

김치 유래의 내산성 유산균으로 제조한 요구르트의 이화학적 특성

김 선 재

목포대학교 식품산업기술연구센터(RRC)

(2005년 4월 19일 접수)

Physicochemical Characteristics of Yogurt Prepared with Lactic Acid Bacteria Isolated from *Kimchi*

Seon-Jae Kim

Food Industrial Technology Research Center, Mokpo National University

(Received April 19, 2005)

Abstract

Fourteen strains out of fifty six strains of lactic acid bacteria isolated from Kimchi showed a resistance to artificial gastric juice. In particular, lactobacilli AK 3, AK 7, BK 28, and DK 37 showed a strong resistance and their viable cell counts of the initial stage were no change after the 2 hours cultivation in an artificial gastric juice. All five lactic acid bacteria were used as starters in producing yogurts. The physicochemical characteristics of yogurts were examined. The original pH, titratable acidity, viscosity and viable cell counts of yogurts were 3.78~4.32, 0.96~1.41%, 1,659~2,348 cps and $1.1 \times 10^9 \sim 2.1 \times 10^9$ cfu/mL, respectively. The β -galactosidase activity reached maximum at 48 hr, and reduced gradually during incubation.

Key Words : lactic acid bacteria, Kimchi, yogurt, β -galactosidase activity

1. 서론

김치는 배추나 무를 주원료로 마늘, 생강, 파, 고춧가루, 젓갈 등 다양한 향신료를 첨가하여 일정기간 발효시킨 한국의 고유 발효식품이며 이들 원료와 미생물의 작용에서 유래되는 성분이 잘 조화되어 고유의 맛을 나타내게 된다¹⁾. 이러한 채소 발효식품과 관련된 미생물 중 젓산균들은 그 영양학적 및 약리학적 장점들이 부각되고 있으며, 김치의 기능성과 효능에 관한 연구결과들이 활발하게 진행되면서 유산균의 활용에 대한 인식이 재평가되고 있다^{2,3)}. 젓산균은 우유, 채소류 발효식품 그리고 유산균 제제의 제조에 이용되는 것 이외에도 그 대사산물들이 인체의 영양 강화와 여러 가지 생리활성이 있음이 밝혀지고 있다^{4,5)}.

김치 발효과정에 관여하는 유산균은 유산과 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해되지만 안전성이 높은 bacteriocin과 H₂O₂ 및 diacetyl 생성으로 인한 항균작용을 나타낸다^{6,7)}. 또한 유산균은 약물대사, 항돌연변이성, 항암성, 위액 분비촉진 및 방사선 저항성 등의 특징을 가지는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 최근에 유산균의 특징 중에 probiotics 라는 기능적인 측면에 관심이 모아지고 있다. Probiotics는 살아있는 균주를 섭취한다는 점에

서 항생제의 첨가로 야기될 수 있는 잔류 및 내성문제를 해결하는 항박테리아제로 장내 미생물군의 균형유지와 대장균의 감소를 통한 성장 촉진 등의 효과를 나타내는 신생 성장촉진제라 할 수 있다⁹⁻¹¹⁾.

한편 유산균이 분비하는 β -galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase, EC.3.2.1.23)는 lactose를 glucose와 galactose로 분해, 생산하는 효소¹²⁾로서 우유나 유가공품 특히, whey에서 lactose의 함량을 낮추고, lactose intolerance와 식품에서 lactose로 인한 농축유제품과 아이스크림에 생기는 sandiness, 그리고 낮은 감미도를 해결하는 방안으로 연구되어 왔다¹³⁾.

본 연구에서는 우리나라 전통 발효식품인 김치로부터 내산성 유산균을 분리하여 동정하고, 향후 이들 유산균을 이용하여 우유를 원료로 하는 요구르트 등 여러 발효식품에 응용할 수 있는지 여부를 조사하기 위해 이들 균주를 이용하여 요구르트를 제조하였다. 제조한 요구르트의 이화학적 특성과 유산균의 β -galactosidase 활성도 및 유산균의 생존율 등을 조사 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 유산균의 분리

김치로부터 유산균의 분리는 전남 목포지역 가정에서 담근 숙성정도가 각기 다른 5종의 김치 20점을 시료로 사용하여 실시하였다. 균주의 순수분리는 0.02% sodium azide를 첨가한 MRS agar¹⁴⁾를 사용하여 각 김치에서 2~4균주씩 분리하여 총 35균주를 순수분리 하였다. 순수분리된 유산균주는 MRS agar에 접종하여 37℃에서 24시간 배양시킨 후 4℃에서 보관하면서 사용하였다.

2. 인공위액에 대한 내성 유산균의 선발

인공위액은 Kobayashi 등¹⁵⁾의 방법에 따라 HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정된 MRS broth에 pepsin 1%를 첨가하여 사용하였다. 인공위액에서의 내성균주 선발은 분리된 유산균을 MRS broth에서 2회 이상 계대배양하여 37℃에서 24시간 진탕 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 이어 상등액을 버리고 균체를 회수하여 37℃로 유지된 인공위액을 상등액과 동량으로 첨가하여 37℃에서 3시간 진탕하였다. 3시간 배양 후 0.02% sodium azide를 첨가한 MRS agar에 streaking하여 37℃에서 24시간 배양 후 colony 생성 유무를 관찰하였다.

인공위액에서 선발된 균주의 생존 특성을 조사하기 위하여, 균주를 인공위액에서 2시간 배양 후 0.1% 멸균 peptone을 사용하여 희석하였다. 이 희석액을 MRS agar(Difco, USA)에 접종하여 37℃에서 48시간 동안 배양 후 생성된 colony를 계측하여 배양전의 생균수와 비교하였다.

3. 요구르트 제조 및 이화학적 특성조사

시판우유에 탈지분유 (3%, w/v)를 첨가하여 멸균(121℃, 15분)한 배지에 선발된 내산성 유산균 배양액을 각각 5%(v/v)의 농도로 접종한 후 37℃에서 24시간 정지배양하여 요구르트를 제조하였다. 제조된 요구르트의 pH는 pH meter (Isteck, Korea)로, 산도는 Collins¹⁶⁾의 방법에 따라 측정하였고, 점도는 200mL의 요구르트를 8℃의 cold room에서 Brookfield viscometer (DV-II, USA)를 이용하여 측정하였다. 그리고 요구르트의 생균수는 희석평판법으로 계수하였다¹⁷⁾.

4. β -galactosidase 활성도

김치로부터 선발된 내산성 유산균을 starter로 이용하여 요구르트를 제조하고 경시적으로 β -galactosidase 효소 활성도와 유산균의 생존율을 측정하였다. β -Galactosidase의 조효소액은 요구르트 2g에 2mL의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 가한 후 2분간 초음파 처리하였고, 기질은 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)를 5mM되도록 녹여 5mL씩 나눠 4℃에 보관하며 사용하였다. β -

Galactosidase 효소 활성은 준비된 기질 5mL에 조효소액 1mL를 첨가하여 37℃에서 15분간 반응시키고 ice-bath에서 급냉시킨 후 2.5mL의 1.0M Na₂CO₃ 용액을 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액은 spectrophotometer를 이용하여 420nm에서 유리 o-nitrophenol을 정량하여 측정하였다. 효소활성의 정도는 시료 1g에서 1분 동안 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG)로부터 1 mol의 o-nitrophenol을 유리하는 것을 1 unit로 하였다^{17,18)}.

III. 결과 및 고찰

1. 인공위액에 대한 내성 유산균의 분리

전남 목포의 각 가정에서 담근 김치로부터 산패 시작시기인 pH 3.0~4.0에서 21균주, 김치의 최적 가식기인 pH 4.0~4.5 범위에서 16균주, 숙성 초기 김치에서 12균주, 김치 담금 직후의 7균주 등 총 56균주의 유산균을 각각 분리하였다. 김치에서 분리한 총 56균주의 유산균 중 14균주가 pH 2.5인 인공위액에 내성을 나타내었다. pH의 분포별로 보면 pH 3.0~4.0 범위의 유산균들은 대체로 산에 대한 내성이 강한 균주들이었으며 김치의 숙성기간별로 내산성균 등이 고루 분포되는 것으로 보아 김치의 숙성도에 관계없이 김치 발효 관련 유산균은 인공위액에 대해 내성이 있을 것으로 판단되었다.

김치로부터 분리된 유산균 중 14균주를 인공위액에서 2시간 진탕 후의 생존 정도를 조사한 결과를 <Table 1>에 나타냈다. 선발된 유산균 모두 인공위액에서 2시간 배양 후에 나타난 경향은 초기 유산균가 대략적으로 수 10⁹/mL에서 배양 후는 유산균수가 10⁷~10⁹/mL를 나타냈다. 유산균의 생존정도는 균주에 따라 다소 차이는 있겠으나 대체로 1~2 log cycle의 감소현상을 나타냈다. 김치로부터 분리된 내산성 유산균 AK 3, AK 7,

<Table 1> Survival of the lactic acid bacteria isolated from Kimchi in artificial gastric acid

Strain	Control(CFU/mL)	Pepsin(pH2.5)(CFU/mL)	Survival (%)
AK 3	4.2 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸	61.9
AK 7	3.7 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸	64.9
AK 14	3.3 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸	42.1
BK 24	2.4 × 10 ⁹	2.1 × 10 ⁸	9.2
BK 28	2.2 × 10 ⁹	1.7 × 10 ⁹	77.3
CK 29	3.6 × 10 ⁸	3.1 × 10 ⁶	0.9
CK 33	5.5 × 10 ⁹	1.1 × 10 ⁹	37.1
CK 36	1.1 × 10 ⁹	4.1 × 10 ⁷	3.7
DK 37	6.2 × 10 ⁹	3.5 × 10 ⁹	56.5
DK 42	3.5 × 10 ⁷	3.2 × 10 ⁶	9.1
DK 43	5.2 × 10 ⁸	3.1 × 10 ⁶	0.6
EK 56	3.6 × 10 ⁸	6.3 × 10 ⁶	1.8
EK 64	1.4 × 10 ⁹	4.1 × 10 ⁸	29.3
EK 87	3.2 × 10 ⁸	3.7 × 10 ⁶	1.2

<Table 2> Physicochemical characteristics of yogurt made by using lactic acid bacteria for 24hr at 37°C

Strains used for yogurt	Original pH	Titrateable acidity as lactic acid(%)	Viscosity (cps)	Viable cells (cfu/mL)
AK 3	4.05	0.99	1,785	1.3 × 10 ⁹
AK 7	3.98	1.21	1,876	1.1 × 10 ⁹
AK 14	4.32	0.96	1,659	1.9 × 10 ⁹
BK 28	3.78	1.41	2,348	2.1 × 10 ⁹
DK 37	4.12	1.09	2,089	1.7 × 10 ⁹

BK 28 그리고 DK 37 균주들은 초기 생균수에 비해 인공위액에서 2시간 진탕 후의 생균수가 감소하였지만, 그 생존율이 59~77%를 나타내 다른 유산균에 비해 인공위액에 대해 비교적 높은 내성을 나타낸 것으로 판단된다.

인간의 순수한 위액의 pH는 1.4~2.0 정도로 거의 대부분의 미생물은 사멸될 것으로 판단되나, 섭취된 음식물 등의 완충작용에 의해 위의 pH가 다소 높아져 미생물의 사멸을 어느 정도 감소시킬 수 있다고 생각된다¹⁹⁾. 그러나 유산균이 정상작용 등 체내에서 여러 가지 생리적 기능을 발휘하려면 위 내에서 생존이 가능해야 한다. 따라서 유산균을 생균 형태로 이용하는 발효 제품에 있어서 발효제품안에 존재하는 유산균을 인간이 섭취할 때 위를 통과하는 동안 낮은 pH 조건과 유기산에 의해 그 생존율이 저하될 수 있어 사전에 인공위액 등에 내성을 지니는 유산균들을 채집하고 분리하여 발효식품 등의 품질 안정화 인자 또는 건강기능성식품 인자로서 이용하는 것 중요한 과제라 생각되며, 본 연구결과에서는 선발된 5균주도 식품에 있어 그 활용도가 넓을 것으로 판단되었다.

2. 내산성 유산균으로 제조한 요구르트의 특성

탈지분유가 3% 첨가된 시판우유에 선발된 내산성 유산균 5 균주를 starter로 사용하여 요구르트를 제조하였다. 제조된 요구르트에 대하여서는 이화학적 특성과 생균수를 측정하였고 그 결과는 <Table 2>에 나타났다. 요구르트 5종류는 전체적으로 pH는 3.78~4.32 사이였으며, 산도는 0.96~1.41%, 그리고 점도는 1,659~2,348cps로 나타났다. 요구르트의 유산균 생균수는 1.1 × 10⁹~2.1 × 10⁹cfu/mL의 범위를 나타냈다. 내산성 유산균 BK 28이 다른 균주에 비해 pH 3.78, 산도는 1.41%를 나타내었고 점도가 2,348cps로 가장 높게 나타났다. 국내에서 시판되는 농후 발효유의 점도는 대략 256~3,164cps인 것으로 알려져 있는데²⁰⁾, 김치에서 분리한 내산성 유산균으로 제조한 요구르트도 비교적 높은 수치를 나타내어 본 연구에 사용된 내산성 유산균은 다양한 발효제품에 사용이 가능할 것으로 판단되었다.

3. 내산성 유산균의 β-galactosidase 활성

김치로부터 분리된 내산성 유산균인 AK 3 균주 등을 starter로 하여 우유배지에 접종하고 37°C에서 72시간 동안 배양하며 경시적으로 β-galactosidase 역가를 측정된 결과를 <Table 3>에 나타났다. 내산성 유산균의 β-galactosidase 활성은 경시적

<Table 3> Activity of β-galactosidase in yogurt incubated with lactic acid isolated from Kimch

Incubation time(hr)	Lactic acid isolated from Kimchi				
	AK 3	AK 7	AK 14	BK 28	DK 37
0	1.8 ¹⁾	2.6	1.6	2.1	2.7
12	3.7	8.4	6.5	7.4	4.3
24	9.6	12.5	11.4	14.9	10.6
36	10.2	12.6	14.3	20.6	12.6
48	10.4	12.8	16.3	34.3	15.4
60	8.6	8.2	14.2	29.4	11.6
72	7.3	6.2	9.6	8.6	10.3

1) β-galactosidase activity(unit)

으로 효소활성이 증가하는 경향을 나타냈으며, 48시간에 최고의 활성도를 나타냈지만 그 이후에는 감소하는 경향을 나타냈다. 특히 BK 28은 발효 24시간의 β-galactosidase 활성과 비교해 볼 때 발효 48시간에서 2.1배 이상으로 현저하게 증가하는 경향을 나타냈다. Rhee 등²¹⁾은 김치에서 *Lactobacillus plantarum*을 분리하여 β-galactosidase 활성을 측정된 결과, β-galactosidase는 발효 48시간에서 2배 이상 증가하는 경향을 나타냈다고 보고 하였는데, 본 연구에서도 BK 28 유산균에서 유사한 결과를 나타냈다.

이상의 여러 가지 결과를 종합하여 볼 때, 본 연구에서 얻어진 김치 유래의 내산성 유산균은 산업적 발효제품에 다양하게 응용이 가능할 것으로 생각된다. 특히 내산성 유산균 BK 28은 요구르트 제조에 사용될 수 있는 최상의 조건을 가지고 있는 것으로 나타나, 현재 이 유산균이 발현하는 기능성 검정과 동정 연구를 진행 중에 있다.

IV. 요약

전남 목포의 각 가정에서 담근 김치로부터 분리된 총 56균주의 유산균 중 14균주가 pH 2.5인 인공위액에 내성을 나타냈다. 이 내산성 유산균은 인공위액에서 2시간 배양할 경우, 초기 유산균수의 수 10⁹/mL에서 유산균수가 10⁷~10⁹/mL의 범위를 나타냈다. 김치로부터 분리된 내산성 유산균 AK 3, AK 7, BK 28 그리고 DK 37 균주들은 초기 생균수에 비해 인공위액에서 2시간 진탕 후의 생균수가 감소하였지만, 그 생존율이 59~77%를 나타내 다른 유산균에 비해 인공위액에 대해 비교적 높은 내성을 나타냈다. 내산성 유산균으로 배양한 요구르트 5종류는 전체적으로 pH는 3.78~4.32 사이였으며, 산도는 0.96~1.41%, 그리고 점도는 1,659~2,348 cps로 나타났다. 요구르트의 유산균 생균수는 1.1 × 10⁹~2.1 × 10⁹ cfu/mL의 범위를 나타냈다. 내산성 유산균 BK 28이 다른 균주에 비해 pH 3.78, 산도는 1.41%를 나타내었고 점도가 2,348 cps로 가장 높게 나타났다. 산성 유산균의 β-galactosidase 활성은 경시적으로 효소활성이 증가하는 경향을 나타냈으며, 48시간에 최고의 활성도를 나타냈지만 그 이후에는 감소하는 경향을 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부지원 지역협력연구센터인 목포대학교 식품산업기술연구센터(RRC)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

■ 참고문헌

- 1) Cheigh HC, Park KY. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of Kimchi. *Crit. Rev Food Sci Nut* 34: 175-203, 1994
- 2) Kim DS. Characteristics of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. Oh-B3. *Kor J Microbiol Biotechnol* 30: 184-188, 2002
- 3) Ahn DK, Han TW, Shin HY, Jin IN, Ghim SY. Diversity and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Kimch. *Kor J Microbiol Biotechnol* 31: 191-196, 2003
- 4) Atrih A, Rekhif N, Milliere JB, Lefebvre G. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Can J Microbiol* 39: 1173-1179, 1993
- 5) Klaver FAM, van der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile saltconjugating activity. *Appl Environ Microbiol* 59: 1120-1124, 1993
- 6) Kim BJ, Min BH, Kim JH, Han HU. Isolation of dextran-producing *Leuconostoc lactis* from Kimchi. *J Microbiol* 39: 11-16, 2001
- 7) Kwon DY, Koo MS, Ryoo CR, Kang CH, Min KH, Kim WJ. Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in Kimchi and its characteristics. *J Microbiol Biotechnol* 12: 96-105, 2002
- 8) Rhee CH, Park HD. Isolation and characterization of lactic acid bacteria producing antimutagenic substance Korean Kimchi. *Kor J Microbiol Biotechnol* 27: 15-22, 1999
- 9) Fernandez MF, Boris S, Barbes C. Probiotic properties of human *lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 94: 445-449, 2003
- 10) Lee CH, Jun KD, Kim WS, Paik, HD Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Lett Appl Microbiol* 32: 1-6, 2001
- 11) OSullivan GC. Probiotics. *Brit J Surg* 88: 161-162, 2001
- 12) Greenberg NA, Mahoney RR. Rapid purification of β -galactosidase(*Aspergillus niger*) from a commercial preparation. *J. Food Sic* 46: 684-689, 1981
- 13) Pazur JH, Tipton TM, Budovich J, Marsh JM. Structural characterization of products of enzymatic disproportionation of lactose. *J Amer Chem Soc* 80: 119-121, 1958
- 14) Lee NK, Kim HW, Cho SY, Paik HD. Some probiotic properties of some lactic acid bacteria yeasts isolated from Jeot-gal. *Kor J Microbiol Biotechnol* 31: 297-300, 2003
- 15) Kobayashi Y, Tohyama K, Terashima T. Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Jpn J Microbiol* 29: 691-697, 1974
- 16) Collins JL, Ebah CB, Mount JR, Demott BJ, Draughon FA. Production and evaluation of milk-sweet potato mixtures fermented with yogurt bacteria. *J Food Sci* 56: 685-688, 1991
- 17) Shan N, Jelen P. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *J Food Sci* 55: 506-509, 1990
- 18) Martini M, Bollweg CGL, Levitt MD, Savaiano DA. Lactose digestion by yogurt β -galactosidase : influence of pH and microbial cell integrity. *Am J Clin Nutr* 45: 432-436, 1987
- 19) Lee NK, Kim TH, Choi SY, Lee SK, Paik HD. Identification and probiotic properties of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jept-gal, a Korean fermented food. *Food Sci Biotechnol* 13: 411-416, 2004
- 20) Shin YS, Sung HJ, Kim DH, Lee KS. Survival rate of lactic acid bacteria and the change of β -galactosidase activity in commercial yogurts under the acidic conditions. *Agr Chem Biotech* 37: 143-147, 1994
- 21) Rhee Y.H, Kang MS. Physicochemical characteristics and β -galactosidase activity of *Lactobacillus plantarum* from Kimchi. *Agr Chem Biotech* 39: 54-59, 1996