

Lactobacillus plantarum GBL17 균주를 이용한 복분자 유산발효 특성

류은혜·윤혜훈·정지혜[†]
(재)베리&바이오식품연구소

Characteristics of Lactic Acid Fermentation of Black Raspberry Juice Using the *Lactobacillus plantarum* GBL17 Strain

Eun-Hye Ryu · Hae-Hoon Yoon · Ji-Hye Jung[†]

Berry & Biofood Research Institute, Gochang-gun, Jeonbuk, 56417, Korea

Abstract

Lactic acid fermentation of black raspberry (*Rubus occidentalis*) juice was carried out by using the *Lactobacillus plantarum* GBL17 strain. The sterilized black raspberry juice was fermented using the *L. plantarum* GBL17 strain at 30°C for 72 hours after which the total acidity increased and the pH value decreased. In addition, the highest total acidity content (2.38%) was reached, the lowest pH value (3.22) was observed, and the sugar content decreased by 9.8 °Brix after the 72 hour fermentation. The number of viable cells rapidly increased up until 24 hours, after which it gradually decreased. HPLC analysis of the organic acids showed 14.51 mg/g of lactic acid content in the fermented black raspberry juice, which was not detected in the non-fermented black raspberry juice (control). The content of fructose and glucose slightly decreased after fermentation. The total polyphenol and flavonoid contents of the fermented black raspberry juice increased significantly after fermentation. The DPPH radical scavenging activity of fermented black raspberry juice (70.92%) was higher than that of the control (62.96%). After lactic acid fermentation, there was no significant increase in ABTS radical scavenging activity. These results confirm that lactic acid bacteria, such as *L. plantarum* GBL17, showed generally higher activities with a potential as a functional beverage.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, black raspberry, fermentation, lactic acid fermentation, antioxidant activity

I. 서론

복분자(*Rubus occidentalis*)는 장미과 낙엽관목으로서 중국이 원산지이나 국내에서 남부 및 중부 지방에서 주로 재배되고 있으며, 5~6월에 둥근 열매가 착과되어 품종 및 기후 조건에 따라 6월 중순에서 8월에 단맛과 신맛 및 독특한 향을 가지는 검붉은 색으로 완숙된다(Park PJ 등 2004). 예로부터 복분자는 신(身)과 간(肝)을 보호하고 눈을 밝게 하며, 신정(腎精) 보강 및 정력 감퇴 치료에 효과가 있다고 동의보감에 기록되어 있으며, 현대에 이르러 Ahn DK(1998)가 복분자에 함유된 인, 철, 칼륨, 유기산, 비타민 C 및 gallic acid, tannin, catechin, quercetin 등의 풍부한 영양성분 및 기능성에 대하여 밝히면서 더욱 주목받게 되었다. 뿐만 아니라 많은 연구자들이 복분자의 면역 증진(Han JG 등 2009), 항산화(Lee SM 등 2012), 항

균 효과(Jeon YH 등 2012), superoxide 제거활성(Lee SJ 2013), 항암(Lee SJ 등 2014), 항염증 활성(Yoon HJ 등 2011) 및 항고혈압 활성(Lee JH 등 2014) 등의 다양한 기능성을 과학적으로 입증하면서 소비 및 생산 증가에 따른 가공식품개발의 필요성이 대두되었다.

복분자를 이용한 연구로는 복분자 식빵(Kwon KS 등 2004), 샐러드 드레싱(Jung SJ 등 2008), 복분자 첨가 소스(Sung KH & Lee JH 2009), 설기떡(Rha YA & Kang BN 2014), 초콜릿(Yu OK 등 2007), 젤리(Yu OK 등 2008)와 같이 복분자를 첨가한 다양한 가공식품 개발에 관한 연구가 보고된 반면에 발효식품에 대한 연구는 복분자주(Shin HJ 등 2006), 발효 음료(Lee SU 등 2009) 및 요구르트(Lee JH & Hwang HJ 2006) 정도만이 보고되어 있어 최근 급성장하고 있는 발효식품시장에서 경쟁력을 가지기 위해서는 복분자 발효제품에 대한 추가적인 연구가 필요한 실정이다.

유산균은 식품의 발효에 관여하는 주된 미생물로 정장 작용(Lee KE 등 1996, Ann YG 등 2013), 항콜레스테롤(Ko KH 등 2013), 면역증강 효과(Ham JS 등 2007), 유당

[†]Corresponding author: Ji Hye Jung, Berry & Biofood Research Institute, 558, Bokbunja-ro, Buan-myeon, Gochang-gun, Jeonbuk, 56417, Korea
Tel: +82-63-560-5160
Fax: +82-63-563-6680
E-mail: 5011402@hanmail.net

불내증 완화(Seo JH & Lee H 2007), 항암 작용(Kato I 등 1994) 등의 다양한 생리활성을 지니고 있어 건강증진 및 질병예방을 위한 probiotics로 사용되고 있다. 발효식품의 대부분을 차지하는 유산균 발효는 식품에 다양한 풍미와 조직감을 부여하고, 영양 및 기능성 성분의 생성으로 식품의 가치를 증가시킬 뿐만 아니라 bacteriocin과 같은 항균성 물질의 생합성으로 저장성을 향상시키는 오래된 식품 가공법이다(Leroy F & De Vuyst L 2004).

따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성을 지니는 복분자 착즙액에 복분자로부터 분리 동정한 *Lactobacillus plantarum* GBL17 균주를 접종하여 발효특성 및 유산발효물의 효능을 확인하여 기능성 발효 음료의 제조 가능성을 검토하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 복분자(*Rubus occidentalis*)는 전라북도 고창군에서 2014년에 수확한 것을 구입하여 Kim JE 등(2014)의 고품질 복분자 생산을 위한 냉해동 조건 연구에 따라 -40°C에서 냉동 보관 후 4°C에서 저온 해동하여 사용하였다. 발효에 이용한 유산균은 본 연구소에서 분리 동정한 *Lactobacillus plantarum* GBL17(수탁번호 KCCM 11622P)을 사용하였다.

2. 유산균의 생육조건

유산균은 MRS(Difco, Detroit, MI, USA) 액체 배지에서 2회 이상 계대배양한 후 전배양한 균주를 배양액의 1%농도로 접종하여 30°C와 37°C에서 각각 6시간 간격으로 총 48시간 동안 pH 및 흡광도를 측정하였다. pH측정은 pH meter(S20, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정하였고, 흡광도는 분광광도계(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 사용하여 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하였다.

3. 복분자 발효물 제조

냉동 복분자는 4°C에서 해동 즉시 유압착즙기(Stainless 70L, Tomotech Ltd, Seoul, Korea)를 사용하여 착즙액을 얻은 후 착즙액에 존재하는 오염균을 제거하기 위하여 복분자 착즙액을 80°C에서 3분간 가열 살균하여 사용하였다. 유산발효 starter로 사용된 유산균은 MRS(Difco) 배지에서 2회 이상 계대배양한 후 착즙액에 2%가 되도록 접종하였으며, 30°C에서 72시간 배양하면서 시간에 따른 발효 특성을 조사하였다.

4. 복분자 유산 발효물 이화학적 특성 변화

복분자 유산균 발효액의 pH는 pH meter(Mettler Toledo)로 측정하였으며, 총산도는 시료 용액 10 mL를 pH 8.3까지 도달하는데 필요한 0.1 N NaOH 용액의 소비량(mL)으로 정의하였으며 lactic acid(% w/w)함량으로 환산하여 나타내었다. 당도는 상온에서 당도계(PAL-1 Pocket Refractometer, ATAGO, WA, USA)를 이용하여 측정하였다.

5. 생균수 측정

복분자 유산 발효 기간의 생균수는 배양액 1 mL에 멸균 식염수 9 mL를 혼합하여 10배 희석법으로 희석하였고 희석액 100 µL를 MRS 평판배지에 도말한 후 30°C에서 48시간 배양한 뒤 형성된 집락수를 계수하여 colony forming unit(CFU)으로 나타내었다.

6. 유기산 함량 분석

복분자 유산균 발효액의 유기산 측정은 건강 기능 식품 공전(Korea Food and Drug Administration 2008)에 준하여 C18 카트리지에 acetonitrile/distilled water(1:1) 10 mL에 시료 10 mL를 가하여 초기 용출액 4~5 mL를 제거 후 HPLC system(Nanospace SI-2, Shiseido, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다. 유기산 표준물질은 acetic acid, citric acid, lactic acid, malic acid, tartaric acid, succinic acid(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였고, 분석 컬럼은 prevail organic acid column(4.6×250 mm, 5 µm, Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA)을 사용하였다. 이동상은 0.25 M KH₂PO₄(pH 2.4)를 사용하였으며 유속은 0.4 mL/min, 시료 주입량은 10 µL, 검출기는 diode array detector(Agilent 1200, Agilent Technologies Inc., Philadelphia, PA, USA)를 사용하여 214 nm에서 측정하였다.

7. 유리당 함량 분석

복분자 유산균 발효액의 유리당 함량은 식품공전 방법(Korea Food and Drug Administration 2005)에 준하여 실시하였다. 시료 5 g에 50% 에탄올 용액(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 가하여 85°C 수조에서 25분간 가온하여 추출하였다. 이를 9,000 rpm으로 10분간 원심분리(Hanil Supra 22K, Hanil Science Industrial Co., Seoul, Korea)한 뒤 membrane filter(0.45 µm)로 여과한 후 HPLC(Agilent Technologies Inc.)로 분석하였다. 유리당 표준물질은 fructose, glucose, sucrose, maltose, lactose(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 분석 컬럼은 carbohydrate analysis column(4.6×250 mm, 4 µm, Waters Co., Milford, DE, USA)을 사용하였고, 이동상은

80% acetonitrile(JT baker Co., Phillipsburg, NJ, USA)을 사용하였으며 유속은 1.0 mL/min, 시료주입량은 20 µL로 하여 RI detector(M410RI, Water Co., Milford, DE, USA)로 검출하였다.

8. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량측정은 Folin O & Denis W(1912)의 방법을 응용하여 측정하였다. 시료액 1 mL에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 1 mL를 가하고 3분간 반응시킨 후 10% Na₂CO₃ 1 mL를 넣고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 분광광도계(UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질은 gallic acid(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 검량곡선을 작성하고 이로부터 총 폴리페놀 함량을 mg gallic acid equivalents(GAE)/g으로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량은 Davis WB(1947)의 방법을 응용하여 측정하였다. 시료액 1 mL에 diethylene glycol 2 mL와 1 N NaOH 20 µL를 가한 다음 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 분광광도계를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준물질로 rutin(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 검량곡선을 작성하였고 이로부터 총 플라보노이드 함량은 mg rutin equivalents (RE)/g으로 나타내었다.

9. DPPH 및 ABTS radical 소거활성 측정

DPPH 및 ABTS radical 소거능은 항산화 물질의 전자공여 작용으로 인하여 방향족 화합물 및 아민류가 환원되어 나타나는 탈색반응을 평가지표로 사용한다(Kwon GJ 등 2007). 본 연구에서는 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거활성의 경우 Choi JS 등(1993)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 각 농도별로 조제한 시료액 100 µL에 에탄올 200 µL를 가하고 0.2 mM DPPH 용액 300 µL를 5초간 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader(Synergy HT, Biotec, Washington DC, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신에 에탄올을 첨가하여 실험하였다.

ABTS assay는 Arts MJ 등(2004)의 방법을 변형하여 측정하였다. 농도별로 조제한 시료액 5 µL에 ABTS radical 용액 195 µL를 첨가하여 7분간 반응시킨 후 microplate reader(Biotec)를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신에 에탄올을 첨가하여 실험하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: Absorbance of sample

B: Absorbance of blank

10. 통계처리

본 연구는 각 시험항목별로 3회 반복하여 분석하였으며, 통계처리는 SPSS program 23.0(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 각 sample간의 통계적 유의성 검증은 Student's t-test와 one-way ANOVA를 실시하였으며, 각 군 간의 차이는 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 유산균의 생육

L. plantarum GBL17의 생육 조건을 규명하기 위하여 MRS 액체배지를 이용하여 30°C와 37°C에서 48시간 동안 각각 배양하면서 균수 및 pH 변화를 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 *L. plantarum* GBL17을 37°C에서 배양한 경우 18시간에 최대 증식을 나타내었으나 30°C에서는 6~12시간 사이에 대수기를 지나 배양 24시간에 최대 증식을 나타내었으며 37°C에서 배양하였을 때보다 높은 흡광도 값을 보였다. 배양 온도에 따른 pH 변화는 30°C와 37°C 모두 배양 12시간까지 급격히 감소한 이후 pH 3.8에서 유지되는 경향을 보였으며, 각 온도의 최대 생육지점인 24시간 및 18시간에서 각각 pH 3.80 및 pH 3.79를 나타내었다. 이는 Jeon CP 등(2010)이 보고한 새우젓으로부터 분리된 *L. brevis* HLJ59가 배양 후 24시간에서 최대 증식을 나타내었다는 결과와 일치하였으며, Yang EJ & Chang HC(2008)의 연구에서 김치로부터 분리된 *L. plantarum* AF1이 배양 20시간에서 생육 정지기에 이르렀으며, 생육에 따라 pH가 감소하여 정지기에서 pH 3.9에

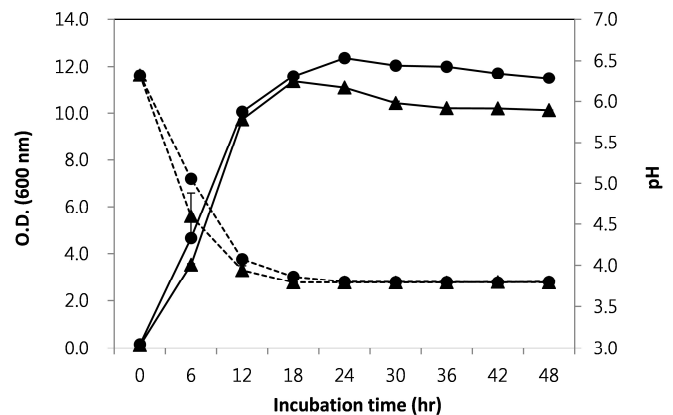


Fig. 1. Growth rate (solid line) and pH changes (dashed line) of *L. plantarum* GBL17 in MRS broth at different temperature (●: 30°C, ▲: 37°C).

도달 후 유지되었다는 보고와 유사한 것으로 나타났다. 따라서 복분자 착즙액을 발효시키기 위하여 첨가하는 starter는 최대 증식을 나타낸 30°C에서 24시간 배양액을 복분자 착즙액에 2%(v/v)가 되도록 첨가하여 8.40~8.41 log CFU/mL가 되도록 유산균 접종량을 결정하였다.

2. 복분자 유산 발효액의 pH, 산도 및 당도 변화

복분자 착즙액에 *L. plantarum* GBL17을 접종한 후 30°C에서 24시간 간격으로 총 120시간까지 발효를 진행한 결과 발효 96시간에서 산도는 2.58%을 나타내었고 발효 120시간에는 2.84%로 산도가 증가하는 경향을 나타내었다. 하지만 발효 72시간 이후부터 산도증가 폭이 완만하였으며 관능평가 결과 신맛이 너무 강하여 기호도가 낮아 추후 유산발효액 가공 등을 고려하여 발효시간은 72시간까지로 정하였다(data not shown). 따라서 복분자 착즙액에 *L. plantarum* GBL17을 접종한 후 30°C에서 72시간 발효하면서 pH 및 산도의 변화를 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 균주를 접종한 유산발효액의 초기 pH는 3.67에서 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하여 72

시간 후 pH 3.22를 나타내었으며, 대조구로 유산균을 접종하지 않은 복분자 착즙액의 경우 초기 pH 3.64에서 72시간 후 pH 3.57로 유산균 첨가군에 비하여 미미한 감소를 나타내었다. 산도는 유산발효가 진행되면서 계속 증가하여 초기 0.98%에서 72시간 발효 후 2.38%까지 크게 증가하였으나, 대조군의 산도는 초기 0.98%에서 72시간 후 1.04%로 유산균 첨가군에 비해 미미한 증가 폭을 나타내었다. 이는 Lee YH 등(2008)의 *L. plantarum* KLAB21를 이용한 복숭아 주스의 발효연구에서 발효가 진행됨에 따라 pH가 감소하고 산도는 증가하였으며 그 증가폭은 발효초기 1일 동안 가장 크게 나타난다는 연구결과와 유사하였다. 한편, 복분자 착즙액에 *L. plantarum* GBL17을 접종한 후 30°C에서 72시간 발효하면서 당도의 변화를 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 초기 당도는 10.3 °Brix에서 발효 72시간 후 당도가 감소하여 9.8 °Brix로 나타났으나 유산균을 접종하지 않은 대조군의 경우 10.4 °Brix에서 72시간 후 10.2 °Brix를 나타내어 복분자 착즙액이 *L. plantarum* GBL17에 의하여 정상적인 유산발효가 이루어진 것으로 판단된다.

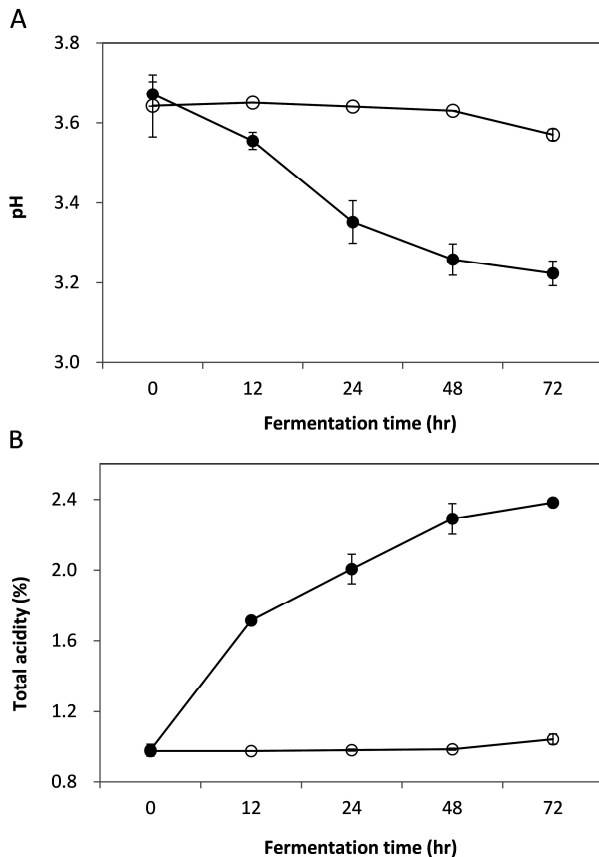


Fig. 2. Changes in pH (A) and total acidity (B) of black raspberry juice during fermentation for 72 hr at 30°C (○: control, ●: *L. plantarum* GBL17).

3. 복분자 유산 발효액의 생균수 변화

복분자 착즙액에 *L. plantarum* GBL17을 접종한 후 시간별 생균수 변화를 측정된 결과는 Table 1에 나타내었다. 초기 유산균수는 8.40 log CFU/mL에서 발효 진행에 따라 유산균수가 증가하여 24시간에서 11.15 log CFU/mL로 최대값을 나타낸 후 점차 감소하여 발효 72시간 후 9.26 log CFU/mL를 나타내었다. 이는 유산 발효에 따른 당 및 무기질의 소모가 균체의 생존율에 영향을 미친 것으로 판단된다(Kang KM 등 2013). 반면 대조구로 유산균을 접종하지 않은 복분자 착즙액의 경우 발효기간 동안 유산균이 검출되지 않았다. Yang M 등(2013)은 *L.*

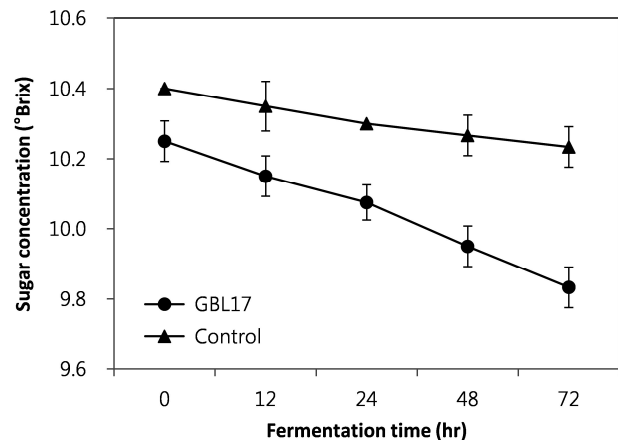


Fig. 3. Changes in sugar concentration of black raspberry juice during fermentation with *L. plantarum* GBL17.

Table 1. Changes in lactic acid bacteria of fermented black raspberry juice by *L. plantarum* GBL17

Fermentation time (h)	Lactic acid bacteria (log CFU/mL)	
	Non-fermented black raspberry juice	Fermented black raspberry juice
0	ND ¹⁾	8.40±0.01 ^{2)ds)}
12	ND	10.22±0.23 ^b
24	ND	11.15±0.56 ^a
48	ND	10.60±0.52 ^{ab}
72	ND	9.26±0.12 ^c

¹⁾ Not Detected.

²⁾ Values are mean±SD.

³⁾ Mean±SD with different superscript within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

plnatarum YML-4를 이용하여 두유 요구르트를 제조하기 위해 32시간까지 발효한 결과 24시간에서 생육이 가장 좋았으며 24시간 이후부터 생육이 점차 감소한다고 보고 하였으며, Yang SJ & Hong JH(2015)는 *L. plnatarum* CGKW3을 이용하여 블루베리 착즙액 및 추출물을 배양한 모든 구간에서 발효 24시간에 최대 생육을 나타낸 후 점차 감소하였다고 보고하여 본 연구결과와 일치하였다. Song TC 등(2007)에 따르면 발효액에 대한 당 첨가를 통해 24시간 이후 지속적인 유산균의 생육을 증가 시킬 수 있다고 밝히고 있으나 본 연구에서는 첨가물 없이 유산균의 생균수가 최대치로 나타나는 배양 24시간(11.15±0.56 log CFU/mL)을 최적 발효 시간으로 선정 후 실험을 진행하였다.

4. 복분자 유산 발효에 따른 유기산 및 유리당 함량 변화

L. plantarum GBL17을 이용한 복분자 착즙액의 유산발효 전후의 유기산 함량변화를 Table 2에 나타내었다. 유산 발효 전 복분자 착즙액에 존재하는 유기산은 citric acid와 malic acid로 각각의 함량은 13.70 mg/g, 1.71 mg/g

으로 나타났으나 24시간동안 *L. plantarum* GBL17을 이용한 발효 후 citric acid는 11.68 mg/g, malic acid는 1.30 mg/g으로 감소하는 경향을 나타내었다. 반면 lactic acid의 경우 발효 전에는 검출되지 않았으나 발효 후 14.51 mg/g으로 검출되어 유기산 중 가장 높은 함량을 나타내었으며 그밖에 acetic acid와 tartaric acid 및 succinic acid는 유산 발효 전과 유산 발효액 모두에서 검출되지 않았다. 이는 복분자 농축액의 유기산 함량이 유산발효 후 lactic acid의 함량은 9배 이상 증가한 반면 citric acid는 감소한다는 Park YS & Chang HG(2003)의 연구 결과와 유사하였다. 이와 같은 복분자 착즙액의 발효에 의한 lactic acid 증가는 발효에 사용된 *L. plantarum* GBL17 균주가 젖산균의 일종으로서 발효 중 균주에 의해 lactic acid가 생성되었으며 유기산의 경우 TCA 회로의 중간산물로서 젖산균의 생육에 이용되었기 때문에 citric acid 및 malic acid의 감소가 나타난 것으로 판단된다(Lee YH 등 2008).

L. plantarum GBL17을 이용한 복분자 착즙액의 유산발효 전후의 유리당 함량변화를 Table 3에 나타내었다. 발효 전 확인된 주요 유리당은 fructose와 glucose로 함량은 각각 57.86 mg/g, 46.00 mg/g이었으나 유산균을 이용한 발효 후 fructose 함량은 54.66 mg/g, glucose의 함량은 42.85 mg/g으로 감소되었으며 sucrose, maltose와 lactose는 발효 전과 발효 후 모두에서 검출되지 않았다. 복분자 착즙액의 유산발효 후 fructose와 glucose의 감소는 발효 중 유산균의 생육을 위한 영양원과 유산 및 유기산 발효의 기질로 당이 이용되었기 때문으로 판단된다(Kim KM 등 2012).

5. 복분자 유산 발효액의 항산화 활성

폴리페놀 및 플라보노이드는 대표적인 식물체의 2차 대사산물로서 항산화, 항염증, 항혈전 및 항암 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며 생리활성의 주요 평가 지표로 이용된다(Shahidi F & Wanasundara PK 1992, An BJ 등 2002). 복분자 착즙액의 유산발효에 따른 항산화 활성 변화를 측정하기 위한 총 폴리페놀, 총 플라보

Table 2. Changes in organic acid content of black raspberry juice by the fermentation

Black raspberry juice	Organic acid content (mg/g)					
	Lactic acid	Citric acid	Malic acid	Acetic cid	Tartaric acid	Succinic acid
Non-fermented	ND ¹⁾	13.70±0.42 ²⁾	1.71±0.07	ND	ND	ND
Fermented	14.51±0.14	11.68±0.75*	1.30±0.24*	ND	ND	ND

¹⁾ Not Detected.

²⁾ Values are mean±SD.

* $p < 0.05$ indicate statistically significant differences from the non-fermented black raspberry juice.

Table 3. Changes in free sugar content of black raspberry juice by the fermentation

Black raspberry juice	Free sugar content (mg/g)				
	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	Lactose
Non-fermented	57.86±0.05 ¹⁾	46.00±0.02	ND ²⁾	ND	ND
Fermented	54.66±0.04*	42.85±0.03*	ND	ND	ND

¹⁾ Values are mean±SD.

²⁾ Not detected.

**p*<0.05 indicate statistically significant differences from the non-fermented black raspberry juice.

Table 4. The effect *L. plantarum* GBL17 fermentation on total polyphenol contents, total flavonoid contents, DPPH and ABTS radical scavenging in black raspberry juice

Black raspberry juice	Total content of water-soluble compounds		Radical scavenging activity (%)	
	Polyphenol (mg GAE ¹⁾ /g)	Flavonoid (mg RE ²⁾ /g)	DPPH	ABTS
Non-fermented	2.44±0.04 ³⁾	0.65±0.04	62.96±0.72	41.24±1.89
Fermented	3.71±0.03*	0.83±0.01*	70.92±0.64*	44.12±0.23

¹⁾ GAE: gallic acid equivalents.

²⁾ RE: rutin equivalents.

³⁾ Values are mean±SD.

**p*<0.05 indicate statistically significant differences from the non-fermented black raspberry juice.

노이드, DPPH radical 소거활성 및 ABTS radical 소거능 분석결과를 Table 4에 나타내었다. 유산 발효 전 총 폴리페놀 함량은 2.44±0.04 mg GAE/g을 나타낸 반면 *L. plantarum* GBL17로 발효한 복분자 유산 발효액의 총 폴리페놀 함량은 3.71±0.03 mg GAE/g으로 유의적인 증가를 나타내었다. 이는 Lee JB 등(2014)의 부추 당침액의 유산균 발효에 따라 총 폴리페놀 함량의 증가가 나타난다는 보고와 유사한 것으로 나타났다. 총 플라보노이드 함량의 경우 발효 전 0.65±0.04 mg RE/g에서 유산 발효 후 0.83±0.01 mg RE/g으로 유의적으로 증가하는 것으로 나타나 *L. plantarum* GBL17을 이용한 복분자 착즙액의 발효는 항산화 물질의 증가 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

복분자 착즙액의 유산발효에 따른 DPPH와 ABTS radical 소거능 분석 결과 *L. plantarum* GBL17을 이용한 유산발효에 의해서 DPPH 및 ABTS radical 소거능의 증가가 확인되었으며, 특히 DPPH radical 소거능의 경우 대조구에 비하여 8%가량의 유의적 증가를 나타냈다(Table 4). 이는 Park YS & Chang HG(2003)의 복분자의 젖산발효 후 DPPH radical 소거능이 소폭 감소하였다는 보고와는 상이하나 이러한 원인은 발효에 관여하는 균주의 특성에 따라 생성되는 발효대사 산물의 차이로 인해 DPPH radical 소거능에 차이가 있는 것으로 판단된다(Jang JY 등 2015). 또한 DPPH에서는 유의적 증가가 있었으나, ABTS의 radical 소거능에서는 대조군과 유의적 차이를 보이지 않았는데, 그 이유는 DPPH의 경우 자유 radical에 대한 환원력인 것

에 반해 ABTS는 양이온 radical에 대한 환원력으로 두기질과 반응물과의 결합 정도가 달라져 radical 제거 능력의 차이를 나타낸 것으로 판단된다(Jeong JW 등 1994, Li H 등 2007). 이러한 결과를 바탕으로 항산화 활성(Lee SM 등 2012)이 우수한 것으로 알려진 복분자를 *L. plantarum* GBL17 균주로 유산발효 시 항산화 증진효과를 나타내어 향후 기능성 제품 개발에 활용 가능할 것으로 기대된다.

IV. 결론

본 연구에서는 복분자를 원료로 하여 *L. plantarum* GBL17 균주에 의한 유산발효 특성을 확인하고 유산발효물의 유기산, 유리당 함량 및 항산화 활성을 조사하였다. *L. plantarum* GBL17의 생육조건 분석결과 37°C보다 30°C에서 잘 생육하였으며, 30°C에서 24시간 배양 시 높은 생육도를 나타내었다. 복분자 착즙액에 *L. plantarum* GBL17을 2%접종 후 30°C에서 발효시간에 따른 유산발효 특성을 조사하였다. 발효가 진행됨에 따라 pH는 3.67에서 72시간 후 pH 3.22까지 감소하였으며, 산도는 발효시간이 경과함에 따라 증가하여 72시간 후 2.38%를 나타내었다. 당도는 발효가 진행되면서 감소하여 발효 종료 시 9.8 °Brix를 나타내었고, 유산균 생균수는 접종 후 증가하여 24시간에서 11.15 log CFU/mL로서 최대값을 나타낸 후 감소하여 72시간 후 9.26 log CFU/mL를 나타내었다. 생육 특성이 가장 우수한 24시간 발효물을 이용하여 유산 발효에 따른 유기산 및 유리당 함량을 확인하였

다. 유기산의 경우 *L. plantarum* GBL17을 이용한 유산발효에 의해서 lactic acid가 14.51 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타낸 반면 citric acid와 malic acid는 감소하여 각각 11.68 mg/g, 1.30 mg/g으로 나타났으며, 유리당 분석에서는 fructose와 glucose의 함량이 각각 감소하여 54.66 mg/g, 42.85 mg/g으로 확인되었다. 복분자 유산 발효물의 항산화 활성은 유산발효 후에 총 폴리페놀 함량이 2.44±0.04 mg GAE/g에서 3.71±0.03 mg GAE/g으로, 총 플라보노이드 함량은 0.65±0.04 mg RE/g에서 0.83±0.01 mg RE/g으로 유의적인 증가를 나타내었다. 또한 DPPH radical 소거능은 유산발효에 의하여 8%가량의 유의적 증가를 나타내었고, ABTS radical 소거능 또한 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다. 본 연구를 통해 다양한 생리활성을 지닌 복분자의 *L. plantarum* GBL17에 의한 유산발효 가능성을 확인하고 유산발효 시 항산화 활성이 증가되는 결과를 바탕으로 향후 기능성 유산발효 음료의 개발 가능성이 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 전북 고창군에서 시행한 2015년 지역 농식품 선도클러스터 육성사업의 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 깊이 감사드립니다.

References

Ahn DK. 1998. Illustrated book of Korea medicinal herbs. Kyohuk publishing. Seoul, Korea. pp 946-947

An BJ, Bae MJ, Choi HJ, Zhang YB, Sung TS, Choi C. 2002. Natural products, organic chemistry: Isolation of polyphenol compounds from the leaves of Korean persimmon (*Diospyros kaki* L. Folium). J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 45(4): 212-217

Ann YG, Jang BC, Park SJ. 2013. Biological activity and improvement effect on irritable bowel syndrome of wax ground extract and probiotic lactic acid bacteria. Korean J Food Nutr 26(1):137-145

Arts MJ, Haenen GR, Voss HP, Bast A. 2004. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. Food Chem Toxicol 42(1):45-49

Choi JS, Lee JH, Park HJ, Kim HG, Young HS, Mun SI. 1993. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus davidiana*. Kor J Pharmacogn 24(4):299-303

Davis WB. 1947. Determination of flavonones in citrus fruits. Anal Chem 19:476

Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phospho-molybdic compounds as color reagents. J Biol Chem 12:239-243

Ham JS, Kim HS, Noh YB, Chae HS, Ahn CN, Han GS, Choi SH, Jeong SG. 2007. Anti-allergy effect of lactic acid bacteria. Korean J Dairy Sci Technol 25(1):21-25

Han JG, Kwon MC, Ha JH, Jeong HS, Kim Y, Jeong MH, Kim JC, Lee HY. 2009. Enhancement of immuno modulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel extracts by nano-encapsulation process. Korean J Medicinal Crop Sci 17(1): 54-60

Jang JY, Lee JE, Choi EJ, Oh YJ, Lee SH, Kim HJ. 2015. Effect of starter cultures on the antioxidant activities of *Allium hookeri* root-hot water extract. Korean J Food Cook Sci 31(1):098-102

Jeon CP, Kim YH, Lee JB, Jo MS, Shin KS, Choi CS, Kwon GS. 2010. Physiological characteristics and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus brevis* HLJ59 isolated from salted shrimp. Kor J Microbiol 46(1):9-14

Jeon YH, Sun X, Kim MR. 2012. Antimicrobial activity of the ethanol extract from *Rubus coreanus* against microorganisms related with foodborne illness. Korean J Food Cook Sci 28(1):9-15

Jeong JW, Lee YC, Jung SW, Lee KM. 1994. Flavor components of citron juice as affected by the extraction method. Korean J Food Sci Technol 26(4):709-712

Jung SJ, Kim NY, Jang MS. 2008. Formulation optimization of salad dressing added with *Bokbunja* (*Rubus coreanus* Miquel) juice. J Korean Soc Food Sci Nutr 37(4):497-504

Kang KM, Park CS, Lee SH. 2013. Effects of D-tagatose on the growth of intestinal microflora and the fermentation of yogurt. J Korean Soc Food Sci Nutr 42(3):348-354

Kato I, Endo K, Yokokura T. 1994. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. Int J Immunopharmacol 16(1): 29-36

Korea Food and Drug Administration. 2005. Food standard code. Korea Food and Drug Administration. Seoul, Korea. pp 367-385

Korea Food and Drug Administration. 2008. Health functional food code. Section III.3.3.6. Citric acid. Food and Drug Administration. Seoul, Korea. pp III.3.3.6

Kim JE, Jo HJ, Yu MJ, Song KB, Kim HY, Hwang IG, Yoo SM, Han GJ, Park JT. 2014. Freeze-thawing conditions to produce high quality Bokbunja (*Rubus occidentalis*). Korean J Food Sci Technol 46(6):710-715

Kim KM, Kim YN, Choi BK, Oh DH. 2012. Physicochemical and microbiological changes of the fermented dandelion (*Taraxacum officinale*) extracts with raw sugar. Korean J Food Preserv 19(1):131-137

Ko KH, Liu W, Lee HH, Yin J, Kim IC. 2013. Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in different kimchi. J Korean Soc Food Sci Nutr 42(1):89-95

Kwon GJ, Choi DS, Wang MH. 2007. Biological activities of hot water extracts from *Euonymus alatus* leaf. Korean J Food

- Sci Technol 39(5):569-574
- Kwon KS, Kim YS, Song GS, Hong SP. 2004. Quality characteristics of bread with rubi fructus (*Rubus coreanus* Miquel.) juice. Korean J Food Nutr 17(3):272-277
- Lee JB, Bae JS, Son IK, Jeon CP, Lee EH, Joo WH, Kwon GS. 2014. Antioxidant and ACE inhibiting activities of sugared-buchu (*Allium ampeloprasum* L. var. *porum* J. Gay) fermented with lactic acid bacteria. J Life Sci 24(6):671-676
- Lee JH, Choi HR, Lee SJ, Lee MJ, Ko YJ, Kwon JW, Lee HK, Jeong JT, Lee TB. 2014. Blood pressure modulation effects of black raspberry extracts *in vitro* and *in vivo*. Korean J Food Sci Technol 46(3):375-383
- Lee JH, Hwang HJ. 2006. Quality characteristics of curd yogurt with *Rubus coreanum* Miquel juice. Korean J Culin Res 12(2):195-205
- Lee KE, Choi UH, Ji GE. 1996. Effect of kimchi intake on the composition of human large intestinal bacteria. Korean J Food Sci Technol 28(5):981-986
- Lee SJ. 2013. Physico-chemical characteristics of black raspberry fruits (*Bokbunja*) and wines in Korea. Korean J Food Sci Technol 45(4):451-459
- Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Kwon JW, Lee HK, Jeong JT, Lee TB. 2014. Effects of unripe black raspberry extracts on prostate cancer cell line and rat model of benign prostatic hyperplasia. J Korean Soc Food Sci Nutr 43(4):507-515
- Lee SM, You YH, Kim KM, Park JJ, Jeong CS, Jhon DY, Jun WJ. 2012. Antioxidant activities of native Gwangyang *Rubus coreanus* Miq. J Korean Soc Food Sci Nutr 41(3):327-332
- Lee SU, Baek SH, Kim JY, Lee JH, Heo JW, Lee KS. 2009. Fermentation characteristics of Korean raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) with chlorella. J Life Sci Nat Res 32(1):1-4
- Lee YH, Choi SW, Park HD. 2008. Characteristics of lactic acid fermentation of peach juice by *Lactobacillus planatarum* KLAB21 possessing antimutagenic effects. Korean J Food Preserv 15(3):469-476
- Leroy F, De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Tech 15(2):67-78
- Li H, Choi YM, Lee JS, Park JS, Yeon KS, Han CS. 2007. Drying and antioxidant characteristics of the shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom in a conveyer-type far-infrared dryer. J Korean Soc Food Sci Nutr 36(2):250-254
- Park PJ, Lo SC, Han SS. 2004. Control of disease, insect pest and weed cultivation area of *Rubus coreanus* Miquel. J Life Sci Nat Res 26(1):56-67
- Park YS, Chang HG. 2003. Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 46(4):367-375
- Rha YA, Kang BN. 2014. Quality evaluation of *Sulgidduk* added with *Rubus coreanus* Miquel leaf powder. Korean J Culin Res 20(6):128-135
- Seo JH, Lee H. 2007. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. Korean J Food Sci Technol 39(6):681-687
- Shahidi F, Wanasundara PK. 1992. Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr 32:67-103
- Shin HJ, Nam HG, Lim IJ, Cha WS. 2006. Comparison of volatile flavor compounds in *Bokbunja* (*Rubus coreanus* Miquel) wines with and without mushroom extracts. Korean J Biotechnol Bioeng 21(6):410-413
- Song TC, Lee CH, Kim YE, Kim IH, Han DS, Yang DH. 2007. The functionality of the saltwort (*Salicornia herbacea* L.) extract fermented juice. J Korean Soc Food Sci Nutr 36(4):395-399
- Sung KH, Lee JH. 2009. A study on quality characteristics of teriyaki sauce with added *Rubus coreanus* Miquel. J East Asian Soc Dietary Life 19(6):958-966
- Yang EJ, Chang HC. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. Kor J Microbiol Biotechnol 36(4):276-284
- Yang M, Kwak JS, Jang SR, Jia YA, Park IS. 2013. Fermentation characteristics of soybean yogurt by mixed culture of *Bacillus* sp. and lactic acid bacteria. Korean J Food Nutr 26(2):273-279
- Yang SJ, Hong JH. 2015. Quality characteristics of *Yanggaeng* prepared with fermented blueberry by lactic acid bacteria. Korean J Food Cook Sci 31(2):128-135
- Yoon HJ, Park SY, Oh ST, Lee KY, Yang SY. 2011. Extract of *Rubus coreanus* fruits increases expression and activity of endothelial nitric oxide synthase in the human umbilical vein endothelial cells. J Life Sci 21(1):44-55
- Yu OK, Kim MA, Rho JO, Sohn HS, Cha YS. 2007. Quality characteristics and the optimization recipes of chocolate added with *Bokbunja* (*Rubus coreanus* Miquel). J Korean Soc Food Sci Nutr 36(9):1193-1197
- Yu OK, Kim JE, Cha YS. 2008. The quality characteristics of jelly added with *Bokbunja* (*Rubus coreanus* Miquel). J Korean Soc Food Sci Nutr 37(6):792-797

Received on Dec.9, 2015/ Revised on Dec.21, 2015/ Accepted on Dec.24, 2015