

김치로부터 *Lactobacillus sakei* 생육저해 *Leuconostoc* 및 *Weissella* 속 균주의 분리

이광희 · 이종훈*
경기대학교 식품생물공학과

Received: February 17, 2011 / Revised: April 26, 2011 / Accepted: April 27, 2011

Isolation of *Leuconostoc* and *Weissella* Species Inhibiting the Growth of *Lactobacillus sakei* from *Kimchi*. Lee, Kwanghee and Jong-Hoon Lee*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea – *Kimchi* is a group of traditional fermented vegetable foods in Korea and known to be the product of a natural mixed-fermentation process carried out principally by lactic acid bacteria (LAB). According to microbial results based on conventional identification, *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* were considered to be responsible for the good taste and over-ripening of *kimchi*, respectively. However, with the application of phylogenetic identification, based on 16S ribosomal RNA gene similarities, a variety of *Leuconostoc* and *Lactobacillus* species not detected in the previous studies have been isolated, together with a species in the genus *Weissella*. Additionally, *Lactobacillus sakei* has been accepted as the most populous LAB in over-ripened *kimchi*. In this study, *Leuconostoc* and *Weissella* species inhibiting the growth of *Lb. sakei* were isolated from *kimchi* for future applications to do with *kimchi* fermentation. From 25 *kimchi* samples, 378 strains in the genera *Leuconostoc* and *Weissella* were isolated and 68 strains identified as *Lc. mesenteroides*, *Lc. citreum*, *Lc. lactis*, *W. cibaria*, *W. confusa*, and *W. paramesenteroides* exhibited growth inhibition against *Lb. sakei*. Most of the strains also had antagonistic activities against *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, and *Lb. plantarum*. Their antagonistic activities against *Lb. sakei* were more remarkable at lower temperatures of incubation.

Key words: *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus sakei*, *kimchi*

김치는 적당히 발효되면 특유의 상쾌한 맛을 가지게 되지만, 발효 후기에 접어들면서 산도가 증가하고 연부현상이 일어나 풍미가 떨어지게 된다. 살균공정이 없어 유통과정에서도 발효가 진행되는 특성상 일정한 품질의 제품 생산이 어렵기 때문에 품질 표준화와 함께 가식기간 연장은 상업김치의 상품성 및 유통기한과 연관된 가장 큰 문제점으로 대두되었고[29], 상업적 생산이 본격화되면서 김치발효에 관여하는 미생물을 효과적으로 제어하여 풍미를 향상시키고 가식기간을 연장시키려는 연구가 진행되고 있다.

방사선 조사, 열처리, 고압처리와 같은 물리적 방법을 적용한 결과, 발효 초기 미생물의 생육저해를 통한 발효 지연 효과가 보고되었다[3, 4, 17, 19, 34, 47, 51]. 그러나 물리적 처리에 의한 품질 저하와 영양 손실의 가능성이 크고, 설비 투자에 따른 생산비용 증가가 발생할 수 있다. 자몽종자 추출물 등의 천연추출물들[13, 23, 45, 53], sorbic acid 등의 식품보존료와 유기산 및 염 혼합물 등을 첨가한 시도가 진

행되었다[1, 15, 22, 30, 43, 44]. 그러나 그 효과가 미미하거나 첨가물 자체가 가지고 있는 강한 맛과 향에 의해 김치 고유의 풍미가 저하되는 것으로 나타났다. 또한, 식품공전에 제시된 김치규격에는 식품보존료의 사용이 허용되지 않기 때문에 상업적 적용은 불가능한 것으로 사료된다.

이러한 물리적, 화학적 처리를 이용한 김치발효 제어와 함께 종균(starter)을 이용하여 김치발효를 제어하려는 연구가 다수 진행되었다. 종균을 적용한 초기 연구에서는 김치발효 미생물의 천이 및 역할에 대한 충분한 지식이 확보되지 못해 김치에서 우점으로 검출되는 미생물을 적용하였다[10, 36, 50]. 이들 연구에서는 종균 첨가에 의한 높은 초기 균수의 달성으로 숙성기간의 단축과 품질 균일화에 대한 가능성을 확인할 수 있었지만, 상업적 김치생산과 관련된 가식기간 연장은 고려되지 못했다.

김치의 상업화와 함께 김치발효 관련 미생물에 대한 연구가 본격적으로 진행됨에 따라 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* 속의 유산균들이 김치발효에 관여한다는 사실이 밝혀졌고, *Leuconostoc* 속은 발효 초기에, 적숙기 이후에는 *Lactobacillus* 속이 우점으로

*Corresponding author

Tel: +82-31-249-9656, Fax: +82-31-253-1165

E-mail: jhl@kyonggi.ac.kr

검출되는 것으로 보고되었다[37, 40, 41, 49]. 특히, 분리된 *Leuconostoc* 속 중, 많은 수가 *Lc. mesenteroides*로 동정되었고, 발효 후기에 검출되는 *Lactobacillus* 속 중에서 많은 수가 *Lb. plantarum*으로 동정되어, hetero 발효형 유산균 *Lc. mesenteroides*는 유익균으로, homo 발효형 유산균 *Lb. plantarum*은 산패균으로 인식되었다[37, 41].

이러한 미생물군집분석 결과를 토대로 Kang 등[21]과 Kim 등[26-28, 33]은 김치로부터 *Leuconostoc* 속 균주들을 분리한 다음, 돌연변이를 유발시켜 내산성 변이주를 선발하고, 이들을 종균으로 김치를 제조하여 특성 변화를 검토하였다. 종균의 생장에 의해 유기산의 생성과 *Lactobacillus* 속의 생장이 지연되어 가식기간이 연장되고 관능이 좋아지는 것으로 보고하였다. 또한 발효 후기에 증가하는 유기산의 생성을 제어하려는 시도는 내산성 효모의 사용으로 발전하였다. Kim 등[24, 25]은 탄소원으로 유산(lactic acid)과 초산(acetic acid)을 이용하는 *Saccharomyces* 속 효모를 분리하여 종균으로 첨가한 결과, 효모가 유기산의 생성을 감소시켜 김치의 가식기간을 연장하고 향기성분의 생성을 증가시키는 것으로 보고하였다. 또한 내산성 *Leuconostoc* 변이주를 효모와 함께 종균으로 첨가하는 경우, 그 효과가 커진다고 보고하였다[28].

단백질성 항균물질인 bacteriocin 생성 유산균을 이용한 *Lb. plantarum*의 생육저해를 통하여 김치의 가식기간을 연장하려는 시도들이 진행되었다. 김치로부터 분리한 bacteriocin 생성 *Enterococcus* 속 균주를 종균으로 적용한 결과, 가식기간 연장에 유효한 것으로 보고되었다[42]. 그러나 *Enterococcus* 속은 김치발효에서 차지하는 비중이 높지 않으며, 항생물질 내성에 의한 균주의 안전성이 거론되고 있어 김치발효를 위한 종균으로는 적합하지 않은 것으로 사료된다[16, 18]. 또한 *Lb. plantarum*의 생육을 억제하는 bacteriocin 생성 *Leuconostoc* 속 균주가 분리되어 bacteriocin의 특성이 규명되었고[8, 54], 분리된 균주 중 *Lc. citreum* GJ7 균주를 김치제조에 적용한 결과, 우수한 관능적 특성과 가식기간 연장, 종균의 발효기간 중 지속적인 우점을 보고하였다[9].

김치의 건강기능성 향상을 목표로 bifidobacteria를 김치제조에 사용하였으나[6, 7, 31], bifidobacteria의 첨가가 관능적으로 우수하다는 유의성 있는 결과가 도출되지 못하였고, 첨가한 균주가 발효의 진행에 따라 감소한다는 문제점이 제기되었다[6]. Choi 등[11]은 대장균 생육억제 및 가식기간 연장을 위하여 유산을 김치의 절입단계에 소금과 함께 사용하였고, 호염성 *Lactobacillus* sp.를 김치에 첨가하였으나, 제조법이 김치의 규격과 맞지 않으며 관능성이 고려되지 않아 상업적 적용 가능성은 낮은 것으로 생각된다.

현재까지 보고된 김치발효 관련 종균 연구는 1) 김치 적숙기의 우점종을 종균으로 적용한 연구, 2) 내산성 균주를 이용하여 산패균의 생장을 제어하려는 연구, 3) bacteriocin 생산 균주를 이용하여 발효 후기 우점균의 생육을 제어하려

는 연구, 4) 그 외 건강기능성 부여, 관능성 향상, 식품위해균의 억제능력을 보유한 종균을 적용한 연구 등으로 요약할 수 있으며, 각 연구들은 제시한 목표를 어느 정도 달성한 것으로 사료된다.

한편, 16S rRNA 유전자(16S rDNA) 염기서열을 이용한 계통발생학적 분류가 확대됨에 따라 유산균 분류에 변화가 발생하였고, 국내에서 진행된 김치발효 관련 유산균 연구에도 2000년을 기점으로 본격적으로 반영되기 시작했다. 특히 Collins 등[14]이 *Lactobacillus* 속 일부와 *Lc. paramesenteroides*를 *Weissella* 속으로 재분류한 연구결과가 김치발효 미생물 연구에 반영되어 *Leuconostoc* 속뿐만 아니라 *Weissella* 속이 김치발효 초기와 적숙기에 우점을 차지하고 있으며 적숙기 이후에는 *Lb. sakei*가 우점한다는 연구결과가 보고되었다[38, 39, 48].

이러한 김치발효 관련 미생물군집의 천이 및 우점종에 대한 페리다임의 변화에도 불구하고, 여전히 *Lb. plantarum*을 생육제어의 대상으로 규정하고 있으며, 새롭게 도출된 김치발효 관련 미생물 연구결과를 반영하지 못하고 있다[9, 42, 54]. 새로운 결과가 종균 연구에 적용된 예로는 Choi 등[12]이 김치발효 초기의 미생물군집분석을 통하여 *Lc. citreum*의 우점을 확인하고 내산성 *Lc. citreum* 균주를 분리하여 김치발효의 종균으로 사용한 정도에 불과하고, 발효 후기에 생장하는 대표적 유산균 *Lb. sakei*의 생육을 저해하여 가식기간을 연장하려는 연구는 시도된 바 없다.

본 연구자들은 계통발생학적 분류체계와 분자생물학적 방법론의 도입으로 변화된 김치발효 관련 연구결과들을 반영하여, 발효 후기의 우점종으로 알려진 *Lb. sakei*의 생육을 저해하는 *Leuconostoc* 및 *Weissella* 속 균주의 선발을 시도하여 *Lb. sakei* 생육저해 균주의 존재를 확인하였다.

김치로부터 *Leuconostoc* 및 *Weissella* 속 유산균의 분리, 배양 및 동정

Leuconostoc 및 *Weissella* 속 유산균의 분리를 위한 김치 시료는 시중의 대형마트에서 구입하였다. 김치시료의 국물은 멸균한 거즈로 여과하였고, 고형물은 무게대비 2배의 멸균수를 가하여 혼합한 후 여과하였다. 각 여액을 동량 혼합한 다음, single colony의 분리가 가능한 농도로 생리식염수로 희석하여 MRS medium(Difco, USA) 및 leuconostoc selective medium(LUSM)[2]에 1.5%(w/v) 한천을 첨가한 고체배지에 도말하고 30°C, 미호기 조건에서 24시간 배양하였다. 각 배지에서 생장한 집락들 중, 색깔과 모양이 차이는 나는 다양한 집락을 선발한 다음 동일 배지를 이용하여 순수분리 하였다. 순수분리한 균주들은 MRS medium을 사용하여 30°C에서 배양하였다.

각 배지에서 분리한 bacteria는 16S rDNA 염기서열 분석에 의해 계통발생학적으로 동정하였다. 16S rDNA의 증폭은

DNeasy tissue kit(Qiagen, Germany)을 이용하여 추출된 DNA를 PCR 하거나 colony PCR을 통하여 수행하였고, bacteria의 증폭에 많이 사용되는 eubacterial universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC A-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하였다[35]. UNOII Thermocycler(Biometra, Germany)를 PCR 반응에 사용하였으며, 50 μ L 반응계에는 template DNA, 100 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase(Roche, Germany), 20 pmol의 primer를 첨가하였다. 반응조건은 95°C에서 5분 예비가열 후, 95°C 1분간 변성, annealing 57°C 1분, 72°C 1분 중합반응의 과정을 30회 반복하고, 마지막에 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR 반응산물은 0.8% agarose gel을 이용한 전기영동으로 확인하였으며, 16S rDNA 크기에 해당하는 DNA band를 Gel & PCR purification system(SolGent, Korea)으로 회수, 정제하였다. 정제된 단편의 염기서열결정은 수탁업체(SolGent)에 의뢰하여 수행하였고, 결정된 염기서열은 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)와 EzTaxon server 2.1(<http://147.47.212.35:8080/>)에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 nucleotide blast search를 통해 계통발생학적으로 동정하였다. Database에 등록된 표준균주(type strain)와 가장 높은 상동성을 나타내는 분류군(Taxon)을 해당 염기서열에 해당하는 bacteria로 결정하였다.

총 25종의 김치로부터 순수분리한 균주들을 계통발생학적으로 동정한 결과, *Leuconostoc* 속은 148균주, *Weissella* 속은 230균주가 확보되어, 총 378균주가 분리 동정되었다(Table 1).

Lb. sakei 생육저해활성 보유 *Leuconostoc* 및 *Weissella* 속 균주 선발

생육저해활성 보유 미생물의 선발을 시도하는 경우, 많은 연구자들은 저해활성의 확인을 위한 대상 지시균주를 기탁기관으로부터 분양받아 실험을 진행하였다[5, 8, 42, 55]. 그러나 미생물의 생리활성은 종(species)보다는 균주(strain) 특이적인 현상으로 나타내는 경우가 빈번하다. 따라서 본 연구자들은 지시균주를 김치로부터 분리하여 계통발생학적으로 *Lb. sakei*로 동정한 CK0155 균주를 지시균으로 사용하여 *Leuconostoc* 및 *Weissella* 속으로 동정된 378균주의 지시균 생육저해활성을 검토하였다. 전배양한 지시균주를 약 10^5 CFU/mL 농도로 희석하여 MRS 한천배지에 200 μ L 도말하여 건조시킨 다음, 약 10^8 CFU/mL 농도의 실험균주를 백금이를 이용해 희석접종하여 30°C에서 24시간 배양 후 생육저해환의 생성 유무로 생육저해활성을 확인하였다. 생육저해환 생성이 확인된 균주는 agar disk diffusion method [55]를 이용하여 지시균 생육저해활성을 재확인하였다.

Leuconostoc 속 148균주, *Weissella* 속 230균주의 *Lb. sakei* 생육저해활성을 검토한 결과, *Leuconostoc* 속 23균주,

Weissella 속 45균주로 총 68균주가 선발되었다(Table 1). 김치로부터 가장 높은 빈도로 분리된 *Leuconostoc* 속 균주는 *Lc. mesenteroides*로 88균주가 분리되었지만 10%의 균주가 저해활성을 나타내었고, 11균주가 분리된 *Lc. lactis*는 10균주가 생육저해활성을 가지고 있어 가장 높은 빈도로 저해활성을 나타내었다. *Weissella* 속의 경우에는 *W. cibaria*가 가장 많이 분리되었고, 활성을 보유한 균주도 33균주로 가장 많은 수가 선발되었다. *W. confusa*는 31균주가 분리되었지만, 11균주가 활성을 나타내어 *Weissella* 속에서 가장 높은 35%의 선발빈도를 나타내었다. 한편 *W. koreensis*는 *W. cibaria* 다음으로 많은 63 균주가 분리되었지만, 활성을 나타낸 균주는 분리되지 않았다. *Lb. sakei*의 생육저해는 *Lc. mesenteroides*, *Lc. citreum*, *W. cibaria*, *W. confusa*의 경우에는 균주 특이적 현상으로 분석되지만, *Lc. lactis*의 경우 91%의 확률로 생육저해활성을 나타내고 *W. koreensis*의 경우에는 63 균주 중에서 생육저해를 보이는 균주가 없다는 점을 고려하면 종(species) 수준에서의 생리적 특성과도 깊은 관계가 있는 것으로 추정된다.

선발균주의 *Lactobacillus* 속 유산균 생육저해활성

분자생물학적 방법의 적용으로 밝혀진 김치발효 후기의 미생물군집은 *Lb. sakei*가 우점한다는 보고가 주를 이루고 있지만, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*과 같은 *Lactobacillus* 속 유산균도 꾸준히 검출되고 있다. 따라서 *Lb. sakei* CK0155 균주 생육저해활성을 나타낸 68균주의 *Lactobacillus* 속 유산균 생육저해활성을 agar disk diffusion method를 이용하여 검토하였다(Table 2). 생육저해활성의 검토는 김치에서 빈번히 검출되는 것으로 알려진 7종 *Lactobacillus* 속 유산균의 표준균주(*Lb. brevis* ATCC14869^T, *Lb. curvatus* KCTC3767^T, *Lb. paraplantarum* ATCC700211^T, *Lb. plantarum* KCTC3108^T, *Lb. pentosus* KCCM40997^T, *Lb. sakei* subsp. *sakei* KCTC3603^T, *Lb. sakei* subsp. *carneus* KCTC3802^T)를 대상으로 선정하였고, 이들 표준균주들은 Korean Collection for Type Cultures(KCTC), Korean Culture Center for Microorganisms(KCCM), ATCC the global bioresource center로부터 구입하였다. 이들 균주는 MRS broth에서 30°C, 24시간 전배양한 다음 약 10^5 CFU/mL의 농도로 희석하여 MRS 한천배지에 300 μ L 도말하였고, 건조되면 살균된 paper disk(ϕ 6 mm, Whatman, UK)를 올려놓았다. Paper disk에 약 10^9 CFU/mL의 농도로 농축한 선발균주의 배양액 40 μ L를 첨가하고, 30°C에서 24시간 배양하여 생육저해환의 생성을 확인하였다.

Table 2에는 *Lb. sakei* CK0155 생육저해활성을 보유한 68균주의 7종 *Lactobacillus* 속 표준균주에 대한 생육저해활

성을 중복을 고려하여 일부만을 제시하였다. 균주에 따라 생육저해균의 스펙트럼에 약간의 차이는 있었지만 선발균주들 대부분이 *Lb. plantarum*에 대해 약한 생육저해를 나타냈고, 7종 *Lactobacillus* 속 유산균에 대해 유사한 생장억제 스펙트럼을 가지고 있었다. 선발된 *Leuconostoc* 속 균주 중, *Lc. citreum* 2균주, *Lc. mesenteroides* 8균주가 모든 지시균에 대하여 생육저해를 나타내었고, 모든 지시균의 생육을 저해하는 *Lc. lactis* 균주는 발견되지 않았다. 선발된 *Weissella* 속 45균주의 경우에는 *W. confusa* 1균주를 제외한 모든 균주가 7종 지시균 모두에 대하여 생육저해활성을 보유하고 있었다. *Leuconostoc* 속보다는 *Weissella* 속 균주들이 다소 높은 생육저해활성을 가지고 있었다(data not shown).

온도에 따른 *Lb. sakei* 생육저해

선발균주의 *Lb. sakei* 생육저해에 미치는 배양온도의 영향을 agar disk diffusion method를 사용하여 확인하였다. 전배양한 지시균 CK0155 균주를 약 10^5 CFU/mL의 농도로 MRS 한천배지에 200 μ L 도말하여 건조시킨 후, 살균된 paper disk(ϕ 6 mm, Whatman)를 올려놓았다. Paper disk에 약 10^9 CFU/mL의 농도로 농축한 실험균주 배양액 40 μ L를 첨가하여 10°C에서 5일, 20°C에서 4일, 30°C 및 37°C에서는 2일간 배양하여 생육저지환(clear zone)의 생성을 확인하였다(Fig. 1). 온도에 따른 생육저해활성 비교를 위한 균주는 Table 1에 제시한 균주 일부를 임의로 선택하여 사용하였다.

선발된 *Lb. sakei* 생육저해활성 보유 *Leuconostoc* 및

Table 1. Numbers of strains inhibited the growth of *Lactobacillus sakei* CK0155 among the *Leuconostoc* and *Weissella* strains isolated from 25 kimchi samples.

Genus	Species	Isolated strains	Selected strains
<i>Leuconostoc</i>	<i>Lc. carnosum</i>	1	0
	<i>Lc. citreum</i>	34	4
	<i>Lc. holzapfelii</i>	13	0
	<i>Lc. kimchii</i>	1	0
	<i>Lc. lactis</i>	11	10
	<i>Lc. mesenteroides</i>	88	9
<i>Weissella</i>	<i>W. cibaria</i>	123	33
	<i>W. confusa</i>	31	11
	<i>W. hellenica</i>	3	0
	<i>W. koreensis</i>	63	0
	<i>W. paramesenteroides</i>	1	1
	<i>W. soli</i>	8	0
	<i>W. viridescens</i>	1	0

Weissella 속 균주의 생육저해 효과는 30°C 및 37°C의 중온보다 10°C 및 20°C의 저온에서 뚜렷하게 나타났다. 본 실험에서 선발된 *Leuconostoc* 및 *Weissella* 속 균주들은 저온발효 김치에서 검출되고 있고, *Lb. sakei* 또한 저온발효 김치의 우점종으로 보고되고 있다. 뿐만 아니라 *Lb. sakei*는 2~4°C에서도 생육하는 것으로 보고되었다[20]. 따라서 낮은 온도에서 *Lb. sakei*의 생육저해가 뚜렷하게 나타난 것은 균주간의 생육온도 차이에 의한 영향이 아니라, 미생물의 생장이 지연되는 낮은 온도에서 생육저해물질에 의한 *Lb. sakei*

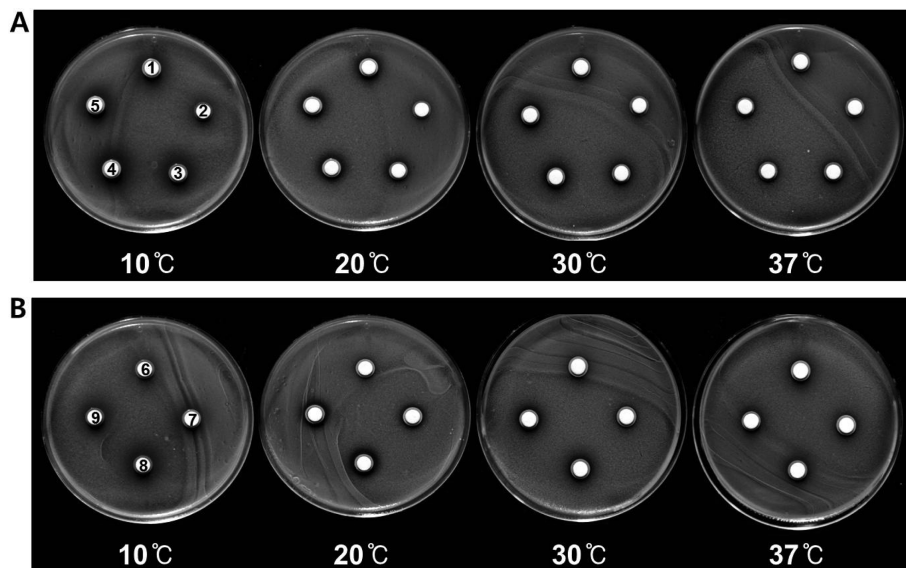


Fig. 1. Effect of temperature on the growth inhibition of *Lb. sakei* by *Leuconostoc* (A) and *Weissella* (B) strains. The growth inhibition of *Lb. sakei* CK0155 by strains *Lc. mesenteroides* CK0241 (1), *Lc. lactis* CK0352 (2), *Lc. citreum* CK0496 (3), *Lc. citreum* KM1207 (4), *Lc. mesenteroides* CK0122 (5), *W. confusa* KK0655 (6), *W. paramesenteroides* KK0717 (7), *W. cibaria* CK0235 (8), and *W. cibaria* CK0487 (9) was measured by agar disk diffusion method.

Table 2. Antagonistic activity of the *Leuconostoc* and *Weissella* strains isolated from kimchi against *Lactobacillus* spp..

Identification	Strain ^a	Indicator strain ^b						
		<i>Lb. sakei</i> spp. <i>carneus</i>	<i>Lb. sakei</i> spp. <i>sakei</i>	<i>Lb.</i> <i>brevis</i>	<i>Lb.</i> <i>curvatus</i>	<i>Lb.</i> <i>paraplantarum</i>	<i>Lb.</i> <i>pentosus</i>	<i>Lb.</i> <i>plantarum</i>
<i>Lc. citreum</i>	CK0496	+	+	+	+	+	+	w
	KK0512	+	+	+	+	-	+	w
	KK0518	+	+	-	+	-	+	w
	KM1207	+	+	+	+	+	+	w
<i>Lc. lactis</i>	CK0352	w	+	+	-	-	+	w
	KK0831	+	+	+	+	-	+	w
	KK0947	+	+	+	+	-	w	w
<i>Lc. mesenteroides</i>	CK0122	+	+	+	+	+	+	w
	CK0241	+	+	+	+	-	+	w
<i>W. cibaria</i>	CK0235	+	+	+	+	+	+	w
	CK0487	+	+	+	+	+	+	w
	KK0720	+	+	+	+	+	+	w
<i>W. confusa</i>	KK0655	+	+	+	+	+	+	w
	KK0754	+	+	-	+	+	+	w
<i>W. paramesenteroides</i>	KK0717	+	+	+	+	+	+	w

^aThe strain number of strains isolated from kimchi was arbitrarily mentioned and some representative strains are shown at this table.

Antagonistic activity: +, positive; -, negative; w, weak.

^bType strains, *Lb. brevis* ATCC14869^T, *Lb. curvatus* KCTC3767^T, *Lb. paraplantarum* ATCC700211^T, *Lb. plantarum* KCTC3108^T, *Lb. pentosus* KCCM40997^T, *Lb. sakei* subsp. *sakei* KCTC3603^T, and *Lb. sakei* subsp. *carneus* KCTC3802^T, were used as the indicator strain for activity determination.

의 성장저해가 더 크게 나타난 것으로 추정된다.

고 찰

현재까지 진행된 김치발효 관련 종균 연구를 종합하면 우수한 김치 종균이 갖추어야 할 조건은 1) 김치 유래 유산균으로 김치발효 초기 및 적숙기의 우점종이어야 하며, 2) 산생성이 적고, 청량감을 부여하는 hetero 발효형 유산균이 적합하다. 또한 3) 내산성을 가지고 있어 발효 후기까지 생존하고, 4) 김치발효 후기에 우점하는 homo 발효형 *Lactobacillus* 속 유산균의 생육과 식품위해균 억제능을 보유한 균주가 유리하다.

본 연구에서 선발된 *Lb. sakei* 생육저해활성 보유 *Lc. mesenteroides*, *Lc. citreum*, *Lc. lactis*, *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. paramesenteroides* 균주들은 저온발효 김치의 초기 및 적숙기에 빈번히 검출되며, hetero 발효형 유산균이다. 이들의 내산성은 아직 검토되지 않았지만 김치발효 후기에 우점하는 homo 발효형 *Lactobacillus* 속 유산균의 생육저해활성을 가지고 있어 김치발효의 종균으로 사용되기에 필요한 요건들 중 3가지 요건을 갖추고 있어 기존에 보고된 종균들에 비해 우수한 것으로 판단된다. 상업적으로 제조된 김치가 저온에서 유통되고 있다는 점을 고려하면, 선발균들의 *Lb. sakei* 생육저해활성이 저온에서 높게 나타나는 점은 산업적

적용에 매우 유리한 특성 중의 하나로 사료된다. 한편, 선발균주들이 발효후기 산패균으로 알려진 *Lb. plantarum*에 대해 약한 생육저해활성을 나타내었지만, 저온발효 김치에서는 발효 후기에 *Lb. plantarum*이 검출되지 않는다는 최근의 연구보고를 고려하면 *Lb. plantarum*에 의한 산패의 영향은 거의 없을 것으로 추정된다[32, 38, 46, 48, 52]. 향후, 본 연구에서 선발된 68균주들 중, 내산성이 우수한 균주를 선발하여 생육저해활성 물질 및 작용기작을 규명하고, 김치 적용실험을 진행할 예정이다.

Acknowledgment

This work was supported by 2008 grant from the Small and Medium Business Administration (SanKiYeon 08-1-054).

REFERENCES

- Ahn, S.-J. 1988. The effect of salt and food preservatives on the growth of lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Korean J. Food Sci.* **4**: 39-50.
- Benkerroum, N., M. Misbah, W. E. Sandine, and A. T. Elarki. 1993. Development and use of a selective medium for isolation of *Leuconostoc* spp. from vegetables and dairy

- products. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 607-609.
3. 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.
 4. 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**: 109-119.
 5. Cha, D.-S. and D.-M. Ha. 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.
 6. Chae, M.-H. and D.-Y. Jhon. 2006. Preparation of *Kimchi* containing *Bifidobacterium animalis* DY-64. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 431-437.
 7. Chae, M.-H., E.-J. Park, T.-K. Oh, and D.-Y. Jhon. 2006. Preparation of kimchi containing *Bifidobacterium longum* BO-11. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 232-236.
 8. Chang, J. Y., H. J. Lee, and H. C. Chang. 2007. Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 2504-2515.
 9. Chang, J. Y. and H. C. Chang. 2010. Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter. *J. Food Sci.* **75**: M103-M110.
 10. Cho, Y. and H. S. Rhee. 1991. Effect of lactic acid bacteria and temperature on kimchi fermentation (II). *Korean J. Soc. Food Sci.* **7**: 89-95.
 11. Choi, K. S., C. Sung, M. H. Kim, and T. K. Oh. 1999. Fermentation method of *Kimchi* using halophilic *Lactobacillus* sp. HL-48 and lactic acid. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 246-251.
 12. Choi, I.-K., S.-H. Jung, B.-J. Kim, S.-Y. Park, J. Kim, and H.-U. Han. 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. *Antonie van Leeuwenhoek* **84**: 247-253.
 13. 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.
 14. Collins, M. D., J. Samelis, J. Metaxopoulos, and S. Wallbanks. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 596-603.
 15. Han, J.-S. and J. Kang. 2004. Retardation of *kimchi* fermentation by addition of glucono- δ -lacton. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 553-559.
 16. Hegstad, K., T. Mikalsen, T. M. Coque, G. Werner, and A. Sundsfjord. 2010. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**: 541-554.
 17. Hong, J.-J., H.-S. Cheigh, and D.-S. Lee. 2006. Quality characteristics of canned *kimchi* prepared by minimal thermal processing. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 754-760.
 18. Huycke, M. M., D. F. Sahn, and M. S. Gilmore. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Eng. Infect. Dis.* **4**: 239-249.
 19. Jung, J.-L., M.-H. Kim, M.-J. Kim, K.-S. Jang, and S.-D. Kim. 1994. Kimchi fermentation and heat treatment under sub-atmosphere. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **40**: 95-104.
 20. Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}, pp. 1209-1234. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
 21. Kang, S.-M., W.-S. Yang, Y.-C. Kim, E.-Y. Joung, and Y.-G. Han. 1995. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for *kimchi* fermentation and effect of starter. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 461-471.
 22. Kim, W.-J., K.-O. Kang, K.-H. Kyung, and J.-I. Shin. 1991. Addition of salts and their mixtures for improvement of storage stability of *kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**: 188-191.
 23. 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.
 24. Kim, H.-J., C.-S. Lee, Y.-C. Kim, C.-B. Yang, and S.-M. Kang. 1996. Identification of yeasts isolated from *kimchi* for *kimchi* starter. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 430-438.
 25. Kim, H.-J., S.-M. Kang, and C.-B. Yang. 1997. Effect of yeast addition as starter on fermentation of *kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**: 790-799.
 26. Kim, Y.-C., E.-Y. Jung, E.-H. Kim, D.-H. Jung, S.-H. Jung, D.-H. Yi, T.-J. Kwon, and S.-M. Kang. 1998. Properties of acid tolerance of acid-resistant mutant *Leuconostoc mesenteroides* which was improved as *kimchi* starter. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 102-109.
 27. Kim, Y.-C., E.-Y. Jung, E.-H. Kim, D.-H. Jung, O.-S. Yi, T.-J. Kwon, and S.-M. Kang. 1998. Strain improvement of *Leuconostoc paramesenteroides* as a acid-resistant mutant and effect on *kimchi* fermentation as a starter. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 151-160.
 28. Kim, Y.-C., E.-Y. Jung, H.-J. Kim, D.-H. Jung, S.-G. Hong, T.-J. Kwon, and S.-M. Kang. 1999. Improvement of kimchi fermentation by using acid-tolerant mutant of *Leuconostoc mesenteroides* and aromatic yeast *Saccharomyces fermentati* as starters. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 22-31.
 29. Kim, S.-J. 2001. Difficulty in Korean *kimchi* industry for modernization. *Food Industry Nutr.* **6**: 34-37.
 30. Kim, D.-H. and Y. S. Hahn. 2003. Effect of addition of ethanol and organic acids on the quality of *Mul-kimchi*. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **13**: 305-312.
 31. Kim, T.-W., A.-K. Park, G.-R. Kim, J.-M. Lee, D.-K. Chung,

- and H.-Y. Kim. 2003. Characterization of functional kimchi using *Bifidobacterium lactis*. *Korean J. Food Sci. Biotechnol.* **35**: 924-927.
32. Kim, M. and J. Chun. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **103**: 91-96.
 33. Kim, Y.-H., H.-Z. Kim, J.-Y. Kim, T.-B. Choi, and S.-M. Kang. 2005. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* as a acid-resistant mutant and effect on kimchi fermentation as a starter. *Korean J. Appl. Microbiol.* **33**: 41-50.
 34. Kim, J. S., Y. Kim, J.-M. Park, T.-J. Kim, B. S. Kim, Y. M. Kim, H. R. Kim, and N. S. Han. 2010. Inhibition of microbial growth in cabbage-kimchi by heat treatment and nisin yucca extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 1678-1683.
 35. Lane, D. J. 1991. 16S-23S rRNA sequencing, pp. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, New York.
 36. Lee, S.-H. and S.-D. Kim. 1988. Effect of starter on the fermentation of kimchi. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **17**: 342-347.
 37. Lee, C.-W., C.-Y. Ko, and D.-M. Ha. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean J Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 102-109.
 38. Lee, J.-H. 2009. Current studies on the community of lactic acid bacteria in kimchi, a traditional Korean fermented food. *Milk Sci.* **58**: 153-159 (in Japanese).
 39. Lee, M., K. H. Cho, and J.-H. Lee. 2010. Application of 16S rDNA PCR-RFLP analysis for the rapid identification of *Weissella* species. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 455-460.
 40. Lim, C.-R., H.-K. Park, and H.-U. Han. 1989. Reevaluation of isolation and identification of Gram-positive bacteria in kimchi. *Korean J. Microbiol.* **27**: 404-414.
 41. 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.
 42. Moon, G.-S., C.-H. Kang, Y.-R. Pyun, and W. J. Kim. 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.
 43. 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.
 44. Park, I. K., S. H. Kim, and S. D. Kim. 1996. Effect of organic acids addition during salting on the fermentation of kimchi. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **6**: 195-204.
 45. Park, W. P., K. D. Park, and S. H. Cho. 1996. Effect of grapefruit seed extract on kimchi fermentation. *Foods Biotechnol.* **5**: 91-93.
 46. Park, J. A., G.-Y. Heo, J. S. Lee, Y. J. Oh, B. Y. Kim, T. I. Mheen, C. K. Kim, and J. S. Ahn. 2003. Change of microbial communities in kimchi fermentation at low temperature. *Korean J. Microbiol.* **39**: 45-50.
 47. Park, J.-G., J.-H. Kim, J.-N. Park, Y.-D. Kim, W.-G. Kim, J.-W. Lee, H.-J. Hwang, and M.-W. Byun. 2008. The effect of irradiation temperature on the quality improvement of kimchi, Korean fermented vegetables, for its shelf stability. *Radiat. Physics Chem.* **77**: 497-502.
 48. Shim, S. and J.-H. Lee. 2008. Evaluation of Lactic acid bacterial community in kimchi using terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 247-259.
 49. So, M.-H. and Y.-B. Kim. 1995. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 495-505.
 50. So, M.-H., M.-Y. Shin, and Y.-B. Kim. 1996. Effects of psychrotrophic lactic acid bacterial starter on kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 806-813.
 51. Sohn, K.-H. and H.-J. Lee. 1998. Effects of high pressure treatment on the quality and storage of kimchi. *Int. J. Food Sci. Technol.* **33**: 359-365.
 52. Um, S., W.-S. Shin, and J.-H. Lee. 2006. Real-time PCR monitoring of *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus paraplantarum* during kimchi fermentation. *Food Sci. Biotechnol.* **15**: 595-598.
 53. Wee, J.-H. and K.-H. Park. 1997. Retardation of kimchi fermentation and growth inhibition of related microorganisms by tea catechins. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**: 1275-1280.
 54. Yang, E. J., J. Y. Chang, H. J. Lee, J. H. Kim, D. K. Chung, J. H. Lee, and H. C. Chang. 2002. Characterization of the antagonistic activity against *Lactobacillus plantarum* and induction of bacteriocin production. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**: 311-318.
 55. Yang, E. J. and H. C. Chang. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 276-284.