



김치 분리 항진균 유산균의 치즈 스타터로서 이용 가능성

오현희¹ · 허창기¹ · 최하늘¹ · 양희선¹ · 배인휴² · 이재성² · 정용섭³ · 이남근⁴ · 정후길^{1*}

¹(재)임실치즈과학연구소, ²순천대학교 동물자원학과, ³전북대학교 식품공학과,
⁴전북대학교 바이오식품소재개발 및 산업화연구센터

Potential of Antifungal Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi as Cheese Starters

Hyun Hee Oh¹, Chang Ki Huh¹, Ha Nuel Choi¹, Hee Sun Yang¹, In Hyu Bae², Jai Sung Lee²,
Yong Seob Jeong³, Nam Keun Lee⁴ and Hoo Kil Jung^{1*}

¹Imsil Research Institute of Cheese Science, Imsil 566-881, Korea

²Dept. of Animal Science & Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

³Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea

⁴Research Center for Industrial Development of Biofood Materials, Chonbuk National University,
Jeonbuk 561-756, Korea

Abstract

This study was performed to identify the cheese starter potential of antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Eight fungi were isolated from cheese or the cheese ripening room, and identified as *Penicillium* and *Cladosporium* by ITS-5.8S rDNA analysis. Twenty-two lactic acid bacteria species with antifungal activity were isolated from Kimchi, and identified as *Lactobacillus* and *Pediococcus* by 16S rRNA sequence analysis. Six lactic acid bacteria species were selected (*L. sakei* subsp. ALJ011, *L. sakei* subsp. ALI033, *L. sakei* subsp. ALGy039, *P. pentosaceus* ALJ015, *P. pentosaceus* ALJ024, and *P. pentosaceus* ALJ026) based on higher antifungal activity from the initial 22 species. Out of the six identified species, *L. sakei* subsp. ALI033 had the highest antifungal activity. For growth of the six lactic acid bacteria, optimal temperature and pH were 30~37°C and 7.0, respectively. Proteolytic activities of the six lactic acid bacteria were almost as strong as the commercial strain *Str. thermophilus* Body-1. Coagulative activities of *L. sakei* subsp. ALI033, *P. pentosaceus* ALJ015, and *P. pentosaceus* ALJ024 were higher than those of *L. sakei* subsp. ALJ011, *L. sakei* subsp. ALGy039, and *P. pentosaceus* ALJ026. The acid resistance of *L. sakei* subsp. was higher than that of *P. pentosaceus*. The major organic acid component of the lactic acid bacteria culture medium was lactic acid.

Keywords: Cheese fungi, antifungal activity, lactic acid bacteria, cheese starter, culture characteristics

서론

치즈를 포함한 유제품은 곰팡이의 생육에 영향을 받아

쉽게 변패된다. 통상적으로 대장균 등의 유해세균은 숙성 과정에서 치즈의 산도와 유산균의 생육에 의해 사멸되지만, 외피에 생육하는 곰팡이는 시간이 갈수록 증가한다(Jung *et al.*, 2012). FAO에서는 전 세계 농산물의 25%가 곰팡이 독소로 오염되었음을 추정하였으며, 세계 식품 생산의 5~10%가 곰팡이의 오염으로 상당한 경제적 손실을 초래하고 있

* Corresponding author: Hoo Kil Jung, Imsil Research Institute of Cheese Science, Imsil 566-881, Korea. Tel: +82-63-644-2170, Fax: +82-63-644-2185, E-mail: hkjung@irics.re.kr

음을 보고하였다(Yang and Chang, 2008). 농촌진흥청의 정의에 따르면 진균의 생장, 생식 등을 억제하는 작용이 있는 물질을 총칭하여 항진균제라 한다. 현재 알려진 항진균제로는 보존제, 에탄올 등의 화학물질과 자몽종자 추출물, 피톤치드, 식물성 정유, 마늘 등의 천연물을 비롯하여 나타마이신 등의 항생제 및 프로바이오틱 유산균 등의 미생물제제, 오존처리 등이 있다(Jung *et al.*, 2012). 기존에는 주로 화학적 보존제 및 방부제가 많이 사용되었으나, 어린이의 경우 하루 허용량을 쉽게 초과할 수 있고, 질병 유발 가능성 및 지속적인 체내 축적으로 인한 문제들이 제기되고 있어(Choi *et al.*, 2013), 안전성과 경제성이 우수한 천연 항진균제에 대한 연구의 필요성이 증대되고 있다.

최근 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로 등록되어 그 안전성을 인정받고 있는(Kim and Ko, 2012) 유산균은 발효식품의 주된 미생물로 특히 오랫동안 발효유제품의 스타터로 이용되어 왔다(Ko *et al.*, 2013). 유산균은 유산이나 초산과 같은 유기산이나 알코올, 균체 외 다당류 및 여러 효소들을 생산함으로써 발효되는 동안 부패 미생물의 증식을 억제하고, 발효식품의 조직감 향상과 바람직한 풍미를 부여한다(Lim, 2012). 최근 정장작용을 비롯한 장내세균의 안정화, 위장관내 병원균의 증식 억제, 혈중 콜레스테롤의 저하, 면역 조절, 항암 효과 등 다양한 기능성이 알려지면서 산업적 이용분야가 식품에서 의약, 화장품 및 사료분야까지 확대되고 있다(Kim *et al.*, 1999).

구강을 통해 섭취되는 유산균이 살아있는 상태로 장내에 도달하여 다양한 기능성을 나타내기 위해서는 위와 십이지장을 생존하여 통과해야 하는데, 위의 pH는 1.4~2.0 정도로서 거의 대부분의 미생물을 사멸시키지만, 함께 섭취하는 음식에 따라 위의 pH가 2~8 정도의 범위로 변하여 미생물의 사멸을 감소시키게 된다. 위를 통과한 유산균은 췌장에서 분비되는 담즙산에 노출되어 최종적으로는 위산 및 담즙에 대한 내성이 있는 유산균이 장에 도달하여야 그 기능성을 발휘한다(Sim *et al.*, 1995).

현재 국내에서 유제품에 사용하고 있는 유산균은 대부분이 외국에서 개발된 락토바실러스 등을 사용하며, 이것은 동물의 장내, 원유 또는 외국인의 장내로부터 분리된 균주이다. 식물성 식품을 주로 섭취하는 한국인에게 잘 적용될 수 있도록 김치와 같은 식물성 식품으로부터 분리한 유산균의 개발이 필요한 실정이다(Jang and Kang, 2004).

우리나라 전통발효식품인 김치는 발효과정 중에 유산균이 많이 생성되고, 유산균이 생산하는 유기산에 의한 pH 저하, H₂O₂, CO₂, diacetyl, bacteriocin 등 항균 활성물질이 생성되어 유해미생물을 사멸시키거나 생육을 억제하는 작용을 하여 식품의 저장성과 안전성에 기여한다(Son *et al.*, 2013).

최근에는 김치의 유용성에 관한 연구가 다수 발표되었으며, 면역 활성 증진 및 항암 효과 등의 생리활성 기능이 밝혀지면서 영양공급 외에도 건강 유지에 꼭 필요한 식품으로 인식되고, 신선한 야채를 열처리 하지 않고 담그기 때문에 야채의 모든 영양소가 유지될 뿐 아니라, 유산균의 함유량이 많아 좋은 유산균 공급원으로 보고되고 있다(Kim *et al.*, 2011). 김치의 발효과정에서 나타나는 유산균은 초기에 *Leuconostoc mesenteroides*가 우세균종으로 김치 내용물을 산성화하여 혐기적 상태로 유지하며 호기성 세균의 성장을 억제하나, 그 이후에는 *Lactobacillus plantarum* 균종이 나타나는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2012). 숙성과정에서 증식하는 김치 유산균에 의해 생성되는 다양한 대사산물들은 기능성 음료, 식품 및 유산균제제로 인체의 영양 강화 또는 생리활성 기능 촉진 및 건강기능성 식품의 형태로 활용되고 있으며, 또한 유산균이 지니고 있는 항균 및 항진균 활성 때문에 천연 식품보존제로서의 활용방안 모색을 위한 연구가 이루어지고 있다.

특히 김치로부터 분리한 균주가 기존의 식용 유산균제보다 유해미생물에 대한 억제활성과 내산성, 내담즙산성 능력이 뛰어난 뿐 아니라, 암 세포의 증식을 효과적으로 억제하고, 면역활성이 우수하여 장내 유해미생물들의 생장억제 및 면역활성 증강 목적으로 식품을 비롯한 건강보조식품에까지 활용할 수 있다(Park *et al.*, 2004).

따라서 본 연구에서는 한국 전통식품인 김치에서 유산균을 분리하여 항진균 효과가 뛰어난 균을 선발하고, 그 배양 특성을 조사하여 숙성 중 치즈 및 유제품의 곰팡이의 생육이 저해될 수 있는 스타터 개발에 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 곰팡이균 수집

본 실험에 사용된 곰팡이는 임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성 중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 곰팡이를 채취하여 PDA(potato dextrose agar, Difco, USA) 평판배지 및 YM(yeast medium, Difco, USA) 액체배지에 각각 접종하여 25°C에서 48시간 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

2. 곰팡이균의 순수 분리 및 동정

수집한 곰팡이는 PDA(potato dextrose agar, Difco, USA) 및 YM(yeast medium, Difco, USA) 액체배지를 이용하여 배양, 분리를 수차례 반복하여 8종의 곰팡이균을 순수분리하였고, (주)마크로젠에 ITS-5.8S rDNA 분석을 의뢰하여 동

정하였다.

3. 김치에서의 유산균 분리 및 확보

전라북도 전주시와 임실군, 전라남도 광양시, 경기도 등지에서 제조원이 다른 배추김치를 수집하여, 각각의 김치 내용물 전체를 마쇄한 후에 멸균 거즈로 여과하였다. 김치 여과액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후 2% 탄산칼슘(CaCO₃)이 첨가된 MRS(Lactobacilli MRS agar, Difco, USA) 평판배지와 pH indicator인 0.006% BCP(Bromocresol Purple, Sigma, USA)를 포함한 MRS 평판배지를 이용하여 유산균을 분리하였다. 그 중 BCP의 보라색 배지가 노란색으로 변하는 균집을 각각 취하여 3차적으로 새로운 BCP 배지에 도말하였으며, 순수한 유산균이 얻어질 때까지 3회 반복하였다. 그 결과 44종의 유산균을 분리하였으며, 분리된 유산균 44종 중 전주지역 김치에서 분리한 유산균 29종을 LJ001에서 029로, 임실지역 김치에서 분리한 유산균 6종을 LI030에서 LI035, 경기도지역 김치에서 분리한 유산균 4종을 LGy036에서 039, 광양지역 김치에서 분리한 유산균 4종을 LGw040에서 044로 명명하여 실험에 사용하였다(Table 1). 대조균은 Baik(2011)의 보고에 따라 우수한 항진균 활성을 나타내는 표준 유산균 *Leuconostoc citreum* (KCTC3524) 유산균을 사용하였다.

4. 항진균 활성 측정

다양한 지역의 김치로부터 분리한 유산균 44종에 대한 항진균 활성을 측정하기 위해 임의로 선정된 분리 곰팡이균 1종에 대하여 표준 유산균 및 분리 유산균의 항진균 활성을 확인하였다. MRS(Lactobacilli MRS agar, Difco, USA) 평판배지를 이용하여 유산균을 배양하고, 그 위에 PDA(potato dextrose agar, Difco, USA) 배지를 이용하여 곰팡이를 배양한 후 유산균에 의한 곰팡이 생육저지환의 크기를 확인하는 중층배양법으로 항진균 활성을 측정하여 6종을 선발하였다.

Table 1. Lactic acid bacteria isolated from Kimchi

Lactic acid bacteria	Collection site
LJ001~029 ¹⁾	Jeonju
LI030~035 ²⁾	Imsil
LGy036~039 ³⁾	Gyeonggi
LGw040~044 ⁴⁾	Gwangyang

¹⁾ LJ: Lactic acid bacteria from Kimchi in Jeonju

²⁾ LI: Lactic acid bacteria from Kimchi in Imsil

³⁾ LGy: Lactic acid bacteria from Kimchi in Gyeonggi

⁴⁾ LGw: Lactic acid bacteria from Kimchi in Gwangyang

5. 선발 유산균의 특성 규명

1) 배양시간, 초기 pH, 온도에 따른 균체 생육도 측정

항진균 활성을 보인 최종 선발된 6종 유산균의 균체 생육성 측정은 배양 시간과 초기 pH, 그리고 배양온도의 변화로 측정하여 알아보았다. 먼저 MRS(Lactobacilli MRS broth, Difco, USA) 액체배지에 유산균 전 배양액을 2% 접종하고, 일정 간격으로 배양액을 취해 균체 생육을 측정하여 배양 시간에 따른 변화를 확인하였다. 초기 pH에 의한 변화는 1 N NaOH와 1 N HCl 용액을 사용하여 MRS 배지의 pH를 4~10으로 조정하여 비교하고, 배양온도는 25, 30, 37, 40, 50°C로 달리하여 배양한 후 채취하여 UV-VIS spectrophotometer (Libra S22, Biochrom, England)를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하여 균체 생육성을 비교하였다.

2) 단백질 응고성 측정

유산균에 의한 유단백질의 응고성을 측정하기 위해 항진균 효과가 있는 6종의 유산균을 MRS(Lactobacilli MRS broth, Difco, USA) 배지에 유산균 전 배양액을 2% 각각 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 유산균액을 10% 환원탈지유에 2% 농도로 각각 접종한 후, 30°C에서 12시간 동안 배양하여 커드의 형성 정도를 관찰하고, 상업균주인 *Streptococcus thermophilus* Body-1을 대조균으로 사용하여 치즈 제조용 starter로서의 사용 가능성 여부를 판단하였다.

3) 단백질 분해력 측정

유산균에 의한 유단백질의 분해력 측정은 항진균 활성이 있는 6종의 유산균을 10% 환원탈지유에 접종하여 배양하고, 각각에서 유리되는 tyrosine 함량으로 나타냈다. 10% 환원탈지유 배지에 유산균 전 배양액을 1% 접종한 후 30°C에서 24시간 동안 배양하여 tyrosine 함량을 측정하였다. 유산균액을 시간별로 채취하여 여과지(Whatman, No. 2, England)로 여과한 후 여과액 5 mL에 0.44 M trichloroacetic acid 5 mL를 가해 침전시켰다. 30분 반응시킨 후 여과지로 여과하여 여과액 1 mL와 0.44 M 탄산나트륨 2.5 mL를 혼합한 후 1 N folin 시약 200 µL를 가하여 5분 동안 반응시켰다. 각 시료의 발색 정도는 UV-VIS spectrophotometer (Libra S22, Biochrom, England)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상업균주인 *Streptococcus thermophilus* Body-1과 비교하였으며, tyrosine 농도는 100 µL/mL까지 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

4) 내산성 측정

산에 대한 저항성 실험은 항진균 활성이 있는 6종의 유산균 전 배양액을 MRS(Lactobacilli MRS broth, Difco, USA) 액체배지에 2% 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 9,950×g로 5분 동안 초고속 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체에 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate 용액을 각각 초기 배양액과 동일한 양으로 첨가하여 현탁한 후 30°C에서 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24시간 동안 배양하면서 시간대별 생육 정도는 UV-VIS spectrophotometer (Libra S22, Biochrom, England)를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 유산균 상층액의 유기산 정량

항진균 활성이 있는 6종의 유산균 전 배양액을 MRS(Lactobacilli MRS broth, Difco, USA) 액체배지에 2% 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 유산균의 배양액을 원심분리기(Vision, Korea)를 이용하여 5,500 rpm에서 15분 원심분리하여 0.45 μm membrane filter(Nalgene, USA)로 여과한 후, 유기산 함량을 액체크로마토그래피(Agilent, USA)의 분석용 시료로 사용하였다. 분석온도는 40°C, 이동상은 0.1% perchloric acid로 하였으며, 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 유기산의 표준물질은 acetic acid, citric acid, lactic acid, malic acid, succinic acid, tartaric acid를 각각 0.1% perchloric acid 용액을 사용하여 최종 농도가 1%가 되도록 조제하여 사용하였으며, 표준물질의 retention time과 peak area를 이용하여 대조구인 MRS 액체배지와 상층액의 유산균 함량을 mg/kg 단위로 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 곰팡이균의 탐색 및 동정

임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성 중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 곰팡이를 채취하여 PDA(potato dextrose agar, Difco, USA) 평판배지에 도말하여 25°C에서 48시간 동안 배양한 뒤, 형성되는 포자의 집락을 관찰하였다. 그 결과, 다양한 종류의 곰팡이들이 동일한 배지 내에서 관찰되었으며, 이를 3회 분리 배양하여 균사는 PDA 평판배지 및 YM(yeast medium, Difco, USA) 액체배지에 접종하여 25°C에서 10일간 배양한 후 광학현미경으로 균사 및 포자형태를 관찰하였다. 곰팡이균의 형태, 색상 및 포자의 특징을 비교하여 최종 분리 배양된 곰팡이균 8종을 FA, FB, FC, FD, FE, FF, FG 그리고 FH로 각각 명명하여, 16S rRNA 염기서열을 결정하고, 알려진 다른 균주와 비교하였다. 각각의 곰팡이균을 동정한 결과, FA 곰팡이균은 *Penicillium solitum* strain, FB는 *Penicillium brevicompactum*

strain, FC는 *Penicillium commune* isolate, FD는 *Penicillium roqueforti*, FE는 *Penicillium echinulatum*, FF는 *Penicillium polonicum*, FG는 *Penicillium solitum* 그리고 FH는 *Cladosporium sphaerospermum*으로 각각 판정되었다. 분리 곰팡이균 8종은 동정 후 *Penicillium solitum* strain FI01, *Penicillium brevicompactum* strain FI02, *Penicillium commune* isolate FI03, *Penicillium roqueforti* FS04, *Penicillium echinulatum* FS05, *Penicillium polonicum* FS06, *Penicillium solitum* FS07 그리고 *Cladosporium sphaerospermum* FS08로 각각 명명하여 실험에 사용하였다.

2. 김치에서 분리한 유산균의 항진균 활성 평가

다양한 지역에서 수집한 김치로부터 분리한 44종의 분리 유산균 중 곰팡이 FB(*P. brevicompactum* strain FI02)에 대하여 생육저지환의 크기 및 형태를 바탕으로 항진균 활성이 크다고 판정된 22종의 유산균을 다시 곰팡이 FB(*P. brevicompactum* strain FI02)에 대하여 항진균 활성을 재확인하였다. 결과에 따라 22종 가운데 항진균 활성이 가장 뚜렷한 6종의 유산균을 최종 선발하여 ALD, ALH, ALJ, ALL, ALS, 그리고 ALT로 명명하고, (주)마크로젠에 16S rRNA 분석을 의뢰하여 확인하였다. 6종의 유산균은 동정 후 *L. sakei* subsp. ALJ011, *L. sakei* subsp. ALI033, *L. sakei* subsp. ALGy039, *P. pentosaceus* ALJ015, *P. pentosaceus* ALJ024, *P. pentosaceus* ALJ026으로 각각 명명하여 실험에 사용하였다(Table 2). 최종 선발한 항진균 유산균 6종으로 임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성 중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 분리 곰팡이균 8종에 대하여 항진균 실험을 진행한 결과는 Table 3과 같다. 생육저지환의 모양과 크기로 항진균 활성을 평가한 결과, 최종 선발된 분리 유산균 6종은 치즈와 치즈 숙성실에 자생하는 곰팡이균 8종에 대하여 대부분 항진

Table 2. Antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi

Strain ¹⁾	Nomenclature
ALD	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ011 ²⁾
ALH	<i>L. sakei</i> subsp. ALI033 ³⁾
ALJ	<i>L. sakei</i> subsp. ALGy039 ⁴⁾
ALL	<i>P. pentosaceus</i> ALJ015 ²⁾
ALS	<i>P. pentosaceus</i> ALJ024 ²⁾
ALT	<i>P. pentosaceus</i> ALJ026 ²⁾

¹⁾ ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T

²⁾ ALJ: antifungal lactic acid bacteria from Kimchi in Jeonju 011, 015, 024, 026

³⁾ ALI: antifungal lactic acid bacteria from Kimchi in Imsil 033

⁴⁾ ALGy: antifungal lactic acid bacteria from Kimchi in Gyeonggi 039

Table 3. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi against fungi isolated from cheese and cheese ripening room

Antifungal ³⁾ lactic acid bacteria	Fungi ²⁾							
	FA	FB	FC	FD	FE	FF	FG	FH
<i>L. citreum</i> ¹⁾	×	×	×	×	×	×	×	×
ALD	×	×	×	×	×	×	×	×
ALH	×	×	×	×	×	×	×	×
ALJ	×	×	×	×	×	×	×	×
ALL	×	×	×	×	×	×	×	×
ALS	×	×	×	×	×	×	×	×
ALT	×	×	×	×	×	×	×	×

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each fungi. Degree of clear zone by growth inhibition; -: no inhibition, ×: below 10 mm, ××: 10~15 mm, ×××: above 15 mm

¹⁾ *L. citreum*: *Leuconostoc citreum* KCTC3524

²⁾ FA~H: fungi A~H

³⁾ ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T

균 활성을 보였다. 곰팡이균 FB와 FH에는 6종의 분리 유산균 모두 대조균인 표준 유산균 *Leuconostoc citreum*(KCTC3524) 보다 활성이 크게 나타났으며, 곰팡이 FC와 FE에 대하여 6종의 분리 유산균은 대조균인 표준 유산균 *Leuconostoc citreum* (KCTC3524)과 비교하여 유사한 결과를 보였다. 특히, 유산균 ALH가 곰팡이균 8종에 대하여 항진균 활성이 가장 큰 것으로 평가되어, 숙성 중 치즈 및 치즈 숙성실의 곰팡이를 저해하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

3. 선발 유산균의 특성 규명

1) 선발 유산균의 최적 배양조건

(1) 배양시간에 의한 영향

최종 선발된 6종 유산균의 배양시간에 의한 균체 생육 변화를 확인하기 위해 30°C에서 5시간 간격으로 흡광도 및 pH를 측정하여 확인하였다. 6종의 유산균들은 배양 5시간 부터 빠르게 증가하다가 20시간에서 성장이 완화된 경향을 보였으나, 유산균 간에 유의적 차이는 없었다(Fig. 1). 또한 유산균의 생육에 따라 5시간 간격으로 배양액의 pH를 측정된 결과, 배양시간의 경과할수록 배양액의 pH가 낮아졌으며, 이는 균체 생육에 따른 유기산 생성에 의한 pH 저하로 추정된다(Fig. 2). 이 결과는 Woo 등(2005)의 연구결과와 유사한 성향을 보였다.

(2) 초기 pH 및 온도에 의한 영향

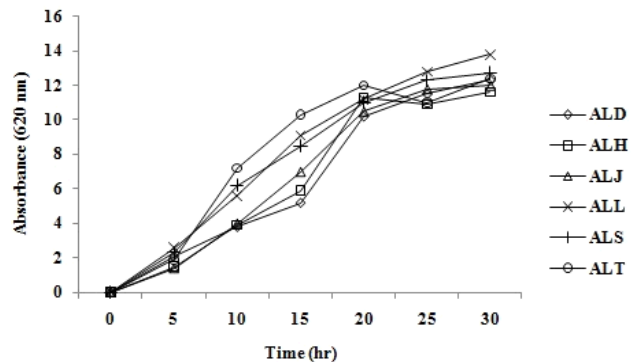


Fig. 1. Time course of antifungal lactic acid bacteria growth. ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

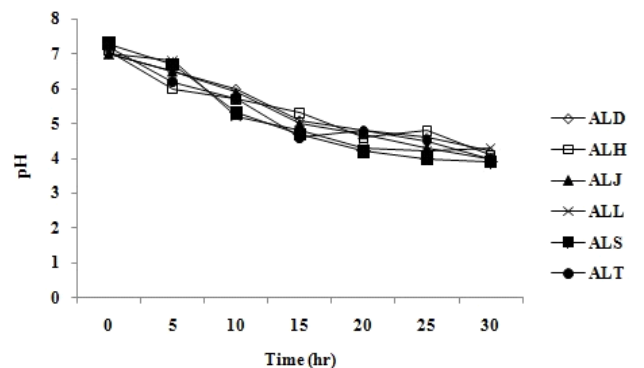


Fig. 2. pH course of antifungal lactic acid bacteria growth. ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

최종 선발된 6종 유산균의 최적 pH를 결정하기 위해 기본 배지의 초기 pH를 4에서 10까지 변화시켜 30°C에서 20시간 배양한 후, 균체의 생육 정도는 흡광도를 측정하여 확인하였다(Fig. 3). 6종의 유산균체 생육을 위한 적정범위는 pH 6~8이며, 최적 pH는 7임을 확인할 수 있었다. 또한 최적의 온도를 결정하기 위해 배양 온도를 25, 30, 37, 40, 50°C로 변화시켜 배양 20시간 후 유산균의 생육 정도를 확인하였다(Fig. 4). 6종의 유산균체의 생육은 25~37°C까지는 비교

적 높은 활성을 나타냈으나, 50°C에서는 생육이 현저히 감소되었다. 유산균체 생육을 위한 최적의 온도는 30~37°C이며, 37°C 이상에서는 생육에 영향을 미쳐 활성이 떨어지는 것을 확인하였다. 이 결과는 Lim 등(2013)과 강 등(2002)의 연구결과와 유사하며, 이러한 성장특성은 락토바실러스 속에 속하는 다른 유산균과 유사한 것으로 발효제품의 제조를 위한 starter로서 사용할 수 있으며, 산업화에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 사료된다.

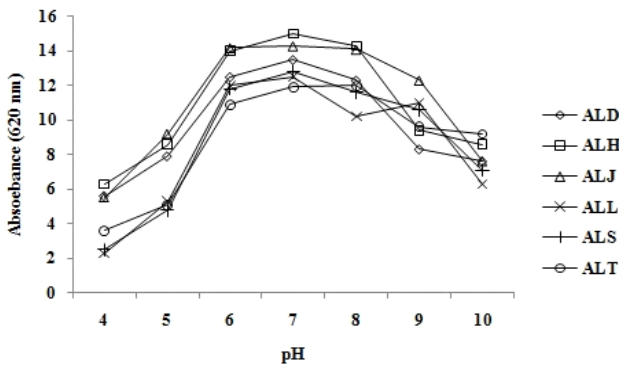


Fig. 3. Effect of initial pH on antifungal lactic acid bacteria growth. ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

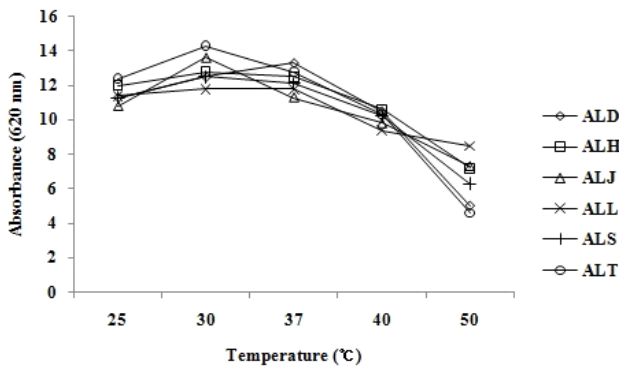


Fig. 4. Effect of initial temperature on antifungal lactic acid bacteria growth. ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

2) 단백질 응고성

최종 선발된 6종 유산균에 의한 유단백질의 응고성을 확인하기 위해 커드 형성 특성을 상업균주인 *Streptococcus thermophilus* Body-1과 비교하였다. Table 4에서와 같이 6종의 유산균 중 ALH, ALL, ALS는 상업균주와 유사한 수준으로 단백질 응고력을 보이며, 12시간에 유단백질이 응고되었으나, ALD, ALJ, ALT 유산균은 같은 배양시간 동안 비교적 낮은 수준의 응고력을 보였다. 본 결과는 Lim 등(2008)의 연구결과와 유사한 결과를 나타냈으며, 이는 ALH, ALL, ALS 균주의 단백질 응고력은 치즈 starter로서 적합하게 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

3) 단백질 분해력

치즈 starter로서의 사용 가능성을 평가하기 위해 최종 선발된 6종 유산균의 단백질 분해력을 확인한 결과는 Fig. 5와 같다. 6종의 유산균의 단백질 분해력은 단백질 분해에 의해 유리되는 tyrosine의 양을 측정하여 비교하였다. 배양시간이 증가함에 따라 단백질 분해력이 지속적으로 증가하였으며, 24시간까지 유지하였다. 특히, ALD 유산균이 16시간 이후 비교적 높은 단백질 분해력을 보였으나, 6종의 유산균의 단백질 분해력은 대조균으로 사용된 *Str. thermophilus* Body-1과 유사한 분해력을 보였고, Lim 등(2008)의 연구결과와 유사한 성향을 보였으며, 치즈 starter로서의 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

4) 내산성

Table 4. Coagulation of milk protein by antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi

Strain ¹⁾	<i>Str. thermophilus</i> Body-1	ALD	ALH	ALJ	ALL	ALS	ALT
Coagulation of milk protein	++	+	++	+	++	++	+

-: No coagulation of milk protein after 12 hr at 30°C, +: Weak coagulation of milk protein after 12 hr at 30°C, ++: coagulation of milk protein after 12 hr at 30°C

¹⁾ *Streptococcus thermophilus* Body-1: *Str. thermophilus* Body-1, ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T

최종 선발된 6종 유산균의 내산성은 pH 3의 조건에서 30°C, 24시간 동안 배양한 후, 시간대별(0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 시간)로 유산균의 생육도를 UV-VIS spectrophotometer (Libra S22, Biochrom, England)를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 6). 산성조건(pH 3)에서 시간에 따른 6종 유

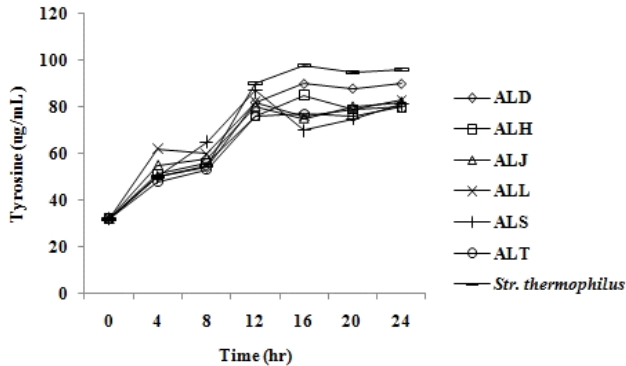


Fig. 5. Proteolytic activity of antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi in 10% reconstituted skim milk at 30°C. *Streptococcus thermophilus*: Str. thermophilus Body-1, ALD, H, J, L, S, T; antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

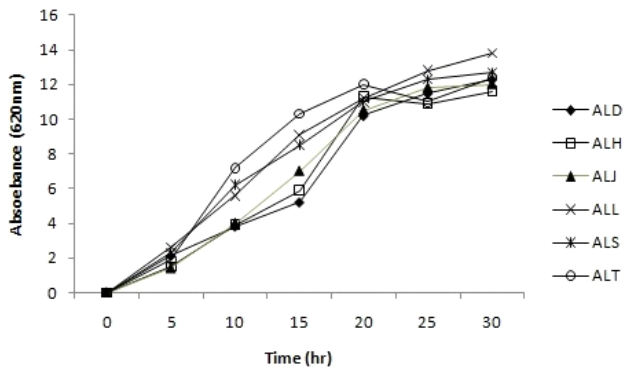


Fig. 6. Acid resistance of antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi in MRS broth (pH 3) at 30°C. ALD, H, J, L, S, T; antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

산균의 생육은 감소하는 경향을 보였으나, 이 중 *Lactobacillus sakei* subsp.인 ALD, ALH 및 ALJ 유산균들은 산성 조건에서 보다 잘 견디는 것을 확인하였다. *Pediococcus pentosaceus*인 ALL, ALS 및 ALT 유산균들은 16시간 이후 현저히 생육이 감소하였으며, 20시간 이후에는 대부분 사멸하여 *Lactobacillus sakei* subsp. 균주보다 산성 조건에서 생육도가 저하되었다. 선발된 유산균 중 위를 통과한 후 장시간 활성을 유지하기 위한 조건에는 *Lactobacillus sakei* subsp.인 ALD, ALH 및 ALJ 유산균이 보다 적합할 것으로 판단되었다.

5) 유기산

최종 선발된 6종 유산균이 생성하는 유기산을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 대조구로 사용한 MRS 액체배지에는 tartaric acid가 14,087 mg/100 g으로 가장 높은 함량으로 존재하였으며, acetic acid, citric acid, lactic acid의 순으로 존재하였다. 그러나 succinic acid는 검출되지 않았다. 선발 유산균 6종의 배양액을 분석한 결과, 6종의 유산균 모두 lactic acid의 함량이 가장 많았으며, 대조구와 비교하여 약 150배 증가된 것으로 선발 유산균의 발효에 의해 lactic acid가 다량 생성됨을 확인할 수 있었다. Acetic acid의 함량도 크게 증가하여 대조구에 비해 4배 가량 증가되었다. 그러나 malic acid와 tartaric acid는 배양 후 크게 감소하였는데, 이것은 유산균의 유기산 대사 과정에서 malic acid와 tartaric acid로부터 lactic acid가 생성되었을 것으로 추정되었다.

요 약

본 연구는 치즈 숙성 중 오염원인 곰팡이균 제거 기술 개발의 일환으로 치즈 숙성실에서 자생하는 곰팡이와 다양한 지역의 김치로부터 유산균을 분리하여 곰팡이에 대한 생육 억제활성이 있는 항진균 활성 유산균을 선발하고, 선발된 유산균의 배양특성을 확인하였다. 치즈와 치즈 숙성실에 자

Table 5. Organic acid content in culture supernatant of antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi (mg/100 g)

Strain ¹⁾	Acetic acid	Citric acid	Lactic acid	Malic acid	Succinic acid	Tartaric acid
Control(MRS)	4,254	2,354	287	758	-	14,087
ALD	18,254	2,547	40,254	-	-	7,854
ALH	15,875	3,546	50,247	246	-	5,954
ALJ	17,854	4,102	45,242	259	-	6,579
ALL	17,895	3,864	43,254	-	-	6,940
ALS	18,005	3,598	47,258	-	-	6,982
ALT	16,358	3,549	45,365	278	-	6,497

¹⁾ ALD, H, J, L, S, T; antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T

생하는 곰팡이 8종과 다양한 지역의 김치로부터 유산균 44종을 분리·동정하였고, 김치에서 분리한 유산균 44종 중 항진균 활성이 있는 유산균 6종을 최종 선발하여 그 특성을 규명하였다. 최종 선발된 유산균 6종 중에서 유산균 ALH (*L. sakei* subsp.)가 곰팡이균 8종에 대하여 항진균 활성이 가장 크게 나타났다. 최종 선발된 6종의 유산균의 생육은 배양 5시간부터 20시간까지 활발하였고, 배양시간이 경과할수록 배양액의 pH는 낮아졌다. 유산균 생육의 최적온도는 30~37°C였으며, 최적 pH는 7이었다. 단백질 분해력은 6종 유산균 모두 유사하였으며, 단백질 응고력은 ALH, ALL, ALS 균주가 ALD, ALJ, ALT 균주에 비해 좋았다. 또한 ALD, ALH, ALJ 균주는 ALL, ALS, ALT 균주보다 산성조건에서 잘 견디는 것을 확인하였다. 유산균 배양액의 유기산 조성을 분석한 결과, lactic acid가 가장 많이 생성되었다. 본 실험에서 김치에서 분리한 유산균은 항진균력이 뛰어나고, 배양특성이 유제품을 제조하기에 적합하다고 사료되므로, 추후 곰팡이의 생육을 억제할 수 있는 치즈 및 유제품 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산물식품부 고부가가치식품기술개발사업(111143-2)에 의한 연구비로 수행된 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Baek, E. J. 2011. Antifungal activities of lactic acid bacteria and application of a lactic acid bacterial starter in rice cakes. M.D. dissertation, Inha Univ., Seoul, Korea.
- Choi, H. Y., Ryu, B. H., Sim, G. S., Kim, Y. S., Lee, J. H. and Ha, W. K. 2013. Novel lactic acid bacteria isolated from Kimchi and having antifungal activity, and composition including it. Korea Patent 10-1256727.
- Jang, D. H. and Kang, D. K. 2004. The new *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi having high resistance ability of acid and bile, and products containing it. Korea Patent 10-0455832.
- Jung, H. K., Choi, H. N., Oh, H. H., Huh, C. K., Yang, H. S., Oh, J. H., Park, J. H., Choi, H. Y., Kim, K. H. and Lee, S. G. 2012. Prevention of fungal contamination during cheese ripening-current situation and future prospects. Korean J. Dairy Sci. Technol. 30(2):75-81.
- Kim, I. C. and Ko, K. G. 2012. Lactic acid bacterium separated from Kimchi and uses thereof. Korea Patent 10-1194795.
- Kim, I. C., Ko, K. G. and Jang, H. C. 2011. Lactic acid bacterium separated from Kimchi and uses thereof. Korea Patent 10-1005747.
- Kim, J. H., Oh, M. K., Rhee, Y. H., Choi, K. C., Lee, Y. K. and Shin, S. Y. 1999. Selection and physico-chemical characteristics of lactic acid bacteria which had cholesterol lowering activities. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42(2):83-90.
- Ko, K. H., Liu, W., Lee, H. H., Yin, J. and Kim, I. C. 2013. Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in different Kimchi. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42(1):89-95.
- Lee, H., Lee, J. J., Chang, H. C. and Lee, M. Y. 2012. Acute toxicity of *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from Kimchi in mice. Korean J. Food Preserv. 19(2):315-321.
- Lim, S. D., Kim, K. S. and Jo, S. A. 2013. Method for preparing Mozzarella cheese using *Streptococcus macedonicus* LC743. Korea Patent 10-1221587.
- Lim, S. M. 2012. Synbiotic potential of yoghurt manufactured with probiotic lactic acid bacteria isolated from mustard leaf Kimchi and prebiotic fructooligosaccharide. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 40(3):226-236.
- Lim, Y. S., Kim, S. Y. and Lee, S. K. 2008. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from kefir made of goat milk. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 28(1):82-90.
- Park, Y. H., Ryu, B. H., Lee, I. S. and Kang, K. H. 2004. Acid tolerant probiotic *Lactobacillus sakei* Probio-44 that can suppress the growth of pathogenic microorganisms and suppressed tumour growth and promoted the production of several different cytokines of immune responses. Korea Patent 10-2004-0076183.
- Sim, J. H., Oh, S. J., Kim, S. K. and Baek, Y. J. 1995. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic-acid-bacteria species isolated from lactic fermented products. Korean J. Food Sci. Technol. 27(1):101-104.
- Son, H. K., Lee, M. Y., Chng, H. C. and Lee, J. J. 2013. Acute toxicity of crude anti-fungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42(6):892-897.
- Woo, J. Y., Paek, N. S. and Kim, Y. M. 2005. Studies on antioxidative effect and lactic acid bacteria growth

- of persimmon leaf extracts. Korean J. Food & Nutr. 18(1):28-38.
17. Yang, E. J. and Jang, H. C. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 36(4):276-284.
18. 강혜선, 박선미, 윤수희, 황태식, 박두현. 2002. 김치에서 분리한 유산균의 생리학적 및 분류학적 특성. 산업기술연구소 논문집 12:13-21.

(Received: September 1, 2013 / Accepted: October 28, 2013)