

# 김치 유래 유산균을 이용한 단호박 발효음료 제조 기술 개발

노현지 · 김기은\*  
서경대학교 생물공학과

## Fermentation of *Cucurbita maxima* Extracts with Microorganisms from Kimchi

Hyun-Ji Roh and Gi-Eun Kim\*

Department of Biotechnology, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea.

**Abstract** 19 strains, which could be identified as *Lactobacillus* sp. were isolated. The *Cucurbita maxima* has been known as a traditional healthy food and variable positive effects on the human body were already reported. In this study we tried to develop a production process for a healthy fermented drink with *Cucurbita maxima* and strains originated from Kimchi. Many kinds of *lactobacilli* species existed in the fermented food cannot survive in the acidic conditions in the stomach. So we tried to search and select a strain, which can arrive to the small intestine. A species of a *Lactobacillus* named as C332 was identified as *Lactobacillus plantarum* and selected for the fermentation process. With the treatment with artificial gastric juice and artificial bile the survival rate of the cells could be calculated. The physiological characteristics at the variable conditions have been tested. After fermentation process the sensoric tests on the product with panels were tried. The most of the cells could survive in the acidic conditions and facultative anaerobe. Especially some antibacterial effects against *E.coli* were also found. With all kinds of the results from our research the fermented *Cucurbita maxima* drink can be a successful item in the market.

**Keywords:** Kimchi, *Lactobacillus plantarum*, *Cucurbita maxima*, resistance of acid

### 서 론

한국의 김치는 세계적으로 알려진 대표적인 채소발효 식품으로 거의 모든 채소가 김치의 원료로 사용될 수 있다.(1) 김치는 배추나 무등 다양한 향신료를 첨가하여 일정시간 발효시킨 것이다(2). 김치의 독특한 맛은 발효과정에 작용하는 미생물과 발효결과 생긴 부산물에 의해 나타나는 맛이다. 발효에 참여하는 미생물 중에는 젖산균이 있다. 젖산균은 유산균제에 이용되거나, 그 대사산물들을 인체의 영양강화 또는 생리활성기능 촉진에 이용할 수 있음이 연구 되었다(3, 4).

근래에는 probiotics라는 기능적인 측면에서 유산균이 주목을 받고 있다. Probiotics는 살아있는 균주를 섭취하는 것이라 잔류 및 내성문제를 해결할 수 있는 항박테리

아제로 성장촉진 등의 효과를 나타내는 신생 성장촉진제라 할 수 있다(5, 6, 7).

또한, 참살이 열풍으로 인하여 건강보조식품에 대한 관심이 증가하면서 자연식품이나 이를 이용한 발효음식에 대해 사람들이 재평가하기 시작했다. 건강기능성식품의 대표적인 원료인 단호박은 오래전부터 한국인에게 친숙한 식량자원이다. 단호박은 다른 과채류에 비해 까다롭지 않은 기후조건을 가지고, 뿌리의 발달이 좋으므로 다른 작물의 재배가 곤란한 척박한 토양에서도 잘 자란다(8). 단호박은 최근 들어 늙은 호박보다 카로테노이드의 함량이 10 배 이상 높으며, 건강기능성의 중요한 지표가 되는 항산화 특성은 단호박이 늙은호박보다 전자공여작용, 아질산염 소거작용 등이 더 높게 나왔다(9). 호박의 이용과 관련하여 호박 꿀차(10), 고구마와 호박을 첨가한 요구르트 제조 연구(11), 호박식초(12), 호박떡(13), 호박첨가수프(14), 호박양생제조(15)등이 보고되었다. 그러나 호박분말 첨가가 아닌 단호박 자체를 기질로 사용한 발효음료나 유산균을 김치에서 분리하여 사용한 발효음료는 개발이 되어 있지

### \*Corresponding author

Tel: +82-2-940-7154, Fax: +82-2-919-0345  
e-mail: gkeun@skuniv.ac.kr

않다. 따라서 본 연구는 단호박의 소비 수율을 증가시키고 단호박의 식품 영양학적 가치를 그대로 가진 새로운 유산균 발효 음료를 개발하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 김치에서 유산균 분리

유산균은 서울지역의 일반가정에서 담근 김치에서 분리하였으며 김치는 담근지 35일된 김치이다. 김치는 김치냉장고에서 보관하였으며, 총 3종의 김치를 시료로 사용하여 분리 하였다. 분리 및 배양에 사용된 배지는 MRS agar 또는 broth(Proteose Peptone No.3 10.0 g, Beef Extract 10.0 g, Yeast extract 5.0 g, Dextrose 10.0 g, Polysorbate 80 1.0 g, Ammonium Citrate 2.0 g, Sodium Acetate 5.0 g, Magnesium Sulfate 0.1 g, Manganese Sulfate 0.05 g, Dipotassium Phosphate 2.0 g, Distilled Water 1.0 L/Difco)이다. 분리된 유산균은 액체배지에 접종하여 36°C shaking incubator에서 rpm 120으로 48시간 배양시킨 후 4°C에서 보관하며 종균으로 사용하였다. 종균냉동보관은 glycerol을 처리하여 -80°C에서 3개월마다 계대하였다. 균은 인공위액과 인공담즙산에서 살아남은 1종을 최종적으로 실험에 사용하였고, 이는 C332라 명명하였다.

### 인공위액에 대한 내산성균주 분리

인공위액은 Kobayashi 등의 방법에 따라 1 N HCl을 사용하여 pH2.5로 조정된 MRS broth에 pepsin 1%를 첨가하여 사용하였다(16). 김치에서 분리된 유산균을 36°C MRS broth에서 24시간 배양시킨 후 15 ml tube에 넣고 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 상등액을 버리고 균을 회수하였다. 회수된 균에 상등액과 동일한 양의 인공위액을 넣은 후 36°C shaking incubator에서 2시간 배양한 후 10<sup>-3</sup>배 희석하여 MRS agar배지에 0.5 ml 도말하여 36°C 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정 하였다. 대조균은 pepsin을 첨가하지 않고 pH를 맞추지 않은 broth를 이용 하였다. 대조균의 희석은 10<sup>-5</sup>배를 하였다.

인공위액에 대한 내산성균주 분리 시 사용된 시약은 0.45 µm의 membrane filter에 거른 후 사용하였다.

### 인공담즙산에 대한 내성균주 분리

인공담즙액은 broth 배지에 10%의 oxgall (Difco) stock solution을 1%만큼 첨가하여 사용하였다(16). 김치에서 분리된 유산균을 36°C MRS broth에서 24시간 배양시킨 후 15 ml tube에 넣고 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 상등액을 버리고 균을 회수하였다. 회수된 균은 인공위액을 상등액 만큼 넣어 36°C shaking incubator에서

2시간 배양한 후 10<sup>-3</sup>배 희석하여 MRS agar배지에 0.5 ml 도말하여 36°C 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정 하였다. 대조균은 10%의 oxgall을 넣지 않은 broth를 사용하였다. 대조균의 희석은 10<sup>-5</sup>배를 하였다.

인공담즙액산에 대한 내성균주 분리시 사용된 시약은 0.45 µm의 membrane filter에 거른 후 사용하였다.

### 단호박 배지 제조

국내산 단호박은 신토자 품종으로 2007년 10월에 경기도 양평에서 수확된 것으로 서울 경동시장에서 구입하였다. 단호박은 구입 후 분리 및 세척하여 초저온 냉동고(-80°C)에 보관하면서 사용하였다. 배지 제조는 과피 부분과 과육 그리고 씨 부분으로 나누었으며 과피 및 과육을 잘게 썰고 (1cm이하) 씨는 반으로 잘라 플라스크에 넣은 후 60°C에서 1시간 증탕하였다. 증탕한 배지는 거름종이로 거른 후 멸균하여 사용하였다. 광밀도와 glucose value, pH 등 생육학적 특성에 이용된 배지는 거름종이로 거른 후 0.45 µm의 membrane filter에 거른 후 배지로 사용하였다.

### 분리된 유산균의 호기적 및 혐기적 배양 비교

분리된 유산균을 단호박 50 ml broth 배지에 접종하고 CO<sub>2</sub> 가스를 주입하였다. 이후 플라스크를 마개로 막은 후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 1일간 배양하며, 2시간별로 관찰하였다. 대조균으로 사용하기 위하여 분리된 유산균을 단호박 50 ml broth 배지에 접종하고 CO<sub>2</sub> 가스를 주입하지 않았다. 변화를 관찰하기 위하여 광밀도 (optical density)와 glucose 량, pH를 분석하였다. 광밀도는 660 nm에서 측정하였으며 glucose는 Glucose kit를 사용하여 측정하였다. 효소용액 3.0 ml에 측정할 검체와 맹검을 0.02 ml 넣고 36°C에서 5분간 증탕한 후 맹검을 대조구로 하여 파장 505 nm에서 측정하였다. 맹검은 증류수를 사용하였다. 단호박 배지는 0.45 µm membrane filter로 거른 후 사용하였다.

### 유산균 단호박 배지 발효물의 항균활성 측정

*E.coli* k12를 LB broth에 배양하여 LB agar 5 ml가 도포된 배지에 *E.coli*를 0.15 ml 도말하였다. 그 다음 단호박 배지 0.45 µm에 거른 발효물을 묻힌 paper disk를 말린 후 plate에 올려놓았다. 이후 36°C incubator에서 18시간 배양한 후 결과를 관찰하였다.

### pH, 적정산도 및 생균수의 측정

pH값의 측정은 pH-meter를 사용하여 측정하였고 적정산도는 단호박 발효배지 중 17.6 ml를 덜어낸 다음 증류수 17.6 ml를 더하여 총 볼륨 35.2 ml를 만든 후 phenolphthalein용액을 2-3적 가하였다. 0.1 N NaOH용

액을 적정하여 30초 동안 분홍빛이 사라지지 않을 때 까지 사용된 NaOH용액의 양으로 계산하였다.

생균수 측정은  $10^{-4}$ 배를 0.9% 식염수에 희석한 다음 MRS agar배지에 0.5 ml를 도말 한 후 36°C의 배양기에서 48시간 배양하였다. 이후 콜로니를 계수하여 희석배수를 곱하여 1 ml중의 생균수를 측정하였다.

### 16s rRNA Full Sequencing

동정된 균주들 중 활성이 가장 좋은 균주를 취하여 16s rRNA full sequencing을 하였다. 16s rRNA full sequencing을 한 결과를 rRNA database (NCBI : national center for biotechnology information, RDP : ribosomal database project, ERD : European ribosomal RNA database)와 비교하여 대상 미생물이 어떤 종류의 미생물이 분리 되었는지 확인하였다.

### 농도별, 발효시간별 단호박 발효음료의 관능검사

단호박 배지를 농도별로 10, 20, 30%를 만들어 발효시켰다. 무게는 wet weight를 이용하여 구하였다. 발효시간 별로 12, 24, 36, 48시간동안 발효를 시켰다. 이렇게 만들어진 발효음료는 15°C로 냉각하여 5점 평점법 (매우 좋음 5점, 좋음 4점, 보통 3점, 나쁨 2점, 매우 나쁨 1점)으로 평가하였다. 유의성 검정은 패널과 시료별로 점수의 합계를 계산한 뒤 분산분석 방법으로 하였다. 관능평가 요원은 의사소통이 가능하고, 단맛, 신맛, 짠맛, 쓴맛과 향을 구분 할 줄 아는 대학생 및 대학원생 13명으로 구성하였다.

### 저장성 평가

발효가 끝난 단호박 음료를 밀폐 시킨 후 4°C의 냉장고에 보관하여 3일 간격으로 생균수와 pH 그리고 산도를 측정하였다. 이상의 모든 측정치는 3회 반복 실시하여 평균값으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 김치에서 유산균 분리

김치에서 유산균으로 추정되는 균주 19종을 분리 하였다. 이들을 배양하며 발효물의 pH가 pH 4를 넘어가는 균들은 실험에서 제외하여 총 3종을 분리하였다. 이 후 인공위액과 인공담즙산에서 살아남은 1종을 분리하였고, 이를 C332라 칭하였다.

### 인공위액에 대한 내산성균주 분리

유산균을 건강음료로 사용하기 위해서는 유산균이 대부분

죽는 위에서 위산을 견딜 수 있는 내산성이 요구된다. 최종적으로 선별된 3종 중 2종은 사멸하였고 C332라 명한 1종만이 살아남았다. C332를  $10^{-3}$ 배 희석하여 MRS agar배지에 0.5 ml도말하여 37°C 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정 하였다. 생균수 측정결과  $1.66 \times 10^5$  CFU/ml개를 셀 수 있었다. 대조군 배지에서 자란 균은  $10^{-5}$ 배 희석하여 MRS agar배지에 0.5ml도말하여 36°C 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수 측정한 결과  $1.22 \times 10^8$  CFU/ml개였다. 인공위액에서 유산균의 일부 사멸이 관찰되었다.

### 인공담즙산에 대한 내성균주 분리

내산성 유산균이 위산에 살아남았다 하여도 위를 통과하여 장으로 오게 되면 음식을 중성화 하는 과정에서 담즙산을 만나게 된다. 담즙산은 유산균을 사멸시키는 또 다른 변수이며 이 담즙산도 통과해야 장에 유산균이 살아서 도달 할 수 있다. 이 실험은 인공위액에서 살아남은 유산균을 가지고 실험 하였다. 10%의 oxgall을 broth 배지에 첨가하여 균을 배양한 후 배양된 균을  $10^{-3}$ 배 희석하여 MRS agar배지에 0.5 ml도말하여 36°C 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정 하였다. 생균수 측정결과  $1.486 \times 10^6$  CFU/ml개를 셀 수 있었다. 대조군은 인공위액에서 나온 결과를 그대로 사용하였다. 인공위액 실험이나 인공담즙산 실험이나 대조군으로 사용되는 것은 아무것도 첨가하지 않은 MRS broth를 사용하였기 때문이다. 대조군 보다는 생균수가 적지만, 10%의 oxgall배지에서도 C332 유산균이 살아남는 것으로 관찰되었다.

### 분리된 유산균의 호기적 및 혐기적 배양 비교

본 연구는 단호박 발효 음료이기에 이제 단호박 배지를 이용하여 실험을 하였다. 앞에서 내산성과 담즙내성 균주를 분리한 유산균을 이용하여 단호박 배지에 접종하였다.

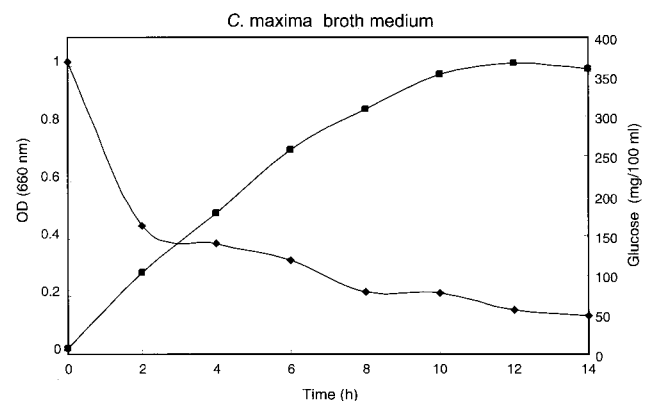


Fig. 1. Growth of strain C332 in the medium made of *C. maxima* extract. OD (■) and glucose concentration (◆) during C332 cultivation.

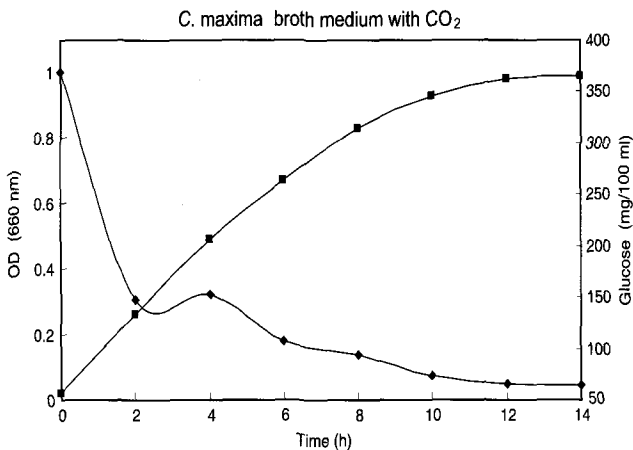


Fig. 2. Growth of strain C332 in the medium with CO<sub>2</sub> gas made of *C. maxima* extract. OD (■) and glucose concentration (◆) during C332 cultivation.

단호박 배지를 호기적과 혐기적으로 배양시켜 둘을 비교해 보았다(Fig. 1, Fig. 2). 호기적 배양보다 혐기적 배양에서 초기균체의 성장속도나 최종 밀도에서 더 높은 수치를 나타냈으나 수치적 차이는 미미하였다. 김치에서 분리된 C332의 미생물은 통성혐기성 미생물임을 확인할 수 있었으며 발효음료의 대량 생산적 측면에서 보았을 때 호기적 미생물이 혐기적 미생물보다 배양시 비용이 덜 소요되는 점을 감안할 때, 산업적으로도 유용한 균주로 판단할 수 있다.

**유산균 단호박배지 발효물의 항균활성 측정**

약 18시간 배양 후 대장균에 대한 저해성을 확인하였다. 유산균이 최종적으로 머무를 곳은 사람의 대장이다.

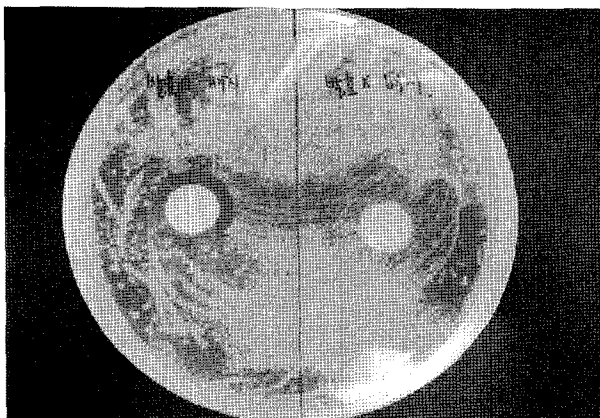


Fig. 3. Inhibitory effect of fermented extract of *C. maxima* on *E. coli*.

대장에서의 대장균제어는 유산균의 가장 중요한 역할이고, 유산균발효음료가 의약품이 아닌 기능성식품의 종류인 음료이기 때문에 다른 병원성 미생물에 대한 성장저해 효과

는 실험에서 배제하였다. 실험결과 대장균이 도포된 plate에서 단호박 배지 발효물을 묻힌 paper disk를 중심으로 지름 14 mm의 클리어존이 생성된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 발효되지 않은 단호박 배지를 묻힌 paper disk에서는 클리어존이 형성되지 않았다. 이것으로 보아 대장균에 대한 항균활성은 유산균 단호박 배지 발효물의 낮은 pH에 의한 것이라 추측되었다.

**pH, 적정산도 및 생균수의 측정**

pH값은 pH-meter기를 사용하여 측정하였다. 단호박 배지가 MRS배지보다 시작 pH가 더 낮은 것으로 관찰되었다. 이 중 단호박 배지에 CO<sub>2</sub>가 첨가 된 것은 CO<sub>2</sub>에 의해 시작 pH가 더 낮아진 것으로 생각된다. MRS에서도 CO<sub>2</sub>첨가가 약간의 시작 pH 수치 저하가 있었지만, MRS 배지 자체의 완충작용으로 인해 단호박 배지보다는 pH의 변화가 덜 한 것으로 나타났다. MRS배지에서는 미생물이 만들어내는 산으로 인해 pH 4.1까지 떨어졌고 단호박 배지는 pH 3.8까지 떨어졌다. 결과는 Fig. 4에 나타내었다.

산도측정은 phenolphthalein용액을 2~3적을 가하여 색깔의 변화로 측정하였으며, 여기에 사용된 계산식은 다음과 같다.

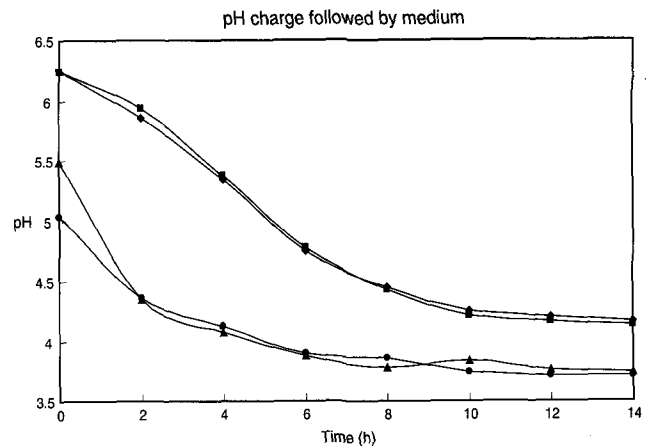


Fig. 4. pH variation of MRS on *C. maxima* extract under CO<sub>2</sub> atmosphere. MRS (◆), MRS with CO<sub>2</sub> (■), *C. maxima* (▲), *C. maxima* with CO<sub>2</sub> (●) during C332 cultivation.

$$\text{적정산도 (\%)} = \frac{0.1N \text{ NaOH 적정량 (ml)} \times 0.009}{\text{시료무게 (g)}} \times 100 \tag{17}$$

Table 1. pH charge, titration acidity, CFU according to the aerobic and anaerobic conditions

C332	Original pH	Titrateable acidity as lactic acid (%)	Viable cells (CFU/ml)
Aerobic	3.89	1.34	1.11×10 <sup>8</sup>
Anaerobic	3.80	1.41	1.12×10 <sup>8</sup>

이렇게 나타난 적정산도는 혐기적 배양의 경우 1.41%이다. 생균수는 호기적배양의 경우  $1.11 \times 10^8$  CFU/ml이며 혐기적배양의 경우  $1.12 \times 10^8$  CFU/ml이다. 결과는 Table 1에 나타나 있다.

### 16rs RNA Full Sequencing

위 실험을 통하여 최종적으로 분리된 균 C332에 대한 16r RNA Full Sequencing을 하여 균주 동정을 실시하였다. 그 결과 C332는 *Lactobacillus plantarum*의 확률이 99%로 동정되었다(Fig. 5).

```
Lineage:
Results for Query Sequence: J, 1384 unique oligos

no rank Root (20) (match sequences)
domain Bacteria (20)
phylum Firmicutes (20)
class "Bacilli" (20)
order "Lactobacillales" (20)
family Lactobacillaceae (20)
genus Lactobacillus (20)
S000539959 not_calculated 0.991 1311 Lactobacillus plantarum; DSM 13273; AJ965487
S000638380 not_calculated 0.990 1298 uncultured bacterium; E590; DQ327080
S000941690 not_calculated 0.985 1447 Lactobacillus plantarum; NRIC 0384; AB362653
S000941691 not_calculated 0.985 1447 Lactobacillus plantarum; NRIC 0385; AB362654
S000941692 not_calculated 0.985 1447 Lactobacillus plantarum; NRIC 0386; AB362655
S000941693 not_calculated 0.985 1447 Lactobacillus plantarum; NRIC 0387; AB362656
S000941695 not_calculated 0.985 1451 Lactobacillus pentosus; NRIC 0391; AB362658
S000941697 not_calculated 0.985 1432 Lactobacillus pentosus; NRIC 0394; AB362660
S000941698 not_calculated 0.985 1436 Lactobacillus pentosus; NRIC 0395; AB362661
S000941699 not_calculated 0.985 1440 Lactobacillus pentosus; NRIC 0396; AB362662
S000941700 not_calculated 0.985 1451 Lactobacillus pentosus; NRIC 0397; AB362663
S000941701 not_calculated 0.985 1447 Lactobacillus pentosus; NRIC 0398; AB362664
S000941702 not_calculated 0.985 1447 Lactobacillus pentosus; NRIC 0399; AB362665
S000941703 not_calculated 0.985 1447 Lactobacillus pentosus; NRIC 0400; AB362666
S000941705 not_calculated 0.985 1433 Lactobacillus pentosus; NRIC 0404; AB362668
S000941706 not_calculated 0.985 1440 Lactobacillus pentosus; NRIC 0405; AB362669
S000941707 not_calculated 0.985 1437 Lactobacillus pentosus; NRIC 0406; AB362670
S000941708 not_calculated 0.985 1435 Lactobacillus pentosus; NRIC 0407; AB362671
S000941709 not_calculated 0.985 1438 Lactobacillus pentosus; NRIC 0408; AB362672
S000941710 not_calculated 0.985 1436 Lactobacillus pentosus; NRIC 0409; AB362673
```

Fig. 5. Comparison 16r RNA Full Sequencing result to RNA databases (NCBI, RDP, and ERRD).

### 농도별, 발효시간별 단호박 발효음료의 관능검사

단호박의 농도별, 발효시간별로 관능적 차이가 있는지 검사를 하였다. 이 실험은 어느 농도와 어느 발효시간이 가장 좋은 것인지 판단한 실험은 아니므로 차후 기호도 또는 선호도 검사가 진행되어야 할 것이다. 결과 및 통계 분석에 사용된 수식은 다음과 같다.

자유도

$$\text{시간 간 자유도} = \text{시료수} - 1 = 12 - 1 = 11$$

$$\text{패널 간 자유도} = \text{패널수} - 1 = 13 - 1 = 12$$

$$\text{오차에 대한 자유도} = \text{총 자유도} - (\text{시료간 자유도} + \text{패널 간 자유도}) = 155 - (11 + 12) = 132$$

$$\text{총 자유도} = \text{총 검사 횟수} - 1 = 156 - 1 = 155$$

제곱합

$$\text{수정계수 (CF, correction factor)} = (\text{총합계})^2 / \text{총 검사횟수} = (384)^2 / 156 = 945.2$$

$$\text{시료 간 제곱합} = (\text{각 시료에 대한 합} / \text{각 시료에 대한 검사 횟수}) - \text{CF} = \{(38^2 + 39^2 + 32^2 \cdot \cdot \cdot + 23^2) / 13\} - 945.2 = 54.0$$

$$\text{패널 간 제곱합} = (\text{각 시료에 대한 합} / \text{각 패널에 대한 검사 횟수}) - \text{CF} = \{(26^2 + 19^2 + 34^2 \cdot \cdot \cdot + 29^2) / 12\} - 945.2 = 24.5$$

$$\text{총 제곱합} = (\text{검사에서 얻은 모든 값에 대해 가가의 값을 제곱하여 얻은 값}) - \text{CF} = \{(4^2 + 3^2 \cdot \cdot \cdot + 2^2) / 12\} - 945.2 = 196.8$$

$$\text{오차의 제곱합} = \text{총 제곱합} - (\text{시료 간 제곱합} + \text{패널 간 제곱합}) = 196.8 - (54.0 + 24.5) = 196.8 - 78.5 = 118.3$$

평균제곱

$$\text{시료 간 평균제곱} = \text{시료 간 제곱합} / \text{시료의 자유도} = 54.0 / 11 = 4.9$$

$$\text{패널 간 평균제곱} = \text{패널 간 제곱합} / \text{패널의 자유도} = 24.5 / 12 = 2.0$$

$$\text{오차의 평균제곱} = \text{오차의 제곱합} / \text{오차의 자유도} = 118.3 / 132 = 0.9$$

F값 (분산비)

$$\text{시료 간 F값} = \text{시료 간 평균제곱} / \text{오차의 평균제곱} = 4.9 / 0.9 = 5.5$$

$$\text{패널 간 F값} = \text{패널 간 평균제곱} / \text{오차의 평균제곱} = 2.0 / 0.9 = 2.2$$

위와 같은 계산법(18)을 이용하여 각각 구하여진 값으로 분산분석표를 완성하였다(Table 2).

기준이 되는 F값은 엑셀 함수 FINV를 이용하여 유의수

Table 2. Effects of *C. maxima* extract concentration and incubation time on taste of *C. maxima* fermentation drink beverage

factor	degree of freedom	sums of squares	mean square	F value
treatment (sample)	11	54.0	4.9	5.5
panel	12	24.5	2.0	2.2
error	132	118.3	0.9	
total	155	196.8		

준 5%에 해당하는 1.86값을 구하였다. 시료의 F값은 5.5이며, 기준이 되는 F값은 1.86 이므로 시료의 F값이 기준값보다 크므로 유의수준 5%에서 단호박 발효음료는 농도별 발효시간별로 서로 다른 특성의 차이를 보인다고 볼 수가 있다. 정확한 최적 농도와 발효시간별 최적 발효는 기호도 또는 선호도 검사를 차후에 진행해 확인해야 한다.

### 저장성 평가

발효가 완료된 단호박 발효음료의 저장성을 알아보기 위해 4°C에서 보관하면서 생균수와 pH, 산도를 측정하였다. 결과는 Table 3에 나타내었다. 변화를 관찰하는 12일 동안 별다른 특이사항은 감지되지 않았다. 생균수는 저장 6일째 되는 날부터 약간의 감소를 보이기 시작했다. 산도는 저장 기간 동안 약간 증가하는 경향을 보였으며, pH도 약간 떨어지는 경향을 보였다. 우리나라의 경우 호상요구르트(총 젖산균 수는  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml)이여야 한다는 것에 감안할 때(19), 저장하는 12일 동안 기준치를 상회하는 유산균수를 볼 때, 단호박 발효음료의 저장성은 우수하다고 할 수 있다.

**Table 3.** During the 12days deposit in 4°C, CFU, pH, change of acidity

	0 day	3 day	6 day	9 day	12 day
colony count (CFU/ml)	$1.18 \times 10^8$	$1.18 \times 10^8$	$1.17 \times 10^8$	$1.15 \times 10^8$	$1.15 \times 10^8$
pH	3.89	3.72	3.62	3.62	3.61
acidity	1.34	1.39	1.41	1.42	1.42

### 고 찰

유산균을 건강음료로 사용하기 위해서는 유산균이 대부분 죽는 위에서 위산을 견딜 수 있는 내산성이 요구되므로, 최종적으로 선별된 3종 중 생존한 C332를 발효음료제조개발에 사용하였다.

내산성 유산균이 위산에서 생존하여도 위를 통과하여 장으로 오게 되면 음식물을 중성화 하는 과정에서 담즙산을 만나게 된다. 담즙산은 유산균을 사멸시키는 또 다른 변수이므로, 담즙산에 대한 반응 테스트에서 C332는 생존하였다.

본 연구는 호박발효 음료이기에 이제 호박배지를 이용하여 실험을 하였다. 앞에서 내산성과 담즙내성 유산균을 배양한 결과 C332는 통성혐기성임을 확인하였으며, 발효음료의 대량 생산적 측면에서 보았을 때 호기적 미생물이 혐기적 미생물보다 배양시 비용이 덜 소요되는 점을 감안할 때, 산업적으로도 유용한 균주로 판단할 수 있다.

대장균에 대한 항균성은 실험을 통해 확인하였다. 대장에서 대장균제어는 유산균의 중요한 역할이므로, 장 건강 유지에 유용한 발효음료가 될 수 있을 것이며, 저장성 또한 우수할 것이다.

### 요 약

김치유래 유산균 단호박 발효음료의 개발을 위해 김치에서 유산균 19종을 분리하였다. 이후 진행된 인공 위액 및 인공 담즙산 실험에서 살아남은 유산균 1종을 선별하였고 이를 C332라 명명하였다. 이 C332는 앞으로 진행되는 모든 실험에서 종균으로 사용하였다. C332는 인공 위액에서  $1.66 \times 10^5$  CFU/ml, 담즙산에서  $1.49 \times 10^6$  CFU/ml 만큼의 생균수를 측정하였다. C332를 단호박 배지에서 호기적과 혐기적으로 배양한 결과 광밀도, pH에서 큰 차이를 발견하지 못하여 통성혐기성 미생물임을 확인하였고, *E.coli*에 대한 항균활성 측정결과 14 mm의 클리어 존이 생겨나 *E.coli*에 대한 항균활성을 확인하였다. 발효가 끝난 단호박 배지는 pH가 3.8까지 떨어졌으며, 산도는 1.41%이다. 16s rRNA full sequencing을 통해 C332는 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었다. 이후 관능검사를 통해 발효 시간별, 농도별로 발효음료가 유의수준 5%로 유의성이 있음을 검증하였다. 저장성평가를 통해 12일간의 저장기간 중 약간의 산도증가 경향과, 약간의 pH 저하경향을 확인하였고, 우리나라 호상요구르트의 유산균 기준치 ( $1.0 \times 10^8$  CFU/ml)를 상회하는 생균수 (발효 후 경과 12일  $1.15 \times 10^8$  CFU/ml)를 확인하여 저장성이 우수한 것으로 나타났다.

접수 : 2008년 10월 30일, 게재승인 : 2009년 4월 23일

### REFERENCES

- 고정삼 (2004), 식품생물산업 p189, 유한문화사, 서울.
- Cheigh, H. C. and Park, K. Y. (1994), Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi, Crit. Rev. Food Sci Nut. Busan University, Busan.
- Atrih, A., Rekhif, N., Milliere, J. B., and Lefebvre, G. (1993) Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19, *Can. J. Microbiol.* **39**.
- Klaver, F. A. M. and van der Meer, R. (1993), The assumed assimilation of cholesterol Lactobacilli and Biofidobacterium bifidum is due to their bile saltconjugation activity, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**.
- Fernandez, M. F., Boris, S., and Barbes, C. (2003), Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract, *J. Appl. Microbiol.* **94**.
- Lee, C. H., Jun, K. D., and Kim, W. S. (2001), HD Partial characterization of polyfementicin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*, *Lett. Appl. Microbiol.* Kyungnam University, Kyungnam.
- O'Sullivan, G. C. (2001), Probiotics, p88, Brit J Surg.

8. 강호윤, 박승중, 신연표, 여인호, 유근배, 정연규 (1978), 채소원예학, p201, 학문사, 서울.
9. Kim, S. R., Ha, T.Y., Song, H. N., Kim, Y. S., and Park, Y. K. (2005), Comparison of Nutritional Composition and Antioxidative Activity for Kabocha Squash and Pumpkin, *Korea J. Food Sci. Technol.* 171-177.
10. Park, Y. H. (1995), A study on the development pumpkin-citron-honey drink, *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24.
11. Shin, Y. S., Lee, K. S., and Kim, D. H. (1993), Studies on the preparation of yoghurt from milk and sweet potato or pumpkin, *Korean J. Food Sci. Technol.* 26.
12. Yun, S. J. and Ahn, H. J. (2000), Quality characteristics of pumpkin rice cake prepared by different cooking methods, *Korean J. Soc. Food Sci.* 16.
13. Keum, J. H. (1999), Studies on garlic and pumpkin vinegar, *Korean J. Food Nutr.* 12.
14. Kim, J. M., Rho, Y. H., and Yoo, Y. J. (2004), Quality properties of cream soup added with Chungdong pumpkin and sweet pumpkin. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33.
15. Choi, E. M. and Jung, B. M. (2004), Quality characteristics of Yanggeng prepared by different ratio of pumpkin, *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 20.
16. Paik, H. D., Jung, M. Y., Jung, H. Y., Kim, W. S., and Kim, K. T. (2002), Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for Oral Bacteriotherapy of Gastrointestinal Disorders, *Korean J. Food Sci. Technol.* 34.
17. 강윤환, 김기은, 민윤식, 이수정 (2003), 식품가공학 실험, p157, (주)북스힐, 서울.
18. 구난숙, 김향숙, 이경애, 김미정 (2006), 식품관능 검사, pp111-114, (주)교문사, 서울.
19. 보사부 (1991), 식품공전, p97, 한국식품공업협회, 서울.