

발간등록번호

11-1543000-000866-01

은행외종피를 이용한 혐오취, Allergy 저감화 및 면역증진
소재 개발

Development of Immune-enhancing, Odor-reducing and
Allergy-reducing Products with Sarcotesta of *Ginkgo biloba*

한국식품연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “은행외종피를 이용한 혐오취, Allergy 저감화 및 면역증진 소재 개발”
과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 04 월 03 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원
주관연구책임자 : 이 명 기
연 구 원 : 이 영 경
연 구 원 : 박 소 림
연 구 원 : 이 성 훈
연 구 원 : 조 용 선
연 구 원 : 김 영 호
연 구 원 : 손 동 화
연 구 원 : 남 영 도
연 구 원 : 임 성 일
연 구 원 : 임 상 동
연 구 원 : 김 효 진
연 구 원 : 송 경 모
위 축 연 구 원 : 박 선 현
위 축 연 구 원 : 정 진 경
위 축 연 구 원 : 홍 지 영
위 축 연 구 원 : 장 지 은
참 여 기 업 : 두성은행영농조합

요 약 문

I. 제목

은행외종피를 이용한 혐오취, Allergy 저감화 및 면역증진 소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

은행은 천식, 뇌동맥 경색이나 대뇌의 혈류장애 등의 질병에 뛰어난 소재로 각광받고 있다. 2020년 은행의 세계 총 수요량은 20만 톤을 초과할 것으로 추산하고 있으며, 2000년 우리나라의 은행(알) 총 생산량은 약 1,760 톤으로 계속 증가되고 있는 추세이다(한국농업연감, 2004).

하지만 은행열매를 수확하여 은행알을 얻는 과정에서 외종피인 과육의 폐기율이 높아 문제가 되고 있다. 은행외종피에도 폴리페놀성분 등 다양한 기능성물질이 있음에도 불구하고 특유의 혐오취와 알레르기 원인물질 때문에 이용되지 못하고 대부분이 버려지고 있기 때문이다.

본 연구팀은 은행외종피의 이러한 단점을 복합발효공정을 이용하여 폐자원의 부가 가치를 증진시킨 새로운 식품소재로 활용하기 위하여 연구를 실시하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 은행외종피의 혐오취 및 Allergy 저감화 공정 개발

- 고온처리에 의한 휘발성을 증진시켜 저감화
 - 열풍건조, 고온습윤처리 방법 검토
- 미생물 이용한 혐오취 저감화
 - 혐오취인 Butyric Acid 이용균주 선별
 - 휘발성 물질 생성 균주 및 유기산 생성 균주 선별하여 혐오취 이용 및 masking 검토
 - 혐오취 저감화 균주로부터 은행외종피 Allergy 유발물질 분해 균주 선별
- 발효 공정 다변화에 의한 저감화
 - 호기, 혐기 배양 등의 발효공정 경시적 변환 시스템 개발

2. 은행외종피의 면역력 증진 공정 개발

- 면역력 우수균주를 이용한 발효공정 개발
 - 혐오취 및 allergy 저감화 균주를 이용한 액상배양물에 면역력 우수균주 액상발효

- 혐오취 및 allergy 저감화 균주를 이용한 액상배양물을 열풍건조후에 면역력이 우수한 버섯균주 등을 이용한 고체배양
- 발효물의 면역력관련 물질인 cytokine 생성 등의 기능성활성평가

IV. 연구개발결과

발효종균의 개발을 위해서 식품에서 분리된 젖산균(60종), 효모균(40종), 버섯균(11종)을 대상으로 은행외종피의 혐오취 변화를 확인하기 위하여 배양물의 부티르산의 함량을 분석하였고, 알레르기 원인물질인 우루시올류의 저감화 확인을 위하여 우루시올류를 첨가한 배지에서 생육성을 조사하였다. 그 중 부티르산의 함량 저감효과가 우수하고, 우루시올류에 저항력이 우수한 균주 *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, 맛느타리 버섯균을 발효종균으로 선발하여 다단계 복합발효공정을 개발하였다.

본 연구팀은 확립한 복합발효공정을 이용하여 제조한 최종발효 결과물인 개발된 소재에서 부티르산 함량을 원재료대비 약 60배 이상 감소시켰고(원재료의 1/60 수준), 우루시올류에 의한 알레르기 발현을 약 50배 이상(원재료의 1/50 수준) 감소시킨 것을 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 주요연구실정 및 성과

1) 학회논문게재: 총 1건

- Lee, Myung-Ki, et al. Characterization and use of microbial communities in communities in *Doenjang* to control the unpleasant odor of *Ginkgo sarcotesta*. 2014. *Food Sci. Biotechnol.* 23(6), 1959-1964.
- 게재예정-고추장, 은행채취기간별

2) 특허출원 및 등록: 총 11건(출원 9건, 출원 및 등록 2건)

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2012	은행외종피의 혐오취를 저감시키는 방법 및 이를 이용한 된장 발효식품	한국식품연구원	대한민국	10-2012-0117 609 (등록)

	은행외종피의 혐오취를 저감시키는 방법 및 이를 이용한 고추장 발효식품	한국식품연구원	대한민국	10-2012-0117 607 (등록)
2013	건조 처리를 이용한 은행외종피의 혐오취 저감 방법	한국식품연구원	대한민국	10-2013-0125 137
	열수 처리를 이용한 은행외종피의 혐오취 저감 방법	한국식품연구원	대한민국	10-2013-0125 128
	습열 처리를 이용한 은행외종피의 혐오취 저감 방법	한국식품연구원	대한민국	10-2013-0125 126
	일라이트 함유 필름을 이용한 은행외종피의 혐오취 저감 방법	한국식품연구원	대한민국	10-2013-0125 122
2014	사카로마이세스 세레비지애를 이용한 은행외종피의 혐오취 저감 방법	한국식품연구원	대한민국	10-2014-0086 258
	락토바실러스 사케이를 이용한 은행외종피의 혐오취 저감 방법	한국식품연구원	대한민국	10-2014-0086 255
	락토바실러스 브레비스를 이용한 은행외종피의 혐오취 저감 방법	한국식품연구원	대한민국	10-2014-0086 246
	엔테로코커스 페시움을 이용한 은행외종피의 혐오취 저감 방법	한국식품연구원	대한민국	10-2014-0086 232
	비피도박테리움롱검 을 이용한 은행외종피의 혐오취 저감 방법	한국식품연구원	대한민국	10-2014-0086 216

3) 학회발표: 총 3건(국내 1건, 국외 2건)

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Reduction of Stinky Flavor in sarcotesta of Ginkgo biloba using Doenjang (Korean soybean paste) Fermentation	Yi, Sung-Hun	Lee, Myung-Ki	Park, Sun-Hyun; Jang, Ji-Eun; Park, So-Lim	International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics	포스터발표	국외 (Kosice, Slovakia)	-
2013	Manufacture of Fermented sarcotesta of Ginkgo biloba and Gochujang for Reducing Stinky Flavor	Sunhyun Park	Myung-Ki Lee	Jiyoung Hong, Sung-Hun Yi	한국미생물 학회연합 국제학술대회	포스터발표 (D-16)	국내	-
2014	Lactic Acid Bacteria Selection for Butyric Acid-Reductcing and Urushiols-Resistant Strains of Ginkgo biloba sarcotesta Fermentation	Myung-Ki Lee	Myung-Ki Lee	SunhyunPark, Young-Kyoungrhee, So-limPark, Dong-HwaShon, Young-Ho Kim	International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics	포스터발표	국외 (Budapest, Hungary)	-

4) 기술이전: 총 1건

◦ ‘두성영농은행영농조합’에 ‘①은행외종피의 혐오취를 저감시키는 방법 및 이를 이용한 된장발효식품, ②은행외종피의 혐오취를 저감시키는 방법 및 이를 이용한 된장 발효식품’에 대한 기술을 이전함(2014년 10월 13일).

5) 성과홍보: 2건(약취관련 1건, 은행산업관련 1건)

- 식품연구, 은행과육 약취 제거 기술 개발. 중앙일보. 2014년 9월 24일 등
- ‘고부가’은행 식품산업을 만들려면. 한국농어민신문. 2012년 11월 1일

2. 향후 성과활용 계획

향후 본 연구팀의 ‘은행외종피 발효소재 제조기술’은 이용되지 않고 버려지는 은행외종피의 양을 감소시키고 부산물 활용성 제고에 크게 기여할 수 있을 것으로 내다본다.

이번 연구 결과는 식용으로 이용하는 은행종실부를 제외하고 남은 부산물이자 폐기물인 은행외종피의 혐오취와 알레르기원을 제거할 수 있는 방향을 제시하였고, 향후 폴리페놀성분 및 각종 영양성분이 많은 은행외종피를 상품화하여 관련 농가에 경제적으로 큰 파급효과를 가져올 것이다.

또한, 은행외종피 발효공정에 이용한 젖산균주는 발효식품종균으로서 기능뿐만 아니라 프로바이오틱스(probiotics) 기능을 겸비할 수 있어 미생물 자원으로서의 가치도 높으며, 발효기술을 이용한 혐오취 제거공정기술은 은행외종피 이외의 다른 혐오취 폐자원의 부가가치 제고에 활용할 수 있을 것이다.

SUMMARY

I. Title

Development of Immune-enhancing, Odor-reducing and Allergy-reducing Products with Sarcotesta of *Ginkgo biloba*

II. Purpose and necessity of the R&D

Ginkgo has recently been attracting keen attention for its therapeutic effects on asthma, cerebral infarction, and cerebral ischemia. The global yield of ginkgo nuts is expected to exceed 200,000 tons by 2020, and the domestic product of ginkgo nuts, 1,760 tons as of 2000, has been continuously increasing (Korean Farmers' Almanac 2004).

In the process of obtaining ginkgo nuts, however, a problem is raised by the high waste rate of the sarcotesta constituting the pulp of ginkgo fruit. Although the sarcotesta contains various functional materials such as polyphenols, it is discarded on account of its malodor and allergens.

Against this background, this research team conducted a study to recycle the waste of sarcotesta as a novel food material with a high value added by overcoming its major drawback employing a complex fermentation process.

III. Content and scope of the R&D

1. Development of the technology reducing the malodor and allergens of ginkgo sarcotesta
 - Reduction via thermal treatment for increasing volatility
 - In review: hot-air drying, hot-wet processing
 - Reduction via microorganism
 - Isolation of strains reducing the butyric acid responsible for the malodor
 - In review: isolation of strains synthesizing volatile compounds and those producing organic acids for using and masking malodor
 - Isolation of strains decomposing allergens in the sarcotesta from those used for malodor reduction
 - Reduction via fermentation process diversification
 - Development of a fermentation process sequential change system with aerobic and anaerobic cultures

2. Development of a process for immunity boosting of ginkgo sarcotesta
 - Development of fermentation process using strains efficacious in immunity-boosting
 - Liquid state fermentation of immunity boosting strains in liquid culture media using strains for malodor and allergen reduction
 - Solid state culture using mushroom strains with superior immunity after the hot-air drying of liquid culture media for the strains for malodor and allergen reduction
 - Evaluation of functionality activation such as cytokine production, immunity-related substance of the fermented material

IV. Results

In order to develop fermentation strains, we first analyzed the butyric acid contents of the culture media of lactic acid strains (60 species), yeast strains (40 species), and mushroom strains (11 species) isolated from foods to determine the change in malodor of sarcotesta. Then we investigated the viability of the strains in the culture media added with urushiol to verify the reduction of allergen urushiol. As a result, we selected the strains *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and oyster mushroom strains, which reduced butyric acid content efficiently and demonstrated a high resistance to urushiol, and developed a multi-step complex fermentation process.

The material developed as the final product of fermentation achieved using the complex fermentation process established in this study was found to reduce the butyric acid content to the 1/60 level of the raw material and the urushiol-induced allergic reactions to the 1/50 level of the raw material.

V. Achievements and application plans

1. Future plans for applying the study achievements

The “ginkgo sarcotesta fermentation material production technology” developed by our research team is expected to greatly contribute to reducing the amount of ginkgo sarcotesta waste and enhancing the byproduct recycling.

The results of this study will serve as basic data for deriving methods for reducing malodor and allergens of ginkgo sarcotesta, a byproduct of edible ginkgo nut harvesting which is currently discarded as waste. Commercialization of ginkgo sarcotesta rich in polyphenols and various nutrients will greatly improve the economy of farm households

committed.

Lactobacillus brevis, the lactic acid strain species used for the fermentation process of ginkgo sarcotesta, is a highly valuable microbial resource useful not only as fermentation food strains, but also as probiotics.

Furthermore, the fermentation-based malodor reduction technology developed in this study will be used for improving the value added of malodor waste resources by finding a variety of applications other than reducing the malodor of ginkgo sarcotesta.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	20
section 1. The background of the research	20
1. The background of the research	20
2. The Necessity of research	20
A. Technical aspects	20
B. Economic and industrial aspects	21
C. Social and cultural aspects	22
3. Future plans for applying the study achievements	22
section 2. Research objectives and content	23
1. Research objectives	23
2. Research develop objectives and content	23
A. Final objective and main contents of research	23
Chapter 2. Current domestic and international technology	24
section 1. Current domestic and international technology	24
1. Current of product and market	24
A. current of product and market	24
B. Industrial direction and expected effect of development technology	25
2. Research plan with 3P (patent, paper, product) analysis	26
A. Results of 3P analysis	26
Chapter3. Scope and Contents of Research	29
section 1. Material and methods	29
1. Reducing stinky smell and allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta using high temperature treatment	29

A. Established of stinky smell analysis method	29
B. stinky smell reduction via high temperature-air drying of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	31
C. stinky smell reduction via high temperature-wet drying of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	32
D. Analysis allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	32
2. Reducing stinky smell and allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta using microorganism	38
A. Screening of butyric acid conversion strain	38
B. Screening of allergens reduction strain	40
3. Reducing stinky smell and allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta using fermented food	41
A. Reducing stinky smell and allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta using <i>Doenjang</i>	41
B. Reducing stinky smell and allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta using Gochujang	43
4. Screening of immune enhancement strains	43
A. Microbial community analysis of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta during ripening	43
B. Characteristics and isolation of screening strain	43
5. Immune and anti-inflammatory efficacy evaluation of selected strains from the <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	44
A. Anti-inflammatory efficacy evaluation of selected strains from the <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	44
B. Immune efficacy evaluation of selected strains from the <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	45
C. Immune efficacy evaluation with sample concentrations	46
6. Reduction of stinky smell using microorganism	47
A. Screening of organic acid-produced strain	47
B. Screening of stinky smell reducing strain	48

7. Analysis of allergen reducing-strain	52
A. Fermentable examine of screening strain in <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	52
8. Examine of immune enhancement strains and fermentation enhancement	52
A. Examine of immune enhancement in <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	52
9. Reduction using diversity fermentation procedure	53
A. Study on the Fermentation procedure under the different temperature	53
B. Diversification of fermentation procedure	54
10. Development of allergen reduction process	59
A. Screening of allergens reducing strain and establishing fermentation process	59
B. Dermatitis test for allergen reduction process	60
11. Development of fermentation process using immunity-boosting strain	61
A. Evaluation of functionality activation such as cytokine production, immunity-related substance	61
12. Establishing of final fermentation process	62
A. Establishing of fermentaion process in <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	62
B. Mass-production procedure of in <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	62
C. Production of prototype	64
D. Developed technology transfer of fermented <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta and it's business consideration	66
section 2. Results and Discussion	67
1. Reducing stinky smell and allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta using high temperature treatment	67
A. Established of stinky smell analysis method	67
B. stinky smell reduction via high temperature-air drying of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	68
C. stinky smell reduction via high temperature-wet drying of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	71
D. Analysis allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	74

2. Reducing stinky smell and allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta using microorganism	
86	
A. Screening of butyric acid conversion strain	86
B. Screening of allergens reduction strain	88
3. Reducing stinky smell and allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta using fermented food	
89	
A. Reducing stinky smell and allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta using <i>Doenjang</i>	
.....	89
B. Reducing stinky smell and allergens of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta using Gochujang	94
4. Screening of immune enhancement strains	100
A. Microbial community analysis of <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta during ripening	100
B. Characteristics and isolation of screening strain	102
5. Immune and anti-inflammatory efficacy evaluation of selected strains from the <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	107
A. Anti-inflammatory efficacy evaluation of selected strains from the <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	107
B. Immune efficacy evaluation of selected strains from the <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	109
C. Immune efficacy evaluation with sample concentrations	111
6. Reduction of stinky smell using microorganism	116
A. Screening of organic acid-produced strain	116
B. Screening of stinky smell reducing strain	116
7. Analysis of allergen reducing-strain	121
A. Established of allergens (urushiols) analysis method	121
8. Examine of immune enhancement strains and fermentation enhancement	130

A. Examine of immune enhancement in <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	130
9. Reduction using diversity fermentation procedure	131
A. Study on the Fermentation procedure under the different temperature	131
B. Diversification of fermentation procedure	137
10. Development of allergen reduction process	161
A. Dermatitis test for allergen reduction process	161
11. Development of fermentation process using immunity-boosting strain	164
A. Evaluation of functionality activation such as cytokine production, immunity-related substance	164
12. Establishing of final fermentation process	172
A. Establishing of fermentaion process in <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	172
B. Mass-producion procedure of in <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta	173
C. Development of prototype	176
D. Developed technology transfer of fermented <i>Ginkgo biloba</i> sarcotesta and it's business consideration	180
Chapter4. Coal achievement and contribution	182
Chapter5. ConclusionandRecommendations	183
Chapter6. Research compares the relevantnational and international technical level	184
Chapter 7. Current of research facilities and equipment	186
Chapter 8. References	187

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	20
제1절. 연구배경	20
1. 연구개발배경	20
2. 연구개발의 필요성	20
가. 기술적 측면	20
나. 경제·산업적 측면	21
다. 사회·문화적 측면	22
3. 연구개발에 따른 기대성과	22
제2절. 연구목표 및 내용	23
1. 연구목표	23
2. 연구개발의 목표 및 내용	23
가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황	24
제 1 절. 국내외 기술개발 현황	24
1. 제품 및 시장현황	24
가. 제품생산 및 시장현황	24
나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과	25
2. 3P(특허, 논문, 제품) 분석을 통한 연구추진계획	26
가. 3P 분석결과	26

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과29

제1절. 실험재료 및 방법 29

- 1. 고온처리에 의한 혐오취 및 알레르기 저감화 연구 29
 - 가. 혐오취 분석방법 29
 - 나. 열풍건조에 의한 은행외종피의 혐오취 저감화 31
 - 다. 고온습윤처리에 의한 은행외종피의 혐오취 저감화 32
 - 라. 은행외종피의 알레르기원 분석 32

- 2. 미생물을 이용한 혐오취 및 알레르기 저감화 연구 38
 - 가. 부티르산 변환균주 선별 38
 - 나. 은행외종피의 알레르기 저감화 균주선발 40

- 3. 식품을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화 41
 - 가. 된장을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화 41
 - 나. 고추장을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화 43

- 4. 면역력 증진 기능균주의 선별 43
 - 가. 숙성진행 중인 은행외종피 유래균주의 균총분석 43
 - 나. 선별균주의 특성 조사 및 동정 43

- 5. 은행외종피 유래 선별균주의 면역증강 및 항염증 효능평가 44
 - 가. 은행외종피 유래 선별균주의 면역증강 효능 평가 44
 - 나. 은행외종피 유래 선별균주의 항염증 효능 평가 45
 - 다. 시료 농도별 면역증강 효능 평가 46

- 6. 미생물을 이용한 혐오취 저감화 47
 - 가. 휘발성물질 생성 및 유기산 생성 균주 선발 47
 - 나. 기존 식품 균주를 이용한 혐오취 저감 균주의 선별 48

7. 알레르기 저감화 균주 적용성 검토	52
가. 우루시올류 첨가배지에서의 생육검토	52
8. 면역력증진 균주 및 발효물의 기능향상 검토	52
가. 은행외종피 자체의 면역력 증진효과 검토	52
9. 발효공정 다변화에 의한 저감화	53
가. 온도에 따른 발효공정 연구	53
나. 발효조건외 다변화(혼합배양 등 발효공정변화)연구	54
10. 알레르기원 저감화 공정완료	59
가. 은행외종피 알레르기원 감소균주 최종 선별 및 발효공정 확립	59
나. 은행외종피 발효물의 동물 피부염 테스트	60
11. 면역력 우수균주를 이용한 발효공정 개발	61
가. 혐오취 및 알레르기원 감소균주와 버섯균주를 이용한 고체배양물의 면역 활성평가	61
12. 최종 발효 공정 확립	62
가. 은행외종피 발효공정 확립	62
나. 은행외종피 발효물의 대량생산	62
다. 시제품의 생산	64
라. 개발된 은행외종피 발효물의 기술전수 및 사업화 검토	66
제2절. 실험결과 및 고찰	67
1. 고온처리에 의한 혐오취 및 알레르기 저감화 연구	67
가. 혐오취 분석방법 확립	67
나. 열풍건조에 의한 은행외종피의 혐오취 저감화	68
다. 고온습윤처리에 의한 은행외종피의 혐오취 저감화	71
라. 은행외종피의 알레르기원 분석	74

2. 미생물을 이용한 혐오취 및 알레르기 저감화 연구	86
가. 부티르산 변환균주 선별	86
나. 은행외종피의 알레르기 저감화 균주선발	88
3. 식품을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화	89
가. 된장을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화	89
나. 고추장을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화	94
4. 면역력 증진 기능균주의 선별	100
가. 숙성진행 중인 은행외종피 유래균주의 균총분석	100
나. 선별균주의 특성 조사 및 동정	102
5. 은행외종피 유래 선별균주의 면역증강 및 항염증 효능평가	107
가. 은행외종피 유래 선별균주의 면역증강 효능 평가	107
나. 은행외종피 유래 선별균주의 항염증 효능 평가	109
다. 시료 농도별 면역증강 효능 평가	111
6. 미생물을 이용한 혐오취 저감화	116
가. 휘발성물질 생성 및 유기산 생성 균주 선발	116
나. 기존 식품 균주를 이용한 혐오취 저감 균주의 선별	116
7. 알레르기 저감화 균주 적용성 검토	121
가. 선발균주의 은행외종피에서 발효성 검토	121
8. 면역력증진 균주 및 발효물의 기능향상 검토	130
가. 은행외종피 자체의 면역력 증진효과 검토	130
9. 발효공정 다변화에 의한 저감화	131
가. 온도에 따른 발효공정 연구	131

나. 발효조건외 다변화(혼합배양 등 발효공정변화)연구	137
10. 알레르기원 저감화 공정완료	161
가. 은행외종피 발효물의 동물 피부염 테스트	161
11. 면역력 우수균주를 이용한 발효공정	164
가. 혐오취 및 알레르기원 감소균주 고체배양물의 면역활성평가	164
12. 최종 발효 공정 확립	172
가. 은행외종피 발효공정 확립	172
나. 은행외종피 발효물의 대량생산	173
다. 시제품의 개발	176
라. 개발된 은행외종피 발효물의 기술전수 및 사업화 검토	180

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도182

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획183

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보184

제 7 장 연구시설장비 현황186

제 8 장 참고문헌187

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절. 연구배경

1. 연구개발배경

은행은 은행나무의 황색의 열매로 다육성의 외종피와, 흰색의 단단한 중과피, 그 중과피 안쪽의 갈색 피막의 내종피, 그 내종피 속의 청록색의 배젖(은행알)으로 구성되어 있다. 은행알은 수분 55%, 당질 38%, 지방질 1.7%, 단백질 5%, 카로틴, 비타민 C, 칼슘, 칼륨, 인, 철분, 기타 레시틴, 아스파라긴산, 에르고스테롤 등을 함유한 영양성이 우수한 식품이다.

일반적으로 은행에는 여러 가지 성분이 함유되어 있으므로 한방과 민간요법에서 은행이 많이 활용되고 폐결핵이나 해소 천식치료에도 사용하고 있으며, 어린이나 노약자의 야뇨증, 여성의 대하증을 치료한 다든지 혈액순환에 좋다는 것은 이미 알려져 있고 많은 연구결과가 나왔으며 특히 은행잎을 이용하여 많은 연구를 진행되고 있어 여러 가지 약품이나 식품으로 사용되고 있다.

그러나 은행외종피에는 4탄 지방산의 Butyric Acid ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)가 주요 혐기취로 존재하기 때문에 특유의 구린 악취를 내므로 사용을 꺼리고, 알레르기를 일으키는 물질인 urushiols (ginkgolic acid [$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_3 = 80\%$]; bilobol [$\text{C}_{21}\text{H}_{30}(\text{OH})_2 = 18\%$]; ginkgol [$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{OH} = 2\%$])가 함유되어 이용되지 않고 버려지고 있다.

또한 열매(은행알)와 외종피의 부피의 비가 약 1:4 정도가 되는데 은행 열매를 수확하여 은행알을 얻기 위하여 외종피인 과육을 분리하는 과정 폐기되는 외종피의 비율이 크며, 또 은행열매에는 많은 양의 과액을 함유하고 있으므로 그 은행열매에서 은행을 얻는 도중에 많은 양의 과액이 생겨서 수율이 낮다. 현재까지 외종피에 함유된 과액과 외종피는 사용하지 못하고 폐기처분하였으므로 유효성분이 함유되어 있는 은행열매의 과액과 외종피의 버리는 것은 자원낭비가 될 뿐 아니라, 그 폐기된 은행열매에 함유된 과액과 외종피는 수질환경을 오염시키고 외종피가 썩는 동안에는 외종피의 특유의 냄새인 구린 냄새가 그대로 대기 중에 확산되므로 대기환경을 오염시키는 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 은행외종피의 혐오취 성분 및 알레르기 성분을 분석하고 이를 저감화하는 연구를 진행하고자 하였다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 은행알은 수분 55%, 당질 38%, 지방질 1.7%, 단백질 5%, 카로틴, 비타민 C, 칼슘, 칼륨, 인, 철분 함유, 기타 레시틴, 아스파라긴산, 에르고스테롤 등을 함유 영양성이 우수한 식품 소재이나 시안화물이 함유되어 있어서 한꺼번에 다량을 먹을 수는 없음
- 은행외종피는 4탄지방산의 Butyric Acid($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)가 주요 혐기취로 존재하여

사용을 꺼리고 또한 allergy를 일으키는 물질인 urushiols(ginggolic acid[C₂₁H₃₂O₃ = 80%]; bilobol [C₂₁H₃₀(OH)₂ = 18%]; and, ginkgol [C₂₀H₃₂OH = 2%])가 함유되어 있음

- 일부 절에서 밀봉된 비닐에 외종피가 포함된 은행을 넣어서 1~2년 삭힌 후에 위장병 등에 이용하나 역겨운 냄새는 지속됨
- 은행알을 얻기 위하여 썩히고 분리된 외종피를 물로 세척하는 데, 강물에 세척시는 강이 오염되어 물고기가 폐사되기도 함
- 은행외종피를 활용하기 위한 환경친화농약용 발효액 시험구에서는 병해충이 거의 발생하지 않았으며, 방제효과는 은행, 혼합액, 옷, 어성초, 참죽발효액 순으로 나타나나 만들기가 어려움
- 보다 활용성 및 부가가치 높은 은행외종피 이용방법 개발이 요구됨

나. 경제 · 산업적 측면

- 은행나무는 해충, 질병에 대한 저항성이 강하고, 매연, 분진, 이산화질소, 아황산가스를 흡수하며 신선한 산소배출이 일반 나무 보다 5, 6배 많음
- 한국은 은행 803톤(1996년), 1,076톤(2,000년), 은행잎 2,383톤(1996년), 지역별로 충남이 331톤으로 전체 생산량의 41%차지, 전북, 경기도 순으로 생산함
- 국제시장에서 은행의 연간 수요량은 약 5만 톤으로 중국의 연 수출량은 6,000톤 가량으로 국제시장 총 수요량의 1/8을 중국이 공급하고 있음.
- 은행 전문가는 2020년 은행의 세계 총 수요량은 20만 톤을 초과할 것으로 추산하고 있으며 이 시기에 중국의 열매 맺는 은행나무 수는 현재에 비해 약 10배로 증가한 700만 그루에 달할 것이며 연 은행 생산량은 10만톤으로 국제시장 총 수요량의 1/2를 차지할 것으로 예상함.
- 중국의 은행의 재배 및 가공기술은 한국보다 낙후되어 있으므로, 우리나라는 재배 노하우와 가공기술, 설비 또는 가공 반제품, 완제품 등 부가가치 상품을 개발하여 중국시장을 공략하여야 할 수 있을 것임.
- 은행잎은 말초혈관 혈액순환을 원활히 해주는 성분은 크게 2가지, flavonoid 계통과 terpenoids [ginkgolides, bilobalides]계통을 함유하고 있으며 유럽은 은행잎추출 복합제로 연간 5억\$ 매출 함
- 은행잎을 가지고 만든 약품명으로는 징코민, 기넥신이 있고 약리작용 성분은 징코플라본 배당체(ginkgoflavon glycoside)로서 혈관벽 손상을 방지하고, 말초혈관을 확장하여 혈액순환을 원활함
- Ginkgolides는 혈소판 응집저해, 수술 및 저혈압 등에 의한 쇼크 방지, 항알레르기(천식 치료효과 등), 면역기능 증가, Prostaglandin 생성저해 등 PAF-Antagonist 효과 나타남
- 은행외종피도 안전한 식품소재로 개발하면 식품사용가능(은행잎차, 은행잎술, 은행잎 스

프, 은행잎 울무죽 등으로 이용, 1998년 3월 보건복지부는 은행잎을 차 원료로 사용허가 함)

다. 사회·문화적 측면

- 은행나무는 살아 있는 화석으로 2억 년 전부터 존재했으며 수명이 길어 수천년 생존 가능하고 냄새는 과충류(공룡)의 이빨립을 주기 위하여 진화한 것으로 추정됨
- 정원수, 가로수, 방화수, 방풍수, 분재로 나무로서도 다양하게 이용되며 잎과 열매도 이용성 높음
- 은행나무는 할아버지가 심어서 손자 때에 수확을 한다고 공손수(公孫樹)라하여 왔으며 지금은 속성수가 개발되어 있음
- 용문사의 은행나무(국보30호)는 나이가 천년을 넘었고 다수의 은행나무가 천연물 및 보호수로 보호되고 있음
- 은행나무는 별도로 방제를 하지 않아도 될 만큼 병해충에 강해 다른 작물에 비해 재배가 쉽고 공해에 강하여 가로수로 많이 식목함.
- 점차 고령화되는 현 추세에서 천연물 유래 건강식품의 관심이 지속됨에 따라 다양한 소재 및 기능성 탐구 연구가 가속화되는 것을 고려하였을 때, 은행은 향후 인기가 예상되는 품목으로 식품소재 개발로 시장규모를 확대할 수 있을 것으로 판단됨

3. 연구개발에 따른 기대성과

- 가. 은행외피 세척에 따른 어류폐사 등의 환경오염 감소 및 폐기자원 기능성 물질 소재로 활용 가능
- 나. 혐오취 제거공정 개발로 다른 혐오취 폐자원 활용 증진 가능
- 다. 액상형은 발효음료로, 고체상은 발효환으로 기능성 식품제조 가능
- 라. 종균으로서 미생물 자원확보
- 마. 은행생산자(두성은행영농조합 등)에 종균이용 기술 접목하면 신산업으로 산업화 가능

제2절. 연구목표 및 내용

1. 연구목표

천식, 뇌동맥 경색이나 대뇌의 혈류장애 등의 질병에 뛰어난 은행이지만 혐오취와 알레르기 원인물질을 함유하여 이용이 안되는 과육인 외종피를 이용하여 혐오취와 알레르기를 저감화시키는 발효 및 제조공정을 개발하고 면역력을 증진시키는 소재를 개발함

2. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

(1) 연구개발의 최종목표

은행 과육인 외종피를 이용하여 혐오취와 알레르기를 저감화시키는 발효 및 제조공정을 개발하고 면역력을 증진시키는 소재를 개발함

(2) 주요연구내용

① 은행외종피의 혐오취 및 Allergy 저감화 공정 개발

㉠ 고온처리에 의한 휘발성을 증진시켜 저감화

- 열풍건조, 고온습윤처리 방법 검토

㉡ 미생물 이용한 혐오취 저감화

- 혐오취인 Butyric Acid 이용균주 선별

- 휘발성 물질 생성 균주 및 유기산 생성 균주 선별하여 혐오취 이용 및 masking 검토

- 혐오취 저감화 균주로부터 은행외종피 Allergy 유발물질 분해 균주 선별

㉢ 발효 공정 다변화에 의한 저감화

- 호기, 혐기 배양 등의 발효공정 경시적 변환 시스템 개발

② 은행외종피의 면역력 증진 공정 개발

㉠ 면역력 우수균주를 이용한 발효공정 개발

- 혐오취 및 allergy 저감화 균주를 이용한 액상배양물에 면역력 우수균주 액상발효

- 혐오취 및 allergy 저감화 균주를 이용한 액상배양물을 열풍건조후에 면역력이 우수한 버섯균주 등을 이용한 고체배양

㉡ 발효물의 면역력관련 물질인 cytokine 생성등의 기능성활성평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내외 기술개발 현황

1. 제품 및 시장현황

가. 제품생산 및 시장현황

(1) 국내 제품생산 및 시장현황

- 은행은 흔히 구워먹기 위한 껍질 있는(중종피) 은행 및 은행알로 판매되며 가공식품은 드뭄. '행리환'은 은행을 청국장으로 발효시켜 마늘과 9회죽염수를 첨가하고 밀가루, 찹쌀 등의 첨가제 없이 40도 이하로 저온 건조한 환, '징코청'은 은행을 발효숙성시킨 발효액으로 어성초, 삼백초, 매실 발효액이 첨가되어 두성은행영농조합에서 판매되고 있음.
- 은행생산 3300여 농가로 약 1,350톤을 생산하는 예산군은 전국 은행 생산량(3,550톤)의 약 38% 수준을 차지하고 있음(2010). (<http://blog.daum.net/e-chungnam/320> 충남도청 공식블로그)
- 은행은 크기에 따라서 값이 많이 차이가 나서 중종피 은행이 2,500~8,000원/kg 까지 다양하게 판매되고 있음. (http://gingkocokr.ivyro.net/gingko_06.htm)
- 한편, 국내 은행잎 제품으로 SK케미컬의 기넥신은 400억 원대(2007), 타나민 200억원 대 매출 기록하였으며, 동방제약 '징코민'도 시장 점유율이 높은 것으로 알려졌다.
<http://blog.naver.com/j6k5sul/140130885930>

(2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 은행은 중국 약 50,000톤, 일본 500~600톤이 생산된다. 생산되는 대부분은 거의 자연적으로 심어진 것에서 생산되고 계획생산에 의한 것은 그 다지 많지 않음. 중국에서는 2020년이 되면 세계 총 수요량이 20만 톤을 넘을 것으로 추정하여 향후 은행 생산량을 10만 톤으로 늘리려고 함.
- 중국에서 생산되는 은행은 일본, 싱가포르, 태국, 대만 등으로 매년 6,000여 톤을 수출한다. 은행나무를 이용한 의약품 등은 세계적으로 연간 약 10억\$(한화 약 1조 2,000억원)에 달하는 엄청난 판매량을 기록하고 있음. 예컨대, 독일은 1986년 은행잎을 재료로 한 단일상품으로 판매순위 2위를 차지했다. 연간 30%이상 판매성장 기록과 함께 1989년에는 약 4억 2,000만 마르크(한화 2,500억 원)의 매출을 올렸다. 프랑스에서도 은행잎 엑스제 타나칸(Tanakan)이 12%의 성장률로 약 8억 프랑(한화 1,700억원)의 매출을

기록했음.

http://www.sanrimji.com/contents.jsp?item_id=14056&month=09&webzine_id=526&year=1999 (산림조합 웹진)

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

(1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 개발된 소재는 추가 기술개발 없이도 액상형은 발효음료로, 고체상은 발효환 형태의 기능성 식품으로 제조하여 판매 가능하며, 발효된 외종피는 면역력 증진을 위한 소재이므로 노인, 허약자, 면역 기능성을 선호하는 사람을 대상으로 하여 제품이 개발될 수 있을 것임.
- 경쟁제품으로는 우리나라에서 가장 많이 팔리고 있는 홍삼제품, 버섯제품, probiotics 제품 등이 될 수 있으며, 또한 은행외종피에는 폴리페놀류도 다량 함유되어 있으므로 항산화 기능성 관련 제품과도 경쟁할 수 있을 것임. 식품 외에도 샴푸 및 비누류의 주방세제 등에도 응용 가능할 것임.
- 기타 기대효과로 혐오취 제거공정 개발에 의한 다른 혐오취 폐자원 활용 증진이 가능하고 종균으로서 미생물 자원확보가 가능하며 은행외피 세척에 따른 어류폐사 등의 환경오염을 감소시킬 수 있음.

(2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만 원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과 ¹⁾	50	100	600	12,000	20,000	32,750
경제적 파급효과 ²⁾	50	50	12,000	21,000	30,000	52,300
부가가치 창출액 ³⁾	50	100	900	15,000	25,000	41,050
합 계	150	250	2,700	48,000	75,000	126,100

¹⁾직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

²⁾경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치

³⁾부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

2. 3P(특허, 논문, 제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과

(1) 특허분석결과

- 검색된 혐오취제거 관련 특허는 1,654이었으며 유효특허는 128건으로 나타났다. 관련성 점수별 분포를 보면 5점 만점에 관련도 2점 특허가 68건으로 가장 많으며, 관련도 가장 높은 5점 특허는 1건으로 국내특허로 나타났다.
- 이 특허는 2011년 6월에 공개된 최근 특허로서 은행외종피에 자연균총으로 장기간발효(4~8개월)하고 생강첨가 가열하여 냄새를 Masking 하는 것으로 본연구의 발효 및 소재 제조가 1개월 소요로 짧은 과정, 그리고 냄새 원인물질을 휘발시키고 냄새제거 균류로 발효시켜서 생물전환하는 부분이 달랐음. 국가별 출원율은 한국, 일본, PCT 출원이 전체의 85.94%를 차지하며, 한국이 55건 42.96%로 1위국으로 나타났다. 이것은 한국의 발효 식품이 냄새가 많이 나므로 개선시킬려는 노력이 나타난 것으로 보임.
- 최근 혐오취제거 관련 연구는 균주를 이용하여 음식물 등의 폐기물자원을 재활용시키는 연구가 많았으며, 본 연구 관련해서는 *Bacillus subtilis*를 이용한 기능성 대두발효(된장) 관련된 연구가 많았음.
- 은행외종피의 고온처리, 고습처리, 그리고 발효종균에 따른 휘발성물질 및 유기산 대사에 따른 각각의 특허출원이 가능할 것임.
- 검색된 allergy 저감 관련 특허는 584이었으며 유효특허는 231건으로 나타났다. 미국, 중국, PCT출원이 전체 특허의 80.09%를 차지하며, 미국이 75건 32.46%로 1위국, 중국이 61건 26.41%로 2위국, PCT출원이 49건 21.21%로 3위로 나타났으며, 관련성이 높은 특허는 'Use of probiotic lactic acid bacteria for balancing the skin's immune system'으로 햇볕 UV에 의한 피부질환에 관한 연구이었음.
- 최근 allergy 저감 관련 특허연구는 은행외피의 allergy 원인 물질인 ginkgolic acid 분석에 대한 연구로 나타났고 그 외, 접촉성 피부질환치료, 은행 terpene lactone의 기능성 관련부분 특허연구가 있었음.
- Allergy 저감화 부분은 미생물에 따른 urushiols(ginkgolic acid) 등의 감소기술, inflammation 감소기술이 각각 특허출원이 가능할 것임.
- 면역증진관련 특허는 282건이었으나 은행 및 은행을 발효시켜서 증진시킨 특허는 없었고 주로 probiotics에 의한 면역 기능성 증진의 연구가 많았으며 본 연구관련성이 낮았음. 중국, PCT, 한국 출원이 전체 출원특허의 68.79%를 차지하였으며, 관련도 높은 특허는 PCT 출원이 가장 많았음.
- 최근 연구는 사료에 면역력 증진시키는 부분과 단백질 재조합으로 면역력을 증진시키는

연구가 많았음. 그러나 본연구 관련해서는 disorder 치료, prebiotics와 probiotics 부분, 세포외 다당물질에 의한 면역력 증진연구가 많았음.

- 면역력증진 분야에서는 발효종균 세포벽 또는 세포외 다당물질 생성조건 등, 그리고 외종 피에 버섯배양기술이 특허출원 가능할 것임.

(2) 논문분석결과

- 은행외종균 혐오취 관련 논문은 260건 중에서 144건이 유효논문으로 나타났으며 관련성 점수별 분포를 보면 1점 논문이 75건으로 가장 많았으며 관련성이 가장 높은 5점 만점 논문은 없었음. 그 중에 87 피인용회수를 가진 'Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates'이 관련성이 높았는데 비록 포도주관련 논문이지만 냄새라는 관점에서 연관성이 나타났으므로 차이가 있었음.
- 혐오취 저감화부분에서는 고온처리 및 고습처리 방법, 그리고 발효종균에 따른 휘발성물질 및 유기산 대사에 따른 각각의 논문발표가 가능할 것임.
- 은행외종균 allergy 저감화 관련 논문은 188건 중에서 152건이 유효논문으로 나타났으며 본 과제와 연관성은 낮았지만 피인용지수가 435건인 Herb-drug interactions 같은 연구가 많았음.
- 그리고, allergy 원인물질을 분석하는 'Determination of trace amounts of ginkgolic acids in Ginkgo biloba L. leaf extracts and phytopharmaceuticals by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry' 같은 논문이 상대적으로 관련성이 높았음.
- Allergy 저감화 부분은 미생물에 따른 urushiols(gingkgolic acid) 등의 감소방법, inflammation 감소방법이 각각 논문발표가 가능할 것임.
- 은행외종균 면역증진 논문은 1,251건 중에서 412건이 유효논문으로 나타났으며 330 피인용회수를 가진 '*Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles'이 관련성이 높았음.
- 면역력증진 분야에서는 발효종균 세포벽 또는 세포외 다당물질 생성조건 등, 그리고 외종 피에 버섯배양방법이 각각 논문발표 가능할 것임.

(3) 제품 및 시장분석결과

- 은행 가공식품산업은 아직 초보단계로 은행알을 구워먹는 수준으로 이용되고 있으므로 이것을 다양한 가공식품으로 만드는 산업이 커질 수 있고 또한, 일반 식품 보다는 기능성 식품개발로 부가가치가 큰 새로운 시장분야로 대두될 것임.
- 제약 분야에서는 은행잎이 혈류개선 및 뇌전달제 물질 등으로 많이 개발되어 있지만 계속

새로운 약리작용을 연구되고 있으므로 신시장이 계속 창출되고 있음.

- 한편, 개발된 발효외종피 소재는 추가 기술개발 없이도 액상형은 발효음료로, 고체상은 발효환 형태의 기능성 식품으로 제조하여 판매 가능하며, 발효된 외종피는 면역력 증진을 위한 소재이므로 노인, 허약자 및 면역 기능성을 선호하는 사람을 대상으로 하여 소재이용제품이 개발될 수 있을 것이다. 특히, 기존 은행산업에서 외종피 이용은 거의 이루어지지 않고 있음으로서 안전한 기능성 소재개발은 혈류개선 등의 은행잎의 기능성에 편승하여 쉽게 소비자에게 확산될 수 있을 것임.
- 경쟁제품으로는 우리나라에서 가장 많이 팔리고 있는 홍삼제품, 버섯제품, probiotics 제품 등이 될 수 있으며, 또한 은행외종피에는 폴리페놀류도 다량 함유되어 있으므로 항산화 기능성 관련 제품과도 경쟁할 수 있을 것이다. 그 외에도 빵, 과자, 스포츠음료의 원료, 샴푸 및 비누류의 주방세계 등에도 응용 가능할 것임.
- 기타 기대효과로 혐오취 제거공정 개발에 의한 다른 혐오취 폐자원 활용 증진이 가능하고 종균으로서 미생물 자원확보가 가능하며 은행외피 세척에 따른 어류폐사 등의 환경오염을 감소시킬 수 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절. 실험재료 및 방법

1. 고온처리에 의한 혐오취 및 알레르기 저감화 연구

가. 혐오취분석방법확립

(1) 은행외종피의 혐오취

악취는 일반적으로 여러 화합물들의 혼합물에 의해 야기된다. 이는 인간에게 정신적, 생리 화학적 스트레스를 유발시켜 메스꺼움, 두통, 식욕감퇴, 호흡곤란 및 알레르기 증세 등 인체의 자각반응을 나타내기 때문에 제거해야한다. 현재까지 지구상에는 약 200만종의 화합물이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서 약 20만종에서 40만종의 화합물이 냄새를 유발하는 것으로 보고되고 있다. 냄새를 유발하는 물질은 유기산류, 알콜류, 아민류, 방향족화합물류, 알데하이드류, 에스테르류, 황화수소류 등 매우 다양하고 물질의 종류에 따라 차이가 있으며, 이러한 물질 일부가 악취로 인식되게 된다.

특히, 은행외종피에서 나는 혐오취는 butyric acid가 주를 이루고 있으므로 butyric acid를 중점적으로 분석하였고, 또 다른 악취성분인 hexanoic acid를 함께 분석에 이용하였다.

Butyric acid는 무색으로 물에 대한 용해도는 거의 없어 일부만 물에 녹는 성질을 갖고 으며, 알코올, 에테르, 벤젠, 아세톤 및 유기 용매에 녹는 성질을 갖고 있는 물질로 냄새로는 불쾌하고 썩은 냄새를 풍기며, 사람이 인지할 수 있는 최소감지농도가 0.000019 ppm으로 낮은 악취물질로 눈의 손상, 피부 손상이나 화상, 소화기 및 호흡기 손상을 유발시키는 유해성을 지닌 악취 물질이다.

Hexanoic acid는 6개의 탄소를 가지는 직선형의 지방산으로서 caproic acid 라는 이름을 가지고 있다. 악취를 가진 무색의 액체로 물에는 조금밖에 녹지 않지만 알코올이나 에테르 등의 유기용매에 잘 녹는다. 천연으로는 버터, 야자유, 팜유 등의 성분으로 글리세리드의 형태로 존재한다.

(2)은행외종피의 혐오취 분석

(가) 은행외종피의 채취

분석에 사용한 은행외종피는 2011년 10월에서 11월 사이에 수확된 은행열매에서 분리한 것으로 두성영농조합에서 구입하여 사용하였다. 잘 익은 열매이외에 숙성 전의 외종피의 유기산 함량의 변화를 확인하기 위하여 열매가 열린 후 부터(7월) 1개월 간격으로 은행외종피

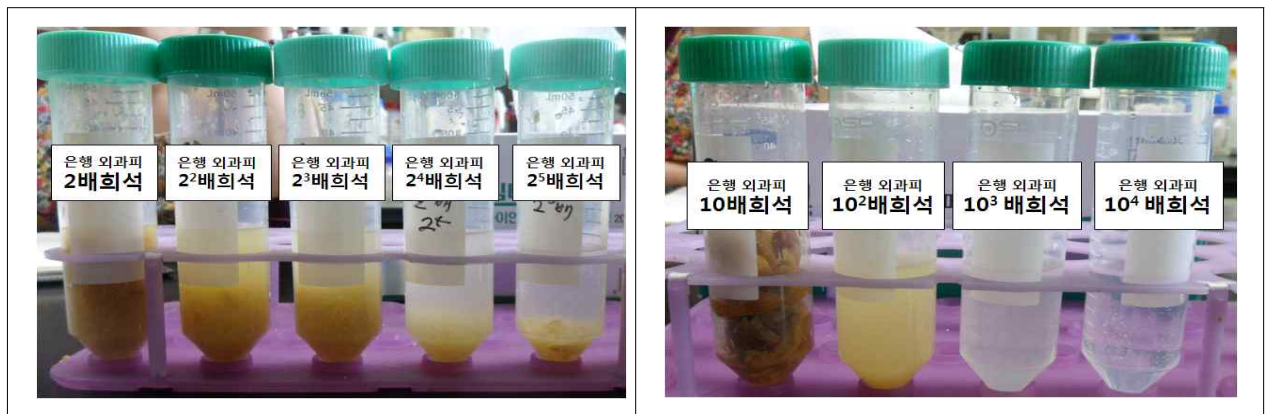
를 채취하여 기간별 유기산 분석을 실시하였고, 그림 1은 은행외종피의 채취 당시 열매의 외관이다.

(나) 은행외종피 혐오취 역치분석

은행외종피를 희석하여 관능적으로 역치(최소감지농도, Threshold)를 확인하는 실험을 실시하였다. 유기산 분석을 위하여 은행외종피는 10배 희석하여 분석에 이용하였고, 역치 확인을 위한 시료는 잘 익은 은행외종피를 물에 2배~2⁶배로 2진 희석 및 10~10⁵배로 10진 희석하여 후각으로 역치를 확인하였다(그림 2).



(그림 1) 채취기간별 은행외종피의 외관변화



(그림 2) 은행외종피의 역치확인을 위한 희석수의 준비

(다) 은행외종피 혐오취 분석방법의 확립

고속액체크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC)를 사용하여 은행외종피의 혐오취 성분인 butyric acid 및 주요 유기산을 분석하였다. 분석에 사용한 시료는 마쇄하여 HPLC용 methanol에 1 : 9 (w:v)의 비율로 혼합하여 균질기로 5분간 균질화한 후 3,000×g, 4℃, 10분간 원심분리하여 상정액을 회수해 분석에 이용하였고, 상정액은 0.2 μm syringe filter (PVDF, Whatman, Brentford, UK)로 여과하여 아래의 분석조건 표 1에서 분석하였다.

(표 1) 은행외종피 혐오취 분석을 위한 HPLC 작동 조건

HPLC instrument	Conditions
Column	Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm)
Elution	0.008 N H ₂ SO ₄
Flow rate	0.6 mL/min
Detector	UV 210 nm
Oven temperature	50°C
Injection volume	20 μ l

나. 열풍건조에 의한 은행외종피의 혐오취 저감화

(1) 건조온도 및 시간조건 탐색

현재까지 식품의 건조는 주로 저온의 열풍을 이용하여 식품손상을 최소화하기 위해 장시간 건조하였다. 열풍건조는 시스템 구성과 공정이 간단하고 설비가 다른 건조 장치들에 비해 경제적이므로 현재 가장 많이 이용되어 왔다. 따라서 은행외종피를 온도 및 시간을 달리하여 열풍건조 하였다. 건조온도에 따른 건조시간의 차이 등을 고려하여 예비실험을 통해 최종산물의 수분함량이 45~50%가 되는 조건인 60°C 10시간, 70°C 8시간, 80°C 6시간, 90°C 5시간, 100°C 4시간의 5가지 조건에서 열풍건조를 수행하였다.

또한 열풍건조 외에 우수한 건조효과와 품질상태 보존이 용이한 동결건조 방식과 햇빛건조, 그늘건조, 송풍건조 등을 이용하여 은행외종피를 건조하였다. 동결건조는 동결건조기에서 저온으로 2일간 실시하였고, 햇빛건조는 지열의 영향을 최소화하기 위하여 30 cm 이상의 높이의 선반위에 얹어 햇빛이 잘 드는 곳에서 주간에만 2일간, 그늘건조는 햇빛건조와 같은 조건으로 햇빛이 들지 않는 그늘에서 주간에만 3일간 건조를 실시하였다. 송풍건조는 실온에서 바람을 1일간 송풍하여 건조하였다.

(2) 건조 조건별 은행외종피의 혐오취 분석

표 2와 같은 9가지 건조조건에서 건조한 은행외종피는 확립한 HPLC 분석(표 1)을 통하여 혐오취 분석을 실시하였다.

(표 2) 은행외종피의 혐오취 저감을 위한 건조온도 및 건조시간

No.	Treatment	Time
1	열풍건조, 60℃	10시간
2	열풍건조, 70℃	8시간
3	열풍건조, 80℃	6시간
4	열풍건조, 90℃	5시간
5	열풍건조, 100℃	4시간
6	햇빛건조, 28±2℃	2일
7	송풍건조, 25±2℃	1일
8	그늘건조, 25±2℃	3일
9	동결건조, -70~-80℃	2일

다. 고온습윤처리에 의한 은행외종피의 혐오취 저감화

(1) 고온습윤처리 조건 탐색

건조방법과 반대로 수분을 첨가하여 고온조건에서 혐오취 성분을 저감화시킬 수 있는 방법을 고안하고자 하였다. 따라서 은행외종피를 찌는 과정인 습윤처리와 끓이는 과정인 열수처리를 하였다.

습윤처리는 은행외종피를 찌기에 넣고 100℃에서 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 10시간 동안 찌는 6가지 조건에서 실시하였다.

열수처리는 은행외종피와 물의 비율을 1:2(w:v)로 하여 100℃의 물에서 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 10시간의 6가지 조건과, 은행외종피와 물을 비율을 달리하여 1시간 동안 처리한 6가지(은행외종피:물=1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:10) 조건으로 총 12가지 조건에서 실시하였다.

(2) 고온습윤처리별 은행외종피의 혐오취 분석

위와 같이 18가지의 조건에서 고온습윤처리한 은행외종피는 확립한 HPLC 분석(표 1)을 통하여 혐오취 분석을 실시하였다.

라. 은행외종피의 알레르기원 분석

(1) 알레르기원(urushiols) 정성적 분석

우루시올류는 주로 옷나무의 주성분으로 알려져 있다. 옷나무를 비롯한 옷나무속수종의 유

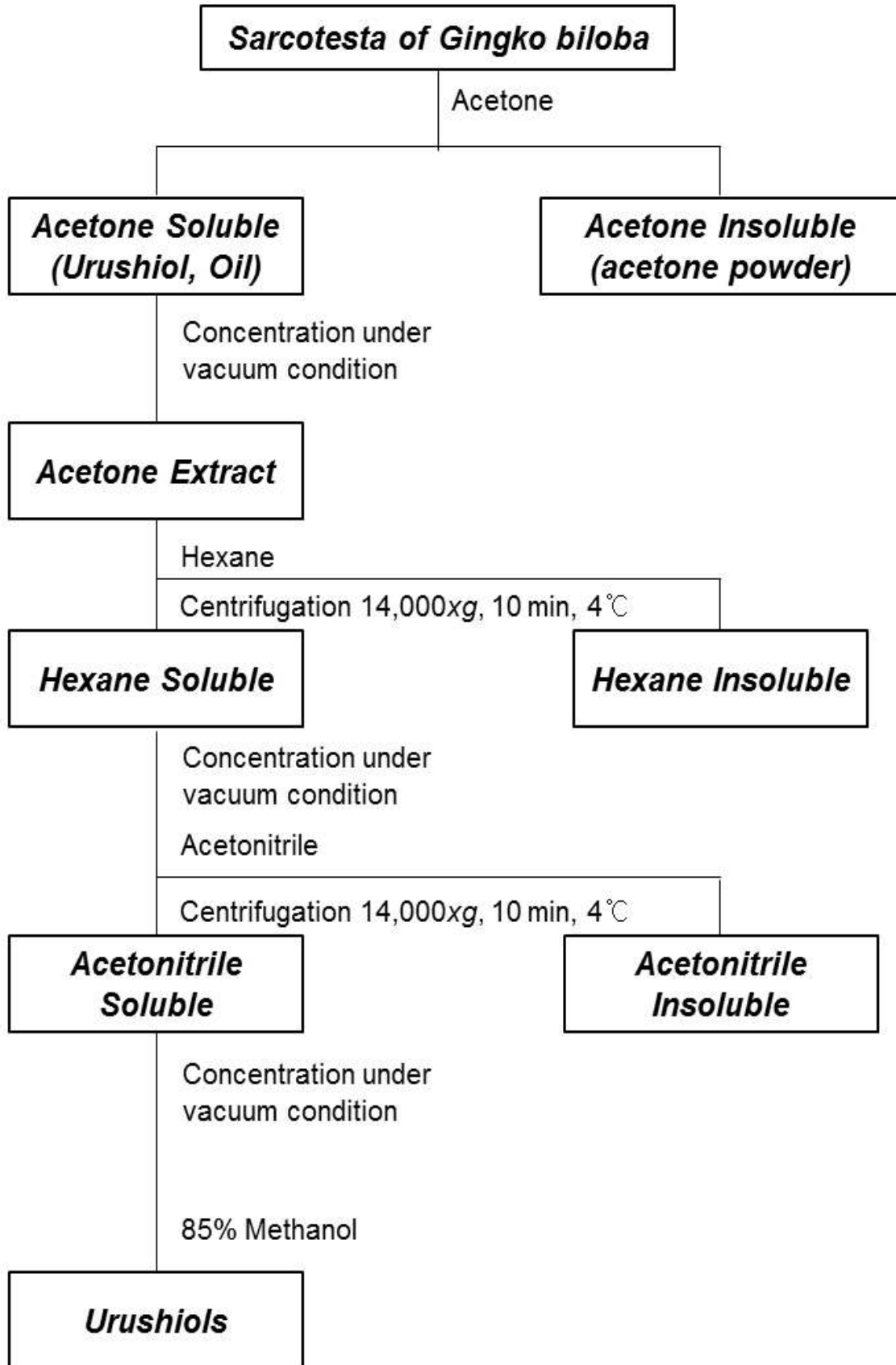
액의 주성분인 페놀성물질로 특이체질인 사람은 옷나무에 접근하는 것만으로도 전신에 ‘옷오름’이라는 피부염을 일으키는 알레르기 유발물질이다. 이러한 우루시올류는 은행외종피에도 다량 존재하는 주요 알레르기원으로 접촉시 심각한 피부염을 일으킨다(그림 3).



(그림 3) 우루시올류에 의한 피부염증상

알레르기원의 정성적 분석은 전년도에 확립한 방법인 Thin layer chromatograph(박층크로마토그래피, TLC)를 이용하여 실시하였다. 전개용매는 Toluene, Ethylformate, Formic acid (5 : 4 : 1, v/v)를 이용하여 물질을 전개하였다. UV lamp (short wave 245 nm)를 이용하여 물질의 분리정도를 확인하고, 10% H₂SO₄ 용액을 분무한 후 heating 발색시켜서 우루시올류의 정성적인 확인을 실시하였다. 표준물질로는 상업적으로 판매되는 정제된 urushiol(15:1)을 구입하여 사용하였다.

또한, 시료의 우루시올 분석을 용이하게 하기 위하여 유기용매를 이용하여 은행외종피에서 우루시올류를 추출하여 TLC 분석에 이용하였다. 시료의 3배에 해당하는 아세톤(acetone)을 첨가하여 하룻밤 동안 실온(25℃)에서 진탕하여 반응을 하고, Whatman No.2 paper로 여과한 후 그 반응액을 감압농축하였다. 아세톤과 동량의 헥산(hexane)용액을 첨가하고 녹지 않은 물질을 분리하기 위해서 14,000×g, 4℃에서 10분간 원심분리하여 상등액만 다시 감압농축하였다. 아세톤, 헥산과 동량으로 아세토나이트릴(acetonitrile)을 첨가하고 위와 같은 조건(14,000×g, 4℃, 10분)에서 원심분리를 실시하였다. 용해되지 않은 부분을 제거하고 나머지 반응용액을 다시 감압농축한 후 85% 메탄올(methanol)에 녹여 시료로 사용하였다. 우루시올의 추출방법의 모식도는 그림 4와 같다.



(그림 4) 은행외종피의 우루시올류 추출과정 모식도

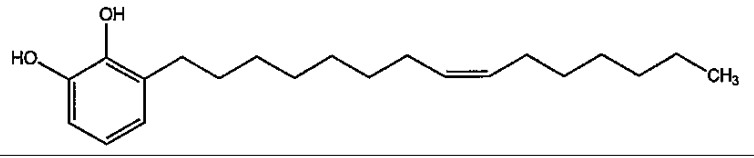
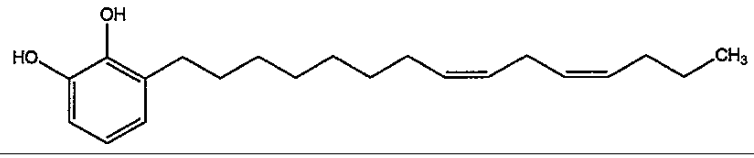
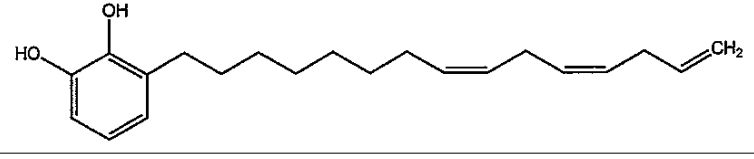
(2) 알레르기원(urushiols) 정량적 분석

(가) 우루시올류 정량분석을 위한 HPLC 분석조건 확립

우루시올류의 정성적인 분석 뿐 아니라, 보다 정밀한 분석을 위하여 정량적으로 우루시올류를 분석방법을 확립하고자 하였다.

그러나 옷나무 유래의 우루시올류의 여러 가지 정량분석방법을 은행외종피유래 우루시올류의 분석에 적용하였을 때 정확한 정량이 이루어지지 않았다. 따라서 은행외종피 유래 우루시올류의 정량적 분석을 위한 분석방법을 새롭게 확립하였다. 분석은 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분석하였고, 분석에 이용한 표준물질은 urushiol 15:1 (C₂₁H₃₄O₂), urushiol 15:2 (C₂₁H₃₂O₂), urushiol 15:3 (C₂₁H₃₀O₂) 3가지 종류의 우루시올이다(표 3).

(표 3) 표준물질로 사용한 우루시올류

urushiol (15:1)		
Molecular formula	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	
Molecular weight	318.50 g/mol	
urushiol (15:2)		
Molecular formula	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	
Molecular weight	316.49 g/mol	
urushiol (15:3)		
Molecular formula	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	
Molecular weight	314.47 g/mol	

우루시올류의 정량분석에 사용한 은행외종피 우루시올의 추출은 앞서 기술한 정성분석의 우루시올 추출방법과 같다(그림 4). 그림 4와 같은 방법으로 추출한 은행외종피 우루시올류를 아래와 같은 분석조건에서 정량분석 하였다(표 4).

(표 4) 우루시올류 분석을 위한 HPLC 작동 조건

HPLC instrument	Conditions															
Instrument	Jasco (PU2089, CO2060, AS2051, UV2075)															
Column	C18, 250×4.8 mm, 5 μ m															
Elution	eluent A : H ₂ O eluent B : CH ₃ OH gradient															
	<table border="1"><thead><tr><th>Time (min)</th><th>eluent A</th><th>eluent B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>17</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>30</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>31</td><td>60</td><td>40</td></tr></tbody></table>	Time (min)	eluent A	eluent B	0	60	40	17	0	100	30	0	100	31	60	40
Time (min)	eluent A	eluent B														
0	60	40														
17	0	100														
30	0	100														
31	60	40														
Flow rate	1.2 mL/min															
Detector	UV 220 nm															
Oven temperature	45°C															
Injection volume	20 μ l															

① 건조방법별 우루시올류의 함량변화

1차년도(2012년)에는 건조방법을 달리한 은행외종피 시료에서 우루시올을 추출하여 TLC를 통하여 정성확인을 실시하였다. 또한 정성적인 평가보다 명확한 확인을 위하여 정량분석을 HPLC를 이용하여 실시하였다.

② 고온습열방법을 이용한 우루시올류의 함량변화

1차년도(2012년)에는 은행외종피에 습열처리를 실시한 후 우루시올을 추출하여 TLC분석을 실시하였다. 2차년도에는 우루시올의 정량적분석을 추가적으로 실시하였다.

③ 열수처리방법 이용한 우루시올류의 함량변화

1차년도(2012년)에 열수처리는 두 가지 방법으로 나누어 실시하였다. 은행외종피와 물의 혼합비율을 1:2로 고정하고 끓이는 시간을 달리하여 처리한 시료와 처리시간을 1시간으로 고정하고 은행외종피에 물을 첨가하는 비율을 달리하여 열수공정을 실시하였다. 2차년도에는 우루시올의 정량적 분석을 추가적으로 실시하였다.

(나) 우루시올의 정량분석을 위한 LC/MS 분석조건 확립

LC-MS에 의한 우루시올류의 분석은 그림 4의 우루시올류 추출방법을 이용하여 은행외종피에서 우루시올류를 추출한 후 실시하였다. HPLC를 통하여 분석한 물질의 피크를 질량분석기로 보내어 분리된 물질의 분자량을 추적하여 보다 정확하게 우루시올류를 분석하고자

하였다. 질량분석기를 사용하여 분석하는데 있어서 첫 번째 출발점은 분석물질을 기체화하는 것으로, 본 연구에서는 전기분무이온화법(electrospray ionization, ESI)를 이용하여 분석되었다. 각 피크별로 정확한 분자량 값을 얻은 후 C, H, O 등의 원소비율에 의한 예상 분자식을 유추하였다.

우루시올의 LC/MS 분석조건은 다음의 표 5와 같으며, 서울대학교 농생명대학 공동기기원(주나이샘)에 의뢰하여 분석하였다.

(표 5)우루시올류의 LC/MS 분석을 위한 조건

(a) LC parameter

instrument	Conditions									
Insturument	A Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap									
Column	Imtakt Unison UK-C18 , ser#KC08A1Z , 100x2mm, 3um Prod#UK024									
Elution	eluent A : 0.1% formic acid DW eluent B : 0.1% formic acid methanol gradient									
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Time (min)</th> <th style="text-align: center;">eluent A</th> <th style="text-align: center;">eluent B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">15</td> <td style="text-align: center;">85</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">30</td> <td style="text-align: center;">15</td> <td style="text-align: center;">85</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	eluent A	eluent B	0	15	85	30	15	85
Time (min)	eluent A	eluent B								
0	15	85								
30	15	85								
Flow rate	200 μ l/min									
Injection volume	10 μ l									
Running time	30 min									

(b) MS parameter

instrument	Conditions
Insturument	A Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap
Temperature	320°C
Ion source voltage	3.5 kV
Sheath gas	30 units
Aux gas	5 units
scan time	0.001 min
change polarity time	0.02 min

2. 미생물을 이용한 혐오취 및 알레르기 저감화 연구

가. 부티르산(butyric acid) 변환균주 선별

(1) 식품미생물자원(누룩, 김치, 된장)을 이용한 enrichment culture

은행외종피의 혐오취를 저감화하기 위하여 식품미생물자원을 이용한 enrichment culture 를 이용하여 butyric acid 변환 균주를 선별하고자 하였다. Enrichment culture에 사용한 식품미생물자원은 발효미생물이 많은 누룩, 김치, 된장으로 선정하였다.

누룩은 곡물, 흔히 소맥(밀)을 분쇄하여 원관형으로 만들어 미생물을 번식시켜 건조시킨 한국의 전통곡자로서 술 제조에 쓰이는 발효제(starter culture)의 일종이다. 술을 만드는 효소를 갖는 곰팡이를 곡류에 번식시킨 것으로 누룩곰팡이는 빗갈에 따라 황국균(黃麴菌)·흑국균(黑麴菌)·홍국균(紅麴菌) 등이 있는데 막걸리나 약주에 쓰이는 것은 주로 황국균이다. 누룩의 종류는 누룩은 재료에 따라 밀가루로 만드는 누룩, 쌀과 녹두로 만드는 누룩, 가을보리로 만드는 누룩, 쌀가루로 만드는 누룩 등이 있다. 누룩의 명칭은 제조시기에 따라 춘국, 하국, 절국, 동국 등으로 불렸는데, 밀을 수확한 후에 만드는 절국이 가장 많았다. 형태에 따라서는 곡물을 가루 낸 다음 몽쳐서 만드는 병국(막누룩)과 곡물의 낱알이나 곡분으로 만드는 산국 등으로 구분되는데, 주로 많이 이용된 것은 병국이었다. 병국은 가루를 직접 사용하는 경우가 많았는데 물이나 즙액에 우려내는 경우(물누룩)도 있다. 요즈음에는 밀가루로 만든 분국과 밀을 세 조각으로 타서 얻은 가루와 밀기울로 만든 조국으로 나누어 그 용도를 달리하는데, 분국은 약주, 과하주용으로 쓰이고 조국은 탁주, 소주용으로 쓰인다.



(그림 5) 식품미생물자원-발효식품, 누룩

김치는 우리 고유의 전통 발효식품으로 배추 또는 무를 주원료로 한 야채 젖산발효식품이다. 감칠맛과 상쾌한 신맛 등이 잘 조화된 맛과 씹을 때의 신선한 조직감을 가지고 있고, 주요 재료가 야채이기 때문에 비타민, 무기질이 풍부하고 젖산등 유기산은 식욕을 촉진시키기 때문에 주요한 부식의 위치를 차지하고 있다. 또한 김치는 다양한 재료와 복잡한 발효작용, 여러 가지 형태의 생화학적 반응들에 의하여 생리활성 기능뿐만 아니라 식이섬유소, 비타민, 무기질 등을 공급해 주어 영양학적으로도 매우 우수하다.



(그림 6) 식품미생물자원-발효식품, 김치

된장은 삶은 콩에 미생물이 자연 접종되어 만들어진 메주를 이용한 한국의 대표적인 반 고체상 대두발효식품이다. 된장은 영양이 풍부하여 100 g당 열량 128 kcal, 단백질 12 g, 지방 4.1 g, 탄수화물 14.5 g, 회분, 철분, 인, 칼슘, 비타민까지 함유되어 있다. 이러한 된장은 주원료인 단백질이 미생물의 작용으로 분해되어 생성된 분해산물과 발효과정 중에 미생물의 작용에 의해 새로이 생성되는 물질들로 구성됨으로써 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

이처럼 여러 가지 효능이 있는 식품미생물자원에 은행외종피를 10% 첨가하여 enrichment

culture 하였고, butyric acid에 저항성이 있는 균주를 TSA, MRS, PDA 등의 배지를 이용하여 분리하였다. 분리한 균주는 다시 은행에 $10^6 \sim 10^7$ CFU/g이 되도록 첨가하여 발효를 진행하였고, 혐오취 저감화에 효과가 있는 균주를 선별하였다.



(그림 7) 식품미생물자원-발효식품, 된장과 메주

(2) butylate 첨가배지를 이용한 butyric acid 저항균주 선별

식품미생물자원에서 분리한 균뿐만 아니라 본 연구실에 보존중인 발효식품 유래 젖산균을 이용하여 butyric acid에 저항성이 있는 균주를 탐색하고자 하였다. 보존된 젖산균의 활성을 위하여 MRS broth 배지를 이용하여 증균배양을 하였고, butyric acid를 첨가하여 만든 MRS agar 배지에 증균된 배양액을 점적하여 butyric acid에 저항력이 있는 균주를 선별하였다. 실험에 사용한 균주는 본 연구실에서 분리한 김치에서 유래된 젖산균을 대상으로 확인하였다.

나. 은행외종피의 알레르기 저감화 균주선발

(1) 우루시올류 첨가 enrichment culture

숙성 진행 중인 은행외종피에 우루시올을 첨가하여 알레르기 유발물질을 분해하는 균주를 선별하고자 하였다. 은행에서 순수하게 분리 및 정제된 우루시올류는 굉장히 고가이기 때문에 경제적인 측면을 고려하여 우루시올 성분이 함유된 옷 진액을 시료에 첨가하여 enrichment culture하였고, TSA, MRS, PDA 등의 배지를 이용하여 우루시올 분해균주를 선별하였다.

3. 식품을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화

가. 된장을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화

(1) 시료의 준비

우리나라 전통발효식품의 대표적인 된장의 효소분해 작용을 하는 점을 적용하여 은행외종피를 장류에 섞어 일정기간 저장하여 은행외종피의 혐오취와 알레르기 유발물질의 저감화를 확인하고자 하였다. 은행외종피를 마쇄하여 된장과 비율을 1:1이 되도록 혼합하였다. 또한 온도에 따른 저감화 정도를 비교하기 위하여 마쇄 은행외종피 된장을 10, 20, 30, 50℃에 나누어 저장하여 2개월 간격으로 6개월간 시료를 채취하였다.

(2) 발효물의 기간별 혐오취 분석

기간별로 채취한 은행외종피의 유기산 분석은 서울대학교 농생명과학 공동기기원 (NICEM, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 유기산분석을 위하여 시료는 메탄올에 10 배 희석하여 3,000×g에서 10분간 원심분리한 후 0.22 μm membrane filter를 이용하여 여과하여 HPLC (Ultimate3000, Dionex, USA) 분석의 시료로 사용하였다. 이 때 사용한 HPLC의 컬럼은 Aminex 87H column (300×7.8 mm)를 사용하였으며 온도는 40℃로 유지하였다. 이동상은 0.01 N H₂SO₄ 를 이용하여 0.5 mL/min로 흘려보내었다. 시료의 1회 주입량은 10 μl 이었으며 detector는 RI (Shodex RI-101, Japan), UV (210 nm)를 사용하여 30분간 분석하였다.

(3) 발효물의 미생물군집분석

(가) 선택배지에 의한 미생물군집조사

서로 다른 온도에서 발효한 된장은행외종피 시료 중 30℃에서 0, 2, 6개월간 발효한 시료 3가지의 시료의 미생물 군집분석을 실시하였다. 된장은행외종피에 존재하는 균주를 여러 선택배지로 분리하여 균총을 분석하였다. 시료는 멸균환경에서 10배 (0.85% NaCl 225 mL + 시료 25 g) 희석한 후 스토마커(speed level 5, 1 min)로 균질화 하였다. 그 후 총균, 젖산균, 효모 및 곰팡이 등을 분리하고자 각각의 선택배지에 도말한 후 배양하였다. 총균수의 분석을 위하여 tryptic soy agar (TSA)를 사용하였다. 또한 총 젖산균 분석을 위하여 pH를 5.5로 조절한 Lactobacilli MRS agar (MRS agar)를 사용하였다. 젖산속의 세부분석으로 Modified Lactobacillus selection agar medium (m-LBS, *Lactobacillus* species), KF-streptococcus (*Enterococcus, pediococcus* species) 및 phenylethyl alcohol with 2% sucrose agar (PES, *Leuconostoc* species)를 사용하였다. 이밖에 효모 및 곰팡이 분석을 위하여 tartaric acid로 pH를 조절한 potato dextrose agar (PDA)를 사용하였다. 각 시료 및 배지에서 분리한 균은 미생물의 군집(colony)형태에 따라 나누었고, 개체군의 균수(population size)를 확인하였다.

(나) 16r RNA Full Sequencing

선택배지에 의해 분리된 10개 균주는 마크로젠에 의뢰하여 16S rRNA PCR을 실시하였다. 분리된 균주로부터 genomic DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자를 PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭하였다. 16S rRNA 염기서열분석을 위하여 27F (forward primer, 5'-AgAgTTTgATCMTGGCTCAg-3'), 1492R (reverse primer, 5'-TACggYTACCTTgTTACgACTT-3') 2개의 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다.

(다) Next Generation Sequencing (NGS)기반 미생물군집구조 분석

된장은행외증피의 microbial community 분석은 (주)천랩(Chunlab, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 시료의 미생물군집구조를 분석하기 위하여 시료는 균질화한 후 genomic DNA를 추출하였다. 대장균 16S rRNA의 V1, V2, V3 다변영역을 사용한 fusion forward primer를 제작하여 사용하였다. DNA 증폭을 위해 20 μ l tube에 1 μ l template DNA, 2 μ l 각 primer (20 pmol), 1 μ l dNTP (각 100 mM), 5 μ l 10xPCR buffer, 0.25 μ l Taq polymerase (Roche, Germany), 40.7 μ l H₂O의 반응 시약을 넣고 thermal cycler (PTC-200, Peltier Thermal Cyclerm, PharmaTech & GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems)에서 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C 5분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 1분30초로 30 cycle의 조건에서 수행하였다. QIAquick8 PCR Purification Kit(QIAGEN, Cat. No. 28106)를 이용해서 정제한 PCR 산물은 454GS Junior system(ref)로 pyrosequencing을 진행하였다.

(라) Next Generation Sequencing (NGS)기반 미생물군집구조 분석 결과해석

Barcode sorting에 따라 분리된 각 서열들에서 primer 및 linker를 뺀 뒤 나머지 서열의 길이가 300 bp 이하인 것들은 분석에서 제외했고, UCHIME program을 이용해 chimera 염기 서열과 16S rRNA가 아닌 서열들도 제거하였다. EzTaxon extended database를 이용하여 BLASTN 탐색 실행결과로 찾은 상위 다섯개의 hits를 대상으로 pair-wise alignment를 실행한 뒤 얻은 similarity를 기준으로 분류학적 동정을 수행하였다. Pyrosequencing을 통하여 얻어진 염기서열은 (주)천랩에서 제공하는 군집분석프로그램인 CLcommunityTM을 이용하여 분석하였다. 3% 서열 불일치 도를 기준으로 CD-HIT program을 이용하여 시료 내에 존재하는 operational taxonomic unit (OTU) 수를 구하였다. 통계분석은 MOTHUR program을 사용해서 rarefaction curve, abundance-based coverage estimator (ACE) Chao1 richness index (Chao 1), Shannon 및 Simpson diversity indices (Simpson)들과 Good's coverage index (coverage)를 분석하여 종 다양성을 비교하였다. 각각의 시료는 Phylum, class, genus, species 수준에서 미생물을 분석하였다(taxonomic composition). 또한 시료 간의 유연관계를 확인하기 위하여 각 시료 사이의 종 다양성 차이를 분석하는 beta diversity (Fast Unifrac Analysis)를 CLcommunityTM프로그램을 이용하여 Heat map과

Principal coordinate analysis (PCoA)를 수행하였다.

나. 고추장을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화

(1) 시료의 준비

우리나라 전통발효식품의 대표적인 고추장의 효소분해 작용을 하는 점을 적용하여 은행외종피를 장류에 섞어 일정기간 저장하여 은행외종피의 혐오취와 알레르기 유발물질의 저감화를 확인하고자 하였다. 은행외종피를 마쇄하여 고추장과 비율을 1:1이 되도록 혼합하였다. 또한 온도에 따른 저감화 정도를 비교하기 위하여 마쇄 은행외종피 고추장을 10, 20, 30, 50℃에 나누어 저장하여 2개월 간격으로 시료를 6개월간 채취하였다.

(2) 발효물의 기간별 혐오취 분석

고추장을 이용한 은행외종피 발효물과 같은 방법으로 혐오취 분석을 실시하였다.

(3) 발효물의 미생물군집분석

고추장을 이용한 은행외종피 발효물과 같은 방법으로 미생물군집분석을 실시하였다.

4. 면역력 증진 기능균주의 선별

가. 숙성진행 중인 은행외종피 유래균주의 균총분석

은행외종피에는 우루시올류에 저항력이 있는 균총이 생육하고 있을 것으로 추측하여 은행외종피에 자연적으로 존재하는 균주의 분리하여 균총을 분석하고자 하였다. 두성은행영농조합에서 구입한 은행(2011년 10월~11월 수확)과 2011년 10월에 직접 채취한(경기도 용인시) 은행을 이용하여 은행외종피 유래 균을 분리해냈다. 시료는 멸균환경에서 10배(0.85% NaCl 225mL + 은행 시료 25g) 희석한 후 스토마커(speed level 5, min 1)로 균질화 하였다. 그 후 총균, 젖산균, 혐기균, 효모 및 곰팡이 등을 분리하고자 각각의 선택배지에 도말한 후 배양하였다. 미생물 분리 수집은 생성된 미생물의 군집형태에 따라 분리하였다.

나. 선별균주의 특성 조사 및 동정

(1) 선별균주의 점질 다당체 생성특성 확인

선별한 균주는 당종류에 따른 점질 다당체 생성특성을 파악하였다. 점질물 생성 유산균의 경우 식품의 물성 변화 및 유지에 영향을 미치며 면역측면에서 장점을 가진다. 분리된 미생물은

Freeman et al.의 방법을 응용하여 TSB 배지에 이전 연구에서 선택된 미생물 18종을 24hr 동안 배양하여 충분히 활성화시켜 실험에 사용하였다. 또한 당의 종류를 치환하여 고체 배지를 제조한 후 젖산균을 접종하여 발생하는 콜로니의 특징을 조사하기 위해 TSA 배지와 TSA 배지에 5% 당 (sucrose, maltose, rhamnose, lactose)을 첨가하여 멸균한 배지를 만들었다. 이 과정에서 우선 당을 제외한 TSA 배지 구성성분을 증류수에 용해하여 121°C, 15분 고압증기멸균하고, 각각의 멸균한 증류수에 당(sucrose, maltose, rhamnose, lactose)을 용해한 후 멸균된 0.45 μm filter로 여과하여 TSA 배지 용액에 최종 농도가 5% 되도록 첨가하였다. 이 후 배지용액을 골고루 교반한 후 멸균된 agar plate에 균혀 배지를 제조하였고, 젖산균 접종은 지름 2 mm의 멸균한 woodstick에 균체 배양액을 적신 후 각각의 배지에 찍고 30°C, 48시간 배양하였다.

선택배지에 따른 균생성 18종을 control 배지(TSA 배지)와 당을 첨가한 TSA 배지에 점적하여 모양, 색상, 특징(광택여부와 형태), 크기 그리고 점질물 생성여부를 확인하였다. 점질물 생성여부는 플레이트를 기울였을 때 흐르는 경우 + + + +, woodstick으로 긁었을 때 끈적한 경우 + + +, woodstick으로 긁었을 때 따라오는 경우 + +, woodstick으로 긁었을 때 따라오지 않는 경우 +, 점질물이 생성되지 않은 경우 -로 표시하였다.

(2) 선별균주의 동정

은행외종피에서 분리한 18종의 균주는 16S rDNA의 염기서열을 결정하기 위하여 (주)마크로젠과 (주)솔젼트에 의뢰하여 16S rDNA의 염기서열을 구하였고 NCBI의 blast search를 통하여 동정하였다.

5. 은행외종피 유래 선별균주의 면역증강 및 항염증 효능평가

가. 은행외종피 유래 선별균주의 면역증강 효능 평가

(1) 면역증강 효능평가를 위한 시료의 준비

은행외종피에서 분리한 균주 총 18개 균주 가운데 선행연구를 통해 면역활성물질이 있을 것으로 사료되는 점질 다당체를 많이 생성하는 균주 5가지를 선별하였다. 선별한 균주 5종을 TSB 배지와 5%의 sucrose를 첨가한 TSB배지에서 24시간동안 증균 및 활성화 시킨 후 원심분리(10,000 \times g, 4°C, 10분)하여 균과 배양액을 분리하였다. 분리한 배양액에는 배지와 동량의 95% 에탄올을 첨가하여 4°C에서 24시간 침전시킨 후 다시 원심분리(10,000 \times g, 4°C, 10분)하여 침전물인 exopolysaccharide (EPS)과 상정액을 분리하였다. EPS는 회수하여 동결건조하여 본 실험에 사용하였다.

(2) 세포생존율 측정(MTT assay)

세포 생존율은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

(Sigma-Aldrich Co.) 측정으로 분석하였다. Raw 264.7 cell 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/mL 농도로 분주하고 24 시간 배양한 뒤 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 제조해 놓은 시료를 각각 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 처리한 다음, 20 시간 배양하였다. well 의 media를 모두 제거한 뒤 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 serum free DMEM과 혼합한 뒤 well 당 200 μL 씩 분주하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 Dimehtyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 MTT 환원에 의해 생성된 포르마잔을 microplate reader (infinite M200 Pro, Tecan, Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 산화질소 생성량 확인(NO assay)

배양액에서의 NO 생성은 NO의 산화물인 아질산의 측정을 통해 평가하였다. Griess 분석 방법을 이용하였으며 Raw 264.7 cell 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/mL 농도로 분주하고 24 시간 배양한 뒤, Raw 264.7 cell에 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 제조해 놓은 시료 표 17를 각각 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 다음, 20 시간 배양하였다. 배양 후 상등액 100 μL 를 새로운 96-well plate에 옮긴 후 griess reagent (Sigma-Aldrich Co.)와 1:1로 혼합하여 넣고 shaker에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. standard curve는 sodium nitrite를 이용하여 측정하였다.

나. 은행외종피 유래 선별균주의 항염증 효능 평가

(1) 항염증 효능 평가를 위한 시료의 준비

항염증 효과 확인을 위한 시료는 면역증강 활성 평가에 사용한 시료와 같다.

(2) 세포 생존율측정(MTT assay)

세포 생존율은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich Co.) 측정으로 분석하였다. Raw 264.7 cell 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/mL 농도로 분주하고 24 시간 배양한 뒤 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 제조해 놓은 시료를 각각 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 처리한 다음, 20 시간 배양하였다. well 의 media를 모두 제거한 뒤 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 serum free DMEM과 혼합한 뒤 well 당 200 μL 씩 분주하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 Dimehtyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 MTT 환원에 의해 생성된 포르마잔을 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 산화질소 생성량 확인(NO assay)

배양액에서의 NO 생성은 NO의 산화물인 아질산의 측정을 통해 평가하였다. Griess 분석 방법을 이용하였으며 Raw 264.7 cell 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/mL 농도로 분

주하고 24 시간 배양한 뒤 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 Raw 264.7 cell에 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 제조해 놓은 시료를 각각 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 다음, 20 시간 배양하였다. 배양 후 상등액 100 μL 를 새로운 96-well plate에 옮긴 후 griess reagent (Sigma-Aldrich Co.)와 1:1로 혼합하여 넣고 shaker에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. standard curve는 sodium nitrite를 이용하여 측정하였다.

다. 시료 농도별 면역증강 효능 평가

(1) 시료의 준비

위의 면역증강 활성평가에서 효과가 있는 시료를 농도별로 희석하여 면역증강 활성을 확인하였다. 선별된 시료는 G7, suc G5, suc G16 세 가지 이다.

(2) 세포생존율(MTT assay)

세포 생존율은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich Co.) 측정으로 분석하였다. Raw 264.7 cell 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/mL 농도로 분주하고 24 시간 배양한 뒤 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 제조해 놓은 시료 (G7, sucrose G5, sucrose G16)를 각각 6.25, 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 처리한 다음, 20 시간 배양하였다. well 의 media를 모두 제거한 뒤 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 serum free DMEM과 혼합한 뒤 well 당 200 μL 씩 분주하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 Dimehtyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 MTT 환원에 의해 생성된 포르마잔을 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 산화질소 생성량의 확인(NO assay)

배양액에서의 NO 생성은 NO의 산화물인 아질산의 측정을 통해 평가하였다. Griess 분석 방법을 이용하였으며 Raw 264.7 cell 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/mL 농도로 분주하고 24 시간 배양한 뒤, Raw 264.7 cell에 선별된 시료 3종(G7, sucrose G5, sucrose G16)을 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 제조하여 각각 6.25, 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 처리한 다음, 20 시간 배양하였다. 배양 후 상등액 100 μL 를 새로운 96-well plate에 옮긴 후 griess reagent (Sigma-Aldrich Co.)와 1:1로 혼합하여 넣고 shaker에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader (infinite M200 Pro, Tecan, Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. standard curve는 sodium nitrite를 이용하여 측정하였다.

(4) 단백질 발현정도 확인(Western blot)

단백질 시료는 Raw 264.7 cell에 Phosphate buffer saline (PBS) 1 mL을 첨가하여 수집하였고, BSA 정량을 통해 30 μg 씩을 100°C에서 5분간 변성을 유도하였다. 변성이 완료된

단백질은 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동으로 전개시켰고, 90분 동안 80 V 전기반응기를 사용하여 membrane으로 옮긴 뒤, 5% skim milk로 비특이적 단백질을 억제시켰다. 1차 항원은 iNOS로 4℃에서 8시간동안 반응시킨 뒤 세척하였고, HRP-conjugated secondary antibody를 결합시킨 뒤, ECL system으로 반응시켰다. 이를 Chmi-doc을 이용해 iNOS 단백질의 발현정도를 확인하고 분석하였다.

(5) Cytokine 유도능 평가

은행외종피에서 분리한 균주를 이용하여 면역력 증진균주를 선발하고자 하였다. 은행외종피에서 분리한 균주는 총 18개였고, 그중 면역증강 활성평가(MTT assay, NO assay)에서 효과가 있는 시료를 농도별로 희석하여 면역증강 활성을 확인하였다. 선별된 시료는 G7, suc G5, suc G16 세 가지이다. 시료 처리를 한 Raw 264.7 cell 배양 상등약을 100 μ l를 취하여 Mouse cytokine/ Chemokine magnetic bead panel kit(#MCYTOMAG-70K, MILLIPLEX[®] MAG, Millipore co. Darmstadt, Germany)를 사용하여 IL-1 β , IL-6, IL-12 (p40), TNF α 의 농도를 측정하였다.

6. 미생물을 이용한 혐오취 저감화

가. 휘발성물질 생성 및 유기산 생성 균주 선발

(1) Enrichment culture 유래 휘발성물질 또는 유기산 생성 균주 선발 및 발효성 검토

전년도(2012년, 1차년도) 연구에서 butyric acid 변환균주를 선발하고자, 식품미생물자원(누룩, 김치, 된장)에 은행외종피를 10% 첨가하여 enrichment culture를 수행하였다. 누룩, 김치, 된장을 대상으로 enrichment culture를 실시한 결과, 총 17개의 균을 균집형태(colony)에 따라 분리하였다(그림 1). 또한 분리한 균주 17종은 다시 은행에 10⁶~10⁷ CFU/g이 되도록 첨가하여 발효를 진행하였고, 은행외종피의 주요 혐오취원 butyric acid의 저감에 효과가 있는 균주를 선별한 바 있다.



(그림 8) 은행외종피에서 분리한 미생물 17종의 균집형태(colony shape)

나. 기존 식품 균주를 이용한 혐오취 저감 균주의 선별

(1) 은행외종피의 혐오취 저감을 위한 식품균주(젖산균 및 효모)의 선별

본 연구실이 보존하고 있는 식품균주 중 젖산균과 효모를 대상으로 은행외종피의 혐오취를 저감화할 수 있는 균주를 선별하고자 하였다. 본 연구에 사용된 균주는 젖산균 60종과 효모 40종, 총 100종이다(표 6, 7).

(표 6) 본 실험에 사용한 젖산균 60종의 이름과 분리원

No.	Strain	균주번호	분리원
1	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	KFRI 743	-
2	<i>Bifidobacterium breve</i>	KFRI 744	Intestine of infant
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC 3195	-
4	<i>Enterococcus faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	KFRI 685	-
5	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 826	Kimchi
6	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 823	Kimchi
7	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 822	-
8	<i>Enterococcus faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	KFRI 685	-
9	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 1182	Fermenting apple juice
10	<i>Eubacterium limosum</i>	KFRI 753	-
11	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	KFRI 238	-
12	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCTC 3102	Fermenting Sevillano variety olives
13	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCTC 3498	human feces
14	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 146	-
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 812	Kimchi
16	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 805	Kimchi
17	<i>Lactobacillus casei</i>	KFRI 228	-
18	<i>Lactobacillus corniformis</i> subsp. <i>corniformis</i>	KCTC 3505	Fermentating olives
19	<i>Lactobacillus curvatus</i>	KFRI 654	Milk
20	<i>Lactobacillus fermentans</i>	KFRI 145	Fermented beets
21	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	KFRI 229	-
22	<i>Lactobacillus honohiechii</i>	KFRI 234	-
23	<i>Lactobacillus lactis</i>	KCTC 2181	-
24	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KFRI 1183	-
25	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KFRI 481	-
26	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCTC3099	-
27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 464	Pickled cabbage
28	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 144	-
29	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 814	Kimchi
30	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 813	Kimchi
31	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 660	Pickled cabbage
32	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 471	-
33	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 470	-
34	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 464	Pickled cabbage
35	<i>Lactobacillus sake</i>	KFRI 815	Kimchi
36	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	KFRI 669	-

37	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	KFRI 670	-
38	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	KFRI 671	-
39	<i>Lactococcus plantarum</i>	KFRI 1186	Frozen peas
40	<i>Lactococcus plantarum</i>	KCTC 1048	-
41	<i>Leuconostoc carnosum</i>	KCTC 3252	Soil
42	<i>Leuconostoc lactis</i>	KFRI 232	-
43	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>mesenteroides</i>	KCTC 3505	Fermentating olives
44	<i>Leuconostoc carnosum</i>	KCTC 3524	-
45	<i>Leuconostoc carnosum</i>	KCTC 3525	Vakuüm-packaged meats
46	<i>Leuconostoc lactis</i>	KCTC 3528	Milk
47	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCTC 3530	-
48	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCTC 3505	Fermentating olives
49	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>mesenteroides</i>	KFRI 145	Fermented beets
50	<i>Leuconostoc creoris</i>	KFRI 241	-
51	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KFRI 818	-
52	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>mesenteroides</i>	KFRI 819	Kimchi
53	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>mesenteroides</i>	KFRI 820	Kimchi
54	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>mesenteroides</i>	KFRI 821	Kimchi
55	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	KCTC 3101	-
56	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KCTC 3507	Dried American beer yeast
57	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KFRI 832	-
58	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KFRI 833	Kimchi
59	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KFRI 834	Kimchi
60	<i>Weissella confusa</i>	KFRI 1184	-

(표 7) 본 실험에 사용한 효모 40종 이름과 분리원

No.	Strain	균주번호	분리원
1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	KFRI 00106	Ragi
2	<i>Candida edax</i>	KFRI 00113	Fermented swine manure
3	<i>Candidaintermedia</i>	KFRI 00115	Feces
4	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var.	KFRI 00137	Whey fermentation
5	<i>Rhodotorula glutinis</i>	KFRI 00172	-
6	<i>Candida tropicalis</i>	KFRI 00178	-
7	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	KFRI 00259	Rum
8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00265	-
9	<i>Saccharomyces heterogenicus</i>	KFRI 00270	-
10	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	KFRI 00316	-
11	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	KFRI 00441	Ragi
12	<i>Cryptococcus albidus</i>	KFRI 00457	soil
13	<i>Torulaspora fermentati</i>	KFRI 00550	Sherry
14	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	KFRI 00551	-
15	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	KFRI 00552	-
16	<i>Filobasidium capsuligenum</i>	KFRI 00555	-
17	<i>Candida rugosa</i>	KFRI 00557	-
18	<i>Torulaspora hansenii</i>	KFRI 00560	-

19	<i>Hansenula sp.</i>	KFRI 00588	-
20	<i>Candida sp.</i>	KFRI 00589	-
21	<i>Citeromyces sp.</i>	KFRI 00590	-
22	<i>Cantharellus cibarius</i>	KFRI 00597	-
23	<i>Pleurotus sajorcaju</i>	KFRI 00600	-
24	<i>Hericium erinaceus</i>	KFRI 00606	-
25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00631	Wine
26	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	KFRI 00635	-
27	<i>Rhodotorula gracillis</i>	KFRI 00636	-
28	<i>Sporobolomyces holsaticus</i>	KFRI 00637	-
29	<i>Sporobolomyces holsaticus</i>	KFRI 00638	-
30	<i>Torulopsis candida</i>	KFRI 00639	-
31	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00795	-
32	<i>Candida lipolytica</i>	KFRI 00909	-
33	<i>Candida pseudotropicalis</i>	KFRI 00910	Yogurt
34	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00920	-
35	<i>Saccharomyces lactis</i>	KFRI 00922	Gassy cheese
36	<i>Saccharomyces rosei</i>	KFRI 00926	-
37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00937	-
38	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	KFRI 00938	Rum
39	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 01013	Wine
40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 01019	-

(2) 선발된 식품균주를 이용하여 발효한 발효물의 혐오취 분석

은행외종피에서 나는 혐오취는 butyric acid가 주를 이루고 있으므로 butyric acid를 중점적으로 분석하였고, 또 다른 악취성분인 hexanoic acid를 함께 분석에 이용하였다.

Butyric acid는 무색으로 물에 대한 용해도는 거의 없어 일부만 물에 녹는 성질을 갖고 있으며, 알코올, 에테르, 벤젠, 아세톤 및 유기 용매에 녹는 성질을 갖고 있는 물질로 냄새로는 불쾌하고 썩은 냄새를 풍기며, 사람이 인지할 수 있는 최소감지농도가 0.000019 ppm으로 낮은 악취물질로 눈의 손상, 피부 손상이나 화상, 소화기 및 호흡기 손상을 유발시키는 유해성을 지닌 악취 물질이다. Hexanoic acid는 6개의 탄소를 가지는 직선형의 지방산으로서 n-caproic acid 라는 이름을 가지고 있다. 악취를 가진 무색의 액체로 물에는 조금밖에 녹지 않지만 알코올이나 에테르 등의 유기용매에 잘 녹는다. 천연으로는 버터, 야자유, 팜유 등의 성분으로 글리세리드의 형태로 존재한다.

따라서 은행외종피와 식품균주를 이용한 발효물의 혐오취 변화는 butyric acid와 hexanoic acid의 함량분석으로 확인하였다. 은행외종피의 혐오취 성분인 butyric acid와 hexanoic acid의 분석은 고속액체크로마토그래피(HPLC, High performance liquid chromatography)를 이용하여 분석하였고, 분석조건은 아래와 같다(표 8). 분석에 이용한 시료는 발효물을 4,000 rpm, 4℃, 10분간 원심분리하여 회수한 상정액으로 HPLC용 methanol에 1:9 (w:v)의 비율로 희석한 후, 0.2 μm syringe filter (PVDF, Whatman, Brentford, UK)로 여과하여 이용하였다.

(표 8) butyric acid와 hexanoic acid 분석을 위한 HPLC 작동 조건

HPLC instrument	Conditions
Insturument	Waters, E2695
Column	Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm)
Elution	0.008 N H ₂ SO ₄
Flow rate	0.6 mL/min
Detector	UV 210 nm
Oven temperature	50°C
Injection volume	20 μ l

(3) 선발된 식품균주를 이용하여 발효한 발효물의 마스킹(masking) 효과 검토

혐오취를 제거하는 방법은 발생원(혐오취원) 자체의 감소나 제거로 이루어 질수도 있으나, 혐오취를 직접 제거하는 대신에 방향이 강한 물질로 혐오취를 마스킹하는 방법도 이용된다. 근원적인 혐오취의 저감은 혐오취 생성원의 제거에 기초하여야 할 것이나, 부득이 발생하게 된 혐오취성분은 마스킹 방법과 같이 후처리하여야 하는 경우도 있다. 마스킹법의 원리는 다른 방향이 강한 물질로 혐오취성분을 감각적으로 인지하지 못하게 하여 혐오취원을 덜 느끼게 하는 것이다.

본 연구에서는 별도의 마스킹제를 첨가하지 않고, 미생물의 발효를 통해 생성되는 발효산물에 의한 마스킹효과를 확인하고자 하였다. 선발된 균주를 이용하여 은행외종피 발효물을 제조하고, 발효물을 분석하여 혐오취성분인 butyric acid와 hexanoic acid가 아닌 다른 휘발성유기산 성분을 확인하였다.

분석의 표준물질로는 acetic acid, formic acid 등 끓는점이 150°C 이하로 비교적 낮고 수중에서 휘발하기 쉬운 유기산을 이용하였다. 휘발성유기산의 분석은 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분석하였고, 분석조건은 아래와 같다(표 6). 분석에 이용한 시료는 발효물을 4,000×g, 4°C, 10분간 원심분리하여 회수한 상정액으로 HPLC용 methanol에 1:9 (w:v)의 비율로 희석한 후, 0.2 μ m syringe filter (PVDF, Whatman, Brentford, UK)로 여과하여 이용하였다.

(표 9) 휘발성유기산 분석을 위한 HPLC 작동 조건

HPLC instrument	Conditions
Instrument	Waters, E2695
Column	Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm)
Elution	0.008 N H ₂ SO ₄
Flow rate	0.6 mL/min
Detector	UV 210 nm
Oven temperature	50°C
Injection volume	20 μ l

7. 알레르기 저감화 균주 적용성 검토

가. 우루시올류 첨가배지에서의 생육검토

(1) 혐오취저감화 균주 및 은행외종피 유래 균주의 우루시올 첨가 액체배지에서 생육검토

앞서 고체배지를 통하여 생육을 확인한 균주는 액체배지에서 생육검토를 실시하였다. 액체배지상에서 생육을 확인한 균주는 젖산균 10종으로 고체배지상에서 우세한 생육을 나타낸 균주이다. 대조균은 Trytic soy broth(TSB)를 이용하였고 TSB에 옷추출 농축물 0.1, 1%, 은행외종피 0.5, 5, 10%를 첨가하여 알레르기원이 첨가된 액체배지를 제조하였다. 각각의 액체배지에는 고체배지의 생육검토에서 선발한 10개 균주를 초기균수 $10^{4\sim5}$ CFU/mL이 되도록 접종하였고 24시간, 48시간으로 나누어 생균수를 확인하였다. 생균수의 측정은 TSA 배지에 평판도말법으로 측정하였다.

8. 면역력증진 균주 및 발효물의 기능향상 검토

가. 은행외종피 자체의 면역력 증진효과 검토

(1) 시료

시료는 은행의 종실부를 제거한 은행외종피 부분 100 g을 증류수와 1:1로 섞어 착즙하여 사용하였다. 착즙한 착즙액은 원심분리(4,000×g, 4°C, 10분)하여 상정액을 분리하였고 상정액은 동결건조하여 본 실험에 사용하였다.

(2) 세포독성평가

세포 독성 평가는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich Co.) 측정으로 분석하였다. Raw 264.7 cell 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/mL 농도로 분주하고 24 시간 배양한 뒤 500 $\mu\text{g/mL}$ 으로 제조해 놓은 시료를 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 다음, 20 시간 배양하였다. well의 media를 모두 제거한 뒤 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 serum free DMEM과 혼합한 뒤 well 당 200 μL 씩 분주하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 Dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 MTT 환원에 의해 생성된 포르마잔을 microplate reader (infinite M200 Pro, Tecan, Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 산화질소(NO) 생성량 확인

배양액에서의 산화질소 생성은 산화질소의 산화물인 아질산의 측정을 통해 평가하였다. Griess 분석 방법을 이용하였으며 Raw 264.7 cell 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/mL 농도로 분주하고 24 시간 배양한 뒤, Raw 264.7 cell에 500 $\mu\text{g/mL}$ 으로 제조해 놓은 시료를 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 다음, 20 시간 배양하였다. 배양 후 상등액 100 μL 를 새로운 96-well plate에 옮긴 후 griess reagent (Sigma-Aldrich Co.)와 1:1로 혼합하여 넣고 shaker에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. standard curve는 sodium nitrite를 이용하여 측정하였다.

9. 발효공정 다변화에 의한 저감화

가. 온도에 따른 발효공정 연구

(1) 온도에 따른 선발균주의 growth rate 확인

1, 2차년도 연구결과로 선발된 균주 젓산균 4종, 효모 1종의 growth rate를 확인하기 위하여 평판도말법을 이용한 콜로니계수를 실시하였다.

(가) 균주의 접종

선발균주 5종을 10^{8-9} log CFU/mL로 활성화한 후 대조균인 tryptic soy broth(TSB)과 은행외종피를 10% 첨가한 TSB배지에 접종하였다. 균주는 초기균수 10^{5-6} log CFU/mL이 되게 준비된 배지에 접종하였다. 접종에 이용한 선발균주는 다음의 표 10과 같다.

(표 10) 1차 선발된 젖산균 4종과 효모 1종

	균주명
1	<i>Bifidobacterium longum</i>
2	<i>Enterococcus faecium</i>
3	<i>Lactobacillus brevis</i>
4	<i>Lactobacillus sake</i>
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

(나) 균주배양

각각의 균주는 최적 배양온도를 확인하기 위하여 25, 30, 35℃로 배양온도를 달리하여 배양을 실시하였고, 혐기배양과 호기배양조건 중 최적배양조건을 확인하기 위하여 각각의 균주는 호기배양과 혐기배양으로 나누어 배양하였다. 서로 다른 조건에서 배양한 균주는 48시간 동안 배양하여 배양물의 균수 확인을 실시하였다. 혐기배양조건을 만들어주기 위하여 혐기배양기에 이산화탄소 생성팩을 넣은 후 밀봉하여 배양을 하였고, 혐기도의 확인은 indicator를 이용하여 확인하였다. 또한, 일반증균배지인 TSB에서의 균주의 성장과 은행외종피에서의 균주의 성장을 비교하기 위하여 은행외종피를 10% 첨가한 TSB 배지에서의 균주의 성장도 함께 관찰하였다.

(다) 배양물의 각 온도별 growth curve

배양액의 균수확인 0, 12, 24, 48시간 배양한 배양물을 채취하여 10진 희석한 후 TSA 배지에 평판도말하여 실시하였다.

나. 발효조건외 다변화(혼합배양 등 발효공정변화)연구

(1) 선발균주의 고체배양

(가) 젖산균/효모균을 이용한 은행외종피 발효물의 제조

최적발효조건을 확인한 젖산균 4종과 효모 1종을 이용하여 고체배지를 제조하였다(표 11). 수분함량과 은행외종피의 비율을 다르게 한 서로 다른 은행외종피 고체배지를 제조하고 각각의 은행외종피 고체배지에 1%의 활성화 시킨 균주를 접종하여 48시간 동안 배양하였다. 선발균주는 butyric acid의 감소 효과가 있고, 우루시올류에 저항성을 나타내는 균주로 *Bifidobacterium longum*(GB1), *Enterococcus faecium*(GB2), *Lactobacillus fermentans*(GB3), *Lactobacillus sake*(GB4), *Saccharomyces cerevisiae*(GB5) 5개 균주이다.

(표 11) 은행외종피 고체배지의 제조

No.	배지조성	수분함량(%)
1	은행외종피:물=1:1(w/v)	80%
2	은행외종피:물=1:2(w/v)	90%
3	은행외종피:쌀:물=1:1:2(w/w/v)	80%
4	은행외종피:쌀:물=1:1:4(w/w/v)	90%

(나) 다단계 복합발효 균주를 이용한 은행외종피 발효물의 제조

은행외종피를 잘게 마쇄하여 고체배지를 제조하였다. 멸균하여 준비한 은행외종피 고체배지에 1차로 활성화시킨 맛느타리 버섯균을 최종농도 1%가 되게 접종하여 20℃에서 14일 동안 배양한 후, 멸균처리를 실시하였다. 멸균처리한 맛느타리버섯 은행외종피 발효물에 *L. brevis* 와 *S. cerevisiae*를 각각 접종하여 2가지 버섯은행외종피 발효물을 제조하였고, 각각의 특성을 확인하는 실험을 실시하였다.

(다) 선발균주를 이용한 발효물의 유기산확인

유기산분석을 위하여 시료는 증류수에 10배 희석하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 0.22 µm membrane filter를 이용하여 여과하여 HPLC(Ultimate3000, Dionex, USA)로 분석하였다. 이때 사용한 HPLC 컬럼은 Aminex 87 H column(300×7.8 mm)를 사용하였으며 온도는 40℃로 유지하였다. 이동상은 0.01N H₂SO₄를 이용하여 0.5 mL/min으로 흘려보냈다. 시료의 1회 주입량은 10 µl이었으며 detector는 RI(Shodex RI-101, Japan), UV 210 nm를 사용하여 30분간 전개하였다.

(라) 선발균주를 이용한 발효물의 폴리페놀류 확인

시료의 total phenol content(총폴리페놀함량분석)은 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 시료의 전처리를 위하여 80% 메탄올로 시료를 희석하고 균질화한 후 20분간 sonication 하였다. Whatman 2번 filter paper로 여과 후 100% 메탄올로 여러 번 세척하고, 남은 solid cake로 다시 한 번 추출을 진행하였다. 추출액을 모아 rotary evaporator로 건조시킨 후, 100% 메탄올에 녹여 정용한 다음 -4℃이하에서 보관하였다. 총폴리페놀류의 측정을 위하여 0.5 mL 증류수에 125 µl의 전처리한 시료와 표준시료를 넣은 후, Folin-Ciocalteu(발색제)를 125 µl를 넣었고, 그 후 7% carbonate 용액을 1.25 mL넣고, 증류수로 3 mL을 맞추었다. 상온에서 90분간 방치 후 760 nm에서 total phenol content 흡광도를 측정하였다. 표준시료는 gallic acid를 사용하였다.

또한, 은행에 주요 플라보노이드 함량분석을 위하여 kaempferol, quercetin, isorhamnetin 세 가지 성분의 플라보노이드 함량을 확인하였다(서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM, Korea)).

(2) 일라이트비닐을 이용한 발효조건 탐색

(가) 서로 다른 일라이트비닐을 이용한 은행외종피의 숙성

‘화진캐미칼’에서 공급받은 일라이트 함유 비닐을 이용하여 은행외종피를 저장한 후 기간별로 butyric acid의 함량변화를 조사하였다. 저장 실험에 사용된 일라이트 비닐의 종류는 총 4가지이며 표 12에 나타내었다. 저장시료인 통은행과 마쇄한 은행외종피는 각각의 일라이트비닐에 넣어 서로 다른 온도조건인 10, 20, 30℃에서 저장하며 6개월간 시료를 채취한 후 변화를 확인하였다.

(표 12) 4가지 종류의 일라이트 비닐(A, B, C, D)

일라이트비닐 A (노란색)	일라이트비닐 B (노란색)	일라이트비닐 C (적색)	일라이트비닐 D (회색)
			
충북 영동산 일라이트 입자크기: 3000 mesh 두께: 0.06 mm	충북 영동산 일라이트 입자크기: 2000 mesh 두께: 0.06 mm	충북 영동산 일라이트 입자크기: 3000 mesh 두께: 0.07 mm	충북 단양산 일라이트 입자크기: 2000 mesh 두께: 0.07 mm

(나) 유기산 및 혐오취분석

기간별로 채취한 은행외종피의 유기산 분석은 서울대학교 농생명과학 공동기원 (NICEM, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 유기산분석을 위하여 시료는 메탄올에 10 배 희석하여 3,000×g에서 10분간 원심분리한 후 0.22 μm membrane filter를 이용하여 여과하여 HPLC (Ultimate3000, Dionex, USA) 분석의 시료로 사용하였다. 이 때 사용한 HPLC의 컬럼은 Aminex 87H column (300×7.8 mm)를 사용하였으며 온도는 40℃로 유지하였다. 이동상은 0.01 N H₂SO₄ 를 이용하여 0.5 mL/min로 흘러보내었다. 시료의 1회 주입량은 10 μl 이었으며 detector는 RI (Shodex RI-101, Japan), UV (210 nm)를 사용하여 30분간 분석하였다.

(3) 첨가물을 이용한 발효조건 탐색

(가) 첨가물을 이용한 은행외종피 발효액의 제조

선발된 균주를 대상으로 혐오취원을 저감하는 새로운 발효공정을 탐색하기 위하여, 중탄산나트륨, 중탄산칼륨, 중탄산칼슘과 같은 첨가물을 발효물에 투입하여 butyric acid의 저감 효과를 확인하였다. 첨가물의양은 중탄산칼슘 0.025, 0.25, 0.5%, 중탄산칼륨 0.05, 0.5, 1%, 중탄산나트륨 0.05, 0.5, 1%로 나누어서 혐오취의 변화를 확인하였다.

(나) 유기산 및 혐오취 분석

기간별로 채취한 은행외종피의 유기산 분석은 서울대학교 농생명과학 공동기기원 (NICEM, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 유기산분석을 위하여 시료는 메탄올에 10 배 희석하여 3,000×g에서 10분간 원심분리한 후 0.22 μ m membrane filter를 이용하여 여과하여 HPLC (Ultimate3000, Dionex, USA) 분석의 시료로 사용하였다. 이 때 사용한 HPLC의 컬럼은 Aminex 87H column (300×7.8 mm)를 사용하였으며 온도는 40℃로 유지하였다. 이동상은 0.01 N H₂SO₄ 를 이용하여 0.5 mL/min로 흘려보내었다. 시료의 1회 주입량은 10 μ l 이었으며 detector는 RI (Shodex RI-101, Japan), UV (210 nm)를 사용하여 30분간 분석하였다.

(4) 은행외종피 첨가한 누룩의 발효조건 탐색

(가) 은행외종피 누룩의 제조

은행외종피 배지에서 저항성이 있는 균주를 선발하기 위한 선행연구를 진행하여 가장 생육 활성이 좋은 균주 및 은행외종피 함량을 선정하고, 누룩 제조에 필요한 곡류(쌀, 통밀, 겉보리, 밀기울)에 대해 각각 첨가하여 은행외종피 누룩을 제조하였다.

쌀 누룩 제조의 경우, 쌀을 수세하고 3시간 동안 침지시킨 다음 물 빼기를 한 후, 121℃에서 15분간 고압 멸균하였다. 이를 50 g씩 Cell culture dish에 넣고 은행외종피 함량 및 저장기간에 따라 분쇄한 30%의 은행외종피와 곰팡이 선발균주를 접종하여 25℃ 배양실에서 15일간 배양하였다. 선발균주의 접종은 25℃ PDB(Potato Dextrose Broth) Medium에서 진탕 배양한 곰팡이 선발균주를 Waring Blender로 Low level에서 약 20초간 분쇄한 후에 원심분리용 용기에 담아 3,000×g, 10 min, 4℃로 원심분리하고, 원심 분리한 곰팡이 균의 상등액은 버리고 침전물은 멸균한 0.85% NaCl로 현탁하여 각 처리구에 10⁴ CFU/ml씩 접종하였다. 통밀, 겉보리, 밀기울 기질도 이와 같은 방법으로 제조하였다.

(나) 생균체량 측정

은행외종피 누룩 시료의 1 g씩 생리식염수 99 mL을 첨가하여 Waring Blender로 Low level에서 40초간 분쇄하고 10진 희석하여 PDA(Potato Dextrose Agar) Medium에 균주 도말, 배양(25℃, 0일, 10일 15일)한 후 곰팡이 생균체량을 계수하였다.

(다) 환원당함량 측정

은행외종피 누룩 시료의 10 g씩 생리식염수 40 mL을 첨가하여 Waring Blender로 Low level에서 40초간 분쇄한 후, 원심분리용 용기에 담아 3,000×g, 10 min, 4℃로 원심분리하고 상등액을 취하여 환원당 분석시료로 사용하였다. 환원당은 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법에 의하여 측정하였다. 은행외종피 누룩 추출물 0.5 mL에 DNS 시약 1.5 mL을 가하여 균

일하게 혼합하여 끓는 물에 5분간 증탕한 후, 잔열로 인한 반응을 차단시키기 위해 찬물에 바로 식힌 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, glucose를 이용한 표준곡선으로부터 환원당 함량을 산출하였다.

(라) 효소활성도 측정

은행외종피 누룩 시료의 10 g씩 생리식염수 40 mL을 첨가하여 Waring Blender로 Low level에서 40초간 분쇄한 후, 원심분리용 용기에 담아 3,000×g, 10 min, 4°C로 원심분리하고 상등액을 취하여 효소활성도 분석시료로 사용하였다. 당화력은 soluble starch를 0.5%가 되도록 녹인 후 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 기질용액 1ml씩 은행외종피 누룩 추출물 0.1 mL을 효소액으로 첨가하여 40°C에서 2시간 효소반응을 시킨 다음 이때 생성된 반응액 1 mL을 사용하여 DNS방법으로 측정하였다. 1 Unit(U)의 단위는 1시간동안 1 μmol의 α-amylase를 생산하는 효소량으로 정의하였다.

(마) 유기산 및 혐오취분석

기간별로 채취한 은행외종피의 유기산 분석은 서울대학교 농생명과학 공동기기원 (NICEM, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 유기산분석을 위하여 시료는 메탄올에 10 배 희석하여 3,000×g에서 10분간 원심분리한 후 0.22 μm membrane filter를 이용하여 여과하여 HPLC (Ultimate3000, Dionex, USA) 분석의 시료로 사용하였다. 이 때 사용한 HPLC의 컬럼은 Aminex 87H column (300×7.8 mm)를 사용하였으며 온도는 40°C로 유지하였다. 이동상은 0.01 N H₂SO₄ 를 이용하여 0.5 mL/min로 흘려보내었다. 시료의 1회 주입량은 10 μl 이었으며 detector는 RI (Shodex RI-101, Japan), UV (210 nm)를 사용하여 30분간 분석하였다.

(바) 폴리페놀류의 분석

시료의 total phenol content (총폴리페놀함량분석)은 서울대학교 농생명과학공동기기원 (NICEM, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 시료의 전처리를 위하여 80% 메탄올로 시료를 희석하고 균질화한 후 20분간 sonication 하였다. Whatman 2번 filter paper로 여과 후 100% 메탄올로 여러 번 세척하고, 남은 solid cake로 다시 한 번 추출을 진행하였다. 추출액을 모아 rotary evaporator로 건조시킨 후, 100% 메탄올에 녹여 정용한 다음 -4°C이하에서 보관하였다. 총폴리페놀류의 측정을 위하여 0.5 mL 증류수에 125 μl의 전처리한 시료와 표준시료를 넣은 후, Folin-Ciocalteu(발색제)를 125 μl를 넣었고, 그 후 7% carbonate 용액을 1.25 mL넣고, 증류수로 3 mL을 맞추었다. 상온에서 90분간 방치 후 760 nm에서 total phenol content 흡광도를 측정하였다. 표준시료는 gallic acid를 사용하였다. 또한 플라보노이드류의 분석을 위하여 kaempferol, isorhamnetin, quercetin 3가지 표준시료를 사용하였고 총폴리페놀류 분석과 동일한 방법으로 분석을 실시하였다.

10. 알레르기원 저감화 공정완료

가. 은행외종피 알레르기원 감소균주 최종 선별 및 발효공정 확립

3년간의 연구결과를 종합적으로 분석하여 복합발효방법을 선택하였다. 첫 번째로 원재료인 은행외종피의 혐오취를 감소시키기 위하여 선행연구에 따라 2배 부피의 물을 첨가하여 열수 처리하는 공정을 실시하였다. 선행연구에 따르면 10시간 열수처리를 하는 것이 가장 많은 혐오취 저감효과를 나타냈으나, 경제적인 측면을 고려하여 1시간 열수 처리한 은행외종피를 발효의 소재로 사용하였다.

열수처리 공정을 거친 은행외종피를 배지로 하여, *L. brevis* 를 접종하여 발효한 젖산균발효물과 *S. cerevisiae*를 접종한 효모균 발효물, 맛느타리버섯을 접종한 버섯 발효물, 1차 맛느타리버섯발효물에 *L. brevis*를 2차 접종한 버섯-젖산균 복합발효물과 맛느타리버섯 발효물에 *S. cerevisiae*를 2차 접종한 버섯-효모균 복합발효물, 총 5가지의 복합발효물을 제조하였다.

발효에 사용한 균주인 *L. brevis*와 *S. cerevisiae*는 본 연구실에서 분리 및 보관중인 젖산균과 효모균을 사용하였다. 젖산균인 *L. brevis* 균주는 한국미생물보존센터에 기탁하여 수탁번호 KFCC11585P를 부여받았고, 효모균인 *S. cerevisiae* 균주는 KFCC1158P 을 부여받았다. 또한, 맛느타리버섯 균사체는 한국미생물보존센터에서 균주를 분양받아 사용하였다 (KCTC 26072; *Pleurotus sapidus*). 젖산균은 30℃에서, 효모균은 25℃의 온도에서 활성화한 후, 제조한 은행외종피 고체배지에 1%의 접종하여, 48시간동안 배양하였다. 버섯발효물은 버섯균사체를 활성화하여 waring blender에 분쇄하여 고체배지에 1%가 되도록 접종하였고, 2주간 균사체를 배양하였다. 각각 발효물의 상세한 제조방법은 표 13에 나타내었다.

(표 13)은행외종피 발효물의 제조

No.	접종균주	배양온도(℃)	배양기간(day)
FG1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	2
FG2	<i>Lactobacillus brevis</i>	25	2
FG3	맛느타리버섯 균사체	25	14
FG4	맛느타리버섯+ <i>S. cerevisiae</i>	25	14+ 2
FG5	맛느타리버섯+ <i>L. brevis</i>	25, 30	14+ 2

FG1은 *L. brevis*를 접종하여 2일간 발효하였고, FG2는 *S. cerevisiae*를 접종하여 2일간 발효하였고, FG3은 맛느타리버섯 균사체를 접종하여 14일간 발효를 실시하였다. FG4, FG5의 경우 2단계의 발효과정을 거쳐 발효물을 제조하였다. 맛느타리버섯 균사체를 14일간 배양한 후 저온살균(65℃, 30분 가열)을 하고, 다시 젖산균과 효모균을 접종하여 2일간 발효를 실시하였다.

나. 은행외종피 발효물의 동물 피부염 테스트

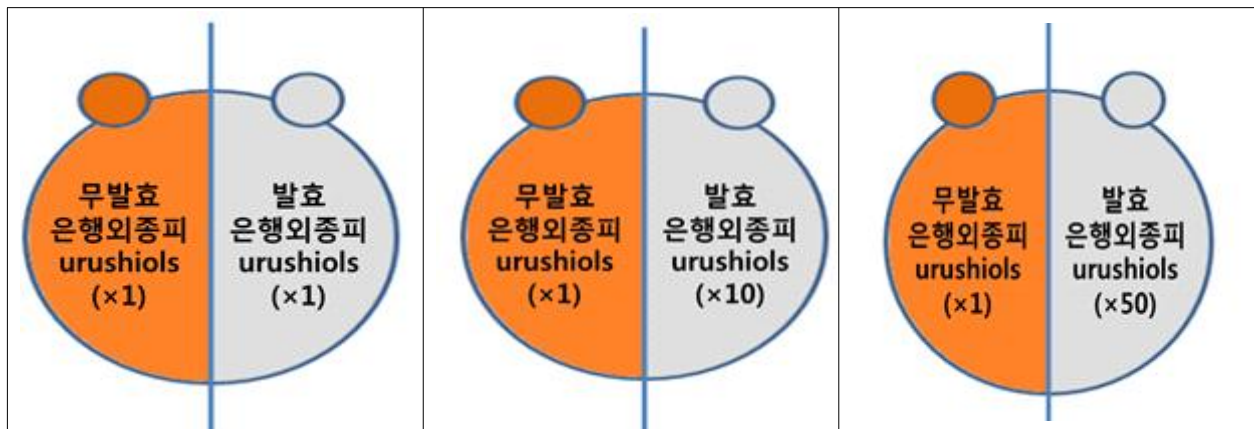
(가) 실험동물의 준비

은행외종피 발효물의 알레르기원 저감을 확인하기 위하여 동물모델을 이용하여 피부염발진 정도를 확인하는 실험을 진행하였다. 실험에 사용된 동물은 생후 5주된 Hairless 암컷 마우스로 (주새론바이오(경기도, 대한민국)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료를 퓨리나(서울, 대한민국)에서 구입하였으며, 모든 동물은 일정한 온도($25\pm 2^{\circ}\text{C}$)와 습도($50\pm 5\%$)가 유지되며 12시간의 명암주기가 조절되는 동물실에서 사육되었다. 또한 실험동물은 사육실에서 1주간 충분히 안정화한 후 각 그룹으로 분리되었고, 전 실험기간 동안 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 충분히 공급하였다. 실험동물의 취급은 실험동물윤리위원회에 계획서를 제출하고 승인받았으며(승인번호 2014-0041), 위원회의 동물실험 취급규정에 따라 사육하고 실험하였다.

(나) 마우스를 이용한 은행외종피 발효물의 피부염 테스트

실험동물의 등과 귀에 대조군인 발효하지 않은 은행외종피 우루시올추출액 원액과 발효한 은행외종피의 우루시올추출액(1, 10, 25, 50배 농축물)은 에탄올에 녹여 준비하였고, 각각의 준비된 시료는 올리브오일과 섞어(에탄올에 녹인 우루시올추출액:올리브오일=4:1(v/v)) 사용하였다. 실험용액을 마우스의 피부에 도포하기 전에 수지침을 이용하여 스크래치(한쪽 면에 5회 실시)를 주어 약한 자극을 주었고, 그 후 등에 준비한 시료를 100 μL 전체적으로 도포하여 발진결과를 육안으로 확인하였다. 또한 마우스의 귀 앞뒤면에 20 μL 의 시료를 도포하여 48시간 이후 나타나는 발진결과를 육안관찰과 귀두께의 변화를 확인하였다.

(그림 9)은행외종피 발효물의 우루시올추출물 피부염테스트



11. 면역력 우수균주를 이용한 발효공정 개발

가. 혐오취 및 알레르기원 감소균주와 버섯균주를 이용한 고체배양물의 면역활성평가

'9. 나, (1), (가) 젓산균/효모균을 이용한 은행외종피 발효물의 제조'에서 제조한 발효물을 대상으로 면역활성평가를 실시하였다. 또한 최종적으로 확립된 복합발효공정으로 제조된 '5가지 은행외종피 발효물(표 13)'을 대상으로 면역활성평가 테스트를 실시하였다. 측정항목은 아래와 같다.

(1) 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich Co.) 측정으로 분석하였다. Raw 264.7 cell 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/mL 농도로 분주하고 24 시간 배양한 뒤 500 µg/mL으로 은행외종피 발효물을 50 µg/mL의 농도로 처리한 다음, 20 시간 배양하였다. well 의 media를 모두 제거한 뒤 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 serum free DMEM과 혼합한 뒤 well 당 200 µL씩 분주하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 Dimehtyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 MTT 환원에 의해 생성된 포르마잔을 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) NO 생성량 확인

배양액에서의 산화질소 생성은 산화질소의 산화물인 아질산의 측정을 통해 평가하였다. Griess 분석 방법을 이용하였으며 Raw 264.7 cell 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/mL 농도로 분주하고 24 시간 배양한 뒤, Raw 264.7 cell에 선별된 시료를 500 µg/mL으로 제조하여 50 µg/mL의 농도로 처리한 다음, 20 시간 배양하였다. 배양 후 상등액 50 µL를 새로운 96-well plate에 옮긴 후 griess reagent (Sigma-Aldrich Co.)와 1:1로 혼합하여 넣고 shaker에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader (infinite M200 Pro, Tecan, Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. standard curve는 sodium nitrite를 이용하여 측정하였다.

나. cytokine 생성 등의 기능성활성평가

(1) Cytokines 분석

Raw 264.7 cells의 배양 상등액을 취하여 cytokines 분석 kits인 MILLIPLEX MAP Mouse Panel I-4 Plex (Merck Millipore Corp., St. Charles, USA)를 사용하여 MAGPIX (Luminex, Austin, TX, USA) 기기로 측정하였으며, 얻어진 MFI(Median Fluorescence Intensity)값으로 IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α 의 농도를 환산하였다.

12. 최종 발효 공정 확립

가. 은행외종피 발효공정 확립

3년간의 연구결과를 종합적으로 분석하여 복합발효방법을 선택하였다. 첫 번째로 원재료인 은행외종피의 혐오취를 감소시키기 위하여 선행연구에 따라 2배 부피의 물을 첨가하여 열수처리하는 공정을 실시하였다. 열수처리 공정을 거친 은행외종피를 배지로 하여, *L. brevis*를 접종하여 발효한 젖산균발효물과 *S. cerevisiae*를 접종한 효모균 발효물, 맛느타리버섯을 접종한 버섯 발효물, 1차 맛느타리버섯발효물에 *L. brevis*를 2차 접종한 버섯-젖산균 복합발효물과 맛느타리버섯 발효물에 *S. cerevisiae*를 2차 접종한 버섯-효모균 복합발효물, 총 5가지의 복합발효물을 제조하였다.

(표 13)은행외종피 발효물의 제조

No.	접종균주	배양온도(°C)	배양기간(day)
FG1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	2
FG2	<i>Lactobacillus brevis</i>	25	2
FG3	맛느타리버섯 균사체	25	14
FG4	맛느타리버섯+ <i>S. cerevisiae</i>	25	14+ 2
FG5	맛느타리버섯+ <i>L. brevis</i>	25, 30	14+ 2

FG1은 *L. brevis*를 접종하여 2일간 발효하였고, FG2는 *S. cerevisiae*를 접종하여 2일간 발효하였고, FG3은 맛느타리버섯 균사체를 접종하여 14일간 발효를 실시하였다. FG4, FG5의 경우 2단계의 발효과정을 거쳐 발효물을 제조하였다. 맛느타리버섯 균사체를 14일간 배양한 후 저온살균(65°C, 30분 가열)을 하고, 다시 젖산균과 효모균을 접종하여 2일간 발효를 실시하였다.

나. 은행외종피발효물의 대량생산

(1) 파일럿 플랜트 규모(pilot plant scale) 의 은행외종피 발효물의 제조

실험실 규모인 플라스크 배양(flask scale culture)으로 제작하였던 은행외종피 발효물의 대량생산조건을 검토하기 위하여 파일럿플랜트 규모에서 은행외종피 발효물을 제조하여, 대량생산 적용연구를 실시하였다. 50 L 용량의 발효조를 이용하여 발효물을 제조하였고(그림), 발효에 사용된 원재료인 은행외종피는 선행연구인 실험실규모에서 사용하였던 것과 같이 2배 부피의 물을 첨가하여 열수처리하여 준비하였다. 최종 확립된 은행외종피 복합발효물 중 맛느타리버섯과 젖산균인 *L. brevis*를 단계적으로 접종하여 만든 발효물과, 맛느타리버섯균과 효모균인 *S. cerevisiae*를 접종하여 만든 발효물 두 가지 발효물에 대해 대량생산 공정 적용실험을 실시하였다.

(가) 발효조의 준비

플라스크 배양과 비교 시 발효조에서의 배양은 산소전달, 전단응력, pH 등의 운전조건이 다를 수 있다. 따라서 플라스크 배양에서 얻은 결과를 토대로 발효조 운전조건을 새롭게 확립하는 실험을 수행하였다. 발효조는 121℃에서 15분간 고압살균 하였고, 살균 후 무균상자에서 방냉하고, 살균한 배지를 은행외종피배지(은행외종피 고형분 함량 30%)를 분주하였다. 발효에 이용할 원재료는 50 L용량의 발효조에서 30 L로 조업부피를 유지하였다. 또한 증발로 인한 배지의 감소를 막기 위해서 습윤기를 공기 공급라인에 설치하여 공기 중의 수분함량을 포화상태로 유지하여 발효조로 공급하였다.

(나) 맛스타리버섯균주의 접종

활성화 시킨 맛스타리버섯균주를 waring blender에 분쇄하여 준비한 은행외종피배지에 5%(vol.%)로 접종하여 180-200 rpm과 25℃로 유지된 발효조에서 14일간 배양을 실시하였다. 14일 후 맛스타리버섯균주가 자가분해(autolysis)를 일으키지 않도록 하기 위하여 60℃에서 30분간 저온살균하여 1단계 발효를 중지시켰다.

(다) 젖산균 및 효모균의 2차 접종

저온에서 살균한 버섯발효물을 발효조에 넣고, 미리 준비한 *L. brevis*와 *S. cerevisiae*를 각 3%(vol.%)씩 접종하여 2차 발효를 실시하였다. *L. brevis*는 30℃에서, *S. cerevisiae*는 25℃에서 2일간 발효조에서 배양하였다. 발효조의 임펠러(impeller)의 속도는 180-200 rpm으로 유지하였다.

(2) 대량생산공정으로 생산된 발효물의 분석

발효조에서 대량 생산한 발효물의 분석을 위하여 pH, 균수, 부티르산 함량 등을 확인하였다.

(가) 발효물의 pH 분석

은행외종피 발효물의 발효 과정 중 경시적으로 나타나는 pH 변화는 pH meter를 이용하여 직접 측정하였다.

(나) 발효물의 균수측정

발효물의 균수측정은 발효 과정 중 경시적으로 배양물을 채취하여 10진 희석한 후 PDA와 TSA배지에 평판도말하여 실시하였다. 1차 버섯균에 의한 발효물은 waring blender에 분쇄하여 PDA에 평판도말하여 균수를 확인하였고, 젖산균과 효모균은 TSA에 배지에 평판도말하여 균수를 확인하였다.

(그림 10) 발효조 외관과 내부 임펠러의 모습



(다) 발효물의 부티르산 함량변화 확인

발효물의 부티르산 함량변화는 다른 시료와 마찬가지로 고속액체크로마토그래피(HPLC, High performance liquid chromatography)를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 앞서 기술한 표 5와 같다. 분석에 이용한 시료는 발효물을 4,000 rpm, 4℃, 10분간 원심분리하여 회수한 상정액으로 HPLC용 methanol에 1:9 (w:v)의 비율로 희석한 후, 0.2 μm syringe filter (PVDF, Whatman, Brentford, UK)로 여과하여 이용하였다.

다. 시제품의 개발

(1) 은행외종피 발효환의 제조

다단계 복합발효 균주로 제조한 은행외종피 발효물을 이용하여 은행외종피 발효환을 제조하였다. 은행외종피는 잘게 마쇄하여 멸균하여 은행외종피 고체배지를 제조하였다. 1차로 활성화시킨 맛스타리 버섯균을 최종농도 1%가 되게 접종하여 20℃에서 14일동안 배양한 후 재 멸균처리를 실시하였다. 멸균처리한 맛스타리버섯 은행외종피 발효물에 *L. brevis* 와 *S. cerevisiae*를 각각 접종하여 맛스타리버섯과 젖산균(*L. brevis*)과 맛스타리버섯과 효모균(*S. cerevisiae*) 버섯은행외종피 발효물을 제조하였다. 제조된 발효물은 0.5 cm의 두께로 얇게 펴서 24시간동안 30℃의 열풍건조기에서 건조를 진행하였다. 건조가 끝난 은행외종피에는 5%의 조청을 첨가하여 환 제품을 제조하였으며 제조한 환을 초콜릿을 쉘 초콜릿 안에 채워 섭취하기 용이한 초콜릿 코팅환을 제조하였다.

(2) 은행외종피 발효음료의 제조

마쇄한 은행외종피를 10% 첨가하여 은행외종피액을 제조하고 균주를 접종하여 발효시켰다. 제조한 은행외종피 발효액을 이용한 과일식초형 발효음료의 제조를 위해서 문헌상의 유기산 조성을 응용하여 은행외종피 발효액의 유기산을 재조정하였다.

(그림 11) 은행외종피 발효음료 제조를 위한 유기산의 조성

Samples	Organic acid	Contents
Control	Tartaric acid	340.0
	Lactic acid	186.3
	Acetic acid	4981.5
	Citric acid	132.9
Grape vinegar	Oxalic acid	28.2
	Tartaric acid	340.0
	Lactic acid	186.3
	Acetic acid	5305.6
	Citric acid	141.4
	Succinic acid	21.9
Apple vinegar	Oxalic acid	64.8
	Tartaric acid	38.3
	Malic acid	427.1
	Lactic acid	41.2
	Acetic acid	4601.7
	Citric acid	89.9
	Succinic acid	67.8
Persimmon vinegar	Acetic acid	4233.0
	Tartaric acid	47.3
	Lactic acid	32.6
	Citric acid	20.5
	Fumaric acid	0.6
	β -galacturonic acid	290.0

(참고문헌: 도토리를 이용한 건강 별미 식초 음료 개발, 농림수산식품부 연구보고서, 2001)

재배합한 은행외종피 발효용액을 신맛, 향, 전체적인 기호도에 대해서 10명의 관능요원에게 실험목적 및 평가항목들에 대해 설명하고 9점척도법으로 검사를 실시하였다. 9점은 매우 좋거나, 강함이고, 0점은 매우 싫거나, 약함으로 평가하였다. 결과의 통계처리는 SPSS version 11을 사용하였으며, 신뢰수준 5%에서 분산분석(ANOVA: analysis of variance)를 하여 다중검증법(DMART: Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검정하였다.

(3) 은행외종피 발효조청의 제조

쌀을 수세하여 3시간동안 침지시킨 후 물을 제거하고 멸균한 후 분쇄한 은행외종피를 30% 첨가하여 은행외종피 발효기질을 제조하였다. 이 후 제조한 은행외종피 기질에 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* 를 접종하여 25℃ 배양실에서 15일간 배양하였다. 곰팡이 균주의 배양은 PDB(Potato Dextrose Broth) Medium에서 진

탕 배양하여 Waring Blender로 약 20초간 분쇄한 후에 3,000 rpm, 10 min, 4℃로 원심분리한 침전물을 접종에 사용하였다. 균주를 접종 후 고, 원심 분리한 곰팡이 균의 상등액은 버리고 침전물은 멸균한 0.85% NaCl로 현탁하여 각 처리구에 10^4 CFU/mL씩 접종하였다. 접종한 은행외종피와 쌀 기질은 15일 동안 배양하여 은행외종피 누룩을 제조하였다. 조청의 제조를 위하여 500 g의 쌀에 350 mL의 물을 첨가하여 고두밥을 짓는다. 지어진 고두밥에 1.5 L의 물과 100 g의 엿기름을 첨가하여 60℃에서 7시간동안 수침하여 당화하였다. 이를 멸균한 면보로 여과하여 거른액에 준비해둔 은행외종피 누룩을 100 g 첨가하여 2시간동안 95℃ 이상에서 끓여 엿기름을 제조하였다.

라. 개발된 은행외종피 발효물의 기술전수 및 사업화 검토

(1) 기술이전

본 연구팀은 은행외종피의 폐기로 인하여 많은 경제적 손실을 겪고 있는 두성은행영농조합에 본 연구에서 개발한 기술을 이전하고, 향후 농가가 활용할 수 있도록 지속적으로 지도 및 조언을 하고자 한다.

(2) 식품의약품안전처 식품원재료 승인 추진계획

은행외종피는 식품으로 사용할 수 없는 원재료임으로 식약처의 원재료 사용 허가를 승인받아야 원재료로써 사용할 수 있다. 따라서 개발한 은행외종피 발효물이 식품으로 이용될 수 있도록 식약처 법규에 따른 규격인정을 진행하여야 한다.

식품원료로 식약처의 허가를 받지 못한(식품공전에 없는) 소재의 경우 독성시험(급성, 만성, 아급성)이 필요하다. 그에 따른 연구기간은 2-3년, 연구비는 약 3-5억 원이 추가적으로 필요하며, 본 과제에서는 현실적으로 달성하기 어려움이 있다. 식품원료허가와 관련된 내용은 향후 추후과제를 통하여 달성될 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 추후 진행하여야 할 식약처 절차와 관련된 내용을 확인하고 필요한 절차에 대해 제시하였다.

제2절. 실험결과 및 고찰

1. 고온처리에 의한 혐오취 및 알레르기 저감화 연구

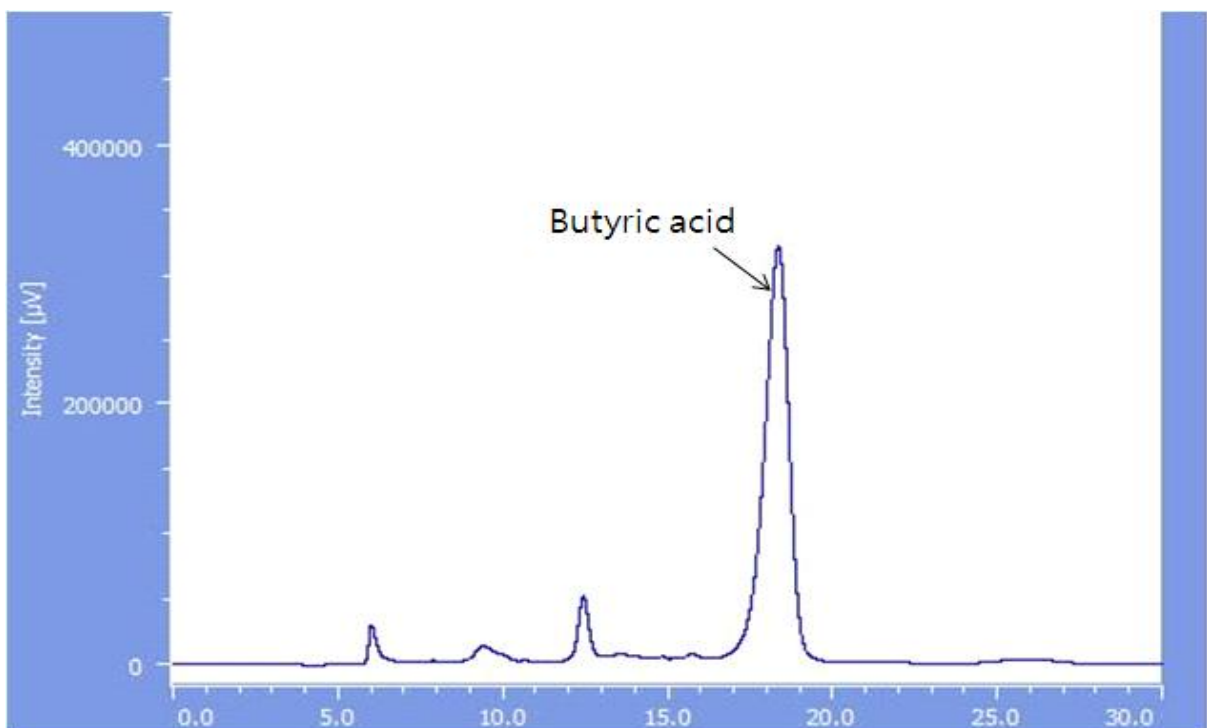
가. 혐오취 분석방법 확립

(1) 은행외종피의 혐오취 분석결과

(가) 은행외종피 혐오취 기기분석 결과

잘 익은 은행외종피(2011년 10월 수확)의 유기산을 분석한 chromatogram은 그림 7에서 보는 바와 같고, 혐오취 성분인 butyric acid가 가장 많은 비율을 차지하고 있음을 확인하였다. 표준 물질로 사용한 butyric acid와 hexanoic acid중 hexanoic acid는 은행외종피에서 주요 혐오취로 검출되지 않았으며, 확립된 혐오취 분석방법을 이용하여 모든 시료의 혐오취 분석을 실시하였다.

또한 잘 익은 은행외종피 1 g 당 butyric acid의 양은 약 5.53 mg/g로 다른 유기산 성분들과 비교 하였을 때, 전체 유기산 함량의 약 80~90%를 차지하는 양이었다. 따라서 본 연구에서는 은행외종피의 혐오취 성분인 butyric acid의 함량을 줄이기 위한 연구를 진행하였다.



(그림 12) 은행외종피의 유기산 함량 HPLC chromatogram

(나) 은행외종피의 혐오취 역치확인

악취는 개별 물질마다 사람이 느낄 수 있는 최소농도나 냄새의 질이 다르다. 어떤 물질이 사람에게 냄새로 느껴지기 시작되는 최소의 농도를 역치(최소감지농도, Threshold)이라 한다. 역치는 사람마다 조금씩 차이를 나타내고 민족이나 연령에 따라서도 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 냄새의 수준(odor level)을 가장 쉽게 확인 할 수 있는 방법의 하나로 은행을 물에 희석하여 혐오취의 역치를 확인하였다. 은행외종피의 혐오취는 10³배 이상으로 희석하였을 때 냄새를 감지 할 수 없었고, 그 농도는 원시료의 5.53 mg/g의 1/10³인 5.53 ug/g으로 추정되었다.

나. 열풍건조에 의한 은행외종피의 혐오취 저감화

(1) 열풍건조온도 및 건조시간에 따른 은행외종피의 수분함량

은행외종피의 혐오취 및 알레르기원을 저감화 시키기 위하여 열풍건조 및 여러 가지 건조방법을 적용하여 은행외종피를 건조하였다. 건조에 사용한 은행외종피는 은행종실부를 제거한 후 2절한 외종피를 사용하였으며, 수분함량은 반건조 조건인 55%이하로 낮추고자 하였다. 건조전의 은행외종피의 수분함량은 약 70%였고, 건조 후 은행외종피의 수분함량은 동결 건조한 은행외종피 시료를 제외하고 모든 시료가 약 45~50%가 되도록 온도에 따른 시간을 조절하였다. 각 시료의 수분함량을 (표 14)에 나타내었다. 또 건조 후의 은행외종피의 외관을 (그림 13)에 나타내었다. 100℃에서 열풍 건조하는 경우, 3~4시간 만에 원하는 수분함량에 도달하였으나, 다른 시료에 비하여 색변화가 많음을 확인할 수 있었다.

(표 14) 건조온도에 따른 소요시간 및 최종산물의 수분함량

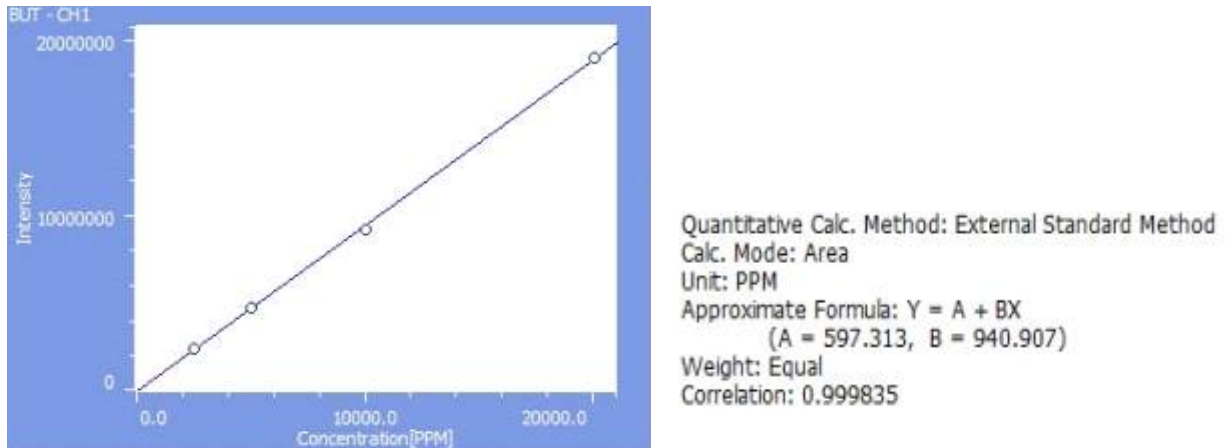
No.	Treatment	시료명	Time	water content (%)
1	control, 은행외종피	D-con	-	70.25
2	열풍건조, 60℃	D-1	10시간	50.95
3	열풍건조, 70℃	D-2	8시간	46.44
4	열풍건조, 80℃	D-3	6시간	46.64
5	열풍건조, 90℃	D-4	5시간	49.34
6	열풍건조, 100℃	D-5	4시간	51.32
7	햇빛건조, 28±2℃	D-6	2일	50.83
8	송풍건조, 25±2℃	D-7	1일	51.41
9	그늘건조, 25±2℃	D-8	3일	51.47
10	동결건조, -70~-80℃	D-9	2일	3.21

		
열풍건조, 60℃	열풍건조, 70℃	열풍건조, 80℃
		
열풍건조, 90℃	열풍건조, 100℃	햇빛건조, 28±2℃
		
송풍건조, 25±2℃	그늘건조, 25±2℃	동결건조, -70~-80℃

(그림 13) 건조조건별 은행외종피의 건조 후 외관 및 색의 변화

(2) 건조 조건별 은행외종피의 혐오취 분석

위의 표 15와 같이 건조방법별 은행외종피의 혐오취 분석을 실시하였다. 혐오취 분석의 표준물질은 butyric acid와 capnoic acid를 사용하였고, butyric acid만 시료에서 검출되었다. 표준물질을 희석하여 분석한 결과값을 이용하여 표준검량곡선을 작성하였다(그림 14).



(그림 14) butyric acid의 표준검량곡선

위의 표준 검량 곡선에 대입하여 시료별 butyric acid의 함량변화를 확인하였다(표 15). 건조 조건을 달리한 시료의 경우, 모든 조건에서 control인 은행외종피보다 낮은 butyric acid 함량을 확인하였다. 그 중 가장 감소한 시료는 은행외종피를 동결건조 한 것으로 control에 비해 약 3.4배 정도 감소한 수치를 보였다. 하지만 동결건조의 경우 많은 비용과 시간이 소요되기 때문에 경제적인 면을 고려하였을 때, 약 2배정도 감소한 80℃에서 6시간 동안 열풍건조하는 조건을 향후 연구에 활용하는 것이 좋을 것으로 사료되었다.

(표 15) 건조방법에 따른 butyric acid의 함량변화

No.	Sample name	Quantity (ppm)	retention time (min)
1	control, 은행외종피	43,687	18.42
2	열풍건조, 60℃/10시간	33,458	18.42
3	열풍건조, 70℃/8시간	31,670	18.48
4	열풍건조, 80℃/6시간	27,596	18.46
5	열풍건조, 90℃/5시간	30,665	18.43
6	열풍건조, 100℃/4시간	35,305	18.42
7	햇빛건조, 28±2℃/2일	41,859	18.40
8	송풍건조, 25±2℃/1일	37,569	18.44
9	그늘건조, 25±2℃/3일	37,357	18.44
10	동결건조, -70~-80℃/2일	15,724	18.44

다. 고온습윤처리에 의한 은행외종피의 혐오취 저감화

(1) 습열처리 조건에 따른 은행외종피의 혐오취의 분석결과

은행외종피의 혐오취를 저감시키기 위하여 은행외종피를 100℃에서 6가지 조건에서 찌는 작업을 실시했다. 시료에 따른 처리시간을 다음의 표 16에 나타냈다.

(표 16) 시료에 따른 습열처리 시간

No.	시료명	시간
1	S-control	-
2	S-1	30 min
3	S-2	1 h
4	S-3	2 h
5	S-4	3 h
6	S-5	4 h
7	S-6	10 h

습열처리에 따른 butyric acid의 함량변화는 다음과 같다. 습열처리를 통하여 혐오취를 저감화하는 방안을 마련하고자 하였다. Control인 찌지 않은 은행외종피와 비교하였을 때, 전체 시료가 감소한 결과를 보였으나, 실제 찌는 시간이 길어질수록 butyric acid가 감소하는 경향을 나타냈다. 10시간 동안 찌는 경우 약 3배 정도의 감소율을 나타냈다. 따라서 찌는 공정의 경우 시간이 경과함에 따라 혐오취원을 감소시키기는 하나, 찌는 공정의 시간이 길어지게 되어 경제적인 손실을 초래할 것으로 사료되어 적절한 시간 선택이 요구된다.

(표 17) 습열처리에 따른 butyric acid의 함량변화

No.	Sample name	시간	Quantity (ppm)	retention time (min)
1	S-control	-	45,285	18.48
2	S-1	30 min	21,832	18.35
3	S-2	1 h	19,915	18.42
4	S-3	2 h	19,142	18.48
5	S-4	3 h	17,670	18.47
6	S-5	4 h	15,326	18.46
7	S-6	10 h	13,943	18.35

(2) 열수처리 조건에 따른 은행외종피의 혐오취의 분석결과

은행외종피의 열수처리는 크게 두 가지 그룹으로 나누어서 진행하였다. 첫 번째 그룹은 은행외종피와 물의 혼합비율을 1:2로 고정하고 끓이는 시간을 달리하여 처리하였고, 그 시료명과 처리시간을 아래의 표 18에 나타내었다.

(표 18) 시료에 따른 열수처리시간

No.	Sample name	time	은행:물(w/v)
1	W-control	-	1:2
2	W-1	30 min	1:2
3	W-2	1 h	1:2
4	W-3	2 h	1:2
5	W-4	3 h	1:2
6	W-5	4 h	1:2
7	W-6	10 h	1:2

열수처리 시간에 따른 butyric acid의 변화는 표 19에 나타내었다. 열수처리는 습열처리와 달리 시간이 길어질수록 butyric acid의 양이 줄어들음을 확인할 수 있었다. 처리 시간 10시간까지 시간이 늘어나면 늘어날수록 감소하는 양상을 나타냈다. 특히 10시간 동안 열수처리를 한 경우, control의 butyric acid 양인 50,571 ppm에서 1,853 ppm으로 약 27배 감소하였다.

(표 19) 열수처리 시간별 butyric acid의 함량변화

No.	Sample name	time	Quantity (ppm)	retention time (min)
1	W-control	-	50,571	18.30
2	W-1	30 min	9,502	18.30
3	W-2	1 h	8,195	18.31
4	W-3	2 h	7,714	18.30
5	W-4	3 h	7,130	18.31
6	W-5	4 h	6,150	18.32
7	W-6	10 h	1,853	18.31

두 번째 열수처리 그룹은 처리시간을 1시간으로 고정하고 은행외종피에 물을 첨가하는 비율을 달리하여 열수공정을 실시하였다. 은행외종피와 물의 혼합비율(w/v)은 표 20에 나타내었다.

(표 20) 시료의 열수처리 시 은행외종피와 물의 혼합비율

No.	시료명	시간	은행:물(w/v)
1	W2-control	-	-
2	W2-1	1h	1:0
3	W2-2	1h	1:1
4	W2-3	1h	1:2
5	W2-4	1h	1:3
6	W2-5	1h	1:4
7	W2-6	1h	1:10

은행외종피와 물의 혼합비를 조절한 시료의 butyric acid 함량 변화를 표 21에 나타내었다. 열수처리를 하지 않은 은행외종피의 butyric acid 함량인 30,571 ppm과 비교하였을 때, 전혀 물을 첨가하지 않고 처리한 시료는 11,032 ppm로 2배 이상 감소하였다. 하지만 이 수치는 물의 비율을 더 늘린 시료보다는 낮은 감소율을 나타냈다. 은행외종피 시료에 물의 비율을 높여서 혼합할수록 더 많은 양의 butyric acid의 감소함을 알 수 있었고, 10배의 물을 첨가하여 열수처리를 할 경우 그 수치가 앞의 표 19에 나타난 10시간동안 열수처리를 하는 공정과 비슷한 감소율을 보였다. 그 함량변화는 표 21에 나타냈다.

(표 21) 열수처리 시 은행외종피와 물의 혼합비율에 따른 butyric acid 함량변화

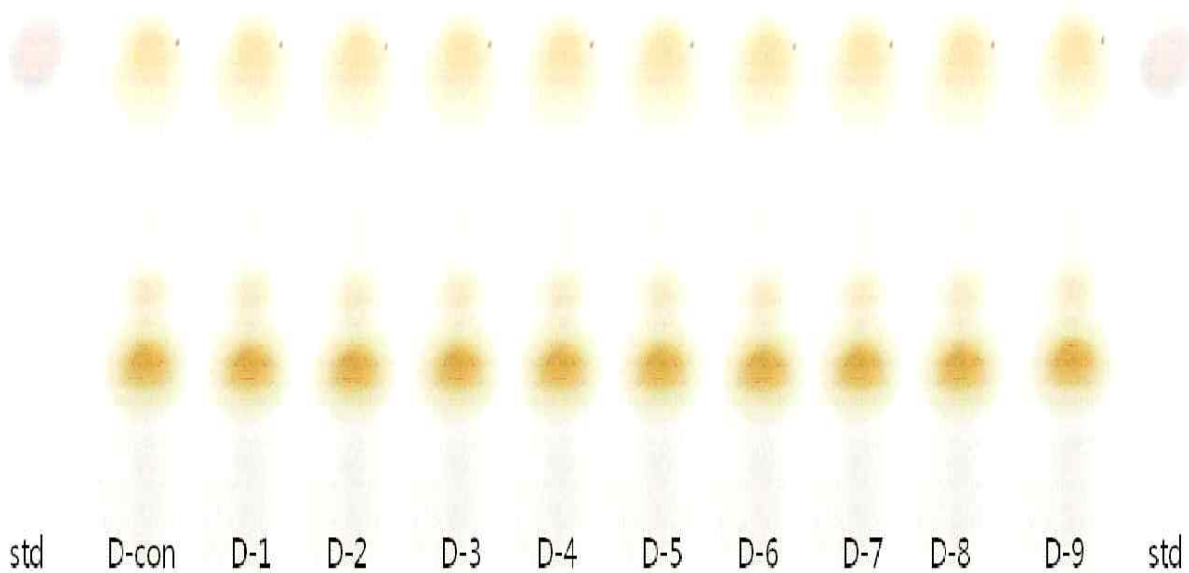
No.	시료명	은행:물(w/v)	Quantity (ppm)	retention time (min)
1	W2-control	-	50,571	18.30
2	W2-1	1:0	18,249	18.31
3	W2-2	1:1	12,248	18.32
4	W2-3	1:2	8,006	18.32
5	W2-4	1:3	5,110	18.32
6	W2-5	1:4	3,980	18.32
7	W2-6	1:10	2,184	18.31

라. 은행외종피의 알레르기원 분석

(1) 각 처리공정별 은행외종피의 우루시올류 TLC분석 결과

(가) 건조 조건별 은행외종피의 우루시올류 TLC분석

건조방법을 달리한 은행외종피시료에서 urushiol을 추출하여 TLC를 통하여 정성확인을 실시하였다(그림 15).

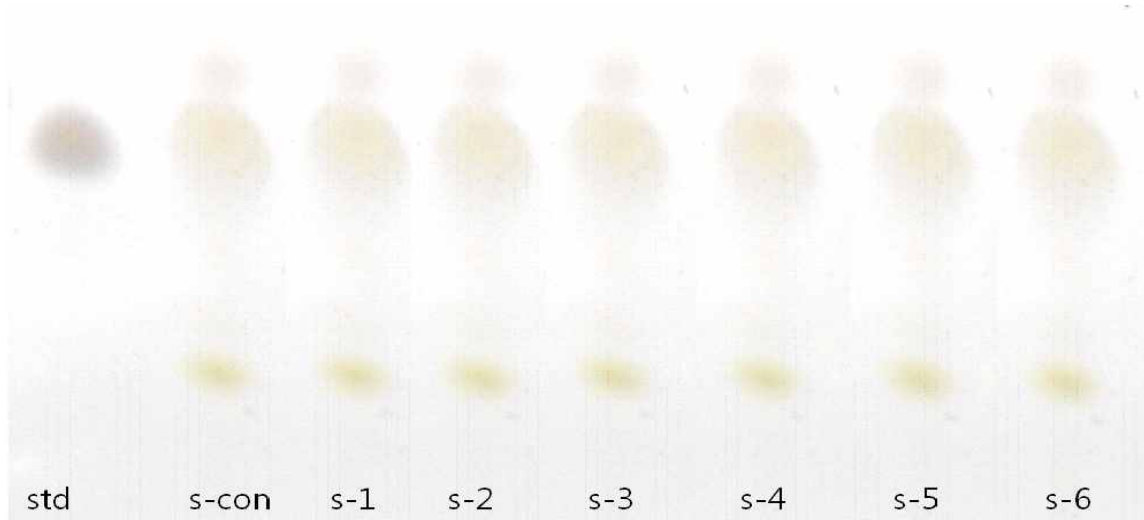


(그림 15) 건조방법을 달리한 은행외종피 시료의 TLC를 통한 우루시올의 분석

시료의 이름은 표 14에 제시된 바와 같다. Control을 포함한 10의 샘플에서 모두 우루시올류가 분석되었다. D-1에 비하여 D-5의 spot 사이즈는 비슷하나 색이 옅어졌음을 알 수 있었다. 이는 열풍건조 시 건조 온도가 증가할수록 우루시올의 함량이 현저히 줄어드는 것을 아 니었지만 미미하게 줄어들었음을 알 수 있었다. 그리고 Urushiol의 Rf치는 0.79였고, 9개의 spot 모두 비슷한 수치였으며, 선행연구와 유사한 Urushiol의 Rf치(0.82)를 구할 수 있었다. 하지만 TLC의 특성상 정성평가는 가능하나 구체적인 정량평가가 어려움으로 향후 HPLC 실험을 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

(나) 습열처리 조건별 은행외종피의 우루시올류 TLC 분석

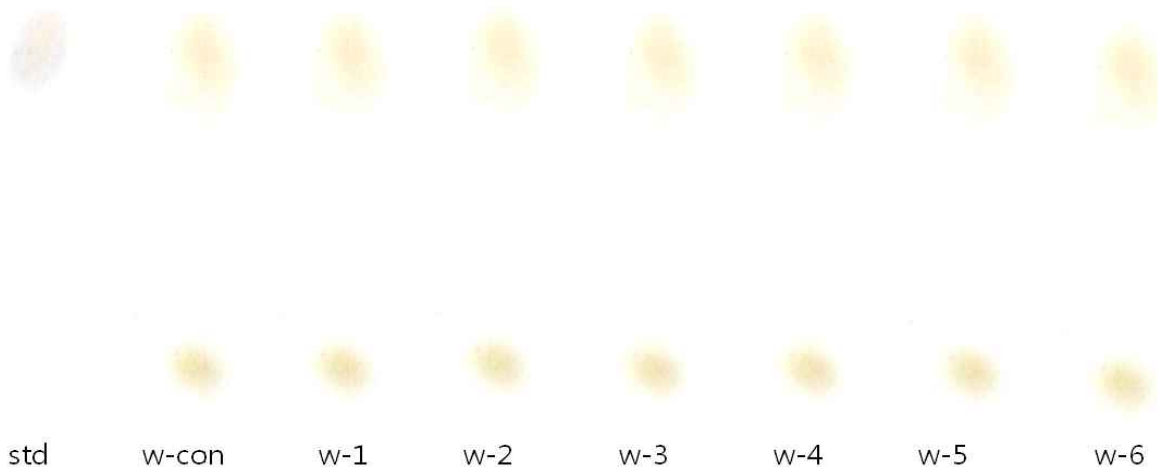
습열처리시간에 따른 은행외종피의 우루시올류 분석은 다음 그림 16과 같다. 그림에 표시한 시료의 이름은 표 16에 제시하였다.



(그림 16) 습열처리를 달리한 은행외종피 시료의 TLC를 통한 우루시올의 분석

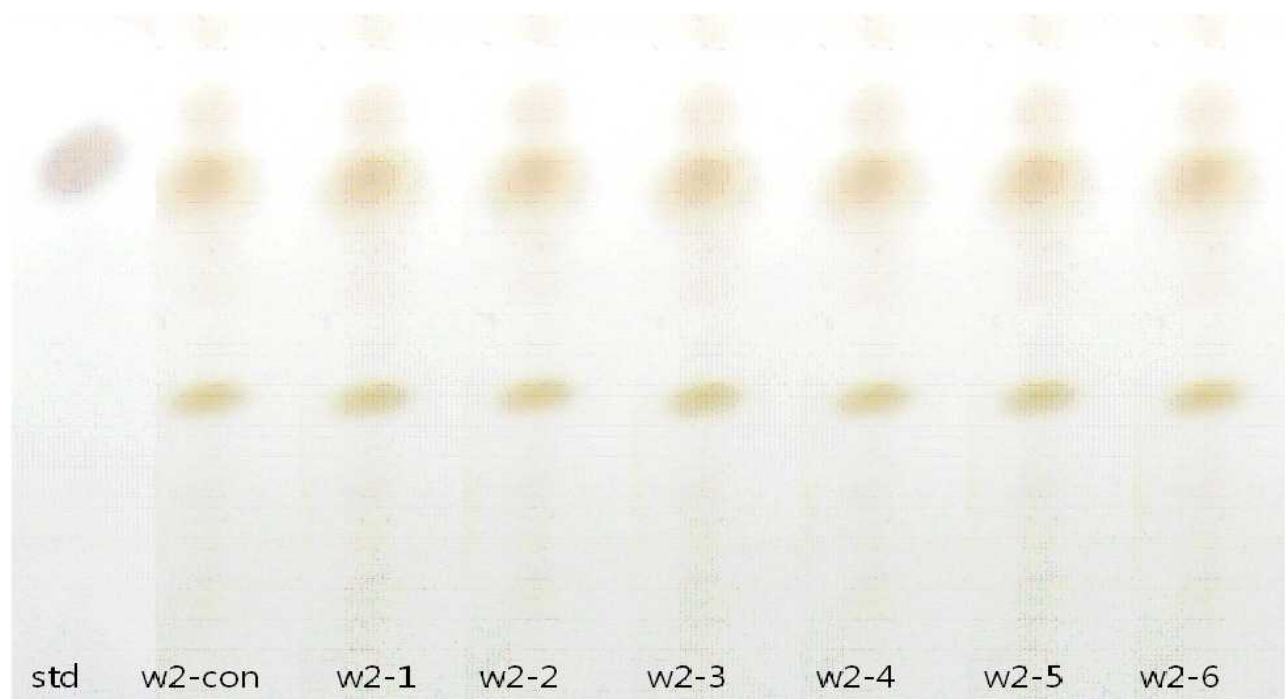
Urushiol의 Rf치는 0.84였고, 6개의 spot 모두 비슷한 수치였으며, 표준물질의 Rf가 선행연구와 유사한 0.82를 구할 수 있었다. Control을 포함한 6개의 샘플에서 모두 우루시올류가 분석되었다. 육안으로 그 spot의 크기나 색 차이를 확인하기 어려울 정도로 비슷한 크기와 색을 나타내어 결과를 비교하기 힘들었다.

(다) 열수처리 조건별 은행외종피의 우루시올류 TLC 분석



(그림 17) 열수처리 시간을 달리한 은행외종피 시료의 TLC를 통한 우루시올의 분석

은행외종피와 물의 혼합비율을 1:2로 고정하고 끓이는 시간을 달리하여 처리한 시료의 이름은 표 20과 같다. 본 실험에서 control과 7개의 샘플에서 모두 우루시올류가 분석되었다(그림 17). Spot의 사이즈나 색을 봤을 때 w-1에서 w-6까지의 변화가 현저하게 보이지는 않았지만 육안으로 봤을 때 색이 열리는 것을 알 수 있었고, 이는 끓이는 시간이 길어질수록 우루시올의 함량이 줄어드는 것을 알 수 있었다. 또한 Urushiol의 Rf치는 0.77이었고, 6개의 spot 모두 비슷한 수치였으며, 선행연구와 유사한 Urushiol의 Rf치(0.82)를 구할 수 있었다.



(그림 17) 열수처리시 물의 비율을 은행외종피 시료의 TLC를 통한 우루시올의 분석

처리시간을 1시간으로 고정하고 은행외종피에 물을 첨가하는 비율을 달리하여 열수공정을 실시한 시료이며 시료의 명은 표 20, 21과 같다.

본 실험에서 control과 포함한 7개의 샘플에서 모두 우루시올류가 분석되었다(그림 17). Control을 포함한 6개의 샘플에서 모두 우루시올이 분석되었다. 육안으로 그 spot의 크기나 색 차이를 확인하기 어려운 정도로 비슷한 크기와 색을 나타내어 결과를 비교하기 힘들었다. 또한 Urushiol의 Rf치는 0.79이었고, 7개의 spot 모두 비슷한 수치였으며, 선행연구와 유사한 Urushiol의 Rf치(0.82)를 구할 수 있었다.

(2) 각 처리공정별 은행외종피의 우루시올류 HPLC분석 결과

(가) 건조방법별 우루시올류의 함량변화

여러 가지 건조방법별로 처리한 은행외종피의 우루시올을 추출하여 함량변화를 측정하였다. 우루시올의 종류에 따라 함량변화를 각각 측정하였다. 건조방법별 우루시올류의 함량변화는 표 13과 같다. 대조구의 (15:1)-우루시올의 함량은 3,147 ppm, (15:2)-우루시올의 함량은 1,308 ppm, (15:3)-우루시올의 함량은 15,184 ppm, 총 우루시올류 함량은 19,639 ppm 이었다. 동결건조처리를 한 시료를 제외하고 대부분의 처리조건에서 대조구와 비슷한 함량을 나타내었다. 동결건조한 시료의 경우 (15:1)-우루시올의 함량은 1,128 ppm로 대조구에 비하여 약 2.7배 감소하였고, (15:2)-우루시올의 함량은 1,293 ppm로 비슷한 수준을 유지하였다. (15:3)-우루시올의 함량은 8,477 ppm로 약 1.8배 감소하였고 총 우루시올류 함량은 10,898 ppm으로 약 1.8배 감소하였다.

(표 22) 건조방법별 우루시올류의 함량변화

No.	시료명	우루시올류 함량 (ppm)			
		15:1	15:2	15:3	total
1	control, 은행 외종피	3,147	1,308	15,184	19,639
2	열풍건조, 60℃/10시간	3,010	1,288	12,498	16,796
3	열풍건조, 70℃/8시간	3,035	1,229	12,603	16,867
4	열풍건조, 80℃/6시간	2,901	1,276	12,866	17,043
5	열풍건조, 90℃/5시간	2,943	1,270	12,552	16,765
6	열풍건조, 100℃/4시간	2,923	1,288	12,514	16,725
7	햇빛건조, 28±2℃/2일	3,235	1,209	12,332	16,776
8	송풍건조, 25±2℃/1일	3,138	1,279	12,761	17,178
9	그늘건조, 25±2℃/3일	2,912	1,269	12,929	17,110
10	동결건조, -70 ~ -80℃/2일	1,128	1,293	8,477	10,898

(나) 고온습윤처리를 이용한 우루시올류의 함량변화

은행외종피의 혐오취 및 알레르기원을 저감시키기 위하여 은행외종피를 100℃에서 6가지 조건에서 찌는 작업을 실시했다. 그에 따른 우루시올류의 함량변화는 표 14와 같다. 대조구의 (15:1)-우루시올의 함량은 3,147 ppm, (15:2)-우루시올의 함량은 1,308 ppm, (15:3)-우루시올의 함량은 15,184 ppm, 총 우루시올류 함량은 19,639 ppm 이었다. (15:1)-우루시올의 함량과 (15:2)-우루시올의 함량 변화는 처리시간을 달리하여도 크게 차이가 나지 않았다. (15:3)-우루시올의 경우 30분간 찌는 공정을 처리하였을 때 약 2.4배로 우루시올의 양이 감소하였고, 처리시간을 늘여도 거의 비슷한 수치를 나타내었다. 가장 많이 우루시올의 양이 감소한 시료는 10시간동안 은행외종피를 찌는 공정인 'S-6' 시료이며 총 우루시올류의 함량은 처리 전 19,639 ppm에서 9,056 ppm으로 약 2 배 감소하였다.

(표 23) 습윤방법별 우루시올류의 함량변화

No.	시료명	시간	urushiols quantity (ppm)			
			15:1	15:2	15:3	total
1	S-control	-	3,147	1,308	15,184	19,639

2	S-1	30 min	3,121	1,284	6,235	10,640
3	S-2	1 h	3,016	1,288	5,833	10,137
4	S-3	2 h	3,101	1,266	5,838	10,205
5	S-4	3 h	3,046	1,289	5,260	10,495
6	S-5	4 h	2,967	1,276	5,931	10,174
7	S-6	10 h	2,224	1,305	5,527	9,056

(다) 열수처리방법 이용한 우루시올류의 함량변화

은행외종피의 열수처리는 크게 두가지 그룹으로 나누어서 진행하였다. 첫 번째 그룹은 은행외종피와 물의 혼합비율을 1:2로 고정하고 끓이는 시간을 달리하여 처리하였고, 두 번째 열수처리 그룹은 처리 시간을 1시간으로 고정하고 은행외종피에 물을 첨가하는 비율을 달리하여 열수공정을 실시하였다. 열수처리 후 각 시료별 우루시올류의 함량변화는 표 15에 나타내었다. 대조구의 (15:1)-우루시올의 함량은 1,549 ppm, (15:2)-우루시올의 함량은 805 ppm, (15:3)-우루시올의 함량은 5,527 ppm, 총 우루시올류 함량은 7,881 ppm 이었다. 열수처리를 한 시료의 경우 우루시올의 함량변화가 거의 나타나지 않았다. 가장 많이 우루시올의 양이 감소한 시료는 2배의 물을 첨가하고 10시간 동안 끓이는 공정인 'W-6'시료였다. 그러나 대조구와 비교하였을 때 비슷한 수치였다.

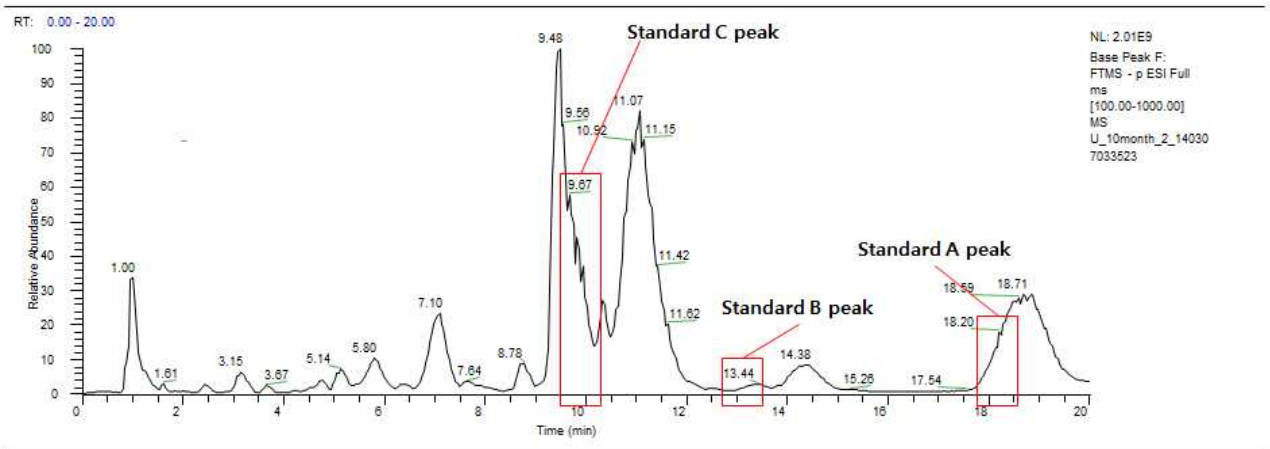
(표 24) 열수처리방법별 우루시올류의 함량변화

No.	시료명	시간 (min)	은행:물 (w/v)	urushiols quantity (ppm)			
				15:1	15:2	15:3	total
1	W-control	-	1:2	1,549	805	5,527	7,881
2	W-1	30 min	1:2	1,559	818	5,012	7,389
3	W-2	1 h	1:2	1,596	735	5,004	7,335
4	W-3	2 h	1:2	1,537	737	5,579	7,853
5	W-4	3 h	1:2	1,448	753	5,782	7,983
6	W-5	4 h	1:2	1,435	799	4,860	7,094
7	W-6	10 h	1:2	1,310	760	5,012	7,082
8	W2-1	1 h	1:0	1,545	852	5,346	7,743
9	W2-2	1 h	1:1	1,354	871	4,964	7,189
10	W2-3	1 h	1:2	1,329	783	5,134	7,246
11	W2-4	1 h	1:3	1,376	774	5,079	7,229
12	W2-5	1 h	1:4	1,254	738	5,312	7,304
13	W2-6	1 h	1:10	1,279	717	5,301	7,297

(3) 은행외종피의 우루시올류 LC/MSMS분석 결과

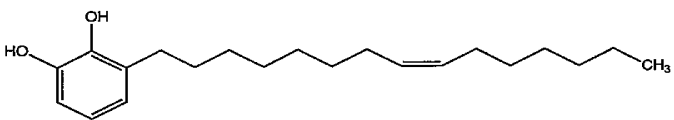
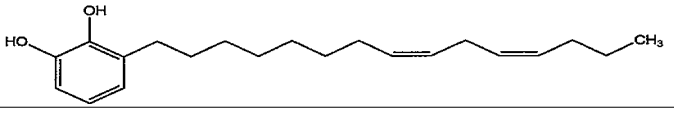
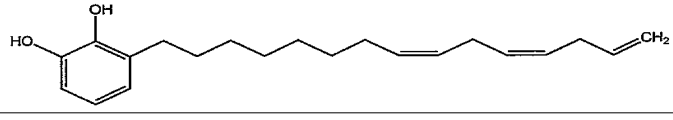
(가) 우루시올류의 LC분석결과

은행외종피의 우루시올류 추출물을 고분해능 액체크로마토그래피로 분석한 결과이다(그림 18). 분석에 사용한 표준품(표 4), 3가지 우루시올류가 분석시료의 peak와 일치하는 부분이 있기는 하나, 보다 많은 양의 알려지지 않은 peak로 인하여 전체적인 우루시올류를 정량할 수 없었다(특히, RT 9.48과 11.07의 큰 peak와 표준품의 peak가 일치하지 않음). 아래의 표 25는 10-11월에 수확한 은행외종피 우루시올류 추출물을 분석한 크로마토그램이다. 붉은색으로 표시된 peak가 구입한 표준품과 일치하는 부분으로, 세가지 피크를 제외하고 다른 주요한 피크가 존재하기 때문에, 세가지 우루시올류가 감소하는 것을 확인하는 것으로 우루시올류 전체의 함량이 줄어들었다고 볼 수 없다. 따라서 보다 정밀한 LC/MS 분석을 추가적으로 실시하였다.



(그림 18)원재료 은행외종피 우루시올 추출물의 크로마토그램

(표 25)은행 유래 우루시올 표준품

Standard A: urushiol (15:1)		
Molecular formula	$C_{21}H_{34}O_2$	
Molecular weight	318.50 g/mol	
Standard B: urushiol (15:2)		
Molecular formula	$C_{21}H_{32}O_2$	
Molecular weight	316.49 g/mol	
Standard C: urushiol (15:3)		
Molecular formula	$C_{21}H_{30}O_2$	
Molecular weight	314.47 g/mol	

(나) 우루시올류의 LC/MSMS 분석결과

본 연구에서 사용한 방식인 전기분무이온화법(ESI)은 탈착 이온화법 중 하나로 휘발성이 없거나 불안정한 시료에도 사용할 수 있다. 따라서 1984년 처음 소개된 이래로 분자량 100,000 Da 이상의 분자량을 갖는 폴리펩티드, 단백질, 올리고뉴클레오티드 등과 같은 생화학 물질을 분석하는 가장 중요한 방법 중의 하나가 되었다. 또한 이 방법으로 무기화학 종류나 합성 고분자 물질의 특성을 알아내는데 응용할 수도 있다. 따라서 우루시올류와 같이 다양하고 복잡한 폐놀성 물질을 분석하기 적합하다고 사료되었다.

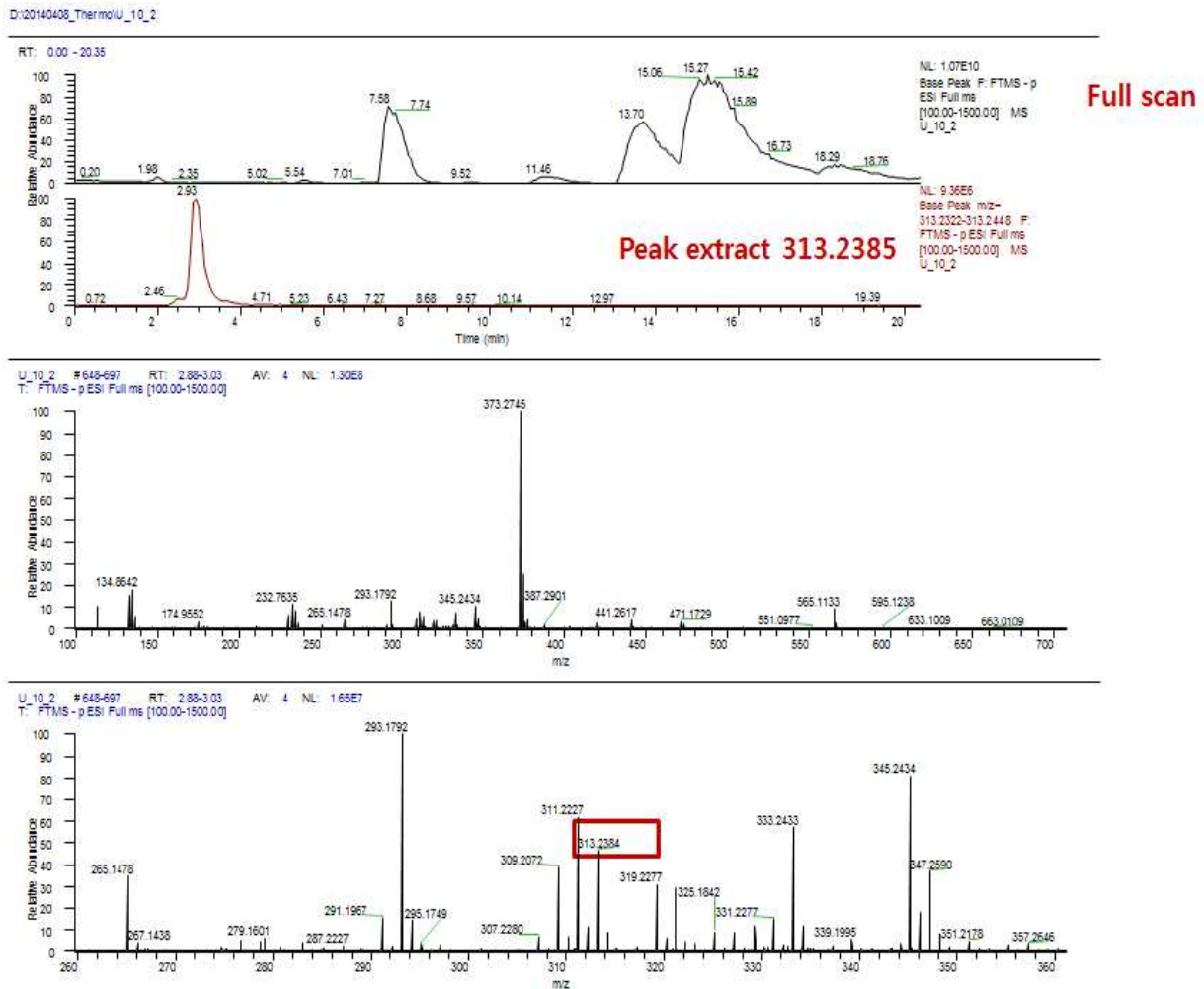
LC/MS 분석은 시료에서 분자량범위와 LC조건 등으로 물질을 분리하여 측정된 분자량 값으로 이 물질이 어느 물질인지 추정하는 방법이다. 따라서 시료에서 LC/MS실험을 하여 일정수준(100,000 카운트 이상)의 분자량 피크를 추출하여 기계적으로 분자식을 유추하였다. 특히, high resolution LC 실험으로는 정확한 분자량 값을 얻을 수 있기 때문에 C, H, O 등의 원소비율에 의한 예상 분자식을 유추할 수 있었다. 이러한 방식으로 예측되는 분자량에 대한 MSMS 실험으로 그 물질의 fragment를 얻어 어떤 moiety를 가지고 있는지 추정하여 분자구조를 예측하는 할 수 있고, 이러한 결과를 바탕으로 우루시올 분자식을 계산하였다. 그 계산식은 다음의 표 26과 같다.

(표 26) 은행외종피의 우루시올류 분자식 계산

moiety	#C in R	#DoubleB	# C	# H	# O	MW	H adduct positive ion	negative ion
C ₆ O ₂ H ₅	15	2	21	32	2	316.2397	317.2475	315.2319
	15	3	21	30	2	314.224	315.2319	313.2162
	16	0	22	38	2	334.2866	335.2945	333.2788
	17	1	23	38	2	346.2866	347.2945	345.2788
	17	2	23	36	2	344.271	345.2788	343.2632
	17	3	23	34	2	342.2553	343.2632	314.2475
	18	0	24	42	2	362.3179	363.3258	361.3101
	18	1	24	40	2	360.3023	361.3101	359.2945
	19	3	25	38	2	370.2866	371.2945	369.2788
	20	1	26	44	2	388.3336	389.3414	387.3258
	20	2	26	42	2	386.3179	387.3258	385.3101

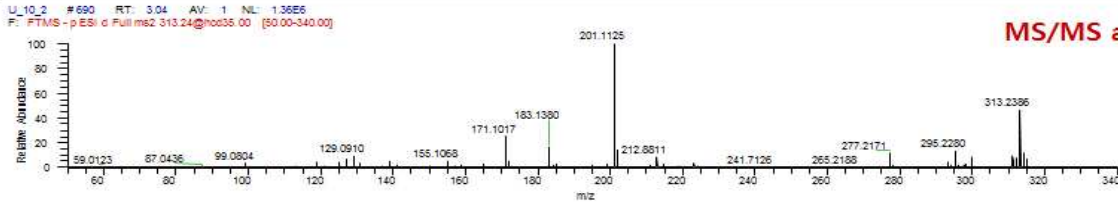
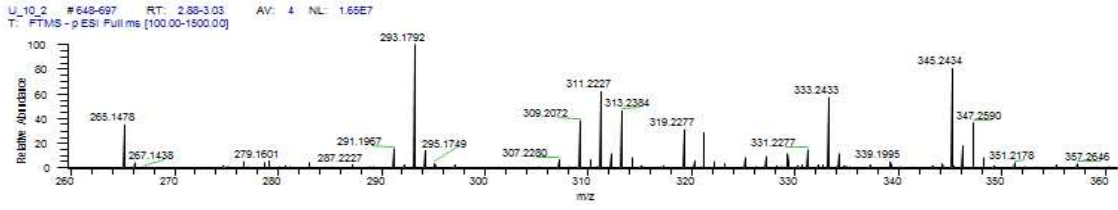
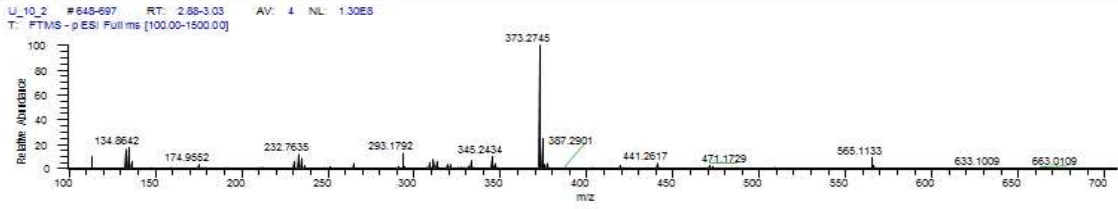
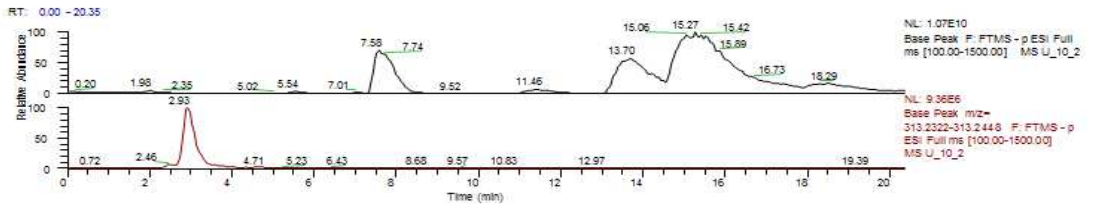
이렇게 얻어진 분자량 중에서 우루시올류 분자량과 유사한 것을 찾았고, 다시 LC/MS에서 peak extraction을 하여 이 분자량이 갖을 수 있는 예상 분자식을 계산, 이 분자량에 대한 MSMS 결과를 그림 19에 나타내었다.

LC/MS분석을 통하여 8개의 우루시올류와 유사한 피크를 확인하였다. 하지만, 여전히 전체적인 우루시올류 피크를 확인할 수 있는 레퍼런스가 현재 존재하지 않았으며, LC/MS로 확인한 피크역시 우루시올류로 추정할 뿐, 크로마토그램상에 나타나는 피크전체의 함량을 계산하는데 무리가있으며, 각 피크에 대한 명확한 정의 또한 어려웠다. 특히, 현재 옷의 우루시올류에 대한 연구보고는 다수 존재하지만, 은행자체의 우루시올류에 대한 연구는 전무한 실정으로 좀 더 명확한 은행외종피의 알레르기원 확인을 위하여 최종 생산물인 은행외종피 버섯발효물을 이용한 동물피부염 테스트를 실시하였다.



(그림 19) 분자량 313.2385의 LC/MSMS 크로마토그램

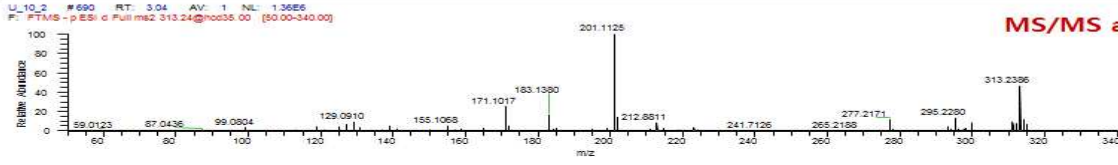
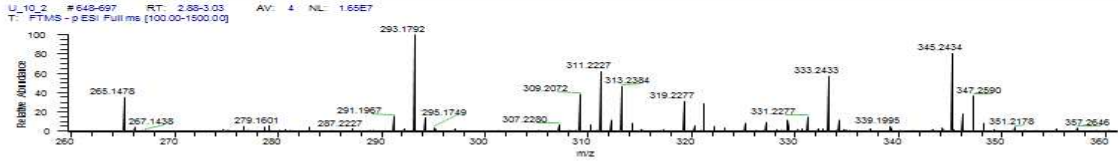
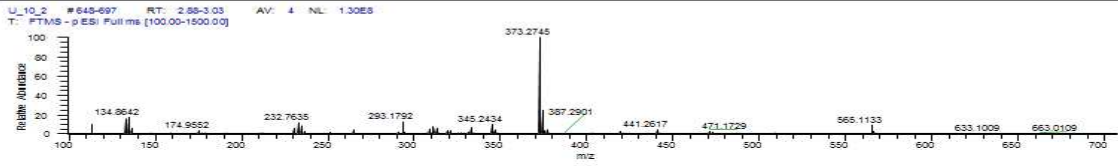
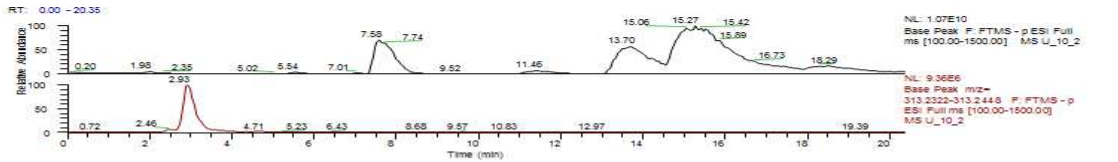
D:\20140408_Thermo\U_10_2



MS/MS at 313.24

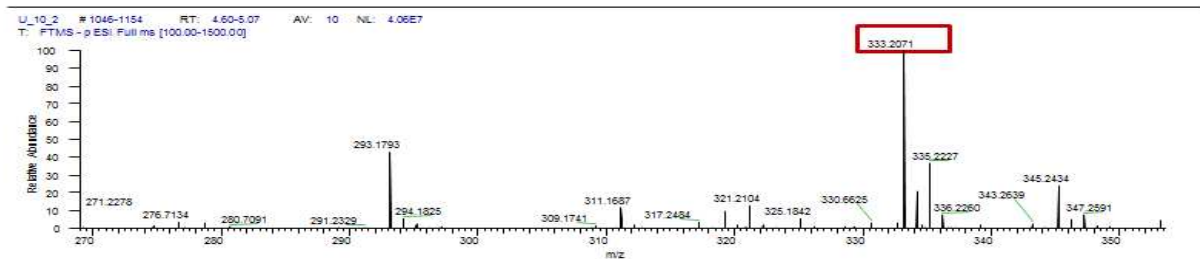
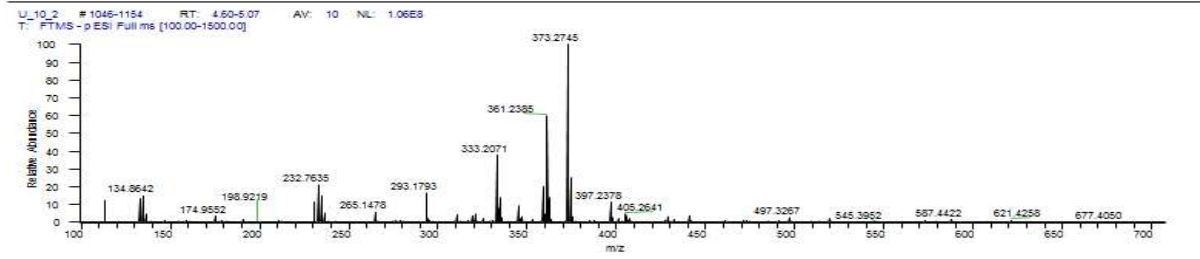
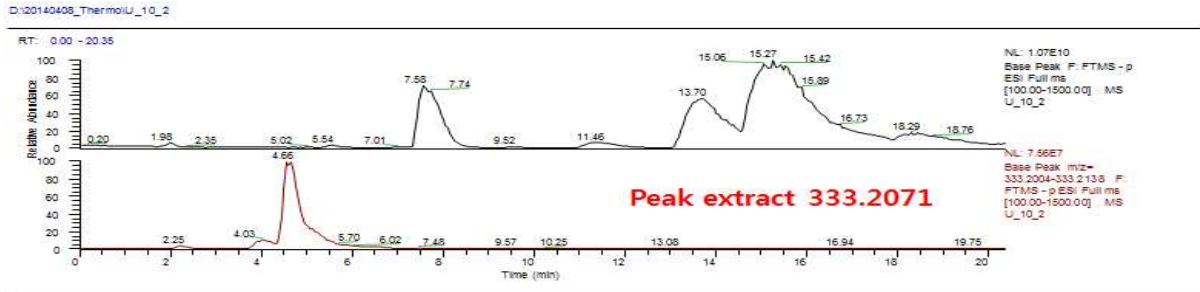
(그림 19) 분자량 313.24의 LC/MSMS 크로마토그램

D:\20140408_Thermo\U_10_2

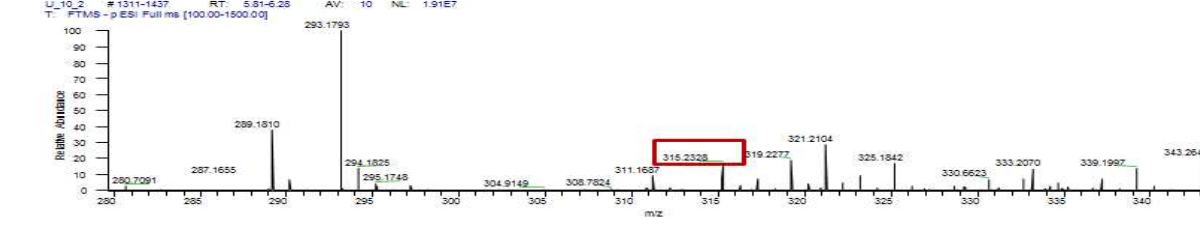
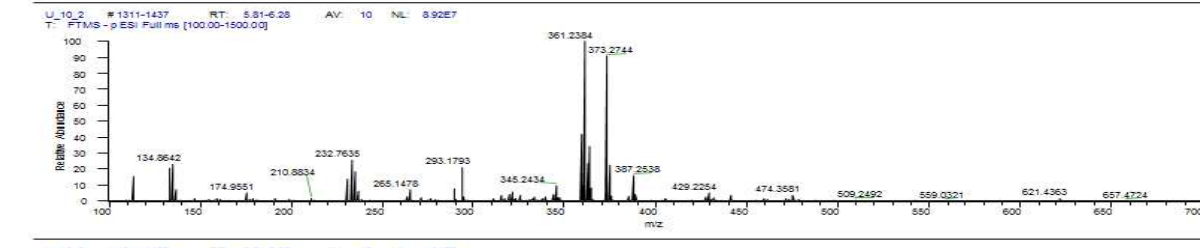
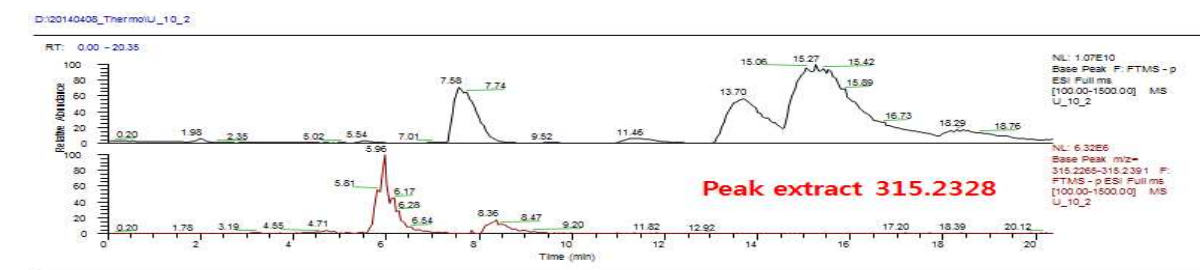


MS/MS at 313.24

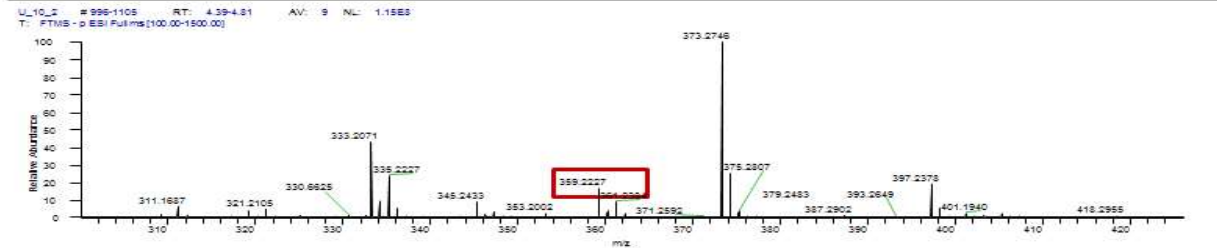
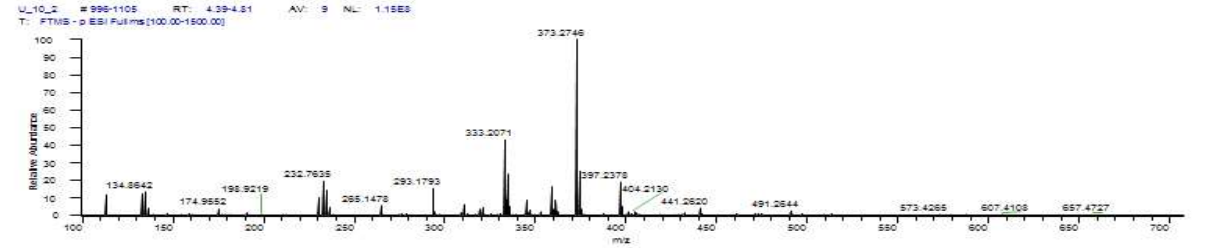
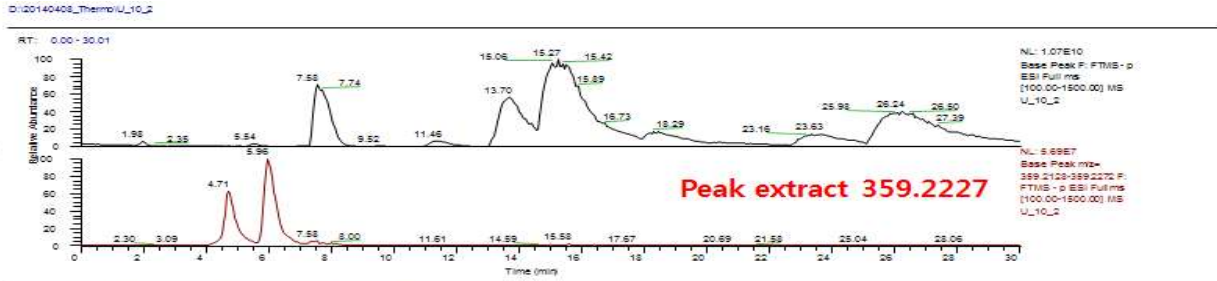
(그림 20) 분자량 313.24의 LC/MSMS 크로마토그램



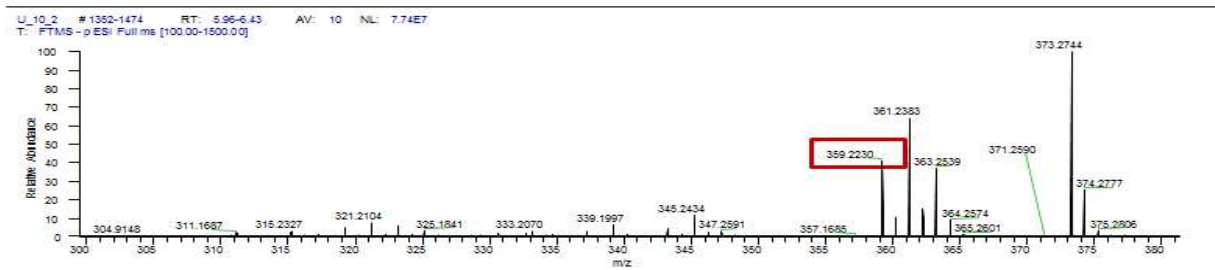
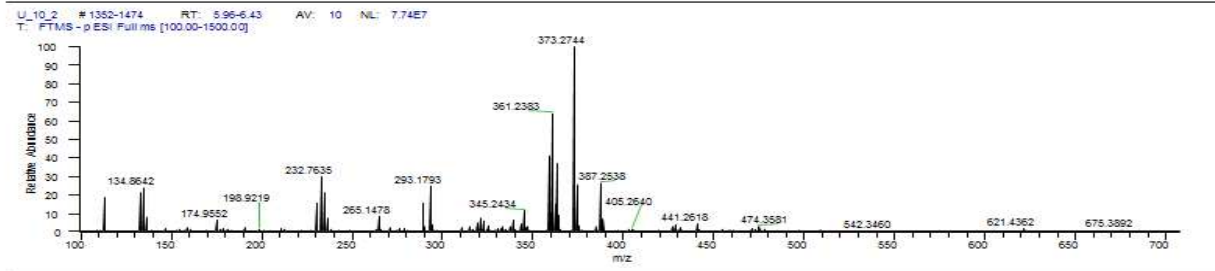
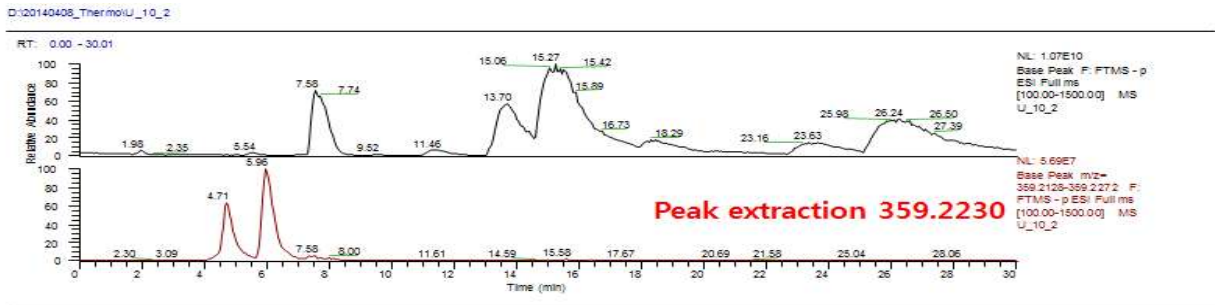
(그림 21) 분자량 333.2071의 LC/MSMS 크로마토그램



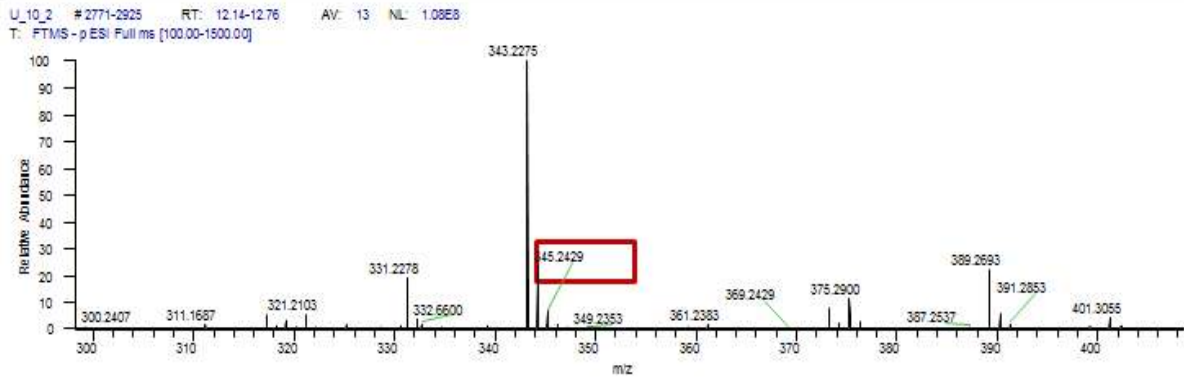
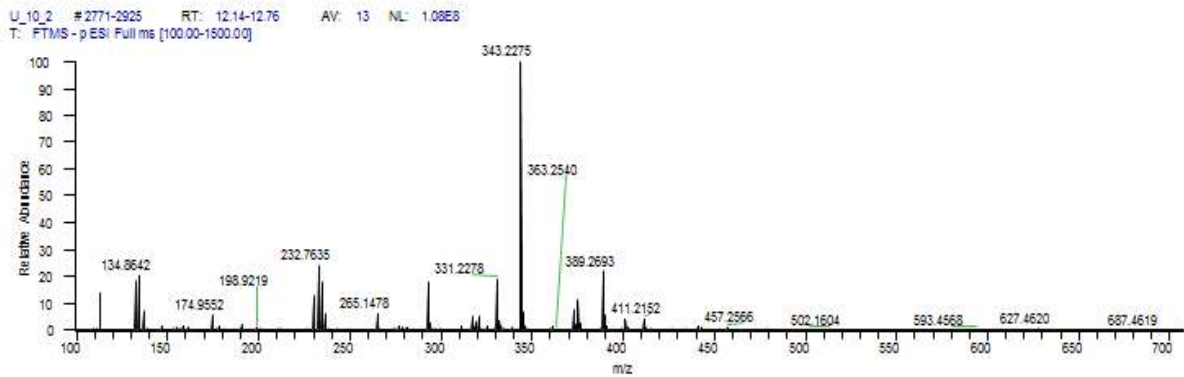
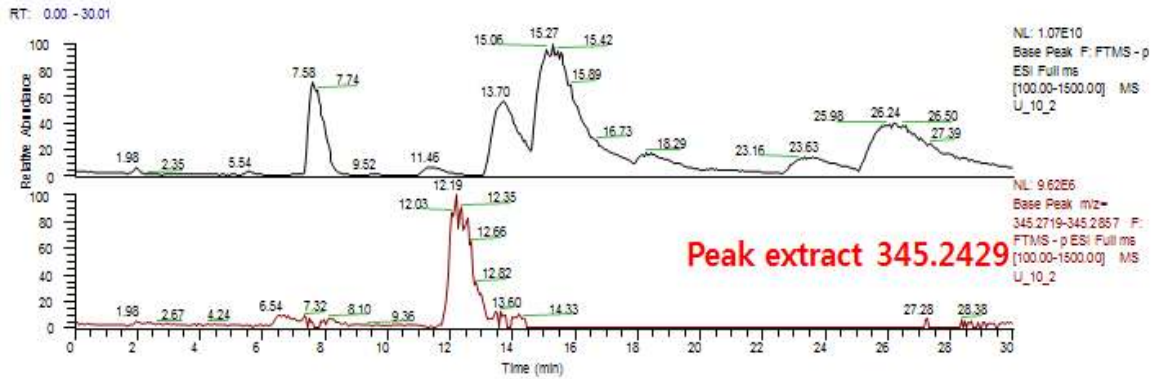
(그림 22) 분자량 315.2328의 LC/MSMS 크로마토그램



(그림 23) 분자량 359.2227의 LC/MSMS 크로마토그램



(그림 24) 분자량 359.2230의 LC/MSMS 크로마토그램



(그림 25) 분자량 345.2429의 LC/MSMS 크로마토그램

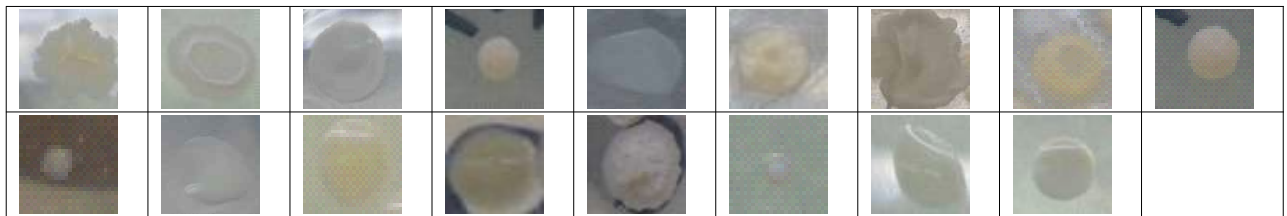
2. 미생물을 이용한 혐오취 및 알레르기 저감화 연구

가. 부티르산(butyric acid) 변환균주 선별

(1) 식품미생물자원(누룩, 김치, 된장)을 이용한 enrichment culture

Butyric acid 변환균주를 선별하고자 은행외종피에 식품미생물자원을 첨가하여 enrichment culture를 실시하였다. 누룩, 김치, 된장을 대상으로 enrichment culture를 실시하였고 총 17개의 균을 분리하였다. 균의 분리는 군집형태(colony)를 파악하여 서로 다른 colony를 분리하였고 그림 26에 나타냈고, 각 균총별로 개체균의 크기를 확인하여 표 27에 나타냈었다. 또한 분리한 균주 중 개체균의 크기가 큰 균주를 다시 선별하여 은행외종피 발효물제조에 이용하였다.

(그림 26) 은행외종피에서 분리한 미생물 18종의 군집형태(colony shape)



(표 27) 식품미생물자원 Enrichment culture에서 분리한 균주의 개체균 크기(population size)

No.	균주명	분리원	개체균크기 (log CFU/g)	No.	균주명	분리원	개체균크기 (log CFU/g)
1	GD-1	된장-TSA	<10 ⁶	10	GK-5	김치-PDA	<10 ⁴
2	GD-2	된장-PES	<10 ⁴	11	GK-6	김치-PDA	<10 ³
3	GD-3	된장-PES	<10 ⁶	12	GN-1	누룩-TSA	<10 ⁶
4	GD-4	된장-MRS	<10 ⁶	13	GN-2	누룩-TSA	<10 ⁶
5	GD-5	된장-PDA	<10 ⁶	14	GN-3	누룩-TSA	<10 ⁶
6	GK-1	김치-TSA	<10 ³	15	GN-4	누룩-MRS	<10 ⁵
7	GK-2	김치-TSA	<10 ³	16	GN-5	누룩-PDA	<10 ⁶
8	GK-3	김치-TSA	<10 ⁵	17	GN-6	누룩-PDA	<10 ⁶
9	GK-4	김치-MRS	<10 ⁵				

(2) butyrate 첨가배지를 이용한 butyric acid 저항균주 선별

Butyric acid에 저항성이 있는 균주를 탐색하여 은행외종피 발효에 이용할 균주를 선별하고자 MRS agar에 butyric acid를 첨가하여 배지를 제조하였다. butyric acid는 0.001, 0.01, 0.1, 1%의 네 가지로 나누어서 제조하였다. 0.001%의 butyric acid를 첨가한 MRS 배지는 control 배지인 MRS agar와 비교하였을 때 동일한 성장을 나타내었고, 1%의 butyric acid를 첨가한 배지의 경우 실험에 이용한 균주 모두 자라지 않았으므로(그림 27), 0.01, 0.1% 첨가한 MRS 배지에서 생육하는 균주를 선별하였다. 1차년도 연구결과 여섯 종의 젖산균을 선별하였고, 2차년도에 보다 많은 균주를 대상으로 추가실험을 실시하였다. 2차년도의 결과는 다음의 '6. 미생물을 이용한 혐오취 저감화' 부분에 기술하였다.

(그림 27) 1% butyric acid를 첨가한 MRS 배지에서의 젖산균의 생육



(그림 28) 1% butyric acid를 첨가한 MRS 배지에서의 젖산균의 생육



나. 은행외종피의 알레르기 저감화 균주선발

(1) 우루시올류 첨가 enrichment culture

은행외종피에 균 분리원으로 하고 TSA배지와 우루시올을 함유한 옷 진액을 첨가하여 enrichment culture 하였다. 배양한 후 균집(colony)형성에 따른 균주를 총 14개균을 선별하였다. 선별한 균주의 colony 형태는 그림 29에 나타내었고, 그 균주의 분리원 및 개체군의 크기는 표 28에 나타내었다.

선별한 균주는 앞서 연구한 식품미생물자원과 함께 배양하여 선별해 낸 은행외종피 유래 균주와 같은 방식으로 발효에 이용할 예정이며, 향후 혐오취원과 우루시올류를 저감화할 수 있는 균주를 선별하는 연구에 이용하고자 한다.

(그림 29) 은행외종피에 옷을 첨가하여 enrichment culture 한 후 분리한 14 균주



(표 28) 옷진액 Enrichment culture에서 분리한 균주의 개체군 크기(population size)

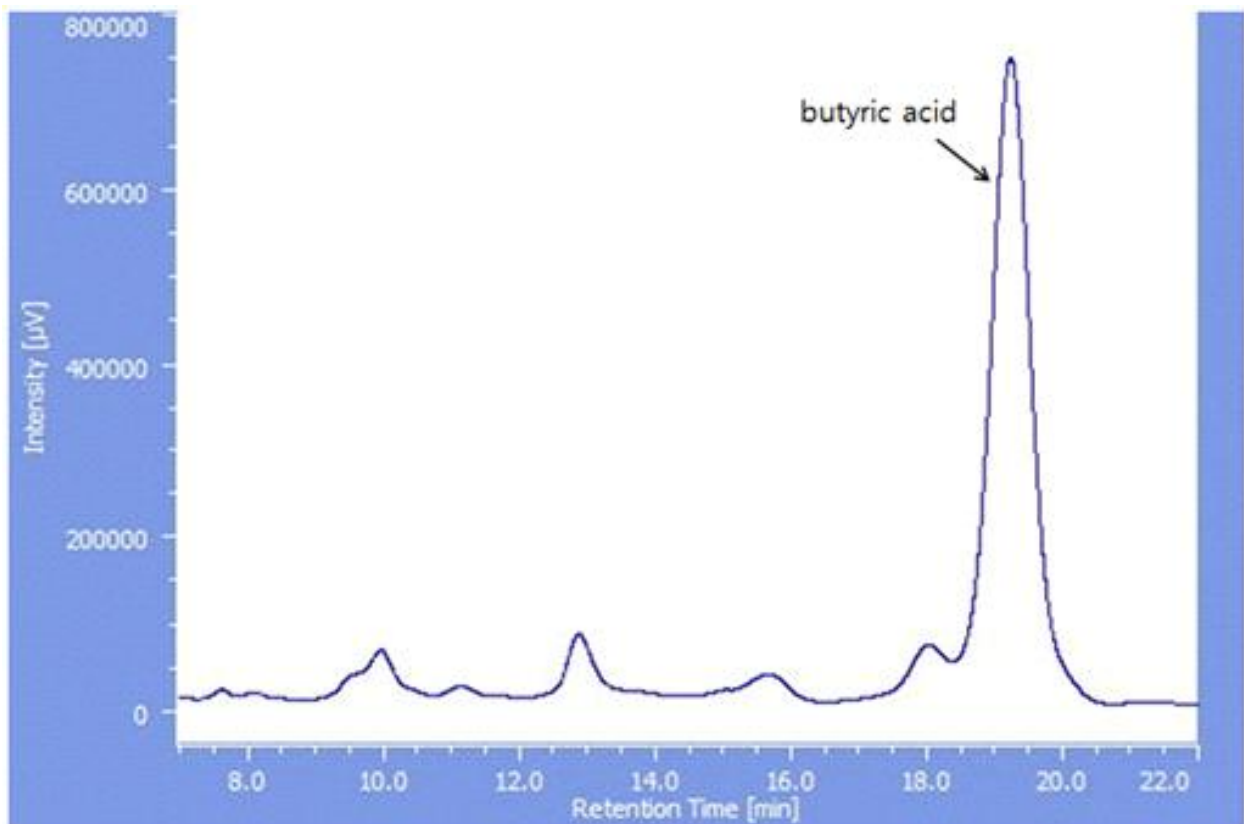
No.	균주명	분리원	개체군크기 (log CFU/g)	No.	균주명	분리원	개체군크기 (log CFU/g)
1	GU-1	TSA	1.2×10^6	8	GU-5	PDA	5.1×10^4
2	GU-2	TSA	2.5×10^4	9	GU-6	PDA	2.4×10^3
3	GU-3	TSA	3.2×10^6	10	GU-1	PDA	3.4×10^6
4	GU-4	TSA	1.8×10^6	11	GU-2	PDA	1.4×10^6
5	GU-5	TSA	2.4×10^7	12	GU-3	PDA	2.5×10^6
6	GU-1	TSA	1.8×10^7	13	GU-4	PDA	1.6×10^5
7	GU-2	MRS	2.2×10^3	14	GU-5	PDA	2.7×10^6

3. 식품을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화

가. 된장을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화

(1) 된장을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화

은행외종피의 혐오취를 저감시키기 위하여 은행외종피를 된장과 혼합하여 은행 외종피 된장을 제조하였다. 제조한 은행외종피 된장을 서로 다른 온도와 기간 동안 발효를 진행하여 혐오취인 butyric acid의 성분변화를 확인하였다. 그림 30은 HPLC를 이용하여 분석한 은행외종피 된장의 유기산 분석을 나타낸 크로마토그램이다. 이 은행외종피 된장이 함유한 유기산 중 butyric acid이 가장 많은 비율을 차지하고 있음을 확인하였다.



(그림 30) 은행외종피 된장의 유기산을 HPLC를 이용하여 분석한 크로마토그램

은행외종피 된장의 발효 온도 및 기간의 경과에 따라 변화한 butyric acid의 농도 변화를 표 29에서 나타냈다. 혐오취의 주성분인 butyric acid의 농도는 10℃에서 발효한 경우, 2개월 후 3.05 mg/g, 4개월 후 2.8 mg/g, 6개월 후 2.63 mg/g로 발효초기의 뷰탄산의 함량인 3.51 mg/g 보다 6개월 후의 함량이 약 1.3배 정도 감소하였다. 20℃에서 발효한 경우는 발효 6개월 후 1.34 mg/g로 발효초기와 비교하여 2.6배가량 감소하였으며, 30℃에서 발효한 경우 발효 6개월 경과 후 1.09 mg/g로 약 3.2배 감소한 것을 알 수 있었다. 하지만, 50℃에서 발효한 경우 10℃에서 발효한 경우와 함량 변화가 비슷하였다. 본 발명의 butyric acid의 함량은 발효기간이 길수록 감소하며, 발효온도가 높을수록 단기간에 함량을 줄일 수 있음을 확인하였다. 다만, 발효온도가 30℃인 경우에 가장 현저한 함량변화를 보여주었다.

(표 29) 은행외종피 된장의 발효온도 및 기간 경과에 따른 butyric acid의 농도 변화

온도 (°C)	기간 (개월)			
	0	2	4	6
10℃	3.51	3.05	2.88	2.63
20℃	3.51	2.04	1.48	1.34
30℃	3.51	2.05	1.35	1.09
50℃	3.51	3.00	2.81	2.63

(2) 된장을 이용한 은행외종피의 미생물 균집변화

(가) 된장은행외종피 유래 미생물의 분리

여러 가지 선택배지를 이용하여 분리한 균주는 미생물균집(colony)형태에 따라 분류하였다. 분리된 균주는 총 6개의 균집크기를 확인한 후, 마크로젠에 의뢰하여 동정을 실시하였다 (표 30). TSA배지에서 분리한 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* subsp. 이다. *B. amyloliquefaciens*의 균수는 A시료 8.12 CFU/mL, B시료 8.39 CFU/mL, C시료 7.92 CFU/mL을 나타내었고, *Bacillus subtilis* subsp. 는 A시료 7.01CFU/mL, B시료 7.81CFU/mL, C시료 7.98 CFU/mL을 나타내었다. 두 균주 모두 기간 변화에 따른 균수변화가 크게 나타나지 않으며 비슷한 양상을 보였다. *B. licheniformis*는 A시료 5.40 CFU/mL, B시료 5.50 CFU/mL, C시료 5.01 CFU/mL로 이 분리균주 또한 기간에 따른 변화를 나타내지 않았으나, 전체적으로 *B. amyloliquefaciens*와 *Bacillus subtilis* subsp. 보다 적은 수의 미생물 균집크기를 보였다. MRS와 PES 배지에서도 *B. amyloliquefaciens*를 분리해내었고 기간별로 비슷한 균주인 약 7.0 CFU/mL의 균수를 나타내었다. PDA배지를 이용하여 *Bacillus subtilis* 균주를 분리하였다. *B. subtilis* 균주 역시 기간에 따른 균수변화를 나타내지 않고 비슷한 균수를 유지하였다.

(표 30) 시료에서 분리한 균주의 군집크기와 동정결과

Source (medium)	Population size (log CFU/mL)			Identification (Strain)	Identify (%)
	A	B	C		
TSA	8.12	8.39	7.92	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99
TSA	5.40	5.50	5.01	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
TSA	7.01	7.81	7.98	<i>Bacillus subtilis</i> subsp.	99
MRS	7.94	7.45	6.66	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99
PES	7.70	7.94	7.02	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99
PDA	7.97	8.29	7.59	<i>Bacillus subtilis</i>	99

*A, B, and C samples were obtained at the initial stage of fermentation, after 6 months fermentation, and after 12 months fermentation, respectively.

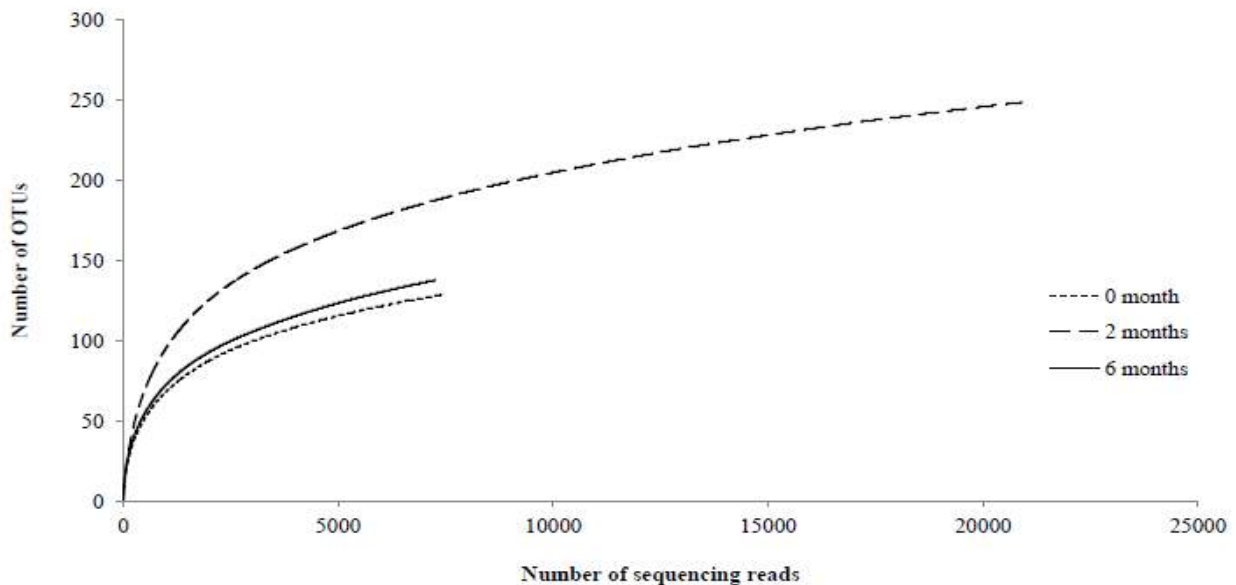
(나) NGS 분석을 이용하여 분석한 된장은행의종피의 미생물군집 다양성

NGS를 이용하여 시료 A, B, C의 미생물군집 다양성을 분석하였다. 얻어진 염기서열의 read수와 CLcommunity프로그램으로 추정된 OTUs는 표 31과 같다. 시료 A는 6,909 read, 118 OTUs, 154.05 ACE, 162 Chao 1, 2.37 Shannon, 0.24 Simpson, 1.00 coverage로 추정되었다. 시료 B는 19,150 read, 231 OTUs, 333.62 ACE, 290 Chao 1, 2.41 Shannon, 0.28 Simpson, 1.00 coverage, 시료 C는 6,697 read, 128 OTUs, 168.47 ACE, 172 Chao 2.32 Shannon, 0.30 Simpson, 0.99 coverage로 추정하였다. 각 시료로부터 관찰된 OTUs의 숫자를, sequence수에 비례하는 증가곡선으로 표현한 그래프인 rarefraction curve는 그림 31와 같다. 종 풍부도를 추정한 결과의 추세는 시료 B가 가장 높고 시료 A와 C는 비슷한 수준을 보였다.

(표 31) 16S rRNA 유전자 라이브러리에 의한 시퀀스 분석

Sample	Total reads	OTUs	ACE	Chao1	Shannon	Simpson	Coverage
Sample A	6,909	118	154.05	162	2.37	0.24	1.00
Sample B	19,150	231	333.62	290	2.41	0.28	1.00
Sample C	6,697	128	168.47	172	2.32	0.30	0.99

observed diversity richness (OTUs), Abundance-based coverage estimator (ACE), estimated OUT richness (Chao 1), diversity index (Shannon), Simpson diversity indices (Simpson) were calculated with MOTHUR at the 3% distance level. Values in brackets represent 95% confidence intervals (A: initial storage of sample, B: middle storage (2 months), C: final storage (6 months)).



(그림 31) 세가지 은행외종피 고추장의 pyrosequencing 기법에 의한 rarefaction curve
Rarefaction curves were constructed at a 97% sequence similarity cut off value(A, B, and C samples were obtained at the initial stage of fermentation, after 6 months fermentation, and after 12 months fermentation, respectively).

(다) 종수준(Species level)의 된장은행외종피의 미생물군집분석

종수준에서 미생물군집변화를 저장초기의 시료와 비교하여 확인하였다(표 32). A시료의 우점종은 *Staphylococcus gallinarum* (67.87%) 로 가장 많은 부분을 차지하였다. B시료 62.85%, C시료 67.03%로 비슷한 수준을 유지했다. *Staphylococcus gallinarum* 다음은 *Bacillus mojavensis*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus subtilis*, *bacillus atrophaeus*,

Tetragenococcus halophilus, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus tequilensis* 순의 비율을 나타내었다. 우점종인 *Staphylococcus gallinarum* 를 제외한 대부분의 종은 1~10%의 균집빈도를 보였고 숙성시기별로 미세한 증가와 감소를 나타내었다.

최근 발효식품의 발효가 진행되는 동안의 미생물군집을 분석하는 연구는 혼합물의 발효과정을 이해하고, 발효 동안 변화되는 제품의 품질유지를 위해 필수적으로 요구되고 있다. 장류 재료인 국내 메주들의 미생물군집 구조를 분석하기 위하여 16S rRNA 유전자 서열 분석에 기반을 두 pyrosequencing 연구. 전통된장의 숙성전과 숙성후의 세균군집구조를 분석한 연구 등이 있다. 미생물 군집을 조사하는 방법은 배지를 이용하는 배양법과 유전자를 이용하는 분자생물학적 분석방법 2가지로 나눌 수 있다. 첫 번째 배지를 이용하여 미생물을 배양한 후 동정하는 전통적인 배양법은 미생물의 형태적, 생리 화학적 특성에 대하여 알아보는 방법이다. 장점은 콜로니의 형태로 실제적인 균주를 확보할 수 있어서 미생물의 존재 여부를 확실하게 확인 할 수 있다는 점이다. 하지만 배지의 종류가 다양하고, 사용하는 배지의 종류에 따라서 배양 가능한 균주의 종류가 제한적이기 때문에 모든 종류의 미생물을 배양하는 데에는 어려움이 있다. 실제로 본 연구에서 분리한 균주들은 서로 다른 선택배지를 사용하였음에도 불구하고 모두 *Bacillus* 속으로 동정되었다. 전통적인 배지법만을 사용해서는 실제 존재하는 우점종을 확인하고 분리배양 할 수는 있었으나 발효물내에 다양하게 존재하는 미생물의 군집을 전체다 확인하는데 어려움이 있었다.

두 번째는 분자생물학적인 방법으로 환경에 존재하는 미생물을 직접 배양하지 않고, 유전체를 추출하여 미생물군집을 조사하는 방법이다. 이 방법은 DNA 를 이용하여 균주의 존재여부를 확인하기 때문에 배양법보다 빠르게 환경 시료 내의 미생물 군집을 분석할 수 있다는 장점이 있다. 또한 배양법으로 발견되지 않은 배양하기 어렵거나 현실적으로 배양이 되지 않는 미생물에 대한 연구도 가능하다.

본 연구에 이용된 pyrosequencing 은 nucleotide 결합 동안 방출되는 pyrophosphate 검출에 기반을 둔 next-generation DNA sequencing 으로서, 각 시료에 특이적인 barcode system 이 pyrosequencing 에 도입됨에 따라 국내에서도 간석지, 강 오염수, 젓갈, 메주 등의 미생물 군집분석에 이 방법의 이용이 활발해지고 있다. 발효물의 미생물군집구조의 추이를 살펴보는 것은 발효물의 품질 및 제조공정을 확인하는데 중요한 자료를 제공할 수 있다. 이런 이유로 최근 미생물 생태의 표준 도구로 이용되고 있는 pyrosequencing 방법을 사용하여, 본 연구에서 개발한 새로운 발효물인 된장박이은행외과피의 숙성기간동안의 미생물 군집 구조를 확인할 필요가 있었다. 본 연구는 된장박이 은행외과피의 숙성 전과 숙성 후의 과정에서 발효기간별 세균의 군집 분포와 전이과정을 조사하여 제조 과정 중 발효 세균들의 역할을 이해하는 데 그 목표를 두었다. 중 수준에서 미생물군집을 분석한 결과를 보면(표 27) *Staphylococcus gallinarum* 이 가장 많은 부분을 차지하는 우점종으로 분석되었다. 이 균은 *Staphylococcus* 속에 속하는 균 그람양성균이지만 병원성은 가지고 있지 않다. 또한 2010년 김 등이 발표한 일본발효된장의 우점종으로 존재하였다. 따라서 이

균이 대부분을 차지하는 것은 된장에서 유래한 균이 본 발효물에 대부분을 차지하고 있음을 나타낸다.

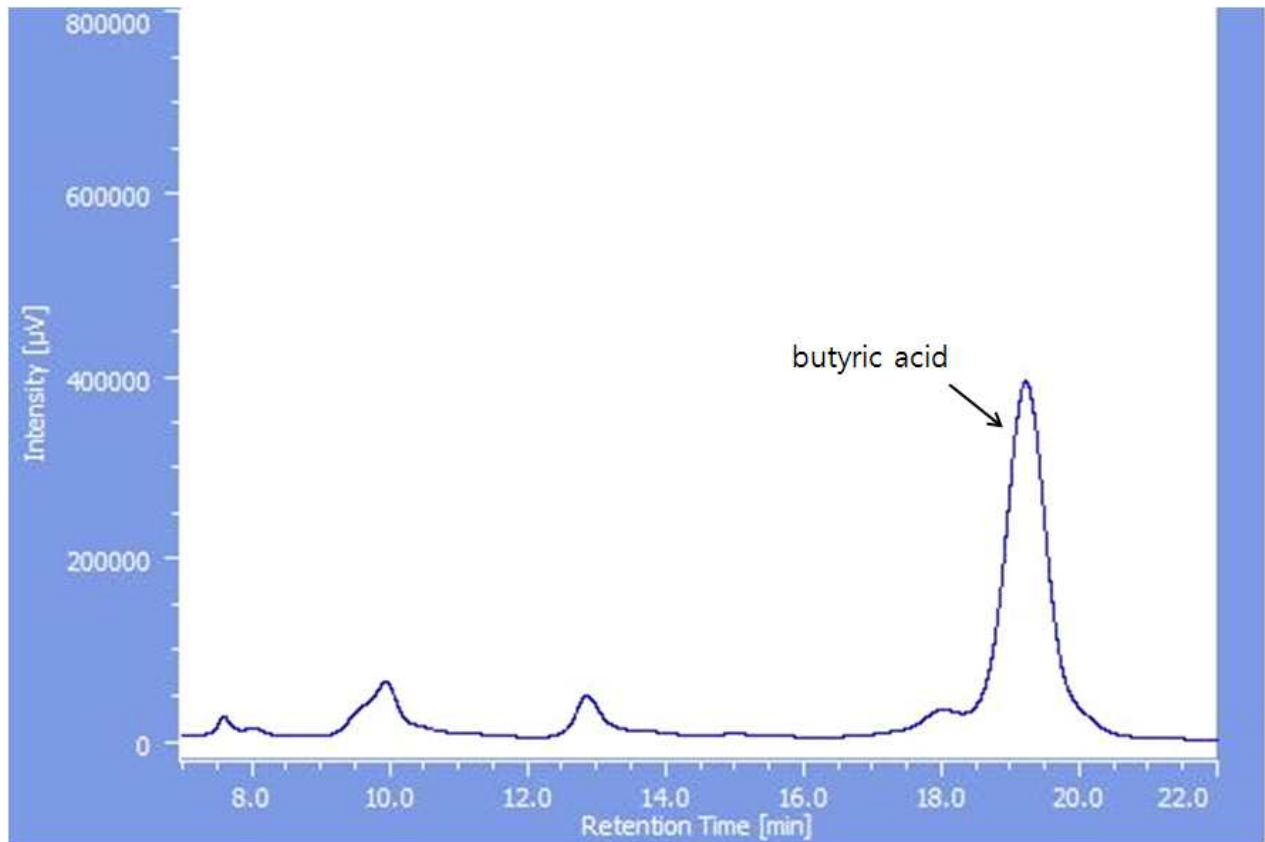
(표 32) 은행외종피 된장에서 미생물 군집의 변화

Division	Bacterial species *	% of total sequence		
		A	B	C
<i>Bacteria</i>	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	70.63	66.25	71.81
	<i>Bacillus mojavensis</i>	9.36	10.17	7.82
	<i>Bacillus siamensis</i>	4.96	6.65	5.29
	<i>Bacillus subtilis</i>	2.88	4.03	2.60
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1.71	1.98	2.46
	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	2.89	1.83	1.57
	<i>Bacillus sonorensis</i>	1.40	1.72	1.55
	<i>Bacillus tequilensis</i>	1.04	1.39	0.99
	ETC(<1.0%)	5.11	5.98	5.91

* The species was selected on the basis of high rank in the percentage of total sequences in each sample A, B, and C (A, B, and C samples were obtained at the initial stage of fermentation, after 2 months fermentation, and after 6 months fermentation, respectively).

나. 고추장을 이용한 은행외종피의 혐오취 및 알레르기 저감화

은행외종피의 혐오취를 저감시키기 위하여 은행외종피를 고추장과 혼합하여 은행 외종피 고추장을 제조하였다. 제조한 은행외종피 고추장을 서로 다른 온도와 기간 동안 발효를 진행하여 혐오취인 butyric acid의 성분변화를 확인하였다. 그림 32은 HPLC를 이용하여 분석한 은행외종피 고추장의 유기산 분석을 나타낸 크로마토그램이다. 이 은행외종피 고추장이 함유한 유기산 중 butyric acid이 가장 많은 비율을 차지하고 있음을 확인하였다.



(그림 32) 은행외종피 고추장의 유기산을 HPLC를 이용하여 분석한 크로마토그램

은행외종피 고추장의 발효 온도 및 기간의 경과에 따라 변화한 butyric acid의 농도 변화를 표 33에서 나타냈다. 혐오취의 주성분인 butyric acid의 농도는 10℃에서 저장한 경우, 2개월 후 1.93 mg/g, 4개월 후 1.52 mg/g, 6개월 후 1.35 mg/g로 저장초기의 butyric acid의 함량인 1.91 mg/g과 비교하였을 때 6개월 후의 butyric acid 함량이 약 1.4배 정도 감소하였다. 본 발명의 20℃에서 저장한 경우는 저장 6개월 후 1.21 mg/g로 저장초기와 비교하여 1.5배가량 감소하였으며, 30℃에서 저장한 경우 저장 6개월경과 후 0.75 mg/g로 약 2.6배 감소하였다. 본 발명의 butyric acid의 함량은 저장기간이 길수록 감소하며, 저장온도가 높을수록 단기간에 함량을 줄일 수 있음을 확인하였다. 다만, 50℃에서 발효를 수행한 경우 10℃에서 발효를 수행한 경우와 그 효과가 비슷하였다.

(표 33) 은행외종피 고추장의 발효온도 및 기간 경과에 따른 butyric acid의 농도 변화

온도 (°C)	기간 (개월)	butyric acid (mg/g)			
	0	2	4	6	
10°C		1.91	1.93	1.52	1.35
20°C		1.91	1.93	1.43	1.21
30°C		1.91	1.63	1.23	0.74
50°C		1.91	1.93	1.55	1.38

된장과 고추장을 이용하여 은행외종피의 혐오취 저감을 위한 연구를 실시하였고, 효과가 있음을 확인하였다.

(2) 고추장을 이용한 은행외종피의 미생물 군집변화

(가) 고추장은은행외종피 유래 미생물의 분리

여러 가지 선택배지를 이용하여 분리한 균주는 미생물군집(colony)형태에 따라 분류하였다. 총 6개의 분리된 균주는 발효기간별로 각각의 군집크기(population size)를 확인하였고 (fig. 1), 마크로젠에 의뢰하여 동정을 실시하였다(표 34). TSA배지에서 분리한 *Bacillus* sp. 는 시료 A에서 7.23 CFU/g, 시료 B는 5.70 cfu/g, 시료 C는 4.60 cfu/g 으로 점점 감소하였다. PDA에서 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens*, MRS에서 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens*, PES에서 분리한 *Bacillus* sp. 역시 숙성기간이 길어짐에 따라 감소하는 것으로 나타났다. TSA에서 분리한 *Bacillus pumilus*의 경우 시료 B와 C에 나타나지 않았고, 80°C에서 가열한 시료는 A, B, C 모두에서 비슷한 수치인 7.74, 7.30, 7.81 CFU/g을 나타냈다.

(표 34)은행외종피 고추장의 미생물 군집분석

Source (medium)	Population size (log CFU/mL)			Identification (Strain)	Identify (%)
	A*	B	C		
TSA	7.23	5.70	4.60	<i>Bacillus</i> sp.	99
TSA	6.60	-	-	<i>Bacillus pumilus</i>	99
PDA	5.70	5.11	4.45	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 1	99
MRS	7.74	6.24	3.48	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 2	100
PES	7.29	5.15	4.60	<i>Bacillus</i> sp.	99
TSA-heating	7.74	7.30	7.81	<i>Bacillus subtilis</i> subsp.	99

(나) NGS 분석을 이용하여 분석한 고추장은행외종피의 미생물군집 다양성

NGS를 이용하여 시료 A, B, C의 미생물군집 다양성을 분석하였다. 얻어진 염기서열의 read수와 CLcommunity프로그램으로 추정된 OTUs는 표 34와 같다. 시료 A는 2473 read, 372 OTUs, Chao 1, 4.61 Shannon 로 추정되었다. 시료 B는 4982 read, 96 OTUs, 134.75 Chao 1, 2.06 Shannon, 시료 C는 826 read, 27 OTUs, 41 Chao 1, 2.05 Shannon로 추정하였다. 시료 내에 존재하는 특이적인 종의 수를 추정한 결과, 시료 A가 가장 높고 시료 B, 시료 C 순으로 나타났다.

(표 34) 16S rRNA 라이브러리에 의한 시퀀스분석

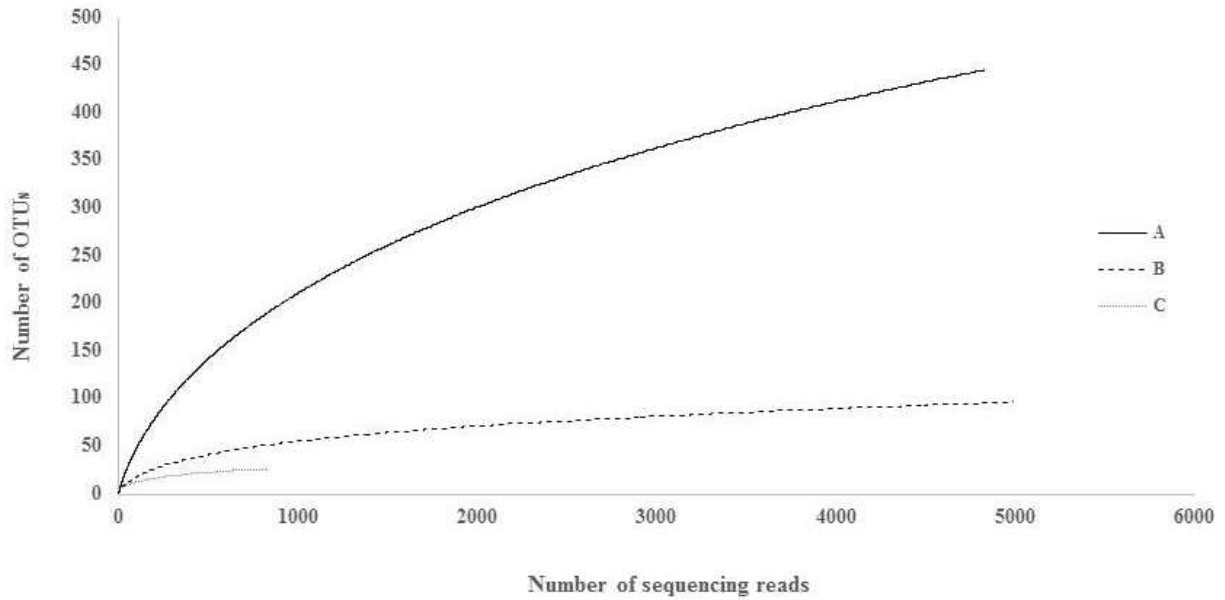
Sample	Total reads	OTUs	Chao 1	Shannon
A	2473	372	575.12	4.61
B	4982	96	134.75	2.06
C	826	27	41	2.05

Observed diversity richness (OTUs), Abundance-based coelevation estimator (ACE), estimated OUT richness (Chao 1), diversity index (Shannon), Simpsons diversity indices (Simpson) were calculated with MOTHUR at the 3% distance level. Values in brackets represent 95% confidence intervals (A: initial storage of sample, B: middle storage (6 months), C: final storage (12 months)).

(다) 종수준(Species level)의 고추장은행외종피의 미생물군집분석

종수준에서 미생물 군집변화를 비교하여 확인하였다(표 31). 시료 A의 우점종은 *Bacillus siamensis* (16.30%) 로 가장 많은 부분을 차지하였다. 그 다음으로는 *staphylococcus gallinarum* (7.16%), *Weissella fabalis* (4.97%), *Enterobacter cowanii* (4.25%), *Pantoea agglomerans* (4.12%), *Tetragenococcus halophilus* (4.08%), *Pantoea vagans* (2.47%), *Klebsiella michiganensis* (1.98%), *Serratia rubidaea* (1.90%), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1.58%), *Pantoea deleyi* (1.21%) 등으로 구성되었다. *Bacillus siamensis*는 시료 A에서 8.35%의 비율을 차지했지만 숙성 6개월 경과 후 시료 인 B에서 80.22%로 크게 증가하였다가 다시 숙성 12개월째인 시료 C 58.60%로 다시 감소하는 양상을 보였다. 그 외의 균주는 숙성기간이 증가함에 따라 모두 감소하는 경향을 나타내었다.

각 시료간의 군집 다양성을 비교하기 위하여 종 수준의 분석결과를 PCoA를 이용하여 2차원 그래프를 작성하였다(그림 36). 세 가지 시료는 *Bacillus siamensi* 의 군집변화로 비교할 수 있었다. 세가지 시료가 서로 다른 좌표를 나타내고 있으나, 시료 A보다 시료 B, C가 비슷한 군집을 가지는 것으로 판단된다.



(그림 35) 세가지 은행외종피 고추장의 pyrosequencing 기법에 의한 rarefraction curve

(표 36) 은행외종피 고추장에서 미생물 군집의 변화

Domain	Bacterial species*	% of total sequence		
		A	B	C
<i>Bacteria</i>	<i>Bacillus siamensis</i>	16.30	80.27	58.60
	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	7.16	0.00	0.00
	<i>Weissella fabalis</i>	4.97	0.00	0.00
	<i>Enterobacter cowanii</i>	4.25	0.02	0.00
	<i>Pantoea agglomerans</i>	4.12	0.00	0.00
	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	4.08	0.00	0.00
	<i>Pantoea vagans</i>	2.47	0.00	0.00
	<i>Klebsiella michiganensis</i>	1.98	0.00	0.00
	<i>Serratia rubidaea</i>	1.90	0.00	0.00
	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1.58	0.00	0.00
	<i>Pantoea deleyi</i>	1.21	0.00	0.00
	ETC(<1.0%)	49.97	19.71	41.41

*The species were selected on the basis of high rank in the percentage of total sequences in each sample (A: initial storage of sample, B: middle storage (6 months), C: final storage (12 months)).

선택배지를 이용하여 분리한 균주의 동정결과는 모두 *Bacillus* 속으로 동정되었다. 고추장 시료 내에서 배양을 통한 미생물 분리방법으로 *Bacillus* 이외의 다른 균을 분리하기 어려운 이유는 *Bacillus* 속이 우점하고 있기 때문인 것으로 사료된다. Park 등의 연구에서 다양한 선택배지를 이용하여 고추장의 미생물 분리 및 동정하였으나 분리된 고추장

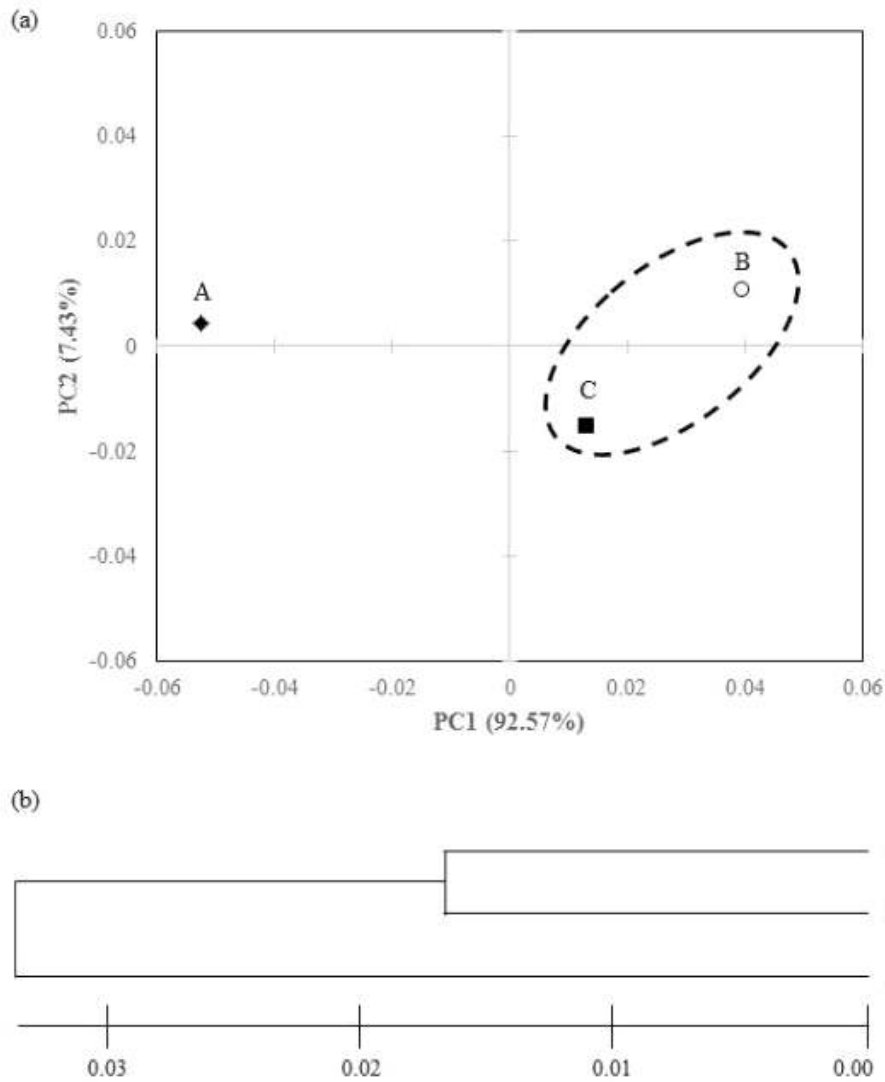
미생물은 *Bacillus amyloquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* 등 *Bacillus* 속으로 동정된 결과와 유사하다. 고추장의 미생물에 대한 Lee 등의 연구에서 *Bacillus* 가 상업용 고추장의 56~70%, 재래식 고추장의 38~50%의 분포를 나타내고 *Bacillus subtilis*가 지배균이라고 하였다. 또한 이것은 본 연구의 pyrosequencing 결과인 표 36에서 *Bacillus* 속이 시료 내에서 가장 많은 비율을 차지한다는 결과와 비교해 볼 때, 다른 종에 비해 상대적으로 많은 우점종인 *Bacillus* sp. 가 은행고추장발효물을 직접 배양한 생태계에서도 우세하게 나타나는 것으로 생각된다.

중수준에서 미생물군집을 확인한 결과(표 36)를 보면 우점종인 *Bacillus siamensis*는 발효초기보다 기간경과 후 비율이 증가하였다. 6개월 경과 후 80.22%, 12개월 경과 58.60%로 발효초기보다 시료 내 비율이 증가한 것을 알 수 있다. 이 밖에도 *Bacillus atrophaeus*의 비율이 발효기간이 길어짐에 따라 증가하였다. *Bacillus siamensis*는 메주, 된장 등에 존재하는 균으로 고추장의 주원료인 메주에서 기인한 것으로 추측된다. 젖산균인 *Weissella fabalis*, 주로 된장, 젓갈 등의 식품에서 분리되는 호염젖산균인 *Tetragenococcus halophilus* *Tetragenococcus halophilus* 등도 고추장에서 유래한 것으로 사료되며 이 균주들은 기간이 경과함에 따라 비율이 감소하였다.

두번째 구성 비율을 나타낸 *Staphylococcus gallinarum*는 사람에게는 병원성이 없으나 곤충병원성세균이라고 알려져 있다. 이 균은 자연에서 채취한 은행외과피 표면에서 분리된 것으로 보인다. 또한 유자과피 등 주로 식물체 외과피에서 분리되는 *Enterobacter cowanii*, 식물체표면과 외과피에서 분리되는 *Pantoea*속인 *Pantoea afflomerans*, *Pantoea vagans*, *Pantoea deleyi*, 무른 과일 등에서 분리되는 *Serratia rubidaea* 등은 *Staphylococcus gallinarum*와 마찬가지로 은행외과피 표면과 과육에서 유래된 것으로 추측된다. 이들 은행외과피 유래 균들은 발효초기에 발견되었으나, 발효기간이 경과함에 따라 비율이 0%로 모두 감소하였다.

이처럼 *Bacillus siamensis*를 제외한 대부분의 종의 비율이 발효기간이 경과함에 따라 감소하는 것은 각 시료 내에 특이적으로 존재하는 종의 수가 감소하는 결과(그림 25)와 일치한다.

은행외과피는 특유의 짙은맛과 악취, 알레르기 유발물질을 포함하고 있어 매년 많은 양이 생산되고 있으나 이용하지 못하고 폐기되고 있다. 따라서 본 연구는 은행외과피의 성질을 변화시키고자 미생물 자원이 풍부한 고추장을 이용하여 마쇄한 은행외과피와의 혼합물을 제조하였다. 미생물군집 분석결과, 고추장에 포함된 우점종에 의하여 은행외과피 유래의 미생물 군집이 감소 및 변화되는 것을 확인하였다. 본 연구는 발효를 이용하여 복잡한 공정 없이 은행외과피와 고추장의 혼합만으로 은행외과피의 미생물 천이가 이루어 짐을 확인하였으며 이를 기반으로 한 새로운 은행외과피 발효물을 제조를 기대한다.



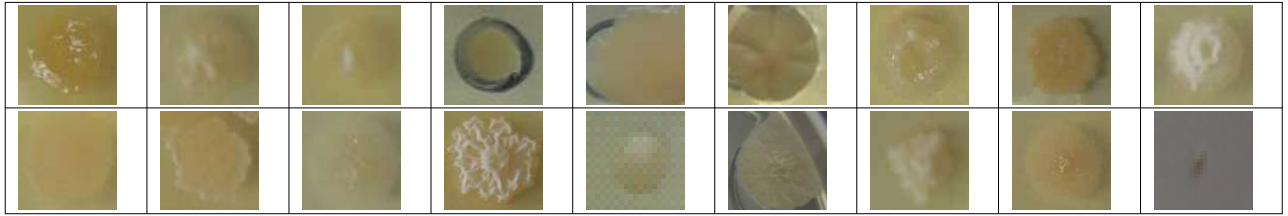
(그림 36) 은행외종피 고추장의 숙성 기간별 미생물군집 비교

4. 면역력 증진기능균주의 선별

가. 숙성진행중인 은행외종피 유래 균주의 균총분석

본 연구에서는 은행외종피에는 butyric acid 및 urushiols에 저항력이 있는 균총이 생육하고 있을 것으로 추측하여 은행외종피에 자연적으로 존재하는 균주의 분리하여 균총을 분석하였다. 두성은행영농조합에서 구입(2011년 10월~11월 수확)한 은행과 2011년 10월에 직접 채취한(경기도 용인시)은행을 이용하여 은행외종피 유래 균을 분리한 결과 미생물의 군집(colony) 형태에 따라 총 18종으로 균총을 나누었고(그림 37), 각 균총별 개체군의 크기(population size)를 확인하여 표 37에 나타내었다.

(그림 37) 은행외종피에서 분리한 미생물 18종의 균집형태(colony shape)



(표 37) 은행외종피에서 분리한 미생물 18종의 개체군 크기(population size)

No.	균주명	개체군크기 (log CFU/g)	No.	균주명	개체군크기 (log CFU/g)	No.	균주명	개체군크기 (log CFU/g)
1	G1	2.1×10^3	2	G2	2.7×10^3	3	G3	2.5×10^3
4	G4	3.1×10^3	5	G5	3.3×10^3	6	G6	2.6×10^3
7	G7	2.7×10^3	8	G8	2.7×10^3	9	G9	2.1×10^3
10	G10	3.2×10^3	11	G11	4.8×10^3	12	G12	5.1×10^3
13	G13	2.9×10^3	14	G14	4.2×10^3	15	G15	2.7×10^3
16	G16	6.2×10^3	17	G17	3.7×10^3	18	G18	6.2×10^3

나. 선별균주의 특성조사 및 동정

(1) 선별균주의 점질 다당체 생성특성확인

선별한 균주는 당종류에 따른 점질 다당체 생성특성을 파악하였다. 점질물 생성 균의 경우 식품의 물성 변화 및 유지에 영향을 미치며 면역측면에서 장점을 가진다. 따라서 은행외종피에서 분리한 균의 점질생성능력을 파악하여 향후 면역 활성 실험에 사용할 균주를 선별하고자 하였다. 표 38은 은행외종피에서 분리한 균주의 당 종류에 따른 저질 다당체 생성 확인한 결과이다. TSA배지에 5%의 sucrose, maltose, rhamnose, lactose를 각각 첨가하여 점질 다당체 생성을 확인하였다. 그 결과 면역활성을 가질 성격이 큰 광택을 띄고, 크기 10 mm(점적한 115종의 colony 평균크기) 이상, 그리고 점질 다당체 생성량이 ++ 이상인 균 5종을 선별하였다. 선별한 균주 5종을 이용하여 exopolysaccharide (EPS)를 추출하고 다음의 면역력 증진 관련 효능 평가를 실시하였다.

(표 38) 은행외종피 분리균주의 당의 종류에 따른 점질 다당체 생성 확인

No. -분리원	이름	모양	색상	특징(광택, 형태)	크기(mm)	Slime
1-PDA	TSA	불규칙원형	녹색	광택X	5	-
	TSA+Lactose	불규칙원형	녹색	광택X	6	-
	TSA+Maltose	불규칙원형	녹색	광택X	6	-
	TSA+Rhamnose	불규칙원형	녹색	광택X	6	-
	TSA+Sucrose	불규칙원형	녹색	광택X	5	-
2-PDA	TSA	불규칙원형	녹색	광택X	6	-
	TSA+Lactose	불규칙원형	녹색	광택X	4	-
	TSA+Maltose	불규칙원형	녹색	광택X	5	-
	TSA+Rhamnose	불규칙원형	녹색	광택X	6	-
	TSA+Sucrose	불규칙원형	녹색	광택X	3	-
3-PDA	TSA	불규칙원형	녹색	광택X	6	-
	TSA+Lactose	불규칙원형	녹색	광택X	6	-
	TSA+Maltose	불규칙원형	녹색	광택X	13	-
	TSA+Rhamnose	불규칙원형	녹색	광택X	5	-
	TSA+Sucrose	불규칙원형	녹색	광택X	6	-

4-PDA	TSA	원형	연한노랑	광택O	6	+
	TSA+Lactose	원형	연한노랑	광택O	10	+
	TSA+Maltose	원형	연한노랑	광택O	5	+
	TSA+Rhamnose	원형	연한노랑	광택O	8	+
	TSA+Sucrose	원형	연한노랑	광택O	6	+
5-MRS	TSA	불규칙원형	연한노랑	광택O	30	++
	TSA+Lactose	불규칙원형	연한노랑	광택O	30	++
	TSA+Maltose	불규칙원형	연한노랑	광택O	25	++
	TSA+Rhamnose	불규칙원형	연한노랑	광택O	25	++
	TSA+Sucrose	불규칙원형	연한노랑	광택O	25	++
6-MRS	TSA	원형	연한노랑	광택O, 표면물방물	10	+
	TSA+Lactose	원형	연한노랑	광택O, 표면물방물	12	+
	TSA+Maltose	원형	연한노랑	광택O, 표면물방물	10	+
	TSA+Rhamnose	원형	연한노랑	광택O, 표면물방물	10	+
	TSA+Sucrose	원형	연한노랑	광택O, 표면물방물	10	+
7-MRS	TSA	원형	연한노랑	광택X	10	++
	TSA+Lactose	원형	연한노랑	광택X	8	++
	TSA+Maltose	원형	연한노랑	광택O	9	++
	TSA+Rhamnose	원형	연한노랑	광택O	10	++
	TSA+Sucrose	원형	연한노랑	광택X	8	++
8-TSA	TSA	원형	연한노랑	광택X	8	+
	TSA+Lactose	원형	연한노랑	광택O, 표면물방물	10	+
	TSA+Maltose	원형	연한노랑	광택O, 표면물방물	12	+
	TSA+Rhamnose	원형	연한노랑	광택O, 표면물방물	12	+
	TSA+Sucrose	원형	연한노랑	광택O, 표면물방물	14	+
9-TSA	TSA	넓게퍼진원형	연한노랑	광택O	16	+
	TSA+Lactose	넓게퍼진원형	연한노랑	광택O	18	+
	TSA+Maltose	넓게퍼진원형	연한노랑	광택O	15	+
	TSA+Rhamnose	넓게퍼진원형	연한노랑	광택O	13	+
	TSA+Sucrose	넓게퍼진원형	연한노랑	광택O	15	+

10-TSA	TSA	원형	녹색	광택X	5	-
	TSA+Lactose	원형	녹색	광택X	8	-
	TSA+Maltose	원형	녹색	광택X	8	-
	TSA+Rhamnose	원형	녹색	광택X	6	-
	TSA+Sucrose	원형	녹색	광택X	5	-
11-TSA	TSA	불규칙원형	녹색	광택X	5	-
	TSA+Lactose	불규칙원형	녹색	광택X	9	-
	TSA+Maltose	불규칙원형	녹색	광택X	7	-
	TSA+Rhamnose	불규칙원형	녹색	광택X	4	-
	TSA+Sucrose	불규칙원형	녹색	광택X	7	-
12-TSA	TSA	불규칙원형	연한노랑	광택X	10	-
	TSA+Lactose	불규칙(꽃모양)	연한노랑	광택X	19	-
	TSA+Maltose	불규칙(꽃모양)	연한노랑	광택X	17	-
	TSA+Rhamnose	불규칙(꽃모양)	연한노랑	광택X	15	-
	TSA+Sucrose	불규칙(꽃모양)	연한노랑	광택X	26	-
13-TSA	TSA	불규칙원형	연한노랑	광택X	8	+
	TSA+Lactose	불규칙원형	연한노랑	광택X	12	+
	TSA+Maltose	불규칙원형	연한노랑	광택X	10	+
	TSA+Rhamnose	불규칙원형	연한노랑	광택X	13	+
	TSA+Sucrose	불규칙원형	연한노랑	광택X	20	+
14-TSA	TSA	불규칙원형	연한노랑	광택X	7	+++
	TSA+Lactose	불규칙원형	연한노랑	광택X	12	+++
	TSA+Maltose	불규칙원형	연한노랑	광택X	15	+++
	TSA+Rhamnose	불규칙원형	연한노랑	광택X	12	+++
	TSA+Sucrose	불규칙원형	연한노랑	광택X	20	+++
15-KF	TSA	불규칙원형	연한노랑	광택X	10	+++
	TSA+Lactose	불규칙원형	연한노랑	광택X	15	+++
	TSA+Maltose	불규칙원형	연한노랑	광택X	13	+++
	TSA+Rhamnose	불규칙원형	연한노랑	광택X	12	+++
	TSA+Sucrose	불규칙원형	연한노랑	광택X	20	+++

16-KF	TSA	불규칙원형	연한노랑	광택X	7	+++
	TSA+Lactose	불규칙원형	연한노랑	광택X	15	+++
	TSA+Maltose	불규칙원형	연한노랑	광택X	13	+++
	TSA+Rhamnose	불규칙원형	연한노랑	광택X	12	+++
	TSA+Sucrose	불규칙원형	연한노랑	광택X	20	+++
17-PES	TSA	원형	연한노랑	광택X	14	+
	TSA+Lactose	원형	연한노랑	광택X, 표면물방물	15	-
	TSA+Maltose	원형	연한노랑	광택X, 표면물방물	13	-
	TSA+Rhamnose	원형	연한노랑	광택X	15	-
	TSA+Sucrose	꽃모양(별모양)	연한주황	광택X	35	-
18-PES	TSA	원형	연한노랑	광택X	15	+
	TSA+Lactose	원형	연한노랑	광택X, 표면물방물	14	-
	TSA+Maltose	원형	연한노랑	광택X, 표면물방물	12	-
	TSA+Rhamnose	원형	연한노랑	광택X	15	-
	TSA+Sucrose	꽃모양(별모양)	연한노랑	광택X	40	-

(2) 선별균주의 동정

은행외종피에서 분리한 18종의 균주는 16S rDNA의 염기서열을 결정하기 위하여 (주)마크로젠과 (주)솔젯에 의뢰하여 16S rDNA의 염기서열을 구하였고 NCBI의 blast search를 통하여 동정하였다. 그 결과를 다음의 표 39에 나타내었다.

(표 39) 은행외종피에서 분리한 균주 18종의 동정결과

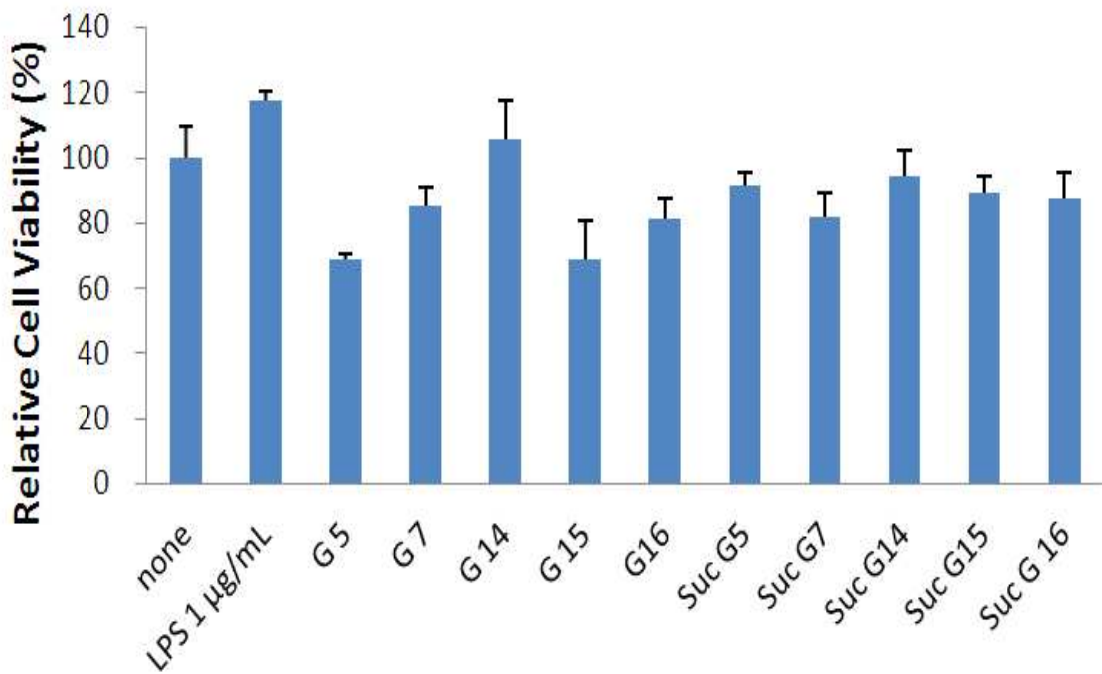
Name	Description	Match	Pct(%)
G1	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	1448	99
G2	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain	1470	99
G3	<i>Candida railenensis</i>	602	99
G4	<i>Moraxella osloensis</i>	1444	99
G5	<i>Bacillus sp.</i> N6;AB04385	1449	99
G6	<i>Candida railenensis</i>	609	99
G7	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	1457	98
G8	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	1439	99
G9	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	1431	99
G10	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	1429	99
G11	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	1447	99
G12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain	1465	99
G13	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	1427	99
G14	<i>Staphylococcus sp.</i>	1467	100
G15	<i>Bacillus subtilis</i> strain	1474	99
G16	<i>Staphylococcus sp.</i>	1475	100
G17	<i>Bacillus licheniformis</i>	1364	98
G18	<i>Bacillus licheniformis</i> strain	1461	98

5. 은행외종피 유래 선별균주의 면역력 증진관련 활성평가

가. 은행외종피 유래 선별균주의 면역증강 효능 평가

(1) 세포 생존율 측정결과

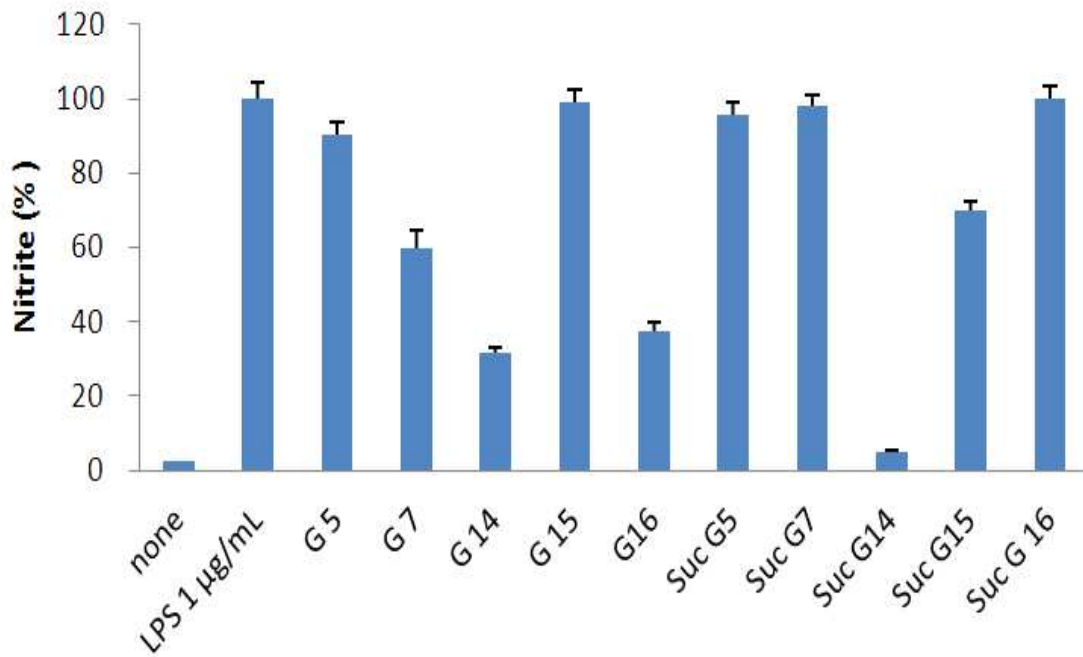
MTT assay를 통해 세포 생존율을 평가한 결과는 그림 38과 같다. 대조군에 비해 G5, G15 시료를 제외한 모든 시료에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였다.



(그림 38) 면역증강 효능 평가를 위한 시료별 세포 생존율 평가

(2) NO 생성량 확인결과

LPS 처리군 대비 시료의 NO 생성량은 그림 39와 같다. G5, G15, sucrose G5, sucrose G7 및 sucrose G16 시료에서 80% 이상의 NO 생성량을 나타내었으나, 세포 생존율을 고려할 때 G7, sucrose G5, sucrose G7 및 sucrose G16 시료에서 면역증강 효능이 있는 것으로 나타났다.

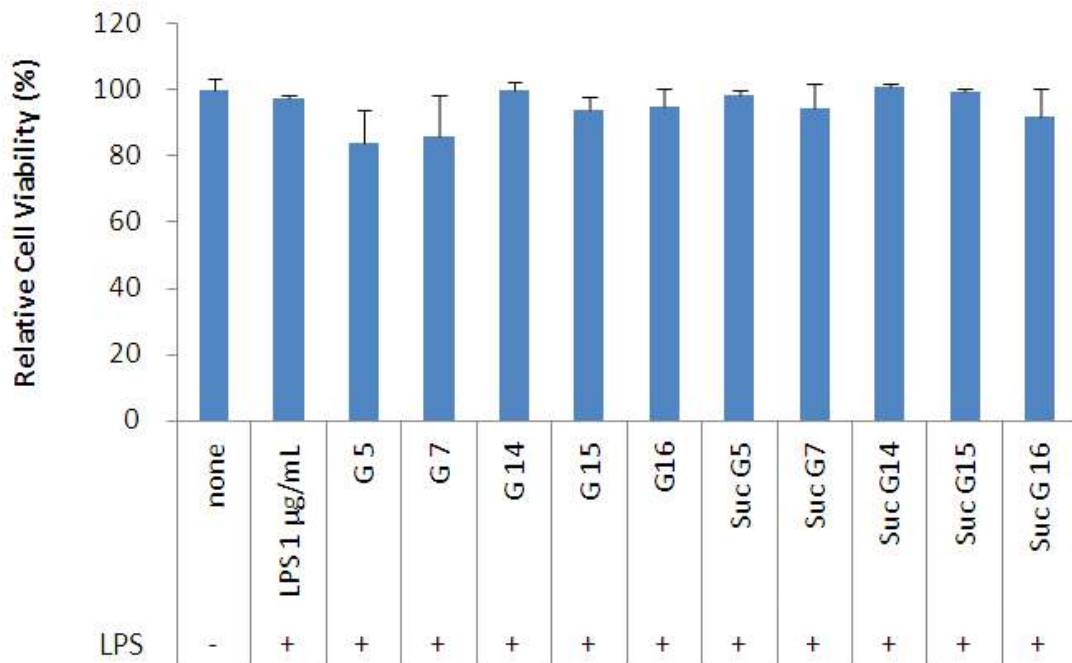


(그림 39) 면역증강 효능 평가를 위한 시료별 NO 생성량 확인

나. 은행외종피 유래 선별균주의 항염증 효능평가

(1) 세포 생존율 측정결과

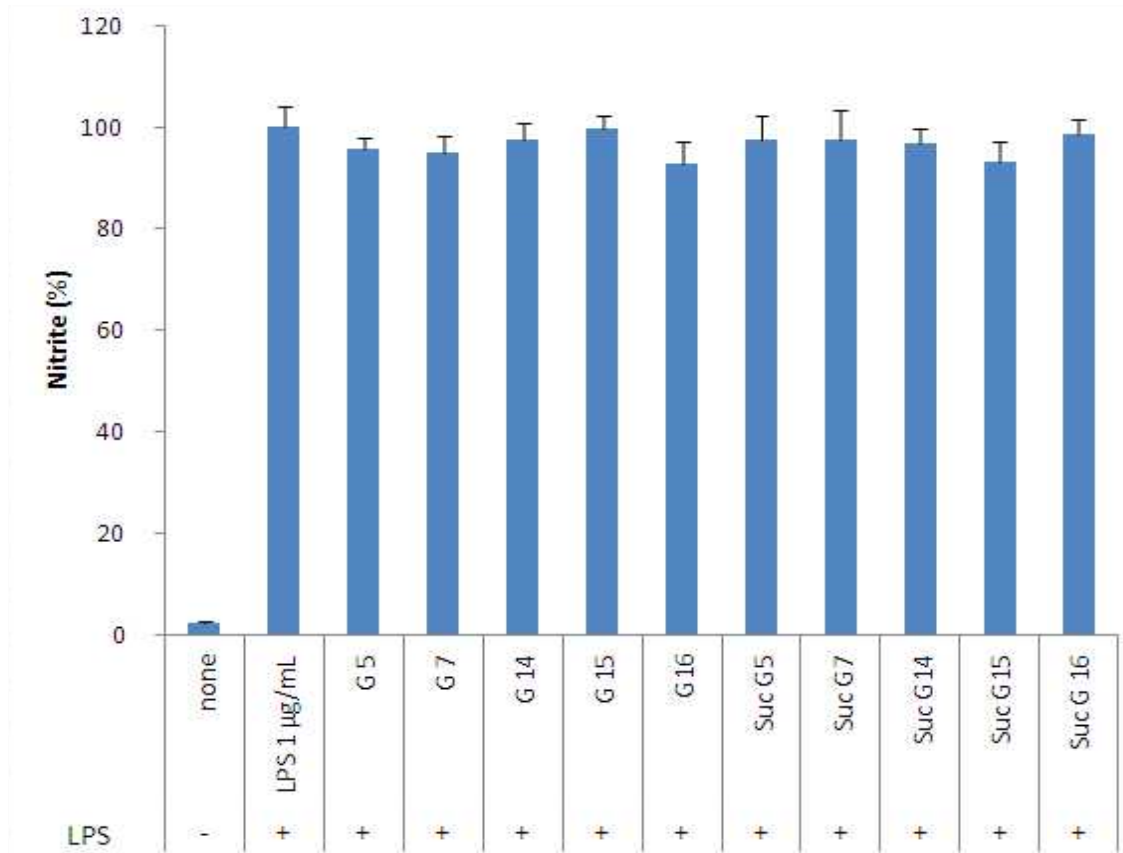
그림 40과 같이 모든 시료에서 세포 생존율이 80% 이상을 나타내, 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다.



(그림 40) 항염증 효능 평가를 위한 시료별 세포 생존율

(2) NO 생성량 확인 결과

항염증 효능 평가를 위한 시료별 NO 생성율은 다음과 같다(그림 41). 모든 시료에서 LPS 처리군과 유의적인 차이를 보이지 않아 항염증 효능이 없는 것으로 판단된다.

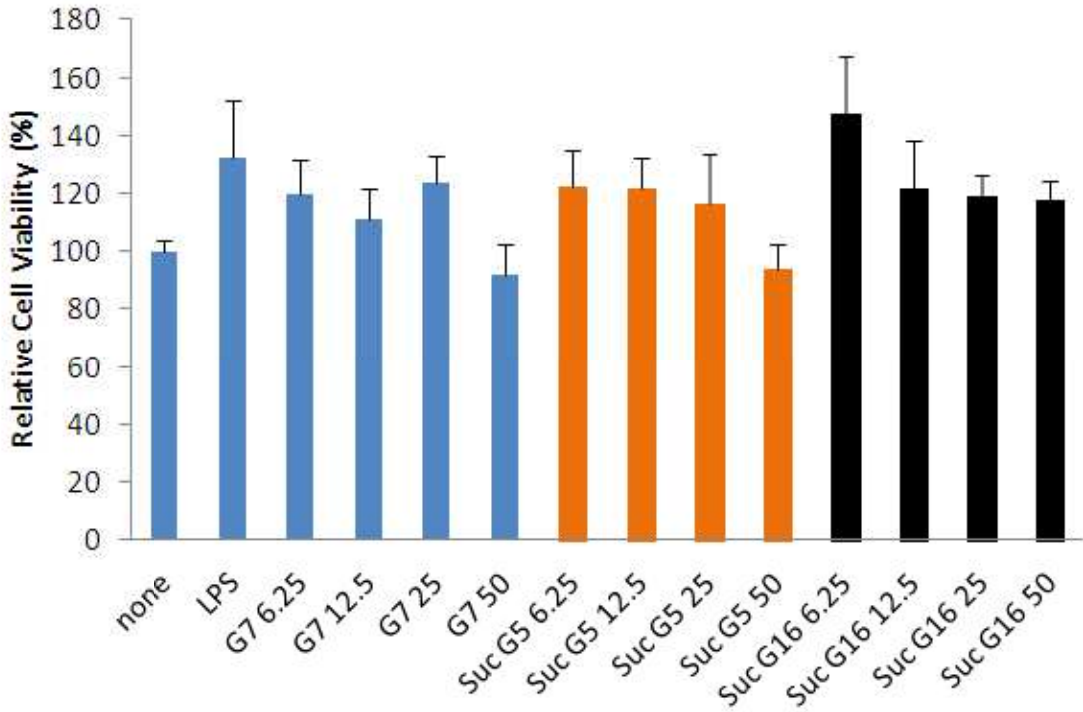


(그림 41) 항염증 효능 평가를 위한 시료별 NO 생성량 확인

다. 시료 농도별 면역증강 효능평가

(1) 세포 생존율 확인결과

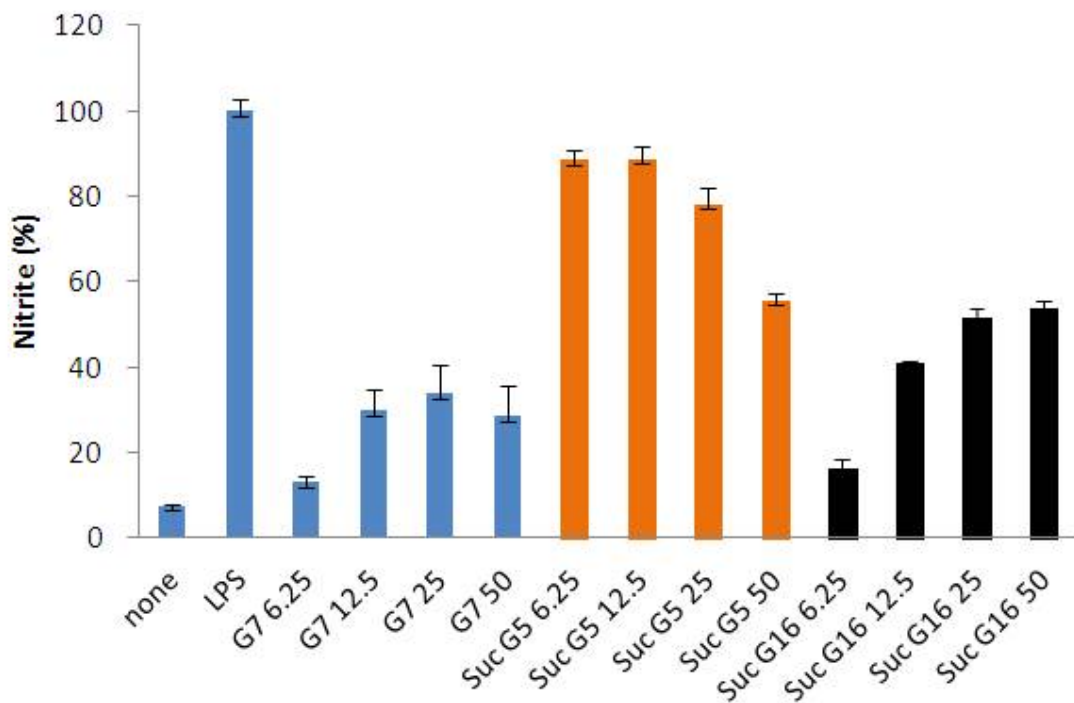
MTT assay를 통해 세포 독성을 확인한 결과는 그림과 같다. G7 및 sucrose G5 시료의 50 μ g/mL 농도를 제외하고 대조군(none)과 비교하였을 때 독성이 나타나지 않았다(그림 42).



(그림 42) 농도별 시료처리 세포의 독성 평가

(2) NO 생성량 확인결과

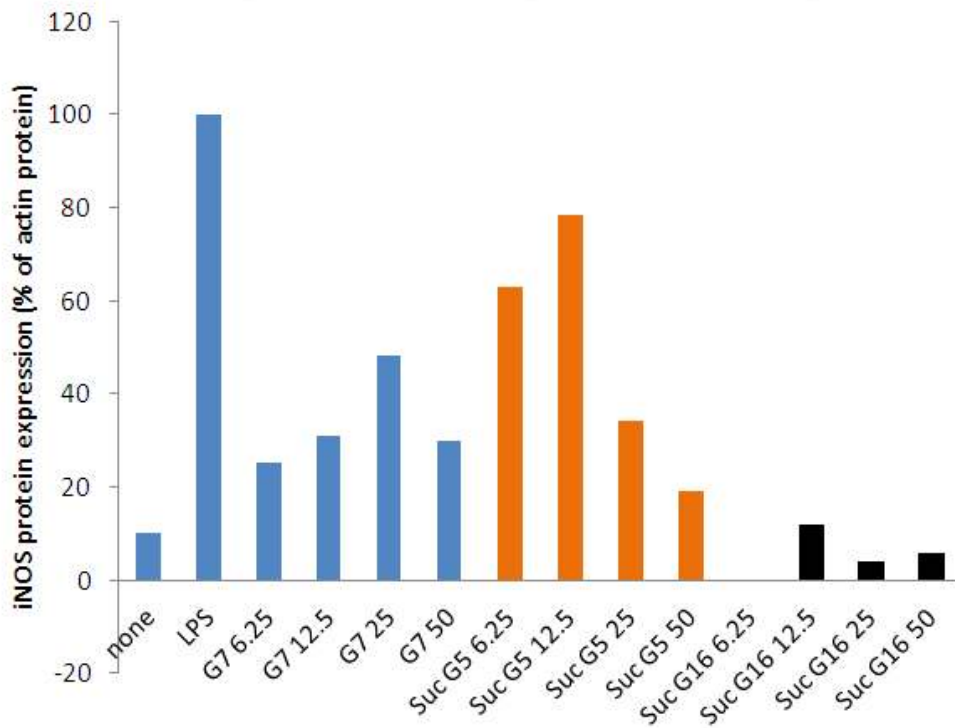
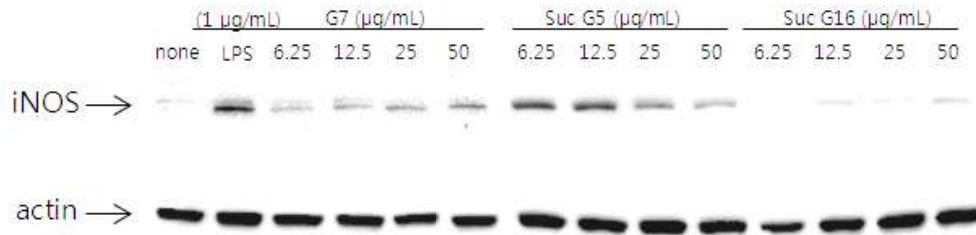
농도별로 시료를 처리한 결과는 그림 43와 같다. G7 시료에서는 농도가 높아질수록 NO값이 증가하였으나 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서는 세포 독성으로 인해 값이 줄어드는 경향을 나타내었다. sucrose G5 시료에서는 저농도인 6.25 및 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 비교적 높은 값을 나타내었고 고농도로 갈수록 감소하였다. sucrose G16 시료에서는 농도 의존적인 경향을 나타내었다. 세 가지 시료군 전체를 비교하였을 때 저농도에서 높은 활성을 보인 sucrose G5 시료에 면역증강 효능이 있는 것으로 판단된다.



(그림 43) 농도별 시료처리 NO 생성량 확인

(3) 단백질 발현 정도 확인결과

iNOS의 단백질 수준의 발현 정도를 확인한 결과는 그림 44와 같다. LPS 처리군과 대비하여 G7시료는 농도 의존적으로 증가하였으나 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 감소하였고, sucrose G5 시료는 6.25, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 63,78%의 발현정도를 나타내었다. sucrose G16 시료는 네 가지 농도 모두 15% 미만의 낮은 발현율을 나타내었다.



(그림 44) 농도별 시료의 iNOS protein 발현 정도 확인

(4) Cytokine 농도결과

은행외종피에서 분리한 균주는 총 18개였고, 그중 면역증강 활성평가(MTT assay, NO assay)에서 효과가 있는 시료를 농도별로 희석하여 면역증강 활성을 확인하였다. 선별된 시료는 G7, suc G5, suc G16 세 가지 이다(표 40).

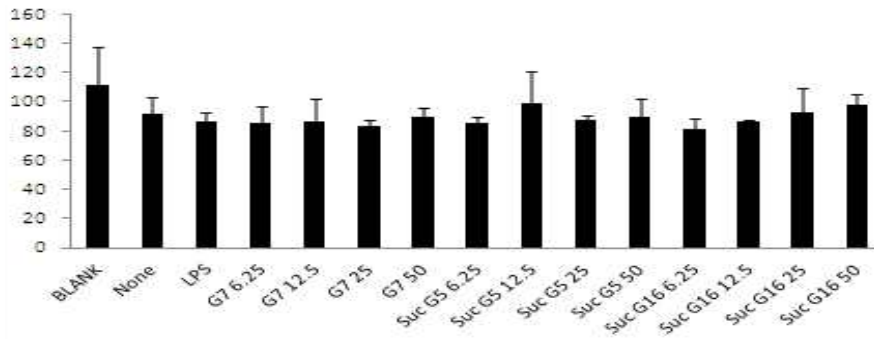
(표 40) 면역증강평가에 사용한 은행외종피 유래 균주의 EPS

No.	시료명	증균배지	농도
1	G5	TSB	50 µg/mL
2	G7	TSB	
3	G14	TSB	
4	G15	TSB	
5	G16	TSB	
6	suc G5	TSB+5% sucrose	
7	suc G7	TSB+5% sucrose	
8	suc G14	TSB+5% sucrose	
9	suc G15	TSB+5% sucrose	
10	suc G16	TSB+5% sucrose	

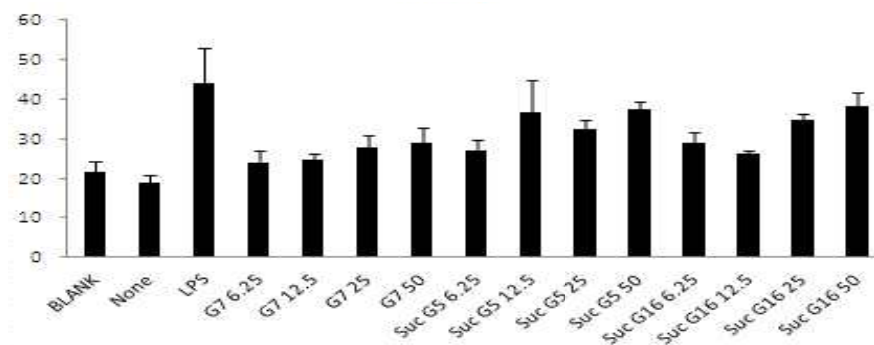
은행외종피 유래균주 3종 (G7, Suc G5, Suc G16)을 선별하여 농도별(6.25, 12.5, 25 및 50 ppm) cytokine을 측정 한 결과는 그림 45와 같다.

그림 45, (A) IL-12(p40)에서는 모든 시료에서 유의적 차이가 없는 것으로 나타났으며 그림 45, (B) IL-1 β 의 경우 G7시료에서는 농도별 유의차를 보이지 않았으나 Suc G5 시료에서는 12.5 및 50 ppm에서 다른 두 농도보다 높게 나타났으며, Suc G16 시료는 12.5 ppm 농도를 제외하고 농도 의존적으로 높게 나타났다. 그림 45, (C) IL-6의 경우 G7 및 Suc G16시료에서는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였고, Suc G5 시료는 12.5 ppm에서 50 ppm까지 유의적인 차이를 보이지 않았으나 동일 농도에서 다른 두 시료보다 높은 값을 나타냈다. IL-6는 macrophage의 활성화로 생성되어 T-cell과 B-cell 활성화 등 세포성 면역 활성화에 기여하는 것으로 알려져 있다. 그림 45, (D) TNF- α 의 경우 시료별 및 농도별로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 은행외종피 유래균주 3종 (G7, Suc G5, Suc G16)에 대해서 효능평가를 한 결과 Raw 264.7 cell에 SUC G5를 처리하면 6.25 μ l의 낮은 농도에서도 NO 활성화 효능이 두드러졌으나, 처리 농도 중 50 μ l의 고농도에서 일부 세포 사멸 효과가 있는 것으로 확인되었다. 그러나 세포수가 적어짐에도 IL-1 β , IL-6, IL-12(p40), TNF- α 의 cytokines 분비는 높은 수준이 유지되어 Macrophage 활성화 와 함께 cytokines 생성 증가로 이어져 이 후 생체에서의 연쇄적인 면역 작용에 유효할 것으로 기대되었다. 또한 Suc G16 균주 처리에서는 NO 유도능과 cytokines 생성능 등에서 농도 의존적인 결과를 나타내 상대적으로 적은 독성에 농도 의존적 면역 유도 효능이 있을 것으로 기대된다.

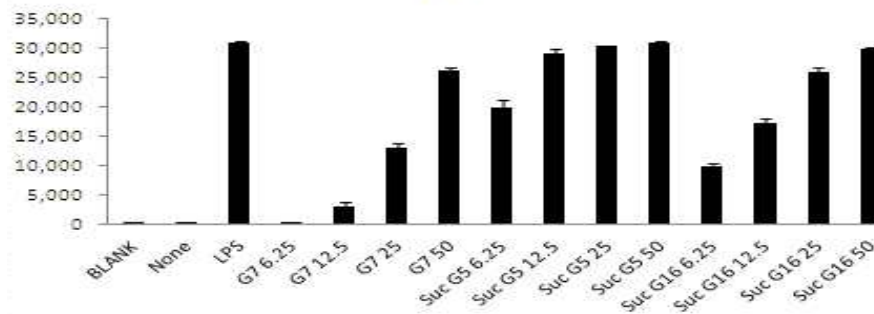
(A) IL-12(p40)



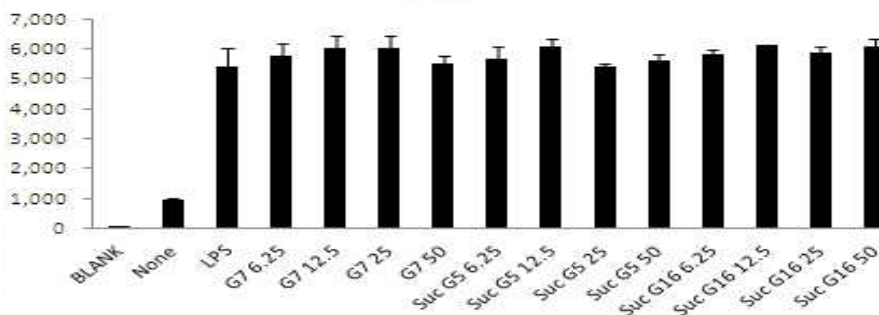
(B) IL-1 β



(C) IL-6



(D) TNF- α



(그림 45) 은행균주 3종 (G7, Suc G5, Suc G16)의 cytokine 확인

6. 미생물을 이용한 혐오취 저감화

가. 휘발성물질 생성 및 유기산 생성 균주 선발

(1) Enrichment culture 유래 휘발성물질 또는 유기산 생성 균주 선발 및 발효성 검토

은행외종피를 식품미생물자원에 첨가하여 배양한 후 우세균총 17을 분리하였고, 그 중 분리원에 따른 10개의 우세균주를 선별하여 은행외종피발효에 직접 이용하였다. 10개의 균주를 이용한 은행외종피 발효물은 주요 혐오취원인 butyric acid의 함량변화를 확인하였다(표 41). 된장에서 분리한 균주 1번이 가장 큰 butyric acid 함량변화를 나타냈고(대조구 대비 12%), 향후 이 균주의 16S rRNA 동정과 추가 발효조건에 대한 실험진행 하고자 한다. 현재 본 균주를 이용하여 첨가물을 달리한 발효공정에 대한 효과를 실험 진행 중에 있다.

(표 41) 은행외종피 발효물의 butyric acid 함량변화

No.	균주명	분리원	Quantity (ppm)	retention time (min)
1	GD-1	된장-TSA	2,810.91	18.29
2	GD-3	된장-PES	3,076.61	18.28
3	GD-4	된장-MRS	3,294.51	18.29
4	GD-5	된장-PDA	3,134.06	18.29
5	GK-3	김치-TSA	2,983.55	18.28
6	GK-4	김치-MRS	3,158.60	18.30
7	GK-5	김치-PDA	3,302.35	18.26
8	GN-3	누룩-TSA	3,314.16	18.27
9	GN-4	누룩-MRS	3,354.00	18.26
10	GN-5	누룩-PDA	2,860.19	18.27
Con	control	은행외종피	23,493.83	18.30

나. 기존 식품 균주를 이용한 혐오취 저감 균주의 선별

(1) 선별된 식품균주를 이용하여 발효한 발효물의 혐오취 분석 및 마스킹 효과 검토

식품유래 균주 100종(젓산균 60, 효모 40)에 은행외종피를 10%로 첨가한 액체배지 접종하고 48 시간 뒤 생성물의 혐오취 분석과 휘발성유기산분석을 실시하였다. 그 결과는 (표 42)와 같다. 은행외종피를 첨가한 배지에 균주를 접종하여 혐오취 성분을 저감화하고 휘발성유기산을 보다 많이 생성하는 균주를 뽑는 것을 목적으로 하였다. 분석결과 은행외종피의 혐오취성분인 butyric acid와 hexanoic acid의 함량이 줄어든 균주인 *Bifidobacterium bifidum*(KFRI 743),

Enterococcus faecium(KFRI 1182), *Lactobacillus brevis*(KFRI 145), *Lactobacillus sake*(KFRI 815), *Weissella confusa*(KFRI 1184), *Saccharomyces cerevisiae*(KFRI 01019) 총 여섯 개 균주를 선발하였다.

균주의 접종으로 마스킹효과를 확인하기 위하여 휘발성유기산인 acetic acid와 formic acid의 함량을 측정하였다. acetic acid의 함량이 대조구보다 높은 균주는 *Bifidobacterium bifidum*(KFRI 743), *Enterococcus faecium*(KFRI 1182), *Lactobacillus brevis*(KFRI 145), *Lactobacillus sake*(KFRI 815), *Weissella confusa*(KFRI 1184), *Candidaintermedia*(KFRI 00115), *Pleurotus sajorcaju*(KFRI 00600), *Saccharomyces cerevisiae*(KFRI 00795), *Saccharomyces cerevisiae*(KFRI 00920), *Saccharomyces lactis*(KFRI 00922), *Saccharomyces cerevisiae*(KFRI 00937), *Saccharomyces cerevisiae*(KFRI 01013), *Saccharomyces cerevisiae*(KFRI 01019) 13개였고, formic acid 함량이 증가한 균주배양물은 *Lactobacillus brevis*(KFRI 145), *Lactobacillus plantarum*(KFRI 144), *Lactobacillus plantarum*(KFRI 464), *Lactobacillus sake*(KFRI 815), *Leuconostoc lacits*(KFRI 232), *Saccharomyces cerevisiae*(KFRI 01019) 6개 이다. 이 중 acetic acid와 formic acid 함량이 모두 증가한 균주는 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sake*, *Saccharomyces cerevisiae* 균주 3가지이다.

(표 42) 선발된 식품균주와 은행외종피 발효물의 혐오취 및 휘발성유기산 함량변화

No.	Strain	균주번호	혐오취 및 휘발성유기산 분석			
			butyric acid (ppm)	hexanoic acid (ppm)	acetic acid (ppm)	formic acid (ppm)
1	control (10%은행외종피배지)	-	54,199	17,045	1,211	1,381
2	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	KFRI 743	39,432	9,651	3,221	1,311
3	<i>Bifidobacterium breve</i>	KFRI 744	50,218	15,426	1,242	1,320
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC 3195	54,162	15,452	1,324	1,351
5	<i>Enterococcus faecalis var. liquefaciens</i>	KFRI 685	51,357	17,065	1,240	1,384
6	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 826	52,394	16,532	1,242	1,320
7	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 823	41,469	16,523	1,652	1,302
8	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 822	48,253	12,354	1,452	1,375
9	<i>Enterococcus faecalis var. liquefaciens</i>	KFRI 685	51,558	17,263	1,320	1,304
10	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 1182	31,362	7,292	2,248	1,329
11	<i>Eubacterium limosum</i>	KFRI 753	41,734	16,267	1,246	1,276
12	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	KFRI 238	48,437	16,826	1,652	1,324
13	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCTC 3102	52,203	19,562	1,685	1,210
14	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCTC 3498	37,472	15,362	1,642	1,342
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 146	49,290	16,428	1,520	1,324

16	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 812	55,859	12,375	1,652	1,375
17	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 805	54,943	16,845	1,423	1,365
18	<i>Lactobacillus casei</i>	KFRI 228	47,125	14,562	1,652	1,354
19	<i>Lactobacillus corniformis</i> subsp. <i>corniformis</i>	KCTC 3505	40,768	16,542	1,667	1,324
20	<i>Lactobacillus curvatus</i>	KFRI 654	54,732	14,521	1,542	1,395
21	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 145	36,881	6,554	2,432	3,241
22	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	KFRI 229	43,228	10,324	1,272	1,327
23	<i>Lactobacillus honohiechii</i>	KFRI 234	46,672	16,247	1,264	1,248
24	<i>Lactobacillus lactis</i>	KCTC 2181	51,202	12,522	1,320	1,249
25	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KFRI 1183	38,864	16,592	1,624	1,375
26	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KFRI 481	42,157	11,246	1,726	1,392
27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCTC3099	54,218	16,275	1,246	1,346
28	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 464	37,181	15,894	1,325	1,270
29	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 144	44,678	15,782	1,342	3,200
30	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 814	51,120	15,410	1,279	1,276
31	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 813	46,984	16,242	1,360	1,138
32	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 660	54,123	10,325	1,249	1,356
33	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 471	54,621	12,024	1,247	1,301
34	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 470	41,785	12,530	1,368	1,395
35	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 464	49,523	12,062	1,369	3,642
36	<i>Lactobacillus sake</i>	KFRI 815	32,245	7,501	2,032	2,039
37	<i>Lactococcu lactic</i> sp. <i>lactis</i>	KFRI 669	56,782	12,071	1,652	1,207
38	<i>Lactococcu lactic</i> sp. <i>lactis</i>	KFRI 670	43,582	12,620	1,624	1,295
39	<i>Lactococcu lactic</i> sp. <i>lactis</i>	KFRI 671	49,503	12,842	1,579	1,348
40	<i>Lactococcus plantarum</i>	KFRI 1186	48,265	13,265	1,326	1,369
41	<i>Lactococcus plantarum</i>	KCTC 1048	48,325	13,225	1,346	1,302
42	<i>Leuconostoc carnosum</i>	KCTC 3252	39,237	16,220	1,262	1,327
43	<i>Leuconostoc lacits</i>	KFRI 232	39,546	12,207	1,276	2,290
44	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>mesenteroides</i>	KCTC 3505	38,324	14,208	1,620	1,246
45	<i>Leuconostoc carnosum</i>	KCTC 3524	42,651	10,325	1,462	1,203
46	<i>Leuconostoc carnosum</i>	KCTC 3525	43,628	10,426	1,552	1,276
47	<i>Leuconostoc lactis</i>	KCTC 3528	52,012	11,652	1,324	1,320
48	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCTC 3530	46,823	10,328	1,320	1,267
49	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCTC 3505	44,125	13,207	1,326	1,203

50	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>mesenteroides</i>	KFRI 145	41,032	12,039	1,342	1,380
51	<i>Leuconostoc creoris</i>	KFRI 241	40,326	11,032	1,624	1,271
52	<i>Leuconostoc menseteroides</i>	KFRI 818	38,230	16,121	1,607	1,235
53	<i>Leuconostoc menseteroides</i> sp. <i>menseteroides</i>	KFRI 819	37,210	15,421	1,362	1,276
54	<i>Leuconostoc menseteroides</i> sp. <i>menseteroides</i>	KFRI 820	41,265	11,451	1,380	1,320
55	<i>Leuconostoc menseteroides</i> sp. <i>menseteroides</i>	KFRI 821	42,562	16,520	1,427	1,346
56	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	KCTC 3101	50,232	12,842	1,271	1,390
57	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KCTC 3507	49,213	10,301	1,427	1,357
58	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KFRI 832	44,032	9,984	1,268	1,304
59	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KFRI 833	34,921	12,201	1,491	1,290
60	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KFRI 834	46,366	11,065	1,274	1,302
61	<i>Weissella confusa</i>	KFRI 1184	32,210	9,881	3,104	1,371
62	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	KFRI 00106	36,219	11,012	1,274	1,620
63	<i>Candida edax</i>	KFRI 00113	42,689	10,482	1,650	1,652
64	<i>Candidaintermedia</i>	KFRI 00115	46,865	10,113	2,111	1,384
65	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var.	KFRI 00137	53,265	13,024	1,241	1,271
66	<i>Rhodotorula glutinis</i>	KFRI 00172	51,035	10,325	1,234	1,249
67	<i>Candida tropicalis</i>	KFRI 00178	43,253	11,039	1,032	1,230
68	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	KFRI 00259	47,856	12,745	1,652	1,901
69	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00265	47,965	8,452	1,745	1,320
70	<i>Saccharomyces heterogenicus</i>	KFRI 00270	50,368	10,128	1,248	1,384
71	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	KFRI 00316	46,823	14,712	1,352	1,368
72	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	KFRI 00441	39,236	15,520	1,492	1,342
73	<i>Cryptococcus albidus</i>	KFRI 00457	39,520	14,403	1,614	1,420
74	<i>Torulaspora fermentati</i>	KFRI 00550	38,652	16,210	1,268	1,562
75	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	KFRI 00551	39,626	14,149	1,241	1,421
76	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	KFRI 00552	34,685	15,170	1,354	1,074
77	<i>Filobasidium capsuligenum</i>	KFRI 00555	41,652	11,032	1,657	1,203
78	<i>Candida rugosa</i>	KFRI 00557	45,469	12,071	1,492	1,273
79	<i>Torulaspora hansenii</i>	KFRI 00560	51,253	11,682	1,542	1,032
80	<i>Hansenula</i> sp.	KFRI 00588	42,656	12,302	1,642	1,024

81	<i>Candida</i> sp.	KFRI 00589	52,315	12,212	1,426	1,065
82	<i>Citeromyces</i> sp.	KFRI 00590	42,352	11,087	1,234	1,420
83	<i>Cantharellus cibarius</i>	KFRI 00597	49,562	10,071	1,625	1,243
84	<i>Pleurotus sajorcaju</i>	KFRI 00600	48,522	11,802	2,034	1,652
85	<i>Hericium erinaceus</i>	KFRI 00606	47,326	13,260	1,121	1,275
86	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00631	46,523	8,940	1,652	1,359
87	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	KFRI 00635	48,216	13,301	1,349	1,243
88	<i>Rhodotorula gracillis</i>	KFRI 00636	47,326	12,032	1,362	1,652
89	<i>Sporobolomyces holsaticus</i>	KFRI 00637	43,956	11,072	1,592	1,460
90	<i>Sporobolomyces holsaticus</i>	KFRI 00638	38,962	13,017	1,397	1,246
91	<i>Torulopsis candida</i>	KFRI 00639	41,356	11,420	1,032	1,320
92	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00795	43,579	9,052	3,626	1,324
93	<i>Candida lipolytica</i>	KFRI 00909	43,692	11,073	1,624	1,320
94	<i>Candida pseudotropicalis</i>	KFRI 00910	44,326	12,469	1,846	1,652
95	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00920	33,261	12,920	2,487	1,485
96	<i>Saccharomyces lactis</i>	KFRI 00922	42,953	13,402	2,610	1,320
97	<i>Saccharomyces rosei</i>	KFRI 00926	43,625	12,321	1,231	1,623
98	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00937	43,262	12,709	3,210	1,462
99	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	KFRI 00938	49,562	10,478	1,624	1,954
100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 01013	48,623	9,548	2,340	1,452
101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 01019	31,742	8,221	4,120	2,641

7. 알레르기 저감화 균주 적용성 검토

가. 선발균주의 은행외종피에서 발효성 검토

(1) 혐오취 저감화 균주 및 은행외종피 유래 균주의 우루시올 첨가 고체배지에서 생육검토

혐오취를 저감할 수 있는 균주선발을 위해 이용하였던 식품유래균주 100종(젖산균 60종, 효모 40종)과 전년도(2012년)에 분리한 은행외종피 유래 분리균주 18종, 버섯균주 9종 중 우루시올에 저항성 있는 균주를 선발하기 위하여 우루시올 첨가 고체배지 생육성 검토 실험을 실시하였다. 우루시올을 대신하여, 우루시올류가 포함되어있는 옷엑스와 은행외종피를 각각의 배지에 농도별로 첨가하여 배지를 제조하였고, 균의 생육여부와 콜로니크기(콜로니 지름의 크기, 단위: mm)를 통해서 우루시올류에 저항성이 있는 균주를 선발하였다(표 43).

실험에 이용된 균주는 총 127균주이며, 그 중 옷을 첨가한 배지와 은행외종피를 첨가한 배지 모두에서 잘 자란 균주 10종과 버섯균주 3종을 선발하였다. 선발된 균주는 *Bifidobacterium bifidum*(KFRI 743), *Enterococcus faecium*(KFRI 1182), *Lactobacillus brevis*(KFRI 146), *Lactobacillus fermentans*(KFRI 145), *Lactobacillus lactis*(KCTC 2181), *Lactobacillus sake*(KFRI 815), *Leuconostoc mesenteroides*(KCTC 3530), *Leuconostoc mensesteroides* sp. *mensesteroides*(KFRI 820), *Pediococcus cerevisiae*(KCTC3101), *Weissella confusa*(KFRI 1184), 조개껍질버섯(IUM 4919), 맛느타리버섯(IUM 4386), 느타리버섯(IUM 4367)이다.

(표 43) 기존 식품균주 및 은행외종피 유래 균주의 우루시올 첨가 고체배지에서 생육검토

(단위: mm)

No.	Strain	균주번호	배지조성					
			control (TSA)	옷 0.1%첨가	옷 1%첨가	은행외종피 1%첨가	은행외종피 10%첨가	은행외종피 50%첨가
1	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	KFRI 743	15	15	10	12	8	3
2	<i>Bifidobacterium breve</i>	KFRI 744	30	0	0	0	0	0
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC 3195	8	0	0	0	0	0
4	<i>Enterococcus faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	KFRI 685	30	0	0	0	0	0

5	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 826	18	20	3	0	0	0
6	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 823	5	50	1	0	0	0
7	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 822	6	0	0	0	0	0
8	<i>Enterococcus faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	KFRI 685	18	8	0	0	0	0
9	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 1182	22	16	9	19	8	0
10	<i>Eubacterium limosum</i>	KFRI 753	11	0	0	0	0	0
11	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	KFRI 238	25	11	0	4	2	2
12	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCTC 3102	33	22	0	0	0	0
13	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCTC 3498	19	6	0	0	0	0
14	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 146	8	6	4	1	1	1
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 812	8	0	0	1	1	1
16	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 805	7	3	0	1	2	1
17	<i>Lactobacillus casei</i>	KFRI 228	8	6	0	1	2	1
18	<i>Lactobacillus corniformis</i> subsp. <i>corniformis</i>	KCTC 3505	15	2	2	2	1	1
19	<i>Lactobacillus curvatus</i>	KFRI 654	10	0	0	0	0	0
20	<i>Lactobacillus fermentans</i>	KFRI 145	19	11	11	3	2	1
21	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	KFRI 229	26	26	1	0	0	0
22	<i>Lactobacillus honohiechii</i>	KFRI 234	14	8	2	0	0	0
23	<i>Lactobacillus lactis</i>	KCTC 2181	39	30	23	20	20	1
24	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KFRI 1183	14	1	0	0	0	0
25	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KFRI 481	10	0	0	0	0	0
26	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCTC3099	22	10	0	5	0	0
27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 464	11	1	0	0	0	0
28	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 144	22	0	0	0	0	0
29	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 814	20	3	0	0	0	0
30	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 813	4	2	0	0	0	0
31	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 660	4	4	2	0	0	0
32	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 471	4	2	0	0	0	0
33	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 470	4	2	0	0	0	0
34	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KFRI 464	4	0	0	0	0	0
35	<i>Lactobacillus sake</i>	KFRI 815	15	15	12	15	8	1
36	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	KFRI 669	4	2	0	0	0	0

37	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	KFRI 670	5	0	0	0	0	0
38	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	KFRI 671	23	11	0	0	0	0
39	<i>Lactococcus plantarum</i>	KFRI 1186	23	1	0	0	0	0
40	<i>Lactococcus plantarum</i>	KCTC 1048	4	3	0	0	0	0
41	<i>Leuconostoc carnosum</i>	KCTC 3252	28	0	0	0	0	0
42	<i>Leuconostoc lactis</i>	KFRI 232	5	2	0	0	0	0
43	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>mesenteroides</i>	KCTC 3505	5	1	0	0	0	0
44	<i>Leuconostoc carnosum</i>	KCTC 3524	27	11	0	0	0	0
45	<i>Leuconostoc carnosum</i>	KCTC 3525	7	3	0	0	0	0
46	<i>Leuconostoc lactis</i>	KCTC 3528	13	3	0	3	1	1
47	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCTC 3530	8	3	1	1	1	1
48	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCTC 3505	7	3	0	0	0	0
49	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>mesenteroides</i>	KFRI 145	24	3	0	0	0	0
50	<i>Leuconostoc creoris</i>	KFRI 241	4	3	0	1	1	1
51	<i>Leuconostoc menseteroides</i>	KFRI 818	23	2	0	0	0	0
52	<i>Leuconostoc menseteroides</i> sp. <i>menseteroides</i>	KFRI 819	23	8	0	0	0	0
53	<i>Leuconostoc menseteroides</i> sp. <i>menseteroides</i>	KFRI 820	19	6	1	19	19	1
54	<i>Leuconostoc menseteroides</i> sp. <i>menseteroides</i>	KFRI 821	4	5	0	3	0	0
55	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	KCTC 3101	7	6	1	1	1	1
56	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KCTC 3507	11	5	0	2	1	1
57	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KFRI 832	21	5	1	2	1	1
58	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KFRI 833	6	5	0	2	1	1
59	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KFRI 834	6	0	0	0	0	0
60	<i>Weissella confusa</i>	KFRI 1184	12	10	0	8	6	3
61	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	KFRI 00106	30	0	0	0	0	0
62	<i>Candida edax</i>	KFRI 00113	5	0	0	0	0	0
63	<i>Candidaintermedia</i>	KFRI 00115	8	0	0	0	0	0
64	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var.	KFRI 00137	16	0	0	5	0	0
65	<i>Rhodotorula glutinis</i>	KFRI 00172	5	0	0	0	0	0
66	<i>Candida tropicalis</i>	KFRI 00178	27	0	0	0	0	0
67	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	KFRI 00259	8	0	0	0	0	0

68	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00265	9	0	0	0	0	0
69	<i>Saccharomyces heterogenicus</i>	KFRI 00270	14	0	0	0	0	0
70	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	KFRI 00316	7	0	0	0	0	0
71	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	KFRI 00441	5	0	0	0	0	0
72	<i>Cryptococcus albidus</i>	KFRI 00457	6	0	0	0	0	0
73	<i>Torulaspora fermentati</i>	KFRI 00550	5	0	0	0	0	0
74	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	KFRI 00551	4	0	0	0	0	0
75	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	KFRI 00552	7	0	0	0	0	0
76	<i>Filobasidium capsuligenum</i>	KFRI 00555	8	0	0	0	0	0
77	<i>Candida rugosa</i>	KFRI 00557	3	0	0	0	0	0
78	<i>Torulaspora hansenii</i>	KFRI 00560	16	0	0	0	0	0
79	<i>Hansenula</i> sp.	KFRI 00588	9	0	0	0	0	0
80	<i>Candida</i> sp.	KFRI 00589	7	0	0	0	0	0
81	<i>Citeromyces</i> sp.	KFRI 00590	11	0	0	0	0	0
82	<i>Cantharellus cibarius</i>	KFRI 00597	10	0	0	0	0	0
83	<i>Pleurotus sajorcaju</i>	KFRI 00600	20	0	0	0	0	0
84	<i>Hericium erinaceus</i>	KFRI 00606	18	0	0	0	0	0
85	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00631	3	0	0	0	0	0
86	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	KFRI 00635	3	0	0	0	0	0
87	<i>Rhodotorula gracillis</i>	KFRI 00636	9	0	0	0	0	0
88	<i>Sporobolomyces holsaticus</i>	KFRI 00637	3.5	0	0	2	0	0
89	<i>Sporobolomyces holsaticus</i>	KFRI 00638	11	0	0	0	0	0
90	<i>Torulopsis candida</i>	KFRI 00639	8	0	0	0	0	0
91	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00795	9	0	0	0	0	0
92	<i>Candida lipolytica</i>	KFRI 00909	21	0	0	0	0	0
93	<i>Candida pseudotropicalis</i>	KFRI 00910	9	0	0	0	0	0
94	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00920	2	0	0	0	0	0

95	<i>Saccharomyces lactis</i>	KFRI 00922	11	0	0	7	2	0
96	<i>Saccharomyces rosei</i>	KFRI 00926	13	0	0	6	3	0
97	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00937	5	0	0	0	0	0
98	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	KFRI 00938	8.5	0	0	0	0	0
99	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 01013	10	0	0	0	0	0
100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 01019	9	0	0	5	2	0
101	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	은행외종피-G01	5	1	1	3	2	0
102	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	은행외종피-G02	6	1	0	1	0	0
103	<i>Candida railenensis</i>	은행외종피-G03	6	0	0	1	0	0
104	<i>Moraxella osloensis</i>	은행외종피-G04	6	1	0	2	0	0
105	<i>Bacillus</i> sp.	은행외종피-G05	30	1	0	5	0	0
106	<i>Candida railenensis</i>	은행외종피-G06	10	2	0	2	0	0
107	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	은행외종피-G07	10	1	0	1	0	0
108	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	은행외종피-G08	8	2	0	1	0	0
109	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	은행외종피-G09	16	3	0	2	0	0
110	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	은행외종피-G10	5	3	0	1	0	0
111	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	은행외종피-G11	5	3	0	1	0	0
112	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	은행외종피-G12	10	4	0	2	0	0
113	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20103	은행외종피-G13	8	2	0	1	0	0
114	<i>Staphylococcus</i> sp.	은행외종피-G14	7	1	0	2	0	0
115	<i>Bacillus subtilis</i> sp.	은행외종피-G15	10	2	0	2	0	0
116	<i>Staphylococcus</i> sp.	은행외종피-G16	7	2	0	1	0	0
117	<i>Bacillus licheniformis</i>	은행외종피-G17	14	1	0	2	0	0
118	<i>Bacillus licheniformis</i>	은행외종피-G18	15	1	0	2	0	0
119	조개껍질버섯	IUM 4919	52	17.5	14.5	30	36.5	0
120	말굽버섯	IUM 1897	30	0	0	0	0	0
121	좀벌집버섯	IUM 4412	77.5	23	0	31	0	0
122	상황버섯	IUM 4808	31.5	0	0	0	0	0
123	표고버섯	IUM 4320	30	0	0	0	0	0
124	팽이버섯	IUM 4972	73	0	0	0	0	0
125	영지버섯	IUM 47	80	0	0	0	0	0
126	맛느타리버섯	IUM 4386	57.5	36.5	17	22.5	40	0
127	느타리버섯	IUM 4367	61	26.5	24.5	21.5	32.5	0

(2) 선발된 혐오취저감화 균주 및 은행외종피 유래 균주의 우루시올 첨가 액체배지에서 생육검토

앞선 우루시올류를 첨가한 고체배지의 생육실험에서 선발한 10개 균주 *Bifidobacterium bifidum*(KFRI 743), *Enterococcus faecium*(KFRI 1182), *Lactobacillus brevis*(KFRI 146), *Lactobacillus fermentans*(KFRI 145), *Lactobacillus lactis*(KCTC 2181), *Lactobacillus sake*(KFRI 815), *Leuconostoc mesenteroides*(KCTC 3530), *Leuconostoc menseteroides sp. menseteroides*(KFRI 820), *Pediococcus cerevisiae*(KCTC3101), *Weissella confusa*(KFRI 1184)를 대상으로 우루시올류를 첨가한 액체배지에서의 생육확인을 위한 실험을 진행하였다.

실제 은행외종피 발효물의 제조시 액체배지에서 균주를 접종하기 때문에 우루시올류를 첨가한 액체배지를 이용하였을 때, 과연 선발한 균주가 잘 생육할 수 있는지 여부를 확인하는 실험을 진행한 것이다. 액체배양의 경우 24시간, 48시간으로 2차례 나누어 균수를 측정하였고, 그 결과는 다음의 표 44, 표 45에 나타내었다.

(표 44) 선발된 균주의 우루시올 첨가 액체배지에서 24시간 배양 후 생균수 확인

No.	Strain	균주명	control	웃 0.1%	웃 1%	은행외종피 0.5%	은행외종피 5%	은행외종피 10%
			Log (CFU/ml)	Log (CFU/ml)	Log (CFU/ml)	Log (CFU/ml)	Log (CFU/ml)	Log (CFU/ml)
1	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	KFRI 743	9.34	9.31	8.95	8.80	8.75	8.67
2	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 1182	9.14	9.14	8.87	9.04	8.97	8.74
3	<i>Lactobacillus fermentans</i>	KFRI 146	7.59	5.68	5.71	4.49	4.51	3.38
4	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 145	9.14	8.50	7.69	8.76	8.78	8.67
5	<i>Lactobacillus lactis</i>	KCTC 2181	8.14	<10 ³	<10 ³	3.85	3.62	3.41
6	<i>Lactobacillus sake</i>	KFRI 815	8.80	8.76	8.70	8.63	8.59	8.51
7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCTC 3530	7.80	7.78	6.48	8.96	4.82	4.51
8	<i>Leuconostoc menseteroides sp menseteroides</i>	KFRI 820	8.75	6.88	6.84	4.65	4.24	<10 ³
9	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	KCTC3101	8.93	8.91	8.72	4.35	<10 ³	<10 ³
10	<i>Weissella confusa</i>	KFRI 1184	8.97	8.09	7.77	6.05	5.95	5.56

(표 45) 선발된 균주의 우루시올 첨가 액체배지에서 48시간 배양 후 생균수 확인

No.	Strain	균주명	control	웃 0.1%	웃 1%	은행외종피 0.5%	은행외종피 5%	은행외종피 10%
			Log (CFU/ml)	Log (CFU/ml)	Log (CFU/ml)	Log (CFU/ml)	Log (CFU/ml)	Log (CFU/ml)
1	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	KFRI 743	9.84	9.82	9.60	9.88	9.76	9.58
10	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 1182	9.83	9.83	9.58	9.79	9.71	9.44
15	<i>Lactobacillus fermentans</i>	KFRI 146	8.83	5.75	5.81	4.99	4.62	<10 ³
21	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 145	9.83	9.18	8.55	9.54	9.71	9.83
24	<i>Lactobacillus lactis</i>	KCTC 2181	8.74	3.00	<10 ³	5.78	5.60	4.19
36	<i>Lactobacillus sake</i>	KFRI 815	9.16	9.01	9.10	8.81	8.92	8.72
48	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCTC 3530	9.05	7.80	6.90	9.15	4.88	<10 ³
54	<i>Leuconostoc menseteroides sp menseteroides</i>	KFRI 820	8.51	6.90	6.89	6.32	6.00	<10 ³
56	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	KCTC3101	9.53	9.25	7.67	<10 ³	<10 ³	<10 ³
62	<i>Weissella confusa</i>	KFRI 1184	9.68	8.31	7.77	6.35	6.00	5.96

10개의 선발된 균주 중 *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus fermentans*, *Lactobacillus sake* 4개 균주는 대조구와 비교하였을 때, 모든 실험군에서 큰 차이를 보이지 않고 우수한 생육을 나타냈다. 24시간동안 배양한 시료보다 48시간동안 배양한 시료의 경우가 균이 더 많이 자랐음을 확인했다. 특히 가장 높은 균수를 나타낸 *Bifidobacterium bifidum*는 무첨가균인 대조구의 균수는 log 9.84 CFU/ml 이었고, 웃엑스와 은행외종피를 첨가한 시료 모두 약 log 9 CFU/mL 이상의 균집크기를 나타냈다. 다른 6개의 균주보다 선발된 4개 균주 *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sake*가 보다 높은 생육정도를 나타내었다. 또한, 4균주 모두 이전의 혐오취확인 실험에서 butyric acid와 hexanoic acid이 감소됨을 확인했고, 특히 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sake* 두 개 균주는 마스크링효과도 기대되는 균주이다.

(3) 선발균주를 이용한 은행외종피 발효물의 제조

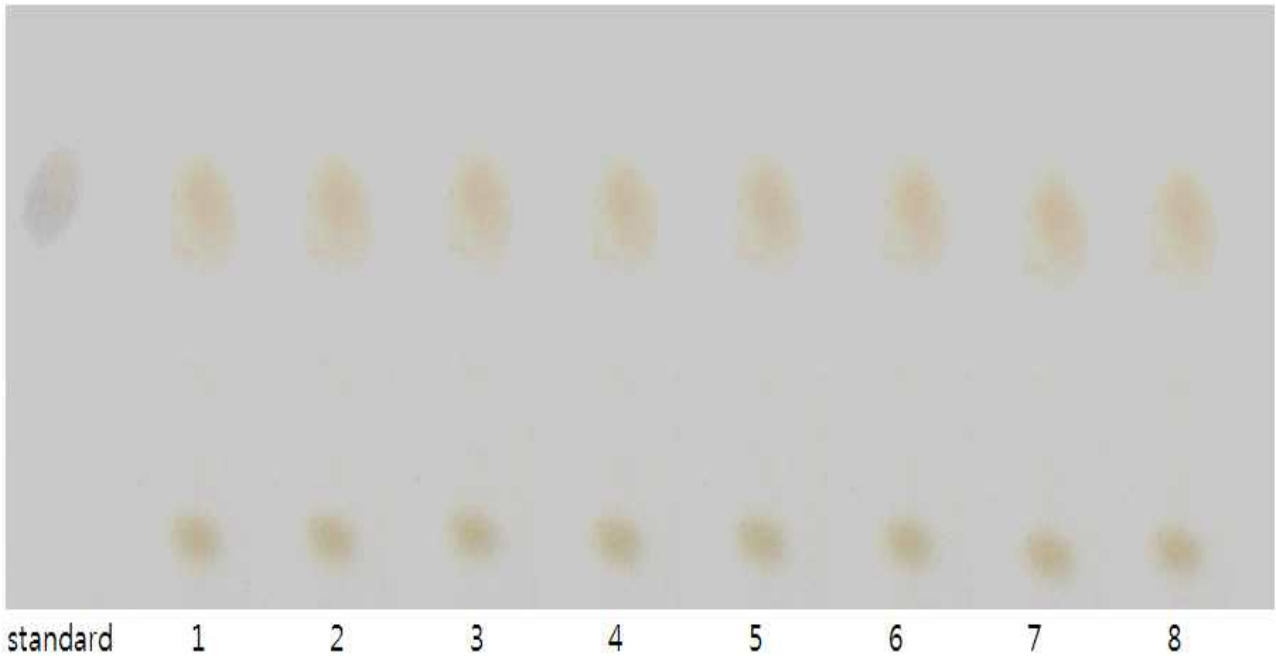
앞선 실험을 통하여 은행외종피의 혐오취원을 저감하고 우루시올류에 저항성 있는 균주 4종과 우수버섯균주 3종을 선발했다. 4가지 균주는 은행외종피에 직접 접종하여 발효물을 제조하고 분석을 실시하였다.

혐오취원인 butyric acid와 hexanoic acid의 함량변화를 표 46에 나타내었다. 균주를 배양하기 전의 은행외종피배지 자체의 butyric acid의 함량은 54,199 ppm이고 hexanoic acid의 함량은 17,045 ppm이었다. Butyric acid의 함량변화는 *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sake* 균주를 첨가하였을 때, 각각 39,432 ppm, 31,362 ppm, 36,881 ppm, 32,245 ppm으로 약 1.5배 감소하였다. 그러나 버섯균주의 경우 butyric acid의 함량변화는 거의 나타나지 않았다. Hexanoic acid의 함량은 *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sake*, 느타리버섯 균주를 접종하였을 때 9,651 ppm, 7,292 ppm, 6,554 ppm, 7,501 ppm, 8,077 ppm으로 약 2배 감소하는 것으로 나타났다. 균주를 은행외종피에 접종하여 butyric acid와 hexanoic acid를 저감할 수 있는 균주는 Hexanoic acid의 함량은 *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sake*, 느타리버섯 등 5 가지로 향후 본 균주를 이용한 발효물의 제조연구를 진행하였다. 현재 본 균주를 이용하여 혐오취원을 저감하는 새로운 발효공정을 탐색중이며, 중탄산나트륨, 중탄산칼륨, 중탄산칼슘과 같은 첨가물을 이용한 발효물의 제조실험을 진행하였다.

(표 46) 혐오취원인 butyric acid와 hexanoic acid의 함량변화

No.	Strain	균주번호	butyric acid 함량 (ppm)	hexanoic acid 함량 (ppm)
1	균주 무첨가 은행외종피배지	-	54,199	17,045
2	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	KFRI 743	39,432	9,651
3	<i>Enterococcus faecium</i>	KFRI 1182	31,362	7,292
4	<i>Lactobacillus brevis</i>	KFRI 145	36,881	6,554
5	<i>Lactobacillus sake</i>	KFRI 815	32,245	7,501
6	조개껍질버섯	IIUM 4919	53,821	13,678
7	맛느타리버섯	IUM 4386	51,364	12,183
8	느타리버섯	IUM 4367	51,577	8,077

알레르기원인 우루시올류의 분석은 정성평가인 TLC 분석과 정량평가인 HPLC분석으로 나누어서 진행하였다. 앞서 실험에서 우루시올을 추출한 방법과 같은 방법으로 우루시올을 추출하였고(그림 4), 정성분석을 실시하였다(그림 46). 우루시올류의 Rf치는 0.80로 선행연구와 유사한 우루시올 Rf치(0.82)를 구할 수 있었고, 8개 시료모두 비슷한 spot을 나타내었다.



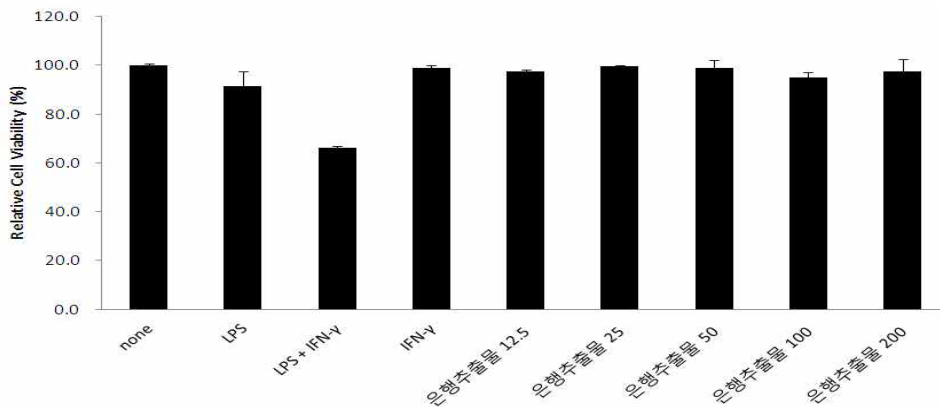
(그림 46) 선발균주를 이용한 발효물의 우루시올 정성평가(TLC 분석)

8. 면역력증진 균주 및 발효물의 기능향상 검토

가. 은행의종피 자체의 면역력 증진효과 검토

(1) 세포독성평가

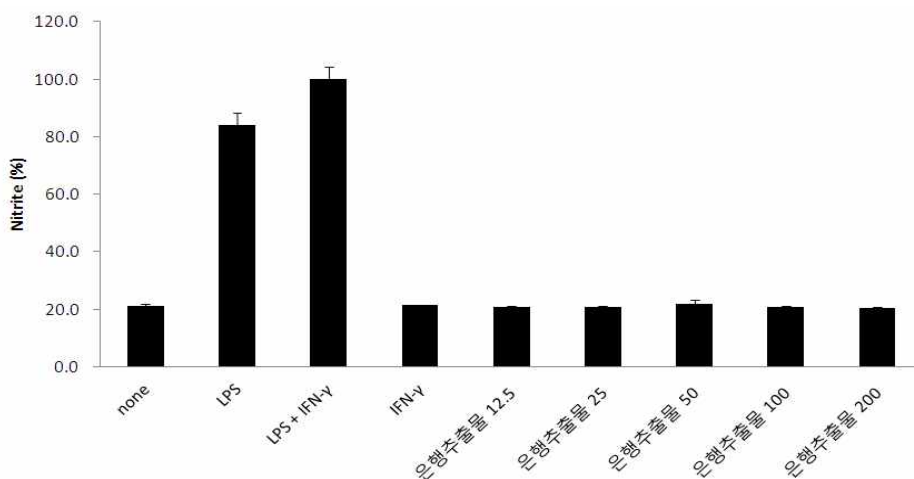
은행 추출물의 세포 독성을 평가한 결과 모든 농도에서 대조군(none) 대비 90%이상의 세포 생존율을 보여 200 µg/mL 농도까지 세포 독성이 없는 것으로 나타났다(그림 47).



(그림 47). 은행 추출물 세포 독성 평가

(2) 산화질소(NO) 생성량 확인

은행 추출물의 산화질소 생성량을 확인한 결과 농도의 시료에서 산화질소 생성량이 대조군 (LPS+IFN-γ) 대비 20%로, 활성을 유도하지 않은 IFN-γ 처리군과 같은 정도를 나타내 IFN-γ로 감각시킨 면역 세포는 은행 추출물 처리에 의한 활성화 효능이 없는 것으로 판단되었다(그림 48).



(그림 48) 은행 추출물 산화질소 생성능

9. 발효공정 다변화에 의한 저감화

가. 온도에 따른 발효공정 연구

(1) 온도와 산소공급에 따른 선발균주의 growth rate 확인

은행외종피 최적 발효균주로 선발된 젖산균과 효모균은 최적 배양조건을 확인하기 위하여 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서 48시간 동안 배양을 실시하였다. 각각의 균주의 growth curve를 아래의 그림에 모두 나타내었다.

*B. longum*의 경우, 혐기배양 조건과 30℃에서 가장 빠르게 성장하였다. 특히 호기조건보다는 혐기조건에서 더 잘 생장을 하는 것을 확인하였고, 혐기조건하에서 30℃, 48시간 까지 배양을 지속하였을 때 약 10 log CFU/mL의 균수를 나타냈다(그림 40, 41). 이 같은 배양조건은 은행외종피를 10%로 첨가한 TSB배지에서도 비슷한 양상을 보였다.

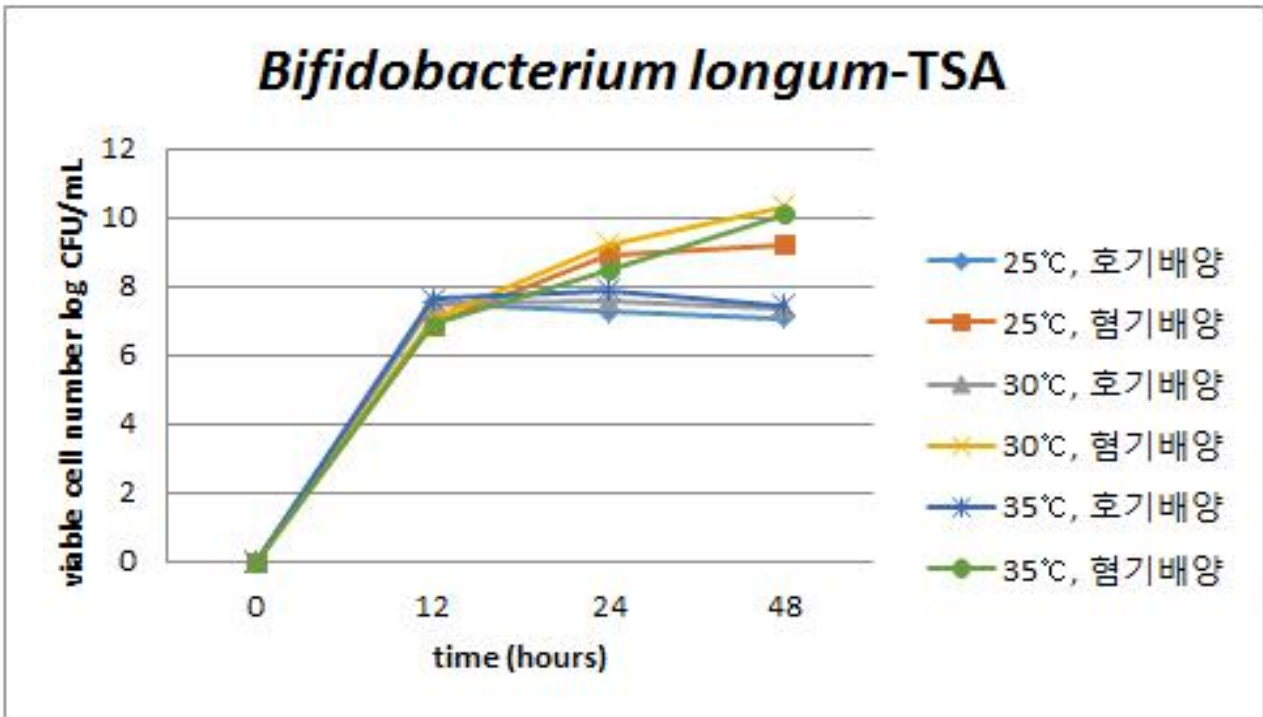
E. faecium, *L. brevis*, *L. sakei*는 혐기배양조건과 호기배양조건 모두에서 잘 자랐으며, 30-35℃의 배양온도에서 높은 생장을 나타내었다(그림 42, 43, 44, 45, 46, 47). *S. cerevisiae*는 혐기조건에서는 다소 낮은 균수를 나타내었다. 호기조건에서 더 높은 생장률을 나타내었으며, 가장 생장이 빠르고 높은 온도는 25℃에서 배양하는 조건이었다(그림 48, 49).

각 균주별 성장곡선은 다음의 그림 49-58와 표 47에 도표로 나타내었다.

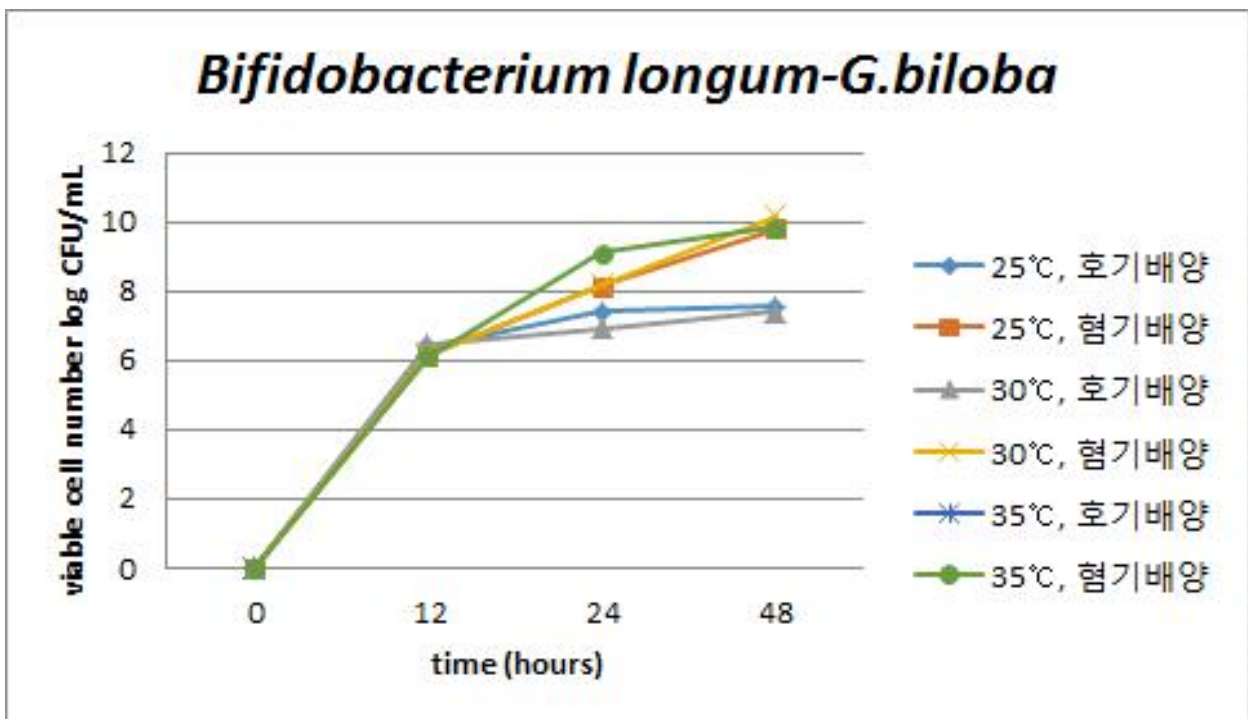
(표 47) 각 균주별 은행외종피에서 최적배양조건

	배양온도(℃)	혐기/호기
<i>B. longum</i>	30-35	혐기
<i>E. faecium</i>	30-35	혐기/호기
<i>L. brevis</i>	30-35	혐기/호기
<i>L. sakei</i>	30-35	혐기/호기
<i>S. cerevisiae</i>	25	호기

① *Bifidobacterium longum*

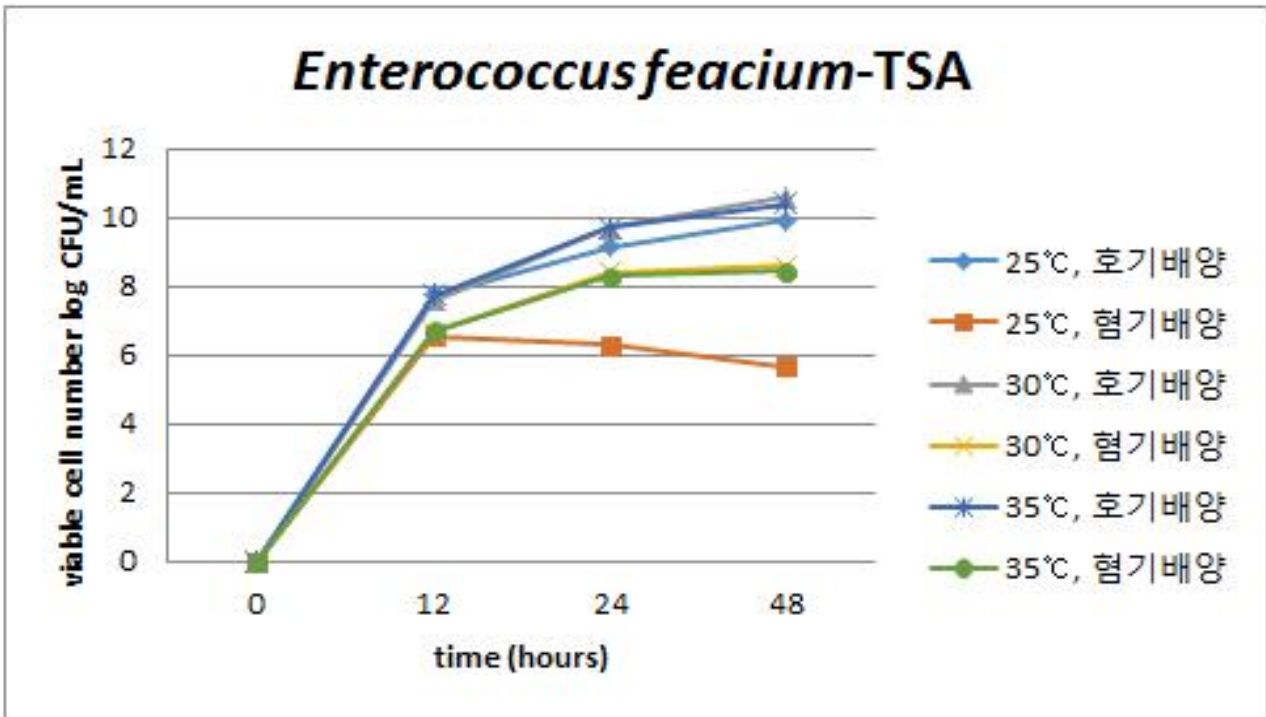


(그림 49) 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서의 TSB에 접종한 *B. longum*의 생장곡선

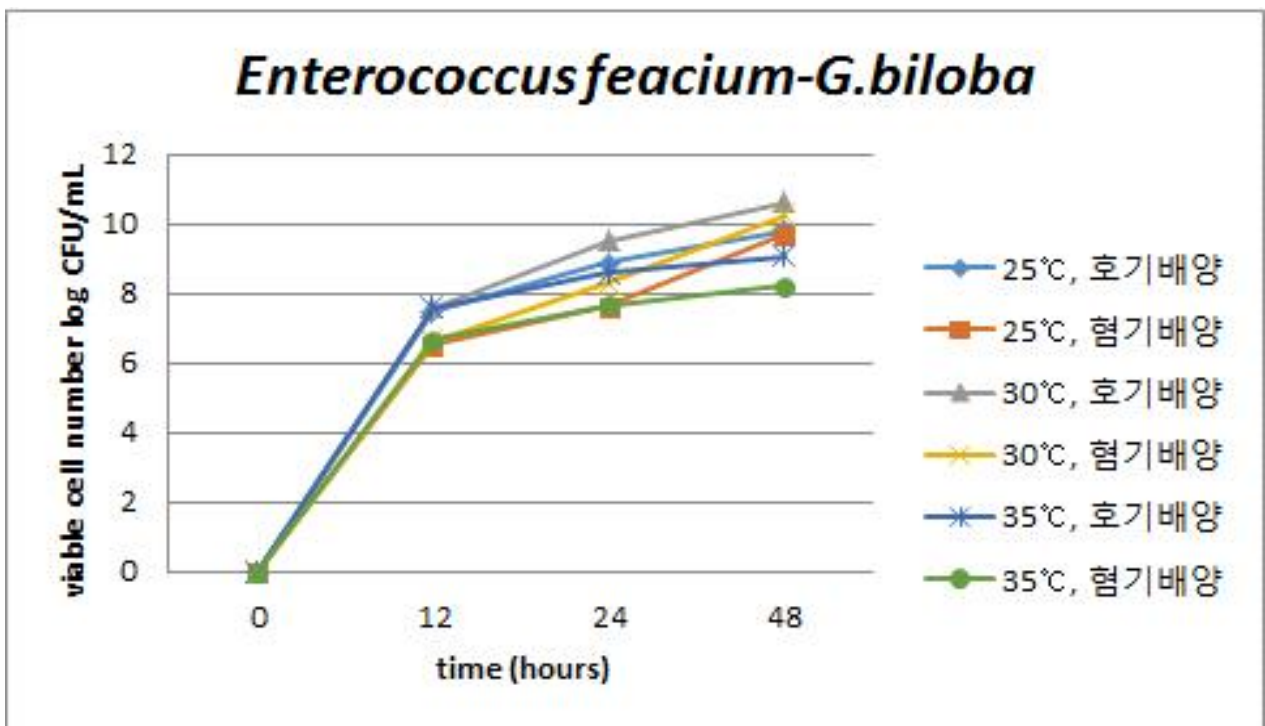


(그림 50) 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서의 10% 은행외종피를 첨가한 TSB에 접종한 *B. longum*의 생장곡선

② *Enterococcus faecium*

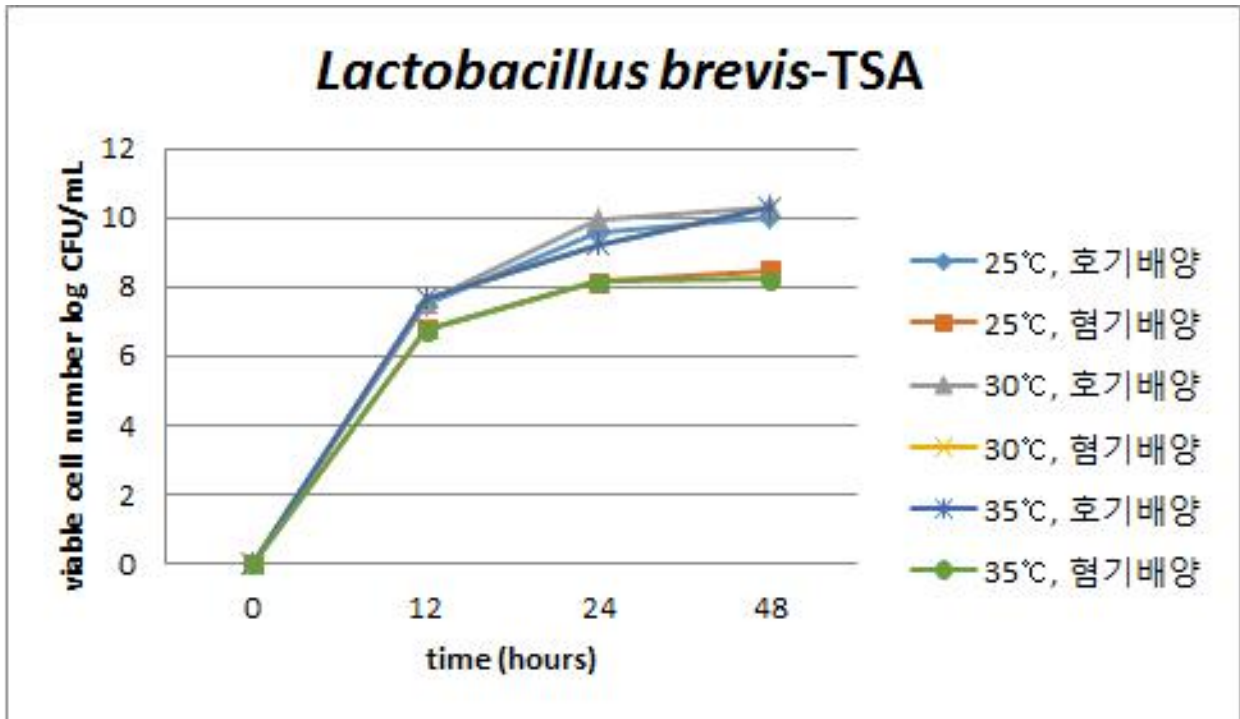


(그림 51) 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서의 TSB에 접종한 *E. faecium*의 생장곡선

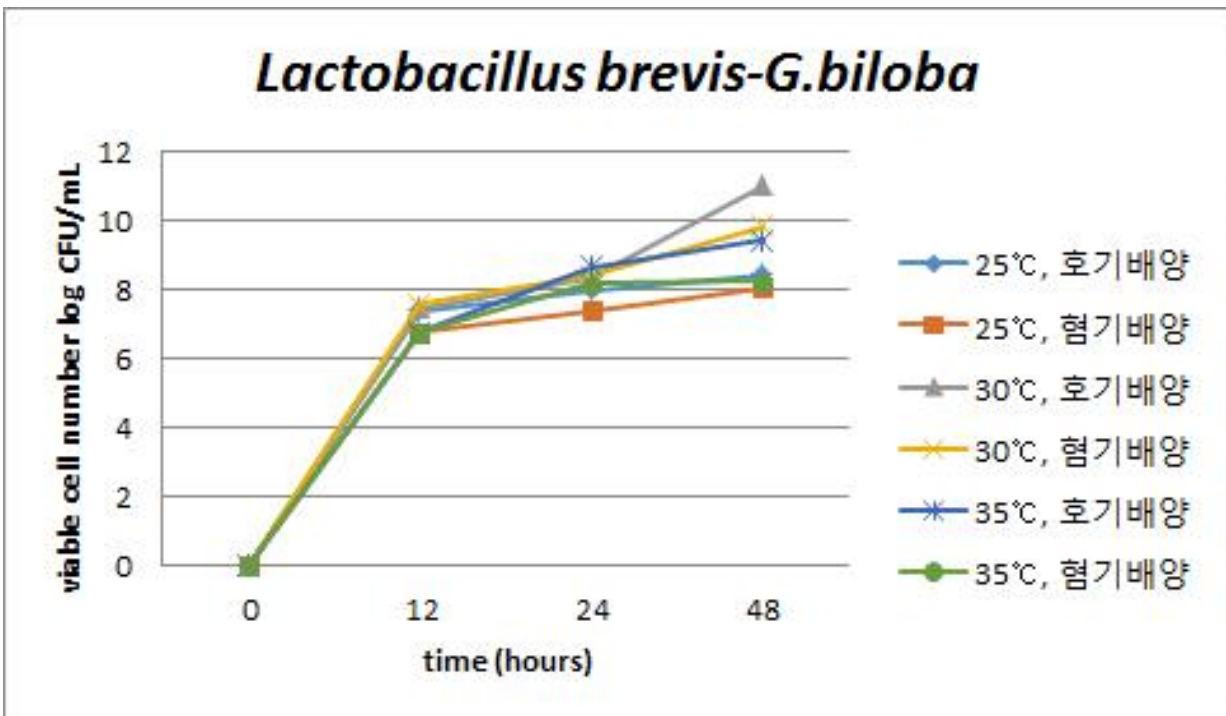


(그림 52) 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서의 10% 은행의종피를 첨가한 TSB에 접종한 *E. faecium*의 생장곡선

③ *Lactobacillus brevis*

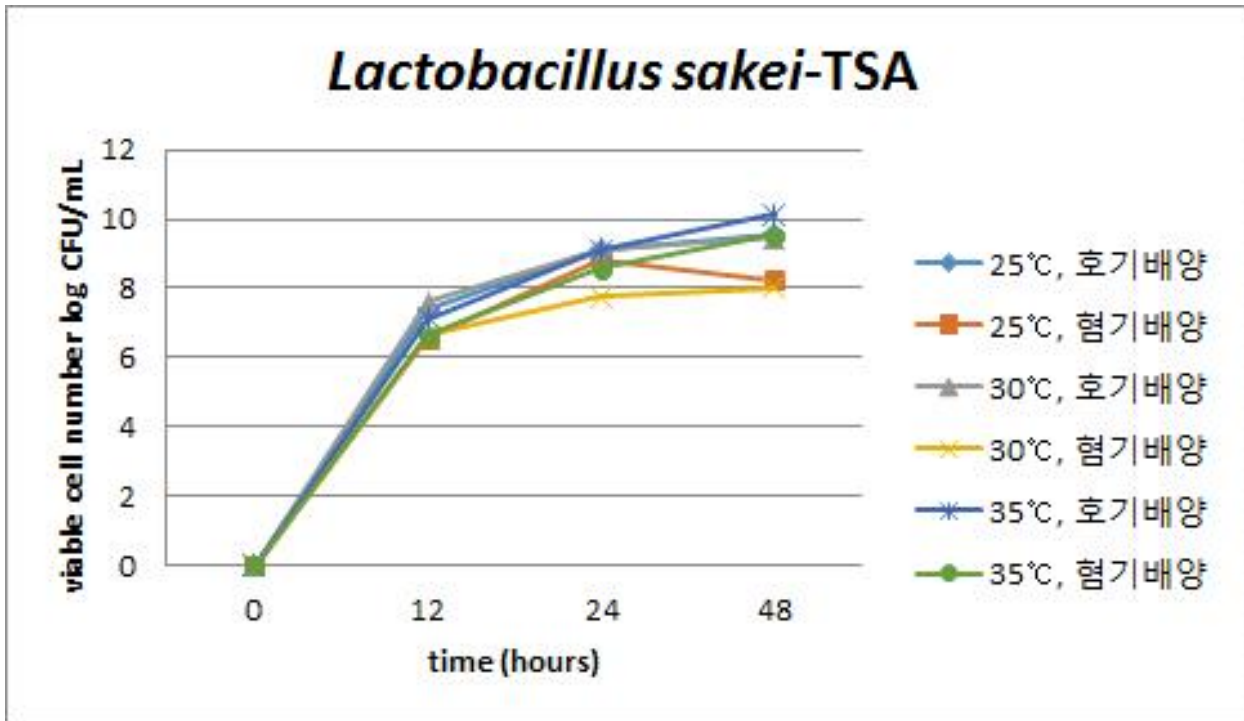


(그림 53) 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서의 10% 은행외종피를 첨가한 TSB에 접종한 *L. brevis*의 성장곡선

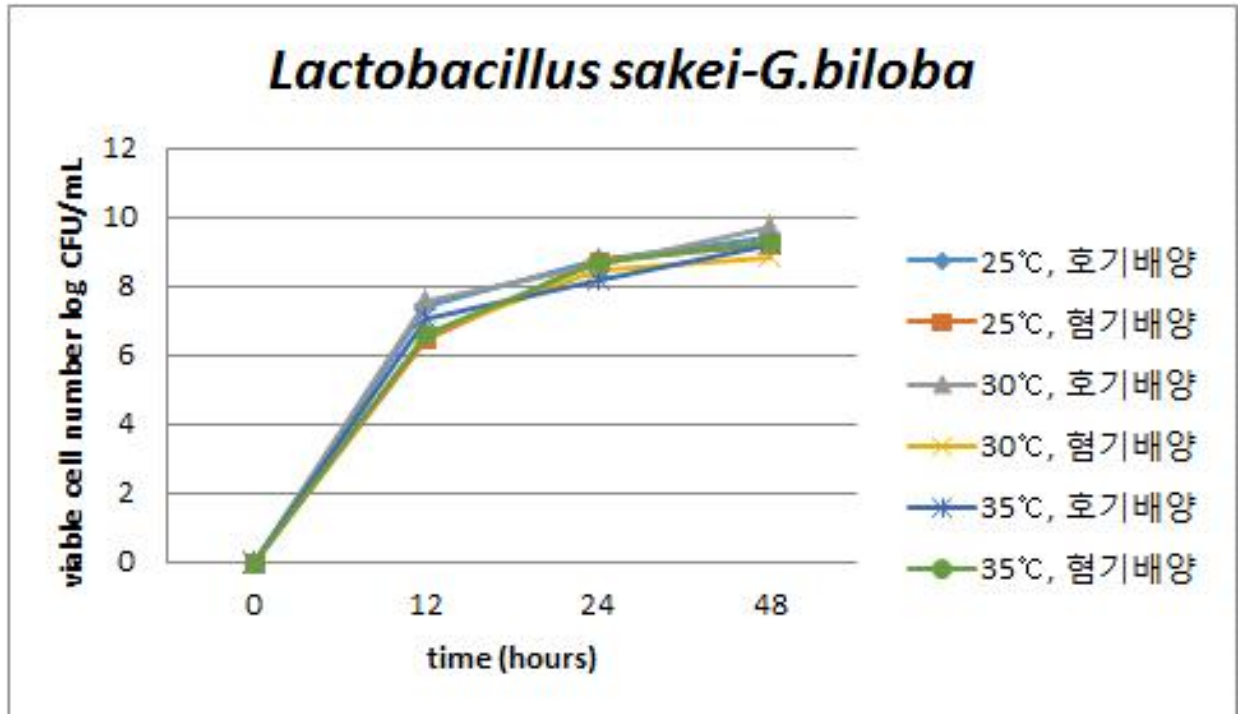


(그림 54) 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서의 10% 은행외종피를 첨가한 TSB에 접종한 *L. brevis*의 성장곡선

④ *Lactobacillus sakei*

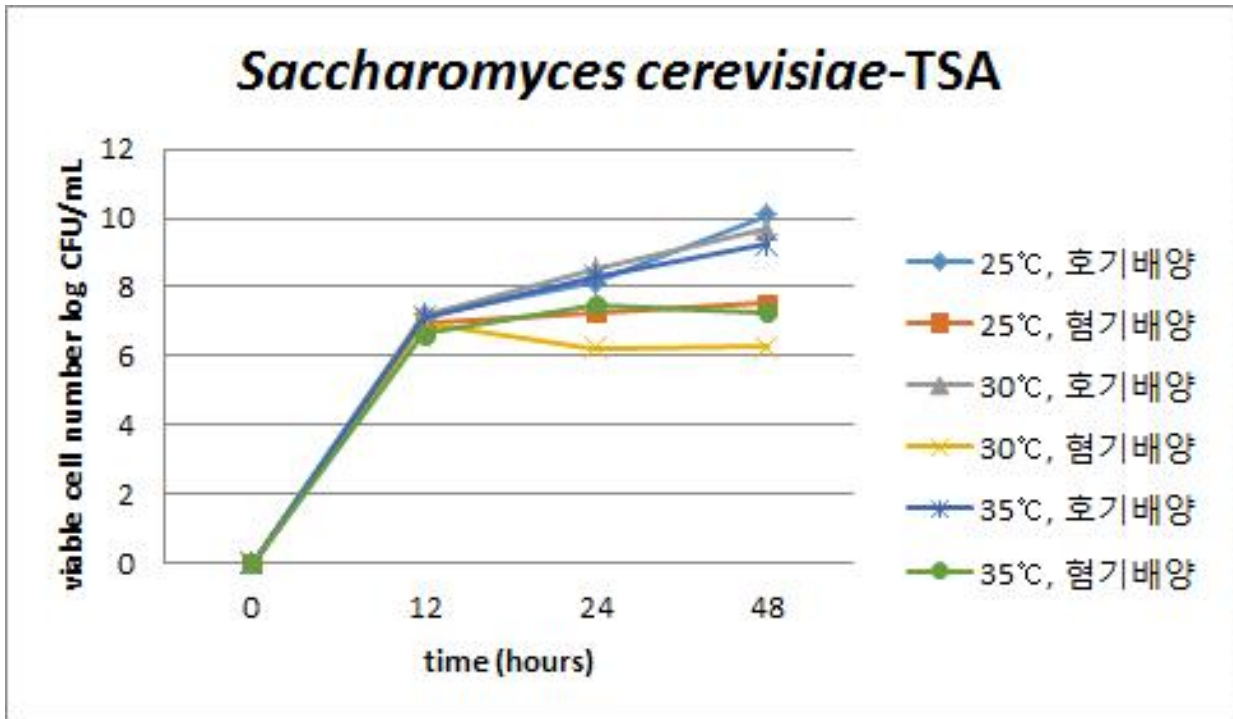


(그림 55) 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서의 10% 은행외종피를 첨가한 TSB에 접종한 *L. sakei*의 성장곡선

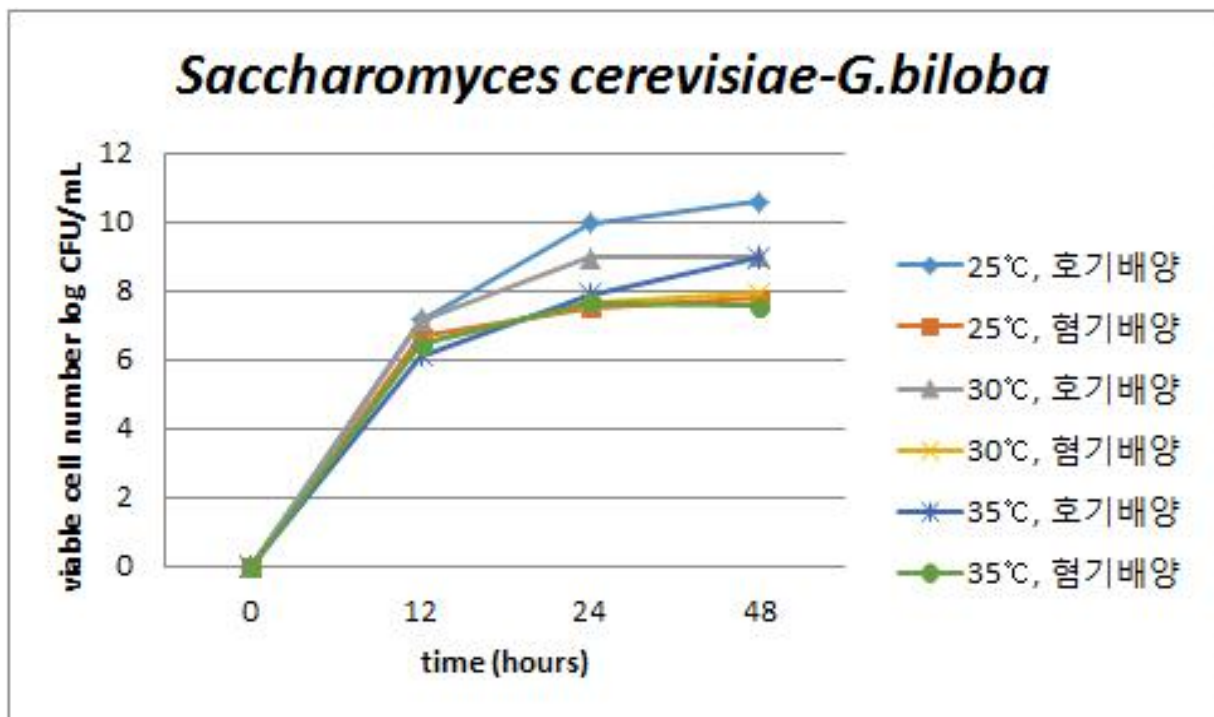


(그림 56) 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서의 10% 은행외종피를 첨가한 TSB에 접종한 *L. brevis*의 성장곡선

⑤ *Saccharomyces cerevisiae*



(그림 57) 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서의 10% 은행외종피를 첨가한 TSB에 접종한 *S. cerevisiae*의 성장곡선



(그림 58) 서로 다른 온도와 서로 다른 산소공급조건에서의 10% 은행외종피를 첨가한 TSB에 접종한 *S. cerevisiae*의 성장곡선

나. 발효조건변화의 다변화(혼합배양 등 발효공정 변화)연구

(1) 선발균주의 고체배양

(가) 젖산균/효모균을 이용한 은행외종피 발효물의 유기산함량변화

식품유래 균주 젖산균 4종과 효모 1종을 이용하여 은행외종피 발효물을 제조하였다. 제조된 은행외종피 발효물의 혐오취를 분석하여 표 48에 나타내었다. 균주를 접종하여 발효한 경우, 대조균인 은행외종피에 비하여 혐오취가 감소함을 확인할 수 있었다. 그 중 효과가 좋은 *L. brevis*와 *S. cerevisiae*를 최종발효산물을 만드는 균종으로 선발하였다.

(표 48) 젖산균과 효모균을 이용한 은행외종피 발효물의 혐오취분석

No.	시료명	접종균주 및 배지(기질)	butyric acid (ppm)
1	control 1	무발효	36745.41
2	1-GB1	<i>B. longum</i>	29745.21
3	1-GB2	<i>E. feacium</i>	21933.14
4	1-GB3	<i>L. brevis</i>	16629.96
5	1-GB4	<i>L. sakei</i>	16362.20
6	1-GB5	<i>S. cerevisiae</i>	17455.89
7	control 2	무발효	15264.24
8	2-GB1	<i>B. longum</i>	8388.58
9	2-GB2	<i>E. feacium</i>	9720.88
10	2-GB3	<i>L. brevis</i>	8703.83
11	2-GB4	<i>L. sakei</i>	9275.94
12	2-GB5	<i>S. cerevisiae</i>	7481.08
13	control 3	무발효	8417.54
14	3-GB1	<i>B. longum</i>	6054.22
15	3-GB2	<i>E. feacium</i>	4679.43
16	3-GB3	<i>L. brevis</i>	5869.12
17	3-GB4	<i>L. sakei</i>	5864.08
18	3-GB5	<i>S. cerevisiae</i>	4637.92
19	control 4	무발효	4478.57
20	4-GB1	<i>B. longum</i>	1850.93
21	4-GB2	<i>E. feacium</i>	1501.05
22	4-GB3	<i>L. brevis</i>	1785.93
23	4-GB4	<i>L. sakei</i>	1563.95
24	4-GB5	<i>S. cerevisiae</i>	1473.03

(나) 다단계 복합발효 균주를 이용한 은행외종피 발효물의 제조

*L. brevis*와 *S. cereviae*, 그리고 2차년 도에 선발한 버섯균주중 맛느타리버섯을 최종 발효에 이용할 종균으로 선발하였다. 2차년 도에 선발된 버섯균주 중 맛느타리버섯과 조개껍질버섯 중 약용으로 쓰이는 조개껍질버섯보다 향후 식품으로써 이용가치를 높이기 위하여 식용 섭취하는 맛느타리버섯을 최종 발효종균으로 선정하였다.

따라서 이 3가지 종균을 이용하여 복합발효한 은행외종피에 혐오취변화를 표 49에 나타내었다. 본 발효물의 제조에 이용된 은행외종피는 1차적으로 열수공정을 거친 은행외종피로 이미 원재료(53,745 ppm)대비 약 30배(1,990 ppm)의 혐오취를 저감한 은행외종피를 이용하여 발효에 이용하였다.

(표 49) 다단계 복합발효균주를 이용한 은행외종피 발효물의 유기산 및 혐오취 분석

시료명	malic acid (ppm)	lactic acid (ppm)	shikimic acid (ppm)	Fumaric acid (ppm)	butyric acid (ppm)
은행외종피(열수처리 후)	143,516	26,660	658,810	7,740	1,990
<i>L. brevis</i> 발효물	289,869	42,020	953,710	15,000	1,060
<i>S. cereviae</i> 발효물	11,484	n/a	42,900	590	1,280
맛느타리 발효물	25,231	n/a	60,720	1,120	1,800
맛느타리+ <i>L. brevis</i> 발효물	43,084	11,360	110,610	2,860	889
맛느타리+ <i>S. cereviae</i> 발효물	51,525	n/a	131,770	3,330	957

가장 높은 수준으로 혐오취를 저감한 발효물은 맛느타리와 *L. brevis*의 복합발효물로 발효전의 열수처리한 은행외종피 대비 약 2배 이상의 혐오취 감소(1/2수준)을 달성하였다. 이것은 원재료인 무처리 은행외종피와 비교하였을 때 약 60배 이상의 혐오취 감소(1/60 수준)를 이끌어 낸 것이다. 맛느타리버섯과 *S. cereviae* 복합발효물 또한 butyric acid 함량 957 ppm로 원재료 대비 약 60배의 감소를 나타내었다.

(다) 선발균주를 이용한 발효물의 폴리페놀류 확인

선발된 균주를 이용하여 만든 복합발효물의 혐오취가 저감된 것을 확인하였고, 이 발효물의 새로운 기능성을 탐색하여 신소재로 활용하기 위한 기초 자료로써 폴리페놀류 함량을 확인하였다. 분석한 폴리페놀류는 총폴리페놀의 함량과 은행에 주요하게 함유되어 있는 플라보노이드인 kaempferol, quercetin, isorhamnetin 세 가지 성분의 플라보노이드 함량을 확인하였다.

(표 49) 폴리페놀류함량

	total polyphenolic compound (mg/g(GAE))		플라보노이드					
			quercetin (mg/kg)		kaempferol (mg/kg)		isorhamnetin (mg/kg)	
	AV	SD	AV	SD	AV	SD	AV	SD
은행외종피(열수처리 후)	7.17	0.14	3.13	0.45	1.27	0.31	31.52	6.18
<i>L. brevis</i> 발효물	3.15	0.45	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>S. cerevisiae</i> 발효물	4.73	0.62	2.66	0.60	1.96	0.57	40.54	16.28
맛느타리 발효물	0.38	0.70	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
맛느타리+ <i>L. brevis</i> 발효물	0.34	1.03	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
맛느타리+ <i>S. cerevisiae</i> 발효물	3.83	1.01	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

균주를 접종하여 발효한 경우, 초기의 열수처리한 은행외종피의 총폴리페놀함량은 전체적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 가장 총폴리페놀함량이 높은 발효물은 *S. cerevisiae*를 접종하여 발효한 발효물이었다. 플라보노이드성분역시 발효이후에 급격하게 줄어드는 것을 확인하였다. 특히 플라보노이드는 효모인 *S. cerevisiae*를 접종한 발효물을 제외하고 모든 발효물에서 검출되지 않았다.

본 실험은 향후, 폴리페놀의 기능성을 활용할 식품이나 소재로써 개발연구에 본 연구의 결과를 활용할 때 이와 같은 폴리페놀류의 함량변화를 고려하여 적절한 균주를 선택하는 기초자료가 될 것이다.

(2) 일라이트비닐을 이용한 발효조건 탐색

(가) 서로 다른 일라이트비닐을 이용한 은행외종피의 숙성

(나) 유기산 및 혐오취분석

표 50은 각각의 일라이트 비닐에 ‘통은행’을 저장한 후 butyric acid의 함량을 측정한 값을 저장 온도별로 표시하였다. 모든 비닐에서 저장 기간 동안 butyric acid가 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 온도가 높을수록 더 감소하는 경향을 나타냈다. 가장 많은 감소를 보인 저장 비닐은 30℃에서 6개월간 저장한 비닐 D의 시료이다.

표 51은 각각의 일라이트 비닐에 ‘마쇄한 은행외과피’를 저장한 후 측정한 값을 저장 온도별로 표시하였다. 통은행을 저장한 실험과 마찬가지로 전체적으로 모든 처리구의 시료가 저장기간이 지날수록, 저장온도가 높을수록 butyric acid가 감소하는 경향을 나타내었다. 그 중에서도 6개월 경과 후 30℃에 저장한 비닐 D의 시료가 가장 낮은 값을 나타내었다.

모든 실험군에서 butyric acid 함량이 감소한 것으로 보아 비닐의 재료로 사용된 일라이트 성분이 휘발성유기산 butyric acid를 흡착한 것으로 판단되며, 특히 단양산 일라이트를 이용하여 만든 비닐 D의 경우, 영동산 일라이트를 이용한 다른 A, B, C 비닐보다 더 큰 효과를 나타낸 것을 확인하였다.

(표 50) 서로 다른 온도 및 일라이트 비닐에 저장한 통은행시료의 butyric acid 함량변화

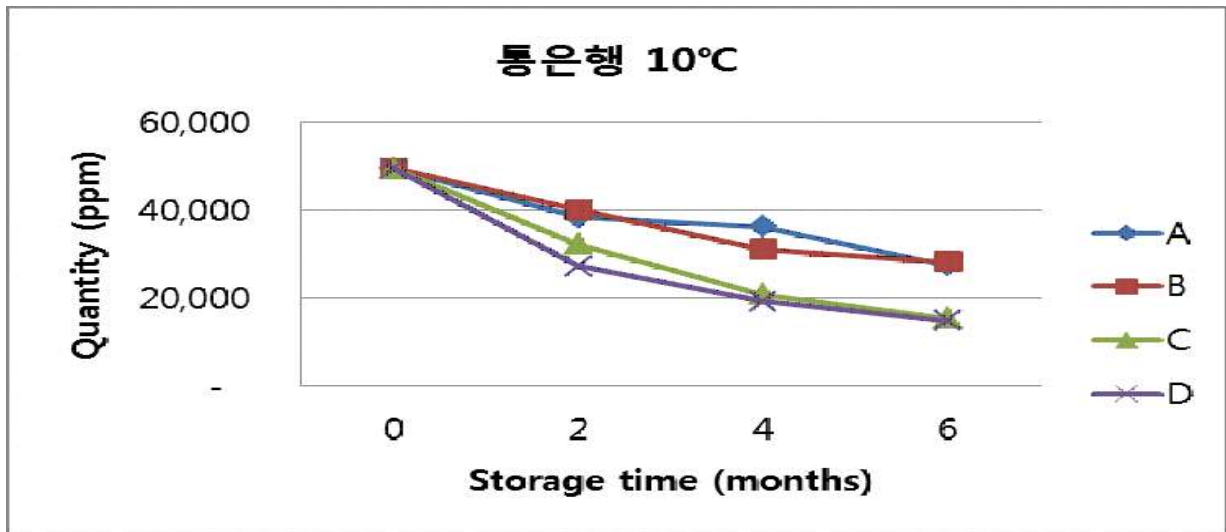
No.	시료명	저장시료	비닐 type	저장온도 (°C)	저장기간 (months)	Quantity (ppm)
1	control	통은행	A	-	0	49,683
2	A-1-1	통은행	A	10	2	38,500
3	A-1-2	통은행	A	10	4	36,291
4	A-1-3	통은행	A	10	6	27,467
5	A-2-1	통은행	A	20	2	39,178
6	A-2-2	통은행	A	20	4	31,353
7	A-2-3	통은행	A	20	6	31,426
8	A-3-1	통은행	A	30	2	36,417
9	A-3-2	통은행	A	30	4	31,634
10	A-3-3	통은행	A	30	6	21,823
11	B-1-1	통은행	B	10	2	40,213
12	B-1-2	통은행	B	10	4	31,157
13	B-1-3	통은행	B	10	6	28,302
14	B-2-1	통은행	B	20	2	39,664
15	B-2-2	통은행	B	20	4	27,396
16	B-2-3	통은행	B	20	6	26,827

17	B-3-1	통은행	B	30	2	37,760
18	B-3-2	통은행	B	30	4	34,852
19	B-3-3	통은행	B	30	6	29,358
20	C-1-1	통은행	C	10	2	32,371
21	C-1-2	통은행	C	10	4	20,846
22	C-1-3	통은행	C	10	6	15,530
23	C-2-1	통은행	C	20	2	39,205
24	C-2-2	통은행	C	20	4	23,780
25	C-2-3	통은행	C	20	6	23,976
26	C-3-1	통은행	C	30	2	37,401
27	C-3-2	통은행	C	30	4	32,637
28	C-3-3	통은행	C	30	6	23,958
29	D-1-1	통은행	D	10	2	27,348
30	D-1-2	통은행	D	10	4	19,315
31	D-1-3	통은행	D	10	6	14,880
32	D-2-1	통은행	D	20	2	21,502
33	D-2-2	통은행	D	20	4	13,679
34	D-2-3	통은행	D	20	6	12,197
35	D-3-1	통은행	D	30	2	19,968
36	D-3-2	통은행	D	30	4	11,246
37	D-3-3	통은행	D	30	6	7,684

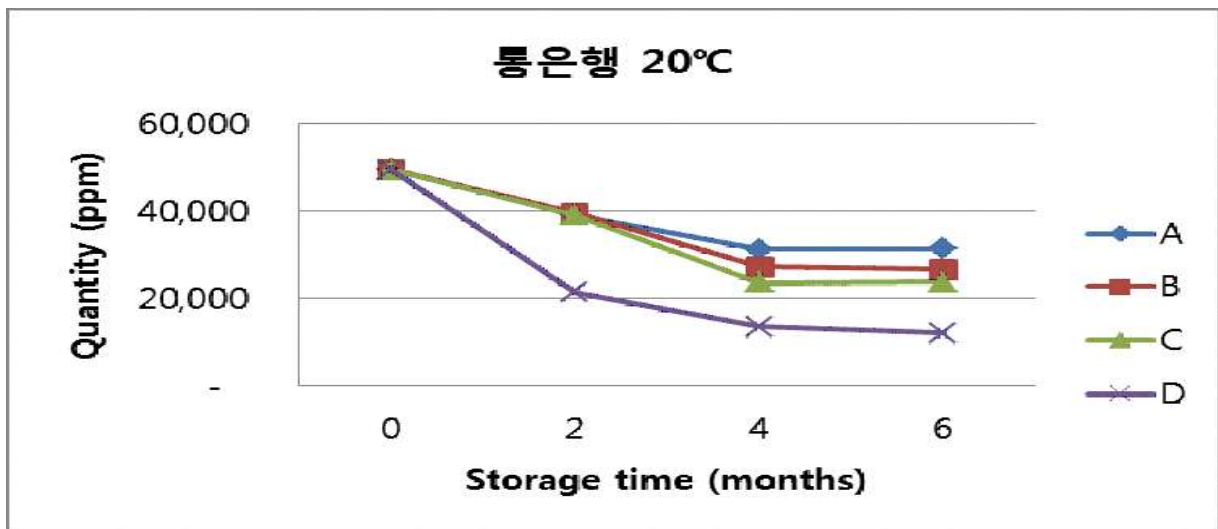
(표 51) 서로 다른 온도 및 일라이트 비닐에 저장한 마쇄한 은행외과피의 butyric acid 함량변화

No.	시료명	저장시료	비닐 type	저장온도 (°C)	저장기간 (months)	Quantity (ppm)
1	control	마쇄 은행외과피	A	-	0	46,467
2	a-1-1	마쇄 은행외과피	A	10	2	24,439
3	a-1-2	마쇄 은행외과피	A	10	4	16,807
4	a-1-3	마쇄 은행외과피	A	10	6	15,821
5	a-2-1	마쇄 은행외과피	A	20	2	29,064
6	a-2-2	마쇄 은행외과피	A	20	4	24,993
7	a-2-3	마쇄 은행외과피	A	20	6	22,893
8	a-3-1	마쇄 은행외과피	A	30	2	24,439
9	a-3-2	마쇄 은행외과피	A	30	4	16,807
10	a-3-3	마쇄 은행외과피	A	30	6	15,821

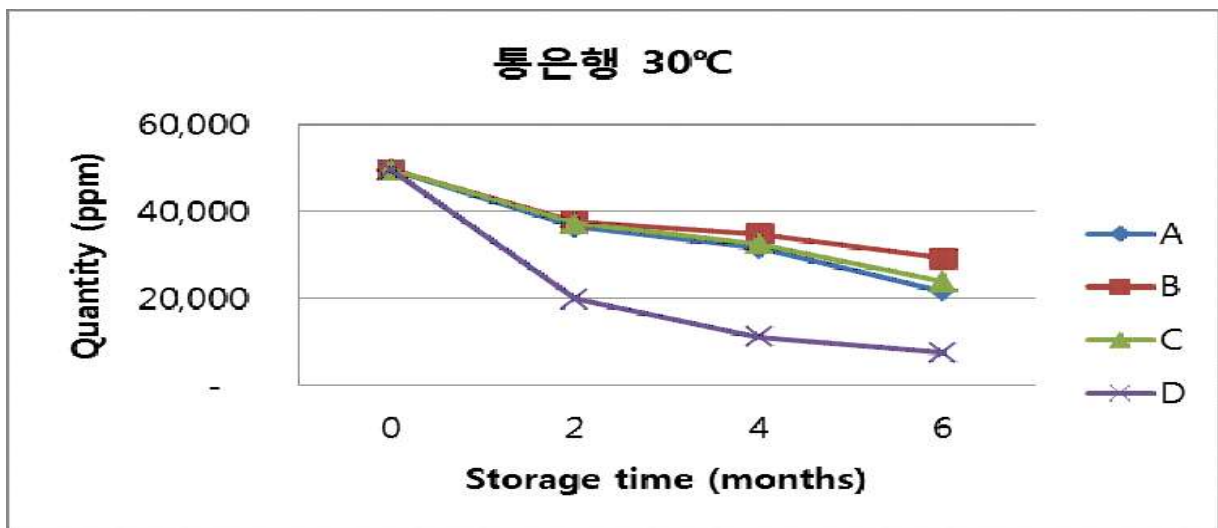
11	b-1-1	마쇄 은행외과피	B	10	2	18,284
12	b-1-2	마쇄 은행외과피	B	10	4	15,363
13	b-1-3	마쇄 은행외과피	B	10	6	13,197
14	b-2-1	마쇄 은행외과피	B	20	2	22,409
15	b-2-2	마쇄 은행외과피	B	20	4	15,610
16	b-2-3	마쇄 은행외과피	B	20	6	14,172
17	b-3-1	마쇄 은행외과피	B	30	2	20,964
18	b-3-2	마쇄 은행외과피	B	30	4	18,991
19	b-3-3	마쇄 은행외과피	B	30	6	13,709
20	c-1-1	마쇄 은행외과피	C	10	2	19,758
21	c-1-2	마쇄 은행외과피	C	10	4	14,593
22	c-1-3	마쇄 은행외과피	C	10	6	12,977
23	c-2-1	마쇄 은행외과피	C	20	2	22,292
24	c-2-2	마쇄 은행외과피	C	20	4	16,758
25	c-2-3	마쇄 은행외과피	C	20	6	15,333
26	c-3-1	마쇄 은행외과피	C	30	2	17,003
27	c-3-2	마쇄 은행외과피	C	30	4	15,609
28	c-3-3	마쇄 은행외과피	C	30	6	14,788
29	d-1-1	마쇄 은행외과피	D	10	2	14,508
30	d-1-2	마쇄 은행외과피	D	10	4	12,638
31	d-1-3	마쇄 은행외과피	D	10	6	11,474
32	d-2-1	마쇄 은행외과피	D	20	2	15,700
33	d-2-2	마쇄 은행외과피	D	20	4	13,369
34	d-2-3	마쇄 은행외과피	D	20	6	11,330
35	d-3-1	마쇄 은행외과피	D	30	2	13,955
36	d-3-2	마쇄 은행외과피	D	30	4	11,385
37	d-3-3	마쇄 은행외과피	D	30	6	10,226



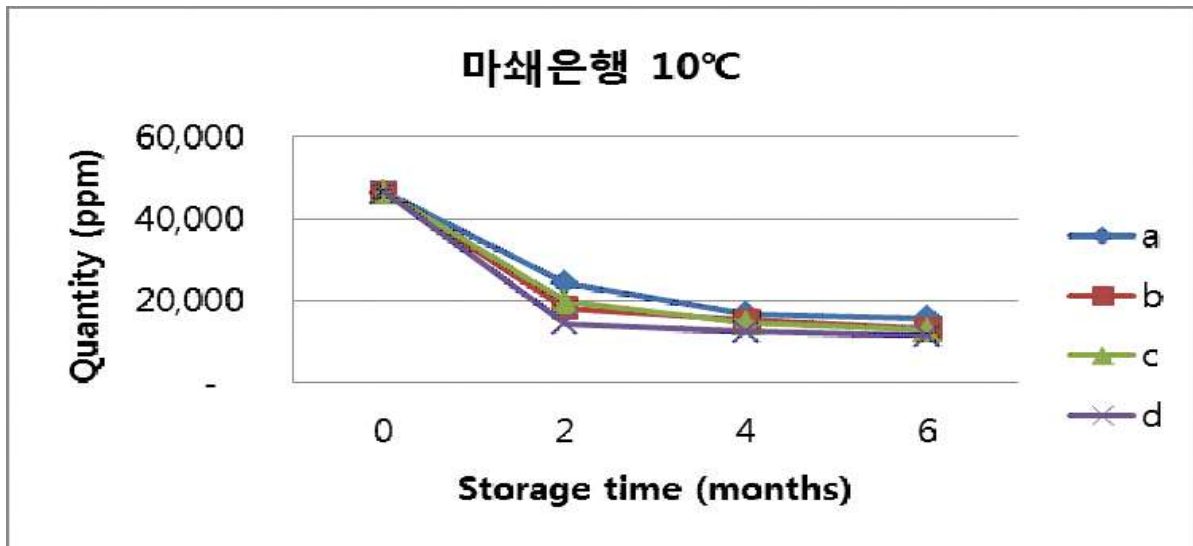
(그림 59) 10°C에서 저장한 통은행의 일라이트비닐별 butyric acid 함량



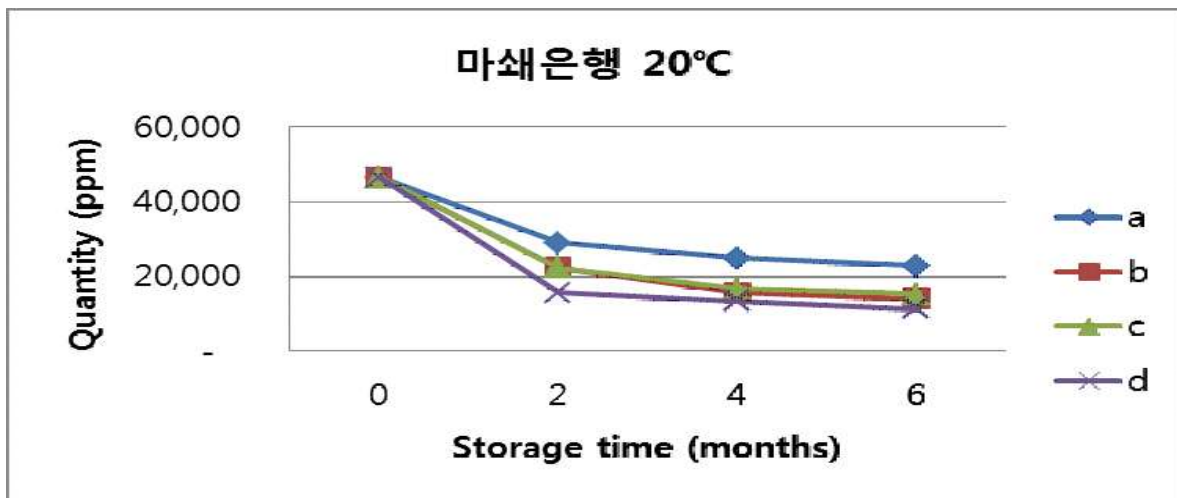
(그림 60) 20°C에서 저장한 통은행의 일라이트비닐별 butyric acid 함량



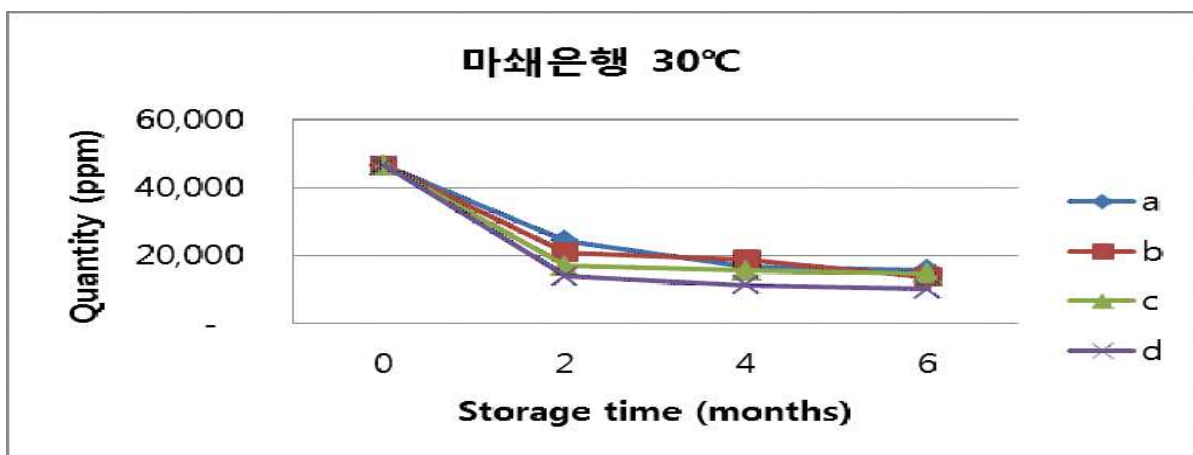
(그림 61) 30°C에서 저장한 통은행의 일라이트비닐별 butyric acid 함량



(그림 62) 10°C에서 저장한 마쇄 은행외과피의 일라이트 비닐별 butyric acid 함량



(그림 63) 20°C에서 저장한 마쇄 은행외과피의 일라이트 비닐별 butyric acid 함량



(그림 64) 30°C에서 저장한 마쇄 은행외과피의 일라이트 비닐별 butyric acid 함량

(3) 첨가물을 이용한 발효조건 탐색

(가) 첨가물을 이용한 은행외종피 발효액의 제조

(나) 유기산 및 혐오취분석

은행발효물에 첨가한 첨가물은 중화제로 사용하고 있는 중탄산나트륨(NaHCO_3), 탄산칼슘(CaCO_3), 중탄산칼륨(KHCO_3) 세가지 물질이다.

중탄산나트륨은 중조, 중탄산소다, 산성탄산나트륨이라고도 한다. 팽창제, 인조 탄산수, 발포 분말주스의 원료로 사용한다. 단미(單味)로 사용할 때는 열에 의해 분해되어 알칼리성이 강하게 되고 빵 등에 사용하면 황색을 띠고 밀가루 중의 비타민류가 파괴되는 등의 결점이 있으므로 산성인산칼슘 등의 산성 물질을 배합하여 사용하면 좋다. 이 외에 의약, 가루비누의 배합제, 양모의 세정용, 포말 소화제, 농업용, 섬유 공업용, 피혁 공업용, 금속 공업용(금속 열처리용, 정련용, 요업용) 등에 쓰인다. 사용기준은 없다. 백색 결정성 분말, 결정덩어리이고 습기 찬 공기 속에서 서서히 변화한다. 냉감(冷感)이 있는 알칼리성 맛을 갖는다. 물에 녹고 에탄올에 녹지 않으며 수용액은 약알칼리성을 나타낸다. 비중: 2.16~2.22, 용점: 270°C로 탄산가스를 잃는다. 방치하거나 가온하면 알칼리성이 된다. 50°C로 뜨겁게 하면 분해하여 탄산가스가 발생하여 팽창제의 역할을 한다. 100°C에서 탄산나트륨이 된다. 독성은 없지만 다량 투여로 알칼리증을 일으키는 경우도 있다. 의약으로서 1회 0.5~1g, 1일 3~5g을 사용한다. 보존은 밀봉용기에 해야 한다.

탄산칼슘은 칼슘의 탄산염으로 대리석, 방해석, 선석(霏石), 석회석, 백악, 빙주석(氷洲石), 조개껍질, 달걀껍질, 산호 등으로서 산출된다. 시멘트의 주원료, 산화칼슘의 원료, 제철, 건축재료 등의 각종 중화제(中和劑)로 사용된다.

중탄산칼륨은 무색투명한 결정 또는 백색의 입상분말이다. 물에는 쉽게 용해하여 알칼리를 나타내고, 알코올에는 용해되지 않는다. 공기 중에서 안정성을 가진다. 비식품용도로는 소화제, 산중화제, 세제첨가제 등에 사용된다.

혐오취 저감균주로 선발한 젖산균과 효모 균주를 첨가물의 함량을 달리한 은행첨가 배지에 접종한 후 48시간 배양하였고, 그 발효물의 총균수와 butyric acid 함량을 확인하여 다음의 표에 나타내었다.

첨가물을 첨가한 네 가지 균주를 이용한 은행외종피 발효물의 butyric acid 함량은 첨가물을 첨가하지 않을 때 첨가하였을 때, 모든 처리구에서 약 3~4배 감소하는 것을 확인하였다. 특히, KFRI 743균주는 KHCO_3 0.5%, 1%를 첨가한 경우, 발효물의 butyric acid 함량이 가장 많이 감소하였다. KFRI 1182균주, KFRI 145 균주, KFRI 815 균주는 CaHCO_3 를 0.5% 첨가한 경우 가장 많은 감소율을 나타내었다.

(표 52) 첨가물을 달리한 은행외종피 발효물의 균수와 butyric acid 함량변화

No.	접종균주	조성	첨가물	첨가물 함량(%)	균수확인 (CFU/ml)	butyric acid 함량확인 (ppm)
1	<i>bifidobacterium bifidum</i> (KFRI 743)	은행 10% 첨가	무첨가	-	10.17	39,432
2			CaCO ₃	0.03	10.03	13,650
3			CaCO ₃	0.25	10.26	8,176
4			CaCO ₃	0.5	10.43	7,909
5			KHCO ₃	0.05	8.24	8,176
6			KHCO ₃	0.5	8.56	7,025
7			KHCO ₃	1	8.28	7,136
8			NaHCO ₃	0.05	10.09	12,807
9			NaHCO ₃	0.5	10.57	13,679
10			NaHCO ₃	1	10.72	13,526
11	<i>Enterococcus faecium</i> (KFRI 1182)	은행 10%	무첨가	-	9.67	31,362
12			CaCO ₃	0.03	9.98	12,450
13			CaCO ₃	0.25	10.14	8,054
14			CaCO ₃	0.5	10.38	7,309
15			KHCO ₃	0.05	8.26	8,521
6			KHCO ₃	0.5	8.38	7,016
7			KHCO ₃	1	8.53	7,361
8			NaHCO ₃	0.05	10.54	12,790
9			NaHCO ₃	0.5	10.57	12,689
10			NaHCO ₃	1	10.47	13,101
1	<i>Lactobacillus brevis</i> (KFRI 145)	은행 10%	무첨가	-	10.55	36,881
2			CaCO ₃	0.03	9.71	7,688
3			CaCO ₃	0.25	10.23	7,126
4			CaCO ₃	0.5	9.98	6,957
5			KHCO ₃	0.05	8.32	11,424
6			KHCO ₃	0.5	8.26	12,516
7			KHCO ₃	1	8.33	10,479
8			NaHCO ₃	0.05	10.64	13,237
9			NaHCO ₃	0.5	10.46	12,487
10			NaHCO ₃	1	9.94	12,364
1	<i>Lactobacillus sake</i> (KFRI 815)	은행 10%	무첨가	-	10.49	32,245
2			CaCO ₃	0.03	10.02	10,781
3			CaCO ₃	0.25	9.89	9,971
4			CaCO ₃	0.5	9.92	9,824
5			KHCO ₃	0.05	8.18	11,224
6			KHCO ₃	0.5	8.55	10,249
7			KHCO ₃	1	8.46	10,684
8			NaHCO ₃	0.05	10.26	12,457
9			NaHCO ₃	0.5	10.12	12,540
10			NaHCO ₃	1	10.91	12,321

(4) 누룩을 이용한 은행외종피의 발효조건 탐색

(가) 은행외종피 누룩의 제조













누룩 제조의 경우 필요한 곡류(쌀, 통밀, 겉보리, 밀기울)를 이용하여 Cell culture dish에 50g씩 넣고 곰팡이 선발균주(F1: *Rhizopus oryzae*, F2: *Aspergillus oryzae*, F3: *Aspergillus niger*)를 접종하여 25℃ 배양실에서 15일간 배양한 후 0, 4, 10, 15일차에서 관찰하였다(그림 65). 이와 비교하여 은행외종피 누룩 제조는 선행연구를 진행하여 가장 생육활성이 좋은 은행외종피 함량(30%)에 따라 분쇄한 은행외종피를 곡류(쌀, 통밀, 겉보리, 밀기울)와 혼합하여 같은 방법으로 15일간 배양한 후 0, 4, 10, 15일차에서 관찰하였다(그림 66).

F1(*R. oryzae*) 균주의 경우, 쌀과 겉보리에서 4일차부터 검은색 포자가 뒤덮였으며 통밀과 밀기울에서는 균사체의 생장이 진행되다가 10일차부터 검은색 포자가 뒤덮이기 시작하여 시료들 전부 15일차에 검은색 포자가 완전히 뒤덮은 것을 확인 할 수 있었다. 이와 비교하여 은행외종피를 혼합한 시료는 전부 10일차부터 검은색 포자가 뒤덮였으며 15일차에서도 은행외종피를 혼합하지 않은 시료들보다 검은색 포자의 뒤덮인 정도가 적었다.













F2(*A. oryzae*) 균주의 경우, 밀기울을 제외한 쌀, 통밀 그리고 겉보리에서 4일차부터 녹색 포자가 뒤덮였으며 밀기울에서는 균사체의 생장이 진행되다가 10일차부터 녹색 포자가 뒤덮이기 시작하여 시료들 전부 15일차에 녹색 포자가 완전히 뒤덮은 것을 확인 할 수 있었다. 이와 비교하여 은행외종피를 혼합한 시료는 쌀과 통밀에서 4일차부터 녹색포자가 조금씩 생겨나면서 시료들 전부 15일차에는 은행외종피를 혼합하지 않은 시료와 같이 녹색 포자가 완전히 뒤덮은 것을 확인 할 수 있었다.

F3(*A. niger*) 균주의 경우, 밀기울에서 4일차부터 검은색 포자가 뒤덮였으며 쌀과 겉보리에서는 균사체의 생장이 진행되다가 10일차부터 검은색 포자가 뒤덮이기 시작하여 15일차에 검은색 포자가 완전히 뒤덮었고, 통밀에서는 15일차까지 검은색 포자의 생장이 적게 이루어진 것을 확인 할 수 있었다. 이와 비교하여 은행외종피를 혼합한 시료는 겉보리와 밀기울에서 10일차부터 검은색 포자가 뒤덮이기 시작하여 15일차에 완전히 뒤덮었고, 쌀과 통밀에서 균사체의 생장이 진행되면서 15일차까지 검은색 포자의 생장이 적게 이루어진 것을 확인 할 수 있었다.

(그림 65) 당화중균을 달리한 곡류 기질별 누룩 제조 (15일차)

Name	F1	F2	F3
쌀			
통밀			
겉보리			
밀기울			

(그림 66) 당화중균을 달리한 곡류 기질별 은행외종피 첨가 누룩 제조 (15일차)

Name	F1	F2	F3
쌀			
통밀			
겉보리			
밀기울			

(나) 생균체량 측정

Waring Blender로 분쇄한 제조된 누룩의 균체량은 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지를 사용하여 표준평판배양법으로 0, 10, 15일차에서 측정 결과를 확인하였다(표 53). 곰팡이 선발균주 (F1:*Rhizopus oryzae*, F2:*Aspergillus oryzae*, F3:*Aspergillus niger*) 접종을 하지 않은 sample을 제외하고 초기 생균체량 4.7~5.3 log(CFU/ml)에서 10일 후에는 6.0~7.0 log(cfu/ml)로, 15일 후에는 7.10 log(cfu/ml)까지 증가된 sample이 관찰되었다. F1 균주 접종 시 균체 성장이 높은 곡류 기질로는 통밀이었으며, F2에서는 통밀과 밀기울, F3에서는 쌀과 겉보리 기질이 균체 성장이 높은 것으로 관찰되었다.

(표 53)곡류 기질에 따라 은행외종피 첨가 누룩에 저항하는 당화종균의 기간별 생균체량 측정

sample	log(CFU/ml)		
	0 day	10 day	15 day
찢쌀	<2.00	3.64	5.39
찢쌀+F1	5.18	6.54	6.63
찢쌀+F2	5.30	6.77	6.81
찢쌀+F3	4.70	7.04	7.10
은행30%+ 찢쌀	<2.00	2.93	3.19
은행30%+ 찢쌀+F1	5.18	6.13	6.39
은행30%+ 찢쌀+F2	5.30	6.62	6.48
은행30%+ 찢쌀+F3	4.70	6.76	6.81

sample	log(CFU/ml)		
	0 day	10 day	15 day
찢통밀	<2.00	<2.00	<2.00
찢통밀+F1	5.18	6.93	6.94
찢통밀+F2	5.30	6.84	6.86
찢통밀+F3	4.70	6.71	6.71
은행30%+ 찢통밀	<2.00	4.36	5.44
은행30%+ 찢통밀+F1	5.18	6.55	6.90
은행30%+ 찢통밀+F2	5.30	6.23	6.89
은행30%+ 찢통밀+F3	4.70	5.98	6.53

sample	log(CFU/ml)		
	0 day	10 day	15 day
찢밀기울	<2.00	<2.00	<2.00
찢밀기울+F1	5.18	6.54	6.56
찢밀기울+F2	5.30	6.61	6.78
찢밀기울+F3	4.70	6.08	6.74
은행30%+ 찢밀기울	<2.00	<2.00	<2.00
은행30%+ 찢밀기울+F1	5.18	6.51	6.56
은행30%+ 찢밀기울+F2	5.30	6.80	6.82
은행30%+ 찢밀기울+F3	4.70	6.03	6.78

sample	log(CFU/ml)		
	0 day	10 day	15 day
찢겉보리	<2.00	<2.00	<2.00
찢겉보리+F1	5.18	6.59	6.64
찢겉보리+F2	5.30	6.82	6.79
찢겉보리+F3	4.70	6.97	7.02
은행30%+ 찢겉보리	<2.00	5.04	5.82
은행30%+ 찢겉보리+F1	5.18	5.20	5.30
은행30%+ 찢겉보리+F2	5.30	6.58	6.69
은행30%+ 찢겉보리+F3	4.70	6.76	7.11

¹⁾ F1: *Rhizopus oryzae* ²⁾ F2: *Aspergillus oryzae* ³⁾ F3: *Aspergillus niger*

(다) 환원당함량 측정

환원당류들은 단맛을 부여하는 물질로 미생물의 대사에 따른 효소력 변화와 밀접한 관계가 있어 미생물이 glucose 대사에 이용하는 정도에 따라 환원당 변화가 생긴다. 본 실험에서는 제조된 은행외종피 누룩의 시간별 환원당 함량 변화를 표 54, 그림 67에 나타내었다.

쌀 기질을 이용한 경우 F3(*Aspergillus niger*) 균주를 접종하였을 때 10일 차에서 1.99% (찢쌀+F3), 1.85% (은행+찢쌀+F3)로 가장 높은 환원당 함량을 나타내었고, 이는 15일차에서 각각 2.04, 1.87 %로 증대되었다. 통밀 기질은 F1(*Rhizopus oryzae*) 균주를 접종하였을 때 10일 차에서 1.88% (찢통밀+F1), 1.27% (은행+찢통밀+F1)로 가장 높은 환원당 함량을 나타내었고, 이는 15일차에서 각각 1.86, 1.29 %로 증대되었다. 겉보리 기질은 F3(*Aspergillus niger*) 균주를 접종하였을 때 10일 차에서 0.94% (찢겉보리+F3), 0.93% (은행+찢겉보리+F3)로 가장 높은 환원당 함량을 나타내었고, 이는 15일차에서 각각 1.09, 1.04 %로 증대되었다. 밀기울 기질은 F2(*Aspergillus oryzae*) 균주를 접종하였을 때 10일 차에서 0.84% (찢밀기울+F2), 0.63% (은행+찢밀기울+F2)로 가장 높은 환원당 함량을 나타내었고, 이는 15일차에서 각각 0.88, 0.64 %로 증대되었다.

이러한 결과로 쌀 기질에 F3(*Aspergillus niger*) 균주를 접종한 경우 환원당 함량이 가장 우수함을 알 수 있었으며, 생균체량 측정에 따라 균사체 형성이 뛰어난 sample에서 환원당 함량이 높은 값을 나타내었다.

(표 54) 은행외종피에 저항하는 당화중균을 접종한 곡류 기질의 기간별 환원당 함량 측정

sample	10 day	15 day
	RS(mol)	RS(mol)
control	0.60±0.00	0.60±0.00
찢쌀	0.75±0.00	0.93±0.01
찢쌀+ F1	0.89±0.00	0.89±0.10
찢쌀+ F2	1.18±0.00	1.22±0.00
찢쌀+ F3	1.99±0.23	2.04±0.00
은행	1.06±0.00	1.06±0.00
은행+ 찢쌀	1.07±0.02	0.98±0.00
은행+ 찢쌀+ F1	0.84±0.02	0.82±0.00
은행+ 찢쌀+ F2	1.15±0.02	1.17±0.00
은행+ 찢쌀+ F3	1.85±0.02	1.87±0.06

sample	10 day	15 day
	RS(mol)	RS(mol)
control	0.60±0.00	0.60±0.00
찢통밀	0.62±0.00	0.64±0.01
찢통밀+ F1	1.88±0.00	1.86±0.00
찢통밀+ F2	1.84±0.03	1.86±0.00
찢통밀+ F3	1.27±0.01	1.27±0.02
은행	1.06±0.00	1.06±0.00
은행+ 찢통밀	1.09±0.00	1.05±0.05
은행+ 찢통밀+ F1	1.27±0.01	1.29±0.03
은행+ 찢통밀+ F2	1.02±0.01	1.08±0.01
은행+ 찢통밀+ F3	0.92±0.00	0.92±0.01

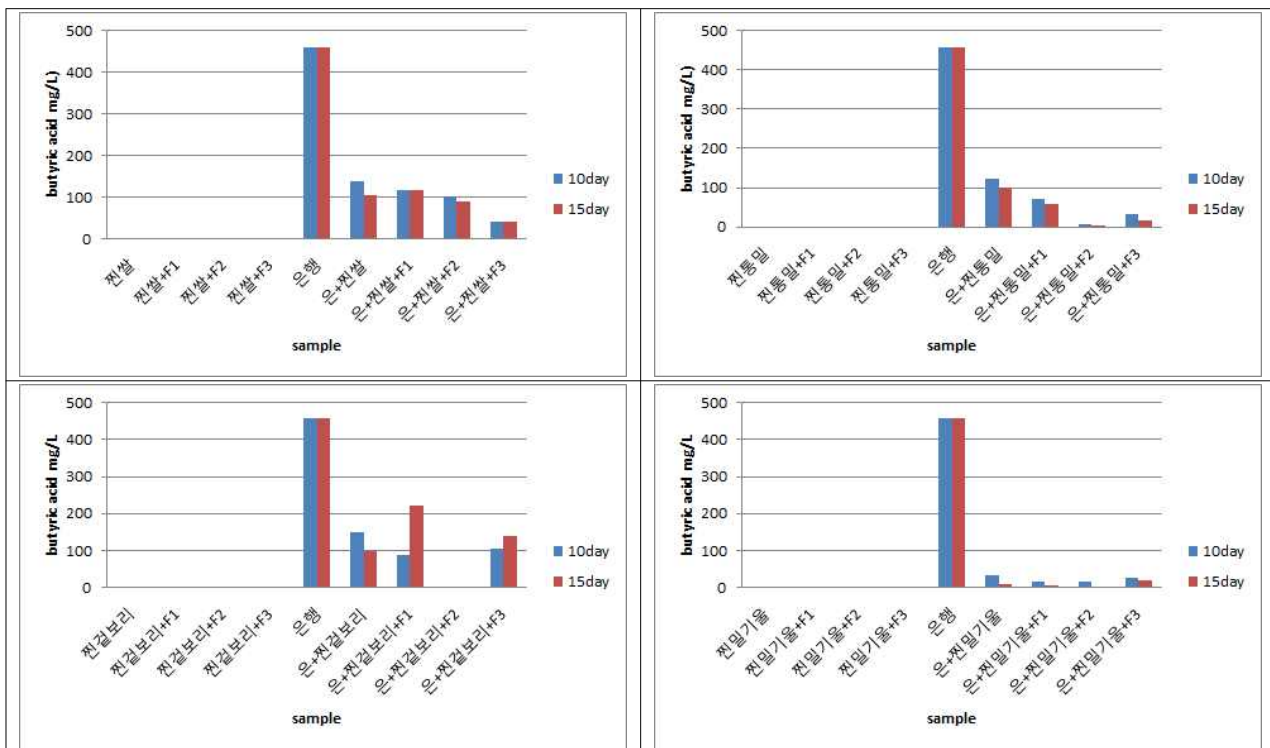
sample	10 day	15 day
	RS(mol)	RS(mol)
control	0.60±0.00	0.60±0.00
찢겉보리	0.63±0.01	0.62±0.01
찢겉보리+ F1	0.62±0.00	0.61±0.00
찢겉보리+ F2	0.90±0.01	0.93±0.01
찢겉보리+ F3	0.94±0.01	1.09±0.00
은행	1.06±0.00	1.06±0.00
은행+ 찢겉보리	1.26±0.05	1.29±0.00
은행+ 찢겉보리+ F1	0.64±0.01	0.64±0.00
은행+ 찢겉보리+ F2	0.71±0.01	1.02±0.01
은행+ 찢겉보리+ F3	0.93±0.01	1.04±0.01

sample	10 day	15 day
	RS(mol)	RS(mol)
control	0.60±0.00	0.60±0.00
찢밀기울	0.69±0.02	0.70±0.00
찢밀기울+F1	0.83±0.00	0.78±0.07
찢밀기울+F2	0.84±0.02	0.88±0.02
찢밀기울+F3	0.68±0.01	0.88±0.02
은행	1.06±0.00	1.06±0.00
은행+ 찢밀기울	0.71±0.00	0.70±0.03
은행+ 찢밀기울+ F1	0.63±0.00	0.64±0.00
은행+ 찢밀기울+ F2	0.63±0.01	0.64±0.02
은행+ 찢밀기울+ F3	0.61±0.00	0.63±0.00

¹⁾ F1: *Rhizopus oryzae*

²⁾ F2: *Aspergillus oryzae*

³⁾ F3: *Aspergillus niger*



(그림 67) 은행외종피에 저항하는 당화중균을 접종한 곡류 기질의 기간별 환원당 함량변화

(라) 효소활성도 측정

곡류 기질 당 기간별 전분분해효소 활성을 표 55, 그림 68에 나타내었다. Unit(U)의 단위는 1 시간동안 1 μ mol의 α -amylase를 생산하는 효소량으로 정의하였다. 쌀 기질을 이용한 경우, F3(*Aspergillus niger*) 균주를 접종하였을 때 10일차에서는 낮은 효소 활성을 나타내다가 15일차에서 가장 높은 활성을 보였다. 통밀 기질은 전반적으로 F3(*Aspergillus niger*) 균주를 접종하였을 때 10일차에서 효소 활성이 비교적 높았으며, 15일차부터는 감소하는 추세를 보였다. 겉보

리 기질 역시 전반적으로 F3(*Aspergillus niger*) 균주를 접종하였을 때 높은 효소 활성을 보였다. 밀기울 기질은 전반적으로 F2(*Aspergillus oryzae*) 균주를 접종하였을 때 10일차에서 효소 활성이 높았으며, 다른 곡류 기질에 비해 효소활성이 비교적 낮게 나타났다. 이는 곡류에 함유되어 있던 탄수화물이 α -amylase의 기질이 되어 효소 활성이 높았다가 전분질 기질이 고갈되어감에 따라 점차 활성이 낮아지는 것으로 추정된다. 따라서 접종한 균주 특성의 차 뿐 아니라 발효시간이 경과함에 따라 알칼리화 되어 α -amylase 활성을 감소시키는 원인이 된 것으로 사료된다.

이러한 결과로 쌀 기질에 F3(*Aspergillus niger*) 균주를 접종한 경우 15일차에서 찌쌀+F3와 은행+찌쌀+F3이 각각 22.30 ± 0.02 , 21.30 ± 0.00 unit/g 으로 전분분해효소 활성이 가장 우수함을 알 수 있었다.

(표 55) 은행외종피에 저항하는 당화종균을 접종한 곡류 기질의 기간별 효소활성도 측정

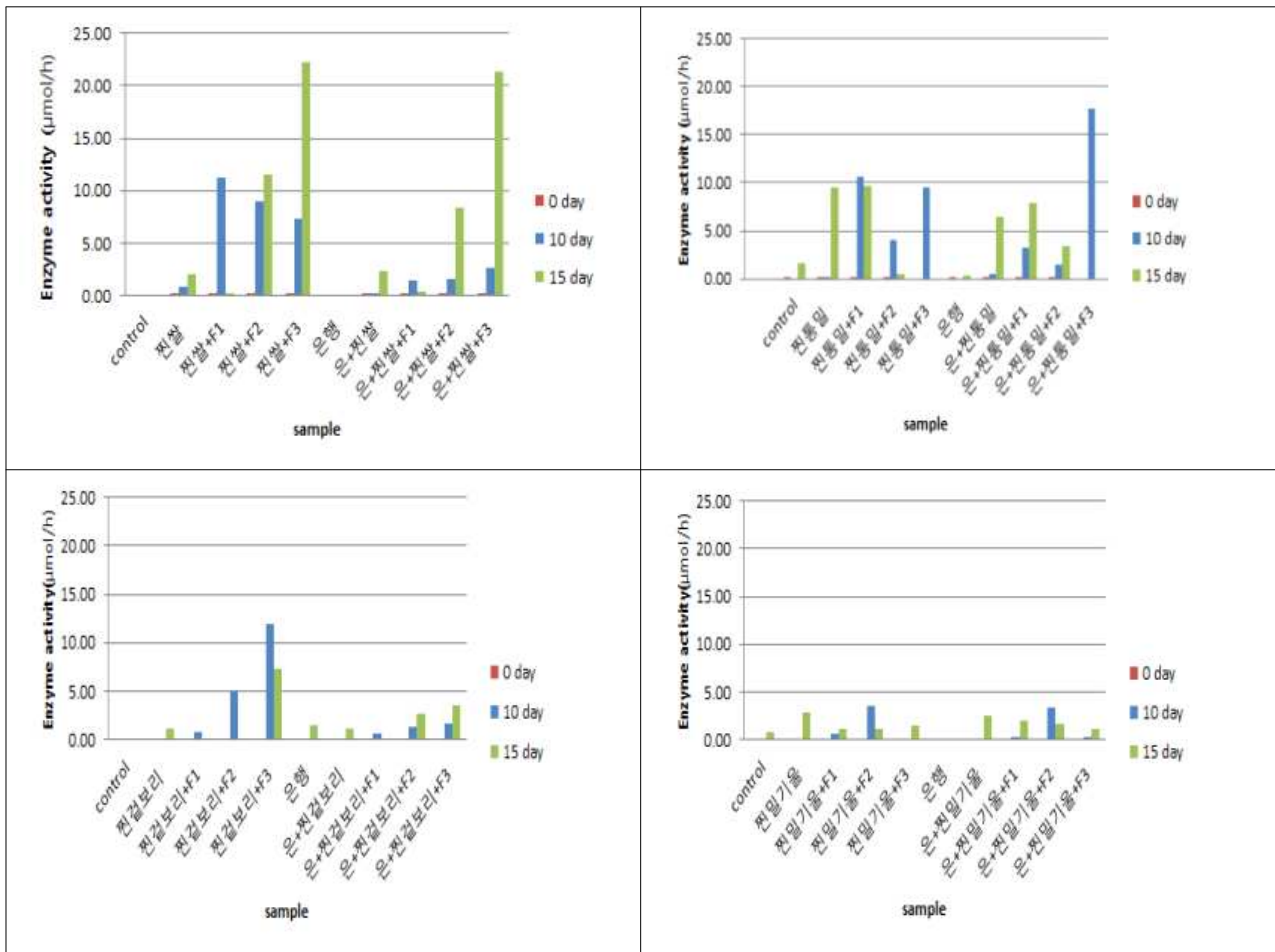
		쌀		
day		0	10	15
sample		Enzyme activity(U)		
control		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
찌쌀		0.17±0.00	0.90±0.00	2.10±0.02
찌쌀+ F1		0.17±0.01	11.27±0.02	0.17±0.09
찌쌀+ F2		0.17±0.01	8.99±0.35	11.57±0.00
찌쌀+ F3		0.17±0.01	7.38±0.04	22.30±0.02
은행		0.00±0.00	0.00±0.01	0.00±0.02
은행+ 찌쌀		0.17±0.02	0.20±0.01	2.33±0.00
은행+ 찌쌀+ F1		0.17±0.02	1.38±0.00	0.33±0.00
은행+ 찌쌀+ F2		0.17±0.02	1.57±0.03	8.33±0.01
은행+ 찌쌀+ F3		0.17±0.02	2.65±0.09	21.30±0.00

		통밀		
day		0	10	15
sample		Enzyme activity(U)		
control		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
찌통밀		0.17±0.00	0.23±0.01	1.63±0.03
찌통밀+ F1		0.17±0.01	10.58±0.00	9.57±0.01
찌통밀+ F2		0.17±0.01	4.04±0.03	9.72±0.07
찌통밀+ F3		0.17±0.01	9.58±0.00	0.47±0.03
은행		0.00±0.00	0.00±0.01	0.00±0.02
은행+ 찌통밀		0.17±0.02	0.50±0.01	0.40±0.03
은행+ 찌통밀+ F1		0.17±0.02	3.25±0.00	6.47±0.03
은행+ 찌통밀+ F2		0.17±0.02	1.49±0.01	7.87±0.00
은행+ 찌통밀+ F3		0.17±0.02	17.68±0.15	3.43±0.02

		겉보리		
day		0	10	15
sample		Enzyme activity(U)		
control		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
찢겉보리		0.17±0.00	0.03±0.00	1.10±0.04
찢겉보리+ F1		0.17±0.01	0.83±0.01	0.07±0.04
찢겉보리+ F2		0.17±0.01	5.00±0.01	0.03±0.00
찢겉보리+ F3		0.17±0.01	11.93±0.02	7.37±0.00
은행		0.00±0.00	0.00±0.01	1.40±0.02
은행+ 찢겉보리		0.17±0.02	0.10±0.01	1.17±0.00
은행+ 찢겉보리+ F1		0.17±0.02	0.63±0.02	0.13±0.01
은행+ 찢겉보리+ F2		0.17±0.02	1.32±0.00	2.60±0.01
은행+ 찢겉보리+ F3		0.17±0.02	1.67±0.00	3.47±0.00

		밀기울		
day		0	10	15
sample		Enzyme activity(U)		
control		0.00±0.00	0.00±0.00	0.85±0.00
찢밀기울		0.17±0.00	0.02±0.00	2.82±0.01
찢밀기울+ F1		0.17±0.01	0.58±0.02	1.20±0.01
찢밀기울+ F2		0.17±0.01	3.55±0.00	1.22±0.02
찢밀기울+ F3		0.17±0.01	0.07±0.01	1.40±0.01
은행		0.00±0.00	0.00±0.01	0.00±0.05
은행+ 찢밀기울		0.17±0.02	0.18±0.02	2.57±0.11
은행+ 찢밀기울+ F1		0.17±0.02	0.37±0.03	2.07±0.02
은행+ 찢밀기울+ F2		0.17±0.02	3.33±0.02	1.73±0.01
은행+ 찢밀기울+ F3		0.17±0.02	0.37±0.00	1.10±0.03

¹⁾ F1: *Rhizopus oryzae* ²⁾ F2: *Aspergillus oryzae* ³⁾ F3: *Aspergillus niger*



(그림 68) 은행외종피에 저항하는 당화종균을 접종한 곡류 기질의 기간별 효소활성도 측정

(마) 유기산 및 혐오취분석

은행외종피 누룩의 유기산 함량은 표 56에 나타내었다. 본 연구의 결과에서 각 기질에 균주를 접종하였을 때 유기산 함량이 검출되지 않았지만, 은행 자체의 유기산 함량이 459.09 mg으로 높아 은행을 30% 첨가한 각각의 쌀, 통밀, 걸보리, 밀기울 기질 누룩에서 비교적 높은 유기산이 검출된 것을 확인하였다.

쌀 기질을 이용한 경우, F3(*Aspergillus niger*) 균주를 접종하였을 때 혐오취인 butyric acid 함량이 가장 감소한 것을 확인 할 수 있었고, 10일차에서 15일차로 갈수록 그 수치가 낮아졌다. 통밀, 걸보리, 밀기울 기질은 전반적으로 F2(*Aspergillus oryzae*) 균주를 접종하였을 때 butyric acid 함량이 비교적 많이 감소되었다. 이는 고유의 은행외종피가 함유하고 있는 butyric acid 함량을 곰팡이 균주가 성장 및 발효되면서 혐오취 감소 효능이 있다고 추정되었다.

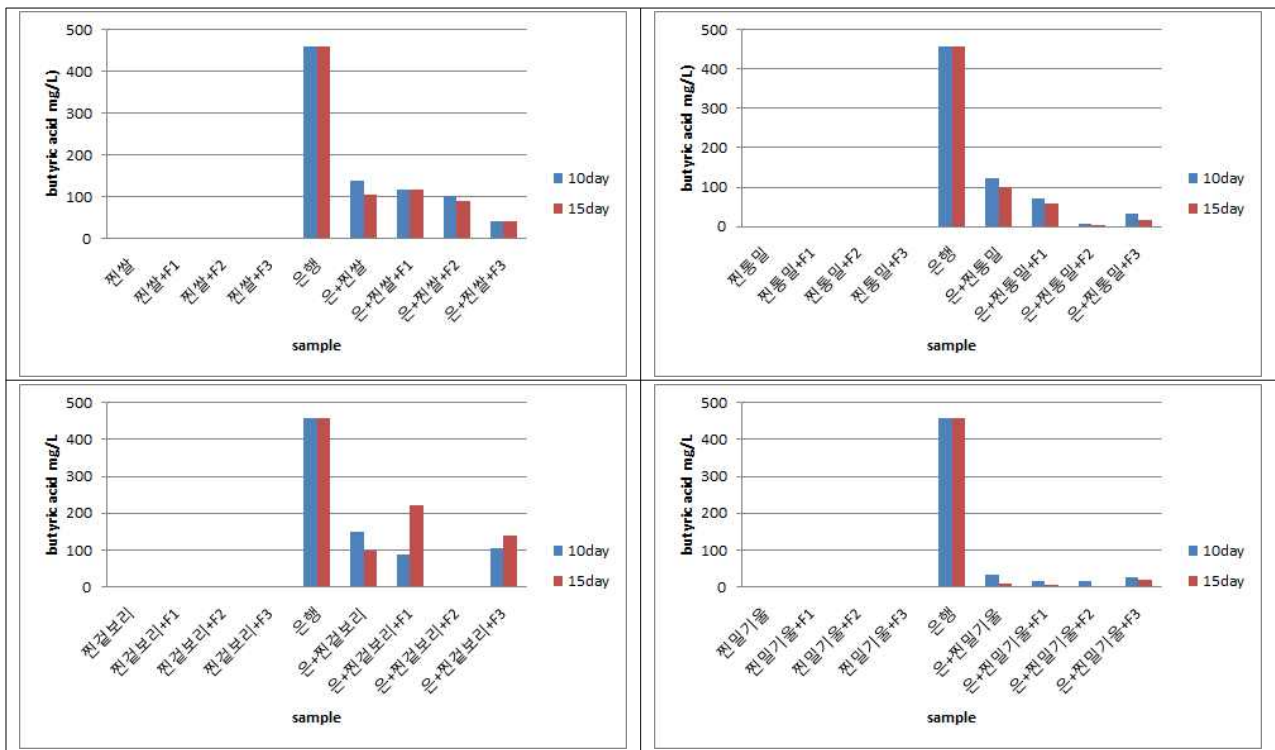
(표 56) 은행외증피에 저항하는 당화중균을 접종한 곡류 기질의 기간별 유기산 함량 측정

쌀		
sample	10day	15day
	butyric acid mg/L	
찐쌀	n.a.	n.a.
찐쌀+F1	n.a.	n.a.
찐쌀+F2	n.a.	n.a.
찐쌀+F3	n.a.	n.a.
은행	459.09±11.44	459.09±11.44
은+ 찐쌀	137.93±0.03	104.79±0.06
은+ 찐쌀+F1	116.91±0.20	116.62±0.31
은+ 찐쌀+F2	100.48±0.01	89.69±0.20
은+ 찐쌀+F3	41.16±0.13	39.66±0.17

통밀		
sample	10day	15day
	butyric acid mg/L	
찐통밀	n.a.	n.a.
찐통밀+F1	n.a.	n.a.
찐통밀+F2	n.a.	n.a.
찐통밀+F3	n.a.	n.a.
은행	459.09±11.44	459.09±11.44
은+ 찐통밀	124.16±0.06	99.61±0.13
은+ 찐통밀+F1	71.03±0.03	59.31±0.27
은+ 찐통밀+F2	5.54±0.00	2.96±0.11
은+ 찐통밀+F3	32.53±0.01	15.59±0.04

겉보리		
sample	10day	15day
	butyric acid mg/L	
찐겉보리	n.a.	n.a.
찐겉보리+F1	n.a.	n.a.
찐겉보리+F2	n.a.	n.a.
찐겉보리+F3	n.a.	n.a.
은행	459.09±11.44	459.09±11.44
은+ 찐겉보리	150.86±0.01	99.63±0.23
은+ 찐겉보리+F1	87.90±0.02	220.91±4.51
은+ 찐겉보리+F2	3.81±0.02	n.a.
은+ 찐겉보리+F3	104.65±0.01	139.07±0.03

sample	밀기울	
	10day	15day
	butyric acid mg/L	
찢밀기울	n.a.	n.a.
찢밀기울+F1	n.a.	n.a.
찢밀기울+F2	n.a.	n.a.
찢밀기울+F3	n.a.	n.a.
은행	459.09±11.44	459.09±11.44
은행+찢밀기울	32.38±0.06	9.25±0.17
은행+찢밀기울+F1	14.53±0.10	6.28±0.06
은행+찢밀기울+F2	15.59±0.54	n.a.
은행+찢밀기울+F3	26.02±0.04	20.92±0.04



(그림 69) 유기산 및 혐오취분석

(바) 폴리페놀류의 분석

① 총폴리페놀 함량분석

은행외종피 누룩의 총 폴리페놀 함량은 표 57, 그림 70에 나타내었다. 본 연구의 결과에서 은행 자체의 폴리페놀 함량이 11.54 mg으로 높아 전체적으로 은행을 30% 첨가한 각각의 쌀, 통밀, 겉보리, 밀기울 기질 누룩에서 무첨가 은행외종피 누룩과 비교하여 높은 폴리페놀 함량이 검출된 것을 확인하였다. 특히, 은행외종피 누룩에 F2(*Aspergillus oryzae*)를 접종하였을 때 폴리페놀 함량이 가장 많았다.

(표 57) 은행외종피에 저항하는 당화중균을 접종한 곡류 기질의 기간별 폴리페놀 함량 측정

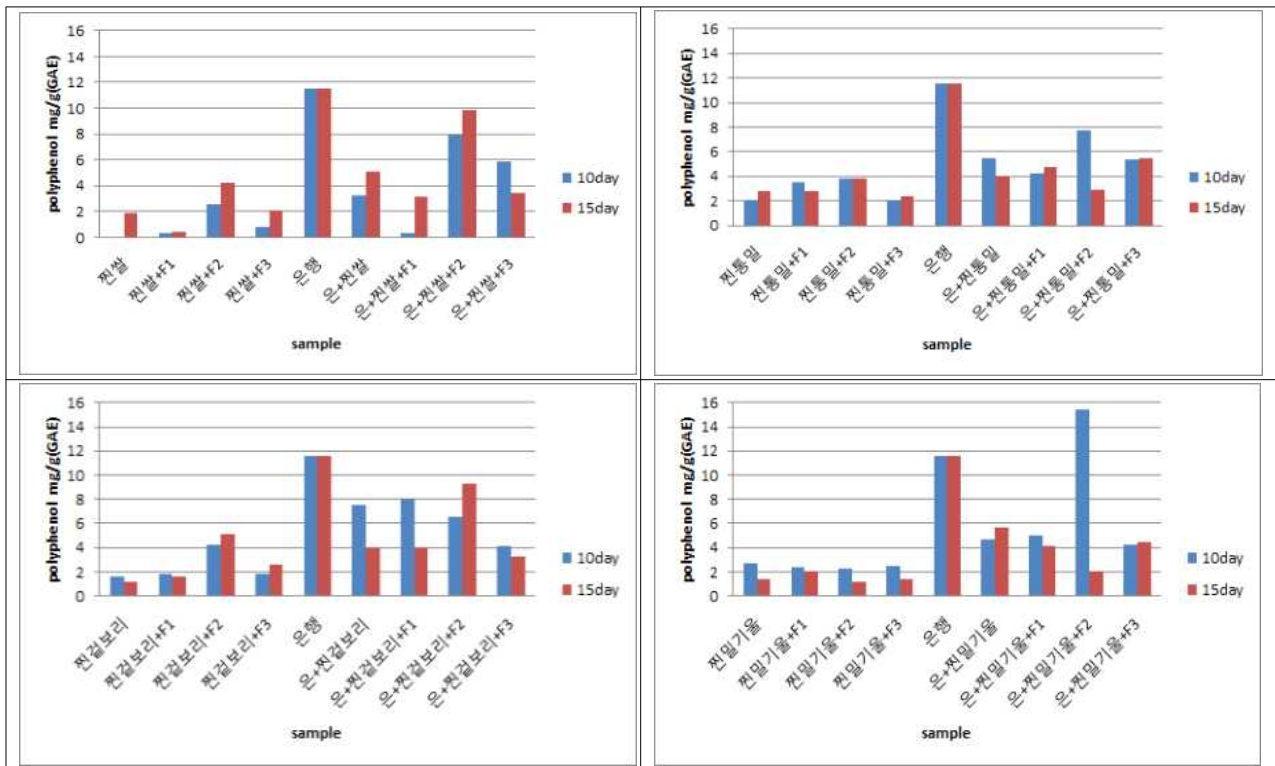
sample	쌀	
	10day	15day
	polyphenol mg/g(GAE)	
찢쌀	0.08±0.01	1.89±0.12
찢쌀+ F1	0.37±0.09	0.41±0.17
찢쌀+ F2	2.56±0.24	4.27±0.47
찢쌀+ F3	0.86±0.03	2.08±1.37
은행	11.54±2.98	11.54±2.98
은행+ 찢쌀	3.22±0.48	5.06±1.14
은행+ 찢쌀+ F1	0.34±0.05	3.17±0.05
은행+ 찢쌀+ F2	7.90±0.53	9.87±2.00
은행+ 찢쌀+ F3	5.86±3.25	3.47±0.35

sample	통밀	
	10day	15day
	polyphenol mg/g(GAE)	
찢통밀	2.03±0.04	2.78±0.17
찢통밀+ F1	3.56±0.02	2.74±0.18
찢통밀+ F2	3.78±0.04	3.79±0.05
찢통밀+ F3	2.07±0.47	2.42±0.44
은행	11.54±2.98	11.54±2.98
은행+ 찢통밀	5.44±0.19	4.02±0.11
은행+ 찢통밀+ F1	4.26±0.07	4.79±0.40
은행+ 찢통밀+ F2	7.74±0.94	2.94±0.08
은행+ 찢통밀+ F3	5.40±0.39	5.47±0.02

sample	겉보리	
	10day	15day
	polyphenol mg/g(GAE)	
찢겉보리	1.64±0.22	1.12±0.01
찢겉보리+ F1	1.79±0.10	1.65±0.10
찢겉보리+ F2	4.2±0.06	5.13±0.16
찢겉보리+ F3	1.80±0.08	2.64±0.13
은행	11.54±2.98	11.54±2.98
은행+ 찢겉보리	7.53±2.53	4.06±0.75
은행+ 찢겉보리+ F1	8.00±4.42	4.03±0.62
은행+ 찢겉보리+ F2	6.51±0.88	9.26±2.81
은행+ 찢겉보리+ F3	4.08±1.12	3.21±0.42

sample	밀기울	
	10day	15day
	polyphenol mg/g(GAE)	
찢밀기울	2.66±0.17	1.34±0.03
찢밀기울+F1	2.40±0.03	2.01±0.06
찢밀기울+F2	2.27±0.00	1.13±0.02
찢밀기울+F3	2.49±0.02	1.43±0.04
은행	11.54±2.98	11.54±2.98
은행+ 찢밀기울	4.66±0.42	5.70±0.24
은행+ 찢밀기울+F1	5.00±2.20	4.09±0.25
은행+ 찢밀기울+F2	15.39±1.70	2.10±0.40
은행+ 찢밀기울+F3	4.29±0.06	4.43±0.54

¹⁾ F1: *Rhizopus oryzae* ²⁾ F2: *Aspergillus oryzae* ³⁾ F3: *Aspergillus niger*



(그림 70) 은행외종피에 저항하는 당화종균을 접종한 곡류 기질의 기간별 폴리페놀 함량 측정

② 플라보노이드의 분석

은행외종피 누룩의 flavonoid 함량은 표 58에 나타내었다. 본 연구의 결과에서는 쌀과 통밀 기질에 F2(*Aspergillus oryzae*)를 접종한 은행+찢쌀+F2 와 은행+찢통밀+F2를 제외한 은행외종피 누룩의 flavonoid 함량이 검출되지 않았는데, 이는 은행 자체에 들어있는 flavonoid 성분을 곰팡이 균이 발효되며 성장하면서 이를 분해시킨 것으로 추정된다.

(표 58) 은행외종피에 저항하는 당화종균을 접종한 곡류 기질의 기간별 flavonoid 함량 측정

sample	쌀	
	10day	15day
	flavonoid mg/kg	
찢쌀	0.00	0.00
찢쌀+ F1	0.00	0.00
찢쌀+ F2	0.00	0.00
찢쌀+ F3	0.00	0.00
은행	0.00	0.00
은행+ 찢쌀	0.00	0.00
은행+ 찢쌀+ F1	0.00	0.00
은행+ 찢쌀+ F2	2.84	0.00
은행+ 찢쌀+ F3	0.00	0.00

sample	통밀	
	10day	15day
	polyphenol mg/g(GAE)	
찢통밀	0.00	0.00
찢통밀+ F1	0.00	0.00
찢통밀+ F2	0.00	0.00
찢통밀+ F3	0.00	0.00
은행	0.00	0.00
은행+ 찢통밀	0.00	0.00
은행+ 찢통밀+ F1	0.00	0.00
은행+ 찢통밀+ F2	2.53	0.00
은행+ 찢통밀+ F3	0.00	0.00

¹⁾ F1: *Rhizopus oryzae* ²⁾ F2: *Aspergillus oryzae* ³⁾ F3: *Aspergillus niger*

10. 알레르기원 저감화 공정완료

가. 은행외종피 발효물의 동물 피부염 테스트결과

선발된 5가지 복합발효물을 제조하여 hairless 마우스의 피부에 발진테스트를 실시하였다. 마우스의 등과 귀에 도포한 후 2일 후 마우스의 등과 귀의 발진정도를 확인하였다. 본 실험의 목적은 피부염증을 일으키는 무발효 은행외종피와 선발된 복합발효물을 비교하여 알레르기원 인물질을 감소시키는 발효공정을 찾아내는 것이다.

발진정도는 등의 부어오름을 육안으로 관찰하여 ‘-: 아무증상없음, +: 피부표면이 살짝 붉음, ++: 피부표면이 매우 붉음, +++: 피부표면이 매우 붉고 부어오름, ++++: 피부표면이 매우 붉고 부어올랐으며 벗겨짐’의 5가지 강도로 나타내었고, 귀의 두께를 캘리퍼스를 이용하여 측정하였다. 또한 실험을 종료한 쥐의 귀를 잘라 각각의 무게를 비교하여 아래의 표에 나타내었다. 모든 측정값은 5마리의 마우스를 반복수로 하여 측정한 값의 평균값이다.

표 59는 젖산균인 *L. brevis*를 접종한 은행외종피 발효물의 피부발진테스트 결과이다. 대조군은 발효하지 않은 은행외종피 원재료의 우루시올류를 추출하여 도포한 결과이고, 실험군은 *L. brevis*을 이용하여 발효한 발효물의 우루시올류를 도포한 실험결과이다. 실험군의 경우 1/10로 희석한 용액, 1배 용액, 10배 농축물, 25배 농축물, 50배 농축물을 도포하였다.

*L. brevis*를 이용하여 은행외종피를 발효한 발효물의 우루시올류의 피부염발진은, 약 10배로 농축한 실험군에서 피부표면이 붉게 부어오는 증상을 나타내었다. 하지만 이 발진증상은 대조군인 무발효 은행외종피에 비해서 약한 수준의 발진으로 약 20배정도 피부염증상이 완화된 것으로 보인다.

(표 59) *L. brevis*을 이용하여 발효한 은행외종피 발효물의 우루시올류 마우스 피부도포 결과

	대조군 (×1)	실험군				
		×1/10	×1	×10	×25	×50
등 발진	++++	-	-	++	++	++
귀두께 (mm)	0.61±0.14	0.35±0.13	0.66±0.25	0.54±0.11	0.59±0.32	0.34±0.15
귀무게 (g)	0.13±0.01	0.06±0.01	0.08±0.02	0.09±0.01	0.09±0.01	0.10±0.02

*S. cerevisiae*를 이용한 은행외종피 발효물은 10배 농축한 우루시올류를 처리한 실험군에서 ‘+:피부표면이 살짝 붉음’ 증상을 나타냈고, 25배, 50배로 농축한 우루시올류를 처리한 실험군에서 ‘++: 피부표면이 매우 붉음’ 증상을 나타냈다. 이것은 대조군이 무발효 처리군이 ‘++++: 피부표면이 매우 붉고 부어올랐으며 벗겨짐’의 증상보다 약한 수준이므로 *S. cerevisiae*으로 발효시킨 발효물 역시 우루시올류 감소에 효과가 있는 것으로 사료된다(표 60).

(표 60) *S. cerevisiae*을 이용하여 발효한 은행외종피 발효물의 우루시올류 마우스 피부도포 결과

	대조군 (×1)	실험군				
		×1/10	×1	×10	×25	×50
등 발진	++++	-	-	+	++	++
귀두께 (mm)	0.51±0.07	0.32±0.03	0.53±0.08	0.39±0.18	0.48±0.21	0.42±0.11
귀무게 (g)	0.12±0.02	0.06±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.09±0.02	0.11±0.04

아래의 표 56, 57, 58은 맛느타리버섯 발효물과 맛느타리버섯+*L. brevis* 복합발효물, 맛느타리버섯+*S. cerevisiae* 복합발효물의 피부염발진 확인실험의 결과이다. 세가지 시료 모두, 발효 후 대조군보다 피부발진증상이 거의 나타나지 않는 것을 확인하였다. 발효물의 우루시올류를 50배까지 농축을 한 시료를 처리한 실험군에서도 피부표면이 살짝 붉은 정도의 증상만 보여, 약 50배 이상의 우루시올류를 감소한 것으로 여겨진다.

(표 61) 맛느타리버섯을 이용하여 발효한 은행외종피 발효물의 우루시올류 마우스 피부도포 결과

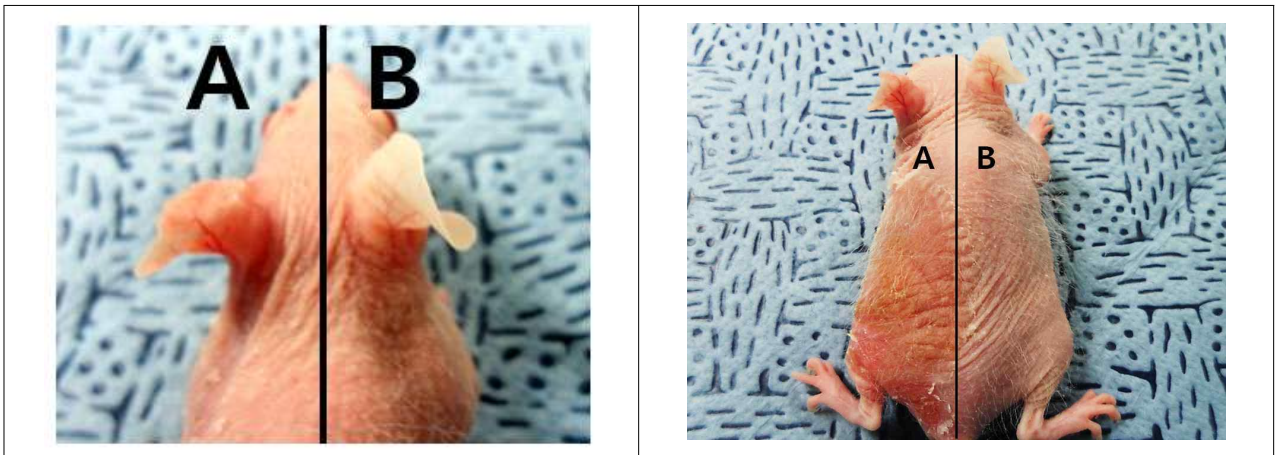
	대조군 (×1)	실험군				
		×1/10	×1	×10	×25	×50
등 발진	++++	-	-	-	-	+
귀두께 (mm)	0.52±0.21	0.29±0.23	0.43±0.22	0.42±0.02	0.45±0.13	0.46±0.5
귀무게 (g)	0.11±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.11±0.01

(표 62) 맛느타리버섯균과 *L. brevis*를 이용하여 복합발효한 은행외종피 발효물의 우루시올류 마우스 피부도포 결과

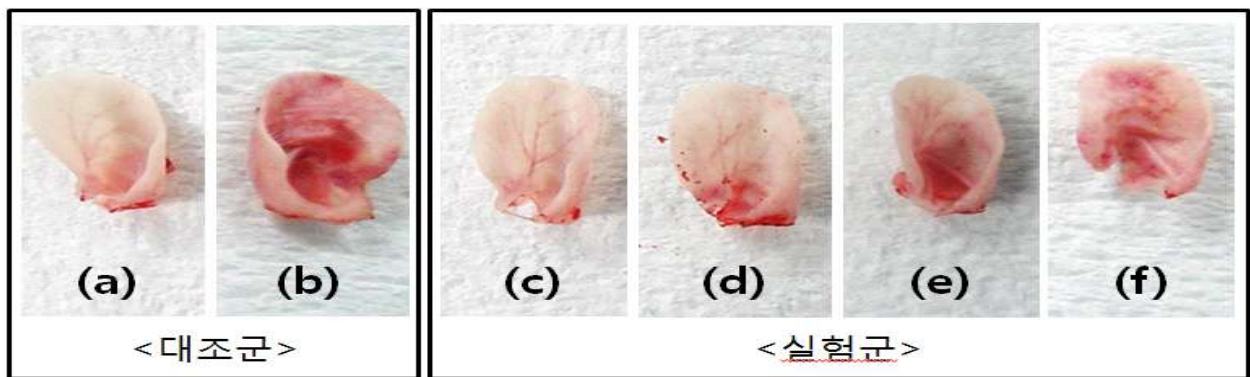
	대조군 (×1)	실험군				
		×1/10	×1	×10	×25	×50
등 발진	++++	-	-	-	-	+
귀두께 (mm)	0.51±0.08	0.32±0.06	0.49±0.11	0.5±0.07	0.53±0.01	0.54±0.03
귀무게 (g)	0.13±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01

(표 63) 맛느타리버섯균과 *S. cerevisiae*를 이용하여 복합발효한 은행외종피 발효물의 우루시올류 마우스 피부도포 결과

	대조군 (×1)	실험군				
		×1/10	×1	×10	×25	×50
등 발진	++++	-	-	-	-	+
귀두께 (mm)	0.54±0.03	0.36±0.16	0.43±0.11	0.76±0.21	0.65±0.02	0.23±0.2
귀무게 (g)	0.12±0.02	0.04±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.06±0.03	0.05±0.01



(그림 71) 은행외종피 발효물의 알레르기 발현 동물실험; (A)무발효 은행외종피 우루시올추출물도포, (B)선발종균을 이용하여 발효한 은행외종피 우루시올추출물(×10배 고농도 농축물) 처리구



(그림 72) 은행외종피 발효물의 알레르기 발현 동물실험; 은행외종피 발효 우루시올 추출물의 마우스 귀 도포 실험결과. (a)알레르기원 무처리구, (b)무발효 은행외종피 우루시올추출물(×1배) 처리구, (c)발효 은행외종피 우루시올추출물(×1배) 처리구, (d)발효 은행외종피 우루시올추출물×10배 농축물 처리구, (e)발효 은행외종피 우루시올추출물×25배 농축물 처리구, (f)발효 은행외종피 우루시올추출물×50배 농축물 처리구

11. 면역력 우수균주를 이용한 발효공정 개발

가. 혐오취 및 알레르기원 감소균주(젖산균/효모균) 고체배양물의 면역활성평가

MTT assay를 통해 세포생존율을 평가한 결과는 그림 73과 같다. 대조군과 비교하였을 때 GB1균주를 2번 기질에(은행외종피:물=1:2(w/v)) 접종한 경우(2- GB1)를 제외하고, 모든 시료의 추출물에서 80% 이상의 세포생존율을 보였다.

LPS 처리군 대비 시료의 NO 생성량은 그림 74와 같다. 1번 기질의 경우, 발효전과 발효후를 비교하였을 때, KFRI1019균주를 접종한 경우를 제외하고 발효 전 기질보다 높은 NO생성능을 나타내었다. 대부분의 기질에서 발효전보다 발효후 높은 NO생성능을 나타낸 것을 확인하였고, 이 중 NO생성능이 높은 발효물(1-GB1, 3-GB1, 3-GB4, 4-GB1, 4-GB4, 4-GB5)을 대상으로 cytokine test를 추가 실시하였다.

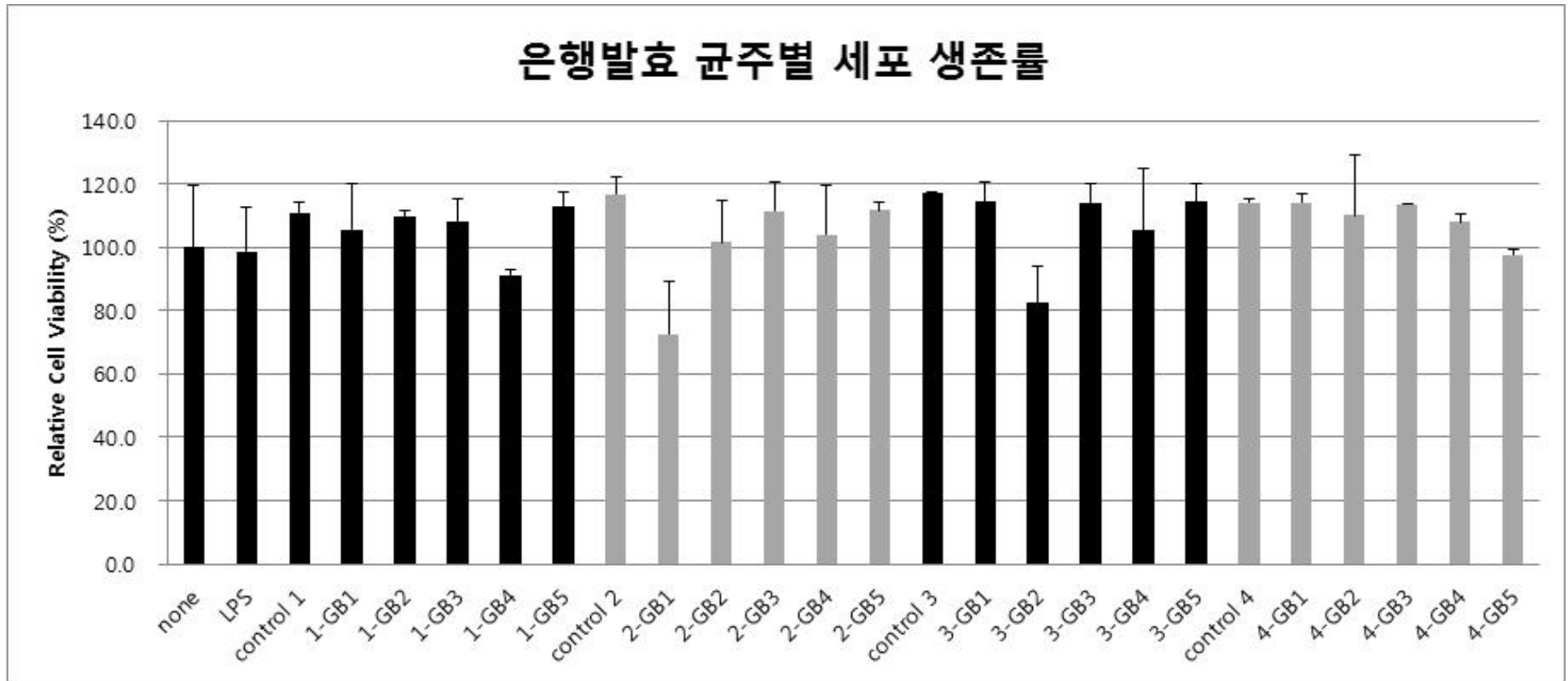
해당 기질과 발효물 추출물을 처리한 Raw 264.7 cells 배양 상등액의 cytokines 농도를 측정한 결과는 그림 75과 같다. Cytokines 중 IL-1 β 는 macrophage와 T-cell을 활성화하여 선천성 면역과 획득성 면역, 세포성 면역과 체액성 면역의 면역계 전반을 활성화 시키는 기능에 크게 관여를 하고 있다. 그림 75(A) 에서 나타난 바와 같이 대체로 발효 전 기질에 비해 발효 후 기질 추출물에 의한 IL-1 β 유도능이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 발효 전 기질 추출물 처리에 의한 세포배양 상등액 중의 IL-1 β 농도는 3.40~3.60 pg/ml이었으나, 4-GB4 발효 추출물 처리구는 발효 전 기질 대비 4.56배 농도가 증가하였다. 그러나, 동일 기질을 Y1019균으로 발효한 발효 추출물 4-GB5는 오히려 0.41배 수준으로 감소하였다.

IL-6는 T cell과 B cell의 체액성 면역 반응에 관여하여 면역 세포 분화 및 급성 감염 상태의 단백질 생산을 유도하는 기능을 가지고 있다. 그림 75(B) IL-6의 세포 배양액 중의 농도는 발효 전 기질 처리구에서는 22.4(control 1)~383.5(control 3) pg/ml인 것으로 확인하였다. 그러나 발효물의 경우, 267.5 pg/ml 농도를 유도한 4-GB5발효물 처리구를 제외하고는 572.4(3-GB1)~3,262,8(4-GB4)까지 높아졌다.

면역체계에서 IL-12는 암세포를 공격하는 NK cell 을 활성화하고, CD4 T cell의 분화를 활성화 시키는 역할을 한다. 대부분의 기질 또는 발효물 추출물을 처리한 Raw 264.7 cells 배양 상등액에서는 IL-12를 확인할 수 없었으나, 발효물인 3-GB4(0.9 pg/ml)와 4-GB5(0.1 pg/ml)을 확인할 수 있었다(그림 75(C)).

제암효과가 있는 것으로 알려진 TNF- α 그림 66(D)는 대체로 발효 전 기질 추출물 보다는 발효 후 추출물 처리에 의한 유도 효과가 큰 것으로 나타났으나 처리구간의 편차가 커서 통계적인 유의성 보다는 평균적인 경향만을 확인할 수 있었다.

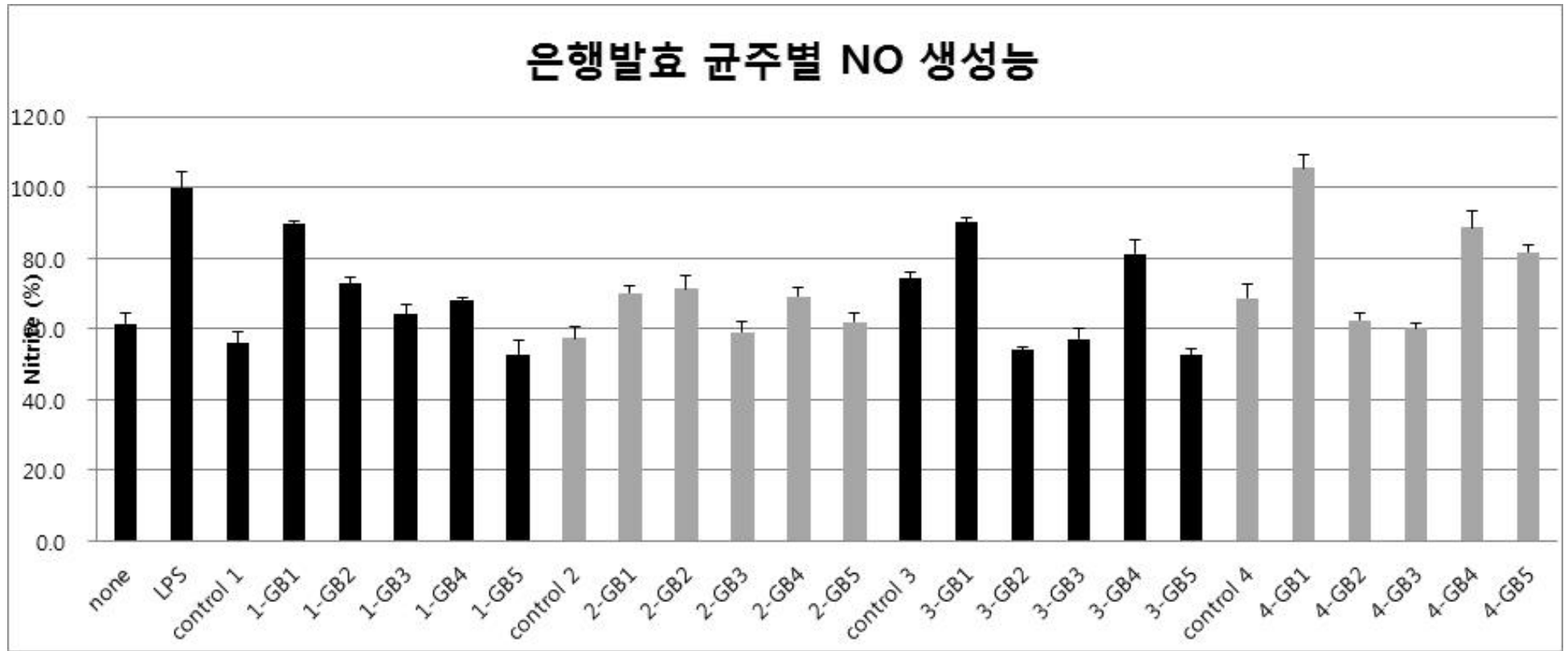
은행발효 균주별 세포 생존률



(그림 73) MTT 분석 결과

(표 64) MTT 분석 결과

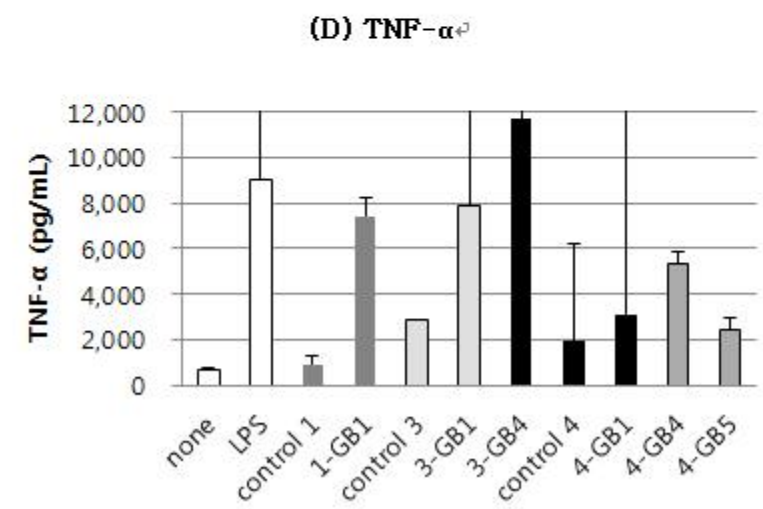
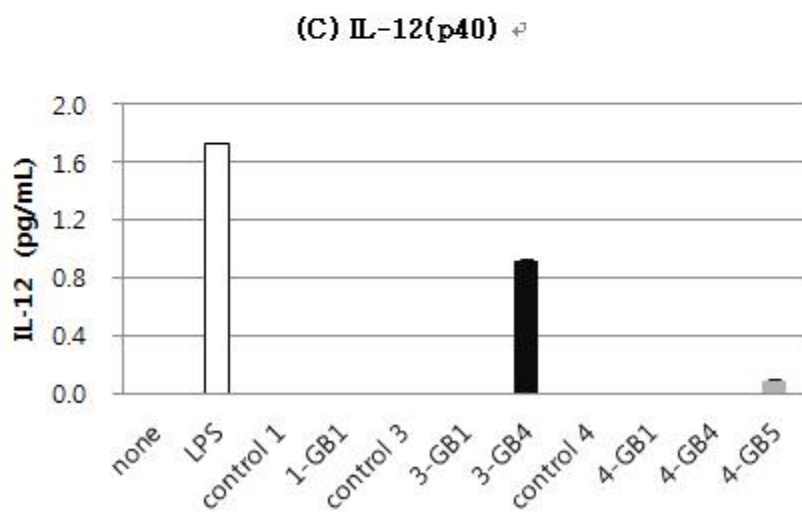
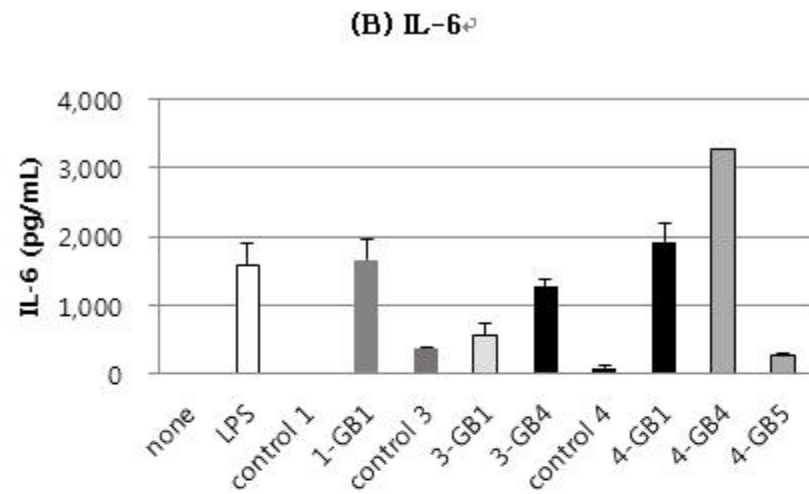
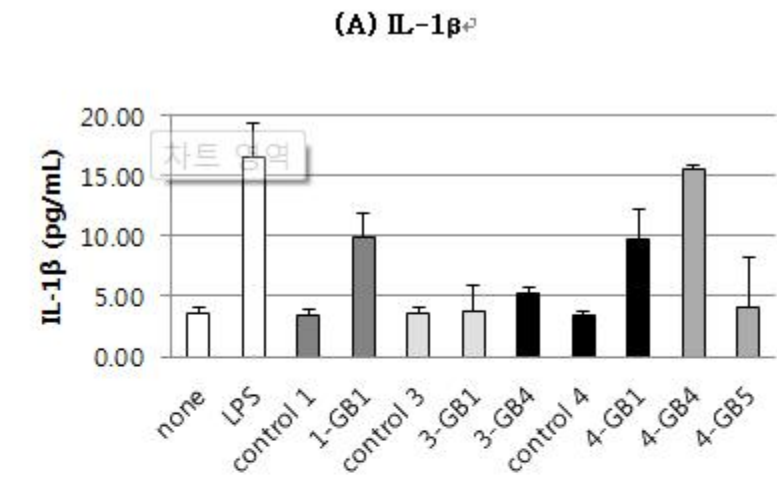
		OD ₅₄₀			maen	SD	Relative Cell Viability (%)			maen	SD
	none	3.185	3.799	2.571	3.185	0.614	100.0	119.3	80.7	100.0	19.3
	LPS	2.636	3.438	3.343	3.139	0.438	82.8	108.0	105.0	98.6	13.8
1	CON 1	3.605	3.516	3.413	3.511	0.096	113.2	110.4	107.2	110.3	3.0
2	G1-1	2.584	3.444	3.330	3.120	0.467	81.2	108.2	104.6	98.0	14.7
3	G10-1	3.577	3.632	3.485	3.565	0.074	112.3	114.1	109.4	111.9	2.3
4	G21-1	3.736	3.333	3.717	3.595	0.227	117.3	104.6	116.7	112.9	7.1
5	G36-1	1.937	1.922	2.012	1.957	0.048	60.8	60.4	63.2	61.4	1.5
6	Y1019-1	3.254	2.983	3.160	3.132	0.137	102.2	93.7	99.2	98.3	4.3
7	control 1	3.680	3.586	3.340	3.535	0.176	115.5	112.6	104.9	111.0	5.5
8	1-GB1	2.067	2.991	3.736	2.931	0.836	64.9	93.9	117.3	105.6	16.5
9	1-GB2	3.794	3.646	3.016	3.486	0.413	119.1	114.5	94.7	109.4	13.0
10	1-GB3	3.602	3.632	3.109	3.448	0.294	113.1	114.1	97.6	108.3	9.2
11	1-GB4	2.473	2.794	3.454	2.907	0.501	77.6	87.7	108.5	91.3	15.7
12	1-GB5	3.535	3.688	3.575	3.600	0.080	111.0	115.8	112.3	113.0	2.5
13	control 2	2.290	3.730	3.704	3.241	0.824	71.9	117.1	116.3	116.7	0.6
14	2-GB1	2.098	2.345	2.489	2.311	0.198	65.9	73.6	78.2	72.6	6.2
15	2-GB2	3.565	2.838	3.310	3.238	0.369	111.9	89.1	103.9	101.7	11.6
16	2-GB3	3.324	3.676	3.652	3.551	0.197	104.4	115.4	114.7	111.5	6.2
17	2-GB4	3.507	3.807	2.621	3.311	0.617	110.1	119.5	82.3	104.0	19.4
18	2-GB5	3.672	3.651	3.338	3.554	0.187	115.3	114.6	104.8	111.6	5.9
19	control 3	3.773	3.676	3.720	3.723	0.049	118.5	115.4	116.8	116.9	1.5
20	3-GB1	3.738	3.616	3.563	3.639	0.090	117.4	113.5	111.9	114.3	2.8
21	3-GB2	2.241	2.313	3.328	2.627	0.608	70.4	72.6	104.5	82.5	19.1
22	3-GB3	3.619	3.632	3.631	3.627	0.007	113.6	114.0	114.0	113.9	0.2
23	3-GB4	3.437	3.265	3.365	3.356	0.086	107.9	102.5	105.7	105.4	2.7
24	3-GB5	3.651	3.687	3.585	3.641	0.052	114.6	115.8	112.6	114.3	1.6
25	control 4	3.696	3.549	3.645	3.630	0.074	116.0	111.5	114.4	114.0	2.3
26	4-GB1	3.700	3.674	3.527	3.634	0.093	116.2	115.4	110.8	114.1	2.9
27	4-GB2	2.480	3.524	3.494	3.166	0.595	77.9	110.7	109.7	110.2	0.7
28	4-GB3	3.624	3.722	3.498	3.615	0.112	113.8	116.9	109.8	113.5	3.5
29	4-GB4	3.393	3.689	3.229	3.437	0.233	106.5	115.9	101.4	107.9	7.3
30	4-GB5	3.516	2.646	3.153	3.105	0.437	110.4	83.1	99.0	97.5	13.7



(그림 74) NO 생성능 결과

(표 65) NO 생성능 결과

		OD ₅₄₀			maen	SD	NO			maen	SD	환산량 (%)			maen	SD
	none	0.236	0.220	0.240	0.232	0.011	21.10	19.60	21.48	20.72	1.00	62.6	58.2	63.7	61.5	3.0
	LPS	0.389	0.354	0.376	0.373	0.017	35.15	31.97	33.97	33.70	1.60	104.3	94.9	100.8	100.0	4.8
7	control 1	0.214	0.200	0.222	0.212	0.011	19.07	17.76	19.84	18.89	1.05	56.6	52.7	58.9	56.1	3.1
8	1-GB1	0.346	0.329	0.333	0.336	0.009	31.17	29.64	30.02	30.28	0.80	92.5	88.0	89.1	89.9	2.4
9	1-GB2	0.258	0.285	0.277	0.273	0.014	23.10	25.58	24.89	24.52	1.28	68.6	75.9	73.9	72.8	3.8
10	1-GB3	0.230	0.249	0.247	0.242	0.010	20.54	22.27	22.11	21.64	0.95	61.0	66.1	65.6	64.2	2.8
11	1-GB4	0.254	0.248	0.267	0.257	0.010	22.78	22.24	23.97	23.00	0.89	67.6	66.0	71.1	68.2	2.6
12	1-GB5	0.203	0.190	0.207	0.200	0.009	18.06	16.84	18.48	17.80	0.85	53.6	50.0	54.8	52.8	2.5
13	control 2	0.223	0.210	0.217	0.217	0.006	19.92	18.74	19.39	19.35	0.59	59.1	55.6	57.5	57.4	1.7
14	2-GB1	0.266	0.258	0.266	0.264	0.005	23.90	23.09	23.89	23.63	0.46	70.9	68.5	70.9	70.1	1.4
15	2-GB2	0.272	0.266	0.268	0.268	0.003	24.37	23.82	24.03	24.07	0.28	72.3	70.7	71.3	71.4	0.8
16	2-GB3	0.211	0.226	0.233	0.223	0.011	18.83	20.14	20.83	19.93	1.02	55.9	59.8	61.8	59.1	3.0
17	2-GB4	0.247	0.257	0.277	0.260	0.015	22.12	23.02	24.83	23.32	1.38	65.6	68.3	73.7	69.2	4.1
18	2-GB5	0.227	0.237	0.238	0.234	0.006	20.25	21.19	21.27	20.90	0.57	60.1	62.9	63.1	62.0	1.7
19	control 3	0.265	0.281	0.292	0.279	0.013	23.76	25.23	26.22	25.07	1.24	70.5	74.9	77.8	74.4	3.7
20	3-GB1	0.324	0.349	0.340	0.338	0.013	29.14	31.48	30.63	30.42	1.18	86.5	93.4	90.9	90.3	3.5
21	3-GB2	0.345	0.351	0.359	0.352	0.007	31.12	31.68	32.39	31.73	0.63	92.3	94.0	96.1	54.2	1.9
22	3-GB3	0.213	0.215	0.221	0.216	0.004	18.95	19.22	19.76	19.31	0.41	56.2	57.0	58.6	57.3	1.2
23	3-GB4	0.289	0.300	0.324	0.304	0.018	25.96	26.99	29.20	27.39	1.65	77.0	80.1	86.7	81.3	4.9
24	3-GB5	0.197	0.192	0.207	0.199	0.008	17.56	17.09	18.45	17.70	0.69	52.1	50.7	54.8	52.5	2.0
25	control 4	0.251	0.254	0.271	0.259	0.011	22.50	22.76	24.34	23.20	0.99	66.8	67.5	72.2	68.9	2.9
26	4-GB1	0.402	0.396	0.384	0.394	0.009	36.36	35.83	34.71	35.63	0.84	107.9	106.3	103.0	105.7	2.5
27	4-GB2	0.334	0.349	0.355	0.346	0.011	30.11	31.44	31.99	31.18	0.97	89.4	93.3	94.9	62.5	2.9
28	4-GB3	0.226	0.222	0.235	0.227	0.006	20.14	19.83	20.98	20.32	0.59	59.8	58.9	62.3	60.3	1.8
29	4-GB4	0.335	0.315	0.345	0.332	0.015	30.21	28.39	31.11	29.90	1.39	89.7	84.2	92.3	88.7	4.1
30	4-GB5	0.288	0.302	0.330	0.307	0.022	25.86	27.16	29.75	27.59	1.98	76.7	80.6	88.3	81.9	5.9



(그림 75) Cytokine 분석 결과

(표 66) Cytokine 분석 결과

(A) IL-1 β

none	3.20	4.00	3.20	4.00	3.60	0.46
LPS	16.59	19.96	12.96	16.59	16.53	2.86
control 1	3.20	3.20	3.20	4.00	3.40	0.40
1-GB1	12.96	8.91	8.91	8.91	9.92	2.03
control 3	3.20	4.00	3.20	4.00	3.60	0.46
3-GB1	3.20	4.00	4.00	4.00	3.80	0.40
3-GB4	4.00	4.00	8.91	4.00	5.23	2.46
control 4	3.20	3.20	3.20	4.00	3.40	0.40
4-GB1	12.96	12.96	4.00	8.91	9.71	4.26
4-GB4	19.96	16.59	16.59	8.91	15.51	4.68
4-GB5	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	0.00

(B) IL-6

IL-6					mean	SD
none	20.92	22.73	13.86	16.96	18.6	3.983101
LPS	1547.95	2032.08	1222.35	1522.95	1581.3	334.9451
control 1	24.72	20.15	22.82	21.78	22.4	1.914983
1-GB1	1858.25	1731.09	1465.44	1623.42	1669.6	166.517
control 3	330.32	294.17	402.28	507.12	383.5	93.88388
3-GB1	571.71	620.61	548.25	548.85	572.4	33.97301
3-GB4	1652.03	1306.76	1169.37	1000.85	1282.3	276.4452
control 4	90.14	93.23	100.39	82.29	91.5	7.498846
4-GB1	1971.13	1942.92	1916.29	1902.9	1933.3	30.2057
4-GB4	3517.92	3185.55	3227.53	3120.15	3262.8	175.7335
4-GB5	492.65	63.85	389.75	123.59	267.5	206.4146

(C) IL-12(p40)

IL-12(p40)					mean	SD
none	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
LPS	1.73	1.73	1.73	1.73	1.73	0.00
control 1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1-GB1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
control 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3-GB1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3-GB4	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.00
control 4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4-GB1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4-GB4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4-GB5	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.00

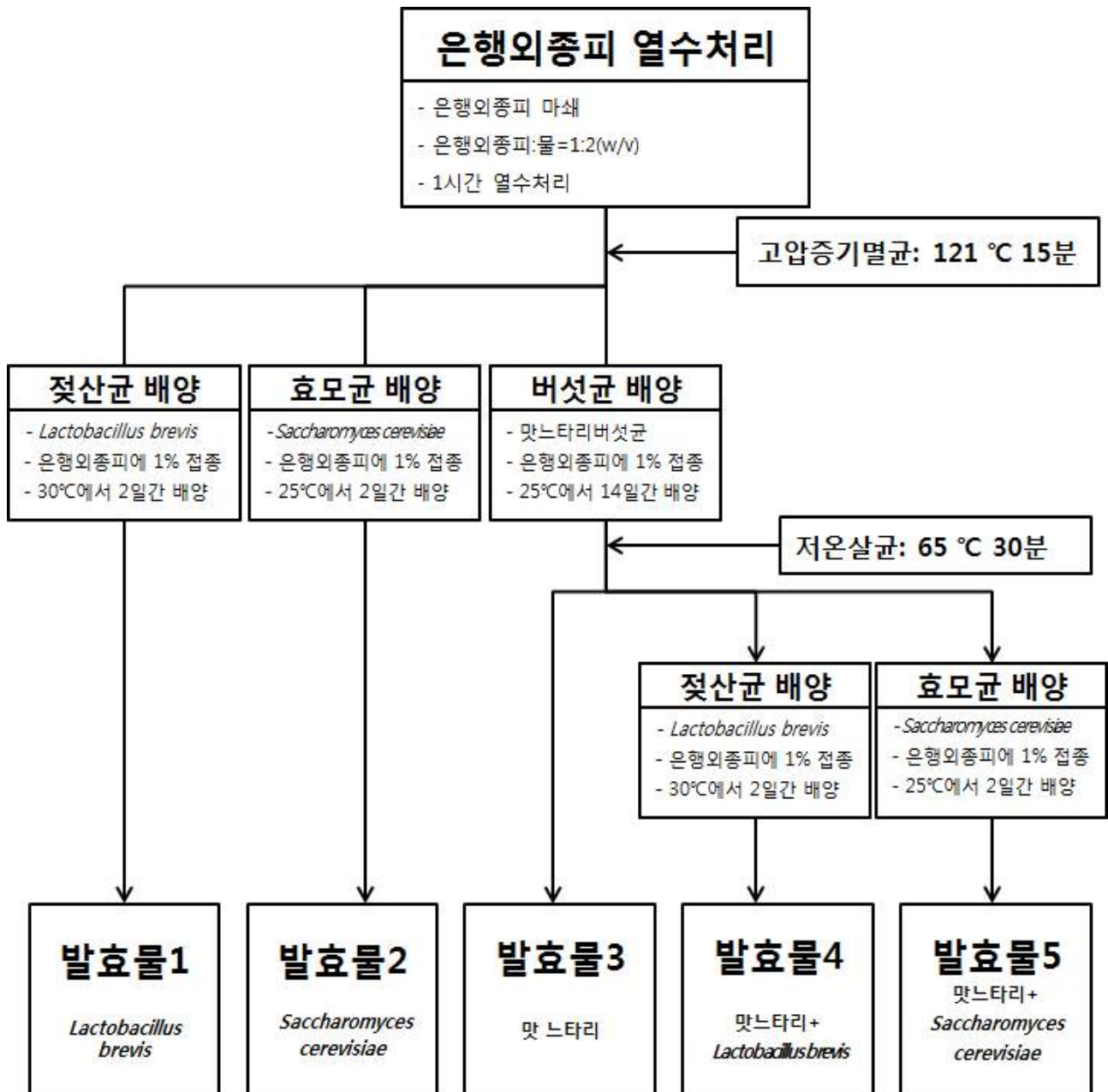
(D) TNF- α

TNF- α					mean	SD
none	691.02	657.05	574.28	761.55	671.0	77.78059
LPS	2837.27	4445.26	18985.41	9702.37	8992.6	7278.425
control 1	913.45	964.26	906.3	928.65	928.2	25.805
1-GB1	>32957.59	11772.3	3051.58	>32957.59	7411.9	6166.48
control 3	2095.14	1713.17	3685.96	3796.01	2822.6	1072.839
3-GB1	12589.59	7522.29	2419.69	8989.05	7880.2	4217.154
3-GB4	32957.59	2662.04	3386.79	7744.11	11687.6	14356.51
control 4	1190.57	2415.98	2367.05	1885.68	1964.8	568.9348
4-GB1	2613.02	3286.58	2751.53	3791.07	3110.6	538.6791
4-GB4	4348.86	4502.57	3406.1	8989.05	5311.6	2499.064
4-GB5	>32957.59	1097.96	>32957.59	3709.27	2403.6	1846.475

12. 최종 발효 공정 확립

가. 은행외종피 발효공정 확립

3가지 종균을 이용하여 만든 최종 은행외종피 복합발효물의 제조 공정은 그림 76과 같다. 본 발효물의 제조에 이용된 은행외종피는 1차적으로 열수공정을 거친 은행외종피로 이미 원재료(53,745 ppm)대비 약 30배(1,990 ppm)의 혐오취를 저감한 은행외종피를 이용하여 발효에 이용하였다.



(그림 76) 5가지 발효물의 제조 공정도

나. 은행외종피 발효물의 대량생산

(1) 파일럿플랜트 규모의 은행외종피 발효물의 제조

은행외종피 발효물의 대량생산연구를 위하여 파일럿플랜트 규모로 은행외종피 발효물을 제조하였다. 균주접종 전 30% 은행외종피 배지(기질)를 제조하기 위하여, 은행외종피의 고형분함량을 고려해 기질의 비율을 조절하였다. 은행외종피는 평균 60%의 수분함량을 가진다. 따라서 순수 은행외종피만의 고형분함량을 전체의 30%가 되도록 맞추기 위하여, 초기 은행외종피의 중량비율을 60%로 높여서 물과 혼합하였다. 그 혼합비율은 아래의 표 67과 같다.

(표 67)대량생산한 은행외종피 복합발효물의 재료 및 비율

재료	발효물종류	맛느타리버섯균+젖산균 복합발효물		맛느타리버섯균+효모균 복합발효물	
		중량비율(%)	실제중량	중량비율(%)	실제중량
	은행외종피	60	18 kg	60	18 kg
	물	30	9 L	30	9 L
	균주접종(균주배양액)	10	3 L	10	3 L
	합계	100	30 L	100	30 L

표 67의 비율로 은행외종피 기질을 제조하고 미리 준비한 균주를 각각 접종하여 분석을 실시하였다. 각각의 발효물의 버섯균주를 5% 미리 접종하고, 2주 후 멸균하여 젖산균과 효모균을 각각의 발효물의 접종하여 ‘맛느타리버섯균+젖산균 복합발효물’, ‘맛느타리버섯균+효모균 복합발효물’ 발효조에서 두 가지 발효물을 제조하였다.

(2) 대량생산한 발효물의 분석

(가) 발효물의 pH 분석

시간대별로 발효물의 pH변화를 확인하여 발효정도를 확인하였다. 버섯균과 젖산균 복합발효물은 최종 pH 3.78, 버섯균과 효모균 복합발효물은 pH 3.48로 발효가 진행됨에 따라 pH가 낮아지는 경향을 나타내었다. 이는 발효시 생성되는 대사산물에 의하여 pH가 낮아지는 현상으로 대량생산한 은행외종피 복합발효물의 발효가 진행됨을 나타낸다.

(표 68) 대량생산한 은행외종피 복합발효물의 발효기간별 pH 변화 분석

발효기간(일)	발효물종류	맛느타리버섯균+ 젖산균 복합발효물	맛느타리버섯균+ 효모균 복합발효물
		pH(평균)	pH(평균)
0일		5.43±0.01	5.33±0.02
7일		5.03±0.01	5.01±0.01
14일		4.52±0.02	4.48±0.01
16일		3.78±0.01	3.48±0.02

(나) 대량생산한 발효물의 균수측정

시간대별로 발효물의 접종한 균주의 균수변화를 확인하여 발효의 경시적인 변화를 확인하였다. pH의 변화를 미루어보아 발효가 진행된 것을 알 수 있었다. 보다 정확한 단계별 발효공정을 확인하기 위하여, 각각의 시간대별로 시료를 채취하여 균수를 확인하였다. 평판도말하여 확인한 균수는 맛느타리버섯과 젖산균 복합발효물의 경우, 아래의 표 69와 같이은행외종피에 의한 생육저해없이 활발하게 잘 생육하고 있음을 확인할 수 있었다. 초기 5.13 CFU/g 접종한 버섯균수는 발효 14일후, 7.11 CFU/g으로 증가하였고, 멸균후 접종한 젖산균의 수는 5.23 CFU/g에서, 최종발효산물인 16일 후의 시료에서는 8.98 CFU/g으로 균수가 활발히 증가하였다.

맛느타리버섯균과 효모균의 복합발효물도 비슷한 양상을 나타내었다. 발효 초기(0일차) 4.89 CFU/g로 접종한 버섯균은 발효 14일 이후 7.27 CFU/g로 크게 증가하였고, 1차 발효물의 멸균후 새롭게 접종한 2차발효물은 초기(14일) 5.14 CFU/g에서 발효말기(16일)에 8.53 CFU/g으로 크게 증가하였다.

(표 69)대량생산한 은행외종피 복합발효물의 발효기간별 총균수 변화 분석

발효물종류 발효기간(일)	맛느타리버섯균+ 젖산균 복합발효물	맛느타리버섯균+ 효모균 복합발효물
	log CFU/g(평균)	log CFU/g(평균)
0일(접종 직후)	5.13±0.05	4.89±0.04
7일(버섯균수)	6.15±0.02	6.43±0.01
14일(버섯균수)	7.11±0.01	7.27±0.02
14일(젖산균/효모균수)	5.23±0.01	5.14±0.01
16일(젖산균/효모균수)	8.98±0.03	8.53±0.04

(다) 대량생산한 발효물의 부티르산 함량변화 확인

대량생산한 은행외종피 복합발효물의 발효기간별 부티르산 함량변화를 확인하였다. 본 연구에서 가장 주요한 효과인 발효에 의한 은행외종피의 혐오취 저감을 확인하기 위하여 부티르산 함량을 각 단계별로 분석하였다. 초기 열수처리한 은행외종피의 경우, 약 2,489~2,501 ppm으로 원재료인 은행외종피 대비(약 55,000 ppm) 혐오취가 20배 이상의 감소를 달성하였다. 열수처리한 은행외종피를 이용하여 발효물을 제조한 결과, 맛느타리 버섯균을 접종하였을때는, 거의 혐오취의 함량변화를 나타내지 않았다. 다른 유기산의 함량이 변화하여 마스킹의 효과를 나타내기는 하였으나, 혐오취인 부티르산의 함량은 거의 변화가 없었다. 버섯균의 발효 이후, 젖산균과 효모균을 각각 접종하였을 때, 젖산균 발효물의 경우 978 ppm으로 원재료 대비 약 56배의 감소율, 효모균 발효물의 경우 1,023 ppm으로 원재료 대비 약 53배의 감소율을 나타내었다. 이는 실험실규모인 플라스크배양의 결과인 원재료 대비 약 60배 감소율(원재료의 1/60수준)보다 낮은 수준이지만, 비슷한 수준으로 본 실험을 대량생산에도 적용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

(표 70)대량생산한 은행외종피 복합발효물의 발효기간별 부티르산 변화 분석

발효물종류 발효기간(일)	맛느타리버섯균+ 젖산균 복합발효물	맛느타리버섯균+ 효모균 복합발효물
	ppm(평균)	ppm(평균)
0일	2,501	2,489
7일	2,342	2,247
14일	2,242	2,149
16일	978	1,023

다. 시제품의 개발

(1) 은행외종피 발효환의 제조

맛느타리버섯 은행외종피 발효물에 *L. brevis* 와 *S. cerevisiae*를 각각 접종하여 맛느타리버섯+젖산균(*L. brevis*)과 맛느타리버섯+효모균(*S. cerevisiae*) 버섯은행외종피 발효물을 제조하였다. 제조한 환은 열풍건조하였으며 5%의 조청을 첨가하여 환 제품을 제조하였으며 제조한 환을 관능평가를 진행하였다(그림 77, 78). 2가지의 발효환은 20대여성 20명을 대상으로 은행향, 단향, 쓴향, 은행맛, 단맛, 쓴맛, 조직감 및 전체적인 기호도로 총 8가지 항목에 대하여 진행하였으며 결과는 다음과 같다(표 71). 관능결과 은행향 및 은행맛은(butyric acid)의 양은 버섯+젖산균 발효환에서 각각 3.67 ± 1.21 , 3.15 ± 1.35 과 버섯+효모 발효균에서 각각 3.92 ± 1.18 , 3.13 ± 1.43 으로 나타났다. 이에 비하여 단향과 단맛은 버섯+젖산균에서 각각 6.78 ± 1.25 , 6.58 ± 0.93 버섯+효모균에서 각각 6.15 ± 0.94 , 6.72 ± 1.13 으로 나타나 발효물의 주된 향을 구성하고 있는 것으로 보여 졌다. 쓴향과 쓴맛도 은행향 및 은행맛과 비슷한 수준을 나타내어 은행외종피 발효환에서의 강도는 낮은 것으로 나타났다. 종합적 기호도의 경우 버섯+젖산균의 경우 7.19 ± 1.10 , 버섯+효모균의 경우 6.49 ± 1.68 으로 나타나 은행외종피 발효환의 기호도는 대체적으로 ' 좋음'을 나타냈다. 버섯+젖산균 발효환은 버섯+효모균 발효환에 비하여 종합적인 기호도가 소폭 낮게 나타났는데 이는 오차범위 내에 있는 것으로 나타나 샘플 간의 큰 차이는 보이지 않음을 알 수 있었다. 또한 제조한 환은 초콜릿을 쉘 초콜릿안에 채워 섭취하기 용이한 초콜릿 코팅환을 제조하였으며 그 시제품은 사진과 같다.

(표 71) 은행외종피발효환의 관능기호도 검사

Sample	버섯+ 젖산균 (<i>L. brevis</i>)	버섯+ 효모균 (<i>S. cerevisiae</i>)
은행향	3.67±1.21	3.92±1.18
단향	6.78±1.25	6.15±0.94
쓴향	3.44±1.08	4.38±1.22
은행맛	3.15±1.35	3.13±1.43
단맛	6.58±0.93	6.72±1.13
쓴맛	4.92±1.44	5.54±1.09
단단함(조직감)	7.45±0.81	7.82±1.60
종합적 기호도	7.19±1.10	6.49±1.68



(그림 78) 맛느타리버섯+ 젖산균(*L. brevis*) 버섯은행외종피 발효환



(그림 77) 맛느타리버섯+ 효모균(*S. cerevisiae*) 버섯은행외종피 발효환

(2) 은행외종피 발효음료의 제조

제조한 네가지의 Control, Grape vinegar, Apple vinegar, Persimmon vinegar 과실식초형 음료는 20대여성 20명을 대상으로 은행향, 신향, 쓴향, 은행맛, 신맛, 쓴맛, 목넘김 및 전체적인 기호도로 총 8가지 항목에 대하여 진행하였으며 결과는 다음과 같다(그림 79). 은행향 및 은행맛은 control에서 2.27로 가장 적게 나타났으나 나머지 은행외종피 발효물식초의 경우에도 3.18~3.61 사이의 범위를 나타내어 은행외종피발효물이 첨가되지 않은 control과 비교해서도 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 시료중에서는 사과식초가 3.18±1.40로 가장 낮게 나타났다. 신향과 신맛의 경우에는 Control이 가장 높게 나타났으며 포도식초의 경우가 신향과 신맛이 가장 낮게 나타났다. 쓴맛의 경우는 큰 차이가 없었으나 포도식초에서 4.28±1.43 로 가장 낮게 나타남을 알 수 있었다. 은행맛의 경우에는 Control이 가장 낮았으며 감식초의 경우 가장

높게 나타났다. 목넘김의 경우 포도와 사과식초를 가장 부드럽게 느꼈으며 전체적인 기호도의 경우 Control이 가장 낮았으며 포도식초의 기호도가 가장 높았다. 은행외종피 발효물이 함유된 샘플중에서는 감식초의 기호도가 가장 낮게 나타났다. 위와같은 관능평가 결과를 통하여 은행외종피를 이용하여 과실식초형 발효음료를 제작 했을 시 butyric acid에서 비롯되는 은행의 맛과 향은 Control에 비하여 소폭 높게 나타났지만 미비한 수준이었다. 하지만 은행외종피발효물을 첨가한 식초의 경우 식초의 신향과 신맛이 감소되고 목넘김이 대조구에 비하여 부드러워 모든 시료에서 대조구에 비하여 전체적인 기호도가 높게 나타났다(표 72).

(표 72) 은행외종피첨가 과실식초형 발효음료의 관능기호도 검사

Sample	Control	Grape	Apple	Persimmon
은행향	2.27±1.21	3.61±2.07	3.18±1.40	3.55±1.86
신향	8.05±1.54	7.62±1.21	7.88±1.69	7.57±1.40
쓴향	5.15±1.86	4.28±1.43	5.01±1.22	5.43±1.56
은행맛	2.55±2.05	3.16±1.81	3.44±1.38	3.92±2.07
신맛	7.84±1.33	7.39±0.94	7.18±1.04	6.82±0.92
쓴맛	4.57±0.81	4.29±1.38	4.01±1.08	4.48±1.84
목넘김	4.97±1.19	6.73±1.40	6.45±1.35	5.91±1.69
종합적 기호도	6.82±1.25	7.73±1.60	7.45±1.60	7.01±1.13



(그림 79) 은행외종피첨가 과실식초형 발효음료

(3) 은행외종피 발효조청의 제조

은행외종피발효물을 첨가한 발효조청의 관능평가 결과는 다음과 같다. 관능평가는 고두밥에 엿기름을 첨가하여 제조한 조청과, 은행외종피누룩을 첨가한 은행외종피발효조청을 이용하여 20대 여성 20명을 대상으로 진행하였다. 관능평가결과 은행외종피는 일반조청에서 2.67로 은행외종피 발효조청보다 소폭 높은값을 나타냈지만 모두 오차범위내로 나타났다. 또한 두 샘플 모두 은행향의 강도가 낮게 나타나서 조청에서 은행향은 거의 감지되지 않는 것으로 보여졌다. 단향의 경우는 일반조청에서 더 높게나타났으며 단맛또한 같은 추세를 나타냈다. 하지만 고소한향과 고소한맛의 경우 은행외종피 발효조청의 경우 각각 6.34 ± 1.84 , 7.43 ± 2.01 으로 일반조청보다 큰 폭 높게 나타남을 알 수 있었다. 조직감의 경우 부유물이 없는 일반조청의 경우가 은행외종피 발효조청보다 높게나타나 종합적 기호도의 경우 일반조청이 은행외종피 발효조청보다 높게 나타났다. 하지만 은행외종피 발효조청에서의 부유물을 제거하는 등 다양한 공정을 통하여 조직감을 개선한다면 고소한향이 일반조청보다 강한 은행외종피 조청에서의 기호도가 상승할 것으로 보여진다.

(표 73) 은행외종피첨가 발효조청의 관능기호도 검사

Sample	조청	은행외종피 조청
은행향	2.67 ± 1.24	2.49 ± 1.69
단향	6.87 ± 0.86	5.82 ± 1.01
고소한향	5.18 ± 1.43	6.34 ± 1.84
은행맛	3.42 ± 0.94	4.11 ± 1.33
단맛	7.10 ± 0.76	6.82 ± 0.94
고소한맛	6.04 ± 1.57	7.43 ± 2.01
조직감	6.73 ± 1.84	4.99 ± 1.47
종합적 기호도	6.49 ± 1.33	6.71 ± 1.41



(그림 80) 은행외종피첨가 발효조청

라. 개발된 은행외종피 발효물의 기술전수 및 사업화 검토

(1) 기술이전

1차년도에 연구한 내용을 바탕으로 두성은행영농조합으로 1건의 기술이전을 실시하였다. 기술이전의 내용은 ‘은행외종피의 혐오취를 저감시키는 방법 및 이를 이용한 된장, 고추장 발효식품’에 관한 내용으로 2014년 10월 13일에 기술이전 되었다. 기술이전된 내용은 2014년 등록된 특허 ‘은행외종피의 혐오취를 저감시키는 방법 및 이를 이용한 된장 발효식품(특허등록번호 10-1419415)’, ‘은행외종피의 혐오취를 저감시키는 방법 및 이를 이용한 고추장 발효식품(특허등록번호 10-1392184)’의 내용이다. 또한, 최종연구결과를 토대로 현재 알레르기저감 및 면역력이 증진된 은행외종피 발효물에 대한 특허출원을 진행중에 있으며, 본 특허의 내용을 두성은행영농조합으로 기술이전할 계획이다.

두성은행영농조합은 2009년에 설립된 영농조합법인으로 은행생산업체이다. 본 업체는 연간 1,350톤의 은행을 생산하고 있는 충청남도 예산군에 자리하고 있으며, 은행관련 상품을 판매하고 있는 업체이다. 두성은행영농조합에서 판매되고 있는 은행상품은 피은행, 간은행 뿐만 아니라 징코청과 같은 은행발효액(은행을 발효숙성시켜 어성초, 삼백초, 매실발효액등을 첨가한 것) 등이 있다.

(2) 식품의약품안전처 식품원재료 승인 추진계획

은행외종피의 경우 식품공전상에 등록된 식품소재(식품원재료)가 아니기 때문에 이러한 은행외종피 발효물이 식품으로 이용될 수 있도록 하기 위하여, 본 개발품의 안전성을 평가하고, 식품으로써 이용하기 위하여 식품의약품안전처(식약처)로부터 허가를 취득하는 과정이 이어져야 한다.

본 연구는 은행외종피의 butyric acid 의 저감화를 통하여 혐오취를 감소시켰으며 Urushiol의 저감화를 통하여 알러지를 저감화 시켰다. 본 연구를 통하여 개발된 은행외종피는 식품소재로서 이용가능성이 있을것으로 보여 졌으며, 이 후 식품소재로 이용하기 위해서는 식약처의 식품원재료 인증과정이 진행되어야 한다. 식약처의 식품 원재료 인증을 받기 위해서는 우수실험실운영규정에 운영된 기관(GLP)에서 실험한 동물실험을 통한 독성시험(급성, 만성, 아급성)이 진행되어야 한다. 그에 따른 연구기간이 2-3년, 연구비 약 3-5억 원이 추가적으로 요구된다.

따라서 본 과제에서는 은행외종피의 냄새저감화 기술 및 알레르기 저감화기술을 을 참여업체인 두성은행영농조합에 기술이전 하고자 하며, 상품화는 추가 기술이전 후에 업체에서 식약처에서 식품원재료로 인증을 받은 후 진행할 수 있도록 향후 지도 및 기술지원을 지속하고자 한다(그림 80).

「식품위생법」제7조제2항 및 시행규칙 제5조제4항에 따른 고시되지 아니한 식품(원료로 사용되는 경우만 해당)의 기준·규격 인정 등 및 한시적으로 인정하는 식품의 제조·가공 등에 관한 기준과 성분의 규격

- 제출자료의 요약본,
- 기원 및 개발경위, 국내외 인정, 사용현황 등에 관한 자료
(언제, 어느나라에서, 어떤 경위로 개발되었는지 기재. 국내·외 인정·허가 상황, 사용기준 등의 관련 내용을 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission)기준에 맞추어 첨부)
- 제조방법에 관한 자료
(제조과정에 사용된 용매, 효소, 미생물 등 안전성 평가와 관련된 기준 기재)
- 원료의 특성에 관한 자료
(원료를 특정 지을 수 있는 성상, 물성, 섭취방법, 용도, 주요성분 등에 관한 자료)
- 안정성에 관한 자료
(우수실험실운영규정(GLP)에 따라 운영된 기관에서 실시하며 OECD에 따르거나 이에 준하여 실험할 것, 단회투여독성실험, 3개월 반복투여독성실험, 유전독성실험에 관한 자료 포함)

독성평가 완료 후 규격인정 진행예정

(그림 80) 식품원재료 허가를 위한 식약처의 제도적 절차 모식도

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구를 통하여 부티르산의 함량 저감효과가 우수하고, 우루시올류에 저항력이 우수하며 면역력 증진효과가 있는 균주 *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, 맛느타리 버섯균을 발효종균으로 선발하였으며, 이를 이용한 다단계 복합 발효공정을 개발하였다. 개발된 복합발효공정을 이용하여 제조한 최종발효 결과물인 개발된 소재에서 부티르산 함량을 원재료대비 약 60배 이상 감소시켰고(원재료의 1/60 수준), 우루시올류에 의한 알레르기 발현을 약 50배 이상(원재료의 1/50 수준) 감소시킨 것을 확인하였다.

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 은행 외종피의 헴오취 저감화 공정 개발 -된장 및 자연치즈 수준의 냄새 저감화 달성 여부(원료의 1/10 이하 butylic acid)	원료의 1/10 수준의 butylic acid함량 감소를 목표로 하였으나 1/60 함량 감소를 달성함)
② 은행 외종피의 Allergy 저감화 공정 개발 -Allergy patch test에서 원료의 10배 이상 안전성 확보	-연구목표는 Allergy patch test에서 원료의 10배 이상 안전성 확보였으나, 50배 이상의 안전성 확보를 달성함.
③ 은행 외종피의 면역력 증진 공정 개발 -면역력증진 종균 set 1종 이상 개발여부 -면역증진버섯 배양 공정 개발여부	-은행외종피의 면역력증진 종균 2종과 면역증진버섯 배양 공정 개발을 완료함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

향후 본 연구팀의 ‘은행외종피 발효소재 제조기술’은 이용되지 않고 버려지는 은행외종피의 양을 감소시키고 부산물 활용성 제고에 크게 기여할 수 있을 것으로 내다봄. 이번 연구 결과는 식용으로 이용하는 은행종실부를 제외하고 남은 부산물이자 폐기물인 은행외종피의 혐오취와 알레르기원을 제거할 수 있는 방향을 제시하였고, 향후 폴리페놀성분 및 각종 영양성분이 많은 은행외종피를 상품화하여 관련 농가에 경제적으로 큰 파급효과를 가져올 것임.

또한, 은행외종피 발효공정에 이용한 젖산균주는 발효식품종균으로서 기능뿐만 아니라 프로바이오틱스(probiotics) 기능을 겸비할 수 있어 미생물 자원으로서의 가치도 높으며, 발효기술을 이용한 혐오취 제거공정기술은 은행외종피 이외의 다른 혐오취 폐자원의 부가가치 제고에 활용할 수 있을 것으로 전망됨.

- 활용실적

- ☞ 특허등록 : 2건(국내특허)
- ☞ 특허출원 : 9건(국내특허)
- ☞ 학회발표 : 3편(국내 1, 국외2)
- ☞ 논문게재 : 1편(SCI급)

- 추가활용계획

- ☞ 특허출원 : 4건, ☞ 학회 발표 : 1편, ☞ 논문게재 : 2편(SCI급 1편, 비SCI 1편)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 악취 관련연구

- ① **Improvement of fish-sauce odor by treatment with bacteria isolated from the fish-sauce mush (Moromi) made from frigate mackerel.** JOURNAL OF FOOD SCIENCE | 69 (2): M45-M49 MAR 2004.

: 생선액젓의 냄새를 저감화 시키기 위하여 고등어에서 분리된 Staphylococcus xylosum를 이용하였다. 그 결과 Staphylococcus xylosum 처리된 생성소스에서는 악취가 대조구에 비해서 저감화되는 효과확인함.

- ② **Fermentation microorganisms and flavor changes in fermented foods.** JOURNAL OF FOOD SCIENCE | 69 (1): M35-M37 JAN-FEB 2004

: 식품의 발효과정 중에는 상대적으로 맛과 향의 변화가 발생한다. 이는 발효 미생물의 대사활동과 상호작용하는 활성효소 등의 시스템사이의 변화이다. 이처럼 발효식품의 풍미변화에서 유산균의 역할이 중요해지고 있다. 이 논문은 그에 대한 리뷰논문임.

- ③ **Chemical conversion of alpha-keto acids in relation to flavor formation in fermented foods.** JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY | 52 (5): 1263-1268 MAR 10 2004

: 페닐알라닌으로부터 유도되는 플라보노이드 컴파운드는 치즈 등의 발효식품의 향미형성에 매우 중요한 과정이다. 본 연구에서는 이 플라보노이드 컴파운드의 전환 및 변환을 통하여 치즈 맛과 향의 형성을 제어하기 위한 새로운 방법을 연구하였음.

- ④ **Effects of adding butyric acid to PN on gut-associated lymphoid tissue and mucosal immunoglobulin A levels.** JOURNAL OF PARENTERAL AND ENTERAL NUTRITION | 35 (4): 465-472 JUL 2011

: 단쇄 지방산은 장 점막에 유의한 효과를 보이는 것으로 입증되었다. 본 연구에서는 마우스동물모델에서 Parenteral nutrition(PN)+ 부티릭산을 첨가하였다. 실험결과 소장 보호작용으로 림프구보호작용이 대조구에 비해서 유의하게 낮았다. 이를 통해 부티릭산을 함유하는 새로운 PN은 장점막 면역장애를 개선시킬 것임.

2. 알레르기 관련연구

- ① **Exploring the chemistry of quinones by computation.** QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS | 19 (1): 22-28 MAR 2000

:웃, 아이비에 주로 존재하는 1, 4-벤조퀴논 및 우루시올의 대사에 관한 논문으로 1, 4-벤조퀴논과 우루시올의 정량적인 분석을 실시한 논문임.

- ② **Evidence for immunotoxic effects of crude Ginkgo biloba L-leaf extracts using the popliteal lymph node assay in the mouse.** INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHARMACOLOGY | 22 (3): 229-236 MAR 2000

:은행나무 접촉에 의한 알레르기 반응의 원인으로 ginkgolic acid(알킬페놀)을 확인하였고, 은행나무 잎 추출물의 알레르기 반응 제어해 줄 수 있는 immunotoxic 특성을 갖는 성분을 분석한 논문임.

- ③ **Regulation of the contact sensitivity response to urushiol with anti-urushiol monoclonal antibody ALG 991.** ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH | 291 (12): 652-658 DEC 1999

:웃과 아이비의 독성의 접촉감도 분석에 관한 논문으로, 우루시올과 반응하는 단일클론항체의 조절을 통하여 알레르기를 치료하는 것을 목적으로 한 논문임.

- ④ **Determination of ginkgolic acid using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography.** CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY | 28 (8): 985-988 AUG 20 2000

:은행잎의 피부염을 유발하는 ginkgolic acid의 추출방법과 고성능액체크로마토그래피를 사용하여 ginkgolic acid를 검출한 논문

3. 면역활성 관련연구

- ① **Adherent Properties and Macrophage Activation Ability of 3 Strains of Lactic Acid Bacteria.** JOURNAL OF FOOD SCIENCE | 76 (1): M1-M7 JAN-FEB 2011

:3가지 종류의 젖산균의 macrophage의 활성화 능력을 확인한 연구로 선발균주의 장점착능과 cytokine 등의 면역활성인자의 평가를 통해, 선발균주의 프로바이오틱활성을 확인한 논문.

- ② **The fungal metabolite, citrinin, inhibits lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced nitric oxide production in glomerular mesangial cells.** INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY | 10 (12): 1608-1615 Sp. Iss. SI DEC 2010

:본 연구에서는 홍국의 발효 이차 대사산물인 곰팡이독소가 산화질소(NO) 생성능과 염증조절역할(면역조절역할)의 매개체로 이용될 수 있는지 확인하였음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

1. 연구기자재비

해당사항없음

2. 시설비

해당사항없음

제 8 장 참고문헌

1. Ahn JH, Kim BY, Kim DH, Song JK, Weon HY (2012) Application of amplicon pyrosequencing in soil microbial ecology. *Korean J Soil Sci Fert* **45**, 1073-1085.
2. Al-Zoreky N, Sandine WE (1991) *Lactococcus* Genus: A selective and differential agar medium. *J Food Sci* **56**, 1729-1730.
3. Andersson AM, Weiss N, Fainey F, Salkinoja-Salonen MS (1999) Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *J Appl Microbiol* **86**, 622-634.
4. Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Statist* **11**, 265-270.
5. Chao A and Lee SM (1992) Estimating the number of classes via sample coverage. *J Am Stat Assoc* **87**, 210-217.
6. Chen SX, Wu L, Yang XM, Jiang XG, Li LG, Zhang RX (2007) Comparative molluscicidal action of extract of *Ginkgo biloba* sarcotesta, arecline and niclosamide in snail hosts of *Schistosoma Japonicum*. *Pestic Biochem Physiol* **89**, 237-241.
7. Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Sys Evol Microbiol* **57**, 2259-2261.
8. Chun J, Kim KY, Lee HJ, Choi Y (2010) The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2- deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. *BMC Microbiology* **10**, 101-108.
9. Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH (2007) *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J Clin Microbiol* **45**, 1989-1992.
10. Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwel N, Matgeus RJ, Noskin O, Fichards JA, Schoenberger NE (2000) *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil* **81**, 668-678.
11. Drosinos EH, Paramithiotis S, Kolovos G, Tsikouras I, Metaxopoulos I (2007) Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiol* **24**, 260-270.
12. Dutta-Roy AK, Gordon MJ, Kelly C, Hunter K, Crpsbie L, Knihgt-Carpentar T,

- Williams BC (1999) Inhibitory effect of *Ginkgo biloba* extract on human platelet aggregation. *Platelets* **10**, 298-305.
13. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194-2200.
 14. Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**, 237-264.
 15. Hamady M, Lozupone C, Knight R (2009) Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J* **4**, 17-27
 16. Han GJ, Shin DS, Jang MS (2009) The quality characteristics of *Aralia continentalis* Kitagawa *Jangachi* by storing time. *Korean J Food Cookery Sic* **25**, 8-15.
 17. Hill TC, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF (2003) Using ecological diversity measures with vacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* **43**, 1-11.
 18. Jin HS and Lee WO (2000) Production condition and utilities of extracellular biopolymer from *Bacillus licheniformis*. *Korean J Environ Biol* **18**, 199-203.
 19. Jin HS, Kim JB, Lee KJ (2007) Major microbial composition and its correlation to the taste of sunchang traditional kochujang. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **20**, 363-368.
 20. Kempf M, Theobald U, Fiedler HP (2000) Production of the antibiotic gallidermin by *Staphylococcus gallinarum*-development of a scale-up procedure. *Biotech Lett* **22**, 123-128.
 21. Kenneth LH, Gerald VB, Daniel S (1975) Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* **56**, 1459-1461.
 22. Kim DC, Cho E, In MJ, O Ch, Hong KW, Kwon SC, Chae HJ (2012) The prediction of shelf-life of pickle processed from Maengjong bambo. *J Korea Acad Industr Coop Society* **13**, 2641-2647.
 23. Kim TW, Lee JH, Kim SE, Park MH, Chang HC, Kim HY (2009) Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* **131**, 265-271.

24. Kim TW, Lee JH, Park MH, Kim HY (2010) Analysis of bacterial and fungal communities in Japanese and Chinese-fermented soybean pastes using nested PCR-DGGE. *Curr Microbiol* **60**, 315-320.
25. Kim YS, Jeong DY, Hwang YT, Uhm TB (2011) Bacterial community profiling during the manufacturing process of traditional soybean paste by pyrosequencing method. *Korean J Microbiol* **47**, 275-280.
26. Kim YS, Kim MC, Kwon SW, Kim SJ, Park IC, Ka JO, Weon HY (2011) Analyses of bacterial communities in meju, a Korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation-based and pyrosequencing methods. *J Microbiol* **49**, 340-348.
27. Leboffe MJ and Pierce BE (2010) *Microbiology: Laboratory theory and application*, (3rd ed), Morton Publishing Company Press, Colorado
28. Lee CW, Ko CY, Ha DW (1992) Microflora changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* **20**, 102-109.
29. Lee JM, Jang JH, Oh NS, Han MS (1996) Bacterial distribution of *Gochujang*. *Korean J Food Sci Tehchnol* **28**, 260-266.
30. Lee JS, Kwon SW, Chung SW, Choi YJ, Yoo JY, Chung DH (1996) Changes of microorganisms, enzyme activities and major components during the fermentation of Korean traditional doenjang and kochujang. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* **24**, 247-253.
31. Lee KH, Lee MS, Park SO (1976) Studies on the microflora and enzymes influencing on Korea native kochuzang (red pepper soybean paste) aging. *J Korean Agric Chem soc* **19**, 82-92.
32. Lee MK, Park WS, Kang KH (1996) Selective Media for Isolation and Enumeration of Lactic Acid Bacteria from *Kimchi*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **25**, 754-760.
33. Lee TS, Yang KJ, Park YJ, Yu JH (1980) Studies on the brewing of *Gochujang* (red pepper paste) by the addition of yeasts Strains. *Korean J Food Sci Technol* **12**, 313-323.
34. Li W and Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **22**, 1658-1659.
35. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV,

- Goodwin BC, He W, Helgesen S, Ho Ch, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JP, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, Mcdade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JP, Plant R, Luc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Voga KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM (2005) Genome sequencing in open microfabricated high density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380.
36. Mohamed HAA, Shymaa RB, Sylvia S, Stefan R (2011) Isolation and characterization of *Serratia rubidaea* from dark brown spots of tomato fruits. *Phytoparasitica* **39**, 175-183.
37. Monier JM and Lindow SE (2005) Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces. *Microb Ecol* **49**, 343-352.
38. Myers EW and Miller W (1988) Optimal alignments in linear space. *Comput Appl Biosci* **4**, 11-17.
39. Pan W, Luo P, Fu R, Gao P, Long Z, Xu F, Xiao H, Liu S (2006) Acaricidal activity against *Panonychus citri* of a *Ginkgo biloba*. *Pest Manag Sci* **62**, 283-287.
40. Park HK, Gil B, Kim JK (2002) Characteristics of taste components of commercial kochujang. *Food Sci biotechnol* **11**, 376-379.
41. Park SJ, Chang JH, Cha SK, Moon GS (2009) Analysis of the bacterial composition during *gochujang*, a Korean traditional fermented hot pepper–soybean paste, fermentation. *Food Sci Biotechnol* **18**, 1035-1037.
42. Park YJ, Kim JH, Kim YK (2003) Comparative analysis of host insect immunodepression induced by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophilus* and *Staphylococcus gallinarum*, with differential pathogenicities. *Korean J Appl Entomol* **42**, 353-360.
43. Saleem S, Zhuang H, Biswal S, Chirsten Y, Dore S (2008) *Ginkgo biloba* extract neuroprotective action is dependent on heme oxygenase 1 in ischemic reperfusion brain injury. *Stroke* **39**, 3389-3396.
44. Sasaki K, Wada K, Haga M (2003) Chemistry and biological activities of *Ginkgo biloba*. *Bioactive Natural Products* **28**, 165-198.
45. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB,

- Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahi JW, Stres B, Thallinger GG, Van Harn DJ, Weber CF (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7537-7541.
46. Shigeo M and Toshio O (1988) Selective media for enumerating lactic acid bacteria groups from fermented pickles (in Japanese). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **35**, 610-617.
47. Snauwaert I, Papalexandratou Z, De Vuyst L, Vandamme P (2013) Characterization of strains of *Weissella fabalis* sp. Nov. and *Fructobacillus tropaeoli* from spontaneous cocoa bean fermentations. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 1709-1716.
48. Sneath PHA and Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*, (2nd ed.), W. H. Freeman Press, San Francisco.
49. Soumitesh C, Danica H, Michele B, Nancy C, David A (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* **69**, 330-339.
50. Sumpavapol P, Tongyonk L, Tanasupawat S, Chokesajjawatee N, Luxananil P, and Visessanguan W (2010) *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (*poo-khem*) in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2364-2370.
51. Takasi K, Yukino U, Saeko I, Hajime T, Yuko T, Bon K (2012) Suppressive effect of *Tetragenococcus halophilus*, isolated from fish-nukazuke, on histamine accumulation in salted and fermented fish. *Food Chem* **130**, 569-574.
52. Weisburg WG, Bams SM, Pellertier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**, 697-703.
53. Wu XY, Mao GH, Yang LQ, Wu JB, Zhu XH (2006) Study on the extraction technology of crude polysaccharides from *Ginkgo sarcotesta*. *Food Sci* **27**, 372-375.
54. Wu XY, Mao G, Zhao T, Zhao J, Li F, Liang L, Yang L (2011) Isolation, purification and in vitro anti-tumor activity of polysaccharide from *Ginkgo biloba* sarcotesta. *Carbohydrate Polymers* **86**, 1073-1076.
55. Yang JE, Park YJ, Chang HC (2007) Cloning of four genes involved in limonene hydroxylation from *Enterobacter cowanii* 6L. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 1169-1176.
56. Yang XM, Chen SX, Xia L, Chen X (2008) Molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* of *Ginkgo Biloba*. *Fitoterapia* **79**, 250-254.

57. Jeong YJ, Lee MH, Seo KI, Kim JN, Lee YS (1998) The quality comparison of grape vinegar by two stages fermentation with traditional grape vinegar. *J. The East Asian. Dietary Life* **8**, 462-468.
58. Jeong YJ, Seo JH, Lee GD, Park NY, Choi TH (1999) The quality comparison of apple vinegar by two stages fermentation with commercial apple vinegar. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 353-358.
59. Hong JH, Lee GM, Hur SH (1996) Production of vinegar using destringed persimmons during low temperature storage. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25**, 123-128.
60. Kim DH (1999) Studies on the production of vinegar from Fig. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 53-60.
61. Jeong ST, Kim JG, Chang HS, Kim YB, Choi JU (1996) Optimum condition of Acetic acid Fermentation for Persimmon Vinegar Preparation and Quality evaluation of Persimmon Vinegar. *The Korean Soc. Food Preserv.* **3**, 171-178
62. Lee DS, Ryu IH, Lee KS, Shin YS, Chun SH (1999) Optimization in the Preparation of Aloe Vinegar by *Acetobacter* sp. and Inhibitory Effect against Lipase Activity. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **42**, 105-110.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 ‘고부가가치식품 기술개발사업’의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 ‘고부가가치식품기술개발사업’의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.