creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000264647
조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2015年 2月
碩士學位 論文

김치로부터 분리한 항균 활성을 가진 *Leuconostoc mesenteroides* TA의 특성 및 그 항균 물질의 특성 규명

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

李 設 華

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

김치로부터 분리한 항균 활성을 가진 *Leuconostoc mesenteroides* TA의 특성 및 그 항균 물질의 특성 규명

Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* TA isolated from Kimchi harboring antimicrobial activity and its antimicrobial compound

2015년 2월 25일

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

李 設 華

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

김치로부터 분리한 항균 활성을 가진 *Leuconostoc mesenteroides* TA의 특성 및 그 항균 물질의 특성 규명

指導敎授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함

2014年 10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

李 設 華

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

李設華의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 이 재 준 印

委 員 조선대학교 교수 이 주 민 印

委 員 조선대학교 교수 장 해 춘 印

2014 年 11 月

朝鮮大學校 大學院

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT ····· Ⅶ
LIST OF TABLES ····· Ⅴ
LIST OF FIGURES ····· Ⅵ

제 1 장 서 론 ····· 1

제 2 장 실험 재료 및 방법 ····· 6
제 1 절 항진균 활성 균주의 분리 및 동정 ····· 6
1. 항진균 활성 균주 분리 ····· 6
2. 분리 균주의 동정 ····· 6
3. 공시균주와 분리 균주의 상이성 ····· 7
가. 당 발효능 ····· 7
제 2 절 분리균주의 특성 ····· 7
1. 생육 최적 조건 ····· 7
가. 배양 온도에 따른 생육도 및 항균0 활성 측정 ····· 7
나. 초기 pH에 따른 생육도 및 항균 활성 측정 ····· 8
다. 배양 상징액의 준비 ····· 8
2. 생육시기에 따른 항균 활성 ····· 8
3. 안전성 평가 ····· 9
가. 용혈성 확인 ····· 9
나. 항생제 감수성 ····· 9
다. 효소 활성 ····· 10

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

4. 분리 균주의 항균 활성 측정 ····· 10
가. 사용한 균주 ····· 10
(1) 곰팡이 ····· 10
(2) 효모 ····· 11
(3) 세균 ····· 13
나. 항균 활성 측정 방법 ····· 13
5. 항균 spectrum 조사 ····· 15
가. 조항균 물질 (배양 상징액)의 준비 ····· 15
나. 사용한 균주 ····· 15
다. 항균 활성 실험 ····· 15
(1) 지시 균주의 준비 ····· 15
(2) 항균 활성 측정 방법 ····· 16
6. 조항균 물질 (배양 상징액)의 안정성 ····· 16
가. pH 안정성 ····· 16
나. 온도 안정성 ····· 16
다. 효소 안정성 ····· 17
라. 항진균 및 항세균 활성 측정 ····· 17
제 3 절 항균 물질의 정제 및 특성 ····· 17
1. SPE (solid phase extraction) 정제 ····· 17
2. 항균 spectrum 조사 ····· 18
3. SPE 정제 조항균 물질의 안정성 ····· 18
가. pH 안정성 ····· 18
나. 온도 안정성 ····· 19
다. 용매 안정성 ····· 19
라. 항진균 및 항세균 활성 측정 ····· 19

제 3 장 결과 및 고찰 ····· 20

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

제 1 절 항진균 활성 유산균주의 분리 및 동정 ····· 20
1. 항진균 활성 균주의 분리 ····· 20
2. 분리균주의 동정 ····· 20
3. 공시균주와 분리 균주의 상이성 ····· 26
제 2 절 분리균주의 특성 규명 ····· 28
1. 생육 최적 조건 ····· 28
가. 배양 온도에 따른 생육도 및 항균 활성 측정 ····· 28
나. 초기 pH에 따른 생육도 및 항균 활성 측정 ····· 30
2. 생육시기에 따른 항균 활성 ····· 32
3. 안전성 평가 ····· 34
가. 용혈성 확인 ····· 34
나. 항생제 감수성 ····· 34
다. 효소 활성 ····· 37
4. 분리 균주의 항균 활성 측정 ····· 39
5. 항균 spectrum 조사 ····· 43
6. 조항균 물질 (배양 상징액)의 안정성 ····· 45
가. pH 안정성 ····· 45
나. 온도 안정성 ····· 45
다. 효소 안정성 ····· 45
제 3 절 항균 물질의 정제 및 특성 ····· 48
1. SPE 정제 및 항균 spectrum 조사 ····· 48
2. SPE 정제 조항균 물질의 안정성 ····· 50
가. pH 안정성 ····· 50
나. 온도 안정성 ····· 50
다. 용매 안정성 ····· 50

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 4 장 결 론 ····· 52

제 5 장 참고 문헌 ····· 57

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

LIST OF TABLES

Table 1. List of fungi used in the study ····· 12

Table 2. List of bacteria used in this study ····· 14

Table 3. Sugar ultilization characterization of *Leu. mesenteroides* TA ····· 22

Table 4. Compare of sugar ultilization characterization between *Leu. mesenteroides* TA and *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293^{T} ····· 27

Table 5. Minimum Inhibitory Concentration(MIC) of various antibiotics against *Leu. mesenteroides* TA ····· 36

Table 6. Enzymatic activities of *Leu. mesenteroides* TA by API zym analysis ·· 38

Table 7. Inhibitory spectrum of culture supernatant ····· 44

Table 8. Effect of pH, heat, and enzyme treatment on the supernatant of *Leu. mesenteroides* TA ····· 47

Table 9. Inhibitory spectrum of antimicrobial compound ····· 49

Table 10. Effect of pH, heat, and enzyme treatment on the antimicrobial activity of *Leu. mesenteroides* TA ····· 51

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

LIST OF FIGURES

Figure 1. Chemical structures of various antifungal compounds produced by LAB. ····· 5

Figure 2. Isolation of antifungal lactic acid bacteria ····· 21

Figure 3. Gram staining and microscopic observation of the isolate TA ····· 22

Figure 4. 16s rRNA sequence of the isolate TA ····· 24

Figure 5. Phylogenetic relationship between the isolate TA and other related bacteria based on 16s rRNA sequences ····· 25

Figure 6. Effect of temperature on the growth of *Leu. mesenteroides* TA ····· 29

Figure 7. Effect of initial pH of the growth medium on the growth of *Leu. mesenteroides* TA ····· 31

Figure 8. Growth, pH, and antibacterial and antifumgal activities of *Leu. mesenteroides* TA ····· 33

Figure 9. Hemolysis test of *B.* cereus KCTC 3624 (A) and *Leu. mesenteroides* TA (B) ····· 35

Figure 10. Antifungal activity of *Leu mesenteroides* TA ····· 41

Figure 11. Antibacterial activity of *Leu mesenteroides* TA ····· 42

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* TA isolated from Kimchi harboring antimicrobial activity and its antimicrobial compound

Lee, Seol Hwa
Adviser : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.
Department of Food and Nutrition,
Graduate School of Chosun Unversity

A lactic acid bacterium having antifungal activity was isolated from kimchi. The isolate was identified as *Leuconostoc* sp. based on its morphological and biochemical properties, and 16S rRNA gene sequences determination. Growth and antifungal, and antibacterial activities of *Leu. mesenteroides* TA were measured at 28℃, 30℃, and 37℃ at 24, 48 hr. The effects of initial pH (pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0) on growth, antifungal and antibacterial were also determined. *Leu. mesenteroides* TA could grow well at 30℃ with initial pH of 6.0～7.0.

Leu. mesenteroides TA was non-hemolytic. To obtain antibiotic susceptibilities of LAB, minimum inhibitory concentration (MIC) of 9 antibiotics for *Leu. menseteroides* TA. *Leu. menseteroides* TA was sensitive of ampicillin, vancomycin, gentamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol. The enzyme profiling is an important factor for selection of strains as starter cultures. The enzymatic potential of the *Leu. mesenteroides* TA was evaluated using the API ZYM kit. *Leu. mesenteroides* TA was observed strong α-glucosidase activity and β-glucosidase.

Leu. mesenteroides TA showed antifungal activity against *Aspergillus*

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

fumigatus ATCC 96918, *A. flavus* ATCC 22546, *A. ochraceus* PF-2, *A. nidulans* PF-3, *Penicillium expansum* KCTC 6434, and *Pichia kudriavzevii* GY1 using a dual culture overlay assay and paper disc assay. Furthermore, *Leu. mesenteroides* TA represented antibacterial activity against various species of gram-positive and gram-negative bacteria.

The antifungal and the antibacterial activity were stable at heat or proteolytic enzyme treatment, but it was unstable at pH 5.0~7.0.

The antifungal compounds were partial purified by solid phase extraction (C_{18} SPE column), and The antifungal compounds were observed antimicrobial activity. The antifungal compounds showed antifungal activity against various species of fungi. However, The antifungal compounds were not inhibited almost bacteria except *Bacillus* sp.

The antifungal and the antibacterial compounds were stable at heat or solvent, but it was unstable at pH 3.0 and pH 5.0~8.0

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

제 1 장 서 론

치즈, 된장, 간장, 술 등과 같은 식품의 발효와 관련된 이로운 곰팡이들이 있지만 많은 종류의 곰팡이들이 식품에서 부패를 일으키며, 이취, 독소 생성, 변색 등 식품의 품질 저하뿐만 아니라 인체에 유해한 작용을 일으킬 수 있다[8, 28, 67].

곰팡이에 의한 식품의 품질 저하는 곰팡이가 생육하면서 분비하는 exoenzyme들에 의해 발생할 수 있다[3]. 또한, dimethyl disulphide, geosmin, 2-methyl isoborneol 등과 같은 휘발성 물질을 생산하여 매우 적은 양으로도 식품과 음료의 품질 저하를 가져올 수 있다[30]. FAO (Food and Agriculture Organization)는 전 세계 농산물의 25%가 곰팡이 독소로 오염되었을 것임을 추정하였으며[1, 27], 전 세계 식품 시장에서 곰팡이의 오염에 따른 경제적 손실이 10% 이상 차지하고 있다[59]. 더 나아가 식품 속 곰팡이 포자는 심각한 건강 문제를 야기하기도 한다[54]. 그러나 곰팡이의 오염으로 인한 가장 큰 문제는 곰팡이 독소 (mycotoxin)의 생성이다. 곰팡이 독소는 인체에 여러 가지 만성적 또는 급성적인 영향을 미치며, 연간 수백만 달러의 피해를 입혀 농산물을 폐기하게 만든다[27]. 현재까지 400종 이상의 곰팡이 독소가 알려져 있으며, 식품과 사료에서 생성되는 mycotoxin의 대부분은 *Aspergillus* 속, *Penicillium* 속에서 생성되며 곡류에서 생성되는 mycotoxin의 대부분은 *Fusarium* 속 등에 의하여 생성된다[26].

이에 식품과 사료에서 유해 미생물 및 곰팡이를 억제하기 위한 여러 가지 보존 방법들이 제시 되고 있으며, 크게 물리적인 방법과 화학적인 방법으로 나눌 수 있다[8].

물리적인 방법에는 drying, freeze-drying, cold storage, modified atmosphere storage, heat treatment 등이 포함되며, 화학적인 방법으로는 보존료로 사용되는 화학 첨가물을 이용하는 방법이다. 즉, acetic acid, lactic acid, propionic acid, sorbic acid, benzoic acid 등과 같은 유기산들이 식품첨가제로 이용되고 있으며[8], 특히 benzoic acid와 sodium benzoate는 항진균 물질로 널리 사용되고 있다. 그 중 편의성과 저렴한 비용으로 인해 nitrite, sorbic acid, sodium metabisulfite, 염소제 등 다양한 합성 보존료가 장기간 사용되어 왔다[59].

많은 합성 보존료가 진균의 성장을 억제하기 위해 음료 및 훈육제품에 사용되고 있지만, 오랜 기간 동안의 냉장 보관 온도에서 효과가 없음이 보고되었다[59]. 뿐만 아니라 몇몇 효모 및 곰팡이는 화학 방부제 및 일부 방부제에 대해 내성을 가지고 있다. 예를 들어, 일부 *Penicillium*, *Saccharomyces*, 및 *Zygosaccharomyces* 속에 속하는 종들은

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

potassium sorbate의 존재 하에 생장할 수 있으며, 몇몇 곰팡이들은 sorbic cid를 분해할 수 있는 능력을 가지고 있기도 하다[59].

현재 사용되고 있는 항생제와 합성 보존료의 빈번한 사용은 미래에 항생제 내성 증가, 인체내 축적 등 안전성에 관한 문제가 지속적으로 대두되고 있고, 물질의 종류, 사용량 등에 따라 인체에 부정적 영향을 주기도 한다. 이러한 문제 등으로 소비자들의 화학 방부제 사용 감소에 대한 요구가 증가하고 있으며 최근 몇 년 동안 자연 식품에서 발생하는 세균의 보존 능력에 대하여 관심이 증가하고 있는 추세이다.

항생제와 합성 보존료 문제점을 해결할 수 있는 새로운 식품 보존 방법으로 천연물 유래의 식품 보존제에 대한 연구들이 많이 진행되어 왔으며, 특히 생물학적 보존제로 오랜 역사와 함께 인체에 매우 유익한 균으로 알려진 유산균을 이용하려는 노력들이 진행되고 있다[19, 20, 61].

유산균은 그람 양성, 무아포, 비 운동성, 간균과 구균 모양의 형태의 이종 그룹을 포함하여 탄수화물을 이용하여 젖산을 생성하는 미생물로서[77], 유산균의 초기 분류 체계는 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*로 대표적인 4가지 속으로 분류되어 왔다. 그러나 현재 4가지 속은 재분류하여 개정되었으며 다음과 같은 *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Mlissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* 및 *Weissella* 속으로 구성되어졌다[18].

유산균 식품의 역사는 고대 농경목축시대로 거슬러 올라가며 현재 자연계에 널리 존재하며 발효 가공 식품에서 종균으로 널리 사용되고 있다. 그러한 이유에는 식품의 보존성 향상 및 향기 등의 관능적 특성과 영양학적 가치에 기여하기 때문이다[15, 36, 64]. 뿐만 아니라 유산균의 발효를 이용한 농·축산물의 보존 가공법의 발전은 식생활 개선에 큰 변화를 가져왔다.

그 중 김치는 한국인 식사에서 중요한 구성 요소로 오랫동안 간주되어 온 유산균에 의해 발효된 한국의 전통 식품으로 김치의 발효는 미생물, 산도, 소금과 같은 환경적인 요인에 의해 영향을 받는다[48]. 김치는 영양학적으로 우수하며 면역력 강화, 정장작용, 항암효과 등 건강식품으로 알려져 있다[12]. 김치발효에 주로 관여하는 미생물에는 *Leuconostoc*속, *Lactobacillus*속, *Weissella*속, *Lactococcus*속, 그리고 *Pediococcus*속이 있다[48]. 최근에는 주요 김치 생산 업체 김치의 맛과 품질을 개선하기 위해 종균 배양액으로 *Leuconostoc mesenteroides*를 사용하기 시작하였다[9, 65].

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

*Leuconostoc*은 제당공업이나 인체 임상시료에서 분리된 경우 식품연부와 안전성 면에서 일부의 부정적 견해가 있지만, *Leuconostoc*에 속하는 균주들은 식품의 발효(sauerkraut, 절임류, 육제품 등), 낙농제품의 향미 및 가스 생산, 산업 또는 임상용 dextran 및 고가폴리머 생산, mannitol 생산, 유지 산업의 생물학적 보존제 생산, 기능성 식품으로서의 잠재적 역할 등 산업적으로 매우 중요하며[44], 인체에 노출되거나 인류가 장기간 소비한 역사를 고려할 때 *Leuconostoc*은 섭취하여도 되는 안전한(generally regarded as safe: GRAS)미생물이다[70].

유산균은 lactic acid, acetic acid, propionic acid 등의 유기산과 함께 각종 발효산물을 생성한다. 또한 pH의 저하와 발효산물 중 항균 활성 물질의 생산으로 부패 미생물과 병원성 미생물을 사멸시키거나 생육을 억제하는 작용을 하여 식품의 보존성과 안전성을 유지하게 한다[42]. 유산균이 생산하는 유기산의 비해리 분자는 항균성이 있는 것으로 알려져 있으며 이외에도 H_2O_2, CO_2, diacetyl, bacteriocin 등이 항균작용을 한다[33, 51, 71]. 또한, 유산균에 의해 생성된 유기산 중 젖산, 아세트산, phenyllactic acid (PLA) 및 p-OH-phenyllactic acid (OH-PLA)는 곰팡이 및 세균의 성장을 억제하는 역할을 한다[25, 37, 46, 51, 53, 68, 69].

유산균 배지인 MRS 배지에 있는 sodium acetate와 유산균이 생산하는 lactic acid의 조합이 항진균 활성을 상승시키며, 유산균이 생산하는 다른 항진균 물질들과 상승작용을 한다는 보고들이 있다[4, 5]. 반면 항진균 활성을 가진 유산균보다 더 많은 양의 lactic acid를 생성하는 유산균에서 항진균 활성이 관찰되지 않았다는 보고도 있다[39].

본질적으로 복잡한 유산균의 항진균성 화합물에 대해 이전에 여러 연구에서 분리 과정에 발생하는 어려움에 대해 보고되어온 바 있다[35, 38, 45, 77]. 분리 과정 중 대부분의 항진균 화합물은 LLE (Liquid-Liquid Equilibrium) 또는 SPE (solid phase extraction)를 포함한 각각의 유기 분획 또는 흡착제 컬럼에 흡착하는 물질에 대해 연구되어왔으며[18], 소수성 C_{18} column을 이용한 SPE는 성공적으로 사용되어 현재 항진균 화합물의 분리를 위해 널리 적용되어 왔다[63].

지금까지 밝혀진 유산균에 의해 생성된 항진균 활성 물질은 유기산, cyclic dipeptides, reuterin, fatty acid, carboxylic acids 등의 물질이 있으며(Figure 1), 현재 발표된 천연 식품 보존제로의 유산균의 경우 대부분이 서구 발효 식품 유래의 유산균으로 이루어져 있다[4]. 더욱이나 *Leuconostoc* 속 유산균에 대한 항진균 활성 논문의 경우 매우 소수이며, 대다수의 연구가 단순히 항진균 활성을 나타내는 현상에 관한

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

보고들로 항진균 활성을 가진 *Leuconostoc* 속 균주에 대한 항세균 활성 실험은 더더욱 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 유해 세균뿐만 아니라 인체에 유해한 곰팡이를 억제할 수 있는 유산균을 우리 나라 발효 식품인 김치로부터 분리·동정한 Leu. mesenteroides TA 균주의 항미생물 활성 범위와 균주의 특성을 조사하였으며, 더 나아가 이 균주가 생산하는 항진균 물질의 특성을 확인하고자 실시하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

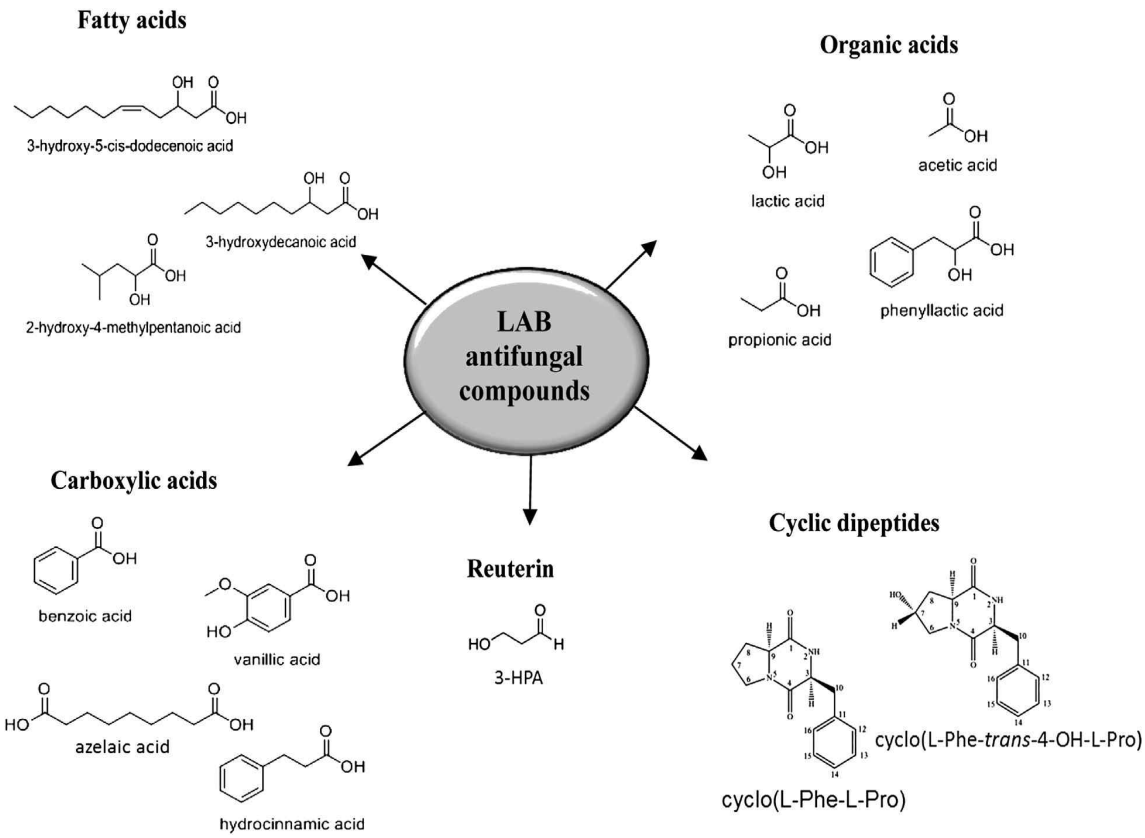

Figure 1. Chemical structures of various antifungal compounds produced by LAB[18].

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 항진균 활성 균주의 분리 및 동정

1. 항진균 활성 균주 분리

중소기업 태백에서 시판 김치를 구입한 후 숙성하여 적정 산도 0.4~0.5% 범위에 도달한 김치를 김치 내용물 전체를 마쇄하여 멸균거즈로 여과하였다. 김치 여과액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후 100 μL를 취하여 Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Sparks, MD, USA) broth 한천배지(1.5% agar, w/v)와 $CaCO_3$ (Amersco, Cochran, GA, USA)가 2% (w/v) 첨가된 MRS (Difco) 한천배지에 도말하였다. 30℃에서 평판배양하면서 MRS (Difco) 한천배지에서 집락을 형성하는 균주들 중 곰팡이에 대한 저해활성을 보이는 균주를 분리하였다. 분리 균주는 24시간 동안 30℃에서 배양한 후에 25% (w/v) glycerol stock으로 -70℃에서 보관하였다. 실험에 사용할 경우에는 5 mL MRS (Difco) 액체 배지에 접종하여 24시간 동안 30℃에서 배양한 후에 본 배양할 배지에 계대하여 사용하였다.

2. 분리 균주의 동정

항진균 활성을 나타내는 분리균주의 동정을 위하여 일차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그람 염색 (Gram stain kit, Difco) 및 현미경 관찰과 API 50CHL system (Biomerieux, Marcy IEtiole, France)을 이용하여 당 발효 능을 조사한 후에 균주동정 프로그램 (http://apiweb.biomerieux.com)을 이용하여 균주를 동정하였다. 최종적인 동정을 위하여 분리균주의 16s rRNA gene 염기서열을 결정하여 알려진 균주들과 비교하였으며, 16s rRNA gene 염기서열을 분석하기 위하여 분리 균주로부터의 genomic DNA 추출은 DNeasy blood & tissue Kit DNA (Qiagen, Chantilly, VA, USA)을 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

3. 공시균주와 분리 균주의 상이성

가. 당 발효능

API 50CHL system (Biomerieux)을 이용하여 당 발효 능을 조사한 후에 균주동정 프로그램 (http://apiweb.biomerieux.com)을 이용하여 분리균주와 공시균주 *Leu. mesenteroides* ATCC 8293^{T}과의 당 발효능 차이를 비교분석하였다. 공시균주 *Leu. mesenteroides* ATCC 8293^{T}는 한국 미생물 자원 센터에서 구입하였다.

제 2 절 분리균주의 특성

1. 생육 최적 조건

가. 배양 온도에 따른 생육도 및 항균 활성 측정

분리 균주의 배양 온도에 따른 생육도 조사 및 항진균 및 항세균 활성을 측정하기 위하여 MRS (Difco) 액체 배지에 분리 균주를 1% (w/v) 접종하여 28℃, 30℃, 37℃에서 24시간과 48시간 동안 각각 정치 배양하여 A_{600} (Ultra spec 2100 pro, Amersham Biosciences, Bristol, UK)에서 흡광도를 측정하여 생육도를 확인한 후 배양 상징액을 제조하였다. 배양 상징액은 본 배양액을 4℃에서 원심분리(9,500 ×*g*, 15 min, 4℃)하여 얻은 배양 상징액을 0.45 ㎛ membrane filter (Adventec MFS, Tokyo, Japan)로 제균하였다. 제균한 상징액은 동결건조 (freeze dry system, SFDSM12, Samwon, Bucheon, Korea)한 후에 20 mM sodium acetate (pH 4.0) 완충액에 녹여 25배 농축 배율로 준비하여 이를 조항균 물질로 하여 항균 활성 실험에 사용하였다. 대조구로는 균주를 배양하지 않은 MRS (Difco) broth를 동일한 과정으로 처리하여 사용하였다.

항진균 및 항세균 활성 측정은 spot on the lawn test [76]방법으로 다음과 같이 시행하였다. 지시 곰팡이인 *Aspergillus fumigatus* (*Asp. fumigatus*) ATCC 96918의 포자를 MEA (malt extract agar, Difco) 배지 20 mL에 5.0×10^4 CFU/mL로 첨가하여 petri dish에 부은 후 굳으면 분리 균주의 배양 상징액 10 μL를 배지 위에 spotting하여 30℃에서 48시간 동안 배양한 후 활성을 측정하였다. 지시 균인 *Bacillus subtilis* (*B.*

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

subtilis) ATCC 6633은 LB (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 액체 배지에 1% 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였으며, 1.0×10^6 CFU/plate로 도말하여 배양 상징액 10 μL를 배지 위에 spotting하여 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 후 활성을 측정하였다.

역가는 항균 물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해 환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 mL에 대해서 환산해주는 환산 계수를 곱하여 AU/mL로 나타내었다. 흡광도 및 항균 활성 측정은 3회 반복하여 측정하였다.

나. 초기 pH에 따른 생육도 및 항균 활성 측정

배지 초기 pH가 분리 균주의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, pH를 보정하지 않은 pH 6.5의 100 mL MRS (Difco) 액체 배지와 5 N NaOH 또는 5 N HCl로 pH 4.0, 5.0, 6.0 그리고 7.0으로 보정한 100 mL MRS (Difco) 액체 배지에 분리 균주를 1% (w/v) 접종하여 30℃에서 24시간과 48시간 동안 각각 정치 배양한 후 A_{600} (Amersham Biosciences)에서 흡광도를 측정하여 생육도를 확인하였으며, 초기 pH에 따른 분리 균주의 배양액은 배양 상징액으로 제조하여 항균 활성 실험에 사용하였다. 항진균 및 항세균 활성 측정은 spot on the lawn test 방법으로 시행하였다[76]. 항세균 활성 측정의 지시 균으로는 *B. subtilis* ATCC 6633을 항진균 활성 측정의 지시 곰팡이는 *Asp. fumigatus* ATCC 96918을 사용하였다.

2. 생육시기에 따른 항균 활성

분리균주를 30℃에서 0~48시간 동안 정치배양하면서 A_{600} (Amersham Biosciences)에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 그리고 생육에 따른 배양액의 pH를 pH meter (510 pH meter, Fisher, Singapore)로 측정하였다. 배양 시간마다의 배양 상징액을 제조하여 항균 활성 실험에 사용하였다. 항진균 및 항세균 활성 측정은 spot on the lawn test 방법으로 시행하였다[76]. 항세균 활성 측정의 지시 균으로는 *B. subtilis* ATCC 6633을 사용하였으며, 항진균 활성 측정의 지시 곰팡이는 *Asp. fumigatus* ATCC 96918을 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

3. 안전성 평가

가. 용혈성 확인

분리 균주가 적혈구를 파괴하거나 분해하는 현상인 용혈성을 나타내는지 조사하였다. Blood agar base (Oxoid, Hampshire, England)를 멸균 후에 7% horse blood (Oxoid)를 첨가하고 평판배지를 만들어서 준비한 후, 5 mL MRS (Difco) 액체배지에 1% (w/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 분리 균주를 백금이로 streaking한 후 30℃에서 48시간 배양하였고, 적혈구 용혈에 의한 균체 주위 투명환 생성여부로 용혈성을 판단하였다. 용혈을 일으키는 양성반응 대조군으로는 *B. cereus* KCTC 3624를 사용하여 위 방법과 동일하게 실험하였다.

나. 항생제 감수성

분리 균주의 항생제 감수성은 액체 배지 희석법 (Broth microdilution method)을 이용하여 측정하였다[56]. 실험에 사용된 항생제는 9종으로 ampicillin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA), vancomycin (Sigma), gentamycin (Sigma), streptomycin (Sigma), erythromycin (Sigma), clindamycin (Sigma), tetracycline (Sigma), chloramphenicol (Sigma)이며, 이들 항생제는 규정된 용매에 녹인 후 사용하였다. 항생제 감수성을 측정하기 위한 배지는 0.5% dextrose를 첨가한 MH (Mueller-Hinton, Difco) 액체 배지에 항생제를 각 농도별로 조절하여 첨가하였다. 항생제의 최소 생육저해 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위하여 분리 균주는 MRS 액체 배지에 1% (w/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 배양액을 원심분리 (9,950 ×*g*, 4 min, 4℃)하여 균체를 회수한 후 0.5% dextrose가 첨가된 MH (Difco) 액체 배지에 현탁하여 A_{600}=0.4~0.5가 되도록 한 후 현탁액을 MH (Difco) 액체 배지에 1:1000 희석하고, 항생제를 단계별로 희석하여 준비한 배지에 균주의 현탁액을 접종한 후 혐기적인 조건에서 30℃에서 24시간동안 배양하였다. 감수성 여부 및 탁도는 A_{600} (Amersham Biosciences)에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, 균주에 대한 감수성 해석은 European Food Safety Authority (EFSA, 2012)를 참고하여 각각의 항생제가

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

첨가된 배지에서 균주가 증식하지 않는 최소 농도로 최소 생육저해 농도를 결정하였다.

다. 효소 활성

분리 균주의 효소 활성을 측정하기 위하여 API ZYM kit (BioMerieux)를 사용하였다. 실험을 위해 먼저 분리 균주는 MRS (Difco) 액체배지에 1% (w/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 배양액을 원심분리 (9,950 ×*g*, 4 min, 4℃)하여 균체를 회수한 후 멸균수에 균을 풀어 현탁액을 준비하였다. 현탁액 500 μL를 5 mL suspension medium (BioMerieux)에 풀어준 후 5~6 Mcfarland (BioMerieux)로 탁도를 맞추었다. 스트립을 준비하여 희석한 유산균을 API ZYM kit (BioMerieux)의 각 cupule에 65 μL씩 분주한 뒤, 37℃에서 4시간동안 배양하였다. 그리고 표면활성 증가와 용해를 돕기 위한 ZYM-A (BioMerieux)와 ZYM-B (BioMerieux)시약을 각각 cupule에 한 방울씩 떨어뜨린 후 밝은 곳에서 약 5분간 반응시킨 후 색의 변화 정도를 관찰하며 효소 활성을 측정하였다. 색의 변화 정도에 따라 0~5까지의 값으로 표시할 수 있으며, 0 (=0 nmole)은 음성반응, 5 (≥40 nmoles)는 최대 강도의 반응이고 4, 3, 2, 1은 각각 30, 20, 10, 5 nmoles을 나타내며, ≥3이면 양성으로 판정하였다.

4. 분리 균주의 항균 활성 측정

가. 사용한 균주

본 실험에 사용한 곰팡이 7종과 효모 1종은 Table 1에 정리하였으며, 세균 18종은 Table 2에 정리하였다.

(1) 곰팡이

항진균 활성 실험을 위하여 지시 곰팡이로 사용한 곰팡이는 다음과 같이 준비하였다. *Asp. fumigatus* ATCC 96918, *Aspergillis flavus* ATCC 22546, *Aspergillus nidulans* PF-3의 경우 MEA 배지에 접종하여 30℃에서 3~4일 동안 배양하였다. *Aspergillus*

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

petrakii PF-1, *Aspergillus ochaceus* PF-2는 PDA (potato dextrose agar, Difco) 배지에 접종하여 30℃에서 3~4일 동안 배양하였으며, *Clasdosporium gossypiicola* KF-2, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110는 PDA 배지에 접종하여 25℃에서 3~5일 동안 배양하여 준비하였다.

(2) 효모

항진균 활성에 사용한 효모는 *Pichia kudriavzevii* GY1[56]은 YPD (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% dextrose) 액체 배지에 접종하여 25℃에서 1일 동안 배양하여 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. List of fungi used in the study

Group	strains	Medium[a]	Incubation temperature	Source
Mold	*Aspergillus flavus* ATCC 22546	MEA	30℃	ATCC[b][52]
	Aspergillus fumigatus ATCC 96918	MEA	30℃	ATCC[48]
	Aspergillus petrakii PF-1	PDA	30℃	[56]
	Aspergillus ochaceus PF-2	PDA	30℃	[56]
	Aspergillus nidulans PF-3	MEA	30℃	[56]
	Clasdosporium gossypiicola KF-2	PDA	25℃	[56]
	Penicillium roqueforti ATCC 10110	PDA	25℃	ATCC [16]
Yeast	*Pichia kudriavzevii* GY1	YPD	30℃	[56]

[a]MEA, Malt extract agar; PDA, Potato dextrose agar; YPD, 1% yeast extract, 2% bacto-peptone, and 2% dextrose

[b]ATCC, American Type Culture Collection

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(3) 세균

지시 균으로 사용한 세균은 *Bacillus cereus* KCTC 3624, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Salmonella enterica* serovar *Typhi* ATCC 19430, *Micrococcus luteus* ATCC 15307, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853은 LB 액체 배지에 1% (w/v) 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. *Listeria monocytogenes* ATCC 19113은 BHI (Brain heart infusion, Difco) 액체 배지에 1% (w/v) 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802는 NB (Nutrient broth, Difco) 액체 배지에 2% NaCl (Duchefa, Haarlem, Netherlands)를 첨가한 액체 배지에 1% (w/v) 접종하여 37℃에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

지시 균으로 사용한 유산균은 *Lactobacillus plantarum* KFRI 464, *Lactobacillus plantarum* KFRI 236, *Lactobacillus acidophilus* KFRI 150, *Leuconostoc mesenteroides* KFRI 218, *Lactobacillus delbrueckii* KFRI 347이며, MRS (Difco) 액체 배지에 1% (w/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

나. 항균 활성 측정 방법

곰팡이, 효모 및 세균에 대한 항균 활성 실험은 dual culture overlay assay [38]방법을 변형하여 다음과 같이 시행하였다. 분리 균주의 배양액 10 μL를 micropipette을 이용하여 MRS (Difco) 평판배지의 중앙에 3 cm 길이로 분주하며 그어주었다. 감수성 곰팡이와 효모 및 세균은 각 배양 배지의 soft agar (0.75% agar) 10 mL에 $1.0x10^6$ 효모 및 세균 cell 또는 곰팡이 포자를 첨가하여 분리 균주가 접종된 MRS (Difco) 평판 배지 위에 부어주었다. 분리 균주와 지시 균이 접종된 평판 배지는 30℃에서 24시간 동안 배양한 후에 지시 균의 생육 온도에서 배양하면서 생육 저해환의 생성 여부를 관찰하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. List of bacteria used in this study

Group	Strains	Medium[a]	Incubation temperature	Source[b]
Bacteria	*Bacillus cereus* KCTC 3624	LB	37℃	KCTC[78]
	Staphylococcus aureus subsp. *aureus* ATCC 29213	LB	37℃	ATCC
	Escherichia coli O157:H7 ATCC 43895	LB	37℃	ATCC
	Salmonella enterica serovar *Typhi* ATCC 19430	LB	37℃	ATCC[60]
	Micrococcus luteus ATCC 15307	LB	37℃	ATCC[77]
	Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802	NB+2%NaCl	37℃	ATCC[40]
	Bacillus subtilis ATCC 6633	LB	37℃	ATCC[73]
	Streptococcus mutans ATCC 25175	LB	37℃	ATCC[17]
	Enterococcus faecalis ATCC 29212	LB	37℃	ATCC[2]
	Listeria monocytogenes ATCC 19113	BHI	37℃	ATCC
	Escherichia coli ATCC 25922	LB	37℃	ATCC[7]
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	LB	37℃	ATCC[42]
Lactic acid bacteria	*Lactobacillus plantarum* KFRI 464	MRS	30℃	KFRI [10, 41]
	Lactobacillus plantarum KFRI 236	MRS	30℃	KFRI[10]
	Lactobacillus acidophilus KFRI 150	MRS	30℃	KFRI[22]
	Leuconostoc mesenteroides KFRI 218	MRS	30℃	KFRI[10]
	Lactobacillus delbrueckii KFRI 347	MRS	30℃	KFRI[10]

[a]LB, Luria-Bartani medium; BHI, Brain heart infusion medium; NB, Nutrient broth MRS, de Man, Rogosa Sharpe medium

[b]ATCC, American Type Culture Collection; KFRI, Korea Food Research Institute; KCTC, Korean collection for Type Cultures

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

5. 항균 spectrum 조사

가. 조항균 물질 (배양 상징액)의 준비

본 실험에 사용된 배양 상징액은 다음과 같이 준비하였다. 분리 균주를 5 mL MRS (Difco) 액체 배지에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 정치 배양하였다. 100 mL MRS (Difco) 액체 배지에 전배양액을 1% 접종하고, 다시 30℃에서 24시간 동안 정치하면서 본 배양하였다. 본 배양액을 4℃에서 원심분리(9,500 ×*g*, 15 min, 4℃)하여 얻은 배양 상징액을 0.45 ㎛ membrane filter (Adventec)로 제균하였다. 제균한 상징액은 동결건조 (freeze dry system, Samwon)한 후에 20 mM sodium acetate (pH 4.0) 완충액에 녹여 25배 농축 배율로 준비하여 이를 조항균 물질로 하여 항균 활성 실험에 사용하였다. 대조구로는 균주를 배양하지 않은 MRS (Difco) broth를 동일한 과정으로 처리하여 사용하였다.

나. 사용한 균주

본 실험에 사용한 곰팡이 7종과 효모 1종 은 Table 1에 정리하였으며, 세균 18종은 Table 2에 정리하였다.

다. 항균 활성 실험

(1) 지시 균주의 준비

지시 곰팡이로 사용한 곰팡이들은 PDA (Difco) 또는 MEA (Difco) 배지 20 mL를 멸균하여 식힌 후 곰팡이 포자를 5.0×10^4 CFU/mL로 첨가하여 petri dish에 부은 후 굳으면 실험에 사용하였다.

지시균으로 사용한 효모와 세균들은 배지에 1.0×10^6 CFU/plate로 도말하여 준비하였고, 유산균은 MRS (Difco) soft agar (0.75%, w/v) 10 mL에 1.0×10^5 CFU/mL로 첨가

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

하여 top agar로 부어서 사용하였다[76].

(2) 항균 활성 측정 방법

항균 활성은 paper disc method[76]를 이용하여 조사하였다. 곰팡이 포자가 첨가된 평판 배지 또는 효모와 세균이 도말된 평판 배지 위에 8 mm 직경의 paper disc (Advantec, Tokyo, Japan)를 놓고 항균 물질을 100 μL씩 일정하게 분주하여 지시 균에 대한 생육 저해 활성을 측정하였다. 생육 저지환은 digimatic caliper (CD-15CPX, Mitutoyo, Kawasaki, Japan)를 사용하여 지름을 측정하였으며, 실험은 3회 반복하였다.

6. 조항균 물질 (배양 상징액)의 안정성

가. pH 안정성

pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 분리균주의 배양 상징액을 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 pH 3.0~8.0으로 조정하고 4℃에서 6시간 동안 처리하였다. pH-renaturation 실험을 위하여 pH 3.0~8.0으로 조정된 시료 중 일부를 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 원래의 유산균 배양 직후 배양액 pH인 4.4로 조정하고 4℃에서 6시간 동안 처리하였다. pH 처리된 시료와 이를 다시 원래의 균체 배양 직후 pH로 복원 (renaturation)시킨 시료를 모두 동결 건조한 후에 3차 증류수에 녹여 항진균 활성 실험 및 항세균 활성 실험에 사용하였다. 분리 균주를 배양하지 않은 MRS (Difco) 배지를 동일한 과정으로 처리하여 항진균 활성 실험 및 항세균 활성 실험의 대조구로 사용하였다.

나. 온도 안정성

온도에 따른 영향을 알아보기 위하여 준비된 조항균 물질 200 μL를 4℃, 30℃, 37℃, 50℃, 70℃에서 24시간, 100℃에서 30분, 121℃에서 15분간 열처리한 후에 항진균 및 항세균 활성을 측정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

다. 효소 안정성

실험에 사용한 효소는 다음과 같이 준비하였다. Proteinase K (EC 3.4.21.64., Sigma), protease (type Ⅰ, Sigma), trypsin (EC 3.4.21.4, Sigma)은 50 mM Tris-HCl, 10 mM $CaCl_2$ 완충액 (pH 7.5)에, pepsin (EC 3.4.23.1, Sigma)은 50 mM citrate 완충액 (pH 2.0)에, lipase (EC 3.1.1.3, type Ⅶ, Sigma)는 50 mM Tris-HCl, 10 mM $CaCl_2$ 완충액 (pH 7.0)에, α-amylase (EC 3.2.1.1, Type Ⅷ, Sigma)는 50 mM sodium phosphate, 10 mM NaCl 완충액 (pH 7.0)에 20 mg/mL가 되도록 준비하였다. 상징액은 2 mg/mL의 농도로 37℃에서 6시간 처리한 다음, 100℃에서 5분 동안 끓여 효소를 불 활성화시킨 후 잔존활성을 측정하였다. 대조구는 항균 물질에 효소액 대신 완충액을 첨가하여 동일한 조건으로 처리한 후에 활성을 비교하였다.

라. 항진균 및 항세균 활성 측정

온도, pH, 그리고 효소를 처리한 항균 물질의 잔존 활성은 spot on the lawn test를 사용하여 상기된 방법으로 시행하였다[76]. 항세균 활성 측정의 지시 균으로는 *B. subtilis* ATCC 6633을 사용하였으며, 항진균 활성 측정의 지시 곰팡이는 *Asp. fumigatus* ATCC 96918을 사용하였다.

제 3 절 항균 물질의 정제 및 특성

1. SPE 정제

항균 물질의 부분 정제를 위하여 SPE 정제를 시행하였다. 분리 균주를 MRS (Difco) 액체 배지에 접종하여 30℃, 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 원심분리 (8,000 RPM, 30 min, 4℃)하여 얻은 상징액을 0.45 ㎛ membrane filter (Adventec)로 제균하여 2.5 L의 배양 상징액을 준비하였다. SPE column (Isolute, C_{18} EC, 10 g; International Sorbent Technology, Hengoed, United Kingdom)은 methanol (HPLC-grade, Fisher,

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Fair Lawn, NJ, USA) 100 mL로 활성화 시킨 후 10 mM sodium acetate (pH 4.0) 완충액을 100 mL 흘려내려 equilibration 상태로 준비하였다. 제균된 상징액 2.5 L를 SPE column에 통과시킨 후 5% aqueous acetonitrile (HPLC-grade, Fisher)로 column을 수세하고 95% aqueous acetonitrile (HPLC-grade, Fisher)로 30 mL 수집하였다. fraction은 진공원심농축기 (VS-802, Vision, Daejeon, Korea)를 이용하여 용매를 휘발시킨 후에 10 mM sodium acetate (pH 4.0)에 녹여 사용하였다.

2. 항균 spectrum 조사

지시균 및 지시 곰팡이로 사용한 세균, 곰팡이 및 효모는 항균 활성 측정에 상기된 방법으로 배양하여 준비하였다.

항균 활성 실험에 사용한 공시 균주 및 유해 균주는 다음과 같이 준비하였다. *B. cereus* KCTC 3624, *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *Sal. enterica* serovar *Typhi* ATCC 19430, *M. luteus* ATCC 15307, *B. subtilis* ATCC 6633, *Pseudo. aeruginosa* ATCC 27853는 LB 액체 배지에 1% (w/v) 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양하였다. *V. parahaemolyticus* ATCC 17802는 NB 액체 배지에 2% NaCl를 첨가한 액체 배지에 1% (w/v) 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양하여 실험에 사용하였으며 *Pichia kudriazevii* GY1은 YPD 액체 배지에 1% (w/v) 접종하여 25℃에서 24시간 배양하여 사용하였다. 지시 곰팡이로 사용한 곰팡이들은 Table 1에 기재된 곰팡이를 이용하였으며, PDA 또는 MEA 배지 20 mL를 멸균하여 식힌 후 곰팡이 포자를 $5.0x10^4$ CFU/mL로 첨가하여 petri dish에 부은 후 굳으면 실험에 사용하였으며, spot on the lawn test 방법으로 시행하였다[76].

3. 항균 물질의 안정성

가. pH 안정성

pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 부분 정제물을 pH 3.0 (50 mM glycine-HCl), pH 4.0 (50 mM sodium acetate), pH 5.0 (50 mM sodium acetate), pH 6.0 (50 mM sodium acetate), pH 7.0 (50 mM Tris-HCl), pH 8.0 (50 mM Tris-HCl) 완충액

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

에서 6시간 동안 4℃에서 처리한 후 항진균 및 항세균 활성을 측정하였다.

나. 온도 안정성

온도에 따른 영향을 알아보기 위하여 준비된 조항균 물질 150 μL를 4℃, 30℃, 37℃, 50℃, 70℃에서 6시간, 100℃에서 30분, 121℃에서 15분간 열처리한 후에 항진균 및 항세균 활성을 측정하였다.

다. 용매 안정성

용매에 대한 안정성을 알아보기 위하여 용매를 휘발시킨 조항균 물질에 methanol (Fisher), acetone (Fisher), acetonitrile (Fisher), ethanol (Merck, Darmstadt, Germany)을 녹여 25℃에서 1시간 동안 처리하였다. 그 후 용매를 제거하고 10 mM sodium acetate (pH 4.0)에 녹여 항진균 및 항세균 활성을 측정하였다.

라. 항진균 및 항세균 활성 측정

온도, pH, 용매 그리고 효소를 처리한 항균 물질의 잔존 활성은 spot on the lawn test를 사용하여 상기된 방법으로 시행하였다[76]. 항세균 활성 측정의 지시 균으로는 *B. subtilis* ATCC 6633을 사용하였으며, 항진균 활성 측정의 지시 곰팡이는 *Asp. fumigatus* ATCC 96918을 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 항진균 활성 유산균주의 분리 및 특성 규명

1. 항진균 활성 균주의 분리

숙성된 김치로부터 유산균을 분리하기 위하여 김치 여과액을 MRS (Difco) 평판배지와 2% $CaCO_3$가 첨가된 MRS (Difco) 평판배지에 도말하여 30℃에서 48시간 배양하면서 형성되는 미생물 집락을 관찰하였다(Figure 2). MRS (Difco) 평판배지 상에서 하얗게 균사를 형성하면서 자라는 곰팡이 1종이 관찰되었으며, 곰팡이에 대한 뚜렷한 저해활성을 보이는 균주 1종을 분리하였다. 항진균 활성 균주는 TA라고 명명하였다.

2. 분리균주의 동정

분리 균주를 MRS (Difco) 액체배지에 접종하여 24시간 혐기 배양한 후 gram staining을 하여 현미경으로 관찰 결과 그람 양성의 구균으로 관찰되었다(Figure 3). 생화학적 특성으로 Biolog에 의한 유산균 동정 kit에 해당하는 API 50CHL system을 이용하여 당 대사능을 조사 결과 분리 균주를 *Leuconostoc mesenteroides*로 판정하였다. 분자생물학적인 정확한 동정을 위하여 16s rDNA 염기서열을 결정하고(Figure 4), 이를 Genbank에 등록된 다른 균주들과 염기서열을 비교한 결과 *Leu. mesenteroides* ATCC 8293^T과 100% 상동성을 보였다(Figure 5). 따라서 항진균 활성을 보이는 분리균주에 대하여 *Leu. mesenteroides*로 동정하였으며, *Leu. mesenteroides* TA로 명명하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

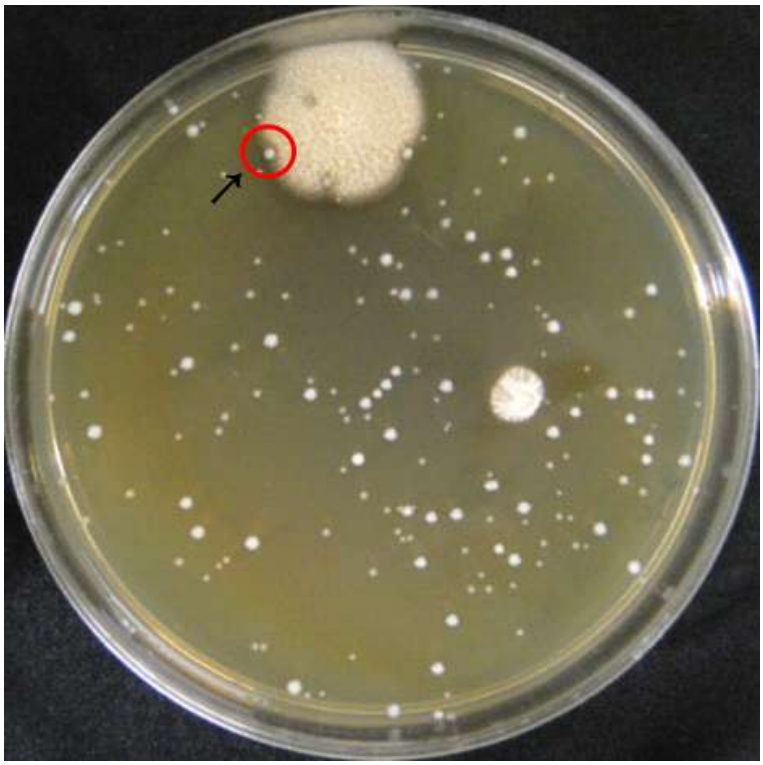

Figure 2. Isolation of antifungal lactic acid bacteria

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

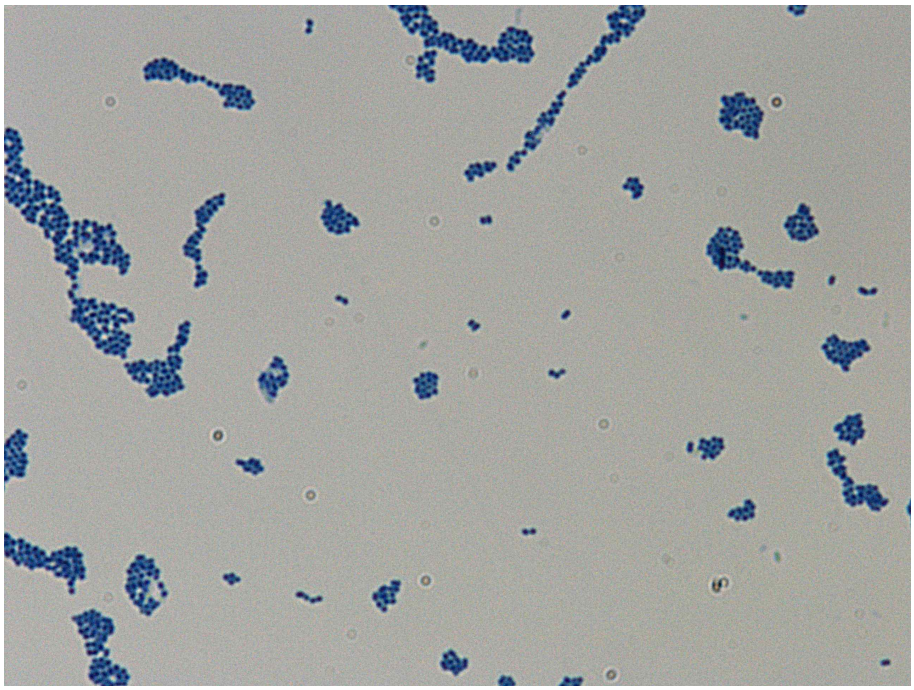

Figure 3. Gram staining and microscopic observation of *Leu. mesenteroides* TA

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Sugar ultilization characterization of *Leu. mesenteroides* TA

Sugar	Metabolism	Sugar	Metabolism
Control	-	Esculin	-
Glycerol	-	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	-
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β Methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	Raffinose	+
Glucose	+	Starch	-
Fructose	+	Glycogen	-
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N Acetyl glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdalin	-	2 keto-gluconate	-
Arbutin	-	5 keto-gluconate	-

-, negative; +, positive

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

```
1     TTGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGGATGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG    60
61    AACGCACAGC GAAAGGTGCT TGCACCTTTC AAGTGAGTGG CGAACGGGTG AGTAACACGT   120
121   GGACAACCTG CCTCAAGGCT GGGGATAACA TTTGGAAACA GATGCTAATA CCGAATAAAA   180
181   CTTAGTGTCG CATGACACAA AGTTAAAAGG CGCTTCGGCG TCACCTAGAG ATGGATCCGC   240
241   GGTGCATTAG TTAGTTGGTG GGGTAAAGGC CTACCAAGAC AATGATGCAT AGCCGAGTTG   300
301   AGAGACTGAT CGGCCACATT GGGACTGAGA CACGGCCCAA ACTCCTACGG GAGGCTGCAG   360
361   TAGGGAATCT TCCACAATGG GCGAAAGCCT GATGGAGCAA CGCCGCGTGT GTGATGAAGG   400
421   CTTTCGGGTC GTAAAGCACT GTTGTATGGG AAGAACAGCT AGAATAGGAA ATGATTTTAG   480
481   TTTGACGGTA CCATACCAGA AAGGGACGGC TAAATACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG   540
541   TATGTCCCGA GCGTTATCCG GATTTATTGG GCGTAAAGCG AGCGCAGACG GTTTATTAAG   600
601   TCTGATGTGA AAGCCCCGGAG CTCAACTCCG GAATGGCATT GGAAACTGGT TAACTTGAGT   660
661   GCAGTAGAGG TAAGTGGAAC TCCATGTGTA GCGGTGGAAT GCGTAGATAT ATGGAAGAAC   720
721   ACCAGTGGCG AAGGCGGCTT ACTGGACTGC AACTGACGTT GAGGCTCGAA AGTGTGGGTA   780
781   GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CACCGTAAAC GATGAACACT AGGTGTTAGG   840
841   AGGTTTCCGC CTCTTAGTGC CGAAGCTAAC GCATTAAGTG TTCCGCCTGG GGAGTACGAC   900
901   CGCAAGGTTG AAACTCAAAG GAATTGACGG GGACCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT   960
961   TAATTCGAAG CAACGCGAAG AACCTTACCA GGTCTTGACA TCCTTTGAAG CTTTTAGAGA  1020
1021  TAGAAGTGTT CTCTTCGGAG ACAAAGTGAC AGGTGGTGCA TGGTCGTCGT CAGCTCGTGT  1080
1081  CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT TATTGTTAGT TGCCAGCATT  1140
1141  CAGATGGGCA CTCTAGCGAG ACTGCCGGTG ACAAACCGGA GGAAGGCGGG GACGACGTCA  1200
1201  GATCATCATG CCCCTTATGA CCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGCGTA TACAACGAGT  1260
1261  TGCCAACCCG CGAGGGTGAG CTAATCTCTT AAAGTACGTC TCAGTTCGGA TTGTAGTCTG  1320
1321  CAACTCGACT ACATGAAGTC GGAATCGCTA GTAATCGCGG ATCAGCACGC CGCGGTGAAT  1380
1381  ACGTTCCCGG GTCTTGTACA CACCGCCCGT CACACCATGG GAGTTTGTAA TGCCCAAAGC  1440
1441  CGGTGGCCTA ACCTTTTAGG AAGGAGCCGT CTAAGGCAGG ACAGATGACT GGGGTGAAGT  1500
1501  CGTAACAAGG TAGCCGTAGG AGAACCTGCG GCTGGATCAC CTCCTTT
```

Figure 4. 16s rRNA sequence of *Leu. mesenteroides* TA

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

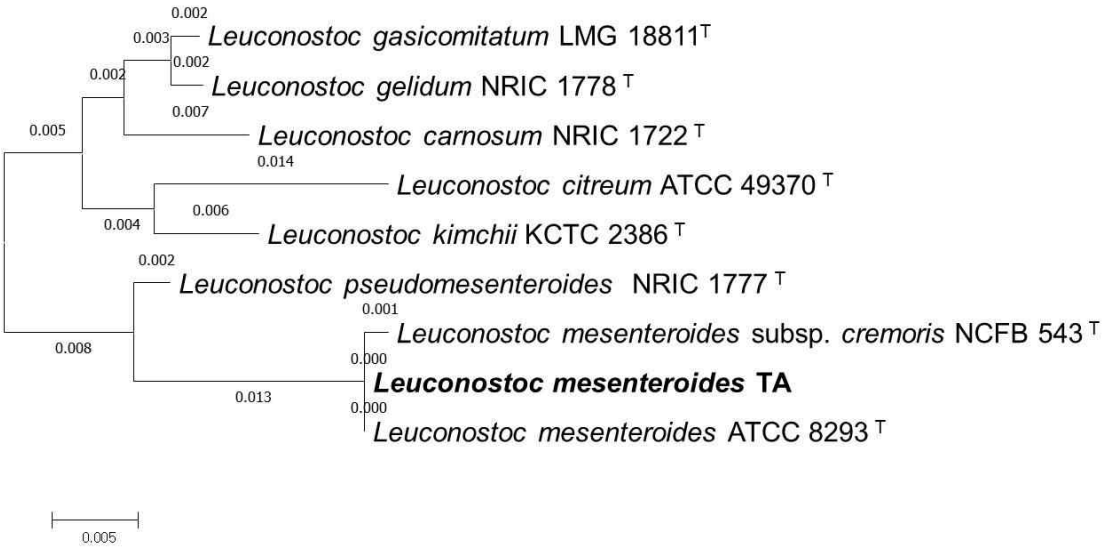

Figure 5. Phylogenetic relationship between the *Leu. mesenteroides* TA and other related bacteria based on 16s rRNA sequences

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

3. 공시균주와 분리 균주의 상이성

분자 생물학적으로 100% 상동성을 이루는 *Leu. menseteroides* TA와 *Leu. mesenteroides* ATCC 8293^{T}에 대하여 생화학적 특성 차이를 확인하기 위하여 Biolog에 의한 유산균 동정 kit에 해당하는 API 50CHL system을 이용하여 당 대사능을 조사한 결과, 49종의 당 중에 cellobiose, lactose, gentiobiose, gluconate 4 종의 당 대사능에서 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이는 균주가 자라나는 환경의 차이에 따라서 발효하는 당의 차이로 예상 된다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Compare of sugar ultilization characterization between *Leu. mesenteroides* TA and *Leu. mesenteroides* ATCC 8293^{T}

Sugar	Metabolism		Sugar	Metabolism	
	TA	8293		TA	8293
Glycerol	−	−	Mannitol	+	+
Erythritol	−	−	Sorbitol	−	−
D-Arabinose	−	−	α-Methyl-D-mannoside	+	+
L-Arabinose	+	+	α-Methyl-D-Glucoside	+	+
Ribose	+	+	N-Acetyl glucosamine	−	−
D-Xylose	+	+	Amygdalin	−	−
L-Xylose	−	−	Arbutin	−	−
Adonitol	−	−	Esculine	−	−
β-Methyl-xyloside	−	−	Salicin	+	+
Galactose	+	+	Cellobiose	−	+
D-Glucose	+	+	Maltose	+	+
D-Fructose	+	+	Lactose	−	+
D-Mannose	+	+	Melibiose	+	+
L-Sorbose	−	−	Sucrose	+	+
Rhamnose	−	−	Trehalose	+	+
Dulcitol	−	−	Inuline	−	−
D-Raffinose	+	+	D-Tagatose	−	−
			D-Fucose	−	−
Starch	−	−	L-Fucose	−	−
Glycogene	−	−	D-Arabitol	−	−
Xylitol	−	−	L-Arabitol	−	−
β-Gentiobiose	−	+	Gluconate	+	−
D-Turanose	+	+	2 keto-gluconate	−	−
D-Lyxose	−	−	5 keto-gluconate	−	−
Inositol	−	−	Melezitose	−	−

−, negative; +, positive

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

제 2 절 분리균주의 특성 규명

1. 생육 최적 조건

가. 배양 온도에 따른 생육도 및 항균 활성 측정

분리 균주 *Leu. mesenteroides* TA를 28℃, 30℃, 37℃에서 24시간, 48시간 동안 24시간 간격으로 흡광도를 측정하여 배양 온도에 따른 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었으며, 24시간, 48시간의 배양 상징액은 지시 곰팡이는 *Asp. fumigatus* ATCC 96918, 지시 균는 *B. subtilis* ATCC 6633으로 하여 배양 온도에 따른 항균 활성을 측정하였다. 그 결과 Figure 6과 같이 분리 균주는 28℃, 30℃에서 24시간 배양 시 높은 생육도를 보였으며, 30℃에서 가장 높은 생육을 보였다. 37℃에서는 24시간 동안 정치 배양하였을 때 최대 생육의 절반정도 생육하였다. *Asp. fumigatus* ATCC 96918과 *B. subtilis* ATCC 6633에 대한 항균 활성 측정 결과 28℃, 30℃에서 24시간에서 최대 활성 (800 AU/mL)을 보여 48시간까지 유지되는 것을 확인할 수 있었으며, 37℃에서 배양 시 48시간 이후에도 최대 활성의 절반인 400 AU/mL의 항진균 및 항세균 활성을 나타내었다. 이를 바탕으로 *Leu. mesenteroides* TA는 30℃에서 가장 높은 생육도와 항균활성을 보이는 것을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

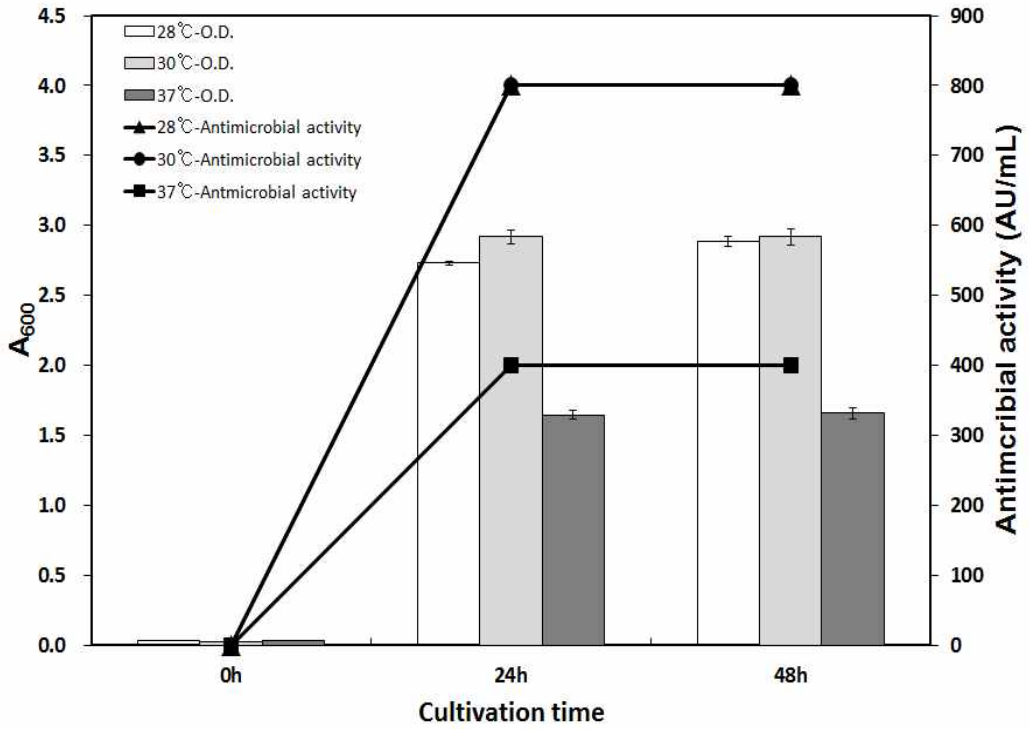

Figure 6. Effect of temperature on the growth of *Leu. mesenteroides* TA

□, cell growth at 28℃(A_{600}); ■, cell growth at 30℃(A_{600}); ■, cell growth at 37℃(A_{600}). *Asp. fumigatus* ATCC 96918 and *B. subtilis* ATCC 6633 were used as indicators. All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

나. 초기 pH에 따른 생육도 및 항균 활성측정

pH 4.0, 5.0, 6.0 6.5 그리고 7.0으로 보정한 MRS 액체 배지에 30℃에서 24시간과 48시간 동안 각각 정치 배양하여 *Leu. mesenteroides* TA의 생육도를 확인하였으며, 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. 24시간과 48시간의 배양 상징액은 지시 곰팡이는 *Asp. fumigatus* ATCC 96918, 지시 균은 *B. subtilis* ATCC 6633으로 하여 초기 pH에 따른 항균 활성을 측정하였다. 그 결과, Figure 7과 같이 *Leu. mesenteroides* TA는 pH 6.0에서부터 pH 7.0까지의 범위에서 잘 생육하였으나, pH 6.0 이하에서는 생육도가 감소하였으며 pH 4.0에서는 거의 생육하지 못하였다. 항균 활성 측정 결과 *Asp. fumigatus* ATCC 96918에 대해서는 pH 6.0에서부터 pH 7.0까지의 범위에서 최대 활성 800 AU/mL를 유지하였으며 pH 6.0 이하에서는 항진균 활성이 점점 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 반면 *B. subtilis* ATCC 6633에 대해서는 pH 6.5~7.0에서는 최대 활성 800 AU/mL를 유지하였으나 pH 6.0 이하에서는 항균 활성이 점점 더 감소하여 초기 배지의 pH 4.0으로 배양 시 100 AU/mL를 나타내었다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

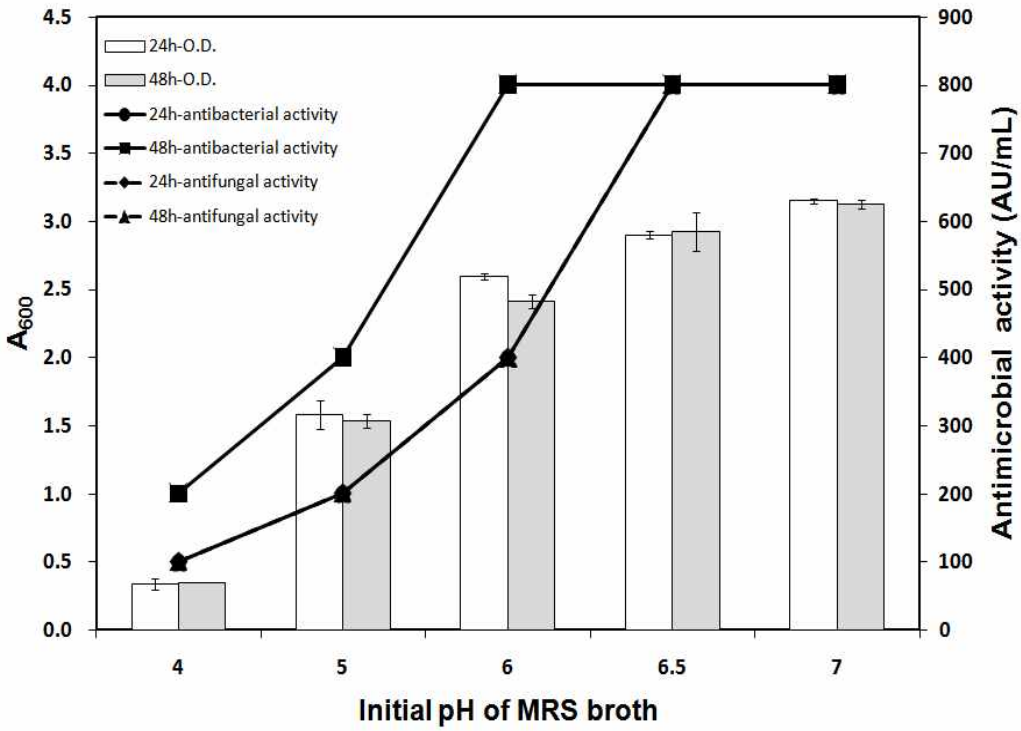

Figure 7. Effect of initial pH of the growth medium on the growth of *Leu. mesenteroides* TA

□, cell growth at 24hr(A_{600}); ■, cell growth at 48hr(A_{600}). *Asp. fumigatus* ATCC 96918 and *B. subtilis* ATCC 6633 were used as indicators. All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2. 생육시기에 따른 항균 활성

Leu. mesenteroides TA의 생육 최적 조건을 바탕으로 생육곡선과 생육에 따른 항균 활성을 조사하였다. 그 결과 *Leu. mesenteroides* TA는 4~12시간 사이에 대수기를 지나 16시간 정도에 생육 정지기에 이르렀으며, 생육에 따라 pH도 점점 감소하면서 생육 정지기 이후에 pH 4.4를 유지하였다. 생육에 따른 *Asp. fumigatus* ATCC 96918에 대한 항진균 활성은 생육곡선과 함께 증가하기 시작하여 생육 정지기에 이르기 전 12시간부터 최대 활성 (800 AU/mL)을 나타냈으며, 48시간까지 활성이 유지되었다. *B. subtilis* ATCC 6633에 대한 항세균 활성은 항진균 활성과 달리 생육 정지기에 들어선 20시간 후부터 최대 활성을 나타내었으며, 48시간까지 활성이 감소되지 않고 유지되었다.

항진균 활성 유산균에 관한 연구[38]들에서 항진균 물질이 단백질성 물질일 경우 세포 사멸기에 접어들면서 항진균 활성이 감소하는 결과를 보였으며, 반대로 비단백질성 물질일 경우 세포의 사멸에 영향을 받지 않고 활성이 그대로 유지되는 결과를 보였다. 따라서 *Leu. mesenteroides* TA가 생산하는 항균 물질은 비단백질성 물질이거나 세포의 사멸에 따른 단백분해효소의 영향을 받지 않는 안정한 물질로 추정되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

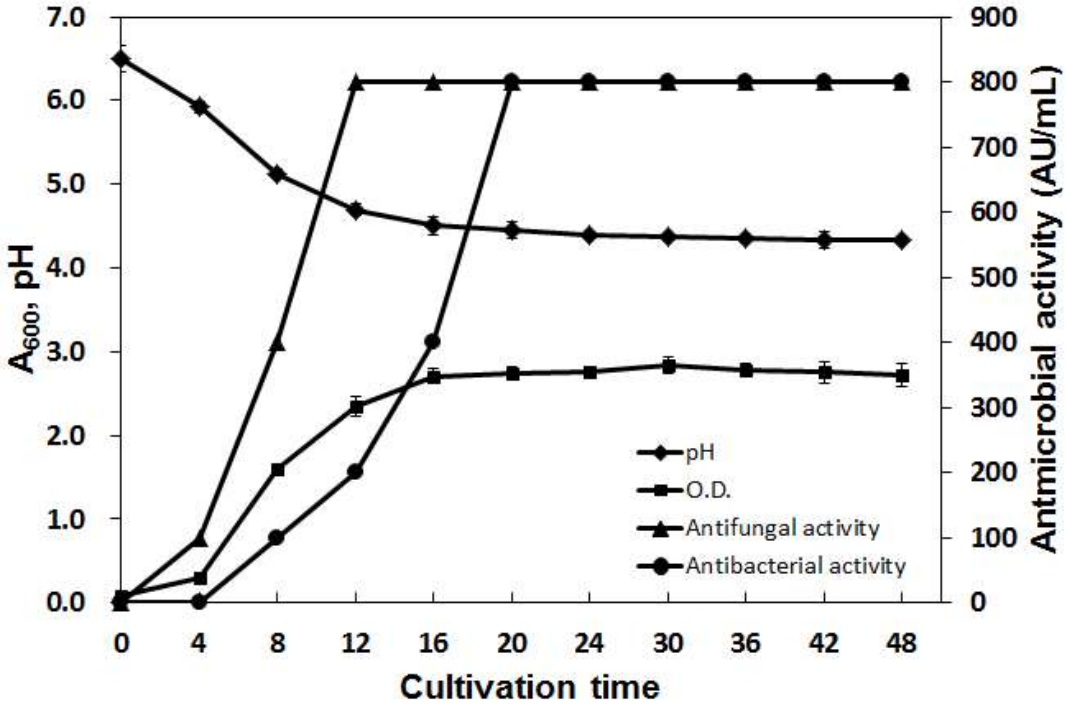

Figure 8. Growth, pH, antibacterial and antifungal activities of *Leu. mesenteroides* TA

Asp. fumigatus ATCC 96918 and *B. subtilis* ATCC 6633 were used as indicators. All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

3. 안전성 평가

가. 용혈성 확인

Leu. mesenteroides TA의 용혈성을 7% horse blood agar로 확인한 결과 용혈 현상을 유발하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 양성 대조구 *B. cereus* KCTC 3624 균주는 균체 주위에 투명환을 나타내는 용혈현상을 유발하는 β-hemolysis 반응를 보였다(Figure 9).

나. 항생제 감수성

최근 질병예방 및 치료 목적으로 사용되는 항생제는 매년 그 사용빈도와 농도가 증가하며 무분별한 항생제 오·남용에 의한 항생제 내성 균주가 사회적으로 문제되고 있다. 이에 항생제 사용을 규제하고 그 사용량을 줄여가는 추세이다. 본 실험에서는 김치로부터 분리한 *Leu. mesenteroides* TA에 대하여 European Food Safety Authority (EFSA, 2012)에서 제시한 *Leuconostoc* 속에 대한 break point를 참고하여, 여러 항생제 ampicillin (Sigma), vancomycin (Sigma), gentamycin (Sigma), streptomycin (Sigma), erythromycin (Sigma), clindamycin (Sigma), tetracycline (Sigma), chloramphenicol (Sigma)을 포함한 9 종류의 항생제 감수성 또는 내성을 최소 생육 저해 농도(MIC)로 측정하였다. 그 결과 9종류의 항생제에 대하여 EFSA 2012에서 제시한 breakpoint보다 낮은 MIC를 보이면서 감수성을 나타냈다(Table 5).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

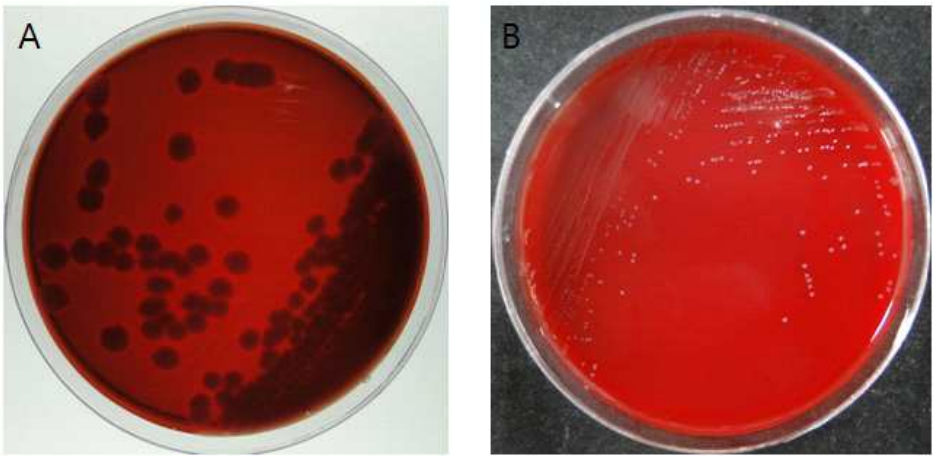

Figure 9. Hemolysis test of *B. cereus* KCTC 3624 (A) and *Leu. mesenteroides* TA (B)

The medium plate of blood agar base supplement with 7% horse blood. The plates were incubated at 37℃ overnight.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. Minimum inhibitory concentration(MIC) of various antibiotics against *Leu. mesenteroides* TA

strains	MIC (μg/mL)[b]								
	AMP	VAN	GEN	KAN	STR	ERY	CLI	TET	CHL
Break points for *Leuconostoc mesenteroides*[a]	2	n.r.[c]	16	16	64	1	1	8	4
Leuconostoc mesenteroides TA	2	>512	0.125	1	2	0.06	1	4	4

[a] Break points were according to the guidelines of the EFSA (EFSA 2012)

[b] Strain with MICs lower than or equal to the breakpoints are considered susceptible. *AMP* ampicillin,; *VAN* vancomycin,; *GEN* gentamycin,; *STR* streptomycin,; *ERY* eryrhromycin,; *CLI* clindamycin,; *TET* tetracycline,; *CHL,* chloramphenicol.

[c] n.r. Not required.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

다. 효소 활성

Leu. mesenteroides TA의 효소활성을 확인하기 위하여 API-ZYM kit를 사용하였다. Esterase (C4), Leucine arylamidase, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolases는 5 nM로 미약한 활성을 보였으며 β-galactosidase의 경우 10 nM의 활성을 보였다. α-glucosidase, β-glucosidase은 20~30 nM으로 강한 활성을 보였다. 발암효소로 알려진 β-glucuronidase는 benzopyrene과 같은 독성물질이 인체에 들어왔을 때 간에서 glucuronic acid와 결합되어 그 독성이 중화가 되지만, 이 결합된 물질이 소장에서 담즙과 함께 장내에 배설되고 장내세균의 β-glucuronidase에 의해 탈포합되면 다시 독성이 생길 수 있다. *Leu. mesenteroides* TA는 β-glucuronidase 활성이 0 nM로 활성을 보이지 않아 발암유발의 잠재적 위험성이 없다는 것을 입증하였다(Table 6).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 6. Enzymatic activities of *Leu. mesenteroides* TA by API zym analysis

Enzyme	*Leu. mesenteroides* TA
Control	0
Alkaline phosphatase	0
Esterase (C4)	5
Esterase Lipase (C8)	0
Lipase (C14)	0
Leucine arylamidase	5
Valine arylamidase	0
Crystine arylamidase	0
Trypsin	0
α-Chymotrypsin	0
Acid phosphatase	0
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	5
α-Galactosidase	0
β-Galactosidase	10
β-Glucuronidase	0
α-Glucosidase	20
β-Glucosidase	30
N - Acetyl-β-glucosaminidase	0
α-Mannosidase	0
α-Fucosidase	0

0, No enzyme activity; 5, 10, 20, 30, ≥40 indicates nM of hydrolyzed substrate after 4hr of incubation at 37℃.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

4. 분리 균주의 항균 활성 측정

Leu. mesenteroides TA의 항진균 및 항세균 활성을 확인하기 위하여 dual culture overlay assay를 이용하여 곰팡이, 효모 및 세균에 대한 생육 저해 활성을 조사하였다.

Leu. mesenteroides TA는 식품과 사료를 오염시키며 인체에 aspergillosis를 유발시키는 *Asp. fumigatus* ATCC 96918와 알레르기나 염증성 폐렴에 관여하는 *C. gossypiicola* KF-2의 병원성 곰팡이에 대하여 강한 저해활성을 나타내었다. 또한, 곰팡이 독소를 생성하는 곰팡이 종류인 *Asp. petrakii* PF-1과 메주에서 분리한 식품과 사료에서 보관 기간 동안 부패를 일으키며 독소를 생성하는 곰팡이 종류인 *Asp. nidulans* PF-3와 *Asp. ochraceus* PF-2에 대해서도 생육 저해 활성을 보였다. 뿐만 아니라 간암 유발 물질인 aflatoxin을 생성하는 *Asp. flavus* ATCC 22546에 대하여 *Leu. mesenteroides* TA 균체 주변으로 포자 형성이 억제되는 것을 확인 할 수 있었으나, *Pichia kudriavzevii* GY1과 저온저장 식품에서 변패를 일으키는 *P. roqeuforti* ATCC 10110에는 항균 활성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

Leu. mesenteroides TA는 식품 및 사료에서 부패를 일으키는 *P. aeruginosa* ATCC 27853 및 *M. luteus* ATCC 15307에 대해서 강한 항세균 활성을 나타내었다. 뿐만 아니라 식중독의 원인균인 *Sal. enterica* serovar *Typhi* ATCC 19430, *B. cereus* KCTC 6434, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 균주에 대해서도 항균 활성을 나타내었다.

Magnusson 등[39]은 다양한 곳에서 분리한 유산균 42종에 대해 항진균 활성을 dual culture overlay assay를 이용하여 실험하였으며, 실험된 유산균 속이나 종에 따라 항진균 활성은 다양하게 나타난다고 보고하였다. Wulijideligen 등[74]은 520종의 유산균에 대하여 *P. chrysogenum* 균주에 대하여 dual culture overlay assay를 이용하여 실험한 결과 138종의 유산균에서 항진균 활성이 나타났으며, 그 중 항진균 활성이 강한 17종에 대하여 더 다양한 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 보았다. 그 중 *Leu. mesenteroides* ATCC 8293^T과 계통학적으로 100% 일치하는 *Leu. mesenteroides* 368에서 가장 강한 항진균 활성을 확인하였다.

기존 보고에 따르면 유산균은 유기산, diacetyl, bacteriocin, H_2O_2 등의 항균 물질을 생산하여 항균 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으나 현재 대부분의 연구들이 항세균

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

활성에만 집중되어 왔으며[13, 29, 32], 현재에 이르러 항진균 활성 유산균에 관한 연구 및 항진균 물질을 규명하는 연구에 주목을 받고 있다. 기존에 보고된 유산균을 생산하는 항진균 물질로는 유기산, phenyllactic acid, reuterin, cyclic peptides, fatty acid, proteinaceous compounds 등[18]이 있으며 현재 끊임없이 보고되고 있다. 그러나 *Leuconostoc* 속 유산균에 대한 항진균 활성 논문의 경우 매우 소수이며, 대다수의 연구가 단순히 항진균 활성을 나타내는 현상에 관한 보고들이며, 항진균 활성 *Leuconostoc* 속 균주에 대한 항세균 활성 실험은 더더욱 매우 미흡하다.

따라서 본 연구 결과 *Leu. mesenteroides* TA의 균체는 다양한 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 나타내었으며, 식중독 균주 및 식품 부패 미생물을 포함한 세균에 대하여서도 광범위한 항세균 활성을 지니는 것을 관찰하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 10. Antifungal activity of *Leu. mesenteroides* TA

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

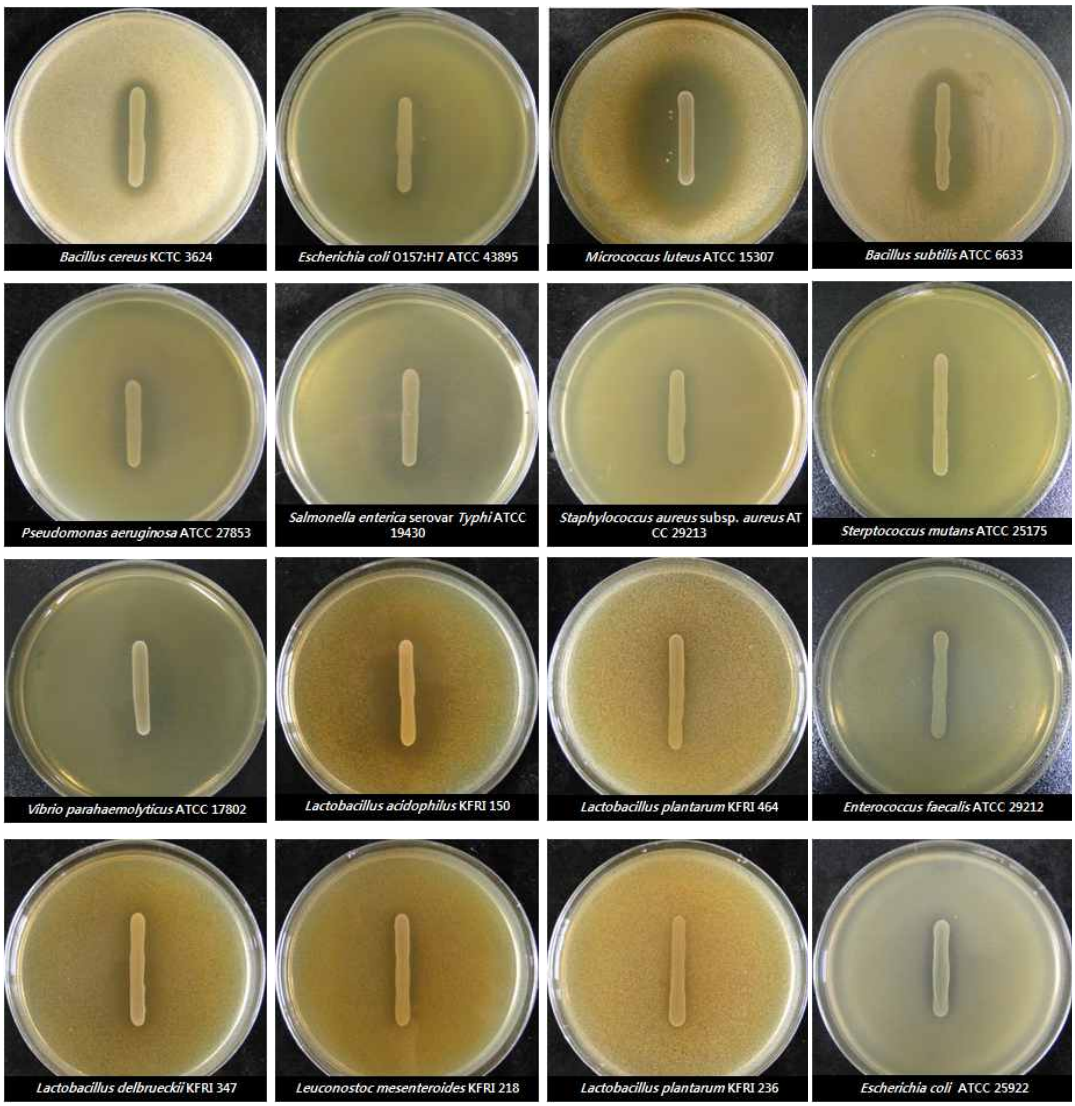

Figure 11. Antibacterial activity of *Leu. mesenteroides* TA

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

5. 항균 spectrum 조사

세균 17종, 효모 1종, 그리고 곰팡이 7종에 대한 *Leu. mesenteroides* TA가 생산하는 항균 물질에 의한 항균 활성을 paper disc assay를 통해 확인하였다(Table 7).

세균에 대한 항균 활성 결과 대체로 모든 세균에 대하여 항균 활성을 나타냈으며, 특히 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853 그리고 *Lb. acidophilus* KFRI 150 균주들에 대하여 강한 항균 활성을 보였으며, *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213에 대해서 약한 항균 활성을 보였다. 효모 1종에 대해서는 dual culture overlay assay 결과와 유사하게 약한 활성을 보였다.

곰팡이에 대한 항균 실험 결과에서는 *Asp. fumigatus* ATCC 96918에 대하여 가장 강한 저해 활성을 나타내었으며, dual culture overlay assay 결과와 마찬가지로 *Asp. flavus* ATCC 22546에 대해서는 약한 활성을 보였다. 그러나 균체를 이용한 항균 활성 실험에서 *P. roqueforti* ATCC 10110에 대해 항균 활성이 나타나지 않았으나 *Leu. mesenteroides* TA가 생산한 항균 물질에 의해서는 항균 활성을 나타내었다.

Leu. mesenteroides TA가 생산하는 항균 물질은 곰팡이뿐만 아니라 세균에 대해서도 광범위한 항균 spectrum을 가지고 있다. 그러나 효모에 대해서는 낮은 활성을 보이므로 이는 항균 물질의 항균 활성 기작이 곰팡이나 세균의 세포벽이나 세포막에는 특이적으로 영향을 미치지만 효모의 세포벽 구조에는 덜 민감할 수 있음을 알 수 있었다.

기존 보고에 의하면 우리나라에서 발효식품인 김치에서 분리한 *Leu. mesenteroides* LK3는 *Saccharomyces cerevisiae*에 대하여 paper disc assay를 이용하여 항효모 활성을 조사하여 항균 활성을 나타내었다[49].

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 7. Inhibitory spectrum of culture supernatant

M/O	Indicator species	Antimicrobial activitiy
Bacteria	*Bacillus cereus* KCTC 3624	+++
	Staphylococcus aureus subsp. *aureus* ATCC 29213	+*
	Escherichia coli O157:H7 ATCC 43895	++
	Salmonella enterica serovar *Typhi* ATCC 19430	+++
	Micrococcus luteus ATCC 15307	++
	Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802	++++
	Bacillus subtilis ATCC 6633	++++
	Streptococcus mutans ATCC 25175	+++
	Enterococcus faecalis ATCC 29212	++
	Listeria monocytogenes ATCC 19113	+
	Escherichia coli ATCC 25922	+++
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	++++
	Lactobacillus plantarum KFRI 464	++
	Lactobacillus plantarum KFRI 236	++
	Lactobacillus acidophilus KFRI 150	++++
	Leuconostoc mesenteroides KFRI 218	+++
	Lactobacillus delbrueckii KFRI 347	++
Yeast	*Pichia kudriavzevii* GY1	+*
Mold	*penicillium roqueforti* ATCC 10110	+
	Aspergillus nidulans PF-3	++
	Aspergillus ochraceus PF-2	++
	Aspergillus fumigatus ATCC 96918	+++
	Aspergillus petrakii PF-1	++
	Clasdosporium gossypiicola KF-2	++
	Aspergillus flavus ATCC 22546	+

Acitivity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: -, no inhibitory zone; +, below 10.0mm; ++, 10.0~14.0 mm; +++, 14.0~18.0 mm; ++++,above 18.0mm; *, turbid zone.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

6. 조항균 물질 (배양 상징액)의 안정성

가. pH 안정성

배양 상징액의 pH에 대한 영향을 실험한 결과 *B. subtilis* ATCC 6633에 대한 항세균 활성에서는 pH 3.0에서 본래의 활성보다 높은 2400 AU/mL가 나타났으며, pH 4.0에서 본래의 활성을 유지하였으나 pH 5.0 이상에서는 활성이 급격히 상실되어 pH 6.0 이상부터 활성을 상실하였다. 그리고 pH를 3.0~8.0으로 조정하여 4℃에서 6시간 동안 처리 후, 균체 배양 후의 배양액 pH 4.4로 복원시켰을 때, pH 처리에 의해 활성이 감소되었던 pH 5.0~8.0 구간의 활성이 100% 회복되었다(Table 8). *Asp. fumigatus* ATCC 96918에 대한 항진균 활성에서는 pH 3.0~4.0에서는 본래의 활성을 유지하였으나 pH 5.0 이상에서는 활성이 급격히 상실되어 pH 6.0 이상부터 활성을 상실하였다. 이를 바탕으로 항균 물질은 pH 3.0~4.0 사이의 산성 구간에서 최적의 활성을 나타냄을 알 수 있다.

나. 온도 안정성

온도에 대한 안정성 실험에서는 항세균과 항진균 활성 모두 4℃, 30℃, 50℃, 70℃에서 24시간, 100℃에서 30분, 121℃에서 15분간 열처리한 후에도 활성을 100% 유지하여 (Table 8) 온도에 매우 안정한 물질로 추정할 수 있었다.

다. 효소 안정성

각종 효소에 대한 영향을 알아본 결과 항진균과 항세균 활성을 어떠한 효소에도 영향을 받지 않았다(Table 8). 따라서 항균 활성 물질은 비단백질성 물질이거나 단백가수분해효소에 영향을 받지 않는 물질이며, 당이나 지질의 결합이 항진균 활성에 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

기존의 보고에 의하면 항진균 물질인 phenyllactic acid를 생산하는 *Lb. plantarum* 21B의 배양액 (pH 3.7)을 pH 5.0~7.0로 조정하였을 때 활성이 감소하였으나 원래의 pH로 복원시켰을 경우 항진균 활성도 회복되었으며, 100℃에서 15분간 열처리한 후에

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

도 항진균 활성을 유지하였다[34]. 단백질성 물질을 생산하는 *Lactobacillus brevis* NCDC 02는 pH 4.0~8.0로 조정하였을 때 활성을 유지하였으나, 121℃에서 15분간 열처리한 후에는 부분적으로 활성이 감소하였으며 pepsin과 protease 처리에서는 활성을 상실하였다[23].

항진균 물질 및 항세균 물질의 안정성 실험 결과 *Leu. mesenteroides* TA가 생산하는 항균 물질은 산성 구간에서 안정하며, pH 3.0~7.0으로 처리 후 다시 원래 균체 배양액 pH (pH 4.4)로 복원시켰을 때 항균 활성이 100% 회복되었다. 또한 열과 효소처리에도 항균 물질의 활성이 100% 유지되는 것으로 나타나 *Leu. mesenteroides* TA의 항균 물질은 열과 효소처리에 매우 안정한 물질로 추정된다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 8. Effect of pH, heat, and enzyme treatment on the supernatant of *Leu. mesenteroides* TA

Treatment		Antifungal activity (AU/mL)	Antibacterial activity (AU/mL)
pH	3.0	800	2400
	4.0	800	1200
	5.0	200	200
	6.0	0	0
	7.0	0	0
	8.0	0	0
pH-renaturation	3.0 → 4.4	800	800
	4.0 → 4.4	800	800
	5.0 → 4.4	800	800
	6.0 → 4.4	800	800
	7.0 → 4.4	800	800
	8.0 → 4.4	800	800
Heating	4℃, 24h	800	800
	30℃, 24 h	800	800
	50℃, 24 h	800	800
	70℃, 24 h	800	800
	100℃, 30 min	800	800
	121℃, 15 min	800	800
Enzyme	Proteinase K	800	800
	Protease	800	800
	Pepsin	800	800
	Trypsin	800	800
	α-Amylase	800	800
	Lipase	800	800

The antifungal activity and the antibacterial activity were measured by spot on the lawn test. *Asp. fumigatus* ATCC 96918 and *B. subtilis* ATCC 6633 were used as indicators.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

제 3 절 항진균 물질의 정제 및 특성

1. SPE 정제 및 항균spectrum 조사

항균 물질의 부분 정제를 위하여 SPE를 시행하였다. C_{18} SPE column (Isolute)을 사용하여 hydrophilic fraction을 제거하고 hydrophobic compounds만을 흡착하여 95% aqueous acetonitrile을 이용하여 용출하였다. 용출한 후 항균 활성을 확인하기 위하여 용매를 휘발시킨 후 농축하여 시료를 사용하였다. 세균 7종, 효모 1종, 그리고 곰팡이 7종에 대한 *Leu. mesenteroides* TA가 생산하는 항균 물질에 의한 항균 활성을 spot on the lawn test를 통해 확인하였다.

세균에 대한 항균 활성 결과 *Baciilus* 속 2종을 제외한 세균에 대하여 항균 활성이 나타나지 않았으며, 효모 1종에 대한 항균 활성도 나타나지 않았다. 그러나 지시 곰팡이로 사용한 5종의 곰팡이에 대해서는 모두 항진균 활성을 나타내었다. 이는 *Leu. mesenteroides* TA가 생산하는 항균 물질 중 hydrophobic한 물질은 항진균 활성을 가지고 있으며, 세균에 대해서는 좁은 spectrum을 나타내는 것을 알 수 있다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 9. Inhibitory spectrum of antimicrobial compound

M/O	Indicator species	Antimicrobial activty (AU/mL)
Bacteria	*Bacillus cereus* KCTC 3624	10
	Staphylococcus aureus subsp. *aureus* ATCC 29213	0
	Escherichia coli O157:H7 ATCC 43895	0
	Salmonella enterica serovar *Typhi* ATCC 19430	0
	Micrococcus luteus ATCC 15307	0
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	0
	Bacillus subtilis ATCC 6633	10
Yeast	*Pichia kudriavzevii* GY1	0
Mold	*Penicillium roqueforti* ATCC 10110	5
	Aspergillus nidulans PF-3	160
	Aspergillus ochraceus PF-2	10
	Aspergillus fumigatus ATCC 96918	10
	Aspergillus petrakii PF-1	20
	Clasdosporium gossypiicola KF-2	40
	Aspergillus flavus ATCC 22546	5

The antifungal activity and the antibacterial activity were measured by spot on the lawn test.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2. SPE 정제 조항균 물질의 안정성

가. pH 안정성

조항균 물질의 pH에 대한 영향을 실험한 결과 *B. subtilis* ATCC 6633에 대한 항세균 활성에서는 pH 4.0에서 본래의 활성 (800 AU/mL)을 유지하였으나 pH 4.0보다 낮은 pH 3.0과 pH 4.0보다 높은 pH 5.0~8.0에서는 본래의 활성보다 낮은 100 AU/mL가 나타났다(Table 10). *Asp. fumigatus* ATCC 96918에 대한 항진균 활성에서는 pH 4.0에서는 본래의 활성 (800 AU/mL)를 유지하였으나 pH 3.0에서는 본래의 활성보다 낮은 100 AU/mL를 보였으며, pH 5.0 이상에서는 활성이 급격히 상실되었다.

나. 온도 안정성

조항균 물질의 온도에 대한 안정성 실험에서는 항세균 활성과 항진균 활성 모두 4℃, 30℃, 50℃, 70℃에서 24시간, 100℃에서 30분, 121℃에서 15분간 열처리한 후에도 활성을 100% 유지하여(Table 10) 온도에 매우 안정한 물질로 추정할 수 있었다.

다. 용매 안정성

조항균 물질의 용매에 대한 안정성 실험에서는 methanol, acetone, acetonitrile, ethanol에 25℃에서 1시간 처리한 후 용매를 제거하고 10 mM sodium acetate (pH 4.0)에 녹여 항세균 및 항진균 활성을 확인하였다. 그 결과 항세균 및 항진균 활성을 100% 유지하여(Table 10) 용매에 매우 안정한 물질로 추정할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 10 Effect of pH, heat, and enzyme treatment on the antimicrobial compound of *Leu. mesenteroides* TA

Treatment		Antifungal activity (AU/mL)	Antibacterial activity (AU/mL)
pH	3.0	1.25	1.25
	4.0	10	10
	5.0	1.25	0
	6.0	1.25	0
	7.0	1.25	0
	8.0	1.25	0
Heating	4℃, 24h	10	10
	30℃, 24 h	10	10
	50℃, 24 h	10	10
	70℃, 24 h	10	10
	100℃, 30 min	10	10
	121℃, 15 min	10	10
Solvent	Ethanol	10	10
	Acetonitrile	10	10
	Acetone	10	10
	Methanol	10	10

The antifungal activity and the antibacterial activity were measured by spot on the lawn test. *Asp. fumigatus* ATCC 96918 and *B. subtilis* ATCC 6633 were used as indicators.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

제 4 장 결 론

현재 식품 보존 방법으로 물리적인 방법에는 drying, freeze-drying, cold storage, modified atmosphere storage, heat treatment 등이 있으며, 화학적인 방법은 보존료로 사용되는 화학 첨가물을 이용하는 방법이 있다. 그 예로는 acetic acid, lactic acid, propionic acid, sorbic acid, benzoic acid 등이 사용되고 있다. 그러나 현재 사용되고 있는 항생제와 방부제의 빈번한 사용은 항생제 내성 및 체내 축적성 등 안전성에 관한 문제가 지속적으로 대두되고 있다[8]. 이에 소비자들의 화학 방부제 사용 감소에 대한 요구로 인해 최근 몇 년 동안 새로운 식품 보존 방법에 대한 관심이 증가하고 있다.

현재 천연물 유래의 식품 보존제에 대한 연구들이 많이 진행되어 왔으며, 특히 생물학적 보존제로서 오랜 역사와 함께 인체에 매우 유익한 균으로 알려진 유산균을 이용하려는 노력들이 진행되고 있다.

유산균은 유기산을 포함한 각종 발효산물을 생성하여 발효식품에 산미와 독특한 풍미를 부여한다. 또한 pH의 저하와 발효산물 중 항균 활성 물질의 생산으로 부패 미생물과 병원성 미생물을 사멸시키거나 생육을 억제하는 작용을 하여 식품의 보존성과 안전성을 유지하게 한다. 그러나 식품 부패균 및 병원성 미생물뿐 아니라 곰팡이에 의한 경제적 손실과 인체에 매우 치명적이라는 문제로 인해 광범위한 항균 활성을 나타내는 유산균에 대한 연구가 필요한 실정이다.

이에 본 연구에서는 우리나라의 발효식품 김치로부터 항진균 및 항세균 활성 유산균을 분리하고 항진균 활성 균주의 특성 규명 및 항진균 물질의 특성을 규명하고자 하였다.

숙성된 김치로부터 항진균 활성을 나타내는 유산균을 분리하여 형태학적, 생화학적 및 분자생물학적 동정을 시행하였다. 항진균 활성 유산균은 분자생물학적으로 *Leu. mesenteroides* ATCC 8293^{T}에 대하여 100% 상동성을 나타내었으며, 이에 *Leu. mesenteroides* TA로 동정하였다. 그러나 두 균주간의 생화학적 특성을 조사한 결과 두 균주간의 당 대사능에서 차이가 관찰되었으며, 이는 두 균주가 서로 다른 환경에서 자라나며 차이를 나타내었다고 보았으며 계통학적인 유전자는 동일하여도 당대사능이 다르게 나타나는 것으로 추정하였다.

Leu. mensenteroides TA의 배양 온도에 따른 생육을 조사한 결과 30℃에서 가장

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

높은 생육을 나타내며 최대 항진균 활성 (800 AU/mL) 및 항세균 활성 (800 AU/mL)을 나타냄으로 최적 배양 온도가 30℃임을 알 수 있었다. 배양 배지의 초기 pH를 pH 4.0~7.0 범위로 조정하여 균주를 24시간, 48시간 배양 시 생육도는 pH 6.0~7.0 구간에서 높았으며, *Leu. mensenteroides* TA의 항진균 활성은 생육도와 비례하여 pH 6.0~7.0에서 24시간 만에 최대 활성 (800 AU/mL)을 보였다. 또한 항세균 활성도 pH 6.0~7.0구간에서는 배양 24시간 이후에 최대 항균 활성 (800 AU/mL)를 나타내어 48시간까지 유지되었다.

최적 배양 조건을 *Leu. mesenteroides* TA의 생육시기에 따른 항진균 및 항세균 활성을 조사한 결과 생육 정지기에 이르는 배양 16시간 전인 12시간 만에 항진균 활성은 최대 활성 (800 AU/mL)을 나타내었다. 반면, 항세균 활성은 생육 정지기 이후인 20시간만에 최대 활성 (800 AU/mL)를 나타냈으며 항진균 및 항세균 활성은 48시간까지도 활성이 감소되지 않는 것으로 나타났다. 항진균 활성 유산균에 관한 연구[42]들에서 항진균 물질이 단백질성 물질일 경우 세포 사멸기에 접어들면서 항진균 활성이 감소하는 결과를 보였으며, 반대로 비단백질성 물질일 경우 세포의 사멸에 영향을 받지 않고 활성이 그대로 유지되는 결과를 보였다. 따라서 *Leu. mesenteroides* TA가 생산하는 항균 물질은 비단백질성 물질이거나 세포의 사멸에 따른 단백분해효소의 영향을 받지 않는 안정한 물질로 추정되었다.

용혈 현상은 적혈구가 붕괴하여 헤모글로빈이 혈구(血球) 밖으로 용출하는 현상으로 적혈구가 지나치게 많이 파괴되는 경우 혈액의 산소 운반 능력이 떨어져 빈혈 현상이 발생하게 되므로 식품에 유산균주로 이용 시 체내에 공급되어 용혈 현상을 유발하는지 조사하였다. 그 결과 *Leu. mesenteroides* TA는 용혈 현상을 일으키지 않는 안전한 균주로 나타났다.

안전성 조사로 항생제 감수성을 조사하는 것은 항생제를 복용하는 환자에 대하여 적절한 유산균 선택에 올바른 정보를 제공하여 내성유전자의 확산방지에 도움이 될 수 있다. *Leu. mesenteroides* TA는 9종의 항생제 ampicillin과 vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol에 대하여 감수성을 측정한 결과 9종류의 항생제에 대해 EFSA 2012 [20]에서 제시한 breakpoint보다 낮은 MIC를 보이면서 감수성을 나타냈다.

Leu. mesenteroides TA 균주를 이용하기 위한 안전성 조사로 균주가 생산하는 효소 또한 중요한 부분을 차지하고 있다. *Leu. mesenteroides* TA가 발암효소로 알려진 β-glucuronidase에 대해 0 nmole로 체내에 이용시 안전한 균주이며 이당체 또는 배당

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

체의 β - 1,4 glycosidic acid bond를 가수분해하여 glucose를 생산하는 중요한 효소인 β - Glucosidase의 활성이 30nmole 이상으로 강한 활성이 확인됨에 따라 에너지원으로 도움이 될 것으로 사료된다[47].

Leu. mesenteroides TA 균주의 균체에 의한 항진균 및 항세균 활성을 dual culture overlay assay로 시행하여 관찰한 결과, 식중독 원인균이며 인체에 유해한 *Asp. flavus*, *A. ochraceus*뿐만 아니라 식품과 사료에서 부패를 일으키는 원인인 *Asp. fumigatus*, *Asp. nidulans*와 병원성 곰팡이인 *C. gossypiicola*에 대하여 저해 활성을 보였다. 뿐만 아니라 다양한 항세균에 대하여 항균 활성을 보였다. 특히 식중독 원인균인 *V. parahaemolyticus*와 *Sal. enterica* serovar *Typhi*, 그리고 부패 미생물인 *Micrococcus luteus*에 대하여 강한 저해 활성을 보였다.

Leu. mensenteroides AFT는 *Penicillium*, *Aspergillus, Fusarium*, *Mucor* 속 등 다양한 곰팡이에 대한 항진균 활성을 나타내었으며, *Hansenula* 속 효모에 대하여서도 항균 활성을 나타내었다[31].

Leu. mesenteroides TA가 생산하는 항균 물질에 의한 항진균 및 항세균 활성을 조사한 결과, 식중독 원인 곰팡이 및 식품과 사료 부패 곰팡이 모두에 항진균 활성을 보였다. 또한 세균에 대한 항균 활성 실험 결과 그람 양성과 그람 음성균 및 다른 유산균에 대하여 강한 저해활성을 나타내어 *Leu. mesenteroides* TA가 곰팡이뿐만 아니라 세균에 대하여 넓은 항균 활성을 가지는 것을 알 수 있었다. 몽골의 전통 식품인 Airag에서 분리한 *Leu. mesenteroides* 368은 *Leu. mesenteroides* ATCC 8293^{T}과 분자생물학적 동정이 상동성을 이루는 균주로서 현재 *Aspergillus*, *Penicillium*, Rhizopus 속 등의 곰팡이에 대하여 저해 활성을 나타내었다[74]. 이는 환경에 따라 당대사능에서 차이가 관찰되었더라도 계통학적인 유전자는 동일한 두 균주에서 모두 항진균 활성이 나타나는 것으로 사료된다.

Mouna Boulages[47]는 *Leu. mesenteroides* 27종에 대하여 항진균 및 항세균 활성을 알아본 결과 13종의 균주에서 항진균 및 항세균 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

현재 *Leuconostoc* 속 균주에 대하여 항세균 활성을 나타내는 보고는 많으나, 항진균 활성을 보고한 논문을 매우 드물며, 항진균 활성을 나타내는 유산균 *Leuconostoc* sp.에 대하여 항세균 활성에 대하여 보고한 논문은 더욱이나 드물다. 이는 항진균 활성을 나타내는 *Leuconostoc* sp.이 항세균 활성을 나타내지 않는 것보다는 항균 활성 조사를 항진균에 국한하여 실험한 것으로 추정된다.

Leu. mesenteroides TA의 조항균 물질 (배양 상징액)의 pH, 온도, 그리고 효소에 대

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

한 안정성 실험을 실행하였다. *Leu. mesenteroides* TA는 pH 3.0~4.0에서는 안정하였으며 pH 5.0 이상에서는 불안정한 결과를 보였으나, pH 3.0~8.0으로 처리한 후 다시 원래 배양 직후 pH (pH 4.4)로 복원시켰을 때 항진균 및 항세균 활성을 100% 회복함을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 121℃, 15분간 열처리한 후에도 항진균 및 항세균 활성을 유지하였으며 각종 효소의 처리에도 항진균 및 항세균 활성에 영향을 받지 않으므로 TA의 배양 상징액은 열과 효소처리에도 매우 안정한 물질임을 확인하였으며, 이러한 결과는 생육곡선에 따른 항진균 및 항세균 활성 실험에서 추정한 결과와 유사하다. 항진균 물질인 phenyllactic acid를 생산하는 *Lb. plantarum* 21B의 배양액을 pH 5.0~7.0로 조정하였을 때 활성이 감소하였으나 원래의 pH (pH 3.7)로 복원시켰을 경우 항진균 활성도 회복되었으며, 100℃에서 15분간 열처리한 후에도 항진균 활성을 유지하였다[34]. 단백질성 물질을 생산하는 *Lactobacillus brevis* NCDC 02는 pH 4.0~8.0로 조정하였을 때 활성을 유지하였으나, 121℃에서 15분간 열처리한 후에는 부분적으로 활성이 감소하였으며 pepsin과 protease 처리에서는 활성을 상실하였다[23].

Benzoic acid, 5-methyl-2,4-imidazolidinedione, tetra hydro-4-hydroxy-4-methyl-2H-pyran-2-one, 그리고 3-(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedion의 항진균 물질들을 생산하는 *Lb. plantarum* VTTE-78076 배양액의 항균 활성은 121℃에서 15분 동안 열처리한 후에도 안정하였으며 단백분해효소 처리에 영향을 받지 않았다[45]. 뿐만 아니라 delta-dodecalactone의 항진균 물질을 생산하는 *Lb. plantarum* AF1의 배양액(pH 3.9)을 pH 5.0~7.0로 조정하였을 때 활성이 감소하였으나 원래의 pH로 복원시켰을 경우 항진균 활성도 회복되었으며, 121℃에서 15분간 열처리한 후에도 항진균 활성을 유지하였을 뿐만 아니라 각종 효소의 처리에도 항진균 활성에 영향을 받지 않았다[76].

Leu. mesenteroides TA가 생산하는 항균 물질의 특성을 조사하기 위하여 C_{18} SPE column으로 처리하여 95% aqueous acetonitrile로 용출한 분획에 대하여 항균 활성을 조사하였다. 그 결과 C_{18} SPE column으로 분리한 항균 물질은 다양한 곰팡이에 대해서는 항균 활성을 나타내었으나, 배양 상징액과 달리 세균에 대해서는 좁은 항균 spectrum을 나타내었다. 이는 *Leu. mesenteroides* TA가 생산하는 항균 물질 중 SPE 정제 분획에서 나타나는 hydrophobic한 물질은 항진균 활성을 가지고 있으며, 세균에 대해서는 좁은 spectrum을 나타내는 것을 알 수 있다.

Leu. mesenteroides TA가 생산하는 항균 물질에서 hydrophobic한 물질에 대한 안정성 실험으로 pH, 온도, 용매에 대한 안정성 실험을 실행하였다. *Leu. mesenteroides* TA는 121℃, 15분간 열처리한 후에도 항진균 및 항세균 활성을 유지하였다. methanol,

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

ethanol, acetone, acetonitrile 용매에 대해서도 항진균 및 항세균 활성이 안정하였다. 그러나 *Leu. mesenteroides* TA가 생산하는 hydrophobic한 항균 물질은 pH 4.0에서는 안정하였으나 pH 3.0 및 pH 5.0 이상에서는 불안정한 결과를 보였다. 배양 상징액을 이용한 안정성 실험에서는 산성구간에서는 안정한 결과와는 달리 pH 4.0 구간에서만 안정하며 pH 3.0 및 pH 5.0 이하에서는 항균 활성은 부분 상실하였다. 이는 배양 상징액은 유기산의 영향에 의해 산성 구간에서 안정하였으나, SPE column에 흡착된 hydrophobic한 항균 물질의 경우 강한 산성 구간에서는 항균 활성을 상실하며, 중성 구간뿐만 아니라 알칼리 구간에서도 항균 활성을 가지지 못하는 것으로 추측된다.

본 연구에서는 곰팡이를 억제할 수 있는 새로운 식품 보존 방법으로 천연 식품 보존제로 사용이 가능한 유산균을 분리하고 특성을 규명하였다. 현재 유산균의 항세균 활성에 대한 연구는 많으나, 항진균 활성에 대한 연구는 많이 이루어지지 않아 있으며, 특히 *Leuconostoc* 속 균주의 항진균 활성에 대한 연구는 매우 미흡하다. 본 연구는 우리나라 전통 발효식품인 김치로부터 분리한 항진균 활성을 가진 유산균을 분리하고 균주의 특성 및 항진균 물질을 부분적으로 규명하였다.

김치에서 분리한 *Leu. mesenteroides* TA는 안전성 실험을 바탕으로 인체에 매우 안전하며 유익한 특성을 가지는 균주이며 항진균 활성뿐만 아니라 식중독 균주 및 식품 부패 미생물을 포함한 다양한 세균에 대하여 항세균 활성을 나타내어 식품이나 사료에서 보존제로의 가능성을 알 수 있었다.

향후 실험에서는 *Leu. mesenteroides* TA가 생산하는 유기산을 포함한 다른 물질들과의 상승 작용에 대한 연구와 더불어 항진균 물질들이 어떠한 기작으로 곰팡이를 저해하는지에 대한 연구들이 추가되어야 할 것이다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

제 5 장 참 고 문 헌

1. Aziz, N. H., and Moussa, L. A. 2002. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control*. **13:** 281-288.

2. Baker, C. N., and Tenover, F. C. 1996. Evaluation of Alamar colorimetric broth microdilution susceptibility testing method for staphylocci and entrococci. *Journal Clinical Microbiology*. **34:** 2654-2659.

3. Bigelis, R. 1992. Food enzymes, pp. 361-415. *In* Finkelstein, Finkelstein, D. B., and Ball, C. 1992. *Biotechnology of filamentous fungi: technology and products*. *Biotechnology* (USA).

4. Bjorck, L. 1978. Antibacterial activity effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. *Journal of Dairy Research*. **45:** 109-118.

5. Bjorck, L., Rosen, C. G., Marshall, V., and Reiter, B. 1975. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonas and other gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. **30:** 199-204.

6. Boulares, M., Aouadhi, C., Mankai, M., MOUSSA, O. B., Essid, I., and Hassouna, M. 2012. Characterization, identification and technology properties of psychrotrophic lactic acid bacteria originating from tunisian fresh fish. *Journal of Food Safety*. **32:** 333-344.

7. Boyle, V. J., Fancher, M. E., and Ross, R. W. 1973. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **3:** 418-424.

8. Brul, S., and Coote, P. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food*

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Microbiology. **50:** 1-17.

9. Caplice, E., and Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms on food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. **50:** 131-149.

10. Chang, J. Y., Lee, H. J., and Chang, H. C. 2007. Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI 464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. *Journal of Applied Microbiology*. **103:** 2504-2515.

11. Chełkowski, J. 1991. Cereal grain. *Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage* . Elsevier Science Publishers., Amsterdam.

12. Cheigh, H. S., Park, K. Y., and Lee, C. Y. 1994. Biochemical, microbiological and nutritional aspects of Kimchi(Korean fermented vegetable products). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **34:** 175-203.

13. Chikindas, M. L., García-Garcerá, M. J., Driessen, A. J., Ledeboer, A. M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., ... and Venema, G. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from Pediococcus acidilactici PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **59:** 3577-3584.

14. Chikindas, M. L., M. J. G. Garcera, and A. J. M. Driessen, A. M. Ledeboer, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, T. Abee, W. L. Koning, G. Venema. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from Pediococcus acidilactici PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **59:** 3577-3584.

15. Choi, H. J., Lee, H. S., Her, S., Oh, D. H., and Yoon, S. S. 1999. Partial

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by Leuconostoc sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*. **86:** 175-181.

16. Choi, H., Kim, Y. W., Hwang, I., Kim, J., and Yoon, S. 2012. Evaluation of *Leuconostoc citreum* HO12 and *Weissella koreensis* HO20 isolated from kimchi as a starter culture for whole wheat sourdough. *Food Chemistry*. **134:** 2208-2216.

17. COYKENDALL, A. L. 1977. Proposal to elevate the subspecies of Streptococcus mutans to species status, based on their molecular composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **27:** 26-30.

18. Crowley, S., Mahony, J., and van Sinderen, D. 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science and Technology*. **33:** 93-109.

19. Delves Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *International Journal of Dairy Technology*. **44:** 100-117.

20. Earnshaw, R. G. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. *In The Lactic Acid Bacteria Volume 1*. pp. 211-232. Springer US.

21. EFSA(Europeam Food Safety Authority). 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. The EFSA Journal. **10:** 2740.

22. Efthymiou, C., and Hansen, P. A. 1962. An antigenic analysis of *Lactobacillus acidophilus*. *The Journal of infectious diseases*. **110:** 258-267.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

23. Falguni, P., Shilpa, V. I. J., and Mann, B. 2010. Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC 02. *International Journal of Dairy Technology*. **63:** 70-76.

24. Farkas, J., Doyle, M. P., and Beuchat, L. R. 2007. Physical methods of food preservation. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, (Edn. 3), 685-712.

25. Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M. H., Lievin-Le Moal, V., and Servin, A. L. 2005. pH, lactic acid, and non-lactic acid dependent activities of probiotic lactobacilli against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Applied and Environmental Microbiology*. **71:** 6008 - 6013.

26. Filtenborg, O., Frisvad, J. C., and Thrane, U. 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. **33:** 85-102.

27. Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., and Galvano, G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *Journal of Food Protection*. **64:** 120-131.

28. Gravesen, S., Frisvad, J. C., and Samson, R. A. 1994. Microfungi. (Edn. 1). *Munksgaard International Publishers Ltd.*

29. Hurst, A. 1981. Nisin. *Advances in Applied Microbiology*. **27:** 85-123.

30. Illy, A., and Viani, R. (Eds.). 1995. *Espresso Coffee: The Chemistry of Quality.* London, UK : Academic Press.

31. I. suzuki, M .Nomurasa and T. morichi. 1991. Isolation of lactic acid bacteria which suppress mold growth and show antifungal action. *Milchwissenschaft*. **46:**

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

635-639.

32. Joerger, M. C., and Klaenhammer, T. R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology*. **167:** 439-446.

33. Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie*. **70:** 337-349.

34. Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., and Gobbetti, M. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Applied and Environmental Microbiologyl. **66:** 4084-4090.

35. Li, H., Liu, L., Zhang, S., Cui, W., and Lv, J. 2012. Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current Microbiology*. **65:** 156-161.

36. Lindgren, S. E., and Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*. **87:** 147-163.

37. Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., ... and De Vuyst, L. 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*. **157:** 241 - 247.

38. Magnusson, J., and Schnurer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

compound. *Applied and Environmental Microbiology.* **67:** 1-5.

39. Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J., and Schnurer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolated of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters.* **219:** 129-135.

40. Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., DePaola, A., Ishibashi, M., Shimada, K., Nishibuchi, M., and Liebana, E 2004. Characterization of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Isolates from Clinical Sources in Spain and Comparison with Asian and North American Pandemic Isolates. *Journal of Clinical Mcrobiology.* **42:** 4672-4678.

41. Mayo, B., Derzelle, S., Fernandez, M., Léonard, C., Ferain, T., Hols, P., Suarez, J, E., and Delcour, J. 1997. Cloning and characterization of cspL and cspP, two cold-inducible genes from *Lactobacillus plantarum.* *Journal of Bacteriology.* **179:** 3039-3042.

42. Medeiros, A. A., O'Brien, T. F., Wacker, W. E., and Yulug, N. F. 1971. Effect of salt concentration on the apparent in-vitro susceptibility of *Pseudomonas* and other gram-negative bacilli to gentamicin. *The Journal of Infectious Diseases.* **124:** S59-64.

43. Messens, W., and De Vuyst, L. 2002. Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs - a review. *International Journal of Infectious Diseases.* **72:** 31-43.

44. Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., and Vandamme, E. J. 2005. *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: producing, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* **80:** 845-860.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

45. Niku Paavola, M. L., Laitila, A., Mattila Sandholm, T., and Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. **86:** 29-35.

46. Ohhira, I., Kuwaki, S., Morita, H., Suzuki, T., Tomita, S., Hisamatsu, S.,and Shinoda, S. 2004. Identification of 3-phenyllactic acid as a possible antibacterial substance produced by *Enterococcus faecalis* TH10, *Biocontrol Science*. **9:** 77 - 81.

47. Painbeni, E., Vallés, S., Polaina, J. U. L. I. O., and Flors, A. G. U. S. T. I. 1992. Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **174:** 3087-3091.

48. Park, E. J., Chun, J., Cha, C. J., Park, W. S., Jeon, C. O., and Bae, J. W. 2012. Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing. *Food Microbiol*. **30:** 197-204.

49. Park, J. M., Shin, J. H., Bak, D. J., Chang, U. J., Suh, H. J., Moon, K. W., Yang, C. Y., Park. H., and Kim, J. M. 2013. Effect of a *Leuconostoc mesenteroides* Strain as a Starter Culture Isolated from the Kimchi. *Food Science and Biotechnology*. **22:** 1729-1733.

50. Pfaller, M. A., Vu, Q., Lancaster, M., Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Grant, C., McGinnis, R., Pasarell, L., Rinaldi, M. G., and Steele-Moore, L. 1994. Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *Journal of clinical microbiology*. **32:** 1625-1628.

51. Lavermicocca, P., Valerio, F., and Visconti, A. 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*. **69:** 634 - 640.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

52. Richard, J. L., Tiffany, L. H., and Pier, A. C. 1969. Toxigenic fungi associated with stored corn. *Mycopathologia et mycologia applicata*. **38:** 313-326.

53. Rocken, W. 1996. Applied aspects of sourdough fermentation. *Advances in Food Sciences*. **18:** 212 - 216.

54. Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A., and Sinderen, D. V. 2010. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology* .

55. Rudek, W. A. L. T. E. R. 1978. Esterase activity in Candida species. *Journal of clinical microbiology*. **8:** 756-759.

56. Ryu, E. H., Yang, E. J., Woo, E. R., and Chang, H. C. 2014. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from Kimchi. *Food Microbiology*. **41:** 19-26.

58. Segal, E., Gottlieb, S., Altboum, Z., Gov, Y., and Berdicevsky, I. 1997. Adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells-effect of nikkomycin. *Mycoses*. **40:** 33-39.

59. Schnurer, J., and Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as preservatives. *Trends in Food Science and Technology*. **16:** 70-8.

60. Sneath, P. H. A., and Skerman, V. B. D. 1966. A list of type and reference strains of bacteria. *International journal of systematic bacteriology*. **16:** 1-134.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

61. Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic bacteria. *Antonie van Leewenhoek*. **70:** 331-345.

62. Strockbine, N. A., Marques, L. R., Newland, J. W., Smith, H. W., Holmes, R. K., and O'brien, A. D. 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct with similar biologic activities. *Infection and Immunity*. **53:** 135-140.

63. Strom, K., Sjogren, J., Broberg, A., and Schnurer, J. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. **68:** 4322-4327.

64. Stiles, M. E., and Hastings, J. W. 1991. Bacteriocin producing by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Science and Technology*. **2:** 247-251.

65. Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews*. **40:** 772-756.

66. Tenover, F. C., McDougal, L. K., Goering, R. V., Killgore, G., Projan, S. J., Patel, J. B., and Dunman, P. M. 2006. Characterization of a Strain of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Widely Disseminated in the United States. *Journal of Clinical Microbiol*. **44:** 108-118.

67. Tipples, K. H. 1995. Quality and nutritional changes in stored grain. *Stored Grain Ecosystems,* 325-351.

68. Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S. L., Visconti, A., and Lavermicocca,

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

P. 2008. Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage, *IInternational Journal of Food Microbiology*. **122:** 328 - 332.

69. Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, P., Sisto, A., de Candia, S., and Lavermicocca, P. 2009. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Systematic and Applied Microbiology* **32:** 438 - 448.

70. Vijayendra, S. V. N., Palanivel, G., Mahadevamma, S., and Tharanathan, R. N. 2008. Physico-chemical characterization of an exopolysaccharide produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc* sp. CFR 2181 isolated from dahi, an Indian traditional lactic acid fermented milk product. *Carbohydrate Polyners*. **72:** 300-307.

71. Vuyst, L. D., and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic and Professional..

72. Waleh, N. S., and Ingraham, J. L. 1976. Pyrimidine ribonucleoside monophosphokinase and the mode of RNA turnover in *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology*. **110**: 49-54

73. Wessels, S., Axelsson, L., Bech Hansen, E., De Vuyst, L., Laulund, S., Lahteenmaki, L., and von Wright, A. 2004. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science and Technology.* **15:** 498-505.

74. Wulijideligen, S., and Miyamoto, T. 2011. Screening and Identification of

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Lactic Acid Bacteria from Airag for Antifungal Activity. *Journal of Animal and Veterinary Advanced*. **21:** 2751-2757.

75. Wu, Y. C., Kimura, B., and Fujii, T. 2000. Comparison of three culture methods for the differentiation of *Micrococcus* and *Staphylococcus* in fermented squid shiokara. *Fisheries Science*. **66:** 142-146.

76. Yang, E. J., and Chang, H. C. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. **36:** 276-284.

77. Yang, E. J., and Chang, H. C. 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*. **139:** 56-63.

78. Yeo, I. C., Lee, N. K., Cha, C. J., and Hahm, Y. T. 2011. Narrow antagonistic activity of antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* SCK-2 against *Bacillus cereus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **112:** 338-344.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

감사의 글

어느 새 2년이라는 짧은 시간이 지나 졸업이 가까워지니 후회와 아쉬움만이 남습니다. 2년이라는 시간동안 저에게 많은 가르침을 주시며 저의 곁을 지켜주신 많은 분들께 감사하는 마음을 담아 감사의 글을 전합니다.

대학 생활을 마치고 실험실 생활을 하며 부족함이 많은 저에게 학문에 대한 열정과 제가 나아가야할 길을 가르쳐주시고 그 길에 아낌없는 지원과 배려해주신 장해춘 지도교수님께 머리 숙여 감사합니다. 학부 시절 학문에 대한 넓은 지식과 과학자로써의 길을 일깨워 주신 김경수 교수님, 노희경 교수님, 김복희 교수님께도 감사드립니다. 뿐만 아니라 바쁘신 와중에도 제 부족한 논문을 다듬어 주시고 조언해주시며 논문 심사를 맡아주신 이재준 교수님과 이주민 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

지난 3년이라는 시간동안 가족보다 더 오랜 시간을 곁에서 함께한 저희 실험실 식구들에게도 정말 감사합니다. 항상 저희들을 감싸 안아주시고 학문적으로 성장할 수 있는 버팀목이 되어주신 장지윤 박사님, 부족함이 많은 저를 이끌어주시고 밝은 에너지를 함께 나눠주시고 제 못난 모습 다 안아주시던 송희 언니, 학부 시절 처음 실험실에 들어와 실험이라는 것에 관심을 갖게 해주신 정선 언니, 지금은 다른 곳에서 열심히 일하시지만 실험실 시작에 도움을 준 해훈 언니, 어떠한 일에도 웃음을 잃지 않고 저희에게 긍정의 힘을 주신 은혜언니, 저의 덜렁거리는 성격을 꾸짖기보다 많이 웃어준 수줍은 똑순이 언니 은아 언니, 제 부족함을 메꿔주시고 항상 제 밝은 모습만 봐주시려하던 슬기언니, 실험에 힘들어할 때면 말없이 다 토닥여준 세연 언니 감사합니다. 우리 실험실의 야무진 또박 또박 글씨 성경이, 툴툴거리지만 속 깊은 왜요~동생 해비, 머리보다 감성으로 통한 수진이, 포기 하지 않고 최선을 다할 줄 알던 할머니 다혜, 이제 시작이라는 앞에서 겁먹지 않고 야무지게 나아가는 우리 혜란이, 초롱이에게도 고마움 전합니다.

그 누구보다 제가 선택한 길을 믿어주시고 지지해주시며 한결같이 저를 사랑해주시는 엄마, 아빠께도 너무나도 감사드리며 사랑합니다. 주말이면 잠만보가 되버린 저를 대신 해 부모님 일을 잘 도와주는 오빠와 아직 철부지 막둥이 우리 착한 경훈이에게도 고맙다는 말 전합니다. 그리고 언제나 제 걱정 많이 하시고 음식 솜씨 끝내주는 우리 할머니, 명절이면 제가 좋아하는 새우를 가득 준비해주시던 외할머니, 멀리 있

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

으면서 제 걱정 많이 해주신 저희 고모, 이모, 삼촌 모두에게 감사드립니다.

힘들고 지칠 때 항상 웃음으로 날 받아주던 내 소중한 친구들..고등학교 3년이라는 시간동안 내 산책길을 함께하던 해인이, 감성 충만하지만 옳은 말 해주던 지선이, 바쁘다고 힘들어하는 날 위해 언제든 와주는 봉쓰타일 수인, 툴툴거리지만 내 생각 많이 해주는 궁금함 많은 은슬이, 내게만은 화도 못내는 욱녀 민지, 고등학교 추억으로 만날 때면 언제나 행복하게 해주는 하나, 기쁨, 슬픔, 행복 그보다 더 많은 감정을 함께 해온 미주, 실험실 생활에 힘든 나와 커피 한잔의 여유를 즐겨주던 망구다은, 그리고 실험실 2년이라는 시간동안 내 곁에서 위로가 되어준 우리 은지, 모두모두 고마운 마음 전합니다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

저작물 이용 허락서

학 과	식품영양학과	학 번	20137042	과 정	석사
성 명	한글 이설화 한문 李設華 영문 Lee seol hwa				
주 소	전남 나주시 금천면 원곡리 229-11번지				
연락처	e-mail : najuli91@hanmail.net				
논문제목	한글: 김치로부터 분리한 항균 활성을 가진 *Leuconostoc mesenteroides* TA의 특성 및 그 항균 물질의 특성 규명 영문: Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* TA isolated from Kimchi harboring antimicrobial activity and its antimicrobial compound				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함(다만, 저작물의 내용변경은 금지함)
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함

: 동의(○) 반대( )

2014 년 11월

저작자 : 이설화 (인)

조선대학교 총장 귀하

Collection @ chosun