최 종
연구보고서

발효화분식품 개발에 관한 연구

Studies on fermented pollen food

경북대학교

농림부

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구보고서입니다

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

최 종 보 고 서

1997 년도 농림수산특정연구사업에 의하여 완료한 **발 효 화 분 식 품 개 발** 에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

1997. 12. 20.

주관연구기관 : 경 북 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 동 신 (인)

주관연구기관장 : 경북대학교 총장 (직인)

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “발효화분식품 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 12. 20.

주관연구기관명 : 경 북 대 학 교
총괄연구책임자 : 김 동 신
연 구 원 : 박 상 교
협동연구기관명 : 고 려 양 봉 원
협동연구책임자 : 고 상 인

요 약 문

Ⅰ. 제 목

발효화분 식품개발에 관한 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

부가가치가 높고 경쟁력있는 발효화분 식품을 개발하여 양봉농가의 감소를 저지하며, 충매화 과수농업을 간접적으로 지원한다.

화분의 외피는 exine으로 되어 있어 어떠한 강산, 알카리, 에테르, 알콜 등의 유기용매 및 소화효소에서도 분해되지 않으므로 매우 작은 입자 (10 50 ㎛)내의 영양분을 인체소화관에서 흡수하는 것은 매우 비효과적이다. 화분외피를 파쇄하여 화분내에 존재하는 아미노산, 단백질, 지질, 당질, 비타민류, 광물질, 효소 및 호르몬 등이 소화관내에서 흡수되어 영양과 건강의 기능을 발휘하도록 한다.

화분은 자연에 노출된 상태에서 자연계에 있는 각종 박테리아에 오염되어 있으므로, 이들을 사멸하기 위하여 열처리를 하는 것은 화분이 가지고 있는 비타민, 효소, 호르몬 등의 생물가를 저하시킨다. 그러므로 열처리하지 않고 자연 생화분이 지니고 있는 영양물을 그대로 인체가 이용할 수 있도록 발효와 숙성의 공정을 통하여 마치 벌이 만든 Bee-bread와 같은 제품을 생산하여 식품의 기능성 (항 전립선염, 항 알레르기)을 지니도록 한다.

화분의 발효에 응용되는 스타터 칼처 (유산균)는 *Lactobacillus acidophilus*로서 장내 부패균의 억제와 혈중 콜레스테롤 저하 및 장내 세균총의 평형을 유지토록 한다. 특히 발효화분에 응용할 수 있는 벌크 스타터를 독자적으로 개발하여 완제품에 스타터의 이질성 배지성분이 첨가되지 않도록 한다. 또한 응용한 유산균이 생산한 항균물질을 분리하여 화분식품의 미생물학적 안전성을 확인토록 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

가. 화분외피의 파쇄

화분의 껍질은 exine이라고 하는 외층으로서 sporopollenin으로 구성되어 있다. 이것은 어떤 강산, 알카리, 각종 효소, 그리고 동물의 소화효소에 의하여 분해되지 않으므로, 벌의 창자에 비하여 대형이고 내용물의 속도가 빠른 사람의 창자내에서 소화흡수되는 것은 거의 불가능하며, 다만 화분의 발아구막 (germination pore membrane)이 삼투압에 의하여 파괴되어 유출될 가능성은 있으나 영양물의 소화흡수에는 충분치 못하다.

Pollen germination tubes 이용 : 화분 발아배지에 화분을 넣고 배양할 때 발아관이 돌출하였으며, 이것은 pepsin, lysozyme 등의 효소처리와 sonication, homogenization 등의 물리적 처리에서도 효과가 없었다.

French pressor 이용 : 화분을 증류수에 혼합하여 French pressor 기구에 넣어 압력을 16,000 psi로 하였을 때 대부분의 화분은 파괴되었다. 그러나 시료가 매우 적은 관계로 산업상 응용에는 부적당한 것이었다.

Mortar grinder 이용 : Mortar grinder에 화분을 넣고 30 40분간 회전을 시킨 결과 화분의 파쇄율은 매우 저조하여 산업상 응용할 수 없었다.

Bantam mill : 화장품 분말 제조용인 Bantam mill에 화분을 소량씩 계속 투여하여 파쇄하였으나 그 결과는 저효율적이었다.

Glass bead mill : 유리구슬 (3 5 mm)을 이용하여 증류수에 화분을 넣고 회전시킨 결과 양호한 결과를 얻었다. 그러나 화분파쇄가 수중에서 이루어지는 결점이 있었다.

Homogenizer : 화분을 현탁시키고 최고의 속도로 회전시켰으나 파쇄는 전혀 나타나지 않았다.

Sonicator : 화분을 증류수에 넣고 sonicator로서 파쇄공정을 시도하였으나 전혀 영향을 받지 않았다.

Vibration mill : Vibration mill에 직경 25 mm의 aluminium ball과 화분을 넣어 2시간 이상 진동시킨 결과 만족한 파쇄결과를 얻었으며, 이는 건조화분을 파쇄하므로 물을 첨가하여 발효화분을 제조하는데 최적의 방법이다.

나. 발효화분 식품제조 및 동물실험

Bee-bread 제조 : 유리튜브에 화분을 넣고 그 위에 칼처를 접종시키고 맨 위에 벌꿀을 채워 꿀 두께가 0.5 1.0 cm되도록 하고 그 위에 vaspar를 충진시켜 37℃에서 발효시킨다. Bee-bread는 발효가 lactic acid bacteria에 의하여 진행되지 않으며 gas가 발생하여 vaspar 뚜껑이 터지는 결과를 나타내었으며, 안전성이 떨어졌다.

발효화분제조 : 30% 파쇄화분용액을 비열처리한 것과 열처리한 것에 3%의 *Lactobacillus acidophilus* 칼처를 넣어 발효시키고 병원균에 대한 안전성검사를 한 결과 15시간내에 모두 사멸하였다.

비열처리 발효화분은 열처리한 것에 비하여 더욱 강한 풍미를 보였다.

숙성화분제조 : 파쇄화분에 *Lactobacillus acidophilus* 칼처를 혼합 (50:50, w/v) 한 후 5℃의 냉장실에 저장하면서 병원균의 사멸을 조사한 결과 숙성 15일에 모든 병원균이 사멸하였으나 칼처를 혼합하지 않은 것은 20일이 경과하여도 여전히 나타났다. 칼처를 이용하여 화분을 숙성시킨 숙성화분식품은 산업화할 수 있는 가장 유리한 것이다. 이것은 Bee-bread와 같은 조직을 보였다.

스타터 칼처 제조 : 유산균들이 MRS, Elliker 및 milk배지에서 잘 자라지만 이들 배지의 성분을 화분식품의 제조에 혼합할 수 없으므로 화분을 주성분으로하여 필요한 산을 완충시키는 성분을 첨가하여 화분칼처를 제조하였다. *Lactobacillus acidophilus* 칼처 3%를 파쇄화분이 15% 혼합되고 0.2% dipotassium phosphate가 첨가된 배지에 접종하여 37℃에서 14 16시간 배양하여 사용한다. 화분배지의 pH는 3.5 3.7이며, 24시간때는 pH 3.3 3.5를 보였다. 이렇게 제조된 화분칼처는 파쇄화분 숙성에 응용되어 병원균을 사멸하는데 이용된다.

동물실험 : 파쇄화분과 비파쇄화분을 쥐에 섭취케하여 쥐의 변에서 화분의 단백질 소화율

을 측정한 결과 파쇄화분의 단백질 소화율이 높았다.

파쇄화분과 비파쇄화분의 사료효율을 쥐에서 조사한 결과 파쇄화분이 높았다.

사람의 빈혈 치유효과를 보기 위하여 경북대학교에 재학중인 학생중 혈액성분이 빈혈성을 나타내는 10명을 대상으로 파쇄화분을 복용시킨 후 혈액검사를 한 결과 개인에 따라 큰 효과를 보였다.

다. 화분칼처의 항균물질 분리

화분식품을 열처리하지 않고 안전성을 보장하기 위하여 발효 및 숙성의 방법을 시행하였다. 병원균을 사멸시키는 원인은 유산균에 의하여 생산된 유산과 항균물질에 기인한다. 발효화분에 함유된 항균물질을 분리하기 위하여 ammonium sulfate 처리, ethyl-acetate 추출, Sephadex gel 투과, Thin-layer chromatography에 의하여 항균성을 나타내는 항균물질을 분리하였다.

라. 발효화분식품의 미생물적 안전성

발효화분식품의 안전성 : 30% 파쇄화분용액을 유산균으로 발효시켰을 때 15시간내에 모든 병원균이 사멸하였다. 그러므로 발효가 안전성을 나타내었다.

숙성화분식품의 안전성 : 파쇄화분과 유산균 화분칼처를 50:50 (w/v)으로 하여 잘 혼합한 후 5℃의 냉장실에서 숙성시킬 때 모든 병원균이 15일만에 사멸하여 안전성을 보였지만 화분칼처 대신 증류수를 이용할 때는 20일에도 병원균이 생존하였다.

마. 화분의 농약안전성

56종의 농약성분을 분석한 결과 연구에 사용된 화분에서 검출되는 농약성분은 없었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구의 목적은 소화되지 않는 화분의 외피 파쇄와 그것을 원료로하여 비열처리 공정으로 인한 비타민, 효소 및 호르몬 등의 물질을 천연 그대로 인체가 흡수하도록하여 영양 및 기능성을 최대한 활용케 하는데 있었다. 식품을 비열처리하면 식품내의 병원균이 생존하고 있으므로 이들을 사멸하기 위하여 발효 및 숙성공정을 실행하여 식품의 안전성을 연구하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 결 과

가. 화분파쇄를 위하여 진동밀 (Vibration mill)을 제작하여 미세한 화분입자를 파쇄하였다.

나. 발효화분식품 제조는 30% 파쇄화분용액을 비열처리하고 3%의 *Lactobacillus acidophilus* CH-2 칼처를 접종하여 14 16시간 발효시킨 후 병원균에 대한 안전성을 확인하였다.

다. 숙성화분식품을 제조하기 위하여 파쇄화분과 *Lactobacillus acidophilus* CH-2 화분칼처를 50:50 (w/v)의 비율로 잘 혼합한 후 5℃에서 10일이상 숙성시켜 병원균에 대한 안전성을 확인하였다.

라. 발효화분식품의 제조에 이용되는 화분 스타터 칼처의 제조는 15% 파쇄화분용액에 0.2% dipotassium phosphate를 첨가하여 121℃에서 멸균처리하고 37℃로 냉각시킨 후 3% *Lactobacillus acidophilus* CH-2 칼처를 접종하여 14 16시간 배앙하여 만들었다.

마. 쥐에 파쇄화분을 섭취케 한 결과 소화율 및 사료효율이 모두 양호하게 나타났으며, 사람의 빈혈혈액 정상화에도 개인에 따라 특이한 효과를 보였다.

바. 화분 칼처로부터 유산균이 생산한 항균물질을 분리하여 항균성을 조사한 결과 우유배지보다 더 좋은 결과를 얻었다.

사. 화분에 농약성분이 오염되었는지를 검사한 결과 전혀 나타나지 않았다.

2. 건 의

화분식품의 애로사항인 외피 파쇄 및 천연화분의 미생물적 안전성을 모두 해결하였으므로 다음과 같이 건의합니다.

가. 양봉단위조합으로 하여금 발효화분식품을 생산 및 판매할 수 있도록 재정적 지원을 한다.

나. 충매화 과수농업이 활발한 지역에 벌-화분 채취 양봉가를 장려하여 원료화분의 공급을 원만케 한다.

다. 화분식품이 체육식품이 될 수 있도록 연구사업을 계속 지원한다.

SUMMARY

This study was carried out on the manufacturing of the fermented pollen food without a heat treatment. It increased the safety from the food-borne pathogens.

The main results of the study are as follows:

1. A vibration mill was selected for cracking the bee pollen loads.
2. To produce the fermented pollen food, a non-heat treated 30% cracked pollen solution was inoculated with 3% of *Lactobacillus acidophilus* CH-2 culture and incubated for 14 16 hrs to destroy the pathogens.
3. To produce the ripened pollen food, the cracked pollen and *Lactobacillus acidophilus* CH-2 culture were mixed (50:50, w/v) well, ripened at 5℃ for 10 days and confirmed the safety from pathogens.
4. The starter culture was prepared from the the fermented pollen food. The 15% cracked pollen solution with 0.2% dipotassium phosphate was heated at 120℃ and cooled to 37℃. The sterilized pollen solution was inoculated with 3% *Lactobacillus acidophilus* CH-2 culture and incubated at 37℃ for 14 16 hrs.
5. The digestibility of the cracked pollen load in the intestinal tract of mice showed more effective digestibility than control groups. Although it showed variation among individual, the cracked pollen helped recovery from anaemia in human.
6. The antibacterial agent isolated from the fermented pollen showed remarkable antibacterial activity than from the fermented milk alone.
7. The bee pollen loads were analyzed for the contamination of agricultural insecticides. The analyses did not show any component of insecticide.

CONTENTS

1. The cracking methods for bee pollen loads with the vibration mill ····· 16

2. Nutritional composition of the cracked pollen loads ····· 19

3. The impurity of the imported pollen loads from China ····· 29

4. The starter culture preparation with the cracked pollen ····· 32

5. Manufacturing the fermented pollen food and its safety from contaminated pathogens ····· 33

6. Manufacturing the ripened pollen food and its safety from contaminated pathogens ····· 41

7. Lactic acid bacterial cultures and their antibacterial agents ····· 48

8. Digestibility of the bee pollen loads in the intestinal tract of mice ····· 57

9. The efficiency of the bee pollen loads as food in the intestinal tract of mice ····· 59

10. The therapeutic effects of the cracked bee pollen on anaemia ····· 60

11. The safety of pollen load from the agricultural insecticides ····· 62

12. References ····· 64

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

부가가치가 높고 경쟁력있는 발효화분식품을 개발하여 양봉농가의 감소를 저지하며, 충매화 과수농업을 간접적으로 지원한다.

화분은 꿀벌 유충이 성장하는데 필수로 하는 단백질을 비롯한 필수영양소의 급원이 되고 있을 뿐만 아니라 (Haydak, 1970), 성충벌의 정상적인 활동을 위해 없어서는 안될 단백질의 유일한 원천인 점을 고려해 보면 화분의 영양학적 가치는 높다고 할 수 있으며 현재에 식품으로도 이용되고 있다 (박 등, 1994).

꿀벌이 넥타 (花蜜)를 수집하는 과정에서 화밀과 타액 등을 이용하여 고추씨 모양의 자그마한 덩어리인 화분경단 (花粉瓊團, pollen load)을 만들어 뒷다리에 달고 와서 벌의 부화 및 성장에 이용하는데, 이 화분경단은 약 25만 650만개 정도의 화분세포로 구성되어 있으며 대개 화분세포의 크기는 12 100 ㎛이고 (이 등, 1992), 밀원의 종류에 따라 색과 맛이 다를 뿐만 아니라 (최, 1982; 김, 1986), 화분경단에 포함되어 있는 각각의 화분세포는 크기, 모양, 표면무늬, 구성, 발아구의 형태, 벽의 층상구조 등이 아주 다양하여 속 또는 종까지의 동정도 가능하다.

또한 화분의 영양성분에 관하여 일반성분 (Vivino와 Palmer, 1944; Youssef 등, 1978; 김, 1986; 김, 1987; 장 등, 1991; 이, 1989), 유리당 (Youssef 등, 1978; 김, 1986; 김, 1987; 석과 김, 1982; 이, 1989), 무기물 (Vivino와 Palmer, 1944; Youssef 등, 1978; 김, 1987; 석과 김,

1982; 이, 1989), 지방산 (Youssef 등, 1978; 김, 1987; 이, 1989; 정 등, 1984), 아미노산 (김, 1986; 김, 1987; 윤 등, 1985; 이, 1989), 비타민 (Vivino와 Palmer, 1944; 성, 1994) 등이 다양하게 연구되어 왔으며, 이들 조성은 밀원 식물의 종류, 생육환경, 혼합정도와 양봉양식, 채취시기 및 지역에 따라 화분경단의 성분조성이 달라진다고 한다 (Vivino와 Palmer, 1944; 최, 1982).

화분을 영양식품으로써 대량으로 먹기 시작한 것은 프랑스인들이며 유럽에서는 "완전 식품"이라고 하여 인류의 역사중 경이로운 식품이라고 하고 (김, 1986), 일부 동구권 국가에서는 운동선수들에게 항피로, 항스트레스 식품으로 복용시키는 것으로 알려져 있는데, 이는 화분의 투여로 화분이 조혈작용을 도와서 적혈구수와 hemoglobin수준을 증가시켜 항피로, 항스트레스 작용과 밀접한 관계가 있다고 보고하였다 (손, 1982). 그리고 우리나라에서도 옛조상때부터 송화화분를 이용하여 다식을 만들어 고귀한 식품으로 사용하여 왔고, 동의보감의 기록에 의하면 약용으로도 사용되었다고 한다 (류, 1988). 또한 동물실험에서는 화분경단을 쥐에게 투여한 결과 적혈구의 수와 용적, 혈색소 농도 (손, 1982), 그리고 장간막 비만세포의 수 (손, 1982) 및 간장 알콜탈수소효소 (간장 ADH)의 활성을 증가시켰으며 (윤 등, 1985), mouse의 체중이 증가하고 간장의 지질대사가 활발하였음이 보고되어지고 있다 (정 등, 1984).

그러나 화분경단의 표피는 exine이라고 하는 외층과 intine인 내층으로 구성되어 있는데, 특히 외피인 exine은 sporopollenin으로 되어 있어 어떠한 강산, 알카리, 알콜 및 소화효소에 의해서도 분해되지 않고 대부분의 동물, 곤충, 그리고 꿀벌 등이 분해하지 못한다 (Stanley와 Wilson, 1974; 김 등, 1988; 김 등, 1984; 이, 1989). 또 화분의 알레르기원으로 작용하는 표피는 튼튼하고 두꺼운 층으로 되어 있어서 인체의 소화관내에서 잘 분해되지 않으므로 화분내의 영양소가 밖으로 나오지 못하게 된다.

한편 유산균 발효식품의 보존성은 유산균이 유산, 초산 등의 유기산을 생산하여 식품의 산성화를 기하므로서 중성 pH에서 잘 자라는 부패균 및 병원성균의 성장을 억제하는 효과뿐 만 아니라 과산화수소와 특수한 항균물질을 생산함이 알려졌다 (de Klerk과 Coetzze, 1961; Gilliland 등, 1984; Wheater 등, 1951).

*Lactobacillus acidophilus*는 사람 또는 동물의 장내에서 분리되는 균으로 장내의 병원성 균인 *Salmonella* sp. (Adler와 Massa, 1980; Khedkar 등, 1990), *Shigella* sp., *Staphylococci* sp. (Dahiya와 Speck, 1968; Balasubramanyam과 Varadaraj, 1995), *Coliform* sp. (Watkins 등, 1982) 등과 다른 오염균 (Collins와 Hardt, 1980)의 성장을 억제시키거나 사멸시키고 정장작용을 하는 유익한 균으로서 세균성 위장병을 예방·치료할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Gilliland와 Speck, 1977; Adams와 Hall, 1988; Cruywagen 등, 1996; 신 등, 1996).

특히 *Lactobacillus acidophilus*균은 위산, 담즙산 등에 저항성이 있어서 (Sandine 등, 1979; Klaenhammer와 Kleeman, 1981; Gilliland 등, 1984; Overdahl와 Edmund, 1991) 다른 유산균에 비하여 장내에서 정착하여 산성환경을 만들어 부패균을 억제시키고, 창자의 연동운동을 촉진시킨다. 또한 이 균이 생산한 acidophilin (Shahani 등, 1972; Shahani 등, 1977), acidolin (Hamdan과 Mikolajcik, 1974), lactacin B (Barefoot와 Klaenhammer 1983), lactacin F (Muriana와 Klaenhammer, 1991)등과 같은 항균물질 (Mikolajcik과 Hamdan, 1975; 김, 1984)이 분리, 정제되었고, 부패균 및 병원성균을 억제하여 장내의 정상 미생물균총을 이루며, 또한 혈청 cholesterol수준을 감소시키는 것으로 알려져 있다 (Buck와 Gilliland, 1994; Brashears와 Gilliland, 1995; Grunewald, 1982; Gilliland와 Walker, 1990; 박 등, 1996).

꿀벌이 수집한 자연화분에는 각종 세균들이 오염될 수 있으며, 특히 식품성질환 (food-borne diseases)을 유발하는 *Staphylococci* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., 그리고 *Coliform* sp. 등이 동물, 사람, 각종 기구 등에 의하여 오염되어 질병을 일으킬 수 있다. 화분에 오염되어 있어 식품성 질환을 일으키는 모든 병원균을 72℃에서 15초 동안 열처리함으로써 완전히 사멸시켜 미생물학적으로 안전한 식품을 제조할 수 있지만 동시에 화분이 내포하고 있는 vitamines, hormones, 그리고 enzymes등이 파괴되므로 천연화분에 비하여 영양 및 건강 기능적 가치가 저하된다.

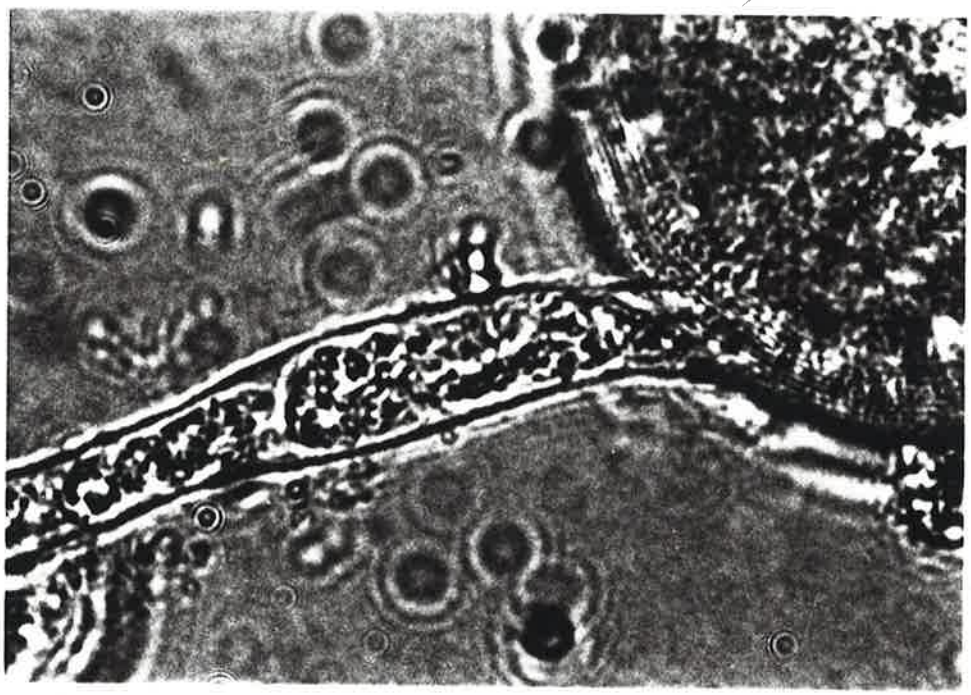
본 연구는 화분파쇄, 파쇄화분의 영양, 발효화분식품 제조 및 병원균에 대한 안전성, 숙성화분식품 제조 및 병원균에 대한 안전성, 동물실험에 의한 건강기능, 화분의 농약성분 안전성 분석, 그리고 화분칼처의 항균성 물질의 분리 등을 수행하였다.

제 2 장 화 분 파 쇄

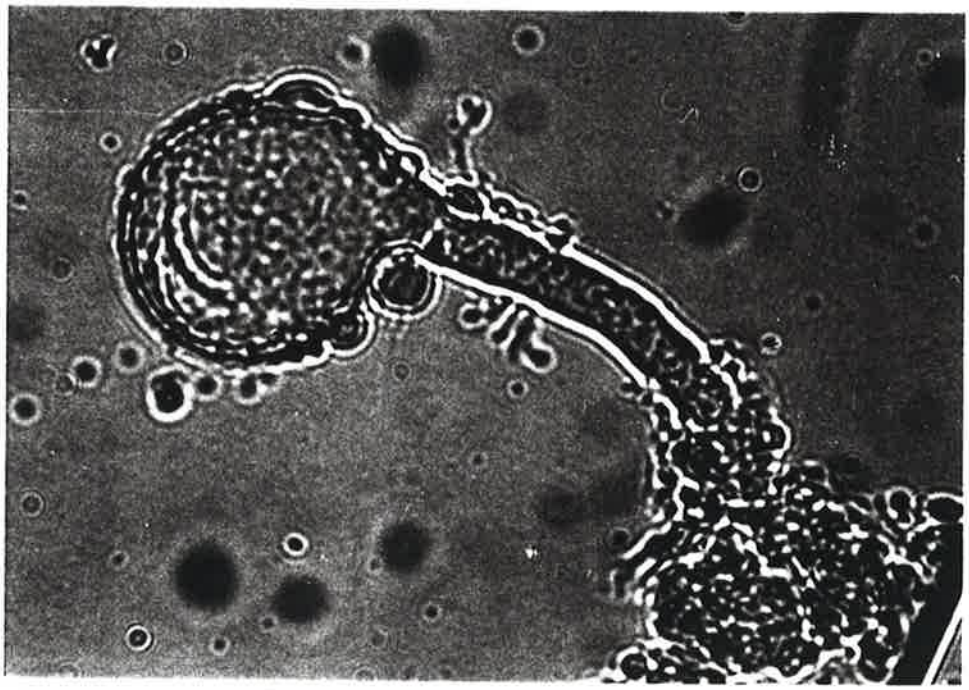
제 1 절 서 설

화분의 표피는 sporopollenin으로 되어 있어 어떠한 효소, 산, 알카리에도 분해되지 않고 대부분의 동물 그리고 곤충도 분해하지 못한다 (Brooks와 Shaw, 1971). 본 연구의 동물실험에서 화분의 단백질을 쥐가 미약하게 흡수하는 결과를 보였으며, 또한 Wang (1989)이 동물의 창자에서 화분의 발아구가 삼투압에 의하여 파열되고 소화효소가 접촉하여 단백질을 소화케 한다는 것을 보고한 바 있다.

본 연구는 화분세포내에 있는 영양보고를 이용하기 위하여는 발아구에서 발아되는 생식튜브 (germination tube)를 파괴하여 발아에 이용하는 영양분을 노출시킬 목적으로 화분의 생식튜브 발생 및 그것의 파괴를 시도하였다. 그러나 그 결과는 만족하지 아니하여 화분자체를 직접 파쇄시켜서 세포내의 영양분을 노출시키는 것이 가장 적절하다는 결론을 얻었다. 화분을 파쇄시키는 방법으로 French pressor, Bantam mill, Glass bead mill, Homogenizer, Sonicator, 그리고 Vibration mill 등을 이용하여 파쇄의 효율성 및 산업에의 이용 등을 평가하였다. 본 연구에서 가장 적절한 화분파쇄 방법은 Vibration mill (진동밀)을 이용하는 것이었다.

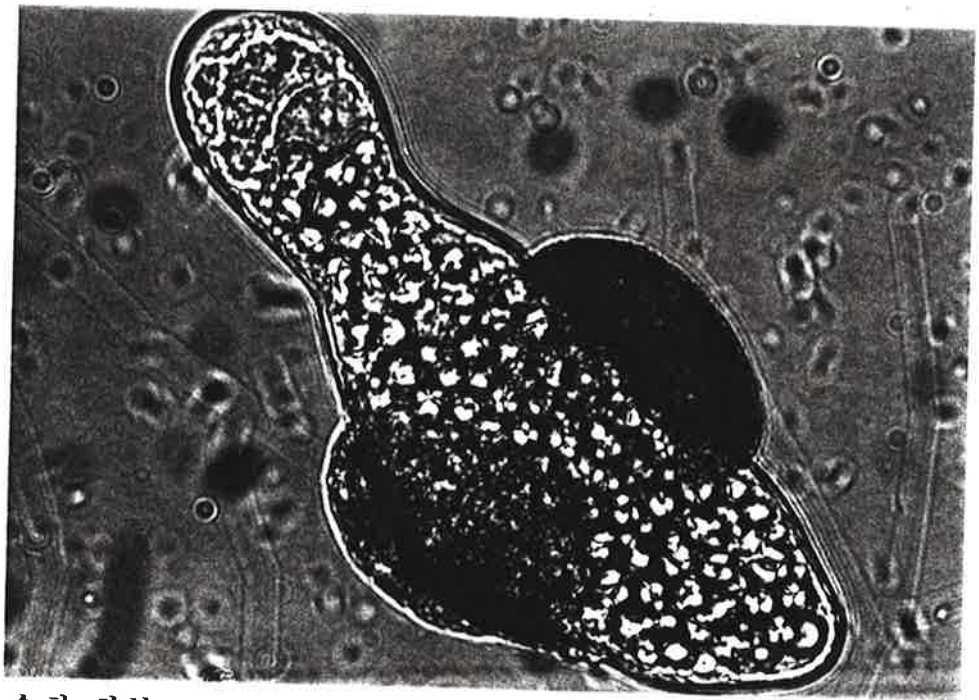


모과화분

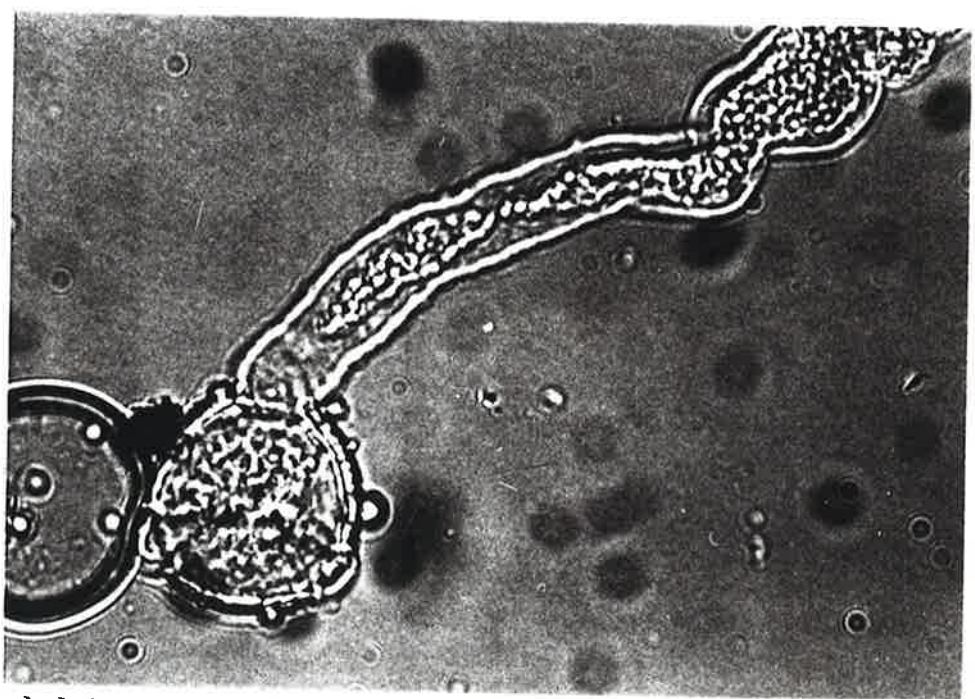


자두화분

Fig. 1. 각종 hand-collected pollen의 germination tubes.



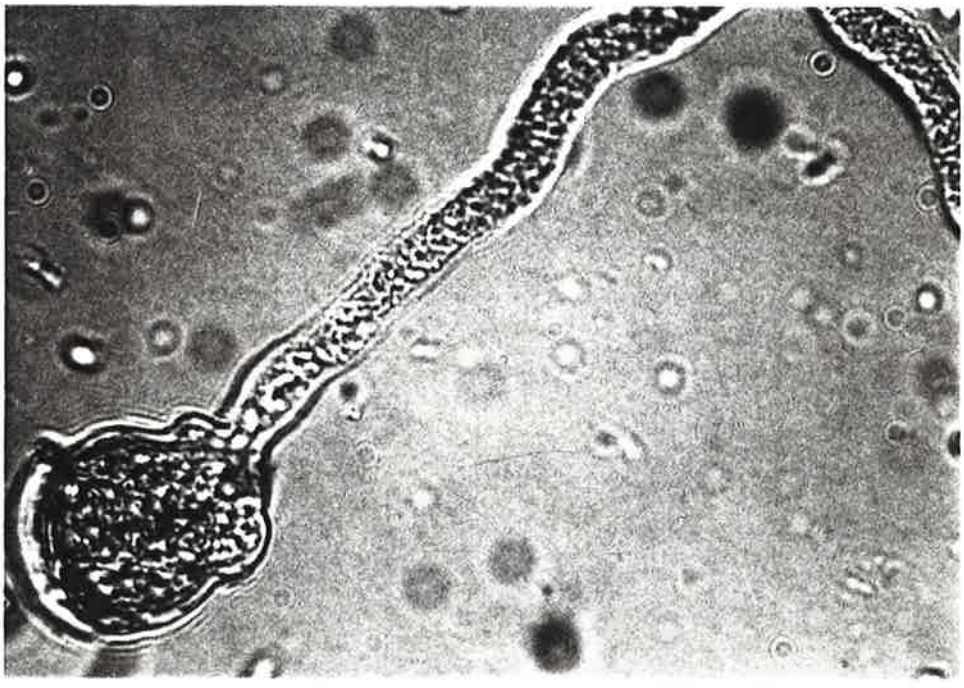
송화 화분



만리향 화분

Fig. 2. 각종 hand-collected pollen의 germination tubes.

배 화분



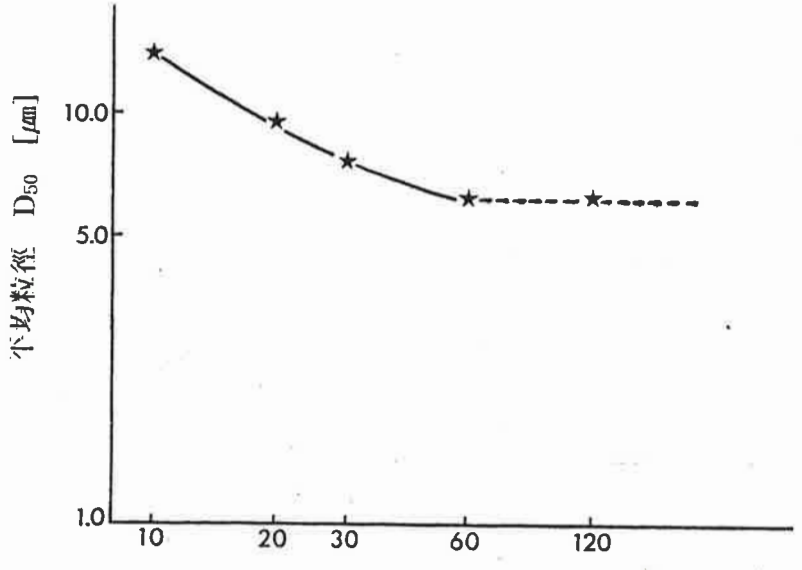
복숭아 화분

Fig. 3. 각종 hand-collected pollen의 germination tubes.

제 2 절 Vibration mill에 의한 화분파쇄

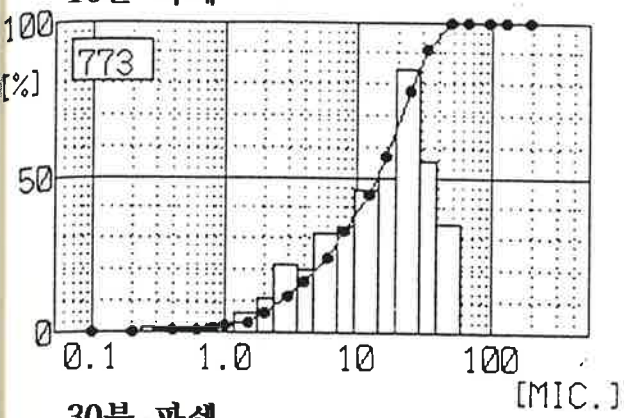
Vibration mill (중앙공업사, 일본)은 ceramic jar와 aluminium ball (직경 10. 15, 25 mm)로 구성되어 있다. 화분을 dry oven에서 수분함량을 3%이하로 건조시켜 파쇄용으로 사용하였다.

Ceramic jar에 aluminium ball과 화분을 넣고 (ball 무게 6 kg, 화분무게 400 g) 1,200/cpm에서 진동시키면서 화분의 파쇄율을 시간별로 측정하였다. Aluminium ball의 직경이 10 mm, 15 mm의 것을 사용할 때 작동 30분만에 화분이 덩어리가 되어 더 이상 파쇄기능이 나타나지 않았으며 이 때 화분의 파쇄율은 80%정도 되었다. 그러나 25 mm의 aluminium ball을 이용할 때는 작동 30분후에도 화분이 덩어리로 나타나지는 않았지만 파쇄율이 저조하여서 다시 계속해서 120분간 작동시켜서 화분의 파쇄율이 90%정도되어 가장 만족스러운 성적을 얻었다.

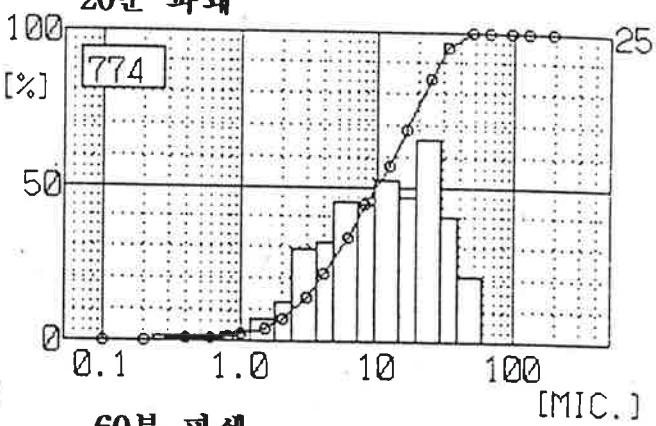


진동수 (CPM) : 1,200, ball 직경 : 25 mm, 분쇄매체 : 6 kg (80%)

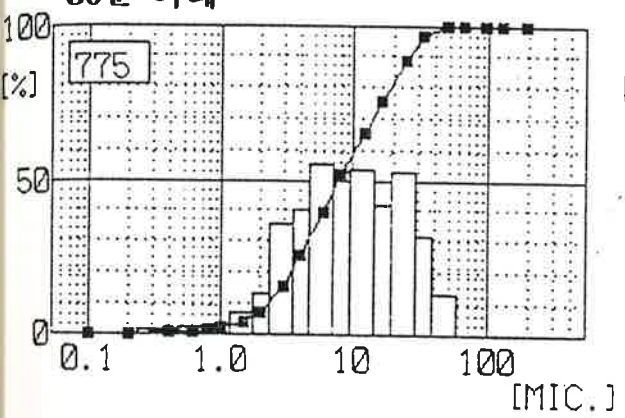
10분 파쇄



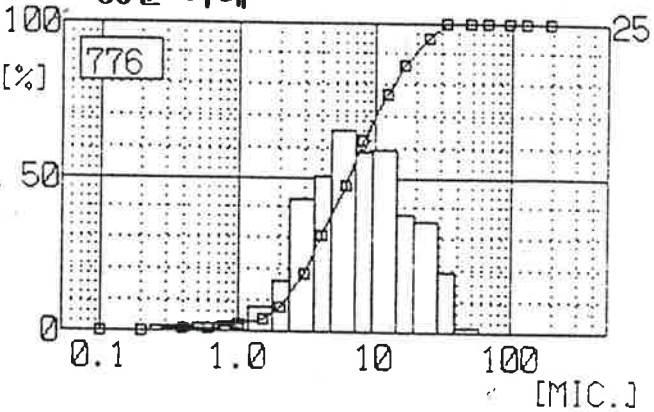
20분 파쇄



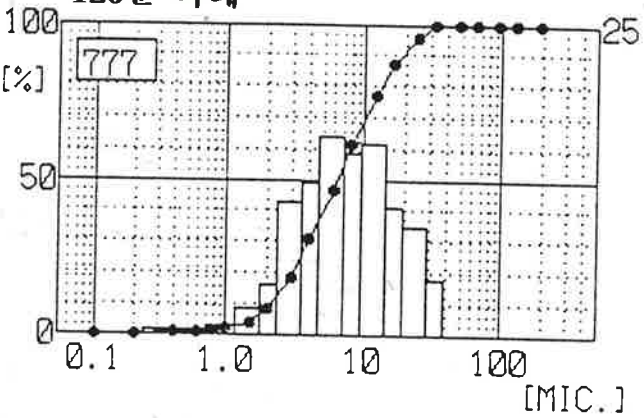
30분 파쇄



60분 파쇄



120분 파쇄



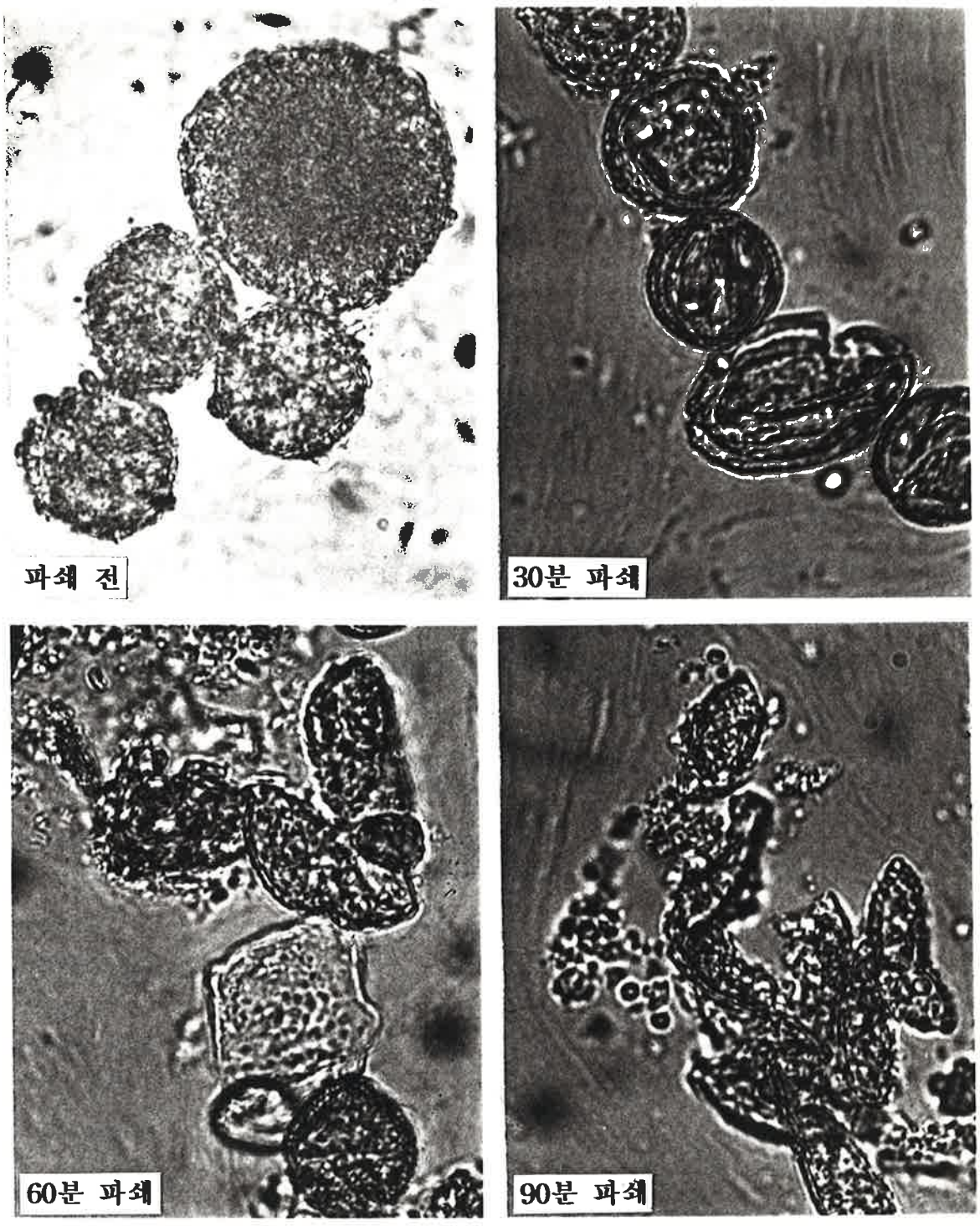


Fig. 4. 파쇄시간에 따른 화분의 형태 (×1,000).

제 3 절 파쇄화분의 영양성분

분석에 이용된 화분은 초봄에 꿀벌이 수집한 도토리화분으로서 dry oven에서 수분 3% 이하로 건조시키고 vibration mill에 넣어 25 mm의 aluminium ball을 사용하여 파쇄시킨 것을 사용하였다.

1. 탄수화물

화분경단을 파쇄하여 그 분말에 대한 탄수화물조성에 대한 분석은 Pirisino (1983)의 방법을 응용하여 실시하였다. 시료 5 g를 정밀하게 취한 후 HPLC용 acetonitrile (Merck Co., Germany) 10 ㎖을 첨가하여 잘 혼합한 다음 4℃, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 화분세포 파편과 단백질 성분을 침전시키고 상층액을 취하였다. 이를 membrane filter (0.2 ㎛, PTFE, Millipore Co., USA)로 여과하여 HPLC (Waters Associates)로 분석하였다.

이때 사용된 HPLC의 장치 및 분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. The operating conditions of HPLC for carbohydrate analysis

Items	Operating conditions
Column	Aminex HPX-87H (300×7.8 ㎜ i.d., cation exchange)
Column Temp.	65℃
Detector	R I
Mobile phase	0.009*N* H_2SO_4
Flow rate	0.6 ㎖/min
Chart speed	0.5 ㎝/min

HPLC에서 분리된 각 당의 peak는 당류 표준품 (Merck Co., Germany)의 retention time과 비교·동정하여 유리당 함량을 계산하였다.

파쇄화분에 대한 탄수화물조성에 대한 분석 결과는 Table 2와 같다. 본 실험에서 나타난 파쇄화분의 탄수화물은 glucose, fructose, arabinose, 그리고 trehalose가 함유되어 있었으며, 파쇄화분에서 glucose는 3.55%, fructose는 3.66%, arabinose는 0.16%, 그리고 trehalose는 0.32%가 함유되어 있었고, 이중 fructose의 함량이 가장 많았으며, 환원당과 비환원당의 함량은 7.37%와 0.32%로 나타났다. 혼합 화분경단에서 김 (1986)은 fructose가 17.74%, glucose가 14.08%이었고, 이 (1989)는 fructose 13.05%, glucose 10.63%이고 환원당이 25.47%, 비환원당이 19.58%였다. 석 등 (1982)은 환원당 24.6 29.8%, 비환원당 1.3 4.5%이었다는 보고에 비해 환원당 함량과 전체 총당의 함량이 낮았다. 이와같이 당함량의 차이가 심한 것은 식물의 종류에 따라서 sucrose나 다당류의 함량이 많은 밀원이 있는 반면에 fructose나 glucose 등의 단당류가 많은 밀원도 있으며, 식물에서 직접채취한 화분은 꿀벌이 모아온 화분경단보다 비환원당의 비율이 높은데, 이는 꿀벌이 화분을 수집중 벌 체내에 저장되어 있는 꿀과 타액으로 화분을 모으면서, 그 속에 포함되어 있는 전화효소가 화분경단에 혼입되어 저장 및 건조과정 중 이 효소의 분해 작용으로 인해 환원당이 증가한다 (최, 1982). 위의 사실들로 미루어 보아 본 실험에서 사용된 화분경단은 저장중의 숙성과 밀원식물의 차이로 인해 환원당 함량은 높은 것으로 생각되나 전체 총당의 함량은 낮은 것으로 생각된다.

Table 2. Carbohydrate composition of cracked pollen

Pollen / Carbohydrate	Cracked pollen
	····· % ·····
Glucose	3.55
Fructose	3.66
Arabinose	0.16
Trehalose	0.32

2. 유리아미노산

파쇄화분에 대한 유리 아미노산 조성의 측정은 Bullock과 Irvine (1956) 및 O'Keefe (1976)의 방법에 따라 실시하였다. 삼각 flask에 시료 10 g을 정확하게 취한 후 25% TCA (Trichloroacetic acid, Yakuri chemicals Co., Japan)용액 20 ㎖을 첨가하여 잘 혼합한 다음 4℃, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액 20 ㎖을 취하였다. 이에 동량의 ethyl ether (Merck Co., Germany)를 처리한 후 rotary evaporator (Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 농축시킨 농축액을 0.2*M* sodium citrate (pH 2.2)로 20 ㎖되게 조절하였다. 이것을 membrane filter (0.2 ㎛, PTFE, Millipore)로 여과하여 분석용 시료로 하였으며, 분석조건은 Table 3과 같다.

Table 3. The operating conditions of Auto Amino Acid Analyzer for amino acid analysis

Instrument : Biochrom 20 (Pharmacia, England)
Standard : Physical Fluid Calculation Standard
Coulmn : High Resolution Coulmn (250×4.6 ㎜ + Resin Pot, Bio 20 peek Lithium)
Detector : Photometer
Volume Loaded : 40 ㎕
Amount Loaded : 10 ㎚
O. D. Range/Gain : 440 ㎚ … 1.0, 570 ㎚ … 1.0
Flow Rate : 40 ㎖/hr
Pressure : 88 bar
Reaction Coil Temperature = 135℃

Buffer	Molarity	pH	Batch No.
Buffer 1 - Lithium buffer A	0.20	2.80	05682
Buffer 2 - Lithium buffer B	0.30	3.00	05575
Buffer 3 - Lithium buffer CII	0.50	3.15	05667
Buffer 4 - Lithium buffer DII	0.90	3.50	05603
Buffer 5 - Lithium buffer pH 3.55	1.65	3.55	05679
Buffer 6 - Lithium hydroxide	0.30	-	05591

파쇄화분의 tryptophan을 제외한 아미노산의 함량은 Table 4와 같다. 화분의 아미노산 함량은 화분 100 g당 아미노산을 ㎎으로 나타내고 있다.

Table 4에서 보는 바와 같이 proline이 파쇄화분에서 520.62 ㎎으로 그 함량이 가장 많았고, aspartic acid는 439.50 ㎎으로 다음으로 많았다. 그리고 arginine도 파쇄화분에서 204.99 ㎎으로 비교적 많이 함유되어 있었고, glycine은 파쇄화분에서 3.90 ㎎, ornithine은 2.49 ㎎으로 함량이 가장 적게 나타났다.

총 22종의 아미노산을 확인하였고, 필수아미노산도 특히 많은 양을 함유하고 있음을 알 수 있었으며, 김 (1986)이 보고한 자료와 비교해 볼 때 전체적으로 아미노산 함유량이 더 많

았으며, 더 많은 종류의 아미노산이 함유되어 있었다. 필수아미노산은 동물성 식품이나 식물성 식품과 비교하여 볼 때 valine의 경우 쇠고기 0.8 ㎎, 계란 0.92 ㎎, 쌀 0.88 ㎎ (Takashi, 1984)이었으나 화분은 55.76 ㎎으로 많은 양을 보이고 있어 화분의 영양적 가치는 꿀벌과 유충의 주식원으로서 뿐만 아니라 식용으로 활용 가능하고 건강식품으로서의 가치가 있다고 사료된다.

Table 4. Free amino acid of cracked pollen

Free amino acid	Cracked Pollen(㎎/100g)
Aspartic acid	439.50
Threonine	13.99
Serine	42.53
Glutamic acid	72.38
Glutamine	67.88
Proline	520.62
Glycine	3.90
Alanine	32.66
Citrulline	25.91
Valine	54.11
Cystine	13.60
Methionine	11.18
Isoleucine	10.80
Leucine	16.49
Tyrosine	12.56
β-Alanine	8.29
Phenylalanine	61.88
γ-Aminoisobutyric acid	34.07
Ornithine	2.49
Lysine	14.60
Histidine	38.32
Arginine	204.99
Total amino acid	1702.75
Total essential amino acid	183.05

3. 총지질과 지방산

화분의 총 지질 추출은 Folch 등 (1957)의 방법에 따라 5 ㎖의 chloroform과 methanol (2:1, v/v) 혼합용액 (C/M 용액)을 화분 1 g이 담긴 시험관에 넣고 1시간 정도 방치시킨 다음 polytron homogenizer (Kinematica ag., Switzerland)로 미세하게 파쇄하였고, 지질이 완전히 추출되도록 5 ㎖의 C/M (2:1, v/v) 혼합용액을 재첨가하여 다시 2시간 동안 방치시켰다. 증류수를 첨가하여 교반한 뒤 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 시험관을 정량한 후 pasteur pipette으로 혼합추출용액의 하층액을 뽑아 정량한 시험관에 분주하였다. 추출액이 담긴 chloroform 하층액은 질소가스 (N_2)로 chloroform을 휘발시킨 다음 각 화분의 총지질 함량을 측정하였으며, 측정후 즉시 3 ㎖의 C/M (2:1, v/v)혼합용액에 용해시킨 뒤 분석할 때까지 -30℃이하의 냉동고에 보관하였다.

냉동고에 보관중인 총지질이 함유된 C/M (2:1, v/v)혼합용액 3 ㎖중에서 200 ㎕을 새로운 시험관에 옮기고 질소가스로 혼합용액을 휘발시킨 다음 internal standard [pentadecanoic acid (C15:0), 1 ㎕/1 ㎍]용액 30 ㎕를 넣고 다시 질소가스로 휘발시켰다. 이에 6% methanolic sulfuric acid 5 ㎖를 넣고 90℃의 항온수조에서 90분 동안 methylation시켰다 (Yeo 등, 1989).

Methylation후 실온에서 충분히 냉각시킨 시험관에 4 ㎖의 petrolium ether를 넣어 5분정도 vortex한 후 다시 2 ㎖의 증류수를 넣고 약 3분정도 vortex를 한 다음 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 pet. ether를 질소가스로 휘발시키고 적당량의 hexane에 용해시킨 다음 지방산 조성을 분석하기 위해 gas liquid chromatography (GLC)에 injection한다.

이때 사용된 GLC의 장치 및 분석 조건은 Table 5와 같다.

Table 5. Conditions of GLC for fatty acid analysis

Instrument	: Shimadzu Model GC-17A
Integrator	: Shimadzu chromatopac Model C-R7A
Column	: DB-225 capillary column(30 m×0.25 ㎜) (J & W Scientific, USA)
Column initial temp.	: 100℃
Column final temp.	: 220℃
Detector temp.	: 250℃
Injection temp.	: 240℃
N2 flow rate	: 50 ㎖/min
Attenuation	: 2
Chart speed	: 7 ㎜/min
Range	: 102

파쇄화분의 총지질은 10.86%으로 Vivino 등 (1944)의 혼합화분 1.4 4.4%, Youssef 등 (1978)의 클로버화분 8.36%, 옥수수화분 9.31%, 김 (1986)의 혼합화분 2.07 3.45% Youssef 등 (1978)의 들겨자화분 10.25%보다는 높았다. 파쇄화분에서 얻은 지방의 지방산 조성은 Table 6과 같다. 총 지방중 linoleic acid (C18:2n-6)의 함량이 파쇄화분이 31.3 mol%로 가장 많았고, 그 다음이 linolenic acid (C18:3n-3)로 28.6 mol%, palmitic acid (C16:0)는 25.7 mol%, oleic acid (C18:1)는 6.2 mol%, 그리고 stearic acid (C18:0)는 5.2 mol%로서 이들 5 종의 지방산이 화분 지방산의 거의 대부분을 차지하고 있으며, 포화 지방산에 대한 불포화 지방산의 비율 (불포화 지방산/포화 지방산)은 포화 지방산이 32.5 mol%이고 불포화 지방산이 66.1 mol%로서 2.03이었다. 또한 본 실험과 김 (1987), 이 (1989)의 실험 결과에서는 linoleic acid (C18:2n-6)가 가장 많은 양을 함유하고 있으며, 이들 지방산의 종류 및 함량은 김 (1987)과 이 (1989) 등의 연구 결과에서 보듯이 많은 차이를 보이고 있는데, 이러한 차이는 생육환경, 채취시기 및 지역 등에서 오는 차이도 있겠지만 특히 화분의 종류에 따라 심한 차이를 보이는 것으로 생각된다.

Table 6. Fatty acid composition of cracked pollen

Fatty acids		Composition (mol%)
		Cracked Pollen
C14:0	Myristic acid	0.4
C16:0	Palmitic acid	25.7
C18:0	Stearic acid	5.2
C18:1	Oleic acid	6.2
C18:2n-6	Linoleic acid	31.3
C18:3n-3	Linolenic acid	28.6
C20:0	Arachidic acid	0.7
C22:0	Behenic acid	0.5
uniden.a		1.2
Saturated fatty acid		32.5
Unsaturated fatty acid		66.1
UFA/SFA		2.03

a Unidentified fatty acids

4. 무기물

건조시킨 화분 0.2517 g을 천칭하여 Teflon wear에 담고 3 ㎖ HNO3와 0.5 ㎖ H2O2를 첨가하여 microwave (Digestion/Drying Module, Milestone 1200)를 사용하여 가수분해하였다. 조건은 250 watts에서 2분, 2분간 냉각, 250 watts에서 6분, 400 watts에서 5분, 600 watts에서 5분간 처리한 다음 5분간 ventilation하였다. 처리한 시료를 beaker에 담고 산을 완전히 증발시킨 다음 1%의 nitric acid가 함유된 3차 증류수로 100 ㎖로 하였고, 이를 ICP-AES기 (Jobin Yvon, Model TY38 plus., France)로 무기물 분석에 이용하였다. 분석조건은 plasma gas (P1)를 12 ℓ/min, argon gas (G1)를 0.2 ℓ/min, Nebulizer (Mainhard nebulizer)는 0.25 ℓ/min으로 하여 분석하였다. 각 시료에 대한 분석조건은 Table 7과 같다.

Table 7. Analytical conditions of ICP Emission Spectrometer

Conditions	Cu	Fe	Ca	Mg	P	K	Na	Ti	Zn	Mn
Wave length(㎚)	223.008	258.588	393.366	279.806	214.914	766.490	588.995	336.121	213.856	259.373
Detection Limit(ppb)	13.0	15.0	0.2	15.0	76.0	60.0	29.0	53.0	1.8	1.6
Interfering elements	-	-	V	Cr,Fe,V	Al,Cu	Ti	Ti	Ca,Cr,V	Al,Cu,T	Fe
Standard Low(ppm)	0.02	1.00	1.00	1.00	1.00	20.0	0.20	0.10	0.04	0.04
Standard High(ppm)	1.00	4.00	10.0	20.0	40.0	50.0	2.00	0.995	2.00	0.40
Voltage(V)	993	733	651	673	853	623	740	703	763	722
Window size(㎚)	0.0295	0.0325	0.0288	0.0312	0.0298	0.0293	0.0230	0.0306	0.0298	0.0278

파쇄화분의 무기물 함량은 Table 8과 같다.

분석된 무기물의 종류는 파쇄화분에서 모두 10종이 검출되었고, 무기물의 함량은 K이 655.19 ㎎/100 g으로 가장 많았으며, P이 506.95 ㎎/100 g, Mg이 113.39 ㎎/100 g, Ca이 193.96 ㎎/100 g으로 비교적 많은 양이 함유되어 있었다.

화분의 Fe함량은 35.56 ㎎/100 g으로 일반적인 식물성 식품에 비해 높은 함량을 함유하고 있어 식품 100 g당 볶은보리 18.9 ㎎, 참깨 19.0 ㎎, 돼지간 16.4 ㎎보다 높은 수준이었으며 (농촌진흥청, 1986), 화분경단을 10 g/㎏/day로 4주간 투여한 동물실험에서 흰쥐 (Wister계)의 적혈구 용적이 12% 증가, 혈색소 농도 13% 증가, 적혈구 수는 56%가 증가 (손, 1982)하였음을 보고하였다. 또한 생체내에서 많은 작용을 하고 있으나 부족하기 쉬워 관심이 큰 무기물인 Zn, Cu 등이 7.50 ㎎/100 g과 1.17 ㎎/100 g으로 화분이 다른 식품에 비해 다소 높은 함량을 함유하고 있어 화분이 이들 성분의 좋은 급원으로 생각할 수 있다.

Table 8. Mineral composition of cracked pollen

Element	Cracked pollen (㎎/100g)
Cu	1.16
Fe	35.56
Ca	193.96
Mg	113.39
P	506.95
K	655.19
Na	34.14
Ti	2.32
Zn	7.50
Mn	12.15

제 4 절 수입화분의 불순물조사

발효 파쇄화분은 원료수집부터 파쇄전까지 원료에 대한 철저한 위생품질관리가 필요하므로 우선 중국산 수입화분의 불순도를 조사하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 국내화분과 중국화분의 수분함량

국내화분과 중국화분을 각각 100 ㎖의 beaker에 정확히 10 g씩 칭량하여 80℃의 dry oven에서 24시간, 48시간 건조시켰다. 이를 desiccator에 넣어 1시간 동안 방냉시킨 다음 상평직시천평 (Mettler Toledo Model AB104., Switzerland)에서 무게를 측정하여 그 차이를 수분의 함량으로 하였다.

Table 9. Moisture content of domestic and imported pollen load

구 분 / 생산국	Moisture content (%)			
	Drying after 24 hr	Drying after 48 hr	Drying after 24 hr	Drying after 48 hr
한 국	1.6627	1.7295	16.627	17.295
	1.6647	1.7265	16.647	17.265
	1.6759	1.7358	16.759	17.358
평 균	1.6678	1.7306	16.678	17.306
중 국	0.5729	0.6455	5.729	6.455
	0.5650	0.6348	5.650	6.348
	0.5543	0.6276	5.543	6.276
평 균	0.5644	0.6360	5.644	6.360

<국내화분의 수분함량>	<중국화분의 수분함량>
24시간 건조후 : 16.7%	24시간 건조후 : 5.6%
48시간 건조후 : 17.3%	48시간 건조후 : 6.3%

결과 : 국내화분의 수분함량은 중국화분의 수분함량보다 약 2.75배가 많이 함유되어 있다.

2. 국내화분과 중국화분의 불순물함량

국내화분과 중국화분을 각각 500 ㎖의 beaker에 정확히 100 g씩 칭량하여 증류수로 수회 세척하여 화분을 제거하고 남는 모래 (불순물)만을 여과 (Whatman filter paper #1)하여 모았다. 이를 dry oven에서 24 (48)시간 건조시킨 다음 상평직시천평에서 모래의 무게를 측정하였다.

<국내화분 100 g에 대한 모래량>	<중국화분 100 g에 대한 모래량>
모래의 무게 : 0.0045 g (4.5 ㎎)	모래의 무게 : 0.1654 g (165.4 ㎎)

결과 : 중국화분에 내재하는 모래의 양은 국내화분의 그것보다 약 37배가 많이 함유되어 있다.

제 3 장 스타터 칼처제조(Starter culture preparation)

제 1 절 서 설

화분식품에 이용된 유산균은 *Lactobacillus acidophilus* 균이다.

유산균 발효식품의 보존성은 유산균이 유산, 초산 등의 유기산과 과산화수소를 생산하여 식품의 산성화를 기하므로서 중성 pH에서 잘 자라는 부패균 및 병원성균의 성장을 억제하는 효과뿐 만 아니라 특수한 항균물질을 생산함이 알려졌다 (de Klerk과 Coetzze, 1961; Gilliland 등, 1984; Wheater 등, 1951).

*Lactobacillus acidophilus*는 사람 또는 동물의 장내에서 분리되는 균으로 장내의 병원성균인 *Salmonella* sp. (Adler와 Massa, 1980; Khedkar 등, 1990), *Shigella* sp., *Staphylococci* sp. (Dahiya와 Speck, 1968; Balasubramanyam과 Varadaraj, 1995), *Coliform* sp. (Watkins 등, 1982) 등과 다른 오염균 (Collins와 Hardt, 1980)의 성장을 억제시키거나 사멸시키고 정장작용을 하는 유익한 균으로서 세균성 위장병을 예방·치료할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Gilliland와 Speck, 1977; Adams와 Hall, 1988; Cruywagen 등, 1996; 신 등, 1996).

특히 *Lactobacillus acidophilus*균은 위산, 담즙산 등에 저항성이 있어서 (Sandine 등, 1979; Klaenhammer와 Kleeman, 1981; Gilliland 등, 1984; Overdahl와 Edmund, 1991) 다른 유산균에 비하여 장내에서 정착하여 산성환경을 만들어 부패균을 억제시키고, 창자의 연동운동을 촉진시킨다. 또한 이 균이 생산한 acidophilin (Shahani 등, 1972; Shahani 등, 1977), acidolin (Hamdan과 Mikolajcik, 1974), lactacin B (Barefoot과 Klaenhammer, 1983), lactacin F (Muriana와 Klaenhammer, 1991)등과 같은 항균물질 (Mikolajcik과 Hamdan, 1975; 김, 1984)이 분리, 정제되었고, 부패균 및 병원성균을 억제하여 장내의 정상 미생물균총을 이루며, 또한 혈청 cholesterol수준을 감소시키는 것으로 알려져 있다 (Buck와 Gilliland, 1994; Brashears와 Gilliland, 1995; Grunewald, 1982; Gilliland와 Walker, 1990; 박 등, 1996).

제 2 절 스타터 칼처의 제조

유산균의 스타터 칼처제조 방법에는 전통적 방법 (system Ⅰ)과 농축칼처제조 (system Ⅱ)가 있다.

본 연구에서는 system Ⅰ을 이용하며, *Lactobacillus acidophilus*를 MRS 배지에서 3회이상 계대배양하여 mother culture를 제조하고 0.2% dipotassium phosphate를 첨가한 10 15% 파쇄화분용액에 3% 유산균 칼처를 첨가하여 37℃에서 16시간이상 배양하여 pH 3.7정도 되었을 때 냉각하여 5℃에 저장하여 사용하였다.

Lyophilized culture, *Lactobacillus acidophilus*
↓
MRS broth, 37℃, 16 hr
↓ transfer 1% to blank MRS broth
MRS broth, 37℃, 16 hr
↓ transfer 1% to blank MRS broth
MRS broth, 37℃, 16 hr
↓ transfer 1% to blank MRS broth
Cracked pollen medium with 0.2% dipotassium phosphate
↓ 37℃, 16 24 hr
Pollen culture
↓ Cool to 5℃
Pollen culture prepared

Fig. 5. Diagram of culture preparation.

제 4 장 발효화분 식품제조 및 식품성 병원균에 대한 안전성

제 1 절 서 설

화분을 파쇄하여 열처리하면 미생물적 안전성은 확보할 수 있으나 화분이 내포하고 있는 각종 비타민, 효소, 호르몬 등이 파괴되어 영양가가 감소되며 또한 화분의 건강 기능성도 소멸될 가능성이 있다.

본 연구의 중요한 핵심분야는 화분의 파쇄공정과 비열처리 화분식품이면서 미생물적 안전성을 확보하는 것이다.

파쇄한 화분을 *Lactobacillus acidophilus*로 발효시킬 때 유산균의 수가 증가함과 동시에 유산이 생산되어 pH가 떨어지면서 부패균이나 병원균의 증식억제 및 사멸을 유도할 수 있으며, 뿐만 아니라 *Lactobacillus acidophilus*균이 생산한 항균물질 (acidophilin)이 생산되어 그람 음성 및 양성균을 사멸시키는 효과를 얻을 수 있다.

제 2 절 발효화분 식품제조 및 병원균에 대한 안전성

1. 발효화분 식품제조

Vibration mill에서 파쇄된 화분을 stainless steel통에 넣고 물을 첨가하여 30% 파쇄화분 용액을 만든 다음 준비된 활성 *Lactobacillus acidophilus* 칼처를 3% 접종하여 37℃에서 24시간 배양하고 pH가 3.7정도 될 때 5℃로 냉각하여 제조한다.

Vibration mill

↓25 mm aluminium ball + dried pollen, vibration for 2 hr

Cracked pollen

↓ addition of water (70%)

Pollen solution (30% pollen)

↓ addition of 3% active culture

Fermentation at 37℃ for 24 hr

↓ pH 3.7, cool to 5℃

Fermented pollen food

Fig. 6. Diagram of fermented pollen food.

2. 발효화분 식품의 미생물적 안전성

가. 공시균주 및 배지

본 실험에 사용된 *Lactobacillus* (*Lb.*) *acidophilus* CH-2는 Chr. Hansen's (Denmark)사의 것을 구입하였고, 병원균은 *Staphylococcus* (*Sta.*) *aureus* 7473, *Escherichia* (*E.*) *coli* 6-PE-4, *Salmonella* (*Sal.*) *typhimurium* 0901, *Shigella* (*Shi.*) *flexneri* 9199-NIH로서 중앙대학교 의과대학 미생물학연구실에서 분양받아 사용하였다. 유산균용 배지로 *Lb. acidophilus* CH-2는 Tomato juice agar (Difco Co., USA), *Sta. aureus* 7473은 Staphylococcus medium 110 agar (Difco Co., USA), *E. coli* 6-PE-4는 Violet red bile agar (Difco Co., USA), 그리고 *Sal. typhimurium* 0901과 *Shi. flexneri* 9199-NIH는 SS agar (Difco Co., USA)를 선택배지로 사용하였다.

나. 화분배지에서 유산균의 성장

15%의 파쇄화분용액과 0.2%의 dipotassium phosphate를 첨가한 15% 파쇄화분용액을 121℃에서 15분간 멸균하고 3%의 *Lb. acidophilus* CH-2를 접종한 다음 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 4시간 간격으로 채취한 시료를 0.1% peptone용액에 10진법으로 희석한

다음 Tomato juice agar에 표준평판법 (Standard plate count method; Diliello, 1982)을 사용해서 anaerobic GasPak jar (BBL, Beckon Dickinson Microbiology Systems., USA)를 이용하여 *Lb. acidophilus* CH-2의 성장정도를 측정하였다.

화분배지에서 *Lb. acidophilus* CH-2의 성장은 Fig. 7과 같이 15% 파쇄화분용액을 대조구로 하고 0.2%의 dipotassium phosphate를 첨가한 15% 파쇄화분용액에서 *Lb. acidophilus* CH-2의 성장정도는 배양 12시간대에 최고의 균수를 보였으나 대조구의 경우 7.4×107인 반면 dipotassium phosphate첨가구에서는 8.6×108으로 대조구보다 높게 나타났다. 따라서 화분을 *Lb. acidophilus* CH-2의 배지로 사용할 경우에는 dipotassium phosphate를 첨가하므로서 산의 완충작용에 영향을 받아 성장을 더 좋게 하였다고 사료된다.

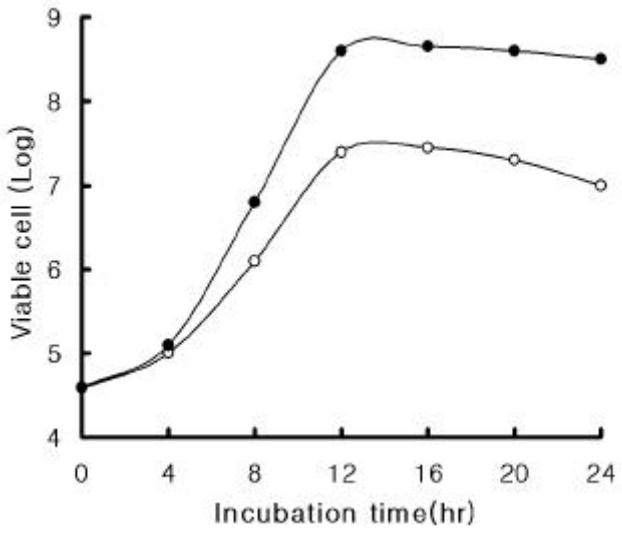


Fig. 7. Growth curve of *Lb. acidophilus* CH-2 at 37℃ in 15% cracked-pollen medium (o—o) and 15% cracked-pollen medium added with 0.2% dipotassium phosphate (●—●).

다. 유산균 칼처에 의한 병원균의 사멸

Lb. acidophilus CH-2의 파쇄화분 발효용액에 의한 병원성균의 사멸정도를 측정하였다. 30% 파쇄화분용액을 70℃에서 15분간 열처리한 용액과 열처리하지 않은 용액 각 800 ㎖에 *Lb. acidophilus* CH-2를 3%씩 접종하였다. 이들 두 용액을 각 4그룹으로 나누어 병원성균인 *Sta. aureus* 7473, *E. coli* 6-PE-4, *Sal. typhimurium* 0901, *Shi. flexneri* 9199-NIH를 각각 3%씩 접종하여 37℃에서 3시간 간격으로 24시간 배양하는 동안 채취한 시료를 0.1% peptone용액에 10진법으로 희석한 다음 각 병원성균의 선택배지에 표준평판법으로 조사하였고, 배양후에는 4℃에서 저장하면서 저장 하루간격으로 시료를 채취하여 사멸정도를 조사하였다.

Lb. acidophilus CH-2는 배양 9시간대에 최대의 균수를 나타내었고, 병원성균은 열처리한 용액과 열처리하지 않은 용액 모두에서 배양 12시간과 15시간에 모두 사멸되는 것으로 나타났다 (Fig. 8, 9). 4℃에서 *Lb. acidophilus* CH-2의 경우 그 수가 점점 감소하여 저장 3일째에는 현저히 감소하였고, 병원성균은 전혀 나타나지 않았다. 따라서 배양동안 *Lb. acidophilus* CH-2에 의한 병원성균의 억제로 발효화분은 안전한 식품으로 이용될 수 있다 (Fig. 10).

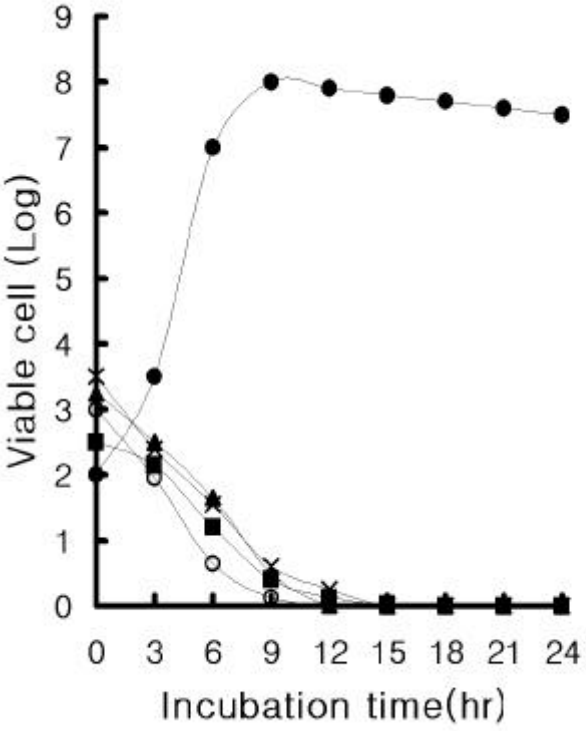


Fig. 8. Growth inhibition of pathogens (■—■:*E. coli* 6-PE-4, ▼—▼:*Sal. typhimurium* 0901, x—x:*Shi. flexneri* 9199-NIH, ○—○:*Sta. aureus* 7473) and growth of *Lb. acidophilus* CH-2 (●—●) during incubation in the 30% cracked-pollen media (heated pollen) at 37℃.

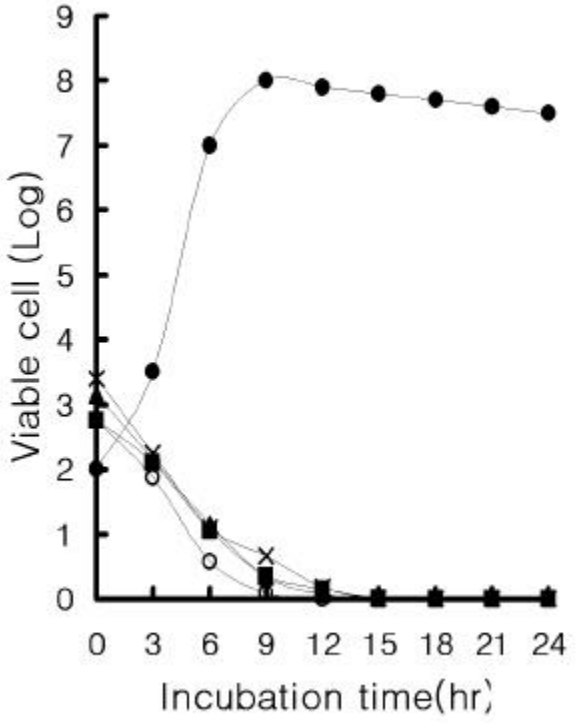


Fig. 9. Growth inhibition of pathogens (■—■:*E. coli* 6-PE-4, ▼—▼:*Sal. typhimurium* 0901, x—x:*Shi. flexneri* 9199-NIH, ○—○:*Sta. aureus* 7473) and growth of *Lb. acidophilus* CH-2 (●—●) during incubation in the 30% cracked-pollen media (non-heated pollen) at 37℃.

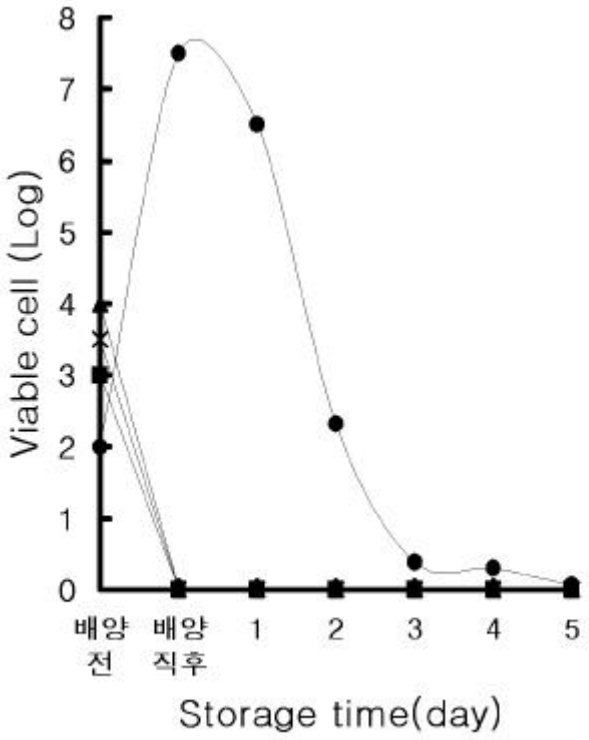


Fig. 10. Inhibition of pathogens (■—■:*E. coli* 6-PE-4, ▼—▼:*Sal. typhimurium* 0901, x—x:*Shi. flexneri* 9199-NIH, ○—○:*Sta. aureus* 7473) and viable cell of *Lb. acidophilus* CH-2 (●—●) during storage at 4℃ after incubation in the 30% cracked-pollen media at 37℃.

라. pH 및 적정산도의 변화

Lb. acidophilus CH-2와 4종의 병원성균을 각각 접종한 파쇄화분용액을 37℃에서 24시간 배양하면서 3시간 간격으로 시료를 채취하여 pH의 변화를 측정 (Corning pH meter 245, UK)한 결과 열처리한 파쇄화분용액과 열처리하지 않은 용액의 pH는 4.5 5.0을 보였으며, Fig. 11, 12와 같이 나타났다.

배양시간이 경과함에 따라 *Lb. acidophilus* CH-2와 *Lb. acidophilus* CH-2 및 각 병원성균 혼합배양물 모두에서 pH는 점점 낮아져 병원성균이 거의 사멸하는 결과를 보였으며 (Fig. 8, 9), 배양 12시간에는 pH 3.5 3.7, 배양 24시간에는 pH 3.3 3.5로 매우 낮게 나타났다. 이로 보아 *Lb. acidophilus* CH-2가 내산성균으로서 배양 24시간까지는 균수가 거의 줄어들지 않고 다만 장기간 저장하였을 때 줄어드는 것을 볼 수가 있다 (Fig. 10).

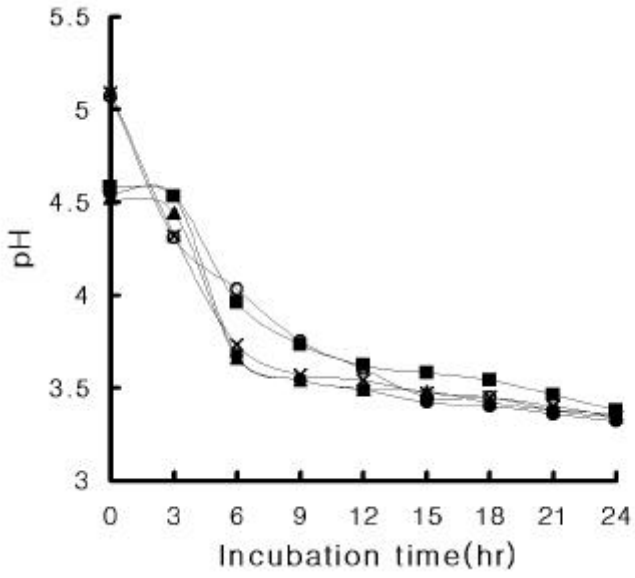


Fig. 11. pH changes during incubation of *Lb. acidophilus* CH-2 with each pathogen (■—■:*E. coli* 6-PE-4, ▼—▼:*Sal. typhimurium* 0901, x—x:*Shi. flexneri* 9199-NIH, ○—○:*Sta. aureus* 7473) and *Lb. acidophilus* CH-2 (●—●) in the 30% cracked-pollen media (heated pollen) at 37℃.

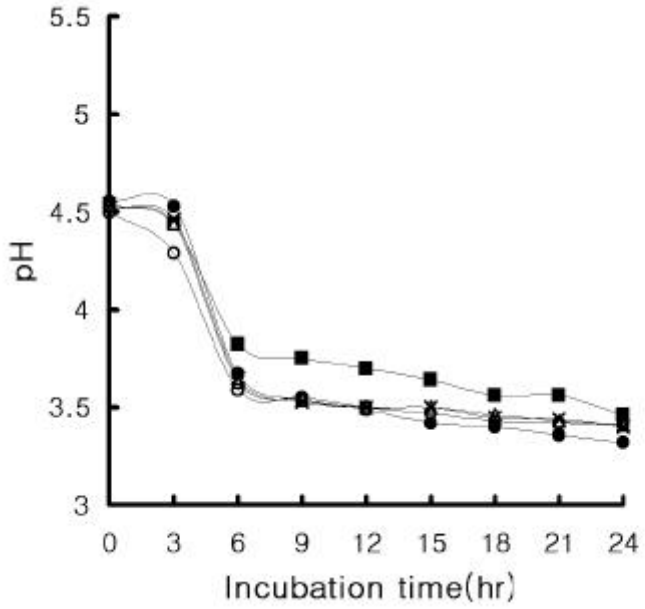


Fig. 12. pH changes during incubation of *Lb. acidophilus* CH-2 with each pathogen (■—■:*E. coli* 6-PE-4, ▼—▼:*Sal. typhimurium* 0901, x—x:*Shi. flexneri* 9199-NIH, ○—○:*Sta. aureus* 7473) and *Lb. acidophilus* CH-2 (●—●) in the 30% cracked-pollen media (non-heated pollen) at 37℃.

발효화분 제조시 오염된 *Staphylococcus aureus* 7473, *E. coli* 6-PE-4, *Salmonella typhimurium* 0901, *Shigella flexneri* 9199-NIH**는 발효공정중** 15**시간내에 모두 사멸하였으므로 식품의 안전성을 확인하였다.**

제 3 절 숙성화분식품 (bee-bread) 및 병원균에 대한 안전성

1. 숙성화분식품 제조

파쇄화분에 50%**의 칼처를 넣어 잘 혼합한 후 발효공정을 시행하지 않고 바로 냉장** (5℃)**해서** 15**일간 숙성하여 화분에 오염된 병원균을 사멸시켜 제조된 식품을 숙성화분식품이**

라 한다.

숙성화분식품 제조의 이론적 근거는 화분칼처에 이미 병원균을 죽일 수 있는 산과 항균물질이 포함되어 있기 때문에 칼처의 접종량을 50%로 높혀 (발효의 경우는 3% 접종) 완전히 혼합하여 병원균이 칼처의 항균력에 의하여 사멸토록 한 것이다.

Vibration mill
↓25 mm aluminium ball + dried pollen, vibration for 2 hr
Cracked pollen
↓ addition of 50% culture and mix well
Pollen-culture mixture
| Cool to 5℃, storage for 15 days
↓ safety test against pathogens
Ripened pollen food

Fig. 13. Diagram of ripened pollen food manufacture.

2. 숙성화분식품의 병원균에 대한 안전성

가. 숙성화분에 의한 병원성균의 사멸효과

파쇄화분에 *Lb. acidophilus* CH-2 pollen culture를 50% (w/v) 첨가하여 잘 혼합한 것과 파쇄화분에 멸균증류수 50% (w/v)를 혼합한 것을 4그룹으로 나누어 병원성균인 *Sta. aureus* 7473, *E. coli* 6-PE-4, *Sal. typhimurium* 0901, *Shi. flexneri* 9199-NIH를 각각 3%씩 접종하여 4 5℃의 냉장실에서 숙성시키면서 1일 간격으로 채취한 시료를 0.1% peptone용액에 10진법으로 희석한 다음 표준평판법으로 각 병원성균의 선택배지에 표준평판법으로 조사한 결과 Fig. 14와 같다.

50% *Lb. acidophilus* CH-2 pollen culture를 사용한 화분혼합물의 경우에는 *Sta. aureus* 7473, *Shi. flexneri* 9199-NIH와 *Sal. typhimurium* 0901이 저장 10일만에 사멸되었고, *E.*

coli 6-PE-4는 저장 15일만에 사멸되었다. 그러나 대조구인 50% 멸균수가 들어있는 화분용액의 경우에는 저장 20일에도 병원성균들이 모두 존재하였다. 따라서 *Lb. acidophilus* CH-2가 항균물질을 생산함으로서 병원성균을 억제하고 안전한 화분식품을 만들 수 있다고 사료된다.

숙성화분식품의 병원균에 대한 안전성을 실험한 결과 숙성을 시작한 이후 15일만에 오염된 모든 식품성 병원균이 사멸하였으므로 숙성화분식품 제조에 이용되는 pollen culture의 유산균수, pH, 그리고 항균성물질 생산등이 중요한 요건이 되는 것이다.

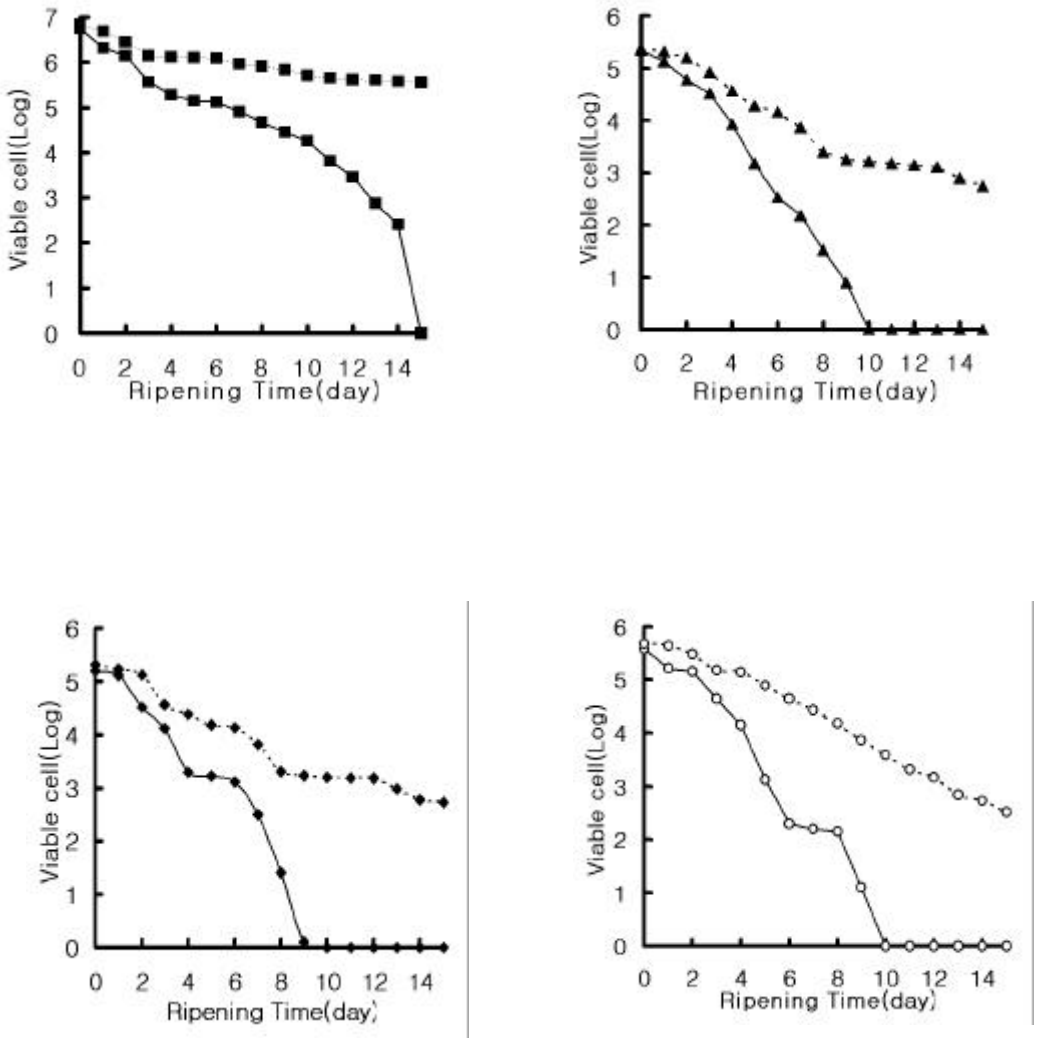


Fig. 14. Growth inhibition of pathogens (■—■:*E. coli* 6-PE-4, ▼—▼:*Sal. typhimurium* 0901, ◆—◆:*Shi. flexneri* 9199-NIH, ○—○:*Sta. aureus* 7473) in the 50% cracked pollen mixed with 50% *Lb. acidophilus* CH-2 pollen culture during ripening at 4 5℃ (— : 50% *Lb. acidophilus* CH-2 pollen culture, ··· : 50% sterilization water).

나. Pollen culture 여액의 항균력 측정

15% 파쇄화분용액에 *Lb. acidophilus* CH-2를 3% 접종하여 37℃에서 24시간 배양하여 pollen culture를 만든 다음 4℃, 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액만을 취하였으며, 이를 pollen culture의 여액이라고 한다. 이 상층액 각 50 ㎖에 4 종의 병원성균을 각각 3% 접종하여 적정성장온도에서 배양하면서 배양 2시간 간격으로 각 병원균의 성장억제정도를 각 선택배지에 표준평판법으로 조사한 결과 Fig. 15와 같이 배양시간이 경과할수록 병원성균의 수는 점점 감소하여 배양 6시간이후에는 병원성균의 성장이 완전히 억제되었다.

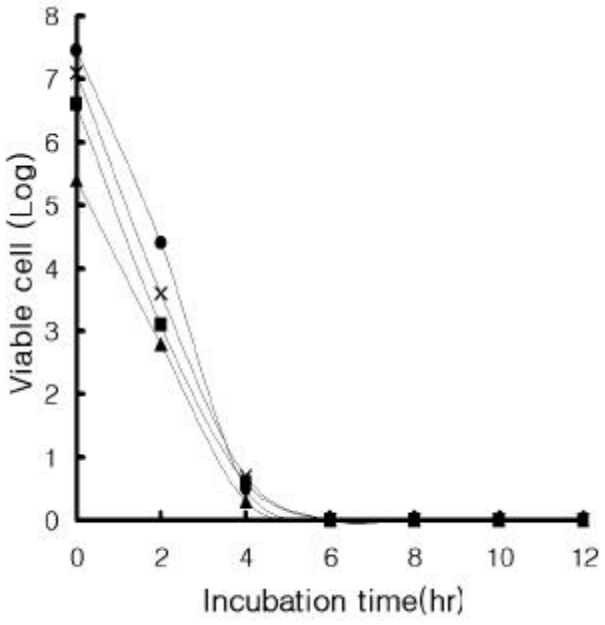


Fig. 15. Antibacterial effect (x-x:*E. coli* 6-PE-4, ●—●:*Sal. typhimurium* 0901, ■—■:*Shi. flexneri* 9199-NIH, ▼—▼:*Sta. aureus* 7473) of supernatant of 15% cracked and fermented pollen incubated at 37 ℃ with *Lb. acidophilus* CH-2.

제 5 장 화분칼처의 항균물질 분리

제 1 절 서 설

유산균에 의한 발효유제품의 많은 장점들은 오래전부터 알려져 왔으나 Metchnikoff (1908)가 Balkan지방 사람들이 발효유를 많이 마시기 때문에 장수한다고 한 것은 최초로 발효유의 항균적 효과를 시사한 것이라고 할 수 있다. 그 후 많은 연구자들이 유산균에 관하여 관심을 가지게 되고 연구가 활발하여 항균효과에 대한 문헌이 발표되었다 (Babel, 1977; Berridge, 1947; de Klerk과 Coetzze, 1961; Hamdy와 Miller, 1971; Kulp와 Rettger, 1924; Lindgren과 Clevstrom, 1978; Pinheiro 등, 1968; Price와 Lee, 1970; Sharma와 Gandhi, 1981; Sharma와 Gandhi, 1983; Tramer, 1966).

그리고 영양적, 장내질환에 대한 치료 효과를 과학적으로 증명한 연구보고도 발표되었다 (Lindgren과 Clevstrom, 1978; Mather와 Babel, 1959; Pulusani 등, 1979; Reddy 등, 1970; Shahani 등, 1972).

유산균은 버터, 치즈, 발효유 등과 같은 여러 유제품에 있어서 좋은 방향성을 부여함과 동시에 그 맛을 개선할 뿐 만 아니라 압도적인 미생물총, 혹은 대사산물로 식품을 부패시키는 많은 부패균 및 장내질환을 유발하는 병원성세균을 억제하여 그 제품에 저장성 및 안정성을 부여하게 된다 (Frazier, 1967; Genske와 Branen, 1973; Hurst, 1973).

이러한 유산균의 항균작용은 발효과정 중에 생성되는 여러종류의 유기산 (Sorrells와 Speck, 1970), 상당한 수준의 과산화수소 (Dahiya 와 Speck, 1968), 그리고 항균물질 (Daly 등, 1971; Frazier, 1967; Genske와 Branen, 1973; Mather와 Babel, 1959; Reddy 등, 1970)에 의한 것으로 설명되어 진다.

유산균 발효유에서 분리된 항균물질로는 Hirsch (1951; 1947)와 Mattick 등 (1947)과 Mather와 Babel (1959)은 *Lactococcus lactis*로부터 peptide성 물질인 nisin을 분리하였고, Wheater 등 (1951)은 *Lactobacillus lactis*로부터 lactobacillin을, Kodama (1952)는

*Lactobacillus plantarum*으로부터 lactolin을 각각 분리하였다. 그리고 Kavasnikov와 Sudenko (1967)에 의해서는 *Lactobacillus brevis*로 부터 lactobrevin이 분리되었다.

또한 Vincent 등 (1959)에 의해서는 *Lactobacillus acidophilus*로부터 휘발성의 lactocidin이, Shahani 등 (1972; 1976; 1977; 1983)에 의해서는 acidophilin이 분리되었으며, Mikolajcik과 Hamdan (1975)에 의해서는 acidolin이 분리되었다. 그리고 김 (1983; 1984)에 의해서는 토마토쥬스 배지에서 성장한 *Lactobacillus acidophilus*로부터 분자량이 약 264로 추정되는 항균물질이 분리·정제되었다.

그리고 Barefoot과 Klaenhammer (1983)에 의해서는 lactacin이 분리되었다. *Lactobacillus bulgaricus*에서 bulgarican (Shahani 등, 1976)이 생성되는 것으로 알려졌으며, *Lactococcus cremoris*에서 열에 불안정한 수용성의 diplococcin (Oxford, 1944; Whitehead, 1933; Whitehead와 Riddet, 1933)이, Zajdel 등 (1985)에 의해 감수성균의 단백질합성을 저해하는 lactostrepcin 5가 분리되었다. 그리고 *Bifidobacterium bifidum*과 *Bifidobacterium longum*에서 bifidin과 bifilong이 분리되었다 (Anand 등, 1984; Jao 등, 1978; 강과 신, 1986). 또한 특정 질병을 치료하려는 임상적인 시도까지도 이루어지고 있는 실정이다 (Collins와 Hardt, 1980).

그러나 nisin을 제외한 많은 bacteriocin의 화학적 구조, 작용기전 등은 아직까지 명확히 밝혀지지 않아서 유산균의 과학적인 이용을 위해서는 이들 bacteriocin에 관한 보다 많은 연구가 이루어져야 될 것으로 사료된다.

제 2 절 유산균칼처 및 항균성

유산균이 생산한 항균물질의 특성은 유산균의 종류와 배지 및 성장조건에 따라 상이하므로 많은 유산균을 사용하는 것이 좋다.

1. 사용된 유산균 칼처

Lactobacilli sp.는 *Lb. plantarum* R (Rosell Institute), *Lb. helveticus* CH-1 (Chr. Hansen's Lab.), *Lb. helveticus* LHB-02 (Chr. Hansen's Lab.), *Lb. bulgaricus* Lb-12 (Chr. Hansen's Lab.), *Lb. bulgaricus* 18 (Chr. Hansen's Lab.), *Lb. casei* 01 (Chr. Hansen's Lab.), *Lb. casei* YA-70 (Hankuk Yakult R & D), *Lb. casei* Chr. (Chr. Hansen's Lab.)를 사용하였고, lactococci sp.는 *Lc. lactis* CH-1 (Chr. Hansen's Lab.), *Lc. lactis* R (Rosell Institute), *Lc. cremoris* CH-1 (Chr. Hansen's Lab.), *Lc. cremoris* R (Rosell Institute), *Lc. diacetylactis* R (Rosell Institute)를, streptococci sp.는 *Str. thermophilus* A (Chr. Hansen's Lab.), *Str. thermophilus* C (Wiesby Co.), *Str. thermophilus* CH-1 (Chr. Hansen's Lab.), *Str. thermophilus* ST-36 (Chr. Hansen's Lab.), *Str. thermophilus* TH-3 (Chr. Hansen's Lab.), *Str. thermophilus* TH-4 (Chr. Hansen's Lab.), 그리고 leuconostocs sp.는 *Leu. cremoris* R (Rosell Institute), *Leu. cremoris* CH-1 (Chr. Hansen's Lab.), *Leu. cremoris* 08 (Chr. Hansen's Lab.), *Leu. cremoris* 09 (Chr. Hansen's Lab.)를 사용하였다. Culture는 동결건조 culture를 사용하였고, lactobacilli sp.는 Lactobacilli MRS broth (Difco Co.)를, lactococci sp., streptococci sp. 및 leuconostocs sp.는 Elliker broth (Difco Co.)를 121℃에서 15분간 열처리한 것을 배지로하여 3회 계대배양한 다음 subculture로 사용하였다. 배양온도는 lactobacilli sp.중 *Lb. helveticus*는 42℃에서, 그외의 culture는 37℃에서 배양하였고, lactococci sp.와 leuconostocs sp.는 30℃에서, streptococci sp.는 42℃에서 배양하였다.

2. Lactococci sp., Streptococci sp., Leuconostocs sp., Lactobacilli sp.의 항균성물질 생성

탈지환원유를 배지로하여 5종의 lactococci sp., 6종의 streptococci sp., 4종의 leuconostocs sp., 그리고 8종의 lactobacilli sp.를 각각의 적정 성장온도에서 36시간동안 배양시킨 배양물이 지니는 항균력을 측정한 결과 Table 10과 같이 *Lb. helveticus* CH-1균주가 ψ25.0 mm (9 mm well을 포함)로 가장 강한 항균력을 나타내었고, *Lb. casei* Chr.과 *Lb. casei* 01균주가 각각 ψ17.5 mm와 ψ17.0 mm로 비교적 높게 나타났으며, 그외의 균주는 ψ11.5 16.0 mm로 나타났다.

Table 10. Bacterial inhibiting zone diameter (mm) exhibited by various lactic acid bacterial strain fermented in reconstituted skim milk

No.	Species	Strain	Agar	Antibacterial zone dia.(㎜) including well (9 ㎜)
1	***Lc. lactis***	CH-1	Nutrient (Nut)	13.0
2	***Lc. lactis***	R	Nut	13.0
3	***Lc. cremoris***	CH-1	Nut	12.5
4	***Lc. cremoris***	R	Nut	12.5
5	***Lc. diacetylactis***	R	Nut	14.0
6	***Str. thermophilus***	A	Nut	16.0
7	***Str. thermophilus***	C	Nut	14.3
8	***Str. thermophilus***	CH-1	Nut	15.0
9	***Str. thermophilus***	ST-36	Nut	14.0
10	***Str. thermophilus***	TH-3	Nut	13.2
11	***Str. thermophilus***	TH-4	Nut	14.0
12	***Leu. cremoris***	R	Nut	12.0
13	***Leu. cremoris***	CH-1	Nut	12.5
14	***Leu. cremoris***	08	Nut	-
15	***Leu. cremoris***	09	Nut	12.8
16	***Lb. helveticus***	CH-1	Nut	25.0
17	***Lb. plantarum***	R	Nut	12.0
18	***Lb. acidophilus***	CH-2	Nut	15.5
19	***Lb. casei***	Chr.	Nut	17.5
20	***Lb. casei***	01	Nut	17.0
21	***Lb. casei***	YA-70	Nut	11.5
22	***Lb. bulgaricus***	18	Nut	12.0
23	***Lb. bulgaricus***	Lb-12	Nut	15.5

3. Lactobacilli sp.의 배지에 따른 항균성물질 생성

멸균된 탈지환원유, MRS broth, 20% 파쇄 화분용액 (20% CP), 그리고 20% 파쇄 화분용액에 7종의 화학성분을 첨가한 배지 (20% CP＋7 ing.)에 8종의 lactobacilli sp.를 각각 접종하여 적정 성장온도에서 36시간 배양한 배양물이 지니는 항균력을 조사한 결과, *Lb. casei* YA-70균주는 milk배지 (ψ11.5 mm)에서 보다 20% 파쇄 화분용액에서 항균력이 훨씬 높게 나타났고 (ψ24.0 mm), 7종의 화학성분을 첨가한 20% 파쇄 화분용액 배지에서는 ψ26.5 mm로 더 높게 나타나서 milk 배지에서보다 ψ15.0 mm의 큰 차이를 보였으며, MRS broth에서도 높은 항균력을 보였다. *Lb. plantarum* R도 milk배지 (ψ12.0 mm)에서 보다 20% 파쇄 화분용액에서 항균력이 훨씬 높게 나타났고 (ψ23.0 mm), 7종의 화학성분을 첨가한 배지에서는 ψ25.0 mm로 더 높게 나타나서, milk 배지에서보다 ψ13.0 mm의 차이를 보였다. 또한 *Lb. acidophilus* CH-2, *Lb. casei* Chr, *Lb. casei* 01도 milk배지에서보다 20% 파쇄 화분용액과 7종의 화학성분을 첨가한 배지에서 배양시켰을 때 그 항균력이 더 큰 것으로 나타났다. 그러나 *Lb. helveticus* 는 4종의 배지에서 비슷한 효과를 보였고 (ψ23.5 26.0 mm), *Lb. bulgaricus* 18은 화분배지에서는 오히려 항균력이 전혀 나타나지 않았고, *Lb. bulgaricus* Lb-12 strain은 20% 파쇄 화분용액에서는 차이가 없었으나 7종의 화학성분을 첨가한 화분배지에서는 항균력을 보이지 않았다 (Table 11).

Table 11. Bacterial inhibiting zone diameter (mm) exhibited by lactobacilli sp. fermented in 4 media

Zone & Media / Culture	Antibacterial zone dia.(㎜) including well (9 ㎜)			
	Milk	MRS broth	20 CP	20 CP ＋7 ing*
***Lb. helveticus* CH-1**	25.0	23.5	24.0	26.0
***Lb. plantarum* R**	12.0	25.5	23.0	25.0
***Lb. acidophilus* CH-2**	15.5	25.0	18.0	21.0
***Lb. casei* Chr.**	17.5	24.0	24.0	26.0
***Lb. casei* 01**	17.0	24.5	25.0	27.0
***Lb. casei* YA-70**	11.5	24.0	24.0	26.5
***Lb. bulgaricus* 18**	12.0	22.0	-	-
***Lb. bulgaricus* Lb-12**	15.5	21.0	16.0	-

* 7 chemical ingredients

4. 화분추출물이 유산균의 항균효과에 미치는 영향

20%의 파쇄 화분용액에서 원심분리하여 얻은 상층액을 0 30%의 농도로 탈지환원유에 첨가한 배지에서 4종의 유산균을 접종·배양한 결과 Table 12와 같이 *Lb. plantarum* R이 화분추출물에 의해 가장 큰 효과를 나타내었고, *Lb. casei* 01와 *Lc. diacetylactis* R에 대해서도 약간의 효과가 있었다. 그 결과 화분추출액 15%를 첨가할 때 4종의 유산균이 생산한 항균력이 좋았다.

Table 12. Antibacterial effect of pollen extract added in skim milk for fermentation of lactic acid bacteria

Culture	Pollen extr. (%)	Antibacterial zone dia. (㎜) including well(9 ㎜)						
		Amt.(%) of pollen extr. added in skim milk						
		C(0)	5	10	15	20	25	30
***Lb. casei* 01**	20	17.0	18.5	20.0	20.0	19.5	19.5	19.5
***Lb. helveticus* CH-1**	20	23.0	23.0	23.0	23.0	21.5	21.5	21.5
***Lb. plantarum* R**	20	15.5	17.0	18.0	19.0	20.0	20.0	21.0
***Lc. diacetylactis* R**	20	12.0	13.0	13.5	13.5	13.0	13.0	13.0

5. 우유에 첨가한 화분의 농도, 화분용액의 pH, 20% 파쇄화분용액에 화학성분 첨가시 *Lactobacillus acidophilus* CH-2의 항균효과

20%의 파쇄 화분용액을 0 30%의 농도로 첨가한 탈지환원유 배지와, 20% 파쇄화분을 배지로 한 것 (20% CP, pH 5.2와 pH 6.9), pH를 조절한 20% 파쇄화분배지 (20% CP, pH 6.9)로 한 것, 그리고 20% 파쇄 화분용액에 7종의 화학성분을 첨가한 배지 (20% CP+7 ing., pH 5.2와 pH 6.9)에 *Lb. acidophilus* CH-2를 접종배양하여 그 항균효과를 측정한 결과, milk배지에 첨가한 화분의 농도가 증가할수록 항균효과도 높아지는 경향을 보였다. 파쇄

화분용액의 pH를 6.9로 조절하였을 때는 조절하지 않았을 때보다 항균효과가 높게 나타났고, 7종의 화학성분을 첨가하였을 때는 그 효과가 더 높게 나타났다 (Table 13).

Table 13. Antibacterial effect of skim milk added cracked pollen, 20% cracked pollen solution (pH 5.2, 6.9) and 20% cracked pollen solution added 7 chemical ingredients (pH 5.2, 6.9) for incubation of *Lb. acidophilus* CH-2

Culture	Antibacterial zone dia. (㎜) including well (9 ㎜)										
	Amt.(%) of cracked pollen added in skim milk							20% CP pH 5.2	20% CP pH 6.9	20% CP + 7 ing. pH 5.2	20% CP + 7 ing. pH 6.9
	C(0)	5	10	15	20	25	30				
Lb. acido CH-2	16.0	19.5	20.0	19.5	20.0	22.0	22.0	22.0	24.0	26.0	27.0

상기의 배지에서 pH의 변화는 milk배지에 첨가한 화분의 농도가 높을수록 pH도 떨어져 30%첨가하였을 때 pH 3.70을 보였다. 그러나 7종의 화학성분을 첨가한 파쇄 화분용액에서 배양시켰을 때 (pH 3.66 3.80)는 첨가하지 않은 화분배지에서보다 오히려 pH가 높게 나타났다 (pH 4.02 4.10).

Table 14. pH after 36 hr incubation of *Lb. acidophilus* CH-2 in media of skim milk added cracked pollen, 20% cracked pollen solution (pH 5.2, 6.9) and 20% cracked pollen solution added 7 chemical ingredients (pH 5.2, 6.9)

	pH after 36 hr incubation of *Lb. acidophilus* CH-2										
구분	Amt. (%) of cracked pollen added in skim milk							20% CP pH 5.2	20% CP pH 6.9	20% CP + 7 ing. pH 5.2	20% CP + 7 ing. pH 6.9
	C(0)	5	10	15	20	25	30				
pH	4.02	3.84	3.85	3.97	3.76	3.72	3.70	3.66	3.80	4.02	4.10

6. 화분의 농도와 화분용액의 pH에 따른 *Lactobacillus acidophilus* CH-2, *Lactobacillus plantarum* R의 항균효과

파쇄 화분용액의 농도를 10, 20, 30%로 달리하고 pH를 조절하지 않은 대조구 (pH 5.2)와 중화시킨 실험구 (pH 6.9), 그리고 각 농도의 파쇄화분 용액에 7종의 화학성분을 첨가한 대조구 (20% CP＋7 ing., pH 5.2)와 7종의 화학성분을 첨가하고 중화시킨 20% 파쇄화분 용액 (20% CP＋7 ing., pH 6.9)을 배지로하여 *Lb. acidophilus* CH-2와 *Lb. plantarum* R의 항균효과를 조사한 결과 각 농도의 파쇄 화분용액배지에 7종의 화학성분을 첨가하였을 때 항균효과가 높게 나타났고, pH를 중화시킨 배지에서 약간 더 높았다. 파쇄 화분의 농도가 10%보다는 20, 30%일 때 항균효과가 더 높았고, 20%와 30%의 농도는 그 효과가 거의 비슷하였다 (Table 15). 따라서 본 실험에 사용된 파쇄 화분용액의 농도는 20%로 하였다.

Table 15. Antibacterial effect to *Lb. acidophilus* CH-2 and *Lb. plantarum* R according to the concentrations of cracked pollen, pH and 7 chemical ingredients

			Antibacterial zone dia. (㎜) including well (9 ㎜)					
			Lb. acidophilus CH-2			*Lb. plantarum* R		
			Not added 7 ing.	Added 7 ing.	Milk	Not added 7 ing.	Added 7 ing.	Milk
pH 5.2	Conc. of CP (%)	10	21.5	24.0	15.5	21.0	23.0	12.0
		20	23.0	25.0		22.5	24.3	
		30	23.0	25.2		22.7	24.5	
pH 6.9	Conc. of CP (%)	10	22.5	24.5		21.5	23.5	
		20	24.0	26.0		23.0	25.3	
		30	24.5	26.0		23.2	25.5	

7. 유산에 의한 항균효과

각 농도별로 lactic acid를 well당 150 ㎕씩 주입하여 시험균 *Pseu. fluorescens*에 대한 항균력을 조사한 결과 1%의 lactic acid를 주입하였을 때는 20.0 mm를 나타내었고, 농도가 증가할수록 항균력도 높아져 5%일 때는 36.5 mm, 10%일 때는 50.0 mm를 나타내었다 (Table 16).

Table 16. Antibacterial effect of % lactic acid against to the *Pseu. fluorescens*

		Antibacterial zone dia. (㎜) including well (9 ㎜)/150 ㎕
Lactic acid (%)	1	20.0
	2	26.0
	3	31.5
	4	35.0
	5	36.5
	10	50.0

8. 항균물질의 추출 및 정제

1) Methanol-Acetone 추출

탈지환원유, 20% 파쇄 화분용액, 그리고 7종의 화학성분을 첨가한 20% 파쇄 화분용액을 배지로 하여 37℃에서 28시간 배양한 각 배양물 320 ml를 4℃, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 (Vision Co. VS15,000CF., Korea)하여 상층액만을 회수하였다. 이를 45℃, rotary evaporator (Eyela Rotary Evaporator, Rikakikai., Japan)로서 수분을 완전히 증발시켜 농축시키고 1,000 ㎖의 methanol을 가하여 1시간동안 stirring한 다음 4℃, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물은 제거하고 상층액을 여과 (Whatman fliter paper # 2)한 다음 회수하였다. 회수한 상층액을 45℃에서 rotary evaporator를 이용하여 농축시켰다. 이와같은

방법으로 2회 더 실시하여 얻은 물질을 methanol 추출물이라 하였다.

이 methanol 추출물에 다시 1,000 ㎖의 acetone을 넣고 1시간 동안 교반한 다음 4℃, 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 침전물은 위와 동일한 방법으로 2회 반복 추출하여 상층액을 모았다. 회수된 상층액은 45℃에서 rotary evaporator로 감압농축하여 갈색의 점질성 물질을 얻었으며, 이를 Methanol-Acetone 추출물 (M-A extract)이라 한다.

20% 파쇄 화분용액 (20% CP)과 7종의 화학성분을 첨가한 20% 파쇄 화분용액 (20%＋7 ing.)에서 배양한 배양물을 methanol과 acetone으로 추출하였을 때의 항균력은 탈지환원유에서 배양한 배양물을 methanol과 acetone으로 추출하였을 때의 항균력보다 훨씬 높았다.

또한 20% 파쇄 화분용액 (20% CP)과 7종의 화학성분을 첨가한 20% 파쇄 화분용액 (20%＋7 ing.)에서 배양한 배양물을 ethyl acetate로 추출하였을 때는 methanol이나 acetone으로 추출하였을 때보다 항균력이 훨씬 높았다.

2) Ammonium sulfate 분획-ethyl acetate 추출

20% 파쇄 화분용액을 배지로하여 *Lb. plantarum* R을 3% 접종하여 37℃에서 28시간 배양시켜 얻은 배양물을 4℃, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만을 회수하였다. 이 상층액에 ammonium sulfate를 가하여 85%의 포화농도액을 만들고 1시간동안 stirring하였다. 이를 다시 4℃, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액과 침전물을 분리·회수하였다. 상층액은 45℃, rotary evaporator로서 수분을 완전히 증발시켜 농축시키고 20 ㎖의 methanol을 첨가하여 농축물을 용해시킨 다음 1,000 ㎖의 ethyl acetate를 가하여 1시간동안 stirring하였다. 이를 4℃, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만을 회수하고, 남은 침전물을 위와 동일한 방법으로 ethyl acetate로 2회 더 처리하여 상층액만을 모았다. 회수한 상층액을 45℃에서 rotary evaporator를 이용하여 농축시켰으며, 이를 ammonium sulfate-ethyl acetate추출물이라 하였다. 침전물은 증류수에 용해시켜 항균력의 유무를 조사하였다.

85% ammonium sulfate 포화농도로 처리하여 얻은 상층액에서는 항균력이 강하게 나타났고, TLC 전개에서 얻은 band에서도 항균력이 강하게 나타났다. 그러나 증류수에 용해시킨 침전물에서는 항균력이 전혀 나타나지 않았다.

따라서 20% 파쇄 화분용액 (20% CP)과 7종의 화학성분을 첨가한 20% 파쇄 화분용액 (20% CP+7 ing.)에서 배양한 배양물은 85% ammonium sulfate 포화농도로 처리하고, ethyl acetate로 추출하였을 때 methanol이나 acetone으로 추출하였을 때보다 항균력이 훨씬 높게 나타난다는 것을 알 수 있었다.

3) Thin-layer chromatography

Methanol 추출물, methanol-acetone 추출물, 그리고 ethyl acetate 추출물, ammonium sulfate-ethyl acetate추출물을 TLC plate sheet (Merck Co., Germany)에 각 150 μℓ씩 loading하였다. Loading물이 완전히 건조된 후에 TLC sheet를 chloroform-methanol (90:10, v/v)을 용매로하여 전개시킨 다음 전개된 TLC sheet를 공기중에서 건조시키고 UV하에서 흡광대를 띄게 하였다. UV하에서 나타난 모든 bands의 silica gel을 긁어 모아 methanol로 용출시키고 이를 12,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 모았다. 이를 질소 (N2 gas)로 용매를 증발시키고 얻은 농축물을 300 μℓ의 methanol에 용해시켜 시험균에 대한 항균효과를 조사하였다.

Lb. plantarum R 배양물에서 얻은 ethyl acetate추출물, ammonium sulfate-ethyl acetate 추출물의 TLC plate에 전개시키고 UV하에서 확인한 band의 silica gel에서 용출시켜 얻은 물질을 disc bioassay법 (disc/15 μℓ)으로 항균력을 조사한 결과 ammonium sulfate-ethyl acetate의 추출물에서는 6개의 band중 2번과 3번 band사이에서 항균효과 (15.0 mm)가 나타났다.

제 6 장 발효화분 섭취 동물실험

제 1 절 서 설

오래전부터 화분을 섭취한 사람에게 건강증진효과 및 질병치유의 보고가 있다. 특히 건강기능성을 간추려 보면 화분은 전립선의 기능에 필요한 영양소, 특히 Zinc (Zn)를 정상적으로 공급하여 전립선비대증의 자연치료효과가 있다.

화분의 식물성 섬유는 장의 연동운동을 도우며 꿀벌이 분비한 항균성 물질은 위장내의 병원균을 억제한다. 벌화분은 rutin을 함유하여 인체의 모세혈관을 탄력성있게 하여 심장 및 대뇌의 모세혈관 보호로 생명에 지대한 기능을 갖는다.

영국의 운동선수, 국가코치인 McNab씨는 올림픽경기의 육상선수의 90%이상이 화분을 복용한다고 한다. 그외 미식축구선수, 권투선수, 무하마드 알리등이 화분을 복용하였다. 화분이 심장, 혈액, 그리고 각종 근육에 포함한 모세혈관을 튼튼히 하여 노폐물과 가스교환이 잘 될 수 있도록 하며 산소공급 매개체인 헤모글로빈을 증가시킨다.

인체의 세포나 조직이 계속 재생되는데는 DNA의 기능이 활발하여 효소 및 호르몬을 정상적으로 합성하여야 한다. DNA와 RNA가 많이 포함된 음식을 먹으면 노인의 피부가 탄력성이 있으며, 젊게 보이는 것은 원천적으로 세포의 핵산재생과 관련되는 것이라고 볼 때 화분은 식물의 정자로서 이를 잘 공급한다.

그외 간질환 및 빈혈증세에도 치료효과를 보인다는 보고가 있다.

제 2 절 쥐의 창자에서 화분단백질의 소화

화분은 그 외피가 어떠한 소화효소나 강산, 알카리, 알콜, 에테르 등의 유기용매에도 영향을 받지 않으므로 100 ㎛이하되는 작은 입자속에 있는 영양물질이 동물의 창

자에 흡수되는 것은 의심스럽고 흥미로운 일이다. 화분이 과연 그 외피 내부에 있는 단백질이 이용되는가에 대하여 동물 실험을 실시하였다.

화분과 파쇄화분의 단백질 소화율

5마리의 mice를 한 그룹으로하여 화분과 화분을 ball mill에 넣어 파쇄한 후 동결 건조시킨 파쇄화분을 각각 급여했다.

쥐의 분변 채취는 먼저 쥐를 1일간 절식시킨후 각각의 pollen을 급여하여 5일간의 예비시험기간을 둔 후 매일 2회씩 7일간 변을 채취하였다. 채취된 변을 60 80℃에서 24시간 동안 건조시킨 후 Kejeldahl로서 조단백질 함량을 구하여 각각 pollen의 단백질 소화율을 측정하였다.

$$\text{percent digestable protein} = 100 - 100\left[\frac{\text{total protein g in feces}}{\text{total protein g in pollen}}\right]$$

화분과 파쇄화분의 단백질 소화율을 측정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

$$\text{화분의 단백질 소화율} = 100 - 100\left[\frac{10.49}{22.91}\right] = 54.22\%$$

$$\text{파쇄화분의 단백질 소화율} = 100 - 100\left[\frac{9.60}{23.49}\right] = 59.13\%$$

자연화분을 급여한 쥐의 배변내 화분은 현미경상에서 그 형상이 전혀 변화하지 않은 것으로 관찰되었다. 이는 화분 외피가 쥐의 창자에서 분비되는 어떤 소화액에도 분해되지 않았다는 증거이다. 그러나 쥐 창자에서 섭취된 화분의 단백질 소화율이 54%로 나타난 것은 쥐의 소화효소가 화분의 발아구를 통하여 작용한 것으로 고려할

수 있다. 즉, 세포질과 외피인 exine은 외부와 열릴 가능성이 있는 부분이 발아구(germination pores)라고 생각할 수 있다. 이 발아구가 창자내의 삼투압에 의하여 파괴되면 그 극히 작은 구멍을 통하여 효소가 침투되어 소화작용이 일어날 것이다. Wang씨가 사람과 가장 유사한 원숭이에게 화분을 먹인 후 조사한 결과 화분벽이 화분내에 있는 아미노산, 비타민 C, 그리고 광물질의 소화에 어떠한 영향도 미치지 못한다고 하였다. 이러한 사실은 본 실험에서도 유사성을 보이고 있다. 그러나 germination pore가 대단히 적고 소화관은 계속 움직여 소화물을 이동시키기 때문에 사람의 창자에서 소화 가능성을 완전히 확신케하기 위하여는 화분의 외피를 파괴하고 섭취하여야 할 것이다. 파쇄한 화분을 섭취한 쥐의 단백질 소화율은 파쇄하지 않은 것보다 약간 높게 나타났다. 이는 화분 조단백질 분석에 효소작용을 받게되는 세포질 단백질보다 소화작용을 받지 않는 외피의 질소화물에 대한 영향이 클 것으로 사료된다. 그러므로 세포질 단백질의 소화율을 측정하여야 할 것이다.

제 3 절 화분의 사료효율 - 동물성장

발효화분을 첨가한 사료와 일반사료를 사육한 쥐의 무게를 측정하여 실험구와 대조구간의 사료효율을 측정하였다.

공시동물 : 젖을 뗀 백색 마우스 새끼, 평균 20 g, 28마리 사용

대 조 구 : 일반사료 사육 13마리 (수컷 10, 암컷 3)

실 험 구 : 발효화분 10% (w/w)비율로 일반사료에 혼합하여 단단한 발효화분 혼합사료로 사육 15마리 (수컷 5, 암컷 10)

대조구 평균 증가 체중 : 61.6 g

대조구 평균 사료 소비량 : 106.1 g

실험구 평균 증가 체중 : 62.4 g

실험구 평균 사료 소비량 : 78.0 g

$$\text{대조구 사료 효율} = \frac{\text{g diet cons}}{\text{g wt. gain}} = \frac{106.1\ \text{g}}{61.6\ \text{g}} = 1.72$$

$$\text{실험구 사료 효율} = \frac{\text{g diet cons}}{\text{g wt. gain}} = \frac{78.0\ \text{g}}{62.4\ \text{g}} = 1.25$$

발효화분 혼합 사료효율이 일반 사료 효율보다 양호하였다.

제 4 절 빈혈증 식이효과

경북대학교에 재학중인 여학생의 혈액검사 결과 적혈구 수 (400 550만/㎕), **백혈구 수** (4,000 10,000/㎕), **혈색소** (**여**, 11.0 17.0 g/㎗), **헤마트크리트** (**여**, 35 52%), **혈소판수** (15만 40만/㎣), **평균 적혈구 용적** (**여**, 80 96 ㎛³), **평균 적혈구 혈색소** (27 33 ㎛㎍), **평균 적혈구 혈색소 농도** (32 36%), **적혈구 침강 속도** (**여**, 0 15 ㎜/hr)**의 항목에 대하여 정상치에 미달하는 학생을** 10**명 선택하여 식사후** tea spoon**으로 한 숟가락의 발효 화분을 매일** 3**회씩 복용하였다.**

발효 화분을 6**주간 복용한 후 다시 학생들의 혈액을 검사하여 발효화분 복용전의 혈액검사 수치와 비교하여 그 효능을 검증한 결과 개체에 따라 차이가 많았으며, 특히 한 학생에 대한 빈혈치료 효과는 매우 양호하였다.**

〈임상분석 결과〉

복 용 전

검 사 명		참 고 치	검 사 결 과	판 정	
				정 상	유소견
혈액학검사	적 혈 구 수	400~550만/㎕	478	0	+
	백 혈 구 수	4,000~10,000/㎕	6900	0	+
	혈 색 소	남:12.0~18.0g/dl 여:11.0~17.0g/dl	10.8		0 +
	헤마트크리트	남:36~54% 여:35~52%	32		0 +
	혈 소 판 수	15만~40만/㎣	30	0	+
	평균적혈구용적	80~96㎌	69	0	+
	평균적혈구혈색소	27~33 ㎍㎍g	21		0 +
	평균적혈구혈색소농도	32~36%	30		0 +
	ESR(적혈구침강속도)	남 0~9 mm/hr 여 0~15 mm/hr	8	0	+
	백혈구백분율 Band	2~14%			
	백혈구백분율 Seg	43~59%			
	백혈구백분율 Eos	2~4%			
	백혈구백분율 Bas	0~1%			
	백혈구백분율 Mono	4~6%			
	백혈구백분율 Lympho	25~35%			

복 용 후

검 사 명		참 고 치	검 사 결 과	판 정	
				정 상	유소견
혈액학검사	적 혈 구 수	400~550만/㎕	581	0	+
	백 혈 구 수	4,000~10,000/㎕	7000	0	+
	혈 색 소	남:12.0~18.0g/dl 여:11.0~17.0g/dl	11.4	0	+
	헤마트크리트	남:36~54% 여:35~52%	35.2	0	+
	혈 소 판 수	15만~40만/㎣	32	0	+
	평균적혈구용적	80~96㎌	80.0	0	+
	평균적혈구혈색소	27~33 ㎍㎍g	27.0	0	+
	평균적혈구혈색소농도	32~36%	32	0	+
	ESR(적혈구침강속도)	남 0~9 mm/hr 여 0~15 mm/hr	2	0	+
	백혈구백분율 Band	2~14%			
	백혈구백분율 Seg	43~59%			
	백혈구백분율 Eos	2~4%			
	백혈구백분율 Bas	0~1%			
	백혈구백분율 Mono	4~6%			
	백혈구백분율 Lympho	25~35%			

제 7 장 화분의 농약에 대한 안전성 검사

꿀벌이 수집한 화분에 농약의 잔류 여부를 확인하므로서 화분이 식품으로서의 안전성을 조사하였다. 분석방법은 보건사회부 고시 제 1994-62호의 "식품중 농약잔류 시험법"에 준하여 분석하였다.

분석한 농약은 유기인계인 EPN, Diazinon, Demothoate, Melathion, Parathion, Fenotrothion, Fenthion, Phenthoate, Methidation, Chlorpyrifos, Dichlorvos, Azinphos-methyl, Omethoate, Pirimiphos-methyl, Chlorfenvinphos, Ethion, Phosalone, Phosmat, Carbofenothion 등 19종, 유기염소계인 BHC, DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Captafol, Chlorobenzilate, Dicofol, Captan, Folpet, Tetradifon, Endosulfan, Chlorothalonil 등 13종, carbamate계인 Carbaryl, Carbendazim, Methomyl 등 3종, 그리고 기타 농약으로서 Methamidofos, Ethoprophos, Terbufos, Edifenphos, Metribuzin, Dichlofluanid, Pendimethaline, Chinomethionate, Phoxim, Etrimfos, Metalxyl, Procymidone, Propagite, Triadimenol, Trichlorofon, Clofentezine, Triadimefon, Triforine, Thiodicarb, Amitraz 등 총 55종의 농약에 대하여 분석하였다.

상기의 분석방법에 준하여 화분내 잔류농약을 분석한 결과 Table 17에서 보는 바와 같이 화분내에는 농약이 전혀 잔류하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 화분을 식품 또는 기타 첨가물로 사용할 때 매우 안전한 것으로 사료된다.

Table 17. Pesticides analyzed in the experiment with domestic pollen-load

Compounds	Classification	Conc.	Compounds	Classification	Conc.
EPN	Organophos.	ND*	Folpet	Organochlorine	ND*
Diazinon	"	"	Tetradifon	"	"
Demothoate	"	"	Endosulfan	"	"
Melathion	"	"	Chlorothalonil	"	"
Parathion	"	"	Carbaryl	Carbamate	"
Fenotrothion	"	"	Carbendazim	"	"
Fenthion	"	"	Methomyl	"	"
Phenthoate	"	"	Methamidofos	Micellaneous	"
Methidation	"	"	Ethoprophos	"	"
Chlorpyrifos	"	"	Terbufos	"	"
Dichlorvos	"	"	Edifenphos	"	"
Azinphos-methyl	"	"	Metribuzin	"	"
Omethoate	"	"	Dichlofluanid	"	"
Pirimiphos-methyl	"	"	Pendimethaline	"	"
Chlorfenvinphos	"	"	Chinomethionate	"	"
Ethion	"	"	Phoxim	"	"
Phosalone	"	"	Etrimfos	"	"
Phosmat	"	"	Metalxyl	"	"
Carbofenothion	"	"	Procymidone	"	"
BHC	Organochlorine	"	Propagite	"	"
DDT	"	"	Triadimenol	"	"
Aldrin	"	"	Trichlorofon	"	"
Dieldrin	"	"	Clofentezine	"	"
Endrin	"	"	Triadimefon	"	"
Captafol	"	"	Triforine	"	"
Chlorobenzilate	"	"	Thiodicarb	"	"
Dicofol	"	"	Amitraz	"	"
Captan	"	"	Carbamate	"	"

*no detected

인 용 문 헌

1. Adams, M. R., and C. J. Hall. 1988. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixture. Inter. J. Food Sci. and Tech. 23:287-292.
2. Alder, H. E., and A. J. D. Massa. 1980. Effect of ingested *Lactobacilli* on *Salmonella infantis* and *E. coli* and on intestinal flora, pasted vent, chick growth. Avian Diseases. 24:868-878.
3. Anand, S. K., R. A. Stinivasan, and L. K. Rao. 1984. Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*. Cult. Dairy Prod. J. 2.:6.
4. Babel, F. J. 1977. Antibiosis by lactic culture bacteria. J. Dairy Sci. 60(5):815.
5. Balasubramanyam, B. V., and M. C. Varadaraj. 1995. Anti-bacterial effect of *Lactobacillus* spp. on foodborne pathogenic bacteria in an Indian milk-based fermented culinary food item. Cult. Dairy Prod. J. 2.:22-27.
6. Barefoot, S. F., and T. R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45(6):1808-1815.
7. Berridge, N. J. 1947. Further purification of nisin. Lancet. 253:7.
8. Brashears, M. M., and S. E. Gilliland. 1995. Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* cells as influenced by the growth phase. J. Dairy Sci. 78:2326-2335.
9. Brooks, J., and Shaw, G. 1971. Recent developments in the chemistry, biochemistry, geochemistry and posttetrad ontogeny of sporopollenins derived from pollen and spore exine. Heslop-Harrison, J(ed) pollen : development and physiology. Butterworths London, p. 99-114.

10. Buck, L. M., and S. E. Gilliland. 1994. Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. J. Dairy Sci. 77:2925- 2933.

11. Bullock, D. H., and O. R. Irvine. 1956. A chromatographic study of cheddar cheese ripening. J. Dairy Sci. 39:1229- 1235.

12. Collins, E. B., and P. L. Hardt. 1980. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 63:830.

13. Cruywagen, C. W., I. Jordaan, and L. Venter. 1996. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. J. Dairy Sci. 79:483- 486.

14. Dahiya, R. S., and M. L. Speck. 1968. Hydrogen peroxide formation by *Lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 51:1568- 1572.

15. Daly, C., W. E. Sandine, and P. R. Elliker. 1971. Influence of pH on inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Streptococcus diacetylactis*. J. Dairy Sci. 54:755.

16. Davis, P. H., and V. H. Heywood. 1973. Principles of Angiosperm Taxonomy, Krieger Publ. Co. N.Y.

17. de Klerk, H. C., and J. N. Coetzze. 1961. Antibiosis among Lactobacilli. Nature. 192:340.

18. Diliello, L. R. 1982. Methods in food and dairy microbiology. AVI Publishing Co. Inc.

19. Folch, J., M. Lee, and G. H. Sloanestanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. chem. 226:497- 509.

20. Frazier, W. C. 1967. Fungi Microbiology. 2nd ed. McGraw Hill Book Co. Inc. New York.

21. Genske, R. P., and A. L. Branen. 1973. Properties of antimicrobial substances with *S. diacetylactis* and *L. citrovorum*. Modern Dairy. July/August. 12.

22. Gilliland, S. E., and D. K. Walker. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. J. Dairy Sci. 73:905-911.

23. Gilliland, S. E., and M. L. Speck. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative cultures. J. Food Prot. 40:820-823.

24. Gilliland, S. E., T. E. Stanley, and L. J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J. Dairy Sci. 67:3045-3051.

25. Grunewald, K. K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Sci. 47:2078-2079.

26. Hamdan, L. Y., and E. M. Mikolajcik. 1974. Acidolin : An antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. J. Antibiot. 27(8):631-636.

27. Hamdy, A. H., and C. C. Miller. 1971. Antibiotics for bovine mycoplasms. J. Dairy Sci. 54(10):1541.

28. Haydak, M. H. 1970. Honey bee nutrition. Ann. Rev. Ent., 15:143-156.

29. Hirsch, A. 1951. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. J. Gen. Microbiol. 5:208.

30. Hurst, A. 1973. Microbial antagonism in foods. In microbial food-borne infections and intoxications(ed Hurst and de Man). Department of National Health and Welfare. Ottawa. Canada.

31. Jao, Y. C., E. M. Mikolajcik, and P. M. T. Hansen. 1978. Growth of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennysylvanicus* in laboratory media supplemented with amino sugars and spent broth from *E. coli*. J. Food Sci. 43:1257.

32. Kavasnikov, E. I., and V. I. Sudenko. 1967. Antibiotic properties of *Lactobacillus bervis*. J. Dairy Sci. Abstr. 29:3972.

33. Khedkar, C. D., J. M. Dave, and S. S. Sannabhadti. 1990. Antibacterial activity of human strains of *Lactobacillus acidophilus* grown in milk against selected pathogenic and spoilage type bacteria. Cult. Dairy Prod. J. 11:29- 31.

34. Klaenhammer, T. R., and E. G. Kleeman. 1981. Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial of *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 41(6):1461- 1467.

35. Kodama, R. 1952. Studies on lactic acid bacteria : Lactolin a new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria. J. Antibiot. 5:72.

36. Kulp, W. L., and L. F. Rettger. 1924. A comparative study of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bact. 9:357.

37. Lindgren, S., and G. Clevstrom. 1978. Antibacterial activity of lactic acid bacteria. 1. Activity of fish silage, a cereal starter and isolated organisms. Swedish J. Agric. Res. 8:61.

38. Mather, D. W., and F. J. Babel. 1959. Inhibition of certain types of bacterial spoilage in creamed Cottage cheese by the use of a creaming mixture prepared with *Streptococcus citrovorus*. J. Dairy Sci. 42:1917.

39. Mattick, A. T. R., and A. Hirsh. 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. Lancet. 253:5.

40. Metchnikoff, E. 1908, "The prolongation of life". 1st ed G. P. Putnam's Sons, New York, NY.

41. Mikolajcik, E. M., and I. Y. Hamdan. 1975. *Lactobacillus acidophilus* **I**. Growth characteristics and metabolic products. Cult. Dairy Prod. J. 10(1):10.

42. Mikolajcik, E. M., and I. Y. Hamdan. 1975. *Lactobacillus acidophilus* **II**. Antimicrobial agents. Cult. Dairy Prod. J. 10(1):18.

43. Muriana, P. M., and T. R. Klaenhammer. 1991. Purification and partial

characterization of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl. Environ. Microbiol. 57(1):114-121.

44. O'keefe, A. M., P. F. Fox, and C. Daly. 1976. Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in cheddar cheese. J. Dairy Res. 43:97-107.
45. Overdahl, B. J., and E. A. Zottola. 1991. Relationship between bile tolerance and the presence of a ruthenium red staining layer on strains of *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 74:1196-1200.
46. Oxford, A. E. 1944. Diplococcin, an antibacterial protein elaborated by certain milk streptococci. Biochem. J. 38:178.
47. Pinheiro, A. J. R., B. J. Liska, and C. E. Parmelee. 1968. Properties of substances inhibitory to *Pseudomonas fragi* produced by *Streptococcus citrovorus* and *Streptococcus diacetylactis*. J. Dairy Sci. 51(2):183.
48. Price, R. J., and J. S. Lee. 1970. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing *Lactobacilli*. J. Milk Food Technol. 33:13.
49. Pulusani, S. R., D. R. Rao, and G. R. Sunki. 1979. Antimicrobial activity of lactic cultures; Partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*. J. Food Sci. 44(2):575.
50. Reddy, S. G., R. L. Henrickson, and H. C. Olson. 1970. The influence of lactic cultures on ground beef quality. J. Food Sci. 35:787.
51. Sabine, D. B. 1963. An antibiotic effect of *Lactobacillus acidophilus*. Nature. 199:811.
52. Sandine, W. E. 1979. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. J. Food. Prot. 42(3):289-292.
53. Shahani, K. M., G. V. Reddy, B. A. Friend, and R. C. Chandan. 1983. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. **III**. Production and partial purification of bulgarican from *Lactobacillus bulgaricus*. Cult. Dairy Prod. J.

18:15.

54. Shahani, K. M., J. R. Vakil, and A. Kilara. 1976. Natural Antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. I. Cultural conditions for the production of antibiosis. Cult. Dairy Prod. J. 11(4):14.

55. Shahani, K. M., J. R. Vakil, and A. Kilara. 1977. Natural Antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. II. Isolation of Acidophilin from *L. acidophilus*. Cult. Dairy Prod. J. 12(2):8-11.

56. Shahani, K. M., J. R. Vakil, and R. C. Chandan. 1972. Antibiotic acidophilin and process for preparing the same. U. S. Pat No. 3,689,640. Sep. 5.

57. Sharma, N., and D. N. Gandhi. 1981. Preparation of acidophilin. I. Selection of the starter cultures. Cult. Dairy Prod. J. 5:6.

58. Sharma, N., and D. N. Gandhi. 1983. Preparation of acidophilin. II. Chemical bacteriological and sensory evaluation. Cult. Dairy Prod. J. 8:19.

59. Sorrells, K. M., and M. L. Speck. 1970. Inhibition of *Salmonella gallinorium* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. J. Dairy Sci. 53:239.

60. Stanley, R. G., and H. F. Wilson. 1974. Pollen biology, biochemistry. Management Springer New York.

61. Takashi, E. 1980. Honeybee science. 1(2):49-58.

62. Tramer, J. 1966. Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. Nature. 211:204.

63. Vincent, J. G., R. C. Veomett, and R. F. Riley. 1959. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. J. Bact. 78:477.

64. Vivino, A. E., and L. S. Palmer. 1944. The chemical composition and nutritional value of pollens collected by bees. Arch. Biochem. 4:129-136.

65. Wang, W. 1989. Study on the digestibility and absorptivity of unbroken-walle pollen. The XXXII nd International Congress of Apiculture. p. 56.

66 Watkins, B. A., B. F. Miller, and D. H. Neil. 1982. In vivo inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *E. coli* in gnotobiotic chicks. Poultry Sci. 61:1298-1308.

67. Wheater, D. M., A. Hirach, and A. T. R. Mattick. 1951. "Lactobacillin" An antibiotic from Lactobacilli. Nature 168:659.

68. Whitehead, H. R., and W. Riddet. 1933. Slow development of acidity in cheese manufacture. Investigation of a typical case of "non-acid" milk. New Zealand J. Agr. 46:225.

69. Whitehead, H. R. 1933. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. Biochem. J. 27:1793.

70. Yeo, Y. K., D. J. Philbrick, and B. J. Holub. 1989. Altered acyl chain composition of alkylacyl, alkenylacyl, and diacyl subclasses of choline and ethanolamine glycerophospholipids in rat heart by dietary fish oil. Biochimica Biophysica Acta. 1001:25-30.

71. Youssef, A. M., R. S. Farag, M. A. Ewies, and El-Shaka. 1978. Chemical studies on pollen collected by honeybee in Giza region, Egypt. J. Apicul. Res. 17(3):110-113.

72. Zajdel, J. K., P. Ceglowski, and W. T. Dobrzanski. 1985. Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. Appl. Environ. Microbiol. 49(4):969.

73. **강국희**, **신현청**. 1986. **유산균** *Bifidobacterium* **에 의한 항균성 물질생성**. **대한보건협회 학술대회 연제초록** p. 4.

74. **김동신**. 1983. **유산균의 항균작용에 관한 연구**. **경북대 농학지**. 1:169.

75. **김동신**. 1984. *Lactobacillus acidophilus* **가 생산한 항균물질에 관한 연구**. **대한수의학회지**. 24(2):149.

76. **김병각**, **박설희**, **천문호**, **최응칠**. 1988. **한국 시판 화분식품에 관한 연구**. Korean J. Food

Hygiene. 3(1):1-15.

77. 김재길. 1986. 화분하의 화학적 조성 및 아미노산 함량. 한국양봉학회지. 1(2):91-96.

78. 김정우, 신상철, 김병각. 1984. 건강식품으로서의 화분 제재에 관한 연구(제 1보). 생약학회지. 15(3):147-149.

79. 김정헌. 1987. 화분하의 성분조성에 관한 연구. 단국대학교 대학원 석사논문.

80. 농촌진흥청. 1986 : 식품성분표, 제 3개정판. 농촌영양개선연수원.

81. 류영수. 1988. 동의보감에 나타나는 꽃가루 (花粉)의 효능에 관한 고찰. 한국양봉학회지. 3(1):26-47.

82. 박소영, 고영태, 정후길, 양진오, 정현서, 김영배, 지근억. 1996. 유산균들의 콜레스테롤 저하성, 내산성, 내담즙성, 항생제 내성 비교. 산업미생물학회지. 24(3):304-310.

83. 박호용, 오현우, 한창훈, 장영덕. 1994. 대전지역의 늦은 봄 꿀벌의 화분수집활동. 한국양봉학회지. 9(2):137-143.

84. 보건사회부 : 보건사회부고시 제 1994-62호. 식품중 농약잔류 시험법. 1994. 12. 7.

85. 석귀덕, 김미경. 1982. 봉밀 및 화분하의 순도시험과 성분조사. 생약학회지. 14(4):197-200.

86. 성은찬. 1994. 화분단 이야기. 전국농업기술자협회출판부.

87. 손관수. 1982. 화분의 장간막 Mast cell에 미치는 영향. 고려대학교 대학원 석사논문.

88. 손진희. 1982. 화분이 조혈작용에 미치는 영향. 고려대학교 대학원 석사논문.

89. 신명수, 김용재, 배형석, 백영진. 1996. 유산균 투여가 건강한 성인의 분변미생물 및 부패산물 생성에 미치는 영향. 산업미생물학회지. 24(2):254-260.

90. 윤수홍, 안정임, 권정숙. 1985. 화분립의 영양생화학적 연구. 2. 해바라기 화분립의 아미노산 조성과 Rat 肝 Alcohol dehydrogenase 활성에 미치는 영향. J. Korean Soc. Food Nutr. 14(1):27-32.

91. 이봉우. 1989. Pollen Load의 가공 처리에 따른 화학 성분의 변화에 관한 연구. 중앙대학교 대학원 석사논문.

92. **이상태**, **박성우**, **김재길**. 1992. **한국산 5종 꿀의 화분 분석**. **한국양봉학회지**. 7(1):67-77.

93. **장윤환**, **최광수**, **조인호**, **신명재**. 1991. **한국산 대용화분의 화학성분 및 꿀벌 기호성 비교**. **한국양봉학회지**. 6(1):1-7.

94. **정영건**, **윤수홍**, **권정숙**, **배만종**. 1984. **화분립의 영양생화학적 연구**. 1. **해바라기 화분립의 지질 조성과** Mouse **肝臟 콜레스테롤 대사에 미치는 영향**. J. Korean Soc. Food Nutr. 13(2):169-174..

95. **최승윤** : **양봉학**, **서울대학교 출판부**.