



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](#)

2017年 2月
碩士學位 論文

식품미생물 유래 천연항균소재의
식중독균 생육저해 효과와 이의
식품적용

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

權 惠 蘭

식품미생물 유래 천연항균소재의
식중독균 생육저해 효과와 이의
식품적용

Effects of biopreservatives originated from food
microorganisms on food-borne pathogens and their
application into food

2017年 2月 24日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

權 惠 蘭

식품미생물 유래 천연항균소재의
식중독균 생육저해 효과와 이의
식품적용

指導教授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함




2016年 10月

朝鮮大學校 大學院

食 品 營 養 學 科

權 惠 蘭

權惠蘭의 碩士學位論文을 認准함

委員長	조선대학교	교수	<u>이재준</u>	
委員	조선대학교	교수	<u>이주원</u>	
委員	조선대학교	교수	<u>장래준</u>	

2016年 11月

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT	VIII
LIST OF TABLES	IV
LIST OF FIGURES	V
제 1 장 서 론	1
제 2 장 실험재료 및 방법	5
제 1 절 공동배양에 의한 식중독/부패 미생물의 생육저해 효과	5
1. 항균물질 생성균주와 식중독/부패 미생물의 공동배양	5
가. 사용한 균주	5
나. 항균물질 생성균주와 식중독/부패균의 공동배양	8
다. 항균물질 생성균주와 식중독/부패 곰팡이의 공동배양	9
2. 항균물질 생성균주의 배양 상징액과 식중독/부패 미생물의 공동배양	11
가. 항균물질 생성균주의 배양 상징액 (항균물질) 준비	11
나. 배양 상징액 (항균물질)과 식중독/부패균의 공동배양	11
다. 배양 상징액 (항균물질)과 식중독/부패 곰팡이의 공동배양	12
제 2 절 정균/사균 기전 확인	13

1. 배양 상징액 (항균물질) 처리에 의한 식중독/부패 곰팡이의 생육저해 효과	13
2. 형태학적 관찰 (SEM/TEM)	13
제 3 절 항균물질 (배양 상징액)의 식품적용	15
1. 배양 배지에 따른 항세균 활성	15
가. 사용한 균주	15
나. 항균물질 준비	15
다. 배양 배지에 따른 항균물질의 항세균 활성 측정	15
2. 항균물질 적용에 따른 배지 내 <i>E. coli</i> O157:H7의 생육저해 효과	17
가. 항균물질 적용	17
나. 형태학적 관찰 (SEM)	17
3. 항균물질 적용에 따른 신선편의식품 내 <i>E. coli</i> O157:H7의 생육저해 효과	18
가. 실험재료 및 준비	18
나. 항균물질 적용	18
다. <i>E. coli</i> O157:H7의 생육도 측정	18
제 3 장 결과 및 고찰	19
제 1 절 공동배양에 의한 식중독/부패 미생물의 생육저해 효과	19
1. 항균물질 생성균주와 식중독/부패 미생물의 공동배양	19
가. 항균물질 생성균주와 식중독/부패균의 공동배양	19
나. 항균물질 생성균주와 식중독/부패 곰팡이의 공동배양	26

2. 항균물질 생성균주의 배양 상징액과 식중독/부패 미생물의 공동배양	30
가. 배양 상징액 (항균물질)과 식중독/부패균의 공동배양	30
나. 배양 상징액 (항균물질)과 식중독/부패 곰팡이의 공동배양	36
제 2 절 정균/사균 기전 확인	43
1. 배양 상징액 (항균물질) 처리에 의한 식중독/부패 곰팡이의 생육저해 효과	43
2. 형태학적 관찰 (SEM/TEM)	45
가. 식중독 세균	45
나. 식중독/부패 곰팡이	45
제 3 절 항균물질 (배양 상징액)의 식품적용	50
1. 항균물질 적용에 따른 배지 내 <i>E. coli</i> O157:H7의 생육저해 효과	50
가. 배양 배지에 따른 항세균 활성	50
나. 항균물질 적용에 따른 배지 내 <i>E. coli</i> O157:H7의 생육 측정	50
다. 형태학적 관찰 (SEM)	53
2. 항균물질 적용에 따른 신선편의식품 내 <i>E. coli</i> O157:H7의 생육저해 효과	55
제 4 장 결 론	57
제 5 장 참고문헌	62

LIST OF TABLES

Table 1. Number of foodborne illness outbreaks and case by cause substance and year.....	4
Table 2. List of microorganisms used in the study.....	7
Table 3. Co-cultivation condition of antimicrobial compound producing bacteria and food pathogen.....	10
Table 4. List of microorganisms used in the study.....	16
Table 5. Antimicrobial activities of <i>Lb. plantarum</i> AF1 and <i>B. subtilis</i> SN7 producing antimicrobial compounds.....	51

LIST OF FIGURES

Figure 1. Growth inhibition of <i>P. kudriavzevii</i> DY1 with different initial numbers by <i>Lb. plantarum</i> AF1	21
Figure 2. Growth inhibition of <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895 with different initial numbers by <i>Lb. plantarum</i> AF1	22
Figure 3. Growth inhibition of <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895 with different initial numbers by <i>B. subtilis</i> SN7	23
Figure 4. Growth inhibition of <i>S. Typhi</i> ATCC 19430 with different initial numbers by <i>Lb. plantarum</i> HD1	24
Figure 5. Growth inhibition of <i>S. aureus</i> ATCC 29213 with different initial numbers by <i>Lb. plantarum</i> EM	25
Figure 6. Growth inhibition of <i>A. flavus</i> ATCC 22546 with different initial numbers by <i>Lb. plantarum</i> HD1	27
Figure 7. Growth inhibition of <i>A. fumigatus</i> ATCC 96918 with different initial numbers by <i>Lb. plantarum</i> AF1	28
Figure 8. Growth inhibition of <i>A. ochraceus</i> PF-2 with different initial numbers by <i>Lb. plantarum</i> HD1	29
Figure 9. Growth inhibition of <i>P. kudriavzevii</i> DY1 with different initial numbers by <i>Lb. plantarum</i> AF1 culture supernatant	31

- Figure 10. Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 with different initial numbers by *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant..... 32
- Figure 11. Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 with different initial numbers by *B. subtilis* SN7 culture supernatant..... 33
- Figure 12. Growth inhibition of *S. Typhi* ATCC 19430 with different initial numbers by *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant..... 34
- Figure 13. Growth inhibition of *S. aureus* ATCC 29213 with different initial numbers by *Lb. plantarum* EM culture supernatant..... 35
- Figure 14. Growth inhibition of *A. flavus* ATCC 22546 spore with different initial numbers by *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant..... 37
- Figure 15. Growth inhibition of *A. fumigatus* ATCC 96918 spore with different initial numbers by *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant..... 38
- Figure 16. Growth inhibition of *A. ochraceus* PF-2 spore with different initial numbers by *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant... 39
- Figure 17. Growth of the inoculated *A. flavus* ATCC 22546 hyphae in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant..... 40
- Figure 18. Growth of the inoculated *A. fumigatus* ATCC 96918 hyphae in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant..... 41

Figure 19. Growth of the inoculated *A. ochraceus* PF-2 hyphae in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant..... 42

Figure 20. Growth of the inoculated pathogenic molds in LAB culture supernatant..... 44

Figure 21. Scanning electron photomicrographs of pathogenic bacteria..... 46

Figure 22. Scanning electron photomicrographs of pathogenic molds..... 47

Figure 23. Transmission electron photomicrographs of pathogenic bacteria.. 48

Figure 24. Transmission electron photomicrographs of pathogenic molds..... 49

Figure 25. Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 treatment of antimicrobial compounds in LB broth..... 52

Figure 26. Scanning electron photomicrographs of *E. coli* O157:H7 cells..... 54

Figure 27. Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 (initial about 2 log CFU/g) with antimicrobial compounds in salad..... 56

ABSTRACT

Effects of biopreservatives originated from food microorganisms on food-borne pathogens and their application into food

Kwon, Hye Ran

Adviser : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

Lactobacillus plantarum AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM and *Bacillus subtilis* SN7 were isolated from Kimchi and Meju. Growth inhibitory effects of lactic acid bacteria and *Bacillus subtilis* producing antimicrobial compounds on food pathogens were investigated using co-cultivation technique; growth of the pathogenic molds and bacteria were completely inhibited within 12~36 hr, whereas growth of yeast was completely inhibited after 48 hr of incubation by treatment of LAB. Reduction of *E. coli* O157:H7 cell growth (2 log CFU/mL) was observed at 24 hr by treatment of *B. subtilis*. However, growth of LAB and *B. subtilis* were not affected by co-cultivation with the pathogens.

When hyphae and spores of molds were treated with culture supernatant of the LAB, the growth of hyphae and germination of spores were inhibited. Growth of the pathogenic bacteria was completely inhibited within 4 hr and reduction of yeast cell growth (2 log CFU/mL) was observed at 48 hr by treatment of the LAB culture supernatant. When *E. coli* O157:H7 was treated with *B. subtilis* culture supernatant, cell growth

of the *E. coli* O157:H7 was not inhibited. After the hyphae and spores were treated with the LAB supernatant, they were inoculated into the culture medium (MEB), and then their growth was observed. None of growth of hyphae or spore was observed after this treatment. When the molds and bacteria were treated with the LAB supernatant, outer cell wall of the mold was shrunked or damaged and cytoplasmic space was empty. Moreover, deformation of cell shape and empty hole in cytoplasmic space from the treated bacteria were observed by SEM and TEM observation.

To investigate inhibitory effect of antimicrobial substance on *E.coli* O157:H7, salad was prepared using mix of *Lb. plantarum* AF1 and *B. subtilis* SN7 culture supernatant and additionally inoculation of *E. coli* O157:H7 with 1~2 log CFU/g. Salads were stored at 37°C, 15°C, and 4°C for 1 day, 2 days, and 3 days, respectively. As a result, when the antimicrobials were mixed and stored at 4°C for 3 days, the growth inhibition of *E. coli* O157:H7 was the largest.

This study suggested an alternative to chemical preservatives such as natural food preservative derived from GRAS microorganisms.

제 1 장 서 론

일인당 국민소득의 증가와 함께 건강과 안전에 대한 관심이 높아지고 여성의 사회진출이 늘어나면서 편리성에 대한 요구가 증대됨에 따라 신선편의식품 시장이 점차 발전하게 되었다. ‘신선편의식품’이란 ‘농·임산물을 세척, 박피, 절단 또는 세절 등의 가공공정을 거치거나 이에 단순히 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로서 그대로 섭취할 수 있는 샐러드, 새싹채소 등의 식품’을 말한다[60]. 신선편의식품의 제조공정 특성 상, 가열처리나 살균공정을 거치지 않고 최소가공 공정을 통해 제품화되므로 세척이나 포장 등 유통과정에서 위생적으로 주의하지 않을 경우, 미생물의 오염에 쉽게 노출되어 식중독 발생 위험이 커지게 된다[1, 8, 20, 38].

‘식중독’이란, ‘식품의 섭취로 인하여 인체에 유해한 미생물 또는 유독 물질에 의하여 발생하였거나 발생한 것으로 판단되는 감염성 또는 독소 질환’을 말한다[58]. 식중독은 미생물 식중독과 자연독 식중독, 화학적 식중독으로 분류가 되며 이 중 미생물 식중독이 가장 많이 발생되고 있다. 연도별 원인물질에 따른 미생물 식중독 발생 통계를 보면 2006년부터 2016년까지 대장균과 노로 바이러스에 의한 식중독 발생 건수가 가장 많았으며 다음으로 살모넬라, 황색포도상구균, 클로스트리디움 퍼프린젠스 순서로 발생하는 것으로 나타났다. 특히 최근 병원성 대장균의 경우 발생 양상이 점차 증가하고 있어 식품 안전에 문제가 되고 있다[59] (Table 1).

Escherichia coli (*E. coli*)는 그람 음성의 간균, 통성혐기성균으로 7~50℃의 넓은 온도 범위에서 생육할 수 있으며, 최적 온도는 37℃이다. 생육 가능 pH 범위는 4.4~9.0이며, 최적 pH는 6.0~7.0이다. 일반적으로 사람이나 동물의 위장관에 존재하며, 표면에 존재하는 균체항원 (O 항원), 협막항원 (K 항원), 편모항원 (H 항원)과 각 항원에 특이적인 항체의 면역학적 반응에 따라 혈청형 (serotype)을 구분한다. 대부분의 대장균은 무해하나 일부독성을 생성하는 병원성 대장균을 독소의 종류, 특성에 따라 장출혈성대장균 (EHEC, Enterohaemorrhagic *E. coli*), 장병원성대장균 (EPEC, pathogenic *E. coli*), 장독소형대장균 (ETEC, Enterotoxigenic *E. coli*), 장관흡착성대장균 (EAEC, Enteroaggregative *E. coli*), 장침입성대장균 (EIEC, Enteroinvasive *E. coli*) 5가지로 분류한다. 이 중 장출혈성대장균 (EHEC)은 출혈성 대장염과 용혈성 요독 증후군 (haemolytic uraemic syndrome, HUS)을 동반하는 위해도가 높은 병원성 대장균으로, *E. coli* O157:H7이 대표적이다. 또한 EPEC 및 EHEC의 O157:H7과 같이 Shiga toxin

과 연관된 병원성 대장균을 STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*)로 부르기도 한다 [34]. *E. coli* O157:H7로 인한 식중독은 전 세계적으로 문제가 되고 있다. 2011년 유럽에서 발견된 식중독의 원인균은 STEC에 속하는 것으로 EHEC O104:H4로 밝혀졌으며 원인식품은 유기농 새싹채소였다. 이와 같이 생고기, 덜 익은 육제품, 원유, 오염된 채소 및 과일로부터 *E. coli* O157:H7의 감염이 보고된 바 있다[4, 21, 52].

선진국에서는 신선편의식품 관련법규가 구체적으로 마련되어있어 품질유지 및 위생상 안전성을 확보할 수 있었으나, 국내에서는 2007년이 되어서야 신선편의샐러드·새싹채소 규격 (미생물 기준)이 고시되어 2008년부터 시행되고 있다. 신선편의식품의 미생물을 제어하기 위한 방법으로 온도 조절 및 포장 가공기술이 이용되고 있으며[17] chlorine, sodium hydrochlorite, chlorine dioxide 등 화학적 세척제를 이용한 미생물 제어도 이용되고 있다[8, 14, 25]. 그러나 화학제의 지속적인 사용으로 인해 체내에 잔류되는 등 여러 문제가 야기될 수 있어 소비자들의 기피현상이 커지고 있다[15, 31, 41].

이와 같은 추세에 따라 화학적인 방법이 아닌 천연 향균물질을 이용한 미생물 제어에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. Hexanal, hexyl acetate, (E)-2-hexenal은 휘발성 방향물질로 진균에 효과적이고, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*에 대한 항세균 활성도 있어 천연보존제로 이용될 수 있으며[27], carvacrol과 cinnamic acid을 처리한 과일의 부패 미생물의 제어도 보고된 바 있다[26, 40]. 특히 미생물로부터 유래된 천연항균제의 사회적 요구성 또한 증대되고 있는데, 가장 널리 알려진 생물학적 보존제인 nisin은 항균 스펙트럼이 넓어 치즈나 음료 등 여러 식품에 이용되고 있다[6, 13, 16, 18]. 유산균과 고초균은 인체에 안전한 GRAS (generally recognized as safe) 등급의 미생물로 세계적으로 다양한 발효식품의 형태로 섭취되고 있으며[36], 생균제로서 기능성식품의 개발이나 축산업 등에서도 활용되고 있다[3].

유산균 및 고초균이 생산하는 물질의 항균활성을 측정하는 여러 방법 중 spot-on-the-lawn test[53]와 같이 plate 내에서 항균활성을 측정하는 방법은 지시균의 일부에만 향균물질이 적용되어 지시균이 배양됨에 따라 향균물질의 역가가 점점 줄어드는 한계가 있다. 그러나 공동배양은 broth 전체에 향균물질의 영향이 지속적으로 적용되어 지시균이 저해되는 배양 시간을 알 수 있고, 이는 실제 식품에 향균물질을 적용할 경우 식중독/부패 미생물의 생육 저해를 위한 향균물질의 사용 농도를 정하는 기준이 된다. 또한 식용배지를 이용하여 천연향균물질을 생산하는 경우, 식품첨가물이 아닌 식품원료 자체로 접근하므로 분리·정제 과정을 거치지 않아 비용 면에서 효율적이다.

소비자들의 건강과 위생에 대한 인식이 점차 높아짐에 따라 식중독/부패 미생물로부터 식품의 미생물학적 안전성 확보가 중요한 문제로 대두되고 있고, 이를 해결하기 위해 화학적 식품보존제가 사용되고 있으나 체내 축적과 독성으로 인해 사용량에도 제한이 따르는 등 부작용이 발생하였다. 이를 대체하기 위하여 전통발효식품으로부터 항균활성을 지니는 GRAS 미생물을 분리하여 천연 식품 보존제를 개발하고자 한다.

본 연구에 사용된 균주는 *Lactobacillus plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM, *Bacillus subtilis* SN7으로 선행된 실험을 통하여 김치 및 메주로부터 분리·동정되었고[12, 42, 53, 61], *Lb. plantarum* AF1의 항진균 물질은 3,6-bis(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedion, δ -dodecalactone으로 규명되었으며[54, 55], *Lb. plantarum* HD1의 항진균 물질은 5-oxododecanoic acid, 3-hydroxy decanoic acid, 3-hydroxy-5-dodecenoic acid로 규명되었다[42]. 또한 *Lb. plantarum* EM의 내산성 및 인공담즙 저항성, 항생제 감수성, 콜레스테롤 동화능 등의 특성과 항균활성[12, 56], *B. subtilis* SN7의 안전성 및 효소, 온도, pH에 대한 안정성과 항균활성 등이 규명되었다[30, 61].

본 연구에서는 전통발효식품으로부터 분리된 유산균 및 고초균의 여러 식중독균에 대한 항균활성을 조사한 뒤, 식중독균에 대해 뛰어난 항균활성을 갖는 배양 상정액을 개발 식용배지[57]에서 생산하여 식품에 적용함으로써 천연 식품 보존제로서의 가능성을 확인하였다.

Table 1. Number of foodborne illness outbreaks and case by cause substance and year

원인물질	구분	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	합계
Pathogenic <i>E. coli</i>	Outbreaks	38	62	36	37	28	32	31	31	38	39	27	399
	Illnesses	2,832	1,945	1,278	1,671	1,926	2,109	1,844	1,089	1,784	2,138	959	19,575
<i>Salmonella</i>	Outbreaks	22	42	22	17	27	24	9	13	24	13	12	225
	Illnesses	576	1,497	387	477	677	1,065	147	690	1,416	202	231	7,365
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Outbreaks	25	33	24	12	18	9	11	5	7	5	9	158
	Illnesses	547	634	329	106	223	133	195	40	78	25	241	2,551
<i>Campylobacter</i>	Outbreaks	1	7	6	7	15	13	8	6	18	22	14	117
	Illnesses	53	449	73	405	380	329	639	231	490	805	768	4,622
<i>Staphylococcus aureus</i>	Outbreaks	32	38	15	12	19	10	5	5	15	11	0	162
	Illnesses	1,924	843	556	864	372	323	35	63	195	191	0	5,366
<i>Clostridium perfringens</i>	Outbreaks	2	4	6	5	5	7	13	33	28	15	7	125
	Illnesses	160	81	434	527	171	324	297	516	1,689	394	125	4,718
<i>Bacillus cereus</i>	Outbreaks	5	1	14	0	14	6	6	8	11	6	1	72
	Illnesses	59	50	376	0	401	98	111	112	49	22	16	1,294
Other microorganisms	Outbreaks	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3
	Illnesses	5	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	25
Norovirus	Outbreaks	51	97	69	32	31	31	50	43	46	58	25	533
	Illnesses	3,338	2,345	2,105	568	1,994	1,524	1,665	1,606	739	996	502	17,382
Other Virus	Outbreaks	3	2	1	0	2	3	1	1	4	2	0	19
	Illnesses	33	32	26	0	8	21	22	2	102	9	0	255
Natural poison	Outbreaks	1	3	2	6	6	4	3	1	1	0	0	27
	Illnesses	4	22	50	126	33	27	13	16	5	0	0	296
Chemical substance	Outbreaks	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	4
	Illnesses	14	0	34	0	3	0	0	0	0	0	0	51

출처 : 식품의약품 안전처 식중독 통계시스템. 원인물질별/연도별 식중독 통계. 2016[59]

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 공동배양에 의한 식중독/부패 미생물의 생육저해 효과

1. 항균물질 생성균주와 식중독/부패 미생물의 공동배양

가. 사용한 균주

본 실험에 사용한 항균물질 생성균주인 유산균 3종과 고초균 1종, 식중독/부패 미생물은 Table 2와 같다..

(1) 항균물질 생성균주

유산균 3종은 5 mL MRS (De Man Rogosa Sharpe, Difco, Sparks, MD, USA) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간동안 정치 배양하여 실험에 사용하였다.

고초균 1종은 5 mL TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Sparks, MD, USA) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 37℃에서 24시간동안 진탕 배양하여 실험에 사용하였다.

(2) 세균

식중독 원인균으로 사용된 세균 중 gram 음성균인 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi ATCC 19430은 LB (Luria Bertani; 1% NaCl, 1% Bacto-tryptone, 0.5% Yeast extract) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 진탕 배양하였다. gram 양성균인 *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213은 TSB (Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 진탕 배양하여 실험에 사용하였다.

(3) 곰팡이

식중독/부패 곰팡이인 *A. fumigatus* ATCC 96918, *A. flavus* ATCC 22546는 MEA (Malt Extract Agar, Difco) 배지에 접종하여 30℃에서 3~4일 동안 배양하였고, *A. ochraceus* PF-2는 PDA (Potato Dextrose AGar, Difco) 배지에 접종하여 30℃에서 3~4일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

(4) 효모

부패 미생물인 *Pichia kudriavzevii* DY1은 YPD (2% bacto-peptone, 1% Yeast extract, 2% dextrose) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 진탕 배양하여 실험에 사용하였다.

Table 2. List of microorganisms used in the study

Group	Microorganism	Medium ^a	Incubation temperature	Reference
Antimicrobial compound producing strain	<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1	MRS	30°C	[54]
	<i>Lactobacillus plantarum</i> HD1	MRS	30°C	[42]
	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM	MRS	30°C	[12]
	<i>Bacillus subtilis</i> SN7	TSB	37°C	[61]
Bacteria	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	LB	37°C	[49]
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430	LB	37°C	[35]
	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. aureus</i> ATCC 29213	TSB	37°C	[45]
	Mold	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	MEA	30°C
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918		MEA	30°C	[42]
<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2		PDA	30°C	[42]
Yeast	<i>Pichia kudriavzevii</i> DY1	YPD	30°C	[37]

^aMRS, De Man Rogosa Sharpe; TSB, Tryptic soy Broth; LB, Luria bertani; MEA, Malt Extract Agar; PDA; Potato Dextrose Agar; YPD, Yeast extract Peptone Dextrose

나. 항균물질 생성균주와 식중독/부패균의 공동배양

(1) 항균물질 생성균주

유산균 3종은 5 mL MRS (Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 정치 배양한 후, 원심분리 (8000 × g, 15 min, 4℃)하여 균체를 회수하였다. 고초균 1종은 5 mL TSB (Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 진탕 배양한 후, 원심분리 (8000 × g, 15 min, 4℃)하여 균체를 회수하였다.

(2) 식중독/부패균

식중독 원인균은 5 mL LB 또는 TSB (Difco) 액체 배지에 각각 1% (v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 진탕 배양한 후, 원심분리 (8000 × g, 15 min, 4℃)하여 균체를 회수하였다.

부패균은 5 mL YPD 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 진탕 배양한 후, 원심분리 (8000 × g, 15 min, 4℃)하여 균체를 회수하였다.

(3) 식중독/부패균의 초기 접종 농도 설정

식중독/부패 미생물의 초기균수가 10^6 CFU/mL 이하에서는 대부분의 식품에서 관능적 변화가 일어나지 않지만, 향후 식중독과 같은 문제를 제어하기 식중독/부패 미생물의 초기 접종 농도를 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL의 범위로 설정하였다. 하지만 효모의 경우, 국내 시판 김치의 담금 직후 초기 산막효모의 농도가 약 10^2 CFU/mL임을 근거로 하여 초기 접종 농도를 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL의 범위로 설정하였다[62].

(4) 식중독/부패균 생육저해 활성

항균물질 생성균주와 식중독/부패균을 Table 3의 조건과 같이 공동배양하여 식중독/부패균의 생육저해 효과를 측정하였다.

MRS (Difco) 또는 TSB (Difco) 액체 배지에 항균물질 생성균주의 초기 농도가 약 6.0~7.0 log CFU/mL이 되도록 접종하고 여기에 식중독/부패균을 약 2.0~6.0 log CFU/mL 접종하여 30℃에서 0~24시간동안 정치 또는 진탕 배양하면서 4시간마다 항균물질 생성균주와 식중독/부패균의 생균수를 측정하였다. 항균물질 생성균주는 MRS (Difco) 또는 TSB (Difco) 평판배지에 도말하였고, *E. coli* O157:H7은 SMAC (Macconkey sorbitol agar, Difco), *S. Typhi*는 XLD (Xylose Lysine Desoxycholate, Difco) 평판배지, *S. aureus*는 MSA (Mannitol Salt Phenol, Difco) 평판배지, *P. kudriavzevii* DY1은 YPD 평판배지에 도말하였다. MRS (Difco), YPD 평판배지는 30℃에서, 그 외 배지는 37℃에서 배양하였다. 대조구로는 MRS (Difco) 또는 TSB (Difco) 액체 배지에 항균물질 생성균주를 약 6.0~7.0 log CFU/mL, 식중독/부패균을 약 2.0~6.0 log CFU/mL가 되도록 각각 접종하여 30℃ 또는 37℃에서 정치 또는 진탕 배양한 것으로 하였다.

다. 항균물질 생성균주와 식중독/부패 곰팡이의 공동배양

항균물질 생성균주와 식중독/부패 곰팡이를 Table 3의 조건과 같이 공동배양하여 식중독/부패 곰팡이의 생육저해 효과를 측정하였다.

항균물질 생성균주의 균체를 상기된 방법으로 회수하여 준비하였다. 식중독/부패 곰팡이의 포자는 현미경 (DS-U1, Nikon, Tokyo, Japan)과 haemocytometer (MARIENFELD, Germany)로 포자의 수를 확인하였다. 5 mL MRS (Difco) 액체 배지에 항균물질 생성균주인 유산균 3종을 초기 농도가 약 6.0~7.0 log CFU/mL이 되도록 접종하고, 여기에 식중독/부패 곰팡이를 초기 농도가 약 4.0~6.0 log spores/mL이 되도록 접종하여 30℃에서 0~48시간동안 정치 배양하면서 12시간 간격으로 항균물질 생성균주와 식중독/부패 곰팡이의 생균수를 측정하였다. 항균물질 생성균주는 MRS (Difco) 평판배지에 도말하였고, *A. flavus*와 *A. fumigatus*는 MEA (Difco) 평판배지에 도말하였으며, *A. ochraceus*는 PDA (Difco) 평판배지에 도말하여 30℃에서 배양하였다.

Table 3. Co-cultivation condition of antimicrobial compound producing bacteria and food pathogen

Antimicrobial compound producing bacteria	Food pathogen
<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895 <i>P. kudriavzevii</i> DY1 <i>A. fumigatus</i> ATCC 96918
<i>Bacillus subtilis</i> SN7	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895
<i>Lactobacillus plantarum</i> HD1	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430 <i>A. flavus</i> ATCC 22546 <i>A. ochraceus</i> PF-2
<i>Lactobacillus plantarum</i> EM	<i>S. aureus</i> ATCC 29213

2. 항균물질 생성균주의 배양 상징액과 식중독/부패 미생물의 공동배양

가. 항균물질 생성균주의 배양 상징액 (항균물질) 준비

유산균 3종을 5 mL MRS (Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 동안 정치하여 전배양하였다. 전배양액을 100 mL MRS (Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하고, 다시 30℃에서 24시간 동안 본배양하였다.

고초균 1종을 5 mL TSB (Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 동안 진탕하여 전배양하였다. 전배양액을 50 mL TSB (Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하고, 다시 37℃에서 24시간 동안 본배양하였다.

본배양액을 원심분리 (9950 × g, 15 min, 4℃)하여 얻은 상징액을 유산균 3종은 0.45 μm membrane filter (Advantec MFS, Inc., Japan), 고초균은 0.20 μm membrane filter (Advantec)로 제균하여 실험에 사용하였다.

나. 배양 상징액 (항균물질)과 식중독/부패균의 공동배양

식중독/부패균의 균체를 상기된 방법으로 회수한 뒤, 식중독균은 5 mL 배양 상징액에 초기 농도가 약 4.0~6.0 log CFU/mL이 되도록 접종하여 37℃에서 0~24시간동안 진탕 배양하며, 4시간마다 선별배지에 도말하여 식중독균의 생균수를 측정하였다. 부패균은 5 mL 배양 상징액에 초기 농도가 약 2.0~3.0 log CFU/mL이 되도록 접종하여 30℃에서 0~48시간동안 정치 배양하며, 12시간까지는 6시간 간격으로 도말하고, 그 이후로는 12시간 간격으로 도말하여 효모의 생균수를 측정하였다.

다. 배양 상징액 (항균물질)과 식중독/부패 곰팡이의 공동배양

식중독/부패 곰팡이의 포자와 균사를 각각 접종하였다. 균사의 경우, *A. flavus*와 *A. fumigatus*는 MEA (Difco) 평판배지, *A. ochraceus*는 PDB (Difco) 평판배지에서 자란 곰팡이의 균사를 백금으로 긁어 5 mL MEB (Difco) 또는 PDB (Difco) 액체 배지에 접종하고, 30°C에서 24시간동안 진탕 배양하였다. 배양된 균사를 sonication (VC 130, Sonics Inc., Newtown, USA)을 Amplitude: 60, Pulse: 2 sec, Time: 40 sec 조건으로 시행하여 균질화한 후에 5 mL 배양 상징액에 최종 흡광도 0.05가 되도록 접종하여 0~48시간동안 30°C에서 정치 배양하였다. 생육도를 측정하기 위해 12시간 간격으로 Spectrophotometer (Ultra spec 2100 pro, Amersham Bioscience, Bristol, UK) A₆₀₀에서 흡광도를 측정하였다.

포자는 상기된 방법으로 포자의 수를 확인한 뒤에 5 mL 배양 상징액에 곰팡이 포자의 최종 농도가 약 4.0~6.0 log spores/mL가 되도록 접종하여 30°C에서 0~15일동안 정치 배양하였다. 생육도를 측정하기 위해 3일 간격으로 Spectrophotometer (Amersham Bioscience) A₆₀₀에서 흡광도를 측정하였다.

제 2 절 정균/사균 기전 확인

1. 배양 상징액 (항균물질) 처리에 의한 식중독/부패 곰팡이의 생육저해 효과

식중독/부패 곰팡이 3종에 대한 배양 상징액 (항균물질)의 정균/사균 작용을 확인하기 위해 배양 상징액 5 mL에서 30℃, 24시간동안 처리된 *A. flavus* ATCC 22546, *A. fumigatus* ATCC 96918, *A. ochraceus* PF-2의 균사 및 포자를 회수하여 곰팡이 전용배지인 MEB (Malt Extract Broth, Difco) 액체 배지에 재 접종하였다. 균사의 경우 회수된 전량을, 포자는 곰팡이의 초기 농도를 6.0 log spores/mL로 접종한 처리구에서 회수된 전량을 MEB (Difco)에 접종하였다. 대조구는 5 mL MEB (Difco) 액체 배지에 항균물질이 처리되지 않은 곰팡이 균사 ($A_{600} \approx 0.05$) 및 포자 (6.0 log spores/mL)를 접종한 것으로 하였다. 이를 30℃에서 48시간 진탕 배양 후 사진 촬영하여 생육을 기록하였다.

2. 형태학적 관찰 (SEM/TEM)

배양상징액 (항균물질) 처리에 의한 식중독/부패 미생물의 외부 및 내부의 형태학적 변화를 SEM (Scanning Electron Microscopy)과 TEM (Transmission Electron Microscopy)으로 관찰하기 위해 Kalchayanand 등의 방법을 일부 변형한 전처리 과정을 시행하였다[24].

100 mL 배양 상징액에 식중독/부패 미생물을 접종하고 37℃에서 24시간 진탕 배양한 뒤 원심분리 (9,950 × g, 5 min, 4℃)하여 균체를 회수하였다. 얻어진 균체를 PBS (Phosphate Buffered Saline, GE Healthcare Hyclone, Korea)로 3회 수세한 후 2.5% (v/v) glutaraldehyde (pH 7.4, Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)로 4시간동안 전고정 시켰다. 전고정 된 시료를 pH 7.4의 0.1 M sodium cacodylate buffer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)로 상온에서 15분씩 방치하여 3회 수세한 후 1% (v/v) osmium tetroxide (OsO_4 , Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)를 넣어 2시간 동안 후고정하였다. 다시 0.1 M sodium cacodylate buffer

(Sigma-Aldrich)로 상온에서 15분씩 방치하여 3회 수세한 후 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% (v/v) 농도의 에탄올을 이용하여 순차적으로 10분씩 탈수과정을 거친 다음 최종 100% 에탄올로 탈수과정을 3회 반복하였다.

SEM 시료를 만들기 위해 *tert*-butanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)로 15분씩 총 3회 치환한 다음, desicator에서 하루 동안 건조시켰다. 건조된 시료를 이온 코팅기 (E-1030, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 진공상태에서 백금으로 100초간 코팅한 후, FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope S-4700, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

TEM 시료를 만들기 위해 에탄올을 이용하여 순차적인 탈수과정을 거친 후, 포매 과정은 Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma-Aldrich)를 이용하여 60°C에서 28시간동안 처리하였다. 시료는 ultra-microtome (Leica EM UC6, Bensheim, Germany)을 이용하여 절편 제작 후, uranyl acetate (Sigma-Aldrich)와 lead citrate (Sigma)로 염색한 다음 JEOL CXII Bio Transmission Electron Microscope를 이용하여 관찰하였다. 대조구로는 식중독/부패 미생물의 배양액으로 위와 동일한 방법으로 전처리하였다.

제 3 절 항균물질 (배양 상징액)의 식품적용

1. 배양 배지에 따른 항세균 활성

가. 사용한 균주

본 실험에 사용한 항균물질 생성균주 2종과 감수성 균주 1종을 Table 4에 정리하였다.

나. 항균물질 준비

5 mL MRS (Difco) 또는 TSB (Difco) 액체 배지에 항균물질 생성균주를 1% (v/v) 접종하고, Table 4의 조건대로 전배양하였다. 전배양액을 100 mL MRS (Difco) 액체배지와 개발 식용배지에 각각 1% (v/v) 접종하여 배양한 후, 본배양액을 원심분리 (8000 × g, 15 min, 4°C)하여 얻은 상징액을 0.45 μm 또는 0.20 μm membrane filter (Advantec MFS, Inc., Japan)로 채균하였다. 채균된 상징액은 동결건조 (freeze dry system, SFDSM12, Samwon, Busan, Korea)한 후, *Lb. plantarum* AF1의 상징액은 20 mM sodium acetate (pH 4.0) 완충용액에 녹여 5 배 농축 배율로 준비하였고, *B. subtilis* SN7의 상징액은 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)에 녹여 준비하였다.

다. 배양 배지에 따른 항균물질의 항세균 활성 측정

시판 배지와 개발 식용배지에 따른 항균물질의 *E. coli* O157:H7에 대한 활성을 조사하였다. 항세균 활성의 측정은 spot-on-the-lawn test 방법[53]을 사용하였다. *E. coli* O157:H7를 LB 평판배지에 1.0×10⁶ CFU/plate로 도말하여 준비하였고 항균물질 10 μL를 배지에 spotting한 후, 37°C에서 15~16시간 배양하여 활성을 측정하였다.

Table 4. List of microorganisms used in the study

Group	Microorganism	Medium ^a	Incubation temperature	Reference
Antimicrobial compound producing strain	<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1	MRS	30°C	[54]
	<i>Bacillus subtilis</i> SN7	TSB	37°C	[61]
Sensitive bacteria	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	LB	37°C	[49]

^aMRS, De Man Rogosa Sharpe; TSB, Tryptic soy Broth; LB, Luria bertani

2. 항균물질 적용에 따른 배지 내 *E. coli* O157:H7의 생육저해 효과

가. 항균물질 적용

5 mL LB 액체 배지에 *E. coli* O157:H7를 각각 1 log CFU/mL, 2 log CFU/mL로 접종하고, 개발 식용배지에서 배양한 *Lb. plantarum* AF1 배양 상징액 3%, *B. subtilis* SN7 배양 상징액 1%를 각각 단독 처리하거나, *Lb. plantarum* AF1 배양 상징액 3%와 *B. subtilis* SN7의 배양 상징액 1%를 혼합하여 처리하고 37°C에서 정지 배양하였다. 이를 0~24시간까지 8시간 간격으로 spectrophotometer (Amersham Bioscience) A₆₀₀에서 흡광도를 측정함으로써 *E. coli* O157:H7의 생육도를 확인하였다. 대조구로는 5 mL LB 액체 배지에 *E. coli* O157:H7를 각각 1 log CFU/mL, 2 log CFU/mL를 접종한 것으로 하였다.

나. 형태학적 관찰 (SEM)

항균물질의 단독 또는 혼합 처리에 의한 *E. coli* O157:H7 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 Kalchayanand 등의 방법을 일부 변형한 전처리 과정을 거쳐 SEM (Scanning Electron Microscopy)으로 확인하였다[24].

단독 처리는 개발 식용배지에서 배양한 *Lb. plantarum* AF1 배양 상징액과 *B. subtilis* SN7 배양 상징액을 각각 사용하였고, 혼합 처리는 *Lb. plantarum* AF1 상징액과 *B. subtilis* SN7 상징액을 3:1 비율로 혼합하여 사용하였다. 실험구는 100 mL의 배양 상징액 (단독/혼합)에 *E. coli* O157:H7를 접종하였고, 대조구는 100 mL LB 액체 배지에 *E. coli* O157:H7를 접종하여 37°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 전처리 과정은 상기된 방법과 동일하게 시행하였다.

3. 항균물질 적용에 따른 신선편의 식품 내 *E. coli* O157:H7의 생육저해 효과

가. 실험재료 및 준비

전남 광주 광역시 남구 소재의 대형할인매장에서 양상추, 로메인, 적채, 레드치커리, 양배추, 청경채, 비타민, 적근대가 혼합되어있는 salad를 구입하여 사용하였다. 구입한 salad는 흐르는 수돗물에 2회 세척한 후, 여러 종류의 야채가 고루 혼합되도록 플라스틱 용기에 50 g씩 소분하여 실험에 사용하였다.

나. 항균물질 적용

50 g의 salad에 *E. coli* O157:H7을 약 1~2 log CFU/g 으로 접종한 뒤, 개발 식용배지에서 배양한 *Lb. plantarum* AF1 배양 상징액 3%, *B. subtilis* SN7 배양 상징액 1%를 단독 처리한 구간과 *Lb. plantarum* AF1 배양 상징액 3%와 *B. subtilis* SN7 배양 상징액 1%를 혼합하여 처리한 구간으로 나누어 진행하였다. 모든 시료는 냉장온도인 4°C, 여름철 매대 온도인 15°C, *E. coli* O157:H7의 최적 온도인 37°C에서 실험을 진행하였다. 저장기간은 육안으로 관찰하였을 때 실제 섭취 가능하다고 판단되는 기간으로 설정하여 4°C는 3일, 15°C는 2일, 37°C는 1일까지 저장하였다. 대조구로는 50 g의 salad에 *E. coli* O157:H7를 약 1~2 log CFU/g 접종한 것과 50 g의 salad에 *E. coli* O157:H7를 약 1~2 log CFU/g 접종 후 기존 천연 보존제 중 하나인 주정을 1% 처리한 것으로 하였다.

다. *E. coli* O157:H7의 생육도 측정

50 g의 salad에 멸균수 25 mL를 가한 후, 균질기 (HHM-600, Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 1분간 마쇄한 뒤, 멸균된 거즈로 시료를 거른 후 시험용액 1 mL를 취하여 멸균수 9 mL에 단계 희석하였다. SMAC (Difco) 평판배지에 각 단계 희석액 100 μ L를 도말하고 37°C에서 24시간 배양한 뒤 집락을 계수하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 공동배양에 의한 식중독/부패 미생물의 생육저해 효과

1. 항균물질 생성균주와 식중독/부패 미생물의 공동배양

가. 항균물질 생성균주와 식중독/부패균의 공동배양

유산균 3종 (*Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM)과 고초균 1종 (*B. subtilis* SN7)의 식중독/부패균에 대한 생육 저해 활성을 조사하였다(Fig. 1~5). 유산균 3종은 단독배양과 공동배양 간의 생육에 차이 없이 약 9.0 log CFU/mL로 높은 생균수를 나타내었고, 고초균 1종 또한 단독배양과 공동배양 간의 생육에 차이 없이 약 8.0 log CFU/mL의 생균수를 나타내었다.

P. kudriavzevii DY1은 단독배양 시 배양 시간의 경과에 따라 생육이 증가하여 배양 48시간에 최대 생육도 (6.5~6.7 log CFU/mL)를 나타내었으나, *Lb. plantarum* AF1과 공동배양한 결과, *P. kudriavzevii* DY1의 2.0 log CFU/mL, 3 log CFU/mL 접종 구간 모두 배양 48시간에 *P. kudriavzevii* DY1의 생육이 완전히 저해되었다(Fig. 1).

E. coli O157:H7은 *Lb. plantarum* AF1과 *B. subtilis* SN7에 대해 각각 공동배양을 진행하였다. *Lb. plantarum* AF1과의 공동배양에서 *E. coli* O157:H7을 단독배양 시 배양 시간의 경과에 따라 생육이 증가하여 배양 24시간에 최대 생육도 (8.1~8.5 log CFU/mL)를 나타내었으나, *Lb. plantarum* AF1과 공동배양 결과, 4.0 log CFU/mL 접종 시 배양 20시간에 생육이 완전히 저해되었고, 5.0 log CFU/mL, 6 log CFU/mL 접종 시 배양 24시간에 *E. coli* O157:H7의 생육이 완전히 저해되었다(Fig. 2). 그러나 *B. subtilis* SN7과 공동배양에서는 *E. coli* O157:H7을 단독배양 시 배양 시간의 경과에 따라 생육이 증가하여 약 9.0 log

CFU/mL의 높은 생균수를 보였고, *B. subtilis* SN7과 공동배양 시, *E. coli* O157:H7의 가장 낮은 농도인 4.0 log CFU/mL로 접종한 구간에서도 생육이 완전히 저해되지 않고, 대조구에 비해 ≈ 2.0 log CFU/mL 정도만 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 3).

*S. Typhi*은 단독배양 시 배양 시간의 경과에 따라 생육이 증가하여 배양 24시간에 최대 생육도 (8.1~8.6 log CFU/mL)를 나타내었으나, *Lb. plantarum* HD1과 공동배양 결과, 4.0 log CFU/mL, 5.0 log CFU/mL 접종 시 배양 20시간에 생육이 완전히 저해되었고, 6.0 log CFU/mL 접종 시 배양 24시간에 생육이 완전히 저해되었다(Fig. 4).

*S. aureus*은 단독배양 시 배양시간의 경과에 따라 생육이 증가하여 배양 24시간에 최대 생육도 (8.0~8.5 log CFU/mL)를 나타내었으나, *Lb. plantarum* EM과 공동배양 결과, 모든 접종 구간에서 배양 20시간에 *S. aureus*의 생육이 완전히 저해되었다(Fig. 5).

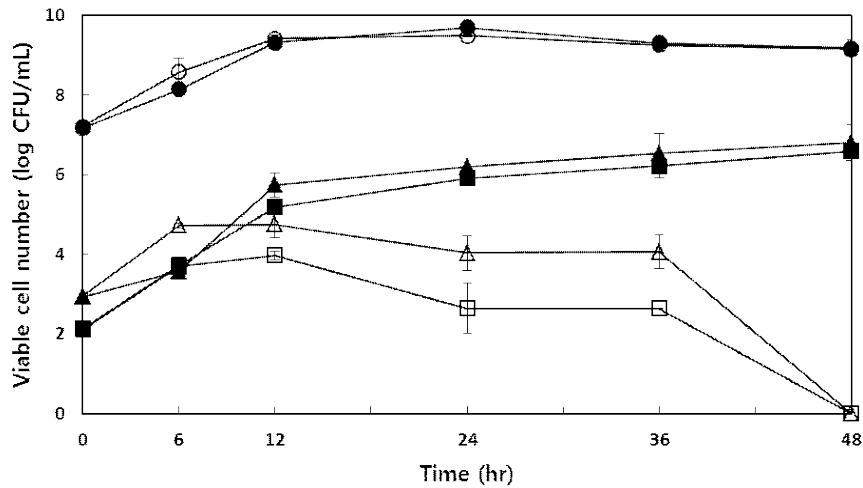


Figure 1. Growth inhibition of *P. kudriavzevii* DY1 with different initial numbers by *Lb. plantarum* AF1

- , *Lb. plantarum* AF1 (initial about 7 log CFU/mL) without *P. kudriavzevii* DY1 inoculation
- , *P. kudriavzevii* DY1 (initial about 2 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* AF1 inoculation
- ▲, *P. kudriavzevii* DY1 (initial about 3 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* AF1 inoculation
- , *Lb. plantarum* AF1 (initial about 7 log CFU/mL) with *P. kudriavzevii* DY1 co-culture
- , *P. kudriavzevii* DY1 (initial about 2 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* AF1 co-culture
- △, *P. kudriavzevii* DY1 (initial about 3 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* AF1 co-culture

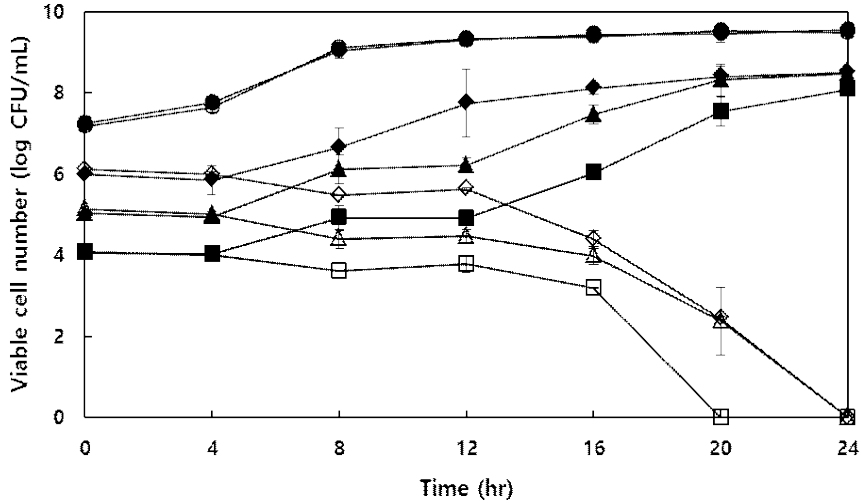


Figure 2. Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 with different initial numbers by *Lb. plantarum* AF1

●, *Lb. plantarum* AF1 (initial about 7 log CFU/mL) without *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 inoculation

■, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (initial about 4 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* AF1 inoculation

▲, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (initial about 5 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* AF1 inoculation

◆, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (initial about 6 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* AF1 inoculation

○, *Lb. plantarum* AF1 (initial about 7 log CFU/mL) with *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 co-culture

□, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (initial about 4 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* AF1 co-culture

△, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (initial about 5 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* AF1 co-culture

◇, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (initial about 6 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* AF1 co-culture

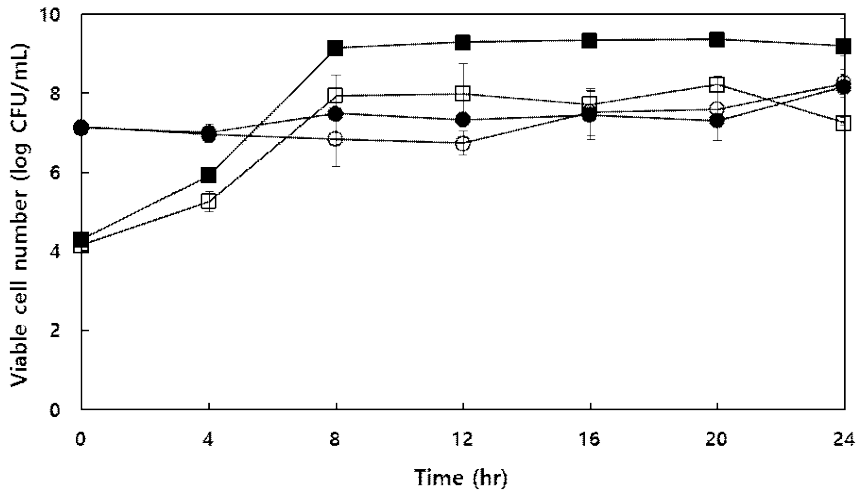


Figure 3. Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 with different initial numbers by *B. subtilis* SN7

●, *B. subtilis* SN7 (initial about 7 log CFU/mL) without *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 inoculation

■, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (initial about 4 log CFU/mL) without *B. subtilis* SN7 inoculation

○, *B. subtilis* SN7 (initial about 7 log CFU/mL) with *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 co-culture

□, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (initial about 4 log CFU/mL) with *B. subtilis* SN7 co-culture

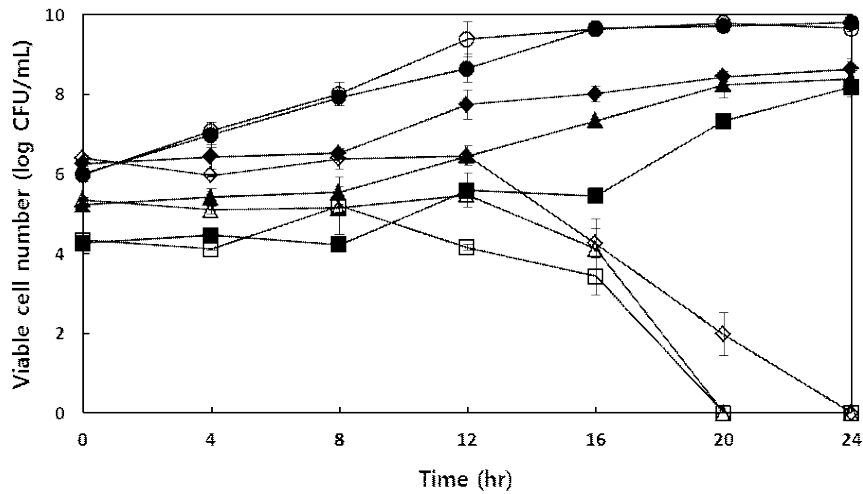


Figure 4. Growth inhibition of *S. Typhi* ATCC 19430 with different initial numbers by *Lb. plantarum* HD1

- , *Lb. plantarum* HD1 (initial about 6 log CFU/mL) without *S. Typhi* ATCC 19430 inoculation
- , *S. Typhi* ATCC 19430 (initial about 4 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* HD1 inoculation
- ▲, *S. Typhi* ATCC 19430 (initial about 5 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* HD1 inoculation
- ◆, *S. Typhi* ATCC 19430 (initial about 6 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* HD1 inoculation
- , *Lb. plantarum* HD1 (initial about 6 log CFU/mL) with *S. Typhi* ATCC 19430 co-culture
- , *S. Typhi* ATCC 19430 (initial about 4 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* HD1 co-culture
- △, *S. Typhi* ATCC 19430 (initial about 5 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* HD1 co-culture
- ◇, *S. Typhi* ATCC 19430 (initial about 6 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* HD1 co-culture

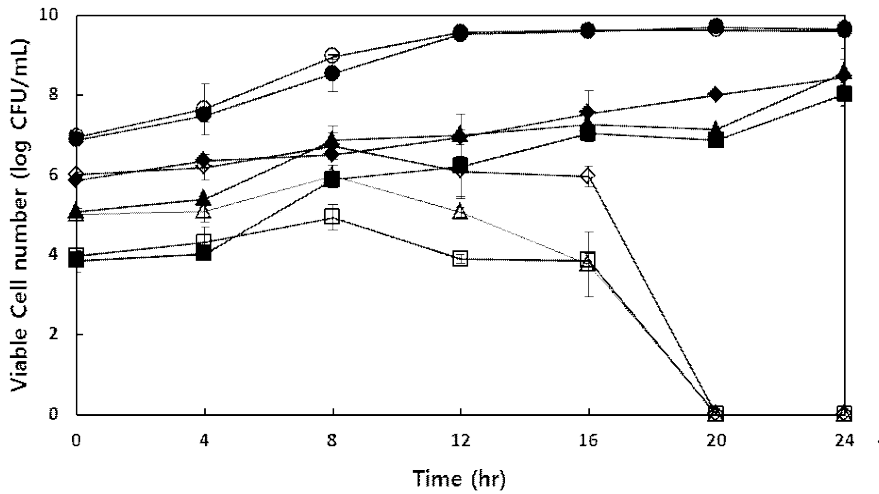


Figure 5. Growth inhibition of *S. aureus* ATCC 29213 with different initial numbers by *Lb. plantarum* EM

●, *Lb. plantarum* EM (initial about 7 log CFU/mL) without *S. aureus* ATCC 29213 inoculation

■, *S. aureus* ATCC 29213 (initial about 4 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* EM inoculation

▲, *S. aureus* ATCC 29213 (initial about 5 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* EM inoculation

◆, *S. aureus* ATCC 29213 (initial about 6 log CFU/mL) without *Lb. plantarum* EM inoculation

○, *Lb. plantarum* EM (initial about 7 log CFU/mL) with *S. aureus* ATCC 29213 co-culture

□, *S. aureus* ATCC 29213 (initial about 4 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* EM co-culture

△, *S. aureus* ATCC 29213 (initial about 5 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* EM co-culture

◇, *S. aureus* ATCC 29213 (initial about 6 log CFU/mL) with *Lb. plantarum* EM co-culture

나. 항균물질 생성균주와 식중독/부패 곰팡이의 공동배양

항균물질 생성균주 2종 (*Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1)의 식중독/부패 곰팡이에 대한 생육 저해 활성을 조사하였다(Fig. 6~8). 항균물질 생성균주는 식중독/부패 곰팡이와의 공동배양에 영향을 받지 않아 단독배양과 공동배양간의 생육에 차이 없이 배양 24~48시간에 약 9.0 log CFU/mL의 생균수를 나타내었다. 또한 식중독/부패 곰팡이 3종은 단독배양 시 배양시간의 경과에 따라 생육이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 *Lb. plantarum* HD1과 *A. flavus* ATCC 22546 포자를 공동배양 시 배양 24시간 (4.0~5.0 log spores/mL 접종 시)에서 36시간 (6.0 log spores/mL 접종 시)에 *A. flavus* ATCC 22546의 생육이 완전히 저해되었고, *Lb. plantarum* AF1과 *A. fumigatus* ATCC 96918 포자를 공동배양 시 *A. fumigatus* ATCC 96918은 배양 24시간 (4.0~5.0 log spores/mL 접종 시)에서 36시간 (6.0 log spores/mL 접종 시)에 생육이 완전히 저해되었다. *Lb. plantarum* HD1과 *A. ochraceus* PF-2 포자를 공동배양 시 배양 12시간 (4.0~5.0 log spores/mL 접종 시)에서 24시간 (6.0 log spores/mL 접종 시)에 *A. ochraceus* PF-2의 생육이 완전히 저해되었다.

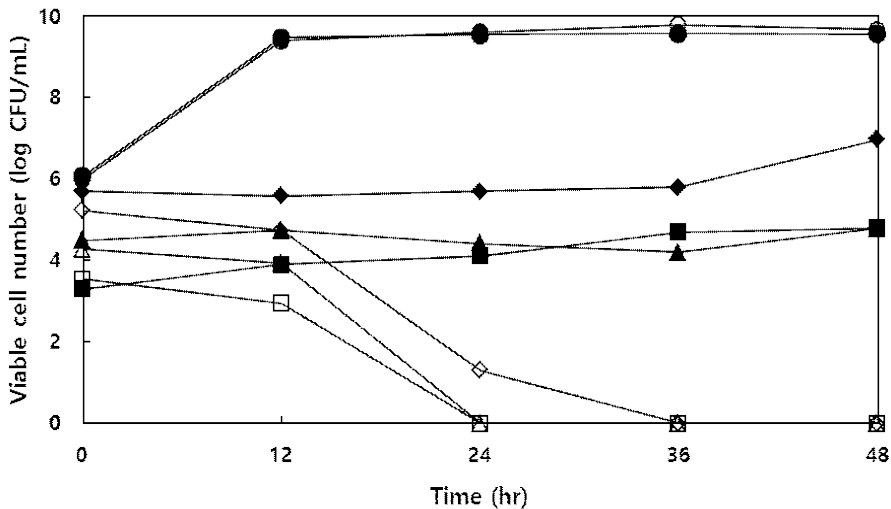


Figure 6. Growth inhibition of *A. flavus* ATCC 22546 with different initial numbers by *Lb. plantarum* HD1

●, *Lb. plantarum* HD1 (initial about 6 log CFU/mL) without *A. flavus* ATCC 22546 inoculation

■, *A. flavus* ATCC 22546 (initial about 4 log spore/mL) without *Lb. plantarum* HD1 inoculation

▲, *A. flavus* ATCC 22546 (initial about 5 log spore/mL) without *Lb. plantarum* HD1 inoculation

◆, *A. flavus* ATCC 22546 (initial about 6 log spore/mL) without *Lb. plantarum* HD1 inoculation

○, *Lb. plantarum* HD1 (initial about 6 log CFU/mL) with *A. flavus* ATCC 22546 co-culture

□, *A. flavus* ATCC 22546 (initial about 4 log spore/mL) with *Lb. plantarum* HD1 co-culture

△, *A. flavus* ATCC 22546 (initial about 5 log spore/mL) with *Lb. plantarum* HD1 co-culture

◇, *A. flavus* ATCC 22546 (initial about 6 log spore/mL) with *Lb. plantarum* HD1 co-culture

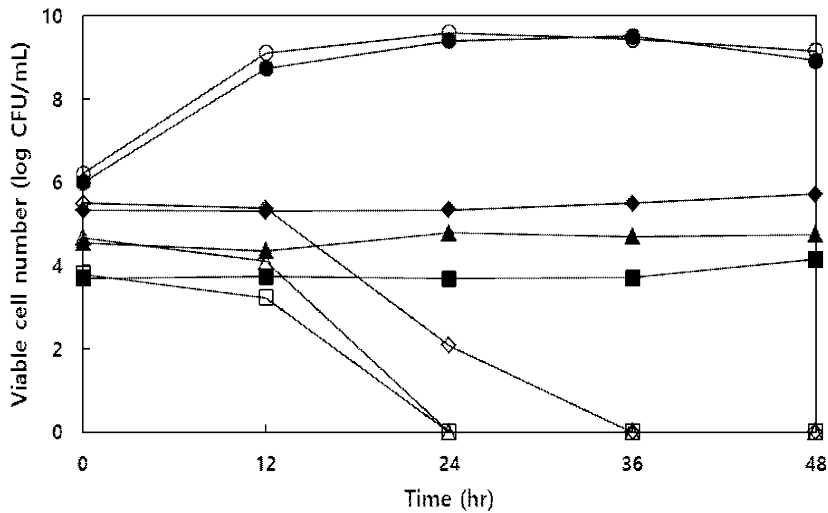


Figure 7. Growth inhibition of *A. fumigatus* ATCC 96918 with different initial numbers by *Lb. plantarum* AF1

- , *Lb. plantarum* AF1 (initial about 6 log CFU/mL) without *A. fumigatus* ATCC 96918 inoculation
- , *A. fumigatus* ATCC 96918 (initial about 4 log spore/mL) without *Lb. plantarum* AF1 inoculation
- ▲, *A. fumigatus* ATCC 96918 (initial about 5 log spore/mL) without *Lb. plantarum* AF1 inoculation
- ◆, *A. fumigatus* ATCC 96918 (initial about 6 log spore/mL) without *Lb. plantarum* AF1 inoculation
- , *Lb. plantarum* AF1 (initial about 6 log CFU/mL) with *A. fumigatus* ATCC 96918 co-culture
- , *A. fumigatus* ATCC 96918 (initial about 4 log spore/mL) with *Lb. plantarum* AF1 co-culture
- △, *A. fumigatus* ATCC 96918 (initial about 5 log spore/mL) with *Lb. plantarum* AF1 co-culture
- ◇, *A. fumigatus* ATCC 96918 (initial about 6 log spore/mL) with *Lb. plantarum* AF1 co-culture

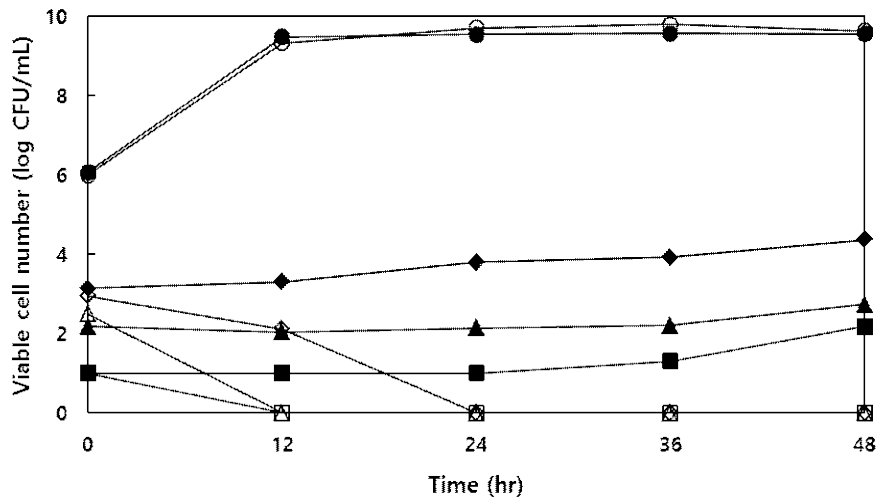


Figure 8. Growth inhibition of *A. ochraceus* PF-2 with different initial numbers by *Lb. plantarum* HD1

- , *Lb. plantarum* HD1 (initial about 6 log CFU/mL) without *A. ochraceus* PF-2 inoculation
- , *A. ochraceus* PF-2 (initial about 4 log spore/mL) without *Lb. plantarum* HD1 inoculation
- ▲, *A. ochraceus* PF-2 (initial about 5 log spore/mL) without *Lb. plantarum* HD1 inoculation
- ◆, *A. ochraceus* PF-2 (initial about 6 log spore/mL) without *Lb. plantarum* HD1 inoculation
- , *Lb. plantarum* HD1 (initial about 6 log CFU/mL) with *A. ochraceus* PF-2 co-culture
- , *A. ochraceus* PF-2 (initial about 4 log spore/mL) with *Lb. plantarum* HD1 co-culture
- △, *A. ochraceus* PF-2 (initial about 5 log spore/mL) with *Lb. plantarum* HD1 co-culture
- ◇, *A. ochraceus* PF-2 (initial about 6 log spore/mL) with *Lb. plantarum* HD1 co-culture

2. 항균물질 생성균주의 배양 상징액과 식중독/부패 미생물의 공동배양

가. 배양 상징액 (항균물질)과 식중독/부패균의 공동배양

유산균 3종 (*Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM)과 고초균 1종 (*B. subtilis* SN7) 배양 상징액 (항균물질)의 식중독/부패균에 대한 생육 저해 활성을 조사하였다. *P. kudriavzevii* DY1은 단독배양 시 배양시간의 경과에 따라 생육이 점차 증가하여 배양 48시간에 최대 생육도 (6.9 log CFU/mL)를 나타내었고, *Lb. plantarum* AF1의 상징액과 공동배양 시 배양 48시간 이후 ≈ 2 log CFU/mL 정도 저해되었다(Fig. 9). *E. coli* O157:H7는 *Lb. plantarum* AF1의 상징액과 *B. subtilis* SN7 상징액에 대한 생육 저해를 각각 확인하였다. *Lb. plantarum* AF1의 상징액과의 공동배양에서 *E. coli* O157:H7을 단독배양 시 배양시간의 경과에 따라 생육이 증가하여 배양 24시간에 최대 생육도 (8.4~8.5 log CFU/mL)를 나타내었으나, *Lb. plantarum* AF1의 상징액과 공동배양 시 배양 4시간에 생육이 완전히 저해되었다(Fig. 10). 그러나 *B. subtilis* SN7과 공동배양에서는 *E. coli* O157:H7을 단독배양 시 배양시간의 경과에 따라 생육이 증가하여 배양 24시간에 최대 생육도 (9.2~9.4 log CFU/mL)를 나타내었고, *B. subtilis* SN7의 상징액과 공동배양 시 생육이 완전히 저해되지 않고, 대조구에 비해 0.3~1.8 log CFU/mL 정도 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 11). *S. Typhi* 은 단독배양 시 생육이 점차 증가하여 배양 24시간에 최대 생육도 (8.2~8.4 log CFU/mL)를 나타내었고, *Lb. plantarum* HD1의 상징액과 공동배양 시 배양 4시간에 생육이 완전히 저해되었다(Fig. 12). *S. aureus*는 단독배양 시 배양 24시간에 최대 생육도 (8.7~8.9 log CFU/mL)를 나타내었고, *Lb. plantarum* EM의 상징액과 공동배양 시 배양 4시간에 생육이 완전히 저해되었다(Fig. 13)

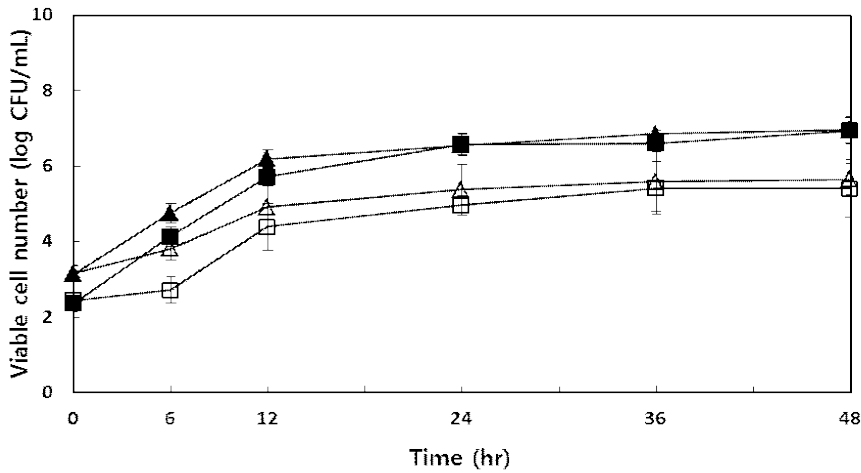


Figure 9. Growth inhibition of *P. kudriavzevii* DY1 with different initial numbers by *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

■, *P. kudriavzevii* DY1 growth (initial about 2 log CFU/mL) in MRS medium

▲, *P. kudriavzevii* DY1 growth (initial about 3 log CFU/mL) in MRS medium

□, *P. kudriavzevii* DY1 growth (initial about 2 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

△, *P. kudriavzevii* DY1 growth (initial about 3 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

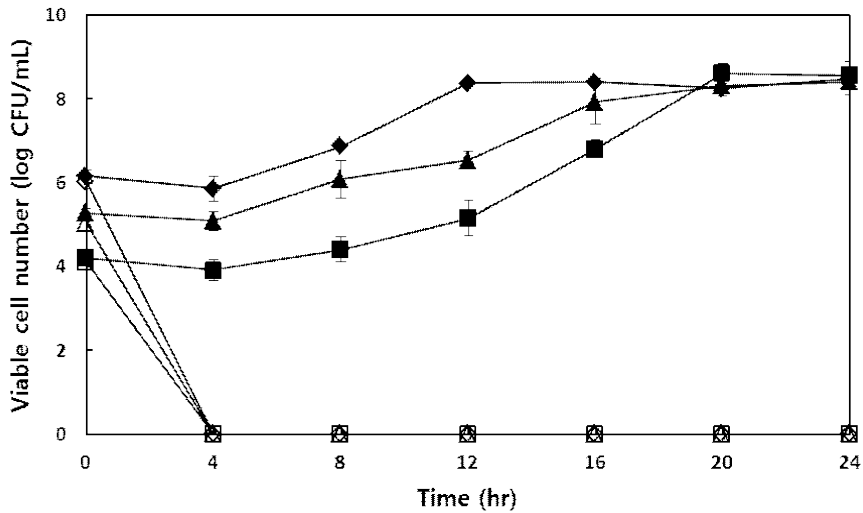


Figure 10. Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 with different initial numbers by *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

■, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 4 log CFU/mL) in MRS medium

▲, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 5 log CFU/mL) in MRS medium

◆, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 6 log CFU/mL) in MRS medium

□, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 4 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

△, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 5 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

◇, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 6 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

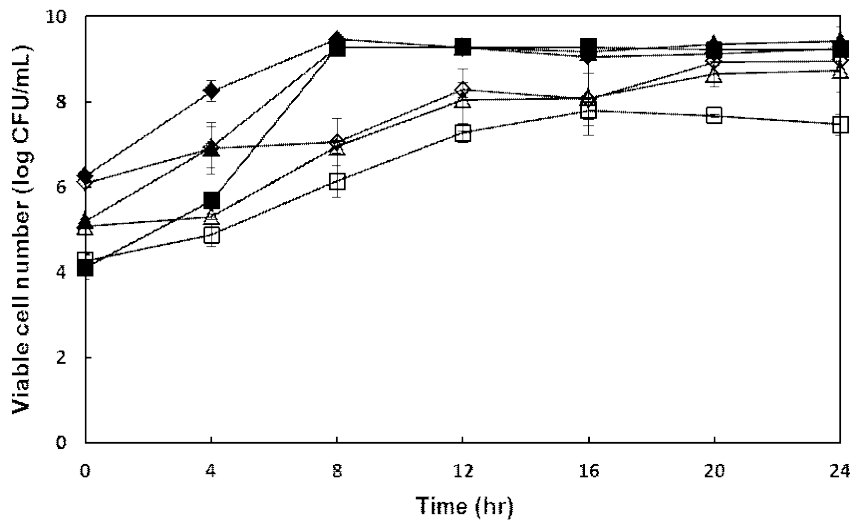


Figure 11. Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 with different initial numbers by *B. subtilis* SN7 culture supernatant

■, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 4 log CFU/mL) in TSB medium

▲, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 5 log CFU/mL) in TSB medium

◆, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 6 log CFU/mL) in TSB medium

□, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 4 log CFU/mL) in *B. subtilis* SN7 culture supernatant

△, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 5 log CFU/mL) in *B. subtilis* SN7 culture supernatant

◇, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 growth (initial about 6 log CFU/mL) in *B. subtilis* SN7 culture supernatant

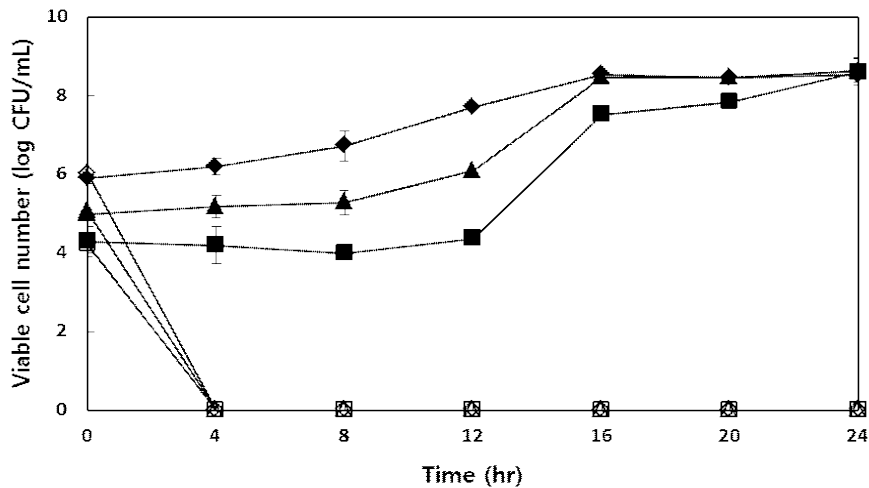


Figure 12. Growth inhibition of *S. Typhi* ATCC 19430 with different initial numbers by *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

■, *S. Typhi* ATCC 19430 growth (initial about 4 log CFU/mL) in MRS medium

▲, *S. Typhi* ATCC 19430 growth (initial about 5 log CFU/mL) in MRS medium

◆, *S. Typhi* ATCC 19430 growth (initial about 6 log CFU/mL) in MRS medium

□, *S. Typhi* ATCC 19430 growth (initial about 4 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

△, *S. Typhi* ATCC 19430 growth (initial about 5 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

◇, *S. Typhi* ATCC 19430 growth (initial about 6 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

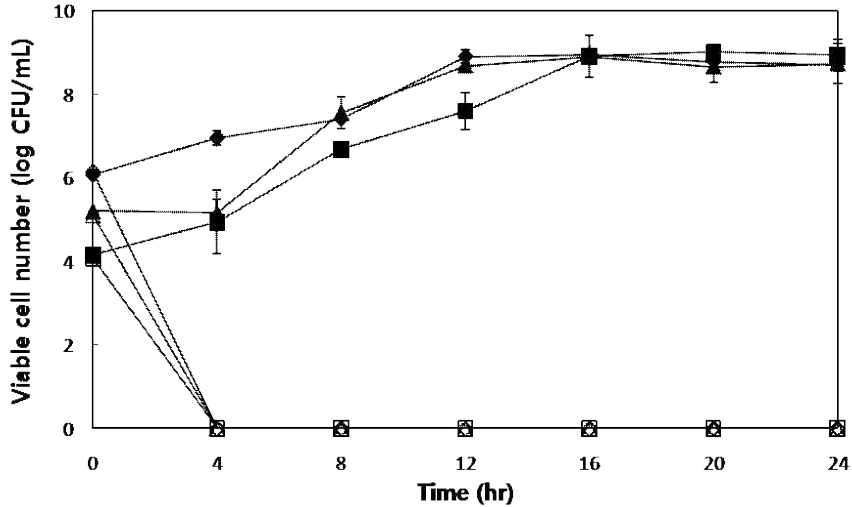


Figure 13. Growth inhibition of *S. aureus* ATCC 29213 with different initial numbers by *Lb. plantarum* EM culture supernatant

■, *S. aureus* ATCC 29213 growth (initial about 4 log CFU/mL) in MRS medium

▲, *S. aureus* ATCC 29213 growth (initial about 5 log CFU/mL) in MRS medium

◆, *S. aureus* ATCC 29213 growth (initial about 6 log CFU/mL) in MRS medium

□, *S. aureus* ATCC 29213 growth (initial about 4 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* EM culture supernatant

△, *S. aureus* ATCC 29213 growth (initial about 5 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* EM culture supernatant

◇, *S. aureus* ATCC 29213 growth (initial about 6 log CFU/mL) in *Lb. plantarum* EM culture supernatant

나. 배양 상징액 (항균물질)과 식중독/부패 곰팡이의 공동배양

유산균 2종 (*Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1) 배양 상징액 (항균물질)의 곰팡이 포자 및 균사에 대한 생육 저해 활성을 조사하였다(Fig. 17~19).

곰팡이 3종의 포자를 4.0~6.0 log spores/mL로 접종 후 단독배양 시 3종 모두 배양시간의 경과에 따라 생육이 점차 증가되었으나, 배양 상징액 (항균물질)에 공동배양한 결과, 포자의 발아가 거의 일어나지 않음을 나타내었다(Fig. 14~16).

곰팡이 3종의 균사를 $A_{600} \approx 0.05$ 로 접종 후 단독배양 시 배양시간의 경과에 따라 생육이 점차 증가되었으나, 배양 상징액 (항균물질)에 공동배양한 결과, 36시간 이후로는 생육이 증가하지 않는 것으로 나타났다.

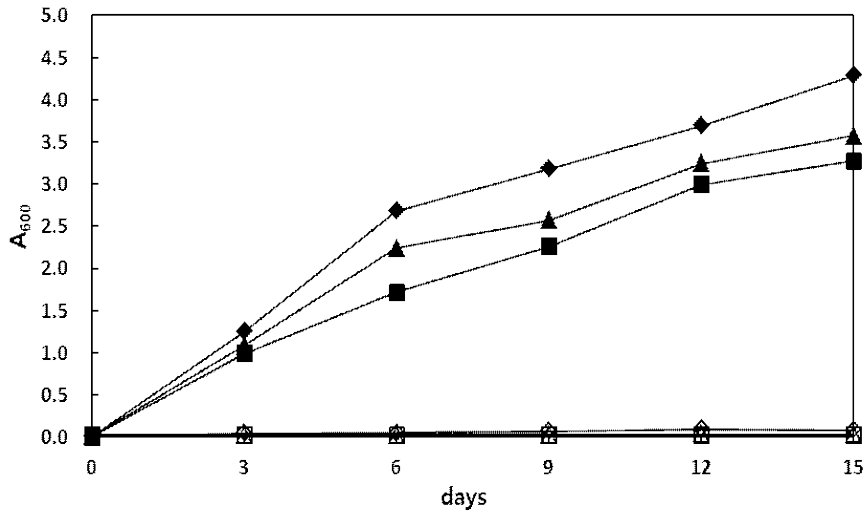


Figure 14. Growth inhibition of *A. flavus* ATCC 22546 spore with different initial numbers by *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

■, *A. flavus* ATCC 22546 growth (initial about 4 log spore/mL) in MRS medium

▲, *A. flavus* ATCC 22546 growth (initial about 5 log spore/mL) in MRS medium

◆, *A. flavus* ATCC 22546 growth (initial about 6 log spore/mL) in MRS medium

□, *A. flavus* ATCC 22546 growth (initial about 4 log spore/mL) in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

△, *A. flavus* ATCC 22546 growth (initial about 5 log spore/mL) in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

◇, *A. flavus* ATCC 22546 growth (initial about 6 log spore/mL) in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

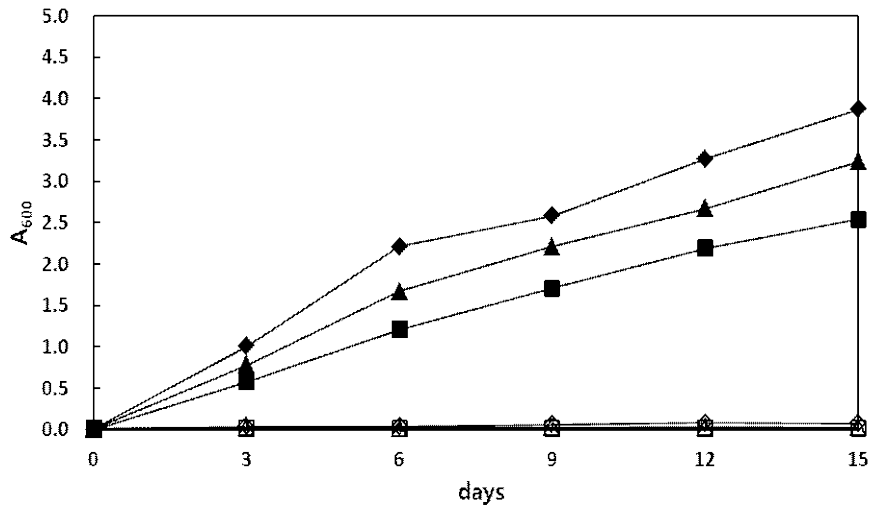


Figure 15. Growth inhibition of *A. fumigatus* ATCC 96918 spore with different initial numbers by *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

■, *A. fumigatus* ATCC 96918 growth (initial about 4 log spore/mL) in MRS medium

▲, *A. fumigatus* ATCC 96918 growth (initial about 5 log spore/mL) in MRS medium

◆, *A. fumigatus* ATCC 96918 growth (initial about 6 log spore/mL) in MRS medium

□, *A. fumigatus* ATCC 96918 growth (initial about 4 log spore/mL) in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

△, *A. fumigatus* ATCC 96918 growth (initial about 5 log spore/mL) in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

◇, *A. fumigatus* ATCC 96918 growth (initial about 6 log spore/mL) in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

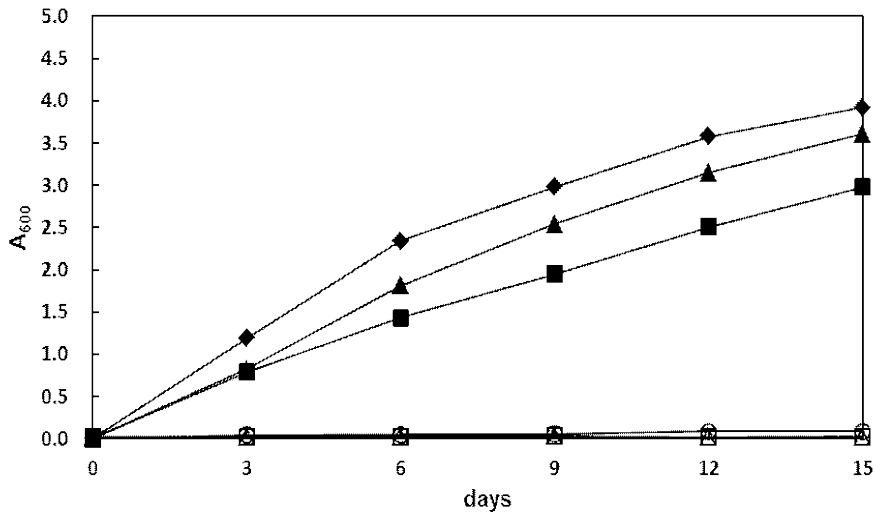


Figure 16. Growth inhibition of *A. ochraceus* PF-2 spore with different initial numbers by *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

- , *A. ochraceus* PF-2 growth (initial about 4 log spore/mL) in MRS medium
- ▲, *A. ochraceus* PF-2 growth (initial about 5 log spore/mL) in MRS medium
- ◆, *A. ochraceus* PF-2 growth (initial about 6 log spore/mL) in MRS medium
- , *A. ochraceus* PF-2 growth (initial about 4 log spore/mL) in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant
- △, *A. ochraceus* PF-2 growth (initial about 5 log spore/mL) in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant
- ◇, *A. ochraceus* PF-2 growth (initial about 6 log spore/mL) in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

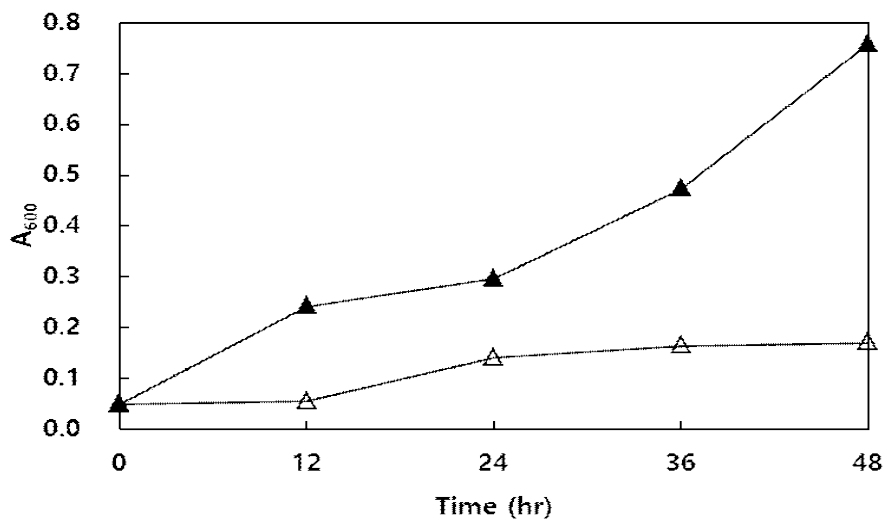


Figure 17. Growth of the inoculated *A. flavus* ATCC 22546 hyphae in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

▲, *A. flavus* ATCC 22546 growth in MRS medium

△, *A. flavus* ATCC 22546 growth in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

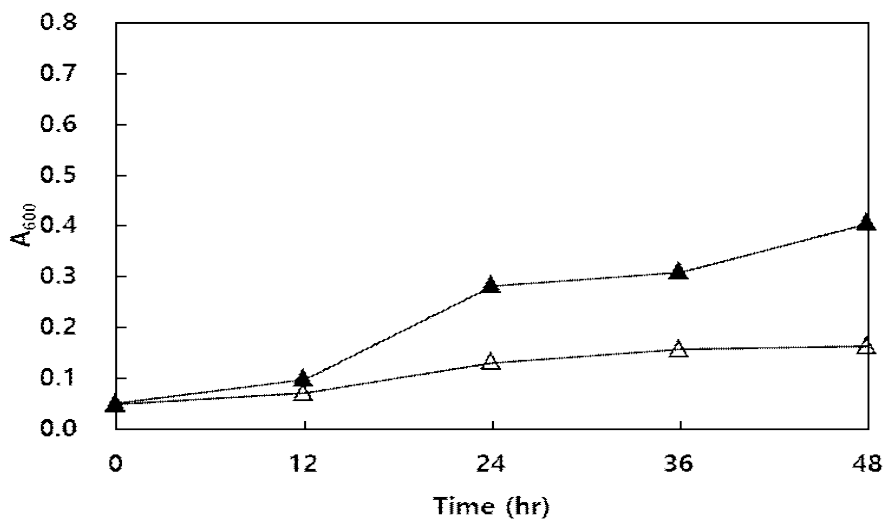


Figure 18. Growth of the inoculated *A. fumigatus* ATCC 96918 hyphae in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

▲, *A. fumigatus* ATCC 96918 growth in MRS medium

△, *A. fumigatus* ATCC 96918 growth in *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

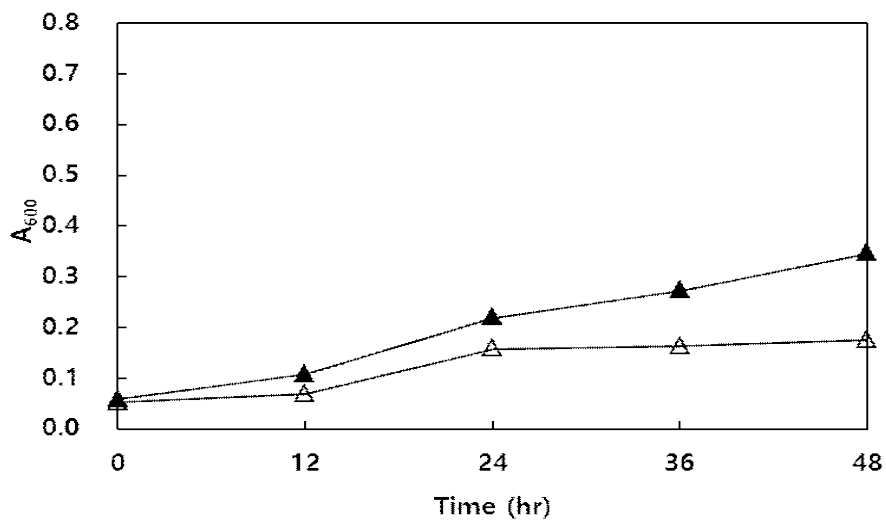


Figure 19. Growth of the inoculated *A. ochraceus* PF-2 hyphae in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

▲, *A. ochraceus* PF-2 growth in MRS medium

△, *A. ochraceus* PF-2 growth in *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

제 2 절 정균/사균 기전 확인

1. 배양 상징액 (항균물질) 처리에 의한 식중독/부패 곰팡이의 생육저해 효과

항균물질의 정균/사균 작용을 규명하기 위해 항균물질 생성균주 2종(*Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1)의 배양 상징액 5 mL에서 30°C, 24시간동안 처리된 곰팡이 3종(*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*)의 균사 및 포자를 5 mL MEB (Difco) 액체 배지에 재접종하여 배양 후 생육도를 확인하였다(Fig. 20). 항균물질이 처리되지 않은 곰팡이 균사와 포자를 접종한 대조구에서는 생육이 잘 나타났으나, 항균물질 처리 후 재접종한 곰팡이 균사와 포자는 생육이 관찰되지 않았다. 이를 통해 항균물질은 곰팡이 3종의 균사 및 포자에 대해 사균작용을 나타냄을 규명하였다.




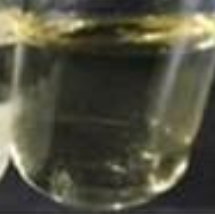
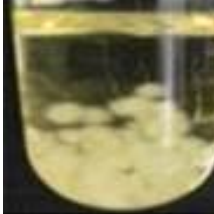

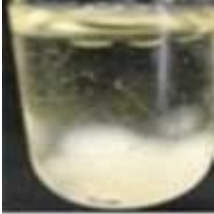

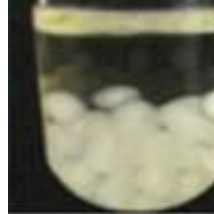
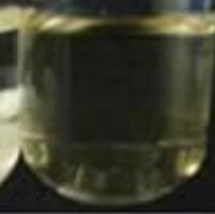

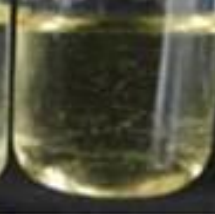
	<i>A. flavus</i> ATCC 22546		<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918		<i>A. ochraceus</i> PF-2	
	Control	After treated with <i>Lb. plantarum</i> HD1 culture supernatant	Control	After treated with <i>Lb. plantarum</i> AF1 culture supernatant	Control	After treated with <i>Lb. plantarum</i> HD1 culture supernatant
Hyphae						
Spore						

Figure 20. Growth of the inoculated pathogenic molds in LAB culture supernatant.

2. 형태학적 관찰 (SEM/TEM)

유산균 3종의 배양 상징액 (항균물질) 처리에 의한 식중독/부패 미생물의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 전처리 과정을 거쳐 SEM과 TEM으로 확인하였다.

가. 식중독 세균

상징액 처리 전 *E. coli* O157:H7은 세포 표면이 매끄러운 데 비해, *Lb. plantarum* AF1의 상징액 처리 후에는 세포가 수축되어 쪼그라들고, 세포 표면 일부의 손상이 관찰되었다.

상징액 처리 전 *S. Typhi*의 세포 표면은 약간 울퉁불퉁하지만 정상적인 형태였으나, *Lb. plantarum* HD1의 상징액 처리 후에는 세포가 심하게 쪼그라들었고, 세포 내 빈공간이 관찰되었다.

상징액 처리 전 *S. aureus*의 세포는 표면이 매끄러운 구균의 형태가 관찰되었으나 *Lb. plantarum* EM의 상징액 처리 후에는 세포막이 파괴되어 세포내용물이 유출되었고, 세포가 와해되는 것으로 관찰되었다(Fig. 21, 23).

Shen 등은[43], 천연항균물질인 cinnamaldehyde는 세포의 외피를 관통하여 직접적인 영향을 줌으로써 *E. coli*와 *S. aureus*의 세포벽 손상, 세포 용해를 일으켜 세포 외부의 구조를 변화시킨다고 보고하였다.

나. 식중독/부패 곰팡이

상징액 처리 전 곰팡이 포자 3종 모두 둥근 포자 형태가 관찰되었고, 포자의 외벽 또한 둥근 형태로 형성되어 있었으나, 상징액 처리 후 포자의 형태가 찌그러졌으며 세포 외벽이 찌그러져 둥근 형태를 상실하였고, 일부는 세포 내 빈공간이 관찰되었다(Fig. 22, 24).

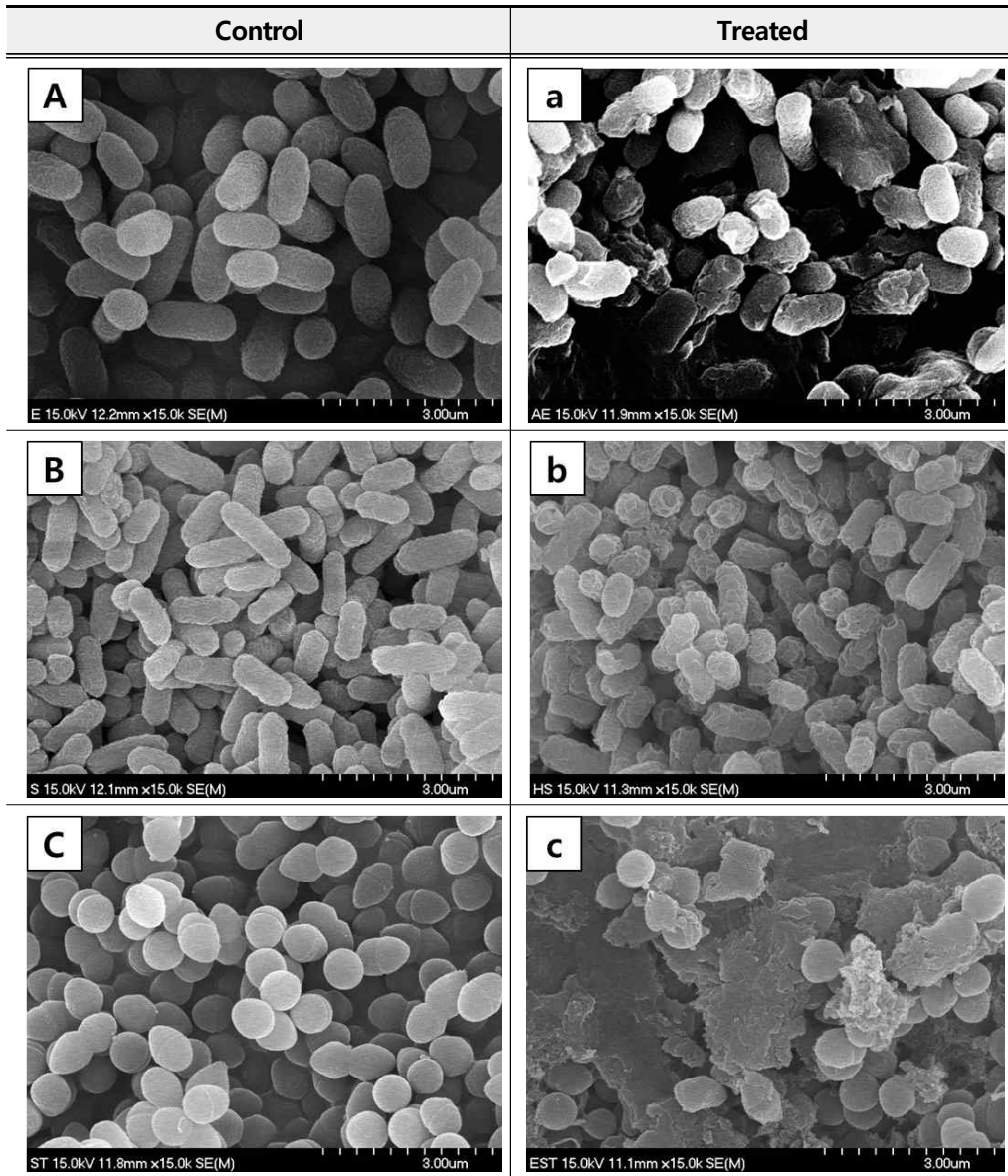


Figure 21. Scanning electron photomicrographs of pathogenic bacteria

A, *E. coli* O157:H7 control; a, *E. coli* O157:H7 was treated with *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant; B, *S. Typhi* control; b, *S. Typhi* was treated with *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant; C, *S. aureus* control; c, *S. aureus* was treated with *Lb. plantarum* EM culture supernatant

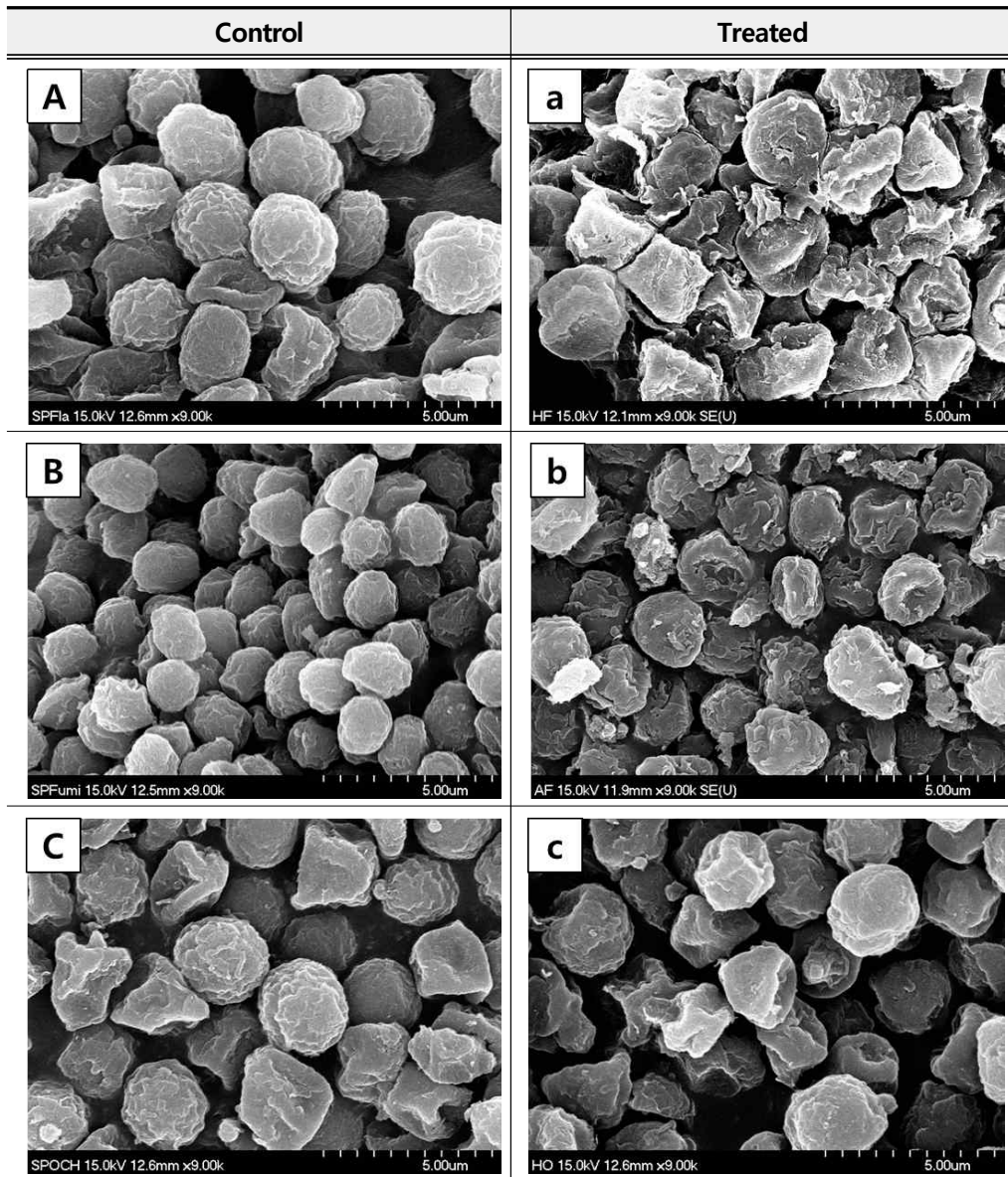


Figure 22. Scanning electron photomicrographs of pathogenic molds

A, *A. flavus* control; a, *A. flavus* was treated with *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant; B, *A. fumigatus* control; b, *A. fumigatus* was treated with *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant; C, *A. ochraceus* PF-2 control; c, *A. ochraceus* PF-2 was treated with *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

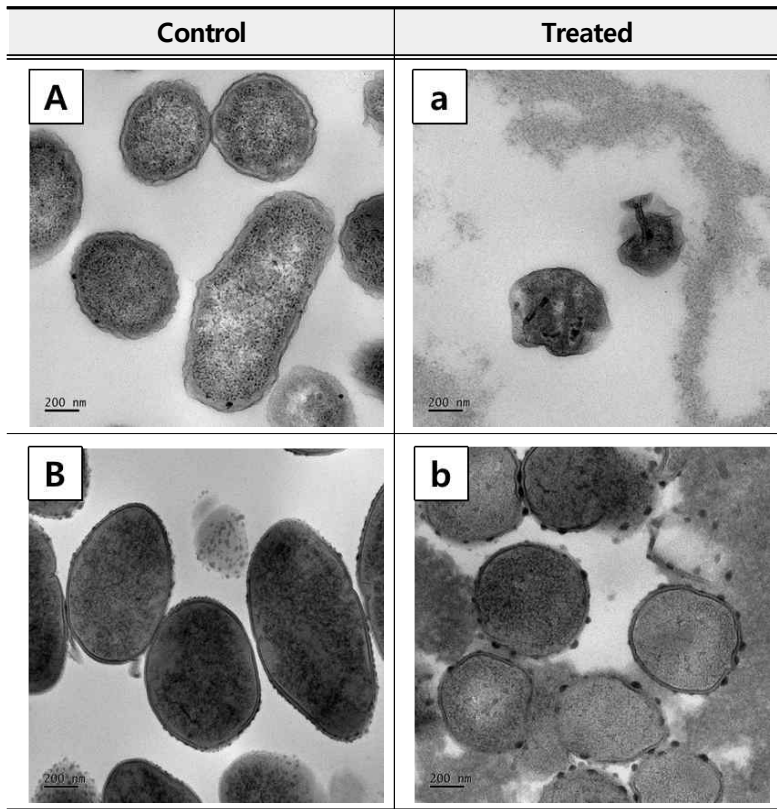


Figure 23. Transmission electron photomicrographs of pathogenic bacteria

A, *S. Typhi* control; a, *S. Typhi* was treated with *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant; B, *S. aureus* control; b, *S. aureus* was treated with *Lb. plantarum* EM culture supernatant

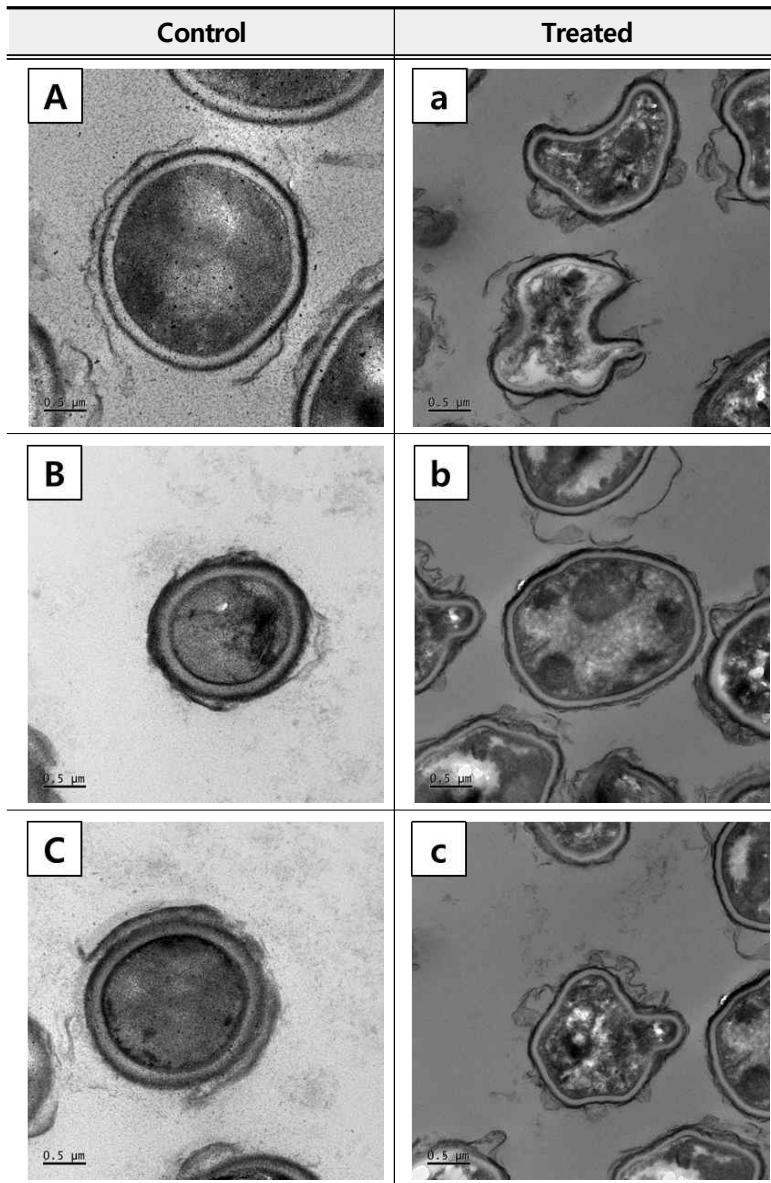


Figure 24. Transmission electron photomicrographs of pathogenic molds

A, *A. flavus* control; a, *A. flavus* was treated with *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant; B, *A. fumigatus* control; b, *A. fumigatus* was treated with *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant; C. *A. ochraceus* PF-2 control; c, *A. ochraceus* PF-2 was treated with *Lb. plantarum* HD1 culture supernatant

제 3 절 항균물질 (배양 상징액)의 식품적용

1. 항균물질 적용에 따른 배지 내 *E. coli* O157:H7의 생육 저해 효과

가. 배양 배지에 따른 항세균 활성

배양 배지에 따른 *Lb. plantarum* AF1과 *B. subtilis* SN7이 생산하는 항균물질의 *E. coli* O157:H7에 대한 항균활성을 spot-on-the-lawn test를 통하여 확인하였다.

시판 배지인 MRS (Difco)와 TSB (Difco)를 사용한 항균물질 생성 균주의 배양 상징액과 개발 식용배지를 사용한 항균물질 생성 균주의 배양 상징액의 항균활성을 측정한 결과, MRS (Difco)와 개발 식용배지를 사용한 *Lb. plantarum* AF1의 상징액은 *E. coli* O157:H7에 대하여 동일한 활성 (800 AU/mL)이 나타났고, TSB (Difco)와 개발 식용배지를 사용한 *B. subtilis* SN7의 상징액은 *E. coli* O157:H7에 대하여 동일하게 활성이 나타나지 않았다(Table 5).

나. 항균물질 적용에 따른 배지 내 *E. coli* O157:H7의 생육 측정

Spectrophotometer (Amersham Bioscience) A₆₀₀에서 흡광도를 측정하여 항균물질의 단독 또는 혼합 처리에 의한 *E. coli* O157:H7의 생육 저해 활성을 조사하였다(Fig. 25). 5 mL LB 액체 배지에 *E. coli* O157:H7를 각각 1 log CFU/mL, 2 log CFU/mL 접종하고 항균물질을 단독 또는 혼합 처리하여 37°C에서 정치 배양한 결과, 항균물질을 전혀 처리하지 않은 대조구와 비교했을 때, *Lb. plantarum* AF1 또는 *B. subtilis* SN7을 단독 처리했을 때보다 혼합 처리한 경우에 *E. coli* O157:H7의 생육이 가장 저해되는 것으로 나타났다.

Table 5. Antimicrobial activities of *Lb. plantarum* AF1 and *B. subtilis* SN7 producing antimicrobial compounds.

Strains	Medium	Antimicrobial activity (AU/mL)
<i>Lb. plantarum</i> AF1	MRS	800
	edible media	800
<i>B. subtilis</i> SN7	TSB	0
	edible media	0

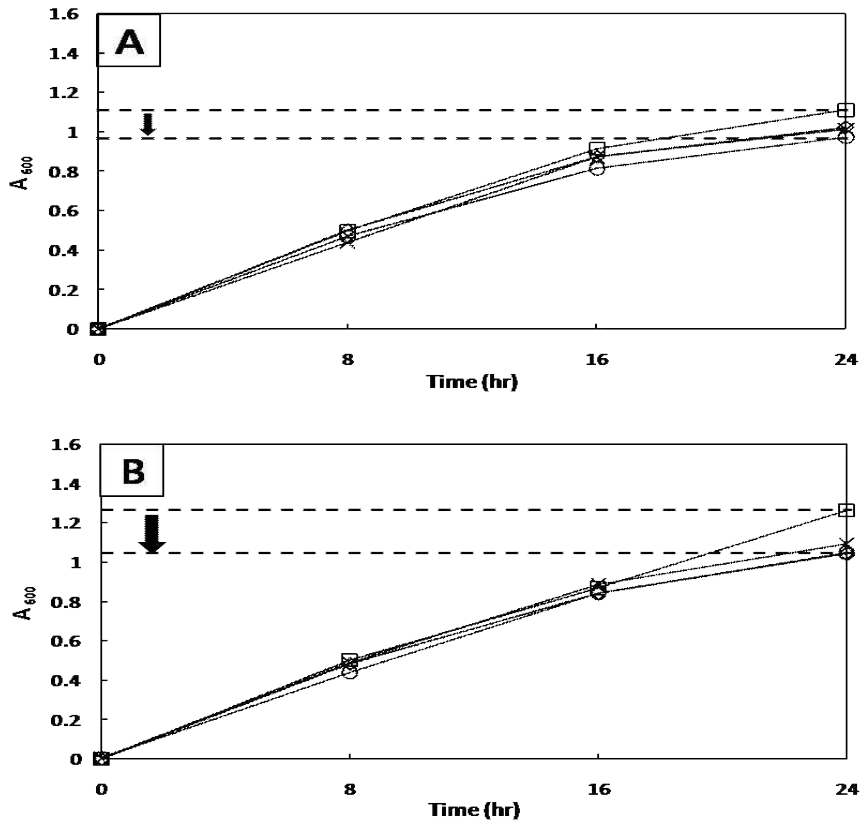


Figure 25. Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 treatment of antimicrobial compounds in LB broth

A, Growth of *E. coli* O157:H7 (initial about 1 log CFU/mL)

B, Growth of *E. coli* O157:H7 (initial about 2 log CFU/mL)

□, Growth of *E. coli* O157:H7 in LB broth

×, Growth of *E. coli* O157:H7 treated with *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant

◇, Growth of *E. coli* O157:H7 treated with *B. subtilis* SN7 culture supernatant

○, Growth of *E. coli* O157:H7 treated with *Lb. plantarum* AF1 and *B. subtilis* SN7 culture supernatant

다. 형태학적 관찰 (SEM)

항균물질 (배양 상징액) 처리에 의한 *E. coli* O157:H7의 생육 저해를 관찰하기 위해 전처리 과정을 거쳐 SEM으로 확인하였다(Fig. 26).

항균물질을 전혀 처리하지 않은 대조구에서는 *E. coli* O157:H7의 세포 표면이 정상적으로 매끄러운 모습이었으나, *Lb. plantarum* AF1 배양 상징액을 단독 처리한 결과 전반적으로 세포 표면이 쪼그라드는 현상이 관찰되었고, *B. subtilis* SN7 배양 상징액을 단독 처리한 결과, 세포껍질이 일부 관찰되었으나, 대부분 온전한 형태를 유지하는 것으로 관찰되었다. 그러나 *Lb. plantarum* AF1과 *B. subtilis* SN7을 혼합 처리한 결과, 세포 표면에 구멍이 생기고 세포가 와해되는 현상이 관찰되었다. 이는 유산균과 고초균으로부터 생성된 항균물질이 세포벽이나 세포막의 구조에 직접적으로 작용하여 세포의 구조적 안정성이나 세포벽의 투과성에 영향을 주는 것으로 여겨진다[46].

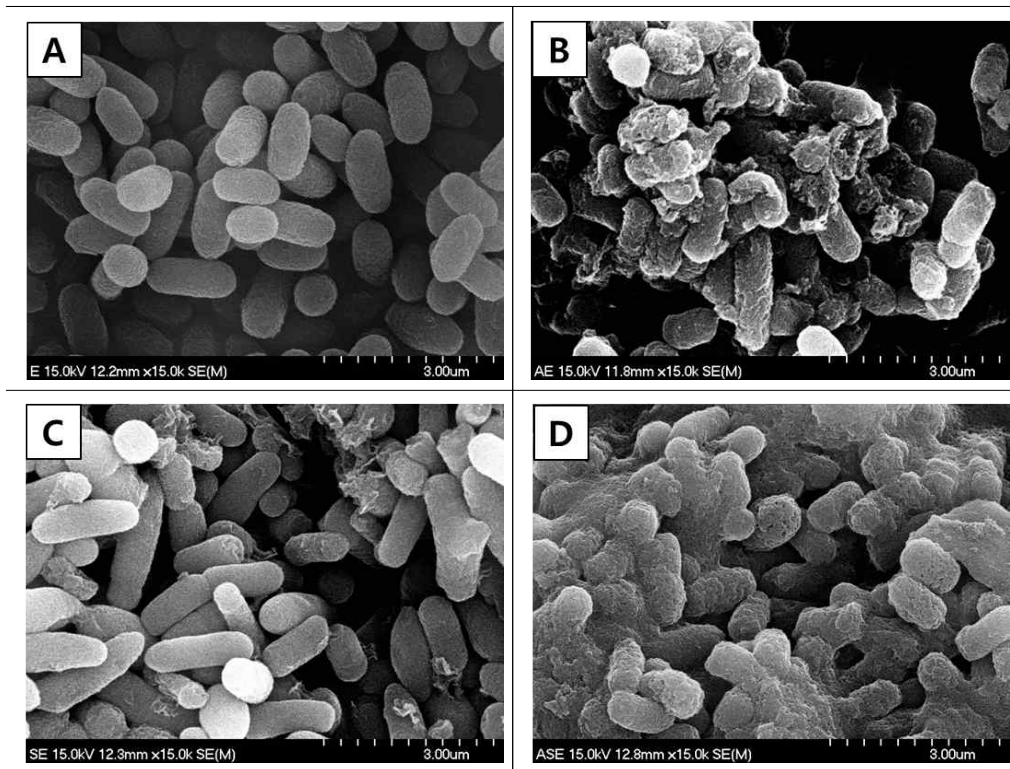


Figure 26. Scanning electron photomicrographs of *E. coli* O157:H7 cells

A, *E. coli* O157:H7 control; B, *E. coli* O157:H7 was treated with *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant; C, *E. coli* O157:H7 was treated with *B. subtilis* SN7 culture supernatant; D, *E. coli* O157:H7 was treated with *Lb. plantarum* AF1 and *B. subtilis* SN7 culture supernatant

2. 항균물질 적용에 따른 신선편의식품 내 *E. coli* O157:H7의 생육저해 효과

Salad 내에서 항균물질의 단독 또는 혼합 처리에 의한 *E. coli* O157:H7의 생육 저해 활성을 조사하였다(Fig. 27). 항균물질 적용에 앞서 아무것도 처리하지 않은 salad의 *E. coli* O157:H7의 분포를 확인한 결과, 검출되지 않았다(data not shown).

50 g의 salad에 *E. coli* O157:H7을 약 1~2 log CFU/g으로 접종한 후, 항균물질을 단독 또는 혼합 처리하여 37°C, 15°C 그리고 4°C에 저장하면서 *E. coli* O157:H7의 생균수를 측정된 결과, 모든 온도에서 대조구에 비해 항균물질을 처리한 salad의 *E. coli* O157:H7의 생육이 저해되는 것으로 나타났고, 항균물질을 단독 처리했을 때보다 혼합 처리한 경우에 *E. coli* O157:H7의 생육 저해가 더 크게 나타났다. *E. coli* O157:H7의 최적온도인 37°C에서는 저장 1일 차에 대조구에 비해 항균물질 혼합 처리 시 2.25~2.30 log CFU/g 감소하였고, 여름철 매대 온도인 15°C에서는 저장 2일차에 대조구에 비해 0.74~1.66 log CFU/g 감소하였다. 냉장온도인 4°C에서는 저장 3일 차에 대조구에 비해 항균물질 혼합 처리 시 1.33~2.48 log CFU/g 감소하였다. 이는 항균물질과 온도에 의한 hurdle effect로 두 가지의 제어 요소를 병용함으로써 신선식품의 품질 유지와 안전성 향상에 도움을 주는 것으로 사료된다.

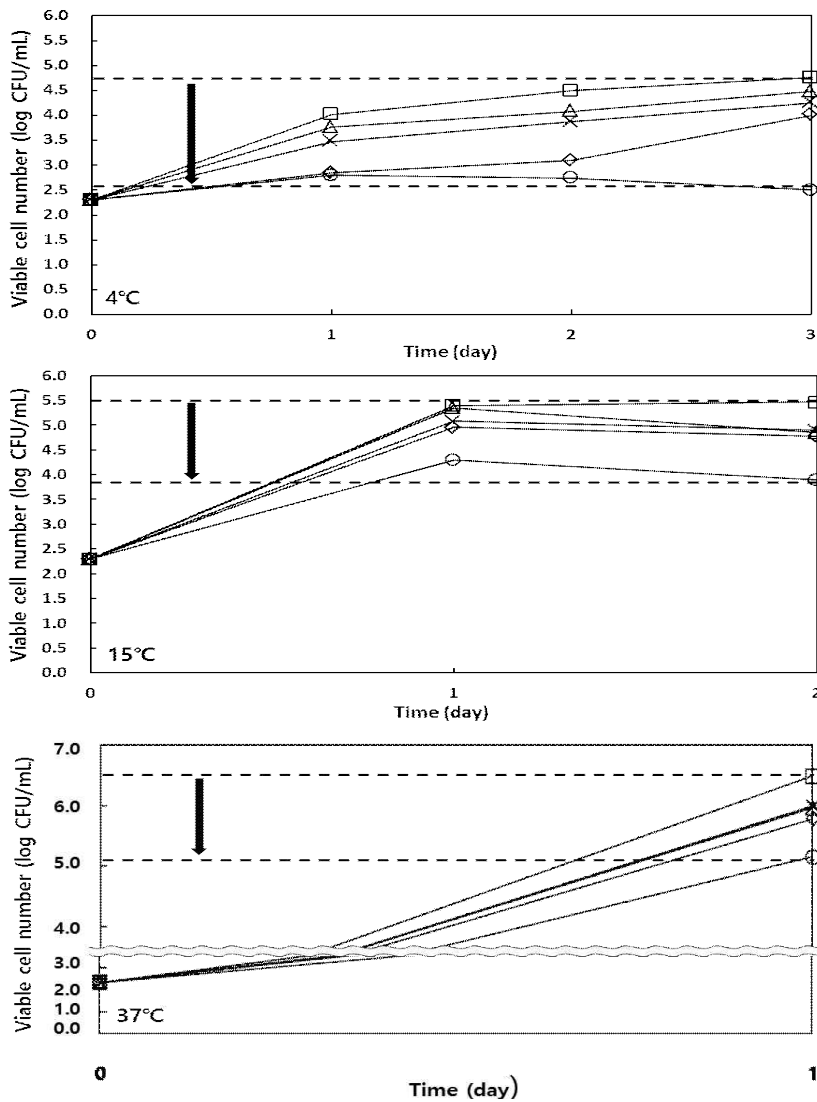


Figure 27. Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 (initial about 2 log CFU/g) with antimicrobial compounds in salad

- , Growth of *E. coli* O157:H7 without any treatment (control)
- △, Growth of *E. coli* O157:H7 treated with alcohol
- ×, Growth of *E. coli* O157:H7 treated with *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant
- ◇, Growth of *E. coli* O157:H7 treated with *B. subtilis* SN7 culture supernatant
- , Growth of *E. coli* O157:H7 treated with *Lb. plantarum* AF1 and *B. subtilis* SN7 culture supernatant

제 4 장 결 론

경제가 발전함에 따라 외식 산업의 성장과 더불어 건강과 웰빙에 대한 관심이 높아졌고 신선편의식품 시장이 점차 발전하기 시작하였다. 하지만 신선식품이나 최소가공식품 (minimally processed food)은 원재료의 가열·살균 공정을 거치지 않거나 최소한의 공정만 처리 후 제품화 하는 특성 상 식품 유해 미생물에 노출될 확률이 높아진다. 식품 유해 미생물의 감염으로 인한 생고기, 육제품, 살균되지 않은 원유, 오염된 채소 및 과일 등의 식중독 발병 사례는 전 세계적으로 다수 보고되고 있으며[4, 21, 52], 그 중 신선식품의 소비가 증가함에 따라 *E. coli* O157:H7의 감염으로 인한 생 야채 또는 과일로부터의 식중독 발생이 증가하고 있다. *E. coli* O157:H7은 사람이나 동물의 위장관에 존재하며, 일반적으로 무해하나, 일부 독성을 생성하는 병원성 대장균에 감염될 경우, 출혈성 대장염이나 용혈성 요독 증후군 (HUS)과 같은 증상이 나타날 수 있다[34]. 이와 같은 유해 미생물을 제어하기 위해 화학적 세척제나 보존료의 사용이 증대되었으나, 체내 축적과 같은 안전성에 대한 문제가 발생함에 따라 천연 보존제의 필요성이 대두되고 있는 추세이다. 화학적 보존제의 대체제로 유산균이나 고초균, 또는 이로부터 생산된 항균물질과 관련된 연구가 보고되고 있다[22, 29, 32, 33, 44, 50].

본 연구에서는 항균물질 생성균주인 유산균, 고초균과 항균물질 생성균주의 배양상징액에 식중독/부패 미생물을 공동배양함으로써 유산균 및 고초균의 식중독/부패 미생물에 대한 항균활성을 조사하고, 개발 식용배지로부터 생산한 항균물질을 salad에 적용함으로써 유산균 및 고초균의 천연 식품 보존제로서 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

먼저 항균물질 생성균주의 식중독/부패 미생물에 대한 항균활성을 측정된 결과, 항균물질 생성균주는 단독배양과 공동배양 간의 생육에 차이 없이 배양시간의 경과에 따라 생육이 점차 증가하였고, 식중독/부패 미생물은 단독배양 시 배양시간의 경과에 따라 점차 증가하여 배양 24~48시간에 최대 생육을 나타내었으나, 공동배양 시 배양시간의 경과에 따라 생육이 점차 감소되어 완전히 저해되었다.

식중독/부패균의 경우, *P. kudriavzevii* DY1은 *Lb. plantarum* AF1과 공동배양 시 배양 48시간에 생육이 완전히 저해되었고, *E. coli* O157:H7은 *Lb. plantarum* AF1과 공동배양 시 초기 접종 농도에 따라 차이가 있지만, 배양 20~24시간에 생육이 완전히 저해되었으나, *B. subtilis* SN7과 공동배양 시 생육이 완전히 저해되지 않고, 대조구에 비해 감소되는 정도로 나타났다. *S. Typhi*는 *Lb. plantarum* HD1과 공동배양 시 배양 20~24시간에 완전히 저해되었으며, *S. aureus*는 *Lb. plantarum* EM과 공동배양 시 배양 20시간에 완전히 저해되었다.

식중독/부패 곰팡이의 경우, *A. flavus*와 *A. fumigatus*를 *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1에 각각 공동배양한 결과, 초기 접종 농도에 따라 차이가 있으나 배양 24~36시간에 생육이 완전히 저해되었고, *A. ochraceus*는 *Lb. plantarum* HD1과 공동배양 시 초기 접종 농도에 따라 차이가 있으나 배양 12~24시간에 생육이 완전히 저해되었다.

항균물질 생성균주인 유산균 3종과 고초균 1종 배양 상징액의 식중독/부패 미생물에 대한 항균활성을 측정된 결과, 식중독/부패균은 단독배양 시 배양시간의 경과에 따라 생육이 점차 증가하여 배양 24~48시간에 최대 생육을 나타내었지만, 공동배양 시 *P. kudriavzevii* DY1은 배양 48시간 이후 $\approx 2 \log$ CFU/mL 정도 생육이 저해되었다. 또한 유산균 3종의 상징액을 처리한 *E. coli* O157:H7, *S. Typhi*, *S. aureus*는 모두 배양 4시간에 생육이 완전히 저해되었으나, *B. subtilis* SN7 상징액을 처리한 *E. coli* O157:H7은 완전히 저해되지 않고, 대조구에 비해 감소하는 것으로 나타났다.

배양 상징액과 공동배양한 식중독/부패 곰팡이의 포자의 경우 단독배양 시 배양시간에 따라 생육이 증가하는 데 비해 공동배양 시 포자의 발아가 거의 일어나지 않았고, 균사의 경우에도 단독배양 시 배양시간에 따라 생육이 증가하였으나, 공동배양 시 배양 36시간 이후로는 생육이 증가하지 않음을 확인하였다.

항균활성의 작용기전을 규명하기 위해 항균물질이 처리된 곰팡이 포자 및 균사를 MEB (Difco) 액체배지에 재접종하여 배양한 결과, 곰팡이의 생육이 관찰되지 않았고, 식중독/부패 미생물의 형태학적 변화를 SEM과 TEM을 통해 관찰한 결과, 항균물질을 처리한 식중독/부패 미생물의 세포가 쪼그라들거나 세포막이 붕괴되고, 세포 내용물이 유출되어 곳곳이 비어보이는 현상을 확인하였다. 이를

통해 항균물질이 식중독/부패 미생물에 대하여 사균작용을 나타내는 것을 알 수 있었다.

유산균의 항세균 활성은 bacteriocin 또는 nonbacteriocin에 의해 나타난다. Holo 등은[22], *Lb. plantarum*이 생산하는 bacteriocin인 plantaricin W에 의한 gram-positive 세균의 생육 저해를 보고하였고, Silva 등은[44], *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*의 항세균 활성은 낮은 pH 환경에서만 나타나며 이 항균활성은 열과 단백질분해효소에 안정한 nonbacteriocin인 단쇄지방산에 의해 나타난다고 보고하였다.

본 연구와 유사한 결과로 Varma 등은[50], *Lb. fermentum* 배양액과 배양 상정액에 *E. coli*, *S. paratyphi A*, *S. sonnei*을 공동배양한 결과, *Lb. fermentum*이 생산하는 단백질성 항균물질에 의한 병원균의 생육 저해 뿐만 아니라 *Lb. fermentum*으로부터 분리된 cell surface associated proteins에 의해 장내 세균인 *E. coli*의 부착능이 저해됨을 보고하였다. 또한 Chang 등은[10], *Leu. citreum* GJ7과 식중독균인 *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *S. Typhi*을 공동배양함으로써 *Leu. citreum* GJ7이 생산하는 kimchicin GJ7의 식중독균에 대한 생육 저해 활성과 함께 *Leu. citreum* GJ7을 starter로 첨가한 김치의 식중독균 생육 저해 활성을 나타내었다.

또한 유산균은 유기산이나 대사산물, cyclic peptide를 생산함으로써 항진균 활성을 나타내기도 한다. Li 등에 의하면[32, 33] *Lb. casei* AST 18의 항진균 물질은 lactic acid, acetic acid, cyclo(Leu-Pro)이며, *Lb. casei* AST 18 처리 시 *P. chrysogenum*의 균사 표면, cytoplasm의 이상과 세포 소기관의 소실 및 자가소화가 일어나는 것을 확인하였다. 또한 Ström 등은[48], *Lb. plantarum* 393와 *A. nidulans* J283의 공동배양에 의한 *A. nidulans* 균사의 vacuolization과 hyphal tip이 부풀어오르는 등 곰팡이 균사의 형태학적 변화를 보고하였으며, Laref 등은[28], *Lactobacillus* strain에 의해 나타나는 곰팡이 균사와 분생자의 발아 억제능은 bacteriocin에 의한 것이 아닌 자유수와 결합수 차이로 인해 fungistatic, fungicide 효과가 나타남을 보고하였다. 본 연구에서 나타나는 항균활성은 *Lb. plantarum* AF1의 항균물질인 δ -dodecalactone, 3,6-bis(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedion과 *Lb. plantarum* HD1의 5-oxododecanoic acid, 3-hydroxy decanoic

acid, 3-hydroxy-5-dodecenoic acid에 의한 것으로 확인되었다[42, 53, 55].

고초균의 병원성 미생물에 대한 저해는 β -1,3-glucanase[29], cyclic lipopeptide antibiotics (CLPs)[39], 휘발성 유기산 화합물[5] 등에 의해 나타난다. Waewthon grak 등에 의하면[51], *B. subtilis* ABS-S14의 *P. digitatum*에 대한 저해 활성은 CLPs에 의한 것으로 보고되었으며, Chitarra 등은[11], *B. subtilis* YM 10-20이 생산하는 iturin-like compound에 의한 *P. roqueforti*의 발아능 억제를 보고하였다. 또한 Lee 등은[30], *B. subtilis* SN7은 박테리옌을 생성함으로써 발효식품인 청국장 내에서 *B. cereus*의 영양세포 뿐만 아니라 포자의 생육까지도 억제하는 것으로 보고하였다.

식품 유래 미생물로부터 생성된 항균물질의 식품보존제로서의 가능성을 알아보기 위해 개발 식용배지로부터 *Lb. plantarum* AF1과 *B. subtilis* SN7이 생산한 항균물질을 salad에 처리하여 *E. coli* O157:H7의 생육 저해를 관찰하였다. 항균물질을 단독 처리한 salad에 비해 혼합 처리한 salad에서 *E. coli* O157:H7의 생육저해가 가장 크게 나타났으며, 육안으로 봤을 때 실제 섭취할 수 있는 상태까지를 저장기간으로 설정하여 실험한 결과, 4°C에서 3일까지 저장하였을 때의 *E. coli* O157:H7의 생육 저해가 가장 크게 나타났다. 이를 통해 온도와 항균물질의 hurdle effect가 신선식품의 미생물학적 안전성에 도움을 주는 것으로 사료된다.

이와 비슷한 결과로 Bari 등은[7], *L. monocytogenes*를 접종한 cabbage, broccoli에 nisin과 pediocin을 단독 또는 sodium lactate, potassium sorbate, phytic acid, citric acid와 혼합하여 처리한 결과, 항균물질 간의 hurdle effect에 의해 *L. monocytogenes*의 생육이 감소되었다고 보고하였다.

또한 유산균과 고초균의 상승효과에 관한 연구 결과로, Jhan 등은[23] red bean의 발효 시 *B. subtilis*와 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*를 혼합 처리할 경우 red bean의 항산화능, 피브린 용해능이 향상된다고 보고하였으며, Ge 에 의하면[19], *Lb. paracasei* HD1-7의 상정액을 처리한 *E. coli* O157:H7, *B. subtilis*의 생육 저해 효과와 *Lb. paracasei* HD1-7의 bacteriocin인 Paracin 1.7의 생산은 *B. subtilis*에 의해 유도됨이 보고되었다.

본 연구에서는 김치 및 메주로부터 분리된 유산균, 고초균의 항균활성을 조사하고, 이를 개발 식용배지로부터 생산하여 salad에 처리했을 때, 유산균과 고초균

의 항균물질을 혼합한 경우에 항균 활성이 더 강하게 작용한다는 것을 확인하였다. 본 논문에서 진행한 실험은 GRAS 미생물 유래의 천연 식품 보존제로서 화학적 보존제를 대체할 수 있는 방안이 될 것이며, 향후 실험에서는 유산균과 고초균의 상승작용에 대한 연구와 더불어 항균 활성을 나타내는 물질의 규명 및 기전에 관한 연구가 추가되어야 할 것이다. 이러한 점들을 보완한다면 식품산업에서 보존제로서의 활용 가치가 증가될 것으로 사료된다.

제 5 장 참고문헌

1. Abadias, M., Cañamás, T. P., Asensio, A., Anguera, M., &Viñas, I. 2006. Microbial quality of commercial ‘Golden Delicious’ apples throughout production and shelf-life in Lleida (Catalonia, Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 404-409.
2. Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., &Viñas, I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1), 121-129.
3. Abe, F., Ishibashi, N., &Shimamura, S. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *Journal of Dairy Science*, 78(12), 2838-2846.
4. Ackers, M. L., Mahon, B. E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P. S., ... &Griffin, P. M. 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *Journal of Infectious Diseases*, 177(6), 1588-1593.
5. Arrebola, E., Sivakumar, D., &Korsten, L. 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*, 53(1), 122-128.
6. Arques, J. L., Rodriguez, E., Nunez, M., &Medina, M. 2008. Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 70-75.

7. Bari, M. L., Ukuku, D. O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K., & Kawamoto, S. 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1381-1387.
8. Beuchat, L. R., Adler, B. B., & Lang, M. M. 2004. Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1238-1242.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) : Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2014, Annual Report
10. Chang, J. Y., & Chang, H. C. 2011. Growth Inhibition of Foodborne Pathogens by Kimchi Prepared with Bacteriocin Producing Starter Culture. *Journal of Food Science*, 76(1), M72-M78.
11. Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., Van Aelst, A. C., Rombouts, F. M., & Abee, T. 2003. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 159-166.
12. Choi, E. A., & Chang, H. C. 2015. Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 210-217.
13. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 66(1-2), 117-140.

- nal of Food Microbiology*, 71(1), 1-20.
14. Cliffe-Byrnes, V., &O'Beirne, D. 2005. Effects of chlorine treatment and packaging on the quality and shelf-life of modified atmosphere (MA) packaged coleslaw mix. *Food Control*, 16(8), 707-716.
 15. Davidson, P. M., Post, L. S., Branen, A. L., &McCurdy, A. R. 1983. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. *Antimicrobials in Foods*, 371.
 16. Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., &Ross, P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16(9), 1058-1071.
 17. Devlieghere, F., Vermeiren, L., &Debevere, J. 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4), 273-285.
 18. Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., &Degraeve, P. 2016. Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1262-1274.
 19. Ge, J., Fang, B., Wang, Y., Song, G., &Ping, W. 2014. *Bacillus subtilis* enhances production of Paracin1. 7, a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HD1-7, isolated from Chinese fermented cabbage. *Annals of Microbiology*, 64(4), 1735-1743.
 20. Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V.,

- Garrett, E. H., & Busta, F. F. 2003. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(s1), 78-141.
21. Hilborn, E. D., Mermin, J. H., Mshar, P. A., Hadler, J. L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., ... & Glynn, M. K. 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives of Internal Medicine*, 159(15), 1758-1764.
22. Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., & Nes, I. F. 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, 147(3), 643-651.
23. Jhan, J. K., Chang, W. F., Wang, P. M., Chou, S. T., & Chung, Y. C. 2015. Production of fermented red beans with multiple bioactivities using co-cultures of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1281-1287.
24. Kalchayanand, N., Dunne, P., Sikes, A., & Ray, B. 2004. Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 91(1), 91-98.
25. Keskinen, L. A., Burke, A., & Annous, B. A. 2009. Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157: H7 from lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2), 134-140.

26. Knowles, J., &Roller, S. 2001. Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 64(10), 1542-1548.
27. Lanciotti, R., Belletti, N., Patrignani, F., Gianotti, A., Gardini, F., &Guerzoni, M. E. 2003. Application of hexanal,(E)-2-hexenal, and hexyl acetate to improve the safety of fresh-sliced apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2958-2963.
28. Laref, N., &Guessas, B. 2013. Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 13, 80.
29. Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P., &Phongpaichit, S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of β -1, 3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(7), 990-997.
30. Lee, S. G., &Chang, H. C. 2016. Assessment of *Bacillus subtilis* SN7 as a starter culture for Cheonggukjang, a Korean traditional fermented soybean food, and its capability to control *Bacillus cereus* in Cheonggukjang. *Food Control*.
31. Lewis, R. J. 1989. Their regulatory status their use by the food industry. *Food additives handbook*, Robert, WD (Ed.), Nostrand Reinhold, New York, 3-27.
32. Li, H., Liu, L., Zhang, S., Cui, W., &Lv, J. 2012. Identification of

- antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current Microbiology*, 65(2), 156-161.
33. Li, H., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Uluko, H., Pang, X., ... &Lv, J. 2014. Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control*, 43, 57-64.
 34. Lim, J. Y., Yoon, J. W., &Hovde, C. J. 2010. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 5.
 35. Mariem, C., Sameh, M., Nadhem, S., Soumaya, Z., Najiba, Z., &Raoudha, E. G. 2014. Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from *Nitraria retusa* fruits and their applications to meat product preservation. *Industrial Crops and Products*, 55, 295-303.
 36. Mathur, S., &Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281-295.
 37. Moon, S. H., Chang, M., Kim, H. Y., &Chang, H. C. 2014. *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened Kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23(2), 489-497.
 38. Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., &Diez-Gonzalez, F. 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157: H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota

- farmers. *Journal of Food Protection*, 67(5), 894-900.
39. Ongena, M., & Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.
 40. Roller, S., & Seedhar, P. 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh cut melon and kiwifruit at 4°C and 8°C. *Letters in Applied Microbiology*, 35(5), 390-394.
 41. Roller, S. (Ed.). 2003. *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Elsevier.
 42. Ryu, E. H., Yang, E. J., Woo, E. R., & Chang, H. C. 2014. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology*, 41, 19-26.
 43. Shen, S., Zhang, T., Yuan, Y., Lin, S., Xu, J., & Ye, H. 2015. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. *Food Control*, 47, 196-202.
 44. Silva, M., Jacobus, N. V., Deneke, C., & Gorbach, S. L. 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(8), 1231-1233.
 45. Soromou, L. W., Zhang, Y., Cui, Y., Wei, M., Chen, N., Yang, X., ... & Wang, D. 2013. Subinhibitory concentrations of pinocembrin exert anti *Staphylococcus aureus* activity by reducing a toxin expression. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1), 41-49.

46. Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., &Corke, H. 2007. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5484-5490.
47. Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van leeuwenhoek*, 70(2-4), 331-345.
48. Ström, K., Schnürer, J., &Melin, P. 2005. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiology Letters*, 246(1), 119-124.
49. Sun, X., Wang, Z., Kadouh, H., &Zhou, K. 2014. The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan - gallic acid films. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 83-89.
50. Varma, P., Dinesh, K. R., Menon, K. K., &Biswas, R. 2010. *Lactobacillus fermentum* isolated from human colonic mucosal biopsy inhibits the growth and adhesion of enteric and foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, 75(9), M546-M551.
51. Waewthongrak, W., Pisuchpen, S., &Leelasuphakul, W. 2015. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 44-49.
52. World Health Organization. 2011. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in raw beef and beef products: approaches for the provision of scientific ad-

- vice: meeting report.
53. Yang, E. J., & Chang, H. C. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*, 36(4), 276-284.
 54. Yang, E. J., & Chang, H. C. 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1), 56-63.
 55. Yang, E. J., Kim, Y. S., & Chang, H. C. 2011. Purification and characterization of antifungal δ -dodecalactone from *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Journal of Food Protection*, 74(4), 651-657.
 56. 김성경, 장해춘. 2016. *Lactobacillus plantarum* EM이 생산하는 향균물질의 특성 연구. 석사학위논문, 조선대학교, 광주
 57. 문송희, 장해춘. 2016. GRAS 등급 미생물용 식용배지의 개발과 이를 활용한 천연식품보존제의 개발과 응용. 박사학위논문, 조선대학교, 광주
 58. 식품위생법. 제2조 제14항
 59. 식품의약품 안전처 식중독 통계시스템, 원인물질별/연도별 식중독 통계. 2016
 60. 식품의약품 안전처 식품공전, 식품별 기준 및 규격. 2016
 61. 이슬기, 장해춘. 2014. 메주에서 분리한 향 *Bacillus cereus* 활성을 지닌 *Bacillus subtilis*의 분리, 특성 규명과 그 향균 물질의 분리정제. 석사학위논문, 조선대학교, 광주

62. 장지윤, 최유리, &장해춘. 2011. 국내 시판김치의 김치담금부터 숙성까지의 미생물 균총 변화. *한국식품저장유통학회지*, 18(5), 786-794.

감사의 글

지난 2년간의 대학원 생활을 마무리하며 논문을 쓰고 졸업을 앞두고 설레고 기쁘지만, 한편으론 아쉬운 마음이 듭니다. 실험실 생활을 하며 울고 웃었던 일들 모두가 제게는 더 성장할 수 있는 계기가 되었고, 잊지 못할 추억으로 남습니다. 주위에 저를 응원해주는 분들이 계셨기에 좋은 결실을 맺게 되어 그분들께 감사의 말을 전하고 싶습니다.

먼저 학부시절부터 대학원 생활까지 항상 열정적인 모습으로 제가 나아갈 방향을 제시해주시고, 여러모로 큰 가르침을 주신 장해춘 지도 교수님께 진심으로 고개 숙여 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 저의 논문을 세심히 교정해주시고 심사해주신 이재준 교수님과 이주민 교수님 감사드립니다. 그리고 학부시절부터 전공에 대해 학문적으로 많은 가르침을 주신 김경수 교수님, 김복희 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

대학원 생활동안 가족같이 함께 생활하며 힘이 되어준 소중한 미생물 실험실 식구들 정말 감사합니다. 실험실을 이끌어주시며, 실험이나 생활 등 조언과 함께 항상 먼저 손 내밀어주셨던 송희언니, 실험에 있어서 마지막까지 아낌없는 도움 주시고, 제가 많이 의지했던 정 많은 슬기언니, 실험실 생활에 있어 격려와 응원 해주시며 힘이 돼주셨던 은지언니, 항상 긍정적인 모습으로 실험실을 밝혀주신 설화언니, 학부시절 처음으로 실험 가르쳐주시고 배울 점이 많았던 성경언니, 실험실과 공부방 옆자리에서 함께 생활하며 많은 도움 주셨던 해비언니 모두들 감사합니다.

실험실 생활 중 많이 의지하고 부부라는 말을 들을 정도로 가장 많은 시간을 함께 보낸 내 동기 초롱이, 동생이지만 내 옆자리에서 많은 도움을 준 소영이, 엉뚱하지만 밝고 야무진 별명부자 유빈이, 앞으로 대학원 생활을 앞두고 있는 소정이, 함께하지 못해 아쉬운 다영이에게도 고마운 마음을 전합니다.

늘 내 이야기 들어주면서 답답해하지만 공감해주고 큰 힘이 되어 준 늘이, 만나면 웃으면서 달려와서 기분 좋아지게 해주는 혜인이, 각자 다른 곳에서 생활하며 자주 보진 못하지만 만날 때마다 즐거운 란희, 진주, 미선이, 대학생활 때부터 내 이야기 많이 들어준 주이, 대학 졸업 이후로 더 가까워져 힘든 일 있으면 공

감해주는 현지, 애솔이, 아라, 누구보다 묵묵히 내 옆에서 큰 힘이 되어준 사람에게도 고맙습니다.

마지막으로 항상 저를 먼저 생각해주시고, 제 편이 되어주시는 엄마, 무뚝뚝하지만 늘 저를 자랑스러워하시는 아빠, 항상 나에게 양보해주는 오빠. 표현을 잘하지 않아 투정만 부리지만, 누구보다도 우리 가족 사랑하고 감사합니다. 남들에게겐 무서우시지만 저에게만큼은 약해지시는 할아버지, 아프실 때도 저는 잊지 않으신 할머니께도 감사의 말씀 전합니다.

제 주변에서 저를 위해 아낌없는 격려와 응원해주신 모든 분들께 감사드립니다. 앞으로 감사한 마음 잊지 않고, 더욱 더 성장하여 성숙한 사람이 되도록 노력하겠습니다. 항상 건강하시고 행복한 일만 가득하시길 바라겠습니다.

2016년 12월
권혜란 올림