

막걸리에서 분리한 젖산세균인 *Lactobacillus casei* HK-9의 특성 및 항균 활성

백 현, 최문섭, 오계현*

Characterization and Antibacterial Activity of *Lactobacillus casei* HK-9 Isolated from Korean Rice Wine, Makgeolli

Hyun Baek, Moon-Seup Choi, and Kye-Heon Oh*

접수: 2012년 5월 31일 / 게재승인: 2012년 6월 27일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The purpose of this work was to examine the antibacterial activity derived from a lactic acid bacterium isolated from Korean rice wine, called makgeolli. Various physiological and biochemical properties of this strain were characterized. Both the BIOLOG system and phylogenetic analysis using 16S rRNA sequencing were utilized for identification, and the strain was designated as *Lactobacillus casei* HK-9, and registered in GenBank as [JQ951606]. Growth rate, production of organic acids (e.g., lactic acid and acetic acid), and pH changes during growth were monitored. The maximum concentrations of lactic acid and acetic acid were approximately 576 mM and 199 mM, respectively, and pH was changed from 7.00 to 3.74 after 72 h of incubation. HPLC was used to confirm the production of lactic acid and acetic acid. Significant antimicrobial activity of the concentrated supernatant was demonstrated against various food-poison causing bacteria (e.g., *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*). Ethanol tolerance of *L. casei* HK-9 showed up to 12% of ethanol within the culture.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei* HK-9,

순천향대학교 생명시스템학과
Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan, Chung-Nam 336-745, Republic of Korea
Tel: +82-41-530-1353, Fax: +82-41-530-1350
e-mail: kyeheon@sch.ac.kr

Makgeolli, Korean rice wine

1. 서론

막걸리는 찹쌀, 보리쌀, 밀가루 등에 누룩과 물을 섞어 발효시키는 우리나라 전통주로서, 최근 몸에 좋다는 연구결과가 밝혀지고 있어서, 막걸리의 소비가 증가추세로 이어지고 있다. 지난 2010년 막걸리 출고량은 2009년 보다 58.1% 증가하였고, 막걸리 수출량은 19,407 kL로 2009년보다 178.1%가 증가하였으며, 외인의 수입이 막걸리의 보급증가로 인해 감소하고 있다고 보고하였다 [1].

젖산균은 사람의 장내 균종을 개선시켜 숙주에게 유익한 효과를 주는 미생물 또는 혼합 배양물을 의미하는 프로바이오틱 (probiotics)의 대표적 미생물이다 [2]. 젖산균은 그람 양성균의 비운동성, 비포자형성, 발효성대사에 의해 젖산을 생성하는 세균으로 [3], 야채나 과일의 발효를 통해서 식품의 풍미를 향상시키며, 사람의 소화관과 생식기 등에서 방어 시스템을 가지는 것으로 보고된 바 있다 [4-7]. 젖산균은 암 예방 [8,9], 면역시스템 활성화 [10] 등의 다양한 기능성이 있는 것으로 알려져 있다. 항균능력도 뛰어난 것으로 알려져 있는데, 젖산균을 이용하여 식중독 원인세균을 사멸시키는 것으로 나타났다 [5]. 특히 *Lactobacillus* 종은 다양한 세균에 대한 항균활성 연구가 이루어지고 있으며, 항균활성인자로서 유기산, 과산화수소, 박테리옌 등이 알려져 있다 [11,12]. 최근에 막걸리를 포함하는 곡주 (穀酒)가 항산화 [13]와 항노화 [14]의 기능이 있다고 보고된 바 있다.

본 연구에서는 시판되는 막걸리로부터 *Lactobacillus casei*

HK-9을 농화배양기법을 통해 분리하여, 여러 가지 형태학적 및 생화학적 특성을 조사하였으며, 분리세균을 이용하여 식중독을 일으킬 수 있는 여러 가지 병원균들에 대한 항균 활성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주확보와 배양조건

본 연구에서 사용된 젓산세균은 충남 아산시 신창면 주변 상점에서 제조 판매되는 S양조장의 쌀막걸리 (조성: 백미 56%, 밀가루 20%, 전분당 24%)를 구입하여 농화배양기법으로 분리하였다. 막걸리 시료를 1 mL 취해 생리식염수가 담긴 튜브에 넣고 10^{-6} 으로 희석한 후, 100 μ L를 0.002% BPB (bromophenol blue)가 첨가된 MRS (Difco, USA) 고체 평판배지에 도말하고, 37°C 배양기에서 혐기적 조건으로 48시간 배양하였다. 균주의 생육과정에서 노란색을 띠는 균주를 선별하여 MRS 고체평판배지에 평판도말법을 통한 순수 배양으로 HK-9을 분리하였다.

2.2. 분리세균의 형태학적 관찰 및 생화학적 특성조사

분리세균 HK-9을 MRS 고체평판배지에 도말하여 단일 집락의 형태를 확인하고, 그람염색을 실시하여 형태학적 특성을 관찰하였으며, 여러 가지 생화학적 특성을 조사하였다 [2]. 분리세균의 동정은 GP2 Microplate™ Identification System (BIOLOG, Hayward, USA)를 이용하여 동정하였다. 분리세균을 BUG 고체평판배지에 도말한 후, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세균 현탁액을 Biolog Turbidimeter (BIOLOG, Hayward, USA)를 이용하여 20%까지 맞추고 GP2 MicroPlate의 96개의 well에 각각 150 μ L씩 분주하였고, 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 MicroPlate의 결과는 MicroLog™ database software를 통해 확인하였다.

2.3. 16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

분리세균 HK-9의 유전학적 계통수 (phylogenetic tree)를 작성하기 위하여 16S rRNA sequencing을 실시하였다. HK-9 균주를 이용하여 genomic DNA를 추출하였고, 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 8F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')와 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACG ACTT-3') primer를 사용하였으며, PCR을 통하여 증폭하였다. Genomic DNA를 주형으로 하여 PCR Mastermix (GenDEPOT, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 수행조건은 denaturation (94°C, 30초), annealing (60°C, 30초), elongation (72°C, 30초) 단계를 30회 반복한 후, 72°C에서 10분간 유지하였다. PCR에 의하여 증폭된 DNA 단편을 전기영동한 후, agarose gel extraction kit (Intron, Korea)를 이용하여 회수한 후, PCR 결과물을 염기서열 분석업체인 솔젠트 (Solgent Co., Daejeon, Korea)에 의뢰하여 부분적인 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI의 BLAST 분석 프로그램을 사용하여 상동성을 비교하였으며, 계통유전학적 계통수는 Bio Edit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA),

Clustal X (Conway Institute, UCD, Ireland), Mega4 (The Biodesign Institute, Arizona State University, AZ, USA) 등의 프로그램을 이용하여 작성하였다.

2.4. 세균의 생장에 따른 pH의 변화와 유기산 분석

MRS 액체배지는 pH 7.0으로 조절한 후, 분리세균인 HK-9를 접종하고, 37°C에서 배양시키면서, 세균의 생장에 따른 pH의 변화와 배양기간 중에 생산되는 유기산의 변화를 8시간 간격으로 72시간 까지 측정하였다. 세균의 생장은 8시간마다 MRS 고체 평판배지에 배양액의 10^{-6} 희석액을 100 μ L씩 평판도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양한 후, 연속희석법에 의한 집락수를 계수하여 성장곡선을 작성하였다. pH 변화는 8시간마다 10 mL씩 채취하고 균체를 제거한 후, pH meter를 이용하여 측정하였다.

분리 세균에 의해 생산되는 유기산을 분석하기 위해 HPLC를 사용하였다. 분석에 사용된 HPLC system은 UV/VIS-151 detector와 321 pump가 부착된 Gilson사 HPLC를 사용하였으며, Supelco사의 Supelcogel C-610H 컬럼 (300 mm × 7.8 mm, 입자크기 9 μ m)을 사용하였다. HPLC 작동조건은 flow rate 0.5 mL/min, UV 파장은 210 nm로 맞추어 사용하였다. Mobile phase는 0.1% phosphoric acid를 0.45 μ m membrane filter에 여과하고, 초음파세정기를 이용하여 용액 내의 기포를 제거한 후 사용하였다. 유기산은 분석용 표준품과 배양액으로부터 채취한 시료를 대상으로 분석하였다. 표준품은 젓산 (lactic acid)과 아세트산 (acetic acid)을 각각 1:1의 비율로 혼합하여 만들었으며, 배양액은 생성된 유기산을 정량하기 위하여 채취한 시료를 13,000 × g에서 30분간 원심분리한 후, 0.45 μ m syringe filter로 여과하였고, Hamilton syringe를 사용하여 HPLC injector 내에 20 μ L를 주입하였다. HPLC chromatogram은 Unipoint™ (Gilson, Inc., USA)에 의해 제공된 프로그램에 의해 작성되었다.

2.5. 세균의 농축 배양상등액 제조

분리세균 HK-9의 항균활성을 확인하기 위하여 MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 48시간 동안 배양한 후, 4,000 × g에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 상등액을 0.5N NaOH를 사용하여 pH를 7.0으로 조절한 대조군과 pH를 조절하지 않은 실험군을 준비한 후, 멸균된 0.2 μ m syringe filter를 이용하여 여과한 후, 동결건조기를 이용하여 건조한 후 20배로 농축하였다.

2.6. 농축 배양상등액의 항균활성 조사

농축된 배양상등액의 항균활성은 평판 확산 검정법 (plate diffusion assay)을 통하여 확인하였다. 대상세균으로는 식중독 감염의 원인균으로 보고된 그람양성 세균인 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 그람음성 세균인 *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*를 이용하였다. 대상세균들을 액체영양배지 (nutrient broth)에 각각 접종하여 37°C 진탕배양기에 24시간 배양시킨 후, 고체영양배지 (nutrient agar)에 멸균된 면봉으로 도말하고, 여기에 paper

disc를 올려놓은 뒤, 두 종류의 농축 배양 상등액 20 μ L를 흡수시키고, 37°C 배양기에서 24시간 배양시켜 paper disc 주변에 생성된 투명대의 크기로 항균활성을 측정하였다.

2.7. 알코올 농도별 생존력 확인

분리세균의 알코올 농도에 따른 생존력을 확인하기 위하여, 각각 다른 농도의 알코올이 포함된 MRS 액체배지에 균을 배양한 후, 배양액을 10⁶로 희석하여 100 μ L를 MRS 평판 배지에 도말하였고, 37°C 배양기에서 48시간 배양시켜 균주의 생존력을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세균의 분리 및 특성

시중에서 판매하는 막걸리로부터 항균활성 물질을 생성하는 세균들을 농화배양기법을 통하여 분리하였다. 0.002% BPB가 첨가된 MRS 고체평판배지에서 성장 중, 유기산을 형성하여 노란색 집락을 형성하는 균주를 선별하여, 총 3회에 걸친 순수계대배양으로 HK-9를 분리하였다. 분리세균은 그람염색을 통하여 형태학적 분석을 실시하였으며, 현미경으로 관찰한 결과 그람양성의 간상형 세균으로 관찰되었다. Table 1에서 보여주는 바와 같이, 인돌(indole) 형성여부에서는 음성으로 나타났으며, glucose를 이용하지 못하였고, methyl red 시험은 음성, Voges-Proskauer 시험에서는 양성 반응을 나타내었다. 녹말과 젤라틴 분해여부 시험에서는 음성을 나타내었으며, catalase 시험에서는 음성, oxidase 시험에서는 양성을 나타내었다. Klingler iron agar 배지에서 나타난 disulfhydase에 의한 H₂S의 형성은 양성으로 확인되었으며, Simmon's citrate 이용여부와 litmus milk 시험에서 펩톤화(peptonization)는 음성으로 확인되었다.

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolate, *L. casei* HK-9

Morphological characteristics	
Cell shape	Rod
Gram stain	Positive
Physiological characteristics	
Indole production	-
Glucose	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	+
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	-
Oxidase	+
Simmon's citrate	-
H ₂ S (KIA)	+
Litmus milk (peptonization)	-

+: Positive reaction, -: Negative reaction.

3.2. 세균의 동정 및 16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

분리세균 HK-9 균주의 동정을 위해, 각종 탄소원 이용

여부를 BIOLOG 분석시스템을 이용하여 조사하였고, MicroLog™ database software를 이용하여 분석한 결과, HK-9는 *Lactobacillus casei*로 동정되었으며, *Lactobacillus casei* HK-9으로 명명하였다. BIOLOG 분석시스템을 사용하여 얻어진 생화학적 특성은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Biochemical characteristics of the isolate, *L. casei* HK-9 using the BIOLOG analysis system

Biochemical tests	
Water	- D-tagatose +
α -cyclodextrin	- D-trehalose -
β -cyclodextrin	- Turanose +
Dextrin	+ Xylitol -
Glycogen	- D-xylose +
Inulin	- Acetic acid +
Mannan	- α -Hydroxy butyric acid -
Tween 40	- β -Hydroxy butyric acid -
Tween 80	- γ -Hydroxy butyric acid +
<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine	+ β -Hydroxy phenyl acetic acid -
<i>N</i> -acetyl-D-mannosamine	- α -Keto glutaric acid -
Amygdain	- α -Keto valeric acid +
L-arabinose	- Lactamide -
D-arabitol	- D-lactic acid methylester -
Arbutin	- L-lactic acid -
Cellobiose	+ D-malic acid -
D-fructose	+ L-malic acid -
L-fucose	+ Methyl pyruvate -
D-galactose	- Mono-methyl succinate +
D-galacturonic acid	- Propionic acid -
Gentiobiose	+ Pyruvic acid -
D-gluconic acid	+ Succinamic acid -
α -D-glucose	+ Succinic acid -
<i>m</i> -inositol	- <i>N</i> -acetyl-L-glutamic acid +
α -D-lactose	+ Alaninamide -
Lactulose	+ D-alanine +
Maltose	+ L-alanine -
Maltotriose	- L-alanyl glycine -
D-mannitol	+ L-asparagine -
D-mannose	+ L-glutamic acid -
D-melezitose	- Glycyl-L-glutamic acid -
D-melibiose	- L-pyroglytamic acid +
α -methyl D-galactoside	+ L-serine -
β -methyl D-galactoside	+ Putrescine -
3-methylglucose	+ 2,3-butanediol -
α -methyl D-glucoside	- Glycerol +
β -methyl D-glucoside	+ Adenosine -
α -methyl D-mannoside	- 2-deoxy adenosine +
Palatinose	- Inosine -
D-psicose	+ Thymidine +
D-raffinose	+ Uridine -
L-rhamnose	- Adenosine-5'-monophosphate -
D-ribose	- Thymidine-5'-monophosphate -
D-salicin	- Uridine-5'-monophosphate -
Sedoheptulosan	- Fructose-6-phosphate +
D-sorbitol	+ Glucose-1-phosphate -
Stachyose	- Glucose-6-phosphate -
Sucrose	- D-L- α -glycerolphosphate -

Lactobacillus casei HK-9의 유전학적 계통수 (phylogenetic tree)를 작성하기 위하여, PCR을 통해 16S rRNA 유전자를 증폭하고, 부분적인 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 NCBI의 BLAST 분석프로그램을 사용하여 상동성을 비교한 결과, *L. casei*와 97%의 유전적 상동성을 보였다. 염기서열은 GenBank에 [JQ951606]로 등록하였으며, *Lactobacillus* 종에 속하는 다른 균주들과의 계통유전학적 계통수를 작성하였다 (Fig. 1).

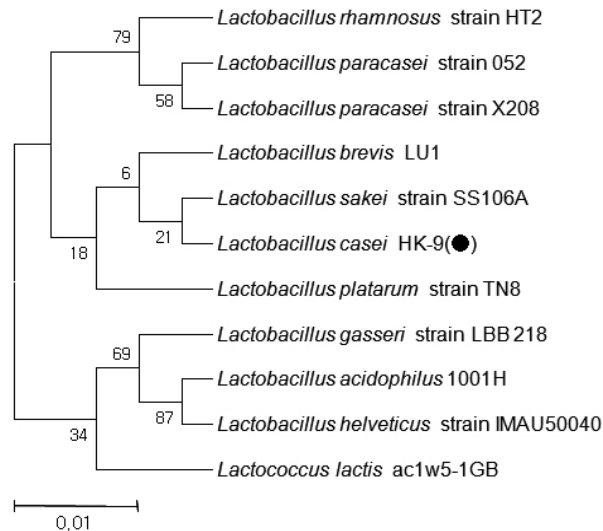


Fig. 1. Phylogenetic relationship between *L. casei* HK-9 (●) and its related strains based on 16S rRNA gene sequence analysis.

3.3. 세균의 생장에 따른 pH의 변화와 유기산 분석

분리세균 HK-9균주를 pH 7.0으로 조절된 MRS 액체배지에 접종하고 세균의 생장과 pH 변화를 8시간 간격으로 측정하였다 (Fig. 2). 배양시간 동안 배양액의 pH는 지속적으로 감소하였으며, 40시간 이후 생장이 느려짐에 따라 pH의 변화도 감소하여, 최종 pH는 3.74로 확인되었다.

분리세균에 의해 생산되는 유기산을 분석하기 위해 HPLC를 사용하여 분석한 결과, 젖산과 아세트산이 혼합된 표준품과 비교하여 배양액에서 채취한 시료에서도 14.41 min과 16.26 min에서 동일한 피크 (peaks)가 확인되었다. 따라서 이 두개의 피크는 유기산인 lactic acid와 acetic acid로 확인되었으며, 분리세균 HK-9의 배양시간 경과에 따른 유기산인 젖산과 아세트산의 생성량은 24시간에서 370 mM과 120 mM, 48시간에 526 mM과 155 mM, 그리고 72시간에서 576 mM과 199 mM로 각각 정량되었다 (Fig. 3). pH 감소와 비교하였을 때, 이들 유기산은 배양액의 pH를 낮추는데 직접적인 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 많은 연구에서 젖산세균은 발효기간 중 유기산 (organic acids), diacetyl, 과산화수소, bacteriocin 등과 같은 다양한 화합물을 생산하는 것으로 알려져있다 [15,16]. 신생아 태변에서 분리한 *Lactococcus lactis* HK-9에서 배양기간 중에 495.6 mM 젖산과 104.3 mM 아세트산을 생성하였고 [6], 새우양식장에서 분리된 *Lactobacillus* sp. JK-8은 192 mM 젖산과 43.6 mM 아세트산을 생성하였으며 [17], 김치에서 분리된

Lactobacillus plantarum YK-9는 72시간 이내에 588.7 mM 젖산과 255.5 mM 아세트산을 생성하였다고 보고하였다 [5]. 이들 결과는 인체 또는 주변에 존재하는 젖산균의 분리 장소와 균주의 종류에 따라 다양한 화합물이 생산되며, Fig. 2에서 보여주는 바와 같이, HK-9 배양은 주요 대사 산물로서 젖산과 아세트산을 생산하는데, 이들 유기산은 pH를 하락시켜 병원성 세균의 항균활성에 영향을 미친다는 것을 제시한다.

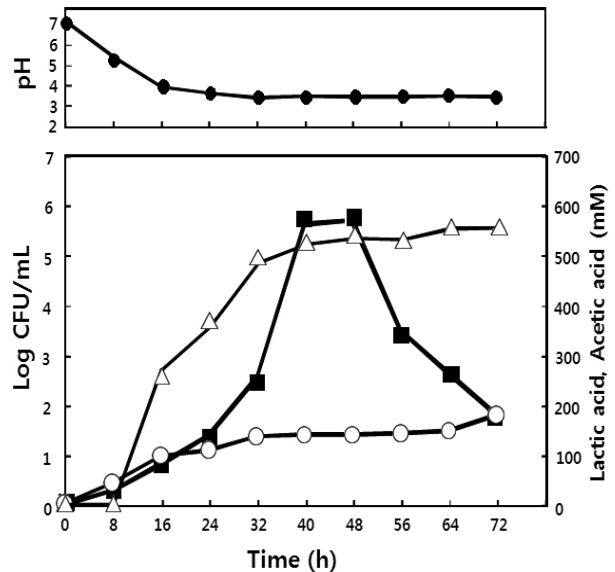


Fig. 2. Growth of *L. casei* HK-9 culture, measured as viable cell count (■) and compared with the parallel formation of lactic acid (Δ), acetic acid (\circ), and pH changes (\bullet).

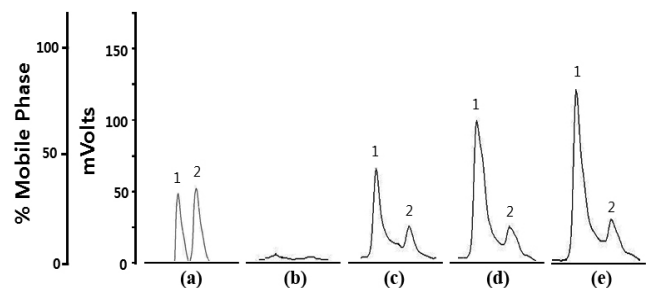


Fig. 3. HPLC chromatograms of a mixture of authentic standards containing lactic acid and acetic acid (a), and of culture samples of *L. casei* HK-9 at the beginning (b) and after 24 h (c), 48 h (d), and 72 h of incubation (e); peak 1, lactic acid; peak 2, acetic acid.

3.4. 농축 배양상등액의 항균활성 조사

분리세균 HK-9의 항균활성 시험은 plate diffusion assay 방법 [18]을 이용하여 농축 배양상등액을 그람양성 세균인 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, MRSA, 그람음성 세균인 *E. coli*, *S. enteritidis* 등 6가지 식중독 감염 원인세균에 노출시키고 24시간 동안 배양한 후, paper disc주변에 형성되는 투명대를 통하여 항균활성을 확인하였다 (Fig. 4). HK-9에서 생성되는 항균물질을 비교하기 위해서 pH를 조절하였으며, 그 결과 pH를 7.0으로 조절한 배양상등액에서는

투명대가 형성되지 않았지만, 조절하지 않은 배양상등액에서는 6가지 균주 모두에게서 투명대가 형성되었고, 이 결과는 분리세균 HK-9 항균활성 물질이 유기산으로써, 식중독 원인세균들의 성장저해에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 분리세균 HK-9의 배양액은 접종이 되어 배양기간이 경과함에 따라 7.0이었던 초기 pH가 급속히 감소되었으며, 배양 72시간에는 3.74로 유지되었는데, 이는 배양액 중에 젖산과 아세트산의 유기산들이 생성되었기 때문이다. 배양액의 pH를 7.0으로 조절하면, 배양액이 중성으로 되어 항균활성이 사라지게 되는데 (자료 미제시), 이는 HK-9가 가지는 항균활성 요인이 유기산들이라는 것을 의미한다. HK-9에서 얻어진 결과는 새우양식장에서 분리한 젖산세균 *Lactobacillus* sp. JK-8과 유사한 결과를 보여주었다 [17].

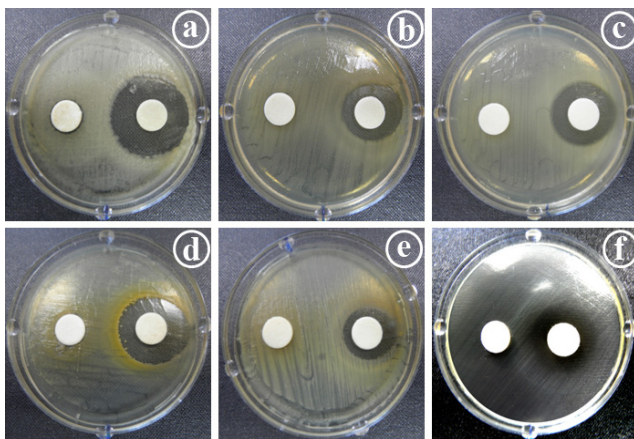


Fig. 4. Antibacterial activity of 20-fold concentrated culture supernatants from *L. casei* HK-9. Paper discs soaked with the supernatants were placed onto lawn plates of *B. cereus* (a), *E. coli* (b), *S. enteritidis* (c), *S. aureus* (d), MRSA (e), *L. monocytogenes* (f). All strains grew on nutrient agar plates.

젖산균의 항균활성은 여러 논문을 통해 보고된 바 있는데, 김치, 우유, 술 등의 발효식품, 수서환경, 또는 사람의 내장과 생식기 등에서 분리된 다양한 젖산균은 식품의 맛과 풍미를 증진시키거나, 환경이나 생물체에서의 방어기작에 중요한 역할을 한다 [4-7,17,19]. 본 연구를 통해서 막걸리에서 분리된 *Lactobacillus casei* HK-9는 발효기간에 경과함에 따라 알코올 맛에 부가하여 젖산균으로부터 젖산이나 아세트산 생성에 따른 맛의 변화가 다소 진행이 된다하더라도 다양한 식중독 원인세균들에 대한 항균능력으로 젖산균이 가지는 기능성을 가지는 것으로 사료된다.

3.5. 알코올 농도별 생존력 확인

분리세균 HK-9의 알코올 농도별 생존력을 확인하기 위해, 6~14%의 알코올을 포함하는 MRS 액체배지에 HK-9를 배양한 후, MRS 고체배지에 평판도말하여 집락수를 계수하였다. 알코올의 농도증가에 따라 형성된 집락의 수는 점차 감소하였으며, 14% 알코올이 포함된 배지에서는 집락을 관찰되지 않았다. 막걸리에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* ST4는 10% 이상의 알코올 농도에서는 생존하지 않는다는 것이

보고된 바 있다 [20]. 이러한 결과는 HK-6가 지금까지 알려진 알코올 내성 젖산균들과 비교하여 높은 알코올 내성을 갖는 젖산균으로 조사되었는데, 이는 막걸리와 같은 발효주를 제조에서 존재하는 젖산균이 가지는 대표적인 특성으로 알려져 있다.

막걸리는 우리의 전통 발효주로서 많은 사람들의 애호를 받지만, 저장성이 매우 짧아 제조후 유통기간 이내라 할지라도 신맛이 생겨서 술의 변질우려와 함께 기호주로서 외면을 받을 소지가 있다. 본 연구를 통해서, 막걸리의 신맛은 젖산균의 다양한 식중독 원인균들에 대한 항균활성으로 음용시 건강에 문제가 되지 않는다는 것을 생각할 수 있으며, 추후 막걸리 고유의 맛과 함께 젖산균의 기능성을 고려한 새로운 알코올성 음료 개발에 대한 가능성을 제시하고 있다.

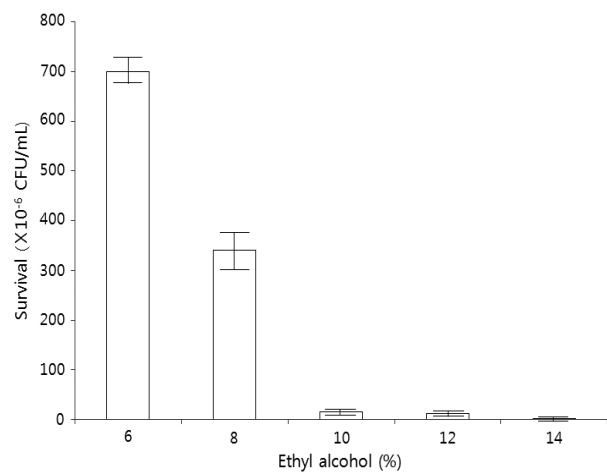


Fig. 5. Survival tests of *L. casei* HK-9 cells in the different concentrations of alcohol (%). Data shown represent the mean \pm SD based on triplicate studies.

4. 결론

본 연구는 막걸리에서 분리한 젖산균인 *Lactobacillus casei* HK-9의 다양한 생리적 특성과 항균활성을 조사하기 위해 실시하였다. 이 균주를 MRS 배지에서 분리하여, BIOLOG 시스템과 16S rRNA 염기서열을 이용한 계통유전학적 분석으로 동정하여, *Lactobacillus casei* HK-9으로 명명하고, GenBank에 [JQ951606]로 등록하였다. 배양기간 중 성장률, 유기산 생산 (예, 젖산과 아세트산), pH 변화를 조사하였다. 배양기간 중에 젖산과 아세트산의 생산량이 증가하는 것을 확인하였고, 젖산과 아세트산의 최대농도는 약 576 mM과 199 mM였으며, pH는 배양 72시간 경과 후 7.00에서 3.74로 변화하였다. 젖산과 아세트산의 생산은 HPLC로 확인하였다. 농축된 *L. casei* HK-9의 배양상등액은 식중독 원인세균들 (예, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*)에 대하여 현저한 항균활성이 있음을 보여주었다. *L. casei* HK-9은 12% 알코올에도 성장할 수 있는 것으로 확인되었다.

감사

본 연구는 순천향대학교 학술연구비의 일부 지원으로 수행하였음.

References

1. On, G. U. (2011) Liquor column-2011 Economic prospect and liquor industry. *Korea Alcohol and Liquor Industry* 31: 14-21.
2. Chun, J. W, C. W Ma, and K. H. Oh (2005) Physiological characterization of *Lactobacillus* sp. JK-8 isolated from shrimp aquaculture pond. *Kor. J. Microbiol.* 41: 18-23.
3. Ringo, E. and F. J. Gatosoupe (1998) Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177-203.
4. Balcázar, J. L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J. L. Múzquiz, O. Gironés (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278: 188-191.
5. Song, Y. J., S. H. Park, J. Y. You, Y. S. Cho, and K. H. Oh (2009) Antibacterial activity against food-poisoning causing bacteria and characterization of *Lactobacillus plantarum* YK-9 isolated from kimchi. *KSBB J.* 24: 273-278.
6. Baek, H., H. R. Ahn, Y. S. Cho, and K. H. Oh (2010) Antibacterial effects of *Lactococcus lactis* HK-9 isolated from feces of a new born infant. *Kor. J. Microbiol.* 46: 127-133.
7. Ahn, H. R., J. S. So, and K. H. Oh (2011) Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from vaginas of women of childbearing age. *Kor. J. Microbiol.* 47: 308-315.
8. Hirayama, K. and J. Rafter (2000) The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* 2: 681-686.
9. Wollowski, I., G. Rechkemmer, and B. L. Pool-Zobel (2001) Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 451-455.
10. Herich, R. and M. levkut (2002) Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med.* 47: 169-180.
11. Aly, S., A. T. Cheik, H. N. Imael, and S. T. Alfred (2004) Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from burkina faso fermentated milk. *J. Nutri.* 3: 174-179.
12. Yang, B. G., J. G. Lee, and M. S. Heo (2003) Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* BK19 against fish pathogenic bacteria. *Kor. J. Microbiol.* 39: 56-61.
13. Jeong, J. W., P. W. Nam, S. J. Lee, and K. G. Lee (2011) Antioxidant activities of Korean rice wine concentrates. *J. Agric. Food Chem.* 59: 7039-7044.
14. Seo, M. Y., S. Y. Chung, W. K. Choi, S. H. Park, M. J. Seo, J. K. Park, J. W. Kim, and C. S. Park (2009) Anti-aging effect of rice wine in cultured human fibroblasts and keratinocytes. *J. Biosci. Bioeng.* 107: 266-271.
15. Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 655-671.
16. Farzanfar, A. (2006) The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48: 149-158.
17. Ma, C. W., Y. S. Cho, and K. H. Oh (2009) Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture* 287: 266-270.
18. Schillinger, U. and F. K. Lucke (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
19. Maragkoudakis, P. A., K. C. Mountzouris, D. Psyras, S. Cremonesem, J. Fischer, M. D. Cantor, and E. Tsakalidou (2009) Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *Int. J. Food Microbiol.* 130: 219-226.
20. Lee, S. G., K. W. Lee, T. H. Park, J. Y. Park, N. S. Han, and J. H. Kim (2012) Proteomic analysis of proteins increased or reduced by ethanol of *Lactobacillus plantarum* ST4 isolated from makgeolli, traditional korean rice wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 516-525.