

동치미로부터 분리한 *Lactobacillus sakei* J4의 항균활성 및 생균제로서 특성

박중현¹ · 오덕환¹ · 정하열*

¹강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학전공, 한경대학교 식품생물공학과 및 식품생물산업연구소

Antimicrobial Activity of *Lactobacillus sakei* J4 Isolated from Korean *Dongchimi* and Its Probiotic Properties

Joong-Hyun Park¹, Deog-Hwan Oh¹, and Ha-Yull Chung*

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University Department of Food Science
and Biotechnology, Hankyong National University and Food and Biotechnology Research Center

Abstract

Various lactic acid bacteria were isolated from Korean *Dongchimi* (whole radish Kimchi with added water) in order to study their antimicrobial activity, optimal culture conditions and probiotics. Among the eight isolated strains, J4 showed the highest inhibitory effect on pathogens (*Bacillus cereus* KCTC 3624, *Listeria monocytogenes* KCTC 13064, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* KCTC 3881, *Escherichia coli* KCTC 2441, *Salmonella enterica subsp. enterica* KCTC 2514, *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2729). It was identified as *Lactobacillus sakei* based on its morphological and 16S rRNA gene sequence, and designated as *L. sakei* J4. The optimal pH of the medium, culture temperature and shaking speed for the antimicrobial substance (s) production were pH 8.5, 30°C and 0 rpm, respectively. *L. sakei* J4 had 24.3% of survival after 2 hr incubation in the artificial gastric juice, 25.8% of survival after 24 h incubation in the presence of 0.3% oxgall and 101.2% of survival after 24 hr incubation in the 0.5% pancreatic juice. These results suggest that *Lactobacillus sakei* J4 may be commercially used for the probiotic culture.

Key words: probiotics, *Lactobacillus sakei*, antimicrobial, *Dongchimi*, lactic acid bacteria

서 론

김치는 사용하는 재료와 제조 방법 등에 따라 그 종류가 매우 다양한데 김치 무리는 크게 일반 김치류, 깍두기류, 동치미류, 절임류 및 식혜류 등 다섯 가지로 구분한다. 동치미는 우리나라 겨울철에 많이 섭취하는 김치 무리 중 하나로 무를 원료로 하여 적당한 농도의 소금물에 무와 약간의 부재료를 첨가하여 발효시킨 식품으로서 무 자체의 독특한 향미와 양념 첨가로 인한 감칠맛, 짠맛과 발효 시 유산균에 의해 생성된 젖산, 유기산 및 이산화탄소 등이 국물에 함유되어 있어 상쾌한 탄산미가 있어 음료의 역할을 하며, 비타민과 무기질이 비교적 많이 함유되어 있어 미량 영양소의 공급원이 되고 체액의 산도 평형을 조절하기 때

문에 건강식품으로서의 가치를 지닌다(Noh et al., 2008).

유산균(LAB; Lactic acid bacteria)은 비병원성으로 Gram 양성, catalase 음성, 비포자 형성균으로서, 탄수화물을 이용하여 젖산 또는 초산을 생성하는 것이 특징이며, 사람이나 포유동물의 소화관 구강, 여성의 생식기, 각종 발효식품과 토양 등 자연계에 널리 분포되어 있다(Chon et al., 2008). 또한 각종 발효식품의 제조에 수백 년간 이용되어 왔으나 독성이 알려지지 않은 일반적으로 안전한 미생물(GRAS; generally regarded as safe)로 인간이나 동물의 장관에 상존하여 식중독 세균이 소화관 상피에 부착하는 것을 방해하여 식중독 발생을 막아주고, 유산균에 의해 생성된 발효생성물인 유기산, 알콜, 과산화수소, diacetyl 및 bacteriocin 등은 각종 질병을 예방·억제하거나 병원성 미생물과 장내 유해균을 죽이거나 증식을 억제하여 건강유지에 큰 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Casla et al., 1996; Lee & Baek, 2001; Guarner & Malagelada, 2003). 이와 같이 유산균 발효를 이용하여 제조된 제품은 원료 자체의 영양적 효과와 발효생성물로 인한 효과가 복합적으로 이루어져 사람이나 가축의 건강증진에 기여하여 최근

*Corresponding author: Ha-Yull Chung, Department of Food Science & Biotechnology, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi 456-749, Korea
Tel: +82-31-670-5156; Fax: +82-31-677-0990
E-mail: chy@hknu.ac.kr
Received March 13, 2012; revised May 18, 2012; accepted May 18, 2012

probiotics로 널리 이용되고 있다(Klaenhammer, 1988; Jack et al., 1995).

Probiotics란 충분한 수의 미생물을 섭취 시 장내 미생물 균형을 개선시키거나 면역계를 활성화시켜 고유의 기본 영양을 넘는 건강효과를 발휘하는 살아있는 미생물 식품 보충제라고 정의 할 수 있다(Geamer & Schaafsma, 1998; Fuller, 1989). Probiotics의 효과를 기대하기 위해서는 먼저 위의 산성에서 소장의 중성 또는 염기성까지의 pH 변화, 담낭 및 췌장 분비액의 존재, 활성적인 점막면역반응 등에 대한 내성이 있어야 하며(Dunne, 2001), 생리학적, 화학적으로 한정되는 장내 환경에서 일시적으로 지속되는 상당한 수의 미생물 섭취를 필요로 한다. Probiotics 균주는 첫째, 사람에게 얼마나 좋은 영향을 미치는지, 둘째, 제품의 전체 shelf-life 중 얼마나 많은 균이 살아남는지, 셋째, 장관을 통과할 때 얼마나 살아남는지, 장내 상피세포에 얼마나 응집하여 체내에 남아있는지, 넷째, 다른 병원성 미생물들에 대해 얼마나 많은 항균물질을 생산하는지, 다섯째, 장내 미생물군을 건강한 상태로 안정화 시킬 수 있는지 등을 검토하여 선발하여야 한다(Gilliland, 1990; Macfarlane & Cummings, 2002). Probiotics는 체내에서 일어나는 생체조절과 관련된 유당 분해(Sanders, 2000), 결장암의 예방(Brady et al., 2000; Wollowski et al., 2001), 혈중 콜레스테롤 수치 감소, 혈압의 감하(Sanders, 2000), 면역기능증진(Ouwehand & Salminen, 2002), 헬리코박터 파이로리균의 증식억제 및 사멸(Hamilton-Miller, 2003), 항암·항염증작용(Braat et al., 2004), 미네랄 흡수력 증진(Famularo et al., 2005), 장내 유해균 성장 억제(Miranda, 2006), 비노생식기 질환의 억제(Reid, 2001; Famularo et al., 2001) 등 많은 기작과 연관되어 있다. 섭취된 probiotics가 숙주를 이롭게 하는 기작에 대한 연구와 유산균이 분비하는 항생물질을 이용한 천연 항생제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 이러한 유산균주의 선발과 선발균주를 이용한 생균제에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 probiotics 균주 선발을 위해 전통 발효식품인 동치미로부터 식중독균에 대해 높은 항균활성을 보이는 유산균을 분리동정하여 배양조건을 확립하고, 위산, 담즙산, 췌장액에 대한 저항성 실험을 통해 probiotics로서의 가능성을 탐색하여 보았다.

재료 및 방법

재료 및 사용균주

본 실험에 사용된 김치는 2009년 11월 안성 재래시장과 대형할인점에서 포기김치, 총각김치, 열무김치, 동치미를 구매하여 균주 분리용 시료로 사용하였다. 항균성물질을 생산하는 균주를 분리하기 위해 무균적으로 김치(무) 20 g

과 김치국물 5 g을 취하여 멸균 생리식염수(0.85% NaCl) 225 mL을 가한 후 Bagmixer(Bagmixer 400 W, Interscience, Saint-Nom-la-Breteche, France)로 1분간 균질화한 것을 단계 희석하여 2% CaCO₃를 첨가한 Lactobacilli MRS agar (Yang & Chang, 2008)에 0.1 mL 도말하여 35°C에서 호기 배양하여 투명환을 나타내는 균주를 1 차선별 하였다. 1 차선별 균주를 MRS agar에 direct method(Kim et al., 1999)를 실시하여 항균성물질 분비능이 우수한 균주를 2 차선별 하였다. 2 차선별 균주를 LB soft agar(0.75% agar)에 disc diffusion method(Bhunia et al., 1988)로 감수성균주에 대해 강한 항균력을 나타내는 균주를 최종 선별하였다. 최종선별한 균주를 증균배양 후 원심분리하여 얻은 균체에 멸균된 배지 75%(v/v), glycerol 25%(v/v)를 섞어 1.5 mL microtube에 100 µL씩 분주하여 액체질소에 급속동결시킨 후 -86°C deep freezer에 보관하여 사용하였다. 감수성균주는 그람양성균으로 *Bacillus cereus* KCTC 3624, *Listeria monocytogenes* KCTC 13064, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* KCTC 3881을 사용하였고, 그람음성균으로 *Escherichia coli* KCTC 2441, *Salmonella enterica subsp. enterica* KCTC 2514, *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2729를 사용하였다. *B. cereus* KCTC 3624균주는 LB배지에서 30°C에서 호기배양하여 사용하였고, *V. parahaemolyticus* KCTC 2729균주는 3% NaCl을 첨가한 NB배지에 25°C에서 호기배양하여 사용하였다. 나머지 다른 균주는 LB배지에서 37°C에서 호기배양하여 사용하였다. 감수성균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea)에서 분양 받아 증균배양 후 -86°C에서 stock하여 사용하였다.

분리 균주의 항균 스펙트럼

-86°C에서 보관한 최종선별 균주를 10 mL MRS broth에 접종하여 30°C에서 24시간, 2 회 계대 배양하여 균의 활성을 높인 배양액을 100 mL MRS broth에 3%(v/v) 접종하여 배양 후, 원심분리(3,000 rpm, 30 분, 4°C)하여 균체는 제거하고, 상징액은 회수하여 이를 조항균물질로 사용하였다. 조항균물질로 감수성균주에 대해 disc diffusion method(Bhunia et al., 1988)로 항균 스펙트럼을 조사하였다. 감수성균주 20 µL와 15 mL의 LB soft agar(0.75% agar)를 혼합하여 조심스럽게 petri dish에 붓고 실온에서 정치시켜 배지를 균한 후 핀셋을 이용하여 paper disc(diameter 8 mm, advantec, Tokyo, Japan)를 배지에 얹은 후, 조항균물질을 60 µL씩 paper disc에 떨어뜨렸다. 30°C, 24시간 동안 배양하면서 paper disc 주위에 감수성 균주에 대한 생육저해환(clear zone)의 생성유무를 관찰하여 Burnier calipers(530-101, Mitutoyo, Kawasaki, Japan)로 생육저해환의 크기(mm)를 측정하였다.

분리 균주의 형태학적 특성 및 동정

항균성물질 생산균주의 형태학적 특성은 Gram-staining을 하여 광학현미경(BX50, Olympus, Tokyo, Japan)으로 1,500 배율에서 검경, 주사전자현미경(SEM; S-3500N, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 15 KV, 10,000 배율에서 관찰하였다. 화학적 고정에는 배양액을 원심분리(5,000 rpm, 30 분)한 후 상정액을 제거, 10 mL 멸균 생리식염수(0.85% NaCl)를 첨가하여 현탁 후 원심분리하여 균체를 회수하는 작업을 3 회 반복하여 균체를 세척하였다. 회수한 균체에 50 mM phosphate buffer 10 mL을 첨가하여 회석 후 0.45 µm membrane filter를 filter holder에 장착, filtration하여 균체를 filter에 부착시켰다. 부착된 균체를 고정시키기 위해 5% glutaldehyde 용액에 12시간 동안 침지 후 멸균 생리식염수에 1분간 세척, 30, 60 및 90% EtOH에 순차적으로 10 초 침지, isoamyl acetate에 30 분 침지 후 stub에 고정, ion sputter(E-1010, Hitachi, Tokyo, Japan)에서 60 초간 코팅(Pt+Pd)하여 SEM으로 관찰하였다.

분리한 균주를 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법을 이용하여 NCBI BLAST program을 이용하여 GenBank에 등록된 유전자들과 상동성을 비교하여 동정하였다. Genomic DNA를 추출한 후 PCR 장치를 사용하여 전체 DNA 중에서 16S rDNA 절편을 증폭시켰다. Primer는 universal primer로 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 pre-denaturation 95°C, 15 분, 1 cycle, denaturation 95°C, 20 초, annealing 50°C, 40 초, polymerization 72, 90 초, 30 cycles, post-polymerization 72°C, 5 분, 1 cycle의 조건으로 수행하였다. 동정한 균의 계통발생학적 연관관계를 측정하기 위해 CLUSTAL W 프로그램을 이용하여 결과를 계통수로 나타내었다.

분리 균주의 최적 배양 조건

분리 균주의 최적 배양 조건을 검색하기 위해 온도, 배지 pH, 진탕속도를 평가하였다. 최종 선별된 균주의 최적 생육온도를 찾기 위해 100 mL broth에 분리균주 배양액 3%(v/v)를 접종한 후 20, 25, 30 및 35°C에서 48시간 정지 배양하면서 spectrophotometer(HNBT-3000 UV/VIS, Hanbitnanobiotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 OD₆₀₀에서 4시간 간격으로 흡광도를 측정하였다. 배지의 초기 pH가 균주 생육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pH 6.5의 MRS broth에 5 N HCl과 5 N NaOH 용액을 첨가하여 pH를 3.5-10.5의 범위로 조절한 후 분리균주 배양액 3%(v/v)를 접종하고 생육적온 30°C에서 48시간 정지배양하면서 OD₆₀₀에서 4시간 간격으로 흡광도를 측정하였다. 생육에 진탕속도가 미치는 영향을 알아보기 위해 생육적온 30°C, 최적 pH 8.5에서 진탕속도를 0, 100, 150 및 200 rpm으로 각각 조절하여 배양한 후 분리균주 배양액의 흡광도를 OD₆₀₀에서 4시간 간격으로 측정하였다.

분리 균주의 인공위액, 담즙산, 췌장액에 대한 저항성

선발 균주의 인공위액, 담즙산, 췌장액에 대한 저항성을 평가하였다(Chung et al., 2003). 인공위액의 저항성 측정은 MRS broth에 30°C, 24시간 동안 배양한 배양액을 50 mL의 인공위액(1000 unit pepsin/mL, MRS broth, pH 3.0, 처리구)과 MRS broth(비처리구)에 각각 3%(v/v) 접종하고 30°C, 2시간 동안 정지배양 후 1 mL을 취해 멸균생리식염수(0.85% NaCl)에 단계회석하여 MRS agar에 0.1 mL 도말한 후 생균수를 측정하여 계산하였다. 담즙산의 저항성 측정은 MRS broth(비처리구)와 0.3% oxgall이 첨가된 MRS broth(처리구)에 인공위액에서 생존한 균 3%(v/v)를 접종하여 30°C에서 24시간 동안 정지배양 후 생균수를 측정하여

Table 1. Antimicrobial activity of cell-free culture supernatant of inhibition spectrum of lactic acid bacteria isolated from Korean Dongchimi.

Pathogen strains	Zone of inhibition (mm)								
	MRS broth	J1	J2	J3	J4	J5	S1	S2	S3
Gram (+) <i>B. cereus</i> KCTC 3624	- ¹⁾	18.87±0.76 ^{d2)}	17.30±0.49 ^c	14.55±0.62 ^a	19.85±0.53 ^d	14.93±0.69 ^{ab}	20.37±0.96 ^d	19.03±0.72 ^d	16.22±0.63 ^{bc}
<i>L. monocytogenes</i> KCTC 13064	-	17.63±0.49 ^{bc}	14.91±0.60 ^a	16.80±0.80 ^b	18.37±0.38 ^{cd}	17.25±0.61 ^{bc}	16.78±0.72 ^b	17.53±0.56 ^{bc}	19.12±0.59 ^d
<i>S. aureus</i> KCTC 3881	-	19.80±0.72 ^d	16.11±0.73 ^c	11.43±0.30 ^a	22.49±0.37 ^e	15.57±0.30 ^c	15.21±0.57 ^{bc}	19.83±0.63 ^d	14.32±0.59 ^b
Gram (-) <i>E. coli</i> KCTC 2441	-	17.30±0.54 ^b	17.35±0.70 ^b	16.45±0.44 ^b	17.90±0.64 ^b	14.83±0.62 ^a	16.60±0.47 ^b	17.21±0.99 ^b	13.75±0.61 ^a
<i>S. enterica</i> KCTC 2514	-	16.98±0.85 ^e	15.30±0.92 ^c	13.60±0.31 ^b	16.28±0.53 ^{cd}	11.42±0.86 ^a	14.88±0.57 ^{bc}	16.32±0.83 ^{cd}	15.17±0.72 ^{bc}
<i>V. parahaemolyticus</i> KCTC 2729	-	22.55±0.38 ^{cd}	19.31±0.60 ^a	23.49±0.64 ^{de}	24.59±0.29 ^e	20.45±1.03 ^{ab}	19.96±0.77 ^{ab}	21.28±0.84 ^{bc}	24.09±0.78 ^{de}

Values are mean±SD (n=3).

¹⁾no inhibition.

²⁾Different superscriptive letters in a row indicate significant difference among samples at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

계산하였다. 채장액의 저항성 측정은 MRS broth와 0.5% 채장액이 첨가된 MRS broth에 담즙산에서 생존한 균 3%(v/v)를 접종하여 30°C에서 24시간 동안 정치배양 후 생균수를 측정하여 계산하였다.

통계처리

모든 실험은 3 회 반복 실시하여 mean±SD로 나타내었으며, 각 실험결과의 통계분석은 SPSS(statistical package social science, version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용한 일원분산분석법을 실시하여 Duncan's multiple range test에 의해 시료간의 유의적 차이(p < 0.05)를 검정하였다.

결과 및 고찰

항균물질 생산 균주의 분리

균주 분리용 시료인 포기김치, 총각김치, 열무김치, 동치미로부터 투명한을 나타내는 균주를 각각 12 균주, 14 균주, 14 균주, 10 균주를 분리하여 1 차적으로 총 50 균주를 선별하였다(결과미제시). 1 차선별 균주로부터 direct method(Kim et al., 1999)를 사용하여 항균성물질 분비능이 우수한 균주 8 종을 2 차선별 하였고, 임시적으로 J1, J2, J3, J4, J5, S1, S2 및 S3라 명명하였다. 2 차선별 균주를 LB soft agar(0.75% agar)에 disc diffusion method(Bhunia et al., 1988)로 감수성 균주에 대해 강한 항균력을 나타내는 J4균주를 최종선별 하였다. Park et al.(1999)에 의하면 병아리의 소장으로부터 *L. salivarius*를 분리하였고, Yang et al.(2004)은 1세미만의 유아분변으로부터 *Bifidobacterium* spp.를 분리하였다. 이처럼 위해 미생물의 생육을 억제하고 숙주의 위산, 담즙산, 채장액 등 소화관에 강한 내성을 지닌 균주 선발을 위해 김치뿐 만 아니라 다양한 소재로부터 균주를 분리하고 있다.

분리 균주의 항균 스펙트럼

2 차선별 균주의 항균성물질을 제조하여 감수성균주에 대해 항균 스펙트럼을 조사한 결과(Table 1), *Bacillus cereus*에 대해 S1, J4, S2의 생육저해환의 크기가 각각 20.03±0.96, 19.03±0.72 및 19.85±0.53 mm, *Listeria monocytogenes*는 S3, J4, J1가 19.12±0.59, 18.37±0.38 및 17.63±0.49 mm, *Staphylococcus aureus*는 J4, S2, J1이 22.49±0.37, 19.83±0.63 및 19.80±0.72 mm, *Escherichia coli*는 J4, J1, J2가 17.90±0.64, 17.35±0.70 및 17.35±0.54 mm, *Salmonella enterica*는 J1, S2, J4가 16.98±0.85, 16.32±0.83 및 16.28±0.53 mm, *Vibrio parahaemolyticus*는 J4, S3, J3가 24.59±0.29, 24.09±0.78 및 23.49±0.64 mm로 J4가 gram 양성균과 음성 모두에 강한 항균활성을 나타내었다. Chung et al.(2003)은 일반가정에서 담근 동치미로부터 *Lactobacillus* sp. FF-3를 분리하여 *E. coli* O157, *Salmonella* sp., *Bacillus*

Table 2. Effect of artificial gastric juice, 0.3% bile acids, 0.5% pancreatic juice on the growth of isolated lactic acid bacteria.

Digestive juice	Lactic acid bacteria	Viable cell count (log CFU/mL)		Viability (%)
		No treatment	Treatment	
Artificial gastric juice	J1	7.15±0.06	6.35±0.05	15.9±0.2 ¹⁾
	J2	7.84±0.04	6.43±0.01	3.9±0.3 ^a
	J4	7.81±0.05	7.19±0.03	24.3±3.0 ^d
	S1	7.76±0.01	6.87±0.01	13.1±0.6 ^c
	S2	7.15±0.02	6.05±0.01	8.0±0.3 ^b
0.3% bile acids	J1	9.15±0.01	8.62±0.01	29.9±0.5 ^{cd}
	J2	8.95±0.04	8.44±0.02	31.0±2.3 ^d
	J4	9.04±0.02	8.45±0.02	25.8±0.4 ^b
	S1	9.33±0.01	8.44±0.01	13.0±0.1 ^a
	S2	9.15±0.02	8.59±0.01	28.0±0.6 ^{bc}
0.5% pancreatic juice	J1	8.82±0.02	8.36±0.03	34.6±1.1 ^b
	J2	8.96±0.04	8.95±0.04	97.9±1.6 ^d
	J4	9.11±0.04	9.11±0.03	101.2±4.5 ^d
	S1	9.07±0.01	8.88±0.02	63.8±2.9 ^c
	S2	8.82±0.05	8.15±0.05	21.0±1.0 ^a

Values are mean±SD (n=3).
¹⁾Different superscriptive letters in a column indicate significant difference among samples at p < 0.05 level by Duncan's multiple range test.

sp. 균주에 대해 항균활성을 측정된 결과 20, 38 및 21 mm의 생육저해환을 나타내었고, Yang & Chang(2008)도 배추김치로부터 *Lactobacillus plantarum* AF1을 분리하여 gram 양성균에 대해 항균활성을 측정된 결과 18 mm 내외의 높은 생육저해환을 나타내었다. Kim et al.(2004)이 김치에서 분리한 *L. sakei* P3-1을 총 25 균주에 대해 저해활성을 측정된 결과 *L. monocytogenes*에서 3 mm 이상의 저해환을 보였고, Moon et al.(2011)은 김치에서 *L. sakei* K-7을 분리하여 충치균인 *Streptococcus mutans*의 생육억제력을 확인하였다. Lee et al.(2011)도 가정에서 직접 담근 김치로부터 11 종의 *L. sakei* 균주를 분리하여 7 종의 식중독균에 대해 높은 항균력을 가지는 것을 확인하였다. 이처럼 김치류로부터 분리한 유산균은 다른 균주에 대해 대부분 높은 항균력이 있음을 확인하였다. 이는 유산균이 분비하는 젖산, 초산, 과산화수소, diacetyl 및 박테리오신과 같은 발효생성물로 인해 다른 균주의 생성을 억제하기 때문으로 알려져 있다(Pan et al., 2009; Ma et al., 2009). 따라서 식중독균에 대한 높은 항균력을 지닌 J4의 형태학적 특성과 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 동정을 하고 계통발생학적 연관관계를 조사하였다.

분리 균주의 형태학적 특성 및 동정

항균력이 가장 좋은 J4균주를 최종 선별하여 형태학적 특성은 그람양성, 간균으로 확인되었다(Fig. 1). 최종 선별된 J4균주를 동정하기 위하여 universal primer인 27F와

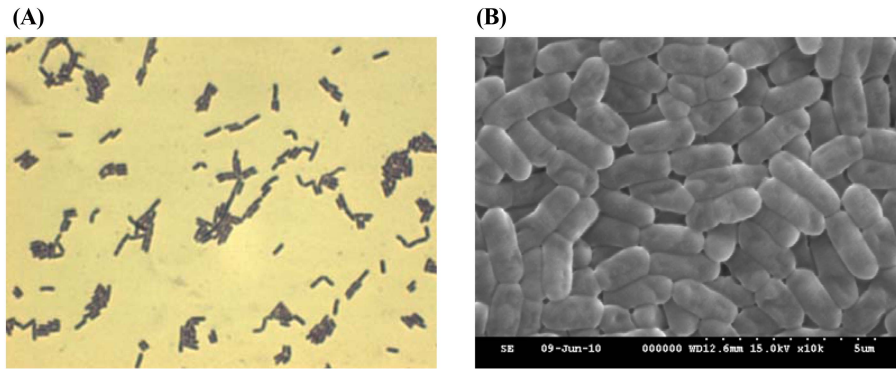


Fig. 1. Light microscope image of *L. sakei* J4 after Gram staining (A) and scanning electron microscope image (B).

1492R를 사용하여 16S rRNA partial sequence 분석 후, NCBI GenBank sequence database의 BLAST를 통하여 염기서열과 상동성을 비교하여 동정한 결과, *Lactobacillus sakei*(accession No. AB601167)와 99%의 상동성을 나타내어, 최종 선별 균주인 J4균주를 *L. sakei* J4라 명명하였다. 동정된 *L. sakei* J4의 16S rRNA partial sequence는 NCBI GenBank sequence database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)에 등록하였다. 동정된 *L. sakei* J4의 계통학적 분석은 CLUSTAL W 프로그램을 이용하여 비교하여 나타내었다(Fig. 2). Kim et al.(2004)은 김치로부터 그람양성, 간균인 *L. sakei* P3-1균주를 분리하였고, Lim et al.(2008)

은 동치미부터 그람양성, 간균인 *L. plantarum* K11균주를 분리하였다. 대부분 김치로부터 분리한 균주는 *Lactobacillus* 속 균으로 그람양성, catalase 음성, 비포자형성, 비운동성, 간균인 특징이 있다.

분리 균주의 최적 배양 조건

분리 균주의 최적 생육온도를 찾기 위해 각 온도대별로 생육속도를 측정하여 결과(Fig. 3), 초기배양속도는 35°C일 때 가장 활발히 증식이 일어났지만 8시간 이후부터 30, 25°C의 증식이 활발히 진행되어 12시간 이후부터는 30°C에서 가장 활발하게 증식하는 것을 확인할 수 있었다. 이는

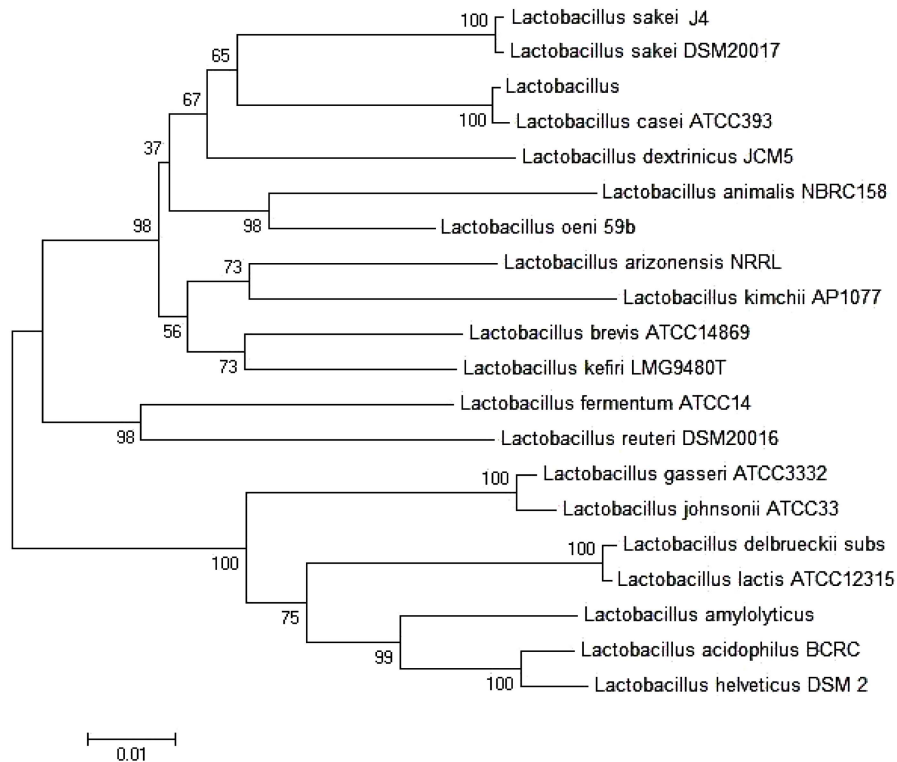


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of *L. sakei* J4 isolated from Korean *Dongchimi*.

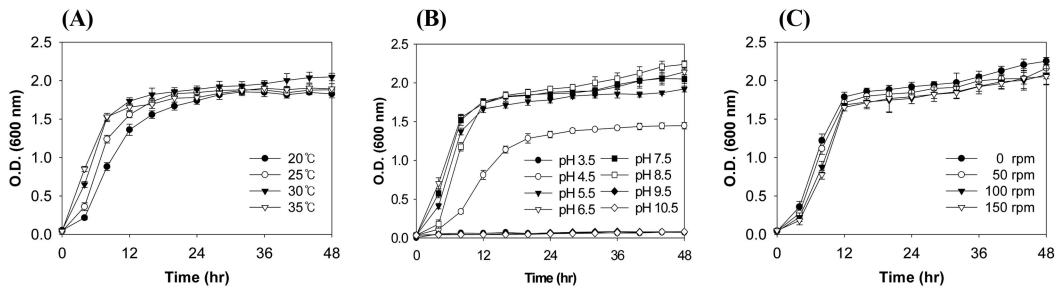


Fig. 3. Optimal growth conditions of *L. sakei* J4; temperature (A), pH (B) and shaking speed (C). Each value is expressed as mean±SD (n=3).

Kim et al.(2002)과 Kim et al.(2004)의 결과와 동일한 결과임을 확인하였다. 배지의 초기 pH에 따른 분리 균주의 생육정도를 알아본 결과는 Fig. 3와 같다. 분리 균주를 접종한 후 초기에는 pH를 조정하지 않을 때 가장 활발하게 증식이 일어났지만, 16시간 이후부터 pH 8.5일 때 증식이 가장 활발히 일어났다. 그러나 pH 3.5, 9.5 및 10.5에서는 증식이 일어나지 않았다. 진탕속도가 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3와 같다. *L. sakei*는 통성혐기성균으로 진탕배양을 할 때보다 정치배양을 할 경우 균의 생육이 활발함을 확인하였다. 동치미로부터 분리한 *L. sakei* J4 균주는 배지초기 pH 8.5, 30°C, 정치배양을 할 경우 생육이 가장 활발히 일어나는 것을 확인하였다.

분리 균주의 인공위액, 담즙산, 췌장액에 대한 저항성

항균 스펙트럼을 통해 강한 항균력을 보였던 J1, J2, J4, S1 및 S2 균주의 인공위액저항성 실험결과는 Table 2과 같다. J4균주가 24.3±3.0%의 생존율을 보여 다른 균주들보다 인공위액에 대해 저항성이 높은 것으로 확인되었다. 한편, 인공위액에서 높은 생존율을 보였던 J4균주는 담즙산에서 25.8±0.4%의 생존율을 보였고, 인공위액에서 3.9±0.3, 8.0±0.3%로 낮은 생존율을 보여주었던 J2, S2 균주가 담즙산에서는 31.0±2.3, 28.0±0.6%로 높은 생존율을 보여주었다. S1 균주를 제외하고는 담즙산에 대한 저항성이 다소 높음을 확인하였다. Gilliland et al.(1984)과 Flock et al. (1992)은 일반적으로 *Lactobacillus* 속의 미생물이 담즙산에 대한 약한 특성을 가지며, 미생물이 공역 부위를 자를 효소를 가지고 있으면 담즙산의 존재에 취약하다고 보고하였다. 그러나 Lee & Choi(2006)가 분리한 균주에서는 담즙산에 대해 77.6-99.8%의 아주 높은 생존율을, Chung et al.(2003)이 분리한 균주에서는 0.01-6%의 낮은 생존율을 보여줌으로써 *Lactobacillus* 속이라 할지라도 담즙산에 대한 저항성이 다른 것을 확인할 수 있었다. 췌장액에 대한 저항성 실험결과, 인공위액과 담즙산에서 생존한 균들의 췌장액에서의 생존율은 J2, J4, S1 균주가 98, 101 및

64%로 J4 균주가 췌장액에 대한 내성이 가장 높은 것을 확인하였다. J4 균주가 인공위액, 담즙산, 췌장액에 대한 저항성이 상대적으로 크지만, Chung et al.(2003)이 동치미로부터 분리한 FF-3 균주의 인공위액에 대한 생존율(90%)과 비교하였을 때 낮은 생존율을 갖고 있음을 확인하였다. J4 균주의 인공위액에 대한 저항성을 높이기 위해 Kim et al.(2002)과 같이 균체를 캡슐화를 시킨 후 키티산을 코팅하여 내산성을 높여 인공위액에 대한 저항성을 높이는 등의 연구가 앞으로 필요할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 probiotics 균주 선발을 위해 동치미로부터 식중독균에 대해 높은 항균활성을 보이는 유산균을 분리동정하여 배양조건을 확립하고, 위산, 담즙산, 췌장액에 대한 저항성 실험을 비교, 분석하여 probiotics 균주로 사용 가능성을 탐색하고자 하였다. 2% CaCO₃를 첨가한 MRS agar를 이용하여 김치 무리로부터 식중독균의 저해능이 우수한 8 균주를 분리하였다. 식중독균에 대해 항균활성실험 결과 J4가 *B. cereus*는 19.85±0.53 mm, *L. monocytogenes*는 18.37±0.38 mm, *S. aureus*는 22.49±0.37 mm, *E. coli*는 17.90±0.64 mm, *S. enterica*는 16.28±0.53 mm, *V. parahaemolyticus*는 24.59±0.29 mm의 생육저해환을 형성하여 가장 높은 항균력을 나타내었다. J4 균주의 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 *L. sakei*와 99% 상동성을 나타내어 *L. sakei* J4라 명명하였다. *L. sakei* J4의 최적배양조건은 pH 8.5, 30, 정치배양시 가장 활발하게 생육이 진행됨을 확인하였다. *L. sakei* J4는 인공위액에서의 생존율 24.3±3.0%, 담즙산에서의 생존율 25.8±0.4%, 췌장액에서의 생존율 101.2±4.5%로 다른 균주보다 상대적으로 생존율이 높았으며, 향후 alginate를 이용한 캡슐화, chitosan을 이용한 재코팅 등의 연구방법을 정립하여 인공위액에 대한 저항성을 높인다면 프로바이오틱스 균주로서 조건을 충족시킬 수 있으리라 사료된다.

참고문헌

- Bhunia AK, Johnson MC, Ray B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 65: 261-268.
- Brady LJ, Gallaher DD, Busta FF. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. J. Nutr. 130: 410S-414S.
- Braat H, Brande JVD, Tol EV, Hommes D, Peppelenbosch M, Deventer SV. 2004. *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4⁺ T cells via modulation of dendritic cell function. Am. J. Clin. Nutr. 80: 1618-1625.
- Casla D, Requena D, Gómez R. 1996. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. J. Appl. Bacteriol. 81: 35-41.
- Chung WB, Soe WS, Cha JY, Cho YS. 2003. Isolation and characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for probiotics production from Korean Dongchimi. Korean J. Food Preserv. 10: 406-410.
- Chon HS, Choi BR, Jeong GJ, Mo IP. 2008. Evaluation system for an experimental study of low-pathogenic avian influenza virus (H9N2) infection in specific pathogen free chickens using lactic acid bacteria *Lactobacillus platarum* KFCC11389P. Avian Pathol. 37: 593-597.
- Dunne C. 2001. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: Probiotics and gut disorder. Inflammatory Bowel Dis. 7: 136-145.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.
- Flock M, Binder HJ, Filbum B, Gershengoren W. 1992. The effect of bile acids on intestinal microflora. Am. J. Clin. Nutr. 25: 1418-1423.
- Famularo G, Perluigi M, Coccia R, Mastroiacovo P, Simone CD. 2001. Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. Med. Hypotheses 56: 421-430.
- Famularo G, Simone CD, Pandey V, Sahu AR, Minisola G. 2005. Probiotic Lactobacilli: an innovative tool to correct the malabsorption syndrome of vegetarians. Med. Hypotheses 65: 1132-1135.
- Gilliland SE, Staley TE, Bush LT. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J. Dairy Sci. 67: 3045-3049.
- Gilliland SE. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87: 175-188.
- Guamer F, Schaafsma GJ. 1998. Probiotics. Int. J. Food Microbiol. 39: 237-238.
- Guarner F, Malagelada JR. 2003. Gut flora in health and disease. Lancet 361: 512-519.
- Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T, Nase L, Saxelin M, Korpela R. 2001. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. Br. Med. J. 322: 1327.
- Hamilton-Miller JMT. 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. Int. J. Antimicrob. Agents. 22: 360-366.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59: 171-200.
- Kim SI, Kim IC and Chang HC. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganism and sensitive strain from soil. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 526-533.
- Kim K, Jang KI, Kim CH, Kim KY. 2002. Optimization of culture conditions and encapsulation of *Lactobacillus fermentum* YL-3 for probiotics. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 255-262.
- Kim HT, Park JY, Lee GG, Kim JH. 2004. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain from Kimchi. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 560-656.
- Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 70: 337-349.
- Lee HJ, Yoon HS, Ji YS, Kim HN, Park HJ, Lee JE, Shin HK, Holzapfel WH. 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from Kimchi. Int. J. Food Microbiol. 145: 155-161.
- Lee JJ, Baek YJ. 2001. Health benefits of Lactic acid bacteria. Bioindustry News 14: 24-30
- Lee SB, Choi SH. 2006. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* isolates for calf meal supplements. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 26: 106-112.
- Lim SM, Lee GJ, Park SM, Im DS. 2008. Incubation conditions affecting bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from Dongchimi. J. Food Hyg. Safety 23: 113-120.
- Macfarlane GT, Cummings JH. 2002. Probiotics, infection and immunity. Curr. Opin. Infect. Dis. 15: 501-506.
- Miranda H. 2006. Probiotics may help stressed gut. WebMD. Rev. from <http://www.webmd.com/> Accessed Oct. 24. 2006.
- Moon JS, Ahn JE, Han AR, Heo JS, Eon HJ, Shin CS, Choi HS, Han NS. 2011. Anticariogenic activities of *Lactobacillus sakei* K-7 isolated from Kimchi. Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J. 26: 513-516.
- Noh JS, Kim JH, Lee MJ, Kim MH, Song YO. 2008. Development of auto-aging system for the Kimchi refrigerator for optimal fermentation and storage of Dongchimi. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 661-668.
- Ouweland AC, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek 82: 279-289.
- Park HS, Lee JH, Uhm TB. 1999. Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* isolated from chicken intestines. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 1003-1009.
- Reid G. 2001. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. Am. J. Clin. Nutr. 73: 437S-443S.
- Sanders ME. 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. J. Nutr. 130: 384S-390S.
- Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am. J. Clin. Nutr. 73: 451S-455S.
- Yang HJ, Jang KI, Kim CH, Lee YB, Sohn HS, Kim KY. 2004. Screening of *Bifidobacterium* spp. for the Development of infant probiotics. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 790-794.
- Yang EJ, Chang HC. 2008. Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Kimchi. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 36: 276-284.