

복분자와 클로렐라 혼합물의 젖산발효 최적조건 및 품질 특성

김재영^{1,2*} · 이상욱^{3*} · 김나형⁴ · 문광현⁵ · 백승희⁶

¹충북대학교 농화학과, ²환경부 화학물질안전원 연구개발교육과
³원광대학교 식품·환경학부, ⁴원광대학교 한의과대학 한방체액조절연구센터
⁵순창군청 건강장수사업소, ⁶충북도립대학교 바이오식품생명과학과

Optimal Lactic Acid Fermentation Conditions and Quality Properties for *Rubus coreanus* Miquel (*Bokbunja*) and Chlorella Mixtures

Jae-Young Kim^{1,2*}, Sang-Uk Lee^{3*}, Na-Hyung Kim⁴,
Kwang-Hyun Moon⁵, and Seung-Hwa Baek⁶

¹Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University

²Division of Research Development and Education, National Institute of Chemical Safety, Ministry of Environment

³Department of Food and Environmental Sciences and

⁴Center for Hanbang Body-Fluid Research, College of Korean Medicine, Wonkwang University

⁵Department of Health and Longevity, Sunchang County Office

⁶Department of Biofood Science and Biotechnology, Chungbuk Provincial University

ABSTRACT To develop a functional fermentation food from *Rubus coreanus* Miquel (*Bokbunja*) and chlorella mixtures, optimal lactic acid fermentation conditions were established, and quality properties based on physicochemical evaluation such as chemical compositions, free sugars, organic acids, and antibacterial activities were investigated. Regarding optimal fermentation strain selection, formation of lactic acid was best in *Lactobacillus plantarum* among the experimental strains (10 kinds), and the optimal fermentation temperature was 37°C. In addition, overall acceptability in the sensory evaluation was highest in the 5% chlorella mixture sample. Therefore, quality properties of the prepared sample under the established optimal fermentation conditions were investigated. Moisture, total sugar (dry basis), crude fiber (dry basis), and pH of fermented *Rubus coreanus* Miquel juice (RCM) with 5% chlorella mixture (RCM-C5) were reduced by 4.90%, 14.15%, and 0.32%, respectively, as compared with non-fermented RCM. Meanwhile, crude protein, crude fat, and crude ash (dry basis) of RCM-C5 were elevated by 13.75%, 0.18%, and 0.73%, respectively, as compared with RCM. The yellowness (b value) of color values was greater in RCM-C5 compared to RCM. The free sugar and organic acid contents of RCM-C5 were elevated by 0.97% and 616.30 mg%, respectively, as compared with RCM. In addition, the gram positive bacterium *Staphylococcus aureus* was elevated by 5.83% while gram negative bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium were elevated by 2.94% and 4.67%, respectively, as compared with RCM. In conclusion, the quality properties of RCM and chlorella lactic acid fermentation mixtures were improved compared with the general RCM product. Consequently, it is possible to apply fermented RCM as a functional fermentation food.

Key words: *Rubus coreanus* Miquel (*Bokbunja*), chlorella, optimal fermentation conditions, lactic acid, quality properties

서 론

복분자는 장미과의 낙엽관목으로 우리나라 남부 및 중부 지방의 해발 50~1,000 m의 산기슭의 양지에 자생하며, 5~6월에 꽃이 피고 지역과 품종에 따라 다르지만 6월~8월

에 열매가 성숙한다. 완숙된 복분자 과실은 검붉은 색을 띠며, 단맛과 신맛 및 독특한 향을 갖는다(1-3). 또한 약용으로 강장제, 양위, 유정, 한설, 유뇨, 소변 과다, 불임 등에 널리 이용된다(1,4). 이외에 식용으로도 활용되는데 복분자 과실에는 유리당 및 무기질의 인, 철, 칼륨이 다량 함유되어 있고 유기산 및 비타민 C가 다량 함유되어 있어 인체 건강에 이로운 식품으로 사용된다(1,5,6). 그뿐만 아니라 복분자의 기능성 연구 결과를 통해 항암 활성, 면역증진, 항산화, 항균 효과 등 다양한 생리활성에 대한 효능이 밝혀졌다(1,7,8). 한편 복분자의 국내 생산량은 2013년 기준으로 연간 9,801

Received 28 October 2015; Accepted 11 January 2016

Corresponding author: Seung-Hwa Baek, Department of Biofood Science and Biotechnology, Chungbuk Provincial University, Chungbuk 29046, Korea

E-mail: jinho@cpu.ac.kr, Phone: +82-43-730-6381

*These authors contributed equally to this work.

톤이며, 전국적으로 생산량이 가장 높은 고창, 순창, 정읍 등 전북지역이 5,747개 농가(1,560 ha)에서 8,317톤, 그 뒤를 이어 전남지역이 403개 농가(98 ha)에서 412톤, 강원 지역이 263개 농가(70 ha)에서 348톤, 경북지역이 210개 농가(52 ha)에서 215톤 등, 전국에 7,008개 농가가 1,907 ha에서 9,801톤을 재배·생산하고 있다(9). 이처럼 대량 생산과 여러 가지 기능성 효능에 힘입어 복분자의 기호도가 점차 높아짐에 따라 이를 좀 더 극대화할 수 있는 기능성 식품 개발 연구가 필요한 실정이다.

담수 조류의 일종인 클로렐라는 광합성에 의해 성장하고 다량의 필수아미노산을 가진 단백질,식이섬유질,비타민(A, B군, C, E 등), 미네랄 등이 많이 함유되어 균형 잡힌 영양식품으로 인정받고 있으며, 식물보다 증식속도가 매우 빠르므로 미래의 단백질 식품으로 기대되어 일찍부터 식량화에 관한 연구가 진행되고 있다(10,11). 특히 클로렐라에는 CGF(chlorella growth factor)라는 생리활성 물질이 함유되어 있어(12) 동식물의 성장촉진, 유아 및 성장기 어린이의 성장촉진, 면역증강, 항균, 항암 효과, 세포부활, 혈압강하, 간의 지방질 감소 및 기능 회복 등 다양한 생리활성 기능을 포함하는 것으로 보고되었다(10). 따라서 전술한 내용과 같이 클로렐라의 기능성이 인정되어 꿈의 식품, 완전식품, 미래의 식량으로 불리며 어린이 영양제, 기능성 식품 등으로 시판되고 있어, 건강식품의 소재로 그 이용 범위가 확대되고 있다.

젖산균은 성장작용이 있어 음료 형태(13), 변비, 설사 등의 각종 특정 질환의 예방(14) 또는 치료를 목적으로 한 tablet 형태의 의약 제재로도 이용되고 있다(15). 이러한 젖산균을 이용해 식품을 발효할 경우 생산되는 젖산, 향기 성분, 다당류 등은 식품의 외형, 풍미, 맛, 조직감 등을 향상시킬 뿐만 아니라 병원성 미생물의 성장을 억제하고 식품의 안전성을 부여한다(16,17). 따라서 우리 인체에 이로운 점이 많은 젖산균을 식품 발효에 활용한다면 현대사회에서 추구하는 기능성 식품을 창조하면서 품질 향상에도 기여할 것으로 판단된다.

한편 영양 과잉, 운동량 부족, 스트레스가 원인이 되어 발생하던 성인병은 식생활 양상이 서구화되면서 점차 유아와 청소년들까지 다양한 연령층에서 발생하고 있어, 혈액순환계 질환 등 각종 생활습관병 예방 및 치료에 효과적인 식품소재를 탐색하고 탐색된 소재로 식품의 기능을 상호보완 또는 강화한 기능성 식품의 개발 필요성이 대두하였다. 이러한 사회적 필요성에 부응할 수 있는 기능성 식품 개발에 유용한 식이 소재는 생활주변에 다양하게 존재하고 있으나, 본 연구는 여러 연구에 의해 영양·기능성이 입증된 복분자와 클로렐라 소재를 활용하고 식품의 이화학적 특성을 향상하는 균주를 이용하여 영양·기능성이 풍부한 혼합 발효식품을 개발하고자 하였다.

따라서 본 연구는 복분자와 클로렐라 혼합물의 기능성 발효제품을 개발하고자 품질 특성을 최대화할 수 있는 최적

발효조건을 확립하고, 확립된 방법으로 제조한 혼합 발효물의 일반성분, 유리당, 유기산, 항균 활성 등 화학적 특성에 대한 품질 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

복분자는 전북 고창군에서 생산된 과실을 구입하여 착즙한 액을 시료로 사용하였으며, 클로렐라는 시중에 판매하는 분말제품(Daesang, Seoul, Korea)을 구입하여 사용하였다.

사용균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 원광대학교 식품·환경학과에서 보유 중인 *Bifidobacterium longum*[KCCM 11953; Korean Culture Center of Microorganisms(KCCM), Seoul, Korea], *Lactobacillus acidophilus*[KCTC 3111; Korean Collection for Type Cultures(KCTC), Daejeon, Korea], *Lactobacillus brevis*(KCTC 3102), *Lactobacillus bulgaricus*(KCTC 3635), *Lactobacillus casei*(KCTC 3109), *Lactobacillus lactis*(KCCM 11357), *Lactobacillus plantarum*(KCTC 3108), *Lactobacillus rhamnosus*(KCCM 11320), *Pediococcus pentosaceus*(KCTC 3507), *Streptococcus thermophilus*(KCTC 2185) 등 젖산균 10종을 사용하였으며, 실험 전에 3회 계대 배양하였다. 또한 실험에 사용한 배지는 plate count agar(Difco, Detroit, MI, USA), nutrient agar(Difco), Lactobacilli MRS broth(Difco)를 사용하였다.

최적 발효조건 시험

Park과 Chang(2)이 보고한 복분자 젖산 최적 발효조건(최적온도 37°C)을 기초로 하여 MRS 1/2 회석 배지에 접종 균주를 달리하고, 클로렐라 분말을 2.5, 5, 10%가 되게 조절하여 멸균한 다음 각 균주를 2% 접종한 후, 진탕 배양기를 이용하여 37°C, 150 rpm 조건으로 4일간 배양하면서 생성되는 산의 함량을 측정하여 최적균주를 선발하였다. 또한 복분자 착즙액(고형분 약 10%)에 클로렐라 분말(고형분 약 92%)을 2.5, 5, 10% 농도가 되게 조절하여 멸균한 후 젖산균을 2%가 되게 접종한 다음 20, 25, 30, 35, 40, 45°C의 배양온도를 달리하고 진탕 배양기를 이용하여 150 rpm 회전 속도로 4일간 배양하면서 젖산 생산에 적합한 최적온도와 발효기간을 조사하였다. 최종적으로 상기 결과에서 도출된 발효 최적균주, 온도, 발효기간을 기초로 하여 클로렐라의 첨가 농도를 달리한 후 복분자와 클로렐라 혼합물을 제조하여 관능평가를 하였다. 관능평가 패널은 식품 전공자로 구성된 대학생, 대학원생, 일반인 등 20명을 대상으로 관능평가 인지능력 측정을 통해 최종 선정하였다. 즉 후보자들에게 단맛(설탕), 짠맛(소금), 신맛(구연산), 쓴맛(카페인)의 4가

지 기본 맛에 대한 3점 검사를 실시하였고, 고득점자 15명을 최종적으로 선정하였다. 선정된 패널에게는 평가 전에 본 연구의 목적을 설명하고, 관능평가 원리, 방법 등 이론 및 실기 교육훈련을 하였다. 상기 훈련된 패널을 대상으로 색, 향기, 단맛, 신맛, 기호도에 대한 관능평가를 9점 채점법(18)으로 실시하였다. 이때 채점 기준은 아주 강하다(아주 좋다) 9점, 보통으로 강하다(좋다) 7점, 적당하다(좋지도 나쁘지도 않다) 5점, 보통으로 약하다(나쁘다) 3점, 아주 약하다(매우 나쁘다) 1점이었다. 여기에서 얻어진 관능평가 결과를 바탕으로 적정 클로렐라 첨가 수준을 결정하였다.

일반성분 측정

일반성분 분석은 AOAC법(19)에 따라 측정하였다. 수분 함량은 105°C 상압건조법, 조단백질 함량은 semi-micro Kjeldahl법, 조지방 함량은 Soxhlet 추출법, 조회분 함량은 550°C 직접회화법, 조섬유는 fritted glass crucible법으로 측정하였으며, 총당은 phenol-sulfuric acid법(20)에 따라 측정하였다. pH는 시료에 증류수를 가하여 pH meter(HM-25R, Toadkk, Tokyo, Japan)로, 당도는 시료와 증류수를 1:1로 희석하여 여과한 액을 굴절당도계(PR-32, Atago, Tokyo, Japan)로, 색도는 색차계(JX-777, Juki, Tokyo, Japan)를 이용하여 Hunter의 L(lightness), a(redness), b(yellowness) 값으로 표현하였다. 이때 사용한 표준색판은 L: 92.68, a: -0.83, b: 0.85 값의 백색판을 사용하였다. 적정산도는 pH가 8.1이 되는 데 소요되는 0.1 N sodium hydroxide 용액의 소비량을 구한 후 lactic acid로 환산하여 총산 함량(%)을 산출하였다. 이외에 총균수의 측정은 발효 물에 0.85% sodium chloride 용액을 10⁴~10⁸ 수준으로 희석한 시료를 1 mL씩 분주하여 plate count agar에 도포한 후 37°C에서 24시간 배양하여 나타난 colony를 계수하였다.

유리당 측정

유리당은 AOAC법(19)에 따라 측정하였다. 복분자와 클로렐라 혼합물 10 mL에 95% 에탄올 용액 40 mL를 가하여 진탕 추출한 후 회전감압농축기로 에탄올을 제거하고 증류수로 50 mL가 되도록 정용한 시료액을 0.45 µm membrane filter로 최종 여과한 다음 HPLC systems(Nanospace SI-2, Shiseido, Tokyo, Japan)으로 분석하였다. 이때 HPLC 분석조건은 Prevail Carbohydrate ES(4.6×250 mm, 5 µm, Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼 온도는 40°C, 이동상은 75% acetonitrile 용액을 사용하여 분당 0.5 mL 속도로 유지했으며, 주입량은 20 µL로 하여 굴절계검출기(RI-104, Shiseido)를 사용하여 분석하였다. 표준물질은 glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였으며, 이를 적정한 농도로 희석하여 표준용액을 조제한 후 작성된 검량선으로 유리당 함량을 산출하였다.

유기산 측정

유기산은 Gancedo와 Luh(21)의 방법에 따라 측정하였다. 복분자와 클로렐라 혼합물 3 mL에 50% 에탄올 용액 100 mL를 가하여 150 rpm에서 약 2시간 정도 진탕 추출하고 여과한 액을 회전감압농축기로 에탄올을 제거하였다. 이를 amberlite IRA 95 음이온 교환수지(Sigma-Aldrich Co.)에 통과시켜 유기산을 흡착시킨 후 약 100 mL의 이온교환수로 세척하였다. 흡착된 유기산은 6 N formic acid로 유리시켜 감압 건조한 후 여기에 이온교환수 10 mL를 넣고 잘 혼합한 다음 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC systems(Shiseido)으로 분석하였다. 이때 HPLC 분석조건은 RSpak KC-811(4.6×250 mm, 5 µm, Shodex, Tokyo, Japan) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 40°C, 이동상은 50 mM perchloric acid 용액을 사용하여 분당 0.65 mL 속도로 유지했으며, 주입량은 20 µL로 하여 굴절계검출기(Shiseido)를 사용하여 분석하였다. 표준물질은 citric acid, lactic acid, formic acid, acetic acid, propionic acid, tartaric acid, malic acid, succinic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였으며, 이를 적정한 농도로 희석하여 표준용액을 조제한 후 작성된 검량선으로 유기산 함량을 산출하였다.

항균 활성 측정

항균 활성 측정을 위해 먼저 복분자와 클로렐라 혼합물 10 mL에 물 40 mL를 넣고 실온에서 60분간 진탕한 후 여과한 액을 50 mL로 정용하여 시료 용액으로 사용하였다. 항균 활성 측정에 사용된 검정균주는 그람양성(+)세균[*Staphylococcus aureus*(KCTC 1621)]과 그람음성(-)세균[*Escherichia coli*(KCTC 2441), *Salmonella* Typhimurium(KCTC 1925)]을 KCTC에서 분양받아 사용하였다. 항균성 검정은 검정균 1 백금이를 5 mL의 액체배지(nutrient broth; Difco)에 접종하여 2일간 배양한 후, 새로운 배지 5 mL를 함유한 시험관에 시료 0.1 mL와 상기 검정균의 배양액 0.1 mL를 각각 넣고 37°C에서 24시간 배양한 다음 표준평판배양법에 따라 생균수를 측정하여 아래 식에 따라 항균 효과를 확인하였다.

$$\text{항균 활성(\%)} = 1 - \frac{\log \text{시험액의 생균수}}{\log \text{대조액의 생균수}} \times 100$$

통계분석

통계분석은 SPSS ver. 19(SPSS, Chicago, IL, USA) 소프트웨어를 이용하여 측정하였다. 즉 데이터 간의 유의차는 Student's *t*-test와 one-way ANOVA의 Duncan's multiple range test를 통해 *P*<0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

복분자와 클로렐라의 일반성분 함량

실험에 사용된 재료의 일반성분은 복분자의 경우 수분이

80.52%였고, 건량 기준으로 탄수화물은 57.97%, 조단백질은 7.32%, 조지방은 13.86%, 조회분은 17.95% 수준이었으며, 클로렐라의 경우 수분은 7.40%에 건량 기준으로 탄수화물은 31.43%, 조단백질은 50.76%, 조지방은 8.53%, 조회분은 9.28% 수준이었다(Table 1). 이처럼 복분자는 클로렐라와 비교하여 수분 함량과 탄수화물, 조지방, 조회분 함량이 풍부한 것에 반해 조단백질 함량이 상대적으로 적은 경향이였다. 이러한 결과로 비추어 보면 일정 수준의 복분자와 클로렐라 혼합 조성으로 서로 부족한 영양성분을 보충할 수 있고, 클로렐라에 CGF 유산균 생육 촉진 물질(chlorella growth factor)이 함유된 것으로 밝혀져 있기 때문에(12) 복분자만으로 젖산발효 시 부족한 젖산균의 생육영양에 대한 보충 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 이를 근거로 수분이 풍부한 복분자는 주재료로 사용하고, 부재료로서 클로렐라를 사용하여 복분자만으로 젖산발효 시 부족한 젖산균 생육영양 보충 효과와 더불어 각 재료에 풍부하게 함유된 영양소 및 생리활성 물질의 활용을 기대할 수 있었다.

클로렐라 첨가에 따른 최적균주 선발

젖산균 발효에 따른 산 생성의 최적균주를 선발하고자 MRS 1/2 회석 배지에 클로렐라 분말을 2.5, 5, 10% 수준으로 조절하고 젖산균의 산 생성량을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다.

클로렐라 분말 첨가에 따른 모든 균주는 산 생성량이 증가하였다. 배양 전 산 생성량이 0.09~0.20%였던 수준이 4일 배양 후 산 생성량은 0.98~2.13% 수준으로 대폭 증가하는 경향이였다. 특히 산 생성량이 우수한 젖산균은 *L. plantarum*(2.13%) > *L. casei*(2.02%) > *L. brevis*(1.98%) > *L. lactis*(1.95%)로 확인되었으며, 이 중 4일 배양기간 동안 가장 높은 산 생성량을 보이면서 적정 수준의 발효능을 보이는 균주는 *L. plantarum*과 *L. casei*인 것으로 평가되었다. Cho 등(22)은 *S. thermophilus*와 *L. casei* 혼합균주로 요구르트를 제조할 경우 클로렐라 추출물 분말을 0.25% 수준으로 조절함에 따라 산 생성과 균의 증식에 효과가 있다고 하였으며, Sung 등(23)은 클로렐라를 0.5% 첨가한 경우 생균수가 최대를 나타내었다고 하였다. 이로 미루어본바 본 실험에 사용된 모든 균주는 클로렐라 첨가 때문에 균의 증식과 산의 생성이 촉진되었지만, 각각의 균주마다 증식 특성이 다르기 때문에 그 발효 특성이 일부 상이하고 균의 증식 정도와 산 생성량이 서로 차이가 나타났다. 따라서 본 연구에서 확인된 클로렐라 첨가에 따른 발효 최적균주는 산 생성량이 가장 우수한 *L. plantarum*과 *L. casei*임을 확인하였고 복분자-

클로렐라 첨가 혼합물 발효 최적균주를 선발하기 위한 시험균주로 선택되었다.

복분자와 클로렐라 혼합물 발효의 최적균주 선발 및 첨가 농도 선정

클로렐라 발효 최적균주로 1차 선발된 *L. plantarum*과 *L. casei* 중 복분자에 클로렐라 분말을 첨가한 혼합물의 젖산발효에 가장 적합한 최적균주를 선발하고자 그 발효 특성으로서 젖산 생성량을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2의 결과에서 보는 바와 같이 *L. plantarum*과 *L. casei* 모든 균주는 시간이 지날수록 산 생성량이 증가하는 경향이였으며, 클로렐라 첨가량이 많을수록 산 생성량이 증가하는 경향이였다. 이는 클로렐라에 함유된 CGF 유산균 생육 촉진 물질이 젖산균의 증식을 활발하게 하여 산 생성을 증가시킨 것으로 추측된다(12). 전체적인 4일 발효기간 동안 *L. plantarum*의 산 생성량 추이는 1.28~2.67% 범위를 나타냈으며 일별 변화폭은 1일차에 1.28~1.81%, 2일차에 2.10~2.55%, 3일차에 2.34~2.67%, 4일차에 2.31~2.60%의 경시적인 증가폭을 나타내었다. 반면에 *L. casei*의 경우 전체적인 산 생성량 추이는 1.28~2.26% 범위를 나타냈고, 일별 변화폭은 1일차에 1.28~1.80%, 2일차에 1.46~2.08%, 3일차에 1.58~2.26%, 4일차에 1.61~2.26%의 경시적인 증가폭을 나타냈다. 하지만 *L. plantarum*에 비해 *L. casei*의 변화폭이 적어 클로렐라 분말이 첨가된 복분자 혼합물의 젖산발효 최적균주는 *L. plantarum*이 가장 적합한 것으로 확인되었으며, 위와 같은 조건에서 최적의 클로렐라 분말 첨가 수준은 5~10% 농도에서 활성이 높아 적합한 농도 수준으로 평가되었다.

복분자와 클로렐라 혼합물의 최적 발효온도

복분자와 클로렐라 혼합물 젖산발효의 최적온도를 조사하고자 최적균주로 선발된 *L. plantarum*을 2% 접종하고 20, 25, 30, 35, 40, 45°C 조건에서 나타나는 경시적인 산 생성량을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 *L. plantarum* 접종 후 4일 발효기간 동안 산 생성량의 전체적인 추이는 0.98~2.81% 범위로 2.5% 첨가 수준에서 0.95~2.47%, 5% 첨가 수준에서 0.86~2.74%, 10% 첨가 수준에서 0.73~2.81%의 범위를 나타내었다. 이러한 변화 추이는 대조군 0.95~2.50% 범위의 결과와 비교하면 2.5% 첨가 수준을 제외하고 증가하는 것으로 추정되었다. 온도조건별 추이는 *L. plantarum* 접종 후 산 생성량이 가장 높았던 발효온도는 35°C와 40°C였으며, 20, 25, 30, 45°C에서 산 생성량은 비교적 낮은 경향이

Table 1. Chemical compositions of *Rubus coreanus* Miquel (*Bokbunja*) and chlorella (%)

Materials	Moisture	Carbohydrate (dry basis)	Crude protein (dry basis)	Crude fat (dry basis)	Crude ash (dry basis)
<i>Rubus coreanus</i> Miquel (<i>Bokbunja</i>)	80.52±0.65	57.97±0.68	7.32±0.83	13.86±1.92	17.95±0.33
Chlorella	7.40±0.33	31.43±1.22	50.76±1.46	8.53±0.67	9.28±0.56

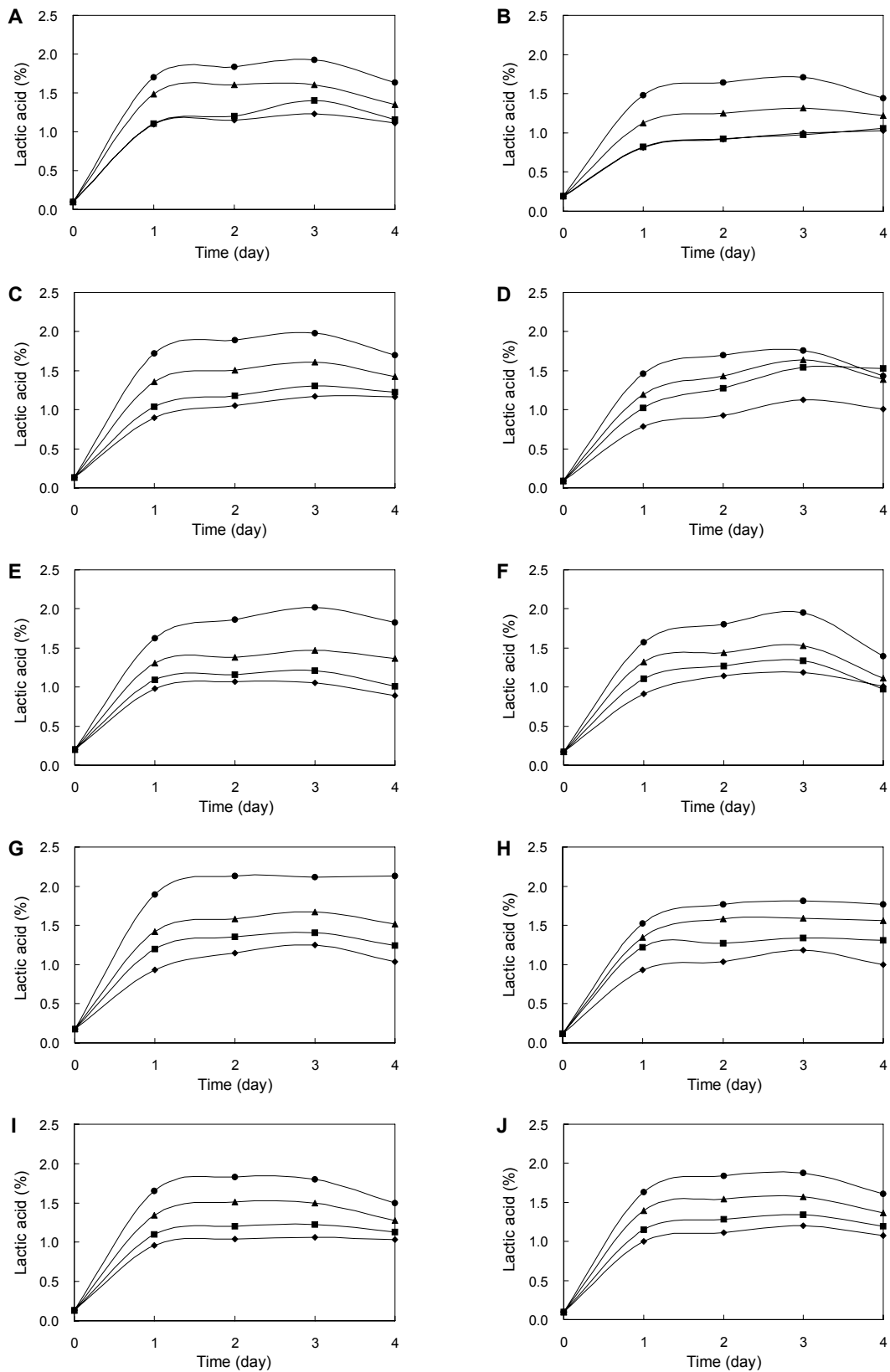


Fig. 1. Lactic acid formation activities of bacterium types by chlorella addition in MRS broth. (A) *Bifidobacterium longum*, (B) *Lactobacillus acidophilus*, (C) *Lactobacillus brevis*, (D) *Lactobacillus bulgaricus*, (E) *Lactobacillus casei*, (F) *Lactobacillus lactis*, (G) *Lactobacillus plantarum*, (H) *Lactobacillus rhamnosus*, (I) *Pediococcus pentosaceus*, and (J) *Streptococcus thermophilus*. \blacklozenge , no added chlorella; \blacksquare , added chlorella 2.5%; \blacktriangle , added chlorella 5.0%; \bullet , added chlorella 10.0%.

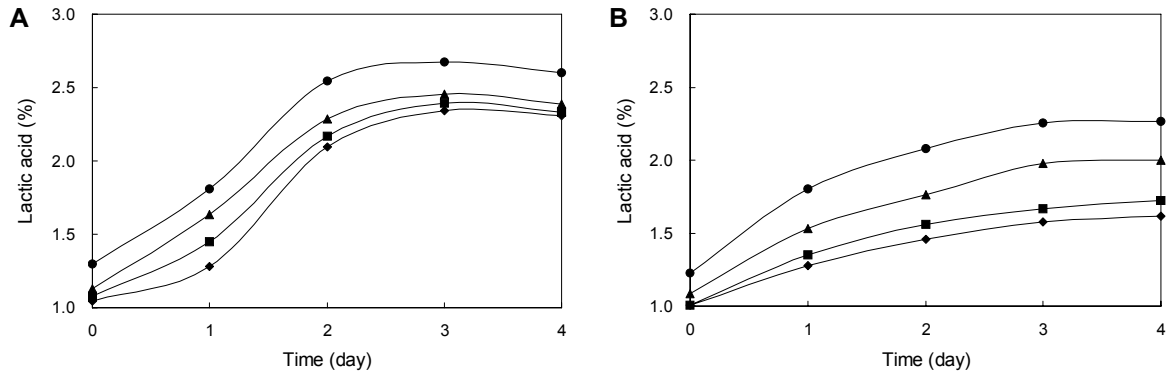


Fig. 2. Lactic acid formation activities by inoculation of *L. plantarum* (A) and *L. casei* (B) in *Rubus coreanus* Miquel juice and chlorella mixtures. —◆—, no fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 100.0%; —■—, fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 97.5% with chlorella 2.5% mixtures; —▲—, fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 95.0% with chlorella 5.0% mixtures; —●—, fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 90.0% with chlorella 10.0% mixtures.

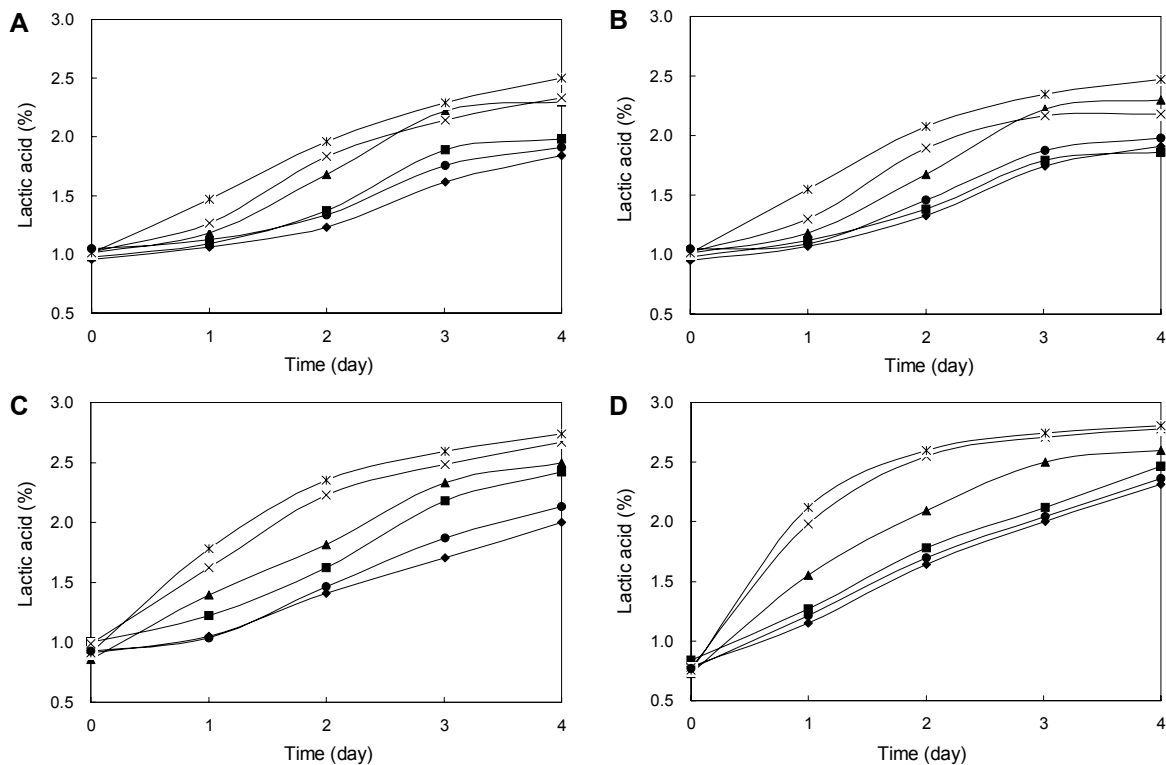


Fig. 3. Lactic acid formation activities by various temperature conditions of *Rubus coreanus* Miquel juice and chlorella mixtures. (A) No fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 100.0%, (B) fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 97.5% with chlorella 2.5% mixtures, (C) fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 95.0% with chlorella 5.0% mixtures, (D) fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 90.0% with chlorella 10.0% mixtures. —◆— 20°C, —■— 25°C, —▲— 30°C, —×— 35°C, —*— 40°C, —●— 45°C,

었다. 특히 클로렐라 5와 10% 첨가구에서 그 차이가 매우 뚜렷한 경향이었는데, 35°C 조건에서 4일 발효 후 산 생성량은 각각 2.67과 2.78%, 40°C 조건에서 4일 발효 후 산 생성량은 각각 2.74와 2.81%로 높았다. 이러한 결과는 복분자 젖산발효의 최적온도가 35°C와 37°C라고 보고한 Park과 Chang(2)의 연구와 유사한 경향이였다. 따라서 본 연구에서 추정한 젖산발효 최적온도가 35~40°C 수준이라는 점과 기존 연구의 결과를 기초로 할 때 복분자와 클로렐라 혼합물 젖산발효의 최적온도는 37°C 수준이 적합한 것으로

판단되었다.

복분자와 클로렐라 젖산발효 혼합물의 관능평가

실제 개발된 발효식품의 대중 선호도를 조사하고자 복분자와 클로렐라 혼합물의 젖산발효 최적조건으로 제조된 제품의 색, 향, 단맛, 신맛, 종합적 기호도 등 관능평가를 실시한 결과는 Table 2와 같다.

색의 관능평가 결과는 복분자 착즙액 100%(*Rubus coreanus* Miquel juice; RCM)=복분자 착즙액 95%-5% 클로

Table 2. Sensory evaluation of *Rubus coreanus* Miquel juice and fermented *Rubus coreanus* Miquel juice-chlorella mixtures

Samples ¹⁾	Color	Flavor	Sweet taste	Sour taste	Overall acceptability
RCM	7.67±0.21 ^{a2)}	6.47±0.15 ^b	5.40±0.13 ^c	7.80±0.23 ^a	6.60±0.09 ^c
RCM-C2.5	7.52±0.15 ^a	6.63±0.17 ^{ab}	5.80±0.21 ^{ab}	7.67±0.18 ^{ab}	6.73±0.11 ^{bc}
RCM-C5	7.53±0.19 ^a	6.87±0.12 ^a	5.93±0.26 ^a	7.40±0.17 ^{bc}	7.00±0.12 ^a
RCM-C10	7.13±0.24 ^b	6.60±0.13 ^{ab}	5.53±0.15 ^{bc}	7.27±0.12 ^c	6.87±0.16 ^{ab}

¹⁾RCM: no fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 100.0%, RCM-C2.5: fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 97.5% with chlorella 2.5% mixtures, RCM-C5: fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 95.0% with chlorella 5.0% mixtures, RCM-C10: fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 90.0% with chlorella 10.0% mixtures.

²⁾Means with the same letter in a column are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

렐라 혼합물(RCM-C5)=복분자 착즙액 97.5%-2.5% 클로렐라 혼합물(RCM-C2.5)> 복분자 착즙액 90%-10% 클로렐라 혼합물(RCM-C10)의 유의적인 차이가 인정되었다($P<0.05$). 전체적인 경향은 대조구인 RCM에 비해 모든 클로렐라 첨가구가 낮은 선호도를 나타내었으며, 클로렐라를 첨가한 시료 중에서는 첨가량이 5% 수준인 RCM-C5가 7.53점으로 가장 높은 선호도를 나타내었다. 향기의 관능평가 결과는 RCM-C5≥RCM-C2.5=RCM-C10≥RCM의 유의적인 차이가 인정되었다($P<0.05$). 전체적인 경향은 대조구인 RCM에 비해 모든 클로렐라 첨가구가 높은 선호도를 나타내었으며, 클로렐라 첨가량이 5% 수준인 RCM-C5가 6.87점으로 가장 높은 선호도를 나타내었다. 단맛의 관능평가 결과는 향기의 결과와 유사한 경향이었다. 유의적인 차이는 RCM-C5≥RCM-C2.5≥RCM-C10≥RCM 수준으로 인정되었으며($P<0.05$), 전체적인 경향은 대조구인 RCM에 비해 모든 클로렐라 첨가구가 높은 선호도를 나타내었고, RCM-C5가 5.93점으로 가장 높은 선호도를 나타내었다. 신맛의 관능평가 결과는 RCM≥RCM-C2.5≥RCM-C5≥RCM-C10의 유의적인 차이가 인정되었다($P<0.05$). 전체적인 경향은 대조구인 RCM에 비해 모든 클로렐라 첨가구가 낮은 선호도를 나타내었으며, 클로렐라를 첨가한 시료 중에서는 첨가량이 가장 낮은 RCM-C2.5에서 7.67점으로 가장 높은 선호도를 나타내었다. 색, 향, 단맛, 신맛을 종합한 전체적인 기호도 평가 결과는 RCM-C5≥RCM-C10≥RCM-C2.5≥RCM의 유의적인 차이가 인정되었다($P<0.05$). 전체적으로는 대조구인 RCM에 비해 모든 클로렐라 첨가구가

높은 평가 결과를 나타내었으며, RCM-C5가 7.00점으로 가장 높은 평가를 나타내었다.

이상의 관능평가 결과를 종합하면 클로렐라를 첨가한 혼합물은 복분자로 이루어진 대조군보다 향기 및 단맛에서만 높은 경향이었고, 클로렐라를 첨가한 혼합물 사이에는 신맛을 제외한 모든 관능평가 결과가 RCM-C5에서 가장 우수하였으며, 종합적인 기호도 측면에서도 RCM-C5가 가장 높은 결과를 나타내었다. 따라서 복분자와 클로렐라 혼합물 젖산 발효를 제품화하는 가장 최적 수준은 클로렐라 5% 첨가 수준이 가장 이상적인 것으로 판단되었다. 이와 같은 실험을 통해 확립된 최적 발효조건, 제품화하기 위한 최적 관능평가 결과를 근거로 하여 복분자 착즙액에 클로렐라 5%를 첨가하고 젖산균(*L. plantarum*)을 접종하여 발효시킨 혼합물을 제조한 다음 제품의 일반성분, 젖산균수, 산도, 당도, 색도, 유리당, 유기산, 향균 활성 등 품질 특성을 평가하였다.

복분자와 클로렐라 젖산발효 혼합물의 일반성분 함량

RCM과 최적조건에서 발효된 RCM-C5의 수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 총당, 조섬유, 젖산균수, 산도, 당도, 색상 등 일반성분 함량을 비교한 결과는 Table 3과 같다.

RCM에 비해 RCM-C5의 수분은 4.90%(80.52%→75.62%), 건량 기준 총당은 14.15%(57.97%→43.82%), 건량 기준 조섬유는 0.32%(2.34%→2.02%), pH는 0.68(4.00→3.32) 감소하였다. 여기서 수분 함량이 감소한 이유는 발효 여부에 관계없이 액상으로 존재하는 복분자 착즙액에 분말상인 클로렐라가 첨가되었기 때문으로 판단된다. 또한 총당

Table 3. Chemical compositions of *Rubus coreanus* Miquel juice and fermented *Rubus coreanus* Miquel juice-chlorella mixtures

Samples ¹⁾	Moisture	Dry basis					
		Crude protein	Crude fat	Crude ash	Total sugar	Crude fiber	
----- % -----							
RCM	80.52±0.65 ^{**}	7.32±0.83 ^{***}	13.86±1.92	17.95±0.33 [*]	57.97±0.68 ^{***}	2.34±0.43	
RCM-C5	75.62±1.49	21.07±0.21	14.04±1.38	18.68±0.16	43.82±0.17	2.02±0.45	
Samples	Lactic acid bacteria count (CFU/g)	pH	Total acidity (%)	Brix	Color values		
					L	a	b
RCM	—	4.00±0.12 [*]	1.69±0.31 [*]	9.4±0.12 ^{***}	45.63±0.31 [*]	6.74±0.21	0.88±0.05 ^{***}
RCM-C5	3.30×10 ¹⁰	3.32±0.34	2.29±0.21	7.8±0.14	44.15±0.51	6.50±0.23	1.62±0.07

¹⁾RCM: no fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 100.0%, RCM-C5: fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 95.0% with chlorella 5.0% mixtures.

^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$.

의 감소 원인은 클로렐라 첨가 및 젖산균 발효 시 혼합물 안에 존재하는 당 성분이 젖산균 대사의 탄소원으로 이용되어 감소한 것으로 추측되었다. 한편 건량 기준으로 조단백질, 조지방, 조회분 함량은 각각 13.75%(7.32%→21.07%), 0.18%(13.86%→14.04%), 0.73%(17.95%→18.68%) 증가하였는데, 이는 발효에 의한 영향보다는 이들의 함량이 Table 1에 나타난 결과를 바탕으로 복분자보다 상대적으로 함량이 높은 클로렐라의 첨가가 영향을 미친 것으로 판단된다(10). 이상의 결과를 볼 때 복분자를 발효시켜 기능성 식품을 제품화하고자 할 경우 클로렐라를 일정 수준으로 첨가함에 따라 복분자 성분 중 비교적 적게 함유된 단백질 또는 식이섬유 등을 강화해 더욱 우수한 제품을 개발할 수 있을 것으로 추측되었다. 젖산균수는 4일 발효 후 3.30×10^{10} CFU/g의 결과를 나타내었다. RCM과 RCM-C5의 총산도는 1.69와 2.29%로 RCM-C5에서 높은 경향이었는데, 이는 젖산발효 때문에 생성된 각종 유기산 함량이 증가하여 나타난 현상이라고 보고한 Shin 등(24)의 결과에서 그 원인을 찾을 수 있었다. 한편 당도는 9.40 Brix에서 7.80 Brix로 감소하는 경향이었는데, 이 결과 역시 젖산발효 과정 중 젖산균 대사에 의한 당 함량 감소 현상이 기인한 것으로 추측된다. 색도에 있어 색의 밝기를 나타내는 백색도인 L 값은 RCM과 RCM-C5 사이에는 큰 차이 없이 각 45.63과 44.15를 나타내었으며, 적색도 값인 a 값 역시 차이가 없이 각각 6.74와 6.50을 나타내었다. 하지만, 황색도를 나타내는 b 값은 RCM이 0.88, RCM-C5가 1.62로 큰 차이를 나타내는 경향이 있었다. 즉 두 제품 모두 밝고 약간의 황색을 띠는 적색이었지만, 이 중 RCM-C5가 RCM보다 황색을 더 띠는 것으로 판단되었다.

복분자와 클로렐라 젖산발효 혼합물의 유리당 및 유기산 함량

RCM과 최적조건에서 발효된 RCM-C5의 유리당 함량을

비교한 결과는 Table 4와 같다. 주요 구성 유리당인 fructose와 glucose는 RCM의 경우 각각 4.13%, 4.08%를 함유하고 있었으며, RCM-C5는 각각 4.91%, 4.42% 함량을 나타내었다. 이처럼 복분자에 클로렐라를 첨가하여 젖산발효로 제조한 RCM-C5는 일반 복분자 시료인 RCM보다 유리당 함량이 증가함을 확인하였다. 한편 sucrose, maltose, lactose 함량의 합은 RCM의 경우 전체 유리당 함량의 10.18% 수준, RCM-C5의 경우 7.61% 수준으로 비교적 적은 함량이 포함된 것으로 나타났다. 이는 복분자의 주요 유리당이 glucose와 fructose라고 보고한 Cha 등(25)의 결과와 복분자 과실의 유리당 함량이 fructose 3.98%, glucose 3.65%라고 보고한 Kwon 등(26)의 결과와 유사하였다.

RCM과 최적조건에서 발효된 RCM-C5의 유기산 함량을 비교한 결과는 Table 5와 같다. 유기산의 함량은 RCM의 경우 1,693.54 mg% 수준이었으며, RCM-C5는 2,309.84 mg%로 증가하는 경향이 있었다. 이는 젖산균 발효 때문에 유기산 함량이 증가한 것으로 특히 lactic acid 함량의 증가폭이 높았는데, 이는 발효에 사용한 균주인 *L. plantarum*이 젖산균으로 균의 대사과정 중 생성하는 주요 유기산이 lactic acid인 것으로 판단된다. 또한 acetic acid는 lactic acid보다 증가폭이 작았으나 *L. plantarum*의 2차 대사산물에 기인하여 생성된 것으로 젖산발효 과정에 의해 증가한 것으로 판단된다. 이외에 다른 유기산의 변화는 미미하거나 감소하는 경향이 있었다.

복분자와 클로렐라 젖산발효 혼합물의 항균 활성

RCM과 최적조건에서 발효된 RCM-C5의 유해세균(*St. aureus*, *E. coli*, *Sal. Typhimurium*, *Bacillus cereus*)에 대한 항균 활성을 비교 조사한 결과는 Table 6과 같다. RCM과 RCM-C5 모두 실험에 사용한 검정균에 대해 항균 활성을 나타내었다. 이는 RCM과 RCM-C5가 *St. aureus*, *E. coli*, *Sal. Typhimurium*, *B. cereus*의 생육을 억제한다

Table 4. Free sugar contents of *Rubus coreanus* Miquel juice and fermented *Rubus coreanus* Miquel juice-chlorella mixtures

Samples ¹⁾	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	Lactose	Total
----- % -----						
RCM	4.13±0.33*	4.08±0.19	0.83±0.09***	0.03±0.01**	0.07±0.01***	9.14±0.64
RCM-C5	4.91±0.16	4.42±0.13	0.25±0.03	0.14±0.02	0.38±0.02	10.11±0.37

¹⁾RCM: no fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 100.0%, RCM-C5: fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 95.0% with chlorella 5.0% mixtures.

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Table 5. Organic acid contents of *Rubus coreanus* Miquel juice and fermented *Rubus coreanus* Miquel juice-chlorella mixtures

Samples ¹⁾	Citric acid	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	Tartaric acid	Malic acid	Total
----- mg% -----							
RCM	439.02±6.28***	167.99±5.13***	31.39±0.83***	4.54±0.48***	425.60±7.40***	624.99±8.40	1,693.54±28.52
RCM-C5	348.10±9.48	893.50±5.44	58.21±3.50	17.70±0.28	376.31±2.50	616.01±2.49	2,309.84±23.70

¹⁾RCM: no fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 100.0%, RCM-C5: fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 95.0% with chlorella 5.0% mixtures.

***P<0.001.

Table 6. Antibacterial activities of *Rubus coreanus* Miquel juice and fermented *Rubus coreanus* Miquel juice-chlorella mixtures (%)

Samples ¹⁾	Gram positive bacterium		Gram negative bacteria	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>	Typhimurium
RCM	15.45	2.04	2.97	
RCM-C5	21.28	4.98	7.64	

¹⁾RCM: no fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 100.0%, RCM-C5: fermented *Rubus coreanus* Miquel juice 95.0% with chlorella 5.0% mixtures.

는 Park과 Chang(2)의 보고와 유사하였다. 특히 *E. coli*와 *Sal. Typhimurium*에 대한 항균 활성보다는 *Sta. aureus*에 대한 항균 활성이 월등히 뛰어나 그람음성균보다는 그람양성균에 대한 저해율이 더 높은 것으로 판단된다. 또한 *Sta. aureus*에 대한 저해율에서 RCM의 저해율 15.45%보다는 RCM-C5가 21.28%로 더 높게 나타났는데, 이는 젖산균 발효 때문에 생성된 각종 유기산에 의한 항균 활성에 기인(27)한 것으로 판단된다. *E. coli*와 *Sal. Typhimurium*도 *Sta. aureus*와 유사한 경향을 나타내어 클로렐라 첨가와 젖산균 발효 때문에 저해율이 각각 2.04%에서 4.98%로, 2.97%에서 7.64%로 향상되는 결과를 확인하였다.

이상의 결과로 미루어본바 복분자와 클로렐라 혼합물의 젖산발효 최적조건을 활용하여 제조된 시료의 품질평가 결과 일반 복분자 시제품보다 일반성분, 유리당, 유기산, 항균 활성 등 이화학적 특성이 향상되는 결과를 나타내어, 이를 실제 제품으로 제조한다면 영양·기능성이 풍부한 기능성 발효식품으로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 복분자와 클로렐라 혼합물의 기능성 발효제품을 개발하고자 품질 특성을 최대화할 수 있는 최적 발효조건을 확립하고, 확립된 방법으로 제조한 혼합 발효물의 일반성분, 유리당, 유기산, 항균 활성 등 화학적 특성에 대한 품질 특성을 조사하였다. 먼저 복분자와 클로렐라 젖산발효 혼합물의 최적 발효균주를 확인한 결과 젖산 생성이 *Lactobacillus plantarum*에서 가장 우수한 것으로 평가되었고, 최적 발효 온도는 37°C였다. 이와 같은 조건으로 복분자와 클로렐라 젖산발효 혼합물을 제조하여 관능평가를 한 결과 종합적 기호도 측면에서 클로렐라 분말 5% 첨가구가 가장 우수한 것으로 평가되었다. 따라서 시판 복분자 착즙액(*Rubus coreanus* Miquel juice; RCM)과 복분자와 클로렐라 5% 첨가 젖산발효 혼합물(RCM-C5)을 제조하여 일반성분, 유리당, 유기산, 항균 활성 등 품질 특성을 조사하였다. RCM과 비교하여 RCM-C5는 수분의 경우 4.90%, 건량 기준 총당은 14.15%, 건량 기준 조섬유는 0.32% 감소하였다. 한편 건량 기준으로 조단백질, 조지방, 조회분은 각각 13.75%, 0.18%, 0.73% 증가하였다. 색도는 두 시료 모두 밝고 약간의 황색을 띠는 적색이었지만 RCM-C5가 RCM보다 황색을 더 띠었다. RCM과 비교하여 RCM-C5의 유리당 함량은 0.97%,

유기산 함량은 616.30 mg%, 항균 활성은 그람양성균인 *Staphylococcus aureus*가 5.83%, 그람음성균인 *Escherichia coli*와 *Salmonella Typhimurium*은 각각 2.94%, 4.67% 증가하였다. 이상의 결과로 미루어본바 일반 복분자 시제품보다 복분자와 클로렐라 젖산발효 혼합물의 품질 특성이 향상되는 결과를 나타내어, 이를 실제 제품으로 제조한다면 영양·기능성이 풍부한 기능성 발효식품으로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Kim JY, Baek SH, Kim SJ. 2011. Effect of compost fermented with Korean medicinal herb waste on physicochemical characteristics of *Rubus coreanus* Miquel (*Bokbunja*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 839-847.
- Park YS, Chang HG. 2003. Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 367-375.
- 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: 56-67.
- Li SZ. 1973. *Comprehensive outline of the materia medica*. Komunsa, Seoul, Korea. p 720-721.
- Cha HS, Youn AR, Park PJ, Choi HR, Kim BS. 2007. Physicochemical characteristics of *Rubus coreanus* Miquel during maturation. *Korean J Food Sci Technol* 39: 476-479.
- Cho SH, Choi SW, Lee HR, Lee JY, Lee WJ, Choi Y. 2004. Safety and effects on lipid parameters of *Rubus coreanus* and *Atractylodes japonica* in ovariectomized rats. *J Food Sci Nutr* 9: 361-366.
- Mullen W, McGinn J, Lean ME, MacLean MR, Gardner P, Duthie GG, Yokota T, Crozier A. 2002. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J Agric Food Chem* 50: 5191-5196.
- Chung TH, Kim JC, Lee CY, Moon MK, Chae SC, Lee IS, Kim SH, Hahn KS, Lee IP. 1997. Potential antiviral effects of *Terminalis chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* against duck hepatitis B virus (DHBV). *Phytotherapy Res* 11: 179-182.
- MAFRA. 2014. *The annual output of cash crops-2013*. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Sejong, Korea. p 50.
- Kang MS, Sim SJ, Chae HJ. 2004. Chlorella as a functional biomaterial. *Korean J Biotechnol Bioeng* 19: 1-11.
- Kim DC, Won SI, In MJ. 2014. Preparation and quality characteristics of *Mul-kimchi* added with chlorella. *J Appl Biol Chem* 57: 23-28.
- Lee YK, Lee HK. 2002. Industrial application of algae. *Bio-industry News* 15(2): 19-24.

13. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66: 365-378.
14. Black FT, Anderson PL, Ørskov J, Ørskov F, Gaarslev K, Laulund S. 1989. Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveller's diarrhoea. *Travel Med* 5: 333-335.
15. Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M, Hämäläinen P, Ihantola-Vormisto A, Muurasniemi-Isoviita L, Nikkari S, Oksanen T, Pörsti I, Salminen E, Siitonen S, Stuckey H, Toppila A, Vapaatalo H. 1990. Prevention of travellers diarrhoea by *Lactobacillus* GG. *Ann Med* 22: 53-56.
16. Lee LS, Jung KH, Choi UK, Cho CW, Kim KI, Kim YC. 2013. Isolation and identification of lactic acid producing bacteria from kimchi and their fermentation properties of soymilk. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1872-1877.
17. Sandine WE, Muralidhara KS, Elliker PR, England DC. 1972. Lactic acid bacteria in food and health: A review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and Lactobacilli. *J Milk Food Technol* 35: 691-702.
18. Lee CH, Chae KS, Lee SK, Park BS. 1982. *Quality managements in food industry*. Yoorim Munhwa Press, Seoul, Korea. p 43.
19. AOAC. 1995. *Official methods of analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 69-74.
20. Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168: 167.
21. Gancedo MC, Luh BS. 1986. HPLC analysis of organic acids and sugars in tomato juice. *J Food Sci* 51: 571-573.
22. Cho EJ, Nam ES, Park SI. 2004. Effect of chlorella extract on quality characteristics of yoghurt. *Korean J Food & Nutr* 17: 1-7.
23. Sung YM, Cho JR, Oh NS, Kim DC, In MJ. 2005. Preparation and quality characteristics of curd yogurt added with chlorella. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 60-64.
24. Shin YS, Sung HJ, Kim DH, Lee KS. 1994. Preparation of yogurt added with potato and its characteristics. *Korean J Food Sci Technol* 26: 266-271.
25. Cha HS, Lee MK, Hwang JB, Park MS, Park KM. 2001. Physicochemical characteristics of *Rubus coreanus* Miquel. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1021-1025.
26. Kwon KH, Cha WS, Kim DC, Shin HJ. 2006. A research and application of active ingredients in *Bokbunja* (*Rubus coreanus* Miquel). *Korean J Biotechnol Bioeng* 21: 405-409.
27. Kim SH, Sung HJ, Shin YS, Kim DH, Lee KS. 1994. Inhibitory effect of lactic acid bacteria and its metabolites on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Korean J Food Sci Technol* 26: 644-648.