

김치유래 exo-polysaccharide 생성능 *Leuconostoc* 및 *Weissella* 균을 이용한 발효유 제조

민경아 · 정장호*
세종대학교 조리외식경영학과

Yogurt Production Using Exo-polysaccharide-producing *Leuconostoc* and *Weissella* Isolates from Kimchi

Koung-Ah Min and Chang-Ho Chung*

Department of Culinary Science and Food Service Management, Sejong University

Abstract The purpose of this study was to investigate the effect of exopolysaccharide (EPS)-producing *Leuconostoc* and *Weissella* isolates from kimchi as a probiotic starter and replacement for thickening agents such as pectin and gums in yogurt. Potential probiotic isolates were first screened for their acid and bile tolerance, and then evaluated for antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. When the selected *Leuconostoc* or *Weissella* isolates were co-inoculated in yogurt without a thickening agent, the yogurt with 4% sucrose produced lower syneresis values than the control and had higher EPS yields. The isolates were able to survive at a level of 10^6 CFU/mL when incubated at 4°C for 12 days. This study shows that EPS-producing *Leuconostoc* and *Weissella* strains have the potential to produce a synbiotic yogurt.

Keywords: *Leuconostoc*, *Weissella*, probiotic starter, kimchi, yogurt

서 론

FAO/WHO의 정의에 따르면 프로바이오틱스(Probiotics)는 “충분한 양을 섭취하였을 때 숙주의 건강에 도움이 되는 살아있는 균”이라 한다. 사람과 동물의 위장관에 서식하면서 유익한 효과를 나타내는 미생물 생균제로서 대부분의 프로바이오틱 세균(Probiotic bacteria)은 젖산세균(Lactic Acid Bacteria, LAB)이다(1). 프로바이오틱스의 특성으로는 위장기능 개선, 불안정한 장내균총 개선, 유당불내증 감소, 항생제 유발 설사의 예방, 콜레스테롤의 수준 감소, 대장암과 면역계 자극의 예방 등 다양한 질병예방 효과와 생리작용을 하는 것으로 밝혀져 있다. 프로바이오틱스의 작용을 위해 젖산세균은 내산성과 내담즙성이 있고 위장관에서 서식 가능해야하며 소장의 상피세포에 정착하여 증식하면서 유해 미생물에 대한 길항력이 필요하다(2-5).

김치발효 과정에 관여하는 유산균의 관심이 높고 이러한 젖산 세균들을 이용한 우유(Milk) 제품이 많지 않은 실정에서 이를 이용한 요구르트(Yogurt)의 개발은 김치의 긍정적인 인식과 더불어 장 건강에도 좋은 효과를 줄 수 있어 소비자들에게 선택될 가능성이 높을 수 있다. 김치 초기발효부터 중간 발효단계까지 주요

한 세균인 이형젖산세균(Hetero lactic acid bacteria)으로는 *Leuconostoc*과 *Weissella*속 세균이 있다(6). 이 균들은 대사과정에서 젖산(Lactic acid), 아세트산(Acetic acid), 알코올(Alcohol), 이산화탄소(CO₂), 만니톨(Mannitol) 등을 부산물로 생성하며(7), 슈크로스(Sucrose)가 존재할 경우 텍스트란슈크레이스(Dextranase)를 이용하여 포도당(Glucose)과 과당(Fructose)으로 가수분해한 뒤 과당을 탄소원과 에너지원으로 사용하고 동시에 포도당을 고분자 형태이며 세포 밖 다당류(Exo-polysaccharide, EPS)의 일종인 텍스트란(Dextran)을 형성한다(8-10). 이러한 EPS는 대개 프리바이오틱(Prebiotic) 성질을 보이는 것으로 알려져 있다(11-13).

우유발효 제품은 우유단백질인 카세인(Casein)이 pH 저하로 인해 응고되는 성질을 이용하여 부드러운 젤(Gel)상의 조직을 만드는 것인데 물리적 현상에 따른 유청 분리 현상과 조직이 끊어지는 것을 방지하기 위해 우유고형물 함량을 14-18%로 높이거나 안정제를 첨가하여 사용하는 경우가 많다(14). 대표적인 안정제로는 젤라틴(Gelatin), 펙틴(Pectin), 우무(Agar) 등이 이용되지만(15), 안정제의 사용은 생산원가의 상승과 소비자들의 부정적인 인식으로 인해(16) 서유럽에서는 1960년대 말부터 발효유에 대한 안정제 사용을 법적으로 규제해오고 있으며 이에 따른 안정제의 대체제로 미생물 다당류에 대한 연구가 이루어져 오고 있다(17,18). 본 연구는 김치와 그 재료에서 분리되고 프로바이오틱 스타터(Probiotic starter)로 그 가능성을 가진 *Leuconostoc* 종과 *Weissella* 종을 선발하고 이들 선발균주를 발효유 제조 시 혼합균주로 사용하여 슈크로스 대사과정을 통해 EPS를 형성하도록 하여 안정제 대체제로 요구르트의 점성(Viscosity)을 높일 수 있도록 하였다. 또한 젖산세균 원재료에 포함된 슈크로스를 이용하여 EPS를 생산해 낼 수 있다는 점을 이용하여 프리바이오틱과 프로바이오

*Corresponding author: Chang-Ho Chung, Dept. of Culinary Science and Food Service Management, Sejong University, Seoul, 05006, Korea
Tel: +82-2-3408-3222
Fax: +82-2-3408-4313
E-mail: cchung@sejong.ac.kr
Received March 18, 2016; revised May 11, 2016;
accepted May 13, 2016

틱(Probiotic)이 동시에 존재할 수 있는 신바이오틱(Synbiotic) 개념의 발효유유제품을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

EPS (Exo-polysaccharides) 생성균주의 분리와 사용 배지

본 실험에서 사용된 균주들의 경우, 표준균주는 농촌진흥청 농업유전자원정보센터(Korean Agricultural Culture Collection (KACC), Jeonju, Jeollabuk-do, Korea)에서 분양받았으며 김치에서 분리해낸 균주들을 Park 등(19)의 연구에서 분리 동정된 균주들을 사용하였다(Table 1). 이들 균주들은 PYS 고체배지(펩톤 (Peptone) 1%, 효모 (Yeast) 0.5%, 슈크로스 10%, 한천 1.5%)에 도말하여 28°C에서 48시간 평판 배양하여 점질균을 선정하였다. 선별한 점질균들은 MRS (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에서 배양시키면서 실험에 사용하였다.

EPS 생성 유산균의 배양시간에 따른 생육도 측정

분리균주의 배양시간에 따른 생육도를 조사하기 위해 MRS 액체배지에 분리균주를 1% (v/v) 접종한 뒤 28°C에서 73시간 정지 배양하면서 증식속도를 590 nm에서 흡광도를 이용하여 3회 반복 측정하였다(20).

EPS 생성 젖산세균의 프로바이오틱 특성의 내산성과 내담즙성 시험

Lee 등(21) 방법에 따라 내산성시험은 10% 염산(HCl) (Samchun Pure Chemical Co., Ltd., Kyunggi-do, Korea)를 이용하여 pH 2.5로 조정된 MRS broth 배지에 김치에서 분리한 균주의 배양액을 10% (10^{7-9} CFU/mL 수준) 접종하였다. 접종이 끝난 배지는 37°C에서 배양하면서 2시간, 6시간에 배양된 배양액을 MRS 배지에 도말한 뒤 28°C에서 48시간 배양 후 생균수를 측정하였다. 내담

즙성 시험은 MRS broth 배지에 0.45 μ m로 여과 제공된 쓸개즙산(Bile) (Oxgall, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 0.3% (v/v) 첨가한 후 균주의 배양액을 10% 접종하였다. 접종이 끝난 배지는 37°C에서 24시간 배양한 후 MRS 우무 배지에 도말한 뒤 28°C, 48시간 배양 후 생균수를 측정하였다. 대조구(Control)는 각각 pH를 조절하지 않은 MRS 액체 배지, 쓸개즙산을 첨가하지 않은 MRS 액체 배지를 사용하였으며 생존율은 아래와 같은 식에 의해 측정하였다.

$$\text{Survival (\%)} = \frac{\text{Log}_{10} \text{number of viable cells survived (CFU/mL)}}{\text{Log}_{10} \text{number of control viable cells survived (CFU/mL)}} \times 100$$

EPS 생성 젖산세균의 Probiotic 특성의 유해미생물 생육억제

*Escherichia coli*와 *Salmonella Typhimurium*은 한국 농업미생물자원센터(KACC)에서 분양받았으며 배양배지는 각각 Luria Bertani 액체 배지(Difco Laboratories), Tryptic Soy 액체배지(Difco)를 사용하였다.

내산성 시험과 내담즙성 시험을 통해 선별된 균주들에 의한 병원성 미생물 억제 능력을 시험하기 위해 활성 높은 균 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 0.45 μ m syringe filter로 제공하였다. 이 배양 상층액을 냉동 건조기를 사용하여 10배로 농축하였다(22).

분리균주의 병원 미생물에 대한 생육억제 능력의 측정을 위해 paper disc method(23,24)를 사용하여 선별(Screening)하였다. *E. coli*, *S. Typhimurium*은 각각 LB배지, Tryptic Soy Agar 배지에 10^8 CFU/mL수준으로 도말한 뒤 멸균된 paper disc (diameter 6 mm, Advantec, Tokyo, Japan)를 배지에 얹은 후 농축된 배양 상층액을 40 μ L씩 paper disc에 떨어뜨려 37°C, 24시간 동안 배양하면서 paper disc 주위에 병원성 미생물에 대한 생육저해환(clear zone)의 크기(mm)를 측정하였다.

Table 1. Information of LAB (Lactic Acid Bacteria) isolates from kimchi (19)

Isolate number	Name of most similar strain	GenBank accession no.
B1	<i>Bifidobacterium bifidum</i> KACC NO. 20601	type culture
A12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KACC.12312	type culture
A45	<i>Weissella cibaria</i> KACC.11845	type culture
KC. 1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain DM1	JX490158
KC. 2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> strain RD9	JN863618
KC. 3	<i>Leuconostoc citreum</i> strain C2	JX490162
KC. 4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain Wikim SH007	JX402128
KC. 5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> strain NM196-1L	HM218806
KC. 6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> strain J18	CP003101
KC. 7	<i>Weissella confusa</i> strain Cab3	JX649223
KC. 8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain THK-D433	JX536122
KC. 9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain CTBRBL226	JX426116
KC. 10	<i>Weissella cibaria</i> strain 2012-Le12	JX041933
KC. 11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> strain RD24	JN863609
KC. 12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	AB596940
KC. 13	<i>Weissella cibaria</i> strain MGD4-4	HM058481
KC. 14	<i>Weissella cibaria</i> strain 4712	AB593356
KC. 15	<i>Weissella confusa</i> strain K1-LB5	FR667198
KC. 16	<i>Leuconostoc lactis</i> strain NM173-6 16S	HM218705
KC. 17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain 1112	AB593362
KC. 18	<i>Leuconostoc</i> subsp. strain TPD29	HM224479
KC. 19	<i>Leuconostoc holzapfelii</i> type strain LMG23990T	AM600682

항균 스펙트럼을 통해 항균활성이 두드러진 분리균주들은 MRS 액체배지에서 *E. coli*는 LB 액체배지에서 10^8 CFU/mL 수준으로 배양하였다. MRS 액체배지에 분리균주와 *E. coli*를 동시에 혼합 접종하고 하나의 MRS 배지에는 *E. coli*를 단독접종한 뒤 37°C에서 3, 6, 12시간 배양하면서, 분리균주들은 MRS 배지, *E. coli*는 EMB 배지로부터 생균수를 측정하였고 12시간 배양 후 pH를 측정하였다(25,26)

선별을 통해 선별된 분리균주의 덱스트란슈크레이스 활성

분리균주를 PYS 액체배지에서 24시간 배양한 후 그 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 조효소로 0.2 M 아세트산 완충용액(Acetate buffer) (pH 5.0) 2 mL과 1.75 M 슈크로스 0.5 mL를 혼합하여 기질액으로 사용하였다. 기질액 2.5 mL과 조효소액 500 µL를 항온수조 30°C에서 1시간 반응시킨 뒤 반응을 정지시키고 0.05 N 수산화소듐(NaOH)을 첨가하였다. DNS 방법(27)에 따라 DNS 시약 0.6 mL, 시료 0.2 mL을 100°C에서 5분간 방치한 뒤 2분간 얼음 안에서 온도를 낮춘 후 증류수 3.2 mL을 첨가하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과당 표준 곡선(Fructose standard curve)으로부터 샘플의 과당 함량을 정량하였으며 1DSU는 30°C에서 1시간 반응시킬 때 슈크로스 1 mg을 덱스트란으로 전환시키는 효소의 양으로 반응 중에 생성되는 과당 0.52 mg에 해당된다. 샘플 중의 단백질은 Bradford 방법에 따라 샘플 1 mL에 direagent concentrate을 1 mL 첨가하여 5분간 실온에 방치하고 595 nm에서 흡광도를 측정하여 소혈청알부민 표준 곡선(Bovine serum albumin standard curve)으로부터 정량하였고 덱스트란슈크레이스활성을 고유 활성도(specific activity)로 나타냈다.

선별을 통해 선별된 분리균주의 crude-EPS 정량

분리균주를 28°C에서 72시간 PYS 액체배지에서 배양한 후 10,000 rpm, 10분간 원심분리한 상층액을 0.45 µm syringe filter에 통과시켰다. 그리고 상층액 양의 2배 2-프로판올(2-propanol)을 첨가하여 4°C에서 15시간 방치한 뒤 침전물을 회수하여 알루미늄 측정접시에 옮겨 수분이 증발될 때까지 105°C 건조 오븐(dry oven, Seki Science Co., Changwon, Korea)에서 건조한 뒤 중량을 측정하였다(28).

요구르트의 제조

요구르트 제조를 위한 혼합균주는 Lyofast SAB 440B; *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* (Sacco srl, Codarago CO, Italy) 제품을 사용하였으며 분리균주의 경우 MRS 액체배지에 3회 배양한 후 10,000 rpm, 10분 원심분리하여 상층액 제거 후 살균 3차 증류수로 제거한 상층액 만큼 넣어 3회 반복 원심분리하여 균체를 회수하였다. 시유(우유 지방 함량 3.7%)와 탈지분유는 (협)서울우유(Seoul, Korea)에서 제공받았으며 대조균의 안정제는 펙틴(Pectin) (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 요구르트는 Suh 등(29)의 방법으로 제조하였으며 우유에 탈지분유 3.7%를 넣고 대조구의 경우 펙틴 0.2%, 대조구의 경우 펙틴을 제외하고 슈크로스를 2, 4% 첨가한 뒤 교반기(LAB Stirrer MS3040, Tops Misung Scientific Co., Seoul, Korea)를 사용하여 40°C에서 1,600 rpm 속도로 5분간 혼합한 후 90°C에서 10분간 살균하였다. 그 다음 40°C로 냉각하여 혼합균주를 0.002% (w/v) 첨가한 후 배양기(Incubator)에 넣어 43°C에서 pH 4.5에 이를 때까지 발효시켰다. 그 후 10°C에서 하루 동안 안정화시키고 4°C에서 저장하며 4일 간격(0, 4, 8, 12일)으로 실험을 진행하였으며 실험균의 경우 대조구의 제조와 동일

하며 혼합균주 접종 시 김치에서 분리한 균을 0.01% (v/v)으로 함께 접종하였다.

pH · 적정산도 측정

시료 10 g과 살균 수 90 mL를 스토마커(BagMixer 400, Inter-science, Arpents, France)로 혼합한 뒤 pH 변화는 pH meter (Model PB-10, Satorius AG, Germany)를 이용하여 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었고 산도변화는 0.1 N NaOH 용액을 pH 8.3이 될 때까지 중화 적정하여 소비된 0.1 N 수산화소듐 양으로부터 젖산을 정량하였고 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

$$\text{적정산도}(\%, \text{w/v}) = \frac{0.009 \times V \times f}{S} \times 100 \times \text{희석배수}$$

V=0.1 N NaOH 소비량(mL)

f=0.1 N NaOH의 factor

S=시료량(g)

*0.009: N/10 수산화소듐용액 1 mL에 해당하는 젖산 량

점성 측정방법

점성은 4°C로 저장된 시료를 Brookfield-Viscometer (Model DV-T Prime, Brookfield Eng. Labs., Middleboro, MA, USA), Spindle No. 64를 사용하여 100 rpm에서 5분에서 8분까지 1분 간격으로 점도를 측정하여 평균치로 나타내었으며 3회 반복하였다.

젖산 세균수

시료 요구르트 살균수에 십진 희석하여 0.005% 아자이드화소듐(Sodium azide)를 넣은 MRS 고체배지에 37°C, 48시간 배양하여 형성된 콜로니(colony)를 계측하여 CFU (colony forming unit)/mL로 나타냈다. 김치에서 분리한 점질물 생성 젖산세균 수는 PYS 고체배지에서 28°C, 24시간 배양하여 형성된 콜로니를 계측하여 CFU/mL로 나타냈다.

시너레시스(Syneresis)

Keogh와 O’Kennedy(30)의 방법에 따라 요구르트 30 g을 50 mL Conical Tube에 취하고 4°C에서 12일 동안 보관 후 1,500 rpm, 10분간 원심분리하여 분리된 상층액 무게로 시너레시스(%)를 계산하였다.

$$\text{시너레시스}(\%) = \text{상층액} / \text{요구르트 무게} \times 100$$

요구르트 EPS 정량

4°C에서 24시간 저장 후 0일차 일 때 점질물을 생성하는 분리균주로 제조한 시료를 10,000 rpm, 10분간 원심분리하여 분리된 상층액을 0.45 syringe filter에 통과시켰다. 그리고 상층액 양의 2배 2-프로판올(2-propanol)을 첨가하여 4°C에서 15시간 방치한 뒤 침전물을 회수하여 알루미늄 측정접시에 옮겨 붓고 수분이 증발될 때까지 105°C 건조오븐에서 건조한 뒤 중량을 측정하였다(28).

통계분석

실험에서 얻은 결과는 SPSS Ver 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) Program을 사용하여 p=0.05 수준에서 통계처리하여 분석하였다. 실험은 3회 반복실험을 기본으로 하여 분석방법으로는 평균과 표준편차 및 분산분석을 실시하였으며 Duncan의 다중범위 검정(Duncan’s multiple range test)을 이용하여 다중비교검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

김치 분리 *Leuconostoc* 및 *Wissella*균의 내산성 및 내담즙성 시험

프로바이오틱스 생균은 내산성이 있어야 하므로 본 연구에서는 pH 2.5로 조정된 MRS broth 배지에 균을 2시간, 6시간 노출시켜 생존율을 측정 한 결과, KC. 2를 제외한 균들은 2시간, 6시간 지난 후에 사멸하지 않고 10^7 - 10^8 CFU/mL 수준을 유지하며 대부분 85% 이상의 생존율을 보이며 높은 저항성을 보였다(Table 2). 일반적으로 내산성이 강하여 프로바이오틱스 생균제로 많이 이용되고 있는 *Lactobacillus*의 연구를 살펴보면 Kim과 Yi(31)의 연구에서 *L. acidophilus*가 pH 2.5에서 85-88%의 생존율, Lee 등(21)의 *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203이 pH 2.3에서 80% 이상의 생존율을 보이는 것과 비교하였을 때 본 연구의 분리균주들은 비슷한 생존율을 나타내었다. Kim과 Chang(20) 연구의 EPS 생성 분리균주는 pH 3.0에서 초기균수 10^8 CFU/mL을 유지하면서 높은 생존율을 보였고 Lee 등(32)의 연구에서는 *Weissella* 속 균주를 pH 2.0과 pH 3.0에 노출시켰을 때 pH 2.0에서는 생존율이 저조하였지만 pH 3.0에서는 10^9 CFU/mL 수준을 유지하여 산에 대해 강한 내성을 보였으며 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

Table 2. Acid and bile tolerance of LAB isolates

Strain	Survival (%)		
	pH 2.5		at 24 h with 0.3% Oxgall
	at 2 h	at 6 h	
A12	90.8	84.7	84.7
A45	99.4	56.8	56.8
KC. 1	90.9	85.6	85.6
KC. 2	-	-	-
KC. 3	87.7	82.8	82.8
KC. 4	89.0	84.3	84.3
KC. 5	89.6	83.8	83.8
KC. 6	87.1	85.4	85.4
KC. 7	91.3	88.5	88.5
KC. 8	82.1	72.2	72.2
KC. 9	90.9	84.8	84.8
KC. 10	89.3	83.1	83.1
KC. 11	89.7	85.2	85.2
KC. 12	89.1	83.2	83.2
KC. 13	87.8	82.8	82.8
KC. 14	89.5	86.1	86.1
KC. 15	89.1	88.1	88.1
KC. 16	87.8	84.4	84.4
KC. 17	88.8	83.3	83.3
KC. 18	89.6	84.8	84.8
KC. 19	90.0	83.4	83.4

∴ no growth

김치에서 분리한 EPS 생성 균주들은 내산성 시험에서 높은 생존율로 인해 인체 내에서 음식물을 통해 섭취 시 위를 통과하여 장으로 이동할 것으로 예측할 수 있으나 그 이후 대장에 도달하기 전에 십이지장과 소장 통과 시 분비되는 소화효소와 탄산수소나트륨(NaHCO_3)을 포함하는 췌장액과 쓸개즙산의 영향을 받게 된다. 쓸개즙산은 세균의 성장을 억제하거나 사멸시킬 수 있기 때문에 프로바이오틱스로서의 기능을 유지하기 위해서는 장관의 쓸개즙산 농도인 0.6 g/L 보다 높은 쓸개즙산 함유 배지에서 성장이 가능해야 한다(33). Gilliland 등(34)은 프로바이오틱스균의 쓸개즙산이 0.3% 함유된 배지에서 성장해야 한다고 하였으며 Fuller Afric(35)의 경우는 0.15-0.3% 쓸개즙산 함유 배지에서 성장 가능해야 한다고 하였다. 본 연구에서는 쓸개즙산을 0.3% 첨가한 MRS 액체배지에 분리균주를 접종하여 24시간 배양한 뒤 생존율을 측정 한 결과, KC. 2를 제외한 나머지 분리균주들의 생존율이 60% 이상이었으며(Table 2), 이는 Kim과 Chang(20)의 연구결과 중 *Leuconostoc kimchii* GJ2와 유사한 결과를 보였다. Chung 등(36)의 연구결과에 따르면 동치미로부터 분리한 *Lactobacillus* sp. FF-3이 인공위액에 대한 내성은 강한 반면 인공담즙은 생존율이 6%로 나타난 점, 그리고 Lee 등(21)의 연구에서는 유아분변에서 분리한 젖산균 균주를 쓸개즙산 0.3%를 첨가한 배지에 5시간 배양했을 때 생존율이 약 57%인 점을 고려할 때 본 연구의 김치분리 균주들 또한 내산성과 동시에 인공담즙에 대해서도 생존함으로써 구강 섭취를 통해 장에 도달할 가능성이 높을 것으로 예상되었다.

유해미생물 생육억제 시험

내산성과 내담즙성을 가지는 프로바이오틱스 생균제는 위장관 서식과 동시에 상피세포에 정착하여 증식하면서 정상 장내 세균총의 균형을 유지하고 유해미생물에 대한 길항력이 요구된다(5). 따라서 장관계 병원성 세균인 *E. coli*와 *S. Typhimurium*에 대한 생육억제 능력에 대한 시험을 항균물질생산력을 이용하였다. 대표적인 프로바이오틱스 생균제로 많이 이용되고 있는 B1 (*B. bifidum* KACC NO. 20601)과 표준균주인 A12, A45과 비교하였을 때 KC. 4, KC. 5, KC. 10, KC. 11, KC. 13이 좋은 항균활성을 보였다(Table 3). 이중 KC. 5, KC. 10가 *E. coli*에 대해서는 각각 15.0, 14.6 mm이며 *S. Typhimurium*에 대해서는 15.0, 12.6 mm로 다른 분리균주들보다 항균활성이 뛰어났으며 *E. coli*에 대한 억제능력이 *S. Typhimurium*에 대한 억제능력보다 더 우수하였다. 이는 김치에서 분리한 젖산균들의 프로바이오틱스 특성을 살펴본 Kim(37)의 연구 중에서 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KM37, KM 64가 *E. coli*에 대해서는 각각 10.0, 12.0 mm의 clear zone 형성을 보였고 *S. Typhimurium*에 대한 억제능은 보이지 않는 결과와 Lee와 Lee(38)의 연구에서 *Leuconostoc mesenteroides* CK0122가 *S. Typhimurium*에 대한 항균활성을 보이지만 *E. coli*에 대해서는 억제능력이 나타나지 않은 결과와 비교하였을 때 본 연구의 분리균주들이 병원성 미생물에 대한 억제능력을 알 수 있었다. 유해미생물 억제능력 시험에서 우수하였던 KC. 4, KC. 5, KC. 10, KC. 11, KC. 13 균주들과 *E. coli*를 혼

Table 3. Antimicrobial activity of LAB isolates on the grow of *E. coli* and *S. typhimurium* by paper disc method

sensitive strains	clear zone (mm)											
	B1 (<i>B. bifidum</i>)	A12	A45	KC. 1	KC. 4	KC. 5	KC. 9	KC. 10	KC. 11	KC. 12	KC. 13	KC. 14
<i>Escherichia coli</i>	15.0	13.0	13.0	13.0	14.6	15.0	13.0	14.6	14.3	12.6	14.0	9.6
<i>Salmonella Typhimurium</i>	11.6	11.6	9.3	9.0	12.3	15.0	10.6	12.6	11.6	9.3	11.6	9.3

Table 4. Dextransucrase activities and dextran yield of LAB isolates

Strain No.	Enzyme activity (DSU)	Protein (mg)	Specific acivity (DSU/mg protein)	Dextran yield (%)
A12	0.79±0.007 ^c	0.06±0.001 ^c	14.18±0.13 ^{1) b2)}	38.90±0.51 ^b
A45	0.66±0.005 ^d	0.07±0.003 ^b	9.67±0.44 ^d	34.11±0.51 ^c
KC. 5	0.83±0.002 ^b	0.08±0.003 ^a	10.43±0.38 ^c	34.82±0.69 ^c
KC. 10	1.09±0.021 ^a	0.07±0.003 ^b	15.91±0.38 ^a	48.48±0.16 ^a

¹⁾Value are mean±SD (n=3).

²⁾Different superscriptive letters in a column indicate significant difference among samples at p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

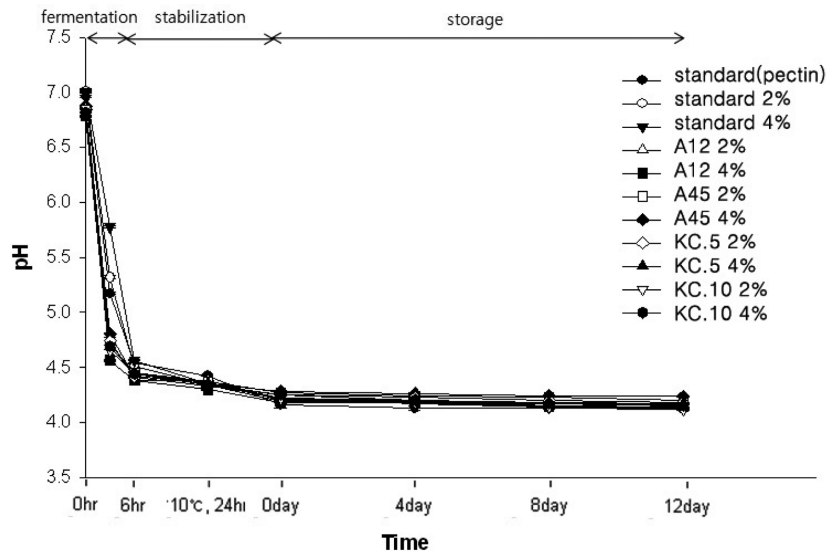


Fig. 1. pH of yogurt with LAB isolates. at 43°C, for 0-6h: fermentation; at 10°C, for 24 h: stabilization; at 4°C, for 12 days: storage

합 접종하여 37°C에서 12시간 배양하면서 생균수 및 pH 측정된 결과 *E. coli*의 단독으로 MRS 액체배지에 접종한 경우 3시간 이후 균수가 줄어들었으나 그 이후부터는 큰 변화 없이 유지되었다. 하지만 유산균과 함께 혼합 접종한 경우 12시간 배양 후 10⁵-10⁶ CFU/mL 수준으로 *E. coli*의 균수가 감소한 것을 볼 수 있었다. 김치에서 분리한 균주들 중에서는 KC. 5, KC. 10이 *E. coli*의 증식에 많은 영향을 미치며 12시간 배양 후 pH와 비교하였을 때 KC. 5, KC. 10의 pH는 다른 균주들에 비해 낮은 편이었다. Lim 등(39)의 연구결과에서 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*와 *E. coli*를 MRS broth 배지에 6시간 함께 배양한 뒤 *E. coli* 균수가 10⁷ CFU/mL로 감소하였고 Kim 등(25)의 연구에서는 *L. acidophilus*와의 12시간동안의 혼합배양에서 10⁵ CFU/mL 이하 수준으로 *E. coli*의 성장이 저해되었으며 이때 pH가 4.23, 4.07, 4.11으로 미루어보아 본 연구의 *E. coli*에 대한 생육억제는 배양 시간의 흐름에 따라 낮아지는 pH, 박테리옌(Bacteriocin) 등의 유산균 대사물질에 의한 사멸작용에 기인하는 것으로 판단되었다.

선별 *Leuconostoc*과 *Weissella* 분리균의 텍스트란슈크레이스, Crude-EPS 특성

프로바이오틱 특성 시험을 통해 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KC. 5, *Weissella cibaria* KC. 10으로 최종 2개의 균종을 선별하였으며 표준균주와 함께 DNS 방법을 이용하여 텍스트란슈크레이스 활성을 환원당의 반응정도로 측정하였다(Table 4).

효소활성도(Enzyme activity)의 경우 KC. 10균주가 가장 우수

하였으며 고유활성도(specific activity)는 15.91 DSU/mg protein으로 가장 높았으며 이는 *Weissella cibaria* 표준균주인 A45의 9.67 DSU/mg protein 보다 높은 수치였다. KC. 5는 *Leuconostoc mesenteroides* 표준균주인 A12보다 낮은 수치를 보였다. 본 실험의 김치에서 분리한 균주의 고유활성도는 Lee 등(40)연구에서 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 5-13의 14.50 DSU/mg protein과 유사한 결과를 보였으며 각 균주마다 텍스트란슈크레이스 활성능은 유의적인 차이를 나타냈다(p<0.05).

Farwa 등(41)의 연구에서 효소활성도가 증가할수록 EPS production이 증가하였는데 효소활성도와 고유활성도가 높은 KC. 10과 표준균주 A12의 경우 EPS 수율 또한 높은 것과 유사하다. 10% 슈크로스가 함유되어 있는 PYS 액체배지에서의 EPS 수율의 경우 KC. 10균주는 48.48%, A12는 38.90%, A45와 KC. 5는 각각 34.11, 34.11%이였으며 고유활성도와 같이 유의적인 차이를 보였다(Table 4, p<0.05). 이는 Kim 등(42)의 연구에서 슈크로스를 12% 첨가한 경우 EPS 수율이 60.7%였는데 이 연구에서는 10 DSU의 효소활성을 가지고 있는 텍스트란슈크레이스 첨가해주었다는 것을 감안할 때 유사한 텍스트란 및 EPS 수율을 보일 것으로 판단되었다.

선별 *Leuconostoc*과 *Weissella* 균주를 이용한 요구르트 pH와 적정산도

제조 요구르트의 pH는 발효 6시간 때, 4.5에 도달하였으며 12일 저장기간 동안에 pH의 큰 변화 없이 pH 4.1-4.2 범위를 유지하였다. Chamber(43)의 보고에 따르면 요구르트의 바람직한 pH

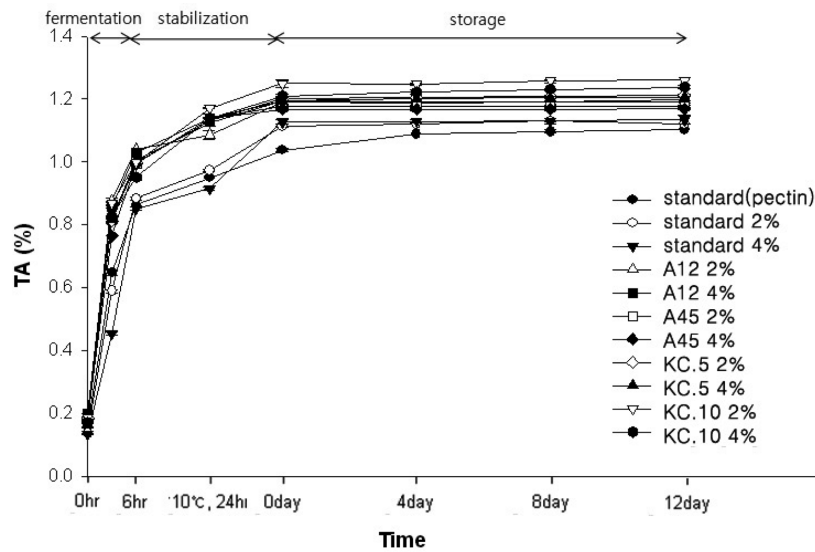


Fig. 2. Titrateable acidity (TA) (%) of yogurt with LAB isolates. at 43°C, for 0-6 h: fermentation; at 10°C, for 24 h: stabilization; at 4°C, for 12 days: storage

의 범위가 4.0-4.5라는 점과 한국인의 기호에 맞는 요구르트 pH가 3.7-4.2(44)와 비교하였을 때 본 연구의 요구르트 시료들은 발효가 종료된 시점부터 적당한 pH를 유지하고 있었다(Fig. 1).

요구르트에 설탕을 넣지 않은 대조군(펙틴 포함)과 슈크로스 2% 첨가한 요구르트, 슈크로스 4% 첨가한 요구르트 간에 pH의 유의적인 차이가 보이지 않았다. 이는 Lee 등(45)의 요구르트 제조 시 슈크로스 농도를 0-8% 첨가하였을 때 연구결과와 유사하다. 김치에서 분리한 균주들을 첨가한 실험군과 혼합균주만 첨가한 대조군과 비교하였을 때 시료들 간에 차이가 없음을 미루어 보아 분리균주들에 의한 요구르트 발효는 정상적으로 이루어지는 것으로 판단되었다. 요구르트의 발효과정 중 젖산 생성은 요구르트의 풍미에 관여하는데 젖산은 카세인 미셀(casein micelle)의 불안정화에 관여하여 유단백질을 응고시켜 커드를 형성하고 신맛을 준다(14). 젖산으로부터의 적정산도 측정 시 시료들 간의 큰 차이는 보이지 않았으나 김치에서 분리한 균주를 첨가한 요구르트가 산도 1.2-1.3%로 1.1-1.15% 사이인 대조군에 비해 산도가 높았다(Fig. 2). Rasic과 Kurmann(46)은 0.85-1.20%가 요구르트의 적정산도라고 보고하고 있으며 국내에서 시판되고 있는 농후 발효유의 적정산도는 0.82-1.24%라는 보고(47)와 비교하였을 때 적정산도 범위 안에서 약간 높은 산도를 유지하고 있는 것으로 나타났다.

요구르트 점도

요구르트의 분리균주 첨가가 점도에 미치는 영향을 살펴본 결과 발효과정과 안정화 단계를 거친 뒤 4°C 저장기간 0일차의 펙틴을 첨가한 대조군의 점도는 1459.67 cp로 표준균주 A12를 접종한 요구르트 중 슈크로스를 4% 첨가한 요구르트와 KC. 5, KC. 10을 접종한 요구르트가 대조군에 비해 점도가 좋았으며 시료 간 차이는 있으나 저장이 진행되어 최종 12일째의 점도는 0일차의 점도보다 저하되었다(Table 5). 이는 글루코하이드로라아제(Glucohydrolase)에 의한 점성물질의 점차적인 분해로 인한 것으로 판단되며 Macura와 Townsley(48)의 연구와 Pidoux 등(49)의 연구 결과들과 같은 양상을 보였다. 미생물 첨가가 없는 대조군과 비교하였을 때 A12, KC. 5, KC. 10을 접종한 요구르트 중 슈크로스 함량이 4%인 실험군이 마지막 저장기간인 12일째에 높은 점도

를 나타내었고 시료간의 유의적인 차이가 있었다($p < 0.05$). 이는 Lee 등(45)의 연구에서 슈크로스 첨가량이 증가할수록 요구르트의 점도가 증진된 것과 유사한 결과를 나타냈다.

요구르트의 점도에는 유산균이 생성해내는 산의 정도, 총 고형분 함량, 단백질 가수분해, 사용균주의 점질물 형성 정도 등이 영향을 미친다고 보고되고 있다(46). Bouzar(50)에 의하면 낮은 pH는 유단백질 응고물 구조에 영향을 주며 EPS 양이 점도와 조직에 작용하는 유일한 인자는 아니라는 결과를 나타내었다. 또, 다른 연구에서는 산 생성에 의해 단백질이 응고되어 점도가 생성되고 EPS 생산과 수화가 진행됨에 따라 점차적으로 점도가 증진된다고 보고되고 있다(51). EPS는 점도에 긍정적으로 작용하나 점도에 대한 EPS의 기작은 매우 복잡하며 단순히 그 함량으로만 결정되지 않고 분자량, 중합체 정도, EPS와 단백질 간의 상호작용 등으로 요구르트의 점도에 영향을 미친다(52).

이에 따라 본 연구의 분리균주에 따른 요구르트의 점도는 각 균주마다 생성해 내는 EPS의 양, 분자량, 슈크로스의 함량 등에 의한 것으로 사료되며 고형분의 함량이 증가할수록 요구르트의 점도가 증가하였고 이는 대조군과 실험군 모두 비교하였을 때 슈크로스 2% 첨가한 경우보다 4% 첨가한 시료들이 점도가 높았음을 통해 알 수 있었다. 그리고 요구르트에 사용된 혼합균주 중 *L. acidophilus*와 *S. thermophilus* 중의 경우 두 가지 이상의 단당이 결합되어 있는 헤테로다당류(Heteropolysaccharides)를 생성하는데 일반적으로 이것은 호모다당류(Homopolysaccharides)에 비해 낮은 수율값을 보이고 EPS 생성이 일시적인 특성을 보인다(53). 따라서 대조군 중 펙틴을 첨가하지 않고 슈크로스 2, 4% 첨가한 요구르트와 실험군과 비교하여 보면 점도가 더 우수하는데 이는 김치에서 분리한 균주들이 EPS 중 한 가지 형태의 당으로만 결합되어 있는 glucan 형태의 호모다당류 형태를 생성하여 저장기간 동안 비교적 점도를 유지하고 있는 것으로 보인다. 하지만 펙틴을 첨가한 요구르트에 비해 분리균주를 첨가한 요구르트의 경우 저장기간 간의 시료 차가 펙틴을 첨가한 요구르트의 비해 크게 나타나 안정성에 대한 연구가 필요하다고 판단된다. 국내에서 시판되고 있는 농후 발효유의 점도는 대략 256-3,164 cp(54)으로 김치에서 EPS를 생성하고 프로바이오틱 특성을 가지는 KC. 5, KC. 10 균주들을 발효유 제품에 이용할 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 5. Viscosity of yogurt with LAB isolates at 4 for 12 days

Sucrose	Sample of yogurt	Storage period (days)			
		0	4	8	12
0%	Standard (pectin)	1459.67±0.22 ^{dA}	1420±2.00 ^{eAB}	1417.33±2.33 ^{gB}	1398±1.00 ^{1)d2)B3)}
	Standard	1361.30±1.30 ^{fA}	1162.96±0.04 ^{hB}	1113±3.00 ^{iC}	1091±3.20 ^{jD}
	A12	1296±2.62 ^{hC}	1382±3.16 ^{fA}	1317±1.00 ^{hB}	1218.66±1.34 ^{hD}
	A45	1218.96±8.96 ^{iD}	1354.33±2.23 ^{gA}	1315±0.50 ^{hB}	1238±1.10 ^{gC}
	KC. 5	1565.03±6.40 ^{cB}	1650±4.90 ^{bA}	1647±12.50 ^{bA}	1206.67±6.17 ^{iC}
2%	KC. 10	1622.30±1.10 ^{abB}	1635±8.00 ^{eA}	1499±1.00 ^{cC}	1396.30±0.70 ^{dD}
	Standard	1380±8.50 ^{eA}	1345±3.20 ^{hAB}	1320±6.00 ^{hAB}	1269±1.00 ^{fB}
	A12	1626±15.00 ^{abB}	1681±2.30 ^{gA}	1592±1.00 ^{cC}	1417±1.00 ^{cD}
	A45	1325±1.00 ^{gC}	1466±1.0 ^{dA}	1426.66±0.46 ^{fB}	1309±0.90 ^{eD}
	KC. 5	1611±1.00 ^{bbB}	1685.67±6.77 ^{gA}	1679±9.10 ^{gA}	1456.50±0.50 ^{gC}
4%	KC. 10	1614±4.00 ^{bbB}	1680.30±0.70 ^{gA}	1553±4.20 ^{dC}	1445.50±0.50 ^{bdD}

¹⁾Value are mean±SD (n=3).

^{2)a-j}Different superscriptive letters in a column indicate significant difference among samples at p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

^{3)A-D}Different superscriptive letters in a row indicate significant difference among samples at p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

Table 6. Viable cell counts of yogurt with LAB isolates at 4 for 12 days

(unit: CFU/mL)

sucrose	Sample of yogurt	Medium	Fermentation period (h)			Stabilization period	Storage period (days)			
			0	3	6	10°C, 24 h	0	4	8	12
0%	Standard (pectin)	MRS	4.50×10 ⁵	1.75×10 ⁶	3.31×10 ⁷	6.08×10 ⁷	4.35×10 ⁷	4.0×10 ⁷	2.25×10 ⁷	1.50×10 ⁷
	Standard	MRS	4.25×10 ⁵	1.32×10 ⁶	3.61×10 ⁷	5.12×10 ⁷	7.80×10 ⁷	3.08×10 ⁷	2.10×10 ⁷	1.40×10 ⁷
2%	A12	MRS	4.07×10 ⁷	1.27×10 ⁸	1.28×10 ⁸	1.90×10 ⁸	1.50×10 ⁸	6.90×10 ⁷	4.10×10 ⁷	3.0×10 ⁷
		PYS	2.80×10 ⁷	2.48×10 ⁷	2.09×10 ⁷	7.0×10 ⁶	5.75×10 ⁶	5.70×10 ⁶	5.53×10 ⁶	3.80×10 ⁶
	A45	MRS	3.77×10 ⁷	4.09×10 ⁸	2.60×10 ⁸	8.35×10 ⁷	8.0×10 ⁷	6.20×10 ⁷	3.0×10 ⁷	2.95×10 ⁷
		PYS	3.66×10 ⁷	2.74×10 ⁷	1.97×10 ⁷	1.40×10 ⁶	1.02×10 ⁶	6.50×10 ⁵	5.50×10 ⁵	2.0×10 ⁵
	KC. 5	MRS	3.15×10 ⁷	6.50×10 ⁸	8.90×10 ⁸	8.0×10 ⁷	7.30×10 ⁷	5.57×10 ⁷	1.30×10 ⁷	1.20×10 ⁷
		PYS	5.44×10 ⁷	1.37×10 ⁷	1.56×10 ⁷	3.70×10 ⁶	2.50×10 ⁶	1.93×10 ⁶	1.64×10 ⁶	1.03×10 ⁶
KC. 10	MRS	4.46×10 ⁷	4.20×10 ⁸	4.61×10 ⁸	3.0×10 ⁸	2.85×10 ⁸	2.27×10 ⁸	1.90×10 ⁸	1.36×10 ⁸	
	PYS	7.24×10 ⁷	2.94×10 ⁷	1.90×10 ⁷	1.16×10 ⁷	1.10×10 ⁷	9.56×10 ⁶	9.10×10 ⁶	7.80×10 ⁶	
4%	Standard	MRS	4.80×10 ⁵	2.36×10 ⁶	6.68×10 ⁷	4.10×10 ⁷	3.10×10 ⁷	2.20×10 ⁷	1.55×10 ⁷	1.22×10 ⁷
		MRS	4.55×10 ⁷	2.42×10 ⁸	1.47×10 ⁸	6.70×10 ⁷	5.90×10 ⁷	5.0×10 ⁷	4.75×10 ⁷	2.90×10 ⁷
	A12	PYS	3.27×10 ⁷	3.11×10 ⁷	1.79×10 ⁷	9.70×10 ⁶	5.25×10 ⁶	4.79×10 ⁶	4.36×10 ⁶	4.29×10 ⁶
		MRS	3.18×10 ⁷	4.26×10 ⁸	2.69×10 ⁸	1.10×10 ⁸	7.76×10 ⁷	5.90×10 ⁷	5.15×10 ⁷	3.85×10 ⁷
	A45	PYS	4.58×10 ⁷	3.22×10 ⁷	2.48×10 ⁷	1.10×10 ⁷	9.38×10 ⁶	1.85×10 ⁶	1.25×10 ⁶	4.50×10 ⁵
		MRS	4.07×10 ⁷	3.50×10 ⁸	1.23×10 ⁸	6.0×10 ⁷	5.80×10 ⁷	4.55×10 ⁷	3.05×10 ⁷	1.60×10 ⁷
	KC. 5	PYS	8.55×10 ⁷	3.40×10 ⁷	1.49×10 ⁷	3.0×10 ⁶	2.90×10 ⁶	2.50×10 ⁶	2.49×10 ⁶	1.57×10 ⁶
		MRS	4.04×10 ⁷	4.50×10 ⁸	3.13×10 ⁸	3.0×10 ⁸	2.85×10 ⁸	1.86×10 ⁸	1.30×10 ⁸	1.10×10 ⁸
	KC. 10	PYS	8.07×10 ⁷	2.98×10 ⁷	1.99×10 ⁷	9.97×10 ⁶	9.25×10 ⁶	5.50×10 ⁶	4.35×10 ⁶	3.75×10 ⁶

요구르트 유산균 생균수변화

발효과정부터 12일 저장기간 동안의 요구르트의 전체 유산균 수는 초기 접종량은 분리균주의 첨가로 인해 실험군의 유산균 수가 더 높지만 발효과정 및 안정화 과정을 거친 뒤 저장기간에서는 실험군과 대조군의 유산균 수가 유사하며(Table 6), 이는 Seo 등(55)의 *Leuconostoc citreum*을 요구르트 제조 시 혼합균주와 함께 첨가한 연구결과와 유사하다. 그리고 PYS 고체배지에 도달하여 김치에서 분리한 균주의 생균수는 발효과정 및 저장기간이 진행됨에 따라 감소하는데 이러한 결과 역시 Seo 등(55)의 연구 중 *L. citreum*을 요구르트 제조 시 혼합균주와 함께 첨가한 뒤 40°C에서 발효시킨 결과와 일치한다.

Aminigi 등(56)은 저장이 진행됨에 따라 유산균수가 점차 감소하는데 본 연구에서도 발효 종료 후 안정화 단계까지는 전체 유산균의 수가 증가하나 저장기간에 들어서면서 시간이 지남에 따라 유산균수가 점차 감소하는 경향과 유사하다.

요구르트의 생균수는 발효과정에서의 유산균의 증식은 균의 접종량, 총 고형물의 양, 우유 내의 영양분 이용정도에 따라 차이가 나며 저장기간 동안에는 저장온도 및 시간을 포함한 배양조건, 발효산물 내에 포함되어 있는 길항물질, 발효 및 저장기간 동안 생성된 유기산의 함량에 좌우된다고 보고되어지며 또한 생균수의 생존 및 증식은 산생성량과 상관관계로 유산균의 생균수가 많을수록 pH는 낮아지고 산도는 증가하는 경향을 가진다(57). 본

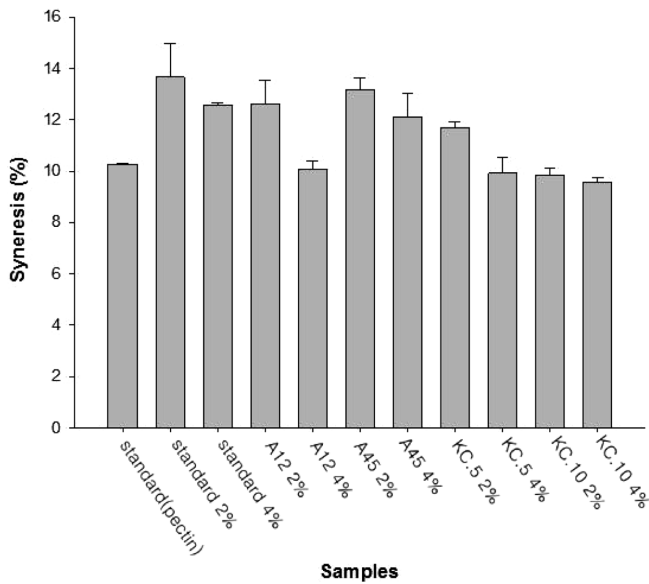


Fig. 3. Syneresis of yogurt with LAB isolates at 12 day.

연구의 전체 유산균 수 중 KC. 10을 접종하여 제조한 요구르트가 저장 12일째까지도 10^8 CFU/mL의 수준을 유지하고 있으며 이는 적정산도에서도 KC. 10을 접종하여 제조한 요구르트의 산도가 가장 좋은 것으로 보아 유산균 수와 산도의 상관관계가 있음을 알 수 있다.

Donkor 등(58)의 연구에서 보던 탈지유에 EPS 종류 중 fructans 종류인 이눌린(inulin)을 첨가하여 *L. acidophilus* 와 *Lactobacillus casei*로 요구르트를 발효시킨 경우 이눌린이 유산 등의 대사산물을 증가시키고 요구르트 저장기간 동안 고농도의 산 생성 중에도 세포 손상 없이 균들의 활성을 일정하게 유지시킨 결과로 인해 유산균 수가 대조군에 비해 1 log cycle 이상 증가하였는데 KC. 10균주의 유산균 수가 대조군에 비해 생균수가 높은 것으로 보아 KC. 10균주가 형성한 EPS로 인한 결과로 사료된다. KC. 10을 접종한 요구르트 외에 다른 요구르트 시료들의 유산균 수는 10^7 CFU/mL 수준으로 유산균이 장관 내에서 프로바이오틱스 특성으로서의 작용을 하기 위한 최소 유산균 수는 최소 10^6 CFU/mL 이상이어야 하는 점(59)과 현행 식품공전(60)에 의한 요구르트의 생균수가 10^7 - 10^8 CFU/mL 규정임을 볼 때 본 연구의 요구르트는 성분규격에 적합함을 알 수 있었다.

요구르트 시너레시스

요구르트를 12일 동안 저장한 뒤 저장 종료일에 시너레시스를 A12, KC. 5 균주의 슈크로스 함량 4%과 KC. 10균주의 요구르트가 펙틴을 첨가한 요구르트와 함께 9.5-10% 사이로 시너레시스가 가장 적은 값을 나타냈다(Fig. 3, $p < 0.05$). 이는 점도와 유사한 결과로 점도가 우수하였던 요구르트의 경우 유청 분리 현상도 감소하였다.

유산균이 생성하는 EPS는 유산균의 세포표면에 부착되어 있고 우유 단백질인 카세인과 상호작용을 하는데 이는 EPS 필라멘트(filaments)로 인해 카세인 미셀과 연결되어 있기 때문이다. 그리고 유산균과 EPS, EPS와 카세인 미셀 간의 상호작용은 카세인 미셀 간의 상호작용보다 더 많은 에너지로 인해 파괴된다. 즉, 요구르트에 약한 전단 처리는 EPS와 연결되지 않은 카세인 미셀 구조(Casein micelle network)에 부분적 분열이 일어나서 미셀 조

Table 7. Dextran yield of yogurt with LAB isolates at 12 day

Sucrose	Culture No.	Dextran yield (%)
2%	A12	2.25±0.01 ^e
	A45	1.96±0.07 ^e
	KC. 5	2.14±0.04 ^f
	KC. 10	2.63±0.01 ^d
4%	A12	3.58±0.04 ^b
	A45	3.04±0.04 ^c
	KC. 5	3.54±0.04 ^b
	KC. 10	3.89±0.09 ^a

¹⁾Value are mean±SD (n=3).

²⁾Different superscriptive letters in a column indicate significant difference among samples at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

각을 만들고 전단이 계속되어 강도가 강해지면 세균으로부터 EPS가 분리되는데 이때 이러한 구조적 분해의 효과에 의해서 EPS가닥에 새로운 점착성 말단이 형성되어 또 다른 집단이 형성된다. 이와 같이 요구르트가 변형될 때 EPS와 유산균 간의 상호작용이 중단되더라도 EPS는 세포표면으로부터 분리된 후에도 카세인과 지속적인 상호작용이 이루어지기 때문에 요구르트를 교반하여 구조적 파괴가 진행되더라도 빠르게 균일화가 이루어져 시너레시스를 막아준다(61). 따라서 본 연구의 시너레시스 역시 점도와 유사하게 복합적으로 고형분의 함량, 유산균의 생균수, EPS의 결합구조 등으로 인한 결과로 판단되었다.

요구르트 EPS 수율

분리균주를 접종하여 제조한 요구르트를 12일 동안 저장한 뒤 저장 종료일에 EPS 수율을 측정된 결과는 Table 7과 같으며 슈크로스 함량이 4% 요구르트가 2% 경우보다 EPS 수율이 더 좋았으며 KC. 10을 접종한 슈크로스 4% 요구르트가 3.89%로 가장 높았다.

Hehre 등(62)의 연구에서 슈크로스 농도를 0.5-5%로 텍스트란을 포함한 EPS 생성율을 보았을 때 슈크로스의 농도가 증가할수록 EPS 생성률은 증가하였고 Sarwat 등(41)의 연구에서도 슈크로스의 농도가 15%까지는 EPS가 비례적으로 증가하였으나 15%를 넘어서면서 오히려 EPS의 생성률은 감소하였는데 이는 요구르트의 EPS 수율이 슈크로스 2%보다 4%에서 더 높은 것과 유사하다.

본 연구의 EPS 수율은 시료간의 유의적인 차이가 있었으며 ($p < 0.05$) 전체적으로 2-4% 정도의 수율을 보였다. A12, KC. 5, KC. 10을 접종한 요구르트 중에 슈크로스 함량이 4%인 샘플이 EPS 수율이 높았으며 요구르트 점도와 시너레시스와도 유사한 경향을 띄는 것으로 보아 이 균주들이 슈크로스 4%에서 EPS 생성능력이 우수하며 이 균주들이 생성하는 EPS의 안정성 또한 높은 것으로 판단된다.

요 약

김치에서 분리된 *Leuconosotc*종과 *Weissella*종의 프로바이오틱스 특성시험과 요구르트에 접종하여 그 특성에 대해 알아보았다. 김치에서 분리한 균주들 대부분 85% 이상의 생존율을 보이며 산에 대한 높은 저항성을 보였다. 내담즙성 시험에서는 쓸개즙산을 0.3% 첨가한 MRS broth에 분리균주를 접종하여 측정된 결과 한 균주를 제외한 나머지 분리균주들의 생존율이 60% 이상으로 우

수한 내성을 보였다. 내산성과 내담즙성 모두 우수한 *Leuconostoc* 6종, *Weissella* 3종을 *E. coli*와 *S. Typhimurium*에 대한 생육억제 능력에 대한 시험을 진행하였다. 최종적으로 *Leuconostoc* 종인 KC. 5과 *Weissella* 종인 KC. 10을 최종 선발하였다. 선별된 김치 분리균주 KC. 10의 텍스트란슈크레이스 활성 및 EPS 수율은 각각 15.91 DSU/mg protein 및 48.81%로 일반 type 균주보다도 높았다. 선별 김치분리 균주를 이용하여 제조한 요구르트를 제조한 뒤 측정된 pH는 발효 6시간 때 pH 4.5에 도달하였으며 12일 저장기간 동안에 pH의 큰 변화는 없었다. 산도는 1.2-1.3%로 1.1-1.15% 사이인 대조군에 비해 산도가 높았다. 4°C 저장기간 동안, 요구르트의 점도는 펙틴을 첨가한 대조군과 비교하였을 때 A12, KC. 5, KC. 10을 접종한 요구르트 중 슈크로스 함량이 4%인 첨가하고 선별된 김치 *Leuconostoc* 및 *Weissella* 접종 실험군이 12일 째까지 유의적인 차이의 높은 점도를 나타내었다($p < 0.05$). 요구르트 저장 종료일에 시너레시스 측정값과 EPS수율 결과는 선별 김치균주를 이용한 4% 슈크로스첨가 요구르트는 대조군에 비해 시너레시스가 적은 값을 나타냈으며($p < 0.05$), EPS수율 또한 시료간 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 프로바이오틱 및 요구르트 특성시험을 종합해본 결과 선별 김치균주들을 요구르트 제조 시 혼합균주로 첨가할 경우 EPS 생성으로 인해 프로바이오틱 특성과 프리바이오틱 특성을 동시에 가져 신바이오틱 발효유의 생산이 가능하였다.

References

- Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease-therapeutic rationale and role. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 56: 809-818 (2004)
- Sanders ME. Probiotics: Considerations for human health. *Nutr. Rev.* 61: 91-99 (2003)
- Mainville I, Areand Y, Farnworth ER. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 99: 287-296 (2005)
- Pinto MG, Franz CMAP, Schillinger U, Holzappel WH. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 205-214 (2006)
- Schillinger U, Guigas C, Holzappel WH. *In vitro* adherence and other properties of *Lactobacilli* used in probiotic Yogurt-like products. *Int. Dairy J.* 15: 1289-1297 (2005)
- Han HU, Lim CR, Park HK. Determination of microbial community as an indicator of kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22: 26-32 (1990)
- Chyun JH, Rhee HS. Studies on the volatile fatty acids and carbon dioxide produced in different kimchis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 8: 90-94 (1976)
- Dols M, Chraïbi W, Remud-Simeon M, Lindley ND, Monsan PF. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2159-2165 (1997)
- Miller AW, Robyt JF. Functional molecular size and structure of dextransucrase by radiation inactivation and gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* 870: 198-203 (1986)
- Tsuchiya HM, Koepsell HJ, Corman J, Bryant J, Bogard G, Feger VH, Jackson RW. The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 64: 524-524 (1952)
- Cerning J, Marshall VME. Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. *Recent Res. Dev. Microbiol.* 3: 195-209 (1999)
- Ricciardi A, Clement F. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. *Ital. J. Food Sci.* 12: 23-45 (2000)
- Sikkema J, Oba T. Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria. *Snow Brand Rep.* 107: 1-31 (1998)
- Jung SW. Fermentation characteristics of yogurt using lactic acid bacteria with high exopolysaccharide production ability isolated from sourdough. PhD thesis, Dongguk University, Seoul, Korea. pp. 1-76 (2007)
- Anonymous. Cultured milk products. p. 245. In: *Dairy Processing Handbook*. Bylund G (ed.). Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden (1995)
- Cerning J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 113-130 (1990)
- Zourari A, Acocolas JP, Desmazeaud MJ. Metabolism and biochemical characteristics of yoghurt bacteria: A review. *Lait* 73: 1-34 (1992)
- Schellhaass SM, Morris HA. Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting withropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. *Food Struct.* 4: 279-287 (1985)
- Park JH, Ahn HJ, Kim SG, Chung CH. Dextran-like exopolysaccharide-producing *Leuconostoc* and *Weissella* from kimchi and its ingredients. *Food Sci. Biotechnol.* 22: 1047-1053 (2013)
- KIM KJ, Chang HC. Isolation and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from Kimchi. *Korean J Microbiol. Biotechnol.* 34: 196-203 (2006)
- Lee SH, Yang EH, Kwon HS, Kang JH, Kang BH. Potential probiotic properties of *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203 isolated from infant feces. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 36: 121-127 (2008)
- Schillinger U, Lucke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906 (1989)
- Lee SH, Lee MJ. Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Korean J Microbiol. Biotechnol.* 25: 617-622 (1997)
- Chun JW, Ma CW, Oh KH. Physiological characterization of *Lactobacillus* sp. JK-8 isolated from shrimp aquaculture pond. *Kor. J. Microbiol.* 41: 18-23 (2005)
- Kim EA, Baick SC, Chung WH. A study on growth inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium by lactic acid bacteria. *J. Anim. Sci. Technol.* 44: 491-498 (2002)
- Ha CG, Cho JK, Chai YG, Heo KC. Isolation and identification of lactic acid bacteria containing superior activity of the bile salts deconjugation. *Korean J. Food Sci. An.* 24: 164-170 (2004)
- Goyal A, Katiyar SS. Fractionation of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextran sucrose by polyethylene glycol: A sample and effective method purification. *J. Microbiol. Meth.* 20: 225-231 (1994)
- Hwang SK. Isolation of bacteria producing dextran from fermented Kimchi and optimization of dextran production. MS thesis, Joongbu University, Geumsan, Korea (2007)
- Suh HM, Ahn JJ, Kwak HS. Effects of pectin and fruit juice concentrate on the viscosity of drink yogurt during storage. *Korean J. Food Sci. An.* 17: 207-211 (1997)
- Keogh MK, O'Kennedy BT. Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. *J. Food Sci.* 63: 108-112 (1998)
- Kim EA, Yi DH. The probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from infant feces. *J. Korean Soc. Appl. Bi.* 51: 93-101 (2008)
- Lee KW, Park JY, Jeong HR, Heo HJ, Han NS, Kim JH. Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe* 18: 96-102 (2012)
- Paik HD, Jung MY, Jung HY, Kim WS, Kim KT. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 73-78 (2002)
- Gilliland SE, Staley TE, Bush LT. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67: 3045-3051 (1984)
- Fuller Afric R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Microbiol.* 66: 365-378 (1989)
- Chung WB, Soe WS, Cha JY, Cho YS. Isolation and characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for probiotics production from

- Korean dongchimi. Korean J. Food Preserv. 10: 406-410 (2003)
37. Kim SJ. Potential probiotic properties of Lactic acid bacteria isolated from kimchi. Food Sci. Biotechnol. 14: 547-550 (2005)
 38. Lee KH, Lee JH. Characterization of the bacteriocin produced by a *Leuconostoc mesenteroides* strain inhibiting the growth of *Lactobacillus sakei*. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 39: 390-396 (2011)
 39. Lim SD, Kim KS, Cho SA, Do JR. Physiological characteristics and immunomodulating activity by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BF146 isolated from new-born infant feces. Korean J. Food Sci. An. 30: 223-231 (2010)
 40. Lee AY, Park JY, Hahn YS. Study on the improvement of quality in Jeung-pyun prepared with Lactic bacteria having high dextransucrase activity as starters. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 400-407 (2006)
 41. Sarwat F, Qader SAU, Aman A, Ahemd N. Production and characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. Int. J. Biol. Sci. 4: 379-386 (2008)
 42. Kim MS, Lee SO, Ryu HJ, Kang HK, Yoo SK, Chang SS, Kim DW, Kim DM, Kim SH. Synthesis of highly branched isomaltodextrin by acceptor reaction using dextransucrase from *L. mesenteroides* B-742CB and B-512FMCM. Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J. 16: 200-206 (2001)
 43. Chamber JV. Culture and processing techniques important to the manufacture of good quality yogurt. Cult. Dairy Prod. J. 14: 28-34 (1979)
 44. Lee JS, Han PJ, Suh KB. Studies on production modified yogurt (soy cream) from soybean milk. Korean J. Food Sci. Technol. 4: 194-199 (1972)
 45. Lee SH, Han JP, Kim SD. Effect of sucrose on the viscosity of yogurt manufactured by *L. bulgaricus* FR1025. J. Basic Sci. Res. Inst. 1: 53-57 (1987)
 46. Rasic JL, Kurmann JA. Yoghurt. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark. p. 103 (1978)
 47. Lee SH, Koo YJ, Shin DH. Physicochemical and bacteriological properties of yogurt made by single or mixed cultures of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. Korean J. Food Sci. Technol. 20: 140-147 (1988)
 48. Macura D, Townsley PM. Scandinavian ropy milk-identification and characterization of endogenous ropy *Lactic streptococcus* and their extracellular excretion. J. Dairy Sci. 67: 735-744 (1984)
 49. Pidoux M, Brillouet JM, Quemener B. Characterization of the polysaccharides from *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. Biotechnol. Lett. 10: 415-420 (1988)
 50. Bouzard F, Cerning J, Desmazeaud M. Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain stater cultures in yoghurt production. J. Dairy Sci. 80: 2310-2317 (1997)
 51. Bang BH, Seo JS, Jeong EJ, Kim KP. Studies on the manufacture of peanut yoghurt. Korean J. Food Nutr. 17: 53-59 (2004)
 52. Ruas-Madiedo P, Tuinier R, Kanning M, Zoon P. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. Int. Dairy J. 12: 689-695 (2002)
 53. Duboc P, Mollet B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. Int. Dairy J. 11: 759-768 (2001)
 54. Rhee, YH, Kang, MS. Physico-chemical characteristics and β -galactosidase activity of *Lactobacillus plantanum* from kimchi. Agr. Chem. Biotech. 39: 54-59 (1996)
 55. Seo DM, Kim SY, Eom HJ, Han NS. Synbiotic synthesis of oligosaccharides during milk fermentation by addition of *Leuconostoc stater* and sugar. J. Microbiol. Biotechnol. 17: 1758-1764 (2007)
 56. Aminigi ER, Metzger L, Lehtola PS. Biochemical composition and storage stability of a yogurt-like product from African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*). Int. J. Food Sci. Technol. 44: 560-566 (2009)
 57. Kristi E, Biliaderis CG, Tzanetakis N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. Int. Dairy. J. 13: 517-528 (2003)
 58. Donkor ON, Nilmini SLI, Stolic NP, Vasiljevic T, Shah NP. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. Int. Dairy. J. 17: 657-665 (2007)
 59. Akalin AS, Fenderya S, Akbulut N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. Int. J. Food Sci. Technol. 39: 613-621 (2004)
 60. MFDS. Food Standards Codex. Ministry of Food and Drug Safety. Cheongwon, Korea. p. 215 (2002)
 61. Hess SJ, Roberts RF, Ziegler GR. Rheological properties of non fat yoghurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharides or using commercial stabilizer system. J. Dairy Sci. 80: 252-263 (1997)
 62. Hehre EJ, Sugg JY. Serologically reactive polysaccharides produced through the action of bacterial enzyme: Dextran of *Leuconostoc mesenteroides* from sucrose. J. Exp. Med. 75: 339-353 (1942)