

김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* LHB55의 항균성과 요구르트 제조 적합성 연구

이승규¹ · 이연정¹ · 김민경¹ · 한기성¹ · 정석근¹ · 오미화¹ · 장애라¹ · 김동훈¹ · 배인휴² · 함준상^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²순천대학교

A Study on the Yogurt Manufacture Suitability and Antimicrobial Activity of *Lactobacillus plantarum* LHB55 Isolated from Kimchi

Seung-Gyu Lee¹, Yeon-Jung Lee¹, Min-Kyung Kim¹, Ki-Sung Han¹, Seok-Geun Jeong¹, Mi-Hwa Oh¹, Aera Jang¹, Dong-Hun Kim¹, In-Hyu Bae² and Jun-Sang Ham^{1*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, ²Sunchun University

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a new starter for fermented milk. The approach started with 103 acid-producing isolates from Kimchi, a type of spiced, fermented cabbage and then PCR screening was used to identify 72 *Lactobacillus* strains. The ability to inhibit the growth of food-borne human pathogens (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*) of these strains were measured, using the paper disk method. Among them, one bacterium (LHB55) that showed a strong antibacterial activity against food-borne human pathogens was identified and further characterized, using 16S rDNA sequencing and API 50CHL system. Because this isolate was identified as *L. plantarum*, it was named as *L. plantarum* LHB55. The yogurt produced using commercial LAB with *L. plantarum* LHB55 did not display properties that are microbially or physico-chemically different from the control group, which suggests that *L. plantarum* LHB55 can be used as a useful starter for yogurt containing high antibacterial activity. We think that identifying effective starter strains enabling further development of fermented milk that can deliver better health benefits such as antimicrobial properties is of high significance, and thus our effort in this type of approach will continue.

(Key words : Kimchi, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, Antibacterial activity, Yogurt)

서 론

우유나 식품발효에 사용되는 유산균은 자연계에 널리 분포하는 미생물로서 김치를 비롯한 다양한 식품에서 발견된다. 김치 숙성에서 나타나는 미생물은 호기성 세균과 혐기성 세균 그리고 효모가 주류를 이루고 있고, 발효초기에는 호기성 및 혐기성 세균의 성장이 함께 증가하고 발효가 진행됨에 따라 젖산과 각종 유기산이 생성되어 pH가 낮아져 내산성 혐기성 균이 주류를 이루게 되며, 산패 이후에는 호기성 세균이 다시 증가하는 것으로 알려져 있다 (Lee and Kang, 1996). 식품발효에 이용되는 미생물 중에서 유산균은 기능성 probiotic 미생물로서 가장 주목되고 있는 유익한 세균으로서 인체에 대한 영양효과 뿐만 아니라 다양한 생리적 기능을 담당한다고 보고되었다 (Jeon et al., 2007, Sanders and Huis in't

Veld, 1999).

김치의 발효 과정에서 나타나는 유산균은 초기에 *Leuconostoc mesenteroides*가 우세 균종으로 김치 내용물을 산성화하여 혐기적 상태로 유지하며 호기성 세균의 성장을 억제하고 그 이후에는 *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) 균종이 김치 발효에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Mheen and Kwon, 1984; Lee and Kang, 1996). 김치의 발효에 관여하는 미생물의 증식양상은 배추의 품종 (Lee et al., 1994), 발효온도와 염분 (Ko et al., 1994) 등에 의해 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있고, 특히 온도의 영향이 가장 큰 요인으로 알려져 있다 (Park et al., 1994). 김치 유산균들 중 *L. plantarum*은 20~30°C의 중온 발효시에 가장 우세미생물로 나타난다 (So and Kim, 1995).

최근 *L. plantarum*의 보고를 살펴보면 milk-soymilk에 *L.*

* Corresponding author : Jun-Sang Ham, Quality Control and Utilization of Animal Products Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea. Tel: +82-31-290-1692, Fax: +82-31-290-1697, E-mail: hamjs@korea.kr

plantarum 균주 단독 또는 *Momordica charantia*와 혼합해서 제조한 발효유를 고지혈 hamster에 급여 시 콜레스테롤 (cholesterol)이 감소하였고(Tsai, 2009), *L. plantarum* MA12 균주 powder를 고지혈 rat에 급여 결과 콜레스테롤 감소 효과를 확인하였다(Wang, 2009). 그리고 *L. plantarum* PH04를 고지혈 마우스에 급여 결과 분 (fecal)에서 유산균수가 증가하고 반면 콜레스테롤 수치가 약 10% 감소(Nguyen, 2007)하였다. 그리고 *L. plantarum* KC21에 의해 생성되는 유기산과 박테리옌에 의한 항균활성 측정 결과 *Staphylococcus aureus*에 대해 약 70%의 항균력이 있다는 보고(Lim and Im, 2008), *L. plantarum* LP31에서 생산되는 새로운 박테리옌 Plantaricin이 병원성 미생물 (*Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*)의 성장을 억제한다는 보고(Muller et al, 2009)와 *L. plantarum* C11 유산균에서 박테리옌 생산은 전사활성물질 PlnC와 억제물질 PlnD의 반응조절은 quorum sensing (정족수 인식) pathway를 통하여 조절된다는 보고(Straume et al., 2009) 등 국내·외에서 *L. plantarum*에 대한 항균력과 콜레스테롤의 감소효과에 대한 많은 연구들이 보고되었다.

유산균을 이용한 항균효과에 관한 연구가 최근 많이 이루어지고 있는 이유는 무분별한 항생제 사용으로 인한 세계적으로 문제가 되고 있는 항생제 내성균을 줄일 수 있는 해결책 중 하나로 유산균이 생산하는 박테리옌과 같은 천연 항균제의 개발이 무엇보다 중요하기 때문이다. 이와 같은 박테리옌 생산 유산균을 이용한 많은 항균활성 연구가 이루어짐에도 불구하고 항균력을 가진 김치유산균 스타터를 이용한 발효유제품 제조의 예는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 김치에서 병원성 미생물에 대한 항균활성이 강한 유산균을 분리하여 균의 특성을 조사하고 요구르트 제조를 통한 관능적 특성을 파악하여 발효유제품의 스타터로서의 사용 적합성을 확인하기 위함이다.

재료 및 방법

1. 재료

배추김치는 경기지역의 식품회사 두 곳에서 판매하는 상업용 김치를 구입하여 실험에 사용하였다. 발효유 제조에 사용된 우유는 국립축산과학원 실험 목장에서 착유한 우유를 사용하였으며, 발효균주는 상업용 균주인 ABT-5 (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus thermophilus*, Chr. Hansen, Denmark), ST-B01 (*Streptococcus thermophilus*, Chr. Hansen, Denmark)과 LH-B02 (*Lactobacillus helveticus*, Chr. Hansen, Denmark)를 사용하였다.

2. 유산균 분리 및 배양

김치 유산균 분리를 위해 구입 당일의 김치 시료와 저장 온도별, 저장 기간별로 달리한 7종류 (구입당일, 4°C-5일, 4°C-10일, 4°C-20일, 20°C-5일, 20°C-10일, 20°C-20일 숙성)의 김치시료 50g을 각각 분쇄하였다. 분쇄한 김치시료를 각각 Sterile Filter Bag (BLD science, USA)에 넣고 circulator stomacher (Stomacher 400, Seward, UK)를 이용하여 액상 부분만을 분리하였다. 분리된 시료 1 ml을 취하여 십진 희석법으로 희석 후 100 µL를 MRS agar plate에 도말(spread)하여 37°C 배양기에 48시간 배양하며 균을 관찰하였다. 각 시료별 단일 집락(colony) 20개를 무작위로 선별하여 BCP 한천배지 (Difco, USA)에 획선평판법(streak plate)으로 분리 접종 후 37°C 배양기에 24시간 배양하여 산 생성에 의해 집락 주위가 노란색으로 변하는 균을 확인하였다. 확인된 균을 MRS액체 배지에 접종 후 37°C에서 16시간 배양하여 30% glycerol stock을 제조하여 초저온 냉동고(-70°C)에 보관하여 실험에 사용하였다.

3. 피검 균주의 배양

실험에 사용된 피검 균주로는 병원성 세균인 *Escherichia coli* K99, *Staphylococcus aureus* KCTC 2618, *Salmonella enteritidis* ATCC 49223을 사용하였다. *S. aureus*는 brain heart infusion (BHI; Difco, USA) broth를 *E. coli*는 Luria-Bertani (LB; Difco, USA) broth를 사용하였고, *S. enteritidis*는 Tryptic Soy broth (TSB; Difco, USA)를 사용하였다.

4. 분리균의 항균 활성 시험

김치 분리균 배양액 1.5 mL을 원심분리 (13,000 × g, 10 min, 4°C)한 후 상등액을 0.45 µm syringe filter를 사용하여 제균하였다. 제균된 상등액을 1 N NaOH로 pH 7.0으로 보정한 후 분리균주의 병원성 미생물 (*E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*)에 대한 항균 활성 측정을 위해 paper disk method (Kim et al., 1999)를 사용하여 screening 하였다. 지시균주가 도말된 평판배지 위에 6 mm 직경의 paper disk (Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 놓고 40 µL씩 일정하게 가한 후에 감수성 세균은 37°C에서 24시간 동안 배양하여 분리균주가 생산하는 항균 물질에 의한 생육 저지환 생성 여부를 관찰하였다.

5. 조항균 물질의 정제

분리균들 중 항균활성이 높은 균 (*L. plantarum* LHB55)을 3 mL MRS 액체배지에서 전배양(A600; 0.8)한 균액 100 µL를 MRS 액체배지 100 mL에 접종하고, 18시간 동안 본 배양 후 원심분리 (10,000 g, 20 min, 4°C)하여 상등액을 회수하였다. 회수한

상등액을 0.45 µm membrane filter로 제균하였다. 제균 된 배양액을 진공 동결건조기(PVTFD 10R, Ilshin Lab Co., Korea)를 사용하여 동결건조 하였다. 동결 건조된 시료를 1 mL의 0.1% trifluoroacetic acid (TFA, Sigma Co., USA)에 녹이고, Methanol (HPLC-grade, Merck, Germany)과 water (HPLC-grade, Merck, Germany)로 미리 soaking 시킨 C18 column (Eclipse XDB, 4.6 × 150 mm, 5 µm, Agilent, USA)에 주입하여 역상 HPLC (1200, Agilent, USA)로 분리하였다. 분리방법은 시료 주입 후 10분간 0.1% TFA로 세척하고, 다음 20분간 0.1% TFA를 함유한 acetonitrile (HPLC-grade, Sigma Co., USA)를 0~100% linear gradient, 마지막 5분간은 0.1% TFA를 함유한 acetonitrile 100% 용매로 용출시켰다. 유속은 1.0 ml/min로 유지하였다. 회수한 분획을 모은 후 진공 동결건조기를 사용하여 용매를 제거 하고 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) 1 mL에 녹여 항균활성 측정에 사용하였다. 항균활성 측정은 분리균의 항균 활성 시험에서 언급한 paper disk method에 준하여 동일하게 측정하였다.

6. 분리 균의 확인

분리 균의 유산균 판별을 위하여 DNeasyTissue kit (Qiagen, USA)을 사용하여 Genomic DNA를 추출하였고, DNA 시료는 -20°C 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다. 유산균 스크리닝을 위하여 추출한 Genomic DNA 2 µL (1 µg/µL)에 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 제작한 유산균 16S rRNA specific primer (Leuconostoc-F; 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', Leuconostoc-R; 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3', Lactobacilli-F1; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', Lactobacilli-R1; 5'-TCTACGCATTCCACCGCTAC-3', Lactobacilli-F2; 5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3', Lactobacilli-R2; 5'-GGGTTGCGCTCGTTG-3', Lactobacilli-F3; 5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG-3', Lactobacilli-R3; 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') forward, reverse primer를 각각 1 µL (10 pM/µL)와 Accupower preMix (Bioneer, Korea)를 사용하여 PCR 방법으로 DNA 증폭하였다. 증폭 산물 10 µL와 500 bp DNA size marker (TaKaRa, Japan) 5 µL를 1% agarose에 전기영동하여 유산균 16S rRNA를 확인하였다. PCR (Thermal Cycler DICE, TaKaRa, Japan)을 위한 실험 조건은 처음 denaturation은 94°C, 5 분, 다음 94°C/30 sec, 52°C/30 sec, 72°C/1 min으로 30 cycle, 마지막으로 72°C에서 10 min 간 반응시켰다.

7. 분리 균의 동정

분리균의 동정을 위해 일차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그람 염색법을 이용하여 염색 후 형광현미경 (DE/AXIO

Imager A1, Carl Zeiss, Germany) 검경으로 균의 미생물학적 특성을 확인하였고, 당 발효 능을 조사하기 위해 API 50 CHL system (BioMerieux, France)을 이용하였고, 그 결과를 균주 동정 프로그램 (<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 동정하였다. 최종적인 균 동정을 위하여 분리 균주의 16S rRNA의 염기서열 결정법으로 동정하였으며 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

추출한 Genomic DNA를 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit을 이용한 chain-termination dideoxynucleoside triphosphate법 (sanger et al., 1977)으로 ABI 3100-Avant genetic analyzer (Applied Biosystems, Lennik, Belgium)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 균주들의 염기서열을 nucleotide searching 프로그램인 NCBI BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 사용하여 유산균을 동정하였다.

8. 요구르트의 제조

원료유 1 L를 92°C에서 10분간 열처리 후 40°C로 냉각하여 대조구는 스타터 균주 0.01% (DVS, Direct Vat Set) Chr. Hansen 를 사용하였고, 처리구는 배추김치에서 분리한 *L. plantarum* LHB55 : ST-B01 (*S. thermophilus*, Chr. Hansen, Denmark) : LH-B02 (*L. helveticus*, Chr. Hansen, Denmark)를 1:1:1 비율로 0.01% 접종하여 40°C에서 5시간 배양하여 제조하였다.

9. pH 측정

pH는 pH meter (pH/ion meter 450, Corning, USA)로 측정하였다.

10. OD 측정

OD는 Spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Japan)를 사용하여 600 nm에서 측정하였다.

11. 유산균수 측정

요구르트 배양 전·후 시료를 십진 희석법으로 희석하여 평판배양법으로 BCP 한천배지 (Difco, USA)에 1 mL씩 분주하고 37°C에서 48시간 동안 배양하여 노랑색 콜로니를 계수하여 유산균수로 표시하였다.

12. 일반성분

요구르트의 단백질, 지방, 유당, 총고형분 함량은 Milkoscan FT120 (Foss, Denmark)로 측정하였다.

13. 관능검사

관능적 품질평가는 국립축산과학원 연구원을 대상으로 15명의 패널요원을 선발하여 시료에 충분한 지식과 용어, 평가기준 등을 숙지시킨 후 실시하였다. 관능평가는 색상, 풍미, 조직감, 맛, 그리고 전반적인 기호도에 대하여 9점 채점법으로 실시하였으며, 9점은 대단히 좋다, 1점은 대단히 나쁘다로 나타내었다.

14. 통계분석

결과는 SAS EG 프로그램의 일원분산분석으로 분석하였고, 처리구간의 평균간 비교는 T-test 통하여 유의성 검정($\alpha=0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 항균활성 유산균 분리 및 동정

김치로부터 구입당일과 숙성온도 (4, 20°C), 숙성기간 (5, 10, 20 일)을 달리하여 분리한 균 140종을 BCP 한천배지를 이용하여 103종의 산생성균을 확인하였다. 103종의 산생성균의 genomic DNA와 LAB 16S rRNA specific primer 4종을 사용하여 PCR 방법으로 DNA 증폭 후 전기영동하여 유산균을 스크리닝 하였다 (Fig. 1). Lane 2, 3, 4, 5의 Leuconostoc primer, Lactobacilli primer 3, Lactobacilli primer 2, 그리고 Lactobacilli primer 1를 이용한 PCR 증폭산물은 각각 약 1,490, 580, 560, 그리고 610 bp로 확인 되었다. 확인 된 72개의 유산균을 MRS 액체배지에 24 시간 배양 (37°C)한 균 배양액을 원심분리와 syringe filter로 제균 하였다. 그리고 산에 의한 미생물 성장 억제력을 방지하기 위하여 회수한 상등액에 1 N NaOH로 pH 7.0으로 보정하였다. 보정된 균 배양액을 농축 후 병원성 미생물인 *E. coli*, *S. aureus*, *S. enteritidis*에 대한 항균활성을 관찰하였다. 확인 된 분리균들 중 20°C에서 5일간 숙성한 5번 균주 (*L. plantarum* LHB55)가 항균 활성이 강하게 나타났다. 이 분리 균주를 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과 Gram 양성, catalase 음성 그리고 포자를 형성하지 않는 비운동성의 bacilli 형태로 확인되었다. 그리고 API 50 CHL kit (BioMerieux, France)를 사용하여 분리균의 당 이용성 조사 (Table 1)를 통한 균 동정 결과 *L. plantarum*과 매우 유사한 것으로 판정되었다. 보다 정확한 동정을 위하여 분리균주의 16S rRNA 염기서열을 결정하고 (1,365 bp), NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

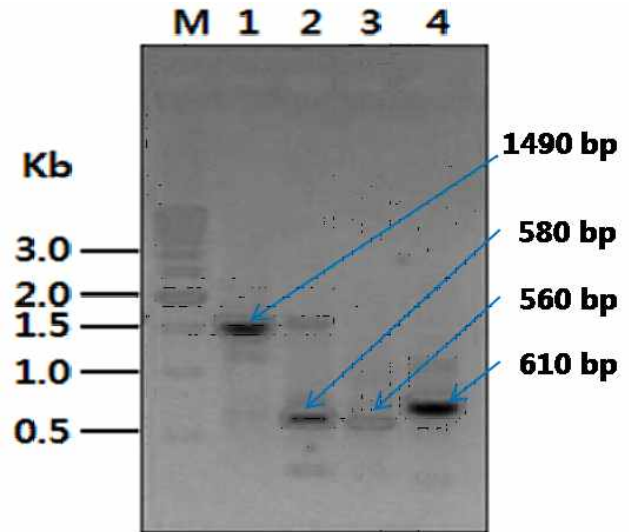


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR products by using lactic acid bacteria specific primers. M, 500bp DNA ladder; lane 1, Leuconostoc primer; lane 2, Lactobacilli primer 3; lane 3, Lactobacilli primer 2; lane 4, Lactobacilli primer 1.

의 blast program을 사용하여 GenBank에 등록된 16S rRNA 유전자들과 상동성을 비교하였다. 그 결과 *L. plantarum* strain IMAU10173 (Accession NO; GU 125615) 유전자와 100% (1365/1365) 상동성을 보였다. 따라서 본 균주는 최종 *L. plantarum*으로 동정되었으며, *L. plantarum* LHB55라 명명하였다.

2. 조항균 물질의 정제 및 항균활성

L. plantarum LHB55의 배양액을 이용하여 조항균 물질을 정제하기 위해 배양액을 원심분리 후 membrane filter를 사용하여 제균한 다음 동결건조기를 이용하여 농축하였다. 농축된 배양물을 C18 역상 column으로 정제하였다. 정제된 항균물질을 paper disk method를 사용하여 병원성 미생물에 대한 항균활성을 조사하였다 (Table 2). 그 결과 *E. coli*, *S. aureus*, *S. enteritidis*에 대한 항균 효과는 각각 8.3 ± 0.72 mm, 5.7 ± 0.89 mm, 4.5 ± 0.64 mm로 나타났다. 유산균의 항균물질 (bacteriocin)의 많은 종류가 그람 양성균에 대한 항균효과는 높으나 항균 spectrum이 좁아 그람 음성균이나 효모, 곰팡이에 대해서는 거의 항균력이 없다는 보고 (Klaenhammer, 1988)와 같이 그람 양성균인 *S. aureus*에서 높은 항균력을 보였지만, 또 한편 그 보고와는 달리 그람 음성균인 *E. coli*에 대해 더 높은 항균력을 보였다. 이것은 동치미에서 분리한 *L. plantarum* K11이 생산한 박테리오킨은 *E. coli* O157에 대한 항균효과가 높다는 보고 (Lim and Im, 2007)와 유사한 결과를 보였다. 향후 항

Table 1. Carbohydrate utilization profile of the LHB55 isolated, as determined using the API 50 CHL system

Carbohydrate	Reaction	Carbohydrate	Reaction
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	-
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
b-Methyl-xyloside	-	Melezitose	+
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Starch	-
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	b-Gentiobiose	+
Inositol	-	D-Turanose	+
Manitol	+	D-Lyxose	-
Sorbitol	-	D-Tagatose	-
a-Methyl-D-mannoside	-	D-Fucose	-
a-Methyl-D-glucoside	+	Gluconate	-
N-Acetyl glucosamine	+	2 keto-gluconate	-
Amygdaline	+	5 keto-gluconate	-
Esculine	+		

+, positive; -, negative

균물질의 특성을 좀 더 구체적으로 파악하기 위해서는 다양한 방법의 정제와 SDS-PAGE를 이용한 단백질 전기영동에 의한 분자량 측정, mass spectrophotometer 분석법에 의한 아미노산 서열결정 및 동정이 필요하다고 판단된다.

3. *Lactobacillus plantarum* LHB55 첨가 요구르트의 유산균수

L. plantarum LHB55를 스타터 균주로 사용하여 제조한 요구르트의 발효 전후 유산균 수를 계수하여 Table 3에 나타내었다. 대조구와 *L. plantarum* LHB55 첨가구의 발효전 유산균 수는 각각 7.51±0.06, 7.42±0.05 Log CFU/g 이었으며 발효 후는 각각 8.67±0.05, 8.28±0.07 Log CFU/g으로 증가하였으나 대조구와 처

Table 2. Antimicrobial activity of *L. plantarum* LHB55

Microorganism	Indicator	Activity
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> K-99	+++++
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 49223	+++
Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 12256	+++

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator.

Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: +; 0~2 mm, ++; 2.1~4 mm, +++; 4.1~6 mm, ++++; 6.1~8 mm, +++++; 8.1~10 mm.

Table 3. Lactic acid bacterial counts of the yogurt

Treatment	Before incubation	After incubation
Control	7.51±0.06 ¹⁾	8.67±0.05
LHB55	7.42±0.05	8.28±0.07

¹⁾ Values are mean±SE, Means within the same row with different superscript are significantly different at 5% level by the t-test.

리구간의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 요구르트 제조후의 유산균수는 마늘즙 첨가 요구르트의 품질 특성 연구에서 ABT-5를 대조구 스타터로 사용한 요구르트의 유산균수 측정 보고 (Lee et al., 2009)의 요구르트 제조 후 유산균수 7.96±0.04에 비해 조금 높은 경향을 나타내었다. 세균이 생산하는 박테리오파지와 같은 항생물질 생산 목적이 다른 종 (species)의 세균이나 세포의 생장을 억제하거나 성장을 못하게 하여 결국 자기 자신의 종이 환경에서 우점하기 위해 분비하는 물질이다. 본 연구에 사용된 *L. plantarum* LHB55는 병원성 미생물에 대한 항균 효과가 있었지만 스타터로 같이 사용된 *S. thermophilus*, *L. helveticus*의 균수 측정결과에서 생장 억제 현상은 나타나지 않았다. 요구르트 제조 후 측정된 균수에서 유의적 차이는 없었지만 대조구에 비해 약간 낮은 결과는 요구르트 제조시 처음 스타터 균주 접종량이 대조구에 비해 낮아서 나타난 결과로 추측된다. 따라서 *L. plantarum* LHB55를 복합 스타터 균주로 사용에 적합하리라 판단된다.

4. *L. plantarum* LHB55 첨가 요구르트의 성분 분석 및 이화학적 특성

L. plantarum LHB55를 스타터 균주로 사용하여 제조한 요구르트의 이화학적 특성을 Table 4에 나타내었다. 대조구의 지방, 단백질, 유당, 총고형분 함량과 pH는 각각 3.37±0.02, 2.72±0.02, 4.07±0.02, 18.47±0.03, 4.78±0.02로 확인되었고, LHB55 첨가 요구르트는 각각 3.33±0.02, 2.75±0.02, 4.04±0.01, 18.43±0.03, 4.65±0.02로 확인되었다. 유단백질과 총고형분은 두 구간 차이가

Table 4. General composition and physicochemical properties of the yogurt

Treatment	Fat	Protein	Lactose	Total Solid	pH
Control	3.37±0.02 ¹⁾	2.72±0.02	4.07±0.02	18.47±0.03	4.78±0.02
LHB55	3.33±0.02	2.75±0.02	4.04±0.01	18.43±0.03	4.65±0.02* ²⁾

¹⁾ Values are mean±SE.

²⁾ Means within the same row with different superscript are significantly different at 5% level by the t-test.

Table 5. Sensory characteristics of the yogurt (N=16)

Treatment	Color	Flavor	Texture	Taste	Overall
Control	7.31±0.30 ¹⁾	7.31±0.25	7.06±0.27	6.56±0.32	7.00±0.20
LHB55	7.44±0.26	6.88±0.33	7.00±0.34	6.81±0.43	7.31±0.27

¹⁾ Values are mean±SE, Means within the same column with different superscript are significantly different at 5% level by the T-test.

나타나지 않았고, pH는 LHB55 첨가 요구르트에서 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$). 이는 Table 3의 유산균수 변화와 유사한 경향을 나타내었다. 그리고 김치에서 분리한 *L. plantarum* 균주 3종을 이용한 요구르트 제조 연구에서 *L. plantarum*은 산생성능이 우수하고, 단일 균으로 요구르트 제조시에는 pH를 4.08~4.30 범위까지 낮춘다는 보고(Rhee and Kang, 1996)와 유사한 경향을 나타내었다. 본 연구의 LHB55 첨가 요구르트는 *L. plantarum* LHB55 단일 균주를 사용하여 제조한 것이 아니고 *S. thermophilus*, *L. helveticus*와 같이 복합균주를 사용하였기에 pH를 4.08~4.30 범위 내에 도달할 수 있을 정도의 산을 생성하지 못한 것으로 생각된다.

5. 발효유의 관능적 특성

병원성 미생물 (*E. coli*, *S. aureus*, *S. enteritidis*)에 대한 항균활성을 가진 *L. plantarum* LHB55를 이용하여 제조한 요구르트의 관능검사를 실시한 결과는 Table 5와 같다. 대조구의 색, 향기, 조직감, 맛, 전체적인 기호도가 각각 7.31±0.30, 7.31±0.25, 7.06±0.27, 6.56±0.31, 7.00±0.20로 나타났고, *L. plantarum* LHB52 첨가 요구르트는 각각 7.44±0.26, 6.88±0.33, 7.00±0.34, 6.81±0.43, 7.31±0.27로 색과 조직감은 두 구간 차이를 나타내지 않았고, 향기에서는 대조구보다 처리구가 낮게 나타났다. 처리구에서 향에 대한 기호도가 낮게 나타난 이유는 *L. plantarum* LHB55 처리에 의해 김치 숙성시 나타나는 특유의 향에 의한 결과로 판단된다. 그러나 처리구간의 유의적인 차이를 나타내지는 않았다($p>0.05$). 그것은 아마도 우리 국민들 대부분이 김치 특유의 향에 대해 적응되어 있기 때문인 것으로 생각된다. 단지 요구르트에서 김치향을 미세하게 느끼는 민감한 패널요원들의 약간의 거부 반응인 것으로 추측된다. 그리고 맛과 전체적인 기호도는 대조구보다 처리구에서 다소 높게 나타났으나 유의적 차이는 없었다($p>0.05$).

이 결과로 볼 때 처리구에서 향에 대한 관능평가 성적이 낮아 맛과 전체적인 기호도가 낮으리라 추측했었는데, 오히려 처리구에서 높게 나타난 것은 김치와 같은 우리 전통식품의 맛에 우리국민 대다수가 길들여져 있다는 해석도 가능하리라 생각된다. 요구르트 제조에 있어서 *L. plantarum* LHB55 단독균주를 사용하지 않은 이유는 단독균주 사용시 풍미와 기타 관능적으로 나쁜 결과를 얻을 수 있으며 복합 스타터의 사용시 관능적 특성에는 영향을 미치지 않기 때문이며, 항균활성을 지닌 probiotics의 역할을 동시에 함으로써 그 파급효과가 크다고 사료되기 때문이다. 김치에서 분리한 유산균이지만 pH를 제외한 성분분석, 관능 테스트, 미생물 수 변화 결과에서 보듯이 유의적 차이가 나타나지 않아 요구르트 제조에 *L. plantarum* LHB55 균주의 사용 가능성을 시사해 주었다. 요구르트 제조에 의한 유산균의 장내 정착이 병원성 미생물의 증식의 억제와 장내 세균총에 있어서 중요한 작용(Dedios et al., 1978)을 하므로 항균성 및 기능성 증진 등의 인간에게 유리하게 작용하는 스타터 균주와 발효유제품 개발은 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

이 연구는 김치에서 분리한 항균활성이 우수한 요구르트 제조용 유산균 스타터를 개발하기 위함이다. 분리한 103개의 산 생성 균주를 PCR로 screening하여 72개의 유산균을 분리하였다. 분리균의 배양액을 paper disk method를 사용하여 병원성 미생물 (*E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus*)에 대한 항균활성을 측정하였고, 활성이 강한 균주를 선별하여 API 50CHL과 16S rRNA sequencing 방법으로 균을 동정하였다. 균은 *L. plantarum*으로 확인되어 *L. plantarum* LHB55로 명명하였다. *E. coli*에 대해 높은 항균효과를 나타내는 *L. plantarum* LHB55를 사용하여 제조한 요

구르트의 미생물학적, 이화학적 특성과 관능검사 결과 대조구와의 유의적인 차이는 거의 없었다. 그 결과 김치에서 분리한 *L. plantarum* LHB55의 항균활성이 우수한 요구르트 제조 스타터 균주로서 사용 가능함을 확인하였다. 항균성 등 인간에게 유리하게 작용하는 스타터 균주와 발효유제품 개발은 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

인 용 문 헌

- DeDios, Pozo-Olano, J., Warran, J. H., Gomez, G. G. and Cavazos, M. G. 1978. Effect of a lactobacilli preparation on traveler's diarrhea. *Gastroenterol.* 74:829-839.
- Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A. W., Bruggeman, C. A. and Stobberingh, E. E. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13:222-235.
- Francis, A. W. 1995. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). pp. 1754-1755, Mandell Douglas and Bennetts Principles Bennett's Principles & Practice of Infections Disease. 4th eds., Churchill Livingstone.
- Han, S. J., Jung, P. M., Kim, H. G. Hwang, E. H. and Seong, I. W. 1999. Multiple intestinal ulcerations and perforations secondary to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* enteritis in infants. *J. Pediatr. Surg.* 34:381-386.
- Jeon, S. R., Song, T. S., Kim, J. Y., Shin, W. C., Her, S. U. and Yoon, S. S. 2007. Identification and characterization of lactic acid bacteria starters isolated from the commercial drink-yogurt products. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 27:509-516.
- Jeong, H. J., Kim, W. J., Kim, M. J. and Park, S. C. 1995. Nosocomial infection surveillance in the care unit. *Kor. J. Infect. Dis.* 27:105-117.
- Kim, S. I., Kim, I. C. and Chang, H. C. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 526-533.
- Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Bichimie.* 70:337-349.
- Ko, Y. D., Kim, H. J., Chun, S. S. and Sung, N. K. 1994. Development of control system for Kimchi fermentation and storage using refrigerator. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 26:199-203.
- Lee, I. S., Park, W. S., Koo, Y. J. and Kang, K. H. 1994. Changes in some characteristics of brined chinese cabbage of fall cultivars during storage. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 26:239-245.
- Lee, S. G., Lee, Y. J., Kim, M. K., Han, K. S., Jeong, S. G., Jang, A., Chae, H. S., Kim, D. H. and Ham, J. S. 2009. Quality characteristics and inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* KCCM 40510 of yogurts manufactured with garlic juice. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 29:500-505.
- Lim, S. M. and Im, D. S. 2007. Bactericidal effect of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from Dongchimi on *Escherichia coli* O157. *J. Food Hyg. Saf.* 22:151-158.
- Lim, S. M. and Im, D. S. 2009. Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19:178-186.
- Mheen, T. I. and Kwon, T. W. 1984. Effect of temperature and salt concentration on Kimchi fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 16:443-450.
- Muller, D. M., Carrasco, M. S., Tonarelli, G. G. and Simonetta, A. C. 2009. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp31 strain isolated from dry-fermented sausage. *J. Appl. Microbiol.* 106:2031-2040.
- Nguyen, T. D., Kang, J. H. and Lee, M. S., 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. 2007. *Int. J. Food Microbiol.* 113:358-361.
- Park, S. G., Hwang, Y. O., Jung, J. H. and Lee, K. M. 2001. Biological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from food-borne patients in Seoul. *J. Food Hyg. Saf.* 16:159-167.
- Park, W. S., Lee, I. S., Han, Y. S. and Koo, Y. J. 1994. *Kimchi* preparation with brined chinese cabbage and seasoning mixture stored separately. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 26:231-238.
- Rhee, Y. H. and Kang, M. S. 1996. Characteristics of beta-galactosidase activity in *Lactobacillus plantarum* from *Kimchi*. *Agr. Chem. Biotechnol.* 39:60-66.
- Rhee, Y. H. and Kang, M. S. 1996. Physico-chemical characteristics and β -galactosidase activity of *Lactobacillus plantarum* from *Kimchi*. *Agr. Chem. Biotechnol.* 39:54-59.
- Sanders, M. E. and Huis In't Veld, J. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:293-315.
- So, M. H. and Kim, Y. B. 1995. Cultural characteristics psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 27:506-515.
- Straume, D., Johansen, R. F., Bjoras, M., Nes, I. F. and Diep, D. B. 2009. DNA binding kinetics of two response regulators, PlnC and PlnD, from the bacteriocin regulon of *Lactobacillus plantarum* C11. *BMC. Biochem.* 10:17-27.
- Taylor, J., Hirsch, A. and Mattick, A. R. T. 1949. The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *Vet. Rec.* 61:197-198.

- Tsai, T. y., Chu, L. H., Lee, C. L. and Pan, T. M. 2009. Atherosclerosis-preventing activity of lactic acid bacteria-fermented milk-soymilk supplemented with *Momordica charantia*. J. Agric. Food Chem. 57:2065-2071.
- Wang, Y., Xu, N., Xi, A., Ahmed, Z., Zhang, B. and Bai, X. 2009. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84:341-347.
- Yoon, J. H., Lee, S. T. and Park, Y. H. 1996. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:187-194.
- (접수일자 : 2009. 11. 26 / 수정일자 : 2010. 1. 25 / 채택일자 : 2010. 2. 17)