



김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* K74의 GABA 생산 및 생리적 특성

박선영 · 심혜영 · 김기성 · 임상동*

한국식품연구원

Physiological Characteristics and GABA Production of *Lactobacillus plantarum* K74 isolated from Kimchi

Sun-Young Park, Hye-Young Shim, Kee-Sung Kim and Sang-Dong Lim*

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

Abstract

Aminobutyric acid (GABA), a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system of animals, has several physiological effects including anti-hypertensive, diuretic, tranquilizing, and anti-stress properties, in humans. The purpose of this study was to investigate *Lactobacillus plantarum* K74, which was isolated from kimchi and selected as a strain with a high ability to produce GABA, to develop a new starter culture for fermented milk production. *L. plantarum* K74 produced 134.52 $\mu\text{g/mL}$ GABA in MRS broth containing 1% MSG, 212.27 $\mu\text{g/mL}$ GABA in MRS broth containing 2% MSG, and 234.63 $\mu\text{g/mL}$ GABA in MRS broth containing 3% MSG. The optimum growth temperature of *L. plantarum* K74 was 34°C, reaching a pH of 4.4 after 18 hours of growth. *L. plantarum* K74 was most sensitive to novobiocin out of 16 different antibiotics tested, and was most resistant to kanamycin and polymyxin B. *L. plantarum* K74 did not produce β -glucuronidase, a carcinogenic enzyme, and was comparatively tolerant to bile juice and low pH. Furthermore, it displayed resistance to *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* at rates of 54.9%, 46.3%, and 0.7%, respectively.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, physiological characteristics, GABA, functional product

서 론

김치는 우리나라의 대표적인 전통 발효식품으로 비타민, 카로틴, 아세틸콜린, dextran, acetate, 식이섬유 등이 풍부하여 항산화, 항균, 면역증강, 간 기능 개선, 항 돌연변이 및 항암작용, 항 콜레스테롤작용 등의 다양한 효과가 있는 것으로 보고되었다(Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2009). 젖산균은 특히 김치의 발효과정 중에 생성되어 김치의 맛을 부여함과 동시에 김치에 위와 같은 기능성을 부여한다. 김치의 발효과정 중 생성되는 젖산균 중 *L. sakei*,

L. brevis, *L. plantarum*, *L. buchneri*와 같은 *Lactobacillus* 종은 김치 발효의 마지막 단계에서 우세하게 존재하는 미생물종으로 김치의 신맛을 낸다(Cho *et al.*, 2011). 이러한 김치 젖산균은 dextransurase, alcohol/acetalddehyde dehydrogenase 등의 유익한 효소를 생산하며, 글루탐산탈탄산효소(GAD)는 글루탐산의 탈탄산반응을 촉매하여 GABA (Gamma-Amino Butyric Acid)를 생산한다(Higuchi *et al.*, 1997; Kim and Kim, 2012).

GABA는 미생물에서 동식물에 이르기까지 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종(Ueno, 2000)으로, 동물의 경우 뇌, 신장, 심장, 폐 등에서 존재하는 주된 억제성 중추신경계 신경전달물질이며, 식물의 경우에는 발아현미를 비롯한 녹차, 발아곡류, 배추 뿌리 등에 많이 존재하고

* Corresponding author: Sang-Dong Lim, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea. Tel: +82-31-780-9082, Fax: +82-31-780-9160, E-mail: limsd@kfri.re.kr

마무리 하였다. 서열 분석은 PCR product를 solgent PCR purification kit(SolGent, Korea)로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer(Applied Biosystems, USA)로 자동 분석하였다.

4. 젖산균의 생장

L. plantarum K74 균주의 생장은 생균수, pH를 측정하여 시험하였다. 생균수는 10% MRS broth 150 mL에 젖산균을 50 µL(9.6×10⁵ CFU/mL)를 접종한 후 34, 37, 40°C에서 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone 용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 배양하여 계수하였고, 온도 및 시간별로 pH 변화를 측정하였다. 이때 pH는 pH meter(Mettler model 345, England)로 측정하였다.

5. 항생제 내성 시험

항생제 내성 시험은 MRS 액체배지에 L. plantarum K74 균주를 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 0.1% peptone 용액에 적정농도로 희석하였다. 각 항생제가 각 농도별로 포함된 tryptic soy 액체배지에 10⁵~10⁶ CFU/mL 수준으로 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 생장 여부를 결정하였다. 항생제 내성 측정에는 2배 희석방법을 사용하였으며, 억제된 가장 낮은 농도를 MIC(Minimal inhibitory concentration) 값으로 결정하였다. 항생제는 Sigma Chemical Co.(USA)로 부터 구매하여 사용하였다. 항생제는 Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin, Penicillin-G, Methicillin, Oxacillin, Ampicillin, Bacitracin, Rifampicin, Novobiocin, Lincomycin, Polymyxin B, Chloramphenicol 및 Vancomycin을 시험에 사용하였다.

6. 효소활성 시험

MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 동안 배양한 L. plantarum K74 균주를 생리식염수로 희석하여 10⁵~10⁶ CFU/mL 수준의 시료를 조제한 후, API ZYM kit(API bioMerieux, Lyon, France)를 이용하여 37°C에서 5시간 배양한 다음 효소반응시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0~5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의 alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, β-glucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, α-mannosidase, β-fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

7. 내담즙성 실험

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 따라 MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 배양된 L. plantarum K74 균주를 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 배지와 대조구로서 oxgall을 첨가하지 않은 배지에 각각 1% 접종하였다. 37°C의 incubator에서 7시간까지 혐기배양하면서 시간별로 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 혐기 배양하여 계수하였다.

8. pH 내성

Clark 등(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 2, 3, 4 용액과 대조구로서 pH 6.4 용액을 제조하였고, 제조된 pH 용액 10 mL에 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에서 37°C, 24시간 배양된 L. plantarum K74 균주(약 10⁹ CFU/mL)를 1 mL씩 섞은 후 37°C에서 혐기 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 혐기 배양한 다음 계수하였다.

9. 항균력 실험

Gilliland와 Speck(1977)의 방법에 따라 항균력 측정에 사용한 지시균인 Escherichia coli, Salmonella typhimurium 및 Staphylococcus aureus는 한국식품연구원으로 부터 분양받았으며, 지시균의 증식배지로서 Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus는 nutriunt 액체배지에서 호기적으로 37°C, 24시간 배양하였다. 혼합배양 및 대조군에 사용된 배지는 MRS 액체배지로서 젖산균과 지시균을 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 선택배지로서 Escherichia coli는 EMB agar, Salmonella typhimurium은 Bismuth sulfite agar, Staphylococcus aureus는 Baird parker agar를 사용하여 37°C에서 6시간 배양하였다. 젖산균에 의한 지시균의 억제율은 다음의 식으로 구하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{대조군의 균수 CFU/mL} - \text{혼합배양 후의 균수 CFU/mL}}{\text{대조군의 균수 CFU/mL}}$$

10. 통계분석

결과는 평균±표준편차(SD)로 나타내고, 통계분석은 Statistical Package for Social Sciences(SPSS, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)로 실시하였다. 유의차는 one-way ANOVA로 통계처리하였고, Duncan's multiple range tests를 사용하여 유의성 5% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 젖산균 분리

가정 및 국내산 김치제품 48종이 수집되었다. Modified MRS 배지를 사용하여 노란색 집락을 형성하는 273개의 단일 균락을 분리하였고, 잠정적으로 젖산균이라 추정하였다.

2. GABA 생산균주 선발

분리된 젖산균을 대상으로 monosodium glutamate 2%가 첨가된 MRS broth에 37°C에서 18시간 배양한 후 GABA 함량이 50 µg/mL 이상 생산하는 균주가 75 균주, 90 µg/mL 이상 생산하는 균주가 5 균주 선발되었고, MSG 1%, 2% 및 3% 함유된 MRS 배지에 각각 배양한 결과는 Table 2와 같다. K74 균주는 MSG 1%가 첨가된 MRS broth에서 GABA 함량이 134.52 µg/mL이었고, MSG 2%와 3%가 첨가된 MRS broth에서 GABA 함량이 각각 212.27 µg/mL과 234.63 µg/mL를 나타내어 다른 네 균주에 비해 GABA 함량이 가장 높았다. 또한, Seok 등(2008)에 따르면 김치에서 분리한 *Lactobacillus* sp. OPK2-59를 스타터로 사용하고, MSG를 첨가한 김치의 GABA 함량이 180 mg/kg인 것과 Tung 등(2011)이 김치에서 분리한 *L. plantarum* NTU 102를 0.6% MSG를 첨가한 8%의 skim milk 배지에서 24시간 발효시킨 결과, GABA 함량이 33 µg/mL인 것과 비교하였을 때 K74 균주는 우수한 GABA 생성능을 보였다.

3. 선발된 젖산균의 동정 및 DNA Sequence

선발된 K74의 genus와 species를 결정하기 위하여 생리적, 생화학적 시험을 하였다. 선발된 K74는 Gram 양성을 나타내었고, 현미경으로 관찰 시 rod 형태의 hetero균이며, 산소 유무와 상관없이 잘 성장하였고, catalase와 운동성은 음성으로 나타났다. 45°C에서 성장하는 반면, 15°C에서는 성장하지 않았으며, glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니아를 생성하지 않아 genus *Lactobacillus*에 속하였다. Species를 정하기 위하여 API 50CHL kit(BioMereux, France)

를 이용하여 49종의 당 발효 시험을 실시한 결과(Table 3), K74는 lactose 등 19종으로부터 산을 생성하였다. 그 결과를 ATB identification system에 입력한 결과, *Lactobacillus plantarum*으로 판명되었으며, 16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열 분석하였다. 분석된 염기서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과, *L. plantarum*(I.D. 99%)으로 동정되었고, 계통수를 Fig. 2에 나타내었으며, *Lactobacillus plantarum* K74로 명명하였다.

4. *L. plantarum* K74의 생장

Fig. 3에서 보는 바와 같이 *L. plantarum* K74의 최적 생장온도를 알기 위하여 MRS broth 150 mL에 젖산균 배양액을 10 µL 접종한 후 34°C, 37°C, 40°C별로 3시간 간격으로 24시간까지 배양시험한 결과, *Lactobacillus plantarum* K74는 34°C와 37°C에서 거의 차이가 없었으나, 34°C가 약간 빠른 생장률을 보였다. Fig. 4는 24시간까지의 pH 변화를 나타낸 것으로 34°C 및 37°C에 비해 40°C가 가장 완만한 산 생성을 보였다. pH 역시 34°C와 37°C 간에 차이가 거의 없었으며, pH 4.4에 도달하기까지 18시간이 소요되었다. You 등(2005)에 따르면 Kefir로부터 분리한 *L. rhamnosus*가 최대 정산기에 도달하는데 24시간 소요되고, 24시간에서의 pH가 4.6인 것과 비교하였을 때 *L. plantarum* K74는 빠른 생장을 보였다.

5. *L. plantarum* K74의 항생제 내성

치료 목적으로 섭취된 항생제나 식품에 존재하는 항생물질에 의해서 probiotics 균주가 사멸될 경우에 생체 내에서의 가능성이 낮아지게 되는데, 이러한 측면에서 항생제에 대한 내성은 매우 중요한 요소로 인식되고 있는 실정이다 (Charteris et al., 2001). 따라서 시중에서 이용되고 있는 총 16가지의 항생제에 대해 *L. plantarum* K74 균주가 내성이 있는지를 Table 4에 나타내었다. Kanamycin에 대한 MIC

Table 2. pH and GABA content produced after incubation at 37°C for 18 hr in the MRS broth added monosodium glutamate and 1% lactic acid bacteria

Strains	1% MSG		2% MSG		3% MSG	
	GABA(µg/mL)	pH	GABA(µg/mL)	pH	GABA(µg/mL)	pH
K13	86.70±12.41 ^b	4.03	117.56± 8.48 ^{abc}	4.18	187.71± 4.69 ^b	4.40
K61	64.13± 7.16 ^c	4.07	107.76±12.66 ^c	4.18	150.16±16.25 ^c	4.42
K67	82.90± 2.70 ^b	4.05	128.99±7.48 ^{bc}	4.43	154.86± 4.69 ^c	4.47
K71	89.16± 4.69 ^b	4.01	109.40±2.82 ^{bc}	4.14	186.14± 2.70 ^b	4.44
K74	134.52±10.83 ^a	4.13	212.27±7.48 ^a	4.30	234.63±24.38 ^a	4.43

All values are mean±standard deviation of three replicates.

^{a-c} Means values with different superscript within same proportion of MSG are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3. Physiological characteristics of *Lactobacillus plantarum* K74

Gram reaction			+
Cell type			Rod
Spore forming			-
Motility			-
Aerobic growth			+
Anaerobic growth			+
Catalase reaction			-
Growth at 15℃			-
Growth at 45℃			+
Gas forming from glucose			-
Ammonia production from alginin			-
Acid production from			
Glycerol	-	Salicin	+
Erythritol	-	D-Celiobiose	+
D-Arabinose	-	D-Maltose	+
L-Arabinose	-	D-Lactose	+
D-Ribose	-	D-Melibiose	+
D-Xylose	+	D-Saccharose	-
L-Xylose	-	D-Trehalose	+
D-Adonitol	-	Inulin	+
Methyl-β-D-Xylopyranoside	-	D-Melezitose	-
D-Galactose	-	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon(starch)	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	+	Gentiobiose	-
L-Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
D-Mannitol	-	D-Fucose	-
D-Sorbitol	+	L-Fucose	-
Methyl-α-D-Mannopyranoside	+	D-Arabitol	-
Methyl-α-D-Glucopyranoside	-	L-Arabitol	-
N-AcetylGlucosamine	-	Potassium Gluconate	-
Amygdalin	+	Potassium 2-KetoGluconate	-
Arbutin	+	Potassium 5-KetoGluconate	-
Esculin	+		

농도는 3,200 µg/mL로서 가장 내성이 높았고, Polymyxin B, Streptomycin 순이었다. 반면 Novobiocin에 대한 항생제 내성의 MIC 농도는 7.5 µg/mL로서 가장 감수성이 높았고, Bacitracin, Penicillin-G, Methicillin 등도 감수성이 높은 것으로 나타났다. Moon 등(2006)에 따르면 장내 상주 균이며, pro-

biotics로 활용되고 있는 93개의 *Bifidobacterium*과 유산균으로부터 분리한 10개의 균주에 대한 항생제 내성분포를 분석한 결과, 대부분의 *Bifidobacterium*은 chloramphenicol, rifampicin에 대해서는 감수성을 가지고 있었으며, aminoglycoside계 항생제와 vancomycin에 내성을 가진다는 것과 약간 차이가 있었다.

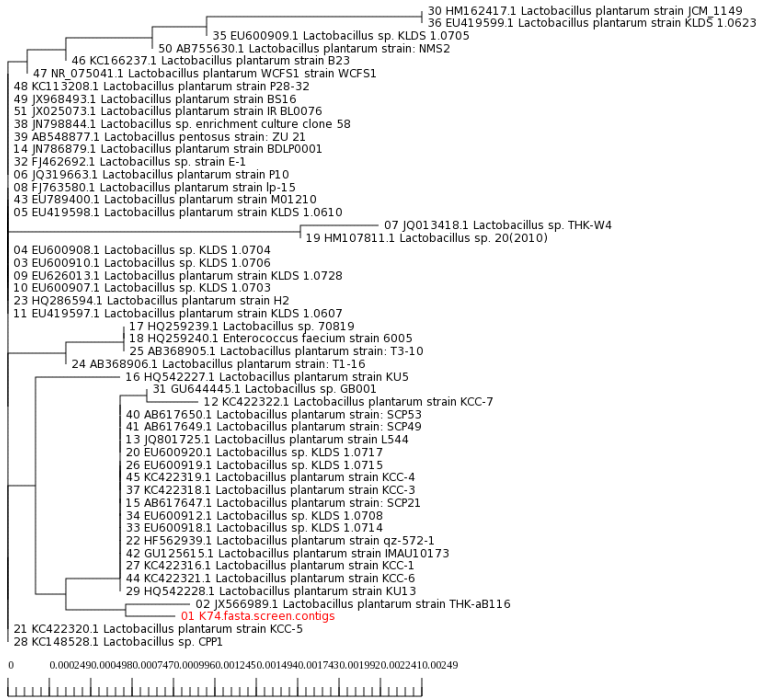


Fig. 2. Phylogenetic tree of *Lactobacillus plantarum* K74.

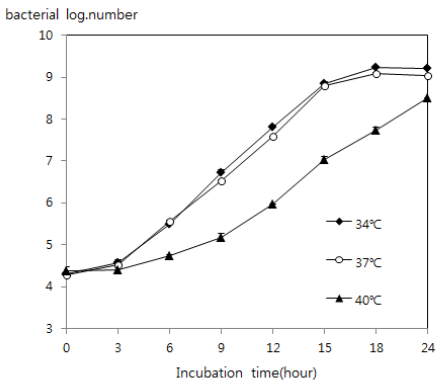


Fig. 3. Growth of *Lactobacillus plantarum* K74 in MRS broth at various temperature.

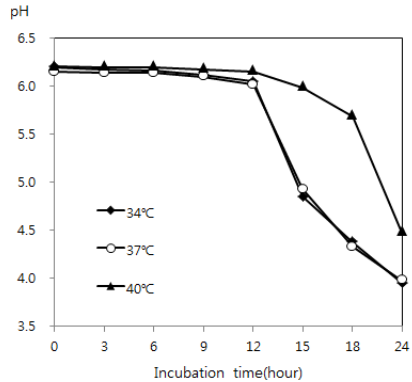


Fig. 4. pH changes of MRS broth during the growth of *Lactobacillus plantarum* K74 in MRS broth at various temperature.

6. *L. plantarum* K74의 효소활성

L. plantarum K74의 효소활성 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. Leucine arylamidase와 Cystine arylamidase는 2를 나타내 효소활성이 다른 효소들에 비해 높게 나타났으나, 전반적으로 효소활성이 높지 않은 것으로 나타났다. 특히, 유당을 glucose와 galactose로 분해시키는 유당분해효소인 β -galactosidase가 1을 나타내었다. 또한 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 0으로 나타나, 안정된 젓산균임을 알 수가 있었다. Jeong 등(2001)의 연구에서도 *L. plantarum* MY4의 효소활성이 β -galactosidase는 약하게 나타나고, β -glucuronidase에 대해서는 0으로 안정성을 보인 결과와 유사하였다.

7. *L. plantarum* K74의 담즙 내성

담즙산은 십이지장에서 분비되는 물질로 세균의 성장을

억제하는 기능을 가지고 있기 때문에 probiotics로의 기능을 하기 위해서는 담즙에 대한 내성을 지니고 있어야 한다 (Gilliand and Speck, 1977). *L. plantarum* K74의 내성 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 7시간 동안 배양 후 평균수가 0.3% oxgall을 첨가하지 않았을 때는 4.4×10^8 CFU/mL, 0.3% oxgall을 첨가하였을 때는 1.3×10^8 CFU/mL로 약간 억제 받기는 하였으나, 담즙 내성이 있는 것으로 나타났다. 이 결과는 Cho 등(2007)에 따르면 김치로부터 분리한 *L. plantarum* JK-01 균주가 oxgall이 첨가된 MRS 배지에서 보인 담즙 내성의 결과와 유사하며, *L. plantarum* K74은 담즙 내성이 우수한 것으로 확인되었다.

8. *L. plantarum* K74의 pH 내성

위액의 pH는 pH 0.9이지만 음식을 섭취하였을 경우 위의 pH는 pH 3까지 올라간다(Erkkila and Petaja, 2000). 그

Table 4. Antibiotics susceptibility of *Lactobacillus plantarum* K74

Antimicrobial agents	Strains
	<i>L. plantarum</i> K74
Minimalinhibitoryconcentrations(μ g/mL)	
Aminoglycosides	
Amikacin	160 \pm 0
Gentamycin	160 \pm 0
Kanamycin	3,200 \pm 0
Neomycin*	200 \pm 0
Streptomycin	1,600 \pm 0
β -Lactams	
Penicillin-G*	40 \pm 0
Methicillin	40 \pm 0
Oxacillin	240 \pm 0
Ampicillin	320 \pm 0
Gram-positive spectrum	
Bacitracin*	30 \pm 0
Rifampicin	120 \pm 0
Novobiocin	7.5 \pm 0
Lincomycin*	800 \pm 0
Gram-negative spectrum	
Polymyxin B*	2,400 \pm 0
Broad spectrum	
Chloramphenicol	320 \pm 0
Vancomycin	400 \pm 0

*units/mL.

All values are mean \pm standard deviation of three replicates.

Table 5. Enzyme patterns of *Lactobacillus plantarum* K74

	Strains
	<i>L. plantarum</i> K74
Alkaline phosphatase	0
Esterase(C4)	0
Esterase lipase(C8)	0
Lipase(C14)	0
Leucine arylamidase	2
Valine arylamidase	1
Cystine arylamidase	2
Trypsin	0
α -Chymotrypsin	1
Acid phosphatase	1
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	1
α -Galactosidase	0
β -Galactosidase	1
β -Glucuronidase	0
α -Glucosidase	1
β -Glucosidase	1
N-Acetyl- β -glucosaminidase	1
α -Mannosidase	0
α -Fucosidase	0

*: A value ranging from 0 to 2 is assigned to the standard color, Zero represents a negative ; 5 represent a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength ; 1 corresponds to the liberation of 5 nanomoles, 2 to 10 nanomoles, 3 to 20 nanomoles, 4 to 30 nanomoles and 5 to 40 nanomoles or more

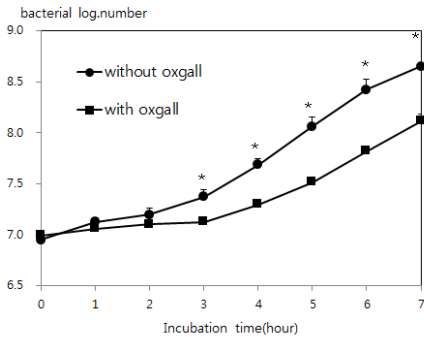


Fig. 5. Growth of *Lactobacillus plantarum* K74 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with/without 0.3% oxgall. * $p < 0.05$ between with oxgall and without oxgall (t -test).

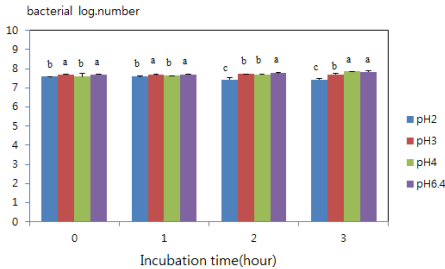


Fig. 6. Survival of *Lactobacillus plantarum* K74 after three hours in HCl solution (pH 2.0, 3.0, 4.0 and 6.4). ^{a-c} Means values with different superscript within same time are significantly different ($p < 0.05$)

렇기 때문에 probiotics로서 충분한 기능을 발휘하기 위해서는 적어도 pH 3 이하의 낮은 pH 조건에서도 생존하여 위장관을 통과하고, 소장 내로 도달하여야 한다(Booth, 1985; McDonald et al., 1990). 산에 대한 *L. plantarum* K74의 내

성 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 대조구인 pH 6.4에서의 균수와 비교한 결과, *L. plantarum* K74 균주는 pH 2에서 0시간에는 생존율이 77%이던 것이 3시간 이후에는 38.5%로 감소하였고, pH 3에서는 0시간에 100%이던 생존율이 3시간 이후에 72.8%로 감소하였으며, pH 4에서는 생존율 감소를 보이지 않았다. You 등(2005)에 따르면 Kefir에서 분리한 *Lactobacillus rhamnosus*는 pH 2에서 35%로 감소한 결과와 비교해 보았을 때 *L. plantarum* K74 균주는 내산성 실험에서 우수한 결과를 보였다.

9. *L. plantarum* K74의 항균력

L. plantarum K74가 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 6과 같다. *L. plantarum* K74는 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*에 대해 각각 54.9%와 46.3%로서 억제효과가 큰 반면, *Staphylococcus aureus*에 대해 0.7%로서 억제효과가 거의 없는 것으로 나타났다. 배양 후 pH의 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH 6.65~6.68이며, 혼합배양액은 pH 4.93~5.04이었다. Daeschel(1989)과 Havinar 등(1992)은 pH 강하, 산화 환원 전위의 감소, 유해균과의 경쟁적 영양성분 소비, 과산화수소의 생성, 젖산균이 생산하는 유기산과 박테리오신의 살균 작용과 강한 항균활성물질 분비에 의해 젖산균의 항균효과가 나타난다고 보고하였다. 본 실험에서 *L. plantarum* K74에 의한 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*의 생육 억제는 이러한 억제 요소들의 작용에 기인하는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 김치로부터 GABA 생성능이 우수한 젖산균을 분리 및 동정하고, 이 균주의 생리적 특성을 규명하여 상업적으로의 이용가능성을 검토하고자 실시하였다. 이를 위해 MSG 2%가 첨가된 MRS broth에 37°C에서 18시간 배양한 후 GABA 함량이 50 µg/mL 이상 생산하는 75개의 균주를 1차로 선별하였으며, 90 µg/mL 이상 생산하는 5 균주를 2

Table 6. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus plantarum* K74 in MRS broth

Pathogens	Pathogens ^a		K74 ^a		Inhibition(%)
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	5.8±0.4×10 ⁴	6.65	2.7±0.3×10 ⁴	5.04	54.9±6.1
<i>Salmonella typhimurium</i>	4.8±0.7×10 ⁵	6.67	2.6±0.3×10 ⁵	4.95	46.3±2.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.2±0.5×10 ⁶	6.68	2.1±0.3×10 ⁶	4.93	0.7±9.7

*Initial count of *Lactobacillus plantarum* K74 : 6.5±0.5×10⁵ CFU/mL

^a Determined after 6 h of incubation at 37°C

All values are mean±standard deviation of three replicates.

차로 선별하였고, 선발된 5 균주를 MSG 1%, 2% 및 3% 함유된 MRS 배지에 각각 배양한 결과, K74 균주가 최종 선 발되었다. K74 균주는 MSG 1%가 첨가된 MRS broth에서 GABA 함량이 134.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, MSG 2%와 3%가 첨가 된 MRS broth에서 GABA 함량이 각각 212.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 234.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, 동정 결과 L. plantarum K74라고 명명되 었다. L. plantarum K74의 최적 성장 온도는 34°C이었으며, pH 4.4에 도달하기까지 18시간이 소요되었다. L. plantarum K74는 또한 담즙산과 산성의 pH에서 모두 우수한 생존력 을 나타냈으며, 발암효소인 β -glucuronidase를 생성하지 않 고 유당분해효소인 β -galactosidase를 약간 생성하는 것으 로 나타났다. 항생제 내성 실험 결과 Kanamycin, Polymyxin B, Streptomycin에 내성을 Novobiocin, Bacitracin, Penicillin-G, Methicillin에 감수성을 나타냈으며, Escherichia coli와 Salmonella typhimurium에 각각 54.9%와 46.3%의 억제 효과를 지니고 있고, Staphylococcus aureus에 대해서는 거의 억제 효과가 없는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 논문은 한국식품연구원 기본연구사업(과제번호: E0131301) 의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

참고문헌

- Bae, M. O., Kim, H. J., Cha, Y. S., Lee, M. K. and Oh, S. H. 2009. Effects of Kimchi lactic acid bacteria *Lactobacillus* sp. OPK2-59 with high GABA producing capacity on liver function improvement. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38:1499-1505.
- Booth, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. Microbiol. Rev. 49:359-378.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. 2001. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. J. Food Prot. 64:2007-2014.
- Cho, J. K., Li, S. J., Yoon, Y. C., Hwang, S. G., Heo, K. C. and Choe, I. S. 2007. The identification and physiological properties of *Lactobacillus plantarum* JK-01 isolated from Kimchi. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 27:363-370.
- Cho, S. Y., Park, M. J., Kim, K. M., Ryu, J. H. and Park, H. J. 2011. Production of high γ -aminobutyric acid (GABA) sour Kimchi using lactic acid bacteria isolated from Mukeunjee Kimchi. Food Sci. Biotechnol. 20:403-408.
- Clark, P. A., Cotton, L. N. and Martin, J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-tolerance to simulated pH of human stomachs. Cul. Dairy Prod. J. 28:11-14.
- Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as preservatives. J. Food Technol. 43: 164-167.
- Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Sci. 55:279-300.
- Gilliand, S. E. and Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures, J. Food Prot. 40:820-823.
- Gilliand, S. E. and Speck, M. L. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. 33:15-18.
- Gilliland, S. E. and Walker, D. K. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. J. Dairy Sci. 73:905-911.
- Hammes, W. P., Weiss, N. and Holzapfel, W. 1992. The genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. pages 1563-1578 in The Prokaryotes. 2nd ed, Springer-Verlag, New York. USA.
- Havinaar, R., Brink, B. T. and Veid, J. H. J. I. 1992. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R. (ed), Probiotics. Chapman & Hall, London. pp. 209-224.
- Higuchi, T., Hayashi, H. and Abe, K. 1997. Exchange of glutamate and γ -aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. J. Bacteriol. 179:3362-3364.
- Jacobs, C., Jaeken, J. and Cibson, K. M. 1993. Inherited disorders of GABA metabolism. J. Inher. Metab. Dis. 16:704-715.
- Jeong, H. Y., Jeong, M. Y., Kim, G. T. and Baek, H. D. 2001. Characterization of a potential probiotic strain *Lactobacillus plantarum* MY4. Annual Meeting of Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, pp. 882-885, Nov. 7.
- Kim, J. H., Kwon, M. J., Lee, S. Y., Ryu, J. D., Moon, G. S., Cheigh, H. S. and Song, Y. O. 2002. The effect of Kimchi intake on production of free radicals and anti-oxidative enzyme activities in the liver of sam. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31:109-116.

18. Kim, M. J. and Kim, K. S. 2012. Isolation and identification of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Kimchi. *J. Korean Soc. Appl. Chem.* 55:777-785.
19. Kim, Y. T., Kim, B. K. and Park, K. Y. 2007. Antimutagenic and anticancer effects of leaf mustard and leaf mustard Kimchi. *Journal of Food Science and Nutrition* 12:84-88.
20. Lim, S. D., Kim, K. S. and Do, J. R. 2011. Physiological characteristics and production of vitamin K₂ by *Lactobacillus fermentum* LC272 isolated from raw milk. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 31:513-520.
21. McDonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2124-2128.
22. Moon, B. Y., Lee, S. K. and Park, J. H. 2006. Antibiotic resistant characteristics of *Bifidobacterium* from Korean intestine origin and commercial yoghurts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38:313-316.
23. Oh, S. H. 2007. Effect and applications of germinated brown rice with enhanced levels of GABA. *Food Sci. Indus.* 40:41-46.
24. Oh, S. H. and Oh, C. H. 2003. Brown rice extract with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci. Biotechnol.* 12:248-252.
25. Oh, S. H., Soh, J. R. and Cha, Y. S. 2003. Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *J. Med. Food* 6:115-121.
26. Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R. and Takahashi, T. 2000. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *Food Sci. Technol. Res.* 47:596-603.
27. Seok, J. H., Park, K. B., Kim, Y. H., Bae, M. O. Lee, M. K. and Oh, S. H. 2008. Production and characterization of kimchi with enhanced levels of γ -aminobutyric acid. *Food Sci. Biotechnol.* 17:940-946.
28. Tung, Y. T., Lee, B. H., Liu, C. F. and Pan, T. M. 2011. Optimization of culture condition for ACEI and GABA production by lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 76:M585-M591.
29. Ueno, H. 2000. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 10:67-79.
30. Wong, C. G. T., Bottiglieri, T. and Snead, O. C. 2003. GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.* 54:S3-S12.
31. Yoo, S. J., Cho, J. K., Hwang, S. G. and Heo, K. C. 2005. Probiotic characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from kefir. *Korean J. Food. Sci. Ani. Resour.* 25:357-364.
32. Zhang, G. and Bown, A. W. 1997. The rapid determination of gamma aminobutyric acid. *Phytochem.* 44:1007-1009.

(Received: September 9, 2013 / Accepted: October 30, 2013)