

Home-made 요구르트와 시판 중인 요구르트에서 분리한 젖산균의 기능적 특성 조사

최문섭 · 윤현명 · 오계현*

순천향대학교 자연과학대학 생명시스템학과

Studies on the Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Home-made Yogurt and Commercial Yogurt

Moon-Sup Choi, Hyun-Myoung Yun, and Kye-Heon Oh*

Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Chung-Nam 336-745, Republic of Korea

(Received January 20, 2014 / Accepted February 25, 2014)

The objective of this work is to investigate and compare several functional properties of lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus casei* SK-7 isolated from home-made yogurt and *Lactobacillus bulgaricus* YK-11 from commercial yogurt. Initially, physiological and biochemical properties of SK-7 and YK-11 were characterized. Phylogenetic analysis using 16S rRNA sequencing were performed to identify the strains, and the strain could be assigned to *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus bulgaricus*, designated as *L. casei* SK-7 and *L. bulgaricus* YK-11. Phylogenetic tree of SK-7 and YK-11 was plotted based on 16S rRNA sequence comparisons. Production of lactic acid and organic acid, and pH changes in the cultures of SK-7 and YK-11 were monitored during 72 h. During the incubation period, several functional properties of *L. casei* SK-7 and *L. bulgaricus* YK-11 were examined. *L. casei* SK-7 and *L. bulgaricus* YK-11 cultures eliminated 93.9% and 88.2% of nitrite, respectively. Antioxidant activity of cultural supernatants of SK-7 and YK-11 were 62.6%, 54.9%, and activity of β -galactosidase were 14.9 units/mg and 13.1 units/mg, respectively. The antimicrobial activities were examined with 20-fold concentrated culture supernatants from the cultures of SK-7 and YK-11. The activities of SK-7 supernatants were clearly observed against all microorganisms in this work, whereas no activities were observed in YK-11 supernatants. Although it might be conducted additional functional research, functional properties of LAB isolated from home-made yogurt have been shown to be better than those of commercial yogurt in this work.

Keywords: functional property, lactic acid bacteria, probiotic, yogurt

요구르트(yogurt)는 우유에 젖산균을 접종하여 발효를 통해 응고시킨 제품으로, 발칸 지방, 중동, 특히 동부 지중해연안 제국에서 제조되고 음용되어온 식품이다. 요구르트는 비교적 산성을 띠고 상쾌한 풍미가 있는 식품으로, 비타민 A와 비타민 B₂를 포함하여 우유에 존재하는 단백질과 칼슘, 망간 등의 무기질이 함유되어 있다. 또한 젖산균에 의해 지방과 단백질이 분해되어 있어 체내에서 소화가 잘되고 흡수가 쉬운 상태로 존재한다. 요구르트는 숙성 과정에 작용하는 미생물과 효소의 작용으로 맛과 풍미가 생성되고 보존성도 증대된다. 요구르트는 섭취 시 장에서 *Helicobacter pylori* 균의 생장을 억제하며, 활성 산소와 과산화 지질 소거에 영향을 줄 수 있는 것으로 보고된 바 있다(Lin *et al.*, 1999; Yang and Sheu, 2012).

프로바이오틱스(probiotics)는 체내에 들어가서 유익한 효과를 주는 균으로, 정상적인 장과 비노생식기의 미생물 균주를 일정하게 유지시키는 능력이 있으며, 혈중 콜레스테롤을 감소시키고, 젖당 불내증을 완화하는 능력이 있다. 그리고 항암작용, 면역증강작용, 비노생식기의 미생물 오염 등을 억제하는 작용이 있으며, 설사의 예방 및 완화 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Sanders, 1999; Saarela *et al.*, 2002; Gill, 2003).

요구르트는 종류에 따라 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 등과 같은 다양한 젖산균들이 발효에 관여하는 것으로 알려져 있으며(Martini *et al.*, 1991), 이들 젖산균의 기능과 체내에 작용하는 유익함에 대하여 많은 연구들이 보고되어왔다. 이들 균주는 항생제에 대하여 강한 내성을 가지고 있고(Zhou *et al.*, 2012), 적정 농도 이상의 섭취시 체내에서 청색증을 나타내는 메트헤모글로빈혈증(methemoglobinemia)의 원인물질인 아질산염에 대한 소거능(Alan *et al.*, 1998)을 비

*For correspondence. E-mail: kyeheon@sch.ac.kr; Tel.: +82-41-530-1353; Fax: +82-41-530-1350

못하여, 세포 손상을 일으키는 유해산소를 제거하여 세포의 정상적인 성장과 분화를 유도하는 항산화능(Aloğlu and Oner, 2011), 젖당 불내증을 완화시킬 수 있는 β -galactosidase 활성(Savaiano and Levitt, 1987)이 높고, lactoferricin과 같은 항균활성 물질을 분비하여 유해균에 대한 저항력을 가지는 것으로 보고되었다(Paul and Somkuti, 2010).

본 연구에서는 젖산균의 기능성에 주안점을 두고, 가정에서 직접 만든 home-made 요구르트와 시중에서 판매되고 있는 요구르트에서 발효에 기여하는 젖산균을 분리하여, 이들 젖산균에 대한 다양한 기능성을 비교 분석하였으며, 분리 균주들의 분자유전학적 계통수를 작성하였다.

재료 및 방법

세균의 분리 및 배양

가정에서 요구르트 제조기(K사)를 이용하여 42°C에서 8시간 동안 발효시킨 요구르트와 시중에서 판매되고 있는 요구르트(P사, K제품)를 각각 5 ml씩 취하여 100 ml의 생리식염수가 담긴 플라스크에 주입시킨 후, 진탕배양기에서 10분간 교반시켰다. 잘 섞인 시료를 10^{-2} - 10^{-3} 만큼 희석시킨 후, 100 μ l씩 취하여 0.002% BPB (bromophenol blue)가 첨가된 MRS (deMan, Rogosa, and Sharpe) (Difco Co., USA) 고체평판배지에 도말하고, 37°C에서 48시간 동안 배양하였다(Song *et al.*, 2009). 도말 평판법을 이용한 순수배양기법으로 각각의 MRS 고체평판배지에서 home-made 요구르트에서 SK-7과 시판용 요구르트에서 YK-11의 젖산균을 분리하고, MRS 액체배지에 접종하여, 배양기에서(37°C, 160 rpm) 유지시키며, 본 실험에 이용하였다.

16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

두 가지 요구르트에서 분리한 젖산균의 계통수 작성을 위하여 16S rRNA에 대하여 PCR을 실시하였다. 27F primer (5'-AAGGGAACACCACTGGCGAAGG-3')와 1492R primer (5'-CCAGGCGGTCAACTTAATGCG-3')를 16S rRNA 유전자 증폭을 위해 사용하였으며, 이전에 발표된 PCR의 수행조건에 근거하여 실험을 진행하였다(Song *et al.*, 2009). 증폭된 DNA fragment를 agarose gel 전기영동한 후, agarose gel extract kit (Intron, Korea)를 사용하여 gel상에서 회수하였으며, 이를 통해 부분적인 염기서열을 결정하였다.

분리세균의 형태학적, 생리화학적 특성조사

분리된 SK-7 균주와 YK-11 균주의 단일 집락의 형태를 확인하기 위하여, MRS 고체평판배지에 도말하여 배양한 후, 그람염색을 통하여 위상차 현미경으로 형태학적 특성을 관찰하였다. 생리화학적 특성을 비교하기 위하여, glucose, starch, citrate, gelatin 이용여부, methyl red (MR) 시험, Voges-Proskauer (VP) 시험, Klingler iron agar (KIA)에서 H₂S 생성여부, indole 생성여부, litmus milk 이용 여부 등을 조사하였다. 본 시험에서 사용한 KIA, MR-VP, Simmon's citrate, litmus milk 배지는 Difco 사(USA)의 제품을 이용하였다.

세균의 생장에 따른 pH 변화 측정

MRS 액체배지 100 ml에서 분리한 균주들을 각각 접종하고, 진탕배양기에서(37°C, 160 rpm) 72시간 동안 배양하였다. pH는 12시간 마다 3 ml의 배양액을 취하여 측정하였다.

HPLC에 의한 유기산의 정량분석

HPLC를 이용하여 젖산균이 생성하는 유기산 중에서 lactic acid와 acetic acid를 분석하였다. 분석에 사용된 HPLC system은 SPD-10A UV/Vis detector가 부착된 Shimadzu사의 LC-10AT 제품을 사용하였고, 컬럼은 Supelcogel C-610H (300 nm \times 7.8 mm, 입자크기 9 μ m)를 이용하였다. 공극 직경이 0.45 μ m인 membrane filter (Pall-Gelman, East Hills, USA)에 여과한 0.1% (v/v) phosphoric acid (pH 2.1)를 mobile phase로 사용하였고, HPLC 작동조건은 flow rate를 0.5 ml/min, UV detector의 파장을 210 nm로 설정하였다. Lactic acid와 acetic acid를 1:1로 섞은 용액을 HPLC를 통해 분석하여 나온 값으로 표준정량곡선으로 도식화하고, 12시간 마다 채취한 시료를 분석하여, 그 값을 표준정량곡선에 대입/산출하여 유기산을 정량하였다(Chun *et al.*, 2005).

아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능 조사는 Ito 등(1979)의 방법을 따라서 실시하였다. 배지는 멸균된 sodium nitrite 용액(1 mg/ml)과 MRS 액체배지를 1:9의 비율로 혼합한 것을 사용하였으며, 두 가지 요구르트에서 추출된 젖산균을 각각 배지에 접종하여, 72시간 동안 진탕배양기(37°C, 160 rpm)에서 배양하였다. 12시간 마다 1 ml의 배양액을 취하여 5분간 13,000 rpm에서 원심분리한 후, 100 μ l의 상등액을 취하여 0.02% sulfanilamide와 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 35% HCl을 각각 1 ml씩 첨가하여, 암실에서 5분간 반응시킨 후, 538 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화능 측정

분리한 젖산균을 100 ml의 MRS 액체배지 접종하여 72시간 동안 진탕배양기에서 배양하였다. 12시간 마다 배양액을 취하여 10분간 13,000 rpm에서 원심분리한 후, 상등액을 취하여 실험에 사용하였다. Blois의 방법(Blois, 1958)을 참고하여 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 기질로 이용한 항산화능을 측정하였다.

β -Galactosidase 활성 측정

β -Galactosidase 활성은 Miller의 방법(1972)을 따라 측정하였다. 분리한 두 가지 젖산균을 MRS 액체배지에 각각 접종한 후, 72시간 동안 진탕배양 하였으며, 12시간 마다 3 ml의 배양액을 취하여 10분간 13,000 rpm에서 원심분리 하였다. 원심분리한 후, 균체를 회수하고, 동량의 Z buffer (60 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄ · 7H₂O, 50 mM β -mercaptoethanol, pH 7.0)를 첨가하여 균체를 재현탁시켜, 여기에 서 1 ml를 취하여 OD₆₅₀을 측정하고, 다시 0.5 ml를 취하여 Z buffer 0.5 ml와 섞어 희석시켰다. 희석된 균체에 100 μ l chloroform과

50 µl 0.1% SDS (sodium- dodecyl sulfate)를 첨가한 후, 잘 혼합하였다. 배양기에서 30℃로 2분간 보관한 후, ONPG (*o*-nitrophenyl-β-D-galactoside, 4 mg/ml)가 첨가된 phosphate buffer를 0.2 ml 첨가하여 15분간 30℃의 배양기에서 반응시켰으며, 0.5 ml의 1 M Na₂CO₃를 첨가하여 종결시켰다. 흡광도는 420 nm와 550 nm에서 측정하여 β-galactosidase의 활성을 각각 계산하였다. 효소의 활성단위(unit)는 1 g의 시료에서 1분 간 ONPG로부터 1 µmol의 *o*-nitrophenol이 유리하는 것을 1 unit으로 하였으며, *o*-nitrophenol의 유리량은 표준정량곡선에서 산출하였다.

$$Activity = \frac{OD_{420} - (1.75 OD_{550})}{OD_{650} \times time \times vol} \times \frac{1 \text{ nmol}}{0.0045 \text{ ml cm}} \times 1.7 \text{ ml}$$

항균활성 조사

각각의 요구르트에서 분리한 젖산균들의 항균력을 조사하기 위해, 젖산균 균주들을 MRS 액체 배지에 접종하고 37℃에서 48 시간 동안 배양한 후, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리를 통해 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 0.2 µm syringe filter로 여과시킨 후, 여과액을 동결건조기를 이용하여 20배로 농축시켰다. 농축시킨 배양상등액의 항균력은 disc diffusion assay 방법을 통하여 조사하였다. 항균활성조사에 사용된 균주들은 *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Candida albicans* ATCC 90028, *Enterobacter aerogenes* ATCC 15038, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella enteritidis* ATCC 14028, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CCARM 3141, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Shigella sonnei* ATCC 25931 등의 식중독을 일으킬 수 있는 균주들을 사용하였다. 이들 세균들은 액체배지에 접종한 후, 24시간 배양하여 사용하였고, 배양된 균주들을 고체평판배지에 도말하고, paper disc를 올려놓은 후, 농축시킨 배양상등액을 20 µl 흡수시켜 37℃에서 24시간 배양시켜, disc 주변에 투명대의 형성유무를 확인하는 방식으로 조사하였다.

결과 및 고찰

세균의 분리 및 배양

가정에서 직접 발효시킨 요구르트와 시중에서 판매중인 요구

르트로부터 농화시킨 배양액에서 우점종으로 대별되는 균주를 MRS 고체평판배지를 이용하여 도말 평판법을 통해 순수배양을 하여 분리하였다. 분리된 두 가지 균주는 MRS 액체배지에 접종하여, 진탕배양기에서 배양을 유지시키며 본 실험에 이용하였다.

16S rRNA sequencing을 통한 계통수 분석

각각의 요구르트 내에 존재하고 있는 균주의 phylogenetic tree를 작성하기 위해, 균주에 존재하는 genomic DNA를 추출한 후, PCR을 이용한 증폭을 통해 염기서열을 부분적으로 결정하였다. 결정된 염기서열을 NCBI의 BLAST 분석프로그램을 사용하여 상동성을 비교한 결과, home-made 요구르트에서 분리한 균주 SK-7은 *Lactobacillus casei*와 99%, 그리고 시판요구르트에서 분리한 YK-11은 *Lactobacillus bulgaricus*와 98%의 유전적 상동성을 보여주었다. 이들 균주는 각각 *Lactobacillus casei* SK-7과 *Lactobacillus bulgaricus* YK-11로 명명되었으며, *Lactobacillus* 속(genus)에 속하는 다른 균주들과의 유연관계를 Fig. 1에 나타내었다.

분리세균의 형태학적, 생리화학적 특성조사

두 가지의 요구르트에서 분리한 젖산균을 각각 그람염색하여, 위상차 현미경으로 형태학적 특성을 관찰하였을 때, 모두 그람양성의 막대형으로 관찰되었다. 특정 배지와 지시약 반응을 이용하여 균주의 생리화학적 특성조사를 실시한 결과, SK-7과 YK-11 모두 glucose 시험은 양성반응을 나타냈지만, 산의 생성 여부를 조사하는 methyl-red 시험과 KIA를 이용하여 disulfhydrase에 의한 H₂S의 형성유무를 확인하는 시험은 YK-11에서만 양성으로 나타났다. 그 밖에 indole production, citrate, starch, gelatin 등의 이용여부와 litmus milk를 펩톤화 시키는 반응 모두 음성으로 관찰되었다(Table 1).

세균의 생장에 따른 pH 변화 측정

분리한 *L. casei* SK-7 균주와 *L. bulgaricus* YK-11 균주를 각각 MRS 액체배지에 접종하여 72시간 동안 진탕배양기에서 배양하였으며, 12시간 마다 그 변화를 측정하였다(Fig. 2). SK-7 균주의 경우 72시간까지 지속적으로 pH가 감소하였으나, YK-11는 36시간까지 감소하였으며, 그 후 거의 일정하게 유지되었다.

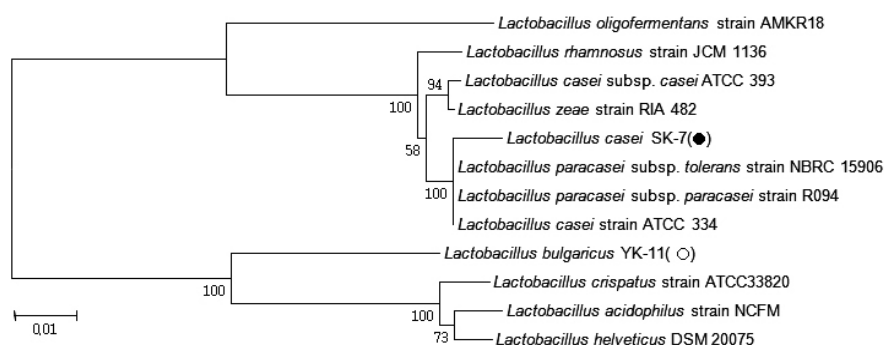


Fig. 1. Phylogenetic analysis of *L. casei* SK-7 (●) and *L. bulgaricus* YK-11 (○) related bacteria of the *Lactobacillus* subspecies group based on 16S rRNA sequence comparisons.

Table 1. Phenotypic characteristics of *L. casei* SK-7 and *L. bulgaricus* YK-11 isolated from home-made and commercial yogurts, respectively

	<i>L. casei</i> SK-7	<i>L. bulgaricus</i> YK-11
Morphological characteristics		
Cell shape	Rod	Rod
Gram stain	Positive	Positive
Physiological characteristics		
Indole production	-	-
Glucose	+	+
Methyl red	-	+
Voges-Proskauer	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-
Simmon's citrate	-	-
H ₂ S (KIA)	-	+
Litmus milk (peptonization)	-	-

배양초기 액체배지의 pH는 7.00이었으며, 72시간 배양 후, 최종 pH는 SK-7 균주와 YK-11 균주의 최종 pH는 각각 4.21과 4.96으로 측정되었다.

HPLC에 의한 분리 균주의 유기산 분석

분리균주 SK-7과 YK-11을 각각 MRS 액체배지에 접종하고, 72시간 동안 진탕배양기에서 배양하였으며, 유기산 분석에 사용할 시료는 12시간 마다 채취하여 HPLC로 분석하였다. HPLC chromatogram 상에 두개의 주요 peak와 몇 개의 작은 peak들이 관찰되었다. Authentic standard로서 lactic acid와 acetic acid가 1:1로 혼합된 것을 사용하였으며, 시료와 standard를 비교하였을 때, 각각 7.70분과 8.90분에서의 peaks가 동일한 것으로 나타났으며, 이들 유기산은 각각 lactic acid와 acetic acid로 확인되었다. Lactic acid의 생성은 두 가지 균주 모두에서 지속적으로 증가하는 것으로 측정되었으며, 최종 생성량은 SK-7 균주가 354.3 mM, YK-11 균주가 316.1 mM로 측정되었다. 이에 비해 acetic acid는 두 가지 균주 모두 12시간까지 생성량이 증가하였으며, 최종 생성량은 SK-7 균주가 146.3 mM, YK-11 균주가 127.3 mM로 측정되었다. 젖산균에 의한 유기산 생성에 관한 많은 연구가 발표되었으나, 대부분의 연구는 다양한 김치발효에 관여하

는 젖산균으로서, 생성된 유기산의 함량은 본 연구에서 생성된 유기산과 비교하여 높은 것으로 보고되었다(Song *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013).

분리 균주의 아질산염 소거능

분리균주에 대한 아질산염 소거능 측정을 위하여, 12시간 간격으로 배양액의 아질산염 농도를 측정하였다(Fig. 3). 두 가지 균주 모두 활발하게 아질산염을 소거하였으며, SK-7 균주의 경우 12시간 이후에 소거능이 급속도로 증가하여 72시간이 되었을 때, 최종적으로 93.88%를 나타내었다. YK-11은 48시간까지 소거능이 지속적으로 증가하다가, 그 이후에는 일정 수준으로 유지되었으며, 최종적으로 88.2%의 소거능을 나타내었다. *L. casei* SK-7은 다양한 발효 젖산균들과 비교했을 때 비슷한 범주의 소거능을 나타내었으며, 시중에서 판매되고 있는 요구르트에서 분리한 젖산균과 비교하였을 때 아질산염을 더 잘 소거하는 것으로 나타났다. 아질산염은 체내에서 아민류(amines)와 반응하여 발암물질인 니트로사아민(nitrosamine)을 생성하는 것으로 알려져 있으며(Mirvish, 1970), 이러한 면에서 요구르트에서 아질산염 소거능은 젖산균의 기능성으로서 매우 중요한 것으로 사료된다.

분리 균주의 항산화능

분리균주 SK-7과 YK-11의 항산화능 측정을 위하여, DPPH를 이용한 radical scavenging capacity를 조사하였다(Fig. 4). 이들 균주에서 항산화능은 배양 후 12시간까지 급격하게 증가하였으며, 그 이후에는 적정 수준으로 유지되는 것으로 나타났다. 최종 항산화능은 SK-7에서 62.60%, 그리고 YK-11에서 54.98%로 각각 측정되었다. 결과적으로 *L. casei* SK-7 균주는 시판되는 요구르트에서 분리한 젖산균인 *L. bulgaricus* YK-11과 비교하여, 더 높은 항산화능을 보이는 것으로 나타났다. 다른 연구에서도 DPPH를 이용하여 전통적으로 발효시켜 만든 요구르트가 시중에서 판매되고 있는 요구르트보다 항산화능이 더 뛰어나다는 결과가 보고된 바 있다(Aloğlu and Oner, 2011). 활성산소(reactive oxygen species, ROS)라는 유해 물질의 생성은 체내에서 산화생성물을 생성시키는데, 이로 인해 세포 내에서 촉매 기능을 담당하고 있는 효소의 기능을 상실하게 하고(Pelicano *et al.*, 2004),

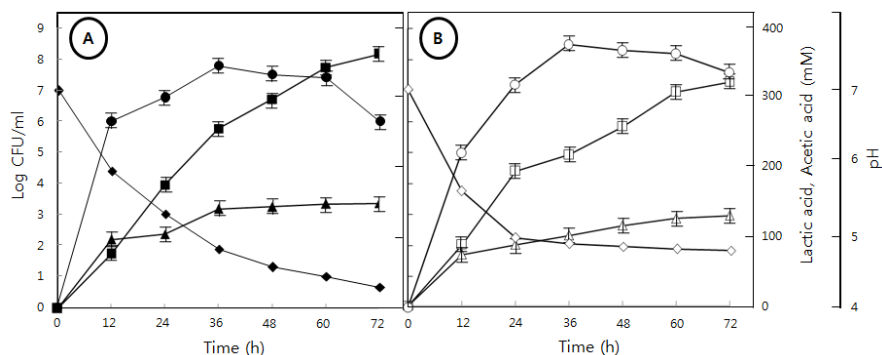


Fig. 2. Growth of test cultures SK-7 (A) and YK-11 (B), measured as viable cell count (●, ○) and compared with the parallel formation of lactic acid (■, □), acetic acid (▲, △), and pH change (◆, ◇). Results are mean±SD of three parallel measurements.

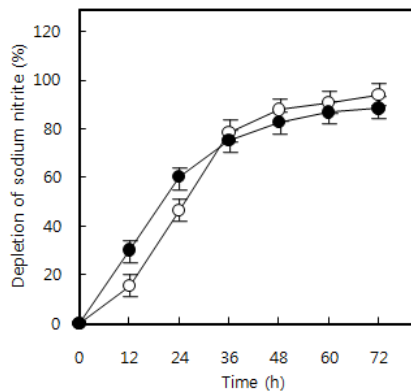


Fig. 3. Nitrite depletion by test culture SK-7 (●) and YK-11 (○) during incubation period. Results are mean±SD of three parallel measurements.

세포의 DNA strand를 분리시키며, 악성 형질 변환을 일으켜 암을 유발하는 요인이 된다(Sallmyr *et al.*, 2008). 이러한 측면에서 요구르트의 항산화능은 매우 유용한 기능성으로서, 본 연구에 사용된 요구르트 분리균주는 모두 활성산소를 소거하는 능력을 가지는 것으로 조사되었다.

β-Galactosidase 활성 측정

분리균주 SK-7과 YK-11의 β-galactosidase 활성을 알아보기 위하여 효소액에 대한 기질의 분해도를 측정하였다(Fig. 5). *L. casei* SK-7 균주의 경우, 접종 후 24시간까지 β-galactosidase 활성이 급격히 증가하였으며, 36시간이 경과하였을 때, 14.9 units/mg으로 가장 높은 활성을 나타내며, 그 후 배양시간이 경과함에 따라 활성이 급격히 감소하였다. *L. bulgaricus* YK-11 경우에는 *L. casei* SK-7 균주에서와 마찬가지로 24시간 까지 β-galactosidase 활성이 급격히 증가하였으며, 이 때 13.1 units/mg으로 가장 높은 활성을 나타내었다. 그 후 배양시간이 경과함에 따라 활성이 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다. β-Galactosidase 활성은 유제품에 포함된 젖당의 분해에 관여하는 효소로서, 또 다른 기능성의 요인으로 알려져 있다.

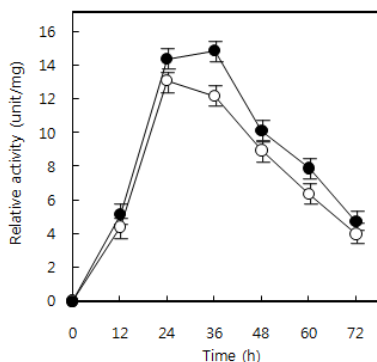


Fig. 5. β-Galactosidase activity of SK-7 (●) and YK-11 (○), measured as optical density and calculated relative activity. Data shown represent the mean±SD based on triplicate studies.

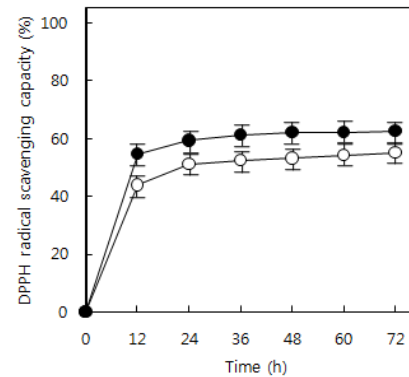


Fig. 4. Antioxidant capacity of SK-7 (●) and YK-11 (○), measured as optical density and DPPH radical scavenging capacity. Data shown represent the mean±SD based on triplicate studies.

항균활성 조사

분리된 젖산균인 *L. casei* SK-7과 *L. bulgaricus* YK-11의 항균력 조사는 disc diffusion assay 방법(Song *et al.*, 2009)을 이용하여 확인하였다. 두 가지 분리균주의 농축시킨 배양상등액을 식중독에 관여하는 그람양성 세균인 *B. cereus*, MRSA, *S. aureus*, 그람음성 세균인 *E. coli*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *Shigella sonnei*, 그리고 효모인 *Candida albicans*에 각각 노출시킨 후, 24시간 동안 배양하여 disc 주위에 형성되는 투명대의 형성유무를 통해 항균활성을 조사하였다. 그 결과 home-made 요구르트에서 분리된 SK-7은 모든 균주에 대해 투명대를 형성하므로써 항균활성을 가진 것으로 관찰되었으나(Fig. 6), 시판요구르트에서 분리된 YK-11는 항균활성이 거의 나타나지 않았다. 새우양식장에서 분리한 *Lactobacillus* 종의 새우 질병유발 병원균들에 대한 항균활성에 관한 연구에서 배양중 생성된 유기산에 의한 항균활성과 배양상등액을 중화시켰을 경우에 항균활성이 나타나지 않았다는 것을 보고하였다(Ma *et al.*, 2009). 본 연구에서도 pH를 중성으로 조절한 배양상등액에서는 항균활성이 나타나지 않았으나, pH를 조절하지 않은 상등액에서는 항균활성이 나타나는 동일한 결과가 얻어졌으며, 이 결과를 통해서 항균활성에 관여하는 물질은 유기산인 것으로 판단된다. 본 연구에서 사용된 것과 다른 요구르트와 치즈에서 분리된 *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus casei* 등과 비교하였을 때, *B. cereus*, *E. coli*와 같은 균주들에 대한 항균활성 효과와 유사한 것으로 보고된 바가 있다(Yang *et al.*, 2012).

요구르트를 비롯하여 여러 발효식품 등에서 분리되는 젖산균은 식품의 맛과 풍미를 증진시키거나 생물체 내에서 방어기작에 중요한 역할을 하며, 특히 항균활성에 관여하는 요소는 유기산, 과산화수소, 디아세틸(diacetyl), 박테리오신(bacteriocin) 등이 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며, *Lactobacillus* 종에서 생산되는 박테리오신은 그람양성 및(또는) 음성 세균에 대해 뛰어난 항균력을 가진 것으로 보고되고 있다(Schillinger and Lücke, 1989).

현대 사회에서 요구르트는 음료로서 뿐만 아니라, 젖산균이라는 프로바이오틱스가 첨가되어 있는 기능성 식품으로써 음용

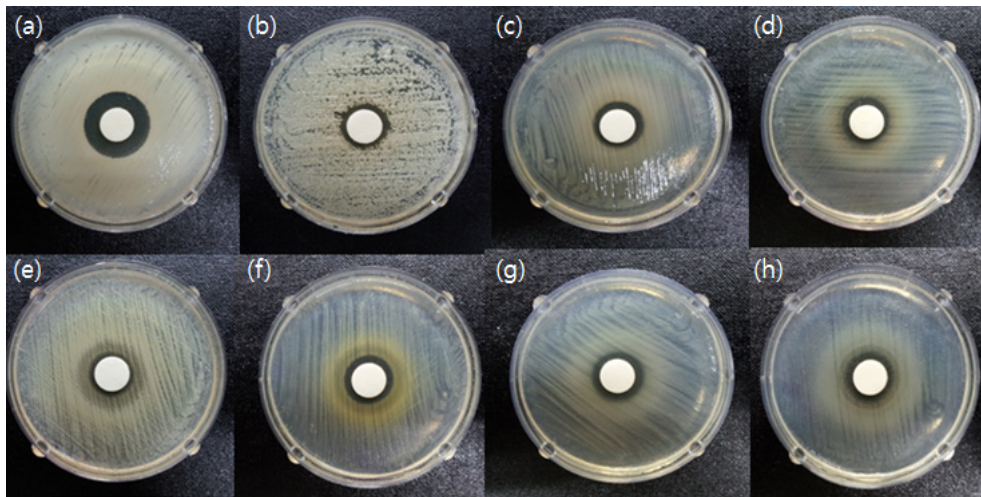


Fig. 6. Antibacterial activity by 20-fold concentrated culture supernatants from SK-7. Paper discs soaked with the supernatants were placed onto lawn plates of *Bacillus cereus* (a), *Candida albicans* (b), *Enterobacter aerogenes* (c), *Escherichia coli* (d), MRSA (e), *Staphylococcus aureus* (f), *Salmonella enteritidis* (g), *Shigella sonnei* (h). All strains grew on nutrient agar plates.

되고 있으며, 젖산균의 여러 가지 기능적인 특성은 많은 연구자들에 의해 보고되어왔다. 그러한 가운데, 집에서 제조되는 요구르트와 시판되는 요구르트에 대한 기능성의 비교에 대해서도 꾸준히 문제가 제기되어 오고 있다. 본 연구에서 시료로 사용된 요구르트들이 home-made 요구르트와 시판 요구르트를 대표하는 것은 아니지만, 이들 요구르트 내에 존재하는 젖산균들이 가지는 기능성에 대한 연구 발표는 여전히 미흡하기 때문에, 국민의 건강증진 차원에서 지금보다 많은 조사가 이루어져야 할 필요가 있다고 사료된다.

적 요

본 연구는 home-made 요구르트에서 분리한 *Lactobacillus casei* SK-7과 시중에서 판매되고 있는 요구르트에서 분리한 *Lactobacillus bulgaricus* YK-11의 기능성을 비교 분석하기 위해 실시하였다. 먼저 분리세균인 SK-7과 YK-11의 생리화학적 특성조사를 진행하였다. 이들 균주는 16S rRNA 염기서열을 이용한 계통유전학적 분석방법으로 동정하여, 각각 *L. casei* SK-7과 *L. bulgaricus* YK-11로 명명하였다. 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 SK-7과 YK-11의 유전적 계통수를 작성하였다. 72시간 동안 SK-7과 YK-11 배양에서 lactic acid와 acetic acid의 생산, 그리고 pH 변화를 조사하였다. 배양기간 동안 *L. casei* SK-7과 *L. bulgaricus* YK-11의 몇가지 기능성을 조사하였다. *L. casei* SK-7과 *L. bulgaricus* YK-11 배양상등액은 주어진 nitrite를 각각 93.9%와 88.2% 소거하였다. SK-7 and YK-11 배양상등액의 항산화능은 각각 62.6%와 54.9%였으며, β -galactosidase 활성은 14.9 units/mg과 13.1 units/mg로 측정되었다. 항미생물 능력은 SK-7과 YK-11 배양의 20배 배양농축액으로 조사되었으며, SK-7은 이 조사에 사용된 모든 미생물에서 명백한 것으로 관찰되었으나, YK-11에서는 관찰되지 않았다. 부가적인 기능성 연구가 이루어져야 되겠지만, 본 연구에서는 home-made 요구

르트에서 분리된 젖산균의 기능성은 시판요구르트에서의 기능성과 비교하여 우수한 것으로 조사되었다.

감사의 말

본 연구는 순천향대학교의 학술연구지원사업의 연구비 지원하에 수행되었다.

참고문헌

- Alan, F., Keenan, P., Donovan, F.O., Mayne, P., and Murphy, J. 1998. Methaemoglobinemia associated with sodium nitrite in three siblings. *BMJ* **24**, 1138-1139.
- Aloğlu, H.S. and Oner, Z. 2011. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *J. Dairy Sci.* **94**, 5305-5314.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Chun, J.W., Ma, C.W., and Oh, K.H. 2005. Physiological characterization of *Lactobacillus* sp. JK-8 isolated from shrimp aquaculture pond. *Kor. J. Microbiol.* **41**, 18-23.
- Gill, H.S. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**, 755-773.
- Ito, Y., Yodoshi, M., Tanaka, J.L., and Iwaida, M. 1979. Comparison of two methods and improvements for colorimetric determination of nitrite in cod roe. *J. Food Prot.* **42**, 715-718.
- Kim, D.H., Cho, H.W., Kim, D.H., and Oh, K.H. 2013. Functional characterization of *Lactobacillus sakei* JK-17 isolated from long-term fermented Kimchi, Muk Eun Ji. *KSBB J.* **28**, 18-23.
- Lin, M.Y. and Yen, C.L. 1999. Reactive oxygen species and lipid peroxidation product scavenging ability of yogurt organisms. *J. Dairy Sci.* **82**, 1629-1634.
- Ma, C.W., Cho, Y.S., and Oh, K.H. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture* **287**, 266-270.

- Martini, M.C., Lerebours, E.C., Lin, W.J., Harlander, S.K., Berrada, N.M., Antoine, J.M., and Savaiano, D.A.** 1991. Strains and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect on *in vivo* lactose digestion. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1041–1046.
- Miller J.H.** 1972. Experiments in molecular genetics. pp. 352–355. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA.
- Mirvish, S.S.** 1970. Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **44**, 633–639.
- Paul, M. and Somkuti, G.A.** 2010. Hydrolytic breakdown of lactoferricin by lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 173–178.
- Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P.** 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updat.* **7**, 97–110.
- Saarela, M., Lahteenmaki, L., Crittenden, R., Salminen, S., and Mattila-Sandholm, T.** 2002. Gut bacteria and health foods-the European perspective. *Inter. J. Food Microbiol.* **78**, 99–117.
- Sallmyr, A., Fan, J., and Rassoool, F.V.** 2008. Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. *Cancer Lett.* **18**, 1–9.
- Sanders, M.E.** 1999. Probiotics. *Food Technol.* **53**, 67–77.
- Savaiano, D.A. and Levitt, M.D.** 1987. Milk intolerance and microbe-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.* **70**, 397–406.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K.** 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1901–1906.
- Song, Y.J., Park, S.H., You, J.Y., Cho, Y.S., and Oh, K.H.** 2009. Antibacterial activity against food-poisoning causing bacteria and characterization of *Lactobacillus plantarum* YK-9 isolated from kimchi. *KSBB J.* **24**, 273–278.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., and Fillmore, S.** 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express* **2**, 48–59.
- Yang, Y.J. and Sheu, B.S.** 2012. Probiotics containing yogurts suppress *Helicobacter pylori* load and modify immune response and intestinal microbiota in the *Helicobacter pylori* infected children. *Helicobacter* **17**, 297–304.
- Zhou, N., Zhang, J.X., Fan, M.T., Wang, J., Guo, G., and Wei, X.Y.** 2012. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. *J. Dairy Sci.* **95**, 4775–4783.