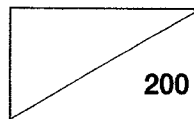


664.024  
L293K

GA0050-1002

최 종  
연구보고서



19916638

# 쌀과 과채류를 이용한 면역기능 강화 Bifidus 발효제품 개발

Development of Immunologically Active  
Fermented BIFIDUS Products Using Rice and  
Fruits/Vegetables

연구기관

한국식품개발연구원

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “쌀과 과채류를 이용한 면역기능 강화 Bifidus 발효 제품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 차 성 관

연 구 원 : 홍 석 산

연 구 원 : 박 중 현(경원대)

협동연구기관명 : 한림대학교

협동연구책임자 : 지 근 익

협동연구기관명 : 경원대학교

협동연구책임자 : 장 학 길

연 구 원 : 목 철 균

연 구 원 : 이 영 택

**여 백**

# 내용누락

기능 강화능을 갖는 *amylolytic Bifidobacterium*을 배양하고 BIFIDUS Growth Factor 인 과채류, 특히 사과즙스 가공부산물인 사과박을 이용할 경우 기능성 고부가가치화 및 영양적 향상기술을 개발할 수 있다. 쌀은 우리나라를 비롯하여 전세계 인구의 반 이상이 주식으로하고 있는데, 우리나라의 쌀 생산은 품종개량과 영농기술의 발전에 힘입어 급격히 늘어 났으나, 일인 당 연간 소비량은 1979년에도 135kg에 서 1994년도에는 110.5kg으로 감소하였다. 이러한 쌀소비의 감소는 식품 소비패 턴의 다양화에 기인하지만 아직 쌀을 이용한 다양한 제품개발의 미진함에도 큰 원인이 있다. 농산물 수입개방에 대응하는 전략적 대체작목으로 대두된 사과의 경우 1988년 생산비가 320원/kg에 불과하였으나 1993년에는 675원에 이르고 있어 물가상승 률을 감안하면 사과 농가의 수취가격은 오히려 감소해 가고 있고 일정량의 수입이 불 가피해 질 전망이다. 특히 사과즙스를 가공한 후 발생하는 사과박이 2만 2천 M/T(1993년도)에 이르고 있어 부산폐기물의 효율적인 처리방안의 모색이 요망되고 있 는데, 이 사과박을 BIFIDUS균의 Growth Factor로 이용함으로써 폐기물의 식량자원화 및 생산자이익 극대화를 도모하여야 한다. 소비자의 건강 지향적 구입 패턴에 비추 어 볼 때 생리활성 유산균을 상품화하는 것은 우리나라의 제품 판매전략에 있어 서 매우 중요하다고 할 수 있는데, BIFIDUS균을 비롯한 유산균 이용식품에 대한 수요가 계속 증가할 것으로 예견하고 있다. 발효식품은 한국의 식품 중에서 중요 한 비중을 차지하고 있으며 발효기술이 일찍 한국에서 발달 되었지만 선진화하는 데에는 일본보다 늦었기 때문에 세계 시장에서는 그 지위가 약하고 오히려 일본 의 발효식품이 한국을 점점 잠식하여 가고 있는 실정이다. 발효유는 현실적으로 우리나라에도 거대한 시장이 형성되어 있으며, 국민의 건강과 체력 증진에 관련 된 영양학적 근거도 우수하기 때문에, 원료자원의 다양화 및 고기능성 균주를 개 발하여 기술우위성을 확보하여 역수출 할 수 있도록 노력하여야 한다. 본 연구에 서는 쌀을 기질로 사과즙스 제조시 착즙 후 폐기되는 사과박을 식이섬유원과

*Bifidobacterium*의 growth factor로 이용하여 면역기능 강화능을 갖는 음료를 개발하기 위하여 한국인의 장내에서 직접분리한 *Bifidobacterium*을 배양하고 쌀당화액과 사과박의 혼합발효를 통하여 기능성 부여, 고부가가치화 및 제품의 다양화를 시도하였다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### ■ BIFIDUS균주의 배양학적 특성 연구

- 쌀/과채류 발효 적합성 검증
- 균의 성장을, 발효패턴등 배양학적 연구
- Growth Factor 검증

#### ■ 곡과류 발효용 BIFIDUS 균주의 선발

- 한국인유래의 amylolytic BIFIDUS를 분리하고

제품발효 우수균주 선발

- 면역능력검정 system 개발

(Michigan대학, Dr. Pestka와 공동연구)

#### ■ Amylase 생산 BIFIDUS균을 이용한 쌀 당화/발효 시스템 개발

- 쌀 당화 시스템개발
- 쌀/사과박 발효특성구명

#### ■ 종균생산및 제품생산을 위한 발효공학적 기초기술확립

- 종균 생산기술 개발
- 제품발효기술개발
- 쌀/과채류 발효특성구명

#### ■ 선발균주의 동정, 생리 활성 특성 연구

-F-6-PPK, DNA분석 등을 통한 배양, 생리,

유전학적인 동정

- Amylase 특성 연구

- 면역능력증강 균주의 선발

(Michigan대학 Dr. Pestka와 국제공동연구)

■ 사과박 전처리 시스템 개발 및 발효제품 생산 시스템 연구

- 사과박 건조기술 개발

- 쌀/건조사과박/과채류 발효시스템 개발

■ 품질개선 및 저장성 향상 기술 개발

- Pilot Plant 규모 발효실증 연구

- 종균의 혼합 기술 및 안정화 기술 개발

- 저장성 향상 기술 개발

■ 발효균주 및 발효제품의 기능성 제고

- Amylase 활성, 쌀, 과채류 발효 특성, 면역증강 능력,

생리활성 종합적 고찰.

- 면역기능인자의 분리 및 발현을 통한 제품종의

면역기능증진인자 강화

■ 제품 생산 공정 개발

- 부산물 이용 제품 개발

- 제품 생산 설비 선택

- 생산 공정 lay-out 완성

#### IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

## 1. 연구개발 결과

본 연구의 목적은 한국인에서 분리한 amyolytic *Bifidobacterium* 중 amylase 활성과 면역 증강능이 높은 균주를 이용하여 쌀과 과채류 소재 발효 제품을 개발하는 것이다. 본 연구를 위하여 다양한 연령층의 성인 및 유아들 지원자로부터 변시료를 제공받아 전분이 첨가된 고체 배지에서 자라는 *Bifidobacterium* 중 amylase 활성이 높은 47균주를 분리하였다. 이들을 다시 액체 배양하여 amylase 활성이 높은 균주를 선발하였는데 액화력, 당화력 및 비 활성도(specific activity)를 기준으로 Int-57, JS9, HJ7, SJ8, MS1, MS5, ZS8 등의 분리 균주가 우수하였다. 다음은 쌀과 과채류를 소재로 하여 발효 적합성을 조사하였다. 조사 결과 선발된 amyolytic *Bifidobacterium* 균주들은 호화 쌀 원료에서 배양성 및 발효성이 non-amyolytic bifidobacteria 균주에 비하여 우수하였다. 과채류 소재 중에서는 사과, 복숭아, 당근 등에서 균 생육과 관능성이 우수하였다.

면역 활성화에 미치는 amyolytic *Bifidobacterium*의 영향을 조사하기 위하여 macrophage 세포에 해당하는 murine macrophage cell line RAW 264.7을 이용하였고 면역 조직으로는 Peyer's patch를 분리하여 이용하였다. 조사된 면역 매개 물질로서는 tumor necrosis factor(TNF- $\alpha$ ), Interleukin(IL)-6 등의 cytokine과 nitric oxide(NO), hydrogen peroxide 및 식균능 등을 대상으로 하였다. Amyolytic *Bifidobacterium* 균주들간에는 macrophage의 TNF- $\alpha$  증강능이 서로 상이하였다. Non-amyolytic *Bifidobacterium* 균주들도 역시 서로 다른 TNF- $\alpha$  증강능을 보여주었다. 대장균의 그람 음성 세균이 보유하는 lipopolysaccharide를 *Bifidobacterium*과 동시에 첨가하였을 때는 오히려 TNF- $\alpha$ 의 수준이 감소하였다. Amyolytic *Bifidobacterium* 중에서는 SJ32의 TNF- $\alpha$  생산능이 높은 것으로 나타났다. SJ32는 IL-6, NO 및 hydrogen peroxide의 생산 증강능도 높았다.



본 실험에서는 amylolytic *Bifidobacterium* 등 쌀 발효 제품 적용성이 우수한 균주들을 대상으로 이들의 macrophage cell line에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과 RD35 균주와 RD50 균주가 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 생성을 모두 높은 수준으로 증가시켰다. 균체의 농도가 증가할수록 cytokine 생산능이 일반적으로 증가하였지만 균체의 농도가 250 $\mu$ g/mL 수준에 달하였을 때 일부의 균주에서 cytokine 생산능이 감소하는 경우도 있었다. 대체로 cytokine 증가능이 클수록 NO의 수준도 크게 증가시켰지만 cytokine에 비하여는 균주별 차이가 뚜렷하지는 못하였다. 본 연구실에서 장 상피세포 부착능이 높은 균주들이 macrophage 세포 활성 증강능이 높은 결과를 얻은 바 있어 RD35와 RD50 등의 균주들은 장내의 상피 세포와 면역 조직의 M 세포에 대한 부착능이 커서 면역세포의 유입이 용이하고 또한 macrophage를 비롯한 T 세포 및 B 세포와의 부착능 및 활성능이 높아질 것이라는 가능성이 새롭게 제기되었다.

*Bifidobacterium*에 의한 당근 발효 제품의 제조 특성을 조사하였다. BGN3 균주를 비롯한 여러 종류의 *Bifidobacterium*들은  $10^8$  CFU/mL 이상의 균주로 성장하였다. 성장이 양호한 경우 pH는 30시간 경과 후 pH 4.2 부근에 도달하였다. 당근 주스에 부원료로서 ascorbic acid와 cysteine 등이 *Bifidobacterium* 성장 촉진에 기여하였는데 제품 적용에는 ascorbic acid가 cytokine보다 우수할 것으로 생각된다. 발효 후 향과 맛을 기준으로 판정하였을 때 *Bifidobacterium* 발효는 무발효 대조군에 비하여 기호도를 증진시켰다. 향기 성분 분석 결과 발효 중 생성되는 성분으로는  $\beta$ -terpine,  $\alpha$ -terpine, endocarbonylactate, di-limonene,  $\beta$ -farnesene,  $\alpha$ -bergamolene 등이었고 소실되는 성분들은 2- $\beta$ -pinene과 delta-4-carene이 대표적이었다.

쌀발효 배지에서 질소원 및 사과박 첨가실험에서 질소원을 첨가하지 않은 쌀배지에서는 균주들의 성장이 저조 하였으나, 0.5% skim milk와 ISP의 첨가로써  $10^7$ 에서  $10^8$ 으로의 생육촉진 효과를 가져왔다. 또한 쌀발효배지에 10% 냉동사과박을 첨가 함으로써 24시간에서 12시간으로 발효시간이 감축되는 bifidus 균의 빠른 성장촉진을

가져오는 것이 확인되었다. *Lactobacillus acidophilus* KFRI 233 균주의 쌀배지 발효 물과 *Bifidobacterium longum* 35 균의 균체를 첨가한 후, 4°C와 20°C에서 8일간 저장 실험한 결과 *L. acidophilus*는 저장기간 중  $10^8$  이상의 균수가 유지 되었으나, *Bif. longum*은 8일간의 저장기간 중  $10^5$  이하로 균수가 점차적으로 감소되는 경향을 보여 주었다.

쌀의 분쇄는 호화 후 당화시 당화속도를 상승시키고 당화 수율을 향상시켰다. 쌀의 분쇄는 충격식 분쇄기를 사용하여 평균입도 453  $\mu\text{m}$  정도가 되도록 하는 것이 적당하였다. 호화전 예비가온은 호화 후 당화를 용이하게 하는 효과가 있었으며 최적 예비가온 조건은 60°C, 45분이었으며, 최적 호화 조건은 당화수율 및 에너지 효율을 고려하여 온도 100°C, 시간 40분으로 결정되었다. 쌀당화액 제조를 위한 적정 효소첨가량 결정시험 결과  $\alpha$ -amylase 0.135 unit/g rice powder와 glucoamylase 3.375 unit/g rice powder를 적정 효소첨가량으로 결정하였으며 적정 당화시간은 75 분이었다. 쌀당화액을 *Bifidobacterium* sp. FBD-27을 사용하여 37°C에서 48시간 발효시킨 결과 pH는 발효 전 5.39에서 12시간 후에는 3.93으로 낮아졌으며 그 이후에는 미미하게 감소하여 발효 48시간 이후에는 3.58을 나타내었다. 산도는 초기 0.045%에서 발효시간에 따라 증가하여 48시간 후에는 0.153%를 보였다. *Bifidobacterium*수는 초기  $4.8 \times 10^6$  CFU/ml에서 발효 36시간 후에는  $2.2 \times 10^8$  CFU/ml로 증가하다가 48시간후에는  $1.4 \times 10^8$  CFU/ml로 감소하여 비피더스균의 활성은 36시간 발효시 가장 좋은 것으로 나타났다.

사과박 건조기술을 개발하기 위하여 사과박 건조 특성을 조사하였다. 사과박의 수분비율( $MR = (M_t - M_e)/(M_o - M_e)$ )은 역S자 형태로 감소하고 건조양상은 수분비율에 따라 향를건조, 감를건조 1단계, 감를건조 2단계 등 3단계로 구분되었다. 각 건조단계에서의 활성화에너지는 향를건조에서는 21.0 kJ/mol, 감를건조 1단계에서는 26.2 kJ/mol, 감를건조 2단계에서는 24.0 kJ/mol을 보여 감를건조 1단계의 온도의존

성이 가장 큰 것으로 나타났다. 사과박의 건조조건은 L값이 가장 높은 값을 보인 0.7 m/s, 70℃로 결정되었으며 건조시간은 2.5시간이 소요되었다.

쌀과 사과박을 이용한 비피더스 발효음료를 제조하여 기능성 음료로 활용하기 위해서 사과박/쌀가루 혼합물의 건조기술을 개발하였다. WAP 첨가비율을 42%로 결정하였으며 사과박/쌀가루 혼합물(apple-pomace/rice-flour mixture: ARM)의 건조과정 중 수분함량 감소에 따른 건조속도의 변화는 감률건조에 속하였다. ARM의 건조 중 수분비율(MR)의 변화는 두께에 따라 두가지 형태로 구분되었으며 감률건조 1단계에서의 활성화에너지는 16.1 - 21.3 kJ/mol를 나타내었으며 감률건조 2단계에서는 6.2 - 7.9 kJ/mol의 값을 보여 1단계에서의 활성화에너지가 2단계보다 큰 값을 보였다. ARM의 두께 및 건조온도에 따른 건조소요시간은 건조온도가 높을수록 두께가 얇을수록 단축되었다. 최적 건조조건인 두께 2 mm, 풍속 0.7 m/s, 건조온도 70℃에서 ARM의 건조에 소요된 시간은 1.5시간이었으며 이는 사과박(WAP)을 단독으로 건조할 때의 2.5시간에 비하여 건조시간을 1시간 단축할 수 있었다.

쌀당화액을 *Bifidobacterium*으로 발효시킨 결과 향미성분의 약점을 보완하기 위해 사과박(WAP)을 첨가한 발효공정을 완성하였다. 완성된 *Bifidobacterium* 발효음료를 이용하여 쌀젖산발효물의 기능성을 부여하고자 호상 쌀젖산발효물을 제조하여 *Bifidobacterium* 발효음료와 비율을 달리하여 혼합함으로써 기능성과 관능성의 향상을 도모하고 제품의 다양화를 시도하였다. *Bifidobacterium*발효 음료(BFD)의 제품화와 대량생산에 필수적인 건조공정과 발효공정을 연계한 생산시스템을 검토하였고 물질수지를 구하여 100 ml/btl x 10,000 btl/day의 생산규모에서 완성하였다. 아울러 쌀젖산발효물과 비피더스발효물의 혼합에 의한 제품 LFW/BFS 및 LFR/BFW의 생산을 위한 기초 공정설계 자료로서 이들 제품의 100 ml/btl x 10,000 btl/day의 생산규모의 lay-out도 완성하였다.

## 2. 활용에 대한 건의

### 가. 활용실적

#### 1) 학술지발표논문

1. 이세경, 지근억 (1996) Bifidobacteria에 의한 항돌연변이 효과. 한국산업미생물학회지, 28:796-799
2. Jong-Hyun Park, Min Kwon, Young-Jo Koo (1996) Effects of soybean extract on growth and metabolism of Clostridium perfringens and some human intestinal bacteria. Foods and Biotechnology, 5:220-225
3. C.J.Kim, G.E.Ji (1996) A partially purified  $\beta$ -glucosidase from *Bifidobacterium adolescentis* converts cycasin to a mutagenic compound. Letters in Applied Microbiology and Biotechnology, 22:145-148
4. 박소영, 고영태, 정후길, 양진오, 정현서, 김영배, 지근억 (1996) 유산균들의 콜레스테롤 저하성, 내산성, 내담즙성, 항생제 내성 비교. 한국산업미생물학회, 24:304-310
5. 박종현, 송혜경, 안준배, 지근억, 목철균 (1997) 한국인 유래의 amylolytic *Bifidobacterium*에 의한 쌀발효. 한국식품과학회지, 29:581-587
6. 박소영, 고영태, 이주연, 목철균, 박종현, 지근억 (1997) *Bifidobacterium*에 의한 당근발효. 한국식품과학회지, 29:571-575
7. Ahn, J.B., J.K. Hwang, C.T. Kim, K.H. Lee and J.H. Park (1997) Bifidogenic effect of glucooligosaccharide prepared from glucose by extrusion process. J.Micro.Biotechnol., 7:174-179

8. 안준배, 이계호, 박종현 (1997) 한국인의 분변으로부터 내산소성 균주의 분리, 동정 및 분리균주의 특성. 한국식품영양학회지, 10:122-126
9. Lee, S.K., Y.B. Kim and Geun Eog Ji. (1997) Purification of amylase secreted from *Bifidobacterium adolescentis*. J. of Applied Microbiology 83:267-272
10. 이주연·목철균·박종현·장학길·구동주 (1998) 비피더스발효를 위한 쌀당화액 제조공정의 최적화. 한국농화학회지 투고 중
11. 이주연·목철균·박종현·장학길 (1998) 쌀당화액의 *Bifidobacterium* 발효시 환원제가 미치는 영향. 한국산업미생물학회지 투고 중

## 2) 학술대회발표

1. 구동주, 목철균, 박종현, 지근억, 장학길 (1996) *Bifidobacterium* spp  $\alpha$ -amylase family의 생장을 위한 환원제 선발 및 이를 이용한 쌀/사과박 발효. '96 한국농화학회 추계학술대회, 1996.10. 아주대학교
2. 송혜경, 지근억, 목철균, 박종현 (1996) 한국인 유래의 BIFIDOBACTERIA를 이용한 쌀 발효 특성. '96 한국식품과학회 추계학술대회, 1996. 10. 교육문화회관
3. 박소영, 고영태, 이주연, 목철균, 지근억 (1996) *Bifidobacterium*을 이용한 당근발효. '96 한국식품과학회 춘계학술대회, 1996, 6. 전북대학교
4. 송혜경, 안준배, 지근억, 목철균, 박종현 (1996) 한국인에서 분리된 내산, 내산소성이 강한 *Bifidobacterium* spp.  $\alpha$ -amylase family의 특성. '96 한국식품과학회 춘계학술대회, 1996, 6. 전북대학교
5. 안준배, 지근억, 이계호, 박종현 (1996) 한국인의 장내에서 내산성, 내산

- 소성이 우수한 bifidobacteria의 분리 및 동정. '96 한국산업미생물학회  
 춘계학술대회, 1996, 4. 과학기술회관
6. 정현서, 이명자, 김영배, 지근억 (1996) 내산, 내담즙성을 보유한  
*Bifidobacterium* 균주의 분리 및 선발. '96 한국산업미생물학회  
 춘계학술대회, 1996, 4. 과학기술회관
  7. 김선영, 이기은, 지근억, 목철균, 박종현 (1997) 쌀 bifidobacteria  
 발효를 위한 분리균주 동정과 발효조건. '97 한국식품과학회 추계  
 학술대회, 1997.11. 덕성여자대학교
  8. 이기은, 안준배, 안병학, 정후길, 박종현 (1997) 인체유래의 bifidobacteria  
 의 세포지방산 분석 및 동정특성 조사. '97 한국산업미생물학회  
 추계학술대회, 1997. 10. 전남대학교
  9. 신순영, 박종현 (1997) Activities of organic acid enzymes and acid  
 permeability of bifidobacteria. '97 한국산업미생물학회 추계학술대회,  
 1997, 10. 전남대학교
  10. 이주연, 목철균, 박종현, 장학길(1997) 쌀과 사과박을 이용한 비피더스 발효  
 음료의 개발 및 특성, 97'Agricultural Biotechnology Symposium · Plant  
 Biotechnology for new Biomaterials, The Research Center for New  
 Bio-Materials in Agriculture
  11. 이주연, 목철균, 장학길, 박종현 (1997) 사과박 건조공정의 최적화 및  
 건조 사과박을 첨가한 쌀당화액의 Bifidus 발효, 한국식품과학회  
 제 59차 학술발표회 1997. 11. 덕성여자대학교
  12. 박소영, 지근억, 고영태, 정후길 (1997) Alteration of nitric oxide,  
 hydrogen peroxide and cytokine production in RAW 264.7 cells by  
 Bifidobacterium exposure. '97 한국한국산업미생물학회 추계학술대회,

1997. 10. 전남대학교

13. 안준배, 황재관, 김종태, 이계호, 박종현 (1997) Bifidogenic effect analysis of glucooligosaccharide prepared from glucose by extrusion process. '97 한국산업미생물학회 춘계학술대회, 1997, 4. 서울대학교
14. 신순영, 박종현 (1997) Activity of catalase, superoxide dismutase, NADH oxidative enzymes related with sensivity in bifidobacteria. '97한국 산업미생물학회 춘계학술대회, 1997. 4. 서울대학교
15. 안준배, 이계호, 박종현 (1997) 배양과정중 산소의 존재가 한국인으로부터 분리된 내산소성 Bifidobacterium sp. 의 세포 지방산 조성에 미치는 영향. '97한국산업미생물학회 춘계학술대회, 1997. 4. 서울대학교
16. 이주연, 목철균, 박종현, 장학길 (1998) 비피더스발효를 위한 쌀/사과박 혼합물 건조공정의 최적화, 한국식품과학회 제 60차 학술발표회 발표, 1998. 5. 30. 부산대학교
17. 김선영, 박종현, 지근억, 차성관 (1998) 쌀과 사과박을 이용한 비피더스 발효제품의 제조. 한국식품과학회 제61차 학술발표회. 1998. 11. 7. 이화여자대학교 발표

### 3) 특허출원 및 등록

1. 지근억, 박소영, 이주연, 목철균, 고영태. 1996. 내산성, 내담즙성 비피더스를 이용한 당근 발효제품 제조. 대한민국 특허출원 제 96-6271
2. 지근억, 정현서, 이명자, 김영배. 1998. 내산성, 내담즙성 비피도박테리아 선발법. 대한민국 특허 공고번호 제 96-7860
3. 차성관, 홍석산, 김왕준, 구영조. 1998. 락토바실러스 아시도필러스 KFRI

나. 건의

본 연구의 결과를 토대로 한 산업체에의 기술이전을 위하여 지속적인 산업체와의 협의 그리고 기술의 scale up 하기위한 산업화연구과제의 가능성 타진이 요망됨.



## SUMMARY

The aim of this research is to develop a fermented rice and vegetable products using Korean-originated amylolytic *Bifidobacterium* strains with high immuno-enhancing activity. 47 amylolytic *Bifidobacterium* strains were isolated on starch-containing agar medium from the fecal samples of the various age groups of Korean. The amylase activities of these strains were subsequently measured and compared after liquid culture in the starch-containing medium. Based on their abilities of starch liquefaction and saccharification and specific amylase activities strains such as Int-57, JS9, HJ7, SJ8, MS1, MS5 and ZS8 were chosen. Then, fermentation by selected-*Bifidobacterium* strains were carried out on rice, fruit and vegetables. Amylolytic *Bifidobacterium* strains showed significantly higher growth than non-amylolytic strains on gelatinized rice. Among the various fruits and vegetables tested, juices of apples, peaches and carrots were shown to be good growth substrates for the *Bifidobacterium*.

To study the effect of the amylolytic *Bifidobacterium* strains on the immune function, murine macrophage cell line RAW 264.7 and immune cells isolated from the Peyer's patch immune tissue were used. For the assessment of the macrophage activation, cytokines such tumor necrosis factor(TNF- $\alpha$ ) and Interleukin(IL)-6, nitric oxide(NO), hydrogen peroxide and phagocytic activities were measured. Lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella typhimurium* suppressed the production of TNF- $\alpha$  below the *Bifidobacterium*-treated level when LPS and *Bifidobacterium* were co-incubated with RAW 264.7 cells. Among the amylolytic *Bifidobacterium* strains, SJ32 which showed the greatest stimulatory

effect on the production of TNF- $\alpha$  also showed the highest stimulatory activities on the production of IL-6, NO and hydrogen peroxide.

The effect of the amylolytic *Bifidobacterium* strains which were selected for their suitability in the fermentation of rice were evaluated on their macrophage-stimulatory actions. Strains of RD35 and RD50 showed greater macrophage-stimulation in the production of TNF- $\alpha$  and IL-6. As the cell concentration increased the cytokine production increased, although the cytokine levels started to decline over cell concentration to 250  $\mu$ g/mL in some strains. The strains which showed higher cytokine-stimulating activity generally stimulated greater production of nitric oxide even though the difference were less marked between strains. In our previous studies we showed that macrophage-stimulatory activity are co-related with the adhesion to the intestinal-epithelial cells. These results may suggest that high-adhesive strains to the epithelial cells may also retain high adhesion to the immune cells such as macrophage, T cell and B cell.

Fermentation of the carrot juice by *Bifidobacterium* were characterized. Most of the *Bifidobacterium* strains tested grew above  $10^8$  CFU/mL. The pH reached to about 4.2 after 30h fermentation. When various supplements were added, ascorbic acid and cysteine promoted the growth of the *Bifidobacterium* during fermentation. Ascorbic acid may be favored for their superior sensory value to cysteine. The volatile compounds produced during fermentation are  $\beta$ -terpine,  $\alpha$ -terpine, endocarboxylactate, dl-limonene,  $\beta$ -farnesene,  $\alpha$ -bergamolene. Delta-4-carene and 2- $\beta$ -pinene disappeared during fermentation.

Addition of 0.5% skim milk and ISP to the rice fermentation media brought

the effect of growth acceleration from  $10^7$  to  $10^8$  CFU/ml, and the addition of 10% frozen apple pomace accelerated fermentation time from 24 hr. to 12 hr. After the addition of the cells of *Bifidobacterium longum* 35 to the rice fermentation product of *Lactobacillus acidophilus* KFRI 233, it was stored 8 days at 4°C and 20°C. During the 8 days' storage, the cells of *Lb. acidophilus* KFRI 233 maintained at the level of  $10^8$ , but the cells of *Bif. longum* 35 decreased gradually to the  $10^5$  CFU/ml.

Grinding or size reduction and preheating of rice before gelatinization facilitated the saccharification process and improved the saccharification yields. A coarse grinding of rice to the mean particle size of 453  $\mu$ m in an impact mill and the preheating at 60°C for 45 min were appropriate for the saccharification. The optimum gelatinization condition was at 100°C for 40 min. The optimum addition levels of the amylolytic enzymes for the saccharification of rice were 0.135 unit/g rice powder for  $\alpha$ -amylase and 3.375 unit/g rice powder for glucoamylase and the conditions were at 60°C for 75 min.

The fermentation of the saccharified rice solution(SRS) was done at 37°C using *Bifidobacterium* sp. FBD-27 for 48 hrs. A great decrease in pH from 5.39 to 3.93 was observed for first 12 hrs of the fermentation. The pH and the titratable acidity of 48hr fermented SRS was 3.58 and 0.153%, respectively. The viable number of *Bifidobacterium* was  $4.8 \times 10^6$  CFU/ml before the fermentation and showed the maximum  $2.2 \times 10^8$  CFU/ml after 36 hr and decreased gradually afterward showing  $1.4 \times 10^8$  CFU/ml after 48 hr fermentation.

Drying characteristics of wet apple pomace(WAP) was investigated to

optimize drying process for the yearlong supply for the raw material of the fermented products. The drying of the WAP consisted of 3 stages: constant rate drying, 1st and 2nd stages of falling rate drying. The drying rate constant of each stage of drying was calculated and its temperature dependence was estimated according to Arrhenius equation. The magnitude of activation energy of each drying stage were 21.0 kJ/mol for the initial constant rate drying, 26.2 kJ/mol for the first stage of the falling rate drying and 24.0 kJ/mol for the second stage of the falling rate drying. The optimum drying condition of the WAP was at 70°C and air velocity of 0.7 m/s. Drying took 2.5 hrs under the condition.

A drying scheme of apple pomace/rice mixture(ARM) was developed. In this scheme, ground rice was used as a drying aid to increase the drying rate and thereby to reduce the drying time. The optimum mixing ratio of the ARM was 42% wet apple pomace and 58% ground rice. The drying of ARM consisted of 2 stages of falling rate drying. The activation energy of the 1st stage was 16.1 - 21.3 kJ/mol, and was 6.2 - 7.9 kJ/mol in 2nd stage. The optimum drying temperature and air velocity were 70°C and 0.7 m/s, respectively. The drying time was 1.5 hrs, which was 1 hr less than that of WAP alone.

Two types of products were developed: LFR/BFW, lactic acid fermented rice mixed with *Bifidobacterium* fermented WAP/SRS, and LFW/BFS, lactic acid fermented WAP/SR mixed with *Bifidobacterium* fermented SRS. The mixed products showed the best sensory properties with the mixing of 4 parts of lactic acid fermented rice and 1 part of *Bifidobacterium* fermented SRS. LFW/BFS had better sensory properties than LFR/BFW. The lay-out of the production processes for

the developed products were proposed for 100 ml/btl x 10,000 btl/day production scale.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	33
1) Background of the research .....	33
2) Necessity of the research .....	34
3) Objectives and contents of the research .....	39
Chapter 2. Materials and Methods .....	41
1) Isolation and selection of amylolytic bifidobacteria from Korean people .....	41
2) Selection of the bifidobacteria with immuno-enhancing ability .....	41
1. Macrophage cell line .....	41
2. Nitric oxide .....	42
3. Cytokine .....	42
4. Production of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	42
3) Identification, enzyme pattern and cultural, physiological characteristics of the selected bifidobacteria .....	42
4) High density cell culture of bifidobacteria .....	43
5) Fermentation suitability of the gelatinized rice, fruits and vegetables by selected bifidobacteria .....	43
6) Optimization of pre-treatment of the rice substrate and development of rice saccharification system .....	44

7) Development of drying processes of apple pomace and of dry apple pomace/saccharified rice solution fermentation system .....	45
8) Drying of apple pomace/rice flour mixture and its fermentation .....	47
9) Quality improvement of bifidobacteria fermented rice with lactic fermentation .....	48
10) Analysis of physico-chemical and microbiological properties .....	48
Chapter 3. Results and Discussion .....	51
1) Isolation and selection of functional Bifidobacteria .....	51
1. Isolation of amylolytic bifidobacteria from Korean people .....	51
2. Development of the experimental methods for the assessment of immuno-enhancing action of the bifidobacteria .....	53
3. Selection of the bifidobacteria with immuno-enhancing ability .....	55
a. Effect of amylolytic bifidobacteria on the production of macrophage TNF- $\alpha$ .....	55
b. Effect of amylolytic bifidobacteria on the production of macrophage IL-6 .....	57
c. Effect of amylolytic bifidobacteria on the production of hydrogen peroxide from macrophage cell line .....	58
d. Effect of amylolytic bifidobacteria on the production of nitrogen oxide from macrophage cell line .....	59
4. Identification of selected bifidobacteria .....	60
2) Cultural and physiological characteristics of the selected bifidobacteria .....	64

1. Enzyme pattern of the selected strains .....	64
2. Cultural physiology of the selected strains .....	64
a. Acid resistance .....	64
b. Oxygen resistance .....	65
c. Effect of the growth factor .....	66
3. High density cell culture of bifidobacteria .....	67
4. Development of the immuno-enhancing ability .....	68
3) Fermentation suitability of the selected strains .....	71
1. Fermentation suitability on gelatinized rice, fruits and vegetables .....	71
a. Comparison of the growth of the amylolytic and non-amylolytic bifidobacteria on gelatinized-rice .....	71
b. Fermentation of the bifidobacteria on fruits and vegetables .....	72
2. Fermentation product suitability .....	74
a. Fermentation of rice by selected bifidobacteria .....	74
b. Effect of additive materials on rice fermentation .....	77
c. Fermentation of rice/apple pomace .....	80
d. Fermentation of onion juice .....	81
e. Fermentation of carrot juice .....	81
4) Development of bifidomicrobial fermentation products .....	82
1. Manufacture of bifidobacterial rice fermentation products with frozen apple pomace .....	82
2. Manufacture of bifidobacterial carrot fermentation products .....	85
a. Comparison of the fermentation on various fruits and	





b. Selection of <i>Bifidobacterium</i> strains and AP/SRS ratio .....	101
6) Optimization of Drying Processes of Apple Pomace and Development of Fermentation System of Dry Apple Pomace(DAP)/Saccharified Rice Solution(SRS)(DAP/SRS) .....	102
1. Development of Drying Technology of Apple Pomace .....	102
a. Drying characteristics of apple pomace .....	102
b. Establishment of drying conditions .....	105
2. Development of <i>Bifidobacterium</i> Fermentation System of DAP/SRS .....	106
a. Rice saccharification process .....	106
b. Fermentation of DAP/SRS .....	107
c. Comparison of fermentation characteristics between wet apple pomace(WAP) and dry apple pomace(DAP) .....	110
d. Optimization of <i>Bifidobacterium</i> fermentation of DAP/SRS .....	112
7) Drying of Apple Pomace/Rice Flour Mixture(ARM) and its Fermentation ...	113
1. Drying of Apple-pomace/Rice-flour Mixture(ARM) .....	113
a. Mixing ratio for ARM .....	113
b. Drying characteristics of ARM .....	115
c. Optimization of drying process .....	117
2. Fermentation of Dried ARM(DARM) .....	119
3. Material Balance of <i>Bifidobacterium</i> fermented DARM(BFD) .....	120
8) Quality Improvement of Lactic Acid Fermented Rice with <i>Bifidobacterium</i> Fermented Rice Beverage .....	123
1. Lactic Acid Fermentation of Rice .....	123
2. <i>Bifidobacterium</i> Fermentation .....	123

3. Mixing of Lactic Acid Fermented Rice(LFR) and <i>Bifidobacterium</i>	
fermented Products .....	125
a. Mixing of LFR and <i>Bifidobacterium</i> fermented WAP/SRS(BFW) for	
LFR/BFW .....	126
b. Mixing of lactic acid fermented WAP/SR(LFW) and <i>Bifidobacterium</i>	
fermented SRS(BFS) for LFW/BFS .....	127
4. Material Balances of Mixed Products .....	129
a. Material balance for LFR/BFW .....	129
b. Material balance for LFW/BFS .....	130
9) Lay-outs of Production Processes for Developed Products .....	130
 Chapter 4. References .....	 139

# 목 차

제 1 장 서 론 .....	33
1. 연구의 배경 .....	33
2. 연구의 필요성 .....	34
3. 연구개발의 목표 및 내용 .....	39
제 2 장 재료 및 방법 .....	41
1. 한국인 유래의 amylolytic bifidobacteria의 선발 .....	41
2. 면역능력 비피더스균주 선발 .....	41
가. Macrophage cell line .....	41
나. Nitric oxide .....	42
다. Cytokine .....	42
라. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 의 생성 .....	42
3. 선발균주의 동정, 효소활성 및 배양학적 생리활성특성연구 .....	42
4. 고농도 균체배양연구 .....	43
5. 쌀 및 과채류에 대한 발효적합성 연구 .....	43
6. 쌀기질의 전처리조건 설정 및 쌀 액화, 당화의 최적화 .....	44
7. 사과박 건조 공정 및 건조사과박/쌀당화액 발효 시스템 개발 .....	45
8. 사과박/쌀가루 혼합건조 및 발효 .....	47
9. <i>Bifidobacterium</i> 쌀젖산발효물의 품질개선 .....	48
10. 이화학 성분분석 및 미생물 수의 측정 .....	48

제 3 장	결과 및 고찰	51
제 1 절	기능성 비피도박테리아의 분리 및 선발	51
1.	한국인 유래의 amyolytic bifidobacteria의 선발	51
2.	면역능력 비피더스균주 선발실험을 위한 방법확립	53
3.	면역능력 비피더스균주의 선발 ( <i>in vitro</i> macrophage activity)	55
가.	Macrophage의 TNF- $\alpha$ 생산에 미치는 amyolytic <i>Bifidobacterium</i> 의 영향	55
나.	IL-6의 생산에 미치는 <i>Bifidobacterium</i> 의 영향	57
다.	Hydrogen peroxide 생산에 미치는 amyolytic <i>Bifidobacterium</i> 의 영향	58
라.	Nitrogen oxide(NO)의 생산에 미치는 <i>Bifidobacterium</i> 의 영향	59
4.	균주의 동정	60
제 2 절	비피더스 선발균주의 배양, 생리학적 연구	64
1.	선발균주의 분비효소의 특성조사	64
2.	선발균주의 배양학적 생리연구	64
가.	선발 <i>Bifidobacterium</i> spp.의 내산성 (acid resistance)	64
나.	<i>Bifidobacterium</i> spp.의 내산소실험 (oxgen resistance)	65
다.	선발균주의 생육인자(growth factor)에 대한 영향	66
3.	고농도균체배양 연구	67
4.	<i>Bifidobacteria</i> 의 면역증강능력연구	68
제 3 절	선발 균주의 쌀 및 과채류에 대한 발효적합성 연구	71

1. 쌀 및 과채류에 대한 발효적합성 연구 .....	71
가. 쌀배지에서의 amyolytic 과 non-amyolytic bifidobacteria의 생육비교 .....	71
나. Bifidobacteria에 의한 과채류의 발효 .....	72
2. 발효제품화에 대한 실험 .....	74
가. Bifidobacteria에 의한 쌀발효 .....	74
나. 부재료첨가에 의한 쌀발효실험 .....	77
다. Bifidobacteria에 의한 쌀/사과박발효 .....	80
라. Bifidobacteria에 의한 양파발효 .....	81
마. Bifidobacteria에 의한 당근발효 .....	81
 제 4 절 <i>Bifidobacterium</i> 이용 발효제품의 생산 .....	82
1. 냉동사과박 첨가 비피더스 쌀 발효제품의 제조 .....	82
2. <i>Bifidobacterium</i> 에 의한 당근 발효식품의 제조 .....	85
가. 과일과 채소의 종류에 따른 발효 .....	85
나. 부원료 첨가에 따른 당근발효 .....	86
다. <i>Bifidobacterium</i> 배양에 의한 관능의 변화 .....	87
라. <i>Lactobacillus acidophilus</i> 와 <i>Str. thermophilus</i> 와의 혼합배양 ...	88
마. 당근 발효증의 휘발 향기 성분의 변화 .....	89
 제 5 절 쌀 당화시스템 및 <i>Bifidobacterium</i> 발효 시스템 개발 .....	92
1. <i>Bifidobacterium</i> 발효를 위한 쌀 당화 시스템 개발 .....	92
가. 당화를 위한 쌀의 분쇄조건 확립 .....	92
나. 최적당화를 위한 호화 전 예비가온 조건 .....	93

다. 최적당화를 위한 호화 조건 .....	93
라. 쌀 당화액 제조를 위한 당화 조건 확립 .....	95
마. <i>Bifidobacterium</i> 발효 쌀당화액의 특성 .....	95
2. 쌀당화액의 비피더스 발효특성 규명 .....	96
가. <i>Bifidobacterium</i> 의 최적 발효조건을 위한 혐기적 조건 확립 .....	97
나. 환원제를 첨가한 <i>Bifidobacterium</i> 발효 쌀당화액의 특성 .....	97
다. 쌀당화액 발효에 적합한 균주 선발 .....	99
3. 사과박/쌀당화액 혼합물의 <i>Bifidobacterium</i> 발효특성 .....	100
가. 사과박/쌀당화액 혼합물의 <i>Bifidobacterium</i> 발효를 위한 환원제 선발 .....	100
나. 사과박/쌀당화액 <i>Bifidobacterium</i> 발효를 위한 균주 선발 및 혼합 비율 결정 .....	101
제 6 절 사과박 건조 공정 및 건조사과박/쌀당화액 발효 시스템 개발 .....	102
1. <u>사과박 건조기술</u> 개발 .....	102
가. 사과박 건조특성 .....	102
나. 사과박 건조조건 결정 .....	105
2. 건조사과박/쌀당화액 <i>Bifidobacterium</i> 발효 시스템 개발 .....	106
가. 쌀당화액 제조 공정 개발 .....	106
나. 건조사과박/쌀당화액 혼합물의 발효 .....	107
다. 생사과박과 건조사과박의 발효특성 비교 .....	110
라. <i>Bifidobacterium</i> 발효의 최적화 .....	112

제 7 절 사과박/쌀가루의 혼합건조에 의한 건조효율 향상

및 건조물의 발효특성 .....	113
1. 사과박/쌀가루 혼합물 (apple-pomace/rice-flour mixture; ARM)의	
건조기술 개발 .....	113
가. ARM의 WAP (wet apple pomace) 첨가 비율 결정 .....	113
나. ARM의 건조양상 .....	115
다. ARM 최적 건조조건 결정 .....	117
2. 사과박/쌀가루 건조물 (dried apple-pomace/rice-flour mixture;	
DARM)의 발효 특성 .....	119
3. 사과박/쌀가루 건조물 (DARM)을 이용한 비피더스 발효음료	
( <i>Bifidobacterium</i> fermented dried ARM; BFD) 제조 물질수지 .....	120
 제 8 절 <i>Bifidobacterium</i> 발효음료를 이용한 호상	
쌀젖산발효물의 품질개선 .....	123
1. 쌀 젖산 발효 .....	123
2. <i>Bifidobacterium</i> 발효 .....	123
3. 쌀젖산발효물과 비피더스발효물과의 혼합 .....	125
가. 쌀젖산발효물 (LFR)과 <i>Bifidobacterium</i> 발효한 WAP/SRS	
(BFW)의 혼합제품 (LFR/BFW) .....	126
나. 젖산발효한 사과박/쌀당화물 (LFW)과 <i>Bifidobacterium</i> 발효한	
쌀당화액 (BFS)과의 혼합제품 (LFW/BFS) .....	127
4. 혼합 제품의 제조를 위한 물질수지 .....	129
가. <i>Bifidobacterium</i> 발효한 WAP/SRS (BFW)의 쌀젖산발효물	
(LFR)과의 혼합제품 (LFR/BFW)의 물질수지 .....	129
나. <i>Bifidobacterium</i> 발효한 쌀당화액 (BFS)과 젖산발효한 사과박/쌀당화물	



(LFW)의 혼합제품 (LFW/BFS)의 물질수지 .....	130
제 9 절 개발제품의 생산공정 lay-out .....	130
제 4 장 참고문헌 .....	139

# 제 1 장 서 론

## 가. 연구의 배경

■ 근래에 질병및 성인병이 선진국형으로 이전되면서 건강지향 소비성향이 고조되고 기능성 건강식품에 대한 소비자의 요구가 강해져서 이러한 식품시장이 크게 형성되고 있으나 아직까지 국내산 농산물로 이러한 식품에의 개발연구는 활발하지 못하고 있음.

■ 2000년대 우리나라도 노령인구가 7%를 넘어서서 본격적인 노령화 시대에 진입하게 되고 이와함께 의료복지등의 사회부담의 증가가 필요하게 되는 이때 기능성 식품의 개발로 그 비용을 경감하려는 노력을 선진국과 같이 시도되어야 함.

■ 곡류등 전분질 재료로 한 젓산발효식품에 관한 연구는 매우 제한적으로 수행되어왔음. 아프리카지역에서 Fufu및 Gari등에 대한 기술이 개발되어 있으나 그 이외 지역에서는 최근에 수행되기 시작했고 우리나라에도 장수, 신다리등 쌀을 젓산발효한 식품은 전통적으로 존재하여 왔음이 밝혀졌고 과학적인 재조명이 시도되고 있음.

■ BIFIDUS 및 유산균을 이용하는 현재의 발효유는 서양의 문화와 원료에 적합하게 발전된 것으로서 우리나라는 우리의 문화·풍토에 알맞게 발전시켜 나아가기 위한 연구 노력이 요망되는 시대임. 특히 BIFIDUS균은 인체건강에 큰 기여를 하여 면역능력증강, 항암, 변비방지등의 생리기능을 갖고 있으며 현재의 Lactobacilli 쌀요구르트 발효공정을 단순화시킬 수있는 특성을 가지고 있음.

■ WTO 체제하에서 부분적인 쌀시장 개방으로 농가의 심리적인 충격과 국내 쌀 시장에 미치는 영향을 최소화 할 수있는 수입쌀 가공에의 연구가 필요.

■ 향후 과잉생산이 예상되는 사과등에 대한 가공연구로 새로운 형태의 시장 형성이 시급하며 특히 사과박등의 폐기물에 대한 효율적인 이용방안 제시로 생산자단체

소득에 기여하고 환경오염문제를 해결해야 함.

■ 국내농업의 장기적인 발전을 위하여는 가격경쟁력과 함께 품질의 경쟁력을 향상시켜야 하나 농업자원의 부존여건이 불리한 우리의 입장에서는 특히 품질경쟁력을 제고하여 수입농산물에 대하여 국내 농산물의 차별화를 도모해야 하는 시대적인 요청이 있음.

■ 국내산 농산물을 고도의 기술과 자본집약적인 가공식품으로 전환함으로써 수입산 농산물 및 가공식품에 대한 제품차별화를 도모해야 함. 또한 우리나라의 농민과 생산자 단체에게 경제적 이윤이 환원될 수 있도록 가공산업에 적극 참여를 유도해야 함.

## 나. 연구의 필요성

### ○ 기술적 측면

■ 세계적으로 BIFIDUS균의 이용이 현재까지는 유가공품 중에 치우쳐 있다. 이는 서양식 식문화의 영향력에 기인하는 것으로서 BIFIDUS균을 우리의 쌀 및 과채류 발효에 적합하도록 선발 및 배양기술을 개선 확립할 필요성이 있음.

■ 현재 *Lactobacillus*를 이용한 쌀요쿠르트 개발이 시도되었으나 곰팡이 amylase를 따로 첨가하는 공정에서 곰팡이 유래의 향미가 혼입되어 관능적으로 열악함. *Lactobacillus* 형에 비하여 생체기능이 더욱 우수하고 강력한 amylase를 보유하는 BIFIDUS균을 사용하면 당화와 동시에 쌀 및 과채류 발효를 수행할 수 있으며 따라서 관능개선 및 공정단순화가 가능하여 품질개선과 원가절감을 수행할 수 있음.

■ 전분 위주의 쌀에 면역기능 강화능을 갖는 amylolytic *Bifidobacterium*를 배양하고 BIFIDUS Growth Factor인 과채류, 특히 사과주스 가공부산물인 사과박을 이

용할 경우 기능성 고부가가치화 및 영양적 향상기술을 개발할 수 있음.

▣ 소비자의 다양하고 건강 지향적인 요구에 부응하여 쌀의 기능성과 기호도 및 부가가치의 향상을 위한 기술로서 쌀을 이용한 비피더스 발효제품 개발과 주요 과채류의 이용증진 개발을 도모할 것임.

▣ 우리나라에서도 쌀및 과채류를 이용한 자체적인 유산균 종균개발이 절실히 필요했음에도 불구하고 그동안 개발이 지연된데는 다음과 같은 기술적인 난제가 있었기 때문이며 이를 위해 본 과제를 통하여 이러한 문제를 해결하는 연구가 필요함.

문 제 점	해결 방안
쌀전분 당화를 위한 amylase효소의 별도 처리	강력한 amylase 생산 BIFIDUS균주의 확보로 당화 발효공정의 일원화
사과박의 처리문제. '93년도 2만 2천M/T의 효율적인 처리방안 미비(환경오염)	사과박을 BIFIDUS의 Growth Factor로 이용함으로써 폐기물의 식량자원화및 생산자 이익증대화
과채류 발효에 적합한 균주의 미비	과채류발효에 적합한 균주를 한국인 장내에서 분리
생리 활성 및 기능성의 검증 미비	생리 활성 보유 균주의 선발을 통한 차별화 및 건강 지향적 전략 추진, 장내 균총 중 핵심 유용균주인 비피더스 이용 In Vivo, In Vitro 평가 방법 개발
종균의 고농도 배양에 대한 기술적인 취약성	생육 촉진 인자, 산화환원 전위 혐기배양 기술 개발
종균의 동결건조 기술과 분말 제조 시설의 미비	생존성(Viability) 제고 및 안정화 기술 개발
제품의 다양화, 질적·영양적 향상	사과박등 주요 과채류를 이용한 관능적·질적·영양적 향상
개발기술의 실용화	대량 생산 시스템 검증을 위한 pilot system 검정 및 scale up 기술 개발

## ○ 경제·사회적인 측면

■ 경제 발달 및 소득 수준의 향상에 따라서 국민들은 건강 지향적인 상품에 많은 관심을 갖게 되고 기능성 식품에 대한 요구성이 증가됨. 유산균 관련 제품은 계속적으로 수요가 늘어갈 것이나 김치 및 장류의 경우에는 전체 소비량은 감소할 것으로 예측됨. 앞으로의 전망은 자연발효식품보다는 우량종균을 이용한 조절발효식품으로 건강에 대한 위험 인자를 함유하는 제품보다는 생리기능이 우수하고 건강 지향적 발효식품으로 소비자의 선택이 두드러지게 될 것으로 예측됨.

■ 쌀은 우리나라를 비롯하여 전세계 인구의 반 이상이 주식으로하고 있음. 우리의 쌀 생산은 품종개량과 영농기술의 발전에 힘입어 급격히 늘어 났으나 일인당 연간 소비량은 1979년에도 135kg에서 1994년도에는 110.5kg으로 감소하였음. 이러한 쌀소비의 감소는 식품 소비패턴의 다양화에 기인하지만 아직 쌀을 이용한 다양한 제품개발의 미진함에도 큰 원인이 있음. WTO에 대응에는 쌀의 고부가가치화는 우리의 농업에 있어서 절대적인 과제연구분야라고 할 수있음.

■ 농산물 수입개방에 대응하는 전략적 대체작목으로 대두된 사과와 경우 1988년 생산비가 320 원/kg에 불과하였으나 1993년에는 675원에 이르고 있어 물가상승률을 감안하면 사과 농가의 수취가격은 오히려 감소해 가고 있고 일정량의 수입이 불가피해 질 것임으로 포화상태에 다다른 생식용 이외에 가공용 수요의 증진책이 시급히 요청되고 있음. (조웅제 박사. UR이후 과실및 채소의 적정가공품목 선정에 관한 연구, 1993)

■ 특히 사과주스를 가공한 후 발생하는 사과박이 2만 2천 M/T(1993년도)에 이르고 있어 이 부산폐기물의 효율적인 처리방안의 모색이 요망됨. 이 사과박을 BIFIDUS균의 Growth Factor로 이용함으로써 폐기물의 식량자원화 및 생산자이익 극대화를 도모하려함.

■ 밤, 유자, 당근, 양파등의 과채류들은 현재 생과수요는 포화에 이르러

있고 생산량의 기복이 심하여 이를 위한 가공제품으로의 육성이 시급히 요청되는 작물들임. 또한 이들은 지금까지 비교적 농촌의 주요 수입원으로 인지되어 있어 앞으로의 홍수출하로 사회적인 문제의 소지를 앓고 있는 작물들이기도 함.

■ 덴마크에서는 콜레스테롤 저하능력이 있는 *Enterococcus faecium* 균주를 이용한 Gaio라는 상품을 개발한 결과 주문량을 제대로 공급하지 못하게 되어 새로운 생산공장을 건설하게 되었음. 그러나 *Enterococcus faecium*보다 안전성에 대한 문제의 소지가 없는 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*로부터 면역능력 증강등의 생리기능이 우수한 균주를 선발할 필요가 있고 본 연구팀에 의하여 일부 연구가 진행된 바 있음.

### ○ 사회적 측면

■ 각 나라와 민족은 고유한 식문화, 체질, 생활 환경이 조성되어 있고 그에 따라 각 민족에 적합한 장내균총이 형성된다. 특히, 우리나라 사람들은 각종 유산균 발효 식품을 섭취하여 왔기 때문에 현재 국내 업체에서는 외국에서 수입한 유산균 중에서 우리나라 사람의 기호에 어느 정도나마 근접하는 균주를 다시 선발하는 이중적인 과정을 거침. 따라서 차제에 선발단계에서부터 한국적 원료에 적합하고 한국인으로부터 분리되고 한국인의 기호성에 맞는 특성을 가지는 생리활성이 큰 종균을 선발하는 것이 당면 과제임.

■ 소비자의 건강 지향적 구입 패턴에 비추어 볼 때 생리활성 유산균을 상품화하는것은 우리나라의 제품 판매전략에 있어서 매우 중요하다고 할 수있음. BIFIDUS균을 비롯한 유산균 이용식품에 대한 수요가 계속 증가할 것으로 예견하는 것은 다음과 같은 사항에 근거를 두고 있음.

1) 한국인의 식생활 양식이 점차 서구화되면서 부위별 암발생률중 대장암이 1995년 현재 4위로 부상하였고(비교 : 1975년, 10위) 향후 급속히 증가가

예상되며 또한, 과민성 대장 증세(설사와 변비의 교대증 수반)를 호소하는 사람이 약 300만명임.

2) 점차 노령화 사회에 접어들면서 변비등의 기능적 장애, 장내 부패의 심화등이 노인의 증대한 위험 인자가 되고 있음.

3) 한국 사람들의 90% 이상이 유당불내증 증상을 겪고 있는 점을 고려할 때 쌀과 과채류등을 발효시킨 식품의 섭취를 통한 생리 활성 유산균 투여가 바람직한 형태로 볼 수 있음.

4) 식품의 안전성 문제가 국내외적인 관심으로 부각되는 시점에서 식품 보존료의 대체, 축산 농가의 항생제 남용을 막기 위한 사료 첨가제용 생균제로서의 유산균의 필요성이 증가되고 있음.

5) 최근에 세계적으로 콜레스테롤 감소 능력을 보유한 균주를 이용한 발효유가 개발되어 시장이 급속히 확대되고 있음.

■ 발효식품은 한국의 식품 중에서 중요한 비중을 차지하고 있으며 발효기술이 일찍 한국에서 발달되었지만 선진화하는 데에는 일본보다 늦었기 때문에 세계 시장에서는 그 지위가 약하고 오히려 일본의 발효식품이 한국을 점점 잠식하여 가고 있는 실정임. 유산균에 대한 수요는 유아와 중장년층에 이르기까지 매우 높아지고 있기 때문에 BIFIDUS균등의 유산균 종균 및 발효 기술에 있어서 하루 빨리 경쟁력 및 우수성을 확보하지 못하면 식문화의 예속이 우려되는 상황될 수 있음.

■ 발효유는 원래 지중해 지방에서 기원된 것으로 알려져 있지만 현실적으로 우리나라에도 거대한 시장이 형성되어 있으며 국민의 건강과 체력 증진에 관련된 영양학적 근거도 우수하기 때문에 원료자원의 다양화 및 고기능성 균주를 개발하여 기술우위성을 확보하여 역수출 할 수 있도록 노력하여야 할 시점임.

## 다. 연구개발의 목표 및 내용

### 1) 연구개발 최종목표

쌀/과채류 발효에 적합한 균주로서 amylase 활성과 면역증강능력이 강력한 BIFIDUS균을 한국인 장내에서 계속 탐색, 최종균주를 선발하고 쌀과 과채류 (사과, 당근, 양파등)를 대상으로 발효하여 기능성 건강 발효제품을 개발하여 상품화 함.



2) 연구개발 목표 및 연구내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (1995)	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ BIFIDUS균주의 배양학적 특성 연구</li> <li>■ 곡과류 발효용 BIFIDUS균주의 선발</li> <li>■ Amylase 생산 BIFIDUS균을 이용한 쌀 당화/발효 시스템 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 쌀/과채류 발효 적합성 검증</li> <li>- 균의 성장을, 발효폐턴등 배양학적 연구</li> <li>- Growth Factor 검증</li> <li>- 한국인유래의 amylolytic BIFIDUS를 분리하고 제품발효 우수균주 선발</li> <li>- 면역능력검정 system 개발 (Michigan대학, Dr. Pestka와 공동연구)</li> <li>- 쌀 당화 시스템개발</li> <li>- 쌀/사과박 발효특성구명</li> </ul>
2차 년도 (1996)	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 종균생산및 제품생산을 위한 발효공학적 기초기술개발</li> <li>■ 선발균주의 동정, 생리활성 특성 연구</li> <li>■ 사과박 전처리 시스템 개발및 발효제품 생산 시스템 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 종균 생산기술 개발</li> <li>- 제품발효기술개발</li> <li>- 쌀/과채류 발효특성구명</li> <li>- F-6-PPK, DNA분석 등을 통한 배양, 생리, 유전학적인 동정</li> <li>- Amylase 특성 연구</li> <li>- 면역능력증강 균주의 선발(Michigan대학 Dr. Pestka와 국제공동연구)</li> <li>- 사과박 건조기술 개발</li> <li>- 쌀/건조사과박/과채류 발효시스템 개발</li> </ul>
3차 년도 (1997)	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 품질개선및 저장성 향상기술개발</li> <li>■ 발효균주및 발효제품의 기능성제고</li> <li>■ 제품생산공정개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pilot Plant규모 발효실증연구</li> <li>- 종균의 혼합기술및 안정화 기술개발</li> <li>- 저장성향상기술 개발</li> <li>- Amylase활성, 쌀, 과채류 발효특성, 면역증강능력, 생리활성 종합적 고찰.</li> <li>- 면역기능인자의 분리 및 발현을 통한 제품종의 면역기능증진인자 강화</li> <li>- 부산물 이용 제품개발</li> <li>- 제품생산설비 선택</li> <li>- 생산공정 lay-out 완성</li> </ul>

## 제 2 장 재료 및 방법

### 1. 한국인 유래의 amylolytic bifidobacteria의 분리 및 선발

한국인의 분변에서 직접 분리하였는데 변시료를 제공한 지원자는 성인 및 유아들로 구성되었으며 38명 지원자로부터 얻은 변시료는 받는 즉시 혐기적 상태에서 1% 가용성전분이 첨가된 BHI 고체배지에 도말되었고, 자란 균집락중 요오드용액에 의해 투명환을 형성하는 집락으로부터 균을 순수분리하였다. 분리된 균주중 Y, V자형의 무정형의 그람양성 혐기성균이며 fructose-6-phosphate phosphoketolase (F-6-PPK) 양성, 젖산과 초산을 주요 발효산물로 갖는 균주를 *Bifidobacterium*으로 동정하였다. Amylase 역가를 측정하기 위하여 MRS액체배지에 1% 가용성 전분과 1.5% sodium propionate를 첨가하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 균체를 원심분리하여 회수하고 균체를 파괴하여 intracellular enzyme과 extracellular amylase의 역가를 DNS법과 iodine value로 측정비교하였다. 활성 1단위는 50°C에서 1분당 1  $\mu$ mole의 maltose를 생성시키는 효소량으로 정하였다.

### 2. 면역능력 비피더스균주 선발

1) Macrophage cell line : Mouse macrophage cell line RAW2647을 10% FBS, 1mM sodium pyruvate, 1% NCTC-135, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 unit/ml penicillin이 첨가된 DMEM에 배양하였다. 배양은 습도 조절된 5% CO<sub>2</sub> incubator내에서 37°C로 유지하며 수행하고 세포의 생존률은 trypan blue로 염색하여 관찰하였다. 세포는 15cm tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA)에서 활성화시키고 실험을 위해서는 5x10<sup>5</sup> macrophage cells/ml이 포함된 96-well culture plates (Costar, Cambridge MA)에서 3반복처리 배양하였다.

2) Nitric oxide (NO) : L-arginine이 함유되어 있지 않은 special DMEM에 arginine이 2mM농도가 되도록 조절한 뒤 면역세포를 배양하며 시간별로 시료를 처리하였다. NO정량을 위하여는 N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride와 sulfanilamide가 함유된 Griess발색시약을 사용하였다.

3) Cytokine : 조사되는 cytokine의 종류로서는 Tumor Necrosis Factor(TNF- $\alpha$ )와 Interlukin(IL)-6 및 Interferon (IFN)을 포함하였다. 각각의 cytokine에 대한 anti-mouse monoclonal antibody(MAB)을 ELISA plate에 coating 한 뒤 배양된 세포의 상등액을 취하여 sandwich ELISA법에 의하여 각 cytokine에 대하여 정량적인 cytokine농도를 결정하였다. 정량적인 발색은 biotin-streptavidin-HRC (horse radish peroxide)을 이용하였다.

4) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>생성 : Macrophage에 의하여 생산되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 정량은 Tiku(1990)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 *Bifidobacterium* 다당류와 함께 배양된 macrophage를 3회 PBS로 세척하고 5  $\mu$ M-dichlorofluorescein diacetate함유 PBS를 각 well에 첨가하였다. 1시간 반응한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 산화된 dichlorofluorescein을 485 nm excitation/530nm emission fluorometry (Model Cytofluor II, Bioresearch Inc., Bedford, MA)로 정량하였다.

### 3. 선발균주의 동정, 효소활성 및 배양학적 생리특성연구

균주의 동정은 API 50 CHL 균동정 kit를 이용한 탄수화물자화성에 의한 동정과 아울러 세포막의 지방산 조성에 의한 data base를 이용하는 system (MIDI system)을 최적화하여 동정하였다. 동정결과 일차선발된 균주들이 상용으로 사용되지

않고 있는 종의 균주로 동정되었기 때문에 이들 균주의 효소관련 특성을 조사하였는데, API-ZYM system을 이용하여 탄수화물관련 및 유해효소의 특성에 대하여 그들 효소의 유무를 조사하였다. 내산성에 대한 선발균주의 특성을 연구하기 위하여 산소의 영향을 최대한 배제하였는데, 실험 배지를 anaerobic glove box 내에서 pouring 한후 37°C anaerobic incubator 내에서 12시간 방치하여 산소를 완전히 제거하였다. 실험 균주를 희석하여 aerobic clean bench 내에서 신속히 도말하고, anaerobic jar를 이용하여 96시간(4 days) 배양하였다. HCl 배지는 5N HCl로 pH 4.8, Acetic acid 배지는 2N acetic acid로 pH 5.0 으로 맞추어 주었다. 산소에 대한 특성연구를 위하여 산소노출시간 1시간 이내의 실험구를 대조구로 사용하였고 희석된 균주를 agar plate에 도말한 후 aerobic incubator (37°C) 내에서 20시간 전배양하여 산소에 노출시킨 후 anaerobic jar에 옮겨 96 시간 배양하였다.

#### 4. 고농도 균체배양 연구

산화환원전위 및 용존산소에 의한 선발균주의 특성을 연구하고자 발효조 (B. Braun BIostat<sup>®</sup> M, 1.5 L)와 ORP meter (NOVA)을 사용하여 산화환원전위와 용존산소를 monitor하였다. 일차 선발균주인 *Bifidobacterium* Int-57, JS9, HJ30, SJ32에 대하여 고농도 배양균주의 산화환원전위 및 용존산소변화에 대한 균의 생육특성을 알아보려고 실험하였다. 배지로는 SMRS, 즉 MRS 5.2%와 CaCl<sub>2</sub> 0.02 %, cysteine 0.05%로 구성되어 있으며 1.3L를 제조하여 배양하였다. Inoculum은 2%이었고 37°C에서 배양하였고 pH는 6.0에서 조절되었다. 이때 pH 조절을 위하여 NH<sub>4</sub>OH (10 N)를 사용하였고 150 rpm으로 agitation시켰다. 종균을 접종하기 전에 N<sub>2</sub>와 CO<sub>2</sub>를 사용하여 purging시켜 산소를 제거하였다.

#### 5. 쌀 및 과제류에 대한 발효적합성 연구

Amylolytic, non-amylolytic bifidobacteria의 생육정도를 0.05% cysteine과 0.2% yeast extract가 첨가되고 호화된 쌀배지에서 비교하였다. 과채류에 대하여는 일차적으로 amylase역가를 갖고 있는 것으로 선발된 균주의 하나인 *Bif. adolescentis* Int-57과 non-amylolytic *B. longum* ATCC15707을 사용하여 복숭아, 사과, 포도, 오렌지, 오이, 당근, 배추 등에 배양하여 균생육여부와 그 발효물의 기호성에 대한 예비적인 실험을 수행하였다. Bifidobacteria의 생균수는 액체 배양액을 혐기적으로 희석한 후 BL 등의 고체배지에 Benno 등의 방법에 의하여 도말 배양하여 colony forming unit로 측정되었다. 배지의 환원성을 높이기 위하여 증자 열처리와 ascorbic acid를 0.1% 첨가 하였다. 산도는 적정산도(titratable acidity)를 측정하였고, 환원당은 DNS 방법으로 그리고 총당은 phenolic-sulfuric method로 측정하였다. Skim milk를 Alcalase, Protamax, Neutralse로 각각 첨가량을 달리하여 분해하여 최적분해조건을 산출했다. 최적 분해조건은 formol titration변법으로 분해된 아미노산을 적정하였다. 쌀 1% 당화액, 쌀1% 당화액에 Skim milk 5% 첨가한 것, 쌀 1% 당화액에 Skim milk digest를 Protamax 로 분해한 후 첨가하여 배양하여 발효한 뒤 산물의 총균수, 산도, pH를 측정하였다.

## 6. 쌀기질의 전처리 조건 설정 및 쌀 액화, 당화의 최적화

쌀의 분쇄는 소형 충격식 분쇄기 (Hanil FM-600W)을 사용하여 200 g batch로 각각 30, 60, 90초 동안 분쇄하였고, 또 다른 방법으로 마찰식 분쇄기 (Cyclotec 1093, Tecator, Sweden)를 사용하여 분쇄하였다. 예비가온 및 호화는 분쇄한 쌀에 쌀 중량의 6.4배가 되도록 증류수를 가한 후 60℃에서 0 - 45분간 예비가온하고 100℃에서 10 - 40분간 호화하였다. 당화는 호화한 쌀가루에  $\alpha$ -amylase를 0.135 - 0.203 unit/g rice powder, glucoamylase 1.188 - 5.063 unit/g rice powder가 되도록 0.1% (w/v) 효소용액을 첨가한 후 60℃에서 0 - 3시간동안 당화하

였다. 당화 후 나일론 백을 사용하여 여과한 후 당화액을 회수하였다. 환원제의 선발을 위하여 쌀당화액 10 ml에 0.02% (w/v) resazulin 용액을 10  $\mu$ l를 가한 후에 1% (w/v) cysteine과 1% (w/v) ascorbic acid 용액의 첨가량을 달리하여 100°C에서 5분간 가열 후 색택의 변화를 색차계 (Minolta CR-200, Japan)를 사용하여 측정 후 산소제거능을 비교하였다. 쌀당화액을 media bottle에 넣고 환원제를 0 - 0.1% 수준으로 첨가한 후 마개를 막아 100°C에서 10분간 가열하고 냉각 후 종배양한 *Bifidobacterium*을 2% 접종하여 37°C에서 발효하였다. 쌀분발과 물의 비율을 1:7로 하여 60°C로 40분간 preheating 한후 100°C에서 40분간 호화한 호화액에  $\alpha$ -amylase (Termamyl, BAN, NOVO사)을 이용하여 액화시킨 후 그액을 PYF배지에 처리쌀의 농도가 1%되도록 첨가하여 발효하였다. 액화조건은 Termamyl의 경우 첨가량과 반응 시간을 달리하여 분해하여 첨가량 6KNU, 반응시간 40분을 최적조건으로 하였다. BAN의 최적조건은 첨가량 24KNU, 반응시간 60분이었다. PYF배지에 액화액을 첨가하여 공시균주와 선발균주를 접종하여 발효한 후 총균수, 산도, pH를 측정하였다. 액화액을 glucoamylase (AMG, NOVO사)를 이용하여 당화시킨후 배지에 첨가하였다. 분해 최적 조건은 10KNU, 45분이었다. 이때 pH는 4.5로 조정하였다. AMG의 분해정도는 glucose의 생성량으로 표시하였다. 발효후 산물의 총균수, 산도, pH를 측정하였다.  $\alpha$ -Amylase의 역가는 발효산물이 전분을 분해한 후의 maltose 생성량을 표시하였고, 총당은 Phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법으로 측정하였고 환원당은 DNS법으로 측정하였다. 산도는 0.1N NaOH 를 적정량을 이용하여 계산하였다.

$$\text{산도}(\%) = \frac{0.1N - \text{NaOH 소비량}(ml) \times F \times 0.009}{\text{시료량}(ml)} \times 100$$

## 7. 사과박 건조 공정 및 건조사과박/쌀당화액 발효 시스템 개발

사과박의 제조는 사과 (품종: 부사)를 구입하여 박피한 후 절단하여 1% ascorbic acid에 15분간 침지한 후 쥬서기 (KMJ-703, DAEWOO, Korea)를 이용하여

착즙시 회수된 사과박을 사용하였고, 사과박 건조를 위한 건조 용기는 두께 0.8 mm의 철판을 이용하여 양쪽 면에서 건조가 가능하도록 제작하였고, 사과박은 크기 10 cm × 10 cm, 두께 4 mm가 되도록 철판 위에 장치하고 열풍건조기 (Thermolyne 9000, Barnstead, U.S.A.)에서 풍속 (0.3 - 0.7 m/s)과 온도 (40 - 90℃)를 달리하여 평형수분함량에 도달할 때까지 건조한 것을 분쇄하여 사용하였다. 사과박 건조 중 시료의 무게변화는 digital balance (BP210D, Sartorius Ltd., U.S.A.)를 사용하여 15분 간격으로 측정 기록하였다. 건조온도와 풍속별로 건조시간에 따른 시료의 건량기준 수분함량으로부터 수분 비율(MR, moisture ratio)을 식 (1)과 같이 계산하고, 식 (2)의 모델에 의거하여 건조속도 상수(k)를 구하였다. 건조속도 상수에 따라 건조구간을 3단계로 나누어 구한 활성화 에너지(Ea)를 식 (3)과 같이 Arrhenius식을 이용하여 구하였다.

$$MR = \frac{(M_t - M_e)}{(M_o - M_e)} \text{----- (1)}$$

$$MR = a e^{-kt} \text{----- (2)}$$

$$k = A \exp(-E_a/RT) \text{----- (3)}$$

여기서  $M_t$  = 건조시간  $t$ 에서의 수분함량 (g water/g solid)

$M_e$  = 평형수분함량 (g water/g solid)

$M_o$  = 초기 수분함량 (g water/g solid)

$a$  = 상수

$k$  = 건조속도상수 ( $\text{min}^{-1}$ )

$t$  = 건조시간 (min)

$A$  = 빈도인자 ( $\text{min}^{-1}$ )

$E_a$  = 활성화에너지 (kJ/mol)

$R = \text{기체상수 (8.314 kJ/mol} \cdot \text{K)}$

$T = \text{절대온도 (K)}$

사과박/쌀당화액 발효를 위하여 생사과박 또는 건조사과박을 쌀당화액에 첨가하여 발효하였다. 사과박을 첨가하기 위한 쌀당화액은 당도를 증가시키기 위하여 효소첨가량을 증가시켜 제조하였다. 즉 분쇄한 쌀 100 g을 기준으로 1%의  $\alpha$ -amylase 용액과 glucoamylase 용액을 각각 8.5 - 25.5% 수준으로 가하여 60°C에서 1시간 당화하여 여과하였다. 여과한 쌀당화액에 사과박을 가하여 *Bifidobacterium* spp. FBD-22, 27를 2%씩 접종하여 37°C에서 42시간 발효하였다.

#### 8. 사과박/쌀가루 혼합건조 및 발효

사과박/쌀가루 건조물 (dried apple-pomace/rice-flour mixture: DARM)의 건조실험은 분쇄한 쌀가루와 사과박을 중량비 70:30, 64:36, 58:42, 52:48로 가한 후 식품가공기 (Food Prossesor, model HR 2871, Phillips, Holland)를 사용하여 혼합하고 혼합물을 sheeter (SE150, Korea)에 통과시켜 두께 1 - 3 mm의 sheet로 만들어 10 cm×10 cm 크기로 절단하여 두께 0.8 mm의 철망 위에서 건조하였다. 건조는 풍속 (0.3 - 0.7 m/s), 온도 (40 - 90°C)를 달리하여 평형수분함량에 도달할 때까지 건조하였다. 사과박/쌀가루 건조물 (dried apple-pomace/rice-flour mixture: DARM)의 발효 특성 조사실험은 건조한 ARM을 분쇄한 후 물을 첨가하여 (dried ARM 111 g: D.W. 640 g) 호화(100°C, 40분)하고 냉각 후에 0.1%  $\alpha$ -amylase와 0.1% glucoamylase 용액을 17% 수준으로 첨가하여 1시간 동안 당화/액화하고 1% ascorbic acid를 0.04% 첨가한 후 100°C에서 10분간 가열하여 산소를 제거하고 살균하여 발효를 위한 전처리를 행하였다. 여기에 *Bifidobacterium* spp. FBD-22와 27를 1%씩 접종하여 37°C에서 발효하였다.



## 9. *Bifidobacterium* 발효음료를 이용한 호상 쌀젖산발효물의 품질개선

쌀젖산발효물은 목 등<sup>5)</sup>의 방법을 토대로 하여 제조하였다. 즉 쌀에 물을 쌀:물=1:1.25 (w/v)의 비율로 첨가하여 전기 밥솥에서 15분간 침지하고 30분간 호화하여 밥을 제조하고 0.3% (w/v)  $\alpha$ -amylase와 glucoamylase 효소액을 밥 증량의 75% 수준으로 첨가하여 60°C에서 1시간동안 당화시킨 다음 단독으로 또는 사과박을 첨가하여 균질화하였다. 균질화한 당화물을 95°C에서 30분간 가열처리함으로써 효소를 불활성화시키고 동시에 살균한 다음 냉각 후 젖산균 스타터 (*Lactobacillus bulgaricus* (LB), *Streptococcus thermophilus* (TA))를 첨가하여 37°C에서 28시간동안 발효하였다. 쌀만을 발효한 제품을 LFR (lactic acid fermented rice, 쌀젖산발효물)이라 명명하였고, 사과박을 첨가하여 젖산발효한 제품은 LFW (lactic acid fermented WAP/SR, 사과박 첨가 쌀젖산발효물)이라 칭하였다. *Bifidobacterium* 발효한 WAP/SRS (BFW)와 SRS (BFS)의 제조는 BFW (*Bifidobacterium* fermented WAP/SRS, 비피더스 발효 사과박/쌀당화액)는 사과박(WAP)을 쌀당화액(SRS)에 WAP:SRS=1:2(w/w) 비율로 첨가하여 *Bifidobacterium* sp. FBD-35를 접종하여 48시간 발효하여 제조하였고, BFS (*Bifidobacterium* fermented SRS, 비피더스 발효 쌀당화액)는 사과박 첨가없이 쌀당화액만을 *Bifidobacterium* sp. FBD-35로 발효하여 제조하였다. LFW/BFS는 제조한 LFW와 BFS를 LFW:BFS=1:1 - 4:1로, LFR/BFW는 LFR과 BFW를 LFR:BFW=1:1 - 4:1의 비율로 혼합하여 제조하였다.

## 10. 이화학 성분분석 및 미생물 수의 측정

수분의 측정은 상압가열 건조법<sup>6)</sup>을 사용하여 정량하였고, 당도는 굴절 당도계 (N.O.W., 0-32%, Japan)를 사용하여 °Brix로 측정하였다. 분쇄한 쌀의 입도의 측정은 분쇄한 쌀을 표준체 세트를 사용하여 Ro-tap (RX-29 W.S. Tyler, U.S.A.)위에

서 2분간 sieving한 결과로부터 평균입도 (mean particle size, MPS)를 식 (4)과 같이 계산하였다.

$$MPS = \frac{w_1 \times d_1 + w_2 \times d_2 + \dots + w_n \times d_n}{w_1 + w_2 + \dots + w_n} \quad \text{--- (4)}$$

여기서,  $w_n$  = aperture별 회수시료의 무게 (g)

$d_n$  = aperture ( $\mu\text{m}$ )

색도는 색차계 (Minolta CR-200, Japan)를 이용하여 Hunter 값인 명도 (L), 적색도 (a), 황색도 (b)를 측정하였다. 발효물의 pH는 pH meter (model 520A, Orion, U.S.A.)를 사용하여 측정하였으며, 산도는 시료 10 mL를 취하여 0.1% 페놀프탈레인을 지시약으로 사용하여 0.1N NaOH으로 적정하고 소비된 NaOH양으로부터 식 (5)에 의하여 %젖산으로 산도를 계산하였다.

$$\text{산도 (\%젖산)} = \frac{\text{NaOH 소비량} \times \text{NaOH 역가}}{\text{시료부피}} \times 0.009 \quad \text{---- (5)}$$

환원당의 측정은 Somogyi-Nelson법을 사용하여 환원당을 측정하였다. 당과 구리시약의 반응으로 생성된 산화제일 구리 ( $\text{Cu}_2\text{O}$ )를 산성 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )하에서 인몰리브덴산 [ $\text{H}_3\text{CPO}_4(\text{Mo}_{12}\text{O}_{36})_n\text{H}_2\text{O}$ ]과 반응시켜 몰리브덴청(靑)으로 발색시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로는 glucose 용액을 사용하였으며 당량과 흡광도 사이의 검량선을 작성하여 시료중의 환원당량을 결정하였다. 유동특성을 조사하기 위한 점도는 점도계 (Cone and plate viscometer, RVDV-II, Brookfield, U.S.A.)를 이용하여 20°C에서의 전단속도별 전단응력을 측정하였다. 측정 결과를 식 (6)과 같이 Herschel-Bulkley model에 의거하여 해석하고, SAS<sup>7)</sup>를 이용하여 점조도지수(K) 및 유동거동지수(n)을 계산하였다.

$$\tau = K(D)^n + \tau_y \quad \text{----- (6)}$$

여기서  $\tau$  = 전단응력 (Pa)

$D$  = 전단속도 ( $s^{-1}$ )

$K$  = 점조도지수 ( $Pa \cdot s^n$ )

$n$  = 유동거동지수

$\tau_y$  = 항복응력 (Pa)

*Bifidobacterium* 균수의 측정은 Press tube에서 발효시킨 시료를 혐기성 용액에 십진적으로 희석한 후 MBS [modified *Bifidobacterium* selective medium: trypticase 10 g, protease 5 g,  $(NH_4)_2SO_4$  3 g,  $KH_2PO_4$  2 g,  $K_2HPO_4$  1 g, L-cysteine 0.5 g,  $C_3H_5O_2Na$  10 g,  $MgSO_4$  0.1 g, 올리고당 mixture (플락토올리고당, 갈락토올리고당, 이소말토올리고당) 25 ml, D.W. 1 l]에 도달하여 anaerobic jar (Difco Co.)에 질소충진하고 anaerobic catalyst와 gas generating systems을 넣고 37°C에서 3일간 혐기배양한 colony를 계수하였다. 젖산균수 측정은 시료를 멸균 증류수 희석액을 사용하여 10단계 희석법에 따라 희석액 1 ml를 멸균 페트리접시에 무균적으로 취하여 약 43 - 45°C로 유지한 Rogosa SL agar 약 15 ml를 무균적으로 분주하였다. 페트리접시 뚜껑을 덮고 agar가 부착하지 않도록 주의하며 조용히 회전하여 좌우로 기울이고 검체와 배지를 잘 섞어 냉각 응고시킨 후 페트리접시를 거꾸로 하여 37°C에서 3일간 배양하고 배양 후 평판당 30 - 300개 이상의 집락을 생성한 평판을 택하여 생성된 집락수를 계수하였다. 비피더스발효음료의 관능검사는 경원대학교 식품생물공학과 대학원생 및 학부생으로 구성된 10명의 패널을 대상으로 다섯가지 항목 (색, 향, 맛, 조직감, 종합적 기호도)에 대하여 9점 채점법으로 실시하였다. 이때 채점기준은 아주 좋다: 9점, 보통으로 좋다: 7점, 좋지도 나쁘지도 않다: 5점, 보통으로 나쁘다: 3점, 아주 나쁘다: 1점이었다. 실험결과의 통계분석은 SAS를 사용하여 Duncan의 중범위검정을 실시하여 유의차를 분석하였다.<sup>7)</sup>

## 제 3 장 실험결과 및 고찰

### 제 1 절 기능성 비피도박테리아의 분리 및 선발

#### 1. 한국인 유래의 amyolytic bifidobacteria의 분리

한국인 유래의 amyolytic bifidobacteria를 분리하기 위하여 성인 및 유아들로 구성된 지원자로부터 얻은 변시료를 받는 즉시 혐기적 상태에서 십진법에 의해 희석한 후 BHI + starch고체배지에 도말 하였다. 도말된 plate는 Gas-pak (BBL) 등의 혐기적 장치를 이용하여 이틀간 배양한 후, 요오드용액을 첨가해 투명환을 형성하는 균주를 순수분리 하였다. 순수분리된 균주중 Y, V자형의 무정형의 그람 양성 혐기성균이며 fructose-6-phosphate phosphoketolase (F-6-PPK) 양성, 젖산과 초산을 주요 발효산물로 갖는 균주를 *Bifidobacterium*으로 동정하였다. 이렇게하여 47개의 amyolytic *Bifidobacterium* 균주들을 순수분리 하였다. 순수분리된 amyolytic *Bifidobacterium* 균주의 amylase역가를 비교하기 위하여 47개의 균주들은 BHI-starch 액체배지에서 16시간 배양한 후 세포내외의 활성을 비교하였다. 고체배지에서 투명환의 크기는 비슷하였지만 액체배지에서 배양된 균주의 효소활성은 각기 다른 양상을 보여 주었다. 이들의 75% 정도가 상등액에서 0.3 unit/ml의 활성을 보였으며 예외로 2균주만이 0.9 units/ml정도의 활성을 나타내었다. 일반적으로 균체내에서 높은 활성을 나타내는 균주는 세포외 즉 상등액에서 또한 활성을 가지고 있었고, 대부분의 효소활성은 세포외의 bound형보다는 세포외에서 나타내고 있었다. 균주들 가운데 *B. adolescentis* Int-57과 *B. adolescentis* ZS8은 다른 균주들에 비해 높은 활성을 가지고 있었다 (Table 1).

Table 1. Amylase activity (U/ml · min) of the value *Bifidobacterium* strains isolated.

<i>Bifidobacterium</i> spp. *	Amylase activity (U/ml · min)	
	Supernatant	Pellet
HS3	0.35	0.14
SK12	0.20	0.12
GE26	0.13	0.07
J136	0.12	0.05
EH17	0.49	0.19
HE30	0.15	0.07
MS5	0.39	0.17
EH10	0.17	0.10
IH1	0.16	0.11
Int57 ( <i>B. adolescentis</i> )	0.96	0.27
IH6	0.18	0.14
GY3	0.12	0.10
MS1	0.18	0.09
EH1	0.14	0.08
ZS8 ( <i>B. adolescentis</i> )	0.98	0.24
E218	0.22	0.12
HS12	0.28	0.12
E17	0.16	0.10
E216	0.30	0.15
E15	0.43	0.18
JS9	0.23	0.16
H340	0.15	0.05

\* The amylolytic Bifidobacteria were grown in the BHI-starch liquid medium for 16-hours and assayed for the amylase activity of the intra(pellet) and extra(supernatant) cellular portion.

또한 이들의 선발균주를 액체배지에서 배양하여 amylase의 생산성을 비교하여 우수한 amylolytic *Bifidobacterium* spp.를 선발하고자 specific activity를 비교하였다. MRS액체배지에 1% 가용성 전분과 1.5% sodium propionate를 첨가하여 37℃에서

24시간배양 하였다. 균체를 원심분리하여 회수하고 균체를 파괴하여 intracellular enzyme과 extracellular amylase의 역가를 DNS법 (Table 2)과 iodine value로 측정 비교하였다. Iodine value에 의한 역가비교는 Int57, JS9, HJ7, SJ8등의 균주가 intracellular와 extracellular amylase가 다같이 높게 나왔다. 또한 DNS에 의한 분석결과를 보면 iodine value의 분석과 같이 상기의 균주가 그의 역가가 높았으며 비활성도(specific activity, U/mg)가 0.09-0.12 정도로 나타났다. 따라서 Int57, JS9, HJ7, SJ8, MS1, MS5, ZS8 등의 분리균주가 우수한 amylase 역가를 갖고 있는 것으로 나타났다.

Table 2. Amylase activities of selected *Bifidobacterium* spp. isolated from Korean

Strain	EH17	MS5	IH1	GY3	IH6	Int57	MS1	E218	E17	E15	JS9	HJ7	SJ8
Extra specific activity (U/mg)	34.1	79.4	9.5	72.0	25.5	66.6	46.5	6.8	21.2	4.8	100	90	58.1
Intra specific activity (U/mg)	100	378	733	0	520	966	600	0	122	43	600	441	500

☞ 1U : 10mg 의 starch를 분해하는 enzyme의 양

## 2. 면역능력 비피더스균주 선발실험을 위한 방법확립

본 과제에서는 면역기능이 우수한 *Bifidobacterium* spp.을 선발하기 위하여 연구원을 미국 미시간대학에 파견하여, 비피더스균의 면역반응 및 면역증강능 보유 비피더스 균주의 선발실험에 대한 가능성과 세부적인 방법론을 Dr. Pestka와 협의하였으며, 비피더스균의 생존성제고를 위한 방법 등에 대한 의견도 교환하였다.

Macrophage cell line (Raw2647)과 lamina propria, Peyer's patch 및 lymph node 의 장내면역세포들을 이용하여 한국인 유래의 bifidobacteria균주들이 이들 세포들의 활성에 어떻게 영향을 미치는지 조사하기 위하여 면역활성대상으로는 면역세포의 cytokine생산능과 세포의 증식능 및 면역세포 탐식능의 평가법을 이용 하였다. 또한 bifidobacteria와 *Salmonella* lipopolysaccharide 및 mouse- interferon r 등 이미 면역활성기전이 잘 알려진 물질들과 비교하여 bifidobacteria의 면역효과에 대한 기작을 조사 하였고, 실험용 쥐로는 장내면역활성실험에 일반적으로 이용되는 B6C3F1 쥐를 이용 하였다.

1) Macrophage 및 T helper cell line : Macrophage cell line은 Raw264.7을 사용하고 T helper cell line은 EL4 cell line을 사용하였다. 이들 세포들을 10% FBS (fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)에 계대하여 5% CO<sub>2</sub>, 95% air 조성으로 유지된 CO<sub>2</sub> incubator에 배양 하였다.

2) Lymphocyte preparation : 실험쥐를 에테르를 이용하여 마취시킨 후 장내의 복강을 개복하고 무균적으로 장내면역세포의 주된 기관인 Peyer's patch, intrapithelial lymphocytes, lamina propria 등을 만들었다. 이들을 미세하게 절단한 뒤 균질화시킨 후 ammonium chloride등장액을 사용하여 적혈구를 파괴시켰다. Lamina propria세포는 Lycke(1986)의 방법에 의하여 얻고, intraepithelial lymphocyte는 Mosley와 Klein (1992)의 방법에 의하여, 그리고 Peyer's patch세포를 얻기 위하여는 collagenase처리를 하고 De Simone (1986)의 방법을 사용하여 Peyer's patch세포를 얻었다.

3) Cytokine production : 조사되는 cytokine의 종류로는 Tumor Necrosis Factor (TNF)와 interleukin (IL) 및 interferon (IFN)을 포함 하는데, 각각의 cytokine에 대한 anti-mouse monoclonal antibody (MAB)을 Elisa plate에 coating시킨 뒤, 배양된 세포의 상등액을 취하여 각 cytokine에 대하여 정량적으로 cytokine농

도를 결정 하였다. 정량적인 발색은 biotin-streptavidin-HRPC (horse radish peroxide)을 이용 하였다.

4) Cytokine expression : IL, TNF, ILN 등의 mRNA수준을 검사 하였다. 민감도가 높은 방법으로 역전사 PCR법을 사용 하였는데, 각 cytokine에 대한 PCR증폭 probe를 사용하여 혼성화한 뒤 얻어진 autoradiograph를 video scanning하여 정량화 하였다.

5) Nitric oxide (NO) : L-argine이 없는 special DMEM에 argine이 2 mM 농도가 되도록 조절한 뒤 면역세포를 배양하여 시간별과 농도별로 실험물질을 처리 하였다. NO정량을 위하여는 N-(r-nophthyl)-ethlenediamine dihydrochloride와 sulfanilamide 가 함유된 Griess발색시약을 사용 하였다.

6) Hydrogen peroxide : Hydrogen peroxide의 정량적 검출은 2,7-dichlorofluoresein diacetate이 hydrogen peroxide와 반응하여 생성되는 fluometer (CytoFluor II, BIOSEARCH, USA)로 정량 하였다. 이때 형광의 여기상태 (excited state) 유도를 위하여는 485nm를 사용하고 emission형광은 530nm에서 측정 하였다.

7) Phagocytosis 및 cytolytic assay : Macrophage와 cytotoxic T 세포의 phagocytosis 및 세포독성능을 조사 하였다. 세포이 배양되거나 분리된 세포들을  $1.5 \times 10^3$  Cr<sup>51</sup>-p815 또는 Samonella 표적세포와 혼합하고 4시간 배양하고, p815세포는 anti CD3 monoclonal antibody가 부착된 형태를 이용 하였다.

### 3. 면역능력 비피더스균주 선발 (*in vitro* macrophage activity)

가. Macrophage의 TNF- $\alpha$  생산에 미치는 amyolytic *Bifidobacterium*의 영향

Macrophage의 TNF- $\alpha$  생산에 미치는 amyolytic *Bifidobacterium*의 영향을 조사하기 위하여 LPS 첨가와 비첨가시에 생산되는 TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA법으로 정



량하였다. 이때 사용된 *Bifidobacterium*은 95°C에서 30분 처리된 균주로서 0, 10, 50, 250 µg/ml의 농도에서 반응을 실시하였다. 대조군으로서는 amylase 생산을 하지 않은 NA1, NA2, NA3, NA4를 사용하였고 공시균주로서는 *B. longum* ATCC 15707, *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. infantis* ATCC 15697을 사용하였다. LPS를 첨가하지 않았을때는 균체량의 증가에 따라 TNF-α의 생산이 증가하였다. 균주에 따라 TNF-α의 생산정도가 매우 상이하였다. 한국인 유래 amylolytic *Bifidobacterium* 균주로서는 SJ32가 가장 높은 활성을 보였다. Non amylolytic(NA) 균주들도 TNF-α 생산을 높이는 정도가 상이하였고 SJ32에 비하여는 약하였다. LPS를 첨가하였을 때에는 오히려 TNF-α 생산의 감소가 관찰되었고 이러한 현상은 LPS 무 첨가시 TNF-α를 높은 수준으로 생산시켰던 균주에서 현저히 나타났다. 따라서 macrophage 배양 초기의 신속한 TNF-α 생산 유도는 배양 후기의 생산을 역으로감소시키는 효과가 있는 것으로 생각된다. 본 실험의 결과로 TNF-α의 생산에 미치는 균주별 차이가 인정되었고 amylolytic *Bifidobacterium*인 SJ32의 TNF-α의 생산 활성이 높은 것으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Effect of Amylolytic *Bifidobacterium* on TNF-α Production by LPS Non-Stimulated(LPS-) RAW 264.7 Macrophage Cell Line.

Cell conc(µg/ml)	TNF-α produced (ng/ml)			
	control	10	50	250
<i>Bifidobacterium</i>				
INT-57	0.45	0.54	31.14	75.19
JS8	0.45	0.78	1.89	92.89
JS9	0.45	4.02	74.24	110.5
SJ32	0.45	55.31	79.26	113.4
HJ30	0.45	2.41	31.21	70.38
NA1	0.45	0.61	0.77	27.95
NA2	0.45	0.60	1.63	25.24
NA3	0.45	0.67	4.65	16.97
NA4	0.45	17.52	51.08	96.44
<i>B. longum</i> ATCC 15707	0.45	45.60	49.61	71.75
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	0.45	34.54	67.83	87.15
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	0.45	6.45	42.74	31.26

나. IL-6의 생산에 미치는 *Bifidobacterium*의 영향

Macrophage의 IL-6 생산에 미치는 amyolytic *Bifidobacterium*의 영향을 조사하기 위하여 TNF- $\alpha$  생산조사시에 사용한 실험 디자인을 사용하였고 ELISA법에 의하여 IL-6의 생산을 조사하였다. IL-6의 생산에 미치는 *Bifidobacterium*의 영향은 TNF- $\alpha$ 의 경우와는 달리 LPS 무첨가균은 물론 LPS별첨가균에서도 균주의 양이 많아질수록 IL-6의 생산이 증가하였다. 균주에 따라 IL-6의 생산에 미치는 정도가 상이하였으며 TNF- $\alpha$ 를 높은 수준으로 생산시킨 균주들이 역시 IL-6도 높은 수준으로 생산시켰다. 따라서 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 등의 cytokine은 *Bifidobacterium* 균체의 특정 성분에 의하여 동시에 유도 생산되는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 macrophage 활성을 높이는 특정 균주의 선발을 보다 용이하게 할 수 있는 결과로서 amyolytic *Bifidobacterium*으로서 SJ32를 macrophage 활성 증진용 선발 균주로 정하였다(Table 4).

Table 11. Effect of Amyolytic *Bifidobacterium* on IL-6 Production by LPS Non-Stimulated (LPS-) RAW 264.7 Macrophage Cell Line.

<i>Bifidobacterium</i>	Cell conc( $\mu$ g/ml)	IL-6 produced (ng/ml)		
	control	10	50	250
INT-57	0.14	0.15	0.90	6.91
JS8	0.14	0.13	0.19	3.23
JS9	0.14	0.71	4.19	14.93
SJ32	0.14	8.63	10.06	19.43
HJ30	0.14	0.22	1.97	7.62
NA1	0.14	0.19	0.18	1.34
NA2	0.14	0.16	0.30	3.20
NA3	0.14	0.15	0.61	6.84
NA4	0.14	0.21	0.89	11.79
<i>B. longum</i> ATCC 15707	0.14	3.83	6.73	9.83
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	0.14	4.89	6.72	15.39
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	0.14	1.02	6.87	11.17

다. Hydrogen peroxide 생산에 미치는 amyolytic *Bifidobacterium*의 영향

Hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )는 macrophage의 식균작용에서 중요한 역할을 한다.  $H_2O_2$ 의 생산을 정량적으로 조사하기 위하여는 형광 분석법을 사용하였다.  $H_2O_2$ 의 생산에 미치는 *Bifidobacterium*의 농도는 다음의 nitrogen oxide 생산 실험과 마찬가지로 0, 11, 33, 100, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 균체 농도를 사용하였다. 사용된 균체의 농도에서 *Bifidobacterium*의 농도가 증가 할수록  $H_2O_2$ 의 생산이 증가하였으나 LPS 존재하에서는 대체적으로 100  $\mu\text{g/ml}$  이상에서는 약간 감소하였다. Cytokine 생산 조사시에 나타난 것처럼 균주별 차이가 인정되었고 대체적으로 cytokine의 생산을 높게 유도시킨 균주는 역시  $H_2O_2$ 의 생산도 높은 수준으로 생산시키는 것으로 나타났다(Table 5).

Table 5. Effect of Amylolytic *Bifidobacterium* on Hydrogen Peroxide Production by LPS Non-Stimulated (LPS-) RAW 264.7 Macrophage Cell Line.

Cell Conc( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ production(nM)				
	control	11	33	100	300
<i>Bifidobacterium</i>					
INT-57	22.6	30.0	28.8	27.6	29.2
JS8	22.6	22.3	21.4	25.3	28.1
JS9	22.6	35.2	39.6	36.8	24.8
SJ32	22.6	33.9	38.4	49.8	45.2
HJ30	22.6	26.7	34.7	30.0	24.8
NA1	22.6	23.4	27.9	24.5	28.2
NA2	22.6	24.1	26.8	27.5	27.1
NA3	22.6	30.6	38.6	40.5	36.3
NA4	22.6	27.1	32.9	26.2	22.5
<i>B. adolsecentis</i> ATCC 15703	22.6	28.5	28.7	33.1	36.3
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	22.6	30.8	37.8	34.7	31.3

라. Nitrogen oxide(NO)의 생산에 미치는 *Bifidobacterium*의 영향

NO는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 함께 macrophage의 식균작용과 종양세포의 사멸에 중요한 역할을 한다. Macrophge의 NO 생산에 미치는 amylolytic *Bifidobacterium*의 영향을 조사하기 위하여  $\text{H}_2\text{O}_2$  생산 조사시에 사용한 실험 디자인을 사용하였고 Griess 법에 의하여 NO를 정량하였다. NO의 생산에 미치는 *Bifidobacterium*의 영향은 균주의 양이 많아 질수록 NO의 생산이 증가되었고 이러한 현상은 LPS 무첨가군에서 보다 현저하였다. 균주에 따라 NO의 생산에 미치는 정도가 상이하였으며 대체적으로 cytokine과  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 높은 수준으로 생산시킨 균주들이 역시 NO도 높은 수준으로 유도하는 것으로 나타났다. 이상의 TNF- $\alpha$ , IL-6,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NO 생산 실험에서 amylolytic *Bifidobacterium* 균주인 SJ32는 모든면에서 macrophage에 대한 활성정도가 amylolytic *Bifidobacterium* 중에서는 물론이거니와 non-amylolytic *Bifidobacterium* 및 공시균주와 비교하여도 가장 강한 것으로 나타나 앞으로 SJ32의

어떤 세포 분획 성분이 macrophage 활성 증가에 기여하는지 조사되고, *Bifidobacterium*이 macrophage에 미치는 영향과 함께 T세포와 B세포 면역체계에 미치는 종합적 검토가 이루어 질 것이다(Table 6).

Table 6. Effect of Amyolytic *Bifidobacterium* on Nitric Oxide Production by LPS Non-Stimulated (LPS-) RAW 264.7 Macrophage Cell Line.

Cell Conc(μg/ml)	NO production(μM)				
	control	11	33	100	300
<i>Bifidobacterium</i>					
INT-57	3.6	9.4	8.6	12.3	15.4
JS8	3.6	9.3	6.4	6.7	8.2
JS9	3.6	11.2	11.3	12.3	11.4
SJ32	3.6	9.0	11.5	13.7	15.1
HJ30	3.6	5.8	7.4	8.8	10.8
NA1	3.6	4.3	5.1	5.9	7.0
NA2	3.6	4.5	3.9	4.2	10.5
NA3	3.6	5.0	7.8	11.5	12.4
NA4	3.6	8.3	10.3	11.2	10.7
<i>B. adolsecentis</i> ATCC 15703	3.6	10.3	8.8	9.2	13.8
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	3.6	6.7	10.3	10.2	10.1

#### 4. 선발균주의 동정

균주의 동정은 API 50CHL 동정 kit를 사용하여 선발균주의 탄수화물 자화성을 조사하였고, 이러한 탄수화물 자화성 pattern을 기초로하여 Bergey's manual of systemmatic bacteriology 등의 방법에 준하여 각각의 균주를 동정하였다. 이들 선발균주의 당자화성은 각각의 균주에 따라 다른 발효 pattern을 보여주었다. 현재까지의 선발과정에서 우수한 균주로 판명된 Int 57은 *B. adolescentis* group으로, JS9, HJ30과 SJ32는 다같이 *B. pseudocatanulactum* group으로 일차동정되었다. 그러나 이러한 당동정의 결과로는 정확한 동정이 될 수가 없어서 세포막의 지방산 조

성에 의하여 분석하는 MIDI (Microbial Identification System, HP GC)를 사용하여 상기의 균주를 동정하였다. 탄수화물자화성의 결과와 MIDI에 의한 결과를 종합하면 Int-57은 *B. adolescentis*으로, JS9, HJ30, SJ32는 *B. pseudocatenulactum*으로 동정할 수가 있었다(Table 7).

Table 7. Characteristic of carbohydrate fermentation of *Bifidobacterium* spp. isolated from Korean intestine.

	<i>Bif.</i> Int57	<i>Bif.</i> JS9	<i>Bif.</i> HJ7	<i>Bif.</i> SJ8
L-Arabinose	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+
Mannose	-	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+
Inulin	+	-	-	-
D-Xylose	+	+	+	+
Gluconate	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Identified	<i>Bif. adolescentis</i>	<i>Bif. pseudo-catenulatum</i>	<i>Bif. pseudo-catenulatum</i>	<i>Bif. pseudo-catenulatum</i>

이와같이 1차적으로 선발된 4종의 *Bifidobacterium*은 *B. adolescentis* 1종과 *B. pseudocatenulatum* 3종인 것으로 균 동정결과 밝혀져, 종균으로 사용하기에는 안전성 검증을 위한 문제가 제기될 수 있으므로, amylase 효소역가를 가지고 있고 면역능력이 우수한 균주중 재차 균주의 선발작업이 이루어졌고, 최종적으로 선발된 4종의 *Bifidobacterium* 균주는 아래 Table 8에서 보여주는 것과 같이 MIDI 동정 시스템과 API 동정 kit를 이용하여 *B. longum* 1 균주와 *B. breve* 3균주로 동정 되어졌다.

Table 8. Identification of *Bifidobacterium* strains with API Kit and MIDI system

Carbon Source Utilization	<i>Bifidobacterium</i> strains			
	35(JS18)	37(E15)	50(BC40)	54(MJ19)
Glycerol	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-
L-Arabinose	+	-	+	+
Ribose	+	+	+	+
D-Xylose	+	-	(+)	+
L-Xylose	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-
$\beta$ -Methyl-xyloside	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	(+)	+
D-Fructose	+	+	-	(+)
D-Mannose	+	(+)	(+)	(+)
L-Sorbose	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	+
Sorbitol	-	+	+	+
$\alpha$ -Methyl-D-mannoside	-	-	-	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	(+)	+	-	-
N- Acetyl glucosamine	-	-	-	(-)
Amygdaline	-	-	(+)	-
Arbutine	-	+	(+)	-
Esculine	+	+	+	+
Salicine	-	+	(+)	-
Cellobiose	-	(+)	-	-
Maltose	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+
Trehalose	-	(+)	-	-
Inuline	-	-	-	-
Melezitose	+	-	-	-
D-Raffinose	+	+	+	+
Amidon	-	+	-	-
Glycogene	-	+	+	-
Xylitol	-	(+)	-	-
$\beta$ -Gentiobiose	-	-	(+)	-
D-Turanose	(+)	+	(+)	(-)
D-Lyxose	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-
Gluconate	-	-	(+)	-
2-ceto-gluconate	-	-	-	-
5-ceto-gluconate	-	-	-	-
Identification	<i>B.longum</i>	<i>B.breve</i>	<i>B.breve</i>	<i>B.breve</i>



## 제 2 절 비피더스 선발균주의 배양, 생리학적 연구

### 1. 선발균주의 분비효소의 특성조사

선발균주의 효소활성 특성을 조사하기 위하여 API-ZYM system을 사용하여 선발균주의 효소활성 특성을 조사하였다. 공시균주인 non-amyolytic *B. breve*, *B. longum*과 amyolytic *Bifidobacterium* JS9, HJ30, SJ32의 탄수화물 관련 효소의 역가에서 차이점을 발견할 수가 있었다. 즉,  $\alpha$ -galactosidase의 경우는 HJ30와 SJ32균주에서는 발견할 수가 없었고 다른 균주에서는 발견되었다.  $\beta$ -gactosidase도 유사한 경향을 보여 주었고  $\alpha$ -glucosidase의 경우는 HJ30에서는 그의 역가를 발견할 수가 없었다.  $\beta$ -glucosidase의 역가가 amyolytic strain에서 강하게 나타났는데 이는 인체건강에 비교적 좋지 않은 효소이기 때문에 차후에 발효시에 이들 효소에 대한 점검이 필요하다. 그러나 인체발암관련 효소인  $\beta$ -glucuronidase는 constitutive하게 분비되고 있지 않는 것으로 나타났지만 inducible한지에 대한 관련 보완연구가 요망되었다. Alkaline phosphatase는 amyolytic strain에서만 그의 역가가 보였고 non-amyolytic strain에서 trypsin역가가 보인 것이 특이하였다.

### 2. 선발균주의 배양학적 생리연구

#### 가. 선발 *Bifidobacterium* spp.의 내산성 (acid resistance)

산소의 영향을 최대한 배제하기 위하여 실험 배지를 anaerobic glove bag내에서 pouring 한 후 37°C anaerobic incubator 내에서 12시간 방치하여 산소를 완전히 제거하였다. 실험 균주를 산소가 배제된 혐기희석에 10진 희석하여 aerobic clean bench 내에서 신속히 도말하고, anaerobic jar를 이용하여 96시간(4 days) 배양하였다. 이때 aerobic 상태에서 도말하는 시간은 10분이내, 배지중 산소가 anaerobic jar 내에서 제거되는 시간을 1시간 이내로 균주가 산소에 노출되는 시간을 최대로 줄였다. 산소의 영향이 배제 되었으므로 각 균주의 생존률이 높아질 것으로

예상되어 기존의 실험방법중 실험 배지의 pH를 좀더 낮추어 주었다. HCl 배지는 5N HCl로 pH 4.8, Acetic acid 배지는 2N acetic acid로 pH 5.0으로 맞추어 주었다. 위와 같은 방법으로 22균주에 대해 내산성을 조사한 내산성이 강한 균주는 다음 표3와 같으며, 특히 HJ7 균주가 HCl, acetic acid에 대해 그의 viability가 각각 99%, 99%로 두드러지게 강한 내산성을 보였다(Table 9).

Table 9. Acid resistability to acetic acid and hydrogen chloride of selected *Bifidobacterium* spp. isolated from Korean intestine

		EH17	MS5	IH1	GY3	E17	JS9	HJ7	SJ8
Viability* (%)	HCl	95.9	78.0	95.0	96.8	66.5	78.6	99.0	99.0
	Acetic acid	59.3	80.5	20.0	87.1	81.6	76.8	99.0	65.0

\* Viability was expressed viable count ratio(x100) between acidic and control cultures on plate.

나. *Bifidobacterium* spp.의 내산소실험 (oxygen resistance)

산소노출시간 1시간 이내의 실험구를 대조구로 사용하였고 희석된 균주를 agar plate에 도말한 후 aerobic incubator (37°C) 내에서 20시간 전배양하여 산소에 노출시킨 후 anaerobic jar에 옮겨 96 시간 배양하였다. IH1, KII와 KI3균주들이 산소에 노출되어도 생육이 우수한 것으로 나타났다. 하지만 HJ7은 내산성은 우수하였지만 산소에 대한 내성은 나쁜 것으로 보였다(Table 10).

Table 10. Acid resistability to oxygen of selected *Bifidobacterium* spp. isolated from Korean

	IH1	MS1	JS9	KI1	KI3	HJ7	SJ8	BMH3
Viability* (%)	99.0	64.0	< 1.0	84.0	85.0	< 1.0	69.0	71.0

\* Viability was expressed viable count ratio(x100) between oxygen exposed culture and control culture on the plate.

상기와 같은 선정방법에 의하여 우수균주 4종 (Int57, JS9, HJ7, SJ8) 선발하였다. 우선 이들 균주들은 amylase의 생산이 우수하여 쌀 등의 전분질의 발효에 적합하리라 사료되고 특히 SJ8 균주는 내산소성(oxygen resistance)과 내산성(acid resistance)도 아울러 우수하므로 고농도균체배양과 균주의 stability에 유리한 기본적인 특성을 갖춘 것으로 판단된다. Int57 균주는 내산, 내산소성은 좋지 않았지만 extracellular amylase의 역가가 우수하였으며 JS8, HJ7은 내산소성은 좋지 않았지만 내산성과 amylase생성이 우수하였다.

#### 다. 선발균주의 생육인자(growth factor)에 대한 영향

현재까지 알려진 bifidus factor중에서 가장 경제적으로 유리하고 다량으로 섭취하여도 인체에 나쁜영향을 미치지 않는 탄수화물계의 bifidus factor를 사용하여 생육의 촉진여부를 실험하였다. 이들의 올리고당은 효소에 의하여 생산된 것이 아니고 압출성형에 의하여 만들어진 올리고당(한식연 발명품, 해외특허신청중)을 사용하였다. Exoligo-2 (glucose25%+oligosugar 75%)의 경우 공시균주인 non-amylolytic *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* 등의 생육은 대조구인 glucose보다 생육이 저조하였다. 그러나 기선발된 amylolytic bifidobacteria중 EH1, JS9, HJ7, SJ8 등의 균들은 Exoligo-2에서 생육이 왕성하여

10시간 배양할 때 이미 stationary phase에 도달하여 glucose, fructoligo, galactoligo당의 대조구보다 30시간이상 빠른 생육현상을 발견하였다. 또한 Exolac-2 (lactose 30%+lactoligo 70%)에서도 같은 현상을 발견하였다. 이들 amyolytic bifidobacteria는 다른 non-amyolytic균에 비하여 더 많은 glucosidase activity를 갖고 있는 것으로 나타났다.

### 3. 고농도균체배양 연구

*Bifidobacterium* sp. Int-57의 고농도균체배양의 경우 3L 발효조에 의하여 발효조건을 다음과 같이 설정하였다. Inoculum 2%, 37°C, pH6.0 (10N, NH<sub>4</sub>OH), CO<sub>2</sub>를 접종전 약 1시간 정도 purging한 후 배양기간중에는 중지하였고 배지는 MRS를 기준배지로 하고 cystein 0.05%, skim milk를 1% 첨가된 배지를 사용하였다. 이때 선 발균주 모두 10<sup>10</sup>cfu/ml이상의 생육이 이루어졌다. 그리고 redox potential과 dissolved oxygen등은 상기의 배양조건에서 고농도 균체배양에 커다란 영향을 주지 않고 있음을 확인하였다. Acetic acid의 생성이 대수기 후기에 많이 이루어지고 있어 이러한 조건에서 제조된 원말종균의 stability와 viability에 영향을 줄 수 있을 것에 대한 평가가 추후에 필요하리라 생각된다. 종균생산을 위한 고농도균체배양은 현재 상업적으로 사용되고 있는 종균균수가 10<sup>10</sup>cfu/ml인 것을 감안하면 현재의 발효조건으로 상업적인 종균생산이 가능하리라 사료된다. pH를 조절하지 않은 경우 배양 15시간만에 균수는 2.0x10<sup>9</sup>를 보여 주었으며 redox potential은 배양초기에 -330mV에서 12시간 배양한 후 -240까지 올라가는 현상을 흥미로운 결과를 보여 주었다. 배양이 끝날 때까지 dissolved oxygen이 0.5% pO<sub>2</sub>이하를 보여 주었고 이러한 경향은 배양이 끝날 때까지 계속되었다. Acetic acid/lactic acid의 비율은 배양 12시간때 3.6까지 증가하여 최고를 보여 주었고 발효 후기에 lactic acid의 생산이 이루어지면서 약 2.5 전후의 값을 나타냈다. *Bifidobacterium* sp. JS9, HS30, SJ32의 고농도균체배양

의 경우는 pH를 6.0 으로  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10N)을 사용하여 조정하는 경우는 이들 균주가  $10^{10}$ cfu/ml를 보여주어 pH를 조절하지 않은 배양보다 10배의 균수의 증가 현상을 나타내었다. Redox potential은 배양 초기에 -250~-260mV에서 시작하여 배양이 진행되면서 낮아지다가 배양 9~12시간에 -350~-360mV의 수치를 보여주어 충분한 혐기도를 유지함을 알 수가 있었다. 또한 dissolved oxygen도 초기의 0.2~1.0 pO<sub>2</sub>가 배양 3~6시간에 0으로 떨어져서 고농도균체배양에서 산소의 영향은 배양은 크지 않음을 알 수가 있었다. Acetic acid/lactic acid의 비율은 대수기까지 2.0이하를 유지하다가 정지기에서 acetic acid의 생산이 많아져 그의 비율이 2.8-3.8사이의 값을 보여 주었다.

#### 4. Bifidobacteria의 면역증강능력연구

인체의 장내 세균총은 Lamina propria, Peyer's patches 등의 장내 면역계에 영향을 미친다. 이들 면역계는 macrophage, B세포, T세포 등이 면역을 담당하고 있다. 이들 중 macrophage는 외부에서 침입하는 유해 항원을 직접 탐식하고 항원을 표면에 제시하여 B 및 T세포에 항원을 전달한다. 또한 macrophage에 의하여 생산되는 IL-1, IL-6 및 TNF- $\alpha$  등은 cytokine을 생성하는 여러 종류의 면역 세포의 활성을 조절한다. 본 실험에서는 한국인에서 분리한 amylase활성이 강하고 제품 적용성이 우수한 균주들을 대상으로 이들이 macrophage에 미치는 영향을 조사하기 위한 *in vitro* 실험을 실시하였다. 실험 결과 특히 RD35 균주와 RD50 균주가 TNF- $\alpha$  (Table 11), IL-6 (Table 12) 생성을 모두 높은 수준으로 증가시켰었고 RD60 균주는 다른 균주들에 비하여 IL-6 와 TNF- $\alpha$ 의 생산 능력이 낮았다. 균체의 농도가 증가할수록 cytokine 생산능이 일반적으로 증가하였지만 균체의 농도가 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$  수준에 달하였을 때 일부의 균주에서 cytokine수준이 감소하는 경우도 있었다. 대체적으로 cytokine 증가능이 큰 균주들이 NO의 수준도 크게 증가시켰지만 cytokine에 비하여는 균주별 차이가 뚜렷하지는 못하였다(Table 13). 본 연구의 결과는 macrophage의 활성

농이 균주에 따라 상이함을 보여주는 것이다. 이러한 균주별 차이가 생기는 것이 균체의 어떤 성분 때문인지 조사하는 것이 요구된다. 본 연구실에서는 hydrophobicity가 높은 균주가 macrophage의 활성을 증가시키는 능력이 크다고 하는 자체 연구 결과를 얻은 바 있어 현재 균체의 hydrophobicity와 macrophage의 활성능과의 관계를 더욱 구체적으로 조사하고 있다. 또한 hydrophobicity가 높은 균주들이 장내의 상피세포에 대한 부착능도 더 높은 것으로 조사되었다. 따라서 hydrophobicity가 높은 균주들이 장내의 상피세포와 M세포의 부착능이 커서 면역계로의 유입이 용이하고 또한 macrophage를 비롯한 T세포 및 B세포와의 전반적인 부착능 및 활성능이 더욱 높을 것이라는 가능성이 매우 흥미롭게 제기되었다.

Table 11. Effect of Amylyolytic *Bifidobacterium* on TNF- $\alpha$  production by RAW 264.7 Macrophage Cell Line

Cell conc ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>Bifidobacterium</i> sp	TNF- $\alpha$ produced (ng/mL)			
	Control	10	50	250
RD 33	2.2	6.0	11.9	12.5
RD 35	2.2	10.8	18.3	22.5
RD 37	2.2	9.7	15.8	15.6
RD 48	2.2	11.0	10.2	11.3
RD 50	2.2	12.4	18.7	24.7
RD 54	2.2	11.4	17.0	22.9
RD 58	2.2	11.7	16.2	19.9
RD 60	2.2	6.5	10.2	8.5

Table 12. Effect of Amylyolytic *Bifidobacterium* on IL-6 production by RAW 264.7 Macrophage Cell Line

Cell conc ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>Bifidobacterium</i> sp	IL-6 produced (ng/mL)			
	Control	10	50	250
RD 33	3.0	4.5	49.0	12.5
RD 35	3.0	25.5	77.0	90.0
RD 37	3.0	9.5	16.5	44.5
RD 48	3.0			
RD 50	3.0	56.0	66.5	3.0
RD 54	3.0	26.0	7.5	7.0
RD 58	3.0	4.0	2.5	12.0
RD 60	3.0	3.5	4.0	6.0

Table 13. Effect of Amyolytic *Bifidobacterium* on NO production by RAW 264.7 Macrophage Cell Line

Cell conc ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>Bifidobacterium</i> sp	NO produced ( $\mu\text{M}$ )			
	Control	10	50	250
RD 33	42.0	42.0	57.0	71.0
RD 35	42.0	39.0	51.0	70.0
RD 37	42.0	54.0	62.0	80.0
RD 48	42.0	53.0	65.0	75.0
RD 50	42.0	69.0	70.0	65.0
RD 54	42.0	55.0	73.0	81.0
RD 58	42.0	57.0	69.0	68.0
RD 60	42.0	52.0	54.0	70.0

### 제 3 절 선발 균주의 발효적합성 연구

#### 1. 쌀 및 과채류에 대한 발효적합성 연구

가. 쌀배지에서의 amyolytic 과 non-amyolytic bifidobacteria의

생육비교

Amyolytic, non-amyolytic bifidobacteria의 성장정도를 0.05% cysteine과 0.2% yeast extract가 첨가되고 호화된 쌀배지에서 비교하였다. Non-amyolytic bifidobacteria에 비해 amyolytic bifidobacteria의 성장능이 우수하였는데, amyolytic bifidobacteria균수가  $10^8$  cfu/ml로 성장한 반면, non-amyolytic bifidobacteria은 18시간 배양에서  $1-5 \times 10^7$ cfu/ml의 균수로 성장을 하였다. *B. adolescentis* Int-57은 고체 및 액체배지에서 강한 amylase활성을 갖고 있으며 또한 다른 amyolytic bifidobacteria도 쌀에서 균의 생육이 우수하였다. 따라서 이는 amyolytic activity를 가지고 있는 bifidobacteria는 별도의 액화, 당화효



소의 첨가없이도 직접 쌀을 발효할 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.

#### 나. Bifidobacteria에 의한 과채류의 발효

일차적으로 amylase역가를 갖고 있는 것으로 선발된 균주의 하나인 *Bif. adolescentis* Int-57을 사용하여 쌀, 복숭아, 사과, 포도, 오렌지, 오이, 당근, 배추등에 배양하여 균생육여부와 그 발효물의 기호성에 대한 예비적인 실험을 수행하였다. 오렌지와 배추같은 것은 관능적으로 나쁘게 나타났지만 복숭아, 사과, 포도, 당근등은 관능적인 수락도가 비교적 높게 나와 계속적인 보완실험으로 발효제품으로의 개발에 대한 가능성을 확인하였다. 복숭아와 당근은 균의 생육도 왕성하게 일어남을 알 수가 있었다(Table 14). 또한 *B. longum*의 배양을 다시 과일과 야채를 원료로 배양하여 조사하였다. 당근, 복숭아, 오렌지 등에서 20시간 후 균수의 증가가  $5 \times 10^8$  수준으로 거의 동일하였다. 오이와 사과에서는 약  $10^8$  수준으로 배양되었다. 배추에서는  $5 \times 10^7$  수준으로 배양되었고 포도에서는 균의 성장이 관찰되지 않았다. Bifidobacteria 배양이 양호한 원료에서 산도가 많이 증가하였고 pH저하가 현저하였다(Table 15).

Table 14. Fermentation pattern of several fruits and vegetables by *Bif. adolescentis* Int-57 and their organoleptic acceptability. ( $3 \times 10^6$  cfu/ml, initial counts)

	Titratible acidity	pH (pH of control)	Viable counts	Organoleptic
Peach	10.28	3.99 (6.24)	$1.15 \times 10^8$	Good
Apple	0.87	5.42 (6.22)	$< 10^7$	Good
Grape	0.42	5.85 (6.31)	$< 10^7$	Good
Orange	8.98	4.29 (6.38)	$4.06 \times 10^8$	Bitter
Cucumber	8.50	3.89	$9.33 \times 10^7$	Bad
Carrot	10.87	3.96 (6.83)	$7.00 \times 10^7$	Good
Cabbage	1.00	5.45 (5.74)	$4.00 \times 10^7$	Bad

포도에서는 배양후 pH가 6.4정도로 되었고 산도도 0.22에 불과하여 포도에서 bifidobacteria가 증식하지 않아 pH와 산도의 변화가 미약한 것으로 생각된다. 배추와 오이에 bifidobacteria을 배양한 경우는 풍미가 현저히 저하하여 불쾌한 냄새를 내었다(data not shown). 오렌지, 복숭아 등에서는 bifidobacteria의 균수 증가는 있었지만 원래 원료의 좋은 관능성을 더 이상 증가시키지는 못하였다(data not shown). 과채류의 경우는 amylolytic, non-amylolytic bifidobacteria의 생육에 큰 차이가 없었고 이들 모두 사과, 복숭아, 당근등에는 균생육이 좋았고 발효물의 기호도도 우수하였다.

Table 15. Growth of *B. longum* ATCC 15707 during fermentation of various fruits and vegetables.

Raw materials	Viable cell counts <sup>1)</sup>	pH <sup>2)</sup>	Titratable acidity <sup>2)</sup>
Carrot	$4.7 \times 10^8$	4.3	1.0
Grape	$1.5 \times 10^6$	6.5	0.2
Apple	$2.5 \times 10^7$	5.0	0.3
Orange	$5.2 \times 10^8$	4.3	1.0
Peach	$6.5 \times 10^8$	4.2	1.0
Chinese cabbage	$6.2 \times 10^7$	5.4	0.3
Cucumber	$1.9 \times 10^8$	4.6	0.9

- 1) Cells were inoculated with  $3 \times 10^6$  cfu/ml and incubated for 24hrs. Then viable cell numbers were counted as described in the materials and methods.
- 2) pH and titratable acidity were measured after 30 hour fermentation as described in the materials and methods.

## 2. 발효제품화에 대한 실험

### 가. Bifidobacteria에 의한 쌀발효

이미 분리 동정된 *B. adolescentis* Int-57를 이용하여 쌀발효를 실시한 후 bifidobacteria에 의한 쌀발효의 가능성 및 관능을 평가하였다. *B. adolescentis* Int -57은 cysteine과 yeast extract가 첨가된 쌀 기본배지에서 높은 성장을 보였다. 쌀 기본배지에 배양시 초기균수는  $10^6$  cfu/ml 이었고 12~16시간 배양시 가장 높은 성장을 나타냈다. 쌀기본배지에 cysteine을 첨가하여 16시간 배양시 균수가  $10^6$ 에서  $5.8 \times 10^7$  cfu/ml으로 증가됨을 볼 수 있었고 cysteine과 yeast extract을 쌀 기본배지에 첨가시  $1.3 \times 10^8$  cfu/ml의 균수를 나타내었다. Cysteine은 쌀배지에서 산화 환원전위차를 낮추어bifidobacteria의 성장에 유익한 작용을 준다. 모든 group에서 배양 12시간후에는 균수가 감소하였다. 이는 pH의 감소와 산도의 증가에 의한다. 배양 16시간 까지는 pH의 감소가 두드러지나 그 이후는 천천히 감소한

다. pH의 변화는 총산도의 증가와 관계가 있다. 쌀발효에 있어 환원당 함량은 배양 8 시간 이후부터 빠르게 증가하는 반면 아밀라아제 활성은 24시간 쌀발효 때 높다. 성장초기 아밀라아제에 의한 전분으로부터 유리된 당은 발효된 쌀에 축적된다. 아밀라아제 활성은 생존균수의 감소 후에도 상대적으로 안정하다. 발효과정중 maltotriose의 축적은 glucose 대부분이 소실되는 동안 명백해 진다. 장시간 배양은 쌀전분의 분해과정이 더 진행되어 맥아당의 농도를 증가시킨다. 이는 쌀발효에 있어 glucose의 부재는 *B. adolescentis* Int-57 아밀라아제의 특성보고에 의해 설명되어진다. 그리고 1%의 gelatin의 발효쌀에의 첨가는 반응액의 안정성을 보여주었다. Amyolytic bifidobacteria를 이용한 쌀발효 연구는 앞으로 panel test 및 발효조건의 정형화에 대한 조사가 더 요구되나 관능적으로 상당한 정도의 제품화에 대한 좋은 가능성을 보여주었다(Table 16).

Table 16. Change in viable cell count, pH, titratable acidity and reducing sugar concentration during rice fermentation by *Bifidobacterium* Int-57

Group		Time (h)	0	4	8	12	16	24	48
Rice	Cell count (x10 <sup>6</sup> ) <sup>1</sup>	1.0	2.2	7.0	9.8	12	8.0	4.3	
	pH	6.9	6.8	6.3	6.0	5.8	5.7	5.5	
	Acidity <sup>2</sup>	0.15	0.22	0.32	0.37	0.42	0.47	0.50	
	Reducing sugar <sup>3</sup>	0.15	0.18	0.26	0.44	1.0	1.9	3.7	
Rice+0.05% cysteine	Cell count (x10 <sup>6</sup> )	1.0	3.7	15	49	580	22	5.1	
	pH	6.9	6.7	6.0	5.5	5.0	4.7	4.4	
	Acidity	0.15	0.25	0.94	1.49	1.71	1.86	1.95	
	Reducing sugar	0.15	0.30	0.58	1.59	2.40	4.80	7.50	
Rice+0.05% cysteine+ 0.02% yeast extract	Cell count (x10 <sup>6</sup> )	1.0	4.9	54	130	110	36	5.4	
	pH	6.9	6.6	5.6	5.2	4.7	4.4	4.2	
	Acidity	0.15	0.45	1.29	2.08	2.23	2.43	2.62	
	Reducing sugar	0.15	0.54	1.0	3.2	5.8	12.8	17.4	
Amylase activity (mU/ml.min)		-	2	6	15	22	36	29	

<sup>1</sup>cfu/ml

<sup>2</sup>The amount of 0.1N NaOH solution required to neutralize each culture broth (10ml) to pH8.2

<sup>3</sup>Equivalent of maltose expressed as mg/ml

쌀을 기본배지로하여 발효를 실시하였을때 JS9, HJ7, SJ8균주는 32시간 배양했을 때 10<sup>9</sup> cfu/ml 까지 도달하는 균생육이 양호하였다. 그러나 Int-57의 경우와는 달리 배양초기에는 균의 생육이 느리게 이루어졌고 32시간이후에는 균수가 완만히

감소하였다. 또한 산의 생성도 느리게 일어나서 48시간 배양시에는 Int-57보다 더 많은 양이 생산되었다. *Bifidobacterium* Int57, JS9, HJ7, SJ8을 사용하여 쌀당화액을 발효한 결과 Int57과 SJ8은 단맛이 강한 반면 JS9와 HJ7은 신맛이 강하였으며 관능특성은 대체로 양호하였으나 향이 약하여 향을 보강할 필요성이 있음이 확인되었다. 본 연구의 계획대로 쌀당화액에 사과박 등의 부재료를 첨가하여 쌀과 혼합발효시스템을 개발할 경우 bifidobacteria의 성장 뿐만 아니라 향개선에도 도움이 될 것으로 기대된다.

#### 나. 부재료첨가에 의한 bifidobacteria의 쌀발효실험

쌀 젖산 발효물은 영양적인 면에서는 단백질과 lysine함량이 낮은 편이므로 lysine 함량이 높은 대두 단백질과 혼합하여 발효시키면, 영양적으로 상호보완적이다. 대두 단백질은 대두취로 일컬어 지는 비린내 계통의 좋지 않은 향을 가지고 있으나 젖산 발효를 통하여 향이 개선된다는 보고가 있다. 본 실험에서는 bifidobacteria 쌀 발효 음료의 기호성 향상과 영양적 균형을 위하여 쌀발효에 ascorbic acid와 분리대두단백(Isolated soybean protein)를 첨가하여 발효시켰다. 쌀발효시 ascorbic acid와 분리 대두 단백질의 첨가는 bifidobacteria의 생육에 도움이 되었고 관능적인 평가도 좋아 이를 첨가한 기능성 쌀발효 식품으로의 개발에 효과적인 방법으로 평가되었다. 관능적인 개선을 위해 현재 배지의 환원제로 사용하고 있는 cysteine을 ascorbic acid로 대체하고자 선발된 균주의 하나인 *Bifidobacterium* JS9에 의한 적정농도를 결정하였다. Ascorbic acid의 농도가 0.05%에서 0.1%까지 증가함에 따라 균의 생육은 증가하였고 더욱 증가하면 균은 생육은 저해되는 현상을 관찰할 수가 있었다. 따라서 0.1%의 ascorbic acid를 첨가할 때 현재 환원제인 cysteine의 0.05%와 같은 효과를 볼 수가 있었다. 이는 선택변화에 의한 적정농도(0.04-0.05%)보다 그의 농도가 증가된 것으로 균의 생육을 위해서는 더욱 많은 환원

력이 필요한 것으로 보인다. *Bifidobacterium* JS9를 선발균주로 하여 ISP를 2%, 3%, 5% 첨가하여 발효하였다. 5% 경우의 균생육이  $10^{10}$  cfu/ml으로 균의 생육이 왕성하였으며 산생성도 양호한 것으로 나타났다. 그러나 5% ISP는 약간의 이취가 감지되어 3%의 농도가 관능적인 평가에서는 유리하였다. 선발균주인 *Bifidobacterium* Int-57, JS9, HJ7, SJ8를 사용하여 3% ISP와 0.1% ascorbic acid를 첨가하여 쌀발효를 수행하였다. Cysteine만 첨가한 대조구 쌀발효물에 비하여 균의 생육이 현저히 빨리 일어나 발효 12시간만에 균수가  $10^9$ - $10^{10}$ cfu/ml까지 도달하였다. 이는 대조구보다 20시간정도 빠른 균생육이라 할 수 있다. 또한 산생성도도 48시간 발효후 대조구보다 약 2배인 1.0%이 되었다. 그리고 발효생성물인 lactic acid는 30mM~40mM이었고, acetic acid는 70mM~80mM 이었으며 lactic acid와 acetic acid의 ratio는 1 : 1.5~2.5였다. 관능적 기호성의 감소를 유발하는 acetic acid의 생산도 SJ8을 제외하면 높지 않은 것으로 나타났다. 최종적으로 선발된 4균주(35, 37, 50, 54)를 이용한 쌀/과채류 발효제품을 개발하기 위하여 skim milk와 ISP와 같은 질소원을 쌀배지에 첨가 하였을 때 선발균주에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음 Fig. 1, 2, 3에서 볼 수 있는 것과 같다. Fig. 1에서 볼 수 있는 것과 같이 쌀만 첨가된 배지에서는 선발균주들의 별다른 성장을 보이지 않고 있으나, Fig. 2에서와 같이 쌀배지에 skim milk를 0.5% 첨가 하였을 때는 35번 균주의  $10^7$ 에서  $10^8$  CFU/ml의 뚜렷한 성장 촉진효과를 보여주고 있고, 쌀배지에 ISP 0.5%를 첨가 하였을 때도 성장속도가 느리기는 하지만 35번 균주의 성장이 관찰 되었다(Fig. 3).

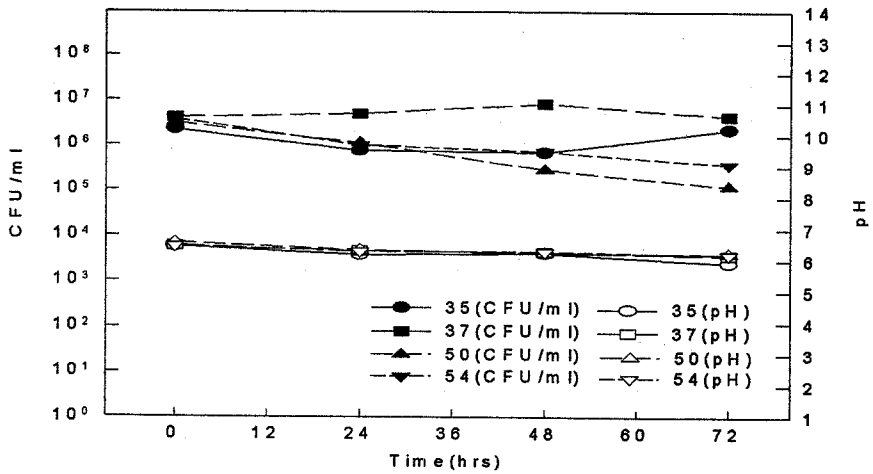


Fig. 1. Fermentation curves of *Bifidobacterium* strains using only 1% rice in the medium

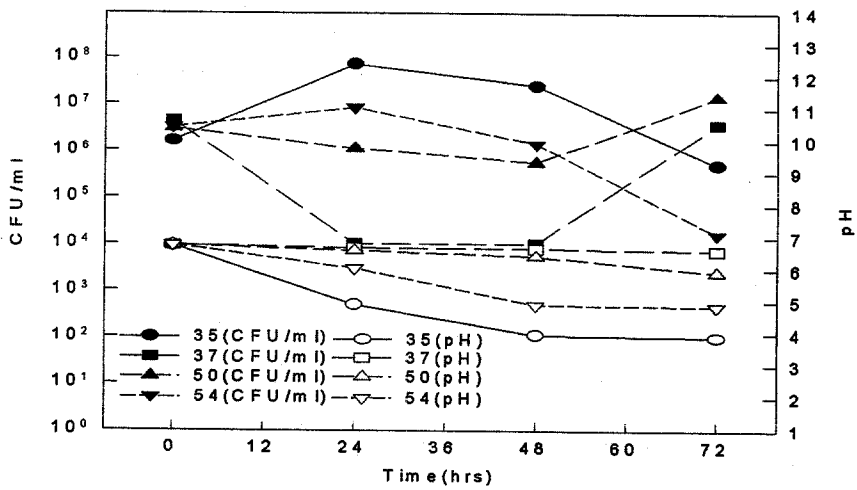


Fig. 2. Fermentation curves of *Bifidobacterium* strains using 1% rice and 0.5% skim milk in the medium



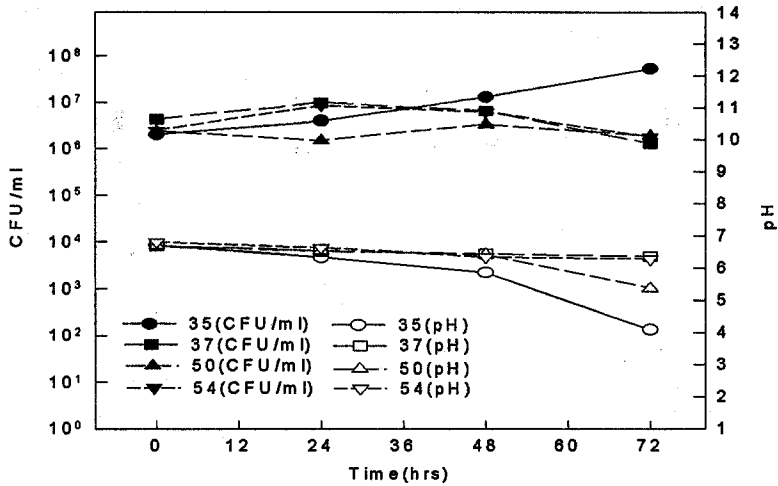


Fig. 3. Fermentation curves of *Bifidobacterium* strains using 1% rice and 0.5% ISP in the medium

#### 다. *Bifidobacteria*에 의한 쌀/사과박발효

*Bifidobacterium* INT-57 을 사용하여 사과즙을 발효한 결과 관능적으로는 상당히 좋은 결과를 얻었으나 균의 생육은 잘 되고 있지 않은 것으로 나타났다. 따라서 쌀당화액에 사과박을 첨가하여 발효한 결과 쌀당화액 단독의 경우에 비하여 균의 생육이 현저히 증가되었고 관능특성이 뚜렷이 향상되었다. *Bifidobacterium* Int57, JS9, HJ7과 SJ8을 사용하여 쌀당화액/사과박 혼합물을 발효한 결과 신맛을 많이 내는 JS9와 HJ7이 사과박의 단맛과 조화를 이룬 맛을 갖는 발효물을 생산하여 쌀당화액/사과박의 발효균주로 선발되었으며 적정발효조건은 37°C, 42시간이었다. 환원제를 달리한 쌀당화액/사과박 혼합 발효물의 관능특성은 ascorbic acid를 사용한 경우가 cysteine을 사용한 경우보다 유의적으로 우수한 품질을 나타내었으며 cysteine을 사용한 경우는 sulfur에서 유래한 냄새가 강하여 관능적 품질이 낮았다. 쌀당화액

/사과박의 비율을 달리하여 발효한 결과, 비율 90/10은 drink-type의 제품에 적당하였고 비율 60/40은 paste-type 제품의 제조에 적합하였고 두 제품 모두 관능적 품질이 우수하였다. 발효제품의 bifidobacteria균수는 최대  $3.9 \times 10^9$  cfu/g 이었다.

#### 라. Bifidobacteria에 의한 양파발효

양파를 blender로 갈아 녹즙기로 착즙한 후 0.2%와 0.05% cysteine을 첨가한 후 bifidobacteria를 48시간 배양발효하였다. 배양액의 pH는 많이 떨어져서 3.8 - 4.9 정도까지 되었으나 균의 생육은 잘 이루어지지 않았다. *B. animalis*는 생육이 잘 된 것으로 나타났다. 이들이 잘 생육이 잘 이루어지지 않은 것은 양파속에 있는 미생물을 억제하는 allyl compound 계통에 의한 것으로 추정되며 butyric acid와 sulfur계통의 풍미때문에 관능적으로, 개선되어야 하리라 생각된다.

#### 마. Bifidobacteria에 의한 당근발효

당근 주스액에 *B. longum* ATCC 15707, *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. infantis* ATCC 15697 등의 표준 균주와 본 실험실에서 분리되어 보관중인 *B. longum* BGN4 및 *B. adolescentis* Int57 균주를 접종하여 36시간까지 발효하였다. 본 실험조건에서 12시간 간격으로 조사하였을 때 24시간 배양에서 균의 생균수가 가장 높았고 36시간 배양에서는 생균수의 숫자가 일반적으로 줄어들었다. 조사된 균주들 중 *B. longum* 및 *B. adolescentis* 등의 성장이 양호하였고 *B. bifidum* 균주는 성장이 저조하였다. 이는 *B. bifidum*의 발효성 당의 종류의 숫자가 적은 것에 기인한 것이라고 생각된다. Bifidobacteria의 증식능력은 원료에 따라 다른 양상을 보인다. 우유의 경우에는 *B. longum*, *B. bifidum* 등의 증식이 양호하고 *B. adolescentis*의 증식은 저조한 것으로 알려져있다. 당근발효의 경우는 발효에 의하여 산미가 가하여져 당근 자체보다 관능의 개선이 되고 또한 유익한

bifidobacteria균주를 보유하여 기능성식품으로의 개발가능성이 제시되었다(Table 17).

Table 17. Change of the viable cell numbers during fermentation of carrot juice with different *Bifidobacterium* strains.

Strains	Fermentation Time (hr)			
	0	12	24	36
<i>B. longum</i> ATCC 15707	$2.3 \times 10^6$	$1.2 \times 10^8$	$5.4 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$
<i>B. longum</i> BGN3	$1.5 \times 10^6$	$1.4 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$	$3.0 \times 10^8$
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	$3.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^8$	$4.7 \times 10^8$	$3.7 \times 10^8$
<i>B. adolescentis</i> Int-57	$1.9 \times 10^6$	$2.1 \times 10^8$	$4.3 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$
<i>B. bifidum</i> ATCC 29521	$3.2 \times 10^6$	$1.5 \times 10^7$	$7.7 \times 10^7$	$4.0 \times 10^6$
<i>B. bifidum</i> BGN4	$2.6 \times 10^6$	$8.2 \times 10^6$	$1.5 \times 10^7$	$8.1 \times 10^6$
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	$2.0 \times 10^6$	$1.4 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$

#### 제 4 절 *Bifidobacterium* 이용 발효제품의 생산

##### 1. 냉동사과박 첨가 비피더스 쌀 발효제품의 제조

건조 사과박을 쌀 배지에 첨가하여 선발된 4 균주(35, 37, 50, 54)를 각각 발효시켰을 때 35번 선발균주가 제일 좋은 성장을 보여 주었고, 37번 균주의 경우는 1일 발효 후에는 성장이 저하 되었다가( $10^6 \rightarrow 10^5$ ), 2일 후에는 다시  $10^8$  균수로 급격하게 성장하는 패턴을 보여 주었다. 이러한 37번 균주의 특성은 균주를 20 시간 공기중에 노출시키는 방법으로 측정된 내산소성 실험결과, 측정된 생존률은 35번 균주가 10%, 37번 균주가 0.01%, 50번 균주가 1% 그리고 37번 균주가 0.1% 이었다. 건조사과박 첨가 실험결과 성장에 미치는 첨가 효과는 35>50>54>37의 순으로 좋

은 결과를 얻게 되었다. 건조 사과박의 첨가 발효제품에서는 관능적으로 문제가 될 수 있기 때문에 냉동 사과박을 직접 제조하여 냉동 시킨 후 냉동시료를 이용하여 냉동사과박 첨가 실험을 실시 하였다. 사과박을 직접 제조한 결과는 아래의 Table 18에서 보는 것과 같다. 냉동사과박을 첨가한 발효제품의 3일간의 균수와 pH-값 그리고 환원당의 측정결과는 Fig. 4와 Fig. 5에서 보는 것과 같다. 35번 균주의 경우 0.5% ISP만 첨가 하였을 경우 24시간 후에  $10^8$ 으로 성장 하였으나, 0.5% ISP와 10% apple pomace를 첨가 하였을 때는 12시간 이내에  $10^8$  이상 수준으로 균이 성장하고 있음을 관찰 할 수가 있었다.

Table 18. 사과박의 제조결과

	1회	2회	평균
사과무게	284g(100%)	286g(100%)	285g(100%)
씨, 껍질	78.64g(27.69%)	71.57g(25.1%)	75.1g(26.4%)
사과박	52.45g(18.47%)	46.35g(16.2%)	49.4g(17.3%)
즙	140.81g(49.58%)	150.79g(52.7%)	145.8g(51.1%)
손실분	12.1g(4.26%)	17.28g(6.0%)	14.7g(5.1%)
환원당(mg/ml)	110.6	81.6	96.1

전분기수분해 효소가 처리된 쌀배지에서의 유산균들의 생육, 기능성 그리고 관능적인 발효특성을 고려하여 최종적으로 *Lactobacillus acidophilus* KFRI 233 균주가 젖산발효균주로 선발 되었으며, 선발균주를 이용하여 쌀/사과박 발효제품 Risoghurt를 제조한 후, 별도로 고농도 배양시켜 얻어진 *Bifidobacterium longum* 35 균주를 첨가하였고 4℃와 20℃에서 8일간 저장실험을 하였다. Fig. 6은 발효제품 Risoghurt의 저장중 생균수의 변화, 산생성 및 pH-값의 변화를 보여주고 있다. *L. acidophilus* 의 균수는 저장기간중 변화가 없었으나 *B. longum* 균주의 균수는 저장기간중 점점 감소하여 8일 후에는  $10^5$  이하로 감소되었음을 알 수 있었다.

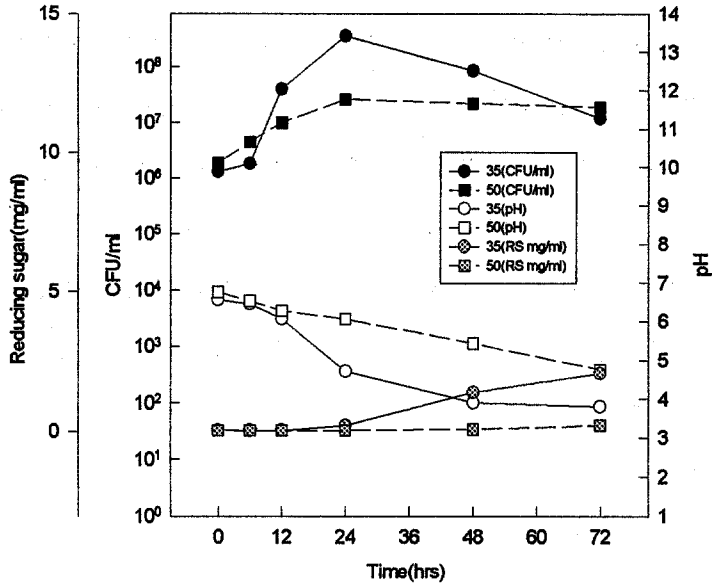


Fig. 4. The changes of cell counts, pH-value and reducing sugars during the fermentation of two *Bifidobacterium* strains 35, 50 with 0.5% ISP

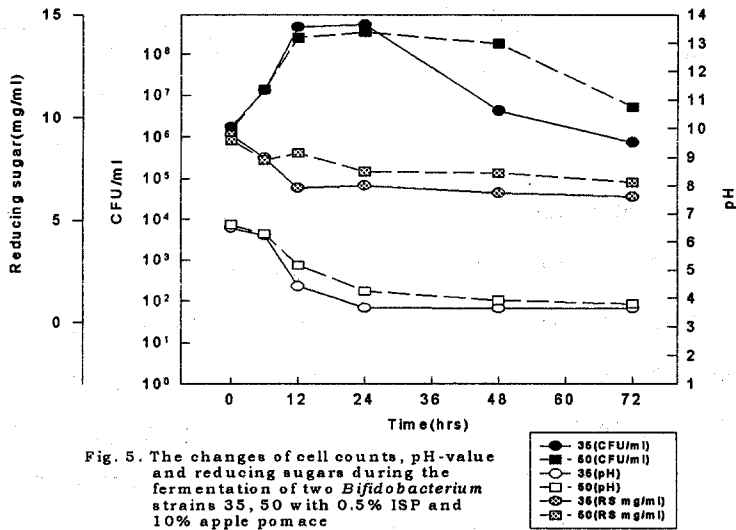


Fig. 5. The changes of cell counts, pH-value and reducing sugars during the fermentation of two *Bifidobacterium* strains 35, 50 with 0.5% ISP and 10% apple pomace

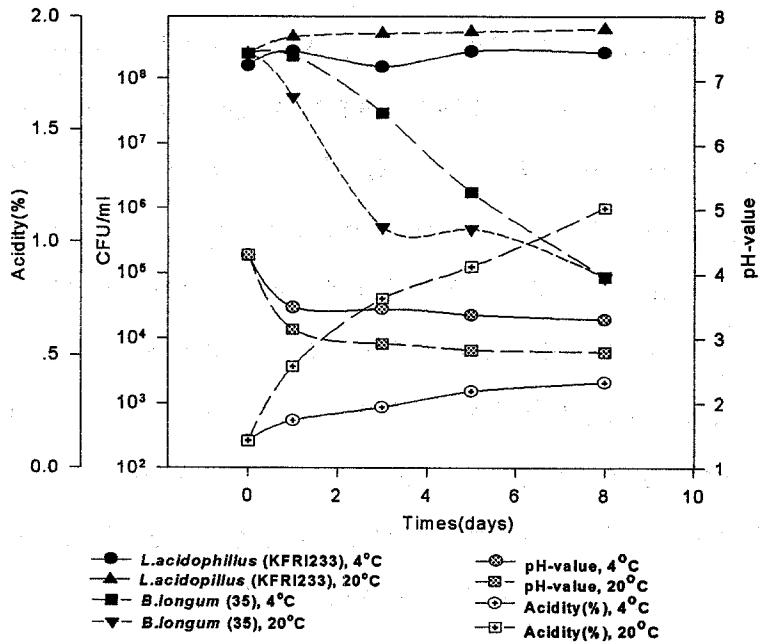


Fig. 6. Total viable cell counts and acid production of *L. acidophilus* KFR1 233 and *B. longum* 35 during the Storage of Risoghurt at 4°C and 20°C

## 2.. *Bifidobacterium*에 의한 당근 발효식품의 제조

### 가. 과일과 채소의 종류에 따른 발효

*Bifidobacterium*의 배양을 당근이외에 다른 종류의 과일과 야채를 원료로 배양하여 조사하였다. 당근, 복숭아, 오렌지 등에서 20시간 후 균수의 증가가  $5 \times 10^8$  수준으로 거의 동일하였다. 오이와 사과에서는 약  $10^8$  수준으로 배양되었다. 배추에서는  $5 \times 10^7$  수준으로 배양되었고 포도에서는 균의 성장이 관찰되지 않았다. *Bifidobacterium* 배양이 양호한 원료에서 산도가 많이 증가하였고 pH저하가 현저하였다. 포도에서는 배양후 pH가 6.4정도로 되었고 산도도 0.22에 불과하여 포도에서

*Bifidobacterium*이 증식하지 않아 pH와 산도의 변화가 미약한 것으로 생각된다. 배추와 오이에 *Bifidobacterium*을 배양한 경우는 풍미가 현저히 저하하여 불쾌한 냄새를 내었다(data not shown). 사과, 오렌지, 복숭아 등에서는 *Bifidobacterium*의 균수 증가는 있었지만 원래 원료의 좋은 관능성을 더 이상 증가시키지는 못하였다(data not shown). 특히, 이들 과일의 경우 *Bifidobacterium*의 배양을 위하여 NaOH를 이용하여 pH를 중성으로 조정한다는 것은 관능저하의 요인이 될 수 있으며 제조 과정의 복잡성이 증가되는 요인이 되기 때문에 바람직하지 않은 측면이 있다. 그러나 당근은 원료 자체가 거의 중성에 가깝기 때문에 pH의 조정이 불필요할 수 있고 발효에 의하여 산미가 가하여져 당근 자체보다 관능의 증진의 개선이 되고 또한 유익한 *Bifidobacterium* 균주를 보유하여 식품 기능성이 증진되어 조사된 원료중 *Bifidobacterium* 배양 원료로 가장 적합하다고 할 수 있다.

#### 나. 부원료 첨가에 따른 당근발효

당근 주스에 ascorbic acid (0.05%), L-cysteine·HCl (0.05%), yeast extract (0.2%), 두유 (10%), 탈지분유 (10%), 사과 주스 (10%) 등을 첨가한 상태에서 *Bifidobacterium* 발효를 실시하였다 (Table 19). 사과 이외에는 첨가된 재료 모두 *Bifidobacterium* 균수의 증가에 기여하였다. 첨가 재료 중에서 ascorbic acid 및 cysteine을 첨가한 경우에는 배양액의 산화 환원 전위를 낮춤으로써 *Bifidobacterium*의 성장을 더욱 촉진하였다고 생각된다. 특히 ascorbic acid 보다는 cysteine을 첨가한 경우에 균체수의 증가가 현저하고 균의 성장 개시를 앞당기는 것으로 나타났다. Yeast extract, 두유 및 탈지분유 등을 첨가한 경우에는 *Bifidobacterium*대한 영양인자를 보충하여 균체수의 증가가 이루어진 것으로 생각된다. 사과의 첨가는 영양 인자에 대한 보충 효과는 없는 것으로 생각된다. 두유나 탈지분유를 첨가한 경우에는 발효액의 물성이 더욱 안정화되었고 사과를 첨가한 경우에

는 관능성의 증진이 관찰되었다(data not shown).

Table 19. Effect of adding various ingredients on the growth of *B. longum* ATCC 15707 during fermentation of carrot juice.

Materials added	Fermentation time (h)			
	0	12	24	36
Control (carrot only)	$3 \times 10^6$	$3.9 \times 10^8$	$5.2 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$
+ 0.05 % ascorbic acid	$3 \times 10^6$	$5.4 \times 10^8$	$6.8 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$
+ 0.05 % L-cysteine.HCl	$3 \times 10^6$	$7.8 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$
+ 0.2 % yeast extract	$3 \times 10^6$	$4.9 \times 10^8$	$7.0 \times 10^8$	$3.7 \times 10^8$
+ 10 % soy milk	$3 \times 10^6$	$5.7 \times 10^8$	$7.5 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$
+ 10 % skim milk	$3 \times 10^6$	$5.2 \times 10^8$	$9.0 \times 10^8$	$5.0 \times 10^8$
+ 10 % apple juice	$3 \times 10^6$	$3.2 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	$1.6 \times 10^8$

#### 다. *Bifidobacterium* 배양에 의한 관능의 변화

향은 발효가 진행되면서 발효하지 않은 대조구의 당근액보다 훨씬 향상되었다 (Table 20). *B. longum* ATCC15707은 대수기 증기 이후에 많이 개선되어 관능검사점수가 미발효 당근액의 3.0에서 6.7로 높아졌고 *B. longum* BGN3도 같은 경향을 보여 주었다. *B. bifidum* BGN4의 발효액 향도 많이 개선되었으나 대수기 후기에 주로 이루어졌다. 그리고 발효되지 않은 당근액보다 발효가 진행되면서 맛향상이 이루어졌는데 특히 *B. longum* BGN3은 대수기 후기에 신맛에 대한 관능평가 점수가 9.0을 보이는 좋은 효과를 보였다. 전체적인 기호도는 발효하지 않은 당근액보다 3종의 bifidobacteria에 의한 발효액이 더 좋은 점수를 보여 주었는데 그중 *B. longum*이 가장 높은 점수를 보여 미발효 당근액의 4.0보다 높은 6.0을 보였다.



Table 20. Comparison of sensory scores of fermentation product of carrot juice by *Bifidobacterium* spp. at each culture time

	non-fermentation	<i>B.longum</i> <sup>2)</sup>	<i>Bif. BGN3</i> <sup>3)</sup>	<i>Bif. BGN4</i> <sup>4)</sup>	
pH	6.79	4.98	4.85	4.78	
Brix	11.0	10.9	10.8	10.8	
Total acidity	0.075	0.310	0.344	0.381	
CFU/ml	0	$3.6 \times 10^8$	$1.2 \times 10^9$	$2.9 \times 10^8$	
Sensory scores <sup>1)</sup>	Sour aroma	2.0	6.7	4.7	3.7
	Sweat aroma	6.7	3.3	4.7	4.7
	Sour taste	2.3	5.7	4.3	4.0
	Sweat taste	6.3	5.3	5.7	5.7
	Overall	4.3	5.0	5.7	5.3

<sup>1)</sup>Each value represented the mean of 5 observations

Culture time was adjusted for maximum growth of each strain as 24 hour<sup>2)</sup>, 12 hour<sup>3)</sup>, 36 hour<sup>4)</sup>.

라. *Lactobacillus acidophilus*와 *Str. thermophilus*와의 혼합배양

*Bifidobacterium*과 *L. acidophilus* 또는 *S. thermophilus* 균주를 혼합 배양하며 발효의 진행에 따라 0, 12, 24 시간 경과 후 각각의 균체수를 측정하여 그 결과를 Table 21에 나타내었다. 혼합배양에서는 *Bifidobacterium*의 균수가 적어지는 경향이 있다. 특히, 배양시간이 경과함에 따라 *L. acidophilus*와의 혼합배양에서 *Bifidobacterium*이 현저히 사멸하는 것으로 나타났다. 이러한 점에서 *Bifidobacterium*을 *Lactobacillus*와 혼합 배양하여 높은 *Bifidobacterium* 균수를 유지하려면 내산성이 강한 *Bifidobacterium* 균주를 선발하여 사용할 필요가 있을 것이다. *L. acidophilus*가 첨가되지 않은 *Bifidobacterium* 단독배양에서 상대적으로 높은 수준의 *Bifidobacterium* 균수가 유지되어 *Bifidobacterium* 단일 배양이 바람직하다고 할 수 있다. 이와같은 경우에도 당근에서의 배양 적성이 우수하고 내산성이 우수하며

유통보관 중에도 균수의 사멸이 적은 균주의 사용은 제품의 질적인 측면에서 바람직할 것이다. 본 연구의 결과는 기본적으로 당근을 원료로하여 *Bifidobacterium* 균주를 배양하였을 때 *Bifidobacterium*의 배양이 양호하게 일어나고 산도의 적절한 증가에 의하여 당근의 관능의 개선이 일어남을 조사한 것이다.

Table 21. Growth of *Bifidobacterium* ATCC 15707 during the fermentation of the carrot by mixed culture with *L. acidophilus* ATCC4356 and *S. thermophilus* ATCC19258.

Combination of the strains		Bacteria counted	Fermentation time (h)		
			0	12	24
<i>B. longum</i>	only	<i>B. longum</i>	$3 \times 10^6$	$4.2 \times 10^8$	$5.4 \times 10^8$
<i>L. acidophilus</i>	only	<i>L. acidophilus</i>	$3 \times 10^6$	$6.7 \times 10^8$	$6.9 \times 10^8$
<i>S. thermophilus</i>	only	<i>S. thermophilus</i>	$3 \times 10^6$	$6.4 \times 10^8$	$5.9 \times 10^8$
<i>B. longum</i>		<i>B. longum</i>	$3 \times 10^6$	$3.8 \times 10^8$	$2.2 \times 10^7$
<i>L. acidophilus</i>	3:1	<i>L. acidophilus</i>	$1 \times 10^6$	$5.0 \times 10^8$	$6.5 \times 10^8$
<i>B. longum</i>		<i>B. longum</i>	$3 \times 10^6$	$7.5 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$
<i>S. thermophilus</i>	3:1	<i>S. thermophilus</i>	$1 \times 10^6$	$4.7 \times 10^8$	$1.6 \times 10^8$
<i>B. longum</i>		<i>B. longum</i>	$3 \times 10^6$	$8.4 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$
<i>L. acidophilus</i>		<i>L. acidophilus</i>	$1 \times 10^6$	$5.4 \times 10^8$	$5.0 \times 10^8$
<i>S. thermophilus</i>	3:1:1	<i>S. thermophilus</i>	$1 \times 10^6$	$2.9 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$

#### 마. 당근 발효중의 휘발 향기 성분의 변화

*Bifidobacterium* BGN2에 의한 당근 발효는 전형적인 발효 패턴을 보여 주었다. 24시간 배양에서 pH는 4.5로 감소하였고 생균수도  $4 \times 10^8$  CFU/1nL에 달

하여 발효 중 약 100배의 생균수가 증가하였다. 향기 성분의 GC-MS 분석 결과 약 30 종류의 향기 성분을 동정하였다(Table 22). 이들 성분 중 발효 과정 중 생성되는 종류와 성분으로는  $\beta$ -terpine,  $\alpha$ -terpine, endobonylacetate, dl-limonene,  $\beta$ -farnesene,  $\alpha$ -bergamolene들이었고 소실되는 성분들은 2- $\beta$ -pinene과 delta-4-carene이 대표적이었다. 본 결과는 *Bifidobacterium*에 의한 당근 발효 중의 휘발성 향기 성분들에 정량적, 정성적 변화가 일어났음을 보여주는 결과이었다. *Bifidobacterium*에 의한 당근 발효 중의 향기 성분 변화를 본 연구 결과에서 처음 시도된 것이었다. 당근 자체의 휘발성 terpenoid로서는 terpinolene과 caryophyllene 등이 보고되어 있고 당근 가공 식품의 flavor로서는 ethanethiol, dimethyl sulfide, acetaldehyde, octanol, 2-decenol들이 검출되어 보고된바 있다. 당근향 중 불쾌취기에 기여하는 성분으로는 isocouannin이 조사된바 있고 쓴 맛 성분들은 eugenin, isochlorogenic acid, hydroxybenzoic acid 등에 기인한다고 제안된바 있다. 본 연구에서의 *Bifidobacterium*에 의한 당근 발효 성분의 분석이 의미를 갖기 위해서는 발효로 각 성분 분획의 냄새에 대한 관능 검사가 요구된다. 따라서 앞으로도 지속적으로 향기 성분의 동정 결과가 발효 당근의 관능성 및 기능성에 어떠한 관련이 있는지 조사될 것이다.

Table 22. Identification of Volatile Compound of the fermented carrot juice with *Bifidobacterium* BGN4

Compound Name	control	24h treatment
$\alpha$ -pinene	***	***
sabinene	***	***
2- $\beta$ -pinene	***	
delta-4-carene	***	
bornylene	***	***
$\gamma$ -terpinene	***	***
$\alpha$ -terpinolene	***	***
bornyl acetate	***	***
trans-caryophyllene	***	***
$\beta$ -sesquiphellandrene	**	
$\beta$ -selinene	***	***
$\beta$ -cukekene	***	***
$\beta$ -bisabolene	***	***
$\alpha$ -humulene	***	
$\beta$ -terpinene		***
$\alpha$ -terpinene		***
endobornyl acetate		***
geranyl acetate		***
dl-limonene		***
$\beta$ -farnesene		**
$\alpha$ -bergamotene		***

Identification : \*\*\* ( purity 80 - 100 % )

    \*\* (     "    60 - 79 % )

    \* (     "    < 59 % )

## 제 5 절 쌀당화 시스템 및 *Bifidobacterium* 발효시스템 개발

### 1. *Bifidobacterium* 발효를 위한 쌀 당화 시스템 개발

#### 가. 당화를 위한 쌀의 분쇄조건 확립

충격식 분쇄기 및 마찰식 분쇄기를 사용하여 분쇄한 쌀의 입도측정 결과는 Table 23과 같았다. 마찰식 분쇄기를 사용한 쌀의 입도가 충격식 분쇄기를 사용하여 분쇄한 것보다 작은 입도를 보였으며, 충격식 분쇄기를 사용한 경우 분쇄시간에 따라 입도가 감소하였다.

Table 23. Mean particle size (MPS) of rice powder

Mill	Grinding time (sec)	MPS ( $\mu\text{m}$ )
Impact mill	30	453.4
Impact mill	60	325.9
Impact mill	90	268.8
Abrasive mill	N/A	150.2

각 시료별로 입도분포를 조사한 결과 Fig. 7과 같이 충격식 분쇄기를 사용하여 30, 60초간 분쇄한 시료는 425  $\mu\text{m}$  (40 mesh)에서, 90초간 분쇄한 시료는 250  $\mu\text{m}$  (60 mesh)에서 가장 많이 회수되었고, 마찰식 분쇄기로 분쇄한 쌀은 입자가 미세하여 80  $\mu\text{m}$  (200 mesh)에서 가장 많이 회수되었다.

분쇄방법별로 분쇄한 쌀을 당화하면서 30분마다 당도 ( $^{\circ}\text{Brix}$ )를 측정하였다. 그 결과는 4시간 당화 후 충격식 분쇄기로 30초간 분쇄한 시료는 12.9  $^{\circ}\text{Brix}$ 였으며, 나머지 시료는 12.0  $^{\circ}\text{Brix}$ 이하였다. 당화시간에 따른 당도변화는 당화 1시간 후에 최종 당도의 70% 이상으로 증가하는 것으로 나타났고 1시간 이후 효소에 의한 당화 속도는 점진적으로 감소하였다. 따라서 에너지 효율을 고려하여 쌀의 최적분쇄는 충격식 분쇄기로 30초 분쇄하는 것으로 결정하였다.

#### 나. 최적당화를 위한 호화 전 예비가온 조건

결정된 분쇄조건, 즉 충격식 분쇄기로 30초간 분쇄한 시료를 사용하여 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 가온처리가 당화에 미치는 영향을 평가한 결과 호화하기 전 예비가온이 당화를 더욱 빠르게 진행시키는 것을 확인할 수 있었다. 예비가온시간은 45분 처리한 경우 90분 이후의 당화력이 가장 크고, 예비가온시 에너지도 효율적으로 이용할 수 있으므로 최적 예비가온시간은 45분으로 결정하였다. 곡류를 이용한 발효에서 수침시간을 조절하는 공정은 많이 이용되고 있으며, 예비가온을 전처리 공정에 이용하는 방법도 높은 당화 효율을 보여 곡류를 사용하는 공정의 효과적인 전처리 방법으로 사료된다.

#### 다. 최적당화를 위한 호화 조건

위의 방법과 동일한 처리 후 호화조에서 시간을 달리하여 호화한 다음, 효소를 첨가하여 당화하면서 당화시간별 당도를 측정한 결과 호화시간이 증가함에 따라 당 생성속도가 증가하였다. 당화수율 및 에너지 효율을 고려하여 적정 호화조건을 호화

온도 100℃, 호화시간 40분으로 결정하였다.

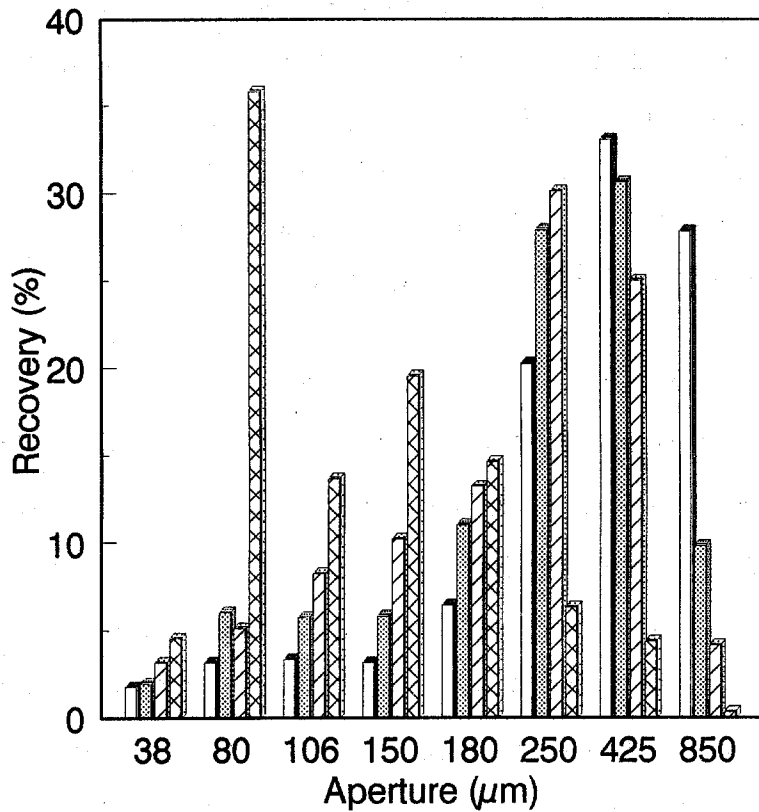


Figure 7. Particle size of ground rice by different milling method

- |                        |                        |
|------------------------|------------------------|
| □ : Impact mill 30 sec | ▒ : Impact mill 60 sec |
| ▨ : Impact mill 90 sec | ⊠ : Abrasive mill      |

#### 라. 쌀 당화액 제조를 위한 당화 조건 확립

분쇄한 쌀을 호화 후, 효소 첨가량을 달리하여 환원당량을 측정하였다. 측정결과는 당화 15분 후에는 2.3 - 5.2 mg/ml의 환원당량을 보였으며 당화시간이 길어질수록 모든 처리구에서 환원당의 증가를 보였고,  $\alpha$ -amylase 0.135 unit/g rice powder와 glucoamylase 3.375 unit/g rice powder 수준으로 첨가한 경우 75분 당화시 38.7 mg/ml로 가장 빠른 시간에 높은 환원당을 나타내었다. 따라서  $\alpha$ -amylase 0.135 unit/g rice powder와 glucoamylase 3.375 unit/g rice powder를 적정 효소첨가량으로 결정하였으며 적정 당화시간은 75분이었다.

#### 마. *Bifidobacterium* 발효 쌀당화액의 특성

쌀당화액을 *Bifidobacterium* sp. FBD-27을 사용하여 37℃에서 48시간 발효시키면서 12시간마다 pH, 산도, *Bifidobacterium*수를 측정한 결과 Table 24와 같이 pH는 발효 전 5.39에서 12시간 후에는 3.93으로 낮아졌으며 그 이후에는 미미하게 감소하여 발효 48시간 이후에는 3.58을 나타내었다. 산도는 초기 0.045%에서 발효시간에 따라 증가하여 48시간 후에는 0.153%를 보였다. *Bifidobacterium*수는 초기  $4.8 \times 10^6$  CFU/ml에서 발효 36시간 후에는  $2.2 \times 10^8$  CFU/ml으로 증가하다가 48시간 후에는  $1.4 \times 10^8$  CFU/ml로 감소하여 비피더스균의 활성은 36시간 발효시 가장 좋은 것으로 나타났다.



Table 24. Changes in major properties of the saccharified rice solution during fermentation by *Bifidobacterium* sp. FBD-27

Fermentation time (hr)	Property		
	pH	Titratable acidity (%)	Viable cell count (CFU/ml)
0	5.39	0.045	$4.8 \times 10^8$
12	3.93	0.117	$1.5 \times 10^8$
24	3.79	0.126	$1.6 \times 10^8$
36	3.61	0.144	$2.2 \times 10^8$
48	3.58	0.153	$1.4 \times 10^8$

*Bifidobacterium* sp. FBD-27을 이용하여 발효한 쌀당화액 발효물의 관능검사결과 발효시간이 길어질수록 맛과 종합적 기호도가 낮아졌는데 이는 *Bifidobacterium*에 의해 생성되는 초산때문에 신맛이 너무 강해진 결과로 생각된다. 향기는 전체적으로 낮은 값을 보였으며 24시간 발효시 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 향미성분의 보완이 필요함을 시사하는 것으로써 과채류를 이용한 향미개선이 요구된다.

*Bifidobacterium*수와 관능검사 결과를 종합할 때 24시간 발효한 쌀당화액이 초산의 신맛과 쌀당화액의 단맛이 조화를 이루어 관능성이 가장 우수하였다. 이상의 결과로부터 쌀을 이용한 *Bifidobacterium*발효제품의 기능성 식품으로서의 관능성을 확인할 수 있었다.

## 2. 쌀당화액의 비피더스 발효특성 규명

#### 가. *Bifidobacterium*의 최적 발효조건을 위한 혐기적 조건 확립

쌀당화액에 resazulin 용액을 10  $\mu$ l를 가한 후에 1% (w/v) cysteine과 1% (w/v) ascorbic acid 용액의 첨가량을 달리하여 100°C에서 5분간 가열 후 색택의 변화를 측정하였다. 그 결과 L값은 ascorbic acid를 첨가한 경우 높게 나타났고, a값은 ascorbic acid를 첨가한 것이 낮은 값을 나타내어 ascorbic acid의 환원력이 cysteine의 환원력보다 우수함을 알 수 있었다. 환원제의 적절한 첨가량은 ascorbic acid용액을 0.04%첨가한 경우 가장 높은 L값과 가장 낮은 a값을 나타내어 적정 첨가량으로 결정하였다.

Ascorbic acid 용액 0.04%를 첨가하여 100, 90, 80°C에서 30분 동안 가열하며 a값을 측정한 결과 100°C에서 가열한 경우 10분 이내에 급격히 감소하였고, 90, 80°C에서 가열한 경우는 10분 동안 감소하다가 그 이후에는 완만하게 감소하거나 거의 변화가 없어 가열처리온도 100°C에서 가장 빠른 시간에 높은 환원력을 보여주었다. Ascorbic acid과 cysteine의 환원력을 비교하기 위해 동일한 조건에서 L값과 a값을 측정하여 환원력의 정도를 측정한 결과는 ascorbic acid 첨가시 기울기가 크게 나타났다. 따라서 *Bifidobacterium*발효를 위한 혐기적 환경 조성을 위한 조건으로 0.04% ascorbic acid를 첨가하여 100°C에서 10분간 가열하는 것으로 결정하였다.

#### 나. 환원제를 첨가한 *Bifidobacterium*발효 쌀당화액의 특성

쌀당화액에 환원제를 0 - 0.1%수준으로 첨가하고 발효한 후 pH, 산도, *Bifidobacterium*수를 측정하고 관능검사를 실시하였다. pH 측정결과는 환원제를 첨가하지 않은 경우 3.42였고 ascorbic acid 0.04% 첨가시 pH 3.07로 가장 낮았고 첨가량이 많아질수록 pH는 점점 높아져 0.1% 첨가시에는 대조구와 큰 차이가 없었다. Cysteine를 첨가한 경우는 첨가량이 증가할수록 pH가 높아져 일반적인 발효특성과는 다른 양상을 보였다.

산도는 환원제를 첨가하지 않은 대조구가 0.165%였고 cysteine첨가구는 0.02%첨가시 0.199%, ascorbic acid는 0.04%첨가시 0.199%로 가장 높았다. 그러나 그 이상 첨가하는 경우 오히려 산도가 감소하여 과도한 환원제의 첨가는 *Bifidobacterium* 발효에 부반응을 일으키는 것으로 사료된다. Ascorbic acid 첨가시 0.1% 첨가구를 제외한 모든 실험구에서 대조구보다 높은 산도를 나타내어 ascorbic acid는 *Bifidobacterium* 발효에 적합한 환원효과를 가지고 있음이 증명되었다.

발효 후 *Bifidobacterium* 수를 측정된 결과는 환원제를 0.02%첨가한 ascorbic acid와 cysteine처리구의 *Bifidobacterium* 수는 유사하였으나, 0.04%첨가구에서 ascorbic acid가  $3.4 \times 10^8$  CFU/ml, cysteine첨가구가  $2.2 \times 10^8$  CFU/ml이었다. Ascorbic acid 0.1% 첨가시는  $2.2 \times 10^8$  CFU/ml였으며, cysteine 0.1%첨가시는  $8.0 \times 10^7$  CFU/ml로 환원제가 적정량 이상 첨가되면 환원력은 오히려 감소하며 그 정도는 cysteine이 ascorbic acid에 비해 크게 나타났다.

우수한 환원력을 가진 0.04%첨가구를 선택하여 관능성과 유의성을 조사한 결과는 Table 25과 같이 선택과 입안에서의 촉감은 유의적인 차이가 없었으나 ascorbic acid를 첨가한 경우가 cysteine을 첨가한 경우에 비하여 향, 맛, 기호도에 있어서 우수한 것으로 나타났다. 전체적인 기호도는 ascorbic acid 첨가시 가장 좋은 기호도를 보였고 cysteine첨가구에서 관능적인 열화가 확인되었다.

Table 25. Sensory data of *Bifidobacterium* fermented saccharified rice solution with reducing agents at 0.04% level

Reducing agents	Sensory items*				
	color	flavor	taste	mouthfeel	overall
ascorbic acid	6.1 <sup>a</sup>	5.8 <sup>a</sup>	5.8 <sup>a</sup>	6.0 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a</sup>
cysteine	6.4 <sup>a</sup>	4.8 <sup>b</sup>	4.7 <sup>b</sup>	6.0 <sup>a</sup>	4.6 <sup>b</sup>

\* Means with the same letter are not significantly different ( $\alpha = 0.05$ ).

그러나 박 등<sup>8)</sup>의 *Bifidobacterium*에 의한 당근발효 연구결과 ascorbic acid보다는 cysteine을 첨가한 경우에 균체수가 더 증가하며 *Bifidobacterium*의 성장을 촉진하는 것으로 본 실험의 결과와 차이가 있었으나 관능검사 결과 cysteine첨가시 기호도의 열화가 두드러져 당근발효 실험과는 달리 쌀당화액을 기질로 한 *Bifidobacterium*발효음료에 적절한 환원제는 0.04% ascorbic acid였다. 박 등<sup>9)</sup>의 L-cysteine HCl을 농도별로 첨가하여 각 농도에서의 증식과 각각의 환경에서 증식한 *B. breve*의 산소에 대한 내성정도를 알아본 연구 결과 0.05 - 0.10% L-cysteine HCl을 첨가하였을때 증식도 우수하고 과산화수소에 대한 내성도 우수한 결과를 나타내어 0.05 - 0.10% L-cysteine HCl을 첨가하여 배양하였을때 증식이나 저장시 산소에 대한 저해를 줄일 수 있는 배양조건임을 밝히고 있으나, *Bifidobacterium* 발효에 환원제로 사용하기 위한 L-cysteine HCl의 첨가는 관능적 열화로 인하여 식품에 적용하기 어려울 뿐만 아니라, 발효특성도 부적절한 것으로 확인되었다.

다. 쌀당화액 발효에 적합한 균주 선발

*Bifidobacterium* spp.의 가장 우수한 균주 선발을 위하여 6시간마다 pH와 적정산도를 측정하였다. 균주별 pH는 초기 6.26에서 발효 6시간 후 4.75 - 4.98으로 감소하였으며 *Bifidobacterium* sp. FBD-28은 발효 30시간 이후, *Bifidobacterium* spp. FBD-13, 22, 27은 발효 36시간 이후 4.25이하로 감소하였다(Fig. 13).

적정 산도 역시 초기에는 균주별 차이를 보이지 않고 증가하며 36 - 42 시간 발효 후 급격한 산도의 증가를 나타내었다(Fig. 14). 실험 결과로부터 *Bifidobacterium* FBD-13, 22가 42시간 발효 후 pH가 3.74로 가장 낮았고 산도 역시 높아 0.2%이상의 값을 나타냈다.

*Bifidobacterium* sp. FBD-22의 접종량을 달리하여 pH를 측정한 결과는 Fig. 15과 같이 6시간 발효 후에 접종량이 많을수록 pH는 빠르게 감소하였으나 42시간 발효시에는 접종량별 차이가 없었다. 또한 pH의 감소는 24 - 42시간 발효시 급격히 감소하였다. 적정산도는 Fig. 16과 같이 0 - 30시간까지는 서서히 증가하며 30 - 42시간에서 급격한 산도의 증가를 나타냈고, 2% 접종한 실험구가 발효 42시간에 산도 0.235%로 가장 높은 값을 나타내어 다른 실험구에 비하여 우수한 것으로 나타났다. 이상의 결과 pH와 산도는 30 - 42시간에서 변화가 크게 일어나는 것을 확인하였고, 최적 발효시간은 42시간이 좋은 것으로 나타났다. 균주별로는 *Bifidobacterium* spp. FBD-13, 22의 pH와 산도의 변화가 두드러졌으며, 최적 접종량은 2%임을 알 수 있었다.

### 3. 사과박/쌀당화액 혼합물의 *Bifidobacterium* 발효특성

가. 사과박/쌀당화액 혼합물의 *Bifidobacterium* 발효를 위한 환원제 선발

*Bifidobacterium*의 성장을 촉진시키기 위해 환원제로 ascorbic acid와 cysteine을 생사과박과 쌀당화액 혼합물(40:60)에 각각 0.04% 가한 후에 100℃에서 가열 살균하여 냉각한 후 *Bifidobacterium* FBD-22를 2% 첨가하여 42시간 발효하면서 6시간

마다 pH와 산도를 측정된 결과, pH의 경우 cysteine을 사용하였을 때보다 ascorbic acid를 사용하였을 때 더욱 뚜렷이 감소하여 초기 4.17에서 3.62까지 감소하였다. 산도는 0 - 36시간까지 두 첨가구 모두 유사하게 증가하여 같은 값을 나타내었으나, 42시간에 ascorbic acid를 사용한 경우 cysteine을 사용한 경우보다 증가하였다. 위의 조건에서 제조한 사과박/쌀당화액 혼합물을 48시간동안 발효한 제품의 관능검사를 실시한 결과는 향미, 맛, 조직감, 종합적인 기호도 모든 항목에서 ascorbic acid를 사용한 것이 cysteine을 사용한 경우보다 우수하였다. 이상의 결과로 *Bifidobacterium*을 발효시키기 위한 혐기적 조건을 위하여 사용한 환원제는 ascorbic acid를 사용한 것이 cysteine을 사용한 것보다 모든 면에서 우수한 것으로 나타났다.

나. 사과박/쌀당화액 *Bifidobacterium*발효를 위한 균주 선발 및 혼합

비율 결정

사과박:쌀당화액 비율을 달리하여 혼합한 후 환원제를 첨가하고 *Bifidobacterium* spp. FBD-13, 22, 27, 28 를 2%수준으로 접종하여 48시간 발효 후 관능검사를 실시한 결과 향은 *Bifidobacterium* sp. FBD-27을 사용한 경우가 다른 균주보다 우수한 것으로 나타났으며, 맛과 종합적 기호도에서는 *Bifidobacterium* sp. FBD-22를 사용한 경우가 가장 우수하였다.

사과박 첨가량별 관능검사 결과 사과박:쌀당화액 비율 40:60을 사용한 것이 향, 맛, 조직감에서 가장 우수하였고 종합적 기호도는 사과박:쌀당화액 비율 10:90과 40:60이 비슷하게 우수하였다. 이상의 결과로 *Bifidobacterium* FBD-22, 27을 사용하는 것이 다른 균주를 사용하는 것보다 관능적으로 우수하며, 적정 사과박 첨가량은 40% (v/v)로 결정하였다.

## 제 6 절 사과박 건조 공정 및 건조사과박/쌀당화액 발효 시스템 개발

### 1. 사과박 건조기술 개발

#### 가. 사과박 건조특성

사과박의 건조기준 수분함량( $M_{d.b.}$ )은 5.70이었다. 사과박을 온도 70℃, 풍속 0.7 m/s의 조건에서 건조 중 건조시간별 수분함량의 변화는 건조시간 75분까지는 수분함량의 감소가 급격하였으나 75분이후의 수분함량의 감소는 완만하였다. 같은 건조조건에서 사과박의 수분비율(MR)은 역S자 형태로 감소하여 건조양상은 수분비율에 따라 항률건조, 감률건조 1단계, 감률건조 2단계 등 3단계로 나뉘어졌다. 이는 생사과박의 초기수분함량이 높아 건조초기에는 항률건조가 진행되거나 건조가 진행됨에 따라 당의 농축, 점성의 증가에 의해 심한 수축과 균열이 발생하며 표면경화현상이 복합적으로 일어나기 때문에 나타나는 현상으로 사료된다.

건조온도와 풍속을 달리하여 사과박을 건조하고  $MR = A \exp(-k \cdot t)$ 에 의거하여 구한 건조단계별 건조속도 상수 (k)값은 Table 26과 같이 감률건조 1단계에서의 k값이 가장 높았으며 건조온도 및 풍속이 증가할수록 높은 값을 보였다.

Table 26. Effects of air velocity and drying temperature on drying rate constants at different drying stages

Air velocity (m/s)	Drying temperature (°C)	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2$ (min <sup>-1</sup> )	$k_3$ (min <sup>-1</sup> )
0.3	40	0.0052	0.0172	0.0127
	50	0.0099	0.0322	0.0093
	60	0.0162	0.0557	0.0209
	70	0.0204	0.0273	0.0432
	80	0.0185	0.0647	0.0629
	90	0.0296	0.1108	0.0340
0.5	40	0.0104	0.0237	0.0237
	50	0.0128	0.0478	0.0157
	60	0.0153	0.0494	0.0186
	70	0.0189	0.0875	0.0245
	80	0.0248	0.0765	0.0241
	90	0.0303	0.1015	0.1015
0.7	40	0.0093	0.0294	0.0110
	50	0.0155	0.0407	0.0123
	60	0.0169	0.0456	0.0145
	70	0.0257	0.0578	0.0376
	80	0.0310	0.0998	0.0187
	90	0.0262	0.1146	0.0478

건조온도에 따른 각 건조구간별 건조속도상수를 Arrhenius식에 적합시킨 결과 직선으로 작도되었으며 직선의 기울기로부터 계산한 활성화 에너지는 Table 27과 같이 향를건조에서는 21.0 kJ/mol, 감를건조 1단계에서는 26.2 kJ/mol, 감를건조 2단계에서는 24.0 kJ/mol을 보여 감를건조 1단계에서의 온도의존성이 가장 큰 것으로 나타났다. 이러한 결과는 사과박의 건조에서 건조단계마다 수분이동기구가 달라지는 것을 시사한다.



Table 27. Activation energy of drying rate constant at air velocity  
0.7 m/s

Drying stage	Ea (kJ/mol)
1st stage	21.014
2nd stage	26.207
3rd stage	24.036

정 등<sup>10)</sup>의 사과 건조에 관한 연구 결과에서는 사과의 moisture content (d.b.)가 8.4 - 7.0에서 활성화에너지는 6.6 kJ/mol로 보고하여 본 실험에서 구한 사과박 건조 활성화에너지 21.0 - 26.2 kJ/mol과 큰 차이를 보였는데, 이는 사과는 조직이 다량의 수분을 함유하는 얇은 섬유질로 구성되며 다공성이기 때문에 사과박에 비하여 건조표면으로 수분이동에 대한 저항이 적기 때문으로 사료된다. 또한 건조속도 상수는 풍속에 따라  $k_2$ 와  $k_3$ 의 유의차는 없었으나 온도에 의한 유의차는 각 단계에서 확인되었다(Table 28).

Table 28. Duncan's multiple range test for drying rate constant of apple pomace

Effect	Means*		
	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_3$ ( $\text{min}^{-1}$ )
<hr/>			
Air velocity (m/s)			
0.7	0.02075 <sup>a</sup>	0.06463 <sup>a</sup>	0.02365 <sup>a</sup>
0.5	0.01874 <sup>ab</sup>	0.06441 <sup>a</sup>	0.02075 <sup>a</sup>
0.3	0.01665 <sup>b</sup>	0.05889 <sup>a</sup>	0.03051 <sup>a</sup>
<hr/>			
Drying temperature(°C)			
90	0.02870 <sup>a</sup>	0.10896 <sup>a</sup>	0.0409 <sup>a</sup>
80	0.02476 <sup>ab</sup>	0.08036 <sup>b</sup>	0.0353 <sup>a</sup>
70	0.02167 <sup>b</sup>	0.07266 <sup>b</sup>	0.0351 <sup>ab</sup>
60	0.01613 <sup>c</sup>	0.05023 <sup>c</sup>	0.0180 <sup>ab</sup>
50	0.01274 <sup>cd</sup>	0.04023 <sup>cd</sup>	0.0124 <sup>b</sup>
40	0.00829 <sup>d</sup>	0.02342 <sup>d</sup>	0.0118 <sup>b</sup>

\* Means of each effect with same letter in each column are not significantly different ( $\alpha = 0.05$ ).

#### 나. 사과박 건조조건 결정

건조에 소요된 시간은 Table 29와 같이 건조온도와 풍속에 따라 단축되었으며 가장 오랜 시간이 소요된 건조조건은 건조온도 40°C, 풍속 0.3 m/s로 10.3시간이 소요되었고 가장 짧은 시간이 소요된 건조조건은 건조온도 90°C, 풍속 0.7 m/s로 1.8시간

이 소요되었다.

Table 29. Drying time of apple pomace at different air velocity and drying temperature

(unit: hr)

Drying temperature (°C)	Air velocity (m/s)		
	0.3	0.5	0.7
90	2.8	1.8	1.8
80	3.3	2.8	2.3
70	3.5	3.5	2.5
60	5.0	5.3	4.8
50	8.0	6.3	5.5
40	10.3	7.0	7.0

건조 후 사과박의 L값을 측정한 결과는 L값은 온도가 증가할수록 증가하는 경향을 보이다가 건조온도 60 - 70℃를 정점으로 감소하였다. 풍속에 따른 변화는 60℃까지 0.5 > 0.7 > 0.3m/s 순으로 낮아지다가 70℃에서는 0.7 > 0.3 > 0.5m/s 순으로 낮아졌다. 이상의 결과를 토대로 사과박의 건조조건은 가장 높은 L값을 보인 건조온도 70℃, 풍속 70 m/s로 결정되었으며 건조시간은 2.5시간이 소요되었다.

## 2. 건조사과박/쌀당화액 *Bifidobacterium* 발효 시스템 개발

### 가. 쌀당화액 제조 공정 개발

건조 사과박을 쌀당화액에 혼합하여 *Bifidobacterium* 발효할 경우 사과박의 건조

중 갈변에 의한 설택 열화가 수반되므로 건조 사과박의 첨가량에는 한계가 있었으며, 따라서 건조사과박/쌀당화액 혼합물의 당도를 높일 필요가 있었다. 당도를 증가시키기 위한 쌀당화액의 제조공정을 확립하고자 효소 첨가량을 달리하여 당화시킨 결과는 환원당 함량을 기준으로 한 1% 효소용액 첨가량은 8.5%수준과 17%수준에서 당화시간에 따라 환원당량이 증가하였으며 25.5%실험구는 17% 경우보다도 환원당 생성능력이 감소하였다. 이상의 결과로부터 1% 효소용액 첨가량은 환원당 함량이 가장 높은 17% 수준이 적당하였으며 당도측정 결과 당화시간 60분 이후에는 일정한 수준으로 유지되어 당화조건은 60℃, 60분으로 결정하였다.

#### 나. 건조사과박/쌀당화액 혼합물의 발효

풍속 0.7 m/s, 온도 70℃에서 건조한 사과박을 분쇄하여 당화액에 0 - 5% 수준으로 첨가하여 발효한 제품의 특성을 조사한 결과는 Table 30과 같다. 발효음료의 당도는 발효 전과 발효 후 차이가 거의 없었으며 건조 사과박 첨가비율이 높을수록 발효물의 당도는 증가하였다. 산도는 발효 전 0.045 - 0.052%에서 발효 후에는 0.153%까지 증가하였으며, pH는 발효 전 4.40 - 6.08에서 발효 후 3.31 - 3.70으로 감소하였다. 비피더스의 생육은 사과박 첨가 비율 0 - 20%에서는 차이가 없었으나 첨가비율 2.5% 이상에서는 첨가비율이 높을수록 균수는 감소하였다. 건조사과박 1.6% 첨가구는  $1.36 \times 10^7$  CFU/ml 인데 반하여 5% 첨가구는  $6.48 \times 10^6$  CFU/ml로 나타나 비피더스의 생장은 건조 사과박 첨가비율이 낮은 실험구에서 더 좋은 활성을 보였다. 이상의 결과로부터 건조 사과박의 적정 첨가수준은 1.6 - 2.0%가 적당한 것으로 나타났다.

Table 30. Properties of fermented dry apple pomace/saccharified rice solution with respect to dry apple pomace addition level

Properties	Fermentation time (hr)	Dry apple pomace addition level (%)					
		0	1.6	2.0	2.5	3.3	5.0
Sweet-ness ( °Brix)	0	11.5	12.5	12.5	12.8	13.2	14.0
	42	11.6	12.5	12.6	13.0	13.4	14.2
TA (%)	0	0.045	0.046	0.048	0.049	0.051	0.052
	42	0.126	0.153	0.144	0.135	0.153	0.153
pH	0	6.08	5.04	4.79	4.75	4.57	4.40
	42	3.31	3.45	3.52	3.61	3.64	3.70
<i>Bifido-</i> <i>bacterium</i> number (CFU/ml)	0	4.8 $\times 10^4$	4.8 $\times 10^4$	4.8 $\times 10^4$	4.8 $\times 10^4$	4.8 $\times 10^4$	4.8 $\times 10^4$
	42	1.44 $\times 10^7$	1.36 $\times 10^7$	1.28 $\times 10^7$	7.16 $\times 10^6$	6.52 $\times 10^6$	6.48 $\times 10^6$

건조 사과박의 첨가수준을 결정하기 위하여 건조 사과박을 0 - 3.33% 수준으로 첨가하여 발효한 제품의 관능검사 결과 Table 31에서와 같이 색, 향, 맛, 조직감은 1.33 - 2.22%가 양호하였으며 전체적인 기호도에서 1.33 - 2.22%간의 유의차는 없었으나 1.67% 첨가한 것이 가장 높은 점수를 보여 건조 사과박의 적정 첨가수준은 1.67%로 결정되었다. 건조 사과박을 첨가하여 발효한 제품의 관능특성은 쌀당화액만을 발효한 경우보다 훨씬 우수하여 건조 사과박을 이용한 발효제품의 개발가능성을 확인하였다.

Table 31. Sensory score of *Bifidobacterium* fermented beverage with respect to dry apple pomace addition level

Sensory properties	Addition level (%)	Sensory score*
color	1.33	6.3 <sup>a</sup>
	1.67	5.7 <sup>ab</sup>
	2.22	5.3 <sup>ab</sup>
	0	3.9 <sup>b</sup>
	3.33	3.4 <sup>b</sup>
flavor	1.67	5.7 <sup>a</sup>
	1.33	5.1 <sup>a</sup>
	2.22	4.3 <sup>a</sup>
	3.33	2.4 <sup>b</sup>
	0	2.3 <sup>b</sup>
taste	2.22	4.6 <sup>a</sup>
	1.33	4.3 <sup>a</sup>
	1.67	4.2 <sup>a</sup>
	3.33	4.1 <sup>a</sup>
	0	2.3 <sup>b</sup>
mouthfeel	1.33	5.9 <sup>a</sup>
	1.67	4.7 <sup>ab</sup>
	2.22	4.7 <sup>ab</sup>
	0	4.1 <sup>ab</sup>
	3.33	3.3 <sup>b</sup>
overall	1.67	5.6 <sup>a</sup>
	1.33	5.2 <sup>a</sup>
	2.22	5.2 <sup>a</sup>
	3.33	3.1 <sup>b</sup>
	0	2.1 <sup>b</sup>

\*Scores with same letter are not significantly different ( $\alpha=0.05$ ).

건조사과박 첨가비율에 따른 발효 제품의 유동특성을 측정된 결과를 Hershel-Bulkley model ( $\tau = K(r)^n + \tau_y$ )에 의거하여 해석하고, 점조도지수 (K) 및 유동거동지수 (n)를 계산한 결과 Table 32와 같이 건조 사과박을 첨가하지 않은 실험 구에서는 K값이  $0.0177 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$  이었고, 사과박 첨가비율에 따라 증가하여 3.3%첨가구

에서는 1.2405 Pa · s<sup>n</sup> 이었다. 유동거동지수는 전 실험구에서 1.0 이하의 값을 보여 전단속도가 증가할수록 점도가 낮아지는 경향을 보이는 의가소성유체 (pseudoplastic fluid)에 속하였고 사과박 첨가비율에 따라 점도도 지수는 증가하며 의가소성이 뚜렷해졌다.

Table 32. Flow properties of *Bifidobacterium* fermented beverage with respect to dry apple pomace addition level

Addition level of dry apple pomace (%)	K (Pa · s <sup>n</sup> )	n	$\tau_y$ (Pa)
0	0.0177	0.7518	0.0309
1.33	0.2784	0.4515	0.0918
1.67	0.5396	0.3972	0.0927
2.22	1.1481	0.3852	0.0757
3.33	1.2405	0.3524	0.1404

#### 다. 생사과박과 건조사과박의 발효특성 비교

쌀당화액(SRS) 단독 또는 쌀당화액/사과박 혼합액에 *Bifidobacterium* spp. FBD-22, 27를 접종하여 발효시킨 결과 pH는 5.0 - 5.3에서 3.82 - 3.85로 낮아졌고, 산도는 0.06 - 0.12%에서 0.20%까지 증가하였으며, *Bifidobacterium*수는 10<sup>8</sup> CFU/ml 수준으로 나타났다. 관능검사결과 쌀당화액 (SRS) 단독으로 발효한 경우보다 사과박을 첨가하여 발효한 음료의 기호도가 높게 나타났으며 건조사과박 (DAP/SRS)을 이용한 음료가 생사과박 (WAP/SRS)을 이용한 경우보다 기호성이 우수하였다.

물질별, 균주별, 발효시간별 기호도를 평가한 결과는 Table 33과 같이 물질별로는 건조사과박을 첨가한 경우 기호도가 가장 우수하였으며 생사과박을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우는 유의차가 없었으나 건조사과박을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우와는 유의차가 있었다.

균주별로는 *Bifidobacterium* sp. FBD-22와 FBD-27간의 유의차가 있었으며, *Bifidobacterium* sp. FBD-22로 발효한 음료가 FBD-27로 발효한 음료보다 기호도가 높았다. 발효시간은 42시간 발효시 가장 좋은 기호도를 보였다. 발효 14시간과 28시간 사이에는 유의적인 차가 없었으나 14시간과 42시간 사이에는 유의적인 차이가 있었다. 따라서 비피더스 발효음료는 건조사과박을 첨가하여 *Bifidobacterium* sp. FBD-22를 접종하여 42시간 발효한 경우 관능적으로 가장 우수하였다.



Table 33. Overall quality score of *Bifidobacterium* fermented beverage with respect to materials, starters and fermentation time

Overall quality score*	
Materials	
SRS	5.883 <sup>d</sup>
SRS+WAP	6.556 <sup>d</sup>
SRS+DAP	7.944 <sup>a</sup>
Starters	
<i>Bifidobacterium</i> FBD-22	7.407 <sup>a</sup>
<i>Bifidobacterium</i> FBD-27	6.148 <sup>d</sup>
Fermentation time (hr)	
14	6.167 <sup>d</sup>
28	7.000 <sup>ad</sup>
42	7.167 <sup>a</sup>

\* Judged by 9 point scoring method.

Scores with same letter are not significantly different ( $\alpha=0.05$ ).

#### 라. *Bifidobacterium* 발효의 최적화

*Bifidobacterium* sp. FBD-22의 접종량(0.5, 1, 1.5, 2%)을 달리하여 발효시간(21, 28, 35, 42시간)별로 비피더스음료의 발효특성을 조사한 결과는 pH는 접종량에 따른 차이가 없었으며 발효 전 5.37에서 21시간 발효 후 3.84 - 4.41로 낮아졌고 발효시간 21시간 경과 후의 pH의 변화는 미미하였다. 산도는 발효시간에 따라 초기에는 접종량이 증가할수록 높은 값을 보였으나 28시간 이후에는 접종량에 따른 차이가 둔화되었으며 비피더스균수는 발효 35시간까지 증가하다 이후에 감소하는 경향을 보였으며 1.5%와 2%접종량은 유사한 결과를 보였다. 관능적 기호성은 접종량을 1.5%로 하여 28

시간 발효한 것이 높은 기호성을 보여 적정 균주 첨가량은 1.5%이었으며 발효시간은 28 - 35시간이 적당하였다.

## 제 7 절 사과박/쌀가루의 혼합건조에 의한 건조 효율

### 향상 및 건조물의 발효특성

쌀과 사과박을 이용한 비피더스 발효음료를 제조하여 기능성 음료로 활용하기 위해서는 사과박의 저장 및 년중 조달을 위하여 건조가 필요하다. 그러나 사과박을 단독으로 건조할 경우 표면경화에 의한 건조속도 저하가 수반되었다. 이러한 문제점을 해결하고자 사과박의 건조속도를 향상시키고 건조효율을 높이기 위하여 주원료인 쌀가루를 생사과박과 혼합하여 건조함으로써 쌀가루를 건조보조제로 활용하여 건조 효율을 향상시키는 기법을 개발하고 사과박/쌀가루 혼합물 (apple-pomace/rice-flour mixture; ARM)의 건조특성 및 발효특성을 조사하였다.

#### 1. 사과박/쌀가루 혼합물 (apple-pomace/rice-flour mixture; ARM)의 건조기술 개발

##### 가. ARM의 WAP (wet apple pomace) 첨가 비율 결정

사과박을 쌀당화액에 첨가하여 혼합발효한 결과를 토대로 WAP 첨가비율을 30 - 48%로 조절하여 쌀가루와 혼합하여 반죽을 만들고 두께 2 mm의 평판으로 성형하여 풍속 0.7 m/s, 온도 70℃에서 건조하였다. WAP 첨가비율에 따른 건조곡선은 WAP 첨가비율이 증가함에 따라 초기 건조속도는 높았으나 첨가비율은 건조 시간에 큰 영향을 미

치지 않았다. 그러나 WAP의 첨가 비율이 높은 경우는 건조가 진행됨에 따라 심한 수축 및 뒤틀림 현상이 관측되었고 그 정도는 첨가량이 클수록 심화되어 WAP의 적정 첨가비율을 42%로 결정하였다.

식품의 건조과정에서는 건조조건이 부적당하기 때문에 급격한 또는 불균일한 수축을 일으켜서 균열 및 변곡 등을 수반하여 제품의 품질을 손상시키는 경우가 많다.<sup>11,12)</sup> 이와 같은 수축은 재료의 종류, 시료의 채취부분 및 건조조건 등에 따라서 차이가 난다.<sup>13)</sup> 따라서 건조수축의 상태를 명확히 하므로써 건조기구해명이 뒷받침이 되는 것은 물론 건조 과정 중에 수축이 일어날 경우 건조조건을 조절한다던가 혹은 균일한 수축이 일어날 수 있게 하기 위해서 두께를 일정하게 하여 건조하는 것 등의 방안이 요구된다.<sup>14)</sup> Kilpatrick 등<sup>15)</sup>은 건조중 수축되는 정도는 탈수되어지는 물의 양에 비례한다고 하였으며 Yokoya 등<sup>16)</sup>도 유연한 조직을 가진 식품일수록 수축의 정도가 크다고 보고하였다.

근채류의 건조 및 수축특성을 조사한 조 등<sup>14)</sup>의 연구에서도 건조 중 근채류 (무, 고구마)는 탈수와 수축현상이 현저하고 두께가 얇을수록 수축이 많이 일어났으며 온도에 따른 영향은 적었다. Shinohara와 Wada<sup>17)</sup>는 건조시 수축은 70℃이하의 온도에서 건조하면 동일한 경향을 나타내지만 80℃이상의 온도에서는 수축이 훨씬 많이 이루어진다고 보고하였는데, 이는 본 연구에서 수행한 WAP첨가량을 달리한 ARM의 건조결과와 일치하는 것이었으며 결정된 ARM의 적정 건조온도(70℃)와 유사한 결과였다.

풍속을 0.4 - 1.2 m/s 범위에서 달리하여 무, 고구마 등 근채류를 건조하였을 경우 풍속이 0.4 m/s에서 1.2 m/s로 증가할 때 수축률의 증가량은 약 3 - 4% 정도로 큰 차이는 없었으며<sup>14)</sup> 건조속도에서 감률건조 2단계에서는 상대습도 및 풍속의 영향을 받지 않는다는 Brennan 등<sup>18)</sup>의 보고와 같이 건조 중 수축속도에 있어서도 감률건조 2단계 영역에서는 상대습도 및 풍속은 큰 영향을 미치지 못함을 보고하였다.

감률건조 1단계는 시료의 표면이 건조되어 건조속도가 감소함으로써 나타나는 구

간이고 감률건조 2단계는 표면에서 일어나던 증발면적이 고체내부로 이동하게 되어 더욱 건조속도가 떨어지며 이 기간에서의 건조속도는 고체 내부수분의 확산 속도에 의하여 지배되며 상대습도 및 풍속등의 외부요인에는 영향을 받지 않는 구간으로 보고되고 있다. 따라서 감률건조양상을 보이는 ARM 건조조건은 WAP 42%첨가시 70℃, 0.7m/s에서 가장 적절함을 확인하였고 이 조건은 WAP 단독 건조조건과도 일치하였다.

#### 나. ARM의 건조양상

사과박/쌀가루 혼합물 (ARM)의 건조과정 중 수분함량 감소에 따른 건조속도의 변화는 감률건조에 속하였다. ARM표면의 건조는 빠르게 진행되는 반면 ARM 내부로부터 표면으로의 수분 이동 속도는 낮아 내부수분의 표면이동에 의하여 건조속도가 지배되며 건조가 진행됨에 따라 수분 함량이 감소하여 건조속도가 직선적으로 감소하였다.

ARM의 두께별 건조곡선은 1 mm두께의 ARM이 동일한 건조 조건에서 수분 함량이 빠르게 낮아졌고 2 mm, 3 mm순으로 두께가 증가함에 따라 건조속도가 감소하였다.

ARM의 건조 중 수분비율 (MR)의 변화는 두께에 따라 두가지 형태로 구분되었다. 즉 두께 2 mm 이상의 경우는 감률건조 1단계와 2단계로 구분되었으나 두께 1 mm의 ARM은 1단계에서 건조가 완성되었다.

건조속도상수 (k)값은 Table 34와 같이 건조 온도에 따라 증가하였고 두께에 따라 감소하였으며 감률건조 2단계에서 큰 값을 나타내었다.

Table 34. Effects of drying temperature and thickness on drying rate constant of ARM\* during falling rate period  
(unit: min<sup>-1</sup>)

Drying temperature (°C)	Thickness (mm)					
	1		2		3	
	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>
40	0.041	-	0.025	0.056	0.017	0.047
50	0.058	-	0.039	0.065	0.022	0.047
60	0.067	-	0.041	0.057	0.041	0.046
70	0.104	-	0.049	0.066	0.027	0.046
80	0.113	-	0.061	0.076	0.036	0.065
90	0.130	-	0.066	0.079	0.040	0.071

\* apple-pomace/rice-flour mixture

\*\* 2nd stage of falling rate drying was not observed

건조속도 상수를 Arrhenius식에 의거하여 작도한 결과 건조 1단계에서의 건조속도는 온도변화에 민감하게 변화하였으나 2단계에서의 건조속도는 온도 변화에 덜 민감하게 반응하는 결과를 나타내었으며 ARM 두께별 건조단계별 활성화에너지는 Table 35와 같이 건조 1단계에서는 1 > 2 > 3 mm 순으로 활성화 에너지가 낮아졌으며 2단계에서는 두께 3 mm의 활성화에너지가 두께 2 mm인 경우에 비하여 큰 값을 보였다. 건조 1단계에서의 활성화에너지는 16.127 - 21.306 kJ/mol를 나타내었으며 건조 2단계에서는 6.281 - 7.889 kJ/mol의 값을 보여 건조 1단계에서 활성화에너지가 2단계보다 큰 값을 보였다. 또한 사과박만을 단독 건조한 활성화 에너지가 21.014 - 26.207 kJ/mol (Table 27)인데 반하여 ARM 건조의 활성화에너지는 6.281 - 21.306 kJ/mol로서 ARM

건조시 온도의 영향이 감소하여 건조가 용이해짐을 알 수 있었다.

Table 35. Effect of thickness on activation energy of drying of ARM\* at air velocity 0.7 m/s

(unit: kJ/mol)

Drying stage	Thickness (mm)		
	1	2	3
1st stage	21.306	17.448	16.127
2st stage	-	6.281	7.889

\* apple-pomace/rice-flour mixture

#### 다. ARM 최적 건조조건 결정

건조한 ARM(dried ARM: DARM)의 갈변도 (L값, a값)와 건조속도를 기준으로 최적 건조조건을 결정하기 위해 DARM을 분쇄한 후 L값과 a값을 측정하여 가장 높은 L값과 가장 낮은 a값을 나타내는 풍속과 건조온도, 두께를 결정하고 건조소요 시간을 조사하여 갈변을 최소화하면서 건조시간을 단축하는 효율적인 건조조건을 확립하였다.

DARM을 분쇄하여 색택을 측정한 결과 갈변도가 낮은(높은 L값, 낮은 a값) 풍속은 0.7 m/s이었으며 풍속 0.7 m/s에서 DARM의 L값과 a값은 Table 36과 같았으며 2 mm 두께로 건조온도 70°C에서 DARM이 가장 높은 L값과 가장 낮은 a값을 보여 가장 양호한 DARM을 획득할 수 있었다.

Table 36. Lightness and redness of dried ARM\*(DARM) at 0.7 m/s air velocity

Drying temperature (°C)	Thickness (mm)					
	1		2		3	
	L	a	L	a	L	a
40	81.64	0.08	83.39	0.19	82.96	1.21
50	80.79	0.27	84.28	0.07	85.10	0.14
60	83.01	0.02	83.66	-0.16	84.46	-0.03
70	84.13	-0.05	85.53	-0.33	82.70	0.71
80	83.59	-0.29	82.67	0.36	84.38	0.47
90	84.60	-0.37	83.01	0.53	81.75	1.13

\* apple-pomace/rice-flour mixture

ARM의 두께 및 건조온도에 따른 건조소요시간은 Table 37과 같이 건조온도가 높을수록 두께가 얇을수록 단축되었다. 최적 건조조건인 두께 2 mm, 풍속 0.7 m/s, 건조온도 70°C에서 ARM의 건조에 소요된 시간은 1.5시간이었으며 이는 사과박 (WAP)을 단독으로 건조한 경우 2.5시간에 비하여 1시간이 단축된 시간이었다.

Table 37. Drying time of ARM\* at 0.7m/s

(unit: hr)

Drying temperature (°C)	Thickness (mm)		
	1	2	3
90	0.8	1.3	1.8
80	1.0	1.5	2.0
70	1.0	1.5	2.5
60	1.5	2.0	2.8
50	1.5	2.0	2.8
40	1.8	2.5	3.3

\* apple-pomace/rice-flour mixture

ARM 열풍건조시 수분의 이동 메카니즘을 시간과 온도에 대한 함수로 적절하게 표현하기 위하여 회귀분석을 실시하여 얻은 모델의 계수 값은 ARM의 건조 온도 (x)에 따른 건조소요시간 (y)을 plot하여 회귀식을 구한 결과, 두께 3 mm의 경우  $y = 261.4 - 1.7x$  ( $r^2=0.952$ ), 2 mm의 경우  $y = 199.1 - 1.4x$  ( $r^2=0.954$ ), 1 mm의 경우  $y = 153 - 1.2x$  ( $r^2=0.933$ )이었다. 이를 이용하면 ARM의 열풍건조시의 건조온도에 따른 건조소요시간을 시료의 두께에 따라 계산할 수 있다.

## 2. 사과박/쌀가루 건조물 (dried apple-pomace/rice-flour mixture; DARM)의

### 발효 특성

건조한 ARM을 분쇄한 후 물을 첨가하여 발효를 위한 전처리를 행하였다. *Bifidobacterium* spp. FBD-22와 27를 1%씩 접종하여 37°C에서 16 - 48시간 발효시킨 후 pH, 산도, 비피더스균수의 변화를 측정된 결과 Table 38과 같았다. pH는 초기 4.52에서 3.68 - 3.86로 낮아졌으며, 산도는 0.176%에서 0.306 - 0.424%로 증가하였



고, 비피더스균수는 초기  $4.8 \times 10^6$  CFU/ml에서 32시간 발효 후  $2.0 \times 10^9$  CFU/ml으로 매우 높게 나타나 기능성음료 제조에 적합한 공정임을 확인하였다. *Bifidobacterium* 균주에 따른 발효물의 관능검사결과 *Bifidobacterium* spp. FBD-22와 27간의 유의차는 없었으며 발효시간은 32시간이 가장 양호하게 나타났다. 완성된 제품의 이름을 BFD(*Bifidobacterium* fermented dried ARM)라 명명하였다.

Table 38. Properties of *Bifidobacterium* fermented DARM\*

<i>Bifido- bacterium</i>	Ferment- ation time (hr)	pH	Titratable acidity (%)	Bifidus count (CFU/ml)	Overall sensory scores**
<i>Bif.</i> FBD-22	0	4.52	0.176	$4.8 \times 10^9$	4.8 <sup>b</sup>
	16	3.84	0.338	$1.5 \times 10^9$	5.8 <sup>a</sup>
	32	3.71	0.415	$2.0 \times 10^9$	6.7 <sup>a</sup>
	48	3.68	0.424	$1.4 \times 10^9$	6.7 <sup>a</sup>
<i>Bif.</i> FBD-27	0	4.52	0.176	$4.8 \times 10^9$	4.8 <sup>b</sup>
	16	3.86	0.337	$1.6 \times 10^9$	6.2 <sup>a</sup>
	32	3.83	0.343	$2.0 \times 10^9$	7.0 <sup>a</sup>
	48	3.81	0.306	$1.7 \times 10^9$	5.8 <sup>a</sup>

\* dried apple-pomace/rice-flour mixture

\*\* Scores with same letters are not significantly different at 0.05 level.

### 3. 사과박/쌀가루 건조물 (DARM)을 이용한 비피더스 발효음료

(*Bifidobacterium* fermented dried ARM: BFD) 제조 물질수지

사과박/쌀가루 건조물 (dried apple-pomace/rice-powder mixture: DARM)을 원료

로 한 *Bifidobacterium* 발효 음료 (BFD)의 생산을 위한 물질수지는 Fig. 8에서 보는 바와 같이 100 ml×10,000 bottles/day 규모로 생산하기 위해서는 쌀가루 151.9 kg 과 사과박 111.1 kg, 물 1007.8 kg, 0.1%  $\alpha$ -amylase 용액 200.2 kg, 0.1% glucoamylase 용액 200.2 kg, 비피더스 종균 15 kg이 소요되었다.

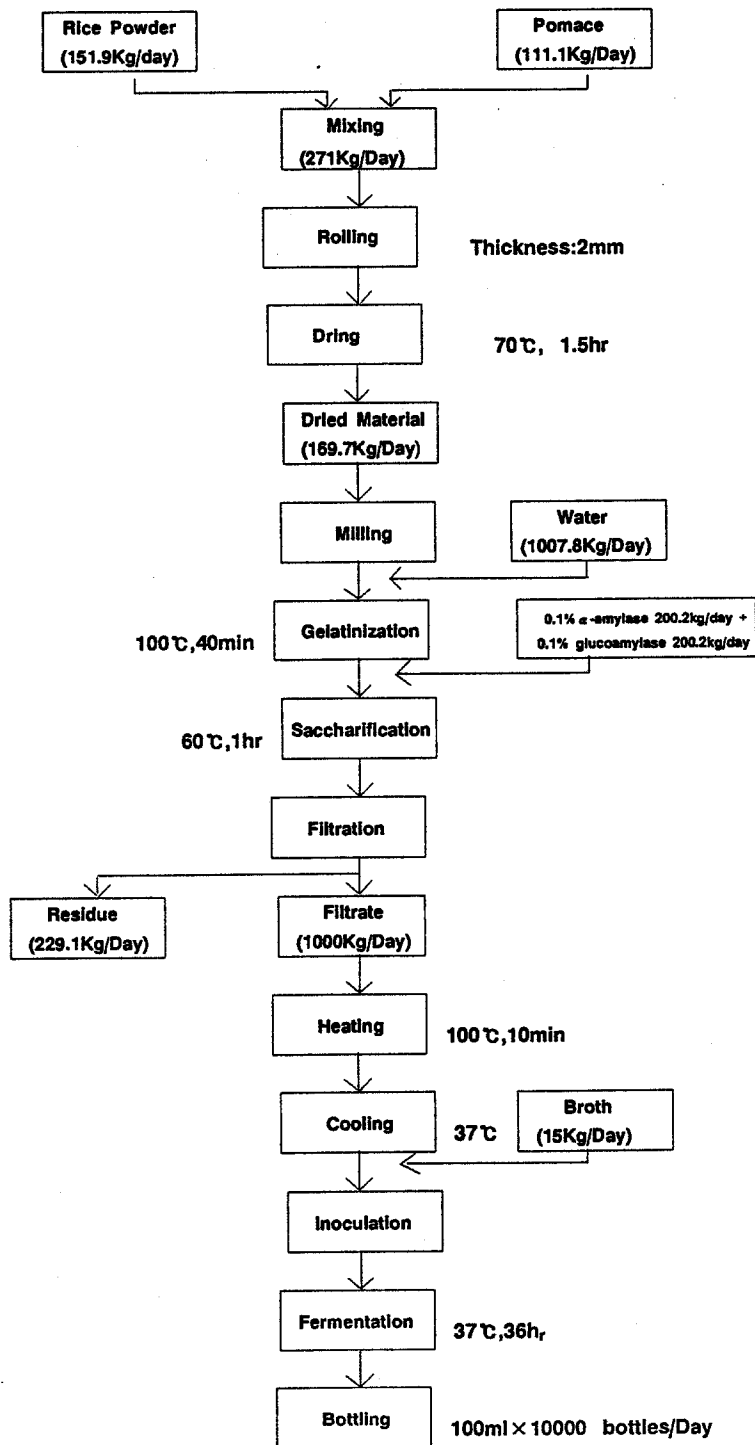


Figure 8. Material balance in *Bifidobacterium* fermented ARM(BFA) processing

## 제 8 절 *Bifidobacterium* 발효음료를 이용한 호상 쌀젖산발효물의 품질개선

쌀당화액을 *Bifidobacterium*으로 발효시킨 결과 향미성분을 보완할 필요가 있었으며 이를 위해 사과박 (WAP)을 첨가한 발효공정을 완성하였다. 완성된 *Bifidobacterium* 발효음료를 이용하여 목 등<sup>5)</sup>에 의하여 개발된 쌀젖산발효물의 기능성을 부여하고자 호상 쌀젖산발효물을 제조하여 *Bifidobacterium* 발효음료와 비율을 달리하여 혼합함으로써 기능성과 관능성의 향상을 도모하고 제품의 다양화를 시도하였다.

### 1. 쌀 젖산 발효

밥을 제조하고 0.3% (w/v)  $\alpha$ -amylase와 glucoamylase 효소액을 밥 중량의 75% 수준으로 첨가해 55℃에서 1시간동안 당화시킨 다음 균질화하였다. 균질화한 당화물을 95℃에서 30분간 가열처리함으로써 효소를 불활성화시킴과 동시에 살균한 다음 냉각 후 젖산균 스타터 (*Lactobacillus bulgaricus* (LB), *Streptococcus thermophilus* (TA))를 첨가하여 37℃에서 28시간동안 발효하였다.

젖산균의 첨가량 (LB+TA: 0.05+0.05=0.1%, 0.1+0.1=0.2%, 0.15+0.15=0.3%, 0.2+0.2=0.4%)을 달리하여 발효특성을 조사한 결과 pH는 접종량별 차이없이 24시간까지 빠르게 감소하며 42시간까지는 완만하게 감소하였다. 적정산도 측정결과는 pH에 비해 접종량별 차이가 있었으며 젖산균 첨가량은 0.3%가 적당하였다.

### 2. *Bifidobacterium* 발효

주관연구기관에서 새로 선발한 *Bifidobacterium* spp. FBD-35, 37, 50, 54의 발효특성을 조사하기 위하여 당화액에 1.67%의 건조사과박을 첨가하고 4가지 균주를 1.5%씩

접종하여 37℃에서 36시간 동안 발효하여 특성을 조사한 결과 pH는 FBD-35 균주를 접종한 경우 발효 전 5.39에서 12시간 이후 5.01로 낮아지며 36시간발효 후에는 3.72로 균주 중에서 가장 낮은 값을 나타내었으나 FBD-35를 제외한 FBD-37, 50, 54 균주는 pH 저하를 관측할 수 없었다. 적정산도 역시 pH 측정 결과와 유사하게 FBD-35균주를 접종한 경우에만 뚜렷하게 산도가 증가하였다.

*Bifidobacterium*수를 조사한 결과 FBD-35가  $10^8$  CFU/ml으로 가장 높은 *Bifidobacterium* 성장율을 보였으며 나머지 균주들은  $10^6$  CFU/ml 수준으로 이에 미치지 못하였다. 이는 FBD-35를 제외한 나머지 균주들이 산소에 아주 민감하기 때문으로 판단되며 산소에 노출시 성장능력이 저하되는 균주들은 *Bifidobacterium* 음료 제조시 부적절하여 이용을 지양하였다.

pH, 산생성능, 생균수 등 발효특성이 가장 우수한 것으로 평가된 *Bifidobacterium* sp. FBD-35를 이용하여 쌀당화액 (saccharified rice solution; SRS)에 사과박 (wet apple pomace; WAP) 첨가비율을 달리하여 발효한 제품의 pH와 산도를 측정한 결과 Table 39와 같이 WAP:SRS = 1:2에서 가장 우수하였다.

Table 39. Properties of *Bifidobacterium* sp. FBD-35 fermented WAP:SRS with respect to mixing ratio

Properties	Fermentation time (hr)	WAP:SRS (w:w)		
		1:1.5	1:2	1:2.5
pH	0	5.23	5.23	5.23
	48	4.53	4.43	4.67
TA (%)	0	0.07	0.07	0.07
	48	0.11	0.18	0.13

### 3. 젖산발효물과 비피더스발효물과의 혼합

*Bifidobacterium*과 *L. acidophilus* 또는 *S. thermophilus* 균주를 혼합배양하여 당근 발효한 박 등<sup>8)</sup>의 연구결과는 혼합배양에서 *Bifidobacterium* 균수가 감소함을 보고하였다. 특히 배양 시간이 경과함에 따라서 *L. acidophilus*와의 혼합배양에서 *Bifidobacterium*이 현저히 사멸하는 것으로 나타나 내산성이 강한 *Bifidobacterium* 균주를 선발할 필요성을 보고하였다. 젖산균과 혼합배양에 따른 *B. bifidum*의 성장에 관한 연구결과에서도 *B. bifidum*, *L. acidophilus* 및 *S. thermophilus*를 혼합배양하였을 때 *S. thermophilus*의 빠른 성장에 의해 배양초기에 배지내의 pH가 4.8이하로 급격히 떨어지므로 *Bifidobacteria*가 성장하는데 불리한 조건으로 작용하였다.<sup>19)</sup>

따라서 본 연구에서 혼합발효는 젖산균과 비피더스균 발효공정을 각각 분리하여 수행함으로써 혼합배양시 발생할 수 있는 상호 부반응을 억제하였다.

가. 쌀젖산발효물 (LFR)과 *Bifidobacterium*발효한 WAP/SRS (BFW)의

혼합제품 (LFR/BFW)

사과박을 당화액에 (WAP:SRS=1:2)비율로 첨가하여 *Bifidobacterium sp.* FBD-35로 48시간 발효시킨 발효물(*Bifidobacterium* fermented WAP/SRS; BFW)과 젖산균을 첨가하여 16시간 발효 후 균질화시킨 호상 쌀젖산발효물 (lactic acid fermented rice; LFR)의 발효시간별 특성을 조사하였다. BFW는 12시간마다 LFR은 4시간마다 발효물의 특성을 조사한 결과 Table 40과 같이 pH는 BFW가 초기 4.52에서 48시간 발효 후 3.75로 감소하였고 LFR은 초기 6.23에서 16시간 발효 후 4.03으로 감소하였다. 적정산도는 BFW의 경우 발효 전 0.063%에서 48시간 발효 후 0.090%로 LFR은 발효 전 0.032%에서 16시간 발효 후 0.094%로 증가하였다.

Table 40. Properties of BFW and LFR before mixing

BFW*			LFR**		
Fermentation time (hr)	pH	TA (%)	Fermentation time (hr)	pH	TA (%)
0	4.52	0.063	0	6.23	0.032
12	3.96	0.072	4	5.39	0.045
24	3.95	0.081	8	4.96	0.072
36	3.91	0.090	12	4.44	0.081
48	3.75	0.090	16	4.03	0.094

\* *Bifidobacterium* fermented WAP/SRS

\*\* Lactic acid fermented rice

BFW와 LFR의 혼합은 호상발효유의 점도를 기준으로 하여 LFR:BFW 혼합비율 (1:1,

2:1, 4:1)을 조절하였고 특성을 조사한 결과 Table 41과 같이 혼합비율별로 뚜렷한 차이는 없었으나 관능특성에서 LFR:BFW=4:1에서 가장 좋은 결과를 보였으며 완성 제품을 LFR/BFW로 명명하였다.

Table 41. Properties of LFR:BFW\* mixture with respect to mixing ratio

Properties	LFR:BFW (w:w)		
	1:1	2:1	4:1
pH	3.67	3.77	3.68
TA (%)	0.45	0.45	0.47
Lactic acid bacteria (CFU/ml)	$9 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$	$2.1 \times 10^7$
<i>Bifidobacterium</i> (CFU/ml)	$5.3 \times 10^6$	$4.95 \times 10^6$	$5.1 \times 10^6$

\* LFR: lactic acid fermented rice

BFW: *Bifidobacterium* fermented WAP/SRS

나. 젖산발효한 사과박/쌀당화물 (LFW)과 *Bifidobacterium* 발효한

쌀당화액 (BFS)과의 혼합제품 (LFW/BFS)

사과박(WAP):쌀당화물 (SR) 혼합비율을 0.5:1, 1:1, 1.5:1, 2:1로 조절하고 혼합하여 젖산발효한 사과박/쌀발효물 (lactic acid fermented WAP/saccharified rice; LFW)의 혼합비율별 발효특성을 조사한 결과 pH, 산도, 젖산균수에서 WAP:SR 0.5:1이 가장 우수하였다.



비피더스발효한 쌀당화액 (*Bifidobacterium* fermented saccharified rice solution: BFS)은 *Bifidobacterium* sp. FBD-35를 쌀당화액에 접종하여 48시간동안 발효시켜 제조하였다. 혼합하기 전 BFS와 LFW의 특성은 Table 42와 같이 BFS의 pH는 4.37, 산도는 0.045%이었으며 LFW의 pH는 4.09, 산도는 0.271%로 쌀발효물에 사과박을 첨가함으로써 젖산발효시 산생성능이 향상됨을 알 수 있었다.

Table 42. Properties of BFS and LFW before mixing

BFS*			LFW**		
Fermentation time (hr)	pH	TA (%)	Fermentation time (hr)	pH	TA (%)
0	4.95	0.018	0	4.58	0.090
12	4.44	0.036	4	4.47	0.153
24	4.44	0.036	8	4.43	0.258
36	4.38	0.040	12	4.43	0.270
48	4.37	0.045	16	4.09	0.271

\* *Bifidobacterium* fermented saccharified rice solution

\*\* Lactic acid fermented WAP/saccharified rice

LFW:BFS의 혼합비율에 따른 관능특성은 LFW:BFS=4:1에서 가장 양호한 맛, 조식감, 기호도를 나타내어 적정 혼합비율로 결정되었으며 혼합제품을 LFW/BFS라 명명하였다.

한편 LFW/BFS의 관능특성과 LFR/BFW를 비교하면 Table 43과 같이 LFW/BFS가 약간 더 우수한 것으로 나타나 사과박을 첨가하여 쌀젖산발효물을 제조하여

*Bifidobacterium* 발효한 쌀당화액과 혼합하는 것이 사과박을 첨가하여 *Bifidobacterium* 발효한 쌀당화액을 쌀젖산발효물에 첨가하는 경우보다 *Bifidobacterium*의 성장환경과 관능적인 면을 고려할 때 더욱 유용한 공정으로 판단되었다.

Table 43. Comparison of sensory scores of LFW/BFS and LFR/BFW

Products*	Mixing ratio	Overall score
LFW/BFS	4:1	7.00
	2:1	5.36
	1:1	5.09
LFR/BFW	4:1	6.91
	2:1	4.73
	1:1	5.27

\*LFW: Lactic acid fermented WAP/saccharified rice

BFS: *Bifidobacterium* fermented SRS

LFR: Lactic acid fermented saccharified rice

BFW: *Bifidobacterium* fermented WAP/SRS

#### 4. 혼합 제품의 제조를 위한 물질수지

가. *Bifidobacterium* 발효한 WAP/SRS (BFW)의 쌀젖산발효물 (LFR)과의 혼합제품 (LFR/BFW) 물질수지

LFR/BFW 100 ml × 10,000 bottles/day 규모의 생산을 위한 물질수지는 Fig. 9와 같다. 쌀젖산 발효 공정에서 쌀 311.28 kg/day을 원료로 하여 발효시켰을 경우 얻어지는 젖산 발효물 (LFR)은 800 kg/day이었으며, 이때 젖산균 스타터는 LB와 TA 각각 4.67 kg이 소요된다. 비피더스발효에서 당화액 130.72 kg/day과 사과박 65.36

kg/day을 원료로 하여 발효한 경우 *Bifidobacterium* 종균(FBD-35)은 3.92 kg이 소요되며 비피더스 발효물 (BFW)의 수득량은 200 kg/day이었다. 각각 발효한 두 발효물을 혼합하고 균질화하여 LFR/BFW 100 ml×10,000 bottles/day을 생산할 수 있다.

나. *Bifidobacterium*발효한 쌀당화액 (BFS)과 젖산발효한 사과박/쌀당화물

(LFW)의 혼합제품 (LFW/BFS) 물질수지

사과박을 쌀당화물에 첨가하여 젖산 발효한 중간제품 (LFW)에 *Bifidobacterium*발효한 쌀당화액 (BFS)을 혼합한 제품 (LFW/BFS)의 100 ml×10,000 bottles/day 규모의 생산을 위한 물질수지는 Fig. 10과 같이 쌀 224.09 kg/day을 원료로 하고 사과박을 224.09 kg/day첨가하여 젖산균 스타터 (LB와 TA 각각 3.36 kg)로 발효시킨 발효물 (LFW)의 생산량은 800 kg/day였으며 당화액 196.08 kg/day을 *Bifidobacterium* 종균 (FBD-35 3.92 kg)으로 발효시킨 발효물 (BFS)의 생산량은 200 kg/day였다. 두 발효물을 균질화하여 얻어진 최종산물은 LFW/BFS 100 ml×10,000 bottles/day이었다.

## 제 9 절 개발제품의 생산공정 lay-out

앞의 제 3절에서 개발한 BFD(*Bifidobacterium* fermented dried ARM), 제4절에서 개발한 LFR/BFW 및 LFW/BFS의 100 ml×10,000 bottles/day 규모의 생산을 위한 공정의 lay-out은 각각 Fig. 11, 12, 13와 같다.

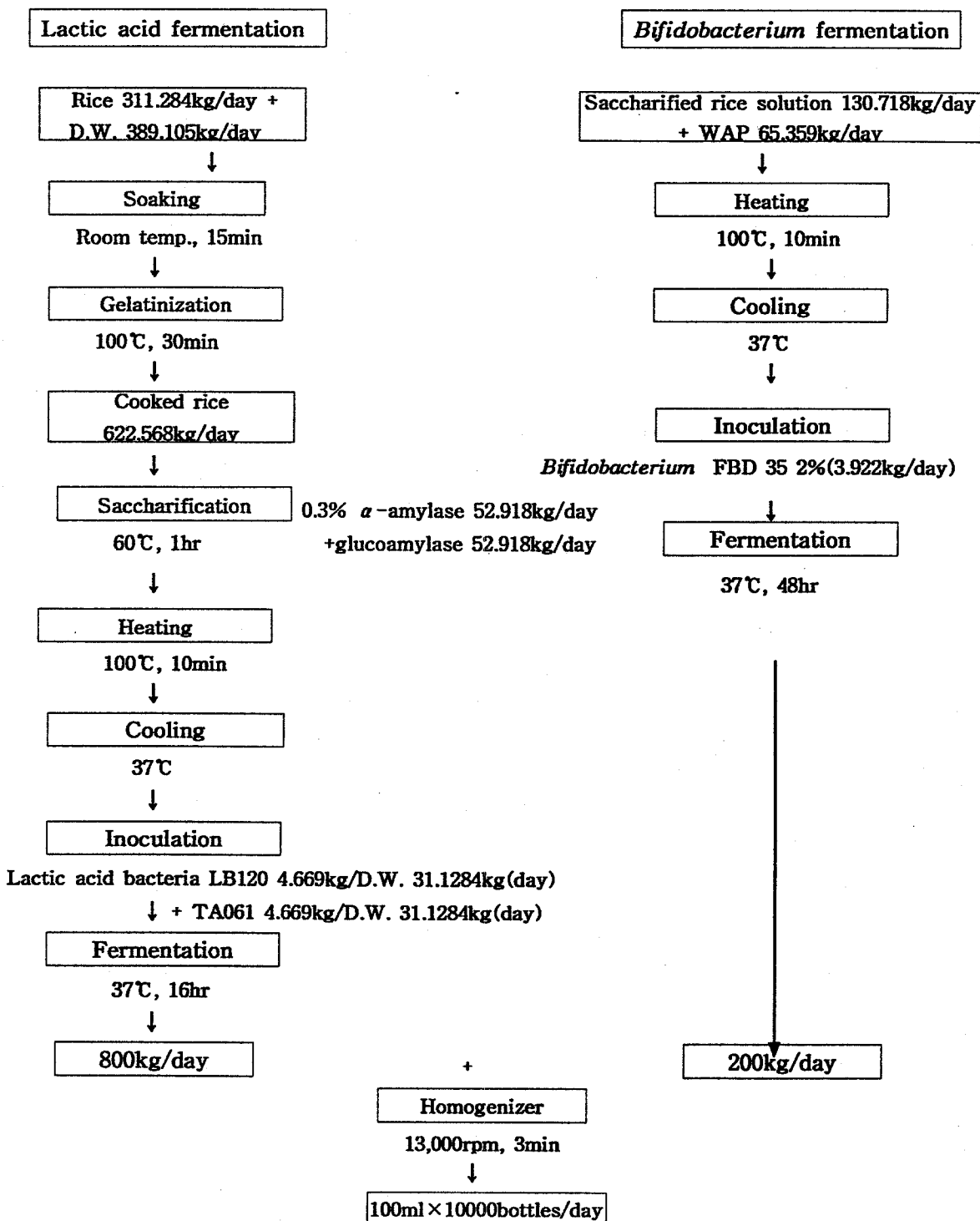


Figure 9. Material balance in LFR/BFW processing

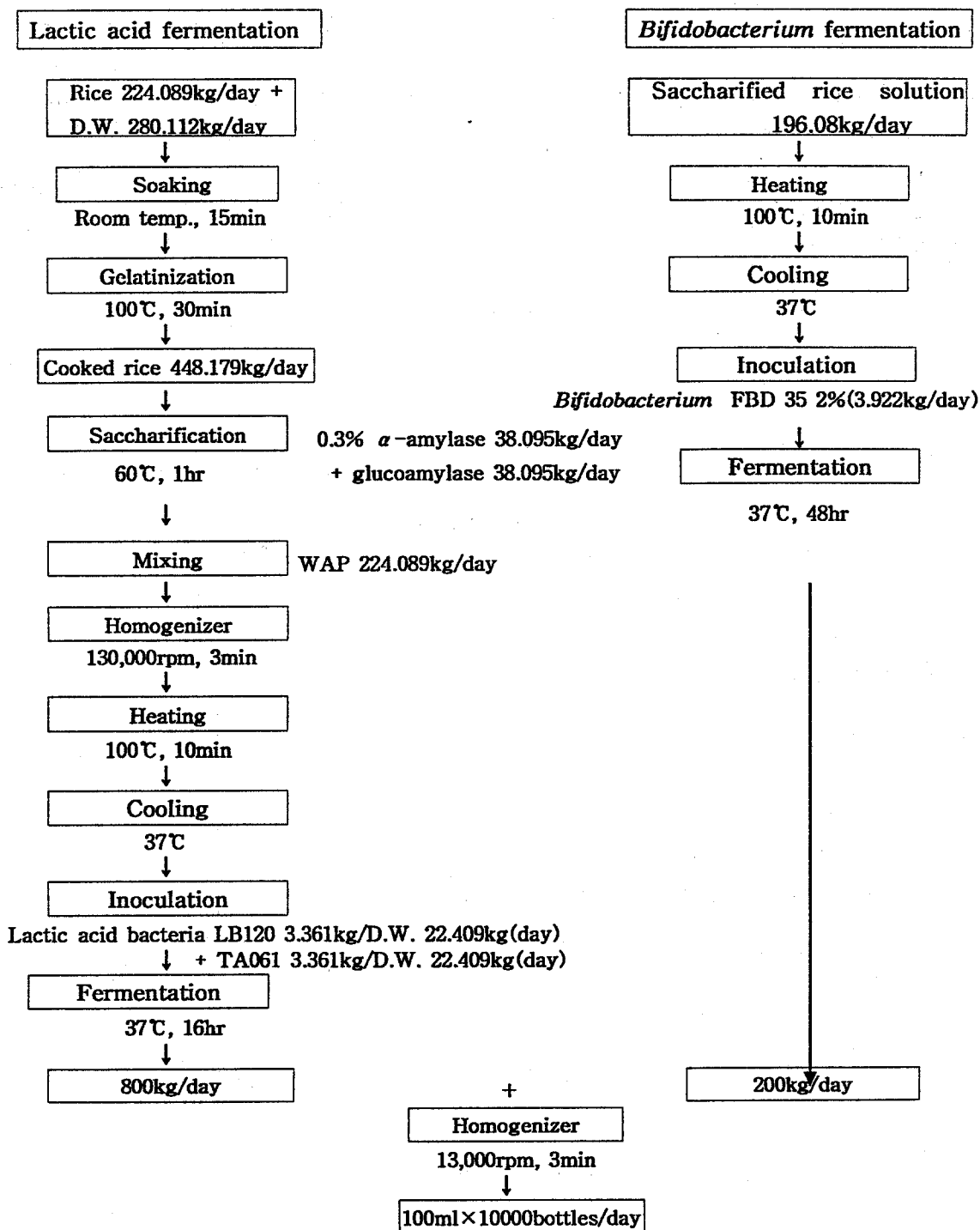


Figure 10. material balance in LFW/BFS processing

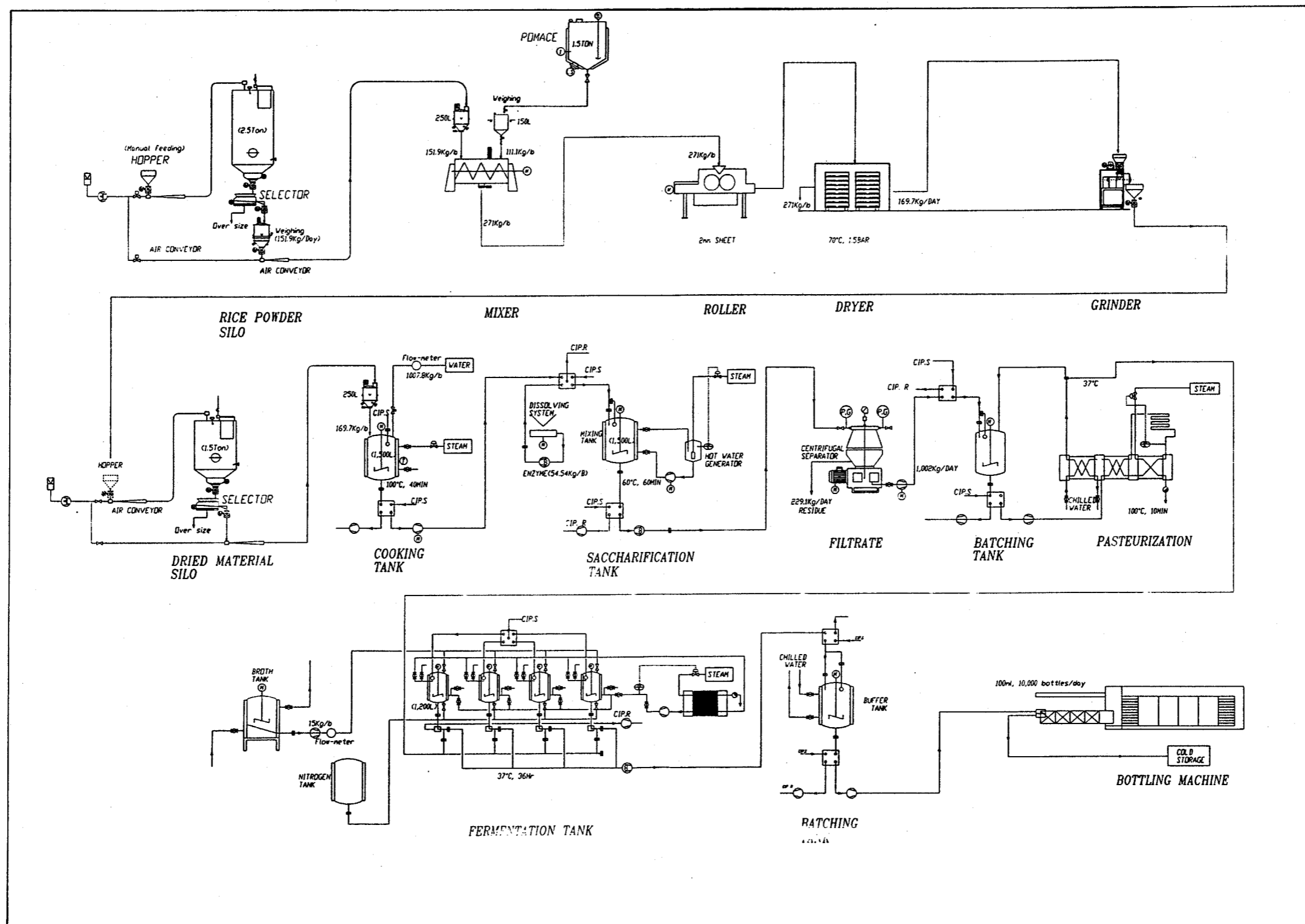


Figure 11. Process lay-out of *Bifidobacterium* fermented DARM(BFD)

**여 백**

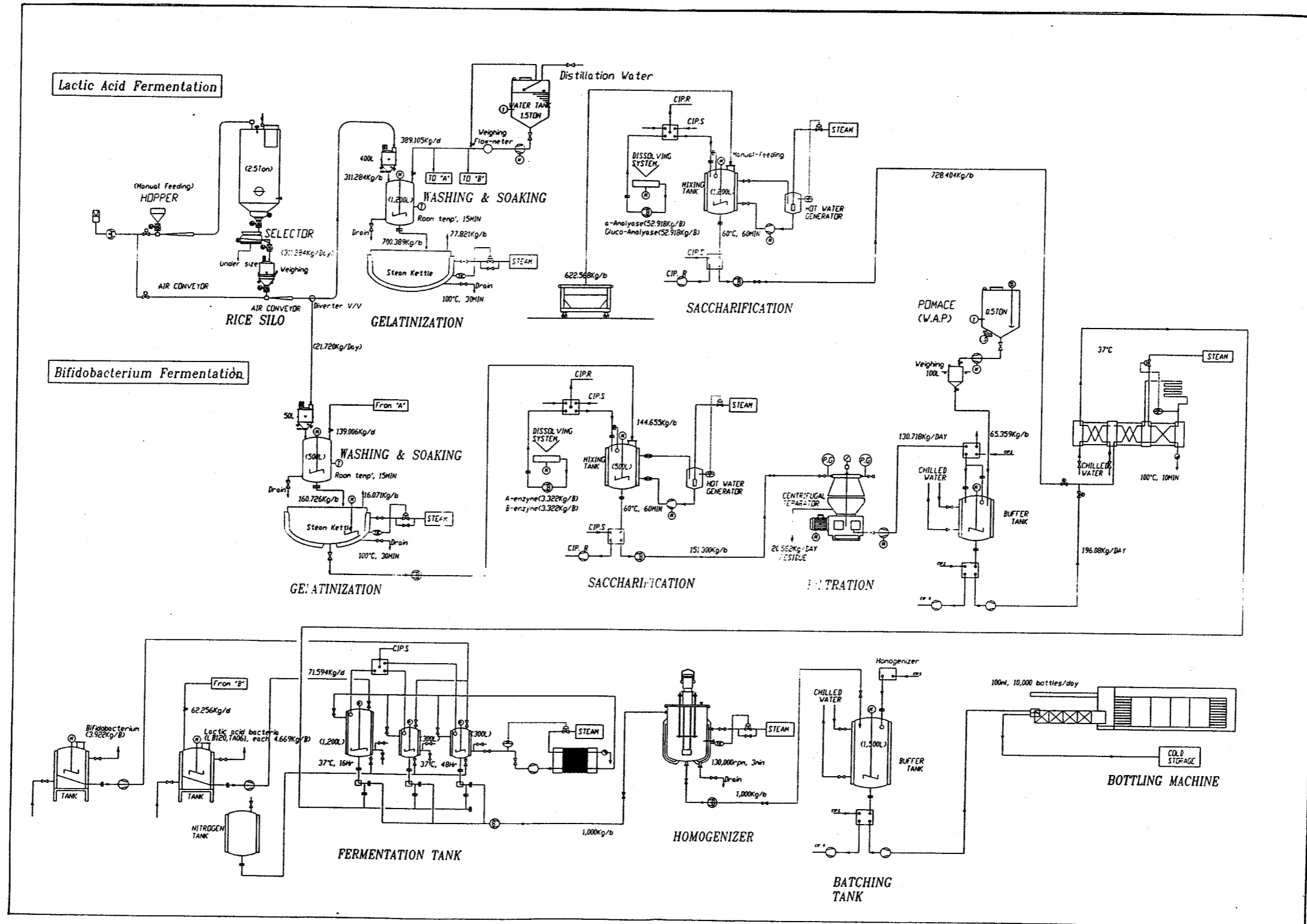


Figure 12. Process lay-out of LFR/BFW



여 백

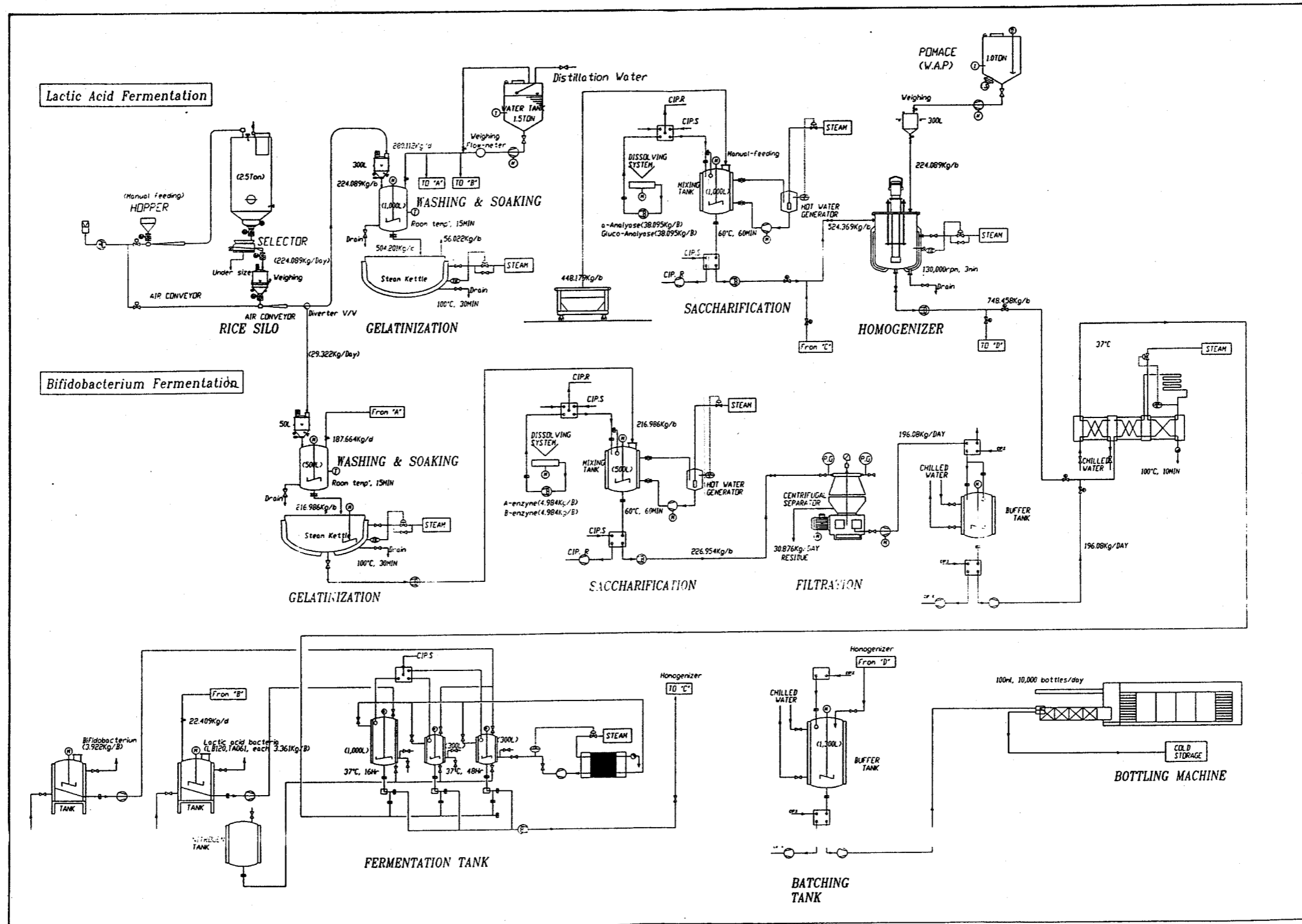


Figure 13. Process lay-out LFW/BFS

여 백

## 제 4 장 참고문헌

1. Jung, H.G.: Study on growth properties and characterization of factors affecting the aerobiosis of aerotolerant *Bifidobacteria*. Ph. D. Thesis, Sungkyunkwan Univ., Korea. (1993)
2. Seppo salminen atte von wright: Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc (1993)
3. Shimamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miakawa, H., Yaeshima, T., Araya, T. and Tomita, M.: Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J. Dairy Sci.*, **75**:3296 (1992)
4. 강국희, 허경희: 비피더스균과 올리고당. 유한문화사 (1994)
5. Mok, C., Han, J., Kim, Y.J., Kim, N., Kwon, D.Y. and Nam, Y.J.: Lactic acid fermentation of rice and quality improvement by amylolytic enzyme treatment during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**(6):739 (1991)
6. 주현규, 조광연, 박충균, 조규성, 채수규, 마상조: 식품분석법. 유림문화사 (1995)
7. SAS Institute, Inc. SAS User's Guide: Statistics, version 5 edition, SAS Institute Inc, Cary, NC, U.S.A. (1985)
8. Park, S.-Y., Ko, Y.-T., Lee, J.Y., Mok, C., Park, J.H. and Ji, G.-E. : Fermentation of carrot juice by *Bifidobacterium* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**:571 (1997)
9. Park, H.K. and Heo, T.R.: Effect of culture conditions on the growth characteristics and survival of *Bifidobacterium breve* (in Korean) *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**:451 (1996)

10. Jung, S.-K., Choi, Y.-H., Shon, T.-H. and Choi, J.-U.: The drying characteristics of apples at various drying conditions. *Korean J. Food Sci. Technol*, **18**(1):61 (1986)
11. Kamei, S. and Toweil, R.: Studies on drying shrinkage. *J. Soc. Chem. Mach. Japan*, **16**(11):372 (1952)
12. 木村進: 體積收縮と表面硬化. 乾燥食品事典, 朝倉書店, 東京 p.168 (1984)
13. 保坂秀明: 食品工學入門. 化學工業社, 東京 p.144 (1972)
14. Cho, D.-J., Hur, J.-W. and Kim, H.-Y.: Influencing factors in drying and shrinking characteristics of root vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol*, **21**(2):203 (1989)
15. Kilpartrick, P.W., Lowe, E. and Van arsdel, W.B.: Tunnel dehydrators for fruit and vegetables. *Advances in food research*, **6**:359 (1955)
16. Yokoya, K.: On the drying shrinkage of Miyabe. *J. Soc. Agr. Che. Japan*, **51**(5):281 (1977)
17. Shinohara, H. and Wada, M.: Air drying of sweet potatoes *J. Soc. Chem. Eng. Japan*, **19**(11):568 (1955)
18. Brennan, J.G., Butter, J.R., Cowell, N.D. and Lilly, A.E.: Food engineering operations. Applied science Pub. Ltd. London, p.318 (1976)
19. Lim, K.S., Huh, C.S. and Back, Y.J.: Studies on the growth of *Bifidobacterium bifidum* HY-8108 in Milk (in Korean). *Korean J. Dairy Sci.* **12**:172 (1990)