김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* LHC52의 항균활성과 요구르트의 관능성 연구

이승규 · 한기성 · 정석근 · 오미화 · 장애라 · 김동훈 · 배인휴¹ · 함준상*

농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과, ¹순천대학교 동물자원과학과

A Study on the Sensory Characteristic of Yogurt and Antimicrobial Activity of *Lactobacillus plantarum* LHC52 Isolated from Kimchi

Seung-Gyu Lee, Ki-Sung Han, Seok-Geun Jeong, Mi-Hwa Oh, Aera Jang,
Dong-Hun Kim, In-Hyu Bae¹, and Jun-Sang Ham*

Division of Quality Control and Utilization of Animal Products, National Institute of Animal Science, RDA,
Suwon 441-706, Korea

¹Department of Animal Science and Technology, Sunchun University, Sunchun 200-701, Korea

Abstract

The aim of our study was to develop a new starter culture for fermented milk. Polymerase chain reaction screening of 103 acid-producing isolates from Kimchi identified 72 *Lactobacillus* strains. The ability of the strains to inhibit the growth of the food-borne human pathogens (*Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus*) was measured, using a conventional paper disk method. Among the 72 strains, strain LHC52 displayed potent antagonistic activity. Use of 16S rDNA sequencing and the API 50CHL system identified the strain as *Lactobacillus plantarum* and it was designated *L. plantarum* LHC52. Biochemical analyses revealed especially high antibacterial activity against *E. coli*. Yogurt produced using *L. plantarum* LHC52 did not show different microbiological and physicochemical properties compared to conventionally-prepared yogurt, implicating *L. plantarum* LHC52 as a useful, potentially antibacterial starter culture for yogurt preparation.

Key words : Kimchi, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, antibacterial activity, fermented milk

서 론

우유나 식품발효에 사용되는 유산균은 자연계에 널리 분포하는 미생물로서 김치를 비롯한 다양한 식품에서 발견된다. 식품발효에 이용되는 미생물 중에서 유산균은 기능성 probiotics로서 가장 주목되고 있는 유익한 세균으로서 인체에 대한 영양효과 뿐만 아니라 다양한 생리적 기능을 담당한다고 보고되었다(Jeon *et al.*, 2007; Sanders and Huis in't Veld, 1999).

김치의 발효 과정에서 나타나는 유산균은 초기에 *Leuconostoc mesenteroides*가 우세 균종으로 김치 내용물을 산성화하여 혐기적 상태로 유지하며 호기성 세균의 성장을 억제하나 그 이후에는 *Lactobacillus plantarum*균종

이 나타나는 것으로 알려져 있다(Mheen and Kwon, 1984; Lee and Kang, 1996). 김치의 발효에 관여하는 미생물의 증식양상은 배추의 품종(Lee *et al.*, 1994), 발효온도와 염분(Ko *et al.*, 1994)등에 의해 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있고, 특히 온도의 영향이 가장 큰 요인으로 알려져 있다(Park *et al.*, 1994). 김치 유산균들 중 *L. plantarum*은 20-30°C의 중온 발효 시에 가장 우세 미생물로 나타난다(So and Kim, 1995).

최근 *L. plantarum*의 보고를 살펴보면 milk-soymilk에 *L. plantarum* 균주 단독 또는 *Momordica charantia*와 혼합해서 제조한 발효유를 고지혈 hamster에 급여 시 콜레스테롤이 감소하였고(Tsai, 2009), *L. plantarum* MA12 균주 powder를 고 콜레스테롤 rat에 급여 결과 콜레스테롤 감소 효과를 확인하였다(Wang, 2009). 그리고 *L. plantarum* PH04를 고지혈 마우스에 급여 결과 분(fecal)에서 유산균 수가 증가하고 반면 콜레스테롤 수치가 약 10% 감소(Nguyen, 2007)하였다는 콜레스테롤의 감소 효과들에 관

*Corresponding author : Jun-Sang Ham, Quality Control and Utilization of Animal Products Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea. Tel: 82-31-290-1692, Fax: 82-31-290-1697, E-mail: hamjs@korea.kr

한 연구들이 보고되었다. 그리고 *L. plantarum* KC21에 의해 생성되는 유기산과 박테리오신에 의한 항균활성 측정 결과 *Staphylococcus aureus*에 대해 약 70%의 항균력이 있다는 보고(Lim and Im, 2008), *L. plantarum* LP31에서 생산되는 새로운 박테리오신 Plantaricin이 병원성 미생물(*Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*)의 성장을 억제한다는 보고(Muller et al., 2009)와 *L. plantarum* C11 유산균에서 박테리오신 생산은 전사활성물질 PlnC와 억제물질 PlnD의 반응 조절은 quorum sensing(정족수 인식) pathway를 통하여 조절된다는 보고(Straume et al., 2009) 등 국내·외에서 *L. plantarum*에 대한 항균력과 콜레스테롤의 감소효과에 대한 많은 연구들이 보고되었다.

유산균을 이용한 항균효과에 관한 연구가 최근 많이 이루어지고 있는 이유는 무분별한 항생제 사용으로 인한 세계적으로 문제가 되고 있는 항생제 내성균을 줄일 수 있는 해결책 중 하나로 유산균이 생산하는 박테리오신과 같은 천연 항균제의 개발이 무엇보다 중요하기 때문이다. 이와 같은 박테리오신 생산 유산균을 이용한 많은 항균활성 연구가 이루어짐에도 불구하고 항균력을 가진 김치유산균 스타터를 이용한 발효 유제품 제조의 예는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 김치에서 병원성 미생물에 대한 항균활성이 강한 유산균을 분리하여 균의 특성을 조사하고 발효 유제품의 스타터로서의 사용 적합성을 확인 후 요구르트 제조를 통한 관능적 특성을 파악하기 위함이다.

재료 및 방법

재료

배추김치는 경기지역의 식품회사 두 곳(풍미식품, 일품김치)에서 판매하는 상업용 김치를 구입하여 실험에 사용하였다. 발효유 제조에 사용된 우유는 국립축산과학원 실험 목장에서 착유한 우유를 사용하였으며, 발효균주는 상업용 균주인 ABT-5(*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus thermophilus*, Chr. Hansen, Denmark), ST-B01(*Streptococcus thermophilus*, Chr. Hansen, Denmark)와 LH-B02(*Lactobacillus helveticus*, Chr. Hansen, Denmark)를 사용하였다.

유산균 분리 및 배양

김치 유산균 분리를 위해 구입 당일의 김치 시료와 저장 온도 별, 저장 기간 별로 달리한 7종류(구입당일, 4°C-5일, 4°C-10일, 4°C-20일, 20°C-5일, 20°C-10일, 20°C-20일 숙성)의 김치시료 50 g을 각각 분쇄하였다. 분쇄한 김치시료를 각각 Sterile Filter Bag(BLD Science, USA)에 넣고 circulator stomacher(Stomacher 400, Seward, UK)를 이용하여 액상 부분만을 분리하였다. 분리된 시료 1 mL을 취

하여 십진 희석법으로 희석 후 100 µL를 MRS agar plate에 도말(spread)하여 37°C 배양기에 48시간 배양하며 균을 관찰하였다. 각 시료별 단일 집락(colony) 20개를 무작위로 선별하여 BCP 한천배지(Difco, USA)에 획선평판법(streak plate)으로 분리 접종 후 37°C 배양기에 24시간 배양하여 산 생성에 의해 집락 주위가 노란색으로 변하는 균을 확인하였다. 확인된 균을 MRS액체 배지에 접종 후 37°C에서 16시간 배양하여 30% glycerol stock을 제조하여 초저온 냉동고(-70°C)에 보관하여 실험에 사용하였다.

피검 균주의 배양

실험에 사용된 피검 균주로는 병원성 세균인 *Escherichia coli* K99, *Staphylococcus aureus* KCTC 2618, *Salmonella Enteritidis* ATCC 49223을 사용하였다. *S. aureus*는 brain heart infusion(BHI; Difco, USA) broth를 *E. coli*는 Luria-Bertani(LB; Difco, USA) broth를 사용하였고, *S. Enteritidis*는 Tryptic Soy broth(TSB; Difco, USA)를 사용하였다.

분리균의 항균 활성 시험

김치 분리균 배양액 1.5 mL을 원심분리(12,000×g, 10 min, 4°C)한 후 상등액을 0.45 µm syringe filter를 사용하여 제균하였다. 제균된 상등액을 1 N NaOH로 pH 7.0으로 보정한 후 분리균주의 병원성 미생물(*E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*)에 대한 항균 활성 측정을 위해 paper disk method(Kim et al., 1999)를 사용하여 screening하였다. 지시균주가 도말된 평판배지 위에 6 mm 직경의 paper disk(Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 놓고 40 µL 씩 일정하게 가한 후에 감수성 세균은 37°C에서 24시간 동안 배양하여 분리균주가 생산하는 항균 물질에 의한 생육 저지환 생성 여부를 관찰하였다.

분리 균의 확인

분리 균의 유산균 판별을 위하여 DNeasyTissue kit(Qiagen, USA)을 사용하여 Genomic DNA를 추출하였고, DNA 시료는 -20°C 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다. 추출한 Genomic DNA 2 µL(1 µg/µL)에 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 제작한 유산균 16S rRNA specific primer(Leuconostoc-F; 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', Leuconostoc-R; 5'-AGAAAGGAG GTGATCCAGCC-3', Lactobacilli-F1; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', Lactobacilli-R1; 5'-TCTACGCATTCCACCGCTAC-3', Lactobacilli-F2; 5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3', Lactobacilli-R2; 5'-GGGTTCGCTCGTTG-3', Lactobacilli-F3; 5'-AAACTCAAAGGA ATTGACGG-3', Lactobacilli-R3; 5'-AAGGAGGTGATC-CAGCC-3') forward, reverse primer 각각 1 µL(10 pM/µL)와 Accupower preMix(Bioneer, Korea)를 사용하여 PCR 방법으로 DNA를 증폭하였다. 증폭 산물 10 µL와 500 bp

DNA size marker(Takara, Japan) 5 μ L를 1% agarose에 전기영동하여 유산균 16S rRNA를 확인하였다. PCR(Thermal Cycler DICE, Takara, Japan)을 위한 실험 조건은 처음 denaturation은 94°C/5 min, 다음 94°C/30 sec, 52°C/30 sec, 72°C/1 min으로 30 cycle, 마지막으로 72°C에서 10 min 간 반응시켰다.

분리 균의 동정

분리균의 동정을 위해 일차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그람 염색법을 이용하여 염색 후 형광현미경(DE/AXIO Imager A1, Carl Zeiss, Germany) 검경으로 균의 미생물학적 특성을 확인하였고, 당 발효 능력을 조사하기 위해 API 50 CHL system(BioMerieux, France)을 이용하였고, 그 결과를 균주 동정 프로그램(<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 동정하였다. 최종적인 균 동정을 위하여 분리 균주의 16S rRNA의 염기서열 결정법으로 동정하였으며 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

추출한 Genomic DNA를 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTTGTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR을 수행하였다(Jeon *et al.*, 2007). PCR 산물은 BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit을 이용한 chain-termination dideoxynucleoside triphosphate법(Sanger *et al.*, 1977)으로 ABI 3100-Avant genetic analyzer(Applied Biosystems, Lennik, Belgium)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 균주들의 염기서열을 nucleotide searching 프로그램인 NCBI BLASTN(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 사용하여 유산균을 동정하였다.

조향균 물질의 정제

조향균 물질의 정제는 Yang과 Chang(2007)의 방법을 변형하여 실시하였다. 분리균들 중 향균활성이 가장 높은 균을 3 mL MRS 액체배지에서 전배양(A_{600} ; 0.8)한 균액 100 μ L를 MRS 액체배지 100 mL에 접종하고, 18시간 동안 본 배양 후 원심분리(10,000 g, 20 min, 4°C)하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 0.45 μ m membrane filter로 제균하였다. 제균된 배양액을 진공 동결건조기(PVTFD 10R, Ilshin Lab Co., Korea)를 사용하여 건조하였다. 동결 건조된 시료를 1 mL의 0.1% trifluoroacetic acid(TFA, Sigma Co., USA)에 녹이고, methanol(HPLC-grade, Merck, Germany)과 water(HPLC-grade, Merck, Germany)로 미리 soaking 시킨 C18 column(Eclipse XDB, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, Agilent, USA)에 주입하여 역상 HPLC(1200, Agilent, USA)로 분리하였다. 분리방법은 시료 주입 후 10분 간 0.1% TFA로 세척하고, 다음 20분 간 0.1% TFA를 함유한 acetonitrile(HPLC-grade, Sigma Co., USA)를 0-100% linear gradient, 마지막 5분 간은 0.1% TFA를 함유한 acetonitrile

100% 용매로 용출시켰다. 유속은 1.0 mL/min로 유지하였다. 회수한 분획을 모은 후 진공 동결건조기를 사용하여 용매를 제거 하고 20 mM Tris-HCl(pH 7.2) 1 mL에 녹여 향균활성 측정에 사용하였다. 향균활성 측정은 분리균의 향균 활성 시험에서 언급한 paper disk method에 준하여 동일하게 측정하였다.

요구르트 제조용 스타터 균 제조

요구르트 제조용 스타터 균 제조는 배추김치에서 분리한 *L. plantarum* LHC52를 MRS broth 4 L에 접종 후 16 시간 배양한 배양액을 원심 분리하여 배양 상등액을 제거 한 다음 남은 균체를 멸균된 0.85% saline 용액을 사용하여 현탁시켜 세척하였다. 동일한 방법으로 세척과정을 반복한 후 마지막 원심 분리된 균체를 동결건조기를 사용하여 동결 건조하였다. 동결 건조된 시료의 스타터 균 제조용으로 적합성 유무를 판별하기 위해 0.1 g을 사용하여 균 수 측정결과 1.0×10^{11} /g으로 요구르트 제조용 스타터 균주로 사용 가능함을 확인하였다. 동결 건조된 균을 초저온 냉동고(-70°C)에 보관하여 요구르트 제조에 사용하였다.

요구르트의 제조

원료유 2 L를 각각 1 L씩 분배하여 92°C에서 10분간 열처리 후 40°C로 냉각하여 대조구는 상업용 균주인 ABT-5(Chr. Hansen, Denmark)를 0.01%(0.1 g/L) 사용하였고, 처리구는 동결 건조한 분리균 *L. plantarum* LHC52(0.033 g): ST-B01(0.033 g, *S. thermophilus*, Chr. Hansen, Denmark): LH-B02(0.033 g, *L. helveticus*, Chr. Hansen, Denmark)를 1:1:1 비율로 0.01%(0.1 g/L) 접종하여 40°C에서 5시간 배양하여 제조하였다.

L. plantarum LHC52 첨가 요구르트의 향균활성

제조한 요구르트의 향균활성 측정은 한천배지확산법(agar well diffusion method)은 Lee 등(2009)의 방법으로 평가하였다. Petri dish에 8 mm 직경의 metal borer를 올려 놓고 *E. coli*는 Luria-Bertani(LB; Difco, USA) agar, *S. aureus*는 brain heart infusion(BHI; Difco, USA) agar 그리고 *S. enteritidis*는 Tryptic Soy agar(TSA; Difco, USA)에 각각 접종하여 부어 굳힌 후 metal borer를 제거하고, 지시균이 접종되지 않은 각각의 agar 0.05 mL로 아래쪽을 막은 평판을 4°C에서 완전히 굳혔다. 제조한 요구르트 100 μ L를 홈에 주입하고 4°C에서 12시간 방치한 후 37°C에서 8시간 배양 후 억제환의 크기를 측정하고 metal borer의 지름 8 mm를 감하여 향균활성으로 표시하였다.

pH 측정

pH는 pH meter(pH/ion meter 450, Corning, USA)로 측정하였다.

OD 측정

OD는 Spectrophotometer(UV-1800, Shimadzu, Japan)를 사용하여 600 nm에서 측정하였다.

유산균수 측정

요구르트 배양 전·후 시료를 십진 희석법으로 희석하여 평판배양법으로 BCP 한천배지(Difco, USA)에 1 mL씩 분주하고 37°C에서 48시간 동안 배양하여 노랑색 콜로니를 계수하여 유산균수로 표시하였다.

일반성분

요구르트의 단백질, 지방, 유당, 총고형분 함량은 Milkoscan FT120(Foss, Denmark)로 측정하였다.

관능검사

관능적 품질평가는 국립축산과학원 연구원을 대상으로 15명의 패널요원을 선발하여 시료에 충분한 지식과 용어, 평가기준 등을 숙지시킨 후 실시하였다. 관능평가는 색상, 풍미, 조직감, 맛, 그리고 전반적인 기호도에 대하여 9점 채점법으로 실시하였으며, 9점은 대단히 좋다, 1점은 대단히 나쁘다로 나타내었다.

통계분석

결과는 SAS EG 프로그램의 일원분산분석으로 분석하였고, 처리구간의 평균간 비교는 T-test 통하여 유의성 검정($\alpha=0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

항균활성 유산균 분리 및 동정

김치로부터 구입당일과 숙성온도(4, 20°C), 숙성기간(5, 10, 20일)을 달리하여 분리한 균 140종을 BCP 한천배지를 이용하여 103종의 산생성균을 확인하였다. 103종의 산생성균의 Geonmic DNA와 LAB 16S rRNA specific primer 4종을 사용하여 PCR 방법으로 DNA 증폭 후 전기영동하여 유산균 확인을 하였다(Fig. 1). 확인된 72개의 유산균들 중 병원성 미생물에 대한 항균활성 관찰 결과 분리균들 중 20°C에서 5일간 숙성한 2번 균주(*L. plantarum* LHC52)가 항균활성이 가장 강하게 나타났다. 이 분리 균주를 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과 Gram 양성, catalase 음성 그리고 포자를 형성하지 않는 비운동성의 bacilli 형태로 확인되었다. 그리고 API 50 CHL kit(Bio-Merieux, France)를 사용하여 분리균의 당 이용성 조사(Table 1)를 통한 균 동정 결과 *L. plantarum*과 매우 유사한 것으로 판정되었다. 보다 정확한 동정을 위하여 분리균주의 16S rRNA 염기서열을 결정하고(1,387 bp), NCBI(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 blast program을 사용하여 GenBank에 등록된 16S rRNA 유전자들과 상동성을 비교하였다. 그 결과 *L. plantarum* strain SC56(Accession NO; GQ 461604)유전자와 99%(1383/1387) 상동성을 보였다. 따라서 본 균주는 최종 *L. plantarum*으로 동정되었으며, *L. plantarum* LHC52라 명명하였다.

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR products by using lactic acid bacteria specific primers. M, 500 bp DNA ladder; 1, Lactobacilli primer 1; 2, Lactobacilli primer 2; 3, Lactobacilli primer 3; 4, *Leuconostoc* primer.

Table 1. Carbohydrate utilization profile of the LHC52 isolated, as determined using the API 50 CHL system

Carbohydrate	Reaction	Carbohydrate	Reaction
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
b-Methyl-xyloside	-	Melezitose	+
Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Starch	-
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	b-Gentiobiose	+
Inositol	-	D-Turanose	-
Manitol	+	D-Lyxose	-
Sorbitol	+	D-Tagatose	-
a-Methyl-D-mannoside	-	D-Fucose	-
a-Methyl-D-glucoside	+	Gluconate	+
N-Acetyl glucosamine	+	2 keto-gluconate	-
Amygdaline	+	5 keto-gluconate	-
Esculine	+		

+, positive; -, negative

ncbi.nlm.nih.gov/)의 blast program을 사용하여 GenBank에 등록된 16S rRNA 유전자들과 상동성을 비교하였다. 그 결과 *L. plantarum* strain SC56(Accession NO; GQ 461604)유전자와 99%(1383/1387) 상동성을 보였다. 따라서 본 균주는 최종 *L. plantarum*으로 동정되었으며, *L. plantarum* LHC52라 명명하였다.

조 항균물질의 항균활성

정제된 조 항균물질을 paper disk method를 사용하여 병원성 미생물에 대한 항균활성을 조사하였다(Table 2). 그 결과 *E. coli*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*에 대한 항균효과는 각각 9.4 ± 0.83 mm, 6.2 ± 0.62 mm, 4.6 ± 0.56 mm로 나타났다. 유산균의 항균물질(bacteriocin)의 많은 종류가 그람 양성균에 대한 항균효과는 높으나 항균 spectrum이 좁아 그람 음성균이나 효모, 곰팡이에 대해서는 거의 항균력이 없다는 보고(Klaenhammer, 1988)와 같이 그람 양성균인 *S. aureus*에서 높은 항균력을 보였지만, 또 한편 그 주장과는 달리 그람 음성균인 *E. coli*에 대해 더 높은 항균력을 보였다. 이것은 LHC52가 분비하는 항생물질이 cheese starter 균주인 *Lactococcus lactis* sbsp. *lactis*가 생산하는 대표적 bacteriocin인 nisin(Taylor et al., 1949)과 같이 항균 범위가 넓은 항균물질로 추정된다. 그리고 동치미에서 분리한 *L. plantarum* K11이 생산한 박테리오신은 *E. coli* O157에 대한 항균효과가 높다는 보고(Lim and Im, 2007)와 유사한 결과를 보였다. 향후 항균물질의 특성을 좀 더 구체적으로 파악하기 위해서는 다양한 방법의 정제와 SDS-PAGE를 이용한 단백질 전기영동에 의한 분자량 측정, mass spectrophotometer 분석법에 의한 아미노산 서열 결정과 동정이 필요하다고 판단된다.

Lactobacillus plantarum LHC52첨가 요구르트의 유산균수

L. plantarum LHC52를 스타터 균주로 사용하여 제조한 요구르트의 발효 전후 유산균 수를 계수하여 Table 3에 나타내었다. 대조구와 *L. plantarum* LHC52 첨가구의 발효 전 유산균 수는 각각 7.32 ± 0.04 , 7.35 ± 0.05 Log CFU/g이었으며 발효 후는 각각 8.76 ± 0.05 , 8.82 ± 0.08 Log CFU/g으로 증가하였으나 대조구와 처리구간의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 요구르트 제조후의 유산균수는 마늘즙 첨가 요구르트의 품질 특성 연구에서 ABT-5를 대조구 스타터로 사용한 요구르트의 유산균수 측정 보고(Lee et al., 2009)에 비해 조금 높은 경향을 나타내었다. 세균이 생산하는 박테리오신과 같은 항생물질 생산 목적이 다른 종(species)의 세균이나 세포의 성장을 억제하거나 성장을 못하게 하여 결국 자기 자신의 종이 환경에서 우점하기 위

Table 3. Lactic acid bacterial counts of the yogurt

Treatment	Before incubation	After incubation
Control	7.32 ± 0.04	8.76 ± 0.05^a
LHC52	7.35 ± 0.05	8.82 ± 0.08^a

Values are mean $\pm$ SE

Means within the same row with different superscript are significantly different at 5% level by the t-test.

해 분비하는 물질이다. 본 연구에 사용된 *L. plantarum* LHC52는 병원성 미생물에 대한 항균 효과가 있었지만 스타터로 같이 사용된 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*의 균수 측정결과에서 성장 억제 현상은 나타나지 않았다. 요구르트 제조 후 측정된 균수에서 유의적 차이는 없었지만 대조구에 비해 약간 높은 결과로 보아 복합 스타터 균주의 사용 시 다른 유산균의 성장에 영향을 주지 않는 것으로 판단되어 *L. plantarum* LHC52를 복합 스타터 균주로 사용이 가능하리라 판단된다.

L. plantarum LHC52 첨가 요구르트의 성분 분석 및 이화학적 특성

L. plantarum LHC52를 스타터 균주로 사용하여 제조한 요구르트의 이화학적 특성을 Table 4에 나타내었다. 대조구의 지방, 단백질, 유당, 총고형분 함량과 pH는 각각 3.41 ± 0.01 , 2.72 ± 0.01 , 4.1 ± 0.02 , 18.49 ± 0.01 , 4.81 ± 0.02 로 확인되었고, LHC52 첨가 요구르트는 각각 3.37 ± 0.01 , 2.79 ± 0.01 , 3.99 ± 0.02 , 18.43 ± 0.02 , 4.69 ± 0.02 로 확인되었다. 유단백질과 총고형분은 두 구간 차이가 나타나지 않았고, pH는 LHC52 첨가 요구르트에서 낮게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다($p > 0.05$). 이는 Table 3의 유산균수 변화와 유사한 경향을 나타내었다. 그리고 김치에서 분리한 *L. plantarum* 균주 3종을 이용한 요구르트 제조 연구에서 *L. plantarum*은 산 생성능이 우수하고, 단일 균으로 요구르트 제조시에는 pH를 4.08-4.30 범위까지 낮춘다는 보고(Rhee and Kang, 1996)와 유사한 경향을 나타내었다. 본 연구의 LHC52 첨가 요구르트는 *L. plantarum* LHC52 단일 균주를 사용하여 제조한 것이 아니고 *S. thermophilus*와 *L. helveticus*와 같이 복합균주를 사용하였기에 pH를 4.08-4.30 범위 내에 도달할 수 있을 정도의 산을 생성하지 못한 것

Table 2. Antimicrobial activity of *L. plantarum* LHC52 (N=9)

Microorganism	Indicator	Activity
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> K-99	+++++ ^a
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 49223	++++ ^b
Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 12256	+++ ^c

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator.

Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: +; 0-2 mm, ++; 2.1-4 mm, +++; 4.1- 6 mm, ++++; 6.1-8 mm, +++++; 8.1-10 mm.

Values are mean $\pm$ SE (n=9).

Means within the same row with different superscript are significantly different at 5% level by the t-test.

Table 4. General composition and physicochemical properties of the yogurts (N=6)

Treatment	Fat	Protein	Lactose	Total Solid	pH
Control	3.41±0.01 ^a	2.72±0.01 ^a	4.1±0.02 ^a	18.49±0.01 ^a	4.81±0.02 ^a
LHC52	3.37±0.01 ^a	2.79±0.01 ^a	3.99±0.02 ^a	18.43±0.02 ^a	4.69±0.02 ^a

Values are mean±SE (N=6).

Means within the same row with different superscript are significantly different at 5% level by the t-test.

으로 생각된다.

L. plantarum LHC52 첨가 요구르트의 항균활성

L. plantarum LHC52 첨가 요구르트의 항균활성 측정 결과를 Table 5에 나타내었다. *E. coli*에 대한 항균력은 대조구는 10.82±0.58, 첨가구는 11.03±0.73으로 첨가구에서 활성이 높았고, *S. aureus*에 대한 항균력은 대조구는 9.89±0.61, 첨가구는 10.11±0.67로 나타났으며, *S. Enteritidis*에 대한 항균력은 대조구는 10.37±0.56, 첨가구는 10.51±0.69로 나타났다. 이상의 결과에서 세 가지 지시균 모두 대조구에 비해 첨가구에서 항균활성이 높은 경향을 나타내었으나 유의적 차이는 나타나지 않았다($p<0.05$). 최근 마늘즙 4, 8, 12%첨가 요구르트가 다약제 내성을 지닌 *S. aureus* KCCM 40510에 대해 농도 의존적으로 항균력이 증가한다는 보고(Lee *et al.*, 2009)와 오미자 추출물을 0.4, 0.6, 0.8, 1.0% 첨가하여 제조한 액상 요구르트에서 *E. coli*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*와 같은 식중독 원인균들의 성장억제 효과 보고(Hong *et al.*, 2003)와 같이 항균성을 지닌 천연 물질들과 *L. plantarum* LHC52를 혼합 사용하여 요구르트를 제조한다면 더욱 우수한 병원성 미생물에 대한 항균활성을 가진 요구르트를 제조 가능하리라 생각된다.

발효유의 관능적 특성

병원성 미생물(*E. coli*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*)에 대한

Table 5. Antimicrobial activity of yogurt added *L. plantarum* LHC52

Treatment	Antimicrobial activity (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>
Control	10.82±0.58 ^a	9.89±0.61 ^b	10.37±0.56 ^c
LHC52	11.03±0.73 ^a	10.11±0.67 ^b	10.51±0.69 ^c

Values are mean±SE.

Means within the same row with different superscript are significantly different at 5% level by the t-test.

항균활성을 가진 *L. plantarum* LHC52를 이용하여 제조한 요구르트의 관능검사를 실시한 결과는 Table 6과 같다. 대조구의 색, 향기, 조직감, 맛, 전체적인 기호도가 각각 7.31±0.30, 7.31±0.25, 7.06±0.27, 6.56±0.31, 7.00±0.20로 나타났고, *L. plantarum* LHC52첨가 요구르트는 각각 7.75±0.23, 6.75±0.25, 7.06±0.38, 6.56±0.38, 7.06±0.28로 색에 있어서는 대조구에 비해 첨가구 요구르트에서 높게 나타났고 향기에서는 대조구가 약간 높게 나타났으나, 대조구와 처리구간의 유의적인 차이를 나타내지는 않았다($p>0.05$). 그리고 조직감, 맛, 전체적인 기호도는 두 구간 차이를 나타내지는 않았다. 처리구에서 향에 대한 기호도가 낮게 나타난 이유는 *L. plantarum* LHC52처리에 의해 김치 숙성 시 나타나는 특유의 향이 약간 있었으나 결과에서 보듯이 관능적으로 영향을 주지 않았다. 그것은 아마도 우리 국민들 대부분이 김치 특유의 향에 대해 적응되어 있기 때문인 것으로 생각된다. 단지 요구르트에서 김치향을 미세하게 느끼는 민감한 패널요원들의 약간의 거부 반응인 것으로 추측된다. 그리고 요구르트 제조에 있어서 *L. plantarum* LHC52 단독균주를 사용하지 않은 이유는 단독균주 사용 시 풍미와 기타 관능적으로 나쁜 결과를 얻을 수 있으며 복합 스타터의 사용시 관능적 특성에는 영향을 미치지 않기 때문이며, 항균활성을 지닌 probiotics의 역할을 동시에 함으로써 그 파급효과가 크다고 사료된다. 김치에서 분리한 유산균이지만 관능 테스트, 미생물 수의 변화, 성분 분석결과에서 보듯이 모든 성분에서 유의적 차이가 나타나지 않아 요구르트 제조에 *L. plantarum* LHC52 균주의 사용 가능성을 시사해 주었다. 요구르트 제조에 의한 유산균의 장내 정착이 병원성 미생물의 증식의 억제와 장내 세균총에 있어서 중요한 작용(Dedios *et al.*, 1978)을 하므로 항균성 및 기능성 증진 등의 인간에게 유익하게 작용하는 스타터 균주와 발효 유제품 개발은 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Table 6. Sensory characteristics of the yogurts (N=16)

Treatment	Color	Flavor	Texture	Taste	Overall
Control	7.31±0.30 ^a	7.31±0.25 ^a	7.06±0.27 ^a	6.56±0.31 ^a	7.00±0.20 ^a
LHC52	7.75±0.23 ^a	6.75±0.25 ^a	7.06±0.38 ^a	6.56±0.38 ^a	7.06±0.28 ^a

Values are mean±SE (n=16).

Means within the same row with different superscript are significantly different at 5% level by the t-test.

요 약

이 연구는 김치에서 분리한 항균활성이 우수한 요구르트 제조용 유산균 스타터를 개발하기 위함이다. 분리한 103개의 산생성 균주를 PCR로 screening하여 72개의 유산균을 분리하였다. 분리균의 배양액을 paper disk method를 사용하여 병원성 미생물(*E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*)에 대한 항균활성을 측정하였고, 활성이 강한 균주를 선별하여 API 50CHL과 16S rRNA sequencing 방법으로 균을 동정하였다. 균은 *L. plantarum*으로 확인되어 *L. plantarum* LHC52로 명명하였다. *L. plantarum* LHC52는 특히 *E. coli*에 대해 높은 항균성을 나타내었다. *L. plantarum* LHC52를 사용하여 제조한 요구르트의 미생물학적, 이화학적 특성과 관능검사 결과 대조구와의 유의적인 차이는 없었다. 그 결과 김치에서 분리한 *L. plantarum* LHC52의 항균활성이 우수한 요구르트 제조 스타터 균주로서 사용 가능함을 확인하였다.

참고문헌

- DeDios, Pozo-Olano, J., Warran, J. H., Gomez, G. G., and Cavazos, M. G. (1978) Effect of a lactobacilli preparation on traveler's diarrhea. *Gastroenterol.* **74**, 829-839.
- Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A. W., Bruggeman, C. A., and Stobberingh, E. E. (2007) The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 222-235.
- Francis, A. W. (1995) *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrom). pp. 1754-1755, Mandell Douglas and Bennetts Principles and Infections Disease. 4th eds., Churchill Livingstone.
- Han, S. J., Jung, P. M., Kim, H. G. Hwang, E. H., and Seong, I. W. (1999) Multiple intestinal ulcerations and perforations secondary to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus enteritis* in infants. *J. Pediatr. Surg.* **34**, 381-386.
- Hong, K. H., Nam, E. S., and Park, S. I. (2003) Effect of Omija (*Schizandra chinensis*) extract on the growth inhibition of food borne pathogens in yoghurt. *Kor. J. Food. Sci. Ani. Resour.* **23**, 342-349.
- Jeon, S. R., Song, T. S., Kim, J. Y., Shin, W. C., Her, S. U., and Yoon, S. S. (2007) Identification and characterization of lactic acid bacteria starters isolated from the commercial drink-yogurt products. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **27**, 509-516.
- Jeong, H. J., Kim, W. J., Kim, M. J., and Park, S. C. (1995) Nosocomial infection surveillance in the care unit. *Kor. J. Infect. Dis.* **27**, 105-117.
- Kim, S. I., Kim, I. C., and Chang, H. C. (1999) Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 526-533.
- Klaenhammer, T. R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Bichimie.* **70**, 337-349.
- Ko, Y. D., Kim, H. J., Chun, S. S., and Sung, N. K. (1994) Development of control system for Kimchi fermentation and storage using refrigerator. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**, 199-203.
- Lee, I. S., Park, W. S., Koo, Y. J., and Kang, K. H. (1994) Changes in some characteristics of brined chinese cabbage of fall cultivars during storage. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**, 239-245.
- Lee, S. G., Lee, Y. J., Kim, M. K., Han, K. S., Jeong, S. G., Jang, A., Chae, H. S., Kim, D. H., and Ham, J. S. (2009) Quality characteristics and inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* KCCM 40510 of Yogurts manufactured with garlic juice. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **29**, 500-505.
- Lim, S. M. and Im, D. S. (2007) Bacteriocidal effect of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from Dongchimi on *Escherichia coli* O157. *J. Food Hyg. Saf.* **22**, 151-158.
- Lim, S. M. and Im, D. S. (2009) Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 178-186.
- Mheen, T. I. and Kwon, T. W. (1984) Effect of temperature and salt concentration on Kimchi fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **16**, 443-450.
- Muller, D. M., Carrasco, M. S., Tonarelli, G. G., and Simonetta, A. C. (2009) Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp31 strain isolated from dry-fermented sausage. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 2031-2040.
- Nguyen, T. D., Kang, J. H., and Lee, M. S. (2007) Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. 2007. *Int. J. Food Microbiol.* **113**, 358-361.
- Park, S. G., Hwang, Y. O., Jung, J. H., and Lee, K. M. (2001) Biological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from food-borne patients in Seoul. *J. Food. Hyg. Saf.* **16**, 159-167.
- Park, W. S., Lee, I. S., Han, Y. S., and Koo, Y. J. (1994) Kimchi preparation with brined Chinese cabbage and seasoning mixture stored separately. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**, 231-238.
- Rhee, Y. H. and Kang, M. S. (1996) Characteristics of beta-galactosidase activity in *Lactobacillus plantarum* from Kimchi. *Agr. Chem. Biotechnol.* **39**, 60-66.
- Rhee, Y. H. and Kang, M. S. (1996) Physico-chemical characteristics and β -galactosidase activity of *Lactobacillus plantarum* from Kimchi. *Agr. Chem. Biotechnol.* **39**, 54-59.
- Sanders, M. E. and Huis in't Veld, J. (1999) Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **76**, 293-315.
- So, M. H. and Kim, Y. B. (1995) Cultural characteristics psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 506-515.
- Straume, D., Johansen, R. F., Bjoras, M., Nes, I. F., and Diep, D. B. (2009) DNA binding kinetics of two response regula-

- tors, PlnC and PlnD, from the bacteriocin regulon of *Lactobacillus plantarum* C11. *BMC. Biochem.* **10**, 17-27.
25. Taylor, J., Hirsch, A., and Mattick, A. R. T. (1949) The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *Vet. Rec.* **61**, 197-198
26. Tsai, T. y., Chu, L. H., Lee, C. L., and Pan, T. M. (2009) Atherosclerosis-preventing activity of lactic acid bacteria-fermented milk-soymilk supplemented with *Momordica charantia*. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 2065-2071.
27. Wang, Y., Xu, N., Xi, A., Ahmed, Z., Zhang, B., and Bai, X. (2009) 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.
28. Yang, E. J. and Chang, H. C. (2007) Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJP1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 339-346.
29. Yoon, J. H., Lee, S. T., and Park, Y. H. (1996) Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioidea* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 187-194.

(Received 2009.11.20/Revised 1st 2010.2.11, 2nd 2010.4.9/
Accepted 2010.4.13)