

김치로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum* JK-01의 동정 및 생리적 특성

조진국* · 이관호¹ · 조성진 · 윤여창² · 황성구 · 허강철 · 최일신

국립한경대학교 친환경농축산물연구센터(GRRC) 및 동물생명환경과학부

¹중국 연변대학교 농학원 식품과학부, ²건국대학교 동물생명과학대학 축산식품생물공학과

The Identification and Physiological Properties of *Lactobacillus plantarum* JK-01 Isolated from *Kimchi*

Jin-Koo Cho*, Guan-Hao Li¹, Sung-Jin Cho, Yoh-Chang Yoon², Seong-Gu Hwang, Kang-Chil Heo, and Il-Shin Choe

Gyeonggi-do Regional Research Center and Dept. of Animal Life & Environment Science, Hankyong National University, Anseong 450-149, Korea

¹Department of Food Science, Agricultural College of Yanbian Univeristy, Jilin Province, China

²Dept. of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

ABSTRACT

In order to identify probiotic microorganisms, 25 isolates of *Lactobacillus* sp. were selected from *kimchi* based on their growth rates, lactic acid production and salt tolerance. The isolate JK-01 was identified as *Lactobacillus plantarum* by the API kit and 16S rDNA analysis (99.9% of homology), and named as *L. plantarum* JK-01. The maximum number of *L. plantarum* JK-01 was reached at 18 hr fermentation in MRS broth and the pH gradually decreased to 4.5. *L. plantarum* JK-01 showed high enzyme activities for xylanase, amylase, protease, and phytase on MRS agar plates containing each substrate. *L. plantarum* JK-01 showed high resistance to acidic pH and bile salts, and grew well even at pH 2.0 and 1.0 % bile salt. In particular, *L. plantarum* JK-01 showed high heat stability as shown by 3.3×10^3 CFU/mL at 60°C. The isolate showed remarkable antimicrobial activity against *E. coli* in MRS broth based on its disappearance after 18 hr and clear zone formation using a paper disk assay. These results suggest that *L. plantarum* JK-01 may be probiotic in nature.

Key words : *kimchi*, *Lactobacillus plantarum* JK-01, probiotics, antimicrobial activity

서 론

우리나라의 대표적인 전통식품인 김치에서는 유산균이 유기산, bacteriocin 등의 항균성물질을 생산하여 김치발효에 유해한 세균들의 증식을 억제하고 각종 향미 성분을 생산하여 김치에 독특한 향미를 부여한다. 김치의 주요 유산균은 *Lactobacillus* 및 *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* 속이 있는 것으로 밝혀졌으며, 16S rRNA와 RAPD-PCR 등의 동정법에 의하여 42.6-82%가 *Weissella koreensis* 인 것으로 보고된 바 있다(Kim and Chun, 2005). 우점 유산균은 제조 장소, 식품재료, 숙성 온도 등에 따라 다른 결

과가 연구자들에 의해 제시되고 있다. 또, 김치에서 분리한 유산균은 최근에 조류독감 바이러스(AI virus)의 감염 억제효과가 있다고 알려져 식품과 사료업계에서 주목을 받고 있으며 이미 *Weissella* sp.는 식품 및 사료첨가제로 이용되고 있다(이종화, 2006). 이에 반하여, 김치의 발효 후기에 출현하는 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus brevis* 등은 여분의 당류를 이용하여 젖산을 더 많이 생성하므로 김치를 시게 하는 원인균으로 김치의 산패균으로 알려져 있다(강상모, 1996). 김치의 산패를 방지할 목적으로 이러한 유산균의 증식을 억제 또는 제거하기 위한 연구와 특허가 소개되어 있으나, 성공적인 사례는 아직까지 없다. 그러나, 증식이 빠르고 pH를 낮추는 성질을 가진 *L. plantarum*을 발효스타터나 생균제로 이용할 경우는 오히려 장점으로 이용될 가능성이 있다.

L. plantarum 균주는 생균제에서는 유산을 생성하여 제품의 pH를 낮추어 주고 풍미를 부여하는 등 긍정적 역할

*Corresponding author : Jin-Kook Cho, Dept. of Animal Life & Environment Science, Hankyong National University, Anseong 450-149, Korea. Tel: 82-31-670-5208, Fax: 82-31-670-5127, E-mail: chophd@empal.com

을 하고 있으며, 발효소시지에서는 유산균이 성장하면서 유해한 미생물은 사멸하고 수분이 감소하여 발효소시지의 저장성이 길어지는 기능을 부여하고 있다(Ammor and Myo, 2007). 전통적인 발효식품으로 그 안전성이 입증된 김치에서 분리한 유산균은 한국인에게는 보다 친화적이고 안전한 발효스타터가 될 가능성이 있다. 미국과 일본에서는 식물성 유산균을 첨가하여 발효시킨 음료들이 인기를 더하고 있으므로 김치 유산균을 분리 생산하여 식품이나 생균제로 이러한 기능을 응용하여 보는 것도 바람직한 일이라고 할 수 있다.

생균제는 일반적으로 숙주에 정착하여 유해세균을 억제하거나 배제하거나 산을 생성하거나 병원체의 생장에 항균적 작용을 하는 과산화수소나 박테리옌을 생산하는 능력을 내포하고 있으며, 그 효과로 위장질환의 예방(Tannock *et al.*, 1988)과 면역증강(Kimura *et al.*, 1997) 및 항돌연변이, 항암활성(Fuller and Gibson, 1997) 등이 보고되고 있다. 특히, 식품분야의 프로바이오틱 유산균은 발효 유제품 및 유산균 정장제 및 생균제 등으로서 널리 사용되고 있고(Hood *et al.*, 1988), 요구르트나 치즈 등 발효유제품에 대한 소비자의 기호가 다양화되면서 우수한 맛과 향기를 주는 새로운 균주개발이 더욱 중요시되고 있다(Tannock, 1997). 또 장내에서 기능 발휘를 위해서는 선발된 장내 균총이 장내에 도달되도록 strain은 하부 장관내의 담즙산에 대한 내성을 지녀야 하며(Park *et al.*, 1996), 위액의 강산과 장내 상피세포에 대한 부착력과 해로운 균총에 비해 증식속도가 빠르며 유해세균에 대한 길항력 등이 요구된다(MacDonald *et al.*, 1990; Havenaar *et al.*, 1992; Tannock, 1997).

국외에서는 생균제 개념으로 소개되지는 않았지만 전통적으로 사용되어 온 유산균들이 있고 실험방법의 발달과 함께 새로운 프로바이오틱 유산균들이 개발되어 낙농산업에서의 사용은 일반화되고 있다(Leory *et al.*, 2006). 국내에서는 이미 김치의 *L. plantarum*에 대해 많은 연구가 이루어 졌는데 Lee(1996)가 인공위액과 담즙에 대한 내성이 있는 유산균을 분리한 바 있으며, 아질산염 제거능에 대한 연구도 보고된 바 있으나(Oh *et al.*, 1997), 생균제로서의 이용성에 대한 연구는 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 생균제로 이용할 가능성 있는 유산균주를 선발하기 위하여 김치에서 *L. plantarum*을 탐색하여 분리·동정하였고, 탐색균주의 성장특성 및 효소활성과 내열성, 내산성, 내담즙산성, 항균효과 등을 측정하였다.

재료 및 방법

재료

김치는 가정에서 담근 김치나 시판김치(광천식품, 안성)를 구입하여 이용하였고, *Escherichia coli* KCTC 1041는 한국유전자은행(Korean Collection for Type Cultures,

KCTC)의 표준균주를 사용하였다. MRS broth와 nutrient broth는 Difco사(Sparks, MD, USA)에서 구입하였다.

Lactobacillus sp.의 분리 및 동정

김치를 무균적으로 잘게 다진 다음, 그 중 1 g을 멸균 생리식염수 20 mL에 현탁하고 단계적으로 희석하여 0.2% CaCO₃를 포함한 MRS 고체배지에 도말하였다. 37°C에서 48시간 배양하여 자란 colony들 중 크고 주위 colony로부터 잘 분리된 것을 선택한 뒤 0.02% NaN₃가 첨가된 MRS 고체배지에서 30°C에서 48시간 동안 배양하였다.

김치로부터 1차적으로 배지상의 colony 형태, 냄새, 현미경 관찰 및 내생포자 형성 여부, 내염성, 산생성 등을 관찰하여 25개의 유산균으로 추측되는 colony가 얻어졌다. pH하강과 성장속도가 빠른 5개의 균주를 선택하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Williams *et al.*, 1986)에 따라 비교하였고, API 50CHL reagent kit (Biomérieux, L'etoile, France)의 당이용 실험을 통하여 *L. plantarum*을 동정하였다. 즉, API 50CHL reagent kit의 49개의 당에 대하여 37°C에서 48시간 배양하면서 색의 여부를 관찰하여 각각의 당을 탄소원으로 이용하는지의 여부를 실험하고 동정여부는 API Lab Plus Software중 API50 CHL(version 4.0)에서 검색하였다.

또, 이 균주로부터 DNA를 추출하여 27F Primer (AgAg TTTgATCMTGGCTCAg)와 1492R Primer (TACggYTAC CTTgTTACgACTT)를 이용하여 94°C에서 45초, 55°C에서 60초, 72°C에서 60초로 된 35 사이클의 polymerase chain reaction으로 증폭한 후, 16S rDNA의 염기서열을 분석하고 PC컴퓨터에서 BLAST 프로그램을 이용하여 비교하였다(Löffler *et al.*, 2000). 최종 분리한 균주는 30%의 glycerol이 첨가된 MRS액체 배지에 균을 넣어 -70°C에서 동결보존하였다.

MRS 배지상의 성장특성과 pH 변화

L. plantarum JK-01의 성장특성은 Jar Fermenter(BK511, Kobiotech, Korea)를 이용하여 각각 MRS broth에 pH 조절없이 32°C에서 48시간 배양하였다. 총 생균수는 배양액을 0.85% NaCl 용액에 10진 희석시킨 다음 평판 배지에 0.1 mL씩 분주하여 도말한 후, 최적 온도에서 배양하고 콜로니 형성단위(colony forming unit)를 측정하여 계산하였다(APHA, 1985). pH는 pH meter (HM-5E, Toa, Japan)를 이용하여 6시간 간격으로 48시간 까지 측정하였다.

효소분비 활성

효소활성을 측정하기 위해 *L. plantarum* JK-01의 24시간 배양액을 4°C, 430×g로 20분간 원심분리하여 균체를 회수한 후 Table 1에서 제시한 바와 같이 각 기질을 포함하는 기초배지에 형성되는 clear zone의 크기로 5가지 가

Table 1. Medium compositions used for detection of the some hydrolytic enzyme activities by using a agar plate method

Enzyme	Substrate (basal medium : MRS ¹⁾)	Dye	Clear zone
Protease	2%(w/v)skim milk		+
Cellulase	1%(w/v)CMCellulose ²⁾	0.2%(w/v)congo red sol.	+
Amylase	1%(w/v)soluble starch	0.2%(w/v)I ₂ +4%(w/v)KI	+
Xylanase	1%(w/v)oat spelt xylan		+
Phytase	Ca-Phytate(5), NH ₄ NO ₃ (5) MgSO ₄ (0.5), KCl(0.5), FeSO ₄ (0.01), MnSO ₄ (0.01), Dextrose(15) at g/L		+

¹⁾ MRS Agar.

²⁾ Carboxymethyl cellulose(medium viscosity, Sigma).

수분해효소의 분비 여부를 결정하였다(전홍기, 1998; Shiral *et al.*, 1994). Protease 및 xylanase, phytase는 배양 후 곧 바로 clear zone 확인이 가능하였다. Cellulase의 경우 0.2% (w/v) congo red액으로 염색한 후 1 M NaCl로 씻어내어 clear zone을 확인하였으며, α-amylase의 경우 0.2%(w/v) I₂와 4%(w/v) KI를 함유한 용액으로 염색하여 clear zone의 생성 여부를 확인하였다.

내산성 및 내담즙산성 분석

내산성 평가는 Kobayashi(1974)방법을 수정하여 MRS broth를 0.1 N HCl로 pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0로 조정된 다음 *L. plantarum* JK-01을 첨가하여 30분 정치 후 생존한 미생물수를 측정하였다.

내담즙산성은 oxgall(Sigma)을 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%(w/v) 되게 첨가한 MRS broth에 *L. plantarum* JK-01 균주 (2.0×10⁹ CFU/ml)를 접종하여 37°C에서 6시간 방치한 후, 각 broth 0.1 mL를 MRS agar plate에 도말하여 나타난 미생물수를 계수하여 생존율(%)을 확인하였다.

내열성 분석

열 안정성은 유산균을 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 80°C로 유지된 MRS broth(Difco)에 넣어 10분간 정치 후 생존한 미생물 수를 계수하였다.

항균활성 측정

미리 *L. plantarum* JK-01 균주는 MRS배지에서, 대장균은 Nutrient broth에서 12-24시간 배양한 후, 대조구로 MRS 배지에는 대장균만을 약 5.0×10⁷ CFU/mL이 되도록 접종하고, 다른 하나의 MRS 배지에는 JK-01과 대장균이 각각 약 5.0×10⁷ CFU/mL이 되도록 혼합 접종하였다. 접종된 액상배지를 37°C 배양기에서 정치 배양하면서 3시간 간격으로 배양액을 채취하였고, 채취액은 다시 멸균 생리식염수로 희석한 다음 nutrient agar plate에 도말하였다. 37°C에서 24시간 배양하여 나타난 집락을 대장균수로 계수하였다.

다른 방법으로는 nutrient agar plate에 15% *E. coli* KCTC 1041를 얇게 분주하여 준비한 후, paper disc를 배

지위에 올려 놓은 다음 pH를 7.0으로 조정된 유산균액을 50 μL씩 흡수시켜 37°C에서 24시간 배양하여 투명한 형성 유무를 조사하였다. 대조군으로는 broth만 첨가한 경우와 50 ppm의 oxytetracyclin(Sigma)을 첨가한 경우로 하였고, 유산균을 원심분리한 후의 상층액과 침전된 균체를 사용하여 항균실험에 이용하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정결과

김치로부터 1차적으로 내염성과 산생성이 있는 25개의 유산균으로 추측되는 colony가 MRS palte에서 얻어졌으

Table 2. Sugar-fermentation of the isolated *Lactobacillus* JK-01 on API 50 CHL kit

Sugar substrate	Result	Sugar substrate	Result
Control	-	Esculin	+
Glycerol	-	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-xylose	-	Sucrose	+
L-xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	+
β-Methyl-D-xylose	-	Melezitose	+
Galactose	+	Raffinse	+
Glucose	+	Starch	-
Fructose	+	Glycogen	-
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	+
Rhamnose	+	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-lycose	-
Inositol	-	D-tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	+	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N-Acethyl-glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	+	2-keto-Gluconate	-
Arbutin	+	5-keto-Gluconate	-

+: Positive, -: Negative.

며, pH 하강과 성장속도가 빠른 5개의 균주를 선택하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Williams *et al.*, 1986)에 따라 비교하였고(data not shown), API kit를 이용하여 *L. plantarum*을 동정하였다. Table 2는 *L. plantarum*과 97.2%의 상동성을 나타낸 균주의 API kit의 당이용 결과이며 이 균을 최종적으로 분리한 균주로 하였다.

이 균주의 16S rDNA를 분석하여 비교하였을 때, Fig. 1과 같이 1,571 잔기의 염기배열을 나타냈고 homology를 검색한 결과 역시 *L. plantarum*과 99.9%의 상동성을 나타냈다. 이후 실험에서는 이 균주를 최종 분리한 균주로 하여 *L. plantarum* JK-01로 표기하였다.

MRS 배지상의 성장특성과 pH변화

L. plantarum JK-01의 최적의 성장조건을 구하기 위해 잘 정제된 MRS 배지에 48시간 배양하여 균수를 측정하였다. Fig. 2-A와 같이 MRS 배지에서는 18시간 배양 시 2.9×10^{10} CFU/mL로 최대균수에 달하였으며 이후는 점차 감소하는 것으로 나타났다. 성장에 따른 배양액의 pH

는 배양시간 경과에 비례하여 18시간까지 pH 4.5로 급격히 낮아졌으며 이후는 완만히 하강하며 일정한 수준을 유지하였다(Fig. 2-B). 이러한 결과는 이전의 유산균에 대한 연구결과(You *et al.*, 2005) 보다 성장속도가 빠른 편이며 pH는 조속히 하강한 것이므로 상업용으로 활용하기에 충분한 것으로 판단되었다.

효소분비 활성

프로바이오틱 생균들이 분비하는 효소는 사람이나 동물이 영양분을 섭취하였을 때 전분, 단백질 및 지방과 같은 영양소의 이용을 개선시킬 수 있으며, 이로 인해 음식물 또는 사료의 에너지 가치를 올릴 수 있다(Walsh *et al.*, 1993).

*Lactobacillus*는 *Bacillus*나 곰팡이와 달리 균체내에 분비 효소를 분비하는 것으로 알려져 있는데(전흥기, 1998), *L. plantarum* JK-01은 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 screening 배지상에서 각 기질을 분해하여 형성되는 투명환을 형성하여 각 효소활성을 가지고 있는 것으로 예측되었다. *L.*

```

1 ATTAATTTGA GAGTTTGATC CTGGCTCAGG ACGAACGCTG GCGGCGTGCC TAATACATGC
61 AAGTCGAACG AACTCTGGTA TTGATTGGTG CTTGCATCAT GATTTACATT TGAGTGAGTG
121 GCGAACTGGT GAGTAACACG TGGGAAACCT GCCCAGAAGC GGGGGATAAC ACCTGGAAC
181 AGATGCTAAT ACCGCATAAC AACTTGGACC GCATGGTCCG AGTTTGAAAG ATGGCTTCGG
241 CTATCACTTT TGGATGGTCC CGCGGCGTAT TAGCTAGATG GTGGGGTAAC GGCTCACCAT
301 GGCAATGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT AATCGGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC
361 CAAACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGAAAG TCTGATGGAG
421 CAACGCCGCG TGAGTGAAGA AGGGTTTCGG CTCGTAAAAC TCTGTTGTTA AAGAAGAACA
481 TATCTGAGAG TAACTGTTCA GGTATTGACG GTATTTAACC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC
541 GTGCCAGCAG CCGCGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTGT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA
601 GCGAGCGCAG GCGGTTTTTT AAGTCTGATG TGAAAGCCTT CGGCTCAACC GAAGAAGTGC
661 ATCGGAAACT GGGAAACTTG AGTGCAGAAG AGGACAGTGG AACTCCATGT GTAGCGGTGA
721 AATGCGTAGA TATATGGAAG AACACCAGTG GCGAAGGCGG CTGTCTGGTC TGTAACCTGAC
781 GCTGAGGCTC GAAAGTATGG GTAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCATACCGTA
841 AACGATGAAT GCTAAGTGTT GGAGGGTTTC CGCCCTTCAG TGCTGCAGCT AACGCATTAA
901 GCATTCCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG CTGAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCG
961 CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTCG AAGCTACGCG AAGAACCCTA CCAGGTCTTG
1021 ACATACTATG CAAATCTAAG AGATTAGACG TTCCCTTCGG GGACATGGAT ACAGGTGGTG
1081 CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC
1141 CTTATTATCA GTTGCCAGCA TTAAGTTGGG CACTCTGGTG AGACTGCCGG TGACAAACCG
1201 GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
1261 TACAATGGAT GGTACAACGA GTTGCGAACT CGCGAGAGTA AGCTAATCTC TTAAAGCCAT
1321 TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGC
1381 GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT
1441 GAGAGTTTGT AACACCCAAA GTCGGTGGGG TAACCTTTTA GGAACCAGCC GCCTAAGGTG
1501 GGACAGATGA TTAGGGTGAA GTCGTAACAA GGTAGCCGTA GGAGAACCCTG CGGCTGGATC
1561 ACCTCCTTTC T

```

Fig. 1. 16S rDNA sequence of *L. plantarum* JK-01.

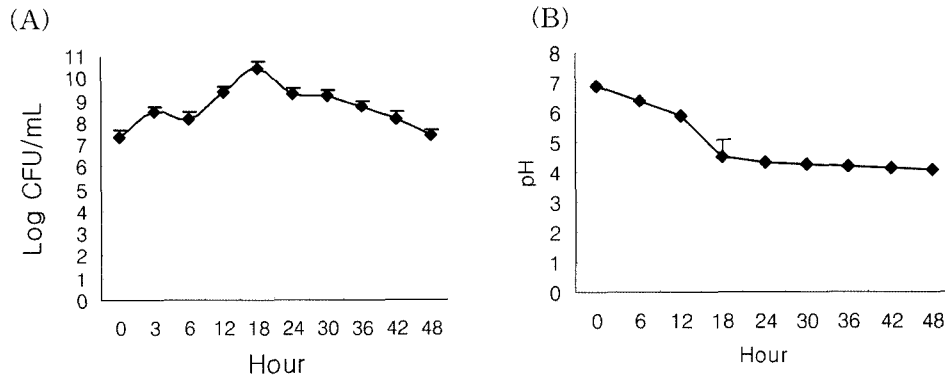


Fig. 2. Fermentation in MRS medium showing viable cell numbers (A) and pH change (B) of *L. plantarum* JK-01. Values are mean \pm SD.

plantarum JK-01의 효소들은 cellulase 효소활성은 미약한 편이었으나, xylanase, amylase, protease, phytase의 순으로 높은 활성을 포함하고 있는 것으로 나타났다. 이중 phytase는 단백질과 무기물질의 이용성을 감소시키며 배설되어 환경오염의 주요 원인으로 지적되고 있는 phytic acid를 분해하여 myo-inositol과 무기태인을 형성하게 하는 효소로 식물, 동물의 장관 및 미생물에 존재하는 것으로 알려져 있다(Eeckhout and Paepe, 1994). phytase 생산 미생물은 *Aspergillus* sp. 및 *Bacillus* sp.가 대표적이며 유산균의 phytase활성은 대체로 곰팡이와 *Bacillus* sp.가 생산하는 활성에 비해 낮은 것으로 알려졌다(Shiral *et al.*, 1994). 이러한 높은 효소활성은 곡류나 전분과 같은 물질의 소화에 도움을 줄 것으로 고찰되어 인체용이나 사료용으로 유용할 것으로 고찰된다.

내산성 및 내담즙산성

김치에서 분리한 *L. plantarum* JK-01의 내산성을 조사한 결과는 Fig. 4-A와 같이 pH 5에서는 7.4×10^8 CFU/mL, pH 2에서는 1.4×10^5 CFU/mL로 약 54% 감소하였다. 생균제로서 기능을 발휘하기 위해서는 pH 3 이하의 낮은 pH 조건의 위장관을 통과하여 소장내로 도달하여 생존하여야 한다(Booth, 1985). *L. plantarum*의 경우 세포내 pH는 다른 내산성 균주보다 낮은 4.6-4.8로 알려져 있고, 또 동물의 장에서 분리한 생균제인 *Enterococcus* sp.는 pH 3의 인공위액 조건에서 2시간 후의 생존율이 90-100%로 알려져 있다(Klaver and van der Meer, 1993). 본 연구에서는 분

리한 *L. plantarum* JK-01은 pH 2에서도 1.36×10^5 CFU/mL을 유지하여 강한 생존율을 나타냈다. 분비위액의 pH가 1-2이지만 타액과 음식의 섭취에 의해 희석되므로 위에서의 이 균의 생존율은 좋은 편으로 사료된다.

분리된 균주를 담즙산에 대한 내성을 실험하기 위하여 0.1-1.0%의 담즙산의 농도에서의 생존율을 조사한 결과, Fig. 4-B에 나타난 바와 같이 *L. plantarum* JK-01(5.7×10^8 CFU/mL)은 담즙산염 0.1%에서 5.1×10^8 CFU/mL로 약 89%가 유지되었으며 담즙산염 0.5% 및 1.0%에서도 10^6 CFU/mL 이상이 생존하였다. 담즙산은 십이지장에서 분비되는 물질로서 세균의 성장을 억제하는 기능을 지니고 있으며, 특히 장내 세균이 아닌 경우에는 담즙산이 함유된 배지에서는 자랄 수 없다고 알려져 있는데(Gilliand *et al.*, 1997), *L. plantarum* JK-01은 내담즙산이 우수한 것으로 확인되었다.

내열성

분리 유산균의 내열성은 MRS 배지에 투여한 다음 실온 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 80°C에서 10분간 정치 후 생존하는 수를 조사하였다(Fig. 5). 분리한 *L. plantarum* JK-01은 30에서 1.6×10^7 CFU/mL인 것이 40°C 이상으로 온도가 높아짐에 비례하여 사멸하기 시작하였으나 60°C에서도 3.3×10^3 CFU/mL의 균주가 측정되어 일반 유산균들보다는 내열성이 있는 것으로 판단되었다. 또한, 발효소시지에 이용할 경우는 pH 4.2-6.0 등에서 성장이 잘되어야 한다는 조건을 내세우고 있는데(Ammor and Myo, 2007), 분

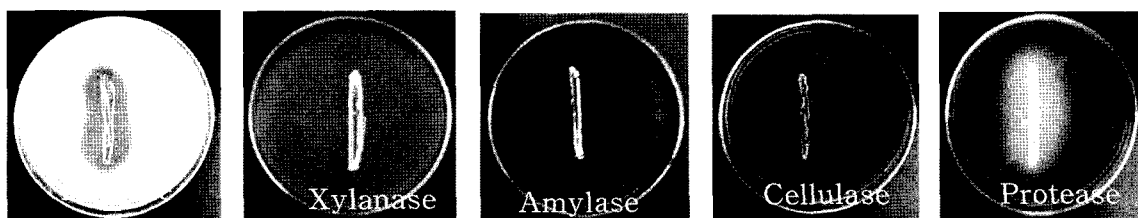


Fig. 3. Phytase, xylanase, amylase, cellulase and protease activities of *L. plantarum* JK-01 on MRS agar plates.

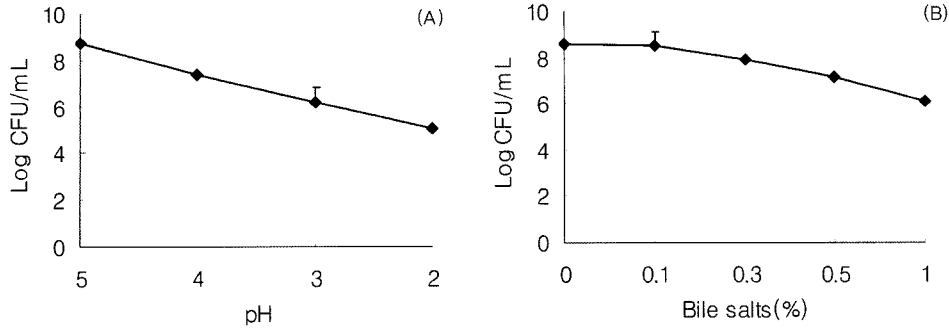


Fig. 4. pH resistance at various pH from 5.0 to 2.0 (A) and bile salts tolerance of *L. plantarum* JK-01 at various bile salt from 0 to 1.0% (B).

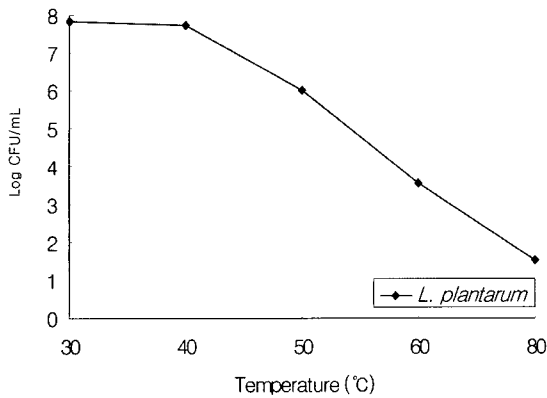


Fig. 5. Heat stabilities of *L. plantarum* JK-01.

를 측정하였다. Fig. 6-A에 나타난 바와 같이 *L. plantarum* JK-01은 6시간부터 급격히 대장균이 감소하기 시작하여 18시간 후에는 완전히 사멸되었다. 또, Fig. 6-B와 같이 paper disk법을 이용하여 투명환의 형성 유무를 검토한 결과 양성 대조군으로 이용한 50 ppm의 Hxytetracyclin (OTC, Sigma)에 비하여는 억제환의 크기가 작았으나 *L. plantarum* JK-01의 배양 상층액과 균체가 모두 투명환을 형성하였다. Havenaar 등(1992)은 유산균에 의한 항균효과는 pH 강하, 유해균과 경쟁적인 영양 성분의 소비, 산화 환원 전위의 감소, 호기적 상태에서 과산화수소의 생성, bacteriocin과 같은 항균활성 물질의 분비 등을 억제 작용으로 설명하고 있다. *L. plantarum* JK-01의 대장균에 대한 생육 억제는 배양 상층액에서도 나타나 bacteriocin에 의한 가능성이 클 것으로 고찰되나 규명을 위해서는 더욱 연구가 필요하다.

리한 유산균은 내산성과 내열성면에서 충분히 이용할 수 있는 것으로 확인되었다.

항균 활성

항균 활성을 보기 위하여 유산균을 대장균(*E. coli*)과 함께 첨가하여 배양하였고, 대장균이 사멸되는 시간과 균수

요 약

김치의 *L. plantarum*의 생균제적 특성을 조사하기 위하

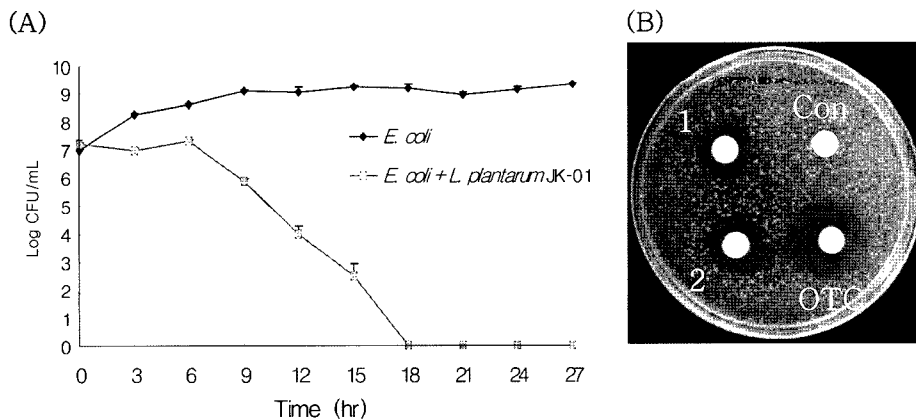


Fig. 6. Antimicrobial activity against *E. coli* by *L. plantarum* JK-01. A was the growth inhibition of *E. coli* KCTC 1041 by *L. plantarum* JK-01 in MRS broth. Values are mean \pm SD (bar). B was antimicrobial activity of *L. plantarum* JK-01 in paper disk assay which contains *E. coli* in LB agar plate (1: culture supernatant of JK-01, 2: Bacteria body of JK-01, Con: Control, OTC: 50 ppm oxytetracyclin).

여 김치에서 산생산과 성장능력 등이 우수한 25종의 *Lactobacillus* sp.를 분리하였고, API kit 분석에 의하여 *L. plantarum*을 동정하고 재차 16S rDNA 염기서열(99.9% 상동성)을 비교한 후 *L. plantarum* JK-01로 표기하였다. *L. plantarum* JK-01은 MRS broth에서 배양시 18시간 후 2.9×10^{10} CFU/ml로 최대로 증식하는 빠른 성장특성을 나타냈으며 pH도 4.5로 조속히 하강하였다. 효소활성은 xylanase, amylase, protease, phytase의 순으로 높은 활성을 포함하고 있는 것으로 예측되었다. *L. plantarum* JK-01은 pH 2에서도 1.36×10^5 CFU/mL가 생존하였고, 1%의 담즙산에서도 약 10^6 CFU/mL 이상이 생존하여 내산성과 내담즙산성이 강한 것으로 나타났다. 또, 60°C에서도 3.3×10^3 CFU/mL 정도로 생존하는 내열성이 있었으며, 대장균과 함께 배양시 18시간 후 대장균을 사멸시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 분리한 *L. plantarum* JK-01은 생균제로서 충분히 이용가치가 있는 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 환경대학교 고품질환경농축산물 생산기술연구센터(CRRC)의 2007년도 연구비 지원으로 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. APHA (1985) Standard methods for the examination of dairy products, 15th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
2. Ammor, M. S. and Mayo, B. (2007) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci.* **76**, 138-1462.
3. Booth, I. R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359-378.
4. Fuller, R. and Gibson G. R. (1977) Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroenterol.* **222**, 28-31.
5. Eeckhout, W., and M. De Paepe (1994) Total phosphorus, phytate-phosphorous and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed. Sci. Tech.* **47**, 19-25.
6. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. (1997) Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 15-18.
7. Havenaar, R., Brink, B. T., and Veld, J. H. (1992) Selection of strains for probiotic use. In: Probiotics. Fuller, R.(ed), Chapman & Hall, New York, pp. 209-224.
8. Hood, S. K. and Zottola, E. A. (1988) Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* **53**, 1541-1516.
9. Kim, M. G. and Chun, J. S. (2005) Bacterial community

structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **103**, 91-96.

10. Kimura, K., McCartney A. L., McConell M. A. and Tannock G. W. (1997) Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological response of their human hosts to the predominant strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3394-3398.
11. Klaver, F. A. M. and van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1120-1124.
12. Kobayashi, Y., Tohyaman, K. and Terashima, T. (1974) Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*. II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance-strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Japan J. Microbiol.* **29**, 691-697.
13. Lee, S. H. and No, M. J. (1997) Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 617-622.
14. Leory, F. Verluyten, J., and Vuyst L. D. (2006) Functional meat cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 270-285.
15. Loffler, F. E., Sun, Q., Li, J., and Tiedje, J. (2000) 16S rRNA gene-base detection of tetrachloroethene-dechlorinating desulfuromonase and dehalococoides species. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1369-1374.
16. MacDonald, L. C. Flemming, H. P., and Hassan, H. M. (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2120-2124.
17. Oh, C. K., Oh, M. C., Hyon, J. S., Choi, W. J., Lee, S. H., and Kim, S. H. (1997) Depletion of nitrite by lactic acid bacteria isolated from kimchi(I). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 549-555.
18. Park, S. Y., Ko, Y. T., Jeong, H. K., Yang, J. O., Chung, H. S., Kim, Y. B., and Ji, G. E. (1996) Effect of various lactic acid bacteria on the serum cholesterol levels in rats and resistance to acid bile and antibiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 304-310.
19. SAS (1999) SAS/STAT Software for PC. Release 6.11, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
20. Shiral, K., Revah-Molseev, S., Garcia-Garlbay, M., and Marshall, V. M. (1994) Ability of some strains of lactic acid bacteria to degrade phytic acid. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 366-369.
21. Tannock G. W., Crichton C., Welling G. W. Koopman J. P., and Midtvedt, T. (1988) Reconstitution of the gastrointestinal microflora of lactobacillus-free mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2971-2975.
22. Tannock, G. W. (1997) Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends Biotechnol.* **15**, 270-274.
23. Walsh, G. A., Power R. F., and Headon D. R. (1993) Enzymes in the animal-feed industry. *Tibtech.* **11**, 424-429.

-
24. Williams *et al.* (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2. Waverly press, Baltimore, USA.
25. You, S. J., Cho, J.-K., Hwang, S.-G., and Heo, K.-C. (2005) *Korean J. Food. Sci. Ani. Resour.* **25**, 357-364.
26. 강상모(1996) 류코노스톡 파라메센테로이드스를 김치제조시 스타터로 첨가하는 방법. 대한민국 특허출원 제1996-033361호.
27. 이종화(2006) 축산신문. 2006년 12월 19일 [2072호].
28. 전홍기(1998) 효소학. 부산대학교출판부, p. 486.
-
- (2007. 4. 11. 접수/2007. 7. 21. 채택)