

시판 생막걸리에서 분리한 유산균의 프로바이오틱스 기능성 연구

정상은 · 김세현*

고려대학교 생명과학대학 식품공학부

Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Commercial Raw *Makgeolli*

Sang-Eun Jung and Sae-Hun Kim*

Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

Abstract The purpose of this study was to characterize the lactic acid bacteria found in *makgeolli* in terms of bacterial identity and gastric compatibility. Lactic acid bacteria were isolated from commercial raw *makgeolli* and separated into six strains that are resistant to gastric acidity and bile acid. These strains were identified by analysis of their 16S rDNA, as *Lactobacillus plantarum* BSM-2 and EHI-1, *Lactobacillus casei* GSM-3 and EHI-2, *Lactobacillus brevis* BSM-3 and *Pediococcus pentosaceus* TJH-1. All strains exhibited adhesion to intestines, showing that they were probiotic. We also found that *L. plantarum* BSM-2 had excellent resistance to bile acid as well as antioxidant activity. Taken together with its antibacterial properties and ability to lower cholesterol, our data suggest that *L. plantarum* BSM-2 was the most beneficial probiotic among the six strains.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotics, *Lactobacillus plantarum*, commercial raw *makgeolli*

서 론

막걸리는 멥쌀, 찹쌀, 보리쌀, 밀가루 등의 곡류와 발효제인 누룩으로 빻어 막 걸러내어 만든 한국의 대표적인 전통주이다(1). 발효된 술덧을 탁하게 걸러서 마시는 술로 발효에 관여한 효모나 다량의 유산균 전체를 음용하여 다른 주류보다 영양학적으로 우수하다(2). 일반적으로 시판 막걸리 700mL에 유산균이 약 7×10^{10} 이상 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며(3), 최근 막걸리의 건강에 유익한 유산균이 다량으로 존재한다는 연구(4,6)가 잇따르면서 막걸리를 통한 유산균 섭취에 관심이 높아지고 있다. 막걸리에서 유산균발효는 다양한 유기산 생성으로 막걸리 풍미를 풍부하게 하며, 발효초기에 발효액의 pH를 빠르게 낮추어 주어 잡균에 의한 오염을 방지함으로써 활발한 효모균의 증식으로 정상적인 알코올발효를 일어나게 한다. 위의 연구결과를 종합해 볼 때, 막걸리 제조의 원재료인 누룩에 분포하는 유산균(7-9)과 국내 시판 막걸리에서의 유산균 분포(4,5,10-13)는 연구되어 있지만, 막걸리 속에 함유된 유산균의 건강기능적 효과와 프로바이오틱스 특성에 관한 연구는 부족한 실정이다. 막걸리는 다양한 유산균이 살아있는 알코올음료로 막걸리 유산균의 프로바이오틱스 특성이 기대되는 바, 본 연구는 국내 시판중인 막걸리 중에서 전통누룩으로 제조한 생막걸리 내 존재하는 유산균종을 분리 동정하고 프로바이오틱스의 특성을 분석하여 막걸리에 존재하

는 유산균의 우수성을 과학적으로 입증하고자 한다.

재료 및 방법

유산균 분리 및 동정

국내에서 시판되고 있는 생막걸리 8종을 구입하여 유산균을 분리 동정 하였다. 전통방식으로 제조하여 판매된 시판 밀누룩으로 제조한 막걸리 6종(BSM, SSM, YNM, GSM, CMM, TJH)과 쌀누룩(EHI), 입국과 개량누룩(SJM)으로 만든 막걸리 각각 1종을 구입하였으며, 각각의 시료는 Table 1과 같다.

생막걸리의 유산균은 MRS배지(proteose peptone No. 3 1%, beef extract 1%, yeast extract 0.5%, dextrose 2%, potassium dihydrogen phosphate 0.2%, Tween 80 0.1%, ammonium citrate 0.2%, sodium acetate 3H₂O 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, MnSO₄·4H₂O 0.005%, Bacto-agar, 1.5%)에 도말하여, 37°C에서 48시간 배양하여 분리한 후 내산성, 내담즙성에서 활성이 가장 뛰어난 6개 균주를 16S rDNA sequencing 방법으로 동정하였다. MRS 액체 배지에서 분리균주를 배양하여 G-spin™ Genomic DNA Extraction kit (No. 17121, iNtRON Inc., Seongnam, Germany)로 genomic DNA를 추출하였고, 16S rDNA를 Taq DNA polymerase (GENEMED Inc., Seoul, Korea) primer (forward, 27F, AGAGTTTGATCTGGCTCAG, reverse, 1525r, AGGAGGTGATC-CAGCC)로 증폭시켰다. PCR (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems, Woburn, MA, USA)은 95°C에서 5분간 초기변성 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 30cycle을 반복하였으며, 72°C에서 10분간 반응 후 종료하였다. PCR product는 band 확인 후 Macrogen (Seoul, Korea)에 16S rDNA sequence 분석을 의뢰하였고, 분석된 염기서열은 NCBI의 data base와 비교하여 분리된 유산균을 동정하였다.

*Corresponding author: Sae-Hun Kim, Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea
Tel: 82-2-3290-3055
Fax: 82-2-953-0737
E-mail: saehkim@korea.ac.kr
Received July 10, 2014; revised November 3, 2014;
accepted November 26, 2014

Table 1. List of the commercial raw makgeolli used in this study

Samples	Alcohol (%)	Use of nuruk	Main materials	Food additives
BSM	5.0	○	Water, non glutinous rice (Korea), nuruk	Sugars, aspartame, phenylalanine
SJM	6.0	×	Rice (Korea) 90%	Maltooligosaccharides 10%, aspartame, phenylalanine, synthetic sweetener
SSM	6.0	○	Water, non glutinous rice (Korea) 17.5%	
YNM	7.0	○	non glutinous rice (Korea) 100%	
GSM	8.0	○	Non glutinous rice (Korea), malted wheat (Korea), water	Aspartame, phenylalanine, synthetic sweetener
CMM	10.0	○	Glutinous rice (paju)100% nuruk 100%	Paju Gaeseong Ginseng (6 years) 5%
TJH	12.0	○	Glutinous rice (Korea) 88.89%, non glutinous rice (Korea) 11.11%	
EHJ	12.5	○	Non glutinous rice, (Baekseolgi, Korea) 100%, rice nuruk	

내산성 및 내담즙성 측정

시판 생막걸리에서 분리한 유산균의 위산에 대한 저항성을 확인하기 위해 pH 2.5로 조정된 MRS broth에 초기 균수를 10⁶ CFU/mL수준을 1% 접종하여 37°C에서 3시간 동안 배양하여 생균수(CFU/mL)를 측정하였다. 생존수가 초기 균수에 비하여 성장한 경우를 내산능력을 가진 것으로 평가하였다. 내담즙성은 Oxgall (Difco, Sparks, MD, USA) 0.3% (w/v)를 첨가하여 제조한 담즙염 배지에 유산균 1%를 접종하고 37°C에서 24시간 동안 배양하여 내산성과 동일한 방법으로 균의 생존율을 조사하였다.

장 부착능 측정

장 부착능은 HT-29 cell (Human intestinal epithelial cells)에 유산균의 부착능력을 확인하였다. HT-29 cell에 RPMI 1640배지(10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin)를 사용하고, 12-well (plate)에 배양한 HT-29 cell에 유산균 1 mL를 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양하였다. 배양 후, well 내에 있는 cell은 0.1 M PBS를 이용하여 6회 세척을 실시하여 부착되지 않은 유산균 제거 후 탈착을 유도하는 Trypsin-EDTA (Hyclone, Logan, UT, USA) 200 µL를 분주하였다. 탈착된 HT-29 cell을 적절히 희석하여 MRS agar plate에 접종하여 37°C에서 18시간 배양 후 생균을 counting 하였고 지시균으로 *L. rhamnosus* GG를 사용하였으며 실험은 3회 반복하였다.

장 부착율(%)=(viable cell count÷initial cell count)×100

DPPH radical을 이용한 항산화능력 측정

시판 생막걸리에서 분리한 유산균의 항산화 능력은 Lin과 Chang (14)의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.2 mM 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)를 methanol에 오랜 시간 가시광선을 차단한 상태에서 용해시켜 DPPH reagent를 제조하고, 3차 계대 배양한 활성이 높은 실험 균주 배양액 800 µL를 DPPH 1 mL에 혼합한 후, 37°C에서 어두운 곳에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 반응물을 원심분리하여 상층액 200 µL을 취해 96 well (plate)에 넣고 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를

이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구(control group)로 sample과 동량의 3차 증류수를, positive control은 0.2 mM ascorbic acid를 사용하였고, scavenging activity (%)는 다음의 공식에 의하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(\frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \right) \times 100$$

항균활성 측정

시판 생막걸리에서 분리한 유산균의 항균활성은 7종류의 indicator 균주(*Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*)를 사용하였다. *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*는 lactose broth, *Enterococcus faecalis*는 brain heart infusion broth를 사용하였으며 그 외의 균주는 tryptic soy broth를 이용하였다. 기본 MRS agar 위에 1%의 지시균주를 접종한 MRS 또는 LB 배지의 top agar layer를 형성시켜 균한 후, 균한 배지에 spot-inoculate하여 시료를 20 µL씩 총 3회 떨어뜨린 후 37°C에서 배양하여 24시간 후 clear zone 생성 여부를 확인하고, clear zone의 지름을 측정하여 항균활성을 확인하였다.

콜레스테롤 저하능 측정

Cholesterol micelle이 함유되어 있는 배지에 시판 생막걸리에서 분리한 유산균을 접종 후 배양하여 균의 성장에 따라 잔존하는 Cholesterol micelle 함량을 측정하였다. MRS-THIO 배지는 Gilliland 등(15)의 방법으로 MRS에 thioglycolic acid 0.2% (w/v), oxgall 0.3% (w/v)를 첨가하여 사용하였다. Cholesterol micelle은 cholesterol 0.0091 mg, L-α-lecithin 0.2 mL를 chloroform 1 mL에 용해하여, 질소가스로 건조시킨 후 0.4 M sucrose 10 mL를 첨가하여 15분간 초음파 처리(Dr Hielscher, GmbH, Teltow, Germany)를 6회 실시하였으며, 0.45 µm Syringe filtering하여 사용하였다. Cholesterol micelle 1 mL를 MRS-THIO 배지 9 mL에 첨가하고 3

Table 2. List of lactic acid bacteria isolated from commercial raw makgeolli

Strains	Species-identification	Identity (%)	GenBank accession No.
BSM-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> BSM-2	100	NC 004567.2
BSM-3	<i>Lactobacillus brevis</i> BSM-3	98	NC 008497.1
GSM-3	<i>Lactobacillus casei</i> GSM-3	97	NC 008526.1
TJH-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TJH-1	97	NC 008525.1
EHJ-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> EHJ-1	100	NC 004567.2
EHJ-2	<i>Lactobacillus casei</i> EHJ-2	99	NC 008526.1

차 계대배양한 실험균주 1%를 접종한 후, 37°C에서 18시간 동안 배양하여 배양액을 11,000 rpm 4°C에서 15분간 원심분리하여 상층액을 획득하였다. 상층액 내 잔존 cholesterol 정량은 Rudel과 Morris (16)가 사용한 o-phtalaldehyde 방법을 이용하여, 2 mL 상층액에 97% ethanol 3 mL과 50% (wt/v) KOH 2 mL를 첨가하고 60°C에서 10분간 가열 후 냉각하여 5 mL hexane을 첨가하여 30초간 vortexing하고 15분간 상온에 정치하였다. Cholesterol이 용해되어 있는 hexane층 상층액 4 mL를 test tube에 분주하여 질소 가스로 건조하였으며, 건조된 test tube에 100 mL의 acetic acid에 0.055 g의 o-phtalaldehyde를 첨가하여 제조한 o-phtalaldehyde 용액 4 mL를 첨가한 후 10분간 정치하고, sulfuric acid 2 mL를 첨가하여 10분 후 분광광도계(Spectrophotometer-DU650, Beckman Co., Colorado, Fort Collins, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 cholesterol standard curve를 작성하여 cholesterol을 산출하였다. Control은 균이 접종되지 않은 micelle만 있는 MRS-THIO를 이용하였다.

통계분석

통계분석은 SAS (Statistical Analysis System, Version 8.1, SAS Institute Inc.) program을 이용하였다. 전체 시료에 대한 차이의 통계적 유의성은 분산분석(ANOVA)으로 분석하였고, 각 시료간의 차이는 Duncan의 다범위 검정(Duncan's multiple range test)으로 5%범위($p < 0.05$)내에서 통계적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

시판 생막걸리의 유산균 분리 및 동정

시판 생막걸리의 유산균은 MRS agar 배지를 사용하여 분리한 후 내산성, 내담성, 장 부착능에서 활성이 가장 뛰어난 6개 균주 BSM-2, BSM-3, GSM-3, TJH-1, EHJ-1, EHJ-2를 동정하였고 그 결과는 Table 2와 같다. 본 연구에서는 시판 전통누룩을 이용하여 제조한 시판 막걸리에서 *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *P. pentosaceus* 4종의 유산균으로 확인되었다. 반면 입국을 사용하여 제조한 생막걸리의 초기 유산균수는 다른 막걸리와 유사하였으나, 내산성, 내담성에서 모두 생존하지 않아 probiotics의 특성을 지닌 유산균을 분리할 수 없었다. Jin 등(5)은 국내 시판 막걸리에서 7종류의 유산균을 분리한 결과 *L. paracasei*, *L. arizonensis*를 막걸리에 존재하는 우세한 유산균이라 하였으며, 그 외에 *L. plantarum*, *L. harbinensis*, *L. parabuchneri*, *L. brevis* 및 *L. hilgardii*는 열세하다고 보고하여 *Lactobacillus* 계통임을 확인할 수 있었다. Seo 등(4)의 연구에서도 *L. plantarum* 균주가 가장 우수하며, *L. plantarum* RW (99%), *L. plantarum* WCFS1 (98%), *L. brevis* ATCC 367 (92%) 균주가 동정되어 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. Kim 등(10)의 연구결과에 의하면 시판 막걸리를 4°C에서 저장하면서 분리한 유산균은 *Pediococcus* sp.이었으나,

20°C에 저장하면서 분리 동정한 유산균은 *L. plantarum*, *L. brevis*가 우세하였고, Kim 등(6)은 *L. crustorum*, *L. plantarum*이 우세하다고 하여 시판 생막걸리에는 *Lactobacillus*속과 *Pediococcus*속이 우점 유산균인 것을 확인할 수 있었다.

시판 생막걸리 유산균의 내산성 및 내담증성

유산균이 probiotics으로의 기능을 발휘하기 위해서는 소화관 내의 조건에서 생존해야 한다. 구강을 통해 섭취된 유산균은 위액과 각종 효소가 존재하는 위를 통과하고, 담즙이 존재하는 십이지장을 거쳐 최종 목적 부위인 장에 도달해야 기능적인 효과를 나타낼 수 있다. 그중에서도 유산균이 위에서 위산과 같은 낮은 pH에서 생존하기 위해서 위산에 대한 내산성을 나타내야 하며(17,18), 담즙성에 대한 내성을 지니는 것이 probiotics의 기본 특성이다(19). 유산균 중에서 *L. plantarum* (20), *L. casei* (19), *L. brevis* (21,22), *P. pentosaceus* (23)가 높은 내산성을 나타내는 균주라고 보고된 바 있다. 본 연구의 시판 생막걸리에서 분리한 유산균의 위내 환경에서 유산균의 생존율 결과는 Fig. 1과 같다. BSM-2, BSM-3, GSM-3, TJH-1, EHJ-1, EHJ-2의 6개 균주는 pH 2.5에서 3시간 후에도 사멸하지 않고 1.3×10^7 CFU/mL수준 이상의 생균수가 측정되어 내산성을 확인할 수 있었다. 이들 유산균의 산에 대한 각기 다른 내성은 환경과 세포질 사이에 pH를 조절하면서 낮은 pH에서도 저항력을 가진 것으로 볼 수 있다(20). BSM-2과 EHJ-1은 같은 종의 *L. plantarum* 임에도 불구하고 서로 다른 저항성을 나타냄을 알 수 있었다. 내성을 보유한 유산균의 내담증성 결과(Fig. 2), 내산성을 보유한 유산균인 BSM-2, BSM-3, GSM-3, TJH-1, EHJ-1, EHJ-2에서 10^8 CFU/mL수준 이상의 생균수가 측정되어 6균주 모두 내산성과 내담증성이 모두 우수한 균주로 probiotic로서의 역할을 할 수 있다고 판단된다. Probiotics로의 기능성을 가진 6개의 균주는 *L. plantarum* BSM-2, EHJ-1, *L. brevis* BSM-3, *L. casei* GSM-3, EHJ-2, *P. pentosaceus* TJH-1이며, 내산성이 강한 *L. plantarum*, *L. casei* 균주들이 상대적으로 담즙산 내성이 우수하여 probiotics로서 이용가능성이 높은 유산균종이라는 연구(17)와 유사한 결과를 나타내었다. 이들은 산성조건과 담즙산에 대해 저해를 거의 받지 않고 생존과 증식을 하는 것을 알 수 있었다. Klaenhammer과 Kleeman (24)의 연구에 따르면 *L. acidophilus*와 같은 젖산균의 세포 형태에 따라 담즙산에 내성의 차이가 있다고 보고된 바 있다. 시판 생막걸리에서 분리된 유산균종은 장내 환경에 적합한 균주로 probiotics의 선별조건에 부합한다고 할 수 있다.

시판 생막걸리 유산균의 HT-29 cell에 대한 장 부착능

유산균이 프로바이오틱스로의 특징을 지니려면 위와 십이지장을 통과하여 최종 목적 부위인 장에 도달하여 장내 상피세포에 정상적으로 부착되어야 그 기능을 할 수 있다(25). *L. rhamnosus* GG는 다른 유산균에 비해 장내 부착능이 뛰어난 것으로 알려져

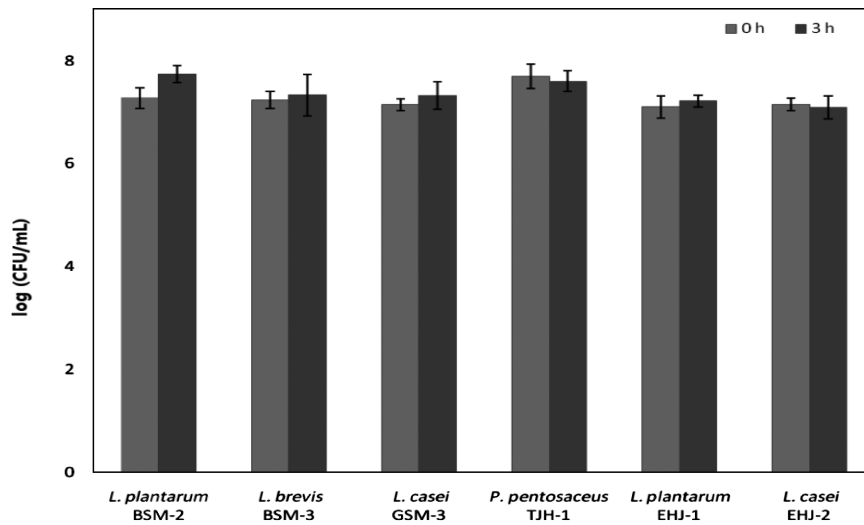


Fig. 1. Acid tolerance of selected probiotic lactic acid bacteria strains from the commercial raw *makgeolli*.

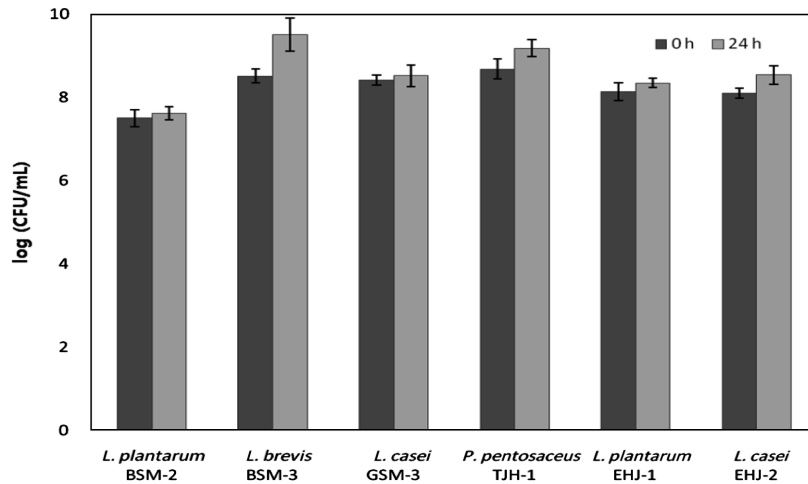


Fig. 2. Bile tolerance of selected probiotic lactic acid bacteria strains from the commercial raw *makgeolli*.

양성대조군으로 사용하였으며(26), 6개의 유산균에서 장 부착여부를 확인할 수 있었다(Fig. 3). *L. plantarum* BSM-2와 EHJ-1은 각각 4.01%와 4.62%의 장 부착능을 보였다. *L. casei* GSM-3는 11.84%, EHJ-2는 7.11%의 장 부착능을 보였다. *L. brevis* BSM-3, *P. pentosaceus* TJH-1은 1.29%, 0.4%의 장 부착능을 보여 대조군인 *L. rhamnosus* GG (2.06%)에 비해 낮은 장 부착능을 나타내었고, *L. casei* GSM-3가 가장 장 부착능이 높았다.

시판 생막걸리 유산균의 DPPH radical을 이용한 항산화능력

생막걸리에서 분리한 유산균의 항산화 능력은 DPPH radical이 감소되는 정도를 통하여 측정하였고, 그 결과는 Fig. 4와 같다. 생막걸리에서 분리한 유산균은 10.30-32.44%까지 항산화능력을 나타내며 유의적인 차이가 있었다. *L. plantarum* BSM-2는 32.44%, EHJ-1은 24.65%의 소거능을 보였으며, *L. casei* EHJ-2는 26.48%, GSM-3는 18.72%, *L. brevis* BSM-3는 15.43%, *P. pentosaceus* TJH-1은 10.60%이었다. *L. plantarum*가 *L. casei*, *L. brevis*에 비해 비교적 높은 분해력을 나타냈으며, *P. pentosaceus*가 가장 낮은 분해력을 나타냄을 확인할 수 있었다. 묵은지에서 분리한 유산균이 38.31-52.5%까지 항산화능력을 지니고 있어(27), 생막걸리의 유산균보다 다소 높은 항산화능력을 지니고 있었다.

시판 생막걸리 유산균의 항균활성

유산균의 항균활성은 유산균에 의해 생성된 유기산, 저급지방산, hydrogen peroxide, diacetyl, 박테리옌(bacteriocin), 항생물질 등을 생성하여 병원성세균과 부패세균의 생육을 억제한다고 보고된 바 있다(28). 유산균의 다양한 유기산은 배양액의 pH를 낮추게 되고, 산성조건은 미생물 배양이 어려운 조건이 된다. 또한 일부 유산균은 Bacteriocin이라는 peptide단위의 단백질을 생산하여 항균활성을 나타나게 된다(29). 시판 생막걸리 유산균의 항균활성이 유기산에 의한 것인지, bacteriocin에 의한 것인지를 알아보기 위해 유산균 배양액을 NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조정하여 실험하였으나 pH를 중성으로 조절한 유산균에서 항균활성이 나타나지 않아 bacteriocin 생성여부를 확인할 수 없었다. 배양액의 pH는 3.81-4.02 사이로 측정되었다. 시판 생막걸리 유산균의 probiotics를 지닌 6개 균주의 항균활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 시판 생막걸리 유래 유산균에서는 Gram염색 특성에 상관없이 항균활성이 나타났다. 각 균주마다 항균활성의 정도가 달랐으며, 시험균주의 종류에 따라서 저해작용 정도가 다르게 나타났다. *L. plantarum* BSM-2보다 EHJ-1의 항균활성이 더 좋았으며, *L. plantarum* BSM-2가 5개 지시균에 항균활성을 보인 반면 *L. plantarum* EHJ-1은 7개 지시균 모두에서 항균활성을 보였다. 한

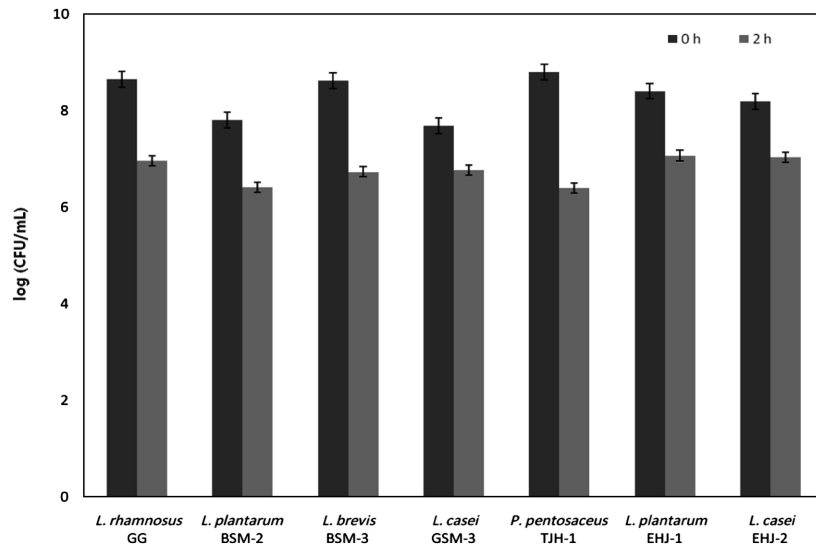


Fig. 3. Adhesion of selected probiotic lactic acid bacteria strains to human intestinal epithelial cells (HT-29) *in vitro*.

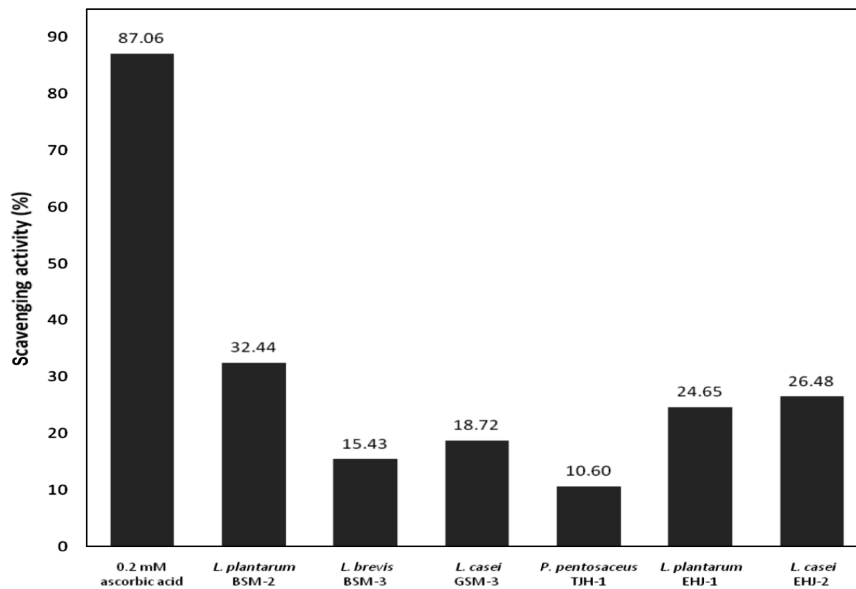


Fig. 4. DPPH radical scavenging effects of selected probiotic lactic acid bacteria strains from the commercial raw makgeolli.

국 전통발효식품인 된장, 김치, 동치미에서 분리한 *L. plantarum* KC21 균주는 항균활성 측정결과 *Staphylococcus aureus*에 대해 약 70%의 항균력이 있다고 보고되었으며(30), 김치에서 분리한 *L. plantarum* YK-9가 6가지 식중독 원인균에 항균효과가 있으며, 모두 유기산 생성에 의해 항균활성효과가 있다는 연구(31)와 유사한 결과를 나타냈다. 막걸리에서 분리한 *L. casei* HK-9의 항균활성 물질은 유기산으로 식중독 원인세균의 성장저해에 탁월한 효과를 나타냈으며, 막걸리의 유산균이 다양한 식중독균에 항균활성으로 작용한다는 연구(32)와 유사한 결과를 나타냈다. 묵은지에서 *L. plantarum*을 분리 했을때는 항균효과를 나타내지 않았고(27), Ahn 등(33)의 김치 연구에서 분리한 *L. plantarum*은 항균력을 지니고 있었지만, 시판 전통누룩으로 제조한 생막걸리에서 분리한 유산균이 훨씬 더 높은 항균력을 지님을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 다양한 식중독 원인 세균을 대상으로 시판 생막걸리에서 분리된 유산균의 항균활성을 확인한 결과, Gram양성이나 Gram음성에 관계없이 항균효과를 나타내는 것으로 확인되었

으며, 우리나라를 대표하는 전통발효주인 생막걸리의 유산균이 식중독 예방에 효과적일 것이라 판단된다.

시판 생막걸리 유산균의 콜레스테롤 저하능

Probiotics로의 기능성을 가진 6개 균주의 콜레스테롤 저하능력은 Fig. 5와 같으며 유의적인 차이를 확인할 수 있었다. *L. plantarum* BSM-2와 EHI-1에서 각각 68.82%, 56.38%로 높은 감소율을 나타내었다. *L. brevis* BSM-3는 22.36%, *L. casei* GSM-3는 20.10%, EHI-2는 15.26%를 나타냈고, *P. pentosaceus* TJH-1에서 9.44%로 가장 낮은 감소율을 나타내었다. 본 연구의 시판 생막걸리에서 분리 동정한 유산균의 경우, *L. plantarum*에서 50% 이상의 콜레스테롤에 저하능력이 있는 것으로 보인다. *L. plantarum*의 콜레스테롤 감소효과에 대해 다양한 연구들이 보고되었는데 김치에 분포하는 젖산균 중에서 *L. plantarum*이 55.91%로 콜레스테롤 저하효과가 있다고 하였고(34), *L. plantarum* PH04를 급여한 고지혈 마우스 분변(fecal)에서 유산균수가 증가하고 반면

Table 3. Antibacterial activity of lactic acid bacteria from commercial raw makgeolli

Indicator strain	Lactic acid bacteria																		
	<i>Lb. plantarum</i> BSM-2			<i>Lb. brevis</i> BSM-3			<i>Lb. casei</i> GSM-3			<i>P. pentosaceus</i> TJH-1			<i>Lb. plantarum</i> EHJ-1			<i>Lb. casei</i> EHJ-2			
	Live cell (mm)	pH (mm)	pH (mm)	Live cell (mm)	pH (mm)	pH (mm)	Live cell (mm)	pH (mm)	pH (mm)	Live cell (mm)	pH (mm)	pH (mm)	Live cell (mm)	pH (mm)	pH (mm)	Live cell (mm)	pH (mm)	pH (mm)	
	3.81 ^{cd}	7.0		3.81 ^{cd}	7.0		4.02 ^a	7.0		3.83 ^c	7.0		3.81 ^d	7.0		3.87 ^b	7.0		
Gram positive bacteria																			
<i>Listeria monocytogenes</i>	+22	-	-	-	-	-	-	-	-	+22	+15	-	+25	-	-	+22	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	+23	-	-	+20	-	-	-	-	-	+30	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+33	-	-	+35	-	-	+28	-	-	+33	+25	-	+40	+30	-	-	-	-	-
Gram negative bacteria																			
<i>Escherichia coli</i>	+22	-	-	+26	-	-	-	-	-	+28	+26	-	+25	+19	-	+25	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	+26	-	-	+17	-	-	+23	-	-	-	-	-	+25	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	+20	+16	-	+22	-	-	+26	+19	-	+24	+20	-	+30	-	-	+26	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	+30	+32	-	+25	-	-	+35	+33	-	+45	+27	-	+45	+30	-	-

^{1)abcd}Mean in a row by different superscripts are significantly different at 5% significance by Duncan's multiple range test.

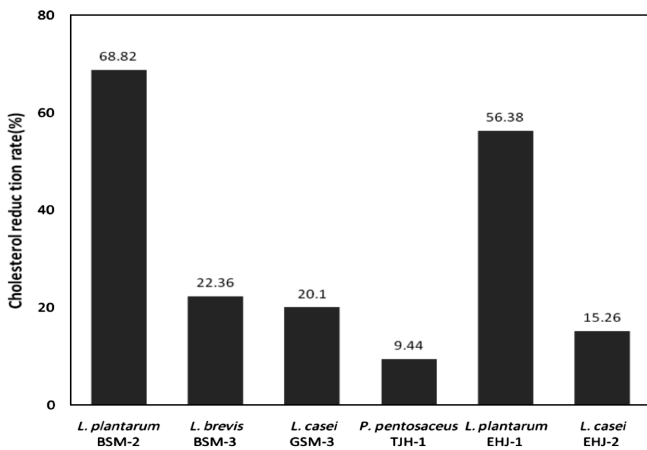


Fig. 5. Cholesterol reduction rate (%) of selected probiotic lactic acid bacteria strains from the commercial raw makgeolli.

콜레스테롤 수치가 약 10% 감소하였고(35), *L. plantarum* MA12 균주 powder를 고 콜레스테롤 rat에 급여 후 콜레스테롤이 감소되었으며(36), milk-soymilk에 *L. plantarum* 균주 단독 또는 *Momordica charantia*와 혼합해서 제조한 발효유를 고지혈 hamster에 급여 시 콜레스테롤이 감소되었다고 보고되었다(37). 또한 건강 강한 가축의 분변에서 분리된 *L. brevis*의 균주는 우수한 콜레스테롤 흡수능력(66-69%)이 있다고 연구된 바 있다(38).

요 약

본 연구에서는 시판 생막걸리에서 분리한 유산균의 probiotics 특성을 연구하기 위해 내산성, 내담즙성, 장 부착능에 효능이 있는 6개 균주를 선별하여 동정하였다. 생막걸리에서 분리한 유산균을 pH 2.5의 산성 및 담즙산(0.3% oxgall) 조건에서 내산성과 내담즙성을 측정 한 결과 BSM-2, BSM-3, GSM-3, TJH-1, EHJ-1, EHJ-2의 6개 균주에서 각각 10⁷, 10⁸ CFU/mL 높은 생존률을 나타내어 우수한 내산성과 내담즙성을 확인할 수 있었다. 내산성과 내담즙성에 효능이 있는 6개 균주의 16S rDNA 분석 결과, *L. plantarum* (BSM-2, EHJ-1) *L. casei* (GSM-3, EHJ-2), *L. brevis* (BSM-3), *P. pentosaceus* (TJH-1)의 4개 group이 동정되었다. 장

부착능에서는 다른 유산균에 비해 장내 부착능이 뛰어난 것으로 알려진 *L. rhamnosus* GG를 대조균으로 사용하였으며 HT-29 cell에 대해 6종의 유산균이 모두 장 부착능을 보였으며 *L. casei* (GSM-3, EHJ-2)가 가장 장 부착능이 높았다. 항산화능력은 *L. plantarum* BSM-2와 EHJ-1에서 각각 32.44%, 24.65%의 DPPH radical 소거능을 보였다. 시판 생막걸리에서 분리된 유산균은 다양한 식중독 원인 세균에 대하여 항균활성을 지니고 있었으며, 본 연구에서는 유산균이 생성하는 항균물질인 bacteriocin이 아닌 유산균 발효 중 젖산을 생성하면서 pH의 저하로 항균활성을 보인다는 결과를 확인할 수 있었다. Probiotics로의 기능성을 가진 6개 균주의 콜레스테롤 저하능력은 *L. plantarum* BSM-2와 EHJ-1에서 각각 68.82%, 56.38%의 높은 감소율을 나타내었다. 시판 생막걸리에서 분리한 유산균의 probiotic 특성을 조사해 본 결과 *L. plantarum* BSM-2, EHJ-1, *L. brevis* BSM-3, *L. casei* GSM-3, EHJ-2, *P. pentosaceus* TJH-1 모두 프로바이오틱스의 기본특성을 지니고 있어 프로바이오틱 균주로서 이용가치가 충분하다고 판단되어지며, *L. plantarum* BSM-2가 내산성, 내담즙성이 가장 우수한 결과를 나타내었고, 장 부착성이 우수하였으며, 뛰어난 항산화 능력과 항균력을 지니며, 콜레스테롤 저하능도 뛰어나 가장 우수한 프로바이오틱 균주라고 판단된다.

References

- Lee JS, Lee TS, Park SO, Noh BS. Flavor components in mash of *takju* prepared by different raw materials. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 316-323 (1996)
- Lee TS, Han EH. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using *Aspergillus oryzae muruks*. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 366-372 (2001)
- Kwon YH, Lee AR, Kim JH, Kim HR, Ahn BH. Changes of physicochemical properties and microbial during storage of commercial *makgeolli*. Korean J. Mycol. 40: 210-214 (2012)
- Seo DH, Jung JH, Kim HY, Kim YR, Ha SJ, Kim YC, Park CS. Identification of lactic acid bacteria involved in traditional Korean rice wine fermentation. Food Sci. Biotechnol. 16: 994-998 (2007)
- Jin J, Kim SY, Jin Q, Eom HJ, Han NS. Diversity analysis of lactic acid bacteria in *takju*, Korean rice wine. J. Microbiol. Biotechnol. 18: 1678-1682 (2008)
- Kim YH, Min JH, Kang MG, Kim JH, Ahn BH, Kim HG, Lee JS. Physicochemical properties, lactic acid bacteria content and physiological functionalities of Korean commercial *makgeolli*.

- Korean J. Microbiol. Biotechnol. 40: 325 - 332 (2012)
7. Jo KY, Ha DM. Isolation and identification of the lactic acid bacteria from *nuruk*. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 38: 95-99 (1995)
 8. Lee JH, Yu TS. Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from *nuruk*. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 15: 359-365 (2000)
 9. Hoon SS, Lee CH, Lee SH, Park JM, Lee HJ, Bai DH, Yoon SS, Choi JB, Park Y S. Analysis of microflora profile in Korean traditional *nuruk*. J. Microbiol. Biotechnol. 23: 40-46 (2013)
 10. Kim SY, Yoo KS, Kim JE, Kim JS, Jung JE, Jin Q, Eom HJ, Han NS. Diversity analysis of lactic acid bacteria in *takju*, Korean rice wines, by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Korean J. Food Sci. Technol. 19: 749-755 (2010)
 11. Kim HR, Lee AR, Kim JH, Ahn BH. Microbial dynamics of commercial *makgeolli* depending on the storage temperature. J. Microbiol. Biotechnol. 22: 1101-1106 (2012)
 12. Lee HR. Diversity of lactic acid bacteria (LAB) in Korean draft rice wines and studies on the functional materials in selected LABs. MS thesis, Kyung Hee University, Seoul, Korea (2012)
 13. Yoo KS. Lactic acid bacterial diversity in *makgeolli* and its effects on fermentation process and quality. PhD thesis, Chungbuk National University, Daejeon, Korea (2013)
 14. Lin MYN, Chang FJ. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Digest. Dis. Sci. 45: 1617-1622 (2000)
 15. Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 49: 377 (1985)
 16. Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. J. Lipid Res. 14: 364-366 (1973)
 17. Sim JH, Oh SJ, Kim SK, Baek YJ. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic acid bacteria species isolated from lactic fermented products. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 101-104 (1995)
 18. Saarela M, Mogensen G, Fondn R, Mtt J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84: 197-215 (2000)
 19. Gilliland SE. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. J. Food Prot. 42: 164-167 (1979)
 20. McDonald LC, Fleming HP. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2120-2124 (1990)
 21. Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. Lett. Appl. Microbiol. 27: 183-185 (1998)
 22. Maria GK, Evdokia KM, Ioannis GO, Adamantini AK. *In vitro* assessment of probiotic properties of *Lactobacillus* strains from infant gut microflora. Food Biotechnol. 22: 1-17 (2008)
 23. Vidhyasagar V, Jeevaratnam K. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from idly batter for probiotic properties *in vitro* original research article. J. Funct. Food. 5: 235-243 (2013)
 24. Klaenhammer TR, Kleeman EG. Growth characteristics bile sensitive and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 41: 1461-1667 (1981)
 25. Dunne CL, O'Mahoney L, Murphy L, Thornton D, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. Am. J. Clin. Nutr. 73: 386S-392S (2001)
 26. Gronlund MM, Isoaurk E, Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Salmiinen SJ. Adhesion of probiotic micro-organism to intestinal mucus. Int. Dairy J. 9: 623-630 (1999)
 27. Kim SE. Identification of lactic acid bacteria (LAB) from *mukgeunji*, a long-term ripened kimchi and analysis of availability of LAB as probiotics. MS thesis, Kyung Hee University, Seoul, Korea (2009)
 28. Aguirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. J. Appl. Bacteriol. 75: 95-107 (1993)
 29. Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemie 70: 337-349 (1988)
 30. Lim SM, Im DS. Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. J. Microbiol. Biotechnol. 19: 178-186 (2008)
 31. Song YJ, Park SH, You JY, Cho YS, Oh KH. Antibacterial activity against food-poisoning causing bacteria and characterization of *Lactobacillus plantarum* YK-9 isolated from kimchi. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 24: 273-278 (2009)
 32. Baek H, Choi MS, Oh KH. Characterization and antibacterial activity of *Lactobacillus casei* HK-9 Isolated from Korean rice wine, *makgeolli*. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 27: 161-166 (2012)
 33. Ahn DK, Han TW, Shin HY, Jin IN, Ghim SY. Diversity and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. J. Korean Microbiol. Biotechnol. 2: 191-196 (2003)
 34. Kim MJ, Kim GR. *In vitro* evaluation of cholesterol reduction by lactic acid bacteria extracted from kimchi. Korean J. Culin. Res. 12: 259-268 (2006)
 35. Nguyen TD, Kang JH, Lee MS. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. Int. J. Food Microbiol. 113: 358-361 (2007)
 36. Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B, Bai X. 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 (2009)
 37. Tsai Ty, Chu LH, Lee CL, Pan TM. Atherosclerosis-preventing activity of lactic acid bacteria-fermented milk-soymilk supplemented with momordica charantia. J. Agr. Food Chem. 57: 2065-2071 (2009)
 38. Bang JH, Shin HJ, Choi HJ, Kim DW, Ahn CS, Jeong YK, Joo WH. Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates. J. Life Sci. 22: 251-258 (2012)