

발효된 물김치인 동치미에서 분리한 혼합 젖산균의 생리활성 증진에 대한 연구

최문섭, 김동민, 오계현*

Studies on the Enhanced Physiological Activities of Mixed Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Watery Kimchi, *Dongchimi*

Moon-Seop Choi, Dong-Min Kim, and Kye-Heon Oh*

Received: 16 July 2015 / Revised: 16 October 2015 / Accepted: 28 October 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The aim of this study was to investigate the efficacy of enhanced physiological activities in cultures isolated from Korean fermented watery Kimchi, Dongchimi, of single lactic acid bacteria (LAB), and when these three are mixed LAB as probiotics. Using the BIOLOG system and 16S rRNA sequencing, the isolates were characterized, and identified and assigned to *Leuconostoc mesenteroides* DK-3, *Leuconostoc dextranicum* DK-6, and *Lactobacillus curvatus* DK-13, respectively. Growth rate and pH changes, production of organic acids as metabolites, and physiological activities of the single and mixed LAB cultures, were monitored and compared. In mixed LAB cultures after 72 h of incubation, the maximum concentrations of lactic acid and acetic acid were approximately 340.5 mM and 191.9 mM, respectively, and pH changed from 7.00 to 3.62. Mixed LAB cultures were able to eliminate 96.3% of nitrite. Activities of antioxidant and β -galactosidase were 60.3% and 16.8 units/mg, respectively. Significant antibacterial activity of the concentrated supernatants was demonstrated against several food-poisoning bacteria. Physiological activities obtained from the mixed LAB cultures have been shown to be considerably higher than those of single LAB cultures. In conclusion, these studies demonstrate that compared to the single cultures, all physiological activities in mixed LAB cultures are significantly enhanced.

Keywords: *Dongchimi*, Physiological activity, Lactic acid bacteria

1. INTRODUCTION

사회가 급격히 발전함에 따라 현대인들은 건강에 대하여 많은 관심을 가지고 있으며, 포만감을 위한 식품 그 자체로서 뿐만 아니라 건강기능을 포함하는 식품에 대하여 관심을 가지고 있다. 인간은 오랜 기간 동안 음식의 맛, 풍미, 식감의 변화뿐만 아니라, 병원성 미생물의 억제에 의해 발효 식품의 제조에 젖산균을 사용하였다 [1-3]. 프로바이오틱스의 대표적인 미생물로서, 미국식품의약국에서 안전하다고 인정한 미생물에 속한다. 젖산균은 장내 균총 안정화 [4], 면역력 증강 [5], 항암작용 [6], 콜레스테롤 저하 [7] 등을 하며, 또한 이들이 생산하는 박테리오신 (bacteriocin)은 세균이 생산하는 천연 항균성 단백질로 병원성 미생물에 대하여 효과적인 살균력이 나타나는 것으로 알려져 있다 [8,9]. 젖산균은 발효에 의한 특징뿐만이 아니라 건강 및 영양학적으로 증진을 주는 중요한 미생물로서, 이러한 젖산균은 발효된 채소 및 과일, 유제품, 가공육류, 동물의 점막을 포함한 여러 곳에서 분리되었다 [10].

동치미는 한국의 대표적인 발효 식품인 김치의 한 종류로서, 일반적인 김치와 다르게 무와 마늘, 생강, 양파, 파 등이 포함된 여러 양념을 버무리고 물을 넣어 발효시킨 김치이며, 매운 맛이 다른 김치에 비해 덜하고 발효 중에 생성되는 유기산에 의해 독특한 풍미를 나타낸다. 김치의 발효에 관여하는 젖산균의 분리와 분리균주의 특성에 대한 여러 연구가 발

순천향대학교 생명시스템학과
Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 31538, Korea
Tel: +82-41-530-1353, Fax: +82-41-530-1350
e-mail: kyeheon@sch.ac.kr

표되어왔다 [11-14]. 동치미를 발효시키는 대표적인 젖산균으로는 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* 속 등이 알려져 있다 [15]. 동치미에 존재하는 다양한 종류의 이들 젖산균의 복합적인 작용으로 발효가 진행되며, 이 과정에서 무우에 포함된 당류가 젖산 및 아세트산을 포함하는 유기산으로 전환되고 이런 유기산은 신맛과 좋은 품질을 보존해주는 것으로 알려져 있다. 이러한 젖산균들은 청색증을 나타내는 메트헤모글로빈혈증 (methemoglobinaemia)의 원인 물질인 아질산염 소거능 [16], 활성산소를 제거하는 항산화능 [17], 유당불내증을 완화시킬 수 있는 β -galactosidase 활성 [18]과 같은 몇 가지 특징적인 생리활성을 가지며, 락토페리신 (lactoferricin)과 같은 여러 기능적 및 항균활성 물질을 분비하여 병원성 미생물에 대한 살균력이 있는 것으로 보고되었다 [19].

본 연구에서는 발효 중인 동치미에서 우점종으로서 *Leuconostoc mesenteroides* DK-3, *Leuconostoc dextranicum* DK-6, *Lactobacillus curvatus* DK-13의 3가지 균주를 분리하여 각각의 생리화학적 및 계통학적 특성을 조사하였다. 단일배양과 혼합배양을 이용하여, 항산화능, 아질산염 소거능 측정, β -galactosidase 활성, 항균활성 등의 생리활성을 측정하고 비교 분석하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 세균의 분리 및 특성 조사

가정에서 담그어 3일 동안 숙성시킨 동치미 국물 10 mL를 생리식염수 50 mL가 담긴 플라스크에 넣은 후, 진탕배양기에서 20분간 교반시켰다. 시료를 10^2 으로 희석한 후, 100 μ L를 0.002% bromophenol blue가 첨가된 MRS (Difco, Sparks, MD, USA) 고체평판배지에 도말 후, 24시간 동안 30°C에서 배양하였다. 순수배양기법으로 동치미에서 DK-3, DK-6, DK-13의 세 가지 젖산균을 분리하였으며 MRS 액체배지에 접종하여 진탕배양기 (30°C, 160 rpm)에 배양을 유지하며 본 실험에 이용하였다.

GP2 MicroPlate™ (Biolog, Hayward, CA)를 사용하여 각 균주의 특성을 분석하였다. 순수 배양된 단일 집락을 5% 혈액이 포함된 trypticase soy agar (TSA) 고체평판배지에 도말한 후, 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양된 균주는 생리식염수에 현탁하여 GP2 MicroPlate™에 접종한 후, BIOLOG automated Micro-Station instrument을 이용하여 각 분리균주의 탄수화물 이용패턴을 조사하였다.

2.2. 16S rRNA 염기서열 분석 및 계통수 작성

동치미에서 분리한 세 가지 젖산균의 계통수를 작성하기 위해 16S rRNA에 대하여 PCR을 실시하였다. 27F primer (5'-AAGGAACACCAGTGGCGAAGG-3')와 1492R primer (5'-CCAGGCGGTCAACTTAATGCG-3')를 사용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였으며 PCR Premix (GenDEPOT, USA)를

이용하여 PCR을 수행하였다. 변성 (94°C, 30초), 냉각 (60°C, 30초), 신장 (72°C, 45초)의 세 단계를 35회 반복한 후, 72°C에서 15분 동안 유지하였다. 증폭된 DNA 절편은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen Co., Germany)를 이용하여 정제하였고 이를 통해 부분적인 염기서열을 ABI373 Automated sequencer (Foster City, CA, USA)를 이용하여 서열을 결정하였으며 BLAST database (NCBI, Bethesda, MD, USA)를 통하여 분석하였다. 분석된 16S rRNA sequences는 Clustal X software (<http://www.clustal.org>)를 이용하여 염기서열을 정렬하였으며 MEGA4 package (Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)를 이용하여 계통수를 작성하였다.

2.3. 생장에 따른 pH 변화 및 유기산 정량분석

HPLC를 이용하여 젖산균이 성장하면서 생성하는 젖산과 아세트산을 분석하였다. 72시간 동안 진탕배양하였으며 12시간마다 배양액을 채취하여 원심분리 (4°C, 13,000 rpm)한 후, 상등액을 취하여 0.20 μ m인 membrane filter (Pall-Gelman, USA)에 여과하여 사용하였다. HPLC 시스템은 UV/VIS-151 detector가 부착된 Gilson 사의 321 pump로 구성되었으며 (Gilson, Inc., USA), column은 Supelcogel C-610H column (300 mm \times 7.8 mm 입자 크기 5 μ m)을 사용하였다. Mobile phase는 0.1% phosphoric acid를 공급 직경이 0.45 μ m인 membrane filter (Pall-Gelman, USA)에 여과하여 사용하였으며, flow rate는 0.5 mL/min, UV detector의 파장은 210 nm에서 분석하였다. 유기산의 분석용 표준물질로 젖산과 아세트산을 각각 1:1의 비율로 혼합하여 표준물질을 만들었으며, 0.45 μ m syringe filter로 여과한 후, Hamilton syringe를 사용하여 HPLC injector 내에 20 μ L를 주사하였다.

2.4. 아질산염 소거능

분리 균주의 아질산염 소거능은 Ito 등 [20]의 방법을 이용하여 측정하였다. MRS 액체 배지 9 mL에 sodium nitrite를 최종 농도가 150 μ g/mL가 되도록 혼합한 후, 단일 및 혼합배양에 접종하였다. 72시간 동안 진탕배양 하였으며 매 12시간마다 배양액을 채취하여 원심분리 (4°C, 13,000 rpm)한 후, 상등액을 취하여 0.02% sulfanilamide와 0.1% *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5 N HCl을 각각 1 mL씩 첨가하여 암실에서 5분간 반응시킨 후, 538 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 항산화능 측정

분리 균주를 MRS 액체 배지에 접종한 후, 72시간동안 배양하면서 매 12시간 간격으로 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 원심분리 (4°C, 13,000 rpm)하여 준비된 상등액을 취하여 사용하였다. 2.5 mL의 시료에 1 mL의 0.3 mM DPPH 용액을 넣고 30분 동안 반응시킨 후, 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음 식을 이용하여 항산화 활성을 백분율로 변환시켰다.

$$AA\% = 100 - [(Abs_{sample} - Abs_{blank}) \times 100] / Abs_{control}$$

AA, antioxidant activity; Abs, absorbance

blank: 배양상등액 2.5 mL+에탄올 1 mL
 control: 0.3 mM DPPH 용액 1 mL+에탄올 2.5 mL

분리 균주를 각각 MRS 액체배지에 각각 접종한 후, 72시간 동안 진탕배양 하였으며, 12시간마다 3 mL의 배양액을 취하여 원심분리한 후, 균체만을 회수하였다. 동량의 Z buffer (60 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 50 mM β-mercaptoethanol, pH 7.0)를 첨가하여

2.6. β-galactosidase 활성

β-Galactosidase 활성은 Miller의 방법 [21]으로 측정하였다.

Table 1. Biochemical characteristics of isolates, DK-3, DK-6, and DK-13 obtained from Dongchimi

Substrates	Isolates			Substrates	Isolates		
	DK-3	DK-6	DK-13		DK-3	DK-6	DK-13
α-Cyclodextrin	-	-	+	D-Trehalose	+	-	+
β-Cyclodextrin	-	-	+	Turanose	+	-	+
Dextrin	-	-	+	Xylitol	-	-	-
Glycogen	-	-	-	D-Xylose	+	-	-
Inulin	-	-	-	Acetic acid	-	-	-
Mannan	-	-	+	α-Hydroxy butyric acid	-	-	-
Tween 40	-	-	-	β-Hydroxy butyric acid	-	-	-
Tween 80	-	-	-	γ-Hydroxy butyric acid	-	-	-
N-Acethyl-D-glucosamine	+	+	+	β-Hydroxy phenyl acetic acid	-	-	-
N-Acethyl-D-mannosamine	-	-	+	α-Keto glutaric acid	-	-	-
Amygdain	+	-	+	α-Keto valeric acid	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	Lactamide	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	D-Lactic acid methylester	+	-	-
Arbutin	+	-	+	L-Lactic acid	-	-	-
Cellobiose	+	-	+	D-Malic acid	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	L-Malic acid	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	Methyl pyruvate	+	-	+
D-Galactose	+	-	+	Mono-methyl succinate	-	-	-
D-Galacturonic acid	-	-	-	Propionic acid	-	-	-
Gentiobiose	+	-	+	Pyruvic acid	+	-	+
D-Gluconic acid	+	+	-	Succinamic acid	-	-	-
α-D-Glucose	+	+	+	Succinic acid	-	-	-
m-Inositol	-	-	-	N-Acetyl-L-glutamic acid	+	-	-
α-D-Lactose	-	-	+	Alaninamide	-	-	-
Lactulose	+	+	+	D-Alanine	-	-	-
Maltose	+	-	+	L-Alanine	-	-	-
Maltotriose	-	-	+	L-Alanylglycine	-	-	-
D-Mannitol	+	-	-	L-Asparagine	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	L-Glutamic acid	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-	Glycyl-L-glutamic acid	-	-	-
D-Melibiose	+	-	-	L-Pyroglutamic acid	-	-	-
α-Methyl D-galactoside	+	-	+	L-Serine	-	-	-
β-Methyl D-galactoside	+	-	+	Putrescine	-	-	-
3-Methylglucose	-	-	+	2,3-Butanediol	-	-	-
α-Methyl D-glucoside	+	-	+	Glycerol	-	-	-
β-Methyl D-glucoside	+	-	+	Adenosine	-	-	+
α-Methyl D-mannoside	-	-	-	2-Deoxyadenosine	-	-	+
Palatinose	+	-	+	Inosine	-	-	+
D-Psicose	+	+	+	Thymidine	-	-	+
D-Raffinose	+	-	-	Uridine	-	-	+
L-Rhamnose	-	-	-	Adenosine-5'-monophosphate	-	-	-
D-Ribose	+	-	+	Thymidine-5'-monophosphate	-	-	-
D-Salicin	+	-	+	Uridine-5'-monophosphate	-	-	-
Sedoheptulosan	-	-	-	Fructose-6-phosphate	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	Glucose-1-phosphate	-	-	-
Stachyose	+	-	-	Glucose-6-phosphate	-	-	-
Sucrose	+	-	+	D-L-α-Glycerolphosphate	-	-	-

+, positive reaction; -, negative reaction.

균체를 재현탁시켜 A_{600} 을 측정하였다. 현탁된 시료 0.5 mL를 취하여 0.5 mL의 Z buffer와 잘 혼합하고 100 μ L의 chloroform과 50 μ L의 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate)를 첨가하여 혼합한 다음 30°C에서 5분간 반응시켰다. 그 후 ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactoside, 4 mg/mL)가 첨가된 0.2 mL의 phosphate buffer를 첨가하여 15분간 30°C의 배양기에서 반응시켰으며, 1 mL의 1 M Na_2CO_3 를 첨가하여 종결시켰다. 흡광도는 420 nm와 550 nm에서 측정하여 β -galactosidase의 활성을 각각 계산하였다.

$$\text{활성} = 1,000 (A_{420} - 1.75 A_{550}) / (tv A_{600})$$

t: 반응 시간(분)

v: 분석에 사용된 배양의 양

2.7. 항균활성 조사

분리 세균의 항균력은 disc diffusion assay 방법 [22]을 통하여 조사하였다. MRS 액체 배지에 30°C에서 24시간 동안 배양한 후, 원심분리하여 상등액을 취하여 공극 직경이 0.45 μ m인 syringe filter로 여과한 후 동결 건조시켜 20배로 농축하였다. 항균활성조사에 사용된 균주들은 식중독 유발과 관련된 균주들로 *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella enteritidis* ATCC 14028, *Staphylococcus au-*

reus ATCC 12600, *Shigella sonnei* ATCC 25931 *Listeria monocytogenes* ATCC 19111를 사용하였다. *L. monocytogenes*를 제외한 균주들은 LB 액체배지에 접종한 후, 24시간 배양하여 사용하였으며, *L. monocytogenes*은 BHI 액체배지에 접종하여 사용하였다. 액체배지에 접종한 후, 이들 세균들은 24시간 동안 배양하여 사용하였으며, 배양된 균주들을 고체평판배지에 도말하고, paper disc를 올려놓은 후, 농축시킨 배양상등액 20 μ L를 흡수시켜 30°C에서 24시간 배양시켜, disc 주변에 투명대의 형성유무를 확인하는 방식으로 조사하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 세균의 분리 및 특성조사

가정에서 담근 동치미로부터 DK-3, DK-6, DK-13의 세 가지 젓산균을 분리하였다. 각 분리균주에 대하여 BIOLOG system (Hayward, CA, USA)와 GP2 MicroPlate™로 각 균주들의 다양한 탄수화물의 이용 여부를 확인하였다 (Table 1).

3.2. 16S rRNA 염기서열 계통수 분석

동치미에서 분리한 세 가지 균주로부터 얻어진 16S rRNA를 universal primer을 이용하여 증폭하였다. 16S rRNA 염기서열

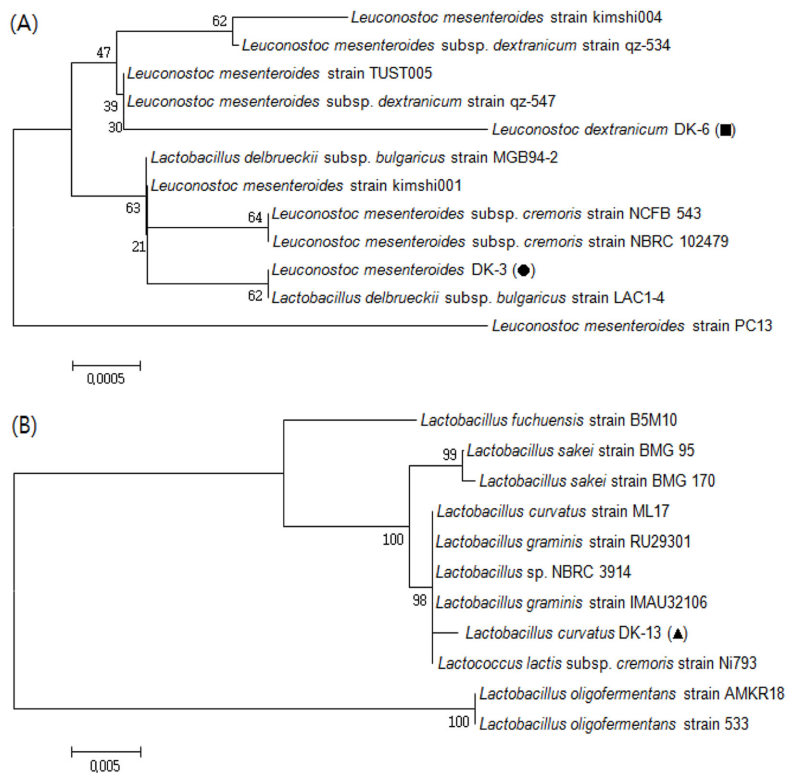


Fig. 1. Phylogenetic analyses of three isolates, *Leuconostoc mesenteroides* DK-3 (●), *Leuconostoc dextranicum* DK-6 (■) and *Lactobacillus curvatus* DK-13 (▲) related lactic acid bacteria based on 16S rRNA sequence comparisons. Bootstrap values at nodes of the dendrogram indicate the percentage of occurrence of the branching order in 500 bootstrapped trees. The bar scale represent 1 nucleotide substitution per 100 nucleotides.

분석은 NCBI의 BLAST를 사용하여 상동성을 비교하였다. 그 결과, DK-3는 *Leuconostoc mesenteroides* (99%), DK-6는 *Leuconostoc dextranicum* (99%), 그리고 DK-13은 *Lactobacillus curvatus* (99%)로 각각 동정되었으며, *Leuconostoc mesenteroides* DK-3, *Leuconostoc dextranicum* DK-6, *Lactobacillus curvatus* DK-13로 각각 명명하였다. 16S rRNA 염기서열 분석에 근거하여 다른 균주들과의 유연관계를 Fig. 1에 나타내었다.

3.3. 생장에 따른 pH 변화 및 유기산 정량분석

세 가지 단일배양 (DK-3, DK-6, DK-13)과 이들의 혼합배양을 MRS 액체배지에 접종하여 진탕배양기 (30°C, 160 rpm)에 배양시키면서 각 배양의 생장에 따른 pH의 변화와 유기산 생성을 12시간 간격으로 HPLC를 이용하여 측정하였다 (Fig. 2). 배양 초기의 pH 7.0에서 배양 후 36시간 만에 단일배양인 DK-3, DK-6, DK-13의 pH는 각각 3.87, 3.88, 3.63이었으며, 동일 시간 경과 후 혼합배양은 pH 3.50으로 최저치에 도달하였다. 또한 72시간 배양 후 최종 pH는 단일배양에서 각각 4.12, 4.01, 3.84로, 그리고 혼합배양에서는 3.62로 다소 증가되는 것으로 나타났다.

배양상등액에서 생산되는 주요 대사산물로서 젖산과 아세트산의 농도를 측정하였다 (Fig. 3). 배양 후 48시간이 경과하였을 때 젖산과 아세트산의 생성은 최고치를 나타내었으며, DK-3의 경우에 200.2 mM과 49.7 mM, DK-6의 경우에 109.6 mM과 28.1 mM, DK-13의 경우에 248.2 mM과 130.3 mM를 생산하였다. 반면에 혼합배양의 경우에는 340.5 mM과 191.9 mM이 생성되었으며, 이 수치는 각 단일배양에서 생산된 젖산과 아세트산 생성과 비교하여 현저하게 많은 양이 생산되었음을 보여주었다.

발효가 잘된 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* YK-9의 배양액으로부터 젖산 588.7 mM과 아세트산 255.5 mM

이 생산되었으며, 특히 묵은지에서 분리한 *L. sakei* JK-17의 배양액에서 생성된 젖산과 아세트산은 각각 474.5 mM과 219.9 mM이었다고 보고하였다 [10,11]. 이들 결과와 비교하여 동치미에서 분리된 세 가지 단일배양과 혼합배양에서 생성된 유기산들은 다른 김치나 묵은지에서의 유기산들과 비교하여 낮게 측정되었다. 반면에 이 결과는 동치미에서 분리된 혼합배양에 의한 이들 유기산 생산과 비교하여 낮은 것으로 확인되었다. 새우양식장에서 분리한 *Lactobacillus* sp. JK-8 배양액에서 생성된 젖산과 아세트산은 각각 192 mM과 43.6 mM이었으며 [23], 요구르트에서 분리한 *L. casei* SK-7 배양액에서 각각 316.1 mM과 127.3 mM이 생성되었는데 [24], 이 결과는 동치미에서의 유기산 생산 결과와 비교하여 낮은 것으로 확인되었다. 이는 원래 젖산균의 출처인 동치미는 액상으로서 세균의 성장을 위한 고형물질과 발효 및 관련 영양소도 적게 포함되어 있기 때문으로, 분리된 젖산균들에 의한 유기산 생성에는 초기 농화에 사용된 시료, 배양 조건, 성상 등이 중요하게 영향을 미치는 것으로 사료된다.

3.4. 아질산염 소거능

각 단일배양과 혼합배양의 아질산염 소거능을 측정하기 위하여, 12시간 간격으로 각 배양액의 아질산염 농도를 측정하였다 (Fig. 4). 단일 및 혼합배양의 아질산염 소거능은 12시간 이후에 급격히 증가하였으며, 배양 후 72시간이 경과하였을 때, 단일배양인 DK-3에서 80%, DK-6에서 56.75%, DK-13에서 50.25%, 그리고 혼합배양의 경우 96.3%로 측정되었다. 단일배양의 경우 모든 배양액은 60시간까지 소거능이 지속적으로 증가한 후에 증가가 둔화된 반면에, 혼합배양은 72시간까지 계속적으로 증가하였다. 발효된 올리브에서 분리한 *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. mesenteroides*의 아질산 소거능은 각각 91.7%, 99.3%, 75%였으며, 묵은지에서 분리한 *L. sakei* JK-17에서는 94.8%라고 보고된 바 있다 [15,25]. 이들 결과를 동치미에서 분리한 단일 및 혼합배양에서의 아질산염 소거

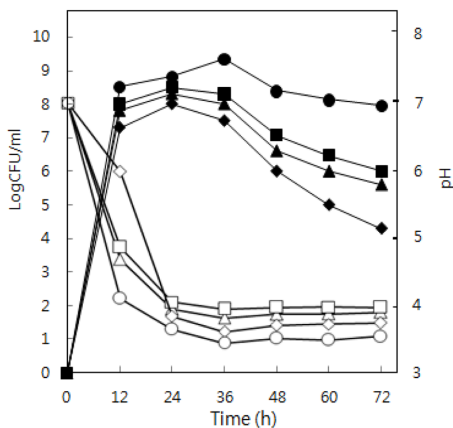


Fig. 2. Changes in viable counts (open) and pH values (closed) of individual cultures, DK-3 (circle), DK-6 (square), DK-13 (triangle), and their mixed culture (diamond) during the incubation period. Error bars represent standard deviations based on three independent replicates.

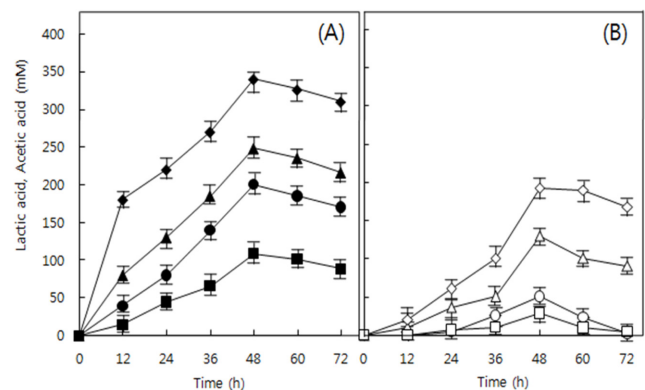


Fig. 3. Formation of major organic acids, lactic acid (A) and acetic acid (B), in pure cultures, DK-3 (●, ○), DK-6 (■, □), DK-13 (▲, △), and their mixed culture (◆, ◇) during incubation period. Error bars represent standard deviations based on three independent replicates.

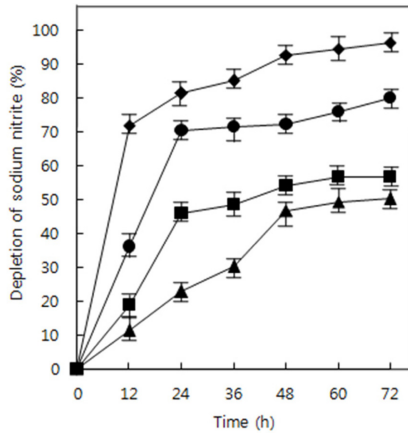


Fig. 4. Nitrite depletion by pure cultures, DK-3 (●), DK-6 (■), DK-13 (▲), and their mixed culture (◆) during incubation period. Error bars represent standard deviations based on three independent replicates.

능 결과와 비교하였을 때, 단일배양에서는 낮게 나타났지만, 혼합배양과 비교했을 때는 우수한 것으로 확인된다. 아질산염은 체내에서 2급 및 3급 아민류(amines)와 반응하여 발암물질인 니트로스아민(nitrosamine)을 생성하는 것으로 알려져 있어 [26], 아질산염 소거능은 젖산균의 기능성으로서 중요한 것으로 사료된다.

3.5. 항산화능

각 단일배양과 혼합배양에서 항산화능을 알아보기 위하여 DPPH를 이용한 라디칼 소거능을 조사하였다 (Fig. 5). 이들 모든 배양 후 24시간까지 급격하게 항산화능이 증가한 후, 60시간 이후에는 일정 수준으로 유지되는 것으로 나타났다.

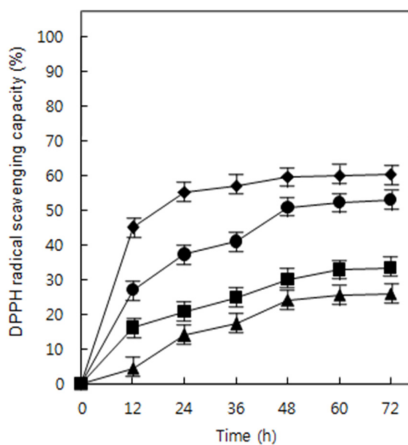


Fig. 5. Antioxidant capacity of pure cultures, DK-3 (●), DK-6 (■), DK-13 (▲), and their mixed culture (◆) during incubation period, measured as optical density and DPPH radical scavenging capacity. Error bars represent standard deviations based on three independent replicates.

DK-3, DK-6, DK-13의 단일배양에서 최종 항산화능은 각각 51.6%, 33.4%, 26.1%로 측정되었으나, 혼합배양에서는 항산화능이 60.3%로 크게 증진되는 것이 관찰되었다.

김치에서의 항산화능은 분리된 젖산균의 종류에 따라 차이가 있는 것으로 보인다. 배추김치로부터 분리한 *B. licheniformis* KS-17과 KS-20에서 40% 이내 [14], *Pediococcus pentosaceus* K-1에서 47.9% [10], 그리고 묵은지에서 분리한 *L. sakei* JK-17에서 53.8% [15] 등의 항산화능에 관한 결과가 보고된 바 있다. 이전의 결과들과 비교하였을 때, 동치미에서의 항산화능은 분리 젖산균의 단일배양에서 비슷하거나 낮았으나, 혼합배양에서는 높은 것으로 나타났다. 활성산소는 인체 내에서 DNA, 단백질, 지질 등에서 산화적 변이의 원인이 되며, 노화와 암을 유발하는 요인이 되는 것으로 보고되었다 [27-29]. 이러한 활성산소를 제거하는 항산화능은 매우 중요한 요인으로 판단되며 분리 젖산균의 혼합배양이 항산화능의 증진에 기여할 것으로 사료된다.

3.6. β-galactosidase 활성

각 단일배양과 혼합배양에서 β-galactosidase 활성을 알아보기 위하여 효소액에 대한 기질의 분해도를 측정하였다 (Fig. 6). 모든 배양에서 이 효소의 활성은 접종 후 24시간까지 급격히 증가하여 최대치에 도달하였으며, 그 후 감소하기 시작하였다. 단일배양인 DK-3, DK-6, DK-13에서 최대 활성은 각각 11.2, 9.8, 9.0 units/mg였으며, 혼합배양의 경우에는 16.8 units/mg로 단일배양과 비교하여 상당히 높게 나타났다. 요구르트에서 분리한 *L. casei* SK-7와 *L. bulgaricus* YK-11에서 β-galactosidase 최대 활성은 각각 14.9 units/mg와 13.1 units/mg라고 보고된 바 있으며 [23], 이들 활성은 동치미에서 분리한 각 단일배양에서의 활성보다는 높았으나, 혼합배양에서의 활성보다는 낮은 것으로 밝혀졌다. β-galactosidase은 유당불내증을 완화시킬 수 있는 것으로 보고되었으며 [18], 이

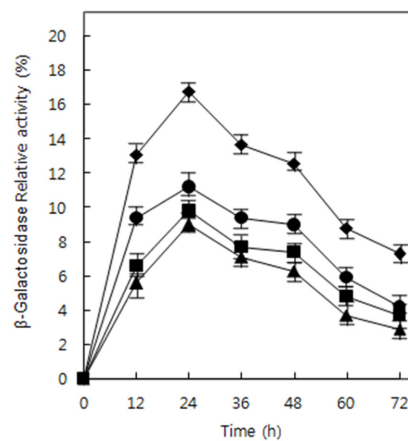


Fig. 6. β-galactosidase activity by pure cultures, DK-3 (●), DK-6 (■), DK-13 (▲), and their mixed culture (◆) during incubation period, measured as optical density and calculated relative activity. Error bars represent standard deviations based on three independent replicates.

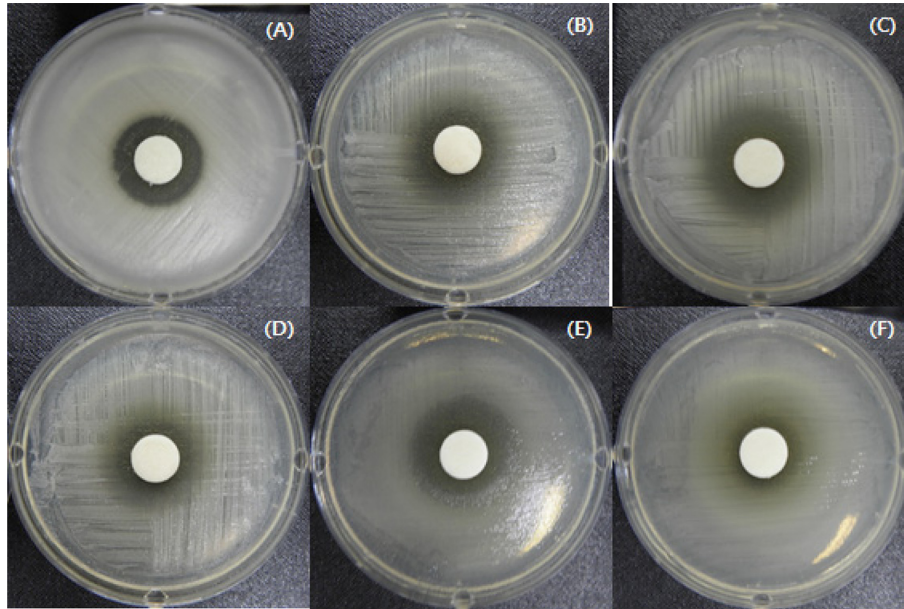


Fig. 7. Antibacterial activity by 20-fold concentrated supernatants from mixed cultures. Paper discs soaked with the supernatants were placed onto lawn plates of *B. cereus* (A), *E. coli* (B), *S. enteritidis* (C), *L. monocytogenes*, (D), *S. aureus* (E), *S. sonnei* (F), respectively.

러한 결과를 바탕으로 유제품에 함유되어 있는 젖당의 분해에 관여하는 효소로서 장내 락타아제가 존재하지 않거나 활성이 낮은 사람들의 젖당 불내성을 개선할 수 있는 생리활성 요인으로 사료된다.

3.7. 항균활성 조사

혼합배양의 항균활성 시험은 농축된 배양상등액을 그람양성 세균인 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*와 그람음성 세균인 *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. sonnei*의 식중독 원인세균에 노출시키고 24시간 동안 배양하여, disc 주변의 투명대 형성 여부를 통하여 항균활성을 확인하였다 (Fig. 7). DK-3, DK-6, DK-13의 단일 균주 배양상등액에서는 낮은 항균활성이 확인되었지만 (자료 미공개), 세균주가 섞인 혼합배양에서는 실험대상 균주들 모두에 대하여 상당히 높은 항균활성이 나타나는 것으로 확인되었다.

동치미에서 분리한 젖산균의 항균활성은 다른 김치나 요구르트에서 분리한 젖산균의 항균활성과 유사한 것으로 보인다 [11,14]. 항균활성에 관한 요인은 박테리옌, 유기산, 과산화수소 등이 알려져 있지만, 본 연구에서 분리세균의 배양액을 pH 조절 및 가열한 후에 항균활성 조사를 통하여 밝혀진 항균활성은 유기산에 기인하는 것으로 판단된다.

우리나라에는 수백 가지의 김치가 알려져 있으며, 동치미 또한 옛날부터 우리 식탁에서 건강을 위한 식품으로 애용되어 왔다. 이러한 동치미를 비롯하여 여러 종류의 발효식품에서 분리된 젖산균들은 식품의 맛과 풍미를 증진시키거나 생물체 내에서 방어기작에 중요한 역할을 하며 [4,5,19], 특히 항균활성에 관여하는 요소인 유기산, 박테리옌 등이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다 [8,9]. 이러한 동치미는 젖산균

에 의한 시원한 맛과 풍미로 많은 주목을 받아왔으나 자극적인 냄새 때문에 과거 음료로 개발에서 문제가 제기된 바 있으며, 상대적으로 발효에 관여하는 여러 젖산균의 생리활성, 기능성, 젖산균들의 상호관계에 의한 상승효과 등과 관련된 연구들은 상대적으로 미진하였던 것이 사실이다. 따라서 추후 동치미가 가지는 여러 가지 장점이 분명히 있는 만큼, 단점을 보완하는 연구를 지속적으로 수행함과 함께, 본 연구를 통해서 밝혀진 동치미에서 분리된 젖산균들의 혼합배양에 의한 여러 가지 유익한 기능성의 증진을 통하여 국민 건강에 기여할 수 있도록 추진되어야 할 것이다.

4. CONCLUSION

본 연구는 한국의 발효 물김치인 동치미로부터 분리한 프로바이오틱으로서 젖산균 단일배양과 이들 세 가지 혼합배양의 몇 가지 생리활성 증진을 비교하기 위한 목적으로 실시하였다. BIOLOG 시스템과 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 균주의 특성을 조사하고 동정하였으며, 그 결과 이들 균주를 *Leuconostoc mesenteroides* DK-3, *Leuconostoc dextranicum* DK-6, *Lactobacillus curvatus* DK-13로 각각 명명하였다. 16S rRNA 염기서열 분석에 근거하여 각 균주들의 계통수를 작성하였다. 단일 및 혼합 젖산균 배양의 성장률과 성장기간 중의 pH 변화, 대사산물로서 유기산 생성, 여러 가지 생리활성 특성을 모니터링하여 비교하였다. 배양 72시간 후에 혼합 젖산균 배양에서 생성되는 젖산 및 아세트산의 최대농도는 대략 340.5 mM과 191.9 mM이었으며, pH는 7.00에서 3.62로 변화하였다. 혼합 젖산균 배양액은 주어진 아질산염을 96.3%

소거하였다. 향산화 및 β -galactosidase 활성은 각각 60.3%와 16.8 units/mg으로 측정되었다. 이들 농축된 배양상등액은 몇 가지 식중독 원인세균들에 대하여 항균활성을 보여주었다. 혼합 젖산균 배양으로부터 얻어진 생리활성은 단일 젖산균 배양에서 얻어진 생리활성보다 상당히 높았다. 결론적으로, 이들 연구를 통해서 유산균 혼합배양은 동일한 단일배양들과 비교하여 조사된 모든 생리활성이 현저하게 증진되는 것으로 나타났다.

Acknowledgements

본 연구는 순천향대학교의 학술연구지원사업의 일부 지원으로 수행되었음.

REFERENCES

- Balcazar, J. L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J. L. Muzquiz, and O. Girones (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278: 188-191.
- Baek, H., H. R. Ahn, Y. S. Cho, and K. H. Oh (2010) Antibacterial effects of *Lactococcus lactis* HK-9 isolated from feces of a new born infant. *Kor. J. Microbiol.* 46: 127-133.
- Ahn, H. R., J. S. So, and K. H. Oh (2011) Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from vaginas of women of childbearing age. *Kor. J. Microbiol.* 47: 308-315.
- Kang C. H., K. O. Chung, and D. M. Ha (2002) Inhibitory Effect on the Growth of Intestinal Pathogenic Bacteria by Kimchi Fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34: 480-486.
- Herich, R. and M. Levkut (2002) Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med.* 47: 169-180.
- Hirayama, K. and J. Rafter (2000) The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* 2: 681-686.
- Kim M. J. and G. R. Kim (2006) *In vitro* evaluation of cholesterol reduction by lactic acid bacteria extracted from Kimchi. *Kor. J. Cul. Res.* 12: 259-268.
- Saarela, M., L. Lahteenmaki, R. Crittenden, S. Salminen, and T. Mattila-Sandholm (2002) Gut bacteria and health foods—the European perspective. *Inter. J. Food Microbiol.* 78: 99-117.
- Gill, H. S. (2003) Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17: 755-773.
- Kim S. J., S. J. Ma, and H. L. Kim (2005) Probiotic properties of lactic acid bacteria and yeasts isolated from Korean traditional food, *jeot-gal*. *Kor. J. Food Preserv.* 12: 184-189.
- 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 plantarum* YK-9 isolated from kimchi. *KSBB J.* 24: 273-278.
- 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.
- Song, Y. R., N. E. Song, J. H. Kim, Y. C. Nho, and S. H. Baik (2011) Exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* strains isolated from kimchi. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 57: 169-175.
- Kim, D. H., H. W. Cho, D. H. Kim and K. H. Oh (2013) Functional characterization of *Lactobacillus sakei* JK-17 isolated from long-term fermented Kimchi, Muk Eun Ji. *KSBB J.* 28: 18-23.
- Lee, C. W., C. Y. Ko, and D. M. Ha (1992), Food and environmental microbiology, others; microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 102-109.
- Alan, F., P. Keenan, F. O. Donovan, P. Mayne, and J. Murphy (1998) Methaemoglobinemia associated with sodium nitrite in three siblings. *BMJ* 24: 1138-139.
- Aloglu, H. S. and Z. Oner (2011) Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *J. Dairy Sci.* 94: 5305-314.
- Savaiano, D. A. and M. D. Levitt (1987) Milk intolerance and microbe-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.* 70: 397-406.
- Paul, M. and G. A. Somkuti (2010) Hydrolytic breakdown of lactoferricin by lactic acid bacteria *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 173-178.
- Ito, Y., M. Yodoshi, J. I. Tanaka, and M. Iwaida (1979) Comparison of two methods and improvements for colorimetric determination of nitrite in cod roe. *J. Food Prot.* 42: 715-718.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics.* pp. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
- Burt, S. A. and R. D. Reinders (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 162-167.
- Ma, C. W., Y. S. Cho, and K. H. Oh (2009) Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture* 287: 266-270.
- Choi, M. S., H. M. Yoon, and K. H. Oh (2014) Studies on the functional properties of lactic acid bacteria isolated from home-made yogurt and commercial yogurt. *Kor. J. Microbiol.* 50: 8-14.
- Esmailzadeh, P., S. Daivishi, 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.
- Mirvish, S. S. (1970) Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 44: 633-639.
- 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.
- Borek, C. (1997) Antioxidants and cancer. *Sci. Med.* 4: 51-62.
- Sallmyr, A., Fan, J., and F. V. Rassool (2008) Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. *Cancer Lett.* 18: 1-9.