Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 28(1): 18-23 (2013)
http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2013.28.1.18

연구논문

장기간 발효 김치인 묵은지에서 분리한 *Lactobacillus sakei* JK-17의 기능성 조사

김동선, 조형우, 김대한, 오계헌*

Functional Characterization of *Lactobacillus sakei* JK-17 Isolated from Long-term Fermented Kimchi, *Muk Eun Ji*

Dong-Seon Kim, Hyeong-Woo Cho, Dae-Han Kim, and Kye-Heon Oh*

접수: 2012년 11월 19일 / 게재승인: 2013년 1월 17일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The purpose of this work was to investigate the several functional characteristics of *Lactobacillus sakei* JK-17 isolated from long-term fermented kimchi, *Muk Eun Ji.* Initially, phylogenetic analysis using 16S rRNA sequencing was performed to identify the isolate JK-17, and the strain could be assigned to *Lactobacillus sakei* and designated as *L. sakei* JK-17. The strain was registered in GenBank as [JX841311]. The changes of bacterial growth and residual organic acids were monitored and HPLC was used to measure quantitatively two organic acids, lactic acid and acetic acid, produced in the culture during 84 hours of incubation. During the incubation period, several functional characteristics of *L. sakei* JK-17 were examined. *L. sakei* JK-17 culture depleted nitrite concentration 94.75%. Antioxidant activity of cultural supernatants of *L. sakei* JK-17 was approx. 53.8%, and β-galactosidase activities were 0.243 units/mL at pH 7.0 and 0.387 units/mL at pH 4.1, respectively. The antibacterial activities against food-poisoning causing bacteria were examined with 20-fold concentrated culture supernatants from *L. sakei* JK-17 and the antibacterial effects were clearly observed against all bacteria tested in this work.

Keywords: Kimchi, Functional property, *Muk Eun Ji, Lactobacillus sakei* JK-17

순천향대학교 생명시스템학과
Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan, Chung-Nam 336-745, Republic of Korea
Tel: +82-41-530-1353, Fax: +82-41-530-1350
e-mail: kyeheon@sch.ac.kr

1. 서론

우리나라 전통 발효식품으로서 묵은지는 김치와 마찬가지로 식이성 섬유를 많이 함유하고 있는 저칼로리 식품으로, 비타민 A, B, C 등을 비롯하여, 그 부재료가 가지는 다양한 영양성분을 공급하고, 인체의 생리기능 활성화에도 도움을 주는 식품이다 [1]. 묵은지 (*Muk Eun Ji*)는 400가지가 넘는 김치의 한 종류로서, 최소 6개월 이상 발효된 김치를 말한다. 묵은지는 숙성하는 과정에서 여러 가지 미생물과 효소의 작용으로 맛과 풍미가 생성되고 보존성도 증대되며, 이와 함께 정장작용, 항산화 효과, 항암효과 등을 포함하는 건강에 대한 다양한 기능성 효과가 있는 것으로 보고되었다 [2].

김치는 채소와 양념의 혼합물에 대한 젖산균의 발효를 통해서 만들어지며, 발효시간의 경과에 따라 *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus sakei*, *Weissella koreensis*를 포함하는 다양한 발효미생물들이 관여하는 것으로 보고되어 있다. 김치의 발효에 관여하는 대부분의 젖산균들은 프로바이오틱 (probiotics)으로 암의 억제효과와 면역증강효과 등의 영양학적 가치가 인정되면서 김치의 관심이 국제적으로도 높아지고 있으며, 김치 발효에 관여하는 젖산균들에 대해 많은 연구가 진행되고 있다 [3,4]. 젖산균은 사람의 장내에서 유기산을 생성하여 산에 예민한 장내 병원성 세균에 대한 오염과 번식을 저해함으로서 사람에게 유익한 효과를 주며, 식중독 원인세균을 사멸시키는 것으로도 알려져 있다 [2,5]. 젖산균은 장내 상피세포에 부착하여 젖산, 유기산, 과산화수소, 항균성 박테리오신 등을 합성하여 오염된 음식 또는 상한 음식을 섭취하였을 때, 병원균에 의한 독소 생산을 억제하고, 독소 수용체를 분

해하여 장내 유해 세균에 항균작용을 하는 것으로 알려져 있다 [6,7]. 최근에는 김치의 발효에 관여하는 젖산세균이 감기에 대한 저항력과 조류인플루엔자의 조절에도 관여하는 것으로 보고되고 있어 많은 관심이 집중되고 있다 [8,9].

본 연구에서는 가정에서 담근 김치를 2년 이상 숙성시킨 김치인, 묵은지로부터 *Lactobacillus sakei* JK-17을 분리하여, 이 세균의 여러 가지 생화학적 특성조사를 실시하였고, 아질산염 소거, 항산화능, β-galactosidase 활성, 식중독 원인세균들에 대한 항균활성 등의 여러가지 기능성에 대하여 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세균의 분리

가정에서 직접 담가 2년 이상 숙성된 묵은지 5 g을 100 mL의 생리식염수가 담긴 플라스크에 넣고 진탕 배양기에서 10분간에서 교반시킨 후, 시료 상등액 100 μL를 0.002% BPB (bromophenol blue)가 첨가된 MRS 고체 평판배지에 도말하고 30°C에서 24시간 배양하였다 [10]. MRS 고체 평판배지에서 도말 평판법을 통한 순수배양기법으로 JK-17을 분리하였으며, MRS 액체 배지에 접종하고, 진탕배양기 (30°C, 160 rpm)에 배양 유지시키면서 본 연구에 이용하였다.

2.2. 16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

JK-17 균주의 계통수를 작성하기 위하여 16S rRNA PCR을 수행하였다. JK-17 균주로부터 genomic DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자를 PCR을 사용하여 증폭하였다. 16S rRNA 유전자 증폭을 위하여 8F와 1492R primer를 사용하였다. PCR의 수행조건은 이전에 발표된 방법에 따랐다 [10]. PCR에 의해 증폭된 DNA 단편을 전기영동한 다음, agarose gel extract kit (Intron, Korea)를 이용하여 gel 상에서 회수하고, 부분적인 염기서열을 결정하였으며, 이 결과를 GenBank database에 등록하였다.

2.3. 분리세균의 생리 화학적 특성 조사

분리세균인 JK-17을 MRS 고체평판배지에 도말하여 생장한 단일집락의 형태를 확인하고, 그람염색을 통한 형태학적 특성을 관찰하였으며, glucose, citrate, 녹말, gelatin 사용여부, methyl red 시험, voges proskauer 시험, indole 생성여부, catalase와 oxidase의 활성여부, klingler iron agar (KIA) 배지에서 H_2S 생성 여부, litmus milk 이용여부 등의 여러 가지 생화학적 특성을 조사하였다 [11]. 본 시험에 사용된 MR-VP, Simmon's citrate, KIA, litmus milk 배지는 Difco사 (Detroit, MI, USA)의 제품을 사용하였다.

2.4. 분리세균의 생장에 따른 pH 변화

MRS 액체배지에 분리세균인 JK-17을 접종하고, 30에서 분당 160회로 회전하는 진탕배양기에 배양시키면서 세균의 생장과 배양기간 중에 생산되는 유기산의 양을 12시간 간격으로 측정하였다. 세균의 생장은 직접계수법을 통하여, 12시간 간격으로 MRS 고체배지에 도말하고 배양 결과를 계수하였다.

2.5. HPLC에 의한 유기산 분석

분리세균 JK-17에 의해 생성되는 유기산을 분석하기 위하여 HPLC를 사용하였다. 분석에 사용된 HPLC system은 SPD-10A UV/Vis detector가 부착된 Shimazu 사의 LC-10AT 제품을 사용하였으며, Supelcogel C-610H 컬럼 (300 mm × 7.8 mm, 입자크기 9 μm)을 이용하였다. Mobile phase는 0.1% (v/v) phosphoric acid (pH 2.1)를 공극직경이 0.45 μm membrane filter (Pall-Gelman, East Hills, USA)에 여과하여 사용하였다. HPLC 작동조건에서 mobile phase의 flow rate는 0.5 mL/min 이었으며, UV detector의 파장은 210 nm로 맞추어 사용하였다. 유기산은 분석용 표준품과 배양액으로부터 채취한 시료를 대상으로 정량분석하였다 [12].

2.6. 아질산염 소거능

아질산염의 소거능은 Ito 등의 방법 [13]에 따라 다음과 같이 실시하였다. 아질산염 소거능 측정에 사용된 배지는 1,000 μg/mL의 멸균된 sodium nitrite 용액과 *Lactobacilli* MRS 액체배지를 1:9의 비율로 조성하였다. 48시간 배양된 분리세균 JK-17을 배지의 1% (v/v)로 접종하여 84시간 동안 33에서 배양하였다. 배양기간 동안 12시간 간격으로 배양액 1 mL를 취하여, 13,000 rpm 에서 5분간 원심분리한 후, 상등액 100 μL를 취하여 여과한 0.02% sulfanilamide, 0.1% *N*-1-naphtylethylene diamine dihydrochloride, 44.5% HCl을 각각 1 mL씩 첨가하여 암실에서 5분간 방치 후 538 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. 항산화능 조사

분리균주를 MRS broth (pH 7.0, 37°C)에 배양하며 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 채취하여 실험에 사용하였다. 항산화능 측정은 Blois의 방법 [14]을 참고하여 수소공여 효과로 측정하였다. 항산화능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging capacity (\%)} = (1 - A_{sample}/A_{blank}) \times 100$$

2.8. β-Galactosidase 활성 측정

β-Galactosidase 활성은 접종 직후의 pH 7.0을 기준으로, 본 실험에서 얻은 생장곡선과 pH결과를 바탕으로 하여 생장이 가장 활발한 지수생장기의 pH 4.1에서 동일한 방법으로 비교 측정하였다. MRS broth (pH 7.0, 37°C)에서 배양하고 있는 분리 균주 배양액을 10 mL씩 채취하여 9,500 rpm 10분간 원심분리한 후 균체를 회수하고, 0.1 M sodium-acetate buffer로 세척하였다. 동일한 buffer에 균체를 현탁시키고, 얼음가루가 담긴 용기에서 초음파 파쇄하였다. 이것을 12,000 rpm

에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 효소액으로 사용하였다. 기질로 이용한 ONPG (*o*-nitrophenyl-β-D-galacto pyranoside)는 buffer에 5 mM이 되도록 용해시킨 후 사용하였다. 기질 1 mL에 효소액 250 μL를 첨가하고 이 혼합액을 10분간 37°C에서 반응시킨 후 0.5 M Na_2CO_3 1 mL을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 420 nm에서 흡광도를 측정하여 β-galactosidase의 활성을 각각 계산하였다 [15]. 효소 활성단위 (unit)는 1분 동안 1 g의 시료에서 ONPG로부터 1 μmol의 *o*-nitrophenol이 유리하는 것을 1 unit으로 하였고, *o*-nitrophenol의 유리량은 표준정량곡선에서 산출하였다.

2.9. 분리세균 JK-17의 배양상등액 제조

배양상등액의 항균력을 조사하기 위하여 분리세균 JK-17을 MRS 액체 배지에 접종하고 30°C에서 48시간 동안 배양한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 채취하여 0.2 μm syringe filter로 여과시켜, 여과액을 동결건조기로 20배로 농축하였다 [16].

2.10. 농축 배양상등액의 항균력 조사

농축된 배양상등액의 항균력은 disc diffusion assay 방법 [10]을 이용하여 확인하였다. 항균력을 조사하기 위해 식중독의 원인이 되는 세균들로 잘 알려진 *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Salmonella enteritidis,* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 세균을 본 실험에 사용하였다. 대상세균들은 각각 LB 액체배지에 접종한 후 24시간 배양하여 사용하였다. *L. monocytogenes*는 세균배양액을 멸균된 면봉을 사용하여 BHI 평판배지에 배양하였으며, 나머지 5가지 세균들은 동일한 방법으로 각각 LB 평판배지에 도말 배양하여, paper disc를 올려놓은 후, 농축 배양상등액 20 μL를 흡수시켜 37°C에서 24시간 배양시켜, disc 주변에 생성된 투명대의 크기를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세균의 분리 및 배양

가정에서 담근 묵은지로부터 유래하는 미생물 컨소시엄으로부터 우점종으로 대별되는 JK-17을 분리하였다. 이 분리세균 JK-17을 MRS 액체배지에 접종하고 진탕배양기 (30°C, 160 rpm)에 배양 유지시키면서 본 연구에 이용하였다.

3.2. 16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

분리균주인 JK-17의 phylogenetic tree를 작성하기 위하여, PCR을 통해 증폭하여, 부분적인 염기서열을 결정하였으며, 그 결과를 GenBank에 [JX841311]로 등록하였으며, 분리세균을 *L. sakei* JK-17로 명명하였다. 이 균주와 *Lactobacillus* 속 (genus)에 속하는 다른 균주들과의 유사성을 Fig. 1에 나타내었다.

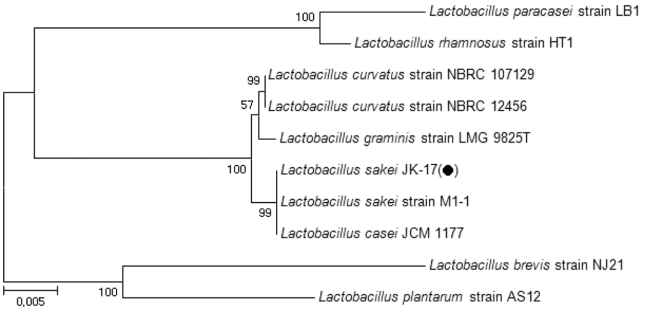

Fig. 1. Phylogenetic analysis of *L. sakei* JK-17 (●) and related bacteria of the *L. sakei* group based on 16S rRNA sequene comparisons.

Table 1. Morphological and physiological characteristics of *L. sakei* JK-17

Morphological characteristics	
Cell shape	Rod
Gram stain	Negative
Physiological characteristics	
Indole production	-
Glucose	+
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	-
Oxidase	-
Simmon's citrate	-
H_2S (KIA)	+
Litmus milk (peptonization)	-

+: Positive reaction, -: Negative reaction.

3.3. 분리세균의 생리화학적 특성조사

L. sakei JK-17에 대한 여러 생화학적 특성조사를 실시하 였다. Indole production 시험에서는 음성반응을 나타내는 초록색의 고리가 형성되었으며, glucose를 발효하여 배지의 색이 노란색으로 변하였다. Methyl red 시험과 Voges-Proskauer 시험 모두에서 음성을 나타내었다. Starch와 gelatin 가수분해 시험에서 모두 투명대가 형성되지 않았으므로 모두 음성임을 확인할 수 있었다. Catalase와 oxidase 시험, 그리고 색변화와 기포 생성도 모두 음성이었으며, citrate 이용여부도 음성으로 나타났다. KIA 배지로 시험한 disulfhydrase에 의한 H_2S의 형성은 양성으로 확인되었으며, litmus milk 시험에서는 펩톤화가 일어나지 않았다 (Table 1).

3.4. 분리세균의 pH 변화

묵은지에서 *L. sakei* JK-17을 MRS 액체배지 (pH 7.0)에 접종하고 진탕배양기 (30°C, 160 rpm)에서 배양시키면서 12시간 간격으로 측정하였다 (Fig. 2). 분리균주 *L. sakei* JK-17은 배양시작 후 42시간까지 지속적으로 pH가 낮아졌으며, 48시간부터 유지되는 것을 확인하였다. 배양초기의 MRS 액체 배

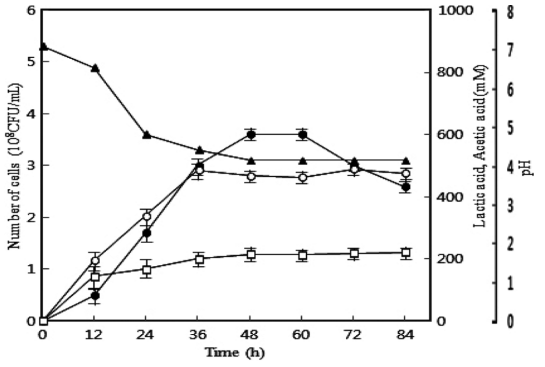

Fig. 2. Growth of test culture JK-17, measured as viable counts (●), associated with formation of lactic acid (○) and acetic acid (□), and pH changes (▲).

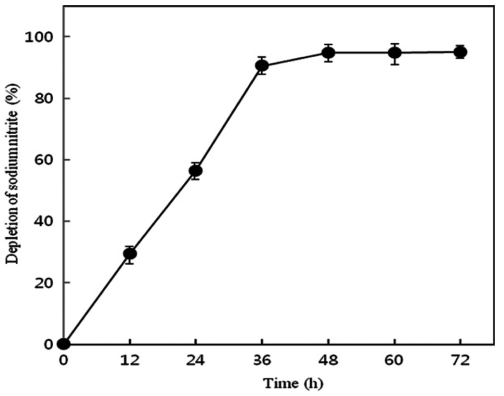

Fig. 4. Nitrite depletion by test culture JK-17 during incubation period. Results are mean ± S.D. of three parallel measurements.

지의 pH는 7.0이었으나 86시간이 지난 후 최종 pH는 4.1로 측정되었다.

3.5. 분리세균의 생장에 따른 HPLC에 의한 유기산 분석

L. sakei JK-17를 MRS 액체 배지 (pH 7.0)에 접종하고 진탕배양기 (30°C, 160 rpm)에서 배양시키면서 세균의 생장과 HPLC를 통한 유기산 분석을 12시간 간격으로 측정하였다 (Fig. 3). 분리균주는 배양 이후부터 60시간까지 생장하였으며, 유기산 생산도 증가하는 것으로 조사되었다. 분리세균 *L. sakei* JK-17이 대사물질로서 생성하는 유기산을 배양액을 채취하여 분석하였는데 배양초기에는 거의 존재하지 않았던 유기산이 배양시간이 지남에 따라 *L. sakei* JK-17 균주의 생장과 비례하여 생성되었다. Lactic acid와 acetic acid가 혼합된 authentic standard와 비교하였을 때 15.23 min과 17.79 min에서 각각 동일한 peak임이 확인되었다 (Fig. 3). 따라서 이들 두 peaks는 각각 lactic acid와 acetic acid로 확인되었으며, 배양 후 84시간이 경과했을 때, 이들 유기산은 각각 474.5 mM과 219.9 mM이 생성되었다. Song 등 [10]은 김치에서 분리한 *L. plantarum.* YK-9가 배양기간 중에 588.7 mM lactic acid와 255.5 mM acetic acid를 생성하는 것으로 보고하였는데, 본 연구에서 얻어진 유기산과 비교하였을 때, 2년 이상 숙성시킨 묵은지에서 분리한 *L. sakei* JK-17은 1주일 동안 발효된 김치에서 분리한 세균 YK-9보다는 유기산 생성에서 다소 적은 것으로 측정되었다.

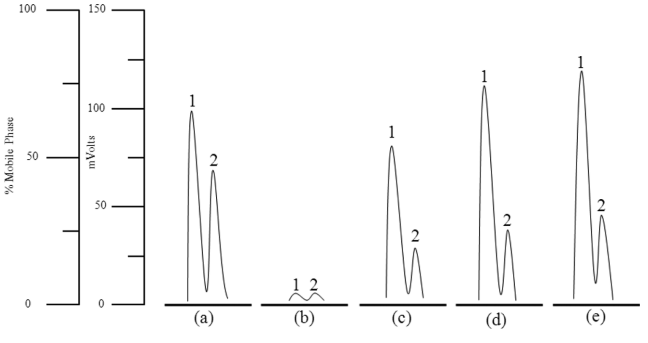

Fig. 3. HPLC chromatograms of mixture of authentic standards, lactic acid and acetic acid (a) and of culture JK-17 filtrates initially (b) and after 24 h (c), 48 h (d), and 72 h (e) of incubation. The retention times for lactic acid (peak 1) and acetic acid (peak 2) are 15.23 and 17.79 min, respectively.

3.6. 젖산균에 의한 아질산염 소거

L. sakei JK-17의 아질산염 소거능을 측정하기 위해, 배양액의 아질산염 농도를 12시간 간격으로 조사하였다 (Fig. 4). *L. sakei* JK-17은 배양기간이 경과함에 따라 매우 활발하게 아질산염을 소거하였으며, 36시간 후에는 90.5%, 최종적으로는 94.8%의 아질산염이 소거되었다. 시판김치에서 분리한 젖산균의 아질산 소거능 조사는 배추김치에서 분리한 젖산균들이 최종적으로 72시간 배양 했을 때 83.5%~91.2%를 보여주었고, 총각김치에서 분리한 *L. plantarum*은 48시간에 98.8%, *L. euconostoc paramesenteroide*는 4일이 경과한 후에도 80.5%의 최종 소거율을 나타내었다 [17]. Esmaeilzadeh 등 [18]은 발효된 올리브에서 분리한 젖산균들인 *L. plantarum, L. fermentum, L. mesenteroides*의 아질산염 최종 소거율이 각각 91.7%, 99.3%, 75%였음을 보고하였다. 아질산염은 체내에서 청색증을 나타내는 메트헤모글로빈혈증 (methemoglobinemia)를 유발하며, 2급이나 3급 아민류 (amines)와 반응하여 발암물질인 니트로스아민 (nitrosamine)을 생성하는 것으로 알려져 있다 [19]. 묵은지에서 분리한 세균 *L. sakei* JK-17은 다양한 김치와 야채발효 젖산균들과 비교하여 비슷한 범주의 아질산염 소거능을 보여주었으며, 이들 젖산균에 의한 아질산염 제거는 기능성에서 중요한 것으로 사료된다.

3.7. 항산화능

L. sakei JK-17의 항산화능을 측정하기 위해서 DPPH를 이용한 라디칼 소거능을 조사하였다 (Fig. 5). 분리세균은 배양시간이 증가함에 따라 항산화능이 증가하는 것으로 확인되었다. 12시간 이후 측정부터 항산화능이 나타나기 시작하였으며, 72시간 후 최종 53.8%로 측정되었다. Song 등 [20] 시판되는 김치로부터 분리한 *Bacillus licheniformis* KS-17와 KS-20에서 모두 40% 미만의 항산화능을 확인하였으며, Park 등

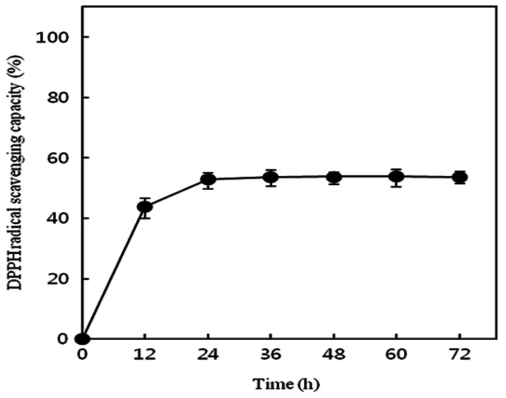

Fig. 5. Antioxidant capacity of JK-17, measured as optical density and calculated DPPH radical scavenging capacity (●); Data shown represent the mean ± SD based on triplicate studies.

[21]의 경남지역 가정에서 담근 김치를 이용한 실험에서 *Pediococcus pentosaceus* K-1의 항산화능이 47.9%로 나타난 것을 확인하였다. 이들 결과와 비교하였을 때, JK-17의 항산화능은 비교적 우수함을 알 수 있었다. 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)의 발생과 항산화 작용사이의 불균형이 발생하였을 때, 활성산소에 의한 DNA, 단백질, 지질, 그리고 작은 세포분자들의 산화적인 변형이 발생하여 일반적인 질병들과 노화와 관련된 퇴화 질환에 넓은 범위에서 영향을 준다 [22-24]. 본 연구에서 사용된 묵은지에서 분리한 JK-17은 노화뿐 만 아니라, 각종 질병을 유발시키는 활성산소를 효과적으로 소거하는 것으로 사료된다.

3.8. β-Galactosidase 활성

L. sakei JK-17의 β-galactosidase 활성을 측정을 하기 위해서 효소액의 pH에 따른 기질의 분해도를 조사하였다 (Fig. 6). 접종 후 12시간 경과 후 pH 7.0에서 0.243 units/mL의 효소 활성으로 가장 높게 나타났으며, 그 이후 균주의 pH 값이 낮아짐에 따라 활성이 급격하게 낮아졌다. 한편 pH 4.1에서는 pH 값이 낮아진 24시간 이후에 0.387 units/mL로 가장 활성이 높았으며, 시간이 경과함에 따라 β-galactosidase 활성은 점차 낮아졌다. Rhee 등 [25]은 김치에서 분리한 유산균 *L. plantarum* 3균주 (strain No. 49, No. 61, No. 75)의 효소 활성은 각각 0.267 units/mL, 0.293 units/mL, 0.667 units/mL로 나타났다고 보고하였다.

3.9. 항균활성 조사

L. sakei JK-17의 항균활성 시험은 disc diffusion assay 방법을 이용하여 측정하였다. 농축된 *L. sakei* JK-17의 농축배양상등액을 그람양성 세균인 *B. cereus*, *L. monocytogenes, S. aureus*, MRSA, 그람음성 세균인 *E. coli*, *S. enteritidis* 등의 6가지 식중독 원인세균에 대하여 각각 노출시키고 24시간 동안 배양하여, disc 주변에 형성되는 투명대 형성여부를 통하여 항균활성을 확인하였다 (Fig. 7). 본 항균활성 조사에서 묵은지에 분리된 *L. sakei* JK-17 농축배양상등액은 시험대상 세균 모두에서 투명대가 관찰되어 항균활성이 있는 것으로 확인되었으며, 이 결과는 일주일 동안 발효된 김치에서 분리한 *L. plantarum* YK-9에서 *S. aureus, B. cereus, L. monocytogenes, E. coli, E. faecalis, S. enteridis* 등의 세균들에 대하여 보여준 항균활성과 유사한 것으로 밝혀졌다 [10]. 이 결과는 2년 이상 발효된 묵은지에서 유래하는 젖산세균의 농축배양상등액이 1주일간 발효된 김치에서 분리된 젖산세균의 농축배양상등액과 비교하여 볼 때, 항균활성에 있어서 유사한 차이를 보여주었다. 항균활성에 관여하는 요인으로는 유기산 (organic acids), 과산화수소 (hydrogen peroxide), 디아세틸 (diacetyl), 박테리오신 (bacteriocin) 등이 알려져 있으며, 특히 많은 *Lactobacillus* 종에서 생산되는 박테리오신은 그람양성과 그람음성세균에 대하여 넓은 항균스펙트럼을 가지는 것으로 보고되고 있다. 그러나 본 연구의 사전연구에서 배양상등액의 pH 조절 및 가열을 통하여 분석된 항균활성에 관여하는 물질로는 lactic acid와 acetic acid의 유기산으로 밝혀졌다.

김치에서 분리된 젖산균은 김치의 맛과 풍미를 증진시키고, 다양한 기능성에 중요한 역할을 하는 것이 여러 논문을 통해 보고된 바 있다. 그러나 깊은 맛을 가지는 묵은지의

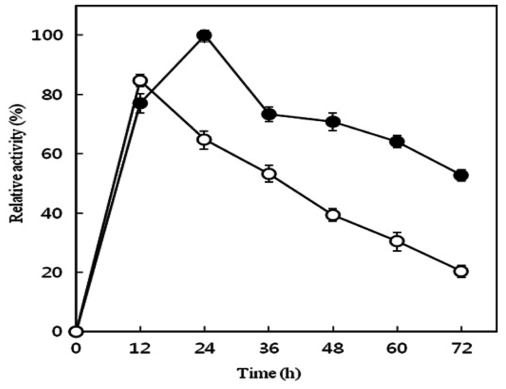

Fig. 6. Effect of pH on the β-galactosidase activity of JK-17, measured in 0.1 M potassium-phosphate buffer (pH 7.0) (○), and measured in 0.1 M sodium-acetate buffer (pH 4.5) (●). Data shown represent the mean ± SD based on triplicate studies.

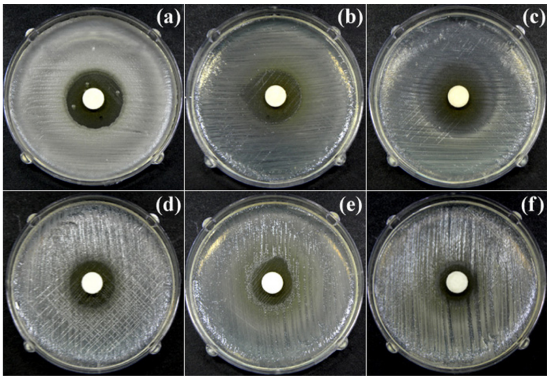

Fig. 7. Antibacterial activity by 20-fold concentrated culture supernatants from JK-17. Paper discs soaked with the supernatants were placed onto lawn plates of *B. cereus* (a), *S. enteritidis* (b), *S. aureus* (c), *L. monocytogenes* (d), *E. coli* (e), MRSA (f).

다양한 기능성에 관한 연구는 상대적으로 미흡한 것이 사실이다. 본 연구를 통해서 우리의 전통 발효식품중의 한가지인 묵은지에서 분리된 *L. sakei* JK-17은 장기간의 숙성기간에도 불구하고 우리 건강에 유익한 여러 가지 기능성이 유지 보존된다는 것이 입증되었다.

4. 결론

본 연구는 장기간 발효된 김치인 묵은지로부터 분리된 *Lactobacillus sakei* JK-17의 다양한 기능성을 조사하기 위하여 실시되었다. 먼저, 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 균주를 동정하였고, 그 결과 *L. sakei* JK-17으로 명명하였으며, 이 균주는 GenBank에 [JX841311]로 등재되었다. 분리세균의 생장과 잔존 유기산의 변화를 조사하였으며, 84시간의 배양기간동안 생산된 두가지 유기산인 젖산과 아세트산의 생성은 HPLC를 통하여 정량적으로 측정하였다. 배양기간 동안 JK-17의 다양한 기능성을 조사하였다. 아질산염은 약 94.75%가 소거되었으며, 항산화능은 약 53.8%를 나타내었다. β-galactosidase 활성을 측정한 실험에서 pH 7.0과 4.1에서 효소활성이 각각 0.243과 0.387 units/mL를 보여주었다. 식중독 원인세균에 대한 항균활성은 *L. sakei* JK-17로부터 20배 농축된 배양상등액에서 조사하였으며, 항균활성은 본 실험에 사용된 식중독 원인세균 모두에 대하여 활성이 있는 것이 관찰되었다.

감사

본 연구는 순천향대학교 학술연구비의 일부 지원으로 수행하였습니다.

REFERENCES

1. Kwak, C. S., J. Y. Hwang, F. Watanabe, and S. C. Park (2008) Vitamin B_{12} contents in some korean fermented foods and edible seaweeds. *Kor. J. Nutr.* 41: 439-4479.
2. Park, G. Y. (1995) The nutritional evaluation, and antimutagenic and anticancer effects of kimchi. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 24: 169-182.
3. Lee, C. W., C. Y. Ko, and D. M. Ha (1992) Miicrofloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identication of the isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 102-109.
4. Ahn, S. C., T. K. Kim, H. J. Lee, Y. J. Oh, J. S. Lee, D. O. Kang, W. K. Oh, T. I. Mheen, and J. S. Ahn. (2001) Fermentation patterns of leek kimchi and Chinese cabbage kimchi. *Kor. J. Microbiol*. 37: 234-238.
5. Baek, H, M. S. Choi, and K. H. Oh (2012) Characterization and antibacterial activity of *Lactobacillus casei* HK-9 isolated from korean rice wine, makgeolli. *KSBB J.* 27: 161-166.
6. Herich, R. and M. Levkut (2002) Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med.* 47: 169-180.
7. Ahn, D. K., T. W. Han, H. Y. Shin, I. N. Jin, and S. Y. Ghim (2003) Diversity and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 191-196.
8. Vrese, M., P. Winkler, P. Pautenberg, T. Harder, C. Noah, C. Laue, S. Ott, J. Hampe, S. Schreiber, K. Heller, and J. Schrezenmeir (2006) Probiotics bacteria reduces duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trials. *Vaccine* 24: 6670-6674.
9. Chon, H. S., B. R. Choi, G. J. Jeong, and I. P. Mo (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 plantarum* KFCC 11389P. *Avian pathol.* 37: 593-597.
10. Song, Y. J., S. H. Park, J. Y. You, Y. S. Cho, and K. H. Oh (2009) Antibacterial activity against food-poisoning causing bacteria and characterization of *Lactobacillus plantaum* YK-9 isolated from kimchi. *KSBB J.* 24: 273-278.
11. Benson, H. J. (1998) Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology. 7th ed., McGraw-Hill, Inc., SF, USA.
12. Chun, J. W., C. W. Ma. and K. H. Oh (2005) Physiological characterization of *Lactobacillus* sp. JK-8 isolated from shrimp aquaculture pond. *Kor. J. Microbiol.* 41: 18-23.
13. Ito, Y., M. Yodoshi, J. I. Tanaka, and M. Iwaida (1979) Comparison of two methods and improvements for colorimetic determination of nitrite in cod roe. *J. Food Prot.* 42: 715-718.
14. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
15. Tanaka, Y., A. Kagamiishi, A. Kiuchi, and T. Houiuchi (1974) Purification and Properties of β-Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.* 77: 241-247.
16. Schillinger, U. and F. K. Lucke (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus* sake isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
17. Ko, J. L., C. K. Oh, M. C. Oh, and S. H. Kim (2009) Depletion of nitrite by lactic acid bacteria isolated from commercial kimchi. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 892-901.
18. Esmaeilzadeh, P., S. Darvishi, K. Ebrahimi, F. mirahmadi, and M. Vaziri (2012) Consideration of lactic acid bacteria ability to reduce nitrite consideration in standard de man, rogosa and sharpe (MRS) broth-sodium nitrite medium during fermentation period. *WASJ.* 18: 430-435.
19. Mirvish, S. S. (1970) Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 44: 633-639.
20. Song. Y. R., N. E. Song, J. H. Kim, Y. C. N, and S. H. Baik (2011) Exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* strains isolated from kimchi. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 57: 169-175.
21. Park, S. B., J. D. Kim, N. R. Lee, J. H. Jeong, S. Y. Jeong, H. S. Lee, D. Y. Hwang, J. S. Lee, and H. J. Son (2011) Isolation and characterization of lactic acid bacteria with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities. *J. Life Sci.* 21: 1428-143.
22. Borek, C. (1993) Molecular mechanisms in cancer induction and prevention. *Environ. Health Perspect.* 101: 237-245.
23. Borek, C. (1997) Antioxidants and cancer. *Sci. Med.* 4: 51-62.
24. Gutteridge, J. M. C. and P. B. Halliwell (1993) Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun*. 19: 141-158.
25. Rhee, Y. H. and M. S. Kang (1996) Characteristic of β- galactosidase activity in *Lactobacillus plantrum* from kimchi. *Agric. Chem. Biotechnol*. 39: 60-66.