

발간등록번호

11-1543000-000375-01

천연식품소재 유래 항진균 물질을 이용한
숙성 중 치즈의 곰팡이 제거기술 개발
(Development of mold removal technology
with antifungal substance isolated from
natural food resources during cheese ripening)

(재)임실치즈과학연구소

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고부가가치식품기술개발사업” 과제(세부과제 “천연식품소재 유래 향진균물질을 이용한 숙성 중 치즈의 곰팡이 제거기술 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2014년 3월 10일

주관연구기관명 : (재)임실치즈과학연구소	협동연구기관명 : 전북대학교
주관연구책임자 : 정후길	협동연구책임자 : 정용섭
세부연구책임자 : 정후길	연구원 : 이남근
연구원 : 허창기	연구원 : 이유리
연구원 : 양희선	연구원 : 정은정
연구원 : 최유진	연구원 : 냐쿠다엘라이자
연구원 : 오현희	협동연구기관명 : 순천대학교
연구원 : 최하늘	협동 연구책임자 : 배인휴
연구원 : 최희영	연구원 : 강산
연구원 : 김경희	연구원 : 장관섭
연구원 : 박중혁	연구원 : 김단오
연구원 : 오전희	연구원 : 김다혜

요 약 문

I. 제 목

천연식품소재 유래 항진균 물질을 이용한 숙성 중 치즈의 곰팡이 제거기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구의 목적

본 연구는 천연물로부터 치즈 숙성 중에 발생하는 유해 곰팡이를 선택적으로 제거하는 항진균 물질을 개발하고, 천연식품소재 유래 항진균 물질을 함유한 숙성치즈의 제조기술을 개발하여 국내 유가공업체에서 치즈 숙성 중 곰팡이로 인해 야기되는 문제들을 해결하는데 기여함으로써 국내 유가공 기술 발전에 그 목적이 있다.

2. 연구의 필요성

자연치즈는 숙성 중에 그 맛과 풍미가 더해져 가치가 상승하지만, 숙성 과정 중에 발생하는 곰팡이에 의해 품질이 저하되기도 한다. 현재 유해 곰팡이를 억제하기 위해 다양한 항진균제가 사용되고 있지만 최근 화학적 보조제에 의한 질병 유발 가능성과 체내 축적의 문제들이 야기되고 있어 천연항진균제에 대한 연구의 필요성이 증대되고 있다. 따라서 천연식품소재로부터 항진균 물질을 개발하고 천연식품소재 유래 항진균 물질을 함유한 숙성치즈의 제조기술을 개발할 필요성이 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1차년도 (2012년)에는 김치로부터 유산균을 분리하고 천연식품소재로부터 활성 성분을 선별

하여 치즈 및 치즈 숙성실에 자생하는 곰팡이에 대한 항진균 활성을 평가하였다. 또한 항진균 활성 물질을 첨가하여 숙성치즈 제조기술을 개발하고 치즈에 적용하여 항진균 활성을 평가하였다. 2차년도 (2013년)에는 항진균 활성이 우수한 유산균에서의 박테리오신(bacteriocin) 탐색 및 대사산물별 활성을 평가하였다. 유산균과 계피의 항진균에 대한 시너지 효과를 확인하는 과정에서 발효유와 식빵을 개발하여 식품에의 접목 가능성을 제시하였다. 또한 정유(essential oil)를 추출하여 다양한 치즈에 접목하여 항진균 활성을 확인하였다.

IV. 연구개발 결과

1. 제 1 차년도

가. 항진균 물질의 개발

- 치즈 및 치즈 숙성실에 자생하는 곰팡이를 분리하여 동정하였다.
- 다양한 지역에서 제조된 김치로부터 유산균을 분리하여 동정하였다.
- 분리한 유산균의 항진균 활성을 확인하였다.
- 항진균 활성 유산균의 특성을 규명하였다.
- 식품소재로부터 항진균 물질을 탐색하였다.
- 식품소재로서 추출된 정유(essential oil)의 항진균 활성을 확인하였다.

나. 항진균 물질을 이용한 자연치즈의 제조기술 개발

- 항진균 활성 유산균의 생육활성을 평가하였다.
- 항진균 활성 유산균을 이용한 스타터 배양액을 제조하였다.
- 항진균 활성 유산균을 이용한 아시아고치즈의 항진균 활성 및 숙성 중 특성변화를 확인하였다.
- 항진균 활성 유산균 배양액을 이용한 베르크치즈 표면의 항진균 활성을 확인하였다.
- 자몽종자추출물을 이용한 가우다치즈 표면의 항진균 활성을 확인하였다.
- 정유(essential oil)를 이용한 털지터치즈 표면의 항진균 활성을 확인하였다.

2. 제 2 차년도

가. 항진균 물질의 개발

- 항진균 활성 유산균에서 박테리오신(bacteriocin) 유전자를 확인하였다.

- 향진균 활성 유산균의 대사산물별 활성을 확인하였다.
- 향진균 활성 유산균 배양액의 항산화 및 항암 활성을 확인하였다.
- 향진균 활성을 나타낸 소재의 추출방법에 따른 활성을 확인하였다.
- 향진균 활성을 나타낸 정유(essential oil)를 추출하였다.
- 정유(essential oil)의 주요 성분의 향진균 활성을 확인하였다.
- 추출한 정유(essential oil)의 향진균 활성을 확인하였다.
- 추출한 정유(essential oil)의 성분을 분석하였다.

나. 향진균 물질의 치즈 및 식품에 적용 가능성평가

- 향진균 활성 유산균을 이용하여 계피 주정추출물을 첨가한 발효유를 제조하였다.
- 향진균 활성 유산균 배양액 및 계피 주정추출물을 첨가하여 식빵을 제조하였다.
- 정유(essential oil) 및 향에 의한 털지터치즈 내부 향진균 활성을 확인하였다.
- 계피유(cinnamon oil)와 계피 수피유(cinnamom bark oil) 표면처리에 대한 가우다치즈의 향진균 활성 및 숙성 중 이화학적 변화를 확인하였다.
- 계피 주정추출물 표면처리에 대한 로마노치즈의 향진균 활성을 확인하였다.
- 계피 분말이 첨가 털지터치즈 표면의 향진균 활성을 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구는 천연물유래 향진균 물질을 개발하기 위해 김치로부터 유산균을 분리하고 식품 소재로부터 활성 성분을 추출하여 치즈 곰팡이에 대한 향진균 활성을 평가였다. 향진균 활성을 보인 유산균의 박테리오신(bacteriocin) 유전자 분석과 대사산물별 활성을 비교분석하였고 정유(essential oil)를 다양한 방법으로 추출하여 활성 성분을 분석하였다. 향진균 활성 유산균과 정유를 이용하여 다양한 치즈에 적용하여 향진균 활성을 평가하였다. 또한 천연향진균 첨가제로써 계피 주정추출물을 첨가한 발효유와 활성 유산균 배양액과 계피를 첨가한 식빵을 제조하여 식품에의 적용가능성을 평가하였다. 연구 결과로 얻어진 향진균 활성 유산균 및 정유를 치즈에 적용함으로써 곰팡이로 인한 숙성치즈의 품질저하를 막고 다양한 치즈 개발에 적극적일 수 있는 환경을 마련함으로써 농가 소득뿐 아니라 치즈 산업의 저변 확대 및 육성에 기여할 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Title

Development of mold removal technology with antifungal substance isolated from natural food resources during cheese ripening

II. Objectives and necessity of research and development

1. Objectives of research and development

The objective of this research was to develop antifungal substances isolated from natural food resource against harmful fungi. This development of antifungal substances will help to control fungal contamination during cheese ripening. In addition, it will improve the competitiveness of dairy industry.

2. Necessity of research and development

At present, antifungal agents are used to suppress harmful fungi. But recently necessity of natural antifungal agents is increasing bring about disease probability and accumulation of chemical additives. Thus, we developed antifungal substances isolated from natural food resource and evaluated their activities.

III. Contents and Scopes of studies

In the first year of the project (2012), we evaluated antifungal activity of natural food resources against fungi isolated from cheese. In the second year (2013), we investigated bacteriocin from lactic acid bacteria and evaluated antifungal activity of metabolic products. We exhibited applicability of various food by developing fermented milk and bread during evaluation of antifungal activity of natural food resources. Also, we confirmed antifungal activity of essential oil extracted form cinnamon.

IV. Results of research and development

1. The first years (2012)

1) Development of antifungal substances

- Isolation and identification of fungi from cheese and cheese ripening room
- Isolation and identification of lactic acid bacteria from Kimchi
- Confirmation of antifungal activity of Kimchi lactic acid bacteria
- Characterization of antifungal lactic acid bacteria
- Screening of natural products possessing antifungal activity
- Screening of antifungal effect of essential oil commercially available manufacturing technique

2) Manufacturing technique of natural cheese using antifungal substances

- Change of cell density during fermentation by the antifungal lactic acid bacteria cultures
- Manufacturing experiment by the antifungal lactic acid bacteria cultures in 10% skim milk
- Confirmation of antifungal activity and characterization by using antifungal lactic acid bacteria for storage on Asiago cheese
- Confirmation of antifungal activity by using antifungal lactic acid bacteria for storage on Berg cheese of surface
- Confirmation of antifungal activity by using grapefruit seed extract for storage on Gouda cheese for surface
- Confirmation of antifungal activity by using essential oil for storage on Tilsiter cheese for surface

2. The second years (2013)

1) Development of antifungal substances

- Confirmation of bacteriocin producing antifungal lactic acid bacteria
- Confirmation of metabolite for antifungal identification

- Confirmation antioxidative activity and anticancer activity of antifungal lactic acid bacteria culture medium
- Methodological development for extraction of antifungal substances from food materials
- Extraction of antifungal essential oil from food materials
- Analysis of major chemical components in antifungal essential oil
- Verification of antifungal effect of extracted essential oil
- Analysis for chemical composition of extracted essential oil

2) Manufacturing technique of natural cheese using antifungal substances

- Development of fermented milk added cinnamon extract
- Development of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon
- Confirmation of antifungal activity by using essential oil and flavor for storage on inside Tilsiter cheese
- Confirmation of antifungal activity and physicochemical changes of Gouda cheese for surface treatment of cinnamon oil and cinnamon bark oil
- Confirmation of antifungal activity of Romano cheese for surface treatment of cinnamon ethanol extracts
- Confirmation of antifungal activity of Tilsiter cheese added cinnamon powder

V. Research outcomes & Further applications

We isolated lactic acid bacteria from natural food resources for development of antifungal substance. We confirmed bacteriocins gene of antifungal lactic acid bacteria and compared specific activity of metabolites. In addition, essential oil was extracted and analyzed by various methods. We evaluated antifungal activity of antifungal lactic acid bacteria and essential oil applied to cheese. Also, we examined synergy effects of antifungal lactic acid bacteria and cinnamon extract by developing fermented milk and bread. Research results will help to control fungal contamination during cheese ripening and improve the competitiveness of dairy industry.

CONTENTS

Document for submission

Summary (Korean)

Summary (English)

Contents (English)

Contents (Korean)

Chapter I . Introduction	15
Section 1. Objectives of research and development	15
Section 2. Necessity of research and development	15
Section 3. Scope of research and development.....	16
Chapter II . Research and development status in domestic and abroad	19
Section 1. Dairy produce and market condition	19
Section 2. Current status and problems of antifungal	22
Chapter III . Research contents and results	27
Section 1. Material and method	27
Section 2. Result and discussion	66
1. The first years (2012)	66
A. Development of antifungal substances	66
(1) Isolation and identification of fungi	66
(2) Investigation of lactic acid bacteria	69
(3) Antifungal activity of lactic acid bacteria	71
(4) Characterization of selected lactic acid bacteria	78
(5) Screening of antifungal activity of extracts of natural resources	85
(6) Selection and antifungal activity of essential oil	86
(7) Antifungal activity of resources according to extraction method	90
(8) Antimicrobiol activity of essential oil against lactic acid bacteria	92
(9) Component analysis of essential oil	93

B. Development of natural cheese manufacturing technology	94
(1) Growth characteristics of antifungal lactic acid bacteria	94
(2) Manufacture of starter using antifungal lactic acid bacteria	96
(3) Characterization of Asiago cheese for storage	98
(4) Antifungal activity of antifungal active substances	101
2. The second years (2013)	104
A. Development of antifungal substances	104
(1) Investigation of bacteriocin from antifungal lactic acid bacteria	104
(2) Antifungal activity of metabolites	105
(3) Antifungal activity by molecular weight	111
(4) Antifungal, antioxidant and anticancer activity	111
(5) Extraction of essential oil	119
(6) Antifungal activity of essential oil	123
(7) Antifungal activity of extracted essential oil	127
(8) Component analysis of extracted essential oil	128
B. Applicability with cheese and food	131
(1) Manufacture of fermented milk using antifungal substances	131
(2) Manufacture of bread using antifungal substances.....	139
(3) Antifungal activity of treated with antifungal substances cheese	190
Chapter IV. Achievement and contribution	198
Section 1. Research goal and attainment	198
Section 2. Contribution to the related fields	200
Chapter V. Plans for the use of the results	201
Section 1. Product commercialization	201
Section 2. Education · Guidance · Publicity	202
Section 3. Intellectual property right security	208
Section 4. Further research	210
Chapter VI. International trend and scientific information	211

Chapter VII. Installation · Equipment	214
Chapter VIII. References	215

목 차

제출문

요약문

SUMMARY

CONTENTS

목차

제 1 장	연구개발과제의 개요	15
제 1 절	연구개발의 목적	15
제 2 절	연구개발의 필요성	15
제 3 절	연구개발의 범위	16
제 2 장	국내외 기술개발 현황	19
제 1 절	유제품 생산 및 시장현황	19
제 2 절	항진균제 사용의 현황과 문제점	22
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	27
제 1 절	연구재료 및 방법	27
제 2 절	연구 내용 및 결과	66
1. 제 1 차년도 (2012)	66	
가. 항진균 물질의 개발	66	
(1) 곰팡이균의 분리 및 동정	66	
(2) 유산균 탐색	69	
(3) 항진균 활성평가	71	
(4) 선발 유산균의 특성규명	78	
(5) 천연물소재 추출물의 항진균 활성 스크리닝	85	
(6) 적용 가능한 정유(essential oil) 선별	86	
(7) 항진균 활성 소재의 추출방법에 따른 활성	90	
(8) 치즈 발효 유산균에 대한 정유(essential oil)의 항균 활성	92	
(9) 정유(essential oil)의 성분분석	93	

나. 향진균 물질을 이용한 자연치즈의 제조기술 개발	94
(1) 향진균 유산균의 생육특성	94
(2) 향진균 활성 유산균을 이용한 스타터 배양액 제조	96
(3) 아시아고치즈의 숙성 중 특성평가	98
(4) 천연물소재와 향진균 활성 유산균을 이용한 치즈의 향진균 활성	101
2. 제 2 차년도 (2013)	104
가. 향진균 물질의 개발	104
(1) 향진균 활성 유산균에서 박테리오신(bacteriocin) 유전자 탐색	104
(2) 향진균 물질 확인을 위한 대사산물별 활성	105
(3) 향진균 물질의 분자량에 따른 향진균 활성 비교	111
(4) 향진균 물질의 향진균, 항산화 및 항암 활성	111
(5) 향진균 활성 정유(essential oil)의 추출	119
(6) 정유(essential oil) 주요 성분의 향진균 활성	123
(7) 추출 정유(essential oil)의 향진균 활성	127
(8) 추출 정유(essential oli)의 성분분석	128
나. 향진균 물질의 치즈 및 식품에 적용 가능성평가	131
(1) 향진균 활성 유산균을 이용한 계피 주정추출물 첨가 발효유 제조	131
(2) 향진균 유산균 배양액과 천연물유래 향진균 물질을 첨가한 식빵 제조	139
(3) 향진균 물질 처리에 의한 치즈의 향진균 활성	190
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	198
제 1 절 목표달성도	198
제 2 절 관련분야에의 기여도	200
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	201
제 1 절 실용화·산업화 계획	201
제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획	202
제 3 절 지식재산권 확보 계획	208
제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획	210
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	211

제 7 장	연구시설·장비 현황.....	214
제 8 장	참고문헌.....	215

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구에서 치즈 숙성 중에 발생하는 유해 곰팡이를 선택적으로 제거하는 항진균 물질을 천연물질로부터 개발하고, 치즈 및 식품에의 적용 가능성을 평가하여 국내 유가공업체에서 치즈 숙성 중 곰팡이로 인해 야기되는 문제들을 해결하는데 기여함으로써 국내 유가공 기술 발전에 토대 마련을 목적으로 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

자연치즈는 유산균의 종류, 숙성정도에 따라 전 세계 800여종이 있다. 2012년 현재 국내의 치즈시장 규모는 연간 5,013억 원으로 총 88,674톤이 소비되고 이 중 소비량의 72.4%가 자연치즈이며, 가공치즈는 27.6%로써 자연치즈 소비 저변이 확산되어 있다. 그러나 현재 자연치즈 대부분은 모짜렐라가 차지하고 있어 다양한 자연치즈 개발 및 상품화가 필요하다. 치즈의 숙성은 치즈를 일정한 조건하에서 보존하면서 치즈의 조직과 풍미를 갖도록 하는 제조과정의 하나이다. 치즈 제조과정에서 제조 직후는 굳고, 부서지기 쉬우며, 풍미가 없는 상태이나 숙성에 의해서 단백질분해, 지방분해 등의 생화학적, 효소학적 및 미생물학적 변화가 일어나면서 부드럽고 유연한 조직과 고유의 풍미를 갖게 된다. 하지만 치즈 숙성 과정 중 곰팡이균에 의한 오염은 일부 치즈(까망베르치즈, 브리치즈, 블루치즈 등)를 제외하고는 치즈의 품질을 저하시키는 장애요인으로 작용하고 있다. 이러한 치즈 숙성 중 곰팡이의 오염을 억제하기 위하여 식품에는 다양한 항생제와 보존제가 사용되고 있는데 최근에는 내성을 가지는 곰팡이가 증가하면서 심각한 문제로 대두되고 있다. 물리적인 처치로 인한 품질저하와 영양적인 손실, 화학 보존제 사용에 대한 소비자들의 거부감과 미생물의 내성 문제 등으로 인하여 새로운 문제를 해결 할 수 있는 방법으로 천연물유래의 식품 보존제에 대한 개발 필요성과 함께 기존의 식품 보존 방법을 보완하거나 대체할 수 있는 방법으로 천연물유래의 보존제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

이에 따라 본 연구를 통하여 치즈 숙성 중에 발생하는 유해 곰팡이를 선택적으로 제거하는 항진균 물질을 천연물질로부터 개발하고 식품에의 적용 가능성을 평가하여 국내 유가공업체에서 치즈 숙성 중 곰팡이로 인해 야기되는 문제들을 해결하고자 하였다.

제 3 절 연구개발의 범위

천연물유래 항진균 물질 개발 및 활성평가를 위한 연구라는 최종 목표 달성을 위한 본 과제
의 개발 범위는 다음과 같다.

1. 제 1 차년도 (2012)

가. 항진균 물질의 개발

- (1) 치즈 및 치즈 숙성실에서 자생하는 곰팡이의 분리 · 동정
- (2) 다양한 지역에서 제조된 김치로부터 유산균의 분리 · 동정
- (3) 김치 분리 유산균의 항진균 활성
- (4) 항진균 활성 유산균의 특성 규명
 - 선발 유산균의 최적 배양조건
 - 단백질 응고성
 - 단백질 분해력
 - 내산성
 - 유기산 정량
- (5) 천연물소재 추출물의 항진균 활성 스크리닝
- (6) 정유(essential oil)의 항진균 활성 스크리닝
- (7) 항진균 활성 소재의 추출방법에 따른 활성
 - 용매에 따른 추출 시 항진균 활성
 - 초임계 추출법에 따른 소재의 항진균 활성
- (8) 치즈 발효에 관여하는 유산균에 대한 정유(essential oil)의 영향
- (9) 항진균 활성이 있는 정유(essential oil)의 성분분석

나. 항진균 물질을 이용한 자연치즈의 제조기술 개발

- (1) 치즈제조를 위한 항진균 활성 유산균의 생육활성
- (2) 항진균 활성 유산균을 이용한 스타터 배양액 제조
- (3) 항진균 활성평가를 위한 숙성형 자연치즈 제조

- 향진균 활성 유산균을 이용한 아시아고치즈의 제조, 향진균 활성 및 숙성 중 변화
- 향진균 활성 유산균 배양액을 이용한 베르크치즈의 제조 및 향진균 활성
- 자몽종자추출물 표면처리 가우다치즈의 향진균 활성
- 정유(essential oil) 표면처리 킬지터치즈의 향진균 활성

2. 제 2 차년도 (2013)

가. 향진균 물질의 개발

- (1) 향진균 활성 유산균 내 박테리오신(bacteriocin) 유전자 확인
- (2) 향진균 활성 유산균의 대사산물별 활성
 - pH 조절에 따른 향진균 활성(유기산)
 - 단백질가수분해 효소 처리에 따른 향진균 활성(박테리오신)
 - 카탈라아제 효소 처리에 따른 향진균 활성(과산화수소)
- (3) 향진균 물질의 향진균, 항산화 및 항암 활성
 - 향진균 활성
 - 라디칼 소거 활성
 - 항산화 관련 효소 활성
 - Nitric oxide 소거 활성
 - 암세포주 성장 억제 활성
- (4) 향진균 활성을 나타낸 정유의 추출(물증류법)
- (5) 추출 정유의 향진균 활성
- (6) 치즈 발효에 관여하는 유산균에 대한 추출 정유(essential oil)의 영향
- (7) 추출 정유(essential oil)의 성분분석

나. 향진균 물질의 치즈 및 식품에 적용 가능성평가

- (1) 향진균 활성 유산균을 이용한 계피 주정추출물 첨가 발효유 제조 및 품질특성
 - 제조 과정 중 품질특성
 - 관능평가
 - 저장 중 품질특성
- (2) 향진균 활성 유산균 배양액 및 계피 첨가 식빵 제조 및 품질특성

- 향진균 활성 유산균 배양액 및 계피를 첨가한 식빵 제조
- 무게, 부피, 비용적 및 굽기손실을
- 수분함량
- pH
- 적정산도
- 색도
- 물성
- 관능검사

(3) 계피 첨가 식빵의 저장 중 품질특성

- 수분함량
- pH
- 적정산도
- 색도
- 물성
- 노화도
- 총균수
- 곰팡이 균수

(4) 정유(essential oil) 표면처리 및 향에 의한 털지터치즈의 향진균 활성

(5) 계피유 및 계피 수피유의 표면처리 가우다치즈의 숙성 중 변화 및 향진균 활성

(6) 계피 주정추출물 표면처리 로마노치즈의 향진균 활성

(7) 계피 분말을 첨가한 털지터치즈의 향진균 활성

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 유제품 생산 및 시장현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

- ◎ 최근의 국내 유제품 시장의 유제품 생산은 전년 동기대비 발효유와 치즈는 증가하였으며, 시유와 탈지분유 및 버터는 감소하였음(발효유 19.6%↑, 치즈 24%↑, 백색시유 1.5%↓, 탈지분유 57.4%↓, 버터 53.6%↓).¹⁾
- ◎ 한국인의 식생활이 서구화되고 와인소비의 증대로 인해 숙성형 자연 치즈 소비 시장이 확장되고 있음에도 적절한 국산 치즈 제품으로 대체하기 위한 방안 마련이 매우 미흡한 실정임.
- ◎ 국내 치즈시장의 구조는 가공 치즈와 자연 치즈 제품으로 구분되는데 이 중 가공 치즈는 주로 소매용으로 전체의 30%가 판매되고 나머지 70%를 차지하는 자연 치즈는 주로 피자 원료로 사용되는 업소용 치즈로 판매되고 있음. 따라서 한국 치즈시장의 확대는 피자 원료 치즈소비량 증대가 견인하고 있음.
- ◎ 국내 치즈시장 규모가 매년 확장일로에 있지만 국내 유통 치즈 량의 대부분은 수입산 치즈가 점유하고 있으며 그러한 배경과 이유는 다음과 같음
 - WTO체제 도입과 낙농선진국과의 잇따른 FTA체결로 저가의 치즈수입이 증대함
 - 한국의 치즈 식문화 수준이 초창기적 수준으로 가공치즈와 피자원료인 모짜렐라 치즈 소비가 대부분을 차지하여 수입치즈의 대부분이 가공치즈 원료인 치즈블록(Cheese block)²⁾과 피자요리 식소재로 사용되는 모짜렐라 치즈 위주로 수입되고 있음.
 - 2012년 세계 치즈 생산량은 2천만 톤 규모이며 교역량은 그의 10% 수준인 2백만 톤으로 교역치즈의 대부분이 치즈블럭과 모짜렐라(산업형 치즈)임. 숙성형 자연치즈(특별 치즈, Specialty cheese³⁾) 교역량은 매우 제한적이고 유수의 치즈 수출국들조차 수입하여 자국의 수요를 충족해야하는 치즈임.

1) (2013), 낙농진흥회 4/4 Vol.26

2) 치즈 블럭(cheese block) : 체다, 가우다, 에담, 툴비 등 반 경성 치즈(semi-hard cheese)를 제조와 동시에 10~20kg단위로 진공 포장하여 가공치즈 업체나 외식업체에 판매, 수출하는 미국, EU, 오세아니아 지역 치즈업체들의 생치즈(Green cheese) 생산품. 국내 가공치즈 업체들이 주로 수입하여 사용 중임.

3) 특별치즈(specialty cheese) : 일명 장인형(匠人型)치즈로 Artisan cheese라고 함. 유럽과 미국 일부 지역치즈제조업자들 중 목장에서 착유한 원유를 사용하여 전통적인 방식으로 직접 제조한 뒤 전통방식으로 숙성하여 판매하는 수제 치즈. 생산수량이 한정적이고 맛과 풍미가 탁월하여 고가에 판매됨. 프랑스, 스위스의 A.O.C치즈, EU의 P.D.O치즈류가 여기에 속함.

- 국내 치즈 산업은 수입산 치즈블럭을 사용한 가공치즈 위주였으므로 진정한 치즈의 정통인 특별 치즈생산 기술을 보유하지 못하였으므로 수입에 의존할 수밖에 없었음
- 한국 치즈 식문화의 낮은 단계에서 특별 치즈시장 형성이 미흡하여 국내 유업계에서는 특별 치즈생산의 필요성을 느끼지 못하였으며 최근 10년 사이에 와인과 고급 빵 문화의 보급 확산일로에 힘입어 특별 치즈 수요자들이 매년 증대하여 2012년 현재 200여종의 특별치즈가 수입 판매 중임.

Table 1. Status of Importing of Dairy Products in Korea

(단위: 톤)

제품	2009년	2010년(전년대비%)	2011년(%)	2012년(%)	2013년(%)P*
탈지분유	9,638	7,903	33,523	18,8840	1519.3
전지분유	1,159	1,367	5,285	1,631	143.8
유장	32,219	37,523(16%)	30,432(-19%)	42,450(39%)	3195.3
혼합분유	25,939	31,572	36,127(14%)	27,548	2742.9
버터	5,352	6,396(19%)	8,578(34%)	7,392(-14%)	5,106(-31%)
치즈	49,023	60,971	76,222	77,506	7196.3
유당	11,935	15,356(29%)	19,560	17,932	1392.8
조제분유(19류)	1,898	2,990(57%)	2,959(1%)	2,943(-1%)	2,774(-6%)
조제분유(18류)	543	548(1%)	205,0(-62%)	2,110(103%)	9,325(-342%)

<자료 : 낙농진흥회>4)*P=추정치

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

◎ 세계의 기능성 유제품 시장은 전 세계적으로 건강 및 복지(health and well-being, HW) 관련 식품은 세계 시장의 1/3(1,040억 달러)정도를 차지하고 있음. 여기 HW 식품 중에서 Better-For-You(BFU)제품이 63%로써 저지방, 저당, 저지방 저당 혼합 유제품이며 기능성 유제품은 26%, 유기농식품은 6%정도를 점유하고 있음. 전 세계의 건강/웰빙 유제품 시장은 지속적으로 증가하는 추세로서 특히 기능성 유제품과 BFU제품이 크게 늘어날 것으로 예상되고 있는 가운데 2011년에는 730억 달러 정도로 추산되고 있음.

◎ 일본의 「특정보건용식품」으로서 승인된 유제품 중 '장 기능 개선과 관련된 기능성 유제

4) 2013.낙농산업동향 (4/4) p.72

품’(71%),‘콜레스테롤 조절과 관련된 기능성 유제품’(11%),‘혈압조절과 관련된 기능성 유제품’(5%),‘혈당 조절과 관련된 기능성 유제품’(1%)을 차지하고 있음.

- ◎ 미국의 유생산량은‘10. 4/4분기, 전년 동기 대비 2.8% 증가한 21,565천 톤(연간생산량 87,420, 전년대비 1.8%↑)이며, 4/4분기 유제품 생산은 치즈-4.5%↑, 버터-7.3%↑, 탈지분유 16.6%↑, 전지분유 11.4%↑로 모두 증가하였음.
- ◎ 신규 가입 EU 10개국(CEEC)⁵⁾: 90년대 초 정치적 붕괴경험불구 지난 10년간 치즈 생산은 가파르게 증가하였음. 1995년부터 치즈 생산량은 연 51.0%씩 증가하였고 2004년에는 966천M/T를 생산(연4.7%증가)하였고. 특히 폴란드, 90년대 초 320천 M/T생산대비 2004년 502천 M/T 생산으로 EU의 신규가입 10개국 치즈 생산량의 50%정도 차지하고 있음. ‘10.11월 누계 우유생산량, 124,471천 톤으로 전년 동기 대비 1.9%증가하였으며 유제품 중 음용유와 버터 및 전지분유는 생산량이 감소, 치즈와 탈지분유는 증가하였음.
- ◎ 일본은 구제역과 봄에는 이상저온, 하절기에는 이상고온으로 생산이 부진하여‘10년 4/4분기에 전년 동기대비 3.7%가 감소한 1,855천 톤이었음. 전지분유를 제외한 유제품 생산, 음용유, 치즈는 감소세를 보였음.
- ◎ 중국은‘10년도 유제품생산, 전년대비 11.6% 증가한 21,596천 톤으로 생산량은 2/4분기부터 증가폭이 둔화되었지만 유제품 수입은 745톤으로 전년대비 24.7%가 증가하였음.
- ◎ 호주, 뉴질랜드지역이 매우 가파른 치즈 증산 성을 보이며 지난 10년간 앞서의 10년 전보다 50%이상 증가한 것으로(연4.6%) 2002년 호주 우유의 풍작으로 치즈생산량이 피크에서 2003년 심한 가뭄으로 생산량이 10% 하락한 뒤 치즈생산의 위축 후 한참 회복기에 놓여 있음.‘10.11월까지 원유생산량은 전년 동기 대비 0.2% 감소한 8,153백만 리터이며, ‘10.11월 유제품 중 전지분유 1.8%↓, 치즈 6.5%↓감소하였음. ⁶⁾
- ◎ 남아메리카 지역은 2000년에 피크에 달해 975천 M/T, 그 이후 2003년까지 하락, 그 수준은 거의 바닥에까지 내려감. 여기에는 아르헨티나의 영향이 크고, 경제의 불황지속으로 2003년에는 경제위기가 최고에 달했기 때문임. 아르헨티나의 2000년도 치즈 생산량은 442천 M/T에서 2003년도 326천 M/T, 그 후 점차 회복세 띠면서 2004년에 370천 M/T였음.

5) CEEC (Central and Eastern European Countries) 중동부 유럽국가 10개국이다. 2004년 EU 가입국 3개국(에스토니아, 라트비아, 리투아니아)과 중부유럽 5개국(폴란드, 체코, 슬로바키아, 슬로베니아, 헝가리) 그리고 2007년 가입한 남동유럽의 2개국(루마니아, 불가리아)을 지칭한다.

6) Dairy Australia

Table 2. Cheese production Amount of Top-10 Major of the World

(단위:천톤)

국가명	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
아르헨티나	325	370	400	480	520	525	530	540
호주	368	389	375	362	360	344	321	335
브라질	460	470	495	528	580	607	614	648
캐나다	342	345	352	291	308	285	291	297
EU-27	6,205	6,481	6,625	6,801	6,760	6,800	6,810	6,970
일본	35	35	39	40	43	47	45	48
멕시코	126	134	143	145	184	188	242	244
뉴질랜드	301	305	297	292	350	292	308	303
러시아	335	350	375	405	435	430	400	430
미국	3,882	4,025	4,150	4,320	4,435	4,496	4,586	4,720

제 2 절 항진균제 사용의 현황과 문제점

1. 항진균제의 시장 현황

항진균제의 국내시장은 2005년에서 2007년 사이 연평균 6.2% 성장률로 감소하다가 2007에서 2015년 사이 연평균 4.3%의 성장률로 성장하여 2005년 948억 원에서 2015년 1,168억 원의 시장을 형성할 것으로 전망된다. 현재 항진균제 시장의 73% 안팎을 점유하고 있는 경구용 및 비경구용 전신성 항균제 부문의 경우 진균감염 질환의 발생률이 증가하는 현상을 보이고, 신약 개발에도 활기를 띄고 있으므로, 항진균제의 성장이 지속될 것으로 판단된다. 항진균 박테리옌 스타터 개발과 신소재 물질을 개발함에 따라 안정적인 제품생산이 가능해지고 낙농가의 소득이 증대되면서 동반자적인 발전 기반이 구축될 것이다. 또한 치즈 숙성 중에 발생하는 곰팡이의 예방을 위해 치즈 표면에 코팅제를 사용하고 있으나 이것은 원초적인 문제 해결이 아닌 예방차원의 대처이기에 보다 본질적인 해결책 마련이 시급한 실정이다.

2. 식품에 사용 가능한 항진균제의 종류

가. 화학물질

(1) 보존제

치즈 중의 곰팡이 생육을 억제하기 위해 현행 국내법상 프로피온산, 프로피온산칼슘, 프로피온산나트륨 등이 보존제로 사용된다. 프로피온산은 빵 또는 과자류에 프로피온산 함량으로 2.5 g/kg, 나트륨염으로 3.24 g/kg, 칼슘염으로 3.14 g/kg의 농도로 사용이 허용되고 있다. 그러나 자연에 존재하는 지방산들과 마찬가지로 쉽게 대사되는 장점이 있어 인체 독성은 낮다.

(2) 에탄올

오래 전부터 에탄올은 화학적 합성 및 발효에 의해 생산되어 곰팡이 저해제로 사용되어 왔으며 곰팡이, 세균, 효모, 바이러스에 대한 살균 효과를 나타낸다. 곰팡이 포자의 사멸에는 고농도의 에탄올이 요구되는데 세포질 내의 침투성과 세포질의 사이토졸이 누출되어 세포를 붕괴시킨다.

나. 천연물

(1) 자몽종자추출물

유럽과 일본 등에서는 가공식품의 저장성 연장을 목적으로 자몽종자추출물을 식품에 직접 첨가하고 있다. 자몽종자추출물은 비독성의 광범위한 살균제, 곰팡이 제거제, 항바이러스 물질 및 향기생충제로 사용된다. 미생물의 생육을 저해하는 자몽종자추출물의 최소농도는 세균에는 10~500 ppm, 곰팡이에는 100~2,000 ppm을 사용한다. 치즈 제품의 이상 세균 및 곰팡이의 억제에는 0.1~1%를 혼합 또는 분무하여 사용한다. 가공치즈의 경우 자몽종자추출물 200~500 ppm 용액을 첨가하거나 3,000 ppm 용액에 침지한다.

(2) 피톤치드

피톤치드는 수목이 해충이나 미생물로부터 자신을 방어하기 위해 대기 중에 발산하는 천연 향균물질을 말한다. 피톤치드의 주성분은 테르펜 계통의 유기화합물이다. 인체에 무리 없이 빠르게 흡수되며 공기 중에 포함된 유해한 물질을 중화시킨다. 특히 강력한 항균작용을 하면서도 기존의 항생제와는 달리 내성이 없다.

다. 항생제

(1) 나타마이신

폴리엔 계열의 항생물질인 나타마이신은 유럽연합(EU)이나 미국 등 50개국 이상에서 치즈 등의 곰팡이 방지용 식품 첨가물로 사용되고 있다. 나타마이신은 치즈 표면에 곰팡이가 생육하는 것을 억제하는데 다른 항진균제보다 낮은 농도에서 곰팡이 균사와 포자를 모두 파괴한다. 숙성기간 동안 치즈의 외피에 흡착된 나타마이신은 빠르게 분해되어 치즈로 이행되지 않는다.

라. 미생물제제

(1) 프로바이오틱 유산균

프로바이오틱 유산균의 대사산물인 박테리오신, 유기산 및 대사산물은 유해 미생물을 제어하여 식품의 유통기한을 연장시킨다. 실제로 *L. casei*는 *A. parasiticus*의 생육과 아플라톡신 생성을 저해한다고 밝혀졌으며, *L. plantarum*은 phenyllactic acid 및 4-hydrophenyllactic acid 등의 항진균 화합물을 생성하는 것으로 밝혀졌다.

마. 오존처리

오존처리는 공기 유래의 곰팡이를 저감시킬 수 있지만 표면 곰팡이의 생육은 저해하지 못한다. 따라서 치즈 숙성실에 오존가스를 사용하면 정상적인 발효 및 숙성과정을 변화시키지 않으면서도 숙성실 환경 내의 곰팡이를 제거할 수 있다. 0.02 ppm의 오존을 처리하면 포자가 사멸되기 때문에 저장기간의 연장 및 저장고의 이취를 감소시킬 수 있다.

3. 항진균제 사용의 문제점

치즈를 포함한 유제품은 곰팡이의 생육에 영향을 받아 쉽게 변패된다. 통상적으로 대장균 등의 유해세균은 숙성과정에서 치즈의 산도와 유산균의 생육에 의해 사멸된다. 하지만 외피에서 생육하는 곰팡이는 시간이 지날수록 증가하기 때문에 숙성기간 내 치즈는 곰팡이에 노출된다. 곰팡이에 의한 치즈의 변질은 식용이 불가능하게 할 뿐만 아니라 치즈의 영양가 및 풍미의 저하, 병원성 감염의 중요한 원인이 된다.

치즈 및 식품의 항진균제의 개발이나 사용이 항세균제에 비해 발전 속도가 지연된 것은 진균류와 포유동물 세포 모두 진핵세포이어서 선택적인 독성을 나타내기 어렵고 강력한 살균 작용을 나타내는 물질은 심각한 세포독성을 나타내기 때문에 부작용이 수반된다고 보고되어 있다. 또한 표준화된 *in vitro* 평가방법이나 *in vivo* 효과를 평가하기 위한 신뢰성이 있는 동물 모델 및 진균 감염을 진단하기 위한 기술이 부족하고 숙주의 방어체계와 약제의 작용기작을 이용한 항세균제 화학요법과 달리 진균 감염증은 숙주의 면역체계 저하와 관련되어 항진균제의 개발이 지연되어 왔다.

이러한 문제점을 감안한다면 보다 안전하게 곰팡이의 생육을 저해할 수 있는 방법을 마련하고 현실 가능한 항진균제의 개발을 위해 천연에서 소재를 찾고 식품 및 치즈에의 적용가능성을 평가해야 할 것으로 판단된다.

4. 국내 천연항진균제 개발 연구

- 쇠비름 (대한민국 발명특허 출원번호 1019990025609)
- 솔잎 (대한민국 발명특허 출원번호 1019990002040)
- 정향나무 (대한민국 발명특허 출원번호 1019960005898)
- 선학초 (대한민국 발명특허 출원번호 1019960055244)
- 봉선화 (대한민국 발명특허 등록번호 1002193060000)
- 녹차 (대한민국 발명특허 출원번호 1020020079673)
- 포도 (대한민국 발명특허 공고번호 19940003990)
- 모과 (대한민국 발명특허 출원번호 1020000068733)
- 키토산 (대한민국 발명특허 출원번호 1019970078820)
- 박테리오신 (대한민국 발명특허 등록번호 100273742, 100123946, 19960015891)
- 산초 및 고추냉이 (한국식품위생안전성학회지)
- 산수유 (한국식품저장유통학회지)
- 겨자 (한국식품위생안전성학회지, 한국식품과학회지)]
- 로즈마리 (한국생명과학회)
- 대나무 (한국식품과학회)

그러나 이와 같은 천연식품 보존제의 소재를 개발하기 위한 수많은 연구에도 불구하고 식품 산업에서 실제로 적용되어 상용화된 사례는 거의 찾아볼 수 없다. 이는 대량생산에 따른 제조 공정의 문제점 및 원가의 상승, 품질의 항상성과 안정성에 문제가 있다. 국내 기술력에 의해 개발된 천연식품보존제의 용도로 사용될 수 있는 성분 또는 제품으로는 키토산, 복합 황금추출

물, 프로폴리스 및 화분 발효물 등이 있다. 세균류에 대해서는 항균력을 나타내지만 효모를 포함하는 곰팡이에 대해서는 거의 효능을 나타내지 못한다. 특히, 치즈의 숙성 중 유해 곰팡이 생육을 저해하는 천연소재 보존제의 개발은 이루어지지 않은 실정으로 이에 대한 연구가 시급한 실정이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 재료 및 방법

1. 제 1 차년도 (2012)

가. 항진균 물질의 개발

(1) 곰팡이균의 분리 및 동정

(가) 곰팡이균의 수집

본 실험에 사용된 곰팡이균은 임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성 중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 곰팡이를 채취하여 PDA(potato dextrose agar, Difco, USA) 평판배지 및 YM(yeast medium, Difco, USA) 액체배지에 각각 접종하여 25℃에서 48시간 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

(나) 곰팡이균의 순수 분리 및 배양

수집한 곰팡이균을 순수분리하기 위하여 배양된 곰팡이균을 0.1% peptone 90 mL에 현탁한 후, 단계적으로 희석하였다. 곰팡이균 희석액 10 µL를 분리용 PDA 평판배지에 도말한 뒤, 25℃에서 5일 동안 배양한 후 나타난 곰팡이균 포자를 채취하여 3회 분리하였다. 순수 분리된 곰팡이균의 균사는 PDA 평판배지 및 YM 액체배지에 접종하여 25℃에서 10일 동안 배양하면서 곰팡이균의 형태, 색상 및 포자의 특징 등을 관찰하였고 미세구조는 광학현미경(LAICA, USA)을 사용하여 균사 및 포자형태를 관찰하였다.

(다) 곰팡이균의 동정

선발된 8종의 곰팡이균들은 (주)마크로젠에 ITS-5.8S rDNA 분석을 의뢰하여 다음과 같은 방법으로 동정하였다. BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)와 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3')과

ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGS-3') primer를 사용하여 PCR 반응을 수행하였으며 ABI 3730xl DNA Analyze r(Applied Biosystems)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GeneBank database에서 유사한 18S rRNA 염기서열과 비교분석을 통하여 확인하였다.

(2) 유산균의 탐색

(가) 항진균 활성이 있는 유산균 표준균주 탐색

국내외 문헌을 통하여 항진균 활성이 있다고 보고된 유산균 균주를 탐색하여 생물자원 센터(KCTC, Korea)로부터 유산균 표준균주 8종(*Leuconostoc citreum* KCTC 3526, *Lactobacillus curvatus* KCTC 3767, *Leuconostoc lactis* KCTC 3528, *Weissella cibaria* KCTC 3807, *Leuconostoc citreum* KCTC 3524, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* KCTC 3505, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* KCTC 3603, *Leuconostoc gasicomitatum* KCTC 3753)을, 한국미생물보존센터(KCCM, Korea)로부터 유산균 표준균주 4종(*Leuconostoc carnosum* KCCM 40458, *Leuconostoc gelidum* KCCM 40460, *Lactobacillus sakei* KCCM 40264, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCCM 11325)을 구입하였다. 균주의 보존을 위해 모든 균주는 MRS(Lactobacilli MRS broth, Difco, USA) 액체배지에 3회 계대 배양한 후 2% lactose가 함유된 배지를 제조하여 혼합하였다. 각각의 배양 균주들은 1.5 mL 씩 분주하여 동결건조하고 냉동(-80°C) 보관하면서 실험에 사용하였다.

(나) 김치에서의 유산균 분리 및 확보

전라북도 전주시와 임실군, 전라남도 광양시, 경기도 등지에서 제조원이 다른 배추김치를 수집하여 각각의 김치 내용물 전체를 마쇄한 후에 멸균거즈로 여과하였다. 김치 여과액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후 100 μ L를 취해 2% 탄산칼슘(CaCO_3)이 첨가된 MRS 평판배지에 1차적으로 도말하여 30°C에서 배양하였다. 배양 중 투명환을 나타내고 집락을 형성하는 균주들을 분리하여 0.006% BCP(Bromocresol Purple, USA)를 포함한 MRS 평판배지에 2차적으로 도말하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 중 BCP 배지의 보라색이 노란색으로 변하는 균집을 각각 취하여 3차적으로 새로운 BCP 배지에 도말하였다. 그 결과 44종의 유산균을 분리하였으며, 각각의 유산균은 MRS 평판배지와 MRS 액체배지에 접종하여 30°C에서 12시간 배양하여 냉장(4°C) 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 1).

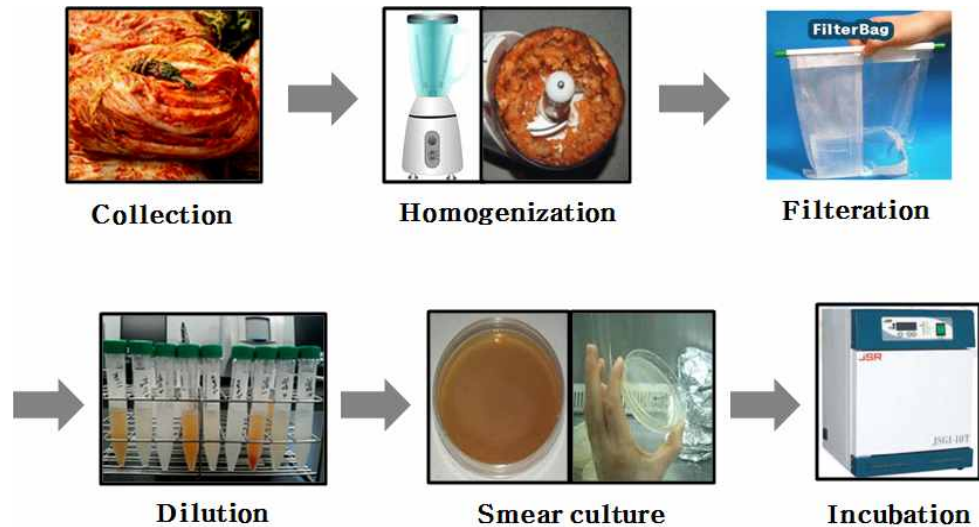


Fig. 1. Isolation of lactic acid bacteria from Kimchi.

(3) 항진균 활성평가

(가) 항진균 활성평가 방법 모색

항진균 활성이 있다고 보고된 표준 유산균과 다양한 지역에서 채취한 김치에서 분리한 유산균의 항진균 활성을 평가하는 방법은 paper disk법, dual culture overlay assay법 및 disc diffusion test 중 하나인 well법 등을 참고하여 항진균 활성을 측정하였다.

(나) 항진균 활성 측정

다양한 지역의 김치로부터 분리한 유산균 44종에 대한 항진균 활성을 측정하기 위해 임의로 선정한 분리 곰팡이균 1종에 대하여 표준 유산균 및 분리 유산균의 항진균 활성을 확인하였다. MRS 평판배지의 중앙에 직경 3 cm의 홈을 낸 다음 표준 유산균과 김치로부터 분리한 유산균 44종을 각각 10 μ L 씩 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다. 유산균 배양이 종료된 후 PDA 평판배지를 유산균이 배양된 MRS 배지 위에 부어 굳혔다. 곰팡이균 FB(임실 지역 치즈 숙성실에서 분리한 곰팡이균)를 균질기(Daihan, Korea)를 이용해 600 rpm에서 5분 간 균질한 후 PDA 평판배지에 접종하였다. 25 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 중층배양한 후 유산균이 생산하는 항진균 물질에 의한 생육저지환 생성 여부 및 크기를 관찰하여 항진균 활성을 평가하였다(Fig. 2).

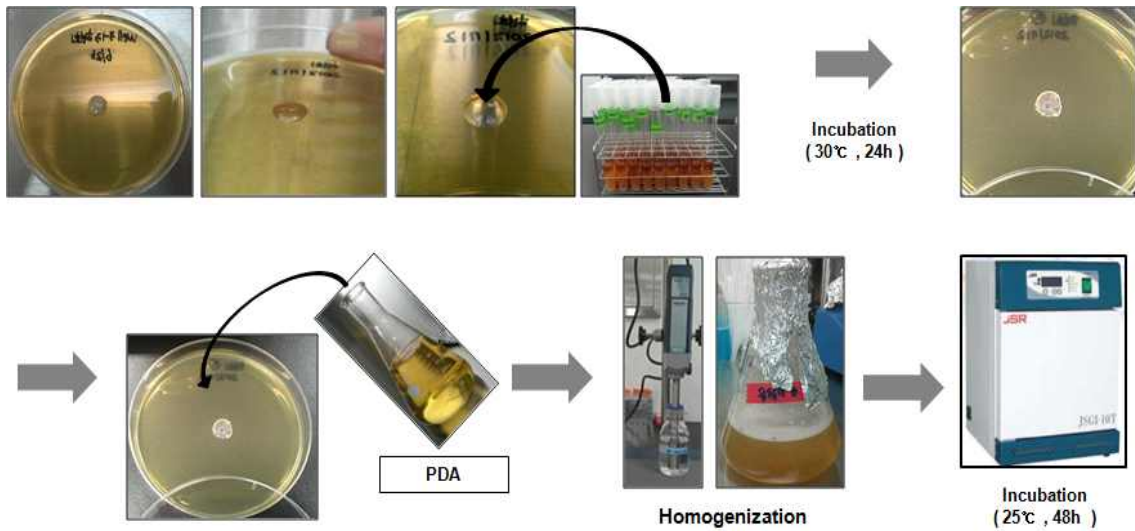


Fig. 2. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi.

(다) 항진균 유산균의 동정 및 선발

다양한 지역의 김치로부터 분리한 44종의 유산균을 임의로 선정된 곰팡이균 FB에 대하여 항진균 활성을 나타낸 22종을 1차 선별하고 (주)마크로젠에 의뢰하여 곰팡이와 같은 방법으로 동정하였다. 곰팡이균 FB에 대하여 항진균 활성을 보인 22종의 유산균 중 형태학적, 생화학적 특성을 비교·분석하여 실험에 사용할 항진균 활성 유산균 6종을 최종 선발하였다.

(라) 유산균의 항진균 효과

임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성 중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 분리 곰팡이 8종에 대하여 최종 선발된 6종의 유산균을 처리하여 생육저지환으로 항진균 활성을 판단하였다. MRS 평판배지 중앙에 직경 3 cm의 홈을 낸 다음 유산균 6종을 각각 10 μ L 씩 접종하여 30°C에서 12시간 동안 배양하였다. 유산균 배양이 종료된 후 PDA 평판배지를 유산균이 배양된 MRS 배지 위에 부어 굳혔다. 8종의 곰팡이를 균질기를 이용해 600 rpm에서 5분간 균질한 후 PDA 배지에 접종하였다. 25°C에서 48시간 동안 중층배양 한 후 유산균이 생산하는 항균 물질에 의한 생육저지환 생성 여부 및 크기를 관찰하여 항진균 활성을 평가하였다.

(마) 유산균 배양액의 최소저해농도(MIC)

최소저해농도 측정은 최종 선발된 6종의 향진균 활성유산균에 의한 임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 분리 곰팡이 8종의 생육 저해 정도를 UV-VIS spectrophotometer(Biochrom, England)로 확인하였다. 분리된 8종의 곰팡이균을 YM 액체배지 100 mL에 희석 접종한 후 25°C에서 배양하여 각 균주가 대수 증식기 중반기에 접어들 때 이를 각각의 새로운 배지 5 mL에 100 µL 씩 접종하였으며, 곰팡이 배양액에 향진균 효과를 보이는 6종의 유산균을 첨가하여 최종 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ppm 농도가 되도록 하였다. 향진균 활성유산균이 접종된 곰팡이균은 25°C에서 48시간 동안 배양한 후 생육정도를 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 선발유산균의 특성 규명

(가) 배양시간, 초기 pH, 온도에 따른 균체 생육도 측정

향진균 활성을 보인 최종 6종 유산균의 균체 생육도 측정은 배양 시간과 초기 pH, 그리고 배양온도의 변화로 측정하여 알아보았다. 먼저 MRS 액체배지에 유산균 전 배양액을 2% 접종하고 일정 간격으로 배양액을 취해 균체 생육을 측정하여 배양시간에 따른 변화를 확인하였다. 초기 pH에 의한 변화는 1 N NaOH와 1 N HCl 용액을 사용하여 MRS 배지의 pH를 4~10으로 조정하여 비교하고, 배양온도는 25, 30, 37, 40, 50°C로 달리하여 배양한 후 채취하여 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하여 균체 생육 활성을 비교하였다.

(나) 단백질 응고성 측정

유산균에 의한 유단백질의 응고성을 측정하기 위해 향진균 활성이 있는 6종의 유산균을 MRS 액체배지에 유산균 전 배양액을 2% 각각 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 유산균액을 10% 환원탈지유에 2% 농도로 각각 접종한 후 30°C에서 12시간 동안 배양하여 커드의 형성 정도를 관찰하고 상업균주인 *Streptococcus thermophilus* Body-1을 대조균으로 사용하여 치즈 제조용 starter로서의 사용 가능성 여부를 판단하였다.

(다) 단백질 분해력 측정

유산균에 의한 유단백질의 분해력 측정은 항진균 활성이 있는 6종의 유산균을 10% 환원탈지유에 접종하여 배양하고 각각에서 유리되는 타이로신 함량으로 나타내었다. 10% 환원탈지유 배지에 유산균 전 배양액을 1%를 접종한 후 30℃에서 24시간 동안 배양하여 타이로신 함량을 측정하였다. 유산균액을 시간별로 채취하여 여과지(Whatman, No.2, England)로 여과한 후 여과액 5 mL에 0.44 M trichloroacetic acid 5 mL를 가해 침전시켰다. 30분 반응시킨 후 여과지로 여과하여 여과액 1 mL와 0.44 M 탄산나트륨 2.5 mL을 혼합한 후 1 N folin 시약 200 μ L를 가하여 5분 동안 반응시켰다. 각 시료의 발색정도는 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상업균주인 *Str. thermophilus* Body-1과 비교하였으며, 타이로신의 농도는 100 μ g/mL까지 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

(라) 내산성 측정

산에 대한 저항성 실험은 항진균 활성이 있는 6종의 유산균 전 배양액을 MRS 액체배지에 2% 접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 9,950 $\times g$ 로 5분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체에 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate 용액을 각각 초기 배양액과 동일한 양으로 첨가하여 현탁한 후 30℃에서 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24시간 동안 배양하면서 시간대별 생육정도는 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(마) 유산균 상등액의 유기산 정량

항진균 활성이 있는 6종의 유산균 전 배양액을 MRS 액체배지에 2% 접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 유산균 배양액을 5,500 rpm에서 15분 원심분리하여 0.45 μ m membrane filter(Nalgene, USA)로 여과한 후 유기산 함량을 액체크로마토그래피(Agilent, USA)의 분석용 시료로 사용하였다. 분석온도는 40℃, 이동상은 0.1% perchloric acid로 하였으며, 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 유기산의 표준물질은 아세트산(acetic acid), 시트르산(citric acid), 젖산(lactic acid), 말산(malic acid), 숙신산(succinic acid), 타타르산(tartaric acid)을 각각 0.1% perchloric acid 용액을 사용하여 최종 농도가 1%가 되도록 조제하여 사용하였으며, 표준물질의 머무름 시간(retention time)과 피크 에어리어(peak area)를 이용하여 함량을 mg/kg 단위로 계산하였다.

(5) 천연물소재 추출물의 항진균 활성 스크리닝

(가) 소재 및 추출방법

식품으로 이용되고 있으며 항진균 활성이 있다고 알려진 솔잎, 엉겅퀴, 오행초, 함초, 뽕잎, 뱀딸기 등의 소재를 선발된 곰팡이균 중 5종에 대하여 항진균 활성을 스크리닝 하였다. 소재는 잘 건조한 후 분쇄하여 10배수의 70% ethanol을 첨가하고 80℃에서 15분간 microwave 추출하여 여과한 후 농축하여 실험에 사용하였다.

(나) 항진균 활성

곰팡이균에 대한 항진균 활성은 disc diffusion assay법을 변형하여 측정하였으며, PDA 평판배지에 액체배지 상에서 활성시킨 곰팡이를 400 μ L 씩 접종하여 도달한 후 8 mm disc(advantec. Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 올려놓고 추출물 20 μ L를 떨어뜨려 25℃에서 5일간 배양하며 disc 주변의 생육저지환을 관찰하였다.

(6) 정유의 항진균 활성 스크리닝

(가) 정유

정유(essential oil)는 식품소재로서 사용가능한 원료로 추출된 8종을 다인솥(dainsoap. Cheongwon, Korea)으로부터 구입하여 사용하였으며, 8종은 바질유(basil oil), 송엽유(pine needle oil), 박하유(peppermint oil), 스페아민트유(spearmint oil), 계피유(cinnamon oil), 계피수피유(cinnamon bark oil), 생강유(ginger oil), 레몬유(lemon oil)이었다.

(나) 정유의 항진균 활성 스크리닝

정유(essential oil)의 항진균 활성은 disc diffusion assay법을 변형하여 사용하였다. PDA평판배지에 액체배지 상에서 활성시킨 곰팡이를 400 μ L를 도달한 후 8 mm disc을 올려 놓고 각 시료 10 μ L를 떨어뜨려 25℃에서 5일간 배양한 후 disc 주변의 생육저지환을 확인하였다.

(다) 최소저해농도(MIC)

스크리닝된 정유 중 항진균 활성이 좋은 바질유(basil oil), 계피유(cinnamon oil), 계피수피유(cinnamon bark oil)에 대하여 최소저해농도 실험을 하였다. MIC 활성은 disc diffusion assay법을 변형하여 사용하였다. 각 곰팡이균액이 400 μ L 씩 도말된 plate에 8 mm disc를 올려놓고 배양하여 용량에 따라 투명한 형성을 확인하였다.

(7) 계피의 용매별 추출에 따른 항진균 활성

정유(essential oil) 중 항진균 활성이 가장 큰 계피에 대하여 추출용매에 따라 항진균 활성을 확인하였다. 계피 열수추출물 제조는 물 100 중량부에 대하여 계피 분말 10중량부를 첨가하고 25°C에서 30분 동안 침지시킨 다음 100°C에서 1시간 동안 추출한 후 여과하여 제조하였다. 계피 주정추출물과 계피 메탄올 추출물 제조는 주정 및 메탄올 100중량부에 대하여 계피 분말 10중량부를 첨가하고 25°C에서 24시간 추출한 후 여과하여 제조하였다. Disc diffusion method 방법으로 각 추출물에 대하여 항진균 활성을 확인하였다.

(8) 계피 및 바질의 초임계 추출에 따른 항진균 활성

정유(essential oil) 중 활성이 큰 계피와 바질의 초임계 추출에 따른 항진균 활성을 확인하였다. 초임계 추출은 추출압력 400 bar, 추출시간 180 min, 추출온도 35°C의 조건으로 추출하였으며, 용매 없이 추출한 후 시료를 메탄올로 회수한 시료(A)와 시료를 메탄올에 40°C, 24시간 침지한 후 초임계 추출(B)하여 항진균 활성을 확인하였다.

(9) 치즈 발효에 관여하는 유산균에 대한 계피유 및 바질유의 항균 활성

항진균 활성을 나타낸 계피유(cinnamon oil)와 바질유(basil oil)에 대하여 치즈 발효에 관여하는 유산균의 억제 활성이 있는지 disc diffusion method를 이용하여 확인하였다. 치즈 발효에 관여하는 유산균은 ABT-5 및 FLORA DANICA(FD)로서 ABT-5는 *L. acidophilus*, *S. thermophilus*의 혼합균주이며, FLORA DANICA(FD)는 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremori*의 혼합균주로 CHR. HANSEN(덴마크)사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

(10) 계피유 및 바질유의 성분분석

계피유(cinnamon oil) 및 바질유(basil oil)의 휘발성 성분의 분석은 GC(Agilent 6890N, Palo Alto, CA, USA)와 GC-Mass(GC-MS QP2010, Shimadzu Co., Japan)를 사용하였으며, GC-Mass에 의해 분리된 peak의 성분은 mass spectrum library(NIST 27, NITS 147, Wiley 7)에 근거하여 동정하였다. 휘발성 성분의 분석을 위한 GC와 GC-Mass의 작동조건은 table 1와 같다.

Table 1. Operating conditions of GC and GC-MS for analysis of volatile components

GC	
Column	HP-INNOWAX (30 m × 0.32 mm id, 0.25 μm)
Injector	250°C
Detector(FID)	260°C
Oven program	50°C → 5°C/min → 230°C(5min hold)
Carrier gas	N ₂
Flow rate	1 mL/min
Split ratio	100 : 1
Sample size	1 μL
GC-MS	
Column	HP-INNOWAX (30 m × 0.32 mm id, 0.25 μm)
Oven program	50°C → 5°C/min → 230°C(5 min hold)
Injector	250°C
Ion source temperature	200°C
EI ionization voltage	70 eV
Carrier gas	He
Split ratio	100 : 1
Sample size	1 μL

나. 향진균 물질을 이용한 자연치즈의 제조기술 개발

(1) 향진균 활성평가를 위한 치즈 제조

(가) 원유

공시 치즈제조용 원유는 순천대학교 서면에 소재하고 있는 부속 동물사육장에서 사육 중인 홀스타인 프리지안(Holstein-Friesian)종으로부터 당일 착유한 신선 원유를 공시 치즈제조에 당일 사용하였다(TA: 0.14~0.15%).

(나) 유산균 starter

중온균 starter는 FD-DVS FLORA-DANICA(CHR. HANSEN Co., Denmark : *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*)를 95°C, 30분간 살균 처리한 10% 환원 탈지유를 32°C로 냉각시킨 뒤 접종하고, 32°C에서 pH 4.5~4.6이 될 때까지 배양하여 냉장 보관하면서 사용하였다. 고온균 Starter는 FD-DVS ABT-5(CHR. HANSEN Co., Denmark : *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*)를 95°C, 30분간 살균 처리한 10% 환원 탈지유를 42°C로 냉각시킨 후 접종하고, 42°C에서 pH 4.5~4.6이 될 때까지 배양하여 냉장 보관하면서 사용하였다. 김치유래 향진균 활성 유산균 starter는 각각의 유산균주를 MRS 액체배지에서 48시간 배양 후 8,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 얻어진 유산균을 모아 치즈 제조에 사용하였다.

(다) 천연소재유래 향진균 활성물질

① 정유

향진균 활성평가를 위한 정유(essential oil)는 Dainsoap(South Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 사용된 계피유(cinnamon oil, France), 계피 수피유(cinnamon bark oil, Sri Lanka), 바질유(basil oil, Bulgaria)을 치즈 표면과 치즈 주위에 20 µL 씩 분무하여 본 실험에 사용하였다.

② 키토올리고당

천연유래 항진균 활성평가를 위한 키토올리고당은 충북 청원군 옥산면에 소재한 씨엔에이바이오텍(주)에서 생산한 키토올리고당분말80(키토올리고당 함량 : 818.35 mg/g)을 구입하여 실험에 이용하였으며 농도를 달리하여(1.0%, 5.0%, 10.0%) 치즈 표면에 20 µL 씩 분무하여 본 실험에 사용하였다.

③ 자몽종자추출물

임실치즈과학연구소에서 구입한 자몽종자추출물을 1.0%, 5.0%, 10.0% 농도별로 치즈 표면에 20 µL 씩 분무하여 본 실험에 사용하였다.

(라) 항진균 활성 유산균을 이용한 치즈제조용 스타터 배양액 제조

10% 환원 탈지유에 32℃와 42℃에서 항진균 활성 유산균을 접종한 후 48시간동안 배양하여 단백질 응고현상을 확인하고 유산균의 생육활성을 측정하였다.

(마) 항진균 유산균 이용 아시아고 치즈 제조 시험설계

Table 2. Formulation of experimental Asiago cheese added with antifungal lactic acid bacteria

	ABT-5	ALH	ALJ	ALS	ALD	ALT	ALL	3524
Raw Milk (kg)	100	100	100	100	100	100	100	100
Starter Culture (mL)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CaCl ₂ (g)	20	20	20	20	20	20	20	20
Rennet (mL)	19	19	19	19	19	19	19	19
ALAB (g)	0	3	3	3	3	3	3	3

ABT-5: *L. acidophilus*, *S. thermophilus*의 혼합균주, 3524: *Leuconostoc citreum* KCTC3524, ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T, ALAB: antifungal lactic acid bacteria

(바) 항진균 활성평가를 위한 숙성형 자연치즈 제조

① 항진균 활성 유산균을 이용한 아시아고치즈 제조

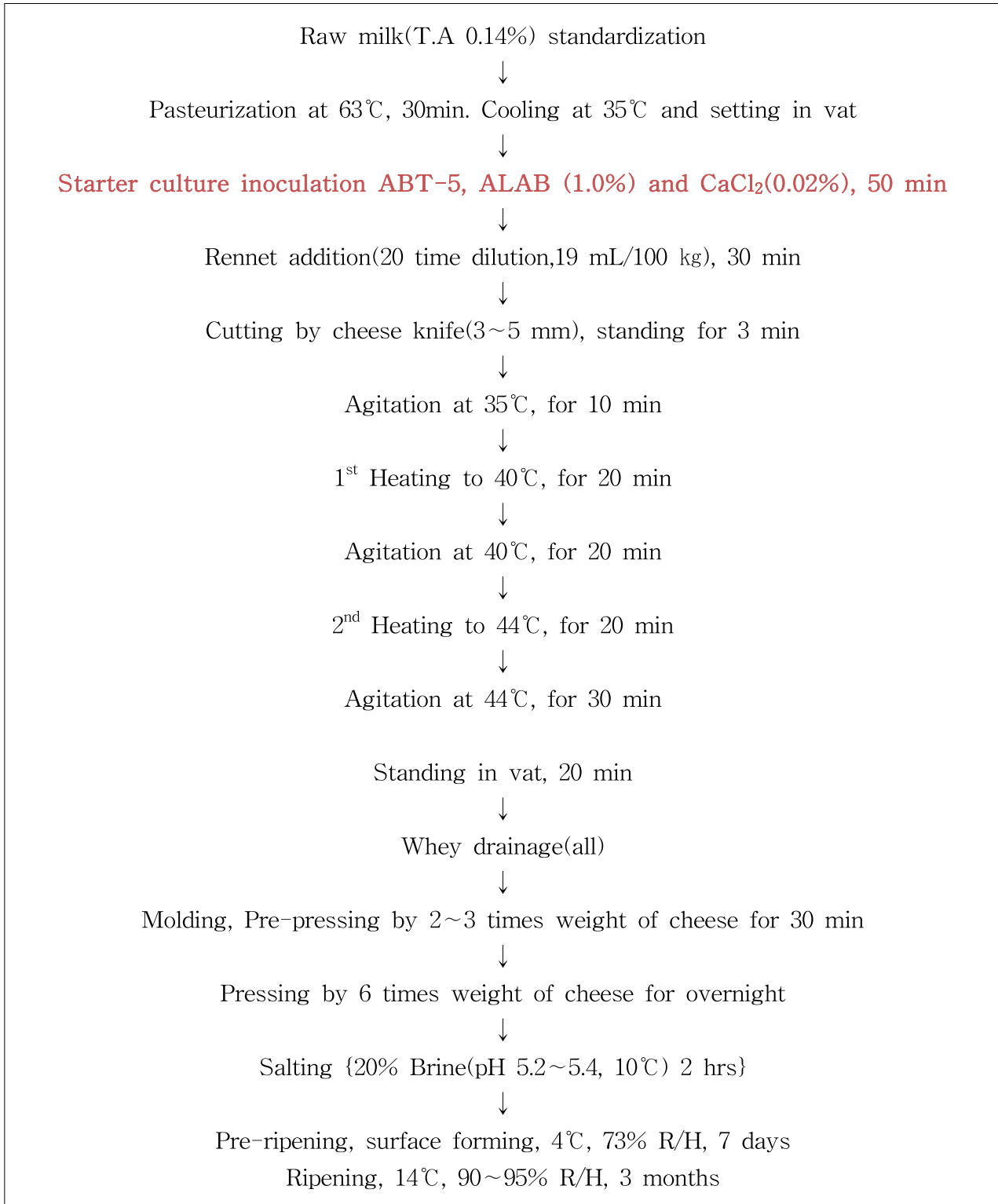


Fig. 3. Procedure for Asiago cheese manufacture added with antifungal lactic acid bacteria.



Fig. 4. Procedure for Asiago cheese manufacture added with antifungal lactic acid bacteria.

② 자몽종자추출물 표면처리 가우다치즈 제조

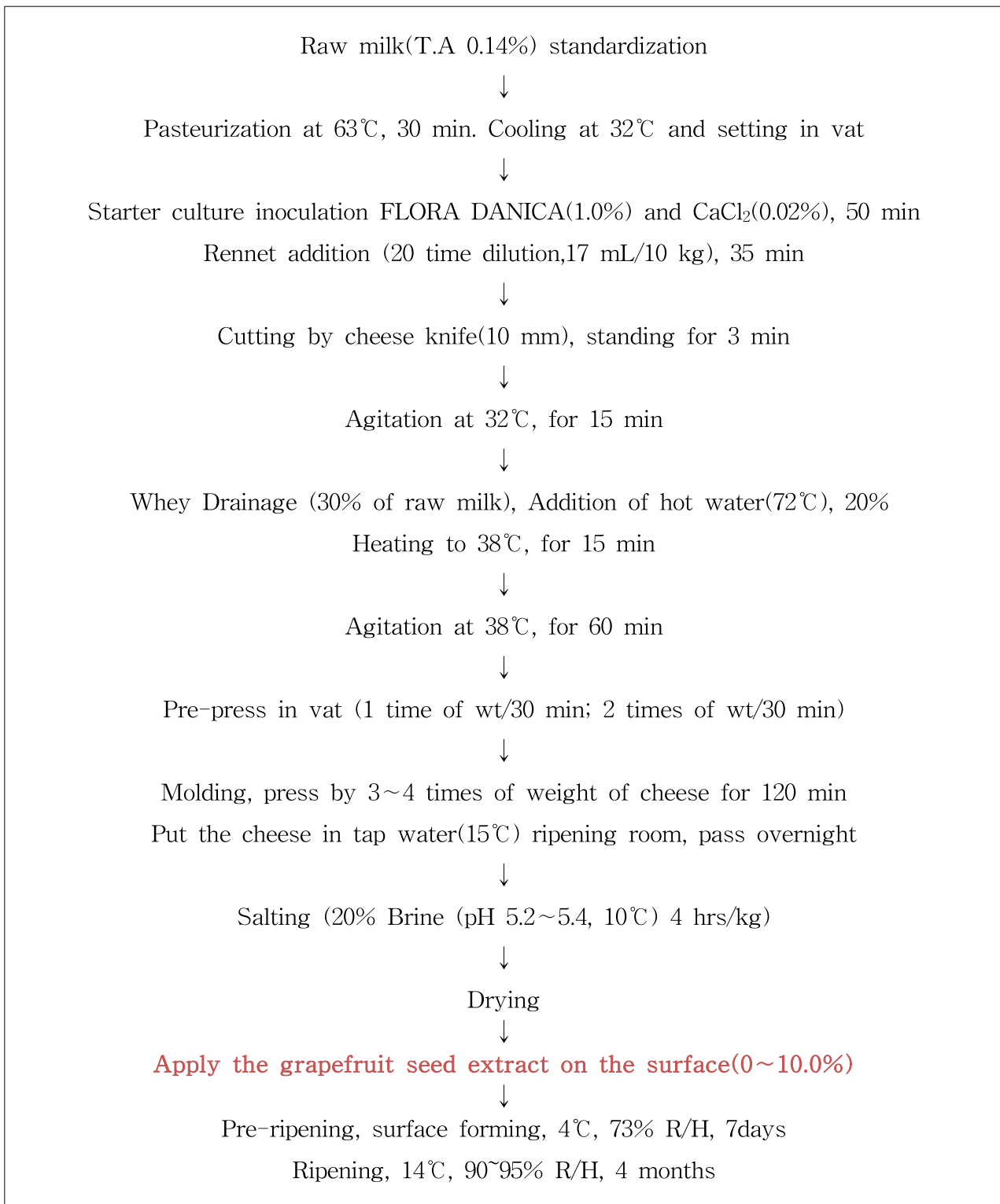


Fig. 5. Procedure for Gouda cheese manufacture on the surface treated with grapefruit seed extract.

③ 정유 표면처리 티지터치즈 제조

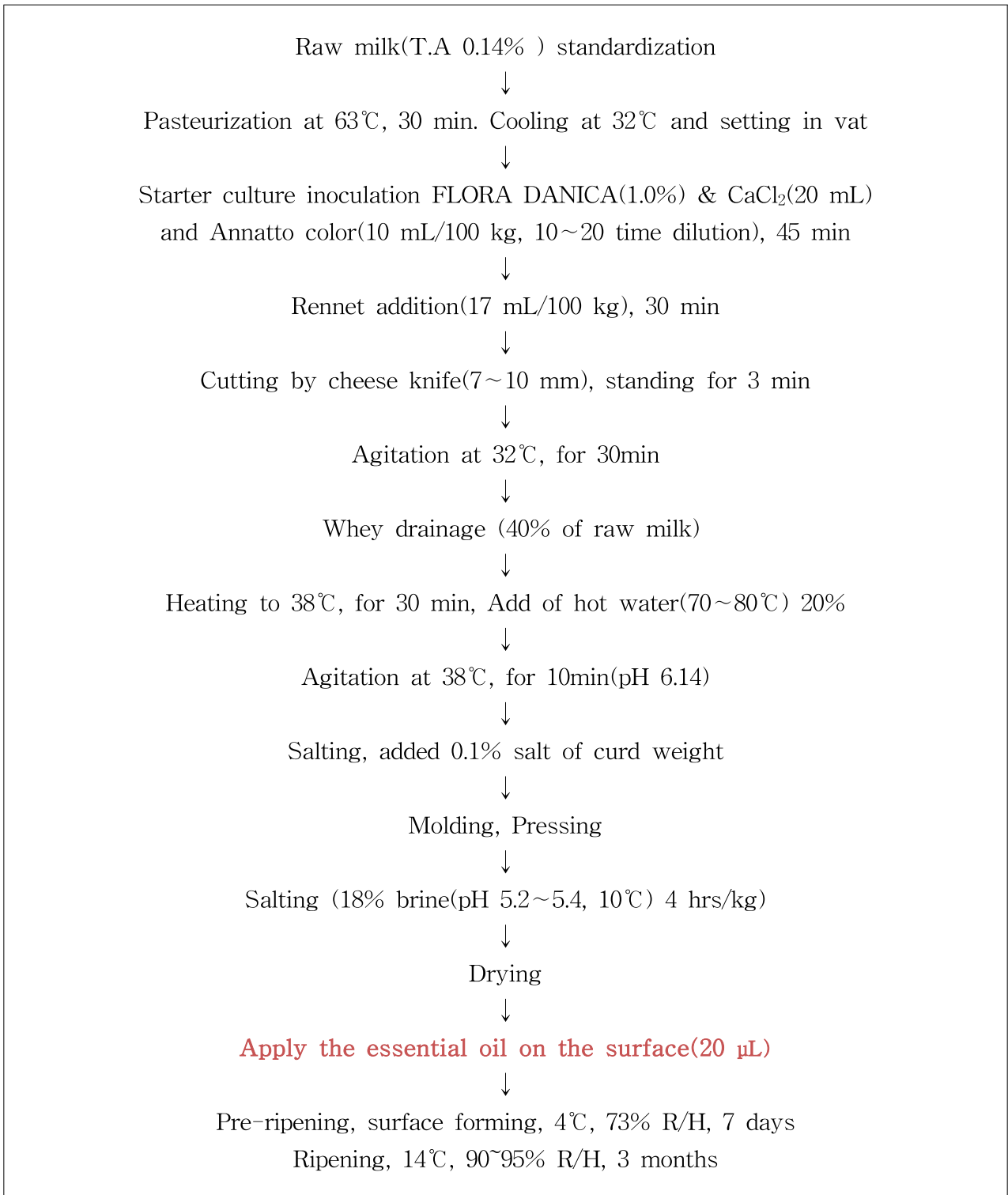


Fig. 6. Procedure for Tilsiter cheese manufacture on the surface treated with essential oil.

(바) 향진균 활성평가를 위한 아시아고치즈의 특성평가

① pH

pH는 생리적 식염수와 치즈를 2:1의 비율(saline:cheese=20 mL:10 g)로 분쇄용 tube에 넣어 균질기(M. Zipperer GmbH, Etzenbach, Germany)로 최대속도 20,000 rpm으로 2분간 균질한 다음 pH meter(Istek Model 720p, Korea)를 사용하여 일정기간별로 측정한다.

② 유산균 수

시료는 생리적 식염수와 유산균배양액 시료를 2:1의 비율로 분쇄용 튜브에 넣어 균질기(M. Zipperer GmbH, Etzenbach, Germany)를 사용하여 20℃하에서 최대속도인 20,000 rpm으로 2분간 균질을 3차례 반복, 분쇄하여 10진 희석 후 0.5% sodium azide가 첨가된 MRS 평판배지와 BCP 평판배지를 이용하여 standard plate count법으로 32℃와 42℃서 48시간 배양 후 생성된 colony 수가 30~300개 나타난 것을 선별하여 계수한다.

③ 수용성 질소화합물 함량

숙성 중 수용성 질소화합물(Water Soluble Nitrogen, WSN)의 경시적인 변화는 치즈 5 g에 증류수 20 mL을 넣고 분쇄 및 균질화를 실시한 후 상등액을 정량하였으며, 질소화합물의 정량은 Tyrosine(Sigma사)을 표준물질로 하여 표준곡선과 환산공식을 얻어 사용하였다. ($y=0.787 x$, $R^2=0.999$)

(아) 천연식품소재와 향진균 활성 유산균을 이용한 치즈의 향진균 활성

① 향진균 활성 유산균을 이용한 아시아고치즈의 향진균 활성

향진균 유산균에 의한 숙성치즈의 향진균 활성을 검토하고자 향진균 유산균을 이용하여 아시아고치즈를 제조하고 숙성실에서 치즈 표면에 곰팡이 생성 정도를 확인하였다.

② 향진균 활성 유산균 배양액을 이용한 베르크치즈 표면 향진균 활성

향진균 유산균에 의한 향진균 활성과 박테리오신(bacteriocin)에 의한 치즈 표면의 향진균 활성을 검토하고자 유산균 배양액과 원심분리 후 얻어진 상등액을 베르크치즈 표면에 1회 도포하였다. 숙성실에서 치즈 표면의 곰팡이 생성 정도를 확인하였다.

③ 자몽종자추출물을 이용한 가우다치즈 표면 향진균 활성

선행실험으로 키토올리고당과 자몽종자추출물의 항진균 활성을 평가한 결과 자몽종자추출물이 PDA 평판배지에서 키토올리고당보다 높은 항진균 활성을 보였다. 이에 자몽종자추출물을 농도를 달리하여(0~10%) 가우다치즈 표면에 1회 도포하였다. 숙성실에서 가우다치즈 표면의 곰팡이 생성 정도를 확인하였다.

④ 정유를 이용한 털지터치즈 표면 항진균 활성

항진균 활성이 우수한 결과를 보인 계피유(cinnamon oil), 계피 수피유(cinnamon bark oil), 바질유(basil oil)을 털지터치즈 표면에 동일하게 20 µL 씩 1회 도포한 후 숙성실에서 곰팡이의 생성 정도를 관찰하였다.

2. 제 2 차년도 (2013)

가. 항진균 물질의 개발

(1) 항진균 활성 유산균에서 박테리오신 유전자 탐색

(가) 항진균 활성 유산균에서 genomic DNA 추출

김치분리 유산균 중 항진균 활성이 가장 큰 유산균 ALH를 2 mL의 MRS 액체배지에 2% 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(8,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 균체를 침전시켰다. 침전된 균체로부터 genomic DNA를 추출하기 위하여 Dokdo-Prep™ Bacterial Genomic DNA Purification Kit(ElpisBio, Korea)를 이용하였다. 추출된 genomic DNA는 spectrophotometer(Biochrom, England)를 사용하여 농도를 측정하였으며, 260/280 nm 값이 1.8-2.0 사이인 DNA를 실험에 이용하였다.

(나) Primer 제작

Lactobacillus sakei 계열이 생산하는 박테리오신으로 알려진 sakacin P(GenBank accession no. Z48542)의 유전자 염기서열을 이용하여 primer를 제작하였고, primer의 위치는 염기서열에 표시하였다. 실험에 사용한 primer는 (주)바이오니아에 의뢰하여 합성하였으며 100 pmol의 농도로 -20°C에서 저장하여 20 pmol의 농도로 희석하여 사용하였다(Table 3, Fig. 7).

Table 3. Oligonucleotide primers for PCR amplification

Primer Name	Oligonucleotide Sequence (5'→3')	T _m (°C)	Base Length	Location
Forward	ATGGAAAAGTTTATTGAATT	42.1	20	2813-2998
Reverse	TTATTTATTCCAGCCAGCGT	51.5	20	



Fig. 7. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the cDNA encoding the preprotein bacteriocin sakacin P(GenBank accession no. Z48542). PCR primer positions are indicated with horizontal arrows and direction of arrows indicates sense/antisense orientation. The cleavage site between pre-sequence and mature bacteriocin is indicated by a vertical arrow. The stop codon TAA is marked with an asterisk.

(다) PCR 반응

PCR은 PTC-200 DNA Engine(Bio-Rad, USA)을 이용하였고, PCR 반응액은 *AccuPower*[®] PCR premix(Bioneer, Korea)를 사용하여, 50 ng의 genomic DNA 1 μL와 20 pmol의 forward 및 reverse primer를 각각 1 μL 넣은 후 최종부피 20 μL가 되도록 멸균증류수를 첨가하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 실시 후, 95°C에서 30초, 47°C에서 30초, 72°C에서 1분을 30회 수행하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 반응하여 PCR을 종결하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하고 UV로 발색시켜 증폭 여부 및 크기를 확인하였다.

(2) 향진균 물질 확인을 위한 대사산물별 활성

(가) 조향진균 물질 확보

ALH의 조향진균 물질은 다음과 같이 확보하였다. 분리균주를 MRS 액체배지에서 24시간 배양한 후 배양액을 4℃에서 원심분리(6,000 ×g, 15 min)하여 상등액을 회수하고, 0.45 μm membrane filter로 제균하여 조향진균 물질을 얻었다. 확보된 조향진균 물질이 포함된 배양액은 10배 농축하여 실험에 사용하였다.

(나) 조향진균 물질의 활성평가

① pH 조절에 따른 향진균 활성평가(유기산)

ALH의 조향진균 물질에 대한 pH 영향에 따른 향진균 활성을 평가하였다. 조향진균 물질이 포함된 배양액에 1 N NaOH와 1 N HCl 용액을 사용하여 pH 3.0~8.0으로 조정하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 paper disk 법을 이용하여 pH에 따른 FB에 대한 생육저해를 확인하였다.

② 단백가수분해 효소 처리에 따른 향진균 활성평가(박테리오신)

ALH의 균주가 생산하는 조향진균 물질이 단백질 성분에 의한 것인지를 파악하기 위해 조향진균 물질이 포함된 배양액에 단백질 분해효소인 proteinase K와 protease를 1 unit/mL의 농도로 각각 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 FB에 대하여 생육저해를 paper disk 법을 사용해 확인하였다.

③ 카탈라아제 효소 처리에 따른 향진균 활성평가(과산화수소)

ALH가 생산하는 조향진균 물질이 과산화수소에 의한 것인지를 파악하기 위해 조향진균 물질이 포함된 배양액에 catalase를 1 unit/mL의 농도로 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 FB에 대하여 생육저해를 paper disk 법을 사용해 확인하였다.

(다) 향진균 물질 확인

조향진균 물질의 분리 정제를 위한 대사산물별 향진균 활성평가 결과, ALH가 생산하는 향진균 물질이 유기산일 가능성이 높다고 판단되었다. 따라서 젖산(lactic acid), 아세트산

(acetic acid), 프로피온산(propionic acid)을 인위적으로 처리하여 FB에 대한 생육저해를 paper disk 법을 사용해 확인하였다.

① 항진균 활성 유산균 배양액과 젖산의 항진균 활성 비교

ALH 배양액의 항진균 활성을 젖산(lactic acid)의 항진균 활성과 비교하기 위해 젖산의 농도를 달리하여(0.0~2.0%) 처리하고 ALH 배양액을 5.0 N NaOH를 사용하여 pH 4.5로 동일하게 조정하여 FB에 대한 항진균 활성을 paper disk 법을 사용해 비교하였다.

② 유기산별 항진균 활성 비교

유기산의 종류에 따른 항진균 활성을 비교하기 위해 젖산(lactic acid), 아세트산(acetic acid), 프로피온산(propionic acid)의 농도를 각각 1.5%로 조절 한 다음 FB에 대한 항진균 활성을 paper disk 법을 사용해 비교하였다.

(3) 항진균 물질의 분자량별 활성평가

ALH를 100 mL MRS 액체배지에서 37°C, 24시간동안 정지배양한 후, 4°C에서 원심분리(6,000 ×g, 15 min)하여 회수한 상등액을 0.45 μm membrane filter 제균하여 조항진균 물질을 얻었다. 조항진균 물질이 포함된 상등액을 Centriprep YM-3(Millipore Co., Billerica, MA, U.S.A)를 이용해 원심분리(3,000 ×g, 15 min)하고 분자량 3,000 Da 이상과 이하의 분획으로 각각 나누어 동결 건조한 후에 20 mM sodium acetate(pH 4.0) 완충액에 녹여 10배 농축 배율로 준비하였다. 분획된 시료의 FB에 대한 항진균 활성을 Paper disk 법을 사용하여 측정하였다.

(4) 항진균 활성 유산균 배양액과 항진균 물질의 항진균, 항산화 및 항암 활성

(가) 균주 및 세포주

실험에 사용된 유산균은 ALH를, 항진균 활성평가를 위한 곰팡이는 FB를 사용하였다. 또한 항산화 및 항암실험을 위해 사용된 대식세포주(RAW 264.7)와 3종의 암세포주(AGS, HT-29, HepG2)는 한국세포주은행(Koan cell line bank, Korea)으로부터 분양받아 형태를 관찰하며 10회 이하로 계대배양한 세포를 사용하였다. 각 세포주는 10% FBS(Invitrogen, USA)가 첨가된 DMEM(Invitrogen) 배지를 사용하여 37°C, 5%의 CO₂ 배양기(Vision, Korea)에서 2~3일마다 계대배양하며 실험에 사용하였다.

(나) 시료 제조

유산균 배양액은 MRS 액체배지에 ALH를 2%(v/v) 접종하여 37℃에서 48시간 배양한 후 원심분리(3,000 rpm, 10 min, 4℃)하였다. 계피 물추출물은 10%(w/v) 계피 분말을 증류수에 30분간 침지한 후 100℃에서 1시간 추출하여 원심분리(10,000 rpm, 10 min, 4℃), 계피 주정추출물은 10%(w/v) 계피 분말을 주정에 24시간 침지한 후 원심분리(3,000 rpm, 10 min, 4℃)하였다. 발효 추출물은 계피 물추출물을 10%(v/v) 첨가한 MRS 액체배지에 ALH를 2%(v/v) 접종하여 37℃에서 48시간 배양한 후 원심분리(3,000 rpm, 10 min, 4℃)하였다. 숙성 추출물은 ALH를 48시간 배양한 배양액에 계피 분말을 1%(v/v) 4℃에서 일주일간 숙성하였다. 계피 주정추출물은 감압 농축하여 주정을 휘발시키고 계피 물추출물, 발효 추출물 및 숙성 추출물은 동결건조하였다. 유산균 배양액과 계피 물추출물은 물에, 계피 주정추출물, 발효 추출물 및 숙성 추출물은 주정에 용해·여과하여 실험에 사용하였다.

(다) 항진균 활성

각 시료의 항진균 활성은 paper disc 방법을 이용하여 평가하였다. PDA 평판배지에 FB를 접종하여 25℃에서 48시간 배양하여 포자를 형성하게 하고, 이를 생리 식염수에 현탁한 후 균일화하여 멸균 거즈로 여과하였다. FB 여과액은 5 mL의 중층용 PDA에 희석하여 분주한 후 실온에서 10분간 굳혔다. 멸균된 paper disc(0.6 mm)에 ALH 배양액, 계피 물추출물, 계피 주정추출물, 발효 추출물 그리고 숙성 추출물을 각각 100 mg/mL의 농도로 흡수 시킨 후 1시간 방치한 후 FB 평판배지 위에 고정하였다. 25℃에서 48시간 배양하여 생성되는 생육저지환의 생성 유무와 크기를 측정하였다.

(라) 항산화 활성

① DPPH 라디칼 소거 활성

ALH 배양액을 농도별(0~10 mg/mL)로 희석하여 96 well plate에 50 µL 씩 분주하고 에탄올에 녹인 100 µM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, USA) 용액을 150 µL 씩 첨가하였다. 실온에서 차광상태로 30분간 반응시킨 후 ELISA reader(DYNEX, USA)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도와 비교하여 그래프로 나타냈다.

② ABTS 라디칼 소거 활성

7 mM ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid, Sigma, USA) 용액과 2.4 mM potassium persulfate(Sigma, USA) 용액을 혼합하여 16시간 동안 차광상태에서 $ABTS^{\cdot+}$ 를 형성시킨 후 ELISA reader로 630 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 0.7 ± 0.02 가 되도록 희석하였다. ALH 배양액을 농도별(0~10 mg/mL)로 희석하여 96 well plate에 분주하고 희석된 $ABTS^{\cdot+}$ 용액을 동량으로 가하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 대한 ABTS 라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도와 비교하여 그래프로 나타냈다.

③ XO 효소 활성

ALH 배양액을 0~10 mg/mL의 농도로 희석하여 xanthin oxidase activity assay kit(Biovision, USA)를 이용하여 xanthin oxidase(XO)의 활성 정도를 측정하였다. XO의 활성은 H_2O_2 의 희석농도로 환산하였으며, 0.1 mM까지 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

④ SOD 활성

ALH 배양액을 0~10 mg/mL의 농도로 희석하여 EpiQuik superoxide dismutase activity/inhibition assay kit(Epigentek, USA)를 이용하여 superoxide dismutase(SOD)의 활성 정도를 측정하였다. SOD의 농도는 10 U/ μ L 까지 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

⑤ NO 생성 억제 활성

ALH 배양액이 RAW 264.7 세포에서 LPS 자극을 통해 생성되는 nitric oxide (NO)를 억제할 수 있는지 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 4×10^5 cells/well의 수로 계대배양하고 24시간 안정화시켰다. 세포독성 실험을 통해 독성을 보이지 않는 농도 (0~5 mg/mL)로 ALH 배양액을 희석하여 처리하고 2시간 후 1 μ g/mL LPS(Lipopolysaccharide, Sigma, USA) 자극을 주었다. 24시간 반응시킨 후 배양물 100 μ L와 동량의 Griess reagent(Promega, USA)를 첨가하여 ELISA reader로 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 64 μ M까지 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

(마) 암세포 성장 억제 활성

ALH 배양액이 다양한 암세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 위암 세포주

(AGS), 대장암 세포주(HT-29) 그리고 간암 세포주(HepG2)를 각각 96 well plate에 4×10^5 cells/well의 수로 계대배양하고 24시간 안정화시켰다. ALH 배양액을 0~10 mg/mL의 농도로 희석하여 처리하고 24, 48 시간 후 PrestoBlue™ viability reagent(Invitrogen, USA)시약을 10 μ L 씩 첨가하였다. 반응 20분 후 ELISA reader로 570 nm(reference 600 nm)에서 흡광도를 측정하였으며 세포의 증식 정도는 대조구의 흡광도에 대한 백분율로 나타냈다.

(5) 정유 추출

추출은 clevenger type apparatus를 이용한 물증류법(hydrodistillation)으로 추출하였으며, 과정은 다음과 같다. 분쇄한 계피 50 g을 둥근플라스크에 넣고, 증류수 500 mL를 넣은 후 시간에 따라 가열하였다. 얻어진 오일에 sodium disulfate를 넣은 후 교반하여 물을 완전히 제거하고 원심분리(10,000 rpm, 5 min)을 통하여 오일만 회수하였다. 최종적으로 syringe filter (0.2 μ m, Chromtech)를 이용하여 불순물을 제거하고 수율을 측정하였으며, 추출된 정유(essential oil)는 갈색 시료보관병에 담아 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

(6) 추출 정유의 항진균 활성

(가) 추출 정유의 항진균 효과

최적의 추출 조건으로 추출된 정유의 항진균 활성은 disc diffusion assay 법을 변형하여 사용하였다. PDA평판배지에 곰팡이균액 400 μ L 씩 도말한 후 8 mm disc을 올려놓고 추출 정유 10 μ L를 떨어뜨려 25°C에서 5일간 배양한 후 disc 주변의 생육저지환을 확인하였다.

(나) 추출 정유의 최소저해농도 (MIC)

추출된 정유의 처리농도에 따른 효과를 확인하여 최소저해농도를 구하였다. MIC 활성은 disc diffusion assay법을 변형하여 사용하였다. 각 곰팡이균액이 400 μ L 씩 도말된 plate에 8 mm disc를 올려놓고 추출 정유를 0.1~1.0 mg/disc의 농도로 떨어뜨려 25°C 5일간 배양 후 투명한 형성을 확인하였다.

(7) 항진균 활성이 있는 추출 정유의 성분분석

추출 정유(essential oil)의 휘발성 성분의 분석은 GC(Agilent 6890N, Palo Alto, CA, USA)와 GC-Mass(GC-MS QP2010, Shimadzu Co., Japan)를 사용하였으며, GC-Mass에 의해 분리된 peak의 성분은 mass spectrum library(NIST 27, NITS 147, Wiley 7)에 근거하여 동정하였다. 휘발성 성분분석을 위한 GC와 GC-Mass의 작동조건은 table 1과 같다.

나. 향진균 물질의 치즈 및 식품에 적용 가능성평가

(1) 향진균 활성 유산균과 천연물유래 향진균 물질의 시너지효과

(가) 재료

발효유 제조에 사용된 원유는 임실지역 낙농가에서 착유하여 사용하였으며, 계피 주정 추출물은 계피 분말 10%를 주정에 24시간 침지한 후 여과하여 사용하였다. 유산균은 김치분리 유산균인 ALH와 상업균주 YF-L812(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, Chr. Hansen)를 10%의 멸균탈지유에 2회 증균 배양하여 사용하였다.

(나) 발효유 제조

발효유 제조를 위하여 원유에 설탕 5%와 계피 주정추출물을 첨가하여 혼합한 후 90℃에서 10분간 살균하고, 43℃에서 냉각하였다. 이후 스타터를 1% 접종하여 40℃에서 pH가 4.6이 될 때까지 6~8시간 동안 배양하였다. pH가 4.6에 도달한 각각의 발효유는 이후 15℃까지 냉각하고 4℃에서 냉장보관하면서 숙성시켰다. 발효유 제조공정은 Fig. 8과 같다.

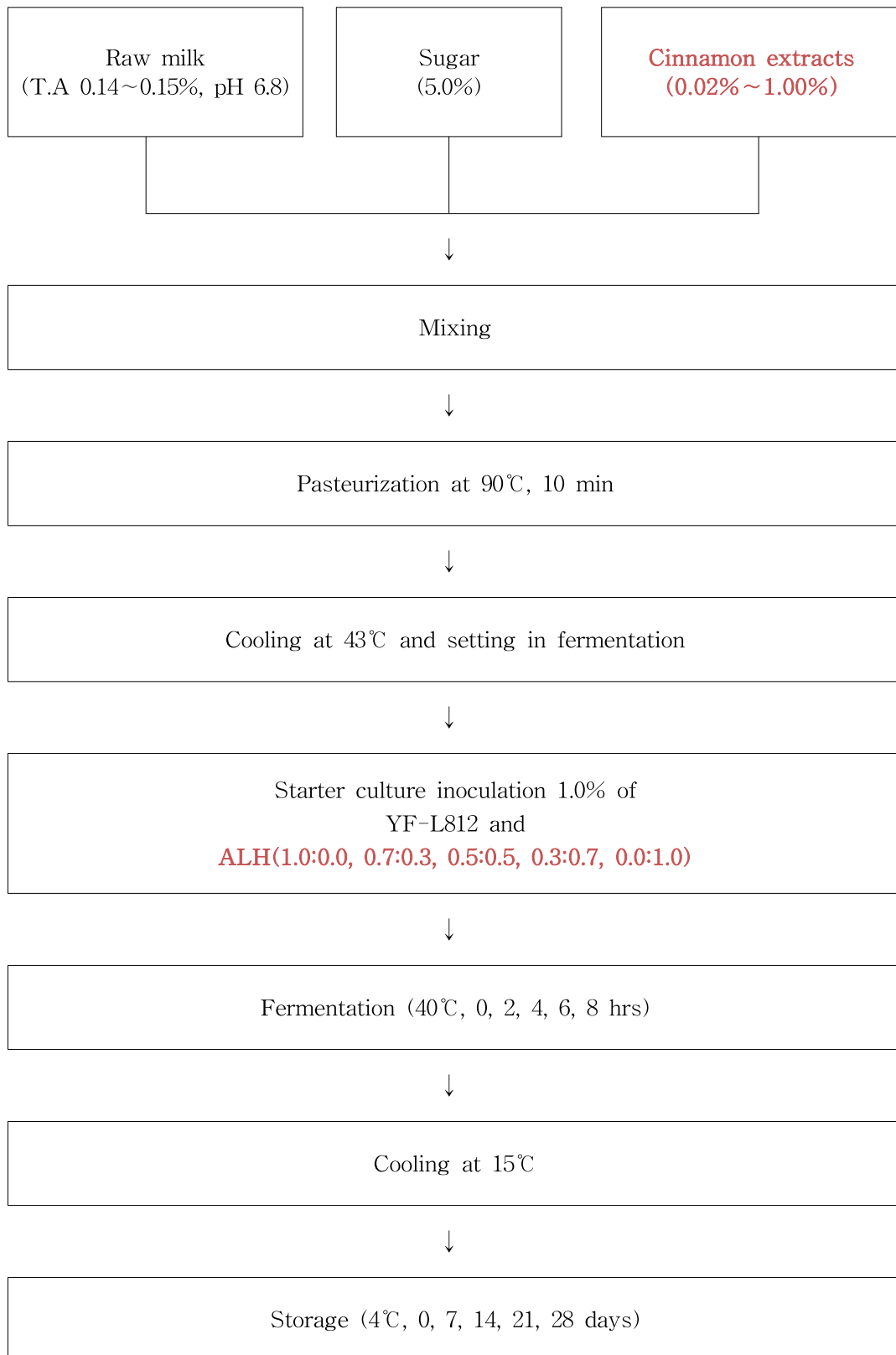


Fig. 8. Procedures for the manufacture methods of fermented milk with lactic acid bacteria isolated from Kimchi using cinnamon extract.

(다) 발효유 제조과정 중 품질특성

발효유 제조과정 중 발효시간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화를 측정하였다. pH 측정은 pH meter(UB-10, Denver, USA)를 이용하였으며, 적정산도는 시료 10 mL에 증류수 10 mL를 혼합하여 현탁액을 만든 후 이 현탁액을 NaOH를 첨가하여 pH 8.3까지 적정하고 NaOH의 소비량에 유산의 환산계수인 0.9를 곱한 후 검체의 무게(g)를 나누어 나타낸 값을 적정산도(%)로 하였다. 유산균수의 변화는 시료 1 mL를 채취하여 멸균식염수에 십진 희석법으로 희석한 뒤 BCP 한천배지를 이용하여 평판배양법으로 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후 나타난 노랑색 콜로니 수를 측정하여 CFU/mL로 표시하였다.

(라) 발효유의 관능평가

발효유의 관능적 특성을 평가하기 위해 연구소의 숙련된 관능평가요원 10명을 관능평가 패널로 선정하여 실험목적을 설명하고 각 측정치에 대해 교육시킨 뒤 9점 척도법을 사용하며 색, 향, 맛, 조직감 및 전체 기호도에 대한 검사를 실시하였다. 모든 결과의 통계처리는 Statistical Package for Social Science(SPSS, version. 12.0) 프로그램을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균±표준편차로 표시하였다.

(마) 발효유의 저장기간에 따른 품질특성

발효가 완료된 각각의 발효유를 4°C에서 냉장보관하면서 7일 간격으로 28일 동안 저장기간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화를 측정하였다.

(2) 향진균 활성 유산균 배양액과 천연물유래 향진균 물질을 첨가한 식빵의 품질특성

(가) 재료

본 실험에서 사용한 유산균 배양액은 MRS 액체배지에 ALH를 2%(v/v) 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 원심분리(3,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 사용하였다. 계피 주정추출물은 10%(w/v) 계피 분말을 주정에 24시간 침지한 후 원심분리(10,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 사용하였다. 식빵 재료로 강력분 밀가루(Daehan, Korea), 쇼트닝(Hains, Korea), 이스트(Jenico

Foods, Korea), 설탕(Samyang, Korea), 소금(Doyumwon, Korea) 및 탈지분유(Seoul Milk, Korea)는 시중에서 구입하여 사용하였다.

(나) 유산균 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵 제조

식빵은 직접반죽법을 적용하여 제조하였다. 재료배합은 table 4와 같이 강력분 1,200 g 과 물 700 g을 기본으로 하였으며, 유산균 배양액과 계피 주정추출물은 전체 중량의 2.5%로 물 700 g을 대신하여 첨가하였고, 유산균 배양액과 계피 주정추출물을 첨가하지 않은 식빵을 대조구로 하였으며, 유산균 배양액과 계피 주정추출물 첨가 비율은 100:0(A 시료), 75:25(B 시료), 50:50(C 시료), 25:75(D 시료), 0:100(E 시료)로 하였다. 이외에 생 이스트 60 g, 설탕 72 g, 소금 18 g, 쇼트닝 36 g 및 탈지분유 48 g을 사용하였다. 반죽은 저속으로 2분간 수화시킨 후 쇼트닝을 첨가하여 중속으로 5분. 그리고 고속으로 5분간 혼합하였다. 1차 발효는 온도 27℃와 습도 75%에서 40분간 수행하였고, 180 g씩 분할하여 둥글리기 한 후 15분간 중간 발효를 시켰다. 이후 성형하여 온도 38℃, 습도 85% 발효실에서 40분간 2차 발효시켜, 윗불 200℃, 아랫불 180℃ 오븐에서 30분간 구웠다.

Table 4. Combination percentage of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract

Materials	Control	A	B	C	D	E
Wheat flour	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200
Shortening	36	36	36	36	36	36
Sugar	72	72	72	72	72	72
Salt	18	18	18	18	18	18
Nonfat dry milk	48	48	48	48	48	48
Yeast	60	60	60	60	60	60
Water	700	670	670	670	670	670
①	0	30	22.5	15	7.5	0
②	0	0	7.5	15	22.5	30

①: Antifungal lactic acid bacteria culture medium

②: Cinnamon ethanol extract

(다) 식빵의 무게, 부피, 비용적 및 굽기손실을 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 무게는 빵을 구운 후 실온에서 방냉한 후 측정하였고, 부피는 종자치환법으로 측정하였다. 빵의 비용적은 빵의 부피(mL)를 반죽의 무게(g)로 나눠 계산하였다. 굽기손실율은 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{굽기손실율 (\%)} = \frac{\text{반죽 중량 (g)} - \text{식빵 중량 (g)}}{\text{반죽 중량 (g)}} \times 100$$

(라) 식빵의 수분함량 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 수분함량은 상압가열건조법으로 측정하였다.

(마) 식빵의 pH 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 pH는 시료 3 g에 증류수를 10배 넣고 교반한 다음 pH meter(Accument 925 pH/ion meter, Fisher Scientific, USA)로 측정하였다.

(바) 식빵의 적정산도 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 적정산도는 AOAC법에 준하여 시료 10 g에 증류수를 10배 넣고 실온에서 30분간 교반한 다음, 1.81×10^3 g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 0.1 N NaOH로 중화 적정하였다. 산도는 소요된 NaOH의 양으로 다음 계산식에 따라 lactic acid(mg%)로 표시하였다.

$$\text{적정산도(mg\%)} = \frac{V \times F \times D \times 0.009}{S} \times 100$$

V : 0.01 N-NaOH 용액의 적정소비량(mL)

F : 0.01 N-NaOH 용액의 역가,

D : 희석배수

0.009 : Lactic acid 계수 값

S : 시료채취량

(사) 식빵의 색도 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 색도는 색차계(JC 801S, Tokyo, Japan)를 사용하여 L(백색도), a(적색도), b(황색도) 값을 측정하였다.

(아) 식빵의 물성 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 물성은 빵 중심 부위를 2×2×1 cm로 절단하여 texture analyzer(TA-XT2i, Stable Micro System Co., Surrey, UK)를 이용하여 TPA(texture profile analysis)로 측정하였다. Compression force의 측정조건은 test type: measure force compression, test speed: 0.1 mm/sec, strain: 50%, probe: P/45으로 하였다. 위의 측정 후 얻어진 force-distance curve로부터 식빵의 경도(hardness), 부착성(adhesiveness), 탄력성(springiness), 응집성(cohesiveness), 점착성(gumminess), 씹힘성(chewiness)의 평균값을 구하였다.

(자) 식빵의 관능검사

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 관능검사는 순천대학교 조리과학과 대학(원)생 17명을 대상으로 실시하였다. 각 시료의 용기에는 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였고, 제시 순서는 무작위로 하였다. 시료를 평가하기 전에 시료의 특성에 따른 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄이기 위해 시료와 시료 사이에 입을 행굴 수 있도록 정수된

물(20±1℃)과 빨는 컵을 함께 제공하였고, 2~3회 정도 충분히 입 행굽을 하도록 하였다. 식빵의 선호도에 대한 평가항목은 색(color), 맛(taste), 향미(flavor), 외형(appearance), 질감(texture) 및 전체적인 선호도(overall preference)로 15점 line scale을 사용하였고, 소수점 첫 번째 자리까지 표기할 수 있도록 하였다. 1점은 '매우 선호하지 않는다', 15점은 '매우 선호한다'로 평가하였다.

(3) 항진균 활성 유산균 배양액과 항진균 물질을 첨가한 식빵의 저장 중 품질특성

(가) 저장 중 식빵의 수분함량 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 저장 중 수분함량은 온도 20℃의 incubator에서 0, 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 저장하면서 경시적으로 시료를 채취하여 상압가열건조법으로 측정하였다.

(나) 저장 중 식빵의 pH 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 저장 중 pH는 온도 20℃의 incubator에서 0, 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 저장하면서 경시적으로 시료를 3 g 채취하여 증류수를 10배 넣고 교반한 다음 pH meter(Accument 925 pH/ion meter, Fisher Scientific, USA)로 측정하였다.

(다) 저장 중 식빵의 적정산도 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 적정산도는 AOAC법에 준하여 온도 20℃의 incubator에서 0, 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 저장하면서 경시적으로 시료 10 g을 채취하여 증류수를 10배 넣고 실온에서 30분간 교반한 다음, 1.81×10³ g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 0.1 N NaOH로 중화 적정하였다. 산도는 소요된 NaOH의 양으로 다음 계산식에 따라 lactic acid(mg/100 g)로 표시하였다.

$$\text{적정산도 (mg/100 g)} = \frac{V \times F \times D \times 0.009}{S} \times 100$$

V : 0.01 N-NaOH 용액의 적정소비량 (mL), F : 0.01 N-NaOH 용액의 역가

D : 회석배수

0.009 : Lactic acid 계수 값

S : 시료채취량

(라) 저장 중 식빵의 색도 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 색도는 온도 20°C의 incubator에서 0, 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 저장하면서 경시적으로 시료를 채취하여 색차계를 사용하여 L(백색도), a(적색도), b(황색도) 값을 측정하였다.

(마) 저장 중 식빵의 물성 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 물성은 온도 5°C의 incubator에서 0, 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 저장하면서 경시적으로 시료를 채취하여 빵 중심 부위를 2×2×1 cm로 절단하여 texture analyzer를 이용하여 TP로 측정하였다. Compression force의 측정조건은 test type: measure force compression, test speed: 0.1 mm/sec, strain: 50%, probe: P/45으로 하였다. 위의 측정 후 얻어진 force-distance curve로부터 식빵의 경도(hardness), 부착성(adhesiveness), 탄력성(springiness), 응집성(cohesiveness), 점착성(gumminess), 씹힘성(chewiness)의 평균값을 구하였다.

(바) 식빵의 반응속도론적 노화도 분석

ALH 배양액과 계피추출물을 첨가한 식빵의 조직감 특성 중 경도 변화를 Avrami 방정식에 적용하여 노화 특성을 분석하였다.

경도의 변화로

$$= e^{-kt} \quad (1)$$

= 일정시간 후 결정화 되지 않은 부분

k = 속도상수 (rate constant)

n = 결정화 mode에 따라 1~4의 값을 갖는 Avrami 지수

t = 저장시간

$$\frac{E_L - E_t}{E} = e^{-kt} \quad (2)$$

E_0 = 초기 (0시간)의 정도

E_t = t 시간 경과 후의 정도

E_L = 이론적으로 도달할 수 있는 최고의 정도

식빵의 이론적 최고 정도 (limiting modulus)는 5°C에서 5일간 저장 후 정도를 얻었다.

식 (2)에서 자연로그와 사용로그를 취하면 다음과 같다.

$$\ln(E_L - E_t)/(E_L - E_0) = -kt^n \quad (3)$$

$$\log[-\ln(E_L - E_t)/(E_L - E_0)] = \log k + n \log t \quad (4)$$

Avrami 지수(n)는 log로 표식된 식 (4)에서 $\log[(E_L - E_t)/(E_L - E_0)]$ (y 축)을 $\log t$ (x 축)에 대하여 좌표로 나타낸 그래프의 기울기로 구하였다.

식 (2)에서 자연로그를 취하면 다음과 같다.

$$\ln(E_L - E_t) = -kt^n + \ln(E_L - E_0) \quad (5)$$

속도상수(k)는 방정식 (5)로부터 $\ln(E_L - E_t)$ 와 시간 t 를 축으로 한 그래프의 기울기로 구하였다.

(사) 미생물 총균수 측정

ALH 배양액과 계피 주정추출물의 비율을 달리한 식빵을 PE봉지에 담아 25°C에 보관하면서 저장 기간별로 미생물 총균수를 측정하였다. 식빵을 10 g씩 채취하여 멸균 증류수 90 mL를 첨가하여 스토마커(AESAP1069, AES Chemunex, Bruz, France)로 30초간 균질화시켰다. 10배 희석법으로 희석한 후 1 mL를 취해 PCA 평판배지에 균일하게 도말하고 30°C에서 3일간 배양하여 총균수를 측정하였다.

(아) 보존기간에 따른 곰팡이균수 및 발생시점 확인

ALH 배양액과 계피 주정추출물의 비율을 달리한 식빵을 PE봉지에 담아 25℃에 보관하면서 저장 기간별로 곰팡이 균수를 측정하였다. 식빵을 10 g씩 채취하여 멸균 증류수 90 mL 씩 첨가하고 스토마커로 30초간 균질화시켜 10배 희석법으로 희석한 후 1 mL을 취해 PDA 평판배지에 균일하게 도말하였다. 25℃에서 5일간 배양하여 곰팡이 균수를 측정하였다. 보존기간에 제품의 품질변화를 알아보기 위해 1 cm 두께로 절단하여 PE봉투에 넣어 25℃ 배양기에 방치하여 1일 1회씩 관찰하여 곰팡이 발생유무를 조사하였다.

(4) 향진균 활성평가를 위한 치즈 제조

(가) 원유

공시 치즈제조용 원유는 순천대학교 서면에 소재하고 있는 부속 동물사육장에서 사육 중인 홀스타인 프리지안(Holstein-Friesian)종으로부터 당일 착유한 신선 원유를 공시치즈 제조에 당일 사용하였다(TA:0.14~0.15%).

(나) 유산균 Starter

공시 치즈인 가우다치즈와 털지터치즈의 중온균 Starter는 FD-DVS FLORA-DANICA(CHR. HANSEN Co., Denmark : *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*)를 원유 100 L 당 2.5 g을 접종하였으며, 로마노치즈에 사용한 고온균 유산균 Starter는 FD-DVS ABT-5(CHR. HANSEN Co., Denmark : *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) 원유 100 L 당 2.5 g을 접종하였다. 향진균 활성 유산균 Starter는 각각의 유산균주를 MRS 액체배지에서 48시간 배양 후 8,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 얻어진 pellet을 모아 100 L 당 3.0 g을 치즈 제조에 사용하였다.

(다) 천연물유래 향진균 활성 물질

① 정유

향진균 활성평가를 위한 정유(essential oil)는 Dainsoap(South Korea)에서 구입하여

사용하였으며, 사용된 계피유(cinnamon oil, France), 계피 수피유(cinnamon bark oil, Sri Lanka), 바질유(Basil oil, Bulgaria)을 치즈 표면과 치즈 주위에 20 μ L 씩 분무하여 본 실험에 사용하였다.

② 계피 주정추출물

계피 주정추출물은 10%(w/v) 계피 분말을 주정에 24시간 침지한 후 원심분리(3,000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C) 한 후 감압 농축하여 주정을 휘발시켰다.

③ 계피

계피 분말은 충북 진천군에 소재한 리치밀(주)에서 제조한 베트남산 계피 분말 (100%)를 치즈에 첨가하였다.

(라) 항진균 활성평가를 위한 치즈 제조

① 계피유와 계피 수피유의 표면 처리 가우다치즈 제조

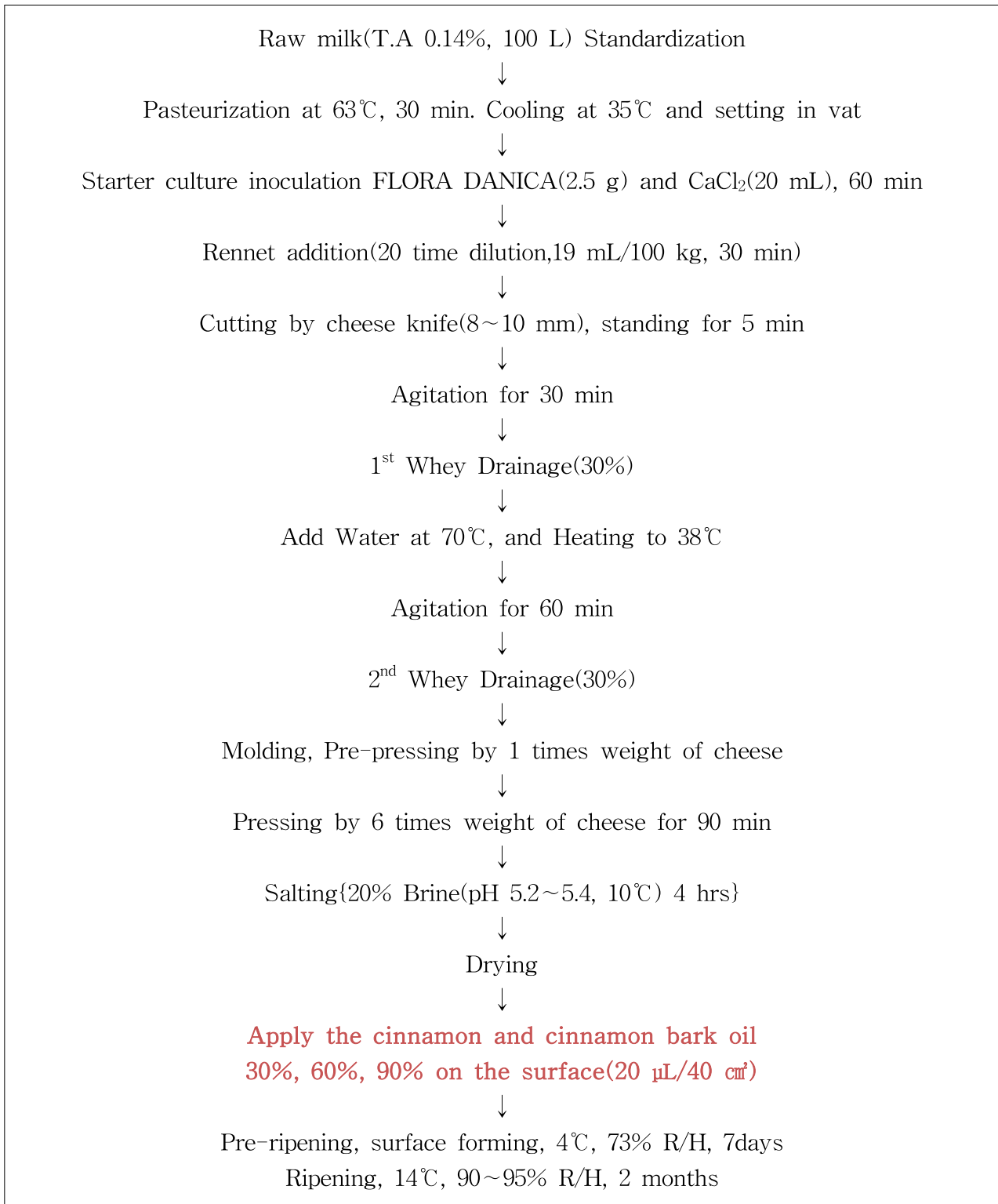


Fig. 9. Procedure of Gouda cheese manufacture on the surface treated with cinnamon and cinnamon bark oil.

② 계피 주정 추출물 표면처리 로마노치즈 제조

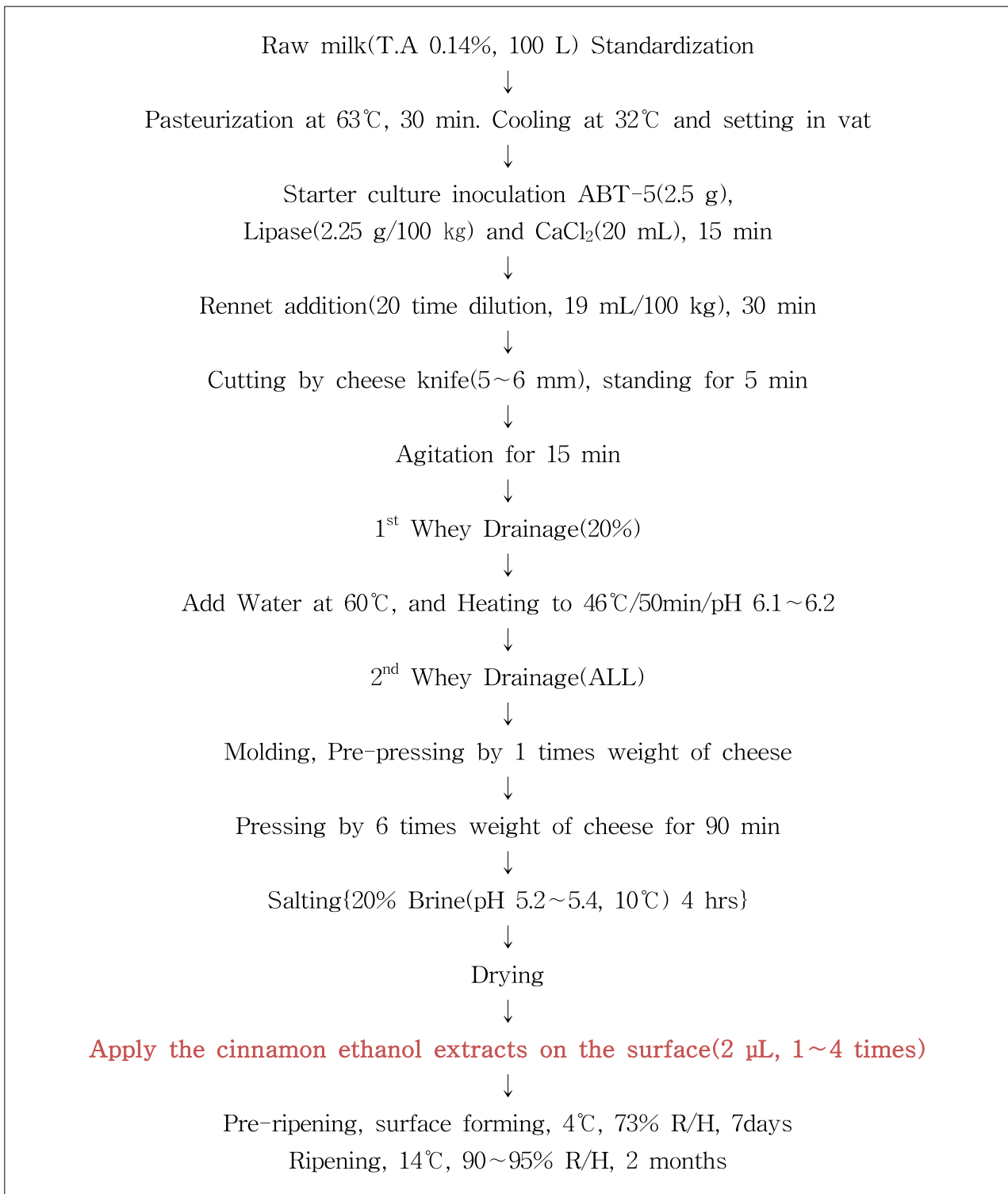


Fig. 10. Procedure of Romano cheese manufacture on the surface treated with Cinnamon ethanol extracts.

③ 계피 분말을 첨가한 틸지터 치즈 제조

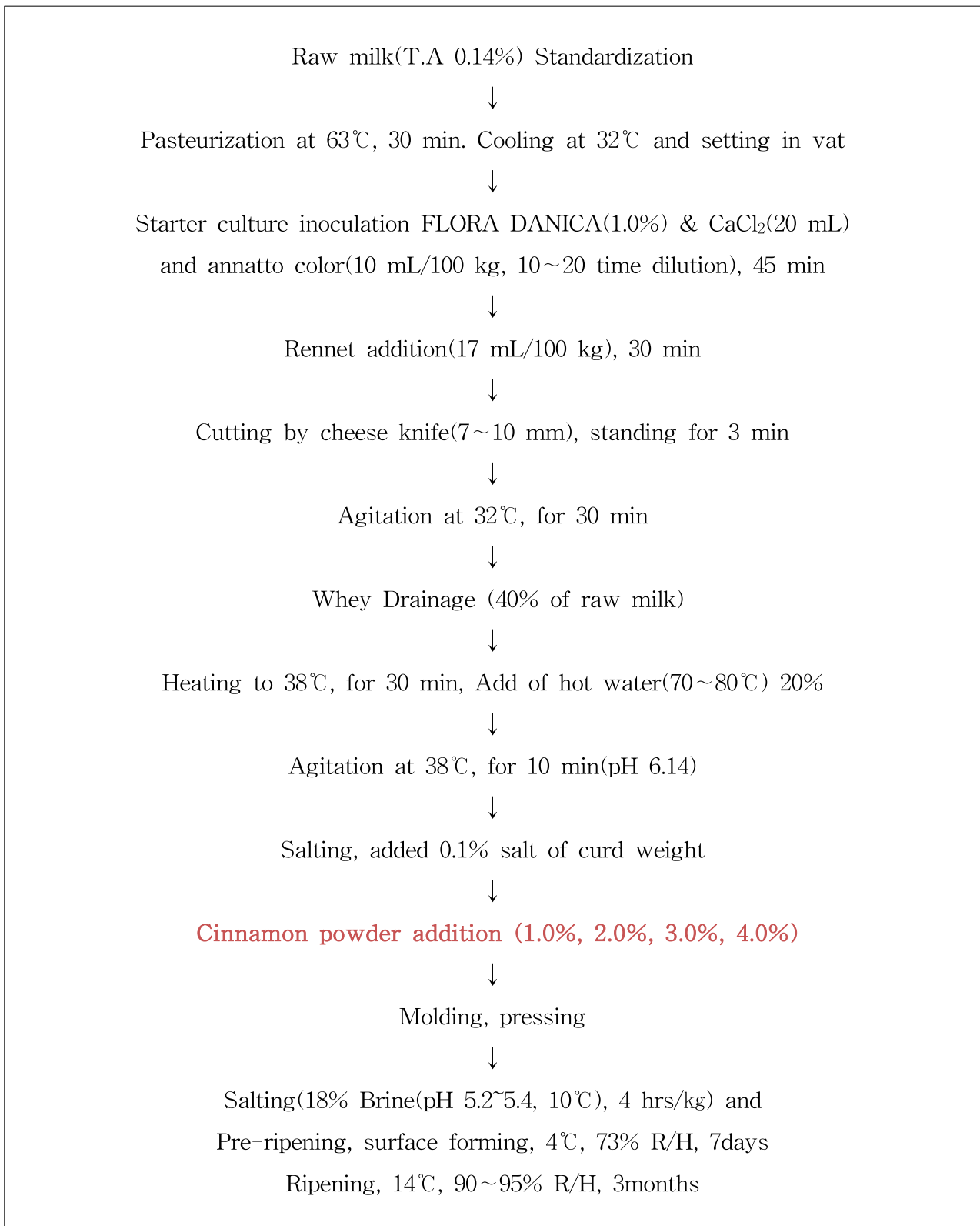


Fig. 11. Procedure for Tilsiter cheese manufacture added with cinnamon powder.

(마) 항진균 활성평가를 위한 치즈의 특성평가

① pH

pH는 생리적 식염수와 치즈를 2:1의 비율(saline:cheese = 20 mL : 10 g)로 분쇄용 tube에 넣어 균질기(M. Zipperer GmbH, Etzenbach, Germany)로 최대속도 20,000 rpm으로 2분간 균질한 다음 pH meter(Istek Model 720p, Korea)를 사용하여 일정기간별로 측정한다.

② 유산균수

시료는 생리적 식염수와 유산균배양액 시료를 2:1의 비율로 분쇄용 튜브에 넣어 균질기를 사용하여 20℃ 하에서 최대속도인 20,000 rpm으로 2분간 균질을 3차례 반복, 분쇄하여 10진 희석 후 0.5% sodium azide가 첨가된 MRS 평판배지와 BCP 평판배지를 이용하여 standard plate count법으로 32℃와 42℃에서 48시간 배양 후 생성된 colony 수가 30~300개 나타난 것을 선별하여 계수하였다.

③ 수용성 질소화합물 함량 변화

숙성 중 수용성 질소화합물 (Water Soluble Nitrogen, WSN)의 경시적인 변화는 치즈 5 g에 증류수 20 mL를 넣고 분쇄 및 균질화를 실시한 후 상등액을 정량하였으며, 질소화합물의 정량은 tyrosine (Sigma)을 표준물질로 하여 표준곡선과 환산공식을 얻어 사용하였다. ($y=0.787 x$, $R^2=0.999$)

④ 관능평가

계피유(cinnamon oil)과 바질유(cinnamon bark oil)를 처리한 가우다치즈의 관능검사는 치즈 시료에 관한 충분한 지식, 용어, 평가기준에 대해 숙지를 시킨 순천대학교 동물자원과 학과 대학원생 및 학부생 16명을 대상으로 실시하였다. 시료는 숙성 8주차의 시료를 사용하였으며 각 시료에 대하여 무작위로 Dairy Sweet, Salty, Cinnamon Flavor, Bitter, Dairy Sour, Flavor, Total Taste를 9점 채점법을 사용하여 실시하였으며 각각 채점하여 표기하도록 하였다 (Table 5).

Table 5. Sensory evaluation rating table for the Gouda cheese on the surface treated with cinnamon and cinnamon bark oil

단맛 (Dairy Sweet)	1 달지 않다	2	3	4	5	6	7	8	9 대단히 달다
짠맛 (Salty)	1 짜지 않다	2	3	4	5	6	7	8	9 대단히 짜다
계피향 (Cinnamon)	1 대단히 약하다	2 아주 약하다	3 보통 약하다	4 약간 약하다	5 강하지도 약하지도 않다	6 약간 강하다	7 보통 강하다	8 아주 강하다	9 매우 강하다
쓴맛 (Bitter)	1 쓰지 않다	2	3	4	5	6	7	8	9 대단히 쓰다
신맛 (Dairy Sour)	1 시지 않다	2	3	4	5	6	7	8	9 대단히 시다
향미 (Flavor)	1 대단히 싫어함	2 아주 싫어함	3 보통 싫어함	4 약간 싫어함	5 좋지도 싫지도 않음	6 약간 좋아함	7 보통 좋아함	8 아주 좋아함	9 대단히 좋아함
전체적인 선호도 (Total Taste)	1 대단히 싫어함	2 아주 싫어함	3 보통 싫어함	4 약간 싫어함	5 좋지도 싫지도 않음	6 약간 좋아함	7 보통 좋아함	8 아주 좋아함	9 대단히 좋아함

제 2 절 연구내용 및 결과

1. 제 1 차년도 (2012)

가. 항진균 물질의 개발

(1) 곰팡이균의 분리 및 동정

(가) 곰팡이균의 순수분리 및 배양

임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성 중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 곰팡이를 채취하여 PDA 평판배지에 도말하여 25°C에서 48시간 동안 배양한 뒤, 형성되는 포자의 집락을 관찰하였다. 그 결과 다양한 종류의 곰팡이들이 동일한 배지 내에서 관찰되었으며, 이를 3회 분리 배양하여 균사는 PDA 평판배지 및 YM 액체배지에 접종하여 25°C에서 10일간 배양한 후 광학현미경으로 균사 및 포자형태를 관찰하였다. 곰팡이균의 형태, 색상 및 포자의 특징을 비교하여 최종 분리 배양된 곰팡이균 8종을 FA, FB, FC, FD, FE, FF, FG, 그리고 FH로 각각 명명하였다(Fig. 12).

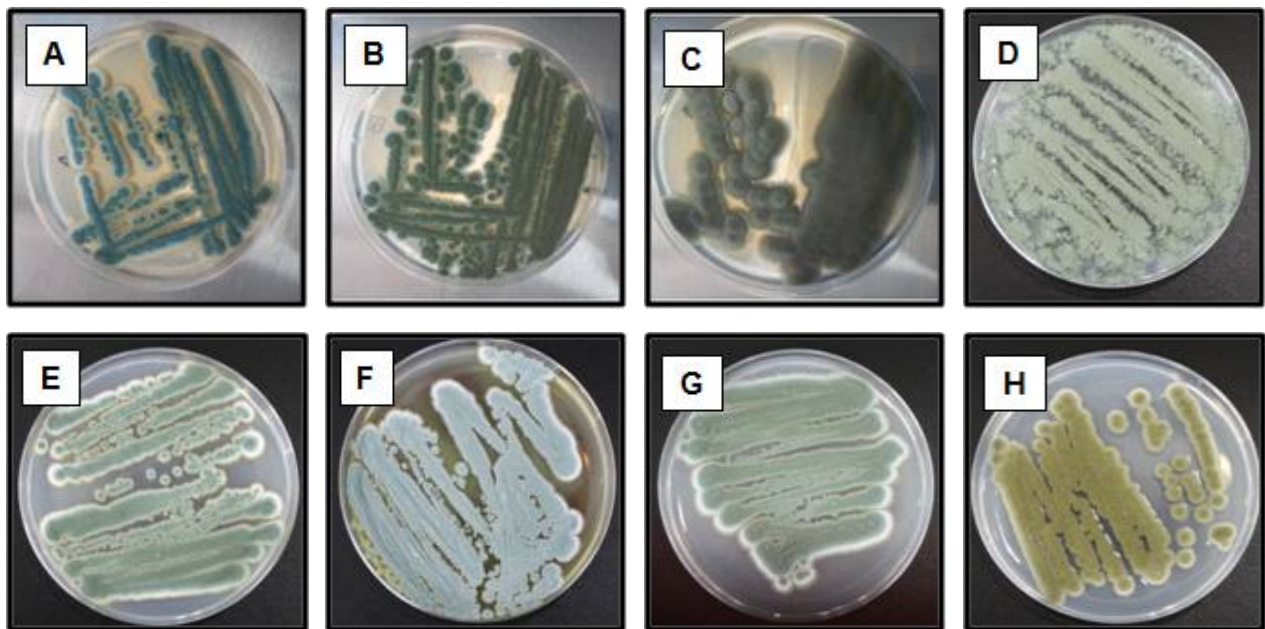


Fig. 12. Fungi isolated from cheese and cheese ripening room. FA~FH: fungi A~H

(나) 곰팡이균의 동정

임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성 중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 곰팡이를 채취한 후 분리 배양한 최종 8종의 곰팡이균을 FA에서 FH로 명명하여 18S rRNA 염기서열을 결정하고 알려진 다른 균주와 비교하였다. 각각의 곰팡이균을 동정한 결과 FA 곰팡이균은 *Penicillium solitum* strain, FB는 *Penicillium brevicompactum* strain, FC는 *Penicillium commune* isolate, FD는 *Penicillium roqueforti*, FE는 *Penicillium echinulatum*, FF는 *Penicillium polonicum*, FG는 *Penicillium solitum*, 그리고 FH는 *Cladosporium sphaerospermum*으로 각각 판정되었다. 분리 곰팡이균 8종은 동정 후 *Penicillium solitum* strain FI01, *Penicillium brevicompactum* strain FI02, *Penicillium commune* isolate FI03, *Penicillium roqueforti* FS04, *Penicillium echinulatum* FS05, *Penicillium polonicum* FS06, *Penicillium solitum* FS07, 그리고 *Cladosporium sphaerospermum* FS08로 각각 명명하여 실험에 사용하였다(Table 6, 7).

Table 6. Identification of fungi isolated from cheese and cheese ripening room

Strain	18S rRNA sequence		Nomenclature
	Homology (%)	Scientific name	
FA	100	<i>Penicillium solitum</i> strain	<i>P. solitum</i> strain FI01
FB	99	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain	<i>P. brevicompactum</i> strain FI02
FC	100	<i>Penicillium commune</i> isolate	<i>P. commune</i> isolate FI03
FD	100	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>P. roqueforti</i> FS04
FE	99	<i>Penicillium echinulatum</i>	<i>P. echinulatum</i> FS05
FF	100	<i>Penicillium polonicum</i>	<i>P. enicillium polonicum</i> FS06
FG	100	<i>Penicillium solitum</i>	<i>P. solitum</i> FS07
FH	100	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>C. sphaerospermum</i> FS08

FA~FH: fungi A~H

Table 7. Contig summary for identification of fungi isolated from cheese and cheese ripening room

Strain		Contig summary												
FA	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
5	576	Penicillium solitum strain 20-01 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, complete sequence	JN642222.1	5683	1761	2332	1134	572	0.0	572	572	100	Plus / Plus	
FB	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
18	580	Penicillium brevicompactum strain KUC1628-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM469408.1	1136	12	575	1102	556	0.0	563	564	99	Plus / Plus	
FC	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
2	529	Uncultured fungus clone L046937-122-075-C01-units 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JF289117.1	602	33	560	1047	528	0.0	528	528	100	Plus / Plus	
FD	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
1	552	Uncultured Trichocomaceae partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and partial 28S rRNA gene, clone F260209_FK3	FN689591.1	584	567	16	1094	552	0.0	552	552	100	Plus / Minus	
FE	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
40	599	Penicillium solitum strain FRR 937 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY373932.1	610	15	573	1094	552	0.0	559	560	99	Plus / Plus	
FF	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
1	563	Penicillium sp. BMP3038 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, region	HQ832995.1	612	46	608	1116	563	0.0	563	563	100	Plus / Plus	
FG	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
1	563	Penicillium solitum strain FRR 937 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY373932.1	610	12	574	1116	563	0.0	563	563	100	Plus / Plus	
FH	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
1	517	Uncultured Cladosporium clone G19p6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	GU327428.1	532	8	524	1025	517	0.0	517	517	100	Plus / Plus	

FA~FH: fungi A~H

(2) 유산균 탐색

(가) 향진균 활성이 있는 유산균 표준균주의 탐색

최근 국내외 문헌자료를 통해 우수한 향진균 활성을 나타내는 유산균 표준균주를 탐색하여 표준유산균 12종을 선별하여 구입하였다. 김치로부터 분리한 유산균의 향진균 활성을 평가하는 대조균으로 사용된 12종의 표준 유산균은 table 8과 같다.

Table 8. Reference strain used in this study

Indicator strains	Reference
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC3526	KCTC ⁽¹⁾
<i>Lactobacillus curvatus</i> KCTC3767	KCTC
<i>Leuconostoc lactis</i> KCTC3528	KCTC
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCCM40458	KCCM ⁽²⁾
<i>Weissella cibaria</i> KCTC3807	KCTC
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC3524	KCTC
<i>Leuconostoc gelidum</i> KCCM40460	KCCM
<i>Lactobacillus sakei</i> KCCM40264	KCCM
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KCTC3505	KCTC
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> KCTC3603	KCTC
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> KCTC3753	KCTC
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KCCM11325	KCCM

⁽¹⁾ KCTC: Korean Collection for Type Culture

⁽²⁾ KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms

(나) 김치에서의 유산균 분리 및 확보

다양한 지역에서 수집한 김치로부터 유산균을 분리하기 위해 각 지역에서 수거한 김치를 분쇄한 후 여과액을 탄산칼슘이 첨가된 MRS 평판배지에 도말하여 30℃에서 배양하였다. 김치 여과액이 도말된 MRS-CaCO₃ 고체배지 상에서 산 생성에 따른 투명환을 형성하는 균주의 집락들이 관찰되었다. 투명환을 나타내는 균주들을 따로 분리하여 BCP를 포함한 MRS 평판배지에 2차적으로 도말하여 BCP의 보라색 배지가 노란색으로 변하는 미생물 균집을 각각 취하여 미생물 균집에 대하여 순수한 유산균이 얻어질 때까지 MRS 고체배지에 3회 반복하여 도말하고 김치로부터 유산균 44종을 확보하였다. 분리된 유산균 44종 중 전주지역 김치에서 분리한 유산균 29종을 LJ001에서 029로, 임실지역 김치에서 분리한 유산균 6종을 LI030에서 LI035, 경기도지역 김치에서 분리한 유산균 4종을 LGy036에서 039, 광양지역 김치에서 분리한 유산균 4종을 LGw040에서 044로 명명하여 실험에 사용하였다(Table 9).

Table 9. Lactic acid bacteria isolated from Kimchi

Lactic acid bacteria	Collection site
LJ001~029	Jeonju
LI030~035	Imsil
LGy036~039	Gyeonggi
LGw040~044	Gwangyang

LJ: Lactic acid bacteria from Kimchi in Jeonju, LI: Lactic acid bacteria from Kimchi in Imsil, LGy: Lactic acid bacteria from Kimchi in Gyeonggi, LGw: Lactic acid bacteria from Kimchi in Gwangyang

(3) 항진균 활성평가

(가) 표준유산균의 항진균 활성

다양한 지역에서 수집한 김치로부터 분리한 유산균의 항진균 활성을 확인하기 위해 먼저 대조군으로 사용된 표준유산균주 12종을 분리 곰팡이균 중 임의로 선정한 FB(*P. brevicompactum* strain FI02)에 대한 항진균 활성을 확인하였다. 그 결과 12종의 표준 유산균 주 가운데 *Leuconostoc citreum* KCTC3524 유산균이 FB 곰팡이균에 대한 항진균 활성이 크게 나타나 김치로부터 분리한 44종의 유산균에 대한 항진균 활성을 비교하는 대조군으로 결정하였다(Fig. 13).

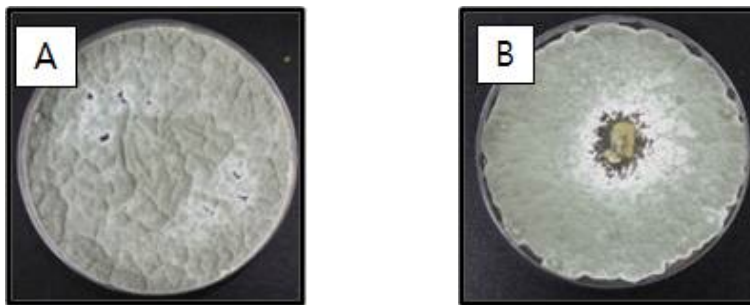


Fig. 13. Antifungal activity of reference lactic acid bacteria against FB. A): None treated, (B): *Leuconostoc citreum* KCTC3524, FB: Fungi B; *P. brevicompactum* strain FI02.

(나) 김치 유산균의 항진균 활성

다양한 지역에서 수집한 김치로부터 분리한 44종 유산균의 항진균 활성을 확인하기 위해 FB에 대하여 항진균 활성을 확인하였다. 그 결과 광양지역 김치에서 분리한 유산균 (LGw040~044)을 제외하고 유산균에 의한 생육저지환을 형성하는 것을 관찰할 수 있었다. 전주지역과 임실지역 김치에서 분리된 유산균에서 FB에 대하여 항진균 활성이 크게 나타났다. 특히, 전주지역과 임실지역의 김치에서 분리한 유산균 중 LJ007, 011, 015, 017, 019와 LI031가 대조군으로 사용된 표준 유산균주 *Leuconostoc citreum* KCTC3524의 FB에 대한 항진균 활성과 유사 또는 보다 크게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 14).

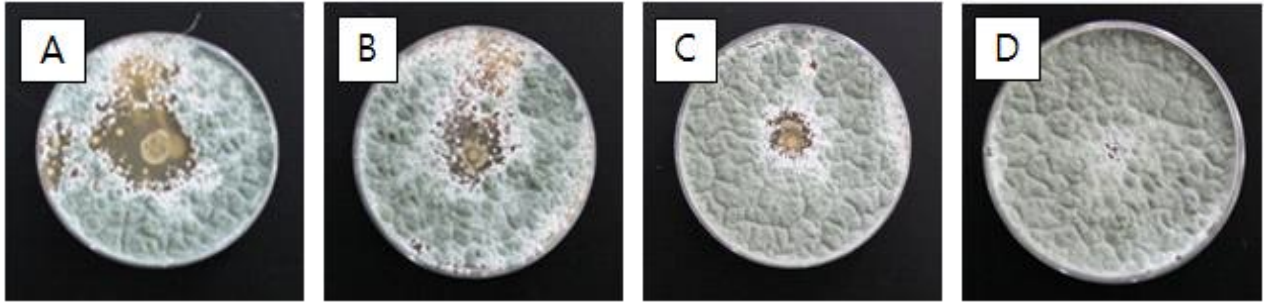


Fig. 14. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi against FB. (A): Lactic acid bacteria from Kimchi in Jeonju 015, (B): Lactic acid bacteria from Kimchi in Imsil 031, (C): Lactic acid bacteria from Kimchi in Gyeonggi 036, (D): Lactic acid bacteria from Kimchi in Gwangang 040, FB: Fungi B; *P. brevicompactum* strain FI02.

(다) 항진균 활성 유산균의 동정 및 선발

44종의 분리 유산균 중 FB에 대하여 생육저지환의 크기 및 형태를 바탕으로 항진균 활성이 크다고 판정된 22종의 유산균을 선발하여 ALA에서 ALV로 명명하였다. 항진균 활성이 있다고 판정되어 1차 선발된 22종의 유산균을 동정한 결과, 전주지역 김치로부터 분리한 유산균 ALA, ALB, ALC, ALD, ALE와 임실지역 김치로부터 분리한 유산균 ALF, ALG, ALH와 경기지역 ALI, ALJ는 *Lactobacillus sakei* subsp.로 동정되었다. 또한 전주지역 김치로부터 분리한 유산균 ALK, ALL, ALM, ALN, ALO, ALP, ALQ, ALR, ALS, ALT, ALU, ALV는 *Pediococcus pentosaceus*로 동정되었다. 최종 선발된 22종의 유산균은 동정 후 *L. sakei* subsp. ALJ002, *L. sakei* subsp. ALJ005, *L. sakei* subsp. ALJ007, *L. sakei* subsp. ALJ011, *L. sakei* subsp. ALJ013, *L. sakei* subsp. ALI031, *L. sakei* subsp. ALI032, *L. sakei* subsp. ALI033, *L. sakei* subsp. ALGy036, *L. sakei* subsp. ALGy039, *P. pentosaceus* ALJ014, *P. pentosaceus* ALJ015, *P. pentosaceus* ALJ016, *P. pentosaceus* ALJ017, *P. pentosaceus* ALJ018, *P. pentosaceus* ALJ019, *P. pentosaceus* ALJ021, *P. pentosaceus* ALJ022, *P. pentosaceus* ALJ024, *P. pentosaceus* ALJ026, *P. pentosaceus* ALJ027, *P. pentosaceus* ALJ029로 각각 명명하여 실험에 사용하였다(Table 10, 11).

Table 10. Identification of antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi

Strain	18S rRNA sequence		Nomenclature
	Homology (%)	Scientific name	
ALA	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ002
ALB	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ005
ALC	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ007
ALD	100	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ011
ALE	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ013
ALF	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALI031
ALG	96	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALI032
ALH	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALI033
ALI	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALGy036
ALJ	99	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp.	<i>L. sakei</i> subsp. ALGy039
ALK	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ014
ALL	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ015
ALM	100	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ016
ALN	97	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ017
ALO	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ018
ALP	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ019
ALQ	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ021
ALR	100	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ022
ALS	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ024
ALT	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ026
ALU	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ027
ALV	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> ALJ029

ALA~ALV: antifungal lactic acid bacteria A~V, ALJ: antifungal lactic acid bacteria from Kimchi in Jeonju 002, 005, 007, 011, 013, 014, 015, 016, 017, 018, 019, 021, 022, 024, 026, 027, 029 ALI: antifungal lactic acid bacteria from Kimchi in Imsil 031, 033, 034, ALGy: antifungal lactic acid bacteria from Kimchi in Gyeonggi 036, 039

Table 11. Contig summary for identification of antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi

Strain		Contig summary												
ALA	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	3	1524	Lactobacillus sakei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0128	AB362609.1	1568	1	1519	2791	1511	0.0	1519	1522	99	Plus/Plus
ALB	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1501	Lactobacillus sakei subsp. carnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni432	AB600196.1	1534	18	1517	2765	1497	0.0	1500	1501	99	Plus/Plus
ALC	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1505	Lactobacillus sakei subsp. carnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni432	AB600196.1	1534	16	1517	2760	1494	0.0	1502	1505	99	Plus/Plus
ALD	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	5	1509	Lactobacillus sakei subsp. carnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni432	AB600196.1	1534	14	1518	2780	1505	0.0	1505	1505	100	Plus/Plus
ALE	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1500	Lactobacillus sakei subsp. carnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni432	AB600196.1	1534	16	1516	2765	1497	0.0	1500	1501	99	Plus/Plus
ALF	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1493	Lactobacillus sakei strain 23K complete genome	CR936503.1	1884661	445554	1867125	2700	1462	0.0	1483	1493	99	Plus/Minus
ALG	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	102	1507	Lactobacillus sakei subsp. carnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni432	AB600196.1	1534	28	1411	2261	1224	0.0	1351	1408	96	Plus/Plus
ALH	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1505	Lactobacillus sakei subsp. carnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni432	AB600196.1	1534	16	1517	2760	1494	0.0	1502	1505	99	Plus/Plus
ALI	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	4	1500	Lactobacillus sakei subsp. carnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni432	AB600196.1	1534	14	1510	2760	1494	0.0	1496	1497	99	Plus/Plus
ALJ	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1494	Lactobacillus sakei subsp. carnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni432	AB600196.1	1534	17	1507	2739	1483	0.0	1491	1494	99	Plus/Plus
ALK	Query		Subject					Score			Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	3	1500	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	15	1509	2736	1481	0.0	1494	1499	99	Plus/Plus

ALA~ALK: antifungal lactic acid bacteria A~K

Strain

Contig summary

ALL	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1498	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	19	1514	2748	1488	0.0	1495	1498	99	Plus/Plus

ALM	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1502	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	17	1518	2774	1502	0.0	1502	1502	100	Plus/Plus

ALN	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1496	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	16	1504	2529	1369	0.0	1457	1498	97	Plus/Plus

ALO	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1510	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	15	1519	2756	1492	0.0	1505	1510	99	Plus/Plus

ALP	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1505	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	19	1521	2767	1498	0.0	1503	1505	99	Plus/Plus

ALQ	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	3	1513	Pediococcus sp. MMZ60A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU157914.1	1547	1	1511	2785	1508	0.0	1510	1511	99	Plus/Plus

ALR	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	4	1506	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	14	1516	2776	1503	0.0	1503	1503	100	Plus/Plus

ALS	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1503	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	16	1518	2771	1500	0.0	1502	1503	99	Plus/Plus

ALT	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1498	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	20	1514	2741	1484	0.0	1494	1498	99	Plus/Plus

ALU	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	3	1509	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	17	1520	2752	1490	0.0	1502	1507	99	Plus/Plus

ALV	Query		Subject				Score			Identities				
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	3	1505	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni1144	AB598964.1	1538	15	1514	2750	1489	0.0	1499	1503	99	Plus/Plus

ALL~ALV: antifungal lactic acid bacteria L~V

(라) 선발 유산균의 항진균 활성 비교

22종의 유산균을 다시 FB에 대하여 항진균 활성을 재확인하였다. 22종 가운데 항진균 활성이 가장 뚜렷한 6종의 유산균을 최종 선발하였다(Table 12). 선발 유산균은 전주지역 김치로부터 분리한 유산균 ADL, ALL, ALS, ALT, 임실지역 김치로부터 분리한 유산균 ALH, 그리고 경기지역 김치로부터 분리한 유산균 ALJ였다. 최종 선발한 항진균 유산균 6종으로 임실지역 유가공업체를 포함한 국내 치즈 생산업체에서 숙성 중인 치즈와 숙성실에서 자생하는 분리 곰팡이균 8종에 대하여 항진균 실험을 진행한 결과는 table 13과 같다. 생육저지환의 모양과 크기로 항진균 활성을 평가한 결과, 최종 선발된 분리 유산균 6종은 곰팡이균 8종에 대하여 대부분 항진균 활성을 보였다. FB와 FH에는 6종의 분리 유산균 모두 대조균인 표준 유산균 *Leuconostoc citreum* KCTC3524보다 활성이 크게 나타났으며, FC와 FE에 대하여 6종의 분리 유산균은 대조균인 표준 유산균 *Leuconostoc citreum* KCTC3524과 비교하여 유사한 결과를 보였다. 특히, ALH가 곰팡이균 8종에 대하여 항진균 활성이 가장 큰 것으로 평가되었다.

Table 12. Antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi

Strain	Nomenclature
ALD	<i>L. sakei</i> subsp. ALJ011
ALH	<i>L. sakei</i> subsp. ALI033
ALJ	<i>L. sakei</i> subsp. ALGy039
ALL	<i>P. pentosaceus</i> ALJ015
ALS	<i>P. pentosaceus</i> ALJ024
ALT	<i>P. pentosaceus</i> ALJ026

ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T, ALJ: antifungal lactic acid bacteria from Kimchi in Jeonju 011, 015, 024, 026 ALI: antifungal lactic acid bacteria from Kimchi in Imsil 033, ALGy: antifungal lactic acid bacteria from Kimchi in Gyeonggi 039

Table 13. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi against cheese and cheese ripening room

Antifungal lactic acid bacteria	Fungi								
	FA	FB	FC	FD	FE	FF	FG	FH	
<i>L. citreum</i>	×	×	×	×	×	×	×	×	
ALD	×	×	×	×	×	×	×	×	
ALH	×	×	×	×	×	×	×	×	
ALJ	×	×	×	×	×	×	×	×	
ALL	×	×	×	×	×	×	×	×	
ALS	×	×	×	×	×	×	×	×	
ALT	×	×	×	×	×	×	×	×	

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each fungi. Degree of clear zone by growth inhibition: - : no inhibition, ×: below 10 mm, ××: 10~15 mm, ×××: above 15 mm, *L. citreum*: *Leuconostoc citreum* KCTC3524, FA~H: fungi A~H, ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T

(마) 유산균 배양액의 최소저해농도

최종 선발된 6종의 향진균 활성유산균의 향진균 활성에 있어 최소저해농도를 측정 한 결과는 table 14와 같다. FA 곰팡이균에 대하여 ALH 유산균의 MIC는 62.5 µg/mL로 가장 높게 나타났으며, 그 다음 ALL 유산균(MIC: 125 µg/mL, ADL 유산균(MIC: 250 µg/mL)순으로 나타났다. FB 곰팡이균에서는 ALH 유산균과 ALT 유산균의 MIC가 62.5 µg/mL로 가장 크게 나타났다. FC와 FH 곰팡이균에서는 6종의 유산균 모두 고른 향진균 활성을 보였다. 특히, FH 곰팡이균에 대하여 ALH, ALL 및 ALS 유산균이 MIC가 62.5 µg/mL로 크게 나타났다. FD와 FE 곰팡이균의 경우 ALH 유산균(MIC: 62.5 µg/mL)이, FF 곰팡이균에 대하여 ALS 유산균(125 µg/mL)의 향진균 활성이 크게 나타났다. 유산균 배양액의 최소저해농도를 측정해 본 결과, 생육저지환으로 알아본 향균활성 실험과 동일하게 분리 곰팡이균 8종에 대하여 ALH 유산균의 향진균 활성이 가장 크게 나타났다. 그 다음으로 ALL, ALS가 유사한 향진균 활성을 보였다.

Table 14. Minimum inhibitory concentration(MIC) of lactic acid bacteria isolated from Kimchi against cheese and cheese ripening room

($\mu\text{g/mL}$)

Antifungal lactic acid bacteria	Fungi								
	FA	FB	FC	FD	FE	FF	FG	FH	
<i>L. citreum</i>	>500	250	250	>500	62.5	>500	>500	125	
ALD	250	125	250	500	125	250	>500	125	
ALH	62.5	62.5	250	62.5	62.5	250	125	62.5	
ALJ	500	125	250	250	250	500	250	125	
ALL	125	250	125	500	125	250	>500	62.5	
ALS	250	250	125	500	125	125	>500	62.5	
ALT	>500	62.5	250	>500	125	250	500	125	

L. citreum: *Leuconostoc citreum* KCTC3524, FA~H: fungi A~H, ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T

(4) 선발 유산균의 특성 규명

(가) 선발 유산균의 최적 배양조건

① 배양시간에 의한 영향

최종 선발된 6종 유산균의 배양시간에 의한 균체생육 변화를 확인하기 위해 30°C에서 5시간 간격으로 흡광도 및 pH를 측정하여 확인하였다. 6종의 유산균들은 배양 5시간부터 빠르게 증가하다가 20시간에서 성장이 완화된 경향을 보였으나 시간에 따른 유산균별 차이는 확인할 수 없었다(Fig. 15). 또한 유산균의 생육에 따라 5시간 간격으로 pH를 측정한 결과 유산균의 생육이 증가할수록 pH가 낮아졌으며, 이는 균체 생육에 따른 유기산 생성에 의한 저하로 추정되었다(Fig. 16).

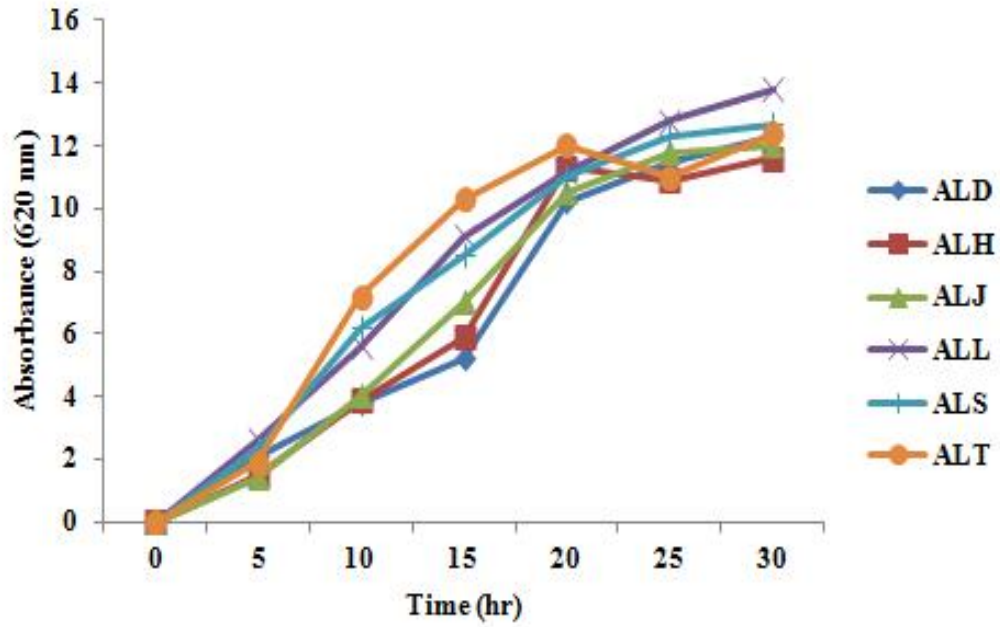


Fig. 15. Time course of antifungal lactic acid bacteria growth. ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

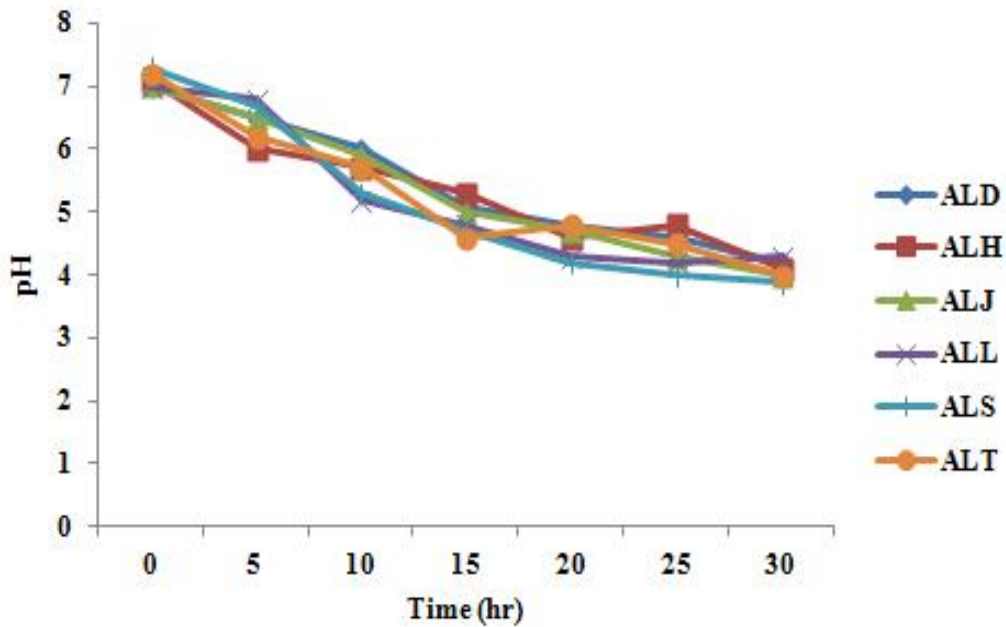


Fig. 16. pH course of antifungal lactic acid bacteria growth. ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

② 초기 pH 및 온도에 의한 영향

최종 선발된 6종 유산균의 최적 pH를 결정하기 위해 기본 배지의 초기 pH를 4에서 10까지 변화시켜 30℃에서 20시간 배양한 후 균체의 생육정도는 흡광도를 측정하여 확인하였다(Fig. 17). 6종의 유산균체 생육을 위한 적정범위는 pH 6~8이며, 최적 pH는 7임을 확인할 수 있었다. 또한 최적의 온도를 결정하기 위해 배양 온도를 25, 30, 37, 40, 50℃로 변화시켜 배양 20시간 후 유산균의 생육정도를 확인하였다(Fig. 18). 6종의 유산균체의 생육은 25~40℃까지는 비교적 높은 활성을 나타냈으나 50℃에서는 생육이 현저히 감소되었다. 유산균체 생육을 위한 최적의 온도는 30℃이며, 50℃ 이상에서는 생육에 영향을 미쳐 활성이 떨어지는 것을 확인하였다.

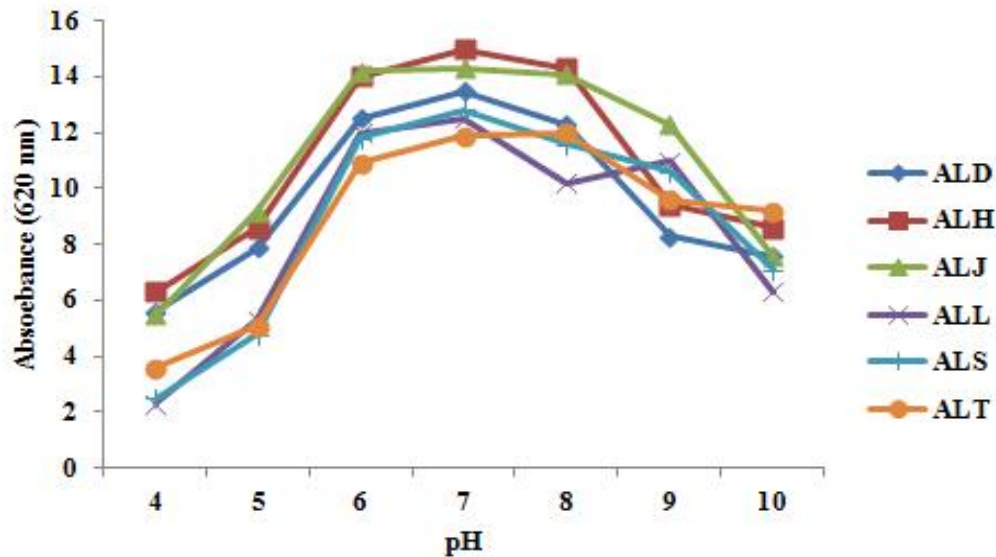


Fig. 17. Effect of initial pH on antifungal lactic acid bacteria growth. ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

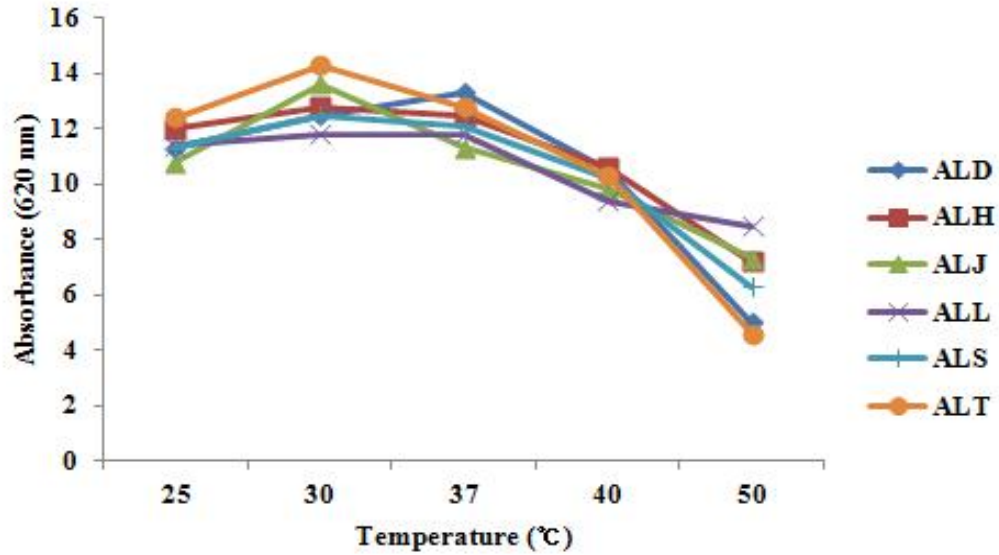


Fig. 18. Effect of initial temperature on antifungal lactic acid bacteria growth. ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

(나) 단백질 응고성

최종 선발된 6종 유산균에 의한 유단백질의 응고성을 확인하기 위해 커드형성 특성을 상업균주인 *Str. thermophilus* Body-1과 비교하였다. Table 15에서와 같이 6종의 유산균 중 ALH, ALL, ALS는 상업균주와 유사한 수준으로 단백질 응고력을 보이며 12시간에 유단백질이 응고되었으나, ALD, ALJ, ALT 유산균은 같은 배양시간 동안 비교적 낮은 수준의 응고력을 보였다. ALH, ALL, ALS 균주의 단백질 응고력은 치즈 starter로서 적합하게 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 15. Coagulation of milk protein by antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi

Strain	<i>Str. thermophilus</i> Body-1	ALD	ALH	ALJ	ALL	ALS	ALT
Coagulation of milk protein	++	+	++	+	++	++	+

-: No coagulation, +: Weak coagulation, ++: coagulation, ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T

(다) 단백질 분해력

치즈 starter로서의 사용 가능성을 평가하기 위해 최종 선발된 6종 유산균의 단백질 분해력을 확인한 결과는 fig. 19와 같다. 6종의 유산균의 단백질 분해력은 단백질 분해에 의해 유리되는 tyrosine의 양을 측정하여 비교하였다. 최종 선발 유산균 모두 배양시간이 증가함에 따라 단백질 분해력이 지속적으로 증가하였으며 24시간까지 분해력을 유지하였다. 특히, ADL 유산균이 16시간 이후 비교적 높은 단백질 분해력을 보였으나 6종의 유산균의 단백질 분해력은 유의적 차이를 보이지 않았으며 특히, 대조군으로 사용된 시판용 치즈 스타터인 *Str. thermophilus* Body-1과 유사한 분해력을 보여 치즈 starter로서의 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

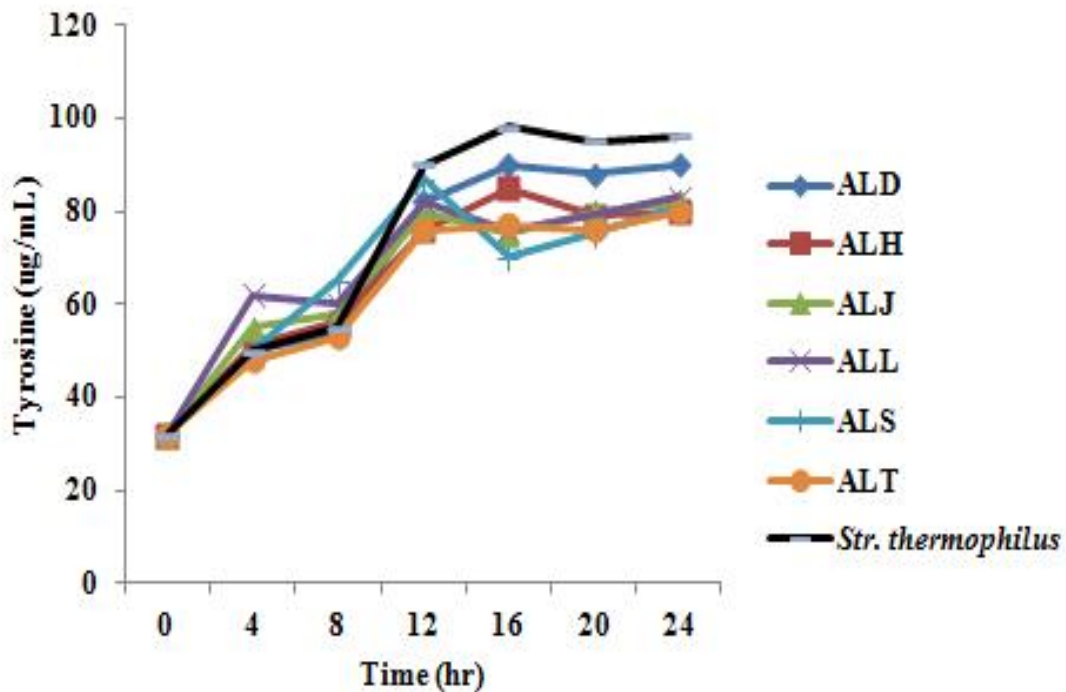


Fig. 19. Proteolytic activity of antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi in 10% reconstituted skim milk at 30°C. *Streptococcus thermophilus*: *Str. thermophilus* Body-1, ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

(라) 내산성

최종 선발된 6종 유산균의 내산성은 pH 3.0의 조건에서 30℃, 24시간 동안 배양한 후 시간대별(0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24시간)로 유산균의 생육도를 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 20). 산성조건(pH 3.0)에서 시간에 따른 6종 유산균의 생육은 감소하는 경향을 보였으나 *Lactobacillus sakei* subsp.인 ALD, ALH 및 ALJ 유산균들은 산성 조건에서 다른 유산균과 비교하여 보다 잘 견디는 것으로 확인하였다. *Pediococcus pentosaceus*인 ALL, ALS 및 ALT 유산균들은 16시간 이후 현저히 생육이 감소하였으며 20시간 이후에는 대부분 사멸하여 *Lactobacillus sakei* subsp. 균주보다 산성 조건에서 생육도가 저하되었다. 최종 선발된 유산균 중 위를 통과한 후 체내 산성조건에서 장시간 활성을 유지하기 위한 조건에는 *Lactobacillus sakei* subsp.인 ALD, ALH 및 ALJ 유산균이 보다 적합할 것으로 판단되었다.

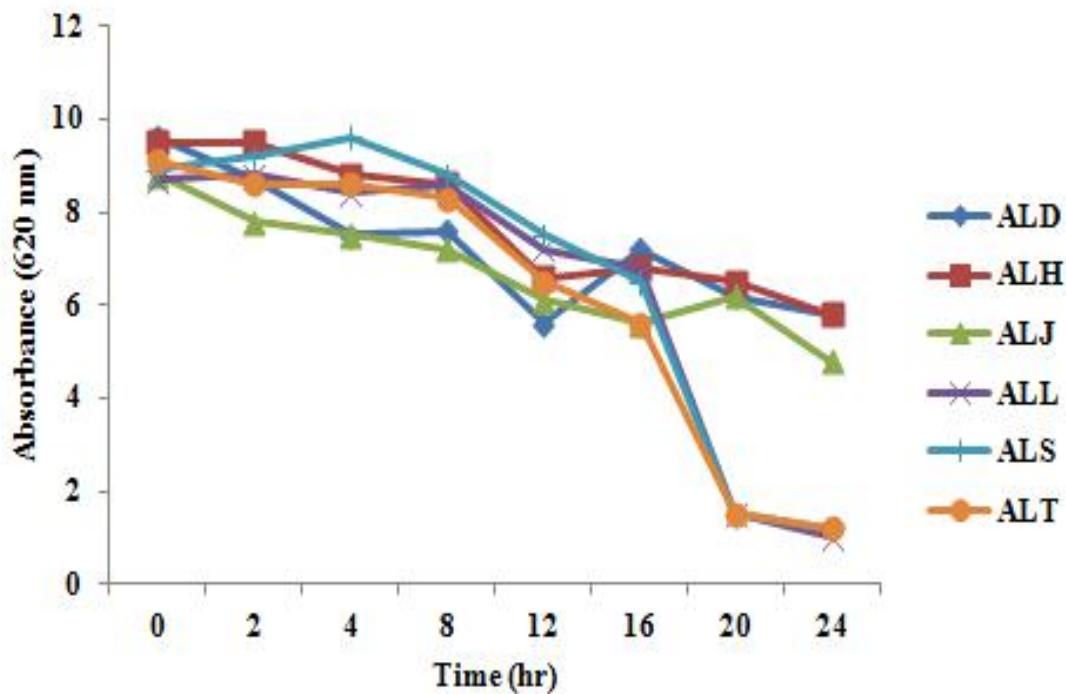


Fig. 20. Acid resistance of antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi in MRS broth(pH 3.0) at 30℃. ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T.

(마) 유기산 정량

최종 선발된 6종 유산균이 생성하는 유기산을 분석한 결과는 table 15와 같다. 대조구로 사용한 MRS 액체배지에는 타타르산(tartaric acid)이 14,087 mg/mL으로 가장 높은 함량으로 존재하였으며 아세트산(acetic acid), 시트르산(citric acid), 젖산(lactic acid)의 순으로 존재하였다. 그러나 숙신산(succinic acid)은 검출되지 않았다. 선발 유산균 6종의 배양액을 분석한 결과, 6종의 유산균 모두 젖산의 함량이 가장 많았으며 대조구와 비교하여 약 150배 증가된 것으로 선발 유산균의 발효에 의해 젖산이 다량 생성됨을 확인할 수 있었다. 아세트산의 함량도 크게 증가하여 대조구에 비해 4배가량 증가되었다. 그러나 말산(malic acid)과 타타르산은 배양 후 크게 감소하였는데 이것은 유산균의 유기산 대사 과정에서 말산과 타타르산로부터 젖산이 생성되었을 것으로 추정되었다.

Table 15. Organic acid content in culture supernatant of antifungal lactic acid bacteria isolated from Kimchi

	Acetic acid	Citric acid	Lactic acid	Malic acid	Succinic acid	Tartaric acid
Control (MRS)	4,254	2,354	287	758	-	14,087
ALD	18,254	2,547	40,254	-	-	7,854
ALH	15,875	3,546	50,247	246	-	5,954
ALJ	17,854	4,102	45,242	259	-	6,579
ALL	17,895	3,864	43,254	-	-	6,940
ALS	18,005	3,598	47,258	-	-	6,982
ALT	16,358	3,549	45,365	278	-	6,497

ALD, H, J, L, S, T: antifungal lactic acid bacteria D, H, J, L, S, T

(5) 천연물소재 추출물의 항진균 활성 스크리닝

천연소재 중 솔잎, 엉겅퀴, 오행초, 함초, 뽕잎, 뱀딸기 추출물을 곰팡이 5종에 대하여 항진균 활성을 확인하였다. 각 소재를 70% ethanol로 추출한 후 농축하여 disc diffusion method를 이용하여 항진균 활성을 확인한 결과를 fig. 21에 나타냈다. 각 추출물을 8 mm disc에 20 μ L 떨어뜨려 25 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양 후 항진균 활성을 확인한 결과 모든 추출물에 대하여 항진균 활성을 나타내지 않았다.

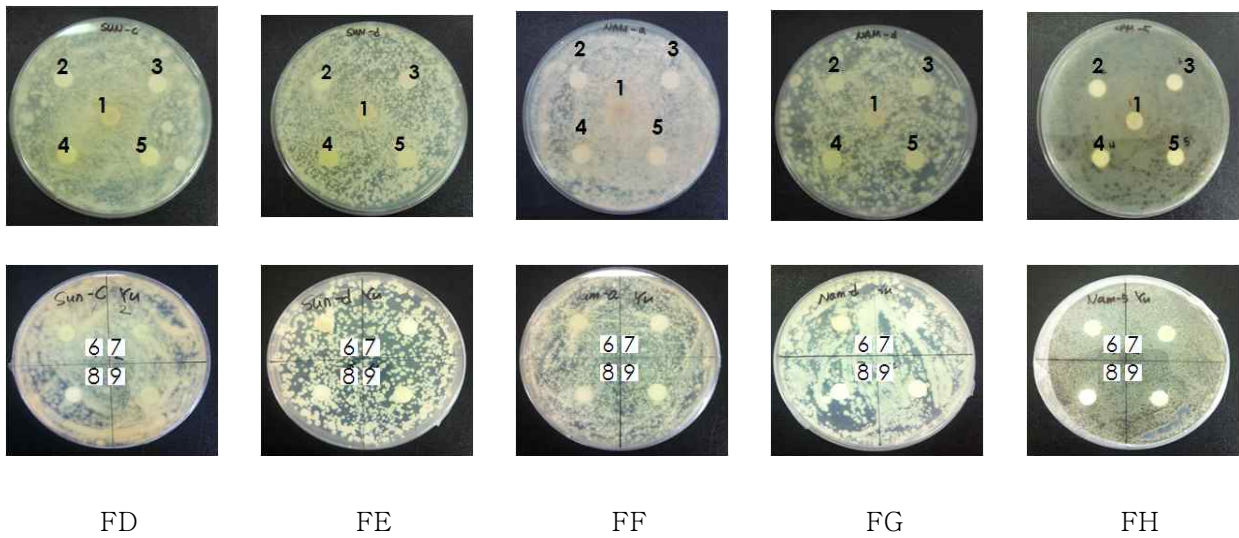


Fig. 21. Screening of antifungal effect for natural resources extracted by ethanol. FD: *Penicillium roqueforti* FS04, FE: *Penicillium echinulatum* FS05, FF: *Penicillium polonicum* FS06, FG: *Penicillium solitum* FS07, FH: *Cladosporium sphaerospermum* FS08. 1: pine needle extract, 2: *Cirsium japonicum* extract, 3: *Portulaca oleracea* L. extract, 4: *Salicornia herbacea* L. young leaf extract, 5: *Salicornia herbacea* L. extracts, 6: *Morus alba* L. leaf extract 7: *Morus alba* L. leaf chlorophyll, 8: *Duchesnea indica* (Andr.) Focke extract, 9: Medicinal Herb extract.

(6) 정유의 항진균 활성 스크리닝 및 적용 가능한 정유 선별

(가) 정유의 항진균 활성

시중에 판매되고 있는 정유(essential oil) 중에서 치즈 및 치즈 숙성실에 자생하는 곰팡이 대한 항진균 활성을 가지는 정유를 선별하고자 하였다. 판매되고 있는 정유 중에서 식품 소재로서 사용가능한 원료를 1차 선별하고 7종의 정유에 대하여 disc diffusion method를 이용하여 항진균 활성을 측정하였다. 사용된 정유는 바질유(basil oil), 송엽유(pine needle oil), 박하유(peppermint oil), 스페어민트유(spearmint oil), 계피유(cinnamon oil), 생강유(ginger oil), 레몬유(lemon oil)이었다. 항진균 활성을 평가 시 PDA 평판배지에 분리 곰팡이 5종을 각각 400 μ L를 접종하여 도달하고 8 mm disc에 essential oil 10 μ L 떨어뜨려 5일간 배양 후 disc 주변의 생육저지환을 확인하였다. 항진균 활성을 비교한 결과, 계피유 > 바질유 > 스페어민트유 > 레몬유 > 생강유 > 박하유 > 송엽유의 순으로 나타났다. 분리 곰팡이 5종에 대해 모두 활성을 나타낸 것은 계피유와 바질유였으며, 박하유와 송엽유는 전혀 효과를 나타내지 않았다 (Table 17, Fig. 22).

Table 17. Screening of antifungal effect for commercial essential oil

Essential oil	Strain				
	FD	FE	FF	FG	FH
Cinnamon	+++	+++	+++	+++	+++
Basil	++	++	++	++	++
Spearmint	-	++	++	-	++
Lemon	++	-	-	-	+
Ginger	-	-	+	-	-
Peppermint	-	-	-	-	-
Pine needle	-	-	-	-	-

FD: *Penicillium roqueforti* FS04, FE: *Penicillium echinulatum* FS05, FF: *Penicillium polonicum* FS06, FG: *Penicillium solitum* FS07, FH: *Cladosporium sphaerospermum* FS08.

가) Cinnamon oil



나) Basil oil



다) Spearmint oil



라) Lemon oil



마) Ginger oil



바) Peppermint oil



사) Pine needle oil



FD

FE

FF

FG

FH

Fig. 22. Screening of antifungal effect for commercial essential oil. FD: *Penicillium roqueforti* FS04, FE: *Penicillium echinulatum* FS05, FF: *Penicillium polonicum* FS06, FG: *Penicillium solitum* FS07, FH: *Cladosporium sphaerospermum* FS08.

(나) 정유의 최소저해농도

스크리닝을 통하여 치즈의 숙성 시 오염에 관여하는 곰팡이를 억제하기 위하여 정유(essential oil)를 적용하는데 있어 가능성을 확인하였으며, 그 중 활성이 좋은 계피유(cinnamon oil)와 바질유(basil oil), 그리고 계피 수피유(cinnamon bark oil)의 농도에 따른 분리 곰팡이 8종에 대한 항진균 활성을 확인하여 table 18과 19에 나타내었다. 바질유의 경우 8 mm disc 당 2, 4, 6, 8 μL 의 농도로 떨어뜨려 투명환의 크기를 확인한 결과 FA, FB, FC, FH의 경우 모든 처리량에 따라 항진균 활성을 나타내었으나, FG는 4 μL , FD, FE의 경우 처리량 6 μL 부터 항진균 활성을 나타내었다. 따라서 바질유의 경우 모든 균주에 대하여 6 μL 이상의 처리부터 항진균 활성을 얻을 수 있었다. 계피유와 계피 수피유의 경우 8 mm disc 당 0.2, 0.5, 1, 2 μL 의 농도로 처리하여 항진균 활성을 확인하였다. 계피유는 FD를 제외한 모든 곰팡이에 대하여 0.5 μL 이상의 처리량부터 항진균 활성을 얻을 수 있었으며, 1 μL 이상의 처리구부터 8종의 모든 곰팡이균에 대하여 항진균 활성을 얻을 수 있었다. 계피 수피유의 경우 FC, FD를 제외한 6종의 곰팡이에 대하여 0.2 μL 처리량부터 항진균 활성을 얻을 수 있었으며, FC의 경우 0.5 μL 처리량부터 그리고 FD의 경우 1 μL 처리량부터 항진균 활성을 얻을 수 있었다. 따라서 계피유와 계피 수피유의 경우 치즈로부터 분리된 8종의 곰팡이균에 대하여 1 μL 이상의 처리부터 항진균 활성을 얻을 수 있었다.

Table 18. Antifungal effect of basil oil by concentration

Strain	Basil (μL)			
	2	4	6	8
FA	12.50 \pm 0.71	15.00 \pm 0.10	19.00 \pm 1.41	18.50 \pm 4.36
FB	15.00 \pm 0.15	17.00 \pm 0.21	14.25 \pm 3.40	17.50 \pm 2.89
FC	10.50 \pm 0.71	11.50 \pm 0.71	12.50 \pm 3.54	15.50 \pm 0.71
FD	-	-	11.00 \pm 0.05	13.00 \pm 0.02
FE	-	-	10.00 \pm 0.10	15.00 \pm 0.11
FF	-	-	11.50 \pm 1.73	14.50 \pm 1.73
FG	-	12.50 \pm 0.71	13.50 \pm 0.71	15.00 \pm 0.10
FH	10.50 \pm 0.71	12.25 \pm 0.50	14.25 \pm 0.96	16.75 \pm 0.96

Table 19. Antifungal effect of cinnamon and cinnamon bark oil by concentration

Strain	Cinnamon (μL)				Cinnamon bark (μL)			
	0.2	0.5	1	2	0.2	0.5	1	2
FA	-	13.25 \pm 0.50	22.50 \pm 4.20	27.50 \pm 2.89	20.00 \pm 0.00	22.50 \pm 3.54	30.00 \pm 2.83	43.00 \pm 2.83
FB	-	10.50 \pm 0.58	17.25 \pm 5.50	26.00 \pm 9.98	20.50 \pm 0.71	29.50 \pm 0.71	34.00 \pm 1.41	38.50 \pm 2.12
FC	-	15.00 \pm 0.10	22.50 \pm 3.54	29.00 \pm 1.41	-	19.50 \pm 0.71	26.00 \pm 1.41	39.50 \pm 3.54
FD	-	-	18.50 \pm 0.71	19.75 \pm 5.12	-	-	15.00 \pm 0.00	29.00 \pm 1.41
FE	-	11.50 \pm 2.12	14.00 \pm 0.10	19.50 \pm 0.71	19.00 \pm 1.41	27.50 \pm 3.54	32.50 \pm 2.12	38.00 \pm 2.83
FF	-	16.00 \pm 0.10	18.00 \pm 0.14	25.00 \pm 2.16	18.50 \pm 0.71	22.50 \pm 3.54	31.00 \pm 1.41	34.50 \pm 0.71
FG	-	10.50 \pm 0.71	16.00 \pm 1.41	24.00 \pm 0.11	16.50 \pm 2.12	26.00 \pm 1.41	31.00 \pm 5.66	41.00 \pm 1.41
FH	-	13.50 \pm 1.73	16.00 \pm 4.62	33.25 \pm 7.89	24.00 \pm 1.41	26.00 \pm 1.41	37.50 \pm 2.12	44.50 \pm 3.54

FA: *Penicillium solitum* strain FI01, FB: *Penicillium brevicompactum* strain FI02, FC: *Cladosporium* sp. FI03, FD: *Penicillium roqueforti* FS04, FE: *Penicillium echinulatum* FS05, FF : *Penicillium polonicum* FS06, FG: *Penicillium solitum* FS07, FH : *Cladosporium sphaerospermum* FS08

(7) 항진균 활성 소재의 추출방법에 따른 활성

(가) 계피의 용매별 추출에 따른 항진균 활성

정유(essential oil) 중 항진균 활성이 가장 큰 계피에 대하여 추출용매에 따른 항진균 활성을 확인하였다(Fig. 23, Table 20). 계피 열수추출물 처리구에서는 생육저지환이 전혀 형성되지 않아 항진균 활성이 없는 것으로 나타났으나 계피 주정추출물과 계피 메탄올추출물 처리구에서는 각각 40 mm, 42 mm 이상의 생육저지환을 형성하며 강한 항진균 활성을 보였다. 계피의 항진균 활성을 나타내는 주요성분인 신남알데히드(cinnamaldehyde), 유제놀(eugenol) 등의 성분들이 물보다는 에탄올과 메탄올과 같은 유기용매에 추출수율이 높아지는 것으로 사료되었다. 상기의 결과로 항진균 활성 물질인 계피를 식품에 적용할 때 계피 주정 추출물을 이용하는 것이 인체에 유해하지 않는 범위에서 항진균 활성을 극대화 할 수 있을 것으로 판단되었다.

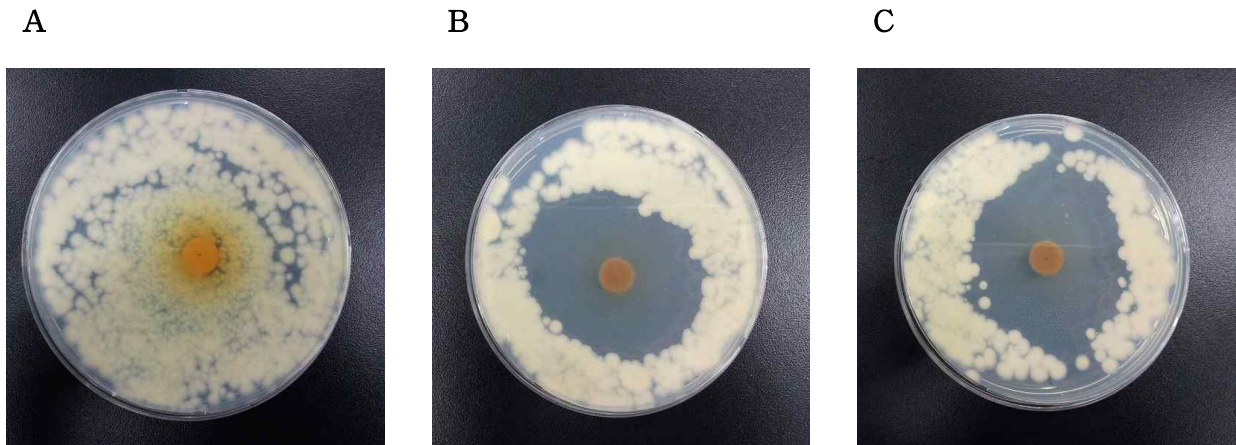


Fig. 23. Antifungal effect of cinnamon for solvent type. A: Water extract 200 µL, B: Ethanol extract 200 µL, C: Methanol extract 200 µL.

Table 20. Antifungal effect of cinnamon for solvent type

	Water extract	Ethanol extract	Methanol extract
Clear zone (mm)	0	40	42

(나) 계피 및 바질의 초임계 추출에 따른 항진균 활성

정유(essential oil) 중 활성이 좋은 계피와 바질의 초임계 추출에 따른 항진균 활성을 확인하였다. 초임계 추출은 추출압력 400 bar, 추출시간 180 min, 추출온도 35°C의 조건으로 추출하였으며, 용매 없이 추출 후 시료를 메탄올로 회수한 시료(A)와 시료를 메탄올에 40°C, 24시간 침지 후 초임계 추출(B)하여 확인하였다(Table 21). 추출 조건에 따라 항진균 활성을 확인해 본 결과 A의 시료의 경우 FF균에 대하여 10, 20 µL의 처리 시 효과가 약간 나타났으며, FB, FH에 대하여 20 µL처리 시 약간의 항진균 활성을 나타내었다. 초임계 추출 B의 시료의 경우 모든 처리구에서 항진균 활성을 나타내지 않았다. 바질 시료의 경우 초임계 추출에 따라 모든 처리구에서 항진균 활성을 나타내지 않았다. 따라서 다른 추출방법에 비하여 치즈 및 치즈 숙성실 분리 곰팡이균의 항진균 활성에 초임계 추출방법은 적합하지 않은 것으로 생각된다.

Table 21. Antifungal effect of supercritical fluid extracts from cinnamon powder

Strain	Cinnamon A (µL)		Cinnamon B (µL)	
	10	20	10	20
FA	-	-	-	-
FB	-	11.50 ± 0.50	-	-
FC	-	-	-	-
FD	-	-	-	-
FE	-	-	-	-
FF	10.00 ± 0.45	14.25 ± 0.50	-	-
FG	-	-	-	-
FH	-	11.25 ± 0.24	-	-

FA: *Penicillium solitum* strain FI01, FB: *Penicillium brevicompactum* strain FI02, FC: *Cladosporium* sp. FI03, FD: *Penicillium roquefortii* FS04, FE: *Penicillium echinulatum* FS05, FF: *Penicillium polonicum* FS06, FG: *Penicillium solitum* FS07, FH: *Cladosporium sphaerospermum* FS08

(8) 치즈 발효 유산균에 대한 정유의 항균 활성

항진균 활성을 나타낸 계피유(cinnamon oil)와 계피 수피유(cinnamon bark oil)가 치즈 발효에 관여하는 유산균의 생육 저해가 나타내는지 확인하기 위해서 치즈의 제조 시 사용되는 유산균제제 2종에 대하여 항균 활성을 확인하였다. Table 22에 나타낸 바와 같이 ABT-5 균주에 대하여 계피유와 계피 수피유의 모든 처리구에 대하여 항균 활성을 나타내지 않아, 치즈 발효에 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다. 그러나, FLORA DANICA균주의 경우 2가지 정유에 대하여 0.5 µL 이상의 처리부터 항균 활성을 나타내어 치즈의 발효 시부터 정유를 사용하는데 있어서 농도 제한이 있을 것으로 생각된다.

Table 22. Antibacterial effect of cinnamon, cinnamon bark, and basil oil

Essential oil (µL)	Strain	
	ABT-5 ¹⁾	FLORA DANICA ²⁾
Cinnamon oil	0.2	-
	0.5	11.75 ± 0.96 ³⁾
	1	16.50 ± 2.08
	2	20.50 ± 0.58
Cinnamon bark oil	0.2	-
	0.5	14.75 ± 0.50
	1	20.50 ± 1.29
	2	21.25 ± 2.06
Basil	2	-
	4	-
	6	-
	8	11.00 ± 0.00

1) The strain is mixed by *L. acidophilus*, *S. thermophilus*

2) The strain is mixed by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*

3) Clear zone (mm) ± SD

(9) 정유의 성분분석

(가) 계피유 및 계피 수피유

계피유(cinnamon oil)와 계피 수피유(cinnamon bark oil)의 성분을 GC로 분석한 결과 계피유의 경우 retention time 28.731 min이 주요 peak로 나타났으며, 계피 수피유의 경우 retention time 26.480 min이 주요 peak로 나타났다. 이의 성분 확인을 위하여 GC-MS로 분석한 결과 계피유의 주요성분은 유제놀(eugenol)이 주요 피크로 확인되었으며, 계피 수피유의 경우 신남알데히드(cinnamaldehyde)로 나타났다(Fig. 24).

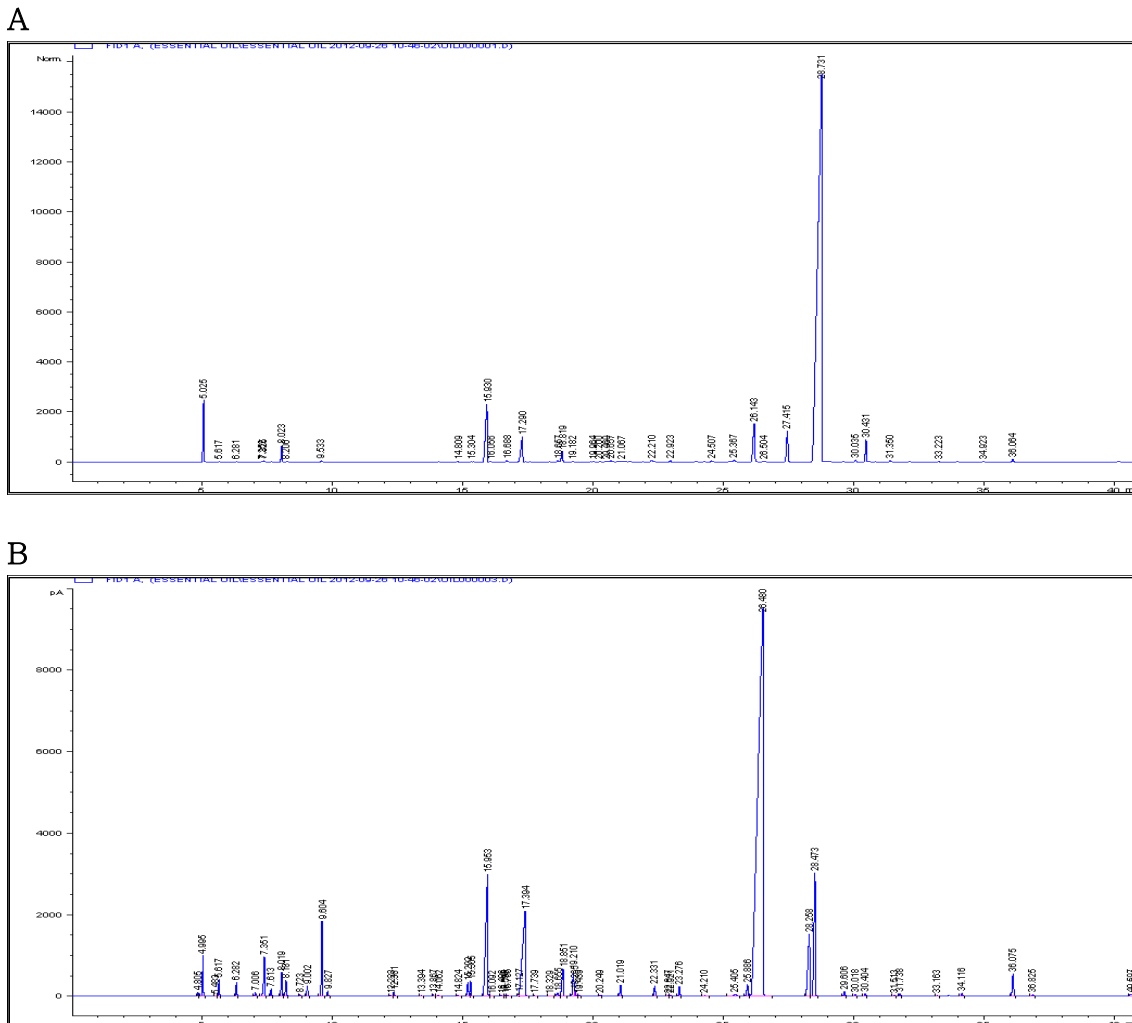


Fig. 24. Gas chromatogram of cinnamon oil and cinnamon bark oil. A: cinnamon oil, B: cinnamon bark oil.

(나) 바질유

바질유(basil oil)을 GC를 통하여 성분분석을 한 결과 RT값 16.028과 19.060 min이 주요 peak로 나타났으며, GC-MS로 성분을 확인 한 결과 리나놀(linalool)과 에스트라골(estragol)으로 확인되었다(Fig. 25).

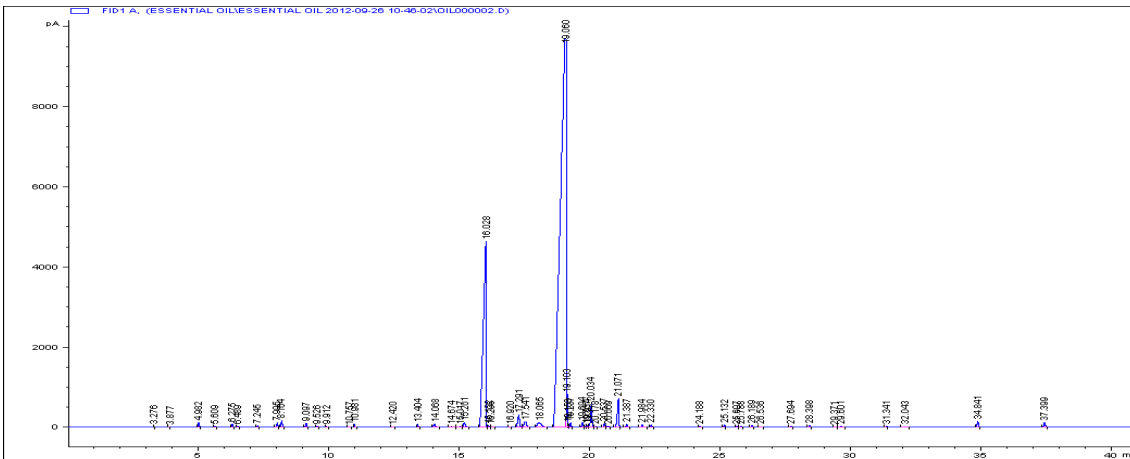


Fig. 25. Gas chromatogram of basil oil.

나. 항진균 물질을 이용한 자연치즈의 제조기술 개발

(1) 항진균 활성 유산균의 생육특성

(가) 유산균 생육활성 측정 (pH/32℃&42℃, MRS broth)

항진균 활성 유산균의 산 생성능력을 알아보기 위하여 배양 중 pH를 측정하여 결과는 fig. 26 와 27과 같이 나타났다. 대조구로 사용된 표준유산균주인 3524균주와 최종 선발된 6종의 유산균을 32℃와 42℃에서 14시간 동안 배양한 결과 모든 유산균에서 낮은 산 생성력을 나타내었다. 일반적으로 발효유제품을 제조하기 위해서는 산 생성력이 높은 유산균주를 사용하여 스타터를 제조하여 발효중점(end point) pH 4.5~4.6 범위(배양시간 : 4~10 hrs.)에서 발효유제품 제조에 사용되는데 본 연구에 사용된 대조구와 모든 김치 유래 항진균 활성 유산균은 pH 6.3 ~5.8로 낮은 산 생성력을 나타내었다.

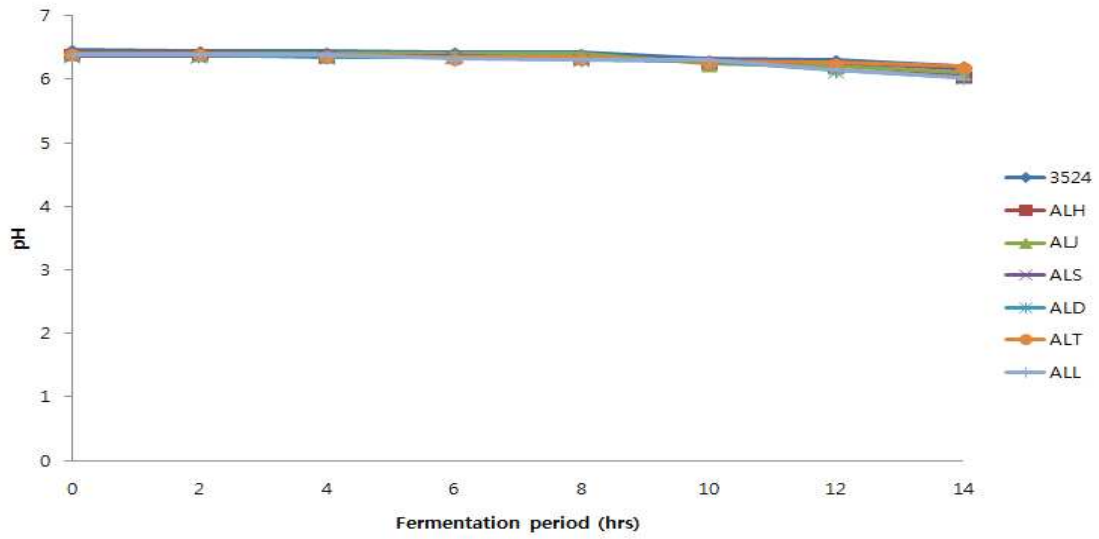


Fig. 26. Change of pH during fermentation by the antifungal lactic acid bacteria cultures in MRS broth (32°C).

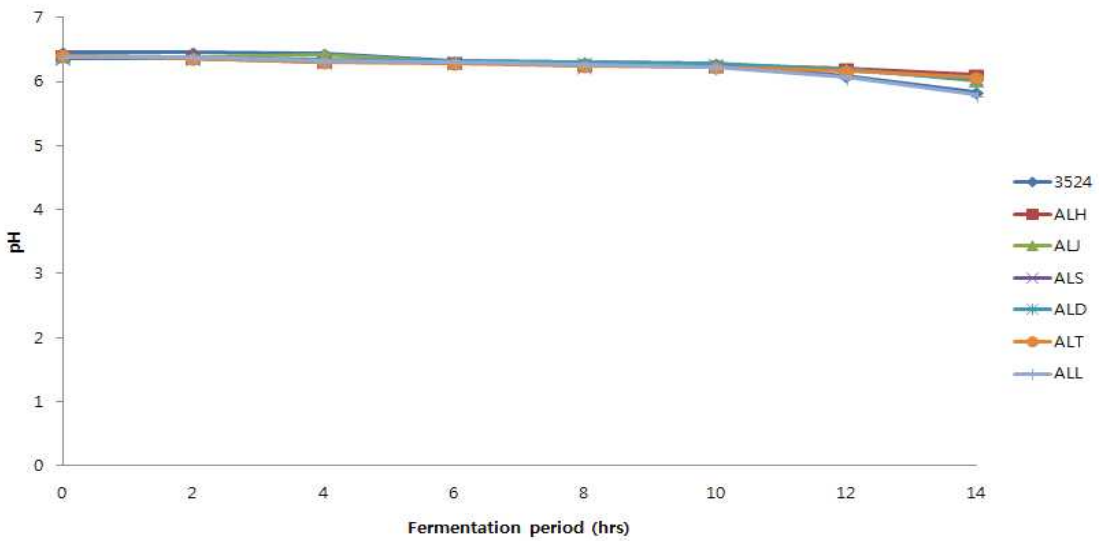


Fig. 27. Change of pH during fermentation by the antifungal lactic acid bacteria cultures in MRS broth (42°C).

(나) 유산균 생육활성 측정 실험(O.D. 660nm/MRS broth(42℃))

배양 중 항진균 유산균의 생육활성을 알아보기 위해 실험한 결과는 fig. 28과 같이 나타났다. 배양시간은 총 36시간 동안 측정하였으며 배양 6시간 째 대조구로 사용된 표준균주인 3524균주와 ALJ가 가장 낮은 생육활성을 보였다. ALJ는 배양 12시간 이후 급격하게 증가하여 배양 24시간 이후에는 ALJ를 비롯한 김치유래 항진균 활성 유산균의 증식이 대조구보다 높은 증식을 나타내었다.

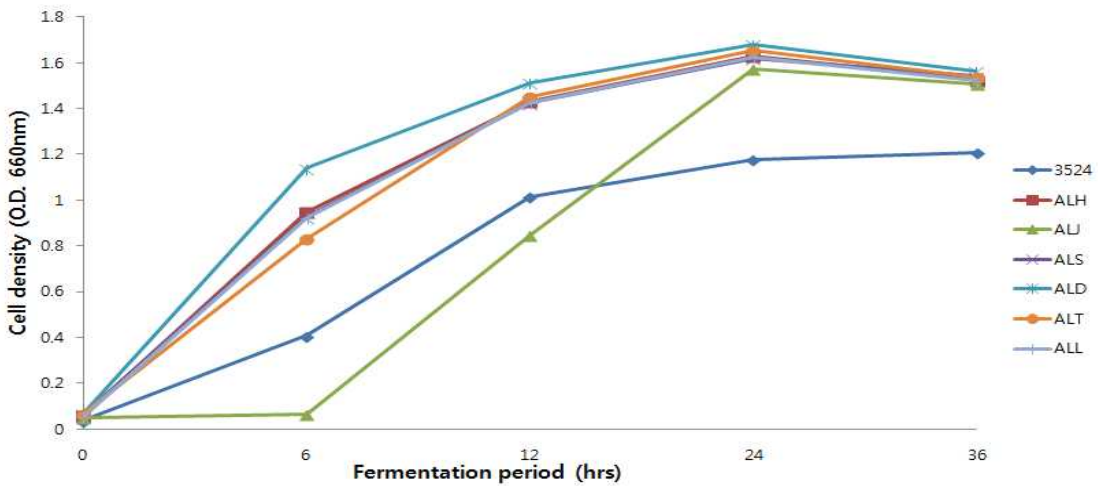


Fig. 28. Change of cell density(LAB) during fermentation by the antifungal lactic acid bacteria cultures in MRS broth (42℃).

(2) 항진균 활성 유산균을 이용한 스타터 배양액 제조

(가) 자연치즈 제조를 위한 스타터 배양액 제조

10% 환원 탈지유에 32℃와 42℃에서 각각의 균주를 접종한 후 48시간동안 배양한 결과 아래 그림과 같이 정상적인 산에 의한 단백질 응고현상은 일어나지 않았다. 일반적인 숙성형 자연치즈 제조에 사용되는 FLORA DANICA(FD)균주와 항진균 활성 유산균의 스타터 제조실험 결과 동일한 시간(8시간)에 FD는 유산에 의해 유단백질이 응고하였으나 혼합 접종한 항진균 유산균은 fig. 29에서와 같이 액체상태를 그대로 유지하여 치즈 제조에 사용할 수 있는 스타터 제조는 이뤄지지 않았다.



Fig. 29. Manufacturing experiment by the antifungal lactic acid bacteria cultures in 10% skim milk (32°C & 42°C).

(나) 항진균 활성 유산균을 이용한 스타터 개발

Fig. 28의 결과와 같이 MRS 액체배지에서는 모든 항진균 활성 유산균수는 높은 생육 활성을 나타내었지만 스타터 제조를 위한 산 생성력이 매우 낮아 스타터 제조에는 부정적인 결과를 보였었다. 하지만 항진균 활성 유산균을 이용한 숙성형 자연치즈를 제조하기 위한 추가 실험으로 10% 환원탈지유에 각각의 균주를 접종한 뒤 배양 12시간과 24시간째에 균수를 측정 한 결과 대조구를 비롯한 모든 유산균주가 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{11}$ CFU/mL의 높은 유산균수를 나타 내었으며, 배양 24시간째에는 중온균 스타터인 FD보다 김치유래 항진균 활성 유산균이 더 높은 생육활성을 나타내어 FD와 함께 숙성형 자연치즈 제조 시 사용하였다(Fig. 30).

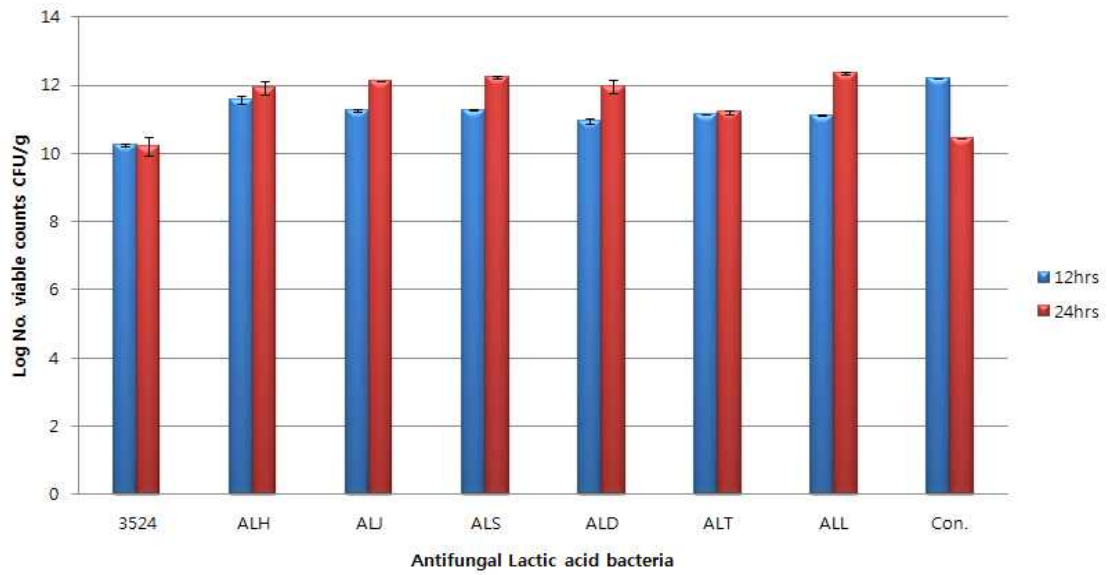


Fig. 30. Change of viable cell counts during fermentation by the antifungal lactic acid bacteria cultures in 10% skim milk (42°C).

(3) 항진균 활성평가를 위한 아시아고치즈의 숙성 중 특성평가

(가) pH

항진균 활성 유산균을 이용한 아시아고치즈의 숙성 중 pH 변화는 fig.31에서와 같이 나타났다. 숙성 0일차에서 실험 구간의 pH 범위는 pH 5.2~5.4 범위에 있었으며, 숙성 종료시점인 24주차에는 점차 낮아져 pH 5.0~5.2 범위를 나타내었다. 항진균 활성 유산균을 접종한 아시아고치즈의 숙성 중 pH 변화는 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p < 0.05$).

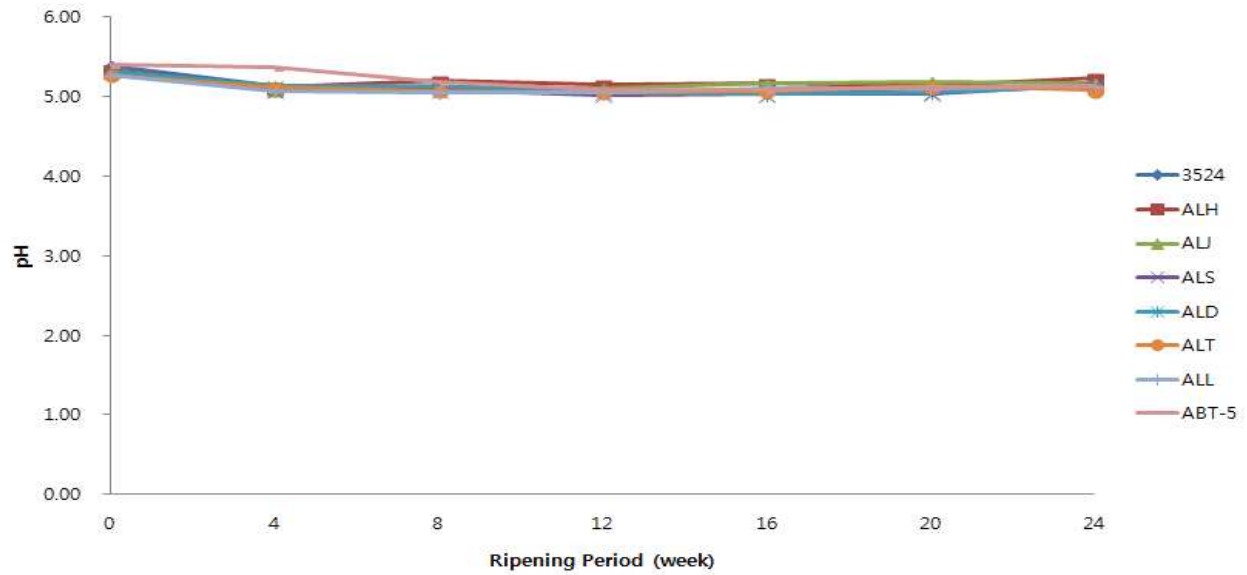


Fig. 31. Change of pH during the ripening of Asiago cheese added with antifungal lactic acid bacteria.

(나) 유산균 수

항진균 활성 유산균을 이용한 아시아고치즈의 숙성 중 유산균 수의 변화는 fig. 32에서와 같이 나타났다. 숙성 0주차에는 실험구간의 유산균 수는 7.3~9.46 log CFU/g으로 ALD와 ALT 처리구에서 가장 많은 유산균수를 보였으며, ALH 처리구에서 가장 낮은 유산균 수를 나타내었다. 숙성 24주차의 실험구간의 유산균수는 log. 7.1~8.2범위를 나타내어 숙성기간이 경과될수록 자연적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

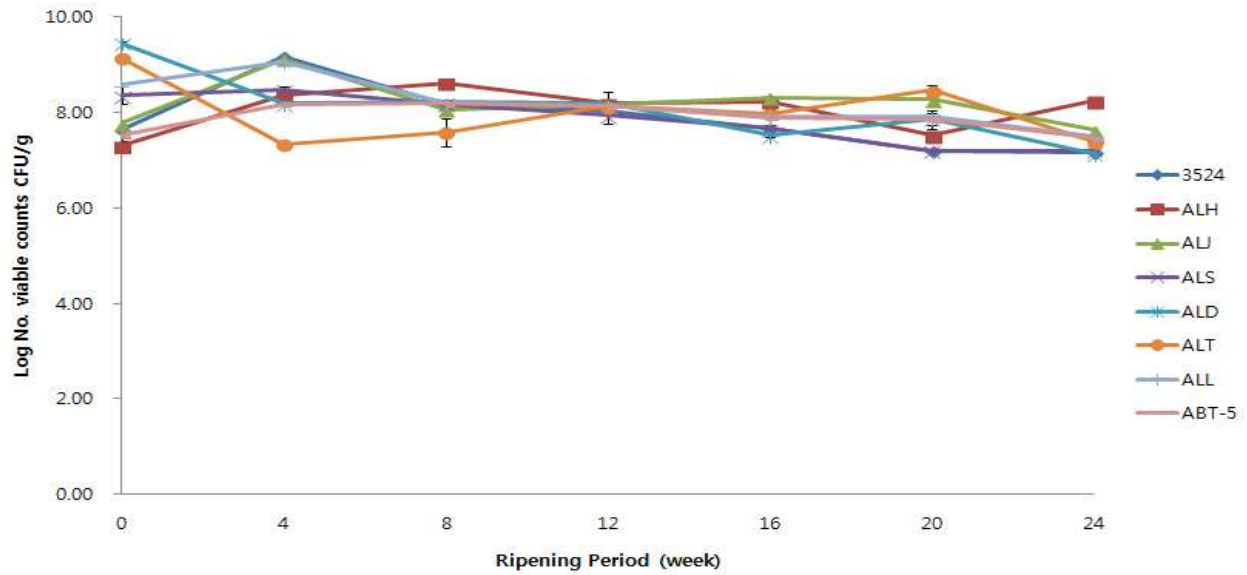


Fig. 32. Change of Viable cell counts(LAB) during the ripening of Asiago cheese added with antifungal lactic acid bacteria.

(다) 수용성 질소화합물 함량

항진균 활성 유산균을 이용한 아시아고치즈의 숙성 중 WSN의 변화는 fig. 33에서와 같이 나타났다. 숙성 0주차에는 0.2~0.34 범위로 실험구간의 유의적 차이는 나타나지 않았다($p < 0.05$). 숙성 8주차 이후에는 ALL가 숙성도가 가장 높은 경향을 나타낸 반면 ALD는 낮은 숙성도를 나타내었다. 항진균 활성 유산균 단일 균주를 이용하여 스타터를 제조하였을 때에는 낮은 산생성으로 인해 치즈제조용 스타터로서 적합하지 않았지만 아시아고치즈 제조에 사용하는 ABT-5 복합균주를 함께 접종함으로써 24주간 숙성과정을 거치면서 모든 처리구에서 원활한 숙성도를 나타내었다.

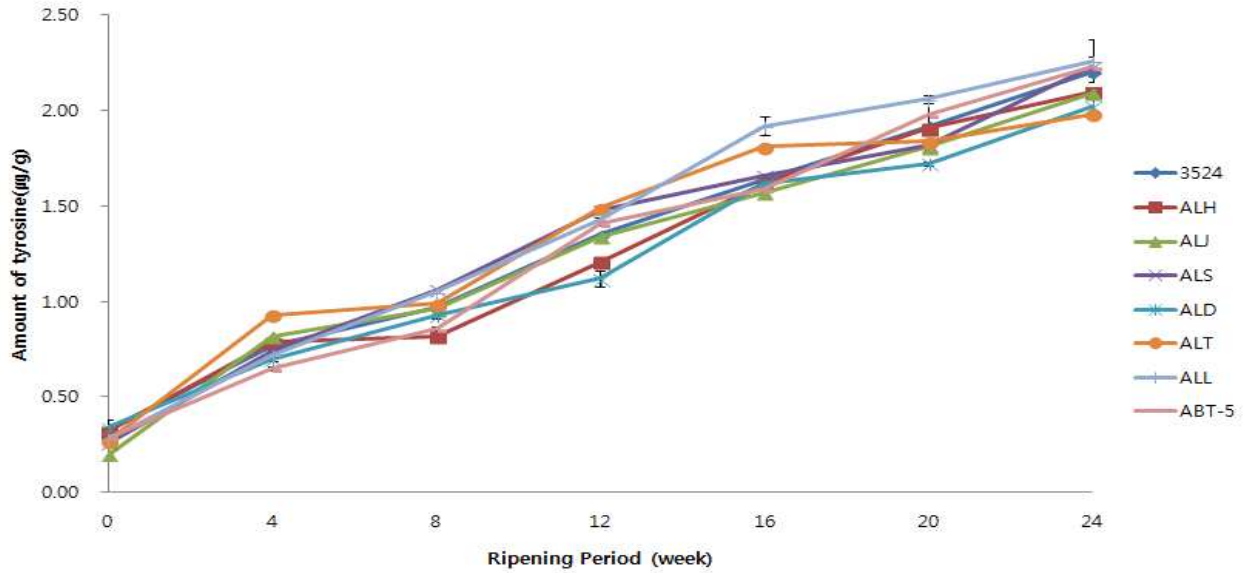


Fig. 33. Change of water soluble nitrogen(WSN) during the ripening of Asiago cheese added with antifungal lactic acid bacteria.

(4) 천연물소재와 항진균 유산균을 이용한 치즈의 항진균 활성

(가) 항진균 활성 유산균을 이용한 아시아고치즈의 항진균 활성

항진균 활성 유산균을 이용한 아시아고치즈의 숙성 중 항진균 활성 측정실험 결과는 fig. 34에서와 같이 볼 수 있다. 숙성 5일차부터 모든 처리구의 표면에 곰팡이가 형성되기 시작하였으며, 숙성 경과에 따라 항진균 활성을 알아보기 위하여 곰팡이를 제거 후 숙성경과에 따라 항진균 활성을 검사하였지만 모든 처리구의 치즈표면에 곰팡이가 형성되어 항진균 활성이 있는 유산균을 이용한 아시아고치즈에 대해 항진균 활성은 나타나지 않았다.



Fig. 34. Effect of fungal growth inhibition of during the ripening of Asiago cheese added with antifungal lactic acid bacteria.

(나) 항진균 활성 유산균 배양액을 이용한 베르크치즈의 표면 항진균 활성

항진균 활성 유산균 배양액에 대한 베르크치즈 표면 항진균 활성 실험은 fig. 35와 같다. 유산균의 균체에 의한 항진균 활성과 박테리옌에 의한 치즈 표면의 항진균 활성을 검토하고자 유산균 배양액 원액과 원심분리 후 얻어진 상등액에 대한 치즈 표면 항진균 활성 실험 결과, 30일 경과 시 모든 치즈 표면에 곰팡이가 증식된 결과를 보였다. 향후 최대 박테리옌 생성 조건에 대한 검토 실험과 도포 횟수에 대한 추가적인 실험이 요구되었다.

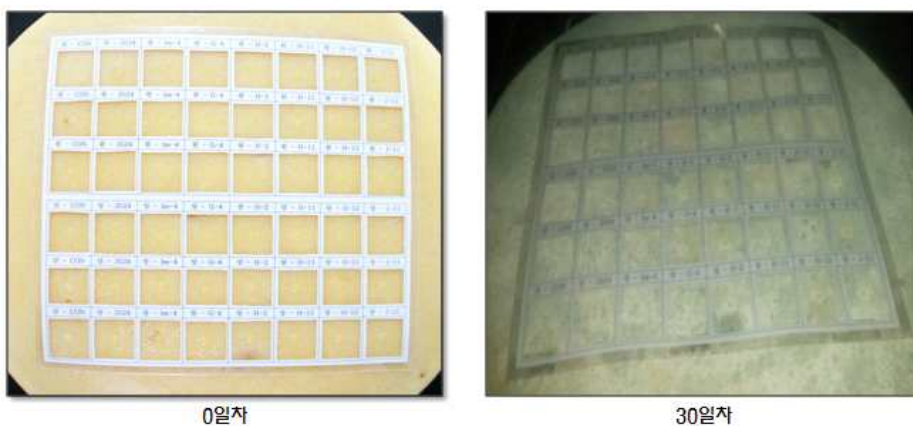


Fig. 35. Effect of antifungal lactic acid bacteria culture medium on the fungal growth inhibition of surface on Berg cheese.

(다) 자몽종자추출물을 이용한 가우다치즈의 표면 항진균 활성

자몽종자추출물을 이용한 가우다치즈 표면의 항진균 활성 실험 결과는 fig. 36과 같다. 선행실험으로 키토올리고당과 자몽종자추출물의 항진균 활성 실험 결과, 자몽종자추출물이 PDA 평판배지에서 키토올리고당보다 높은 항진균 활성을 보여 자몽종자추출물의 농도를 달리 하여 가우다치즈 표면에 1회 도포하였다. 10일 경과 후 모든 가우다치즈 표면에 곰팡이가 자랐으며 함량이 가장 높은 10% 처리에서 곰팡이 생성이 다소 낮은 결과를 보였다. 도포되는 항진균 물질의 농도와 도포 횟수에 대한 추가적인 실험이 요구되었다.



Fig. 36. Antifungal test of Gouda cheese on the surface using grapefruit seed extract.

(라) 정유를 이용한 티지터치즈의 표면 항진균 활성

정유(essential oil)를 이용한 티지터치즈 표면에 대한 항진균 활성을 평가한 결과는 fig. 37과 같다. 항진균 활성이 우수한 결과를 보인 계피유(cinnamon oil), 계피 수피유(cinnamon bark oil), 바질유(basil oil)를 티지터치즈 표면에 1회 도포한 후 30일 동안 숙성실에서 관찰하였다. 이에 대한 결과는 아무 것도 도포하지 않은 대조구와 일반식용유, 바질유에서는 전체적으로 많은 곰팡이들이 자라났지만 계피유와 계피 수피유를 도포한 처리구에서는 30일 이상 경과되어도 곰팡이가 자라지 않아 계피유와 계피 수피유가 치즈 표면에서 가장 좋은 항진균 활성을 나타내는 것으로 평가되었다.

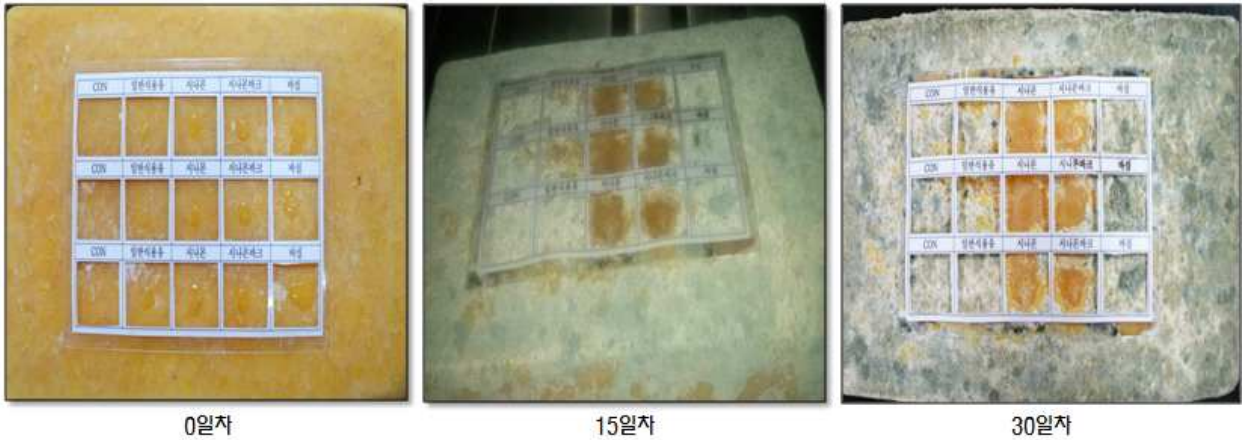


Fig. 37. Effect of essential oil on the fungal growth inhibition of surface on Tilsiter cheese.

2. 제 2 차년도 (2013)

가. 항진균 물질의 개발

(1) 항진균 활성 유산균에서 박테리오신 유전자 탐색

유산균의 세균, 효모, 곰팡이 등 유해 미생물에 대한 생육억제 활성은 유산균들이 생산하는 다양한 대사산물인 유기산, 과산화수소(H_2O_2), 디아세틸(diacetyl) 그리고 박테리오신(bacteriocin) 등에 의해 나타난다. 그 중 박테리오신은 항균성 단백질로서 기존의 항생제와는 달리 체내에서 단백질 가수분해효소에 의해 쉽게 분해되어 인체에 무독성이고 잔류성이 없기 때문에 현재 천연생물학적 보존제로 주목받고 있다. 따라서 유산균이 생산하는 대사산물 중에서 항진균 활성을 나타내는 원인물질을 규명하고자 항진균 활성이 가장 우수한 유산균 ALH를 이용하여 박테리오신 유전자를 탐색하였다. *Lactobacillus sakei* 계열이 생산하는 박테리오신으로 알려진 sakacin P의 유전자 염기서열 정보를 바탕으로 유산균 ALH의 genomic DNA를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 증폭된 186 bp의 DNA 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 38). 따라서 유산균 ALH는 박테리오신 생성 균주로 판단되며 유산균 ALH가 생산하는 박테리오신은 항진균 활성을 나타내는 강력한 후보물질로 추정될 수 있다.

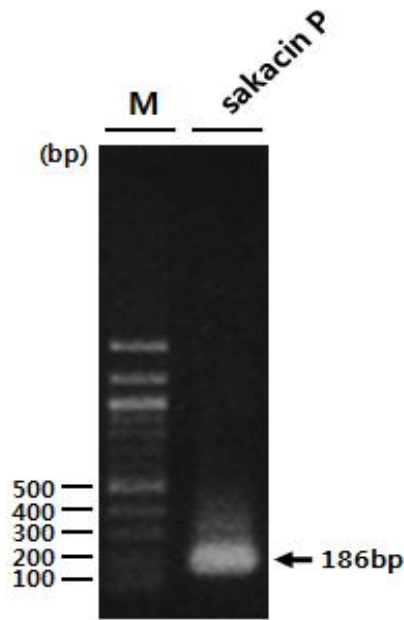


Fig. 38. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products amplified from genomic DNA of ALH. Lane M represents a DNA size marker.

(2) 항진균 물질 확인을 위한 대사산물별 활성

(가) 조항진균 물질의 활성

① pH 조절에 따른 항진균 활성평가 (유기산)

ALH 배양액의 pH 조절에 따른 영향을 살펴보기 위해, 1 N NaOH와 1 N HCl 용액을 사용하여 pH 3.0~8.0으로 조정하고 37°C에서 2시간 동안 처리한 후 곰팡이 FB에 대한 억제능을 측정된 결과는 table 23 및 fig. 39와 같다. 항진균 물질이 유기산일 경우 pH가 산성조건에서는 활성을 보이겠지만 중화가 될 경우는 활성을 가지지 않을 것이라는 가설을 세우고 실험을 진행하였다. pH별 활성을 비교하면 pH 3.0과 4.0에서 본래의 활성을 유지하였으나 pH 5.0~8.0 구간에서는 활성이 보이지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 본 연구에서 분리한 유산균 배양액에 포함된 항진균 물질은 pH에 불안정한 물질로 확인이 되었다.

Table 23. Effects of pH on the antifungal activity of ALH culture medium

	Sample	Clear zone
pH	3.0	×
	4.0	×
	5.0	-
	6.0	-
	7.0	-
	8.0	-

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each fungi. Degree of clear zone by growth inhibition; -: no inhibition, ×: below 10-19 mm

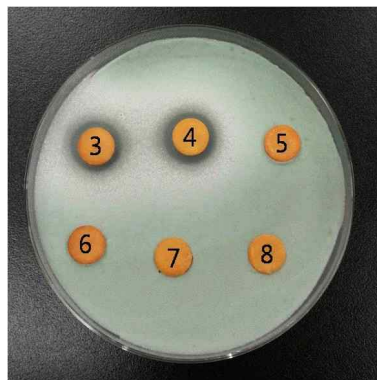


Fig. 39. Effects of pH on the antifungal activity of ALH culture medium. 3: pH 3.0, 4: pH 4.0, 5: pH 5.0, 6: pH 6.0, 7: pH 7.0, 8: pH 8.0.

② 단백질 가수분해 효소 처리에 따른 항진균 활성평가 (박테리옌)

ALH가 생산하는 항진균 물질이 단백질 성분에 의한 것인지 확인하기 위해 단백질 분해효소인 proteinase K와 protease를 1 unit/mL 농도로 효소 처리하여 FB에 대한 생육저해 활성을 측정된 결과는 table 24 및 fig. 40과 같다. 효소를 처리하지 않은 대조구와 proteinase K, protease 처리 시료구 모두 생육저지환이 확인되어 ALH가 생산하는 항진균 물질은 단백질 분해효소에 안정한 비단백질성 물질로 판단된다.

Table 24. Effects of enzyme treatment(proteinase K, protease) on the antifungal activity of ALH culture medium

Sample	Clear zone
Control	×
proteinase K	×
protease	×

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each fungi. Degree of clear zone by growth inhibition; -: no inhibition, ×: below 10-19 mm

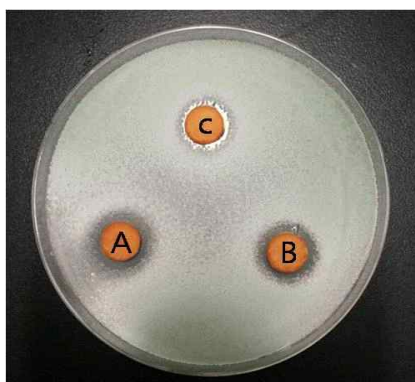


Fig. 40. Effects of enzyme treatment(proteinase K, protease) on the antifungal activity of ALH culture medium. c : ALH culture medium, A : proteinase K treatment of ALH culture medium, B : protease treatment of ALH culture medium.

③ 카탈라아제 효소 처리에 따른 항진균 활성평가 (과산화수소)

ALH가 생산하는 항진균 물질이 과산화수소에 의한 것인지를 파악하기 위해 catalase를 1 unit/mL 농도로 처리하여 FB에 대한 생육저해 활성을 측정한 결과는 table 25 및 fig. 41과 같다. 유산균의 항균 효과에 영향을 주는 대사산물은 유기산, H₂O₂ 및 박테리오신이 있다고 보고되어 있다. H₂O₂는 catalase 처리에 의해 분해가 되므로 catalase를 처리하여 저해 활성을 확인한 결과 대조구와 처리구 모두 생육저지환이 확인되어 항진균 대사물질이 과산화수소가 아님을 확인하였다.

Table 25. Effects of catalase treatment on the antifungal activity of ALH culture medium

Sample	Clear zone
Control	×
catalase	×

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each fungi. Degree of clear zone by growth inhibition; -: no inhibition, ×: below 10-19 mm

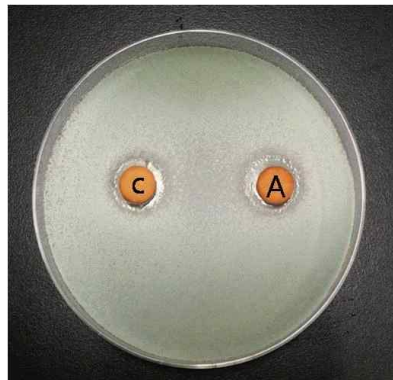


fig. 41. Effects of catalase treatment on the antifungal activity of ALH culture medium. c : ALH culture medium, A : catalase treatment of ALH culture medium.

(나) 유산균 배양액과 Lactic acid의 항진균 활성 비교

항진균 물질 분리 정제를 위한 대사산물별 활성을 평가한 결과 ALH가 생산하는 항진균 물질이 유기산일 가능성이 높다고 판단되었다. ALH 배양액과 젖산(lactic acid) 농도에 따른 항진균 활성을 비교한 결과는 table 26 및 fig. 42와 같다. 젖산 1.0%의 농도에서부터 곰팡이 FB에 대한 생육저지환을 형성하였다. 또한 ALH 배양액의 항진균 활성과 비교해 젖산 1.5% 농도에서 비슷한 항진균 활성을 보였고, 2.0%의 농도에서는 ALH 배양액의 항진균 활성 보다는 높게 나타났다. 젖산과의 항진균 활성평가를 통해 ALH가 생산하는 항진균 물질이 유기산과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

Table 26. Comparison of antifungal activity from ALH culture medium and lactic acid concentration

Samples		Clear Zone
ALH culture medium		××
Lactic acid (%)	0	-
	0.5	-
	1.0	×
	1.5	××
	2.0	×××

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each fungi. Degree of clear zone by growth inhibition; -: no inhibition, ×: below 10-19 mm, ××: 20~29 mm, ×××: above 30 mm

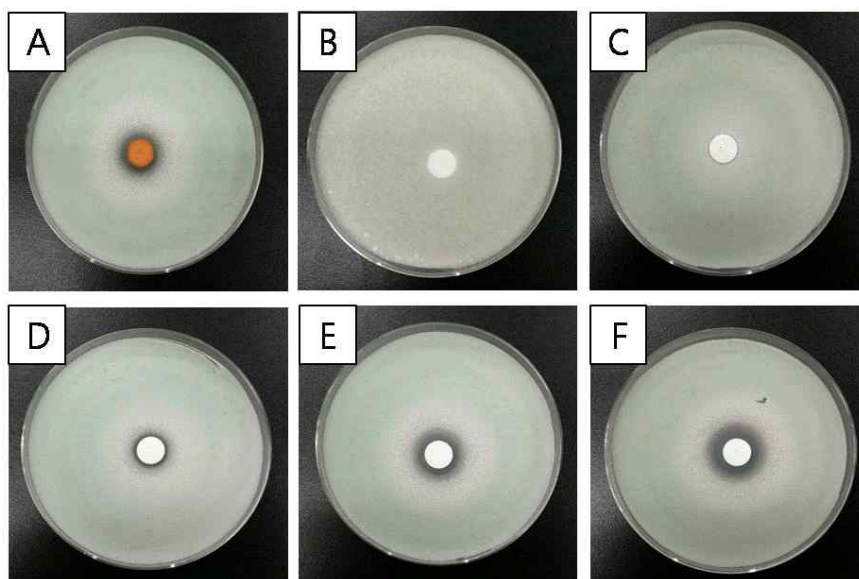


Fig. 42. Comparison of antifungal activity from ALH culture medium and lactic acid concentration. A : ALH culture medium, B : Lactic acid 0%, C : Lactic acid 0.5%, D : Lactic acid 1.0%, E : Lactic acid 1.5%, F : Lactic acid 2.0%.

(다) 유기산별 항진균 활성 비교

유기산 종류에 따른 항진균 활성을 비교하기 위해 젖산(lactic acid), 아세트산(acetic acid), 프로피온산(propionic acid)의 농도를 각각 1.5%로 조절 한 다음 FB에 대한 억제능을 측정한 결과는 table 27 및 fig. 43과 같다. 본 연구에서 ALH 배양액의 유기산 정량 결과 젖산과 아세트산이 주요 유기산으로 확인되어, 이들 유기산이 곰팡이의 성장을 저해하는 주요한 원인인지 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 실험 결과 젖산만이 FB에 대한 생육저해 활성을 보였고 아세트산과 프로피온산은 생육저해 활성을 보이지 않았다.

Table 27. Comparison of antifungal activity by different organic acid

Samples	Clear zone
Lactic acid	×
Acetic acid	-
Propionic acid	-

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each fungi. Degree of clear zone by growth inhibition; -: no inhibition, ×: below 10-19 mm

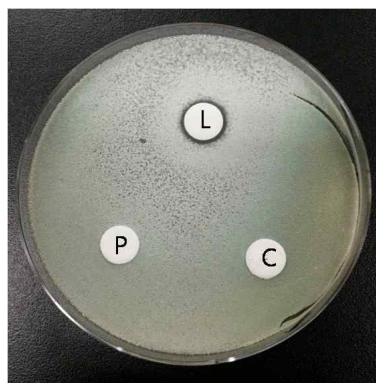


Fig. 43. Comparison of antifungal activity by different organic acid. L : Lactic acid 1.5%, P : Propionic acid 1.5%, C : Acetic acid 1.5%.

(3) 항진균 물질의 분자량에 따른 항진균 활성 비교

ALH가 생산하는 항진균 물질의 분자량을 추정하기 위해 Centriprep YM-3(Millipore Co., Billerica, MA, U.S.A)를 이용해 원심분리(3,000 $\times g$, 15 min)하여 분자량 3,000 Da 이상과 이하로 분획한 시료구의 항진균 활성을 측정한 결과는 fig. 44와 같다. 3,000 Da 기준으로 FB에 대한 활성이 3,000 Da 이상에서는 보이지 않았고, 3,000 Da 이하에서 보여 항진균 물질의 분자량이 3,000 Da 이하로 확인되었다. 이상의 결과로 볼 때 ALH가 생산하는 항진균 물질은 pH에 민감하고, 분자량이 3,000 Da이하인 비단백질성 물질로 추정된다.

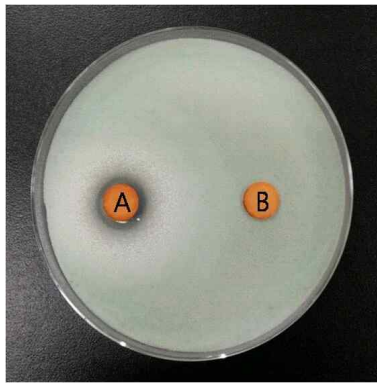


Fig. 44. Antifungal activity of two cell-free fractions from ALH separated by 3,000 Da molecular weight cutter. A : the fraction with molecular masses lower than 3,000 Da, B : the fraction with molecular masses higher than 3,000 Da.

(4) 항진균 물질의 항진균, 항산화 및 항암 활성

(가) 항진균 활성

각 시료(ALH 배양액, 계피 물추출물, 계피 주정추출물, 발효 추출물 및 숙성 추출물)의 곰팡이 FB에 대한 항진균 활성을 paper disc 법을 이용하여 확인하였다(Fig. 45). 대조구과 비교하여 ALH 배양액과 계피 주정추출물은 곰팡이 FB에 대하여 생육저지환을 형성하며 항진균 활성을 나타냈다. 그러나 계피 물추출물, 발효 추출물과 숙성 추출물은 생육저해환을 형성하지 않았다. 단순 계피 물추출물에는 FB에 대한 항진균 활성 물질이 거의 존재하지 않았으며 이는 계피의 phenol 화합물이나 정유성분이 항진균 활성을 나타낸다는 연구들과 일치하였다.

또한 계피를 유산균 발효 및 숙성하는 과정에서 FB에 대한 계피의 항진균 활성 물질이 손상되는 것으로 사료된다. ALH 배양액과 계피 주정추출물의 항진균 활성을 기초로 식품에의 적용실험을 설계하는 자료로 사용하였다.

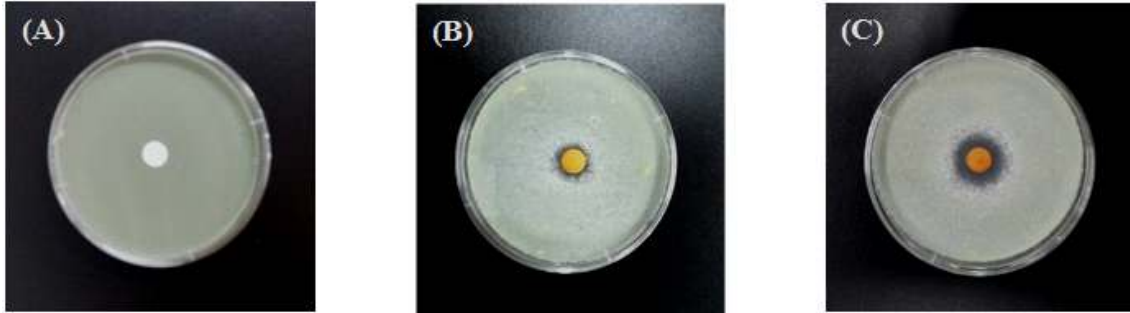


Fig. 45. Antifungal activities of ALH culture medium and ethanol extract of cinnamon against FB after 48 hr of incubation at 25°C. (A): Ethanol, (B): ALH culture medium (C): Ethanol extract of cinnamon.

(나) 항산화 활성

① 라디칼 소거활성

ALH 배양액의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 fig. 46와 같다. ALH 배양액은 농도의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하였으며 5 mg/mL의 농도에서 56%, 10 mg/mL 농도에서 72% 이상의 활성을 보였다. 이는 50 mM ascorbic acid의 67% 라디칼 소거활성과 유사 혹은 보다 큰 활성을 나타냈다. 또한 ALH 배양액의 ABTS 라디칼 소거활성(Fig. 47)을 평가한 결과 DPPH 라디칼 소거활성과 유사하게 농도의존적으로 ABTS 라디칼 소거활성을 보였으며, 5 mg/mL 이상의 농도에서 78% 이상, 10 mg/mL의 농도에서 82%의 라디칼 소거활성을 나타내 50 mM ascorbic acid의 80% 라디칼 소거활성과 유사한 결과를 보였다.

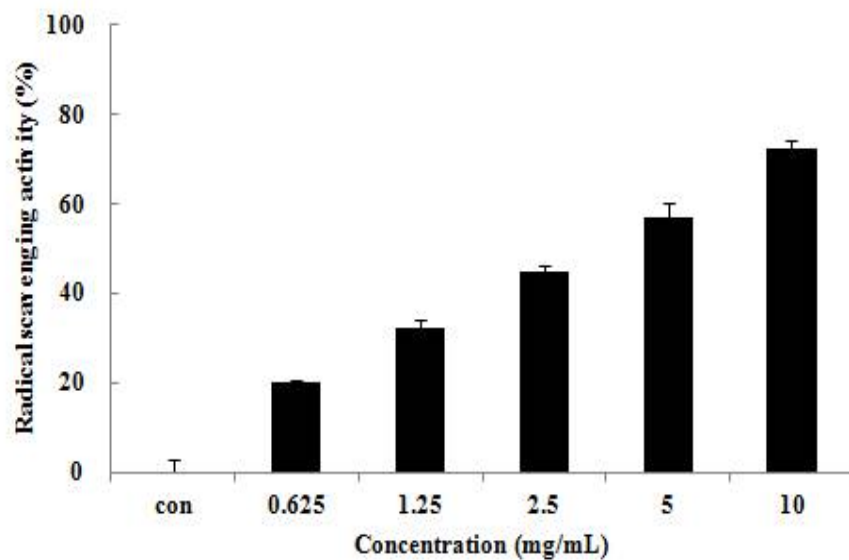


Fig. 46. DPPH radical scavenging activity of ALH culture medium. Each bar represents the mean±SD of triplicated measurement.

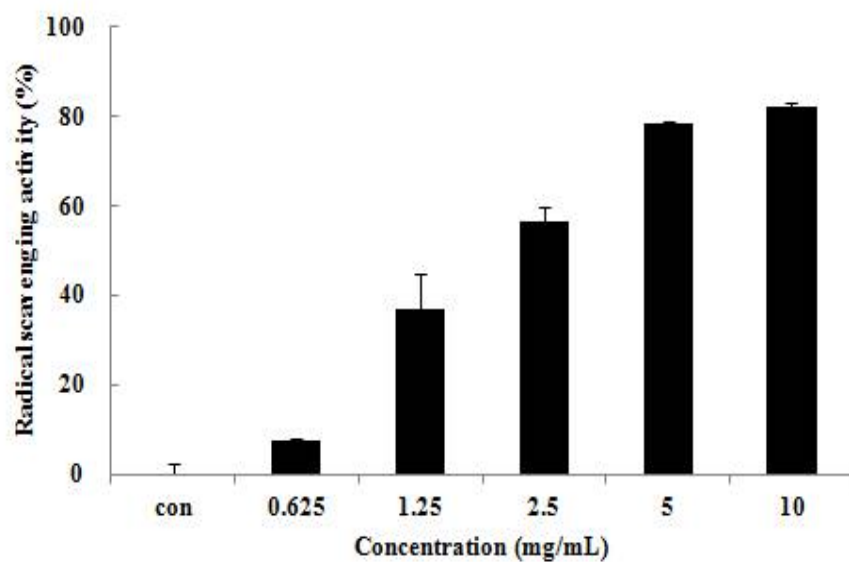


Fig. 47. ABTS radical scavenging activity of ALH culture medium. Each bar represents the mean±SD of triplicated measurement.

② 항산화 관련 효소 활성

ALH 배양액의 산화를 촉진하는 XO의 활성을 확인한 결과는 fig. 48에 나타났다. XO는 XOR(xanthin oxidoreductase)의 oxidase type 효소로 생체 내에서 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 uric acid로 산화하는데 관여하며, 산소를 전자수용체로 이용하여 ROS를 생성함으로써 지질의 과산화, 노화 등에 관여할 뿐만 아니라 각종 성인병 유발의 원인이 된다. 따라서 XO의 활성을 저해함으로써 항산화 활성을 확인할 수 있다. ALH 배양액은 XO 활성을 농도의존적으로 감소시켰으며 특히, 5 mg/mL의 농도에서 49%, 10 mg/mL의 농도에서 59%의 감소율을 보였다. 또한 SOD는 생체 내에서 superoxide의 소거에 관여하는 효소이며 ALH 배양액의 SOD 활성을 평가하여 항산화 활성을 확인하였다. ALH 배양액의 농도가 증가함에 따라 산화를 억제하는 SOD의 활성을 증가시켰다(Fig. 49). 10 mg/mL의 농도에서 5배 이상 SOD 활성이 증가되어 효소에 의한 항산화 활성을 확인하였다. 유산균 대사산물이 라디칼 소거 활성 뿐 아니라 효소의 활성을 저해 혹은 활성화시켜 항산화에 기여하는 것으로 사료된다.

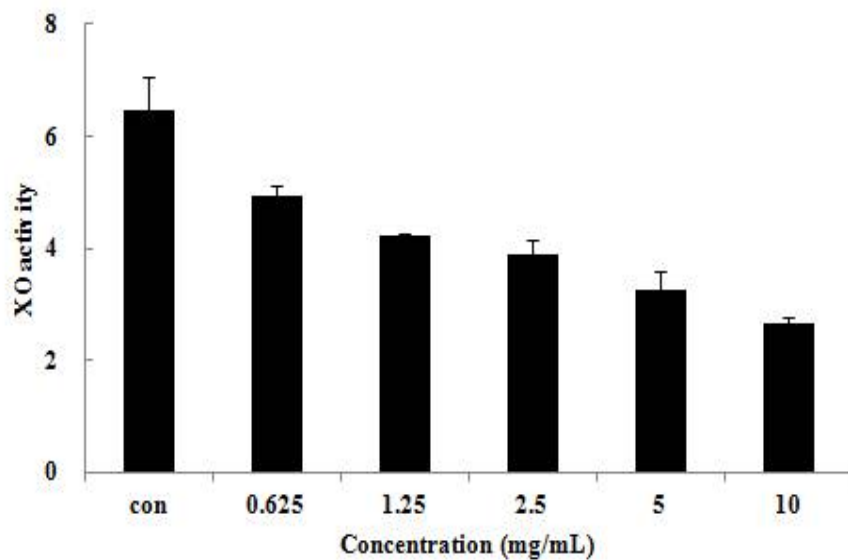


Fig. 48. Xanthin oxidase activity of ALH culture medium. Each bar represents the mean \pm SD of triplicated measurement.

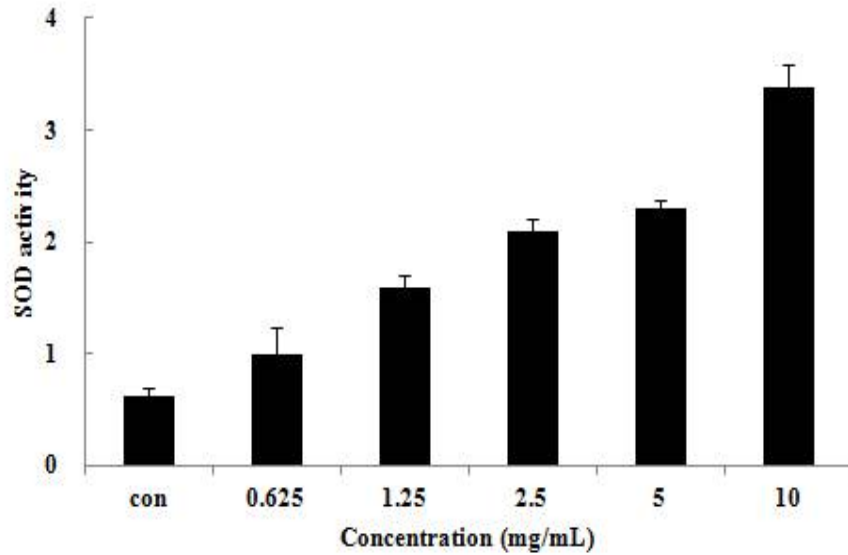


Fig. 49. Superoxide dismutase activity of ALH culture medium. Each bar represents the mean±SD of triplicated measurement.

③ NO 생성 억제 활성

NO는 생체 내에서 신호전달, 혈압 조절, 혈소판 응집 등 다양한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 pro-inflammatroy cytokine이나 lipopolysaccharide(LPS)는 면역세포에 작용하여 L-arginine으로부터 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 작용에 의해 NO의 생성을 증가시킨다. 과도한 NO의 생성은 만성염증에 관여하여 iNOS 활성조절을 통하여 만성염증을 조절한다. ALH 배양액이 세포 내 NO 생성에 미치는 영향을 확인한 결과는 fig. 50에 나타났다. ALH 배양액을 RAW 264.7 세포에서 농도를 달리하여 처리하고 세포독성을 평가한 결과 10 mg/mL의 농도에서 5% 내외의 성장 저해를 확인하였다. 이에 유산균 ALH 배양액의 NO 생성 억제 활성을 평가하는 농도는 최대 5 mg/mL로 결정하였다. LPS에 자극된 RAW 264.7 세포에서 유산균 ALH 배양액은 농도의존적으로 NO의 생성을 저해하였으며, 특히 5 mg/mL의 농도에서 대조구와 비교하여 39% NO 생성 억제 활성을 보였다. 유산균 ALH 배양액은 세포 내에서 라디칼의 형성을 저해함으로써 세포의 노화 및 손상을 억제함을 확인하였다.

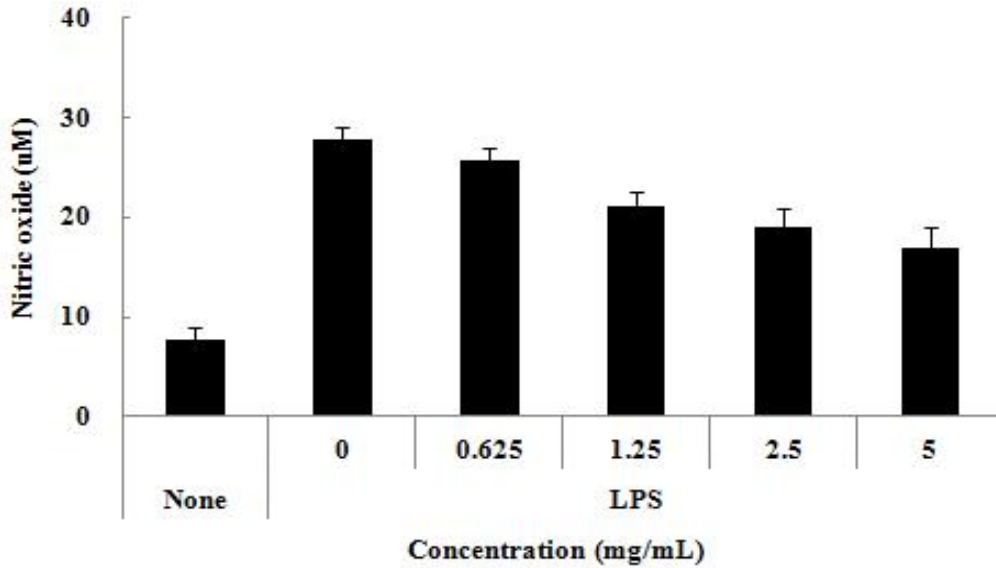


Fig. 50. Effect of ALH culture medium on LPS induced NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of ALH culture medium for 2 h prior to the addition of LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and the cells were further incubated for 24 h. Data shown are the mean \pm SD.

(다) 암세포 성장 억제 활성

ALH 배양액이 암세포의 성장에 미치는 영향을 평가한 결과는 fig. 51, 52, 그리고 53에 나타났다. 위암 세포(AGS), 대장암 세포(HT-29) 그리고 간암 세포(HepG2)에 ALH 배양액을 농도별(0~10 mg/mL)로 처리하여 24, 48시간동안 각각 암세포의 성장을 관찰하였다. 10 mg/mL의 농도에서 48시간 반응시킨 HT-29 세포에서 대조구와 비교하여 22%, AGS와 HepG2 세포에서 20% 내외의 성장 억제 활성을 보였다. 현미경으로 세포의 성장 정도를 확인한 결과(Fig. 51~53 (B)), ALH 배양액이 첨가되었을 때 세포 사멸은 관찰되지 않았다. 그러나 ALH 배양액의 농도가 높을수록 암세포의 성장이 둔화되는 것을 확인할 수 있었다. ALH 배양액은 암세포를 직접적으로 죽이지는 않지만 암세포의 증식·성장하는 속도를 지연시키는 것으로 암의 예방 및 치료에 다양하게 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

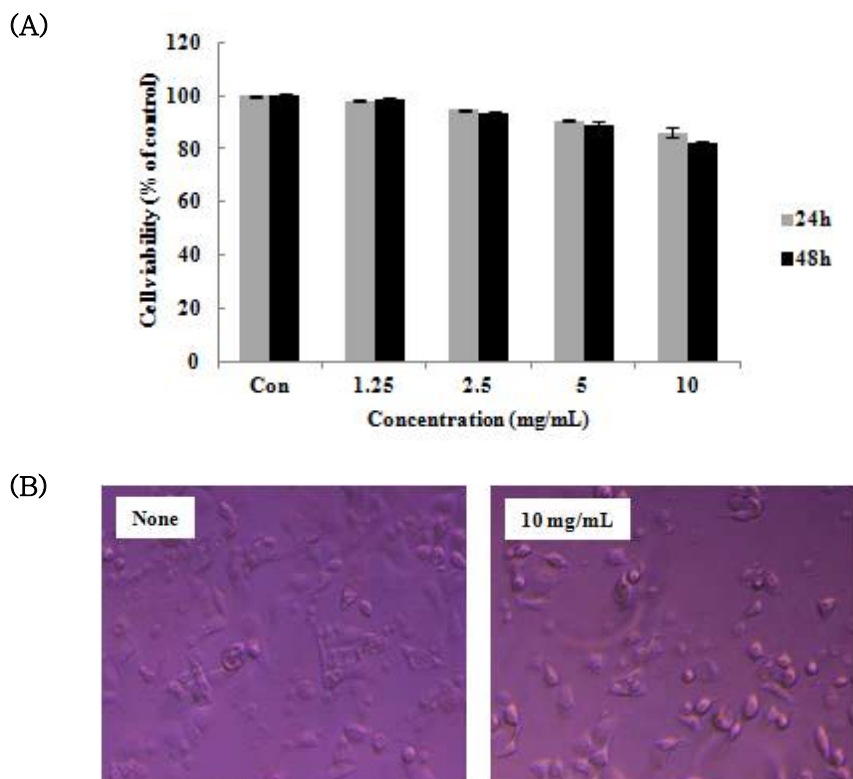


Fig. 51. Antiproliferation effects of ALH culture medium on human stomach cancer cells(AGS). AGS cells were treated with various concentrations of ALH culture medium for 24 and 48 hr. (A): The growth inhibition was measured using PrestoBlue viability reagent. Each bar represents the mean \pm SD of triplicated measurement. (B) After 48 hr incubation with 10 mg/mL ALH culture medium, cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 100$.

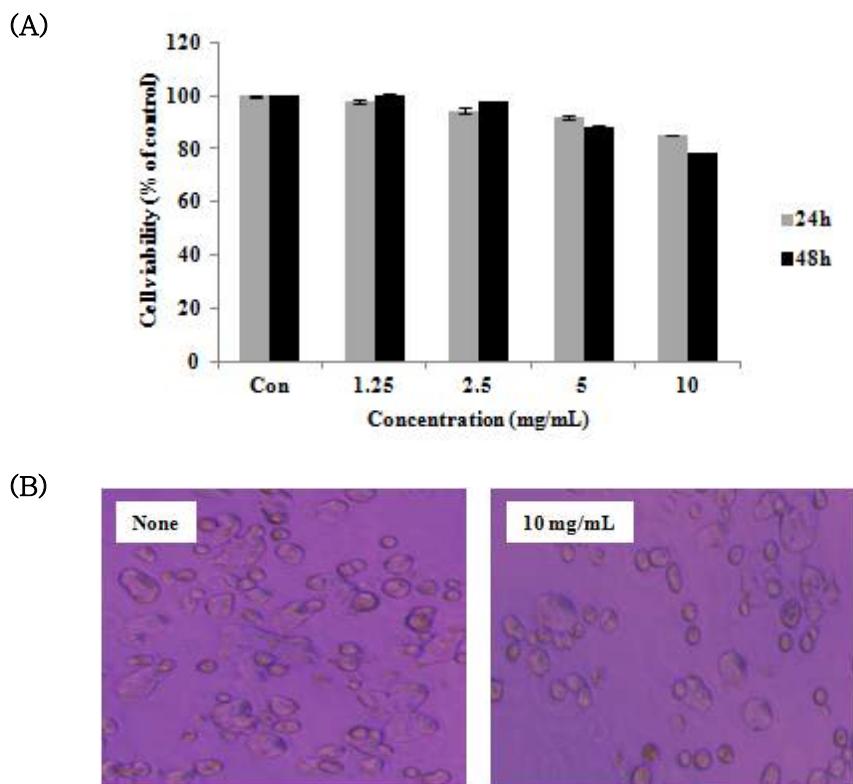


Fig. 52. Antiproliferation effects of ALH culture medium on human colon cancer cells (HT-29). HT-29 cells were treated with various concentrations of ALH culture medium for 24 and 48 hr. (A): The growth inhibition was measured using PrestoBlue viability reagent. Each bar represents the mean \pm SD of triplicated measurement. (B) After 48 hr incubation with 10 mg/mL ALH culture medium, cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 100$.

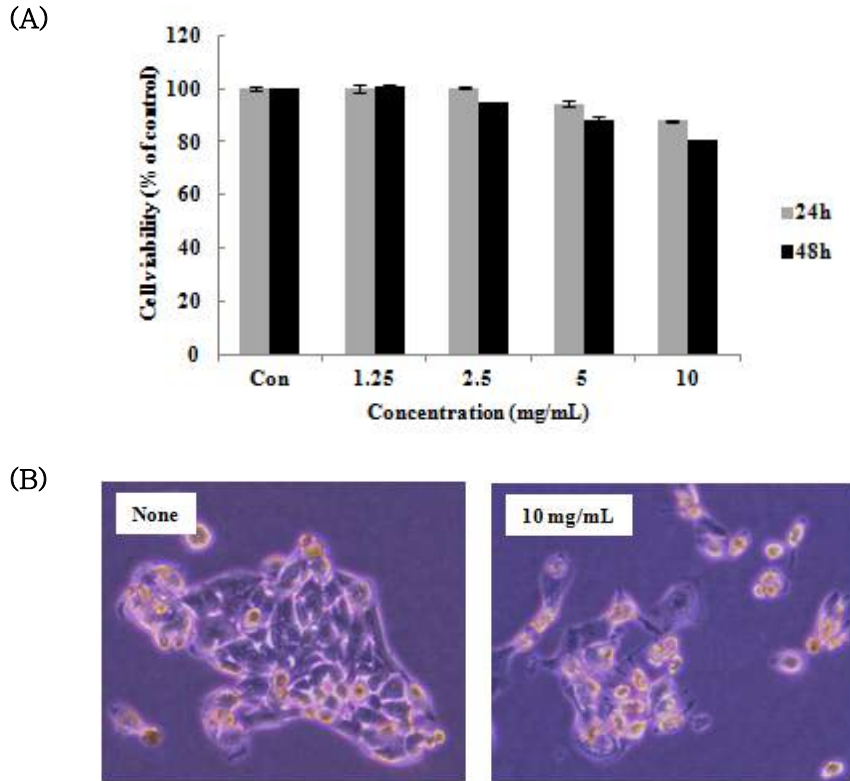


Fig. 53. Antiproliferation effects of ALH culture medium on human liver cancer cells(HepG2). HepG2 cells were treated with various concentrations of ALH culture medium for 24 and 48 hr. (A): The growth inhibition was measured using PrestoBlue viability reagent. Each bar represents the mean \pm SD of triplicated measurement. (B) After 48 hr incubation with 10 mg/mL ALH culture medium, cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 100$.

(5) 정유의 추출

(가) 타입에 따른 정유의 추출

수증기증류법으로 증류가 가능한 clevenger apparatus 방법으로 정유(essential oil)를 추출하였다. Cleavenger의 방법으로 오일이 물보다 비중이 큰 오일을 회수하는 방법(dH, A)과 물보다 비중이 작은 오일을 회수하는 방법(dL, B)로 추출하였다(Fig. 54).



Fig. 54. Extraction method of essential oil by clevenger apparatus type.

(나) 추출시간에 따른 정유의 추출

정유(essential oil) 추출에 따른 최적화 방법을 위하여 추출 시간을 달리하여 실험하였다. 1, 3, 5 시간동안 추출한 후 회수에 따른 정유의 회수율은 fig. 55와 같다. 물보다 비중이 높은 추출 방법에서 추출 3시간의 경우 $2.43 \pm 0.29\%$ 의 수율을 나타내어 가장 높은 수율을 보였으며, 1시간 추출 시 $1.69 \pm 0.37\%$, 5시간 추출 시 $2.00 \pm 0.17\%$ 를 나타내었다. 물보다 비중이 낮은 추출 방법의 경우 역시 3시간 추출 시 $2.07 \pm 0.10\%$ 를 나타내었으며, 1시간 추출 시 $1.04 \pm 0.17\%$ 로 가장 낮은 수율을 나타내었다. 본 연구에서 추출시간에 따라 수율을 비교해본 결과 추출시간의 증가에 따라 수율이 증가되지 않아, 추출 방법 및 추출시간에 따른 정유의 추출 조건은 가장 높은 수율을 나타낸 dH-3hr, 즉 물보다 비중이 높은 타입의 방법으로 3시간 추출하는 것이 가장 적합할 것으로 생각된다.

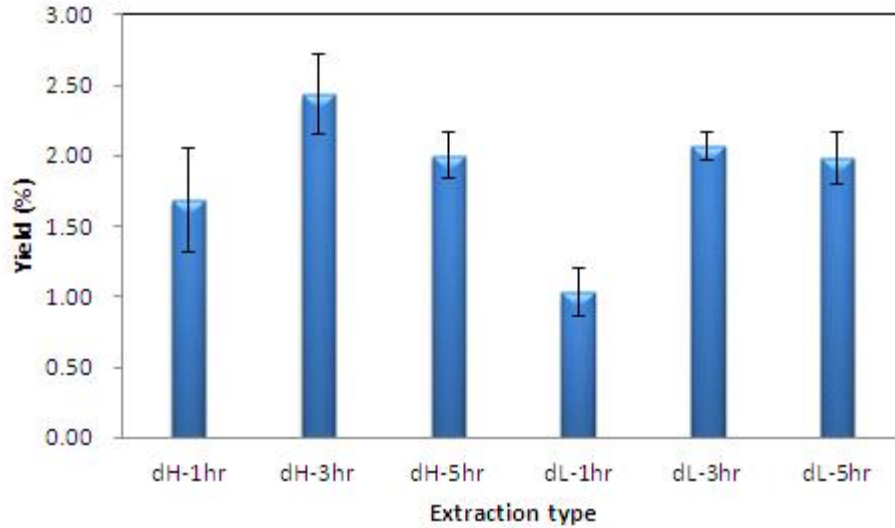


Fig. 55. Yield of cinnamon bark essential oil using the clevenger apparatus type. dH: heavy of specific gravity, dL: light of specific gravity.

(다) 신남알데히드 정량

비중에 따른 추출방법 및 추출 시간에 따라 정유(essential oil)를 추출하여 GC 분석을 시행한 결과 추출된 정유의 주요 peak가 fig. 56에 나타난 바와 같이 신남알데히드(cinnamaldehyde)로 확인되었다. 이는 시중에 판매되고 있는 계피 수피유(cinnamon bark oil)의 주요 성분과도 일치함을 알 수 있었다. 추출 방법 및 시간에 따라 주요 성분인 신남알데히드의 함량을 확인해 본 결과 비중이 물보다 높은 타입의 추출 방법으로 3시간 추출 시 가장 높은 신남알데히드의 함량을 나타내었으며, 추출 5시간의 경우 오히려 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 57). 비중이 물보다 낮은 방법으로 추출한 결과 시간에 따라 증가하는 것을 확인하였으나, 전반적으로 dH-3hr의 방법에 비해 낮은 함량을 나타내었다.

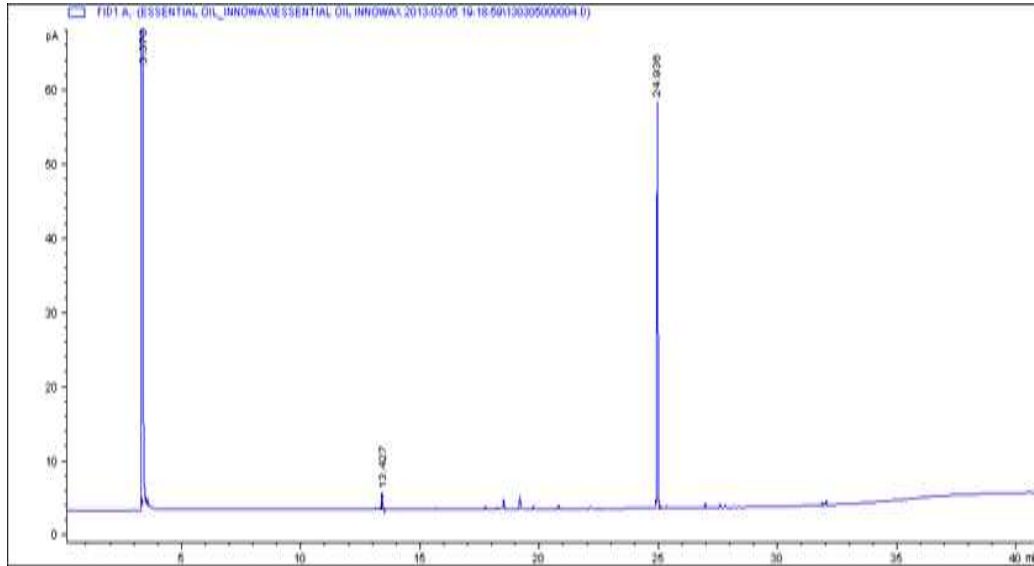


Fig. 56. Gas chromatogram of cinnamon bark essential oil using the clevenger apparatus type (1,000 dilution).

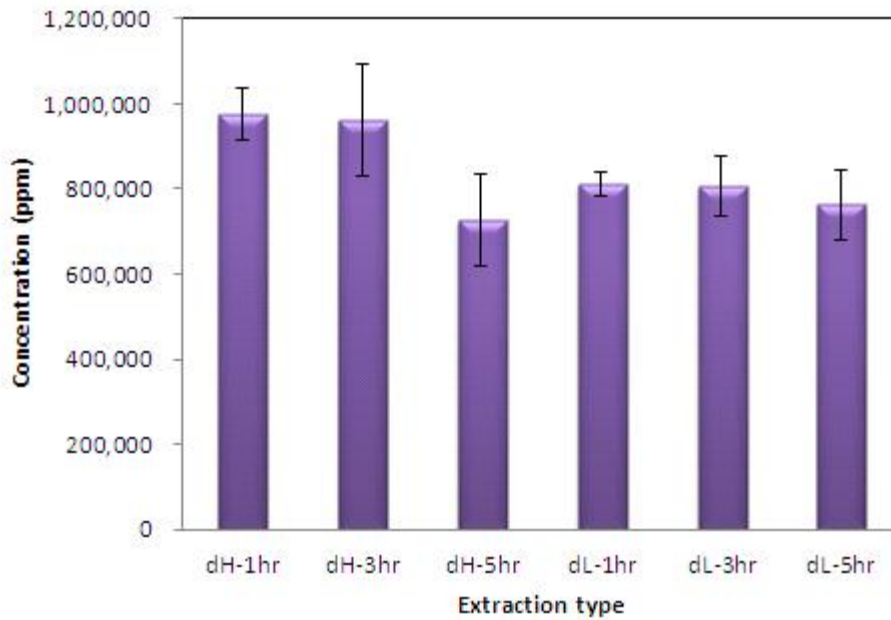


Fig. 57. Concentration of cinnamaldehyde for cinnamon bark essential oil using the clevenger apparatus type. dH: heavy of specific gravity; dL: light of specific gravity.

(라) 추출조건 최적화

추출 수율 및 계피유(cinnamon oil)의 주요성분인 신남알데히드(cinnamaldehyde)의 함량에 따른 추출 조건을 확인해 본 결과 clevenger 추출방법 중 물보다 비중이 무거운 타입의 추출방법으로 3시간 동안 추출하여 오일을 회수하는 것이 가장 적합할 것으로 확인되었다.

(6) 정유 주요 성분의 항진균 활성

(가) 단일 표준 성분의 항진균 활성

시중에 판매되는 정유(essential oil) 중 항진균 활성이 있는 계피유(cinnamon oil), 계피수피유(cinnamon bark oil), 바질유(basil oil)에 대하여 성분 분석한 결과, 주요 peak로 확인된 신남알데히드(cinnamaldehyde), 리나놀(linalool), 유제놀(eugenol)에 대하여 각각 항진균 활성을 확인하였다(Table 28). Disc diffusion method를 이용하여 각각의 성분에 대하여 disc 당 500 μ L 씩 처리하여 8종의 곰팡이에 실험한 결과 신남알데히드에 대해서만 항진균 활성을 나타내었으며, 리나놀과 유제놀에 대해 항진균 활성을 나타내지 않았다. 신남알데히드의 경우 FC에 대하여 36.5 mm의 생육저지환을 나타내어 가장 높은 활성을 보였다. 각각의 성분을 disc 당 1,000 μ L 처리하여 항진균 활성을 확인한 결과 리나놀의 경우 생육저지환을 나타내지 않았으며, 유제놀은 FG를 제외한 다른 균에 대해 약간의 항진균 활성을 나타내었다. Disc 당 1,000 μ L처리 시 신남알데히드의 경우 500 μ L처리와 동일하게 FC에 대하여 51.3 mm로 가장 높은 항진균 활성을 나타내었으며, 다른 곰팡이에 대해서 30 mm 이상의 항진균 활성을 나타냈다.

Table 28. Antifungal activity of cinnamaldehyde, linalool and eugenol

Fungi	Inhibition zone (mm)			
	cinnamaldehyde ^a	cinnamaldehyde ^b	linalool ^c	eugenol ^d
FA	31.3 ± 1.37 ^e	33.8 ± 7.36	ND ^f	11.0 ± 0.82
FB	22.3 ± 2.16	31.3 ± 1.51	ND	11.0 ± 0.82
FC	36.5 ± 2.52	51.3 ± 8.50	ND	18.4 ± 3.70
FD	32.8 ± 2.68	38.0 ± 0.96	ND	10.3 ± 0.50
FE	27.8 ± 3.96	37.2 ± 0.82	ND	11.0 ± 0.00
FF	30.4 ± 4.56	39.7 ± 2.38	ND	13.0 ± 1.41
FG	30.2 ± 2.40	34.2 ± 0.96	ND	ND
FH	28.5 ± 1.00	34.0 ± 1.73	ND	20.3 ± 1.89

^a Diameter of inhibition zone including diameter of disc 8 mm(tested at a volume of 500 µL/disc)

^b Diameter of inhibition zone including diameter of disc 8 mm(tested at a volume of 1,000 µL/disc)

^c Diameter of inhibition zone including diameter of disc 8 mm(tested at a volume of 1,000 µL/disc)

^d Diameter of inhibition zone including diameter of disc 8 mm(tested at a volume of 1,000 µL/disc)

^e Values are given as mean ± S.D. of triplicate experiment.

^f Not detect.

(나) 정유 표준 성분의 시너지효과

항진균 활성을 나타낸 표준성분인 신남알데히드(cinnamaldehyde), 리나놀(linalool), 유제놀(eugenol)에 대하여 혼합에 따른 시너지효과를 확인하였다(Table 29). 단일 표준 용액에 대하여 disc 당 500 µL처리하여 확인하였으며, 두가지 용액의 혼합은 신남알데히드 : 리나놀 = 250 µL : 250 µL, 신남알데히드 : 유제놀 = 250 µL : 250 µL, 유제놀 : 리나놀 = 250 µL : 250 µL 로 처리하였으며, 세가지 용액의 혼합은 신남알데히드 : 리나놀 : 유제놀 = 167 µL : 167 µL : 167 µL의 농도로 처리하여 항진균 활성을 확인하였다. 단일로 처리 시 유제놀 및 리나놀의 경우 항진균 활성을 나타내지 않았으나 신남알데히드 경우 30 mm 이상의 생육저지환을 나타내

었다. 두가지 혼합의 경우 신남알데히드 : 리나놀, 신남알데히드 : 유제놀 처리 시 21~32 mm의 분포로 활성을 나타내었으며, 유제놀 : 리나놀의 혼합의 경우 항진균 활성을 나타내지 않았다. 세가지 용액을 혼합한 경우 16~22.50 mm의 분포로 항진균 활성을 나타내었다. 이 실험의 결과 단일 신남알데히드의 경우 보다 혼합한 disc에서 항진균 활성이 증가하지 않아, 세가지 용액의 혼합은 시너지효과를 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

Table 29. Antifungal activity of mixed STD solution

Fungi	Inhibition zone (mm)						
	Cinnamaldehyde ¹⁾	Eugenol ¹⁾	linalool ¹⁾	C : L ²⁾	C : E ³⁾	E : L ⁴⁾	C : L : E ⁵⁾
FA	-	-	-	-	-	-	-
FB	40.50 ± 2.38 ⁶⁾	ND ⁷⁾	ND	30.25 ± 2.06	31.75 ± 2.87	ND	19.50 ± 1.29
FC	43.00 ± 4.24	ND	ND	32.00 ± 3.92	23.25 ± 1.26	ND	18.75 ± 3.40
FD	39.50 ± 2.38	ND	ND	23.00 ± 4.08	21.00 ± 4.90	ND	16.75 ± 0.96
FE	38.00 ± 4.97	ND	ND	30.75 ± 7.18	27.50 ± 3.51	ND	21.75 ± 0.96
FF	32.50 ± 3.70	ND	ND	25.50 ± 1.29	23.50 ± 4.12	ND	21.00 ± 2.94
FG	-	-	-	-	-	-	-
FH	35.00 ± 4.69	ND	ND	24.75 ± 2.22	26.25 ± 1.89	ND	22.50 ± 2.89

¹⁾Diameter of inhibition zone including diameter of disc 8 mm(tested at a volume of 500 µL/disc)

²⁾ Diameter of inhibition zone including diameter of disc 8 mm(tested at a volume of cinnamaldehyde : linalool = 250 : 250 µL/disc)

³⁾Diameter of inhibition zone including diameter of disc 8 mm(tested at a volume of cinnamaldehyde : eugenol = 250 : 250 µL/disc)

⁴⁾Diameter of inhibition zone including diameter of disc 8 mm(tested at a volume of eugenol : linalool = 250 : 250 µL/disc)

⁵⁾Diameter of inhibition zone including diameter of disc 8 mm(tested at a volume of cinnamaldehyde : linalool : eugenol = 167 : 167 : 167 µL/disc)

⁶⁾Values are given as mean ± S.D. of triplicate experiment.

⁷⁾Not detect.

(7) 추출 정유의 항진균 활성

(가) 추출 정유의 항진균 활성

계피를 이용하여 clevenger apparatus을 이용하여 비중이 물보다 높은 방법으로 3시간 동안 추출한 정유(essential oil)의 항진균 활성을 확인한 결과는 table 30에 나타내었다. 추출된 정유를 disc 당 10 µL의 농도로 떨어뜨려 8종의 곰팡이에 처리한 결과 FC에 대하여 60.5 mm의 생육저지환을 나타내어 가장 강한 활성을 보였으며, FF의 경우 34.5 mm의 생육저지환을 나타내어 8종의 곰팡이 중 가장 낮은 항진균 활성을 나타내었다.

Table 30. Antifungal activity of cinnamon essential oil using the clevenger apparatus type

Fungi	Inhibition zone (mm)
<i>Penicillium solitum</i> strain FI01 (FA)	39.5 ± 3.11
<i>Penicillium brevicompactum</i> strainFI02 (FB)	41.8 ± 1.26
<i>Cladosporium sp.</i> FI03 (FC)	60.5 ± 3.70
<i>Penicillium roqueforti</i> FS04 (FD)	59.5 ± 1.73
<i>Penicillium echinulatum</i> FS05 (FE)	42.8 ± 2.87
<i>Penicillium polonicum</i> FS06 (FF)	34.5 ± 2.08
<i>Pencillium solitum</i> FS07 (FG)	47.5 ± 7.85
<i>Cladisporium sphaerospermum</i> FS08 (FH)	57.5 ± 4.20

(나) 추출 정유의 최소저해농도

Clevenger apparatus type를 이용하여 추출한 정유(essential oil)의 처리농도에 따른 활성을 확인하여 최소저해농도를 구하였다. FA, FB, FE, FF, FH에 대하여 0.125 mg/disc 이상의 처리에서 FC, FG에 대하여 0.166 mg/disc 이상의 처리에서 항진균 활성을 나타내었으며,

FD 에 대하여 0.25 mg/disc 처리 시 항진균 활성을 나타냈다. 8종의 곰팡이에 대하여 모두 항진균 활성을 얻기 위해 추출된 정유를 0.25 mg/disc 이상 처리하여야 할 것으로 확인되었다 (Table 31).

Table 31. Minimum inhibitory concentration of cinnamon essential oil by clevenger apparatus type

Fungi	Inhibition zone (mm)					
	0.1	0.125	0.166	0.25	0.5	10
FA	-	13.75 ± 1.26	20.25 ± 1.26	25.75 ± 0.96	35.00 ± 4.08	44.50 ± 1.91
FB	-	15.00 ± 0.85	18.00 ± 1.41	22.75 ± 0.96	31.75 ± 2.50	44.50 ± 1.73
FC	-	-	19.75 ± 2.99	27.75 ± 6.50	43.50 ± 2.12	44.75 ± 5.74
FD	-	-	-	16.75 ± 2.36	24.25 ± 4.35	38.25 ± 3.95
FE	-	17.50 ± 1.73	21.75 ± 0.50	28.25 ± 1.71	39.25 ± 2.22	45.75 ± 3.30
FF	-	16.25 ± 1.89	18.50 ± 0.58	22.00 ± 0.82	35.75 ± 0.96	42.75 ± 2.22
FG	-	-	12.00 ± 0.00	22.00 ± 1.83	32.50 ± 2.65	39.50 ± 2.38
FH	-	13.50 ± 1.91	18.75 ± 3.30	26.25 ± 3.86	40.50 ± 4.20	51.50 ± 4.36

FA : *Penicillium solitum* strain FI01, FB : *Penicillium brevicompactum* strain FI02, FC : *Cladosporium* sp. FI03, FD : *Penicillium roqueforti* FS04, FE : *Penicillium echinulatum* FS05, FF : *Penicillium polonicum* FS06, FG : *Penicillium solitum* FS07, FH : *Cladosporium sphaerospermum* FS08

(8) 추출 정유의 성분분석

(가) GC 분석

추출된 정유(essential oil)를 GC를 통하여 분석한 결과 13개의 peak가 확인되었으며, 각 peak에 따른 조성은 table 32와 같다. 시간과 추출 방법에 따른 오일은 25.00분에 검출된

peak가 주요성분으로 신남알데히드(cinnamaldehyde)로 확인되었으며, 1시간 추출 시에 88.01, 87.71 area %를 나타내어 가장 높은 값을 보였으며, 추출시간이 증가함에 따라 감소하는 것을 확인하였다.

Table 32. Peak of essential oil from cinnamon bark of extraction method

No.	RT	Area %					
		dH-1hr	dH-3hr	dH-5hr	dL-1hr	dL-3hr	dL-5hr
1	13.55	4.21	5.22	5.37	4.27	4.87	6.02
2	17.85	0.31	0.43	0.51	0.35	0.42	0.62
3	18.62	0.81	1.14	1.42	0.92	1.14	1.72
4	19.30	1.75	2.45	2.91	1.97	2.43	3.55
5	19.83	0.44	0.59	0.70	0.51	0.64	0.89
6	20.87	0.45	0.58	0.69	0.51	0.58	0.81
7	22.18	0.42	0.42	0.41	0.45	0.50	0.41
8	24.02	1.49	3.16	5.26	1.38	2.03	4.67
9	25.00	88.01	83.51	80.17	87.71	85.20	78.26
10	25.41	0.35	0.38	0.41	0.37	0.37	0.43
11	27.61	0.37	0.47	0.56	0.38	0.46	0.68
12	31.88	0.67	0.81	0.80	0.58	0.68	1.00
13	32.04	0.72	0.86	0.79	0.59	0.67	0.93
Total		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

(나) GC-MS를 통한 성분분석

추출 정유(essential oil)의 성분을 확인하고자 GC-MS를 이용하여 분석한 결과 16가지 성분이 확인되었으며, GC분석과 동일하게 주요 peak는 신남알데히드(cinnamaldehyde)로 확인되었다. 그 다음으로 α -copaene(4.94-6.81%), cinnamaldehyde dimethyl acetal(2.42-9.07%), δ -cadinene(1.68-3.45%) 등의 순서로 확인되었다. 추출방법에 따라 성분의 차이는 크게 나타나지 않았으며, 추출시간에 따라 주요성분인 신남알데히드의 비율이 점차 감소하는 경향을 나타냈다(Table 33).

Table 33. Chemical compositions of essential oils from cinnamon bark of extraction method

Compounds	RT	Area %					
		dH-1hr	dH-3hr	dH-5hr	dL-1hr	dL-3hr	dL-5hr
α -Copaene	8.79	5.02	6.25	6.06	4.94	5.69	6.81
β -Elemene	11.08	-	0.35	0.29	-	-	-
α -Amorphene	13.20	0.34	0.53	0.5	0.31	0.53	0.63
(-)-Isolatedene	13.75	0.22	0.34	-	-	0.38	0.42
α -Muurolene	14.05	0.73	1.17	1.41	0.94	1.26	1.77
δ -Cadinene	14.77	1.68	2.66	2.89	2.08	2.41	3.45
Naphthalene	15.26	0.38	0.57	0.57	0.44	0.51	0.73
cis-Calamenene	16.38	0.3	0.63	0.63	0.47	0.46	0.72
Cinnamal	17.77	0.47	0.35	0.42	0.66	0.45	0.51
Calacorene	18.10	-	-	-	-	0.15	-
Cinnamaldehyde dimethyl acetal	19.86	2.82	5.56	9.07	2.42	3.39	7.63
Cinnamaldehyde	20.81	85.64	79.26	75.34	85.66	82.02	73.39
1-Naphthalenol	21.27	0.45	0.43	0.46	0.25	0.63	0.49
α -Cadinol	23.73	0.31	0.45	0.53	0.43	0.47	0.68
Torreyol	23.99	0.21		0.39	0.32	0.27	0.31
2-Propenal	28.22	1.43	1.45	1.44	1.08	1.03	1.77

나. 항진균 물질의 치즈 및 식품에 적용 가능성평가

(1) 항진균 활성 유산균을 이용한 계피 추출물 첨가 발효유 제조

(가) 항진균 활성 유산균을 이용한 발효유 제조과정 중 품질특성

ALH을 이용하여 발효유 제조용 스타터 균주로서 사용 가능성을 탐색하고자 단독 또는 상업균주와 혼합사용하여 발효유를 제조하였고, 발효유 제조과정 중 발효시간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화를 측정한 결과는 table 34와 같다. ALH를 단독으로 사용하여 제조한 발효유의 경우 산 생성력이 매우 낮아 발효유 제조용 스타터로서 적합하지 않았다. 그러나 상업균주(YF-L812)와 ALH를 각각 0.7:0.3, 0.5:0.5, 0.3:0.7의 비율로 혼합하여 제조한 발효유의 경우는 상업균주를 단독으로 사용하여 제조한 발효유와 유사하게 발효 6시간에 발효 종말점인 pH 4.6에 도달하였고, 적정산도 값은 0.85%를 유지하였으며, 유산균수는 4×10^9 CFU/mL을 유지하였다. 따라서 항진균 활성이 우수한 발효유 제조용 유산균 스타터를 개발하기 위해서는 ALH를 단독균주로 사용하기 보다는 산 생성력이 우수한 유산균과 혼합하여 사용하는 것이 적합할 것으로 판단된다.

Table 34. Changes in pH, titration acidity and viable cell counts of fermented milk with lactic acid bacteria isolated from Kimchi during fermentation at 40°C for 8 hours

	Ingredients	Fermentation time (h)				
		0	2	4	6	8
pH	YF 1.0%	6.46	6.27	5.15	4.57	4.38
	YF 0.7%+ALH 0.3%	6.47	6.27	5.19	4.58	4.40
	YF 0.5%+ALH 0.5%	6.47	6.28	5.20	4.59	4.42
	YF 0.3%+ALH 0.7%	6.46	6.28	5.24	4.62	4.44
	ALH 1.0%	6.47	6.45	6.42	6.38	6.32
Titration acidity (%)	YF 1.0%	0.14	0.21	0.59	0.87	1.12
	YF 0.7%+ALH 0.3%	0.14	0.21	0.58	0.86	1.11
	YF 0.5%+ALH 0.5%	0.14	0.20	0.58	0.86	1.11
	YF 0.3%+ALH 0.7%	0.14	0.20	0.57	0.85	1.10
	ALH 1.0%	0.14	0.14	0.15	0.17	0.19
Viable cell counts (CFU/mL)	YF 1.0%	5.3×10^6	7.8×10^7	6.3×10^8	4.3×10^9	2.3×10^{10}
	YF 0.7%+ALH 0.3%	5.3×10^6	7.9×10^7	6.2×10^8	4.2×10^9	2.4×10^{10}
	YF 0.5%+ALH 0.5%	5.2×10^6	7.7×10^7	6.1×10^8	4.1×10^9	2.3×10^{10}
	YF 0.3%+ALH 0.7%	5.1×10^6	7.6×10^7	6.2×10^8	4.2×10^9	2.2×10^{10}
	ALH 1.0%	5.0×10^6	6.2×10^6	7.8×10^6	8.3×10^6	4.6×10^7

YF : YF-L812 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*)

ALH : *Lactobacillus sakei* subsp. ALI033

(나) 항진균 활성 유산균을 이용한 발효유 관능평가

ALH를 이용하여 제조한 발효유의 관능검사를 실시한 결과는 table 35와 같다. 상업균주(YF-L812)를 단독으로 사용하여 제조한 발효유와 상업균주와 ALH를 혼합하여 제조한 발효유 모두 색, 맛, 조직감 항목에서 크게 차이를 나타내지 않았다. 그러나 향 항목에서는 김치 숙성 시 나타나는 특유의 향에 의한 영향으로 ALH의 첨가량이 증가할수록 낮은 기호도를 나타냈지만 전체 기호도 항목에서는 거의 유사하였다. 따라서 항진균 활성이 우수한 발효유를 제조하기 위한 유산균 스타터 첨가량은 발효유 고유의 맛과 김치 특유의 향이 적절히 중화된 상업균주와 ALH의 0.3:0.7 혼합비율이 가장 적합할 것으로 사료된다.

Table 35. Sensory evaluations of the fermented milk with lactic acid bacteria isolated from Kimchi

Ingredients	Sensory evaluation				
	Color	Flavor	Taste	Texture	Overall acceptability
YF 1.0%	6.1±0.83	7.1±1.15	7.1±1.27	6.8±1.05	7.0±1.31
YF 0.7%+ALH 0.3%	6.2±0.85	6.9±1.01	6.9±1.30	6.7±0.98	6.8±1.25
YF 0.5%+ALH 0.5%	6.0±0.82	6.8±1.03	7.0±1.27	6.8±0.96	6.9±1.22
YF 0.3%+ALH 0.7%	6.1±0.81	6.7±1.12	7.1±1.22	6.9±0.98	7.1±1.33

YF : YF-L812(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*)

ALH : *Lactobacillus sakei* subsp. ALI033

All values are mean ± SD (n=10).

(다) 항진균 활성 유산균을 이용한 계피 추출물 첨가 발효유 제조과정 중 품질특성

ALH와 천연물유래 항진균 물질로 알려진 계피의 시너지효과를 탐색하기 위하여 계피 주정추출물이 첨가된 ALH 발효유를 제조하여 발효시간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화를 측정된 결과는 table 36과 같다. 대조구 A, 대조구 B, 계피 주정추출물 0.02% 및 0.05% 처리구에서는 발효 6시간에 발효 종말점인 pH 4.6에 도달하였고, 계피 주정추출물 0.10% 이상 처리구에서는 발효 7시간 만에 발효 종말점인 pH 4.6 근처에 도달하였다. 또한 적정산도 값은

모든 처리구에서 0.8%를 유지하였으며, 유산균수 변화 양상은 계피 주정추출물 1.00% 처리구를 제외하고 모든 처리구에서 4×10^9 CFU/mL을 유지하였다. 따라서 이러한 결과는 발효유 제조과정 동안 항진균 활성을 가지는 ALH는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*의 생육에는 영향을 미치지 않지만 계피 주정추출물 1.0% 이상 처리 시에는 계피의 주요성분인 신남알데히드(cinnamaldehyde), 유제놀(eugenol) 등으로 인해 유산균의 생육억제 현상이 나타난 것으로 사료된다.

Table 36. Changes in pH, titration acidity and viable cell counts of fermented milk with lactic acid bacteria isolated from Kimchi using cinnamon extract during fermentation at 40°C for 8 hours

	Ingredients	Fermentation time (h)				
		0	2	4	6	8
pH	Control A	6.46	6.27	5.17	4.57	4.39
	Control B	6.47	6.28	5.25	4.61	4.42
	Cinnamon extract 0.02%	6.46	6.27	5.24	4.62	4.44
	Cinnamon extract 0.05%	6.47	6.26	5.25	4.63	4.45
	Cinnamon extract 0.10%	6.47	6.27	5.27	4.66	4.47
	Cinnamon extract 0.15%	6.47	6.27	5.28	4.67	4.48
	Cinnamon extract 0.20%	6.47	6.28	5.27	4.68	4.48
	Cinnamon extract 0.50%	6.48	6.28	5.29	4.69	4.49
	Cinnamon extract 1.00%	6.49	6.30	5.31	4.72	4.52
Titration acidity (%)	Control A	0.14	0.21	0.59	0.88	1.14
	Control B	0.14	0.20	0.57	0.85	1.10
	Cinnamon extract 0.02%	0.14	0.20	0.58	0.84	1.08
	Cinnamon extract 0.05%	0.14	0.21	0.57	0.83	1.08
	Cinnamon extract 0.10%	0.14	0.20	0.57	0.83	1.06
	Cinnamon extract 0.15%	0.13	0.20	0.56	0.83	1.05
	Cinnamon extract 0.20%	0.13	0.19	0.56	0.82	1.05
	Cinnamon extract 0.50%	0.13	0.19	0.55	0.82	1.05
	Cinnamon extract 1.00%	0.13	0.18	0.55	0.80	1.02
Viable cell counts (CFU/mL)	Control A	5.3×10^6	7.8×10^7	6.3×10^8	4.3×10^9	2.3×10^{10}
	Control B	5.1×10^6	7.6×10^7	6.2×10^8	4.2×10^9	2.2×10^{10}
	Cinnamon extract 0.02%	5.1×10^6	7.7×10^7	6.1×10^8	4.3×10^9	2.1×10^{10}
	Cinnamon extract 0.05%	5.0×10^6	7.5×10^7	6.0×10^8	4.1×10^9	2.0×10^{10}
	Cinnamon extract 0.10%	5.1×10^6	7.6×10^7	6.1×10^8	4.4×10^9	2.3×10^{10}
	Cinnamon extract 0.15%	5.0×10^6	7.5×10^7	6.1×10^8	4.2×10^9	2.3×10^{10}
	Cinnamon extract 0.20%	5.0×10^6	7.5×10^7	6.2×10^8	4.2×10^9	2.2×10^{10}
	Cinnamon extract 0.50%	5.0×10^6	7.5×10^7	6.0×10^8	4.1×10^9	2.0×10^{10}
	Cinnamon extract 1.00%	4.9×10^6	7.3×10^7	5.9×10^8	3.8×10^9	1.8×10^{10}

Control A : YF-L812 1%

Control B : YF-L812 0.3%+ALH (*Lactobacillus sakei* subsp. ALI033) 0.7%

(라) 항진균 활성 유산균을 이용한 계피 추출물 첨가 발효유의 관능평가

계피 주정추출물이 첨가된 ALH 발효유의 관능평가를 실시한 결과는 table 37과 같다. 관능평가 결과 대조구와 계피 주정추출물 첨가구에서 색과 조직감 항목은 크게 차이를 나타내지 않았으며 향 항목에서는 계피 주정추출물 0.15% 이하 처리구에서 높은 기호도를 나타낸 반면, 계피 주정추출물 0.20% 이상 처리구에서는 낮은 기호도를 나타냈다. 특히 유산균 ALH의 혼합발효로 이루어진 대조구 B의 향 항목에 대한 기호도가 낮은 이유는 김치 숙성 시 나타나는 특유의 향에 의한 영향으로 판단된다. 또한 맛 항목에 대한 기호도는 계피 주정추출물 0.15% 이상 처리구에서 계피의 독특한 맛이 계피 주정추출물 첨가량에 따른 쓴맛으로 누적되어 아주 낮게 나타났다. 따라서 계피첨가 발효유에 대한 전체 기호도는 김치 특유의 향에 계피의 향과 맛이 적절히 중화된 계피 추출물 0.05% 처리구에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 김치유래 유산균과 계피 주정추출물의 시너지효과를 통해 관능적 특성에는 영향을 미치지 않으면서 항진균 및 항균활성이 우수한 발효유제품 개발에 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 37. Sensory evaluations of fermented milk with lactic acid bacteria isolated from Kimchi using cinnamon extract

Ingredients	Sensory evaluation				
	Color	Flavor	Taste	Texture	Overall acceptability
Control A	6.4±0.87	7.0±1.18	6.9±1.20	6.9±0.87	6.8±1.27
Control B	6.5±0.86	6.8±1.07	6.7±1.16	6.8±0.71	6.9±1.32
Cinnamon extract 0.02%	6.5±0.85	7.0±0.97	6.8±1.03	6.8±0.52	7.2±1.23
Cinnamon extract 0.05%	6.5±0.82	7.1±0.85	7.2±1.42	6.8±0.48	7.7±1.16
Cinnamon extract 0.10%	6.5±0.81	7.1±1.42	7.0±1.41	6.9±0.88	7.3±1.15
Cinnamon extract 0.15%	6.4±0.84	7.2±1.22	6.4±1.35	6.8±0.55	6.7±1.25
Cinnamon extract 0.20%	6.3±0.82	6.8±1.27	4.7±1.17	6.8±0.67	5.6±0.87
Cinnamon extract 0.50%	6.3±0.85	6.6±1.15	3.8±1.13	6.7±0.52	4.5±0.94
Cinnamon extract 1.00%	6.3±0.81	6.7±1.14	3.2±1.21	6.8±0.53	3.3±0.63

Control A : YF-L812 1%

Control B : YF-L812 0.3%+ALH(*Lactobacillus sakei* subsp. ALI033) 0.7%

All values are mean ± SD(n=10).

(마) 항진균 활성 유산균을 이용한 계피 추출물 첨가 발효유의 저장 중 품질특성

발효가 완료된 각각의 발효유를 4℃에서 냉장보관하면서 7일 간격으로 28일 동안 저장 기간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화를 측정한 결과는 table 38과 같다. 상업균주 단독으로 발효한 대조구 A의 경우 저장기간 동안 후산발효가 지속적으로 일어나 pH는 28일 저장 후 4.58에서 4.26으로 0.32 저하되었고, 적정산도는 0.88에서 1.20으로 0.32% 증가하였다. 반면에 상업균주와 ALH를 혼합하여 발효한 대조구B의 경우는 동일기간에 pH는 0.19 저하되었으며, 적정산도는 0.28% 상승하는데 그쳤다. 특히 모든 계피 주정추출물 첨가구에서 pH와 적정산도의 변화가 대조구에 비해 훨씬 적은 것으로 확인되었다. 또한 저장기간 중 유산균 수의 변화는 대조구 B 및 모든 계피 주정추출물 첨가구에서 대조구 A와 비교하여 적게 나타났지만 적정치 범위 이상인 10^8 CFU/mL 이상을 유지하고 있으므로 품질의 안정성이 확인되었다. 따라서 이러한 결과는 유기산, 과산화수소, 박테리오신 등을 생산하여 항진균 및 항균활성을 나타내는 김치유래 유산균과 항진균 및 항균 활성이 우수한 계피를 발효유에 적용함으로써 발효유 저장 중에 발효균주의 과도한 증식이나 후산발효를 효과적으로 지연시켜 줄 것으로 판단되며 발효유의 저장품질이 안정적으로 유지될 것으로 사료된다.

Table 38. Changes in pH, titration acidity and viable cell counts of fermented milk with lactic acid bacteria isolated from Kimchi using cinnamon extract during storage at 4°C for 28 days

Ingredients	Storage time (Days)					
	0	7	14	21	28	
pH	Control A	4.58	4.43	4.35	4.30	4.26
	Control B	4.59	4.53	4.49	4.44	4.40
	Cinnamon extract 0.02%	4.59	4.55	4.51	4.45	4.43
	Cinnamon extract 0.05%	4.59	4.55	4.52	4.45	4.45
	Cinnamon extract 0.10%	4.59	4.56	4.52	4.46	4.47
	Cinnamon extract 0.15%	4.58	4.56	4.52	4.46	4.47
	Cinnamon extract 0.20%	4.58	4.57	4.53	4.47	4.48
Titration acidity (%)	Control A	0.88	1.10	1.14	1.18	1.20
	Control B	0.87	1.02	1.05	1.11	1.15
	Cinnamon extract 0.02%	0.87	0.94	1.02	1.09	1.09
	Cinnamon extract 0.05%	0.87	0.94	1.02	1.08	1.07
	Cinnamon extract 0.10%	0.87	0.92	1.02	1.08	1.06
	Cinnamon extract 0.15%	0.88	0.92	0.99	1.06	1.04
	Cinnamon extract 0.20%	0.88	0.89	0.97	1.06	1.04
Viable cell counts (CFU/mL)	Control A	4.3×10 ⁹	6.3×10 ⁹	9.3×10 ⁹	1.5×10 ¹⁰	3.2×10 ¹⁰
	Control B	4.4×10 ⁹	5.3×10 ⁹	7.6×10 ⁹	8.8×10 ⁹	9.8×10 ⁹
	Cinnamon extract 0.02%	4.4×10 ⁹	5.2×10 ⁹	7.6×10 ⁹	8.8×10 ⁹	9.6×10 ⁹
	Cinnamon extract 0.05%	4.3×10 ⁹	5.3×10 ⁹	7.6×10 ⁹	8.7×10 ⁹	9.6×10 ⁹
	Cinnamon extract 0.10%	4.4×10 ⁹	5.1×10 ⁹	7.5×10 ⁹	8.7×10 ⁹	9.5×10 ⁹
	Cinnamon extract 0.15%	4.4×10 ⁹	5.2×10 ⁹	7.4×10 ⁹	8.6×10 ⁹	9.5×10 ⁹
Cinnamon extract 0.20%	4.3×10 ⁹	5.2×10 ⁹	7.5×10 ⁹	8.7×10 ⁹	9.4×10 ⁹	

Control A : YF-L812 1%

Control B : YF-L812 0.3%+ALH (*Lactobacillus sakei* subsp. ALI033) 0.7%

(2) 항진균 유산균 배양액과 천연물유래 항진균 물질을 첨가한 식빵 제조

(가) 항진균 유산균 배양액과 항진균 물질을 첨가한 식빵의 품질평가

① 식빵의 무게, 부피, 비용적 및 굽기 손실을

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵의 무게, 부피, 비용적 및 굽기 손실을 측정된 결과는 table 39와 같고, 제조한 식빵은 fig. 58과 같다. 식빵 반죽의 무게는 541.35~543.03 g으로 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 50:50 비율로 첨가하였을 때 가장 낮았고, ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하였을 때 가장 높았으나, 시료 간 유의한 차이는 없었다. 식빵의 무게는 465.41~494.24 g으로 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 0:100 비율로 첨가하였을 때 가장 높았고, 대조구가 가장 낮았으며 시료 간 유의한 차이가 있었다. 계피 주정추출물 첨가량이 감소하고, ALH 배양액이 증가할수록 식빵의 무게는 감소하는 것으로 나타났다. 식빵의 부피는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 50:50 비율로 첨가한 식빵이 1653.63 mL로 가장 높았고, ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵이 1065.30 mL로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 식빵의 비용적은 부피와 마찬가지로 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 50:50 비율로 첨가하여 제조한 식빵이 3.46 mL/g으로 가장 높았고, ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵이 2.16 mL/g으로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 굽기 손실율은 대조구에서 14.07%로 가장 높았고, ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵이 8.71%로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. ALH 배양액 첨가량이 감소하고 계피 주정추출물 첨가량이 증가할수록 식빵의 굽기 손실율은 감소하는 것으로 나타났다.

Table 39. Weight, volume, specific volume and baking loss rate of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract

Sample	Dough weight (g)	Bread weight (g)	Bread volume (mL)	Bread specific volume (mL/g)	Baking loss rate (%)
Control	541.61±0.97	465.41±1.45 ^d	1538.83±21.07 ^c	3.31±0.04 ^b	14.07±0.15 ^a
A	541.59±1.12	466.45±2.71 ^d	1554.00±6.53 ^{bc}	3.33±0.01 ^b	13.87±0.42 ^a
B	543.03±2.02	472.14±3.58 ^{cd}	1575.67±7.20 ^b	3.34±0.03 ^b	13.05±0.69 ^{ab}
C	541.35±0.63	477.59±1.15 ^c	1653.63±25.94 ^a	3.46±0.06 ^a	11.78±0.24 ^{bc}
D	542.52±1.05	485.04±0.87 ^b	1545.07±3.27 ^c	3.19±0.01 ^c	10.59±0.33 ^c
E	541.39±1.05	494.24±8.81 ^a	1065.30±11.92 ^d	2.16±0.04 ^d	8.71±1.76 ^d

All values are mean±SD.

Mean±SD with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

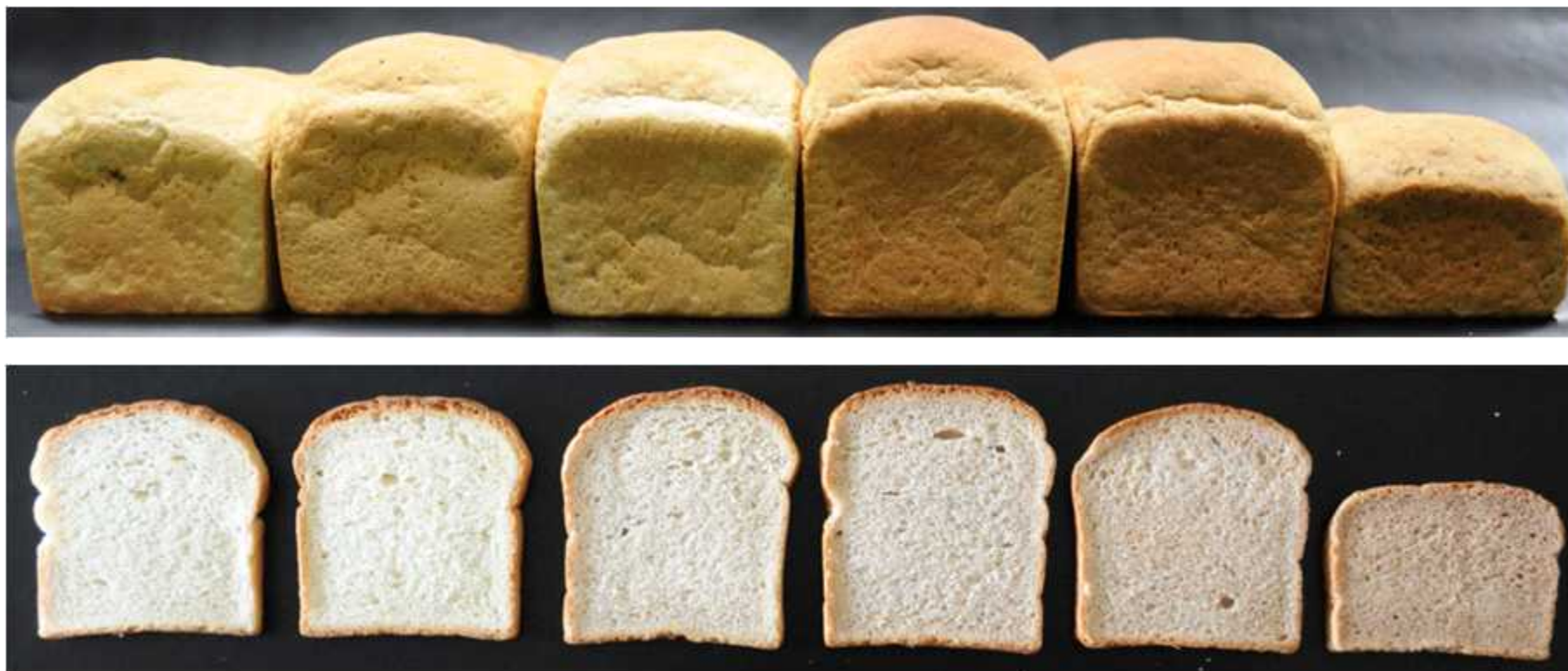


Fig. 58. Cross section of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract.

② 식빵의 수분함량, pH 및 적정산도

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵의 수분함량, pH 및 적정산도를 측정된 결과는 table 40과 같다. 수분함량은 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 40.74%로 가장 높았고, ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 37.96%로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵은 대조구보다 높은 수분함량을 보였으며, 계피 주정추출물 첨가량이 증가할수록 식빵의 수분함량은 감소하는 경향을 보였다. 식빵의 pH를 측정한 결과에서는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 6.58로 가장 높았으며, ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 6.36으로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 식빵의 적정산도를 측정된 결과는 pH 측정과 반대로 ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 8.55 mg%로 가장 높았고, ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 7.66 mg%로 가장 낮았으며 시료 간 유의한 차이가 있었다. ALH 배양액 첨가량이 감소하고 계피 주정추출물 첨가량이 증가할수록 식빵의 산도는 증가하는 것으로 나타났다.

Table 40. Water content, pH and titration acidity of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract

Sample	Water content (%)	pH	Titration acidity (mg%)
Control	40.15±0.28 ^b	6.44±0.04 ^c	7.79±0.24
A	40.74±0.23 ^a	6.58±0.01 ^a	7.66±0.16
B	39.82±0.04 ^b	6.47±0.01 ^c	7.72±0.33
C	39.79±0.16 ^b	6.52±0.01 ^b	8.15±0.60
D	38.88±0.16 ^c	6.50±0.00 ^b	8.46±0.59
E	37.96±0.60 ^d	6.36±0.02 ^d	8.55±0.38

All values are mean±SD.

Mean±SD with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

③ 식빵의 색도

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵의 색도를 측정된 결과는 table 41과 같다. 식빵의 백색도를 측정된 결과에서는 대조구에서 80.22로 가장 높았고, ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 58.32로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 식빵의 적색도를 측정된 결과에서는 ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 6.39로 가장 높았고, ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 -1.91로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 식빵의 황색도를 측정된 결과도 적색도와 마찬가지로 ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 23.80으로 가장 높았고, ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 19.88로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. ALH 배양액 첨가비율이 감소하고 계피 주정추출물 첨가비율이 증가할수록 백색도는 낮아지고, 적색도와 황색도는 증가하는 것으로 계피 주정추출물이 식빵의 색을 어둡게 만드는 것으로 나타났다.

Table 41. Chromaticity of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract

Sample	Whiteness index	Redness index	Yellowness index
Control	80.22±0.20 ^a	-1.77±0.32 ^e	20.55±0.35 ^b
A	79.88±0.28 ^a	-1.91±0.70 ^c	19.88±0.19 ^c
B	72.99±0.32 ^b	2.04±0.23 ^d	19.79±0.44 ^c
C	68.89±0.38 ^c	2.91±0.81 ^c	20.53±0.25 ^b
D	65.04±0.41 ^d	3.98±0.67 ^b	20.85±0.18 ^b
E	58.32±0.70 ^e	6.39±0.25 ^a	23.80±0.03 ^a

All values are mean±SD.

Mean±SD with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

④ 식빵의 물성

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵의 물성을 측정된 결과는 table 42와 같다. 식빵의 경도를 측정된 결과에서는 유산균 ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 6.92 kg으로 가장 높았고, ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 3.31 kg으로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. ALH 배양액 첨가비율이 감소하고 계피 주정추출물 첨가비율이 증가할수록 식빵의 경도는 증가하는 것으로 나타났고, ALH 배양액을 50% 이상 첨가하였을 때에는 대조구보다 경도가 부드러운 것으로 나타났다. 식빵의 부착성을 측정된 결과에서는 대조구에서 0.39로 가장 낮았으며 그 외 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가하여 제조한 식빵에서 0.40으로 대조구보다 높게 나타났으나 시료 간 유의한 차이는 없었다. 식빵의 탄력성을 측정된 결과에서는 계피 주정추출물을 첨가하지 않고 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 0.91로 가장 높았고, 계피 주정추출물만 첨가하여 제조한 식빵에서 0.82로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이는 없었다. 계피 주정추출물 첨가비율이 증가할수록 식빵의 탄력성을 감소하는 것으로 나타났다. 식빵의 응집성을 측정된 결과에서는 대조구, ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵, 그리고 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25로 첨가하여 제조한 식빵에서 0.52로 가장 높게 나타났고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 0.49로 가장 낮았으나 시료 간 유의한 차이는 없었다. 식빵의 점착성과 씹힘성을 측정된 결과에서는 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 3.38과 2.78로 가장 높았고, 계피 주정추출물을 첨가하지 않고 유산균 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 1.71과 1.55로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 점착성과 씹힘성은 경도와 같이 ALH 배양액 첨가비율이 감소하고 계피 주정추출물 첨가비율이 증가할수록 증가하는 것으로 나타났다.

Table 42. Physical properties of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract

Sample	Hardness (kg)	Adhesiveness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness
Control	5.54±0.81 ^b	0.39±0.06	0.90±0.00 ^b	0.52±0.02	2.92±0.48 ^b	2.62±0.43 ^a
A	3.31±0.28 ^d	0.40±0.06	0.91±0.01 ^a	0.52±0.01	1.71±0.14 ^d	1.55±0.12 ^c
B	3.58±0.49 ^d	0.40±0.04	0.90±0.00 ^b	0.52±0.01	1.86±0.25 ^d	1.67±0.22 ^c
C	4.55±0.53 ^c	0.40±0.04	0.90±0.01 ^b	0.51±0.05	2.32±0.40 ^c	2.10±0.36 ^b
D	6.09±0.45 ^b	0.40±0.04	0.89±0.00 ^c	0.51±0.02	3.09±0.29 ^{ab}	2.74±0.27 ^a
E	6.92±0.78 ^a	0.40±0.05	0.82±0.00 ^d	0.49±0.01	3.38±0.39 ^a	2.78±0.32 ^a

All values are mean±SD.

Mean±SD with different superscript within a column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

⑤ 식빵의 관능검사

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵의 관능검사를 측정된 결과는 table 43 및 fig. 59와 같다. 색에 대한 선호도를 측정된 결과에서는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 11.63으로 가장 높았고, ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 8.46으로 가장 낮았으며 시료 간에 유의한 차이가 있었다. ALH 배양액 첨가비율이 감소하고 계피 주정추출물 첨가비율이 증가할수록 색도에서 백색도 측정 결과에서와 같이 색이 어두워서 선호도가 감소하는 것으로 생각된다. 맛에 대한 선호도를 측정된 결과에서는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 50:50 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 11.69로 가장 높은 선호도를 보였고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 5.85로 가장 낮은 선호도를 보였으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵은 특유의 신맛이 강하게 느껴져서 선호도가 낮아진 것으로 생각되며, 계피 주정추출물 첨가량이 50% 이상으로 증가하면 쓴맛이 강하게 느껴져서 맛에 대한 선호도가 낮아진 것으로 생각된다. 향미에 대한 선호도를 측정된 결과도 맛과 마찬가지로 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 50:50 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 12.14로 가장 높은 선호도를 보였고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 7.67로 가장 낮은 선호도를 보였으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. ALH 첨가량이 증가할수록 식빵에서 상한 냄새가 느껴졌고, 계피 주정추출물 첨가량이 증가할수록 계피의 향이 너무 강해서 선호도가 낮아졌다. ALH 배양액과 계피 주정추출물을 50:50 비율로 첨가하면 각각의 냄새를 상쇄시켜 향미에 대한 선호도가 높은 것으로 생각된다. 외형에 대한 선호도를 측정된 결과에서는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 12.06으로 가장 높은 선호도를 보였고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 5.71로 가장 낮은 선호도를 보였다. 질감에 대한 선호도를 측정된 결과에서도 유산균 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 12.04로 가장 높은 선호도를 보였고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 4.91로 가장 낮은 선호도를 보였으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 이와 같은 결과는 기계적 물성 측정 중 경도 측정 결과와 같이 ALH 배양액 첨가량이 증가하고 계피 주정추출물 첨가량이 감소할수록 식빵의 경도가 낮고 부드러워지기 때문에 식빵의 질감에 대한 선호도도 높은 것으로 생각된다. 전체적인 선호도에서는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 50:50의 비율로 첨가한 식빵에서 13.14로 가장 높았고, 그 다음으로 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25의 비율로 첨가한 식빵에서 12.22로 높은 것으로 나타났다. 색, 외형 및 질감에서는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 선호도가 가장 높은 것으로 나타났으나 맛과 향미에서 ALH 특유의 신맛과 냄새가 전체적인 선호도를 낮게 한

것으로 생각되며, 계피 주정추출물을 25~50% 첨가하면 유산균 특유의 신맛과 냄새를 억제하고 높은 농도의 계피 주정추출물 첨가로 인한 물성 변화를 최소화하여 전체적인 선호도가 높아지는 것으로 생각된다.

Table 43. Sensory evaluation of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract

Sample	Color	Taste	Flavor	Appearance	Texture	Overall acceptability
Control	10.44±2.09 ^a	9.29±1.79 ^b	11.48±1.61 ^a	10.36±0.85 ^{bc}	9.76±1.14 ^b	11.74±1.71 ^b
A	11.63±1.35 ^a	10.77±2.43 ^a	11.00±1.86 ^a	12.06±1.90 ^a	12.04±1.93 ^a	10.14±1.29 ^c
B	10.56±1.69 ^a	11.30±1.44 ^a	11.35±1.70 ^a	11.74±1.48 ^a	11.99±1.89 ^a	12.22±1.77 ^{ab}
C	11.06±1.70 ^a	11.69±1.60 ^a	12.14±1.58 ^a	10.56±1.20 ^b	11.34±1.31 ^a	13.14±1.69 ^a
D	9.06±1.78 ^b	8.89±2.83 ^b	8.85±2.09 ^b	9.38±1.06 ^c	7.22±2.75 ^c	9.04±2.14 ^c
E	8.46±1.05 ^b	5.84±1.50 ^c	7.67±1.57 ^b	5.71±2.02 ^d	4.91±1.30 ^d	5.71±1.64 ^d

All values are mean±SD.

Mean±SD with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

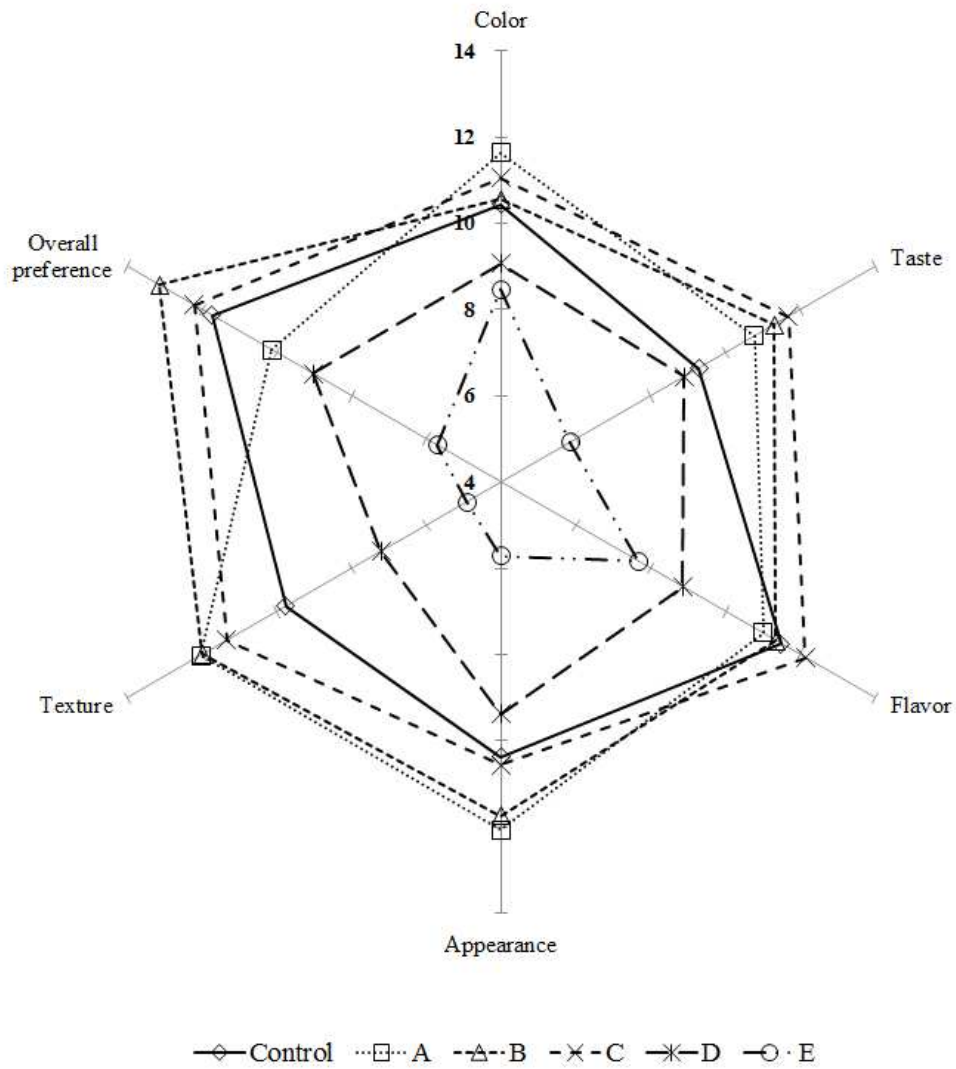


Fig. 59. Sensory characteristics of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract.

(나) 항진균 유산균 배양액과 항진균 물질을 첨가한 식빵의 저장 중 품질특성

① 식빵의 저장 중 수분함량 변화

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵을 20℃ incubator에서 5일 동안 저장하면서 수분함량의 변화를 측정된 결과는 table 44 및 fig. 60과 같다. 저장 1일에 수분함량을 측정된 결과에서는 대조구에서 37.51%로 가장 높았고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 35.60%로 가장 낮았으며, 계피 주정추출물 첨가량이 증가할수록 수분함량이 감소하는 것으로 나타났다. 저장 2일부터 저장 5일까지는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 35.66%, 34.65%, 34.45%, 33.21%로 가장 높게 나타났다. ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵은 저장 2일과 3일에 각각 31.03%, 29.29%로 가장 낮게 나타났다. 저장 4일과 저장 5일에는 ALH 배양액과 계피 주정추출물 첨가비율이 25:75인 식빵에서 각각 28.65%, 28.14%로 가장 낮게 나타났다. 모든 시료는 각각의 저장기간에서 시료 간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 저장기간 동안 모든 시료의 수분함량은 감소하는 경향을 보였고, 모든 시료는 각각의 저장기간에 따라서도 유의한 차이가 있는 것으로 나타났고, ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵이 저장기간 동안 수분함량의 변화가 가장 적은 것으로 나타났으며, 그 다음으로 대조구의 변화가 적은 것으로 나타났다.

Table 44. Water content of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

(Unit: %)

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	40.15±0.28 ^b _A	37.51±0.43 ^a _B	35.32±0.45 ^a _C	34.14±0.24 ^a _D	33.46±0.17 ^a _E	32.49±0.22 ^a _F
A	40.74±0.23 ^a _A	36.57±0.45 ^b _B	35.66±0.43 ^a _C	34.65±0.13 ^a _D	34.45±0.60 ^a _D	33.21±0.03 ^a _E
B	39.82±0.04 ^b _A	36.49±0.19 ^b _B	33.76±0.57 ^b _C	32.29±0.60 ^b _D	29.85±0.75 ^b _E	29.26±0.45 ^b _E
C	39.79±0.16 ^b _A	35.60±0.47 ^c _B	32.94±0.41 ^{bc} _C	31.18±0.83 ^c _D	28.75±0.68 ^b _E	28.25±0.27 ^b _E
D	38.88±0.16 ^c _A	35.66±0.29 ^c _B	32.18±0.88 ^{cd} _C	29.52±0.78 ^d _D	28.65±0.89 ^b _D	28.14±1.04 ^b _D
E	37.96±0.60 ^d _A	35.60±0.48 ^c _B	31.03±1.17 ^d _C	29.29±0.08 ^d _D	29.07±0.66 ^b _D	28.75±1.07 ^b _D

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-d}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-F}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

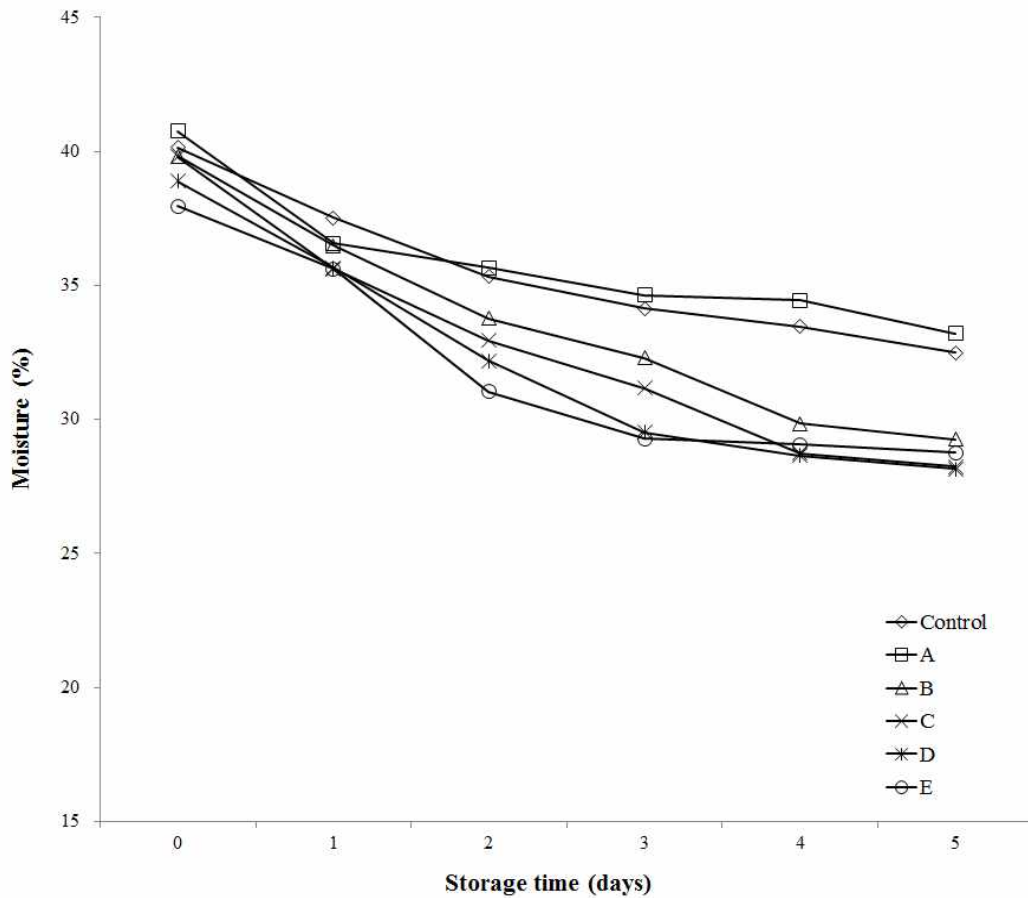


Fig. 60. Change of water content in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

② 저장 중 pH 변화

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵을 20°C incubator에서 5일 동안 저장하면서 pH의 변화를 측정한 결과는 table 45 및 fig. 61과 같다. 저장 1일에 식빵의 pH를 측정한 결과에서는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 6.37로 가장 높았고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 6.14로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 저장 2일에는 대조구의 pH가 5.58로 가장 높았으며, ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 5.35로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 저장 3일과 4일에 식빵의 pH를 측정한 결과에서는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 5.20과 5.11로 가장 높았고, 저장 3일에는 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵의 pH가 5.04로 가장 낮았고, 저장 4일에는 ALH 배

양액과 계피 주정추출물 첨가비율이 75:25인 식빵에서 5.02로 가장 낮았으며, 각각의 저장 기간에 시료 간 유의한 차이가 있었다. 저장 5일에는 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 pH가 5.03으로 가장 높았고, 대조구에서 4.64로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 저장 기간 동안 대조구의 pH가 가장 크게 낮아진 것으로 나타났고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵의 pH의 변화가 가장 적은 것으로 나타났으며, 각각의 시료는 저장기간에 따라서도 유의한 차이가 있었다. 대조구를 제외하고 ALH 배양액과 계피 주정추출물 첨가하여 제조한 식빵에서는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵의 pH가 저장기간 동안 가장 크게 변한 것으로 나타났다.

Table 45. pH of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	6.44±0.04 ^c _A	6.23±0.03 ^d _B	5.58±0.06 ^a _C	5.19±0.05 ^a _D	5.06±0.02 ^c _E	4.64±0.02 ^c _F
A	6.58±0.01 ^a _A	6.37±0.01 ^a _B	5.44±0.01 ^b _C	5.20±0.01 ^a _D	5.11±0.03 ^b _E	4.90±0.02 ^b _F
B	6.47±0.01 ^c _A	6.26±0.00 ^c _B	5.47±0.01 ^b _C	5.14±0.01 ^b _D	5.02±0.01 ^d _E	5.01±0.03 ^a _E
C	6.52±0.01 ^b _A	6.31±0.01 ^b _B	5.48±0.01 ^b _C	5.17±0.02 ^{ab} _D	5.16±0.03 ^a _D	5.00±0.06 ^a _E
D	6.50±0.00 ^b _A	6.29±0.00 ^b _B	5.46±0.03 ^b _C	5.13±0.03 ^b _D	5.13±0.02 ^{ab} _D	5.01±0.02 ^a _E
E	6.36±0.02 ^d _A	6.14±0.01 ^e _B	5.35±0.02 ^c _C	5.04±0.02 ^c _D	5.04±0.01 ^{cd} _D	5.03±0.03 ^a _D

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-d}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-F}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

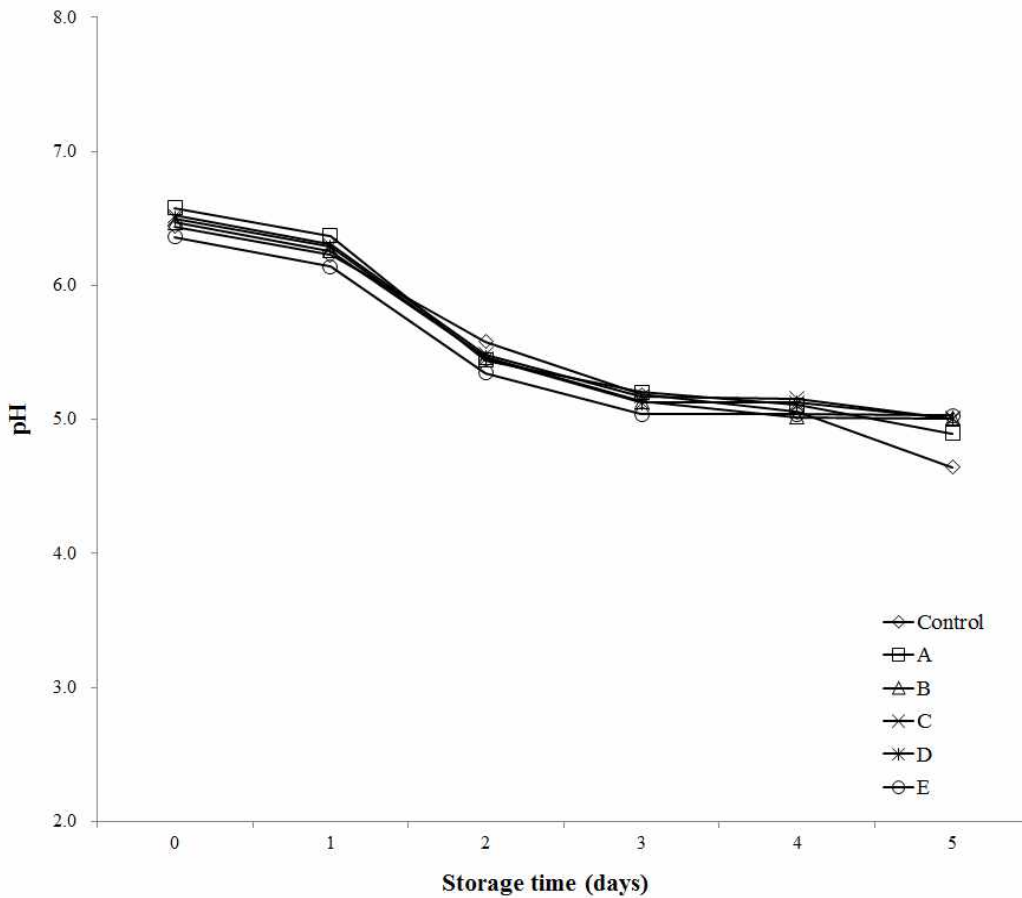


Fig. 61. Change of pH in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

③ 식빵의 저장 중 적정산도 변화

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵을 20°C incubator에서 5일 동안 저장하면서 적정산도의 변화를 측정한 결과는 table 46 및 fig. 62와 같다. 저장 1일에 측정한 적정산도 결과에서는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 9.77 mg%로 가장 높았고, 대조구에서 8.49 mg%로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 저장 2일에 측정한 적정산도 결과에서도 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 10.23 mg%로 가장 높았고, 대조구에서 8.54 mg%로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 저장 3일에 측정한 적정산도 결과에서는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 25:75 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 10.76 mg%로 가장 높았고, ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 9.57 mg%로 가장 낮

았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 저장 4일과 5일에 측정된 적정산도 결과에서는 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 10.75 mg%, 11.52 mg%로 가장 높았고, 대조구에서 각각 12.05 mg%, 13.30 mg%로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 저장기간 동안 모든 시료의 적정산도는 증가하였고, 각각의 시료는 저장기간에 따라서도 유의한 차이가 있었다. 저장기간 동안 적정산도의 변화가 가장 큰 시료는 대조구로 나타났고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵의 저장 중 적정산도의 변화가 가장 적은 것으로 나타났다. ALH 배양액 첨가량이 감소하고 계피 주정추출물 첨가량이 증가할수록 저장기간 동안 적정산도의 변화가 적은 것으로 나타났다. 계피 주정추출물을 첨가하여 식빵을 제조할 경우 최초의 산도는 높으나 저장기간 동안 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

Table 46. Titration acidity of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

(Unit: mg%)

Sample	Storage time (Day)					
	0	1	2	3	4	5
Control	7.79±0.24 ^D	8.49±0.57 ^c _D	8.54±0.19 ^b _D	9.58±0.35 ^c	12.05±0.75 ^a _B	13.30±0.17 ^a _A
A	7.66±0.16 ^E	8.63±0.29 ^c _D	9.57±0.15 ^a _C	9.57±0.15 ^c	11.44±0.52 ^{ab} _B	13.16±0.69 ^a _A
B	7.72±0.33 ^D	9.77±0.38 ^a _C	10.23±0.84 ^a _{BC}	10.50±0.63 ^{BC}	11.28±0.74 ^{ab} _B	13.14±0.48 ^a _A
C	8.15±0.60 ^E	8.91±0.17 ^{bc} _D	10.04±0.17 ^a _C	10.19±0.19 ^c	11.57±0.43 ^{ab} _B	12.97±0.60 ^a _A
D	8.46±0.59 ^D	9.38±0.22 ^{ab} _C	9.53±0.34 ^a _C	10.76±0.93 ^B	10.81±0.45 ^{ab} _B	12.77±0.18 ^a _A
E	8.55±0.38 ^D	9.31±0.27 ^{ab} _{CD}	10.07±0.33 ^a _{BC}	10.63±0.54 ^{AB}	10.75±0.80 ^b _{AB}	11.52±0.96 ^b _A

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-d}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-E}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

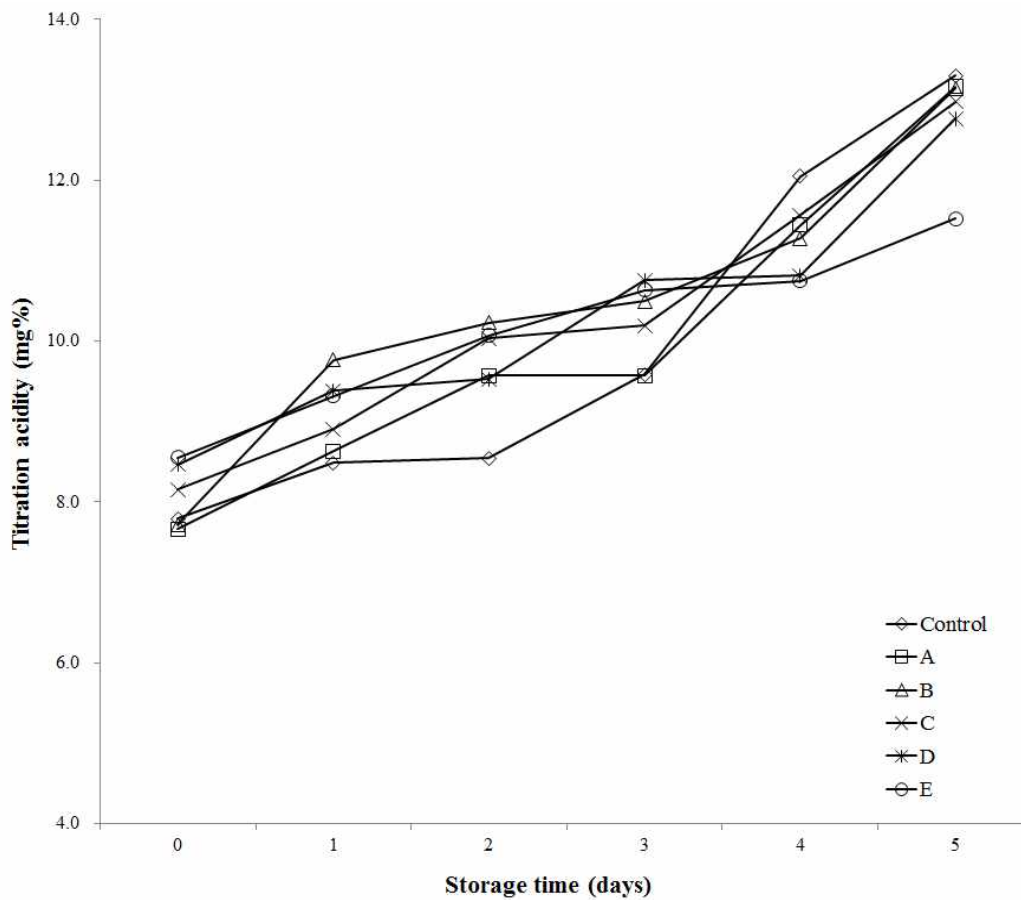


Fig. 62. Change of titration acidity in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

④ 식빵의 저장 중 색도 변화

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵을 20°C incubator에서 5일 동안 저장하면서 색도의 변화를 측정한 결과는 table 47~49 및 fig. 63~65과 같다. 저장기간 동안 식빵의 백색도 변화를 측정한 결과, 저장 1일부터 저장 4일까지는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵의 백색도가 각각 79.11, 79.09, 78.53 및 77.73으로 가장 높았고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵의 백색도가 각각 57.93, 57.90, 57.11 및 57.11으로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 저장 5일에는 대조구의 백색도가 73.19로 가장 높았고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 56.40으로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 저장기간 동안 모든 시료의 백색도는 낮아지는 경향을 보였으며, 각각의 시료는 저장기간에 따라서도 유의한 차이가 있었다. 저장기간 동안

식빵의 적색도 변화를 측정한 결과, 저장 1일부터 저장 5일까지는 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 7.28, 7.34, 7.61, 7.73 및 7.86으로 가장 높았고, 저장 1일부터 3일까지는 ALH 배양액을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 -1.83, -1.75 및 -1.64로 가장 낮았고, 저장 4일째와 5일째에는 대조구에서 각각 -1.49 및 -1.17로 가장 낮았으며, 시료 간 유의한 차이가 있었다. 모든 시료는 저장기간 동안 적색도가 약간 증가하는 경향을 보였고, 대조구와 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하여 제조한 식빵을 제외하고 다른 시료는 각각의 저장기간에 따라서도 유의한 차이가 있었다. 저장기간 동안 식빵의 황색도 변화를 측정한 결과, 저장 1일부터 저장 5일까지는 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 22.18, 21.91, 21.79, 22.09 및 23.53으로 가장 높았고, 저장 1일부터 3일까지는 ALH 배양액을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 18.65, 18.93 및 18.89로 가장 낮았고, 저장 4일에는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 19.03으로 가장 낮았고, 저장 5일에서는 대조구에서 19.56으로 가장 낮았으며, 각각의 저장기간에서 시료 간 유의한 차이가 있었다. 또한 각각의 시료는 저장기간에 따라서도 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다.

Table 47. Whiteness index in of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	80.22±0.20 ^a _A	78.70±0.68 ^a _B	78.49±0.31 ^a _B	77.59±0.84 ^b _C	76.70±0.92 ^b _C	73.19±1.14 ^a _D
A	79.88±0.28 ^a _A	79.11±0.21 ^a _B	79.09±0.27 ^a _B	78.53±0.68 ^a _B	77.73±1.05 ^a _C	70.74±0.74 ^b _D
B	72.99±0.32 ^b _A	71.91±1.18 ^b _{AB}	71.90±0.51 ^b _{BC}	71.54±0.48 ^c _{BC}	72.41±0.66 ^c _C	68.40±0.22 ^c _D
C	68.89±0.38 ^c _A	68.82±0.69 ^c _A	68.09±0.92 ^c _{AB}	67.69±0.69 ^d _B	67.19±0.83 ^d _B	65.52±0.76 ^d _C
D	65.04±0.41 ^d _A	64.82±0.35 ^d _A	64.35±2.02 ^d _A	63.83±0.39 ^e _{AB}	62.90±0.94 ^e _B	58.40±0.33 ^e _C
E	58.32±0.70 ^e _A	57.93±0.35 ^e _A	57.90±0.20 ^e _A	57.11±0.11 ^f _B	57.11±0.53 ^f _B	56.40±0.33 ^f _C

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-f}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-D}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

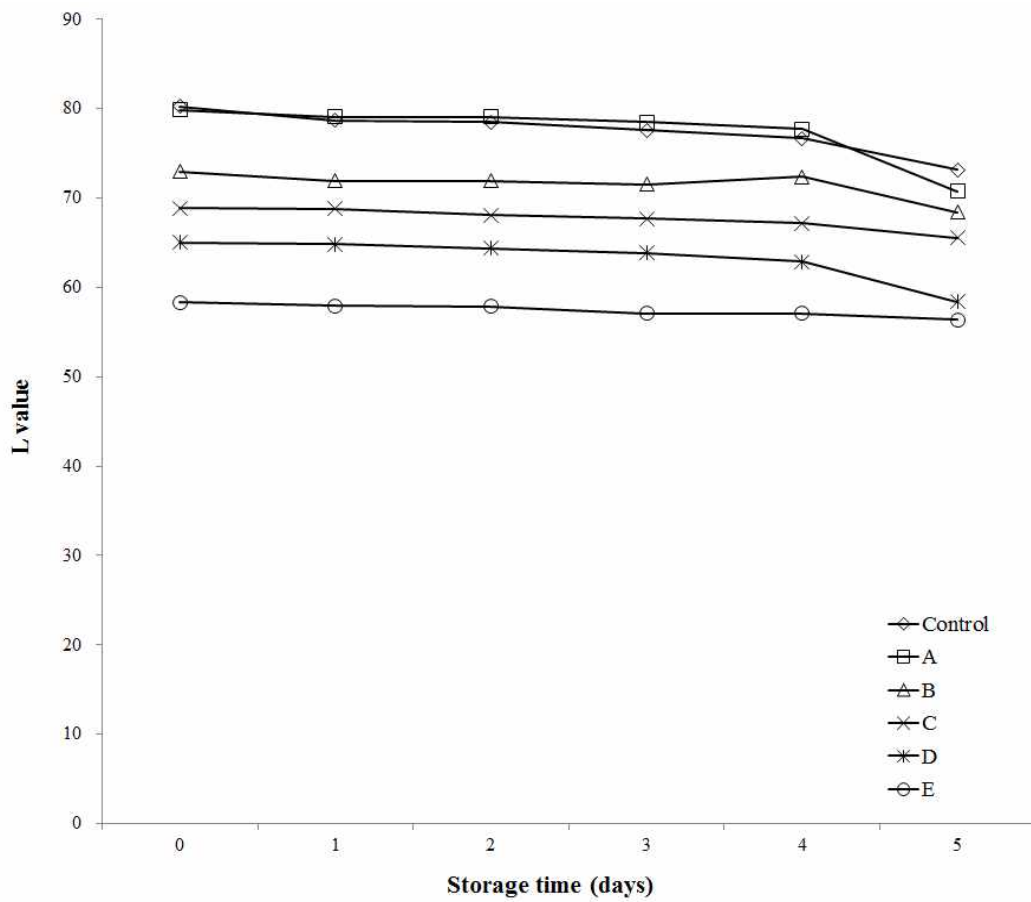


Fig. 63. Change of whiteness index in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

Table 48. Redness index in of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	-1.77±0.32 ^e	-1.64±0.35 ^e	-1.53±0.53 ^e	-1.51±0.81 ^e	-1.49±0.51 ^e	-1.17±0.16 ^f
A	-1.91±0.70 ^e _C	-1.83±0.29 ^e _C	-1.75±0.27 ^e _C	-1.64±0.22 ^e _C	-1.10±0.32 ^e _B	-0.31±0.14 ^e _A
B	2.04±0.23 ^d	2.05±0.29 ^d	2.29±0.24 ^d	2.30±0.50 ^d	2.35±0.43 ^d	2.42±0.24 ^d
C	2.91±0.81 ^c _D	3.09±1.02 ^c _{CD}	3.51±0.69 ^c _{BCD}	3.74±0.36 ^c _{ABC}	4.00±0.29 ^c _{AB}	4.41±0.17 ^c _A
D	3.98±0.67 ^b _C	4.79±0.44 ^b _B	4.82±0.62 ^b _B	5.00±0.49 ^b _{AB}	5.64±0.55 ^b _{AB}	5.25±0.21 ^b _A
E	6.39±0.25 ^a _D	7.28±0.22 ^a _C	7.34±0.31 ^a _{BC}	7.61±0.20 ^a _{AB}	7.73±0.21 ^a _A	7.86±0.18 ^a _A

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-f}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-D}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

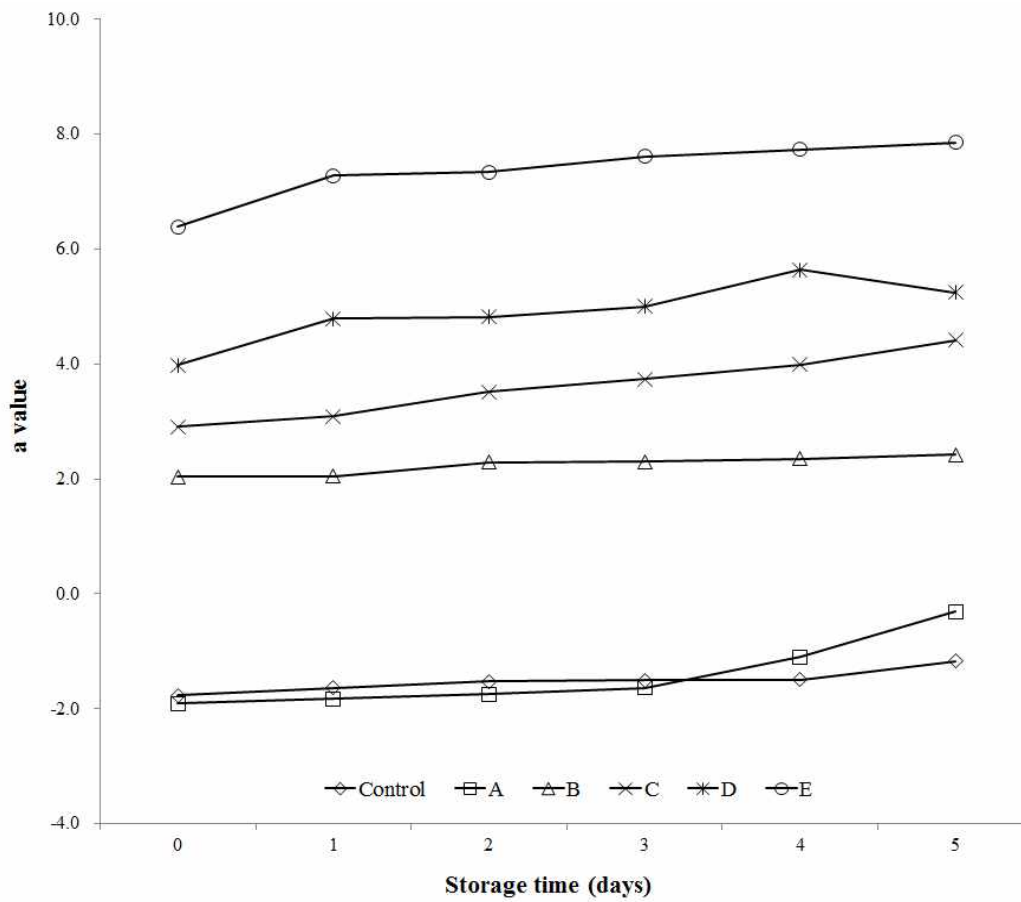


Fig. 64. Change of redness index in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

Table 49 Yellowness index in of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	20.55±0.35 ^b _A	18.88±0.24 ^e _C	19.09±0.30 ^{cd} _C	19.06±0.33 ^c _C	20.81±0.30 ^b _A	19.56±0.18 ^d _B
A	19.88±0.19 ^c _A	18.65±0.22 ^e _B	18.93±0.26 ^d _B	18.89±1.37 ^c _B	19.89±0.42 ^c _A	20.47±0.37 ^c _A
B	19.79±0.44 ^c _{BC}	19.44±0.20 ^d _{CD}	19.54±0.49 ^{bc} _C	20.00±0.25 ^b _B	19.03±0.38 ^e _B	20.74±0.35 ^c _A
C	20.53±0.25 ^b _B	19.87±0.37 ^c _C	19.72±0.11 ^b _C	20.67±0.51 ^b _{AB}	19.44±0.37 ^d _C	21.19±0.84 ^c _A
D	20.85±0.18 ^b _B	20.76±0.13 ^b _{BC}	20.05±0.84 ^b _D	20.55±0.28 ^b _{BCD}	20.23±0.25 ^c _{CD}	22.61±0.51 ^b _A
E	23.80±0.03 ^a _A	22.18±0.10 ^a _B	21.91±0.32 ^a _B	21.79±0.08 ^a _B	22.09±0.14 ^a _B	23.53±0.96 ^a _A

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-d}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-D}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

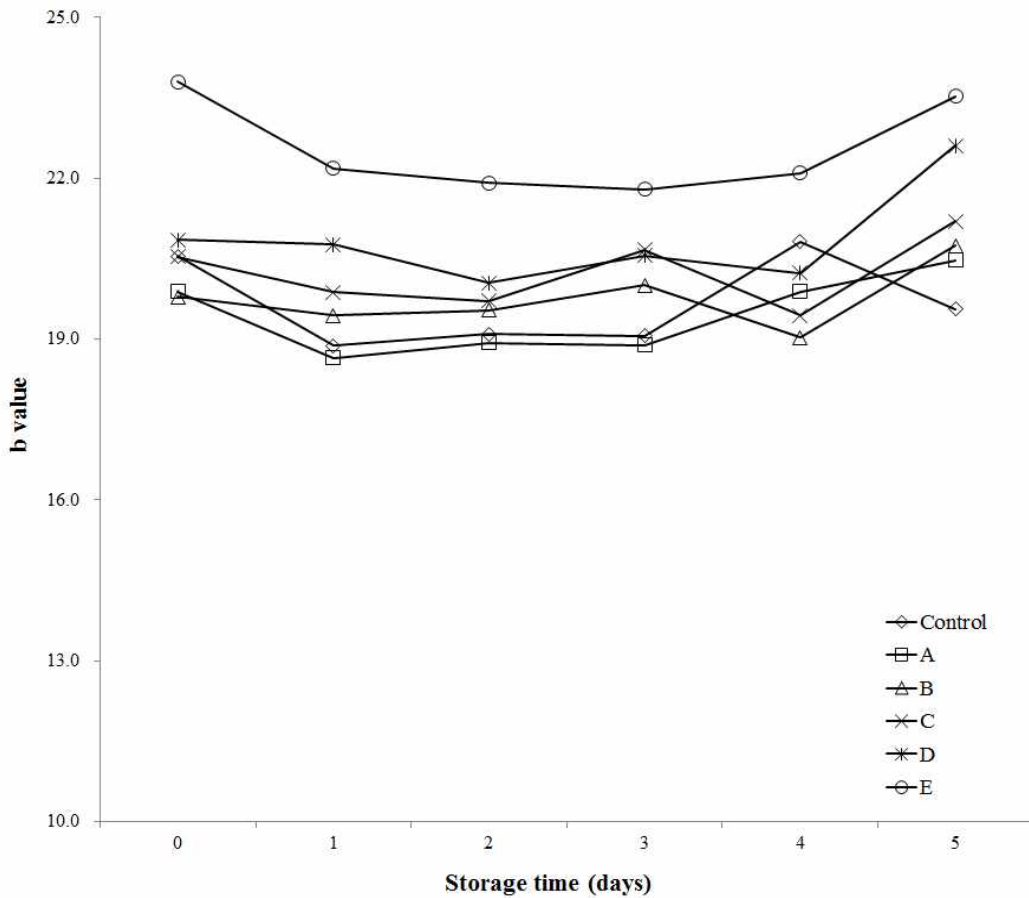


Fig. 65. Change of yellowness index in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

⑤ 식빵의 저장 중 물성 변화

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵을 5°C incubator에서 5일 동안 저장하면서 수분함량의 변화를 측정한 결과는 table 50~55 및 fig. 66~71과 같다. 저장기간 동안 식빵의 경도 변화를 측정한 결과, 저장 1일부터 저장 5일까지는 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 9.10 kg, 10.10 kg, 11.80 kg, 13.24 kg 및 15.13 kg으로 가장 높았고, ALH 추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 4.56 kg, 6.62 kg, 7.05 kg, 7.44 kg 및 7.68 kg으로 가장 낮았으며 시료 간 유의한 차이가 있었다. 모든 시료는 저장기간이 길어질수록 경도는 높아지는 경향을 보였고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵의 경도 변화가 가장 컸으며, ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하여 제조한 식빵의 경도 변화가 가장 적었다. 또한 모든 시료는 각각의 저장기간에 따

라서도 유의한 차이가 있었다. 저장기간 동안 식빵의 부착성 변화를 측정된 결과, 저장 1일과 2일에는 시료 간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났고, 저장 3일째에는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 25:75 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 0.38로 가장 높았고, 저장 4일째에는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 0.34로 가장 높았고, 저장 5일째에는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵과 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 25:75 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 0.33으로 가장 높았다. 저장 3일째부터 저장 5일째에서 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵의 부착성은 각각 0.23, 0.21 및 0.18로 가장 낮았다. 모든 시료의 부착성은 저장기간이 길어질수록 낮아지는 경향을 보였고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서 저장기간 동안 가장 변화가 컸다. 저장기간 동안 식빵의 탄력성 변화를 측정된 결과, 저장 1일과 2일에는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵과 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하여 제조한 식빵의 탄력성이 가장 높았고, 저장 3일부터 저장 5일까지는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵의 탄력성이 가장 높았다. 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵은 저장기간 동안 가장 탄력성이 낮은 것으로 나타났으며, 각각의 저장기간 동안 시료 간 유의한 차이가 있었다. 각각의 시료는 저장기간에 따라서도 유의한 차이가 있는 것으로 나타났으며, 모든 시료는 저장기간이 길어질수록 탄력성은 감소하였으며, 계피 주정추출물을 첨가하여 제조한 식빵의 탄력성이 가장 크게 감소한 것으로 나타났다. 저장기간 동안 식빵의 응집성 변화를 측정된 결과, ALH 배양액과 계피 주정추출물을 50:50 비율로 첨가하여 제조한 식빵의 응집성이 저장기간 동안 가장 높은 것으로 나타났고, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵이 저장기간 동안 가장 낮은 것으로 나타났으며, 각각의 저장기간에서 시료 간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 모든 시료는 저장기간이 길어질수록 응집성은 감소하는 것으로 나타났으며, 각각의 시료는 저장기간에 따라서도 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 저장기간 동안 식빵의 점착성 변화를 측정된 결과, 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵의 점착성이 가장 높은 것으로 나타났고, 저장 1일에는 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 2.18로 가장 낮았고, 저장 2일부터 5일까지는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 3.04, 3.07, 3.23 및 3.16으로 가장 낮은 것으로 나타났고, 저장기간에 각각의 시료는 유의한 차이가 있었으며, 각각의 시료는 저장기간에 따라서도 유의한 차이가 있었다. 저장기간 동안 식빵의 씹힘성 변화를 측정된 결과, 저장 1일부터 4일까지는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 25:75 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 각각 3.55, 3.52, 3.35 및 3.99로 가장 높았고, 저장 5일에는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 50:50 비율로 첨가하여 제조한 식빵에서 3.48로 가장 높았다. 저장 1일에는 ALH

배양액만을 첨가하여 제조한 식빵, 저장 2일과 3일에는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하여 제조한 식빵, 저장 4일과 5일에는 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵의 씹힘성이 가장 낮았다. 모든 시료는 각각의 저장기간에서 시료 간 유의한 차이가 있었고, 각각의 시료는 저장기간에 따라서도 유의한 차이가 있었다.

Table 50. Hardness in of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	5.54±0.81 ^b _D	5.96±0.46 ^c _D	8.10±0.68 ^b _C	8.15±0.31 ^c _C	8.84±0.72 ^c _B	10.30±0.41 ^d _A
A	3.31±0.28 ^d _E	4.56±0.30 ^d _D	6.62±0.42 ^c _C	7.05±0.59 ^d _{BC}	7.44±0.34 ^d _{AB}	7.68±0.78 ^e _A
B	3.58±0.49 ^d _D	4.95±0.58 ^d _C	6.70±0.48 ^c _B	6.87±0.41 ^d _B	7.52±0.57 ^d _A	7.83±0.42 ^e _A
C	4.55±0.53 ^c _E	5.56±0.82 ^c _D	6.82±0.38 ^c _C	7.88±0.69 ^c _B	8.41±0.94 ^c _B	11.12±0.59 ^c _A
D	6.09±0.45 ^b _D	8.32±0.36 ^b _C	8.54±0.36 ^b _C	9.54±0.56 ^b _B	12.20±0.47 ^b _A	12.42±0.49 ^b _A
E	6.92±0.78 ^a _F	9.10±0.57 ^a _E	10.10±0.40 ^a _D	11.80±0.48 ^a _C	13.24±0.62 ^a _B	15.13±0.97 ^a _A

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-d}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-F}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

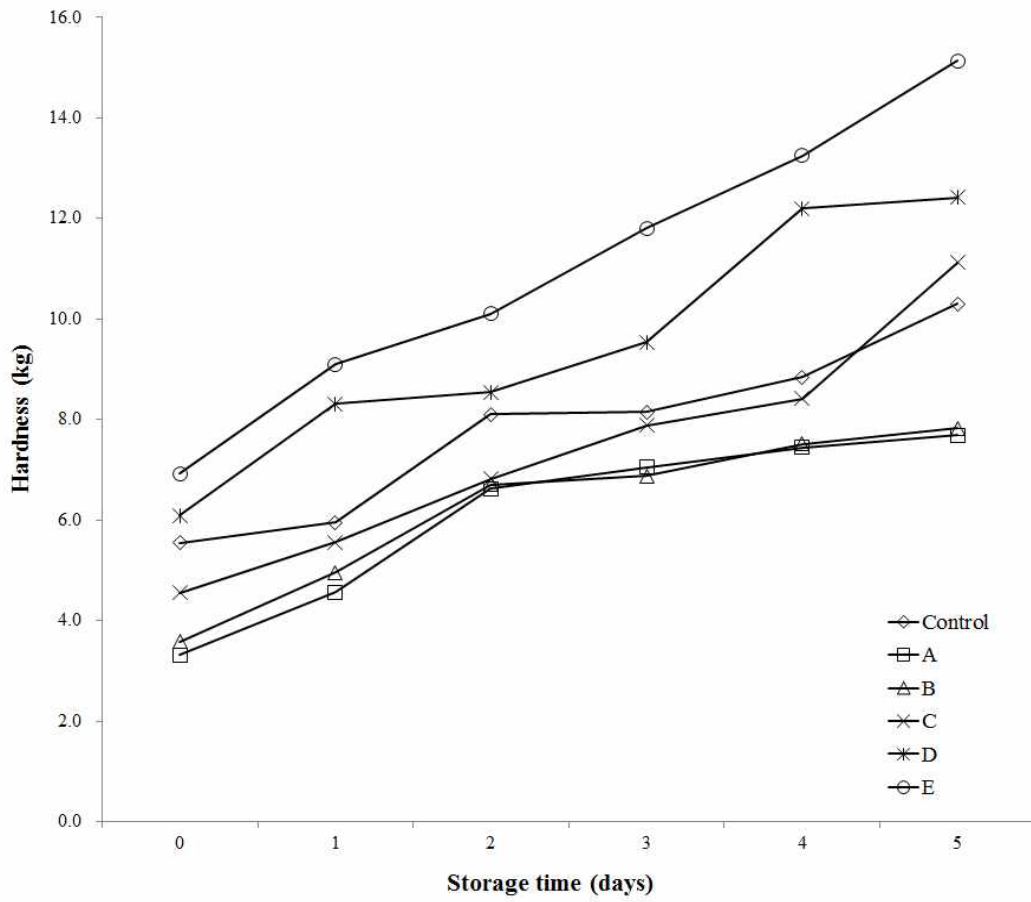


Fig. 66. Change of hardness in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

Table 51. Adhesiveness of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	0.39±0.06 ^A	0.39±0.06 ^A	0.38±0.05 ^A	0.34±0.04 ^{a AB}	0.31±0.05 ^{a B}	0.28±0.06 ^{a B}
A	0.40±0.06	0.39±0.05	0.38±0.06	0.37±0.06 ^a	0.36±0.03 ^a	0.33±0.09 ^a
B	0.40±0.04 ^A	0.38±0.04 ^{AB}	0.36±0.05 ^{AB}	0.36±0.04 ^{a AB}	0.34±0.04 ^{a BC}	0.30±0.04 ^{a C}
C	0.40±0.04 ^A	0.40±0.05 ^A	0.36±0.06 ^{AB}	0.36±0.06 ^{a AB}	0.33±0.06 ^{a B}	0.27±0.06 ^{a C}
D	0.40±0.04 ^A	0.39±0.03 ^A	0.38±0.03 ^A	0.38±0.03 ^{a A}	0.33±0.04 ^{a B}	0.33±0.05 ^{a B}
E	0.40±0.05 ^A	0.40±0.03 ^A	0.34±0.03 ^B	0.23±0.05 ^{b C}	0.21±0.04 ^{b CD}	0.18±0.04 ^{b D}

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-b}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-D}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

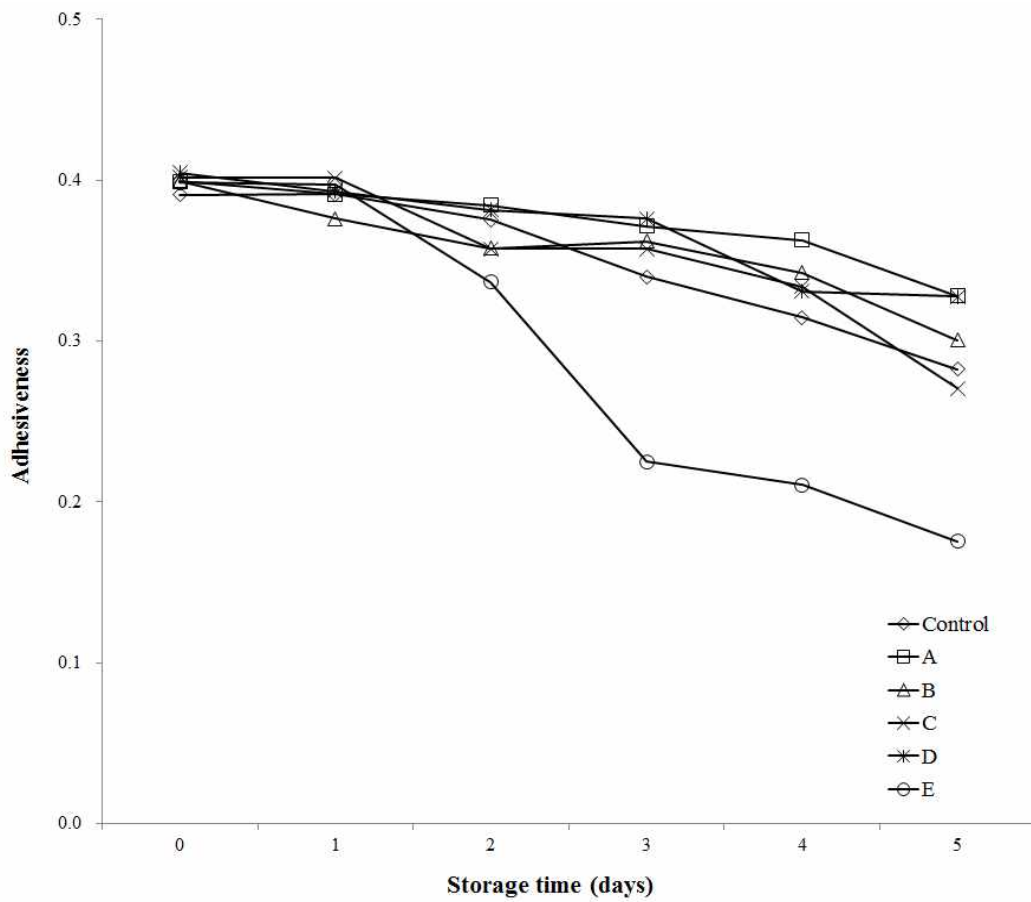


Fig. 67. Change of adhesiveness in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

Table 52. Springiness of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	0.90±0.00 ^b _A	0.89±0.01 ^b _B	0.88±0.00 ^b _C	0.87±0.01 ^a _C	0.81±0.01 ^b _D	0.81±0.01 ^b _D
A	0.91±0.01 ^a _A	0.90±0.02 ^{ab} _A	0.89±0.00 ^a _A	0.88±0.01 ^a _B	0.86±0.02 ^a _B	0.83±0.01 ^a _C
B	0.90±0.00 ^b _{AB}	0.90±0.01 ^a _A	0.89±0.01 ^a _B	0.87±0.01 ^a _C	0.80±0.01 ^{bc} _D	0.78±0.02 ^c _E
C	0.90±0.01 ^b _A	0.89±0.00 ^{ab} _B	0.88±0.00 ^{ab} _B	0.84±0.01 ^b _C	0.80±0.01 ^{bc} _D	0.68±0.01 ^d _E
D	0.89±0.00 ^c _A	0.89±0.00 ^b _A	0.88±0.01 ^b _B	0.81±0.02 ^c _C	0.79±0.01 ^c _D	0.52±0.01 ^e _E
E	0.82±0.00 ^d _A	0.79±0.01 ^c _B	0.76±0.01 ^c _C	0.69±0.01 ^d _D	0.46±0.01 ^d _E	0.33±0.01 ^f _F

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-d}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-F}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

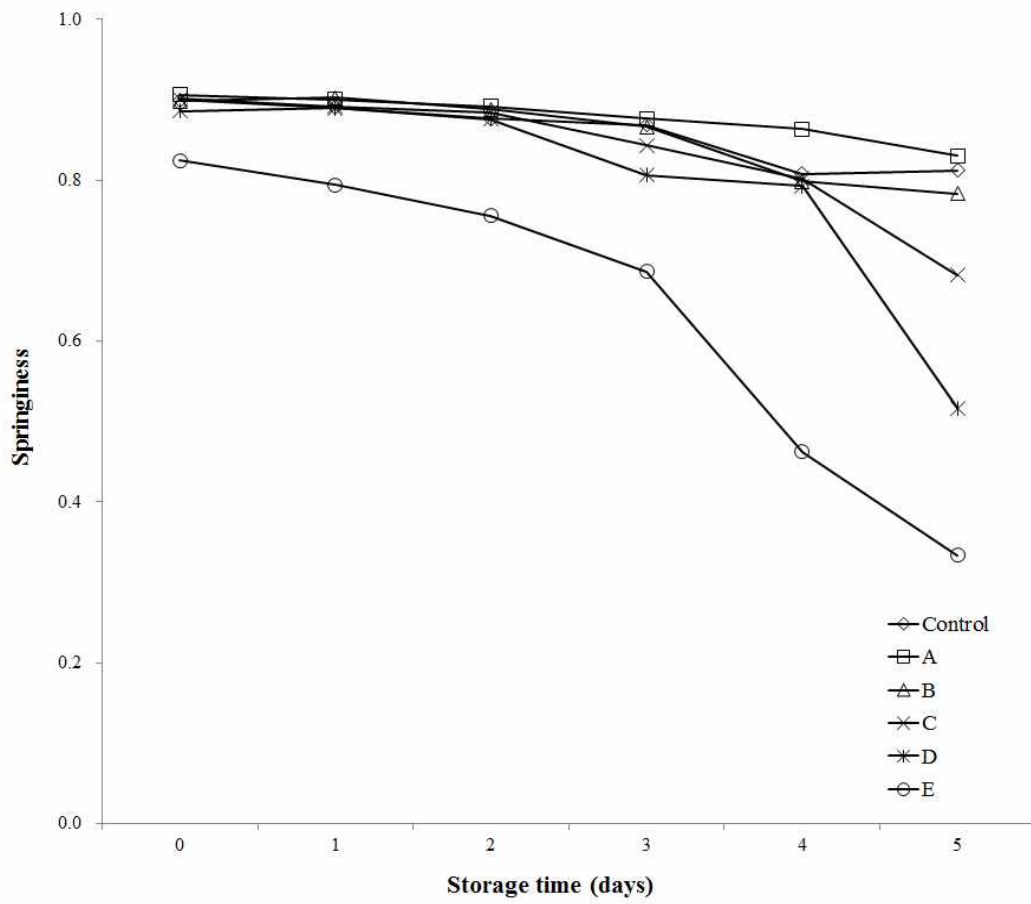


Fig. 68. Change of springiness in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

Table 53. Cohesiveness of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	0.52±0.02 ^a _A	0.50±0.07 ^a _{AB}	0.48±0.01 ^b _{BC}	0.47±0.01 ^{ab} _C	0.46±0.00 ^a _C	0.43±0.01 ^b _D
A	0.52±0.01 ^a _A	0.48±0.00 ^{ab} _B	0.48±0.00 ^b _B	0.45±0.01 ^{bc} _C	0.44±0.03 ^b _C	0.42±0.01 ^b _D
B	0.52±0.01 ^a _A	0.46±0.01 ^b _B	0.45±0.00 ^c _B	0.45±0.04 ^{bc} _{BC}	0.43±0.01 ^{bc} _C	0.40±0.02 ^c _D
C	0.51±0.05 ^{ab} _A	0.50±0.01 ^a _A	0.50±0.00 ^a _A	0.47±0.01 ^a _B	0.47±0.01 ^a _B	0.46±0.01 ^a _B
D	0.51±0.02 ^{ab} _A	0.48±0.01 ^{ab} _B	0.47±0.02 ^b _B	0.44±0.00 ^c _C	0.41±0.02 ^{cd} _D	0.40±0.00 ^c _E
E	0.49±0.01 ^b _A	0.46±0.02 ^b _B	0.41±0.01 ^d _C	0.39±0.01 ^d _D	0.39±0.03 ^d _D	0.37±0.01 ^d _E

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-d}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-E}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

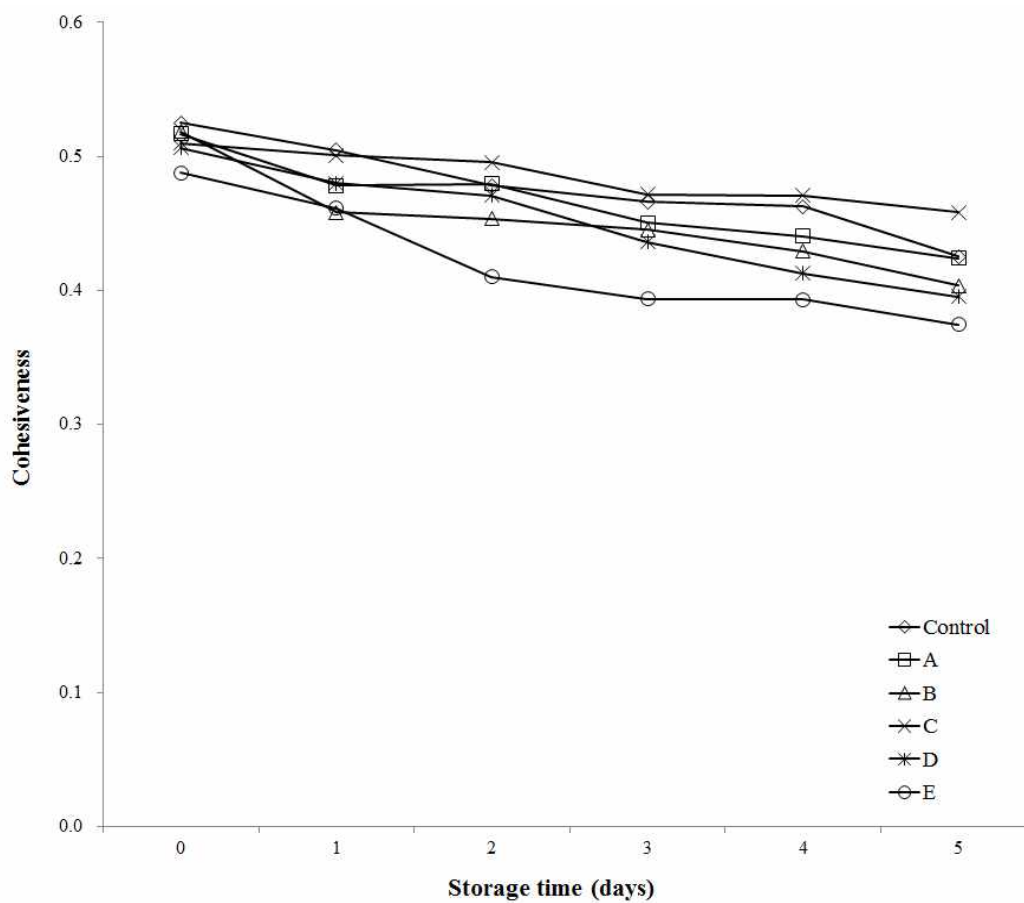


Fig. 69. Change of cohesiveness in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

Table 54. Gumminess of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	2.92±0.48 ^b _C	3.02±0.55 ^b _C	3.88±0.36 ^b _B	3.80±0.15 ^c _B	4.09±0.35 ^b _{AB}	4.38±0.20 ^c _A
A	1.71±0.14 ^d _C	2.18±0.14 ^c _B	3.17±0.21 ^{cd} _A	3.18±0.27 ^d _A	3.28±0.33 ^c _A	3.26±0.29 ^d _A
B	1.86±0.25 ^d _C	2.27±0.27 ^c _B	3.04±0.22 ^d _A	3.07±0.41 ^d _A	3.23±0.29 ^c _A	3.16±0.18 ^d _A
C	2.32±0.40 ^c _E	2.78±0.43 ^b _D	3.38±0.20 ^c _C	3.72±0.35 ^c _{BC}	3.96±0.48 ^b _B	5.10±0.35 ^b _A
D	3.09±0.29 ^{ab} _C	3.99±0.21 ^a _B	4.02±0.28 ^{ab} _B	4.16±0.25 ^b _B	5.04±0.26 ^a _A	4.91±0.21 ^b _A
E	3.38±0.39 ^a _E	4.20±0.32 ^a _D	4.14±0.20 ^a _D	4.65±0.18 ^a _C	5.21±0.53 ^a _B	5.67±0.43 ^a _A

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-d}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-E}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

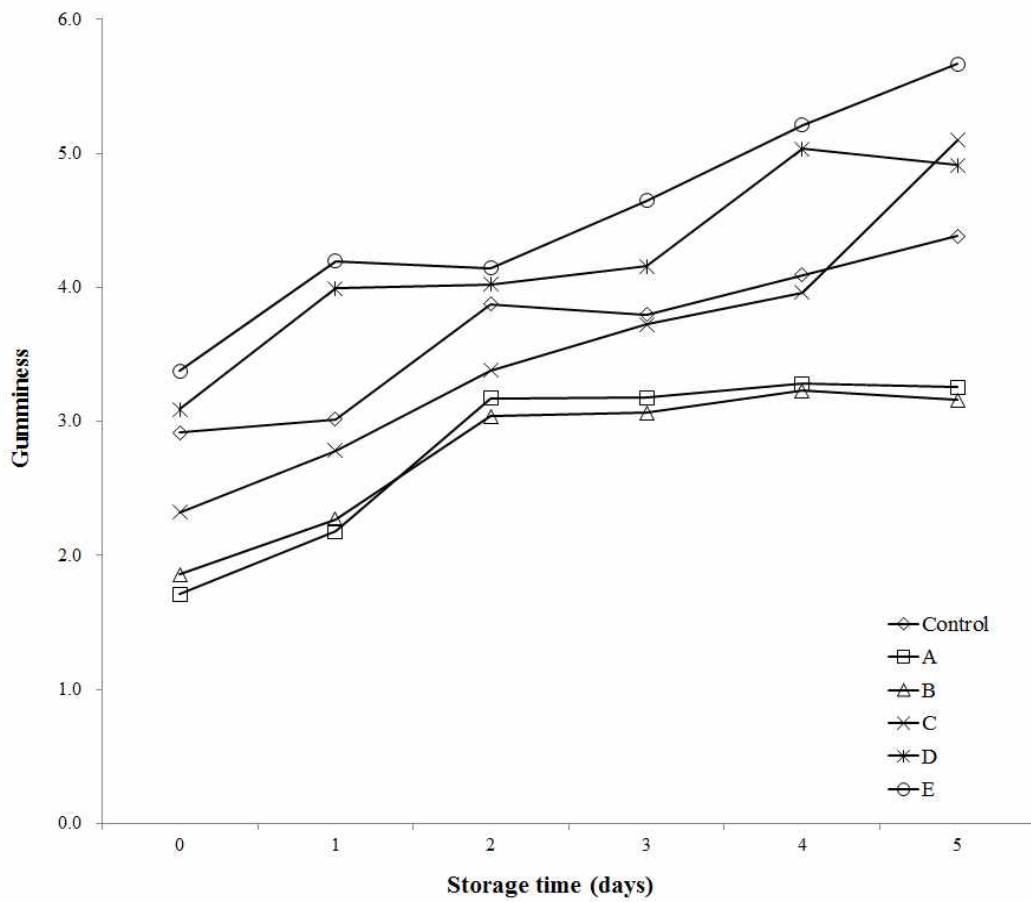


Fig. 70. Change of gumminess in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

Table 55. Chewiness of bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time

Sample	Storage time (Days)					
	0	1	2	3	4	5
Control	2.62±0.43 ^a _B	2.69±0.49 ^b _B	3.40±0.31 ^a _A	3.30±0.15 ^a _A	3.31±0.31 ^b _A	3.56±0.19 ^a _A
A	1.55±0.12 ^c _C	1.96±0.15 ^c _B	2.83±0.17 ^{cd} _A	2.78±0.25 ^b _A	2.84±0.32 ^c _A	2.70±0.26 ^b _A
B	1.67±0.22 ^c _C	2.05±0.25 ^c _B	2.70±0.17 ^d _A	2.66±0.37 ^b _A	2.58±0.24 ^{cd} _A	2.47±0.13 ^c _A
C	2.10±0.36 ^b _D	2.48±0.38 ^b _C	2.99±0.18 ^{bc} _B	3.14±0.27 ^a _B	3.18±0.37 ^b _{AB}	3.48±0.22 ^a _A
D	2.74±0.27 ^a _C	3.55±0.18 ^a _B	3.52±0.23 ^a _B	3.35±0.18 ^a _B	3.99±0.24 ^a _A	2.54±0.13 ^{bc} _C
E	2.78±0.32 ^a _B	3.33±0.24 ^a _A	3.13±0.16 ^b _A	3.19±0.12 ^a _A	2.41±0.22 ^d _C	1.89±0.16 ^d _D

All values are mean±SD. Mean with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{a-d}Means Duncan's multiple range test for different addition (column). ^{A-D}Means Duncan's multiple range test for storage time (row).

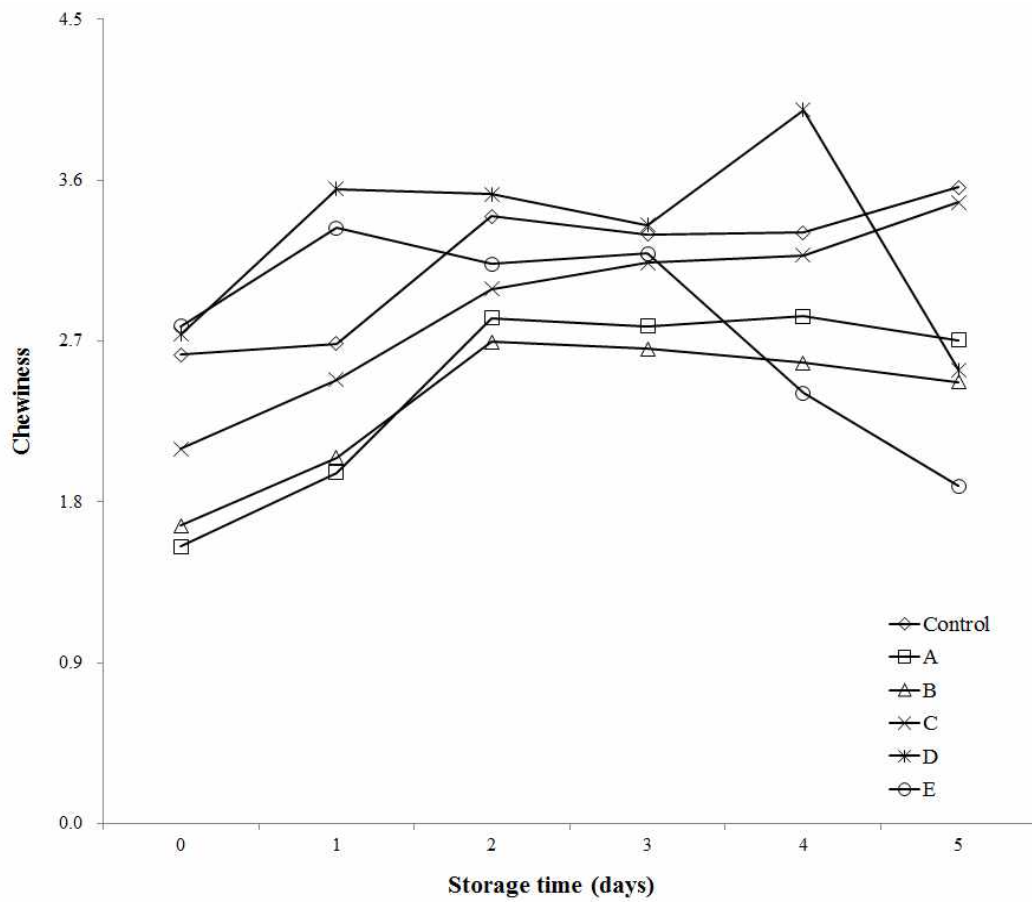


Fig. 71. Change of chewiness in bread added antifungal lactic acid bacteria culture medium and cinnamon ethanol extract for the storage time.

⑥ 유산균 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 노화 억제 분석

ALH 배양액과 계피 주정추출물을 전체 중량의 2.5%를 물 대신에 첨가하여 제조한 식빵의 노화 특성을 분석하기 위하여 20℃ incubator에서 5일 동안 저장하면서 측정된 정도의 변화를 Avrami 방정식에 따라 실험군의 식빵을 대조구 식빵과 비교하여 노화 특성 분석한 결과를 분석하였다. 효과적인 노화 억제 물질의 기준은 대조구와 비교하여 Avrami 지수(n)는 낮은 값으로 판단하였다. ALH 배양액과 계피 주정추출물을 혼합 첨가하여 제조한 식빵을 5℃ 냉장 보관하면서 제조시간 0, 1, 2, 3, 4 및 5일 경과 후 식빵의 경도를 변화를 Avrami 방정식에 따라 $\log -\ln(E - E)/(E_L - E_0)]$ 와 $\log t$ 를 축으로 나타낸 그래프는 fig. 72~77과 같다. 본 실험의 대조구 식빵의 결정화 형태를 나타내는 Avrami 지수(n) 값은 1.8181을 보였으며, 유산균 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵의 Avrami 지수(n) 값은 1.5305, 유산균 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25 비율로 첨가하여 제조한 식빵의 Avrami 지수(n) 값은 1.2988, ALH 배양액과 계피 주정추출물을 50:50 비율로 첨가하여 제조한 식빵의 Avrami 지수(n) 값은 1.3050, ALH 배양액과 계피 주정추출물을 25:75 비율로 첨가하여 제조한 식빵의 Avrami 지수(n) 값은 1.2768 그리고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵의 Avrami 지수(n) 값은 1.1097로 나타났다. ALH 배양액과 계피 주정추출물을 이용하여 제조한 식빵의 n 값은 대조구보다 낮은 것으로 나타나 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 첨가하여 식빵을 제조할 경우 일반 식빵보다 노화 속도가 느린 것으로 나타났고, ALH 배양액을 첨가하지 않고 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵의 n 값이 가장 낮게 나타나 저장 중 식빵의 노화 억제에 효과가 가장 높은 것으로 나타났다.

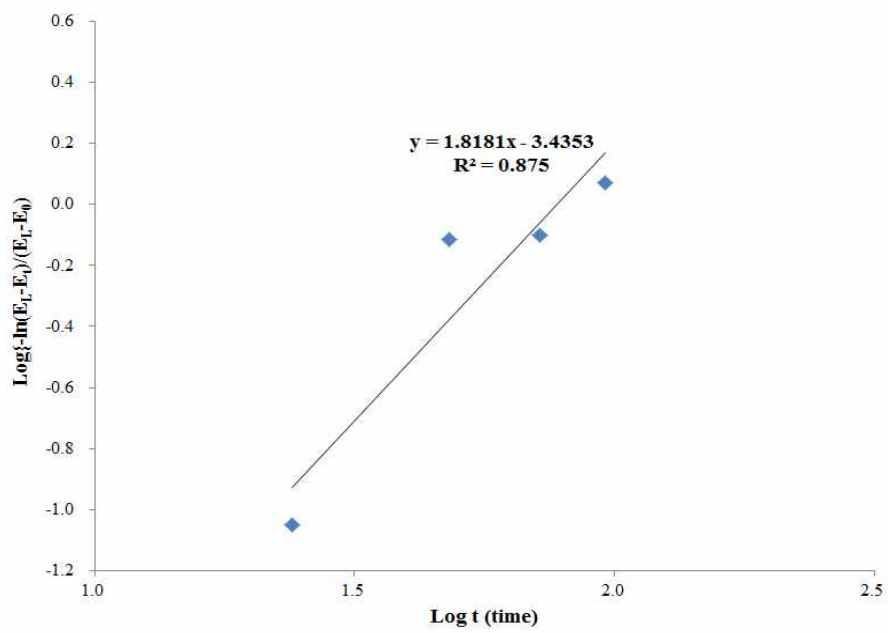


Fig. 72. Plot of $\log [-\ln(E_L - E_t)/(E_L - E_0)]$ versus log time of none treated bread.

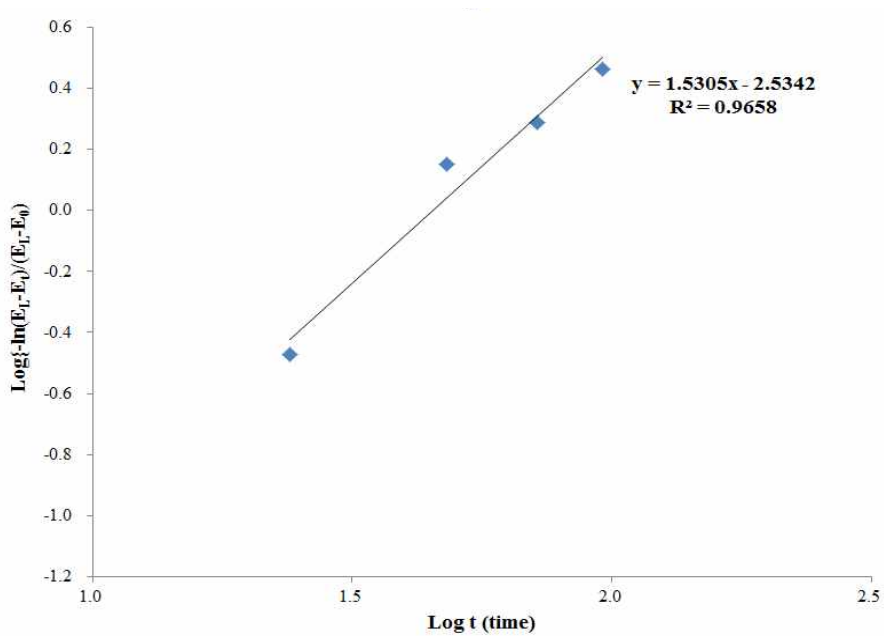


Fig. 73. Plot of $\log [-\ln(E_L - E_t)/(E_L - E_0)]$ versus log time of bread added antifungal lactic acid culture medium.

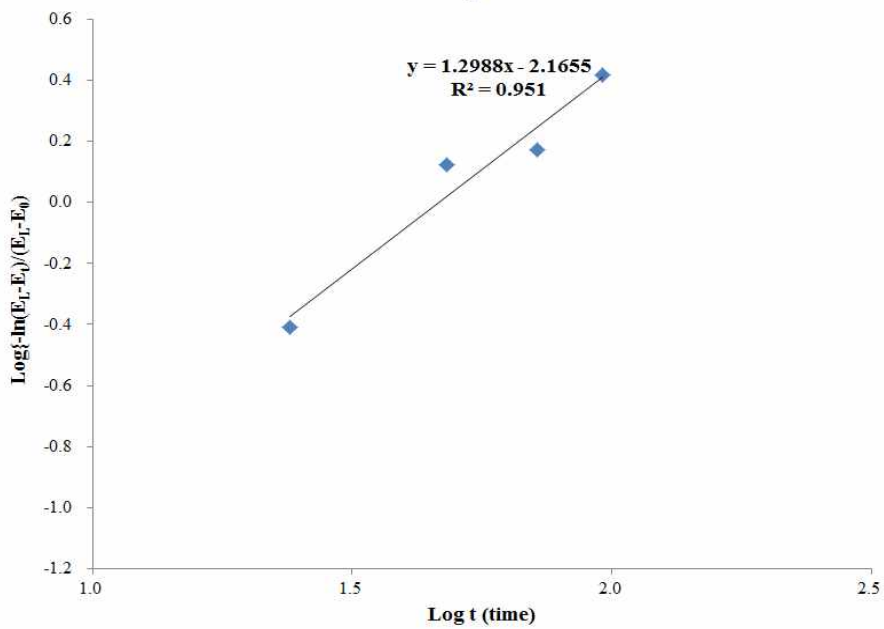


Fig. 74. Plot of $\log [-\ln(E_L - E_t)/(E_L - E_0)]$ versus log time of bread added antifungal lactic acid culture medium and cinnamon, 75:25.

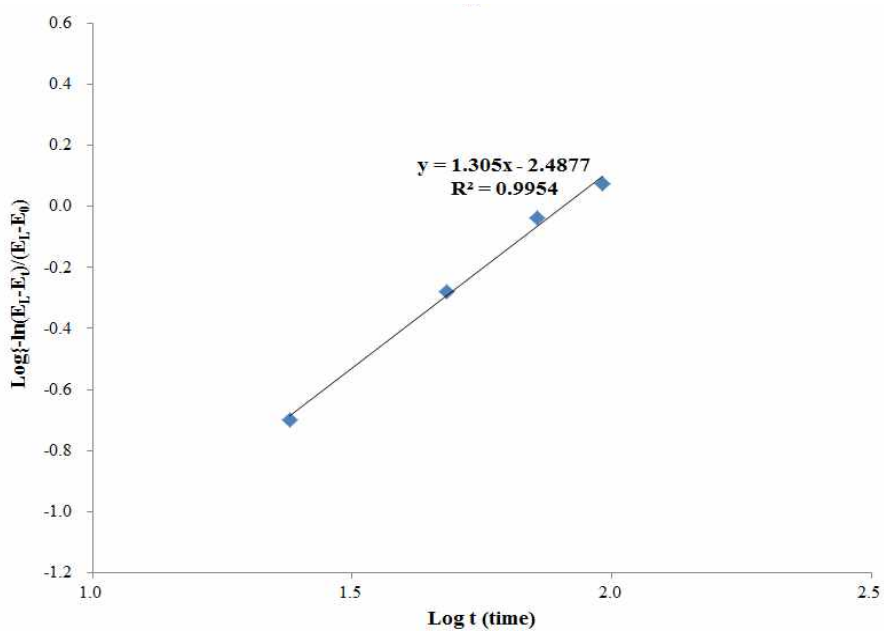


Fig. 75. Plot of $\log [-\ln(E_L - E_t)/(E_L - E_0)]$ versus log time of bread added antifungal lactic acid culture medium and cinnamon, 50:50.

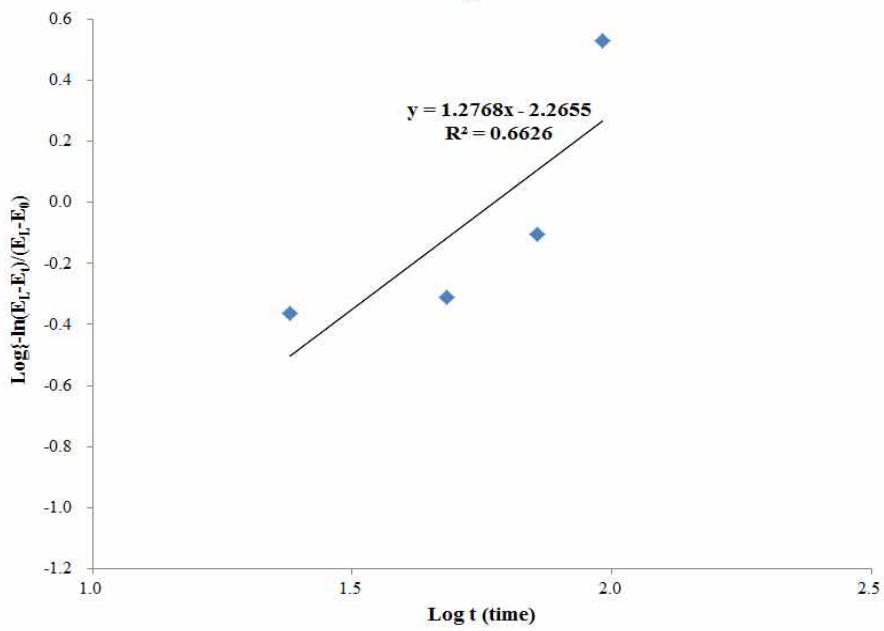


Fig. 76. Plot of $\log [-\ln(E_L - E_t)/(E_L - E_0)]$ versus log time of bread added antifungal lactic acid culture medium and cinnamon, 25:75.

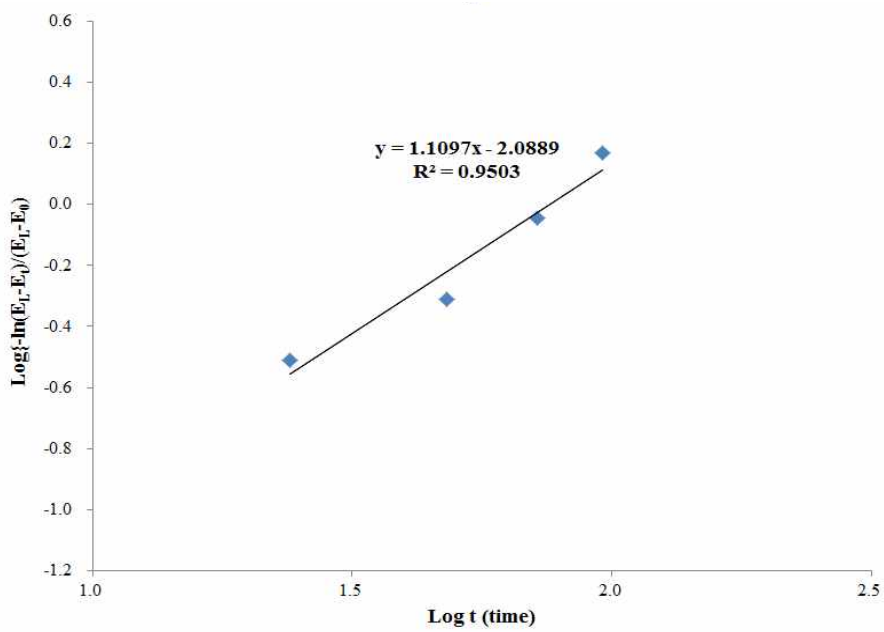


Fig. 77. Plot of $\log [-\ln(E_L - E_t)/(E_L - E_0)]$ versus log time of bread added cinnamon.

⑦ 유산균 배양액과 계피 추출물을 첨가한 식빵의 저장 중 미생물 총균수

ALH 배양액 및 계피 주정추출물을 첨가하여 제조한 식빵을 25℃에 보관하면서 미생물 총균수를 살펴본 결과는 table 56 및 fig. 78과 같다. 제조 당일의 미생물수는 ALH 배양액을 첨가하지 않은 군에 비해 ALH 배양액을 첨가한 군이 더 많았고, 모든 시료가 일정하게 보존기간이 증가할수록 균수가 증가하였다. 계피 주정추출물 첨가량이 증가할수록 미생물수가 적은 것으로 나타났다. 대조구와 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 미생물의 생육이 유사하였고, ALH 배양액과 계피 주정추출물의 첨가비율을 75:25, 50:50, 25:75로 제조한 식빵의 미생물 생육이 유사하였다. 저장 8일째에는 대조구와 ALH 배양액과 계피분말의 첨가비율이 100:0인 식빵의 균수가 가장 많았고 유산균배양액과 계피 주정추출물의 첨가비율이 0:100인 식빵의 균수가 가장 적은 것으로 나타났다.

Table 56. Total viable cell counts of bread added antifungal lactic acid bacteria and cinnamon ethanol extract for the storage time

(Unit: log CFU/g)

Sample	Storage time (Days)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
CON	2	3	4	5	6	6	7	8	9	
A	3	3	4	5	6	6	7	8	9	
B	3	3	4	5	4	5	6	7	8	
C	3	3	3	4	4	5	6	7	7.5	
D	3	4	4	4	5	5	6	7	7.5	
E	2	2	3	4	4	5	5	6	7	

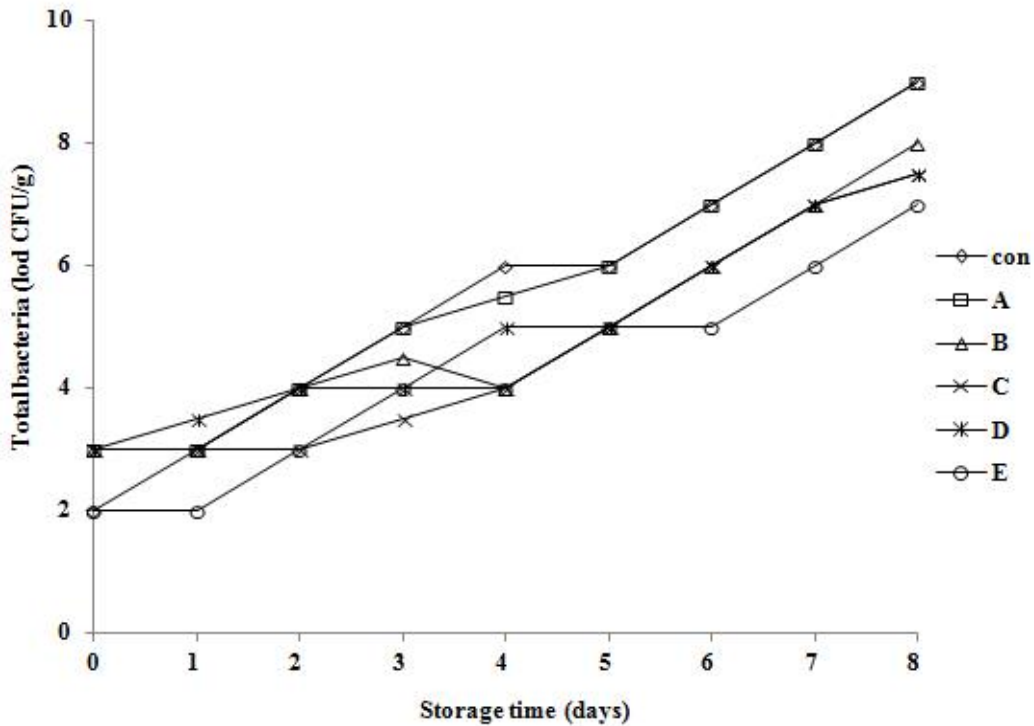


Fig. 78. Changes of total viable cell counts in bread added antifungal lactic acid bacteria and cinnamon ethanol extract for the storage time.

⑧ 유산균 배양액과 계피 주정추출물을 첨가한 식빵의 저장 중 곰팡이 특성평가

ALH 배양액 및 계피 주정추출물을 첨가하여 제조한 식빵을 25℃에 보관하면서 곰팡이 균수를 측정된 결과는 table 57 및 fig. 79와 같다. 3일째부터 대조구와 ALH 배양액만을 첨가한 시료군에서 곰팡이가 발생하여 비슷하게 균수가 증가하였다. 4일째에는 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25, 50:50, 25:75비율로 첨가하여 제조한 식빵에 곰팡이가 발생하였다. 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵에서는 5일째에 곰팡이가 발생하였으며, 다른 시료군에 비해 곰팡이 균수가 낮게 확인되었다. 육안으로 보이는 곰팡이의 발생시점을 확인하기 위해 식빵을 1 cm의 두께로 절단하여 25℃ 항온기에 저장하면서 발생하는 곰팡이를 관찰한 결과는 fig. 80과 같다. 대조구와 ALH 배양액만을 첨가하여 제조한 식빵에서 곰팡이 발생이 가장 많았고, 그 다음으로 ALH 배양액과 계피 주정추출물을 75:25, 50:50, 25:75 비율로 첨가하여 제조한 식빵이 유사하게 곰팡이가 발생하였다. 곰팡이의 발생이 가장 억제된 시료는 계피 주정추출물만을 첨가하여 제조한 식빵이었다.

Table 57. Mold colony counts of bread added antifungal lactic acid bacteria and cinnamon ethanol extract for the storage time
(Unit: log CFU/g)

Sample	Storage time (Days)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
CON	0	0	0	1	3	4	5	6	7
A	0	0	0	1	2	3	5	6	7
B	0	0	0	0	1	3	5	6	6.5
C	0	0	0	0	1	3	4	6	6.5
D	0	0	0	0	1	2	4	6	6.5
E	0	0	0	0	0	2	3	5	6

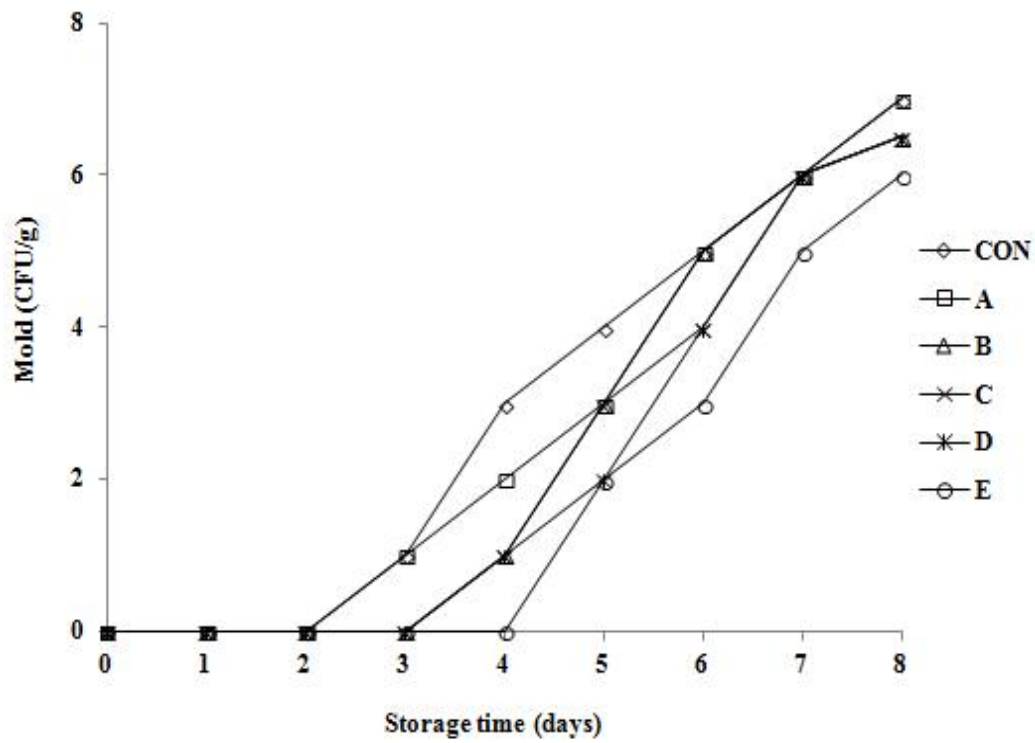


Fig. 79. Changes of mold colony counts in bread added antifungal lactic acid bacteria and cinnamon ethanol extract for the storage time.




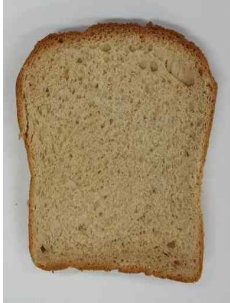








Storage (Days)	Sample					
	CON	A	B	C	D	E
1						
15						

Fig. 80. Mold growth in bread added antifungal lactic acid bacteria and cinnamon ethanol extract for the storage time.

(3) 향진균 물질 처리에 의한 치즈의 향진균 활성

(가) 정유 및 정유 향에 의한 틸지터치즈 내부 향진균 활성

정유(essential oil) 및 향에 의한 틸지터치즈 내부 향진균 활성평가 결과는 fig. 81과 같다. 그림 A는 치즈 숙성 중 외부 표피에 흠집이 생겨 이 흠집을 통해 곰팡이가 내부까지 오염이 되는 경우를 나타내는 사진이다. 이와 같이 치즈 내부에 대한 정유의 도포와 향에 의하여 향진균 활성이 있는지 알아보려고 틸지터치즈를 일정한 크기로 잘라 각각의 밀봉 용기에 넣은 후 정유의 도포는 치즈 내부 표면에 20 μ L 씩 도포하였고, 정유 향에 의한 향진균 활성평가는 틸지터치즈 주위에 각각의 정유를 20 μ L 씩 떨어트려 밀봉 후 20일 동안 향진균 활성을 관찰하였다. 20일 동안 숙성한 결과 계피유(cinnamon oil)와 계피 수피유(cinnamon bark oil)을 도포한 처리구에서만 향진균 활성을 나타냈으며, 향에 의한 향진균 활성은 나타나지 않았다.

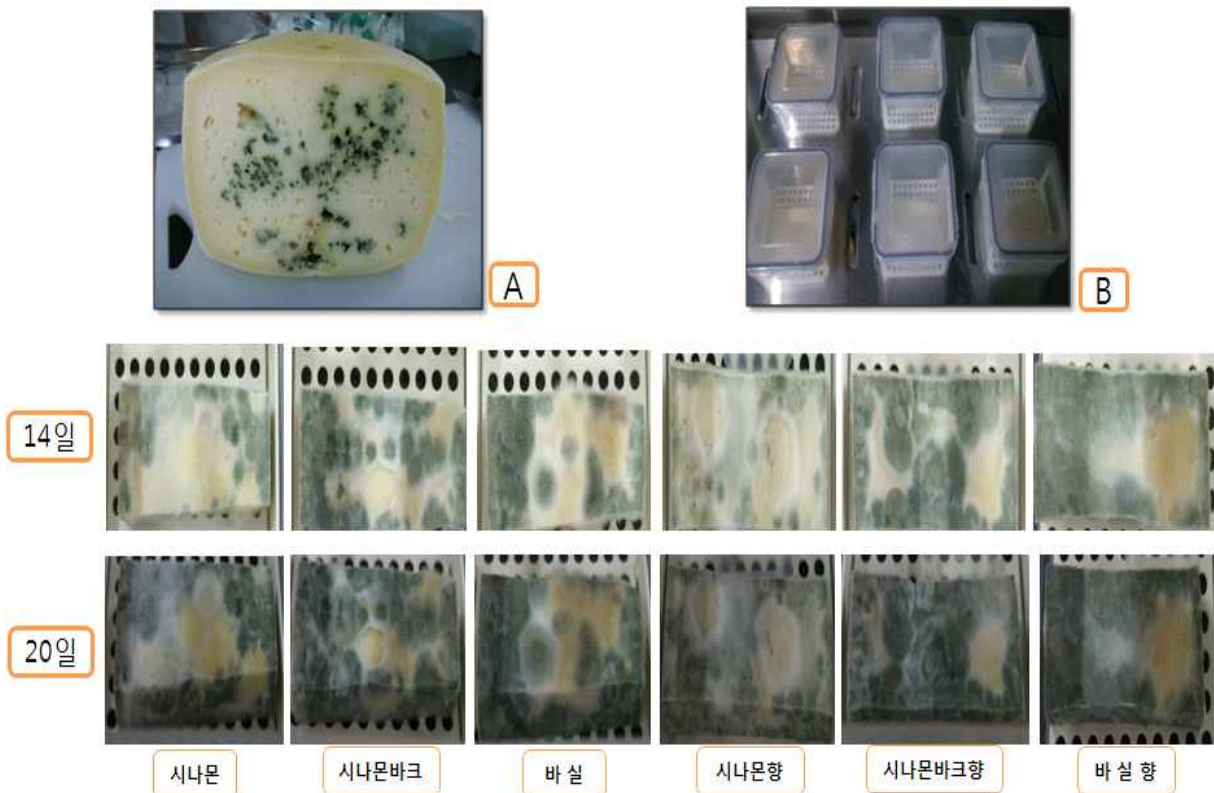


Fig. 81. Effect of essential oil on the fungal growth inhibition of the inside on Tilsiter cheese.

(나) 계피유 및 계피 수피유 표면처리에 의한 가우다치즈의 항진균 활성 및 숙성 중 특성변화

① pH 변화

계피유(cinnamon oil)와 계피 수피유(cinnamon bark oil)을 도포한 가우다치즈의 숙성 중 pH 변화는 fig. 82에서와 같이 나타났다. 숙성 0일차에서 실험구 간의 pH범위는 pH 5.2~5.4 범위에 있었으며, 숙성 종료시점인 8주차에는 점차 낮아져 pH 5.08~5.2 범위를 나타내었다. 본 실험에 사용된 가우다치즈는 1개월에서 3개월간 짧게 숙성하는 치즈로 6개월 이상 숙성하는 치즈의 경우 숙성이 경과될수록 유산균에 의한 단백질 분해로 치즈 내 질소화합물이 증가하여 pH가 높아지는 결과를 나타내는데 본 실험에 사용된 가우다치즈는 2개월간 숙성되어 유산균에 의한 산 생성으로 모든 처리구가 숙성이 경과될수록 pH가 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 치즈 표면에 대한 정유 처리로 인한 숙성 중 pH는 처리구 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p < 0.05$).

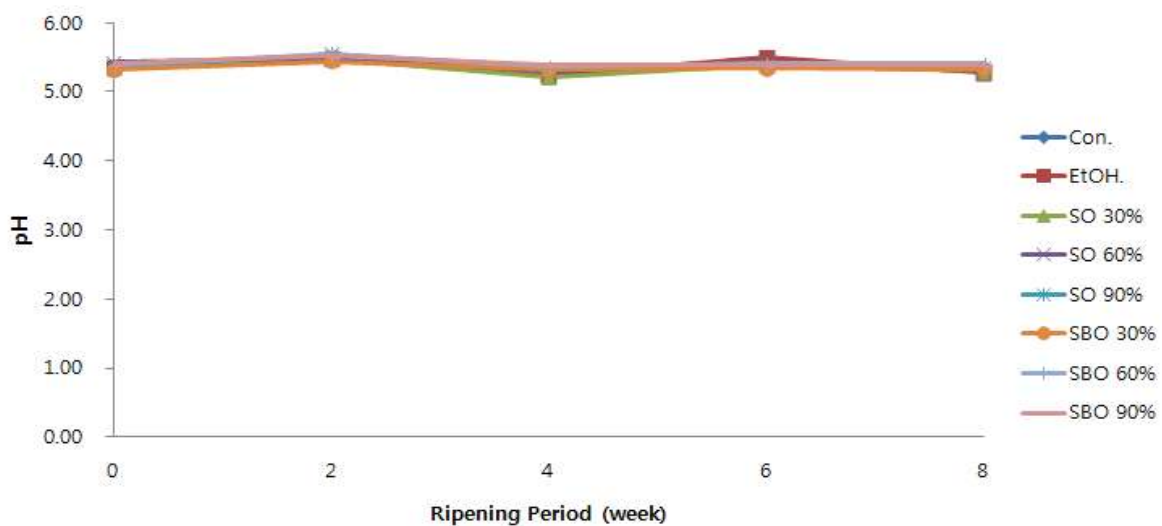


Fig. 82. Change of pH during the ripening of Gouda cheese on the surface treated with cinnamon oil and cinnamon bark oil. EtOH: 95% ethyl alcohol, SO 30%: EtOH 70%+Cinnamon oil 30%, SO 60%: EtOH 40%+Cinnamon oil 60%, SO 90%: EtOH 10%+Cinnamon oil 90%, SBO 30%: EtOH 70%+Cinnamon bark oil 30%, SBO 60%: EtOH 30%+Cinnamon bark oil 60%, SBO 90%: EtOH 10%+Cinnamon bark oil 90%.

② 유산균수의 변화

계피유(cinnamon oil)와 계피 수피유(cinnamon bark oil)을 도포한 가우다치즈의 숙성 중 유산균수의 변화는 fig. 83에서와 같이 나타났다. 숙성 0주차에는 실험구간의 유산균수는 7.6~10.08 log CFU/g으로 대조구에서 가장 많은 유산균수를 보였으며, 계피 수피유 90%처리구에서 가장 낮은 유산균수를 나타내어 오일 농도 함량이 높을수록 유산균수는 감소하는 양상을 보였다. 숙성 8주차의 실험구간의 유산균수는 log. 7.2~9.0 범위를 나타내었으며 숙성 0주차와 마찬가지로 오일농도 함량이 높을수록 낮은 유산균수를 나타내어 항균력이 강한 계피유와 계피 수피유가 가우다치즈 표면에 도포하였을 때 치즈 유산균에 대하여 생육저해 활성이 있음을 알 수 있었다.

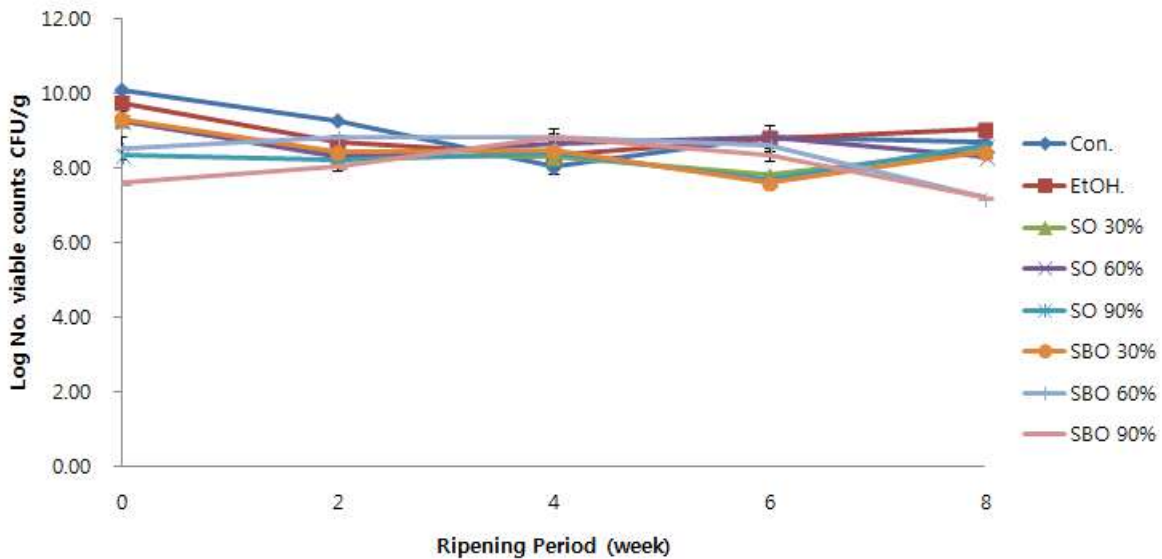


Fig. 83. Change of Viable cell counts(LAB) during the ripening of Gouda cheese on the surface treated with cinnamon oil and cinnamon bark oil. EtOH: 95% ethyl alcohol, SO 30%: EtOH 70%+Cinnamom oil 30%, SO 60%: EtOH 40%+Cinnamom oil 60%, SO 90%: EtOH 10%+Cinnamom oil 90%, SBO 30%: EtOH 70%+Cinnamom bark oil 30%, SBO 60%: EtOH 30%+Cinnamom bark oil 60%, SBO 90%: EtOH 10%+Cinnamom bark oil 90%.

③ 수용성 질소화합물(WSN)의 변화

계피유(cinnamon oil)와 계피 수피유(cinnamon bark oil)를 도포한 가우다치즈의 숙성 중 WSN의 변화는 fig. 84에서와 같이 나타났다. 숙성 0주차에는 0.32~0.40으로 실험구간의 유의적 차이는 나타내지 않았다($p < 0.05$). 하지만 숙성 8주차에는 1.36~1.68범위로 대조구보다 계피유 90%와 계피 수피유 30% 처리구에서 유의적으로 높은 숙성도를 보였다($p < 0.05$). Fig. 82의 유산균수 변화의 경우 계피유와 계피 수피유 처리구에서 낮은 유산균수를 나타내었지만 숙성 8주차에 치즈 내 유산균수가 1.0×10^6 CFU/g 이상으로 높게 유지하여 치즈 숙성에 큰 지장을 초래하지 않았음을 알 수 있었다.

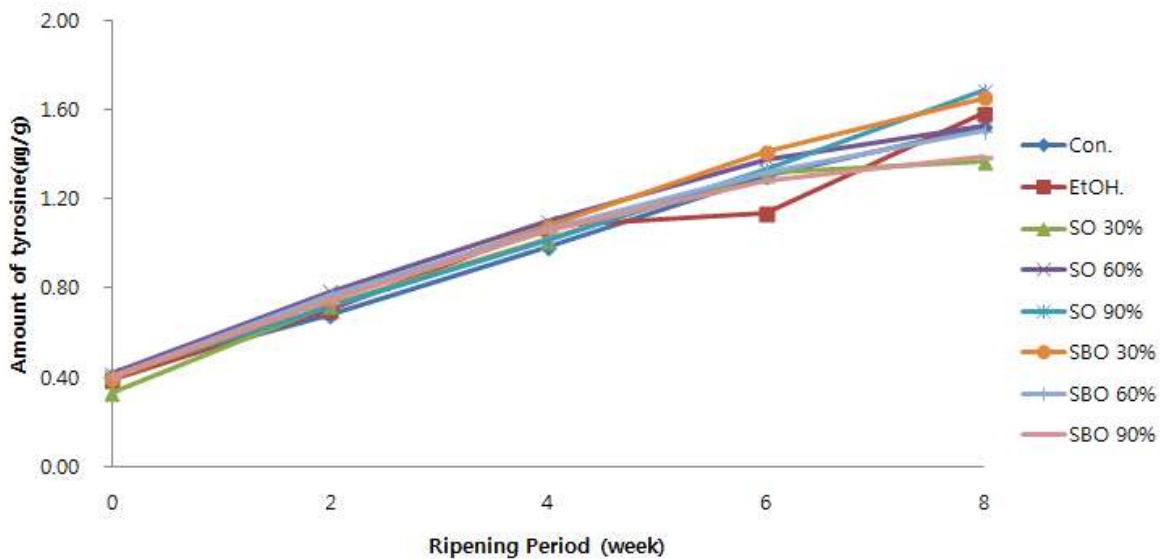


Fig. 84. Change of WSN during the ripening of Gouda cheese on the surface treated with cinnamon oil and cinnamon bark oil. EtOH: 95% ethyl alcohol, SO 30%: EtOH 70%+Cinnamon oil 30%, SO 60%: EtOH 40%+Cinnamon oil 60%, SO 90%: EtOH 10%+Cinnamon oil 90%, SBO 30%: EtOH 70%+Cinnamon bark oil 30%, SBO 60%: EtOH 30%+Cinnamon bark oil 60%, SBO 90%: EtOH 10%+Cinnamon bark oil 90%.

④ 계피유 및 계피 수피유 표면처리에 대한 가우다치즈의 관능평가

계피유(cinnamon oil)과 계피 수피유(cinnamon bark oil)을 도포한 가우다치즈의 관능평가에서는 fig. 85에서와 같은 결과를 나타냈다. Total taste와 flavor에서는 대조구가 가장 높은 점수를 받았으며, dairy sweet에서는 대조구와 계피유 30%처리 구에서 가장 높은 점수를 받았다. Cinnamon flavor는 첨가농도가 높을수록 높은 점수를 받았으며, bitter에서는 계피 수피유 90%에서 가장 높은 점수를 받았다. 정유를 치즈 표면에 도포하였지만 그 향이 치즈 내부로 스며들어 첨가농도가 높을수록 전체적인 기호도 에서는 좋지 않은 결과를 나타내었다.

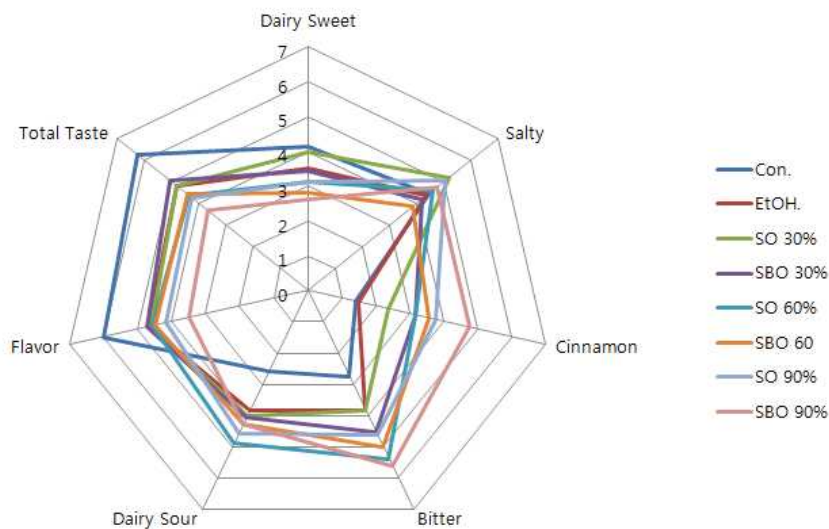


Fig. 85. Sensory characteristics of Gouda cheese on the surface treated with cinnamon oil and cinnamon bark oil during ripening at 14°C for 2 months. EtOH: 95% ethyl alcohol, SO 30%: EtOH 70%+Cinnamon oil 30%, SO 60%: EtOH 40%+Cinnamon oil 60%, SO 90%: EtOH 10%+Cinnamon oil 90%, SBO 30%: EtOH 70%+Cinnamon bark oil 30%, SBO 60%: EtOH 30%+Cinnamon bark oil 60%, SBO 90%: EtOH 10%+Cinnamon bark oil 90%.

⑤ 항진균 활성

계피유(Cinnamon oil)와 계피 수피수(cinnamon bark oil)를 도포한 가우다치즈의 항진균 활성을 측정한 결과는 fig. 86과 같다. 숙성 10일차에는 대조구와 에탄올 처리구에서 치즈 표면에 곰팡이가 생성되는 것을 볼 수 있었으며, 계피유와 계피 수피유 처리구에서는 나타나지는 않았다. 하지만 숙성 8주차에서는 계피유와 계피 수피유 30%와 60%에서도 곰팡이가 생성되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로 숙성 10일차까지는 낮은 농도에서의 정유를 처리함으로써 항진균 활성을 나타냈지만 지속적인 치즈표면에 대한 항진균 활성을 보기 위해서는 높은 농도의 정유를 도포하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.



Fig. 86. Effect of essential oil on the fungal growth inhibition of surface on Gouda cheese treated with cinnamon oil and cinnamon bark oil.

(다) 계피 주정추출물 표면처리에 의한 로마노치즈의 항진균 활성

계피 주정추출물을 도포한 로마노치즈의 항진균 활성 측정 결과는 fig. 87과 같다. 모든 처리구의 치즈 표면에 1회 도포한 후 3일 경과 시부터 모든 처리구의 표면에 곰팡이가 형성되는 것을 볼 수 있었다. 이에 따라 1회가 아닌 도포 횟수별 항진균 활성을 알아보기 위하여 총 4일간 1회부터 4회까지 도포하는 방법으로 실험을 진행하였다. 1회 도포 시 표면처리 5일째부터 표면에 곰팡이가 형성되었으며, 이후 치즈의 전체에 곰팡이가 형성되는 것을 볼 수 있었다. 반면 4일 동안 4회 도포한 처리구에서는 숙성 14일이 경과되어도 치즈 표면에 곰팡이가 형성되지 않아 계피 주정추출물 도포 횟수에 따라 항진균 활성이 달리 나타남을 알 수 있었다. 치즈 표면이 완성되어 숙성이 안정기에 접어들 때까지 항진균 물질의 도포 횟수를 늘리는 것이 바람직하다고 판단하였다.

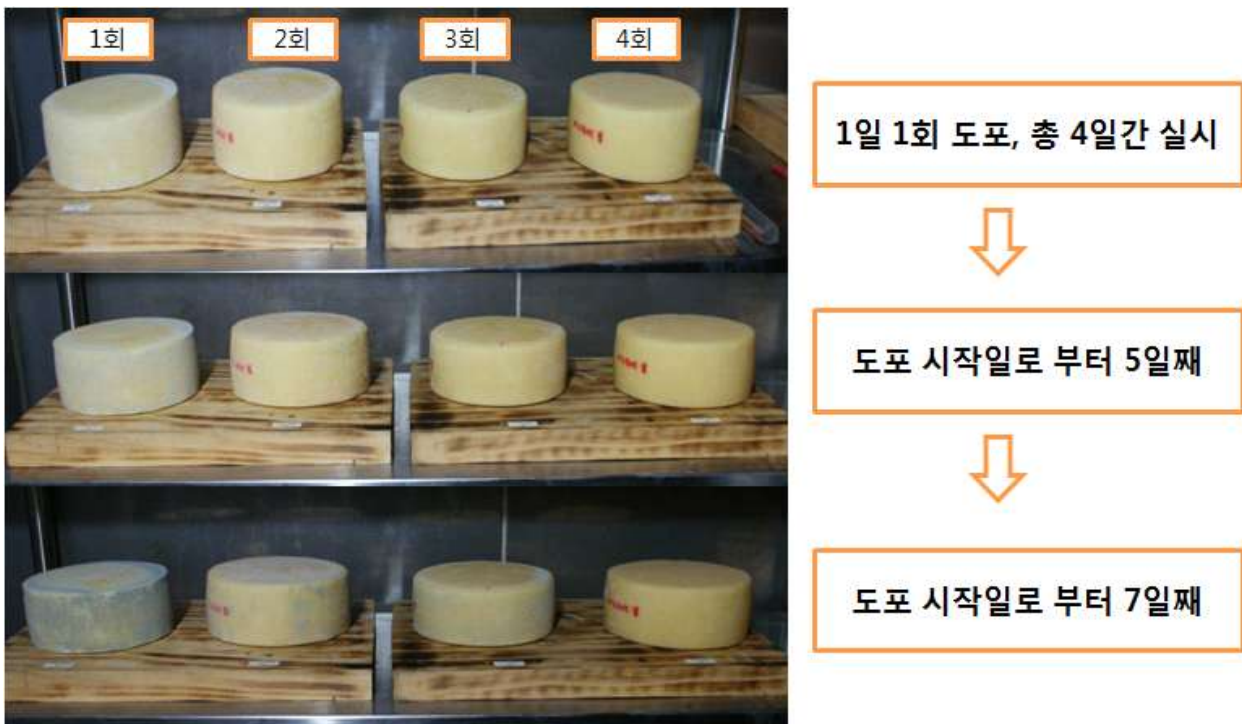


Fig 87. Effect of fungal growth inhibition of surface on Romano cheese treated with cinnamon extract.

(라) 계피 분말 첨가 탈지터치즈 표면의 항진균 활성

계피 분말을 첨가한 탈지터치즈의 숙성 중 항진균 활성을 측정한 결과는 fig. 88과 같다. 숙성 5일차부터 모든 처리구의 치즈 표면에 곰팡이가 형성되기 시작하였으며, 숙성 중 항진균 활성을 보기 위하여 곰팡이가 형성된 치즈를 제거 후 20일차에 다시 확인하였을 때 모든 처리구의 치즈 표면에 곰팡이가 형성됨을 알 수 있었다. 이에 따라 계피 분말을 첨가한 치즈에서는 항진균 활성이 나타나지 않아 단순한 계피 분말의 첨가보다 계피 주정추출물 또는 정유(essential oil)의 치즈 표면 도포가 더 효율적인 방법임을 알 수 있었다.



Fig 88. Effect of fungal growth inhibition on Tilsiter cheese treated with added cinnamon powder

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 제 1 차년도 (2012)

기간	세부과제		세부연구목표	달성도 (%)
2012. 01. ~ 2012. 12.	항진균 물질의 개발	곰팡이균의 분리	곰팡이균 8종 분리	100
			분리 곰팡이균의 동정	100
		유산균의 분리	김치 유산균 44종 분리	100
			분리 유산균의 동정	100
		항진균 활성 유산균의 활성평가	항진균 활성을 가지는 유산균 6종 선발	100
			선발 유산균의 항진균 활성평가	100
		항진균 활성 유산균의 특성규명	항진균 활성 유산균의 특성규명	100
		천연물소재 탐색	천연물소재 추출물의 항진균 활성평가	100
		정유의 항진균 활성평가	정유의 항진균 활성평가	100
			정유의 최소저해농도 측정	100
		항진균 활성 소재의 추출방법에 따른 활성평가	용매별 추출에 따른 활성 비교	100
			초임계 추출에 따른 활성 비교	100
	치즈 유산균에 대한 영향	치즈 유산균에 대한 정유의 항균활성	100	
	정유의 성분분석	항진균 활성 정유의 성분분석	100	
	자연치즈 제조기술 개발	항진균 활성 유산균의 생육특성	치즈제조를 위한 항진균 항진균 활성 유산균의 산생성능 평가	100
		스타터 배양액 제조	항진균 활성 유산균을 이용한 스타터 개발	100
		항진균 활성 물질을 이용한 치즈의 항진균 활성평가	항진균 활성 유산균을 이용한 아시아고치즈의 항진균 활성평가	100
			항진균 활성 유산균 배양액을 이용한 베르크치즈의 항진균 활성평가	100
			자몽종자추출물을 이용한 가우다치즈의 항진균 활성평가	100
	정유를 이용한 털지터치즈의 항진균 활성평가		100	

2. 제 2 차년도 (2013)

기간	세부과제	세부연구목표	달성도 (%)	
2013. 01. ~ 2013. 12.	항진균 물질의 개발	박테리오파지 유전자 탐색	항진균 활성 유산균에서 박테리오파지 유전자 탐색	100
		항진균 물질의 대사산물별 활성평가	pH 조절에 따른 활성평가	100
			단백 가수분해 효소 처리에 따른 활성평가	100
			카탈라아제 효소 처리에 따른 활성평가	100
			젖산의 항진균 활성평가	100
			유기산의 항진균 활성평가	100
			분자량에 따른 항진균 활성평가	100
		항진균 활성 물질의 항산화 및 항암활성	항산화 활성평가	100
			항암 활성평가	100
		정유의 추출	항진균 활성 정유의 추출	100
	정유의 항진균 활성	정유 주요성분의 항진균 활성평가	100	
		추출 정유의 항진균 활성평가	100	
	추출 정유의 성분분석	추출 정유의 성분분석	100	
	항진균 물질의 치즈 및 식품에 적용 가능성 평가	항진균 활성 물질을 이용한 발효유 제조	항진균 활성 유산균을 이용한 계피 주정추출물 첨가 발효유 제조	100
		항진균 활성 물질을 이용한 식빵 제조	항진균 유산균 배양액과 계피를 첨가한 식빵 제조	100
		항진균 물질 처리에 의한 치즈의 항진균 활성	정유 및 정유 향을 처리한 틸지터치즈의 항진균 활성평가	100
			계피유 및 계피 수피유를 처리한 가우다치즈의 항진균 활성평가	100
계피 주정추출물을 처리한 로마노치즈의 항진균 활성평가			100	
계피 분말을 첨가한 틸지터치즈의 항진균 활성평가	100			

제 2 절 관련분야에의 기여도

- 본 연구에서 개발된 천연물유래 항진균 물질 및 항진균 물질을 함유한 치즈제조 기술을 이용하여 생산 기반 및 가공설비 투자를 유도하고 소비 활성을 위한 제품 개발 및 유통 판매의 체계화를 통하여 국내 시장 및 해외 시장 다변화에 적극적으로 대처할 수 있을 것으로 기대된다.
- 본 연구에서 개발된 항진균 물질을 함유한 숙성 치즈는 곰팡이에 의한 손실을 최소화하여 제조단가를 낮춤으로써 수입 치즈에 비교 우위 경쟁력을 확보할 것이며, 치즈의 국내 수입 감소 및 수출 확대에 이어질 것으로 기대된다.
- 본 연구는 일반 치즈와 비교하여 맛과 조직이 동일하거나 우수한 상품적 가치를 지니며 기술 도입으로 인하여 제품의 안정적 생산 및 안전한 먹거리 제공이 부여되는 유일한 기술이 적용될 것으로 기대된다.
- 본 연구에서 얻어진 기술을 이용하여 숙성 치즈의 제조는 생산자에게는 생산비 절감 및 기능성 부여로 인한 고부가가치 창출 효과를 얻을 수 있고, 소비자는 안전하고 다양한 국내산 숙성치즈를 접할 수 있는 기회를 제공할 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화 · 산업화 계획

1. 객관적, 과학적 연구 결과를 바탕으로 항진균 물질을 식품 및 치즈에 적용

과학적 연구를 통한 객관적 사실을 근거로 천연물유래 항진균 물질을 첨가하여 식품과 치즈에 적용하여 곰팡이 억제 가능한 제품을 제조할 수 있다. 이에 본 연구에서 개발된 천연물유래 항진균 물질 및 항진균 물질을 함유한 식품 및 치즈에의 적용 기술을 이용하여 제품 개발 및 유통 판매의 체계화를 통하여 국내 시장 및 해외 시장 다변화에 적극적으로 대처할 수 있을 것으로 판단된다.

2. 기능성식품 및 치즈의 개발

김치분리 유산균 및 천연물유래 항진균 물질을 첨가로 인한 생리활성을 응용한 기능성식품 또는 치즈의 개발이 이루어질 수 있다. 이에 본 연구에서 개발된 천연물유래 항진균 물질 및 항진균 물질을 함유한 식품 및 치즈는 기능성식품으로써 국민건강 증진 효과를 꾀할 수 있을 것으로 판단된다.

3. 안전한 식품 보존제의 개발

본 연구에서 개발한 김치분리 유산균 및 천연물유래 항진균 물질은 화학 항진균제의 내성 및 안전성의 문제와 천연항진균제의 불안정성 및 가격 경쟁력에서의 취약점을 고려하여 항진균제의 개발이 이루어질 수 있을 것으로 판단된다.




제 2 절 교육 · 지도 · 홍보 등 기술 확산

1. 지역 목장형 유가공업체로의 기술이전 (기술이전 계약서)

가. 김치에서 분리한 항진균 효과가 있는 유산균(*Lactobacillus sakei* subsp. ALI033)을 이용한 치즈 및 요구르트 제품 제조 기술

<p style="text-align: center;">농림기술개발사업 성과활용에 따른 기술실시 계약서</p> <p>○ 연구개발과제명 : 천연식품소재 유래 항진균물질을 이용한 숙성 중 치즈의 곰팡이 제거기술 개발 ○ 총 연구개발비 : 337,500,000원 (정부출연금액 : 270,000,000원, 참여기업부담금액 : 67,500,000원) ○ 기술료 청구액 : 없음 ○ 기술사용기간 : 8년 (2013년 11월 ~ 2021년 10월) ○ 계약당사자 ○ (갑) 주관연구기관 : (재)원실치즈과학연구소 (을) 실시기업(참여기업) : 휴먼푸드영농조합법인</p> <p>실시기업대표자 (이하 "실시자"라 한다)와 주관연구기관인 농림수산식품부 "농림기술개발사업"으로 개발한 KNOW-HOW(이하 "기술"이라 한다)를 실시자가 실시함에 있어 다음과 같이 계약을 체결한다.</p> <p>제1조 (정의) (1) 본 계약에서 "기술"이라 함은 김치에서 분리한 항진균 효과가 있는 유산균(<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. ALI033)을 이용한 치즈 및 요구르트 제품 제조 기술을 말한다. (2) 본 계약에서 "기술활용"이라 함은 상기기술을 이용하여 제품을 생산하고 매출이 발생하는 것을 말하며 "기술활용임"이라 함은 최초의 매출발생일을 말한다.</p> <p>제2조 (실시권의 내용) (1) 주관연구기관은 실시자가 본 협약의 조건에 따라 대한민국내에서 "기술" (특허가 발생하는 경우 특허권 포함)을 실시하는데 동의하여 "실시자"에 실시권을 설정한다. 단, 국외실시의 경우에는 제3조에 따른다. (2) 제1항의 "실시권"은 기술을 이용한 제품생산, 원가절감(생산성향상), 품질향상 등의 권리를 말한다. (3) "실시자"는 "주관연구기관"의 사전 서면동의없이 제3자에게 등 실시권을 제공하거나 양도할 수 없다. (4) "주관연구기관"은 "실시자"가 "기술"을 실시하지 아니하는 부분에 대하여는 실시권을 포기한 것으로 간주할 수 있다.</p>	<p>제3조 (국외실시) "국외실시"는 대한민국 이외의 지역에 실시권을 허여하거나 기술을 수출하는 것(중 지역에 제품을 생산, 판매하는 행위 포함)을 말하며, "실시자"가 "기술"을 "국외실시"코자 하는 경우 사전에 "주관연구기관"과 협의하여 본 계약과 별도로 "국외실시"에 관한 실시계약을 체결하여야 한다.</p> <p>제4조 (실시기간) 본 계약기간은 "실시자"가 제1조의 "기술"을 활용하는 날(이하 "기술활용임"이라 한다)로부터 기산하여 2013년 11월부터 2021년 10월말에 만료되는 것으로 한다.</p> <p>제5조 (기술활용시기) "실시자"는 본 기술을 이용하여 특허가 없는 한 계약일로부터 2년 이내에 기술을 활용하여야 하며 정당한 사유없이 등 기간내에 기술활용을 하지 못한 경우에는 본 기술의 실시를 포기한 것으로 간주한다.</p> <p>제6조 (산업재산권 및 기술의 개발) (1) (산업재산권) "주관연구기관"이 본 기술의 결과로서 특허권, 실용신안권 등의 산업재산권을 취득, 소유하였을 경우 "실시자"는 본 계약에 의거 자동적으로 특허권, 실용신안권 등을 실시하며, 상대방인 산업재산권의 출원, 등록, 보존에 필요한 경비는 "주관연구기관"이 부담한다. 다만, 국유특허권은 특허청장과 별도의 "국유특허권실시계약"을 체결하여야 한다. (2) (기술의 개발) "실시자" 또는 "실시자"의 임원 및 피용자가 "기술"의 개발, 확장, 대체 또는 추가발명에 의한 기술(이하 "개발기술"이라 한다)을 발명하거나, 이를 단기로 새로운 산업재산권을 취득하고자 할 경우 "실시자"는 사전에 "주관연구기관"에 통보하여 상호 협의하여 추진하여야 하며, 취득한 산업재산권은 쌍방의 공동소유로 한다. 특허가 없는 한, "개발기술"의 실시 역시 본 계약에 의하여 실시되는 것으로 보고 본 계약은 계속 유효하다.</p> <p>제7조 (실험실의 의무와 자료제공) 본 계약이 목적하는 바를 상호 충족시키기 위해 필요한 제반사항에 대하여 "주관연구기관"은 신의, 성실의 의무를 다하여 "실시자"에게 적극 협조하여야 하고, "실시자"는 본 계약을 성실히 이행하여야 하며 또한 "주관연구기관"은 필요시 "실시자"에게 연구개발 성과의 활용 등 필요한 자료를 요구할 수 있으며 "실시자"는 응하여야 한다.</p>
<p>제8조 (비밀보장) "실시자"는 "기술"이 타인에게 제공되거나 누설되지 않도록 보안에 유의하여야 하며 이 의무에는 "실시기업"의 임원 및 피용자나 그 승계인을 통하여 사실상 위법일이 없도록 하는 의무도 포함한다. 또한 본 조항은 본 계약이 해제 또는 해지되었을 경우에도 계속 유효하다.</p> <p>제9조 (계약의 변경등) (1) 본 계약의 내용은 "실시자"와 "주관연구기관"의 서면합의에 의하여 변경될 수 있다. 다만, "실시자"의 생산능력이 제품수요를 충족하지 못하거나 "실시자"가 "기술"을 기술적으로 충분히 실행하지 못하여 "실시자"가 이를 개선할 능력이 없다고 인정될 경우 "주관연구기관"은 "기술"의 "실시권"을 제3자에게도 허용할 수 있는 권리를 갖는다. (2) "실시자"가 본 계약 체결 후 법인의 주소 등 중요사항을 변경하였을 경우에는 이를 지체없이 "주관연구기관"에 통보하여야 하며, 그 불이행으로 인한 "주관연구기관"의 좌오는 "실시자"의 과실로부터 면책된다.</p> <p>제10조 (계약의 해지) (1) "주관연구기관"은 단종의 경우 30일전의 기한을 두고 "실시자"에게 그 이행을 서면으로 통보함으로써 본 계약을 취소할 권리를 가지며 이에 따라 해지되었을 경우에 "실시자"는 기술자료를 "주관연구기관"에 반환하고 본 계약상의 모든 권리를 포기하여야 한다. (2) "기술활용임"까지 활용을 개시하지 아니하거나 "기술활용임" 전이라도 "실시자"가 활용을 포기한 것으로 "주관연구기관"이 인정하는 경우나, 제5조에 정한 "기술활용임"이후라도 "실시자"가 조업을 중단하여 계속할 수 없다고 인정할 때, 기타 본 계약상의 의무를 위반할 때 (3) 본 계약이 해지 또는 해제되었을 경우, "실시자"는 스스로 또는 제3자로 하여금 "기술"을 실시토록 하거나 본 계약제품의 생산을 행할 수 없다.</p> <p>제11조 (손해배상) "실시자"는 본 계약을 위반하여 "주관연구기관"에 손해를 끼쳤을 때에는 이를 배상하여야 한다.</p>	<p>제12조 (명칭사용) "실시자"는 본 계약과 관련하여 취득한 정보 및 "주관연구기관"이 "실시자"에게 제공한 보고서나 문서의 일부 또는 전부에 대한 그 원본이나 복제, 복사본을 광고물에 축적, 기타 선전의 목적 및 광고상의 이유로 사용할 수 없으며, 또한 상기의 목적으로 "주관연구기관(농림수산식품부 포함)"의 명칭을 암시하거나 사용해서는 아니된다.</p> <p>제13조 (권리양도의 제한) "주관연구기관"과 "실시자"는 본 계약상 특약이 있는 경우를 제외하고 상호 상대방의 동의없이 본 사업의 수행과정에서 취득되는 제반 권리를 제3자에게 제공하거나 양도할 수 없다.</p> <p>제14조 (분쟁해결) 본 계약과 관련하여 혹은 쌍방의 의무이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우 "주관연구기관"과 "실시자"는 이를 상호협의하여 원만히 해결토록 노력하여야 하며, 이러한 분쟁이나 이견이 해결되지 않은 경우에는 「사단법인 대한장사중재원」의 상사중재 규정에 따라 중재로 최종 해결한다.</p> <p>제15조 (계약의 효력) 본 계약의 효력은 서명 날인 서명 날인 날부터 유효하다.</p> <p>제16조 (해시) 본 계약에 명기되지 아니하거나 본 계약상의 해석상 의의가 있는 사항에 대하여는 쌍방의 합의에 의하여 결정한다. 본 계약서는 2부를 작성하여 서명 날인 하고, "실시자"와 "주관연구기관"이 각각 1부를 보관한다.</p> <p style="text-align: right;">2013년 11월 11일</p> <p>주 관 연구 기 관 : (재)원실치즈과학연구소이사장 신원택</p> <p>실 시 자 : 휴먼푸드영농조합법인대표 오준</p> <p>중립연구책임자(연구원) : (재)원실치즈과학연구소장 정후길</p>

나. 천연 에센셜오일이 도포된 향진균 속성 치즈 제조기술

<p style="text-align: center;">농림기술개발사업 성과활용에 따른 기술실시 계약서</p> <p>○ 연구개발과제명 : 천연식품소재 유래 향진균물질을 이용한 속성 중 치즈의 공명이 재기기술 개발</p> <p>○ 총 연구개발비 : 337,500,000원 (정부출연금액 : 270,000,000원, 참여기업부담액 : 67,500,000원)</p> <p>○ 기술료 징수액 : 없음</p> <p>○ 기술사용기간 : 8년 (2013년 11월 ~ 2021년 10월)</p> <p>○ 계약당사자 (갑) 주관연구기관 : (재)임실치즈과학연구소 (을) 실시기업(참여기업) : 유엔푸드영농조합법인</p> <p>실시기업대표자 (이하 "실시자"라 한다)와 주관연구기관장은 주관연구기관이 농림수산식품부 "농림기술개발사업"으로 개발한 KNOW-HOW(이하 "기술"이라 한다)를 실시자가 실시함에 있어 다음과 같이 계약을 체결한다.</p> <p>제1조 (정의) (1) 본 계약에서 "기술"이라 함은 천연 에센셜오일이 도포된 향진균 속성 치즈 제조기술을 말한다. (2) 본 계약에서 "기술활용"이라 함은 상기기술을 이용하여 제품을 생산하고 매출이 발생하는 것을 말하며 "기술활용일"이라 함은 최초의 매출발생일을 말한다.</p> <p>제2조 (실시권의 내용) (1) 주관연구기관은 실시자가 본 협약의 조건에 따라 대한민국내에서 "기술" (특허가 발생하는 경우 특허권 포함)을 실시하는데 동의하여 "실시자"에 실 시권을 설정한다. 단, 국외실시의 경우에는 제3조에 따른다. (2) 제1항의 "실시권"은 기술을 이용한 제품생산, 원자알권(생산성향상), 품질 향상 등의 권리를 말한다. (3) "실시자"는 "주관연구기관"의 사전 서면동의없이 제3자에게 통 실시권을 제공하거나 양도할 수 없다. (4) "주관연구기관"은 "실시자"가 "기술"을 실시하지 아니하는 부분에 대하여 는 실시권을 포기한 것으로 간주할 수 있다.</p>	<p>제3조 (국외실시) "국외실시"는 대한민국 이외의 지역에 실시권을 하여하거나 기술을 수출하는 것(중 지역에서 제품을 생산, 판매하는 행위 포함)을 말하며, "실시자"가 "기 술"을 "국외실시"코자 하는 경우 사전에 "주관연구기관"과 협의하여 본 계약과 별도로 "국외실시"에 관한 실시계획을 체결하여야 한다.</p> <p>제4조 (실시기간) 본 계약기간은 "실시자"가 제1조의 "기술"을 활용하는 날(이하 "기술활용일"이 라 한다)로부터 기산하여 2013년 11월부터 2021년 10월까지 만료되는 것으로 한다.</p> <p>제5조 (기술활용시기) "실시자"는 본 기술을 이용하여 특허가 없는 한 계약일로부터 2년 이내에 기술 을 활용하여야 하며 정당한 사유없이 동 기간내에 기술활용을 하지 못한 경우 에는 본 기술의 실시를 포기한 것으로 간주한다.</p> <p>제6조 (산업재산권 및 기술의 개량) (1) (산업재산권) "주관연구기관"이 본 기술의 결과로서 특허권, 실용신안권 등 의 산업재산권을 취득, 소유하였을 경우 "실시자"는 본 계약에 의거 자들의 으로 동 특허권, 실용신안권 등을 실시하며, 진행중인 산업재산권의 출원, 등록, 보존에 필요한 정비는 "주관연구기관"이 부담한다. 다만, 국유특허권은 특허청장과 별도의 "국유특허권실시계약"을 체결하여야 한다. (2) (기술의 개량) "실시자" 또는 "실시자"의 인원 및 이용자가 "기술"의 개량, 확장, 대체 또는 추가발명에 의한 기술(이하 "개발기술"이라 한다)을 적용하 거나, 이를 근거로 새로운 산업재산권을 취득하고자 할 경우 "실시자"는 사 전에 "주관연구기관"에 통보하여 상호 협의하여 추진하여야 하며, 취득한 산업재산권은 양방의 공동소유로 한다. 특허가 없는 한, "개발기술"의 실시 역시 본 계약에 의하여 실시되는 것으로 보고 본 계약은 계속 유효하다.</p> <p>제7조 (신익성실의 의무와 지도협조) 본 계약이 목적하는 바를 상호 충족시키기 위해 필요한 제반사항에 대하여 "주관 연구기관"은 신의, 성실을 다하여 "실시자"에게 적극 협조하여야 하고, "실시 자"는 본 계약을 성실히 이행하여야 하며 또한 "주관연구기관"은 필요시 "실시 자"에게 연구개발 성과의 활용 등 필요한 자료를 요구할 수 있으며 "실시자" 는 응하여야 한다.</p>
<p>제8조 (비밀보장) "실시자"는 "기술"이 타인에게 제공되거나 누설되지 않도록 보안에 유의하 야 하며 이 의무에는 "실시기업"의 인원 및 피용자나 그 승계인을 통하여 사 실상 위반이 없도록 하는 의무도 포함한다. 또한 본 조항은 본 계약이 해제 또는 해지되었을 경우에도 계속 유효하다.</p> <p>제9조 (계약의 변경등) (1) 본 계약의 내용은 "실시자"와 "주관연구기관"의 서면합의에 의하여 변경될 수 있다. 다만, "실시자"의 생산능력이 제품수요를 충족하지 못하거나 "실시 자"가 "기술"을 기술적으로 충분히 실현하지 못하여 "실시자"가 이를 개선 할 능력이 없다고 인정될 경우 "주관연구기관"은 "기술"의 "실시권"을 제3 자에게도 활용할 수 있는 권리를 갖는다. (2) "실시자"가 본 계약체결 후 법인의 주소 등 중요사항을 변경하였을 경우에 는 이를 지체없이 "주관연구기관"에 통보하여야 하며, 그 불이행으로 인한 "주관연구기관"의 차오는 "실시자"의 과실로부터 면책된다.</p> <p>제10조 (계약의 해지) (1) "주관연구기관"은 다음의 경우 30일전의 기한을 두고 "실시자"에게 그 이 행을 서면으로 <u>해지통지</u>를 본 계약을 취소할 권리를 가지며 이에 따라 해 지되었을 경우에 "실시자"는 기술자료들 "주관연구기관"에 반환하고 본 계약 상의 모든 권리를 포기하여야 한다. 가, "기술활용일"까지 활용을 개시하지 아니하거나 "기술활용일" 전이라도 "실시자"가 활용을 포기한 것으로 "주관연구기관"이 인정하는 경우 나, 제5조에 정한 "기술활용일"이후라도 "실시자"가 조임을 중단하여 계속할 수 없다고 인정할 때 다, 기타 본 계약상의 의무를 위반할 때 (2) 본 계약이 해지 또는 해제되었을 경우, "실시자"는 스스로 또는 제3자로 하여금 "기술"을 실시토록 하거나 본 계약제품의 생산을 행할 수 없다.</p> <p>제11조 (손해배상) "실시자"는 본 계약을 위반하여 "주관연구기관"에 손해를 끼쳤을 때에는 이를 배상하여야 한다.</p>	<p>제12조 (명칭사용) "실시자"는 본 계약과 관련하여 취득한 정보 및 "주관연구기관"이 "실시자"에 게 제공한 보고서나 문서의 일부 또는 전부에 대한 그 원본이나 복제, 복사물 을 광고목적 축전, 기타 선전의 목적 및 경쟁상의 자원으로 사용할 수 없으며, 또한 상기의 목적으로 "주관연구기관(농림수산식품부 포함)"의 명칭을 알시하 거나 사용하지서는 아니된다.</p> <p>제13조 (권리양도의 제한) "주관연구기관"과 "실시자"는 본 계약상 특이한 경우를 제외하고 상호 상대방의 동의없이 본 사업의 수행과정에서 취득되는 제반 권리를 제3자에게 제공하거나 양도할 수 없다.</p> <p>제14조 (분쟁해결) 본 계약이 관련된 하의 혹은 행방의 의무이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생 하는 경우 "주관연구기관"과 "실시자"는 이를 상호협의하여 일단적 해결토록 노력하여야 하며, 이러한 분쟁이나 이견이 해결되지 않은 경우에는 「사단법인 대한상사중재원」의 상사중재 규정에 따라 중재로 최종 해결한다.</p> <p>제15조 (계약의 효력) 본 계약의 효력은 <u>공인전자서명</u>시행 날인한 날부터 유효하다.</p> <p>제16조 (해석) 본 계약이 영기되지 아니하거나 본 계약상의 해석상 의의가 있는 사항에 대하 여는 양방의 합의에 의하여 결정한다. 본 계약서는 2부를 작성하여 서명 날인 하고, "실시자"와 "주관연구기관"이 각각 1통씩 보관한다.</p> <p style="text-align: right;">2013년 월 일</p> <p>주 관 연구 기 관 : (재)임실치즈과학연구소이사장 신현태 </p> <p>실 시 자 : 유엔푸드영농조합법인대표 오준 </p> <p>출발연구책임자(연구원) : (재)임실치즈과학연구소장 정후길 </p>

2. 언론 홍보

가. 중간보고회 (2012.09.05)



다. 성과보고회 (2013.11.07)

2. 논문

<h3 style="text-align: center;">치즈 숙성 중의 곰팡이 오염 방제 (한국유가공기술과학회지)</h3> <div style="text-align: center;">  <p>한국유가공기술과학회지 Korean J. Dairy Sci. Technol. Vol. 30, No. 2, pp. 9-20(2017)</p> </div> <p style="text-align: center;">치즈 숙성 중의 곰팡이 오염 방제 - 현황과 전망 정해길¹ · 최희늘¹ · 오현희¹ · 최정기¹ · 임희선¹ · 오진희¹ · 박종희¹ · 최희영¹ · 김경희¹ · 이송구² (¹원산식품저장유통연구원, ²원산대학교 식품공학부)</p> <p style="text-align: center;">Prevention of Fungal Contamination during Cheese Ripening - Current Situation and Future Prospects Hoo Kil Jung¹, Hee Sun Yang, Hee Sun Yang, Hee Sun Yang, Jun Hee Oh, Jong Seob Jeong, Eun Jeong Jeong, Hoo Kil Jung¹ Dept. of Animal Science & Technology, Seonchok National University, Seonbuk 561-756, Korea ¹Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea ²Research Center for Industrial Development of Biobiof-Materials, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea</p> <p style="text-align: center;">Abstract</p> <p>Mold cause severe cheese deterioration, even though some white and blue molds are used for the manufacture of Camembert and blue cheese, respectively. The species of <i>Geotrichum</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Mucor</i>, <i>Fusarium</i>, <i>Phoma</i>, and <i>Cladosporium</i> are the main fungi that affect contamination during cheese ripening. Once detected by fungal spoilage, cheese becomes toxic and inedible. Fungal deterioration of cheese decreases the nutritional value, flavor profile, physicochemical and organoleptic properties, and increases toxicity and infectious disease. Fungal contamination during cheese ripening is highly damaging to cheese production in Korea (limited milk processing capacity). Therefore, these companies locate to develop animal and ripened cheese varieties. This article discusses the present and ongoing developments in the research mechanism of fungal contamination during cheese ripening. There are 2 categories of antifungal agents: chemical and natural. Major chemical agents are preservatives (propionic acid, sodium propionate, and citric acid propionate) and essential oils (oregano essential oil, grapefruit seed extract, pineacetic acid, and garlic). Natural agents (essential oils) are natural antifungal agents. Additionally, some studies have shown that substances such as autolysin and Delvaco[®] have antifungal activities for cheese contaminated with fungi. Microbial resources such as probiotic lactic acid bacteria, <i>Propionibacterium</i>, lactic acid bacteria from Kimchi, and bacteriocins are well known as antifungal agents. In addition, coculturing treatment has been reported to inhibit the growth activity of cheese-contaminating fungi.</p> <p>Keywords: cheese, cheese ripening, fungal, antifungal agent</p> <p style="text-align: center;">서론</p> <p>1. 곰팡이의 발생 특성 곰팡이는 가장 광범위하게 분포하고 있는데, 인간에게 질병을 일으키는 종류도 있고 있다. 가장 심각한 변질시키는 곰팡이 또는 유해한 곰팡이 및 곰팡이, 곰팡이 등이다.</p> <p>2. 곰팡이 특이(Mycoflora) 발효 치즈를 제조하거나 재가공과 발효공정 원료로 생산되는 유제품 곰팡이가 중요하다. 곰팡이는 호기성이기 때문에 주로 저산소 환경에 존재하지만, 단기간 동안 호기성 환경에서 증식하기도 한다. 곰팡이는 주로 산성 조건에서 잘 증식하며, 건조 조건에서도 호도가 저감되면 증식한다. 따라서 저산소 및 건조 조건에서 증식하여 저산소 환경을 번성시키거나, 발효 치즈나 유제품 발효를 방해하기도 한다.</p> <p style="text-align: center;">1</p>	<h3 style="text-align: center;">김치 분리 유산균의 치즈 곰팡이 항진균 활성 (한국식품저장유통학회지)</h3> <div style="text-align: center;">  <p>한국식품저장유통학회지 The Korean Society of Food Preservation</p> </div> <p style="text-align: center;">Antifungal activity against cheese fungi by lactic acid bacteria isolated from kimchi Ha Nuel Choi¹, Hyun Hee Oh¹, Hee Sun Yang¹, Chang Ki Huh¹, In Hyu Bae², Jai Sung Lee³, Yong Seob Jeong¹, Eun Jeong Jeong¹, Hoo Kil Jung¹ ¹Insil Research Institute of Cheese Science, Insil 566-881, Korea ²Dept. of Animal Science & Technology, Seonchok National University, Seonbuk 561-756, Korea ³Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea ⁴Research Center for Industrial Development of Biobiof-Materials, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea</p> <p style="text-align: center;">김치 분리 유산균의 치즈 곰팡이 항진균 활성 최희늘¹ · 오현희¹ · 최정기¹ · 임희선¹ · 오진희¹ · 박종희¹ · 최희영¹ · 김경희¹ · 이송구² (¹원산식품저장유통연구원, ²원산대학교 식품공학부, ³원산대학교 식품공학부, ⁴원산대학교 바이오식품소재개발 및 산업화연구원)</p> <p style="text-align: center;">Abstract</p> <p>The antifungal activity against cheese fungi by lactic acid bacteria isolated from kimchi was investigated. Eight fungi were isolated from cheese in the cheese ripening room. Two of them were identified as <i>Penicillium</i> and <i>Cladosporium</i> via ITS-5.8S rDNA analysis. Twenty-two species of lactic acid bacteria with antifungal activity were isolated from kimchi. Two of them were identified as <i>Lactobacillus</i> and <i> Pediococcus</i> via 16S rDNA sequence analysis. Of the 22 lactic acid bacteria species, six were selected (<i>L. sakei</i> subsp. ALR101, <i>L. sakei</i> subsp. ALR102, <i>L. sakei</i> subsp. ALG0109, <i>P. pentosaceus</i> ALR103, <i>P. pentosaceus</i> ALR104 and <i>P. pentosaceus</i> ALR105) due to their higher activity against the eight fungi isolated from cheese in the cheese ripening room and among the six species, the <i>P. pentosaceus</i> ALR103 and <i>P. pentosaceus</i> ALR104 isolates from the Jeonbuk area kimchi and the <i>L. sakei</i> subsp. ALR101 isolate from the Insil area kimchi had higher antifungal activity than the other lactic acid bacteria. The minimum inhibitory concentration (MIC) of <i>L. sakei</i> subsp. ALR101 against the eight fungi isolated from cheese in the cheese ripening room was 62.5 µg/ml.</p> <p>Key words: cheese, cheese ripening, fungal, antifungal activity, lactic acid bacteria</p> <p style="text-align: center;">서론</p> <p>치즈 숙성 중의 곰팡이 오염 방제는 제조업체 회사에서, 치즈 제조공정에 매우 중요한 것으로 부속이 연구되어, 곰팡이가 침입하거나 숙성에 의해서 단락된 문제, 가장 큰 문제 중의 곰팡이 오염 방제 및 미생물학적 변질 방지 연구이다. 치즈 숙성 중의 곰팡이 오염 방제에 대한 연구가 많이 있다. 치즈 숙성 중 곰팡이 오염 방제에 대한 연구는 치즈 숙성 중 곰팡이 오염 방제에 대한 연구가 많이 있다. 치즈 숙성 중 곰팡이 오염 방제에 대한 연구는 치즈 숙성 중 곰팡이 오염 방제에 대한 연구가 많이 있다. 치즈 숙성 중 곰팡이 오염 방제에 대한 연구는 치즈 숙성 중 곰팡이 오염 방제에 대한 연구가 많이 있다.</p> <p style="text-align: center;">1</p>
<h3 style="text-align: center;">김치 분리 항진균 유산균의 치즈 스타터로서 이용 가능성 (한국유가공기술과학회지)</h3> <div style="text-align: center;">  <p>한국유가공기술과학회지 Korean J. Dairy Sci. Technol. Vol. 31, No. 2, pp. 133-141(2018)</p> </div> <p style="text-align: center;">김치 분리 항진균 유산균의 치즈 스타터로서 이용 가능성 오현희¹ · 최희늘¹ · 임희선¹ · 박인홍¹ · 이세실¹ · 정용섭¹ · 이남근¹ · 정후길¹ (¹원산식품저장유통연구원, ²원산대학교 식품공학부, ³원산대학교 식품공학부, ⁴원산대학교 바이오식품소재개발 및 산업화연구원)</p> <p style="text-align: center;">Potential of Antifungal Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi as Cheese Starters Hyun Hee Oh¹, Chang Ki Huh¹, Ha Nuel Choi¹, Hee Sun Yang¹, In Hyu Bae², Jai Sung Lee³, Yong Seob Jeong¹, Nam Keun Lee⁴ and Hoo Kil Jung¹ ¹Insil Research Institute of Cheese Science, Insil 566-881, Korea ²Dept. of Animal Science & Technology, Seonchok National University, Seonbuk 561-756, Korea ³Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea ⁴Research Center for Industrial Development of Biobiof-Materials, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea</p> <p style="text-align: center;">Abstract</p> <p>This study was performed to identify the cheese starter potential of antifungal lactic acid bacteria isolated from kimchi. Eight fungi were isolated from cheese in the cheese ripening room, and identified as <i>Penicillium</i> and <i>Cladosporium</i> by ITS-5.8S rDNA analysis. Twenty-two lactic acid bacteria species with antifungal activity were isolated from kimchi, and identified as <i>Lactobacillus</i> and <i>Pediococcus</i> by 16S rDNA sequence analysis. Six lactic acid bacteria species were selected (<i>L. sakei</i> subsp. ALR101, <i>L. sakei</i> subsp. ALR103, <i>L. sakei</i> subsp. ALG0109, <i>P. pentosaceus</i> ALR103, <i>P. pentosaceus</i> ALR104, and <i>P. pentosaceus</i> ALR105) based on higher antifungal activity from the initial 22 species. One of the six identified species, <i>L. sakei</i> subsp. ALR103 had the highest antifungal activity. For growth of the six lactic acid bacteria, optimum temperature and pH were 30-37°C and 7.0, respectively. Proteolytic activities of the six lactic acid bacteria were almost as strong as the commercial strain DP (thermophilus Body-1). Coagulative activities of <i>L. sakei</i> subsp. ALR103, <i>P. pentosaceus</i> ALR103, and <i>P. pentosaceus</i> ALR104 were higher than those of <i>L. sakei</i> subsp. ALR101, <i>L. sakei</i> subsp. ALG0109, and <i>P. pentosaceus</i> ALR105. The acid resistance of <i>L. sakei</i> subsp. ALR103 was higher than that of <i>P. pentosaceus</i>. The major organic acid component of the lactic acid bacteria culture medium was lactic acid.</p> <p>Keywords: Cheese flag, antifungal activity, lactic acid bacteria, cheese starter, culture characteristics</p> <p style="text-align: center;">서론</p> <p>치즈 숙성 중의 곰팡이 오염 방제는 제조업체 회사에서, 치즈 제조공정에 매우 중요한 것으로 부속이 연구되어, 곰팡이가 침입하거나 숙성에 의해서 단락된 문제, 가장 큰 문제 중의 곰팡이 오염 방제 및 미생물학적 변질 방지 연구이다. 치즈 숙성 중의 곰팡이 오염 방제에 대한 연구가 많이 있다. 치즈 숙성 중 곰팡이 오염 방제에 대한 연구는 치즈 숙성 중 곰팡이 오염 방제에 대한 연구가 많이 있다. 치즈 숙성 중 곰팡이 오염 방제에 대한 연구는 치즈 숙성 중 곰팡이 오염 방제에 대한 연구가 많이 있다.</p> <p style="text-align: center;">1</p>	<h3 style="text-align: center;">Inhibitory effect of cinnamon essential oil on selected cheese-contaminating fungi (Penicillium sp.) during cheese-ripening process (Food Science and Biotechnology)</h3> <div style="text-align: center;">  <p>KoSFOST</p> </div> <p style="text-align: center;">논문게재예정증명서 2014-05 호</p> <p style="text-align: center;">제 목: Inhibitory effect of cinnamon essential oil on selected cheese-contaminating fungi (<i>Penicillium</i> sp.) during cheese-ripening process</p> <p style="text-align: center;">저 자: Eun-Jeong Jeong^{1,2}, Nam Keun Lee³, Jisun Oh⁴, Seong Eun Jung⁵, Jai-sung Lee⁶, In-Hyu Bae⁷, Hyun Hee Oh⁸, Hoo Kil Jung⁹, and Yong-Seob Jeong¹⁰</p> <p style="text-align: center;">저 자 소속: ¹Research Center for Industrial Development of Biofood Materials, Chonbuk National University, ²Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, ³Department of Animal Science & Technology, Seonchok National University, ⁴Insil Research Institute of Cheese Science</p> <p style="text-align: center;">위의 논문은 사단법인 한국식품과학회 발행 Food Science and Biotechnology Vol. 23 No. 4 (2014년 8월 31일 발간)에 게재예정임을 증명합니다</p> <p style="text-align: center;">2014년 1월 9일</p> <p style="text-align: center;">사단법인 한국식품과학회 회장 이</p> <p style="text-align: center;">한국식품과학회 Korean Society of Food Science and Technology 139-740 서울특별시 강남구 테헤란로 333-1 한국식품과학회 3414호 Tel: 02-566-7912 Fax: 02-566-9450/www.kosfst.or.kr The Korean Society of Food Science and Technology, 139-740 Seoul, Korea</p>

제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

1. 보다 안전하고 효과적인 천연물유래 항진균제의 개발을 위한 추가연구

보다 효과적인 천연물유래 항진균제 개발을 위해 다양한 소재를 개발하고 소재별 시너지 효과를 확인하는 추가 연구를 진행할 것이다. 또한 다양한 치즈 및 식품에의 적용 실험을 통하여 범용화 할 수 있는 항진균제의 개발을 목표로 한다. 더 나아가 안전한 치즈 및 식품의 보존료로의 등록이 이루어질 수 있도록 연구를 진행할 계획이다.

2. 천연물유래 항진균제의 다양한 생리활성 연구 확대

항진균제 외의 다양한 생리활성을 규명함으로써 폭넓은 활용을 기대할 수 있을 것으로 판단되어 항암, 항산화, 항당뇨 등 다양한 질환을 개선하는 효능을 밝히는 연구를 진행하고자 한다. 치즈 및 식품에 적용 시 생리활성 연구 결과들이 긍정적인 뒷받침 자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

3. 천연물유래 항진균제를 활용한 치즈 제조 매뉴얼 확립

다양한 치즈의 제조 및 저장 중 항진균제의 활용을 통하여 유효성을 입증할 것이며, 반복 및 다양한 시도를 통한 치즈 제조 매뉴얼을 확립할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese

Aynur Ahmadova, Svetoslav Dimitrov Todorov, Imen Hadji-Sfaxia, Yvan Choiseta, Hanitra Rabesona, Soumaya Messaoudi, Akif Kuliyeve, Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, Jean-Marc Chobert, Thomas Haertlé Anaerobe, 20: 42-49 (2013)

2. Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese

Hitoshi Ando, Koji Hatanaka, Ikumi Ohata, Yoshie Yamashita-Kitaguchi, Atsushi Kurata, Noriaki Kishimoto, Food Control, 26: 472-478 (2012)

3. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system

Bhanu Prakash, Priyanka Singh, Akash Kedia, N.K. Dubey Food Research International, 49: 201-208 (2012)

4. Chapter 5 - "Green Preservatives": Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria

Agata M. Pawlowska, Emanuele Zannini, Aidan Coffey, Elke K. Arendt
Advances in Food and Nutrition Research, 66: 217-238 (2012)

5. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species

Eugénia Pinto, Maria José Gonçalves, Karnjana Hrimpeng, Jéssica Pinto, Sara Vaz, Luís André Vale-Silva, Carlos Cavaleiro, Lúgia Salgueiro Industrial Crops and Products, 51: 93-99 (2013)

6. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period

E. Delavenne, J. Mounier, F. Déniel, G. Barbier, G. Le Blay *International Journal of Food Microbiology*, 155: 185–190 (2012)

7. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products

Francesca Valerio, Mara Favilla, Palmira De Bellis, Angelo Sisto, Silvia de Candia, Paola Lavermicocca *Systematic and Applied Microbiology*, 32: 438–448 (2009)

8. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread

Dalia Cizeikiene, Grazina Juodeikiene, Algimantas Paskevicius, Elena Bartkiene *Food Control*, 31: 539–545 (2013)

9. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives

Johan Schnürer, Jesper Magnusson *Trends in Food Science & Technology*, 16: 70–78 (2005)

10. Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review

D.K.D. Dalié, A.M. Deschamps, F. Richard-Forget *Food Control*, Volume 21: 370–380 (2010)

11. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey

Xin Zhao, Zhi-jiang Zhou, Ye Han, Zhan-zhong Wang, Jie Fan, Hua-zhi Xiao *Microbiological Research*, 168: 598–606 (2013)

12. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi

E.J. Yang, H.C. Chang International Journal of Food Microbiology, 139: 56-63 (2010)

13. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai - Tibet plateau

Fan Luo, Su Feng, Qun Sun, Wenliang Xiang, Jian Zhao, Jie Zhang, Zhirong Yang Food Control, 22: 50-53 (2011)

14. Antifungal protection and antioxidant enhancement of table grapes treated with emulsions, vapors, and coatings of cinnamon leaf oil

B.G. Melgarejo-Flores, L.A. Ortega-Ramírez, B.A. Silva-Espinoza, G.A. González-Aguilar, M.R.A. Miranda, J.F. Ayala-Zavala Postharvest Biology and Technology, 86: 321-328 (2013)

15. Mechanisms, clinically curative effects, and antifungal activities of cinnamon oil and pogostemon oil complex against three species of Candida

Gang-sheng WANG, Jie-hua DENG, Yao-hui MA, Min SHI, Bo LI Journal of Traditional Chinese Medicine, 32: 19-24 (2012)

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없음 -

제 8 장 참고문헌

1. Ahn DK, Han TW, Shin HY, Jin IN, Ghim SY. 2003. Diversity and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J Microbiol Biotechnol* 31: 191-196.
2. Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasa1 H, Rao LV, Habibullah CM, Sechi LA, Ahmed N. 2005. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annal Clinic Microbiol Antimicro*, 4: 1-7.
3. AOAC. 1990. The association of official analytical chemists, Official methods of analysis, 15th ed., Washington D.C., USA.
4. AACC. 1982. American association of cereal chemists, Approved method. The Association St. Paul, Minn., USA.
5. Bansal GR, Singh VP, Sachan N. 2011. Effect of probiotic supplementation on performance of broilers. *Asian J Anim Sci*, 5: 277-284
6. Barlow, I., G. T. Lloyd, Z. H. Ramshaw, A. J. Miller, G. P. McCabe and L. McCABE. 1989. Correlations and Changes in flavour and chemical Parameters of Cheddar cheese during Maturation *Aust. J. Daity. Technol.* 44. 7-18
7. Bogovič MB, Naat M, Zorič M. 2003. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technol Biotechnol*, 41: 83-88.
8. Cheng SS, Liu JY, Hsui YR, Chang ST. 2006. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous

cinnamon(*Cinnamomum osmophloeum*). Bioresourc Technology 97: 306–312.

9. Cho JH, Lee DY, Yang CN, Jeon JI, Kim JH, Han HU. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. FEMS Microbiol Lett, 257: 262–267.
10. Choi DM, Lee DS, Chung SK. 2007. Effects of Fermentation pine needle extract on the quality of plain bread. Korean J Food Preserv, 14: 154–159.
11. Choi HJ, Ahn CS, Jeong YK, Kim DW, Joo WH. 2010. Antifungal Activity of Bacillus sp. BCNU 2002 against the Human Pathogens KSBB Journal, 25: 123~129.
12. Choi IK, Jung SH, Kim BJ, Park AY, Kim J, Han HU. 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. Antonie Van Leeuwenhoek, 84: 247–253.
13. Donald G and Barceloux MD. 2009. Cinnamon (*Cinnamomum Species*). Toxicology of Natural Substance, pp. 39–43.
14. Faix Š, Faixová Z, Plachá I, Koppel J. 2009. Effect of cinnamomumzeylanicum essential oil on antioxidative status in broiler chickens. Act Vet Brno 78: 411–417.
15. Fukuzawa K and Takaishi Y. 1990. Antioxidant. J Act Oxyg Free Rad, 1: 55–70.
16. Gilliland SE. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev, 7: 175–188.
17. Gurdi SM, Sumitra MP, Delampasona AN. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresin and their constituent. Food Chem. Toxicol. 45: 1650–1661.

18. Im JS, Lee YT. 2010. Quality characteristics of rice bread substituted with black rice flour. *J East Asian Soc Dietary Life*, 20: 903-908.
19. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. 1995. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine*. 13: 310-312.
20. Jeong ET, Park MY, Lee JG, Chang DS. 1998. Antimicrobial activity and antimutagenesis of cinnamon (*Cinnamomun cassia Blume*) bark extract. *J Fd Hyg Safety*, 13: 337-343.
21. Jeong HW, Han DC, Son KH, Ha, MY. 2003. Antitumor effect of the cinnamaldehyde derivative CB403 through the arrest of cell cycle progression in the G2M Phase. *Biochemical Pharm*, 65: 1343-1350.
22. Jung JY, Kim SA, Chung HJ. 2005. Quality characteristics of low-fat muffin containing corn bran fiber. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 34: 694-699.
23. Han GJ, Son AR, Lee SM, Jung JK, Kim SH, Park KY. 2009. Improved quality and increased in vitro anticancer effect of kimchi by using natural sea salt without bittern and baked (guwun) salt. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 38: 996-1002.
24. Han SH, Woo NRY, Lee SD, Kang MH. 2006. Antioxidative and antibacterial activities of endemic plants extracts in Korea. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 14: 49-55
25. Hu C, Kitts DD. 2004. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. *Mol. Cell Biochem*, 265: 107-113.
26. Hull, M. E. 1947. Studies on Milk protein Colorimetric Determination of the partial Hydrolysis of the proteins in Milk. *J. Dairy Sci*. 30, 881-884.

27. Kang SY, Kim TG, Park MS, Han HM, Jung KK, Kang JH, Moon A, Kim SH. 1999. Inhibitory effects of *Eugenia caryophyllate* , *Ephedra sinica* and *Cinnamomum cassia* on the replication of HBV in HepG2 2.2.15 cells. J Appl Pharmacology, 7: 133-137.
28. Kaur IP, Chopra K, Saini A. 2002. Probiotics; potential pharmaceutical applications. Eur J Pharm Sci, 15: 1-9.
29. Kim HO, Park SW, Park HD. 2004. Inactivation of Escherichia coli O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from cinnamomum cassia shoot. Food Microbiol, 21: 105-110.
30. Kim HS, Choi JW, Ryu SH. 2002. Plasma cholesterol-lowering effects of *Cinnamomi* cortex extract as an inhibitor of pancreatic cholesterol esterase. Korean J Life Sci, 12: 106-112.
31. Kim JS. 2004. Quality characteristics of white bread added with sea tangle powder. MS Thesis, Yosu National University.
32. Kim JS, Kang KJ. 1998. Effect of Laminaria addition on the shelf-life and texture of bread. Korean J Food Nutr, 11: 556-560.
33. Kim M, Chun J. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. Int J Food Microbiol, 103: 91-96.
34. Kim NM, Jeon BS, Park CK, King WJ. 1993. Effect of extraction conditions on mineral components and physical properties in cinnamon extracts. J Korean Agric Chem Soc, 36: 249-254.
35. Kim NM, Sung HS, Woo WJ. 1993. Effect of solvents and some extraction condition on

antioxidant activity in cinnamon extracts. Korean J Food Sci Technol, 25: 204-209.

36. Kim RM, Kim YH, Lee EB. 2000. Anti-allergy activity of cinnamomi cortex. Nat prod Sci, 6: 49-51.
37. Kim YD, Shin HW, Cho JY. 2013. Antifouling activity of coumarin and its derivatives isolated from the cinnamon tree *Cinnamomum loureiroi*. Kor J Fish Aquat Sci, 46: 53-58.
38. Kimoto J, Kurisaki J, Tsuji NM, Ohmomo S, Okamoto T. 1999. *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. Lett Appl Microbiol, 29: 313-316.
39. Kitazawa H, Matsumura K, Itoh T, Yamaguch T. 1992. Interferon induction in murine peritoneal macrophage by stimulation with *Lactobacillus acidophilus*. Microbiol Immunol, 36: 311-315.
40. Klaenhammer TR. 1998. Bacteriocin of lactic acid bacteria. Biochim, 70: 337-349.
41. Ko KH, Liu W, Lee HH, Yin J, Kim IC. 2013. Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in different Kimchi. J Korean Soc Food Sci Nutr, 42: 89-95.
42. Koh YJ, Park YK, Kim YS, Cha DS, Choi HD. 2009. Preparation of hot water extracts of Dandelion leaves to increase anti-inflammatory activity. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 391-395.
43. Kumar A, Saini P, Shrivastava JN. 2009. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. Indian J Exp Biol, 47: 57-62.
44. Kwon EA. 2002. A study of the quality characteristics and the preference of the bread

added with *Laminaria* powder. MS Thesis, Kookmin University.

45. Lee BG, Byun GI, Cha WS. 2009. Quality characteristics of white pan bread by lotus seeds powder. Korean J Food Preserv, 16: 68-74.
46. Lee BW, Shin DH. 1992. Antimicrobial effect of some plant extracts and their fractionates for food spoilage microorganisms. Korean J. Food Sci. Technol.. 23: 205-212.
47. Lee BW, Shin DH. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms, Korean J. Food Sci. Technol. 23: 200-205.
48. Lee GH, Kim YH, Cho HA, Kang SG, Kim DG. 2011. The Effect of *Lactobacillus plantarum* CLP-1 on the Swine Viruses. Korean Society for Biotechnol Bioengin, 26: 62-68.
49. Lee HJ, Jung SI, Hwang YI. 2009. Characteristics and preservation of the plain bread added with onion juice. Journal of Life Science, 19: 781-786.
50. Lee HS. 2002. Inhibitory Activity of *Cinnamomum cassia* Bark-Derived component against rat lens aldose reductase. J Pharmaceut Sci, 3: 226-230.
51. Lee JH, Choi MJ, Chung KC, Lee SK. 2012. Rheological properties of dough and quality characteristics of bread containing whey ferment cultured by *L. acidophilus* KCCM 32820 and *P. freudenreichii* KCCM 31227. Korean J Food Sci An, 32: 803-809.
52. Lee JH, Choi MJ, Jung KC, Lee SK. 2012. Rheological properties of dough and quality characteristics of bread containing whey ferment cultured by *L. acidophilus* KCCM 32820 and *P. freudenreichii* KCCM 31227. Korean J Food Sci. An, 32: 803-809.
53. Lee JM. 2005. Adhesion of kimchi *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell membrane and

sequestration of aflatoxin B1. J Korean Soc Food Sci Nutr, 34: 581-585.

54. Lee JS, Heo GY, Lee JW, Oh YJ, Park JA, Park YH, Pyun YR, Ahn JS. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. Int J Food Microbiol, 102: 143-150.
55. Lee JS, Lee KC, Ahn JS, Mheen TI, Pyun YR, Park YH. 2002. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. Int J Syst Evol Microbiol, 52: 1257-1261.
56. Lee MK, Rhee KK, Kim JK, Kim SM, Jeong JW, Jang DJ. 2007. A survey of research papers on Korean Kimchi and R&D trends. Korean J Food Culture 22: 104-114.
57. Li YQ, Kong DX, Wu H. 2013. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon bark using GC-MS and FTIR spectroscopy. Industrial Crops and Products 41: 269-278.
58. Libby PP, Ridker M, Maseri A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. Circulation, 105: 1135-1143.
59. Liu Y, Chen Z, Ng TB, Zhang J, Zhou M, Song F, Lu F, Liu Y. 2007. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. Peptides, 28: 553-559.
60. Lopez P, Sanchez C, Batlle R, Nerin C. 2005. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. J. Agric. Food Chem., 53: 6939-6946.
61. Manso S, Cacho-Nerin F, Becerril R, Nerin C. 2013. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. Food Control 30: 370-378.

62. Mok, JS, Song, KC, Choi NJ, Ynag HS. 2001. Antibacterial effect of cinnamon bark extract against fish pathogenic bacteria. J Korean Fish Soc, 34: 545-549.
63. Moon SW, Park SH. 2008. Quality characteristics of white pan bread with Chungkukjang powder. 37: 633-639.
64. Nanasombat S, Wimmattigol P. 2011. Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. Food Sci. Biotechnol. 20: 45-53.
65. Oh HK, Shin MS, Im HS. 2007. A study on the quality characteristics of the bread with Samultang. J Korean Soc Food Sci Nutr, 36: 643-650.
66. Oh WG, Kim JH, Lee SC. 2011. Preparation and characterization of white bread with sweet persimmon. J Korean Soc Food Sci Nutr, 40: 253-258.
67. Park CS. 1998. Antibacterial activity of ethanol extract of pine needle against pathogenic bacteria. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 5: 380-385.
68. Park KH, Koh DS, Lim YH. 2001. Anti-allergic compound isolated from *Cinnamomum cassia*. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 44: 40-42.
69. Park KY. 1995. The nutritional evaluation, and antimutagenic and anticancer effects of kimchi. J Korean Soc Food Nutr, 24:169-182.
70. Park JM, Shin JH, Lee DW, Song JC, Suh HJ, Chang UJ, Kim JM. 2010. Identification of the lactic acid bacteria in Kimchi according to initial and over-ripened fermentation using PCR and 16S rRNA gene sequence analysis. Food Sci Biotech, 19: 541-546.
71. Park RJ, Park YK. 2000. Studies on the effects of the parts of *Cinamomum cassia*

PRESL on the antioxidation (I). Kor J Herbology, 15: 45-55.

72. Park SH, Chang KH, Byun GI, Kang WW. 2009. Quality characteristics of bread made with flour partly substituted by lotus leaf powder. Korean J Food Preserv, 18: 47-52.
73. Park SY, Kim SH, Yu DJ, Lee SJ, Ryu KS. 2001. Effects of supplemental *Lactobacillus* on broiler performance. Korean J Poult Sci, 28: 27-40.
74. Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H, Jiang Y. 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. Inno Food Sci Emer Technol, 10: 627-632.
75. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. 2011. Antimicrobial activity of Basil(*Ocimum basilicum*)oil against *Salmonella enteritidis in vitro* and in food. Biosci. Biotechnol. Biochem., 74: 1200-1204.
76. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1997. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med, 26: 1231-1237.
77. Richardson GH. 1985. Standard method for the examination of dairy products. American Public Health Association, Washington, D. C. pp.133.
78. Roh HJ, Kim GE. 2009. Fermentation of curcubita maxima extracts with microorganisms from kimchi. KSBB Journal, 24: 149-155.
79. Sandine WE, Muralidhara KS, Elliker PR, England DC. 1972. Lacticacid bacteria in food and health: A review with special reference to enteropathogenic Escherichia coli as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. J Milk Food Technol, 35: 691-702.

80. Seo YJ, Lee JW. 2012. Antifungal and antioxidant activities of volatile organic compounds generated during the drying process of *Chamaecyparis obtuse*. Korean J Microbiol, 48: 305-308.
81. Shim EJ, An JH, Yu JH. 1996. Studies on the effect of *Lactobacillus delbruckii* on the quality of bread. Korean Dairy Techno, 14: 85-95.
82. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. Inflammopharmacol, 15: 252-259.
83. Silva Cde B, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EE. 2008. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. Braz. J. Infect. Dis. 12: 63-66.
84. Song Y, Kato N, Liu C, Matsumaya Y, Kato H, Watanabe K. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiple PCR assays using group- and species-specific primers derived from 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. FEMS Microbiol Lett, 187: 167-173.
85. Subashbabu P, Prabuseenivasan P, Ignacimuthu S. 2007. Cinnamaldehyde-A potential antidiabetic agent. Phytomed, 14: 15-22.
86. Veljovic K, Terzic-Vidojevic A, Vukasinovic M, Strahinic I, Begovic J, Lozo J, Ostojic M, Topisirovic L. 2007. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. J Appl Microbiol, 103: 2142-2152.
87. Wang SY, Chen PF, Chang ST. 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon(*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. Bioresource Technology 96: 813-818.

88. Yang EJ, Chang HC. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Kor J Microbiol Biotechnol*, 36: 276–284.
89. You Y, Yoo S, Yoon HG, Park J, Lee YH, Kim S, Oh KT, Lee J, Cho HY, Jun W. 2010. In vitro and in vivo hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol*, 48: 1632–1637.
90. Yu JJ, Park HJ, Kim SG, Oh SH. 2009. Isolation, identification, and characterization of *Weissella* strains with high ornithine producing capacity from kimchi. *Kor J Microbiol*, 45: 339–345.
91. Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suarez V, Vinderola G, Reinheimer J, Giraffa G. 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol*, 28: 1033–1040.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 교부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 교부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.