

호상 요구르트에 적합한 *Lactobacillus plantarum* strains 탐색 및 요구르트의 이화학적 및 관능 특성

정성엽[†] · 이용현^{1,†} · 강선아² · 신배근² · 박선민^{2,*}

발효미생물산업진흥원, ¹호서대학교 나노바이오토로닉스과, ²호서대학교 기초과학연구소 · 식품영양학과

Exploration of optimal *Lactobacillus plantarum* strains for curdling milk for yogurt and evaluation of physicochemical and sensory properties

Seong-Yeop Jeong[†], Yong Hyen Lee^{1,†}, Suna Kang², Bae Keun Shin², and Sunmin Park^{2,*}

Department of Microbial Institute for Fermentation Industry

¹Department of Nanobiomechatronics, Hoseo University

²Department of Food and Nutrition, Hoseo University

Abstract Since some strains of kimchi lactobacilli can curdle milk, they can be used for making yogurt. However, the best *Lactobacillus plantarum* strains for curdling milk for yogurt are still unknown. In this study, we determined the best *L. plantarum* strains for curdling milk, and the physicochemical properties of yogurts made using different *L. plantarum* strains were examined. Three strains of *L. plantarum* useful for curdling milk were identified (YD2, YD9, YD12). The number of lactobacilli was lower in yogurts made with *L. plantarum* than in those made with control, and among the *L. plantarum* strains tested, YD12 had the highest bacterial counts. However, the microbial count reached 6.3×10^8 CFU/mL after 24-h fermentation in all yogurts. The pH of the yogurts decreased after 12-h fermentation, while the acidity increased. The low pH and high acidity decreased the viscosity in all the three types of yogurts, because the acids disturbed gel formation due to protein denaturation. Sensory evaluation revealed that the YD12 group showed a high percentage of completion similar to the control group. YD2 and YD9 showed a high sourness value and low sweetness value, whereas YD12 yielded optimal values for all the organoleptic characteristics. Therefore, YD12 would be a high quality bacterial strain for use as a yogurt starter culture.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, yogurt, sensory evaluation, viscosity

서 론

젖산세균(Lactic acid bacteria, 유산균)은 당을 발효, 이용하면서 젖산을 주로 생산하는 세균으로서 그람양성의 구균(cocci), 구형간균(coccobacilli), 간균(rods) 등의 세포형태를 가지고 있으며 내성포자(endospore)를 만들지 않고, DNA의 G+C 함량이 50% 이하인 세균들을 말한다(1). 이러한 젖산세균 속(genus)에는 *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weidella* 등이 있으며 이 외에도 다양한 종류의 젖산세균이 발효유제품 및 다양한 발효식품에서 이용되고 있다(2). 젖산세균은 사람의 장관 내, 구강, 질 등에 상재균으로서 존재하고 있으며, 이러한 젖산세균은 정상 작용, 면역증강작용, 간경화 개선작용, 혈중 콜레스테롤 저하기능, 피부 미용 효과 및 아토피 등에 효능이 있는 것으로 연구결

과 밝혀져 기존의 식품산업 뿐만 아니라 축산사료, 바이오의약품, 바이오화장품 등 다양한 산업에서 그 이용성이 계속적으로 확대되고 있다.

전통발효식품 중의 하나인 김치는 다양한 연구를 통하여 항균 작용, 혈청 콜레스테롤 저하기능, 아토피 피부염 완화 효과, 정상 작용, 변비개선, 항노화기능, 항암효과 및 생리대사 활성화 등의 효과가 있는 것으로 연구결과 밝혀졌으며 이러한 생리활성은 김치의 주 발효원인 젖산세균의 기능성과 유사하다(3). 김치, 젓갈 및 장류식품과 같은 전통발효식품에 함유된 젖산세균의 다양한 기능성 효능이 밝혀지면서 전통발효식품으로부터 기능성 젖산세균의 탐색 및 소재화 등의 다양한 연구가 많이 진행되고 있으며, 이러한 젖산세균을 활용한 제품들이 많이 출시되고 있다(4,5). 김치는 유산균을 비롯하여 알려지지 않은 다양한 종류의 미생물들의 상호작용에 의해서 발효되며, 이러한 김치에는 약 160여종의 다양한 젖산세균이 존재하며, 잘 숙성된 김치 내에는 약 10^8 CFU/mL의 젖산세균이 있는 것으로 알려져 있다(6). 젖산세균은 체제 및 발효유 이외에도 채소 발효식품과 관련된 젖산세균들의 영양학적, 약리학적 장점들이 알려지면서 전통발효식품의 산업화가 관심의 대상이 되고 있다(7).

김치 발효과정 중에 젖산세균에 의해 유기산, 당펩타이드(glycopeptide) 등의 발효산물이 생성되며, 대사산물들은 김치의 맛과 향을 좋게 하고, 섭취하였을 때 사람의 장내에 존재하는 균

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Sunmin Park, Dept. of Food and Nutrition, Hoseo University, Asan, Chungnam 31499, Korea
Tel: 82-41-540-5633
Fax: 82-41-548-0670
E-mail: smpark@hoseo.edu

Received June 6, 2016; revised July 1, 2016;
accepted July 4, 2016

중에 이로운 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 젖산세균의 대사산물의 기능성이 알려지면서 이를 이용한 기능성 음료나 식품, 프로바이오틱스 제제 등의 제품개발이 이루어지고 있으며 특히, 인체의 영양 강화, 생리활성기능 촉진 등의 효과를 가진 다양한 건강기능성 식품이 출시되고 있다(8,9). 김치 젖산세균의 항암작용, 정장작용, 항 노화와 같은 여러 가지 기능이 보고되어 있는 것으로 보아 김치 젖산세균은 인체의 신진대사 및 건강에 중요한 영향을 미치는 것으로 사료된다(10).

김치의 발효는 전형적인 식물성 식품의 젖산 발효 형태를 따르고 있으며, 이러한 김치의 발효초기에는 *Leuconostoc mesenteroides* 등의 균이 성장하면서 젖산 발효 환경을 조성하고 산도가 낮아지면서 *Lactobacilli* 중에서 *L. plantarum* 우점하게 되면서 다른 종의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다(11). *L. plantarum* 균주를 이용한 실험에서는 균주를 단독 혹은 *Momordica charantia*와 혼합하여 발효유를 제조하여 동물에게 제공하였을 때, *L. plantarum*으로 제조한 발효유를 섭취한 햄스터의 콜레스테롤이 감소되는 효과가 있었고(12), 김치 젖산세균을 이용한 다른 동물 실험에서도 흰쥐의 복부지방을 감소시키는 효과가 있었다고 보고하였다(13). 김치 젖산세균의 유해 효과에 대한 연구에서는 *L. plantarum* AF1, *Leuconostoc kimchi* GJ2 등이 독성을 나타내지 않는 안전한 물질로 보고되어 있다(14,15). 이와 같이 김치발효에 관여하는 젖산세균 중 *L. plantarum*은 건강에 유익한 다양한 기능성을 가지고 있어서 이에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데 아직까지 커드를 생성하는 *L. plantarum*을 이용한 호상용 요구르트에 대한 연구는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 가정용 및 시판용 김치 등으로부터 *L. plantarum* 균종을 분리하였고, 우유 발효를 통하여 커드(curd)를 형성하는 균주를 선별하였으며, 선정된 *L. plantarum*을 이용하여 요구르트를 제조하여 이화학적 특성과 관능적 특성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

젖산세균의 탐색 및 분리

수집한 김치시료 1g을 채취하여 9mL의 살균생리식염수(0.85% NaCl)에 첨가하여 1분 동안 블렌더(blender)로 균질화 시킨 후 십진법으로 단계별로 희석한 후 MRS (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 평판배지에 0.1 mL씩 도말 한 후 30°C에서 2일간 배양하였다. 평판배지 상에 형성된 다양한 집락을 선택하여 BCP (bromocresol purple, 0.004%) 첨가 MRS 평판배지에 다시 접종하여 30°C에서 25시간 배양하여 콜로니 주위에 노란색의 환을 형성하는 균주를 선별하였다. 분리한 젖산세균은 MRS 액체배지에 배양하여 균체만을 회수하여 20% (v/v) 글리세롤(glycerol)과 1:1의 비율로 혼합하여 -80°C에서 보관하였으며, 실험에 사용하기 직전에 MRS 액체배지에 2회 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다.

커드(curd)형성 젖균주의 선별

분리 균주 중 커드를 형성하는 젖산세균을 선별하기 위하여 10% skim milk broth (Difco Laboratories)에 분리 균주를 1% 접종하여 37°C에서 4일간 배양한 후 커드 형성능력이 있는 균주를 1차 선별하였으며, 1차 선별한 균주를 대상으로 10% 탈지분유 (Seoulmilk, Seoul, Korea)에 1차 선별 젖산세균을 2.0% 접종하여 37°C에서 4일간 배양하면서 커드 형성능력과 산 생성 능력이 뛰어난 젖산세균을 최종적으로 선별하였다.

선별 젖산세균의 동정

분리 균주의 동정은 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 분리 균주를 동정하였다. 분리 균주의 Genomic DNA는 ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ kit (Zymo Research, Irvine, USA)를 사용하여 DNA를 추출하여 주형으로 사용하였다. PCR 반응을 위한 primers로는 일반적으로 사용되는 프라이머(universal primer)인 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)와 1492R (TACGGYTACTTG TTACGACTT)를 사용하였고, PCR조건은 초기변성(initial denaturation) 94°C에서 5분, 그리고 94°C에서 45초 동안 변성(denaturation), 55°C에서 60초 동안 어닐링(annealing) 및 72°C에서 60초 동안 같은 사이클을 35회 증폭시켰다. 16S rRNA 염기서열 확인은 (주)마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 확인하였다.

선별 젖산세균의 당 이용성 분석

선별한 젖산세균의 발효특성을 알아보기 위하여 API 50 CHL kit (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 이용한 당 이용성을 확인하였다. 선별 균주를 5 mL의 MRS 액체배지에 계대배양 하여 30°C에서 24시간 배양한 후 배양액 1 mL을 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 걷어내고 세포펠릿(cell pellet)만 회수하여 PBS (phosphate buffered saline, 0.1 M, pH 7.0)로 2회 세척한 뒤 실험에 사용하였다. PBS와 McFarland standard를 이용하여 4 이상의 탁도로 맞추어 현탁액을 제조하였고, API 50 CHL medium에 현탁한 균주 배양액을 혼합하여, API 50 CH strip에 분주하고, 미네랄 오일(mineral oil)로 중층하여 37°C에서 24시간 및 48시간 동안 배양한 후 각각의 당 발효패턴을 비교하였다. 당 발효패턴은 각 strip의 미생물 증식에 의한 색의 변화 여부를 통하여 확인하였다.

선별 젖산세균의 다양한 효소활성 분석

선별 젖산세균이 생산하는 다양한 효소 생산능을 확인하기 위하여 API ZYM kit (BioMerieux)를 이용하여 19종의 효소 생산능을 분석하였다. 선별 젖산세균을 5 mL의 MRS액체배지에 계대 배양 하여 30°C에서 24시간 배양한 후 배양액 1 mL을 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 걷어내고 세포펠릿만 회수하였다. 회수한 세포펠릿을 생리식염수(0.85% NaCl)로 2회 세척한 후 멸균증류수로 10⁵-10⁶ CFU/mL 수준으로 희석한 후 API ZYM strip에 각 120 μL씩 접종한 후 37°C에서 4시간 동안 배양하여 ZYM A (BioMerieux)와 ZYM B (BioMerieux)시약을 각 strip에 한 방울씩 첨가하여, 5분 후 색의 변화를 통하여 효소활성을 확인하였다. Alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, α-chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolyase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, β-glucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, α-mannosidase, α-fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

선별 젖산세균을 이용한 요구르트의 제조

순수 분리한 선별 균주를 MRS 고체배지에 도말하여 30°C에서 24시간 배양하였으며, 순수 분리된 집락을 MRS 액체배지에 배양하여 20%(v/v) 글리세롤과 1:1의 비율로 혼합하여 -80°C 초저온냉동고(Ilshin, Seoul, Korea)에 보관하였다. 실험에 사용하기 직전에 MRS 액체배지에 2회 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다. 젖산세균 배양배지는 일반적으로 많이 사용되고

있는 락토바실러스(Lactobacillus) MRS broth (Difco)를 사용하였으며 탈지분유는 (주)매일유업(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 선별 젖산세균을 MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 24시간 전 배양한 후, 10% 탈지분유배지(탈지분유 10%, 설탕 2%)에 전 배양한 균주를 2.0%로 접종하여 37°C에서 5일간 정치 배양하였다.

요구르트는 서울우유에 2.0% (w/v), 정백당(CJ, Seoul, Korea)를 첨가하여 100°C에서 30분간 증탕한 후 40°C 이하로 식힌 후 선별한 균주(YD2, YD10, YD12)를 각각 0.06%로 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 요구르트를 제조하였다. 대조균은 일반적으로 카드 생성을 잘하는 혼합균주로 알려져 있는 ABT-4 (Probio-Tec blended culture, Hansen, Denmark)를 0.02% 접종하여 제조하였다.

생균수 측정

선별균주 및 ABT-4로 제조한 요구르트의 배양시간에 따른 생균수를 측정하였다. 24시간 동안 배양하면서 6시간 단위로 평판계수방법(plate counting method)을 이용하여 생균수를 측정하였다. 시료 1 mL을 회수하여 10진 희석법에 따라 희석한 후, BCP 첨가 MRS agar (Difco)배지를 사용하여 30°C에서 48시간 배양한 후, 생성된 집락을 3회 반복하여 측정하였다. 생균수를 log CFU (colony forming unit)/mL로 나타내었고 측정치를 비교하였다.

pH 및 적정산도

선별균주 및 ABT-4로 제조한 요구르트의 배양시간에 따른 pH 변화 및 적정산도를 조사하였다. pH meter (Orion 3-star Benchtop pH meter, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA)를 이용하여 pH를 측정하였고, 산도측정은 시료를 10 mL씩 취하고 증류수 10 mL를 가하여 1:1희석하고, 0.1N 수산화나트륨(NaOH)으로 pH 8.4가 될 때까지 적정하여 젖산의 산도 측정 계산식으로 계산하여 적정산도를 측정하였다(16).

$$TA (\%) = V \times F \times A \times D \times 1 / S \times 100$$

V: 0.1 N-NaOH 용액의 적정치 소비량(mL)

F: 0.1 N-NaOH 용액의 역가=1.01

A: 0.1 N-NaOH 용액 1 mL에 상당하는 유기산의 양=0.0090

D: 희석배수

S: 시료의 채취량(mL)

점성측정

선별균주 및 ABT-4로 제조한 요구르트의 점성을 측정하였다. 점성 측정은 발효 완료 후 시료를 회수하여 4°C에서 24시간 보관 후 실온에서 점도계(LVDV-II+ Pro, Brookfield Engineering Lab. Inc., Middleboro, USA)의 4번 스피들(spindle)을 이용하여 30 rpm에서 1분 동안 안정화시간을 거친 뒤 30초 간격으로 2분 동안 측정하였다.

관능검사

관능검사는 발효가 완료된 발효유를 냉장보관하고, 호서대학교 학생 19명을 지원을 받아 관능검사를 실시하는 방법을 숙지시킨 후 검사 전 후 물로 입을 행구고 색, 향, 기호도, 맛, 끝 맛, 조직 감에 대하여 각 항목별 최저 1점, 최고 5점의 5단계 평가를 하도록 하였다.

통계분석

본 실험의 모든 통계처리는 SPSS (version 18.0, IBM SPSS, Armonk, New York, NY, USA)를 이용하여, 분산분석(ANOVA)을 실시했으며 각 시료간의 유의성 차이는 Duncan's multiple range test를 사용하여 $p < 0.05$ 의 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

젖산세균의 탐색 및 카드형성 균주의 선발

김치시료로부터 총 90여종의 젖산세균을 분리하였으며, 분리 균주를 대상으로 카드 형성 유무를 확인 한 결과 총 5종의 균주를 1차 선발하였으며, 2차 카드 형성 실험을 통하여 비교적 간단하게 카드를 형성하는 YD2, YD9, YD12균주를 최종 선정하였다.

선정균주의 동정

최종 선정한 YD2, YD9, YD12균주에 대하여 16s rDNA 염기서열 분석결과를 바탕으로 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 제공 하는 Advanced blast search 프로그램을 통하여 GenBank에 등록된 표준 균주와 염기서열을 비교하였으며, 그 결과 YD2, YD9, YD12 균주 모두 *L. plantarum*과 99.9% 유사한 것으로 동정되었다.

선별 균주의 당 발효 패턴 분석

선별 젖산세균을 API 50 CHL kit를 이용하여 당 이용성의 결과를 Table 1에 나타내었다. 선별 젖산세균 3종의 모두, L-아라비노스(arabinose), D-리보스(ribose), D-갈락토스(galactose), D-포도당(glucose), D-과당(fructose), D-마노스(mannose), D-마니톨(mannitol), 아미그달린(amygdalin), 아르부틴(arbutin), 에스쿨린(esculine), 시트란철(III) (ferric citrate), 살리신 (salicine), D-세로비오스(cellobiose), D-엿당(maltose), D-젖당(lactose), D-멜리바이오스(melibiose), D-사카로스(saccharose), 젠티오바이오스(gentiobiose)를 이용하는 능력이 있는 것을 확인 할 수 있었다.

선별 젖산세균의 다양한 효소활성 분석

선별 젖산세균 3종의 다양한 효소활성을 확인하기 위하여 API 20 ZYMkit를 이용하여 확인한 결과를 Table 2에 나타내었다. leucine arylamidase, acid phosphatase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucosidase 및 N-acetyl- β -glucosaminidase 효소활성을 선별 젖산세균 모두 보유하고 있는 것으로 나타났으며, 특히 선별 젖산세균 3종 모두에서 벤조피렌(benzopyrene)을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β -glucuronidase 효소활성이 없는 것으로 확인되었다.

젖산세균수의 변화

요구르트의 생성 과정 중 젖산세균 수는 0, 6, 12, 24시간 배양할 때의 젖산세균수를 측정하여 Table 3에 나타내었다. 대조균 및 실험균에서 생균수를 24시간 동안 지속적으로 증가함을 볼 수 있으며, 처음 접종 후 6시간까지는 미미한 정도로 증가함을 보였지만 6시간 이후에서는 급격하게 증가 되어 24시간 발효가 되었을 때 모든 젖산세균 수에서 6.3×10^8 CFU/mL 이상의 생균수를 나타냈다. Kim 등(17)은 시중에서 판매하는 요구르트를 연구하였는데, 시판된 요구르트 제품의 젖산세균수를 측정하였을 때 총 균수는 $6.3(\pm 0.4) \times 10^6$ 에서 $8.3(\pm 1.4) \times 10^9$ CFU/mL까지 범위의 값

Table 1. Biochemical identification of the strains isolated by carbon source utilization pattern

Carbohydrates	YD2	YD9	YD12	Carbohydrates	YD2	YD9	YD12
Control	- ¹⁾	-	-	Esculine Ferric citrate	+	+	+
Glycerol	-	-	-	Salicine	+	+	+
Erythritol	-	-	-	D-cellobiose	+	+	+
D-arabinose	-	-	-	D-maltose	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	D-lactose	+	+	+
D-ribose	+	+	+	D-melibiose	+	+	+
D-xylose	-	+	-	D-saccharose	+	+	+
L-xylose	-	-	-	D-trehalose	+	+	+
D-adonitol	-	-	-	Inuline	-	+	-
Methyl-β-D-xylopyranside	-	-	-	D-melezitose	+	-	+
D-galactose	+	+	+	D-raffinose	-	+	-
D-glucose	+	+	+	Amidon (Starch)	-	+	-
D-fructose	+	+	+	Glycogene	-	-	-
D-mannose	+	+	+	Xylitol	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	Gentiobiose	+	+	+
L-rhamnose	-	-	-	D-turanose	+	-	+
Dulcitol	-	-	-	D-lyxose	-	-	-
Inositol	-	-	-	D-tagatose	-	-	-
D-mannitol	+	+	+	D-fructose	-	-	-
D-sorbitol	+	-	+	L-fructose	-	-	-
Methyl-α-D-Mannopyranside	+	-	+	D-arabitol	-	-	-
Methyl-α-D-Glucoside	-	-	-	L-arabitol	-	-	-
N-Acethyl-Glucosamine	+	+	+	Potassium gluconate	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	Potassium 2-keto- gluconate	-	-	-
Arbutin	+	+	+	Potassium5-keto-gluconate	-	-	-

¹⁾Data obtained by API 50 CHL kit; +: positive, -: negative

Table 2. Enzyme Patterns of Lactic acid bacteria

Enzyme	Stains		
	YD2	YD9	YD12
Control (Temoin sans substrat)	- ¹⁾	-	-
Alkaline phosphatase	-	-	-
Esterase (C4)	-	-	-
Esterase Lipase (C8)	-	-	-
Lipase (C14)	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+
Valine arylamidase	-	-	-
Crystine arylamidase	-	-	-
Trypsin	-	-	-
α-chymotrypsin	-	-	-
Acid phosphatase	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	-	-	+
α-galactosidase (melibiase)	+	+	+
β-galactosidase (lactase)	+	+	+
β-glucuronidase (hyaluronidase)	-	-	-
α-glucosidase (maltase)	+	+	-
β-glucosidase (cellulase)	+	+	+
N-acetyl-β-glucosaminidase (chitinase)	+	+	+
α-mannosidase	-	-	-
α-fucosidase	-	-	-

¹⁾Data obtained by API 20 ZYM kit; +: positive, -: negative

을 나타내었고, 요구르트 1병을 기준으로 하였을 때 $8.1(\pm 0.4) \times 10^8$ 에서 $1.4(\pm 0.9) \times 10^{11}$ CFU/mL까지의 범위의 값을 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에서는 실험군 및 대조군 모두 김 등의 연구와 비교하였을 때 균수가 비슷한 것으로 보아 김치젖산세균으로 요구르트를 제조하였을 때 젖산세균의 양이 시판되는 요구르트와 같게 제조되었음을 확인할 수 있었다.

pH 및 적정산도의 변화

선별 젖산세균을 이용하여 요구르트 제조 시 각각의 균주 YD2, YD9, YD12, 및 대조군은 0, 6, 12, 24시간 배양하였을 때의 pH와 산도의 변화 상태를 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. pH 분석 결과 발효가 진행되면서 대조군의 경우 배양 6시간 후 pH 6.3에서 12시간 후 pH 5.7, 24시간 후 pH 4.1까지 완만하게 떨어지는 반면 실험군은 12시간까지 산도가 유지되다가 12시간 경과부터 pH 6.6에서 24시간 후 pH 4.3으로 급격히 낮아지는 경향을 보였다. 24시간이 경과 하였을 때 실험군이 대조군 pH와 유사한 값을 보인 것으로 보아 요구르트의 발효가 잘된 것으로 사료된다. Lee 등(18)은 저장온도와 교반조건을 달리한 요구르트의 저장 중 품질변화에서 요구르트의 적당한 pH는 4.1-4.2 범위라고 보고하였고, Lee 등(19)은 시판 요구르트 중 *Lactobacillus* 및 *Bifidobacteria*의 안정성 및 내산성을 연구하였는데, 요구르트의 pH가 4.0 이하로 떨어짐에 따라 균의 생존이 확연하게 떨어진다고 발표하였다. Roh and Kim(20)은 김치 유래 젖산세균을 이용한 단호박 발효음료 제조 기술 개발을 연구하였는데 대조군에서는 pH 값이

Table 3. Number of *Lactobacillus plantarum* in the yogurt according to the fermentation periods

	Fermentation time (h)	Strains (CFU/mL)			
		YD2	YD9	YD12	Control
	0	4.0(±2.88 ^a)×10 ³	3.3(±0.63 ^a)×10 ³	9.8(±6.91 ^c)×10 ²	2.0(±18.3 ^b)×10 ³
	6	2.3(±3.28 ^b)×10 ⁴	1.8(±6.27 ^b)×10 ⁴	4.5(±0.11 ^c)×10 ³	7.1(±4.50 ^a)×10 ⁴
	12	1.4(±0.15 ^b)×10 ⁶	6.7(±0.58 ^c)×10 ⁵	5.0(±0.19 ^c)×10 ⁵	7.6(±95.1 ^a)×10 ⁷
	24	6.3(±0.51 ^c)×10 ⁸	6.3(±12.3 ^c)×10 ⁹	7.6(±11.8 ^b)×10 ⁸	1.3(±29.9 ^a)×10 ⁹

Values are mean±SE (n=3).

^{a,b,c}Different alphabets represent significant differences by Duncan's test at p<0.05.

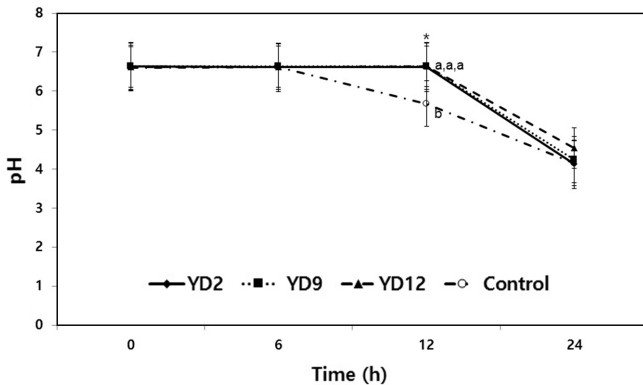


Fig. 1. Changes of pH during making curd yogurt with different strains of *L. plantarum*. Dots are mean±SE (n=3). *Significantly different among the groups at p<0.05. ^{a,b,c}Different alphabets represent significant differences by Duncan's test at p<0.05.

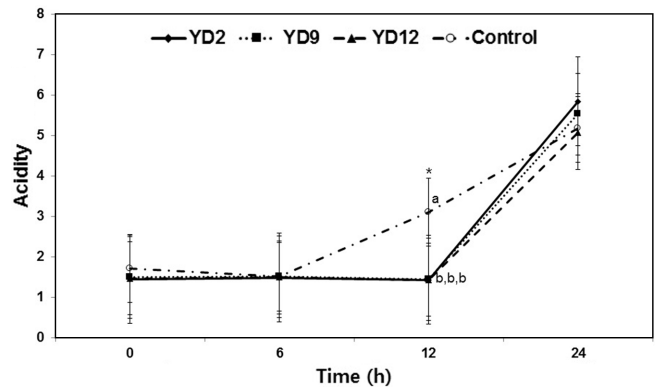


Fig. 2. Changes of acidity during making curd yogurt with different strains of *L. plantarum*. Dots are mean±SE (n=3). *Significantly different among the groups at p<0.05. ^{a,b,c}Different alphabets represent significant differences by Duncan's test at p<0.05.

4.1까지 낮아졌다고 보고하였다. 본 실험에서는 김치 젖산세균을 사용한 대조군 및 실험 군이 12시간째 pH는 평균 6.3값을 나타내었고, 24시간에서는 pH는 평균 4.3값을 나타낸 것으로 보아 산생성이 적절한 것으로 보여진다. Kim(21)의 김치 유래의 내산성 젖산세균으로 제조한 요구르트의 이화학적 특성에 대한 연구에 따르면 김치의 젖산세균으로 요구르트를 제조를 했을 때, 요구르트의 pH는 김치가 가장 맛있을 때의 pH 값인 4.0-4.5에 포함되므로 일반 요구르트의 적정 pH와 유사하였다. 본 연구에서는 김치로부터 분리한 젖산세균을 이용하여 요구르트 제조하였으며, 발효 24시간 후 선별 젖산세균을 이용하여 제조한 요구르트의 pH가 4.3으로 분석되었으며, 이러한 결과를 바탕으로 김치 젖산세균으로 요구르트를 제조 하였을 때 사람이 먹기에 좋은 요구르트가 제조되는 것으로 사료된다. 젖산세균을 사용하여 요구르트를 제조하였을 때, 24시간 발효 후 요구르트 pH가 시판되는 요구르트와 유사한 적정 pH로 제조되도록 실험을 계획하였는데, Kim(21)과 Lee 등(18)의 pH 연구 결과와 유사한 것으로 보아 김치 젖산세균으로 요구르트를 제조를 하였을 때 대조군과 실험군 모두 유사한 값을 보여 요구르트의 제조에 있어 문제가 없는 것으로 사료된다. 또한 Lee 등(19)의 연구를 참고해 보았을 때 본 연구의 요구르트 pH값은 4.3으로 요구르트 생성에 있어 요구르트가 잘 생성되고 생균수에 안정적인 조건을 가지고 있어 생균수의 감소에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. Kim(21)의 논문의 의하면 pH 3.0-4.0 범위의 젖산세균들은 대체로 산에 대한 내성이 강한 균주들로 이루어져 있으며, 김치발효 관련 젖산세균은 인공위액에 내성이 있는 것으로 보고되어있다. 따라서 본 실험의 pH값이 4.3인 것으로 보아 요구르트를 섭취 하였을 때 위산에 대한 내성이 있는 김치 젖산세균에 의해 젖산세균의 파

괴가 적을 것으로 사료된다.

점성 측정

선별 젖산세균을 이용하여 제조한 요구르트의 점성(CP: Centi poise)을 측정된 결과는 Fig 3A-3B에 나타내었다. 냉장온도(4°C)에서 30 rpm, 64초로 점성을 측정(1.5분, 2분, 2.5분, 3분)하였을 때(Fig. 3A), 1.5분에서는 대조군이 739.8, CP YD12군에서 246.6, CP, YD9군은 446.6, CP, YD2군은 439.9, CP로 측정 되었으며, 대조군의 경우 서서히 점성이 낮아져 3분에서는 609.8 CP까지 낮아졌다. YD12군에서는 246.6 CP, YD9군에서는 393.2 CP, YD2군에서는 379.9 CP로 대조군에 비하여 안정적인 모습을 보였다. 이것은 점성 값이 일정하게 유지됨에 따라 요구르트가 안정화된 것으로 보여지며, 김치 젖산세균으로 요구르트를 제조하였을 때 점성에 있어 안정적으로 요구르트를 제조할 수 있을 것으로 사료된다. 상온(19-20°C)에서의 점성 측정 결과 또한 냉장온도에서의 점성과 유사한 경향을 보였다(Fig. 3B). 대조군은 1분에서 539.9 CP에서 3분에 446.2 CP로 완만하게 떨어졌으며, 실험군에서는 각 YD2군은 326.6에서 293.2 CP, YD9군은 286.6에서 239.9 CP, 272군은 186.7에서 180 CP로 조금 낮아지긴 하였으나 그 차이가 크지 않은 것으로 보아 실험 군에서는 점성차가 크게 없는 것으로 나타났다. 또한, 위의 냉장 점성과 비교하였을 때 냉장 점성의 차이가 큰 것으로 보아 점성 측정이 잘 되었다고 볼 수 있다. 대조군과 실험군 간의 점성 차이가 있었는데 이는 대조군은 호상 요구르트 생성에 탁월한 복합균주인 (ABT-4)를 사용하였고, 본 연구에서는 *L. plantarum* 단일 균주를 사용하였기 때문으로 사료된다. 요구르트의 점성은 산도를 낮추어 단백질질을 변성시켜 커드를 형성시킴으로써 점성을 나타내는데 본 연구

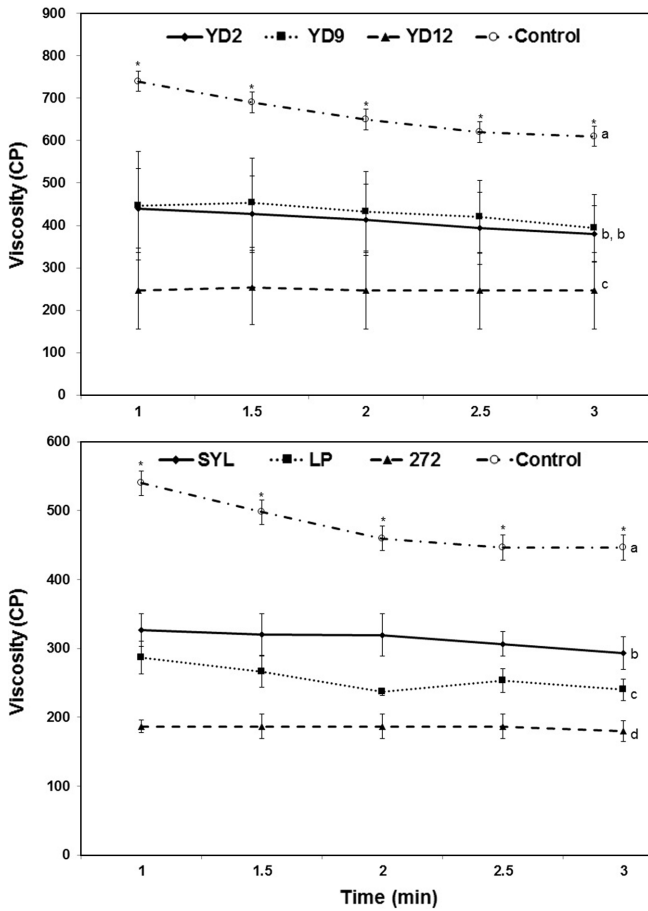


Fig. 3. Viscosity of curd yogurt made with different strains of *L. plantarum*. (A) At 8-9°C for 3 min (B) At 19-20°C for 3 min. Dots are mean±SE (n=3). *Significantly different among the groups at p<0.05. ^{a,b,c,d}Different alphabets represent significant differences by Duncan's test at p<0.05.

에서 김치에 존재하는 젖산세균 중에서 커드를 형성하는 젖산세균을 선별하였지만 커드 형성이 탁월한 젖산세균들에 비해서 커드 생성 능력이 약해서 점성이 낮은 것으로 사료된다. 그러나 Kim 등(22)의 버찌분말을 첨가한 요구르트의 저장 품질 특성 연구와 비교하여 보면 본 실험과 달리 0일에서 7일 사이의 점성의 변화를 보았을 때 점성의 차이가 크게 증가하였다고 보고하였다. Sung 등(23)의 클로렐라를 첨가한 요구르트 제조 점성을 살펴보면 본 실험의 대조군과 마찬가지로 시간이 지남에 따라 점성이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 요구르트 내에서 생성된 산이 단백질과 결합하여 단백질 수화율, 보수력 등의 겔 강도에 영향을 주어 요구르트의 점성이 감소하는 것으로 보고되어 있으며, Jung 등(24)의 연구에서도 대조군의 점성 값이 1시간대에서 4,499 CP를 나타내었고 5시간에서는 3,182 CP로 감소되었다고 보고하였다. Sung 등(23)의 연구에서는 pH와 점성 값에서 pH가 낮아질수록 점성도 낮아지는 것을 볼 수 있다. 버찌분말을 첨가한 요구르트의 저장 중 품질 특성을 연구한 Kim 등(22)과 클로렐라를 첨가한 요구르트의 품질의 특성을 연구한 Sung 등(23)의 연구에서 유사한 결과를 보였는데, 유기산에 의해 pH값이 낮아짐에 따라 점성 값이 낮아지는 것을 볼 수 있다. 이것으로 보아 본 연구에서는 김치 젖산세균으로 요구르트를 제조 하였을 때 점성이 pH 영향을 받지만 요구르트의 커드 또한 잘 형성되고 따라 점성

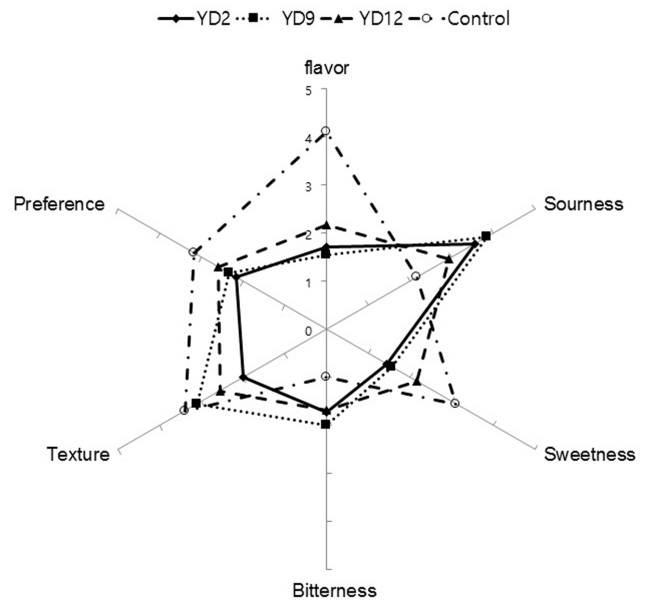


Fig. 4. Sensory evaluation of curd yogurt made with different strains of *L. plantarum*. Dots are mean±SE (n=19).

이 잘 유지됨에 따라 완성도 높은 요구르트를 제조한 것으로 사료된다.

관능검사

선별 젖산세균을 이용하여 제조한 요구르트의 관능검사 결과는 Fig 4와 같다. 대조군에 비하여 다른 균주들에 따라 차이는 있으나 전체적인 평가를 확인해보면 대조군이 신맛과 쓴맛을 제외한 향, 단맛, 조직감 및 기호도에서 가장 높은 값을 나타내었고 다음으로 YD12균이 기호도에서 높은 값을 나타내었다. YD2와 YD9균은 신맛과 쓴맛의 값이 높게 나타나고 단맛과 향미가 낮게 나타났다. 대조군을 제외한 실험군 내에서 YD12균이 기호도에서 가장 높은 점수를 받았으나 대조군에 비하여 값이 낮은 것으로 보아 YD12를 이용한 요구르트 제조에 있어서 향과 쓴맛을 보완해야 할 것으로 사료된다. Lee 등(25)의 김치에서 분리한 *L. plantarum* LHB55의 향균성과 요구르트 제조에 대한 연구에서 균주로 제조한 발효유의 관능적 특성을 조사하였는데, 대조군에 비하여 향과, 조직감이 낮았으나 전체적인 기호도에서 유의적이지는 않았으나 더 높은 점수를 얻었다. 이 등은 요구르트 제조 시 *L. plantarum* LHB55 단독 균주를 사용하지 않았는데 이는 균종이 가지는 풍미와 관능적인 특성이 단독균주 사용으로 인해 덜해지기 때문이라고 보고하였다. 본 연구에서는 단독균주를 접종하여 요구르트를 제조하였기 때문에 기호도에서 실험군이 대조군에 비하여 낮은 점수를 받은 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 커드가 잘 생성 되는 김치 젖산세균을 탐색 및 동정을 통한 *L. plantarum* YD2, YD9, YD12을 분리하였으며, 분리한 젖산세균을 이용한 요구르트를 제조하여 이화학적 특성을 알아보았다. pH와 산도의 변화는 발효시간에 따라 크게 달라졌으며, 12시간 이후 pH는 감소하는 반면 산도는 증가하였다. 점성의 경우 젖산세균의 pH와 산도에 따라 값의 변화가 있었고, pH가 낮고 산도가 높은 경우, 시간에 지남에 따라 점성 값이 감

소하는 경향을 보였다. 이는 생성된 유기산이 단백질의 변성을 일으켜 요구르트 내 겔의 형성을 방해하여 점성을 떨어뜨리는 것으로 사료된다. 요구르트의 이화학적 실험 결과에 있어서 김치에서 얻어낸 젖산세균인 *L. plantarum*에서 커드를 형성하는 균주를 이용하여 요구르트를 제조하였을 때, 커드의 형성이 잘 이루어졌으므로, 요구르트 제조에 있어서 *L. plantarum* 젖산세균이 적합한 것으로 사료된다. 관능검사 결과, 대조군을 제외한 실험군 중 YD12균이 전체적인 기호도에서 가장 높은 값을 얻었으나 대조군에 비하여 낮은 값을 나타내었다. YD12균을 이용해 요구르트를 제조할 때 풍미와 신맛, 쓴맛을 보완시킨다면 시판되는 요구르트와 유사한 혹은 더 높은 기호도를 얻을 수 있을 것으로 기대한다. 김치 젖산세균을 이용한 요구르트 제조 시, 김치 젖산세균이 위산에 대해 내성을 가지고 있으므로 젖산세균이 장까지 잘 전달이 될 것 이라 기대한다.

감사의 글

본 연구는 순창군 향토건강식품명품화사업의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

- Ahn YT. Development of probiotic dairy products using lactic acid bacteria isolated from human intestine. *Food Sci. Ind.* 47: 45-54 (2014)
- Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67-78 (2004)
- Ko, KH, Liu W, Lee HH, Yin J, Kim IC. Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in different kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 89-95 (2013)
- Chang JH, Shim YY, Cha SK, Chee KM. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 109: 220-230 (2010)
- Choi YH, Lee JS, Bae SY, Yang KJ, Yeom KW, Jo DH, Kang OH, Baik HS. Isolation of bacteria with protease activity from cheonggukjang and purification of fibrinolytic enzyme. *J. Life Sci.* 23: 259-266 (2013)
- Cheigh HS. Biogenic components and physiological functionality of kimchi. Ms thesis, Pusan National University, Pusan, Korea (2003)
- Lee SH, No MJ. 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 (1997)
- Atrih A, Rekhif N, Milliere JB, Lefebvre G. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Can. J. Microbiol.* 39: 1173-1179 (1993)
- Klaver FA, van der Meer MR. The assumed assimilation of cholesterol *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt conjugation activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1120-1124 (1993)
- Lee MK, Rhee KK, Kim JK, Kim SM, Jeong JW, Jang DJ. A survey of research papers on Korean kimchi and R&D trends. *J. Korean Soc. Food Cult.* 22: 104-114 (2007)
- Lee SG, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang AR, Kim DH, Bae IH, Ham JS. A study on the sensory characteristic of yogurt and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* LHC52 isolated from kimchi. *Korean J. Food Sci. An.* 30: 328-335 (2010)
- 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)
- Kwon JY, Cheigh HS, Song YO. Weight reduction and lipid lowering effects of kimchi lactic acid powder in rats fed high fat diets. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 1014-1019 (2004)
- Lee H, Lee JJ, Chang HC, Lee MY. Acute toxicity of *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi in mice. *Korean J. Food Preserv.* 19: 315-321 (2012)
- Lee JJ, Lee YM, Chang HC, Lee MY. Acute toxicity of *Leuconostoc kimchi GJ2*, an exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from kimchi, in mice. *J. Life Sci.* 17: 561-567 (2007)
- Lee ST, Kim MB, Kim DK, Ryu JS, Lee HG, Heo JS. Production of curd yogurt from *platycodon grandiflorum* (Jacq.). *Korean J. Med. Crop Sci.* 6: 265-270 (1998)
- Kim DW, Yang TY, Lim JW, Lee KH, Cho SJ, Lee GH. Study of lactic acid bacteria in yogurt on the market. *J. Sci. Edu. Gifted.* 7: 17-22 (2015)
- Lee HJ, Suh DS, Shin YK, Goh JS, Kwak HS. Changes of quality in stirred yogurt during storage at various conditions of temperature and shaking. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 353-360 (1992)
- Lee BJ, Jinghao C, Park OS, Goh JS, Ahn TS, Park SY. Stability and gastric acid resistance of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in commercial yogurts. *Korean J. Microbiol.* 35: 89-93 (1999)
- Roh HJ, Kim GE. Fermentation of *Cucurbita maxima* extracts with microorganisms from Kimchi. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.* 24: 149-155 (2009)
- Kim SJ. Physicochemical characteristics of yogurt prepared with lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J. Korean Soc. Food Cult.* 20: 337-340 (2005)
- Kim KH, Hwang HR, Jo JE, Lee SY, Kim NY, Yook HS. Quality characteristics of yogurt prepared with flowering cherry (*Prunus serrulata* L. var. spontanea max wils.) fruit powder during storage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 1229-1236 (2009)
- Sung YM, Cho JR, Oh NS, Kim CK, In MJ. Preparation and quality characteristics of curd yogurt added with chlorella. *J. Appl. Biol. Chem.* 48: 60-64 (2005)
- Jung HA, Kim AN, Ahn EM, Kim YJ, Park SH, Lee JE, Lee SM. Quality characteristics of curd yogurt with sweet pumpkin. *Korean J. Food Preserv.* 18: 714-720 (2011)
- Lee SG, Lee YJ, Kim MK, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang AR, Kim DH, Bae IH, Ham JS. A study on the yogurt manufacture suitability and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* LHB55 isolated from kimchi. *J. Ani. Sci. Technol.* 52: 141-148 (2010)