

664.7
L 2938

최 종
연구보고서

어육연제품의 유통기간 연장을 위한 천연 식품보존료의 개발

Development of natural food preservatives
for fish meat paste products

연구기관

부 경 대 학 교



농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “어육연제품의 유통기간 연장을 위한 천연 식품보존료의 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 12. .

주관연구기관명: 부경대학교

총괄연구책임자: 장 동 석

연 구 원 : 이명숙, 조학래, 안성기
강재만, 이원동, 박미연
박육연, 정은탁, 이은우
임성미, 강지희, 왕성윤
김정은, 이선희

여 백

요 약 문

I. 제 목

어육연제품의 유통기간 연장을 위한 천연식품보존료 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

어육연제품은 그 특성상 100℃ 이상의 고온처리가 불가능하므로 내열성 포자형성 세균에 의한 부패를 방지할 수 없으며 또한 가열처리 후에 오염된 세균이나 곰팡이의 발생도 큰 문제점으로 남아 있다. 이로 인하여 특히 하절기에는 생산제품의 10% 이상이 반품·폐기되고 있어서 식량자원의 낭비로 인한 경제적 손실이 막대한 실정이다.

한편 식품의 저장수명을 연장시킬 목적으로 사용이 허가되어 있는 화학합성 보존료는 생산업자가 식품위생법상의 허용농도를 지키지 않을 수도 있을 뿐만 아니라 소비자들도 만성독성의 우려 때문에 이들 첨가물이 사용된 식품을 배제하려는 경향이 점점 강해지고 있다. 따라서 현재 업계에서는 화학합성 보존료 사용을 억제하든지 전혀 사용하지 않으면서 유통기간을 연장시키기 위하여 과잉살균을 행하거나 곰팡이의 발생을 억제시키기 위하여 튀김어묵을 진공포장한 후 소비자의 기호도를 높이기 위해 이를 다시 랩과 스티로폼으로 싸는 과대포장 등의 문제점이 있는 것도 사실이다.

그러므로 어육연제품의 유통기간을 연장시킬 수 있는 천연식품보존료

를 개발하는 것이 가치있는 일이며 아울러 기능성이 제고된 고부가가치 제품의 생산을 통해서 기업의 이윤을 극대화하고, 아울러서 어민소득의 증대와 제품의 국제 경쟁력 향상에도 크게 이바지 할 수 있을 것이므로 본 연구는 그 중요성이 큰 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 어육연제품의 변질에 관여하는 미생물 검색

시판되고 있는 게맛살, 판어묵, 튀김어묵 등에서의 미생물의 분포도를 조사하고, 실제로 부패된 어육연제품에서는 어떠한 미생물이 주종을 이루는가를 파악하여 그에 대한 대책을 수립한다.

2. 항균성 물질의 검색

각종 천연식물 추출물, 그리고 알긴산, 키토산 등 수산물과 관련된 물질이나 미생물 대사산물 등에서 항균성 또는 항균성과 기능성을 동시에 가지고 있는 물질을 검색하고 이들 중에서 어육연제품에 활용할 수 있는 항균성 물질을 선택한다.

3. 항진균성 물질의 특성 및 어육연제품에의 적용시험

어육연제품 중에서도 튀김어묵과 같이 표면에 발생하는 곰팡이 때문에 상품성이 조기에 상실되는 것을 방지하기 위하여 항진균성 물질을 개발하며, 이를 어육연제품에 첨가하였을 때 유통기간 연장이 가능한가를 검토하고 아울러 이 물질에 대해서 돌연변이 유발능 등 위생적 안전성도 함께 검토한다.

4. 알긴산 가수분해물을 이용한 식품보존료

기능성 소재인 알긴산의 간편한 가수분해법의 개발을 시도하고, 가수분해물의 항균성을 검토한다. 이를 실제 공장의 제품 생산에 적용시켜서 제조한 제품에 대해 유통기간 연장효과를 시험하고 생산공장에서 종사하고 있는 어육연제품 전문가를 모시고 제품의 물성이나 상품성을 검토한다.

5. 키토산 효소 분해물을 이용한 식품보존료

항균성을 비롯한 각종 기능성이 인정되고 있는 키토산을 효소분해시켜 저분자 키토산으로 만들어 기능성을 높인 다음, 이를 어육연제품에 첨가하여 실용화 방안을 검토한다. 즉 항균성이 높은 키토산 효소분해물을 어육연제품에 첨가하여 실제 생산공장에서 상품규모로 제조한 다음 어육연제품 관계전문가를 모시고 시식회를 통하여 제품의 물성과 상품성을 검토한다

6. 미생물 대사산물을 이용한 식품보존제

유산균이 생산하는 박테리오신의 생산조건, 특성 등을 검토하여 식품보존제로 사용할 수 있는지를 검토한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 어육연제품 부패 미생물의 분리 및 동정

- 1) 게맛살이나 판어묵과 같이 포장 후 가열처리한 어육연제품에서는 *Bacillus* sp.가 약 80%나 차지하여 중요 부패 원인 미생물이었으며, 효모나 곰팡이는 검출되지 않았다.
- 2) 튀김어묵과 같이 가열처리 후 포장을 하는 어육연제품에서는 Gram 양성 간균과 구균이 각각 40%, 28% 검출되었으며, 그 외 Gram 음성 간균과 곰팡이, 효모도 검출되었다.

나. 항진균성 물질의 검색

- 1) 계피 파쇄물을 ethyl alcohol로 추출한 다음 각종 유기용매로 계통분획한 결과, n-hexane 분획물이 항진균력이 제일 우수하였다. 이 분획물은 29 μ g의 농도로도 *Aspergillus oryzae*의 증식을 억제시킬 수 있었다.
- 2) 게맛살 등과 같이 진공포장한 흰 색깔의 어묵에 계피추출물을 첨가하였을 때에는 보존기간은 연장되었으나, 색깔, 탄력성 등 상품성에 문제가 있어서 실용화 하기는 곤란하였다. 그러나 튀김어묵의 표면에다 추출물과 ethyl alcohol을 1:3의 비율로 혼합하여 분무하면 ethyl alcohol만 분무한 대조구에 비하여 25℃에 보존시 2일 정도 보존기간이 연장되었으며, 제품의 상품성에도 별 문제가 없었다. 그리고 계피추출물을 대상으로한 돌연변이원성시

험에서도 안전성이 확인되어 식품첨가물로서 위생적으로 손색이 없음을 알 수 있었다.

다. 식품보존제로서의 알긴산 가수분해물

- 1) Na-alginate에 동량의 ascorbic acid를 섞은 후 물을 가하여 알긴산 4% 용액을 만든다. 이 용액을 121℃에서 30분간 가열하여 알긴산을 가수분해시킨 결과 상대점도 1.05, pH 3.2의 whitish-yellow color의 불투명한 용액을 얻었다.
- 2) 알긴산 가수분해물은 nutrient broth에 0.1% 첨가(가수분해물속의 알긴산의 양을 기준하여)로 어묵의 주요 부패균인 *Bacillus* sp.의 증식을 억제시킬 수 있었다.
- 3) 가수분해물의 어묵에 대한 첨가량은 제품의 탄력과 색깔 등을 고려하면 0.3% 이내였다. 어묵의 제조시 가수분해물을 0.3% 첨가하고 30℃에서 저장하였을 때, 가수분해물을 첨가하지 않은 제품에 비해 1일 가량 보존기간이 연장되었고, 20℃ 저장시에는 2일이, 15℃에서 저장하였을 때는 4일 가량 보존기간이 연장되는 것으로 나타났다.
- 4) 가수분해물을 첨가한 제품의 품질에 대해 업계의 전문가를 중심으로 한 상품성 평가 설문조사에서는 가수분해물을 첨가하여 제조한 제품의 맛과 향이 기존 제품에 비해 별 차이가 없다고 응답한 사람이 전체 응답자의 절반에 가까웠고, 고구마와 비슷한 맛이 감지된다는 사람이 30%였다. 가수분해물을 첨가한 제품의 원가 상승 요인이 5%이내라면 상품화가 가능하다는 답변이 전체 응답자의 60%로 나타났다.

라. 식품보존제로서의 키토산 효소 분해물

- 1) 키토산 분해효소 생산균의 탐색 결과, 토양으로 부터 *Aspergillus* CHS-1, *Penicillium* CHS-2, *Staphylococcus* CHS-3 및 *Bacillus* CHS-4 균주를 분리해 내었으며, 발효공업에서 사용되는 표준균주 중에서는 *Aspergillus oryzae* ATCC 22787이 가장 강한 키토산 분해효소를 생산하는 것을 밝혀내었다. 이 곰팡이는 안전성에 대해 아무런 문제가 없으므로 배양액을 여과하여 균체만 제거하면 고농도의 조효소액으로 바로 사용할 수 있으므로 산업적 이용을 위한 대량 생산시 경제성이 매우 높다고 할 수 있다.
- 2) 고분자 키토산은 효소분해가 진행되어 감에 따라 항균력이 증가하였는데, 2% 용액(30℃)의 점도가 10~5cP(상대점도 ; 1.06)에서 균증식 억제력이 가장 강하게 나타나 고분자 키토산에 비해 약 40배 가량 항균력이 증가하였다. 또한 키토산용액 특유의 짙은 맛도 키토산이 저분자화되어 감에 따라 현저하게 감소되었다. 그러나 점도 4.0cP 이하의 극히 저분자의 키토산은 항균력이 오히려 소실되었다.
- 3) 어묵에 효소분해물을 0.3% 첨가하고 30℃에서 저장하였을 때 저장기간이 무첨가구에 비해 2일 연장되었고, 20℃ 저장시에는 4일, 15℃ 저장시에는 6일 가량 연장되는 효과가 나타났다. 제품의 탄력은 조금 향상되는 바람직한 효과가 나타났으며, 맛에도 문제가 없었다.
- 4) 효소분해물을 첨가한 제품의 품질에 대해 업계의 전문가를 중심으로 한 상품성 평가 설문조사에서 가수분해물 첨가 제품의 맛과 향은 기존 제품에 비해 별 차이가 없다고 응답한 사람이 60%였다.
- 5) 키토산 효소분해물을 첨가하면 기존의 제품에 비해 원가 상승요인이 있지만 키토산의 기능성을 보유한 신제품으로 홍보하면 원가 상승요인을 상쇄할 수 있다고 판단되었다.

마. 식품보존제로서의 미생물 대사산물

1) 항균성 물질인 박테리오신을 생산하는 유산균을 분리하여 *Lactobacillus* sp. GM 7311로 명명하였다. 본 균이 생산한 박테리오신은 Gram 양성균과 음성균에 고른 항균력을 나타내었다.

2) 박테리오신의 활성은 산성측(pH 2.0~5.0)에서는 안정하였고, 열에 대한 안정성은 높아서 pH 5.0에서 100℃, 60분 가열에도 활성 변화가 없었다.

3) 공시균의 배양여액을 n-propanol-acetone처리, 이온 교환크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피를 이용해 박테리오신을 정제할 수 있었다.

4) 부분 정제된 박테리오신을 어묵에 100BU/g 되도록 첨가하고 25℃에서 저장하였을 때 30일 저장에도 생균수의 증가없이 보존할 수 있었다고, 제품의 맛과 냄새, 그리고 탄력도 별 문제가 없었다. 그러나 정제 수율이 극히 낮아 정제 박테리오신을 식품보존제로 사용하기에는 경제적인 부담이 상당히 커서 이를 해결하여야 하는 것이 과제로 남아있다.

바. 총괄 요약

이상의 연구 결과 중에서 중요한 내용만을 요약하면 다음과 같다.

- 1) 게맛살이나 판어묵과 같이 포장 후 가열처리한 어육연제품에서는 *Bacillus* sp.가 주 종으로 검출되었고, 튀김어묵과 같이 가열처리 후 포장을 하는 어육연제품에서는 각종 세균류는 물론이고 곰팡이도 검출되었다.
- 2) 튀김어묵에다 계피의 ethyl alcohol 추출물의 n-hexane 분획물을 표면에 분무시킴으로서 ethyl alcohol만 분무한 대조구에 비하여

25℃에 보존시 2일 정도 곰팡이의 발생을 지연시킬 수 있었다.

- 3) 유산균이 생산한 박테리오신의 항균력은 상당히 우수하여 식품 보존제로 활용할 가치가 있음은 확인되었으나 박테리오신 생산 단가가 너무 높아 실제 어육연제품에 활용하기에는 무리가 있었다.
- 4) 알긴산에 등량의 ascorbic acid를 첨가하고 가열처리 함으로서 가수분해시킬 수 있었는데, 가수분해물을 첨가하여 제조한 진공포장 어묵은 무첨가구에 비해 15℃에서 4일 가량 저장기간이 연장되었다.
- 5) 키토산은 *Aspergillus oryzae* ATCC 22787의 효소를 이용하여 가수분해시켰으며, 효소분해물을 첨가하여 제조한 진공포장 어묵은 저장기간이 무첨가구에 비해 15℃에서 6일 가량 연장되었다. 첨가 제품의 맛과 탄력적인 면에서도 알긴산 가수분해물의 경우보다 우수하였다.
- 6) 알긴산 가수분해물과 키토산 효소분해물을 어육연제품에 첨가하여 공장규모로 생산한 다음 공장현장에 종사하고 있는 전문가들을 모시고 시식회를 통하여 제품의 물성과 상품성을 검토한 결과 보존기간이 연장되는 것은 사실이나 원가상승요인이 발생하므로 기능성 식품임을 홍보하여 원가상승을 상쇄하는 것이 좋겠다는 권고를 받았다.

2. 활용에 대한 건의

가. 본 연구에서 개발된 항진균성 물질인 계피추출물은 계맛살이나 판어묵 같은 흰색 어육연제품에는 사용이 곤란하지만, 튀김어묵의 곰팡이 발육 억제제로 사용 가능하며, 빵에서도 곰팡이 발육억제제로 사용 가능하므로 제빵업계에도 사용을 권장할 수 있다.

나. 키토산 효소분해물과 알긴산 가수분해물은 어육연제품에 첨가하였을 때 보존기간은 확실히 연장되는데 기존 제품에 비하여 원가 상승 요인이 있다. 따라서 이들 물질의 기능성을 집중적으로 부각시켜 기능성의 신제품으로 홍보하여야 원가 상승요인을 상쇄할 수 있다고 판단된다.

다. 키토산 효소분해물과 알긴산 가수분해물은 어육연제품 이외의 각종 식품의 보존료로도 활용 가능하며, 각종 기능성 식품의 소재로도 이용 가능하다.

Summary

Title : Development of natural food preservatives for fish meat paste products

Fish meat paste products are one of the most popular fisheries processing foods and also the amount of their domestic consumption and export to foreign countries have been increasing year by year in Korea. According to the statistical report by the Korea Fisheries Association, annual production amount of fish meat paste products was reached over than one hundred thousand metric tons since 1994.

To improve the quality of fish meat paste products is very important not only for the domestic consumption but also competition with foreign products under the World Trade Organization (WTO) system.

In manufacturing fish meat paste products, it is currently difficult to rise up the heating temperature above 100°C for keeping their specific properties. Residual heat resistant bacterial spores are main cause of spoilage and about 10% of the distributed products has been returned unsold from the market in every summer season.

Therefore, it is one of the urgent problems to protect from the microbial spoilage and food poisoning. While most of the consumers dislike the food containing synthetic chemical preservatives. In this study, authors attempted to develop natural food preservatives for

extension the distribution period of fish meat paste products. Furthermore, we tried to improve the body modulating function of fish meat paste product by adding natural food additives. The results are as follows.

Microbiological distribution of spoiled fish meat products according to the experimental results. *Bacillus* sp. was predominant bacteria as about 80% in vacuum packed heated fish meat paste product but molds and yeasts are not detected. While the products packaged after heat treatment such as fried fish meat paste, contained not only bacteria but also molds and yeasts.

Among the items checked antimicrobial activities, most of the materials submitted to this study have strong antimicrobial activity against Gram positive bacteria but weak against Gram negative bacteria.

While n-hexane fraction from ethanol extract of cinnamomi cortex (*Cinnamomum cassia* Blume) has pretty strong antifungal activity, so authors sincerely suggest that the extract can be used to prohibit the growth of molds on the surface of fried fish meat paste product.

Alginic acid hydrolysate was obtained by heating the sodium alginate with ascorbic acid at 121°C for 30min. The distribution period was prolonged by 4days at 15°C by adding 0.3% of the alginic acid hydrolysate to the fish meat paste products.

The authors found out that *Aspergillus* sp. has the activity to produce a pretty strong chitosanase, and then the enzyme produced by the reference strain, *A. oryzae* ATCC 22787, was used for

preparing the chitosan hydrolysate with high antimicrobial activity.

The antimicrobial activity of the chitosan hydrolysate was increased gradually with decreasing of viscosity of the solution.

The chitosan hydrolysate showing viscosity 5~10cP of 2% solution was revealed the most strong antimicrobial activity. The growth of the *Bacillus* sp. isolated from the fish meat paste was inhibited with the concentration of 20ppm. The astringent taste of chitosan solution was reduced with decreasing of viscosity of the solution.

Furthermore, it has been known that low molecular weight of chitosan hydrolysate has many body modulating functions. It is known that low molecular weight of chitosan hydrolysate has almost no toxicity inspite of its potential activities such as antitumor and anticholesterol activities.

Therefore, authors are willing to recommend to use the chitosan hydrolysate as a food preservative. The authors checked the quality of chitosan added fish meat paste product which made practically in a manufacturing plant.

Heat treated after vacuum packaged fish meat paste products containing 0.3% chitosan hydrolysate was extended its shelf life by 2 days at 30°C or 6days at 15°C.

The bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp. GM 7311 showed strong inhibitory activity against bacteria, but it is currently difficult to use as a food preservative for its high purification cost.

목 차

요 약 서	3
영문요약	12
목 차	15
영문목차	19
표 목 차	23
그림목차	30
제 1 장 서 론	39
제 1 절 연구 개발 목표	41
1. 개발의 필요성	41
2. 연구 개발 목적과 범위	41
제 2 장 어육연제품 부패미생물 분리 및 동정	45
제 1 절 서 론	45
제 2 절 재료 및 방법	46
1. 실험재료	46
2. 실험방법	46
제 3 절 결과 및 고찰	47
제 4 절 요 약	50
제 3 장 항진균성 물질의 검색 및 어육연제품에의 활용	55
제 1 절 서 론	55
제 2 절 재료 및 방법	57
1. 실험재료	57
2. 실험방법	61
제 3 절 결과 및 고찰	67
1. 계피로부터 에탄올추출한 항균성물질의 추출회수별 항균력	67

2. 에탄올추출물의 계통분획별 항균효과	69
3. 헥산분획물의 분획횟수별 항균효과	71
4. 항진균성물질의 분리·정제 및 구조해석	71
5. 헥산분획물의 안정성	71
6. 각종 미생물에 대한 항균력	75
7. 헥산분획물의 천연식품보존료로서의 이용	81
8. 계피추출물의 위생적 안전성	84
제 4 절 요약	89
제 4 장 식품보존제로서의 알긴산 가수분해물	93
제 1 절 서론	93
제 2 절 재료 및 방법	95
1. 실험재료	95
2. 실험방법	95
제 3 절 결과 및 고찰	99
1. 가수분해물의 제조 및 성상	99
2. 가수분해물의 항균력	99
3. 첨가제품의 관능 평가	99
4. 가수분해물의 어묵 보존효과	102
5. 가수분해물을 첨가한 제품의 저장중 관능적 품질변화	103
6. 가수분해물을 첨가한 제품의 품질에 대한 전문가의 상품성 평가	108
제 4 절 요약	111
제 5 장 식품보존제로서의 Chitosan 효소분해물	115
제 1 절 서론	115
제 2 절 재료 및 방법	118
1. 실험재료	118
2. 실험방법	119
제 3 절 결과 및 고찰	126

1. 키토산 분해효소 생산균의 탐색	126
2. 효소의 생산	129
3. 키토산 용액의 효소분해	130
4. 가수분해반응에 따른 키노산의 기능성 변화	130
5. 키토산 효소분해물의 주요 식품 미생물에 대한 항균력	133
6. 키토산 효소분해물의 성상	136
7. 효소분해물 첨가 제품의 관능 평가	136
8. 어묵 보존 효과	139
9. 효소분해물을 첨가한 제품의 저장중 관능적 품질변화	139
10. 효소분해물을 첨가한 제품의 품질에 대한 전문가의 상품성 평가	139
제 4 절 요약	148
제 6 장 식품보존제로서의 미생물 대사산물	153
제 1 절 서론	153
제 2 절 재료 및 방법	154
1. 유산균의 분리 및 동정	154
2. 조박테리오신의 생산	155
3. 항균력 측정방법	155
4. 박테리오신의 생성 최적조건 검토	156
5. 박테리오신의 특성 조사	156
6. Sensitive strain에 대한 억제 작용	156
7. 전자현미경으로 세포형태 관찰	157
8. 세포의 아미노산 조성	157
9. 박테리오신의 정제	158
10. 어육연제품에 응용실험	159
제 3 절 결과 및 고찰	159
1. 유산균의 박테리오신 생산배지 최적화	159
2. 박테리오신의 특성과 작용형태	163
3. 박테리오신의 정제	174

4. 어육연제품에 응용	177
제 4 절 요 약	185
제 7 장 결 론	189
참고문헌	191

CONTENTS

SUMMARY (in Korean)	3
SUMMARY (in English)	12
CONTENTS (in Korean)	15
CONTENTS (in English)	19
List of Tables	23
List of Figures	30
Chapter 1. Introduction	39
Section 1. Research purposes	41
1. Significance of research	41
2. Contents of research	41
Chapter 2. Identification of spoilage microorganisms in fish meat paste product	45
Section 1. Introduction	45
Section 2. Materials and methods	46
1. Materials	46
2. Laboratory methods	46
Section 3. Results and discussion	47
Section 4. Summary	50
Chapter 3. Antifungal substance extracted from cinnamomi cortex and its utilization	55
Section 1. Introduction	55
Section 2. Materials and methods	57
1. Materials	57

2. Laboratory methods	61
Section 3. Results and discussion	67
1. Antimicrobial activities of the ethanol extracts from the cinnamomi cortex by its extraction frequency	67
2. Antimicrobial activities of various solvents fraction from cinnamomi cortex ethanol extract	69
3. Antimicrobial activities of <i>n</i> -hexane fraction by its fraction frequency	71
4. Purification of antifungal substance and its structural analysis	71
5. Stability of <i>n</i> -hexane fraction from the extracts	71
6. Antimicrobial activities of the extracts against various microorganisms	75
7. Utilization of the <i>n</i> -hexane fraction as a food preservative	81
8. Sanitary safety of the extracts	84
Section 4. Summary	89

Chapter 4. Utilization of alginic acid hydrolysate as a food preservative

Section 1. Introduction	93
Section 2. Materials and methods	95
1. Materials	95
2. Laboratory methods	95
Section 3. Results and discussion	99
1. Preparation of alginic acid hydrolysate	99
2. Antimicrobial activity of alginic acid hydrolysate	99
3. Sensory evaluation of fish meat paste product added alginic acid hydrolysate	99
4. Preservative effect of alginic acid hydrolysate on fish meat paste product	102

5. Quality change of fish meat paste product added alginic acid hydrolysate during the storage period	103
6. Industrial utilization of alginic acid hydrolysate on fish meat paste product	108
Section 4. Summary	111

Chapter 5. Utilization of chitosan hydrolysate

as a food preservative	115
Section 1. Introduction	115
Section 2. Materials and methods	118
1. Materials	118
2. Laboratory methods	119
Section 3. Results and discussion	126
1. Antimicrobial activity of chitosan hydrolysate	126
2. Production of chitosanase	129
3. Enzymatic hydrolysis of chitosan solution	130
4. Change of properties of chitosan hydrolysate	130
5. Antimicrobial activity of chitosan hydrolysate against food spoilage microorganisms	133
6. Properties of chitosan hydrolysate	136
7. Sensory evaluation of the product added chitosan hydrolysate	136
8. Preservation effect of chitosan hydrolysate on fish meat paste product	139
9. Quality change fish meat paste product added chitosan hydrolysate	139
10. Industrial utilization of chitosan hydrolysate on fish meat paste product	139
Section 4. Summary	148

Chapter 6. Microbial metabolites	
as a food preservative	153
Section 1. Introduction	153
Section 2. Materials and methods	154
1. Isolation of <i>Lactobacillus</i> sp.	154
2. Production of bacteriocin	155
3. Antimicrobial activity	155
4. Optimum condition of bacteriocin production	156
5. Characteristics of bacteriocin	156
6. Inhibition effect on susceptible strain	156
7. Observation of cell shape by electromicroscope	157
8. Amino acid analysis	157
9. Purification of bacteriocin	158
10. Utilization as a food preservative	159
Section 3. Results and discussion	159
1. Optimum condition for bacteriocin production	159
2. Characteristics of bacteriocin	163
3. Purification of bacteriocin	174
4. Utilization as a food preservative	
on fish meat paste product	177
Section 4. Summary	185
Chapter 7. CONCLUSION	189
References	191

표 목 차

표 2-1. 시판되고 있는 어육 연제품에 대한 미생물 분석결과	47
표 2-2. 생산공장에서 가열처리 전후의 생균수 비교	48
표 2-3. 부패한 튀김어묵에서의 미생물 분포상황	49
표 2-4. 부패한 게맛살에서 분리된 미생물 분포	50
표 3-1. 항균성 측정에 사용된 균주의 목록	59
표 3-2. 부패한 어육연제품에서 분리된 미생물	60
표 3-3. 시험에 제공된 어육연제품의 조성	65
표 3-4. 계피로부터 에탄올 추출 횟수에 따른 항균력	68
표 3-5. 계피로부터 추출한 용액의 항진균력	69
표 3-6. 계피의 알콜 추출물의 용매별 분획물의 항균력	70
표 3-7. 계피의 <i>n</i> -hexane 분획회수에 따른 <i>Aspergillus oryzae</i> 에 대한 항균력 비교	72
표 3-8. 계피로부터 추출한 에탄올 추출물과 <i>n</i> -hexane 분획물의 <i>Aspergillus oryzae</i> 에 대한 항균력 비교	72
표 3-9. 가열처리 후 포장하는 튀김어묵에 대한 미생물 실험결과	77
표 3-10. 진공포장된 부패 게맛살에 대한 미생물 분포 경향	77
표 3-11. <i>n</i> -hexane 분획물의 각종 표준미생물에 대한 최저 증식농도	79
표 3-12. 부패한 어육연제품에서 분리한 각종 미생물에 대한 <i>n</i> -hexane 분획물의 최저 발육저지 농도	80
표 3-13. <i>n</i> -hexane 분획물을 튀김어묵에 분무했을 때 분무농도에 따른 곰팡이 발생 경향(25℃ 저장)	83
표 4-1. 시험에 사용된 어묵의 배합 비율	96
표 4-2. 시제품 시식회에 참석한 주요 생산업체의 전문가 명단	98
표 4-3. 알긴산 가수분해물의 성상	101

표 4-4. 알긴산 가수분해물의 항균력	102
표 4-5. 알긴산 가수분해물을 첨가한 제품의 관능적 품질평가	103
표 4-6. 알긴산 가수분해물을 첨가한 제품의 20℃저장중 파단강도의 변화	103
표 4-7. 알긴산 가수분해물을 첨가한 제품의 20℃저장중 색택의 변화	104
표 5-1. 키토산 분해효소 생산균 분리용 배지	120
표 5-2. 항균력 측정용 배지의 조성	120
표 5-3. 토양에서 분리한 키토산 분해활성을 보유한 곰팡이의 특성	127
표 5-4. 토양에서 분리한 키토산 분해활성을 보유한 세균의 특성	128
표 5-5. 토양에서 분리한 키토산 분해활성을 보유한 미생물의 균체의 키토산 분해효소의 활성도 조사	128
표 5-6. 발효공업에 사용되는 <i>Aspergillus</i> sp.의 표준균주를 대상으로한 균체의 키토산 분해효소의 활성도 조사	129
표 5-7. 키토산 분해효소 생산용으로 개발된 배지의 조성	130
표 5-8. 키토산 용액(2% 용액)의 점도 저하에 따른 용액의 MIC와 씹은맛의 강도 비교	134
표 5-9. 키토산 가수분해물의 각종 세균에 대한 증식억제 최소농도(MIC)	135
표 5-10. 키토산 가수분해물의 각종 효모에 대한 증식억제 최소농도(MIC)	137
표 5-11. 키토산 가수분해물에 의한 곰팡이의 증식억제 경향	137
표 5-12. 키토산 가수분해물의 성장	138
표 5-13. 키토산 가수분해물을 첨가한 제품의 관능적 품질평가	138
표 5-14. 키토산 가수분해물을 첨가한 제품의 20℃저장중 파단강도의 변화	143
표 5-15. 키토산 가수분해물을 첨가한 제품의 20℃저장중	

색택의 변화	143
표 6-1. 박테리오신 생산균주의 배양상층액의 항균패턴	160
표 6-2. <i>Lactobacillus</i> sp. GM 7311이 생산한 박테리오신의 활성에 미치는 유기용매의 영향	164
표 6-3. 박테리오신으로 처리한 미생물의 아미노산 조성변화	173
표 6-4. <i>Lactobacillus</i> sp. GM 7311이 생산한 박테리오신의 정제	174
표 6-5. 박테리오신 첨가시의 어육연제품에서의 생균수 변화	183
표 6-6. 정제된 박테리오신과 정제되지 않은 박테리오신을 어육연제품에 첨가했을 때 관능검사 결과비교	183

List of tables

Table 2-1. Microbiological quality of fish meat paste product distributed in the markets	47
Table 2-2. Comparison of viable cell count between before and after heat treatment of fish meat paste product at the manufacturing plant	48
Table 2-3. Distribution pattern of microorganisms in spoiled fried fish meat paste product	49
Table 2-4. Distribution pattern of microorganisms in spoiled modified crab meat	50
Table 3-1. List of microorganisms submitted for antimicrobial activity test	59
Table 3-2. List of the isolated microorganisms from the spoiled fish meat paste product	60
Table 3-3. Composition of the fish meat paste products used in this study	65
Table 3-4. Antimicrobial activities of the ethanol extract from cinnamomi cortex under different extraction frequency against various microorganisms	68
Table 3-5. Antimicrobial activities of mixture of ethanol extracts form cinnamomi cortex against fungi	69
Table 3-6. Antimicrobial activities of each solvent fractions of ethanol extract from cinnamomi cortex	70
Table 3-7. Comparison of antimicrobial activities of <i>n</i> -hexane fraction from the ethanol extract form cinnamomi cortex by fraction frequency	72

Table 3-8. Comparison of antimicrobial activities against <i>Aspergillus oryzae</i> between ethanol extract and <i>n</i> -hexane fraction of the extract	72
Table 3-9. Microbial experimental results of spoiled unpackaged fried fish meat paste	77
Table 3-10. Microbial experimental results of spoiled vacuum packaged imitation crab meat	77
Table 3-11. Minimum inhibitory concentration(MIC) of the <i>n</i> -hexane fraction from the cinnamomi cortex on the growth of reference microorganisms	79
Table 3-12. Minimum inhibitory concentration(MIC) of the <i>n</i> -hexane fraction from the cinnamomi cortex ethanol extract on the growth of various microorganisms isolated from spoiled fish meat paste products	80
Table 3-13. Molds spoilage pattern of fried fish meat paste products sprayed with <i>n</i> -hexane fraction by the sprayed concentration of <i>n</i> -hexane fraction on the surface of the products during the storage at 25°C	83
Table 4-1. Ingredients of the fish meat paste products submitted to this study	96
Table 4-2. List of sensory evaluation experts, working at the major fish meat paste product manufacturing plants	98
Table 4-3. Characteristics of the alginic acid hydrolysate	101
Table 4-4. Antimicrobial activity of the alginic acid hydrolysate	102
Table 4-5. Sensory evaluation results of the fish meat paste product added alginic acid hydrolysate	103

Table 4-6. Change of elastic properties of the fish meat paste product added alginic acid hydrolysate(at 20°C)	103
Table 4-7. Color change of the fish meat paste product added with alginic acid hydrolysate(at 20°C)	104
Table 5-1. Medium for the microorganisms which can produce chitosanase	120
Table 5-2. Medium for the checking antimicrobial activity	120
Table 5-3. Characteristics of the chitosanase producing mold isolated from soil	127
Table 5-4. Characteristics of the chitosanase producing bacteria isolated from soil	128
Table 5-5. The activity of the exochitosanase produced by the isolated microorganisms	128
Table 5-6. The activity of the exochitosanase produced by the reference strain <i>Aspergillus</i> sp.	129
Table 5-7. Composition of the medium for chitosanase production	130
Table 5-8. Change of MIC and astringent taste by decreasing viscosity of the chitosan solution	134
Table 5-9. Minimal inhibition concentration of the chitosan hydrolysate against various bacteria	135
Table 5-10. Minimal inhibition concentration of the chitosan hydrolysate against various yeasts	137
Table 5-11. Minimal inhibition concentration of the chitosan hydrolysate against various molds	137
Table 5-12. Properties of the chitosan hydrolysate	138
Table 5-13. Sensory evaluation results of the fish meat paste product added chitosan hydrolysate	138

Table 5-14. Change of elastic properties of the fish meat paste products added chitosan hydrolysate	143
Table 5-15. Color change of the fish meat paste product added chitosan hydrolysate	143
Table 6-1. Inhibitory spectrum of the culture supernatant from bacteriocin producing strains	160
Table 6-1. Effect of organic solvent of the activity of bacteriocin that produced by <i>Lactobacillus</i> sp. GM7311	164
Table 6-3. Comparison of amino acid composition(%) of microorganisms treated with the bacteriocin(100BU/ml, 24hrs) from the <i>Lactobacillus</i> sp.GM 7311	173
Table 6-4. Purification of bacteriocin produced by <i>Lactobacillus</i> sp. GM7311	174
Table 6-5. Comparison of viable cell counts on the fish meat paste stored at 25°C	183
Table 6-6. Sensory properties of fish meat paste contained with crude bacteriocin and purified bacteriocin	183

그림 목 차

그림 3-1. 계피의 에탄올 추출물에 대한 용매별 계통분획 과정도	63
그림 3-2. 계피로부터 추출정제된 Cinnam aldehyde의 구조	73
그림 3-3. <i>n</i> -hexane분획물의 <i>Aspergillus oryzae</i> 에 대한 항균력의 pH 안정성	74
그림 3-4. <i>n</i> -hexane분획물의 <i>Aspergillus oryzae</i> 에 대한 항균력의 열안정성	76
그림 3-5. 계맛살에 계피의 <i>n</i> -hexane분획물을 첨가했을 때의 세균 발육경향	82
그림 3-6. 계피의 <i>n</i> -hexane추출물에 대한 첨가농도별 돌연변이원성	86
그림 3-7. 벤조피렌 첨가농도에 따른 돌연변이원성	87
그림 3-8. 계피의 <i>n</i> -hexane분획물의 농도별 항 돌연변이원성	88
그림 4-1. 알긴산의 화학 구조	94
그림 4-2. 알긴산 가수분해물의 제조방법	101
그림 4-3. 알긴산 가수분해물을 함유한 어묵을 30℃에 저장하였을 때 저장시간경과에 따른 생균수 및 pH의 변화	105
그림 4-4. 알긴산 가수분해물을 함유한 어묵을 20℃에 저장하였을 때 저장시간경과에 따른 생균수 및 pH의 변화	106
그림 4-5. 알긴산 가수분해물을 함유한 어묵을 15℃에 저장하였을 때 저장시간경과에 따른 생균수 및 pH의 변화	107
그림 4-6. 알긴산 가수분해물을 첨가한 제품의 품질에 대한 전문가의 상품성 평가(A,B)	109
그림 5-1. Chitosan의 화학구조	118
그림 5-2. 키토산 분해효소 생산균의 분리법	122

그림 5-3. 키토산 분해효소의 활성화도 측정법	123
그림 5-4. 키토산 효소분해물의 제조방법	125
그림 5-5. <i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 22787가 생산한 키토산 분해효소의 반응 최적온도	131
그림 5-6. 키토산용액의 효소적 분해 경향	132
그림 5-7. 키토산 효소분해물을 함유한 어묵을 30℃에 저장하였을 때 저장시간 경과에 따른 생균수 및 pH의 변화	140
그림 5-8. 키토산 효소분해물을 함유한 어묵을 20℃에 저장하였을 때 저장시간 경과에 따른 생균수 및 pH의 변화	141
그림 5-9. 키토산 효소분해물을 함유한 어묵을 15℃에 저장하였을 때 저장시간 경과에 따른 생균수 및 pH의 변화	142
그림 5-10. 키토산 효소분해물을 첨가한 제품의 품질에 대한 전문가의 상품성 평가(A,B)	144
그림 5-11. 개발한 천연식품보존료를 첨가한 시제품의 시식 및 평가회 전경(A,B)	146
그림 6-1. <i>Lactobacillus</i> sp. GM7311의 증식경향과 이 균이 생산한 박테리오신의 활성화변화	162
그림 6-2. <i>Lactobacillus</i> sp. GM7311이 생산한 박테리오신의 활성화에 미치는 pH의 영향	162
그림 6-3. <i>Lactobacillus</i> sp. GM7311이 생산한 박테리오신의 열안정성	164
그림 6-4. 박테리오신 첨가 시기에 따른 <i>Proteus mirabilis</i> 의 생산 경향	166
그림 6-5. 박테리오신 첨가 시기에 따른 <i>Bacillus subtilis</i> 의 생산 경향	167
그림 6-6. 박테리오신 첨가 시기에 따른 <i>Listeria monocytogenes</i> 의 생산 경향	169

그림 6-7. <i>Lactobacillus</i> sp.GM7311이 생산한 박테리오신으로 처리한 미생물의 전자현미경 사진	170
그림 6-8. 조박테리오신의 CM cellulose의 분획패턴	171
그림 6-9. 부분정제된 박테리오신의 Sephacryl HR 100 분획 패턴	176
그림 6-10. 첨가된 박테리오신의 농도에 따른 <i>Listeria monocytogenes</i> 의 온도별 균수 변화	180
그림 6-11. 어육 연제품 마쇄육에 첨가한 박테리오신의 양이 균의 증식에 미치는 영향	181

List fo figures

Figure 3-1 Procedure of solvent fractionation for ethanol extract from cinnamon bark.	63
Figure 3-2 Structure fo Cinnamaldehyde purified from cinnamomi cortex	73
Figure 3-3 Change of antimicrobial activity of <i>n</i> -hexane fraction of cinnamon extract on the growth of <i>Aspergillus oryzae</i> by pH	74
Figure 3-4 Heat stability fo n-hexane fraction from cinnamon extract against <i>Aspergillus oryzae</i>	76
Figure 3-5 Changes of the viable cell counts of imitation crab meat containing cinnamon extract during storage at 25°C	82
Figure 3-6 Mutagenicity of cinnamon extract at various concentrations	86
Figure 3-7 Mutagenicity against benzo(α)pyrene at various concentrations	87
Figure 3-8 Desmutagenicity of cinnamon extract at various concentrations	88
Figure 4-1 Chemical structure of alginic acid	94
Figure 4-2 Preparation scheme of alginic acid hydrolysate	101
Figure 4-3 Change of viable cell count and pH of the fish meat paste product added alginic acid hydrolysate during the storage at 30°C	105
Figure 4-4 Change of viable cell count and pH of the fish meat paste product added alginic acid hydrolysate during the storage at 20°C	106

Figure 4-5 Change of viable cell count and pH of the fish meat paste product added alginic acid hydrolysate during the storage at 15°C	107
Figure 4-6 Sensory evaluation results of the fish meat paste products added alginic acid hydrolysate(A,B)	109
Figure 5-1 Chemical suture of chitosan	118
Figure 5-2 Isolation scheme of chitosanase producing miroorganisms ..	122
Figure 5-3 Measuring method of chitosanase activity	123
Figure 5-4 Preparation scheme of chitosan hydrolysate	125
Figure 5-5 Optimun temperature for the chitosanase produced by <i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 22787	131
Figure 5-6 Enzymatic hydrolyzing pattern of chitosan solution	132
Figure 5-7 Change of viable cell count and pH of the fish meat paste product added chitosan hydrolysate during the storage at 30°C	140
Figure 5-8 Change of viable cell count and pH of the fish meat paste product added chitosan hydrolysate during the storage at 20°C	141
Figure 5-9 Change of viable cell count and pH of the fish meat paste product added chitosan hydrolysate during the storage at 15°C	142
Figure 5-10 Sensory evaluation results of the fish meat paste product added chitosan hydrolysate(A,B)	144
Figure 5-11 Scene of exhibition meeting and sensory evaluation for the manufactured fish meat paste product added alginic acid hydrolysate and chitosan hydrolysate(A,B)	146

Figure 6-1 Change of cell density and activity of bacteriocin produced by <i>Lactobacillus</i> sp. GM7311	162
Figure 6-2 Effect of pH on the activity of bacteriocin produced by <i>Lactobacillus</i> sp. GM7311	162
Figure 6-3 Heat stability of bacteriocin produced by <i>Lactobacillus</i> sp. GM7311	164
Figure 6-4 Survival curves of <i>Proteus mirabilis</i> by the addition of bacteriocin(100BU/ml) to growing cultures at different phase	166
Figure 6-5 Survival curves of <i>Bacillus subtilis</i> by the addition of bacteriocin(100BU/ml) to growing cultures at different phase	167
Figure 6-6 Survival curves of <i>Listeria monocytogenes</i> by the addition of bacteriocin(100BU/ml) to growing cultures at different phase	169
Figure 6-7 Transmission electron micrographs of microorganisms treated with bacteriocin produced by <i>Lactobacillus</i> sp.GM7311	170
Figure 6-8 Elution profile of crude bacteriocin on CM cellulose column chromatography	171
Figure 6-9 Elution profile of patially purified bacteriocin with Sephacryl HR 100 column chromatography	176
Figure 6-10 Effects of added amount of bacteriocin on the growth of <i>Listeria monocytogenes</i> (10 ² /ml) in TSB	180
Figure 6-11 Effect of added amount of bacteriocin on the growth of viable cell counts in the homogenates of fish meat paste at various temperature	181

여 백

제 1 장 서 론

여 백

제 1 장 서 론

어육 연제품은 어육에 소량의 식염을 가하여 고기같이하여 얻은 연육을 가열하여 gel화 한 제품을 말한다. 연제품은 어종이나 어체의 크기에 관계없이 원료의 사용범위가 넓고, 맛의 조절이 자유롭고, 어떤 소재라도 배합이 가능하며, 외관·향미 및 물성이 어육과는 다르고, 바로 섭취할 수 있어서 일반 수산가공식품과는 다른 특징을 가지고 있다.

최근에 식생활이 다양화되고 가공기술이 발달함에 따라 게맛 어묵 등 신제품이 등장하여 연제품의 수요가 많이 증가하고 있으나, 세계 각국의 200해리 경제수역의 선포, 어업 규제 강화, 입어료의 상승 등으로 인하여 원료 사정의 악화 특히 명태 냉동연육이 주원료로 되고 있는 연제품 업계에서는 안정적인 원료 확보의 어려움과 냉동연육 단가의 상승으로 잠재적인 성장 가능성에도 불구하고 많은 어려움을 안고 있다.

또한 최근에는 수산물의 소비가 부진하였던 구미 제국에서도 어패류의 식용화 촉진수단으로서, 또는 수산물의 유효이용의 한 방법으로서 연제품에 대한 관심이 높아져 연제품은 이제 조립식품시대의 세계적인 식품으로 각광을 받고 있다(加藤, 1990; 西川, 1992, 伊藤, 1992; 朴 등, 1997).

우리나라 어육 연제품의 생산은 1980년도에는 13,136 M/T이었으나 그 이후로 급격히 신장하여 1994년부터 100,000 M/T 이상을 생산하고 있어 수산가공품 중 냉동식품 다음으로 그 생산량이 많으며 국내 수산가공업을 주도하여 왔다(韓國水産會, 1996).

어육 연제품에는 품질개선이나 증량의 목적으로 전분이나 식물성 단백질 등이 사용되고 있으며, 이들 부재료는 그 종류와 첨가비율에 따라 연제품의 물성이 달라지므로 부재료의 선택과 첨가량 결정은 연제품의 품질에 미치는 영향을 고려할 때 대단히 중요하다(山内, 1979; Cassen et

al., 1975).

이제까지의 식품은 1차적인 영양기능, 2차적인 감각기능 등 두가지 가치관에서 논의되어 왔다. 그런데 최근에는 식품 중에 포함되어 있는 특정의 소량 물질이 생체조절기능(3차 기능)을 가지고 있음이 밝혀짐에 따라 이러한 식품은 기능성 식품으로서 각광을 받게 되었다. 이와 관련하여 기능성 물질인 DHA(docosahexaenoic acid), alginic acid, chitosan 등은 인체 내에서의 생리적 작용이 잇달아 밝혀지면서 식품에의 이용 가능성도 급격히 증대되었다(稻嶺 등, 1984; Sanders, 1986; Sugano, 1988; Galli et al., 1989; 류, 1992; 전과 김, 1997).

한편 어육 연제품은 부패하기 쉬운 가공품인데도 현재 많은 양의 제품이 무포장 또는 간이 포장상태로 유통되고 있고 포장제품에서도 여름철에는 세균학적 변질이 흔히 일어나고 있어 이에 대한 효과적 위생관리가 요망되고 있으며 일본에서도 어육 연제품으로 인한 식중독 사고가 자주 보고되고 있다(岡田 등, 1974; 東島, 1979). 그리고 어육 연제품은 그 특성상 100℃ 이상의 고온처리가 불가능하므로 내열성 포자형성 세균에 의한 부패를 방지할 수 없으며, 또한 가열살균 후에 오염된 곰팡이의 발생도 큰 문제점으로 남아 있다.

이로 인하여 특히 하절기에는 생산 제품의 10~20%까지나 반품·폐기되고 있어서 연간 약 150 억원에 상당하는 식량자원이 낭비되고 있는 실정이다.

뿐만 아니라 식품의 저장 수명을 연장시킬 목적으로 현재 식품 위생법상 사용이 허가되어 있는 화학합성 보존료에 대하여는 기준 사용량 준수도 문제거리와 만성독성의 우려 때문에 소비자들은 이들 첨가물이 사용된 식품을 배제하려는 경향이 점점 강해지고 있다. 그래서 실제로 게맛살 제품에는 아무런 보존료를 사용하지 않고 있는 실정이다.

또한 튀김어묵의 경우, 곰팡이 발생에 대처하기 위하여 제품의 표면에 알콜 분무를 실시하기도 하지만 별 효과가 없는 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 어육 연제품의 품질 보존기간을 연장할 수 있는 천연 보존료를 개발하고 아울러 기능성 향상도 기하고자 본 연구를 수행하게 되었다.

제 1 절 연구 개발 목표

1. 개발의 필요성

- 가. 어육 연제품은 그 특성상 세균의 내열성 포자를 살균하기 어렵다.
- 나. 화학 합성 보존료에 대한 거부감이 증대되고 있다.
- 다. 여름철 세균에 의한 부패 및 곰팡이의 발육으로 반품·폐기되는 양이 많아 경제적 손실이 크다.
- 라. 천연 식품 보존료 개발하여 제품의 유통기간을 연장시켜야 한다.
- 마. 기능성 제고로 소비증진 및 어민 소득증대를 기할 필요가 있다.
- 바. WTO 체제하에서 제품의 국제 경쟁력을 높혀야 한다.

2. 연구 개발 목적과 범위

- 가. 어육 연제품에서 변질에 관여하는 미생물 검색

시판되고 있는 어육 연제품을 비롯하여 인위적으로 부패시킨 연제품에서의 미생물을 분리하여 원인 미생물을 추적한다.

나. 항균성 물질의 검색

- 1) 각종 천연식물류로부터 항균성 물질을 검색한다.
- 2) 수산물로부터의 항균성 물질을 검색한다.
- 3) 미생물 대사산물로부터 항균성 물질을 검색한다.
- 4) 항진균성 물질에 대한 안전성을 검토한다.

다. 개발된 항균성 물질에 대한 활용성 시험

- 1) 개발된 각종 항균성 물질을 어육 연제품에의 활용 여부 검토
- 2) 우수 항목을 선정하여 어육 연제품에 첨가하여 상품성을 검토한다.
- 3) 항진균성 물질에 대한 위생적 안전성을 검토한다.
- 4) 생산공장의 실제 공정에 적용시켜 제조된 어육연제품에 대한 물성을 평가하고 산업화 가능성을 타진한다.

제 2 장 어육연제품 부패미생물 분리 및 동정

여 백

제 2 장 어육연제품 부패미생물 분리 및 동정

제 1 절 서 론

연제품은 일본으로부터 도래된 식품으로서 전통적으로 곡물을 주식으로 한 우리 국민에게는 특이한 맛과 조직감 때문에 널리 섭취되는 가공식품으로 자리잡게 되었다.

1970년대 식생활 수준향상에 의한 동물성 식품의 수요증대에 따라 소비가 급격히 증가하였고, 가공형태도 기호에 맞게 다양하게 발전되었다.

1975년부터는 연제품의 원료인 육상냉동고기풀이 생산되기 시작하였으며, 80년대 대기업의 참여로 가공·포장기술 발전과 아울러 유통도 지역권 재래시장중심에서 전국시장으로 확대되어 냉동유통이 시작되었다. 특히 연제품 가공업의 혁명이라 할 수 있는 선상 냉동고기풀 생산이 국내에서도 84년부터 시작되어 고품질원료들 소재로한 제품생산이 가능케 되었다.

그런데 어육연제품은 부패하기 쉬운 식품이므로 세균학적 위생관리가 식중독 예방 측면에서도 매우 중요하다.

일반적으로 연제품의 변패는 주로 미생물의 작용에 의하는데, 이들 미생물은 가열후에 부착된 오염균과 가열에서 사멸되지 않고 잔존하는 내열성균으로 대별된다.

한편 연구자들의 보고에 의하면 어육연제품의 부원료인 시판 전분에는 10,000~50,000/g의 내열성 세균이 들어 있고 이들 세균이 부패원인균이며(Kimata와 Kawai, 1951; Kimata와 Sosogi, 1956), 연제품의 변패원인은 제품의 가공에 사용되고 있는 전분, 조미료 및 향신료에 오염되어 있

던 내열성균에 기인한다는 보고도 있다(Tanikawa, 1963).

따라서 본 연구에서는 시판되고 있는 어육연제품을 수거하여 균의 오염상태를 파악하고 또 인위적으로 부패시킨 다음, 균의 분포도를 조사하였다. 이렇게 함으로써 원인이 되는 미생물의 종류를 파악하고, 항균물질 시험시 항균성의 대상 균주로 삼기위하여 실험을 실시하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 실험 재료

부산시내 슈퍼마켓이나 재래시장에서 진열 판매되고 있는 게맛살, 판어묵, 튀김어묵 등을 구입하여 실험에 사용하였으며, 직접 생산공장에서 가열처리 직전과 직후의 제품도 수거하여 시료로 사용하였다.

2. 실험 방법

어묵 시료 50g에 멸균인산완충희석수 450ml씩 가하고 90초간 균질화한 것을 시료 원액으로 활용하였다. 세균학적 실험방법은 미국 FDA의 세균실험 방법인 AOAC International (1992)에서 출판한 것에 준하였으며, 세균의 동정은 Holt et al., (1994) 에 따랐다. 사용된 시약은 분석시약 일급 또는 특급을 사용하였고 세균배양 배지는 Difco(U.S.A)사 제품을 사용하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

시판되고 있는 각종 어육 연제품에 대하여 미생물 분석을 한 결과는 표 2-1, 2-2와 같다.

표 2-1. 시판되고 있는 어육 연제품에 대한 미생물 분석결과

시료명	시료수	최확수/100g		CFU/g	
		대장균군	분변계대장균	생균수 at 35℃	진균수 at 20℃
계맛살	2	<18	<18	8.8×10^4	ND
		<18	<18	4.9×10^5	<300
판어묵	5	<18	<18	1.4×10^9	<300
		2.3×10^2	<18	3.0×10^1	<300
		<18	<18	<300	<300
		<18	<18	1.7×10^5	ND
		<18	<18	<300	ND
부들어묵	2	1.7×10^3	<18	3.7×10^4	5.4×10^2
		2.3×10^3	<18	6.1×10^3	2.0×10
튀김어묵	5	1.7×10^3	<18	7.0×10^4	3.6×10^2
		3.3×10^3	3.3×10^4	2.2×10^5	6.6×10^3
		1.7×10^4	<18	2.0×10^5	ND
		5.4×10^5	3.5×10^3	3.9×10^4	1.9×10^3
		3.3×10^3	<18	1.3×10^6	4.8×10^3

ND : Not detected in planting of 0.1g of sample.

표 2-2. 생산공장에서 가열처리 전후의 생균수 비교

분류	시료명	생균수/g at 35℃		시료수
		가열전(평균)	가열후(평균)	
호기성균	게맛살	$2.5 \times 10^0 \sim 1.5 \times 10^1$ (5.3×10^0)	$2.0 \times 10^1 \sim 4.0 \times 0^1$ (2.9×10^1)	6
	판어묵	$2.7 \times 10^0 \sim 3.7 \times 10^1$ (1.5×10^1)	$2.0 \times 10^1 \sim 4.3 \times 10^2$ (1.1×10^2)	6
	어육소시지	$3.6 \times 10^0 \sim 6.3 \times 10^1$ (2.1×10^1)	ND	6
혐기성균	게맛살	$1.1 \times 10^0 \sim 3.8 \times 10^0$ (5.7×10^0)	ND	6
	판어묵	$1.5 \times 10^0 \sim 1.8 \times 10^1$ (6.0×10^0)	ND	6
	어육소시지	$3.6 \times 10^0 \sim 2.9 \times 10^1$ (9.3×10^0)	ND	6

ND : Not detected in planting of 0.1g of sample.

대장균군과 분변계대장균의 오염을 보면 게맛살과 판어묵에서는 거의 검출되지 않았으나 부들어묵과 튀김어묵에서는 비교적 높은 함량을 나타내고 있었다. 게맛살과 판어묵은 포장한 후 가열처리한 포장제품인 반면 부들어묵과 튀김어묵은 가열한 후 포장되었기 때문에 2차오염된 것임을 추정할 수 있었다. 그리고 곰팡이와 효모 같은 진균류도 같은 경향을 나타내었다. 생균수는 시료 1g 당 $<300 \sim 1.4 \times 10^6$ 사이였으며 대체로 $10^3 \sim 10^4/g$ 정도였으며 튀김어묵의 경우가 비교적 오염도가 높았다(표 1).

한편 게맛살, 판어묵, 어육소시지의 가공공정중 열처리전과 열처리직후의 호기성 및 혐기성 세균의 측정결과 게맛살과 판어묵의 경우는 호기성 균수는 두가지 모두 열처리전에는 평균 $10^6 \sim 10^7/g$ 의 분포를 나타내고 가열공정을 거친 완제품에서는 균수가 현저히 감소되어 $10 \sim 10^2/g$ 의 분포를 보였으며 혐기성균도 가열처리전에는 같은 경향을 보였으나 완제품에서는 나타나지 않았다.

岡田 등(1974)은 보통 어육냉동고기품 중에 $10^4 \sim 10^9/g$ 정도의 균이 존재하며 가열처리 후에는 내열성 포자형성세균은 살아남으나, 구균 및 Gram 음성균은 검출되지 않는다는 보고와 비슷한 결과였다. 그리고 튀김어묵과 게맛살을 인위적으로 부패시켜 미생물을 실험한 결과는 표 3, 4와 같다.

표 2-3. 부패한 튀김어묵에서의 미생물 분포상황

균종	균의 특성	분포 비율(%)
세균	Gram 양성 구균	27.7
	간균	40.0
	Gram음성 구균	-
	간균	30.7
	기타	1.5
진균류	효모	0.03
	곰팡이	0.07

표 2-4. 부패한 게맛살에서 분리된 미생물 분포

균 종	균의 특성	분포비율(%)
세 균	Gram 양성 구균	-
	간균	79.1
	Gram 음성 구균	-
	간균	19.1
진 균	곰팡이	-
	효모	-
기 타		1.8

이상에서 알 수 있는 것은 부패한 튀김어묵에서 검출되는 미생물은 거의 대부분이 세균이고 진균류가 아주 적은 비율로 검출되었으며, 세균중에서 Gram 양성구균이 27.7%, Gram 양성 간균이 40.0%를 차지하였고 Gram 음성 간균도 약 31%나 되었다. 반면에 게맛살에서는 Gram 양성 간균이 79.1%로 절대적 우점종이었으며 효모나 곰팡이는 검출되지 않았다. 따라서 게맛살의 경우는 주로 세균발육 억제 물질을 그리고 튀김어묵에서는 세균과 진균발육억제 물질을 첨가하여야 됨을 알 수 있었다.

제 4 절 요약

1. 게맛살이나 판어묵과 같이 포장후 가열처리하는 제품에서는 대장균군이나 분변계 대장균 등은 검출되지 않으나, 가열처리 후 포장을 하는 튀김어묵에서는 대장균군과 분변계 대장균이 비교적 많이 검출되었으며 진균류도 $10^3/g$ 정도 검출되었다.

2. 어육연제품 제조시 가열처리 전에는 대체로 생균수가 $10^5 \sim 10^6/g$ 정도 검출되었으나 가열처리 후에는 *Bacillus* sp.만이 약 $10^2/g$ 정도 검출되었다.

3. 부패한 게맛살에서 검출된 세균은 Gram 양성 간균이 79%였으며 곰팡이나 효모는 검출되지 않았다.

여 백

제 3 장 항진균성 물질의 검색 및 어육연제품에의 활용

여 백

제 3 장 향진균성 물질의 검색 및 어육연제품에의 활용

제 1 절 서 론

과거부터 식품보존료로서 광범위하게 사용되고 있는 sorbic acid나 benzoic acid와 같은 합성보존료들은 잔류독성, 돌연변이유발성 등의 안전성 문제로 소비자들이 점차 이들의 사용을 기피하고 있는 실정이다. 또한 소비자들의 불신으로 인해 많은 제품들의 유통기간이 짧아졌고 이로 인한 경제적 손실도 커지고 있다. 이러한 문제점들로 인해 천연보존료에 대한 소비자의 요구가 점점 더 높아지고 있고 이에 부응하는 천연보존료에 관한 연구가 국내에서도 많이 진행되고 있다.(이, 1987; 노, 1989; 박, 1995)

달걀이나 우유, 감자 및 어류 등을 비롯한 식품소재에서 분리된 항균성 물질에 대한 연구도 활발하며(Islam 등, 1986; Hughey 등, 1987; 能勢 등, 1988; Beuchat 등, 1989; Denis 등, 1989; 신 등, 1992; Kyung 등, 1994), 유산균이 생산하는 대사산물을 이용하여 미생물증식억제에 대한 연구도 많이 보고되어지고 있다(Ralph 등, 1995). 또한 마늘, 양파, 육두구 및 정향 등과 같은 각종 향신료로부터 추출한 성분들의 항균력에 대한 보고도 있으며(Johnson 등, 1969; Beuchat, 1976; Shelef 등, 1980; Yoshida 등, 1987; Karapinar, 1990; 佐藤 등, 1993), 펙틴분해물(野崎, 1985; 草地 등, 1986; 박, 1989), 유기산(El-Shenawy 등, 1989; 渡邊, 1993; Bizri 등, 1994), 지방산(Wang 등, 1992, 1993) 등이 천연항균성 물질로서 검토된 보고가 있다.

최근에는 한약재와 같은 천연식물 중에서 상당한 항균성 물질이 존재하여 이들 성분의 약리작용 및 천연 항균성 물질의 검색에 관한 연구가 많이 되고 있다.

계피(cinnamomi cortex, *Cinnamomum cassia* Blume)는 녹나무과(Lauraceae)에 속하는 상록열대 계피나무의 수피를 그대로 또는 외피를 제거하여 건조시킨 것으로 계지, 계심, 육계 등의 이름으로도 불려진다. 이는 오래전부터 한방으로 이용되었으며 치료용도는 주로 두통, 발열, 神經性心悸亢進 (신경성심계항진), 진통 등에 사용되고 있다. 계피의 주요 성분은 cinnamaldehyde이며 이는 aromatic compounds로 정제된 것은 음료, 휴잉검, 치약의 향성분, 화장품의 향기, 구취제거제 등으로 많이 이용된다.

계피는 생리활성작용으로 항산화작용이 있는 것으로 알려져 있어 각종 oil에 대한 산화방지 효과가 있는 것으로 보고되어졌다(Teruhisa 등, Nobuji, Yutaka 등, 金 등). 그리고, 항궤양유발작용도 가지는 것으로도 보고되어지고 있다(Shigeo 등, 1987). 계피추출물의 항균작용도 보고되어진 바 있으며 특히 항진균작용에 대한 연구도 보고되어진 바 있다(Satoshi, 1978; Nonuyuki, 1979).

그러나 아직까지 계피추출물의 식품부패과 관련된 미생물에 대한 폭넓은 항균작용 및 식품보존효과에 관한 보고 예는 거의 없는 실정이며 약용, 향신료로 예로부터 많이 쓰여 왔기 때문에 유전독성, 만성독성을 가지지 않을 것으로 사료되나 식품첨가시 인체에 대한 유전독성을 가지는지에 관한 안전성연구도 보고되어진 것이 극히 미미하다.

따라서 본 연구에서는 계피로부터 항균성물질을 추출하여 천연식품보존료로서의 이용가능성을 타진해보기 위해서 추출용매의 종류, 추출조건에 따른 항균력을 시험하고 여러 유기용매로 계통분획을 실시하였다. 각

종 병원성 미생물, 어묵에서 주로 검출되는 부패미생물에 대한 균종별 항균력을 비교 검토하였다. 그리고 추출물의 pH, 온도 등에 대한 안정성을 조사하였고, 배지상에서 효과가 있었던 추출조건을 바탕으로 하여 시료를 대량생산하여 95% ethanol로 여러 농도로 희석하여 실제 어육연제품 및 빵과 같은 곰팡이에 의한 피해가 큰 식품등에 적용하여 그 효과를 살펴보았다.

그리고 계피추출물이 식품에 첨가될 때 돌연변이원성의 여부를 알아보기 위해 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100을 이용한 Ames test를 시험하여 돌연변이원성을 알아보았으며 식품내부에 있을 수 있는 돌연변이인자에 대한 억제능시험도 함께 실시하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 실험재료

가. 재료

시료는 1995년 3월부터 1997년 7월 사이에 부산시 소재 한약 재료 상에서 중국산 계피(*cinnamomi cortex*, *Cinnamomum cassia* Blume)를 구입하여 분말로 분쇄(20~30mesh)한 뒤, 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. 사용균주 및 배지

식품의 부패나 식중독 원인균으로 그람 양성균 8종 및 그람 음성균 5종을 사용하였고, 진균류도 식품의 부패나 병원성과 관계있는 10종을 사용하였다(표 3-1, 2). 그리고 시판되고 있는 어육연제품을 수집하여

30℃에서 7일간 배양하여 세균류 및 곰팡이를 분리하였다.

미생물의 배양에 사용된 배지는 모두 Difco사(USA)제품을 사용하였으며, 그람양성균과 그람음성균은 nutrient broth를 효모 및 곰팡이는 YM broth 및 potato dextrose agar를 각각 사용하였다. 항균력 측정용 배지는 Mueller Hinton broth와 agar를 사용하였으며, 그외의 미생물들은 배양용 배지와 같은 것을 사용하였다.

Ames test에 사용된 Salmonella typhimurium TA98, TA100 등은 nutrient broth(0.5% NaCl)을 이용하여 증균시켰다.

다. 시약

항균성 물질의 추출시의 유기용매는 Junsei사(Japan)의 일급, 또는 특급 시약을 사용하였고, 항진균성 물질의 분리·정제에 사용된 용매는 Nacalai Tesque사(Japan)의 제품을, NMR 구조측정에 사용된chloroform-d₁(CDCl₃)은 E. Merck(Germany)의 제품을 사용하였다. Ames test에 이용된 시약들은 Sigma사(USA) 및 Waco사(Japan)의 제품을 사용하였다.

표 3-1 항균성 측정에 사용된 균주의 목록

	Strain
Bateria	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
	<i>Bacillus stearothermophilis</i> ATCC 10149
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Yeasts	<i>Candida albicans</i> 17PL 76
	<i>Candida intermedia</i> CBS 572
	<i>Kluyveromyces fragilis</i> lactoserum de dannone
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 381
	<i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 361
Molds	<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 9644
	<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 11489
	<i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 20235
	<i>Trichoderma viride</i> ATCC 32098

표 3-2 부패한 어육연제품에서 분리된 미생물

Isolated strains	
Bacteria	<i>Bacillus</i> sp. B9 <i>Corynebacterium</i> sp. B15 <i>Staphylococcus</i> sp. B18 <i>Bacillus</i> sp. B26 <i>Enterobacter</i> sp. B32 <i>Bacillus</i> sp. B41 <i>Acinetobacter</i> sp. B47 <i>Bacillus</i> sp. B51
Molds	<i>Penicillium</i> sp. M1 <i>Aspergillus</i> sp. M5 <i>Penicillium</i> sp. M14 <i>Aspergillus</i> sp. M15 <i>Penicillium</i> sp. M16 <i>Aspergillus</i> sp. M21

2. 실험방법

가. 항균성 물질의 추출 및 조제

시료 100g에 absolute ethanol 200ml를 가하여 24시간 진탕 추출한 후 여과하여 무수에탄올로 100ml되게 정용한 것을 1회째 추출물로 하였고 그 잔사에 위와 같은 조작을 반복하여 2회, 3회, 4회, 5회까지 추출하여 시료로 사용하였다.

무수에탄올 중 1, 2회 추출물을 혼합하여 100ml로 정용한다음 이를 n-헥산, chloroform, ethyl acetate, n-butyl alcohol 등의 유기용매로 분획한 다음 각 가용성획분을 완전농축한 다음 무수에탄올로 100ml씩 정용하였다(그림 3-1).

나. 항진균성물질의 분리·정제 및 구조 해석

(1) 분리·정제

n-헥산분획물로부터 항진균성 물질을 분리·정제하기 위하여 silica gel 및 flash column chromatography를 실시하였다. 이 때 사용된 용매계는 n-헥산 : ethyl acetate였다.

(2) 구조해석

NMR 측정에 사용된 기기는 Bruker DRX300WB spectrometer(Bruker, Germany)였으며, ^1H -NMR은 300.13 MHz에서 ^{13}C -NMR은 75.47 MHz에서 측정하였다. 내부표준물질은 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였고, chemical shift는 ppm으로 나타내었다.

다. 추출용액중의 가용성 고형분함량

가용성 고형분함량은 항균력 측정용 시료 검액을 일정량 취하여 105℃에서 항량점이 될때까지 건조 후 증발잔사의 무게를 측정하여 ml 당 mg으로 나타내었다.

라. 항균력 검사

항균력 검사는 Lorian의 방법에 따라 디스크 확산법(Disk diffusion method)으로 항균력을 측정하였다. 세균의 경우는 미리 전배양된 배양액을 10⁶정도 되게 희석하여 미리 조제된 Mueller hinton agar 평판에 도말한다. 그리고 곰팡이의 경우는 시험균주가 계대 배양된 사면배지에 멸균생리식염수를 가하여 균 현탁액을 만든 다음, 미리 조제된 potato dextrose agar 평판에 도말하였다. 멸균된 filter paper disk(Toyo, 8mm)에 에탄올 추출물을 각 농도별로 40 μ l씩 흡수 시킨 후 추출용매를 완전히 제거시키고 평판배지에 밀착시킨 다음 세균은 35℃에서 24시간, 곰팡이는 25℃에서 96시간 동안 배양한 다음 disk 주변의 투명환의 직경(mm)을 측정하여 항균력을 비교하였다.

단, 첨가되는 용매 자체의 항균력을 배제하기 위하여 모든 실험구는 대조구를 만들어 같은 실험을 실시하였다.

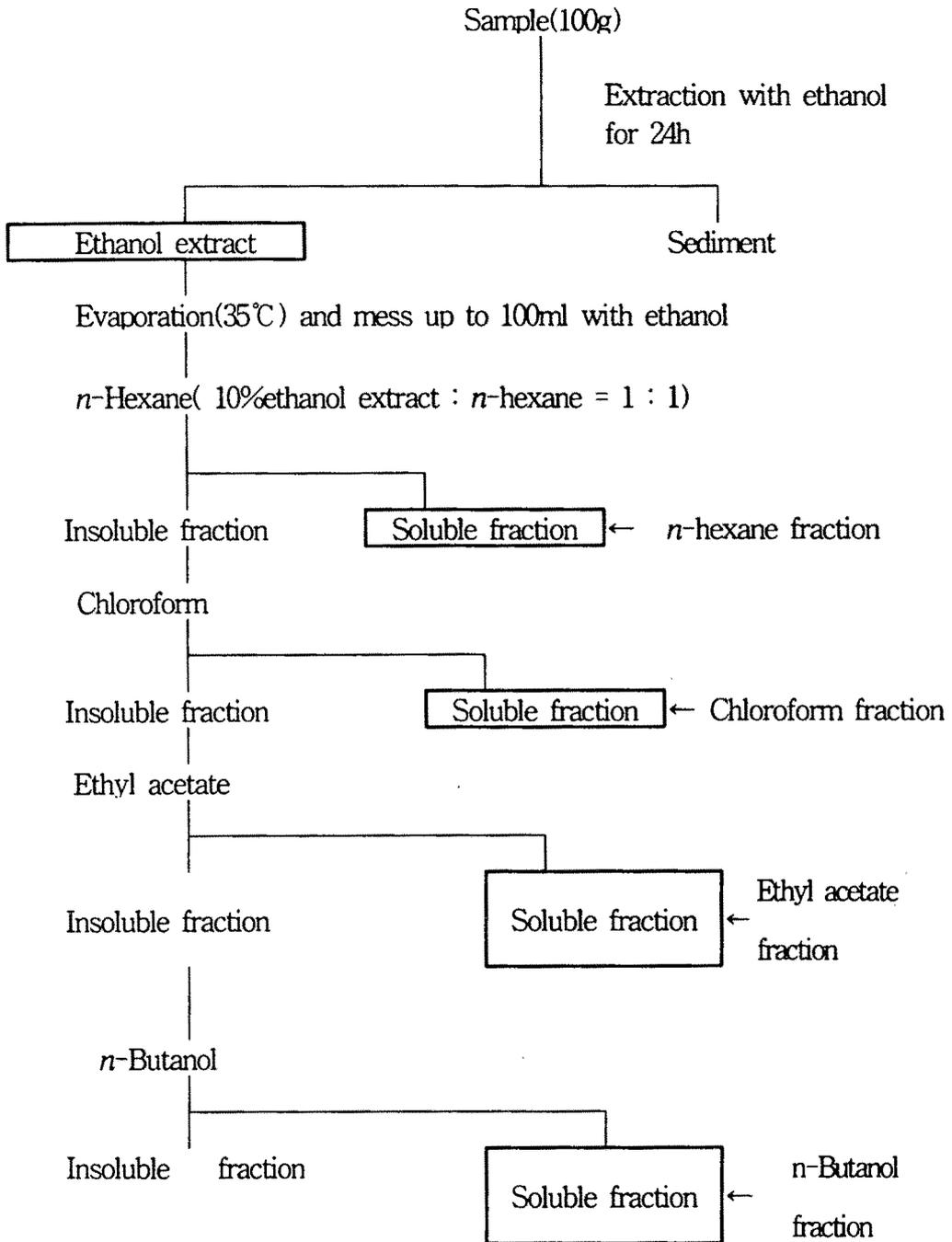


그림 3-1 계피의 에탄올 추출물에 대한 용매별 계통분획 과정도
 각 용매분획은 완전히 증발농축시킨 후 95% ethyl alcohol에
 녹여 사용하였다.

마. 추출물의 각종 미생물에 대한 최소증식억제농도 측정

추출물에 대한 최소증식억제농도의 측정은 Lorian(1991)의 방법에 따라 액체배지 희석법(Broth dilution method)으로 측정하였다. Mueller Hinton broth, brain heart infusion 및 YM broth 9.8ml에 추출물의 고형분 함량이 일정한 농도가 되도록 희석된 액을 0.1ml씩 가한 다음, 18~24시간 계대 배양된 각종 균주를 최종농도가 105/ml가량되게 0.1ml씩 접종하여 세균의 경우는 35℃에서 48시간, 효모는 30℃에서 48시간 배양한 후, 균 증식여부를 흡광도(600nm)로 측정하여 증식억제에 필요한 최소증식억제농도를 구하였다.

최소증식억제농도는 추출물을 105℃에서 건조시킨 후 증발잔사의 잔유물 무게를 측정하여 배지 1ml에 대한 첨가량(μg)으로 나타내었다.

바. 추출물의 pH 및 열에 대한 안정성검사

n-헥산분획물에 대해 pH를 4에서 11까지 조정하여 배지상에서 항균효과를 검사하였으며, 또한 100℃에서 10분, 15분, 30분, 60분, 121℃에서 15분 가열처리한 후 항균력검사를 실시하였다.

사. 어육연제품에서의 보존효과

(1) 흰살어묵에의 적용

시험에 사용된 어육연제품의 조성은 표 3-3과 같다. 어육연제품제조시 계피추출물을 고기갈이전 재료배합시에 일정량 첨가한 다음 고기갈이, 성형, 포장, 가열, 냉각공정을 거쳐서 나온 제품을 시료를 첨가하지 않은 대조구와 함께 25℃에서 저장하면서 1일마다 생균수 및 pH를 측정하였다.

표 3-3 시험에 제공된 어육연제품의 조성

Frozen Alaska pollack meat paste	38.4%
Starch	15.2%
Sodium choride	1.4%
Egg white	4.7%
Soy protein	1.2%
Food additives, liquid	2.1%
Food additives, powder	1.6%
Water	35.4%

(2) 비포장 튀김어묵에의 적용

판어묵은 포장직전의 제품에 분무기를 이용하여 일정량 분사시킨 후 랩으로 덮은 후 곰팡이발육이 가장 잘 되는 25℃에서 저장한 후 어묵의 표면에 곰팡이 집락의 생성유무를 관찰하여 전체 시료처리제품에 대한 곰팡이 집락이 생성된 제품의 비로 나타내었다.

아. Ames test를 이용한 돌연변이원성 및 항돌연변이원성 시험

(1) S9조제

돌연변이 유발물질인 benzo(α)pyrene(B(α)P를 활성형으로 만들

기 위해 체중이 100g되는 Sprague Dawley rat(male)를 사용하여 S-9 fraction을 조제하였다. S-9fraction은 Maron과 Ames의 방법을 이용하였다. 모든 실험조작은 무균적으로 실시하였고, 유도물질로는 3-methylcholanthrene을 사용하였다. S9 mix는 test 실시 1-2시간 전에 조제하였다.

(2) 돌연변이원 시험

Ames test를 개량한 preincubation법을 이용하였으며 시험균주는 Salmonella typhimurium TA98과 TA100을 이용하였다. 계피추출물의 돌연변이능을 알아보기 위해 농도는 4mg/4ml이하로 2배희석법으로 DMSO를 이용하여 희석하였으며, 계피추출물 100 μ l, S9 mix 500 μ l를 첨가하고 12~14시간 정도 배양한 균주를 100 μ l씩 접종한후 37 $^{\circ}$ C shaking water bath에서 20분간 반응시킨후 soft agar(agar 0.6%, NaCl 0.5%)를 부었다. 그리고 나서 37 $^{\circ}$ C에서 48시간동안 배양한 후 colony수를 측정하였다.

(3) 항돌연변이원성 실험

항돌연변이원성을 알아보기 위해서는 변이원물질로 benzo(α)pyrene을 사용하였으며 실험방법은 돌연변이원성 실험과 동일하다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 계피로부터 에탄올 추출한 항균성 물질의 추출 횟수별 항균력

에탄올을 사용해 계피로부터 에탄올가용성추출물을 얻어 이를 완전농축시킨 다음 다시 100ml의 95%에탄올로 정용한 후 각종 미생물에 대한 증식억제능을 조사하였다(표 3-4). 그리고 나서 계피로부터 향미생물체의 수율을 높이기 위해 다시 2, 3차까지 에탄올추출을 시도하여 추출횟수별로 시료를 모은 다음 시료를 만든 후 각종 미생물에 대해 증식억제효과를 살펴보았다. 추출횟수가 많아질수록 평판상의 억제환의 크기가 감소하였으나 *A. oryzae*의 경우는 3차추출한 시료에서도 증식억제능을 보였고 효모류인 *Candida albicans*에도 2차추출한 시료까지 증식억제능을 보여 계피의 에탄올추출물은 세균류에서도 효과는 있으나 진균류에서 더 높은 증식억제효과를 가졌다. 따라서 본 실험에 이용되는 시료로 에탄올을 이용해 2차까지 추출한 것을 모두 합한 후 다시 완전감압농축하여 에탄올 100ml로 정용한 것에 대하여 *Candida albicans*, *Aspergillus oryzae*와 같은 진균류에 대하여 증식억제능을 조사한 결과 표 3-5와 같다. 에탄올 추출물은 약 210 μ g/disk까지 억제효과를 보였다. 이 등(1991, a)은 향백, 정향 등의 한약재를 포함한 31종의 식물을 대상으로 에탄올과 물로 추출한 결과 에탄올 추출물이 더 효과가 좋다고 보고하였으며, 박 등(1992, a)도 자조, 오미자, 목단피 등의 20종 한약재를 물과 에탄올로 추출하여 비교한 결과 에탄올 추출물이 2~100배정도 효과가 좋다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

표 3-4 계피로부터 에탄올 추출횟수에 따른 항균력

Strains	Inhibition zone(mm)							
	1st extract			2nd extract			3rd extract	
	1 ^{a)} (800 ^{b)})	1/2 (400)	1/4 (200)	1 (480)	1/2 (240)	1/4 (120)	1 (36)	1/2 (18)
<i>Bacillus cereus</i>	12	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	±	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	13	10	-	12	-	-	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	24	18	-	22	-	-	17	-

- 100g의 마쇄된 계피를 200ml 에탄올에 담그고 상온에서 24시간동안 진탕한 상층액을 사용하였으며, 그 잔류물로 위 과정을 반복하였다.
- 각 추출물은 완전히 감압증류하여 100ml의 에탄올에 녹여 사용하였다.
- 항균활성은 에탄올 추출물을 95% 에탄올로 단계희석하여 disk 확산법에 의해 측정하였다(disk 당 40 μ l).

a) 희석 비율

b) 사용한 에탄올 추출물의 고형분 함량(μ g/disk)

- not detected

표 3-5 계피로부터 추출한 용액의 항진균력

	Inhibition zone(mm)				
	1680 ^{a)}	840	420	210	110
<i>Candida albicans</i>	18	15	12	±	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	NT	50	27	±	-

- 항균활성은 표 3-4에서와 같이 측정하였다.
- 혼합물은 첫 번째와 두 번째 추출물을 모아서 완전히 진공증발시킨 후 95% ethanol 100ml에 녹여 사용하였다.

a) 에탄올 추출물에 녹아있는 고형분 함량($\mu\text{g}/\text{disk}$)

-, not detected ; NT, not tested.

2. 에탄올추출물의 계통분획별 항균효과

에탄올추출물 100ml에 대해 n-헥산, chloroform, ethyl acetate, n-butyl alcohol 등 각종 유기용매에 대해 계통분획을 실시한후 가용성분획을 모두 완전 감압농축시킨후 다시 100ml의 에탄올로 정용하였다. 정용된 각 분획물에 대해 각 시료를 2배 희석법으로 희석한 후 disk diffusion method를 이용해 항균효과를 조사한 결과는 표 3-6과 같다. 이중 n-헥산분획물에 대한 증식억제효과를 살펴보면 세균의 경우는 $246\mu\text{g}/\text{disk}$ 까지 증식이 억제되었으나 곰팡이에 대해서는 $30.8\mu\text{g}/\text{disk}$ 까지 증식억제능을 보여 상당한 효과를 가졌다.

표 3-6 계피의 알콜 추출물의 용매별 분획물의 항균력

fraction	Dose μg/disk	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
n-Hexane	984	16 ^{a)}	20	26	NT
	492	14	11	18	NT
	246	10	-	12	20
	123	-	-	-	13
	61.5	-	-	-	11
	30.8	-	-	-	10
	15.4	-	-	-	-
Chloroform	276	12	10	12	NT
	138	9	-	-	10
	69	-	-	-	-
Ethyl acetate	356	11	9	10	12
	178	-	-	-	-
	89	-	-	-	-
n-Butanol	904	11	10	10	9
	452	-	-	-	-
	226	-	-	-	-

· 항균활성은 표 3-4에서와 같이 측정하였다.

· 각 분획물은 완전히 진공증발시킨 후 95% ethanol 100ml에 녹여 사용하였다.

a) 저해환의 지름(mm)

- not detected. ; NT, not tested

3. n-헥산분획물의 분획횟수별 항균효과

n-헥산분획물의 곰팡이에 대한 항균효과가 좋기 때문에 수율을 높이기 위해 2차분획까지 실시한 후 *A. oryzae*에 대한 항균효과를 조사한 결과는 표 3-7과 같다. 2차분획물의 경우에도 *A. oryzae*에 대한 증식억제환을 가졌으며 수율을 높이기 위해 1, 2차 분획물을 모두 합한 다음 완전 감압농축 후 다시 에탄올 100ml로 정용하였다. 에탄올추출물과 이것으로부터의 n-헥산분획물과의 항진균물질의 증식억제능을 *A. oryzae*에 대해서 살펴본 결과를 표 3-8에 나타내었다. 에탄올추출물은 disk당 192 μ g의 첨가농도에서 증식억제환을 가졌으나, n-헥산분획물은 29 μ g의 농도에서 증식억제효과를 나타내었다.

4. 항진균성물질의 분리·정제 및 구조해석

n-헥산분획물로부터 silica gel 및 flash column chromatography에 의하여 항진균성물질을 분리·정제하였다. 또한 정제된 물질에 대한 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectra로부터 구조를 해석한 결과, 그 물질은 trans-cinnamaldehyde로 동정되었다(그림 3-2).

5. n-헥산분획물의 안정성

가. pH

pH에 대한 항균성 물질의 안정성을 알아보기 위하여 n-헥산분획물을 pH 4.0에서 pH 11.0까지 각 단계별로 조정하여 *A. oryzae*에 대한 항균력을 조사한 결과는 그림 3-3과 같다. pH 11.0을 제외한 산성 및 알칼리영역의 pH범위에서 거의 비슷한 증식억제환을 가져 이 n-헥산분획물은 pH에 대해 상당히 안정함을 알 수 있었다.

표 3-7 계피의 n-헥산 분획횟수에 따른 *Aspergillus oryzae*에
대한 항균력 비교

	1st fraction			2nd fraction	
	123 ^{a)}	62	31	120	60
<i>Aspergillus oryzae</i>	15 ^{b)}	13	±	15	-

· 항균활성은 표 3-4에서와 같이 측정하였다.

a) 에탄올 추출물에 녹아있는 고형분 함량($\mu\text{g}/\text{disk}$)

b) 저해환의 지름(mm)

-, not detected

표 3-8 계피로부터 추출한 에탄올 추출물과 n-헥산분획물의
*Aspergillus oryzae*에 대한 항균력 비교

	Ethanol extract			n-Hexane fraction			
	192 ^{a)}	96	48	116	58	29	14.5
<i>Aspergillus oryzae</i>	15 ^{b)}	-	-	25	16	12	-

· 항균활성은 표 3-4에서와 같이 측정하였다.

a) 에탄올 추출물에 녹아있는 고형분 함량($\mu\text{g}/\text{disk}$)

b) 저해환의 지름(mm)

-, no growth

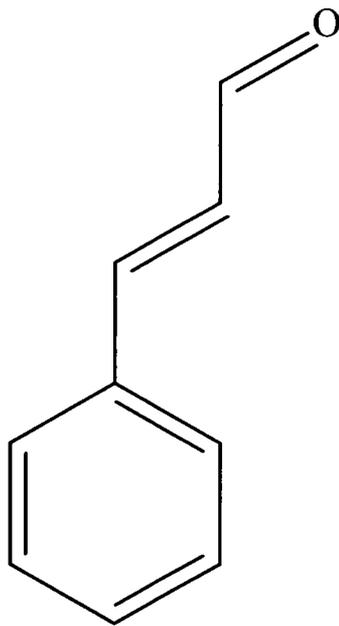


그림 3-2 계피로부터 추출정제된 Cinnam aldehyde의 구조

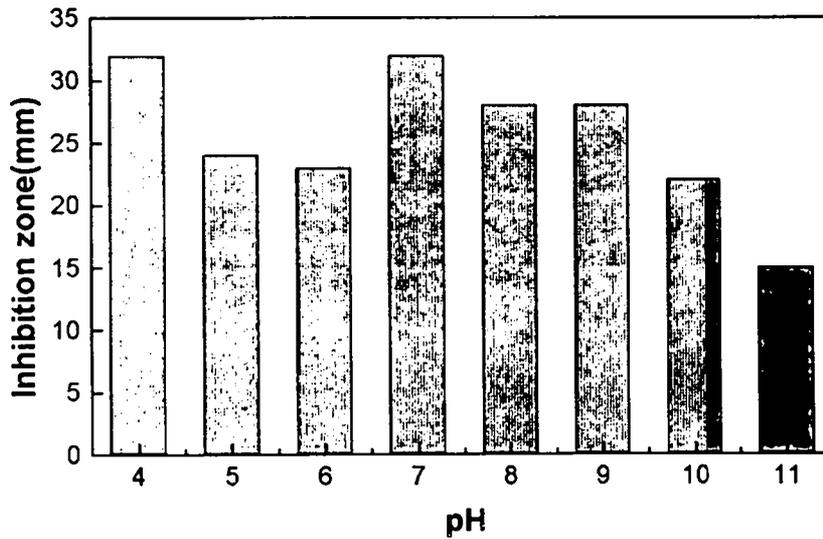


그림 3-3. n-헥산분획물의 *Aspergillus oryzae*에 대한 항균력의 pH 안정성

- 대조구는 0.1N HCl과 1N NaOH를 사용하였다.
- pH를 맞춘 n-헥산분획물은 실온에서 24시간 방치시킨 후 표 3-4에 서와 같은 방법으로 항균활성을 측정하였다.
- 사용한 n-헥산분획물의 농도는 116 μ g/disk이다.

나. 가열

가열에 대한 n-헥산분획물의 안정성을 조사하기 위하여 100℃에서 0, 10, 15, 30, 60분, 121℃에서 15분 가열하여 증식억제효과를 살펴본 결과는 그림 3-4와 같다. 각 가열조건에 따라 처리한 실험구와 대조구를 비교해 보았을 때 증식억제환의 크기가 별다른 차이가 없었다.

이상의 결과로 보아 산성식품, 알칼리식품, 그리고 가열살균식품에 첨가해서 사용하여도 n-헥산분획물의 각종 미생물에 대한 항균효과는 영향을 받지 않을 것으로 사료되었다.

6. 각종 미생물에 대한 항균력

가. 부패된 어육연제품으로부터 각종 미생물의 분리동정

시중으로부터 구입한 게맛살제품, 비포장어묵제품 등을 37℃에서 1주일이상 저장하면서 완전부패시킨 후 세균 및 효모, 곰팡이를 분리·동정한 결과는 표 3-9, 10과 같다. 비포장어묵제품의 경우, 포자형성세균인 Bacillus 속이 약 40%정도의 비율로 검출되었고, 곰팡이류에서는 Asperigillus, Penicillium 속이 0.07%정도로 검출되었다. 그리고 가열 후 진공포장제품인 게맛살제품에서는 그람음성균 및 효모, 곰팡이류는 검출되지 않았으며 Bacillus 속이 72.7%의 검출율을 보였다.

이상과 같이 진공포장제품에서는 주로 Bacillus 속 등의 세균에 의한 부패가 대부분이나 비포장제품에서는 세균 뿐만 아니라 곰팡이류에 의해서도 부패가 많이 일어날 수 있음을 나타내었다.

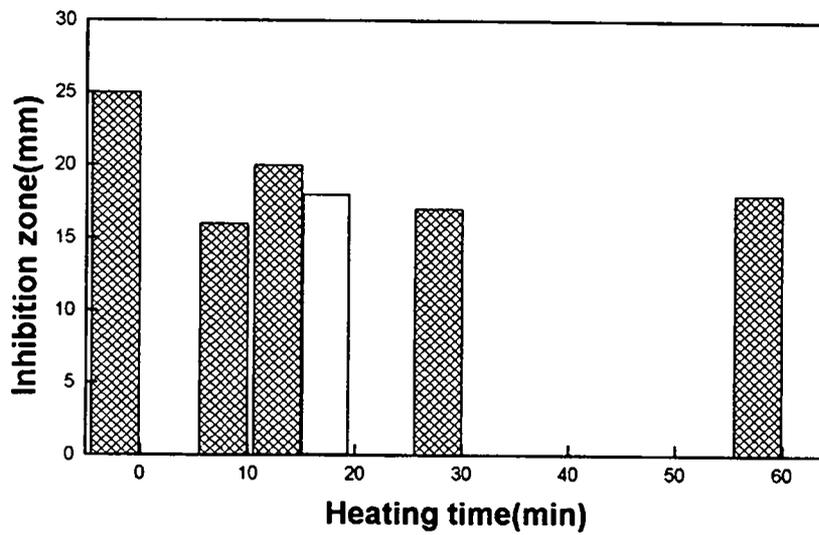


그림 3-4 n-헥산분획물의 *Aspergillus oryzae*에 대한
항균력의 열안정성

▣; 100°C에서 0, 10, 15, 30, 60분간

□; 121°C에서 15분간 반응

항균활성측정은 표 3-4에서의 방법과 같다.

n-헥산분획물의 농도는 116 μ g/disk을 사용하였다.

표 3-9 가열처리 후 포장하는 튀김어묵에 대한 미생물 실험결과

Microorganisms	Distribution(%)	Supposed genus
Bacteria		
Gram-positive cocci	27.7	<i>Streptococcus</i> sp.
rods	40.0	<i>Bacillus</i> sp.
Gram-negative cocci	-	
rods	30.7	<i>Enterobacter</i> sp.
Fungi		
Molds	0.07	<i>Asperigillus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.
Yeasts	0.03	<i>Trichoderma</i> sp.
Non-identified microorganisms	1.5	

-, not detected

표 3-10 진공포장된 부패 계맛살에 대한 미생물 분포 경향

Microorganisms	Distribution(%)	Supposed genus
Bacteria		
Gram-positive cocci	-	
rods	6.4 72.7	<i>Corynebacterium</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.
Gram-negative cocci	-	
rods	19.1	<i>Acinetobacter</i> sp.
Fungi		
Molds	-	
Yeasts	-	
Non-identified microorganisms	1.8	

-, not detected

나. 균종에 따른 최저증식억제농도

(1) 표준균주에 대한 최저증식억제농도

n-헥산분획물의 표준균주에 대한 최저증식억제농도는 표 3-11과 같다. 세균에 있어서는 320~640 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 증식이 억제되었으며 효모류에서는 *C. albicans* IPL에서는 320 $\mu\text{g/ml}$, *C. intermedia* CBS 572에서는 160 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 최소증식억제능을 가졌다.

곰팡이의 경우에는 *A. oryzae* ATCC11489와 *Pen. funiculosum* ATCC 9644에서는 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 증식이 억제되어 세균류에 비해 약 10배 이상의 항균효과를 보였다.

(2) 분리균주에 대한 최저증식억제농도

n-헥산분획물의 부패된 어육연제품으로부터 분리한 균주에 대한 최저증식억제농도를 조사한 결과는 표 3-12과 같다. 세균류에서는 160~640 $\mu\text{g/ml}$ 의 넓은 범위의 농도에서 증식이 저해되었으나 곰팡이에 있어서는 표준균주에 대한 증식억제농도와 비슷한 40~80 $\mu\text{g/ml}$ 의 증식억제농도를 가졌다.

殘夜(1992)에 의하면 식품보존료인 파라옥시 안식향산 에틸의 경우, *B. subtilis*에 대한 MIC는 1000ppm이라고 보고하였고, 갓 에탄올 추출물(강, 1994)은 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타나 계피추출물의 MIC가 320 $\mu\text{g/ml}$ 이므로 훨씬 우수한 것으로 나타났다. 또한 효모 및 곰팡이에 대한 효과를 볼 때 Satoshi (1985)는 계피를 chloroform에 추출한 후 다시 TLC등으로 분리정제한 후 얻은 o-methoxycinnamaldehyde는 *A. niger*에 대한 MIC가 200 $\mu\text{g/ml}$, *A. flavus*에 대해서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 라고 보고하였다. 이에 비해 조추출물인 n-헥산분획물은 상당히 낮은 MIC를 가졌는데 계피중의 여러성분들이 모여 정제된 단일추출물보다도 더 강한 항균효과를 나타내는 것으로 사료된다.

표 3-11 n-헥산 분획물의 각종 표준미생물에 대한 최저 증식농도

	Tested organisms	MIC($\mu\text{g/ml}$)
Bacteria	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	640
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	320
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	640
	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	640
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	640
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	640
	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	320
Yeasts	<i>Candida albicans</i> IPL 76	320
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 381	320
	<i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 361	160
	<i>Candida intermedia</i> CBS 572	160
	<i>Kluyveromyces fragilis</i> 561M	320
Molds	<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 11489	40
	<i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 20235	80
	<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 9644	40
	<i>Trichoderma viride</i> ATCC 32098	80

· 항균력 측정은 액체배지희석법으로 실시하였다.

표 3-12 부패한 어육연제품에서 분리한 각종 미생물에 대한
n-헥산 분획물의 최저 발육저지 농도

	Tested organisms	MIC($\mu\text{g/ml}$)
Bacteria	<i>Bacillus</i> sp. B9	320
	<i>Corynebacterium</i> sp. B15	160
	<i>Staphylococcus</i> sp. B18	320
	<i>Bacillus</i> sp. B26	640
	<i>Enterobacter</i> sp. B32	-
	<i>Bacillus</i> sp. B41	160
	<i>Acinetobacter</i> sp. B47	320
	<i>Bacillus</i> sp. B51	80
Molds	<i>Penicillium</i> sp. M1	80
	<i>Aspergillus</i> sp. M5	40
	<i>Penicillium</i> sp. M14	40
	<i>Aspergillus</i> sp. M15	80
	<i>Penicillium</i> sp. M16	40
	<i>Aspergillus</i> sp. M21	40

- 항균력 측정은 액체배지회석법으로 실시하였다.
- B와 M은 각각 부패한 어육연제품으로부터 분리된 bacteria와 mold를 뜻한다.

7. n-헥산분획물의 천연식품보존료로서의 이용

가. 흰살어묵제품

고기같이 공정에서 원료배합시 계피추출물을 전체중량에 대하여 0.5%의 n-헥산분획물을 첨가한 후 25℃에서 2주간 저장하면서 생균수 및 pH를 측정하였다(그림 3-5). 어묵에서 생균수가 약 5log/ml이상나타날 때를 초기부패로 보았을 때 대조구의 경우 3일째 초기부패가 시작되었으며, n-헥산분획물을 0.5%첨가한 실험구에서는 6일째 초기부패가 시작되어 3일가량의 보존기간연장효과를 가졌다.

보존기간연장효과가 높았으나 계피향 및 짙은 맛이 계속 감지되어 관능효과가 저하되어 보존효과가 높았으나 산업적으로 이용하기에는 문제점을 가졌다.

나. 비포장튀김어묵

어묵제조공정중에 첨가하지 않고 포장직전의 완제품에 95%에탄올과 1:3, 1:5의 비율로 n-헥산분획물과 혼합한 시료와 대조구로서 95%에탄올을 분무처리한 후 25℃에 저장하면서 어묵의 표면에 곰팡이의 증식을 육안으로 관찰한 결과를 표 3-13에 나타내었다. 분무처리를 하지 않은 negative control의 경우는 실험시작 후 2일째 바로 곰팡이의 집락이 관찰되었으며 positive control인 95%에탄올을 처리한 경우는 하루가 더 연장된 3일째에 관찰되었다. 그러나 1:3의 n-헥산분획물 경우에는 분무처리를 하지 않은 것보다 2일이 더 연장되었다.

이상의 결과로 볼 때 어묵에 n-헥산분획물을 처리할 때 어묵제조시 혼합시켜서 향균효과를 증대시키기보다는 주로 곰팡이로 인한 피해가 큰 비포장튀김어묵등에 표면에 직접 분사하므로서 미생물의 증식억제효과를 얻는 것이 더 효율적인 것으로 나타났다.

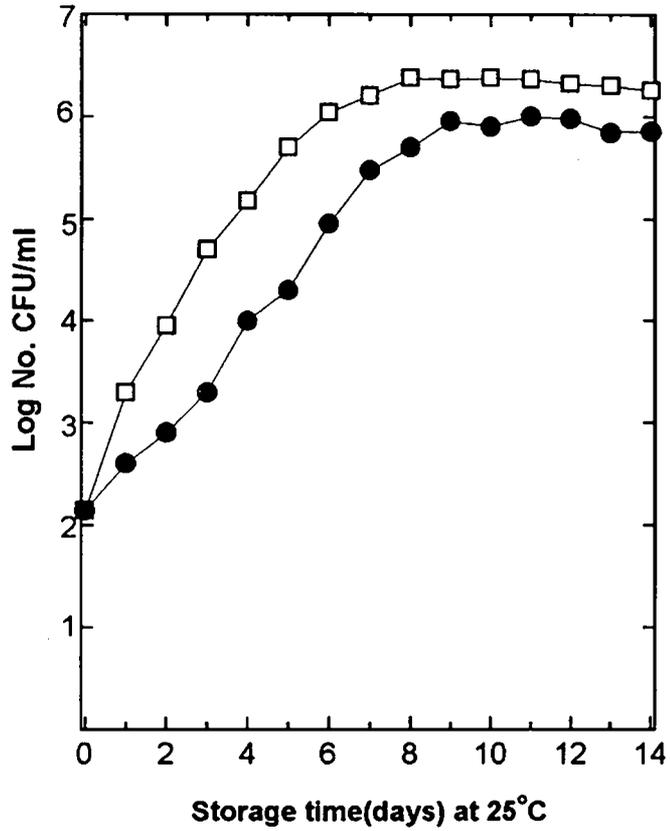


그림 3-5 계맛살에 계피의 n-헥산분획물을 첨가했을 때의 세균발육경향

A : 대조구(□)

B : n-헥산분획물 0.5% 첨가구(●)

표 3-13 n-헥산 분획물을 튀김어묵에 분무했을 때 분무농도에 따른 곰팡이 발생 경향(25℃ 저장)

Treatment	days	Spoilage ratio						
		0	1	2	3	4	5	6
A		0 ^{a)} /10 ^{b)}	0/10	0/10	2/10	2/10	5/10	6/10
B		0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	4/10	6/10
C		0/10	0/10	0/10	3/10	4/10	5/10	8/10
D		0/10	0/10	0/10	2/10	4/10	7/10	9/10
E		0/10	0/10	3/10	6/10	8/10	10/10	10/10

- 각 혼합액은 튀김어묵의 표면에 분무하였다.
 - a) 곰팡이가 생성된 튀김어묵의 수
 - b) 실험에 사용된 튀김어묵의 수
- A. n-Hexane fraction : 95% ethanol = 1:1
 B. n-Hexane fraction : 95% ethanol = 1:3
 C. n-Hexane fraction : 95% ethanol = 1:5
 D. 95% ethanol
 E. 대조구(No spray)

8. 계피추출물의 위생적 안전성

계피는 예로부터 약용, 식용, 화장품 등에 널리 상용되는 물질이며 또한 최근에는 항돌연변이원성을 가진다는 연구보고도 나와 있어 돌연변이원성은 가지지 않을 것으로 사료되나 안전성에 관한 연구보고가 극히 미미하여 Ames test를 이용해 간단하게 돌연변이원성, 항돌연변이원성 시험을 실시하였다.

가. 돌연변이원성 시험

Samonella typhimurium TA98, TA100등의 mutant에 대해 n-헥산 분획물을 20~320 μ g/plate로 첨가한 후의 결과를 그림 3-6에 나타내었다.

Spontaneous revertant colony의 수에 비해서 각 농도로 시료를 첨가하여도 revertant colony의 수에 별다른 차이가 없어 시료자체의 돌연변이원성은 없는 것으로 나타났다.

함 등(1997)은 식용 산채류인 수리취로부터 제조한 추출물에서도 돌연변이원성이 나타나지 않았음을 보고하였고, 한 등(1992)도 쑥, 미나리, 두릅, 도라지 및 들나무등에서도 돌연변이원성이 나타나지 않았다는 경향을 나타내었음을 보고하여서 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

나. 항돌연변이원성 시험

돌연변이원성이 나타나지 않았으므로 식품중에서 발생할 수 있는 발암성물질인 benzo(α)pyrene에 의해 유도된 변이원성에 대한 돌연변이 억제작용을 조사하였다.

그림 3-7은 benzo(α)pyrene에 의해 유도된 TA98균주의 변이원성을 농도에 따라 나타내었다. Plate당 20 μ g의 benzo(α)pyrene이 가장 많은

복귀변이주의 colony를 가져 이 농도를 변이원으로 사용하였고 여기에 n-헥산분획물을 plate당 5~160 μ g까지 농도를 높여가면서 돌연변이억제를 살펴본 결과는 그림 3-8에 나타내었다. Plate당 80 μ g의 cinnamon extract첨가시 95%의 억제효과를 가져 높은 항돌연변이원성을 가진 것으로 사료되었다.

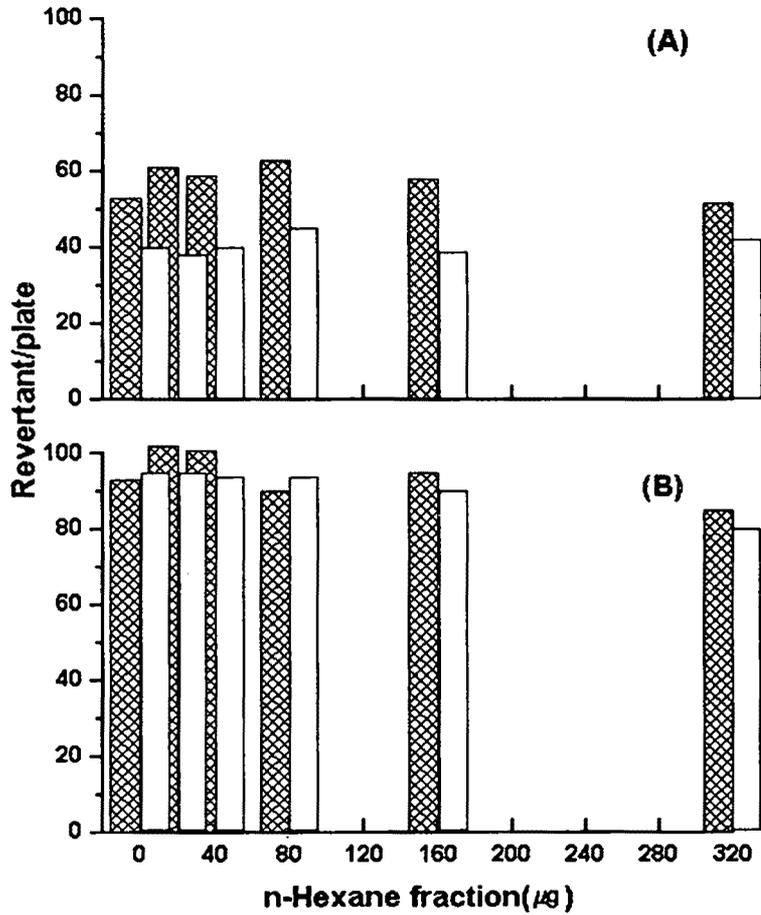


그림 3-6 계피의 n-헥산추출물에 대한 첨가농도별 돌연변이원성
 ⊠; S9 첨가구, □; S9 무첨가구
Salmonella typhimurium TA-100(A) and TA-98(B)을
 이용한 Ames test에 의해 측정하였다.

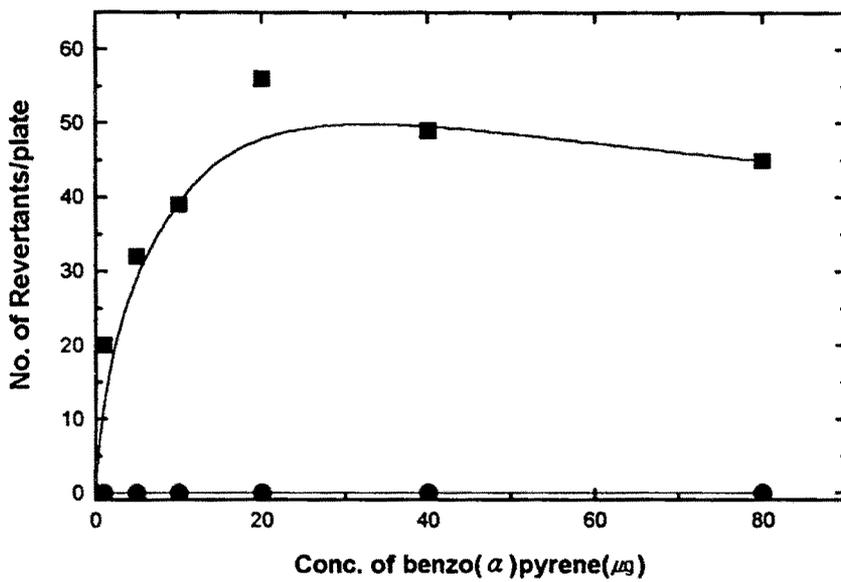


그림 3-7 벤조피렌 첨가농도에 따른 돌연변이원성
 ■; S9 첨가구, ●; S9 무첨가구
Salmonella typhimurium TA-98을 사용하였다.

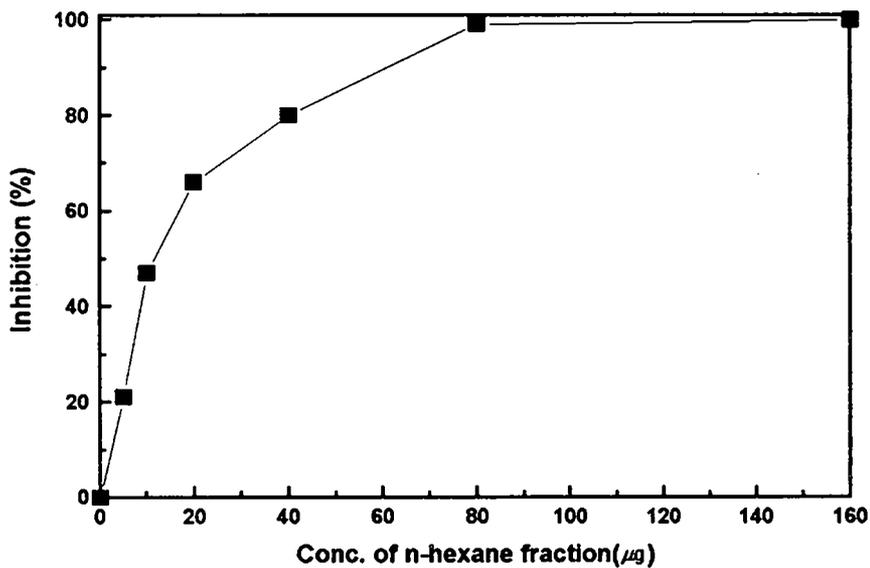


그림 3-8 계피의 n-헥산분획물의 농도별 항 돌연변이원성
 Benzo(α)pyrene(20μg/plate)에 대한 돌연변이원성을 *S. typhimurium*
 TA-98과 S9을 첨가하여 측정하였다.

$$Inhibition(\%) = \frac{M - S1}{M - S0} \times 100$$

M ; 돌연변이물질만 사용했을 때의 His⁺ 복귀주의 수

S0 ; 자연복귀주의 수

S1 ; 돌연변이물질과 계피추출물을 같이 사용했을 때의
 His⁺ 복귀주의 수

제 4 절 요약

1. 변질된 시판연제품에 대한 미생물검사결과 비포장어묵에서는 세균류로는 *Bacillus* sp.가 40%, 곰팡이류로는 *Aspergillus* sp. 및 *Penicillium* sp.가 주로 검출되었으며, 가열 살균된 포장어묵에서는 세균 중 *Bacillus* sp. 72%로 주 분포였고 그람양성 및 음성구균, 및 효모, 곰팡이는 검출되지 않았다.

2. 계피를 에탄올로 3차까지 추출하여 여러 미생물에 대하여 항균력을 검색한 결과, 1, 2차 추출물 모두가 효모 및 곰팡이류에 높은 증식억제 작용을 가졌다.

3. 계피 에탄올 추출물을 각종 유기용매를 이용하여 계통분획하여 분획물에 대한 항균력 검사를 행한 결과, n-헥산 분획물의 항균력이 가장 좋았다. 특히 *A. oryzae* 에 대해서는 29 μ g/disk까지 억제환을 가졌다.

또한 n-헥산분획물로부터 silica gel 및 flash column chromatography에 의하여 향진균성물질을 분리·정제하였으며, 정제된 물질에 대한 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 spectra로부터 구조를 해석한 결과, 계피의 주 향진균성물질은 trans-cinnamaldehyde로 동정되었다.

4. 진공포장된 어육연제품에 적용시켜본 결과 보존기간은 약 2일간 연장되었으나 색도, 탄력 등에서 상품성이 떨어졌다. 그러나 비포장튀김어묵의 경우 어묵의 표면에 에탄올로 1:3으로 희석한 n-헥산 분획물을 분사 처리하였을 때에는 표면 곰팡이 발육이 알코올만 분무한 것에 비하여 2일 이상 보존기간이 연장되어 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

5. 계피추출물의 돌연변이원성 및 항돌연변이원성시험을 실시하였다. 그 결과 plate당 320 μ g까지 돌연변이원성은 나타나지 않았으며, benzo (α)pyrene에 대한 돌연변이억제율은 plate 당 80 μ g에서 100%억제율을 보였다.

제 4 장 식품보존제로서의 알긴산 가수분해물

여 백

제 4 장 식품보존제로서의 알긴산 가수분해물

제 1 절 서 론

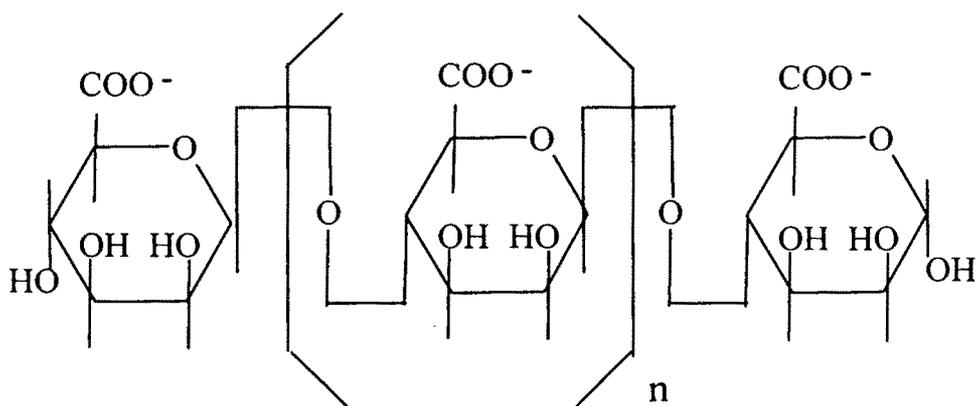
알긴산(alginic acid)은 다시마, 미역 등 갈조류의 세포막을 구성하는 주 성분으로서, D-mannuronic acid와 L-guluronic acid의 공중합체이며, 이들 상호간에는 1,4-glycosidic bond로 결합된 중합도 220~860의 고분자의 polyuronide이다(그림 4-1). 알긴산은 물에 불용성이나 그 알칼리염은 물에 용해되어 극히 점조한 용액을 만든다. 알긴산은 유리의 carboxyl기를 가지는 유기 고분자 전해질로서 용액은 음의 하전을 띠는데, 그 carboxyl기의 활성은 고분자 유기산 중에서 가장 강하다. 알긴산은 사람의 소화관내에서 소화되지 않고, 장의 연동운동을 촉진시키는 식이섬유이므로 변비 치유 및 비만 억제효과를 비롯하여 항암 및 항cholesterol 작용, 유해물질의 인체내에서 독성 발휘 억제효과도 있는 것으로 보고되어 있다.

일반적으로 기능성 다당류는 가수분해하여 저분자화시키면 기능성이 본래보다 더욱 증강되는 것으로 알려져 있는데, 특히 알긴산의 가수분해물은 미생물의 증식을 억제하는 효력도 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 알긴산을 적절히 가수분해시킨다면 현대인들이 가장 두려워하는 암, 고혈압 등과 같은 성인병의 예방효과를 보유하고 식품의 저장성을 높일 수 있는 기능성 식품의 소재로 개발이 가능하다고 하겠으며, 최근 기능성 음료의 소재 등으로도 개발되어 시판 중에 있다(해조미인/동원산업(주)).

알긴산 가수분해물은 항균성에 관해서 北御門(1989)은 polymannuronic

acid나 polygululonic acid를 가수분해시켜 얻은 중합도 3.0~5.0인 올리고당이 세균류에 대해 항균활성을 나타낸다고 보고하였고, 주(1993)는 자연계로 부터 분리해낸 *Vibrio* sp. AL-145의 알긴산 분해효소를 이용해 제조한 알긴산 가수분해물이 *Bacillus cereus* 및 *Staphylococcus aureus*의 증식을 억제한다고 보고한 바있다. 그러나 아직까지 알긴산을 가수분해할 수 있는 효소로서 산업적 용도로 개발된 것은 없다. 또한 알긴산의 화학적 가수분해법으로 무기산을 사용하는 방법이 알려져 있으나 인체에 해가 없거나 유익한 유기산을 사용하는 방법은 아직까지 보고된 것은 없다.

본 연구에서는 알긴산에 ascorbic acid(vitamin C)를 첨가하여 가열함으로써 가수분해시키는 방법을 개발하였으며, 이 가수분해물의 항균력을 확인하고, 이를 어묵에 첨가하여 건강 증진에 도움이 되면서도 어묵의 저장기간을 연장시킬 수 있는 기능성의 천연보존료로 이용하고자 하였다.



Alginic acid

그림 4-1. 알긴산의 화학 구조.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 알긴산

식품첨가물 등급의 Na-alginate를 사용하였다.

나. 어묵

어묵에 대한 알긴산 가수분해물의 첨가효과를 조사하기 위해 제조한 어묵의 원료 배합 비율은 표 4-1에 나타낸 바와 같다.

2. 실험방법

가. 가수분해물의 제조 및 특성 조사

Na-alginate에 등량의 ascorbic acid를 섞은 후 물을 가하여 4% 알긴산 용액을 만든다. 이 용액을 121℃에서 30분간 가열하여 알긴산을 가수분해시킨다.

나. 가수분해물의 항균력

멸균한 nutrient broth에 알긴산 가수분해물을 무균적으로 첨가하여 만든 배지에 공시균을 접종하여 균의 증식 최적온도에서 배양하면서 균의 증식을 억제시킬 수 있는 가수분해물의 최저농도(MIC)를 구하였다.

다. 어묵에 대한 첨가효과

(1) 어묵의 제조

표 4-1의 조성으로 배합한 원료에다 가수분해물을 첨가하여 고기갈이를 하였는데, 가수분해물을 첨가하는 양만큼 첨가하는 물의 양을 줄였다. 고기갈이를 마친 육은 진공포장한 다음 90℃에서 40분간 가열살균하였으며, 가열살균을 마치자마자 얼음물에 담구어 충분히 냉각시켰다.

표 4-1. 시험에 사용된 어묵의 배합 비율

냉 동 연 육	38.4%
전 분	15.2%
식 염	1.4%
난 백	4.7%
대두 단백질	1.2%
액상 첨가물	2.1%
분말상 첨가물	1.6%
물(얼음 포함) + 가수분해물	35.4%

(2) 어묵의 관능 평가

(가) 색택

Color difference meter(Model TC-3600, Tokyo Denshoku, Japan)를 사용하여 측정하였다. X, Y, Z치는 standard로 각각 X=80.8, Y=82.2, Z=91.6으로 조절하였다. Hunter 색체계상의 각 값은 다음의 계산식에 따라 각각 구하였다.

$$L(\text{명도}) = 10.0\sqrt{Y}$$

$$a(\text{적색도}) = 17.5(1.02 \cdot X - Y)/\sqrt{Y}$$

$$b(\text{청색도}) = 7.0(Y - 0.847 \cdot Z)/\sqrt{Y}$$

$$YI(\text{황색도}) = (1.28 \cdot X - 1.06 \cdot Z)100/Y$$

$$W(\text{백도}) = 0.847 \cdot Z$$

(나) 파단강도 (임계절단력; limit cutting force)

제조한 어묵의 중심부위를 폭 11mm을 잘라서 rheometer (NRM-2002J)를 사용하여 측정하였으며 g·f 단위로 표기하였다.

(2) 보존성 시험

(가) 생균수의 측정

A.P.H.A 방법(1992)에 따라 pour plate법으로 행하였다.

(나) pH의 측정

어묵에 9배량의 증류수를 가해 2분간 blending하여 만든 용액의 pH를 측정하였다.

가. 업계 전문가의 상품성 평가

게맛살 제조업계의 실무 책임자 18명과 식품관련학과 교수 12명 등을 대상으로 알긴산 및 키토산 가수분해물을 첨가한 게맛살제품과 제조업체에서 생산 시판 중인 기존의 제품에 대한 상품성을 다음 항목에 대해 비교·평가하였다.

- (1) 기존 제품에는 없는 맛과 향의 감지 여부
- (2) 이 맛이 제품의 상품성에 미치는 영향
- (3) 기존 제품과의 식감 차이
- (4) 상품화가 가능한 제품의 제조원가 상승률의 한도

표 4-2. 시제품 시식회에 참석한 주요 생산업체의 전문가 명단

업 체 명	평 가 자	
	직 책	성 명
대림수산 (주) 부산공장	부 장 과 장 과 장	황 철 순 이 재 돈 구 만 석
대림수산 (주) 안산공장	과 장	정 신 호
오양수산 (주) 안산공장	품질관리실장	김 창 임
신라수산 (주) 안산공장	부 장 과 장	김 광 린 안 병 식
진주햄 (주) 양산공장	공 장 장	구 자 윤
한성기업 (주) 구룡포공장	공 장 장	이 원 동
한성기업 (주) 김해공장	과 장	고 병 호
삼호물산 (주) 성남공장	과 장	김 태 형
명신화성 (주) 양산공장	과 장	김 복 규
국립수산진흥원 위생가공연구실	박 사	이 태 식 임 치 원
동원산업 (주) 창원공장	품질관리팀장	지 청 일

이들 외 식품관련학과의 교수 및 대학원생 30여명참석하였슴

제 3 절 결과 및 고찰

1. 가수분해물의 제조 및 성상

Na-alginate에 동량의 ascorbic acid를 섞어 만든 알긴산 4% 용액을 121℃에서 30분간 가열하면 알긴산이 가수분해되어 극히 점성이 낮은 알긴산 가수분해물이 얻어진다(그림 4-2). 가열시간은 용기에 담은 알긴산 용액의 부피에 따라 적절히 가감할 수 있지만 가열시간이 너무 길면 용액의 황색도가 증가하고 침전물이 생성되며, 너무 짧으면 가수분해도가 떨어짐에 유의하여야 한다. 가장 바람직하게 조제된 가수분해물은 상대점도 1.05이고, 색택은 whitish-yellow color의 불투명한 용액이며, pH는 3.2로 나타났다(표 4-3).

2. 가수분해물의 항균력

알긴산 가수분해물을 멸균한 nutrient broth에 농도별로 첨가하여 항균력을 조사했는데, 대장균은 0.15% 첨가(가수분해물속의 알긴산의 양을 기준)로도 증식이 억제되지 않았으나, 어묵의 주요 부패균으로 분리해낸 *Bacillus* sp.는 0.1% 첨가로 증식이 억제되었다(표 4-4).

3. 첨가제품의 관능 평가

가수분해물을 첨가하여 제조한 어묵의 품질을 무첨가구와 비교해보았다. 가수분해물을 첨가하지 않은 대조구의 pH는 7.4였다. 가수분해물의 첨가량이 증가함에 따라 제품의 pH는 저하되는 경향을 나타내어 가

수분해물 0.3% 첨가(가수분해물속의 알긴산의 양을 기준) 제품은 pH 6.7, 0.5% 첨가 제품은 pH 6.6으로 나타났다. 제품의 탄력은 가수분해물의 첨가량이 늘어남에 따라 파단강도(임계절단력)가 저하되었는데, 이는 가수분해물의 첨가로 제품의 pH가 저하되었기 때문으로 추정된다. Color difference meter를 사용하여 측정한 Hunter color system상의 색택변화도 가수분해물의 첨가량이 증가함에 따라 a치와 b치가 증가하여 제품이 황색화되어 감을 알 수 있었다(표 4-5). 이렇게 알긴산 가수분해물의 첨가량이 너무 많으면 제품의 관능적 품질이 저하되므로 제품에 대한 첨가농도는 품질에 악영향이 크지 않을 정도의 농도인 0.3%로 결정하였다.

가수분해물 첨가 제품은 고구마 맛과 비슷한 약간 구수한 맛을 내었으며, 그 외의 별 다른 맛과 향은 감지되지 않았다.

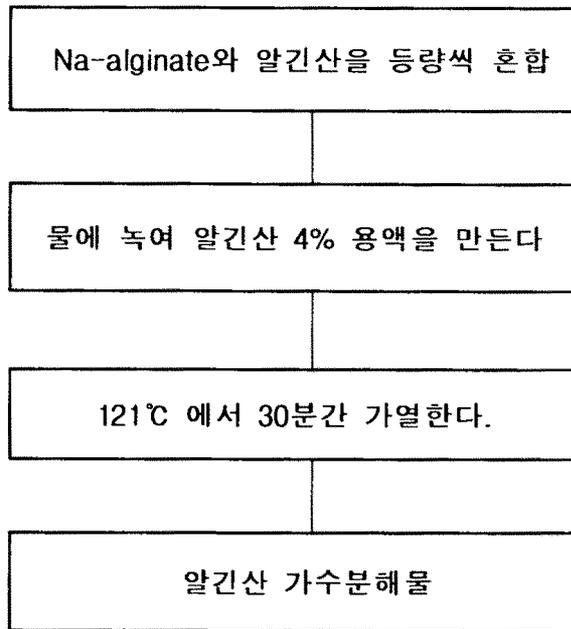


그림 4-2. 알긴산 가수분해물의 제조방법.

표 4-3. 알긴산 가수분해물의 성상

Hunter 색체계					pH	상대점도
L	a	b	YI	W		
32.3	-3.4	-2.2	-19.44	11.43	4.9	

표 4-4. 알긴산 가수분해물의 항균력

	0.075%	0.1%	0.125%	0.15%
<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+

※ 가수분해물이 농도별로 함유된 배지에 공시균을 접종하여 35℃에서 72시간 배양시킨 후 균의 증식 여부를 판별.

+ : 증식, - : 비 증식

4. 가수분해물의 어묵 보존효과

어묵의 저장 중에 제품의 g당 생균수가 10^5 이상이 되는 시점부터 제품에서는 포장의 진공도가 떨어지고, 점질물의 생성과 부패취가 감지되기 시작하였으므로 이때를 초기부패가 시작되는 시기로 볼 수 있다. 알긴산 가수분해물을 0.3% 첨가한 어묵은 30℃에서 저장하였을 때 어묵의 g당 생균수가 10^5 이상이 되는 시점이 무첨가구에 비해 1일 가량 연장되는 것으로 나타났다. 20℃에서 저장하였을 때는 2일이, 15℃에서 저장하였을 때는 4일 가량 연장되는 것으로 나타났다(그림 4-3, 4-4, 4-5). 알긴산 가수분해물을 어묵에 첨가함으로써 어묵의 보존기간이 연장되는 효과를 얻을 수 있었는데, 첨가한 알긴산이 나타내는 기능성을 감안한다면 어묵보존료로 이용 가능하다고 하겠다.

5. 가수분해물을 첨가한 제품의 저장중 관능적 품질변화

가수분해물을 첨가하여 제조한 제품을 20℃에서 저장하면서 저장중 제품의 탄력변화(표 4-6)와 색택변화(표 4-7)를 측정 한 결과, 무첨가구에 비해 유의할 만한 차이점은 나타나지 않았다.

표 4-5. 알긴산 가수분해물을 첨가한 제품의 관능적 품질평가

	pH	Hunter 색체계			파단강도* (g · f)
		L	a	b	
무첨가구	7.4	75.70	-2.07	8.97	129.13
0.3% 첨가구	6.7	70.92	1.22	10.52	101.97
0.5% 첨가구	6.6	65.60	1.57	12.01	87.7

* 임계절단력(Limit cutting force)

표 4-6. 알긴산 가수분해물을 첨가한 제품의 20℃저장중 파단강도의 변화

days	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control	129.13	131.73	138.72	133.99	141.26	148.88	148.83	142.17	147.11	150.67
알긴산	101.97	104.64	119.14	126.95	120.17	121.04	122.09	134.39	129.43	132.02

표 4-7. 알긴산 가수분해물을 첨가한 제품의 20℃저장중 색택의 변화

days	Control					알긴산 가수분해물 첨가시료				
	L	a	b	YI	W	L	a	b	YI	W
1	75.70	-2.07	8.97	19.57	47.63	70.92	1.22	10.52	28.10	39.66
2	71.62	3.75	9.24	27.17	41.86	67.16	4.48	12.22	37.67	33.39
3	68.99	2.93	9.45	27.88	38.31	65.35	2.83	11.44	34.76	32.03
4	67.97	2.90	9.11	27.37	37.37	66.11	3.66	11.83	36.32	32.54
5	66.48	1.79	11.40	32.93	33.39	66.78	3.94	8.66	27.76	36.36
6	73.48	2.33	9.81	26.47	43.73	69.43	5.26	11.28	34.82	37.03
7	49.60	48.30	12.10	32.43	32.03	63.48	1.10	15.58	45.45	26.19
8	70.99	4.24	8.94	27.14	41.36	67.53	6.33	12.32	39.69	33.73
9	67.60	7.65	8.38	30.62	37.63	68.56	4.48	11.84	35.91	35.42

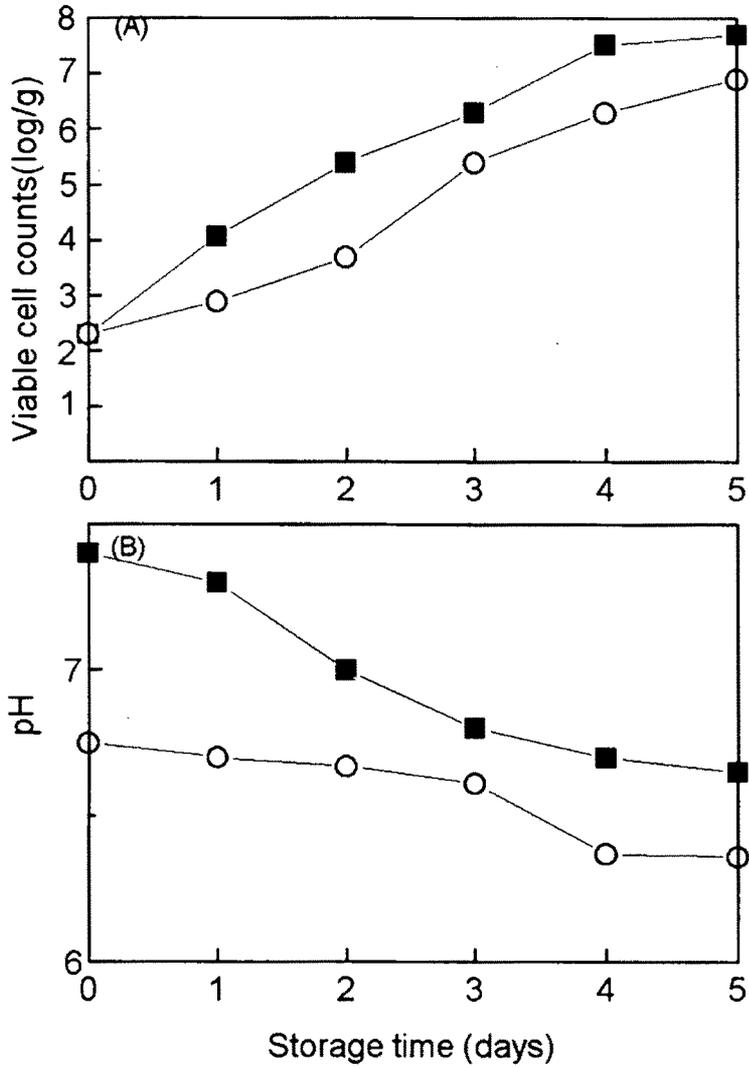


그림 4-3. 알긴산 가수분해물을 함유한 어묵을 30℃에 저장하였을 때 저장시간 경과에 따른 어묵의 g당 생균수 및 pH의 변화.
 (■), 대조구; (○), 알긴산 가수분해물 첨가제품

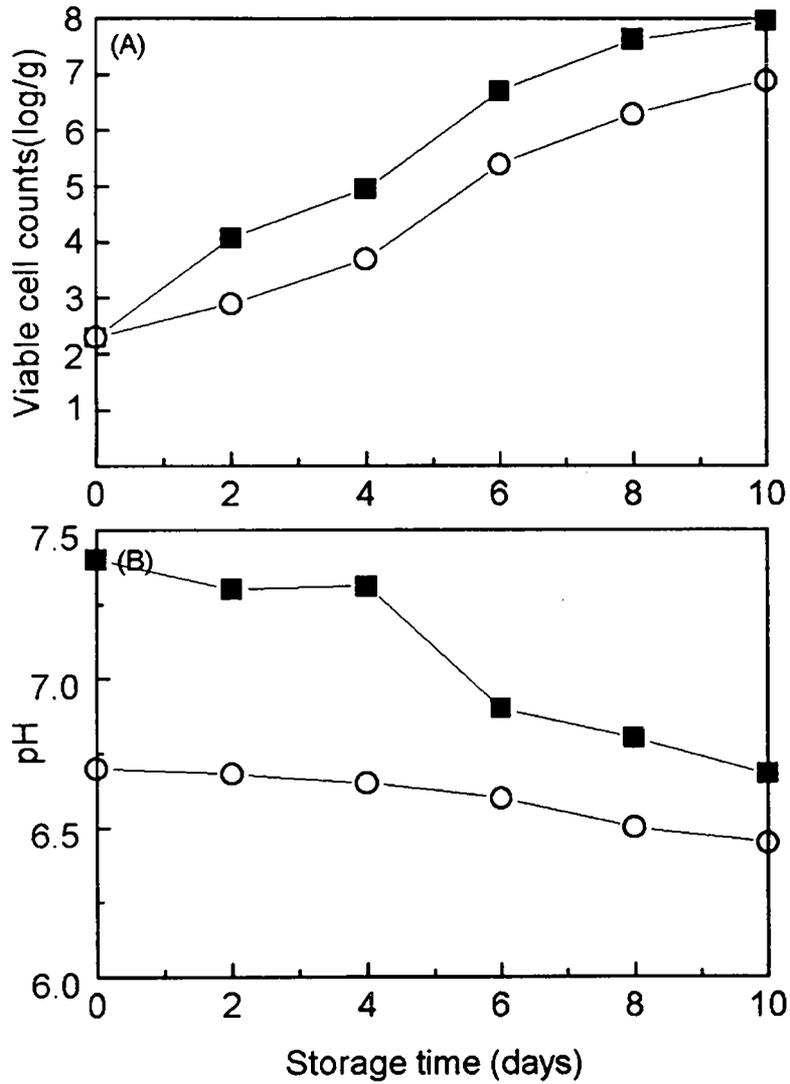


그림 4-4. 알긴산 가수분해물을 함유한 어묵을 20℃에 저장하였을 때 저장시간 경과에 따른 생균수 및 pH의 변화.

(■), 대조구; (○), 알긴산가수분해물 첨가제품

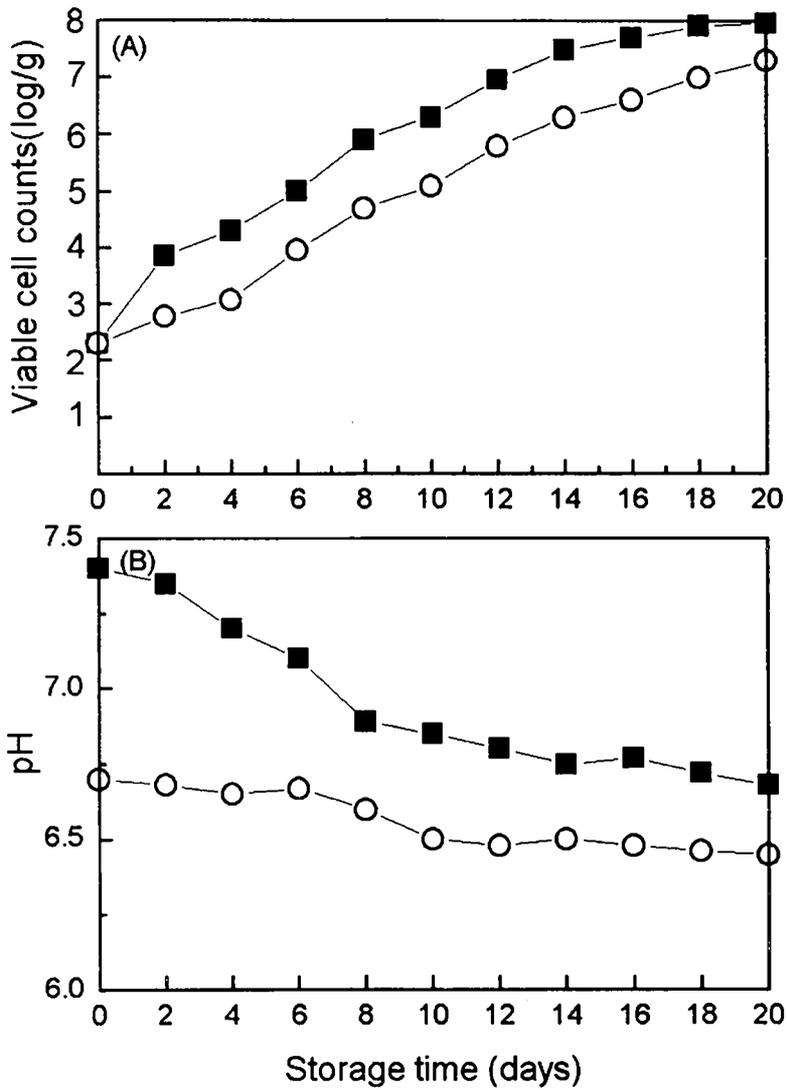


그림 4-5. 알긴산 가수분해물을 함유한 어묵을 15°C에 저장하였을 때 저장시간 경과에 따른 생균수 및 pH의 변화.

(■), 대조구; (○), 알긴산가수분해물 첨가제품

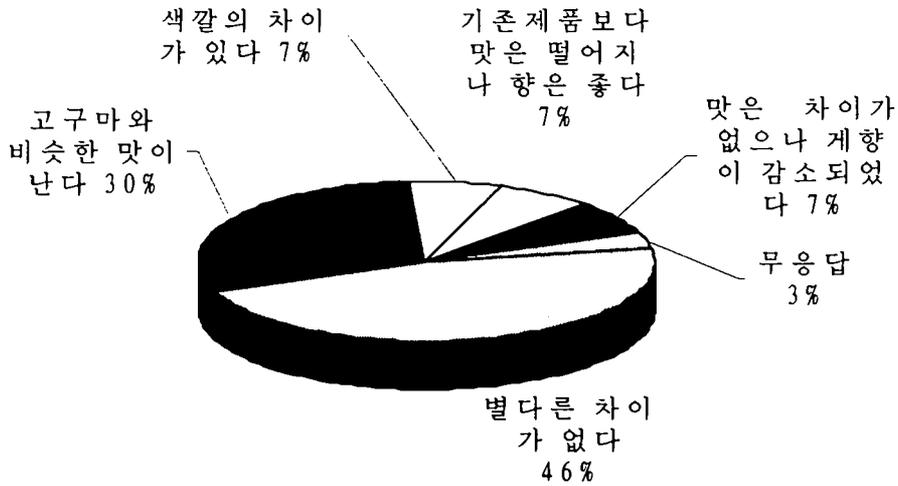
6. 가수분해물을 첨가한 제품의 품질에 대한 전문가의 상품성 평가

가수분해물을 첨가하여 제조한 제품의 맛과 향이 기존 제품에 비해 별 차이가 없다고 응답한 사람이 전체 응답자 30명 중에서 14명으로서 46.7%를 차지하여 절반에 가까웠다. 고구마와 비슷한 맛이 감지된다는 사람이 30%였다. 이러한 맛과 향이 제품의 상품성에는 별 영향이 없다는 응답이 43.3%, 이 맛과 향으로 제품의 상품성이 높아진다는 응답이 6.7%여서 응답자의 절반이 긍정적인 답변을 하였다. 나머지는 부정적인 답변을 하였지만 부정적인 응답자의 대부분은 상품성이 조금 떨어지는 것으로 답변하였다.

식감은 응답자의 절반이 별 영향이 없다고 하였으며, 식감이 높아진다는 쪽이 16%, 나빠진다는 쪽이 35%였다.

가수분해물을 첨가한 제품의 원가 상승 요인이 5%이내라면 상품화가 가능하다는 답변이 응답자의 61%로 나타났다.

(1) 기존제품에는 없는 맛과 향이 감지된다면 어떤 것입니까?



(2) 이 맛과 향은 제품의 상품성에 어떤 영향을 미친다고 생각하십니까?

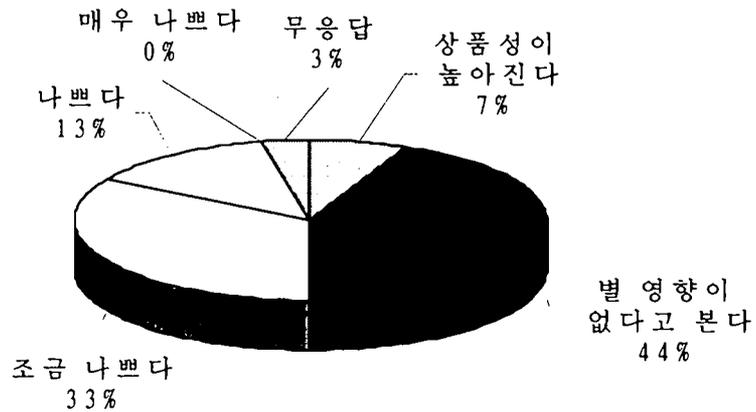
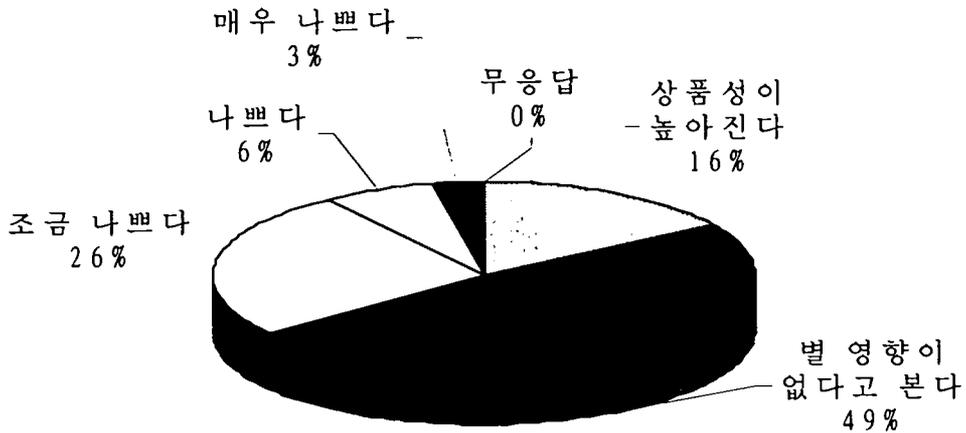


그림 4-6. 알긴산 가수분해물을 첨가한 제품의 품질에 대한 전문가의 상품성 평가(A)

(3) 기존 제품에 비해 식감이 어떻다고
생각하십니까?



(4) 본 제품의 가격이 기존 계맛살 제품
보다도 원가 상승 요인이 있습니다.
가격 상승률이 어느 정도까지라면
상품화가 가능하다고 보십니까?

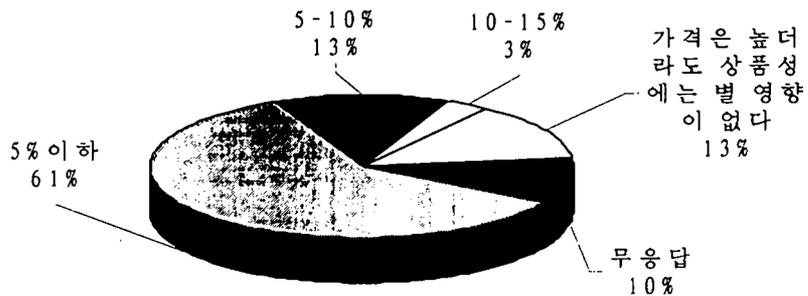


그림 4-6. 알긴산 가수분해물을 첨가한 제품의 품질에 대한
전문가의 상품성 평가(B)

제 4 절 요약

1. Na-alginate에 등량의 ascorbic acid를 섞은 후 물을 가하여 알긴산 4% 용액을 만든다. 이 용액을 121℃에서 20~30분간 가열하여 알긴산을 가수분해시킨다. 이 가수분해물은 상대점도 1.05, pH 3.2의 whitish-yellow color의 불투명한 용액이다.
2. 알긴산 가수분해물은 nutrient broth에 0.1% 첨가(가수분해물속의 알긴산의 양을 기준하여)로 어묵의 주요 부패균인 *Bacillus* sp.의 증식을 억제시킬 수 있었다.
3. 가수분해물 0.3% 첨가 제품은 pH 6.7이었고, 0.5% 첨가 제품은 pH 6.6으로서 무첨가 제품의 pH 7.4 보다는 약간 낮았다. 첨가제품은 약간 구수한 맛(고구마 맛과 유사)을 내었다. 제품의 탄력을 파단강도로 측정한 결과 가수분해물의 첨가량이 증가할수록 저하되는 것으로 나타났다. 제품의 색상은 가수분해물의 첨가량이 증가함에 따라 황색화되었으므로 0.3% 이상의 첨가는 곤란하였다.
4. 어묵의 제조시 가수분해물을 0.3% 첨가하고 30℃에서 저장하였을 때, 가수분해물을 첨가하지 않은 제품에 비해 1일 가량 보존기간이 연장되었고, 20℃ 저장시에는 2일이, 15℃에서 저장하였을 때는 4일 가량 보존기간이 연장되는 것으로 나타났다.
5. 가수분해물을 첨가한 제품의 품질에 대해 업계의 전문가를 중심으로 한 상품성 평가 설문조사에서는 가수분해물을 첨가하여 제조한 제품

의 맛과 향이 기존 제품에 비해 별 차이가 없다고 응답한 사람이 전체 응답자의 46.7%를 차지하여 절반에 가까웠다. 고구마와 비슷한 맛이 감지된다는 사람이 30%였다. 이러한 맛과 향이 제품의 상품성에 긍정적이라는 답변이 절반을 차지하였다. 식감은 응답자의 절반이 별 영향이 없다고 하였다. 가수분해물을 첨가한 제품의 원가 상승 요인이 5%이내라면 상품화가 가능하다는 답변이 응답자의 60%로 나타났다.

제 5 장 식품보존제로서의 Chitosan 효소분해물

여 백

제 5 장 식품보존제로서의 Chitosan 효소분해물

제 1 절 서 론

키토산(chitosan)은 게, 새우 등의 해산 갑각류의 껍질을 산 처리 및 알칼리 처리하여 얻은 키틴(chitin)을 다시 고농도의 수산화나트륨 용액 속에서 가열처리하여 제조한 poly- β (1,4)-D-glucosamine의 천연 다당류이다(그림 5-1). 키토산은 물과 유기용매에는 용해되지 않지만, 묽은 산에는 녹아 점조한 고분자의 양이온성 용액이 된다. 이렇게 (+)하전을 띠는 키토산용액은 폐수처리시 고분자 물질의 응집제로 이용되고 있고, 흡습·보수성을 이용하여 화장품을 비롯한 의약품 등의 분야에도 이용되고 있으며, 키토산 film이나 키토산 섬유 등으로도 제조되어 이용되고 있다. 게다가 키토산은 항암작용, 혈중 콜레스테롤 개선작용, 고혈압 조절작용, 체내의 유해물질의 배설작용, 비피더스균의 증식을 촉진하는 작용 등과 같은 기능성을 보유하고 있으므로 건강식품으로도 활발히 개발되고 있다. 키토산의 기능성에 대한 그간의 국내외 연구 보고를 요약하면 다음과 같다.

1. 항암작용

키토산의 기본 단위체인 D-glucosamine이 natural killer 세포의 활성을 증가시킨다는 보고도 있으며, 키토산올리고당이 대식세포, 림프구 및 cytokine이 면역계를 부활 내지 증강시킴으로서 높은 항종양작용을 나타낸다고 보고되어 있다.

2. 유해물질 배출작용

키토산은 그 구조상 다가양이온을 함유한 mucopolysaccharide로서 체내의 지질, 콜레스테롤, 중금속, 방사능 오염물질 등을 배출하는 역할을 하며, 및 이온 교환능이 있으므로 이들 물질을 치환·흡착·결합하여 체내로 흡수되지 않고 체외로 배출시키는 작용을 한다.

3. 고혈압 강하 작용

과다하게 섭취된 식염은 혈압과 혈당치 상승의 원인이 된다. 키토산의 아미노기는 식염이 해리되어 생성된 염소 이온과 결합하여 체내로의 흡수를 방해하고, 체외로 배출시키는 작용을 하므로 고혈압과 당뇨병의 예방에 효과가 있다.

4. 정상, 소화 촉진 및 장내 균총의 변화(유익균의 증식 촉진)

키토산은 동물성 식이 섬유질 일종으로 설사 및 변비 환자들에게 섭취시키면 분변의 수분 함량의 조정과 장관 통과 시간을 조절하므로써 정상적인 변으로 조정하는 정상 작용을 하며, 비소화성의 식이 섬유가 장내 용모를 자극함으로써 생성된 대사 산물에 의해 장내의 pH를 약산성(pH 5.0)으로 조절하여 장내 유용 세균의 증식최적 pH로 조절하므로써 유해 세균의 증식을 억제하고, 유산균과 같은 유익 세균의 증식을 촉진시켜 정상적인 장내 균총으로 개선시킨다. 또한 키토산의 구성 단위체인 D-glucosamine은 비피더스균의 생육인자로도 이용된다.

키토산의 안전성에 대해 살펴보면 키토산의 원료가 되는 게나 새우

등과 같은 갑각류는 오래 전 부터 섭취해 온 것으로서 안전성이 충분히 확인되어 왔으며, 그 화학적 구조로 볼 때도 생체 친화성이 우수한 D-glucosamine이 반복 연결된 다당류의 형태를 취하고 있다. 쥐 (mouse)에게 키토산을 체중 1kg당 18g을 경구투여하여도 아무런 독성이 나타나지 않는 것으로 보고되어 있다. 그 외에도 변이원성(기형 및 발암성) 시험, 피부 제 1차 자극성 시험, 광독성 시험, 경피 감수성 시험, 안점막 1차 자극성 시험, Patch 시험, 경피 흡수성 시험 등을 통해서도 안전성이 극히 높다고 판단되어 있다.

한편 세균의 세포 표층구조는 (-)하전을 띠고 있으므로 (+)하전을 띠는 키토산과는 상호간의 정전압 형성으로 인하여 각종 생리장애를 유발할 수 있으므로 각종 미생물의 증식을 억제할 수 있으므로 식품보존료로도 이용 가능할 것이다. 그러나 키토산은 분자량이 클수록 특유한 강한 짙은맛을 나타내므로 그대로는 식품소재로 이용하기는 곤란한 실정이다.

키토산은 가수분해시켜 저분자화시키면 항균력이 증강되고, 짙은 맛도 현저하게 감소하는 등 기능성이 상당히 개량됨을 본 연구자 등이 이미 밝힌 바 있다(조, 1989).

본 연구에서는 고분자 키토산을 가수분해시켜 높은 항균력을 가지는 키토산 효소분해물을 제조하여 이를 기능성을 갖춘 어묵용 보존료로 이용하고자 하였다.

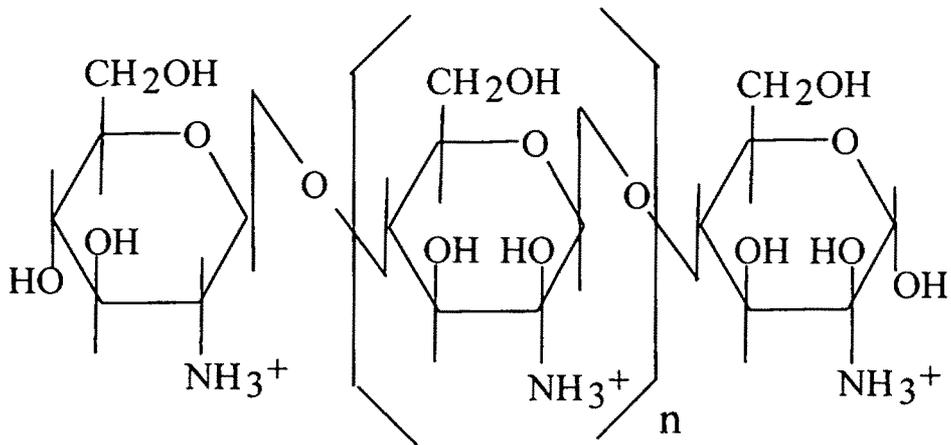


그림 5-1. Chitosan의 화학구조.

Chitosan

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 키토산

고분자 키토산 제품은 (주)신영키토산의 SY-1,000을 2% 이하의 용액의 제조에 사용하였고, 중간 분자인 (주)영덕키토산의 점도 100~150cP의 제품을 어묵보존효과시험을 위한 4%용액의 제조에 사용하였다.

나. 배지

(1) 키토산 분해효소 생산균 분리용 배지

Colloid chitosan 1% 용액과 casamino acid 1%, tryptone 1%, NaCl

1%, K_2HPO_4 0.5%, K_2HPO_4 0.2%의 혼합용액을 각각 121℃에서 15분간
따로 멸균시킨 다음, 50~60℃로 냉각시킨 후 등량씩 혼합하여 조제하였
다(표 5-1).

(2) 균체의 키토산 분해효소 생성 확인용 배지

(1)의 키토산 분해효소 생산균 분리용 배지에서 한천을 제외하여 사용
하였다.

(3) 항균력 측정용 배지

키토산이 배지성분의 용해도에 영향을 미치지 않는 성분들로 표 5-2
와 같은 조성의 배지를 사용하였다.

다. 어묵

알긴산 가수분해물의 보존효과시험에 사용된 조성(표 4-1)과 동일하게
사용하였다.

2. 실험방법

가. 키토산의 용해

키토산 g당 acetic acid 0.3ml를 가하고 물을 4~5 차례로 나누어 가하
면서 수시로 교반하면서 1일 밤 정도 방치한다.

표 5-1. 키토산 분해효소 생산균 분리용 배지

<u>A 용액</u>	
Colloid chitosan	1.0%
<u>B 용액</u>	
Casamino acid	1.0%
Tryptone	1.0%
NaCl	1.0%
K ₂ HPO ₄	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.2%
Agar	1.5%

A, B 두 용액을 각각 121℃에서 15분간 따로 멸균시킨 다음 50~60℃로 냉각시킨 후 등량씩 혼합하여 조제.

표 5-2. 항균력 측정용 배지의 조성

Glucose	1.0%
Casamino acid	1.0%
NaCl	0.5%
K ₂ HPO ₄	0.25%
KH ₂ PO ₄	0.1%
Yeast extract의 투석막 통과 성분	0.2%
Beef extract의 투석막 통과 성분	0.2%
Malt extract의 투석막 통과 성분	0.2%

나. 키토산 분해효소 생산균의 탐색

(1) 효소 생산균의 분리

0.5% 키토산용액 50ml에다 여러 지역에서 채취한 토양을 각각 0.5g씩 가한 Δ -flask를 실온에 방치하면서 용액의 점도 변화를 관찰하였다. 점도 저하가 일어난 flask로 부터 증식된 미생물을 키토산 분해효소 생산균 분리용 배지에 획선배양하여 집락 주위에 투명환이 나타난 균을 키토산 분해효소 생산균으로 1차적으로 선정하였다. 이 균주들을 각각 키토산 분해효소 생산용 배지에 접종하여 colloid chitosan이 대부분 분해될 때 까지 진탕배양(30°C, 100rpm)한 후, 원심분리(10,000rpm, 5°C, 15min) 및 여과(0.45 μ m, membrane filter)로 제균한 배양여액에 대해 효소 활성도를 조사하여 키토산 분해효소 생산균으로 최종적으로 선정하였다(그림 5-2).

(2) 분리 미생물의 동정

세균은 “Bergey's manual of systematic bacteriology” 제1판을 참조하여 동정하였으며, 곰팡이는 Malloch의 “Moulds - Their isolation, cultivation and identification”를 참조하여 동정하였다.

다. 효소 활성도 측정

효소의 활성은 1% 키토산 용액을 시험관에 9ml씩 분취하여 반응온도에서 10분간 예열한 뒤, 효소액 1ml를 가하여 10분간 반응시켰으며, 반응 후 끓는 물 속에서 5분간 가열하여 효소반응을 중지시켰다.

효소 활성도는 효소반응 이전의 반응 혼합액의 상대점도에 대한, 효소반응 후 용액의 상대점도의 비율, 즉 상대점도의 감소율을 효소의 활성도로 표기하였다(그림 5-3).

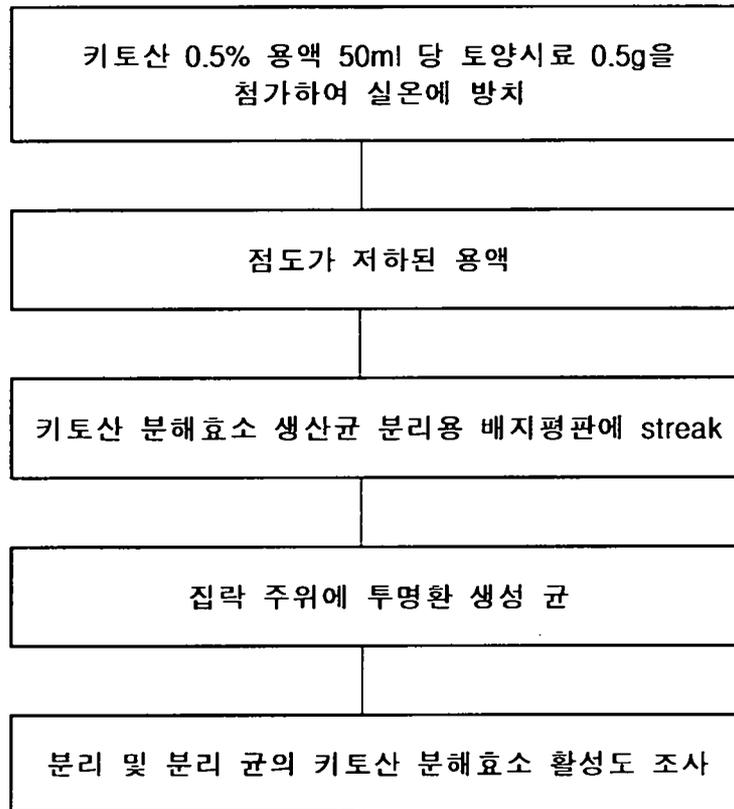


그림 5-2. 키토산 분해효소 생산균의 분리법

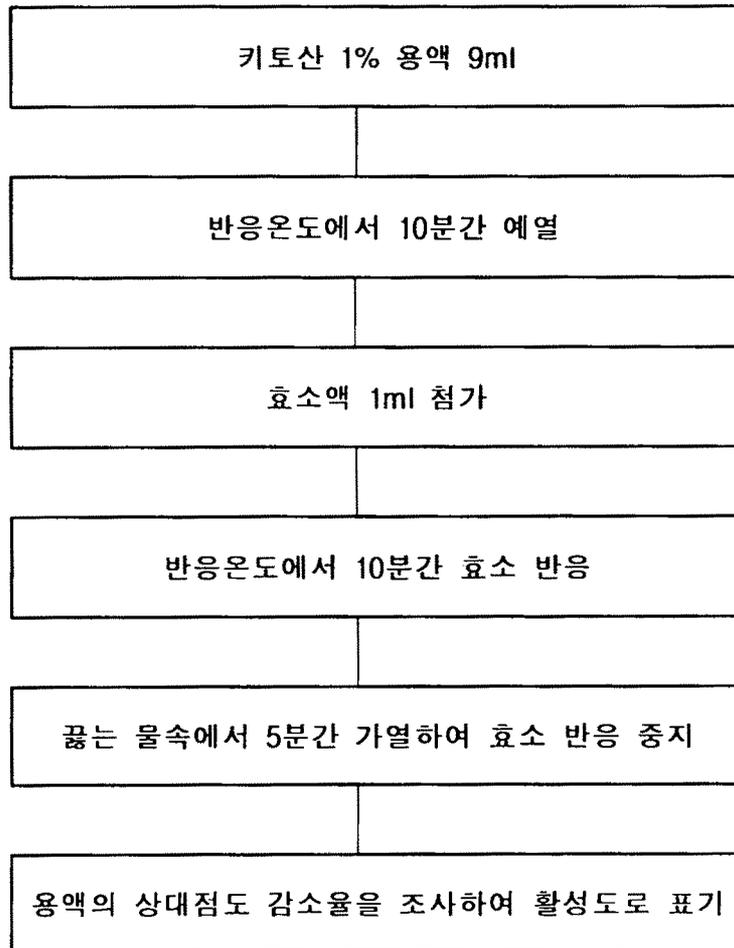


그림 5-3. 키토산 분해효소의 활성도 측정법

라. 효소분해물의 제조 및 특성 조사

(1) 점도의 측정

키토산 용액의 절대점도는 Brookfield 회전 점도계(BM형, Tokyo Keiki Co. , LTD.)를 사용하여 30℃ 수조에서 측정해 cP단위로 표기하였다. 상대점도는 Ostwald형 점도계를 사용하여 30℃ 수조에서 측정하였다.

(2) 효소분해물의 제조

고분자 키토산용액에 키토산 분해효소를 가한 후 40℃에서 효소반응을 시키면서 용액의 상대점도가 목적하는 시점에 도달하면 autoclaving 하여 제조하였다(그림 5-4).

(3) 항균력 시험

멸균한 항균력 측정용 배지(표 5-2)에 효소분해물을 농도별로 첨가한 후 공시균을 접종하여 각 균종 별로 생육의 최적온도에서 배양하면서 균의 증식 여부를 조사하여 균 증식의 억제에 요구되는 효소분해물의 최저농도(MIC)를 구하였다.

마. 어묵 보존시험

알긴산 가수분해물을 사용한 실험과 동일한 방법으로 행하였다.

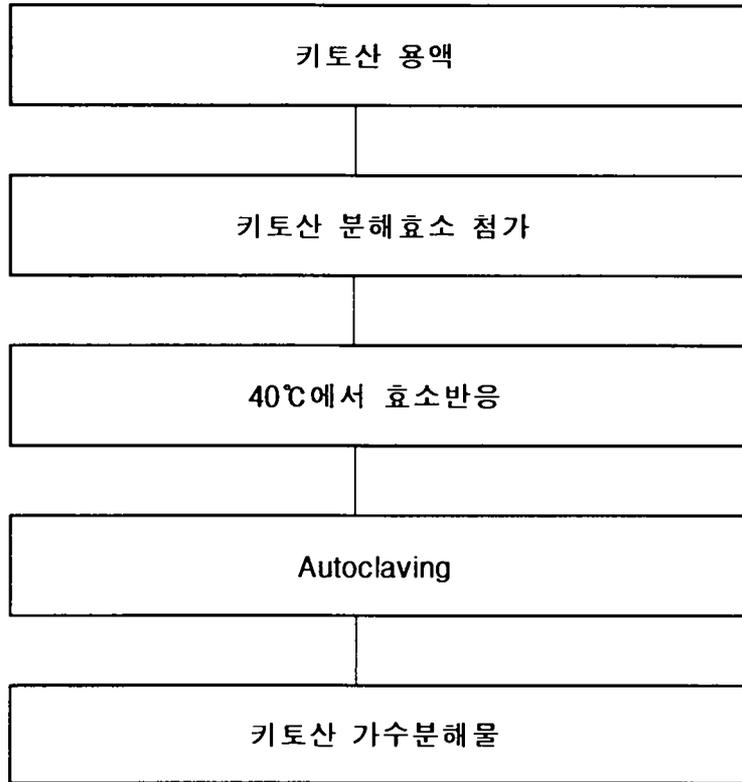


그림 5-4. 키토산 효소분해물의 제조방법.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 키토산 분해효소 생산균의 탐색

가. 토양에서의 탐색

키토산용액에 여러 지역에서 채취한 토양시료를 소량 가하여 25℃에서 방치한 총 20개의 flask 중에서 8개가 방치 15~20일 경에 점도 저하가 일어났다. 이 용액을 키토산 분해효소 생산균 분리용 배지 평판에 streak하여 배양한 결과, 3 종류의 세균과 2 종류의 곰팡이를 각각 분리해 내었다. 이들 분리균의 특성은 표 5-3과 5-4에 나타난 바와 같으므로 곰팡이는 *Aspergillus* sp.와 *Penicillium* sp.로, 세균은 *Staphylococcus* sp.와 *Bacillus* sp.로 추정되었다. 따라서 이후 이들 균주를 *Aspergillus* CHS-1, *Penicillium* CHS-2, *Staphylococcus* CHS-3, *Bacillus* CHS-4로 각각 명명하기로 하였다.

이 균들을 키토산 분해효소 생산용배지에 접종하여 30℃에서 배양하였다. 배양의 종료시점은 각 배양 flask 속의 균체의 증식도가 더 이상 늘어나지 않고, colloid chitosan이 분해되어 완전히 소실될 때까지로 하였다. 배양액을 원심분리 및 millipore(0.45 μ m)로 여과시켜 균체를 제거한 배양여액을 대상으로 균체의 키토산 분해효소의 활성을 30℃에서 측정하여 그 활성도를 표 5-5에 나타내었다. 이들 균들 중에서 *Aspergillus* CHS-1가 가장 활성이 높은 것으로 나타났다.

나. 표준균주에서의 탐색

자연계에서 분리한 균을 식품용 소재의 생산에 사용하려면 균의 생육률에 대한 안전성이 완전히 판별되어야 가능하다. 토양에서 분리된 균주

들 중에서 분리균들 중에서 *Aspergillus* sp.가 가장 키토산 분해효소의 활성이 높은 것으로 나타났으므로 *Aspergillus* sp. 균주 중에서 식용미생물로 분류되어 있고, 발효공업에서 널리 사용되고 있는 표준균주 몇가지를 대상으로 균체의 키토산 분해효소 활성을 조사하게 되었다(표 5-6). 공시균주들은 대부분 높은 효소 활성을 나타내었는데, 특히 *Aspergillus oryzae* ATCC 22787의 활성이 높아서 이후 이 균주를 키토산 분해효소 생산용 균주로 선정하게 되었다. 이 균주는 청주 양조시 쌀 koji 제조용으로 기존 사용되고 있는 균주이므로 균체 생성물의 인체에 대한 안전성에 문제가 없다. 따라서 배양여액은 별다른 정제과정을 거치지 않고도 효소로 바로 사용할 수가 있다.

표 5-3. 토양에서 분리한 키토산 분해활성을 보유한 곰팡이의 특성

집락의 색깔	yellowish brown	bluish green
Septa	+	+
Spore	conidia	conidia
Sterigma	+	+
Vesicle	+	-
Conidiophore	+	+
동정 및 명명	<i>Aspergillus</i> CHS-1	<i>Penicillium</i> CHS-2

표 5-4. 토양에서 분리한 키토산 분해활성을 보유한 세균의 특성

세포의 형태	cocci	rods
Gram 염색성	+	+
내생포자	-	+
운동성	-	+
Oxidase	-	+
Catalase	+	+
Glucose 이용능	fermentative	fermentative
동정 및 명명	<i>Staphylococcus</i> CHS-3	<i>Bacillus</i> CHS-4

표 5-5. 토양에서 분리한 키토산 분해활성을 보유한 미생물의 균체외 키토산 분해효소의 활성화도 조사

균 주	효소 활성화도*
<i>Aspergillus</i> CHS-1	59.7
<i>Penicillium</i> CHS-2	52.3
<i>Staphylococcus</i> CHS-3	33.9
<i>Bacillus</i> CHS-4	50.5

*키토산 1% 용액 9ml를 반응온도에서 10분간 예열한 뒤, 효소액 1ml를 가하여 10분간 반응시켰으며 반응 후 끓는 물 속에서 5분간 가열하여 효소반응을 중지시켰다. 효소 활성화도는 반응 혼합액의 상대점도의 감소율로 표기.

표 5-6. 발효공업에 사용되는 *Aspergillus* sp. 표준균주를 대상으로한 균체의 키토산 분해효소의 활성화도 조사

균 주	효소 활성화도*
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 22787	67.5
<i>Aspergillus oryzae</i> IFO 5238	58.2
<i>Aspergillus oryzae</i> IFO 5239	46.9
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>macrosporus</i> ATCC 16513	54.7

*키토산 1% 용액 9ml를 반응온도에서 10분간 예열한 뒤, 효소액 1ml를 가하여 10분간 반응시켰으며 반응 후 끓는 물 속에서 5분간 가열하여 효소반응을 중지시켰다. 효소 활성화도는 반응 혼합액의 상대점도의 감소율로 표기.

2. 효소의 생산

A. *oryzae*균주를 이용하여 키토산 분해효소를 간편하고 경제적으로 생산하기 위하여 개발해낸 배지의 조성은 표 5-7에 나타낸 바와 같다. 키토산 1%용액은 110℃에서 20분간 가열살균하였으며, yeast extract 1% 용액은 121℃에서 15분간 멸균하였다. 이 용액을 50~60℃로 냉각하여 동일한 양 씩 혼합하여 사용하였다. 이렇게 제조한 배지에 곰팡이를 접종하여 30℃에서 120rpm으로 진탕배양하였는데 배양 1주일경에 곰팡이의 증식이 정지기에 달하고, 배양액 속의 키토산이 완전히 분해되어 용액의 점성이 완전히 소실되었는데 이때를 배양의 종료시점으로 정하였다. 곰팡이는 진탕배양시 균체가 작은 덩어리상으로 엉기게 되므로 보통의 여과지를 통해서도 그 균체를 거의 제거할 수 있다. 이 액을 적당량씩 나누어 동결보관해 두고 필요시 용해하여 키토산 분해효소로 사용하였다.

3. 키토산용액의 효소분해

효소의 활성은 30 ~ 50℃의 범위에서 비교적 높았는데, 반응 최적온도는 40℃로 나타났다(그림 5-5).

키토산 1% 용액 100 m당 조효소액 0.25ml 비율로 가해 반응최적온도에서 가수분해시키면서 용액의 점도 저하 속도를 살펴보았다. 효소 반응 15분경에 용액의 점도가 절반으로 감소되었고, 반응 2시간 경에 1/10 정도로 감소하는 경향을 나타내었다(그림 5-6).

4. 가수분해반응에 따른 키토산의 기능성 변화

표 5-7. 키토산 분해효소 생산용으로 개발된 배지의 조성

<u>용액 A.</u>	
Chitosan	----- 1.0%
<u>용액 B.</u>	
Yeast extract	----- 1.0%

A 용액은 110℃에서 20분간, B 용액은 121℃, 15분간 멸균한 것을 50~60℃로 냉각시킨 후 등량씩 혼합하여 사용.

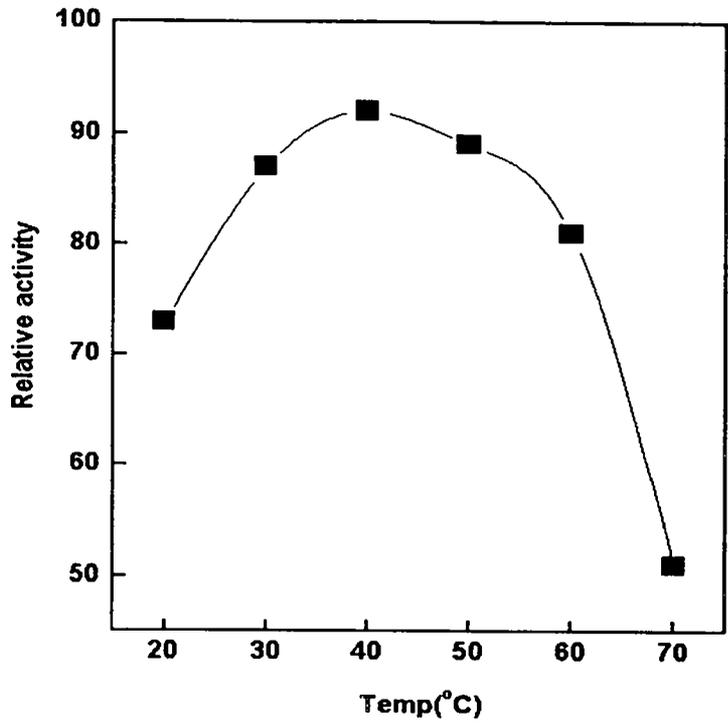


그림 5-5. *Aspergillus oryzae* ATCC 22787가 생산한 키토산 분해효소의 반응 최적온도.

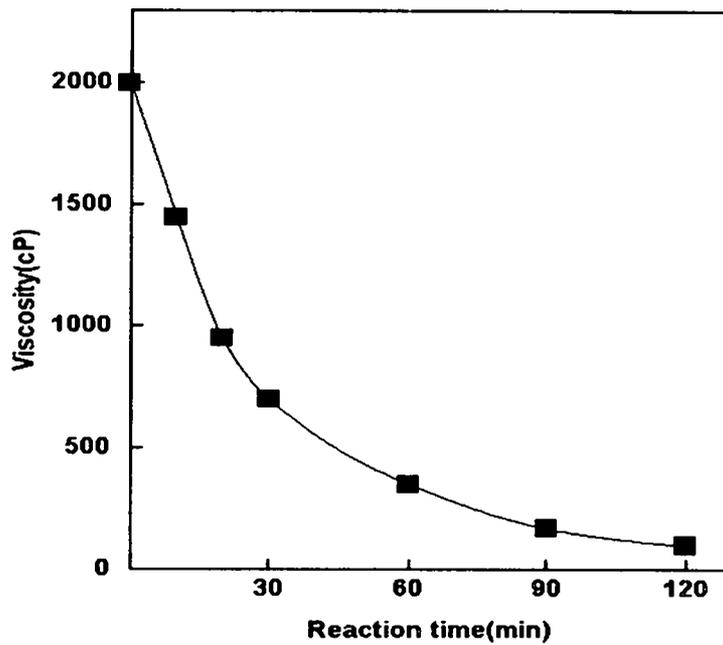


그림 5-6. 키토산용액의 효소적 분해 경향.

키토산 1% 용액 100 m당 *Aspergillus oryzae* ATCC 22787이 생산한 효소액을 0.25ml 비율로 가해 40℃에서 가수분해.

키토산의 가수분해도에 따른 항균력의 변화를 조사해 보기 위하여 키토산 2% 용액을 가수분해시켜 점도 1,000 ~ < 4cP(30℃)의 효소분해물을 얻었으며, 이들 효소분해물의 항균력을 비교해 보았다. 항균력 측정용으로 개발한 배지에다 키토산 효소분해물을 여러 농도로 첨가한 후 대장균과 어묵의 주요 부패균으로 분리해낸 *Bacillus* sp.을 대상으로 균의 증식을 억제시킬 수 있는 키토산 효소분해물의 최저농도(MIC)를 조사하였다(표 5-8).

고분자 키토산은 효소분해가 진행되어 감에 따라 항균력이 증가하는 경향을 보였는데, 용액의 점도가 10 ~ 5cP에서 공시균에 대한 증식 억제력이 가장 강하게 나타났다. Gram 음성균인 대장균은 200ppm으로 증식이 억제되었으나, Gram 양성균인 *Bacillus* sp.는 50ppm으로도 증식이 억제되었다. 따라서 *Bacillus* sp.의 경우를 미루어 볼 때 무처리외의 점도 10만cP 이상의 고분자 키토산에 비해 점도 10 ~ 5cP의 저분자 키토산은 40배 가량 항균력이 증가하였다고 할 수 있다. 그러나 점도 4.0cP 이하의 극히 저분자의 키토산 효소분해물은 오히려 항균력이 저하되어 *Bacillus* sp.의 증식억제에 500ppm이 요구되는 등의 사실로 미루어 볼 때 항균력이 오히려 소실됨에 유의하여야 한다.

키토산용액 특유의 떫은 맛도 키토산이 저분자화되어 감에 따라 현저하게 감소되었다. 따라서 키토산을 식품에 첨가하였을 때 가장 문제시되던 떫은 맛에 관한 우려감도 상당히 줄일 수 있었으므로 키토산 효소분해물이 식품보존료로 개발 가능성을 알 수 있었다.

5. 키토산 효소분해물의 주요 식품 미생물에 대한 항균력

2% 용액의 점도가 10 ~ 5cP인 키토산 효소분해물을 주요 식품미생물을 대상으로 항균력을 조사하였다.

가. 세 균

세균의 증식에 미치는 영향은 표 5-9와 같다. *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Enterobacter* sp.는 100~500ppm으로 증식이 억제되었으나, *Salmonella* sp., *Proteus* sp.는 2,000~3,000ppm으로 증식이 억제되는 등 Gram음성균은 균종 별로 항균력의 민감도에 차이가 컸다. 그러나 *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Lactobacillus* sp. 등의 Gram 양성균은 매우 민감하여 50ppm으로 증식이 억제되었다.

표 5-8. 키토산 용액(2% 용액)의 점도 저하에 따른 용액의 MIC와
뽀은맛의 강도 비교

점도(cP/30℃)	MIC(ppm)		뽀은 맛의 강도
	<i>E.coli</i>	<i>Bacillus</i> sp.	
>100,000	2,000	2,000	매우 강함
1,000	1,000	1,000	매우 강함
400	1,000	1,000	매우 강함
40	1,000	1,000	강함
10 ~ 5	200	50	비교적 약함
< 4	>1,000	500	비교적 약함

표 5-9. 키토산 효소분해물의 각종 세균에 대한 증식억제 최소농도(MIC)

균 주	MIC (ppm)
Gram 양성균	50
<i>Bacillus cereus</i> IAM 1110	50
<i>Lactobacillus</i> sp.	50
<i>Micrococcus</i> sp.	50
<i>Streptococcus faecalis</i>	50
<i>Streptococcus lactis</i> ATCC 19435	50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
Gram 음성균	
<i>Acetobacter aceti</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	200
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1129	200
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6059	3000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
<i>Salmonella typhimurium</i>	2000
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100

- : 생육이 저해되지 않았음

나. 균 류

효모의 증식에 미치는 영향은 표 5-10에 나타낸 바와 같다. 효모류 중 *Saccharomyces* sp., *Kluveromyces* sp.는 50~100ppm으로 억제되었으나, *Pichia* sp.는 1,000ppm으로 억제되었으며, *Hansenulla* sp.는 5,000ppm으로도 증식이 일어나는 등 균종별로 차이가 컸다.

곰팡이의 증식에 미치는 영향은 표 5-11과 같은데, *Penicillium* sp., *Mucor* sp.는 5000ppm으로도 전혀 억제되지 않았으며, *Aspergillus* sp., *Helminthosporium* sp.은 배양 초기에는 생육이 억제되어 5,000ppm으로 3~5일 가량 유도기가 연장되는 효과가 있었고, *Curvularia* sp.는 10ppm으로도 증식이 억제되는 등 균류는 균종에 따라서 항균력의 민감도 차이가 매우 컸다.

6. 키토산 효소분해물의 성상

4% 용액의 pH는 4.9, 상대점도 1.1~1.2, 옅은 황갈색을 띠는 투명한 용액이다(표 5-12).

7. 효소분해물 첨가 제품의 관능 평가

효소분해물 0.3% 첨가 제품은 pH 7.0, 0.5% 첨가 제품은 pH 6.9로서 무첨가 제품의 pH 7.4 보다는 약간 낮았다.

첨가 제품은 키토산 고유의 짙은 맛이 약간 감지되었으나 0.3% 첨가로는 그 정도가 미약하였으므로 별 문제가 되지 않았다.

효소분해물 첨가 제품은 파단강도가 무첨가구에 비해 조금 증가한 것으로 나타나 효소분해물의 첨가로 제품의 탄력이 향상되는 바람직한 결과가 나타났다. Hunter color system상의 색상변화는 효소분해물의 첨가량이 증가함에 따라 a치와 b치가 증가하여 제품의 황색도가 조금 높아졌다(표 5-13). 그러므로 키토산 효소분해물의 제품에 대한 첨가량은 제품의 맛과 색깔을 고려하여 0.3%로 결정하였다.

표 5-10. 키토산 효소분해물의 각종 효모에 대한 증식억제 최소농도(MIC)

균 주	MIC (ppm)
<i>Hansenula anomala</i> CBS 2872	
<i>Kluveromyces fragilis</i>	
<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	
<i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 361	
<i>Pichia farinosa</i>	

표 5-11. 키토산 효소분해물에 의한 곰팡이의 증식억제 경향

균 주	가수분해물 농도(ppm)				
	0	10	100	1000	3000 5000
<i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 20235	1*	1	1	1	2
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 26268	1	1	1	1	1
<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 9644	1	1	1	1	1
<i>Mucor sp.</i>	1	1	1	1	1
<i>Helminthosporium sp.</i>	2	4	4	5	5
<i>Culvularia sp.</i>	2	NG**	NG	NG	NG

* 배지에 첨가된 효소분해물에 의해 공시균의 증식이 억제된 일수

** NG : 배양 1주일 이 경과하여도 증식이 시작되지 않음

표 5-12. 키토산 효소분해물의 성상

Hunter 색체계					pH	상대점도
L	a	b	YI	W		
15.8	-1.1	5.1	49.92	1.34	4.9	1.1~1.2

표 5-13. 키토산 효소분해물을 첨가한 제품의 관능적 품질평가

	pH	Hunter 색체계					파단강도*
		L	a	b	YI	W	
무첨가구	7.4	75.70	-2.07	8.97	19.57	47.63	129.13
0.3% 첨가구	7.0	68.70	-1.23	10.21	25.61	37.20	134.56
0.5% 첨가구	6.9	64.73	1.74	13.99	29.12	33.50	137.91

* Limit cutting force(g · f)

8. 어묵 보존효과

30℃ 저장시 어묵의 g당 생균수가 10^5 이상이 되는 시점에 도달하는데 대조구는 2일이 소요되었으나, 키토산 효소분해물 0.3% 첨가로 2일이 연장되어 4일이 소요되었고, 20℃ 저장시에는 4일, 15℃ 저장시에는 6일 가량 연장되는 효과가 나타났다(그림 5-11, 5-12, 5-13). 이렇게 키토산 효소분해물을 어묵에 첨가함으로써 어묵의 보존기간이 상당히 연장되는 효과를 얻을 수 있었으며, 또한 첨가한 키토산이 나타내는 기능성도 감안한다면 바람직한 어묵보존료로 이용 가능하다고 하겠다.

9. 효소분해물을 첨가한 제품의 저장중 관능적 품질변화

효소분해물을 첨가하여 제조한 제품을 20℃에서 저장하면서 저장중 제품의 색택변화(표 5-14)와 탄력변화(표 5-15)를 측정된 결과, 무첨가구에 비해 유의할만한 차이점은 나타나지 않았다.

10. 효소분해물을 첨가한 제품의 품질에 대한 전문가의 상품성 평가

효소분해물을 첨가하여 만든 제품의 맛과 향은 기존 제품에 비해 별 차이가 없다고 응답한 사람이 전체 응답자의 60%였다. 또한 제품의 상품성에는 별 다른 영향을 미칠 맛과 향이 없다는 응답이 73.3%였다. 식감은 응답자의 절반이 별 영향이 없다고 대답하는 등 대체로 하여 효소분해물을 첨가한 제품의 맛과 향이 기존의 제품에 비해 별 문제가 없다고 답하였다. 알긴산 효소분해물을 첨가하여 만든 제품보다는 키토산 효소분해물을 첨가하는 쪽이 상품성에 대해 높은 평가를 받았다.

효소분해물을 첨가한 제품의 원가 상승 요인은 응답자의 63.3%가 5% 이내로 답하였다(그림 5-8).

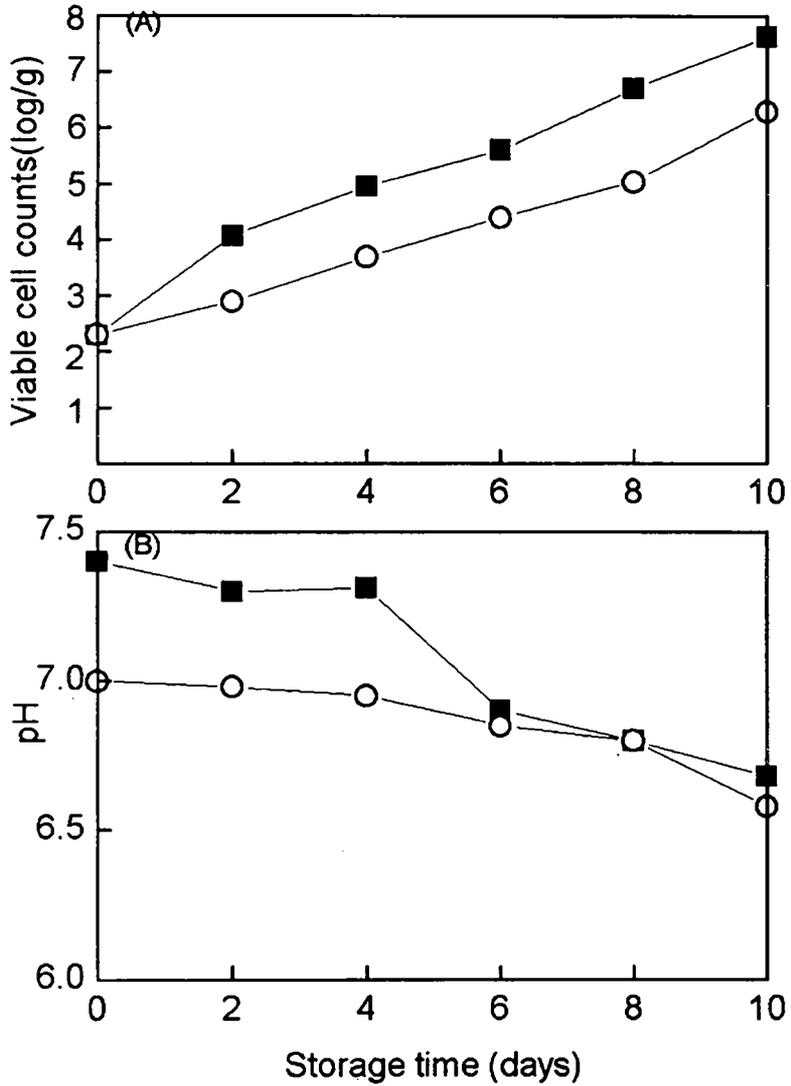


그림 5-7. 키토산 효소분해물을 함유한 어묵을 30℃에 저장하였을 때 저장시간 경과에 따른 생균수 및 pH의 변화 (■), 대조구;(○), 키토산효소분해물 첨가제품

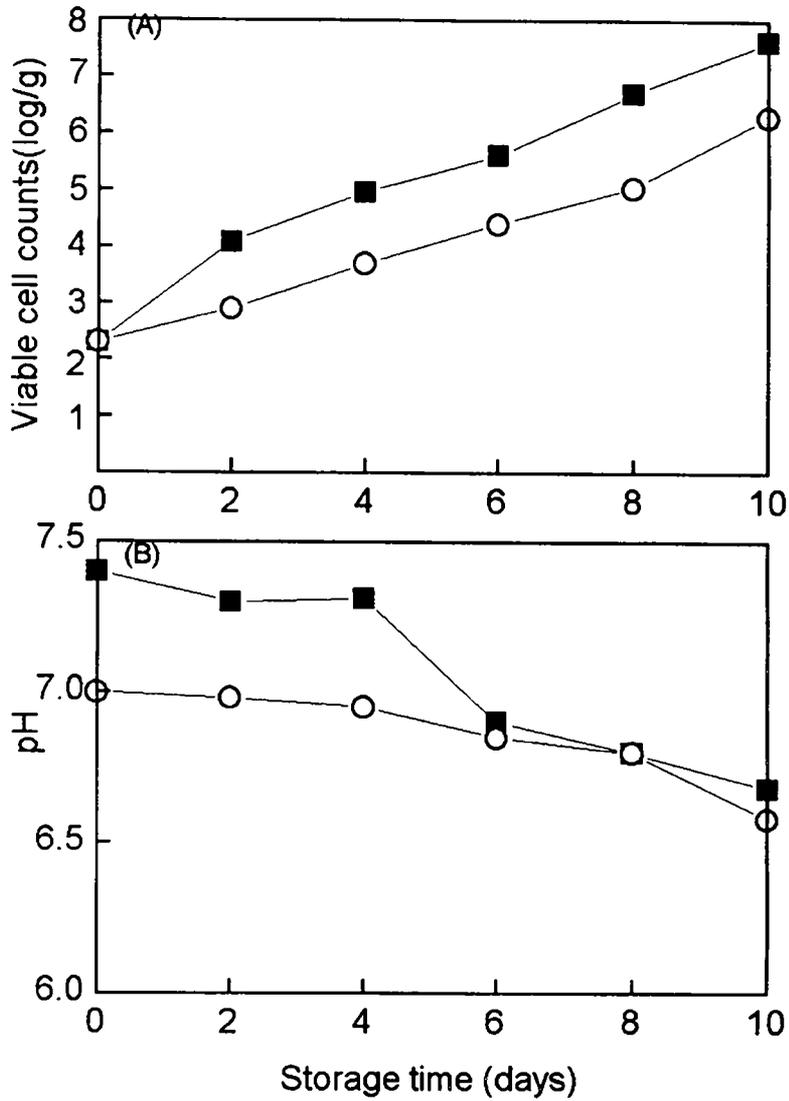


그림 5-8. 키토산 효소분해물을 함유한 어묵을 20℃에 저장하였을 때 저장시간 경과에 따른 생균수 및 pH의 변화.
 (■), 대조구;(○), 키토산효소분해물 첨가제품

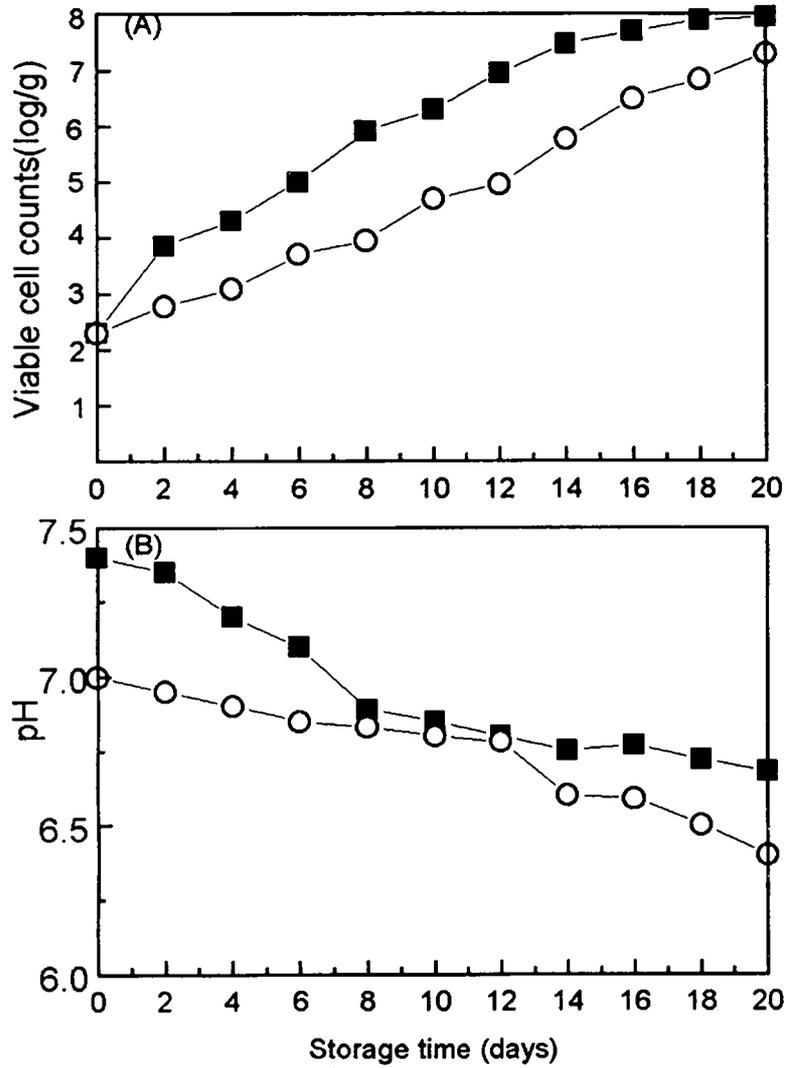


그림 5-9. 키토산 효소분해물을 함유한 어묵을 15°C에 저장하였을 때 저장시간 경과에 따른 생균수 및 pH의 변화.
 (■), 대조구; (○), 키토산효소분해물 첨가제품

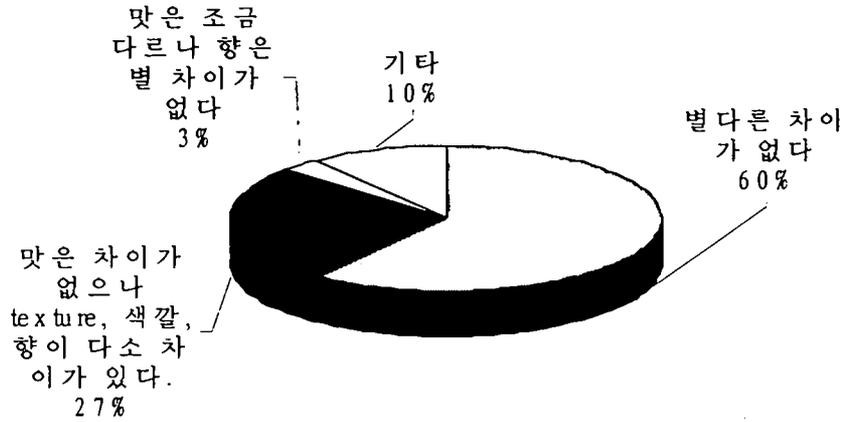
표 5-14. 키토산 효소분해물을 첨가한 제품의 20℃저장중 파단강도의 변화

days	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control	129.13	131.73	138.72	133.99	141.26	148.88	148.83	142.17	147.11	150.67
Chitosan	134.56	136.02	148.67	138.02	145.12	146.35	145.57	148.06	143.86	159.10

표 5-15. 키토산 효소분해물을 첨가한 제품의 20℃저장중 색택의 변화

days	C o n t r o l					Chitosan가수분해물첨가시료				
	L	a	b	YI	W	L	a	b	YI	W
1	75.70	-2.07	8.97	19.57	47.63	68.70	-1.23	10.21	25.61	37.20
2	71.62	3.75	9.24	27.17	41.86	71.34	0.50	11.71	30.19	38.98
3	68.99	2.93	9.45	27.88	38.31	69.21	2.94	10.41	30.28	37.63
4	67.97	2.90	9.11	27.37	37.37	67.90	5.53	10.33	33.38	36.10
5	66.48	1.79	11.40	32.93	33.39	69.14	1.90	10.06	28.34	37.88
6	73.48	2.33	9.81	26.47	43.73	68.92	0.34	11.77	31.23	35.93
7	49.60	48.30	12.10	32.43	32.03	68.26	-1.53	13.22	33.35	33.73
8	70.99	4.24	8.94	27.14	41.36	68.04	4.48	10.95	33.83	35.68
9	67.60	7.65	8.38	30.62	37.63	68.41	2.92	10.62	31.15	36.14

(1) 기존제품에는 없는 맛과 향이
감지된다면 어떤 것입니까?



(2) 이 맛과 향은 제품의 상품성에 어떤 영향을 미친다고 생각하십니까?

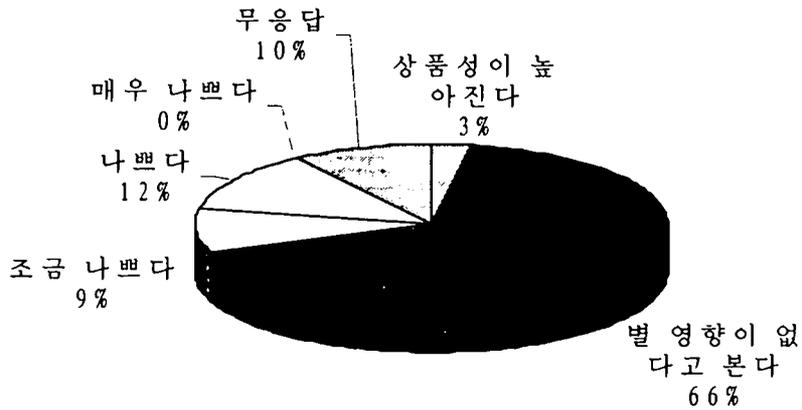
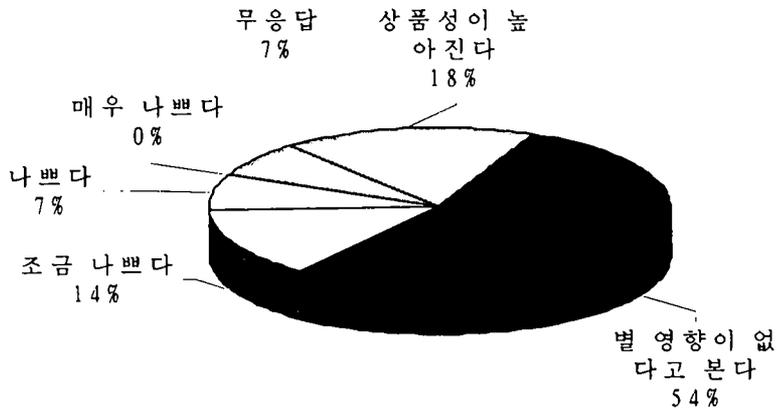


그림 5-10. 키토산효소분해물을 첨가한 제품의 품질에 대한
전문가의 상품성 평가(A)

(3) 기존 제품에 비해 식감이 어떻다고
생각하십니까?



(4) 본 제품의 가격이 기존 계맛살 제품보다도 원가
상승 요인이 있습니다. 가격 상승률이 어느 정도까
지라면 상품화가 가능하다고 보십니까?

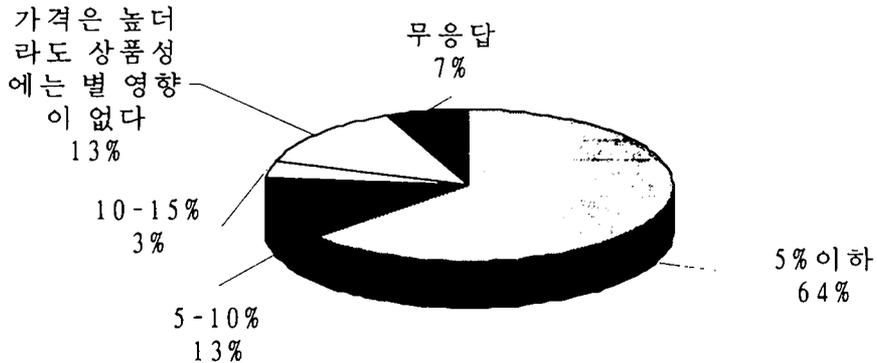


그림 5-10. 키토산효소분해물을 첨가한 제품의 품질에 대한
전문가의 상품성 평가(B)



그림 5-11. 개발한 천연식품보존료를 첨가한 시제품의 시식 및 평가회 전경(A)

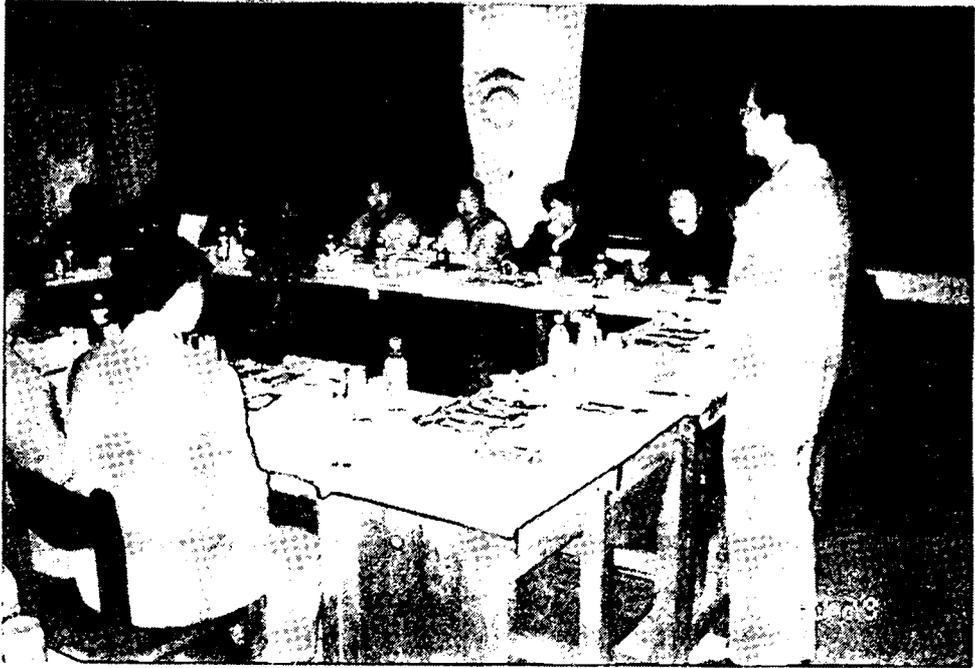


그림 5-11. 개발한 천연식품보존료를 첨가한 시제품의 시식 및 평가회 전경(B)

제 4 절 요약

1. 키토산 분해효소 생산균의 탐색 결과, 토양으로부터 *Aspergillus* CHS-1, *Penicillium* CHS-2, *Staphylococcus* CHS-3 및 *Bacillus* CHS-4를 분리해 내었으며, 발효공업에서 사용되는 표준 균주 중에서는 *Aspergillus oryzae* ATCC 22787이 강한 키토산 분해효소를 생산하는 것을 밝혀내었다.
2. 고분자 키토산은 효소분해가 진행되어 감에 따라 항균력이 증가하였는데, 2% 용액(30℃)의 점도가 10~5cP(상대점도 ; 1.06)에서 균 증식 억제력이 가장 강하게 나타나 고분자 키토산에 비해 약 40배 가량 항균력이 증가하였다. 또한 키토산용액 특유의 짧은 맛도 키토산이 저분자화되어감에 따라 현저하게 감소되었다. 그러나 점도 4.0cP 이하의 극히 저분자의 키토산은 항균력이 오히려 소실되었다.
3. 효소분해물을 0.3% 첨가한 제품은 pH 7.0, 0.5% 첨가 제품은 pH 6.9로서 무첨가 제품의 pH 7.4 보다는 약간 낮았다. 효소분해물의 첨가로 제품의 색상은 약간 황색화 되었으나 0.3% 정도의 첨가로는 별 문제가 없었다. 탄력은 조금 향상되는 바람직한 효과가 나타났으며, 맛에도 문제가 없었다.
4. 어육연제품에 효소분해물을 0.3% 첨가하고 30℃에서 저장하였을 때 저장기한이 무첨가구에 비해 2일 연장되었고, 20℃ 저장시에는 4일, 15℃ 저장시에는 6일 가량 연장되는 효과가 나타났다.

5. 효소분해물을 첨가한 제품의 품질에 대해 업계의 전문가를 중심으로 한 상품성 평가 설문조사에서 효소분해물 첨가 제품의 맛과 향은 기존 제품에 비해 별 차이가 없다고 응답한 사람이 60%였고, 제품의 상품성에는 별 다른 영향을 미칠 맛과 향이 없다는 응답이 73.3%였으며, 식감은 응답자의 절반이 별 영향이 없다고 하여 효소분해물을 첨가한 제품의 맛과 향이 기존의 제품에 비해 별 문제가 없다는 것을 알 수 있었고, 알긴산 효소분해물을 첨가하여 만든 제품보다는 키토산 효소분해물을 첨가하는 쪽이 상품성에 대해 높은 평가를 받았다. 효소분해물을 첨가한 제품의 원가 상승 요인은 응답자의 63.3%가 5% 이내로 답하였다.

여 백

제 6 장 식품보존제로서의 미생물 대사산물

여 백

제 6 장 식품보존제로서의 미생물 대사산물

제 1 절 서 론

미생물 대사산물에 의한 길항작용은 1925년 *Escherichia coli* 배양액에서 처음 발견된 이래 이를 colicin으로 명명하여 이에대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 이러한 미생물 대사산물중 길항 작용을 가지고 있는 물질을 박테리오신(bacteriocin)이라 부르며, 이러한 박테리오신은 미생물이 생산하는 저분자 단백질로서 항균성을 가지고 있고 체내에 흡수시 쉽게 분해되므로 일반 항생물질이나 화학 합성보존제보다 안정성이 높은 것으로 알려져 있다.

유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물중의 하나로서 오래전부터 다양하게 이용되어 오고 있으며, 최근에는 유산균이 생리활성 물질인 박테리오신을 생산한다는 것이 보고된 이래 더욱 관심이 높아지고 있다. 유산균에 의한 길항작용은 그 대사산물에 존재하는 유기산, 과산화수소, diacetyl, 그리고 박테리오신 또는 박테리오신 유사물질(bacteriocin like substance)에서 유래하고 있다(Tramer and Fowler, 1964; Gilliland and Speck, 1977; Barefoot and Nattles, 1993). 유산균에 의한 박테리오신의 생산은 1947년 *Lactococcus lactis*에서 처음 발견된 이래 현재까지 *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., 그리고 *Streptococcus* sp.등에서 생산 분리된 박테리오신에 관한 연구가 꾸준히 발표되고 있다(Tagg et al., 1975; Taraha et al., 1992; Skyttä et al., 1993). 그중에서도 *L. lactis*가 생산한 nisin은 유럽 등에서 아질산을 대신하는 식품보존제로 통조림등에 사용이 되고있다(Hurst, 1981; Kone

and Fung, 1992).

따라서 본 연구는 유산균이 생산하는 항균성 물질인 박테리오신을 검색하여 어육 연제품에 응용하여 유통기간을 연장하고 위생적으로도 안정한 제품을 생산하기 위하여 다음의 실험을 실시하였다. 즉, ① 시판 발효 식품에서 분리한 유산균의 박테리오신 생산배지 최적화, ② 박테리오신의 특성과 작용형태, ③ 박테리오신의 정제, 그리고 ④ 어육 연제품에의 응용 등 4항목으로 나누어 실험, 검토하였고 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 유산균의 분리 및 동정

시판 발효 유제품(고형 요쿠르트 10종, 치즈 3종)과 김치(5종)를 수집하여 잘 마쇄한 다음 10^{-1} ~ 10^{-6} 까지 단계별로 희석하여 이들 각 0.1ml를 MRS agar plate에 도말하여 37°C에서 48~72시간 각각 호기, 혐기상태로 배양한 다음 형성된 집락을 형태별로 분리하여 MRS slant에 배양 보관하였다. 분리 균주의 동정은 형태, 배양 특성과 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's manual of systematic bacteriology(Kandler and Weiss, 1986)와 The Prokaryotes(Hammes et al., 1994)에 준하여 동정하였다.

2. 조박테리오신의 생산

분리된 유산균을 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양한 후 이를 원심분리(4,000×g, 30분)한 다음 상등액을 rotary evaporatory(EYELA N-1, Japan)로 초기량의 1/10으로 감압 농축하여(55°C, 100rpm) -80°C의 동결고(REVCO, ULT 2586-7-D12)에 보관한 것을 조 박테리오신으로 하여 실험에 사용하였다.

3. 항균력 측정방법

- Disk method(Sobrinho et al., 1992 ; Jepperson and Huss, 1993)

MRS broth에서 37°C, 24시간 전배양한 *Proteus mirabilis*를 10⁵/ml정도가 되도록 4ml의 MRS agar(0.7% agar)에 접종한 후 이를 MRS agar(1.5% agar)를 부어 굳힌 평판에 걸쳐 붓고 박테리오신 25μl를 함유한 disk(Ø8mm, Toyo)를 평판위에 얹어 37°C에서 18시간 배양한 후 disk 주위에 형성된 저해환의 직경을 측정하였다.

- Microdilution method (Toba et al., 1991)

96 well microdilution plate를 이용하여 2진 희석한 박테리오신 100μl에 *P. mirabilis*를 20μl, 그리고 Tryptic Soy Broth(TSB) 80μl를 넣어 37°C에서 6시간 배양한 후 ELISA reader(Bio-Tek, UV 900C, Pharmacia)를 사용하여 620nm에서의 OD값을 측정하였다. 박테리오신 시료액 대신 멸균 증류수를 사용한 것을 대조구로하여 대조구의 1/2에 해당하는 흡광도를 나타내는 값에 희석배수를 곱한 값을 bacteriocin unit(BU)로 표시하였다.

4. 박테리오신의 생성 최적조건 검토

시험균주의 배양조건과 배지조성에 따른 박테리오신의 생성 최적조건을 검토하기 위하여 MRS를 기본배지로 배양조건(온도, pH)과 배지조성(탄소원, 질소원, NaCl, 무기염류, 그리고 비타민)을 변화시키면서 균의 증식에 따른 박테리오신의 생산성을 비교하였다. 이때 유산균의 증식은 spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron Instrun)로 660nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었고 박테리오신의 항균력은 microdilution method로 측정하였다.

5. 박테리오신의 특성 조사

조박테리오신의 pH 안정성은 50mM sodium acetate buffer(pH 2.0~5.0)와 50mM sodium phosphate buffer(pH 6.0~13.0)로 조정하여 각 pH에서 4℃, 24시간 방치 후 항균력을 측정하였다. 온도의 경우 박테리오신을 pH 5.0의 50mM sodium acetate buffer 또는 0.02N-HCl(pH 2.3)로 녹여 이를 60~121℃에서 일정시간 열처리한 후 잔존 활성을 측정하였다. 그리고 유기용매에 대한 안정성은 박테리오신을 유기용매와 동량 혼합한 후 4℃에 1시간 방치 후 잔존 활성을 측정하여 나타내었다.

6. Sensitive strain에 대한 억제작용

Lactobacillus sp. GM7311이 생산한 bacteriocin을 배양중인 *L. monocytogenes*와 *P. mirabilis*, *B. subtilis* 균주에 첨가시기를 달리하여

첨가하고, 그에 따른 균의 증식상태를 실험하였다. 즉 tryptic soy broth(TSB, Difco)에 지시균을 약 $10^2/\text{ml}$ 로 접종한 후, 37°C에 배양하면서 배양시간에 따라 초기, 유도기, 대수기, 그리고 정상기에 박테리오신을 100BU/ml가 되도록 첨가하여 24시간 배양한 다음 생균수를 측정하였다. 이때 대조구는 박테리오신을 첨가하지 않은 배지에서 배양한 균의 증식을 측정한 것으로 하였다.

7. 전자현미경으로 세포형태 관찰

박테리오신을 처리한 cell과 정상배양한 세포의 형태를 비교하기 위하여 transmission electron microscope (TEM)를 사용하여 관찰하였다. 즉 *P. mirabilis* 및 *B. subtilis*의 경우는 TSB에서 12시간(대수증식기 중기), *L. monocytogenes*의 경우는 16시간(대수증식기 후기 혹은 정상기 초기) 배양한 액에 각각 100BU/ml의 박테리오신을 첨가하여 24시간 배양한 후 cell을 회수한다. 회수된 cell을 먼저 2.5% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide로 이중고정한 후 탈수하여 Epon 812로 embedding하여 LKB ultramicrotome(Nova, Sweden)을 이용하여 세절한 후, uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 JEM 1200EX-II(JEOL, Japan) 전자 현미경으로 가속전압 80kv에서 관찰하였다.

8. 세포의 아미노산 조성

Lactobacillus sp. GM7311이 생산하는 박테리오신을 처리한 균체의 아미노산 조성 변화를 알아보기 위하여 각 균주별로 박테리오신에 가장 큰 영향을 받는 증식 시기를 선택해 박테리오신으로 처리한 후 아미노

산 성분 조성 변화를 살펴보았다.

P. mirabilis 및 *B. subtilis*는 12시간 배양 후, *L. monocytogenes*는 16시간 배양한 배지에 최종농도 100BU/ml가 되도록 박테리오신을 첨가해서 37°C, 24시간 배양한 다음, 배양액을 원심분리(3,500rpm, 10분)하여 균체를 집균하고, 시료 일정량에 6N HCl 10ml를 가한 후 N₂ gas로 공기를 치환시키면서 밀봉하여 110°C의 sand bath에서 24시간 동안 가수분해시켰다. 분해액을 여과지(0.22 μ m)로 여과하고 rotary evaporatory (EYELA N-1, Japan)로 감압농축하여 HCl을 완전 제거한 다음 0.02N HCl로 10ml 정용하여 Biochrom 20 auto-amino acid analyser (Pharmacia)로 분석하였다.

9. 박테리오신의 정제

원심분리하여 얻은 상등액에 1 l 당 100ml의 n-propanol과 300g의 NaCl을 첨가해 층 분리한 다음 하층액을 취하였다. 여기에 3배의 cold acetone을 서서히 첨가하면서 4°C에서 1시간 동안 반응, 층 분리시킨 후 원심분리(3,000rpm, 10분)하여 상층액을 분리했다. 이 상층액을 rotary evaporatory(EYELA N-1, Japan)를 이용해 acetone을 제거한 후 증류수로 투석(MWCO 1,000, Spectra Por)한 다음 감압농축시킨 것을 다음 단계의 정제 시료로 사용하였다.

감압농축시킨 박테리오신을 20mM sodium phosphate buffer(pH 5.7, buffer A)로 평형화시킨 CM-cellulose column(2.6×40cm)에 주입하였다. 용출은 1.0M NaCl이 첨가된 동일 완충용액을 이용한 linear gradient방법을 사용했다. 유속은 24ml/hr로 조절하였으며 흡광도는 214nm에서 측정하였다.

겔 크로마토그래피에서 얻은 활성 fraction을 A 완충액으로 평형화시킨 Sephacryl HR-100 column(1.6×100cm)에 주입하였다. 동일 완충액을 사용하여 12ml/hr의 유속으로 용출하였으며, 역시 214nm에서 검출하였다.

10. 어육연제품에 응용실험

조 박테리오신과 정제 박테리오신 일정량을 어육 연제품 제조시에 일정량씩 첨가하여 연제품을 제조하여 일정온도에 보관하면서 생균수 검사를 하였고 이때 대조구는 보존제를 첨가하지 않는 것으로 비교 실험을 하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 유산균의 박테리오신 생산배지 최적화

가. 유산균의 분리 및 동정

발효제품에서 분리한 30균주를 대상으로 어육 연제품의 부패 원인균으로 널리 알려진 *Bacillus cereus*, *B. stearothermophilus*(Frazier and Westhoff, 1988), 위생지표세균인 *Escherichia coli*, 그리고 저온성 식중독균인 *Listeria monocytogenes* 등의 4종의 시험균을 대상으로 disk method로 항균력을 측정 한 결과(표 6-1), 4종의 유산균이 강한 항균력을 나타내었다. 그러나 곰팡이와 효모 그리고 세균포자에 대해서는 항균력을 나타내지 않았다. 시험 4균주중 유산균을 제외한 다른 세균에 대하여 골고루 항균력을 나타내고 있는 A 균주를 공시균주로하여 다음 실험을 행하였다. 그리고 항균력 시험 지표균으로는 시험 균주중 가장 박테리오신에 민감한 *Proteus mirabilis*를 사용하였다.

표 6-1. 박테리오신 생산균주의 배양상층액의 항균 패턴

Indicator bacteria	A	B	C	D
Gram Positive Bacteria				
<i>Bacillus cereus</i> IAM 1110	18*	18	12	18
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 10149	18	13	12	17
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20	20	16	20
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	9	12	-	16
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043	18	14	-	18
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	-	-	12	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	-	-	14	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	23	18	17	22
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	23	20	16	19
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	24	17	20	25
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	16	18	18	18
<i>Pediococcus acidilactici</i> NCD01895	-	-	14	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	14	13	10	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	15	12	11	11
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	-	-	15	-
Gram Negative Bacteria				
<i>Aeromonas sobria</i> ATCC 9071	21	19	-	18
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	16	20	-	18
<i>Escheria coli</i> ATCC 9001	23	18	10	20
<i>Klebsiella pneumonia</i> NCTC 5047	26	22	12	10
<i>Proteus mirabilis</i> NCTC 5887	32	13	10	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	26	16	-	17
<i>Proteus vulgaris</i> NCTC 4175	18	15	-	13
<i>Salmonella typhimurium</i> LMG 3266	20	13	10	15

* diameter(mm) of clear zone with disk(Ø8mm)

* - ; no inhibition zones

위의 공시균주를 MRS slant에 계대보관하면서 균의 형태적, 생화학적 실험을 한 결과, 이 균주는 비운동성으로 포자를 형성하지 않는 Gram 양성균의 통성 혐기성 간균($1 \times 5-7 \mu\text{m}$)이었다. 그리고 catalase와 oxidase test는 음성이었고 glucose배지에서 산을 잘 생성하였고 15°C에서 증식하여 gluconic acid 자화성이 있는 것으로 미루어 *Lactobacillus* sp.로 분류할 수 있었다(Hammes et al., 1994). API 50CH kit를 사용하여 당발효 실험을 한 결과 *Lb. plantarium* ATCC 14917과 잘 일치하였으나 공시균주와는 L-arabinose, rhamnose 그리고 lactose 발효성의 차이가 있어 이를 *Lactobacillus* sp. GM 7311로 명명하여 실험에 사용하였다.

나. 대사산물 생성최적조건 검토

배지조성에 따른 박테리오신의 생산성을 알아보기 위하여 MRS broth를 기본배지로 하여 각종 영양원(탄소원, 질소원, 무기염류, 비타민, 그리고 NaCl)을 첨삭하면서 실험하였다. 이때 각각의 배지는 초기 pH 6.0으로 조절하고 37°C에서 24시간 배양한 후 박테리오신의 생산성을 비교하였다. 그 결과 본 실험에 사용된 *Lactobacillus* sp. GM7311은 MRS broth 원래의 조성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

그리고 배양조건에 따른 박테리오신의 생산성을 비교하기 위하여 공시균주를 MRS 배지에 배양하면서 초기 pH, 배양온도, 그리고 배양시간에 따른 박테리오신의 생산성을 비교한 결과 *Lactobacillus* sp. GM7311은 초기 pH 6.0으로 조절한 MRS broth에서 37°C에서 22~24시간 배양한 경우 박테리오신의 생성이 가장 좋았다. 이러한 최적 생산조건에서 배양한 결과 그림 6-1과 같은 양상을 나타내었다.

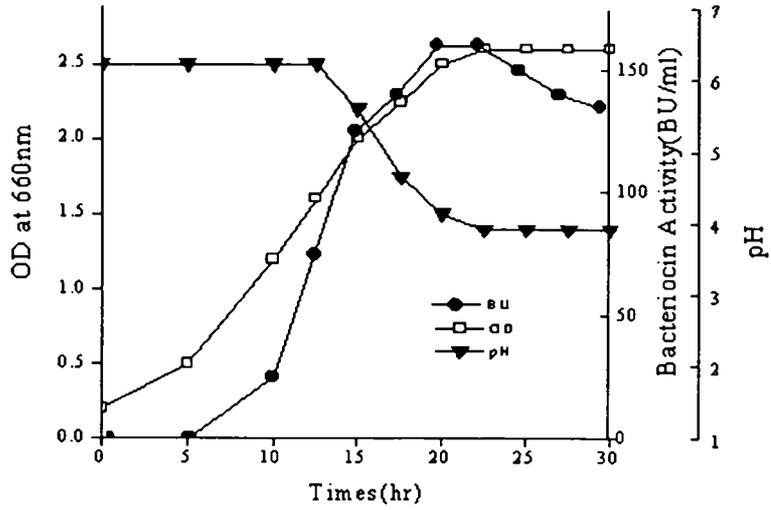


그림 6-1. *Lactobacillus* sp. GM7311의 증식경향과 이 균이 생산한 박테리오신의 활성변화

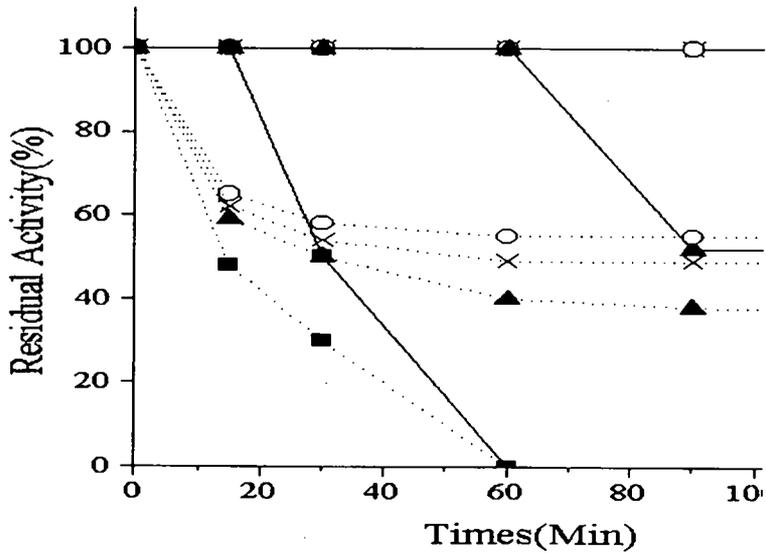


그림 6-2. *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산한 박테리오신의 활성에 미치는 pH의 영향

2. 박테리오신의 특성과 작용형태

유산균은 식품제조와 가공에 다양하게 이용되는 것은 물론 여러 종류의 항균성 물질을 생산하고 있고, 그중에서도 박테리오신은 다양한 미생물에 의해서 생산되고 특히 *Lactococcus lactis*가 생산하는 nisin은 제한적이지만 식품에의 사용이 허용되고있다(Hurst, 1981). 지금까지 발견된 박테리오신은 그 항균력은 잘 연구되어져 있으나 작용기작과 그 특성에 관한 연구는 잘 이루어져 있지 않아 이들을 식품 보존제로 사용하는데 어려움이 있어 최근에는 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서 본장에서는 *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산한 박테리오신의 활성에 영향을 미치는 요인을 조사하고 감수성 세균의 저해 작용형태를 실험하므로써 식품 보존제로서의 이용가능성을 타진해 보았다.

가. 박테리오신의 특성

박테리오신의 pH 안정성을 상대 잔존활성으로 측정한 결과를 그림 6-2에 나타내었다. pH 5.0 이하에서 안정하였으나 pH 5.0 이상에서는 항균력이 급격히 감소하기 시작하여 pH 6.0에서는 잔존활성이 50% 정도였으며 알칼리쪽으로 갈수록 항균력이 감소하였다.

온도에 대한 안정성을 그림 6-3에 나타내었다. 50mM sodium acetate buffer(pH 5.0)의 경우, 60~80℃에서는 처리시간에 관계없이 안정하였고, 100℃의 경우 90분이상, 121℃의 경우 30분 처리에 각각 50%의 활성이 소실되어 열에 상당히 안정한 것으로 나타났다. 그러나, 0.02N-HCl에 용해한 경우 60~100℃에서는 초기 15분 만에 40% 정도의 활성이 감소하였다가 그 이후는 서서히 감소하여 120분 동안 활성 변화가 거의 없었으나, 121℃에서는 초기 15분 가열에 50% 이상의 활성이 소실되었고,

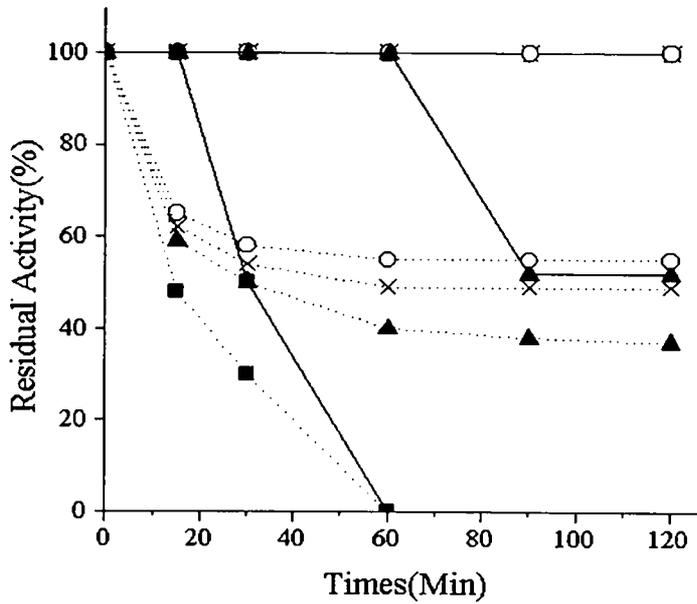


그림 6-3. *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산한 박테리오신의 열안정성
 0.02N HCl(pH 2.3, ···), 50mM sodium acetate buffer(pH5.0, —)
 (○, 60°C; ×, 80°C; ▲, 100°C; ■, 121°C)

표 6-2 *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산한 박테리오신의 활성에 미치는
 유기용매의 영향

Organic solvent	Bacteriocin activity(BU/ml)	Relative activity(%)
Acetone	106	62.4
Ethanol	108	63.5
n-Propanol	61	35.9
iso-Buthanol	110	64.7
Ethyl Ether	113	66.5
Methanol	67	39.4

그 후 지속적으로 감소하여 60분 가열에 활성이 완전히 소실되었다. 이상의 결과에서 본 시험균주가 생산한 박테리오신은 내열성이 상당히 강한 것을 알 수 있었다.

그리고 유기용매에 대한 안정성을 실험한 결과(표 6-2) acetone, ethanol, iso-butanol 그리고 ethyl ether에 의해서는 약 40%의 활성이 감소되었고 n-propanol과 methanol에 의해서는 약 60%의 활성이 감소하여 대체로 유기용매에 대해서는 안정성이 적은 것으로 나타났다.

나. 박테리오신의 첨가시기에 따른 영향

*P. mirabilis*의 경우, 균 접종 직후 및 3시간, 9시간 배양 후 박테리오신을 첨가한 시험구에서는 첨가후 6시간동안은 균수의 변화가 없다가 구후 균수가 급격히 감소하여 각각 21시간, 12시간, 18시간 이내에 균락 형성이 어려운 수준까지 생균수가 감소하였다. 한편, 15시간 및 24시간 배양 후 박테리오신을 첨가한 경우에 있어서는 첨가 후 12시간 동안은 균수 감소를 보였으나 이후로는 10^3 및 10^6 cfu/ml의 균수를 유지하였다(그림 6-4).

*B. subtilis*는 균 접종 직후 및 3시간, 9시간 배양 후 박테리오신을 첨가했을 때, 모두 첨가 즉시 급격한 생균수 감소를 보여 6시간 이내에 모두 균락을 형성하지 못하는 수준까지 감소하였다. 그러나 12시간 및 21시간 배양 후 박테리오신을 첨가했을 때는 첨가 후 각각 12시간 및 9시간 동안은 균수 감소를 보였으나 이후에는 일정하였다(그림 6-5).

*L. monocytogenes*의 경우, *P. mirabilis*나 *B. subtilis*와는 상당히 다른 결과를 나타냈다. 즉 균 접종 직후 및 6시간 배양 후 박테리오신을 첨가한 시험구에서는 균수 변화가 거의 없이 초기 균수를 그대로 유지하였고, 15시간 배양한 대수 증식기 중기에 박테리오신을 첨가한 경우에 있

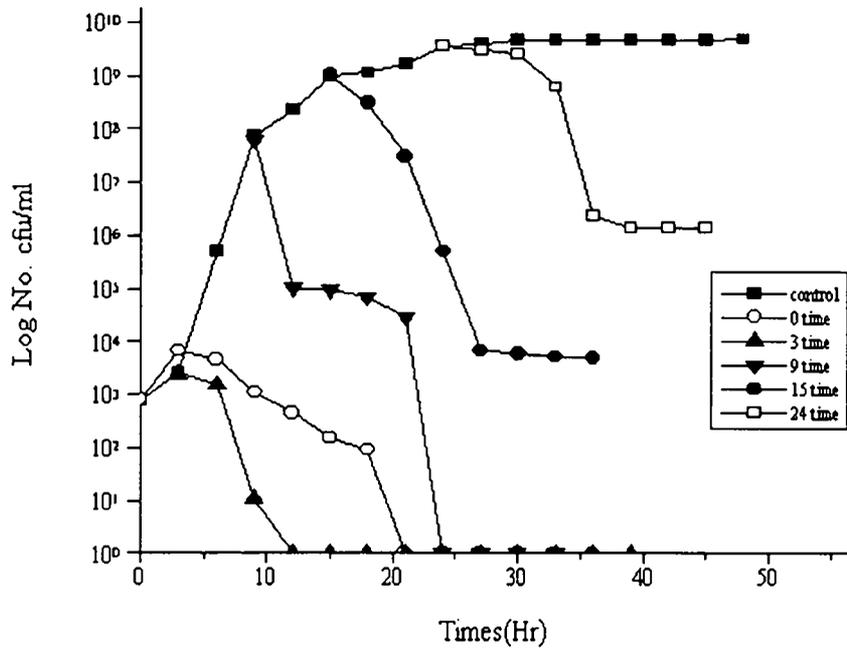


그림 6-4. 박테리오신 첨가 시기에 따른 *Proteus mirabilis*의 생산 경향

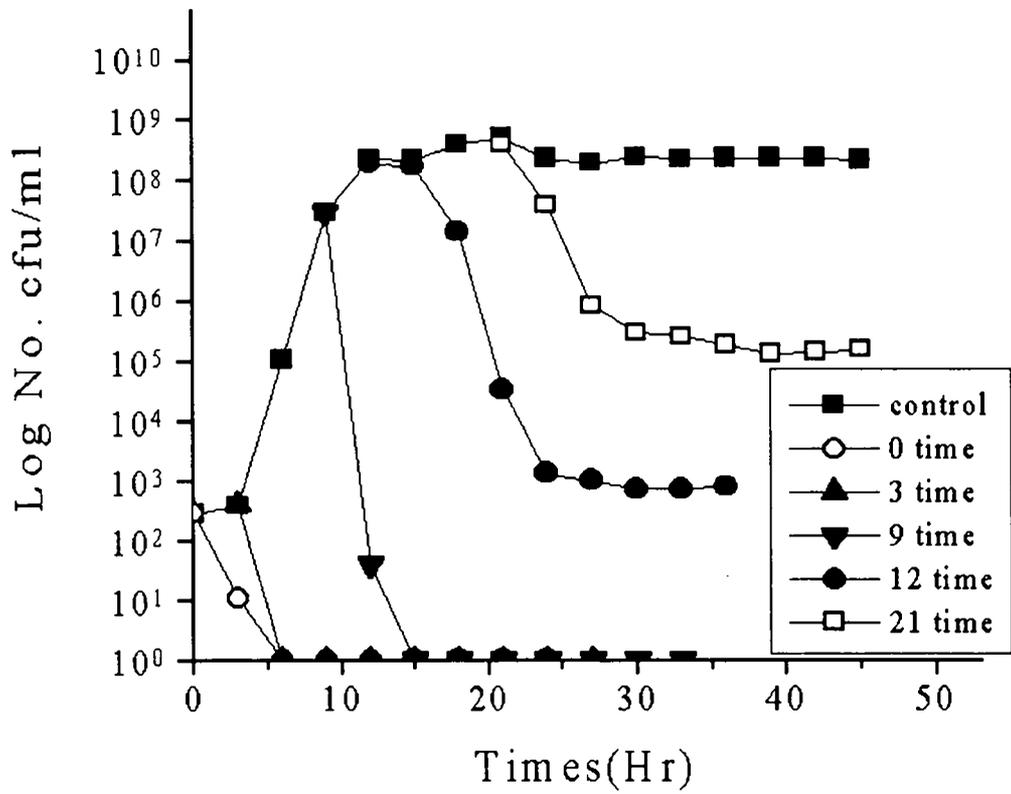


그림 6-5. 박테리옌 첨가 시기에 따른 *Bacillus subtilis*의 생장 경향

어서도 첨가 후 12시간 동안 10^3 cfu/ml 정도의 균수 감소만 보였을 뿐 이후로는 일정하였다. 그러나 21시간 및 27시간 배양 후 박테리오신을 첨가했을 때는 21시간 내에 10^2 cfu/ml까지 균수가 급격히 감소하였는데, 그러나 이 경우 사멸하는 수준에까지 이르지 못했다(그림 6-6).

이상에서 살펴본 바와 같이, *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산하는 박테리오신을 증식이 진행중인 배양액에 증식 시기별로 첨가했을 경우 그 지시균의 종류에 따라 생육에 미치는 영향이 다른 것으로 나타났다. 즉, *P. mirabilis*에 대해서는 균 접종 직후 및 유도기, 대수증식기 중기에 박테리오신을 첨가했을 때 가장 균수 감소가 컸으나, *L. monocytogenes*의 경우는 오히려 대수증식기 후기와 정지기에서 가장 큰 변화를 보였다. *B. subtilis*의 경우는 *L. monocytogenes*와 같은 Gram positive bacteria임에도 불구하고 오히려 Gram negative bacteria인 *P. mirabilis*와 유사한 결과를 나타내어 Gram positive나 Gram negative bacteria에 따라 박테리오신의 작용 형태가 결정되는 것은 아님을 알 수 있었다.

다. 박테리오신 처리 cell의 형태 변화

박테리오신을 처리한 *P. mirabilis*, *L. monocytogenes* 및 *B. subtilis*의 형태 변화를 TEM을 이용하여 관찰하였다.

*P. mirabilis*은 박테리오신을 처리하지 않은 대조구(A)에 비하여 박테리오신을 처리했을 경우(B), 세포벽의 일부가 파괴되어 세포 내용물이 유출되는 것이 관찰되었다(그림 6-7). *B. subtilis*는 박테리오신을 처리했을 경우 세포벽의 일부 또는 전체가 벗겨져나가 세포 모양이 많이 손상된 상태를 뚜렷하게 관찰할 수 있었다(그림 6-8). 그기에 비하여 *L. monocytogene*의 경우는 세포벽의 일부가 파손된 것도 있으나 (그림 6-9) 그렇지 않은 것도 상당수 관찰되었다.

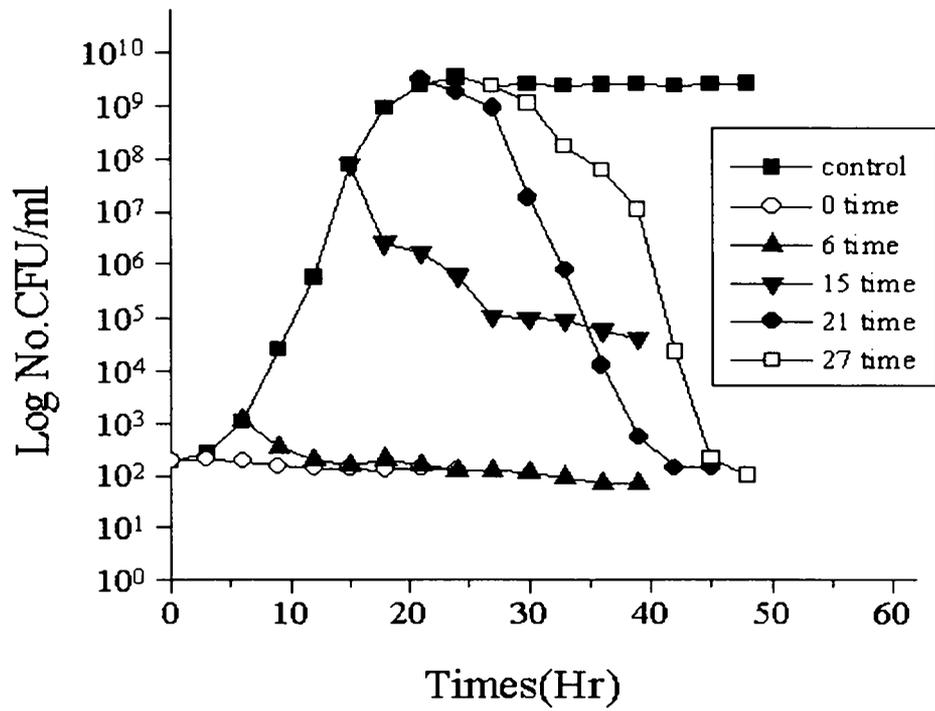
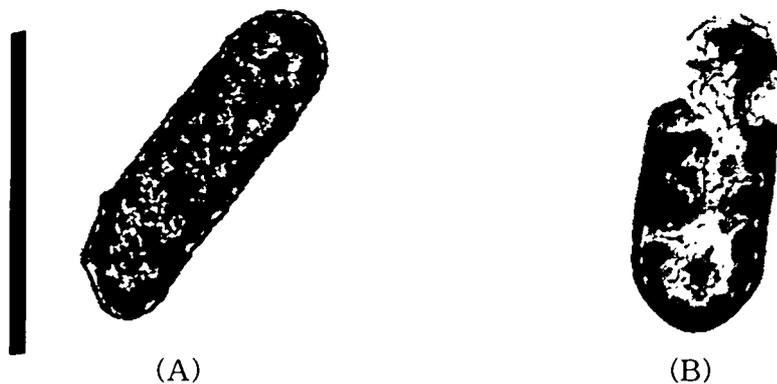


그림 6-6. 박테리오신 첨가 시기에 따른 *Listeria monocytogenes*의 생산 경향

P. mirabilis



B. subtilis



L. monocytogenes

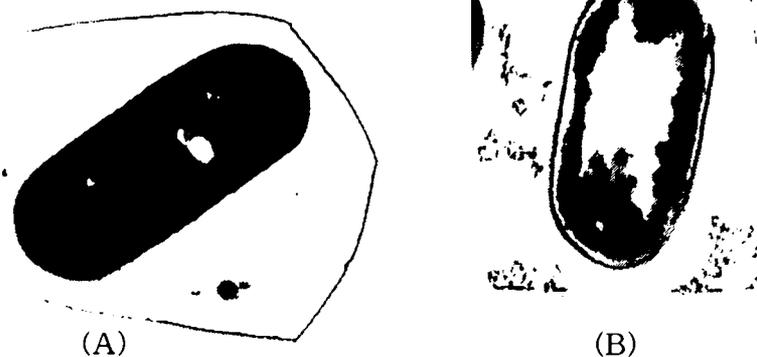


그림 6-7. *Lactobacillus* sp.GM7311이 생산한 박테리오신으로 처리한 미생물의 전자현미경 사진
(A) 대조구 (B) 처리구

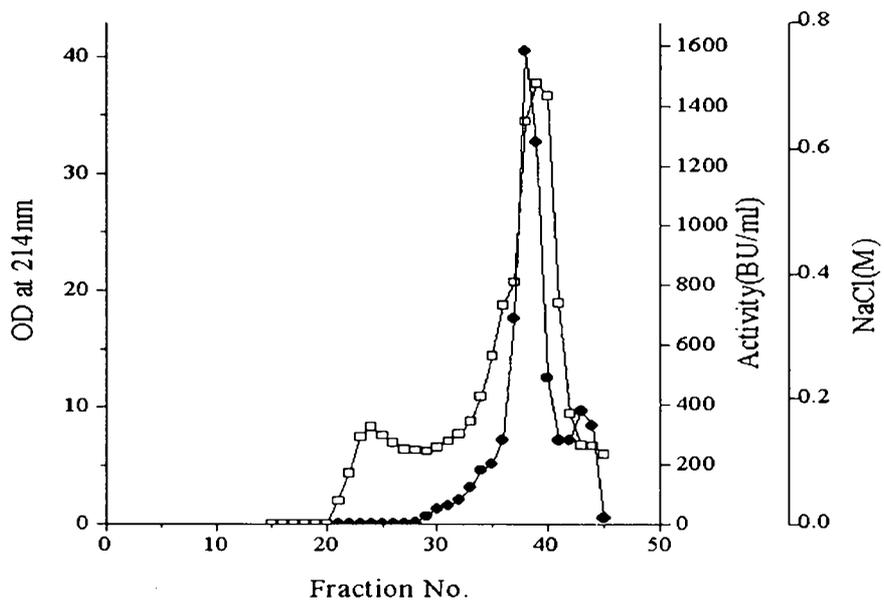


그림 6-8. 조박테리오신의 CM cellulose의 분획패턴.

—□— OD, —●— Activity, —▲— NaCl gradient

지금까지 보고된 바에 의하면 대부분의 박테리오신은 bacteriocidal action을 보이고 일부가 bacteriolytic action을 보인다고 알려져 있으나 본 실험에 사용된 박테리오신은 시험 3균주에 일정시간 처리하면 생균수가 감소하였고 전자현미경 관찰도 bacteriolytic action을 가진 것으로 볼 수 있었다. 다만 *L. monocytogenes*의 경우는 첨가 초기에는 사멸효과가 있었으나 10시간 정도 후에는 균수의 감소가 더 이상 일어나지 않아 앞으로 더 연구되어야 할 것으로 사료되어진다.

라. 균체의 아미노산 조성 변화

Lactobacillus sp. GM7311이 생산하는 박테리오신을 시험균주에 처리한 세포와 그렇지 않은 세포의 아미노산 조성 변화를 살펴본 결과 (표 6-3), *P. mirabilis*는 대조구에 비하여 전반적으로 아미노산의 함량이 감소하였고 특히 methionine의 함량이 크게 감소하였고, 반대로 proline은 증가하는 경향을 보였다. *B. subtilis*는 아미노산 성분 변화가 가장 심해서 serine과 cystine 및 tyrosine의 감소는 약간 적었지만 대부분의 아미노산 성분이 50%이상의 함량 감소를 보였다. 특히 proline과 methionine은 박테리오신 처리 cell에서 검출되지 않았다. 그리고 *L. monocytogenes*의 경우는 아미노산 함량이 전체적으로 *P. mirabilis*보다 컸는데 특히 aspartic acid와 proline이 크게 감소하여 박테리오신 처리 cell에서는 검출되지 않았으며 cystine은 약간 증가하였다.

이상의 결과에서 박테리오신 처리 세포는 대조구에 비하여 아미노산의 함량이 감소하였으나 어떤 일정한 상관 관계는 발견되지 않았다. 다만 *B. subtilis*가 다른 균에 비하여 아미노산의 감소폭이 컸고 이는 그림 6-8의 결과와 일치하는 것으로 추정되어지며 앞으로 균체의 지방산 함유량의 변화도 실험하면 좀더 정확한 결과를 알 수 있을 것이다.

표 6-3. 박테리오신으로 처리한 미생물의 아미노산 조성 변화

Amino Acid	<i>P. mirabilis</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
Aspartic acid	5.313	4.129	6.055	2.717	4.538	2.924
Threonine	2.791	2.100	3.304	1.686	2.877	1.825
Serine	2.487	1.910	2.725	1.692	2.268	1.666
Glutamic acid	5.386	4.203	7.076	3.614	5.218	3.695
Proline	nd	2.008	2.297	nd	3.197	nd
Glycine	4.866	3.569	5.301	2.748	4.235	2.941
Alanine	5.327	3.906	6.456	3.172	6.195	3.642
Cystine	0.177	0.147	0.215	0.147	nd	0.275
Valine	3.365	2.527	3.966	1.958	3.319	2.073
Methionine	1.159	0.231	0.207	nd	0.737	0.534
Isoleucine	2.581	1.984	3.072	1.504	2.709	1.689
Leucine	3.939	2.889	4.366	1.919	3.455	2.084
Tyrosine	1.947	1.442	2.600	1.715	3.049	1.891
Phenylalanine	2.184	1.461	2.398	1.250	2.078	1.160
Histidine	1.077	0.668	1.082	0.558	1.185	0.675
Lysine	3.473	2.388	3.884	1.988	4.570	2.365
Ammonia	24.558	2.938	5.329	2.686	16.186	3.781
Arginine	2.364	1.729	2.570	1.080	1.898	1.290

3. 박테리오신의 정제

식품 보존제는 이를 식품에 첨가하였을 때 식품고유의 맛과 냄새 등의 관능을 해치지 않아야 된다. 따라서 박테리오신의 정제를 실험하고 이를 식품보존제로의 이용가능성을 타진해 보았다. 박테리오신을 정제 하는데 이용된 정제 방법에 따른 정제 결과는 표 6-4에 요약하였다.

표 6-4. *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산한 박테리오신의 정제

Purification step	Total volume (ml)	Total Protein (mg/ml)	Total Activity (BU/ml)	Specific Activity (BU/mg protein)	Yield(%)	Purification fold
Crude supernatant	970	6014	145500	24.2	100	1
Acetone treated supernatant	70	1031	69867	67.8	48.0	2.8
Ion exchange chromatography	20	15	32010	2134	22.0	88.2
Gel filtration chromatography	6	1.0	12076	11938	8.3	493.3

가. n-propanol 추출과 acetone 처리

표 6-4에서 보듯이 배양 상등액의 활성은 150BU/ml이다. 그러나 n-propanol로 분획한 후 acetone을 처리했을 때는 활성이 40%정도 감소하였고 투석하면서 박테리오신의 유실이 일어나 최종 48%의 수율을 나타내었다.

배양 상등액에서 박테리오신을 1차 침전 시키는 방법으로는

(NH₄)₂SO₄를 사용하는 경우가 일반적이는데 본 연구자도 이 방법으로 실험한 결과 박테리오신의 침전이 잘 되지 않아 회수율이 10%부근으로 아주 낮았다. 그리고 한외여과를 실시해 보아도 시간만 많이 소요될 뿐 분자량이 큰 물질들의 제거가 되지않아 농축의 의미밖에 없었다. 따라서 유기용매를 이용한 침전법을 사용하였고 이 방법도 그다지 좋은 결과를 나타내지는 않았지만 3가지 방법중에서는 가장 효과적이었다. 실제 최등(1991)은 methanol과 acetone 등의 유기용매로 박테리오신을 추출하여 52.3%의 회수율을 얻었고 Pulusani et al.(1979)도 50%의 회수율을 얻었다고 보고한 바 있다.

나. 이온 교환 크로마토그래피

박테리오신의 pH 안정성을 고려하여 예비적으로 흡착실험한 결과 완충용액은 pH 5.7 sodium phosphate buffer, 충전제는 양이온 교환수지인 CM cellulose가 선택되었다. Acetone처리액을 투석후 농축시킨 시료를 CM cellulose에 주입, 흡착시킨 후 1M NaCl을 이용해 용출시킨 크로마토그램은 그림 6-8과 같다.

용출액의 흡광도는 214nm에서 측정하였으며 각 fraction별로 활성을 측정했을 때, 최대 활성을 나타내는 fraction은 38번이었으며 활성은 1600BU/ml였다. 비활성은 88배 증가하였고 회수율은 22%이었다.

다. 겔 여과 크로마토그래피

이온 교환으로 얻은 fraction 38을 Sephacryl HR-100으로 겔 여과시켜 박테리오신 이외의 단백질을 제거했다. 실험 결과(그림 6-9) peak는 서로 분리되지 않은 채 A와 B의 두 개가 나타났으나, peak A의 앞쪽 부분에서 박테리오신 활성을 나타냈다. 겔 여과 크로마토그래피 단계

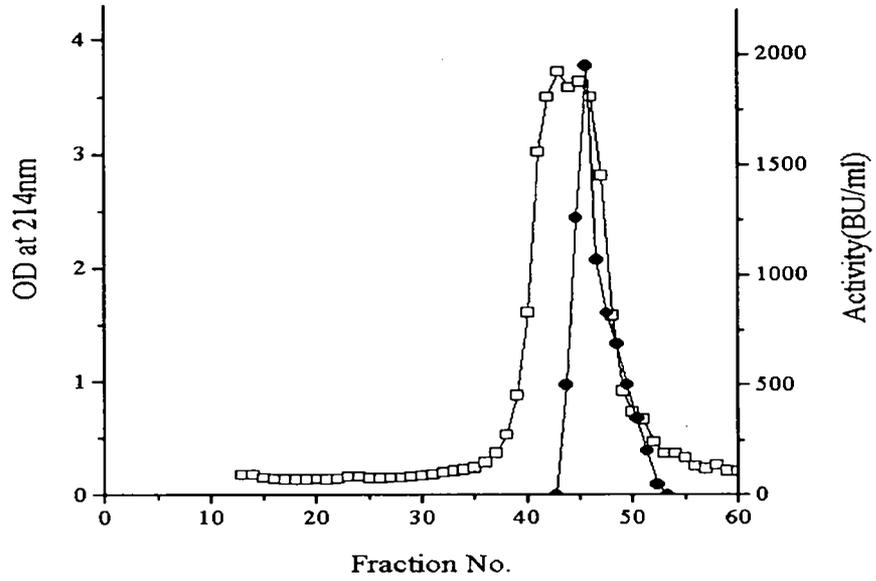


그림 6-9. 부분정제된 박테리오신의 Sephadex HR 100 분획 패턴

—□— OD, —●— Activity.

에서 박테리오신 활성이 크게 증가하여 비활성은 493배의 증가를 보였으며 회수율은 8.3%였다. 이 단계로 정제도는 증가하였으나 회수율이 급격히 저하하였는데 Piard et al.(1992)도 lacticin 481 정제과정에서 lipophilic 담체인 LH60를 사용하여 겔 여과한 결과 3.2%의 회수율을 나타내었다고 보고하였는데 이러한 현상은 lipophilic 담체와 박테리오신사이의 hydrophobic interaction 때문인 것으로 보고한 바 있다.

4. 어육 연제품에 응용

일반적으로 어육연제품은 4℃ 저온유통을 시키고 있으나 유통과정 중 여러가지 사정으로 인하여 온도가 정확히 지켜지지 않는 경우가 허다한 실정이다. 그기에다 현 식품위생법상으로 화학합성 보존제의 사용이 억제되고 유통과정중 변질될 우려가 있어 위생적으로나 경제적으로 막대한 해를 입고 있는 실정이다. 이를 해결하기 위한 방편으로 천연 항균성 물질을 개발하여 이를 연제품에 첨가하면 제품의 유통기간도 연장 시키고 위생적으로 안전한 제품을 생산할 수 있을 것으로 사료된다. 이를 위하여 유산균 대사산물인 박테리오신의 항균력을 먼저 실험하여 첨가 적정농도를 산정하고 이를 연제품에 직접 첨가하여 박테리오신의 항균력과 그 관능검사를 행하였다.

가. 박테리오신의 항균력 검사

일반적으로 수산연제품의 경우, 오염된 초기 균수가 10^2 /g 정도로 보고되고 있으므로 초기균 농도를 10^2 /g로 조정하여 온도별(4, 25, 37℃)로 저장하면서 박테리오신 첨가농도(0, 30, 60, 100BU/ml)에 따른 균수변화를 측정하였다. 이때 시험균주는 저온성 식중독균인 *Listeria*

*monocytogenes*를 사용하였고 이를 tryptone soy broth에 접종 배양하면서 일정 농도의 박테리오신을 첨가하여 임의의 온도에서 저장, 배양하면서 균수의 변화를 측정한 결과는 그림 6-10과 같다.

먼저 4℃에 저장한 경우, 대조구는 6일 이후로 균수가 증가하여 18일에 $4.0 \times 10^5 / \text{ml}$ 에 도달하여 약간의 증감을 보였고 30BU/ml는 6일에 1 log unit 만큼 감소한 뒤 10일 이후부터 검출되지 않았고 60BU/ml와 100BU/ml에서는 검출되지 않았다.

한편 25℃에서 저장했을 때, 대조구는 일정한 속도로 증식하여 72시간에는 $1.0 \times 10^8 / \text{ml}$ 에 도달하였으며 30BU/ml는 12시간까지 약간의 감소 경향을 보이다가 다시 증식하여 대조구와 비슷한 경향을 보였고, 60BU/ml와 100BU/ml에서는 검출되지 않았다.

그리고 37℃에서 저장했을 때는 bacteriocin 첨가량에 따른 균수의 변화는 대조구에서는 21시간까지 급격히 균수가 감소하여 $1.1 \times 10^{10} / \text{ml}$ 에 도달한 후 약간의 증감을 보였으며 30BU/ml는 대조구와 비슷한 증식양상을 보여 48시간에는 $5.5 \times 10^9 / \text{ml}$ 만큼 증식하였다. 60BU/ml와 100BU/ml는 모두 12시간 이후부터 검출되지 않았다.

이상의 결과를 종합해보면, *L. monocytogenes*의 초기농도가 $10^2 / \text{ml}$ 로 하였을 때는 37, 25, 그리고 4℃ 모두 60BU/ml 이상 첨가했을 경우 완전히 저해되었고, 특히 4℃에서는 30BU/ml 첨가에서도 균이 완전히 억제되었다.

나. 연제품 homogenate 에서의 실험

위의 실험결과에서 TSB에서 초기균수가 $10^2 / \text{ml}$ 인 경우 60BU/ml이상의 박테리오신 첨가로 *Listeria monocytogenes*의 증식을 억제할 수 있었다. 본 항에서는 시판 어육 연제품을 멸균 생리 식염수와

1 : 4 (w/w)의 비율로 균질화 한 다음 조 박테리오신을 일정량 첨가하여 4, 25, 그리고 37℃에서 보관하면서 생균수의 변화를 실험하였다. 즉 시판 어육 연제품을 무균적으로 40g 취하고 여기에 멸균 생리 식염수 160g을 넣어 warling blender로 균질화 한 다음 조 박테리오신을 0, 20, 80, 그리고 100 BU/ml되도록 첨가하여 온도별로 저장하면서 생균수의 변화를 측정하였다(그림 6-11).

먼저 4℃에 보관하면서 생균수 변화를 실험한 결과, 박테리오신을 첨가하지 않은 경우는 초기 균수 15/ml에서 저장 30일 동안 균이 서서히 증가하여 1.2×10^3 /ml에 도달하였고 박테리오신을 20BU/ml 첨가한 경우는 2.0×10^2 /ml에 도달하였다. 그러나 80과 100BU/ml를 첨가한 경우는 균수가 오히려 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고 25℃에 보관한 경우는 대조구의 경우 초기균수 95/ml에서 저장 7일 동안 균이 꾸준히 증가하여 10^7 /ml정도 도달한 후 증가속도가 완만하여졌다. 박테리오신을 20BU/ml 첨가한 경우 저장 7일만에 10^5 /ml에 도달한후 균 증식속도가 완만하여 15일 만에 10^6 /ml 정도 증가하였다. 그러나 80BU/ml를 첨가한 경우는 균수의 증가가 매우 완만하여 저장 15일 동안 1-log unit 정도 증가하는데 그쳤다. 100BU/ml를 첨가한 경우는 저장 15일 동안 균수가 오히려 감소하는 경향을 나타내어 1-log unit정도 감소하였다. 37℃에 보관한 경우는 약간의 균수차이가 있었지만 25℃와 비슷한 경향을 나타내었다.

이상의 결과에서 보면 TSB에서는 60BU/ml정도만 첨가하면 균의 증식이 억제되었지만 연제품 균질액에서는 80BU/ml이상, 100BU/ml 정도 첨가하여야 균 증식을 억제할 수 있었다. 두 실험의 지표균종이 달라서 직접 비교할 수는 없으나 배양액의 고형물 농도가 높아지면서 박테리오신의 항균력도 감소하는 경향을 나타내었다.

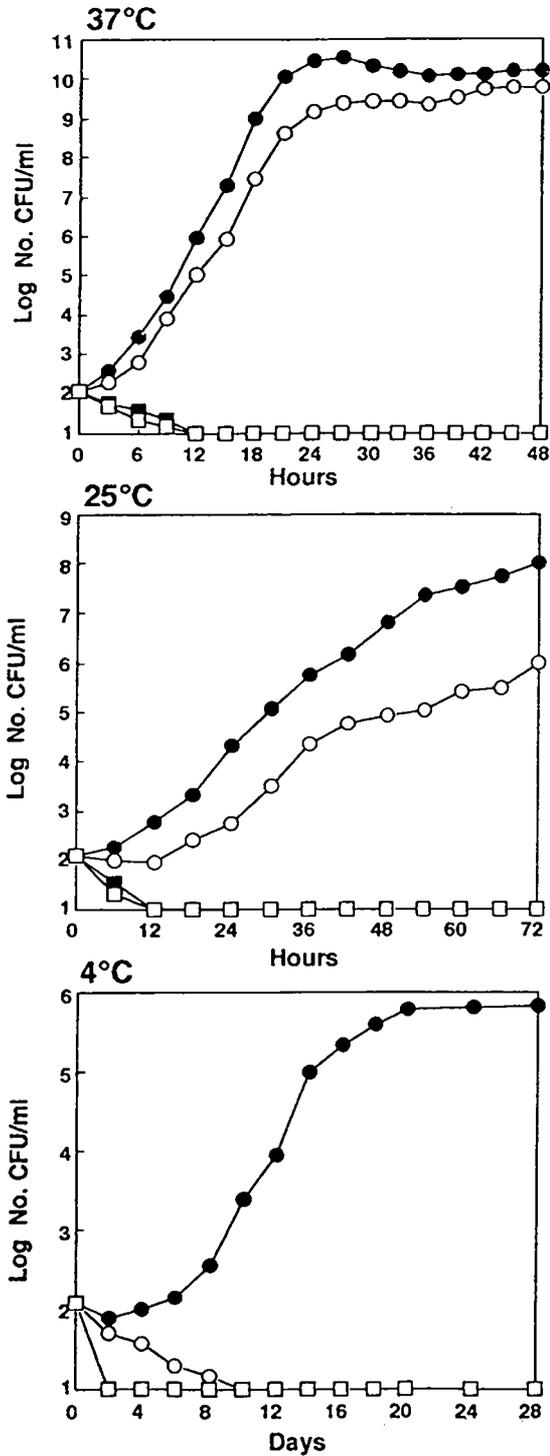


그림 6-10. 첨가된 박테리오신의 농도에 따른 *Listeria monocytogenes*의 온도별 균수 변화

●, 대조구; ○, 30AU/ml; ■, 60AU/ml; □, 100AU/ml

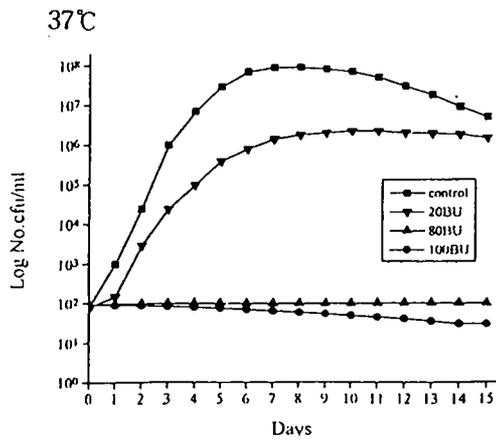
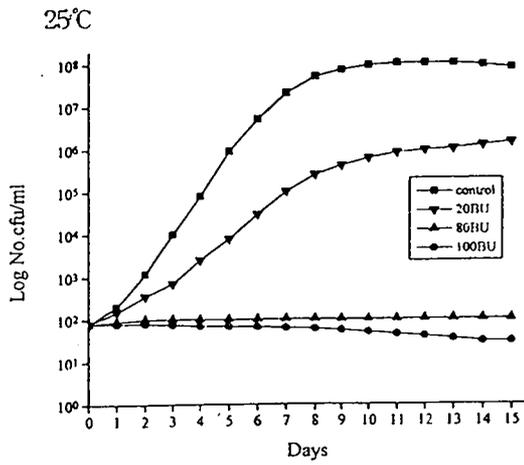
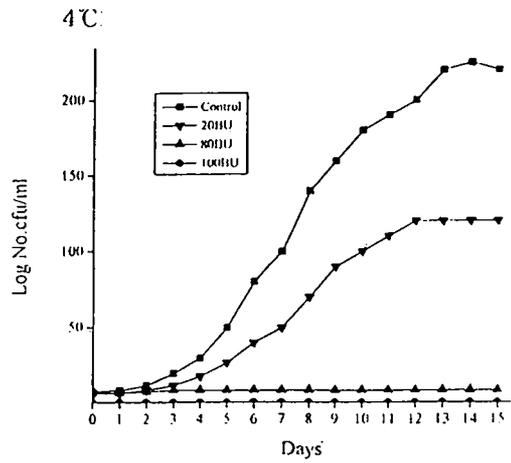


그림 6-11. 어육 연제품 마쇄육에 첨가한 박테리오신의 양이 균의 증식에 미치는 영향

다. 연제품에서의 응용

앞 항의 실험 결과 어육 연제품에는 조 박테리오신으로 100BU/g을 제품에 첨가하면 저장 온도에 관계없이 미생물의 증식을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 그러나 제품의 맛과 조직에 영향을 주게되어 제품의 관능이 상당히 저하되었다. 따라서 연제품 본래의 관능을 방해하지 않으면서 항균효과를 얻을 수 있는 정제 박테리오신을 제조하여 이를 연제품에 100BU/g 첨가하여 이를 25℃에서 30일 동안 저장하면서 생균수의 변화를 실험하였다. 이때 대조구로는 박테리오신을 첨가하지 않은 제품을 사용하였다. 동시에 조 박테리오신을 첨가한 제품도 제조하여, 이상 3가지 제품의 저장 기간에 따른 생균수의 변화를 실험한 결과를 표 6-5에 나타내었다.

대조구의 경우 저장 10일만에 10^8 /ml 까지 생균수가 증가한 다음 20일과 30일 저장에서는 도리어 균수가 감소하는 경향을 나타내었다. 박테리오신을 첨가한 제품은 10일 저장 후에도 초기균수와 큰 차이가 없었으며 그 이후로는 균수가 감소되었고 30일 후에는 균수가 검출되지 않았다. 그리고 대조구의 경우는 저장 5일 경부터 점질물이 생기면서 부패취가 나기 시작하였고 10일 경 부터는 기포가 생기기 시작하였다. 그러나 박테리오신을 첨가한 제품은 외관상으로는 30일 저장에도 별다른 변화를 볼 수 없었으나 손으로 만지면 조박테리오신을 첨가한 제품은 푸석푸석하게 연육이 부스러지는 경향이 있었으나 정제 박테리오신을 첨가한 제품은 30일 후에도 제품의 외관과 조직과 냄새도 대조구와 거의 비슷하였다.

위의 3종류 제품을 제조 직후 관능 검사를 한 결과(표 6-6)로 부터도 정제 박테리오신을 첨가한 경우는 대조구와 거의 비슷한 결과를 나타내었음을 알 수 있었다.

표 6-5. 정제된 박테리오신과 정제되지 않은 박테리오신을 어육 연제품에 첨가했을 때 어육연제품에서의 생균수 변화

Storage time(days)	Control	A	B
0	$1.8 \times 10^1 / \text{ml}$	$1.8 \times 10^1 / \text{ml}$	$1.8 \times 10^1 / \text{ml}$
10	$7.8 \times 10^1 / \text{ml}$	$1.5 \times 10^1 / \text{ml}$	10/ml
20	$3.2 \times 10^1 / \text{ml}$	$1.3 \times 10^1 / \text{ml}$	-
30	$5.3 \times 10^2 / \text{ml}$	-	-

A ; 조박테리오신을 함유한 어육연제품 (100BU/ml)

B; 정제한 박테리오신을 함유한 어육연제품 (100BU/ml)

표 6-6. 정제된 박테리오신과 정제되지 않은 박테리오신을 어육 연제품에 첨가했을 때 어육연제품의 관능검사 결과

	Control	A	B
Color	5.1	2.5	5.2
Flavor	4.5	3.8	4.4
Moistness	4.3	3.6	4.0
Tenderness	4.0	3.8	3.9
Cohesiveness	5.1	4.0	5.2
After swallowing	5.0	3.0	5.1
Overall quality	5.3	3.0	5.5

A ; 조박테리오신을 함유한 어육연제품 (100BU/ml)

B; 정제한 박테리오신을 함유한 어육연제품 (100BU/ml)

제 4 절 요약

유산균이 생산하는 항균성 물질인 박테리오신을 검색하여 어육 연제품에 응용하여 유통기간을 연장하고 위생적으로도 안전한 제품을 생산하기 위하여 다음의 실험을 실시하였다. 즉, ① 시판 발효 식품에서 분리한 젖산균의 박테리오신 생산배지 최적화, ② 박테리오신의 특성과 작용형태, ③ 박테리오신의 정제, 그리고 ④ 어육 연제품에 응용의 4항목으로 나누어 실험, 검토하였고 그 결과 요약하면 다음과 같다.

항균성 물질인 박테리오신을 생산하는 유산균을 시판 유제품에서 분리하여 그의 형태적, 생리·생화학적 특성을 실험한 결과 *Lactobacillus* sp. 와 유사한 성질을 나타내어 이를 *Lactobacillus* sp. GM 7311 로 명명하여 본 실험의 공시 균주로 사용하였다. 본 균이 생산한 박테리오신은 Gram 양성균에 고른 항균력을 나타내었고 그중 *Proteus mirabilis*에 대해 강한 항균력을 나타내어 이를 항균 지표세균으로 선정하여 실험하였다. *Lactobacillus* sp. GM7311은 초기 pH를 6.0으로 조정 한 MRS broth에서 37°C 배양한 경우가 박테리오신 생산 최적조건이었고 이 조건에서 박테리오신은 대수기 말기부터 정상기 초기에 걸쳐 최대로 생산되었고 그 이후에는 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다.

Lactobacillus sp. GM7311이 생산한 박테리오신의 활성은 산성측(pH 2.0~5.0)에서는 안정하였으나, pH 6.0 이상에서는 활성이 급격히 감소되는 경향을 나타내었다. 열에 대한 안정성은, pH 5.0의 sodium acetate buffer에 녹인 박테리오신은 100°C에서 60분 가열에도 활성 변화가 없었으나, 0.02N-HCl(pH 2.3)에 녹인 박테리오신은 60~121°C의 가열로 초기 15분 동안 활성이 40~50% 정도 감소하였고, 그 이후 100°C 이하의 온도에서는 가열시간의 증가에도 활성 변화는 거의 나타나지 않았다. 그

리고 유기용매에 대해서는 대체로 불안정하여 acetone, ethanol, iso-butanol, 그리고 ethyl ether을 박테리오신과 동량 혼합하여 4℃에서 2시간 방치한 결과 초기 활성의 약 40%가 감소하였다. 그리고 감수성 세균에 대한 작용형태를 실험한 결과 시험 3균주에 박테리오신을 배양 시기를 달리하여 첨가하여본 결과 *P. mirabilis*와 *B. subtilis*는 대수기에 감수성이 예민하였는데 비하여 *L. monocytogenes*는 오히려 정상기 때의 균이 감수성이 예민하여 서로 상반된 결과를 보였다. 가장 감수성이 예민한 시기의 균체의 형태와 아미노산의 함량을 대조구와 비교한 결과 3균주 모두 세포벽이 파손된 것과 아미노산의 함량이 감소한 것으로 미루어 본 박테리오신은 bacteriolytic action을 가진 것으로 추정되어진다.

그리고 *Lactobacillus* sp. GM7311을 MRS broth에 배양하여 배양 상정액으로부터 n-propanol-acetone처리, 이온 교환크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피를 이용해 박테리오신을 정제한 결과, 정제 과정의 첫 단계인 유기용매 처리과정에서 약 50%의 활성이 소실되었고 이후 겔 여과 크로마토그래피에서는 활성 증가와 더불어 비활성도 크게 증가하여 정제도 493배 증가를 얻을 수 있었다. 그리고 완전 정제를 확인하기 위하여 현재 전기영동과 HPLC로 실험하고 있는중이다. 그러나 정제 수율이 극히 낮아 정제 박테리오신을 식품보존제로 사용하기에는 경제적인 부담이 상당히 커서 이를 해결하여야 하는 것이 과제로 남아있다.

본 공시균주가 생산한 박테리오신을 연제품에 첨가하여 유통기간을 연장시킬 목적으로 조 박테리오신과 부분 정제된 박테리오신을 첨가하여 저장온도를 달리하면서 생균수의 변화를 실험하였다. 조 박테리오신의 경우는 25℃ 이상의 온도에서 저장하여도 80~100BU/g의 량을 연제품에 첨가하면 30일 저장에도 생균수의 증가없이 보존되었다. 그러나 연제품 고유의 색깔과 맛 그리고 탄력을 저하시켜 제품으로서의 가치가 상실되

었다. 따라서 부분 정제된 박테리오신을 100BU/g 되도록 제품에 첨가하여 관능검사와 항균력 검사를 한 결과 제품의 맛과 냄새, 그리고 탄력도 거의 비슷하였고 25℃에 30일 저장에도 생균수의 증가없이 보존할 수 있었다.

이상의 결과로 미루어보면 유산균 대사산물인 박테리오신은 항균력이 상당히 우수하여 식품 보존제로 이용할 1차 가능성은 있다고 판정되었으나 연제품 고유의 관능을 방해시키지 않기 위하여서는 정제된 박테리오신을 첨가하여야 할 것으로 사료되었다. 그런데 박테리오신의 생산과 정제과정을 살펴보면 MRS배지 1ℓ에서 생산 할 수 있는 조 박테리오신은 150,000BU이고, 이를 정제하면 최종 수율이 8%로 약 12,000BU밖에 회수되지 않아 연제품 120g밖에 만들지 못하게 된다. 즉 박테리오신 생산 단가가 너무 높아 보존제로서 사용하기에는 부적합하다고 생각된다. 따라서 이를 해결하기 위해서는 폐기물을 이용하여 박테리오신을 생산하고 정제과정을 대규모화시키면 박테리오신의 생산 단가를 낮출 수 있을 것으로 추정되어 앞으로 이에 대한 보충 연구가 계속 되어야 할 것으로 사료된다.

제 7 장 결 론

여 백

제 7 장 결 론

어육연제품 유통기간 연장을 위한 천연식품보존료 개발에 관한 연구 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 포장 후 가열처리를 하는 어육연제품에 대하여는 부패세균의 발육억제가 필수적이며, 가열처리 후 포장하는 튀김어묵과 같은 연제품은 곰팡이 발생억제가 급선무였다.
2. 계피마쇄물을 알콜 추출한 다음 *n*-hexane으로 분획한 것을 튀김어묵의 표면에 분무하면 알콜만을 분무한 것 보다 곰팡이 발생을 상온에서 2일 정도 지연시킬 수 있었다.
3. 알긴산 가수분해물을 어육연제품에 0.3% 첨가하였을 때 보존기간은 15℃에서 4일 정도 연장되었으며 기존 흰어묵 제품과 비교하였을 때 고구마 맛이 약간 감지되었다.
4. 키토산 효소분해물을 어육연제품에 0.3% 첨가하였을 때 보존기간은 15℃에서 6일 정도 연장되었으며 맛과 물성에는 기존 제품과 차이가 없었으나 제품의 원가 상승요인이 발생하였다.
5. 젖산균에서 생산된 박테리오신의 항균성은 우수하여 어육연제품에 첨가하면 유통기간은 연장되지만 현재의 상황으로서는 정제수율이 너무 낮아서 식품보존제로 사용하기엔 경제적으로 불합리하였다.

6. 시판되고 있는 키토산 분해효소는 고가이지만 *Aspergillus oryzae* ATCC 22787 균주를 활용하면 저렴한 가격으로 조효소액을 대량으로 생산할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 相磯和嘉. 1976. 食品微生物學. 醫齒藥出版株式會社. 東京, p 255.
- AOAC International. 1992. Bacteriological Analytical Manual, 7th ed. FDA. U. S. A., p 1~215.
- Barefoot, S. F. and C. G. Nettles. 1993. Antibiosis revisited: Bacteriocin produced by dairy starter cultures. J. dairy Sci., 76, p 2366~2379.
- Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 45, p 1808~1815.
- Bronzetti, G. 1994. Antimutagens in food. Trends in Food Science & Technology., 5(10), p 390~395.
- Cassen, R. G., R. N. Terell and C. Couch. 1975. The effect of textured soy flour particles on the microscopic morphology of feankfurters. J. Food Sci., 40(5), p 1097~1098.
- 장동석, 조학래, 구효영, 최위경. 1989. 게 가공 폐기물을 이용한 식품 보존료의 개발에 관한 연구. 한국수산학회지., 22(2), p 70~78.
- 조학래. 1989. 저분자 키토산의 항균성 및 식품보존효과에 관한 연구. 부산수산대학 대학원 공학박사학위논문, p 20~54.
- Chung, Y. G., J. Y. Ahn, O. J. Kwon and C. W. Kang. 1989. Properties of a *Lactobacillus acidophilus* Bacteriocin. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 17, p 94~99.
- Daba, H., S. Pandian, J. F. Gosselien, R. E. Simard, J. Huang and C. Lacroix. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by

- Leuconostoc mesenteriodes*. Appl. Environ. Microbiol., 57, p 3450~3455.
- Danneman, P. J., K. A. Booman, J. Dorsky, A. Kohrman, A. S. Rothenstein, R. I. Sedlak and R. J. Steltenkamp. 1983. Cinnamic aldehyde: A survey of consumer patch-test sensitization. Fd. Chem. Toxic., 21(6), p 721~725.
- Davey, G. P. and B. C. Richardson. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. Appl. Environ. Microbiol., 41, p 84~89.
- Frazier, W. C. and D. C. Westhoff. 1988. Contamination, Preservation, and spoilage of Fish and other Seafoods In *Food Microbiology*, McGraw-Hill, 4th ed., p 253~254.
- Galli, C. and A. P. Simopoulos. 1989. Dietary 3 and 6 fatty acid biological effects and nutritional essentiality. Plenum publishing, New York., p 5~490.
- Gilliland, S. E. and M. L. Speck. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. J. Food Protec., 40, p 820~823.
- Hammes, W. P., N. Weiss and W. Holzapel. 1994. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* In *The Prokaryotes*. ed. by A. Balowers, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer. 2nd Ed., Springer-Verlag, p 1535~1574.
- 함승시, 한홍식, 최근표, 오덕환. 1997. 각종 변이원들에 의해 유도된 돌연변이원성에 대한 수리취 추출물의 억제작용. 한국식품과학회지. 26(3), p 528~533.
- 韓國水産會. 1996. 水産年鑑. 東洋文化印刷(株), p 176~181.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams.
1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed, p 71~566.

東島弘明. 1979. 食中毒發生狀況. *食品衛生研究*, 30(8), p 778~804.

Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27, p 85~123.

황병호, 최근표, 정성원, 김은정, 함승시. 1996. 주목 추출물의 발암 억제효과 및 암세포에 미치는 영향. *한국식품과학회지*. 25(6), p 1062~1068.

稻嶺成男, 片平亮太. 1984. 食品改良剤として乳化EPAの水産練製品への利用. *New Food Industry*, 26(5), p 16~20.

伊藤克廣. 1992. 冷凍おり身および水産練製品の給動向と今後の課題. *食品と科學*, 12, p 93~96.

전유진, 김세권. 1997. 한외여과막 효소반응기에서 제조한 키토산 올리고당의 항암작용, 항균작용 및 칼슘 흡수 촉진작용. *한국키티킨키토산 연구회지*, 2(3), p 60~78.

Jepperson, V. F. and H. H. Huss. 1993. Characteristics and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products, *Inter. J. Food Microbiol.*, 18, p 305~320.

Kakinuma, K., K. Junpei, K. Kotani, K. N. Ikekawa, T. Kada and M. Nomoto. 1984. Cinnamaldehyde : Identification of an antimutagen from a crude drug, cinnamoni cortex. *Agric. Biol. Chem.*, 48(7), p 1905~1906.

강성구. 1995. 갓(*Brassica juncea*)의 향균물질의 분리 및 향균성. *한국식품과학회지*. 24(5), p 695~701.

- 加藤 登. 1990. 水産わり製品の最近の動向. *New Food Industry*, 32(9), p 22~28.
- Kendra, D. F. and L. A. Hadwiger. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol*, 8, p 276~281.
- 김세권. 1997. 키틴·키토산의 기초와 약리. 이화문화출판사.
- Kimata, M. and A. Kawai. 1951. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 16(12), p 55~58.
- Kimata, M. and T. Sosogi. 1956. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 22(4), p 269~272.
- 小林文男, 1987, “キチン質分解酵素の現況と應用”, 別冊フードケミカル-1, キチン/キトサンの科學. p 112~121.
- Kojic, M., J. Svircevic, A. Banina and L. Topisirovic. 1991. Bacteriocin producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, p 1835~1837.
- Kone, K. and D. Y. C. Fung. 1992. Understanding bacteriocins and their uses in foods. *Dairy Food and Environ. Sani.*, 12, p 282~285.
- Krieg N. R. and J. G. Holt, 1984, “Bergey's manual of systematic bacteriology”, Vol. 1, Williams and Wilkins.
- Kurita, N., M. Miyaji, R. Kurane, Y. Takahara and K. Ichimura. 1979. Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Agric. Biol. Chem.*, 43(11), p 2365~2371.

- Liao, C. C., A. E. Yousef, E. R. Richter and G. W. Chism. 1993. *Pediococcus acidilactici* PO2 bacteriocin production in Whey permeate and inhibition of *Listeria monocytogenes* in Foods. J. Food Sci., 58, p 430~434.
- Mahmoud, A. L. E. 1994. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. Lett., Appl., Microbiol., 19, p 110~113.
- Malloch D., 1981, "Moulds-Their isolation, cultivation and identification", Univer. of Toronto press.
- 목종수, 박옥연, 김영목, 장동석. 1994. 용매와 추출조건에 따른 단삼 추출물의 항균력. 한국영양식량학회지, 23(6), p 1001~1007
- Muriana, P. M. and T. R. Klaenhammer. 1991. Purification and partial characterization of lacticin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl. Environ. Microbiol., 57, p 114~121.
- 西川研次郎. 1992. 冷凍おり身とこれから水産ねり製品. 食品工業, p 57~64
- Nielson, J. W., J. S. Dickson and J. D. Crouse. 1990. Use of a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. J. Food Protec., 55, p 497~502.
- 岡田稔, 横關源廷, 衣卷豊輔. 1974. 魚肉わり製品理論と應用. 恒星社厚生閣, p 290~355.
- 박옥연. 1991. 한약초 추출물의 항균성에 관한 연구. 부산수산대학교 대학원 석사학위논문, p 14~30.
- 박옥연, 성희경, 목종수, 장동석. 1995. 상백피 추출물이 미생물의 군체 성분 및 형태 변화에 미치는 영향. 식품위생안전성학회지, 10(3), p 147~153.

- 朴榮浩, 張東錫, 金善奉. 1997. 水産加工利用學. 螢雪出版社, p 791~793.
- Park, Y. H. and D. H. Jo. 1986. Microbial inhibition by isolate of *Pediococcus* from Kimchi. J. Korean Agric. Chem. Soc., 29, p 207~211.
- 박영호, 김선봉, 장동석. 1995. 수산 가공 이용학, 형설출판사, p 833~836.
- Piard, J. C., P. M. Muriana, M. J. Desmazeaud and T. R. Klaenhammer. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Appl. Environ. Microbiol., 58, p 279~284.
- Price, J. S. and R. storck(1975) : Production, purification, and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces*. J. Bacteriol., 124(3), p 1574~1585.
- Pulusani, S. R., K. R. Rao and G. R. Sunki. 1979. Antimicrobial activity of lactic cultures; partial purification and characterisation of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*. J. Food Sci., 44, p 575~578.
- Rammelsberg, M. and F. Radler. 1990. Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. J. Appl. Bacteriol., 69, p 177~184.
- Reddy, G. V., K. M. Shahani, B. A. Friend and R.C.Chandan. 1986. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. J. Cult. Dairy Prod., 18, p 15~19.
- 류미라. 1992. 食品機能研究의 앞으로의 展望. 食品技術, 5(3), p 41~48.
- Samson R. A., E. S. Hoekstra and C. A. N. Van Oorschot, 1981, "Introduction to food-borne fungi", Centraalbureau voor Schimmelcultures.

- Sanders, T. A. B. 1986. Nutritional and physiological implications of fish oils. *J. Nutr.*, 116, p 1857~1862.
- 山川文男. 1979. 大豆蛋白質の物性と食品物性. *日食工誌*, 26(6), p 266~277.
- Satoshi M. 1978. Isolation, purification, and antibiotic activity of *o*-methoxycinnam-aldehyde from Cinnamon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(4), p 577~583.
- Schved, F., A. Lalazar, Y. Henis and B. J. Juven. 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, p 67~77.
- Scott, V. N. and S. L. Taylor. 1981. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci.*, 46, p 121~126.
- Skyttä, E., A. Haikara and T. Mattila-Sandholm. 1993. Production and characterization of antibacterial compounds produced by *Pediococcus damnosus* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, p 134~142.
- Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E. and J. G. Holt, 1986, "Bergey's manual of systematic bacteriology", Vol. 2, Williams and Wilkins.
- Sobrinho, O. J., J. M. Rodriguez, W. L. Moreira, L. M. Cintas, M. F. Fernandez, B. Sanz and P. E. Hernandez. 1992. Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Inter. J. Food Microbiol.*, 16, p 215~225.
- Sugano M. 1988. Nutritional assessment of polyunsaturated fatty acids. *Nippon Noglidagaku Kaishi*, 62(1), p 39~43.

- Tagg, J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker. 1975. Bacteriocin of a group B *Streptococcus*: Partial purification and characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7, p 764~772.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40, p 722~756.
- Tahara, T., K. Kanatani, K. Yoshida, H. Miura, M. Sakamoto and M. Oshimura. 1992. Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, p 1212~1215.
- Tanikawa, E. 1963. *Advanced in Food Research*. Academic Press. New York and London, 12, p 392~415.
- Toba, T., S. K. Samant and T. Itoh. 1991. Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells. *Lett. Appl. microbiol.*, 13, p 102~104.
- Tramer, J. and G. G. Flower. 1964. Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agric.*, 15, p 522~528.
- Vaughan, E. E., C. Daly and G. F. Fitzgerald. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.*, 73, p 299~308.
- Yousef, A. E., J. B. Luchansky, A. J. Degnan and M. P. Doyle. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* in Weiner Exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin H or pediocin AcH during storage at 4°C or 25°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, p 1461~1467.