



김치에서 분리한 유산균의 항균 활성 연구

박선영[†] · 장자영^{1†} · 이종희 · 박해웅 · 최학종¹ · 김태운*

세계김치연구소 미생물발효연구단, ¹세계김치연구소 대사기능성연구단

Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi

Sun-Young Park[†], Ja Young Jang^{1†}, Jong-Hee Lee, Hae Woong Park, Hak-Jong Choi¹, and Tae-Woon Kim*

Microbiology and Fermentation Research Group, World Institute of Kimchi, Gwangju 503-360, Korea

¹Metabolism and Functionality Research Group, World Institute of Kimchi, Gwangju 503-360, Korea

Abstract: A survey was conducted on the isolation of lactic acid bacteria with antibacterial activity. Total 500 lactic acid bacteria were isolated from kimchi and their antibacterial activity was tested against bacteria associated with acidification and hygiene of kimchi, including *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, and *Escherichia coli* using a deferred method. Among them, 15 lactic acid bacteria isolated from kimchi showed antibacterial activity against two or more indicator strains, and they were identified using a 16S rDNA sequence analysis. As a result, seven *Lactobacillus sakei*, four *Lactobacillus plantarum*, one *Lactobacillus paraplantarum*, two *Lactobacillus brevis*, and one *Leuconostoc citreum* were identified. These results suggest that those might be used to improve kimchi quality as a potential starter.

Keywords: kimchi, lactic acid bacteria, antibacterial activity

서 론

유산균은 채소발효식품 및 유제품의 주된 미생물로 저장 작용, 면역 조절, 항암 및 항돌연변이 효과, 콜레스테롤 저하, 항알러지 효과, 유당불내증 완화 등의 효과가 있는 것으로 알려지면서 유산균의 활용 및 산업화에 대한 인식이 재평가되고 있다(Klaver and vander Meer, 1993; Lim *et al.*, 2011; Ko *et al.*, 2013). 김치는 배추나 무, 기타 채소의 주 재료에 소금, 고춧가루, 젓갈, 마늘, 생강 등의 각종 양념을 혼합하여 일정기간 발효시킨 한국의 대표적인 전통식품으로, 발효초기에는 *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* 등의 호기성 미생물이 발견되고, 적숙기 이후에는 *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei* 등의 젖산균이 번식하여 과도한 신맛을 주게 되며, 발효 말기에는 산막효모가 생장하여 연부작용에 관

여한다. 김치의 상업적 생산이 본격화되면서 김치 품질 균일화나 품질유지기한 연장과 관련하여 미생물의 발효 패턴을 조절하여 가식기간을 연장시키려는 연구가 계속되고 있다(Lee and Lee, 2011). 이미 방사선 조사, 고압처리 등과 같은 물리적 처리 또는 에탄올과 같은 화학적 처리를 통한 미생물 제어에 관한 연구는 많이 진행된 바 있으나(Byun *et al.*, 1989; Lee and Byun, 2007; Kim and Hahn, 2003), 식품공전에 제시된 김치 규격에 따르면 식품보존료의 인위적 사용이 허용되지 않으며, 채소를 주·부재료로 쓰는 김치의 경우 품질 저하와 영양 손실의 가능성이 크므로 이를 적용하는데 있어 어려움이 있다. 이러한 이유로 종균을 이용하여 김치 발효를 제어하려는 연구가 다수 진행되었으나, 상품 김치 생산과 관련된 가식기간 연장은 아직 완전히 해결되지 못하고 있는 실정이다(So *et al.*, 1996; Cho and Rhee, 1991). 이는 16S rDNA 염기서열을 이용한 계통학적 분류 등을 통해 김치에 존재하는 다양한 미생물상이 밝혀지고 있음에도 불구하고 *Lb. plantarum*의 생육 저해 균주 개발에만 의존해온 부분도 있다(Yang *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2004; Cha and Ha, 1996). 따라서 본 연구에서는 김치의 과도한 산생성과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되는 *P. pentosaceus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*과 원·부재료부터 유래되는 대장균군의 저감화를 목표로 *Escherichia coli*의 생육을 저해하는 김치 유래 유산균을 탐색하고 분리·

*Corresponding author: Tae-Woon Kim, Microbiology and Fermentation Research Group, World Institute of Kimchi, Gwangju 503-360, Korea.

[†]These authors contributed equally to this work.

Tel: 82-62-610-1723, Fax: 82-62-610-1853

E-mail: korkimchiman@wikim.re.kr

Received December 11, 2013; Revised January 4, 2014;

Accepted January 9, 2014

동정하여 김치의 품질유지기한 연장 및 위생성 향상에 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

유산균의 분리

시료는 전국 각 도별 소매업체로부터 총 10종의 배추김치를 수집하여 유산균 분리실험에 사용하였다. 시료를 0.85% NaCl에 현탁하여 순차적으로 희석한 뒤 MRS-BPB 고체배지(BD Difco, Sparks, MD, USA)에 도말하고 30°C에서 3일간 배양하여 colony를 분리하였으며, 분리된 colony는 MRS broth에 순수배양한 후 -80°C에서 보관하면서 실험에 이용하였다.

항균활성 시험

항균활성 시험은 deferred method(Ahn and Stiles, 1990)를 이용하여 김치 과숙 관련 지시균주 및 대장균에 대하여 분리 균주들의 생육저해활성을 확인하였다. 분리된 500여개의 균주의 항균활성을 측정하기 위해 김치 과숙 관련 지시균주로 김치에서 분리된 *P. pentosaceus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, 대장균군 지시균주로 *E. coli* DH5 α 를 사용하였으며, 김치로부터 분리된 균주들은 MRS agar plate 표면에 접종하여 30°C에서 15시간 동안 전배양하고, 지시균주 배양액 100 μ L를 0.7%(v/v) soft MRS agar에 접종하여 전배양한 plate에 overlay하여 30°C에서 24시간 배양한 후, 지시균주들의 생육저해 정도를 확인하였다.

Genomic DNA 추출 및 16S rDNA 염기서열 분석

항균활성이 우수하여 선발된 15균주는 MRS broth에 배양시킨 후 genomic DNA extraction kit(iNtRON Biotechnology, Daejeon, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 1% agarose gel을 이용하여 확인하였다.

16S rRNA gene을 증폭하기 위하여 추출된 genomic DNA를 template로 하여 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', forward), 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3', reverse) primer를 이용하여 PCR을 진행하였다(Moon *et al.*, 2004). PCR조건은 95°C에서 1분간 denaturation, 45°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension으로 30

cycle을 수행하였다. 얻어진 PCR product는 sequencing을 위하여 purification Kit(iNtRON Biotechnology, Daejeon, Korea)를 이용하여 정제하였다. DNA 염기서열은 ABI PRISM 3700 DNA analyzer(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였으며, 이것을 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)를 이용하여 분리균주를 동정하였다(Altschul *et al.*, 1997).

결과 및 고찰

김치로부터 유산균의 분리

김치의 과숙에 관여하는 지시균주 및 대장균에 대한 항균활성을 가지는 유산균을 선발하기 위하여 전국 6개도(경기, 강원, 전라, 경상, 충청, 제주)에서 배추김치 10종을 수집한 후, MRS-BPB 고체배지를 이용하여 약 500균주를 분리하였다. 이들 균주의 지시균주들에 대한 항균활성을 확인하였다.

지시균주에 대한 항균활성을 가지는 균주 선발

전국 6개도의 배추김치 10종으로부터 분리한 500여개의 균주를 대상으로 김치 과숙에 관여하는 균주로 생각되는 *P. pentosaceus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*과 김치위생 관련 균주인 *E. coli*에 대하여 항균활성을 확인한 결과, 뚜렷한 생육저지환을 나타낸 균주들의 일부 결과를 Fig. 1에 나타내었고 최종적으로 15균주를 선발하였다(Table 1). 그 중 2-7 30균주가 타 균주들에 비해 김치 과숙 균주 및 대장균에 대해 보다 넓은 항균활성 범위를 나타내었다.

선발된 항균활성 우수 균주 동정

김치 과숙 균주 및 대장균에 대해 생육저지환을 나타낸 15균주를 최종적으로 선발하여 동정을 수행하였다(Table 2). 16S rDNA sequencing을 통해 동정한 결과, 1-3 63, 2-7 28, 2-7 29, 2-7 30, 2-7 60, 2-8 10, 2-12 24는 *Lb. sakei*, 2-12 5, 2-12 32, 2-12 41, 2-12 53은 *Lb. plantarum*, 2-12 44와 2-8 59는 *Lb. brevis*, 2-12 54은 *Lb. paraplantarum*으로 동정되어 15균주 중 14종이 *Lactobacillus* 속으로 나타났으며, 2-8 72는 *Leu. citreum* 으로 동정되었다. Kim 등(2004)과 Park

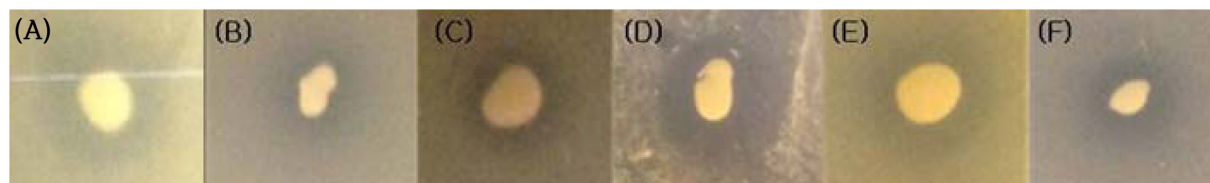


Fig. 1. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi using deferred method. Strain isolated from kimchi<Indicator strain>: (A)2-7 30<*P. pentosaceus*>, (B)2-7 28<*P. pentosaceus*>, (C)2-8 59<*Lb. sakei* 153>, (D)2-12 54<*E. coli*>, (E)2-12 32<*Lb. sakei* 153>, (F)2-12 5<*P. pentosaceus*>.

Table 1. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi

Strains	Indicator strain				
	<i>Lb. sakei</i> 153	<i>Lb. sakei</i> 154	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>E. coli</i>
1-3 63	+ ¹⁾	+	+	+	+
2-7 28	+	+	+	+	+
2-7 29	+	+	-	-	++
2-7 30	+	++	++	++	+
2-7 60	+	++	-	+	++
2-8 10	+	++	+	-	+
2-8 59	+	+	-	-	-
2-8 72	+	+	-	(+)	-
2-12 5	++	+	++	++	-
2-12 24	+	+	+	+	(+)
2-12 32	+	-	++	-	-
2-12 41	+	++	-	++	-
2-12 44	+	+	+	(+)	-
2-12 53	+	-	++	-	-
2-12 54	+	-	-	-	++

¹⁾Degree of clarity of clear zone by growth inhibition : ++; strong inhibition, +; weak inhibition, -; negative inhibition.

Table 2. Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi by 16S rDNA sequencing

Strain No.	Identification
1-3 63	<i>Lactobacillus sakei</i>
2-7 28	<i>Lactobacillus sakei</i>
2-7 29	<i>Lactobacillus sakei</i>
2-7 30	<i>Lactobacillus sakei</i>
2-7 60	<i>Lactobacillus sakei</i>
2-8 10	<i>Lactobacillus sakei</i>
2-8 59	<i>Lactobacillus brevis</i>
2-8 72	<i>Leuconostoc citreum</i>
2-12 5	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2-12 24	<i>Lactobacillus sakei</i>
2-12 32	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2-12 41	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2-12 44	<i>Lactobacillus brevis</i>
2-12 53	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2-12 54	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>

등(2012)은 김치로부터 분리한 유산균의 항균활성을 보고하고 이들 균주들이 분비하는 bactericin의 특성을 분석하는 등 김치유래 유산균들의 항균활성에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 특히, 안 등(2012)의 연구에서 분리한 *Lb. sakei*의 경우 그람양성균 뿐만 아니라 그람 음성균까지도 저해하여 넓은 저해범위를 지닌다고 하였는데 본 연구에서 분리된 몇몇 균주들도 *E. coli* 저해능이 있는 것으로 나타났다.

그러나, 김치 산패관련 균주들 및 대장균군에 대해 뚜렷한 항균활성을 지닌 균주를 선발하고 이를 산업화에 적용한 예는 아직 미비한 실정이다.

전통장, 전통주 등 식품 산업에 있어서 박테리옌 생산균을 분리하고 이를 조사하는 연구(Jung *et al.*, 2009; Baek *et al.*, 2012)가 다양하게 진행되었다. 김치의 경우에도 박

테리옌에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있는데 이는 원재료로부터 *E. coli* 등 대장균군의 유입이나 과도한 발효로 인한 산패균의 생육으로 품질이 저하되는 것을 막을 수 있을 것으로 평가되기 때문이다. 상품 김치에 대한 수요가 증가하고 품질유지기한의 연장이 요구됨에 따라 김치제조 산업에서는 이러한 문제점을 해결하기 위한 일환으로 박테리옌을 생산하는 유산균 스타터의 개발이 필요하게 되었다.

본 실험에서 선발된 균주 중 일부는 김치의 산패를 일으키는 균주 및 *E. coli*를 효과적으로 저해하여 김치의 과숙을 억제하는 효과와 동시에 김치의 안전성을 향상시켜 줄 것으로 기대되었다. 향후 이들 균주들이 생산하는 항균물질의 특성을 알아보기 위하여 항균물질의 정제 및 온도, pH, 효소 처리에 따른 항균물질의 안정성을 확인하는 실험이 요구된다(Jeong *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). 또한, 선발된 균주에 대하여 김치 종균으로써 갖추어야 할 조건 및 특성을 검토하여 김치 적용 실험을 진행하고자 한다.

요 약

김치 과숙에 관여하는 균주와 대장균의 성장을 억제하는 항균활성을 지닌 균주를 김치로부터 선발하고자 하였다. 전국 6개도의 배추김치 10종으로부터 분리한 500여개의 균주를 대상으로 김치의 과도한 산생성에 관여할 것으로 예상되는 *P. pentosaceus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*과 원·부재료로부터 초기에 유입되는 대장균군의 저감화를 위하여 *E. coli*에 대한 항균활성을 살펴본 결과, 2-7 30 균주가 모든 지시균주에 대해 뚜렷한 생육저지환을 나타내었다. 지시균주들에 대해 일부 항균활성을 나타낸 15균주를 최종적으로 선발하여 동정한 결과, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. paraplantarum*, *Leu. citreum*으로 각각 동정되었다.

감사의 글

본 논문은 세계김치연구소 주요사업과제(KE1301-4)의 지원에 의해 이루어진 결과의 일부입니다.

참고문헌

- Klaver F and vander Meer R (1993) The assumed assimilation of cholesterol *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-conjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1120-1124.
- Lim JH, Seo BJ, Kim JE, Chae CS, Lim SH, Hahn YS, and Park YH (2011) Characteristics of immunomodulation by a *Lactobacillus sakei* proBio65 isolated from Kimchi. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 313-316.
- Ko KH, Liu W, Lee HH, Yin J, and Kim C (2013) Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in different kimchi. *J. Food Sci. Nutr.* **42**, 89-95.
- Lee CW, Ko CY, and Ha DM (1992) Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 102-109.
- Lee KH and Lee JH (2011) Isolation of *Leuconostoc* and *Weissella* species inhibiting the growth of *Lactobacillus sakei* from kimchi. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 175-181.
- Byun MW, Cha BS, Kwon JH, Cho HO, and Kim WJ (1989) The combined effect of heat treatment and irradiation on the inactivation of major lactic acid bacteria associated with kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**, 185-191.
- Lee KH and Byun MW (2007) Quality changes of kimchi manufactured with sanitized materials by ozone and gamma irradiation during storage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 216-221.
- Kim DH and Hahn YS (2003) Effect of addition of ethanol and organic acids on the quality of mul-kimchi. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* **13**, 305-312.
- So MH, Shin MY, and Kim YB (1996) Effects of psychrotrophic lactic acid bacterial starter on kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 806-813.
- Cho Y and Rhee HS (1991) Effect of lactic acid bacteria and temperature on kimchi fermentation (II). *Korean J. Soc. Food Sci.* **7**, 89-95.
- Yang EJ, Chang JY, Lee HJ, Kim JH, Chung DK, Lee JH, and Chang HC (2002) Characterization of the antagonistic activity against *Lactobacillus plantarum* and induction of bacteriocin production. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 311-318.
- Moon GS, Kang CH, Pyun YR, and Kim WJ (2004) Isolation, identification, and characterization of a bacteriocin-producing *Enterococcus* sp. from kimchi and its application to kimchi fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 924-931.
- Cha DS and Ha DM (1996) Isolation of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* DU-0608 with antibacterial activity from kimchi and characterization of its bacteriocin. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 270-277.
- Ahn C and Stiles ME (1990) Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2503-2510.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Burdock GA and Carabin IG (2004) Generally recognized as safe (GRAS): history and description. *Toxicol. Lett.* **150**, 3-18.
- Tagg JR, Dajani AS, and Wannarnaker LW (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **40**, 722-756.
- Cho YR, Chang JY, and Chang HC (2007) Production of -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 104-109.
- Kim HT, Park JY, Lee GG, and Kim JH (2004) Isolation of a bacteriocin - producing *Lactobacillus sakei* strain from kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 560-565.
- Park JH, Oh DH, and Chung HY (2012) Antimicrobial activity of *Lactobacillus sakei* J4 isolated from Korean dongchimi and its probiotic properties. *J. Food Eng. Prog.* **16**, 122-128.
- Ahn JE, Kim JK, Lee HR, Eom HJ, and Han NS (2012) Isolation and characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* B16 from kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 721-726.
- Jung SU, Choi JI, Joo WH, Suh HH, Na AS, and Cho YK (2009) Characterization and purification of the bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* isolated from soybean sauce. *J. Life Sci.* **19**, 994-1002.
- Baek H, Choi MS, and Oh KH (2012) Characterization and antibacterial activity of *Lactobacillus casei* HK-9 isolated from Korean rice wine, Makgeolli. *J. Biotech. Bioeng.* **27**, 161-166.
- Jeong SY, Park CS, Choi NS, Yang HJ, Kim CY, Yoon BD, Kang DO, Ryu YW, and Kim MS (2011) Characteristics of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ET45 isolated from kimchi. *J. Microbiol.* **47**, 74-80.
- Lee JW, Han SM, Yun BH, and Oh SJ (2011) Characteristics and partial purification of a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* JNU 534. *J. Food Sci.* **31**, 952-959.