

오디 유산균 발효물의 이화학적 특성 및 항산화 활성

이대훈 · 홍주헌

대구가톨릭대학교 식품공학전공

Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of Fermented Mulberry by Lactic Acid Bacteria

Dae-Hoon Lee and Joo-Heon Hong

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu

ABSTRACT The physicochemical properties and antioxidant activities of fermented mulberry by lactic acid bacteria were investigated. The viable cell counts of lactic acid bacteria slowly increased up to 8.31 log CFU/mL. The pH and titratable acidity were 3.90 and 0.15%, respectively, after 24 h of fermentation. Color in terms of L and a values decreased, whereas b and ΔE values increased. The total anthocyanin contents of fermented mulberry (171.40 mg/100 g) was higher than that of mulberry (144.70 mg/100 g). The cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside contents of fermented mulberry were 61.39 mg/100 g and 85.45 mg/100 g, respectively. Total phenolic and flavonoid contents of fermented mulberry (10.75 g/100 g and 5.02 g/100 g, respectively) was higher than those of mulberry (4.53 g/100 g and 1.77 g/100 g, respectively). The oxygen radical absorbance capacity of fermented mulberry was 292.94 $\mu\text{M/g}$. The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity and superoxide radical scavenging activity of fermented mulberry at 250~2,500 $\mu\text{g/mL}$ were 17.40~58.21% and 32.63~87.34%, respectively. The ferric reducing antioxidant power and reducing power of fermented mulberry at 250~2,500 $\mu\text{g/mL}$ were 37.03~762.13 μM and 0.12~0.74, respectively. The results suggest that mulberry fermented by lactic acid bacteria has potential as functional materials in food industry.

Key words: lactic acid bacteria, mulberry, anthocyanin, physicochemical properties, antioxidant activity

서 론

산화적 스트레스의 직접적인 원인이 되는 활성산소종은 불안정하고 반응성이 좋아 여러 생체 물질과 쉽게 반응하고, 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하게 한다. 이런 관계로 활성산소를 제거하기 위한 항산화성 물질을 과일, 채소 및 자생식물 등 천연물에서 찾고자 하는 노력이 많이 시도되고 있다(1).

오디는 뽕나무과(*Moraceae*), 뽕나무속(*Morus*)에 속하는 교목성 낙엽수인 뽕나무의 열매로서 온대에서 아열대에 이르기까지 널리 분포하며, 분포 밀도가 가장 높은 곳은 동아시아의 한국, 중국 대륙 및 일본 열도이다(2). 오디는 당과 유기산뿐만 아니라 anthocyanin 색소를 다량 함유하고 있는데, 그 성분은 cyanidin-3-glucoside(C3G)와 cyanidin-3-rutinoside(C3R)가 대부분인 것으로 알려졌다.

오디에 함유된 안토시아닌은 붉은색 쌀보다는 4배 이상, 검정콩 및 포도와 비교 시 각각 9배 및 23배나 많이 함유되어 있다고 보고되고 있다(3). 오디의 다양한 기능성 성분과 효능이 알려지면서 기능성 식품과 국민 건강 증진에 기여할 수 있는 천연식품으로 보고되고 있는데, 특히 레스베라트롤이라는 폴리페놀 성분이 함유되어 있어 항산화, 항암 및 항염증 등 다양한 생리활성이 밝혀져 의약품 및 기능성 식품 소재로 주목받고 있는 물질이다(4). 현재까지 오디 발효에 관한 연구로는 오디 와인의 최적 발효 조건에 관한 연구(5), 오디를 첨가한 막걸리 발효에 의한 이화학적 및 미생물학적 연구(6), 오디 분말을 첨가한 요구르트 품질 및 항산화능에 대한 연구(7), 토종 발효미생물을 이용한 오디 발효주의 항산화 및 향기성분에 대한 연구(8)와 오디 EM 활성액(효모, 유산균 및 광합성 세균 등의 복합 미생물 제제) 발효 추출물의 항산화 효과(9) 등이 보고되어 있다. 이처럼 오디의 다양한 연구가 보고되고 있으나 오디 발효물 자체의 기능성 식품 소재에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

최근 발효 식품의 생리활성 작용이 보고됨에 따라 프로바이오틱스를 이용한 발효물의 면역기능 강화, 장 기능 개선, 생리조절 작용 및 새로운 향균물질의 생성 등과 관련된 여러 유익한 효능에 더욱 관심을 두는 추세이다(10). 유산균은

인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로 오래전부터 발효 유제품을 중심으로 인류 생활에 광범위하게 활용되고 있으며, 주요 대사물질은 lactic acid로 이것에 의한 pH의 저하가 발효식품의 보존성을 향상시키는 제1의 요인이다. 그러나 유산은 pH를 저하함으로써 미생물의 생육을 억제하는 것 이외 비해리형의 유산염은 전기적 proton force (구배)를 파괴함으로써 항균 작용을 나타낸다(11). 현재 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*와 같은 젖산균이 probiotic에 많이 이용되고 있으며, 이 균들은 식품 내에서 젖산발효를 일으켜 식품의 부패 방지 및 영양학적 가치가 증진되고 bacteriocin과 같은 항균물질을 분비하여 식중독균을 억제하는 효과가 있다(12).

따라서 본 연구에서는 다른 영양원은 배제하고 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있는 오디만을 영양원으로 유산균을 이용하여 발효하였으며, 오디 유산균 발효물의 이화학적 특성 및 항산화 활성을 평가하여 식품산업에서의 활용 가능성에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험재료로 사용한 오디는 전라북도 부안 지역에서 재배된 Gwasang 품종을 냉장상태로 구입하여 본 실험에 사용하였으며, 시료는 분쇄기(FM-909W, Hanil Co., Sejong, Korea)로 분쇄한 다음 autoclave(HB-506-4, Hanbaek Sci., Co., Bucheon, Korea)를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균시킨 후 실험에 사용하였다.

발효물 제조

오디 발효물 제조를 위하여 사용된 균주는 전통 발효식품 중 김치에서 분리하여 대구가톨릭대학교 식품공학전공 기능성 식품연구실에서 보관 중인 *Lactobacillus plantarum* CGKW3(KACC92075P) 균주를 MRS broth(Difco Co., Detroit, MI, USA)에 24시간 전 배양한 다음, 배양액 2% (v/v)를 오디 분쇄물에 접종하고 37°C에서 0~96시간 정지 배양(IL-21, Jeio Tech., Daejeon, Korea)하였다. 배양이 완료된 발효물은 원심분리기(VS-6000 CFN, Vison Scientific Co., Bucheon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분 동안 분리한 다음 상등액을 동결건조(FreezeZone 2.5, Labconco Co., Kansas, MO, USA) 하여 -70°C 이하에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

생균수, pH 및 산도

생균수 측정은 오디 발효물을 1분 동안 균질화시킨 후 1 mL를 취해 MRS agar(Difco Co.) 배지를 사용하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 형성된 colony 수를 계측하고 희석배수를 곱하여 나타내었다. pH 측정은 pH meter(CH-8603, Mettler Toledo Instruments Ltd., Langacher,

Switzerland)를 이용하여 오디 발효물 20 mL를 취하여 3회 반복 측정하였다. 또한 총산도는 오디 발효물 20 mL에 0.1 N NaOH(Duksan Pure Chemicals, Seoul, Korea)를 pH가 8.3이 될 때까지 적정하였으며 적정에 소비되는 0.1 N NaOH의 소모량을 유기산 함량으로 환산하여 총산 함량(% w/v)으로 아래 식으로 계산하였다.

$$\text{산도}(\%) = [a \times f \times 0.009 / 10 \times \text{시료의 비중}] \times 100$$

a: 0.1 N NaOH의 소비량(mL)

f: 0.1 N NaOH의 역가

0.009: 유산계수(0.1 N-NaOH 1 mL)

색도 측정

색도 측정은 오디 발효물 동결건조 분말을 페트리디쉬에 담아 표준색도가 Y=94.5, a=0.18, b=0.32로 보정된 색차계(Chromameter CR300, Minolta Co., Osaka, Japan)를 사용하여 밝기를 나타내는 L(lightness), 적색도를 나타내는 a(redness), 황색도를 나타내는 b(yellowness) 값을 측정하였으며, 색차 ΔE는 아래와 같이 계산하였다.

$$\Delta E = \sqrt{(L_i - L_t)^2 + (a_i - a_t)^2 + (b_i - b_t)^2}$$

L_i = intial

L_t = test

총 안토시아닌 함량 및 안토시아닌 조성

총 안토시아닌 함량 측정은 Lee 등(13)의 방법에 따라 시료 0.1 g에 pH 1.0 buffer(0.2 M potassium chloride+ 0.2 M hydrochloric acid) 또는 pH 4.5 buffer(0.2 M potassium phosphate+ 0.1 M citric acid) 2 mL를 각각 혼합한 다음 분광광도계(Ultrospec 2100pro, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 이용하여 520 nm와 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 안토시아닌 함량은 아래와 같이 cyanidin-3-glucoside를 기준으로 계산하였다.

$$\text{Total anthocyanin content (mg/100 g)} = \frac{A \times MW \times DF \times 1,000}{\epsilon \times 1}$$

$$A = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{\text{pH } 4.5}$$

$$\text{MW} = \text{molecular weight of cyanidin-3-glucoside} = 449.2 \text{ g/mol}$$

DF = dilution factor

$$\epsilon = \text{the molar absorptivity} = 26,900 \text{ L/cm} \cdot \text{mol}$$

안토시아닌 조성은 HPLC(Waters 2695, Waters Co., Miliford, MA, USA)로 분석하였다. Column은 XBridge™ C₁₈(5 μm 4.6×150 mm, Waters Co.)을 사용하였고, 검출기는 photodiode array detector(Waters 2996, Waters Co.)로 파장은 535 nm에서 검출하였으며, 이동상은 A는 water : HCOOH(90:10, v/v), B는 acetonitrile : methanol

: water : HCOOH(22.5:22.5:40:10, v/v)로 하여 1.0 mL/min의 속도로 10 μ L를 주입한 후 column 온도 30°C에서 분석하였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(14)에 따라 시료 1 mL에 1 N Folin-Ciocalteu(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) reagent 1 mL를 혼합하여 반응시킨 후 20% sodium carbonate(Duksan Pure Chemicals) 1 mL를 첨가하고 실온의 암소에서 30분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultrospec 2100pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

총 플라보노이드 함량은 Davis(15)의 방법을 응용하여 측정하였다. 시료 1 mL에 5% sodium nitrite(Duksan Pure Chemicals) 150 μ L를 혼합하여 실온에서 6분간 반응시킨 후 10% aluminium chloride(Duksan Pure Chemicals) 300 μ L를 첨가하고 실온에서 5분간 반응시킨 다음, 1 N NaOH(Duksan Pure Chemicals) 1 mL와 혼합한 후 분광광도계(Ultrospec 2100pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin(Sigma-Aldrich Co.)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

ORAC 측정은 Talcott와 Lee(16)가 항산화 활성 측정에 사용한 분석법을 이용하였다. 오디 발효물 동결건조 분말 및 Trolox를 농도별로 희석하였으며, 실험용 시료의 제조에는 중성 phosphate buffer(61.6:38.9, v/v, 0.75 M K_2HPO_4 와 0.75 M NaH_2PO_4)를 사용하였다. 검량 곡선을 작성하기 위하여 항산화 활성 비교 표준액으로 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(Trolox, Sigma-Aldrich Co.) 10 μ L를 phosphate buffer 50 mL에 용해하여 제조하였고, 측정기기는 fluorescent micro plate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co., Salzburg, Austria)를 사용하여 485 nm에서 전자가 여기되고 538 nm에서 방출되게 조절하여 분석하였다.

DPPH radical 소거 활성

DPPH radical 소거 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co.)의 환원력을 이용하여 측정하였다(17). 즉 시료 0.5 mL에 4×10^{-4} M DPPH 용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 5 mL를 혼합하여 실온에서 15분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultrospec 2100pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거 활성은 오디 발효물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity (%)=

$$\left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

Superoxide radical 소거 활성

Superoxide radical 소거 활성은 Nishikimi 등(18)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료 500 μ L에 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 100 μ L, 100 μ M phenazine methosulfate(PMS, Sigma-Aldrich Co.) 200 μ L를 혼합하여 반응시킨 후, 500 μ M nitro blue tetrazolium(NBT, Sigma-Aldrich Co.) 200 μ L 및 500 μ M β -nicotinamide adenine dinucleotide(NADH, Sigma-Aldrich Co.) 400 μ L를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultrospec 2100pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide radical 소거 활성은 오디 발효물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

Superoxide radical scavenging activity (%)=

$$\left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP는 Benzie와 Strain(19)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. FRAP reagent는 25 mL acetate buffer(300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM hydrochloric acid(Duksan Pure Chemicals)에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma-Aldrich Co.) 2.5 mL와 20 mM ferric chloride(Duksan Pure Chemicals) 2.5 mL를 첨가하여 제조하였다. 시료 30 μ L에 제조된 FRAP reagent 900 μ L와 증류수 90 μ L를 넣은 후 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultrospec 2100 pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP는 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma-Aldrich Co.)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

환원력

환원력은 Oyaizu(20)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료 1 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 2.5 mL와 1% potassium ferricyanide(Duksan Pure Chemicals) 용액 2.5 mL를 가한 후 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 10% trichloroacetic acid(Duksan Pure Chemicals) 용액 2.5 mL를 가하여 원심분리 한 후, 상등액 2.5 mL에 증류수 2.5 mL와 0.1% ferric chloride(Duksan Pure Chemicals) 용액 0.5 mL를 혼합한 다음 분광광도계(Ultrospec 2100pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 1. Change in viable cell count, pH, and total acidity of mulberry fermentation with *Lactobacillus plantarum* CGKW3

Fermentation time (h)	Viable cell count (log CFU/mL)	pH	Total acidity (%)
Unfermented	—	4.76±0.01 ^a	0.05±0.01 ^d
0	4.75±0.49 ^{c(1)2)}	4.73±0.01 ^b	0.05±0.02 ^d
24	8.31±0.03 ^a	3.90±0.00 ^e	0.15±0.01 ^c
48	8.19±0.14 ^a	3.67±0.02 ^d	0.20±0.01 ^b
72	7.88±0.27 ^a	3.52±0.01 ^e	0.23±0.02 ^a
96	6.80±0.56 ^b	3.49±0.01 ^f	0.24±0.01 ^a

¹⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

²⁾Means with different letters (a-f) within a column are significantly different ($P<0.05$).

통계 처리

모든 실험 결과는 SPSS(19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고 각 측정 평균값의 유의성($P<0.05$)은 Duncan's multiple range test를 실시하여 검정하였다.

결과 및 고찰

생균수, pH 및 산도

유산균을 이용하여 배양된 오디 발효물의 배양 시간별 생균수, pH 및 산도 변화는 Table 1에 나타내었다. 오디의 발효 시간별 생균수는 24시간 이후 8.31 log CFU/mL로 가장 높은 생균수를 나타내었으며, 발효 48~96시간에 생균수가 8.19~6.80 log CFU/mL로 감소하는 경향을 나타내었다. pH 및 산도 또한 오디 발효 24시간 이후 각각 pH 3.90 및 0.15%로 무발효 pH 4.76 및 0.05%에 비해 유의적으로 감소 및 증가를 나타내었다. Sung과 Choi(7)의 오디분말을 첨가한 요구르트의 pH 및 산도 연구에서 유산균의 대사 활동으로 인한 유기산의 증가에 의해 pH는 감소하고 산도는 증가한다고 하였다. 또한 Yang과 Hong(21)의 블루베리 유산균 발효물을 첨가한 양갱의 제조 연구에서 블루베리 배양 24시간에서 생육이 가장 높게 나타난 다음 점차 감소한다고 보고하여 본 연구와 유사한 경향을 나타내었으며, Ahn 등(22)은 뽕잎 추출액을 첨가한 발효유의 이화학적 특성 연구에서 24시간 경과 후 생균수가 증가하지 못한 것은 유산균 생육 패턴에 영향을 주는 유기산과 낮은 pH 및 높은 산도가 원인이라고 보고하였다.

Table 2. Hunter's color value of mulberry fermentation with *Lactobacillus plantarum* CGKW3

Sample	Hunter's color value			ΔE
	L	a	b	
Mulberry	27.12±0.08 ¹⁾	8.94±0.04	-0.22±0.01	—
Fermented mulberry	24.51±0.30	7.41±0.15	-0.05±0.00	3.06±0.26

¹⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

색도, 총 안토시아닌 함량 및 조성

색도는 발효과정 정도를 예측할 수 있는 지표로 이용하였으며, 오디 무발효 및 발효물의 색도를 Table 2에 나타내었다. 명도 L값은 오디 발효물에서 24.51을 나타내어 무발효 오디 27.12에 비해 감소하였으며, 적색과 녹색의 정도를 나타내는 a값은 오디 발효물에서 7.41로 무발효 오디 8.94에 비해 감소하였다. 황색과 청색의 정도를 나타내는 b값은 오디 발효물에서 -0.05로 무발효 오디 -0.22에 높게 나타나 청색도가 감소하고 황색도가 증가되었으며, 발효 전 오디를 기준으로 본 ΔE값은 오디 발효 후 3.06의 색 변화를 나타내었다. 오디 발효물의 L, a 값의 감소 및 b값의 증가는 포도주의 색깔이 일반적으로 발효 초기에 혼탁하고 불투명한 붉은 빛을 띠다가 발효를 거치면서 보다 투명한 붉은색을 나타낸다는 연구 결과와 유사하였으며(23), Lee와 Chae(24)는 적포도주 발효 중 숙성 기간이 오래될수록 포도의 안토시아닌 색소가 안정한 다중합체로 전환됨에 따라 초기의 적자색에서 황갈색의 색상으로 변한다고 보고하였다.

오디의 기능성을 부여하는 데 중요한 역할을 하는 총 안토시아닌 함량 및 조성을 Table 3에 나타내었다. 총 안토시아닌 함량은 오디 발효 후 100 g당 171.40 mg으로 무발효 오디 144.70 mg에 비해 안토시아닌 함량이 증가하였다. 또한 안토시아닌 조성에서도 C3G 및 C3R이 발효 후 각각 100 g당 61.39 mg 및 85.45 mg으로 무발효 오디 43.53 mg 및 58.78 mg보다 증가한 것으로 나타났다. 이는 Lee와 Choi(25)의 뽕나무 품종별 오디즙의 안토시아닌 조성 연구에서 Gwasang 품종의 C3G 및 C3R 함량이 각각 100 mL당 35.16 및 46.78 mg으로 C3R의 함량이 높게 나타났으며, Ryu와 Kwon(26)의 오디의 추출 공정에 따른 성분 변화 및 분말 과립차의 관능특성 연구에서 젖산균 발효과정에 의해 안토시아닌 함량이 7.1배 증가하였다고 보고하여 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 이는 오디 안토시아닌 C3G 함량은 포도, 흑콩 및 흑미보다 아주 높은 것으로 알려져 있어 오디 발효물의 안토시아닌 함량 증가는 다양한 식품

Table 3. Total anthocyanin and anthocyanin composition of mulberry fermentation with *Lactobacillus plantarum* CGKW3

Sample	Total anthocyanin (mg/100 g)	Anthocyanin composition (mg/100 g)	
		Cyanidin-3-glucoside	Cyanidin-3-rutinoside
Mulberry	144.70±5.10 ¹⁾	43.53±0.22	58.78±0.56
Fermented mulberry	171.40±1.93	61.39±0.09	85.45±0.41

¹⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

Table 4. Total phenolic, total flavonoid, and ORAC (oxygen radical absorbance capacity) of mulberry fermentation with *Lactobacillus plantarum* CGKW3

Sample	Total phenolic (tannic acid g/100 g)	Total flavonoid (rutin g/100 g)	ORAC (Trolox μ M/g FW)
Mulberry	4.53 \pm 0.07 ¹⁾	1.77 \pm 0.15	198.54 \pm 5.76
Fermented mulberry	10.75 \pm 0.18	5.02 \pm 0.60	292.94 \pm 10.67

¹⁾All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

개발에 활용할 수 있다 생각한다.

총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 ORAC

오디 유산균 발효물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 ORAC는 Table 4에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 오디 무발효에서 100 g당 4.53 g을 나타내었으나 발효에 의해 10.75 g으로 약 2배 함량이 증가하였으며, 총 플라보노이드 또한 무발효군에서 100 g당 1.77 g을 나타내었으나 발효 후 5.02 g으로 함량이 증가하였다. Seo 등(27)은 꾸지뽕 열매를 *L. casei* KCRZ 1121 및 *L. plantarum* ATCC 10830 유산균을 이용하여 발효한 다음 폴리페놀 함량이 약 47% 증가하였다고 보고하였으며, In 등(28)은 *L. mesenteroides* KACC 9145P 균주를 이용한 배 발효물 제조에서 총 폴리페놀 함량이 발효에 의해 40% 증가하였다고 보고하여 본 연구와 유사한 경향을 나타내었다. ORAC 분석은 AAPH로부터 유도된 peroxy radical에 대한 소거 활성을 형광도로 측정하며, peroxy radical 손상에 대한 억제 시간과 억제율을 모두 반영하는 측정 방법이다(29). ORAC 측정 결과 오디 발효물에서 292.94 μ M/g을 나타내어 무발효 오디 198.54 μ M/g에 비해 높은 항산화 활성을 나타내었다. Park 등(30)은 오디 물 추출물의 ORAC 측정 결과 162.77 μ M/g을 나타내었다고 하였는데, 유산균 발효를 통해 오디의 항산화능이 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 유산균 발효에 의해 저분자 폴리페놀 화합물의 증가와 미생물 대사를 통한 유용 생리활성 물질의 생성에 의한 것으로 사료된다.

DPPH 및 superoxide radical 소거 활성

오디의 유산균 발효에 의한 항산화 활성 차이를 확인하기 위해 250~2,500 μ g/mL 농도에서 DPPH 및 superoxide radical 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 오디 발효물의 DPPH radical 소거 활성은 17.40~58.21%로 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였으며, 무발효 오디 13.54~47.88%에 비해 활성이 우수하게 나타났다. Song 등(31)의 유산균 발효에 의한 톱 추출액의 항산화 활성 연구에서 톱의 항산화 활성이 유산균 발효에 의해 13~18% 증가하였으며, Kwon(9)의 EM 활성액(효모, 유산균 및 광합성 세균 등의 복합 미생물 제제)에 5% 설탕 및 오디 추출물을 농도별(0.1~2.5 mg/mL)로 첨가하여 7일간 발효한 오디의 항산화

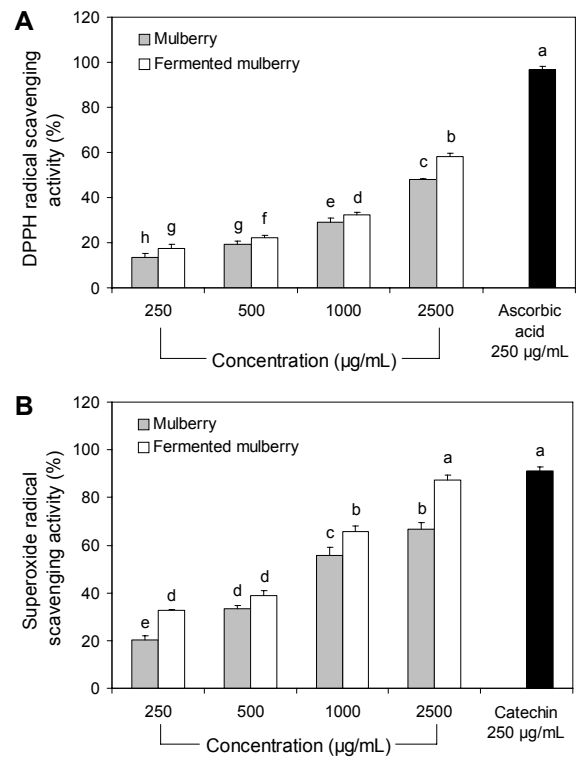


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity (A) and superoxide radical scavenging activity (B) of fermented mulberry by *Lactobacillus plantarum* CGKW3. All values are expressed as mean \pm SD (n=3). Means with different letters (a-h) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

연구 결과 모든 농도에서 오디 발효물의 항산화 활성이 약 7~12% 증가된 결과를 나타내었다. 또한 Lee와 Bae(4)는 오디를 물, 에탄올 및 메탄올을 이용하여 제조한 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 2,500 μ g/mL 농도에서 약 40~70% 소거 활성을 나타내었다. 본 연구에서는 분쇄한 오디를 영양원으로 하여 유산균을 접종한 발효물의 DPPH radical 소거 활성 측정 시 2,500 μ g/mL 농도에서 약 60% 활성을 나타내어 오디 분쇄물에서도 추출물(4)과 유사한 소거 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이는 폴리페놀 성분과 같은 hydroxyl group을 포함하는 화합물이 DPPH radical과 최적으로 반응한다는 연구 결과로 미루어 볼 때(32), 유산균을 이용한 오디 발효에 의해 폴리페놀과 플라보노이드 화합물의 함량이 증가되어 생산된 대사산물이 유효성분으로 작용하거나 성분 변성을 통해 활성이 증가하기 때문이라 사료된다.

생체 내 다양한 전자전달 시스템에서 발생하는 superoxide radical은 활성산소종 생성의 주요한 원인 인자로 세포와 조직의 손상 및 사멸을 야기한다고 알려졌다. 오디 발효물의 superoxide radical 소거 활성은 32.63~87.34%로 무발효 오디 20.45~66.56%에 비해 우수한 활성을 나타내었다. 또한 250 μ g/mL 농도에서 양성대조군으로 사용한 catechin의 약 72%의 활성을 나타내어 오디 발효물의 su-

peroxide radical 소거 활성이 우수함을 확인하였다. 이는 Yamada 등(33)의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 및 종류에 따라 radical 소거 활성에 차이는 있으나 유용성분의 함량이 높을수록 radical 소거 활성이 높아진다는 보고와 일치하였다.

FRAP 및 환원력

FRAP는 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyl-triazine(Fe³⁺-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe²⁺-TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한 것으로 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안된 분석방법이다. 오디 발효물의 250~2,500 µg/mL 농도에서 FRAP 및 환원력 측정 결과는 Fig. 2와 같다. 오디 발효물의 FRAP는 37.03~762.13 µM을 나타내어 무발효 9.80~708.18 µM에 비해 높게 나타났다. 이는 Sánchez-González 등(34)이 총 폴리페놀과 FRAP는 높은 상관관계가 있다고 보고함에 따라 본 연구 결과 또한 유사한 경향을 나타낸 것으로 사료된다. 환원력은 오디 발효물에서 0.12~0.74를 나타내어 무발효 0.11~0.66에 비해 높게 측정되었으며, 오디 발효물의 환원력은 1,000 µg/mL 농도에서 무발효 오디와 유의적인 차이를 나타내었다. Chae 등(8)의 토종 발효미생물을 이용한 오디 발효주의 환원력 측정에서 농도가 증가함에 따라 환원력이 농도 의존적으로 증가하였으며, Tosun

등(35)은 산딸기속(*Rubus*) 식물의 항산화능은 총 페놀성 화합물과 함께 총 안토시아닌 함량도 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. 이는 오디 유산균 발효를 통해 생성된 페놀성 화합물과 증가한 안토시아닌을 바탕으로 높은 항산화 효과를 나타낸 결과로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 오디 유산균 발효물의 식품산업에서의 다양한 이용 가능성을 확인하기 위해 이화학적 특성 및 항산화 활성을 조사하였다. 생균수는 발효 24시간에서 가장 높은 8.31 log CFU/mL를 나타낸 다음 시간이 지남에 따라 균이 감소하였으며, pH 및 산도 또한 각각 발효 24시간에서 유의적인 감소(pH 3.90) 및 증가(0.15%)를 나타내었다. 색도는 L값 및 a값이 오디 발효 후 감소하고 b값 및 ΔE값은 증가하였다. 총 안토시아닌 함량은 오디 발효물에서 100 g당 171.40 mg으로 함량이 증가하였으며, 안토시아닌 조성에서도 cyanidin-3-glucoside 및 cyanidin-3-rutinoside가 각각 100 g당 61.39 mg 및 85.45 mg으로 증가하였다. 오디 발효물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 100 g당 10.75 g 및 5.02 g으로 발효 전에 비해 높게 나타났으며, ORAC 또한 발효물에서 292.94 µM/g으로 활성이 증가하였다. DPPH 및 superoxide radical 소거 활성에서는 오디 발효물에서 각각 17.40~58.21%, 32.63~87.34%로 무발효물보다 높은 소거 활성을 나타내었다. FRAP 및 환원력에서도 오디 발효물의 활성이 37.03~762.13 µM 및 0.12~0.74를 나타내어 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였다. 따라서 페놀성 화합물 및 안토시아닌 함량이 증가한 오디 유산균 발효물을 향후 기능성 식품 소재로 적용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 지역혁신창의인력양성 사업으로 수행된 연구 결과임(No.2013H1B8A2032215).

REFERENCES

1. Fridovich I. 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264: 7761-7764.
2. Ju MJ, Kwon JH, Kim HK. 2009. Physiological activities of mulberry leaf and fruit extracts with different extraction conditions. *Korean J Food Preserv* 16: 442-448.
3. Lee HW, Shin DH, Lee WC. 1998. Morphological and chemical characteristics of mulberry (*Morus*) fruit with varieties. *Korean J Seric Sci* 40: 1-7.
4. Lee EJ, Bae JH. 2011. Study on the alleviation of an alcohol induced hangover and the antioxidant activity by mulberry fruit. *Korean J Food & Nutr* 24: 204-209.
5. Kim YS, Jeong DY, Shin DH. 2008. Optimum fermentation conditions and fermentation characteristics of mulberry (*Morus alba*) wine. *Korean J Food Sci Technol* 40: 63-69.

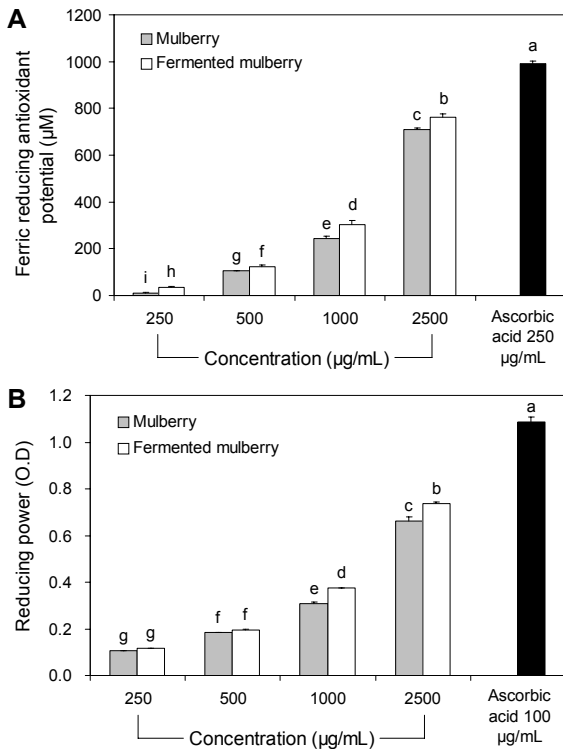


Fig. 2. Ferric reducing antioxidant potential (A) and reducing power (B) of fermented mulberry by *Lactobacillus plantarum* CGKW3. All values are expressed as mean±SD (n=3). Means with different letters (a-i) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test (P<0.05).

6. Kim E, Chang YH, Ko JY, Jeong Y. 2013. Physicochemical and microbial properties of Korean traditional rice wine, *Makgeolli*, supplemented with mulberry during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1682-1689.
7. Sung JM, Choi HY. 2014. Effect of mulberry powder on antioxidant activities and quality characteristics of yogurt. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 690-697.
8. Chae KS, Jung JH, Yoon HH, Son RH. 2014. Antioxidant activity and main volatile flavor components of mulberry wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* B-8. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1017-1024.
9. Kwon HN. 2013. The effect of the antioxidant activities of fermented mulberry extracts as cosmetic materials. *J Invest Cosmetol* 9: 221-227.
10. Ha JH, Jeong MH, Seo YC, Yong CW, Kim JS, Kim HH, Ahn JH, Lee HY. 2010. Enhancement of antioxidant activities of bark of *Berberis koreana* Palibin by lactic acid fermentation. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18: 421-428.
11. Kim JH, Lee WJ, Cho YW, Kim KW. 2009. Storage-life and palatability extension of *Betula platyphylla* sap using lactic acid bacteria fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 787-794.
12. Park YS, Jang HK. 2003. Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 367-375.
13. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *J AOAC Int* 88: 1269-1278.
14. Singleton VL, Rossi JL. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144-158.
15. Davis WB. 1947. Determination of flavonones in citrus fruits. *Anal Chem* 19: 476-478.
16. Talcott ST, Lee JH. 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *J Agric Food Chem* 50: 3186-3192.
17. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
18. Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 849-854.
19. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
20. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction - antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
21. Yang SJ, Hong JH. 2015. Quality characteristics of *yang-gaeng* prepared with fermented blueberry by lactic acid bacteria. *Korean J Food Cook Sci* 31: 128-135.
22. Ahn CS, Yuh CS, Bang IS. 2009. Physicochemical characteristics of fermented milk containing mulberry leaf extract. *Korean J Food & Nutr* 22: 272-278.
23. Kim JC, Lee SH, Min HL, Lee DS, Kim JK. 2009. *Oenology enology*. Baek-san publishing Co., Seoul, Korea. p 111-276.
24. Lee JY, Chae SK. 2010. Studies on the changes in the extraction of phenolics and color characteristics by the enzyme treatment of red grape (Muscat Bailey A) wine during fermentation. *Korean J Food & Nutr* 3: 324-331.
25. Lee YJ, Choi SW. 2013. Physicochemical characteristics and analysis of functional constituents of four different mulberry (*Morus alba* L.) fruit juices. *J East Asian Soc Dietary Life* 23: 768-777.
26. Ryu IH, Kwon TO. 2012. Sensory characteristics of granular tea and the components of mulberry fruit extracts by different extraction process. *Korean J Medicinal Corp Sci* 20: 331-338.
27. Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Kim NH, Kim KH, Rhu EJ, Jeong YK. 2013. Effect of fermented *Cudrania tricuspidata* fruit extracts on the generation of the cytokines in mouse spleen cells. *J Life Sci* 23: 682-688.
28. In MJ, Kim HM, Jin HJ, Kim DC, Oh NS, Chae HJ. 2010. Production of a fermented Korean pear puree using a new strain *Leuconostoc mesenteroides* KACC 91495P isolated from *Kimchi*. *J Appl Biol Chem* 53: 51-55.
29. Alarcon E, Campos AM, Edwards AM, Lissi E, Lopez-Alarcon C. 2008. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chem* 107: 1114-1119.
30. Park HM, Yang SJ, Kang EJ, Lee DH, Kim DI, Hong JH. 2012. Quality characteristics and granule manufacture of mulberry and blueberry fruit extracts. *Korean J Food Cookery Sci* 28: 375-382.
31. Song HS, Eom SH, Kang YM, Choi JD, Kim YM. 2011. Enhancement of the antioxidant and anti-inflammatory activity of *Hizikia fusiforme* water extract by lactic acid bacteria fermentation. *Kor J Fish Aquat Sci* 44: 111-117.
32. Chen JH, Ho CT. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem* 45: 2374-2378.
33. Yamada T, Yamamoto M, Tanimar A. 1987. Studies on the formation of nitrosamines, 7: The effects of some polyphenols on nitrosation of diethylamine. *J Food Hyg Soc Japan* 19: 224-227.
34. Sánchez-González I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F. 2005. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem* 90: 133-139.
35. Tosun M, Ercisli S, Karlidag H, Sengul M. 2009. Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes for their physicochemical properties. *J Food Sci* 74: C575-579.