

## Fermentative characteristics of yogurt using lactic acid bacteria isolated from Korean traditional fermented food

Na-Young Park, Shin-Ho Lee\*

Department of Food Science and Technology, Daegu Catholic University, Gyeongsan 38430, Korea

### 전통 발효 식품에서 분리한 유산균을 이용한 yogurt 발효특성

박나영 · 이신호\*

대구가톨릭대학교 식품공학과

#### Abstract

The objective of this study was to select yogurt starter from Korean traditional fermented foods. The 2 strains (KM24, KM32) among 50 strains of isolated lactic acid bacteria selected as starter based on milk clotting ability, antimicrobial activity against various pathogens, tolerance in artificial gastric and bile juice and growth in 10 % skimmed milk. The strains were identified as *Lacobacillus plantarum* (KM32) and *Pediococcus pentosacesus* (KM24) by 16S rRNA gene sequencing. Viable cell number of yogurt fermented with mixed strains (KM24 and KM32) was 9.66 log CFU/mL after fermentation for 48 h and maintained 10<sup>9</sup> CFU/mL during fermentation for 72 h at 37°C. The pH and titratable acidity of mixed cultured yogurt were 4.25% and 0.83% after fermentation for 48 h at 37°C, respectively. The physico-chemical characteristics of mixed cultured yogurt after fermentation for 48 h were 38.45 µg/mL (polyphenol content), 48.57% (DPPH radical scavenging activity) and 465.40 cp (viscosity), respectively. The mixed cultured yogurt maintained 10<sup>9</sup> CFU/mL of lactic acid bacteria during storage 10 days at 4°C. The viable cell number of yogurt prepared with mixed culture(KM32+KM24) maintained higher and than that of control (*L. casei*) during storage. These results indicated the potential use of selected strains (KM32+KM24) isolated from kimchi as a yogurt starter with strong acid tolerance and probiotics properties.

Key words : lactic acid bacteria, yogurt, kimchi, probiotic

#### 서 론

Probiotics는 살아있는 미생물로 주로 인간의 장 건강에 유익한 영향을 미치며, 소화관의 안정성 유지, 설사 예방이나 증상의 완화, 콜레스테롤 수치의 감소, 고혈압 완화, 면역 체계의 개선 등의 효과가 알려져 있다(1). 최근 probiotics는 전 세계적으로 기능성식품 시장의 60-70% 차지하고 있으며, 그 종류도 매우 다양하게 출시되고 있다(2). 유산균은 probiotics로서 설사와 변비의 치료효과, 장내 유해균의 억

제, 비타민의 생성, 혈중콜레스테롤 저하능, 항암효과, 인체의 면역력 증강 등 다양한 기능성이 보고되고 있다(3). 대부분 산업적으로 이용되고 있는 probiotics는 인간의 장관이나 유제품 등에서 분리한 동물 유래 유산균이었으나, 최근 *Pediococcus*, *Leuconostoc* 속 등 식물유래 유산균이 probiotic 기능이 있다고 밝혀지고 있다(4). 요구르트는 발효 중 유산균이 생성한 산에 의해 우유 단백질인 casein의 안전성이 파괴되어 겔(curd)이 형성되며(5), 요구르트제조에 사용되는 probiotic 유산균은 pH 4.5 이하의 산성조건에서 내성이 있어야 하나(6), 인간의 장에서 분리한 유산균은 산성조건에 매우 민감하므로(7) 현재 발효유 제품 제조에 사용되는 유산균은 특히 내산성이 강한 균주를 사용하고 있으며, 위산과 담즙에 내성이 있어야 한다(8).

김치는 원재료들이 갖는 생리활성과 발효미생물인 유산균의 probiotics 기능을 동시에 갖는 채소 발효식품(9)으로

\*Corresponding author. E-mail : leesh@cu.ac.kr  
Phone : 82-53-850-3217, Fax : 82-53-850-3217  
Received 8 August 2017; Revised 18 August 2017; Accepted 21 August 2017.  
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

발효는 초기 원재료에 존재하는 여러 종의 미생물에 의해 시작되나 발효가 점차 진행됨에 따라 산도가 증가하여 유산균이 대부분 차지하게 된다. 김치는 pH 4.2이하, 적정산도 0.6% 상태에서 가장 풍미가 좋으며(10), 젖산균수는  $10^7$ - $10^9$  CFU/g(11)을 유지하고 있다. 김치 유산균은 김치의 pH 4.2 이하에서도 생육이 가능하므로 내산성이 있어 우유 응고능이 있는 김치 발효 유산균은 요구르트 제조에 사용이 가능할 것으로 판단된다. 최근 식혜, 막걸리, 김치 등 식물성 재료를 이용한 발효식품과 관련된 유산균의 영양학적, 약리학적 장점들이 알려지면서 항균활성 및 기능적 특성에 관한 연구(12-13)가 보고되고 있다.

본 연구는 유산발효를 하는 전통식품에서 요구르트 제조에 활용이 가능한 산내성이 있는 유산균을 분리하여 probiotics 기능을 검증하고 이를 이용한 요구르트 제조 중 발효특성 및 품질 특성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리 및 선발

균주의 분리원은 대구 경북지역에서 수집한 김치, 식혜, 막걸리, 물김치 등 전통 발효식품을 사용하였으며, 각 샘플을 직접 또는 적정 희석하여 0.02% sodium azide가 포함된 MRS Agar(Difco Co. Detroit, MI, USA)에 도말하고, 37°C에서 24시간 배양 후 나타난 특징적인 colony를 취하여 순수 분리한 50균주를 10% 탈지분유에 접종하여 37°C에서 48-72시간동안 배양한 후 응고현상을 보인 16균주를 선발하였다. 선발 균주는 MRS 사면배지에 접종하여 24시간 배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였다.

### 항균활성 측정

선발된 균주에 대한 항균활성은 *Listeria monocytogenes* ATCC19115, *Staphylococcus aureus* ATCC2937, *Bacillus cereus* ATCC14581, *Escherichia coli* ATCC11775, *Salmonella enteritidis* KCTC12400, *Vibrio vulnificus* ATCC 17802에 대해 paper disc method로 생육 억제환 생성 유무를 비교 측정하였다.

### 인공 위액 및 담즙산에 대한 내성 측정

Kobayashi 등(14)의 방법을 변형하여 내산성이 강한 균주를 선발하기 위하여 1 N HCl을 사용하여 pH 1.5로 조정된 nutrient broth(Difco Co., Detroit, MI, USA)에 pepsin 1%를 첨가한 인공 위액을 사용하였다. 선발 균주를 상기 인공위액에 접종하여 37°C에서 3시간 배양 후 1 mL를 취하여 0.1% pepton 용액으로 적정 희석하여 MRS agar(Difco Co.)에 접종, 37°C에서 24시간 배양 후 나타난 colony수를 계측하였다. 분리균주의 인공담즙 액에 대한 내성은 Lee 등(15)

의 방법으로 MRS broth에 pancreatin(Kanto Chemical, Tokyo, Japan) 1%를 첨가한 후 pH 8.3으로 조정하여 멸균시킨 후, 멸균된 10% Oxgall(Difco Co.) 용액 1%를 첨가한 배지를 사용하였으며, 인공위액에서 3시간 배양 후 원심분리하여 상등액을 제거한 균체에 인공담즙 액을 첨가하여 37°C에서 24시간 배양한 후 생균수를 측정 하였다.

### 환원 탈지유에서의 성장 검사

분리 유산균 중 항균활성, 내산성과 내담즙성이 있는 균주를 선발하여 24시간 배양한 배양액을 각각 고형분 함량 10% 멸균 환원탈지유에 3%(v/v) 접종하여 4일간 배양하면서 1일 간격으로 pH, 산도, 생균수를 측정비교 하였다.

### 균주의 동정

최종 선발된 균주를 Gram 염색, catalase test, API 50 CHL kit(BioMerieux Co., Marcy L'Etoile, France)간이 동정한 후 Zhang 등(16)의 27F(5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')와 1429R(5'-GGTTACCTTGTTCAGACTT-3') primer를 사용하여 RNA를 증폭 후 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 (Solgent Co., Daejeon, Korea) 확인하였다.

### 선발균주를 이용한 요구르트의 제조

내산성, 내담즙성, 항균활성, 환원탈지유에서 성장능 등이 우수한 2균주를 선발, 단독 및 혼합 starter로 10% 멸균 환원탈지유에 각각 3%(v/v) 접종한 후 4일간 배양하였으며, 대조군으로 발효가 비교적 완만하게 진행되는 요구르트 제조에 starter로 사용되는 *Lactobacillus casei*(CHR, Hansens Lab., Horsholm, Denmark)를 사용하였다.

### pH 및 적정산도 측정

발효 중 24시간 간격으로 각 시료 10 mL를 취하여 pH는 pH meter(Corning, pH meter 445, Medifield, MA, USA)로, 적정산도는 동일량의 시료에 0.1 N NaOH(Factor=1.001)를 pH가 8.3이 될 때까지 적정한 NaOH 용액의 소비량을 젖산으로 환산하였다.

### 유산균수 측정

발효 중 24시간 간격으로 시료 1 mL를 무균적으로 취한 후 0.1% pepton수로 적정 희석한 후 MRS agar(Difco.)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 나타난 colony수를 mL 당 colony forming unit(CFU)로 나타내었다.

### 점도 측정

점도는 발효가 완료된 요구르트 시료 10 g을 각각 취하여 Brookfield viscometer(LVDV-II, brookfield Engineering Lab Inc., Middleboro, MA, USA)의 18번 spindle을 사용, 1.5 rpm에서 5분경과 후 1분 간격으로 6회 측정하여 평균값

으로 나타내었다.

**총 폴리페놀 함량 측정**

Folin-Denis 법(17)에 따라 발효가 완료된 시료 1 mL에 0.2 N Folin-ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1 mL를 가하여 실온에서 3분간 반응시킨 후, 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL을 가하여 암소에서 1시간 동안 방치한 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 한 표준곡선에 의하여 산출하였다.

**DPPH radical 소거능 측정**

Blois의 방법(18)을 변형하여 발효가 완료된 요구르트와 95% ethanol를 1:1로 비율로 혼합, 24시간 추출한 후 4℃, 3,500 rpm에서 10분간 원심분리(Supra 21k, Hanil science industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)한 후 얻은 상등액을 여과지(Whatman No. 2, Maidstone, England)로 여과시켜 사용하였다. 시료 0.4 mL에 0.4 mM DPPH 에탄올 용액 0.8 mL를 가하여 진탕 혼합하고 상온에서 10분간 방치 후, 525 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 계산식, DPPH radical scavenging activity(%)=100-[(OD of sample/OD of control)×100]에 의하여 활성을 산출하였다.

**요구르트의 저장성**

10% 멸균 환원탈지유에 분리균주를 단독 및 혼합 접종하여 48시간 배양한 후 4℃에 10일간 저장하면서 저장 중 pH, 산도, 생균수의 변화를 비교하였다.

**통계처리**

모든 실험은 3회 반복으로 행하였으며, 유의성 검증은 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software package(version 19.0)를 이용, p<0.05수준으로 Duncan's multiple range test에 의하여 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**분리균주의 항균활성과 인공위액 및 인공 담즙액에 대한 내성**

분리한 50균주의 유산균중 커드형성 능력이 있는 16균주를 선발하여 그람 양성균인 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*와 그람 음성균인 *E. coli*, *S. enteritidis*, *V. vulnificus*에 대한 항균활성을 측정한 결과(Table 1) KM32 균주가 가장 우수한 항균활성을 나타내었다. 공시 균주 중 항균 spectrum이 비교적 넓은 9균주를 선발하여 다음 실험에 사용하였다.

**Table 1. Antimicrobial activity of isolated strains against various pathogens**

	A <sup>1)</sup>	B	C	D	E	F	G	H	shape	origin
KM2	+ <sup>2)</sup>	+	+	+	+	-	+	+	cocci	kimchi
KM9	+	+	+	+	+	-	+	+	cocci	kimchi
KM12	-	-	-	+	-	-	-	-	rod	kimchi
KM24	+	+	+	+	+	-	+	+	cocci	kimchi
KM29	-	-	+	+	+	-	-	-	rod	kimchi
KM32	+	+	+	+	+	+	+	+	rod	kimchi
KM38	-	-	-	-	+	-	-	-	cocci	kimchi
KM43	-	+	+	+	+	+	+	-	rod	kimchi
KM45	-	-	-	-	-	-	+	-	rod	mackuli
KM52	-	-	-	+	-	-	+	+	rod	sikhae
KM57	-	-	-	-	-	-	-	-	cocci	sikhae
KM63	-	+	+	+	-	-	+	+	rod	kimchi
KM69	-	-	-	-	-	-	-	-	rod	sikhae
KM72	-	+	+	+	+	-	+	+	rod	mulkimchi
KM75	-	-	-	-	-	-	-	-	rod	sikhae
KM82	-	-	+	+	+	-	+	+	rod	kimchi

<sup>1)</sup>A, *Bacillus cereus*, B, *Listeria monocytogenes*, C, *Staphylococcus aureus*, D, *E. coli*, E, *almonella Typhmuriium*, F, *Vibrio vulnificus*, G, *Salmonella enteritidis*.

<sup>2)</sup>+, positive; -, negative.

구강을 통해 섭취되는 probiotics는 강산성의 위산과 담즙산에서 살아남아 췌장과 십이지장을 통과하여 최종 목적 부위인 장에 도달하여야 정장의 효과를 발휘하게 된다(19). 항균활성이 우수한 9균주의 인공위액과 인공 담즙액에서 내성은 양호하였으며(Table 2), KM32는 본 실험에 사용한 pH를 1.5로 조정된 인공 위액에서 log reduction이 1.14를 나타내었고, 인공 담즙액에서는 생균수가 증가하는 경향

**Table 2. Viable cell of selected lactic acid bacteria after treatment in artificial gastric juice and bile acid at 37℃**

Strains <sup>1)</sup>	(log No. CFU/mL)			
	Acid tolerance		Bile Tolerance	
	Before <sup>2)</sup>	After <sup>3)</sup>	Before	After
KM2	8.22±0.09 <sup>4)ks5)</sup>	7.03±0.16 <sup>b</sup> (1.19) <sup>3)</sup>	7.66±0.05 <sup>ab</sup>	7.53±0.13 <sup>c</sup> (0.13)
KM9	8.39±0.12 <sup>bc</sup>	4.07±0.22 <sup>c</sup> (4.32)	7.46±0.02 <sup>de</sup>	7.71±.09 <sup>bc</sup> (-0.25)
KM24	8.45±0.12 <sup>b</sup>	6.44±0.08 <sup>d</sup> (2.01)	7.44±0.06 <sup>de</sup>	7.93±0.03 <sup>a</sup> (-0.49)
KM29	8.84±0.04 <sup>a</sup>	6.81±0.04 <sup>c</sup> (2.03)	7.62±0.06 <sup>abc</sup>	7.66±0.12 <sup>c</sup> (-0.04)
KM32	8.79±0.07 <sup>a</sup>	7.65±0.06 <sup>a</sup> (1.14)	7.54±0.08 <sup>bcd</sup>	8.32±0.04 <sup>a</sup> (-0.78)
KM43	8.48±0.17 <sup>b</sup>	7.21±0.11 <sup>b</sup> (1.28)	7.50±0.12 <sup>cde</sup>	5.86±0.07 <sup>e</sup> (1.64)
KM63	8.32±0.08 <sup>bc</sup>	6.72±0.07 <sup>c</sup> (1.60)	7.47±0.05 <sup>de</sup>	6.73±0.05 <sup>d</sup> (0.74)
KM72	8.87±0.04 <sup>a</sup>	7.73±0.04 <sup>a</sup> (1.15)	7.40±0.10 <sup>e</sup>	6.70±0.20 <sup>d</sup> (0.71)
KM82	8.92±0.04 <sup>a</sup>	7.14±0.06 <sup>b</sup> (1.79)	7.68±0.06 <sup>a</sup>	6.51±0.31 <sup>d</sup> (1.17)

<sup>1)</sup>lactic strains isolated from korean traditional fermented foods.

<sup>2)</sup>Survival cell in artificial gastric juice (pH=1.5) for 3 h at 37℃.

<sup>3)</sup>Survival cell in artificial bile acid for 24 h at 37℃ treated with artificial gastric juice for 3 h at 37℃.

<sup>4)</sup>log reduction. Value are means±SD of triplicate determinations.

<sup>5)abc</sup>Means within each column with no common superscripts are significantly different (p<0.05).

(log reduction, -0.78)을 나타내어 소화기관을 통과하는 동안 우수한 생존율을 나타낼 수 있을 것으로 판단되었다. 내산성이 매우 강하고 담즙액에 대한 내성이 우수한 KM2, KM24, KM32 그리고 KM 72 균주를 선발하여 환원탈지유에서 배양특성을 비교하였다.

#### 선발균주의 환원탈지유에서 배양특성과 동정

요구르트 starter로 이용 가능성을 검증하기 위하여 KM2, KM24, KM32와 KM72균주의 환원 탈지유에서 배양 중 생균수, pH, 산도의 변화를 Table 3에 나타내었다. KM24 균주가 가장 높은 생균수를 나타내어 배양 4일 동안  $10^9$  CFU/mL을 유지하였다. pH의 변화는 KM24 균주의 경우 배양 초기부터 감소하여 배양 2일째 pH 4.60으로 낮아져 배양 3일 이후 4.10 이하를 나타내었다. 산도의 변화도 pH와 유사한 경향을 나타내었으며 KM24의 경우 배양 2일째 0.87%, 배양 3일 이후 1.04%를 유지하였다. 요구르트내 유산균수는  $10^7$ - $10^8$  CFU/mL 이상(20), pH는 4.1-4.2(21), 적성산도의 범위는 0.95-1.20%로 제시한 Rasic과 Kurmann(5) 등의 결과와 비교하면 공시균주는 환원탈지유에서 성장은 양호하나 완만하게 산을 생성하여 요구르트 제조를 위해 배양기간이 2일 이상 필요한 것으로 판단되었다. KM24(구균) 균주만 단독으로 요구르트 제조용 starter로 사용이 가능할 것으로 사료되었으나, 내산성과 담즙액 내성 그리고 환원탈지유에서의 양호한 성장을 나타낸 KM32(간균)가 KM24와 발효 중 구균인 *S. thermophilus* 와 간균인 *L. bulgaricus*와 같은 상호작용이 가능할 것으로 판단되어 두 균주를 선발하여

**Table 3. Changes of viable cell, pH and titratable acidity in 10% skim milk inoculated with isolated lactic strains during fermentation for 4 days at 37°C**

	Strains	Fermentation time (day)				
		0	1	2	3	4
Viable cell (log No. CFU/mL)	KM2	7.18±0.13 <sup>1a2)</sup>	9.03±0.04 <sup>b</sup>	9.61±0.20 <sup>ab</sup>	8.98±0.03 <sup>b</sup>	8.60±0.07 <sup>c</sup>
	KM24	7.57±0.54 <sup>a</sup>	8.74±0.07 <sup>c</sup>	9.56±0.22 <sup>ab</sup>	9.37±0.23 <sup>a</sup>	9.03±0.03 <sup>a</sup>
	KM72	7.30±0.07 <sup>a</sup>	7.44±0.06 <sup>d</sup>	9.35±0.22 <sup>b</sup>	8.81±0.02 <sup>b</sup>	8.61±0.03 <sup>c</sup>
	KM32	7.07±0.09 <sup>a</sup>	9.19±0.12 <sup>a</sup>	9.80±0.06 <sup>a</sup>	8.99±0.02 <sup>b</sup>	8.77±0.03 <sup>b</sup>
pH	KM2	6.50±0.02 <sup>b</sup>	5.34±0.03 <sup>b</sup>	4.96±0.06 <sup>b</sup>	4.64±0.02 <sup>b</sup>	4.72±0.04 <sup>a</sup>
	KM24	6.41±0.02 <sup>c</sup>	5.03±0.08 <sup>c</sup>	4.60±0.05 <sup>c</sup>	4.12±0.02 <sup>c</sup>	4.10±0.02 <sup>d</sup>
	KM72	6.49±0.01 <sup>b</sup>	6.10±0.02 <sup>a</sup>	5.46±0.05 <sup>a</sup>	4.85±0.02 <sup>a</sup>	4.63±0.03 <sup>b</sup>
	KM32	6.54±0.03 <sup>a</sup>	5.39±0.01 <sup>b</sup>	4.88±0.03 <sup>b</sup>	4.64±0.04 <sup>b</sup>	4.50±0.03 <sup>c</sup>
Titratable acidity (%)	KM2	0.21±0.01 <sup>b</sup>	0.63±0.01 <sup>ab</sup>	0.73±0.01 <sup>c</sup>	0.88±0.01 <sup>ab</sup>	0.91±0.03 <sup>a</sup>
	KM24	0.22±0.01 <sup>ab</sup>	0.79±0.01 <sup>a</sup>	0.87±0.01 <sup>a</sup>	1.04±0.02 <sup>a</sup>	1.02±0.02 <sup>b</sup>
	KM72	0.22±0.01 <sup>ab</sup>	0.43±0.01 <sup>b</sup>	0.70±0.01 <sup>d</sup>	0.76±0.04 <sup>b</sup>	0.80±0.01 <sup>ab</sup>
	KM32	0.23±0.01 <sup>a</sup>	0.64±0.01 <sup>ab</sup>	0.77±0.01 <sup>b</sup>	0.86±0.01 <sup>ab</sup>	0.81±0.01 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>Value are means±SD of triplicate determinations.

<sup>2)a-c</sup>Means within each column with no common superscripts are significantly different (p<0.05).

단독 및 혼합배양 효과를 검토하였다.

선발된 2 균주를 16S rRNA 염기서열 분석을 이용하여 동정 결과(Table 4), KM24는 gram positive, cocci, catalase negative였으며, *Pediococcus pentosaceus*로 동정되었다. KM32는 gram positive, rod, catalase negative로 *Lactobacillus plantarum*로 동정되었다.

**Table 4. Identification of selected lactic acid bacteria by 16S rRNA gene sequencing**

Strains	Source	Gram staining	Shape	Catalase test	Identification (Similarity, %)
KM24	Kimchi	+	cocci	-	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (99%)
KM32	Kimchi	+	rod	-	<i>Lactobacillus plantarum</i> (100%)

#### 단독 및 혼합균주의 요구르트 발효특성

비교적 산 생성이 완만한 요구르트 starter로 사용되는 *Lactobacillus casei*(대조구), 분리균주인 *P. pentosaceus* KM32와 *L. plantarum* KM24 균주를 단독(단독접종구) 및 혼합접종(혼합 접종구)하여 요구르트 제조 중 발효특성을 비교하였다(Table 5). 유산균수는 모든 처리구에서 배양 24 시간째  $10^8$  CFU/mL 이상이었으며 배양 72시간까지 동일한 수준을 유지하였다. 혼합 접종구에서 배양 48시간과 배양 72시간째 각각 9.66 log CFU/mL과 9.58 log CFU/mL을 나타내어 대조구보다 양호하였다. 이 결과는 김치에서 분리한

**Table 5. Changes in viable cell, pH and titratable acidity of yogurt fermented with single and mixed starter during fermentation for 72 h at 37°C**

Samples <sup>1)</sup>		Fermentation time (h)			
		0	24	48	72
Viable Cell (log No. CFU/mL)	KM32	7.10±0.07 <sup>2b3)</sup>	8.94±0.04 <sup>b</sup>	8.70±0.09 <sup>c</sup>	8.59±0.03 <sup>d</sup>
	KM24	7.16±0.08 <sup>b</sup>	9.19±0.09 <sup>a</sup>	8.99±0.06 <sup>b</sup>	9.03±0.04 <sup>b</sup>
	KM32+KM24	7.24±0.17 <sup>ab</sup>	8.86±0.06 <sup>b</sup>	9.66±0.09 <sup>a</sup>	9.58±0.07 <sup>a</sup>
pH	Control	7.66±0.07 <sup>a</sup>	9.16±0.03 <sup>a</sup>	9.09±0.06 <sup>b</sup>	8.93±0.06 <sup>c</sup>
	KM32	6.55±0.03 <sup>a</sup>	5.44±0.01 <sup>a</sup>	4.74±0.02 <sup>a</sup>	4.50±0.01 <sup>a</sup>
	KM24	6.54±0.01 <sup>a</sup>	4.97±0.01 <sup>d</sup>	4.31±0.01 <sup>b</sup>	4.09±0.01 <sup>b</sup>
Titratable acidity (%)	KM32+KM24	6.48±0.02 <sup>b</sup>	5.04±0.01 <sup>c</sup>	4.25±0.01 <sup>c</sup>	4.04±0.01 <sup>c</sup>
	Control	6.39±0.01 <sup>c</sup>	5.17±0.01 <sup>b</sup>	3.77±0.01 <sup>d</sup>	3.46±0.01 <sup>d</sup>
	KM32	0.20±0.01 <sup>b</sup>	0.43±0.01 <sup>d</sup>	0.68±0.01 <sup>d</sup>	0.76±0.01 <sup>d</sup>
Titratable acidity (%)	KM24	0.20±0.01 <sup>b</sup>	0.76±0.01 <sup>a</sup>	0.85±0.01 <sup>b</sup>	0.88±0.01 <sup>c</sup>
	KM32+KM24	0.20±0.01 <sup>b</sup>	0.71±0.01 <sup>c</sup>	0.83±0.01 <sup>c</sup>	0.99±0.01 <sup>b</sup>
	Control	0.22±0.01 <sup>a</sup>	0.76±0.01 <sup>b</sup>	0.99±0.01 <sup>a</sup>	1.24±0.01 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Control, *Lactobacillus casei*, KM32, *Pediococcus pentosaceus*, KM24, *Lactobacillus plantarum*, KM32+KM24, *P. pentosaceus*+*L. plantarum*

<sup>2)</sup>Value are means±SD of triplicate determinations.

<sup>3)a-d</sup>Means within each column with no common superscripts are significantly different (p<0.05).

*L. plantarum*을 환원탈지유에서 24시간 배양 후 108 CFU/mL 이었다는 Jeong 등(22)의 결과 보다 양호하였다. 분리 균주를 복합으로 사용할 경우 비교적 유산균을 많이 함유하는 요거트 제조가 가능할 것으로 판단되었다. pH 변화는 배양 48시간째 대조구(3.77), KM24 단독 접종구와 혼합 접종구에서 각각 4.31과 4.25이었다. 산도의 변화는 pH 변화와 유사하여 배양 48시간 후 KM32(0.68%), KM24 (0.85%), 혼합 접종구(0.83%), 대조구(0.99%)이었으며, KM32 단독 접종구를 제외하고 각 처리구 공히 배양 72시간 후 0.88-1.24%의 범위를 나타내었다. 혼합 접종구는 대조구에 비해 산생성은 완만하였으나 유산균수는 많았다. 이러한 결과를 김치에서 선발한 유산균을 이용한 요거트 제조 중 배양 24시간 이후 pH는 4.3이었다는 결과(23)와 탈지유로 제조한 요거트의 pH 범위는 4.01-4.27, 산도는 0.82-1.15%(24), mild 요거트와 acid 요거트의 적정산도 범위는 각각 0.85- 0.95%와 0.951-1.20%(5)라는 결과와 비교해 볼 때 KM32와 KM24혼합균주는 mild요거트 제조에 적합하다고 판단되며, 산 생성이 완만하여 배양시간이 48시간 이상 필요할 것으로 사료되었다.

**총 폴리페놀함량, DPPH 라디칼 소거능, viscosity 비교**

요거트의 항산화 활성과 점도의 비교는 Table 6에서 보는 바와 같이 KM24 단독 접종구가 총 폴리페놀함량 (41.56 µg/mL)이 가장 높았으며, DPPH 라디칼 소거능도 KM24 접종구가 가장 높은 52.54%로 혼합 접종구(48.57%)와 대조구(48.22%)에 비해 항산화 활성이 가장 우수하였다.

**Table 6. Comparison of antioxidative activity and viscosity of yogurt fermented single and mixed starter**

	Samples <sup>1)</sup>			
	KM32	KM24	KM32+KM24	Control
Total polyphenol (µg/mL)	33.15±0.09 <sup>2)(k3)</sup>	41.56±0.05 <sup>a</sup>	38.45±0.30 <sup>c</sup>	38.86±0.07 <sup>b</sup>
DPPH radical scavenging activity (%)	44.42±0.13 <sup>c</sup>	52.54±0.15 <sup>a</sup>	48.57±0.30 <sup>b</sup>	48.22±0.11 <sup>b</sup>
Viscosity (cp)	135.20±1.49 <sup>d</sup>	675.30±1.45 <sup>a</sup>	465.40±2.30 <sup>c</sup>	548.80±2.20 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Control, *Lactobacillus casei*, KM32, *Pediococcus pentosaceus*, KM24, *Lactobacillus plantarum*, KM32+KM23, *P. pentosaceus*+*L. plantarum*

<sup>2)</sup>Value are means±SD of triplicate determinations except viscosity (n=6).

<sup>3)a-d</sup>Means within each row with no common superscripts are significantly different (p<0.05).

요거트 제조용 starter YC-380을 이용한 요거트의 DPPH 라디칼 소거능이 24.5% 였다는 보고(24)와 비교할 때 혼합 접종구의 항산화활성은 비교적 양호한 것으로 판단된다. 요거트의 점도는 소비자의 기호성에 영향을 미치는 주요 요인으로 KM24 접종구의 점도(675 cp)가 가장 높았으며, 혼합 접종한 경우 465 cp로 감소하였다. 요거

트의 점도는 요거트 혼합액의 총 고형분 함량과 단백질 가수분해정도, starter의 산과 slime 생성능력에 의해 영향을 받는다(5). 요거트의 지방함량이 감소할수록 강도가 약한 겔을 형성하게 되어 물성학적 특성이나 조직특성, 맛, 풍미 등에 바람직하지 못한 영향을 미치게 된다(25). 공시 요거트의 낮은 점도는 본 연구에 사용한 환원탈지유의 지방 및 고형분 함량(10%)과 KM32의 낮은 산생성 능력 (Table 5)에 기인된 것으로 판단된다.

**요거트의 저장성**

요거트를 4°C에서 10일간 저장 중 유산균수, pH, 산도의 변화는 Table 7에서 보는 바와 같다. 혼합 접종구의 경우 전 저장 기간 동안 가장 높은 유산균수를 유지하였으며, 저장 10일째 9.28 log CFU/mL이었다. pH는 모든 처리구에서 저장기간 동안 저장 초기와 유사하였으나, KM32 접종구는 점차 증가하여 저장 초기 pH 4.54에서 저장 10일째 5.17로 증가하였다. 이는 저장 중 KM32 균주의 단백질 분해능에 의한 단백질 분해현상에 기인된 것으로 사료된다.

**Table 7. Changes in pH, titratable acidity and lactic acid bacteria of yogurt fermented with single and mixed starter during storage for 10 days at 4°C**

	Samples <sup>1)</sup>	Storage period (day)		
		0	5	10
Lactic acid bacteria (log No. CFU/mL)	KM32	8.59±0.03 <sup>2)(b3)</sup>	9.11±0.08 <sup>b</sup>	8.49±0.03 <sup>a</sup>
	KM24	8.57±0.07 <sup>b</sup>	8.90±0.08 <sup>c</sup>	8.33±0.03 <sup>b</sup>
	KM32+KM24	9.03±0.04 <sup>a</sup>	9.36±0.04 <sup>a</sup>	9.28±0.08 <sup>a</sup>
	Control	8.95±0.02 <sup>a</sup>	8.76±0.05 <sup>d</sup>	8.49±0.02 <sup>a</sup>
pH	KM32	4.54±0.07 <sup>a</sup>	4.76±0.03 <sup>a</sup>	5.17±0.06 <sup>a</sup>
	KM24	4.10±0.02 <sup>b</sup>	4.29±0.01 <sup>b</sup>	4.28±0.03 <sup>b</sup>
	KM32+KM24	3.98±0.06 <sup>b</sup>	4.16±0.02 <sup>c</sup>	4.29±0.01 <sup>b</sup>
	Control	3.55±0.10 <sup>c</sup>	3.42±0.03 <sup>d</sup>	3.46±0.04 <sup>c</sup>
Titratable acidity (%)	KM32	0.75±0.01 <sup>d</sup>	0.81±0.01 <sup>d</sup>	0.54±0.01 <sup>d</sup>
	KM24	0.85±0.00 <sup>c</sup>	0.96±0.04 <sup>c</sup>	0.75±0.01 <sup>c</sup>
	KM32+KM24	0.99±0.01 <sup>b</sup>	1.07±0.01 <sup>b</sup>	0.86±0.04 <sup>b</sup>
	Control	1.25±0.01 <sup>a</sup>	1.35±0.01 <sup>a</sup>	1.08±0.01 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Control, *Lactobacillus casei*, KM32, *Pediococcus pentosaceus*, KM24, *Lactobacillus plantarum*, KM32+KM23, *P. pentosaceus*+*L. plantarum*

<sup>2)</sup>Value are means±SD of triplicate determinations.

<sup>3)a-d</sup>Means within each column with no common superscripts are significantly different (p<0.05).

산도의 변화는 저장 5일까지는 다소 증가하다가 그 이후 감소하였다. 혼합 접종구는 대조구에 비해 유산균수는 높고, 산생성 능력이 낮아 pH는 높고, 산도는 낮은 경향을 나타내었다. 유산균의 probiotics 효과를 기대할 수 있는 요거트의 유산균수는 섭취 전 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> CFU/g이어야 하며, 적어도 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> CFU/g 장에 도달하여야 한다(26). 혼합 접종구는 배양 및 저장기간 동안 10<sup>9</sup> CFU/mL을 유지하여 섭취

시 probiotics 효과가 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과로 미루어 보아 김치에서 분리한 *P. pentosaceus* (KM24)와 *L. plantarum*(KM32)는 내산성이 강하고 probiotics 기능이 있으며 발효 및 저장중 높은 수준의 생균수를 유지하므로 요구르트 제조 시 단독 사용보다는 복합 starter로 사용이 가능할 것으로 판단된다. 상업적으로 활용할 경우 당과 고형분 첨가 등 산 생성을 촉진시키는 방안과 발효 온도 등 적정 발효조건 구명과 품질 개선 등에 관한 광범위한 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

전통식품에서 요구르트 제조 가능한 유산균을 선별하기 위하여 김치, 식혜 막걸리에서 분리한 유산균 50균주 중 커드 형성 능력이 있는 16균주를 선별, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *V. vulnificus*에 대한 항균활성과 인공 위액과 담즙액에 대한 내성이 우수한 4 균주를 선별하였다. 4균주의 환원탈지유에서 배양특성 비교. 항균활성과 인공 위액과 담즙에서의 내성 등을 고려하여 KM24(구균)와 KM32(간균)을 최종 선별하여 동정한 결과 각각 *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*로 동정되었다.

요구르트 제조 중 유산균수는 KM24와 KM32균주 혼합 접종구가 가장 높았으며, 배양 48시간째 9.66 log CFU/mL을 나타내었다. pH는 배양 48시간째 각각 4.25(혼합 접종구), 3.77(대조구)을 나타내었다. 산도의 변화는 pH 변화와 유사하여, 배양 72 시간 후 KM32 단독 접종구를 제외하고 0.88-1.24%의 범위를 나타내었다. 혼합 접종구와 대조구의 총 폴리페놀함량은 각각 38.45와 38.86 µg/mL이었다. DPPH 라디칼 소거능은 KM24 접종구가 가장 높은 52.54%로, 혼합 접종구(48.57%)와 대조구(48.22%)에 비해 항산화 활성이 우수하였다.

혼합 접종구의 경우 4°C에서 10일간 저장 중 가장 높은 유산균수를 유지하였으며, 저장 10일째 9.28 log CFU/mL이었다. pH는 KM32 접종구를 제외하고 저장기간 동안 저장 초기와 유사하였으며, 산도는 저장 5일까지는 다소 증가하다가 그 이후 감소하였다. 혼합 접종구는 대조구에 비해 유산균수는 높았으나 pH는 높고, 산도는 낮은 경향을 나타내었다. 이상의 결과를 미루어 보아 분리균주인 KM24와 KM32는 요구르트 제조 시 복합 starter로 사용이 가능할 것으로 판단되었다.

## 감사의 글

이 논문은 대구가톨릭대학교 교내연구비 지원에 의한 것입니다. 지원에 감사드립니다.

## References

- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289
- Mohammadi R, Sohrabvandi S, Mortazavian AM (2012) The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. *Eng Life Sci*, 12, 399-409
- Gilliland SE (1990) Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 87, 175-188
- Jonganurakkun B, Wang Q, Xu SH, Tada Y, Minamida K, Yasokawa D, Sugi M, Hara H, Asano K (2008) *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *J Biosci Bioeng*, 106, 69-73
- Rasic JL, Kurmann JA (1978) Yogurt. In: *Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations*, Techical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark, p 369-380
- Vinderola CG, Bailo N, Reinheimer JA (2000) Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Res Int*, 33, 97-102
- Park YS, Lee JY, Kim YS, Shin DH (2002) Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from *Dongchimi*. *J Agric Food Chem*, 50, 2531-2536
- Gilliland SE (2003) Probiotics. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, 2<sup>nd</sup> ed, Caballero B, Finglas P, Talora F (Editor), Academic Press, Cambridge, MA, USA, p 4792-4798
- Lee H, Yoon H, Ji Y, Kim H, Park H, Lee J, Shin H, Holzapfel W (2011) Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *Int J Food Microbiol*, 145, 155-161
- Mheen TI, Kwon TW (1984) Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. *Korean J Food Sci Technol*, 16, 443-450
- Lee CW, Ko CY, Ha DM (1992) Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor J Appl Microbiol, Biotechnol*, 20, 102-109
- Kim SY, Kim ID, Son JS, Lee SK, Park KJ, Park MS (2011) Biochemical and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J Food Sci Technol*, 43, 446-452
- Ko KH, Liu W, Lee HH, Yin J, Kim IC (2013) Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in

- different kimchi. J Korean Soc Food Sci Nutr, 42, 89-95
14. Kobayashi Y, Toyama K, Terashima T (1974) Biological characteristics of *Lactobacillus*. II. Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *Lactobacillus casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. Japanese J Microbiol, 29, 691-697
  15. Lee SH, No MJ (1997) Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from kimchi. Korean J Appl Microbiol Biotechnol, 6, 617-622
  16. Zhang Y, Xu J, Yuan Z, Xu H, Yu Q (2010) Artificial neural network-genetic algorithm based optimization for the immobilization of cellulase on the smart polymer Eudragit L-100. Bioresour Technol, 101, 3153-3158
  17. Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem, 12, 239-243
  18. Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
  19. Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T (2000) Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. J Biotechnol, 84, 197-215
  20. KFIA (2002) Korean Food Standards Codex. Korea Food Industry Association, Seoul, Korea, p 215
  21. Lee BJ, Jinhao C, Park OS, Goh JS, Ahn TS, Park SY (1999) Stability and gastric acid resistance of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in commercial yogurts. Korean J Microbiol, 35, 89-93
  22. Jeong SY, Lee YH, Kang SA, Shin BK, Park SM (2016) Exploration of optimal *Lactobacillus plantarum* strains for curdling milk for yogurt and evaluation of physicochemical and sensory properties. Korean J Food Sci Technol, 48, 548-554
  23. Kim MJ, Lee SH (2017) Quality and fermentative characteristics of yogurt added with hot water extract of Welsh onion root. Korean J Food Preserv, 24, 387-393
  24. Salvador A, Fiszman SM (2004) Textural and sensory characteristics of whole and skimmed flavored set-type yogurt during long storage. J Dairy Sci, 87, 4033-4041
  25. Lobato-Calleros C, Ramirez-Santiago C, Vernon-Carter EJ, Alvarez-Ramirez J (2014) Impact of native and chemically modified starches addition as fat replacers in the viscoelasticity of reduced-fat stirred yogurt. J Food Eng, 131, 110-115
  26. Muniandy P, Shori AB, Baba AS (2017) Comparison of the effect of green, white and black tea on *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus* spp. in yogurt during refrigerated storage. J Assoc Arab Univ Basic Appl Sci, 22, 26-30