



ARTICLE

박테리오신 생성 *Pediococcus acidilactici*를 적용한  
요거트 특성 및 항균성 연구

현인경 · 김민영 · 김서연 · 이지수 · 최아람 · 강석성\*

동국대학교 식품생명공학과

Functional Properties of Yogurt Fermented by  
Bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici*

In Kyung Hyun, Min Young Kim, Seo-Yeon Kim, Jee-Su Lee,  
Ah-Rang Choi, and Seok-Seong Kang\*

Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University, Goyang, Korea



Received: September 16, 2020  
Revised: September 21, 2020  
Accepted: September 22, 2020

\*Corresponding author :  
Seok-Seong Kang  
Department of Food Science and  
Biotechnology, College of Life Science  
and Biotechnology, Dongguk University,  
Goyang, Korea  
Tel : +82-31-961-5150  
E-mail : sskang@dongguk.edu

Copyright © 2020 Korean Society of  
Dairy Science and Biotechnology.  
This is an Open Access article distributed  
under the terms of the Creative Commons  
Attribution Non-Commercial License  
(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>)  
which permits unrestricted non-commercial  
use, distribution, and reproduction in any  
medium, provided the original work is  
properly cited.

ORCID

In Kyung Hyun  
<https://orcid.org/0000-0002-9417-6757>  
Min Young Kim  
<https://orcid.org/0000-0002-0727-0973>  
Seo-Yeon Kim  
<https://orcid.org/0000-0001-6758-5267>  
Jee-Su Lee  
<https://orcid.org/0000-0003-1673-241X>  
Ah-Rang Choi  
<https://orcid.org/0000-0001-6895-7042>  
Seok-Seong Kang  
<https://orcid.org/0000-0001-7029-9122>

Abstract

Physical and sensory characteristics of commercial yogurts are important aspects for consumer acceptability. In addition, beneficial functions of commercial yogurts are also emphasized for the probiotic dairy products. The aim of this study was to investigate the functional properties of yogurts with the combination of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici*. Yogurts fermented with commercial starter culture (control yogurt) and control yogurt together with *P. acidilactici* HW01 (yogurt+HW01), *P. acidilactici* JM01 (yogurt+JM01), or *P. acidilactici* K10 (yogurt+K10) were prepared. During 28 days after fermentation, the viability of lactic acid bacteria, pH, and brix, in the yogurt samples were assessed with standard methods. Moreover, to investigate the antilisterial activity of the yogurt samples, *Listeria monocytogenes* was simultaneously inoculated when the yogurts were prepared with lactic acid bacteria, and the viability of *L. monocytogenes* was determined. Although yogurt+K10 did not completely remove *L. monocytogenes*, control yogurt, yogurt+HW01, and yogurt+JM01 eradicated *L. monocytogenes* at day 2 after fermentation. However, yogurt+K10 also removed *L. monocytogenes* at day 3 after fermentation. Taken together, these findings suggest that the combination of yogurt with *P. acidilactici* does not affect its quality and they may consequently aid in the development of new probiotic yogurt.

Keywords

yogurt, *Pediococcus acidilactici*, *Listeria monocytogenes*, functional properties

서론

*Pediococcus acidilactici*는 그람 양성 구균으로 광범위한 pH, 온도 및 삼투압에서 성장하는 통성 혐기성균이다. *P. acidilactici*는 김치, sauerkraut와 같은 발효 야채나 발효 유제품, 막걸리와 같은 발효주나 누룩과 맥아에서 분리되었으며, 분리된 *P. acidilactici*가 인체에 유익한 작용을 한다는 연구결과가 있다. 예를 들면, 김치에서 분리한 *P. acidilactici*는 알레르기 및 염증을 효과적으로 제어하여 면역 조절제로서의 기능을 한다는 것이 밝혀졌다[1].

박테리오신은 미생물이 생성하는 천연 항균성 펩타이드 혹은 단백질이다. 인체에 섭취되면 단백질 분해효소에 의해 가수분해됨으로써 활성을 잃게 되며, 독성을 띄지 않고 잔류하지 않는다는 측면에서 새로운 식품보존제로서의 효용이 크게 기대되고 있다. 박테리오신은 양전하를 띄는 물질로서, 음전하를 띄는 인지질 이중층으로 구성된 세포막을 부수어 그 활성을 나타낸다. 박테리오신은 박테리오신 생성균을 저해하지 않으며, 상대적으로 고온에서 안정하고 유기 용매의 영향을 받지 않는다. 특히

그람 양성세균인 spoilage bacteria와 pathogenic bacteria를 효과적으로 저해하며, 대표적인 박테리옌은 *Lactococcus lactis*에 의해 생성되는 nisin, *P. acidilactici*에 의해 생성되는 pediocin 등이 있다. 특히, 김치로부터 분리한 *P. acidilactici* K10에 의해 생성되는 박테리옌은 대부분의 그람 양성세균뿐만 아니라, 일부 그람 음성세균에 대해서도 살균 활성을 보인다. 김치나 막걸리 및 시판되는 누룩에서 분리된 알코올 내성 균주인 *P. acidilactici* K3와 *P. acidilactici* S1은 식중독균을 저해시켜 주는 박테리옌을 생성하는 능력이 있다[2]. 또한 맥아로부터 분리된 *P. acidilactici* HW01은 *P. damnosus*, *P. claussenii* 등의 맥주의 품질에 영향을 주는 미생물을 저해하는 박테리옌을 생성한다[3].

프로바이옌스는 ‘충분한 양을 섭취했을 때 건강에 좋은 효과를 주는 살아있는 균으로 정의되고 있다[4]. 러시아의 과학자 Metchnikoff가 불가리아 사람들이 장수를 누리는 이유가 *Lactobacillus*로 발효된 발효유의 섭취 때문이라는 것을 밝혀낸 이래로 probiotics의 기능성은 오랫동안 연구되어 오고 있다. 가장 대표적인 프로바이옌스 균주로는 *Lactobacillus*가 있으며, 그 중에서도 *Lb. acidophilus*는 장까지 살아남는 능력이 우수하고 과산화수소수 및 천연항생물질을 형성하여 유해균을 억제한다. 면역조절 효과가 뛰어난 *Lactobacillus rhamnosus* 또한 내산성이 강해 장벽에 잘 부착하여 유해균의 침입을 억제하고 항암물질을 감소시킨다[5].

우유 및 유가공제품의 품질은 원유의 미생물학적 품질과 제품을 가공 및 처리하는 공장의 살균조건, 2차 오염 및 저장과 유통온도에 의해 영향을 받는다. 특히, 우유 및 유가공제품의 오염에 관여하는 균주에는 *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Lb. plantarum*, *Leu. mesenteroides* 등이 있다[6]. 특히 *L. monocytogenes*가 냉장온도에서 성장하는 특성은 중요한 의미를 갖는다. 이는 유제품의 오염으로 인하여 초기에 유입된 *L. monocytogenes*의 양이 적더라도, 보관 중 냉장온도에서 *L. monocytogenes*의 신속한 성장이 가능하여 유제품을 부패시킬 수 있다는 것이다. 또한, 공장에서 *L. monocytogenes*에 의한 오염이 발생하면, 제품의 품질을 저하할 뿐만 아니라, 적당한 조건이 갖춰지면 이것이 성장 및 번식할 수 있어 오염된 균을 제거하기가 어렵다는 보고도 있다[7].

따라서 본 실험에서는 요거트에 박테리옌을 생성하는 *P. acidilactici* 3가지 균주를 각각 혼합하여 생균수, brix, pH의 요거트 품질을 측정하였다. 또한 요거트에 저온성 병원성 세균인 *L. monocytogenes*를 접종하여 유산균이 생성하는 물질에 의한 요거트 속 병원성 세균 저해 능력을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 유산균 및 병원성 세균의 배양

요거트 제조 대조균으로는 시판되는 요거트에서 분리한 혼합 균주인 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lb. rhamnosus* GG를 이용하였다. 이는 요거트를 lactobacilli MRS(Neogen, USA) 배지에 streaking하여, 37°C에서 24시간 배양시켜 분리하였다. 요거트에 첨가한 *P. acidilactici* HW01, *P. acidilactici* JM01, *P. acidilactici* K10은 각각 보리, 타락, 묵은지에서 분리하였으며, 실험에 사용된 모든 유산균은 MRS 배지에서 37°C, 24시간 배양하여 사용하였다. 실험에 이용한 병원성 균인 *Listeria monocytogenes* KCTC 13064는 brain heart infusion (Neogen) 배지에서 37°C, 24시간 배양하여 사용하였으며, *L. monocytogenes*를 분별하는 배지로는 supplement를 넣은 PALCAM(UK) 배지를 사용하였다.

### 2. 요거트 제조

시판우유 100 mL에 시판되는 요거트에서 분리한 혼합 균주 3종(*S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*,

*Lb. rhamnosus* GG)을 1% 접종하였다(Yogurt). MRS broth에 혼합 균주 3종을 함께 배양하였으며, 추가적으로 *P. acidilactici* HW01(Yogurt+HW01), JM01(Yogurt+JM01), K10(Yogurt+K10)을 각각 접종하여 37°C, 24시간 배양한 후, 7,600×g, 4°C, 5분간 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 peptone water 10 mL를 넣어 균을 세척한 후, 시판우유 100 mL에 각각의 혼합 균을 1%가 되도록 접종하고, pH가 4.5로 떨어질 때까지 37°C, 24시간에서 48시간 동안 배양하여 요거트를 제조한 다음에 4°C에 보관하였다.

### 3. 요거트의 생균수 측정

요거트를 peptone water에 희석하고, 각 희석액을 100 mL씩 MRS agar에 pouring하여 37°C에서 24시간 배양하여 균을 계수하였다. 각 요거트 샘플은 3반복으로 실험을 진행하여 평균값을 구했다.

### 4. 요거트의 pH 측정

pH meter를 4.01, 7.00 buffer 용액으로 보정한 후, 94.5% 에탄올과 3차 증류수로 유리전극을 세척한 후 각 요거트 샘플의 pH를 3번 측정하여 평균값을 구했다.

### 5. 요거트의 brix 측정

Brix 측정기를 켜고 증류수를 이용해 영점을 조정한 다음, 각 요거트 샘플을 300 mL씩 기포가 생기지 않도록 분주한 후 brix를 3번 측정하여 평균값을 구했다.

### 6. 요거트에서 *Listeria monocytogenes* KCTC 13064 저해 능력

*L. monocytogenes* KCTC 13064( $1 \times 10^5$  CFU/mL)를 시판우유에 유산균과 함께 접종 후, 요거트 속 *L. monocytogenes*의 생균수를 0, 1, 2, 3일 간격으로 분별배지를 이용하여 3반복으로 측정하여 평균값을 구하였다.

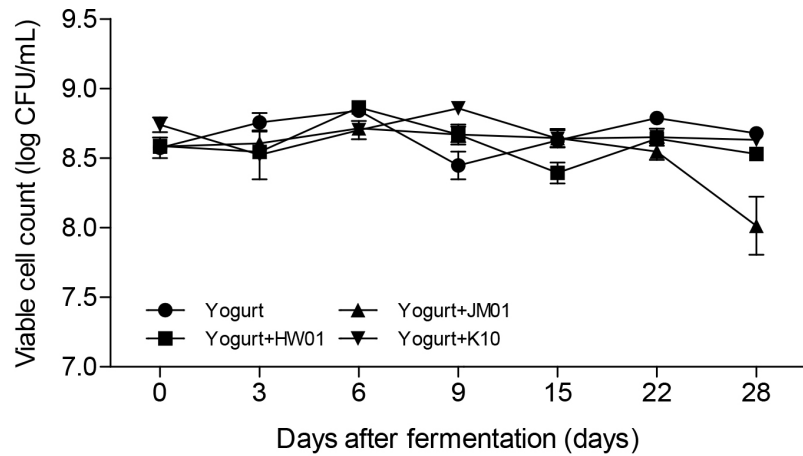
## 결과 및 고찰

### 1. 요거트의 생균수 측정

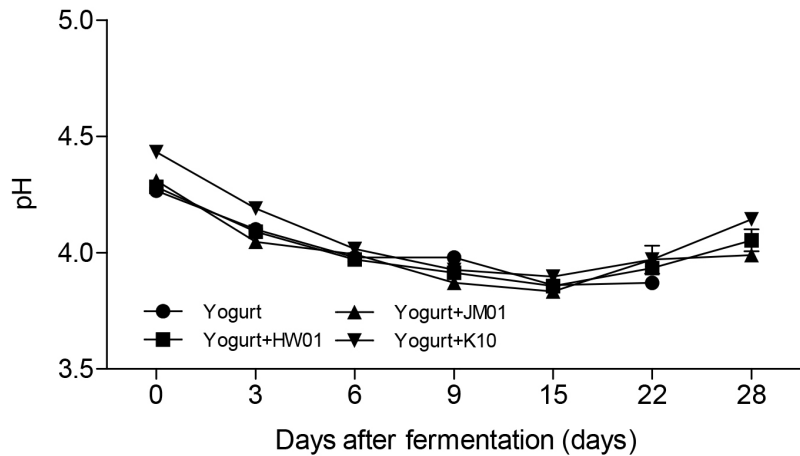
시판되는 요거트에서 분리해낸 혼합 균주 3종만을 적용한 yogurt 대조군 및 yogurt+HW01, yogurt+JM01, yogurt+K10 실험군의 생균수 변화를 측정한 결과, 발효 후 28일 동안 4개의 요거트 샘플은 모두 생균수가 유의적으로 변화하지 않았으나, yogurt+JM01은 22일 이후부터 생균수가 0.5 Log CFU/mL 감소하였다(Fig. 1). 식품공전의 유가공품 기준 및 규격에 따르면, 발효유의 총 유산균 수 기준은  $10^7$  CFU/mL 이상이다. 비록 yogurt+JM01의 생균수가 0.5 Log CFU/mL 감소하였지만, 본 실험에서 제조한 요거트는 모두 유산균 수( $10^8$  CFU/mL 이상)의 기준에 적합하였다.

### 2. 요거트의 pH 측정

시판되는 요거트에서 분리해낸 혼합 균주 3종만을 적용한 yogurt 대조군 및 yogurt+HW01, yogurt+JM01, yogurt+K10 실험군은 발효 후 4°C에 보관한 후 28일 동안 pH를 측정하였다. 초기 pH는 yogurt 대조군 및 실험군 모두 요거트의 최적 pH인 4.3 정도였으며, 발효 후 9일까지는 3일 간격으로, 이후 28일까지는 6일 간격으로 pH 변화를 측정하였다(Fig. 2). 측정 결과, yogurt 대조군과 실험군 모두 15일까지 pH가 감소하는 경향을 보였다. 15일까지의 pH 값은 대조군과 실험군 간의 차이가 거의 나지 않았다. 15일까지는 요거트 내 유산균의 유산발효로 인해 pH가 감소하는 것과 달리, 21일부터는 pH가 증가하기 시작하였다. 이는 발효유의 특성과 관련이 있는 것으로 사료되는



**Fig. 1.** Changes in the viable cell counts of lactic acid bacteria after fermentation. Milk was inoculated with *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, and *Lactobacillus rhamnosus* GG (yogurt) and this milk with the starter culture was also incubated with *Pediococcus acidilactici* HW01 (yogurt+HW01), *P. acidilactici* JM01 (yogurt+JM01) or *P. acidilactici* K10 (yogurt+K10). After the fermentation, the viable lactic acid bacteria enumerated.



**Fig. 2.** Changes in pH of yogurt samples after fermentation. Milk was inoculated with *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, and *Lactobacillus rhamnosus* GG (yogurt) and this milk with the starter culture was also incubated with *Pediococcus acidilactici* HW01 (yogurt+HW01), *P. acidilactici* JM01 (yogurt+JM01) or *P. acidilactici* K10 (yogurt+K10). After the fermentation, the pH was determined for 28 days.

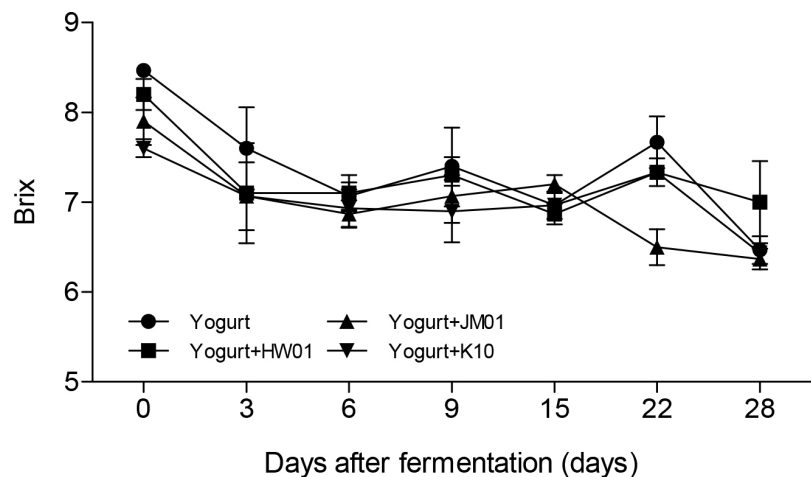
데, 식품공전의 발효유에 대한 정의에 따르면 발효유라 함은 원유 또는 유가공품을 유산균 또는 효모로 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품 첨가물을 가한 것을 말한다. 또한 발효유류의 제조 및 가공기준은 유산균과 효모를 제외한 배합된 원료는 살균 또는 멸균, 냉각 공정을 거친 후 원료로 사용한 유산균 또는 효모 이외의 다른 미생물이 오염되지 않도록 해야 한다는 것이다. 따라서 시판제품에서도 유산균 외의 효모가 발견될 수 있고, 정제를 통해 제조된 종균에 문제가 없다고 하더라도 발효유에 잔존해 있는 효모의 대사산물인 에탄올의 -OH기와 젖산균의 대사산물인 유기산(-H)이 중화반응을 하여 21일 이후부터 pH가 증가한 것으로 추측된다.

### 3. 요거트의 brix 측정

Brix는 당을 나타내는 단위로서, 수용액 속에 녹아 있는 용질의 양을 %단위로 나타낸 것이다. 우유에서 대표적 용질은 lactose이지만, brix에 관여하는 용질의 가용성 고형분에는 당뿐만 아니라 염, 단백질, 산 등도 포함되어 있기 때문에 brix가 높다는 것은 단순히 당도가 높다는 것은 아니다. 먼저 yogurt 대조군 및 yogurt+HW01, yogurt+JM01, yogurt+K10 실험군의 brix는 발효 후 6일까지 감소하는 추세를 보였다(Fig. 3). 이는 요거트 내의 유산균이 당 및 기타 유단백질을 대사에 이용한 결과라 볼 수 있다. 더욱이 pH가 6일까지 감소하는 것으로 보아(Fig. 2), 당을 대사산물로 이용하여 산을 생성하였을 것으로 판단할 수 있다. 그 중 yogurt 대조군이 가장 감소 추세가 작았으며, 실험군에서는 yogurt+HW01, yogurt+K10, yogurt+JM01 순으로 brix가 더 잘 유지되었다. 그리고 15일 이후부터는 품질 변화로 인해 brix 변화가 발생한 것으로 보이며, 21일 이후부터는 효모도 요거트 내의 당을 대사에 이용하기 시작하여 다시 brix가 감소한 것으로 사료된다.

### 4. 요거트에서 *Listeria monocytogenes*의 저해 능력

*L. monocytogenes* 균주를 약  $10^5$  CFU/mL의 같은 농도로 시판우유에 혼합 균주 또는 혼합균주와 *P. acidilactici* 균주를 접종한 후 *L. monocytogenes*의 저해율을 측정하였다(Table 1). 대조군 및 실험군 모두 *L. monocytogenes* 접종 1일 후에 초기 접종량보다 많은 *L. monocytogenes* 생균수가 관찰되었다. 요거트로 발효되기 전인 우유 상태의 pH는 6.5 정도로 *L. monocytogenes*가 일시적으로 증식 가능한 환경으로 사료된다. *L. monocytogenes*를 서로 다른 pH 조건에서 생존 및 성장하는 정도를 관찰한 연구 결과에 따르면, pH 4.0, pH 5.0으로 조정된 것에서 *L. monocytogenes*가 감소했으며, 5일간의 배양 후에는 검출되지 않았다. 하지만 pH 7.0 정도로 조정된 것에서는 급속히 성장했으며, 이후 pH를 4.0 정도로 낮아지면 생균수의 급격한 감소가 나타났다[8]. 이를 통해 *L. monocytogenes*의 저해에는 낮은 pH의 역할이 중요하다고 볼 수 있으며 본 연구의 조건에서도 요거트 발효 후 2일 후를 기점으로 *L. monocytogenes*의 수가 급격한 감소를 확인할 수 있었



**Fig. 3.** Changes in brix of yogurt samples after fermentation. The results were obtained by measuring the brix of each yogurt in 3 iterations. Milk was inoculated with *Streptococcus thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, and *Lactobacillus rhamnosus* GG (yogurt) and this milk with the starter culture was also incubated with *Pediococcus acidilactici* HW01 (yogurt+HW01), *P. acidilactici* JM01 (yogurt+JM01) or *P. acidilactici* K10 (yogurt+K10). After the fermentation, the brix was determined for 28 days.

**Table 1.** Inhibitory effect of yogurt samples with or without *Pediococcus acidilactici* on *Listeria monocytogenes* growth after fermentation

Yogurt samples	<i>L. monocytogenes</i> (Log CFU/mL)			
	Day 0 <sup>1)</sup>	Day 1	Day 2	Day 3
Yogurt	5.28±0.00	6.45±0.01	ND	ND
Yogurt+HW01	4.11±0.03	5.79±0.01	ND	ND
Yogurt+JM01	3.57±0.05	5.28±0.03	ND	ND
Yogurt+K10	3.81±0.08	5.94±0.12	3.18±0.90	ND

<sup>1)</sup> Days after fermentation.

ND, not detected.

다. 이와 함께 *P. acidilactici*는 박테리옌의 생성이 우수한 균주로 알려져 있으며 또한 유산균에서 생성된 박테리옌에 의해 *L. monocytogenes*이 증식이 저해됨이 알려져 있으므로[9,10], 이를 통해 생성된 박테리옌에 의해 *L. monocytogenes*의 생존율이 떨어지는 것으로 사료된다. 추가적으로 yogurt+HW01, yogurt+JM01에서는 발효 후 2일째부터 병원균이 완전한 저해를 보였고, 3일째에는 모든 실험군에서 병원균이 완전히 저해되었다. 이러한 결과를 통해 *P. acidilactici*가 생성한 유기산, 박테리옌과 같은 유용물질에 의해 그람 양성세균인 *L. monocytogenes*가 효과적으로 저해된 것으로 보인다[8].

## 요 약

본 연구에서는 박테리옌을 생성하는 *P. acidilactici*를 적용한 기능성 요거트를 제조하여 항균 활성과 프로바이옌틱로서의 품질을 평가하였다. Yogurt starter로는 시판되는 요거트에서 분리한 혼합 균주 3종(*S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. rhamnosus* GG)을 사용하였으며, 혼합 균주와 *P. acidilactici* HW01, *P. acidilactici* JM01, *P. acidilactici* K10을 각각 혼합 접종하여 각각의 요거트를 제조한 다음 유산균의 생균수, pH, brix를 측정하여 결과, 유산균의 생균수는 모두 8.0 Log CFU/mL 이상의 생균수가 검출되어 유산균 발효유로서 기준에 적합하였다. 또한 pH와 brix를 측정하여 결과, 발효 후 시간이 지남에 따라 모두 감소하였다. 유유나 유제품의 오염에 있어서 유의해야 할 병원성 균인 *L. monocytogenes*를 통해 병원성 저해능을 측정하였으며 *L. monocytogenes*가 발효 후 3일째부터 모두 저해되는 것이 확인되었다. 본 연구 결과를 통해 박테리옌 생성 균주인 *P. acidilactici* HW01, *P. acidilactici* JM01, *P. acidilactici* K10이 발효유제품 제조에 있어서 요거트 제품의 변화 없이 프로바이옌틱 효과를 지닌 균주로 기대되며, 식품안정성 및 새로운 프로바이옌틱 유제품 개발에 도움을 줄 것이라 예상된다. 그리고 *L. monocytogenes* 외의 다른 병원성 균의 저해효과에 대한 연구 및 요거트의 저장온도에 따른 병원성 저해효과 차이에 대한 연구도 기대된다. 따라서 박테리옌 생성 균주를 활용한 기능성 식품을 실제 식품산업에 적용한다면 안전성 및 신제품 개발에 대한 연구가 더 이루어져야 될 것으로 보인다.

## Conflict of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

## 감사의 글

본 연구는 동국대학교 식품생명공학과 연구지원사업에 의해 진행되었음.

## References

1. Kwon DY, Koo MS, Ryoo CR, Kang CH, Min KH, Kim WJ. Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in Kimchi and its characteristics. *J Microbiol Biotechnol.* 2002;12:96-105.
2. Jang D, Park S, Lee H, Pyo S, Lee HS. Isolation of the alcohol tolerant lactic acid bacteria *Pediococcus acidilactici* K3 and S1 and their physiological characterization. *Korean J Microbiol Biotechnol.* 2013;41:442-448.
3. Ahn H, Kim J, Kim WJ. Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. *Food Control.* 2017;80:59-66.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], World Health Organization [WHO]. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria [Internet]. 2006 [cited 2020 Feb 20]. Available from: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>
5. Mercenier A, Pavan S, Pot B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Des.* 2003;9:175-191.
6. Jeong SY, Park CS, Choi NS, Yang HJ, Kim CY, Yoon BD, et al. Characteristics of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ET45 isolated from Kimchi. *Korean J Microbiol.* 2011;47:74-80.
7. George AE, Levett PN. Effect of temperature and pH on survival of *Listeria monocytogenes* in coleslaw. *Int J Food Microbiol.* 1990;11:345-349.
8. Latorre L, Parisi A, Fracalvieri R, Normanno G, Nardella La Porta MC, Goffredo E, et al. Low Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods from Italy. *J Food Prot.* 2007;70:1507-1512.
9. Sivakumar N, Rajamani, Saif A. Partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus acidilactici*. *Braz Arch Biol Technol.* 2010;53:1177-1184.
10. Manjulata Devi S, Halami PM. Detection and characterization of pediocin PA-1/AcH like bacteriocin producing lactic acid bacteria. *Curr Microbiol.* 2011;63:181-185.