



항균활성 김치유산균의 분리 및 그 특성 규명

Isolation and Characterization of Kimchi Lactic Acid Showing Antibacterial Activity

박연진*

전남도립대학교 호텔조리제빵과

Park, Yeon Jin*

Department of Hotel Cuisine & Baking, Jeonnam Provincial college

Abstract

In this study, eight isolates of kimchi *Lactobacillus* were isolated from kimchi samples sourced from Gwangju Metropolitan City and Jeollanam-do Province in order to characterize bacteriocin-producing strains that are involved in the optimum fermentation period for kimchi. As a result of identifying the rDNA sequence, they were named *Leuconostoc mesenteroides*(*Leu. mesenteroides*) PH1, *Leuconostoc mesenteroides*(*Leu. mesenteroides*) PH2, *Lactobacillus sakei*(*Lb. sakei*) HJ5, *Lactobacillus sakei*(*Lb. sakei*) HJC, *Lactobacillus sakei*(*Lb. sakei*) NJ1, *Lactobacillus sakei*(*Lb. sakei*) NJ4, *Lactobacillus sakei*(*Lb. sakei*) YY5, and *Lactobacillus sakei*(*Lb. sakei*) C, respectively. All of the eight isolates grew well in an up-to- 3% saline concentration as a halotolerant, and HJ5, HJC, NJ1, NJ4, YY5, and C showed high bacterial growth even at 5-7%(A600: approximately 3.0). These seem to be halophilic bacterium. Though all of the eight strains showed a meager level of growth in the acidic and alkaline domain (pH 11.0), they grew well in the domain spanning pH 5.0 up to pH 7.0. The bacteriocin that the eight strains produced also exhibited anti-bacterial revitalization in indicator organisms such as fecal contaminants, causative bacteria, and foodborne pathogens. Bacteriocin produced by *Leu. mesenteroides* PH1, *Lb. sakei* HJ5, and *Lb. sakei* HJC were more stable in heat than the other strains. Bacteriocin produced by *Leu. mesenteroides* PH1 and *Leu. mesenteroides* PH2 maintained antibacterial qualities in pH domains except in the pH 4.0-5.0 domain, which is an acidic domain, and pH 11.0 domain, which is an alkaline domain. The bacteriocin produced by *Lac. sakei* HJ5 maintained antimicrobial activity in all of the pH domains except pH 4.0 and pH 11.0 domains. Bacteriocin produced by *Leu. mesenteroides* PH1, *Leu. mesenteroides* PH2, and *Lac. sakei* HJ5 seem to be a proteinaceous substance, while bacteriocin produced by *Lac. sakei* HJC is thought to be a proteinaceous substance where sugars and lipids have been closely stuck together. The eight strains of kimchi *Lactobacillus* exhibit broad antibacterial activity, indicating they could be applied as a strong natural food and animal feed preservative.

Key words: kimchi *Lactobacillus*, bacteriocin, anti-bacterial revitalization, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus. sakei*

I. 서론

유산균은 혐기적으로 탄수화물을 이용해 젖산을 생성하는 미생물로 유제품을 비롯하여 육류, 야채 등의 발효

* Corresponding Author: Park, Yeon-Jin
Tel: +82-61-380-8675, Fax: +82-61-380-8675
E-mail: senovia@hanmail.net

학적인 가공에 발효종균으로 많이 사용되며 식품 보존, 향기, 조직 등 관능적인 특성에 많은 기여를 하고 있다(Chang, 2005; Lingren, 1990; Piard, 1992; Stiles, 1991). 유산균은 발효 시 젖산 생성에 따라 pH가 저하되어 식품을 보존하는 기능을 가지게 되며, 이와 더불어 다양한 미생물 증식 저해물질을 통해 식품 오염 원인균, 병원성균, 부패균의 생육 억제 또는 저하가 가능하다(Chang, 2005). 유산균이 생산하는 항균활성 물질은 젖산을 비롯한 유기산(Tramer, 1964), 과산화수소(Chang et al., 1997; Collins & Aramaki, 1980), diacetyl(Jay, 1982), ammonia 및 저분자 단백질성 물질인 박테리옌(Klaenhammer, 1988) 등이 알려지고 있다. 이러한 물질들이 식품의 발효과정에 안정된 균총 형성에 관여하고 있다고 알려지고 있다(Bamby-Smith et al, 1989; Delves-Broughton, 1990). 항균물질 중 박테리옌은 세균이 세포외로 분비하는 peptide 또는 protein성 항균물질로써 박테리옌을 생산하는 균주와 형태 및 계통학적으로 유사한 균주들에 대해 정균 및 살균작용 가능한 물질이다(Klaenhammer, 1988). 박테리옌은 인간 장내 단백질해 효소에 의해 분해되므로 식품산업에 사용될 수 있는 항균제제로 인식되고 있다(Delves-Broughton, 1990).

김치 발효는 숙성과정에서 미생물들의 상호작용에 따라 자연 발효되는 우리나라의 대표적인 식품이다(Yang et al, 2002). 김치에 존재하는 미생물군의 종류 및 군집발달은 김치 자체의 품질을 결정하는 매우 중요한 요소가 될 수 있다. 현재까지 김치에서 분리되어 동정된 미생물의 종류는 유산균 포함 200여종에 달하고 있다(So & Kim, 1995; Kang et al., 1995; Lee et al., 1992). 김치는 발효과정 동안 *Leuconostoc*속과 같은 이상유산균(heterofermentative lactic acid bacteria) 번식에 의해 발효가 시작되고 김치가 가장 맛있는 단계인 완숙기에는 이상젖산균은 최고치의 성장을 보인다. 이러한 결과는 김치 맛과 이상젖산균간의 긴밀한 연관성이 있다는 것을 보여주고 있으며 김치 발효 중기 이후에는 pH는 4.0 이하로 낮아져 산성에 강한 정상젖산균(homofermentative lactic acid bacteria)에 해당하는 *Lactobacillus*속이 빠르게 증식하여 다량의 산 생성을 통해 김치 산패의 원인이 되고 있다(Kang et al., 1995).

김치산업에서는 김치의 고급화, 규격화하는 방안에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 김치제조가공업체의 표준레시피 개발 등 표준화에 대한 연구, 저장 중 품질 변화에 대한 연구 등 다양하게 진행되고 있다(Chang,

2005). 하지만 다양한 연구 수행 결과 김치 상품화에서 김치 품질의 균일화와 규격화 및 보존성은 김치산업에 있어서 가장 중요한 요소로 보이고 있다.

김치를 비롯한 각종 식품보존을 위해서 물리적 방법, 화학적 식품첨가물 이용 등 다양한 방법이 시도되고 있지만, 물리적 처리는 식품의 질적 저하 및 영양적 손실을 나타내며, 화학적 식품첨가물 처리방법은 소비자들에게 거부감과 미생물 내성 문제 등이 있어(Yang & Chang, 2008) 새로운 식품보존 방법에 대한 요구가 증가하고 있다.

이에 소비자들이 안심하고 찾을 수 있는 천연 유래 식품보존제를 찾기 위한 노력이 다양한 방법으로 이루어지고 있으며 그 중 발효식품으로부터 항균물질 생산 능력이 있는 균주를 동정하여 식품에 적용하기 위한 연구는 *Leuconostoc citreum*(*Leu. citreum*) GJ7이 생산하는 박테리옌과 그 유도물질의 특성 규명(Chang, 2005), 김치로부터 *Lactobacillus plantarum* 생육저해 박테리옌 생산 균주의 분리 및 박테리옌 생산의 유도효과(Yang et al, 2002), 김치로부터 항진균 활성균의 분리(Yang & Chang, 2008), *Helicobacter pylori* 억제능을 가진 김치 유산균의 분리(Lee & Chang, 2008)와 같이 다양하고 심도 있게 이루어지고 있다.

본 연구에서는 박테리옌 생산능이 있는 균주 연구를 통하여 김치 발효과정을 과학적으로 조절하고 보존성을 높여 품질이 균일한 김치 개발을 하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 항균활성 김치유산균을 분리하여 그 특성을 규명하였다. 본 연구를 통해 우리나라의 대표적인 전통식품인 김치가 발효과학에 의하여 김치 맛을 보존함과 동시에 다양한 식품산업에 천연 유래 식품 보존제 활용성을 높이고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 김치 유산균의 분리

김치 최적발효를 주도하는 김치 유산균 분리를 위해 광주광역시 및 전라남도 지역 증가집, 식당, 가정집, 발효식품 전문회사, 유명 사찰 등에서 발효된 김치를 총 17종 수집하여 사용하였다. 김치시료는 내용물 전체를 마쇄한 후, 멸균여과 하여 적정배율로 희석하였다. 희석액은 deman, Rogosa and Sharpe(MRS; Difco, Sparks, MD, U.S.A)고

체배지에 도달하여 24시간 이상 배양하였다. 배양 후에 형성된 콜로니는 CaCO₃가 2% 첨가된 MRS 배지에 tooth picking하여 투명환을 형성하는 콜로니를 유산균으로 잠정적으로 선별하여 Gram염색(BD Co., Sparks, MD, U.S.A) 하여 형태학적인 특성을 현미경으로 관찰하였다.

2. 분리 균주의 동정

항균 활성능이 있는 분리된 김치유산균들의 동정을 위하여 생화학적 특성을 1차적으로 조사하였다. API 50 CHL system(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용해 당 발효능 조사를 한 후 균주 동정 프로그램(<http://apiweb.biomerieux.com>)을 통해 균주 동정을 하였다. 최종 동정을 위해 분리 균주들의 16SrRNA 염기서열을 결정한 후 GenBank에 등록된 표준 균주와 비교하였다. 분리 균주들의 16S rRNA 염기서열 결정은 Palmcycler (Corbett Research, Australia)를 사용하여 다음과 같이 수행하였다. 분리 균주들의 chromosomal DNA를 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, Madison, WI, U.S.A.)으로 분리한 후 LeuP-F(5'-GCGGCGTGCCTAA-TACATGCAAGTCG-3')와 LeuP-R(5'-GACCCGGGAA-CGTATTCACCGCGGC-3') primer를 사용하여 1차 PCR을 수행하였다. 16S rRNA의 complete sequence 분석을 위하여 2차 PCR은 Lb.p-F(5'-ATTAATTTGAGAG-TTTGATCCTGGCTCAGGAC-3') 과 Lb.p-R(5'-AAAAAGAAAGGAGGTGATCCAGCCGCA GGTT--3') primer를 사용하였다. 1, 2차 PCR 산물은 각각 pGEM-T vector(Promega)에 cloning하여 ABI PRISM 3730 DNA Analyzer(Applied Biosystems, foster City, U.S.A.)를 이용하여 염기서열 분석을 하였다. 그 결과를 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의 ribosomal RNA gene sequence와 상동성을 비교하여 분석하였다.

3. 분리 균주의 미생물학적 특성규명

1) 분리 균주의 당 대사능

분리된 유산균들의 C-화합물 대사능 관찰을 위하여 Biolog에 의한 유산균(*Lactobacillus sp.*) 동정 kit에 해당하는 API 50CHL(Biomerieux, France)을 사용하여 분리된 유산균들의 C-화합물 대사능을 살펴보았다.

2) 내염성

배지의 NaCl 초기 농도가 균주들의 성장에 미치는 영향 조사를 위하여, NaCl을 0, 1, 3, 5 및 7 %씩 각각 첨가된 100 mL MRS 액체배지에 분리균주를 1 % 접종하여 24시간 동안 정치배양한 후 A₆₀₀(Ultraspec 2100 pro, Amersham Biosciences Co., England)에서 배양액의 탁도 정도를 흡광도를 통해 측정하였다.

3) 배지의 초기 pH

배지의 초기 pH가 분리된 유산균들의 성장에 미치는 영향 조사를 위하여 1 N NaOH 또는 1 N HCL로 pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0 및 11.0으로 보정한 100 mL MRS 액체배지에 분리균주들을 각각 1 %씩 접종하여 24시간 정치배양한 후 A₆₀₀에서 흡광도를 측정하였다.

4. 항균물질 생성능 및 항균 Spectrum

분리된 유산균들의 항균활성 조사를 위하여 균체를 직접 가하는 direct method(Kim et al., 1999) 와 배양상징액을 paper disk에 가하여 생육저지환을 관찰하는 agar diffusion method(Tagg & Mcgiven, 1971)를 동시에 시행하였다. 분리된 유산균의 항균활성 검증용 지시균주는 *Lactobacillus plantarum* KFRI 464를 비롯하여<Table 3>에 제시된 총 15종의 균주 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella typhimurium* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, *Lactobacillus plantarum* KFRI 464, *Lactobacillus delbruekii* KFRI 347, *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 1628, *Leuconostoc mesenteroides* KFRI 218, *Lactobacillus acidophilus* KFRI 150, *Lactobacillus plantarum* KFRI 236를 사용하였다. Direct method는 혐기적인 상태로 5 mL MRS 액체배지에서 전 배양된 분리균주들과 지시균주들을 24시간 동안 30°C에서 혐기배양하면서 지시균주들에 대한 저지환을 관찰하였다. 분리된 유산균들을 5 mL MRS 액체배지에 30°C에서 24시간 배양 후에 원심분리(9,950×g, 4°C, 15 min)한 후 회수한 상정액은 membrane filter(0.45 μm pore size, Millipore, Beverly, USA)로 제균하고, agar diffusion method를 이용하여 지시균주들에 대한 항균생

성력 여부를 생육저지환을 통해 관찰하였다.

5. 박테리오신의 준비

본 연구에서 사용된 8종의 유산균의 항균물질을 각각 proteinnase k 처리를 한 후 항균 활성이 실험되는 시료를 박테리오신 시료로 삼아 이 후 박테리오신 안정성 실험을 수행하였다. 박테리오신은 다음과 같이 준비 하였다. LAB을 100 mL MRS 액체배지에 1% 접종한 후 30°C에서 24시간 정치하면서 배양하였다. 배양액을 4°C 원심분리(9,500×g, 15 min)하여 상정액을 0.45 μm membrane filter(Advantec MFS, Inc., Japan)로 제균 한 후 제균된 상정액을 동결건조(Labconco, Kansas, MO, U.S.A)하였다. 동결건조된 샘플은 50 mM Tris-HCl(pH 8.3) 완충액에 녹인 후 dialysis tube(MW < 1000; Spectra/Por 6 membrane, Spectrum Laboratories Inc., CA, U.S.A)로 투석 시켜 소금과 유산을 제거시켰다. 투석된 샘플은 다시 -20°C에 보관하면서 필요시 즉시 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.3)에 녹여 사용하였다.

6. 박테리오신 안정성

1) 온도의 영향

박테리오신 활성에 대한 온도별 영향을 알아보기 위해 상기의 방법에 의해 제조된 조항균물질을 4, 37, 50, 70°C에서 12시간 100°C에서 30분 및 120°C에서 15분 동안 열처리 후 각 온도 및 시간대별 항균활성을 유지하는지 관찰하여 항균활성을 측정하였다.

2) pH의 영향

박테리오신의 활성에 대한 pH 영향을 알아보기 위해 pH 4.0-6.0(50 mM sodium acetate), pH 7.0(50 mM Tri-Hcl), pH 11.0(50 mM glycine-NaOH)완충용액을 1 N HCL과 1 N NaOH로 보정하여 제조 하였다. 동결건조된 배양 농축물을 각각의 pH에 해당하는 완충용액에 용해시키고, dialysis-sack(M.W.<1,000, Spectra/Por 6 membrane, Spectrum Laboratories Inc., CA, U.S.A)에 넣은 후 각 pH 완충용액에서 4°C, 6시간 동안 투석시킨 후, 각 pH에서 항균활성을 유지하는지 관찰하여 항균활성을 측정하였다.

3) 각종 효소의 영향

Trypsin(EC 3.4.21.4 type I Sigma, Missouri, USA), protease(type I, Sigma) lysozyme(EC 3.2.1.17, Sigma)을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5), Pepsin(EC 3.4.23.1 type I, Sigma)은 50 mM citrate 완충액(pH 2.0), α-amylase(EC 3.2.1.1 type VIII-A, Sigma)는 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 7.0), Proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma)는 10 mM Tris-HCl-50 mM NaCl-5 mM EDTA(pH 7.5)에 20 mg/mL가 되도록 준비하였다. 박테리오신 시료에 준비된 각종 효소를 4 mg/mL 농도로 37°C에서 12시간 동안 반응시킨 후 활성 변화를 측정하였다. 대조구는 모든 동일한 조건에서 효소액만 빼고 처리하여 사용하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 김치로부터 항균활성 유산균의 분리 및 동정

광주광역시 및 전라남도 지역 김치시료에서 항균활성 균주를 분리하여 그 중 항균능력이 우수한 균주 8종을 선발하였다. 각 균주를 구분하기 위하여 김치의 출처에 따라 각각 PH1, PH2, HJ5, HJC, NJ1, NJ4, YY5, C로 이름을 명명하여 구분하였다. 분리된 8종에 대한 그람염색 및 형태학적인 관찰을 시행하였다<Table 1>. 분리된 균주 모두 그람양성이고 구균에서 단간균, 간균 형태를 나타냈다. 콜로니 모양은 매끈하고 둥근 형태이며 균주 C와 YY5는 크림색을 띄었고 그 밖의 균주는 모두 불투명한 우유빛을 띄었다<Table 1>.

분자생물학적 방법을 이용해 각 균주들의 16S rDNA 염기서열을 결정된 결과 PH1, PH2는 모두 LmesP primer set에 의한 PCR product로 1,304 bp를 얻었으며, 16S rDNA 염기서열 결과 *Leuconostoc mesenteroides* M23035와 99% 상동성을 나타내어 *Leuconostoc mesenteroides*로 동정되어 이름을 각각 *Leu. mesenteroides* PH1, *Leu. mesenteroides* PH2로 명명 하였다. HJ5는 LeuP와 LABP primer set에 의한 PCR product로 1,295 bp를 얻었고, 16S rDNA 염기서열 결과 *Lactobacillus sakei* AF401659와 99% 상동성을 나타내어 *Lactobacillus sakei*로 동정되어 *Lb. sakei* HJ5로 명명 하였다. HJC는 LeuP와 LABP primer set에 의한 PCR product로 1,128 bp를 얻었고, 16S rDNA 염기서열 결과

<Table 1> Cultural characteristics of isolates

Classification	Strains							
	PH1	PH2	HJ5	HJC	NJ1	NJ4	YY5	C
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+
Morphology	coccus	coccus	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Colony	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular
Colony surface	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth
Colony color	milk	milk	milk	milk	milk	milk	cream	cream
Colony opacity	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque

Lactobacillus sakei AF401659와 99% 상동성을 나타냈으며 *Lactobacillus sakei*로 동정되어 *Lb. sakei* HJC로 명명 하였다. C 균주는 LmesP primer set에 의한 PCR product로 1,379 bp를 얻었으며 16S rDNA 염기서열 결과 *Lactobacillus sakei* AF401659와 99% 상동성을 나타내어 *Lactobacillus sakei*로 동정되어 *Lb. sakei* C로 명명 하였다. NJ1은 1-3-1P primer set에 의한 PCR product로 1,242 bp를 얻었으며, 16S rDNA 염기서열 결과 *Lactobacillus sakei* AF401659와 99% 상동성을 나타내어 *Lb. sakei*로 동정되어 *Lb. sakei* NJ1로 명명 하였다. NJ4는 1-3-1P primer set에 의한 PCR product로 1,381 bp를 얻었으며, 16S rDNA 염기서열 결과 *Lactobacillus sakei* AF401659와 99% 상동성을 나타내어 *Lactobacillus sakei*로 동정되어 *Lb. sakei* NJ4로 명명 하였다. YY5는 1-3-1P primer set에 의한 PCR product로 1,381 bp를 얻었으며, 16S rDNA 염기서열 결과 *Lactobacillus sakei* AF401659와 99% 상동성을 나타내어 *Lactobacillus sakei*로 동정되어 *Lb. sakei* YY5로 명명 하였다. [Figure 1]에 16S rDNA 염기서열 결과를 통한 분리·동정균주와 다른 미생물과의 계통발생학적 관계를 자세히 나타냈다.

2. 항균물질 생산 김치유산균주의 미생물학적 특성 규명

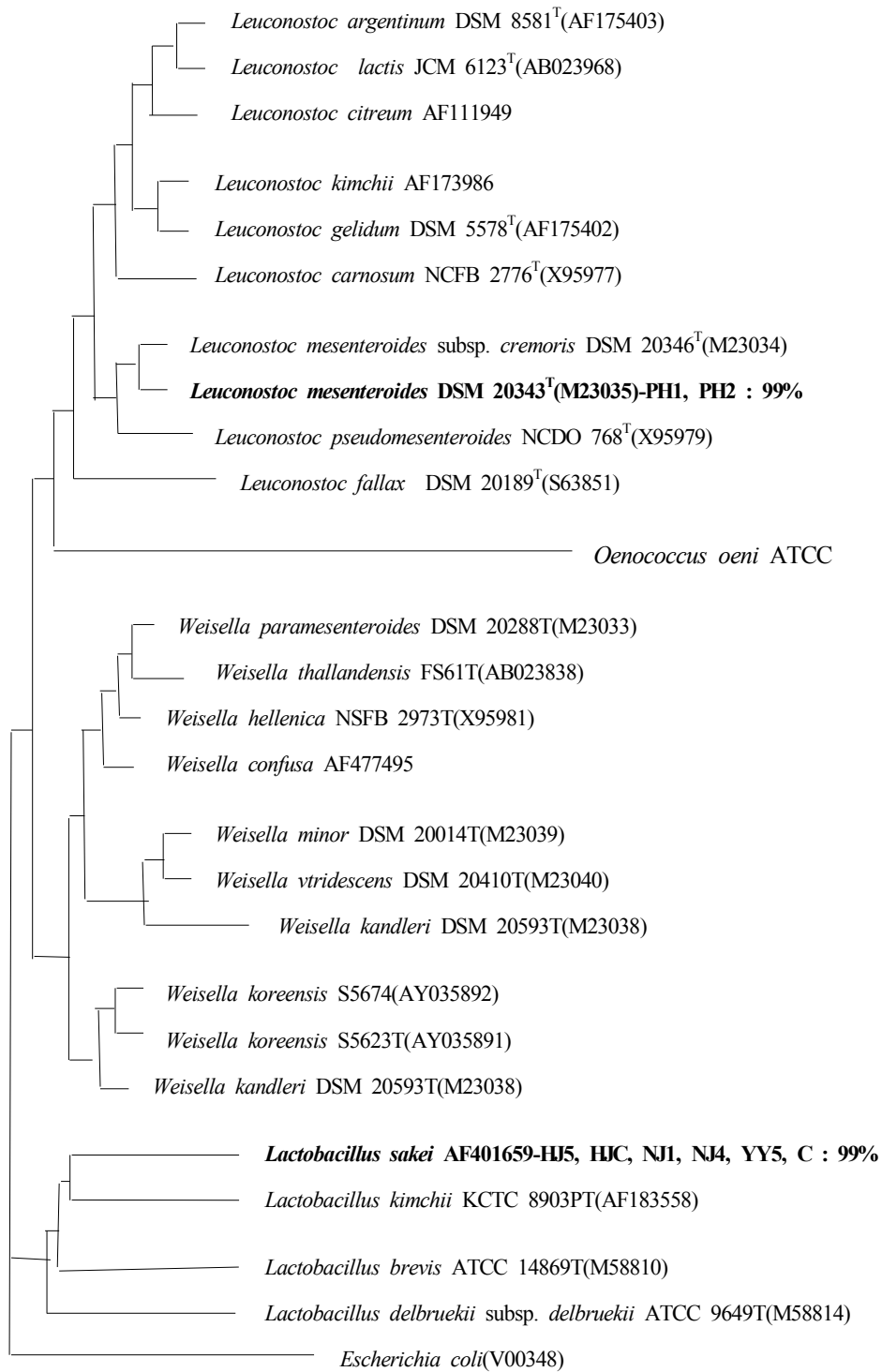
1) 분리 균주의 당 대사능

Biolog에 의해 분리된 8종의 유산균의 C-화합물 대사

능을 살펴보았다<Table 2>. 유산균은 유당을 대사할 수 있다고 알려져 있는데(Chang, 2005) 김치에서 분리 선발된 본 연구에서의 8종 유산균 중 *Leu. mesenteroides* PH2, *Lb. sakei* HJC, *Lb. sakei* NJ1, *Lb. sakei* NJ4 등 총 4종의 유산균은 유당대사능이 음성으로 나타났다. 이와 같은 현상은 유제품에서와 달리 김치에는 유당이 존재하지 않고, 이러한 김치 환경에서 오랜기간 생체 유지를 해온 김치유산균에서는 유당 대사능이 더 이상 필요치 않아 퇴화된 것으로 보인다. 유제품 기원 유산균의 유당 대사능 양성에 반하여 본 연구에서와 같은 김치 유산균의 유당 대사능 음성 결과는 타 연구자들에 의해서도 이미 보고된 바 있는 결과이다(Lee & Chang, 2016; Ryu & Chang, 2013).

2) 내염성

우리나라 김치의 표준 염도는 약 2-3 % 정도 이다. 하지만 남도 김치는 지역의 환경적인 영향으로 인해 표준 염도 보다 더 높은 염도의 김치가 만들어지고 있다. 개발되는 김치종균을 실제 김치에 적용할 경우 염도에 따라서 종균 작용이 변화할 수 있다. 본 연구에서는 분리된 김치 유산균의 내염성을 측정하고 각 분리된 종균의 적용 가능한 김치 염도를 조사하는 기초 자료로 사용하고자 한다. 분리된 8종의 균주는 모두 3 %까지 잘 생육하는 것으로 보아 내염성 균주이며 HJ5, HJC, NJ1, NJ4, YY5, C는 염도(NaCl) 5-7 %(w/v)까지 높은 균 생육을 나타내고 (A600 : 약 3.0) 있어 [Figure 2] 염도가 높은 김치에서도 충분히 활용 가능성이 높다고 볼 수 있다.



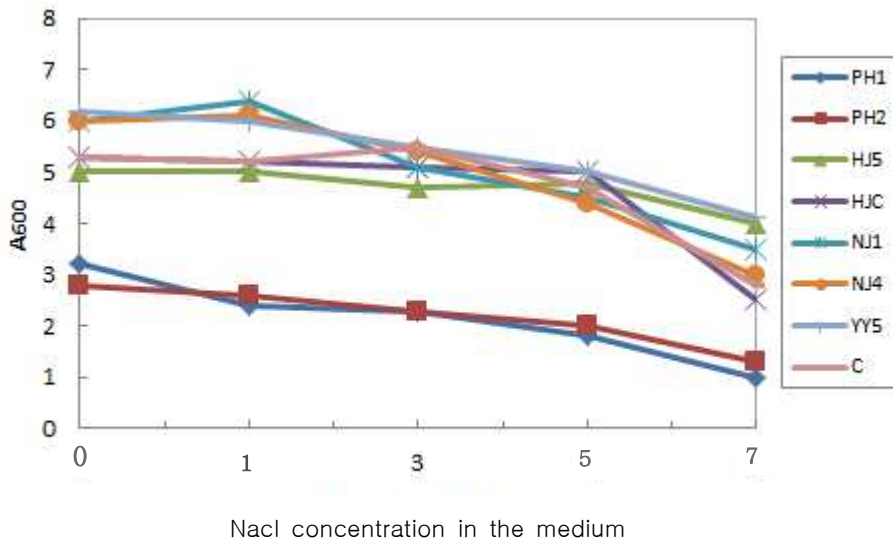
[Figure 1] Phylogenetic relationships between kimchi *Lactobacillus* and other related microorganisms

〈Table 2〉 Saccharometabolism of isolated strains

Characteristics	Strains	PH1	PH2	HJ5	HJC	NJ1	NJ4	YY5	C
Glycerol		-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol		-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose		-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose		+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose		+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose		+	+	-	-	-	-	-	-
L-Xylose		-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol		-	-	-	-	-	-	-	-
β-Methyl-xyloside		-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose		+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose		+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose		+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose		+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose		-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose		-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol		-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol		-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol		+	+	+	-	-	-	-	-
Sorbitol		-	-	+	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-mannoside		+	-	+	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-Glucoside		+	+	-	+	+	+	-	-
N-Acetyl glucosamine		+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutine		+	+	+	+	+	+	-	-
Amygdaline		+	+	+	+	+	+	-	+
Esculine		+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine		+	+	+	+	+	+	-	+
Cellobiose		+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose		+	+	+	-	-	-	-	-
Lactose		+	-	+	-	-	-	+	+
Melibiose		+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose		+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose		+	+	+	+	+	+	+	+
Inuline		-	-	+	-	-	-	-	-
Melezitose		-	-	+	-	-	-	-	-
D-Raffinose		+	+	+	-	-	-	-	-
Amidon		-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogene		-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol		-	-	-	-	-	-	-	-
β-Gentiobiose		+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lyxose		-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose		-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose		-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose		-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol		-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol		-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate		+	+	+	+	+	+	+	+
2 ceto-gluconate		+	+	-	-	-	-	-	-
5 ceto-gluconate		+	+	-	-	-	-	-	-
D-Turanose		+	+	-	-	-	-	-	-

+ : Positive activity

- : Negative activity

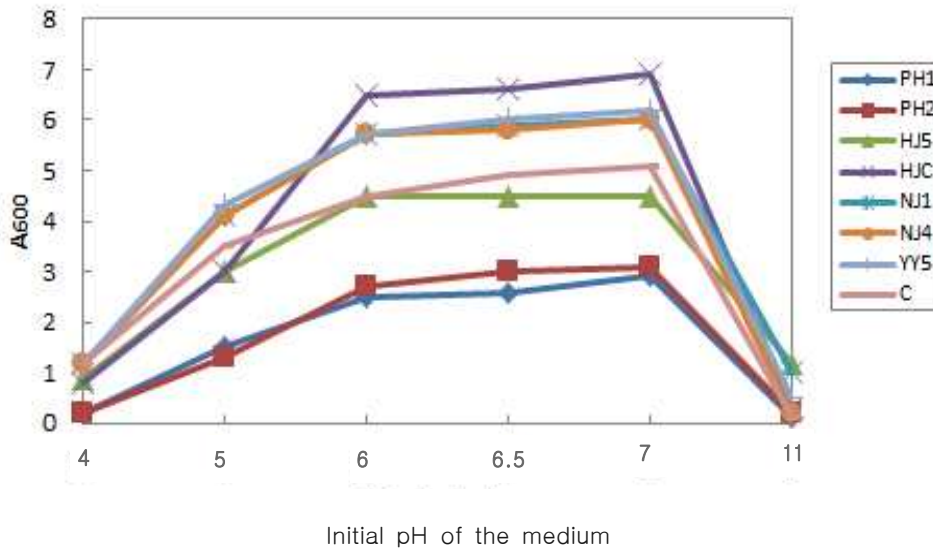


[Figure 2] Effects of NaCl concentration in the medium on the growth of isolates

3) 배지의 초기 pH

[Figure 3]과 같이 분리된 균주 8종 모두 pH 5.0부터 pH 7.0까지 생육을 잘하였고 최적 생육 pH는 7.0 부분에

서 가장 높게 나타나고 있으나 산성 영역인 pH 4.0과 알칼리 영역인 pH 11.0 부근에서는 증식이 매우 미약하였다.



[Figure 3] Effects of initial pH of the medium on the growth of isolates

3. 항균 Spectrum

Leu. mesenteroides PH1는 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212에 대해 항균활성이 나타나지 않았고, *Leu. mesenteroides* PH2는 *Streptococcus faecalis* ATCC 29212에 대해서만 항균활성을 나타내지 않았다. 이를 제외한 본 연구에서 사용된 모든 분리 균주 8종은 지시균주들에 대해, 항균활성을 나타내어 항균 spectrum이 넓은 것을 확인하였다. 즉 김치에서 분리·동정된 8종의 유산균 항균spectrum을 <Table 3>에 나타내었다. 분리된 균주 8종은 같은 유산균인 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus acidophilus* 뿐 아니라 분변의 오염 지표균인 *E. coli*, 패혈증을 일으키는

Pseudomonas, 식중독의 원인균인 *Listeria*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*속 등에서도 항균활성을 보여주고 있다.

4. 분리·동정 유산균이 생산하는 박테리옌

Table 3에서 항균활성을 나타내는 8종의 김치유산균들 중 그 항균원인 물질이 박테리옌인 경우를 조사하고자 하였다. 각각의 유산균 항균물질에 proteinase k를 처리하였을 때 8종의 유산균 항균물질 중 *Leu. mesenteroides* PH1, PH2와 *Lb. sakei* HJ5, HJC로 부티의 항균물질은 모두 항균활성이 실패 되었으나 나머지 4종의 항균물질의 활성은 그대로 유지되었다(data not shown). 이에 *Leu.*

<Table 3> Antimicrobial spectrum of *Lactobacillus* isolated from kimchi

Sensitive indicator \ Strains	PH1	PH2	HJ5	HJC	NJ1	NJ4	YY5	C
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3569	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 464	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus delbruekii</i> KFRI 347	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 1628	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFRI 218	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KFRI 150	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 236	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Positive antibacterial activity

- : Negative antibacterial activity

mesenteroides PH1, PH2와 *Lb. sakei* HJ5, HJC로 부터의 항균물질은 단백질성 물질인 박테리오신임을 알 수 있었다. 이에 *Leu. mesenteroides* PH1, PH2와 *Lb. sakei* HJ5, HJC로 부터의 박테리오신을 PH1, PH2, HJ5, HJC로 각각 명명하고 이의 여러 가지 처리(pH, 온도, 효소 등)에 대한 안정성 특성을 규명하였다.

5. 박테리오신의 안정성

1) 온도의 영향

Leu. mesenteroides PH2가 생산하는 박테리오신은 4-70℃에서 12시간 열처리 시 항균활성을 그대로 유지하고 있었지만 100℃에서 30분, 120℃에서 15분 열처리 시 항균활성이 실패 되었다. 하지만 *Leu. mesenteroides* PH1, *Lb. sakei* HJ5, *Lb. sakei* HJC가 생산하는 박테리오신은 120℃에서 15분간 열처리 시 항균활성을 그대로 유

지하고 있어 열에 매우 안정한 것으로 나타났다<Table 4>. 이와 같은 높은 열 안정성은 식품가공 처리 시 안정된 특성을 나타내므로 식품보존제로 활용 시 그 활용 가치가 높게 평가된다.

2) pH의 영향

Leu. mesenteroides PH1과 *Leu. mesenteroides* PH2가 생산하는 박테리오신은 산성영역인 pH 4.0-5.0과 알칼리 영역인 pH 11.0 구간을 제외하고 항균활성을 유지하고 있었고 *Lb. sakei* HJ5가 생산하는 박테리오신 pH 4.0과 pH 11.0 구간을 제외한 나머지 pH영역에서 항균활성을 유지하고 있었다<Table 4>. pH 안정성 시험에서 가장 넓은 pH 영역에서 그 항균활성을 유지하는 박테리오신 HJC의 경우 다른 3종의 박테리오신에 비해 산업적 활용 가치가 더 뛰어남을 알 수 있다.

<Table 4> Stability of bacteriocin

Classification	Bacteriocin			
	PH1	PH2	HJ5	HJC
A. Effects of temperature				
4℃, 12 h	+	+	+	+
37℃, 12 h	+	+	+	+
50℃, 12 h	+	+	+	+
70℃, 12 h	+	+	+	+
100℃, 30 min	+	-	+	+
120℃, 15 min	+	-	+	+
B. pH stability				
pH 4.0	-	-	-	+
pH 5.0	-	-	+	+
pH 6.0	+	-	+	+
pH 7.0	+	+	+	+
pH 11.0	-	-	-	-
C. Effects of enzyme				
untreated sector (control sector)	+	+	+	+
Trypsin	+	-	+	+
Protease	+	+	+	+
Lysozyme	+	+	+	-
Pepsin	-	-	+	+
α-amylase	+	+	?	-
Proteinase K	-	-	-	-
+ : Positive antibacterial activity				
- : Negative antibacterial activity				

3) 각종 효소의 영향

Leu. mesenteroides PH1이 생산하는 박테리오신은 pepsin과 proteinaseK에 *Leu. mesenteroides* PH2가 생산하는 박테리오신은 trypsin과 proteinase K에, *Lb. sakei* HJ5가 생산하는 박테리오신은 trypsin과 proteinase 및 proteinase K에 실험 되어 단백질성 물질임을 알 수 있었다. *Lb. sakei* HJC가 생산하는 박테리오신은 α-amylase와 proteinase K 그리고 lysozyme에 항균활성이 실험 되어서 당과 지질이 결합된 단백질성 물질임을 알 수 있었다.

본 연구 결과는 김치에서 분리·동정된 김치유산균 8종은 폭넓은 항균활성을 나타내어 김치발효에서 유용한 발효종균으로서의 활용 가능성을 나타낸다. 또한 이들이 생산하는 4종의 박테리오신 모두 천연식품 보존제로 식품 산업에서 활용 가능성을 시사하는 결과이다.

IV. 요약 및 결론

발효된 김치로부터 항균 활성이 있는 유산균 8종을 분리하였다. 분리된 균주들은 형태학적, 생화학적 특성 및 16S rDNA 염기서열을 통해 균주를 동정한 결과 *Leu. mesenteroides* PH1, *Leu. mesenteroides* PH2, *Lb. sakei* HJ5, *Lb. sakei* HJC, *Lb. sakei* NJ1, *Lb. sakei* NJ4, *Lb. sakei* YY5, *Lb. sakei* C로 명명하였다. 분리된 8종의 균주의 내염성 실험결과 8종 모두 염에 대한 안정성이 뛰어나 소금농도 3%까지 잘 생육하여 내염성 균주이며 특히 HJ5, HJC, NJ1, NJ4, YY5, C는 염도(NaCl) 5-7%(w/v)에서도 높은 균 생육을 나타내어(A600 : 약 3.0) 호염성균으로 보이고 있어 염도가 높은 전라도 김치에서도 충분히 활용 가능성이 높다고 볼 수 있다. 최적 생육 pH 실험결과 균주 8종 모두 pH 5.0부터 pH 7.0까지 생육을 잘하였고 최적 생육 pH는 7.0 부분에서 가장 높게 나타나고 있었지만 산성 영역(pH 4.0)과 알칼리 영역(pH 11.0)에서는 증식이 매우 미약하였다. 분리된 균주 8종은 같은 유산균주 뿐 아니라 분변의 오염 지표균, 폐혈증 원인균, 식중독 원인균등 에서도 항균활성을 보여주고 있어 폭 넓은 항균 스펙트럼을 보여주고 있다. 분리된 균주의 박테리오신 안정성 실험 결과 *Leu. mesenteroides* PH1, *Lb. sakei* HJ5, *Lb. sakei* HJC가 생산하는 박테리오신은 121°C에서 15분간 열처리 시 항균활성을 그대로 유지하고 있어 다른 균주에 비해 열에 매우 안정하였다. *Leu. mesenteroides* PH1과 *Leu. mesenteroides* PH2가 생

산하는 박테리오신은 산성역역인 pH 4.0-5.0과 알칼리역역인 pH 11.0에서 항균활성이 유지되었고, *Lb. sakei* HJ5가 생산하는 박테리오신은 pH 4.0과 pH 11.0 구간을 제외한 나머지 pH영역에서 항균활성을 유지하고 있었다. 각종 효소에 대한 안정성 실험 결과 *Leu. mesenteroides* PH1 생산 박테리오신은 pepsin과 proteinaseK에 *Leu. mesenteroides* PH2 생산 박테리오신은 trypsin과 proteinase K에, *Lb. sakei* HJ5가 생산하는 박테리오신은 trypsin과 proteinase 및 proteinase K에 항균활성이 실험 되어 단백질성 물질임을 시사하였고 *Lb. sakei* HJC 생산 박테리오신은 α-amylase와 proteinase K 그리고 lysozyme에 항균활성이 실험 되어서 당과 지질이 붙은 단백질성 물질임을 알 수 있었다. 본 실험에서 분리한 김치 유산균들은 폭넓은 항균 활성을 보여주고 있으며 유산균이 생산해 내는 박테리오신은 박테리오신을 생산하는 균주와 유사한 종 또는 영양적인 요구물질이 비슷한 미생물에 생육저해 효과를 가진다는 연구결과와 일치하고 있다 (Chang, 2005). 이런 결과를 토대로 분리된 8종의 김치유산균은 자연 유래의 강력한 천연 식품보존제와 사료보존제 등으로 활용 가능성이 높다고 생각된다.

주제어 : 김치유산균, 박테리오신, 항균활성,
Leuconostoc mesenteroides,
Lactobacillus. sakei

REFERENCES

Bamby-Smith, F. M., Roller, S. D., Wood, L. F., Barker, M., Nightingale, M. & Gibbs, P. A. (1989). Production of antimicrobial compounds by lactic acid bacteria. The British Food Manufacturing Industrie Research Association. Research Reports No. 662. Leatherhead Food RA.
Chang, I.S., Kim, B. H., & Shin, P. K. (1997). Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 1-6
Chang, J. Y. (2005). Characterization of bacteriocin GJ7 from *Leuconostoc citreum* GJ7 and the inducing factor that influence the bacteriocin production

- and its application to the Kimchi fermentations. Unpublished doctoral dissertation, Chosun University, Gwangju, Korea.
- Collins, E. B. & Aramaki, K. (1980). Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of dairy science*, 63(3), 353-357.
- Delves-Broughton, J. (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, 44(11), 100-117.
- Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), 525-532.
- Kang, S. M., Yang, W. S., Kim, Y. C., Joung, E. Y., & Han, Y. G. (1995). Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for Kimchi fermentation and effect of starter. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 23(4), 461-471.
- Kim, S. I., Kim, I. C., & Chang, H. C. (1999). Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 28(3), 526-553.
- Klaenhammer, T. R (1988). Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349.
- Lee, C. W., Ko, C. Y., & Ha, D. M. (1992). Microfloral of the lactic acid bacteria during *Kimchi* fermentation and identification of the isolates. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1),102-109.
- Lee, S. H. & Chang, H. C. (2016). Isolation of Antifungal Activity of *Leuconostoc mesenteroides* TA from Kimchi and Characterization of Its Antifungal Compounds. *Food Science and Biotechnology*, 25(1),213-219.
- Lee, Y. & Chang, H. C. (2008). Isolation and characterization of Kimchi Lactic acid bacteria showing anti-*Helicobacter pylori* activity. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 106-114.
- Lingren, S. E., Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 87(1-2), 149-164.
- Piard, J. C., Desmazeud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria, 2. Bacteriocin and other antibacterial substances, *Le lait*, 72, 113-142.
- Ryu, E. H. & Chang, H. C. (2013). In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. *Annals of Microbiology*, 63(4), 1387-1395.
- So, M. H. & Kim, Y. B. (1995). Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 27(4), 495-505.
- Stiles, M. E., Hastings, J. W. (1991). Bacteriocin producing by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Science and Technology*, 2, 247-251.
- Tagg, J. R. & Mcgiven, A. R. (1971). Assay system for bacteriocin. *Applied Microbiology*, 21, 943.
- Tramer, J., Foeler, G. G. (1964). Estimation of nisin in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15(8),522-528.
- Yang, E. J., Chang, J. Y., Lee, H. J., Kim, J. H., Chung, D. K., Lee, J. H., & Chang, H. C. (2002). Characterization of the antagonistic activity against *Lactobacillus plantarum* and induction of bacteriocin production. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 34(2), 311-318.
- Yang, E. J. & Chang, H. C. (2008). Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(4), 276-284.

Received 23 August 2017;

1st Revised 14 September 2017;

Accepted 11 October 2017