 부분정제물질 100 - 1000 ug/ml을 각각 첨가하여 무첨가균인 대조균과 비교한 결과를 Fig. 1 과 Fig. 2에 각각 나타내었다. Fig.1에서 보면 부분정제물질 100 ug/ml의 첨가구는 대조균과 비교하여 *Listeria monocytogenes*균의 생육저해에 대하여 거의 차이가 없으나 500 ug/ml 첨가구는 36시간까지는 생육을 억제 하였으나 그 이후 부터는 급속한 생육을 나타내기 시작 하였다. 그러나 1000 ug/ml 첨가구는 72시간까지 완전히 생육을 억제하였다. 그러나 *Staphylococcus aureus*균의 생육억제에 대하여는 비슷한 결과가 Fig. 2에서 나타났으나 500 ug/ml 첨가구가 72시간까지 완전히 생육을 억제 함으로써 부분정제물질이 *Listeria monocytogenes*균보다는 *Staphylococcus aureus*균에 더욱 강한 활성을 나타 내었다. 이같은 결과는 Table 5에 나타난 바와같이 paper disc 방법을 사용한 결과와 일치함을 나타내었다. 일반적으로 활성 물질을 정제할수록 활성효과가 증대되는데 황련추출물의 경우는 오히려 부분정제시 활성이 다소 저하되는 경향을 나타내었다. 이상의 결과로 보아 황련 추출물은 모든 미생물에 대하여 강한 항균력을 나타내므로 새로운 천연 항균소재의 식품보존제로서의 개발 가능성을 제시 하여 주고 있으며 그 이외에 식품첨가물 자가기준 및 규격에 정하여 제조 또는 가공식품의 원료로 사용 할수 있는 품목중 축백, 석창포 및 창출같은 제품은 항균성이 매우 강하고 독성의 염려가 없기 때문에 저장식품의 원료 또는 천연 보존제로서의 이용 가능성을 높여 주고 있다. 본 연구결과를 1996년 6월 미국 New Orleans에서 개최되었던 미국 IFT 국제학술회의서 발표하였으며 또한 식품과학회지 vol 30, 957-963, (1998년)에 투고 하였다.

Table 1. Antimicrobial activities of ethanol extracts of medicinal herbs on microbial growth

Samples	Inhibition zone (mm) ¹					
	P. F.	S. T.	B. S.	E. C.	B. C.	LM
<i>Crataegus pinnatifila</i> Bunge	12	11	14	13	16	ND
<i>Coptis chinensis</i> Franch	13	20	19	16	17	13
<i>Thuja orientalis</i> L.	9	ND	11	14	15	10
<i>Rehmannia glutinosa</i> Libos. var. <i>purpurea</i> Makino	12	ND	ND	8	ND	ND
<i>Atracthodes japonica</i> koidzumi	15	13	11	16	11	10
<i>Acorus graminens</i> Soland	16	17	13	17	10	ND
<i>Quisqualis indica</i> L. var. <i>villosa</i> clarke	8	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Caragana Koreana</i> Nakai	8	12	ND	15	ND	ND
<i>Angelica dahurica</i> Benth et Hook	ND	ND	ND	ND	ND	ND

P. F. : *Pseudomonas fluorescens*, S. T. : *Salmonella typhimurium*, B. S. : *Bacillus subtilis*
 B. C. : *Bacillus cereus*, E. C. : *Escherichia coli*, L. M. : *Listeria monocytogenes*

¹ One thousand μg of ethanol extract was adsorbed into paper disk (8 mm, diameter) and the diameter (mm) of clear zone was confirmed around the colony.

Table 2. Minimal inhibitory concentration of ethanol extract of *Coptis chinensis* Franch on microbial growth

Microorganisms ¹	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 12210	90
<i>Escherichia coli</i> IFO 13168	90
<i>Lactobacillus plantarum</i>	180
<i>Lactobacillus brevis</i>	180
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	90
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 43256	90
<i>Listeria monocytogenes</i> F5027	90
<i>Listeria monocytogenes</i> F5069	180
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	180
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	360
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	90

¹ Final cell concentration for each bacterium was approximately 1×10^3 CFU/mL.

Table 3. Heat stability of ethanol extract of *Coptis chinensis* Franch on *Listeria monocytogenes*

Microorganisms ¹	Inhibition zone (mm) ²			
	no heat	100°C at 30 min	100°C at 60 min	121°C at 15 min
Scott. A	12	12	12	12
ATCC 43256	12	12	12	12

¹ Final cell concentration for each bacterium was approximately 1×10^7 CFU/mL.

² One thousand μg of ethanol extract was adsorbed into paper disk (8 mm, diameter) and the diameter (mm) of clear zone was confirmed around the colony.

Table 4. Effect of pH on MIC of ethanol extracts of *Coptis chinensis* Franch on *Listeria monocytogenes* strains

pH	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ¹		
	Scott A	ATCC 43256	F5027
5.5	90	90	120
6	120	120	120
7	90	90	90
8	45	45	45
9	11.2	11.2	22.5

¹ Final cell concentration for each bacterium was approximately 1×10^3 CFU/mL

Table 5. Antimicrobial activity of partially purified substance of ethanol extracts of *Coptis chinensis* Franch on the microorganisms

Microorganisms ¹	Inhibition zone (mm)
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 12210	10
<i>Escherichia coli</i> IFO 3301	9
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	10
<i>Lactobacillus casei</i>	10
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	10
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 43256	11
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 21541	12
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13
<i>Candida tropicalis</i> IFO 0589	12
<i>Candida utilis</i> IFO 0589	-
<i>Penicillium expansum</i> IFO 4631	11
<i>Rhizopus javanicus</i> IFO 5441	-

¹ Final cell concentration for each bacterium was approximately 1×10^7 CFU/mL.

² Five hundred ug of ethanol extract was adsorbed into paper disk (8 mm, diameter) and the diameter (mm) of clear zone was confirmed around the colony.

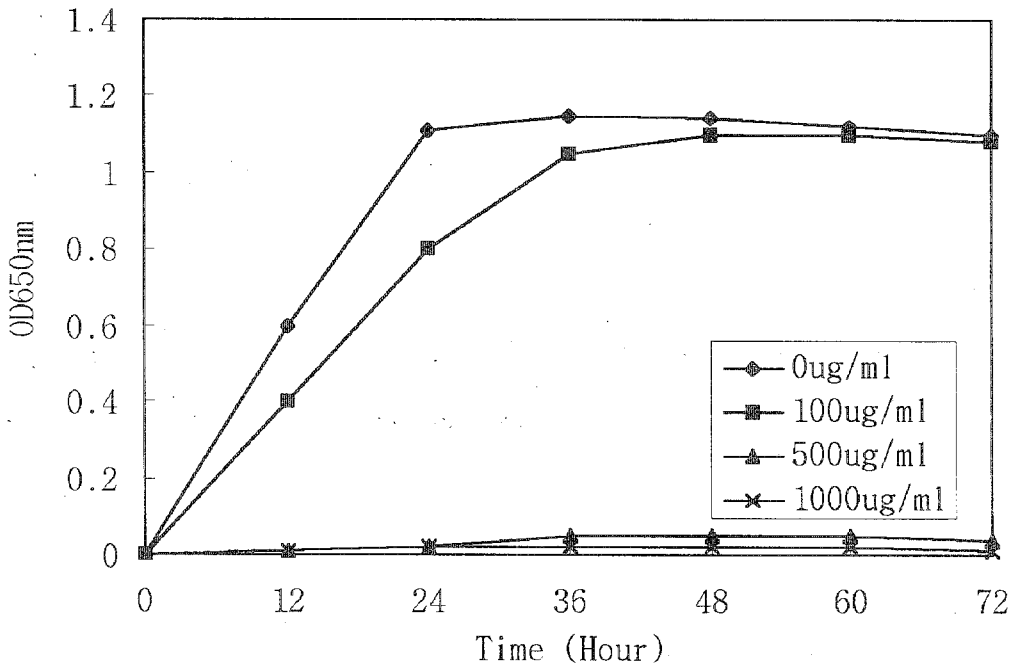


Fig. 1. Growth inhibition of partially purified substance of ethanol extracts of *Coptis chinensis* Franch on *Listeria monocytogenes* Scott A

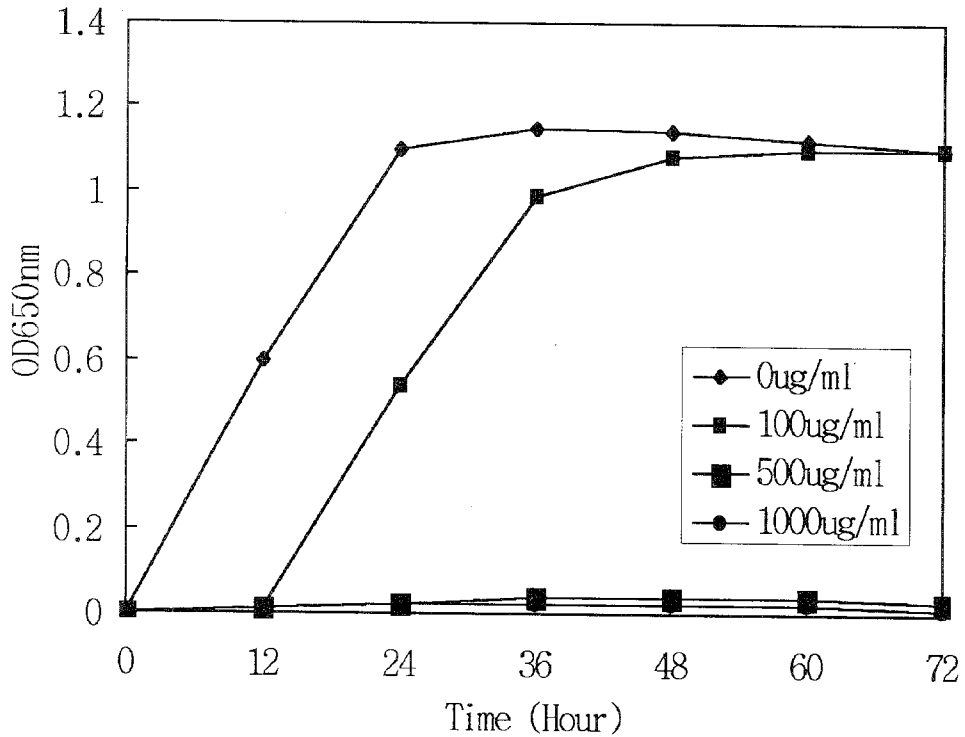


Fig. 2. Growth inhibition of partially purified substance of ethanol extracts of *Coptis chinensis* Franch on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

4. 항균물질의 분리 및 정제

1) 분리 및 정제

항균뿌리를 열수추출하여 활성성분이 함유된 물질을 추출하고 추출물에 물을 가하여 용해되는 부분만을 취하고, 다이아이온(Diaion) HP-20 칼럼크로마토그래피와 셀룰로우스 칼럼크로마토그래피를 이용하여 메틸알코올로 용출 한 후 활성성분을 모으고 메틸알코올을 제거한 다음, 활성성분을 물에 용해하여 Sephadex G-10 칼럼크로마토그래피를 사용하여 염화나트륨으로 용출하였다. 활성 용출된 활성성분을 모아, 동결건조하여 분말상태의 베르베린 나트륨을 얻고 메틸알코올을 가하여 용해시킨 후 4°C 정도의 냉실에 방치하여 99% 이상의 단일물질로 단정되는 미황색의 결정분말을 얻었으며 결정체의 모양을 Fig.3에 명시하였다.

2) 항균물질의 구조분석

정제된 물질의 IR분석결과를 Fig. 4-A에 나타내었다. 2900 cm^{-1} , 1450 및 1360 cm^{-1} 은

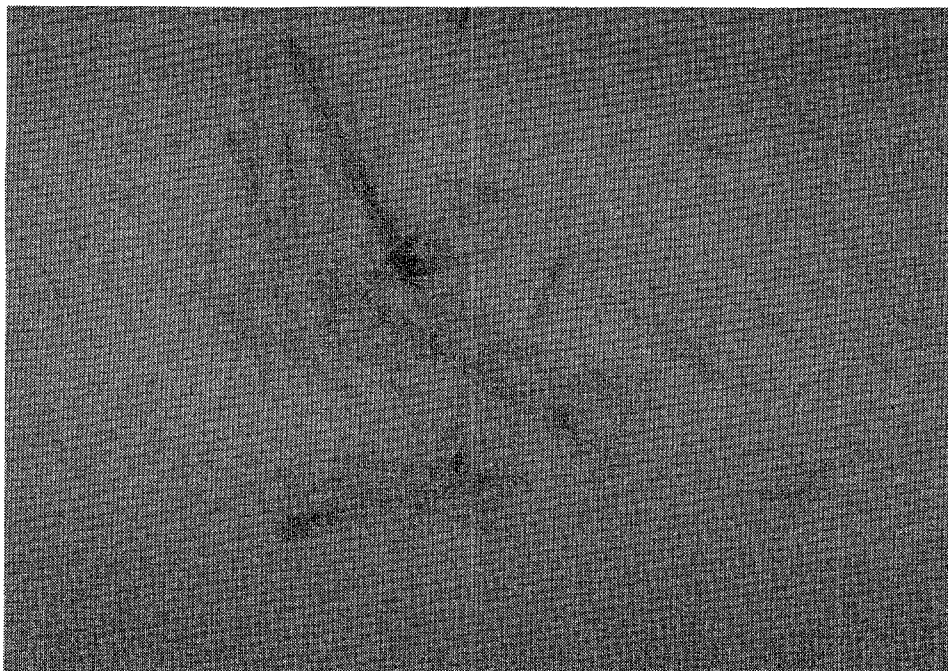


Fig. 3. Crystal formation of active compound

C-H의 흡수피크를 나타내며, 1640 cm^{-1} 의 흡수피크는 C=C를 나타내고, 1140 cm^{-1} 의 흡수피크는 C-O를, 980과 960 cm^{-1} 의 피크는 방향족고리의 C-H이며, 특히 820 cm^{-1} 의 피크는 방향족고리의 이웃한 2개의 H임을 각각 나타내었다. NMR의 분석결과는 Fig. 5-A와 6-A에 각각 나타내었다. ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) 결과는 δ 3.25(t, 2H), 4.12 (s, 3H), 4.21 (s, 3H), 4.92 (t, 2H), 6.10 (s, 2H), 6.96 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 8.06 (AB, $J_{\text{ab}}=9.1$, 2H), 8.70 (S, 1H), 9.77 (s, 1H)를 나타내었고 ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD)은 δ 28.24, 57.23, 57.69, 62.58, 121.55, 121.92, 123.38, 124.54, 127.35, 128.12, 131.93, 135.22, 139.74, 145.82, 146.45, 149.99, 152.08, 152.23을 각각 나타냈다. 한편, 질량분석의 결과는 Fig. 7-A에 나타내었는데 이 물질의 분자량은 337 (M^{++}H^+)로 확인 되었으며 다른 m/z peak는 321(-CH₃)과 278등을 나타내었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 이 정제물질은 berberin-Cl로 판명되었으므로 이를 확인하기 위하여 표준물질의 berberin-Cl을 사용하여 본 정제물질과 똑같은 조건으로 기기 분석을 하여본 결과 IR (Fig. 4-B), ^1H NMR (Fig. 5-B) 및 ^{13}C NMR (Fig. 6-B) 및 MS (Fig. 7-B), 의 결과와 정확히 일치하였다. 이상의 결과와 같이 berberin의 분자량은 336, 분자식은 $[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4]^+$ 이며, 구조식은 Fig. 8에 나타내었다. 즉, 9,10위치에 OCH₃기가 결합되어 있으며 7번위치에 N가 존재하며 1,3번위치에 ether결합을 하고 있다. 한편 이 구조를 바탕으로 하여 ^1H NMR과 ^{13}C NMR의 화학적 이동값을 각각 Fig. 9과 10에 나타내었다.

3) 정제물질의 특성 및 결정

황련의 에탄올 열수 추출물로부터 column chromatography 방법을 이용하여 최종적으로 노란색 결정의 순수 물질을 얻었다. 지금까지 알려진 바에 의하면 황련의 항균성 물질은 주성분이 berberin형 alkaloid성분으로 N+에 결합하는 유기염과 무기염이 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 분리 정제한 물질의 특성은 mp가 145°C에서 decompose하였으며 물에 매우 잘 녹는 수용성 물질이며 메탄올이나 에탄올에 녹는 극성이 큰 결정의 순수물질로서 결정체의 모양은 앞서 Fig.3에서 표기한바와 같이 노란색의 침상형을 나타내었다. 본 연구에서 정제한 berberin-Cl은 표준 berberin-Cl과 비교하여 훨씬 수용성을 나타내었으며 물에 용해시 표준시료보다 훨씬 연한 노란색을 나타내었다. 또한 표준물질과는 달리 처음부터 수용성물질을 타겟으로 분리 하였기 때문에 같은 berberin-Cl이라도 표준물질보다도 훨씬 수용성을 나타내므로 의약품이나 식품보존제로 응용될 경우 더욱 효율이 좋은 것으로 사료된다. 따라서 본 정제물질은 정제방법을 달리한 berberin-Cl의 분리방법으로 현재 특허출원(1998년 제 43012호)을 하였다.

4) 정제물질의 항균력 검색

정제된 berberin-Cl의 항균력 검색을 조사한 결과를 Table 6에 나타내었다. 황련의 정제물질은 *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*나 *Staphylococcus aureus*와 같은 그람양성균과 곰팡이에는 강한 활성을 나타내었으나 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescence*와 같은 그람음성균에는 검색한 농도에서 항균력을 나타내지 않았다. 따라서 이물질은 그람양성균에 특이적인 것으로 나타났다.

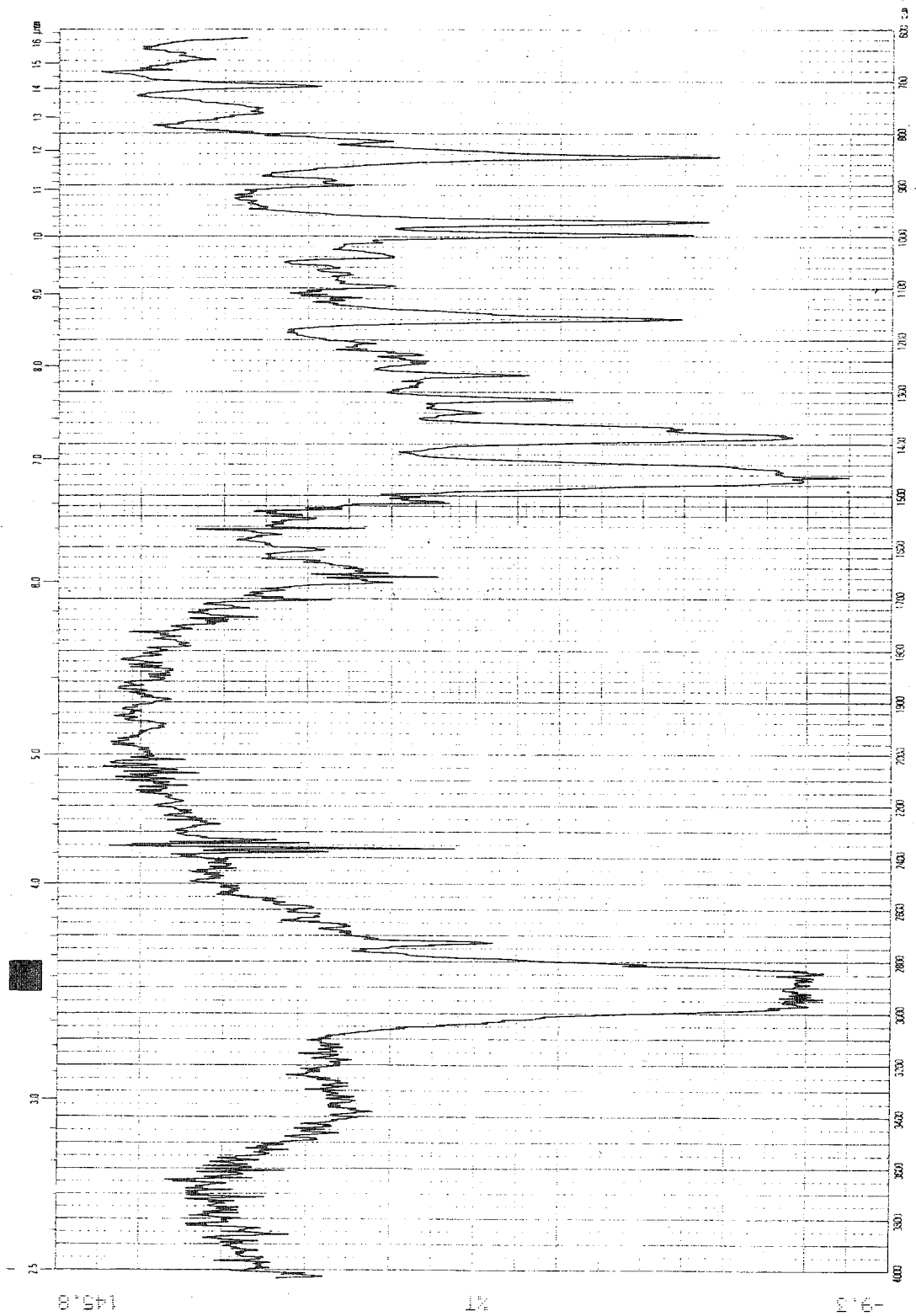


Fig. 4-A. IR spectrum of purified compound from *Coptis chinensis* Franch

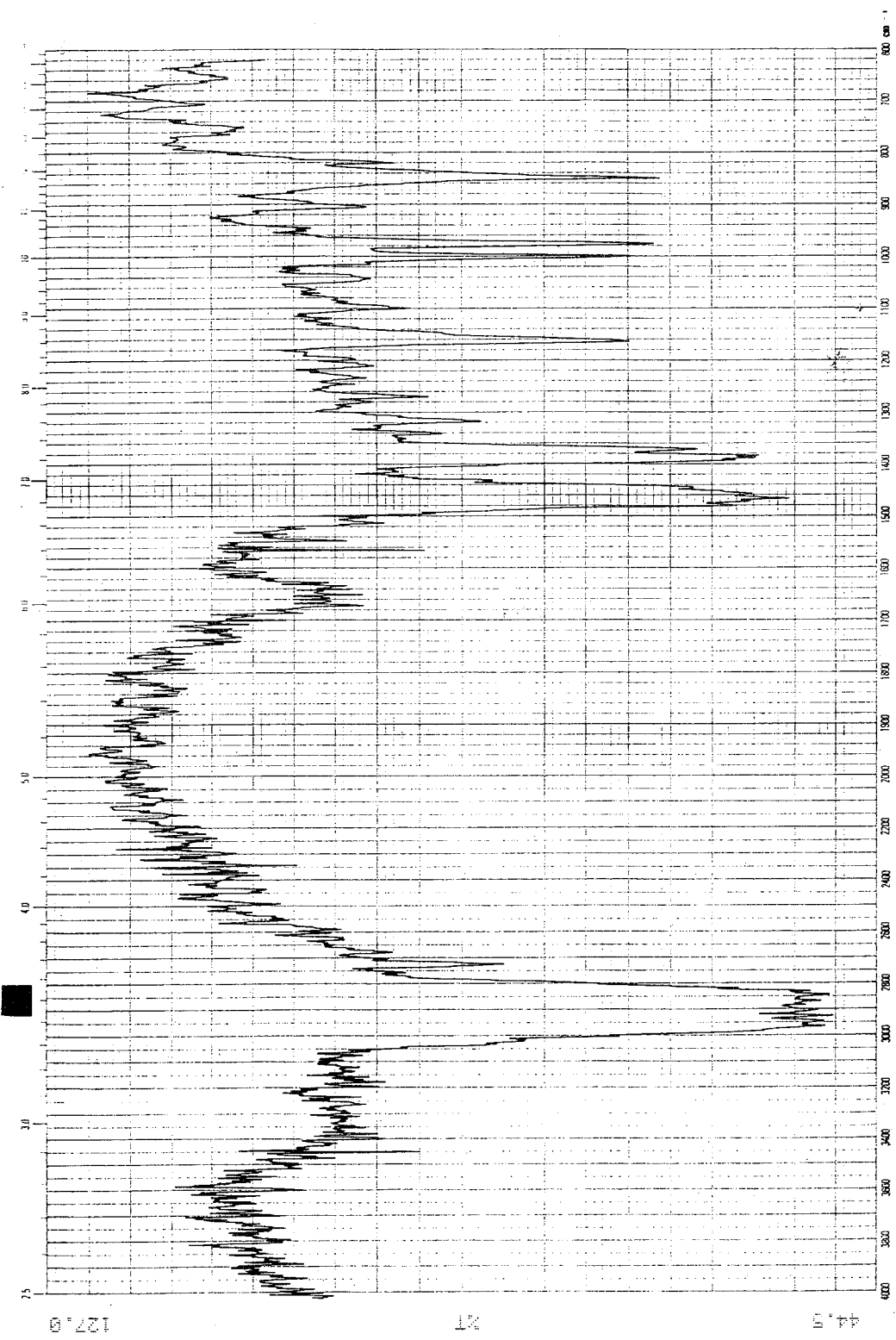


Fig. 4-B. IR spectrum of authentic berberin-Cl

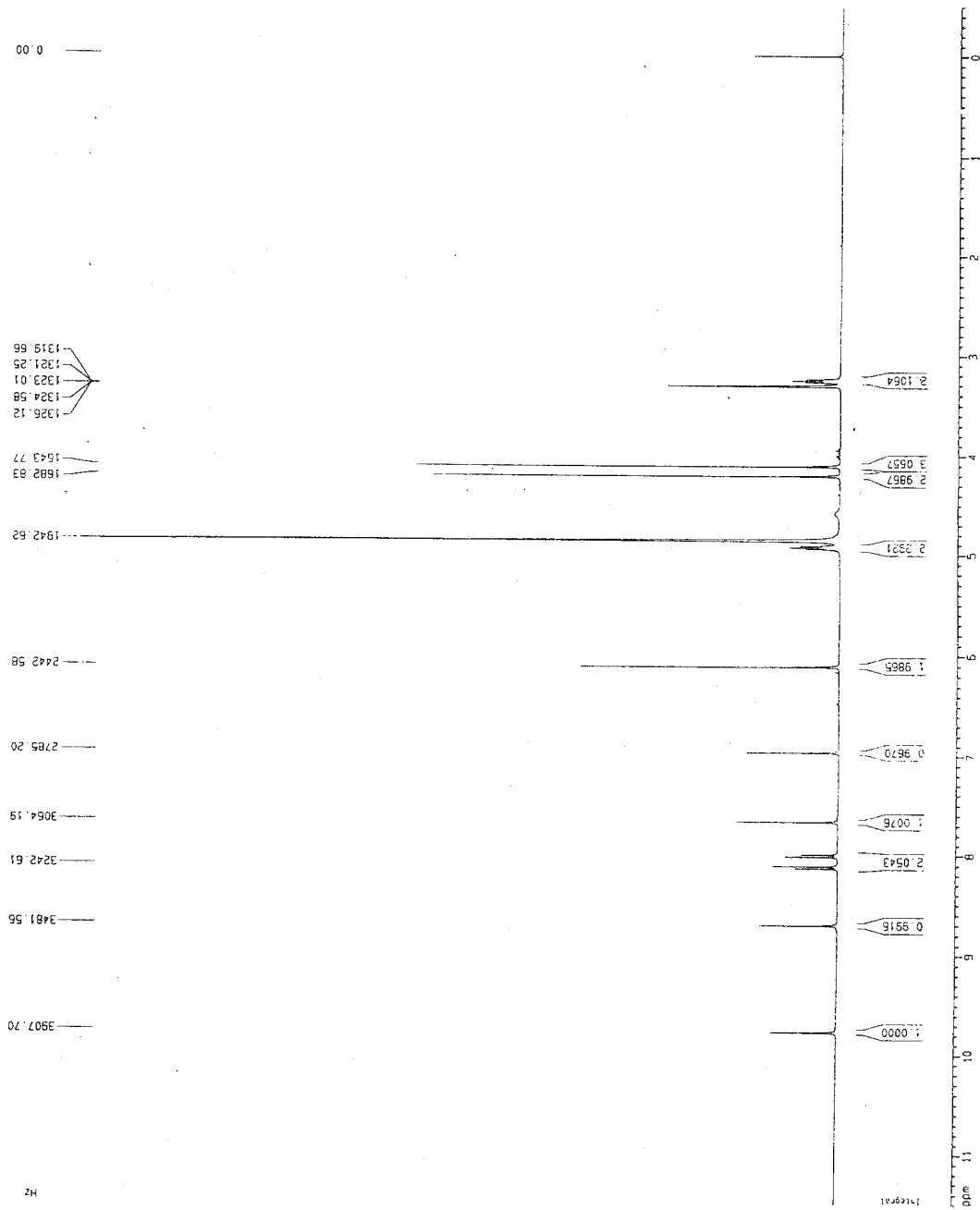


Fig. 5-A. ¹H-NMR spectrum of purified compound from *Coptis chinensis* Franch

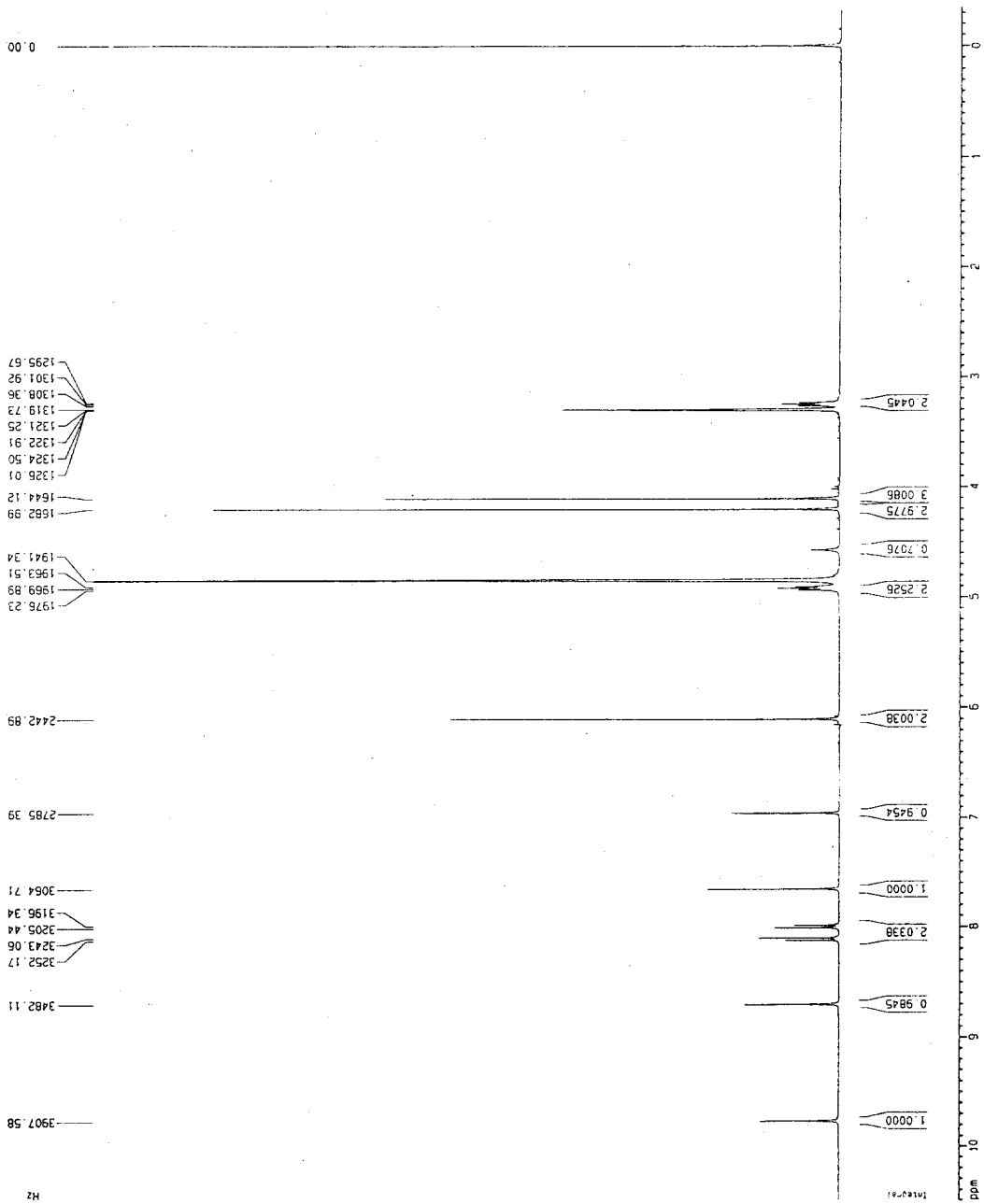


Fig. 5-B. ¹H-NMR spectrum of authentic berberin-Cl

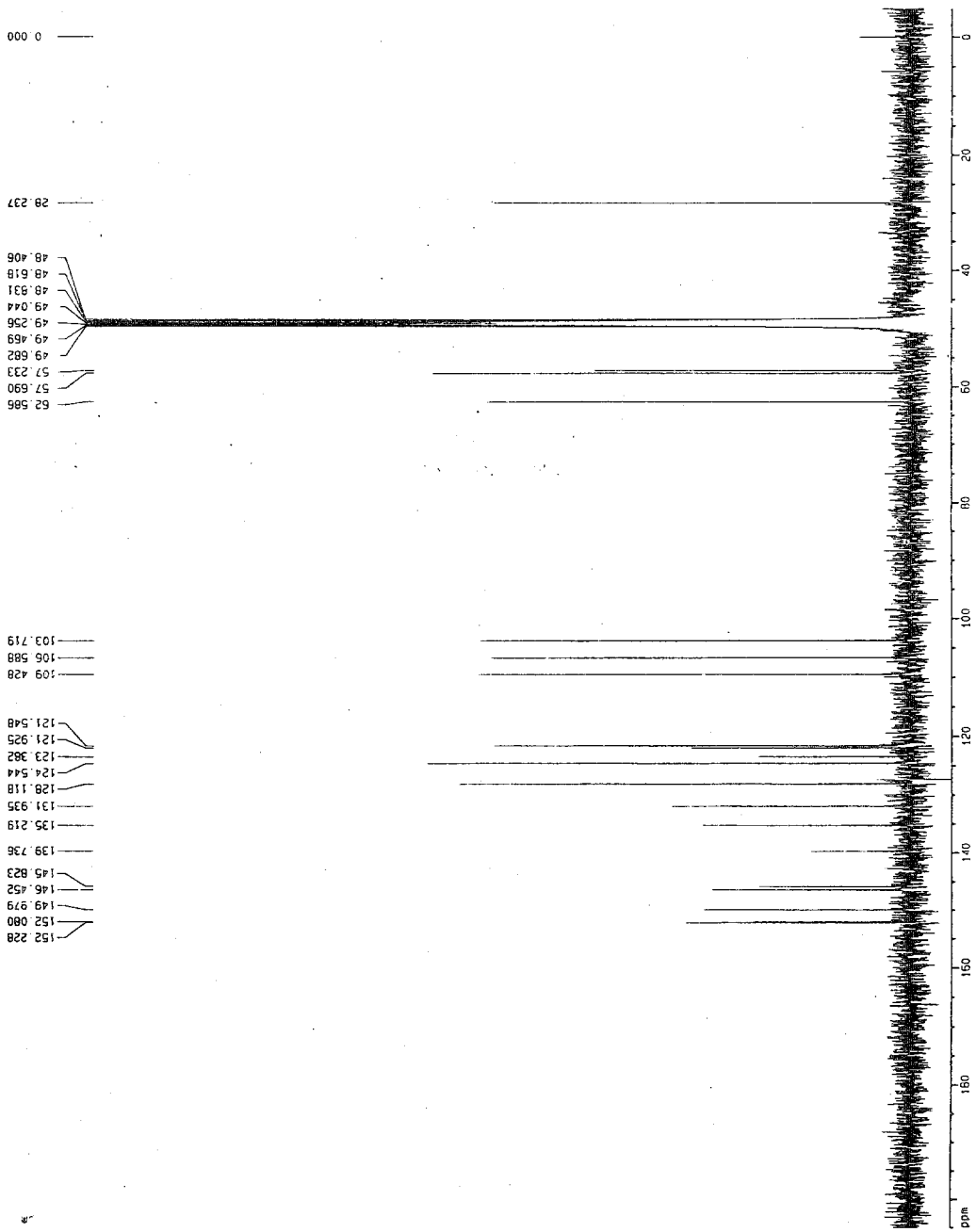


Fig. 6-A. ^{13}C -NMR spectrum of purified compound from *Coptis chinensis* Franch

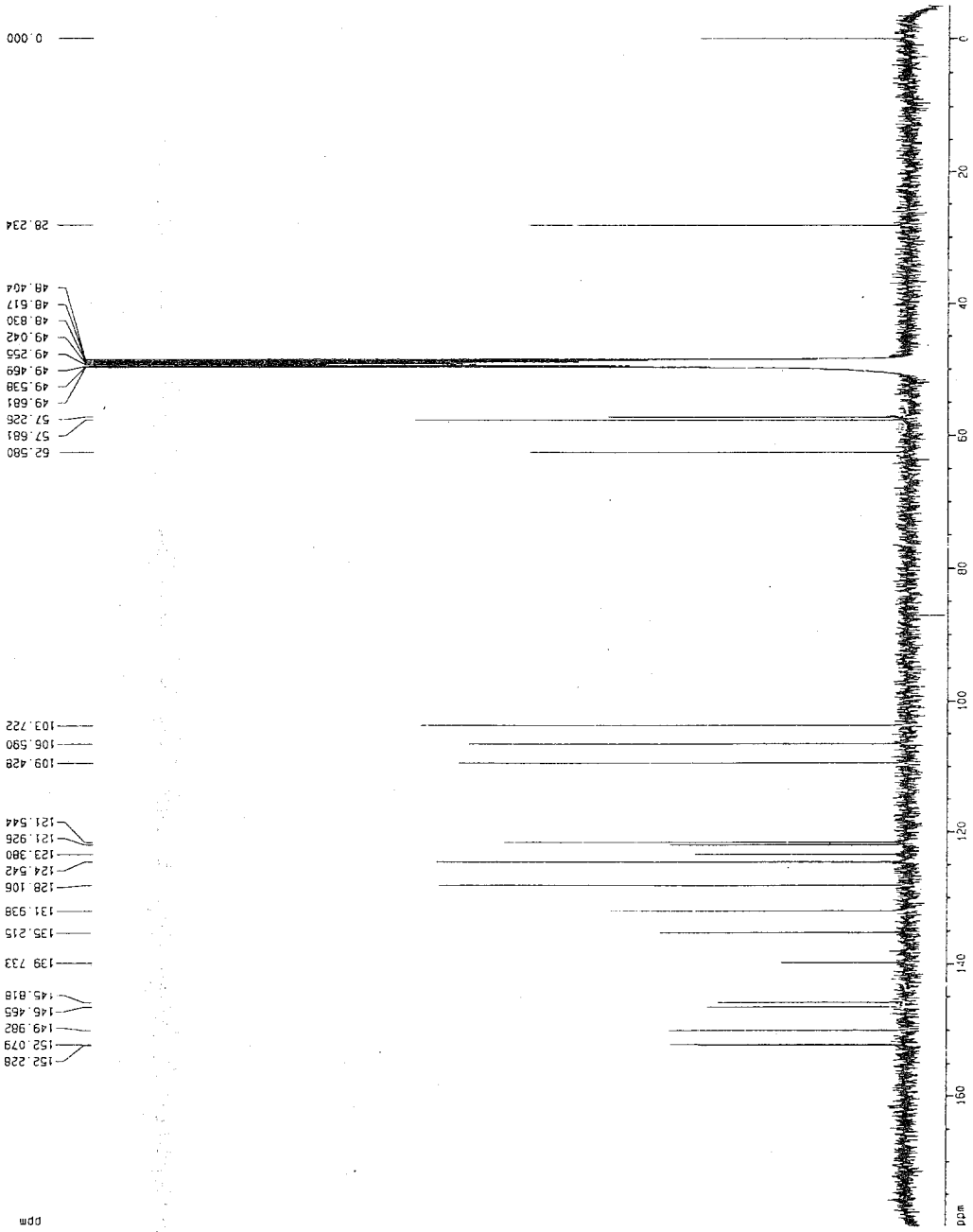


Fig. 6-B. ¹³C-NMR spectrum of authentic berberin-Cl

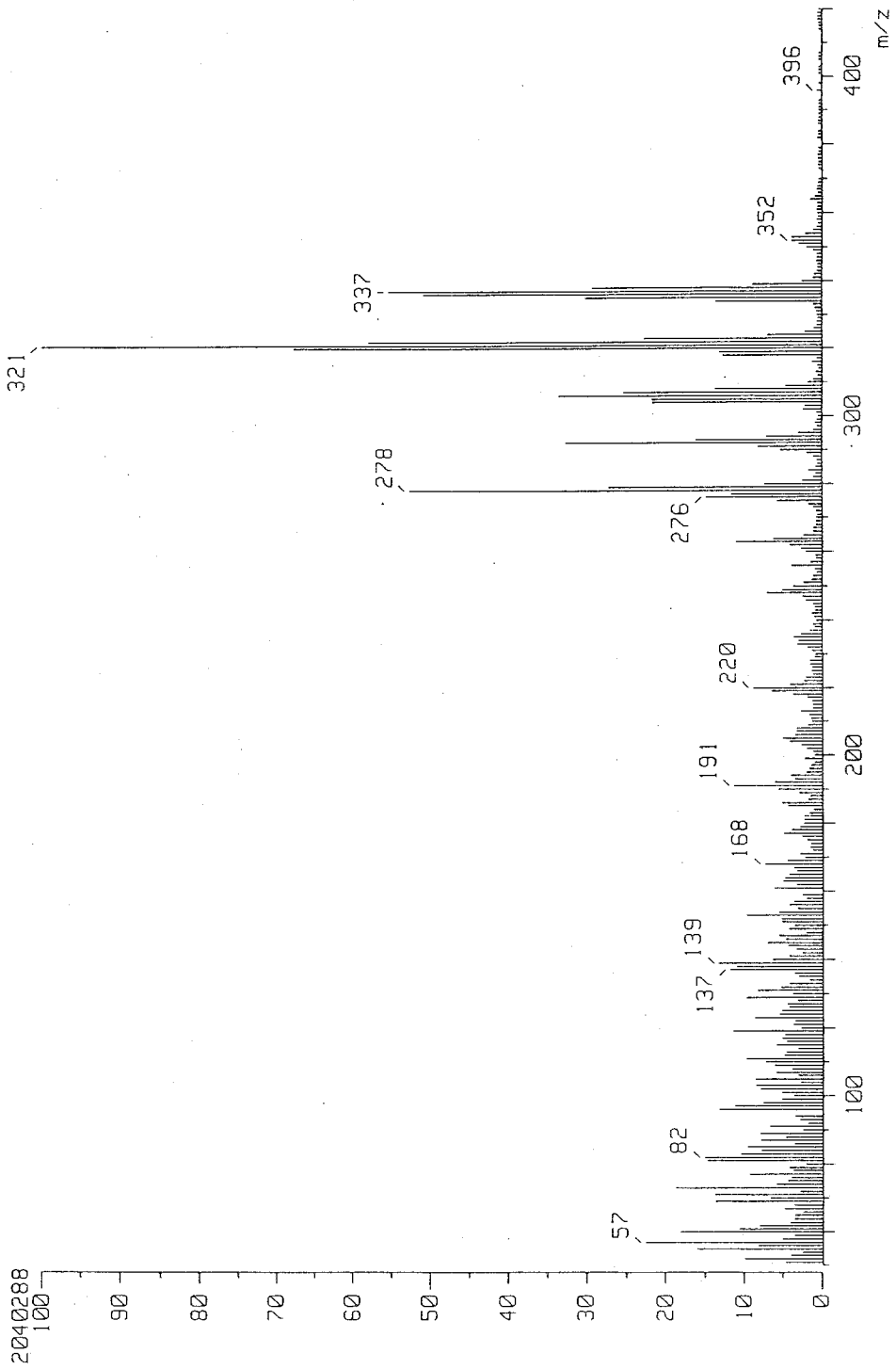


Fig. 7-A. Mass spectrum of purified compound from *Coptis chinensis* Franch

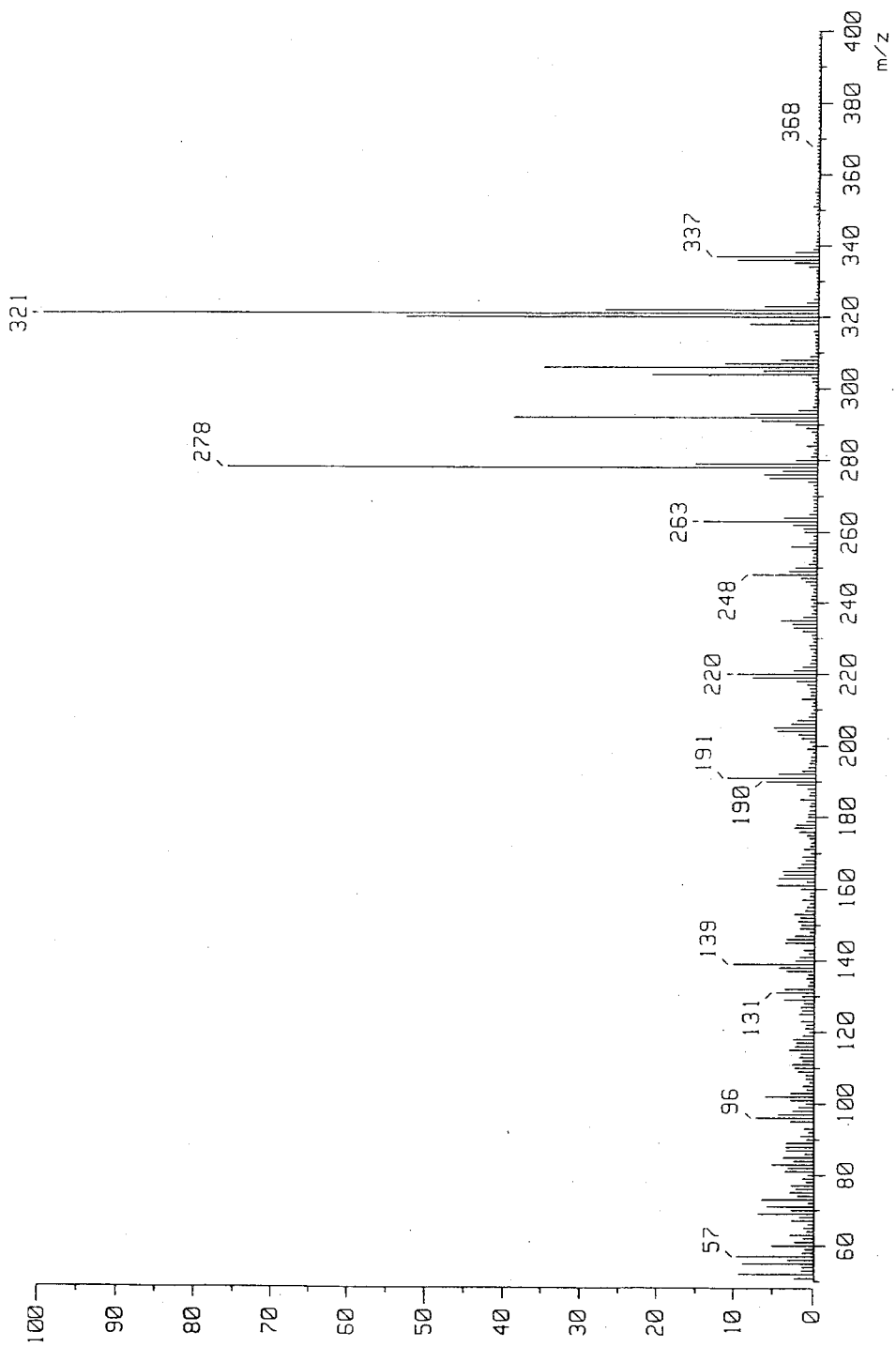


Fig. 7-B. Mass spectrum of authentic berberin-Cl

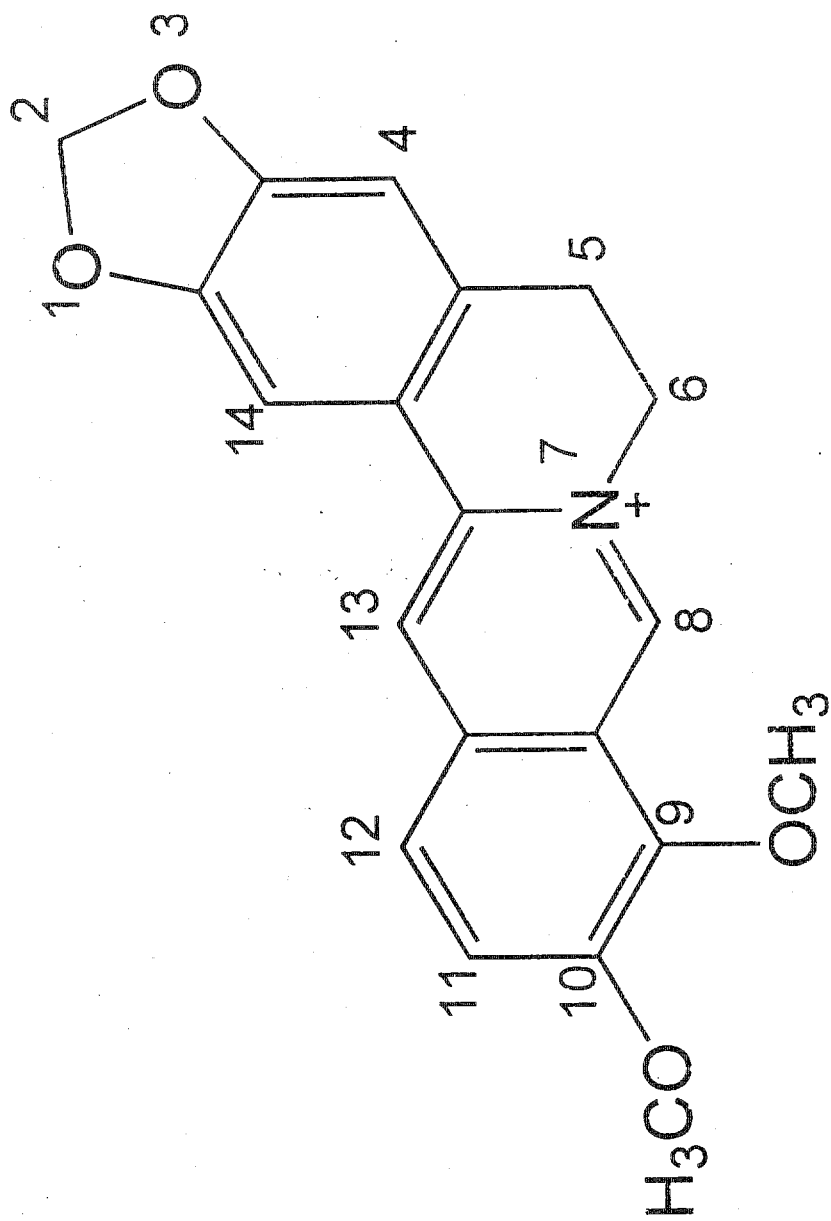


Fig. 8. Structure of Berberine

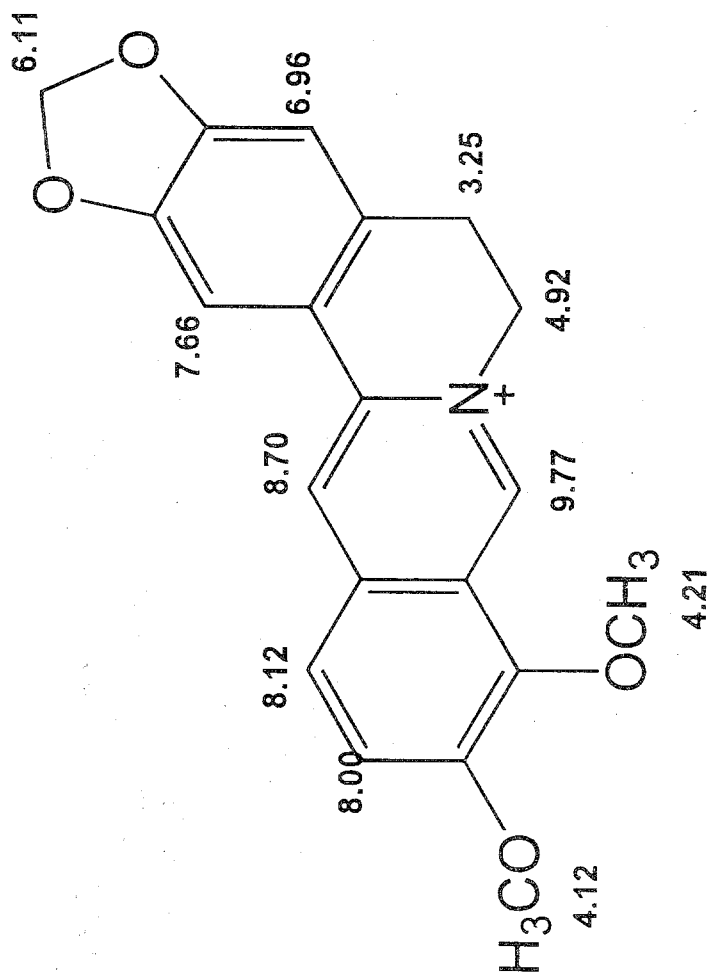


Fig. 9. ¹H-Chemical Shifts of Berberine

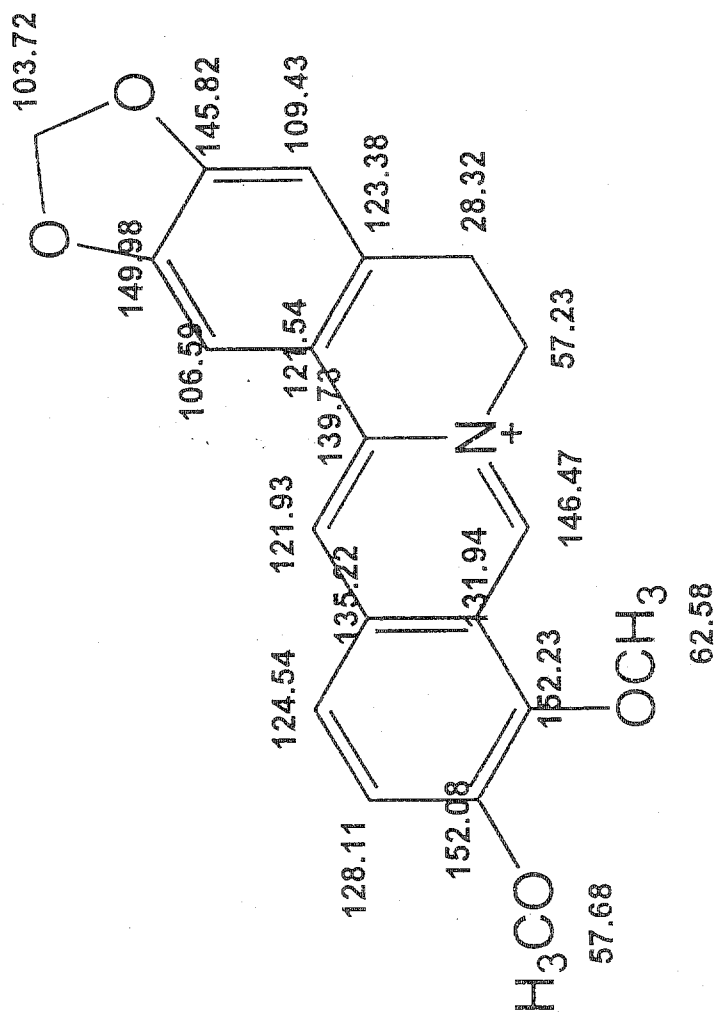


Fig. 10. ¹³C-Chemical Shifts of Berberine

Table 6. Antimicrobial activity of active compound on the microorganisms

Microorganisms ¹	Inhibition zone (mm) ²
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 12210	11
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 933	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	12
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11
<i>Pseudomonas fluorescense</i> ATCC 21541	-
<i>Candida utilis</i> IFO 0589	-
<i>Penicillium expansum</i> IFO 4631	11

1 Final cell concentration for each bacterium was approximately 1×10^7 CFU/ml.

2 Fifty hundred ug of active compound was adsorbed into paper disk (8 mm, diameter) and confirmed the diameter (mm) of clear zone around the colony.

5. 각종식품에의 정제물질의 항균력효과

1) 식중독균에 대한 부분정제물질, 유기산 또는 모노로린의 최소저해농도 in vitro

2차년도에서 항균물질을 분리, 정제 및 구조분석을 완전하게 마치지 못하고 3차년도에서 계속하는동안 정제한 후의 항균물질에 대한 식품응용의 기초자료를 마련하기 위하여 부분 정제된 항균물질을 사용하여 in vitro (TSB 배지)조건에서 식중독균에 대한 항균력검색을 하였으며, 유기산과 monolaurin 과의 혼합반응에 의한 synergistic antimicrobial effect 를 조사하였다. *Staphylococcus aureus*과 *Listeria monocytogenes*에 대한 부분정제물질, 유기산 및 모로노린의 생육저해효과를 Table 7과 8에 각각 나타내었다. 두균에 대한 초산, 젖산 및 구연산의 항균력은 125-250 ug/ml을 각각 나타내었으며 모노로린은 두균 모두 12.5 ug/ml의 MIC를 나타내었다. 부분정제물질은 *Staphylococcus aureus*에 대하여는 500 ug/ml, *Listeria monocytogenes*에 대하여는 16 ug/ml의 MIC를 각각 나타내었다. 한편, Table 9에 젖산과 부분정제물질의 혼합물질의 *Staphylococcus aureus*에 대한 MIC효과를 조사한 결과를 나타내었다. 결과에 의하면 두물질을 혼합하였을때에는 각각의 단독 MIC에 비하여 거의 차이가 없는 것으로 보아 이 두물질은 additive효과를 띄는 것으로 나타났다. 또한 비슷한 결과가 구연산과 부분정제물질과의 혼합에 의해서 나타났다 (Table 10). 따라서 이들 유기산은 부분정제물질과 혼합하였을 때 *Staphylococcus aureus*에 대하여 전혀 상호작용을 하지않는 것으로 나타났다. 그러나 Table 11에 나타난 바와같이 모노로린과 부분 정제물질의 *Staphylococcus aureus*에 대한 MIC효과를 조사하였을 때 각 두물질의 sublethal 농도에서 이 균이 생육을 하지 못하는 것으로 보아 이 두 물질을 혼합하였을 때에는 *Staphylococcus aureus*의 생육억제에 대하여 서로 상승작용을 하는 것으로 나타났다.

한편, Table 12는 젖산과 부분정제물질의 혼합물질의 *Listeria monocytogenes*에 대한 MIC 효과를 조사한 결과를 나타내었다. 두물질을 혼합하였을 때에는 *Listeria monocytogenes*에 대하여 각각의 단독 MIC와 비교하여 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 반면에 Table 13에서는 구연산과 부분정제물질과의 혼합반응을 조사하였는데 이 두물질을 혼합하였을 때에는 오히려 단독의 MIC보다 적은값을 나타내어 두물질은 *Listeria monocytogenes*에 대하여 길항작용을 하는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 나타난 바와같이 식중독세균에 대하여 부분정제물질과 유기산 또는 monolaurin과의 혼합반응시 균종에 따라 약간의 차이는 있지만 일반적으로 부분정제물질은 젖산이나 구연산같은 유기산과는 상호간에 식중독균의 생육 억제작용이 없는것으로 나타났으며 monolaurin과는 유의적으로 상승작용을 나타내는 것으로 나타났다. 따라서 이 결과를 근거로하여 정제된 물질을 식품에 적용할 때 참조하여 응용실험을 수행하였다.

2) *Escherichia coli* O157:H7에 오염된 산성과일류스에서 berberine과 monolaurin의 항균작용

한방재료로 많이 이용되어왔던 황련은 그 주성분이 berberine으로 알려져 있으며 지금까지 보고된 바에 의하면, 황련은 항미생물작용, 아세틸콜린 증강작용, 평활근 이완작용, 해열작용, 항이뇨작용등이 있는 것으로 알려졌다. 양 등은 황련을 감초와 혼합하였을 때 그때 생성되는 침전물이 수종의 그람양성균과 그람음성균에 대한 항균력이 베르베린 단독으로 사용하였을 때 보다도 강하였고 위장관내 흡수율과 경구 투여시의 혈중농도가 높았다고 보고하였다. Berberine은 지금까지 주로 약리작용으로 만이 사용되어 왔으며 식품보존제로서의 이용가능성에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다. 따라서 본 연구는 각종식품에 berberine을 적용하였을 때 항균작용에 관한 효과를 조사하기 위하여 액상식품 (산성주스, 우유)과 고체식품(쇠고기)을 대상으로하여 본 실험을 수행하였다. Fig.11-Fig.13은 당근, 토마토 및 사과주스에 오염된 *E. coli* O157:H7 균에 대한 berberine과 monolaurin의 생육저해효과를 나타내었다. 35°C에서 배양시 berberine과 monolaurin을 단독으로 처리하였을때 대조구에 비하여 차이가 별로 없었으나 혼합처리구에서는 모든주스균에서 약 1 log CFU/ml 이상의 감소가 있었다. 반면에 20°C에서 배양하였을때에는 당근과 토마토주스에 오염된 *E. coli* O157:H7이 berberine monolaurin 단독으로 처리하였을때에는 생육저해효과가 거의없었으나 두물질을 혼합하였을 때에는 당근주스에서는 저장 2일 후 5 log CFU/ml의 감소로 완전히 생육이 억제되었으며 토마토주스에서는 약 5 log CFU/ml의 감소를 나타내었다(Fig.14-15). 반면에, 사과주스에서는 berberine과 monolaurin을 단독처리시 대조구에 비하여 약 0.5 log와 1 log CFU/ml의 감소를 나타냈으며 혼합처리시에는 2일 저장 후 생육이 완전히 억제되었다(Fig.16). 한편, 4°C에서 21일간 저장되었을때에는 berberin과 monolaurin 단독처리시 모든 과실주스에서 대조구에 비하여 1 log CFU/ml이상의 감소를 나타내었으며 혼합처리구의 생육저해효과가 단독처리구에 비하여 약 1 log CFU/ml의 감소를 나타내었다 (Fig.17-19). 이상의 결과 산성과일류스에서 berberine과 monolaurin을 단독으로 처리하였을때에는 높은온도에서는 항균효과가 거의 없었으며 낮은온도에서는 항균력이 증가하는 경향을 나타내었으나 미약하였다. 반면에 혼합하였을때에는 35C를 제외하고는 단독처리구에 비하여 현저한 상승효과를

나타내었으며 토마토주스보다는 당근과 사과주스에서 더 생육저해효과가 증가되었다. 이러한 결과는 음료주스의 종류에 따라 berberine의 항균작용이 달랐으며 이는 음료자체가 갖고있는 성분의 조성차이에 기인한다고 사료된다.

3) *Staphylococcus aureus*에 오염된 우유에서의 berberine과 monolaurin의 항균작용

본 정제물질을 분리할 때 시험균으로 *Staphylococcus aureus*균을 사용하였기 때문에 이 균을 우유에 오염시켜 정제물질의 항균작용 역할을 조사하였다. 위의 in vitro 연구에서는 TSB배지에서 모노로린과 부분정제물질의 *Staphylococcus aureus*에 대한 MIC 결과 각 두물질의 sublethal 농도에서 이 두 물질을 혼합하였을 때에는 *Staphylococcus aureus*의 생육억제에 대하여 서로 상승작용을 나타냈으나 우유에서는 현저히 항균작용이 저하됨을 알수 있었다. berberine과 monolaurin의 항균작용은 whole milk와 skim milk에서 다르게 작용을 하였는데 각 물질의 단독 또는 혼합처리시 35℃에서 배양 하였을 때 whole milk에서는 전혀 항균작용을 나타내지 않았으나 skim milk에서는 300ug/ml 모노로린에서 현저한 항균작용을 나타내었다. 그러나 berberine은 대조구에 비하여 전혀 항균력이 없었고 모노로린과의 혼합처리시도 상승작용을 나타내지 않았다 (Fig. 20과 Fig. 21). 20℃에서 배양 하였을 때에도 35℃에서 배양 하였을 때와 마찬가지로 비슷한 결과가 나타났다(Fig. 22와 Fig. 23). 그러나 4℃에서 배양 하였을 때에는 berberine은 대조구에 비하여 별차이가 없었지만 monolaurin은 매우 현저한 생육억제효과를 나타내었고 혼합하였을 경우도 monolaurin 단독 처리구와 거의 비슷한 항균력을 나타내었다. 따라서 berberine을 우유의 첨가제로 이용할 때는 우유의 종류와 상관없이 거의 항균작용을 나타내지 않았으며 저온에(4℃) 저장시에는 모노로린은 whole milk나 skim milk모두에서 강한 항균력을 나타내었다(Fig. 24와 Fig. 25).

이상의 결과에서 볼 때 우유나 산성음료에서의 berberine의 항균작용은 시험배지에서 나타난 결과와 비교할 때 현저히 저하되었으나 monolaurin의 경우 낮은 온도에서는 강한 항균력을 나타내었고 두물질을 혼합처리 하였을 때에는 현저한 상승효과를 나타내었다.

4) *Listeria monocytogenes*에 오염된 쇠고기에서의 berberin과 monolaurin의 항균작용

Berberine과 monolaurin의 단독 또는 혼합용액속에 침지된 쇠고기를 공기 또는 진공포장한 후 4℃에서 15일간 저장 하였을 때 총균수의 변화의 결과를 Fig. 26에 나타내었다. 대조구에 비하여 berberine과 monolaurin을 단독 또는 혼합처리한 구에서 거의 총균수의 변화가 없는 것으로 보아 이들 물질은 쇠고기의 총균수에 대한 생육억제 효과가 거의 없는 것으로 나타났으며 포장을 하였을 경우 공기포장과 진공포장모두 각 처리구에서 대조구에 비하여 생육억제효과가 거의 없었으며 공기포장과 진공포장의 총균수의 변화에 대한 차이가 거의 없었다 (Fig. 27). 반면에, *Listeria monocytogenes*에 오염된 쇠고기에서 berberin과 monolaurin의 항균작용을 Fig. 28과 Fig. 29에 각각 나타내었는데 공기포장의 경우 단독처리시 berberin과 monolaurin은 비슷한 효과를 나타내었으며 대조구에 비하여 약 0.5-0.8 log CFU/g의 감소를 가져왔으며 혼합처리시에는 약 1.5 log CFU/g의 감소로 현저한 상승효과를 나타내었다. 그러나 진공포장의 경우 저장 7일까지는 berberine과 monolaurin의 혼합처리구에서 단독 처리구에 비하여 더 많은 생육억제효과를 나타냈으나 7일 이후 부터는 혼합처리구보다 monolaurin 단독처리구에서 약

0.55 log CFU/g 정도 감소함을 나타내었다. 이같은 결과는 *Listeria monocytogenes*균에 오염된 쇠고기에서 혼합처리구의 생육억제효과가 단독처리구보다 높았지만 포장의 종류에 따라 항균력의 효과가 영향을 받는 것으로 나타났다.

Table 7. Minimal inhibitory concentration (MIC)^a of organic acid, monolaurin and partially purified compound (PAC) against *Staphylococcus aureus* at 35°C

Antimicrobials (ug/ml)	MIC (ug/ml)						
	8	16	31.2	62.5	125	250	500
Lactic acid	+ ^b	+	+	+	+	-	-
Citric acid	+	+	+	+	+	+	-
Acetic acid	+	+	+	+	-	-	-
Monolaurin	+	- ^c	-	-	-	-	-
PPC	+	+	+	+	+	+	-

^aThe MIC represents the lowest concentration of antimicrobials that showed no growth after 24h incubation.

^b+ : growth

^c- : no growth

Table 8. Minimal inhibitory concentration (MIC)^a of organic acid, monolaurin and partially purified compound (PPC) against *Listeria monocytogenes* at 35°C

Antimicrobials (ug/ml)	MIC (ug/ml)						
	8	16	31.2	62.5	125	250	500
Lactic acid	+ ^b	+	+	+	+	- ^c	-
Citric acid	+	+	+	+	+	+	-
Acetic acid	+	+	+	+	-	-	-
Monolaurin	+	-	-	-	-	-	-
PPC	+	-	-	-	-	-	-

^aThe MIC represents the lowest concentration of antimicrobials that showed no growth after 24h incubation.

^b+ : growth, ^c- : no growth

Table 9. Minimal inhibitory concentration (MIC)^a of combinations of lactic acid and PPC against *Staphylococcus aureus* at 35°C

Lactic acid (ug/ml)	PPC (ug/ml)				
	0	62.5	125	250	500
0	+	+	+	+	-
31.25	+	+ ^b	+	+	-
62.5	+	+	+	+	-
125	+	+	+	-	-
250	-	- ^c	-	-	-

^aThe MIC represents the lowest concentration of antimicrobials that showed no growth after 24h incubation.

^b+ : growth

- : no growth

Table 10. Minimal inhibitory concentration (MIC)^a of combinations of citric acid and PPC against *Staphylococcus aureus* at 35°C

Citric acid (ug/ml)	PPC (ug/ml)				
	0	62.5	125	250	500
0	+	+	+	+	-
31.25	+	+ ^b	+	+	- ^c
62.5	+	+	+	+	-
125	+	+	+	+	-
250	+	+	+	+	-

^aThe MIC represents the lowest concentration of antimicrobials that showed no growth after 24h incubation.

^b+ : growth

- : no growth

Table 11. Minimal inhibitory concentration (MIC)^a of combinations of monolaurin and PPC against *Staphylococcus aureus* at 35°C

Monolaurin (ug/ml)	PPC (ug/ml)				
	0	62.5	125	250	500
0	+	+	+	+	-
8	+	+	± ^d	-	- ^c
16	-	-	-	-	-

^aThe MIC represents the lowest concentration of antimicrobials that showed no growth after 24h incubation.

^b+ : growth

- : no growth

^d±: initiation of growth after 18 h

Table 12. Minimal inhibitory concentration (MIC)^a of combinations of lactic acid and PPC against *Listeria monocytogenes* at 35°C

PPC (ug/ml)	Lactic acid (ug/ml)				
	0	31.25	62.5	125	250
0	+	+	+	+	- ^c
8	+	+ ^b	+	+	-
16	-	-	-	-	-

^aThe MIC represents the lowest concentration of antimicrobials that showed no growth after 24h incubation.

^b+ : growth

- : no growth

Table 13. Minimal inhibitory concentration (MIC)^a of combinations of citric acid and PPC against *Listeria monocytogenes* at 35°C

PPC (ug/ml)	Citric acid (ug/ml)				
	0	62.5	125	250	500
0	+	+	+	+	- ^c
8	+	+ ^b	+	+	± ^d
16	-	±	±	±	-

^aThe MIC represents the lowest concentration of antimicrobials that showed no growth after 24h incubation.

^b+ : growth

- : no growth

^d±: initiation of growth after 18 h

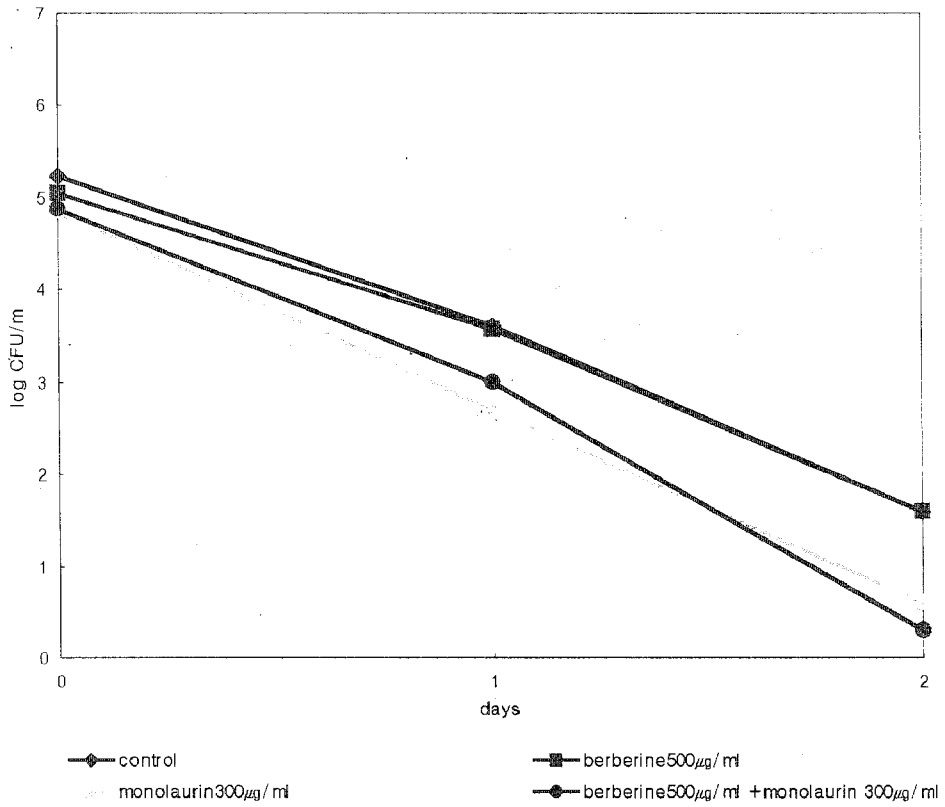


Fig.11. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in carrot juice spiked with *Escherichia coli* 0157:H7 at 35°C

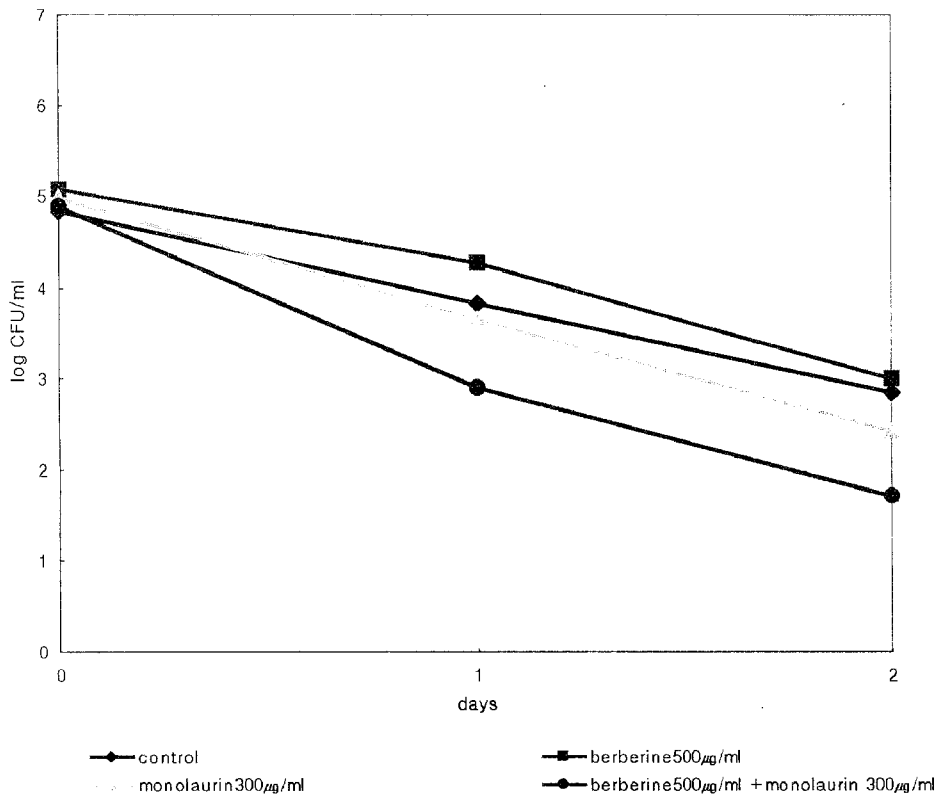


Fig.12. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in tomato juice spiked with *Escherichia coli* 0157:H7 at 35°C

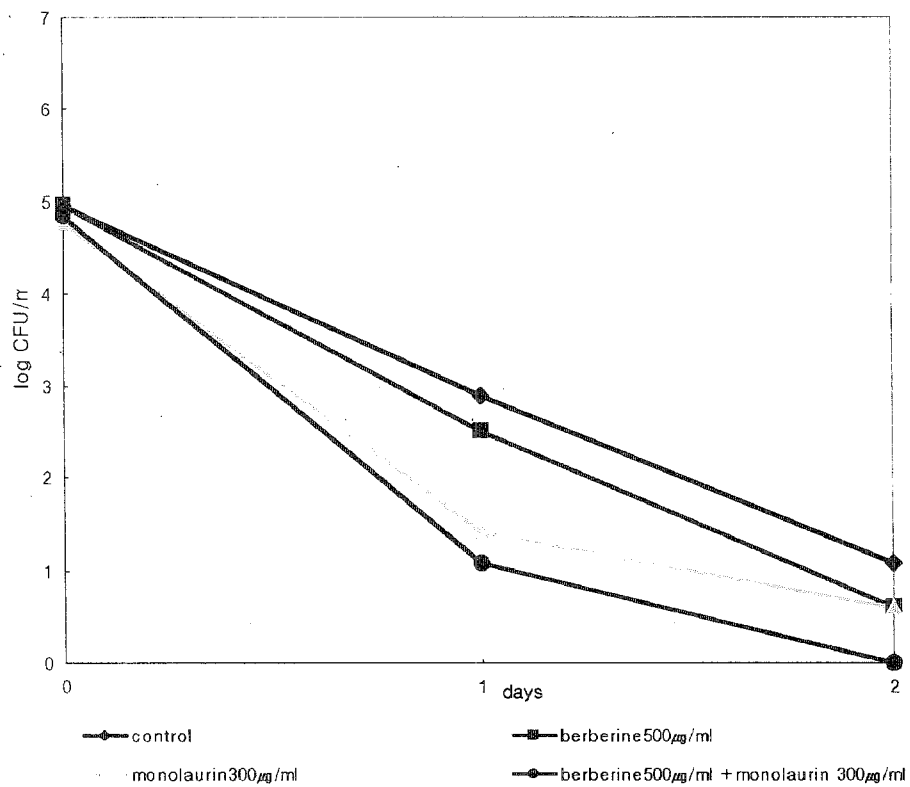


Fig.13. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in apple juice spiked with *Escherichia coli* 0157:H7 at 35°C

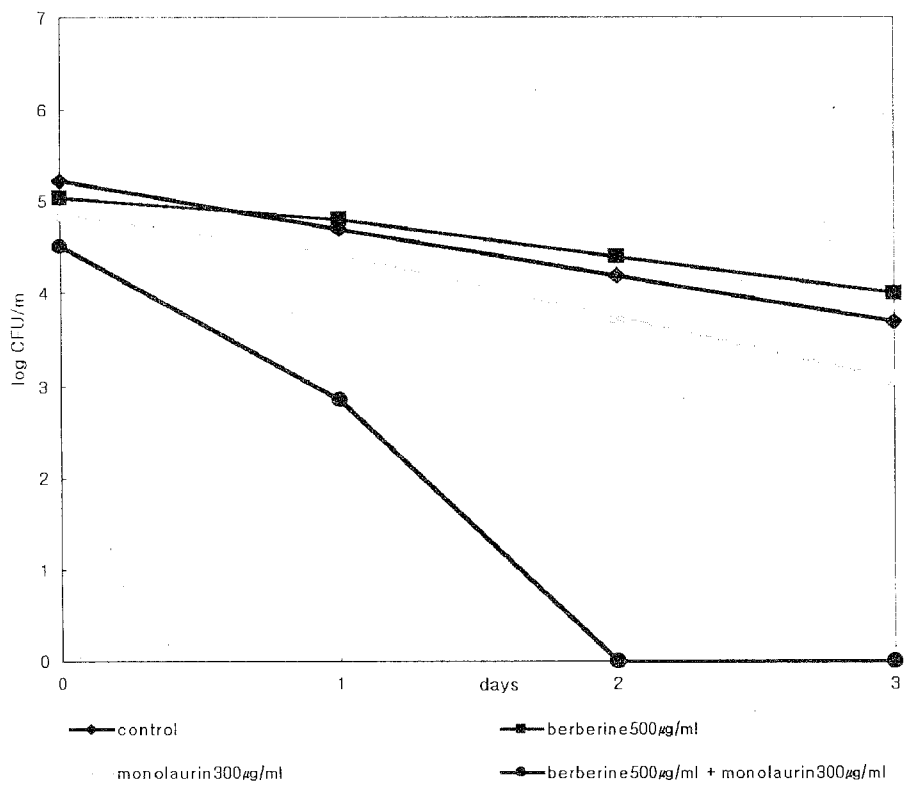


Fig.14. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in carrot juice spiked with *Escherichia coli* 0157:H7 at 20°C

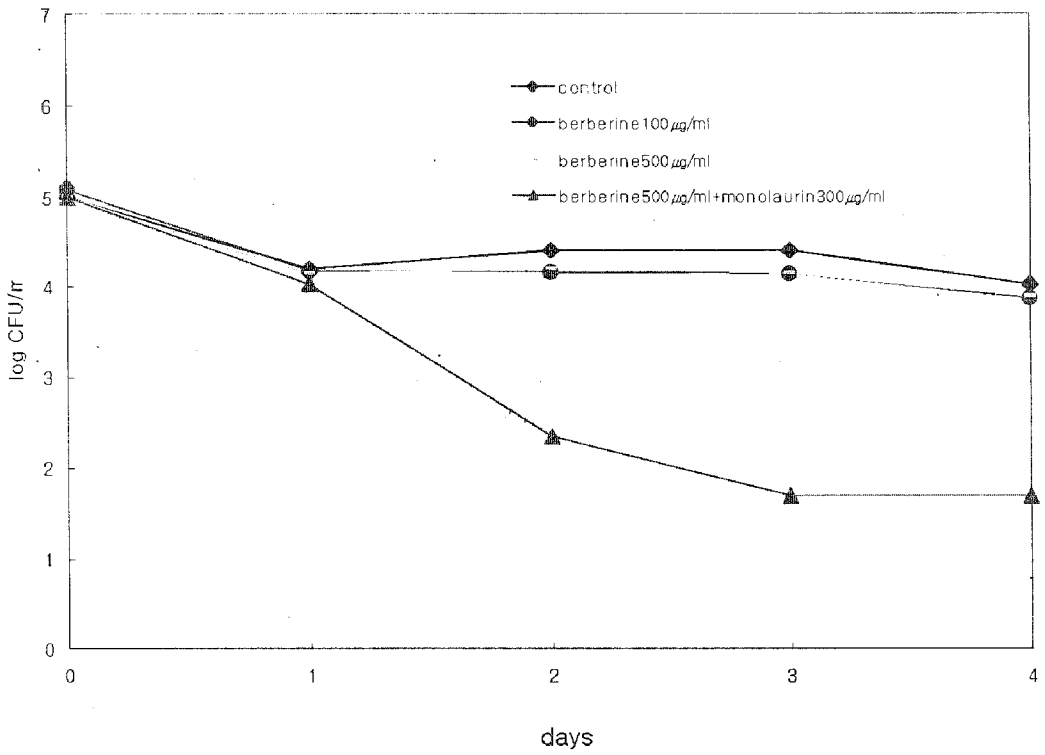


Fig.15. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in tomato juice spiked with *Escherichia coli* 0157:H7 at 20°C

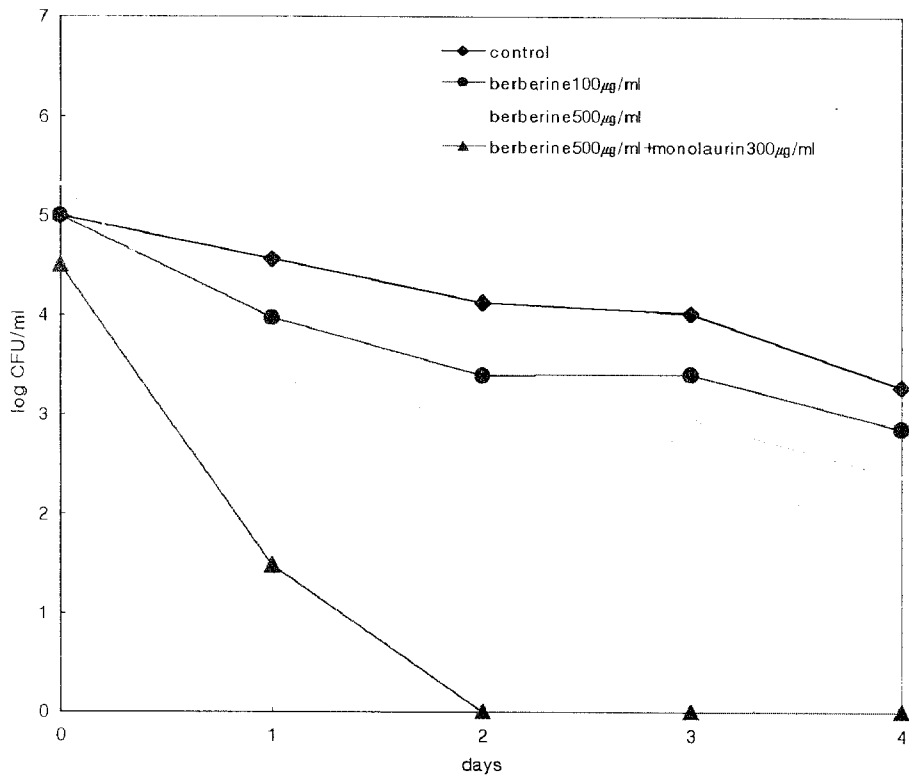


Fig.16. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in apple juice spiked with *Escherichia coli* 0157:H7 at 20°C

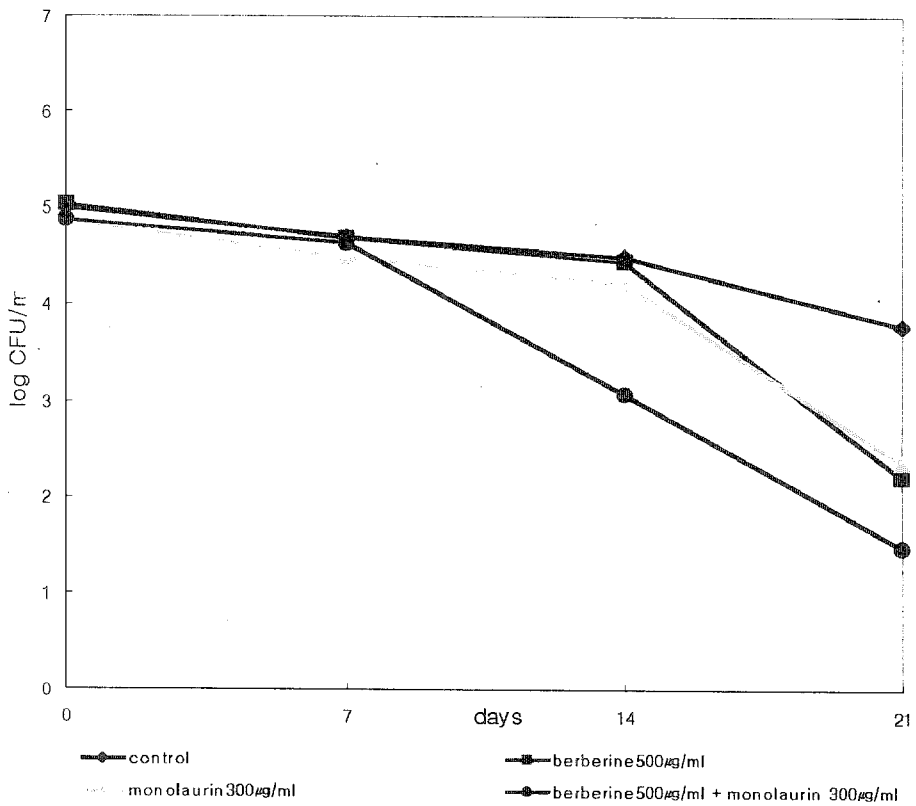


Fig.17. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in carrot juice spiked with *Escherichia coli* 0157:H7 at 4°C

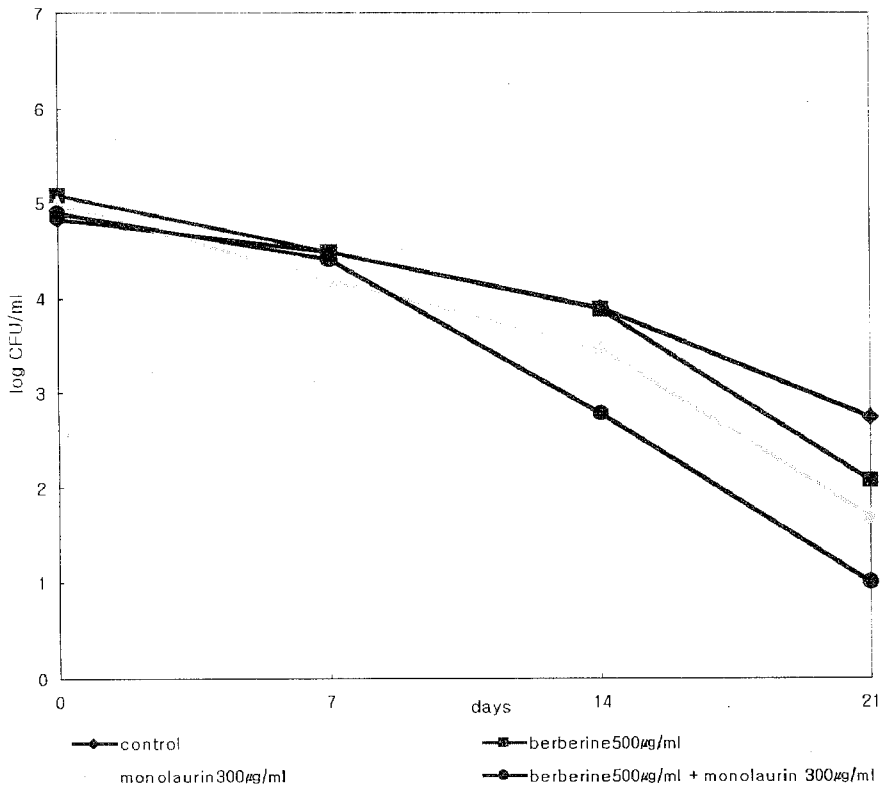


Fig.18. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in tomato juice spiked with *Escherichia coli* 0157:H7 at 4°C

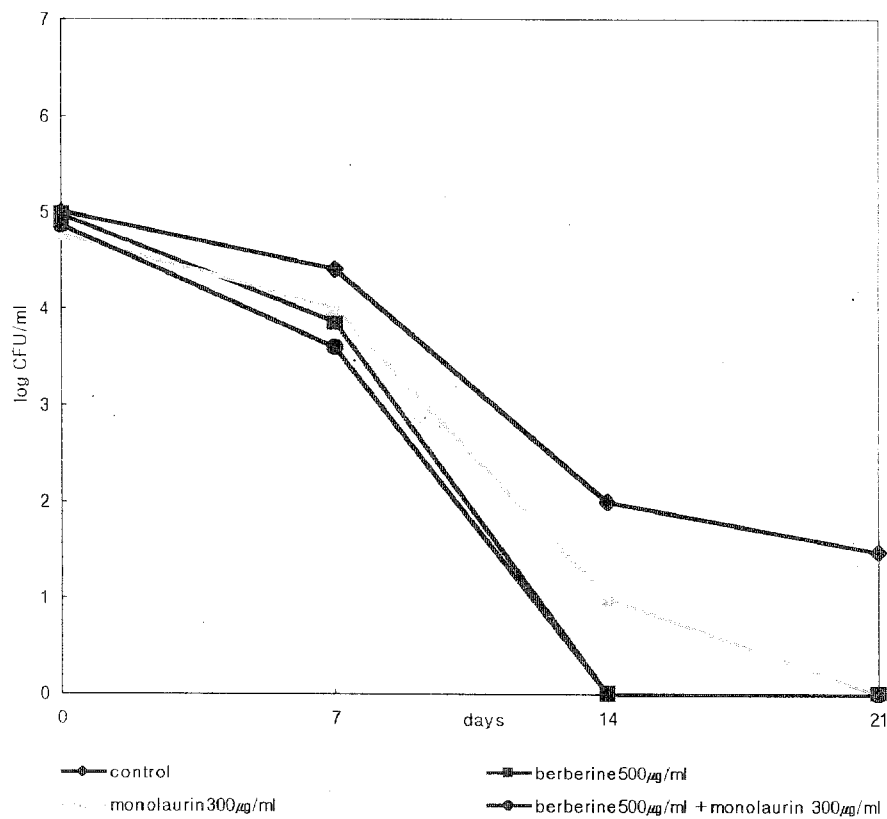


Fig.19. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in apple juice sipked with *Escherichia coli* 0157:H7 at 4°C

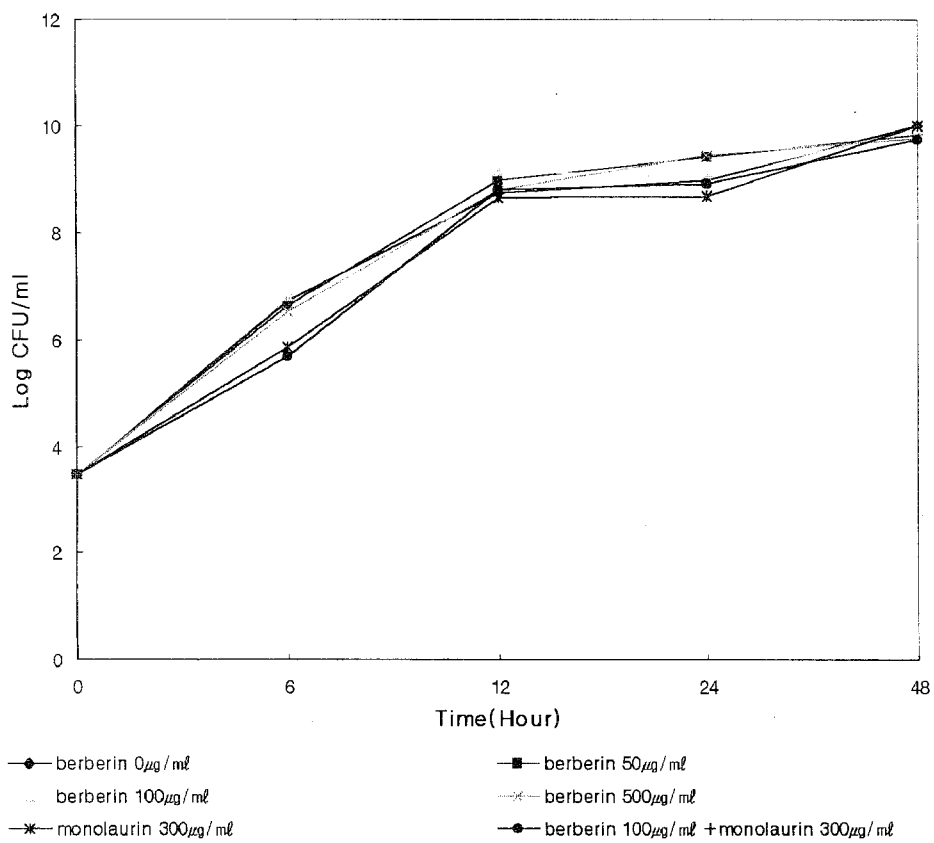


Fig.20. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in whole milk spiked with *Staphylococcus aureus* at 35°C

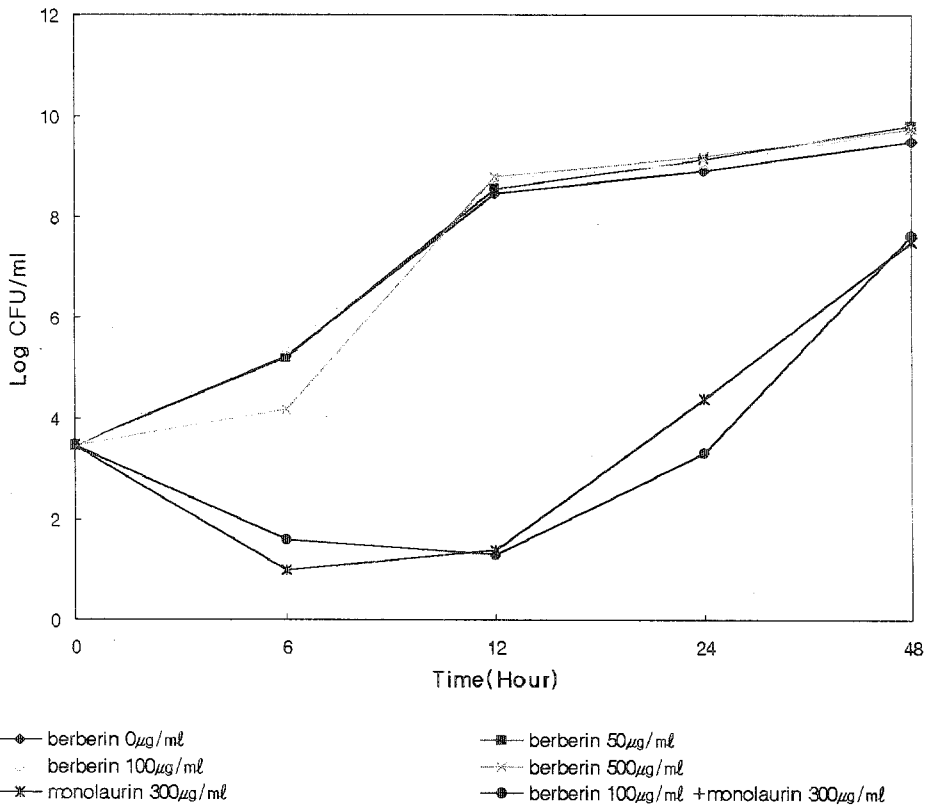


Fig.21. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in Skim milk spiked with *Staphylococcus aureus* at 35°C

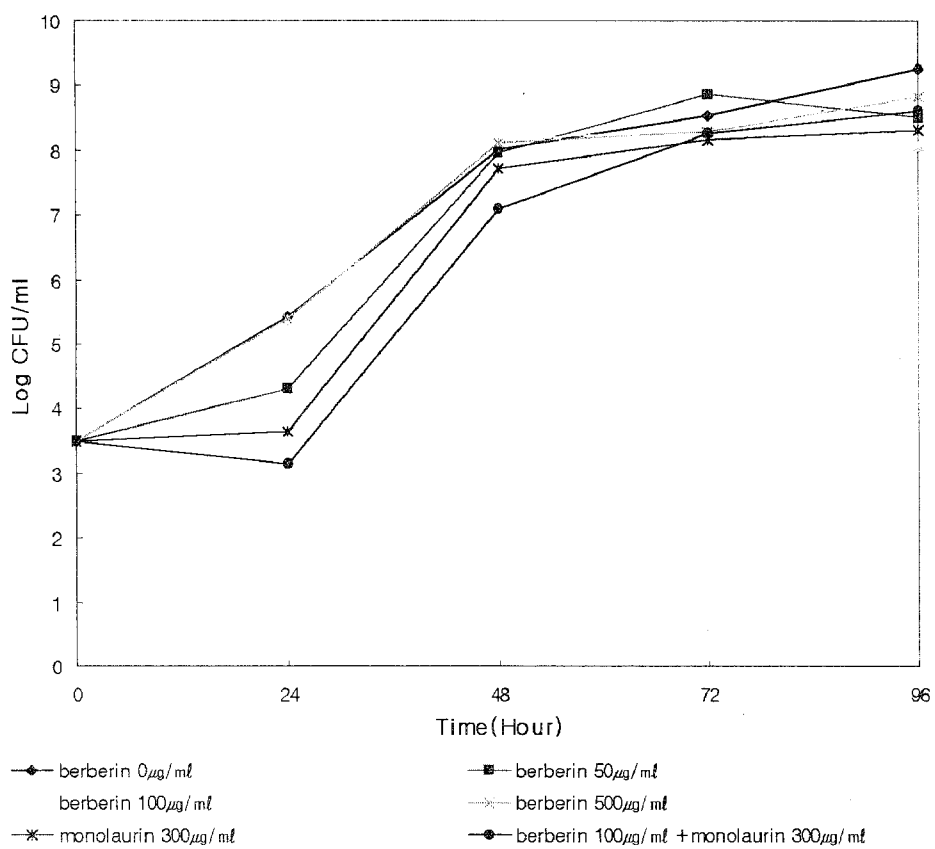
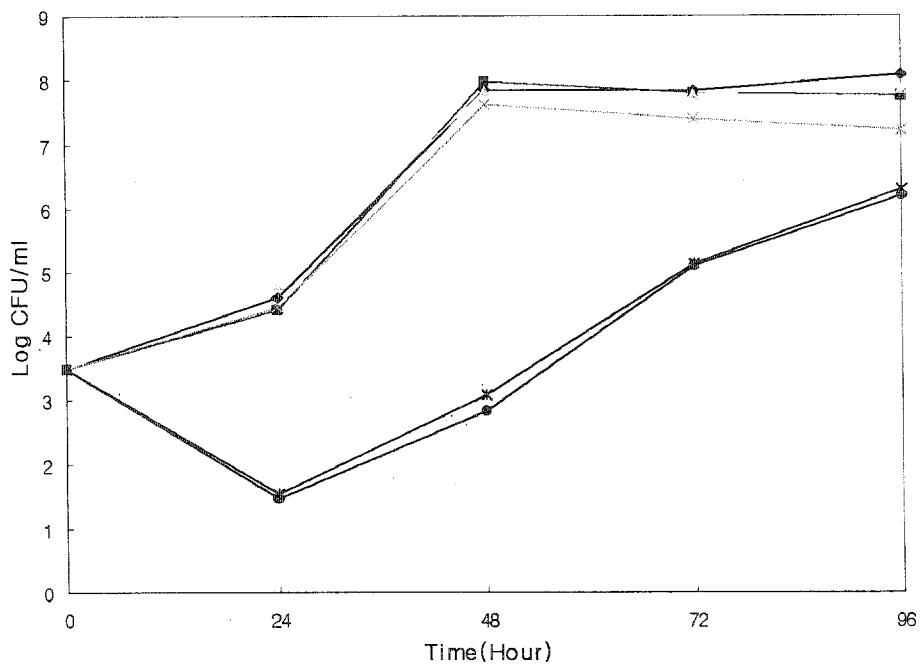


Fig. 22. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in whole milk spiked with *Staphylococcus aureus* at 20°C



● berberin 0 µg/ml
 ■ berberin 50 µg/ml
 ◆ berberin 100 µg/ml
 * berberin 500 µg/ml
 * monolaurin 300 µg/ml
 ● berberin 100 µg/ml + monolaurin 300 µg/ml

Fig. 23. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in Skim milk spiked with *Staphylococcus aureus* at 20°C

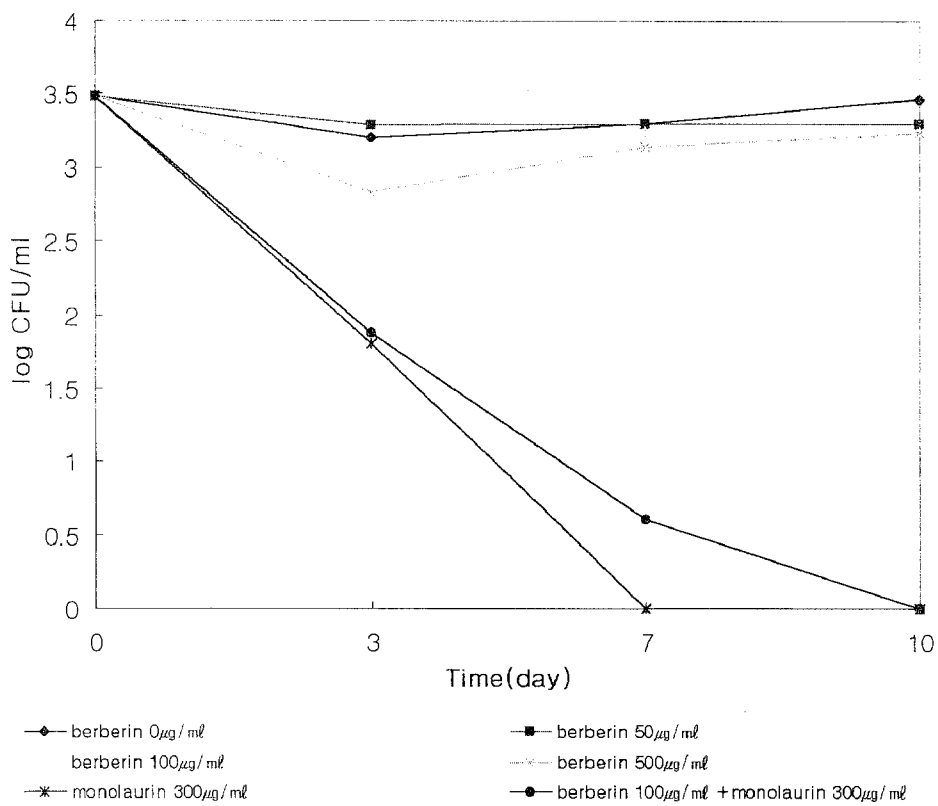


Fig.24. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in whole milk spiked with *Staphylococcus aureus* at 4°C

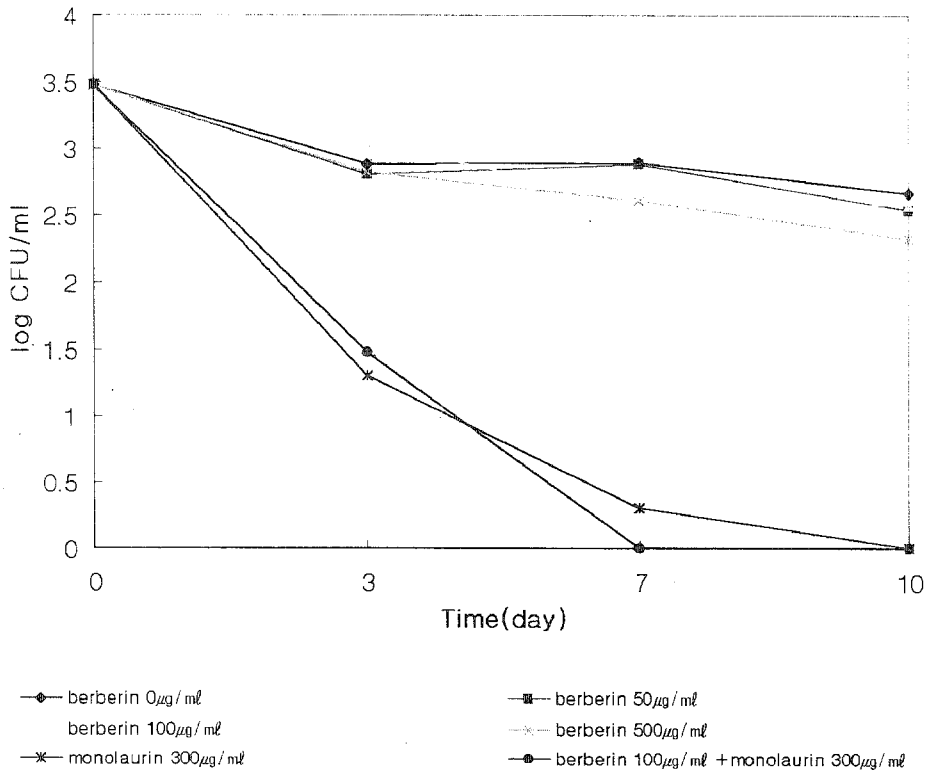


Fig. 25. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in Skim milk spiked with *Staphylococcus aureus* at 4°C

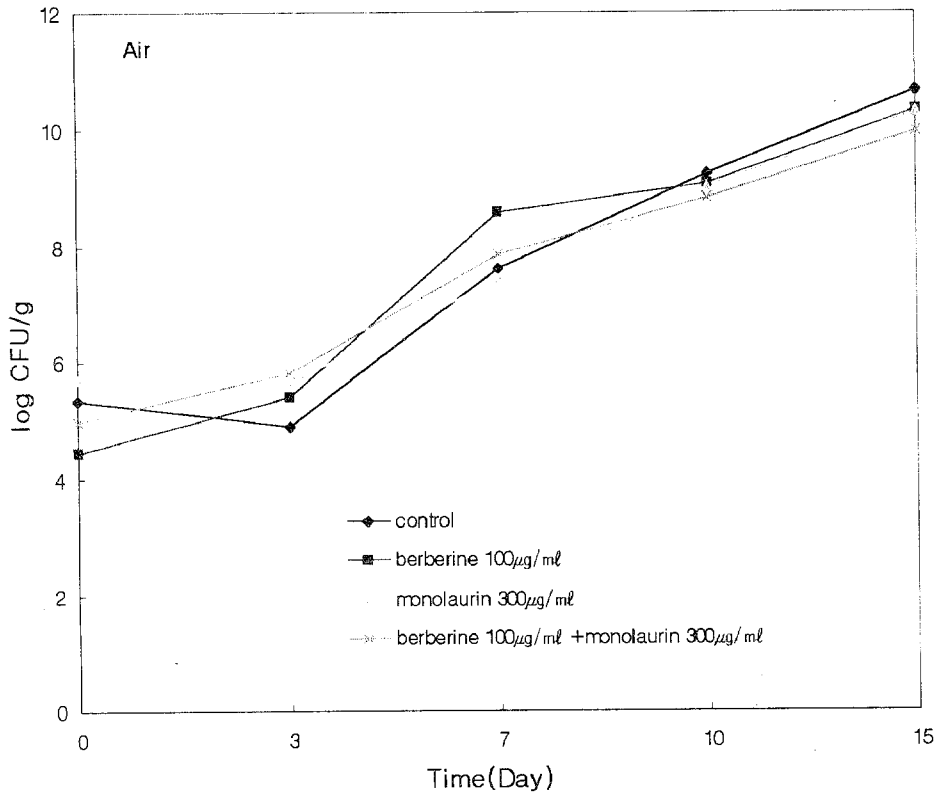


Fig. 26. Inhibitory effect of berberine combined with molaurin on survival and growth of total microorganisms in air packaged beef stored at 4°C for 15 days

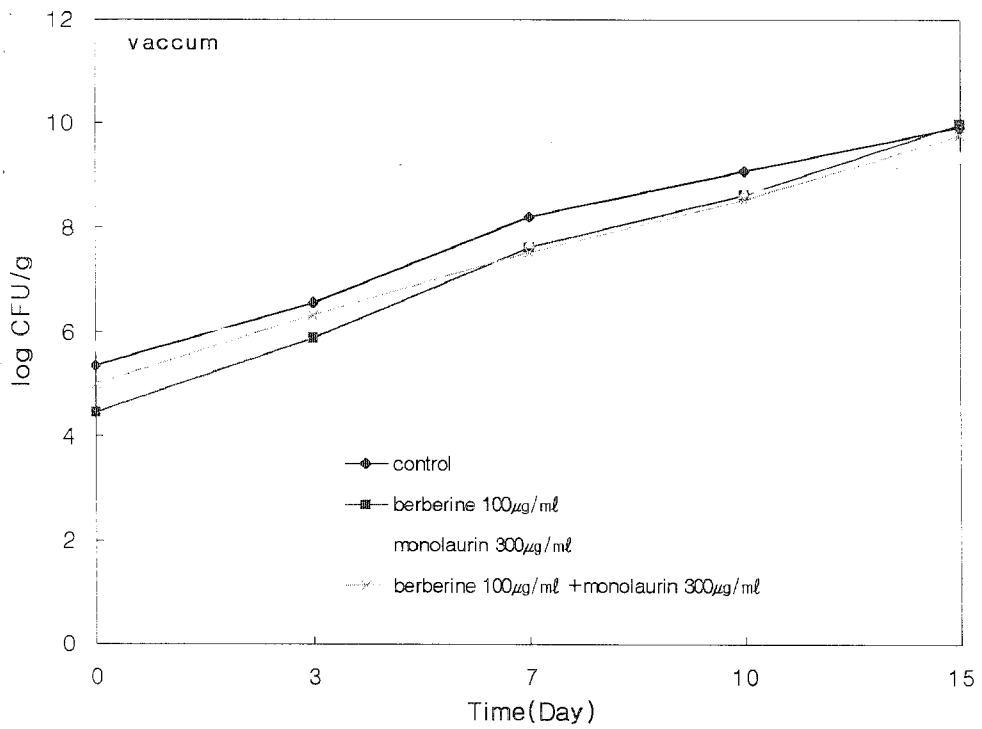


Fig.27. Inhibitory effect of berberine combined with molaurin on survival and growth of total microorganisms in vaccum packaged beef stored at 4°C for 15 days

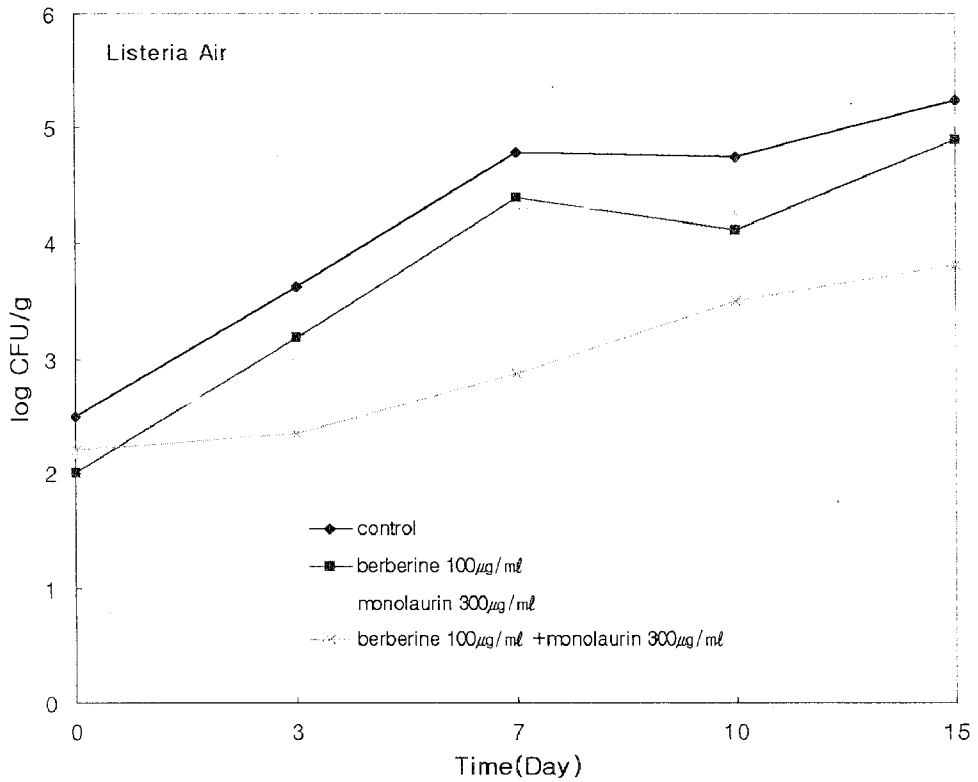


Fig.28. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in air packaged beef spiked with *Listeria monocytogenes* stored at 4°C for 15 days.

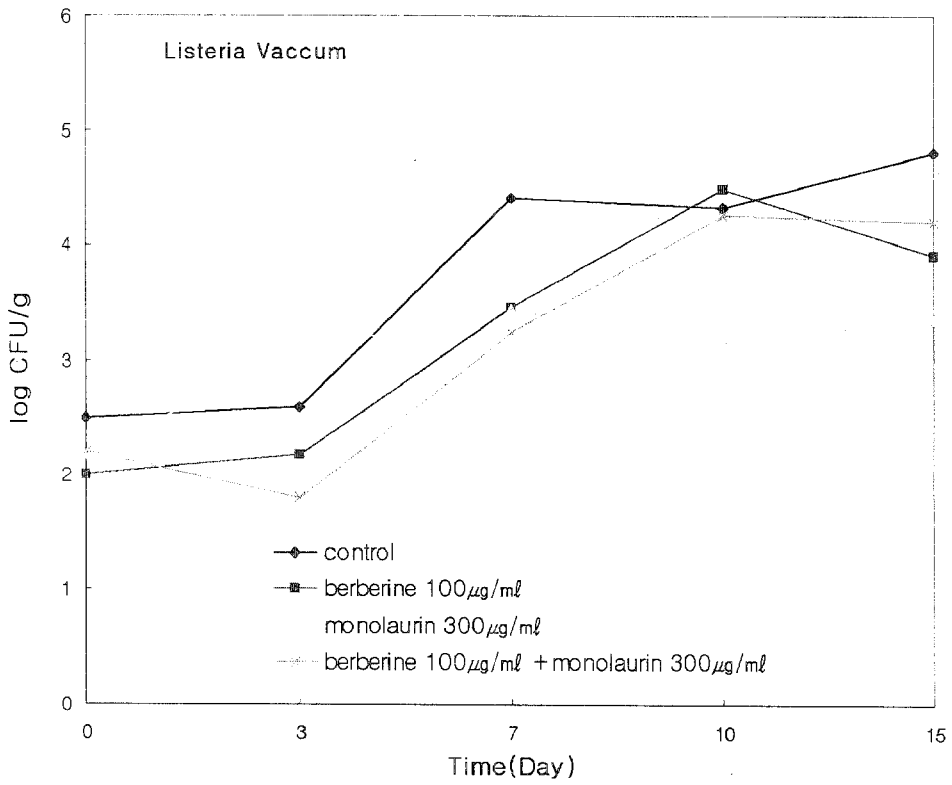


Fig.29. Growth inhibition of berberine combined with monolaurin in vaccum packaged beef spiked with *Listeria monocytogenes* stored at 4°C for 15 days.

제 4 절 결 론

최근 합성 첨가제의 사용에 의한 안전성문제 및 소비자들의 거부가 큰 문제로 대두됨에 따라 독성과 안전성의 문제가 전혀 없는 새로운 천연첨가제의 개발이 매우 필요하게 되었다. 따라서 본 연구는 이러한 측면에서 새로운 천연보존제의 개발을 위한 기초 자료를 마련하고자 여러종류의 약용식물을 대상으로 하여 강력한 항균력을 나타내는 물질을 탐색 하고 그중 가장 강한 항균력을 나타내는 성분을 분리, 정제 및 구조를 규명하여 이 물질을 식품에 적용하여 천연식품첨가제로서의 가능성을 검색하였다. 그 결과, 여러종류의 약용식물중에서 황련이 가장 강력한 항균력을 나타내었으며 황련의 에탄올추출물은 열처리(121°C for 15 min)와 pH에 매우 안정였으며 알칼리성조건하에서 더욱 강한 항균활성을 나타내었다. 이러한 항균력을 나타내는 활성성분을 각종 column chromatography와 TLC방법을 사용하여 분리, 정제한 후 IR, Mass, NMR로 분석한 결과 항균성을 나타내는 물질은 berberin-Cl의 물질로서 판명 되었다. 이 물질의 특성은 mp가 145°C에서 decompose하였으며 물에 매우 잘 녹는 수용성 물질이며 메탄올이나 에탄올에 녹는 극성이 큰 결정의 순수물질로서 99%이상의 순도를 지닌 노란색 침상형의 모양을 나타내었다. 또한, 기존에 황련에서 밝혀진 berberin-Cl은 물에 잘 용해되지 않고 주로 유기용매에 녹여 사용되어 왔으나 이 물질은 기존의 berberin-Cl에 비하여 물에 훨씬 잘 용해되었다. 한편, 정제물질(berberin)을 단독 또는 유기산이나 모노로린과의 혼합반응을 통하여 식품에 응용시 천연 보존제로서의 가능성을 검색한 결과 in vitro에서 berberin은 유기산과는 서로 상호반응 작용이 거의 없는 것으로 나타 났으며 모노로린과는 상승작용을 나타내는 것으로 나타났 다. 이러한 결과를 바탕으로 하여 산성과일류스와 우유에 첨가제로서 사용되었을 때 식중 독세균에 대한 항균작용을 검색한 결과 과일음료류스에서는 *E. coli* 0157:H7에 대한 berberin 또는 monolaurin의 생육저해효과가 단독으로 처리하였을때에는 높은온도에서는 항균효과가 거의 없었으며 낮은온도에서는 항균력이 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 반면에, 두물질을 혼합하였을때에는 35°C를 제외하고는 단독처리구에 비하여 현저한 상승효과를 나타내었으며 토마토류스보다는 당근과 사과류스에서 더 생육저해효과가 증가되었다. 또한, 우유에서는 *Staphylococcus aureus*균에 대한 berberine의 생육저해효과는 거의 미약 하였으나 monolaurin의 경우에는 낮은온도(4°C)에서 whole milk와 skim milk모두 현저한 항균효과를 나타내었고 혼합물질도 비슷한효과를 나타내었다. 한편, 쇠고기에 오염된 *Listeria monocytogenes*균에 대한 생육저해효과를 조사한 결과 berberin 또는 monolaurin을 단독처리 하였을때에는 생육저해효과가 미약하였으나 두물질을 혼합처리 하였을때에는 현저한 생육억제 효과를 나타내었으며 진공포장의 경우 monolaurin의 항균력이 공기포장에 비하여 증가함을 나타내었다.

제 5 절 참고문헌

1. Beuchat, L.R., and Golden, D.A.: Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol, 43, 134(1989)
2. Board, R.G.: The microbiology of Hen's egg. In Advances in Applied Microbiology, Vol.II, Perlman, D. (ed.), AP, New York (1969)
3. Zaika, L.L.: Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. J. Food Safety 9, 97(1988)
4. Davidson, P.M. and Post, L.S.: Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In "Antimicrobials in foods" ed., Branen, A.L. and Davidson, P.M., p371, Marcel Dekker, Inc., New York (1983)
5. 박수용, 김찬조: 생약재에 의한 식품보존에 관한 연구 (제 1보). 몇 가지 생약재의 간장 방부효과. 한국농화학회지, 22, 91(1979)
6. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이응호 : 수산 미이용자원 중에 존재하는 항균성 물질의 검색. 한국식품과학회, 26, 261(1994)
7. 김선재, 박근형: 식물성 김치추출물의 항미생물활성. 한국식품과학회지, 27, 216(1995)
8. Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol. rev. 13: 60-98.
9. Leyer, G.J., Wang, L.L. and Jhonson, E.A. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3752-3755.
10. Oh, D.H. and Marshall, D.L.: Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* by glycerol monolaurate with organic acids. J. Food Sci., 59, 1258(1994)
11. 김홍식, 조광현: 편축 추출물의 항진균 작용에 관한연구. 한국균학회지, 8, 1(1980)
12. Zhao, T., Doyle, M.P. and Besser, R.E. 1993. Fate of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. Appl. and Environ. Microbiol. 59: 2526-2530.