

## 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum*과 *Leuconostoc mesenteroides*에 대한 향신료 에탄올추출물의 선택적 항균효과

김옥미 · 김미경 · 이갑량<sup>1</sup> · 김순동\*

대구효성카톨릭대학교 식품공학과, <sup>1</sup>영남대학교 식품영양학과

**Selective Antimicrobial Effects of Spice Extracts Against *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Kimchi.** Kim, Ok-Mi, Mee-Kyung Kim, Kap-Rang Lee<sup>1</sup>, and Soon-Dong Kim\*. Department of Food Science and Technology, Taegu-Hyosung Catholic University, Kyungsan 713-702, Korea and <sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea—This study was performed to investigate antimicrobial effects and their actions of the ethanol extracts of 12 spices against *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*, which are related to Kimchi fermentation. The cardamon, thyme, and cumin ethanol extracts among 12 spices showed antimicrobial activities against *Lac. plantarum*, not against *Leu. mesenteroides* through paper disc method. The growth of *Lac. plantarum* was inhibited in MRS broth containing each extracts of cardamon (>4%), thyme (>4%) and cumin (>1%). SDS-PAGE and transmission electron micrographs showed that the cell walls and membranes were disrupted and the cytoplasmic components were leaked in strains treated with ethanol extracts.

**Key words:** Kimchi, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, antimicrobial effect, spice

김치는 우리나라 고유의 젖산 발효식품으로서 독특한 맛과 영양이 우수하여 국내 뿐만 아니라 세계적 식품으로 부각되고 있으며, 국내 소비와 수출을 위한 김치산업이 급부상하고 있다. 그러나 수송, 판매 및 유통 중의 환경변화에 따라 품질이 변화되는 문제점이 있어 김치의 품질 향상 및 보존방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

김치초기 숙성균으로는 주로 산 생성이 적은 *Leuconostoc mesenteroides* 등이 관여하고 김치의 산패현상은 산에 저항성이 높고 산 생성량이 많은 *Lactobacillus plantarum* 등의 젖산균이 관여하는 것으로 알려져 있다 [14, 15]. 그러므로 김치가 적절한 발효를 일으키면서 가식기간을 늘이기 위해서는 산 생성량이 적은 젖산균의 번식에는 무관하면서 산 생성량이 많은 젖산균을 선택적으로 제어할 수 있는 항균제의 개발이 요구된다. 지금까지 김치의 보존성에 관련된 미생물의 생육을 저해하는 일반적인 방법으로는 가열처리[2, 6], 방사선 조사[2, 3], 방부제 첨가[16] 및 보존료 첨가[1] 등이 알려져 있다. 그러나 이러한 방법들을 사용함으로써 발생하는 김치의 품질저하 및 경제성의 이유 때문에 실용화되지 못하고 있는 실정이다. 최근 이러한 문제점을 해결하기 위하여 인체에 독성을 나타내지 않은 천연물질의 개발과 이용에 관한 연구[4, 7, 10, 18, 19]가 많이 보고되고 있으나, 아직까지는 김치 고유의 품질과 맛을 유지하면서 저장성을

증진시킬 수 있는 실용적이고 무해한 기술이 개발되지 않고 있다.

향신료 및 그 정유성분이 정균 혹은 살균작용을 갖고 있다는 것은 오래전부터 알려져 왔다. 우리 나라 고유의 김치에는 고추, 마늘, 생강 등의 3~5종의 향신료를 사용하고 있으나 이들 향신료로부터 생성되는 향미가 국제적 식품으로서의 기호를 떨어뜨리는 원인이 되고 있다. 따라서 세계적으로 알려진 기호성 높은 향신료로부터 김치의 향미를 개선시킬 수 있으면서 보존성을 증진시킬 수 있는 재료의 선별과 김치에의 적용연구가 요망되고 있으나 이에 대한 연구는 미약한 실정이다.

본 연구에서는 김치의 천연 보존료 개발의 일환으로서, 여러 종류의 향신료의 에탄올 추출물로부터 *Leu. mesenteroides*의 생육에는 무관하면서 김치 산패의 주 원인균인 *Lac. plantarum*의 생육을 선택적으로 저해시킬 수 있는 항균성 재료를 선별하고, 선별된 향신료 추출물의 항균 작용을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

본 실험에 사용한 향신료는 Table 1과 같으며 10여종을 구입하여 사용하였다.

#### 사용균주 및 배지

*Lac. plantarum* 및 *Leu. mesenteroides*는 가정에서 담

\*Corresponding author  
Tel. 82-53-850-3216, Fax. 82-53-850-3216  
E-mail: kimsd@cuth.cataegu.ac.kr

Table 1. List of spices used for antimicrobial experiment

Spice	Scientific name	Source
Allspice	<i>Pimenta dioca L. Merril</i>	Non-irradiated fresh flavor ground Allspice(Modern products, INC,USA)
Bay leaves	<i>Laurus nobilis L</i>	Whole Bay leaves(Naurel, Ton,s,USA)
Cardamon	<i>Elettaria cardamomun L. Maton</i>	Non-irradiated fresh flavor Ground Cardamon (Modern products, INC, USA)
Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylanicum Nees</i>	Ground Cinnamon (Ton,s, USA)
Cumin	<i>Cuminum cyminum L.</i>	Non-irradiated fresh flavor Whole cumin seed (Modern products, INC, USA)
Garlic	<i>Allium sativum L.</i>	Ground Garlic(Ton,s, USA)
Majoram	<i>Majoma hortensis Moench</i>	Non-irradiated fresh flavor Majoram (Modern products, INC, USA)
Mustard	<i>Brassica hirta, Moensh</i>	Non-irradiated fresh flavor Mustard (Modern products, INC, USA)
Onion	<i>Allium cepa L.</i>	Onion powder (Ton,s, USA)
Parsely	<i>Petroselinum crispum Nym</i>	Parsley Flakes(Ton,s, USA)
Tarragon	<i>Artemisia dracunculul L.</i>	Non-irradiated fresh flavor Tarragon (Modern products, INC, USA)
Thyme	<i>Thymus vlgaris L.</i>	Non-irradiated fresh flavor Thyme (Modern products, INC, USA)

근 김치 즙액으로부터 직접 분리하여 대구효성가톨릭대학교 식품공학과에 보존중인 것을 사용하였다. 젖산균의 배양을 위한 배지로는 0.02% sodium azide를 함유한 MRS 배지를 사용하여 37℃에서 24~48시간 배양하였다.

#### 향신료 추출물 조제

항균력 측정을 위한 향신료의 추출[12, 13]은 500 ml 삼각플라스크에 100 mesh로 분말화한 각각의 향신료 10 g씩에 99.9% 에탄올 100 ml를 넣고 37℃ 진탕배양기에서 3일 동안 추출하였다. 추출액은 Whatman No. 50 여과지로 여과시킨 후 감압건조기를 사용하여 40℃에서 에탄올을 제거시켰으며 멸균증류수로 향신료의 최종농도를 40%가 되게 조절하여 사용하였다.

#### 항균력 측정

항균력은 paper disc법[12, 13]으로 측정하였다. MRS 액체배지에서 12시간 배양한 균주를 0.75% 중층 agar에 2% 접종하여 MRS 평판배지위에 덮고, 40% 향신료 추출액 5 µl씩을 흡수시켜 건조시킨 paper disc(6 mm)를 올려 놓은 다음 37℃에서 48시간 배양하였다. 항균력은 paper disc주위에 저해환의 생성 유무와 그의 크기(mm)를 3회 반복 측정하여 평균치로 나타내었다.

#### 향신료 추출물의 농도별에 따른 항균검사

향신료 추출물의 농도별에 따른 젖산균의 생육에 미치는 효과를 측정하기 위하여 MRS 배지에 향신료 추출물을 각각 0, 1, 2 및 4% 되게 첨가하고 시험균을 접종하여 37℃에서 48시간 동안 배양하면서 6시간 간격으로 시료를 채취하였다. 경시적인 균의 생육은 600 nm에서 흡광도로 측정하였다[13].

#### SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)

향신료 추출물을 첨가한 MRS 배지에서 24시간 배양

한 후 원심분리하여 얻은 균체를 0.85% NaCl 용액으로 2~3회 세척하였으며 0.02% mercaptoethanol을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.2)에 현탁하여 sonication을 행하였다. 균체의 crude 단백질을 Laemmli[11]의 방법에 따라 10% 농도의 겔을 사용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동 후 겔은 Coomassie Brilliant Blue R로 염색하고 탈색 후 단백질을 확인하였다. 표준단백질은 molecular weight standard marker (Sigma, USA)를 사용하였다.

#### 투과전자현미경 조사

향신료 추출물 첨가에 의한 젖산균 세포의 손상여부를 관찰하기 위하여, 24시간 배양한 시험균의 균체를 2.5% glutaraldehyde를 함유한 0.1 M phosphate buffer로 4℃에서 4시간 전고정시킨 후 동일한 buffer로 3-4회 세척하고 다시 1% osmium tetroxide(OsO<sub>4</sub>)를 함유한 buffer에서 90분간 후고정을 하였다. 다음에 동일한 buffer로 세척한 후 2% agar로 block을 만들어 30~100% 알코올로 순차적으로 탈수하였으며, epoxy와 propylene oxide를 섞은 용액으로 치환시킨 후 silicon capsule을 제조하였다. 이렇게 제조된 block sample을 LKB Ultratome V를 사용하여 diamond knife로 절취, 염색하여 투과전자현미경(Hitachi-600)으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

#### 향신료 추출물의 항균활성

김치가 젖산발효식품으로서의 특성을 유지하면서 보존성을 증진시키는 방안의 일환으로 김치의 초기 숙성균인 *Leu. mesenteroides*의 생육에는 무관하면서 김치의 산패에 관여하는 *Lac. plantarum*을 선택적으로 저해할 수 있는 항균제를 탐색하기 위하여 10여종의 향신료로부터 얻은 에탄올추출물의 항균효과를 조사하였다. Table 2에

**Table 2. Antimicrobial effect of ethanol extracts of spices**  
diameter of inhibitory zone (mm)

Spices	<i>Lac. plantarum</i>	<i>Leu. mesenteroides</i>
Allspice	9±0.4	8±0.3
Bay leaves	8±0.3	10±0.5
Cardamon	9±0.3	0±0.0
Cinnamon	12±0.6	9±0.4
Cumin	10±0.3	0±0.0
Garlic	10±0.4	11±0.6
Majorum	9±0.4	9±0.5
Mustard	7±0.3	8±0.3
Onion	9±0.4	9±0.4
Parsely	8±0.3	9±0.5
Tarragon	0±0.0	8±0.3
Thyme	8±0.5	0±0.0

\*Diameter of paper disc is 6 mm. Data are represented to the mean±SD.

서 보는 바와 같이 *Lac. plantarum*에 대하여는 tarragon, *Leu. mesenteroides*에 대하여는 cardamon, thyme 및 cumin을 제외한 나머지 향신료 추출물이 비교적 우수한 항균 효과를 나타내었다. 특히 cardamon, thyme 및 cumin의 에탄올추출물은 *Leu. mesenteroides*에는 항균력을 나타내지 않았으나 *Lac. plantarum*에는 강한 항균력을 나타내었다.

#### 향신료 추출물의 농도별에 따른 항균효과

10여종의 향신료 에탄올추출물 중에서 선별된 3가지 종류의 향신료, 즉 cardamon(CA), thyme(TH) 및 cumin(CU) 추출물의 농도별에 따른 항균활성을 조사하기 위하여 각각의 추출물을 0, 1, 2 및 4%되게 첨가한 MRS배지에 12시간 배양한 *Lac. plantarum*(LP)과 *Leu. mesenteroides*(LM)를 각각 접종하여 균의 성장을 측정하였다. Fig. 1의 CA-LP, CA-LM, TH-LP, TH-LM, CU-LP 및 CU-LM은 각각의 향신료 추출물의 농도별로 *Lac. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*의 생육에 미치는 영향을 조사한 것으로 *Lac. plantarum*의 경우 cardamon과 thyme 추출물 각각을 1% 및 2% 첨가한 구에서는 균의 성장 억제현상이 거의 관찰되지 않았으나, 4% 첨가구에서는 뚜렷한 억제효과를 나타내었다. 그러나 *Leu. mesenteroides*의 경우에는 4% 첨가구에서도 대조구와 비슷한 경향을 나타내었다. 이것은 cardamon 및 thyme 추출물 4%에서 김치 초기 숙성균인 *Leu. mesenteroides*에는 무관하면서 *Lac. plantarum*을 선택적으로 저해하기 때문으로 생각되며 이들 추출물은 김치 보존성에 실용적 가치가 있을 것으로 사료된다. 그러나 이들 추출물의 첨가가 김치의 향미와 특성에 어떤 영향을 미치는가에 대하여는 계속적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

Cumin 추출물 첨가구의 경우, 1% 첨가구에서부터

*Leu. mesenteroides*와 *Lac. plantarum*에 대해 모두 강한 항균력을 나타내었으며 특히 4% 첨가구에서는 *Lac. plantarum*의 성장을 완전히 억제하여 사멸현상을 초래하였다. 그러므로 cumin 추출물을 실제로 김치보존제로서 활용하는 경우에는 겨자유의 경우에서 보고[5]된 바와 같이 초기 김치를 어느 정도 숙성시켰을 때 첨가함으로써, *Leu. mesenteroides*의 생육은 유도하면서 김치 산패균인 *Lac. plantarum*의 생육을 저해시켜 김치의 보존성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

#### 향신료 추출물 처리에 의한 균체 단백질의 변화

향신료 추출물중 cardamon, thyme 및 cumin 추출물의 첨가에 따른 균체 단백질의 양상을 관찰하기 위하여 *Lac. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*의 균체 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 실시하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 *Lac. plantarum*의 경우 대조구에 비하여 추출물 첨가구의 균체 단백질이 소실되는 경향을 나타내었으며 특히 4% cumin 추출물 첨가구의 경우 균체 단백질이 완전히 소실되었다. *Leu. mesenteroides*에서는 4% cardamon 및 thyme 추출물 첨가구의 경우 대조구와 비슷한 경향을 나타내었으며 cumin 추출물 첨가구는 농도가 증가할수록 균체 단백질이 더 많이 소실되는 경향을 나타내었다. 그러나 대조구과 추출물 첨가구의 균체 단백질간의 양상에는 큰 변화가 없었다 (Fig. 2). 따라서 향신료 추출물 첨가에 따른 단백질 감소는 균체의 성장이 억제됨으로서 나타난 현상이며 특정 단백질의 생합성이 저해받아 일어난 것은 아닌 것으로 사료된다.

#### 향신료 추출물 처리에 의한 균체 형태의 관찰

향신료 추출물 처리에 의한 젖산균 세포의 형태 및 세포벽의 상태변화를 관찰하기 위하여 cardamon, thyme 및 cumin 추출물을 첨가한 배지에서 배양된 균체를 투과 전자현미경(Hitachi-600)으로 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Lac. plantarum*의 경우 4% cardamon, 4% thyme 및 2% cumin 추출물을 처리한 구는 대조구에 비하여 세포가 팽윤되고 변형되는 형태적 변화를 나타내며 일부 세포벽과 세포막은 깨어져 세포 내용물이 유출되는 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 *Leu. mesenteroides*의 2% cumin 추출물을 처리한 구의 경우 대조구에 비하여 세포가 팽대하고 일부 세포벽은 완전히 파괴되어 내용물이 모두 유출되어 균 형태가 없어져 버린 것도 관찰되었다. 따라서 향신료 에탄올추출물의 처리는 균체 세포벽 및 세포막을 약화시키며 이로 인하여 균체세포의 내용물을 세포외로 유출시킴으로서 성장을 억제시키는 것으로 판단된다. 이러한 실험결과는 강 등[8]이 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*에 대하여 갖 추출물을

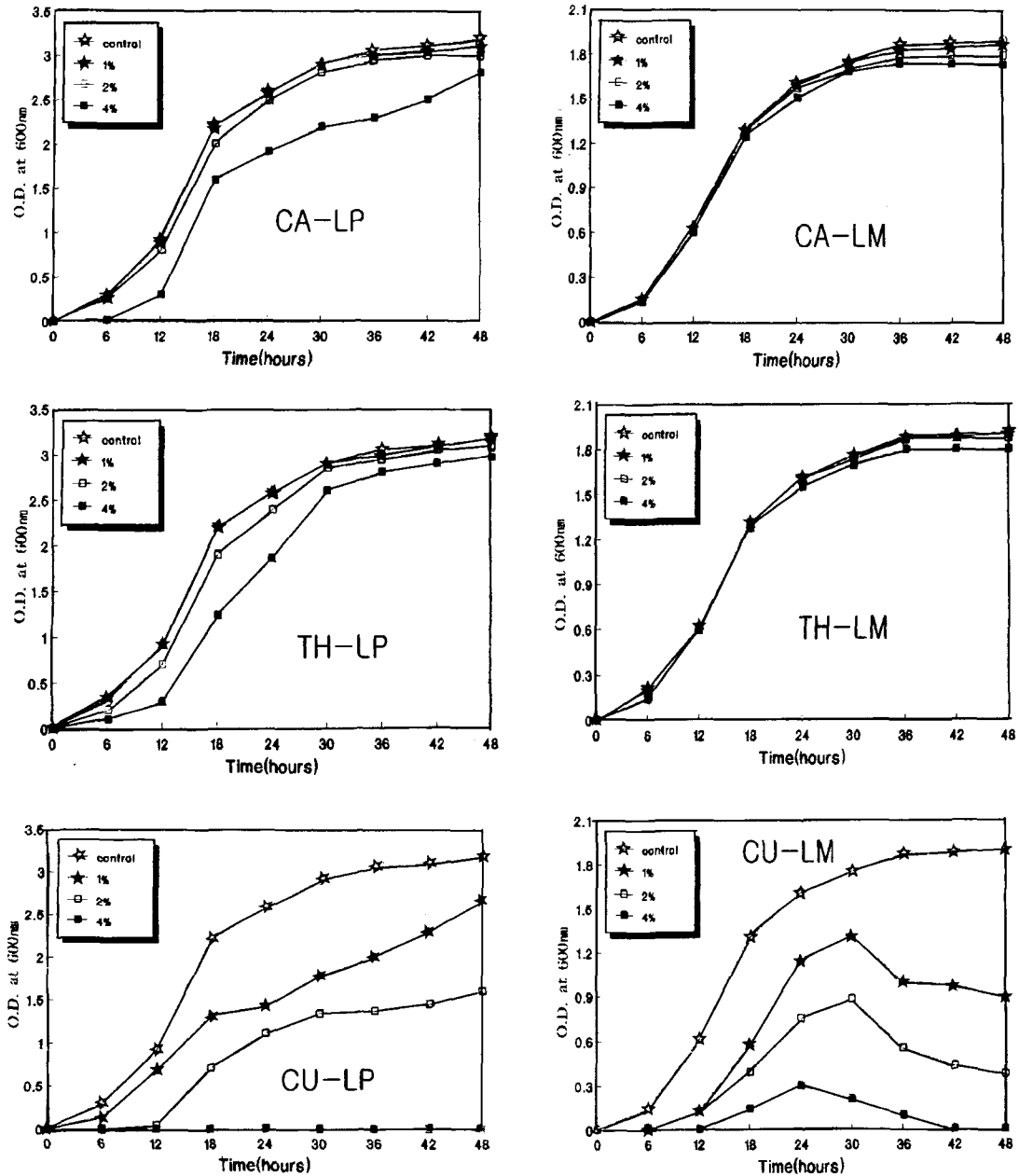


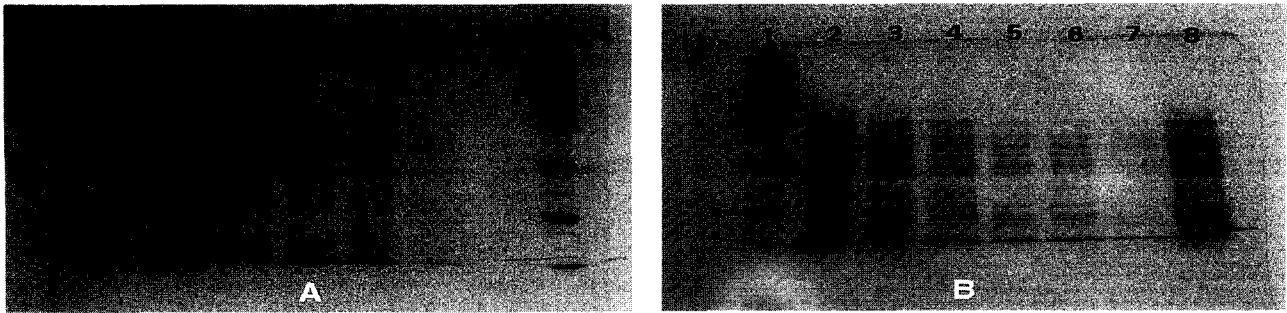
Fig. 1. Growth of *Lac. plantarum* (LP) and *Leu. mesenteroides* (LM) on MRS broth containing each of cardamon (CA), thyme (TH), and cumin (CU) ethanol extracts at 37 °C.

처리한 결과 세포벽의 약화로 인하여 균체성분이 세포외로 누출되었다는 보고와 일치하며, Tatsuguchi 등[17]이 *Escherichia coli*에 NaCl 및 glycine을 처리하였을 때 균체성분이 누출하였다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

요 약

김치가 젖산발효식품으로서의 특성을 유지하면서 보존성을 증진시키는 방안의 일환으로, 김치의 젖산 생성량이 낮은 초기 숙성균인 *Leuconostoc mesenteroides*의 생

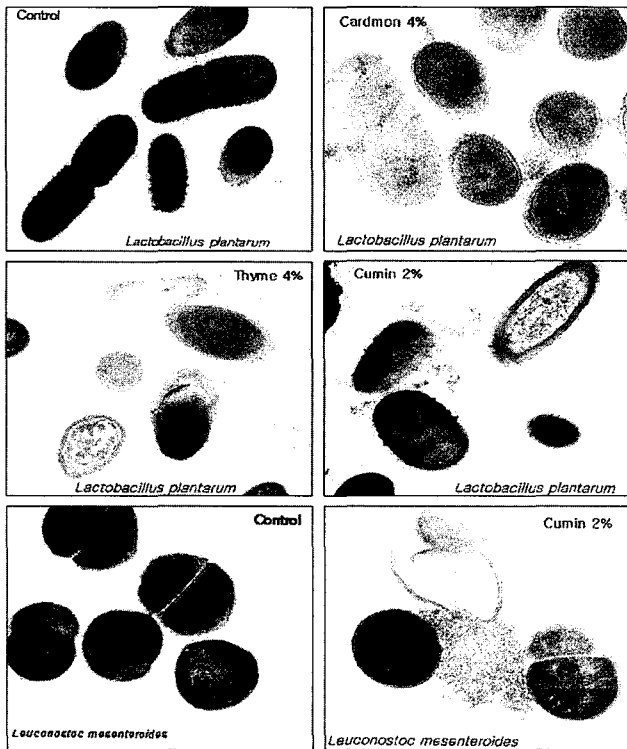
육에는 무관하면서 김치의 산패에 관여하는 *Lactobacillus plantarum*을 선택적으로 저해할 수 있는 항균제를 탐색하기 위하여 10여종의 향신료로부터 얻은 에탄올 추출물의 항균효과를 조사하였다. Paper disc법에 의한 향신료 추출물의 항균력을 측정된 결과 10여종의 향신료 추출물중 cardamon, thyme 및 cumin의 에탄올추출물은 *Lac. plantarum*을 선택적으로 저해시키는 항균효과를 나타내었다. 또한 농도별에 따른 cardamon 및 thyme 추출물은 4%에서, cumin 추출물은 1% 이상의 농도에서 항균효과를 나타내었다. SDS-PAGE 및 투과전자현미경



**Fig. 2.** SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the crude proteins from *Lac. plantarum* (A) and *Leu. mesenteroides* (B). *Lac. plantarum* and *Leu. mesenteroides* were treated with cardamon, thyme, and cumin ethanol extracts, respectively. Samples were separated by 10% SDS-PAGE and stained with coomassie brilliant blue R.

(A) *Lac. plantarum*: Lane 1 and 8, broad molecular weight marker; 2, *Lac. plantarum* crude protein (control); 3, 4% cardamon; 4, 4% thyme; 5, 1% cumin; 6, 2% cumin; 7, 4% cumin.

(B) *Leu. mesenteroides*: Lane 1, broad molecular weight marker; 2 and 8, *Leu. mesenteroides* crude protein (control); 3, 4% cardamon; 4, 4% thyme; 5, 1% cumin; 6, 2% cumin; 7, 4% cumin.



**Fig. 3.** Transmission electron micrographs of *Lac. plantarum* and *Leu. mesenteroides*.

*Lac. plantarum* was treated with 4% cardamon, 4% thyme, and 2% cumin ethanol extracts, respectively and *Leu. mesenteroides* was treated with 2% cumin ethanol extract.

의 결과의 분석을 통하여 향신료 에탄올 추출물의 주요 항균작용은 균체 세포벽 및 세포막을 약화시키며 이로 인하여 균체세포의 내용물을 세포외로 유출시킴으로서 성장을 저해 또는 사멸시키는 것으로 나타났다.

**REFERENCES**

1. Ahn, S. J. 1988. The effect of salt and food preservatives

on the growth of lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Korean J. Soc. Food Sci.* **4**: 39-50.

2. Byun, M. W., B. S. Cha, J. H. Kwon, H. O. Cho, and W. J. Kim. 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.

3. Cha, B. S., W. J. Kim, M. W. Byun, J. H. Kwon, and H. O. Cho. 1989. Evaluation of gamma irradiation for extending the shelf life of *Kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**: 109-114.

4. Chung D. K. and R. Yu. 1995. Antimicrobial activity of bamboo leaves extract on microorganisms related to *Kimchi* fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 1035-1038.

5. Hong, W. S. and S. Yoon. 1989. The effects of low temperature heating and mustard oil on the *Kimchi* fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**: 331-337.

6. Kang, K. O., K. H. Ku, H. J. Lee, and W. J. Kim. 1991. Effect of enzyme and inorganic salts addition and heat treatment on *Kimchi* fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**: 183-187.

7. Kang, S. K., N. K. Sung, Y. D. Kim, S. C. Shin, J. S. Seo, K. S. Choi, and S. K. Park. 1994. Screening of antimicrobial activity of leaf mustard (*Brassica juncea*) extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **23**: 1008-1013.

8. Kang, S. K., Y. D. Kim, and S. K. Park. 1995. Effects of antimicrobial of leaf mustard (*Brassica juncea*) extract on compositions and leakage of cellular materials in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**: 280-285.

9. Kim, S. J. and K. H. Park. 1995. Antimicrobial activity of the extracts of vegetable *Kimchi* stuff. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 216-220.

10. Kim, S. J. and K. H. Park. 1995. Retardation of *Kimchi* fermentation by the extracts of *Allium tuberosum* and growth inhibition of related microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 813-818.

11. Laemmi, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
12. Lee, B. W. and D. H. Shin. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extracts food spoilage microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**: 200-204.
13. Lee, B. W. and D. H. Shin. 1991. Antimicrobial effect of some plant extracts and their fractionates for food spoilage microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**: 205-211.
14. Lee, C. W., C. Y. Ko, and D. M. Ha. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during *Kimchi* fermentation and identification of isolates. *Korean J. Appl. Microbiol.* **20**: 102-109.
15. Mheen, T. I. and T. W. Kwon. 1984. Effect of temperature and salt concentration on *Kimchi* fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16**: 443-450.
16. Park, K. J. and S. J. Woo. 1988. Effect of Na-acetate, Na-malate and K-sorbate on the pH, acidity and sourness during *Kimchi* fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **20**: 40-44.
17. Tatsuguchi, K., J. Sakamoto, J. K. Lee, and M. Tsutsumi. 1989. Effects of treatments with glycine and/or sodium chloride on phospholipid composition of *Escherichia coli*. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* **30**: 506-511.
18. Yoon, S. I., G. D. Park, Y. C. Kim, Y. H. Lim, and C. Lee. 1990. Shelf-life enhancement method of *Kimchi* kinds by using of xanthoxyli fructus extracts and mustard oil. *Korean Patent(B<sub>1</sub>)* No. 1858.
19. Yoon, S. I., G. D. Park, Y. C. Kim, Y. H. Lim, and C. Lee. 1990. Shelf-life enhancement method of *Kimchi* kinds by cinamon oil. *Korean Patent(B<sub>1</sub>)* No. 1766.

(Received July 13, 1998)