

## 원유에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* M23의 Tyrosinase 활성 저해 및 생리적 특성조사

허인숙 · 김기성 · 양승용 · 이남혁 · 임상동\*

한국식품연구원

### Physiological Characteristics and Tyrosinase Inhibitory Activity of *Lactobacillus plantarum* M23 Isolated from Raw Milk

In-Sook Heo, Kee-Sung Kim, Seung-Yong Yang, Nam-Hyouck Lee, and Sang-Dong Lim\*

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

#### ABSTRACT

In order to develop a new starter for fermented milk, *Lactobacillus plantarum* M23 was isolated from raw milk and investigated for physiological characteristics. It showed good tyrosinase inhibitory activity compared with commercial lactic acid bacteria. The optimum growth temperature of *Lactobacillus plantarum* M23 was 40°C and cultures took 17 hr to reach pH 4.3. *Lactobacillus plantarum* M23 showed more sensitivity to Penicillin-G, Oxacillin, Novobiocin, Chloramphenicol in a comparison of 12 different antibiotics, and showed most resistance to Vancomycin. It showed higher leucine arylamidase and  $\beta$ -galactosidase activities compared to 16 other enzymes. It was comparatively tolerant to bile juice and able to survive at pH 2 for 3 hours. It showed high resistance to *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* with rates of 77.8%, 86.5% and 83.8%, respectively. Based on these and previous results, *Lactobacillus plantarum* M23 could be an excellent starter culture for fermented milk with high resistance to melanin.

**Key words :** melanin, tyrosinase inhibitory activity, *Lactobacillus plantarum*, fermented milk, physiological characteristics

#### 서 론

의학계나 화장품 업계에서는 melanin 과잉생성을 억제하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있으며, 지금까지 알려진 tyrosinase의 저해제로 hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid, kojic acid, azelaic acid, corticosteroids, retinoids, arbutin 등이 있으나, 피부 안전성, 제형 안전성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있다(Ando *et al*, 1993; Duckworth and Coleman, 1970; Masuda *et al*, 1996). 특히, 최근에 안전성을 고려하여 상백피(Lee *et al*, 1997), 오배자(Kim *et al*, 1998), 감초(Lee *et al*, 2003), 녹차(No *et al*, 1999), 석이(Park and Chang, 1997), 송이(Woo and Yang, 2003), 치자(Kwak *et al* 2004), 쪽(Kwak *et al*, 2001), 앵두(Hwang *et al*, 2001) 등 천연물로부터 tyrosinase

활성 저해연구가 활발히 이뤄지고 있으며, 그 중 일부는 제품으로 상용화 되고 있으나 tyrosinase 활성 저해능이 있는 젖산균을 이용한 발효유에 대한 연구는 전무하다. *Lactobacillus* 속은 포자를 형성하지 않고 혐기적 또는 통성 혐기성으로 증식하는 그람 양성 세균으로, 자연계에 널리 분포할 뿐만 아니라 사람의 구강 또는 소화기관 등에서도 발견되는 미생물이다(Pelletier *et al*, 1997). 이 세균은 인체에 유익한 미생물로서 다양한 발효 유제품의 스타터로 널리 이용되고 있다. 발효 유제품에 사용되는 젖산균이 인체에 대한 바람직한 건강 효과를 나타내기 위해서는 몇 가지 전제 조건이 필요하다. 일단 섭취된 젖산균은 구강을 통해 섭취된 후 대장까지 이동하게 되는데(Chow and Weimer, 1999), 구강에서는 lysozyme 등과 같은 가수분해 효소의 작용에 대한 저항성을 갖고 있어야 하며 위, 십이지장 및 각 소화관 부위에서 받을 수 있는 치명적인 스트레스를 이겨낼 수 있어야 한다. 또한 *Lactobacillus*는 숙주 특이성을 갖고 있는 것으로 알려져 있으므로 해당 숙주의 장내 환경에 얼마나 잘 적응하느냐 여부도 중요하다

\*Corresponding author : Sang Dong Lim, Korea Food Research Institute, 516 Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam 463-746, Korea. Tel: 82-31-780-9082, Fax: 82-31-780-9160, E-mail: limsd@kfri.re.kr

며, 숙주의 장에 존재하는 다른 미생물과 경쟁할 수 있어야 한다(Gilliand *et al.*, 1980; Fuller, 1973; Lin and Savage, 1984; Morishita *et al.*, 1971).

본 연구는 tyrosinase 활성 저해능이 우수한 젖산균을 원유에서 분리하고 선발하여 기능성 발효유 제품의 스타터로서 적합한지 알아보기 위해 *L. plantarum* M23의 생리적 특성에 대해 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

전국 가축위생시험소(경기, 경북, 전북)와 축산진흥원(제주)에 들어와 있는 목장 원유를 수거하여 Modified MRS 배지(Table 1)에 0.1 mL씩 평면도말법으로 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 그런 다음, 각 균락을 Modified MRS 배지에서 순수분리하고, 노란색으로 변한 균락을 잠정적 젖산균으로 선발하였다. 선정된 균주는 Modified MRS 배지에 3회 백금이로 streaking한 후 호기 배양하여 순수 분리 하였다. 순수 분리된 균주는 10% 환원 탈지유(Difco Laboratories, USA)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하여 응고여부를 확인하였다. 양성반응을 보이며 pH 4.4에 도달하는 균주 179개를 선발하여 tyrosinase 활성 저해율을 측정하였다.

### Tyrosinase 활성 저해효과

균을 1% 접종하여 pH 4.4에 도달하는 10% 환원탈지유를 4°C, 27.216×g에서 10분간 원심 분리하였다. 얻어진 상등액을 0.45 µm PVDF syringe filter(Whatman Co.)로 여과한 후 tyrosinase 활성 저해율을 측정하였다. Matsuda 등(1994)의 방법에 준하여 67 mM phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 8.0 mM L-Dopa 120 µL와 시료 40 µL를 96-well microplate에 넣고 490 nm에서 흡광도(S<sub>1</sub>)를 측정한 후 tyrosinase mushroom(125 unit/mL)용액을 40 µL 첨가하였

다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 생성된 dopachrome의 양을 microplate reader(Emax, Molecular Devices, USA)를 사용하여 흡광도(S<sub>2</sub>)를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않고 시료대신 10% 환원탈지유에 lactic acid를 첨가하여 pH 4.4로 맞춘 후 원심분리하여 얻어낸 상등액을 첨가하고 측정된 흡광도(C<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>)로 다음과 같은 식에 의하여 각각의 tyrosinase 활성 저해율(%)을 구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \frac{(C_2 - C_1) - (S_2 - S_1)}{(C_2 - C_1)} \times 100$$

이 때 멜라닌 생성세포 유래 tyrosinase 활성 저해율 측정 시에는 Mouse 유래의 멜라닌 생성세포주인 Melanoma B16을 Fuller 등(2000)의 방법에 준하여 10% FBS(Fetal bovine serum)와 1% Penicillin-Streptomycin을 함유한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 배양시킨 다음 100π tissue culture dish에 약 5×10<sup>5</sup>개의 cell이 포함된 세포현탁액을 접종한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 충분히 자라게 되면 배지제거 후 tyrosinase buffer(80 mM PO<sub>4</sub> buffer + 1% Triton-X100 + 100 µg/mL PMSF)를 첨가하여 초음파 파쇄하였다. 12500 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 단백질 정량 후 각 반응당 150 µg의 단백질을 효소용액으로 하였다.

### 선정된 균주의 동정 및 DNA sequencing

분리·선정된 젖산 균주는 MRS 액체배지에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등(1992)의 방법에 의하여 실시하였다. 순수 분리된 균주는 Gram염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장, Catalase생성, 15°C 및 45°C에서의 성장, glucose로부터 가스 생성, arginine으로부터 ammonia생성, 현미경 관찰과 API 50CHL kit(bioMerieux, France)를 이용하여 49종의 당 발효 실험을 실시하였다. 젖산균의 DNA sequence는 universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GIT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, solgent EF-Taq을 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭과정은 95°C, 15분을 한 후 95°C, 20초; 50°C, 40초; 72°C, 1분 30초를 30회 시행하였으며 72°C, 5분으로 마무리 하였다. 서열분석은 PCR product를 solgent PCR purification kit로 정제한 후 ABI 3730XL DNA sequencer로 자동분석하였다.

### 젖산균의 생장

젖산균의 생장은 생균수, pH를 측정하여 실험하였다. 생균수는 10% 환원탈지유 200 mL에 젖산균을 50 µL(9.6×10<sup>5</sup>/mL) 접종한 후 34°C, 37°C, 40°C에서 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에 부어 균화 후 37°C

Table 1. Composition of Modified MRS agar

Component	gram/liter
Proteose peptone #3	10.0
Beef extract	10.0
Yeast extract	5.0
Lactose	20.0
Tween 80	1.0
Ammonium citrate	2.0
Sodium acetate	5.0
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.05
Dipotassium phosphate	2.0
Sodium azide	0.25
Bromocresol purple	0.04
Agar	15.0

에서 48시간 배양하여 계수하였다.

**젖산균의 단백질 분해**

10% 환원탈지유를 90°C에서 30분간 살균하여 단백질 분해력 측정배지로 사용하였다. MRS 액체배지에서 18시간 배양된 균주를 1% 접종하고 37에 배양하면서 0, 16시간의 시료를 채취하였다. Hull(1947)의 방법에 따라 시료 5 mL를 취하여 0.72 N trichloroacetic acid 10 mL와 섞어 혼든 후 10분간 정지한 다음 whatman No. 42 여과지에 여과된 시료를 다시 5 mL 취하여 sodium carbonate-sodium tetrphosphate solution 10 mL와 잘 섞은 다음 phenol reagent 3 mL를 다시 섞어서 5분 동안 잘 흔들여 청색 발색시킨 후 spectrophotometer(model 200-20, Hitachi, Japan)를 이용하여 650 nm에서 측정된 값을 미리 만들어진 tyrosine standard의 값으로 환산하여 값을 구하였다. Tyrosine standard curve의 일차식은  $y=0.9664x + 0.02107$ 이며  $R^2$ 는 0.9893으로 나타났다.

**항생제 내성**

항생제 내성 실험은 tryptic soy broth(TSB; Difco, USA)를 사용하여 2배 희석방법에 의해 16종의 항생제에 대한

*L. plantarum* M23의 최소 생육 저해 농도(MIC, Minimal inhibitory concentration) 값으로 측정하였다.

**효소활성**

효소활성 실험은 MRS 액체배지에서 37°C, 18시간동안 배양한 균주를 생리식염수로 희석하여  $10^5$ - $10^6$  CFU/mL 수준의 시료를 조제한 후 API ZYM kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 37°C에서 5시간 배양한 다음 효소반응 시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0-5의 수치로 나타내었다.

**담즙내성**

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 따라 0.05% cysteine 이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 후 liquid paraffin oil을 증층한 다음 MRS액체배지에서 37°C, 18시간 배양하였다. 배양된 균주를 0.3% oxgall이 첨가된 MRS 액체배지와 첨가되지 않은 MRS 액체배지에 각각 1% 접종하여 37°C에서 시간별로 anaerobic jar에서 혐기조건으로 배양하여 OD<sub>620</sub>값을 측정하였다.

**Table 2. Tyrosinase inhibitory activity of commercial lactic acid bacteria and selected lactic acid bacteria**

Strains	Source	Tyrosinase inhibitory activity (%)		
		in mushroom	in melanoma B16	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	ATCC 21053	22.4± 8.58	28.2±1.64	
<i>L. casei</i>	ATCC 393	37.7± 8.83	29.7±3.03	
<i>L. cremotis</i>	KFRI 00349	31.2± 6.19	17.8±4.06	
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i>	ATCC 7830, IFO 3376	16.9± 7.38	8.1±0.91	
<i>L. bulgaricus</i>	ATCC 33409	11.7± 5.43	4.1±2.23	
<i>L. amylophilus</i>	NRRL B-4437	7.5± 2.57	17.5±1.29	
Commercial strain	<i>L. reuteri</i>	KFRI 00661	23.9± 3.49	19.6±1.95
	ABT-L <sup>1)</sup>	Rhodia Inc.	37.3± 5.81	17.2±0.79
	NCFM <sup>2)</sup>	RHONE-POULENC	24.1± 2.40	13.7±3.66
	ABT-D	RHONE-POULENC	25.0± 2.13	18.0±1.94
	ABY-2D <sup>3)</sup>	Rhodia Inc.	41.3± 4.30	12.2±0.69
	BBL <sup>4)</sup>	RHONE-POULENC	15.5± 2.96	12.8±0.36
	ST-1 <sup>5)</sup>	Culture systems. Inc.	0.3± 1.59	5.6±1.76
	ST-5	Culture systems. Inc.	9.0± 4.73	17.4±2.99
	<i>L. acidophilus</i>	Culture systems. Inc.	17.1± 3.02	22.7±1.34
	Fermented milk	A	a company	45.8± 3.83
B		b company	18.5± 1.24	22.4±3.77
C		c company	44.4±10.11	13.9±2.67
D		d company	50.3± 2.87	21.6±2.60
M23 strain isolated from raw milk			52.1± 3.47	32.0±0.97

<sup>1)</sup>Commercial mixed culture composed of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*.  
<sup>2)</sup>*Lactobacillus acidophilus*.  
<sup>3)</sup>Commercial mixed culture composed of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*.  
<sup>4)</sup>*Bifidobacterium longum*.  
<sup>5)</sup>*Streptococcus thermophilus*.

### pH 내성

Clark 등(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 2, 3, 4 용액과 대조구로서 pH 6.4 용액을 제조하였고, 제조된 pH 용액 10 mL에 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에서 37°C, 24시간 배양된 각각의 균주 1 mL씩을 섞은 후 37°C에서 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생존수를 37°C, 48시간 혐기배양한 다음 계수하였다.

### 항균력

Gilliland와 Speck(1977)의 방법에 따라 *L. plantarum* M23의 항균력 실험을 하였으며 사용한 지시균은 병원성균 (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*)이다.

## 결과 및 고찰

### 젖산균의 분리 및 선발

전국 가축위생시험소(경기, 경북, 전북)와 축산진흥원(제주)에 들어와 있는 목장 별 원유를 멸균된 peptone용액으로 단계희석하고, Modified MRS 배지를 사용하여 노란색 집락을 형성하는 2,082개의 단일 균락을 분리하였고 잠정적으로 젖산균이라 추정하였다. 순수 분리된 균주는 10% 환원 탈지유에 접종하고 37°C에서 18시간 배양한 후 응고 여부를 확인하였다. 양성반응을 보이며 pH 4.4에 도달하는 균주 179개를 선발하여 mushroom에서 추출한 tyrosinase를 이용하여 tyrosinase 활성 저해율을 측정된 결과 M23 균주가 가장 우수하게 나타났다.

### Tyrosinase 활성 저해효과

Table 2에서 보는 바와 같이 분리된 젖산균 M23 균주에 대해 tyrosinase 활성 저해율을 측정된 결과, Mushroom에서 추출한 tyrosinase에서는 52.1%, Melanoma B16에서 추출한 tyrosinase에서는 32.0%로 나타났으며, 저해율이 상업균주와 시중 발효유에 비해 높게 나타남에 따라 tyrosinase 활성 저해효과가 우수한 균주로 선발하였다.

### 선발된 젖산균의 동정 및 DNA sequence

선발된 M23의 genus와 species를 결정하기 위하여 생리적, 생화학적 시험을 하였다. 선발된 M23은 Gram 양성을 나타내었고 현미경으로 관찰 시 rod 형태의 homo균이며, 산소유무와 상관없이 잘 성장하였고, catalase와 운동성은 음성으로 나타났다. 15°C에서 성장하는 반면 45°C에서는 성장하지 않았으며, glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니아를 생성하지 않아 genus *Lactobacillus*에 속하였다. Species를 정하기 위하여 API 50CHL kit(BioMereux, France)를 이용하여 49종의 당 발효 시험을 실시한 결과 (Table 3) M23은 lactose 등 25종으로부터 산을 생성하였

Table 3. Physiological characteristics of *L. plantarum* M23

Gram reaction			+
Cell type			rod
Spore forming			-
Motility			-
Aerobic growth			+
Anaerobic growth			+
Catalase reaction			-
Growth at 15°C			+
Growth at 45°C			-
Gas forming from glucose			-
Ammonia production from Alginin			-
Acid production from			
Glycerol	-	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	-	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-D-Xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	+
D-glucose	+	Amidon	-
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	+	Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α-Methyl-D-Mannoside	-	D-Arabitol	+
α-Methyl-D-Glucoside	-	L-Arabitol	-
N acetyl glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdalin	+	2-keto-Gluconate	+
Arbutin	+	5-keto-Gluconate	-
Esculin	+		

다. 그 결과를 ATB identification system에 입력한 결과 *Lactobacillus plantarum*으로 판명되었으며, 16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열분석 하였다(Fig. 1). 분석된 염기서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과 *L. plantarum*(I.D. 99%)으로 동정되어 *Lactobacillus plantarum* M23으로 명명하였다. Lee 등(2006)에 따르면 젖갈에서 분리된 *L. plantarum* NK181은 항균 활성, 항산화 활성 및 콜레스테롤 저해효과가 있어 우수한 probiotic 균주라고 하였다.

### *L. plantarum* M23의 성장

Fig. 3에서 보는 바와 같이 *L. plantarum* M23의 최적 생장온도를 알기 위하여 10% 환원탈지유 200 mL에 젖산균을 50 μL( $9.6 \times 10^5$ /mL) 접종한 후 온도별로 3시간 간격으

```

TTAGCGGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGT 60
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCG
ATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATG
GCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCAGGTATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCACCTTCTCCGGT
TTGTCACCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTT
GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACTCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCAC
CACCTGTATCCATGTCCCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGCAAG
ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG
CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCAGCCGACTCCCGAGGCGGAATGCTTAA 599
TGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTATCGTTTACG
GTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCATACTTTGAGCCTCAGCGTCA
GTTACAGACCAGACAGCCGCTTTCGCAACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTAC
CGTACACATGGAGTCCACTGTCTCTGCCTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACT
TCTTCGTTGAGCCGAAAGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTAC
GCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAG
TTAGCCGTGGCTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTT
TTCTTTAACAAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTCACTCACGCGGCGTTGCTCC
CAGACTTTCGTCATTGTGGAAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGT
GTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTG 1201
AGCCGTTACCCACCCTAGCTAATACGCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAA
GCCATCTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCC
AGGTGTTATCCCCGCTTCTGGGCAGTTTCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCA
CTCAAATGTAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTGCTTCGACTTGCATGTA 1442
    
```

Fig. 1. 16S rRNA sequence of *L. plantarum* M23.

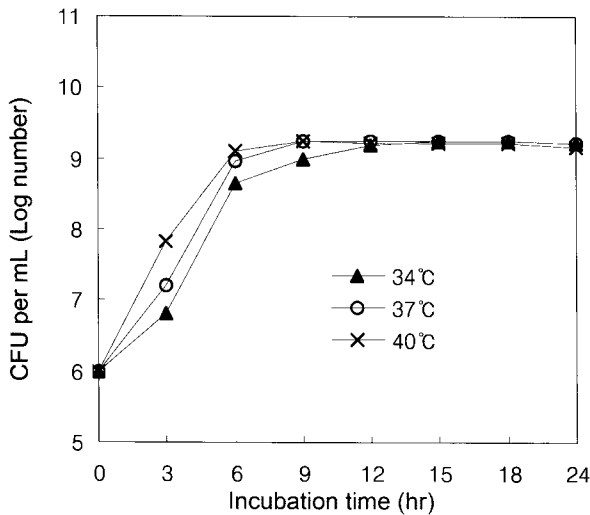


Fig. 2. Growth of *L. plantarum* M23 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures.

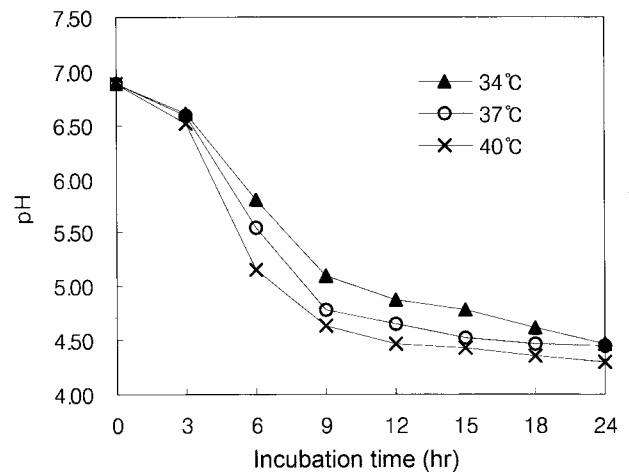


Fig. 3. pH change of 10% reconstituted skim milk during the growth of *L. plantarum* M23 at various temperature.

로 24시간까지 배양하였다. 그 결과 3-6시간대에 대수기를 나타내었고, 40°C에서 가장 빠른 성장률을 보였다. Fig. 4는 24시간까지의 pH 변화를 나타낸 것으로 34°C 및 37°C에 비해 40°C가 가장 빠른 산 생성을 보였으며, 이 때 발효유의 최적 pH 조건인 pH 4.3에 도달하는데 17시간 소요되었다.

***L. plantarum* M23의 단백질 분해**

MRS 액체배지에서 18시간 배양된 *L. plantarum* M23 1%를 10% 환원탈지유에 접종하고 37에 배양하면서 16시간 후 시료를 채취하여 시료의 흡광도를 표준곡선에 대입하여 tyrosine 농도를 구한 결과 0시간일 때 0.191±0.0022 mg에서 16시간 경과 후 0.737±0.068 mg을 나타내었는데, 이는 Lim 등(1996)이 *Lactococcus lactis*로 연구한 결과 0.11 mg이라고 보고한 결과에 비해 단백질 분해력이 높았다.

Table 5에서 보면 trypsin이나 chymotrypsin의 활력은 없지만 protease가 단백질을 분해하지 않았나 사료되었다.

***L. plantarum* M23의 항생제 내성**

치료 목적으로 섭취된 항생제에 의해서 프로바이오틱 균주가 사멸될 경우에 생체 내에서의 기능성이 낮아지게 되는데, 이러한 측면에서 항생제에 대한 내성은 매우 중요한 요소로 인식되고 있는 실정이다. 따라서 시중에서 이용되고 있는 총 16가지의 항생제에 대해 *L. plantarum* M23 균주가 내성이 있는지를 Table 4에 나타내었다.

Park 등(1996)에 따르면 *Lactobacillus* 속 균주에 대한 항생제 내성 실험에서 ampicillin은 0.37 µg/mL, rifampicin은 0.5 µg/mL로 감수성을 나타내었다. 또한 Kim 등(2003)의 연구에 따르면 *L. plantarum* KCTC3099에 대한 항생제 내성 실험에서 ampicillin은 <1 µg/mL, streptomycin은 <0.25 µg/mL, gentamycin은 ≤4 µg/mL, vancomycin은

**Table 4. Antibiotics susceptibility of *L. plantarum* M23**

Antimicrobial Agents	Minimal inhibitory concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )
Aminoglycosides	
Amikacin	40
Gentamycin	10
Kanamycin	50
Neomycin	25
Streptomycin*	25
$\beta$ -lactams	
Penicillin-G*	0.313
Methicillin	5
Oxacillin	1.875
Ampicillin	5
Gram-positive spectrum	
Bacitracin*	3.75
Rifampicin	3.75
Novobiocin	0.11
Lincomycin	3.125
Gram-negative spectrum	
Polymyxin B*	37.5
Broad spectrum	
Chloramphenicol	1.25
Vancomycin*	1600

\* : units/mL.

**Table 5. Enzyme patterns of *L. plantarum* M23**

Enzymes	<i>L. plantarum</i> M23
Alkaline phosphatase	1
Esterase (C4)	1
Esterase lipase (C8)	1
Lipase (C14)	0
Leucine arylamidase	5
Valine arylamidase	4
Cystine arylamidase	2
Trypsin	0
Chymotrypsin	0
Acid phosphatase	3
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	3
$\alpha$ -galactosidase	2
$\beta$ -galactosidase	5
$\beta$ -glucuronidase	0
$\alpha$ -glucosidase	4
$\beta$ -glucosidase	4
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	5
$\alpha$ -mannosidase	0
$\alpha$ -fucosidase	0

\*A value ranging from 0 to 5 is assigned to the standard color, Zero represents a negative; 5 represent a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength; 1 corresponds to the liberation of 5 nanomoles, 2 to 10 nanomoles, 3 to 20 nanomoles, 4 to 30 nanomoles and 5 to 40 nanomoles or more.

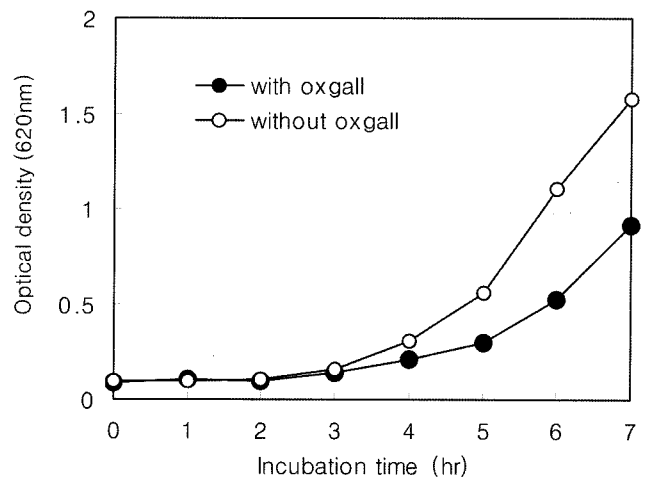
<32  $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타내었다고 보고된 반면 본 연구에서 분리한 *L. plantarum* M23 균주는 ampicillin은 5.0  $\mu\text{g/mL}$ , rifampicin은 3.75  $\mu\text{g/mL}$ , streptomycin은 25  $\mu\text{g/mL}$ , gentamycin은 10  $\mu\text{g/mL}$ 으로 비교적 높은 내성을 보였다. 특히, vancomycin에 대한 항생제 내성의 MIC 농도는 1600  $\mu\text{g/mL}$ 으로 *Lactobacillus plantarum* KCTC3099와 비교했을 때 높은 내성을 나타내었다.

#### *L. plantarum* M23의 효소활성

*L. plantarum* M23의 효소활성 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. Leucine arylamidase,  $\beta$ -galactosidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase는 5를 나타내 효소활성이 높게 나타났으며, valine arylamidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase에 대해서도 비교적 높은 효소활성을 보였다. 특히, 유당을 glucose와 galactose로 분해시키는 유당분해효소인  $\beta$ -galactosidase가 5를 나타냄으로써 젖산균으로 적합하였다. 또한 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인  $\beta$ -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 0으로 나타나 매우 안정된 젖산균임을 알 수가 있었다. Lee 등(2006)의 연구에서도 *L. plantarum* NK181의 효소활성이  $\beta$ -galactosidase에 대해서는 4를 나타내었고,  $\beta$ -glucuronidase에 대해서는 0으로 안정성을 보인 결과와 유사하였다.

#### *L. plantarum* M23의 담즙내성

담즙에 대한 *L. plantarum* M23의 내성결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 7시간 동안 배양 후에 OD값이 0.3% oxgall을 첨가하지 않았을 때는 1.578, 0.3% oxgall을 첨가하였을 때는 0.912로 약간 억제를 받기는 하나 담즙 내성이 있는 것으로 나타났다. Kim 등(2003)에 따르면 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3099의 담즙내성에 대한 반응시간대 별 흡광도 변화를 측정된 결과, 배양 24시간



**Fig. 4. Growth of *L. plantarum* M23 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with or without 0.3% oxgall.**

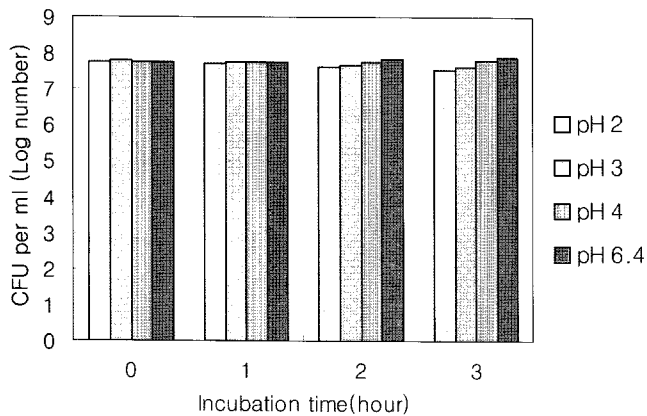


Fig. 5. Survival of *L. plantarum* M23 after three hours in HCl (pH 2, 3, 4, 6.4).

경과후의 흡광도에서 oxgall을 첨가하지 않은 대조구는 최고 OD<sub>610</sub>값이 1.1을 보인 반면, 처리구들은 OD<sub>610</sub>값이 0.5 정도의 수치를 나타내어, 담즙에 의해 저해를 받았다고 보고된 결과보다 우수한 결과를 보였다.

#### *L. plantarum* M23의 pH 내성

젖산균 미생물제로써 충분한 기능을 발휘하기 위해서는 pH 3 이하의 낮은 pH 조건의 위장관을 통과하여 소장내로 도달하여 생존하여야만 한다(Booth, 1985; McDonald *et al.*, 1990). 산에 대한 *L. plantarum* M23의 내성 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 대조구인 pH 6.4의 균수와 비교한 결과 pH 2와 3에서는 생존의 변화가 거의 없어 pH에 대한 내성이 있음을 보였다. 이는 pH 3.0의 조건에서 24시간동안 *L. plantarum* KCTC 3099의 생육의 변화를 확인할 수 없다는 Kim 등(2003)의 연구결과와 유사하였다. pH 4에서는 시간이 지남에 따라 균수의 변화가 0 시간에 비해 3시간 후의 균수가 증가하였으나 대조구 pH 6.4와 비교하였을 때 큰 변화가 없어 내산성이 있음을 알 수 있었다.

#### *L. plantarum* M23의 항균력

*L. plantarum* M23이 식중독균에 대해 어느 정도 억제하

는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 6과 같다. *L. plantarum* M23은 식중독균에 대해 항균력이 우수한 것으로 나타났는데, *E. coli*에 대해 77.7%, *S. typhimurium*은 86.5%, *S. aureus*는 83.8%로서 비교적 높은 항균력을 보였다. 배양 후 pH의 변화를 보았을 때 대조구인 식중독균은 pH 5.63-6.46이며, 혼합배양액은 pH 4.96-5.02이었다. 이는 *L. plantarum* M23과 식중독균의 혼합배양 과정에서 생성된 젖산의 영향으로 억제효과가 있는 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 국내 각 지역의 목장에서 수거한 원유에서 분리된 젖산균 M23 균주에 대해 tyrosinase 활성 저해율을 측정한 결과, mushroom에서 추출한 tyrosinase에서는 52.1%, Melanoma B16에서 추출한 tyrosinase에서는 32.0%로 나타났으며, 활성 저해율이 다른 상업균주와 시중 발효유에 비해 높게 나타남에 따라 tyrosinase 활성 저해효과가 우수한 균주로 선발하였다. 선정된 균은 Gram 양성, rod형태의 homo균이며, 당 발효실험과 16S rRNA 분석결과 *Lactobacillus plantarum*으로 판명되었고, *L. plantarum* M23으로 명명하였다. 발효유에 적합한 starter인지 확인하기 위해 생리적 특성을 조사하였다. *L. plantarum* M23은 배양온도 40°C에서 빠른 성장을 보였고, pH 4.3에 도달하는데 17시간이 소요되었다. 16종의 항생제 중 vancomycin에 대해 내성이 높았으며, 효소활성실험에서 leucine arylamidase, β-galactosidase의 활성도가 높았다. 담즙 첨가시 약간의 영향을 받았으나 담즙에 대한 내성이 있는 것으로 나타났으며, pH 내성 실험결과 pH 2에서 큰 변화가 없음에 따라 내산성이 있었다. 항균력 시험에서는 *E. coli*에 대해 77.8%, *S. typhimurium*와 *S. aureus*에 대해 각각 86.5%, 83.8%의 억제력이 나타나 항균력이 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과를 토대로 멜라닌 억제능이 우수한 기능성 발효유 제품의 스타터로 *L. plantarum* M23은 적합하다고 할 수 있다.

Table 6. Inhibition of pathogens by *L. plantarum* M23 in MRS broth

Pathogens	Growth				
	Pathogens <sup>a</sup>		<i>L. plantarum</i> M23 <sup>*</sup> + Pathogens		Inhibition (%)
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.15×10 <sup>8</sup>	6.46	2.55×10 <sup>7</sup>	5.02	77.8
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.25×10 <sup>8</sup>	5.63	1.68×10 <sup>7</sup>	4.96	86.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.59×10 <sup>8</sup>	5.78	1.07×10 <sup>8</sup>	4.99	83.8

\*Initial count of *L. plantarum* M23 : 1.09×10<sup>7</sup> CFU/mL.

<sup>a</sup>Determined after 6 hr incubation at 37°C.

## 참고문헌

1. Ando, S. O., Ando, Y. S., and Mishima, Y. (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 150-155.
2. Booth, I. R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359-378.
3. Chow, L. and Weimer, B. (1999) Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **82**, 23-31.
4. Clark, P. A., Cotton, L. N., and Martin, J. H. (1993) Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-Tolerance to simulated pH of Human Stomachs. *Cultured Dairy Products J.* **28**, 11-14.
5. Duckworth, H. W. and Coleman, E. (1970) Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **245**, 1613-1615.
6. Fuller, B. B., Drake, M. A., Spaulding, D. T., and Chaudhry, F. (2000) Downregulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell culture by yohimbine. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 268-276.
7. Fuller, R. (1973) Ecological studies of the *Lactobacillus* flora associated with the chop epithelium of the fowl. *J. Appl. Bacteriol.* **36**, 131-139.
8. Gilliland, S. E., Bruce, B. B., Bush, L. J., and Staley, T. E. (1980) Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjunct for young calves. *J. Dairy Sci.* **63**, 964-972.
9. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. (1977) Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.* **40**, 820-823.
10. Gilliland, S. E. and Walker, D. K. (1990) Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.* **73**, 905-911.
11. Hammes, W. P., Weiss, N., and Holzapfel, W. (1992) The Genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. In *The prokaryotes*. 2nd Edition. Springer-Verlag, New York. pp. 1563-1578.
12. Hull, M. E. (1947) Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of th proteins in milk. *J. Dairy Sci.* **30**, 881-884.
13. Hwang, H. S., Kim, J. M., Song, Y. A., and Jeon, Y. J. (2001) Inhibitory effect of ethanol extract and juice of the korean cherry (*Prunus tomentosa* Thunberg) on tyrosinase activity *in vitro*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **33**, 760-763.
14. Kim, E. R., Jung, B. M., Kim, J. Y., Kim, S. Y., Jung, H. K., Lee, H. J., and Chun, H. N. (2003) Basic physiological activities of *Bifidobacterium infantis* Maeil-K9 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3099 selected by anticarcinogenic activities. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 348-354.
15. Kim, H. J., Sapers, G. M., and Choi, S. W. (1998) Isolation and identification of tyrosinase inhibitor from *Galla rhois*. *Food Sci. Biotechnol.* **7**, 56-59.
16. Kwak, J. H., Kim, Y. H., Chang, H. R., Park, C. W., and Han, Y. H. (2004) Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 437-440.
17. Kwak, J. H., Seo, U. K., and Han, Y. H. (2001) Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 220-223.
18. Lee, J. S., Kim, J. A., Cho, S. H., Son, A. R., Jang, T. S., So, M. S., Chung, S. R., and Lee, S. H. (2003) Tyrosinase inhibitors isolated from the Roots of *Glycyrrhiza glabra* L. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**, 33-39.
19. Lee, K. T., Kim, B. J., and Kim, J. H. (1997) Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I) : inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *Intl. J. Cosmetic Sci.* **19**, 291-298.
20. Lee, N. K., Kim, H. W., Chang, H. I., Yun, C. W., Kim, S. W., Kang, C. W., and Paik, H. D. (2006) Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* NK81 isolated from jeotgal, a korean fermented food. *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 227-231.
21. Lim, S. D., Kim, H. S., Kim, K. S., Choi, I. W., Jin, Y. S., and Kim, H. U. (1996) A study on biochemical and physiological characteristics of *Lactobacillus pentosus* LSDM isolated from Kimchi. *Korean J. Dairy Sci.* **18**, 41-52.
22. Lin, J. H. and Savage, D. C. (1984) Host specificity of the colonization of murine gastric epithelium by lactobacilli. *Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Lett.* **24**, 67-72.
23. Masuda, M., Tejima, T., and Suzuki, T. (1996) Skin lighteners. *Cosmetics Toiletries* **111**, 65-77.
24. Matsuda, H., Nakamura, S., and Kubo, M. (1994) Studies of cuticle drugs from natural sources. II. Inhibitory effects of *Prunus* pplants on melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1417-1420 .
25. Mcdonald, L. C., Fleming, H. P., and Hassan, H. M. (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2124-2128.
26. Morishita, Y., Mitsuoka, T. M., Kaneuchi, C., Yamamoto, S., and Ogata, M. (1971) Specific establishment of lactobacilli in the digestive tract of germfree chickens. *J. Microbiol.* **15**, 531-538.
27. No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Yokozawa, T., and Chung, H. Y. (1999) Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci.* **65**, 241-246.
28. Park, S. Y., Ko, Y. T., Jeong, H. K., Yang, J. O., Chung, H. S., Kim, Y. B., and Ji, G. E. (1996) Effect of various lactic acid bacteria on the serum cholesterol levels in rats and resistance to acid, bile and antibiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 304-310.
29. Park, Y. H. and Chang, S. K. (1997) Screening of inhibitory effect of edible mushroom on tyrosinase and isolation of active component. *J. Fd Hyg. Safety* **12**, 195-199.
30. Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlious, P., and Bellom-Fontaine, M. N. (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1725-1731.
31. Woo, H. J. and Yang, D. C. (2003) Inhibitory effect of the extracts of *Tricholoma Matsutake* mycella on Tyrosinase Activity. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 45-50.