

Antifungal activity against cheese fungi by lactic acid bacteria isolated from kimchi

Ha Nuel Choi¹, Hyun Hee Oh¹, Hee Sun Yang¹, Chang Ki Huh¹, In Hyu Bae², Jai Sung Lee²,
Yong Seob Jeong³, Eun Jeong Jeong⁴, Hoo Kil Jung^{1*}

¹*Imsil Research Institute of Cheese Science, Insil 566-881, Korea*

²*Department of Animal Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea*

³*Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*

⁴*Research Center for Industrial Development of Biofood Materials, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*

김치 분리 유산균의 치즈 곰팡이 항진균 활성

최하늘¹ · 오현희¹ · 양희선¹ · 허창기¹ · 배인휴² · 이재성² · 정용섭³ · 정은정⁴ · 정후길^{1*}

¹(재)임실치즈과학연구소, ²순천대학교 동물자원학과, ³전북대학교 식품공학과,

⁴전북대학교 바이오식품소재개발 및 산업화연구센터

Abstract

The antifungal activity against cheese fungi by lactic acid bacteria isolated from kimchi was investigated. Eight fungi were isolated from cheese in the cheese ripening room. Two of them were identified as *Penicillium* and *Cladosporium* via ITS-5.8S rDNA analysis. Twenty-two species of lactic acid bacteria with antifungal activity were isolated from kimchi. Two of them were identified as *Lactobacillus* and *Pediococcus* via 16S rRNA sequence analysis. Of the 22 lactic acid bacteria species, six were selected (*L. sakei* subsp. ALJ011, *L. sakei* subsp. ALI033, *L. sakei* subsp. ALGy039, *P. pentosaceus* ALJ015, *P. pentosaceus* ALJ024 and *P. pentosaceus* ALJ026) due to their higher activity against the eight fungi isolated from cheese in the cheese ripening room; and among the six species, the *P. pentosaceus* ALJ015 and *P. pentosaceus* ALJ024 isolates from the Jeonju area kimchi and the *L. sakei* subsp. ALI033 isolate from the Imsil area kimchi had higher antifungal activity than the other lactic acid bacteria. The minimum inhibitory concentration (MIC) of *L. sakei* subsp. ALI033 against the eight fungi isolated from cheese in the cheese ripening room was 62.5 µg/mL.

Key words : cheese, cheese ripening, fungal, antifungal activity, lactic acid bacteria

서 론

자연치즈는 유산균의 종류, 숙성정도에 따라 전 세계 700~800여종이 있다(1). 2010년 기준 국내의 치즈시장 규모는 연간 5,013억원으로 총 88,674톤이 소비되고 이 중 소비량의 72.4%가 자연치즈이며 가공 치즈는 27.6%로써 자연치즈 소비 저변이 확산되어 가고 있다(2). 이러한 소비 흐름에 맞춰 임실 치즈는 국내 치즈시장에서 확고한 입지를 다지기 위해서 다양한 숙성형 자연치즈 개발이 진행 중이다.

치즈의 숙성은 치즈를 일정한 조건하에서 보존하면서

치즈의 조직과 풍미를 갖도록 하는 제조과정의 하나이다. 치즈 제조과정에서 제조 직후는 굳고, 부서지기 쉬우며, 풍미가 없는 상태이나 숙성에 의해서 단백질 분해, 지방 분해 등의 생화학적, 효소학적 및 미생물학적 변화가 일어나면서 부드럽고 유연한 조직과 고유의 풍미를 갖게 된다(3). 하지만 치즈 숙성 중 곰팡이균은 일부 치즈(까망베르 치즈, 브리 치즈, 블루 치즈 등)를 제외하고는 치즈의 품질을 저하시키는 장애 요인으로 작용하고 있다(4).

치즈 숙성실에서 가장 빈번하게 발생하는 곰팡이는 *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* 등으로서 거의 90%를 차지하는데(5), patulin, mycophenolic acid, ochratoxin A, citrinin, aflatoxin 등의 곰팡이 독소를 생성한다(6,7). 이러한

*Corresponding author. E-mail : hkjung@irics.re.kr
Phone : 82-63-644-2170, Fax : 82-63-644-2185

곰팡이 독소로 인한 급성 독성작용으로는 간과 신장의 손상, 중추신경계의 이상, 피부와 점막의 손상, 구토 및 설사 등이 있으며, 장기적으로 노출되었을 경우에는 만성 질환, 발암, 돌연변이, 태아 기형 등을 유발한다(8,9). 이에 따라 숙성형 자연 치즈 위주로 생산하고 있는 임실 지역 목장형 유가공업체는 곰팡이균 오염에 의한 품질 저하 문제점이 발생하고 있는 실정이다.

항진균제제로 알려진 물질을 보면 화학물질로는 보존제(propionic acid, sodium propionate, calcium propionate)와 에탄올이 조사되었고. 천연물로는 grapefruit seed extract(자몽종자추출물), phytoncide(피톤치드), essential oils(정유), garlic(마늘) 등이 조사 되었으며, 항생제에는 natamycin(나타마이신), Delvocid(텔보시드)가 조사되었다. 미생물제제에는 probiotic lactic acid bacteria(프로바이오틱 유산균), *Propionibacterium*(프로피온산균), bacteriocin(박테리오신), Kimchi lactic acid bacteria(김치 유산균) 등이 효과가 있는 것으로 알려져 있고, ozonization(오존 처리)도 곰팡이 생육을 억제하는데 효과적인 방법으로 알려져 있다(10-14).

따라서 본 연구는 김치 유산균 중 항진균 효과가 있는 유산균을 찾아 치즈 숙성 중 오염원인 곰팡이균 제거기술 개발 일환으로, 임실관내 및 그 외 지역 치즈 숙성실에서 자생하는 곰팡이를 수집·분리하고, 각 지역의 1년 이상 숙성 배추김치에서 치즈 숙성실에서 분리한 곰팡이의 생육 억제에 효과가 있는 항진균 효과 유산균을 선별하고자 하였다.

재료 및 방법

곰팡이균 수집

본 실험에 사용된 곰팡이는 임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 곰팡이를 채취하여 PDA(potato dextrose agar, Difco, Detroit, MI, USA) 평판배지 및 YM(yeast medium, Difco) 액체배지에 각각 접종하여 25°C에서 48시간 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

곰팡이균의 순수 분리 및 배양

수집한 곰팡이균을 순수분리하기 위하여 배양된 곰팡이균을 0.1% peptone 90 mL에 현탁한 후, 단계적으로 희석하였다. 곰팡이균 희석액 10 µL를 분리용 PDA 평판배지에 도말한 뒤, 25°C에서 5일 동안 배양한 후 나타난 곰팡이균 포자를 채취하여 3회 분리하였다. 순수 분리된 곰팡이균의 균사는 PDA 평판배지 및 YM 액체배지에 접종하여 25°C에서 10일 동안 배양하면서 곰팡이균의 형태, 색상 및 포자의 특징 등을 관찰하였고 미세구조는 광학현미경(LAICA, Wetzlar, Germany)을 사용하여 균사 및 포자형태를 관찰하

였다.

분리 곰팡이균의 동정

선별된 8종의 곰팡이균주들은 (주)마크로젠에 ITS-5.8S rDNA 분석을 의뢰하여, 다음과 같은 방법으로 동정 하였다. BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)와 ITS1(5' -TCCGTAGGTGAACCTTTCGG-3')과 ITS4(5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer를 사용하여 PCR 반응을 수행하였으며 ABI 3730xl DNA Analyzer(Applied Biosystems)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GeneBank database에서 유사한 18S rRNA 염기서열 비교분석을 통해 확인하였다.

김치에서의 유산균 분리

전라북도 전주시와 임실군, 전라남도 광양시, 경기도 등지에서 제조원이 다른 배추김치를 수집하여 각각의 김치 내용물 전체를 마쇄한 후에 멸균거즈로 여과하였다. 김치 여과액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후 100 µL를 취해 2% 탄산칼슘(CaCO₃)이 첨가된 MRS(*Lactobacilli* MRS agar, Difco) 평판배지에 1차적으로 도말하여 30°C에서 배양하였다. 배양 중 투명환을 나타내고 집락을 형성하는 균주들을 분리하여 pH indicator인 0.006% BCP (Bromocresol Purple, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 포함한 MRS 평판배지에 2차적으로 도말하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 중 BCP의 보라색 배지가 노란색으로 변하는 균집을 각각 취하여 3차적으로 새로운 BCP배지에 도말하였으며, 순수한 유산균이 얻어질 때까지 3회 반복하였다. 그 결과 44종의 유산균을 분리하였으며, 각각의 유산균은 MRS 평판배지와 MRS 액체배지에 접종하여 30°C에서 12시간 배양하여 냉장 (4°C) 보관하면서 실험에 사용하였다.

항진균 활성 측정

다양한 지역의 김치로부터 분리한 유산균 44종에 대한 항진균 활성을 측정하기 위해 임의로 선정한 분리 곰팡이균 1종에 대하여 표준 유산균 및 분리 유산균의 항진균 활성을 확인하였다. MRS 평판배지의 중앙에 직경 3 mm의 홈을 낸 다음 표준 유산균과 김치로부터 분리한 유산균 44종을 각각 10 µL씩 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 유산균 배양이 종료된 후 PDA 배지를 유산균이 배양된 MRS 배지 위에 부어 굳혔다. 곰팡이균 FB(Imsil 지역 치즈 숙성실에서 분리한 곰팡이균)를 균질기(Daihan, Daejeon, Korea)를 이용해 600 rpm에서 5분간 균질한 후 PDA 배지에 접종하였다. 25°C에서 48시간 동안 중층배양한 후 유산균이 생산하는 항진균 물질에 의한 생육저지환 생성 여부

및 크기를 관찰하여 항진균 활성을 평가하였다(Fig. 2).

항진균 유산균의 동정 및 선발

다양한 지역의 김치로부터 분리한 44종의 유산균을 임의로 선정한 곰팡이균 FB에 대하여 항진균 활성을 나타낸 22종을 1차 선별하고 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCATGG-CTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 (주)마크로젠에 16S rRNA 분석의뢰 후 곰팡이균 동정 방법과 동일하게 동정하였다. 동정된 22종의 유산균 중 곰팡이균 FB에 대하여 항진균 활성이 강하게 나타난 유산균을 형태학적, 생화학적 특성을 비교·분석하여 분리된 곰팡이 8종에 대한 항진균 활성 실험에 사용할 유산균 6종을 최종 선발하였다.

김치 분리 유산균 6종의 항진균 활성

임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 분리 곰팡이 8종에 대하여 최종 선발된 6종의 유산균을 처리하여 생육저지환으로 항진균 활성을 판단하였다. MRS 평판배지 중앙에 직경 3 mm의 홈을 낸 다음 유산균 6종을 각각 10 µL씩 접종하여 30°C에서 12시간동안 배양하였다. 유산균 배양이 종료된 후 PDA 평판배지를 유산균이 배양된 MRS 배지 위에 부어 굳혔다. 8종의 곰팡이를 균질기를 이용해 600 rpm에서 5분간 균질한 후 PDA 배지에 접종하였다. 25°C에서 48시간 동안 중층배양한 후 유산균이 생산하는 항균 물질에 의한 생육저지환 생성 여부 및 크기를 관찰하여 항진균 활성을 평가하였다.

유산균 배양액의 최소저해농도 측정

최소저해농도(MIC) 측정은 최종 선발된 6종의 항진균 활성 유산균에 의한 임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성중인 치즈와 숙성실에서 자생하는

분리 곰팡이 8종의 생육 저해 정도를 UV-VIS spectrophotometer (Biochrom, England)로 확인하였다. 분리된 8종의 곰팡이균을 YM 액체배지 100 mL에 희석 접종한 후 25°C에서 배양하여 각 균주가 대수증식기 중반기에 접어들 때 이를 각각의 새로운 배지 5 mL에 100 µL씩 접종하였으며, 곰팡이 배양액에 항진균 효과를 보이는 6종의 유산균을 첨가하여 최종 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ppm 농도가 되도록 하였다. 항진균 활성유산균이 접종된 곰팡이균은 25°C에서 48시간 동안 배양한 후 생육정도를 UV-VIS spectrophotometer(Biochrom)를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

곰팡이균의 순수 분리 및 배양

임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성 중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 곰팡이를 채취하여 PDA 평판배지에 도말하여 25°C에서 48시간 동안 배양한 뒤, 형성되는 포자의 집락을 관찰하였다. 그 결과 다양한 종류의 곰팡이들이 동일한 배지 내에서 관찰되었으며, 이를 3회 분리 배양하여 균사는 PDA 평판배지 및 YM 액체배지에 접종하여 25°C에서 10일간 배양한 후 광학현미경으로 균사 및 포자형태를 관찰하였다. 곰팡이균의 형태, 색상 및 포자의 특징을 비교하여 최종 분리 배양된 곰팡이균 8종을 FA, FB, FC, FD, FE, FF, FG 그리고 FH로 각각 명명하였다(Fig. 1).

곰팡이균의 동정

임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성 중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 곰팡이를 채취한 후 분리 배양한 최종 8종의 곰팡이균을 FA에서 FH로 명명

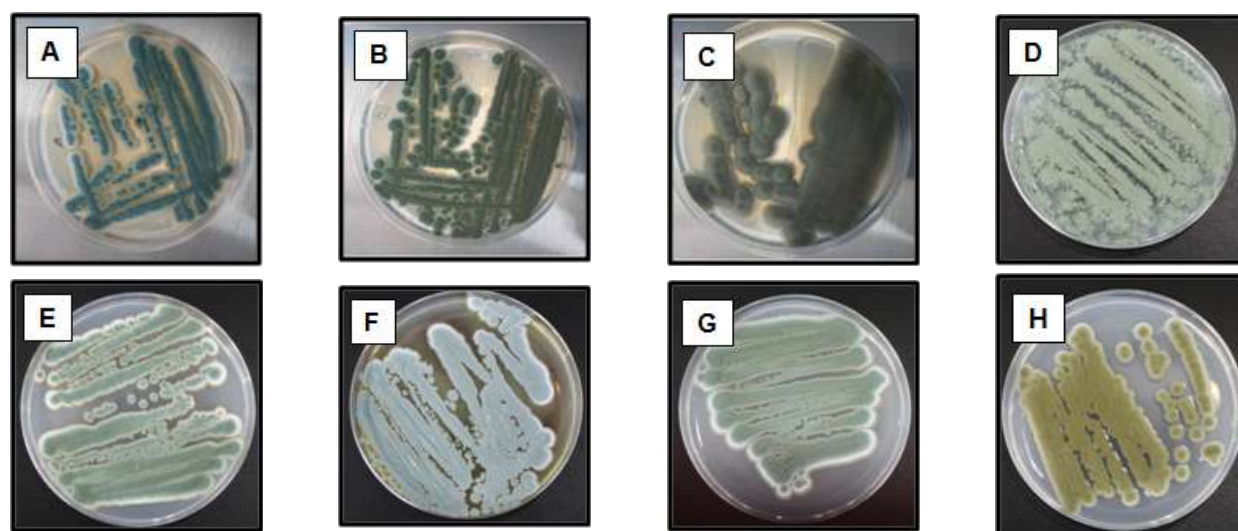


Fig. 1. Fungi isolated from cheese and cheese ripening room. FA~FH: fungi A~H

하여 16S rRNA 염기서열을 결정하고 알려진 다른 균주와 비교하였다. 각각의 곰팡이균을 동정한 결과 FA 곰팡이균은 *Pen. solitum* strain, FB는 *Pen. brevicompactum* strain, FC는 *Pen. commune* isolate, FD는 *Pen. roqueforti*, FE는 *Pen. echinulatum*, FF는 *Pen. polonicum*, FG는 *Pen. solitum* 그리고 FH는 *Cl. sphaerospermum*으로 각각 판정되었다. Jung 등(4)은 치즈 숙성 중의 곰팡이 오염 방제 연구에서 치즈 숙성실에서 가장 빈번하게 발생하는 곰팡이는 *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* 등이 90%를 차지한다고 보고한 바 있어 본 연구의 치즈 숙성실에서 분리·동정된 곰팡이류와 일치하였다.

분리 곰팡이균 8종은 동정 후 *Pen. solitum* strain FI01, *Pen. brevicompactum* strain FI02, *Pen. commune* isolate FI03, *Pen. roqueforti* FS04, *Pen. echinulatum* FS05, *Pen. polonicum* FS06, *Pen. solitum* FS07 그리고 *Cl. sphaerospermum* FS08로 각각 명명하여 실험에 사용하였다 (Table 1).

Table 1. Identification of fungi isolated from cheese and cheese ripening room

Strain	16S rRNA sequence		Nomenclature
	Homology(%)	Scientific name	
FA	100	<i>Penicillium solitum</i> strain	<i>P. solitum</i> strain FI01
FB	99	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain	<i>P. brevicompactum</i> strain FI02
FC	100	<i>Penicillium commune</i> isolate	<i>P. commune</i> isolate FI03
FD	100	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>P. roqueforti</i> FS04
FE	99	<i>Penicillium echinulatum</i>	<i>P. echinulatum</i> FS05
FF	100	<i>Penicillium polonicum</i>	<i>P. polonicum</i> FS06
FG	100	<i>Penicillium solitum</i>	<i>P. solitum</i> FS07
FH	100	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>C. sphaerospermum</i> FS08

FA~FH: fungi A-H

Table 2. Reference strain used in this study

Indicator strains	Reference
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC3526	KCTC ¹⁾
<i>Lactobacillus curvatus</i> KCTC3767	KCTC
<i>Leuconostoc lactis</i> KCTC3528	KCTC
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCCM40458	KCCM ²⁾
<i>Weissella cibaria</i> KCTC3807	KCTC
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC3524	KCTC
<i>Leuconostoc gelidum</i> KCCM40460	KCCM
<i>Lactobacillus sakei</i> KCCM40264	KCCM
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KCTC3505	KCTC
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> KCTC3603	KCTC
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> KCTC3753	KCTC
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KCCM11325	KCCM

¹⁾KCTC: Korean Collection for Type Culture

²⁾KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms

항진균 활성이 있는 유산균 표준균주의 탐색

최근 국내의 문헌자료를 통해 우수한 항진균 활성을 나타내는 유산균 표준균주를 탐색하여 표준유산균 12종을 선별하여 구입하였다. 김치로부터 분리한 유산균의 항진균 활성을 평가하는 대조균으로 사용된 12종의 표준 유산균은 Table 2와 같다.

김치에서의 유산균 분리 및 확보

다양한 지역에서 수집한 김치로부터 유산균을 분리하기 위해 각 지역에서 수거한 김치를 분쇄한 후 여과액을 탄산칼슘이 첨가된 MRS 평판배지에 도말하여 30°C에서 배양하였다. 김치 여과액이 도말된 MRS-CaCO₃ 고체배지 상에서 산 생성에 따른 투명환을 형성하는 균주의 집락들이 관찰되었다. 투명환을 나타내는 균주들을 따로 분리하여 BCP 를 포함한 MRS 평판배지에

2차적으로 도말하여 BCP의 보라색 배지가 노란색으로 변하는 미생물 군집을 각각 취하여 미생물 군집에 대하여 순수한 유산균이 얻어질 때까지 MRS 고체배지에 3회 반복하여 도말하고 김치로부터 유산균 44종을 확보하였다. 분리된 유산균 44종 중 전주지역 김치에서 분리한 유산균 29종을 LJ001에서 029로, 임실지역 김치에서 분리한 유산균 6종을 LI030에서 LI035, 경기도지역 김치에서 분리한 유산균 4종을 LGy036에서 039, 광양지역 김치에서 분리한 유산균 4종을 LGw040에서 044로 명명하여 실험에 사용하였다(Table 3).

표준 유산균에 대한 항진균 활성

다양한 지역에서 수집한 김치로부터 분리한 유산균의 항진균 활성을 확인하기 위해 먼저 대조균으로 사용된 표준 유산균주 12종을 분리 곰팡이균 중 임의로 선정한 FB(*Pen. brevicompactum* strain FI02)에 대한 항진균 활성을 확인하

였다. 그 결과 12종의 표준 유산균주 가운데 *Leuconostoc citreum* KCTC3524 유산균이 FB 곰팡이균에 대한 항진균 활성이 크게 나타나 김치로부터 분리한 44종의 유산균에 대한 항진균 활성을 비교하는 대조군으로 결정하였다(Fig. 2).

Table 3. Lactic acid bacteria isolated from kimchi

Lactic acid bacteria	Collection site
LJ001~029	Jeonju
LI030-035	Imsil
LGy036-039	Gyeonggi
LGw040~044	Gwangyang

LJ: Lactic acid bacteria from kimchi in Jeonju, LI: Lactic acid bacteria from kimchi in Imsil, LGy: Lactic acid bacteria from kimchi in Gyeonggi, LGw: Lactic acid bacteria from kimchi in Gwangyang

김치 유산균에 대한 항진균 활성

다양한 지역에서 수집한 김치로부터 분리한 44종 유산균의 항진균 활성을 확인하기 위해 분리 곰팡이균 중 임의로 선정한 곰팡이균 FB(*Pen. brevicompactum* strain FI02)에 대하여 항진균 활성을 확인하였다. 그 결과 광양지역 김치에서 분리한 유산균(LGw040~044)을 제외하고 유산균에 의한 생육저지환을 형성하는 것을 관찰할 수 있었다. 전주지역과 임실지역 김치에서 분리된 유산균에서 곰팡이균 FB에 대하여 항진균 활성이 크게 나타났다. 특히, 전주지역과 임실지역의 김치에서 분리한 유산균 중 LJ007, 011,

015, 017, 019와 LI031가 대조군으로 사용된 표준 유산균주 *Leuconostoc citreum* KCTC3524의 곰팡이균 FB에 대한 항진균 활성과 유사 또는 보다 크게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 3).

항진균 활성 유산균의 동정 및 선발

다양한 지역에서 수집한 김치로부터 분리한 44종의 분리 유산균 중 곰팡이균 FB(*Pen. brevicompactum* strain FI02)에 대하여 생육저지환의 크기 및 형태를 바탕으로 항진균 활성이 크다고 판정된 22종의 유산균을 선발하여 ALA에서 ALV로 명명하였다. 항진균 활성이 있다고 판정되어 1차 선발된 22종의 유산균을 동정한 결과, 전주지역 김치로부터 분리한 유산균 ALA, ALB, ALC, ALD, ALE와 임실지역 김치로부터 분리한 유산균 ALF, ALG, ALH와 경기지역 김치로부터 분리한 유산균 ALI, ALJ는 *Lactobacillus sakei* subsp.로 동정되었다. 또한 전주지역 김치로부터 분리한 유산균 ALK, ALL, ALM, ALN, ALO, ALP, ALQ, ALR, ALS, ALT, ALU, ALV는 *Pediococcus pentosaceus*로 동정되었다. Magnusson 등(15)은 다양한 곳에서 분리한 유산균 중 항진균 활성을 보인 유산균에 *L. coryniformis*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *P. pentosaceus* 등이 포함 된다고 보고하여 본 연구 결과에서의 항진균 활성 유산균의 동정 결과인 *L. sakei*, *P. pentosaceus*결과와 일치 하였다. Yang 등(16)은 같은 소재인 김치로부터 항진균 활성 유산균을 분리한 결과 *L. plantarum* AF1이 가장 넓은 범위의 항진균 활성을 나타냈다고 보고하여 본 연구와 차이가 있었다. 이는 실험 대상 주요 곰팡이가 Yang 등(16)의 연구에서는 주로 *Aspergillus* 속이었고, 본 연구는 치즈에서 분리한 *Penicillium* 속의 차이에 의해서 나타난 결과라 판단된다.

최종 22종의 유산균은 동정 후 *L. sakei* subsp. ALJ002, *L. sakei* subsp. ALJ005, *L. sakei* subsp. ALJ007, *L. sakei* subsp. ALJ011, *L. sakei* subsp. ALJ013, *L. sakei* subsp. ALI031, *L. sakei* subsp. ALI032, *L. sakei* subsp. ALI033, *L. sakei* subsp. ALGy036, *L. sakei* subsp. ALGy039, *P. pentosaceus* ALJ014, *P. pentosaceus* ALJ015, *P. pentosaceus* ALJ016, *P. pentosaceus* ALJ017, *P. pentosaceus* ALJ018, *P. pentosaceus* ALJ019, *P. pentosaceus* ALJ021, *P.*

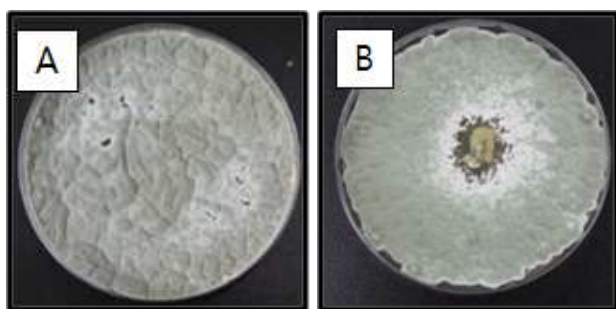


Fig. 2. Antifungal activity of reference lactic acid bacteria against FB. A): None treated, B): *Leuconostoc citreum* KCTC3524, FB: Fungi B; *P. brevicompactum* strain FI02



Fig. 3. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi against FB. (A): Lactic acid bacteria from kimchi in Jeonju 015, (B): Lactic acid bacteria from kimchi in Imsil 031, (C): Lactic acid bacteria from kimchi in Gyeonggi 036, (D): Lactic acid bacteria from kimchi in Gwangang 040, FB: Fungi B; *P. brevicompactum* strain FI02

Table 4. Identification of antifungal lactic acid bacteria isolated from kimchi

Strain	16S rRNA sequence		Nomenclature
	Homology (%)	Scientific name	
ALA	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ002
ALB	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ005
ALC	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ007
ALD	100	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ011
ALE	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ013
ALF	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ031
ALG	96	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALI032
ALH	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALI033
ALI	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALGy036
ALJ	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALGy039
ALK	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ014
ALL	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ015
ALM	100	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ016
ALN	97	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ017
ALO	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ018
ALP	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ019
ALQ	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ021
ALR	100	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ022
ALS	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ024
ALT	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ026
ALU	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ027
ALV	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ029

ALA~ALV: antifungal lactic acid bacteria A-V, ALJ: antifungal lactic acid bacteria from kimchi in Jeonju 002, 005, 007, 011, 013, 014, 015, 016, 017, 018, 019, 021, 022, 024, 026, 027, 029 ALI: antifungal lactic acid bacteria from kimchi in Insil 031, 033, 034, ALGy: antifungal lactic acid bacteria from kimchi in Gyeonggi 036, 039

pentosaceus ALJ022, *P. pentosaceus* ALJ024, *P. pentosaceus* ALJ026, *P. pentosaceus* ALJ027, *P. pentosaceus* ALJ029로 각각 명명하여 실험에 사용하였다(Table 4).

선발 유산균의 항진균 활성 비교

항진균 활성이 있다고 판단된 김치로부터 분리한 22종의 유산균을 다시 곰팡이 FB(*Pen. brevicompactum* strain FI02)에 대하여 항진균 활성을 재확인하였다. 22종 가운데 항진균 활성이 가장 뚜렷한 6종의 유산균을 최종 선발하였다(Table 5). 선발 유산균은 전주지역 김치로부터 분리한 유산균 ALD, ALL, ALS, ALT, 임실지역 김치로부터 분리한 유산균 ALH, 그리고 경기지역 김치로부터 분리한 유산균 ALJ였다. 최종 선발한 항진균 유산균 6종으로 임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 분리 곰팡이균 8종에 대하여 항진균 실험을 진행한 결과는 Table 6과 같다. 생육저지환의 모양과 크기로 항진균 활성을 평가한 결과, 최종 선발된 분리 유산균 6종은 치즈와 치즈 숙성실에서 자생하는 곰팡이

Table 5. Antifungal lactic acid bacteria isolated from kimchi

Strain	Nomenclature
ALD	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ011
ALH	<i>L. sakei</i> subsp. ALI033
ALJ	<i>L. sakei</i> subsp. ALGy039
ALL	<i>P. pentosaceus</i> ALJ015
ALS	<i>P. pentosaceus</i> ALJ024
ALT	<i>P. pentosaceus</i> ALJ026

ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T, ALJ: antifungal lactic acid bacteria from kimchi in Jeonju 011, 015, 024, 026 ALI: antifungal lactic acid bacteria from kimchi in Insil 033, ALGy: antifungal lactic acid bacteria from kimchi in Gyeonggi 039

균 8종에 대하여 대부분 항진균 활성을 보였다. 곰팡이균 FB와 FH에는 6종의 분리 유산균 모두 대조균인 표준 유산균 *Leu. citreum* KCTC3524보다 활성이 크게 나타났으며, 곰팡이 FC와 FE에 대하여 6종의 분리 유산균은 대조균인 표준 유산균 *Leu. citreum* KCTC3524과 비교하여 유사한 결과를 보였다. 특히, 임실지역 김치로부터 분리한 유산균

ALH(*L. sakei* subsp. ALI033)가 곰팡이균 8종에 대하여 항진균 활성이 가장 큰 것으로 평가되었다. 곰팡이별 항진균 활성을 보면 분리 곰팡이 FC(*Pen. commune* isolate FI03)와 FE(*Pen. echinulatum* FS05)는 모든 유산균에서 높은 항진균 활성을 보여 치즈 숙성 중 효과적으로 억제가 가능할 것으로 판단되며, FB(*Pen. brevicompactum* strain FI02)와 FH(*Cl. sphaerospermum* FS08) 곰팡이 또한 표준 유산균 *Leu. citreum* KCTC3524 균주를 제외한 김치에서 선발된 항진균 활성 유산균 6종에서 높은 활성을 보였다. 반면 FD(*Pen. roqueforti* FS04)와 FG(*Pen. solitum* FS07) 곰팡이의 경우 다른 곰팡이에 비해 생육 억제 효과가 다소 떨어지는 경향을 보여 곰팡이별 활성이 다소 차이가 있는 것을 확인하였다. Baek (17)은 전통식품류에서 분리한 유산균의 항진균 활성 연구에서 떡류에서 분리한 곰팡이 3종(*Cladosporium*, *Penicillium*, *Neurospora*)에 대해 분리 유산균 모두 활성을 보였지만 곰팡이의 종에 따라 생장 저해 정도가 다소 차이가 있었다고 보고하여 본 연구 결과와 비슷하였다. 하지만 Baek (17) 연구에서의 가장 생육 저지환이 큰 곰팡이는 *Cladosporium* 이었고, 본 연구에서는 *Penicillium*에 대한 생육 저지환이 가장 큰 것으로 나타났다.

Table 6. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi against 8 fungi isolated from cheese and cheese ripening room

Antifungal lactic acid bacteria	Fungi							
	FA	FB	FC	FD	FE	FF	FG	FH
<i>L. citreum</i>	x	xx	xxx	x	xxx	x	x	xx
ALD	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xx	x	xxx
ALH	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xxx
ALJ	xx	xxx	xxx	xx	xxx	x	x	xxx
ALL	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xx	x	xxx
ALS	x	xxx	xxx	x	xxx	xxx	xx	xxx
ALT	x	xxx	xxx	x	xxx	xxx	xx	xxx

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each fungi. Degree of clear zone by growth inhibition; -: no inhibition, x: below 10 mm, xx: 10~15 mm, xxx: above 15 mm, *L. citreum*: *Leuconostoc citreum* KCTC3524, FA-H: fungi A-H, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T

유산균 배양액의 최소저해농도(MIC) 측정

8종의 분리 곰팡이균에 대한 최종 선발된 6종의 항진균 활성 유산균의 항진균 활성에 있어 최소저해농도를 측정된 결과는 Table 7과 같다. FA 곰팡이균에 대하여 ALH 유산균의 MIC는 62.5 μ L/mL로 가장 높게 나타났으며, 그 다음 ALL 유산균(MIC: 125 μ L/mL), ADL 유산균(MIC: 250 μ L/mL)순으로 나타났다. FB 곰팡이균에서는 ALH 유산균과 ALT 유산균의 MIC가 62.5 μ L/mL로 가장 크게 나타났다. FC와 FH 곰팡이균에서는 6종의 유산균 모두 고른 항진균 활성을 보였다. 특히, FH 곰팡이균에 대하여 ALH, ALL 및 ALS 유산균이 MIC가 62.5 μ L/mL로 크게 나타났다. FD와 FE 곰팡이균의 경우 ALH 유산균(MIC: 62.5 μ L/mL)이,

FF 곰팡이균에 대하여 ALS 유산균(MIC: 125 μ L/mL)의 항진균 활성이 크게 나타났다. 유산균 배양액의 최소저해 농도를 측정해 본 결과, 생육저지환으로 알아본 항진균 활성 실험과 동일하게 분리 곰팡이균 8종에 대하여 ALH 유산균의 항진균 활성이 가장 크게 나타났다.

Table 7. Minimum inhibitory concentration (MIC) of lactic acid bacteria isolated from kimchi against 8 fungi isolated from cheese and cheese ripening room

Antifungal lactic acid bacteria	Fungi							
	FA	FB	FC	FD	FE	FF	FG	FH
<i>L. citreum</i>	>500	250	250	>500	62.5	>500	>500	125
ALD	250	125	250	500	125	250	>500	125
ALH	62.5	62.5	250	62.5	62.5	250	125	62.5
ALJ	500	125	250	250	250	500	250	125
ALL	125	250	125	500	125	250	>500	62.5
ALS	250	250	125	500	125	125	>500	62.5
ALT	>500	62.5	250	>500	125	250	500	125

L. citreum: *Leuconostoc citreum* KCTC3524, FA-H: fungi A-H, ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T

요 약

본 연구는 치즈 숙성 중 오염원인 곰팡이균 제거기술 개발의 일환으로 수행하였다. 치즈 및 치즈 숙성실에서 자생하는 곰팡이를 분리하고, 지역별 김치로부터 유산균을 분리하여 치즈 곰팡이에 대한 항진균 활성을 측정할 결과는 다음과 같다. 치즈와 치즈 숙성실에 분리된 곰팡이는 총 8종으로 *Penicillium*과 *Cladosporium*으로 동정되었다. 지역별 김치로부터 분리된 유산균은 총 44종이고 이 중 항진균 활성을 보인 유산균 22종을 동정한 결과 *Lactobacillus*와 *Pediococcus*로 확인되었다. 동정된 김치 분리 유산균 22종 중 항진균 활성도가 높은 유산균 6종(*L. sakei* subsp. ALJ011, *L. sakei* subsp. ALI033, *L. sakei* subsp. ALGy039, *P. pentosaceus* ALJ015, *P. pentosaceus* ALJ024, *P. pentosaceus* ALJ026)을 선발하여, 치즈 곰팡이균 8종에 대하여 항진균 활성을 측정할 결과 전주지역 김치에서 분리한 유산균인 *P. pentosaceus* ALJ015, *P. pentosaceus* ALJ024 과 임실지역 김치에서 분리한 유산균인 *L. sakei* subsp. ALI033 균주가 치즈 곰팡이에 대한 항진균 활성이 높게 나타났다. 치즈 곰팡이에 대한 유산균 배양액의 최소저해 농도를 측정해 본 결과, 생육저지환으로 알아본 항진균 활성 실험과 동일하게 분리 곰팡이균 8종에 대하여 *L. sakei* subsp. ALI033 유산균의 항진균 활성이 가장 크게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 고부가가치식품기술개발사업의 연구비 지원(111143-2)으로 수행된 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

References

1. R. Scott (1998) *Cheesemaking practice*. Kluwer Academic/Plenum Publishing Co, New York, USA, p 22-23
2. Nam MS (2012) Research and development trends of cheese. Academic forum for advancement of Korean cheese industry of Korean J Dairy Sci Technol, October 6, Imsil, Korea
3. Lee MR, Lee WJ (2008) Understanding of development of cheese texture during ripening. Korean J Dairy Sci Technol, 26, 57-60
4. Jung HK, Choi HN, Oh HH, Huh CK, Yang HS, Oh JH, Park JH, Choi HY, Kim KH, Lee SG (2012) Prevention of fungal contamination during cheese ripening-current situation and future prospects. Korean J Dairy Sci Technol, 30, 75~81
5. Serra R, Abrunhosa L, Kozakiewicz Z, Venancio A, Lima N (2003) Use of ozone to reduce molds in cheese ripening room. J Food Protect, 66, 2355-2358
6. Taniwaki MH, Hocking AD, Pitt JI, Fleet GH (2001) Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. Int J Food Microbiol, 68, 125-133
7. Bullerman LB (1981) Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. J Dairy Sci, 64, 2439-2452
8. Sanglard D (2002) Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. Curr Opin Microbiol, 5, 379-385
9. Dantigny P, Dao T (2011) Control of food spoilage fungi by ethanol. Food Control, 22, 360-368
10. Sitara U, Niaz I, Naseem J, Sultana N (2008) Antifungal effect of essential oils on in vitro growth of pathogenic fungi. Pak J Bot, 40, 409-414
11. Sridhar SR, Rajagopal RV, Rajavel R, Masilamani S, Narasimhan S (2003) Antifungal activity of some essential oils. J Agri Food Chem, 51, 7596-7599
12. Suomalainen TH, Mäyrä-Mäkinen AM (1999) Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. Lait, 79, 165-174
13. Tagg GR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocin of gram-positive bacteria. Bacteriol Rev, 40, 722-756
14. Pintado CMBS, Ferreira MASS, Sousa I (2010) Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. Food Control, 21, 240-246
15. Magnusson J, J Strogren, J Schmurser (2003) Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FFMS Microbiol Lett, 219, 129-135
16. Yang EJ, Chang HC (2008) Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. Korean J Microbiol Biotechnol, 36, 276-284
17. Baek EJ (2011) Antifungal activities of lactic acid bacteria and application of a lactic acid bacterial starter in rice cakes. MS thesis. Inha University, Korea, p 14-15

(접수 2013년 3월 29일 수정 2013년 9월 5일 채택 2013년 9월 17일)