

발효 미생물에 따른 포도가공 부산물의 항산화 활성 및 항균활성

김경희 · 윤영식 · 천세영 · 육홍선[†]

충남대학교 식품영양학과

Antioxidant and Antibacterial Activities of Grape Pomace Fermented by Various Microorganisms

Kyoung-Hee Kim, Young-Sik Yun, Se-Young Chun, and Hong-Sun Yook[†]

Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

The antioxidant activities and antibacterial activities of grape pomace fermented using a variety of useful microorganisms were analyzed. There were several experimental groups: the control, with non-fermented grape pomace; the BS group, fermented by *Bacillus subtilis*; the LP group, fermented by *Lactobacillus plantarum*; the LC group, fermented by *L. casei*; the CU group, fermented by *Candida utilis*; the Y1 group, fermented by *Saccharomyces cerevisiae* strain CHY1011; the Y2 group, fermented by *S. cerevisiae* strain ZP 541; and the M group, fermented by a mixed strain culture of LP, LC, and CU. The yield of freeze-dried powder of fermented grape pomace by BS, LP, LC, CU, Y1, Y2, and M was 10.74%, 9.36%, 8.68%, 9.55%, 7.49%, 9.60%, and 9.71% w/w, respectively. The total polyphenol content of grape pomace showed the highest value in the control, but the fermented LP had higher total polyphenol content than those of other fermented grape pomace. The control and fermented LP had 0.16 mg/mL and 0.28 mg/mL as IC₅₀ values on DPPH radical scavenging, and 0.22 mg/mL and 0.53 mg/mL of ABTS radical scavenging activity, respectively. The FRAP value (5 mg/mL) showed the highest value on fermented LP (2.44 mM) but did not show a significant difference in the control group (12.27 mM). The fermented LC showed the antimicrobial activities against *B. cereus* (11 mm), *B. subtilis* (11 mm), *Staphylococcus aureus* (12 mm), *Escherichia coli* (12 mm), *Enterobacter cloacae* (10.5 mm), *Salmonella enterica* (11.5 mm), and *Pseudomonas aeruginosa* (11 mm) at 5 mg/disc, but the control and other fermented grape pomace did not show antimicrobial activities. Thus, fermented grape pomace by LC is shown to be producing a material that has antibacterial activity. In conclusion, grape pomace fermentation using various lactic acid bacteria strains showed excellent effects in promoting the production of functional materials. Especially, using *L. casei* exhibited an increase in antibacterial activity, and using *L. plantarum* exhibited antioxidant activity.

Key words: antioxidant, grape pomace, antibacterial, fermentation

서 론

최근 건강기능성성분을 포함하는 포도(*Vitis vinifera* L.)의 소비량이 증가하고 있다. 이는 포도에 대한 기호뿐만 아니라 포도 중에 함유된 다양한 생리활성성분인 피토케미칼(phytochemicals)이 건강에 유익하게 작용하는 것과 관계가 높은 것으로 알려져 있으며 이에 따라 포도를 이용한 가공품의 종류도 다양해지고 있다(1). 다양한 생리활성을 가진 포도는 세계 과일 생산량 중 약 30%를 차지하며(2), 그중 약 80%가 포도주 제조에 사용되고, 이로 인해 약 천만 톤의 포도박(포도 과피, 씨, 과육, 줄기를 포함)이 짧은 수확기 동안 발생한다(3). 한국의 경우 2010년 생산량은 약 30만 6천톤으로 그중 9천톤이 가공되고 있으며 이에 따라 수천톤의 포도박이 발생하고 있는 실정이다(4). 가공과정 중에 나오는 포

도박은 phenolic acids, phenolic alcohol, flavan-3-ols, flavonoids 등의 폴리페놀류, anthocyanins, resveratrol 등의 생리활성물질을 높은 수준으로 함유하고 있는 것으로 보고되고 있으며(5-7), 포도박이 포도와 포도즙보다 플라보노이드, 식이섬유, 비타민 A 및 E의 함량이 더 높다는 보고도 있다(8). 한편 effective microorganisms(EM)은 일본의 류큐대학(가고시마 연합대학교)의 히가테루오 교수가 발명한 것으로 항산화물질을 생성하는 일련의 유용미생물군(광합성세균, 유산균, 효모 등)이며, 현재는 농업, 축산업, 의료, 환경 등의 분야에서 활발히 이용되고 있다(9,10). EM제제의 유산균은 유산을 생성하여 발효초기에 pH를 급격히 강하시킴으로써 부패균의 성장을 억제하고 불용성 무기성분(인산 등)을 가용화하며, 효모균은 생리활성물질을 합성하여(비타민, 호르몬 등) 다른 EM균의 성장을 촉진하며, 사상균은 고

[†]Corresponding author. E-mail: yhsuny@cnu.ac.kr
Phone: 82-42-821-6840, Fax: 82-42-821-8887

분자물질을 저분자화시켜 이용 가능케 하며, 방선균은 항균 물질을 생성하여 토양병원균의 증식억제 효과를 나타내고, 광합성세균은 부패발효 시 발생하는 이산화탄소 및 황화수소를 흡수 이용하며 유기물을 고정태로 이용하여 오염 및 악취의 방지효과를 나타낸다고 한다(11). 미생물에 의한 발효는 냄새의 개선과 바람직한 대사산물 생성을 증진시키며(12), Mathew 등(13) 및 Kamm 등(14)의 연구에서도 효모 생성물 및 효모발효가 돼지 사료 산업에 있어 성장률, 영양소 소화율 및 건강 조건을 향상시켰다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 여러 영양성분 및 생리활성 물질 함량이 높은 포도박의 이용가치를 증진시키기 위한 연구의 일환으로 여러 유용 미생물을 이용하여 포도박을 발효시킨 후 여러 미생물별 포도박 발효에 따른 항산화 활성 변화를 조사하여 향후 화장품 및 의약품 등의 산업원료 소재 및 사료 첨가제로서의 이용 가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 포도가공 부산물(이하 포도박)은 2011년 충북 영동에서 수확된 것으로 영동대벤처식품(주)에서 캠벨포도로 포도즙을 착즙하고 남은 포도 부산물을 제공받아 사용하였으며, 사용된 포도가공 부산물의 일반성분은 동결건조시료 기준으로 탄수화물 73.41±2.16, 조단백 11.51±0.96, 조지방 6.91±0.99, 조회분 1.75±0.12, 수분 6.42±0.56%이었다.

사용균주

포도박 발효에 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* KCTC 1022(BS), *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104(LP), *Lactobacillus casei* KCTC 2180(LC), *Candida utilis* KCCM 50342(CU)로 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea) 및 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. *Saccharomyces cerevisiae* 균주들(*S. cerevisiae* strain CHY1011: Y1, *S. cerevisiae* strain ZP 541: Y2)은 빵 발효에 이용되는 효모를 사용하였으며, 18S rRNA 서열의 유사성에 근거하여 가장 가까운 종을 표시하

였다. BS는 nutrient broth에서, LP 및 LC는 Lactobacilli MRS broth에서, CU, Y1, Y2는 YM broth에서 배양하였다. BS, CU, Y1, Y2는 30°C, LP, LC는 37°C에서 24시간 주기로 3회 계대 배양 후 600 nm에서 흡광도 값이 0.4~0.6(1×10⁵ CFU/mL) 범위 안에 들게 하여 발효 균주로 사용하였다 (Table 1).

사용균주에 따른 포도박 발효액의 배양 특성

균주의 성장에 따른 배양액의 pH의 변화는 24시간 배양 후 여과지(Whatman No. 4, Middlesex, UK)에 여과한 다음 pH meter를 사용하여 측정하였다. 혼탁도 측정은 24시간 배양 후 여과된 발효액의 흡광도를 spectrophotometer로 600 nm에서 측정하여 미생물의 발효 정도를 확인하였다. 생균수 측정은 24시간 배양한 포도박 발효액을 여과하여 멸균된 생리 식염수에 희석해 측정하였다. 발효 희석액을 충분히 혼합한 후, plate count agar(PCA) 및 potato dextrose agar(PDA) 배지에 분주한 후 각각 37°C, 30°C에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였으며, 모든 실험구는 4회 반복으로 실험하였다.

포도박 발효물의 발효

포도박 발효물의 제조는 20 g의 glucose와 5 g의 peptone을 1 L의 3차 증류수(DW)에 넣은 후 121°C, 15분으로 가압 고온 멸균하여 실온에서 서서히 식힌 다음 미리 활성화시킨 7종의 발효 균주를 각각 10 mL씩 넣은 후 여기에 100 g의 포도박을 넣고, BS, CU, Y1, Y2, M(LP, LC 및 CU를 3 mL : 3 mL : 4 mL의 비율로 혼합)은 30°C, LP, LC는 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 여과지(Whatman No. 4)로 여과시킨 여액을 121°C에서 15분 동안 가압 고온 멸균시켰다. 멸균된 배양액을 -75°C deep freezer에 12시간 두었다가 freeze dryer에 넣고 동결건조 하여 실험에 사용하였다. 포도박 무발효 대조군으로는, 포도박 100 g당 10배량(w/v)의 DW로 24시간 동안 3회 추출한 후 여과지(Whatman No. 4)로 여과한 다음 동결건조 하여 얻은 포도박 물 추출물(이하 무발효 추출물)을 사용하였다. 각 시료 분획물은 50% ethanol에 용해하여 실험에 사용하였다.

Total polyphenol contents

총 폴리페놀 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu's의 방법(15)에 따라 측정하였다. 시료를 증류수에 녹여 추출한 뒤 시료

Table 1. List of strains used for antimicrobial experiments

	Strains	Media ¹⁾	Temp. (°C)
Gram positive bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	NA/NB	30
	<i>Bacillus subtilis</i>	NA/NB	30
	<i>Staphylococcus aureus</i>	NA/NB	30
Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i>	NA/NB	30
	<i>Enterobacter cloacae</i>	NA/NB	30
	<i>Salmonella enterica</i>	NA/NB	37
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA/NB	37

¹⁾NA: nutrient agar, NB: nutrient broth.

0.2 mL에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 증류수를 1:2로 섞은 혼합액 0.2 mL를 첨가하고 암실에서 3분 방치 후 10% Na₂CO₃ 3 mL를 가하여 1시간 다시 암실에 방치 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준곡선은 gallic acid를 이용한 표준 검량식에 적용하여 1 g에 대한 mg gallic acid equivalents (GAE)로 나타내었다.

DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거능은 Blois(16)의 방법에 준하여 농도 별로 제조한 시료 1 mL에 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Chemical Co.)용액 1 mL를 넣은 후 DPPH용액 1 mL를 가하고 실온에서 30분간 반응시켜 517 nm에서 spectrophotometer(UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료희석액 1 mL에 DPPH용액 1 mL를 가한 후 상온에서 30분간 방치 후 시료와 같은 조건에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음과 같은 계산식에 의해 환산하여, 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도(IC₅₀)로 표시하였다.

DPPH radical scavenging activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

ABTS radical 소거활성 측정

총 항산화력 측정은 Pellegrin 등(17)의 ABTS radical 소거능에 따라서 측정하였다. 7 mM ABTS와 140 mM potassium persulfate 용액을 혼합하여 하루 동안 어두운 곳에 방치하여 ABTS^{•+}를 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 50% ethanol로 희석하였다. 희석된 ABTS^{•+} 용액 1 mL에 50% ethanol에 5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL의 농도로 희석된 추출액 50 µL를 가하여 흡광도의 변화를 정확히 3분 후에 측정하였으며 다음의 식에 의해 저해율을 환산하여, 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도(IC₅₀)로 표시하였다.

ABTS radical scavenging activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

FRAP(ferric reducing antioxidant power) 측정

FRAP 측정 방법은 Benzie와 Strain(18)의 방법을 참고하여 측정하였다. FRAP reagent는 25 mL acetate buffer(300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma Chemical Co.) 5 mL과 20 mM ferric sulfate(FeSO₄) 2.5 mL을 가하여 제조하였다. 제조된 0.9 mL FRAP reagent에 5 및 2.5 mg/mL의 농도로 용해시킨 시료 0.03 mL와 증류수

0.09 mL를 넣은 다음 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 593 nm에서 spectrophotometer(Shimadzu UV-1800)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Blank는 시료 대신 에탄올을 넣어 측정하였다.

Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

각 추출물의 항균활성은 각 균주를 대상으로 disc diffusion assay로 측정하였으며, 측정에 사용된 균주는 그램 양성균 3종류와 그램 음성균 4종류로 한국생명공학연구원서 분양받아 사용하였고 사용된 배지 조건은 Table 1과 같다. 항균시험용 평판배지는 계대 배양된 각 균주를 멸균 면봉을 이용하여 100 µL씩 도말하여 준비하였고, 시료를 disc 당 5, 10 mg이 되도록 paper disc(8 mm)에 천천히 흡수시킨 뒤 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시킨 후 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 30~37°C에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 측정하였으며, 그 결과는 IBM SPSS Statistics 19.0 software system(Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 분산분석(ANOVA)을 실시하여 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

사용균주에 따른 포도박 발효액의 배양성 결과

미생물에 의한 포도박의 발효 정도를 확인하기 위하여 미생물 별로 24시간 발효시킨 포도박 발효액의 pH 변화를 측정하였다. Table 2에서와 같이, pH 값은 발효하지 않은 배지에서 6.27±0.02인 반면(data not shown), 발효한 배지에서는 3.55~4.27이 되어 발효에 의해 pH가 낮아져 모든 실험군에서 모두 발효가 일어났음을 확인하였다. 이 중 BS 균주를 이용한 발효군에서 4.27±0.07로 가장 높은 pH 값을 보였으며, CU(3.85±0.02), Y2(3.84±0.02), Y1(3.79±0.02), M(3.55±0.01), LP(3.49±0.00) 및 LC(3.47±0.01)의 순서로 나타났다. Lee(19)의 연구에서는 방풍통성산을 BS로 발효 시, 발효 전 pH 값인 6.00에서 5.96으로 pH가 거의 유사하였다고 보고하고 있으며, 보통 BS를 이용한 발효의 경우 다른 미생물을 이용한 발효의 경우보다 pH 변화가 적은 편이며 본 연구에서도 BS가 pH 변화에 가장 영향을 덜 주는 것으로 확인되었다. 미생물이 일정한 배수로 증가하는 활동은 흡광도 측정(OD₆₀₀)으로 부유된 미생물의 양을 측정함으로써 판단할 수 있다(20). 발효 후 미생물 생장에 의한 혼탁도 분석 결과(Table 2) 포도박 발효액의 혼탁도는 1.07~1.78을 나타내었고 LC에서 1.07±0.01의 가장 낮은 수치를 나타내었다.

포도박 발효액이 미생물 생장에 미치는 영향을 검토하기

Table 2. pH value, turbidity and viable cell count in the broth of grape pomace fermented by microorganism

Microorganism ¹⁾	pH	Turbidity ⁴⁾	Viable cell count (log CFU/mL)
BS	4.27±0.07 ^{2)a3)}	1.78±0.00 ^a	8.60±0.30 ^a
LP	3.49±0.00 ^f	1.52±0.00 ^e	7.06±0.25 ^b
LC	3.47±0.01 ^f	1.07±0.01 ^g	6.97±0.25 ^b
CU	3.85±0.02 ^b	1.66±0.00 ^c	7.27±0.15 ^b
Y1	3.79±0.02 ^d	1.49±0.00 ^f	7.01±0.21 ^b
Y2	3.84±0.01 ^c	1.74±0.03 ^b	7.20±0.25 ^b
M	3.55±0.01 ^e	1.58±0.00 ^d	6.87±0.59 ^b

¹⁾BS: *B. subtilis*, LP: *L. plantarum*, LC: *L. casei*, CU: *C. utilis*, Y1: *S. cerevisiae* strain CHY1011, Y2: *S. cerevisiae* strain ZP 541, M: microbial consortium fermented with LP, LC and CU.

²⁾Mean±SD (n=4).

³⁾Different letters within a same column differ significantly (p<0.05).

⁴⁾Turbidity measurement based on OD₆₀₀ in the broth of grape pomace fermented by microorganism

위해 24시간 발효 후 생균수를 측정된 결과(Table 2), 6.87~8.60 log CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 BS 처리구에 8.60±0.30 log CFU/mL로 가장 높게 나타났으며, 혼합균주 발효에서 6.87±0.59 log CFU/mL로 가장 낮은 생균수를 나타내었다. 따라서 BS, LP, CU, 효모 및 혼합균주를 사용하여 포도박을 발효했을 때 사용된 미생물들이 포도박을 효과적으로 이용하여 자기 증식에 이용하는 것으로 여겨지며, 발효가 잘 진행되었음을 확인하였다.

포도박 발효물의 수율 및 총 폴리페놀 함량

6종의 단일균주 및 혼합균주를 이용하여 발효시킨 포도박 발효물의 수율은 Table 3에 나타내었다. 대조군의 수율은 3.03±0.37%를 나타내었으며, 발효에 의해 수율이 증가하였다. 발효물 중 BS에서는 10.74±0.28%로 가장 높게 나타났으나 LP, Y1 및 LC 균주 발효물을 제외하고는 유의차를 보이지 않았으며, 혼합균주(9.71±0.39%), Y2(9.60±0.56%), CU(9.55±0.58%), LC(8.68±0.59%), Y1(7.49±0.56%) 그리고 LP(7.36±0.47%) 순으로 낮은 수율을 나타내었다. Kang 등(21)은 꾸지뽕열매 발효 추출물의 추출수율이 꾸지뽕 에탄올 추출물의 수율이 54.22%이었으며, 꾸지뽕 발효물 54.43%, *Bacillus licheniformis* 발효 꾸지뽕 57.71%, *B. subtilis*

발효 꾸지뽕 57.23%의 수율을 나타내었으며 발효에 의해 수율은 약간 증가하였으나 유의적 차이는 없는 것으로 보고하였다.

포도박 발효물의 총 polyphenol 함량을 측정된 결과(Table 4), 대조군은 65.54±1.74 mg/g으로 발효한 포도박에 비해 유의적(p<0.05)으로 높은 값을 보였으며, 발효균주 중에서는 LP가 54.27±2.23 mg/g으로 가장 큰 값을 가졌고 다음으로 LC(43.35±0.82 mg/g), Y2(42.35±0.05 mg/g), Y1(42.08±1.41 mg/g), CU(36.96±3.43 mg/g), BS(31.04±0.71 mg/g), 혼합균주(29.12±0.27 mg/g) 순으로 함량을 나타내었다. Lee 등(22)은 *B. subtilis* 균주로 40°C에서 24시간 발효시킨 탈지대두 grits 발효물의 80% 에탄올 추출물은 총 polyphenol 및 flavonoid 함량이 발효시키기 전에 비하여 3.8~4.8배 증가하였다고 보고하여 본 연구결과와 다른 결과를 나타내었으며, 다른 여러 연구에서도 보통 발효에 의해 polyphenol 함량이 증가한다고 보고되고 있다. 반면 미생물을 이용한 후발효차의 발효기간별 항산화 성분 및 활성변화를 연구한 논문(23)에서는 발효균주에 상관없이 발효가 진행됨에 따라 polyphenol 함량이 감소하였다고 보고하였다. 발효차의 경우 phenol 화합물의 하나인 gallic acid는 발효과정

Table 3. The yield of fermented grape pomace by various microorganism

Microorganism ¹⁾	Yield (%)
Control	3.03±0.37 ^{2)c3)}
BS	10.74±0.28 ^a
LP	7.36±0.47 ^b
LC	8.68±0.59 ^b
CU	9.55±0.58 ^a
Y1	7.49±0.56 ^b
Y2	9.60±0.56 ^a
M	9.71±0.39 ^a

¹⁾Control: water extract of grape pomace, BS: *B. subtilis*, LP: *L. plantarum*, LC: *L. casei*, CU: *C. utilis*, Y1: *S. cerevisiae* strain CHY1011, Y2: *S. cerevisiae* strain ZP 541, M: mixed strain culture with LP, LC and CU.

²⁾Mean±SD (n=3).

³⁾Different letters within a same column differ significantly (p<0.05).

Table 4. The total polyphenol content of fermented grape pomace by various microorganism

Microorganism ¹⁾	Total polyphenol content (GAE mg/g, dry basis)
Control	65.54±1.74 ^{2)a3)}
BS	31.04±0.71 ^c
LP	54.27±2.23 ^b
LC	43.35±0.82 ^c
CU	36.96±3.43 ^d
Y1	42.08±1.41 ^c
Y2	42.35±0.05 ^c
M	29.12±0.27 ^e

¹⁾Control: water extract of grape pomace, BS: *B. subtilis*, LP: *L. plantarum*, LC: *L. casei*, CU: *C. utilis*, Y1: *S. cerevisiae* strain CHY1011, Y2: *S. cerevisiae* strain ZP 541, M: mixed strain culture with LP, LC and CU.

²⁾Mean±SD (n=3).

³⁾Different letters within a same column differ significantly (p<0.05).

중 benzotropolone 구조를 가지는 purpurogallin 유도체를 새롭게 만드는 것으로 알려져 있으며(24), 포도박에 함유된 주요 phenol 화합물인 malvidin 3-O-glucoside 및 malvidin 3-O-p-coumaroylglucoside 등의 anthocyanins류, gallic acid, 5-(hydroxymethyl) furfural, caffeic acid, fertaric acid, syringic acid, p-coumaric acid, sinapic acid, ferulic acid 등의 phenolic acids, quercetin, kaempferol, procyanidin B1 등의 anthoxanthins 및 stilbenes 등(25)은 발효 중 구조가 일부 변경될 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 포도박 발효에 의해 polyphenol 함량이 감소한 것은 발효에 의하여 기존의 페놀 화합물의 구조 변화에 의한 것이나 또는 당 성분의 제거로 인해 여과가 잘되어 추출 수율이 높아졌고 추출액이 많아져 희석에 따라 발효물질의 폴리페놀 함량이 감소한 것으로 여겨진다.

포도박 발효물의 radical 소거능

포도박 발효물의 항산화 활성을 DPPH radical 소거능으로 평가한 것을 Table 5에 나타내었다. 실험결과, 발효하지 않은 포도박 대조군의 IC₅₀값이 0.16±0.10 mg/mL로 나와 가장 높은 항산화활성을 나타내었고 발효에 사용한 미생물들 중 LP가 0.28±0.04 mg/mL로 가장 항산화 활성이 높았고 다음으로 Y2(0.38±0.04 mg/mL), Y1(0.48±0.02 mg/mL), LC(0.50±0.03 mg/mL), CU(0.50±0.03 mg/mL), 혼합균주(0.65±0.01 mg/mL), BS(0.67±0.02 mg/mL) 순으로 IC₅₀값이 낮아졌다. Park 등(26)은 홍삼 및 홍국발효홍삼 분말 추출물의 DPPH radical 소거능을 평가한 결과 홍삼 추출물보다 홍국발효홍삼 추출물에서 약간씩 항산화 활성이 높은 것으로 나타났으며 홍국발효 추출물에서 항산화 활성이 높은 것은 홍삼을 발효시킨 홍국의 영향에 의한 것으로 판단하고

Table 5. DPPH and ABTS radical scavenging activity of fermented grape pomace by various microorganism

Microorganism ¹⁾	DPPH radical scavenging activity	ABTS radical scavenging activity
	IC ₅₀ (mg/mL) ²⁾	
Control	0.16±0.10 ^{3)e4)}	0.22±0.02 ^c
BS	0.67±0.02 ^a	0.81±0.02 ^b
LP	0.28±0.04 ^d	0.53±0.02 ^d
LC	0.50±0.03 ^b	0.83±0.04 ^b
CU	0.50±0.03 ^b	0.60±0.02 ^c
Y1	0.48±0.02 ^b	0.61±0.02 ^c
Y2	0.38±0.04 ^c	0.55±0.02 ^d
M	0.65±0.01 ^a	0.90±0.00 ^a

¹⁾Control: non-fermented grape pomace, BS: *B. subtilis*, LP: *L. plantarum*, LC: *L. casei*, CU: *C. utilis*, Y1: *S. cerevisiae* strain CHY1011, Y2: *S. cerevisiae* strain ZP 541, M: mixed strain culture with LP, LC and CU.

²⁾Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration inhibition curve.

³⁾Mean±SD (n=5).

⁴⁾Different letters within a total sample differ significantly (p<0.05).

있다. Jeon 등(27)은 홍국균을 이용한 마의 에탄올 농도별 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 50% 이상의 에탄올 농도에서 발효 홍국마가 대조군에 비해 더 높은 활성을 나타났다고 보고하고 있으며 이는 폴리페놀 화합물 양과 관련이 있다고 보고하고 있다. Kang 등(28)은 phenolic acid의 일종인 caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid 등과 flavonoid의 일종인 catechin, quercetin, catechol, chlotogenic acid를 포함한 기타 페놀성 물질이 전자공여능에 관여하는 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구에서 포도박 발효물의 항산화 활성이 대조군보다 낮아진 것은 페놀화합물 함량 측정결과 대조군에서보다 발효군에서 낮은 값을 나타낸 것과 마찬가지로의 결과이며, 이는 줄어든 페놀화합물 함량과 더불어 카테킨류 및 비타민 E 등의 항산화 화합물들이 산화되었기 때문인 것으로 여겨진다(23,29).

포도박의 ABTS radical 소거능을 평가한 결과(Table 5), DPPH radical 소거능 결과와 같이 대조군으로 사용한 포도박의 ABTS radical 소거활성은 IC₅₀값이 0.22 mg/mL로 가장 활성이 높았고, 발효물 중에서는 LP 발효물이 0.53 mg/mL로 높은 활성을 나타내었다. 혼합균주의 활성은 IC₅₀값이 0.90 mg/mL로 가장 낮은 활성을 나타내었다. ABTS radical 소거능 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 포도박 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 Kang 등(21)은 꾸지뽕열매 발효 추출물의 ABTS radical 소거능 측정 결과 500 mg%에서는 균주발효균이 대조군에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었고, 1,000 mg%에서는 유사한 경향을 나타내었다고 보고하여 본 연구와 차이를 나타낸 반면, Kim 등(23)은 후발효차의 ABTS radical 소거능이 발효에 의해 감소하였다고 보고하고 있다.

따라서 포도박 발효물의 경우 발효 중에 생산된 radical 소거활성 물질들이 많지 않고, 산화에 의한 항산화 화합물 등의 감소로 대조군보다 낮은 항산화 활성을 나타낸 것으로 여겨지며, 만일 포도박을 발효하여 이용할 경우 유산균인 LP 및 효모인 Y2를 이용하여 발효할 때 포도박 발효 시 항산화 활성 유지에 도움이 될 것으로 사료되었다.

포도박 발효물의 FRAP value

포도박 발효물의 FRAP 측정 결과는 Table 6에 나타내었다. 포도박의 FRAP value는 5 mg/mL 시료농도에서 LP 발효물이 2.44±0.13 mM로 가장 높게 나왔으나 대조군의 2.27±0.16 mM과는 유의차를 보이지 않았다. 다음으로는 LC(1.67±0.10 mM), Y2(1.53±0.13 mM), CU(1.43±0.14 mM), Y1(1.40±0.21 mM) 순으로 활성을 나타내었다. 반면, 2.5 mg/mL 시료농도에서는 대조군이 1.19±0.08 mM로 가장 높은 활성을 나타내었고 이어 LP, Y2, LC, Y1, M 순으로 나타났으며 CU와 BS에서 가장 낮은 활성을 나타내었고 이 둘은 유의차를 보이지 않았다. FRAP assay는 colored ferrous tripyridyl triazine complex에 의해 ferric ion이 ferrous로

Table 6. FRAP (ferric-reducing antioxidant power) value of fermented grape pomace by various microorganism

Microorganism ¹⁾	FRAP value (mM)	
	5 mg/mL	2.5 mg/mL
Control	2.27±0.16 ^{2)a3)}	1.19±0.08 ^a
BS	1.22±0.04 ^{de}	0.55±0.08 ^e
LP	2.44±0.13 ^a	1.00±0.10 ^b
LC	1.67±0.10 ^b	0.76±0.10 ^{cd}
CU	1.43±0.14 ^{cd}	0.55±0.05 ^e
Y1	1.40±0.21 ^{cd}	0.65±0.04 ^{de}
Y2	1.53±0.13 ^{bc}	0.79±0.07 ^c
M	1.02±0.10 ^e	0.56±0.05 ^e

¹⁾Control: non-fermented grape pomace, BS: *B. subtilis*, LP: *L. plantarum*, LC: *L. casei*, CU: *C. utilis*, Y1: *S. cerevisiae* strain CHY1011, Y2: *S. cerevisiae* strain ZP 541, M: mixed strain culture with LP, LC and CU.

²⁾Mean±SD (n=5).

³⁾Different letters within a total sample differ significantly (p<0.05).

전환되어지는 과정을 분석함으로써 시료 내의 총 항산화력을 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric

tripyridyltriazine(Fe³⁺-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe²⁺-TPTZ)으로 환원되는 원리에 기초하여 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안되어진 방법(18)으로 Chaiyasut 등(30)은 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 발효한 태국대두의 경우 발효에 의해 FRAP value가 증가하였다고 보고하고 있으나 본 연구에서는 앞에서의 radical 소거활성 결과와 마찬가지로, 환원력에 의한 항산화 활성 실험결과 대조군이 발효물들에 비해 높은 항산화 활성을 나타내었으며, 발효물들 중에는 LP를 사용한 포도박 발효물이 다른 시료군들에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다.

포도박 발효물의 disc diffusion assay에 의한 항균활성

균주별 발효 포도박의 추출물의 항균활성실험을 수행한 결과를 Table 7에 나타내었다. 대조군의 경우 실험에 사용된 모든 균주에 대해 항균활성을 나타내지 않았으며, 발효 포도박 추출물에서도 *L. casei*와 혼합균주로 발효시킨 포도박 발효액을 제외하고는 항균활성을 나타내지 않았다. LC로 발

Table 7. Antibacterial activities of fermented grape pomace by various microorganism

Microorganism	Size of clear zone (mm)			Microorganism	Size of clear zone (mm)		
	Sample ¹⁾	Conc. (mg/disc)			Sample	Conc. (mg/disc)	
		5.0	10.0			5.0	10.0
<i>B. cereus</i>	Control	- ²⁾	-	<i>E. cloacae</i>	Control	-	-
	BS	-	-		BS	-	-
	LP	-	-		LP	-	-
	LC	11	14.5		LC	10.5	12.5
	CU	-	-		CU	-	-
	Y1	-	-		Y1	-	-
	Y2	-	-		Y2	-	-
	M	9.5	12		M	9	11
<i>B. subtilis</i>	Control	-	-	<i>S. enterica</i>	Control	-	-
	BS	-	-		BS	-	-
	LP	-	-		LP	-	-
	LC	11	12.5		LC	11.5	13
	CU	-	-		CU	-	-
	Y1	-	-		Y1	-	-
	Y2	-	-		Y2	-	-
	M	10	8		M	10.5	13
<i>S. aureus</i>	Control	-	-	<i>P. aeruginosa</i>	Control	-	-
	BS	-	-		BS	-	-
	LP	-	-		LP	-	-
	LC	12	14		LC	11	13
	CU	-	-		CU	-	-
	Y1	-	-		Y1	-	-
	Y2	-	-		Y2	-	-
	M	9.5	12.5		M	9	12
<i>E. coli</i>	Control	-	-				
	BS	-	-				
	LP	-	-				
	LC	12	14				
	CU	-	-				
	Y1	-	-				
	Y2	-	-				
	M	11	13				

¹⁾Control: non-fermented grape pomace, BS: *B. subtilis*, LP: *L. plantarum*, LC: *L. casei*, CU: *C. utilis*, Y1: *S. cerevisiae* strain CHY1011, Y2: *S. cerevisiae* strain ZP 541, M: mixed strain culture with LP, LC and CU.

²⁾-: Not detected.

효시킨 포도박 발효액의 경우 5 mg/disc의 농도에서 *B. cereus*(11 mm), *B. subtilis*(11 mm), *S. aureus*(12 mm), *E. coli*(12 mm), *E. cloacae*(10.5 mm), *S. enterica*(11.5 mm), *P. aeruginosa*(11 mm)와 같이 실험에 사용된 모든 세균에 대해 항균활성을 나타내었다. LP, LC 및 CU의 혼합균주로 발효시킨 포도박 발효액의 경우에는 5 mg/disc의 농도에서 *B. cereus*(9.5 mm), *B. subtilis*(10 mm), *S. aureus*(9.5 mm), *E. coli*(11 mm), *E. cloacae*(9 mm), *S. enterica*(10.5 mm), *P. aeruginosa*(9 mm)의 활성을 나타내어 *L. casei*로 발효시킨 포도박 발효액보다 낮은 항균활성을 나타내었으며 혼합균주에 대한 항균활성은 발효에 사용된 균주들 중 LC에 의한 것으로 사료된다. 이러한 결과로 볼 때 *L. casei*가 포도박을 발효시킬 때 항균활성을 나타내는 물질을 대사산물로 생산해내는 것으로 여겨지며 이때 생산되어지는 물질에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것이다. Cho 등(31)은 자연 발효한 오미자 발효액에서 원래는 항균활성이 없는 오미자액이 발효에 의해 *E. coli* 균주에 대해 항균활성을 나타내었다고 보고하였으며, Kang과 Kim(32)의 연구에서 도꼬마리 추출물의 유산발효 시 미발효시에 비해 *Helicobacter pylori*에 대한 항균활성물질의 생산과 기능성물질인 항산화물질의 생산성이 우사하다고 하였으며 *L. brevis*나 *L. casei*의 단일 배양에서는 미발효 배양액인 대조군에 비해 항균활성이 약간 증가하였으나 *L. brevis*와 *L. helveticus*의 복합배양, *L. plantarum*과 *L. helveticus*의 복합배양균주에서 우수한 항균활성을 나타내었다고 보고하였다.

요 약

본 연구에서는 여러 영양성분 및 생리활성 물질 함량이 높은 포도박의 이용가치를 증진시키기 위한 연구의 일환으로 *Bacillus subtilis*(BS), *Lactobacillus plantarum*(LP), *L. casei*(LC), *Candida utilis*(CU), *Saccharomyces cerevisiae* strain CHY1011(Y1), *S. cerevisiae* strain ZP 541(Y2), 혼합발효(M) 등의 여러 유용 미생물을 이용하여 포도박을 발효시킨 후 미생물별 포도박 발효물에 대한 항산화 활성 변화 및 항균활성을 탐색하였다. 포도박 발효물의 추출수율은 BS(10.74%) 발효물이 가장 높았고, M(9.71%), Y2(9.60%), CU(9.55%), LC(8.68%), Y1(7.49%), LP(7.36%) 순이었다. 총 phenol 함량 측정 결과 대조군은 발효한 포도박에 비해 유의적($p < 0.05$)으로 높은 값을 보였으며, 발효 균주 중에서는 LP로 발효한 발효물이 가장 큰 값을 나타내었다. 포도박 발효물의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 대조군의 IC₅₀값이 0.16 mg/mL로 나와 가장 높은 항산화 활성을 보였다. 포도박 발효물의 경우 LP 발효물이 0.28 mg/mL로 가장 높은 항산화 활성은 나타내었다. ABTS radical 소거능은 대조군의 IC₅₀값이 0.22 mg/mL로 가장 높게 나왔고, 포도박 발효물의 경우 LP 발효물이 0.53 mg/mL로 가장 높은 활성

을 나타내었다. FRAP value(5 mg/mL)는 LP로 발효한 시료가 2.44 mM로 가장 높게 나왔으나 대조군의 12.27±0.16 mM과는 유의차를 보이지 않았다. 항균활성은 대조군에서 항균활성을 나타내지 않은데 반해 LC로 발효시킨 포도박 발효액이 5 mg/disc의 농도에서 항균활성에 사용된 모든 균주에 대해 10.5~11 mm의 항균활성을 나타내어 LC배양이 항균활성을 나타내는 물질을 생산해내는 것으로 사료되었다. 따라서 여러 유용미생물을 이용한 포도박 발효의 경우 유산균을 이용한 발효 시 기능성 물질 생산 증진에 우수한 효과를 나타내리라 사료되며, 특히 *L. casei*를 이용한 포도박 발효는 항균활성과 같은 기능성 증가를, *L. plantarum*을 이용한 발효는 항산화 활성에 긍정적인 효과를 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2011-0012449)이며 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Chang SW, Shin NS, Song JH, Park YD, Rho YT. 2010. Production of powder using concentrated by-products of grape processing. *Korean J Food Preserv* 17: 275-280.
2. Lee EJ, Kwon JH. 2006. Characteristics of microwave-assisted extraction for grape seed components with different solvents. *Korean J Food Preserv* 13: 216-222.
3. Maier T, Schieber A, Kammerer DR, Carle R. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem* 112: 551-559.
4. Fruit processing status. Mifaff digital Library. <http://library.mifaff.go.kr/Skyblueimage/2145.pdf>. p 7.
5. Francis FJ. 1992. A new group of food colorants. *Trends Food Sci Technol* 3: 27-30.
6. Lu YR, Foo LY. 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem* 65: 1-8.
7. Hogan S, Canning C, Sun S, Sun X, Zhou K. 2010. Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. *J Agric Food Chem* 58: 11250-11256.
8. Um MY, Kim MK. 2002. Effect of grape intakes on lipid metabolism of rats during aging. *Korean J Nutr* 35: 713-728.
9. Higa T. 1995. *Use of microorganisms in agriculture & their positive effects on environmental safety*. Nobunkyo, Tokyo, Japan. p 42-74.
10. Higa T. 1998. *The complete data EM encyclopedia*. Sogo Unicom, Tokyo, Japan. p 182-237.
11. Han SK. 2005. Quality improvement of effective microorganisms (EM) pork produced by using EM. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 934-937.
12. Smid EJ, Hugenholtz J. 2010. Functional genomics for food fermentation processes. *Annu Rev Food Sci Technol* 1: 497-519.
13. Mathew AG, Chattin SE, Robbins CM, Golden DA. 1998. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial

- populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. *J Anim Sci* 76: 2138-2145.
14. Kamm K, Hoppe S, Breves G, Schroder B, Schemann M. 2004. Effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on the neurochemistry of myenteric neurones in pig jejunum. *Neurogastroenterol Motil* 16: 53-60.
 15. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-249.
 16. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
 17. Pellegrin N, Roberta R, Min Y, Catherine RE. 1998. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extract for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Method Enzymol* 299: 379-389.
 18. Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 230: 70-79.
 19. Lee SB. 2010. A study on the biological properties of fermentation Bangpungtongseongsan. *PhD Dissertation*. Pukyong National University, Busan, Korea. p 31-34.
 20. Alpen EL, Mandel HG. 1960. A rapid assay method for tritium in bacterial cells. *Biochim Biophys Acta* 43: 317-321.
 21. Kang DH, Kim JW, Youn KS. 2011. Antioxidant activities of extracts from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J Food Preserv* 18: 236-243.
 22. Lee SG, Kim HJ, Lee SP, Lee IS. 2009. Antioxidant and anticancer activities of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUC1. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 657-662.
 23. Kim YS, Jo C, Choi GH, Lee KH. 2011. Changes of antioxidative components and activity of fermented tea during fermentation period. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1073-1078.
 24. Jhoo JW. 2008. Anti-inflammatory effects of purpurogallin carboxylic acid, an oxidation product of gallic acid in fermented tea. *Korean J Food Sci Technol* 40: 707-711.
 25. Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A. 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MA/MS. *J Agric Food Chem* 52: 4360-4367.
 26. Park JC, Cha JY, Lee CH, Doh ES, Kang IH, Cho YS. 2009. Biological activities and chemical characteristics of *Monascus*-fermented Korean red ginseng. *J Life Sci* 11: 1553-1561.
 27. Jeon CP, Lee JB, Choi CS, Kwon GS. 2011. Biological activities of ethanol extracts from *Monascus*-fermented Chinese yam. *J Life Sci* 8: 1142-1148.
 28. Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging, and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol* 28: 232-239.
 29. Park SH, Lee HJ, Ma SJ, Park KH, Moon JH. 2009. An investigation on establishment of index for estimation of quality and preservation period of Pu-erh tea. *J Kor Tea Soc* 15: 59-67.
 30. Chaiyasut C, Kumar T, Tipduangta P, Rungsevijitprapa W. 2010. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. *Afr J Biotechnol* 9: 4120-4126.
 31. Cho EK, Cho HE, Choi YJ. 2010. Antioxidant and antibacterial activities and tyrosinase and elastase inhibitory effect of fermented Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) beverage. *J Appl Biol Chem* 53: 212-218.
 32. Kang DH, Kim HS. 2010. Characterization and anti-*Helicobacter pylori* activity of *Xanthium strumarium* L. extract on lactic acid fermentation. *KSBB J* 25: 244-250.

(2012년 3월 28일 접수; 2012년 6월 22일 채택)