creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000266788

2018年 2月
碩士學位 論文

콜레스테롤 저하능을 가진 발효과채주스의 개발 및 그 특성 규명

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

全 幼 彬

2018年 2月 碩士學位論文
콜레스테롤 저하능을 가진 발효과채주스의 개발 및 그 특성 규명
全 幼 彬

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

콜레스테롤 저하능을 가진 발효과채주스의 개발 및 그 특성 규명

Development and characterization of fermented fruit-vegetable juice with cholesterol lowering ability

2018年 2月 23日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

全 幼 彬

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

콜레스테롤 저하능을 가진 발효과채주스의 개발 및 그 특성 규명

指導敎授 張 海 春

이 논문을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함

2017年 10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

全 幼 彬

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

全幼彬의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교 수 이 재 준 印

委 員 조선대학교 교 수 이주원 印

委 員 조선대학교 교 수 장해초 印

2017년 11월

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT ····· viii
LIST OF TABLES ····· iv
LIST OF FIGURES ····· vi

제 1 장 서 론 ····· 1

제 2 장 실험재료 및 방법 ····· 5
제 1 절 발효과채주스의 개발 및 특성 규명 ····· 5
1. 발효과채주스의 개발 ····· 5
가. 시판 유산균 첨가 음료 조사 ····· 5
나. 발효과채주스의 제조 ····· 5
(1) 사용 균주 ····· 5
(2) 과채주스의 제조 및 발효 조건 설정 ····· 6
2. 발효과채주스의 발효 특성 ····· 7
가. 이화학적 특성 ····· 7
나. 미생물학적 특성 ····· 7
3. 종균비첨가 과채주스에서 분리한 유산균 조사 ····· 8
가. 종균비첨가 과채주스에서 유산균의 분리·동정 ····· 8
나. 종균비첨가 과채주스에서 분리한 유산균에 대한 *Lb. plantarum* EM의 항균 활성 ····· 8
4. 발효과채주스의 항균 spectrum 조사 ····· 11
가. 발효과채주스의 배양 상징액 (조항균 물질)의 준비 ····· 11
나. 사용한 균주 및 배지 ····· 11

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 항균 spectrum 조사 방법 ····· 14
5. 발효과채주스의 저온 저장기간에 따른 특성 ····· 14
가. 이화학적 특성 ····· 14
나. 미생물학적 특성 ····· 14
다. 항균 활성 측정 ····· 15
6. 발효과채주스의 맛의 최적화 ····· 15
가. 관능 평가 ····· 15
나. 통계 처리 ····· 16
제 2 절 발효과채주스의 성분 분석 ····· 17
1. 일반 성분 분석 ····· 17
가. 일반 성분 분석 ····· 17
나. 유리당 분석 ····· 17
다. 유기산 분석 ····· 18
라. 유리 아미노산 분석 ····· 18

제 3 장 결과 및 고찰 ····· 19
제 1 절 발효과채주스의 개발 및 특성 ····· 19
1. 발효과채주스의 개발 ····· 19
가. 시판 유산균 첨가 음료 조사 ····· 19
나. 발효과채주스의 제조 ····· 21
2. 발효과채주스의 발효 특성 ····· 21
가. 이화학적 특성 ····· 21
나. 미생물학적 특성 ····· 25
(1) 유산균수와 총 균수 ····· 25
(2) 유산균 외 균수 ····· 31
(3) 대장균군 ····· 31
3. 종균비첨가 과채주스에서 유산균 분리·동정 ····· 38

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

가. 종균비첨가 과채주스에서 유산균 3종 분리·동정 ····· 38
나. 종균비첨가 과채주스에서 분리한 3종에 대한 *Lb. plantarum* EM의 항균 활성 ····· 41
4. 발효과채주스의 항균 spectrum ····· 43
5. 발효과채주스의 저온 저장기간에 따른 특성 ····· 47
가. 이화학적 및 미생물학적 특성 ····· 47
나. 항균 활성 측정 ····· 51
6. 발효과채주스의 맛의 최적화 ····· 53
제 2 절 발효과채주스의 성분 ····· 55
1. 일반 성분 분석 ····· 55
가. 일반 성분 ····· 55
나. 유리당 ····· 55
다. 유기산 ····· 56
라. 유리 아미노산 ····· 56

제 4 장 결론 ····· 61

제 5 장 참고문헌 ····· 65

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

LIST OF TABLES

Table 1. List of microorganisms used in the study ····· 10

Table 2. List of microorganisms used in spectrum of antimicrobial activity ···· 13

Table 3. Investigation of commercially available beverages containing lactic acid bacteria ····· 20

Table 4. Identification of strains isolated from non-starter fruit-vegetable juice (15℃, 5 days) ····· 40

Table 5. Antimicrobial activity of *Lb. plantarum* EM against three stains isolated from non-starter fruit-vegetable juice ····· 42

Table 6. Inhibitory spectrum of fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM at 15℃ from 0 to 5 days ····· 45

Table 7. Change of pH, acidity and microbial populations in fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM during storage at 4℃ ····· 49

Table 8. Change of pH, acidity and microbial populations in the commercial lactic acid bacteria beverages during storage at 4℃ ····· 50

Table 9. Antimicrobial activity of fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM according storage period at 4℃ ····· 52

Table 10. Sensory evaluation of fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM by addition of D-fructose or sucrose ····· 54

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 11. Proximate composition in non fermented fruit-vegetable juice and fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM (15℃, 5 days) ····· 57

Table 12. Free sugars in non fermented fruit-vegetable juice and fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM ····· 58

Table 13. Organic acids in non fermented fruit-vegetable juice and fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM ····· 59

Table 14. Free amino acids in non fermented fruit-vegetable juice and fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM ····· 60

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

LIST OF FIGURES

Figure 1. Changes in pH and acidity of juice during fermentation at 15℃ using stored apple ····· 23

Figure 2. Changes in pH and acidity of juice during fermentation at 15℃ using newly harvested apple ····· 24

Figure 3. Changes in the viable cell number of lactic acid bacteria of juice during fermentation at 15℃ using stored apple ····· 27

Figure 4. Changes in the viable cell number of lactic acid bacteria of juice during fermentation at 15℃ using newly harvested apple ····· 28

Figure 5. Changes in the viable cell number of total bacteria of juice during fermentation at 15℃ using stored apple ····· 29

Figure 6. Changes in the viable cell number of total bacteria of juice during fermentation at 15℃ using newly harvested apple ····· 30

Figure 7. Changes in the viable cell number of except *Lb. plantarum* EM of juice during fermentation at 15℃ using stored apple ····· 32

Figure 8. Gram staining of the isolated strains except *Lb. plantarum* EM from fermented fruit-vegetable juice using stored apple ····· 33

Figure 9. Changes in the viable cell number of except *Lb. plantarum* EM of juice during fermentation at 15℃ using newly harvested apple ·· 34

Figure 10. Gram staining of the isolated strains except *Lb. plantarum* EM from fermented fruit-vegetable juice using newly harvested apple ····· 35

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 11. Coliform group test of fermented fruit-vegetable juice at 15℃ for 5 days ····· 36

Figure 12. Gram staining of the isolated strains from non-starter fruit-vegetable juice using newly harvested apple ····· 39

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Characterization of Fruit-Vegetable Juice fermented with *Lactobacillus plantarum* EM and its cholesterol-lowering effects

Jeon, Yu Bin
Adviser : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.
Department of Food and Nutrition,
Graduate School of Chosun University

Lactobacillus plantarum EM isolated kimchi showed strong antimicrobial activity and cholesterol-lowering activity. In this study, fruit-vegetable juice was fermented using *Lb. plantarum* EM and then investigated its characteristics. *Lb. plantarum* EM was inoculated 1% into juice mixed with apples and cabbage and fermented at 15℃ for 5 days. After 5 days of fermentation, viable cell number of *Lb. plantarum* EM was found to be more than 9 log CFU/mL.

Fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM showed broad antagonistic activity against different pathogens and food spoilage microorganisms; *Bacillus cereus* KCTC 3624, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* serovar. Typhi ATCC 19430, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. Furthermore, fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM showed antifungal activities against *Aspergillus flavus* ATCC 22546, *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918, *Aspergillus ochraceus* PF-2, *Aspergillus nidulans* PF-3, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

After fermentation of fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM at 15 ℃ for 5 days, the characteristics according to low temperature(4℃) storage period were investigated. As a result, the viable cell number of *Lb. plantarum* EM was about 8.9 log CFU/mL at the 21st day of low temperature storage, and the viable cell number at the end of fermentation was maintained. In addition, even after the low temperature storage period was extended, the fermented fruit-vegetable juice using *Lb. plantarum* EM retained its antimicrobial activity. From the above experiment, it was confirmed that the fermented fruit-vegetable juice using *Lb. plantarum* EM developed in this experiment had excellent preservation and antibacterial activity.

The result of proximate composition analysis for investigation of functional properties of fermented fruit-vegetable juice, the fermented fruit-vegetable juice was found to reduce crude fat by more than 50% compared to non fermented fruit-vegetable juice. The results of free sugar analysis showed that the total amount of free sugars was decreased by carbohydrate metabolism of *Lb. plantarum* EM in fermented fruit-vegetable juice compared to non fermented fruit-vegetable juice. As a result of organic acid analysis, lactic acid production by fermentation increased the lactic acid amount of fermented fruit-vegetable juice compared with non fermented fruit-vegetable juice. Free amino acid analysis showed various amino acids such as glutamine, histidine and proline in fermented fruit-vegetable juice.

The results of organic acid analysis showed that the fermented fruit-vegetable juice significantly was increased lactic acid amount compared to non fermented fruit-vegetable juice.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 1 장 서 론

근래 과학의 발달로 인해 사회 구조가 자동화로 변함에 따라 과거 어느 때보다 생활이 편리하고 윤택해졌다. 동시에 현대인들은 환경오염, 미세먼지, 중금속, 수많은 종류의 유해물질과 항생물질에 노출되어 있고, 과영양 시대로 지나친 육류와 가공음식 섭취, 잦은 음주와 야식 문화 등의 식생활이 문제가 되고 있다[19, 42]. 현대인들의 생활 경제력이 향상됨에 따라 복지, 장수, 건강에 대한 욕구도 증대되고 있다. 이처럼 건강을 챙기고자 하는 소비자들이 늘면서 그에 따라서 식품업계에서도 맛과 건강을 모두 잡을 수 있는 발효식품에 주목하고 있다.

최근 세계적으로 발효식품이 건강에 좋다는 연구 결과가 보고되고 있다. 미국의 저명한 건강 관련 잡지에서 발표된 세계 5대 건강식품으로 스페인 올리브유, 그리스 요구르트, 일본의 콩, 한국의 김치, 인도 렌즈콩 등을 선정하였으며[60], 5가지 중에 발효식품이 3가지나 포함되어 있을 만큼 세계적으로 주목받고 있다. 유럽에서도 그 동안 생소했던 발효식품에 대한 인지도가 점점 늘어가고 있다. 발효식품이 건강에 유익한 이유 중에 장내의 유익한 균을 증가시키고 유해한 균을 감소시키는 정장작용이 제일 먼저 거론된다[47]. 사람의 장에는 유익한 균과 유해한 균이 공존하며 살아가고 있으며, 그 총 량은 항상 일정량을 유지하고 있는데 발효식품을 섭취하여 유익한 유산균을 다량으로 공급하게 되면 상대적으로 유해한 균이 줄어들게 되어 장내 환경은 유익한 균이 우위를 차지하는 바람직한 상태를 유지하게 되는 것이다.

우리나라 고유의 발효식품 중에서도 김치는 과학적으로 그 우수성에 대해 널리 알려져 있다. 김치는 장 속의 다른 유해균의 작용을 억제하고 비만, 고혈압, 당뇨병, 소화기계통의 암 예방에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 김치 원료가 되는 채소 자체에 다량의 섬유소가 함유되어 있어 변비를 예방하고 체중 감량에 도움을 준다.[6, 16, 17, 34, 35]

김치의 발효는 김치 제조를 위해 사용되는 다양한 원재료에서 유래한 미생물들에 의해 일어난다. 미생물은 증식을 하기 위하여 주위의 영양성분을 분해하거나 합성하여 자신이 필요로 하는 물질을 얻게 된다. 이런 과정 중에 본래에는 없던 새로운 영양성분이 만들어지기도 하고, 여러 가지 향기성분이 부산물로 형성되기도 한다. 그 중, 유산균은 대표적인 김치발효 미생물로써 김치 발효 과정 중 우점하게 된다[3]. 김치는 숙성되는 과정에 따라 다양한 종류의 유산균을 포함한다[15]. 다양한 유산균에 의한 김치

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

발효 과정 중 생성된 유기산, 만니톨, 이산화탄소 등은 김치의 독특한 맛과 풍미에 기여하며, 비타민, 아미노산, 프리바이오틱스, GABA (γ-aminobutyric acid) 등은 건강증진에 좋은 역할을 한다[14]. 이러한 김치 발효 유산균은 학문과 산업의 모든 분야에서 관심을 받고 있으며, 다양한 방면으로 미생물학적 연구가 발표되면서 김치 특유의 유산균 기능에 대한 관심이 높아지고 있다.[2, 4]

최근에는 유산균을 생균제로 섭취하는 프로바이오틱스 (probiotics)로서의 개념이 널리 대두되고 있다[40]. 프로바이오틱 생균제는 원생동물에 의해서 생성되는 물질로 다른 원생동물의 생육을 촉진하는 물질을 지칭하며, 숙주의 장내 미생물의 균형을 향상시킴으로서 건강 증진 효과를 나타내는 활성 미생물 보충제를 말한다[31]. 유산균을 비롯한 세균들이 프로바이오틱으로 인정받기 위해서는 상부 소화관의 위산과 담즙산에서 살아남아 소장까지 도달하여 장에서 증식하고 정착하여야 한다. 또한, 장관 내에서 유용한 효과를 나타내어야 하고 생산한 항균물질에 대한 내성과 독성이 없고 비병원성 등의 안전성이 보장되어야 한다[52]. 현재 프로바이오틱 생균제로 사용되고 있는 것은 *Bifidobacterium*속, *Lactococcus*속, *Lactobacillus*속, *Enterococcus*속, *Streptococcus*속 *Bacillus coagulans* 등이 있다. 이러한 프로바이오틱의 개체 수 증가를 위하여 필요한 양분을 제공하는 하는 것을 프리바이오틱스 (prebiotics)라고 한다. 이는 대장 내 유용 미생물에 의해 이용되어 미생물의 생육이나 활성을 촉진함으로써 숙주 건강에 좋은 효과를 나타내게 하는 비소화성 식품성분이다[26]. 프리바이오틱스는 상부 소화관에서 소화 또는 흡수되지 않아야 하고 대장 내에서 유해균을 억제하고 유용 세균을 선택적으로 활성화시킬 수 있어야 한다. 이러한 프로바이오틱스는 라피노오스, 프럭토올리고당 등의 올리고당류와 기타 락티톨, 자일리톨과 식이섬유 등이 해당된다[52]. 장내 유용세균의 생육을 돕는 프로바이오틱과 이들의 영양원인 프리바이오틱의 혼합체인 신바이오틱(synbiotic)은 프로바이오틱 유산균이 보다 빠르게 장에 정착할 수 있도록 하고 장내 유익균들의 성장을 촉진하며, 이러한 형태로 사료 등에서 이미 산업적으로 이용되는 단계에 있다[38].

프로바이오틱스에 대한 관심이 증가하는 추세에 따라 김치에서 유래한 우수한 유산균의 프로바이오틱으로서의 이용 가능성과 기능에 대해서도 다양한 연구가 이루어지고 있다[28]. 지금까지 연구되어 보고된 김치유산균에 대한 기능성과 효능으로는 장내 정상 세균총의 균형을 유지하는 정장작용 효과 외에도 항암효과, 항균작용, 혈청 콜레스테롤 저하 작용, 항변이원작용, 면역 기능 부활 작용에 의한 interferon 유도 등 생리활성에 관한 연구가 보고되었다[8, 20, 27]. 최근에는 항종양효과와 항체 생성 및 세포성

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

면역 활성화 기작에 의한 병원성 세균의 감염 방어, 아토피 피부염 개선 효능과 작용을 규명한 연구가 보고되었고[12, 22, 41, 48], 이러한 질병개선효과를 초래하는 것에 관한 *in vitro* 실험, *in vivo* 실험, 임상시험의 연구가 보고되고 있으며, 이를 바탕으로 생균제 (probiotics)로서의 기능이 주목받고 있다. 이처럼 김치유산균의 다양한 기능성 및 효능에 관한 연구가 밝혀짐으로써 고부가가치를 창출할 수 있는 자원으로 인식되고 있다. 현재까지도 김치유산균의 새로운 종류와 효능에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있으며[18], 김치유산균의 활용에 대해 식품산업 분야에서는 김치유산균의 효능을 제대로 살려 섭취할 수 있는 새롭고 창의적인 건강기능제품이나 식재료를 개발하고 있다. 김치유산균은 최근 빵, 우유, 초콜릿, 음료 등에 대거 등장하면서 식품업계 전반에 건강한 바람을 일으키고 있다.

발효음료시장은 기존의 발효유와 발효음료시장으로 나누어질 수 있었으나, 최근 웰빙 등의 영향으로 발효식품에 대한 관심 및 소비가 증대되어 다양한 제품이 출시되면서 동 시장의 경계가 넓어졌다. 발효유는 관련된 생산설비 투자비가 많이 들고 기존에 이러한 생산설비를 갖춘 업체가 아니라면 발효유 관련 기술의 개발과 기술사업화에 상당한 어려움이 존재하기 때문에 발효유보다는 발효음료(기타음료 등 포함)와 관련된 기술 개발 시 기술사업화에 더 유리하다[55]. 최근 들어 유가공품 외에도 과일, 채소 등을 사용한 과·채주스나 과·채음료에 유산균을 첨가하거나 유가공품 또는 식품성 원료를 유산균으로 발효시켜 가공(살균을 포함)한 유산균음료(유산균수가 1.0×10^6 CFU/mL 이상)[57]의 발효음료 제품을 생산·출시하는 경우가 많으며, 이에 대한 소비자 반응도 좋아 수요가 증가하고 있는 추세이다.

본 연구에서는 우수한 김치유산균을 활용하여 식품에 적용하고, 발효된 식품의 기능적 특성에 대해 조사하고자 한다. 사용할 균주는 *Lactobacillus*속 균주로, 프로바이오틱 유산균으로서 알려진 인체의 장내에 서식하는 정상 미생물 군집의 주요 구성원이다. *Lactobacillus*속은 건강한 소화기관을 유지하는데 중요하다고 알려져 있고 면역증강, 항균, 항바이러스 효과 등을 나타내는 것으로 보고되었으며[13, 24, 25], 미국의 공중건강 가이드라인(U.S. Public Health Service Guidelines)에 의하면, 현재 미국 균주 기탁기관(ATCC)에 기탁된 *Lactobacillus*속 균주 모두 인체나 동물에 질병을 유발할 잠재적 위험에 대해서는 알려진 것이 없다고 인정되는 '안정수준(Bio-safty Level) 1'로 분류되어 있다.

현대인들의 서구화된 식생활로 고지방식, 고콜레스테롤 식이에 따른 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 심혈관계 질환 등이 지속적으로 증가하고 있고, 콜레스테롤 섭취량이

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

증가함에 따라 담석증 환자가 증가하고 있다. 이러한 문제점의 해결방안 중 하나로 비만치료제는 대부분의 시상하부와 관련된 신경전달물질을 조절함으로써 식욕을 억제하는 식욕억제제로써 심장질환, 호흡기질환, 신경계질환 등의 부작용과 함께 그 효능의 지속성도 낮아, 더욱 개선된 비만치료제의 개발이 필요한 실정이다. 이에 안전한 미생물로 여겨져 온 김치유산균을 이용하여 혈중 콜레스테롤 수준을 감소시키고자 하는 연구가 많이 이루어지고 있다[21, 33, 37]. 이러한 추세에 따라 *Lactobacillus*속의 기능성 중에서도 콜레스테롤 저하능에 대해 주목하였다[23].

김치유산균 *Lactobacillus plantarum* EM은 장내에서 생존하고 장내부착능이 우수하며 항생제에 대한 내성을 가지지 않고 안전한 GRAS 미생물이므로 생균활성제로 활용이 가능하다. 또한, 식중독균과 부패균을 포함한 위해 미생물과 곰팡이에 대해서도 강력한 활성을 보이며 광범위한 항균활성을 가지고 있고, 생균 시 뿐만 아니라 사균 상태에서도 콜레스테롤 동화능이 우수하고 혈중 콜레스테롤을 저하능이 뛰어나 프로바이오틱 유산균이 되기 위한 조건을 충족한다고 알려져 있다[5]. 본 연구에서는 이 김치유산균을 사과와 양배추를 사용한 과채주스 발효에 적용하여 발효과채주스를 제조하였다. 김치유산균 *Lactobacillus plantarum* EM을 활용하여 발효과채주스를 제조하고 발효과채주스로서의 가치를 평가하고자 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 발효과채주스의 개발 및 특성 규명

1. 발효과채주스의 개발

가. 시판 유산균 첨가 음료 조사

발효과채주스를 개발하기에 앞서 과일이나 채소를 이용하여 제조한 음료에 유산균을 첨가한 시판 제품을 조사하였다. 조사 항목으로 이화학적 특성은 pH 및 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 pH 8.3이 될 때까지의 적정했을 때 소비량 그리고 당도를 측정하였다. 미생물학적 특성은 조사한 시판 제품의 유산균과 대장균군을 조사하였다.

나. 발효과채주스의 제조

(1) 사용 균주

본 실험에서 과채주스를 발효시키기 위한 유산균으로 *Lactobacillus plantarum* EM을 사용하였다. *Lb. plantarum* EM을 과채주스의 종균으로 사용하기 위하여 5 mL MRS (Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간동안 정치 배양하였다. 전배양액의 1% (v/v)를 5 mL MRS (Difco) 액체 배지에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 정치 배양하고 다시 20 mL MRS (Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 동안 본배양하였다. 본배양액을 원심분리 (Supra 22K with rotor 6, Hanil Science Industrial, Incheon, Korea, 10,100 ×*g*, 15 min, 4℃)한 후, 배양 상징액은 제거하고 남은 균체를 동량의 멸균 3차 증류수로 수세하였다. 다시 동일한 조건으로 원심분리하여 상징액은 제거하고 남은 균체를 동량의 멸균 3차 증류수로 풀어 과채주스의 종균으로 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 과채주스의 제조 및 발효 조건 설정

발효과채주스를 제조하기 위한 원재료 선정에 있어 시중에서 연중 구매할 수 있고 저렴한 국내 농산물 중에 채소로는 양배추와 배추를, 과일로는 사과를 준비하였다. 양배추와 배추를 각각 사과와 동량으로 혼합하여 과채주스를 제조한 결과, 배추를 사용한 과채주스는 배추 특유의 풋내가 강하여 부적합하여 양배추를 사용하였다. 먼저 사과와 양배추를 흐르는 물에 세척하여 준비하였다. 세척된 사과와 양배추를 착즙하기 좋은 크기로 썰고 껍질 채 착즙기 (HD-WWF09, Hurom, Korea)를 이용하여 각각 주스를 제조하였다. 사과주스와 양배추주스는 멸균된 250 mL 삼각플라스크 안에 50 mL씩 동량의 비율로 혼합하였고, 유산균의 대사에 도움을 주기 위하여 과채주스에 0.005% $MnSO_4$ (w/v) (Junsei, Japan)와 0.5% sodium acetate (w/v) (Junsei, Japan)를 첨가하였다.

상기 조사한 시판 음료 중에서 일부 제품에는 새콤한 맛을 위해 보편적으로 사용하는 구연산이 첨가되었다. 이를 반영하여 위와 같이 제조한 과채주스에 구연산 대신 레몬즙 원액을 2% (v/v) 첨가한 과채주스와 첨가하지 않은 과채주스로 나누어 준비하였다. 과채주스를 발효시키기 위하여 상기된 방법으로 준비한 과채주스의 종균을 1% (v/v) 접종하여 발효과채주스를 제조하였다. 레몬즙 첨가/무첨가 발효과채주스의 대조구로는 종균을 접종하지 않은 과채주스를 사용하였다. MRS 대조구는 *Lb. plantarum* EM 본배양액을 100 mL MRS (Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 실험하였다.

종균을 접종하여 제조한 과채주스의 발효 온도를 설정하는데 있어서 고려해야할 부분은 원재료에 존재할 수 있는 미생물의 생육을 저해하며 종균인 *Lb. plantarum* EM이 잘 생육할 수 있는 발효 온도여야 한다는 점이다. 원재료에 존재할 수 있는 유산균 중에서도 탄산가스를 형성하는 균이 증식하게 되면 용기가 팽창하거나 내부에 압력이 발생할 수 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 발효과채주스의 발효 특성

가. 이화학적 특성

과채주스를 제조 후 발효일수에 따른 이화학적 특성을 조사하기 위하여 당도, 염도, pH 및 산도를 측정하였다. 제조한 과채주스가 착즙하였더라도 고형분이 존재하여 멸균거즈로 여과한 후 실험에 사용하였다. 당도와 염도는 각각 디지털 당도계 (Digital probe refractometer L213250, ATAGO, Tokyo, Japan)와 염도계 (ES-421, ATAGO, Tokyo, Japan)를 사용하였다. pH는 pH meter (510 pH meter, Fisher science, Singapore)를 사용하여 측정하였고, 산도는 A.O.A.C (Association of official analytical chemists) 표준 시험법에 따라 과채주스 10 mL를 취하여 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 pH 8.3이 될 때까지의 적정하였다. 총 산 (%)은 젖산 함량으로 환산하여 다음의 식으로 계산하였다.

총 산 (%) = a × f × F × 10
a: 0.1 N 수산화나트륨 용액의 소비량(mL)
f: 0.1 N 수산화나트륨 용액의 factor (1.001)
F: 0.1 N 수산화나트륨 용액의 1 mL에 상당하는 유기산 계수
(젖산의 유기산 계수 0.009)

나. 미생물학적 특성

과채주스를 멸균거즈로 여과한 후 멸균수로 단계적으로 희석하여 실험하였다. 유산균수는 MRS, 2% $CaCO_3$가 함유된 MRS (Difco) 고체 배지에 도말하여 30℃에서 48시간에서 72시간 배양한 후 측정하였고, 총 균수와 유산균 외 균수는 PCA (Plate Count Agar, Difco) 고체 배지에 도말하여 37℃에서 48시간에서 72시간 배양한 후 측정하였다. 대장균군은 대장균군용 건조필름배지 (3M^{TM} Petrifilm-Coliform Count Plate, USA)에 시험용액 1 mL를 분주하여 잘 흡수시키고 37℃에서 24시간에서 48시간 배양한 후 검출 유무를 확인하였다. 유산균 외 균은 배양 후 형성된 colony를 분류하여 gram 염색 (Gram stain kit, Shanonon, Clare, Ireland)한 후 현미경을 사용하여 형태학적으로 관찰하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 종균비첨가 과채주스에서 유산균 분리·동정

당해 새로 난 사과(부사)를 사용하여 제조한 종균비첨가 과채주스의 미생물학적 특성을 조사하던 중, 원재료에 존재하고 있던 유산균이 증식하여 관찰된 colony를 형태학적으로 분류하여 분리, 동정하였다.

가. 종균비첨가 과채주스에서 유산균의 분리·동정

당해 새로 난 사과를 사용하여 제조한 종균비첨가 과채주스의 발효일차에 따른 미생물학적 특성을 조사하였다. 종균비첨가 과채주스를 멸균거즈로 여과한 후 MRS, 2% $CaCO_3$가 함유된 MRS (Difco) 고체 배지에 도말하여 30℃에서 48시간에서 72시간 배양하였다. 미생물학적 특성을 조사하던 중에 원재료에 존재하고 있던 유산균이 증식하여 최대 생육을 나타낸 발효 5일차 plate에서 관찰된 유산균을 형태학적으로 선별하여 분류 후 gram 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 분리한 균주의 동정을 위해 16s ribosomal RNA gene의 염기서열을 분석하여 표준균주와 비교하였다(NCBI Blast program).

나. 종균비첨가 과채주스에서 분리한 유산균에 대한 *Lb. plantarum* EM의 항균 활성

(1) 사용한 균주

항균 물질 생성균주와 지시균주로 사용한 분리 유산균 3종은 Table 1에 정리하였다.

(2) 조항균 물질의 준비

Lb. plantarum EM의 조항균 물질은 다음과 같이 준비하였다. *Lb. plantarum* EM를 MRS (Difco) 액체배지 5 mL에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. MRS 액체배지 5 mL에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 동안 전배양한 후 MRS 액체배지 100 mL에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 동안 본배양하였다. 본배양액을 원심분리 (Supra 22K with rotor 6, Hanil Science Industrial, Incheon, Korea, 10,100 ×*g*, 15 min, 4℃)하여 배양 상징액을 제조한 후 0.45 μm membrane filter

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(Adventec, Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan)로 제균하였다. 제균하여 준비된 배양 상징액은 10 mL씩 소분하여 동결건조(freeze dry system, SFDSM12, Samwon, Busan, Korea)한 후에 20 mM sodium acetate (pH 4.0) 완충용액 2 mL에 녹여 5배 농축액을 제조하였다. 발효과채주스의 조항균 물질의 제조도 상기 동일한 과정으로 준비하였다.

(3) 항균 활성 측정

종균비첨가 과채주스에서 분리한 유산균 3종에 대한 *Lb. plantarum* EM과 발효과채주스의 조항균 물질의 항균 활성은 paper disc method[7]와 spot-on-the-lawn test[49] 방법으로 시행하였다.

Paper disc method 시행을 위하여 감수성 균주인 분리 유산균주 3종 본배양액을 MRS (Difco) 고체 배지에 1.0×10^6 CFU/mL가 되게 도말하여 준비하였다. 지시균주가 도말된 고체 배지 위에 8 mm 직경의 paper disc (Adventec, Tokyo, Japan)를 올려 조항균 물질을 50 μL씩를 천천히 가한 후 흡수되면 다시 50 μL씩 가한 후에 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 생육 저지환은 digimatic caliper (CD-15CPX, Mitutoyo, Kawasaki, Japan)를 사용하여 지름을 측정한 후 평균값을 나타내었다.

Spot-on-the-lawn test는 위와 같이 감수성 균주를 MRS 고체 배지에 1.0×10^6 CFU/mL가 되게 도말한 후 준비한 조항균 물질을 배지 위에 10 μL를 spotting하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후 배지 내 생성되는 생육저지환을 조사하였다. 역가는 항균 물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해 환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 mL에 해당하는 환산 계수를 곱하여 AU/mL로 나타내었다. 모든 항균 활성 측정은 3회의 반복실험을 한 후 평균값을 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. List of microorganisms used in the study

Group	Strains	Medium	Incubation temperature	Reference
Antimicrobial compound producing strain	*Lactobacillus plantarum* EM	MRS	30℃	[22]
Sensitive bacteria	*Weissella cibaria* HL1 *Leuconostoc mesenteroides* HL2 *Leuconostoc mesenteroides* HL3	MRS	30℃	In this study

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 발효과채주스의 항균 spectrum 조사

가. 발효과채주스의 배양 상징액 (조항균 물질)의 준비

과채주스의 발효일차별 항균 spectrum을 조사하기 위하여 상기 동일한 과정으로 배양 상징액을 제조한 후 20 mM sodium acetate (pH 4.0) 완충용액에 녹여 5배 농축액을 제조하였다. 각 발효일차별 과채주스의 대조구의 제조는 종균을 접종하지 않은 과채주스를 동일한 과정으로 처리하여 사용하였다.

MRS 대조구는 과채주스와 같은 발효 조건으로 실험하여 제조한 배양일차별 균주 배양액과 *Lb. plantarum* EM 본배양액을 MRS (Difco) 액체 배지 100 mL에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 균주 배양액을 위와 동일한 과정으로 준비하였다.

나. 사용한 균주 및 배지

본 실험에서 제조한 발효과채주스의 항균 spectrum을 조사하기 위하여 사용한 균주는 Table 2에 정리하였다. 지시균주 및 배지는 다음과 같이 사용하였다.

(1) 세균

항균 spectrum을 조사하기 위하여 사용한 지시균주로는 실생활에서 발생할 수 있는 식중독과 부패균을 포함한 다양한 세균을 준비하였다. 항세균 활성 실험에 사용한 세균 중 *Bacillus cereus* KCTC 3624, *Bacillus* subtilis ATCC 6633, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* serovar. Typhi ATCC 19430은 LB (Luria Bertani; 1% Bacto-tryptone, 1% NaCl, 0.5% Yeast extract) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였고, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213와 *Micrococcus luteus* ATCC 4698는 TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 각각 37℃에서 24시간, 30℃에서 24시간 배양하였고, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802는 2% (w/v) NaCl (Duchefa, Haarlem, Netherlands)을 첨가한 NB (Nutrient Broth, Difco) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 효모

항균 spectrum을 조사하기 위하여 사용한 효모는 다음과 같이 준비하였다. *Pichia kudriavzevii* GY1, *Pichia kudriavzevii* DY1, *Zygosaccharomyces rouxii*는 YPD (Yeast extract Peptone Dextrose; 2% Bacto-peptone, 2% Dextrose, 1% Yeast extract) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후 사용하였다.

(3) 곰팡이

항균 spectrum을 조사하기 위하여 사용한 식중독/부패 곰팡이는 다음과 같이 준비하였다. *Aspergillus flavus* ATCC 22546, *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918, *Aspergillus nidulans* PF-3은 MEA (Malt Extract Agar, Difco) 배지에 접종하여 30℃에서 3~4일 동안 배양하였다. *Aspergillus ochraceus* PF-2와 *Penicillium roqueforti* ATCC 10110은 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) 배지에 접종하여 각각 30℃와 25℃에서 3~4일 동안 배양하여 준비하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. List of microorganisms used in spectrum of antimicrobial activity

Group	Strains	Medium	Incubation temperature	Source
Gram positive bacteria	*Bacillus cereus* KCTC 3624	LB	37℃	[50]
	Bacillus subtilis ATCC 6633	LB	37℃	[45]
	Micrococcus luteus ATCC 4698	TSB	30℃	[32]
	Staphylococcus aureus ATCC 29213	TSB	37℃	[44]
Gram negative bacteria	*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895	LB	37℃	[46]
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	LB	37℃	[1]
	Salmonella enterica serovar. Typhi ATCC 19430	LB	37℃	[29]
	Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802	NB+2% NaCl	37℃	[51]
Mold	*Aspergillus flavus* ATCC 22546	MEA	30℃	[39]
	Aspergillus fumigatus ATCC 96918	MEA	30℃	[39]
	Aspergillus ochraceus PF-2	PDA	30℃	[39]
	Penicillium roqueforti ATCC 10110	PDA	25℃	[39]
	Aspergillus nidulans PF-3	MEA	30℃	[39]
Yeast	*Pichia kudriavzevii* GY1	YPD	37℃	[39]
	Pichia kudriavzevii DY1	YPD	30℃	[30]
	Zygosaccharomyces rouxii	YPD	30℃	[9]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 항균 spectrum 조사 방법

지시균주로 사용된 세균과 효모는 각각 배지에 1.0×10^{6} CFU/plate로 도말하여 준비하였고, 곰팡이의 경우 포자를 각 배지의 20 mL에 5.0×10^{4} CFU/mL가 되게 첨가하여 petri dish에 부은 후에 굳으면 적정 배양 온도에서 선 배양하여 준비하였다. 본 실험에서 사용한 항균 spectrum 조사는 상기 제시된 spot-on-the-lawn test 방법으로 실시하였고 항균 활성 측정은 3회의 반복실험을 한 후 평균값을 사용하였다.

5. 발효과채주스의 저온 저장기간에 따른 특성

상기 실험들을 통하여 최종적으로 설정된 발효 조건에 의해서 제조된 발효과채주스를 시판 음료가 통상적으로 보관되는 냉장 온도(4℃)에 저장하였다. 그 후에 3일 간격으로 발효과채주스의 특성을 조사하여 냉장 온도에서의 저장기간에 따른 보존성과 항균력을 확인하였다.

가. 이화학적 특성

저장일차별 발효과채주스는 고형분이 있으므로 실험을 위해 멸균거즈로 여과하여 준비한 후 상기 제시된 방법으로 pH와 산도를 측정하였다.

나. 미생물학적 특성

멸균거즈로 여과하여 준비한 저장일차별 발효과채주스의 유산균수와 총 균수, 유산균 외 균수, 대장균군에 대하여 상기 제시된 과정으로 실험하였다. 냉장 온도에서의 저장 기간이 늘어남에 따라 유산균 외 균이 자라는지 확인하기 위하여 배양 후 PCA (Difco) 고체 배지에서 형성된 colony를 gram 염색한 후 현미경을 사용하여 형태학적으로 관찰하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 항균 활성 측정

발효 종료 후 냉장 온도에서의 저장 기간이 늘어남에 따라 발효과채주스가 가지고 있는 항균력이 유지되는지를 확인하기 위하여 상기 제시된 동일한 과정으로 지시균주와 발효과채주스의 배양 상징액 (조항균 물질)을 준비하였다. 항균 활성 측정은 spot-on-the-lawn test 방법으로 실시하였다.

6. 발효과채주스의 맛의 최적화

가. 관능 평가

발효 종료 후 발효과채주스의 신맛을 완화해주고 맛의 최적화를 위하여 D-fructose와 sucrose를 농도별로 첨가하여 훈련된 연구원 10명을 대상으로 관능 평가를 실시하였다. 관능 항목으로는 신맛, 단맛, 이미/이취, 기호도에 대하여 5점 척도로 평가하였다. 신맛의 항목은 1점은 매우 시지 않다, 3점은 보통, 5점은 매우 시다로 나타내었다. 단맛의 항목은 1점은 매우 달지 않다, 3점은 보통, 5점은 매우 달다로 나타내었다. 이미/이취 항목은 1점 이미/이취가 매우 남, 3점은 보통, 5점은 이미/이취가 전혀 나지 않음으로 나타내었고, 기호도는 시료의 상대적인 기호도를 5점 척도로 평가하였다.

(1) D-Fructose 첨가에 따른 관능 평가

D-Fructose 첨가에 따른 관능 평가는 D-fructose 무첨가 발효과채주스, D-fructose 1, 2, 4, 6%를 첨가한 발효과채주스를 준비하여 총 5가지 시료에 대한 신맛, 단맛, 이미/이취, 기호도 항목으로 관능 평가를 실시하였다.

(2) Sucrose 첨가에 따른 관능 평가

Sucrose 첨가에 따른 관능 평가는 sucrose 무첨가 발효과채주스, sucrose 1, 2, 4, 6%를 첨가한 발효과채주스를 준비하여 총 5가지 시료에 대한 상기 동일한 항목으로 관능 평가를 실시하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(3) 최종 관능 평가

최종적으로 (1), (2) 관능 평가에서 기호도 순위 1, 2위에 해당하는 시료와 본 실험에서 제조된 발효과채주스와 성상이 비슷한 시판 유산균 음료를 준비하여 총 5가지의 시료에 대한 상기 동일한 항목으로 관능 평가를 실시하였다.

나. 통계 처리

통계 처리는 IBM SPSS statistics program을 사용하여 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)으로 분석을 실시하였으며, 사후 분석으로 Duncan의 다중범위검정법 (Duncan's multiple range test)을 통해 유의성을 검정하였다. ($p<0.05$)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2 절 발효과채주스의 성분 분석

1. 일반 성분 분석

본 실험에서는 종균을 접종하여 제조한 과채주스의 제조직후와 15℃에서 5일 동안 발효시킨 발효과채주스의 일반 성분을 분석하였다. 분석 방법으로는 다음과 같이 사용하였다.

가. 일반 성분 분석

일반 성분으로는 총 당, 조지방, 조단백, 수분, 총 식이섬유, 회분을 조사하였다. 모든 시험 항목은 식품 공전에 의거하여 시험 분석하였다[58]. 총 당 (%)은 벨트란법, 조지방 (g/100g)은 에테르추출법, 조단백 (g/100g)은 Kjeldahl법, 수분은 상압가열건조법, 총 식이섬유는 효소-중량법, 회분은 식품 공전에 제시된 직접회화법을 사용하여 분석하였다.

나. 유리당 분석

종균을 접종하여 제조한 과채주스의 제조직후와 발효과채주스의 유리당은 고속 액체 크로마토그래피 (High Perfermence Liquid Chromatography)로 분석하였다. 분석 기기는 Dionex ultimate 3000 (Thermo Dionex, USA)을 사용하였으며, detector는 Shodex RI-101(Shodex, japan)를 사용하였고, column은 Sugar-pak (Waters, 300*6.5mm, USA)을 사용하였다. 분석 조건으로는 oven temperature는 70℃이고, 이동상은 3차 증류수를 사용하였다. 유속은 0.5 mL/min으로 진행하였고, injection volume은 10 μL로 하여 분석하였다. 표준품으로는 glucose (Junsei chem 98%), galactose (Sigma 99%), arabinose (Aldrich 99%), xylose (Aldrich 99%), fructose (Sigma 99%), mannose (Sigma 99%), sucrose (Sigma 99.5%), maltose monohydrate (Junsei chem 99%), lactose monohydrate (Junsei chem 99%), raffinose (Sigma 99%), stachyose (Sigma 99%)을 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 유기산 분석

유기산은 상기와 같은 Dionex ultimate 3000 (Thermo Dionex, USA)으로 분석하였다. Column은 Aminex 87H column (300x10mm, Bio-Rad, USA)를 사용하였고, detector로 UV 210 nm와 RI(ERC, Refracto MAX520, Japan)를 사용하였고, 이동상은 0.01 N H_2SO_4 (Fluka, USA)를 사용하였으며, oven temperature는 40℃에서 분석 진행하였다. 유속은 0.5 mL/min으로 진행하였고, injection volume은 10 μL로 하여 분석하였다. 분석 시간은 30min이 소요되었고, 표준품으로는 lactic acid sodium salt (Fluka 99%), citric acid (Showa chem 99.5%), malic acid (Kanto chem 99%), succinic acid (Aldrich 99%), oxalic acid (Showa chem 99.5%), fumaric acid (Showa chem 99%), VOAs mixture(formic, acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric, valeric, isocaproic, caproic, heptanoic acid) (AccuStandard FAMQ-004 10mM)을 사용하였다.

라. 유리 아미노산 분석

유리 아미노산 분석을 위한 전처리 과정은 시료를 75% EtOH에 넣고 1시간 동안 초음파추출 후에 다시 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출액을 0.2 μm 필터에 여과한 후 Dionex ultimate 3000 (Thermo Dionex, USA)로 분석하였다. Detector는 UV detector 338 nm와 FL detector로 emission 450 nm, excitation 340 nm(OPA), emission 305 nm, excitation 266 nm(FMOC) 사용하였고, column은 VDSpher 100 C18-E (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm/VDS optilab, Germany)를 사용하였다. 이동상으로는 40 mM sodium phosphate dibasic, pH 7과 3차 증류수, acetonitrile (Merck), methanol (Merck)을 10:45:45 비율로 제조하여 사용하였다. Column temperature와 sample temperature는 각각 40℃, 20℃에서 진행하였으며, injection volume은 0.5 μL로 하여 분석하였다. 프로토콜은 borate buffer (agilent 5061-3339), OPA reagent (agilent 5061-3335), FMOC solution (agilent 5061-3337)과 함께 시료를 단계적으로 혼합한 후 반응을 종결하였다. 표준품으로는 aspartic acid, glutamic acid, serine, histidine, glycine, threonine, alanine, arginine, tyrosine, valine, methionine, phenylalanine, isoleucine, leucine, lysine, proline, cystine (agilent 5061-3330), glutamine, asparagine, tryptophan, hydroxy proline (agilent 5062-2478)와 GABA, taurine (Sigma)을 사용하였다

.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 발효과채주스의 개발 및 특성

1. 발효과채주스의 개발

가. 시판 유산균 첨가 음료 조사

유산균을 접종하여 발효시킨 과채주스를 개발하기에 앞서 시판하는 음료 중에서 유산균을 첨가한 다양한 식품 유형의 과일이나 채소 음료의 특성을 조사하였다(Table 3). 조사된 제품은 유산균을 첨가한 과·채주스 4종, 과·채음료 1종, 유산균음료 3종이었다. 먼저, 유산균을 첨가한 과·채주스 4종은 P사에서 출시한 발효녹즙 제품들로 다양한 채소를 이용하여 식물성 유산균으로 발효시킨 발효즙에 채소즙을 혼합하여 제조하였다. 과·채음료 1종은 W사에서 혼합 과실액에 유산균 배양액을 더하여 1, 2차 발효 과정을 거친 후 살균하여 제조한 제품으로 고형분이 없었다. 유산균음료 3종은 P사 제품으로 각각 명일엽, 마, 치아씨드에 P사에서 보유한 식물성유산균을 첨가하여 만들었고, 고형분이 있는 제품이었다.

조사한 시판 제품들의 이화학적 특성을 조사한 결과 pH는 3.18~4.09였고, 당도는 8.7~15.0 brix°였고, 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 pH 8.3이 될 때까지 적정했을 때의 소비량은 2.74~5.89 mL까지 다양하였다. 미생물학적 특성에서 유산균수는 제품의 유형이 과채음료와 과채주스에 해당하는 제품에서 약 10^2~10^3 CFU/mL, 유산균 음료에 해당하는 제품에서는 최대 약 10^5~10^8 CFU/mL로 조사되었다. 대장균군은 모든 제품에서 검출되지 않았다. 조사한 제품 중에서 비가열한 원재료가 포함된 과채주스와 유산균을 첨가한 음료의 경우 제조일로부터 유통기한이 약 3일에서 10일이었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Investigation of commercially available beverages containing lactic acid bacteria

	1	2	3	4	5	6	7	8
Product name	P사 C제품	P사 S제품	P사 H제품	P사 O제품	W사 S제품	P사 M제품	P사 W제품	P사 C제품
Type	과채주스 (비가열함유)	과채주스 (비가열함유)	과채주스 (비가열함유)	과채주스 (비가열함유)	과채음료	유산균음료	유산균음료	유산균음료
pH	3.96	3.99	4.09	4.08	3.18	3.41	3.56	3.87
0.1N NaOH consumption(mL)	5.89	4.45	4.50	4.13	2.82	4.72	2.74	4.60
Sugar content (Brix°)	10.8	11.8	10.4	8.7	10.2	14.6	15.0	10.9
Lactic acid bacteria (CFU/mL)	4.50×10^{2}	2.40×10^{3}	9.00×10^{2}	1.10×10^{3}	8.10×10^{3}	2.69×10^{5}	1.79×10^{8}	2.41×10^{8}
Coliform group	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Shelf life	제조일로부터 3일				제조일로부터 1년 6개월	제조일로부터 10일		

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 발효과채주스의 제조

본 실험에서 사용한 사과의 품종은 부사로, 과피는 황록 바탕에 담홍색 줄무늬로 착색되며 과육은 황백색으로 육질이 치밀하고 당도가 높고 과즙이 많다. 또한, 저장성이 좋고 10월 중순께 성숙되며 4월까지 저장한다. 과채주스는 양배추와 사과를 흐르는 물에 세척한 후 껍질 채 착즙하여 각각 50 mL씩 동량으로 혼합한 후에 0.005% $MnSO_4$와 0.5% sodium acetate를 첨가하여 제조하였다. 이 후 과채주스에 레몬즙 원액을 2% (v/v)를 첨가한 과채주스와 첨가하지 않은 과채주스를 준비하였다. 발효과채주스의 종균은 *Lb. planatarum* EM 본배양액을 2번 수세 후에 3차 증류수로 균체를 풀어 준비하였다. 상기 준비한 과채주스에 종균을 1% (v/v) 접종하여 제조한 후 15℃에서 0~5일 동안 발효하였다. 레몬즙 첨가/무첨가 발효과채주스의 대조구는 종균을 접종하지 않은 상태로 발효하였다. MRS 대조구는 100 mL MRS 액체 배지에 *Lb. planatarum* EM을 1% (v/v) 접종하여 과채주스와 마찬가지로 15℃에서 0~5일 배양하였다.

2. 발효과채주스의 발효 특성

본 실험에서 사용한 양배추의 경우, 주스를 제조하여 이화학적 특성을 조사하였을 때 pH는 6.34±0.01, 산도는 0.17±0.03으로 구입 시기에 따른 차이가 거의 없었으나, 사과(부사)는 사용한 사과의 품종이 같다하더라도 수확 후 저장한 사과(수확 후 3, 4월까지 저장)를 사용했을 때보다 당해 새로 난 햇사과(약 10월 말~11월)를 사용했을 때 pH가 약 0.4 더 낮았으며, 산도는 약 0.1% 정도 높아 상이한 결과를 나타내었다. 조사된 결과에 따라 과채주스를 제조할 때 사과주스는 저장사과와 햇사과로 나누어 실험하였다.

가. 이화학적 특성

발효과채주스의 당도와 염도는 제조에 사용한 사과의 종류와 품종, 저장 유무에 따라 크게 차이를 보이지 않았다. 측정 결과 당도는 약 9.3~10.3 Brix°, 염도는 약 0.36~0.39%로 측정되었다.

수확 후 저장한 사과를 사용한 경우에는 레몬즙 첨가/무첨가 발효과채주스 모두 발효일차별로 pH가 점차 감소하여 발효 5일차에 약 pH 4 초반으로 측정되었고, 산도는

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

레몬즙을 첨가한 발효과채주스가 레몬즙을 첨가하지 않은 발효과채주스에 비해 발효 2일차까지 평균적으로 약 0.15% 더 높았으나, 발효 3일차부터 거의 차이를 보이지 않으며 발효 5일차에는 레몬즙 첨가/무첨가 발효과채주스 모두 약 0.7%로 측정되었다. 발효과채주스의 대조구는 레몬즙 첨가/무첨가 모두 발효 0일차의 pH와 산도를 유지하였다.

당해 새로 난 햇사과를 사용한 경우에는 레몬즙 첨가/무첨가 발효과채주스 모두 발효일차별로 pH가 점차 감소하였고, 발효 5일차에는 약 pH 3.9로 측정되었다. 산도는 0~5일 발효기간 동안 레몬즙을 첨가한 발효과채주스가 첨가하지 않은 발효과채주스에 비해 평균적으로 약 0.1% 정도 높게 측정되었는데, 발효일이 지남에 따라 산도가 증가하여 레몬즙을 첨가한 발효과채주스의 경우 발효 5일차에는 약 1.2%, 첨가하지 않은 발효과채주스의 경우 약 1.1%로 측정되었다. 종균비첨가 과채주스의 경우 발효가 진행됨에 따라 발효 3일차부터 pH가 감소되었고, 산도가 약 0.61%까지 증가하였다. 이는 과채주스의 원재료에 존재하던 유산균이 증식하여 발효가 일어난 결과로 나타났다. 위 실험결과로 보았을 때, 발효과채주스를 제조하는데 저장한 사과를 사용한 경우에 비해 당해 새로 난 햇사과를 사용한 경우 발효과채주스와 발효과채주스의 대조구의 산도 차이가 크게 벌어지는 것을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

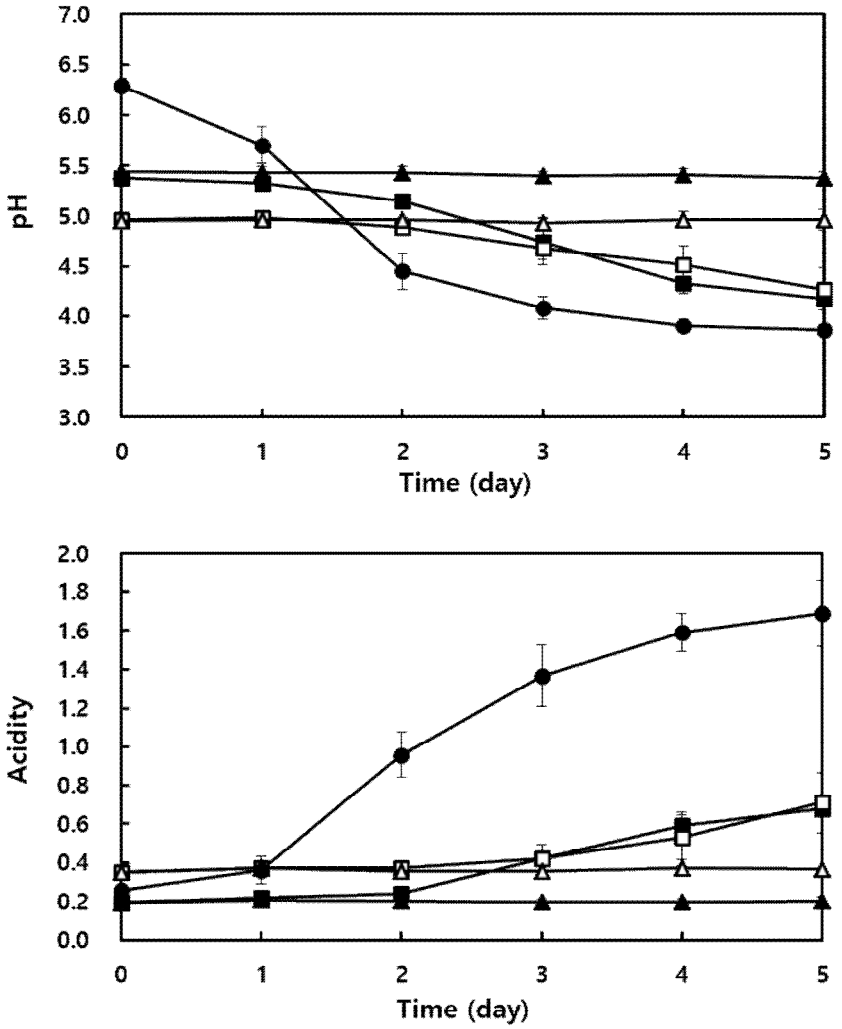

Figure 1. Changes in pH and acidity of juice during fermentation at 15℃ using stored apple

■, Fermented fruit-vegetable juice using *Lb. plantarum* EM

□, Fermented fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice using *Lb. plantarum* EM

▲, Fruit-vegetable juice without starter culture

△, Fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice without starter culture

●, *Lb. plantarum* EM in MRS medium

All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

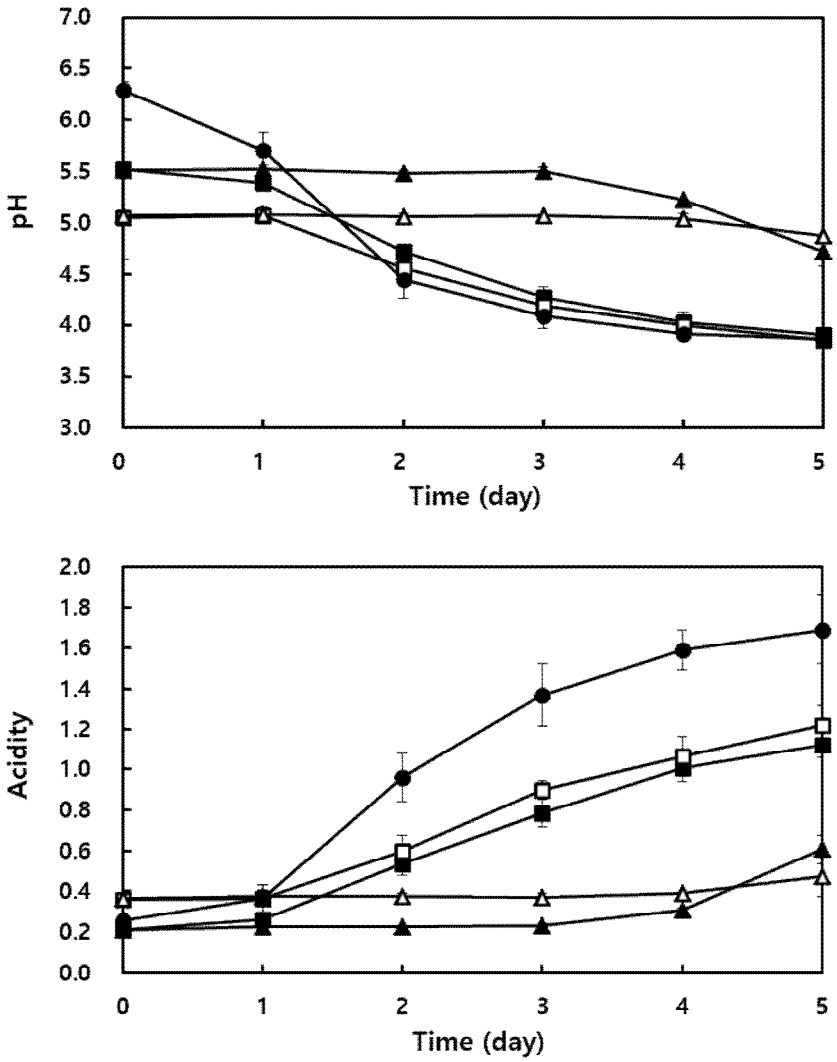

Figure 2. Changes in pH and acidity of juice during fermentation at 15℃ using newly harvested apple

■, Fermented fruit-vegetable juice using *Lb. plantarum* EM

□, Fermented fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice using *Lb. plantarum* EM

▲, Fruit-vegetable juice without starter culture

△, Fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice without starter culture

●, *Lb. plantarum* EM in MRS medium

All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 미생물학적 특성

유산균수는 MRS, 2% $CaCO_3$가 함유된 MRS 고체 배지에 배양하여 측정하였고, 총 균수와 유산균 외 균수는 PCA 고체 배지에 배양하여 측정하였다. 대장균군은 대장균군용 건조필름배지 (3M^{TM} Petrifilm-Coliform Count Plate, USA)에 분주하여 배양한 후 검출 유무를 확인하였다. 유산균 외 균은 배양 후 형성된 colony를 gram 염색한 후 현미경을 사용하여 형태학적으로 관찰하였다.

(1) 유산균수와 총 균수

수확 후 저장사과를 사용한 경우와 당해 새로 난 햇사과를 사용하여 과채주스를 제조한 경우로 나누어 보았을 때, 먼저 수확 후 저장한 사과를 사용한 경우(Figure 3, 5)에 *Lb. plantarum* EM을 접종한 발효과채주스의 유산균수를 측정한 결과는 레몬즙을 첨가한 발효과채주스보다 첨가하지 않은 발효과채주스에서 *Lb. plantarum* EM의 생균수가 발효 2일차 이후부터 차이가 벌어지기 시작하여 발효 3일차에 최대 생육인 약 9.0 log CFU/mL에 도달하며 더 잘 생육하는 것으로 나타났다. 총 균수 측정 결과에서도 *Lb. plantarum* EM이 100% 우점하며 위와 같은 결과를 나타냈다. 종균비첨가 과채주스의 유산균수를 측정한 결과는 레몬즙을 첨가하지 않은 과채주스에서 발효가 진행됨에 따라 원재료에 존재하고 있던 유산균이 증식하여 발효 5일차에 유산균수가 약 5.6 log CFU/mL에 도달하였다. 반면에, 레몬즙을 첨가한 과채주스에서는 유산균이 검출되지 않았다. 총 균수 측정 결과, 레몬즙을 첨가한 과채주스에서 0일차에 초기 균수가 약 4.7 log CFU/mL로 측정되었고, 발효가 진행됨에 따라 서서히 감소하여 약 4.0 log CFU/mL에 도달하였다. 레몬즙을 첨가하지 않은 경우 발효 3일차 이후로 균수가 증가하여 약 6.0 log CFU/mL에 도달하였다.

당해 새로 난 햇사과를 사용한 경우(Figure 4, 6)에는 *Lb. plantarum* EM을 접종한 레몬즙 첨가/무첨가 발효과채주스 모두에서 발효 3일차에 *Lb. plantarum* EM이 약 9.0 log CFU/mL에 도달하여 이후 발효 5일차에 약 9.1 log CFU/mL로 측정되었다. 총 균수 측정 결과에서도 *Lb. plantarum* EM이 100% 우점하며 위와 같은 결과를 나타냈다. 종균비첨가 과채주스의 유산균수는 레몬즙을 첨가하지 않은 종균비첨가 과채주스에서 원재료에 존재하고 있던 유산균이 증식하여 발효 종료일인 5일차에 약 7.7 log CFU/mL로 측정되었다. 레몬즙을 첨가한 과채주스에서 그렇지 않은 과채주스보다 유

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

산균이 더디게 증식하여 발효 5일차에 약 6.5 log CFU/mL로 측정되었다. 총 균수 측정 결과는 레몬즙 첨가/무첨가 경우 모두 발효가 진행됨에 따라 총 균수가 증가하였는데 레몬즙을 첨가한 과채주스에서는 서서히 증가하여 발효 5일차에 약 6.9 log CFU/mL에 도달하였고, 레몬즙을 첨가하지 않은 과채주스에서는 발효 2일차에 급격히 증가하여 발효 5일차에 약 8.1 log CFU/mL에 도달하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

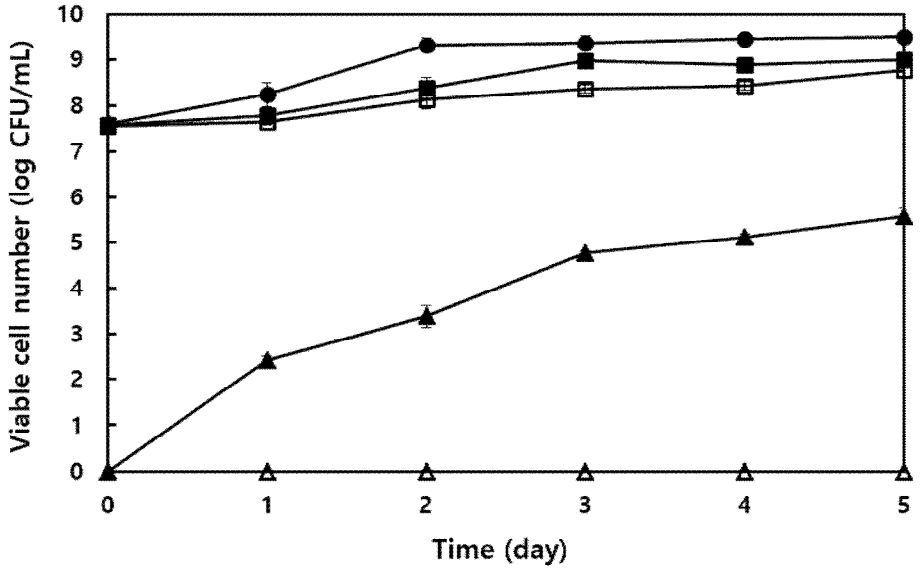

Figure 3. Changes in the viable cell number of lactic acid bacteria of juice during fermentation at 15℃ using stored apple

■, Fermented fruit-vegetable juice using *Lb. plantarum* EM
□, Fermented fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice using *Lb. plantarum* EM
▲, Fruit-vegetable juice without starter culture
△, Fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice without starter culture
●, *Lb. plantarum* EM in MRS medium
All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

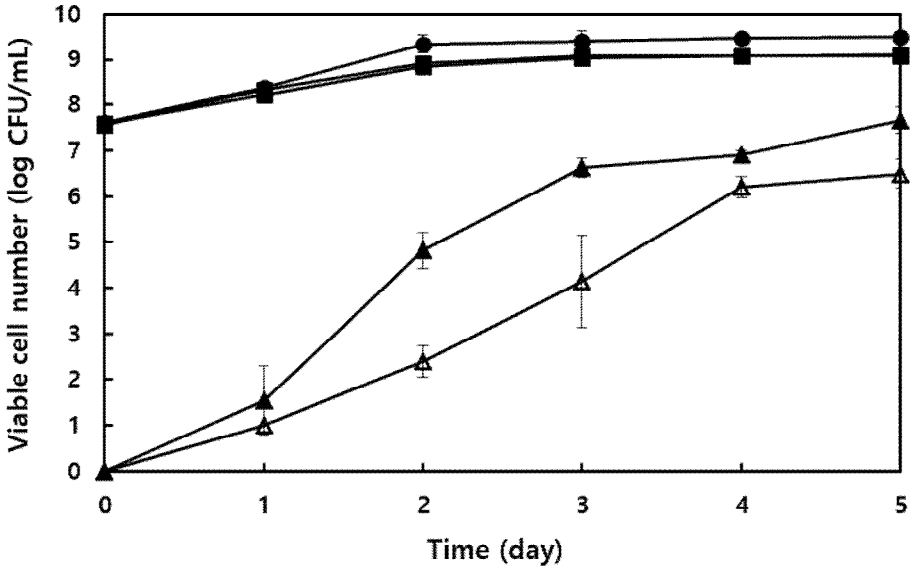

Figure 4. Changes in the viable cell number of lactic acid bacteria of juice during fermentation at 15℃ using newly harvested apple

■, Fermented fruit-vegetable juice using *Lb. plantarum* EM
□, Fermented fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice using *Lb. plantarum* EM
▲, Fruit-vegetable juice without starter culture
△, Fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice without starter culture
●, *Lb. plantarum* EM in MRS medium
All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

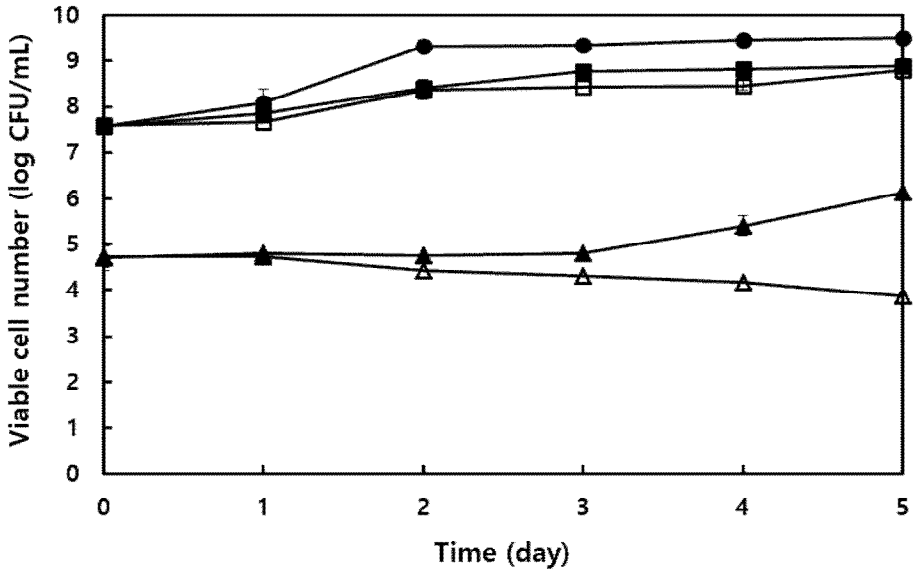

Figure 5. Changes in the viable cell number of total bacteria of juice during fermentation at 15℃ using stored apple

■, Fermented fruit-vegetable juice using *Lb. plantarum* EM
□, Fermented fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice using *Lb. plantarum* EM
▲, Fruit-vegetable juice without starter culture
△, Fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice without starter culture
●, *Lb. plantarum* EM in MRS medium
All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

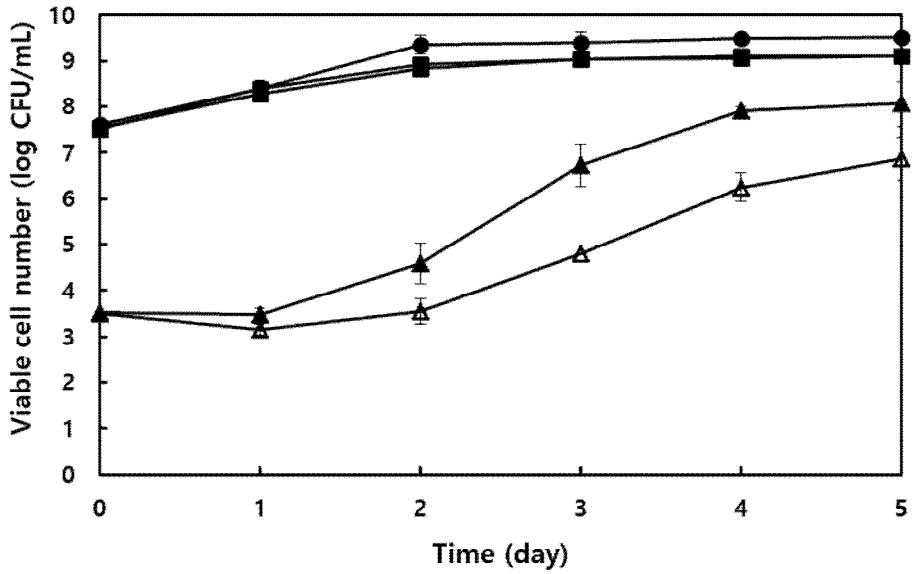

Figure 6. Changes in the viable cell number of total bacteria of juice during fermentation at 15℃ using newly harvested apple

■, Fermented fruit-vegetable juice using *Lb. plantarum* EM
□, Fermented fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice using *Lb. plantarum* EM
▲, Fruit-vegetable juice without starter culture
△, Fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice without starter culture
●, *Lb. plantarum* EM in MRS medium
All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 유산균 외 균수

유산균 외 균수는 PCA 고체 배지에서 배양하여 *Lb. plantarum* EM을 제외한 균수를 조사하였고, 형성된 colony를 형태적으로 분류하여 gram 염색 후 현미경으로 관찰하였다.

수확 후 저장한 사과를 사용한 경우(Figure 7)에서는 레몬즙 첨가/무첨가 발효과채주스의 유산균 외 균수가 초기 균수인 약 4.7 log CFU/mL에서 발효가 진행됨에 따라 서서히 감소하였고 발효 5일차에 약 3 중반 log CFU/mL에 도달하였다. 유산균 외 균의 gram 염색 결과(Figure 8)는 분류된 colony는 모두 음성으로 safranin에 의해 붉은색으로 염색된 것을 확인하였다.

당해 새로 난 햇사과를 사용한 경우(Figure 9)에는 레몬즙 첨가/무첨가 발효과채주스 모두에서 초기 균수 약 2 중반 log CFU/mL에서 발효 5일차에 약 2 초반 log CFU/mL로 다소 감소하였다. 유산균 외 균의 현미경 관찰 결과(Figure 10)는 분류된 colony는 모두 효모로 확인되었다.

(3) 대장균군

레몬즙 첨가/무첨가 발효과채주스와 종균비첨가 과채주스 모두에서 검출되지 않았다(Figure 11).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

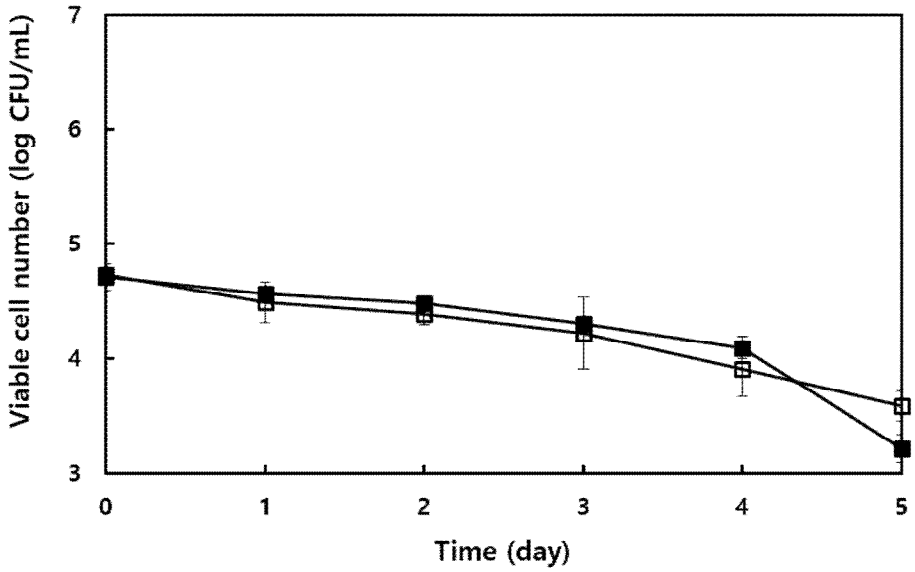

Figure 7. Changes in the viable cell number of except *Lb. plantarum* EM of juice during fermentation at 15℃ using stored apple

■, Fermented fruit-vegetable juice using *Lb. plantarum* EM

□, Fermented fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice using *Lb. plantarum* EM

All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

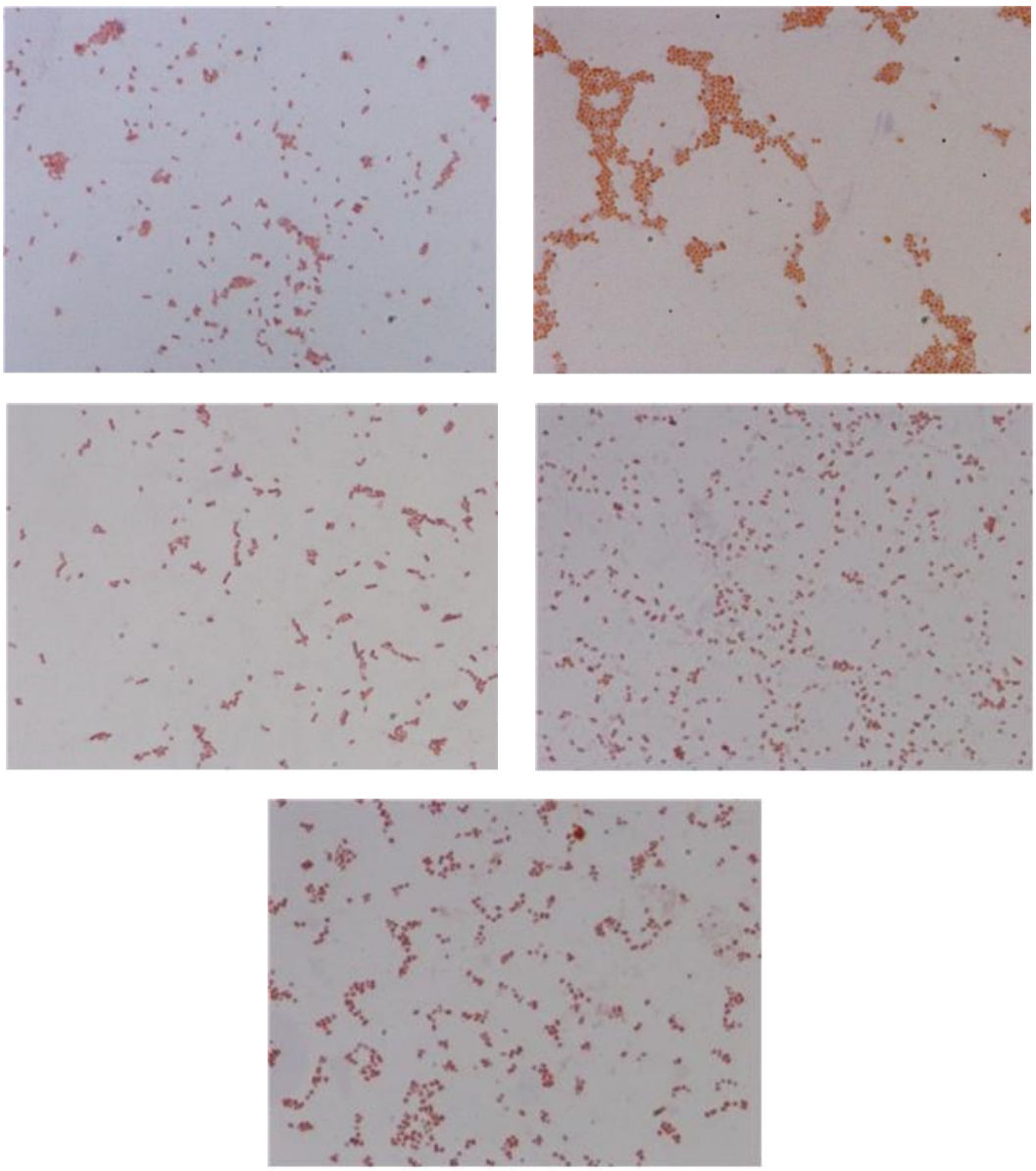

Figure 8. Gram staining of the isolated strains except *Lb. plantarum* EM from fermented fruit-vegetable juice using stored apple

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

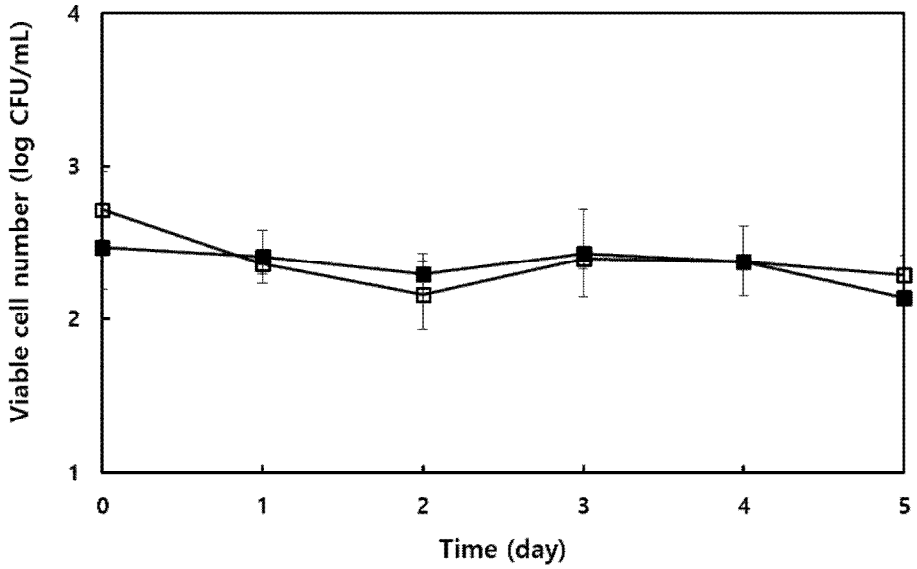

Figure 9. Changes in the viable cell number of except *Lb. plantarum* EM of juice during fermentation at 15℃ using newly harvested apple

■, Fermented fruit-vegetable juice using *Lb. plantarum* EM

□, Fermented fruit-vegetable juice supplemented with 2% lemon juice using *Lb. plantarum* EM

All values were mean ± SD (n=3)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

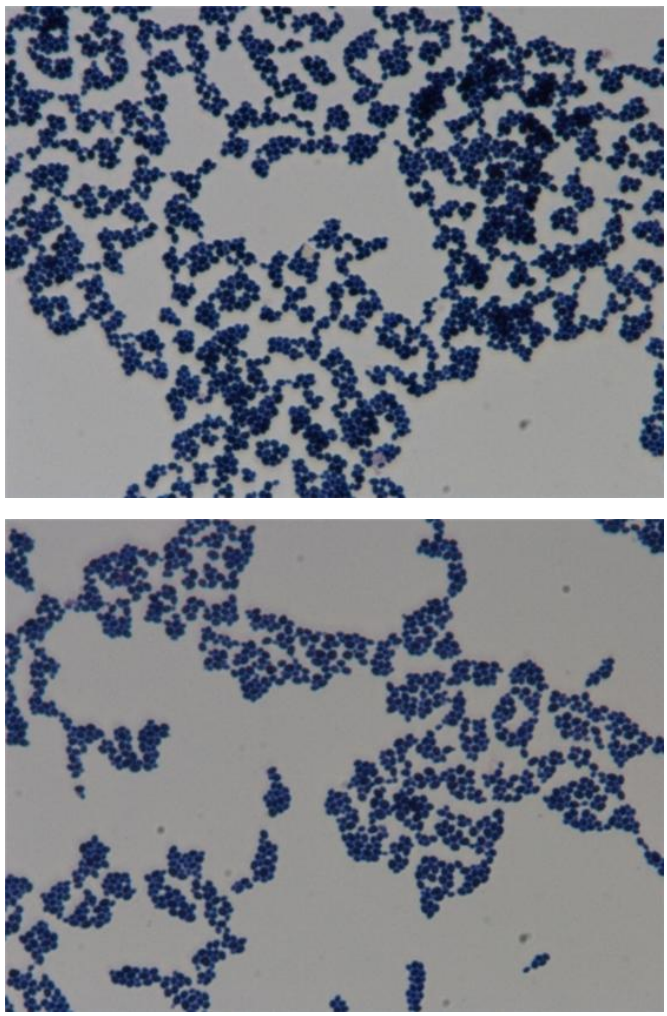

Figure 10. Gram staining of the isolated strains except *Lb. plantarum* EM from fermented fruit-vegetable juice using newly harvested apple

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

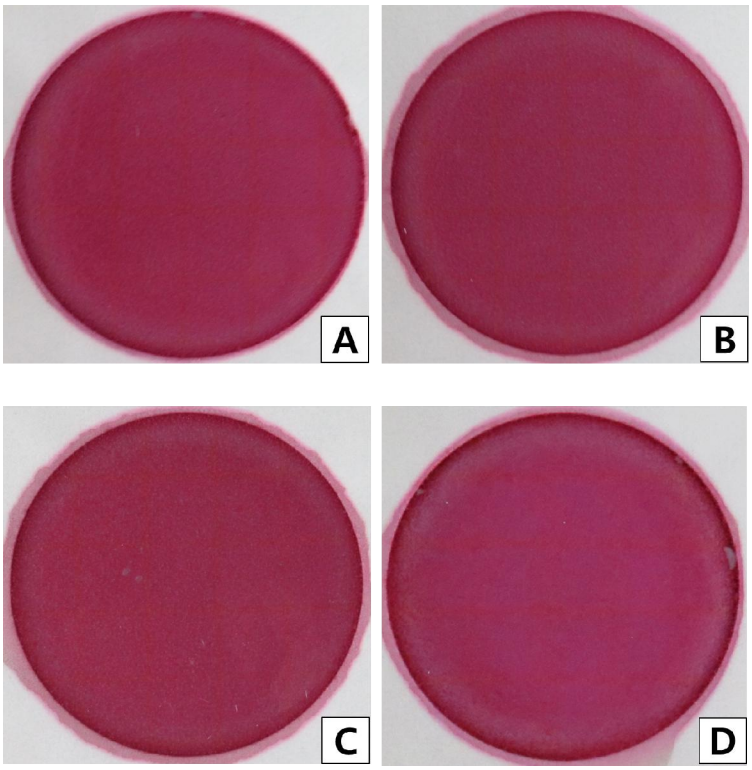

Figure 11. Coliform group test of fermented fruit-vegetable juice at 15℃ for 5 days

The medium is petrifilm-coliform count plate. The plate was incubated at 37℃ for 24h. (A) Fermented fruit-vegetable juice using stored apple. (B) Non-starter fruit-vegetable juice using stored apple. (C) Fermented fruit-vegetable juice using newly harvested apple. (D) Non-starter fruit-vegetable juice using newly harvested apple.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

본 실험에서는 발효과채주스를 제조하는데 저장 사과를 사용했느냐 혹은 햇사과를 사용했느냐에 따른 특성 차이와 레몬즙 첨가 유무에 따른 특성을 조사하였다.

발효과채주스를 제조하는데 사용한 사과에 따른 실험 결과, 수확 후 저장한 사과를 사용했을 때보다 당해 새로 난 햇사과를 사용했을 때 발효 3일차에 *Lb. plantarum* EM의 생균수가 약 9.0 log CFU/mL이며, 이후에 약 9.1 log CFU/mL로 최대 생육에 도달하는 것을 확인하였다.

발효과채주스의 레몬즙 2% (v/v) 첨가 유무에 따른 실험 결과, 당해 새로 난 햇사과를 사용하여 제조한 발효과채주스의 경우 레몬즙 첨가 유무에 상관없이 *Lb. plantarum* EM의 생육 곡선이 매우 유사하였으나, 수확 후 저장한 사과를 사용하여 제조한 발효과채주스의 경우 레몬즙을 첨가하지 않은 발효과채주스에서 *Lb. plantarum* EM이 더 잘 생육하는 것을 확인하였다.

상기 실험 결과에 따라 최종적으로 종균을 접종한 발효과채주스의 제조는 레몬즙을 첨가하지 않고 발효하는 것으로 결정되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 종균비첨가 과채주스에서 유산균 분리·동정

가. 종균비첨가 과채주스에서 유산균 3종 분리·동정

당해 새로 난 사과를 사용하여 제조한 발효과채주스의 대조구 실험으로 종균비첨가 과채주스를 발효 온도인 15℃에서 발효를 하던 도중 과채주스의 원재료에 존재하고 있던 미생물 중 유산균이 증식하였다. 이에 과채주스가 보유하고 있는 유산균에 대해 조사하기 위하여 발효 5일차 plate에서 관찰된 colony를 형태학적으로 선별하였다. 선별한 유산균을 3그룹으로 분류 후 gram 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과(Figure 12), 분리균주 HL1은 그람 양성의 단간균, 분리균주 HL2와 HL3은 그람 양성의 구균으로 확인되었다. 분리균주 3그룹의 1 colony를 각각 MRS 고체배지에 streaking하여 분리한 후 동정하였다. 16s rRNA gene 염기서열 분석 결과는 NCBI Blast program을 사용하여 상동성을 확인하였다. 상동성 검색 결과(Table 4), 분리균주 중 우점율이 가장 높은 HL1은 *Weissella cibaria* Ⅱ-1-59^{T}와 99.8%의 상동성을 나타내었고, 분리균주 HL2와 HL3는 각각 *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293와 99.9%, 99.4%의 상동성을 나타내었다. 분리균주 HL2와 HL3은 형태학적으로 보았을 때, colony 색이 각각 불투명한 흰색과 노란색이었으며 상동성 검색 결과는 99.0%로 나타났다. 상동성 결과에 따라 분리 유산균 *Weissella cibaria* HL1, *Leuconostoc mesenteroides* HL2, *Leuconostoc mesenteroides* HL3로 명명하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

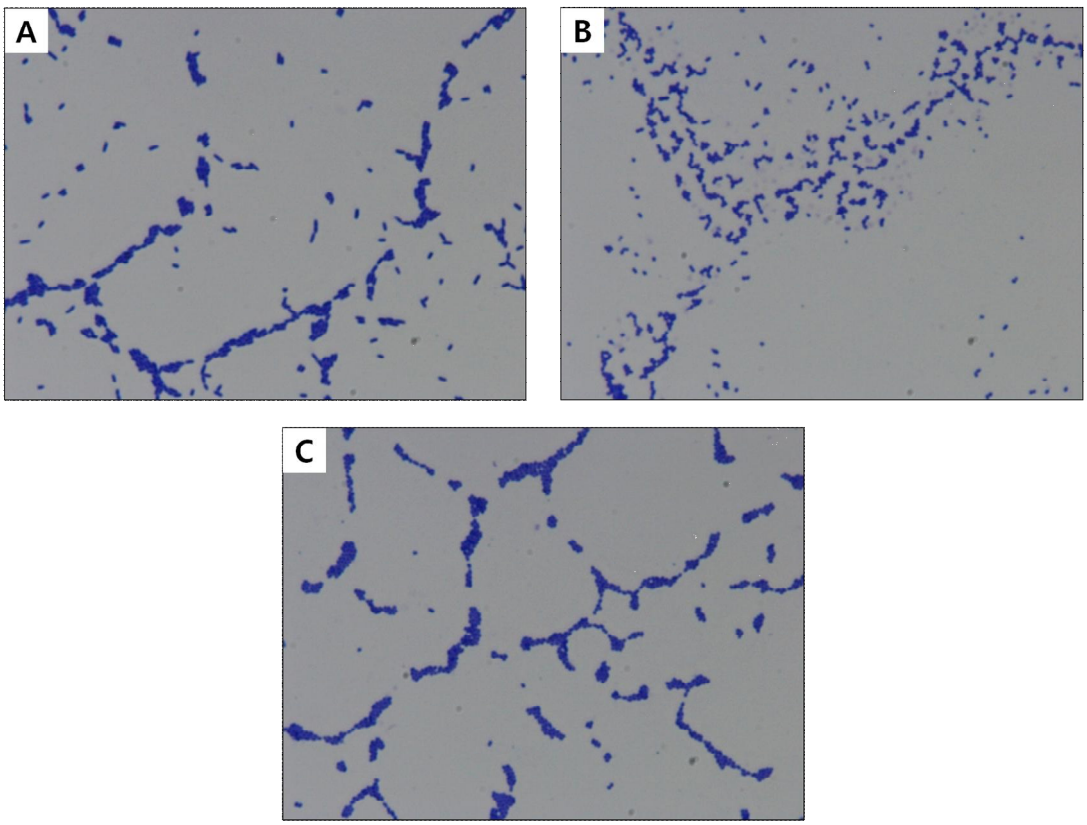

Figure 12. Gram staining of the isolated strains from non-starter fruit-vegetable juice using newly harvested apple

The isolated strains from non-starter fruit-vegetable juice(15℃, 5 days) (A) Dominance rate of 51.4% (B) Dominance rate of 40.5% (C) Dominance rate of 8.1%

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Identification of strains isolated from non-starter fruit-vegetable juice(15℃, 5 days)

Strain	Uni-direction	NCBI blast results	Identity
HL1	1377bp	*Weissella cibaria* strain II-I-59^{T}, patial sequence	99.8%
HL2	1482bp	*Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293^{T}	99.9%
HL3	1443bp	*Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293^{T}	99.4%

* The homology of HL2 and HL3 is 99.0%.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 종균비첨가 과채주스에서 분리한 유산균 3종에 대한 *Lb. plantarum* EM의 항균 활성

본 실험에서 발효과채주스의 종균으로 사용하는 *Lb. plantarum* EM이 원재료에 존재하는 유산균의 생육을 억제하고 종균으로서 적용할 수 있는지를 확인하기위한 실험으로 분리균주 3종에 대한 항균 활성을 조사하였다. 조항균 물질으로는 *Lb. plantarum* EM의 배양 상징액의 5배 농축액과 발효과채주스의 배양 상징액의 5배 농축액을 사용하였다. 항균 활성측정은 paper disc method와 spot-on-the-lawn test로 확인하였다.

Paper disc method 실험 결과(Table 5), *Lb. plantarum* EM과 발효과채주스의 조항균 물질 모두 분리 균주 HL1에 대해서 가장 항균 활성이 강했고, 그 다음으로 HL3, HL2 순서로 나타났다. *Lb. plantarum* EM의 조항균 물질에 비해 발효과채주스의 조항균 물질이 각각의 분리균주에 대한 항균 활성이 상대적으로 약하게 나타났다.

Spot-on-the-lawn test 결과(Table 5), *Lb. plantarum* EM의 조항균 물질은 분리균주 HL3보다 분리균주 HL1과 HL2에서 항균 활성이 더 강하게 나타났다. 반면에 발효과채주스의 조항균 물질은 분리균주 모두에서 항균 활성이 나타나지 않았다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. Antimicrobial activity of *Lb. plantarum* EM against three stains isolated from non-starter fruit-vegetable juice

Antimicrobial compound producing strain	Sensitive bacteria	Antimicrobial activity	
		clear zone	AU/mL
Lb. plantarum EM	*Weissella cibaria* HL1	++++	400
	Leuconostoc mesenteroides HL2	++++	200
	Leuconostoc mesenteroides HL3	++++	400
Fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM	*Weissella cibaria* HL1	+++	0
	Leuconostoc mesenteroides HL2	++	0
	Leuconostoc mesenteroides HL3	+++	0

* Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: -, no inhibition zone; +, below 10.0 mm; ++, 10.0~14.0 mm; +++, 14.0~18.0 mm; ++++, above 18.0 mm.

** The antimicrobial activity were measured by spot-on-the-lawn test (AU/mL)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 발효과채주스의 항균 spectrum 조사

식중독 및 부패균을 포함한 세균 7종, 효모 3종, 곰팡이 5종을 대상으로 본 실험에서 종균으로 사용한 *Lb. plantarum* EM이 생산하는 항균 물질과 종균을 접종하여 제조한 발효과채주스, 발효과채주스의 대조구, MRS 대조구의 발효일차별 (15℃, 0~5일) 항균 활성을 spot-on-the-lawn test로 조사하였다(Table 6). 모든 시료의 조항균 물질은 배양상징액의 5배 농축액으로 제조하여 실험하였다. *Lb. plantarum* EM은 식중독 및 부패균에 대해 강한 항균 활성을 가질 뿐만 아니라 곰팡이에 대해서도 활성을 가져 넓은 항균 spectrum을 나타내는 것으로 조사된 바 있다[52]. 이와 같이 강력한 항균 활성을 가진 *Lb. plantarum* EM을 식품에 적용하여 발효과채주스를 제조했을 때, 식품 자체로도 항균 활성을 가질 수 있는지 대하여 조사하였다. 사용한 발효과채주스를 제조하는데 사용한 사과는 당해 새로 난 햇사과를 사용하였다. 발효과채주스의 조항균 물질의 감수성 균주에 대한 항균 활성은 발효가 진행됨에 따라 전체적으로 더 강한 항균 활성을 나타냈다.

Spot-on-the-lawn test 결과, 발효과채주스의 조항균 물질은 식품 변패와 식중독을 일으키는 *B. cereus* KCTC 3624, 어패류에서 발견되는 식중독 원인균인 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *B. subtilis* ATCC 6633에 대하여 가장 강한 항균 활성을 보였고, 독소형 식중독의 대표적인 원인균인 *S. aureus* ATCC 29213, 장출혈성 대장균인 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, 우유 부패와 관련된 *P. aeruginosa* ATCC 27853, 장피푸스를 일으키는 *S. enterica* serovar. Typhi ATCC 19430을 포함한 그람 양성, 음성균에 대해서 전체적으로 강한 항균 활성을 나타냈다.

효모에 대한 항진균 활성 실험 결과, 식품에서의 산막효모 생성과 이미/이취의 원인이 되는 *P. kudriavzevii* GY1, *P. kudriavzevii* DY1과 *Z. rouxii*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

곰팡이에 대한 실험 결과, aflatoxin을 생산하여 간암을 유발하는 *A. flavus* ATCC 22546, 알러지 유발 및 면역 결핍증 환자에게 질병을 일으키는 *A. fumigatus* ATCC 96918, ochratoxin을 생산하여 신장, 간장 장해를 일으키는 *A. ochraceus* PF-2. 저온저장 식품에서 변패를 일으키는 *P. roqueforti* ATCC 10110에 대해서 강한 항균 활성을 나타냈다.

발효과채주스의 조항균 물질이 *Lb. plantarum* EM의 조항균 물질보다 상기 제시된

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

감수성 균주에 대하여 항균 활성이 다소 약하게 나타났다. 이는 유산균을 배양하는 배지 중의 영양 성분과 농도가 다르므로 *Lb. plantarum* EM의 생육도나 대사 물질에 대해 영향을 주어 차이가 나는 것으로 볼 수 있다. 미생물의 증식은 수분, 탄소원, 질소원 등의 화학적 인자와 온도, pH 등의 물리적 환경 인자에 크게 달라질 수 있다.

반면에, 종균비첨가 과채주스는 감수성 균주에 대하여 항균 활성을 보이지 않거나 발효과채주스의 조항균 물질에 비해 약한 활성을 나타냈다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 6. Inhibitory spectrum of fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM at 15℃ from 0 to 5 days

Group	Strains	Sample	Fermentation at 15℃(days)						30℃
			0	1	2	3	4	5	1
Gram positive bacteria	*Bacillus cereus* KCTC 3624	EM M	0	0	400	800	1,600	1,600	1,600
		Ctrl A	0	0	0	0	0	100	-
		EM A	0	0	100	200	400	800	-
	Bacillus subtilis ATCC 6633	EM M	0	0	400	800	800	1,600	1,600
		Ctrl A	0	0	0	0	0	100	-
		EM A	0	0	100	400	800	800	-
	Micrococcus luteus ATCC 4698	EM M	0	0	0	0	100	200	200
		Ctrl A	0	0	0	0	0	0	-
		EM A	0	0	0	0	0	0	-
	Staphylococcus aureus ATCC 29213	EM M	0	0	0	100	200	200	200
		Ctrl A	0	0	0	0	0	0	-
		EM A	0	0	0	0	0	100	-
Gram negative bacteria	*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895	EM M	0	0	100	200	200	400	400
		Ctrl A	0	0	0	0	0	0	-
		EM A	0	0	0	0	100	200	-
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	EM M	0	0	100	400	800	1600	1600
		Ctrl A	0	0	0	0	0	0	-
		EM A	0	0	100	200	400	400	-
	Salmonella enterica serovar. Typhi ATCC 19430	EM M	0	0	100	200	400	400	800
		Ctrl A	0	0	0	0	0	0	-
		EM A	0	0	0	0	100	200	-
	Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802	EM M	0	0	800	1,600	3,200	3,200	6,400
		Ctrl A	0	0	0	0	0	0	-
		EM A	0	0	200	800	1,600	3,200	-

- To be continued on next page -

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Group	Strains	Sample	Fermentation at 15℃(days)						30℃
			0	1	2	3	4	5	1
Yeast	*Pichia kudriavzevii* GY1	all sample	N.D						N.D
	Zygosacharomyces rouxii	all sample	N.D						N.D
	Pichia kudriavzevii DY1	all sample	N.D						N.D
Molds	*Aspergillus flavus* ATCC 22546	EM M	0	0	200	400	400	800	800
		Ctrl A	0	0	0	0	0	100	-
		EM A	0	0	200	200	400	400	-
	Aspergillus fumigatus ATCC 96918	EM M	0	0	400	800	800	800	800
		Ctrl A	0	0	0	0	0	200	-
		EM A	0	0	200	200	200	400	-
	Aspergillus ochraceus PF-2	EM M	0	0	100	200	400	400	400
		Ctrl A	0	0	0	0	0	100	-
		EM A	0	0	100	100	200	200	-
	Penicillium roqueforti ATCC 10110	EM M	0	0	200	200	200	400	400
		Ctrl A	0	0	0	0	0	0	-
		EM A	0	0	100	100	100	200	-
	Aspergillus nidulans PF-3	EM M	0	0	200	400	800	1600	1600
		Ctrl A	0	0	0	0	0	100	-
		EM A	0	0	200	200	400	800	-

* The antimicrobial activity were measured by spot-on-the-lawn test (AU/mL)

** EM M; *Lb. plantarum* EM inoculation in MRS broth, Ctrl A; fermented fruit-vegetable juice without starter culture, EM A; *Lb. plantarum* EM inoculation in fermented fruit-vegetable juice

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. 발효과채주스의 저온 저장기간에 따른 특성

본 실험에서 개발한 *Lb. plantarum* EM을 접종한 과채주스를 15℃에서 5일 동안 발효한 후 시판 음료가 통상적으로 보관되는 냉장 온도(4℃)에 저장하였다. 식품위생법 시행규칙의 건강기능식품 유통기한 설정 가이드 라인[56]에 따라 저온 저장기간은 유사한 시판 제품의 유통기한이 제조일로부터 10일이므로 이를 감안하여 예상 유통기한의 약 1.3~2배의 기간인 약 3주로 결정하였다. 그 후에 3일 간격으로 발효과채주스의 이화학적, 미생물학적 특성과 상기 발효과채주스의 항균 spectrum항균 활성을 조사하였다. 상기 조사된 시판 유산균 첨가 음료 중 성상이 비슷한 제품의 특성도 함께 조사하여 비교하였다.

가. 이화학적 및 미생물학적 특성

시판 유산균 첨가 음료와 발효과채주스의 저온 저장 시 실험 결과(Table 7, 8), 이화학적 특성으로 발효과채주스와 시판 유산균 첨가 음료 모두 저온 저장 기간이 늘어남에 따라 pH가 감소하고 산도가 증가하였다.

발효과채주스의 유산균수를 측정한 결과, 발효 5일차인 종료 시점에 *Lb. plantarum* EM이 약 9.1 log CFU/mL로 측정되었고 저장 9일차에 약 9.0 log CFU/mL로 감소한 이후 유지하다가 저장 21일차에 약 8.8 log CFU/mL로 감소하였다. 저온에서 저장함에 따라 *Lb. plantarum* EM 생균수가 다소 감소하였으나, 평균적으로 약 9.0 log CFU/mL로 초기 생균수를 유지하는 것으로 나타났다. 총 균수는 *Lb. plantarum* EM이 발효과채주스에서 100% 우점하여 유산균수와 동일한 실험 결과를 보였다. 유산균을 제외한 균수를 측정한 결과, 저장 6일차까지는 효모로 추정되는 colony가 약 2.0~2.5 log CFU/mL로 측정되었고, 관찰된 colony를 분류 후 gram 염색하여 그람 양성인 효모임을 확인하였다. 대장균군은 모든 저장일차 발효과채주스에서 검출되지 않았다.

시판 유산균 첨가 음료에 대한 미생물학적 특성도 본 연구에서 개발한 발효과채주스와 같이 저온(4℃)에 저장하여 3일 간격으로 조사하였다. 그 결과, 초기 총 균수와 유산균수 모두 약 8.2~8.3 log CFU/mL로 측정되었으며, 시판 제품의 유통기한에 가까운 저장 9일차에 유산균수와 총 균수가 모두 약 0.2 log CFU/mL 감소하는 것을 확인하였다. 유통기한 이후에도 저온(4℃) 저장하는 기간이 지남에 따라 유산균수와 총 균

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

수가 감소하였다. 유산균 외 균과 대장균군은 모두 검출되지 않았다.

본 실험에서 제조한 발효과채주스는 저장 기간이 연장되어도 발효 종료 시점에서의 *Lb. plantarum* EM 최대 생육을 유지하므로 보존성에 있어서 우수함을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 7. Change of pH, acidity and microbial populations in fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM during storage at 4℃

Item		Storage (days) at 4℃							
		0	3	6	9	12	15	18	21
pH		3.91±0.07	3.79±0.00	3.73±0.04	3.71±0.01	3.70±0.01	3.69±0.02	3.69±0.04	3.68±0.02
Activity(%)		1.12±0.06	1.38±0.01	1.46±0.08	1.47±0.06	1.49±0.08	1.54±0.08	1.57±0.09	1.58±0.11
Microorganism (log CFU/mL)	Total viable cells	9.11±0.01	9.12±0.03	9.11±0.09	9.01±0.09	9.00±0.00	8.98±0.01	8.98±0.02	8.87±0.09
	LAB	9.10±0.03	9.12±0.04	9.12±0.09	9.03±0.01	8.99±0.00	8.97±0.02	8.98±0.03	8.82±0.04
	Yeast	2.15±0.04	2.45±0.60	1.97±0.81	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Coliform group	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Dominance (%) of *Lb. plantarum* EM		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

* All values were mean ± SD (n=3)

** N.D : Not detected

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 8. Change of pH, acidity and microbial populations in the commercial lactic acid bacteria beverages during storage at 4℃

Item		Storage (days) at 4℃							
		0	3	6	9	12	15	18	21
pH		3.56	3.55	3.54	3.51	3.42	3.40	3.39	3.36
Activity(%)		0.25	0.26	0.27	0.29	0.31	0.32	0.34	0.38
Microorganism (log CFU/mL)	Total viable cells	8.27	8.25	8.23	7.95	7.84	7.82	7.71	7.68
	LAB	8.23	8.15	8.04	7.90	7.80	7.79	7.70	7.60
	other bacteria	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Coliform group	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

* N.D : Not detected

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 항균 활성 측정

발효과채주스의 4℃에서 저장일차별 시료와 유통기한 이전의 시판 유산균 첨가 음료의 항균 활성을 측정하였다. 조항균 물질의 준비는 상기와 같이 각 시료의 배양 상징액을 5배 농축하여 준비하였다.

발효과채주스의 4℃에서 저장 3~21일차 시료의 항균 활성 실험 결과(Table 9), 효모에 대한 항진균 실험 결과는 상기 조사한 발효과채주스의 항균 활성 실험 결과와 마찬가지로 4℃ 저장 전 구간 시료에서 효모 3종에 대하여 항균 활성이 나타내지 않았다.

그람 음성균과 양성균을 포함한 세균 8종, 효모 3종, 곰팡이 5종에 대한 항균 활성 측정 결과, 상기 실험한 발효 종료 후 발효과채주스가 항균 활성을 나타내지 않았던 식품의 변색과 점질을 형성하는 *M. luteus* ATCC 13513에 대하여 저장 3일차부터 항균 활성을 나타내었고, 이후 저장일이 늘어남에 따라 항균 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 이 외의 감수성 균주에 대해서는 저온 저장기간이 연장되어도 발효 종료 시점의 발효과채주스의 항균 활성을 거의 유지하는 것으로 확인되었다.

본 실험에서 개발한 발효과채주스가 시판되는 유산균 음료 중 성상이 비슷한 제품 대비 위해균주에 대한 항균 활성이 뛰어나고 저온 저장기간이 연장되어도 그 활성을 유지하는 것을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 9. Antimicrobial activity of fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM according storage period at 4℃

Group	Strains	Antimicrobial activity (days)								
		0	3	6	9	12	15	18	21	P사 W제품
Gram positive bacteria	*Bacillus cereus* KCTC 3624	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	400
	Bacillus subtilis ATCC 6633	800	800	800	1600	1600	1600	1600	1600	400
	Micrococcus luteus ATCC 4698	0	100	100	100	200	200	200	200	100
	Staphylococcus aureus ATCC 29213	100	100	100	100	100	100	100	100	0
Gram negative bacteria	*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895	200	200	200	200	200	200	200	200	0
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	400	400	400	400	400	400	400	400	200
	Salmonella enterica serovar. Typhi ATCC 19430	200	200	200	200	200	200	200	200	0
	Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	800
Mold	*Aspergillus flavus* ATCC 22546	400	400	400	400	400	400	400	400	0
	Aspergillus fumigatus ATCC 96918	400	400	400	400	400	400	400	400	0
	Aspergillus ochraceus PF-2	200	200	200	200	200	200	200	200	0
	Penicillium roqueforti ATCC 10110	200	200	200	200	200	200	100	100	0
	Aspergillus nidulans PF-3	800	800	800	800	800	800	400	400	0
Yeast	*Pichia kudriavzevii* GY1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pichia kudriavzevii DY1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Zygosaccharomyces rouxii	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* The antimicrobial activity were measured by spot-on-the-lawn test (AU/mL)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. 발효과채주스의 맛의 최적화

Lb. plantarum EM을 접종한 후 15℃에서 5일 동안 발효시켜 제조한 발효과채주스의 맛의 최적화를 위하여 D-fructose와 sucrose를 농도별로 첨가하여 관능 평가를 실시하였다. 관능 평가는 훈련된 연구원 10명을 대상으로 실시하였고, 관능 항목으로는 신맛, 단맛, 이미/이취, 기호도에 대하여 5점 척도로 평가하였다. D-Fructose와 sucrose는 발효과채주스에 0, 1, 2, 4, 6%로 첨가하여 준비한 후, 각각 관능 평가를 실시하였다. D-Fructose와 sucrose의 첨가에 따른 관능 평가를 실시한 후 각각 관능 결과에서 기호도 1, 2순위를 결정하여 본 실험에서 제조한 발효과채주스와 성상이 비슷한 시판 유산균 첨가 음료와 함께 관능 평가를 실시하였다(Table 10).

D-Fructose의 첨가에 따른 관능 평가 결과, 신맛과 이미/이취 항목에 대하여 점수가 크게 차이가 나지 않았으나, D-fructose 첨가량이 높아질수록 단맛과 기호도 항목에서 높게 측정되어 기호도 1, 2순위가 각각 D-fructose 4, 5% 첨가구로 결정되었다. Sucrose의 첨가에 따른 관능 평가에서도 마찬가지로 신맛과 이미/이취 항목에 대하여 점수가 크게 차이가 나지 않았으나, sucrose의 첨가량이 높아질수록 단맛 항목에서는 점수가 높게 측정되나 기호도 항목에서는 sucrose 2%, 1%, 4%, 6%, 0% 첨가구 순으로 결정되었다. 이는 sucrose를 너무 많이 첨가하면 특유의 텁텁한 맛에 의해 인위적인 단맛이 느껴져 오히려 기호도 항목에서 낮은 점수의 결과가 나왔다. D-Fructose와 sucrose의 첨가에 따른 기호도 1, 2순위와 시판 유산균 첨가 음료의 관능 결과, D-fructose를 6% 첨가구가 가장 발효과채주스와 잘 어울리며 부드러운 단맛을 내어 최종 기호도 평가에서 가장 높게 측정되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 10. Sensory evaluation of fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM by addition of D-fructose or sucrose

Addition of sugar	sour taste	sweet taste	off-flavor	overall preferance
Non-addition	4.80±0.42^{a}	1.80±0.63^{e}	4.25±1.04^{a}	1.50±0.53^{d}
D-Fructose 1%	4.10±0.57^{b}	2.80±0.42^{d}	4.25±1.04^{a}	2.30±0.67^{c}
D-Fructose 2%	3.90±0.57^{b}	3.40±0.52^{c}	4.11±1.05^{a}	3.00±0.82^{b}
D-Fructose 4%	3.00±0.82^{c}	4.10±0.57^{b}	4.25±1.04^{a}	3.70±0.48^{ab}
D-Fructose 6%	3.00±0.82^{c}	4.80±0.42^{a}	4.25±1.04^{a}	3.50±0.97^{a}

Addition of sugar	sour taste	sweet taste	off-flavor	overall preferance
Non-addition	4.80±0.42^{a}	1.80±0.63^{a}	4.25±1.04^{a}	1.50±0.53^{b}
Sucrose 1%	4.20±0.42^{ab}	2.80±0.63^{a}	4.25±1.04^{a}	2.80±0.92^{a}
Sucrose 2%	3.60±0.97^{bc}	3.30±0.67^{b}	4.11±1.05^{a}	3.00±0.94^{a}
Sucrose 4%	3.10±1.20^{c}	4.20±0.79^{b}	4.22±0.97^{a}	2.70±0.95^{a}
Sucrose 6%	3.00±1.25^{c}	4.50±0.53^{c}	4.22±0.97^{a}	2.50±0.85^{a}

sample	sour taste	sweet taste	off-flavor	overall preferance
D-Fructose 4%	3.40±0.70^{a}	4.10±0.57^{a}	4.13±0.99^{a}	3.70±0.67^{a}
D-Fructose 6%	3.30±0.67^{a}	4.80±0.42^{b}	4.13±0.99^{a}	4.10±0.57^{a}
Sucrose 1%	3.90±0.57^{a}	3.20±0.42^{b}	4.13±0.99^{a}	3.00±0.47^{b}
Sucrose 2%	3.90±0.57^{a}	3.60±0.70^{bc}	4.13±0.99^{a}	3.00±0.00^{b}
Commercial fermented beverage	2.20±1.03^{b}	3.90±0.74^{c}	3.25±1.16^{b}	1.90±0.32^{c}

* Values are mean ± standard deviation (n=10)

** Different superscripts indicate significant difference at $p<0.05$ by Duncan' multiple comparison.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2 절 발효과채주스의 성분

1. 일반 성분

가. 일반 성분

본 실험에서 개발한 발효과채주스의 특성을 조사하기 위하여 *Lb. plantarum* EM을 접종하여 15℃에서 5일 동안 발효시킨 발효과채주스와 제조 직후의 과채주스의 일반 성분을 분석하였다. 분석 항목으로는 총 당, 조지방, 조단백, 수분, 총 식이섬유, 회분을 조사하였다. 제조 직후의 과채주스와 발효과채주스의 비교 분석 결과(Table 11), 총 당의 함량은 제조 직후의 과채주스에 비해 발효과채주스에서 다소 감소하였다. 이는 유산균이 당을 발효하여 젖산을 생성하는 대사의 결과로 보여 진다. 조지방의 분석 결과는 제조 직후의 과채주스에 비해 발효과채주스의 조지방 함량이 50% 이상 크게 감소하였다. 이를 토대로 콜레스테롤 저하능이 뛰어난 *Lb. plantarum* EM의 생체 내 지질 대사 개선효과 가능성을 확인하였다. 나머지 항목에 대해서는 유의한 차이를 보이지 않았다.

나. 유리당

제조 직후의 과채주스와 발효과채주스의 유리당을 분석한 결과(Table 12), 제조 직후의 과채주스의 유리당 함량은 sucrose가 14,351.379 mg/L, glucose가 32,238.859 mg/L, xylose가 511.865 mg/L, fructose가 50,680.534 mg/L, sorbitol이 2,029.338 mg/L로 총 99,811.975 mg/L으로 검출되었다.

발효과채주스의 유리당 함량은 sucrose가 12,974.720 mg/L, glucose가 21,703.787 mg/L, galactose가 726.556 mg/L, fructose가 48,581.607 mg/L, sorbitol이 1,892.683 mg/L로 총 85,879.353 mg/L이 검출되었다. 제조 직후의 과채주스에 비해 발효과채주스의 유리당 총 함량이 감소하였는데, 이는 종균으로 사용한 유산균의 탄수화물 대사의 결과로 보여 진다. 특히 유산균의 젖산 발효에 의해 포도당의 함량이 크게 감소한 것을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 유기산

제조 직후의 과채주스와 발효과채주스의 유기산을 분석한 결과(Table 13), 제조 직후의 과채주스에서 검출된 유기산은 함량이 많은 순서대로 malic acid가 5,622.032 mg/L, acetic acid가 4,241.487 mg/L, citric acid가 403,989 mg/L, fumaric acid가 48.468 mg/L으로 총 유기산 함량은 10,315.976 mg/L로 분석되었다.

발효과채주스의 유기산 함량은 발효되는 과정에서 유산균의 젖산 생성에 의해 lactic acid가 14,505.630 mg/L로 가장 많이 검출되었으며, acetic acid가 4,216.916 mg/L, malic acid가 2,556.013 mg/L로 총 유기산 함량은 21,278.559 mg/L로 제조 직후의 과채주스에 비해 크게 증가하였다.

라. 유리 아미노산

제조 직후의 과채주스와 발효과채주스의 유리 아미노산의 분석 결과(Table 14, 15), 발효과채주스는 총 19종의 유리 아미노산이 검출되었고, 이에 비해 제조 직후의 과채주스는 tyrosine이 추가로 검출되어 총 20종의 유리 아미노산이 분석되었다. 제조 직후의 과채주스와 발효과채주스의 유리 아미노산의 함량 차이를 살펴보면, 발효과채주스의 유리 아미노산 함량은 제조 직후의 과채주스에서 검출된 유리 아미노산의 함량에 비해 대체로 감소하였고 glycine, GABA, lysine에 대해서는 증가하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 11. Proximate composition in non fermented fruit-vegetable juice and fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM (15℃, 5 days)

Proximate composition (g/100mL)	Non fermented fruit-vegetable juice	Fermented fruit-vegetable juice
Total sugar	10.1	9.2
Crude fat	3.7	1.5
Crude protein	0.7	0.6
Moisture	89.4	90.3
Total dietary fiber	0.9	1.1
Ash	0.6	0.6

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 12. Free sugars in non fermented fruit-vegetable juice and fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM

Free sugar (mg/L)	Non fermented fruit-vegetable juice (15℃, 0 day)	Fermented fruit-vegetable juice(15℃, 5 days)
Sucrose	14,351.379	12,974.720
Glucose	32,238.859	21,703.787
Xylose	511.865	-
Galactose	-	726.556
Fructose	50,680.534	48,581.607
Sorbitol	2,029.338	1,892.683
Total	99,811.975	85,879.353

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 13. Organic acids in non fermented fruit-vegetable juice and fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM

Organic acid (mg/L)	Non fermented fruit-vegetable juice (15℃, 0 day)	Fermented fruit-vegetable juice(15℃, 5 days)
Citric acid	403.989	-
Malic acid	5,622.032	2,556.013
Fumaric acid	48.468	-
Acetic acid	4,241.487	4,216.916
Lactic acid	-	14,505.630
Total	10,315.976	21,278.559

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 14. Free amino acids in non fermented fruit-vegetable juice and fermented fruit-vegetable juice with *Lb. plantarum* EM

Amino acid (mg/L)	Non fermented fruit-vegetable juice (15℃, 0 day)	Fermented fruit-vegetable juice(15℃, 5 days)
Aspartic acid	308.04	227.63
Glutamic acid	47.71	5.59
Asparagine	301.05	34.92
Serine	71.39	3.84
Glutamine	1,104.68	6.77
Histidine	980.66	11.38
Glycine	5.73	19.59
Threonine	28.01	18.78
Arginine	95.83	18.47
Alanine	58.10	526.98
GABA	227.63	267.39
Tyrosine	5.59	-
Valine	34.92	9.68
Methionine	3.84	0.54
Tryptophane	6.77	1.68
Phenylalanine	11.38	0.85
Leucine	19.59	1.27
Isoleucine	18.78	4.37
Lysine	18.47	31.19
Proline	526.98	351.65
Total	3,875.148	3,112.201

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 4 장 결 론

김치의 발효미생물인 김치유산균에 대한 대장염 및 대장암 개선 등의 정장 작용, 비만개선 효능, 바이러스 감염 예방, 항균 작용, 아토피 완화와 알레르기 개선 외에 항암 효과, GABA 생산 등의 효능이 확인되면서 다양한 건강 증진 효능에 대한 연구가 지속적으로 보고되고 있고, 그와 관련된 동물 실험과 임상 연구가 이루어지고 있다.[19, 26, 27]

과거 이러한 김치유산균이 등장하기 전에는 주로 해외에서 수입한 유산균이 대부분이었다. 주로 수입한 유산균은 완전식품인 우유에서 추출한 동물성 유산균으로 사람들이 흔히 떠올리는 대표적인 유산균이었다. 그러나 김치유산균에 대한 연구 보고가 점차 늘어나며 식물성 유산균이 크게 주목을 받고 있다. 김치유산균 등의 식물성 유산균은 동물성 유산균에 비해 짜고 매운 척박한 환경, 적은 영양소 속에서 생존하여 증식해야 하므로 생존력과 각종 영양소를 분해·섭취하는 능력이 뛰어나다고 보고되었다[10, 11].

본 연구에서는 앞선 연구를 통해 콜레스테롤 저하능이 뛰어나다고 보고된 김치유산균 *Lb. plantarum* EM을 활용하여 우리 농산물을 이용한 발효과채주스를 개발하고 그 특성을 규명하고자 한다. Choi 등의 연구에 의하면[5] *Lb. plantarum* EM은 김치에서 분리된 GRAS 미생물이며, 프로바이오틱 유산균이 되기 위한 조건을 충족한다. 또한 광범위한 항균 활성을 가지며 생균 시 뿐만 아니라 사균 상태에서도 콜레스테롤 동화능이 우수한 결과가 보고되어 발효과채주스의 종균으로써 사용하였다.

국내에서도 해외 우수 유산균과 경쟁이 가능한 우수한 김치유산균을 확보하는데 많은 노력을 기울이고 있다. 식품업계에서는 이러한 추세를 따라 김치유산균을 제품에 반영하여 상품화하는데 주력하고 있다. 실제로 식음료업체들에서 김치유산균을 제품에 첨가한 건강기능성 신제품을 내놓고 있다. 이러한 신규 원료인 김치유산균을 활용한 기능성 식품 개발은 기호성이 가미된 또 다른 식품으로 태어나 새로운 시장을 개척할 수 있어 국내 식품 산업 발전에 이바지할 것이며, 국민의 건강과 삶의 질 증진에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다고 보고되고 있다.

발효과채주스의 제조는 국내 농산물인 사과와 양배추를 동량으로 혼합한 후 *Lb. plantarum* EM을 1% (v/v) 접종하였다. 종균을 접종하여 제조한 과채주스의 발효 온도를 설정하기에 앞서 원재료에 존재할 수 있는 미생물의 생육을 저해하여야 한다. 원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

재료에 존재할 수 있는 유산균 중에서도 탄산가스를 형성하는 *Leuconostoc*속이 증식하게 되면 용기가 팽창하거나 내부에 압력이 발생할 수 있어 제품의 품질을 저하시킬 수 있으므로 이를 저해하며, *Lb. plantarum* EM이 잘 생육할 수 있는 저온 발효 온도를 설정해야 한다. 앞선 연구에서는 4℃, 6.5℃, 15℃의 발효 온도에서 다양한 속의 김치 유산균의 생육을 조사하였다[54]. 이를 토대로 다른 유산균의 생육은 더디면서 종균으로 사용한 *Lb. plantarum* EM의 증식에 적합한 15℃의 발효 온도를 선정하였다. 과채주스를 제조하는데 있어서 사용하는 농산물의 특성상 수확 시기별로 종류와 품종, 저장 유무의 차이가 있을 수 있음을 고려해야 한다. 과채주스를 제조하여 레몬즙 첨가 유무에 따른 발효 특성을 알아본 결과, 과채주스를 제조하는데 수확 후 저장사과를 사용한 경우와 당해 새로 난 햇사과를 사용한 경우에 따라 발효 특성이 상이한 결과로 나타났다. 결과적으로 저장사과는 저장되면서 유산균이 증식하는데 필요한 수분 외에 다양한 영양분의 손실로 인하여 발효과채주스를 15℃에서 발효하여 *Lb. plantarum* EM이 최대 생육인 약 9.1 log CFU/mL에 도달하는데 있어서 햇사과에 비해 약 4~6일 정도 더 소요되었다. 레몬즙의 첨가 유무에 따른 결과는 저장사과를 사용한 경우, 레몬즙을 사용하지 않은 발효과채주스에서 *Lb. plantarum* EM이 더 잘 생육하였다. 반면 햇사과를 사용한 경우에는 레몬즙 첨가 유무에 따른 차이가 나지 않았다. 접종해준 *Lb. plantarum* EM 외에 균수는 햇사과를 사용한 경우보다 저장사과를 사용했을 때, 약 1.1~1.3 log CFU/mL 더 많았다. 앞선 결과에 따라 최종적으로 발효과채주스의 제조는 당해 새로 난 햇사과를 사용하여 과채주스를 제조 후 레몬즙을 첨가하지 않고 15℃에서 5일 동안 발효하는 것으로 결정되었다.

Kim 등[53]에 의하면 *Lb. plantarum* EM의 항균 물질은 비단백질성 물질이거나 세포의 사멸에 따른 단백분해효소의 영향을 받지 않은 안정한 물질로, 식중독균과 부패균을 포함한 그람 양성균과 음성균 뿐만 아니라 곰팡이에 대해서도 항진균 활성을 가지며 넓은 spectrum을 나타냈다. 본 연구에서 *Lb. plantarum* EM을 활용하여 제조한 발효과채주스의 항균 활성을 spot-on-the-lawn test를 통하여 조사한 결과, 상기와 마찬가지로 식품 변패와 식중독과 관련된 그람 양성균과 음성균에 대해 강한 저해활성을 나타냈고, 효모에 대한 활성은 나타나지 않았으나 인체에 유해한 곰팡이에 대해서도 넓은 항균 활성을 나타냈다.

본 연구에서 개발한 발효과채주스와 성상이 비슷한 시판 유산균 음료의 유통기한을 감안하여 발효 종료된 직후에 발효과채주스를 4℃에서 21일까지 저장하여 3일 간격으로 이화학적, 미생물학적 특성과 항균 활성을 조사한 결과, 저온에서 저장기간이 늘어

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

남에 따라 *Lb. plantarum* EM의 생육이 평균적으로 약 9.0 log CFU/mL로 초기 생균수를 유지하였다. 항균 활성 측정 결과에서도 저온저장 21일까지 발효종료 시점의 항균 활성을 유지하여, 저온 저장기간이 연장되어도 발효과채주스가 가지고 있는 활성을 보유함을 확인하였다. 개발한 발효과채주스의 맛의 최적화를 위하여 D-fructose와 sucrose를 첨가하여 관능 평가를 실시한 결과, 최종적으로 D-fructose를 6% 첨가한 발효과채주스가 부드러운 단맛이 느껴지고 *Lb. plantarum* EM의 신맛을 잡아주어 전체적인 기호도 점수에서 가장 높게 평가되었다.

Lb. plantarum EM을 접종하여 제조한 과채주스의 발효 전과 후의 특성 조사를 위하여 일반 성분을 분석한 결과, 발효과채주스에서 총 당, 조단백, 수분, 총 식이섬유, 회분의 함량은 크게 변하지 않았으나 조지방 항목에 대해서는 발효 전 시료에 비해 절반 이상 감소하였다. 이는 앞선 연구[59]에서 보고된 *Lb. plantarum* EM의 세포에 콜레스테롤이 흡착한 결과로 추정된다. 이를 통해 *Lb. plantarum* EM이 가지는 기능성이 *Lactobacilli* 배양을 위해 최적화된 배지가 아닌 식품에 적용했을 때에도 그 활성을 유지하는 바를 확인하였고, *Lb. plantarum* EM이 가진 콜레스테롤 저하능에 따른 발효과채주스의 조지방 함량 감소로 추후 생체 내 지질대사 개선효과를 기대해볼 수 있는 결과라고 보여진다.

과채주스의 발효 전과 후의 유리당 분석 결과는 유산균의 탄수화물 대사로 인해 발효 전과 후의 함량이 99,811.975 mg/L에서 총 85,879.353 mg/L로 감소하였고, 특히 젖산 발효에 의한 glucose의 소비로 그 함량이 32,238.859 mg/L에서 21,703.787 mg/L로 가장 크게 감소하였다. 유기산 분석 결과에서도 유산균의 젖산 발효에 의해 총 유기산 함량이 발효 전 10,315.976 mg/L에서 발효 후에 21,278.559 mg/L으로 크게 증가하였다. Sorbhi 등[43]의 연구 결과에서는 맥아와 보리를 사용하여 단일 곡물과 혼합 곡물을 *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826와 *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 8821로 발효시켜 그에 대한 효과를 연구하고자 하였다. 사용한 곡물은 맥아와 보리를 선정하였고, 맥아가 포함된 배지에서 유산균의 성장이 증진되고 상당한 양의 젖산이 생성됨을 보고하였다.

유리 아미노산 분석 결과, 발효과채주스의 유리 아미노산 함량은 발효 전 검출된 유리 아미노산의 함량에 비해 대체로 감소하였고 glycine, GABA, lysine의 함량은 다소 증가하였다. 이와 유사한 결과로 Raffaella 등은[36] grape must를 *Lactobacillus plantarum* DSM19463로 발효시켜 GABA의 합성을 조사하였다. 그 결과, 발효 전 grape must GABA 함량이 0.65±0.21 g/kg에서 발효 후 8.90±0.18 g/kg으로 GABA 함

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

량이 증가되는 것을 확인하였다. 이 후 기능성 포도 음료를 제조하여 GABA가 피부 보호와 관련된 인간 유전자의 발현을 유도한다고 보고하였다.

본 연구에서는 우리나라의 대표적 발효 식품인 김치로부터 분리된 콜레스테롤 저하능을 가진 유산균을 실제로 식품에 적용하여 발효과채주스를 제조하고 그 특성을 조사하였다. 그 결과. 발효과채주스를 저온에서(4℃) 저장하여 *Lb. plantarum* EM 생균수를 조사하였을 때, 저장 21일차까지 발효 종료 시점의 *Lb. plantarum* EM 생균수를 유지하였다. 뿐만 아니라 발효과채주스 자체로 위해미생물에 대하여 항균 활성을 가짐으로서 방부제 없이도 보존성과 항균력이 우수함을 확인하였고, *Lb. plantarum* EM은 높은 콜레스테롤 저하능을 가지며 이를 활용한 발효과채주스의 조지방 함량이 감소한 것을 확인하였다. 상기와 같이 사용 균주인 *Lb. plantarum* EM이 가지는 기능성이 개발한 발효과채주스에서도 나타났으며, 추후 기능성 건강음료로써 실용화 가능성과 프로바이오틱 기능을 확인하였다.

세계적으로 발효유 시장 규모는 지속적으로 성장하고 있고, 근래에는 건강을 강조한 기능성 발효유가 대세이다. 그에 비해 식물성 유산균을 이용한 과·채음료 시장은 미약한 수준이다. 다양한 건강기능성과 강한 생존력을 가진 식물성 유산균을 활용한 발효과채주스의 개발은 국내 농산물의 고부가가치 식량적 이용 측면에서도 주목할 만하다. 이에 본 연구에서 개발한 발효과채주스는 콜레스테롤 저하능과 항균활성이 뛰어난 유산균을 활용하여 발효 이후 저장 중에도 보존성과 항균력이 유지되며 과채의 식이섬유를 함께 섭취할 수 있어 충분한 고부가가치가 있다고 생각된다. 더나아가 개발한 발효과채주스의 저온 저장기간에 따른 관능적 특성을 추가적으로 조사하여 유통기한의 설정과 발효과채주스의 생체 내 지질대사 개선효과에 대한 연구들이 추가되어야 한다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 5 장 참 고 문 헌

1. Andrejko, M., Zdybicka-Barabas, A. & Cytryńska, M. 2014. Diverse effects of Galleria mellonella infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 115: 14-25.

2. Chang, J.H., Shim, Y.Y., Cha, S.K., & Chee, K.M. 2010. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1): 220-230.

3. Chin, H.S., Breidt, F., Fleming, H.P., Shin, W.C., & Yoon, S.S. 2006. Identification of predominant bacterial isolates from the fermenting kimchi using ITS-PCR and partial 16S rDNA sequence analyses. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(1): 68-76.

4. Cho, J.H., Lee, D.Y., Yang, C.N., Jeon, J.I., Kim, J.H., & Han, H.U. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiology Letters*, 257(2): 262-267.

5. Choi, E.A., Chang, C.H. 2015. Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT-Food Science and Technology,* 62(1): 210-217.

6. Choi, S.M., Jeon, Y.S., Rhee, S.H. & Park, K.Y. 2002. Red pepper powder and kimchi reduce body weight and blood and tissue lipids in rats fed a high fat diet. *Nutraceuticals and Food*, 7(2): 162-167.

7. Das, K., Tiwari, R.K.S. & Shrivastava, D.K. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2): 104-111.

8. Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition,* 125(6): 1401-1412.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

9. Hecquet, L., Sancelme, M., Bolte, J. & Demuynck, C. 1996. Biosynthesis of 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3 (2 H)-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5): 1357-1360.

10. Huang, C.J., Wang, M.L. & Kuo, C.Y. 2008. Studies on the cholesterol removal ability of plant origin lactic acid bacteria. *Journal of Taiwan Livestock Research*, 41: 267-274.

11. Igarashi, T. 2007. Development of beverage and food using plant origin lactic acid bacterium. *Bioindustry*, 24: 32-39.

12. Jang, S.E., Hyun, Y.J., Trinh, H.T., Han, M.J. & Kim, D.H. 2011. Antiscratching behavioral effect of *Lactobacillus plantarum* PM008 isolated from kimchi in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(3): 539-544.

13. Jang, S.E., Joh, E.H., Lee, H.Y., Ahn, Y.T., Lee, J.H., Huh, C.S., Han, M.J. & Kim, D.H. 2013. *Lactobacillus plantarum* HY7712 ameliorates cyclophosphamide -induced immunosuppression in mice. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3): 414-421.

14. Jeong, S.H., Lee, S.H., Jung, J.Y., Choi, E.J. & Jeon, C.O. 2013. Microbial succession and metabolite changes during long-term storage of kimchi. *Journal of Food Science*, 78: M763 - M769.

15. Jung, J.Y., Lee, S.H. & Jeon, C.O. 2014. Kimchi microflora: history, current status, and perspectives for industrial kimchi production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6): 2385-2393.

16. Kim, B., Song, J.L., Ju, J.H., Kang, S.A. & Park, K.Y. 2015. Anticancer effects of kimchi fermented for different times and with added ingredients in human HT-29 colon cancer cells. *Food Science and Biotechnology*, 24(2): 629-633.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

17. Kim, E.K., An, S.Y., Lee, M.S., Kim, T.H., Lee, H.K., Hwang, W.S., Choe, S.J., Kim, T.Y., Han, S.J., Kim, H.J., Kim, D.J. & Lee, K.W. 2011. Fermented kimchi reduces body weight and improves metabolic parameters in overweight and obese patients. *Nutrition Research*, 31(6): 436-443.

18. Kim, T.W., Jang, J.Y. 2013. Lactic acid bacteria in kimchi and their immunomodulatory activities. *Current Topic in Lactic Acid Bacteria and Probiotics*, 1(1): 28-37.

19. Koo, S., Park, K. 2013. Dietary behaviors and lifestyle characteristics related to frequent eating out among korean adults. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(5): 705-712.

20. Kwak, S.H., Cho, Y.M., Noh, G.M. & Om, A.S. 2014. Cancer preventive potential of kimchi lactic acid bacteria(*Weissella cibaria, Lactobacillus plantarum*). *Journal of Cancer Prevention*, 19(4): 253-258.

21. Lee, K.H., Song, J.L., Park, E.S., Ju, J., Kim, H.Y. & Park, K.Y. 2015. Anti-obesity effects of starter fermented kimchi on 3T3-L1 adipocytes. *Preventive Nutrition and Food Science*, 20(4): 298-302.

22. Lee, I.H., Lee, S.H., Lee, I.S., Park, Y.K., Chung, D.K. & Choue, R.W. 2008. Effects of probiotic extracts of kimchi on immune function in NC/Nga mice. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 40(1): 82-87.

23. Lee, J., Kim, Y., Yun, H.S., Kim, J.G., Oh, S. & Kim, S.H. 2010. Genetic and proteomic analysis of factors affecting serum cholesterol reduction by *Lactobacillus acidophilus* A4. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14): 4829-4835.

24. Lee, J., Yun, H.S., Cho, K.W., Oh, S.J., Kim, S.H., Chun, T.H., Kim, B.J. & Whang, K.Y. 2011. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immune modulation and longevity. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2): 80-86.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

25. Lee, J., Yun, H.S., Cho, K.W., Oh, S.J., Kim, S.H., Chun, T.H., Kim, B.J. & Whang, K.Y. 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1): 155-161.

26. Lee, K.E., Choi, U.H. & Ji, G.E. 1996. Effect of kimchi intake on the composition of human large intestinal bacteria. *Korean Journal of Food Science and Technology*l, 28(5): 981-986.

27. Lim, J.H., Seo, B.J., Kim, J.E., Chae, C.S., Im, S.H., Hahn, Y.S. & Park, Y.H. 2011. Characteristics of immunomodulation by a *Lactobacillus sakei* proBio65 isolated from kimchi. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 39(3): 313-316.

28. Lim, S.M., Im, D.S. 2009. Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2): 178-186.

29. Mariem, C., Sameh, M., Nadhem, S., Soumaya, Z., Najiba, Z. & Raoudha, E.G. 2014. Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from Nitraria retusa fruits and their applications to meat product preservation. I*ndustrial Crops and Products*, 55: 295-303.

30. Moon, S.H., Chang, M., Kim, H.Y. & Chang, C.H. 2014. *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened Kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23(2): 489-497.

31. Naidu, A.S., Bidlack, W.R. & Clemens, R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(1): 13-126.

32. Newton, G.L., Arnold, K., Price, M.S., Sherrill, C., Delcardayre, S.B, Aharonowitz, Y. & Davis, C. 1996. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 178(7): 1990-1995.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

33. Park, D.Y,, Ahn, Y.T., Park, S.H., Huh, C.S., Yoo, S.R., Yu, R., Sung, M.K., McGregor, R.A. & Choi, M.S. 2013. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. *PLoS One*, 8: e59470.

34. Park, K.Y. 1995. The nutritional evaluation, and antimutagenic and anticancer effects of kimchi. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 24: 169-182.

35. Park, K.T., Jeong, J.K., Lee, Y.E. & Daily, J.Y. 2014. Health Benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *Journal of Medicinal Food,* 17(1) :6-20.

36. Raffaella, D.C., Francesco, M., Carlo, G.R., Maria, D.A., Giammaria, G., Marisa, M., Barbara, D.S. & Marco, G. 2010. Synthesis of ɣ-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM 19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(2): 731-741.

37. Rico, C.W., Shin, J.H., Um, I.C. & Kang, M.Y. 2011. Cholesterol-lowering action and antioxidative effects of microbial gum in C57BL/6N mice fed a high fat diet. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(1): 167-172.

38. Roberfroid, M.B. 1998. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *British Journal of Nutrition*, 80(4): S197-S202.

39. Ryu, E.H., Yang, E.J., Woo, E.R. & Chang, H.C. 2014. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology*, 41: 19-26.

40. Sherwood, L., Gorbach, M.D. 2000. Probiotics and gastrointestinal health. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(1): 2-4.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

41. Shin, K.S., Chae, O.H., Park, I.C., Hong, S.I. & Choe, T.B. 1998. Antitumor effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 13: 357-363.

42. Sohn, S.H. 2006. The modern food consumption phenomena and it's meaning in context of consumption culture. *Journal of the Korean Society of Food Culture*, 21(3): 241-246.

43. Sorbhi, R., Ivan, S. & Severino, S.P. 2012. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiology*, 30(1): 239-244.

44. Soromou, L.W., Zhang, Y., Cui, Y., Wei, M., Chen, N., Yang, X. & Wang, D. 2013. Subinhibitory concentrations of pinocembrin exert anti *Staphylococcus aureus* activity by reducing α-toxin expression. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1): 41-49.

45. Stein, T., Heinzmann, S., Solovieva, I. & Entian, K.D. 2003. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes nisI and nisFEG after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1): 89-94.

46. Sun, X., Wang, Z., Kadouh, H. & Zhou, K. 2014. The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1): 83-89.

47. Vlieg, J.H., Veiga, P., Zhang, C., Derrien, M. & Zhao, L. 2011. Impact of microbial transformation of food on health from fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2): 211-219.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

48. Woo, S.I., Kim, J.Y., Lee, Y.J., Kim, N.S., & Hahn, Y.S. 2010. Effect of *Lactobacillus sakei* supplementation in children with atopic eczema-dermatitis syndrome. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 104(4): 343-348.

49. Yang, E.J. & Chang, C.H. 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1): 56-63.

50. Yeo, I.C., Lee, N.K., Cha, C.J. & Hahm, Y.T. 2011. Narrow antagonistic activity of antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* SCK-2 against *Bacillus cereus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(4): 338-344.

51. Zhao, Y., Yao, Y., Xiao, Y., Chen, Y., Lee, C.C., Zhang, L. & Gu, M. 2013. Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* in dairy food by biofunctionalized magnetic nanoparticle based on nuclear magnetic resonance. *Food Control*, 34(2): 436-443.

52. Ziemer, C.J., Gibson, G.R. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8(5): 473-479.

53. 김성경, 장해춘. 2016. *Lactobacillus plantarum* EM이 생산하는 항균물질의 특성 연구. 석사학위논문, 조선대학교, 광주.

54. 김은지, 장해춘. 2015. 김치로부터 분리한 *Weissella* 속, *Leuconostoc* 속, *Lactobacillus* 속 특성 규명. 석사학위논문, 조선대학교, 광주.

55. 농업기술실용화재단, 발효음료 관련 산업동향 보고서. 2012

56. 식품위생법 시행규칙, 제 45조 제 1항 제 3조.

57. 식품의약품안전처 식품공전, 식품별 기준 및 규격, 음료류.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

58. 식품의약품안전처 식품공전, 식품성분시험법.

59. 최은아, 장해춘. 2014. 김치로부터 분리한 유산균의 콜레스테롤 저하 효과. 석사학위논문, 조선대학교, 광주.

60. http://www.health.com/world's healthiest foods Kimchi-Korea, Feb 1, 2008.

Collection @ chosun