

## Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods and development of a starter for fermented milk

Jong-Hyuk Park<sup>1</sup>, Hye-Jung Moon<sup>1</sup>, Jeon-Hui Oh<sup>1</sup>, Joo-Hee Lee<sup>1</sup>, Kyung-Min Choi<sup>2</sup>,  
Jeong-Dan Cha<sup>2</sup>, Tae-Bum Lee<sup>3</sup>, Min-Jeong Lee<sup>3</sup>, Hoo-Kil Jung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Insil Research Institute of Cheese Science, Insil 566-881, Korea*

<sup>2</sup>*Institute of Jinan Red Ginseng, Jinan 567-801, Korea*

<sup>3</sup>*Gochang Black Raspberry Research Institute, Gochang 585-943, Korea*

### 전통발효식품에서 분리한 유산균의 항균 활성 및 발효유 스타터 개발

박종혁<sup>1</sup> · 문혜정<sup>1</sup> · 오전희<sup>1</sup> · 이주희<sup>1</sup> · 최경민<sup>2</sup> · 차정단<sup>2</sup> · 이태범<sup>3</sup> · 이민정<sup>3</sup> · 정후길<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>임실치즈과학연구소, <sup>2</sup>진안홍삼연구소, <sup>3</sup>고창복분자연구소

#### Abstract

This study was conducted to investigate the antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods and to develop a new starter for fermented milk. The isolates were identified using 16S rDNA sequencing and named *Lactobacillus plantarum* A, *Leuconostoc lactis* B and *L. acidophilus* C. The activity of these strains to inhibit the growth of food-borne human pathogens (*Escherichia coli* NCTC 12923, *Salmonella* Typhimurium NCTC 12023, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994) was measured using the paper disc method. All these strains showed strong antibacterial activity against *Li. monocytogenes* NCTC 11994. The experiment groups were the fermented milks with these strains, and the control group was the fermented milk with the commercial starter (ABT 5). The change of pH, acidity and viable cell counts were measured during their aging time. All the experiment groups showed a significant difference in their aging times compared to the control group. However, the sensory test showed that the experiment groups can be used as useful starters for fermented milk. This result suggests that *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B and *L. acidophilus* C have the potential to be developed as new starters for fermented milk.

**Key words** : fermented milk, lactic acid bacteria, antibacterial activity, fermented food

#### 서 론

발효유는 원유 또는 유가공품을 유산균으로 발효시킨 것으로 정의하고 있으며, 발효유는 완전 식품인 원유에 유산균 starter를 첨가하여 일정한 온도에서 발효시켜 제조되며, starter에 사용되는 유산균은 주로 *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus thermophilus*가 있으며, 대부분이 probiotics에 해당된다(1). Probiotics는 동물의 장내 미생물의 균형을 개선시킴으로써 유익한 효과를 주는 살아있는 미생물 제제로 주로 유산균이 많이 사용되고 있으며 그 외 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 효모 및

*Aspergillus oryzae*와 같은 사상균이 사용되고 있다(2).

Probiotics는 generally recognized as safe(GRAS)로 안전한 미생물이며, 대부분 사람의 장으로부터 유래되며, 내산성 및 내담즙성을 가짐으로써 위장관에서 살아남아 숙주의 장내에 정착하여 숙주에게 건강적 효능을 주는 것으로 보고되어 있다(3,4). Probiotics의 효능으로는 항생제 관련 설사, 병원성 균에 의한 장의 감염, 과민성 대장증후군 같은 위장관 질환 개선, 아토피 피부염 감소, 고혈압 개선, 혈중 콜레스테롤 수준 감소 및 혈중 지질상태 개선, 항비만 효과, 대장암과 위암에 대한 항암 효과 등 다양한 기능성에 대한 연구가 진행되고 있다(5-12).

최근 김치, 젓갈 및 장류와 같은 전통발효식품에서 probiotics 기능을 가지는 유산균주의 분리에 대한 연구가

\*Corresponding author. E-mail : hkjung@irics.re.kr  
Phone : 82-63-644-2181, Fax : 82-63-644-2185

이뤄지고 있으며(12-17), 그 중 발효식품 중에서 유제품의 스타터를 개발하기 위해 젓갈로부터 분리한 유산균 *L. casei* 및 *L. pentosus*를 이용한 요구르트 제조에 관한 연구(18), 갓김치로부터 분리한 *L. acidophilus* GK20 및 *L. paracasei* GK74를 이용한 연구(19)와 Oh와 In(20)은 김치로부터 *Leuconostoc mesenteroides* KC51을, Lee 등(21)은 *L. plantarum* LHCS2를 분리하여 각각 대두 발효유와 요구르트 제조에서의 활용에 관한 연구가 이뤄졌다.

하지만 산업적 활용은 미흡하여 우리나라에서 생산되는 발효유의 대부분은 덴마크, 미국 및 일본에서 수입되는 상업적 starter를 주로 사용하고 있어 독자적인 발효유 스타터 개발이 시급한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 수입되는 발효유 starter를 대체하기 위해 전통발효식품으로부터 유산균을 분리 및 동정하여 이를 이용한 유산균주의 발효유 적합성 및 probiotics로서의 가능성을 확인하여 향후 발효유의 starter 개발을 위한 기초자료로 사용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

유산균 분리를 위하여 배추김치는 전라북도 지역의 가정에서 담근 김치를 사용하였으며, 젓갈류(새우젓) 및 장류(고추장 및 청국장)는 각각 충청남도(광천)와 전라북도(순창)에서 제조된 비살균 시판제품을 구입하여 실험에 사용하였다. 발효유 제조에 사용된 원유는 임실지역 낙농가에서 착유하여 사용하였으며, 대조군으로 사용될 상업용 균주는 Chr. Hansen사(Hørsholm, Denmark)의 ABT-5(*L. acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus thermophilus*)를 사용하였다. 환원 탈지유는 서울우유(Seoul Milk Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 생산된 제품을 구입하여 사용하였다.

### 유산균 분리 및 배양

각 시료 25 g과 멸균생리식염수 225 mL를 sterile filter bag에 넣고 Stomacher(Easy Mix, AES Chemunex, Bruz, France)를 이용하여 혼합하였다. 여기서 액상부분 1 mL를 취하여 십진 희석법으로 희석한 후 100  $\mu$ L를 취해 1 N HCl을 이용하여 pH를 2.5로 조정하여 MRS agar(Lactobacilli MRS agar, Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 각 시료별 배지에서 투명환을 나타내는 단일 colony를 1차 분리하였다. 1차 분리된 균주들을 BCP agar(Eiken chemical Co., Ltd., Shimotsuga, Japan)에 희석평판법으로 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 노란색을 보이는 colony를 2차 분리하였다. 김치로부터 5종, 젓갈에서 1종, 장류에서 5종이 분리되었으며, 이를 MRS agar에 접종하여 37°C에서 24~72시간 배양 후 4°C로 냉장 보관하면서 사용하였다.

### 내산성 및 내담즙성 측정

내산성 측정은 Kobayashi 등(22)의 방법을 변형하여 1 N HCl를 사용하여 pH 2.5로 조정하여 MRS broth(Difco)를 사용하였다. 분리된 유산균을 MRS broth에서 37°C로 24시간 배양한 후 4,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액을 버리고 균을 회수하였다. pH를 조정하여 MRS broth 10 mL에 회수한 균 1%를 접종하여, 37°C에서 2시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

내담즙성은 Kang 등(23)의 방법을 변형하여 내산성과 동일한 방법으로 수행하되, Bacto oxgall(Difco)을 0.3%(w/v)를 가한 MRS broth를 사용하였으며, 37°C에서 4시간 배양한 후 생균수를 측정하였다. 위산과 담즙산에 대한 생존율은 위산 및 담즙산을 처리하기 전과 후의 생균수를 비교하였다.

### 항균 활성 측정

37°C에서 24시간 배양된 병원성 미생물(*Escherichia coli* NCTC 12923, *Salmonella* Typhimurium NCTC 12023, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994)을 면봉으로 Nutrient agar(Difco)에 도말하였다. 도말된 평판배지에 직경 10 mm의 paper disc를 놓고 37°C MRS broth에서 24시간 배양된 분리균을 각각 40  $\mu$ L씩 일정하게 가한다. 37°C에서 24시간 배양한 후 disc 주위의 생육저지환 생성 여부를 확인하였다.

### 분리 균주의 동정

분리균은 16S rRNA 결정법으로 동정하였으며, 염기서열 분석회사인 (주)Macrogen(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 균의 16S rRNA를 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR(DNA engine tetrad 2 peltier thermal cycler, Bio-rad lab., Hercules, CA, USA)을 수행하여 증폭시켰다. PCR 산물은 BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems, Lennik, Belgium)를 이용하여 ABI Prism 3730XL analyzer(Applied Biosystems, Lennik, Belgium)로 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 NCBI BLASTN 프로그램(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 사용하여 유산균을 동정하였다.

### 분리 균주를 이용한 요구르트 제조

MRS broth에 2회 계대배양한 선별 균주를 10%(w/v) 환원탈지유에 1%(v/v) 접종하여  $10^8$  CFU/mL 이상으로 배양한 후 4°C로 냉장보관하며 사용하였다. 대조군은 상업용 균주인 ABT-5를 똑같은 방법으로 배양하여 발효유 제조용 starter로 사용하였다. 원유에 정백당을 5.5%(w/v)로 첨가하여 90°C에서 10분간 혼합, 살균하였다. 그 후 starter를 접종하였으며, 선별 균주의 경우 각각 2%(v/v)씩 접종하고 40°C

에서 6시간 배양하여 제조하였다.

**pH 및 적정산도 측정**

pH는 pH meter(UB-10, Denver Instrument Co., Ltd., Arvada, CO, USA)를 이용하여 2시간 간격으로 6시간까지 변화를 측정하였다. 적정산도는 시료 10 mL에 증류수 10 mL를 혼합하여 현탁액을 만든 후 0.1 N NaOH로 pH 8.3까지 적정시키고, NaOH의 소비량에 유산의 환산계수인 0.9를 곱한 후 시료의 무게(g)를 나누어 나타낸 값을 적정산도(%)로 하였다. 발효 중 적정산도는 2시간 간격으로 6시간까지 경시적인 변화를 측정하였다.

**유산균수 측정**

발효유의 발효 중 유산균수의 변화는 2시간 간격으로 시료 1 mL를 채취하여 멸균식염수에 십진 희석법으로 희석한 뒤 BCP 한천배지를 이용하여 평판배양법으로 37°C에서 48시간 배양하였다. 그 후 나타난 노란색 colony 수를 측정하여 log CFU(colony forming unit)/mL로 나타내었다.

**발효유의 관능검사**

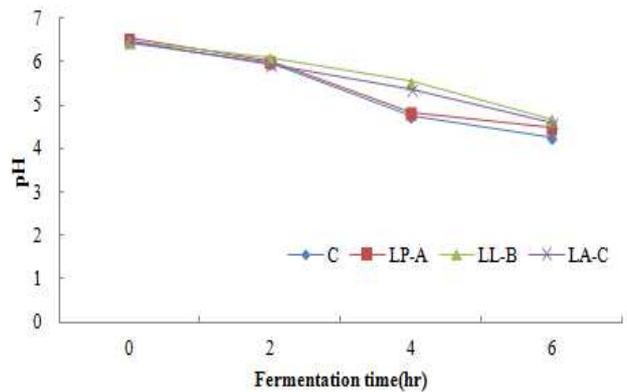
발효유의 pH가 4.7에 도달하였을 때 4°C에서 24시간 냉장하여 시료로 사용하였으며, 관능검사요원 15명을 대상으로 색(color), 향(flavor), 맛(taste), 조직감(texture) 및 전반적

인 기호도(overall acceptability)를 5점 척도법으로 평가하도록 하였다.

**결과 및 고찰**

**스타터 제조를 위한 유산균 분리 및 동정**

발효유 제조를 위한 유산균주의 분리원은 배추김치, 젓



**Fig. 1. Changes of pH during the fermentation of milk by isolated strains.**

C; Fermented milk by ABT 5, LP-A; Fermented milk by *Lactobacillus plantarum* A, LL-B; Fermented milk by *Leuconostoc lactis* B, LA-C; Fermented milk by *Lactobacillus acidophilus* C.

**Table 1. Results of 16S rRNA sequencing of isolates from fermented food**

Strains	Query		Subject	Score							Identities		
	Start	End		Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total
K1	5	1497	<i>Lactobacillus curvatus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni998	AB600200.1	1531	17	1506	2737	1482	0.0	1490	1493	99
K2	8	1512	<i>Weissella viridescens</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 394	AB680180.1	1503	1	1495	2687	1455	0.0	1491	1506	99
K3	1	1490	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni729	AB601179.1	1525	19	1504	2726	1476	0.0	1486	1490	99
K4	2	1480	<i>Leuconostoc lactis</i> culture collection IMAU:80516 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM058726.1	1476	1	1476	2706	1465	0.0	1475	1479	99
K5	4	1477	<i>Lactobacillus acidophilus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 2121	AB690249.1	1507	6	1497	2612	1414	0.0	1469	1492	98
S1	3	1524	<i>Lactobacillus sakei</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0128	AB362609.1	1568	1	1519	2791	1511	0.0	1519	1522	99
G1	1	1494	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. carposus carnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni432	AB600196.1	1534	17	1507	2739	1483	0.0	1491	1494	99
G2	1	1498	<i>Pediococcus pentosaceus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	19	1514	2748	1488	0.0	1495	1498	99
C1	4	1507	<i>Pediococcus</i> subsp. NBRC 107250 gene for 16S rRNA, partial sequence	AB682548.1	1502	1	1501	2747	1487	0.0	1499	1504	99
C2	4	1504	<i>Enterococcus faecium</i> strain IDCC 2103 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU003447.1	1519	15	1506	2708	1466	0.0	1491	1501	99
C3	2	1510	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain Uga146-3 16S rRNA gene, complete sequence	DQ294960.1	1577	21	1521	2652	1456	0.0	1486	1509	98

갈 및 장류를 사용하였으며, pH를 2.5로 조정된 MRS agar를 이용하여 총 11종의 유산균주를 분리하였다(Table 1). 11종의 유산균주는 김치에서 분리한 *L. curvatus*, *Weissella viridescens*, *L. plantarum*, *Leu. lactis* 및 *L. acidophilus* 5종, 새우젓에서 *L. sakei* subsp. 1종, 고추장에서 *L. sakei* subsp. 및 *Pediococcus pentosaceus* 2종, 청국장에서 *Ped.* subsp., *Enterococcus faecium* 및 *Ped. acidilactici* 3종으로 16S rDNA의 염기서열을 표준 균주와 비교하여 작성한 계통수 결과 각각의 균주는 표준균주와 모두 97% 이상 일치하였다(Table 1). Kwon 등(24)은 김치에는 30종 이상의 유산균종이 있으며 그 중 우점종으로 *L. plantarum*, *L. brevis*, *Ent. faecalis*, *Leu. mesenteroides*으로 보고하였다. 젓갈류에는 *Lactobacillus* 속의 유산균주(25), 장류인 간장의 경우에는 *Pediococcus* 속의 유산균주가 분리 동정된다고 보고되어 있으며(26) 본 연구의 결과에서도 이와 유사한 유산균주가 분리됨을 확인하였다.

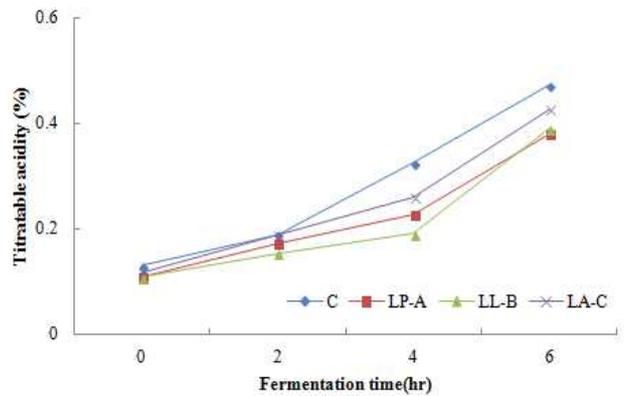
**분리된 유산균의 내산성 및 내담즙성**

분리된 유산균이 probiotics 및 발효유 starter가 되기 위한 필수조건으로 위장관 상부의 산성 조건 및 담즙이 존재하는 환경에서 생존되어야 장내에 부착되어 기능성을 나타낸다고 보고되어 있다(27). 유산균주의 내산성 및 내담즙성을 확인한 결과(Table 2, 3) 내산성은 *Leu. lactis*가 99%로 가장 높았으며, 그 다음으로 *L. acidophilus*, *Ped. acidilactici*, *L. plantarum*, 및 *Ent. faecium*이 각각 96, 95, 94, 및 92%로

**Table 2. Survival rate of isolated strains after 2 hr in MRS broth (pH 2.5)**

Strains	Before incubation (log CFU/mL)	After incubation (log CFU/mL)	Survival rate (%)
	pH 7.0	pH 2.5	
K1 <sup>1)</sup>	7.4	3.7	50
K2 <sup>2)</sup>	4.7	3.5	74
K3 <sup>3)</sup>	8.2	7.7	94
K4 <sup>4)</sup>	7.9	7.8	99
K5 <sup>5)</sup>	8.4	8.1	96
S1 <sup>6)</sup>	7.6	6.7	87
G1 <sup>7)</sup>	8.8	5.7	64
G2 <sup>8)</sup>	7.0	5.8	83
C1 <sup>9)</sup>	7.6	6.7	88
C2 <sup>10)</sup>	7.7	7.1	92
C3 <sup>11)</sup>	7.7	7.4	95

<sup>1)</sup> *Lactobacillus curvatus* isolated from Kimchi; <sup>2)</sup> *Weissella viridescens* isolated from Kimchi; <sup>3)</sup> *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi; <sup>4)</sup> *Leuconostoc lactis* isolated from Kimchi; <sup>5)</sup> *Lactobacillus acidophilus* isolated from Kimchi; <sup>6)</sup> *Lactobacillus sakei* subsp. isolated from salt-fermented shrimp; <sup>7)</sup> *Lactobacillus sakei* subsp. isolated from Gochujang; <sup>8)</sup> *Pediococcus pentosaceus* isolated from Gochujang; <sup>9)</sup> *Pediococcus* subsp. isolated from Cheonggukjang; <sup>10)</sup> *Enterococcus faecium* isolated from Cheonggukjang; <sup>11)</sup> *Pediococcus acidilactici* isolated from Cheonggukjang.



**Fig. 2. Changes of titratable acidity during the fermentation of milk by isolated strains.**

C; Fermented milk by ABT 5, LP-A; Fermented milk by *Lactobacillus plantarum* A, LL-B; Fermented milk by *Leuconostoc lactis* B, LA-C; Fermented milk by *Lactobacillus acidophilus* C.

높게 나타났다. 내담즙성은 *Weissella viridescens*를 제외하고 모두 90% 이상의 내담즙성을 확인하였다(Table 3). Kang 등(28)은 발효식품에서 분리한 유산균의 내산성 및 내담즙성을 분석한 결과 내담즙성은 높지만 내산성이 낮은 것으로 보고되고 있으며, 본 연구의 결과에서도 분리된 유산균주의 대부분은 내담즙성은 높지만 내산성이 우수한 유산균주는 김치에서 분리한 *L. plantarum*, *Leu. lactis* 및 *L. acidophilus* 유산균주 3종 뿐이었다. 따라서 본 연구의 발효

**Table 3. Survival rate of isolated strains after 4 hr in MRS broth containing 0.3% oxgall**

Strains	Before incubation (log CFU/mL)	After incubation (log CFU/mL)	Survival rate (%)
K1 <sup>1)</sup>	7.4	7.2	98
K2 <sup>2)</sup>	4.7	4.1	87
K3 <sup>3)</sup>	8.2	8.1	98
K4 <sup>4)</sup>	7.9	7.6	97
K5 <sup>5)</sup>	8.4	8.3	98
S1 <sup>6)</sup>	7.6	7.1	93
G1 <sup>7)</sup>	8.8	8.0	90
G2 <sup>8)</sup>	7.0	6.4	91
C1 <sup>9)</sup>	7.6	7.4	96
C2 <sup>10)</sup>	7.7	7.1	92
C3 <sup>11)</sup>	7.7	7.4	97

<sup>1)</sup> *Lactobacillus curvatus* isolated from Kimchi; <sup>2)</sup> *Weissella viridescens* isolated from Kimchi; <sup>3)</sup> *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi; <sup>4)</sup> *Leuconostoc lactis* isolated from Kimchi; <sup>5)</sup> *Lactobacillus acidophilus* isolated from Kimchi; <sup>6)</sup> *Lactobacillus sakei* subsp. isolated from salt-fermented shrimp; <sup>7)</sup> *Lactobacillus sakei* subsp. isolated from Gochujang; <sup>8)</sup> *Pediococcus pentosaceus* isolated from Gochujang; <sup>9)</sup> *Pediococcus* subsp. isolated from Cheonggukjang; <sup>10)</sup> *Enterococcus faecium* isolated from Cheonggukjang; <sup>11)</sup> *Pediococcus acidilactici* isolated from Cheonggukjang.

유 스타터 개발을 위한 유산균주 *L. plantarum*, *Leu. lactis* 및 *L. acidophilus*를 선정하였으며, 각각 *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B 및 *L. acidophilus* C로 명명하였다.

### 선택된 유산균의 항균 활성

선택된 유산균주 *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B 및 *L. acidophilus* C의 항균 활성을 측정하기 위하여 각각의 유산균주는  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL를 사용하여 병원성 미생물 *E. coli* NCTC 12923, *Sal. Typhimurium* NCTC 12023, *Li. monocytogenes* NCTC 11994에 대한 항균 활성을 조사하였다(Fig. 3). 병원성 미생물 *Li. monocytogenes* NCTC 11994에 대해 *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B 및 *L. acidophilus* C는 각각 20.1 mm 이상의 저해환을 보였고, *Sal. Typhimurium* NCTC 12023 및 *E. coli* NCTC 12923에 대해서는 *L. plantarum* A가 각각 10 mm 이하의 저해환을 보였고, *Leu. lactis* B 및 *L. acidophilus* C는 저해환이 생성되지 않았다. Kaur 등(29)은 유산균은 유기산,  $H_2O_2$  등의 과산화물질, 박테리오신 등의 2차 대사산물이 유해한 균 특히 병원성 미생물을 저해한다고 보고하고 있으며, 김치의 발효과정 중 발효초기에는 *Aeromonas*속, *Erwinia*속, *Bacillus*속 등이 검출되지만 발효 중반 이후에는 유산균만이 검출되며, 본 실험에서 사용된 배추김치는 저장 30일째의 김치로 *Li. monocytogenes*에 대한 항균 활성이 우수한 유산균주가 분리된 것으로 사료된다. Lee와 No(30)는 김치 유래 유산균이 *E. coli*, *Salmonella subsp.*, *Li. monocytogenes*의 성장을 억제한다고 하였으며, 본 실험에 있어서도 일부 이와 유사한 결과를 나타내었으며, 특히 병원성 미생물 중 *Li. monocytogenes*의 성장 저해율이 높아 발효유제품 뿐만 아니라 식품 및 축산식품의 병원성 미생물 억제제로 이용 가능성이 높은 것으로 생각된다.

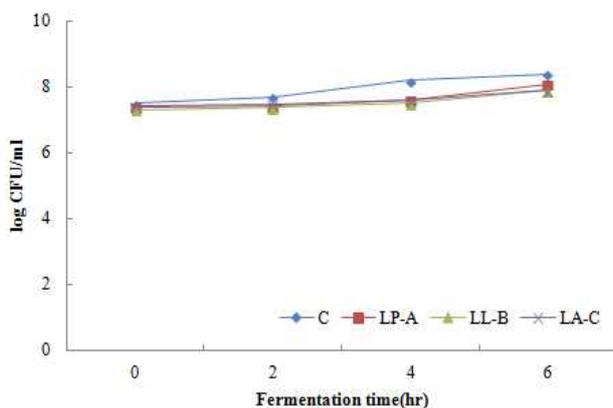


Fig. 3. Changes of viable cell counts during the fermentation of milk by isolated strains.

C; Fermented milk by ABT 5, LP-A; Fermented milk by *Lactobacillus plantarum* A, LL-B; Fermented milk by *Leuconostoc lactis* B, LA-C; Fermented milk by *Lactobacillus acidophilus* C.

Table 4. Antimicrobial activities of selected strains against food-borne pathogens

Indicator stain	Activity		
	LP-A <sup>1)</sup>	LL-B <sup>1)</sup>	LA-C <sup>1)</sup>
<i>E. coli</i> NCTC 12923	+ <sup>2)</sup>	+	-
<i>Sal. typhimurium</i> NCTC 12023	+	-	-
<i>Li. monocytogenes</i> NCTC 11994	+++	+++	+++

<sup>1)</sup>LP-A; *Lactobacillus plantarum* A, LL-B; *Leuconostoc lactis* B, LA-C; *Lactobacillus acidophilus* C

<sup>2)</sup>Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: -, none; +, below 10 mm, ++, 10.1-20 mm, +++, above 20.1 mm

### 선택된 유산균주에 따른 발효유의 이화학적 특성

선택된 유산균주 *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B 및 *L. acidophilus* C를 단독으로 이용하여 발효유를 제조하였으며, 대조구는 상업적 균주 ABT 5를 사용하여 비교하였다. 모든 실험구의 지방, 단백질, 유당 및 총고형분 함량은 각각 4.3~4.8, 3.2~3.5, 4.0~4.2 및 18.0~18.5%로 유의적인 차이는 없었다(data not shown). 선택된 유산균주 및 상업적 스타터를 이용한 발효유의 pH의 변화를 측정된 결과 *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B 및 *L. acidophilus* C는 각각 배양 6시간 이내에 pH가 4.6으로 도달하였으며, 상업적 스타터에 비해 배양 시간이 1~2시간 정도 더 걸린 것으로 나타났다. 상업적 스타터인 ABT 5는 *L. acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus thermophilus* 3종의 유산균이 혼합배양 되어 있어 본 연구에서 사용된 단일 균주에 비해서는 빠르게 산을 생성하는 것으로 사료된다. 단독 유산균주를 사용할 경우 Lee 등(31)은 *L. plantarum*을 이용한 발효유 제조시 pH가 상업적 스타터에 비해 유의하게 낮게 측정되었다고 보고하였으며, 이는 *L. plantarum* 단독으로 사용한 것이 아니라 상업적 균주 ST-B01(*St. thermophilus*, Chr. Hansen, Denmark)와 LH-B02(*L. helveticus*, Chr. Hansen, Denmark)을 1:1로 사용하여 본 연구와는 상의한 결과를 나타내었다. 또한 *L. plantarum*으로 발효유를 제조 시 단독으로 사용할 경우 pH를 4.08~4.30 까지 낮춘다는 연구보고와 다르게 나타났으며, 이는 본 연구에서 분리된 유산균주의 특성에 기인된 것으로 보인다. 하지만 단일균주로 스타터를 제조 시 적정 pH에 도달하지 못하면 스타터로 이용 가능성이 낮는데 비해 본 연구에서 분리해 낸 3종의 유산균은 모두 6시간 이내로 목표 pH에 도달하여 발효유의 스타터로 사용 가능성이 높은 것으로 사료된다. 산도의 변화는 모든 실험구에서 배양시간이 증가할수록 산도는 증가하였으며, 유산균의 변화는 *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B 및 *L. acidophilus* C를 첨가하여 제조한 발효유는 각각 배양 2시간까지는 변화가 없다가 배양 6시간 때 각각  $1.3 \times 10^8$ ,  $7.9 \times 10^7$  및  $7.9 \times 10^7$  CFU/mL로 증가하였고, 상업적 스타터 ABT 5를 사용한 발효유는 배양초기부터 증가하여 배양 6시간째  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL로 증가하였다. *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B 및

*L. acidophilus* C를 단독으로 첨가하였을 경우 상업적 스타터인 ABT 5에 비해 낮은 증가율을 보이고 있으나 상업적 스타터의 경우는 원유를 주성분으로 하여 ABT 5에 속하는 유산균이 잘 자랄 수 있도록 조정이 된 것으로 본 연구에서 사용되는 유산균은 김치에서 분리된 유산균을 적용함으로써 상업적 스타터와는 배양시간의 차이가 생긴 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 선택된 유산균주 3종은 발효유 제조를 위한 스타터로서의 내산성, 내담즙성 및 발효유 제조 시 이화학적 특성이 우수하며 스타터로 이용 가능성이 적합하리라 판단된다.

### 선택된 유산균주에 따른 발효유의 관능검사

선택된 유산균주 *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B 및 *L. acidophilus* C를 이용하여 제조한 발효유의 관능적 특성은 Table 5에 나타내었다. 대조구로는 ABT 5를 이용하여 색, 향기, 조직감, 맛 및 전체적인 기호도를 5점 척도법으로 실시하였으며, 대조구는 각각 4.5, 4.5, 4.8, 4.5 및 4.5로 나타났다. *L. plantarum* A는 각각 4.0, 3.8, 4.0, 4.0 및 4.2로, *Leu. lactis* B는 4.1, 4.0, 3.9, 3.8 및 3.9로, *L. acidophilus* C는 4.0, 4.2, 4.2, 4.0 및 4.2로 나타났다. 관능검사 결과 대조구에 비해 색, 향기, 조직감 및 전체적인 기호도는 유의하게 낮게 측정되었으며, Lee 등(31)은 풍미 및 기타 관능적 특성 저하가 일어난다고 보고하였다. 본 연구는 선택된 유산균주 3종을 발효유 제조 시 스타터로 사용하기 위한 기초 연구로 본 연구에 사용된 유산균주가 김치에서 분리된 단일 균주임을 감안하면 색, 향기, 조직감, 맛 및 전체적인 기호도가 상업적 스타터를 사용한 대조구 대비 80% 이상으로 발효유의 스타터로 이용 가능성이 높은 것으로 보여지며 추후 관능적 특성을 높이기 위한 복합균주에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 판단된다. 또한 Dedios 등(32)은 발효유 제조에 있어 유산균의 장내 정착이 병원성 미생물의 증식 억제와 장내 세균총에 있어서 중요한 작용을 하므로 가능성이 증진된다고 보고하였고, 향후 동물실험 모델을 통한 *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B 및 *L. acidophilus* C의 장내세균 변화 등의 기능성 연구가 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

**Table 5. Sensory characteristics of the fermented milk (n=15)**

Items	C <sup>1)</sup>	LP-A	LL-B	LA-C
Color	4.5±0.39 <sup>2)</sup>	4.0±0.46	4.1±0.72	4.0±0.31
Flavor	4.5±0.46	3.8±0.73	4.0±0.31	4.2±0.64
Texture	4.8±0.73	4.0±0.31	3.9±0.25	4.2±0.61
Taste	4.5±0.37	4.0±0.67	3.8±0.77	4.0±0.31
Overall acceptability	4.5±0.37	4.2±0.51	3.9±0.35	4.2±0.63

<sup>1)</sup>C; Fermented milk by ABT 5, LP-A; Fermented milk by *Lactobacillus plantarum* A, LL-B; Fermented milk by *Leuconostoc lactis* B, LA-C; Fermented milk by *Lactobacillus acidophilus* C

<sup>2)</sup>Mean±SD

## 요 약

본 연구에서는 수입되는 발효유 starter를 대체하기 위해 전통발효식품으로부터 유산균을 분리 및 동정하여 이를 이용한 유산균주의 발효유 적합성 및 probiotics로서의 가능성을 확인하기 위한 기초자료로 사용하고자 실시하였다. 전통발효식품 배추김치, 젓갈 및 장류에서 분리해 낸 유산균주는 11종이며, 이 중 내산성 및 내담즙성이 우수한 *L. plantarum* A, *Leu. lactis* B 및 *L. acidophilus* C를 선택하여 항균활성 및 발효유제조 적용연구를 실시하였다. 3종의 균주에 대한 항균활성은 병원성 미생물인 *Li. monocytogenes* NCTC 11994에 대해서 높은 항균활성을 보였다. 항균활성이 있는 3종의 유산균주를 사용하여 발효유를 제조한 결과 대조구인 ABT 5보다는 미생물학적 및 이화학적 변화가 유의적으로 차이는 낮으나 관능검사 결과 색, 향기, 조직감, 맛 및 전체적인 기호도가 대조구 대비 80% 이상으로 단독 균주임을 감안하면 우수한 관능적 특성을 가지고 있고, 추후 관능적 특성을 높이기 위한 복합균주에 대한 연구가 추가적으로 진행된다면 발효유 스타터로서의 이용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지역특화융복합연구지원사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## References

1. Leroy F, De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Technol, 15, 67-78
2. Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 66, 365-378
3. Collins JK, Thornton G, Sullivan GO (1998) Selection of probiotic strains for human applications. Int Dairy J, 8, 487-490
4. Otero MC, Ocaña VS, Elena Nader-Macías M (2004) Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. Methods Mol Biol, 268, 435-440
5. Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. Am J Clin Nutr, 73, 430S-436S
6. Kim JY, Park BK, Park HJ, Park YH, Kim BO, Pyo S (2013) Atopic dermatitis-mitigating effects of new

- Lactobacillus* strain, *Lactobacillus sakei* probiotics 65 isolated from Kimchi. J Appl Microbiol, 1-10
7. Aihara K, Kajimoto O, Hirata H, Takahashi R, Nakamura Y (2005) Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. J Am Coll Nutr, 24, 257-265
  8. Ataie-Jafari A, Larijani B, Alavi Majd H, Tahbaz F (2009) Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. Ann Nutr Metab, 54, 22-27
  9. Ooi LG, Liong MT (2010) Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. Int J Mol Sci, 11, 2499-2522
  10. Kang JH, Yun SI, Park MH, Park JH, Jeong SY, Park HO (2013) Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. PLoS One, 8, 54617
  11. Gianotti L, Morelli L, Galbiati F, Rocchetti S, Coppola S, Beneduce A, Gilardini C, Zonenschain D, Nespoli A, Braga M (2010) A randomized double-blind trial on perioperative administration of probiotics in colorectal cancer patients. World J Gastroenterol, 16, 167-175
  12. Hwang JW, Baek YM, Yang KE, Yoo HS, Cho CK, Lee YW, Park J, Eom CY, Lee ZW, Choi JS, Jang IS (2013) *Lactobacillus casei* extract induces apoptosis in gastric cancer by inhibiting NF- $\kappa$ B and mTOR-mediated signaling. Integr Cancer Ther, 12, 165-173
  13. Chang JH, Shim YY, Cha SK, Chee KM (2010) Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. J Appl Microbiol, 109, 220-230
  14. Kim SY, Kim JD, Son JS, Lee SK, Park KJ, Park MS (2011) Biochemical and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Korean J Food Sci Technol, 43, 446-452
  15. Jeon CP, Kim YH, Lee JB, Jo MS, Shin KS, Choi CS, Kwon GS (2010) Physiological characteristics and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus brevis* HLJ59 isolated from salted shrimp. Korean J Microbiol, 46, 9-14
  16. Kim SJ, Ma SJ, Kim HL (2005) Properties of lactic acid bacteria and yeasts isolated from Korean traditional food, Jeot-gal. Korean J Food Preserv, 12, 184-189
  17. Choi YH, Lee JS, Bae SY, Yang KJ, Yeom KW, Jo DH, Kang OH, Baik HS (2013) Isolation of bacteria with protease activity from *Cheonggukjang* and purification of fibrinolytic enzyme. J Life Sci, 23, 259-266
  18. Kim JH, Rhee YH, Na HJ, Lee YK, Shin SY (1997) Physico-chemical characteristics of yogurt by *Lactobacillus* sp. from pickles. Agric Chem Biotechnol, 40, 12-17
  19. Lim SM (2012) Synbiotic potential of yoghurt manufactured with probiotic lactic acid bacteria isolated from mustard leaf Kimchi and prebiotic fructooligosaccharide. Korean J Microbiol Biotechnol, 40, 226-236
  20. Oh NS, In MJ (2008) Production of a fermented soymilk using a new strain *Leuconostoc mesenteroides* KC51 isolated from Kimchi. J Korean Soc Appl Biol Chem, 51, 88-91
  21. Lee SG, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang A, Kim DH, Bae IH, Ham JS (2010) A study on the sensory characteristic of yogurt and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* LHC52 isolated from Kimchi. Korean J Food Sci Ani Resour, 30, 328-335
  22. Kobayashi Y, Tohyama K, Terashima (1974) Tolerance of the multiple antibiotic resistant strains, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. Jpn J Microbiol, 29, 691-697
  23. Kang M, Kim D, Kim TW, Park SH, Kim HJ, Jang JY, Han ES (2012) Selection of probiotic bacteria from *Yulmoo Kimchi* using a stimulated human intestinal model system. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 396-401
  24. Kwon MS, Ryoo CR, Kang CH, Min KH, Kim WJ (2002) Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in kimchi and its characteristics. J Microbiol Biotech, 12, 96-105
  25. Jeun JH, Kim HD, Lee HS, Ryu BH (2004) Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. produced Aminobutyric acid (GABA) from traditional salt fermented anchovy. Korean J Food Nutr, 17, 72-79
  26. Jung YS (1963) Microbiological studies of soysauce: identification and isolation of bacteria from traditional soysauce. Korean J Microbiol, 1, 30-35
  27. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S (1999) Probiotics; mechanisms and established effects. Int Dairy J, 9, 43-52
  28. Kang HK, Liu WL, Lee HH, Yin J, Kim IC (2013) Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in different kimchi. J Korean Soc Food Sci Nutr, 89-95
  29. Kaur IP, Chopra K, Saini A (2002) Probiotics; potential pharmaceutical applications. Eur J Pharm Sci, 15, 1-9
  30. Lee SH, No MJ (1997) Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid

bacteria isolated from Kimchi. Korean J Appl Microbiol Biotechnol, 25, 617-622

31. Lee SG, Lee YJ, Kim MK, Han K, Jeong SG, Oh MH, Aera J, Kim DH, Bae IH, Ham JS (2010) A study on the yogurt manufacture suitability and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* LHB55 isolated from Kimchi. J Anim Sci Technol, 52, 141-148
32. Dedios, Pozo-Olano, J, Warran JH, Gomez GG, Cavazos MG (1978) Effect of a *Lactobacilli* preparation on traveler's diarrhea. Gastroenterol, 74, 829-839

---

(접수 2013년 7월 1일 수정 2013년 8월 21일 채택 2013년 9월 3일)