

발간등록번호

11-1543000-000832-01

전통발효유 타락의 산업화 연구(교부가가치식품기술개발사업)
(Industrialization of Tarak, Korean Traditional Fermented Milk
Product)

(주) 한국야쿠르트

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전통발효유 타락의 산업화 연구” 과제(세부과제 “타락발효유의 제품화 기술개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2015 년 01 월 17 일

주관연구기관명 : (주)한국야쿠르트

주관연구책임자 : 장 성 식

세부연구책임자 : 장 성 식

연 구 원 : 명 길 선

연 구 원 : 김 수 아

연 구 원 : 홍 동 기

협동연구기관명 : 성신여자대학교

협동연구책임자 : 한 영 숙

협동연구기관명 : 성신여자대학교

협동연구책임자 : 윤 현 근

협동연구기관명 : 성신여자대학교

협동연구책임자 : 고 성 희

요 약 문

I. 제 목

전통발효유 타락의 산업화 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 연구개발의 목적

막걸리를 발효원으로 한 전통발효유의 표준화를 위해 발효미생물과 발효산물을 분석하고 기능성 성분을 규명하며 응용제품을 개발함으로써 산업화 하고자 함.

- (1) 타락발효유의 제품화 기술개발
- (2) 전통발효유 타락의 제조 표준화 및 영양적 우수성 규명
- (3) 타락의 기능성 분석방법 확립 및 *in vitro* 기능성 규명
- (4) 타락의 응용제품 개발

○ 연구개발의 필요성

(1) 문화적 측면:

- 세계적으로 건강식에 대한 관심이 높아지면서 한식의 건강기능성이 부각되고 있음.
- 한식의 대표적인 발효음식인 김치, 젓갈, 된장, 간장, 고추장은 이미 그 우수성을 과학적으로 인정받고 있음.
- 현재까지 발견된 가장 오래된 한문필사본 조리서인 ‘수운잡방(需雲雜方,1540년)’은 고려 말기에서 조선전기에 걸친 한 시대의 음식법을 추정할 수 있는 귀중한 자료임.
- 수운잡방에는 우유에 탁주를 첨가하여 발효시킨 발효유, **타락**의 제법을 기록함으로써 그 당시부터 발효유가 섭취되었음을 알 수 있음.
- 우리나라에도 전통발효유가 존재했음에도 불구하고 그 제법이나 품질특성이 거의 알려지지 않았으며 체계적인 연구는 시작단계에 불과한 실정임.
- 발효유는 발효에 사용된 미생물의 발효 특성이나 제조방법에 따라 그 종류가 매우 다양하며, 염증억제, 혈압조절, 콜레스테롤저하, 비만억제 등 다양한 기능성이 확인됨으로써 세계인들의 관심이 높은 식품임.
- 타락은 우리나라 전통 발효식품이나 타 발효식품과는 달리 동물성 원료인 우유를 발효시킨 독특한 식품임.

(2) 산업적 측면:

- 현재, 국내 발효유시장의 연간 매출규모는 약 1조4000억 원으로 이 가운데 장과 위, 간 발효유 등 기능성발효유가 전체발효유 시장의 40%를 차지하고 있으며 차별화된 프리미엄급 발효유 제품이 출시되고 있음.
- 전 세계적으로 발효유제품은 비만, 고혈압, 당뇨, 심장질환, 암등과 같이 건강과 웰빙에 문제가 되는 질환을 예방해주는 제품으로 자리를 확고하게 구축하였으며, 유기농을 비롯하여 저지방/무지방, 비타민강화, 저콜레스테롤, 저나트륨, 무카페인, 무설탕 등 다양한 분야에서 신제품 개발도 동시에 이루어지고 있음.
- 유럽 발효유의 특징은 각 나라별로 건강 관심 요인에 차이를 나타냄. 따라서, 주요 관심요인이 되는 특정 질환에 초점을 맞춘 제품이 주류를 이루고 있으며 *L. casei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacteria* 등의 probiotic 젖산균을 제품에 활용하고 있음(한국산업보건진흥원, 2004).
- 발효유의 종류는 젖산균 발효유와 젖산균-효모 발효유가 있으며 특히 젖산균-효모 발효유의 건강기능성이 발표됨으로써 새롭게 주목을 받고 있음.
- 본 연구과제에서 개발될 새로운 전통 타락 발효유의 상품화를 통하여 기업 매출 증대 및 수출 촉진에도 크게 이바지할 것으로 예상됨.

(3) 사회적 측면:

- 유산균을 이용한 전통 기능성 발효에 관한 기술 축적 및 타락균 발효유 개발을 위한 균주의 배양 방법과 발효조건 및 제조공정을 습득한 전문 인력을 양성할 수 있음.
- 한식의 디저트화를 통하여 타락발효유의 브랜드화 가능함.
- 유제품의 맛과 기능성을 향상시킴으로써 유제품의 소비를 향상시킬 수 있음.
- 우유의 수요 증가를 통한 낙농 농가와 유가공 업체의 수익 증대에 기여할 수 있음.

(4) 기술적 측면:

- 타락균을 접종하여 원유 단독배양 후 그 배양액을 균질, 살균, 냉각하여 제조하는 타락균 표준 발효유 대량 제조공정 기술 확보가 가능함.
- 타락균의 기능성 물질과 특유의 맛, 영양성분을 증가시킴으로서 우유의 영양과 타락균이 발효하면서 생성되는 생리활성 물질 성분을 동시에 제공할 수 있는 전통 건강 기능성 발효유제품 개발 기술을 확보할 수 있음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

○ 타락발효유의 제품화 기술개발

- 유산균주의 선발 및 동정
- 선발균주의 표준 배합비 선정
- 발효 공정 최적화
- 타락발효유 시제품 개발 및 관련 품질확보

- 전통발효유 타락의 제조 표준화 및 영양적 우수성 규명
 - 막걸리를 발효원으로 한 타락의 표준화 제법 개발
 - 타락의 발효산물 및 영양성분 분석
- 타락의 기능성 분석방법 확립 및 in vitro 기능성 규명
 - 타락의 추출물 제조법 확립과 분석
 - 타락의 기능성 분석 : 면역 증진, 멜라닌 생성 억제, 항비만, 암세포 성장억제 기능성
- 타락의 응용제품 개발
 - 타락 응용 젤리류 개발(젤리, 푸딩)
 - 타락 응용 프로즌요구르트 개발(아이스크림)

IV. 연구개발결과

○ 타락발효유의 제품화 기술개발

가. 유산균주의 선발 및 동정

- 생막걸리 내의 효모의 농도는 10^6 - 10^8 cfu/mL 수준이었음. 유산균이 분리된 생막걸리는 약 32종으로 수집된 막걸리의 36.8%였으며, 유산균이 있는 경우 농도는 10^4 - 10^6 cfu/mL 수준이었음. 이것으로 보아 막걸리의 주요 발효 균주는 효모와 유산균임을 알 수 있었음. 대량 생산에 용이한 것은 유산균이므로 유산균주를 우선 검토하였음. 현재까지 분리된 균주는 효모가 약 130종, 유산균이 약 200종 정도 임.
- 분리 균주 중 milk 배지에서 커드 형성 유산균을 동정한 결과, *Lactobacillus plantarum* 7 종과 *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 5 종이 각각 규명되었음.
- 몽골 유제품 균주 89종 중 10% skim milk에서 커드를 형성하는 균주는 8종이었으며 *Enterococcus* 균주가 7종, *Lactobacillus* 균주 1종이었음. 그 중 대량 생산에 적용하기 용이한 것은 *Lactobacillus* 속 유산간균으로 *Lactobacillus helveticus*를 배양 테스트에 이용하였음. 타락 균주 47종에서는 10% skim milk에서 커드를 형성하는 균주가 없었음.

나. 선발균주의 표준 배합비 선정

- 선별 10종 균주 중 파일렛 테스트 배양물의 curd 형성균은 총 5종으로 MKRL 5-8, M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2이었으며, 이 중 총 유산균수가 가장 높은 균주는 MKRL 5-8이었음. 이 균주를 적용하여 배양액을 제조할 수 있도록 배양 조건을 설정하였음.
- 막걸리 유래 유산균의 성장이 유성분만으로는 안정적이지 않아 당류를 첨가하여 발효가 잘 되도록 유도하였음. 또한 전통적인 타락과 동일하게 유성분에 막걸리를 넣은 효과를 내기 위해 쌀즙을 넣고 막걸리 유래 유산균으로 발효하였음.

다. 발효 공정 최적화

- 배합비와 같이 원료를 섞고 130~135℃로 2~3초간 가열(UHT, ultra-high temperature sterilization)하여 살균하였음. 살균 후 35~40℃로 냉각하여 막걸리 유래 유산균(MKRL 5-8, M13-23-3, M13-71-2, 모두 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*)을 0.02% 농도로 접종하였음. 37℃ water bath에서 24시간 동안 배양하여 발효시키고 발효가 끝난 샘플은 50/150 bar로 균질하여 드링크 타입의 발효유로 제조하였음.

라. 타락발효유 시제품 개발 및 관련 품질확보

- 선발균주 중 *L. paracasei* M13-23-3이 24시간 배양 후, 산도가 가장 낮았음. *L. paracasei* M13-23-3이 신맛이 가장 적었으며, 당도와 균수는 선발균주 3종의 유의적 차이가 없었으며, 농후발효유 법적 기준에 적합하였음.
- *L. paracasei* M13-23-3으로 발효시킨 타락발효유의 100 g 당 영양성분은 일반적인 드링크 발효유에 비해 지방함량은 낮고 당함량은 높은 편임.
- *L. paracasei* M13-23-3으로 발효시킨 타락발효유로 관능검사 수행 결과 전체적인 맛 점수는 4.0점/7점 척도로 중간 수준이었음(Fig. 8). 원인으로서는 향에 대한 기호도가 낮고 신맛이 강하기 때문이라고 판단이 됨.
- MKRL5-8의 배양액 및 균체는 여드름 원인균인 *P. acnes* ATCC11828 과 *P. acnes* ATCC6919 의 성장을 저해하는 효능이 있음을 확인하였음.

○ 전통발효유 타락의 제조 표준화 및 영양적 우수성 규명

가. 막걸리를 발효원으로 한 타락의 발효산물 및 영양성분 분석

- 막걸리에서 추출한 5종의 *L. paracasei*를 이용해 24시간 37℃에서 타락을 발효하며, 타락의 pH, 산도, 점도, 유기산, 유리당 함량, 지방산, 무기질 함량 및 미세구조를 측정하였음.
- 발효시간이 길어짐에 따라 타락의 pH는 감소하였으며, 특히 발효 12시간에는 pH가 급감, 우유의 등전점인 pH 4.6 부근으로 감소, 발효 12시간부터 커드를 형성하였음을 알 수 있었음.
- pH, 산도와 점도는 발효시간에 따라서 현저하게 달라지나, 균종 간의 차이는 크지 않았음
- 생균수 역시 발효 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보이나, 24시간 후에는 균종 간의 차이가 없었음.
- 유기산 중 젖산 (lactic acid) 함량은 발효 12시간에 급증한 후 발효 시간에 따라 증가하는 경향을 보였음. 균종 간에는 균 5번 샘플이 다른 균종에 비해 높은 수치의 lactic acid를 형성하였음을 알 수 있었음. M13-71-2로 발효한 샘플이 가장 낮은 유당 함량을 보였음.
- 발효 24시간 샘플들을 동결 건조하여 균종간의 무기질과 지방산을 비교한 결과, 무기질은 샘플들 간에 큰 차이가 없었지만, M13-71-2로 발효한 샘플이 다른 샘플들에 비해 높은 미네랄 함량을 보였음. 지방산 결과에서는 약 30%의 불포화지방산을 함유하는 것으로 나타났다.
- 대조군 샘플과 발효 타락샘플의 미세구조를 전자현미경으로 관찰한 결과 발효 타락 샘플에서는 균의 몸체와 함께 EPS(exo-polysaccharides, 균이 생성하는 다당체)로 추정되는 점

질물이 함께 발견되었음.

- *L. paracasei* 가 발효가 진행되는 동안 생체 기능성 물질로 알려진 다당체의 형성 가능성을 보여, 발효유 타락이 항암, 항궤양, 면역 증강 작용 등 인체 내에 bioactive agent로서의 충분한 역할을 할 수 있을 것이라 예상 됨. 특히 M13-71-2는 다른 균종들에 비해 다당류를 더 많이 생성시킴을 알 수 있었음.

○ 타락의 기능성 분석방법 확립 및 in vitro 기능성 규명

가. 타락의 추출물 제조법 확립과 분획

- 제1세부 제조 타락 동결건조 시료제공(MKRL-5-8, M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2)
- 타락 동결건조 시료를 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, phosphate buffer로 분획하여 고형분 회수

나. 면역 증진 기능성 분석 및 기능성 강화 조건 탐색

- 세포 증식도 측정을 위한 MC116 cell, Jurkat cell의 배양 조건 확립
- M13-65-3 시료는 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL 농도에서 jurkat cell의 세포 증식도를 유의하게 증가시킴 ($p < 0.05$).

다. 타락의 멜라닌 생성 억제 기능 분석

- MKRL-5-8, M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2 타락 시료는 100 µg/mL 농도에서 tyrosinase 역가의 약 20%를 저해함.
- MKRL-5-8 시료, M13-67-1 시료는 100 µg/mL 농도에서 α -MSH에 의하여 촉진된 B16 F10 cell의 멜라닌 생성을 유의적으로 억제함. ($p < 0.05$)

라. 타락의 항비만 기능성 규명

- 지방전구세포 (3T3-L1) 배양 조건, 지방세포 분화 조건, 지방 생성 유도 조건 수립
- 타락 추출물 (5-8, 71-2)은 지방세포의 지방 생성도를 유의하게 억제함.
- 타락 추출물 (5-8, 71-2)은 지방세포의 PPAR γ , C/EBP α 발현량 감소 기능이 없음.
- 타락 추출물 (5-8, 71-2)은 쥐를 이용한 동물실험에서 체중감소와 혈중지질 개선 효능이 있음.

마. 타락의 암세포 성장 억제 기능성 규명

- 타락 추출물 (5-8, 23-3, 71-2)에서는 A549 세포 (폐암세포), HepG2 세포 (간암세포)의 성장 억제 기능이 발견되지 않았음.

○ 타락의 응용제품 개발

가. 타락 응용 젤리류 개발(젤리, 푸딩)

- 본 실험에 사용된 타락은 수운잡방(Sueunjabbang Research Institute 2011)과 Lim 등 (2013)의 타락 제조법을 참고한 자연발효 타락을 이용하였음.
- 타락을 이용한 젤리류인 과편, 양갱, 젤리, 푸딩의 실험조리 결과, 타락의 사용량이 비교적 많고, 관능 상 특성이 우수하다고 생각되는 젤리와 푸딩에 대한 제조조건을 확립하였음.
- 타락을 이용한 젤리와 푸딩의 일반성분 분석 결과, 젤리와 푸딩 모두 타락의 첨가량이 많아질수록 수분의 함량은 감소하였고, 조단백질, 조회분, 조지방의 함량은 유의적으로 증가하였음.
- 젤리와 푸딩 모두 타락의 첨가량이 많아질수록 pH는 유의적으로 감소하고 산도는 유의적으로 증가하였으며, 당도는 증가하였음.
- 타락 75%의 타락젤리의 관능품질이 가장 우수한 것으로 판단됨.
- 푸딩 제조 시 타락 특유의 신맛과 향이 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이상의 결과 타락 75%와 100%의 첨가가 바람직한 것으로 생각됨.

나. 타락 응용 프로즌요구르트 개발(아이스크림)

- 본 연구에서는 1세부 과제(한국 야쿠르트)를 통해 제조된 상업용 타락을 이용하여 디저트 식품으로 선호도가 높은 아이스크림 제품류 중 유지지방분 6 % 이상, 유고형분 16 % 이상에 해당하는 아이스크림 규격에 맞춰 타락 응용 프로즌 요구르트(아이스크림)의 제조조건을 확립하고자 하였음.
- 타락첨가 아이스크림의 젖산균수는 7.01-8.17(log CFU/g)의 수준으로 나타났으며, 타락의 첨가에 따라 유의적으로 증가하였음.
- 전반적인 기호도에서 타락을 가장 많이 첨가한 TI-48(타락 48%)이 가장 높게 평가되었음.
- 본 연구 결과를 토대로 향후 연구에서는 타락을 각 50% 첨가하여 아이스크림류의 식품공전 상의 기준 규격에 맞춰 샤베트, 저지방 아이스크림, 아이스크림 등 제품군별 제조를 통해 타락을 이용한 아이스크림의 최적 제품을 제안하고자 함.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 특허출원

- 본 연구결과의 산업재산권 확보를 위해 막걸리 분리 유산균에 대한 특허 ‘여드름 원인균 프로피오니박테리움 아크네스의 생장억제 효능을 가지는 락토바실러스 파라카제이 HY7301

및 이를 유효성분으로 함유하는 제품'과 응용제품에 대한 특허 '타락을 이용한 젤리의 제조 방법 및 타락을 이용한 젤리', '타락을 이용한 푸딩의 제조방법 및 타락을 이용한 푸딩', '타락을 이용한 아이스크림의 제조방법 및 타락을 이용한 아이스크림' 을 특허 출원하였음. 향후 막걸리 균주에 대한 특허 '피부 미백 활성을 가지는 락토바실러스 파라카제이 HY7301의 우유 발효물'을 추가 출원할 예정임.

- '여드름 원인균 프로피오니박테리움 아크네스의 생장억제 효능을 가지는 락토바실러스 파라카제이 HY7301 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품', '피부 미백 활성을 가지는 락토바실러스 파라카제이 HY7301의 우유 발효물' 특허가 등록될 경우, 피부 개선 관련 원료로서 상기 균주를 적용한 고부가가치 '피부 기능성 발효유 제품' 개발이 가능할 것으로 기대됨.

나. 학술대회 발표

- 타락발효유의 제품화 기술개발 관련 다수의 연구결과를 국내학술대회에 지속적으로 발표하였음.
 - The effects of *L. paracasei subsp. paracasei* HY7301 isolated from Makgeolli on cell viability and synthesis of procollagen in human fibroblast. 다산컨퍼런스. 2013.10.31.~2013.11.02. 명길선 외 3인
 - The Probiotic Characteristics of *Lactobacillus paracasei* isolated from Makgeolli. 한국식품과학회. P12-104. 2014.08.25.~2014.08.27. 김수아 외 3인
 - Antagonistic Activity of Potent Probiotic *Lactobacillus* Strain against Acne Pathogens. 한국미생물학회. 2014.04.30.~2014.05.02. 명길선 외 3인
- 전통발효유 타락의 제조표준화 및 영양적 우수성 규명 관련 다수의 연구결과를 국내학술대회에 지속적으로 발표하였음.
 - Historical and Cultural Study on Korean Traditional Fermented Milk, Tarak. 한국식품과학회. P12-052. 2014.08.25.~2014.08.27. 오사다사치코 외 3인
 - Effects of three *Lactobacillus paracasei* strains found in Korean traditional rice wine on nutritional and sensory characteristics of fermented milk. 한국식품과학회. P12-106. 2014.08.25.~2014.08.27. 김상숙 외 7인
 - Study on exo-polysaccharides of cultured milk inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains isolated form Korean traditional rice wine, Makgeolli. 한국식품과학회. P12-098. 2014.08.25.~2014.08.27. 김은정 외 6인
 - Studies on Fermentation Characteristics of Tarak, Korean Traditional Fermented Milk, through the Analysis of Microbial Succession and Metabolites. 한국식품과학회. P12-110. 2014.08.25.~2014.08.27. 정상은 외 8인
- 타락의 응용제품 개발 관련 다수의 연구결과를 국내학술대회에 지속적으로 발표하였음.
 - 타락을 이용한 아이스크림류의 품질특성. 한국식품조리과학회. 식품가공 FPP-4. 2014.10.17. 고성희 외 4인

- 전통발효유 타락을 이용한 디저트상품 개발. 한국식품조리과학회. 식품조리 FCO-6. 2014.10.17. 이경연 외 4인

다. 논문발표 및 게재

- 타락의 응용제품 개발 관련된 논문을 3건 게재하였음(비SCI).
 - 전통발효유 타락을 이용한 젤리의 품질 특성. 한국식품조리과학회지. 29(5); 599-603 (2013)
 - 전통발효유 타락을 이용한 푸딩의 품질 특성. 한국조리학회지. 20(3); 90-99 (2014)
 - 전통발효유 타락을 이용한 아이스크림의 품질 특성. 한국조리학회지. 20(6) (2014)
- 향후 비SCI급 2건, SCIE급 4건의 논문을 추가 게재할 예정임.

2. 활용계획

- 전통발효유 타락의 제조공정 및 기술개발
- 유산균을 이용한 전통 기능성 발효에 관한 기술 축적 및 타락균 발효유 개발을 위한 균주의 배양 방법과 발효조건 및 제조공정을 습득한 전문 인력 양성
- 기능성 발효유로서의 타락 제품 개발
- 외식산업을 통한 한식의 디저트로서 타락 발효유의 브랜드화
- 전통발효유 타락의 제품 개발을 통해 전통 발효식품에 다양한 콘텐츠 제공
- 타락의 응용제품 개발을 통해 타락의 수요에 대한 다각화 및 홍보자료 구축
- 향암 및 항비만, 항동맥경화, 항당뇨, 항산화 기능성 검증 실험 기술을 이용하여 타락 발효산물의 생리활성 물질 연구에 응용

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Industrialization of Tarak, Korean Traditional Fermented Milk Product

II. Objectives and background

We analyzed microbial fermentation of Tarak and its product to standardize traditional fermented milk using rice wine products, and also to identify the functional components. This allows the industrialization of Tarak through the development of applications.

- (1) Development of technologies for commercialization of Tarak fermented milk
- (2) Establishment of manufacturing standards and elucidation of nutritional excellence of traditional fermented milk - Tarak
- (3) Establishment of functional analysis methods for Tarak and elucidation of in vitro functionality
- (4) Developments of commercial products using Tarak

○ The need for research

(1) Cultural aspects

- As the interest in health is being raised worldwide, the health promoting functionality of Korean foods has emerged.
- As representatives of Korean fermented foods, kimchi, fermented fish, miso, and red pepper paste were already recognized for scientific excellence.
- ‘Suunjabang’, the oldest cooking book written in Chinese letter, is a valuable resource to find the food recipes from late Goryeo Dynasty to early Joesun Dynasty.
- In Suunjabang, the recipe of Tarak using milk and Takju exists and it suggested that the fermented milk was consumed at that time.
- Though the traditional fermented milk existed in Korea, the manufacturing process

and the quality characteristics were not revealed and systematic research has started recently.

- Fermented milk products are categorized according to their fermentation characteristics and manufacturing process. Functions such as lowering cholesterol concentration and obesity were already confirmed.
- Tarak is a unique traditional fermented food of Korea. However, unlike other traditional fermented foods, milk of animal origin was utilized as the ingredient.

(2) Industry Aspects

- Annual sales of yogurt products in domestic market is about 1.4 billion USD and functional yogurt have 40% market share of the total market.
- Fermented milk is considered to improve symptoms such as obesity, hypertension, diabetes, and heart disease. New product development trends are low-fat, non-fat, vitamin enhanced, low cholesterol, low sodium, no caffeine, and no sugar in various ways.
- European fermented milk products are mainly focused on the particular disease. Probiotic lactic acid bacteria such as *L. casei*, *L. acidophilus*, and *bifidobacteria* are used for commercial products (Korea Health Industry Development Institute, 2004).
- Either combination of lactic acid bacteria and yeast or only lactic acid bacteria is utilized to ferment milk. Recently, the use of combination of lactic acid bacteria and yeast culture draws attention to the public.
- In this research, the commercialization of new traditional fermented milk, Tarak, is expected to contribute to the company revenue.

(3) Social aspects

- Knowledge accumulation on traditional functional fermentation using the lactic acid bacteria is expected.
- Tarak can be branded as a desert.
- The consumption of dairy products can be increased by improving taste and functionality of dairy products.
- Increase in milk demand will contribute to revenue growth of dairy farmers and dairy companies.

(4) Technical aspects

- Standardized manufacturing process for Tarak in large scale will be developed.
- By improving the flavor and functionality of the milk, it is possible to achieve traditional functional dairy product technology with production of bio-active molecules.

III. Contents and scope of this study

- Development of commercial production technology for Tarak fermented milk
 - Selection and identification of lactic acid bacteria
 - Development of standard recipe with starter microorganism
 - Fermentation process optimization
 - Development of Tarak fermented milk test product and quality assurance

- Manufacturing standards and nutritional excellence of traditional fermented milk Tarak
 - Development of standardized method for tarak by the fermentation of rice wine
 - Analysis of fermentation products and nutrient

- Establishment of functional analysis methods for Tarak and examination of in vitro functionality
 - Establishment of manufacturing Tarak extracts and fractions
 - Functional analysis of Tarak: immune stimulation, inhibition of melanin, antiobesity, cancer cell growth inhibition

- Applications development of Tarak
 - Development of Tarak applications (jelly, pudding)
 - Development of frozen yogurt using Tarak (ice cream)

IV. Results of research and development

- Development of commercialization technologies for Tarak fermented milk
1. Selection and identification of lactic acid bacteria
 - The concentration of yeast was 10^6 - 10^8 cfu/ml in raw rice wine. The lactic acid bacteria were isolated from 32 kinds of raw rice wine products. The concentration of lactic acid bacteria was 10^4 - 10^6 cfu/ml. Yeast and lactic acid bacteria are the major strains for fermentation of rice wine. Lactic acid bacteria are suitable for production in large scale. The isolated strains from rice wine products were about 130 strains of yeast and about 200 strains of lactic acid bacteria with curd formation.
 - Results of identification of lactic acid bacteria were 7 strains of *Lactobacillus plantarum* and 5 strains of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*.
 - Five kinds of enterococcus and one kind of lactobacillus strains from 89 Mongolia dairy products showed curd formation in 10% skim milk. From isolated strains,

Lactobacillus helveticus was used for fermentation test. Tarak strains (n=47) did not show curd formation in 10% skim milk.

2. Standard recipe formulation with selected strains

- MKRL 5-8, M13-2-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-25 showed curd formation in pilot tests. From tested strains, MKRL 5-8 obtained the highest viable count results. The fermentation condition was optimized for the strain.
- Lactic acid bacteria derived from rice wine were not suitable for growing with milk ingredient only. Addition of sugar induced better fermentation. Also, rice soup was used for fermentation.

3. Fermentation Process Optimization

- Ingredients were mixed and sterilized for 2-3 seconds at 103-135 degree (UHT, Ultra High Temperature sterilization). After that, it was cooled to 35-40 degree and inoculated in the concentration of 0.02% with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strains (MKRL 5-8, M13-23-3, M13-71-2) from Korean rice wine. It was fermented for 24 hours in 37 degree using a water bath and homogenized at 50/150 bar for the production of drink type yogurt.

4. Development of Tarak fermented milk test products and establishment of quality control

- The acidity of *L. paracasei* M13-23-3 after 24 hours of incubation showed the lowest results in comparison to other strains. *L. paracasei* M13-23-3 was the lowest in the level of sour taste. Sugar contents and the viable counts of bacteria showed no significant difference between three selected strains.
- Nutrients per 100 g of Tarak fermented milk with *L. paracasei* M13-23-3 were lower in fat contents and higher in sugar contents compared to the typical fermented milk products.
- The sensory evaluation of Tarak using *L. paracasei* M13-23-3 was around the normal level with 4.0 in 7.0 point scale(Fig. 8). It was attributed to the low preference for flavor and the strong acidity.
- Incubated MKRL 5-8 and its fermentation products were effective to inhibit the growth of *P. acnes* ATCC11828 and *P. acnes* ATCC6919.

○ Establishment of manufacturing standards and elucidation of nutritional excellence of traditional fermented milk Tarak

1. Nutritional analysis of the Tarak and fermentation products

- Five *L. paracasei* strains were used for fermentation for 24 hour at 37 degree. Acidity, pH, viscosity, organic acid concentration, free sugar content, fatty acid,

minerals were assayed and microstructure of Tarak was also observed.

- The pH of Tarak was decreased according to the incubation period and was dramatically decreased at 12hr to pH 4.6 (isoelectric point of milk). Curd was produced in the 12 hours of fermentation.
- Acidity, pH, and viscosity can vary significantly depending on the fermentation time. However, it was not great differences between the species.
- The number of live cells also show a tendency to increase according to the length of fermentation time. But it did not show significant differences between the species after 24 hours of incubation.
- Lactic acid contents was sharply increased in 12 hours, after that, slowly increased according to the fermentation time. M13-71-2 showed the highest level of lactic acid.
- Tarak incubated for 24 hours was freeze-dried. Minerals and fatty acids in the samples were analyzed. There was no difference between mineral contents of samples. The sample fermented with M13-71-2 showed a slightly higher mineral content than the other samples. And the samples contained an unsaturated fatty acid of about 30%.
- Microstructure of control and Tarak were observed by electron microscopy and EPS (exo-polysaccharide) was investigated.
- *L. paracasei* produced polysaccharide recognized as biological functional materials in the culture. So, Tarak might be used as a bioactive agent for anti-cancer, anti-inflammation, and immune stimulation. In particular, M13-71-2 produced more polysaccharide than other strains.

○ Establishment of functional analysis methods in the Tarak and elucidation of in vitro functionality

1. Development of manufacturing method for Tarak extracts and fractions

- Freeze-dried samples manufactured in R&D center of Korea Yakult Co., Ltd. (MKRL-5-8, M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2) were used.
- Freeze-dried samples were fractionated using n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, and phosphate buffer.

2. Analysis of immune stimulation and investigation for the condition of functionality improvement

- The establishment of culture conditions of MC116 cell, Jurkat cell for measurement of the degree of cell proliferation.
- Tarak sample(M13-65-3) significantly increased the cell proliferation of Jurkat cells in 10, 50, 100, and 200 $\mu\text{m}/\text{ml}$ concentration ($p < 0.05$).

3. Analysis for inhibition of melanin production by Tarak

- Tarak samples (MKRL-5-8, M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2) reduced tyrosinase activity in 20% at 100 µg/mL concentration.
- Tarak samples (MKRL-5-8, M13-67-1) significantly inhibited the generation of melanin by B16F10 cell accelerated by α-MSH in 100 µg/mL concentration ($p < 0.05$).

4. Analysis of Tarak for antiobesity function

- Establishment of Preadipocytes (3T3-L1) culture conditions, adipocyte differentiation conditions, and lipogenesis induced conditions
- Tarak extract (5-8, 71-2) significantly inhibited the degree of adipocyte lipogenesis
- Tarak extract (5-8, 71-2) did not reduce the expression level of PPAR γ , C/EBP α in the adipocytes.
- Tarak extract (5-8, 71-2) reduced body weight and improved the blood lipids profile in vivo test.

5. Cancer cell growth inhibition analysis of Tarak

- Tarak extract (5-8, 23-3, 71-2) showed no growth inhibitory function for A549 cell (Lung cancer cells), and HepG2 cell (Hepatoma cells).

○ Development of commercial products using Tarak

1. Applications of Tarak for jelly type product (jelly, pudding)

- Tarak, which were traditionally produced according to Suunjabang (Suunjabang Research Institute, 2011) and Lim (2013), were used for this research.
- We tested the possible application of Tarak for Gwapyeon, sweet jelly of beans, jelly, and pudding. As a result, manufacturing procedures with excellent sensory properties were established.
- We analyzed the general composition of the pudding and jelly with Tarak. As more Tarak was used, the less moisture contents were found. However, crude protein, ash, and crude fat were significantly increased.
- As the Tarak quantity increases, the pH is decreased significantly. Conversely, acidity and sugar contents were significantly increased.
- The combination of 75% Tarak and jelly resulted in the best acceptance.
- A sour taste and flavor of Tarak goes well with pudding of Tarak applications. The 100% and 75% of Tarak in pudding were suitable.

2. Application of Tarak for frozen yogurt development (ice cream)

- The legal standard for ice cream defines the contents of milk fat as more than 6% and milk solids as 16% or more. Frozen yogurt manufacturing procedures had been

established according to the above specification.

- The number of lactic acid bacteria in Tarak ice cream was 7.01–8.17(logCFU/g) level. Bacterial counts were significantly increased according to the amount of Tarak.
- In the case that contents of Tarak was 48%, the taste of Tarak application showed the highest acceptance.
- Based on the present findings, we propose to include 50% of Tarak to manufacture ice cream products.

V. The application of research and development results

1. Research results

A. Patent

- To secure a industrial property right on this research result for lactic acid bacteria from makgeolli, we have applied patents of ‘antimicrobial property of *Lactobacillus paracasei* HY7301 and comprising product against *Propionibacterium acnes*’, ‘Method of manufacturing jelly using Tarak’, ‘Method of manufacturing pudding using Tarak and pudding using Tarak’, and ‘Method of manufacturing ice cream using Tarak and ice cream using Tarak’. In addition, we will apply for the patent for skin whitening effect of fermented milk using *Lactobacillus paracasei* HY7301.
- We anticipate that development of functional fermented milk for skin improvement with HY7301 will be possible when the patents of ‘antimicrobial property of *Lactobacillus paracasei* HY7301 against *Propionibacterium acnes*’ and ‘fermented milk of *L. paracasei* HY7301 with skin whitening effect’ are registered.

B. Conference presentation

- We continuously published research results of commercialization of Tarak in domestic conferences.
 - The effects of *L. paracasei subsp. paracasei* HY7301 isolated from Makgeolli on cell viability and synthesis of procollagen in human fibroblast. Dasan conference. 2013.10.31.~2013.11.02. Gil Sun Myung et al.
 - The probiotic characteristics of *Lactobacillus paracasei* isolated from Makgeolli. Korean society of food science and technology. P12-104. 2014.08.25.~2014.08.27. Su a Kim et al.
 - Antagonistic activity of potent probiotic Lactobacillus strain against acne pathogens. The microbiological society of Korea. 2014.04.30.~2014.05.02. Gil Sun Myung et al.
- We also continuously published results for standardization of manufacturing method and nutritional value of traditional fermented milk Tarak in domestic conferences.

- Historical and cultural study on Korean traditional fermented Milk, Tarak. Korean society of food science and technology. P12-052. 2014.08.25.~2014.08.27. Sachiko Osada et al.
- Effects of three *Lactobacillus paracasei* strains found in Korean traditional rice wine on nutritional and sensory characteristics of fermented milk. Korean society of food science and technology. P12-106. 2014.08.25.~2014.08.27. Sang Suk Kim et al.
- Study on exo-polysaccharides of cultured milk inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains isolated from Korean traditional rice wine, Makgeolli. Korean society of food science and technology. P12-098. 2014.08.25.~2014.08.27. Eun Jung Kim et al.
- Studies on fermentation characteristics of Tarak, Korean traditional fermented milk, through the analysis of microbial succession and metabolites. Korean society of food science and technology. P12-110. 2014.08.25.~2014.08.27. Sang Eun Jung et al.
- Application products of Tarak were reported in domestic conferences.
- Quality characteristics of ice cream using Tarak. The Korean society of food and cookery science. food processing. FPP-4. 2014.10.17. Sung Hee Go et al.
- Development of dessert products using traditional fermented milk Tarak. Food and cookery science. Food cooking. FCO-6. 2014.10.17. Kyung Yeon Lee et al.

C. Published papers

- We published three papers for application products of Tarak.
- Quality characteristics of jelly using traditional fermented milk Tarak. The Korean society of food and cookery science. 39(5); 599-603 (2013)
- Quality characteristics of pudding using traditional fermented milk Tarak. The culinary society of Korea. 20(3); 90-99 (2014)
- Quality characteristics of ice cream using traditional fermented milk Tarak. The culinary society of Korea. 20(6) (2014)
- We will publish two non-SCI and four SCIE papers as research achievements.

2. Application plan

- Development of manufacturing process of traditional fermented milk Tarak
- Knowledge accumulation of traditional fermentation using lactic acid bacteria and training of specialist.
- Development of Tarak products as functional fermented milk products.
- Branding of the Tarak Korean desserts.
- Development of various fermented foods through development of Tarak products.
- Production of promotional literature through application products of Tarak
- Studies on biological activity of Tarak using results from assessment for prevention of anticancer, antiobesity, antiatherogenic, antidiabetic, and antioxidant.

CONTENTS

(영 문 목 차)

SUMMARY	2
Chapter 1. Overview of the study	20
Chapter 2. Current status of related technologies in domestic and foreign countries	23
Chapter 3. Results	26
Section 1. Development of commercialization technologies for Tarak	27
Section 2. Establishment of manufacturing standards and elucidation of nutritional excellence of traditional fermented milk Tarak	55
Section 3. Establishment of functional analysis methods and in vitro examination of Tarak	101
Section 4. Development of commercial Tarak products and determination of the value in food culture	117
Chapter 4. Achievement and contribution to relevant fields	139
Chapter 5. Result and application plan of the study	142
Chapter 6. Overseas technical information and knowledge acquired from the study	144
Chapter 7. References	146

목 차

요 약 문	2
제 1 장 연구개발과제의 개요	20
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	26
제 1 절 타락발효유의 제품화 기술 개발	27
제 2 절 전통발효유 타락의 제조 표준화 및 영양적 우수성 규명	55
제 3 절 타락의 기능성 분석방법 확립 및 in vitro 기능성 규명	101
제 4 절 타락의 응용제품 개발 및 식문화적 가치 규명	117
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	139
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	142
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	144
제 7 장 참고문헌	146

제 1 장 연구개발과제의 개요

○ 연구개발의 목적

막걸리를 발효원으로 한 전통 발효유의 표준화를 위해 발효미생물과 발효산물을 분석하고 기능성 성분을 규명하며 응용제품을 개발함으로써 산업화를 하고자 함.

○ 최종 목표

- 전통발효유 타락의 발효특성에 따른 제조 공정 개발을 통해 전통 웰빙식품 분야에 전통 발효유생산 기술을 확보하도록 함으로써 관련 식품산업의 국제경쟁력 제고함.
- 타락의 응용제품 개발로 타락의 이용을 다양화함으로써 전통 발효유의 홍보 및 수요창출을 모색하고 관련 식품산업의 성장을 도모함.

○ 연구개발의 주요내용

- 타락발효유의 제품화 기술개발
- 전통발효유 타락의 제조 표준화 및 영양적 우수성 규명
- 타락의 기능성 분석방법 확립 및 *in vitro* 기능성 규명
- 타락의 응용제품 개발

○ 연구개발의 필요성

- 현재 한국인에 가장 부족한 영양소가 Ca이며 이를 공급하기 위해서는 우유 또는 유제품의 섭취가 가장 실용적인 방법이며 우리 국민들은 아직 다양한 유제품 섭취에 익숙하지 못하여 새로운 유형의 유제품 개발이 절실하게 필요한 실정임.
- 현재 국내에서 유통되는 유제품은 요구르트, 치즈 등 대부분 외국에서 유래된 것들이 대부분이나 국내에서도 막걸리를 접종원으로 한 발효유제품인 타락이 있음을 찾아냈고 이를 한국형 유제품으로 발전시킬 필요가 있음.
- 젖산균은 동물 유래, 식물 유래균이 있으며 발효유, 치즈, 김치 같은 다양한 발효식품에 존재하며 숙주의 건강, 식품 보존 관련 성분 등으로 파악되므로 이들의 상호관련성에 대한 심도 있는 연구가 필요함.
- 타락에 대한 선행연구결과 타락은 막걸리의 성분과 막걸리 발효균이 우유에 작용하여 만든 제품으로 타락의 품질을 조절하고 제어하기 위해서는 접종원으로 우수한 품질의 막걸리를 이용하는 것이 바람직함.
- 타락의 품질특성은 독특한 방향과 특유의 물성을 갖고 있으므로, 발효 미생물과 당, 유기산, 알콜, CO₂, 향기성분, 아미노산을 분석하여 기존 발효유와의 차별성을 규명하고자 함.
- 타락은 막걸리를 접종원으로 우유를 발효시킨 제품이므로 다량으로 생산, 유통시키기 위해서는 안전성에 대한 연구가 필수적으로 필요함.

(1) 문화적 측면:

- 세계적으로 건강식에 대한 관심이 높아지면서 한식의 건강기능성이 부각되고 있음.
- 한식의 대표적인 발효음식인 김치, 젓갈, 된장, 간장, 고추장은 이미 그 우수성을 과학적으로

로 인정받고 있음.

- 현재까지 발견된 가장 오래된 한문필사본 조리서인 '수운잡방(需雲雜方,1540년)'은 고려 말기에서 조선전기에 걸친 한 시대의 음식법을 추정할 수 있는 귀중한 자료임.
- 수운잡방에는 우유에 탁주를 첨가하여 발효시킨 발효유, **타락**의 제법을 기록함으로써 그 당시부터 발효유가 섭취되었음을 알 수 있음.
- 우리나라에도 전통발효유가 존재했음에도 불구하고 그 제법이나 품질특성이 거의 알려지지 않았으며 체계적인 연구는 시작단계에 불과한 실정임.
- 발효유는 발효에 사용된 미생물의 발효 특성이나 제조방법에 따라 그 종류가 매우 다양하며, 염증억제, 혈압조절, 콜레스테롤저하, 비만억제 등 다양한 기능성이 확인됨으로써 세계인들의 관심이 높은 식품임.
- 타락은 우리나라 전통 발효식품이나 타 발효식품과는 달리 동물성 원료인 우유를 발효시킨 독특한 식품임.

(2) 산업적 측면:

- 현재, 국내 발효유시장의 연간 매출규모는 약 1조4000억 원으로 이 가운데 장과 위, 간 발효유 등 기능성발효유가 전체발효유 시장의 40%를 차지하고 있으며 차별화된 프리미엄급 발효유 제품을 내놓으면서 시장 선점에 주력하고 있음.
- 전 세계적으로 발효유제품은 비만, 고혈압, 당뇨, 심장질환, 암등과 같이 건강과 웰빙에 장애가되는 질환을 예방해주는 제품으로 자리를 확고하게 구축하였으며, 유기농을 비롯하여 저지방/무지방, 비타민강화, 저콜레스테롤, 저나트륨, 무카페인, 무설탕 등 다양한 분야에서 신제품 개발도 동시에 이루어지고 있음.
- 유럽 발효유의 특징은 각 나라별로 건강 관심 요인에 차이를 나타냄. 따라서, 주요 관심요인이 되는 특정 질환에 초점을 맞춘 제품이 주류를 이루고 있으며 *L. casei*, *L. acidophilus*, bifidobacteria 등의 probiotic 젖산균을 제품에 활용하고 있음(한국산업보건의진흥원, 2004).
- 발효유의 종류는 젖산균 발효유와 젖산균-효모 발효유가 있으며 특히 젖산균-효모 발효유의 건강기능성이 다투어 발표됨으로써 새롭게 주목을 받고 있음.
- 본 연구과제에서 개발될 새로운 전통 타락 발효유의 상품화를 통하여 기업 매출 증대 및 수출 촉진에도 크게 이바지할 것으로 예상됨.

(3) 사회적 측면:

- 유산균을 이용한 전통 기능성 발효에 관한 기술 축적 및 타락균 발효유 개발을 위한 균주의 배양 방법과 발효조건 및 제조공정을 습득한 전문 인력을 양성할 수 있음.
- 외식산업을 통한 한식의 디저트로서 타락발효유의 브랜딩화 가능함.
- 유제품의 맛과 기능성을 향상시킴으로써 유제품의 소비를 향상시킬 수 있음.
- 우유의 수요 증가를 통한 낙농 농가와 유가공 업체의 수익 증대에 기여할 수 있음.

(4) 기술적 측면:

- 타락균을 접종하여 원유 단독배양 후 그 배양액을 균질, 살균, 냉각하여 제조하는 타락균

표준 발효유 대량 제조공정 기술 확보가 가능함.

- 타락균의 기능성 물질과 특유의 맛, 영양성분을 증가시킴으로서 우유의 영양과 타락균이 발효하면서 생성되는 생리활성 물질 성분을 동시에 제공할 수 있는 전통 건강 기능성 발효유제품 개발 기술을 확보할 수 있음.
- 항암 및 항비만, 항동맥경화, 항당뇨, 항산화 기능성 검증 실험 기술을 이용하여 타락 발효산물의 생리활성 물질 연구에 응용 가능함.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 타락발효유의 제품화 기술개발
 - 유산균주의 선발 및 동정
 - 선발균주의 표준 배합비 선정
 - 발효 공정 최적화
 - 타락발효유 시제품 개발 및 관련 품질확보
- 전통발효유 타락의 제조 표준화 및 영양적 우수성 규명
 - 막걸리를 발효원으로 한 타락의 표준화 제법 개발
 - 타락의 발효산물 및 영양성분 분석
- 타락의 기능성 분석방법 확립 및 in vitro 기능성 규명
 - 타락의 추출물 제조법 확립과 분획
 - 타락의 기능성 분석 : 면역 증진, 멜라닌 생성 억제, 항비만, 암세포 생장억제 기능성
- 타락의 응용제품 개발
 - 타락 응용 젤리류 개발(젤리, 푸딩)
 - 타락 응용 프로즌요구르트 개발(아이스크림)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 관련분야 환경변화

- 발효식품은 나라마다 고유한 방식으로 제조되는 오래된 역사를 가진 식품으로써 그 민족의 식문화를 보여주면서 건강과 문화를 동시에 제공하고 있음. 건강한 먹거리에 대한 관심이 높아지는 요즘, 발효식품에 대한 관심이 필요함. 전통발효식품은 민족의 역사와 생활양식 기후 등을 반영하고 있는 문화집합체이자 slow food의 대명사임.
- 발효식품 시장 또한 성장 추세임. 전통발효식품의 시장규모는 약 3조 1천억원으로 전통식품 시장 4.4조원의 70%를 차지하고 있으며 이를 장류와 막걸 리가선도하고 있음. 이러한 시장의 발전을 위해서 다양한 지원책이 필요한 실정임. 정책자금, 산업 육성 등 제도적 지원뿐만 아니라 기술 개발일 필요. 전통발효 식품의 기반이 되는 발효 미생물 확보와 효율적인 이용이 필요함. 이를 위해 발효 미생물자원의 수집, 분류, 동정 및 종균화 사업과 전통발효식품산업의 과학화 표준화를 이루는 것이 전통 발효식품을 한단계 더 높은 건강식품으로 발전시키는 지름길임 (2012. 06. 20 김재현 농촌진흥청 발효이용과장, 정책브리핑 칼럼&피플기고).
- 우리나라의 전통발효유로써 우유에 막걸리를 첨가하여 발효시킨 타락의 제법이 수운잡방에 기록되어 있음. 타락은 우리나라 전통 발효식품이나 타 발효식품과는 달리 동물성 원료인 우유를 발효시킨 독특한 식품임.
- 막걸리는 고소하면서도 달콤한 맛을 가진 발효주임. 한국에서 역사가 가장 오래된 술이며 6~7도로 알코올 성분이 적음. 막걸리는 부드럽고 독특한 맛을 가지고 있어 세계의 관심을 끌고 있음. 우리나라에서는 ‘경기도 막걸리 축제’, ‘경기도 막걸리 명칭공모’ 등 관심사업을 펼치고 있음.
- 국내 막걸리 시장규모는 2009년 3000억원에서 2012년 1조원을 예상하였으나 현재는 정체기에 있음. 그러나 막걸 리가 국내를 넘어 프랑스의 포도주, 독일의 맥주와 같은 세계적인 술이 될수 있을 것으로 기대됨.
- CJ 경영연구소에 따르면 국내 식품 시장 규모는 2010년 48조 3000억원, 2012년 51조원으로 성숙기에 접어들었다고 보임. 이에 따라 식품 업계는 신성장동력을 찾기위해 노력하고 있음. 핵심 키워드로 “프리미엄”, “소용량”, “간편식”을 들 수 있음. 동서 식품은 인스턴트 커피의 고급화로 카누 제품을 농심 역시 신라면 블랙, 자사는 일반 요구르트 보다 3배 이상 유산균을 넣은 “세븐” 제품을 출시하였음.
- 전 세계적으로 발효유제품은 비만, 고혈압, 당뇨, 심장질환, 암등과 같이 건강과 웰빙에 장애가 되는 질환을 예방해주는 제품으로 자리를 확고하게 구축하였으며, 유기농을 비롯하여 저지방/무지방, 비타민강화, 저콜레스테롤, 저나트륨, 무카페인, 무설탕 등 다양한 분야에서의 신제품 개발도 동시에 이루어지고 있음.
- 현재, 국내 발효유시장의 연간 매출규모는 약 1조4000억 원으로 이 가운데 장과 위, 간 발효유 등 기능성발효유가 전체발효유 시장의 40%를 차지하고 있으며 차별화된 프리미엄 급 발효유 제품을 내놓으면서 시장 선점에 주력하고 있음.

2. 3P (특허, 논문, 제품) 분석 현황

1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 김치나 음료, 전통주를 포함한 발효식품 분야에 집중되어 있으며, 유산균 관련 국내 출원 기술은 초기에는 재료와 관련한 것이 대부분이었지만 최근 기능성 강화, 미생물의 선발, 제품의 보관성 증진과 같은 다양한 분야로 확대되고 있음. 그러나 아직 유효 미생물에 대한 건강기능성 식품으로서의 가능성과 제품생산에 대한 내용을 포괄적으로 포함하고 있는 특허물은 부족하다고 보여짐.
- 본 연구에서 제시한 막걸리에서 분리한 기능성 유산균을 함유한 전통 발효유인 타락의 개발은 현재 관련성이 높게 확인되는 특허가 없어 특허 등록 시 기능성과 기술성 확보가 가능할 것으로 생각됨.

2) 논문분석 측면

- 최근 유산균 관련 논문의 경향성을 보면 유산균의 면역활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 다양한 부위에서 유발되는 종양의 빈도를 감소시킨다는 연구 결과를 내보이고 있음. 그러나 유산균의 배양물 혹은 유산균 내의 특정 물질에 의한 항암 효능과 관련된 연구의 내용은 미비하며 좀 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각됨. 특히, 논문의 검색 결과 유산균의 대장 내에서의 역할이나 효능에 관련된 정보들에 대한 내용은 있지만 본 연구와 직접적으로 연결되는 논문은 적게 발견이 되는 것으로 보아 이 분야와 관련되어 좀 더 깊고 포괄적인 연구가 요구됨.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 유산균 관련 제품은 주로 섭취와 보관이 쉬운 음료나 분말 등과 같은 형태로 건강식품보조제품 품목으로의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 쇠퇴기(정체기)에 접어들어 많은 연구자와 관련 업체들은 면역증진, 항산화 및 항암 효능과 관련된 제품 생산을 목적으로 한 연구를 진행하고 있음.
- 그러므로 브랜드 밸류를 갖춘 본기업과 성신여자대학교 연구팀의 co-work 등을 통하여 본 연구에서 지향하고자 하는 우리의 전통 발효유인 타락 개발과 건강 기능성을 이용한 고기능성 건강 발효유제품 연구를 성공적으로 수행하여 이의 상용화가 이루어진다면 발효유제품의 신시장 창출이 가능하리라 생각됨.

3. 국내 제품생산 및 시장 현황

국내에서는 주로 유산균 발효유 제품을 중심으로 시장이 형성되어 있으며, 유산균 발효유 제품은 식품류에 포함되는 제품으로 한국야구르트, 남양유업, 서울우유, 매일유업, 롯데홈우유 등의 대기업이 생산하고 있다. 유산균을 함유한 건강기능식품은 풀무원테크, 대응제약, 삼아약품, 대상 등이 관련 제품을 생산하고 있으며, 좋은 유산균을 선별하기 위한 동정과정을 수행하며 이를 제품화하기 위한 노력을 꾸준히 하고 있다.

2000년 기준 전체 식품 시장의 규모는 30조원에 육박하며 이중 기능성식품의 시장규모는 10%에 달하는 3조원 규모이며, 이 중 유산균과 관련한 시장규모는 다음과 같다. 유산균 이용 식품(건강보조식품) 387억원(예상 3.87%)점유, 정장 및 다이어트식품(특수영양식품) 460억원, 발효유 9,380억원으로 약 1조원에 육박하는 기능성식품 중에서는 큰 시장이다. 그 중 유산균이 용식품의 성장률은 IMF 이후 경기가 회복되기 시작한 1999년 3%, 2000년 39%, 2001년 43%로 급성장하고 있다.

제품의 질적인 면으로는 맛 위주의 제품보다는 특허균주 사용 제품, 특정 장기의 기능을 활성화 해주는 제품을 중심으로 한 유산균 제품의 고기능성에 초점이 맞추고 개발하고 있다. 그러나 다양한 제품을 통한 질 좋은 유산균의 선별과 전통적인 유산균을 이용한 제품의 실적은 미비한 상황이다.

- ① 야쿠르트사 제품 : 국내 발효유의 대표적인 기업으로 최근 헛개나무 프로젝트 쿠퍼스를 통해 기능성 발효유 부문의 우위를 선점하고 있다. 오랜 시간 축적된 프로바이오틱스 기술을 바탕으로 한 유산균의 효능과 간을 보호하는 효능이 있는 헛개나무 열매에서 추출한 분말을 함유한 제품과 공격적인 마케팅은 제품을 더욱 어필하고 있다는 평이다.
- ② 주식회사 뉴팜 제품 : 이 회사는 유산균, 글루코사민, 홍삼, 효모 함유 등 다양한 웰빙관련 제품을 생산하고 있는 probiotics 전문회사이다. 유산균함유제품으로는 온가족혼합유산균, 뉴팜혼합유산균, 베베락혼합유산균이 있다.
- ③ 셀바이오텍사 제품 듀오락 : 한국과 일본에서 특허 및 출원하였으며 미국과 유럽에서 특허 출원을 진행 중이다. 이 제품은 단백질의 1차 코팅, 다당류의 2차 코팅과정을 통해 유산균의 안정성을 높여 안전하게 장까지 도달할 수 있도록 만든 제품이다. 또한, 셀바이오텍사의 경우 대장암을 치료하는 유산균 개발을 목표로 하고 있으며, 자회사가 가진 기술을 응용한 방법을 통한 치료 물질의 생산을 기대하고 있다.
- ④ 한미약품사 메디락S 장용캡슐 : 이 제품은 활성유산균으로 장내 세균총의 정상화를 통한 장질환의 원인을 개선하는 데에 도움을 주는 유산균 정장제로 소화효소의 생성을 통해 소화를 촉진하는 제품이다.
- ⑤ (주)바이오리듬사 코팅김치유산균 : 유산균이 위, 소장, 대장에서도 살아남아 그 기능과 활성을 유지할 수 있도록 고안한 제품
- ⑥ 씨티바이오사 제품 : AI바이러스 억제 유산균 4종에 대한 특허를 가지고 있음 이 유산균은 김치에서 분리하여 과일로 배양한 것으로 생존력이 높고 항균작용이 우수한 특성이 있다. 이 회사에서 생산하는 동물사료 첨가제는 항생제 종류가 아니라 유산균 및 효소제로서 항생제 내성 등의 문제가 없다는 장점이 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

세부/협동	연구범위	연구수행방법	구체적인 내용
세부 1	타락 발효유의 제품화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 타락균주 및 상업적 유산균주 검토 및 선별 ○ 선별 균주를 적용한 배양물의 특성 분석 및 선별균주의 상품화 ○ 발효 공정 최적화 ○ 선별 균주의 표준 배합비 설정 ○ 타락 시제품개발 및 특성분석 ○ 기능성 테스트 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 생막걸리 효모 및 유산균 분리 ▪ 몽골 유제품 및 타락균주의 상업적 균주선발 및 동정 ▪ 배양물의 이화학, 미생물학적 특성 분석 ▪ 선별 균주의 특허 출원을 위한 기능성 탐색 ▪ Fermenter를 이용한 대량생산공정 및 제조공정도 개발 ▪ 타락 발효유 표준 배합비 개발 및 조정 ▪ 품질 특성분석 및 영양성분 분석 및 관능검사 ▪ 항산화 및 피부 관련 기능성 검토
협동 1	전통발효유 타락의 제조 표준화 및 영양적 우수성 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전통발효유 타락의 표준화 제법 개발 ○ 상업적 타락의 발효특성 및 발효산물 분석 ○ 영양성분 분석 ○ 기호도 분석 ○ 전통타락 발효균총 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 발효원인 다양한 막걸리를 사용하여 제조한 타락의 발효 특성 및 발효 산물 분석 ▪ 타락 내의 유산균 분리 및 동정 ▪ 상업적 타락의 이화학적, 성분적 및 구조적 분석 ▪ 기호도 위치분석, 정량적 묘사분석 ▪ 전통방식 타락의 발효에 따른 미생물 군집분석 ▪ 배양학적 방법을 이용한 원재료 또는 제조방법이 다른 10개 타락시료의 미생물의 군집 분석
협동 2	타락의 기능성 분석방법 확립 및 <i>in vitro</i> 기능성 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 타락의 추출물 제조법 확립 과 분획 ○ 면역 증진 기능성 분석 및 기능성 강화조건 탐색 ○ 멜라닌 생성 억제 기능 분석 ○ 항비만 기능성 규명 ○ 암세포 성장억제 기능성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 타락 추출물 분획을 위한 유기용매 선정 ▪ 타락 추출물 분획 ▪ 면역세포 배양 및 증식도 측정법 수립 ▪ 타락의 면역세포 성장영향분석 ▪ 타락 제조 조건 별 시료 확보 ▪ 제조조건에 따른 타락의 면역세포 성장 영향 비교분석 ▪ tyrosinase 역가 측정법 수립 ▪ 멜라닌 함량 측정법 수립 ▪ 지방세포 증식조절 측정 ▪ <i>in vivo</i> 항비만 기능성 규명 (한국식품연구원의뢰) ▪ 암세포 증식 억제 측정
협동 3	타락의 응용제품 개발 및 식문화적 가치 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 타락응용 젤리류 개발 ○ 프로즌 요구르트(아이스 크림)의 개발 ○ 응용제품의 품질 특성 검사 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 타락을 이용한 메뉴개발 및 조리특성 파악, 젤리와 푸딩의 배합비 확립 ▪ 프로즌 요구르트 적용 적합성 검토 및 표준 레시피 확립 ▪ 제조된 제품의 품질특성검사

제 1 절. 타락 발효유의 제품화 기술 개발

1. 타락균주 및 상업적 유산균주 검토 및 선별

가. 전통타락 컨셉을 응용하기 위한 상업적 균주 스크리닝의 전략적 접근

(1) 전통타락의 특징적 컨셉 분석

- ‘수운잡방(需雲雜方)’은 현재까지 발견된 가장 오래된 한문 필사본 조리서로서 탁청공 김유(1481-1552)에 의해 지어진 것으로 상·하권 두 권에 술 담는 법을 비롯하여 108가지 음식 만드는 법을 기록하고 있으며, 고려 말기에서 조선전기에 걸친 한 시대의 음식법을 추정할 수 있는 귀중한 자료로 평가되고 있음. 바로 이 ‘수운잡방’에는 우유에 탁주를 넣어 발효시킨 타락이 등장함.
- 수운잡방에 기록된 타락에 대한 내용을 살펴보면, “우유가 끓어서 익게 되거든 오지 항아리에 담고 본 타락 작은 잔 한 잔을 섞어서 따뜻한 곳에 놓은 다음 두껍게 덮어둔다. 밤중에 나무 막대로 찔러 보아서 누런 물이 솟아오르면 그 그릇을 시원한 곳에 둔다. 본 타락이 없으면 탁주 한 중바리를 넣어도 좋다. 본타락을 넣을 때 좋은 식초를 조금 같이 넣으면 더욱 좋다(若駝駱卽沸 盛沙缸納本駝駱一小盞和之 置溫處厚 至夜半以木插之 黃水湧出卽置其器於涼處 若無本駝駱則好濁酒一中中鍾亦可 本駝駱入 時好醋少許并入甚良).”라고 제법을 설명하고 있음(Sueunjabbang Research Institute 2011).
- 제법에서 보는 바와 같이 타락은 우유에 막걸리를 접종원으로 사용하거나 또는 미리 제조된 타락을 접종원으로 이용하여 젖산발효시킨 우리 고유의 전통발효유라고 할 수 있음. 또한 타락을 제조하는데 막걸리를 사용하였다는 사실은 우리나라에만 존재하는 전통주인 막걸리의 고유성과 더불어 타락이 우리나라 고유의 독특한 발효유라고 함에 부족함이 없을 것이라 생각됨(Lim 등 2013).
- 전통타락의 특징에서 가장 중요한 컨셉은 우리나라 전통주인 막걸리를 적용한 것임. 우리나라 고유의 전통발효유인 타락을 현대화 및 상업화하기 위한 중요 제품 특징은 우유와 함께 막걸리에서 분리한 접종원을 이용한 것이라 생각됨. 따라서, 전국의 생막걸리에서 접종원을 분리하여 상업적 타락 제품의 개발에 응용하고자 하였음.

(2) 전통타락의 컨셉 응용을 위한 스크리닝 기술

- 막걸리 내의 효모와 유산균을 분리하기 위해 지역별 생막걸리를 수집하였음. 연구결과 막걸리의 주요 발효 균주는 효모와 유산균임을 알 수 있었으며, 자사의 대량 생산에 적용하기 용이한 것은 유산균이므로 유산균주를 우선 검토하였음.
- 막걸리 분리 균 중 발효유 제조에 적합한 균주를 검토하기 위해 유산균 영양 배지인 MRS broth 배양액을 10% skim milk와 10% skim milk, 3% 함수결정 포도당이 혼합된 base 2종에 1.0%의 농도로 접종하여 24~48시간 37℃에서 정치 배양하고 curd를 생성하는 균주를 확인하였음.
- 몽골 유제품 균주 중 10% skim milk에서 커드를 형성하는 균주를 선별하였으며, 그 중 자사의 대량 생산에 적용하기 용이한 것은 *Lactobacillus* 속 유산 간균으로 *Lactobacillus* 속

균주를 배양 테스트에 이용하였음.

- 1차 선별 균주 중 파일럿 테스트를 통해 배양물의 curd 형성을 확인하여 대량 생산이 가능한 활성이 높은 균주를 2차 선별하였으며, 선별 균주 중 총 유산균수가 가장 높은 균주를 우선 검토하였음.



Figure 1. 발효유 제조에 적합한 균주 스크리닝

나. 생막걸리 효모 및 유산균 분리

(1) 국내 생막걸리 수집

막걸리 내의 효모와 유산균을 분리하기 위해 지역별 생막걸리를 수집하였음. 수집지역은 충청도, 대구 경북, 경남, 전북, 전남지역(Figure 1)이며, 각 지역의 대형마트, 편의점 등을 이용하였음. 현재까지 총 87종의 생막걸리를 수집하였으며(Table 1), 수집한 막걸리는 효모와 유산균 분리를 위해 냉장, 냉동 보관함.



Figure 2. 국내 생막걸리 수집 지역
(녹색 점_막걸리 제조사의 위치)

Table 1. 생막걸리 수집 리스트

No.	제품명	제조사	원재료 및 함량
1	국순당 막걸리 우국생	국순당	백미 100%, 아스파탐 0.009%-페닐알라닌 함유
2	옛날막걸리	국순당	국내산 쌀 100%, 전통누룩 3배, 무아스파탐
3	느린마을막걸리 탁주	배상면주가	우리쌀 100% 아스파탐 무첨가, 발효제효모, 조효소제
4	생막걸리	배혜정도가	우리쌀 94% 맥아당 6%, 아스파탐 0.009%(페닐알라닌 함유), 구연산
5	송산포도 생막걸리	배혜정도가	백미 80%, 포도(화성송산) 20%, 덩굴월굴농축액, 아스파탐 0.015%(페닐알라닌 함유)
6	우리쌀참살이생막걸리	참살이L&F	100% 국내산 쌀, 아스파탐(0.0085%, 합성감미료 페닐알라닌 첨가)
7	가평갯생막걸리	(주)우리술	백미 100%, 가평갯 700mg, 아세실팜칼륨(합성감미료)아스파탐(합성감미료 페닐알라닌 첨가)
8	금정산생막걸리	(유)금정산성토산주	백미 100% 국내산, 아스파탐 0.0065%(페닐알라닌 함유)
9	장수생막걸리	(주)서울장수	백미 90%, 말토올리고당 10%, 아스파탐(페닐알라닌 함유)
10	덕산쌀막걸리	세왕주조	쌀 80%, 소맥분 10%, 전분당 10%, 아스파탐 0.0037%, 아세실팜칼륨 0.0035%
11	경기막거리 숨	(주)한주양조	국내산 쌀 100%, 올리고당 0.8%, 젖산 0.04%, 아스파탐 0.004%(합성감미료, 페닐알라닌 함유), 아세실팜칼륨 0.004%(합성감미료), 자일리톨 0.03%
12	우리쌀로빛은 동동주 생	(주)우리술	백미 100%(국내산), 아세실팜칼륨, 아스파탐
13	은자골 탁배기	은척양조장	상주쌀50%, 소맥분(밀-호주, 미국산)40%, 전분 10%, 아스파탐 0.003%
14	나라사랑 포천 생막걸리	포천명가	철원오대쌀 80%, 소맥분 20%(수입산), 아스파탐, 아세실팜칼륨
15	순쌀막걸리	영진주조	백미 90%(국내산 52%, 수입산 48%), 이소말토올리고당 10%, 아스파탐(0.0113%)
16	경남 창녕 우포막걸리	농업회사법인 우포의 아침(주)	쌀(국내산)100%, 발효제: 누룩(밀), 효모, 아스파탐 0.0102%
17	천안홍타령 생막걸리	천안양조장 영농법인	백미 90%(국내산), 이소말토올리고당 10%, 아스파탐
18	안성맞춤 생막걸리	한주양조	안성맞춤 쌀 100%(경기안성), 올리고당 0.8%, 젖산 0.04%, 아스파탐 0.004%(합성감미료, 페닐알라닌 함유), 아세실팜칼륨 0.004%(합성감미료)
19	우리쌀 왕매실 생막걸리	순성왕매실영농조합	백미 89%(국내산), 이소말토올리고당 10%, 매실원액 1%(국내산), 아스파탐 0.01009%
20	공주알밤주	천지인양조	백미 50%(국내산), 공주 알밤 10%(국내산), 전분당 13.3%(국내산), 소맥분 26.7%(수입산), 아스파탐, 허브 후레바, 쇠비름 효소액, 올리고당
21	황토방 쌀막걸리	천지인주조	백미61%(국내산), 전분당 13.4%(국내산), 소맥분25.6%(수입산), 아스파탐(페닐알라닌함유)
22	50년 전통 진한 맛 포천이동 생막걸리	(주)이동주조	쌀(국내산)60%, 소맥분(밀: 호주산, 미국산)40%, 발효제: 누룩(밀), 효모, 첨가제: 아스파탐(합성감미료)0.0113%(페닐알라닌 함유)
23	원대전 생막걸리	(주)대전주조	소맥분(밀) 44.5%(수입산), 쌀(국내산)36.65%, 전분당(국내산)18.85%, 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌 함유) 0.0003%, 아세실팜칼륨(합성감미료) 0.0003%
24	청수대전 생막걸리	(주)대전 한밭주조	백미 90%(국내산), 이소말토올리고당 10%, 아스파탐 0.007%, 아세실팜칼륨 0.007%
25	알밤막걸리	(조)조은술세종	쌀(국내산)70%, 소맥분(수입산), 밤(국내산)5%아스파탐, 아세실팜칼륨

26	이천쌀생막걸리	(주)조은술세종	백미80%(국내산), 소맥분(밀)20%(수입산), 아스파탐(합성감미료)페닐알라닌함유, 구기자, 오미자, 감초
27	부발쌀막걸리	부발주조장	백미(국산)80%, 소맥분(수입산)20%, 아스파탐 0.0125%
28	이천쌀생막걸리	오성주조장	쌀(국내산, 이천쌀)100%, 아스파탐0.009%(합성감미료, 페닐알라닌 함유)
29	지평막걸리	지평주조	소맥분 100%(수입산, 미국), 아스파탐 0.00068%(페닐알라닌함유, 합성감미료)
30	우리쌀로 이천에서 빛은 생막걸리	오성주조장	백미 80%(국내산), 소맥분20%(호주산), 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌함유)
31	포천일동생막걸리	상신주가	백미 70%(국내산), 소맥분20%(수입산), 말토올리고당 10%(국내산), 아스파탐0.01%(합성감미료, 페닐알라닌함유)
32	충주 주덕 아래산 막걸리	주덕양조장	소맥분(미국, 호주산), 아스파탐 0.009%
33	충주 생 밤막걸리	소태막걸리	쌀(국내산:60%, 수입산:25%), 밤5%(국내산), 전분당 10%, 아스파탐0.009%(페닐알라닌함유 합성감미료)
34	충주 찹쌀 생막걸리	소태막걸리	쌀80%(국내산), 찹쌀10%(국내산), 전분당10%(국내산), 아스파탐0.009%(페닐알라닌함유, 합성감미료)
35	미우나고우나 생막걸리	봉류르영농조합법인	백미(국내산)95%, 이소말토올리고당5%, 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌함유)0.011%
36	소백산생막걸리	용두산조은술 영농법인	백미60%(국내산), 소맥분40%(수입산), 아스파탐(합성감미료)0.009%, 페닐알라닌함유
37	수안보 월악산 온천명주 생막걸리	수안보양조장	소맥분100%/국내가공(호주, 미국산), 아스파탐
38	소백산 검은콩 막걸리	대강양조장	백미36%(국내산), 소맥분60%(수입산), 검은콩2%(수입산), 검은깨2%(수입산), 아스파탐(합성감미료)0.009%, 페닐알라닌 함유
39	소백산 동동주	대강양조장	백미60%(국내산), 소맥분40%(수입산), 술잎, 누룩
40	구름을 벗삼아	문경주조	백미(국내산, 문경쌀 90%), 전분당(올리고당 10%), 합성감미료(아스파탐, 아세셀렘)0.0001% 페닐알라닌 함유
41	산동생쌀막걸리	산동탁주양조장	쌀 50%(국내산), 소맥분50%(수입산), 아스파탐(합성감미료)
42	참좋은술 불로생막걸리	청도양조장	쌀70%(수입산), 밀30%(수입산), 아스파탐 0.01%(합성감미료, 페닐알라닌 함유)
43	산동생참쌀동동주	산동탁주양조장	참쌀30%(국내산), 쌀30%(국내산), 소맥분40%, 아스파탐
44	살맛나는 세상 풍악쌀동동주	막걸리나라 가람주조	백미80%(국내산), 소맥분15%(수입산), 전분당5%, 아스파탐(합성감미료)0.009%, 페닐알라닌 함유
45	공주알밤 밤생막걸리	서가원전통술	백미63%(국내산), 공주알밤5%(국내산), 소맥분21%(수입산), 아스파탐(페닐알라닌함유, 합성감미료) 식물(치자)
46	천덕쌀 동동주	서가원전통술	백미50%(국내산), 올리고당10%(국내산), 소맥분40%(수입산), 아스파탐(페닐알라닌함유, 아세셀렘칼륨, 합성감미료)
47	우리햐쌀 생탁	부산합동양조장립제조장	백미90%(국내산), 전분당, 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌함유), 아세셀렘칼륨(합성감미료), 구연산
48	산동 생막걸리	산동탁주양조장	쌀60%(국내산), 소맥분40%(수입산), 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌 함유)
49	오미자 생막걸리	문경주조	백미90%(국내산), 전분당(올리고당)10%, 오미자20%(국내산, 문경동로산), 허브(유기농), 합성감미료(아스파탐, 아세셀렘)0.0001%, 페닐알라닌 함유
50	문경의 아침 우리쌀 생막걸리	문경주조	백미(국내산90%), 전분당(올리고당)10%, 합성감미료(아스파탐, 아세셀렘), 페닐알라닌 함유 0.0001%
51	오미자 동동주	문경주조	백미90%(국내산), 전분당(올리고당)10%, 오미자20%(국내산, 문경동로산), 허브(유기농), 합성감미료(아스파탐, 아세셀렘)0.0001%, 페닐알라닌 함유
52	동해명주 생막걸리	동해양조장	백미(국내산)30%, 소맥분(수입산)70%, 아스파탐(합성감미료)0.005%, 페닐알라닌 함유, 아세셀렘칼륨(합성감미료)0.005%
53	살아있는 술 생 동동주	동해양조장	백미(국내산)100%, 아스파탐(합성감미료)0.005%, 페닐알라닌 함유, 아세셀렘칼륨(합성감미료)0.005%

54	용해야	청슬전통도가	쌀80%(국내산), 소맥분15%(미국산, 호주산), 전분당5%, 솔잎추출물, 아스파탐(합성감미료)0.009% 페닐알라닌 함유
55	순 동동주	청슬전통도가	쌀90%(국내산), 소맥분5%(미국산, 호주산), 올리고당5%, 아스파탐(합성감미료)0.01% 페닐알라닌 함유
56	생탁 쌀막걸리	부산합동양조 연산제조장	백미(미국산)80%, 소맥분(미국산), 전분당, 아스파탐(페닐알라닌함유, 합성감미료), 아세실팜칼륨(합성감미료), 구연산
57	울금 생막걸리	영덕주조	백미(국내산) 90%, 이소말토올리고당10%, 아스파탐(0.011%), 구연산(0.005%), 울금(국내산)3%
58	생 영일만친구	동해양조장	백미(국내산)100%, 우뭇가사리분말 0.2%, 아스파탐(합성감미료)0.005%페닐알라닌함유, 아세실팜칼륨(합성감미료)0.005%
59	한사발생막걸리	(주)영일만주조	백미(국내산)60%, 소맥분(호주산, 미국산)30%, 전분당(수입산)10%, 스테비텐0.009%
60	미담 생막걸리	(주)성광주조	백미(국산)90%, 이소말토올리고당10%, 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌함유)0.01125%, 구연산(0.005%)
61	천삼 산삼막걸리	백암양조장	백미100%(국내산), 산삼배양근1000mg(국내산), 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌함유)0.011%, 구연산0.003%
62	불로 우리쌀 생막걸리	대구탁주합동	쌀(국산)90%, 전분당10%, 아스파탐(합성감미료)0.01111%(페닐알라닌 함유), 젖산 0.0029%, 구연산0.0148%
63	불로 생막걸리	대구탁주합동	소맥분(필)100%(수입산(미국산, 호주산)), 아스파탐(합성감미료)0.0046%(페닐알라닌 함유), 젖산 0.0028%, 구연산0.0107%
64	포천 우리쌀로 빛은 생막걸리	조술당	쌀100%(국내산), 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌함유)
65	생생원 맑은 술	반성양조장	쌀 53%(국내산), 소맥분 26%(수입산), 전분당 21%, 스테비오사이드 0.03%
66	진주쇠미골쌀막걸리	진주탁주공동운영회	쌀(수입산)93.3%, 전분당(수입산)6.7%, 아스파탐(페닐알라닌함유, 합성감미료0.010%)
67	생 반성 막걸리	반성양조장	쌀71%(국내산), 소맥분18%(수입산), 전분당 11%, 스테비오사이드 0.015%
68	금곡 생막걸리	금곡양조장	쌀50%(국내산), 소맥분50%(미국, 호주산), 아스파탐 0.009%
69	나누우리 쌀 생막걸리	순천주조	쌀100%(순천농협쌀), 스테비올배당체(천연감미료), 아세실팜칼륨(합성감미료)
70	친구사이	(주)팔마탁주	쌀100%(순천별량농협쌀), 아스파탐(합성감미료 페닐알라닌 함유)
71	여수 우리햅쌀로 빛은 생막걸리	여수주조공사	쌀(국내산), 소맥분(미국산)
72	대박 생막걸리	국순당	백미100%(국내산), 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌 함유)
73	개도 생막걸리	개도주조장	백미100%(국내산), 아스파탐0.009%(합성감미료)페닐알라닌함유
74	서창 생막걸리	동진주조	쌀100%(국내산), 과당, 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌함유)
75	비아 생 쌀막걸리	(주)비아탁주	쌀(국내산)60%, 소맥분(수입산)20%, 전분당20%, 아스파탐(합성감미료)
76	하남 생막걸리	하남주조장	쌀70%(국내산), 소맥분20%(미국, 호주산), 전분당10%, 아스파탐(합성감미료) 0.01200%(페닐알라닌 함유)
77	누룩으로 빛은 쌀막걸리	광주무등산탁주	백미(수입산)85%, 전분당15%, 아스파탐 0.013%(합성감미료)페닐알라닌함유
78	우리쌀 서석대	광주무등산탁주	백미(국내산)80%, 전분당20%, 아스파탐 0.014%(합성감미료, 페닐알라닌함유)
79	대일 생동동주	담양죽향도가	친환경담양쌀80%, 전분당20%, 아스파탐 0.0072%, 영지, 인삼, 생강, 죽엽분
80	친환경 유기농쌀 고급막걸리 대대포	담양죽향도가	백미(국내산100%)친환경유기농쌀, 벌꿀, 올리고당, 스테비오사이드0.0072%
81	대숲맑은 담양쌀 죽향 생막걸리	담양죽향도가	백미(국내산100%) 담양군 친환경쌀, 아스파탐 0.0072%(합성감미료 페닐알라닌 함유)
82	우리쌀 동동주	광주무등산탁주	백미(국내산)80%, 전분당20%, 아스파탐 0.12%(합성감미료, 페닐알라닌함유)

83	둘레길 생 쌀막걸리	남원지리산 허브영농조합법인	쌀100%(국내산), 아스파탐0.05%(합성감미료), 페닐알라닌함유
84	청주 생 쌀막걸리	청주탁주세종	쌀(국내산)70%, 소맥분(수입산), 전분당5%, 아세틸팔칼륨, 아스파탐(합성감미료, 페닐알라닌 함유)
85	우리몸엔 우리술 생 막걸리	양촌양조장	백미80%(국내산), 소맥분20%(수입산), 아스파탐0.01133%(페닐알라닌함유, 합성감미료)
86	생 찹쌀동동 뽕뽕주	민속주왕주	찹쌀(국내산)10%, 백미(국내산)69.9%, 전분당10%, 전통누룩(국내산)10%, 스크랄로스(0.001%)(합성감미료)페닐알라닌 함유
87	구기자 동동주(맑은술)	세왕주조	백미80%(국내산), 소맥분(밀)20%(수입산), 아스파탐(합성감미료)페닐알라닌함유, 구기자, 오미자, 감초

(2) 막걸리 유래 유산균 및 효모의 분리

(가) 분리방법

유통기한 내의 막걸리 샘플을 십진 희석하여 BCP agar와 PDA agar에 접종하고 각각 37°C에서 72 h, 25°C에서 72h 배양하였음. 유산균 및 효모로 추정되는 colony를 계수하고 BCP agar와 PDA agar에 2회 반복 계대하여 single colony를 얻었음. 획득한 colony는 MRS broth 및 TSB에 접종하여 증균하고 cell down 하여 10% skim milk stock으로 냉동보관하였음.

(나) 분리결과

생막걸리 내의 효모의 농도는 10^6 - 10^8 cfu/mL 수준이었음. 유산균이 분리된 생막걸리는 약 32종으로 수집된 막걸리의 36.8%였으며, 유산균이 있는 경우 농도는 10^4 - 10^6 cfu/mL 수준이었음. 이것으로 보아 막걸리의 주요 발효 균주는 효모와 유산균임을 알 수 있었음. 자사의 대량 생산에 적용하기 용이한 것은 유산균이므로 유산균주를 우선 검토하였음. 현재까지 분리된 균주는 효모가 약 130종, 유산균이 약 200종 정도임.

(3) 유산균주의 선발 및 동정

발효유 제조에 적합한 균주를 검토하기 위해 MRS broth 배양액을 vortexing하여 10% skim milk와 10% skim milk, 3% 함수결정 포도당이 혼합된 base 2종에 1.0%의 농도로 접종하여 24~48시간 37°C에서 정치 배양하고 curd를 생성하는 균주를 확인하였음. 현재까지 테스트한 유산균주 중 10% skim milk 배지에서 curd를 형성하는 균주는 12 strains으로 이들의 당이용성(API 50 CH kit 이용)과 16S rRNA sequencing을 통해 유산균을 동정하였음. 그 결과 *Lactobacillus plantarum* 7 strains와 *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 5 strains으로 각각 규명되었음.

(가) 당이용성을 바탕으로 한 유산균 동정 방법

API 50 CHL kit(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하여 탄소원으로 당이나 당유도체의 이용성을 분석함으로써 균 동정을 검토하였음.

유산균이 증식된 MRS broth 배양액을 vortexing 후 멸균된 microtube에 1 mL씩 분주하고 14,000 rpm 5분간 원심분리 하였음. 균액을 washing하기 위해 상층액을 제거한 후 멸균된 증류수 1 mL를 분주하여, 14,000 rpm 5분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였음. washing을 2회 한 후, 증류수 1 mL를 혼합한 실험용 균액을 제조하였음.

균액 200 μ L를 API kit의 API 50 CHL medium에 접종하고, API 50 CHL well plate에 분주하

였음. 혐기 배양을 위해 liquid paraffin을 도포하고, capping하여 37°C incubator에서 48~72시간 뒤 노란색으로 양성 변화 여부를 확인하여 유산균의 당 이용성을 분석하였음.

(나) 분석결과

Table 2. 1차 선발 유산균의 당이용성 결과

균주명	숫자화된 생화학적 패턴	동정결과	% ID
MKRL5-7	-----+-----++++-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.9
MKRL5-8	-----+-----+-----+-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	99.6
M13-23-3	-----+-----+-----+-----+-----?++++ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	99.8
M13-65-3	-----+-----+-----+-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 2	89.5
M13-66-1	-----+-----+-----+-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.6
M13-67-1	-----+-----+-----+-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	56.5
M13-71-2	-----+-----+-----+-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 3	72.7
M13-78-1	-----+-----+-----+-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.8
M13-78-4	-----+-----+-----+-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.8
M13-78-5	-----+-----+-----+-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.6
M13-82-2	-----+-----+-----+-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	86
M13-82-4	-----+-----+-----+-----+-----+ +++++-----+-----+-----+-----	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.6

(다) 16S rRNA sequencing 방법

분리균주들의 정확한 동정을 위하여 16S rRNA sequence를 비교·분석하였음.

DNA 유전자 염기서열 분석은 마크로젠에 의뢰하여 분석하였으며, primer로는 Universal PCR primer 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하였음. 프라이머를 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하고 염기서열 분석을 통하여 얻어진 분리균주의 부분 염기서열은 Blast network service를 이용하여 GenBank 에 등록된 다른 미생물의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였음.

Table 3. 프라이머 정보

	프라이머이름	구분	구분2	시퀀스
1	518F	유니버설(Free)	Forward	CCA _g CA _g CC _g C _g TAATAC _g
2	800R	유니버설(Free)	Reverse	TACCA _g g _g TATCTAATCC
3	27F	유니버설(Free)	Forward	AgAgTTT _g ATCMTGGCTCA _g
4	1492R	유니버설(Free)	Reverse	TAC _g gYTACCTT _g TAC _g ACTT

(라) 16S rRNA sequencing 결과

12종 균주의 16S rRNA sequence를 비교·분석한 결과 *Lactobacillus plantarum* 7 strains와 *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 5 strains으로 각각 규명되었음.

Table 4. 12종 균주의 16S rRNA sequencing 분석 결과

균주명	16S rRNA 동정결과 판정			
	Length=987		Score	E
	Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
MKRL5-7	dbj AB598986.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1720	0.0
	dbj AB598978.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1720	0.0
	dbj AB598976.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1720	0.0
	dbj AB598974.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1720	0.0
	dbj AB598952.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1718	0.0
	dbj AB598940.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1718	0.0
	dbj AB601179.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1714	0.0
MKRL5-8	gb FJ476122.1	Lactobacillus casei strain TJ6 16S ribosomal RNA ...	1576	0.0
	emb FM177140.1	Lactobacillus casei BL23 complete genome, strain...	1576	0.0
	dbj AB008205.1	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA, partial s...	1576	0.0
	dbj AB008204.1	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA, partial s...	1576	0.0
	dbj AB362763.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1576	0.0
	dbj AB362761.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1576	0.0
	dbj AB362760.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1576	0.0
	dbj AB362702.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1576	0.0
M13-23-3	dbj AB690234.1	Lactobacillus rhamnosus gene for 16S rRNA, parti...	1557	0.0
	dbj AB690191.1	Lactobacillus rhamnosus gene for 16S rRNA, parti...	1557	0.0
	dbj AB680106.1	Lactobacillus rhamnosus gene for 16S rRNA, parti...	1557	0.0
	dbj AB680208.1	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei gene fo...	1557	0.0
	dbj AB680182.1	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei gene fo...	1557	0.0
	dbj AB626054.1	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei gene fo...	1557	0.0
M13-65-3	dbj AB008205.1	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA, partial s...	1648	0.0
	dbj AB008204.1	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA, partial s...	1648	0.0
	dbj AB362763.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1648	0.0
	dbj AB362761.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1648	0.0
	dbj AB362760.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1648	0.0
	dbj AB362702.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1648	0.0
M13-66-1	dbj AB598986.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1413	0.0
	dbj AB598985.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1413	0.0
	dbj AB598981.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1413	0.0
	dbj AB598978.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1413	0.0
	dbj AB598976.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1413	0.0
	dbj AB598972.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1413	0.0
	dbj AB598940.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1413	0.0
M13-67-1	emb FM177140.1	Lactobacillus casei BL23 complete genome, strain...	1596	0.0
	dbj AB008205.1	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA, partial s...	1596	0.0
	dbj AB008204.1	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA, partial s...	1596	0.0
	dbj AB362763.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1596	0.0
	dbj AB362761.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1596	0.0
	dbj AB362760.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1596	0.0
	dbj AB362702.1	Lactobacillus paracasei gene for 16S rRNA, parti...	1596	0.0
M13-71-2	dbj AB690234.1	Lactobacillus rhamnosus gene for 16S rRNA, parti...	1591	0.0
	dbj AB690191.1	Lactobacillus rhamnosus gene for 16S rRNA, parti...	1591	0.0
	emb HE647132.1	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei partial...	1591	0.0
	gb JN974882.1	Lactobacillus casei strain MCL 16S ribosomal RNA ...	1591	0.0
	dbj AB680106.1	Lactobacillus rhamnosus gene for 16S rRNA, parti...	1591	0.0
	dbj AB680208.1	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei gene fo...	1591	0.0
	dbj AB680182.1	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei gene fo...	1591	0.0
M13-78-1	dbj AB598986.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1714	0.0
	dbj AB598985.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1714	0.0
	dbj AB598981.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1714	0.0
	dbj AB598979.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1714	0.0
	dbj AB598978.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1714	0.0
	dbj AB598976.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1714	0.0
M13-78-4	dbj AB598986.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1644	0.0
	dbj AB598985.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1644	0.0
	dbj AB598981.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1644	0.0
	dbj AB598979.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1644	0.0
	dbj AB598978.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1644	0.0
	dbj AB598976.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1644	0.0
	dbj AB598974.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1644	0.0

M13-78-5	dbj AB598986.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1690	0.0
	dbj AB598985.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1690	0.0
	dbj AB598981.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1690	0.0
	dbj AB598979.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1690	0.0
	dbj AB598978.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1690	0.0
M13-82-2	dbj AB598986.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1709	0.0
	dbj AB598985.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1709	0.0
	dbj AB598981.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1709	0.0
	dbj AB598979.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1709	0.0
	dbj AB598978.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1709	0.0
M13-82-4	dbj AB598986.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1663	0.0
	dbj AB598985.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1663	0.0
	dbj AB598981.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1663	0.0
	dbj AB598979.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1663	0.0
	dbj AB598978.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1663	0.0
dbj AB598976.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene fo...	1663	0.0	

Table 5. 유산균의 선발 및 동정

No.	균주명	source	10% skim 배양 결과	10% skim +3% glucose 배양 결과	API결과	16S rRNA결과
1	MKRL 5-7	당사 보유 균주	O	O	<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2	MKRL 5-8	당사 보유 균주	O	O	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>
3	M13-23-3	원대전 생막걸리	O	O	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>L.casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i>
4	M13-65-3	생생원 맑은 술	△	x	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. paracasei</i>
5	M13-66-1	진주최미골쌀막걸리	△	O	<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
6	M13-67-1	생 반성 막걸리	△	O	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. paracasei</i>
7	M13-71-2	여수 우리햐쌀로 빛은 생막걸리	O	O	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>L casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
8	M13-78-1	우리쌀 서석대	O	x	<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
9	M13-78-4	우리쌀 서석대	△	x	<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
10	M13-78-5	우리쌀 서석대	O	?	<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
11	M13-82-2	우리쌀 동동주	O	O	<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
12	M13-82-4	우리쌀 동동주	O	x	<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>

다. 몽골 유제품 및 타락균주의 상업적 균주 선발 및 동정

몽골 유제품 균주 89종 중 10% skim milk에서 커드를 형성하는 균주는 8 strains이었으며 *Enterococcus* strains이 7종, *Lactobacillus* strains 1종이었음. 그 중 자사의 대량 생산에 적용하기 용이한 것은 *Lactobacillus* 속 유산 간균으로 *Lactobacillus helveticus*를 배양 테스트에 이용하였음. 타락 균주 47종 에서는 10% skim milk에서 커드를 형성하는 균주가 없었음.

Table 6. 몽골 유제품 균주

No	Name	Description	Accession	Pct(%)	성장	배지	10%skimmilk
1	T1-1	Enterococcus faecium strain IDCC	EU003447.1	99	O	PDA	x
6	T1-2	Enterococcus faecium strain IDCC	EU003447.1	99	x		x
7	T1-2	Enterococcus faecium strain IDCC	EU003447.1	99	x		x
8	T1-2	Enterococcus faecium strain IDCC	EU003447.1	99	x		x
9	T1-2	Enterococcus faecium strain IDCC	EU003447.1	99	x		x
10	T1-2	Enterococcus faecium strain IDCC					x
46	T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99	O	PDA	x
47	T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	100	O	PDA	x
48	T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99	O	PDA	x
49	T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99	O	PDA	x
50	T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99	O	PDA	x
53	T6	Pichia fermentans isolate E7-1	EU019226.1	100	O	PDA	x
56	T7	Cyberlindnera fabianii strain BZR42	JQ342083.1	100	O	PDA	x
57	T7	Cyberlindnera fabianii strain BZR42	JQ342083.1	99	O	PDA	x
58	T7	Cyberlindnera fabianii strain BZR42	JQ342083.1	99	O	PDA	x
59	T7	Cyberlindnera fabianii strain BZR42	JQ342083.1	99	O	PDA	x
60	T7	Cyberlindnera fabianii strain BZR42	JQ342083.1	99	O	PDA	x
61	T1-1	Pediococcus acidilactici strain	FJ844982.1	99	O	MRS	x
62	T1-1	Pediococcus acidilactici strain	FJ844982.1	99	O	MRS	x
63	T1-1	Pediococcus acidilactici strain	FJ844982.1	99	O	MRS	x
64	T1-1	Pediococcus acidilactici strain	FJ844982.1	99	O	MRS	x
65	T1-1	Pediococcus acidilactici strain	FJ844982.1	99	O	MRS	x
66	T2-1	Lactobacillus curvatus	AB600200.1	99	O	MRS	x
67	T2-1	Lactobacillus curvatus	AB600200.1	99	O	MRS	x
68	T2-1	Lactobacillus curvatus	AB600200.1	99	O	MRS	x
69	T2-1	Lactobacillus curvatus	AB600200.1	99	O	MRS	x
70	T2-1	Lactobacillus curvatus	AB600200.1	99	O	MRS	x
71	T2-2	Lactobacillus helveticus	HM218413.1	99	O	MRS	△
72	T2-2	Enterococcus durans KLDS 6.0318	DQ340072.1	99	O	MRS	△
73	T2-2	Enterococcus durans strain NM1565	HM218621.1	99	O	MRS	x
74	T2-2	Enterococcus durans KLDS 6.0318	DQ340072.1	99	O	MRS	△
75	T2-2	Lactobacillus helveticus	HM218413.1	99	O	MRS	x
76	T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99	O	MRS	x
77	T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99	x		x
78	T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	100	O	MRS	x
79	T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	100	O	MRS	x
80	T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	100	O	MRS	x
81	T3-2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	O	MRS	x
82	T3-2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	O	MRS	x
83	T3-2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	O	MRS	x
84	T3-2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	O	MRS	x
85	T3-2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	O	MRS	x
86	T4-1	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	x		x
87	T4-1	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	x		x
88	T4-1	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	O	MRS	x
89	T4-1	Pediococcus acidilactici	FJ915729.1	99	O	MRS	x
90	T4-1	Pediococcus acidilactici	AB598949.1	99	x		x
91	T5	Enterococcus durans KLDS 6.0318	DQ340072.1	99	O	MRS	○
92	T5	Enterococcus durans KLDS 6.0318	DQ340072.1	100	O	MRS	○
93	T5	Enterococcus durans KLDS 6.0318	DQ340072.1	99	O	MRS	○
94	T5	Enterococcus durans KLDS 6.0318	DQ340072.1	99	O	MRS	○
95	T5	Enterococcus durans KLDS 6.0318	DQ340072.1	99	O	MRS	○
96	T6	Enterococcus faecium strain IDCC 2103	EU003447.1	99	O	MRS	x
97	T6	Enterococcus faecium strain IDCC 2103	EU003447.1	99	O	MRS	x
98	T6	Uncultured organism	HQ749588.1	99	O	MRS	x
99	T6	Uncultured organism	HQ749588.1	99	O	MRS	x
100	T6	Enterococcus faecium strain IDCC 2103	EU003447.1	99	O	MRS	x
101	T7	Weissella confusa	DQ321751.1	99	x		x
102	T7	Weissella confusa	DQ321751.1	99	x		x
103	T7	Weissella confusa	DQ321751.1	99	x		x

104	T7	Weissella confusa	DQ321751.1	99	x		x
105	T7	Weissella confusa	DQ321751.1	99	x		x
106	N1	Pediococcus pentosaceus	AB598987.1	99	x		x
107	N1	Pediococcus pentosaceus	AB598987.1	99	x		x
108	N1	Pediococcus pentosaceus	AB598987.1	99	x		x
109	N1	Pediococcus pentosaceus	AB598987.1	99	x		x
110	N1	Pediococcus pentosaceus	AB598987.1	99	x		x
111	N2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	x		x
113	N2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	x		x
114	N2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	O	MRS	x
115	N2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	x		x
116	N2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	O	MRS	x
117	N2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	x		x
118	N3	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	x		x
119	N3	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	O	MRS	x
120	N3	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	x		x
121	N4	Bacillus anthracos str. H9401	CP002091.1	99	x		x
122	N4	Bacillus anthracos str. H9401	CP002091.1	99	x		x
123	N4	Bacillus anthracos str. H9401	CP002091.1	99	x		x
124	N4	Bacillus anthracos str. H9401	CP002091.1	99	x		x
125	N4	Bacillus sp. NBRC 14416	AB680611.1	99	O	TSB	x
126	N5	Pediococcus pentosaceus	AB598987.1	99	x		x
127	N5	Pediococcus pentosaceus	AB598987.1	99	x		x
128	N5	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99	x		x
129	N5	Pediococcus pentosaceus	AB598987.1	99	x		x
130	N5	Pediococcus pentosaceus	AB598987.1	99	x		x
146	10_4	Pseudomonas putida strain S16	AY741156.1	100	x		x
147	10_4	Pseudomonas putida strain S16	AY741156.1	100	x		x
148	10_4	Pseudomonas putida strain S16	AY741156.1	100	x		x

Table 7. 타락균주

	Name	Description	Acession	Pct(%)	성장	배지	10% skim milk
200	S1-a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
201	S1-b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
202	S1-c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
203	S2-a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BK006945.2	99	O	PDA	x
204	S2-b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN942842.1	99	O	PDA	x
206	S3-a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
207	S3-b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
208	S3-c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
209	S4-a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
210	S4-b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
211	S4-c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
212	S5-a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
213	S5-b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
214	S5-c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99	O	PDA	x
215	S1-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	FJ476121.1	99	O	MRS	x
216	S1-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	99	O	MRS	x
217	S1-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	99	O	MRS	x
218	S1-4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	99	x		x
219	S1-5	<i>Lactobacillus brevis</i>	FJ476121.1	100	O	MRS	x
220	S1-6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99	O	MRS	x
221	S1-7	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	100	O	MRS	x
222	S2-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AJ305322.1	99	O	MRS	x
223	S2-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	EF059987.1	99	x		x
224	S2-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	99	O	MRS	x
225	S2-4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CR936503.1	99	x		x
226	S2-5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598949.1	100	x		x
227	S2-6	<i>Weissella viridescens</i>	AB680180.1	99	O	MRS	x
229	S3-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	EU825661.1	99	x		x
230	S3-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99	O	MRS	x

231	S3-3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CP002033.1	99	x		x
232	S3-4	<i>Lactobacillus crustorum</i>	AB626073.1	99	O	MRS	x
233	S3-5	<i>Lactobacillus mesenteroides</i>	AB601159.1	100	O	MRS	x
234	S3-6	<i>Enterococcus faecalis</i>	AB362602.1	99	O	MRS	x
235	S3-7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB601179.1	100	O	MRS	x
236	S4-1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	AB600197.1	99	x		x
237	S4-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99	x		x
238	S4-3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	99	x		x
239	S4-4	<i>Lactobacillus curvatus</i>	AB600200.1	99	x		x
240	S4-5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	AB600200.1	100	x		x
241	S4-6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	AB601158.1	99	O	MRS	x
243	S5-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CP002033.1	99	O	MRS	x
244	S5-2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CP002033.1	99	x		x
245	S5-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	99	O	MRS	x
246	S5-4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB598986.1	99	O	MRS	x
247	S5-5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	100	x		x
248	S5-6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CP002033.1	99	x		x
249	S5-7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	EU074059.1	100	O	MRS	x

2. 선별 균주를 적용한 배양물의 특성 분석 및 선별균주의 상품화

가. 배양물의 이화학, 미생물학적 특성 분석

(1) 타락 발효유(발효 배지) 표준 배합비 개발

25% 시럽에 해당하고 75%가 배양액 배합비에 해당함. 배양액과 시럽의 배합비가 조화를 이룰 수 있도록 구성하였음. 배양액의 배합비는 아래 Table 8과 같음.

Table 8. 표준 배합비 개발(발효 배지)

원료명	함량(%)
원유	50.000000
탈지분유	2.490000
유산균	0.002425
정제수 1	22.507575
소계	75.000000
시럽	25.000000

(2) 선별 10종 균주 파일럿 배양 테스트

선별 10종 균주 중 파일럿 테스트 배양물의 curd 형성균은 총 5종으로 MKRL 5-8, M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2이었으며, 이 중 총 유산균수가 가장 높은 균주는 MKRL 5-8이었음. 선발 균주 중 총 유산균수가 가장 높은 MKRL 5-8을 적용하여 배양액을 제조할 수 있도록 배양 조건을 설정하였음. 배양 실험 결과, 37℃, 24시간 배양이 최적이었으며, 이 때의 이화학 분석을 통하여 배양물의 특성을 확인하였음.

Table 9. 선별 10종 파일럿 배양 테스트

배양액 UHT, 37도 MRS배양액 0.1%로 접종, 24시간 배양				curd 생성	pH	T.A	균수 (cfu/mL)
1	MKRL 5-7	-	<i>L. plantarum</i>	x	4.92		
2	MKRL 5-8	-	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	o	4.03	0.955	1.33X10 ⁹
3	M13-23-3	원대전 생막걸리	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	o	4.43	0.737	7.00X10 ⁸
4	M13-65-3	생생원 맑은 술	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	o	4.47	0.689	2.90X10 ⁸
5	M13-66-1	진주쇠미골쌀막걸리	<i>L. plantarum</i>	x	5.29		
6	M13-67-1	생 반성 막걸리	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	o	4.41	0.69	2.44X10 ⁸
7	M13-71-2	여수 우리햐쌀로 빛은 생막걸리	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	o	4.38	0.766	2.50X10 ⁸
8	M13-78-1	우리쌀 서석대	<i>L. plantarum</i>	x	5.32		
9	M13-82-2	우리쌀 동동주	<i>L. plantarum</i>	x	5.22		
10	T2-2	몽골유제품	<i>L. helveticus</i>	x	5.17		

Table 10. 최적 배합비를 적용한 MKRL 5-8 접종 배양물의 특성

배양액 UHT, 37도 MRS배양액 0.1%로 접종, 24시간 배양			pH	산도	균수 (cfu/mL)
1차	MKRL 5-8	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	4.10	0.891	1.55X10 ⁹
2차			4.08	0.888	1.76X10 ⁹

나. 선별 균주의 특허 출원을 위한 기능성 탐색

(1) 선별 균주의 기능성 탐색

상기에 선별된 10종 유산균 중 대량생산에 적합한 유산균주를 선정하였고, 그 중 총 유산균 함량이 높고, 배양 풍미가 탁월한 MKRL 5-8 유산균을 적용한 발효유 제품의 상품화를 하고자 하였음. 선정 유산균의 기능성을 확인하고자, 균체를 이용하여 피부세포의 생활성과 프로콜라겐 합성 유도 여부를 확인하였음.

(가) 인간 피부 섬유아세포에서 MKRL 5-8의 생활성 촉진 효과측정

MKRL 5-8 균체가 인체피부섬유아세포의 생활성에 영향을 미치는 지 확인하기 위하여 세포 증식실험(cell proliferation assay)을 실시하였음. 인간 피부 섬유아세포인 Hs68 세포[입수처: 미국세포주은행(ATCC)]를 10% fetal bovine serum, 페니실린 7.5mg/L, 스트렙토마이신 7.5mg/L를 함유하고 있는 DMEM 배지를 사용하여 5% 농도의 CO₂ 배양기에서 37°C로 24시간 배양하였음. 96 well plate에 Hs68 cell을 10⁶ cells/well 농도로 배양하고 여기에 MKRL 5-8의 사멸 균체를 5×10⁸ cfu/mL, 1×10⁹ cfu/mL 농도로 처리하고 24시간 반응시켰음. 반응 후 세포를 원심분리(4,000rpm, 10분)하여 배양배지를 조심스럽게 따라내고 Roche의 proliferation assay kit을 이용하여 세포의 생활성을 비교하여 측정하였음. 그 결과, Figure 2에서 보는 바와 같이 MKRL 5-8균체는 5× 10⁸ cfu/mL 농도 이상에서 피부섬유아세포의 생활성에 영향을 미쳤음(Cont'는 MKRL 5-8을 처리하지 않은 무처리군, 'LAB1','LAB2'는 각각 MKRL 5-8을 5× 10⁸ cfu/mL, 1× 10⁹ cfu/mL 농도로 처리한 군을 나타내었음).

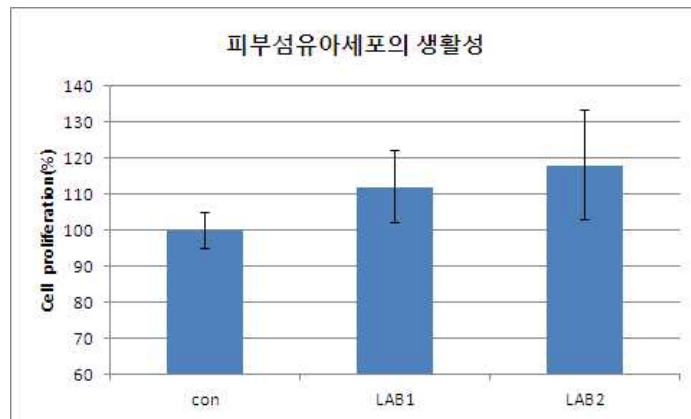


Figure 3. 피부섬유아세포에서 *L. paracasei* MKRL 5-8의 생활성 촉진 효과

(나) 인간 피부 섬유아세포주에서 MKRL 5-8의 프로콜라겐 생성 유도 효과 측정

인간 피부 섬유아세포에서 MKRL 5-8이 프로콜라겐 생성을 증가시키는지 측정하기 위해서 Pro-collagen Type I C-peptide(PIP) EIA kit(Takara, MK101)를 이용하여 Procollagen Type I C-peptide의 생성량을 정량하였음. MKRL 5-8 균체를 100℃의 열을 10분간 가해 사멸시킨 후 5×10^8 cfu/mL, 1×10^9 cfu/mL 의 농도로 인간 피부 섬유아세포인 Hs68 세포에 처리하고 48시간 배양한 세포의 배지로부터 $20\mu\text{l}$ 을 취하여 배지로 분비된 프로콜라겐의 양을 측정하였음. Figure 3은 MKRL 5-8의 인체 섬유아세포에서 프로콜라겐 생성 증진 효과를 측정한 결과를 나타낸 것으로, 'Cont'는 MKRL 5-8을 처리하지 않은 무처리군, 'LAB1','LAB2'는 각각 MKRL 5-8을 5×10^8 cfu/mL, 1×10^9 cfu/mL 농도로 처리한 균을 나타냈음. Figure 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 정상 상태에 존재하는 프로콜라겐의 생성량보다 MKRL 5-8을 처리한 세포에서 프로콜라겐의 합성이 더욱 증가된 것을 확인할 수 있었음.

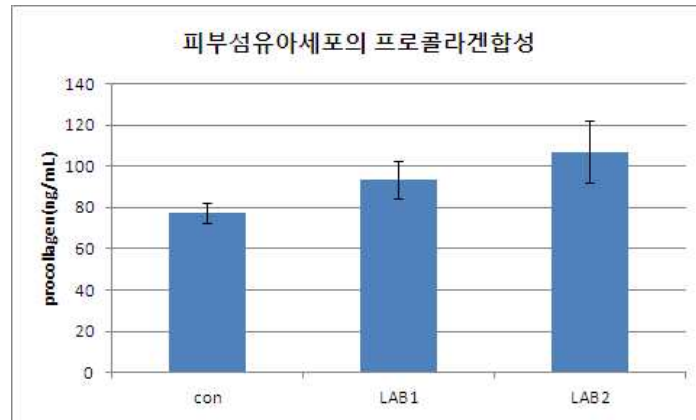


Figure 4. 피부섬유아세포에서 *L. paracasei* MKRL 5-8의 프로콜라겐 생성 유도 효과

3. 발효 공정 최적화

가. Fermenter를 이용한 대량생산공정 및 제조공정도 개발

Fermenter를 이용한 대량생산공정 및 제조공정도 개발하였음. 당사 공정에 맞추어 대량 생산 공정을 개발하였으며, 현장 생산에서 적용 가능할 것으로 판단됨.

(1) 대량 생산 공정

(가) 유원료 배합 및 용해

원유 저장탱크의 원유를 용해탱크로 이송하고 탈지분유를 넣어 용해유를 제조

(나) 용해유 균질 및 살균

용해유를 50~60℃로 예열하여 균질압력 150~200bar로 균질한 후 UHT 판형 살균기에서 130~135℃, 2~3초간 살균하고 판형냉각기에서 37.0± 1.0℃로 냉각한 후 배양탱크로 이송

(다) 종균 접종 및 배양

유산균을 접종하고 37.0± 1.0℃에서 배양(24시간) 후 T.A(%)0.88±0.02에서 배양 종료

(라) 커드의 파쇄

탱크 교반기를 가동하여 배양액의 커드를 파쇄

(마) 시럽(변경가능함)

시럽은 시럽 탱크에 정제수를 이송한 후 기능물질1, 2, 액상과당, 프락토올리고당, 쌀즙을 용해한 후 UHT살균(130~135℃,2~3초)하고 판형 냉각기를 통과시켜 40.0±1.0℃이하로 냉각시킴

(바) 균질 및 혼합

조합탱크로 이송한 후 서서히 교반하면서 10℃이하로 냉각된 시럽에 배양액을 균질기에서 균질(150~200 bar)한 후 판형냉각기를 통과시켜 20℃이하로 냉각하고, 조합탱크로 이송하여 서서히 혼합, 교반하면서 10℃이하로 보관함.(향 및 후침균을 투입)

(사) 포장 용기 제조

포장용기는 성형기에서 생산되어 저장창고에 보관되어 있다 충전기로 공급됨

(아) 충전 및 완제품 제조

용기에 정량 충전 후 container에 옮겨져 냉장고로 운반함

(2) 제조공정도

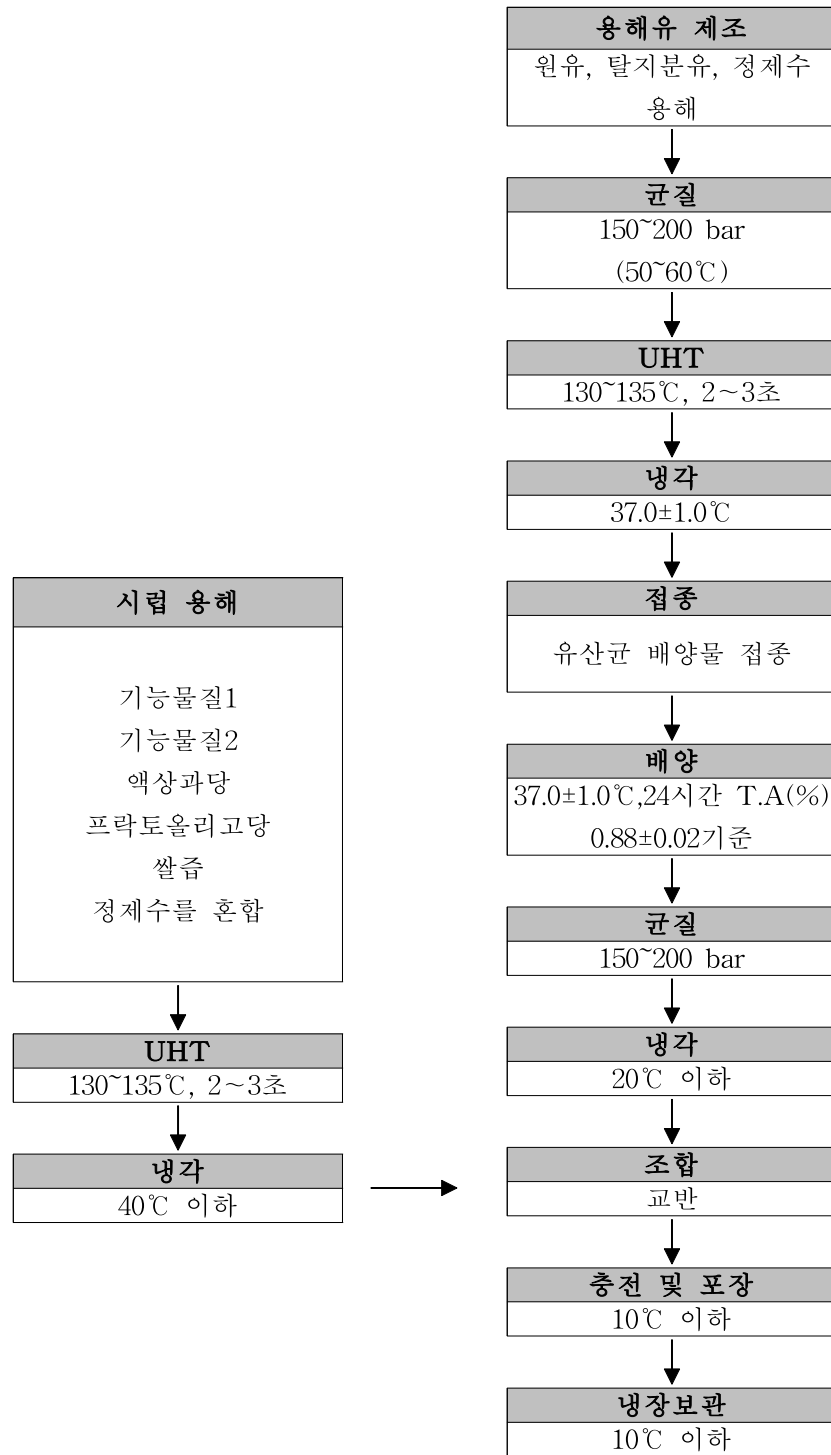


Figure 5. 대량 생산을 위한 제조 공정도

4. 선별 균주의 표준 배합비 설정

가. 타락 발효유 표준 배합비 개발 및 조정

1차년도 연구결과에 따라 원유와 분유만을 이용하여 타락발효유를 제조하려 하였으나 막걸리 유래 유산균이 유성분만으로는 자라는 것이 안정적이지 않아 당류를 첨가하여 발효가 잘 되도록 유도하였음. 또한 전통적인 타락과 같이 유성분에 막걸리를 넣은 효과를 내기 위해 쌀즙을 넣고 막걸리 유래 유산균으로 발효하였음. 변경 표준 배합비는 Table 11과 같음. Table 11의 배합비와 같이 원료를 섞고 130~135℃로 2~3초간 가열(UHT, ultra-high temperature sterilization)하여 살균하였음. 살균 후 35~40℃로 냉각하여 막걸리 유래 유산균(MKRL 5-8, M13-23-3, M13-71-2, 모두 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*)을 0.02%농도로 접종하였고 37℃ water bath에서 24시간 동안 배양하여 발효시키고 배양물은 50/150 bar로 균질하여 드링크 타입의 발효유로 제조하였음.

Table 11. 타락발효유의 배합비

원료명	함량(%)
원유	50.00
탈지분유	4.00
백설탕	10.00
쌀즙	10.00
펙틴	0.12
유산균	0.02
정제수	25.86
소계	100.00

5. 타락 시제품 개발 및 특성 분석

가. 타락발효유의 품질 특성 및 영양성분 분석

(1) 타락발효유의 이화학 분석

선발균주 중 *L. paracasei* M13-23-3이 24시간 배양 후, 산도가 가장 낮았음. *L. paracasei* M13-23-3이 신맛이 가장 적었으며, 당도와 균수는 선발균주 3종의 유의적 차이가 없었으며, 농후발효유 법적 기준에 적합하였음.

Table 12. 선발균주의 이화학 분석결과

선발균주	pH	T.A.	Bx	균수
<i>L. paracasei</i> MKRL 5-8	3.95	0.95	19.59	1.69E+9
<i>L. paracasei</i> M13-23-3	4.62	0.62	19.32	1.42E+9
<i>L. paracasei</i> M13-71-2	3.89	0.97	19.92	1.82E+9

(2) 막걸리 유래 균주의 내산성 테스트

MRS broth(pH 6.85)에 2N HCl을 넣어 pH를 2와 3으로 조정한 배지에 막걸리 유래 유산균을 1×10^7 CFU/mL 수준으로 접종하고 1시간 반, 3시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 살아남은 유산균의 균수를 측정하였음(대조군으로 동량으로 MRS broth pH 6.85에 접종한 샘플을 비교). 그 결과 pH 3에서는 대체로 유산균이 살아남아 균수가 유지되었으나 pH 2 조건에서는 생균수가 크게 줄었음(Fig. 5).

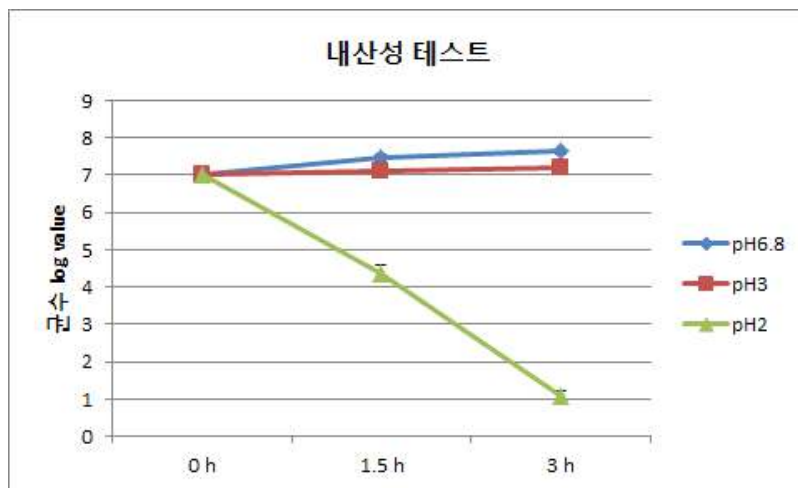


Figure 6. *L. paracasei* M13-23-3 균주의 내산성 테스트

(3) 막걸리 유래 균주의 내담즙성 테스트

MRS broth에 1% Bile extract를 첨가하여 배지를 제조하고 막걸리 유래 유산균을 1×10^7 CFU/mL 수준으로 접종하고 1시간 반, 3시간 동안 37°C에 반응시킨 후 살아남은 유산균의 균수를 측정하였음. 그 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 MKRL5-8, M13-23-3이 내담즙성이 가

장 좋은 편이고 M13-71-2는 낮은 편이었음.

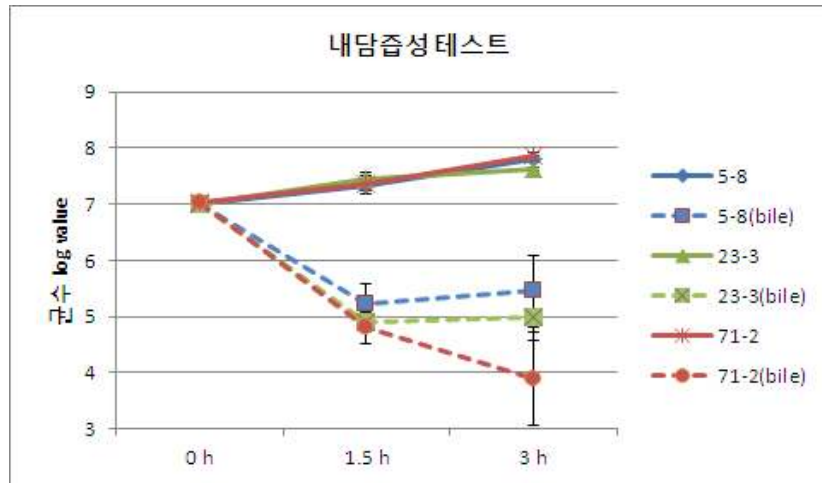


Figure 7. 막걸리 유래 유산균의 내담증성 테스트

(4) 막걸리 유래 균주의 장부착능 테스트

Caco-2 cell(human epithelial colorectal adenocarcinoma cell)을 24 well plates에 1×10^6 cells/well이 되도록 배양하고 bacteria : animal cell이 각각 200 : 1, 100 : 1, 10 : 1이 되도록 처리하고 5% CO₂ incubator에서 1시간 30분 동안 반응시켰음. 이후 well을 1 ml의 PBS로 2번 washing하고 cell에 남아있는 생균수를 측정하였음. 그 결과, Figure. 7에서 보는 바와 같이 MKRL5-8이 200 : 1에서 높은 부착능을 보였음.

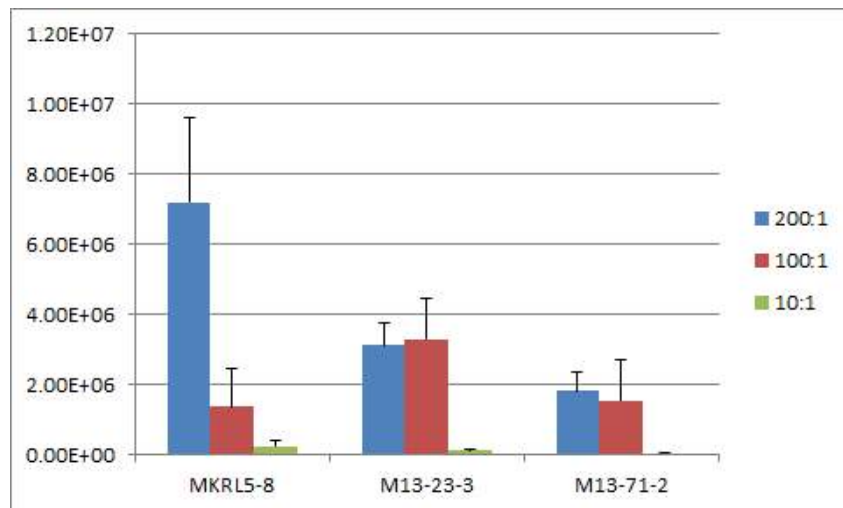


Figure 8. 막걸리 유래 유산균의 장부착능 테스트

(5) 타락 발효유의 영양성분 분석

위의 방법으로 제조된 타락발효유의 영양성분을 분석하였음. *L. paracasei* M13-23-3으로 발효시킨 타락발효유의 100 g 당 영양성분은 Table 13와 같음. 일반적인 드링크 발효유에 비해 지

방함량은 낮고 당함량은 높은 편임.

Table 13. 타락발효유의 영양성분 검사

영양성분	탄수화물 (g)	당류 (g)	단백질 (g)	지방 (g)	포화지방 (g)	트랜스지방 (g)	콜레스테롤 (mg)	나트륨 (mg)
100g 당	17.61	13.14	3.12	1.88	1.24	0.07	5.9	40.81

나. 시제품의 관능검사

자사 연구소 직원 20명을 대상으로 한 시제품의 관능검사를 수행하였음. *L. paracasei* M13-23-3으로 발효시킨 타락발효유를 가지고 관능검사를 수행한 결과 전체적인 맛 점수는 4.0점/7점 척도로 보통 수준이었음(Fig. 8). 관능점수가 보통인 원인으로서는 향에 대한 기호도가 낮고 신맛이 강하기 때문이라고 판단이 되며 바디감이 다소 높다고 평가되어 드링크 타입으로는 약간 묵직한 느낌이라고 판단되었음.



Figure 9. 타락 발효유의 관능검사 결과

6. 기능성 테스트

가. 막걸리 유래 균주의 항산화 활성 테스트

(1) 유산균 시료의 준비

막걸리 유래 유산균이 증식된 MRS broth culture 50 ml을 4,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 남은 균체를 PBS buffer 30ml로 2회 세척하고 유산균 농도가 약 1×10^{10} cfu/ml 농도가 되도록 식염수에 용해하여 막걸리 유래 유산균의 균체(intact cell)로 사용하였음. 준비된 균체(intact cell)를 초음파를 이용하여 파쇄한 후, 14,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 막걸리 유래 유산균의 유산균 초음파 파쇄액(intracellular cell-free extract)으로 사용하였음.

(2) Total Anti-oxidative capacity test

표준시료인 Uric acid와 유산균 시료 20 μ l를 well plate에 첨가하고, 1 \times Reaction buffer 180 μ l을 첨가하여 혼합하였음. 초기 흡광도 값을 490 nm에서 측정 한 후, 1 \times Copper Ion Reagent 50 μ l을 첨가하여 상온에서 5분간 shaking하면서 반응시켰음. Stop solution 50 μ l을 첨가하여 반응을 종료하고 490 nm에서 흡광도를 측정하였음. 총 항산화능의 평가는 메탈이온(Cu^{2+})을 안정화시키는(Cu^{+} 로 변경) 정도를 비교하여 평가하였음. 그 결과, Figure. 9에서 보는 바와 같이 세 균주 모두 intracellular cell-free extract에 비해 intact cell이 항산화 활성이 높으며 균주 간의 차이는 10승 수준에서 MKRL5-8이 약간 높은 항산화 활성을 보였음.

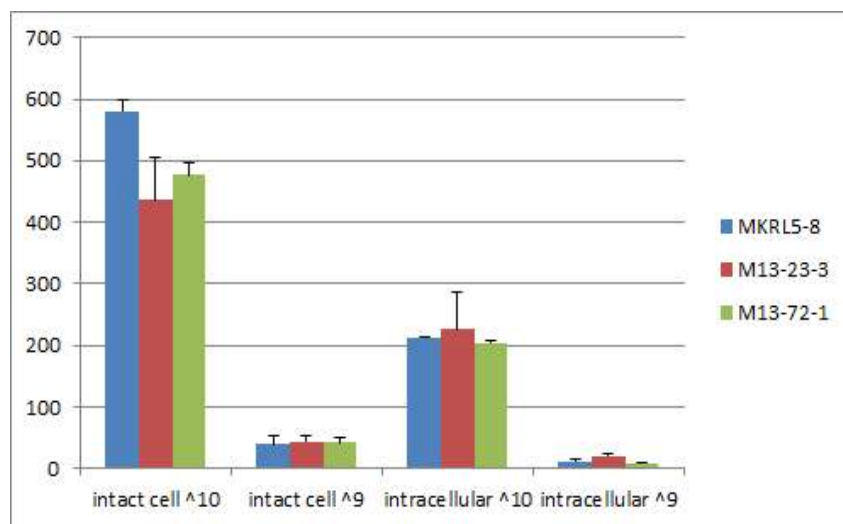


Figure 10. 막걸리 유래 유산균의 총 항산화능 테스트

(3) SOD(superoxide dismutase) 테스트

유산균 시료 5 μ l를 well plate에 첨가하고, Xanthine 용액 5 μ l, Chromagen 용액 5 μ l, 10배 SOD assay buffer 10 μ l를 첨가하였음. 상기 반응액이 90 μ l가 되도록 증류수를 첨가하였음. 반응액에 1 \times Xanthine Oxidase 용액 10 μ l를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C 1 h 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였음. SOD 평가는 효소적 항산화 활성에 대한 평가로 superoxide anion

radical(O_2^-)을 과산화수소로 변경되는 정도를 분석하였음. Figure. 10에서 보는 바와 같이 M13-23-3이 상대적으로 활성도가 높은 것을 확인하였음.

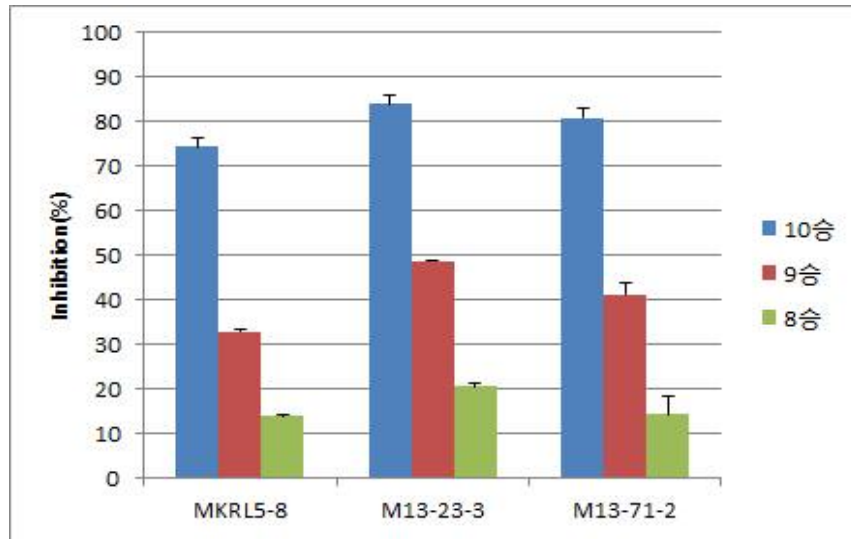


Figure 11. 막걸리 유래 유산균의 SOD 활성 테스트

(4) Catalase 활성 테스트

표준시료인 catalase와 유산균 시료 20 μ l를 well plate에 첨가하고, Hydrogen Peroxide working 용액 (12 mM) 50 μ l를 첨가하여 상온에서 1분간 반응하였다. Catalase Quencher 용액 50 μ l를 첨가하여 반응한 후 새로운 well plate에 5 μ l씩 이동한 후 Chromogenic working 용액 250 μ l를 첨가하여 상온에서 60분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였음. 그 결과, 세 균주 모두 SOD 효소 활성에 의해 만들어지는 과산화수소를 제거하는 catalase 효과는 없었음.

나. 막걸리 유래 균주의 여드름 병원균 항균 활성 테스트

(1) 막걸리 유래 유산균 배양액(culture supernatant)의 항균활성 측정

실험에 이용된 여드름 원인균은 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*) ATCC11828과 ATCC6919 두 가지 균주(strain)을 이용하였으며, 항균활성 측정은 액체배지 배양법을 이용하였음. 막걸리 유래 유산균 MKRL5-8이 증식된 10 mL의 MRS 배양물(culture broth)을 4,000 rpm으로 10분간 원심분리하고, 상층액 5 mL를 취해 0.45 μ m 필터에 여과하여 제균 시킨 후, 이를 유산균 배양액(culture supernatant)으로 사용하였음.

실험은 액체배지(GAM broth)만 담은 비교군(blank), 액체배지에 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*)를 배양한 대조군(control), 액체배지에 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*)를 배양하면서 막걸리 유래 유산균의 배양액을 첨가한 실험군(test) 3개 군으로 나누어 진행하였음. GAM broth는 여드름 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*)를 배양하는 영양액체 배지로 10 mL씩 준비하여 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*)를 접종 시에는 1% 농도로

접종하고 24시간 동안 37°C에서 혐기배양하였음. 이 때 실험군에는 막걸리 유래 유산균 MKRL5-8의 배양액(culture supernatant) 1 mL를 첨가하여 유산균 배양액이 여드름 병원균의 생장에 미치는 영향을 관찰하였음. 대조군으로는 액체배지에 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*)를 동일하게 1% 농도로 접종하고 유산균을 배양하지 않은 MRS broth만을 1 mL 첨가하여 배지의 부피 차이에서 오는 실험 오차를 제거하였음. 여드름 병원균의 성장 정도는 상기의 배양물(culture broth)의 흡광도를 600 nm 에서 측정하여 비교하였음.

Figure. 11 에서 보는 바와 같이 미생물이 자라지 않은 상태인 비교군(blank)은 0.16 정도로 흡광도가 매우 낮고, 대조군(control)인 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes* ATCC11828 과 *P. acnes* ATCC6919)의 배양물의 흡광도는 1.4, 1.5 이상으로 높아졌음. 반면, 대조군에 MKRL5-8의 배양액(culture supernatant)을 첨가한 실험군(test)의 흡광도는 1.2, 1.3 수준으로 상당히 감소했음. 이를 통해, MKRL5-8의 배양액이 여드름 원인균인 *P. acnes* ATCC11828 과 *P. acnes* ATCC6919 의 성장을 저해하는 효능이 있음을 확인하였음.

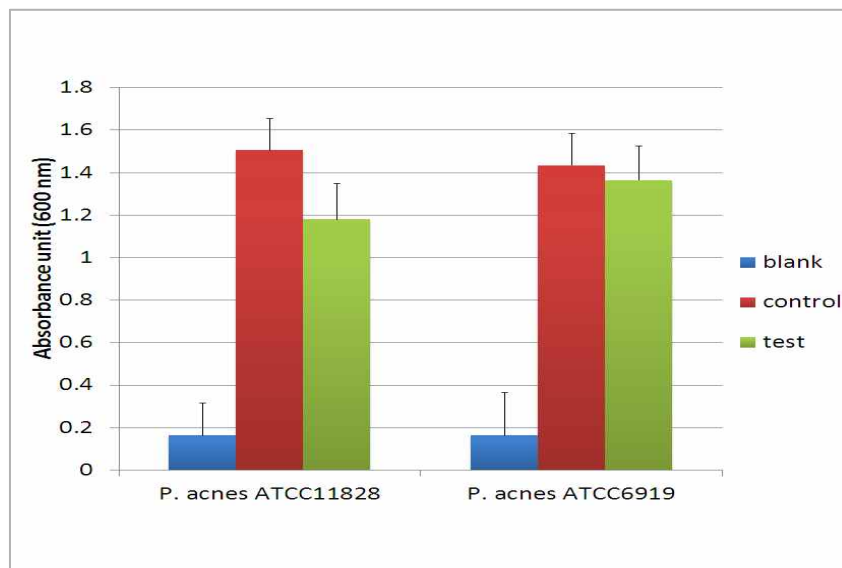


Figure 12. MKRL5-8 배양액의 여드름균 항균 활성

(2) 막걸리 유래 유산균 균체(cell)의 항균활성 측정

막걸리에서 분리된 유산균 균체(cell)의 여드름 원인균에 대한 항균 활성을 확인하였음. 상기 (1) 에서와 같이 MKRL5-8 유산균이 증식된 10 mL의 MRS 배양물(culture broth)을 원심분리하여 상층액을 제거하고 남은 균체를 10 mL의 saline buffer로 2회 세척하고 유산균이 약 1×10^9 CFU/mL 농도가 되도록 saline에 용해하여 실험에 이용하였음.

대조군으로는 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*) ATCC11828 과 ATCC6919 만을 각각 액체배지(GAM broth)에 1% 농도로 접종 후 37°C에서 배양한 것을 이용하였고, 여기에 유산균의 균체를 *P. acnes*와 동량으로(약 1×10^7 CFU)로 접종하여 동시 배양한 후 *P. acnes*와 유산균의 균수를 측정하여 비교하였음. 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*)의 균수는 선택배지인 DRC agar(Differential Reinforced Clostridial Agar)를, 유산균수는 락토바실러스 선택배지인 SL agar에 접종하여 계수하였음.

Figure. 12에서 보는 바와 같이 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*)만을 키운 대조군에서는 프로피오니박테리움 선택배지에서 균수가 로그값으로 9 이상을 나타냈고, 유산균 선택배지에서는 0을 나타냈음. 반면, 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*)와 유산균을 동시에 배양한 실험군에서는 프로피오니박테리움 선택배지에서는 균수가 로그값 8 로 감소하였고, 유산균의 균수가 로그값 8 로 높게 나타났음. 이러한 결과는 *P. acnes* ATCC11828 과 ATCC6919 두 균주(strain) 모두에서 동일하게 관찰할 수 있었음.

상기 실험결과, 막걸리 유래 유산균 MKRL5-8은 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*)의 생장을 억제하고 균수를 감소시켜 프로피오니박테리움 아크네스(*P. acnes*)에 대한 강한 항균활성을 가지는 것으로 확인되었음.

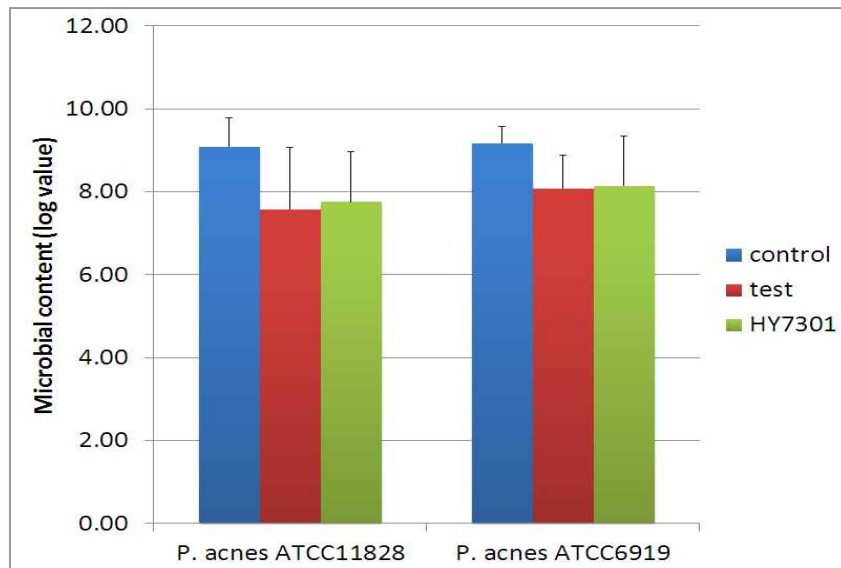


Figure 13. MKRL5-8 균체의 여드름균 항균 활성

7. 상업화 계획

가. 출시계획 및 일정

- 자사 신제품 개발업무 규정 NPD(New Product Development) process 에 따라 진행
- 시장 및 소비자 니즈 기반 아이템 발굴, 일정관리, 각 부서별 역할과 책임을 통해 진행
- 전사적 협업 : 브랜드 위원회를 통한 중장기적 제품화 확정(안) 도출 (예상 기간1~2년 이상)
- 제품 확정(안) 후, 제품 개발 Flow에 따라 진행(예상 기간 2년 내외)

나. 생산설비

- 자사 공장 드링킹 발효유 설비검토
- 천안공장, 논산공장 검토

다. 향후 진행사항

(1) 시생산 및 저장·유통 테스트

- 시생산 제품의 저장기간 설정 및 영양성분 분석을 통한 제품 표기사항 확정
- 유통 테스트를 통한 제품 안전성 확인 실험
- 공정적합성 검증, 제품품질 확인, 최종 제조공정 정립

(2) 포장방법

- 충전: 계량식 충전기 이용
- 밀봉 및 포장: 호상 발효유는 컵포장을 검토, 드링크 발효유는 알루미늄으로 된 roll-on screw 캡 등의 마개 밀봉을 검토하며, Push-on 또는 snap-on캡을 씌움.
- 추후 포장방법은 공장 설비 및 포장 업체 설비를 고려하여 추가 검토할 예정임.
- 당사 제품 충전·포장 라인을 고려하여 개발할 예정임.

(3) 표기사항 검토

- 포장용기에 표기할 사항들은 식품공전 및 축산물의 표시기준에 규정되어 있는 사항들을 준수하도록 검토함.

(4) 제품 용기 및 디자인 확정

(5) 본생산(출시) 및 프로모션(관측 및 홍보)

라. 제품 컨셉(안)

- (1) 컨셉: <요리 古書인 수운잡방에 나온 전통발효유 타락을 재현한 한국형 전통 발효유>
[수운잡방(需雲雜方,1540년): 현재까지 발견된 가장 오래된 한문필사본 조리서]

- 우유에 막걸리를 넣어 발효시킨 전통 발효유 타락의 특성을 계승
- 우리나라 왕족과 귀족들의 별미식 디저트, 프리미엄 전통 타락발효유를 현대식으로 해석하여 제품화한 프리미엄 고급 요거트(디저트) 제품

(2) 식품유형: 농후발효유

(3) 용량: 100~140mL

(4) 가격: 1200원(예상)

제 2 절. 전통발효유 타락의 제조 표준화 및 영양적 우수성 규명

1. 전통발효유 타락의 표준화 제법 개발

가. 발효원인 다양한 막걸리를 사용하여 제조한 타락의 발효 특성 및 발효 산물 분석

(1) 타락의 제조(실제 타락 제조 방법 구현)

시판 생막걸리를 이용하여 전통발효유 타락을 제조하였음. 우유에 시판되는 생막걸리 10%, acetic acid 0.1%를 첨가하여 37°C에서 24시간 발효시키며 우유의 특성변화를 관찰하였음.

(2) 타락 pH 변화 측정

발효 시간에 따른 타락의 pH 변화는 Fig 1. 과 같음. 발효 초기의 pH는 우유의 표준 pH인 7.3에서 0.1 % acetic acid와 발효원인 막걸리의 첨가로 인해 다소 감소하여 0시간 타락의 pH는 6.20 ~ 6.49 수준임. 이후 발효가 진행됨에 따라 pH가 감소하는 것을 알 수 있는데 S1의 경우 발효 4시간 이 후 급격히 pH가 감소하면서 발효 16시간이 경과하였을 때는 pH 4.64의 범위를 나타내어 등전점에 도달하여 curd가 형성되었음. S2의 경우 발효 12시간 경과할 때 까지는 완만한 감소를 나타내다가 발효 12시간 pH 6.0에서 16시간 5.74로 감소하며 급격한 감소를 보이기 시작하여 발효 24시간 까지 꾸준한 감소추세를 보임. S3의 경우 발효 초기인 4 시간 까지 가장 pH 6.21에서 5.84로 가장 급격한 감소추세를 보이지만 이후 완만한 감소를 보이며 발효 24시간에는 pH 5.03 으로 S2와 비슷한 pH를 나타내었음. S4의 경우에는 16 시간까지의 pH가 제조 초기의 pH와 비슷한 수준을 나타내었지만 16시간부터 점차 pH가 감소하며 발효가 진행됨을 알 수 있었고 24 시간의 최종 pH는 5.56이었음. 이처럼 타락이 발효가 진행되면서 pH가 감소하는 것은 발효를 주도하는 젖산균이 우유의 주된 당인 젖당을 소비하여 lactic acid와 이외의 유기산을 생성하면서 pH가 낮아지는 것으로 생각됨.

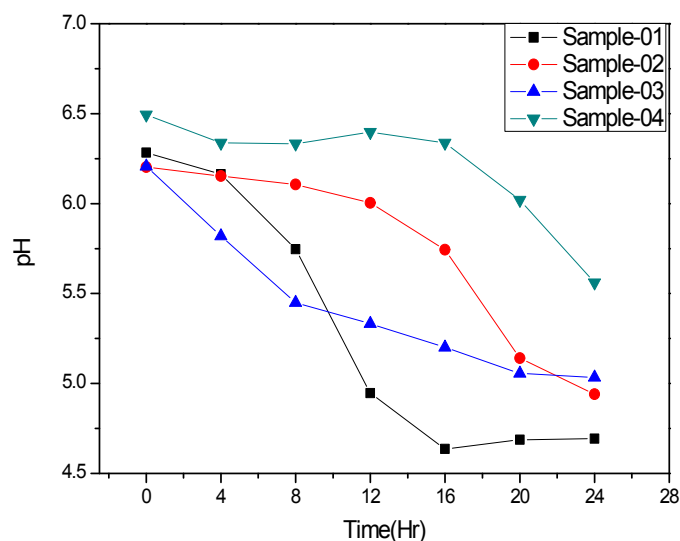


Fig 1. Changes of pH in *Tarak* with different Makgeolli at 37°C for 24 hr.

S1) made with 옛날막걸리(국순당) S2) made with 금정산성막걸리(금정산성토산주)
 S3) made with 느린마을막걸리(배상면주가) S4) made with 덕산쌀막걸리(세왕주조)

(3) 타락의 적정산도 측정

시판막걸리를 이용하여 제조한 타락의 발효시간에 따른 적정산도는 Fig 2. 와 같음. 적정산도의 변화는 pH의 결과와 반대로 발효가 진행됨과 동시에 증가하는 추세를 보임. 산도와 pH 변화는 발효가 일어남에 있어서 기본적인 양태로 발효시간을 결정함에 있어서 중요한 요인이 됨. 발효 초기 빠른 산도의 증가를 보인 것은 S3로 발효 시작 시간, 0.22 %에서 4시간 후 0.32%로 빠른 산도의 증가를 보이지만 이 후 완만히 증가하여 24시간 후에는 산도가 0.56%로 나타났음. 24시간 발효에서 가장 높은 산도를 보인 것은 S1으로 발효 4시간 이후 급격한 산도의 증가를 보여 발효 24시간에는 0.73%로 시료 중 가장 높은 산도를 나타냈음. S2는 발효 16시간 이 후 산도가 증가하여 최종 산도는 0.53 %이며 S4 또한 발효 16 시간 이 후 산도의 증가를 나타내어 최종 산도는 0.40%를 나타내었음. 산도 상승에 의해 curd가 생성되는 발효 시간은 12~16시간으로 집종 막걸리에 따라 다양하게 나타났음. 이는 막걸리 내의 미생물의 종류와 농도에 따라 타락발효의 특성이 다르게 나타나는 것으로 보임.

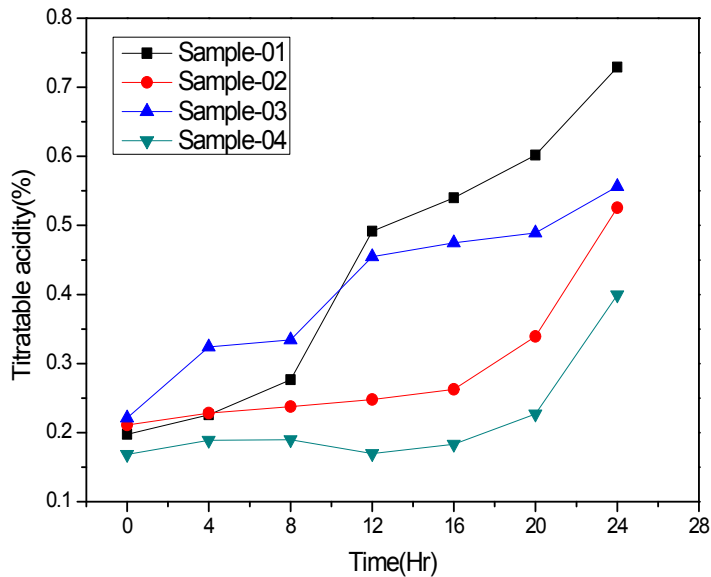


Fig 2. Changes of Titratable acidity in *Tarak* with different Makgeolli at 37°C for 24 hr.

S1) made with 옛날막걸리(국순당) S2) made with 금정산성막걸리(금정산성토산주)
 S3) made with 느린마을막걸리(배상면주가) S4) made with 덕산쌀막걸리(세왕주조)

(4) 타락의 당도 측정

시판막걸리를 이용하여 제조한 타락의 발효시간에 따른 당도는 Fig 3. 과 같음. 발효 0시간 타락의 당도는 각각 9.83 ~ 10.67 %로 모든 실험군에서 비슷한 수준이었음. 이후 S1, S2, S3의 경우에는 발효 4시간까지 당도가 급격히 감소하여 각각 S1은 7.2 S2는 7.0 S3는 7.3의 당도를

나타냈으며 S1, S2, S3의 경우 발효시작과 동시에 감소하여 각각 7.2 %, 7 %, 7.3 %를 나타내었음. 하지만 S4의 경우는 발효 16 시간의 당도가 10.17 %로 0 시간에 비해 큰 차이가 나지 않았으나 16시간에서 감소하여 발효 20시간에는 당도가 6.8 %였음. 이는 S4의 pH가 감소하고 산도가 증가하는 결과와 일치하여 타락의 발효가 시작되며 당도가 감소하는 것으로 생각됨. 이러한 결과는 발효가 진행되면서 발효를 이끄는 젖산균의 작용으로 가지는 우유의 당성분이 분해되어 유기산으로 전환되는 과정에서 당도가 감소한 것으로 생각됨.

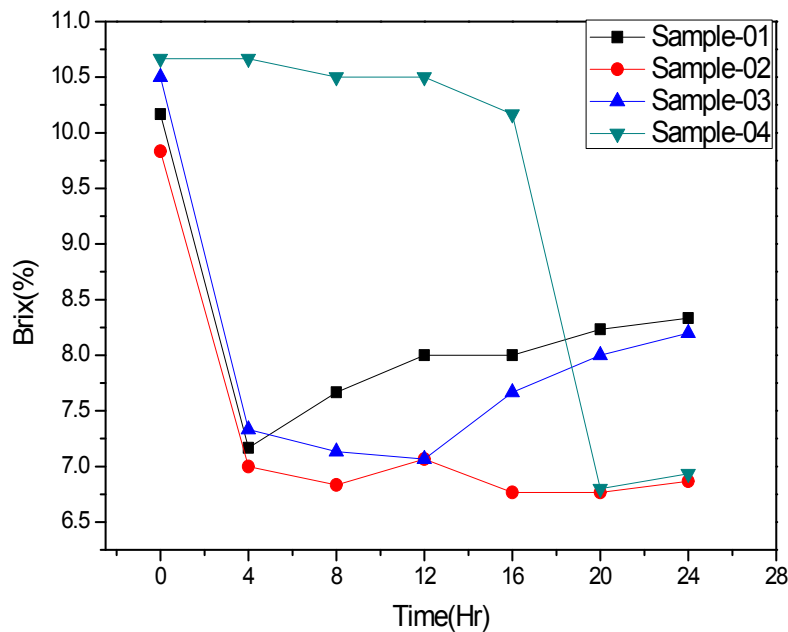


Fig 3. Changes of Brix in *Tarak* with different Makgeolli at 37°C for 24 hr.
 S1) made with 옛날막걸리(국순당) S2) made with 금정산성막걸리(금정산성토산주)
 S3) made with 느린마을막걸리(배상면주가) S4) made with 덕산쌀막걸리(세왕주조)

(5) 타락의 점도 측정

시판막걸리를 이용하여 제조한 타락의 발효시간에 따른 점도는 Fig 4. 와 같음. 발효 초반 발효원인 막걸리를 첨가하였을 때는 우유의 물성과 같은 액상을 나타내며 점도는 7.5 ~ 12.5 cP를 나타내었음. 이후 발효가 시작되면서 pH의 저하에 따라 산도가 증가하고 응고가 시작되면서 되어 점점 높은 점도값을 나타내는데 S1과 S3의 경우 0시간부터 증가하여 발효 8 시간에는 각각 844.17 cp, 1017.33 cP로 최고값을 나타내었음. S2의 경우 발효 12 시간에 점도가 가장 높아졌음(1058.83 cP). 점도는 타락에서 점차 유청이 분리되면서 감소하여 발효 24시간에는 90.00 ~ 175.17 cP의 범위를 나타내었음. S4의 경우에는 발효 12시간까지는 점도는 26.67 cP로 거의 변화를 보이지 않지만 16시간에는 67.50 cP로 소폭 상승하였음. 이후 급격한 상승추세를 보이며 발효 24 시간에는 861.83 cP를 나타내는데 이러한 결과는 발효시간에 따른 pH와 산도의 변화와도 같은 추세를 보이며 S4의 경우에는 16 시간 이후부터 활발한 발효가 일어남을 알 수 있었음.

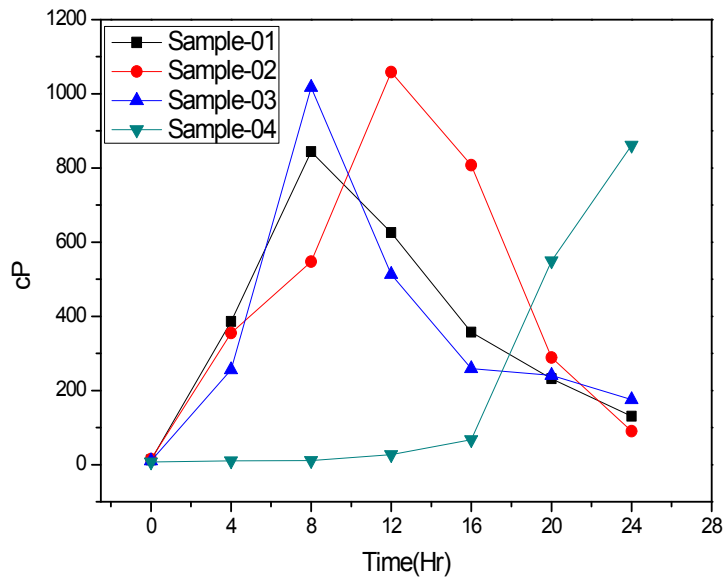


Fig 4. Changes of viscosity in *Tarak* with different Makgeolli at 37°C for 24 hr. S1) made with 옛날막걸리(국순당) S2) made with 금정산성막걸리(금정산성토산주) S3) made with 느린마을막걸리(배상면주가) S4) made with 덕산쌀막걸리(세왕주조)

(6) 타락 발효에 따른 미생물 변화

시판막걸리를 이용하여 제조한 타락의 발효시간에 따른 젖산균 수는 Fig 5. 와 같음. 타락을 처음 제조한 0시간은 각각 발효원인 시판막걸리함유 젖산균으로 인해 S1, S3은 5 log 수준의 젖산균이 S2와 S4의 경우에는 6 log 수준의 젖산균이 존재함을 알 수 있었음. 이후 S1은 발효 4시간에서 12 시간 까지 급격한 젖산균의 성장을 거쳐 12 시간에는 9.5 log 수준의 젖산균 수를 나타내었음. S3은 발효 4시간에서 성장하여 12 시간에는 10 log 수준의 젖산균수를 나타내었음. S2와 S4의 경우는 발효 20시간 까지 비교적 완만하게 젖산균의 성장을 거치지만 20시간 이후에는 모든 실험군에서 생장이 이루어지지 않거나 다소 감소하는 모습을 보였음.

한편, 발효시간에 따른 효모의 농도변화는 Fig 6.과 같음. S1과 S3의 경우는 5 log 수준의 효모수를 나타내며 S2는 6 log S4는 3.5 log 수준의 효모수를 나타내었음. S4의 경우에는 가장 높은 효모수를 가졌지만 12 시간까지 완만한 모양을 보이다 12 시간부터 급격하게 성장하여 20시간에는 8 log 수준이 되었음. S2의 경우 6 log 수준의 당도가 나타냄을 이를 통하여 효모의 수가 가장 많은 S4가 앞서 이화학적인 특성분석을 통해 보아 가장 발효가 늦게 일어난다는 것을 알 수 있었음. 이는 동일한 양의 우유를 배지로 사용할 때 효모와 젖산균이 서로 경쟁을 일으켜 효모수가 많은 경우 오히려 발효가 천천히 일어나는 것으로 생각됨. S3은 발효 16시간 까지 완만히 효모가 성장하여 6 log 수준이지만 이후 급격히 성장해 20시간 에는 8 log 수준을 나타내었음. 결과적으로 최종 타락의 효모수는 모든 실험군에서 7.5 ~ 8 log를 나타내었음. 유산균과 효모의 성장패턴은 strain의 특성이나 초기 접종 농도 등의 요인에 따라 달라지는 것으로 생각됨. 따라서 대량생산 및 풍미가 우수한 타락발효유를 만들기 위해서 균주의 선발과

접종량의 결정이 매우 중요하다고 판단됨.

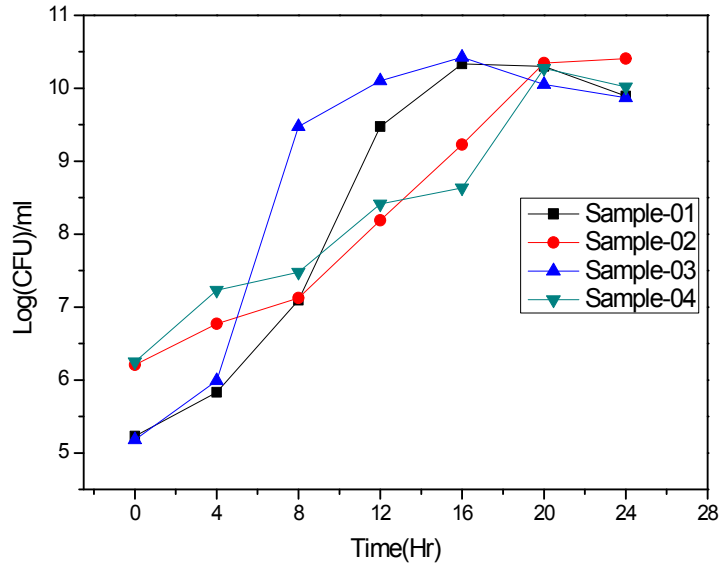


Fig 5. Changes of lactic acid bacteria count in *Tarak* with different Makgeolli at 37°C for 24 hr. S1) made with 옛날막걸리(국순당) S2) made with 금정산성막걸리(금정산성토산주) S3) made with 느린마을막걸리(배상면주가) S4) made with 덕산쌀막걸리(세왕주조)

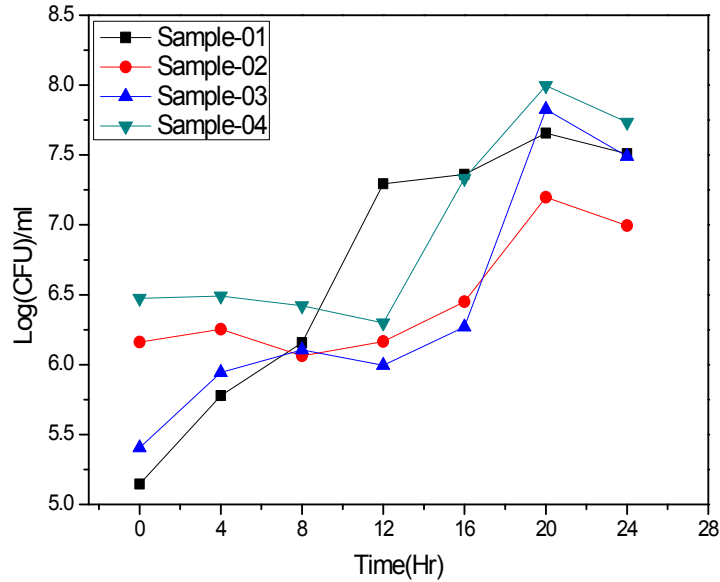


Fig 6. Changes of yeast count in *Tarak* with different Makgeolli at 37°C for 24 hr. S1) made with 옛날막걸리(국순당) S2) made with 금정산성막걸리(금정산성토산주) S3) made with 느린마을막걸리(배상면주가) S4) made with 덕산쌀막걸리(세왕주조)

(7) 타락 발효의 유기산과 에탄올 분석

발효시간에 따른 유기산 생성량은 Fig 7, Fig 8, Fig 9, Fig 10. 과 같음. 4가지 막걸리를 이용한 타락 발효 시 생성되는 유기산은 주로 lactic acid였음. S1과 S3 에서의 발효 12시간 부터 lactic acid의 농도는 큰 폭으로 증가하였음. 또한 S1과 S3 의 경우 ethanol의 양도 발효시간에 따라 증가하였는데 이는 막걸리 유래 효모가 성장하면서 알콜 발효도 일으키는 것으로 생각됨. 또한 모든 실험군에서 초반 초산 0.1%를 첨가한 이 후 발효가 진행되며 acetic acid도 완만히 생성됨을 알 수 있었음. 이것은 타락에서 유청이 분리되는 시점과도 일치함을 Fig 4.에서 알 수 있었음. 이를 통하여 타락은 정상젖산발효균과 이상젖산발효균이 혼재하며 효모가 일부 알콜발효를 이끄는 유산-알콜 혼합형 발효유임을 알 수 있었는데 이때의 발효를 이끄는 균주에 따라서 유기산의 생성량이 달라지는 것으로 생각됨.

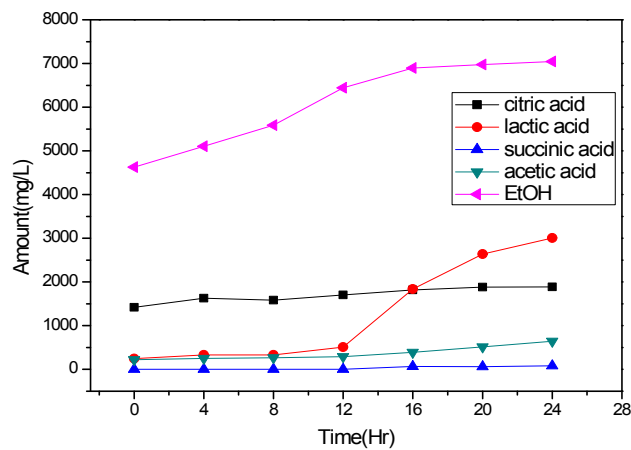


Fig 7. Changes of organic acids and ethanol in S1 Tarak at 37°C for 24 hr.
S1) made with 옛날막걸리(국순당)

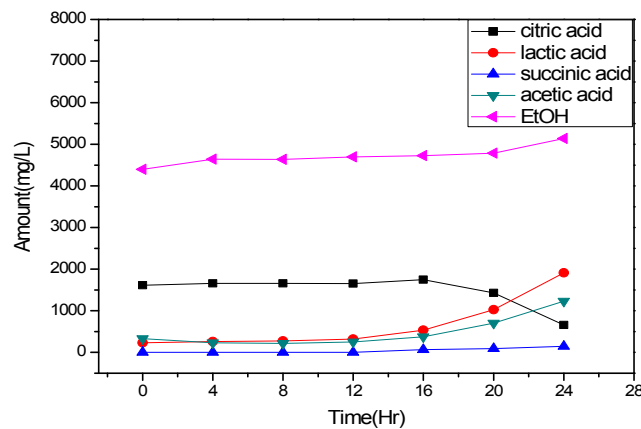


Fig 8. Changes of organic acids and ethanol in S2 Tarak at 37°C for 24 hr.
S2) made with 금정산성막걸리(금정산성토산주)

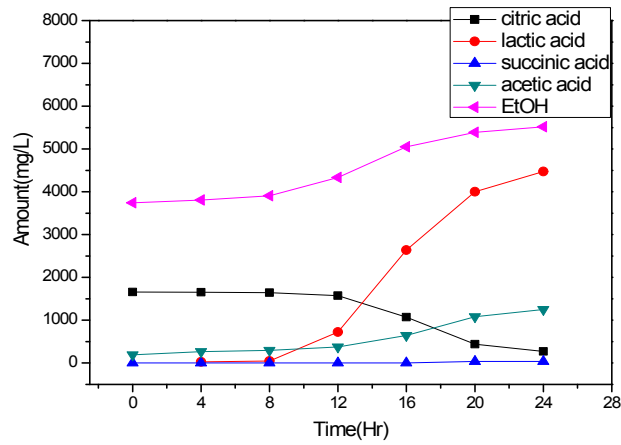


Fig 9. Changes of organic acids and ethanol in S3 Tarak at 37°C for 24 hr.
S3) made with 느린마을막걸리(배상면주가)

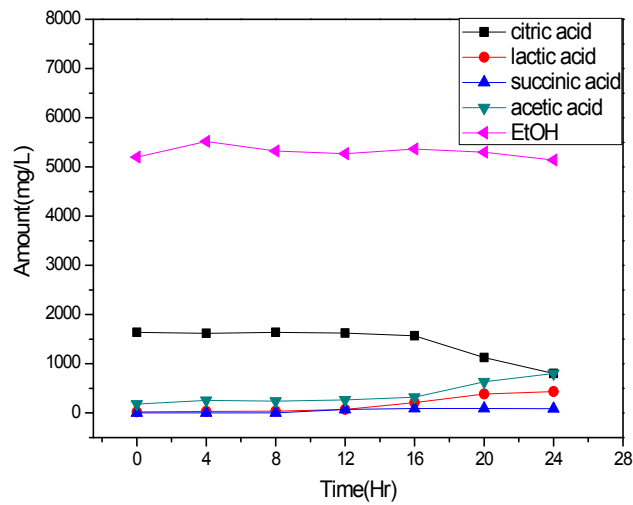


Fig 10. Changes of organic acids and ethanol in S4 Tarak at 37°C for 24 hr.
S4) made with 덕산쌀막걸리(세왕주조)

(8) 타락의 유리당 분석

발효시간에 따른 타락의 유리당의 변화량은 Fig 11. Fig 12. Fig 13. Fig 14. 와 같음. 검출된 주된 당은 lactose 이었으며 S1의 경우 glucose, fructose S3의 경우 glucose가 검출되었음. S1과 S3의 경우 lactose 함량에 큰 차이는 보이지 않았지만 glucose와 fructose는 발효 초반부터 점차 감소하여 발효 16시간에는 검출되지 않았음. 검출된 glucose와 fructose는 발효원인 막걸리에서 함유된 것으로 보이며 이를 발효 중 젖산균이 단당류인 glucose와 fructose를 초기 발효원으로 사용하여 16시간 이후에는 검출되지 않은 것으로 생각됨. lactose만이 검출된 S2, S4의 경우에는 큰 차이를 보이지는 않았지만 발효의 경과와 더불어 lactose가 소량 감소한 것을 알 수 있었음.

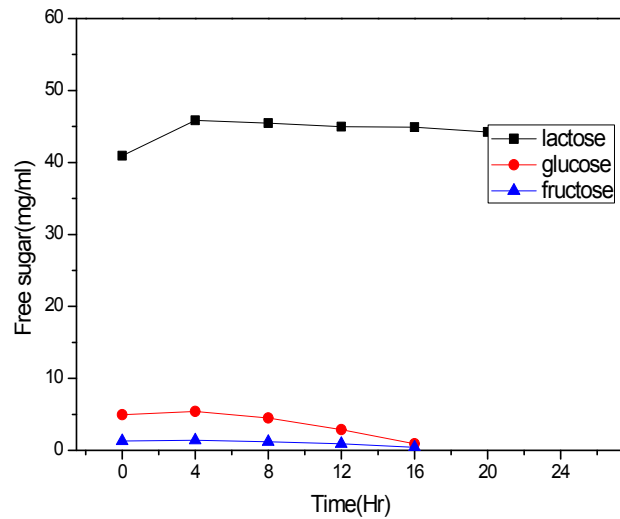


Fig 11. Changes of free sugar in S1 Tarak at 37°C for 24 hr.
S1) made with 옛날막걸리(국순당)

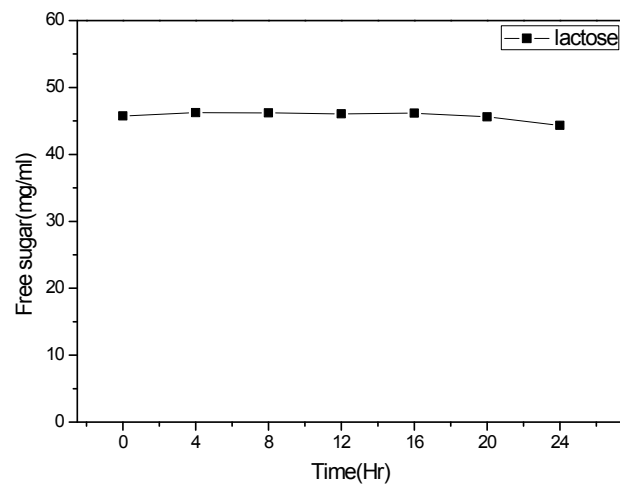


Fig 12. Changes of free sugar in S2 Tarak at 37°C for 24 hr.
S2) made with 금정산성막걸리(금정산성토산주)

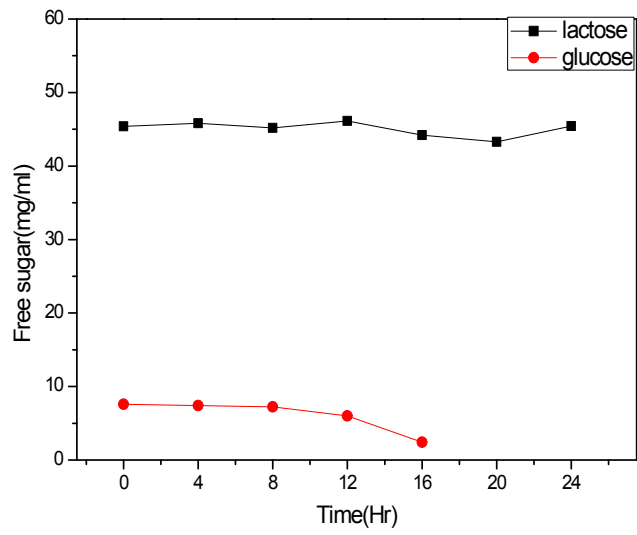


Fig 13. Changes of free sugar in S3 Tarak at 37°C for 24 hr.
S3) made with 느린마을막걸리(배상면주가)

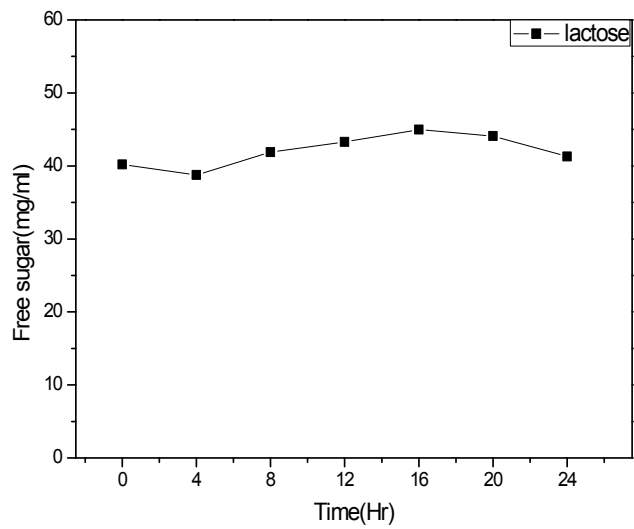


Fig 14. Changes of free sugar in S4 Tarak at 37°C for 24 hr.
S4) made with 덕산쌀막걸리(세왕주조)

나. 타락 내의 유산균 분리 및 동정

(1) 타락에서의 분리균주동정

타락에서 PDA, MRS 배지를 통하여 균주를 순수분리하여 동정한 결과는 Table 1. 과 같았음. 이용 막걸리에 따라 분리된 유산균 및 효모의 종류가 모두 상이하었는데 유산균은 S1의 경우 *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, S2는 *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus crustorum*, *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum*, S3는 *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, S4는 *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc sp.* 가 분리동정 되었음. 이를 통하여 타락발효에 관여하는 젖산균은 이상젖산발효균과 정상젖산발효균이 혼재되어 존재함을 알 수 있었음. 효모는 모든 실험균에서 *Saccharomyces cerevisiae* 가 분리 동정되었음. 분리된 유산균과 효모는 대량배양 및 발효유 제조에 적합한지 여부를 확인하여 실험에 적용할 예정임.

Table 1. Isolated lactic acid bacteria and yeast from *Tarak*

Name	Description	Acession	Pct(%)
S1-a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S1-b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S1-c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S1-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	FJ476121.1	99
S1-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	99
S1-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	99
S1-4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	99
S1-5	<i>Lactobacillus brevis</i>	FJ476121.1	100
S1-6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
S1-7	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	100
S2-a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S2-b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S2-c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S2-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	EU825661.1	99
S2-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
S2-3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CP002033.1	99
S2-4	<i>Lactobacillus crustorum</i>	AB626073.1	99
S2-5	<i>Leuconostoc sp.</i>	EU074059.1	99
S2-6	<i>Enterococcus faecalis</i>	AB362602.1	99

S2-7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB601179.1	99
S3-a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S3-b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S3-c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S3-1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	AB600197.1	99
S3-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
S3-3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	99
S3-4	<i>Lactobacillus curvatus</i>	AB600200.1	99
S3-5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	AB600200.1	100
S3-6	<i>Leuconostoc sp.</i>	EU074059.1	99
S4-a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S4-b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S4-c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JN837100.1	99
S4-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CP002033.1	99
S4-2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CP002033.1	99
S4-4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB598986.1	99
S4-5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	99
S4-6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CP002033.1	99
S4-7	<i>Leuconostoc sp.</i>	EU074059.1	99

(2) Kefir에서의 분리균주동정

Kefir는 젖산균과 효모가 응고된 다당류형태인 kefir grain을 발효시켜 얻은 발효유로 대표적인 유산-알콜 발효유임. 타락발효유 생산에 적합한 후보 균주의 pool을 넓히기 위해 kefir에서 균주를 분리동정 하였음. 제조 방법이 다른 kefir를 각각 T1-1, T1-2, T1-3, T2-1, T2-2, T3-1, T3-2, T4, T5, T6, T7, T8 로 나타내었으며 총 73개의 균주를 분리하였음(Table 2). 주로 *Lactobacillus sp*, *Pediococcus sp* 의 유산균이 분리되었으며 분리된 *Enterococcus sp*의 유산균인 *Enterococcus faecium*도 분리되었는데 이 균주는 유아의 분변에서 분리한 유산균으로 중금속 제거능력이 우수한 것으로 알려져 있음. *Pediococcus sp*의 유산균인 *Pediococcus acidilactici*는 식중독을 일으키는 *Listeria monocytogene*의 성장과 장기 내 이동을 억제하는 것으로 알려져 있기도 함(Dabour N. et al. 2009). 효모로는 유당을 발효에 이용하여 유당분해 능이 뛰어난 것으로 알려진 *Kluyveromyces marxianus*가 분리되었음.

Table 2. Isolated lactic acid bacteria and yeast from *Kefir*

Name	Description	Acession	Pct(%)
T1-1	Enterococcus sp	EU003447.1	99
T1-1	Enterococcus faecium	EU003447.1	99
T1-1	Enterococcus faecium	EU003447.1	99
T1-2	Enterococcus faecium	EU003447.2	99
T1-2	Enterococcus faecium	EU003447.3	99
T1-2	Enterococcus faecium	EU003447.1	99
T1-1	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99
T1-1	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99
T1-1	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99
T1-1	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99
T2-1	Lactobacillus curvatus	AB600200.1	99
T2-1	Lactobacillus curvatus	AB600200.1	99
T2-1	Lactobacillus curvatus	AB600200.1	99
T2-1	Lactobacillus curvatus	AB600200.1	99
T2-1	Lactobacillus curvatus	AB600200.1	99
T2-2	Lactobacillus helveticus	HM218413.1	99
T2-2	Lactobacillus helveticus	HM218413.1	99
T2-2	Enterococcus durans	DQ340072.1	99
T2-2	Enterococcus faecium	HM218621.1	99
T2-2	Enterococcus durans	DQ340072.1	99
T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99
T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99
T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99
T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99
T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99
T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99
T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99
T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99
T3-1	Kluyveromyces marxianus	HE650694.1	99
T3-2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99
T3-2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99
T3-2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99
T3-2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99
T3-2	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99
T4	Pediococcus acidilactici	FJ844982.1	99

T4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	99
T4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	99
T4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	HQ758922.1	99
T4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AB598949.1	99
T5	<i>Enterococcus durans</i>	DQ340072.1	99
T5	<i>Enterococcus durans</i>	DQ340072.1	99
T5	<i>Enterococcus durans</i>	DQ340072.1	99
T5	<i>Enterococcus faecium</i>	DQ340072.1	99
T5	<i>Enterococcus durans</i>	DQ340072.1	99
T6	<i>Enterococcus</i> sp	EU003447.1	99
T6	<i>Enterococcus faecium</i>	EU003447.1	99
T6	<i>Enterococcus faecium</i>	HQ749588.1	99
T6	<i>Enterococcus faecium</i>	HQ749588.1	99
T6	<i>Enterococcus faecium</i>	HQ749588.1	99
T6	<i>Pichia fermentans</i> isolate	FJ176548.1	99
T6	<i>Pichia fermentans</i> isolate	FJ176548.1	99
T7	<i>Cyberlindnera fabianii</i> isolate	JQ342083.1	99
T7	<i>Cyberlindnera fabianii</i> stain	JQ342083.1	99
T7	<i>Cyberlindnera fabianii</i> isolate	JQ342083.1	99
T7	<i>Cyberlindnera fabianii</i> stain	JQ342083.1	99
T7	<i>Cyberlindnera fabianii</i> isolate	JQ342083.1	99
T7	<i>Weissella</i> sp	GQ479964.1	99
T7	<i>Weissella</i> sp	GQ479964.1	99
T7	<i>Weissella</i> sp	GQ479964.1	99
T7	<i>Weissella</i> sp	GQ479964.1	99
T7	<i>Weissella</i> sp	GQ479964.1	99
T8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	99
T8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	99
T8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	99
T8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	99
T8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB598987.1	99
T8	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ844982.1	99

2. 상업적으로 제조한 타락의 발효특성 및 발효산물 분석

가. 상업적 타락의 이화학적, 성분적 및 구조적 분석

(1) 타락 배양물의 제조

막걸리에서 유산균종 5가지를 분리하여 타락을 제조하였으며, 발효 숙성중 이화학적인 변화 및 미생물 변화를 측정하였음. 막걸리에서 분리하여 MRS broth에 배양한 유산균 5종은 모두 *L. paracasei* 로, 제 1세부과제에서 수행한 결과로 제공받았음(MKRL5-8. M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2). 원유 66.7%, 탈지분유 3.3%, 정제수 30% 를 용해하여 제조한 배양액은 pilot 설비를 이용하여 50/150 bar로 균질 후 UHT(130도 이상, 2~3초간) 살균하고 37°C로 냉각 후 준비하였음. 준비한 위의 배양액에 유산균 culture를 1% 농도로 접종한 후 37도°C water bath에서 배양, 0, 6, 12, 18, 24 시간 별로 샘플링하여 배양액의 상태를 비교하였음. 각 strain, MKRL5-8. M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2을 첨가해 제조한 타락은 균 나열 순서대로 1, 2, 3, 4, 5로 지정하고, 균을 첨가한 타락을 시간별로 샘플링한 타락 제품은 균 번호와 발효 시간을 배합하여 샘플이름으로 지정하였음.

(2) 실험방법

- 타락 발효 중 pH, 산도, 점도의 변화 : pH는 pH meter (Orion 2-star Benchtop, Thermoscientific, USA)로 실온에서 측정하고, 총 산도는 0.1N NaOH로 pH 8.30까지 적정하여 소요된 NaOH 소비량을 lactic acid (%)로 환산하여 계산하였음.
- 타락 발효 중 점도의 변화 : 샘플들을 25°C를 유지하면서, viscometer (LVDL-L+, Brookfield, Middleboro, MA. USA)의 2번 spindle로 6rpm에서 30s 간격으로 3회 측정하여 평균값을 나타내었음
- 젖산균수 : 젖산균수는 시료 1ml을 취하여 0.85% 멸균 식염수로 단계적으로 희석해 MRS broth (Difco, U.S,A)배지에 접종하여 37°C에서 48시간 평판배양한 후 생성된 colony를 계측하였음. 3회 반복 측정하여 평균값을 구해 시료액, mL당 colony forming unit (cfu/mL)로 표시하였음
- 유리당 및 유기산 함량 : 유리당 및 유기산 함량은 각 샘플을 4000 rpm에서 10분 동안 원심분리기에서 (A32010(1), GYROZEN, Seoul, Korea) 원심 분리하여 상등액만 채취하여 측정하였음. 채취한 시료액을 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시킨 다음 0.45 membrane filter로 여과하여 HPLC (Water 1515, Waters Co., USA)로 분석하였음. 이때 유리당 분석 column은 carbohydrate analysis column (4.6×250 mm, Waters Co.), mobile phase는 75% acetonitrile (Fisher Co.)을 사용하고 flow rate은 1.0mL/min, injection volume은 20μL, detector는 RI (M410 RI) detector를 사용하였음. 유기산 분석 column은 AtlantisTM dC₁₈(3.9×150mm, Waters Co.), mobile phase는 20 mM NaH₂PO₄ (pH2.7)를 사용하고 flow rate는 1.0 mL/min, injection volume은 20μL, detector는 UV (Waters 2487, 210nm)를 사용하였음.

- 무기질 (양이온, 음이온) 함량 : 무기질 함량은 각 샘플을 균질기 (IKA-WERKE, DE/MF-10)로 마쇄, 초음파 추출기로 추출하여, 0.2 μ m membrane filter로 여과 후 0.45 filter로 여과하여 Dionex ICS3000 (Dionex, USA)로 분석하였음. 무기질은 양이온과 음이온으로 나누어, 양이온은 column은 Ionpac CS12A (4*250mm/Dionex, USA), mobile phase는 20mM MSA (Methanesulfonic acid)을 사용하였고 1.0 mL/min flow rate, 25 μ L injection volume의 조건에서 분석하였음. 음이온은 Ionpac AS20 (4*250mm, Dionex, USA) column, mobile phase는 14mM KOH, 30mM KOH, 30mM KOH를 사용하였고, 1.0mL/min flow rate과 25 μ L injection volume의 조건에서 분석하였음.
- 지방산 함량 : One-step 시료 전처리 방법

동결건조시료 테프론캡의 튜브에 넣음



methylation mixture(MeOH:Benzen:DMP:H2SO4)를 340 μ L, heptane 200 μ L 넣음



80 $^{\circ}$ C 2시간 추출



상온냉각 후 상층액 추출 분석

지방산 분석은 Garces Rafael and Manuel의 방법을 따랐으며, 위의 방법으로 전 처리 한 후 GC (Gas chromatography, Agilent 7890A, CA, USA)를 이용하여 분석하였고, 이때 column은 DB-Wax(30mm*0.25mm*0.25 μ m), detector는 FID(280 $^{\circ}$ C, H₂ 35, Air 350, He 35ml/min)를 사용하였고, injection volume은 1 μ L (split ratio 20) 였음.

참고논문 : *Garces Rafael and Manuel Mancha. 1993 One-Step Lipid Extraction and Fatty Acid Methyl Esters Preparation from Fresh Plant Tissues. Analytical Biochemistry 211:139-143.*

- 타락의 미세구조 : 24시간 발효한 타락 샘플을 동결 건조하여 (FDSSA8508, Ilshinbiobase, Seoul, Korea) 백금 코팅 처리한 후 가속전압 5kV에서 주사전자현미경 (JSM-7500F, JEOL, Japan)을 이용하여 미세구조를 관찰하였음.

(3) 이화학적 분석 결과

- 균종과 발효 시간에 따른 pH의 변화

Table 3. Changes of pH in *Tarak* by fermentation time and strain.

	6h	12h	18h	24h
Con	6.80±0.06			
1	6.30±0.02	4.35±0.00	4.15±0.02	4.03±0.01
2	6.22±0.03	4.55±0.01	4.15±0.01	4.19±0.00
3	6.53±0.01	4.30±0.01	4.18±0.01	4.10±0.01
4	6.53±0.01	4.55±0.04	4.20±0.02	4.10±0.01
5	6.59±0.00	4.36±0.04	4.22±0.01	4.04±0.01

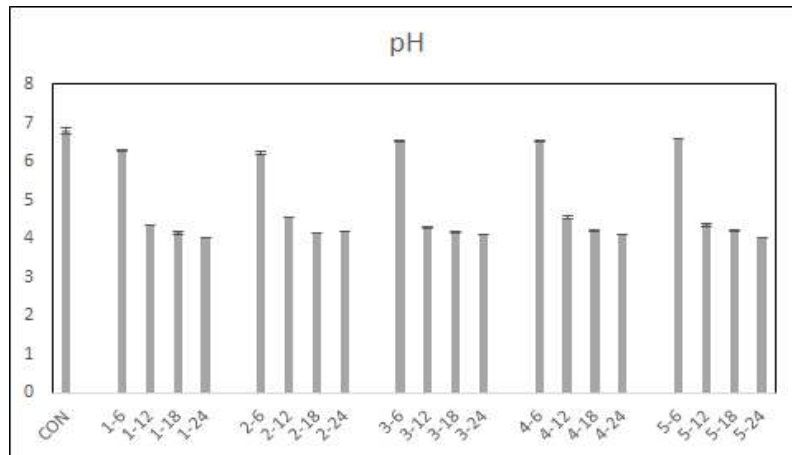


Figure 15. Changes of pH in *Tarak* by fermentation time and strain.

발효 시간이 길어질수록 모든 샘플의 pH는 감소하는 경향을 보였음. 발효 6시간 샘플들은 대조군인 con에 (pH6.8) 비해 약간 감소한 pH를 보이며, pH6.22 ~6.59의 범위를 보였음. 발효 12시간에는 모든 샘플들의 pH가 급격한 감소하여 pH 4.30 ~ 4.55의 범위를 보인 후 지속적으로 감소하여 발효 24시간에는 pH 4.03 ~ 4.19의 범위를 보였음. 균종에 따른 샘플들 간의 pH에는 시료 1과 5번이 pH4.03, pH4.04를 보여 가장 낮은 pH를 보였지만 다른 샘플들과 큰 차이를 보이는 않았음. 발효 12시간에 pH가 우유 단백질 카제인의 등전점 (pH 4.6) 근처에 도달하여 커드가 형성되기 시작함을 알 수 있었음.

- 균종과 발효 시간에 따른 산도 변화

Table 4. Changes of titratable acidity in *Tarak* prepared by different fermentation time and strain.

	6h	12h	18h	24h
Con	0.21±0.01			
1	0.33±0.01	1.31±0.01	1.42±0.01	1.62±0.04
2	0.40±0.01	1.23±0.02	1.54±0.01	1.40±0.01
3	0.25±0.01	1.30±0.02	1.48±0.01	1.58±0.03
4	0.25±0.01	1.22±0.02	1.41±0.04	1.53±0.01
5	0.22±0.01	1.31±0.01	1.40±0.04	1.66±0.03

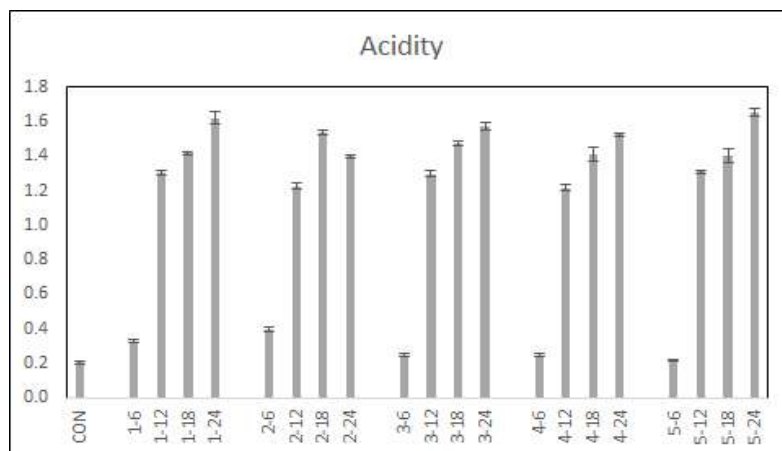


Figure 16. Changes of titratable acidity in *Tarak* prepared by different fermentation time and strain.

발효 시간이 경과하면서 pH가 낮아짐에 따라 산도는 증가하는 경향을 보였으나 균종에 따른 산도에는 샘플들 사이에 큰 차이를 보이지 않았음. pH와 같은 경향으로 발효 12시간에 산도가 급격히 증가하여 1.22 ~ 1.31범위를 보이다가 24시간 발효에는 1.40 ~ 1.66에 도달하였음. 시료 1번과 5번이 24시간 발효에 1.62, 1.66의 산도를 각각 보이며 샘플 중 높은 산도를 보였음.

- 균종과 발효 시간에 따른 점도 변화

Table 5. Changes of viscosity in *Tarak* prepared by different fermentation time and strain.

	6h	12h	18h	24h
Con	4.98±0.06			
1	3.86±0.03	1865.00±62.65	2111.67±99.29	2201.67±40.41
2	5.80±0.03	1353.33±17.56	2910.00±85.00	2170.00±63.84
3	4.66±0.03	2871.67±143.56	2641.67±230.45	2833.33±87.37
4	4.76±0.07	85.00±5.00	2631.67±82.82	2558.33±46.46
5	4.78±0.03	1806.67±50.33	3650.00±70.89	2683.33±50.08

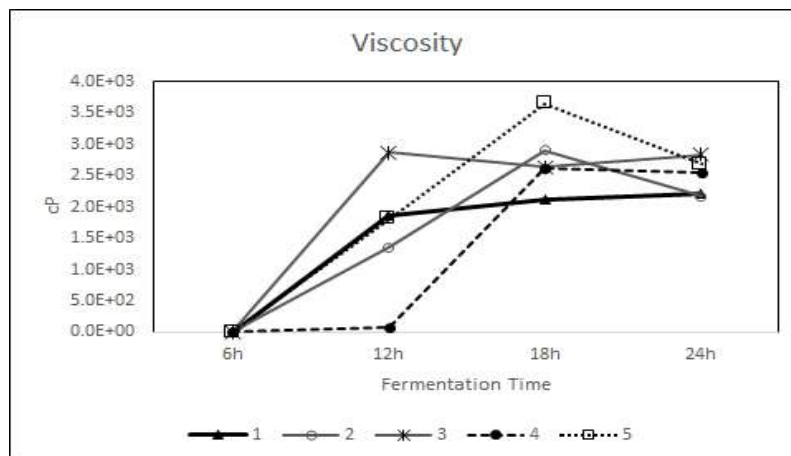


Figure 17. Changes of viscosity in *Tarak* prepared by different fermentation time and strain.

대조군 (con)의 점도는 4.98 cP를 보였으며 점도는 발효가 진행됨에 따라 증가함을 보였으며 (Fig. 17) 발효 6시간의 점도는 대조군 샘플과 큰 차이를 보이지 않고 점도 3.86~5.80cP를 보였음 (Table 5). pH와 산도의 결과와 함께, 발효 12시간에 점도가 급격하게 증가함을 보여 발효 12시간에 커드가 형성되었음을 알 수 있었음. 균종간의 샘플들의 점도는 각 발효 시간에 따라 샘플간 점도가 높고 낮은 차이를 보였고, 발효 24시간에서는 샘플 2번이 가장 낮은 점도 cP 2201을 샘플 5번과 3번이 각각 cP 2683, 2833을 보이며 비교적 높은 점도를 보였음.

- 균종과 발효 시간에 따른 생균수의 변화

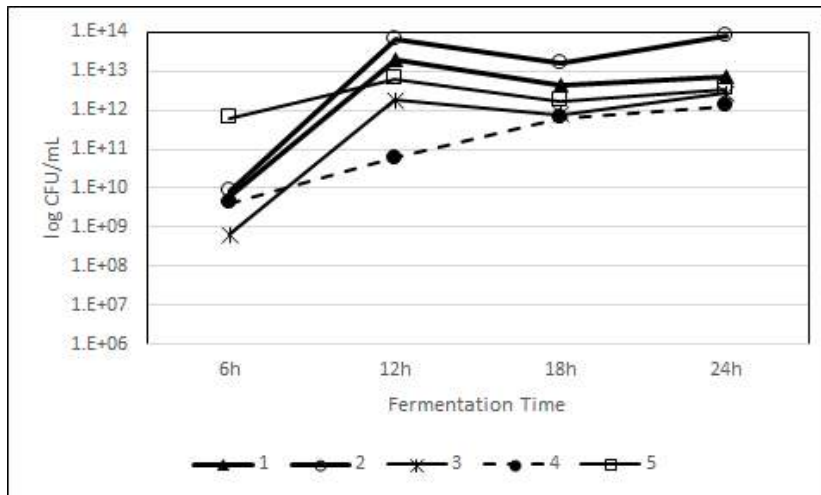


Figure 18. Changes of viable cell count in *Tarak* prepared by different fermentation time and strain.

발효 시간과 균종에 따른 타락의 생균수의 변화는 Fig. 18에 보고되었으며, 샘플 2번과 5번은 발효 18시간에 다소 감소하는 수치를 보였으나 전반적으로 타락의 생균수는 발효가 진행이 됨에 따라 증가함을 보였음. 발효 6시간에는 샘플 균종에 따라 균수가 10^8 cfu/mL에서 10^{11} cfu/mL으로 차이를 보이며, 샘플 3번이 가장 낮은 균수를 샘플 5번이 가장 높은 균수를 보였지만, 발효 24시간에는 모든 샘플이 10^{13} cfu/mL을 보여 샘플들 균종에 따른 차이는 적었음. 샘플 3번 타락이 전체 발효 시간에서 비교적 낮은 생균수를 보였음. 다른 샘플들에 비해 낮은 pH, 높은 산도와 점도를 보인 샘플 5번은 발효 18시간에 다소간 감소한 수치를 제외하고 전반적인 발효 시간동안 높은 생균수를 보였음.

- 균종과 발효 시간에 따른 유기산의 변화

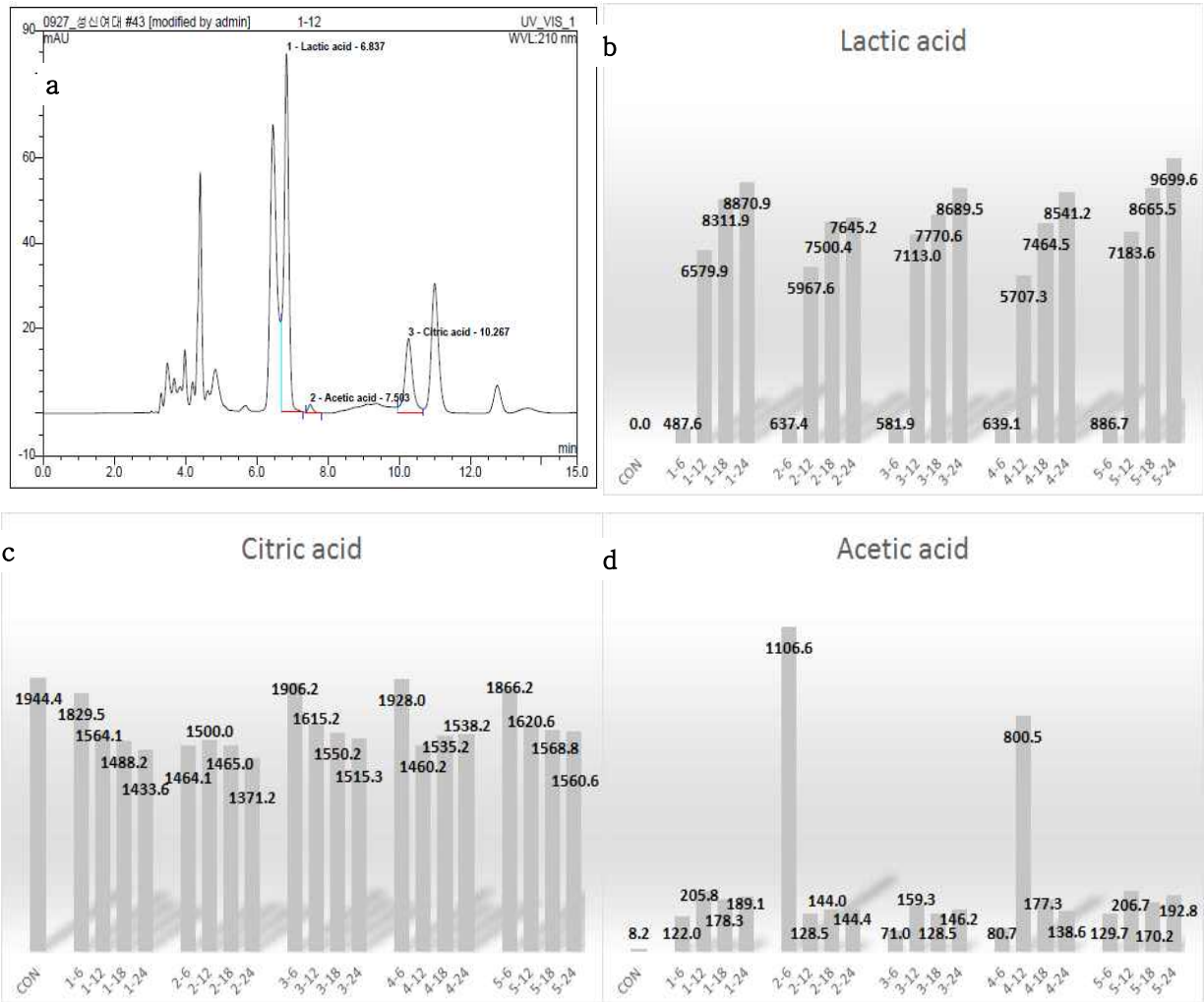


Figure 19. The contents (mg/L) of organic acids in *Tarak* fermented for 24h at 37°C.

크로마토그램에서 (Fig. 19 a) 보듯이 모든 샘플들에서 lactic acid, acetic acid, citric acid가 검출되었음. 이 크로마토그램은 각 유기산의 검출을 보여주기 위한 대표 샘플 크로마토그램으로 선택되어진 것이며(시료 1번, 12시간 발효) 각 샘플마다 검출되어진 유기산의 함량에 따라 용리된 피크의 크기가 차이가 나며, 각 샘플의 유기산 함량에 영향을 미침. Lactic acid(Fig. 19 b)는 citric acid와 달리 대조군 (con) 샘플에서는 0 mg/L 함량을 보이다가 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 모든 균종 샘플에서 발효 12시간에 급격한 증가를 보였음. 균종에 따라서는 샘플 2번인 비교적 낮은 lactic acid 함량을, 샘플 5번이 모든 발효 시간에서 가장 많은 lactic acid를 형성하였음. Citric acid는 (Fig. 19 c) 대조군 (con) 샘플이 가장 높은 수치를 보이다 (1944.4 mg/L), 발효가 진행됨에 따라 감소하는 경향을 보였음. 샘플 2번이 모든 발효 시간에서 다른 샘플들에 비해 가장 낮은 citric acid 함량을 보였음. 대조군 (con) 의 acetic acid는 (Fig. 19 d) (8.2mg/L)에 비해 발효 샘플들은 증가된 acetic acid (Fig. 19 d) 함량을 보였으나 발효 시간이나 균종에 따른 특이 변화와 차이는 없었음.

- 균종과 발효 시간에 따른 유기당의 변화

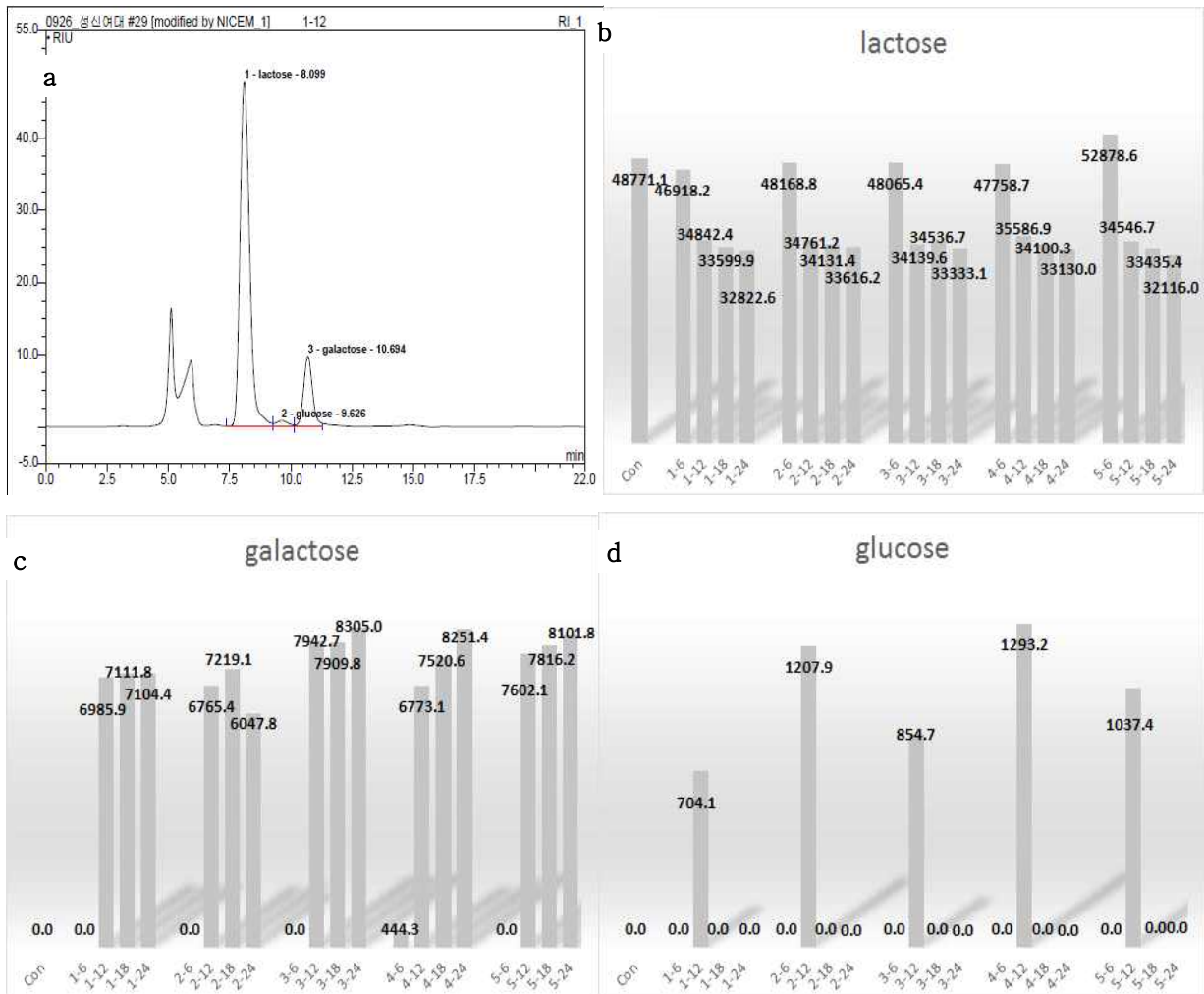


Figure 20. The contents of monosaccharides and disaccharides of *Tarak* fermented for 24h at 37°C.

대표 샘플 크로마토그램에서 (Fig. 20 a, 샘플 1번, 12시간 발효) 보듯이 검출되어진 당은 이당류인 lactose와 단당류인 glucose, galactose이었음. Lactose는 모든 샘플에서 검출되었지만, galactose 와 glucose는 샘플들에 따라 선택적으로 검출되어졌음. Lactose는 (Fig. 20 b) 발효가 진행됨에 따라 대조군(con, 48771.1mg/L)에 비해 감소하는 경향을 보이고 발효 24시간에 샘플 5번이 가장 낮은 lactose 함량인 32116.0 mg/L를 보였음. Galactose는 (Fig. 20 c) 대조군인 con과 발효 6시간에는 샘플 4번을 제외하고는 검출되지 않았지만, 발효 12시간 이후부터 검출되어 발효가 진행됨에 따라 전반적으로 증가하는 경향을 보였음. 샘플 1과 2번은 다른 샘플들에 비해 낮은 galactose 함량을 보였고, 샘플 3번은 가장 높은 galactose 함량을 보였음. Glucose는 (Fig. 20 d) 모든 균종으로 만들어진 샘플에서 발효 12시간 샘플에서만 검출되었고 샘플 1번이 가장 낮은 glucose 함량인 704.1mg/L, 샘플 4번이 가장 높은 glucose 함량인 1293 mg/L를 보였음.

- 균종에 따른 타락의 무기질 함량

Table 6. The contents of cation and anion minerals in *Tarak* fermented by different strains for 24h at 37°C.

	Na	NH ⁴	K	Mg	Ca	Cl	SO ⁴	NO ³	PO ⁴
	mg/g								
1	1.96	0.46	21.31	4.21	56.77	1.77	10.53	0.28	83.58
2	1.86	0.45	19.85	4.74	60.96	1.96	10.22	0.30	80.43
3	1.99	0.43	21.15	4.60	66.00	1.94	10.41	0.31	83.27
4	2.12	0.46	21.90	4.47	57.17	1.98	10.00	0.33	75.50
5	2.06	0.46	22.09	5.13	68.72	1.86	10.77	0.35	84.26

발효 24시간 시료를 동결 건조하여 균종에 따른 시료의 양이온 (Na, NH⁴, K, Ca, Mg)과 음이온 (Cl, SO⁴, NO³, PO⁴) 함량을 측정 비교하였음. 칼슘 (Ca)과 인산 (PO⁴)의 함량이 모든 샘플에서 가장 높았으며, 다음으로는 칼륨(K)과 황산 (SO⁴)이 많았음. 균종에 따른 샘플의 무기질 함량에서는 샘플 5번이 Na, Cl을 제외한 모든 무기질에서 가장 높은 함량을 보였음. 여러 유산균이 생성하는 다당체 (exo-polysaccharides, EPS)는 항암, 면역성 등 여러 생체 기능성을 가지고 있다고 연구 보고 되고 있음. EPS에 함유되어 있는 인산기(phosphate group)는 B-cell 의존형 림프구(lymphocyte) 분열을 촉진 하는 물질(mitogenic activity)로 추정되고 있으며, mitogenic activity는 인산기의 함량과 연관 있다고 보고되고 있음(Kitazawa et al 1998). 높은 인산을 함유하고 있는 타락에서 다당류를 추출하여 인산기의 결합유무에 대해서는 현재 실험 진행 중이나 그러한 결과가 나온다면 타락은 mitogenic activity를 비롯한 그 생체 기능적인 역할이 우수하다고 예상되어짐.

참고논문 : H.Kitazawa, T. Harata, J. Uemura, T. Saito, T. Kaneko, T. Itoh. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharides from *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bularicus*. *International Journal of Food Microbiology* 40 (1998) 169-175

- 균종에 따른 타락의 지방산 함량

Table 7. The contents of fatty acids in *Tarak* fermented by different strains for 24h at 37°C.

지방산	C14*	C14:1*	C16*	C18*	C18:1n9*
ug/mg					
1	0.33	0.24	0.93	0.62	0.49
2	0.52	0.25	1.35	0.85	0.91
3	0.35	0.22	0.69	0.48	0.39
4	0.38	0.22	0.72	0.47	0.36
5	0.29	0.20	0.59	0.39	0.33

* C14 (Myristic acid), C14:1 (Myristoleic acid), C16 (palmitic acid), C18 (Stearic acid), C18:1n9 (Oleic acid)

동결 건조한 발효 24시간 샘플의 균종에 따른 지방산 함량을 측정 비교하였음. 탄소 사슬이 긴 고급 지방산들이 검출되었으며, 포화지방산인 C14(Myristic acid), C16(palmitic acid), C18(Stearic acid)와 불포화 지방산인 C14:1(Myristoleic acid)와 C18:1n9(Oleic acid)가 검출되었음. 일반적으로 동물성 지질에 함유되어 있는 포화지방산 보다는 불포화지방산이 유익한 것으로 알려져 있는데 본 실험에서 얻어진 타락에는 약 30%의 불포화지방산이 함유되어 있었음.

- 타락의 미세구조

세포벽의 일부로 발효 중 미생물에 의해 생성 축적된 점질물로서 알려진 다당체는(exo- polysaccharides, EPS) 발효유 내에 점도를 증가시키고, 유청분리 현상을 완화시켜주는 기능 외에 항암, 항궤양, 면역 증강 작용 및 인체 건강을 돕는 기능성이 있다고 보고되고 있음 (Ruas-madiedo et al. 2002, Zhang et al. 2013). 24시간 발효 타락을 냉동건조 시켜 주사현미경으로 촬영한 결과 대조군 샘플과 달리 막걸리에서 분리한 *L. paracasei*를 이용하여 제조한 타락에서는 타락 표면 구조에 유산균으로부터 생성된 점질물질인 다당체로 여겨지는 거미줄처럼 표면에 실처럼 엉겨 붙은 물질이 촬영되었음. 따라서 *L. paracasei* 로 생성된 타락은 유산균의 일반 기능 외에, 유산균에 의해 형성된 다당체에 의한 면역증강을 비롯한 활성 기능 인자를 함유한 제품이 될 것으로 생각됨.

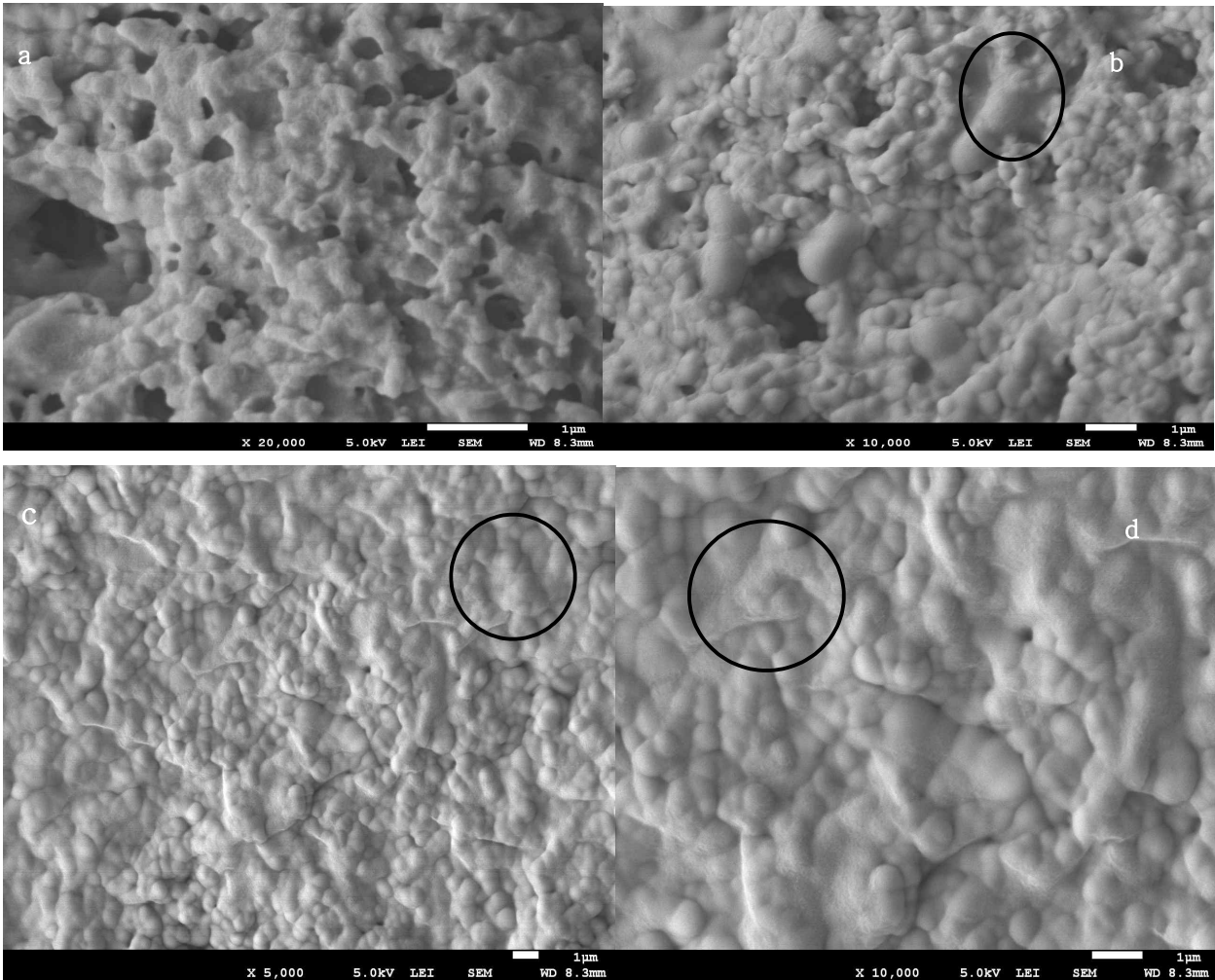


Figure 21. Scanning Electron Microscope images of *Tarak* fermented for 24h at 37°C.

a: con (20,000배) b: 4-24 (10,000배), 샘플 4번 24시간 발효
 c: 5-24 (5,000배), 샘플 5번 24시간 발효 d: 5-24 (10,000 배), 샘플 5번 24시간 발효

참고논문: L.Zahang, C. Liu, D. Li, Y. Zhao, X. Zhang, X. Zeng, Z. Yang, S. Li. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013(54) 270-275
 P. Ruas-Madiedo, J., Huttenholtz, P., Zoon. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 2002 (12) 163-171

- 다당류 수율 및 분자량

Table 8. Yiled of polysaccharides obtained from *Tarak* fermented for 24h.

Sample	1	2	3	4	5
Yield (%)	0.41	0.41	0.48	0.35	0.41

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{동결건조한 다당류 (g)}}{\text{타락 샘플}} \times 100 \text{ (식 1)}$$

24시간 발효 타락 샘플에서 얻어진 다당류의 수율 계산은 위의 식 1과 같고, 얻어진 수율은 0.35 ~ 0.48 % 범위를 보였음.

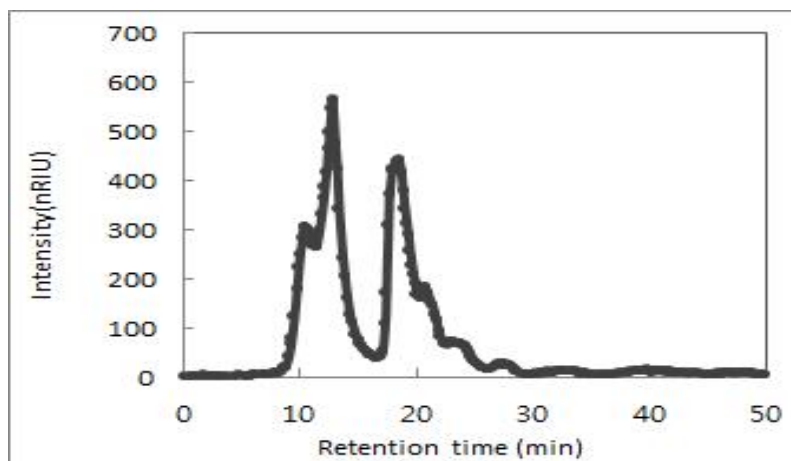


Figure 22. Elution profile of Molecular weight in sample #1 Tarak

Table 9. Molecular weight (Mw) of polysaccharides obtained from *Tarak* fermented for 24h.

Sample	Retention Time (min)	1	2	3	4	5
Mw (Da)	10.2~10.7	4.7×10^5	6.4×10^5	4.3×10^5	3.9×10^5	4.8×10^5
	12.7~13.0	5.2×10^4	5.6×10^4	5.2×10^4	4.2×10^4	5.0×10^4

Fig. 22의 크로마토그램은 샘플 1번의 profile로 대표 크로마토그램을 나타냄. 모든 타락 샘플은 Fig. 22에서 보듯이 2개의 peak를 보이며 용리하였고, 각 샘플의 각 peak에서 측정된 분자량은 Table 9에 표시하였음. 현재 분자량 외에도, 다당류 내에 있는 단당류, 이당류, 무기질, 아미노산 함량 측정이 진행되고 있음.

나. 연구결과 요약 및 결론

- 막걸리에서 추출한 5종의 다른 *L. paracasei*를 이용해 24시간 37°C에서 타락을 발효하며, 타락의 pH, 산도, 점도, 유기산, 유리당 함량, 지방산, 무기질 함량 및 미세구조를 측정하였음.
- 발효시간이 길어짐에 따라 타락의 pH는 감소하였으며, 특히 발효 12시간에는 pH가 급감, 우유의 등전점인 pH 4.6 부근으로 감소, 발효 12시간부터 커드를 형성하였음을 알 수 있었음.
- pH, 산도와 점도는 발효시간에 따라서는 현저하게 달라지나, 균종 간의 차이는 크지 않았음
- 생균수 역시 발효 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보이나, 24시간 후에는 균종 간의 차이가 없었음.
- 유기산 중 젖산 (lactic acid) 함량은 발효 12시간에 급증한 후 발효 시간에 따라 증가하는 경향을 보였음. 균종 간에는 균 5번 샘플이 다른 균종에 비해 높은 수치의 lactic acid를 형성하였음을 알 수 있었음. 발효시간과 함께 감소되는 lactose 함량에서도 M13-71-2로 발효한 샘플이 가장 낮은 lactose 함량을 보였음.
- 발효 24시간 샘플들을 동결 건조하여 균종간의 무기질과 지방산을 비교한 결과, 무기질은 샘플들 간에 큰 차이가 없었지만, M13-71-2로 발효한 샘플이 다른 샘플들에 비해 다소간 높은 미네랄 함량을 보였음. 지방산 결과에서는 약 30%의 불포화지방산을 함유하는 것으로 나타났음.
- 대조군 샘플과 발효 타락샘플의 미세구조를 전자현미경으로 관찰한 결과 발효 타락 샘플에서는 균의 몸체와 함께 균이 생성하는 다당체로 (exo-polysaccharides, EPS) 추정되는 점질물이 함께 발견되었음.
- *L. paracasei* 가 발효가 진행되는 동안 생체 기능성 물질로 알려진 다당체의 형성 가능성을 보여, 발효유 타락이 항암, 항궤양, 면역 증강 작용 등 인체 내에 bioactive agent로서의 충분한 역할을 할 수 있을 것이라 예상이 됨. 특히 M13-71-2는 다른 균종들에 비해 다당류를 더 많이 생성시킴을 알 수 있었음.

3. 타락 발효유의 영양성분 분석

가. 유기산

(1) 실험 방법 : HPLC는 Ultimate3000(Dionex, USA)를 사용하였음. 검출은 215 nm에서 분석하고 시료의 주입량은 10 uL이었음. 이동상은 A(20mM KH₂PO₄, pH2.8) / B(MeOH) gradient (0-10 A 100%, 10-15 A 80%, 15-16 A 10%, 16-21 A 10% 21-22 A 100% 22-27 A 100%)을 사용하였으며, 유속은 0.8 ml/min이었음. 컬럼은 C-18 column (250 X 4.6mm, 5u)을 사용하였으며, 사용온도는 30℃이었음.

(2) 실험 결과 : 3개의 타락 발효유 시료의 유기산 함량을 측정하였음(Table 10). 타락 발효유 시료는 막걸리 유래 균주 MKRL 5-8, M13-23-3, M13-71-2로 각각 발효시킨 것을 이용하였음. 세 가지 샘플 모두 Lactic acid, Citric acid, Acetic acid가 각각 82~89%, 8~9%, 1.5~2.5% 정도로 Lactic acid가 대부분이었음. 이것은 발효시키기 전의 대조군과 비슷한 함량 비율이었음. M13-71-2 시료의 Lactic acid 함량 측정에는 실험 오차가 있었던 것으로 생각됨.

Table 10. Organic acid content of Tarak

Organic acid (unit : mg/L)	Sample			
	control	MKRL 5-8	M13-23-3	M13-71-2
Acetic acid	300.05	151.08	174.36	13.34
Citric acid	948.51	1017.14	1007.07	1806.87
Lactic acid	10446.69	9661.40	10513.85	ND.*

* : N.D. = not detected

나. 유리당

(1) 실험 방법 : HPLC는 Dionex ultimate 3000(pump, autosampler, oven / Dionex, USA)를 사용하였으며 검출기는 Shodex RI-101(Shodex, Japan)을 사용하였음. 컬럼은 Aminex 87P column (300mm x 7.8mm / Bio-rad, USA)을 사용하였으며, 사용온도는 80℃이었음. 표준용액은 glucose, fructose, sucrose (Sigma)을 사용하여 분석하였으며 유속은 0.5 ml/min이었음.

(2) 실험 결과 : 3개의 타락 발효유 시료의 유리당 함량을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 11). 3개의 시료 모두 전체 유리당의 64% 정도가 sucrose, 그 다음 lactose가 6.4%, glucose가 30% 정도였음. 대조군과 유리당의 함량 차에 있어서는 sucrose와 lactose은 대조군과 거의 유사하고 glucose는 유산균으로 발효시킨 샘플이 약간 함량이 높아졌음.

Table 11. Free sugar content of Tarak

Free sugar (unit : mg/L)	Sample			
	control	MKRL 5-8	M13-23-3	M13-71-2
sucrose	110340.04	111125.40	110474.16	114771.67
glucose	10211.63	11075.24	10915.55	13615.01
lactose	51624.20	52589.62	52237.64	52913.85

다. 무기질

(1) 실험 방법 : 무기질의 검출은 Dionex ICS3000 (Dionex, USA)를 사용하였음. 이동상은 음이온이 0-8 min 14 mM KOH, 8-15 min 30 mM KOH, 15-25 min 30mM KOH, 양이온이 20 mM MSA(Methanesulfonic acid)으로 유속 1mL/min이었음. 컬럼은 Ionpac AS20 (4*250mm, Dionex, USA)을 사용하였으며, 컬럼은 사용온도는 30℃이었음.

(2) 실험 결과 : 3개의 타락 발효유 시료의 무기질 함량을 측정한 결과는 Table 12와 같음. 대조군의 미네랄 함량은 Ca, Cl, K, Mg, Na, NH₄, PO₄, SO₄가 각각 20%, 15%, 26%, 2%, 8%, 0.5%, 26%, 1% 정도였음. 이와 비교해 타락 발효유 시료의 미네랄 함량은 Mg, Na, PO₄는 함량이 거의 비슷하고 그 외의 무기질 함량에 있어서 대조군과 함량 차이를 보였음. Ca은 MKRL 5-8, M13-23-3로 발효한 시료는 각각 1133.53, 1161.85 mg/L으로 대조군과 비교해 약 5~7% 적었으며, M13-71-2로 발효한 시료는 약 40% 정도 적은 485.7 mg/L 였음. 한편 Cl은 M13-71-2로 발효한 시료가 1027.32 mg/L으로 대조군에 비해 다소 높게 함유한 것으로 나타났음. K은 MKRL5-8, M13-23-3으로 발효한 시료는 대조군과 비슷하였으나 M13-71-2로 발효한 시료는 1371.14 mg/L으로 다소 적게 함유한 것으로 나타났음. Mg의 경우도 M13-71-2로 발효한 시료는 대조군 대비 낮게 나타났음. NH₄의 경우는 3개의 시료 모두 대조군과 비교해 약 50% 이상은 적은 수치를 나타냈는데 특히 M13-23-3으로 발효한 시료는 약 73% 적은 7.97 mg/L을 나타냈음. 또한 PO₄은 역시 M13-71-2번 시료만 대조군의 약 77% 정도 함유한 것으로 나타났음. 전체적으로는 MKRL 5-8과 M13-23-3으로 발효한 시료는 대조군과 비교해 무기질 함량이 차이가 나지 않는 반면, M13-71-2로 발효한 시료는 대부분의 미네랄 함량이 낮아 졌음.

Table 12. Mineral content of Tarak

Mineral (unit : mg/L)	Sample			
	control	MKRL 5-8	M13-23-3	M13-71-2
Ca	1226.17	1133.53	1161.85	485.70
Cl	922.54	935.45	926.75	1027.32
K	1595.37	1559.38	1603.49	1371.14
Mg	126.97	118.44	122.97	66.92
Na	486.61	473.05	485.93	400.07
NH ₄	30.32	13.13	7.97	13.80
PO ₄	1614.84	1632.82	1652.34	1251.17
SO ₄	69.05	75.83	65.4	109.35

라. 아미노산

(1) 실험 방법 : HPLC Ultimate 3000 (Thermo Dionex, USA)을 사용하였음. 컬럼은 C18 column (4.6mm x 150mm, 5um)을 40℃에서 사용하였음. 이동상은 20 mM Sodium phosphate monobasic, pH 7.8, 3DW / Acetonitrile / Methanol(10 : 45 : 45 v/v%)을 사용하여 시료는 온도 20℃으로 0.5 uL 주입하여 338 nm에서 검출하였음. 표준품은 1 nmol/uL Amino acids 17종을 0.1N-HCL에 용해하여 사용하였음.

(2) 실험 결과 : 3개의 타락 발효유 시료의 유리 아미노산의 함량을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 13, 14). 전체적으로 대조군 및 3개의 타락 발효유의 아미노산 함량은 비필수 아미노산이 약 84.4~86.7%, 필수 아미노산이 13.3~16.7%였음.

대조군의 필수아미노산 Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, Valine의 함량은 각각 5.9%, 9.6%, 27.8%, 1.3%, 0.3%, 23.9%, 4.3%, 26.9%로 Leucine, Phenylalanine, Valine의 함량이 많았음. 그러나 MKRL 5-8과 M13-23-3는 Leucine(26~28%), Valine(23~24%), Histidine(21~24%)순으로 그 함량이 높아 Histidine의 경우에는 대조군 4.84(mg/L)보다 5-8, 23-2가 각각 21.41, 23.49(mg/L)로 높게 측정되었음. 그러나 M13-71-2의 시료는 Lysine이 필수아미노산의 38.6%를 차지했고, 그 다음으로는 Valine이 24.5%로 그 함량이 높았음. 필수아미노산의 경우 Isoleucine, Leucine, Phenylalanine, Threonine, Valine이 대조군과 비교해 타락 발효유 시료에서 전반적으로 적은 함량을 나타내었고, Histidine, Lysine, Methionine은 시료 간의 차이는 있으나 대조군보다 대체로 높은 함량을 나타냈음.

Table 13. Essential amino acid content of Tarak

Essential amino acid (unit : mg/L)	sample			
	control	MKRL 5-8	M13-23-3	M13-71-2
Histidine	4.84	7.61	8.89	0.85
Isoleucine	7.93	2.39	1.96	1.08
Leucine	22.88	10.02	9.83	1.60
Lysine	1.05	1.53	2.21	6.29
Methionine	0.24	0.69	0.54	0.21
Phenylalanine	19.63	3.6	3.71	0.85
Threonine	3.57	1.6	1.67	1.43
Valine	22.12	8.1	9.04	4

비필수 아미노산의 경우에는 Glutamic acid가 대조군이 206.3 mg/L이고 타락 발효유 시료는 52.9~72.27 mg/mL로 낮게 나타났음. 시료들 간의 차이로는 Tyrosine이 MKRL5-8, M13-23-3 시료가 대조군의 53~56% 정도, M13-71-2 시료가 대조군의 6.7% 정도인 0.45 mg/L로 함유량의 차이가 큰 편이었음. 전체적으로는 비필수 아미노산군은 대조군과 비교해 타락 발효유 시료가 낮게 나타났음.

Table 14. Nonessential amino acid content of Tarak

Nonessential amino acid (unit : mg/L)	sample			
	control	MKRL 5-8	M13-23-3	M13-71-2
Alanine	42.55	8.04	9.19	6.79
Arginine	31.31	33.53	36.51	6.49
Aspartic acid	31.15	14.84	13.06	8.64
Asparagine	0.42	0.35	0.4	5.26
Glutamine	0.52	0.53	0.51	4.06
Glutamic acid	206.31	72.27	71.13	52.92
Glycine	18.89	4.09	5.11	7.83
Proline	68.8	53.42	64.46	11.04
Serine	2.33	0.84	1.4	2.92
Tyrosine	7.09	3.75	3.94	0.48

마. 지방산

(1) 실험 방법 : 동결건조 한 시료를 Methylation mixture(MeOH : Benzen : DMP : H₂SO₄ = 39 : 20 : 5 : 2)를 340 uL, heptane 200 uL를 넣어 흔든 후 80℃에서 2시간 추출 후 사온 냉각하여 형성된 두 층 중 상층액을 일정량 추출하고 GC Agilent 7890A(Agilent, USA)으로 컬럼 DB-Wax(Agilent, 30mm*0.25mm*0.25um)을 사용하여 검출기 FID(280℃, H₂ 35, Air 350, He 35ml/min) 50℃ 1min, 200℃ 25℃/min, 5min, 230℃ 3℃/min, 20min, -Injection : 1uL (split ratio 20)를 이용하여 측정하였음.

(2) 실험 결과 : 대조군 및 3개의 타락 발효유 시료의 지방산의 함량은 Table 15와 같음. 전체적으로 Palmitic acid(29~30%), Oleic acid(20~22%), Stearic acid(12~13%), Myristoleic acid(10~11%) 순으로 함량이 많았고 대조군과 비교해 타락 발효유 시료의 주요 지방산 함량은 같거나 비슷했음. 그 외 지방산은 타락 시료들이 대조군보다 그 함량이 50% 이상 낮았음.

포화지방산인 Arachidic acid, Capric acid, Lauric acid, Myristic acid, Palmitic acid, Stearic acid의 경우 타락 발효유 시료에서의 함량이 대조군 대비 20~47.2% 정도 적었음.

불포화지방산인 Linoleic acid, Linolenic acid, Oleic acid, Myristoleic acid, Palmitoleic acid은 타락 발효유 시료에서 대조군 대비 23.8~50% 정도 적게 나타났고 Oleic acid를 제외하고는 시료간의 함량 차이는 적었음.

Table 15. Fatty acid content of Tarak

Fatty acid (unit : mg/g)	Sample			
	control	5-8	23-2	71-3
Arachidic acid(C20:0)	0.05	0.02	0.02	0.01
Capric acid (C10:0)	0.36	0.17	0.16	0.12
Lauric acid (C12:0)	0.66	0.28	0.27	0.19
Linoleic acid (C 18:2ω6 cis and trans)	0.52	0.25	0.22	0.21
Linolenic acid(C18:3ω3)	0.04	0.02	0.02	0.01
Myristic acid(C14:0)	1.87	0.75	0.71	0.5
Myristoleic acid(C14:1)	0.13	0.05	0.05	0.04
Oleic acid (C18:1ω9 cis and trans)	3.95	1.44	1.34	0.97
Palmitic acid(C16:0)	5.25	2.05	1.94	1.39
Palmitoleic acid(C16:1)	0.21	0.09	0.08	0.05
Stearic acid(C18:0)	2.43	0.87	0.82	0.58

4. 타락발효유 시제품의 기호도 분석

가. 타락 발효유의 소비자 검사

관능검사는 요구르트를 좋아하고 소비자 검사에 참여할 시간적 여유 및 의사가 있는 소비자 102명을 대상으로 수행하였음. 소비자 검사는 한국식품연구원 내 관능검사실 개별 booth에서 수행하였으며, 소비자들은 컴퓨터시설이 완비된 개별 booth에서 시료를 맛보고 각 항목에 대한 평가 결과를 직접 입력하였음.

냉장(0°C)보관된 타락 발효유 시료는 검사 5분 전에 30 ml 용량의 투명한 컵에 약 15 ml 씩 담아 watch-glass(지름 6 cm)로 덮어 소비자들에게 제공하였음. 이때 시료의 온도는 $2\pm 1^{\circ}\text{C}$ 였음. 검사물에 대한 편견을 없애기 위해 무작위 세 자리 숫자로 표기(김 등, 1993)된 시료를 한 번에 한 시료씩 제시하였음. 시료의 제시순서는 무작위로 하여 대조효과에 의한 오차를 최소화하였음. 소비자들은 시료를 맛보기 전, 그리고 다음 시료를 맛보기전 제시된 정수로 입가심하도록 하였음.

소비자들은 향, 맛, mouth feel (입안에서 느껴지는 촉감) 및 전반적인 기호도를 9항목 기호척도(1=대단히 싫다, 9=대단히 좋다)에 의해 평가하였으며 이외, 막걸리향, 신향, 단향, 우유향, 단맛, 신맛, 우유맛, 점도(겉쪽한 정도), 후미(신맛), 입 안이 코팅된 정도를 7항목 척도(1=대단히 약함, 7=대단히 강함)에 의해 평가하였음.

각 분석 항목에서 시료 간 차이검증은 Statistical Analysis System(SAS, 2008)을 이용하여 분산분석을 하였으며, 시료 간 차이가 있는 특성의 경우 SNK (Student Newman Keul's) 다중비교를 수행하여 각 시료의 평균값을 비교하였음. 또한 평가된 3개의 타락 발효유 제품의 기호도 및 특성 결과를 요약하기 위해 Xlstat(Version 2014.1.09.)를 이용하여 주성분 분석(Principal component analysis, PCA)를 하였음.

- 본 실험에 사용된 3점의 타락 발효유의 소비자 기호도 평가 결과는 Table 16에 있음. 소비자들은 M13-23-3 시료의 맛과 전반적인 기호도가 가장 높다고 하였으며 MKRL 5-8시료는 가장 낮게 평가하였음.
- 본 실험에 사용된 타락 발효유에 대한 소비자들에 의해 평가한 특성강도는 Table 17에 있음. 세 시료는 단맛, 신맛, 우유 맛, 후미(신맛)에서 차이가 있었음. 소비자들은 시료 M13-23-3의 단맛, 우유 맛을 높게 평가하였으며 신맛과 후미(신맛)은 가장 낮게 평가하였음. 시료 5-8는 신맛과 후미(신맛)는 높았으나, 단맛, 우유 맛은 낮다고 하였음.
- 타락 발효유의 소비자 기호도와 소비자 특성강도 간 상관관계는 Table 18에 있음. 전반적인 기호도는 우유맛($r=1.000$), 단맛($r=0.922$), 우유향($r=0.827$)과 높은 (+) 상관관계가 있었으며, 후미(신맛)($r=-1.000$), 신맛($r=-0.985$)과 신향($r=-0.961$)과 높은 (-) 상관관계가 있었음. 이 결과는 Harper 등(1991)이 발표한 소비자들은 신맛이 약하고 단맛과 우유 향미가 좋은 요르트 제품을 좋아한다는 연구결과를 확인하고 있음.

Table 16. 타락 발효유의 소비자 기호도¹

시료 code	향의 기호도	맛의 기호도**	mouth feel 의 기호도	전반적인 기호도*
MKRL5-8	4.52	5.04 ^b	5.98	5.17 ^b
M13-23-3	4.97	5.86 ^a	5.94	5.86 ^a
M13-71-2	4.88	5.60 ^a	5.84	5.47 ^{ab}

¹ : 소비자 102명 평가의 평균 값 : 1=대단히 낮음, 9=대단히 높음.

^{ab} : column내에서 같은 alphabet은 같은 수준임.

** : 시료 간 p=0.05, 0.01 수준에서 유의적인 차이가 있음.

Table 17. 타락 발효유의 관능적 특성강도¹

시료 #	향				맛			텍스처	후미	
	막걸리향	신향	단향	우유향	단맛**	신맛**	우유맛*	점도	후미*** (신맛)	입안이 코팅된 정도
5-8	4.26	4.13	4.00	3.65	4.75 ^b	4.74 ^a	3.88 ^b	3.93	4.85 ^a	4.32
23-3	4.22	3.70	4.17	3.90	5.24 ^a	4.05 ^b	4.38 ^a	3.90	3.90 ^c	4.31
71-2	4.17	4.05	3.90	3.90	4.77 ^b	4.33 ^b	4.11 ^{ab}	3.83	4.42 ^b	4.02

¹ : 소비자 102명 평가의 평균 값 : 1=대단히 낮음, 7=대단히 높음.

^{ab} : column내에서 같은 alphabet은 같은 수준임.

***, ** : 시료간 p=0.05, 0.01 및 0.001 수준에서 유의적인 차이가 있음.

Table 18. 요구르트의 소비자 기호도와 소비자 특성강도 간 상관관계

	향의 기호도	맛의 기호도	mouth feel 의 기호도	전반적인 기호도
막걸리향	-0.759	-0.665	0.971	-0.435
신향	-0.771	-0.850	-0.071	-0.961
단향	0.328	0.452	0.579	0.678
우유향	0.983	0.949	-0.721	0.827
단맛	0.691	0.782	0.188	0.922
신맛	-0.972	-0.995	0.371	-0.985
우유맛	0.923	0.966	-0.223	1.000
점도	-0.593	-0.479	1.000	-0.222
후미(신맛)	-0.924	-0.967	0.226	-1.000
입안 코팅된 정도	-0.358	-0.230	0.968	0.045

5. 전통타락 발효균총 분석

가. 전통 방식으로 만든 타락의 발효과정에 따른 미생물 군집분석

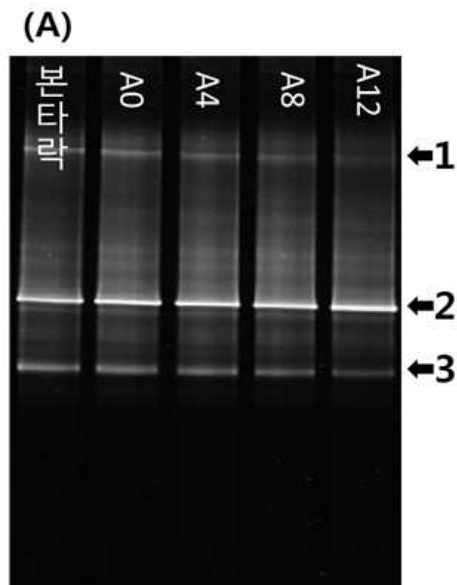
한국의 전통 우유 발효식품인 타락의 발효과정에 따른 미생물 군집 변화를 분석하여 타락 발효에 주요한 역할을 하는 균주를 규명하고자 하였음. 본 연구를 위해 우유에 본 타락, 안동 막걸리, 주모를 넣어 발효시킨 후 세균 군집 변화를 DGGE (denatured gradient gel electrophoresis) 기법을 이용하여 분석하였고 계통수 분석 프로그램을 이용한 계통수 작성하여 주요 타락 발효 미생물의 계통학적 특성을 분석하였음.

① 타락 시료로부터 genomic DNA 추출 및 16S rRNA 유전자 증폭

본 타락, 안동막걸리 그리고 주모를 이용하여 제작한 타락의 시간대별 시료로부터 gDNA 추출하고, 세균의 universal 프라이머인 340F와 758R primer를 이용하여 16S rRNA를 증폭하였음.

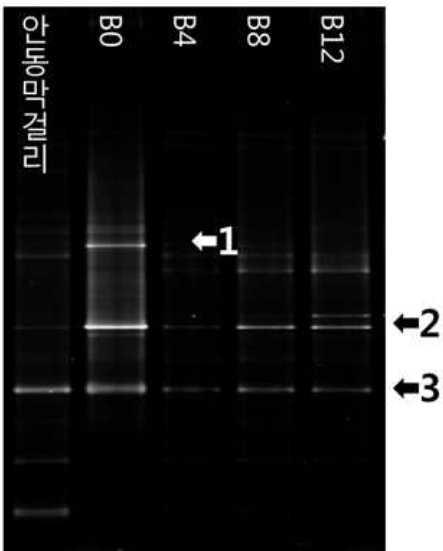
② 타락발효에 따른 세균의 군집분석

16S rRNA를 증폭한 샘플을 이용하여 미생물 군집 변화를 분석하기 위해 DGGE를 수행하였음 (Figure 23).

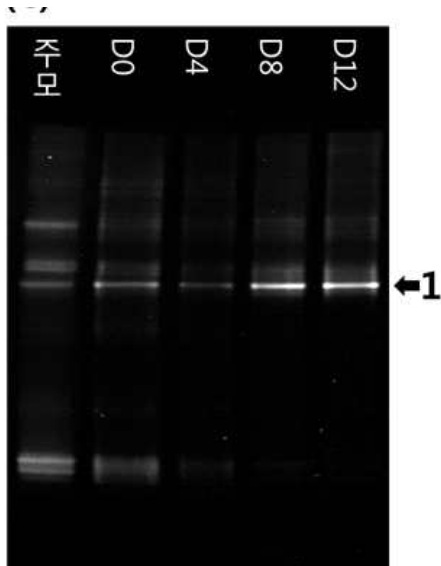


Band No.	length	closest type strain	similarity
1	463	<i>Pseudomonas congelans</i> DSM 14939(T)	99.14
2	463	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 25302(T)	99.57
3	463	<i>Serratia proteamaculans</i> DSM 4543(T)	99.35

(B)



Band No.	Length	Closest type strain	Similarity
1	438	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4(T)	99.54
2	460	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 25302(T)	100
3	463	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363(T)	99.14



Band No.	Length	Closest type strain	Similarity
1	464	<i>Lactobacillus graminis</i> DSM 20719(T)	98.71

Figure 23. 타락의 발효 시간에 따른 DGGE 분석 결과

본 타락을 넣은 본 타락 시료 (A), 안동 막걸리를 넣은 타락시료 (B), 주모를 넣은 타락시료 (C)의 DGGE 결과이며, 각 band에 번호를 부여하여 가장 높은 상동성을 보이는 균주를 아래 표에 나타내었음.

본 타락을 넣은 타락 시료의 경우 주요 band가 3개로 나타나는데 발효 시간의 흐름에 따라 1번과 3번 band는 점차 밝기가 열어지고 2번 band만이 밝아지는 양상을 보였음. 각 band를 추출하여 TA-cloning을 거쳐 해당 미생물의 부분적인 16S rRNA gene의 염기서열을 얻을 수 있었음. 그 결과 1번 band는 *Pseudomonas congelans*와 3번 band는 *Serratia proteamaculans*와 가장 높은 상동성을 보여줌을 확인하였음. 1번과 3번 band는 발효 시간의 흐름에 따라 사라지는 것을 통해 발효가 진행됨에 따라 점차 세균이 사라지는 것을 확인할 수 있었음. 반면 2번 band는 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*로 시간이 지남에 따라 band가 진해지는 것을 통해 타락이 발효하는데 주요한 역할을 하는 균주임을 알 수 있음.

안동 막걸리를 첨가한 타락 시료의 경우 DGGE 결과 band가 3개로 나타났음. 1번 band는 B0에서만 나타나는 것으로 *Clostridium saccharoperbutylaceticum*와 높은 상동성을 보여주었으며 DGGE 결과를 통해 발효과정을 통하여 점차로 사라졌음을 알 수 있음. 2번 band의 경우 발효시간이 흐를수록 band가 밝게 나타나 타락 발효에 있어 가장 주요한 역할을 하는 균주임을 확인하였음. 2번 band의 염기서열 분석 결과 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*와 가장 높은 상동성을 보여 주었음.

마지막으로 주모를 넣은 타락 시료는 한 개의 band가 발효시간이 흐름에 따라 점차 진해지는 양상을 보였음. 분석 결과 이 band는 *Lactobacillus graminis*와 가장 가까운 상동성을 보여 주어 *Lactobacillus graminis*가 주모를 넣은 타락이 발효될 수 있도록 하는 핵심 유산균 균주임을 알 수 있었음. 이와 같이 타락의 발효를 이끄는 균은 *Lactobacillus paracasei*가 주된 균이나 첨가되는 술의 종류에 따라 그 외의 유산균도 검출되어 타락은 다양한 균으로 제조될 수 있는 발효유이음 알 수 있었음.

③ DGGE를 통해 확인된 유산균의 계통학적 특성분석

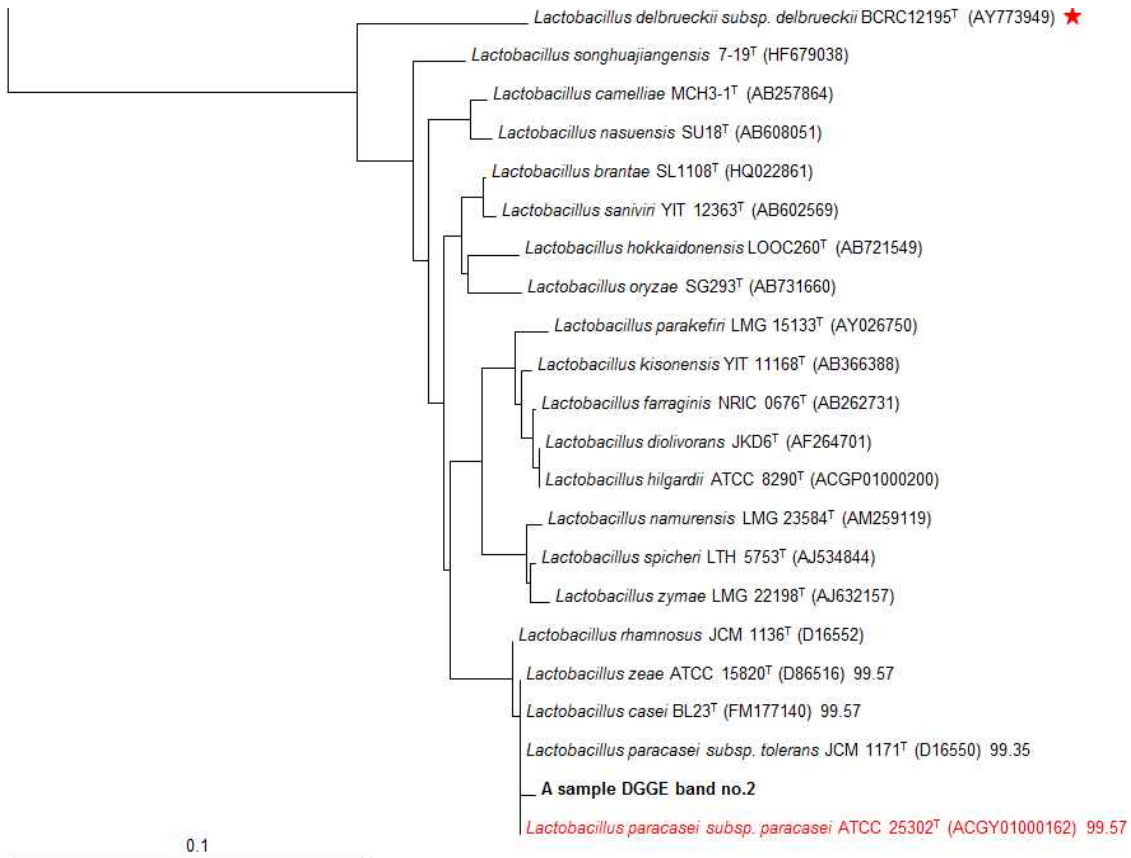


Figure 24. 본 타락 발효 타락시료의 계통학적 분석 결과

본 타락을 넣어 발효시킨 타락시료의 DGGE 결과 나타난 유산균의 neighbor-joining기법을 이용한 계통수로 가장 높은 상동성을 가진 균주를 붉은색으로 표시하였고 *Lactobacillus*를 대표하는 종을 별 표시하였음. out group은 *E.coli* (GenBank accession no., X80725)를 사용하였음.

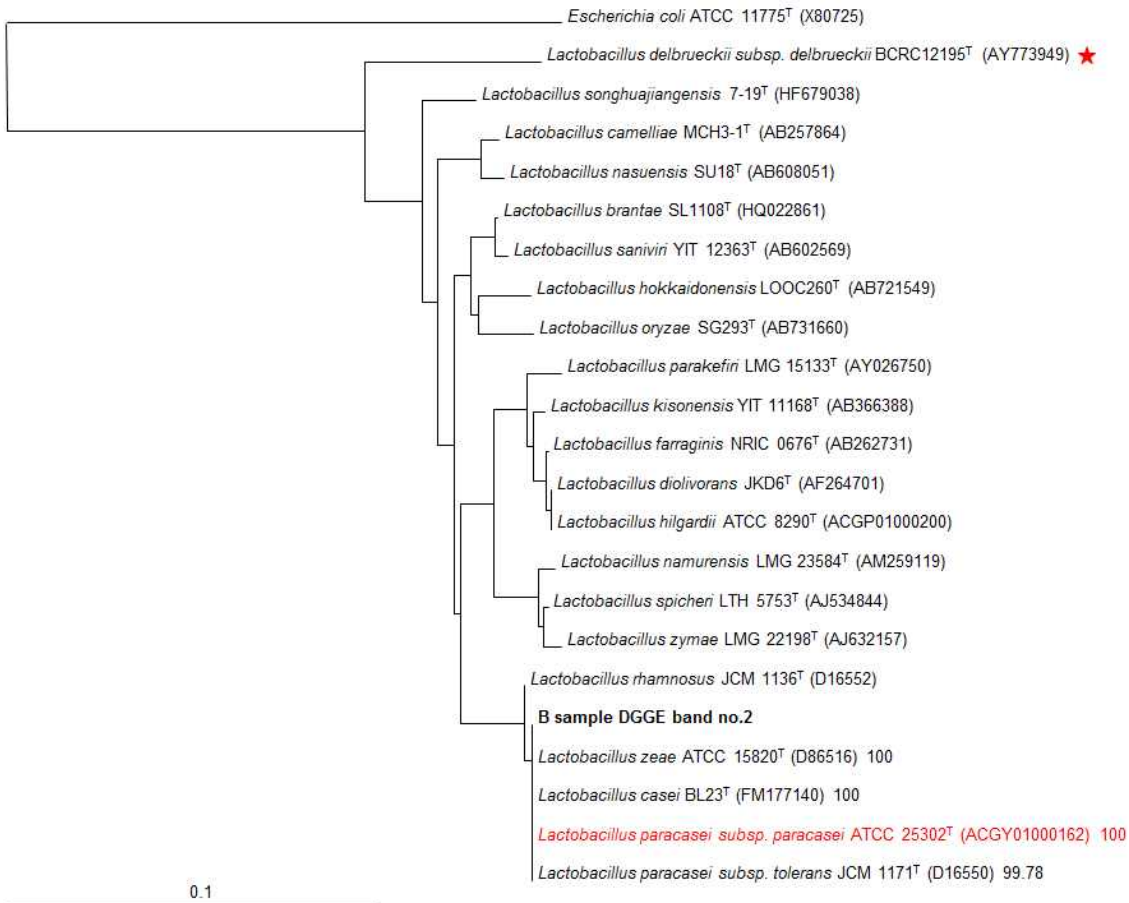


Figure 25. 안동 막걸리 발효 타락시료의 계통학적 분석 결과

안동 막걸리를 넣어 발효시킨 타락시료의 DGGE 결과 나타난 유산균의 neighbor-joining 기법을 이용한 계통수로 가장 높은 상동성을 가진 균주를 붉은색으로 표시하였고 *Lactobacillus*를 대표하는 종을 ★로 표시하였음. out group은 *E. coli* (GenBank accession no., X80725)를 사용하였음.

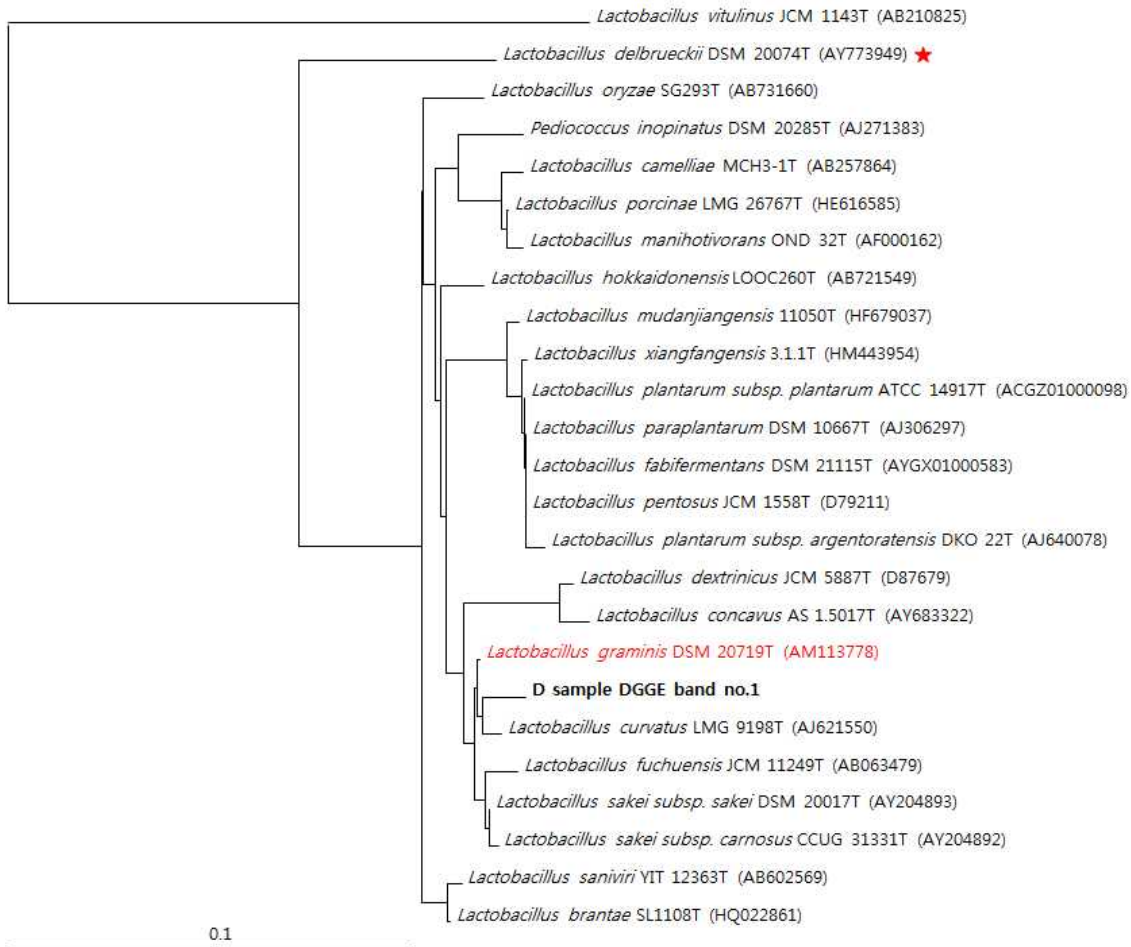


Figure 26. 주모 발효 타락시료의 계통학적 분석 결과

주모를 넣어 발효시킨 타락시료의 DGGE 결과 나타난 유산균의 neighbor-joining 기법을 이용한 계통수로 가장 높은 상동성을 가진 균주를 붉은색으로 표시하였고 *Lactobacillus*를 대표하는 종을 ★로 표시하였음. out group은 *Lactobacillus vitulinus* (GenBank accession no., AB210825)를 사용하였음.

④ $^1\text{H-NMR}$ (Proton - Nuclear magnetic resonance) 분석을 이용한 타락시료의 metabolite 확인

$^1\text{H-NMR}$ 을 이용한 본타락 시료의 대사산물(metabolite)을 분석하였고 그 결과는 Figure 27에 나타내었음.

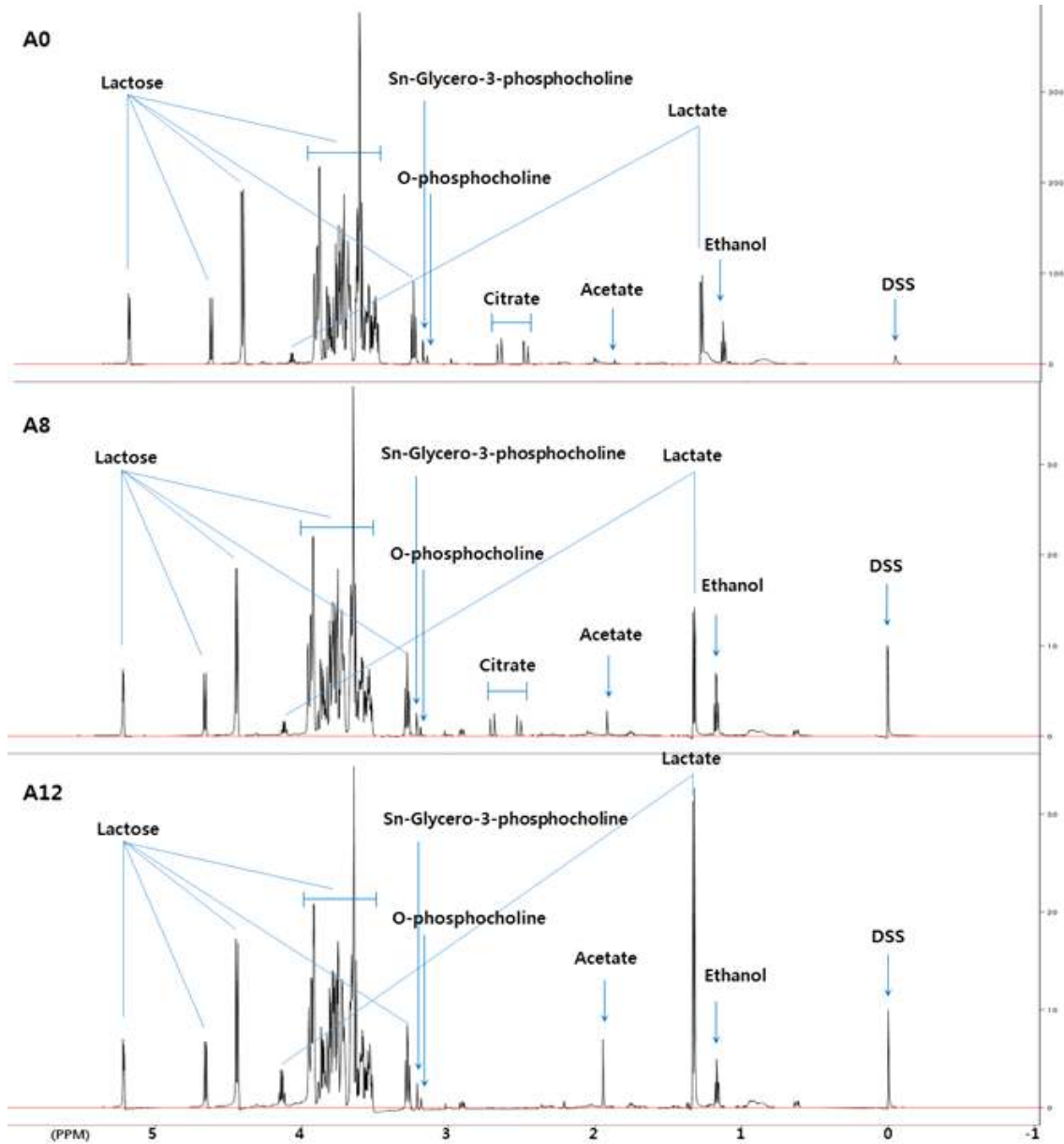


Figure 27. 본타락 시료의 대사산물 분석 결과

$^1\text{H-NMR}$ 분석을 이용하여 본타락 시료의 대사산물(metabolite)를 분석하였고 주요 산물의 peak를 규명하여 표시하였음. 발효산물 분석결과 타락 시료에는 초산(acetate), 시트르산(citrate), 에탄올(ethanol), 젖산(lactate), 유당(Lactose), *O*-Phosphocholine, Sn-Glycero-3-Phosphocholine의 7가지metabolite가 major 대사산물로 검출되었고, 그들의 농도를 Table 19

에 나타내었음.

Table 19. $^1\text{H-NMR}$ 분석을 이용한 본타락의 발효산물(metabolite) 농도

발효 시간(h)	Lactose	Acetate	Citrate	Ethanol	Lactate	O-Phosph ocholine	sn-Glycero- 3-phosphoch oline
0	1517.8	7.7	149	166.3	162.3	5.1	18.5
8	177	4.3	16.5	30	25.2	0.8	2.2
12	68.5	11.7	-	17.6	50.4	0.5	1.6

나. 배양학적 방법을 이용한 원재료 또는 제조방법이 다른 10개의 타락시료로부터 미생물의 균집 비교 분석

원재료와 제조 방법이 10 개의 다른 타락시료(경장주(원), 오정주(원), 술찌게(원), 끓인 것(부원), 데운 것(부원), 경장주, 오정주, 고리초, 안동막걸리, 우유)를 세 번 계대하여 시료를 한천배지(*Lactobacillus* 분리용 MRS, Difco)에 도말하였음. 그 결과 나타난 집락(colony)을 각 시료에서 12개씩 선정하여 (GTG)₅-PCR 기법을 이용하여 동일종의 수를 규명하고 동일한 종의 대표되는 균주의 16S rRNA의 유전자 염기서열 분석과 EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/>) 프로그램 분석을 통해 유사도가 가장 높은 균주를 확인하였고 분리한 미생물의 상대적인 존재 비율로 나타내었음.

① 10가지 타락시료로부터 세균 배양

서울우유 180ml에 50ml의 안동에서 공수한 원재료 (A 보관 경장주, B 보관 경장주, C 술찌게미, D : 끓인 우유에 송화주 첨가, E : 데운 우유 사용, F : 제조 경장주, G : 제조 오정주, H : 고리초 첨가, I : 안동 막걸리, J : 주모 첨가한 타락을 넣어 37°C에서 24시간 발효하였음.

제조방법과 원재료가 다른 10개의 타락 시료(표 2)를 세 번 계대한 시료로부터 세균의 균집을 분석하기 위하여 시료를 PBS (Phosphate Buffered Saline)를 이용하여 단계희석법(serial dilution method)을 통해 희석하였음. 희석된 타락시료는 유산균에 적합한 배지인 *Lactobacillus* 분리용 MRS한천배지에 각각 100 ul 씩 도말 하였고 30°C에서 배양하였음.

② (GTG)₅-PCR을 통한 배양된 콜로니 분석

도말한 한천배지로부터 12개의 콜로니를 선정하였고, 분리한 미생물의 중복성을 배제하기 위하여 (GTG)₅ - oligonucleotide로 제작된 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였음. PCR 방법은 한천배지에 자란 콜로니를 소량 채취하여 5% (w/v) Chelex-100 (Bio-Rad) 100 μl 가 들어있는 E-tube에 현탁시킨 후 100°C에서 10분간 가열하였음. 끓인 용액을 상온으로 식혀 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상등액 1.5 μl 를 PCR 반응의 template로 사용하였음. (GTG)₅ - PCR증폭은 먼저 94°C에서 5분간 가열 후 denaturation을 하기 위해 94°C에서 30초, primer annealing을 위해 45°C에서 1분, DNA strand 합성을 위해 65°C에서 8분 과정으로 30회 반복한

후 65°C에서 16분간 추가 반응을 실시하였음(PCR Master Mix의 구성: 10 X PCR 버퍼 2.5 μ l, 100 mM dNTPs 0.5 μ l, dDW: 18.4 μ l, 10 pmol PCR 프라이머 2 μ l, Taq polymerase, 0.1 μ l 및 주형 1.5 μ l). PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 그 분리 패턴을 비교분석 하였음.

10개의 서로 다른 타락시료(Table 20)로부터 배양한 미생물을 이용하여 수행한 (GTG)₅-PCR 결과를 Figure 28에 나타내었음.

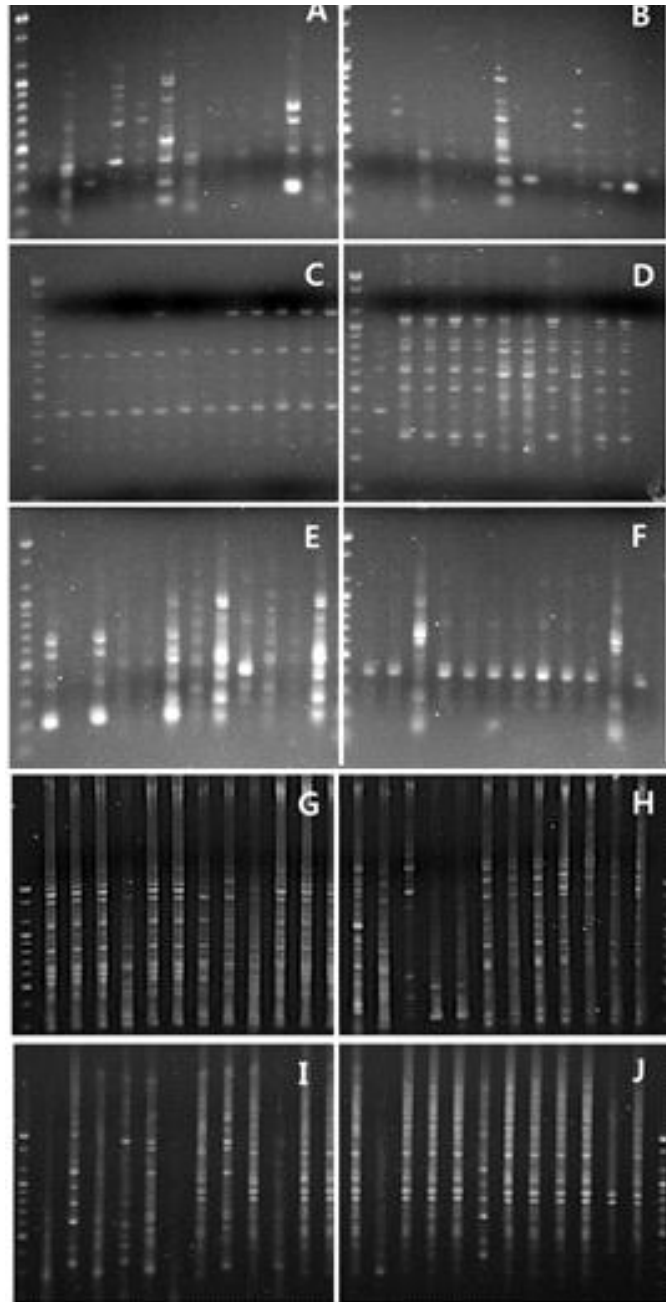


Figure 28. 10개의 타락시료로부터 분리한 콜로니의 (GTG)₅-PCR 결과

A : 경장주(원), B : 오정주(원), C : 술찌게(원), D : 끓인 것(부원), E : 데운 것(부원), F : 경장주, G : 오정주, H : 고리초, I : 안동막걸리, J : 우유

서로 다른 패턴을 가진 균주의 염기서열을 검색하여 유사도가 가장 높은 균주를 찾아 각 시료에 존재하는 미생물 종의 비율을 분석한 결과는 Table 20에 나타내었음. 각 시료는 다양한 유산균을 포함하고 있으며 우점하는 종은 서로 다르며 진한 글씨로 나타내었음. 오정주를 원재료로 하는 B(오정주(원)와 G(오정주) 타락시료의 경우, 대부분 효모로써 16S rRNA 유전자가 PCR 방법에 의해 증폭되지 않아 각각 8개와 6개의 콜로니만을 분석하였음.

Table 20. 10개의 타락 시료에서 분리한 미생물의 군집분석 결과

시료	Closest type strain	Similarity (%)	Relative abundance
A 경장주(원)	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36(T)	99.56	2/11
	<i>Enterococcus durans</i> CECT 411(T)	99.89	2/11
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM 1171(T)	100.00	1/11
	<i>Leuconostoc citreum</i> ATCC 49370(T)	99.68	1/11
	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	100.00	5/11
B 오정주(원)	<i>Enterococcus durans</i> CECT 411(T)	99.89	6/8
	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	100.00	2/8
C 슬째게(원)	<i>Leuconostoc citreum</i> ATCC 49370(T)	99.71	2/11
	<i>Weissella cibaria</i> KACC 11862(T)	99.70	1/11
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336(T)	99.46	1/11
	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> ATCC 7073(T)	100.00	1/11
	<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> KCTC 3535(T)	100.00	5/11
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604(T)	100.00	1/11
D 끓인 것(부원)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO604(T)	100.00	10/12
	<i>Leuconostoc citreum</i> ATCC 49370(T)	100.00	2/12
E 데운 것(부원)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604(T)	100.00	12/12
F 경장주	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM 1171(T)	100.00	5/11
	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 3956(T)	99.59	6/11
G 오정주	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604(T)	100.00	3/6
	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 3956(T)	99.39	2/6
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336(T)	99.72	1/6
H 고리초	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 3956(T)	99.39	11/12
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO604(T)	100.00	1/12
I 안동막걸리	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 25302(T)	99.90	9/12
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM 1171(T)	100.00	3/12
J	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	99.90	1/11

우유	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM 1171(T)	100.00	8/11
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336(T)	99.71	1/11
	<i>Enterococcus durans</i> CECT 411(T)	99.90	1/11

③ 단일패턴 콜로니의 16S rRNA 유전자 증폭 및 염기서열 분석

위의 (GTG)₅-PCR 결과, 유일한 증폭패턴을 가지는 미생물만을 선택하여 16S rRNA 유전자의 증폭을 수행하였음. PCR 증폭은 16S rRNA 유전자의 universal primer 세트인 F1 (5'-AGA TTT GAT CMT GGC TCA G-3')과 R13 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하였으며, 반응조건은 먼저 94°C에서 5분간 가열 후 denaturation을 하기 위해 94°C에서 45초, primer annealing을 위해 60°C에서 45초, DNA strand 합성을 위해 72°C에서 1분 과정으로 32회 반복한 후 72°C에서 10분간 추가 반응을 실시하였음. 각각의 16S rRNA 유전자 증폭산물들은 전기영동을 통해 증폭 여부를 확인 한 후 PCR 정제키트(Bioneer)를 사용하여 정제를 수행하였고, F1프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였음. 각각 얻어진 16S rRNA 유전자의 염기서열들은 EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/>) 프로그램을 이용하여 검색하였으며, 분석된 단일 미생물군집과 비교하여 유사도가 가장 높은 표준균주를 찾았음. 위의 과정을 거쳐 10개 타락 시료에 존재하는 미생물 종의 비율을 분석하였음. 그렇게 분석된 16S rRNA 유전자의 염기서열을 바탕으로 상기에서 언급한 방법을 사용하여 분리 미생물의 계통학적 특성을 분석하였음.

10 개의 타락 시료를 (GTG)₅-PCR을 이용하여 동일 패턴을 같은 종으로 구분하여 염기서열 분석으로 유사도가 높은 균주를 찾았음. 그 결과 *Lactobacillus*와 *Lactococcus*가 가장 많은 비율을 차지하였음. *Lactobacillus*는 *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 가 분리되었고 *Lactococcus*는 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*가 세가지 시료에서 동일하게 분리되었음. 이들의 계통학적 특성을 아래와 같이 분석하였음(Figure 29, 30).

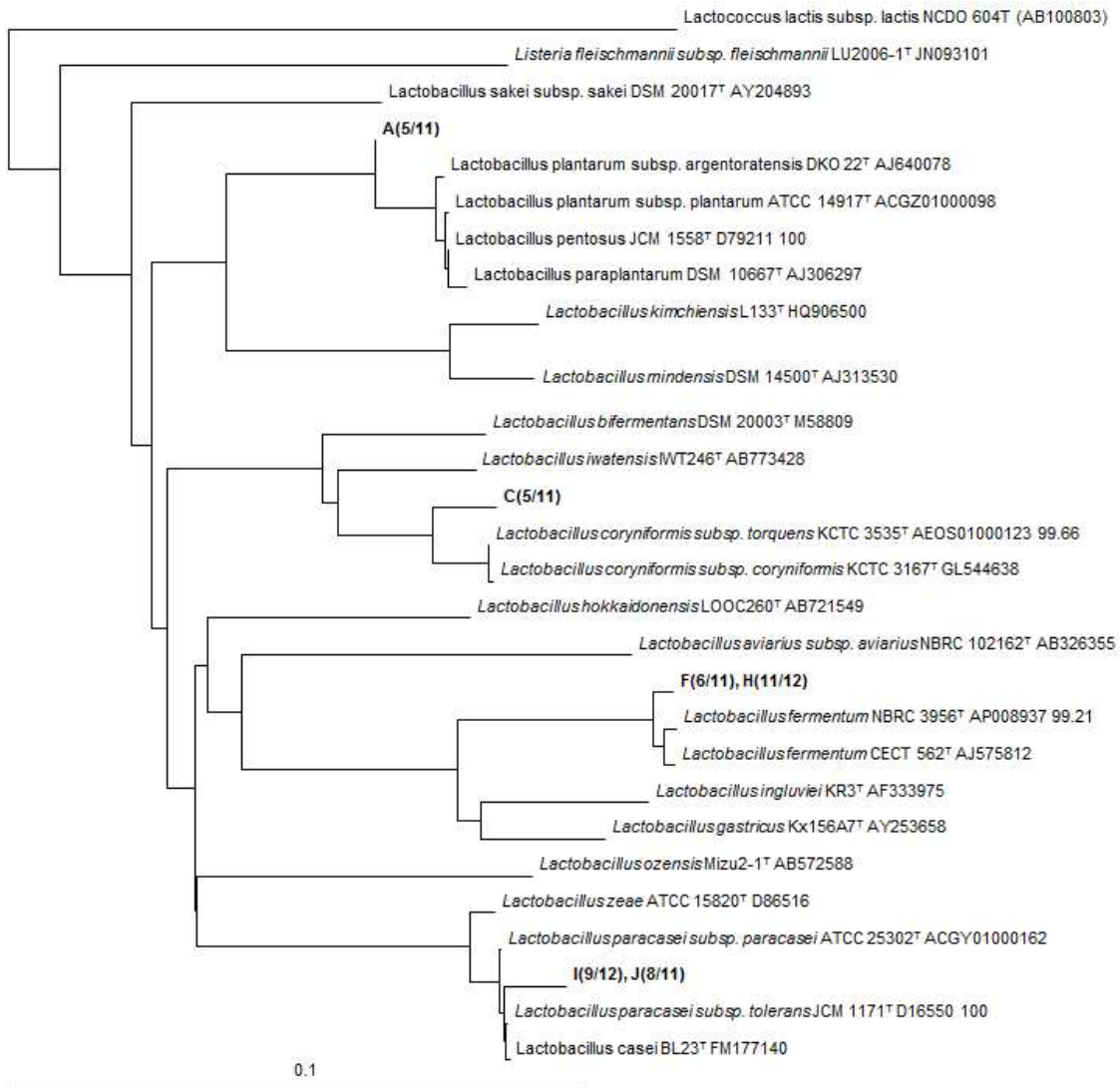


Figure 29. 확인된 유산균의 계통학적 분석 결과

10개의 타락 시료에서 주요한 *Lactobacillus*를 포함한 계통수로 알파벳은 시료의 종류를 나타내며 괄호안의 숫자는 분석된 비율을 말함.

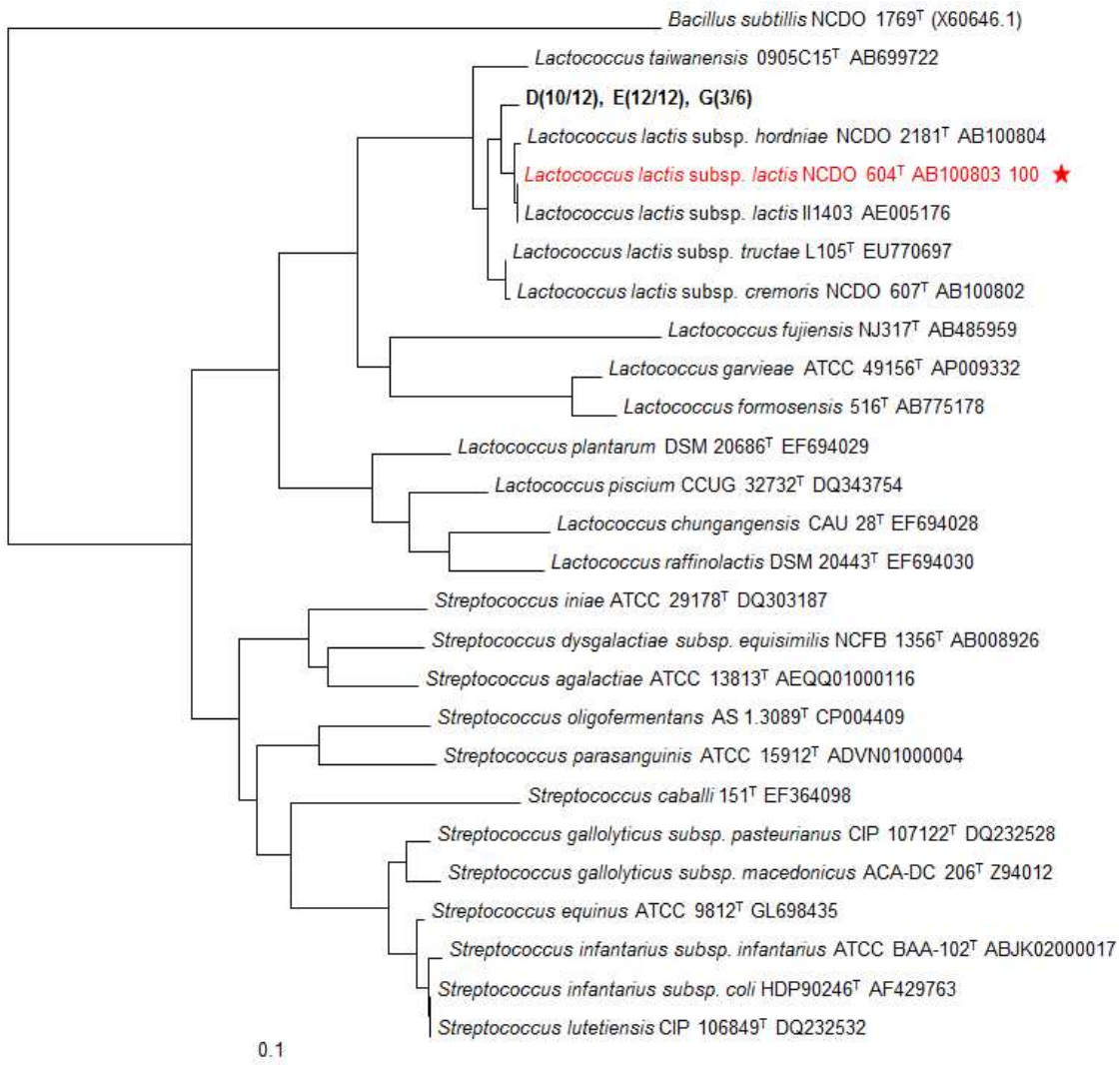


Figure 30. 확인된 유산균의 계통학적 분석 결과

10개의 타락 시료로부터 분리한 주요 미생물인 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*를 포함한 계통수로 알파벳은 시료의 종류를 나타내며 괄호안의 숫자는 분석된 비율을 말함. 붉은색은 가장 상동성이 높은 균주이며 대표 종은 ★로 표시하였음.

제 3 절. 타락의 기능성 분석방법 확립 및 in vitro 기능성 규명

1. 타락의 추출물 제조법 확립과 분획

가. 타락 추출물 분획을 위한 유기용매 선정

- 극성이 다른 유기용매 선정 : n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol

Table 1. 유기용매의 선정

종류	Density (g/mL)	Solubility in H ₂ O (g/100g)	H ₂ O에 대한 상대적인 극성
n-hexane	0.655	0.0014	0.009
ethyl acetate	0.894	8.7	0.228
chloroform	1.498	0.8	0.259
n-butanol	0.81	7.7	0.586
methanol	0.791	miscible	0.762

나. 타락 추출물 분획

(1) 실험방법

(가) 타락 동결건조 시료를 phosphate buffer에 용해시키고 유기용매를 순차적으로 혼합하여 분획 함.

(나) 타락 추출물 분획 순서

- ① 타락 추출물을 phosphate buffer (0.175 M, pH 6.8)에 용해시킴
- ② phosphate buffer와 동량의 n-hexane을 첨가하고 15분 간 교반
- ③ 분별플라스크에 교반액을 넣고 층 분리가 일어나면 n-hexane층 분리 후 진공농축, 건조
- ④ 분리된 phosphate buffer층에 동량의 chloroform을 첨가하고 15분 간 교반
- ⑤ 분별플라스크에 교반액을 넣고 층분리가 일어나면 chloroform층 분리 후 진공농축, 건조
- ⑥ 분리된 phosphate buffer층에 동량의 ethyl acetate를 첨가하고 15분 간 교반
- ⑦ 분별플라스크에 교반액을 넣고 층분리가 일어나면 ethyl acetate층분리 후 진공농축, 건조
- ⑧ 분리된 phosphate buffer층에 동량의 n-butanol을 첨가하고 15분 간 교반
- ⑨ 분별플라스크에 교반액을 넣고 층 분리가 일어나면 n-butanol층 분리 후 진공농축, 건조
- ⑩ phosphate buffer층을 회수하여 진공농축, 건조

(다) 타락 추출물 분획 후 각 분획의 회수율 측정

(2) 실험결과

- 타락 제조 후 동결건조하여 제조한 (제1세부) 추출물 시료 획득
- 제1세부 제조 타락추출물시료 : MKRL-5-8, M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2
- 타락 추출물 분획 : MKRL-5-8 시료

Table 2. 용매 별 타락 추출물 분획 비율

용매	분획 고형분(%)
n-hexane	1.9
chloroform	4.1
ethyl acetate	6.0
n-butanol	22.1
phosphate buffer	65.8

2. 면역 증진 기능성 분석 및 기능성 강화 조건 탐색

가. 면역세포 배양 및 증식도 측정

- 면역세포 선정 : MC116 cell (B lymphocyte), Jurkat clone E6-1 (T lymphocyte)
- 배지 : RPMI1640 배지 + 10% FBS +1% antibiotics(penicillin, streptomycin)
- 배양 조건 : 37°C, 5% CO₂
- 세포 증식도 측정을 위한 최적 세포 농도 확립
 - 면역세포 : MC116 cell (B lymphocyte), Jurkat clone E6-1 (T lymphocyte)
 - 세포 농도 별 96시간 배양 후 MTT 분석법으로 세포 증식도 측정
 - 세포 농도 (cell/well, 96 well plate) : 4×10^4 , 6×10^4 , 8×10^4 , 1×10^5

나. 타락 추출물의 면역세포 증식도 영향 측정

- 면역세포를 타락 추출물이 용해되어 있는 배지에서 96시간 배양 후 증식도를 MTT 분석법으로 측정하고 대조군과 비교함.

(1) 실험방법

- 면역세포 처리 조건
 - 면역세포 : MC116 cell (B lymphocyte), Jurkat clone E6-1 (T lymphocyte)
 - 세포 농도 : 1×10^5 cell/well (96 well plate)
 - 타락 추출물 농도 ($\mu\text{g/mL}$) : 10, 50, 100, 200, 500, 1000
- MTT 분석법
 - ① MC116 cell, Jurkat cell을 각각 1×10^5 cell/well (96 well plate, 100 $\mu\text{L/well}$) 농도로 분주
 - ② 각 농도의 타락 추출물을 첨가 (100 $\mu\text{L/well}$) 후 96 시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)
 - ③ 원심분리 (130 RCF, 4°C, 5 분) 후 배지 제거
 - ④ MTT solution (0.5 mg/mL in growth medium, 100 $\mu\text{L/well}$) 첨가 후 4 시간 동안 37°C에서 배양
 - ⑤ acid-isopropanol 첨가하여 MTT 염료 용해
 - ⑥ 590 nm에서 흡광도 측정

(2) 실험결과

(가) 면역 증진 기능성 분석

- MC116 cell, Jurkat cell의 세포농도 별 성장도 측정
- 면역세포 성장도 측정 조건 수립 : 1×10^5 cell/well (96 well plate), 96 시간 배양 후 MTT 분석법 이용하여 세포 성장도 측정
- 타락 추출물 시료 (MKRL-5-8, M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2)를 MC116 cell과 Jurkat cell 배양 (1×10^5 cell/well, 96 well plate) 배지에 첨가하여 96시간 배양 후 세포 증식도 측정함.

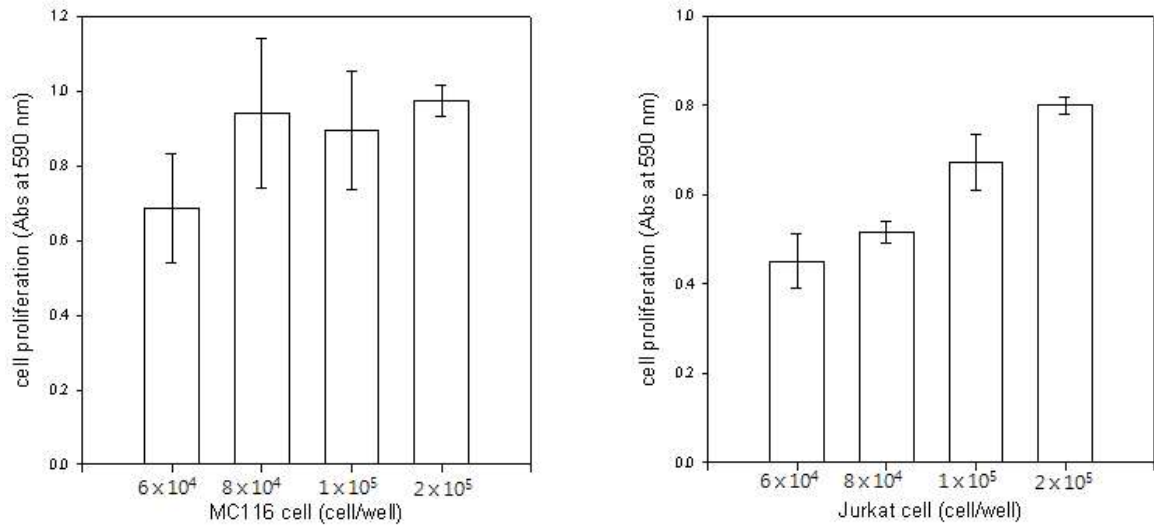


Figure 1. 세포 농도에 따른 MC116 cell과 Jurkat cell의 성장도

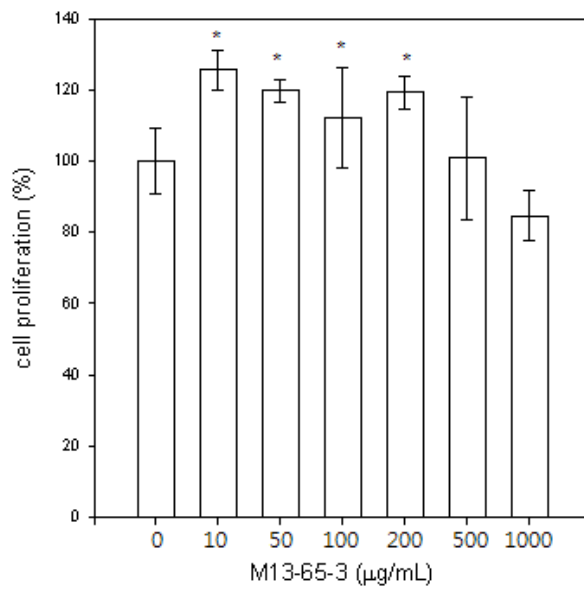


Figure 2. M13-65-3 시료의 Jurkat cell 성장도 영향

- M13-65-3 시료는 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL 농도에서 jurkat cell의 세포 증식도를 유의하게 증가시킴. ($p < 0.05$)
- MKRL-5-8, M13-23-3, M13-67-1, M13-71-2 시료는 시험 조건에서 MC116 cell, Jurkat cell의 성장도를 유의하게 증가시키지 못함.

(나) 면역 증진 기능성 강화 조건 탐색

- M13-65-3 균주를 이용하여 제조한 타락 추출물 시료는 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL 농도에서 Jurkat cell (T lymphocyte)의 성장도를 유의하게 증가시킴.

3. 타락의 멜라닌 생성 억제 기능 분석

가. 타락의 tyrosinase 역가 저해도 측정

- 멜라닌 생성과정에 관여하는 tyrosinase의 역가측정법을 수립하고 타락의 tyrosinase 저해도 측정
- tyrosinase 역가 측정 순서
 - ① 5 mM L-DOPA 0.2 mL에 타락 추출물 (100 µg/mL) 0.5 mL 첨가
 - ② mushroom tyrosinase (200 unit/mL) 0.1 mL 혼합 후 37°C, 10 분 간 반응
 - ③ 반응액 200 µL씩 96 well에 옮기고 490 nm에서 흡광도 측정
 - ④ tyrosinase 역가 저해도 계산

$$\text{Tyrosinase inhibition rate (\%)} = (1 - (S - B)/C) \times 100$$

S : 시험시료의 흡광도

B : 시험시료와 tyrosinase 대신 용매를 사용한 것의 흡광도

C : 대조군, 시험시료 대신 용매를 사용한 것의 흡광도

나. 멜라닌 생성 세포 배양 및 타락의 멜라닌 생성 억제능 측정

(1) 실험방법

- 멜라닌 생성 세포 선정 : B16 F10 cell
- 배지 : DMEM 배지 + 10% FBS +1% antibiotics(penicillin, streptomycin)
- 배양 조건 : 37°C, 5% CO₂
- 멜라닌 생성능 측정 순서
 - ① B16 F10 cell을 96 well plate에 24 시간 배양 (6×10⁴ cell/well, 100 µL/well, 37°C, 5% CO₂)
 - ② 배지를 제거하고 2 µM α-MSH (100 µL/well), 100 µg/mL 타락 추출물 시료 (100 µL/well) 처리 후 48 시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)
 - ③ plate를 원심분리 (130 RCF, 4°C, 5 분) 후 배지 제거
 - ④ 1 N NaOH (100 µL/well) 첨가하고 30 분 간 교반하여 멜라닌 용해
 - ⑤ 450 nm에서 흡광도 측정

(2) 실험결과

(가) 타락의 멜라닌 생성 억제 기능 분석

- 균주를 달리하여 제조한 타락 추출물 (100 µg/mL)의 tyrosinase 역가 저해능을 분석함. Tyrosinase 저해제인 arbutin을 대조구로 사용함(arbutin 100 µg/mL 농도 사용).
- MKRL-5-8, M13-23-3, M13-65-3, M13-67-1, M13-71-2 타락 시료는 100 µg/mL 농도에서 tyrosinase 역가의 약 20%를 저해함. Arbutin은 같은 온도에서 tyrosinase 역가의 약 29%를 저해함.

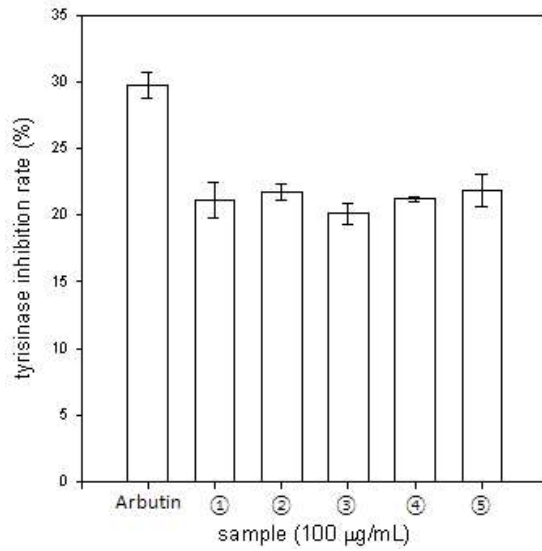


Figure 3. Tyrosinase 역가 저해에 대한 타락 추출물의 영향

①: MKRL-5-8, ②: M13-23-3, ③: M13-65-3, ④: M13-67-1, ⑤: M13-71-2

- 멜라닌 생성 세포인 B16 F10 cell에 멜라닌 생성을 촉진하는 α -MSH를 처리하고 타락 추출물 시료를 동시에 첨가하여 타락 추출물 시료의 멜라닌 생성 억제능을 측정함.
- MKRL-5-8 시료, M13-67-1 시료는 100 µg/mL 농도에서 α -MSH에 의하여 촉진된 B16 F10 cell의 멜라닌 생성을 유의적으로 억제함 ($p < 0.05$)

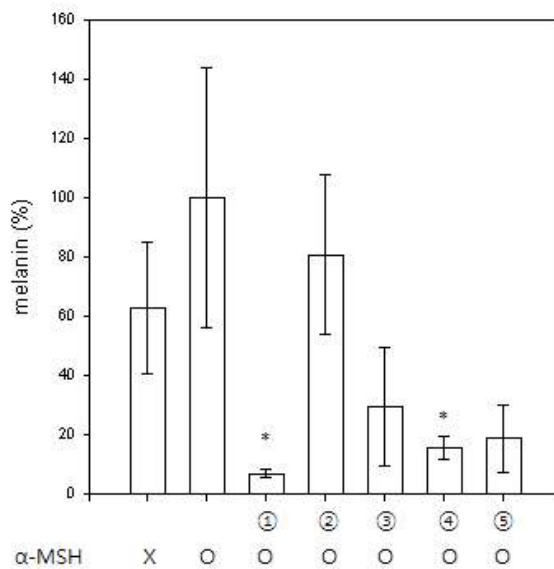


Figure 4. B16 F10 cell에서 멜라닌 생성에 대한 타락 추출물의 영향

①: MKRL-5-8, ②: M13-23-3, ③: M13-65-3, ④: M13-67-1, ⑤: M13-71-2

*'는 α -MSH 처리군과 유의적인 차이를 나타냄 ($p < 0.05$)

4. 항비만 기능성 규명

가. 타락 추출물의 지방전구세포 증식도 영향 측정

(1) 실험방법

- 배양액에 타락 추출물을 첨가하고 지방전구세포를 배양하여 타락 추출물이 지방전구세포의 증식에 미치는 영향을 측정함.
- 지방전구세포 선정 : 3T3-L1
- 배지 : DMEM 배지 + 10% FBS +1% antibiotics (penicillin, streptomycin)
- 배양 조건 : 37°C, 5% CO₂

- 세포 증식도 측정 조건 수립
 - 3T3-L1 세포를 1×10^5 cell/well (96well plate) 농도로 96 시간 배양
 - MTT 분석법으로 세포 증식도 측정

- 지방전구세포 타락 추출물 처리 조건
 - 3T3-L1 세포를 타락 추출물 첨가 상태로 1×10^5 cell/well (96well plate) 농도로 배양
 - 배양 조건 : 37°C, 5% CO₂, 96 h
 - 타락 추출물 : 5-8, 23-3, 71-2
 - 타락 추출물 농도 ($\mu\text{g/mL}$) : 0, 10, 20, 50, 70, 100
 - control : 우유 건조물

- MTT 분석
 - ① 세포 배양 후 원심분리 (130 RCF, 4°C, 5분)하여 배지 제거
 - ② MTT solution (0.5 mg/mL MTT in growth medium, 100 $\mu\text{L/well}$) 첨가 후 4 시간 동안 37°C 에서 배양
 - ③ acid-isopropanol 첨가로 MTT 용해
 - ④ 590 nm에서 흡광도 측정

(2) 실험결과

- 배양액에 타락 추출물을 첨가하여 지방전구세포를 96 시간 동안 배양하고 세포 증식도를 측정함.
- 타락 추출물 (5-8, 23-3, 71-2)은 10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 3T3-L1 세포의 증식을 촉진하므로 타락 추출물의 지방전구세포 증식 억제 기능을 확인 할 수 없음.

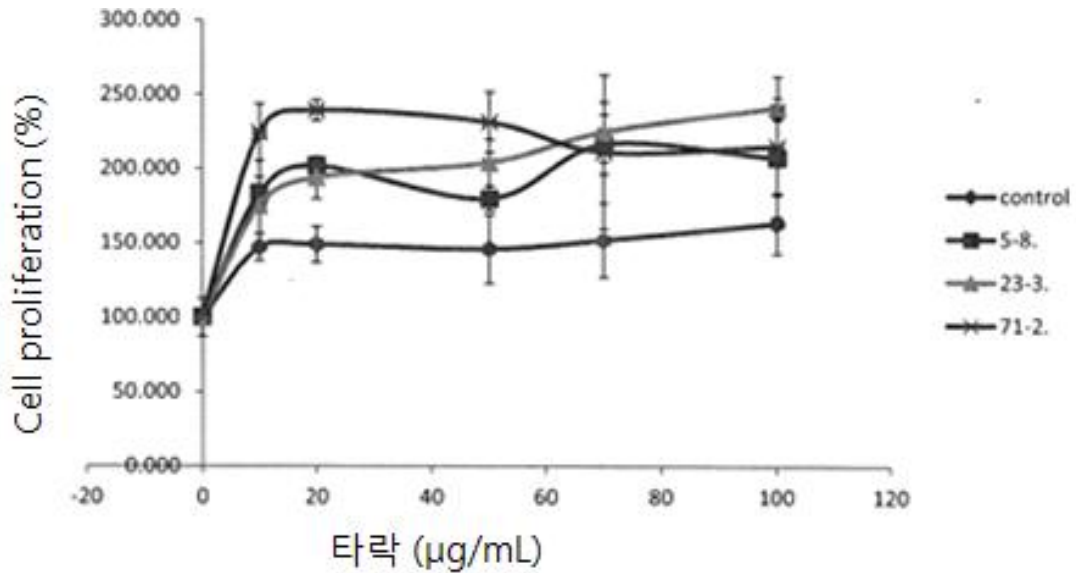


Figure 5. 지방 전구세포(3T3-L1) cell proliferation

나. 타락 추출물의 지방세포 지방생성도 영향 측정

(1) 실험방법

- 지방전구세포가 지방세포로 분화하고 지방을 세포에 축적하는 과정에 타락 추출물이 미치는 영향을 측정함.

- 세포 : 3T3-L1

- 배양 조건 : 37°C, 5% CO₂

- 3T3-L1 세포의 지방 생성 모델

- 타락 추출물 처리 조건

· 지방세포 분화 유도 단계부터 타락 추출물을 배지에 투여

· 타락 추출물 : 5-8, 23-3, 71-2

· 타락 추출물 농도 (µg/mL) : 0, 1, 5, 10, 20

· control : 우유 건조물

- Oil Red O 측정

① 배지 제거

② 세포 고정 (10% formaldehyde, 60 분) 후 PBS로 세포 세척

③ Oil Red O 용액 (3 mg/mL Oil Red O in 60% isopropanol)으로 세포 염색 (1 시간)

④ 세포 세척 후 isopropanol (200µL)로 지질 추출

⑤ 520 nm에서 흡광도 측정

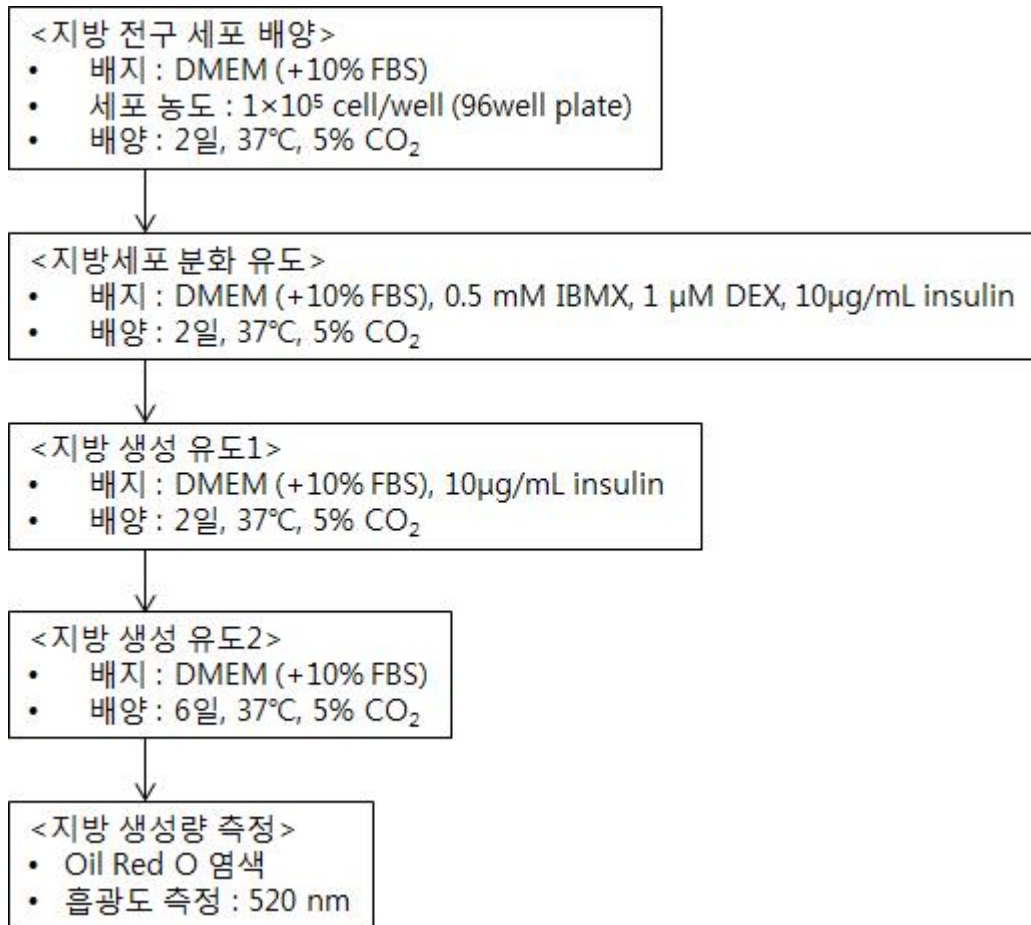


Figure 6. 3T3-L1 세포의 지방 생성 모델

(2) 실험결과

- 지방전구세포를 지방세포로 분화시키고 지방 축적을 유도하면서 타락 추출물을 배지에 첨가하여 타락 추출물의 지방생성도 영향을 Oil Red O 염색으로 측정함.
- 타락 추출물 (5-8, 71-2)은 5 ~ 20 μg/mL의 조건에서 지방세포의 지방생성을 유의하게 억제함.

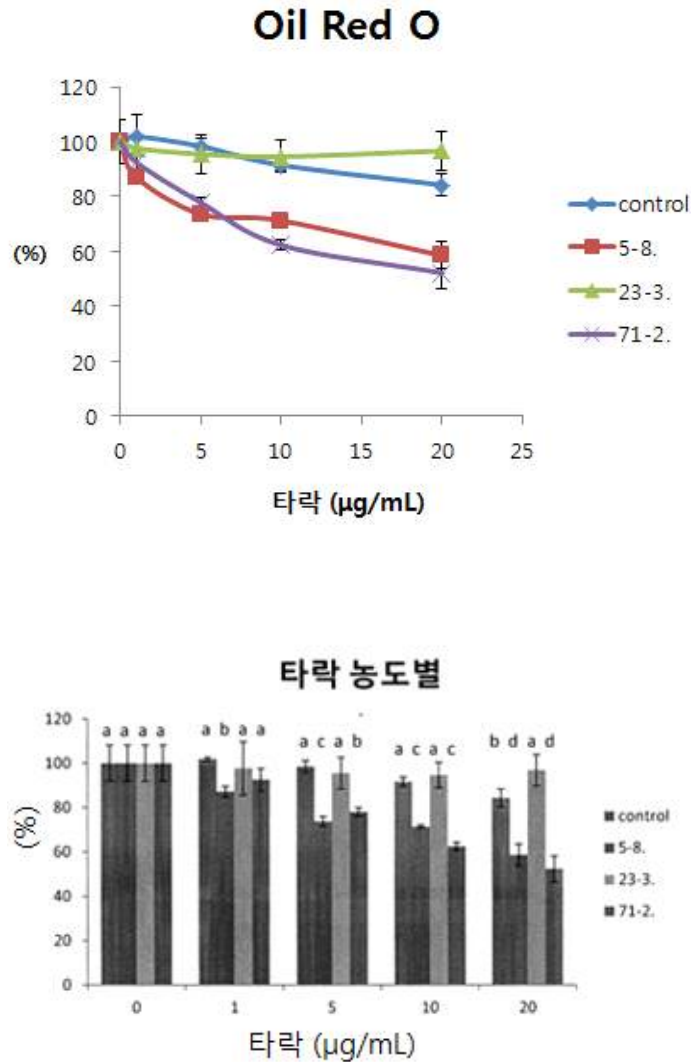


Figure 7. 지방 세포 지방 축적 함량(%)

다. 타락 추출물의 지방세포 PPAR γ , C/EBP α 발현량 영향 측정

(1) 실험방법

- 지방세포의 지방 축적을 촉진하는 PPAR γ , C/EBP α 의 발현량에 타락 추출물이 미치는 영향을 측정함.
- 세포 : 3T3-L1
- 배양 조건 : 37°C, 5% CO $_2$
- 3T3-L1 세포의 지방 생성 유도 후 western blotting으로 PPAR γ , C/EBP α 발현량 측정
- 타락 추출물 처리 조건
 - 지방세포 분화 유도 단계부터 타락 추출물을 배지에 투여
 - 타락 추출물 : 5-8, 71-2
 - 타락 추출물 농도 (µg/mL) : 0, 5, 10, 20
 - control : 우유 건조물

- western blotting

① 세포 회수

② 세포 파쇄 후 세포액 획득 및 단백질 농도 측정

③ western blot

· antibody : anti-PPAR γ , anti-C/EBP α (mouse monoclonal) · marker : β -actin

④ band 정량

(2) 실험결과

- 지방세포 분화와 지방 축적 과정에서 타락 추출물을 세포 배지에 첨가하여 지방세포 내의 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현량에 타락 추출물이 미치는 영향을 western blotting으로 측정함.

- 타락 추출물 (5-8, 71-2)은 5 ~ 20 μ g/mL의 농도에서 지방세포의 PPAR α 발현량에 영향을 미치지 못함.

- 타락 추출물 (5-8)은 10 ~ 20 μ g/mL의 농도에서 지방세포의 C/EBP α 발현량을 증가시킴.

- 타락 추출물 (5-8, 71-2)은 측정 농도에서 지방세포의 PPAR γ , C/EBP α 발현량 감소 기능이 없음.

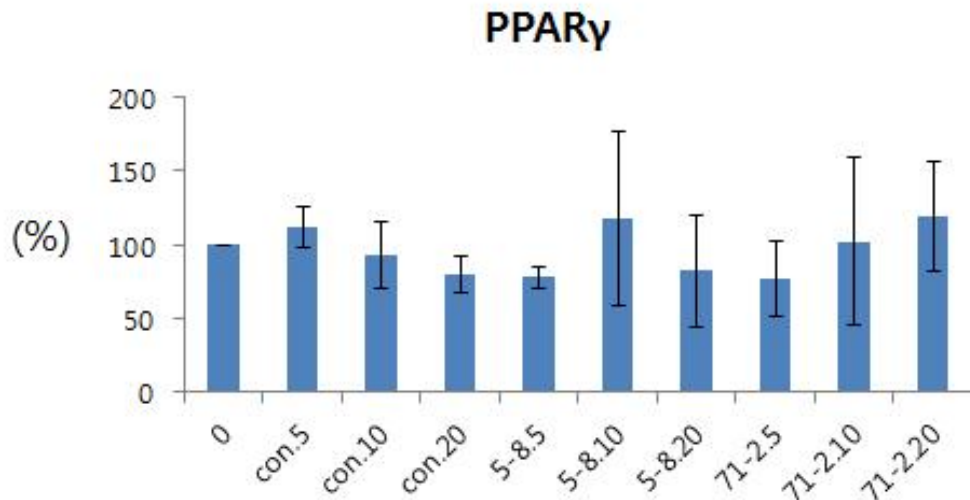


Figure 8. 타락 추출물의 지방세포 PPAR γ 발현량

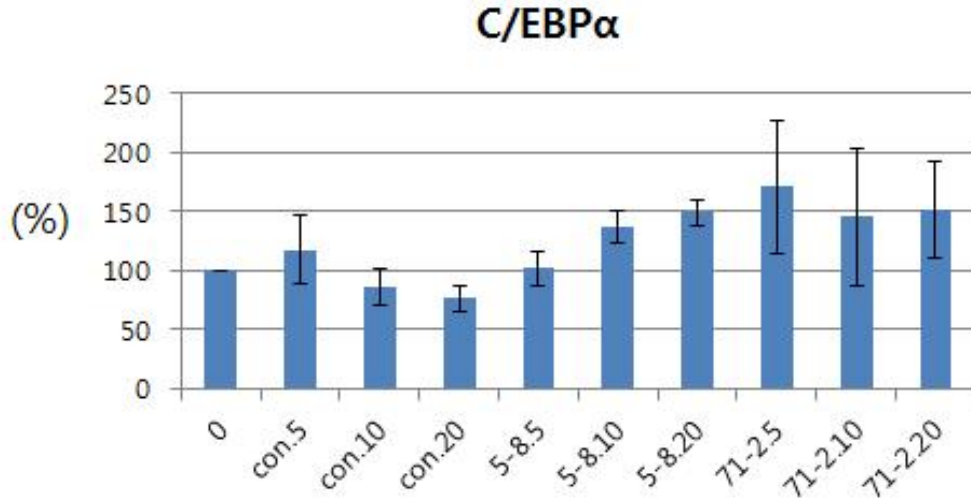


Figure 9. 타락 추출물의 지방세포 C/EBPα 발현량

라. 쥐를 이용한 타락 추출물의 항비만 효능 시험

(1) 실험방법

- 비만사료에 타락 추출물을 첨가한 식이로 키운 마우스로 타락 추출물의 항비만 효능을 시험함.

- 시험종 : C57BL/6J mice (4 주령, 수컷)

- 시험 조건

· 타락 추출물 시료 : A (5-8), B (71-2)

· 식이군 : 정상식이군, 고지방식이군, 고지방식이+A10%, 고지방식이+B10%

· 식이군 당 마우스 10마리 (총 40 마리 (예비 사용을 위하여 50 마리 사육))

- 실험 순서

① 동물입수 후 일반식이로 1 주 사육

② 정상식이군 : 일반식이로 6 주간 사육

고지방식이군 : 고지방식이로 6 주간 사육

고지방식이+A10%군 : 고지방식이+A10%로 6 주간 사육

고지방식이+B10%군 : 고지방식이+B10%로 6 주간 사육

③ 실험동물 희생하고 혈액, 부고환 지방조직 적출, 신장 지방 조직 적출, 간 적출

- 측정항목

① 체중 : 1 주일 간격으로 측정

② 식이섭취량 : 1 주일 간격으로 측정

③ 혈중 지질 : 중성지질, 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤

④ 혈중 AST 역가, ALT 역가

⑤ 부고환 지방조직 무게 측정

⑥ 신장 지방조직 무게 측정

(2) 실험결과

- 체중 : 고지방식이+A10%와 고지방식이+B10%로 생육한 쥐는 고지방식으로 생육한 쥐에 비하여 체중이 유효하게 감소하였음.
- 식이효율 : 고지방식이군, 고지방식이+A10%군, 고지방식이+B10%군은 일반식이군에 비하여 식이효율이 유의하게 증가함. 고지방식이+A10%군과 고지방식이+B10%군은 고지방식이군과 식이효율에서 유의한 차이가 없음.

Table 3. 쥐의 체중과 식이 효율

	일반식이	고지방식이	고지방식이 + A10%	고지방식이 + B10%
최종 체중 (1마리)	27.45±1.00 ^c	35.50±3.36 ^a	32.51±2.14 ^b	31.05±1.91 ^b
식이효율	0.043±0.018 ^b	0.094±0.033 ^a	0.078±0.023 ^a	0.078±0.026 ^a

* 식이효율 = 체중증가량 ÷ 식이섭취량

* 같은 행에서 다른 첨부 문자는 유의한 차이를 나타냄 ($p<0.05$)

- 혈중 지질

- 고지방식이+B10%군의 cholesterol 함량은 고지방식이군에 비하여 유의하게 감소함.
- 고지방식이+A10%군과 고지방식이군은 cholesterol 함량에서 유의한 차이가 없음.
- 실험군 사이에 triglyceride 함량에는 유의한 차이가 없음.
- 고지방식이+A10%군과 고지방식이+B10%군은 HDL 함량에서 고지방식이군과 유의한 차이가 없음.
- 고지방식이+B10%군의 LDL 함량은 고지방식이군에 비하여 유의하게 감소함.
- 고지방식이+A10%군과 고지방식이군은 LDL 함량에서 유의한 차이가 없음.

Table 4. 혈중 지질 농도

	일반식이	고지방식이	고지방식이 + A10%	고지방식이 + B10%
cholesterol (mg/dL)	126±15.4 ^c	191±27.0 ^a	187±12.2 ^a	169±17.2 ^b
triglyceride (mg/dL)	101±34.0	128±19.5	141±70.9	137±56.3
HDL (mg/dL)	112±9.5 ^b	125±4.8 ^a	129±6.4 ^a	127±5.0 ^a
LDL (mg/dL)	14±2.7 ^c	28±10.9 ^a	27±6.3 ^a	21±4.8 ^b

* 같은 행에서 다른 첨부 문자는 유의한 차이를 나타냄 ($p<0.05$)

- 혈중 AST 역가, ALT 역가
 - 실험군 사이에 AST 역가는 유의한 차이가 없음
 - 고지방식이+B10%군의 ALT 역가는 일반식이군, 고지방식이군, 고지방식이+A10%군보다 유의하게 증가함.

Table 5. 혈중 AST 역가, ALT 역가

	일반식이	고지방식이	고지방식이 + A10%	고지방식이 + B10%
AST (U/L)	180±62.2	169±65.9	171±78.7	193±77.7
ALT (U/L)	101±63.7 ^{ab}	109±49.4 ^{ab}	65±21.4 ^{ab}	128±76.6 ^b

* 같은 행에서 다른 첨부 문자는 유의한 차이를 나타냄 ($p<0.05$)

- 지방조직 무게
 - 고지방식이+B10%군은 신장지방의 무게가 고비장식이군에 비하여 유의하게 감소함.
 - 고지방식이+A10%군은 고비장식이군과 신장지방 무게에서 유의한 차이가 없음.
 - 고지방식이+A10%군과 고지방식이+B10%군의 부고환지방 무게는 고지방식이군에 비하여 유의하게 감소함.

Table 6. 지방조직 무게

	일반식이	고지방식이	고지방식이 + A10%	고지방식이 + B10%
신장지방 (g)	0.055±0.017 ^c	0.175±0.048 ^a	0.160±0.039 ^{ab}	0.131±0.046 ^b
부고환지방 (g)	0.170±0.032 ^c	0.444±0.116 ^a	0.364±0.074 ^b	0.323±0.109 ^b

* 같은 행에서 다른 첨부 문자는 유의한 차이를 나타냄 ($p<0.05$)

5. 암세포 성장 억제 기능성 규명

가. 타락 추출물의 폐암세포 증식도 영향 측정

(1) 실험방법

- 세포 선정 : A549 세포
- 배지 : F-12K + 10% FBS +1% antibiotics (penicillin, streptomycin)
- 배양 조건 : 37°C. 5% CO₂
- 세포 증식도 측정 조건 수립
 - A549 세포를 4×10⁴cell/well (96well plate) 농도로 96 시간 배양
 - 타락 추출물을 배지에 첨가함
 - MTT 분석법으로 세포 증식도 측정
- 타락 추출물 첨가 조건
 - A549 세포를 타락 추출물 첨가 상태로 4×10⁴cell/well (96well plate) 농도로 배양
 - 배양 조건 : 37°C. 5% CO₂, 96 h
 - 타락 추출물 : 5-8, 23-3, 71-2
 - 타락 추출물 농도 (µg/mL) : 0, 10, 20, 50, 70, 100
 - control : 우유 건조물

(2) 실험결과

- 타락 추출물은 10~100 µg/mL 농도에서 A549 (폐암세포)의 증식에 영향을 미치지 못함.

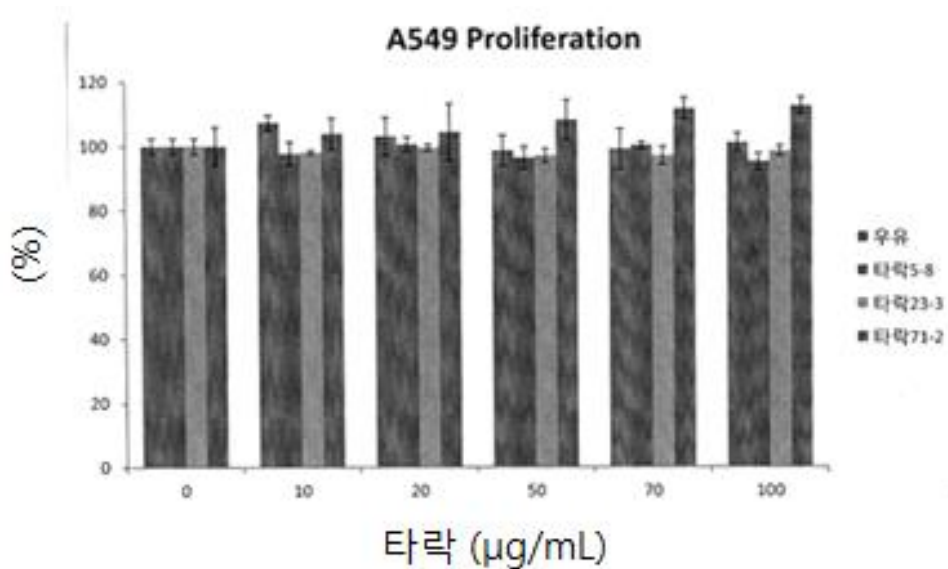


Figure 10. A549 (폐암세포) cell proliferation

나. 타락 추출물의 간암세포 증식도 영향 측정

(1) 실험방법

- 세포 선정 : HepG2 세포
- 배지 : MEM + 10% FBS +1% antibiotics (penicillin, streptomycin)
- 배양 조건 : 37°C, 5% CO₂
- 세포 증식도 측정 조건 수립
 - HepG2 세포를 4×10⁴cell/well (96well plate) 농도로 96 시간 배양
 - 타락 추출물을 배지에 첨가함
 - MTT 분석법으로 세포 증식도 측정
- 타락 추출물 첨가 조건
 - HepG2 세포를 타락 추출물 첨가 상태로 4×10⁴cell/well (96well plate) 농도로 배양
 - 배양 조건 : 37°C, 5% CO₂, 96 h
 - 타락 추출물 : 5-8, 23-3, 71-2
 - 타락 추출물 농도 (µg/mL) : 0, 10, 20, 50, 70, 100
 - control : 우유 건조물

(2) 실험결과

- 타락 추출물은 10~100 µg/mL 농도에서 HepG2 (간암세포)의 증식에 영향을 미치지 못함.

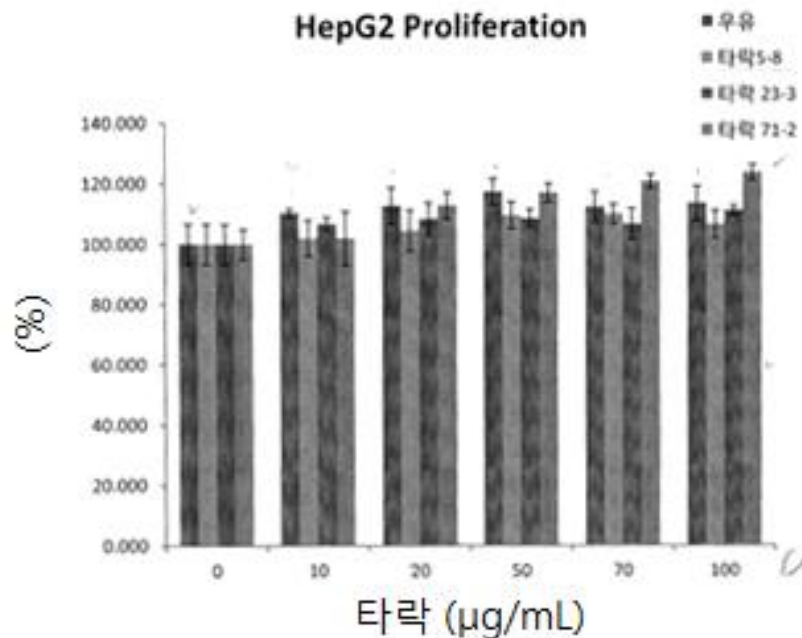


Figure 11. HepG2 (간암세포) cell proliferation

제 4 절. 타락의 응용제품 개발 및 식문화적 가치 규명

1. 타락응용 젤리류 개발

가. 타락의 제조 및 타락을 이용한 메뉴개발을 통한 조리특성 파악

고조리서 ‘수운잡방(需雲雜方,1540년)’과 2012년 농림수산식품부 ‘전통발효유 타락의 발효특성과 건강기능성 규명’ 연구에서의 전통발효유 타락 제조법을 기초로 시판 막걸리를 이용, 자연발효를 통해 재현성 있는 타락을 제조하였음. 제조된 타락의 pH와 산도는 각각 3.86 ± 0.03 , 1.09 ± 0.01 이었음.



Figure 1. 자연발효에 의해 제조된 타락

발효유를 이용한 메뉴개발에 대한 기초조사를 통해 전통 발효유 타락을 이용한 메뉴 개발을 통하여 조리특성을 파악함. 타락을 주요 소재로 한 다양한 메뉴개발로 전통발효유 타락을 다양한 방법으로 섭취 할 수 있는 방안을 모색함. 실험조리를 통한 다양한 메뉴개발 결과, 젤리류 외 드레싱 및 소스류에서의 적용이 유용한 것으로 나타남.



Figure 2. 타락을 이용한 드레싱 및 소스

나. 타락 응용 젤리류 개발을 위한 제조조건 확립

타락을 이용한 젤리류인 과편, 양갱, 젤리, 푸딩의 실험조리 결과, 타락의 사용량이 비교적 많고, 관능 상 특성이 우수하다고 생각되는 젤리와 푸딩에 대한 제조조건을 확립하였음. 젤리와 푸딩에 첨가되는 타락의 비율은 예비실험을 거쳐, 제조에 이용되는 물의 사용량 대비 각

각 0, 25, 50, 75, 100 % 수준으로 결정하였음(0% 첨가균을 대조군으로 함).

이하 타락젤리의 경우 타락첨가 0, 25, 50, 75, 100%에 해당하는 시료를 각각 J-C, J-25, J-50, J-75, J-100 으로 표기하고, 푸딩의 경우에는 각각 P-C, P-25, P-50, P-75, P-100으로 표기하도록 하겠음. 타락 응용 젤리와 푸딩제조를 위한 재료 배합비는 다음 표와 같음.

Table 1. 타락젤리의 재료 배합비

(g)

시료명	젤라틴	설탕	물	타락
J-C	15	50	300	0
J-25	15	50	225	75
J-50	15	50	150	150
J-75	15	50	75	225
J-100	15	50	0	300

Table 2. 타락 푸딩의 재료 배합비

(g)

시료명	젤라틴	설탕	물	타락
P-C	4	30	300	0
P-25	4	30	225	75
P-50	4	30	150	150
P-75	4	30	75	225
P-100	4	30	0	300

- 타락젤리의 제조법 : 배합비대로 설탕과 젤라틴을 먼저 물에 섞고, 타락을 비율별로 첨가한 후 80 °C의 water bath(CT-DW22, Coretech, Anyang, Korea)에서 중탕하면서 재료를 녹이고, 각각 총 5 분간 교반함.



Figure 3. 타락 젤리류의 제조과정

완전히 혼합 및 용해된 후 젤리의 경우 밀폐용기(20×15×5 cm)에 3 cm 높이로 부은 후 상온에서 30분간 식히고, 4 °C 냉장고에서 3시간 성형한 후 실험에 사용하였음. 푸딩의 경우 지름 6 cm, 높이 8 cm의 투명 플라스틱 컵에 6 cm 높이로 부은 후 젤리와 같이 상온에서 30분간 식히고, 4 °C 냉장고에서 3시간 성형한 후 실험에 사용하였음.

타락 응용 젤리류인 타락젤리와 타락푸딩의 제조는 위 배합표 및 제조법에 의해 제조되었는데, 해당 연구기간 중 상반기에는 자연 발효된 타락을 이용하여 제조하였으며, 하반기에는 1세부과제에서 산업화를 위해 제조된 타락을 공급받아 제조하였음. 자연발효 타락을 이용한 적용 제품의 경우, 각각 J1-C, J1-25, J1-50, J1-75, J1-100, P1-C, P1-25, P1-50, P1-75, P1-100 으로 표기하고, 산업화를 위해 제조된 타락을 이용한 적용제품의 경우 각각 J2-C, J2-25, J2-50, J2-75, J2-100, P2-C, P2-25, P2-50, P2-75, P2-100으로 표기하도록 하겠음.

다. 타락 젤리류의 이화학적 품질검사

(1) 일반성분 분석

젤리류 제조에 이용된 타락과 제조된 젤리 및 푸딩에 대하여 수분, 조단백질, 조지방, 조회분 함량을 측정, 분석하였음. 수분은 105°C 상압가열 건조법에 의해 함량을 측정하여 산출하였으며, 조단백질은 Auto-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조회분은 550 °C 직접 회화법으로 각각 정량하였음. 모든 시료에 대해 각각 3회 반복 측정 후 평균과 표준편차로 나타내었음. 자연발효 타락(이하 T1)과 산업화를 위해 제조된 타락(이하 T2)의 일반성분 분석 결과를 아래의 표에 나타내었음.

Table 3. 타락의 일반성분

	Mean± S.D. (%)			
	조단백질	수분	조회분	조지방
T1	3.40±0.22	87.5±0.16	0.72±0.01	3.65±0.15
T2	3.03±0.02	89.46±0.56	0.52±0.02	2.45±0.02

타락을 이용한 젤리와 푸딩의 일반성분 분석 결과, 젤리와 푸딩 모두 타락의 첨가량이 많아질수록 수분의 함량은 감소하였고, 조단백질, 조회분, 조지방의 함량은 유의적으로 증가하였음.

Table 4. T1을 이용한 젤리의 일반성분

	Mean± S.D. (%)			
	조단백질	수분	조회분	조지방
J1-C	4.87±0.05 a	81.78±0.06 a	0.05±0.00 a	0.43±0.02 a
J1-25	5.67±0.02 b	78.47±0.10 b	0.20±0.00 b	1.01±0.01 b
J1-50	6.00±0.09 c	75.39±0.04 c	0.35±0.01 c	2.06±0.19 c
J1-75	6.40±0.17 d	73.59±0.01 d	0.49±0.01 d	2.74±0.06 d
J1-100	6.44±0.10 d	70.47±0.02 e	0.65±0.00 e	3.71±0.14 e
F-Value	119.11*	17444.57*	4793.27*	437.22*

* p<0.05

a-e: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

Table 5. T1을 이용한 푸딩의 일반성분

	Mean± S.D. (%)			
	조단백질	수분	조회분	조지방
P1-C	1.69±0.02 a	88.30±0.01 a	0.03±0.00 a	0.16±0.02 a
P1-25	2.62±0.09 b	84.98±0.01 b	0.18±0.00 b	1.46±0.12 b
P1-50	3.25±0.06 c	83.36±0.04 c	0.35±0.01 c	2.15±0.13 c
P1-75	3.97±0.09 d	79.90±0.05 d	0.52±0.00 d	2.93±0.04 d
P1-100	5.15±0.06 e	77.29±0.04 e	0.69±0.01 e	4.37±0.14 e
F-Value	1130.84*	54433.74*	7459.86*	697.33*

* p<0.05

a-e: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

(2) pH, 산도 및 당도 측정

pH는 시료 5 g을 취한 후 증류수 45 g을 섞어 초음파 분쇄기(T25 basic, IKA WERKE, GMBH, Germany)로 균질화 한 후 pH meter로 3회 반복 측정하여 그 평균값으로 나타냈음. 산도는 시료 10ml를 0.1 N NaOH 수용액으로 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 이 때 소비된 NaOH 용액의 양(ml)을 다음 계산식에 의하여 lactic acid 함량(%)으로 환산하였음.

$$\text{Acidity(\%)} = \frac{0.009 \times \text{mL of 0.1 N NaOH} \times F}{\text{Sample(mL)}} \times 100$$

(F = Factor of 0.1 N NaOH=0.1)

당도 측정은 Brix 당도계(Pokecrefractometer, ATAGO, Japan)를 사용하여 3회 반복 측정하였는데 졸(sol) 상태의 젤리 0.5 ml을 당도계에 떨어뜨려 측정하였음. 젤리와 푸딩 모두 타락의 첨가량이 많아질수록 pH는 유의적으로 감소하고 산도는 유의적으로 증가하였으며, 당도는 증가하였음.

Table 6. T1을 이용한 젤리의 pH, 산도 및 당도

	Mean± S.D.		
	pH	산도 (%)	당도 (%)
J1-C	5.92±0.02 a	0.04±0.00 a	20.67±0.58 a
J1-25	4.74±0.03 b	0.23±0.00 b	21.00±0.00 a
J1-50	4.35±0.03 c	0.46±0.00 c	23.67±0.58 b
J1-75	4.24±0.01 d	0.63±0.04 d	24.00±0.00 b
J1-100	4.23±0.02 d	0.71±0.00 e	24.33±0.58 b
F-Value	3887.43*	685.99*	46.17*

* p<0.05, a-e: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

Table 7. T1을 이용한 푸딩의 pH, 산도 및 당도

	Mean± S.D.		
	pH	산도 (%)	당도 (%)
P1-C	6.53±0.03 a	0.01±0.00 a	11.33±0.58 a
P1-25	4.15±0.01 b	0.22±0.01 b	13.67±0.58 b
P1-50	4.05±0.01 c	0.49±0.00 c	14.00±0.00 b
P1-75	3.88±0.01 d	0.68±0.00 d	14.33±0.58 b
P1-100	3.86±.03 d	0.84±0.00 e	15.50±0.50 c
F-value	7967.75 *	30759.30*	27.93*

* p<0.05, a-e: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

Table 8. T2를 이용한 젤리의 pH, 산도 및 당도

	Mean± S.D.		
	당도 (%)	pH	산도 (%)
J2-0	19.97±0.42 a	5.75±0.04 a	0.04±0.01 a
J2-25	20.57±0.64 a	4.55±0.05 b	0.34±0.01 b
J2-50	20.77±0.15 a	4.24±0.05 c	0.73±0.03 c
J2-75	24.50±0.61 b	4.16±0.01 d	1.19±0.02 d
J2-100	25.70±0.17 c	4.13±0.02 d	1.44±0.03 e
F-value	100.99*	1032.2*	2541.5*

* p<0.05, a-e: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

Table 9. T2를 이용한 푸딩의 pH, 산도 및 당도

	Mean± S.D.		
	당도 (%)	pH	산도 (%)
P2-0	10.50±0.14 a	6.23±0.21 a	0.05±0.01 a
P2-25	11.53±0.35 b	4.10±0.06 b	0.32±0.01 b
P2-50	12.70±0.26 c	3.96±0.08 c	0.69±0.03 c
P2-75	15.17±0.32 d	3.85±0.02 c	1.01±0.02d
P2-100	16.27±0.12 e	3.78±0.05 c	1.30±0.01 e
F-value	220.6*	293.2*	115187.5*

* p<0.05, a-e: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

(3) 색도 측정

색차계(Color meter, JC601, Kyoto, Japan)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness) 값을 3회 반복 측정하였음. 이 때 표준 백색판(standard plate)의 L, a, b 값은 각각 97.83, -0.43, +1.98이었음.

Table 10. T1을 이용한 젤리의 색도

	Mean± S.D.		
	L	a	b
J1-C	54.32±7.35 a	-0.27±0.01 a	-4.90±0.72 a
J2-25	75.32±0.34 bc	-2.16±0.10 b	-0.17±0.08 b
J3-50	83.22±1.27 c	-2.79±0.00 c	+3.52±0.04 c
J4-75	89.18±0.08 d	-3.05±0.01 d	+5.50±0.04 d
J5-100	90.33±0.01 d	-3.03±0.03 d	+7.13±0.04 e
F-value	39.001*	1280.381*	436.81*

* p<0.05, a-d: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

Table 11. T1을 이용한 푸딩의 색도

	Mean± S.D.		
	L	a	b
P1-C	38.80±13.80 a	+0.30±0.50 a	-0.83±0.01 a
P2-25	80.79±0.13 b	-1.97±0.02 b	+2.07±0.06 b
P3-50	87.61±0.48 b	-2.77±0.00 b	+3.16±0.01bc
P4-75	91.54±1.45 b	-2.57±0.59 b	+3.98±0.86 c
P5-100	94.85±0.69 b	-2.16±0.09 b	+5.25±0.51 d
F-value	27.20*	25.31*	52.57*

* p<0.05, a-d: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

Table 12. T2를 이용한 젤리의 색도

	Mean± S.D.		
	L	a	b
J2-0	52.18±0.91 a	-0.22±0.10 a	-5.44±0.96 a
J2-25	68.35±1.39 b	-1.99±0.17 b	-0.28±0.32 b
J2-50	86.51±0.08 c	-2.58±0.03 c	+3.00±0.15 c
J2-75	89.71±0.11 d	-2.88±0.02 d	+5.18±0.12 d
J2-100	91.51±0.69 d	-3.10±0.01 d	+6.27±0.01 d
F-value	885.19*	334.8*	210.48*

* p<0.05, a-d: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

Table 13. T2를 이용한 푸딩의 색도

	Mean± S.D.		
	L	a	b
P2-0	29.86±0.00 a	+0.33±0.06 a	+1.31±0.12 a
P2-25	79.64±7.42 b	-2.07±0.01 b	+2.07±0.13 b
P2-50	90.53±0.44 c	-2.53±0.02 c	+2.40±0.26 b
P2-75	94.15±0.17 c	-2.71±0.01 d	+4.82±0.21 c
P2-100	94.63±0.17 c	-3.05±0.01 e	+5.99±0.12 d
F-value	136.00*	4619.26*	254.10*

* p<0.05, a-d: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

(4) 텍스처 측정

시료를 원판형으로 직경 25 mm, 높이 20 mm로 일정하게 하여 Rheometer(Compac-100, Sun Sci. co., Kyoto, Japan)를 이용하여 지름 20mm의 probe를 부착하였으며 table speed는 60 mm/min, compression ratio를 40%로 주어 각각의 조건에서 제조된 젤리와 푸딩의 물성을 측정하였음. 물성은 압착시험에 의해 측정하였으며 시료를 3회 반복 측정하여 평균값을 취하였고 각 시료에 대한 탄력성(springiness), 응집성(cohesiveness), 씹음성(chewiness), 깨짐성(fracturability), 부착성(adhesiveness)을 측정하였음. 제조된 타락젤리와 타락푸딩에 대해 pH와 산도를 3회 이상 측정하였으며, 그 결과는 표와 같음. T2를 이용한 젤리와 푸딩의 텍스처 측정 및 결과 분석은 현재 진행 중임.



Figure 4. 텍스처와 색도 측정

Table 14. T1을 이용한 젤리의 텍스처

	Mean± S.D.				
	탄력성(%)	응집성(%)	씹음성(g)	깨짐성(g)	부착성(g)
J1-C	89.08±2.95	84.68±6.68	323.18±6.95 a	28798.25±1572.11 a	-6.5±9.19 a
J1-25	88.39±0.19	77.27±3.98	410.66±96.46 ab	36287.37±8445.55 ab	-22.5±12.02 b
J1-50	89.94±0.95	75.68±3.22	514.118±32.60 b	43319.17±6552.38 b	-26.50±3.53 b
J1-75	93.17±0.33	76.89±0.46	505.78±82.94 b	41114.16±626.89 ab	-38.00±1.41 c
J1-100	93.58±3.39	78.98±2.52	790.47±4.30 c	73967.65±2281.47c	-96.00±5.65 d
F-Value	2.692	1.625	17.828 *	24.422 *	42.910 *

* p<0.05, a-d: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

Table 15. T1을 이용한 푸딩의 텍스처

	Mean± S.D.				
	탄력성(%)	응집성(%)	씹음성(g)	깨짐성(g)	부착성(g)
P1-C	215.26±5.86 a	125.21±3.62 a	16.89±0.40 ab	3566.86±85.41	0.00±0.00 a
P1-25	49.15±3.19 b	40.71±3.12 c	8.57±1.23 a	421.29±30.19	0.00±0.00 a
P1-50	95.74±0.52 b	56.52±9.54 b	52.27±11.97 b	4981.14±1114.39	-20.5±2.12 b
P1-75	85.29±1.35 b	62.55±0.82 b	62.27±5.69 b	5306.30±399.84	-25.50.2.12 b
P1-100	175.01±51.97 a	56.61±2.36 b	33.23±6.58 ab	5986.05±2879.20	-27.00±5.66 b
F-value	17.152 *	89.714 *	23.463 *	5.05	44.738 *

* p<0.05, a-c: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's

라. 타락 젤리류의 관능적 품질 검사

제조된 타락젤리와 타락푸딩에 대하여 관능검사를 실시, 최적의 타락젤리와 푸딩의 제조조건을 설정하고자 하였음. 제조된 젤리의 관능검사는 식품영양학과 학부생 및 대학원생 17명을 대상으로 실시하였는데 선발된 17명의 관능검사 요원들에게 실험 목적 및 평가 항목에 대해 설명하고 충분한 훈련을 실시한 후 7점 척도법으로 관능검사를 실시하였음.

이 때 평가점수는 단맛, 신맛, 단단한 정도, 탄력성, 씹힘성에 대해서는 1:매우 약하다 - 7: 매우 강하다로 평가하였고, 전반적 기호도, 외관 맛, 향, 조직감에 대해서 1:매우 싫다 - 7:매우 좋다로 구분하여 평가하였음. 시료는 검사시간 1시간 전에 냉장고에서 꺼내어 젤리의 경우 3×3×3 cm의 크기로 준비하고, 푸딩의 경우 지름 3 cm의 투명 컵에 2 cm의 높이로 준비한 후 흰 접시에 담고 난수표를 이용하여 번호를 구분한 후 물과 함께 제공하였음.

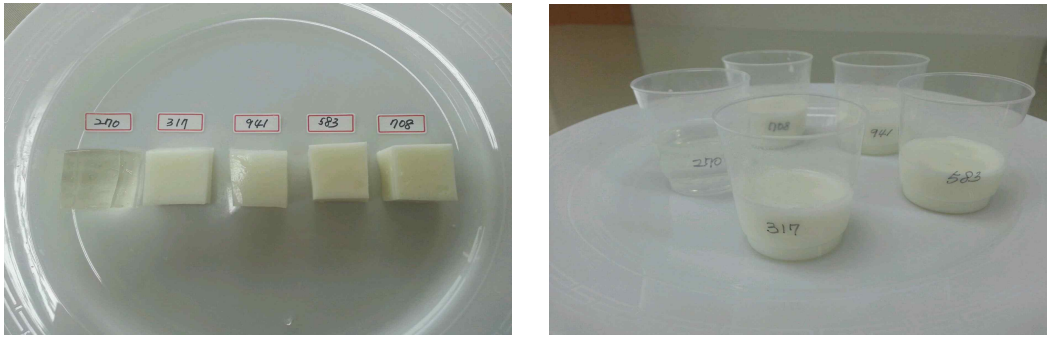


Figure 5. 관능검사용 타락 젤리와 푸딩

Table 16 에서와 같이 T1을 이용하여 제조된 타락젤리의 관능검사 결과 타락 첨가량에 따라 신뢰수준 95%에서 외관, 맛, 신맛, 탄력성에 유의차가 있었음. 타락 75%의 타락젤리의 관능품질이 가장 우수한 것으로 판단됨. T1을 이용한 타락푸딩의 관능검사 결과 타락 첨가량에 따라 신뢰수준 95%에서 전반적 기호도, 외관, 맛, 향, 조직감, 신맛, 단단함 모두 유의차가 있었음. 씹힘성은 신뢰수준 90%에서 유의함. 타락 75%의 타락푸딩의 관능품질이 가장 우수한 것으로 판단됨.

Table 16. T1을 이용한 젤리의 관능검사 결과

	Mean±S.D.					
	J1-C	J1-25	J1-50	J1-75	J1-100	F값
전반적 기호도	3.53±1.07	3.59±0.94	4.35±1.41	4.41±1.46	4.00±1.27	1.832
외관	5.18±1.47 a	4.00±1.00 b	4.00±1.32 b	4.65±1.22 a	3.76±1.52 c	3.612 *
맛	3.18±1.19 a	3.53±0.94 a	4.41±1.46 b	4.41±1.23 b	3.82±1.29 ab	2.86 *
향	3.12±1.11	3.24±1.44	3.88±1.36	3.71±1.26	2.94±1.34	0.778
조직감	4.29±1.16	3.71±1.16	4.29±1.16	4.00±1.22	3.59±1.12	1.03
단맛	4.24±1.44	4.41±1.23	4.06±0.83	4.06±1.20	4.35±0.86	0.263

신맛	1.47±1.07 a	1.94±0.97 a	2.71±1.36 a	3.94±1.30 b	4.65±1.00 b	29.744 *
단단한 정도	4.06±1.03	3.94±0.75	3.82±1.07	4.00±1.00	4.32±1.46	0.472
탄력성	5.29±0.92 a	4.18±0.95 b	4.18±1.29 b	3.82±1.01 bc	3.29±1.36 c	8.261 *
씹힘성	4.12±0.93	3.76±0.97	3.88±1.50	3.82±0.81	3.59±1.70	0.501

* p<0.05, Rating scale: 1(bad) to 7(excellent)

a-c: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

Table 17. T1을 이용한 푸딩의 관능검사 결과

	Mean±S.D.					
	P1-C	P1-25	P1-50	P1-75	P1-100	F값
전반적 기호도	3.12±1.36 a	3.53±1.28 a	4.53±1.33 b	4.82±1.13 b	4.65±1.41 b	5.709 *
외관	4.76±1.68 a	3.18±1.63 b	5.12±1.32 c	4.12±1.17 ab	3.18±1.01 b	7.041 *
맛	2.53±0.94 a	3.35±1.00 b	4.35±1.27 c	4.65±1.06 c	4.71±1.45 c	11.36 *
향	2.53±1.07 a	3.53±0.87 b	3.65±1.22 b	3.88±1.22 b	3.41±1.50 b	3.18 *
조직감	3.88±1.05 ab	3.18±1.33 a	4.41±1.18 b	3.94±1.20 ab	3.35±1.46 a	2.658 *
단맛	4.88±2.03	4.88±1.05	4.53±0.94	4.59±1.06	3.88±1.27	1.605
신맛	1.35±1.00 a	2.82±1.51 b	3.41±1.42 c	3.76±1.30 c	5.06±1.20 d	18.555 *
단단한 정도	3.18±1.47 a	2.23±1.30 b	3.47±1.23 a	3.06±1.03 a	2.24±0.90 b	3.789 *
씹힘성	3.18±1.67 a	2.23±0.97 b	3.41±1.06 a	2.88±1.22 ab	2.59±1.37 ab	2.247 **

* p<0.05, Rating scale: 1(bad) to 7(excellent)

a-c: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

T2를 이용하여 제조된 타락젤리의 관능검사 결과 단맛, 단단한 정도, 씹힘성은 시료간 유의적 차이가 없으나 나머지 특성들은 모두 유의차가 있었는데 타락의 첨가가 증가할수록 높은 평가를 받는 경향을 보임(p<0.05). 타락 첨가 75%와 100%인 J2-75와 J2-100의 관능적 품질이 우수한 것으로 생각됨.

T2를 이용한 타락푸딩의 관능검사 결과 타락 첨가량에 따라 신뢰수준 95%에서 조직감을 제외한 모든 관능특성에서 시료 간 유의차가 있었음(p<0.05). 타락의 첨가에 따라 단맛은 약해지고 신맛은 강하다고 평가되었는데, 그러한 맛의 변화에 대해 긍정적으로 평가하는 것을 알 수 있었음. 푸딩 제조 시 타락 특유의 신맛과 향이 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이상의 결과 타락 75%와 100%의 첨가가 바람직한 것으로 생각됨.

Table 18. T2를 이용한 젤리의 관능검사 결과

	Mean±S.D.					
	J2-C	J2-25	J2-50	J2-75	J2-100	F값
전반적 기호도	2.00±1.49 a	3.05±1.13 b	3.37±1.16 b	5.00±0.78 c	5.00±0.69 c	25.189 *
외관	3.79±1.96 a	3.68±1.60 a	4.58±1.50ab	5.47±1.50 c	5.26±1.59 bc	4.746 *
맛	1.84±1.30 a	2.89±1.20 b	3.16±1.30 b	4.37±1.12 c	4.84±1.17 c	18.393 *
향	2.16±1.38 a	3.63±1.46 ab	4.37±1.38 b	5.21±1.08 c	4.89±1.59 bc	14.511 *
조직감	3.00±1.63 a	3.58±1.74 b	4.16±1.38 bc	4.53±1.17 c	4.00±1.33 bc	3.022 *
단맛	3.89±2.02	4.00±1.29	4.05±1.61	4.42±0.96	4.11±1.37	0.334
신맛	1.11±0.32 a	1.84±1.07 b	2.11±1.10 b	3.47±1.43 c	3.47±1.39 c	16.201 *
단단한 정도	5.32±1.16	5.11±0.99	4.37±1.34	5.16±1.34	4.84±1.68	1.496
씹힘성	4.74±1.63	4.58±1.30	4.68±1.25	5.21±1.13	5.05±1.35	0.749

* p<0.05, Rating scale: 1(bad) to 7(excellent)

a-c: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

Table 19. T2를 이용한 푸딩의 관능검사 결과

	Mean±S.D.					
	P2-C	P2-25	P2-50	P2-75	P2-100	F값
전반적 기호도	2.63±1.01 a	3.37±1.21 a	5.11±1.10 b	4.58±1.77 b	5.05±1.78 b	11.452 *
외관	3.11±1.49 a	3.00±1.15 a	4.95±1.27 b	5.53±0.96 bc	5.79±0.92 c	24.381 *
맛	2.26±0.99 a	2.89±1.10 a	4.63±1.50 b	4.05±1.58 b	4.58±1.77 b	10.545 *
향	2.95±1.27 a	4.16±1.26 b	4.74±1.24 b	4.95±1.54 b	4.95±1.18 b	8.01 *
조직감	4.11±1.63	4.11±1.59	4.32±1.38 a	4.74±2.00	3.95±1.96	1.637
단맛	4.84±1.42 a	4.05±1.22 b	4.11±1.59b	3.68±1.38c	3.63±1.50 c	2.183 **
신맛	1.53±0.84 a	1.95±1.13 a	3.42±1.68 b	4.37±1.42 c	5.42±1.26 c	30.004 *
단단한 정도	3.68±1.49 b	4.11±1.33 bc	2.58±1.26 a	4.89±1.10 c	5.00±1.29 c	10.993 *
씹힘성	3.16±1.38 ab	3.58±1.39 b	2.68±1.45 a	4.32±1.20 c	4.74±1.45 c	6.984 *

* p<0.05, Rating scale: 1(bad) to 7(excellent)

a-c: Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

2. 프로즌 요구르트(아이스크림)의 개발

가. 타락 아이스크림의 제조 조건 확립

식품공전의 “축산물별 기준 및 규격” 중 “축산물의 가공기준 및 성분규격”에서 아이스크림류라 함은 원유, 유가공품을 원료로 하여 이에 다른 식품 또는 식품 첨가물 등을 가한 후 냉동, 경화한 것을 말하며, 유산균함유제품은 유산균(유산간균, 유산구균, 비피더스균을 포함한다) 또는 발효유를 함유한 제품으로 표시한 아이스크림류를 말한다.“라고 정의하고 있음.

아이스크림류는 “아이스크림, 아이스밀크, 샤베트, 저지방아이스크림, 비유지방아이스크림”으로 분류 하였고, 아이스크림은 유지방분 6%이상, 유고형분 16%이상, 아이스밀크는 유지방 2%이상, 유고형분 7%이상, 샤베트는 무지유고형분 2%이상, 저지방아이스크림은 조지방 2%이하, 무지유고형분 10% 이상, 비유지방아이스크림은 조지방 5%이상, 무지유고형분 5% 이상 함유해야 한다고 규정하고 있음.

Table 20. 아이스크림류의 분류

	성분 규격 (%)			
	유지방	조지방	MSNF (무지유고형분)	유고형분
아이스크림	6% 이상			16% 이상
아이스밀크	2% 이상			7% 이상
샤베트			2% 이상	
저지방아이스크림		2% 이하	10% 이상	
비유지방아이스크림		5% 이상	5% 이상	

Table 21. 아이스크림류의 성분규격

	아이스크림, 저지방아이스크림	아이스밀크, 샤베트, 비유지방아이스크림
성상	고유의 향미를 가지고 이미·이취가 없어야 한다.	고유의 향미를 가지고 이미·이취가 없어야 한다.
유지방(%)	6.0이상(단 저지방아이스크림의 경우 조지방 2.0이하)	2.0이상(아이스밀크에 한한다)
세균수	검사시료를 녹인 액체 1ml당 100,000이하(단, 유산균 함유제품, 발효유 함유제품의 경우 유산균수는 제외한다)	검사시료를 녹인 액체 1ml당 50,000 이하(단, 유산균 함유제품, 발효유 함유제품의 경우 유산균수는 제외한다)
대장균군	n=5, c=2, m=10, M=100	n=5, c=2, m=10, M=100
유산균수	표시량 이상(단, 유산균함유 제품에 한한다)	표시량 이상(단, 유산균함유 제품에 한한다)

(n: 검사 시료수, c : 최대 허용시료수, m : 허용기준치(m이하인 제품은 모두 적합), M : 최대허용한계치)

본 연구에서는 1세부 과제(한국 야쿠르트)를 통해 제조된 상업용 타락을 이용하여 디저트식품으로 선호도가 높은 아이스크림 제품류 중 유지방분 6 % 이상, 유고형분 16 % 이상에 해당하는 아이스크림 규격에 맞춰 타락 응용 프로즌 요구르트(아이스크림)의 제조조건을 확립하고자 하였음. 아이스크림 제조에 이용된 상업용 타락의 일반성분 분석 결과는 Table 22와 같음.

Table 22. 상업용 타락의 일반성분 분석 결과

타락 발효유
탄수화물 18g
당류 16g
단백질 3g
지방 1.8g
포화지방 1.2g
트랜스지방 0g

Mean±SD(100g)

수회의 실험 조리를 거쳐 ‘유지방 6% 이상, 유고형분 16% 이상’에 적합하도록 배합표(Table 23)를 작성하였는데, 이에 타락의 최대 첨가량은 총 48%로 결정하고, 우유만을 48% 넣은 시료를 대조군으로 한 후 타락 16% 첨가군(우유 32% 첨가), 타락 32% 첨가군(우유 16% 첨가), 타락 만 48% 첨가군을 각 실험군으로 설정하여 Table 23의 배합비에 따라 재료를 첨가하였음. 타락과 우유(서울우유), 생크림(유지방 37%상, 매일유업), 탈지분유(매일유업), 물엿(제일제당), 설탕(제일제당), 유화안정제와 안정제(구아검, 잔탄검)는 배합비에 따라 정확히 계량. 정확히 계량된 물에 설탕, 유화안정제와 안정제, 탈지분유, 우유, 생크림을 혼합하여 65℃로 유지시킨 후 30분간 저온살균하였음. 이후 10℃로 즉시 냉각시킨 후 타락을 혼합하여 4℃ 냉장고에서 24시간 숙성시켜 아이스크림 혼합물로 제조하였고, 아이스크림 제조기(SSI-141TG, 세아.E&C, Korea)로 타락 아이스크림을 제조하였음.



Figure 6. 아이스크림 제조기

Table 23. 타락아이스크림 제조를 위한 배합표

(g)

재료	시 료 ¹⁾			
	Control	TI- 16	TI-32	TI-48
타락	0	16	32	48
우유	48	32	16	0
생크림	15	15	15	15
탈지분유	6	6	6	6
설탕	13	13	13	13
물엿	4	4	4	4
안정제	0.4	0.4	0.4	0.4
물	13.6	13.6	13.6	13.6

¹⁾ Control : 타락 0 % 첨가 아이스크림
 TI-16 : 타락 16 % 첨가 아이스크림
 TI-32 : 타락 32 % 첨가 아이스크림
 TI-48 : 타락 48 % 첨가 아이스크림

나. 타락 아이스크림의 품질특성 검사

(1) 총 유산균수

- 유산균 생균수는 채취한 타락 아이스크림 시료를 멸균수에 십진희석하여 MRS agar에 도말한 후 35°C에서 72 h 배양한 후 균수를 계측하였다. 균수는 30~300개가 나타나는 평판을 선택하여 계수하였음.
- 아이스크림 제조에 사용된 상업용 타락의 젖산균수는 9.19±0.09(log CFU/g) 이었음.
- 타락첨가 아이스크림의 젖산균수는 7.01-8.17(log CFU/g)의 수준으로 나타났으며, 타락의 첨가에 따라 유의적으로 증가하였음(Table 24).

Table 24. 타락 첨가 아이스크림의 젖산균수

	Mean±SD(log CFU/g)			
	TI-C	TI-16	TI-32	TI-48
	3.30±0.09 ^a	7.01±0.17 ^b	7.56±0.23 ^c	8.17±0.09 ^d

¹⁾ Sample at the same as in Table 4

^{a-d} Means with different superscript in the same column are significantly different(p<0.05) by the Duncan's multiple range test

(2) 제조된 타락아이스크림에 대한 관능적 품질 검사

- 제조된 타락아이스크림에 대하여 관능검사를 실시, 최적의 제조조건을 설정하고자 하였음.
- 성신여대 식품영양학과 학부생 및 대학원생 20명을 대상으로 관능검사를 위한 훈련을 거친 후 7점 평점법으로 관능검사를 실시하였음.
- 지난 1차년도 실험 결과에서 타락아이스크림의 관능검사에서는 타락 첨가량에 따라 신뢰수준 95%에서 외관, 풍미, 전체적 기호도에 유의차가 있었음.
- 외관과 조직감은 시료간의 통계적인 유의적 차가 없었으나 맛, 풍미, 전반적인 기호도에서 타락을 가장 많이 첨가한 TI-48이 가장 높게 평가되었음.
- 본 연구 결과를 토대로 향후 연구에서는 타락을 각 50% 첨가하여 아이스크림류의 식품공전상의 기준 규격에 맞춰 샤베트, 저지방 아이스크림, 아이스크림 등 제품군별 제조를 통해 타락을 이용한 아이스크림의 최적 제품을 제안하고자 함.

Table 25. 타락 첨가 아이스크림의 관능검사 결과

	TI-C	TI-16	TI-32	TI-48
Appearance	5.53±0.56	5.32±0.42	5.48±0.77	5.58±0.21
Taste	5.52±0.96 ^b	5.11±0.49 ^{ab}	5.68±0.57 ^b	6.19±0.92 ^c
Flavor	4.95±1.27 ^b	4.36±1.26 ^a	4.98±1.54 ^b	5.59±1.18 ^b
Texture	5.11±1.63	5.12±1.59	5.22±1.38	5.27±1.20
Overall acceptance	5.63±1.01 ^b	5.17±1.21 ^a	5.47±1.10 ^b	6.34±0.78 ^c

¹⁾ Sample at the same as in Table 4

^{a-d} Means with different superscript in the same column are significantly different($p < 0.05$) by the Duncan's multiple range test

(3) 점도측정을 위한 조건 설정

- 타락 아이스크림의 점도 측정을 위하여 선행연구를 바탕으로 점도 측정 조건을 확립하였음.
- 타락아이스크림의 mix 점도는 Ioanna S & Gregory KZ (1990)의 방법에 의해 4℃에서 Brookfield viscometer(Model LVF, Brookfield Eng., U.S.A.)를 사용하여 spindle No 2로 30 rpm에서 측정하였음.
- 타락 아이스크림의 경우, 타락 첨가량에 따른 유의미한 차이를 보이지 않았음.



Figure 7. 아이스크림 점도 측정

(4) Overrun 측정을 위한 조건 설정

- 타락아이스크림의 Overrun은 Ioanna S & Gregory KZ (1990)의 방법을 이용하여 측정하기로 하였음.
- 아이스크림 제조기를 40분 동안 작동하면서 5분 간격으로 제조기에서 꺼낸 후 아이스크림용 scooper로 담아 무게를 재어 다음과 같은 식으로 계산하였음.

$$\text{Overrun}(\%) = \frac{\text{weight of mix} - \text{weight of ice cream}}{\text{weight of ice cream}} \times 100$$

- 아이스크림의 경우 타락의 첨가량에 따른 유의미한 차이를 보이지 않았음.

(5) 녹아내리는 정도

- 타락 아이스크림의 녹아내리는 정도(melting rate)를 위하여 선행연구들을 바탕으로 점도 측정 조건을 확립하였음.
- 아이스크림의 녹아내리는 정도는 20℃의 실온에서 메스실린더 위에 5mm 구멍크기의 철망을 얹은 후 그 위에 일정한 용기(100 ml)에 담은 아이스크림을 올려놓고 30분 간격으로 90분 동안 메스실린더 바닥으로 녹아서 떨어지는 양을 측정하여 전체량에 대한 유출량의 백분율로 표시하기로 하였음.
- 아이스크림의 경우, 타락의 첨가량에 따른 유의미한 차이를 보이지 않았으나 향후 샤베트, 저지방 아이스크림, 아이스크림 등 제품군별 제조에서는 차이를 보일 것으로 예상됨.

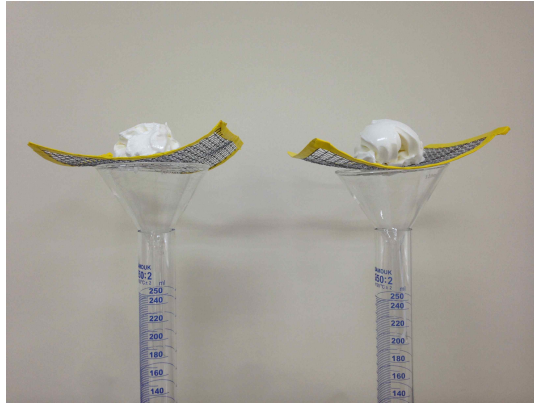


Figure 8. 아이스크림의 녹아내리는 정도 측정

다. 제품군별 타락 아이스크림의 제조

(1) 타락 첨가 50%를 기본으로 제품군별 아이스크림 제조

- 식품공전상의 기준 규격에 맞춰 샤베트, 저지방 아이스크림, 아이스크림 등 제품군별 제조를 통해 타락을 이용한 아이스크림의 최적 제품을 추가로 제안하고자 함
- 유산균을 함유한 샤베트 1종(Sherbet), 아이스밀크 2종(IM-2, IM-4), 아이스크림 1종(IC-6)을 축산물의 가공기준 및 성분규격에 맞춰 제조하고, 아이스크림류의 일반적 품질 특성과 관능적 품질 특성을 알아보려고 하였음.
- 제품별 배합비는 Table 26과 같음.



Figure 9. 완성된 타락 아이스크림류

Table 26. 제품군별 타락아이스크림류 제조를 위한 배합표

Ingredient	Samples ¹⁾			
	Sherbet	IM-2	IM-4	IC-6
<i>Tarak</i>	20	50	50	50
Milk cream	-	5	10	15
Skimmed milk powder	1	2	2	6
Sugar	13	13	13	13
Corn syrup	4	4	4	4
Emulsifier	0.2	0.2	0.2	0.2
Stabilizer (guar gum, xanthan gum)	0.2	0.2	0.2	0.2
Water	60.6	25.6	20.6	11.6
Milk fat	0%	2%	4%	6%
Milk solid	2.5%	6.0%	6.0%	10.0%

¹⁾ Sherbet: Sherbet containing milk fat 0 %
 IM-2 : Ice milk containing milk fat 2 %
 IM-4 : Ice milk containing milk fat 4 %
 IC-6 : Ice cream containing milk fat 6 %

(2) 타락 아이스크림류의 일반적 품질검사 결과

- 타락아이스크림류 믹스의 점도: 수분함량이 높은 Sherbet이 53.33으로 가장 낮았고, IM-2가 155.33, IM-4가 173.00으로 높아졌고, 유지방 함량이 가장 높은 IC-6이 238.67로 가장 높은 값을 나타내었다(Table 27).

Table 27. 타락 아이스크림류 믹스의 점도 Mean±S.D.(Pas)

Sherbet	IM-2	IM-4	IC-6	F-value
53.33±4.62 ^a	155.33±32.59 ^b	173.00±41.58 ^b	238.67±22.30 ^c	20.854 ^{***}

¹⁾ Samples at the same as in <Table 7>

²⁾ Different superscripts within a row(a~c) indicate significantly different($p<0.05$) by the Duncan's multiple range test

*** $p<0.001$.

(3) 타락 아이스크림류의 Overrun

- 모든 시료에서 시간에 따라 유의적으로 증가하였고, 특히 10분에서 15분을 지나며 가장 큰 폭의 유의적 증가가 나타났고, 25분과 30분의 오버런은 유의적 차가 없었음.
- 동결 중 10분에서 IC-6이 22.36%의 오버런으로 가장 높은 값을 나타냈고, IM-4가 14.14%, IM-2가 13.56%로 Sherbet 7.44%의 오버런에 비해 유의적인 증가 값을 나타내었다(Table 28).

Table 28. 타락 아이스크림류의 Overrun Mean±S.D.(%)

	Sherbet	IM-2	IM-4	IC-6	F-value
5 min	1.51±0.03 ^A	1.87±0.82 ^A	1.71±0.99 ^A	1.87±0.83 ^A	0.15
10 min	7.44±0.86 ^{ab}	13.56±2.00 ^{bB}	14.14±1.69 ^{bB}	22.36±1.19 ^{cB}	49.93 ^{***}
15 min	34.75±4.01 ^C	32.42±8.12 ^C	31.41±4.58 ^C	41.14±3.46 ^C	1.99
20 min	37.15±4.87 ^C	32.93±0.35 ^C	36.34±4.89 ^{CD}	42.22±1.59 ^{CD}	3.52
25 min	42.26±2.19 ^{CD}	37.98±0.42 ^{CD}	38.95±5.06 ^D	45.05±1.65 ^D	3.76
30 min	42.50±2.68 ^D	40.65±0.46 ^D	42.53±3.81 ^D	45.05±1.65 ^D	4.35
<i>F</i> -value	126.18 ^{***}	59.77 ^{***}	52.49 ^{***}	248.39 ^{***}	

¹⁾ Samples at the same as in <Table 7>

²⁾ Different superscripts within a row(a~c) and a column(A-D) indicate significantly different($p<0.05$) by the Duncan's multiple range test

*** $p<0.001$

(4) 타락 아이스크림류의 녹아내리는 정도

- 시간의 경과에 따라 모든 시료가 유의적으로 녹아내리는 양이 증가하였고, 모든 시간대에서 유지방을 가장 많이 함유하고 있는 IC-6이 가장 많이 녹아내렸고, 다음은 아이스밀크류인 IM-4, IM-2 순으로 녹는 양이 많았음.
- 수분을 가장 많이 함유하고 있는 Sherbet이 가장 낮은 녹는 양을 나타내었음.

Table 29. 타락 아이스크림류의 녹아내리는 정도 Mean±S.D.(ml)

	Sherbet	IM-2	IM-4	IC-6	F-value
15 min	23.00±1.00 ^{aA}	29.00±7.55 ^{abA}	38.67±9.02 ^{bA}	59.33±7.02 ^{cA}	16.13 ^{***}
30 min	40.00±2.00 ^{ab}	57.33±11.02 ^{bB}	63.33±1.53 ^{bB}	86.33±3.79 ^{cB}	30.97 ^{***}
45 min	53.67±1.53 ^{ac}	79.33±3.06 ^{bc}	86.33±1.53 ^{cC}	96.67±0.58 ^{dC}	281.24 ^{***}
60 min	80.67±1.15 ^{ad}	88.67±2.31 ^{bc}	125.00±5.00 ^{cD}	149.33±1.15 ^{dD}	373.86 ^{***}
<i>F</i> -value	822.05 ^{***}	43.78 ^{***}	145.59 ^{***}	261.31 ^{***}	

¹⁾ Samples at the same as in <Table 7>

²⁾ Different superscripts within a row(a-d) and a column(A-D) indicate significantly different($p<0.05$) by the Duncan's multiple range test

*** $p<0.001$

(5) 타락 아이스크림류의 총 유산균수

- 타락 20%를 혼합한 Sherbet은 7.32 Log CFU/g 으로 유의적으로 낮게 계측되었고, 동일하게 타락 50%를 혼합한 IM-2, IM-4, IM-6은 8.35~8.49 Log CFU/g으로 유의적 차이가 없었음 (Table 30).

Table 30. 타락 아이스크림류의 총 유산균수				Mean±S.D. (Log CFU/g)
Sherbet	IM-2	IM-4	IC-6	F-value
7.32±0.10 ^a	8.35±0.47 ^b	8.49±0.05 ^b	8.39±0.10 ^b	161.33 ^{***}

¹⁾ Samples at the same as in <Table 7>

²⁾ Different superscripts within a row(a-b) indicate significantly different($p<0.05$) by the Duncan's multiple range test

*** $p<0.001$

(6) 타락 아이스크림류의 관능 품질 특성



Figure 10. 관능검사용 타락 아이스크림류

(가) 강도평가

- 이취향목에서는 모든 시료가 2.05~2.85의 범위로 시료 간 유의적 차는 없었음.
- 우유 향에서는 IC-6이 4.10으로 가장 높았고, Sherbet이 3.40으로 IM-4 2.45와 IM-2 2.65에 비해 더 높게 평가.
- 신맛은 IM-4와 IC-6이 2.15, 2.70으로 낮게 평가되었고, Sherbet이 4.20, IM-2가 4.10으로 더 신맛이 있다고 평가.
- 단맛은 IC-6이 5.05로 가장 높게 평가되었다. 쓴맛과 녹는 정도는 시료 간 유의적 차는 없었으나, 쓴맛은 IC-6이 1.65로 가장 낮게 평가되었고, 입 안에서 녹는 정도는 수분 함량이 가장 높아 단단한 질감을 보였던 Sherbet이 4.45로 높았고, 다음이 IC-6으로 4.25로 평가.
- 크림미한 정도는 유지방 6%로 가장 높았던 IC-6이 4.60으로 유의적으로 높게 평가되었고, 바디감도 5.05로 가장 높게 평가되었음.

Table 31. 타락 아이스크림류의 관능 품질특성 - 강도 평가

	Mean±S.D.				
	Sherbet	IM-2	IM-4	IC-6	F-value
Off-flavor	2.70±1.66	2.85±1.81	2.20±1.54	2.05±1.50	1.11
Milk flavor	3.40±1.31 ^b	2.65±1.09 ^{ab}	2.45±1.57 ^a	4.10±1.41 ^c	6.17 ^{**}
Sour	4.20±1.54 ^b	4.10±1.70 ^b	2.15±1.35 ^a	2.70±1.63 ^a	9.04 ^{***}
Sweet	3.05±1.19 ^{ab}	2.50±0.89 ^a	3.50±1.57 ^b	5.05±1.23 ^c	15.48 ^{***}
Bitter	2.40±1.67	2.55±1.96	1.80±1.44	1.65±1.46	1.44
Melt	4.45±1.43	3.50±2.12	3.15±2.11	4.25±1.62	2.22
Creamy	2.70±1.03 ^b	1.55±0.76 ^a	1.50±0.95 ^a	4.60±1.79 ^c	29.40 ^{***}
Body	3.25±1.68 ^b	2.80±2.12 ^{ab}	1.95±1.61 ^a	5.05±1.05 ^c	12.45 ^{***}

¹⁾ Samples at the same as in <Table 7>

²⁾ Different superscripts within a row(a-c) indicate significantly different($p<0.05$) by the Duncan's multiple range test

** $p<0.01$ *** $p<0.001$

(나) 선호도 평가

- 외관 선호도에서 IC-6이 5.70으로 가장 높게 평가되었고, 다음이 Sherbet 5.20으로 평가.
- 맛, 풍미, 조직감에 대한 선호도에서도 IC-6이 다른 시료에 비해 유의적으로 높게 평가.
- Sherbet은 IM-4에 비해 맛, 조직감에서 높게 평가되었고, IM-2보다 조직감에서 더 높게 평가. 전반적인 선호도에서 IC-6이 5.15로 가장 높게 평가되었고, Sherbet이 3.75, IM-2가 3.05, IM-4가 2.50으로 평가.
- 타락을 첨가한 아이스크림류는 유지방 함량이 높은 아이스크림의 관능 선호도가 가장 높았고, 유지방 함량이 중간 정도인 아이스밀크에 비해 유지방 함량이 없는 Sherbet의 관능선호도가 조금 더 높음을 알 수 있었음.
- 단맛, 크림미한 정도, 바디감의 강도가 가장 높게 평가되었던 IC-6이 전반적 선호도에서도 5.15로 가장 높게 평가, 유지방 함량이 중간 정도인 아이스 밀크류인 IC-4가 2.50, IC-2가 3.05인 것에 비해 유지방 함량이 없는 Sherbet이 3.75로 관능 선호도가 조금 더 높았음.

Table 32. 타락 아이스크림류의 관능 품질특성 - 선호도 평가

	Mean±S.D.				
	Sherbet	IM-2	IM-4	IC-6	F-value
Appearance	5.20±1.36 ^c	4.65±0.99 ^b	4.20±0.95 ^a	5.70±1.22 ^d	6.52 ^{**}
Taste	3.65±1.60 ^b	2.80±1.24 ^{ab}	2.45±1.28 ^a	5.10±1.83 ^c	12.26 ^{***}
Flavor	3.45±1.39 ^a	2.95±0.94 ^a	2.90±1.07 ^a	4.60±1.10 ^b	9.63 ^{***}
Texture	3.90±1.55 ^b	2.60±1.23 ^a	2.50±1.28 ^a	5.35±1.31 ^c	19.96 ^{***}
Overall acceptability	3.75±1.59 ^c	3.05±1.15 ^b	2.50±1.40 ^a	5.15±1.76 ^d	11.86 ^{***}

¹⁾ Samples at the same as in <Table 7>

²⁾ Different superscripts within a row(a-d) indicate significantly different($p<0.05$) by the Duncan's multiple range test

** $p<0.01$ *** $p<0.001$

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	세부 1. 타락 발효유의 제품화 기술 개발	○ 타락균주 및 상업적 유산균주 검토 및 선별	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 생막걸리 효모 및 유산균 분리 ▪ 몽골 유제품 및 타락균주의 상업적 균주 선별 및 동정
		○ 선별 균주를 적용한 배양물의 특성 분석 및 선별균주의 상품화	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배양물의 이화학, 미생물학적 특 성 분석 ▪ 타락의 전처리별, 초기산도, 발 효온도에 따른 발효특성 조사 ▪ 선별 균주의 특허 출원을 위한 기능성 탐색
		○ 선별 균주의 표준 배합비 설정	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 타락 발효유 표준 배합비 개발
		○ 발효 공정 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fermenter를 이용한 대량생산공 정 및 제조공정도 개발
	협동 1. 전통발효유 타락의 제조 표준화 및 영양적 우수성 규명	○ 전통 발효유 타락의 표준화 제법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 발효원인 다양한 막걸리를 사용 하여 타락 제조, 우수제품 선정
		○ 발효특성 조사 및 균주 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pH, 산도, 점도, 유리당, 유기산, 젖산균수의 변화, 타락의 무기 질, 지방산 분석, 미세구조 관찰 및 다당류 추출 및 구성 단당류 분석
	협동 2. 타락의 기능성 분석방법 확립 및 <i>in</i> <i>vitro</i> 기능성 규명	○ 타락의 추출물 제조법 확립 과 분획	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 타락 추출물 분획을 위한 유기 용매 선정 : n-hexane, chloro- form, ethyl acetate, n-butanol ▪ 타락 추출물을 phosphate buffer 와 유기용매를 이용하여 순차 분획
		○ 면역 증진 기능성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 면역세포 선정 및 배양조건수립 ▪ 면역세포 증식도 측정법 수립 ▪ 타락의 면역세포 성장영향분석
		○ 면역 증진 기능성 강화 조건 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 타락 제조 조건 별 시료 확보 ▪ 제조 조건에 따른 타락의 면역세포 성장 영향 비교 분석
	협동 3. 타락의 응용제품 개발 및 식문화적 가치 규명	○ 타락응용 젤리류 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 타락을 이용한 젤리류의 제조 조건 확립
				<ul style="list-style-type: none"> ▪ 제조된 제품의 품질특성검사

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2014)	세부 1. 타락 발효유의 제품화 기술 개발	타락 시제품의 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배합비 조정 ▪ 관능검사
		시제품의 특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 품질 특성분석 ▪ 영양성분 분석
		시제품 상품화 방안 모색	80	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 참여기업 관련부서 협의
		실용화를 위한 포장원료, 방법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 포장용기, 형태, 방법 검토
		피부 개선 관련 기능성 테스트	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 보습, 주름, 미백의 피부개선 관련 기능성 검토
	협동 1. 진통발효유 타락의 제조 표준화 및 영양적 우수성 규명	영양성분 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 알콜, CO2, 향기성분, 아미노산 등
		기호도 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 기호도 위치분석 ▪ 생애주기별 소비자 검사 ▪ 정량적 묘사분석 ▪ 기호계층분석
	협동 2. 타락의 기능성 분석방법 확립 및 <i>in vitro</i> 기능성 규명	항비만 기능성 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 지방세포 증식 조절 측정 ▪ 지방세포 자가사멸유도분석 ▪ <i>in vivo</i> 항비만 기능성 규명 (한국식품연구원 의뢰)
		암세포 성장억제 기능성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 암세포 증식 억제 측정 ▪ 암세포 성장억제 기전 규명
		타락의 기능성 강화 조건 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 항비만, 암세포 성장억제 기능성 강화조건 탐색
	협동 3. 타락의 응용제품 개발	프로즌 요구르트(아이스크림)의 제조 조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 프로즌 요구르트 적용 적합성 검토 및 표준레시피 확립
		응용제품의 품질특성검사	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 이화학적 품질검사 ▪ 관능적 검사

2. 관련분야의 기술발전의 기여도

- 현재까지 우리의 전통적인 발효유인 타락의 발효 특성 및 우점균의 분리 및 표준화를 통하여 제품화 시킨 국내회사는 전무한 실정이다. 그 외에 유산균 항균물질을 이용한 제품의 경우 이용형태는 발효액 성분을 모두 포집하여 식품형태로 이용한 제품사가 대부분이다. 활용방안 및 용도적성이 뚜렷하여 고부가가치의 산업화전망이 있는 특정 유산균에 대하여 발현 유전체를 분리, 동정하여 자원화하거나 발현 물질의 구조 규명 및 분리, 정제하고 활용시의 효능효과를 규명하는 등 종합적인 연구개발을 시도하여 우리나라 고유의 전통음식인 타락을 연구하여 건강기능 유제품으로 개발하거나 한 회사는 아직 국내외에 없다. 앞으로 전통식품인 타락을 이용한 유산균을 이용한 다양한 산업화 활용방안이 다양하게 도출되고 기존의 기능성 식품 시장이 더욱 커질 것으로 전망되며 많은 연구자들이 건강증진 물질 탐색 및 형질전환 유산균 개발 가능성을 확인하고 있다. (2003. 8. 미생물유전체활용기술 개발사업단 소식지. page 6~ : Pdeiococcus pentosaceus 유전체의 기능 분석 중)
- 현재까지 알려진 유산균의 효능은 정장작용, 혈중콜레스테롤 감소기능, 면역증강, 내인성 감염억제 기능, 항암 효과 등이 있으며 이러한 기능을 활용한 위궤양 치료제, 항생제, 콜레스테롤 저하제, 항암제 등이 개발되고 있으며 유산균 관련 의약품 시장은 기능성 식품에 버금가는 시장을 형성할 것으로 전망되고 있다. 이에 힘입어 전통식품인 타락을 활용한 발효 유제품의 개발 및 기능성 식품의 소재로 활용 시 이로 인한 경제적 이익 창출은 막대할 것으로 판단된다.
- 앞으로 유산균은 다른 미생물들에 비해 긍정적인 인지도를 가지고 있어 이를 이용한 제품은 꾸준한 시장의 성장이 가능할 것으로 생각되어지고 현재 제약분야에서는 유산균을 이용한 타겟 제약품의 생산이 아주 미미하지만 앞으로 성장이 기대되는 산업 분야로서 유산균을 이용한 제약품을 생산할 경우 내성과 같은 문제점을 해결할 수 있을 것으로 기대되며, 이 분야에 대한 제약품의 발견은 앞으로 경제적으로나 사회적으로 큰 이익이 가능할 것으로 기대된다.
- 그러나, 발효제품과 같이 미생물을 이용하는 제품의 경우는 브랜드파워를 무시할 수 없으므로 관련 업계의 브랜드 밸류를 갖춘 기업과의 co-work이 함께 된다면 더욱 큰 시너지 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 특허출원

- 본 연구결과의 산업재산권 확보를 위해 막걸리 분리 유산균에 대한 특허 ‘여드름 원인균 프로피오니박테리움 아크네스의 생장억제 효능을 가지는 락토바실러스 파라카제이 HY7301 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품’과 응용제품에 대한 특허 ‘타락을 이용한 젤리의 제조방법 및 타락을 이용한 젤리’, ‘타락을 이용한 푸딩의 제조방법 및 타락을 이용한 푸딩’, ‘타락을 이용한 아이스크림의 제조방법 및 타락을 이용한 아이스크림’을 특허 출원하였음. 향후 막걸리 균주에 대한 특허 ‘피부 미백 활성을 가지는 락토바실러스 파라카제이 HY7301의 우유 발효물’을 추가 출원할 예정임.
- ‘여드름 원인균 프로피오니박테리움 아크네스의 생장억제 효능을 가지는 락토바실러스 파라카제이 HY7301 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품’, ‘피부 미백 활성을 가지는 락토바실러스 파라카제이 HY7301의 우유 발효물’ 특허가 등록될 경우, 피부 개선 관련 원료로서 상기 균주를 적용한 고부가가치 ‘피부 기능성 발효유 제품’ 개발이 가능할 것으로 기대됨.

나. 학술대회 발표

- 타락발효유의 제품화 기술개발 관련 다수의 연구결과를 국내학술대회에 지속적으로 발표하였음.
 - The effects of *L. paracasei* subsp. *paracasei* HY7301 isolated from Makgeolli on cell viability and synthesis of procollagen in human fibroblast. 다산컨퍼런스. 2013.10.31.~2013.11.02. 명길선 외 3인
 - The Probiotic Characteristics of *Lactobacillus paracasei* isolated from Makgeolli. 한국식품과학회. P12-104. 2014.08.25.~2014.08.27. 김수아 외 3인
 - Antagonistic Activity of Potent Probiotic *Lactobacillus* Strain against Acne Pathogens. 한국미생물학회. 2014.04.30.~2014.05.02. 명길선 외 3인
- 전통발효유 타락의 제조표준화 및 영양적 우수성 규명 관련 다수의 연구결과를 국내학술대회에 지속적으로 발표하였음.
 - Historical and Cultural Study on Korean Traditional Fermented Milk, Tarak. 한국식품과학회. P12-052. 2014.08.25.~2014.08.27. 오사다사치코 외 3인
 - Effects of three *Lactobacillus paracasei* strains found in Korean traditional rice wine on nutritional and sensory characteristics of fermented milk. 한국식품과학회. P12-106. 2014.08.25.~2014.08.27. 김상숙 외 7인
 - Study on exo-polysaccharides of cultured milk inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains isolated from Korean traditional rice wine, Makgeolli. 한국식품과학회. P12-098. 2014.08.25.~2014.08.27. 김은정 외 6인
 - Studies on Fermentation Characteristics of Tarak, Korean Traditional Fermented Milk, through the Analysis of Microbial Succession and Metabolites. 한국식품과학회. P12-110.

2014.08.25.~2014.08.27. 정상은 외 8인

- 타락의 응용제품 개발 관련 다수의 연구결과를 국내학술대회에 지속적으로 발표하였음.
- 타락을 이용한 아이스크림류의 품질특성. 한국식품조리과학회. 식품가공 FPP-4. 2014.10.17. 고성희 외 4인
- 전통발효유 타락을 이용한 디저트상품 개발. 한국식품조리과학회. 식품조리 FCO-6. 2014.10.17. 이경연 외 4인

다. 논문발표 및 게재

- 타락의 응용제품 개발 관련된 논문을 3건 게재하였음.
- 전통발효유 타락을 이용한 젤리의 품질 특성. 한국식품조리과학회지. 29(5); 599-603 (2013)
- 전통발효유 타락을 이용한 푸딩의 품질 특성. 한국조리학회지. 20(3); 90-99 (2014)
- 전통발효유 타락을 이용한 아이스크림의 품질 특성. 한국조리학회지. 20(6) (2014)

- 향후 비SCI급 2건, SCIE급 4건의 논문을 추가 게재할 예정임.
- Fermentation and Microbial Characteristic of Korea Traditional Fermented Milk Tarak. 한국식품영양과학회지. (투고확인) (2015)
- 전통발효유 타락의 면역 세포 증식 및 멜라닌 생성에의 효과. 한국식품과학회지 (투고예정)
- Studies on Fermentation Characteristics of Tarak, Korean Traditional Fermented Milk, Through the Analysis of Microbial Succesion and Metabolites. *Journal of Microbiology* (투고예정)
- Studies on exo-polysaccharaides of cultured milk inoculated with *Lactobacillus paracaesi* strains isolated from Korean traditional rice wine, Makgoelli. *Food Science and Biotechnology* (투고예정)
- Effects of the three *Lactobacillus paracasei* strains found in Korean traditional rice wine on nutritional and sensory charaterastics of fermented milk. *Food Science and Biotechnology* (투고예정)
- Effect of Tarak extracts on lipid metabolism. *Food Science and Biotechnology* (투고예정)

2. 성과 활용계획

- 전통발효유 타락의 제조공정 및 기술개발
- 유산균을 이용한 전통 기능성 발효에 관한 기술 축적 및 타락균 발효유 개발을 위한 균주의 배양 방법과 발효조건 및 제조공정을 습득한 전문 인력을 양성
- 기능성 발효유로서의 타락 제품 개발
- 외식산업을 통한 한식의 디저트로서 타락 발효유의 브랜딩화
- 전통발효유 타락의 제품 개발을 통해 전통 발효식품에 다양한 콘텐츠 제공
- 타락의 응용제품 개발을 통해 타락의 수요에 대한 다각화 및 홍보자료 구축
- 향암 및 항비만, 항동맥경화, 항당뇨, 항산화 기능성 검증 실험 기술을 이용하여 타락 발효산물의 생리활성 물질 연구에 응용

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

세계 유산균시장은 약 21조원 규모로 유럽(33%), 미국(24%), 일본(19%) 등이 76%를 차지하는 선진국 중심 시장이다. 현재 세계적으로 유산균 배양기술을 보유한 회사는 덴마크의 다니스코, 크리스찬한센, 일본의 모리나가, 캐나다의 로셀 등이며 중간개발에서 완제품 생산에 이르는 경제적 규모의 일관된 생산체제를 구축한 기업은 세계적으로 5개사 정도로 추정되고 있다.

① 미국

- i) 해피패밀리(Happy family사) : 소화기관의 균형을 도와 면역력을 향상시키는 유아용 프리바이오틱스와 프로바이오틱스 ‘해피멜츠’ 제품을 출시하였다. 이 제품은 유기농 과일과 요구르트를 사용하였으며 약 20억 마리의 유산균을 함유하고 있다.
- ii) 스톤니필드팜사 ‘뉴트리카’ : 6개의 다른 균주를 혼합한 제품으로 소화증진, 유당불내증 완화, 칼슘흡수, 면역, 암 예방 등 여러 가지 효능을 열거하고 있다.
- iii) Coromega사 : 오메가 3 지방산을 날개 포장 하여 소비자들이 좋아하는 음식이나 음료에 섞을 수 있게 한 제품을 선보이고 있다.

② 일본

- i) 연구동향 : 유산균 음료, 발효 유제품, 의약품, 생균체제의 개발이 일찍부터 추진되어 왔으며, 유산균과 비피더스균의 probiotics, 생체 내 유용균의 증식인자인 올리고당, 식이섬유 등 prebiotics 소재연구는 세계 최고 수준으로 알려져 있으며 최근 면역부활 기작, 소화기관의 질병 예방 효과, genome 및 DNA 수준의 균주 해석을 중심으로 한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- ii) 유산균 음료 시장규모 : 현재 유산균과 비피더스균의 식품시장 규모는 유산균 음료가 800억 엔, 발효유가 약 2500억 엔이다.
- iii) 기린맥주그룹 : 가열처리 균체 KW 유산균(lactobacillus parakasei KW 3110주)는 기린맥주와 고이와이 유업이 공동 개발한 알레르기 개선효과가 있는 유산균으로서 그룹이 총력을 기울여 연구 개발을 추진하고 있다.
- iv) 기업마다 차이가 있지만 기업에 따라서는 자사 개발 균주 여러 종을 조합하여 제품화하거나 캡슐, 과립형 등 다양한 형태의 제품을 출시하고 있다.

③ 유럽

- i) 연구/시장 동향 : 1989년 Fuller가 probiotics의 개념을 제창한 때부터 본격적으로 유산균의 생리활성 연구가 시작되었다. 유럽에서 독일, 프랑스, 영국, 네덜란드가 가장 중요한 기능성식품 시장이며, 유럽의 기능성유제품 시장의 2/3를 이루고 있다. 2000년의 독일 기능성식품 시장에 대한 정확한 수치는 없으나 6억US\$를 초과하는 것으로 추정된다. 현재 유럽 기능성식품 시장은 장건강제품, 특히 생균제가 주를 이루는데 이들 가운데 유제품이 핵심 분야로 약 13억 5천만 US\$의 판매가 이루어지고 있다. 유로모니터 인터네셔널(Euromonitor Internationla)에 의하면 유럽의 떠먹는 유산균 요구르트 시장은 2005년 16

억 달러 규모로 성장하였다.

- ii) 캐나다 랄푸드사 : 코팅된 유산균을 초콜릿에 사용하는 방법을 개발하여 이 초콜릿을 비스킷, 에너지바, 시리얼과 같은 제품에 적용하고자 한다.
- iii) 이탈리아 Sitia-Yomo SPA : 프로바이오틱 제품을 DIY형태로 만들어 소비자들이 직접 자신의 음식에 넣어 섭취할 수 있도록 하였다.

<표 1> 유산균 관련 제품을 생산하는 각 국의 기업 및 제품

국가	기업명	대표제품	특성	특이사항
한국	한국 야쿠르트	쿠퍼스	헛개나무 열매에서 추출한 분말 함유, 공격적인 마케팅	국내 발효유의 대표적인 기업
	뉴팜	온가족혼합유산균 뉴팜혼합유산균 베베락혼합유산균	유산균을 포함한 다양한 웰빙관련 제품	
	셀바이오텍	듀오락	한국과 일본에서 특허 및 출원, 유산균 관련 자체 기술력 확보	대장암을 치료하는 유산균 개발을 목표로 함
	한미약품	메디락S 장용캡슐	장질환의 원인 개선	
	(주)바이오리듬	코팅김치유산균	유산균의 생존률과 기능 및 활성 유지	
	씨티바이오		김치로부터 유산균 분리, 과일로 배양	AI바이러스 억제 유산균 관련 특허 획득
미국	해피패밀리	해피멜츠	면역력 향상을 위한 유아용 제품, 약 20억 마리 유산균 함유	
	스토니필드 팜	뉴트리카	여러 균주 혼합, 다양한 효능 갖춤	
	Coromega	오메가 3 지방산	제품 날개 포장하여 소비자 편리성 확보 및 취향고려	
일본	기린맥주 그룹	KW 유산균	가열처리 균체, 알레르기 개선효과 가짐	기린맥주와 고이와이 유업이 공동 개발한 유산균에 총력을 기울임
유럽	캐나다 랄푸드	코팅유산균	초콜릿에 사용	
	이탈리아 Sitia-Yomo SPA	프로바이오틱 제품	DIY형태로 제작하여 소비자 취향 고려	

제 7 장 참고문헌

- 경영일, 조한용, 김윤성, 김현철(2005). 서양요리(Western Cooking), 광문각, 174, 파주
- 김광옥, 김상숙, 성내경, 이영춘(1993). 관능검사 방법 및 응용. 신광출판사.
- 김재현 농촌진흥청 발효이용과장(2012). 06. 20, 정책브리핑 칼럼&피플기고
- 미생물유전체활용기술 개발사업단 소식지(2003). 08. page 6~ : Pdeiococcus pentosaceus 유전체의 기능 분석
- 식품의약품안전처. 2013. 건강기능식품의 기준 및 규격
- 식품의약품안전처. 2014. 축산물의 가공기준 및 성분 규격
- 박상옥, 김복자, 김유실, 이양순(2004). 서양요리, 형설출판사, 302-304, 파주
- 안종철(2005). 서양요리의 기초와 응용, 훈민사, 145, 서울
- 안호기, 이은준, 홍금주, 김지웅, 김동호, 김원모(2013). 디저트, (주)교문사, 4, 파주
- 수운잡방 음식연구원, 김유 원저, 윤숙경 편역(2011). 수운잡방(需雲雜方), 컴퍼니 마요, 30-31, 안동
- Adolfsson O, Meydani SN, Russel RM(2004). Yogurt and gut function. *Am J Clin Nut* 80(2):245-256
- AOAC(1990). Official methods of analysis. 15th edition, Association of Official Analytical Chemist. Washington D.C. 1017-1918
- Cho Y, Choi MY(2010). Quality characteristics of Jelly containing added Turmeric(*Curcuma Longa* L.) and Beet(*Beta vulgaris* L.). *Korean J Food Cookery Sci* 26(4):481-489
- Choi EH, Kim DS, Choi SK, Park KB(2013). Optimization and Characteristics of Balsamic Vinegar Jelly with Various Gelling Agents. *The Korean Journal of Culinary Res.* 19(1):155-163
- Dorgan M, Ersoz NB, Toker OS, Kaya Y, Camylmaz E(2014). Optimization of gum combination for instant pudding based on creep and recovery parameters by mixture design

approach. *Eur Food Res Technol* 238(1):47–58

Garces Rafael and Manuel Mancha.(1993). One-Step Lipid Extraction and Fatty Acid Methyl Esters Preparation from Fresh Plant Tissues. *Analytical Biochemistry* 211:139–143.

Gilliland SE(1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology letters* 87(1):175–188

Grujic R, Antonic B, Vujadinovic D, Macanovic M(2011). Traditional sour milk product as basis for the development of new products in Industrial condition. *Quality of Life* 2(3/4):66–74

Harper. S. J., Barnes. D. L. Bodyfelt. F. W. and McDaniel. M. R.(1991). Sensory ratings of commercial plain yogurts by consumer and descriptive panels. *J. Dairy Sci.*74(9):2927–2935

H. Kitazawa, T. Harata, J. Uemura, T. Saito, T. Kaneko, T. Itoh.(1998). Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharides from *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bularicus*. *International Journal of Food Microbiology* 40 169–175

Jang JS, Park YS(2007). Changes in properties of Jeung-pyun prepared with the addition of milk. *Korean J Food Cookery Sci* 23(3):354–362

Kang BS, Kim JI, Moon SW(2012). Quality Characteristics of Yogurt Added with *Sansuyu*(*Corni Fructus*) Extracts. *The Korean Journal of Culinary Res.* 18(3):180–190

Kennedy S(2013). Frozen pudding and mousse hit the sweet spot. 2013 September. *Dairy Foods*. p 20

Kim AJ, Rho JO(2011). The Quality characteristics of Pudding added with black garlic concent rate. *J Korean Living Sci Accoc* 20(2):467–473

Kim AJ, Rho JO(2011). The Quality characteristics of jelly added with black garlic concentrate. *J Korean Living Sci Accoc* 20(2): 467–473

Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Woo KJ(2006). Study on Preparation and Quality of Jelly using Mulberry Leaf Powder. *Korean J Food Cookery Sci* 22(1):56–61

Kim EJ, Han YS(2008). Studies on the manufacturing and fermentation characteristics of soy-sauce kimchi. *Korean J Food Cookery Sci* 24(4):517–524

Kim TY, Kom JM, Yoon IH, Chang CM(1994). Changes in chemical components of soybean cheese making from cow's milk added soybean curd. *J Korean Soc Food Nutr* 23(5): 837-844

Kim YK, Kwon KH, Kim BS, Kim JH, Cha HS(2013). Changes in quality of raw ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) pudding during storage. *Korean J Food Cookery Sci*. 29(6):761-768

Lee KY, Lee JY, Han YS, Yoon HG, Ko SH(2013). Quality characteristics of Jelly using the Tarak, Traditional Fermented Milk. *Korean J Food Cookery Sci* 29(5):599-603

Lee YD, Yoo HL, Hwang JY, Han BK, Choi HJ, Park JH(2010). Antimicrobial Effect of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi and Tarak on *Helicobacter pylori*. *Korean J Food & Nutr* 23(4):664-669

Lim GS, Lee KS, Jang HJ, Jung JK, Lim JY, Chun TH, Han YS, Oh SW(2013). Microbial community analysis of *Tarak*, a fermented milk product. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42(7):1109-1114

Lim HS, Narsimhan G(2006). Pasting and rheological behaviour of soy protein-based pudding. *LWT Food Sci Technol* 39(4):343-349

L. Zahang, C. Liu, D. Li, Y. Zhao, X. Zhang, X. Zeng, Z. Yang, S. Li.(2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88, *International Journal of Biological Macromolecules*, (54) 270-275

Meydani SN, Ha WK (2000). Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr* 71(4):861-872.

Mo EK, Kim HH, Kim SM, Jo HH, Sung CK(2007). Production of *Sedum* extract adding Jelly and assessment of its physicochemical properties. *Korean J Food Sci Technol* 39(6):619-624

Moon HK, Lee SW, Moon JN, Yoon SJ, Lee S, Kim GY(2012). Quality characteristics of Jelly added with Mulberry juice. *Korean J Food Cookery Sci* 28(6):797-804

Oh HJ, Back JW, Lee JY, Oh YJ, Lim SB(2013). Quality Characteristics of Jelly Added with pressed Kiwi(*Actinidia chinensis* var. 'Halla Gold') Juice. *The Korean Journal of Culinary Res.* 19(5):110-120

Park SG, Song TH, Kim DH, Kim GH, Jang KI(2014). Quality Property of Peach Pudding

Added with Korean Peach(*Prunus persica* L. Batsch) Juice and Gelatin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(2):265-272

Park YM, Yoon HH(2012). Quality Characteristics of Sulgidduck Using Dry Rice Powder Added with Different Amounts of Milk. *Korean J Food Cookery Sci* 18(5):267-278

P. Ruas-Madiedo, J., Hufenholtz, P., Zoon(2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, (12)163-171

SAS. SAS User's Guide(1988). Statistics ver 6.03, SAS institute Inc., Cary, NC.

Seol KH, Chang OK, Kim MK, Han GS, Jeong SG, Park BY, Ham JS(2012). Production of Bioactive Peptides from Milk. *Koran J Dairy Sci. Technol.* 30(1):37-44

Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R(2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 77(2):326-330

Son MJ, Whang K, Lee SP(2005). Development of Jelly Fortified with Lactic Acid Fermented Prickly Pear Extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34(3):408-413

Sueunjabbang Research Institute(2011). Sueunjabbang. Compan Mayo, Andong, Korea. pp.30-31

Sun Y, Hayakawa S, Ogawa M, Izumiri K(2007). Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-psicose. *Food Control* 18(3):220-227

Yu OK, Back HI, Cha YS(2008). Quality characteristics of Pudding Added with Bokbunja(*Rubus coreanus* Miquel) Fruit Juice and Bokbunja Wine. *Korean J Food Culture* 23(5):616-620

주 의

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