

## ARTICLE

## 항곰팡이능 보유 유산균의 숙성치즈 적용 연구

김종희<sup>†</sup> · 이은선<sup>†</sup> · 김부민 · 함준상 · 오미화\*

국립축산과학원 축산물이용과

## Application of Lactic Acid Bacteria to Inhibit Fungal Contamination of Cured Cheeses

Jong-Hui Kim<sup>†</sup>, Eun-Seon Lee<sup>†</sup>, Bu-Min Kim, Jun-Sang Ham, and Mi-Hwa Oh\*

National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju, Korea



Received: September 21, 2022

Revised: September 23, 2022

Accepted: September 23, 2022

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this study.

\*Corresponding author :

Mi-Hwa Oh  
National Institute of Animal Science,  
Rural Development Administration,  
Wanju, Korea  
Tel : +82-63-238-7379  
Fax : +82-63-238-7397  
E-mail : moh@korea.kr

Copyright © 2022 Korean Society of Dairy Science and Biotechnology. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## ORCID

Jong-Hui Kim  
<https://orcid.org/0000-0001-8669-993X>  
Eun-Seon Lee  
<https://orcid.org/0000-0002-3957-0575>  
Bu-Min Kim  
<https://orcid.org/0000-0001-7836-3360>  
Jun-Sang Ham  
<https://orcid.org/0000-0003-4966-6631>  
Mi-Hwa Oh  
<https://orcid.org/0000-0001-7838-5260>

## Abstract

Lactic acid bacteria with antibacterial activity can be effectively used as probiotics to inhibit the growth of harmful bacteria that cause food spoilage or food poisoning. In this study, *Pediococcus pentosaceus* M132-2, isolated from soybean paste, was analyzed for its effects on three major contaminating fungi. M132-2 was confirmed to exert antifungal activity by inhibiting the growth of all three fungi tested. In addition, M132-2 displayed excellent salt resistance and low temperature tolerance. Thus M132-2 can survive at the salinity level in cheese and at the low temperatures used in the aging process. Finally, when supernatant from an M132-2 culture was applied to Gouda cheese, the growth of contaminating fungi was significantly inhibited. Consequently, M132-2 may be useful for the prevention of spoilage of various foods, including cheese.

## Keywords

*Pediococcus pentosaceus*, antifungal activity, cured cheese

## 서론

국내 연간 1인당 자연치즈 소비량은 2015년 2.1 kg에서 2021년 2.6 kg으로 증가하는 추세이다 [1]. 자연치즈는 우유에 효소를 넣어 응고 및 숙성한 발효 식품이며, 특히 자연숙성치즈는 제조한 후 제품의 풍미를 증진하기 위해 저온에서 숙성시킨 치즈이다. 숙성치즈는 신선치즈를 제조한 후 수일에서 수년간 숙성 및 저장을 통해 제품의 가치를 향상시킨다[2]. 최근 자연숙성치즈의 미생물 균총에 대한 연구가 광범위하게 진행되고 있으며, 식품 중 부패를 유발하는 세균이나 질병을 유발하는 식중독균과 더불어 진균류인 곰팡이 등 다양한 균이 서로 연관성을 가지고 상호작용을 하는 것으로 보고되고 있다[3].

이 중 일부 곰팡이는 특정 품목의 치즈에 첨가되어 숙성 중 풍미를 제공하는 것으로 알려졌으나, 또 다른 오염 곰팡이는 자연치즈 등과 같이 장기간 숙성을 요하는 제품에서 독소를 생성을 통해 부패를 일으키기도 한다[4]. 자연치즈의 저온 숙성 과정 중 가장 빈번하게 발생하는 곰팡이는 *Aspergillus* spp.와 *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. 등으로 이들이 거의 90%를 차지하고 있는 것으로 알려져 있다[5]. 이 중 *Penicillium commune*은 치즈 등의 유제품에서 오염을 일으키는 대표적인 곰팡이이며[6,7], *Aspergillus niger*는 요거트 등에서 부패를 일으키기도 한다[8]. *Cladosporium cladosporioides*는 환경에 널리 존재하는 곰팡이종으로 공기 중에 오염되어 식품의 오염을 야기할 수 있고[9], 건조한 생선류의 주요 부패 곰팡이이기도 하다[10]. 이러한 곰팡이들은 aflatoxin과

patulin, mycophenolic acid, ochratoxin A, citrinin 등의 독소를 생성하는 것으로 알려져 있다 [11]. 곰팡이 독소로 인한 급성 독성작용으로는 간 및 신장의 손상과 중추신경계 이상, 구토와 설사 등이 있으며, 장기적으로 노출되었을 경우에는 만성질환과 암, 돌연변이, 태아 기형 등을 유발할 수 있다[12].

이에 본 연구에서는 다양한 식중독균에 대해 항균활성을 보유하고 있고 항균표면(biofilm) 생성이 가능한 유산균인 *Pediococcus pentosaseus*를 치즈 숙성 과정 중 오염 곰팡이 제어에도 활용 가능한지 확인하기 위해 항곰팡이능과 환경 저항성 등 균주의 특성을 분석하고, 실제 치즈에 적용해 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 치즈 숙성실 및 표면 미생물 분석

미생물 분석은 식품공전[13]에서 제시하는 방법에 따라 3반복으로 수행하였다. 치즈 숙성실 표면과 치즈 자체 표면의 오염도를 검사하기 위하여 Swab kit(3M Pipette swab Plus, 3M, Saint Paul, MN, USA)를 사용하여 각 시료 표면의 10 cm×10 cm 면적 범위를 채취하였으며, 채취한 시료는 일반세균과 곰팡이에 대한 분석을 수행하였다. 시료 각 1 mL를 취하여 0.85%의 멸균 Sodium Chloride Water 9 mL와 섞어 10배 단계씩 희석하였다. 그 후 각 단계별 희석액 1 mL를 취하여 표준천평판배지(Plate Count Agar, MB-P1040, Kisanbio, Seoul, Korea)와 PDA 배지(Potato Dextrose Agar, MB-P1102, Kisanbio)에 도말 한 후 35°C로 설정한 항온기(incubator)에서 48±2시간 배양하였다. 이후 15-300개의 집락을 생성한 평판의 집락수를 계수하였다.

### 2. 선발균 분리 및 항곰팡이능 분석

발효식품(김치, 젓갈, 장아찌, 장류)에서 분리한 유산균 245균주 중 식중독균(5종)에 대한 항균활성이 뛰어나고 항균표면 형성이 가능한 특성이 있는 *P. pentosaseus* M132-2를 선발하였다[14]. M132-2 균주는 된장에서 분리하였고, 항균활성 분석 대상 식중독균은 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*였다[14]. 이후 분석을 위해서 MRS 액체배지(BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)에 접종한 후 37°C, 24시간 배양하여 사용하였다.

항곰팡이능 분석을 위해서 *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium commune*를 대상으로 실험을 진행하였다. PDA 배지에서 25°C, 72시간 배양한 곰팡이의 포자를 긁어 0.75% PDA 연한천배지에 넣어 잘 섞고 PDA 배지에 부어주었다. 항균액은 배양된 *P. pentosaseus* M132-2를 원심분리(9,950×g, 4°C, 15 min)하여 회수한 상등액을 막 필터(0.45 μm pore size, Millipore, Burlington, VT, USA)로 제균하여 준비하였고, 항균활성은 agar well diffusion assay를 이용하였다.

### 3. 프로바이오틱스 및 환경 저항성 특성 평가

내산성은 완충액의 pH를 HCl(10N)을 이용하여 2.5와 7.0으로 조절한 후 유산균 현탁액(1.0×10<sup>8</sup> CFU/mL)을 접종하고 0, 0.5, 1, 2, 3시간 동안 37°C에서 배양하면서 생균수를 측정하였다. 내담즙성은 MRS 액체배지에 0.3%(w/v) bile salts(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 제조한 인공 담즙액(10 mL)을 37°C에서 배양하면서 1시간 간격으로 생균수를 측정하였다.

내염성 실험을 위해 M132-2 균주를 24시간 37°C에서 전배양한 후 9 Log CFU/mL로 조정하여 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%의 NaCl을 첨가한 MRS 액체배지에 전배양액을 1% 접종하여 37°C에서



24시간 배양하였다. 저온내성 실험을 위해 M132-2 균주를 24시간 37°C에서 전배양한 후 9 Log CFU/mL로 조정하여 5°C, 15°C에서 24시간 배양하고 35°C, 25°C에서 배양한 생균수와 비교하여 생존율을 계산하였다.

#### 4. 치즈에서 오염 곰팡이에 대한 저해능 분석

갓 제조된 고다 치즈는 코팅하지 않은 상태로 실험을 진행하였고 숙성된 고다 치즈는 코팅하여 3개월간 숙성시킨 후 사용하였다. 고다 치즈 숙성 온도인 15°C에서 15일간 저장하면서, 치즈 표면에 *P. pentosaseus* M132-2 상등액을 3일에 한번씩 분무한 처리군과 무처리 대조군을 비교 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 치즈 숙성실 및 표면 미생물 분석

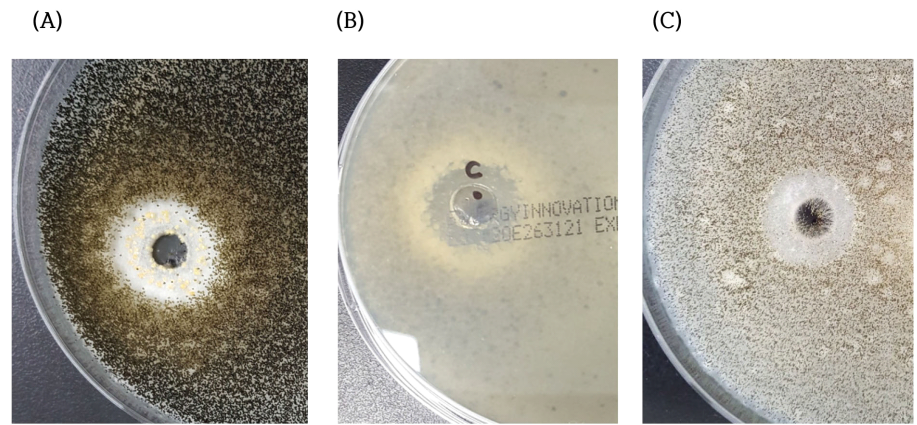
치즈 숙성실 벽면과 숙성 중인 치즈 표면의 미생물 분포를 확인한 결과를 Table 1에 나타내었다. 숙성실 벽면과 치즈 모두에서 위생지표세균인 *E. coli* 및 coliform과 식중독균인 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus*는 검출되지 않았다. 다만 치즈 숙성실에서 일반세균이 약 10<sup>2</sup> CFU/cm<sup>2</sup> 수준으로 검출되었다. *Salmonella* 선택배지에서도 미생물 집락(colony)이 5×10<sup>2</sup> CFU/cm<sup>2</sup> 수준으로 검출되었으나, 유전자 분석 결과, *Serratia quinivorans*인 것으로 판명되었다. 치즈의 경우, 일반세균이 약 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> CFU/cm<sup>2</sup> 수준으로 검출되어 숙성실 내부에 비해 오염도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 일부 식중독균 선택배지에서 미생물이 성장하였으나, 유전자 분석 결과, *Staphylococcus equorum*임을 확인하였다. 또한 치즈 숙성실과 치즈에서는 약 17-42 CFU/cm<sup>2</sup> 수준의 곰팡이가 검출되었다. 전반적인 곰팡이 오염도는 낮은 수준이었으나, 치즈 숙성실과 치즈 자체 표면에서 비슷한 수준으로 검출되는 것으로 보아 숙성기간 중 치즈를 잘 닦아준다고 하더라도 환경에 의한 지속적인 오염이 가능하여 이를 예방할 수 있는 방법이 필요하다.

#### 2. *P. pentosaseus*의 곰팡이 저감능

식중독균 5종(*E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*)에 대해 항균활성을 보유하여 선발된 *P. pentosaseus* M132-2가 오염 곰팡이의 저감에도 효과가 있는지 확인하기 위해 곰팡이 3종(*A. niger*, *C. cladosporioides*, *P. commune*)을 대상으로 항균력을 분석하였다. 그 결과, *P. pentosaseus* M132-2가 상기 곰팡이 3종의 성장을 효과적으로 저해하는 것을 확인하였다(Fig. 1). *P. pentosaseus*는 유용한 유산균종으로 Shin 등[15]은 김치에서 분리한 균주에서 항균활성이 있음을 보고한 바 있고, Choi 등[16]은 이탈리아 라이그라스에서 분리한 균주에서 항진균활성을 분석한 결과를 보고한 바 있다. 본 연구에서 활용한 균주는 항균활성과 항진균활성을 모두 보유하여 치즈 숙성 중 오염 미생물을 효과적으로 저감할 수 있을 것으로 생각한다.

**Table 1.** Prevalence of microorganisms in cheese surface and cheese ripening room

Microorganisms	Ripening room (Log CFU/cm <sup>2</sup> )	Burk cheese (Log CFU/cm <sup>2</sup> )	Gouda cheese (Log CFU/cm <sup>2</sup> )
Total aerobic bacteria	2.14±0.05	5.38±0.03	6.06±0.08
<i>Escherichia coli</i> and coliform	0	0	0
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0
Fungi	1.23±0.04	1.57±0.02	1.53±0.16



**Fig. 1.** Antifungal activity of *Pediococcus pentosaceus* M132-2 against (A) *Aspergillus niger*, (B) *Cladosporium cladosporioides*, (C) *Penicillium commune*.

### 3. *P. pentosaceus*의 프로바이오틱스 및 환경 저항성 특성

프로바이오틱스 특성을 평가하기 위해 내산성과 내담즙성을 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 초기 접종균주와 비교하여 pH 2.5에서 3시간 배양하였을 때 89.57%의 생존율을 나타내었고, 담즙산에서 4시간 배양하였을 때 91.46%의 생존율을 보여 *P. pentosaceus* M132-2 균주의 약 90%가 산성 조건과 담즙산에서 생존 가능함을 확인하였다. 프로바이오틱스 균주로 잘 알려진 *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG 표준균주와 비교하였을 때도 약간 높은 생존율을 보였다 (Table 2).

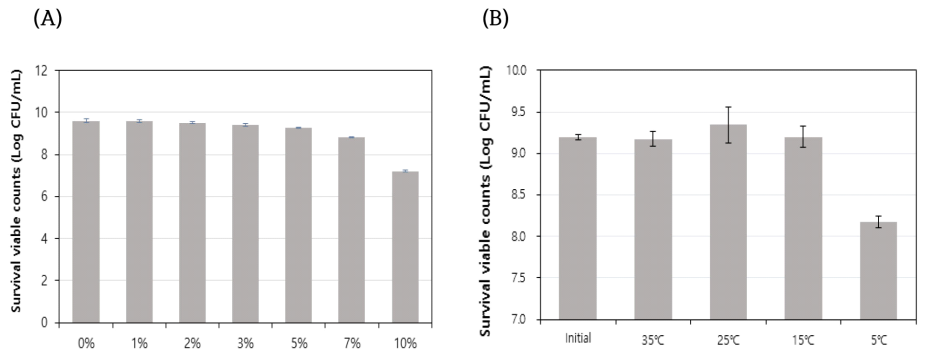
환경 저항성 특성을 분석하기 위해 내염성과 저온 내성을 분석하였다(Fig. 2). 내염성 확인을 위해 염화나트륨(NaCl)을 첨가하지 않은 대조군의 생존수와 비교하여 생존율을 계산한 결과, 염화나트륨 농도 1%-7%까지는 90% 이상의 높은 생존율을 유지하였고, 염화나트륨을 10% 첨가한 배지에서는 약간 감소하여 75.1%의 생존율을 보였다(Fig. 2A). 특히 내염성 유산균으로 알려진 *Leuconostoc mensesenteroides* ATCC 8293이 소금 농도 2%-4%에서 내염 특성을 보인 반면[17], *P. pentosaceus* M132-2 균주는 10%에서도 높은 생존율을 보여 고염에도 매우 높은 저항성을 가지고 있는 것을 확인하였다. 숙성 치즈의 염도가 2% 내외인 것을 고려한다면 치즈의 제조 조건은 *P. pentosaceus* M132-2 균주의 성장과 유지에 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다. 또한 저온 내성을 확인한 결과, 35°C, 25°C와 마찬가지로 15°C에서도 생존율에 차이가 거의 없었으며, 5°C에서도 88.8%의 생존율을 나타내어 높은 저온 내성을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 2B).

### 4. 치즈에서 오염 곰팡이 저해능 분석

*P. pentosaceus* M132-2 균주의 항균효과가 실제 치즈에서도 발휘되는지를 확인하기 위해 제조

**Table 2.** Acid and bile tolerance of *Pediococcus pentosaceus* M132-2

Strains	Initial	pH 2.5		Bile salt 0.3%	
	Log CFU/mL	Log CFU/mL	Survival rate (%)	Log CFU/mL	Survival rate (%)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> M132-2	9.3±0.01	8.33±0.10	89.57	7.16±0.02	91.46
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	8.92±0.03	7.952±0.22	89.12	7.42±0.04	83.74

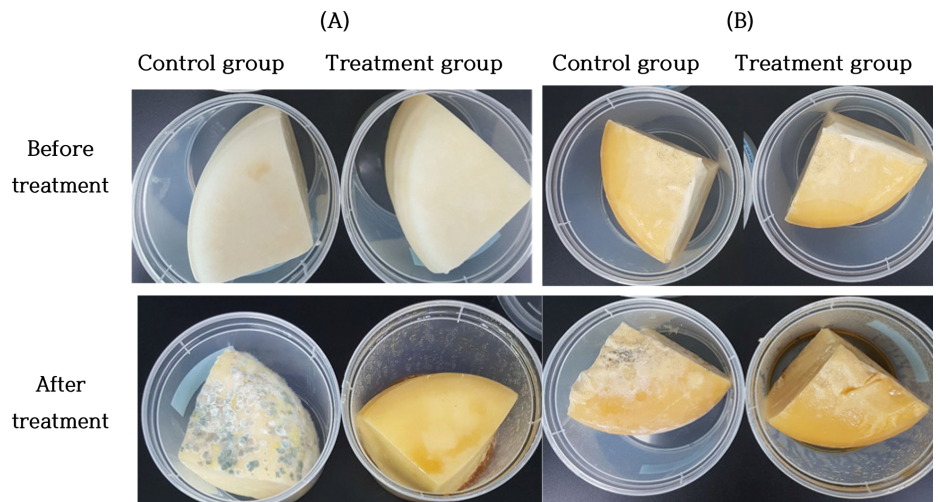


**Fig. 2.** Effect of NaCl concentration (A) and temperature (B) on viability of *Pediococcus pentosaceus* M132-2.

한 고다 치즈를 사용하여 오염 곰팡이에 대한 저해 활성을 분석하였다. 고다 치즈는 하루 전 제조한 제품과 3개월 숙성한 제품을 대상으로 하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 M132-2 균주를 처리한 치즈는 무처리 대조군에 비해 곰팡이의 생장이 현저히 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과를 종합적으로 볼 때, *P. pentosaceus* M132-2 균주의 처리는 수개월 이상 숙성과정을 거치는 치즈에서 오염 곰팡이를 저해하기 위한 유용한 수단이 될 수 있다.

### 요 약

항균활성을 가진 유산균은 생균제 등의 형태로 식품 중 부패나 식중독을 유발하는 유해균을 저해 하는데 효과적으로 활용할 수 있다. 이에 본 연구에서는 된장에서 분리한 유산균인 *P. pentosaceus* M132-2 균주를 주요 오염 곰팡이 3종을 대상으로 분석한 결과, 이들의 생장을 모두 저해하여 항곰팡이능을 보유한 것을 확인하였다. 또한 M132-2 균주는 우수한 내염성과 저온내성을 가지고 있어 치즈의 염도와 저온의 숙성온도에서도 생존이 가능할 것으로 판단된다. 마지막으로 M132-2 상등액을 실제 고다 치즈에 적용한 결과, 오염 곰팡이 생장이 현저하게 저해되는 것을 확인하였다. 결과적으



**Fig. 3.** Antifungal activity of *Pediococcus pentosaceus* M132-2 on Gouda cheese, (A) cheese manufactured 1 day ago, (B) cheese manufactured 3 months ago.

로 *P. pentosaceus* M132-2 균주는 치즈를 비롯한 다양한 식품의 부패 방지에 활용할 수 있는 유용한 수단이 될 수 있다.

## Conflict of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01423802)의 지원과 2022년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것입니다.

## References

1. Korea Dairy Industries Association. Dairy statistics [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 19]. Available from: <http://www.koreadia.or.kr/file/statistics>
2. Engels WJM. Volatile and non-volatile compounds in ripened cheese: their formation and their contribution to flavour. Wageningen, Netherland: Wageningen University & Research; 1997.
3. Brooks JC, Martinez B, Stratton J, Bianchini A, Krokstrom R, Hutkins R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiol.* 2012;31:154-158.
4. Kure CF, Skaar I. The fungal problem in cheese industry. *Curr Opin Food Sci.* 2019;29:14-19.
5. Serra R, Abrunhosa L, Kozakiewicz Z, Venâncio A, Lima N. Use of ozone to reduce molds in a cheese ripening room. *J Food Prot.* 2003;66:2355-2358.
6. Kure CF, Wasteson Y, Brendehaug J, Skaar I. Mould contaminants on Jarlsberg and Norvegia cheese blocks from four factories. *Int J Food Microbiol.* 2001;70:21-27.
7. Visconti V, Rigalma K, Coton E, Dantigny P. Impact of intraspecific variability and physiological state on *Penicillium commune* inactivation by 70% ethanol. *Int J Food Microbiol.* 2020;332:108782.
8. Gougouli M, Koutsoumanis KP. Risk assessment of fungal spoilage: a case study of *Aspergillus niger* on yogurt. *Food Microbiol.* 2017;65:264-273.
9. Ohta T, Park BJ, Aihara M, Ri N, Saito T, Sawada T, et al. Morphological significance of *Cladosporium* contaminants on materials and utensils in contact with food. *Biocontrol Sci.* 2006;11:55-60.
10. Park SY, Lee NY, Kim SH, Cho JI, Lee HJ, Ha SD. Effect of ultraviolet radiation on the reduction of major food spoilage molds and sensory quality of the surface of dried filefish (*Stephanolepis cirrhifer*) fillets. *Food Res Int.* 2014;62:1108-1112.
11. Taniwaki MH, Hocking AD, Pitt JI, Fleet GH. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *Int J Food Microbiol.* 2001;68:125-133.

12. Dao T, Dantigny P. Control of food spoilage fungi by ethanol. *Food Control*. 2011; 22:360-368.
13. Ministry of Food and Drug Safety. Food code [Internet]. 2017 [cited 2022 Sep 19]. Available from: [https://foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01\\_02.jsp?idx=263](https://foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_02.jsp?idx=263)
14. Kim JH, Lee ES, Song KJ, Kim BM, Ham JS, Oh MH. Development of desiccation-tolerant probiotic biofilms inhibitory for growth of foodborne pathogens on stainless steel surfaces. *Foods*. 2022;11:831.
15. Shin HJ, Choi HJ, Kim DW, Ahn CS, Lee YG, Jeong YK, et al. Probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070. *J Life Sci*. 2012;22:1194-1200.
16. Choi KC, Park HS, Lim YC. *Pediococcus pentosaceus* KCC-23 and composition containing it. KR patent 10-1700625. 2017.
17. Ruppitsch W, Nisic A, Hyden P, Cabal A, Sucher J, Stöger A, et al. Genetic diversity of *Leuconostoc mesenteroides* isolates from traditional montenegrin brine cheese. *Microorganisms*. 2021;9:1612.