

최 종 보 고 서

1
1
1
1
4
1
-
2

면역활성
유산균과
유자추출물
을 이용한
기능성
저염명란젓갈의
개발연구

발간등록번호
11-1543000-000374-01

면역활성 유산균과 유자추출물을 이용한 기능성 저염명란젓갈의 개발 연구

(Development of a low-salted egg of
pollack(Myeong-ran jeotgal) by using
the immuno-active lactic acid
bacteria and citron extract)

주 의
(편집순서 8)

농림수산식품부

(15 포인트 고딕체열)

↑
6cm
↓

연세대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 2012-12-26 ~ 2013-12-25 총 2년간에 걸친 “면역활성 유산균과 유자추출물을 이용한 기능성 저염 명란젓갈의 개발연구에 관한 연구(과제번호: 111141-2)” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 12월 25일

주관연구기관명 : 연세대학교

주관연구책임자 : 윤 성 식

연 구 원 : 강 승 범

연 구 원 : 최 재 임

연 구 원 : 이 경 상

연 구 원 : 박 진 호

연 구 원 : 염 종 선

참 여 기 업 : 부일식품

참여기업책임자 : 황 인 기

협동연구기관명 : 단국대학교

협동연구책임자 : 신 영 재

연 구 원 : 김 기 환

연 구 원 : 박 찬 영

연 구 원 : 윤 지 현

연 구 원 : 정 하 연

요 약 문

I. 제 목

면역활성 유산균과 유자추출물을 이용한 기능성 저염 명란젓갈의 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 젓갈은 신선한 재료와 소금만 있으면 쉽게 가공이 가능한 제조법의 단순성으로 일시대량으로 어획되는 소형 잡어류의 효과적인 저장수단임.
- 제조과정 중 자연스럽게 염분의 농도가 높아짐에도 불구하고 발효 및 유통과정 중 유해 미생물이 증식할 우려가 크기 때문에 과학적인 접근을 통해 염분의 농도 및 보존 방법의 개선이 필요함. 특히 최근에는 식생활의 웰빙화 경향이 뚜렷하므로 고단백, 저칼로리, 저염 등 기능성 식품의 선호도가 높아지는 추세임.
- 본 연구는 비타민, 칼슘, 인등의 영양성분이 풍부한 명란젓갈을 위생적으로 제조하고 그 품질을 향상시키기 위해 면역활성 유산균과 유자추출물을 이용한 기능성 저염 명란젓갈의 개발을 위한 과제임.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 면역활성 유산균 대량 배양
 - 면역활성(조절기능)과 병원성 세균이 억제하는 Bacteriocin 생성능 검토
 - 유산균의 증식을 촉진하는 경제적인 배지 검토
 - 고농도 유산균의 대량배양 조건 검토
 - 젓갈 생산용 고농도 유산균의 대량 공급
- 유자 생리활성물질 추출
 - 유자 중 항산화 효과 탐색 및 추출
 - 생리활성 물질 농축 및 활용 연구
 - 젓갈의 향미 보완 연구
- 면역활성 유산균을 첨가한 명란젓갈 발효 공정의 확립
 - 명란 젓갈의 유해 미생물 저해 연구
 - 저염화에 따른 저장성 저하 보완 연구
 - 기능성 유산균과 유자추출물에 의한 젓갈 발효제어 연구

IV. 연구개발 결과

1. 발효식품 및 신선한 과일로부터 다양한 유산 균주를 분리하였다. 분리균주를 이용하여 1차로 MTT assay를 측정하여 총154개의 분리주에서 RAW 264.7 cell-line의 증식에 영향을 유무를 확인하였고, Sandwich ELISA를 이용하여 IL-1 α 의 농도를 측정한 결과를 종합하여 볼 때 FBT26(*L. plantarum*), B28(*L. casei*), Yo-5(*B. longum*)가 RAW 264.7 cell-line에 영향을 미쳐 cytokine의 과발현을 유도하는 것을 확인하였다.

2. 경제적 관점에서 저렴한 유산균용 식용배지를 개발 하고자 분말 유청배지를 제조하고 다양한 질소원에 따른 미생물의 증식 정도를 검토하였다. 즉, yeast extract, soytone, beef extract, malt extract를 1-1.5% 보충하여 배지를 제조 한 다음 유산균을 배양 한 결과 유기 질소원으로서의 yeast extract(1.5%)가 가장 우수했다.

3. 발효조를 이용한 대량배양이 회분배양을 통한 유산균의 배양보다 더 효과적임을 알 수 있었다. 발효 개시 6시간 경과 후 환원당 량이 빠르게 감소함에 따라 18시간 부터는 40% 농도의 glucose를 넣어주면서 총 36시간을 배양한 바, 건조균체량(DCW)으로 14.02g/L을 얻었으며 이는 회분배양의 4배 정도 되는 양의 균체 생산을 달성하였다. 분리주에 명란젓갈에서 오염된 불쾌취 생성 미생물의 증식을 억제하는지 여부를 파악하기 위한 실험에서 분리주 B28, FBT26, YO-5, YK-1, CK-1, FBT18, FBT30에서 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성을 확인하였다.

4. 유자의 항산화 활성을 타 과일의 그것과 비교 측정한 결과, 유자 과육의 경우 총 페놀 화합물의 함량이 가장 높았고, 시험에 사용된 모든 과일에서 과육보다는 과피의 항산화 활성이 더 높게 측정되었다. 유자씨의 항산화 물질의 함량 또한 유자 과육과 비교하여 그 활성이 비슷하게 측정되었다. 유자는 다른 과일과 달리 과육뿐만 아니라 과피도 가식 부위로 이용되므로 과육뿐만 아니라 과피도 다양한 식품의 가공에 응용될 수 있고 첨가에 따른 기능성 효과도 기대된다.

5. 유산균 첨가에 따른 보존성을 측정하기 위하여 면역활성 유산균과 유자추출물을 명란젓갈에 각각 0.5~2% 가량을 첨가하고 8주간 보존하면서 생균수의 변화를 측정한 결과, 시작 후 4주에서 5주째가 가장 유산균수가 증가된 것을 확인하였고, 4주간의 비타민 C를 첨가한 실험구의 경우 4주째에서 생균수가 가장 높게 계수되었다. 비타민 C, 면역활성 유산균 및 유자추출물이 모두 함유된 명란젓갈을 제조하고 시판 명란젓갈 제품과 관능성을 비교한 평가한 결과, 각 시료마다의 관능의 차이는 크지 않았다. 특히 유자추출물이 함유되어 있어 독특한 향미를 부여하여 명란 특유의 비릿한 냄새를 제어할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제에서 얻어진 결과를 이용하여 해외에서 열린 아시아 유산균학회에서 1회의 포스터 발표를 하였고, 2건의 특허를 출원하였다. 그리고 연구 결과의 일부를 한국유산균학회지

(Current Topics in Lactic Acid Bacteria and Prebiotics)에 1편의 논문을 게재하였다. 본 연구결과에서 얻어진 저염명란젓갈의 유산균 및 유자추출물의 첨가 방법에 대해서는 향후 참여기업인 부일식품(주)에게 기술이 이전될 예정이며, 이 결과로 얻어진 방법으로 저염 명란젓갈의 시제품을 제작하였고, 제품의 표시사항과 상표 디자인을 구체적으로 검토하여 상용화 할 계획이다.

SUMMARY

I. Title: Development of a low salted egg of pollack by using immuno-active lactic acid bacteria and citron extract

II. Objectives and R&D Necessity: Fermented fish products(Jeotgal) are the effective storage-type food for small fishes caught in short period of time and easily manufactured using fresh raw materials and sea salt. It is reported that harmful bacteria tend to be grown during fermentation and storage period despite the saltiness is spontaneously increasing after fermentation. High salt food representing fermented fishes are claimed to be responsible for the high blood pressure, heart attack, and chronic diseases for adults. Therefore salt content in the high salt food should be lowered somehow in order to gain popularity of the general consumers. Recently, it is very obvious the well-being trend in terms of dietary life among the Koreans. Accordingly, foods rich in high-protein, low calorie, and low salt are more favored than as it used to be. To keep pace with the overwhelming trend, this project was planned and has been performed to develop a low salted egg of pollack with some healthy functions by using immuno-stimulatory lactic acid bacteria and citron(Yuzu, *Citrus junos* Siebold) extract.

III. Abstract: Recently, it is very obvious the well-being trend in terms of dietary life among the Koreans. Accordingly, foods rich in high-protein, low calorie, and low salt are more favored than as it used to be. To keep pace with the overwhelming trend, this project was planned and has been performed to develop a low salted egg of pollack with some healthy functions, which contains reportedly high level of several vitamins and calcium, by using immuno-stimulatory lactic acid bacteria and citron(Yuzu, *Citrus junos* Siebold) extract.

In order to obtain immuno-stimulatory LAB from various types of fermented foods and fruits, 154 LAB isolates were primary isolated and an isolate FBT215 successfully screened among them via *in vitro* test for immuno-stimulatory activity such as a MTT assay and TNF- α to RAW 264.7 cell-line, cultured at high concentration in a large scale using the whey-based medium supplemented yeast extract, which carries some benefits in its industrial applications because it is edible and cheaper than the common growth medium(e.g. MRS) for LAB. For cheap production cost, fermentation variables have been established in the process of 5L jar fermentation through this study.

Citron extract was also examined for the presence of the anti-oxidant activity. Each sample containing the functional LAB strain(*L. plantarum* FBT215 0.5~2.0%, w/v), the citron extract, and adequate amount of vitamin C(1%, w/v) was added to obtain synergistic effects in the low salted egg of pollack has been monitored in the changes of viable cell counts during the 8 weeks of fermentation or 4 weeks fermentation for the samples of vitamin C supplement. Test products were manufactured according to the developed method and evaluated for the overall quality by 20 trained sensory panel, resulted that the salted egg of pollack with LAB and citron extract was more

preferred to the conventional products mainly due to masking fish smell and pleasant orange-like flavor.

Total outcomes of this project are as follows: one poster presentation in the 7th Asian Conference of Lactic Acid Bacteria, New Dehli, India, two applications of domestic patents, and one original article in Current Topics in LAB and Probiotics, 2013. The newly-developed technology will be transferred soon to Booil Food and marketed after design of the test product and labeling issues are thoroughly reviewed.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of this research project

- Objectives
- Research Necessity

Chapter 2. Current status of R&D in the related area

- Isolation and identification of lactic acid bacteria(LAB)
- Test methods for immuno-stimulatory activity
- Development of edible growth medium for lactic acid bacteria
- Large scale production of a strain of lactic acid bacteria
- Antibacterial activity test against pathogenic indicator strains
- Antioxidant effect from citron extract, Yuzu
- Effect of citron extract on the salted egg of pollack
- Effect of LAB on the salted egg of pollack
- Effect of vitamin C on the salted egg of pollack
- Synergistic effect of LAB, citron extract, and vitamin C
- Sensory evaluation of the low salted egg of pollack developed

Chapter 3. Results of this research project

Chapter 4. Degree of research achievement and contributions to the industry

Chapter 5. Outcomes and plan for practical applications

- Poster presentation
- Patent
- Publications
- Test products of a low salted egg of pollack

Chapter 6. Foreign informations collected during the research period

Chapter 7. References

목 차

제1장 연구개발과제의 개요-----	10
1절 연구개발의 목적	
2절 연구개발의 필요성	
제2장 국내외 기술개발 현황-----	12
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과-----	14
1절 미생물의 분리 및 동정	
2절 분리한 유산균의 면역활성 측정방법	
3절 경제적인 유산균용 식용배지의 개발	
4절 유산균의 대량 배양 및 보존조건	
5절 유해 미생물 저해 효과 확인	
6절 유자의 생리활성물질 추출	
7절 유자추출물의 명란젓갈 첨가효과	
8절 Vitamin C의 명란젓갈 첨가효과	
9절 기능성 유산균과 유자 추출물의 시너지 효과 확인	
10절 기능성 유산균, 유자추출물을 첨가한 저염 명란젓갈의 관능 평가	
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	51
1절 연구개발의 성과 및 활용목표 대비 실적	
제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획-----	52
1절 포스터 발표	
2절 특허	
3절 유산균학회지 논문 게재	
4절 시제품: 면역활성 유자추출물이 함유된 명란젓갈	
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	61
제7장 참고문헌-----	62

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 목적

○현재 시판이 되고 있는 젓갈의 경우에는 위생적인 문제와 병원균, 잡균의 오염을 막기 위해 10% 이상의 염분을 첨가하고 있음. 따라서 짠맛이 매우 강하고 고혈압 등 건강상의 문제를 불러 올 수 있기 때문에 최근 저염 젓갈의 연구가 활발하게 수행되고 있음. 젓갈제조과정중 다양한 방법을 개발하여 염분의 농도 및 보존 방법의 개선이 필요함.

○현대 식생활에서는 웰빙화 경향이 뚜렷하여, 고단백, 저칼로리, 저염 등 기능성 식품을 선호하기 때문에 따라 젓갈을 웰빙 식품화 한다는 목적으로 본 연구는 비타민, 칼슘, 인등의 영양성분이 풍부한 명란젓갈을 이용하여 저염을 바탕으로 품질을 향상시키기 위해 면역활성 유산균과 항산화 효과를 함유한 유자추출물을 이용하여 향미의 개선을 한 기능성 저염 명란젓갈의 개발을 위해 연구를 수행하였다.

2절 연구개발의 필요성

○젓갈은 신선한 재료와 소금만 있으면 쉽게 가공을 할 수 있는 제조법의 단순성 때문에 일시적으로 대량 어획되는 소형 잡어류의 효과적인 저장수단으로 활용될 수 있으며, 젓갈은 옛 문헌에서도 볼 수 있듯이 수세기 전부터 전통적으로 만들어 온 발효식품으로 원료에 따라 그 종류와 맛이 다양함.

○우리나라는 3면이 바다로 어패류를 쉽게 구할 수 있으며 이로 인하여 다양한 형태의 발효 수산물의 제조 및 소비가 이루어지고 있음. 주요 수산가공품으로서 어패류나 그 내장 또는 생식소를 염장 발효시켜 독특한 감칠맛을 내도록한 것으로 김치의 조미용 부재료로서 널리 식용하여온 우리나라의 전통 수산 가공 식품중 하나임.

○젓갈류는 어패류에 15% 이상의 고식염을 가하고 염장하여 자가소화 효소 또는 미생물의 효소작용에 의해 분해되는 육질의 독특한 감칠맛과 특유의 향미를 갖고 있는 국내의 전통 수산 발효 식품으로 분류하고 있음(1). 젓갈은 염분의 농도가 높지만, 발효 및 유통과정 중 유해 미생물이 증식할 수 있기 때문에 과학적인 제조방법을 통하여 저장기간의 연장이나 품질 보존 방법, 위생관리기술의 개선 등이 필요로 함.

○종래의 젓갈은 저장성을 위해 20-30%나 되는 많은 양의 식염으로 염장하고, 원료의 효소작용으로 발효시킨 염장발효식품 임. 젓갈은 숙성이나 발효 시 부패를 방지하기 위해 과량의 염을 사용하므로 염의 함량이 지나치게 높고 주로 경험에 의존한 생산방식 때문에 제품이 비과학적이고 비위생적으로 생산되기 쉬운 문제점도 동시에 갖고 있음. 젓갈은 염분의 농도가 높

지만, 발효 및 유통과정 중 유해 미생물이 증식할 수 있기 때문에 제조방법의 과학적인 해석을 통하여 저장기간의 연장이나 품질 보존 방법, 위생관리기술의 개선 등이 필요로 함.

○기존의 유통기한 연장 연구, 저온숙성이나 수분활성의 개선 등을 통한 연구도 수행 되었으며, 방사선 조사를 통한 발효 숙성기에 급격이 증가하는 젓갈의 미생물 혹은 부패균을 효과적으로 제어하여 저장성을 향상시키는 연구가 보고 된 바 있음(2).

○젓갈은 원료의 수확시기, 성상 또는 가염량에 따라 제품의 품질이 크게 달라지며 저장성을 향상시키기 위해 과량의 염분으로 인해 고혈압환자들이 기피하거나 젊은 층의 기호성이 저하되는 문제점도 가지고 있어 웰빙식단을 추구하는 요즘에 문제점을 제기하고 있어 소비자들의 식생활과 밀접하게 영향이 되고 있는 식염의 양을 줄여 소비자 시호에 맞는 저염을 한 젓갈을 생산이 되는 추세임. 이에 따라 저염을 처리하거나, 부패미생물을 사멸하는 살균처리, 스팀 그리고 식품 보존제의 첨가를 한 연구가 보고되었음(3).

○본 연구는 비타민, 칼슘, 인등의 영양성분이 풍부한 명란젓갈을 이용하여 저염을 바탕으로 품질을 향상시키기 위해 면역활성 유산균과 항산화 효과를 함유한 유자추출물을 이용하여 향미의 개선을 한 기능성 저염 명란젓갈의 개발을 위해 연구를 수행하였음.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

젓갈류의 식품은 일반적인 가공원료로서 상품가치가 낮은 소형의 어패류 및 그 가공 부산물을 원료로 제조되기 때문에 매우 경제성이 높은 수산자원의 이용수단으로 활용되고 있으며 실제로 연안 어촌지역의 가장 기초적인 부가가치 생산수단의 하나로 활용되고 있다(4). 국내에서 제조되는 젓갈류는 대략 160종 가량으로 조사되며 현재 약 550여 개의 젓갈 생산업체에서 제조하고 있다(5). 젓갈의 연구는 1960대 후반부터 현재까지 활발한 연구가 진행중에 있으며 대부분 품질의 개선이나 품질 특성의 강화에 중점을 둔 기술개발이 주가 되는 것으로 파악된다. 연구 현황은 제조법이나 성분분석이 대부분이며 그 밖에는 제조시에 위생적인 문제가 대두되고 있다. 또, 기업적으로 생산함에 따라 품질특화 및 저장성과 유통과정의 안정성 확보 등 다양한 문제점이 생겨나고 있다. 젓갈류의 수산발효식품들은 염장이나 조미료의 첨가, 숙성의 과정 등을 통한 복합적인 기술을 요하는 제품으로 다양한 변수가 발생할 것이다. 젓갈은 식용만이 아닌 조미료나 의약품 등의 산업으로 고부가가치의 새로운 사업의 탄생(그림 2-1, 그림 2-2 참조)도 가능할 것으로 사료 되기 때문에 장기적인 연구(표 2-1참조)가 필요하다(6).

표 2-1. 젓갈관련 국내 연구논문 동향

연구내용별 구분	논문수	비율 (%)
1. 젓갈 제조법에 관한 연구	27	26.7%
-효소활용	6	-
-저염화	6	-
-새로운 제조방법 및 품질개선	9	-
-부재료 첨가효과	6	-
2. 김치에 대한 첨가효과	13	12.9
3. 감마선 응용	5	5.0
4. 성분분석	24	23.8
-영양성분 등	21	-
-안정성 관련성분	3	-
5. 품질지표 및 관리	4	4.0
6. 생리활성 연구	13	12.8
-기능성 물질	4	-
-프로바이오틱 활성화	9	-
7. 기타	15	14.8
-젓갈류 식품 일반	9	-
-기타	6	-
Total	10	100

(김영명, 2008)



그림 2-1. 명란이 부착된 특수 김 제품(<http://thednd.godo.co.kr>)



그림 2-2. 일본의 명란 첫갈 제품(<http://www.yamaya.co.kr>)

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 미생물의 분리 및 동정

1. 유산균의 분리, 배양 및 보존

발효식품 및 과일로부터 유산균주를 분리하기 위하여 채취한 시료를 1 mL 또는 1g씩 취하고 즉시 0.85%(w/v) 생리식염수에 십진 희석하여 MRS(Difco, Detroit, MI, USA) agar, cyclohexamide가 4.5%(w/v) 포함된 MRS agar, MRS(pH 5.5) agar에 고르게 도말한 후 30°C incubator(JSR, JSBI-150C, Korea)에서 48 hr 배양시켰다. 분리된 균주는 20%(v/v) glycerol 용액에 현탁하여 deep freezer(-80°C)(Ilshin, DF9014, Korea)에 넣어 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 분리균의 동정

유산균 분리주의 동정을 API 50 CHL kit(Biomereux, France)를 이용하여 동정하였다(그림 3-1).



그림 3-1. 유산균 동정용 API kit 사진

■ 실험방법 (API 50CHL KIT)

1. MRS plate에 순수분리 되어있는 colony를 백금이를 이용하여 채취한다.
2. API 50 CHL kit에 채취한 균을 풀어준다.
3. Pipet을 이용하여 pipeting을 해준다(vortexing 불가)
4. API Kit 바닥에 물을 부은 후 물을 버리고 물기를 제거한다.
5. Strip을 올린다.
6. Api kit를 기울인 상태에서 1000ul pipet으로 기포가 생기지 않도록 균을 푼 CHL media를 넣는다.
7. Mineral oil이 위로 볼록 올라 올 때 까지 떨어뜨린다.
8. Incubator에서 37℃, 24시간, 48시간 배양 후 측정 결과를 확인한다.

Apilab Plus Software, Version 3.3.3(<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>).

표 3-1. 발효식품 및 과일로부터 분리한 유산균 분리주에 대한 동정 결과

유산균 분리재료	Strain symbol	동정결과	비고	
무김치	HK-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	API 50 CHL	
배추김치1	CK-1	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>	상동	
배추김치2	CK-2	<i>L. plantarum</i>	상동	
배추김치3	CK-3	<i>Weissella kimchii</i>	상동	
배추김치4	CK-4	<i>Leu. mesenteroides</i>	상동	
열무김치	YK-1	<i>Weissella kimchii</i>	상동	
무채	HS-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	상동	
묵은지	OC-1	<i>Leuconostoc lactis</i>	상동	
오이김치	CC-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	상동	
막걸리1	B8	<i>Lactobacillus brevis</i>	상동	
막걸리2	B9	<i>Lactobacillus brevis</i>	상동	
막걸리3	B15	<i>Weissella cibaria</i>	상동	
막걸리2	B18	<i>L. paracasei</i>	상동	
막걸리2	B22	<i>L. sanfrancisco</i>	상동	
막걸리2	B23	<i>L. helveticus</i>	상동	
막걸리2	B27	<i>L. plantarum</i>	상동	
막걸리2	B28	<i>L. casei</i>	상동	
자연치즈	NC-1	<i>L. acidophilus</i>	상동	
과일	포도	GP-1	<i>Lactococcus lactis (Lc.lactis)</i>	상동
	토마토	TO-1	<i>L. plantarum</i>	상동
	귤	TG-1	<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	상동
채소	배추	CH-1	<i>Leu. mesenteroides</i>	상동
	오이	CU-1	<i>L. plantarum</i>	상동
	마늘	GA-1	<i>L.casei</i>	상동
피클	PC-1	<i>L. plantarum</i>	상동	
발효유1	YO-1	<i>L. acidophilus</i>	상동	
발효유2	YO-2	<i>S. thermophilus</i>	상동	
발효유3	YO-3	<i>L. bulgaricus</i>	상동	

발효유4	YO-4	<i>L. gasseri</i>	상동
발효유5	YO-5	<i>B. longum</i>	상동
발효유6	YO-6	<i>L.rhamnosus</i>	상동
발효유7	YO-7	<i>L. bulgaricus</i>	상동
발효유8	YO-8	<i>L. acidophilus</i>	상동
발효유9	YO-9	<i>S. thermophilus</i>	상동

표 3-2. 본 실험실 보유 유산균 목록

번호	보유 균주명	번호	보유 균주명
1	<i>L. plantarum</i> NK181	9	<i>L. lactis</i> FBT22
2	<i>L. plantarum</i> KTCC 40013	10	<i>Leu. mesenteroides</i> FBT25
3	<i>L. plantarum</i> FFL82	11	<i>L. plantarum</i> FBT26
4	<i>Lc. lactis</i> FBT10	12	<i>Leu. mesenteroides.dextranicum</i> FBT 27
5	<i>L. paracasei</i> FBT13	13	<i>Leu. cremoris</i> FBT28
6	<i>L. helveticus</i> FBT15	14	<i>L. casei</i> FBT30
7	<i>L. acidophilus</i> FBT18	15	<i>L. plantarum</i> KCDO 1935
8	<i>L. brevis</i> FBT20	16	<i>L. bulgaricus</i> FBT33

※ 유산균 분리주를 미생물을 MRS-azide 액체배지에서 증식이 양호한 균주를 선별하여 면역활성 측정에 이용함.

2절 유산균 분리주의 면역활성 측정방법

RAW 264.7 cell-line은 마우스 유래 대식세포를 cell-line화 한 것으로 면역활성 측정에 널리 이용되며 activation이 용이하여 현미경상으로 확인이 가능하다(그림 3-2).

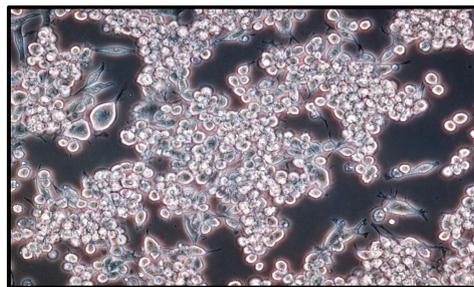


그림 3-2. RAW 264.7 현미경 사진(X400)

1. 유산균 시료 처리: 유산균을 24hr 배양 후 1ml씩 EP tube에 분주하여 centrifuge(Vision 15000 CFNII)를 이용하여 pellet을 제외한 상등액을 제거하였다. 상등액 제거 후 saline을 이용하여 2번 세척 후 HBSS(Hank's balanced salt solution)을 증류수와 1:9로 희석한 것으로 pellet과 혼합 후 90℃로 온도를 조정된 water bath를 이용하여 30분간 열처리를 함으로써 유산균을 사멸시켰다. 각 시료를 HBSS로 적당하게 희석하여 균체 농도가 0.1(O.D @650nm)이 되도록 조절하였다.

2. MTT assay: MTT assay는 시료의 영향을 받은 동물세포의 생존정도를 확인하는 방법으로 써 분리주가 동물세포의 증식에 어떤 영향을 주는 가를 확인하기 위하여 MTT assay(7)를 이용하였다.

가. 실험순서(protocol)

1. cell suspension을 haemocytometer를 사용하여 counting한 다음, 96 well plate의 각 well에 원하는 적정농도의 cell 부유액 180ul를 넣는다.
 - Blank ; 배지 180ul와 PBS 20ul.
 - Control ; 세포부유액 180ul와 PBS 20ul
2. 측정하고자 하는 시료는 PBS에 녹인 후 농도별로 20ul씩 각 well에 첨가한다.
3. 일정시간 incubation한다.
4. 시료를 제거하고, 각 well에 MTT solution을 100ul씩 첨가한다.
5. 4시간동안 incubation시킨 후 MTT 회색액을 조심스럽게 제거한다.
6. 각 well에 100ul의 DMSO를 첨가하여 15-20분간 plate shaker로 흔들어 준다.
7. ELISA reader를 사용하여 wave length 540nm에서 흡광도를 측정한다.
(이 흡광도는 MTT가 세포의 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포수와 비례한다.)

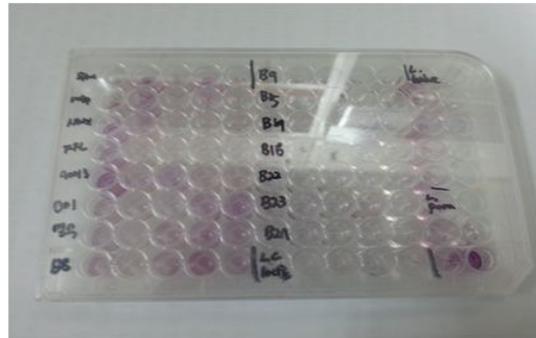
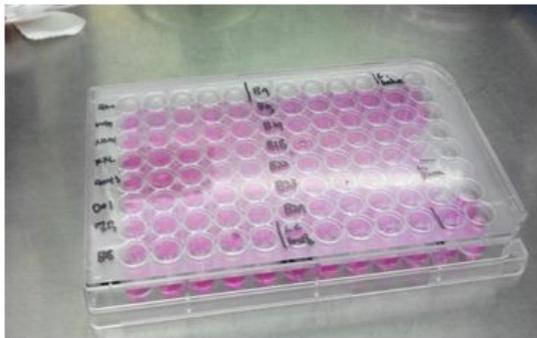


그림 3-3. 시료처리한 RAW 264.7 cell-line 그림 3-4. 2일 배양 후 MTT assay 결과

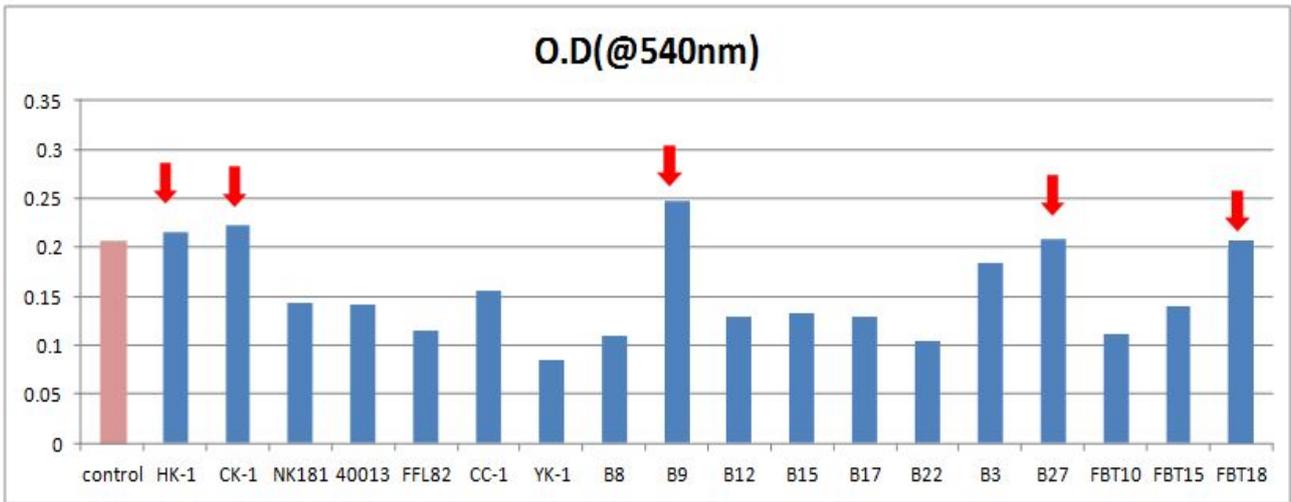


그림 3-4. MTT assay 측정 결과(1)

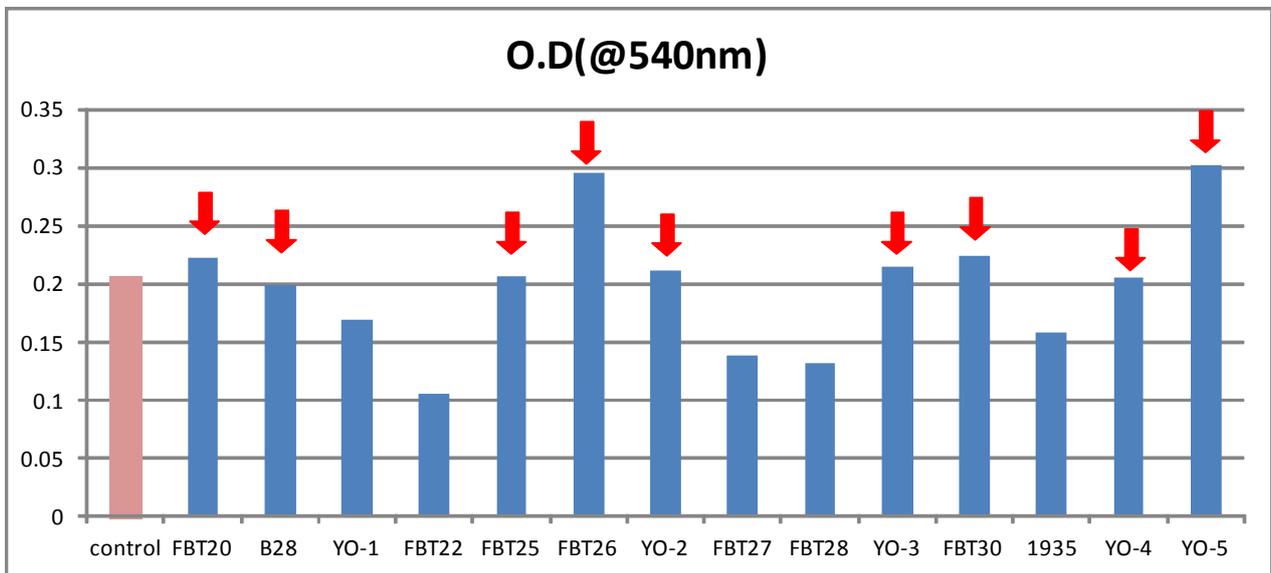


그림 3-5. MTT assay 측정 결과(2)

위 그림(그림 3-4, 그림 3-5)은 RAW 264.7 cell-line에 분리주를 처리하여 MTT assay를 측정한 결과이다. 결과에 나타난 바와같이 HK-1과 CK-1, B9, B27, FBT18, FBT20, B28, FBT25, FBT26, YO-2, YO-3, FBT30, YO-4, YO-5 등(빨간색 화살표 표시) 총 14개의 분리주에서 RAW 264.7 cell-line의 증식에 크게 영향이 없거나, 증식을 촉진시키는 활성을 각각 확인하였다.

3. Sandwich ELISA

IL-1 α 는 활성화된 단핵식균세포, 상피세포 (epithelial cells), 혈관내피세포 (endothelial cell)등에 의해 만들어져 염증반응을 매개하는 cytokine이다. IL-1에는 IL-1 α 와 IL-1 β 의 두 가지형이 있는데, 적은 양에서는 CD4 T cell과 B cell의 활성화하며, 염증세포를 자극할 수 있다.

본 연구에서는 MTT assay 결과 RAW 264.7 cell-line 증식에 도움을 주는 총 24개의 분리주를 선발하여 Sandwich ELISA 실험을 수행하였다. ELISA 실험(8)은 Komabiotec의 ELISA kit를 사용하였으며 IL-1 alpha와 TNF-alpha의 발현량을 각각 측정하였다.

가. IL-1 α 측정결과

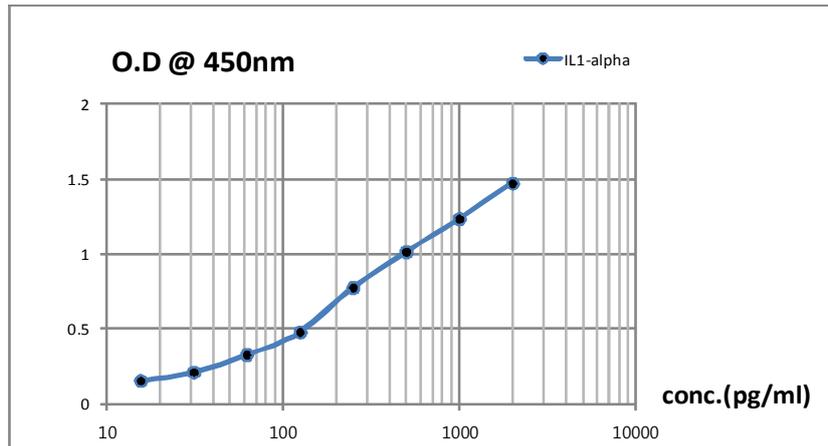


그림 3-6. IL-1 alpha의 농도별 표준곡선의 작성

그림 3-6은 IL-1 alpha의 농도를 측정하기 위하여 standard DNA를 농도별로 첨가하여 측정한 표준곡선이다. 그림에 나타난 바와 같이 대략 2000(pg/ml)까지 농도와 O.D값 사이에 직선 관계를 유지하였다.

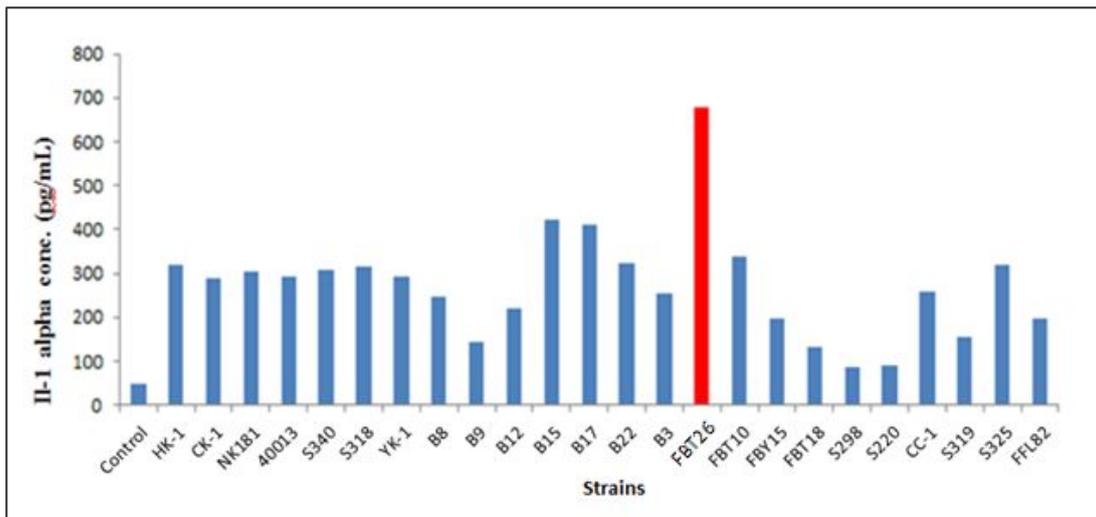


그림 3-7. 유산균 분리주에 대한 IL-1 alpha 발현량 비교

그림 3-7은 RAW 264.7 cell-line에 분리주를 첨가하여 IL-1 alpha의 발현량을 비교한 것이

다. 그림에 나타난 바와 같이 공시한 24개의 분리주 중에서 FBT26가 가장 높았다.

TNF- α 는 그람음성세균 감염에 의해서 세균의 세포막에 있는 내독소 (bacterial endotoxin) 인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 림프구에 의해서 만들어진다. LPS의 양이 적은 경우는 TNF- α 가 적은 양 생성되어, 백혈구나 혈관세포에 작용하여 국소적인 염증반응이 나타나 항원이 제거된다.

나. TNF- α 측정결과

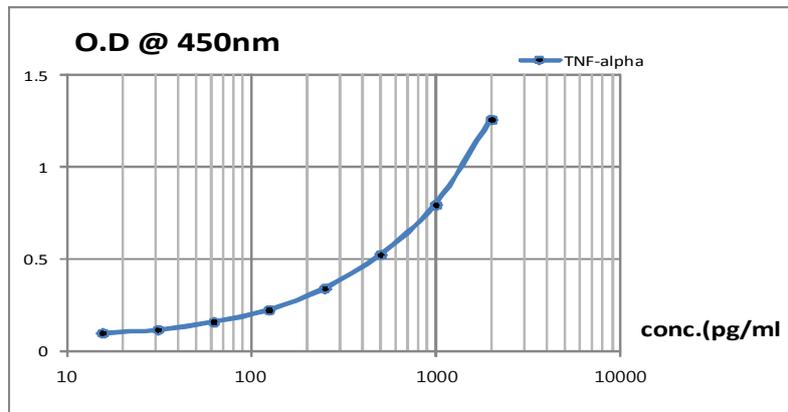


그림 3-8 TNF-1 alpha의 농도별 표준곡선 작성

그림 3-8은 TNF-alpha의 농도별로 나타낸 것이다.

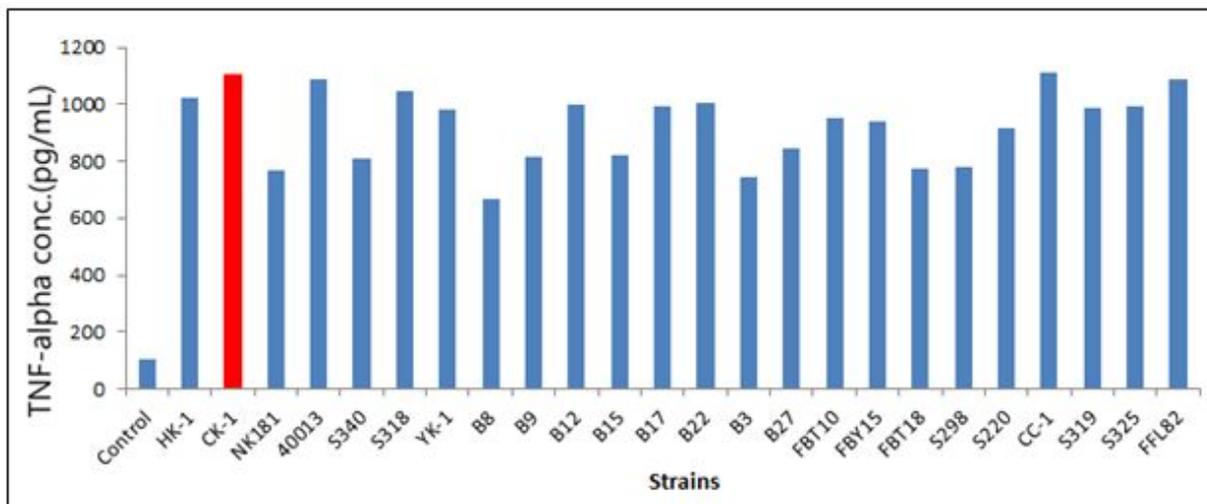


그림 3-9 유산균 분리주에 대한 TNF-alpha 발현량 비교

그림 3-9은 RAW 264.7 cell-line에 분리주를 첨가하여 TNF-alpha의 발현량을 비교한 것이다.

- 그림 3-7 과 그림 3-9을 볼 때 RAW 264.7 cell-line에서 IL-1 alpha와 TNF-alpha가 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 종합적인 실험결과 FBT26(*L. plantarum*), B28(*L. casei*), Y0-5(*B. longum*)이 RAW 264.7 cell-line에 영향을 주어 cytokine (IL-1 alpha, TNF-alpha)이 잘 발현되는 것을 확인하였다.

3절 유산균용 식용배지의 개발

일반적으로 유산균 배양용 배지는 MRS로 잘 알려져 있다. 하지만 각 회사에서 생산하는 배지의 가격이 상당한 가격으로 판매되기 때문에 대체용 식용배지를 개발하였다. 유청은 자연치즈를 제조할 때 생산되는 부산물로 유당과 유청단백질로 이루어져 있어 영양성분이 매우 풍부하다. 따라서 유청을 기본배지로 사용하여 저렴하고 유산균 증식이 원활한 식용 배지를 개발하였다.

1. Lactose 함량에 따른 유산균의 생육 변화

가. 유청분말이 각각 10%, 15% 첨가된 액체배지 중 유산균의 배양시간에 따른 증식 측정

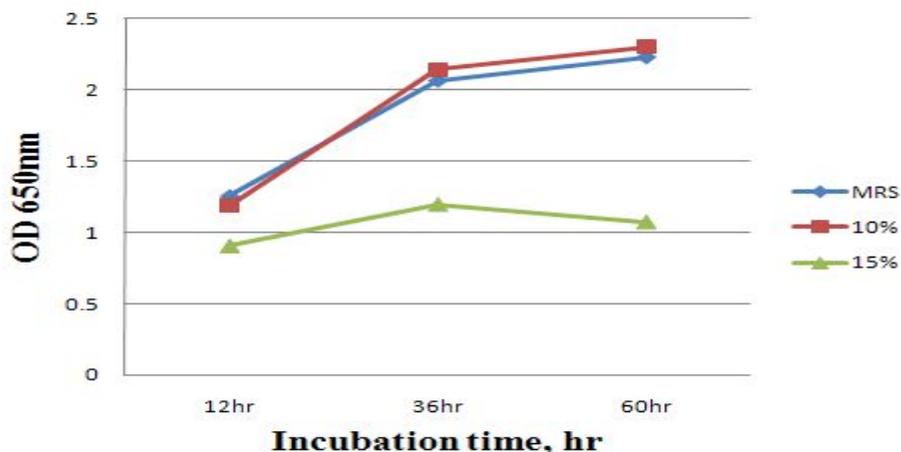


그림 3-10. *L. plantarum*을 37°C에서 10%, 15% 유청배지와 MRS를 이용한 성장 비교

- 그림 3-10은 *L. plantarum*을 유청분말이 각각 10%, 15%함유된 액체배지에 접종하고, 유산균의 증식을 650nm에서 흡광도를 측정하였더니 10%함량의 유청배지에서 대조구로 사용한 시판

MRS 액체배지와 비슷한 정도로 유산균이 증식하는 것을 확인하였다.

나. 유기질소원에 따른 유산균의 생육변화

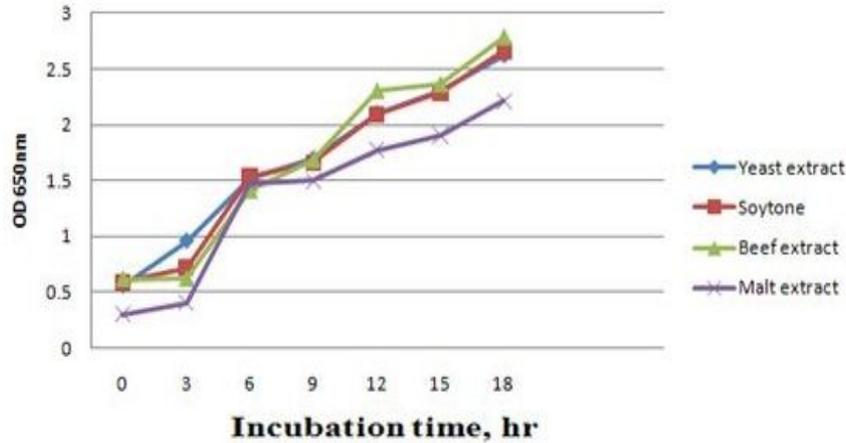


그림 3-11. 유청배지(10%) 중 *L. plantarum*의 증식에 미치는 유기질소원의 영향

그림 3-11은 10%의 분말유청배지를 기본 배지로하여 다양한 질소원에 따른 미생물의 증식을 검토하기 위하여 yeast extract, soytone, beef extract, malt extract를 1% 첨가하여 배지를 제조 한 다음 유산균의 증식을 배양 후 18시간까지 측정 한 결과 유기질소원의 종류에 따라 균체 증식이 차이가 있었으며 유기질소원 중에서 yeast extract가 가장 우수하였다.

다. 유기질소원 농도에 따른 *L. plantarum*의 생육변화

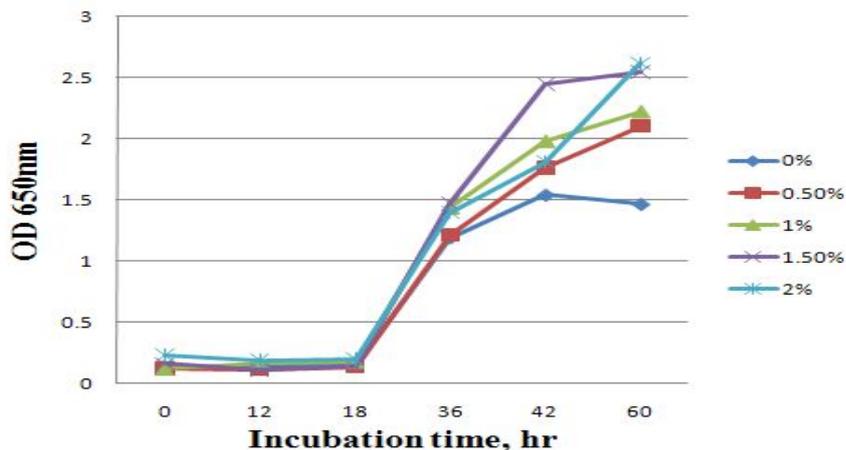


그림 3-12. 유청(10%)배지 중 yeast extract의 농도별 *L. plantarum*의 증식

분말유청배지에 결핍된 유기질소원으로 가장 대표적인 yeast extract의 첨가량에 따른 균체 증식정도를 650nm에서 흡광도를 측정함으로써 수행함. 위 그림(그림 3-12)에 나타난바와

같이 유기질소원으로 yeast extract를 1.5% 첨가하는 것이 적당하다고 판단되었다.

유청의 이용하기 위해서 단백질효소를 사용해야하는 데, 예비실험을 통하여 확인한 결과, Alcalase의 효과가 가장 우수하였다(data not shown).

표 3-3. HWYE배지의 조성 및 제조원가

	첨가량	가격/kg	L당 가격	비고(MRS)
Whey powder(삼익유가공)	25 g	3,000원	75원	
Glucose(국산)	2 g	10,000	40원	
Yeast extract(국산)	10 g	20,000원	200원	
Alcalase(국산)	0.1 g	43,000원	43원	
Ammonium citrate(대정)	2 g	13,800원	28원	
Distilled water (total)	1 L			
			386원	12,000원

표 3-3은 유청분말(삼익유가공)을 기초로 하여 개발한 HWYE(Hydrolyzed whey yeast extract medium)배지의 최적 조성이다. 배지 1L를 제조하기 위해서 유청분말 25g, yeast extract 10g, alcalase(국산) 0.1g, ammonium citrate 2g이 소요되었다. 이것을 금액으로 환산하였을 때 대략 386원정도이며, 증류수 제조, 전기료 등 부대비용을 고려하였을 경우 약 1,000원 정도가 될 것으로 추정되었다. 시중에서 유산균 배양용 배지로 널리 사용되고 있는 MRS 배지의 경우 1L 제조시 55g이 소요되므로 이것으로 금액으로 환산하면 약 12,000원이 된다. 본 연구에서 개발한 HWYE배지는 MRS배지의 1/12 정도의 금액에 불과하여 충분히 경쟁력이 있는 유산균 배양용 배지가 개발되었다고 판단하였다.

4절 유산균의 대량 배양 및 보존조건

가. 유청배지의 배양

(1) 유청배지 생산 단가(1kg)

이름	가격/kg	첨가량	배지 1kg당 가격
유청분말	1,850원	25g	46원
Yeast extract	7,000원	10g	
Ammonium citrate		2g	
alcalase	43,000원	1g	4원
Fe ₂ (SO ₄) ₃			

(2)유청배지 만들기(1L)

1. 유청분말 25g를 증류수 250ml에 녹인다.
2. pH 8.0에 맞춰서 조정(1M NaOH, 1M HCl)
-> 현장에서 이용이 가능한 pH 시험지를 이용하여 산도 조절
3. Alcalase 1g 첨가(whey protein 양의 2.5% → 단백질 가수분해하기 위해서)
유청분말 = 90% 유당 + 10% 유청단백질
4. 3시간동안 Water bath에 정치(50℃)
-> 현장에서 이용이 가능하도록 50℃에서 이용이 가능한 장비의 구비 예정
5. 750ml의 증류수로 희석(4배희석)
6. Yeast extract 1%이상 첨가(10g 이상)
7. Ammonium citrate 0.2% 첨가(2g)
8. pH 7.0 이상 조절(1M NaOH, 1M HCl)
-> 현장에서 이용이 가능한 pH 시험지를 이용하여 산도 조절
9. Autoclave 121℃, 5min
-> 현장에서 이용이 가능한 Autoclave 구비 예정

(3)배양

유청배지를 이용하여 발효조(5L Jar fermentor, Biotron)와 삼각플라스크를 이용하여 *L. plantarum*을 배양하였다(9). 초기 Working volume은 2L로 맞추었고, 온도는 37℃ 동일한 조건을 설정하였다. 발효조의 교반 속도는 최저속도인 50rpm으로 하였으며, pH는 N-NaOH를 사용하여 6.5로 조정하였고 DO(용존산소)는 working parameter에서 제외하였다.



그림 3-13. *L. plantarum*을 접종하여 HWYE배지에 배양중인 유산균(사진)

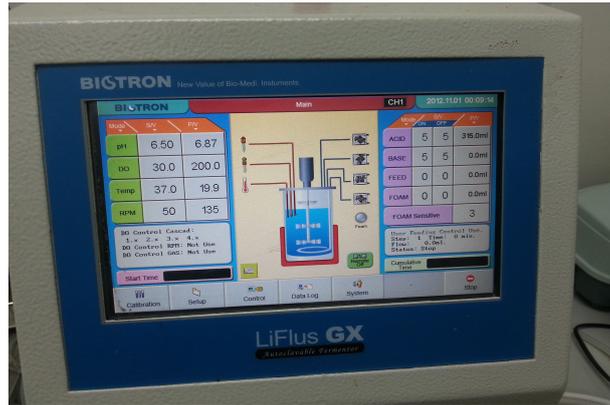


그림 3-14. 발효조의 controller : pH, 온도, 교반속도, DO 조정 패널

아래 그림은 위 Jar fermentor를 이용하여 *L. plantarum*을 배양하면서 3시간마다 시료를 취하여 O.D를 측정된 결과이다.

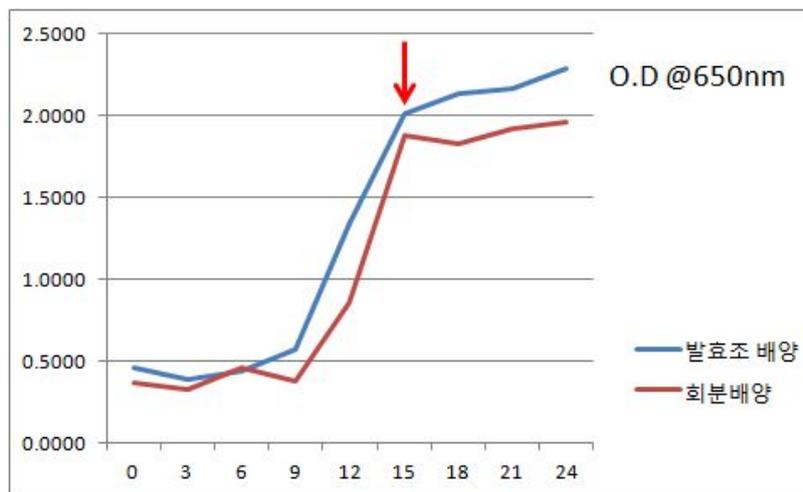


그림 3-15. 유청배지(HWYE배지) 중 *L. plantarum* 증식

그림 3-15에서와 같이 발효조를 이용한 배양이 회분배양을 통한 유산균의 배양보다 더 효과적임을 그래프로 알 수 있었다. 유산균의 생장은 이와 같은 환경적인 요인이 중요한 역할을 하지만 영양성분이 부족하면 생장에 저해를 받을 수 있기 때문에 유산균이 이용하는 당의 변화를 그래프로 표현하였다.

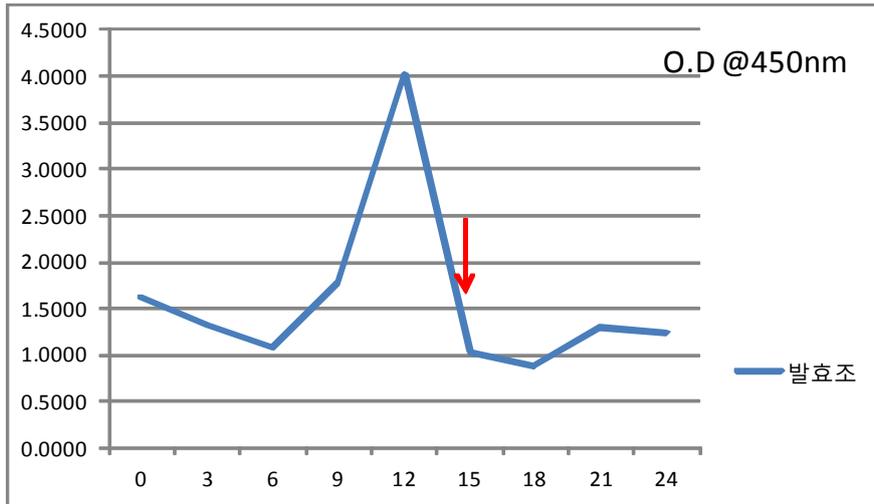


그림 3-16. 유청배지(HWYE배지)로 *L. plantarum* 배양시 환원당량 측정

위 그림 3-16은 Jar fermentor를 이용하여 배양 중 잔당(residual sugar)이 15시간에서 급격히 소모되므로 탄소원을 보충할 필요가 있었다. 따라서, 유산균 분리주를 5L Jar fermentor (LiFlus GX PF1G2SL05, Biotron)를 사용하여 유가배양 하였다. 유산균은 통성혐기성 미생물이기 때문에 산소는 주입시키지 않았다. 교반은 최소 rpm인 50rpm으로 고정하고 pH는 6.5로 조정하였다. 배양하는 동안 pH조절은 3N NaOH 용액을 이용하였다. 배양온도는 37°C로 유지하였다. 배양하는 동안 유산균 분리주가 증식하면서 당을 소모하기 때문에 DNS법을 이용하여 환원당량을 측정하고 줄어드는 양을 비교하였으며 40% glucose용액을 배양 시작 12시간부터 6시간 간격으로 첨가하였다. 산업적으로 짧은 시간 내에 많은 균체를 얻어 내기 위해서 총 36시간 배양을 하였고, 6시간 간격으로 일정량을 채취하여 건조균체량, 환원당량을 측정하였다.

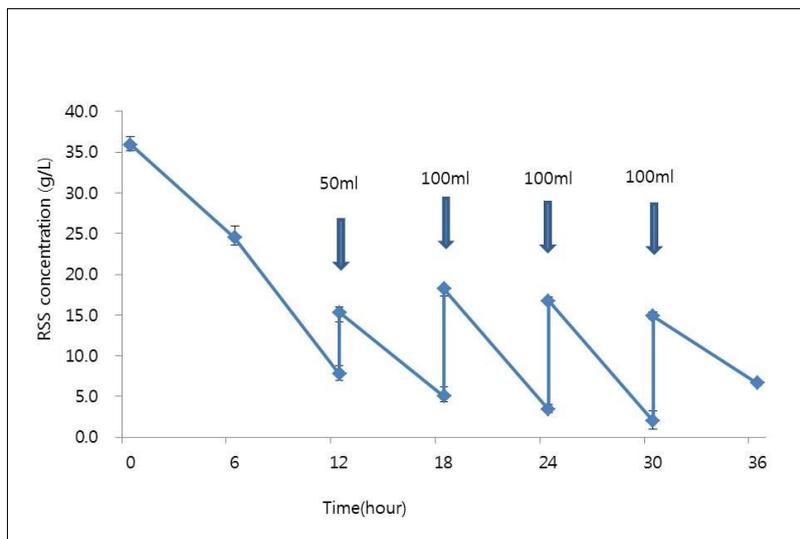


그림 3-17. 유청배지 중 *L. plantarum*을 유가배양과 잔당량의 변화(37°C, pH 6.5)

처음 배양정도는 미비하였으나 12시간째 환원당량을 측정하였을 때 약 25%정도 소모된 것을 확인하였기 때문에 40% glucose용액을 50ml 첨가하였다. 측정하는 6시간마다 환원당량이 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다(그림 3-17). 그래서 18시간째부터 glucose용액을 100ml씩 첨가하여 총 36시간동안 배양한 결과 총 건조균체량(DCW)은 14.02g/L로 회분배양의 4배 정도 되는 양의 균체를 생산할 수 있었다(그림 3-18).

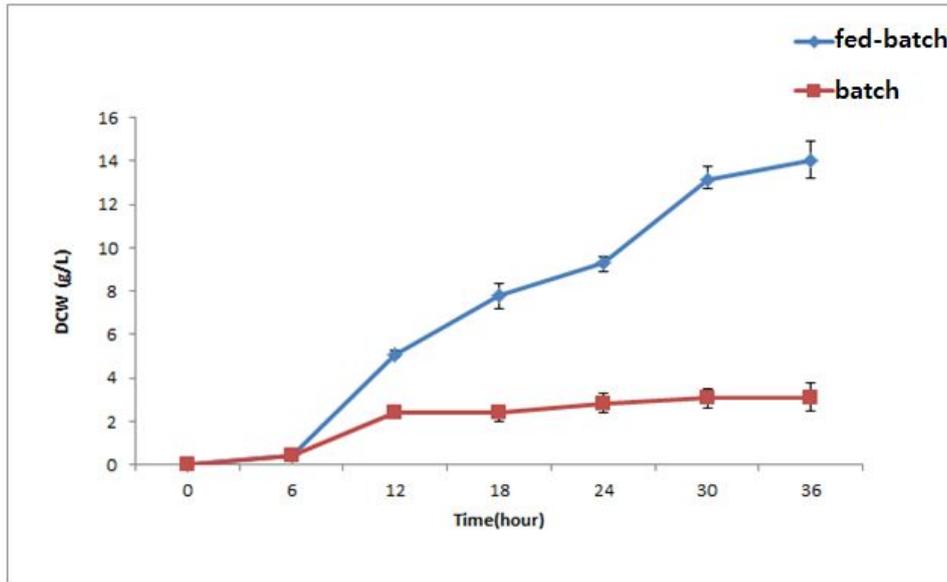


그림 3-18. 회분배양과 유가배양을 이용한 *L. plantarum* 건조 균체량의 비교

5절 유해 미생물 저해 효과 확인

1. 명란젓갈에 오염된 불쾌취 생성 미생물의 억제효과

시중에 유통되고 있는 양념 젓갈을 수집하여 미생물의 오염정도를 실험을 통하여 확인하였다. 그림 5-1에 표시한 바와 같이 여러 가지 불쾌취 생성 미생물이 오염되어 있음을 확인하였다. 이러한 오염 미생물을 제어하기 위하여 본 연구에서는 *L. plantarum*(유산균)을 첨가하여 증식억제 정도를 확인한바 그림 5-2와 같이 불쾌취 생성 미생물의 증식이 억제되는 것으로 나타내었다.

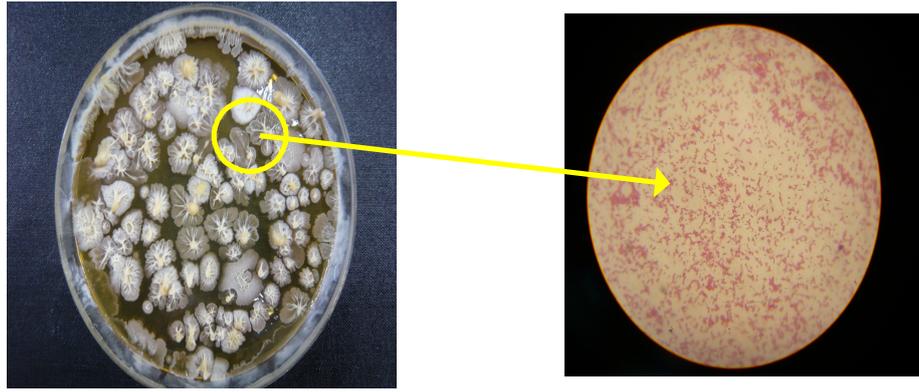


그림 3-19. 명란젓갈의 보존 중 증식하는 불쾌취미생물과 현미경 사진

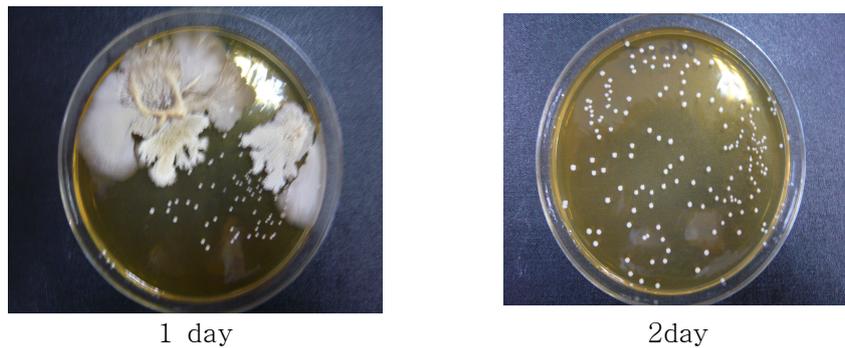


그림 3-20. 유산균 첨가 후 명란젓갈 중 세균의 변화(사진)

그림 3-19과 3-20를 비교하였을 때 유산균 첨가에 의해 불쾌취생성 미생물이 억제된 것을 확인 하였다.

- 유산균은 bacteriocin을 분비하여 다른 미생물의 증식을 억제한다. 분리주 7종을 MRS broth에 배양한 후 1ml를 EP tube에 분주하여 원심분리를 하여 상등액을 0.45um syringe filter(advantec)로 여과한 것을 pH 6.5로 조정하였으며 농축기를 이용해 2X 농축하여 bacteriocin 활성 측정용 시료로 사용하였다(10).

표 3-4. 유산균 분리주가 생산하는 bacteriocin 병원성 미생물 억제 효과

분리주 상등액(2X)	Bacteriocin의 항균활성	
	<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307	<i>E.coli</i> O157:H7 ATCC 35150
A B28	+	-
B FBT26	+	+
C YO-5	+	-
D YK-1	+	-
E CK-1	+	-
F FBT18	+	-
G FBT30	+	-

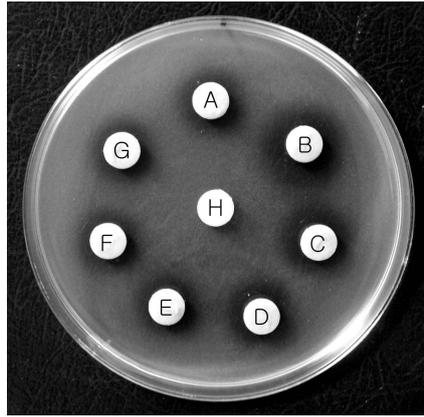


그림 3-21. 유산균 분리주의 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성 확인
(A: B28, B: FBT26, C: YO-5, D: YK-1, E: CK-1, F: FBT18, G: FBT30, H: control)

표 3-4과 그림 3-21과 같이 7주에서 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성을 확인하였다. 특히 분리주 B(FBT26)상등액에서 그람양성, 그람음성 세균을 모두 저해하는 강한 bacteriocin의 활성을 확인하였다.

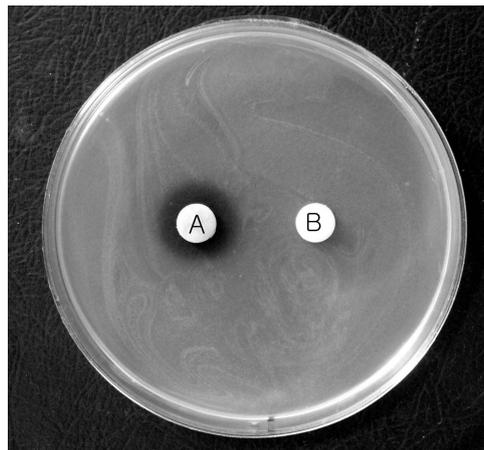
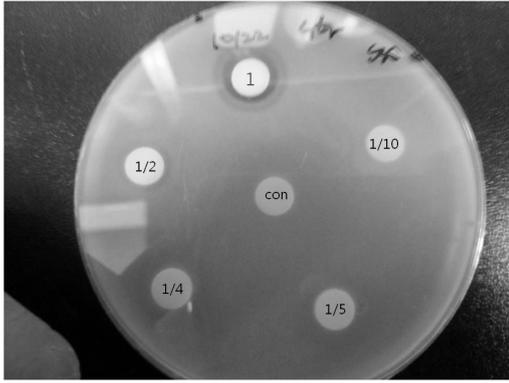


그림 3-22. 분리주 FBT26의 *E. coli* 0157:H7에 대한 항균활성 확인
(A: FBT26, B: control)

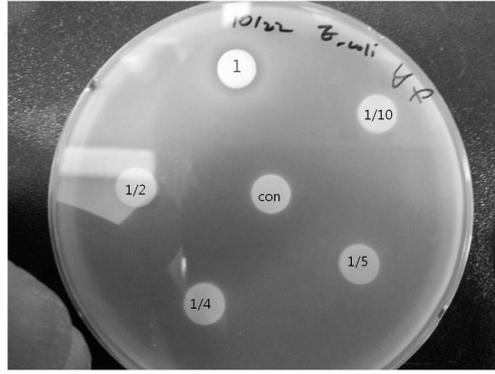
그림 3-22에서는 FBT26만이 *E. coli* 0157:H7에서 항균활성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

2. 유자추출물을 이용한 항균활성 실험

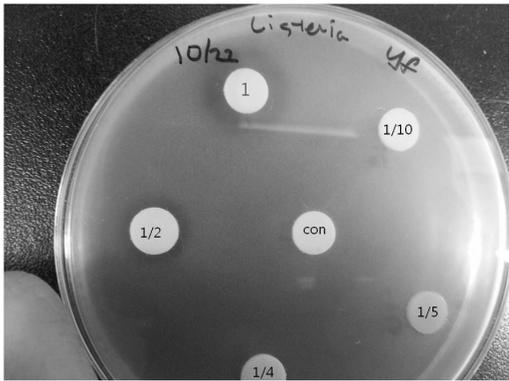
협동연구자(단국대)로부터 제공받은 유자추출물 YF(과육), YS(씨앗), YP(과피)를 이용하여 항균활성 실험을 하였다. 추출물은 80% ethanol로 1차 추출한 다음 여과후 45℃에서 농축한 것을 냉동보관하면서 실험에 사용하였다(11). 지시균으로는 *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes*, *Staph. aureus*, *Shigella sonnei*를 사용하였고, 유자추출물은 원액에 1/2, 1/4, 1/5, 1/10로 희석하여 50ul씩 적가 하였다. BHI agar에 0.85% soft agar를 증층하는 방법을 사용하였으며, paper disc는 Advantec(Ø 8mm)를 사용하였다.



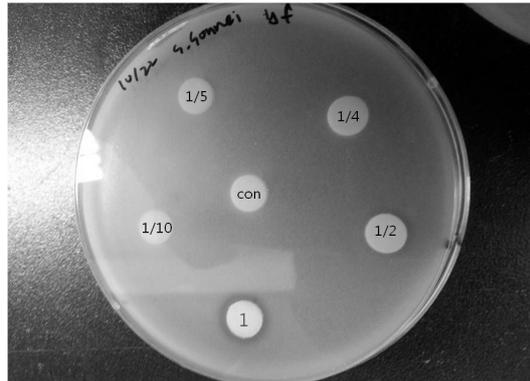
① YF : *Staphylococcus aureus*



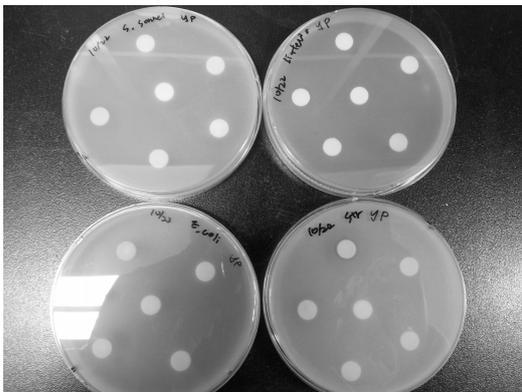
② YF : *Escherichia coli* O157:H7



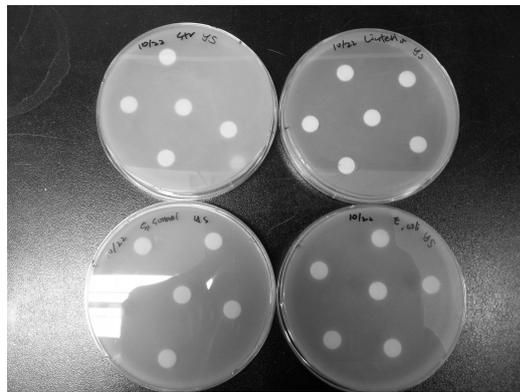
③ YF : *Listeria monocytogenes*



④ YF : *Shigella sonnei*



⑤ YP : 항균활성이 없음



⑥ YS : 항균활성이 없음

그림 3-23. 유자추출물을 이용한 항균활성 확인 실험

그림 3-23에서 보는 바와 같이 YF(과육)추출물 원액을 사용하였을 경우 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Staph. aureus*, *Shigella sonnei*에 대한 항균활성이 있는 것을 확인하였다. 그러나 YP추출물(과피), YS(씨앗)추출물에서는 항균 활성이 나타나지 않았다.

6절 유자의 생리활성물질 추출

1. 실험내용

가. 실험 재료

본 실험의 재료는 시중에서 구하기 쉬운 유자를 포함하여 참외, 적포도, 키위, 바나나, 배, 망고, 사과 등 8가지의 과일을 이용하였다. 각 과일을 세척한 후 과육과 과피를 분리하여 2 x 2 x 2cm 크기로 절단한 다음 액체질소를 이용하여 급속 동결 시켰다. 이렇게 준비된 총 16가지의 시료를 -24℃에 보관 후 실험에 사용하였다. 유자의 경우 씨도 분리하여 위와 동일한 과정을 거친 후 냉동하였다.

나. 시료의 추출

준비된 시료를 다음과 같은 방법으로 각 시료마다 3반복씩 추출을 실시하였다. 막자사발에 시료와 액체질소를 넣고 분쇄한 후 25g을 취해 80% ethanol을 250ml와 함께 믹서기에 넣어 3분간 믹스 하였다. 그 후 균질기를 이용하여 10,000rpm의 속도 3분간 균질 시켰다. 균질화 된 용액을 Whatman 1번 여과지를 이용해 여과시킨 후, 감압식 회전농축기로 온도 45℃에서 농축하여 용액을 얻어내었다. 추출된 용액을 micro tube에 1.5ml씩 넣어 -24℃에 보관하여 분석에 이용하였다.

다. 항산화 물질 분석

항산화 물질 분석 방법은 spectrophotometer를 이용한 일반적인 방법을 사용하였다.

라. 실험 방법 및 결과

(1) 총 페놀화합물 함량 분석

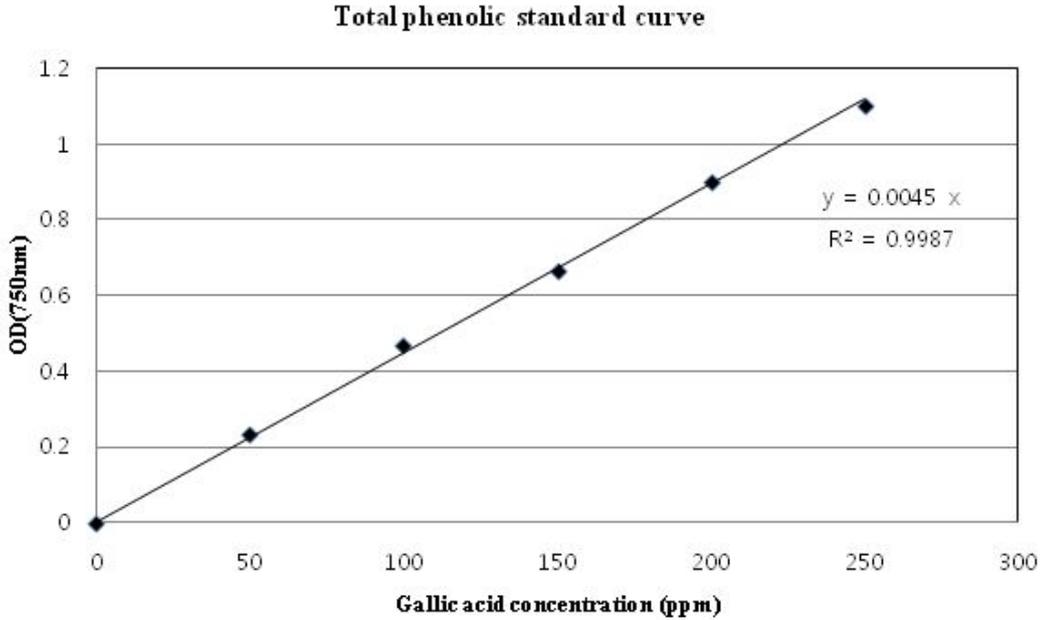


그림 3-24. 총 페놀의 표준검량곡선 작성

Gallic acid를 각각 50ppm, 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm의 농도로 희석하여 Folin-Ciocaltu reagent 0.2ml씩 넣고 vortex하여, 6분간 실온에 방치한다. 7% Na₂CO₃ 2ml를 넣고 vortex하여 90분간 실온암소 상태에서 방치한 후, 750nm Spectrophotometer에서 흡광도를 측정하여 얻어진 값을 이용, 검량선을 작성하였다 (12,13,14). 그 결과 99.87%의 linear한 결과를 얻어 비교 평가에 사용하였다(그림 3-24).

과육 부위의 총 phenolic 함량 측정 결과, 유자 (91.1±12.9mg/100g)와 키위 (80.1±11.4mg/100g)의 과육에서 그 함량이 다른 과일의 과육과 비교하여 유의차 있게 높게 나왔으며, 그 다음으로 망고, 사과, 바나나, 참외, 배, 적포도의 순으로 나타났다 (그림 3-25).

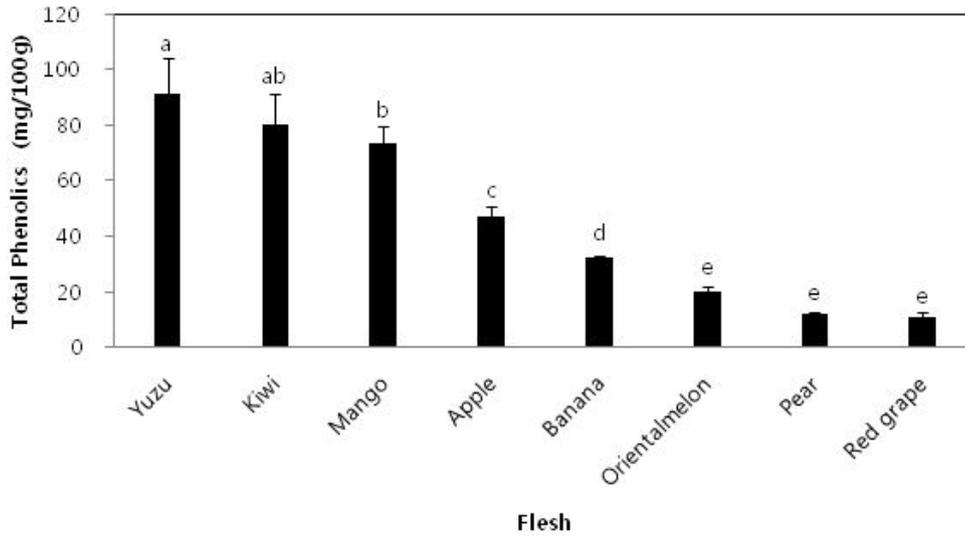


그림 3-25. 다양한 과일 중 과육의 총 페놀함량 비교 (mean \pm SD, n = 3).
(Duncan's multiple range test; $p < 0.05$).

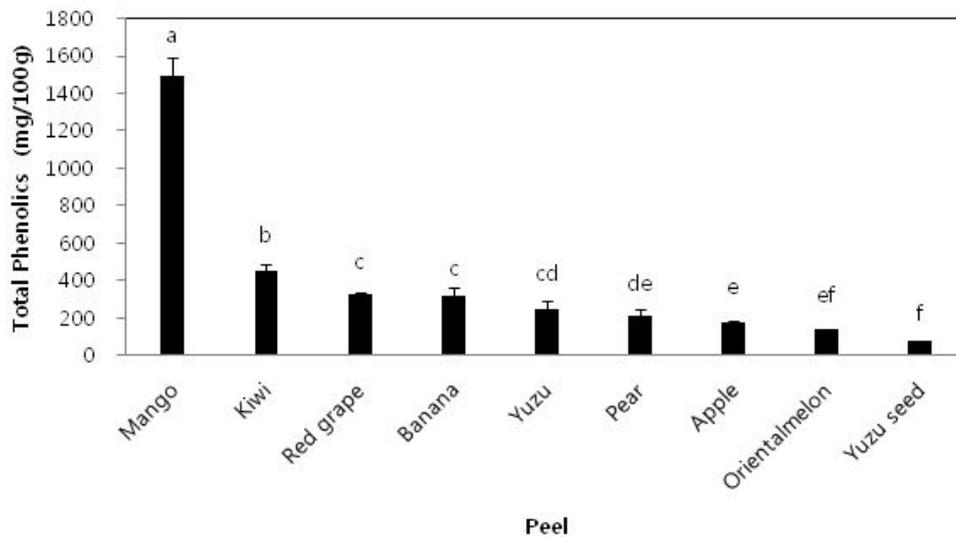


그림 3-26. 다양한 과일 중 과피의 총 페놀함량 비교 (mean \pm SD, n = 3).
(Duncan's multiple range test; $p < 0.05$).

과피 부위의 경우, 망고(1494.5 \pm 94.9mg/100g)의 총 phenolic 함량이 다른 과일과 비교하여 월등히 큰 유의차로 높게 분석되었으며, 키위(452.6 \pm 32.7mg/100g), 적포도(322.1 \pm 17.4mg/100g), 바나나(321.4 \pm 38.5mg/100g), 유자(250.2 \pm 37.8mg/100g), 배(208.3 \pm 36.8mg/100g), 사과(175.7 \pm 6.2mg/100g), 참외(136.1 \pm 6.0mg/100g)로 나타났다. 유자의 경우 유자씨에서는 75.1 \pm 2.6mg/100g으로 나타나 유자 과육에서의 91.1 \pm 12.9mg/100g과 비교하여 유사한 정도의 함량으로 분석되었다(그림 6-3).

2) 총 플라보노이드 함량 분석

(+)-Catechin을 각각 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm의 농도로 희석하여 5% NaNO₂ 0.3ml를

넣고 vortex하여 5분간 방치한 후 10% AlCl₃ 0.3ml를 넣고 vortex하여 6분간 방치하였다. 1N NaOH를 2ml 넣고, 물을 2.4ml 더하여 vortex한 후 510nm Spectrophotometer에서 얻어진 값을 이용하여 검량선을 작성하였다 (14,15,16). 그 결과 99.96%의 linear한 결과를 얻어 비교 평가에 사용하였다(그림 3-26).

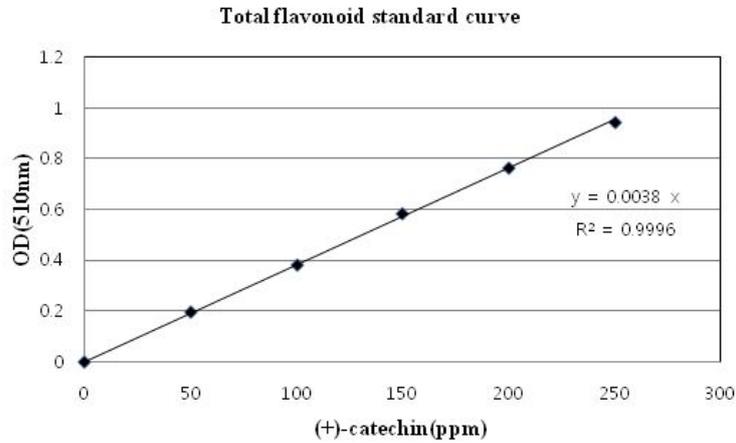


그림 3-27. 플라보노이드 표준검량선

과육의 Total flavonoid 측정결과는 사과의 과육에서 $21.7 \pm 2.0 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 로 유의차 있게 가장 높게 나타났으며, 망고($16.3 \pm 0.6 \text{ mg}/100 \text{ g}$), 바나나($14.0 \pm 0.8 \text{ mg}/100 \text{ g}$), 유자($9.6 \pm 0.8 \text{ mg}/100 \text{ g}$), 키위 ($7.2 \pm 1.0 \text{ mg}/100 \text{ g}$), 적포도($5.5 \pm 0.7 \text{ mg}/100 \text{ g}$), 참외($4.0 \pm 0.5 \text{ mg}/100 \text{ g}$), 배 ($3.7 \pm 0.3 \text{ mg}/100 \text{ g}$) 순으로 나타났다 (그림 3-27).

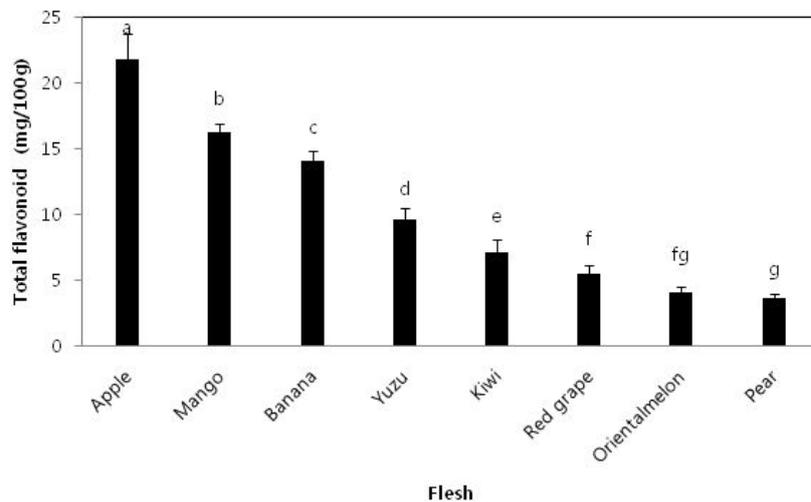


그림 3-28. 다양한 과일 중 과육의 플라보노이드 함량 비교 (mean \pm SD, n = 3). (Duncan's multiple range test; $p < 0.05$)

과피의 총 플라보노이드 측정 결과는 키위 ($282.84 \pm 29.34 \text{ mg}/100 \text{ g}$)와 바나나 ($280.27 \pm 3.76 \text{ mg}/100 \text{ g}$)가 다른 과일과 비교하여 유의차 있게 높이 평가 되었으며, 망고 ($158.86 \pm 8.15 \text{ mg}/100 \text{ g}$), 적포도 ($124.53 \pm 1.56 \text{ mg}/100 \text{ g}$), 배 ($110.60 \pm 17.59 \text{ mg}/100 \text{ g}$), 사과

(94.18±3.84mg/100g), 참외 (41.17±4.36mg/100g), 유자 (26.64±2.84mg/100g), 유자씨 (11.72±1.52mg/100g)순으로 나타났다 (그림 3-28).

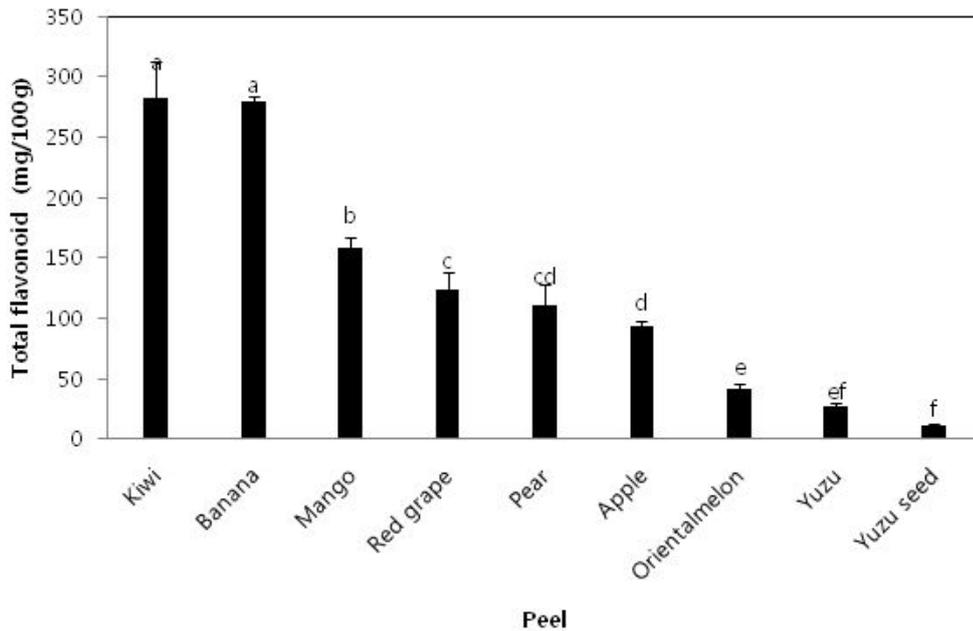


그림 3-29. 다양한 과일 중 과피의 플라보노이드 함량 비교 (mean ±SD, n = 3).
(Duncan's multiple range test; p < 0.05).

(2) 총 안토시아닌 함량 분석

총 안토시아닌 함량을 측정하기 위하여 pH-differential method (17)를 사용하였다. pH1.0의 0.025M KCl buffer와 pH4.5의 0.4M Sodium acetate buffer를 제조하여 실험에 이용했다. 과일 샘플을 희석배율에 맞춰 pH1.0 buffer, pH4.5 buffer 두 가지로 각각 희석 하였고 vortex 후 원심분리기에 7500rpm으로 원심분리 후 침전물을 제거하였고, pH1.0 buffer로 희석한 추출물을 각각 510nm와 700nm의 Spectrophotometer에서 흡광도를 측정하였고 pH4.5 buffer와 희석한 추출물의 경우에도 510nm와 700nm의 Spectrophotometer에서 흡광도를 측정하여 얻어진 흡광도를 이용해 검량하였다 (15, 17, 18, 19).

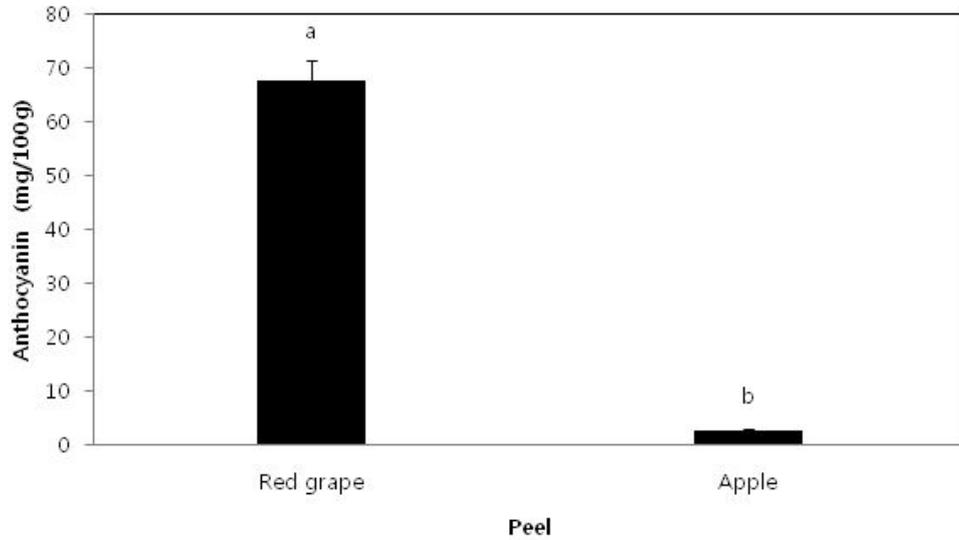


그림 3-30. 과일 중 과피의 안토시아닌 함량 비교 (mean ±SD, n = 3).
(Least significant difference test; p < 0.05).

총 안토시아닌 함량의 경우, 적포도의 과피와 사과의 과피를 제외한 나머지 시료에서는 검출되지 않았다. Anthocyanin 성분이 측정된 적포도 과피와 사과 과피의 측정결과, 적포도 과피에서 67.5±2.8mg/100g으로 사과 과피 (3.9±0.1mg/100g)에 비하여 17배 높게 나타났다(그림 3-30).

(3) 열처리에 의한 유자 과육의 항산화 물질 함량 분석

위의 실험 결과 유자 과육의 경우, 다른 7종의 과일 중 총 페놀 화합물의 함량이 가장 높게 분석되어 유자 과육의 조리 또는 가공 공정 중 발생할 수 있는 열에 의한 항산화 물질의 변화를 분석하였다. 유자 과육을 무처리구, 100도의 끓는 물에 10분간 처리구, autoclave 121도에서 20분간 처리구, 전자레인지에서 10분 처리구로 나누어 총 페놀 화합물과 총 플라보노이드 함량을 각각 측정하였다.

(4) 열처리에 따른 총 페놀 화합물 함량 분석

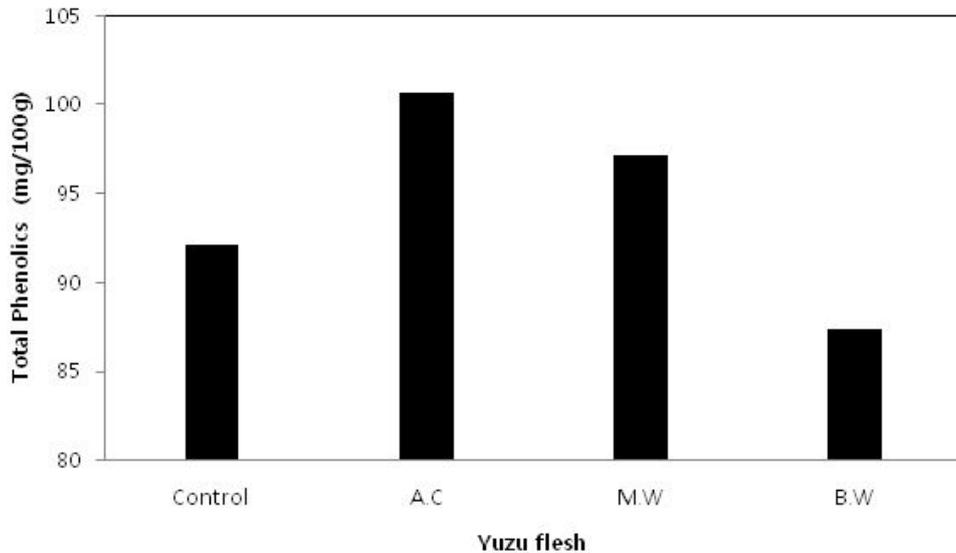


그림 3-31. 다양한 열처리에 의한 유자 과육의 총 페놀 함량 분석
(Control; control, A.C; autoclave, M.W; microwave, B.W; boiling water)

분석 결과, 무처리군의 총 페놀 화합물은 92.1mg/100g 으로 측정되었으며, 121도에서 20분간 autoclave를 실시한 군의 함량은 100.67mg/100g, 전자레인지에서 10분 처리한 군은 97.2mg/100g, 100도의 열수에 10분간 처리한 군은 87.4mg/100g로 나타났다. 총 3반복을 모두 수행한 후 통계분석을 하여야 정확한 결과 해석이 가능하나 무처리군에 비하여 autoclave 또는 전자레인지를 이용하여 열처리를 하여도 동등 또는 그 이상의 함량이 측정되었으며, 반면에 100도의 열수에 처리할 경우는 무처리군에 비하여 감소하는 결과가 나타났다(그림 6-8). 이는 열을 이용하여 처리를 하였을 경우에 항산화 물질의 함량이 증가한다기 보다는 추출 효율이 더 상승되어 가공한 식품으로 섭취하였을 경우에도 생체 내에서 bioavailability가 다소 증가될 수 있는 가능성을 제시하였다.

(5) 열처리에 따른 총 플라보노이드 화합물 함량 분석

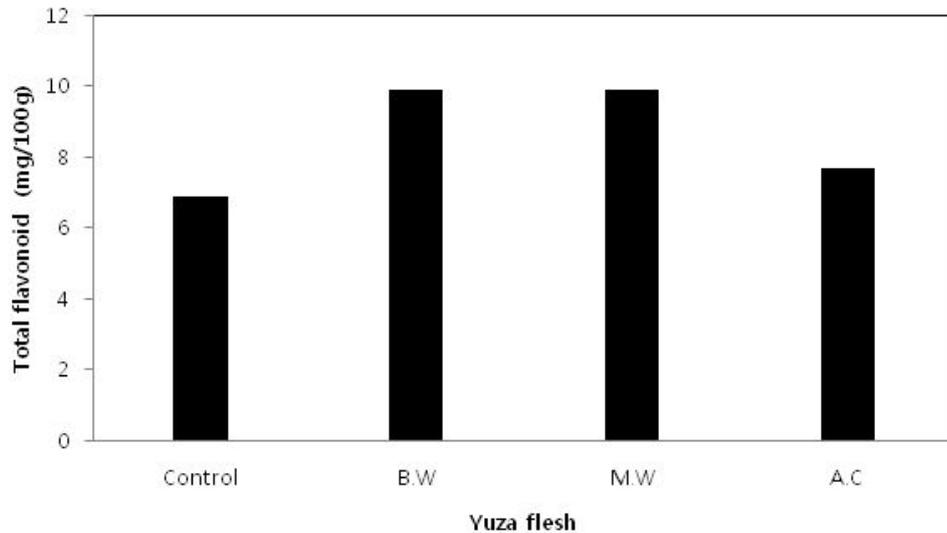


그림 3-32. 다양한 열처리에 의한 유자 과육의 총 플라보노이드 함량 분석
(Control; control, A.C; autoclave, M.W; microwave, B.W; boiling water)

분석 결과, 무처리군의 총 플라보노이드 함량은 6.89mg/100g 으로 측정되었으며, 100도의 열수에 10분간 처리한 군은 87.4mg/100g로 9.89mg/100g, 전자레인지에서 10분 처리한 군은 9.87mg/100g, 121도에서 20분간 autoclave를 실시한 군의 함량은 7.69mg/100g 으로 나타났다.

무처리구에 비하여 열수 또는 전자레인지를 이용하여 열처리를 하였을 경우, 동등 이상의 총 플라보노이드 함량이 측정되었으며, autoclave를 실시한 경우도 무처리군에 비하여 동등한 정도의 함량이 나타났다(그림 3-32).

7절 유자를 이용한 명란젓갈 내 생리활성 물질의 첨가

1. 유자 추출물을 첨가한 명란젓갈 제조

유자를 이용한 명란젓갈에 생리활성 물질 첨가를 위하여 강원도 강릉시에 위치한 한 젓갈 가공업체의 제품을 사용하였으며, (주)엠에스씨에서 제작한 유자 추출물을 실험에 이용하였다. 첨가된 유산균은 주관연구기간인 연세대학교 식품생명공학연구실에서 앞서 연구하였던 유청배지를 이용하여 배양한 *L. plantarum*을 사용하였다.



그림 3-33. 균일한 크기 및 상태의 명란을 이용한 명란젓갈 제조(부일식품)

젓갈 가공업체에서 기존으로 판매가 이루어지던 제품을 대조군으로 정하고 유자농축액 0.5%와 유산균 2%를 첨가한 개선1, 유자농축액 1%와 유산균 2%를 첨가한 개선2를 제작하여 실험에 이용하였다(그림 3-33). 보관은 4℃에서 냉장보관 하며 6주간의 보존실험을 실시하였다.

2. 개발품의 저장 중 품질변화 연구

가. 색상측정

명란젓갈의 색상 변화는 색차계(Chroma Meter CR-400, Minolta, Japan)를 사용하여 Hunter Lab값을 측정하였다. 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness) 값으로 표시하였으며, 처리별 3개의 시료를 각각 3회 반복 측정하여 평균값을 나타내었다.

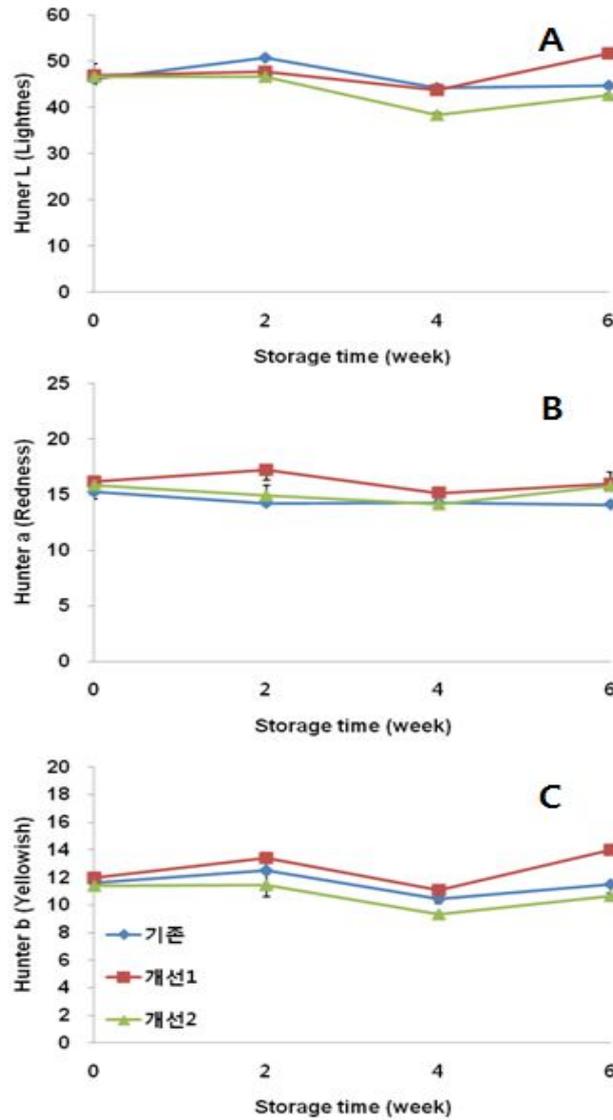


그림 3-34. 처리방법과 저장기간에 따른 명란젓갈 색상측정

그림 3-34의 그래프에서 보는 결과와 같이 명도, 적색도, 황색도 모두 기존제품과 비슷한 경향을 나타냈으며 이는 유산균과 기능성 유산균을 첨가해도 냉장저장 기간 동안 색상의 변화가 나타나지 않으며 기존의 제품과 같은 색상 품질을 유지하고 있는 걸 알 수 있다.

나. 염도측정

명란젓갈의 전체를 믹서 (HR20011, Philips, USA)를 사용하여 grind 한 후 측정하였다. 염도측정은 곱게 간 명란젓갈을 일정량 취하여 이를 물에 희석하여 5% 크롬산칼륨 시약을 가한다. 이후 0.1N 질산은 용액으로 적정하여 염도를 측정하였다.

$$\text{염도}(\%) = F \times b/a \times 0.005844 \times 100$$

a : 명란젓갈 채취량(g)

b : 적정에 소비된 0.1N 질산은 용액의양(mL)

F : 0.1N 질산은 용액의 역가

표 3-5. 처리방법과 저장기간에 따른 명란젓갈 염도측정

	저장기간			
	0주	2주	4주	6주
기존	5.73±0.21 ^b	6.60±0.27 ^a	6.95±0.45 ^a	5.84±0.44 ^b
개선1	6.21±0.32 ^{NS}	5.81±0.52 ^{NS}	6.91±1.84 ^{NS}	5.87±0.56 ^{NS}
개선2	5.86±0.51 ^{NS}	6.01±0.28 ^{NS}	6.22±1.37 ^{NS}	5.57±0.24 ^{NS}

^{NS}유의적차이없음

^{a-b}던킨다중검정. 공통의 첨자를 공유하지 않는 값은 유의적 차이가 있음(p<0.05).

표 3-5에서 보는 결과와 같이 명란젓갈의 염도는 기존제품과 개선제품 모두 염도 6% 정도가 나타났으며 기간에 따른 변화는 거의 없이 나타났다. 이는 유산균과 유자추출물의 첨가량이 염도에 영향을 미칠 정도의 많은 양이 아니며 기존제품에 첨가되는 염분의 양은 그대로 유지했기 때문에 위와 같은 결과가 나타났다고 할 수 있다. 하지만 관능 평가시 패닐이 느끼는 짠맛의 정도는 비슷하지만 젓갈 특유의 씹쓸한 맛이 개선된 두 가지 제품에는 기존제품보다 적게 느껴지는 경향이 있는 것으로 평가 되었으며 이는 유자추출물과 유산균 첨가에 따른 전체적인 젓갈의 맛이 잘 어우러져 나타난 것으로 판단된다.

다. 산도측정

명란젓갈의 전체를 믹서 (HR20011, Philips, USA)를 사용하여 그라인드 한 후 측정하였다. 산도측정은 곱게 간 명란젓갈 1g을 물에 희석한 후 페놀프탈레인 지시약을 가하고 0.1N NaOH를 이용한 중화적정법을 이용하여 acetic acid %로 환산하여 표시하였다.

$$\text{산도}(\%) = (a \times 0.006 \times 100) / b$$

a = 0.1N NaOH 소모량(ml)

b = 명란젓갈 채취량(g)

표 3-6. 처리방법과 저장기간에 따른 명란젓갈 산도측정

	저장기간			
	0주	2주	4주	6주
기존	0.55±0.01 ^b	0.72±0.064 ^a	0.72±0.02 ^a	0.69±0.05 ^a
개선1	0.63±0.04 ^b	0.78±0.02 ^a	0.77±0.03 ^a	0.74±0.01 ^a
개선2	0.65±0.04 ^c	0.78±0.00 ^a	0.71±0.02 ^b	0.73±0.01 ^b

^{NS}유의적차이없음

^{a-c}던컨다중검정. 공통의 첨자를 공유하지 않는 값은 유의적 차이가 있음(p<0.05).

기존 및 두 개의 개선제품 모두 2주이후부터 6주까지 산도의 변화는 큰 변화가 없는 것으로 나타났으며 이는 유자추출물과 유산균을 첨가해도 냉장저장기간 동안에 큰 변화가 없이 품질을 유지하고 있다고 알 수 있다.

라. 가용성 고형분함량 측정

명란젓갈의 전체를 믹서 (HR20011, Philips, USA)를 사용하여 그라인드 한 후 측정하였다. 가용성고형분함량은 디지털 굴절당도계 (PAL-1, Atago, Japan)로 측정하였다.

표 3-7. 처리방법과 저장기간에 따른 명란젓갈 가용성 고형분 함량 측정

	저장기간			
	0주	2주	4주	6주
기존	40.50±0.40 ^b	39.93±0.50 ^{bc}	41.63±0.38 ^a	39.40±0.60 ^c
개선1	39.93±0.15 ^b	39.60±0.30 ^b	40.67±0.25 ^a	39.73±0.29 ^b
개선2	39.60±0.20 ^b	40.00±0.10 ^b	43.53±1.37 ^a	39.83±0.87 ^b

^{NS}유의적차이없음

^{a-c}던컨다중검정. 공통의 첨자를 공유하지 않는 값은 유의적 차이가 있음(p<0.05).

표 3-7에서 보는바와 같이 기존제품과 개선제품의 저장기간 중 가용성 고형분 함량의 변화가 통계적으로 약간의 유의차가 있는 경향을 보이거나 기존 및 개선 제품들 간의 가용성 고형분 함량은 약 40 Brix 내외로 저장기간 동안에 큰 차이는 없는 것으로 판단된다.

마. pH 측정

명란젓갈의 전체를 믹서 (HR20011, Philips, USA)를 사용하여 grind 한 후 측정하였다. pH는 pH meter (Starter300, Ohaus, USA)로 측정하였다.

표 3-8. 처리방법과 저장기간에 따른 명란젓갈 pH 측정.

	저장기간			
	0주	2주	4주	6주
기존	5.95±0.01 ^b	5.85±0.01 ^d	5.88±0.01 ^c	6.11±0.01 ^a
개선1	5.92±0.01 ^a	5.77±0.01 ^d	5.84±0.01 ^c	5.89±0.01 ^b
개선2	5.91±0.00 ^a	5.74±0.01 ^c	5.74±0.01 ^c	5.77±0.01 ^b

^{NS}유의적차이없음

^{a-c}던컨다중검정. 공통의 첨자를 공유하지 않는 값은 유의적 차이가 있음(p<0.05).

표 3-8 에서 보는바와 같이 기존제품과 개선제품의 저장기간 중 pH 변화가 통계적으로 약간의 유의차가 있는 경향을 보이나 기존 및 개선 제품들간의 pH는 제조당일의 pH 5.9 내외를 6주간 유지하는 것으로 나타났다.

다. 개발품의 저장기간 중 관능평가 비교

(1) 재료 및 방법

기존 명란젓갈 제품과 유산균 및 유자추출물을 첨가한 개선2(유자추출물 1% 첨가, 유산균 2% 첨가)제품간의 관능평가를 실시하였다. 개선1(유자추출물 0.5% 첨가, 유산균 2%첨가)을 관능평가에 제외한 이유는 개선 1과 2제품간의 전체적인 맛의 차이가 크지 않아 기존제품과의 정확한 관능평가를 비교하기 위하여 기존제품과 개선2 제품간의 관능평가를 실시하였다.

숙련된 패널 20여명을 대상으로 0주, 2주, 4주 총 3회에 걸쳐 관능평가를 실시하였다. 관능평가는 10점법을 이용하여 기호도를 측정하였으며 10점은 매우 좋다. 1점은 매우 나쁘다로 나타내었다. 측정항목은 색상의 기호도, 향의 기호도, 신맛의 기호도, 짠맛의 기호도, 복합미 등 총 다섯가지 항목으로 실시하였다.

(2) 실험결과

관능평가 결과를 살펴보면 0주, 2주, 4주차 모두 색상의 기호도를 제외한 향의 기호도, 신맛의 기호도, 짠맛의 기호도, 복합미에서 기존제품과 개선제품간의 유의적 차이가 없는 것으로 나타났으며, 색상의 기호도의 경우 0주, 2주에 유의적 차이가 없었지만 4주차에 유의적 차이가 나타났다. 통계적으로는 기존제품과 개선제품간의 차이가 없는 것으로 나왔으나 모든 항목에 있어 기존제품에 비하여 기존제품에 비하여 개선제품의 기호도 점수가 저장기간 동안 높은 점수를 받은 것을 볼 수 있다. 이는 유자추출물 첨가에 따라 전체적인 젓갈의 맛이 다소 향상되고 전체적으로 어우러진 맛을 증진 시킨다고 판단되며 유자추출물 및 유산균 첨가에 따라 개선제품의 영양 및 기능성 측면에서 기존제품에 비하여 품질을 향상시킨다고 판단된다.

표 3-9 . 처리방법과 저장기간에 따른 명란젓갈 기호도 관능평가

	0주		2주		4주	
	기존	개선2	기존	개선2	기존	개선2
색상	5.18±1.51 ^{NS}	5.65±1.17 ^{NS}	6.19±1.63 ^{NS}	6.62±1.91 ^{NS}	6.00±2.10 ^b	7.55±1.60 ^a
향	5.00±1.80 ^{NS}	5.76±1.30 ^{NS}	6.05±1.83 ^{NS}	5.62±2.04 ^{NS}	5.95±2.06 ^{NS}	6.40±2.16 ^{NS}
신맛	5.47±2.03 ^{NS}	5.94±2.14 ^{NS}	5.90±1.89 ^{NS}	5.90±2.12 ^{NS}	5.30±2.13 ^{NS}	6.25±2.27 ^{NS}
짠맛	4.53±1.84 ^{NS}	5.24±1.99 ^{NS}	6.14±1.68 ^{NS}	5.67±2.31 ^{NS}	6.30±1.63 ^{NS}	6.20±1.82 ^{NS}
복합미	5.08±1.68 ^{NS}	5.82±1.67 ^{NS}	6.62±1.72 ^{NS}	6.43±2.11 ^{NS}	6.95±1.67 ^{NS}	6.30±2.08 ^{NS}

^{NS}유의적차이없음

^{a-b}던킨다중검정. 공통의 첨자를 공유하지 않는 값은 유의적 차이가 있음(p<0.05)

8절 Vitamin C 첨가 실험

Control로 사용할 기존제품과 유자추출물 0.5%와 유산균 2%를 첨가한 개선1, 유자추출물 1%와 유산균 2%를 첨가한 개선2 총 4가지 샘플에 1%의 비타민을 첨가하여 유산균수를 측정하였다. 시료와 멸균증류수 1대1의 비율로 맞추어 멸균 비닐에 넣어 Stomacher로 2분간 균질화시킨 후 0.85%의 NaCl로 십진희석하여 유산균만을 선택적으로 계수하기 위하여 MRS agar에 0.004%의 BCP를 첨가하였고 그람음성균을 억제하기 위하여 sodium azide(Sigma)를 0.05% 첨가한 plate에 희석한 용액을 도말하여 24시간 배양 후 계수에 이용하였다.



그림 3-35. 명란젓갈을 Stomacher 처리 후 현탁(사진)

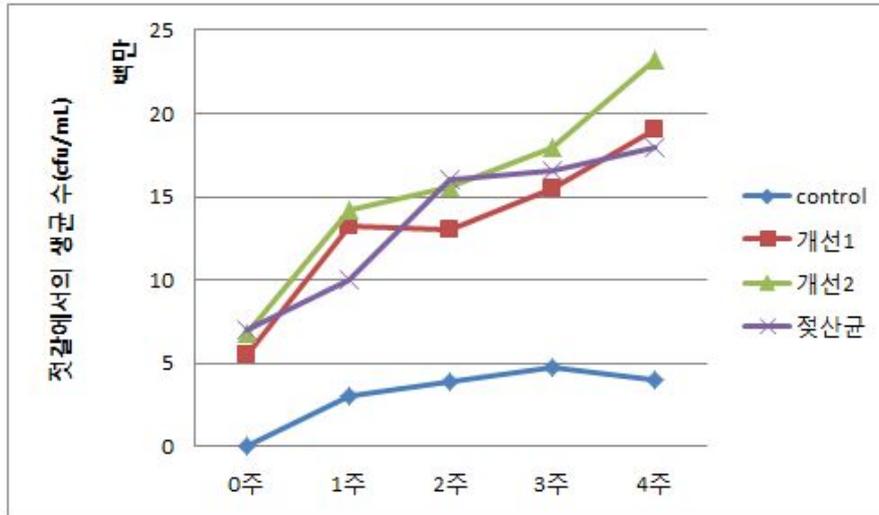


그림 3-36. Vitamin C 첨가 따른 실험구 및 대조구의 생균수 변화

0-4주차에서 기존제품에 비해 개선제품의 생균수 증가의 폭이 더욱 큼을 볼 수 있으며, 그 중에서도 개선2에서 좀 더 좋은 수치를 보여 개선2의 sample에 Vitamin C를 첨가하여 제조하는 제품이 유산균의 보장성에서 크다고 보여 진다(그림 3-36).

9절 기능성 유산균과 유자 추출물의 시너지 효과 확인

비교 sample은 총 4가지로, 기존제품과 유자추출물 0.5%와 유산균 2%를 첨가한 개선1, 유자 추출물 1%와 유산균 2%를 첨가한 개선2, 젖산균 2%를 첨가한 젖산균 sample로 실험을 수행하였다(그림 3-38). 그리고 기존제품의 제작과정에서 고춧가루가 제품에 미치는 영향도 확인하기 위하여 고춧가루가 제외된 백명란 제품도 제작하여 총 8가지 sample에서 1주 간격으로 8주간 생균수를 측정하였다. 시료와 멸균증류수 1대1의 비율로 맞추어 멸균 비닐에 넣어 Stomacher로 2분간 균질화 시킨후 0.85%의 NaCl로 십진희석하여 유산균만을 선택적으로 계수하기 위하여 MRS agar에 0.004%의 BCP를 첨가하였고 그람음성균을 억제하기 위하여 Sodium azide를 0.05% 첨가한 plate에 희석한 용액을 도말하여 24시간 배양 후 계수에 이용하였다.

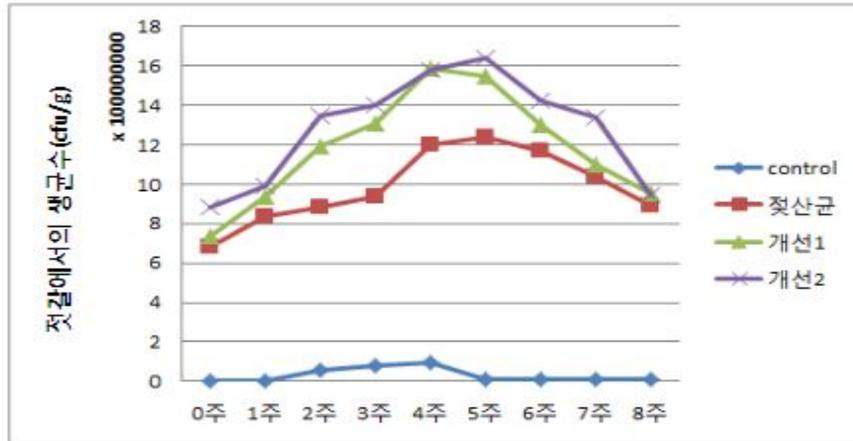


그림 3-37. 기존 명란제품의 보존 중 생균수의 변화(g당 생균수로 표시)

위 그래프는 고춧가루가 첨가된 기존명란제품을 이용하여 8주간의 생균수를 나타낸 그래프로 생균수의 수치는 4-5주차가 가장 높았으며 그 후, 점차 감소됨을 보여준다. 이 점에서 미루어 보아 제작 4주차부터 최상의 맛을 보일것이라고 판단된다(그림 3-37).



그림 3-38. 공시 명란젓갈 Sample(사진)

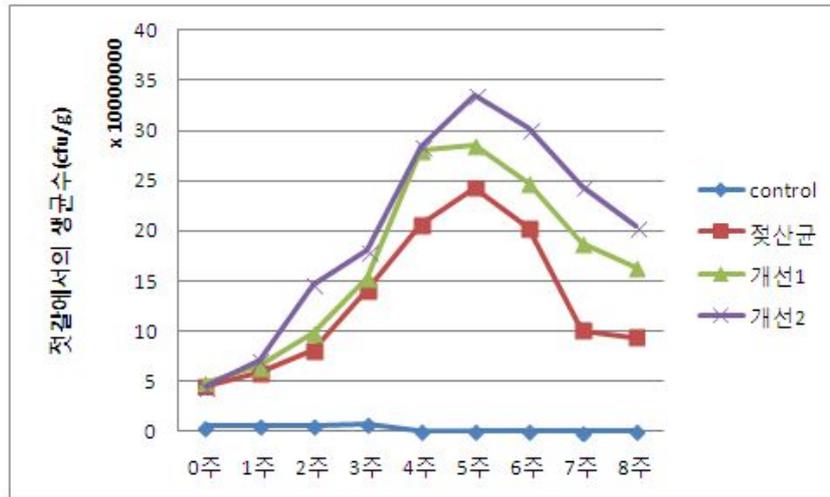


그림 3-39. 백명란의 보존 중 생균수의 변화(g당 생균수로 표시)

그림 3-39에서는 고춧가루가 첨가 되지 않은 백명란을 이용하여 생균수(유산균)을 측정한 그래프로 이 결과에서도 마찬가지로 4-5주차에서 가장 좋은 수치를 보여주고 있지만 고춧가루가 첨가된 명란젓갈 제품과의 생균수 차이를 볼 수 있다. 고춧가루의 유무로 인해 생균수의 수가 미미한 차이를 보이는 것을 미루어 볼 때, 고춧가루의 첨가가 명란젓갈 제품의 저장성 면에서도 더 유효한 결과가 나타났다.

10절 유산균 및 유자추출물을 첨가한 저염 명란젓갈의 관능 평가

공장에서 출고한 기존의 명란젓갈을 바탕으로 유산균 및 유자추출물이 첨가 된 명란젓과, Vitamin C가 첨가 된 명란젓갈, 그리고 시중에서 판매중인 명란젓갈의 4가지 sample을 잘 혼합된 관능평가 요원 20명을 선발하여 기호척도 평가(식품관능검사, 김광옥 등)의 방법을 이용하여 시행 하였다(22).

표 3-10. 관능평가 결과 및 평균값

인원	시중제품- 유산균 백명란	시중제품- 유산균 명란	기존제품- 유산균 백명란	기존제품- 유산균 명란
1	6	8	8	9
2	4	8	9	2
3	4	8	9	2
4	8	2	3	4
5	8	8	7	8
6	8	4	7	9
7	4	6	7	8
8	8	6	7	6
9	3	2	4	5
10	3	5	7	8
11	5	5	7	8
12	7	6	6	8
13	8	8	8	6
14	8	4	6	8
15	5	7	9	6
16	5	8	6	9
17	6	8	8	9
18	7	6	5	8
19	6	8	7	6
20	5	9	8	7
평균	5.9	6.3	6.9	6.8
반올림	6	6	7	7

(패널요원 20명)

표 3-11. 시제품, 기존제품 및 유산균 백명란젓갈, 명란젓갈 기호척도 비교

	타사제품 : 실험구 (유산균백명란)	타사제품 : 실험구 (유산균 명란)	기존제품 : (부일) 실험구 (유산균백명란)	기존제품 : (부일) 실험구 (유산균 명란)
1	-2	-3	0	-1
2	-5	2	-1	6
3	-5	2	-1	6
4	5	4	-1	-2
5	1	0	1	0
6	1	-1	-3	-5
7	-3	-4	-1	-2
8	1	2	-1	0
9	-1	-2	-2	-3
10	-4	-5	-2	-3
11	-2	-3	-2	-2
12	1	-1	0	2
13	0	2	0	4
14	2	0	-2	-4
15	-4	-1	-2	1
16	-1	-4	2	-1
17	-2	-3	0	-1
18	2	-1	1	-2
19	-1	0	1	2
20	-3	-2	1	2
S 값	6.947368421	5.884210526	1.831578947	8.789473684
T 값	-0.643717	-0.6840208	-1.4650101	-0.254402944

-자유도 19인 5% 수준의 t 값은 2.093이다.

3) 기호척도 관능평가의 결과 해석

타사제품 : 유산균 백명란 비교

계산된 t 값(-0.643717)은 -2.093보다 작지 않기 때문에 시판 명란젓갈과 유산균을 첨가한 백명란간에는 유의적인 차이가 없음.

타사제품 : 유산균 명란 비교

계산된 t 값(-0.6840208)은 -2.093보다 작지 않기 때문에 시판 명란젓갈과 유산균을 첨가한 명란간에는 유의적인 차이가 없음.

기존제품(부일) : 유산균 백명란 비교

계산된 t 값(-1.46501055)은 -2.093보다 작지 않기 때문에 기존 생산된 명란젓갈과 유산균을 첨가한 백명란간에는 유의적인 차이가 없음.

기존제품(부일) : 유산균 명란 비교

계산된 t 값(-0.254402944)은 -2.093 보다 작지 않기 때문에 기존 생산된 명란젓갈과 유산균을 첨가한 명란간에는 유의적인 차이가 없음.

위에서 기술한 바와 같이 관능평가 시행 후 결과에서 각 시료마다의 맛의 차이점이 미미했다. 그러나, 시중에서 판매하고 있는 명란젓에서 더 맛있다는 의견도 나오긴 하였지만 이는 시중판매 제품군에서 양념이 더 가미되어 판매를 하기 때문에 맛에서 차이를 느꼈다고 생각한다. 그러나, 기존의 비릿한 냄새를 풍기는 명란젓갈(시중판매)보다, 향긋한 냄새를 풍기는 유자추출물이 함유된 연구개발한 제품을 더 선호하는 추세였다. 그 밖에 의견을 종합하여 보았을 때, 맛 쪽에서는 그다지 차이가 없다고 사료된다(표10-1, 10-2).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절 연구개발의 성과 및 활용목표 대비 실적

본 과제외 2년 연구 개발에 주관기관과 협동기간이 설정하였던 목표의 달성도는 다음과 같다.

구분	연도	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 년도	2012	기능성 유산균 분리 및 동정	- 웰빙 저염 발효젓갈 생산에 필요한 유산균 분리 및 동정 - 분리균의 면역활성능 확인
		값싸고 저렴한 식용 배지 개발	- 기존 유산균 배양용 MRS를 대체한 저렴한 식용배지의 개발 (유청배지를 기본으로 하는 배지의 특허 출원)
		유산균의 대량 배양 및 보존조건	- 고농도 유산균의 대량배양 조건 검토 - 배양 유산균의 저장(보존) 및 제재화 검토
		유해 미생물 저해 효과 확인	- 유자첨가로 인한 젓갈의 유해 미생물 저해 효과 확인 - 유산균과 유자 첨가시 유해 미생물 저해 효과 확인
		유자의 생리활성물질 추출	- 유자의 생리활성물질 추출 - 유자의 부위별(과피, 과육, 씨) 생리활성 물질 확인
		젓갈의 저염화	-명란 염장시 침지액의 염도별 침지정도 확인 -저염화에 따른 저장성 저하 보완 연구
2차 년도	2013	기능성 유산균에 의한 발효제어	-기능성 유산균에 의한 발효조건 성립
		비타민 C 첨가실험	-비타민 C 첨가에 따른 기능성 시너지 효과와 저장성 실험 연구
		기능성 유산균과 유자 추출물의 시너지 효과 확인	-유자 추출물에 의한 기능성 유산균의 생육과 활성 증가 확인
		기능성 유산균, 유자추출물을 첨가한 저염 명란젓갈 생산	-제품 제조시 명란젓갈의 풍미, 품질 확인 -관능평가를 통한 기호성 확인
		시제품의 산업화	-명란젓갈 시제품의 제조(예정)

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절 포스터 발표

본 과제를 토대로 실험한 결과를 바탕으로 하여 인도에서 2013년 9월 7일에서 9월 10일까지 개최된 아시아 유산균 학회에서 “Isolation A probiotic *L. plantarum* Strain with immune Stimulatory Activity from Fermented Vegetables”의 제목으로 포스터 발표를 하였다(그림 5-1).

1. 포스터 초록

This study was conducted to isolate a strain of lactic acid bacteria, which exerts immune stimulatory effects, from the fermented vegetable sources including kimchi. To isolate strains, MRS medium was supplemented with bromocresol purple(BCP) and sodium azide. 250 LAB isolates were primary picked and screened for their immune stimulatory activities in murine RAW 264.7 cells. Among the isolates, a strain FBT215 showed the highest cytokine production activities as expressed IL-1 α 676.9 \pm 22.2 pg/mL and TNF- α 845.2 \pm 31.6 pg/mL. Data obtained from 16S rRNA gene sequencing and API 50 CH kit were used for identification, resulted that the FBT215 belongs to *Lactobacillus plantarum*. The FBT215 strain were characterized in terms of antibiotic susceptibility, acid tolerance, bile salt tolerance and bile salt hydrolase(BSH) activity. The strain harbors a cryptic plasmid, which is not responsible for bacteriocin production. API ZYM kit was also used to further characterization, resulted that the FBT215 produces 7 enzymes representing beta-galactosidase. Therefore it is highly suggested that the *L. plantarum* FBT215 can be used in the various functional foods or probiotic culture preparation.

2. 포스터 사진

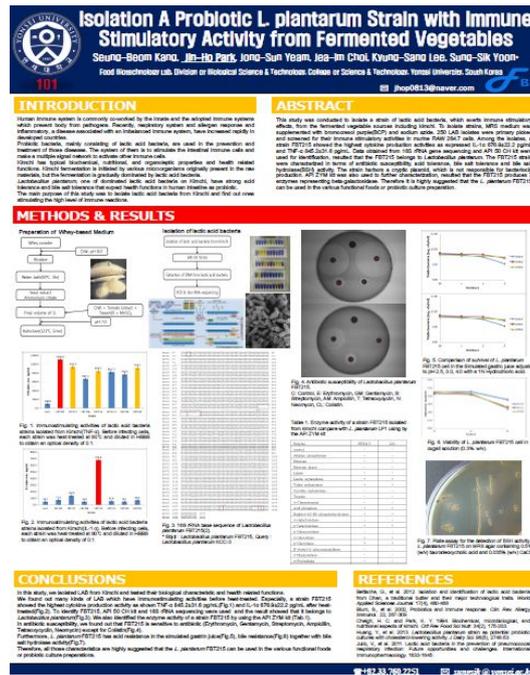


그림 5-1. 아시아유산균 학회 발표 포스터 사진

3. 아시아유산균학회(New Dehli, India, 2013) 현장 사진

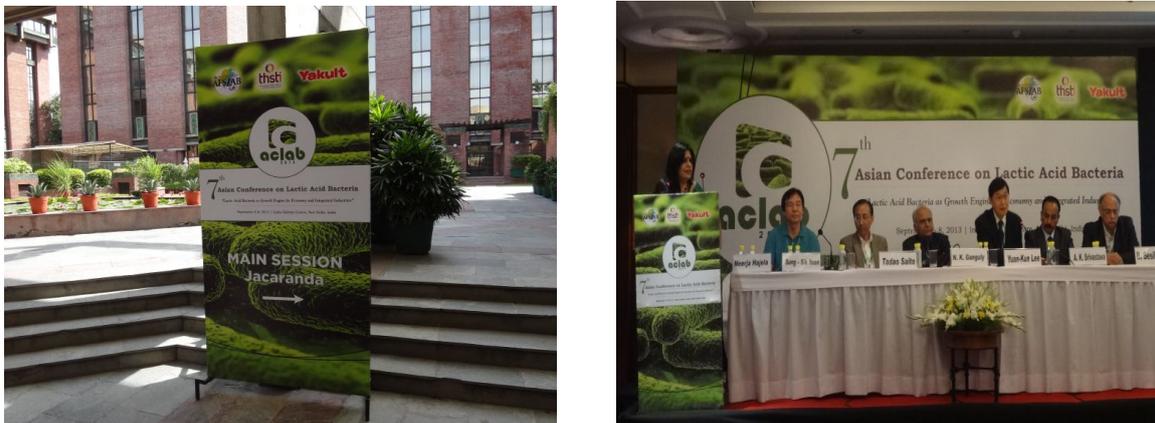


그림 5-2. 인도에서 개최한 아시아 유산균 학회 현장

2절 특허

본 과제를 통한 연구로부터 유청배지의 제조와 김치에서 분리한 *L. plantarum*의 발명 특허 출원이 가능하였고, 그 목록은 다음과 같다.

출원된 특허 목록				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013	토마토 추출물을 포함하는 유청배지 제조 및 유산균의 배양	윤성식, 강승범	대한민국	2013-94385
2013	락토바실러스 플랜타럼 및 이외의 용도	윤성식, 강승범	대한민국	2013-94384

3절 유산균학회지 논문 게재

본 과제를 수행하는 동안 연구개발을 한 결과의 일부를 이용하여 “발효 김치 중 면역활성 젖산균의 분리 및 특성”이란 제목으로 한국 유산균학회지에 투고하였다(2014년 1월 인쇄 예정).

1. 영문 요약

Isolation of *Lactobacillus plantarum* FBT215 (*L. plantarum* FBT215) from fermenting kimchi, which has immunostimulatory effects, was characterized in this study. To isolate probiotic lactic acid bacteria(LAB) from kimchi, properly diluted kimchi samples were spread on MRS agar incorporated BCP and sodium azide. 154 LAB isolates were isolated, screened for immune-stimulatory activities in murine RAW 264.7 cells. Among the 24 LAB strains after MTT assay, FBT215 has shown the best cytokine activity of expression of 676.9 ± 22.2 pg/mL of interleukin IL-1 α and 845.2 ± 31.6 pg/mL of TNF- α . For identification, the typing experiments using 16S rRNA sequencing and API 50 CH kit confirmed that the FBT215 belongs to *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*), shortly called as *L. plantarum* FBT215. The FBT215 strain showed high antibiotic susceptibility, weak acid tolerance, bile salt tolerance and BSH activity but did not produce bacteriocin against indicator strains tested. API ZYM kit analysis resulted that the *L. plantarum* FBT215 produces seven different kinds of enzymes. In conclusion, these properties would be used as a functional probiotic culture in the manufacture of fermented foods.

4절 면역활성 유산균과 유자청이 함유된 명란젓갈 시안

본 과제는 면역활성 유산균과 유자추출물이 함유된 명란젓갈을 개발하는 것으로 연구를 통해 최상의 제조공정을 통하여 시제품의 아래와 같이 제작하였다(그림 4-1, 그림 4-2 참조).



그림 5-3. 명란젓갈의 생산공정(부일식품)



그림 5-4. 면역활성 유산균과 유자추출물을 함유한 명란젓갈의 시제품(안)

5절 사업 활용 계획

가. 배지 제조의 대량화

면역활성 유산균의 배양을 위하여 정기적인 배양교육이 필요할 것으로 판단이 된다. 혹은 전문 배양관련 기술을 습득하고 있는 직원의 고용도 불가피하다고 사료된다. 대량생산이 주목적으로 진행이 되어야 하기 때문에 배지 제조가 대량화가 되어야 한다. 그에 따른 기계가 갖춰져야 할 것이다.



그림 5-5 티앤비테크놀로지의 대용량 미생물배양기 Bio-Water

나. 판매관련 계획

품질 좋은 다양한 것갈 관련 식품을 다량 판매하기 위해 온라인 판매도 가능하다고 사료되기 된다(그림5-10).

사업 계획

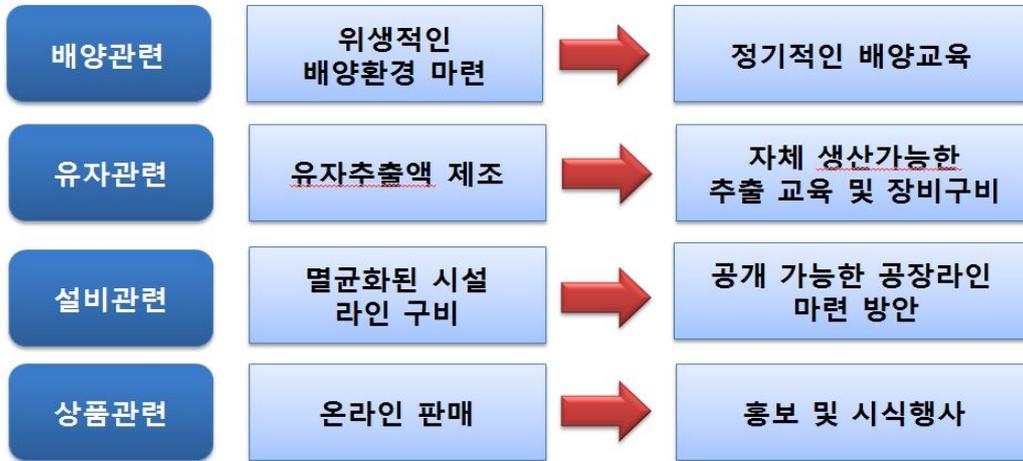


그림5-6 사업관련 계획 모식도

다. 사업증진을 위한 젓갈산업으로의 편입

속초의 미성식품과 함께 해양바이오산업에 지원을 해 볼 예정입니다.



그림 5-7 강릉과학 산업진흥원의 기업 유치 과정

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

명란젓같은 명태의 알을 소금에 절여 먹는 것으로 흔히 젓갈이라고 불리우고 있지만, 명란젓같은 실질적으로 염장품에 더 가깝다. 명란은 단백질과 비타민E가 다량 함유되어 있어 건강에도 유익하다. 하지만 우리나라만의 식품은 아니며 바다와 근접한 나라에서는 명란을 이용한 식품이 많이 제조 판매되고 있다. 한국의 캐비어라고 불리기도 하는 이 명란은 이웃나라 일본에서는 멘타이코(mentaiko)라 하여 그 인기가 새삼 놀랄 만큼 대단하다. 멘타이코를 놓고 본다면 후쿠오카가 단연 일본의 최고라고 해도 과언이 아닐 정도로 멘타이코는 후쿠오카의 자랑이다. 이 인기의 시초는 1946년에 일본 상인이 옮겼던 것을 시작으로 현재는 후쿠오카 지역의 특산물이 되었다. 멘타이코는 후쿠야라고 하는 업체에서 제조 판매하기 시작하여 2011년에 이미 155억엔의 수익을 끌어 올린 후쿠오카의 보물같은 상품이다. 후쿠야에서는 끊임없이 멘타이코를 이용한 제품을 개발 생산하고 있으며(그림 6-1), 후쿠야에서는 신선한 재료가 맛을 만들어 낸다는 일념으로 항상 신선한 재료를 공수하고 있다. 후쿠시마 원전사태에도 불구하고 멘타이코의 인기는 식을 줄 모르며, 홈페이지를 관리하여 온라인 판매를 함으로써 좀 더 소비자와의 거리를 좁히고 있다. 공장견학의 시스템을 운영하여 더 활발하게 고객과의 만남에 힘쓰고 있다. 기본 명란젓갈의 매운 맛의 강도를 조절하여 제품을 생산함에 있어서 항상 고객입장에서 생각하는 기업이기도 하다. 우리나라에서도 저염을 한 명란젓갈의 개발이 활발이 이루어짐에 따라 저염 뿐만 아니라 건강에도 좀 더 가깝게 접할 수 있고 소비자 입장에서 생각 하는 제품이 개발되어야 할 것이며 지역 특산물화가 더 세세하게 이루어질 수 있는 구체적인 계획도 마련해 보아야 할 것이다. 한국과 일본을 제외한 나라에서는 멘타이코를 우선적으로 알고 있기 때문에 이웃나라 일본과의 경쟁력이 강화된 명란젓갈 생산에 사력을 다해야 할 것이다.



그림 6-1. 후쿠야에서 개발한 튜브형태의 명란 젓 제품

제 7 장 참고문헌

- (1) KG Lee and SM Kim (2012) Quality Changes in Low-Salted Squid Jeot-gal during Fermentation and Determination of Shelf-life. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **41**, 687-694
- (2) CR Jo, DH Kim, WD Lee, JJ Lee and MW Byun (2003) Application of Gamma Irradiation on Manufacturing Changran Jeotgal(aged and seasoned intestine of Alaska pollack): Microbiological and Sensory Characteristics. *J.korean Soc. Food Sc. Nutr.* **32**,673-678
- (3) SO Jo, JH Choe, BN Kim, HJ Y, Yun Ji Kim and Cheorun Jo (2009) Microbiological, Physicochemical, and Sensory Characteristics of Myungran Jeotgal Treated by Electron Beam Irradiation. *Korean J. Food Preserv.* **16**,198-203
- (4) YM Km (1997) Technology Development on Low-salted & Fermented Seafoods and Hygienic Packaging. Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries(MIFAFF)
- (5) BN Kim, AR Jang, HP Song, YJ Kim, BH Ko and CR Jo (2008) Microbiological Quality of Myungran Jeotkal and Its Ingredients an Improvement of Shelf-stability by Gamma Irradation. *Korean J. Food Preserv.* **15**, 606-611
- (6) YM Km (2008) Present; Status and Prospect of Fermented Seafood Industry in Korea. *Food science and industry.* **12**, 16-33
- (7) 조덕제 저. 식품분석-이론 및 실습. 지구문화사
- (8) Olaleye SB, Onasanwo SA, Ige AO, Wu KK, Cho CH (2010) Anti-inflammatory activities of a kolaviron-inhibition of nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor-alpha production in activated macrophage-like cell line. *Afr J Med Med Sci.* Suppl:41-46.
- (9) Tao JY, Zheng GH, Zhao L, Wu JG, Zhang XY, Zhang SL, Huang ZJ, Xiong FL, Li CM. 2009. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Melilotus suaveolens* Ledeb on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* **123**, 97-105
- (10) Tamura T, Noda M, Ozaki M, Maruyama M, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M (2010) Establishment of an efficient fermentation system of gamma-aminobutyric acid by a lactic acid bacterium, *Enterococcus avium* G-15, isolated from carrot leaves. *Biol Pharm Bull.* **33**,1673-1679.
- (11) Chang JY, Chang HC (2011) Growth inhibition of foodborne pathogens by kimchi prepared with bacteriocin-producing starter culture. *J Food Sci.* **76**, 72-78.

- (12) Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B, Muthumary J, Srinivasan (2011) Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **79**, 594-598.
- (13) Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen-toxicity, oxygen radicals, transition-metals, and disease. *J. Biochem.* **219**, 1-14
- (14) Meyers KJ, Watkins CB, Pritts MP, Liu RH (2003) Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6887-6892.
- (15) Singleton VL, Orthofer R, Lamuela Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, Oxidants and Antioxidants. *Pt A*, 152-178.
- (16) Shin Y, Liu RH, Nock JF, Holliday D, Watkins CB (2007) Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biol Technol.* **45**, 349-357
- (17) Jia Z, Tang M, Wu J (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.
- (18) Meyers KJ, Watkins, CB, Pritts MP, Liu RH (2003) Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6887-6892.
- (19) M. Monica Giusti and Ronald EW (2001) Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. F1.2.1-F.1.2.1313
- (20) Kim DO, OK Chun, YJ Kim, HY Moon and CY Lee (2003) Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in flesh plums. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6509-6515.
- (21) Boyles MJ, Wrolstad RE (1993) Anthocyanin composition of red raspberry juice: influence of cultivar, processing and environmental factors. *J. Food Sci.* **58**, 1135-1141.
- (22) Wolfe K, Wu X and Liu RH (2003) Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 609-614.
- (23) 김광옥등. 학연사. 식품의 관능 검사.

주 의

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