

김치 유래 유산균의 항균적 특성과 이용

김기은*

Chacteristics & Applications of Lactobacillus sp. from Kimchi

Gi-Eun Kim*

접수: 2011년 7월 18일 / 게재승인: 2011년 10월 18일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Earlier in Korea Kimchi was made in every family and every province has own taste and specialties. These days almost of the Kimchis are manufactured. We collected variable Kimchis, which were made for private use and isolated microorganisms. Some interesting micobial cells were identified and studied for its application as food and drinks. One of them was identified as *Lactobacillus sakei* KJ123. This strain is known as producing interesting aromatic components during Sakei fermentation like Kimchi in variable conditions. We tried to develop a health beverage with fermentation process. The *Cucurbita maxima* has been known as a traditional healthy food and variable positive effects on the human body were already reported. In this study we tried to develop a production process for a healthy fermented drink on this substrate with strains originated from Kimchi. Many kinds of *lacctobacilli* species existed in the fermented food cannot survive in the acidic conditions like human stomach. So we selected resisting strains in this conditions. The survival rate of *Lactobacillus sakei* cells in the artificial gastric juice and bile acid and other physiological characteristics at the variable conditions have been tested. After fermentation process some sensory tests on the product with panels were tried.

Keywords: kimchi, *Lactobacillus sakei*, healthy drink, *Cucurbita maxima*, acid resistance

서경대학교 생물공학과
Department of Biotechnology, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea
Tel : +82-2-940 7154, Fax : +82-2-919 0345
e-mail: gkeun@skuniv.ac.kr

1. 서론

김치는 세계적으로 알려진 대표적인 채소발효 식품으로 거의 모든 채소가 김치의 원료로 사용될 수 있으며, 김치는 배추나 무에 다양한 향신료를 첨가하여 일정시간 발효시킨 것이다 [2,13]. 현재 우리나라는 물론, 한국 식품의 세계화에 중요한 가치를 지니는 김치에 대한 많은 연구가 다양한 형태로 이루어지고 있다. 특히 김치의 발효과정에 작용하는 미생물에 대한 관심은 건강에 대한 기능과, 자연적인 맛과 향을 생성할 수 있는 기능으로서, 많은 관심 속에 다양한 연구가 진행되고 있다. 특히 김치발효과정에서 숙성에 관여하는 유산균에 의해 생성되는 부산물은 맛과 향에 작용할 뿐만 아니라, 이를 섭취하였을 때 장내 세균조성을 이롭게 하는 기능은 이미 오래 전부터 알려져 왔다. 따라서 그 대사산물들은 기능성 음료나 식품은 물론, 유산균제제로 이용되어, 인체의 영양강화 또는 생리활성기능 촉진, 그리고 건강기능성 식품의 형태로 이용되고 있다 [1,12]. 특히, 근래에는 probiotics라는 기능적인 측면에서 유산균이 주목을 받고 있다. Probiotics는 살아있는 균주를 섭취하는 것이라 잔류 및 내성문제를 해결할 수 있는 항박테리아제로 성장촉진 등의 효과를 나타내는 신생 성장촉진제라 할 수 있다 [4,15,16].

건강보조식품에 대한 관심이 증가하면서 자연식품이나 이를 이용한 발효음식에 대한 재평가가 이루어지기 시작했다. 건강기능성식품의 대표적인 원료인 단호박은 오래전부터 한국인에게 친숙한 식량자원으로, 다른 과채류에 비해 생장에 유리한 기후조건을 가지며, 좋은 뿌리 발달로 다른 작물의 재배가 곤란한 척박한 토양에서도 잘 자란다 [6]. 최근 연구 결과 단호박은 높은 호박보다 카로테노이드의 함량이 10배 이상 높으며, 건강기능성의 중요한 지표가 되는 항산화 특성에서는 단호박이 높은 호박보다 전자공여작용, 아질산염 소거작용 등이 더 높게 나왔다 [11,22]. 이러한 호박의 다양한

이용과 관련하여 호박 꿀차 [18], 고구마와 호박을 첨가한 요구르트 제조연구 [20], 호박식초 [23], 호박떡 [8], 호박첨 가수프 [9], 호박양갱제조 [3] 등이 보고되었다. 특히, 호박분말 첨가가 아닌 단호박 자체를 기질로 사용한 발효음료나 유산균을 김치에서 분리하여 사용한 발효음료에 대한 연구는 되었으나 [19], 아직 상품화되어있지 않다. 따라서 본 연구는 단호박의 소비 수요의 유도 목적과 동시에 단호박의 식품 영양학적 가치를 그대로 가진 새로운 유산균 발효 음료를 개발하고자 한다.

본 연구에서는 서울지역의 일반가정에서 담근 지 35일 된 김치에서 균을 분리하여, *L. sakei*를 동정하였다. *L. sakei*는 facultative hetero-fermentative 유산균으로, glucose fermentation을 통해 lactic acid 이외에 acetic acid나 그 이외의 다른 부산물을 생산하며, 김치숙성과정 중반기부터 생육을 시작하여 젖산과 기타 휘발성 대사산물을 생산하여 김치를 복합적이며 독특한 풍미를 지닌 상태로 발효시킨다. 또한 probiotics의 효과를 확인하기 위해 내산성과 내담즙성을 통해 대장균에 대한 항균성과 식품과 음료의 가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 김치에서 유산균 분리

유산균은 서울지역의 일반가정에서 담근 김치에서 분리하였으며 김치는 담근지 35일된 김치이다. 김치는 김치냉장고에서 보관하였으며, 총 3종의 김치를 시료로 사용하여 분리 하였다. 분리 및 배양에 사용된 배지는 MRS agar 또는 broth (Proteose Peptone No. 3 10.0 g, Beef Extract 10.0 g, Yeast extract 5.0 g, Dextrose 10.0 g, Polysorbate 80 1.0 g, Ammonium Citrate 2.0 g, Sodium Acetate 5.0 g, Magnesium Sulfate 0.1 g, Manganese Sulfate 0.05 g, Dipotassium Phosphate 2.0 g, Distilled Water 1.0 L/Difco)이다. 분리된 유산균 CH123은 액체배지에 접종하여 36°C shaking incubator에서 rpm 120으로 48시간 배양시킨 후 4°C에서 보관하며 증균으로 사용하였다. 증균냉동보관은 glycerol을 처리하여 -80°C에서 3개월마다 계대하였다. 동정된 균주들중에서 주류 제조시 향을 생성하는 균주들을 선택하였고, 이 중에서 인공 위액과 인공담즙산에서 살아남은 1종을 최종적으로 실험에 사용하였다.

2.2. 생육 특성 조사

균을 활성화시켜 30°C에서 진탕배양기에서 120 rpm으로 배양하였다. 시료는 4시간 마다 채취하여 분광광도계 (Spectrophotometer, Shimadzu)로 흡광도와 포도당 농도를 측정한다. 흡광도는 660 nm에서 측정하며, 오차를 줄이기 위하여 증류수로 25배 희석한 후 측정한다. 측정된 수치에 희석배수를 곱한다. 이때, 영점 (autozero)은 증류수를 사용한다. 포도당 값은 포도당 키트 (바이오크리니칼시스템, 한국)를 사용하여 505 nm에서 측정한다. 위에서 사용한 키트는 포도당의 농도가 600 mg/dl까지 직진성이 있으므로 이 범위 안에 들어오게 희석하여 측정 하였다. 희석은 증류수를 이용

하여 3배 희석한다. 그리고 측정된 수치에 희석배수를 곱한다. 포도당 키트의 사용방법은 (Table 1)에 있다.

Table 1. Measurement method of glucose kit

	Blind ^a	Standard ^b	Specimen ^c
Sample (mL)	0.02	0.02	0.02
Enzyme solution (mL)	3.0	3.0	3.0

^aBlind: Mixture of distilled water 0.02 mL and enzyme solution 3.0 mL.

^bStandard: Mixture of standard solution 0.02 mL and enzyme solution 3.0 mL.

^cSpecimen: Mixture of specimen serum 0.02 mL and enzyme solution 3.0 mL.

2.3. 인공위액에 대한 내산성균주 분리

인공위액은 Kobayashi 등의 방법에 따라 1 N HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정된 MRS broth에 pepsin 1%를 첨가하여 사용하였다 [16]. 김치에서 분리된 유산균을 36°C MRS broth에서 24시간 배양시킨 후 15 mL tube에 넣고 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 상등액을 버리고 균을 회수하였다. 회수된 균에 상등액과 동일한 양의 인공위액을 넣은 후 36°C shaking incubator에서 2시간 배양한 후 10⁻³배 희석하여 MRS agar배지에 0.5 mL 도말하여 36°C 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정 하였다. 대조균은 pepsin을 첨가하지 않고 pH를 맞추지 않은 broth를 이용 하였다. 대조균의 희석은 10⁻⁵배를 하였다. 인공위액에 대한 내산성균주 분리시 사용된 시약은 0.45 µm의 membrane filter에 거른 후 사용하였다.

2.4. 단호박 배지 제조

국내산 단호박은 신도자 품종으로 2007년 10월에 경기도 양평에서 수확된 것으로 서울 경동시장에서 구입하였다. 단호박은 구입 후 분리 및 세절하여 초저온 냉동고 (-80°C)에 보관하면서 사용하였다. 배지 제조는 과피 부분과 과육 그리고 씨 부분으로 나누었으며 과피 및 과육을 잘게 썰고 (1 cm이하) 씨는 반으로 잘라 플라스크에 넣은 후 60°C에서 1시간 증탕하였다. 증탕한 배지는 거름종이로 거른 후 멸균하여 사용하였다. 광밀도와 포도당 농도, pH값 등 생육학적 특성에 이용된 배지는 거름종이로 거른 후 0.45 µm의 membrane filter에 거른 후 배지로 사용하였다.

2.5. 단호박 배지에서 유산균의 생장곡선과 pH측정

본 연구실에서 분리한 균주 CH123을 농도가 다른 세가지 종류의 단호박 배지 (5%, 10%, 20%), 250 mL에 5 mL씩 접종한 후 36°C의 shaking incubator에서 20시간 동안 배양하면서 광밀도와 포도당 농도, pH값을 측정하였고, 측정방법은 위와 같다.

2.6. 유산균 단호박 배지 발효물의 항균활성 측정

E. coli k12를 LB broth에 배양하여 LB agar 5 mL가 도포된 배지에 *E. coli*를 0.15 mL 도말하였다. 그 다음 단호박 배지 0.45 µm에 거른 발효물을 묻힌 paper disk를 말린 후 plate에

올려놓았다. 이후 36°C incubator에서 18시간 배양한 *E. coli* k12에 대한 항균활성을 측정하기 위해 LB broth배지 250 mL에 *E. coli* k12를 24시간 배양 하고, MRS broth 50 mL에 키워 놓았던 CH123을 250 mL에 계대시킨 후 4시간 간격으로 균주를 시료로 채취하였다. 균주 배양액은 1 mL를 13,000 rpm으로 5분 원심분리 하고, 멸균된 paper disk에 상등액 100 μ L 흡착시킨 후, 15분 건조시킨다. 그리고 MRS agar에 10배 희석 (D.W 9 mL + *E. coli* 1 mL)한 *E. coli*를 100 μ L spreading 하고, 건조 된 paper disk를 배지 중심부에 올려놓고, 결과를 관찰하였다.

2.7. HPLC 분석

균주 CH123의 배양액을 15,000 rpm에서 원심분리하고, 상등액을 채취하여 0.2 μ m membrane filter로 여과하고, HPLC (Acme 9000, Youngjin)로 분석하였다. 사용된 컬럼은 Organic acid analysis column Aminex HPX-87H Ion exclusion column (Bio-Red, U.S.A.)으로 컬럼의 온도는 35°C로 유지시켰다. 이동상은 0.008 M 황산을 이용하여 0.6 mL/min으로 흘려 보냈다. 시료의 일회 주입량은 20 μ L 이었으며, UV-detector를 사용하여 220 nm에서 검출하였다.

2.8. pH, 적정산도 및 생균수의 측정

pH값의 측정은 pH-meter를 사용하여 측정하였고 적정산도는 단호박 발효배지 중 17.6 mL를 덜어낸 다음 증류수 17.6 mL를 더하여 총 볼륨 35.2 mL를 만든 후 phenolphthalein 용액을 2~3적 가하였다. 0.1 N NaOH용액을 적정하여 30초 동안 분홍빛이 사라지지 않을 때 까지 사용된 NaOH용액의 양으로 계산하였다. 생균수 측정은 10^{-4} 배를 0.9% 식염수에 희석한 다음 MRS agar배지에 0.5 mL를 도말 한 후 36°C의 배양기에서 48시간 배양하였다. 이후 콜로니를 계수하여 희석배수를 곱하여 1 mL중의 생균수를 측정하였다.

2.9. 분리된 균주의 성장곡선

김치에서 분리한 균주 CH123의 최적 온도를 알기 위해 MRS broth 50 mL에 30°C shaking incubator에서 배양 시킨 후, 250 mL에 계대배양하여 25°C, 30°C, 35°C 조건에 맞춰 shaking incubator에서 120 rpm의 조건에서 배양하였다. 그리고 2시간 간격으로 spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 광밀도를 측정하고 glucose kit을 이용하여 tube에 효소액 3 mL과 측정할 검체와 맹검 (맹검은 DW를 이용하여 대조군으로 하였다.)을 20 μ L을 넣고 37.5°C에서 중탕한 후 550 nm에서 포도당을 측정하고, pH meter를 이용하여 sample을 tube에 3 mL넣어 pH값을 측정하였다.

2.10. 16s rRNA Full Sequencing

동정된 균주들 중 활성이 가장 좋은 균주를 취하여 16s rRNA full sequencing을 하였다. 16s rRNA full sequencing을 한 결과를 rRNA database (NCBI: national center for biotechnology information, RDP: ribosomal database project, ERD: European ribosomal RNA database)와 비교하여 대상 미생

물이 어떤 종류의 미생물이 분리 되었는지 확인하였다.

2.11. 농도별, 발효시간별 단호박 발효음료의 관능검사

단호박 배지를 농도별로 10, 20, 30%를 만들어 발효 시켰다. 무게는 wet weight를 이용하여 구하였다. 발효시간 별로는 12, 24, 36, 48시간동안 발효를 시켰다. 이렇게 만들어진 발효음료는 15°C로 냉각하여 5점 평점법 (매우 좋음 5점, 좋음 4점, 보통 3점, 나쁨 2점, 매우 나쁨 1점)으로 평가하였다. 유의성 검정은 패넬과 시료별로 점수의 합계를 계산한 뒤 분산 분석 방법으로 하였다. 관능평가 요원은 의사소통이 가능하고, 단맛, 신맛, 짠맛, 쓴맛과 향을 구분 할 줄 아는 대학생 및 대학원생 13명으로 구성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 김치에서 유산균 스크리닝

김치에서 유산균으로 추정되는 균주를 분리하기 위하여 MRS 배지를 사용하였고, 균주 19종을 분리하였다. 배양 후 젖산을 생산할 것으로 추정할 수 있는 pH 4 이하의 균주를 선택하여 총 3종류를 결정하였다. 그 중 독특한 향을 만들어 내는 균주를 선택하였다. 향에 대한 판단은 관능검사 요원들에 의해 빠르게 설정하고, 동정하였다. 균주들을 선정하고, 이 균주들에 대한 생육특성을 조사하였다. 실험 결과 (Fig. 1-3)에 의하면 OD 값의 변화와 포도당의 분해정도를 통해 30°C에서 가장 잘 자랐지만, 25°C에서와 비교했을 때 큰 차이는 없었다. 반면에, 35°C에서는 일정시간 동안 균의 성장을 관찰할 수 없었다. CH123은 상온에서도 잘 성장하며 좋은 아로마를 가지는 특성을 가지므로 발효식품 또는 음료 생성과정에 첨가할 경우 좋은 아로마를 생성하여 식품의 풍미를 증가시킬 수 있는 매우 유용한 균주라 사료된다.

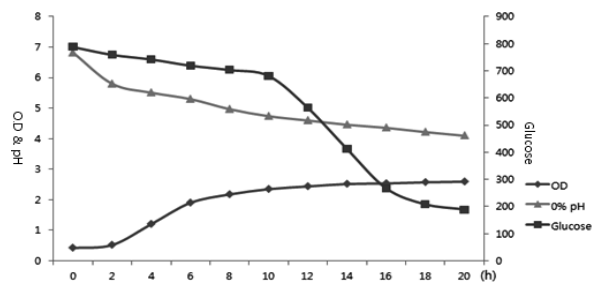


Fig. 1. Growth of *Lactobacillus sakei* at 25°C.

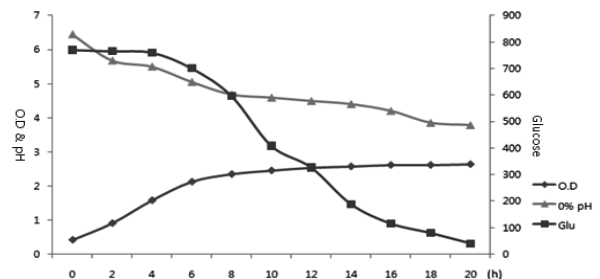


Fig. 2. Growth of *Lactobacillus sakei* at 30°C.

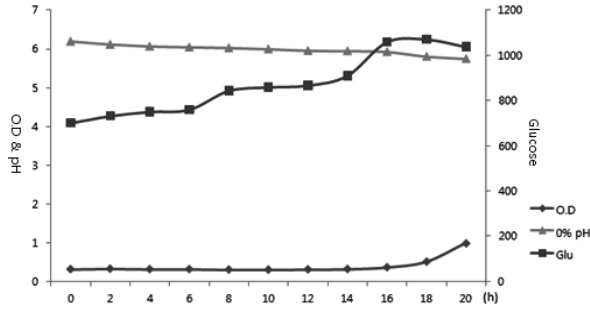


Fig. 3. Growth of *Lactobacillus sakei* at 35°C.

3.2. 인공위액에 대한 내산성균주 분리

유산균을 건강음료로 사용하기 위해서는 유산균이 대부분 죽는 위에서 위산을 견딜 수 있는 내산성이 요구된다. 최종적으로 선별된 3종 중 2종은 사멸하였고 CH123라 명한 1종만이 살아남았다. CH123을 10⁻³배 희석하여 MRS agar 배지에 0.5 mL도말하여 36°C 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정 하였다. 생균수 측정결과 3.7 × 10⁵ CFU/mL 개를 셀 수 있었다. 대조군 배지에서 자란 균은 10⁻⁵배 희석하여 MRS agar 배지에 0.5 mL도말하여 36°C 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수 측정한 결과 1.2 × 10⁸ CFU/mL 개였다. 인공위액에서 유산균의 일부 사멸이 관찰되었으나 위산에 대한 내산성이 있음을 확인하였다 (Fig. 4).

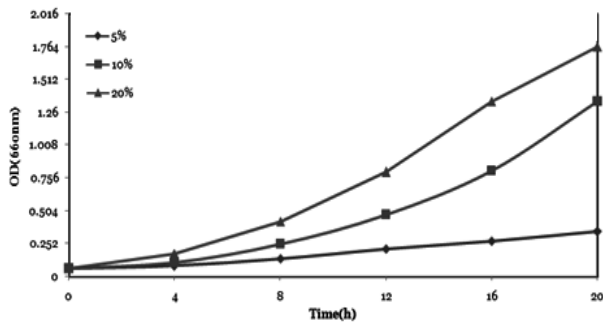


Fig. 4. Growth of *Lactobacillus sakei* in the medium of *Cucurbita maxima*.

3.3. 인공담즙산에 대한 내성균주 분리

내산성 유산균이 위산에 살아남았다 하여도 위를 통과하여 장으로 오게 되면 음식물을 중성화 하는 과정에서 담즙산을 만나게 된다. 담즙산은 유산균을 사멸시키는 또 다른 변수이며 이 담즙산도 통과해야 장에 유산균이 살아서 도달 할 수 있다. 이 실험은 인공위액에서 살아남은 유산균을 가지고 실험 하였다. 10%의 oxgall을 broth 배지에 첨가하여 균을 배양한 후 배양된 균을 10⁻³배 희석하여 MRS agar 배지에 0.5 mL도말하여 36°C 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정 하였다. 생균수 측정결과 2.2 × 10⁹ CFU/mL 개를 셀 수 있었다. 대조군은 인공위액에서 나온 결과를 그대로 사용하였다. 인공위액 실험이나 인공담즙산 실험이나 대조군으로 사용되는 것은 아무것도 첨가하지 않은 MRS broth를 사용하였기 때문이다. 대조군보다는 생균수가 적지만, 10%의 oxgall배지에서도 CH123 유산균이 살아남는 것으로 관찰

되었다 (Fig. 5).

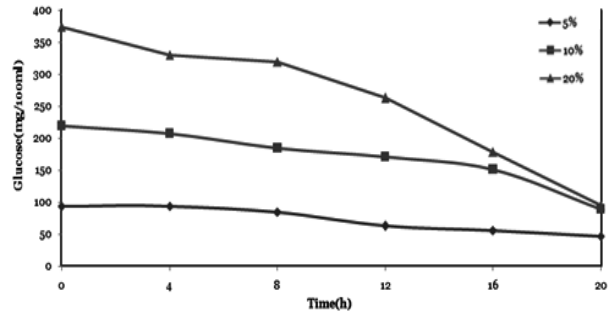


Fig. 5. Glucose Degradation *Lactobacillus sakei* in the medium of *Cucurbita maxima*.

따라서 CH123은 발효식품 생산과정에서 매우 유용한 첨가 미생물로 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한, CH123은 발효과정과, 일부 조건에서 특정 향기성분을 생성할 수 있으므로 맛과, 향, 그리고 항균성까지 종합적으로 갖춘 뛰어난 기능성발효음료생산에 적용할 수 있을 것이다.

3.4. 16s rRNA Full Sequencing

위 실험을 통하여 최종적으로 분리된 균 CH123에 대한 16s rRNA Full Sequencing을 하여 균주 동정을 실시하였다. 그 결과 CH123은 *Lactobacillus sakei*의 확률이 99%로 동정되었다 (Fig. 6). *L. sakei*는 glucose fermentation을 통해 lactic acid 이외에 acetic acid나 그 이외의 다른 부산물을 많이 생산하는 facultative hetero-fermentative 유산균으로 김치숙성과정의 중반기에 세포수가 급격하게 증가하는 것으로 나타나 김치의 맛에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다 [19].

Table 4. Taste of the Fermented Drink with *Lactobacillus sakei* in the 20% *C. maxima* extract

factor	degree of freedom	sums of squares	mean square	F value
treatment (sample)	11	54.0	4.9	5.5
panel	12	24.5	2.0	2.2
error	132	118.3	0.9	
total	155	196.8		

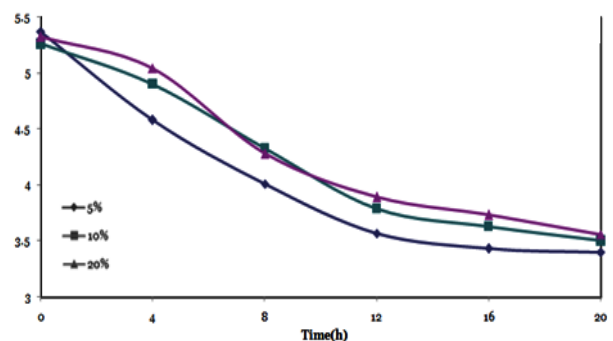


Fig. 6. pH-Change with *Lactobacillus sakei* in the medium of *Cucurbita maxima*.

3.5. 단호박 배지에서 발효과정중의 OD, 포도당, pH값의 변화
 단호박 배지에서 농도 별 *L. sakei*의 OD 값의 변화를 관찰한 결과 시간의 변화에 따라 단호박 배지의 농도가 20%인 경우에서 가장 많이 증가 됨을 확인 하였고 반대로 5%인 경우 가장 낮았다 (Fig. 7). 또한 단호박배지의 농도가 20%인 경우가 낮은 5%의 경우보다 포도당이 많이 소모 되어 지는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 8). pH값을 보면 5% 농도의 배지에서 가장 낮은 pH가 나타나지만, 5%, 10%, 20% 농도 모두 값이 근소한 것을 확인 하였다 (Fig. 9), 따라서, 20%의 단호박배지에서 *L. sakei*의 성장 및 생장이 가장 활발한 것으로 확인 되어 20% 농도의 단호박배지를 최적배지로 정하였다.

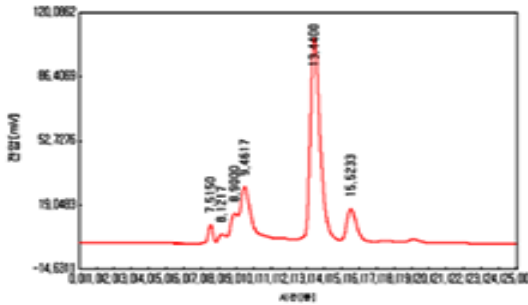


Fig. 7. Acid production of *Lactobacillus sakei* in MRS medium.

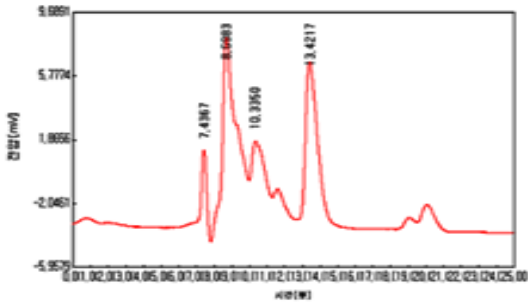


Fig. 8. Acid production of *Lactobacillus sakei* in the 20% of *Cucurbita maxima* extracts.

Lineage:
 Results for Query Sequence: unknown, 1288 unique oligos

```

domain Bacteria (20) (match sequences)
  phylum Firmicutes (20)
    class "Bacilli" (20)
      order "Lactobacillales" (20)
        family Lactobacillaceae (20)
          genus Lactobacillus (20)
            S000261305 not_calculated 0.922 1441 Lactobacillus sakei; HS-1; AB124845
            S000320214 not_calculated 0.921 1409 Lactobacillus sakei; AB183697
            S000393206 not_calculated 0.911 1488 Lactobacillus sakei; AF401673
            S000417782 not_calculated 0.911 1329 Lactobacillus sakei subsp. carnosus (T); CCUG 34545; AY204889
            S000417786 not_calculated 0.914 1339 Lactobacillus sakei subsp. sakei; DSM 20017; AY204893
            S000417788 not_calculated 0.916 1335 Lactobacillus sakei; HNMRS2c; AY204895
            S000608879 not_calculated 0.919 1471 Lactobacillus sakei (T); type strain:DSM 20017; AM113784
            S000610971 not_calculated 0.924 1477 Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K; CR936503
            S000610975 not_calculated 0.919 1476 Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K; CR936503
            S000610978 not_calculated 0.915 1478 Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K; CR936503
            S000610982 not_calculated 0.916 1481 Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K; CR936503
            S000702037 not_calculated 0.911 1394 Lactobacillus sakei; probio-65; DQ631413
            S000734171 not_calculated 0.905 1498 uncultured bacterium; SPB26; DQ922980
            S000736646 not_calculated 0.918 1504 Lactobacillus sakei; PSH-313; DQ989236
            S000806297 not_calculated 0.924 1452 Lactobacillus sp. CWB1/B-659/(E912); EF370992
            S000867833 not_calculated 0.920 1439 uncultured Lactobacillus sp.; SRL-1; EF590122
            S000941643 not_calculated 0.924 1476 Lactobacillus sakei; NRIC 0125; AB362606
            S000941644 not_calculated 0.920 1476 Lactobacillus sakei; NRIC 0126; AB362607
            S000941646 not_calculated 0.924 1476 Lactobacillus sakei; NRIC 0128; AB362609
            S000941768 not_calculated 0.908 1441 Lactobacillus sakei; NRIC 1609; AB362731
  
```

Fig. 9. Comparison 16r RNA Full Sequencing result to RNA databases (NCBI, RDP, and ERRD).

3.6. 유기산 분석

MRS 배지에서 CH123이 생산한 유기산은 HPLC에 의한 분석 결과 lactic acid 269.8243 mM acetic acid 65.2770 mM로 분석되었다. 단호박 배지에서는 단호박 함량 5%, 10%, 20%에서 각각 5%, 1.9031 mM, 10%, 17.1971 mM, 20%에서는 26.2830 mM로 분석되었다. 즉, 단호박 배지의 농도가 높을 수록 당의 농도로 높고, 더 많은 양의 산이 생성되므로, 단호박을 이용한 발효 음료의 건강기능성이 일반적인 호박의 경우보다 더 유효할 것으로 추정된다 (Fig. 10,11).

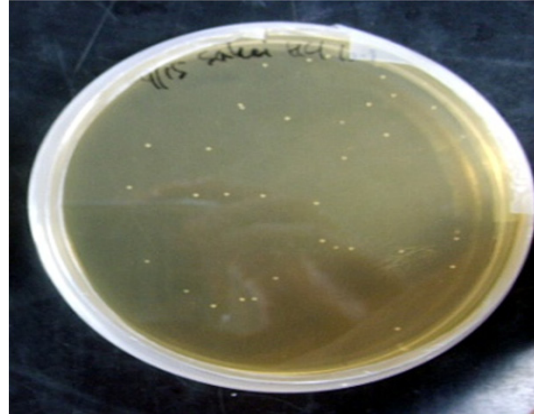


Fig. 10. *Lactobacillus sakei* survived in the Artificial Gastric Juice.

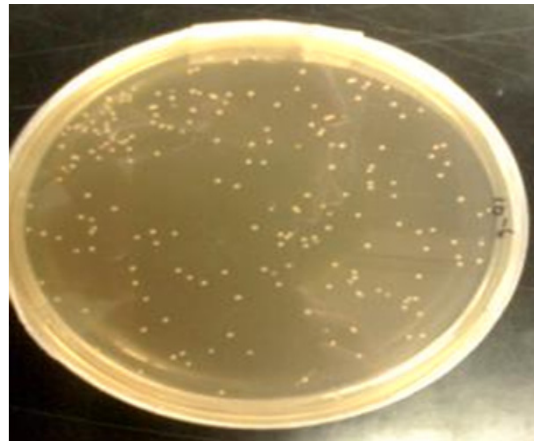


Fig. 11. *Lactobacillus sakei* survived in the Artificial Bile Acid.

3.7. 유산균 단호박배지 발효물의 항균활성 측정

*E. coli*에 대한 antibiotic test결과 clear zone이 형성되었으므로 (Fig. 12), 다른 균들에 대한 항균적 특성이 있을 것으로 사료된다. 식품가공 중에 첨가하여 방부적 기능을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 발효 식품 가공과정에서도 유산균의 기능과 함께 방부제로서의 역할도 기대할 수 있다. 약 18시간 배양 후 대장균에 대한 저해성을 확인하였다. 유산균이 최종적으로 머무는 곳은 사람의 대장이다. 대장에서의 대장균제어는 유산균의 가장 중요한 역할이고, 유산균발효음료가 의약품이 아닌 기능성식품의 종류인 음료이기 때문에 다른 병원성 미생물에 대한 생장저해 효과는 실험에서 배제하였다. 실험결과 대장균이 도포된 plate에서 단호박 배지 발효물을 묻힌 paper

disk를 중심으로 지름 14 mm의 클리어존이 생성된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 발효되지 않은 단호박 배지를 묻힌 paper disk에서는 클리어존이 형성되지 않았다. 이것으로 보아 대장균에 대한 항균활성은 유산균 단호박 배지 발효물의 낮은 pH에 의한 것이라 추측된다.

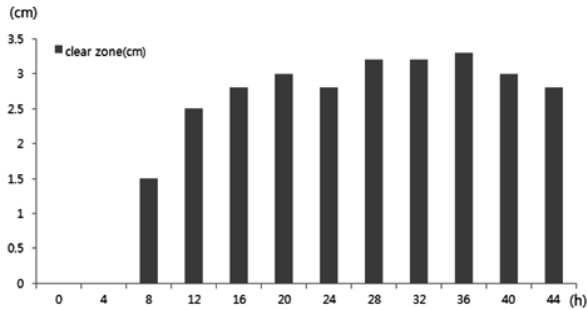


Fig. 12. Antibiotic test of *Lactobacillus sakei* for *E. coli*.

3.8. 농도별, 발효시간별 단호박 발효음료의 관능검사

단호박의 농도별, 발효시간별로 관능적 차이가 있는지 검사를 하였다. 이 실험은 어느 농도와 어느 발효시간이 가장 좋은 것인지 판단한 실험은 아니므로 차후 기호도 또는 선호도 검사가 진행되어야 할 것이다. 결과 및 통계분석에 사용된 수식은 다음과 같다.

<자유도>

$$\begin{aligned} \text{시간 간 자유도} &= \text{시료수} - 1 = 12 - 1 = 11 \\ \text{패널간 자유도} &= \text{패널수} - 1 = 13 - 1 = 12 \\ \text{오차에 대한 자유도} &= \text{총 자유도} - (\text{시료간 자유도} + \text{패널 간 자유도}) = 155 - (11 + 12) = 132 \\ \text{총 자유도} &= \text{총 검사 횟수} - 1 = 156 - 1 = 155 \end{aligned}$$

<제곱합>

$$\begin{aligned} \text{수정계수 (CF, correction factor)} &= (\text{총합계})^2 / \text{총 검사횟수} \\ &= (384)^2 / 156 = 945.2 \\ \text{시료 간 제곱합} &= (\text{각 시료에 대한 합} \times \text{합} / \text{각 시료에 대한 검사 횟수}) - \text{CF} = \{(38^2 + 39^2 + 32^2 + \dots + 23^2) / 13\} - 945.2 = 54.0 \\ \text{패널 간 제곱합} &= (\text{각 시료에 대한 합} \times \text{합} / \text{각 패널에 대한 검사 횟수}) - \text{CF} = \{(26^2 + 19^2 + 34^2 + \dots + 29^2) / 12\} - 945.2 = 24.5 \\ \text{총 제곱합} &= (\text{검사에서 얻은 모든 값에 대해 가가의 값을 제곱하여 얻은 값}) - \text{CF} = \{(4^2 + 3^2 + \dots + 2^2) / 12\} - 945.2 = 196.8 \\ \text{오차의 제곱합} &= \text{총 제곱합} - (\text{시료 간 제곱합} + \text{패널 간 제곱합}) \\ &= 196.8 - (54.0 + 24.5) = 196.8 - 78.5 = 118 \end{aligned}$$

<평균제곱>

$$\begin{aligned} \text{시료 간 평균제곱} &= \text{시료 간 제곱합} / \text{시료의 자유도} \\ &= 54.0 / 11 = 4.9 \\ \text{패널 간 평균제곱} &= \text{패널 간 제곱합} / \text{패널의 자유도} \\ &= 24.5 / 12 = 2.0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{오차의 평균제곱} &= \text{오차의 제곱합} / \text{오차의 자유도} \\ &= 118.3 / 132 = 0.9 \end{aligned}$$

<F값 (분산비)>

$$\begin{aligned} \text{시료 간 F값} &= \text{시료 간 평균제곱} / \text{오차의 평균제곱} \\ &= 4.9 / 0.9 = 5.5 \\ \text{패널 간 F값} &= \text{패널 간 평균제곱} / \text{오차의 평균제곱} \\ &= 2.0 / 0.9 = 2.2 \end{aligned}$$

위와 같은 계산법 [18]을 이용하여 각각 구하여진 값으로 분산분석표를 완성하였다 (Table 2).

기준이 되는 F값은 엑셀 함수 FINV를 이용하여 유의수준 5%에 해당하는 1.86값을 구하였다. 시료의 F값은 5.5이며, 기준이 되는 F값은 1.86 이므로 시료의 F값이 기준 값보다 크므로 유의수준 5%에서 단호박 발효음료는 농도별 발효 시간별로 서로 다른 특성의 차이를 보인다고 볼 수가 있다. 정확한 최적 농도와 발효시간별 최적 발효는 기호도 또는 선호도 검사를 차후에 진행시켜 확인해야 한다.

Table 2. Proximate composition of pumpkin and sweet-pumpkin [23] (unit: %)

	Energy (Kcal)	Moisture	Crud protein	Crud lipid	Crud ash	Crud fiber	Carbohydrate
Pumpkin	27	91	0.9	0.1	0.5	0.8	7.5
Sweet Pumpkin	66	79	1.7	0.2	0.2	1.1	18.0

4. 고찰

유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물 중의 한 종류로 산업적으로 오랫동안 이용되어 왔으며, 발효식품의 주요 미생물로서 식품의 저장수명을 연장시켜 식품보존에 중요한 역할을 한다. 지금까지 여러 가지 유산균과 효모종들이 분리 및 동정되었으며 응용분야와 산업화에 관한 연구도 지속적으로 이루어지고 있다. 앞으로도 이러한 김치 유래 유산균과 미생물의 산업화는 매우 산업적으로 의미 있는 분야가 될 것이다.

또한, 국민 소득이 증대하고 장수와 건강에 관한 관심이 높아지면서 각종 건강식품이 각광을 받기 시작하였다. 이러한 건강식품들 중에서도 미생물의 작용을 받아서 제조된 식품인 발효식품은 전 세계적으로 가장 널리 알려져 있는 건강식품 중 하나이다. 건강식품의 대표적인 원료인 호박은 예로부터 위장이 약한 사람, 회복기간의 환자, 산후 부종제거 등에 좋은 식품으로 알려져 있으며, 카로티노이드가 풍부하여, 항산화, 면역기능향상, 항암 등의 생리활성이 클 뿐 아니라, 섬유소, 펙틴 등이 함유되어 있는 건강식품이다 [23]. 또한 다른 과채류에 비해 기후조건에 대한 적응범위가 넓고, 한국의 기후 풍토하에서 잠재생산 가능성이 대단히 높은 작목의 하나로 간주되고 있으며, 다른 박과 채소보다 병이 심하지 않고 약제를 살포할 필요가 거의 없으므로 무공해 식품으로도 그 가치가 높은 것으로 평가되고 있다. 최근 국민 식생활 패턴이

고급화됨에 따라 건강을 중요시하는 소비자가 급증하면서 약품이 아닌 식품으로 인체의 조절기능에 초점이 맞춘 다양한 기능성 식품이 생산되고 있는 실정이며, 이 중 녹황색 채소류의 항산화, 항암효과가 알려지고 있어 높은 호박을 이용한 새로운 형태의 가공제품은 향후 소비자의 구매 욕구를 충족하기에 충분할 것으로 판단된다. 단호박은 일반 호박보다 크기는 다소 작으나 기존의 호박과는 달리 당도 및 비타민, 무기질의 함량이 높고, 수분함량이 87.9%로 낮은 편으로 맛이 독특하며 생산량의 많은양을 일본으로 수출하고 있다 [22]. 특히 척박한 토양에서 잘 자라고 병이 적어 농약 살포가 적은 무공해 건강식품으로 평가받는 단호박은 건강지향적인 측면에서도 높은 평가를 받고 있어 조리 및 가공 분야의 이용적성에 대한 연구가 이루어지고 있으며 건조방법에 따른 삼투처리 단호박의 품질 특성, 건조 단호박 제조를 위한 삼투건조공정의 최적화 연구가 보고 되었다. 한편 단호박을 이용한 식품에 대한 연구로는 단호박을 이용한 반고형 이유식의 제조, 단호박 첨가수준에 따른 호박떡의 기호성 및 특성 [23] 등의 연구가 보고 되었고, 비교적 높은 기호성과 기능성, 농가의 소득증대 측면으로 볼 때 다양한 가공식품에의 지속적인 응용 연구가 필요하리라 생각된다.

5. 결론

김치에 대한 연구는 오랫동안 지속적으로 이루어졌고, 많은 우수한 결과를 도출하였다. 특히 김치는 각 가정에서 만들어 지므로 맛이나 향이 매우 다양하고, 이는 지역 및 원료물질의 종류와 조성에 따라 미생물의 생육조건도 다양하게 되어 흥미로운 발효결과를 얻게 되는 원인이 된다. 본 연구실에서는 맛과 향이 다양한 여러 가지 김치에서 미생물을 분리하고 동정하였다. 이들중 식품산업화에 응용이 가능하다고 사료되는 균주를 선택하여 지속적으로 연구하였다. 우리나라 대표적인 식품인 김치를 이용한 여러가지 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

동정된 유산균중 *Lactobacillus sakei* KJ123는 특히 사케의 발효과정에서도 분리되었고, 일부 조건에서 특정 향기성분을 만든다는 것을 본 연구실에서 확인한 결과, 이를 건강발효 음료 개발에 적용하는 연구를 실시하였다. 또한 연구중 항균성에 대한 테스트를 실시한 결과 긍정적으로 판단되어 지속적으로 분석하였다. 본 연구에서는 특히 식품이나 음료 발효과정 중 유산균을 첨가하면 맛과 향은 물론 항균성이 특징적으로 작용한다면 방부제등을 대체할 수 있는 효과를 얻을 수 있으므로, 식품첨가미생물로 대체할 수 있다. *Lactobacillus sakei* KJ123는 유기산 생성과 함께 대장균에 대한 테스트 결과 *E. coli* 균생성이 억제되었다.

References

1. Atrih, A. et al. (1993) Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Can. J. Microbiol.* 39.

2. Cheigh, H. C. and K. Y. Park (1994) Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* Busan University, Busan.
3. Choi, E. M. and B. M. Jung (2004) Quality characteristics of yanggeng prepared by different ratio of pumpkin. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 20.
4. Fernandez, M. F. et al. (2003) Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 94.
5. Heo S. J. et al. (1998) The comparison of food constituents in pumpkin and sweet-pumpkin. *Korean J. Dietary Culture* 13: 91-96.
6. Kang, H. Y. et al. (1978) Vegetable Horticulture, pp. 201, Hakamoonsa, Seoul, Korea.
7. Kang, Y. H. et al. (2003) Food Manufacturing Process, pp. 157, Bookshill, Seoul, Korea.
8. Keum, J. H. (1999) Studies on garlic and pumpkin vinegar, *Korean J. Food Nutr.* 12.
9. Kim, J. M., Y. H. Rho, and Y. J. Yoo (2004) Quality properties of cream soup added with chungdong pumpkin and sweet pumpkin. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33.
10. Kim, K. B. et al. (2009) Quality characteristics of sweet pumpkin on mayonnaise. *Korean Food Service Association* 5: 71-87.
11. Kim, S. R., T. Y. Ha, H. N. Song, Y. S. Kim, and Y. K. Park (2005) Comparison of nutritional composition and antioxidative activity for kabocha squash and pumpkin. *Korea J. Food Sci. Technol.* 171-177.
12. Klaver, F. A. M. and R. van der Meer (1993) The assumed assimilation of cholesterol lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt conjugation activity, *Appl. Environ. Microbiol.* 59.
13. Koh, J. S. (2004) Food Biotechnology, pp. 189, Yoohan Press, Seoul, Korea.
14. Koo, N. S. et al. (2006) Food Sensorik, pp. 111-114, Kyomoonsa, Seoul, Korea.
15. Lee, C. H., K. D. Jun, and W. S. Kim (2001) HD Partial characterization of polyfementicin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*, *Lett. Appl. Microbiol.* Kyungnam University, Kyungnam, Korea.
16. O'Sullivan, G. C. (2001) Probiotics, pp. 88, Brit J Sung.
17. Paik, H. D., M. Y. Jung, H. Y. Jung, W. S. Kim, and K. T. Kim (2002) Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 73-78.
18. Park, Y. H. (1995) A study on the development pumpkin-citron-honey drink. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24: 625-630.
19. Roh, H. J. et al. (2009) Fermentation of curcubita maxima extracts with microorganisms from kimchi. *KSBB Journal* 24: 149-155.
20. Shin, Y. S., K. S. Lee, and D. H. Kim (1993) Studies on the preparation of yoghurt from milk and sweet potato or pumpkin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 666-671.
21. So M. H. et al. (1995) Isolation and identification of psychrophilic *Lactobacilli* from kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 495-505.
22. Kim, S. R. et al. (2005) Comparison of nutritional composition and antioxidative activity for kabocha squash and pumpkin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 171-177.
23. Yun, S. J. et al. (2000) Quality characteristics of pumpkin rice cake prepared by different cooking methods. *Korean J. Soc. Food Sci.* 16: 36-40.