

김치분리균주 *Lactobacillus* sp.를 Starter로 한 발효생식 제조에서의 위생미생물 살균효과

김동호 · 송현파 · 손재성* · 차보숙** · 신명곤*** · 변명우†

한국원자력연구소 방사선식품·생명공학연구팀, *(주)새벽을 여는 사람들,
수원여자대학교 식품과학부, *우송대학교 식품생명공학부

Effects of Fermentation to Improve Hygienic Quality of Powdered Raw Grains and Vegetables Raw Grains and Vegetables Using *Lactobacillus* sp. Isolated from *Kimchi*

Dong-Ho Kim, Hyun-Pa Song, Jae-Sung Sohn*, Bo-Suk Cha**,
Myung-Gon Shin*** and Myung-Woo Byun†

Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research
Institute, Daejeon 305-600, Korea

*Dawn Opening Men Co., Yeosu 469-880, Korea

**Dept. of Food Science, Suwon Woman's College, Gyunggi 441-748, Korea

***School of Food Technology, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea

Abstract

Improvement of hygienic quality of powdered raw grains and vegetables by fermentation was investigated. *Lactobacillus* sp. isolated from *kimchi* was used as a starter. The cell counts of coliform group and SS enteric bacteria on the SS agar plate in raw grains and vegetables were 2.3×10^3 cfu/mL and 8.6×10^2 cfu/mL, respectively. The starter, *Lactobacillus* sp., reached 10^7 cfu/mL after 48 hr in fermentation. At that time, the coliform group and enteric bacteria on the SS agar plate were gradually inactivated and eliminated after 60 hr of fermentation. During the fermentation process, pH of the suspension was lowered and acidity increased. Antimicrobial activity of the acidic supernatant of fermented raw grains and vegetables against the *E. coli* sp. and *Salmonella* sp. was higher than that of lactic acid solution or neutralized supernatant. Therefore, it was considered that antimicrobial effect of the fermented raw grains and vegetables might be accelerated by the synergic effect of acid and bacteriocin, and liquid fermentation of powdered raw grains and vegetables will be effective for inactivation of hygienic microorganisms.

Key words: fermentation, powdered raw grains and vegetables, *Lactobacillus*, bacteriocin

서 론

생식은 곡류, 과일, 엽채류 등을 자연건조 또는 동결건조한 다음 분말 등의 형태로 가공한 곡류 가공식품이다. 생식은 정제도가 낮은 곡류나 과채류를 원료로 하고 가열 등의 물리적 가공을 최소화함으로써 식물성 원료에 함유되어 있는 식이섬유, 비타민, 미네랄, 효소 등의 각종 기능성 물질을 최대한 보존하여 이를 섭취하였을 때 유효한 생리적 기능성을 기대할 수 있도록 구성된 식품이다(1). 따라서 생식은 대용식 또는 이유식 개념의 기존 곡류 가공식품과는 구분되는 일종의 건강식품으로 인식되고 있으며, 건강지향의 자연식, 채식 등의 식문화 확산과 더불어 최근 그 소비량이 급속히 증가하는 추세에 있다(2). 그러나 다른 한편으로 생식은 호화되지 않은 전분의 섭취

로 인한 소화장애(3), 비가열 곡류 및 과채류의 식물성 독성물질(4) 섭취에 의한 식성장해, 식물성 allergen(5)에 의한 알러지 유발 등과 같은 부작용을 유발할 가능성도 크다. 특히, 생식은 비가열 가공식품이며 섭취 시에도 조리과정을 거치지 않고 물에 직접 희석하여 음용하므로 생식의 원료 및 제조공정에서 유해 미생물이 유입될 경우 미생물에 의한 식성병해를 일으킬 위험성이 크다. 생식제품의 원료인 곡류와 과채류 등에는 각 원료에 따라 차이는 크지만 곰팡이, *Bacillus*, *Pseudomonas* 등의 토양미생물이 $10^2 \sim 10^5$ cfu/g 내외로 분포하며 병원성 미생물의 분포 가능성도 높은 것으로 보고되고 있다(6,7). 따라서 생식제품의 품질 및 위생기준의 설정과 함께 생식제품에 적합한 새로운 살균기술의 개발이 필요하나 지속적인 시장의 확대에도 불구하고 이에 관한 연구는 아직까지 부족한 실정이다.

†Corresponding author. E-mail: mwbyun@kaeri.re.kr
Phone: 82-42-868-8060, Fax: 82-42-868-8043

한편, 식품의 발효는 미생물의 작용에 의하여 고분자 영양 물질의 분해와 다양한 2차 대사산물의 생성을 유도함으로써 소화흡수도의 향상, 새로운 기능성의 형성, 관능의 향상 등을 기대할 수 있을 뿐만 아니라 식품의 보존성을 향상시킬 수 있는 유효한 공정으로 평가되고 있다(8). 특히 김치나 유발효 식품에 분포하는 젖산균은 pH의 저하와 함께 다른 세균의 생장 저해물질인 bacteriocin을 생성하여 발효식품의 보존성을 높이는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있으며(9-11) 최근에는 *Lactobacillus*나 *Leuconostoc*과 같은 bacteriocin 생산 미생물을 이용하여 식품의 위생미생물 제거에 이용하려는 연구(12,13)도 수행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 비가열식품인 생식제품의 위생미생물을 제거하기 위하여 김치 분리균주인 *Lactobacillus* sp.를 starter로 한 발효공정을 적용기로 하고 생식의 발효에 따른 위생미생물의 살균효과를 조사함으로써 발효를 이용한 생식의 보존성 및 위생성 향상의 새로운 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

원료 및 시약

생식의 발효에 사용한 시료는 S사의 시판 생식제품을 구입하였으며 미생물 분리를 위한 배지는 Difco Laboratories(Detroit, Michigan, USA) 제품을, 일반 시약은 특급 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 생식은 α -현미, 현미, 발아현미, 신선초, 케일, 사과, 당근, 차조, 수수, 울무, 돌미나리, 비트, 양배추, 찹쌀, 보리, 콩, 들깨, 우엉, 호박, 무청, 검은깨, 다시마, 쑥, 영지 등의 과채류를 원료로 하였으며 탄수화물 46.4%, 지질 18.0%, 조단백질 22.3%의 영양성분으로 구성된 것이었다.

발효균주 및 발효생식의 제조

발효 균주인 *Lactobacillus* sp.는 적숙기의 배추김치에서 분리된 것으로, The shorter Bergey's manual(14)에 준한 외형 관찰, gram 염색, 당 이용 분석 등을 통하여 *Lactobacillus* sp.로 잠정 동정된 것을 사용하였다. Starter는 25°C의 MRS broth에서 48시간 배양한(약 1×10^9 cfu/mL) *Lactobacillus* sp. 배양액을 원심분리하여 멸균된 MRS broth에 희석(약 1×10^6 cfu/mL)하였으며, 발효생식은 생식분말 200 g에 멸균수 1 L를 가하여 균질화시킨 현탁액에 *Lactobacillus* sp. 희석액 1 mL를 접종하여 25°C에서 72시간 동안 진탕배양하여 제조하였다.

미생물 검사

생식의 미생물 검사 시료는 생식분말 10 g에 멸균수 90 mL를 가하여 멸균된 mixer(Hanil, FM 680T, Korea)에 60초간 마쇄한 다음, 삼각플라스크에 담아 4°C의 진탕교반기에서 30분간 교반하여 제조하였으며 발효생식은 현탁액을 직접 취하여 시료로 사용하였다. 제조된 시험액을 연속 희석하여 EC agar, SS agar, MRS agar plate에 1 mL씩 pour plating하고,

적정온도에서 3일간 배양하여 생성된 colony의 수를 colony counter(IPI Inc., Microcount 1008, USA) 또는 육안으로 계수하였다. 이 때 각 미생물군은 Difco manual(15)에 따라 EC agar(37°C)에서 분리된 미생물을 coliform group으로, MRS agar(30°C) 분리균주는 *Lactobacillus* group으로 구분하였다. 한편, *Salmonella*의 선택배지로 사용한 SS agar(37°C)는 *Salmonella*나 *Shigella* 뿐만 아니라 자연상태의 비병원성 미생물(gram negative facultatively anaerobic rods, Enterobacteriaceae)도 검출되므로 생식 발효기간 중의 미생물군 변화에서는 *Salmonella* group으로 구분하지 않고 SS agar plate 분리균주로 표기하였다. EC agar plate와 SS agar plate에서 분리된 미생물 가운데 그 출현빈도가 높은 것을 선별하여 Kligler's iron agar에서의 산-알칼리 생성 및 H₂S 생성반응(16) 등에 따라 속 단위까지 잠정 동정하고 이를 *E. coli* sp.와 *Salmonella* sp.로 구분하여 발효생식의 항균력 측정에 사용하였다. 분리된 *Salmonella* sp.는 산-알칼리 생성 및 H₂S 생성반응 시험과 함께 Microbial Identification System(MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, Delaware, USA)을 이용한 세포막의 지방산 분석을 통하여 동정하였다.

pH 및 산도 분석

생식의 pH는 미생물 검사용으로 제조한 시료를 여과(Whatman Paper No. 2)하여 그 여과액의 pH를 pH meter(Model 520A, Orion Co., USA)로 측정하였으며 산도는 20 mL의 여과액에 0.1 N NaOH를 적하하면서 pH 7.3에 도달할 때까지의 NaOH 소요량을 측정하여 다음 이를 lactic acid 함량(%)으로 환산하여 나타내었다. 발효생식의 lactic acid 함량은 0~2.5%의 lactic acid 수용액에 0.1 N NaOH를 적하하여 pH 7.3으로 적정한 표준곡선으로 계산하였다.

발효생식의 위생미생물 살균효과

발효 48 시간이 경과한 발효생식의 현탁액을 여과(nitrocellulose disc paper, pore size 0.45 μ m)한 다음 그 여액을 1 mL씩 취하여 nutrient broth에서 stationary phase까지 배양한 *E. coli* sp.와 *Salmonella* sp. 배양액 9 mL에 첨가하여 각 미생물의 사멸율을 측정하였다. 아울러 *Lactobacillus*가 생산한 유기산이 생식분포 위생미생물의 사멸에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 발효생식의 산도에 준하는 lactic acid(2%) 수용액, 그리고 발효 여액을 1 N NaOH로 중화(pH 7.3)시킨 각각의 시료를 *E. coli* sp.와 *Salmonella* sp. 배양액에 처리하여 발효생식 현탁액과의 사멸율을 비교하였다.

통계분석

생식 발효 중의 미생물, pH 및 산도의 변화는 3회의 반복실험을 하였으며 각 회당 3개의 시료를 검사하였다. 실험결과를 SAS software(17)를 이용하여 분산분석하였으며 Student-Newman-Keul's(SNK) 다중검정법을 이용하여 유의차를 조사하였다. 이 때 유의수준은 5% 이내로 하였다.

결과 및 고찰

발효생식의 미생물 성장 변화

생식의 발효기간 중 MRS agar (*Lactobacillus* spp.), EC agar(coliform bacteria), 그리고 SS agar plate 분리 미생물군의 변화를 조사하였다 (Fig. 1). 발효 초기, 생식의 coliform bacteria는 2.3×10^3 cfu/mL의 수준이었으며 SS agar plate에서 분리된 미생물군도 8.6×10^2 cfu/mL의 분포를 보여 enteric bacteria 계열의 위생미생물 오염 가능성이 매우 높음을 알 수 있었다. 생식의 이와 같은 위생미생물 분포는 소맥분 등의 곡류분말(6)이나 일반 과채류(7)보다 10배 이상 높은 수준이었으며 이러한 결과로 보아 생식의 제조과정에서는 원료로부터의 1차 오염뿐만 아니라 기구나 작업자 등을 통한 미생물의 2차 오염이 상당 부분 진행되고 있음을 예측할 수 있었다. 생식에 starter로 접종한 *Lactobacillus* sp.는 발효초기 1.1×10^3 cfu/mL에서 발효 48시간 이후 10^7 cfu/mL 수준으로 증식하였으며 coliform group과 SS agar 분리 미생물은 발효시간의 경과에 따라 점차 감소하여 발효 48시간 이후에는 거의 사멸되었고 60시간 이후에는 검출되지 않았다. 따라서 생식의 발효는 위생미생물의 살균에 따른 위생성의 향상에 유효한 공정이 될 수 있을 것으로 사료되었으며 추후 발효에 의한 기능성의 향상, 관능의 개선 등과 같은 식품영양학적인 품질개선도 가능할 것으로 기대되었다.

발효생식 분리 위생미생물의 동정

생식의 발효초기에 EC agar와 SS agar plate에서 검출된 미생물을 Kligler's iron agar에서의 산-알칼리 생성 및 H₂S 생성반응 실험, 생리실험을 통하여 잠정 동정하고 *E. coli* sp.와 *Salmonella* sp.를 분리하였다(Table 1A). 분리된 *Salmonella* sp.는 세포막 지방산 분석 결과 *Salmonella typhimurium*으로

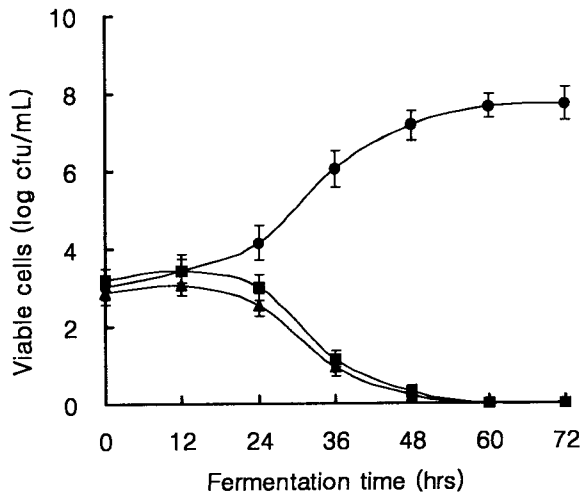


Fig. 1. Changes of the microflora of powdered raw grains and vegetables during its fermentation process. Symbols are *Lactobacillus* group:●, coliform group:■, SS agar isolated enterobacter group:▲.

Table 1. Reactions in Kligler's iron agar and some physiological characteristics of *E. coli* sp. and *Salmonella* sp., and fatty acid composition in cell membrane of *Salmonella* sp. isolated from powdered raw grains and vegetables

A. Kligler's iron agar and some physiological characteristics		
Tests	<i>E. coli</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
Kligler's iron agar test		
Butt	acid	acid
Slope	acid	alkaline
H ₂ S	-	+
Citrate utilization	-	+
Indole	+	-
ONPG	+	-
B. Fatty acid composition of <i>Salmonella</i> sp.		
Fatty acid	Composition (relative %)	
12:0	5.39	
13:0	0.21	
14:0	8.60	
15:0	1.33	
16:1 iso I/14:0 3OH	9.07	
16:1 w7c/15 iso 2OH	27.90	
16:0	22.87	
17:0 cyclo	7.70	
17:0	0.46	
18:1 w7c/w9t/w12t	15.59	
Presumptive identification	<i>Salmonella typhimurium</i>	

동정되어(Table 1B) 생식에 병원성미생물이 생존할 수 있음이 확인되었다.

발효생식의 pH 및 산도 변화

생식 현탁액의 pH는 발효초기 6.8에서 발효시간의 경과에 따라 점차 감소하여 48시간 후 pH 4.0 이하로 낮아졌으며 발효생식의 산도는 발효초기 lactic acid 함량 기준 0.02%에서 점차 증가하여 48시간 이후에는 1.92%까지 높아졌다(Fig. 2). 이러한 생식의 산도는 김치(18)의 발효후기 산도나 젖산균 starter를 이용한 야채발효 제품(19)의 lactic acid 함량보다는 3배 이상 높은 것이었다. 이는 생식에 포함된 곡류의 탄수화물 함량이 야채보다 높아 생식에서 발효에 의한 유기산 생성이 많았기 때문으로 해석되었다.

발효생식의 위생미생물 살균효과

발효 48시간이 경과한 발효생식 현탁액과 발효생식 현탁액의 산도에 준하는 lactic acid 수용액(2% lactic acid), 그리고 1 N NaOH로 중화(pH 7.3)시킨 발효생식 현탁액의 세 가지 시료를 생식에서 분리한 *E. coli* sp.와 *Salmonella* sp. 배양액에 각각 1/10 농도로 처리하여 각 미생물의 사멸율을 측정하였다 (Fig. 3). 발효생식의 현탁액을 처리한 시험구에서, *E. coli* sp. (D value=6.1 min)는 처리 전 10^9 cfu/mL에서 30분 후 10^3 cfu/mL로 그 밀도가 낮아졌고 1시간 후에는 완전사멸되었으며 *Salmonella* sp.(D value=6.8 min)도 비슷한 양상을 나타내었다. 이에 비하여 lactic acid 처리구에서는 처리 전 10^9 cfu/mL에서 2시간 후 *E. coli* sp.(D value=66.2 min)는 10^7 cfu/mL 수준으로, *Salmonella* sp.(D value=74.6 min)는 10^8 cfu/mL 수준으로

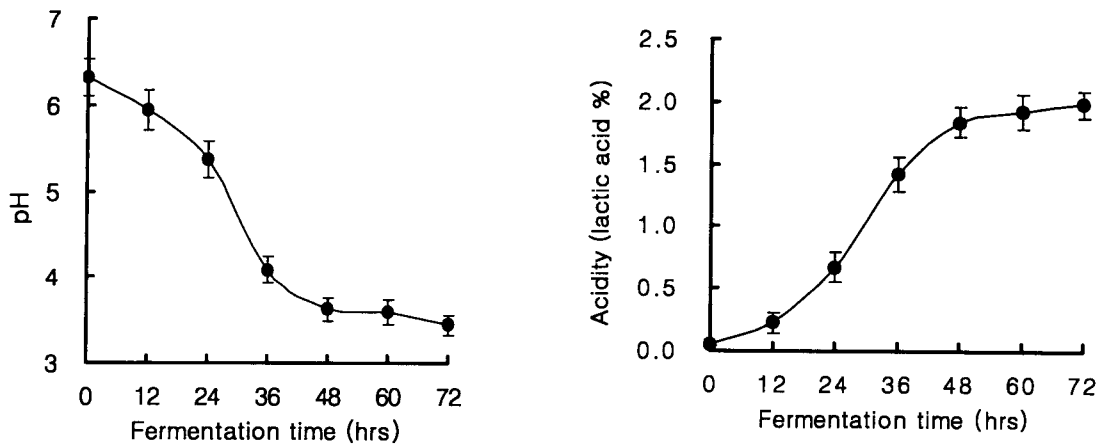


Fig. 2. Changes of pH (left) and acidity (right) of powdered raw grains and vegetables during its fermentation process.

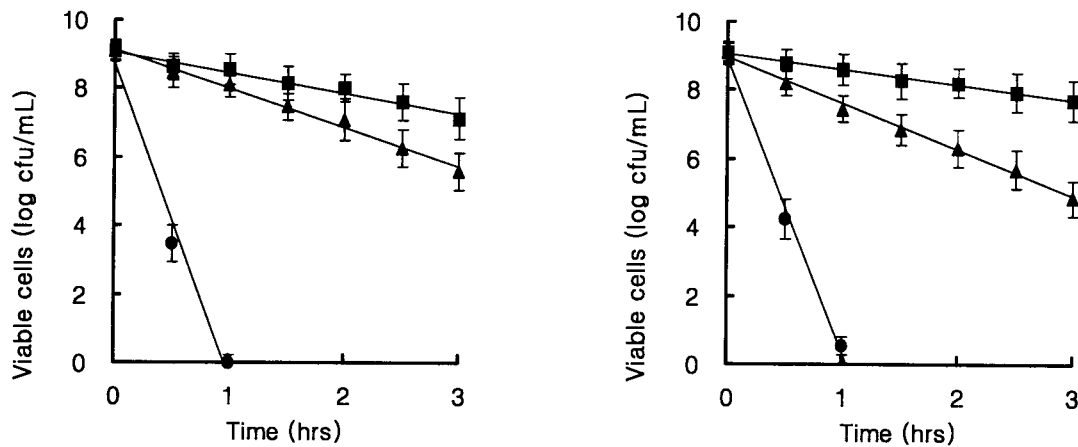


Fig. 3. Antimicrobial effect of the supernatant of fermented raw grains and vegetables, neutralized supernatant of fermented raw grains and vegetables and the solution of 2% lactic acid against *E. coli* sp.(left) and *Salmonella* sp. (right).

Symbols are supernatant of fermented raw grains and vegetables:●, neutralized supernatant of fermented raw grains and vegetables:■, solution of 2% lactic acid:▲.

감소되었으며 1 N NaOH로 중화시킨 발효생식 현탁액을 처리한 시험구에서는 2시간 이후 *E. coli* sp.(D value=133.9 min)와 *Salmonella* sp.(D value=117.5 min) 모두 10^8 cfu/mL 수준으로 감소되는데 그쳤다. 이러한 결과는 김치분리균주 *Lactobacillus* sp.가 생산하는 bacteriocin의 살균작용이 lactic acid를 비롯한 유기산과 복합적으로 처리하였을 때 보다 유효하게 나타난다는 것을 의미하는 것이다. 한편, Alakomi 등(20)은 그람음성세균에 lactic acid를 처리하였을 때 lactic acid가 세균의 세포외막을 통하여 투과되면서 다른 항균성 물질의 작용을 보다 강화시킨다고 보고한 바 있다. 따라서 산성 pH의 발효생식 현탁액의 위생미생물 살균효과가 lactic acid 수용액(2% lactic acid)과 중화(pH 7.3)시킨 발효생식 현탁액에 비하여 높은 것은 lactic acid의 살균 및 투과작용과 bacteriocin의 작용이 상승효과를 나타낸 때문으로 해석되었다. 그러나 다른 한편으로는 본 연구에 사용된 *Lactobacillus* sp.가 산성 pH에서 높은 항균력을 가진 bacteriocin을 생산하였다고 볼 수도 있으며 생식원료 자체에서 유래된 항균물질이나 미생물의 다른 대

사산물이 작용하였을 수도 있다. 따라서 본 model system에서의 위생미생물 살균 기작의 명확한 해석을 위해서는 향후 분리균주 *Lactobacillus* sp.의 동정, bacteriocin의 특성규명 등과 같은 세부적인 조사가 필요할 것으로 사료되었다.

요 약

김치로부터 분리된 *Lactobacillus* sp.를 starter로 한 생식의 발효과정에서 위생미생물의 살균 및 일반품질의 변화를 살펴 보았다. 실험에 사용한 생식분말 현탁액의 coliform group과 SS agar 분리 미생물은 각각 2.3×10^3 cfu/mL, 8.6×10^2 cfu/mL으로 분포하여 위생미생물의 오염 가능성이 컸다. 발효생식에 starter로 접종한 *Lactobacillus* sp.는 발효초기 1.1×10^3 cfu/mL에서 발효 48시간 이후 10^7 cfu/mL 수준으로 증식하였으며 coliform group과 SS agar 분리 미생물은 발효시간의 경과에 따라 점차 감소하여 발효 48시간 이후에는 거의 사멸되었고 60시간 이후에는 검출되지 않았다. 발효생식의 pH는 발효초

기 6.8에서 발효 48시간 후 pH 4.0 이하로 낮아졌고 산도는 발효시간의 경과에 따라 점차 증가하는 양상을 나타내었다. 발효 48시간이 경과한 발효생식 현탁액, 2% lactic acid 수용액, 그리고 pH 7.3으로 중화시킨 발효생식 현탁액을 *E. coli* sp.와 *Salmonella* sp.에 처리한 결과 발효생식의 현탁액을 처리한 시험구의 살균효과(D value ≈ 6 min)가 lactic acid 처리구(D value ≈ 60 min) 및 중성 pH의 발효생식 현탁액(D value ≈ 120 min)에 비하여 높아 김치분리균주 *Lactobacillus* sp.가 생산하는 bacteriocin의 살균작용이 lactic acid를 비롯한 유기산과 복합작용에 의하여 상승작용을 나타냄을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 연구개발사업에 의하여 수행되었으며 그 지원에 감사드립니다.

문헌

- Mazza G. 1998. *Functional foods*. 1st ed. Technomic Publishing Co., Lancaster. p 1-234.
- Kwak NS, Shin HH. 2000. Control of health food. In *Food science and industry*. Korean Society of Food Science and Technology, Seoul. Vol 33, p 43-51.
- Panlasigui LN, Thompson LU, Juliano BO, Perez CM, Yiu SH, Greenberg G. 1991. Rice varieties with similar amylose content differ in starch digestibility and glycemic response in humans. *Am J Clin Nutr* 54: 871-877.
- Molyneux RJ, Beek TA, Breteler H. 1992. Toxic range plants and their constituents. *Phytochemistry and Agriculture* 34: 151-170.
- Breiteneder H, Ebner C. 2000. Molecular and biochemical classification of plant derived food allergens. *J Allergy and Clinical Immunology* 106: 27-36.
- Ray B. 2001. *Fundamental food microbiology*. 2nd ed. CRC Press, New York. p 35-53.
- Nguyen C, Carlin F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr* 34: 371-401.
- Lee CH. 1997. Lactic acid fermented foods and their benefits in Asia. *Food Control* 8: 259-269.
- Mah JH, Kim KS, Park JH, Byun MW, Kim YB, Hwang HJ. 2001. Bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from kimchi. *J Microbiol Biotechnol* 11: 577-584.
- Kwon NH, Kim SH, Bae WK, Kim JY, Lim JY, Noh KM, Kim JM, Ahn JS, Hur J, Park YH. 2001. Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* against major food-borne pathogens. *J Food Hyg Safety* 16: 264-273.
- Rodríguez E, González B, Gaya P, Nuñez M, Medina M. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 10: 7-15.
- Reid G, Burton J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection* 4: 319-324.
- Liserre AM, Landgraf M, Destro MT, Franco B. 2002. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. *Meat Science* 61: 449-455.
- Holt JG. 1977. *The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. p 218-221.
- Difco Laboratories. 1984. *Difco manual*. 10th ed. Detroit, Michigan, USA.
- Hawkey PM, Lewis DA. 1989. *Medical bacteriology: a practical approach*. 1st ed. IRL Press, Oxford. p 139-166.
- SAS. 1989. *SAS User's Guide*. SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA.
- Cheigh HS, Park KY. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Crit Rev Food Sci Nutr* 34: 175-203.
- Gardner NJ, Savard T, Obermeier P, Caldwell G. Champagne CP. 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixture. *Intl J Food Microbiology* 64: 261-275.
- Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2001-2005.

(2002년 6월 14일 접수; 2002년 9월 18일 채택)