

메주에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* JBE245를 이용한 사과 발효 음료 제조

허 준 · 박해석¹ · 엄태봉*

전북대학교 자연과학대학 생명과학과, ¹(재)발효미생물산업진흥원

Production of fermented apple juice using *Lactobacillus plantarum* JBE245 isolated from Korean traditional Meju

Jun Heo, Hae-Suk Park¹, and Tai-Boong Uhm

Department of Biological Sciences, Chonbuk National University

¹Microbial Institute for Fermentation Industry

Abstract Eighty-four strains of lactic acid bacteria were isolated from Korean fermented foods for the production of fermented apple juice. Among these strains, the JBE245 strain that showed rapid growth and food functionality was selected and identified as *Lactobacillus plantarum*. This strain reached the stationary phase after 24 h fermentation at 30°C with 1.5×10^8 colony forming unit (CFU)/mL of viable cells, and maintained its viability levels even after 14 days of storage. During fermentation, the α -glucosidase inhibitory activity (40.4%), total polyphenol content (583.6 mg gallic acid equivalent (GAE)/mL), and 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl hydrate (DPPH) radical scavenging activity (52%) were increased. As judged by a sensory test, the overall preference for the fermented juice (4.22) was comparable to that for the unfermented juice (4.72), indicating that fermentation does not significantly affect the sensory characteristics of apple juice. Consequently, the fermented beverage containing *L. plantarum* JBE245 and apple juice is a promising functional health food.

Keywords: apple juice, functional beverage, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, traditional fermented food

서 론

최근 건강에 대한 관심이 증가하면서 프로바이오틱(probiotic) 기능성 식품들(functional foods)의 소비가 증가하고 있다(1,2). 전통적으로 프로바이오틱 식품(probiotics)은 요거트와 치즈와 같은 유제품들을 의미하였으나 채식주의, 젓당 불내증 등을 지닌 소비자들의 요구가 증가하면서 다양한 식물성 프로바이오틱 식품으로 확대되고 있다(2,3). 식물성 프로바이오틱 식품의 원료로 사과와 생과뿐만 아니라 주스, 잼 등 다양한 가공 식품에 이용되는 대표 과일로서(4) 우리나라 전체 과수 면적의 약 40%에서 재배되고 있다(5). 사과는 식품섬유, 비타민, 폴리페놀과 같은 기능성 물질이 있어 산화방지(6), 항암(7), 항당뇨(8), 심혈관계 질환 개선(9) 등에 효과가 있다고 보고되고 있어 프로바이오틱스 제품 제조를 위한 식물성 원료로 유용하게 이용될 수 있다. 그러나 발효 원료로 사과는 유기산 함량이 높아 대부분의 미생물들은 생육하기 어려우며 산 저항성이 높은 일부 젓산세균들만 생육할 수 있다(3,10). 젓산세균은 오래 전부터 발효 식품 제조에 사용되는 대표적인 프로바이오틱 균주로 면역체계 증진(11)과 항암(12), 산화

방지(13), 콜레스테롤 저하(14) 등의 건강 증진 효과를 가지는 것으로 보고되었다. 또한 다양한 대사 산물을 생산해 향미를 증진시키고 말로락트 발효를 통해 강한 신맛의 말산을 부드러운 맛의 젓산으로 전환시켜 산도를 감소시키는 특성(15)을 보인다. 이러한 이유로 사과를 원료로 한 프로바이오틱 발효 음료 제조를 위해 젓산세균의 사용은 적절하다고 판단되었다. 현재까지 *Lactobacillus rhamnosus*(2)와 *L. casei*(3)를 이용한 사과 발효 음료 개발과 감자(16)와 천년초(17) 등을 이용하여 젓산세균 발효 음료를 제조하는 연구들이 보고되었으나, 국내에서 사과 발효에 적합한 균주 선별에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다. 다만 높은 산도의 사과즙 조건에서 생균수 유지를 위해 산도조절제로 산도를 낮추거나, 균주의 초기 접종량을 높여 제조한 특허가 보고되었다(18,19).

전통 발효식품은 지역, 식품 종류, 발효 조건에 따라 다양한 종류의 미생물이 군집을 이루며, 이들 가운데 일부는 생존력이 강한 젓산세균들이 발효 기간 동안 우점을 이루는 것으로 보고되었다(20-23). Lee 등(20)은 국내 시판 중인 막걸리 18종 가운데 17종에서 젓산세균이 10^6 colony forming unit (CFU)/mL 이상 분포하는 것으로 보고하였고 Jeong 등(23)은 세 종의 재래식 메주에서 젓산세균이 10^{6-8} CFU/g 분포하여 호기성 생균(10^{7-8} CFU/g)과 비슷한 숫자를 나타내어 메주의 발효에 깊게 관여한다고 보고하였다. 이러한 결과들을 토대로 사과 음료 조건에서 발효 및 기능성 특성이 우수한 젓산세균을 국내 전통발효식품으로부터 분리할 수 있을 것으로 판단하였다. 따라서 본 연구는 토종 젓산세균들을 분리하고, 상업용 균주 선별을 위해 내산성과 성장 속도가 빠르고 기능성 특성이 우수한 균을 선별하였다. 또한 선별된

*Corresponding author: Tai-Boong Uhm, Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 54896, Korea

Tel: +82-63-270-3439

Fax: +82-63-270-3362

E-mail: tbuhm@chonbuk.ac.kr

Received May 20, 2016; revised July 22, 2016;

accepted August 2, 2016

균주로 사과 발효 음료를 제조하여 발효 특성과 기능성 특성을 평가하는데 목표를 두었다. 사과와 젖산세균의 유익한 장내 정상 작용을 고려할 때 젖산세균을 이용한 사과 발효 음료는 기호도 뿐 아니라, 건강을 위한 기능성을 향상시킬 수 있을 것으로 예상된다.

재료 및 방법

실험 재료

균주 분리를 위해 재래식으로 제조한 전통 발효 식품으로 전국 각지에서 장류 22종, 메주 14종, 막걸리 13종, 누룩 11종, 젓갈 5종을 수집하였다(Table 1). 장류와 막걸리, 젓갈과 5종의 누룩은 시중에 유통 중인 제품을 구매하였으며, 메주와 6종의 누룩은 전북 순창군에서 가내 제조한 메주를 수집하여 이용하였다. 균주 선발과 사과 발효 음료를 제조하기 위해 이용한 사과 음료는 14°Bx의 장수드림생사과즙(pH 4.05)을 장수농산물종합가공센터에서 구입하여 이용하였다.

표준 균주로 사용된 *L. plantarum* ATCC14917 균주는 농업유전 자원정보센터(KACC)로부터 분양을 받아 사용하였다.

젖산세균주의 분리

균주 분리를 위해 시료 1 g 또는 1 mL을 취해 펩톤액(0.1% peptone+0.85% NaCl)으로 희석한 뒤 0.005% (w/v) bromocresol purple (5,5"-dibromo-o-cresolsulfophthalein, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 MRS (de Man Rogosa and Sharpe agar, Difco Lab, Sparks, MD, USA) 고체배지 표면에 도말하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 주변에 산을 생성하여 노란색 환을 형성하는 집락들을 골라 새 MRS 고체배지 표면에 희선 도말하여 배양 후 단일 집락들을 분리하였다. 그 결과 65종의 시료 가운데 48종의 시료로부터 84종의 젖산세균주를 분리하였으며, 분리된 균주는 MRS 액체배지에 배양 후 40% 글리세롤(glycerol)을 첨가하여 -70°C로 냉동 보관하였다.

사과 발효 적합 균주 선발

발효에 적합한 젖산세균을 선발하기 위해 사과즙 1 mL에 각각의 균주를 약 3×10^5 CFU/mL 이 되도록 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 발효 전과 후의 배양액을 microplate reader (Infinite F50, Tecan, Grödig, Austria)로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 이 가운데 발효 전보다 흡광도 증가폭이 큰 5 균주를 일차 선발하였다. 발효 시간에 따른 선발 균주의 생균수 변화량을 측정하기 위해 500 mL의 사과즙에서 3×10^5 CFU/mL이 되도록 동일하게 접종하고 30°C에서 30시간 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 시간 별로 수집한 배양액은 연속 희석하여 MRS 고체배지에 도말 후 30°C에서 48시간 배양하고 형성된 집락을 계수하였다.

5종의 선발 균주 가운데 발효 중 생육 속도와 산화방지 활성 및 항당뇨 활성을 특성을 토대로 생육 속도가 가장 우수한 균주를 최종 균주로 선정하였다.

알파 글루코시데이스(α -glucosidase) 저해 활성 측정

알파 글루코시데이스 저해 활성을 측정하기 위해 Tibbot 등(24)의 방법을 변형하여 측정하였다. 10 U/mL 알파 글루코시데이스(Sigma-Aldrich) 20 μ L, 30 mM 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside(Sigma-Aldrich) 80 μ L, 0.1 M 인산완충용액(phosphate buffer, pH 6.8) 880 μ L, 시료 용액 20 μ L를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0.5% 아카보스(acarbose,

Sigma-Aldrich)를 양성 대조구로 사용하였고, 저해 활성은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\alpha\text{-Glucosidase inhibition activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}}\right) \times 100$$

총 폴리페놀 함량 및 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) radical 소거능 측정

총 폴리페놀 함량 분석은 Folin-Denis 방법(25)을 변형해 사용하였다. 시료 100 μ L에 증류수 750 μ L, 1 N 폴린-시오칼토페놀 시약(Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Sigma-Aldrich) 50 μ L를 섞어 3분간 방치한 후 35% (w/v) Na_2CO_3 100 μ L를 첨가하였다. 암실에서 1시간 동안 발색 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 총 폴리페놀 함량은 갈산(gallic acid, $\pm 2.5\%$, Sigma-Aldrich)를 표준물질로 사용하여 리터당 mg 갈산당량(GAE)로 나타내었다.

사과 발효 음료의 산화방지 활성을 확인하기 위해 DPPH 라디칼(radical) 소거능을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 Blois의 방법을 변형하였는데 에탄올로 희석한 시료 100 μ L와 에탄올(26)에 용해시킨 0.2 mM DPPH (Sigma-Aldrich) 용액 100 μ L를 혼합하여 암실에 30분간 방치 후 495 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로 시료 대신 에탄올을 사용하였고 0.2 mM L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich)를 양성 대조구로 사용하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}}{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{blank}}}\right) \times 100$$

선발 균주의 동정

최종 선발된 균주의 분자 생물학적 동정을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 실시하였다. 이를 위해 Macrogen (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 universal 프라이머(primer)인 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')으로 16S rRNA 유전자를 증폭하였고 이 PCR 산물을 정제한 후 염기 서열을 해독하였다. 크로마토그램(chromatogram)의 비교를 통해 mixed base와 gap을 보정한 후 BLASTN search를 통해 서열 일치도가 높은 표준 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 얻었다. 선발 균주와 표준 균주의 염기서열간의 상호 비교를 위해 CLUSTAL W(27)를 이용하였고, 계통도 분석은 Tamura-Nei 모델에 기초한 Maximum Likelihood 방법(28)을 사용하였다. 통계적 신뢰도를 산출하기 위해 bootstrap을 1,000회 실행하였으며, 이를 위해 MEGA6 program(29)을 이용하였다.

선발 균주의 명확한 동정을 위해 *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* 종간 구별이 가능한 *recA* 유전자를 이용하여 multiplex PCR을 수행하였다(30). PCR 프라이머로 paraF (5'-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3'), pentF (5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-3'), planF (5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3'), pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3')를 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 2분간 초기 변성 후 95°C에서 30초간 변성, 50°C에서 15초간 결합, 72°C에서 30초간 증폭을 30회 반복하였으며, 72°C에서 5분간 마지막 증폭 한 뒤 전기영동을 통해 PCR 산물 크기를 비교하였다.

선발 균주의 당 대사능을 확인하기 위해 API 50 CHL kit (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)를 이용하여 분석하였다. 균

주를 MRS 고체배지에서 48시간 배양시킨 후 집락을 회수하여 0.85% NaCl 용액에 현탁시켜 균 현탁액을 얻었으며 균 현탁액을 API 50 CHL kit의 메뉴얼에 따라 분석하여 당 대사능을 확인하였다.

선발 균주를 이용한 사과 발효 음료 제조

1 L의 사과즙에 선발 균주를 접종(5.2×10^3 CFU/mL)하여, 30°C에서 정치 배양 후 시간 별 pH, 유기산 및 생균수를 측정하였으며 기능성 특성을 확인하기 위해, 시간별 항당뇨 활성 및 산화방지 활성을 확인하였다. 생균수는 배양액을 연속 희석한 다음 MRS 고체배지에 도말하여 30°C에서 48시간 배양 후 생성된 집락을 계수하였다. 온도에 따른 배양 특성을 보기 위해 배양 온도를 각각 20, 30, 37°C로 달리하여 생균수 변화를 확인하였고, 발효 초기 접종량에 따른 배양 특성을 보기 위해 초기 생균수를 각각 10^3 , 10^4 , 10^5 CFU/mL이 되도록 접종한 뒤, 생균수 변화량을 확인하였다.

발효 용량에 따른 생균수 변화를 확인하기 위해 10 L의 사과즙에 10^4 CFU/mL을 접종하고 30°C에서 48시간 정치 배양하였으며 냉장 중 생균수 변화를 확인하기 위하여 10 L 조건에서 제조된 사과 발효 음료를 4°C에서 14일간 생균수 변화를 관찰하였다.

유기산 분석

발효 음료의 유기산은 HPLC로 정량 분석하였다. 0.6 mL/min 유속의 0.005 N sulfuric acid를 이동상으로 하여 Aminex HPX-87H column (300 mm×7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 50°C로 유지하면서, UV 검출기(Gilson 118/119 detector, Middleton, WI, USA)에서 220 nm 파장으로 분석하였다.

기호도 평가

기호도 평가를 실시하기 위해 20대의 전북대학교 대학생 및 대학원생 82명(남: 44, 여: 38)을 패널로 선정하였다. 평가를 위해 사과 음료와 10 L의 사과즙에 JBE245 균주를 10^4 CFU/mL를 접종 후 30°C에서 30시간 배양하여 사과 발효 음료를 제조하여 각각 50 mL을 패널에게 제공하였다. 발효 음료의 당도는 14°Bx로 발효전과 차이가 없으며, pH는 4.11로 발효전(4.04)보다 소폭 증가하였다. 기호도 평가 항목으로 단맛, 신맛, 짭은맛, 청량감, 전체적 기호도를 선정하였으며 각각의 항목은 7점 척도법(우수 7 점, 미흡 1점)으로 평가하였다.

통계 분석

모든 측정 실험은 3회 반복하여 실행하였으며 얻어진 값들은 평균±표준편차로 나타내었다. 실험의 통계처리는 SPSS (Statistical

Table 2. Growth of 6 strains during fermentation of apple juice

Name	Source	OD ₆₂₀
NC		0.24±0.02
JBE160	<i>Makgeolli</i>	0.45±0.04
JBE245	<i>Meju</i>	0.41±0.00
JBE426	<i>Makgeolli</i>	0.40±0.01
JBE457	<i>Jeotgal</i>	0.44±0.01
JBE466	<i>Cheonggukjang</i>	0.43±0.01
JBE468	<i>Cheonggukjang</i>	0.39±0.01

Values are mean±SD (n=3).

Package Social Science, version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 통해 독립표본 *t*-test, 일원 배치 분산분석과 Duncan's multiple range test를 실시하고 유의적 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

젖산세균 분리 및 1차 선발

전통 발효식품에서 분리한 젖산세균 가운데 사과 음료 조건에서 발효 및 기능성 특성이 우수한 젖산세균을 분리할 수 있을 것으로 판단하여 65종의 다양한 시료로부터 젖산세균을 분리하였다(Table 1). 젖산세균이 우점종을 이루거나 높은 균체수를 보이는 48종의 시료로부터 84종의 젖산세균주를 분리하고 사과즙에서 생육 가능한 균주를 선발하기 위해 사과즙에서 배양 후 흡광도 변화를 확인하였다. 발효 전 620 nm에서 측정된 사과즙의 흡광도는 0.24 ± 0.02 이며, 이 가운데 사과즙에서 생육하지 못한 69종의 균주의 흡광도는 평균 0.25 ± 0.01 로 흡광도 변화가 없으며, 15종의 균주에서 평균 0.40 ± 0.02 의 흡광도 증가를 보였다. 15종의 균주 가운데 매주에서 분리한 JBE245, 막걸리에서 분리한 JBE426, 꿀두기 젓갈에서 분리한 JBE457, 청국장에서 분리한 JBE466 중 JBE468 균주의 증식속도가 가장 우수하여 사과즙에서 발효에 적합한 균주로 일차 선발하였다(Table 2). Pereira 등(3)은 사과 음료의 초기 pH가 높을수록 *L. casei*의 발효 후 생균수가 더 증가하는 것으로 보고하였으며, Kim and Park(18)은 발효 음료 제조시 발효액의 pH가 6.5인 경우 10^7 CFU/mL 이상 생균수가 증가하였으나 pH가 4.5인 경우 10^4 CFU/mL로 생균수가 발효전보다 감소하는 것으로 보고하였다. 따라서 pH 4의 산도가 높은 사과 원액을 이용하기 위해서는 균주의 내산성이 사과 발효 음료 제조를 위한 중요한 특성으로 보인다. 젖산세균은 ATP의 존성 이온 배출, arginine deiminase 경로, 탈탄산 반응, small heat

Table 1. Sample types and collected regions for isolation of lactic acid bacteria

Sample type (No. of samples)	Region of collected sample
Fermented soybean sauces	<i>Gochujang</i> (7)
	<i>Doenjang</i> (7)
	<i>Chenggukjang</i> (6)
	<i>Meju</i> (15)
<i>Makgeolli</i> (13)	<i>Jeonbuk</i> (6), <i>Gyeonggi</i> (2), <i>Busan</i> (1), <i>Daegu</i> (1), <i>Gangwon</i> (1), <i>Seoul</i> (1), <i>Chungnam</i> (1)
<i>Nuruk</i> (11)	<i>Jeonbuk</i> (6), <i>Gyeonggi</i> (3), <i>Busan</i> (1), <i>Gwangju</i> (1)
<i>Jeotgal</i> (5)	<i>Jeonbuk</i> (5)

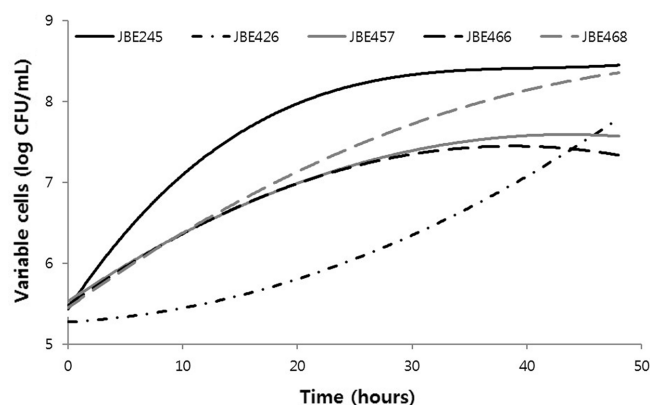


Fig. 1. Change of viable cells of selected strains during fermentation of apple juice at 30°C. Initial inoculum cells were 3×10^5 CFU/mL. *L. plantarum* ATCC14917^T was used control strain. Experiments were performed in triplicate.

shock protein (smHSP) 등을 통해 내산성을 가지는데, 이러한 메커니즘이 균 종류에 따라 차이가 큰 것으로 알려져 있다(31,32). 대표적으로 McDonald 등(32)은 *Leuconostoc mesenteroides*와 *L. plantarum*의 생육이 정지하는 세포 내 pH는 각각 5.4-5.7, 4.6-4.8로 균주마다 차이가 나타나는 것으로 보고하였다. 따라서 선발된 5 균주들은 내산성이 우수한 균주들로 판단되었고, 이 가운데 발효 음료 제조에 적합한 균주를 선발하고자 하였다.

선발 균주들의 사과즙 생육 특성

일차 선발 균주들의 배양 시간에 따른 생육 특성을 확인하기 위해 500 mL의 사과즙에 접종(3.2×10^5 CFU/mL)하여 30시간 배양 후 이들 간의 생균수의 변화량을 비교하였다(Fig. 1). 배양 18 시간에서 JBE245 균주는 7.5×10^7 CFU/mL로 다른 균주들에 비해 높은 증식 속도를 보였고, 배양 24시간에서 9.4×10^8 CFU/mL로 정지기에 도달하여 이후 비슷한 생균수(3.6×10^8 CFU/mL)를 유지하였다. JBE245 균주 이외에 높은 생육 특성을 보인 표준 균주 ATCC 14917와 JBE457은 배양 24시간에서 각각 1.7×10^8 CFU/mL, 3.8×10^8 CFU/mL에 도달하였다. 정지기에 도달하였을 때, 10^8 CFU/mL 이상 도달하는 특성은 다른 연구들에서 이용한 균주들과 유사하였다. 그러나 이들 연구에서 초기 접종량을 10^7 CFU/mL 이상 접종하고(2,3), 사과즙의 pH를 인위적으로 높여 젖산세균 발효를 시도하였다. 사과즙에서 생육 특성을 고려할 때, 생육 속도가 빠르고 높은 균 밀도를 유지하는 JBE245와 JBE457 균주가 발효 음료에 적절한 후보 균주로 판단하였다.

선발 균주들의 항당뇨 활성

알파 글루코시데이스[EC 3.2.1.20]는 소장의 점막에 분포하여 α -D-glucoside를 가수분해하는 효소로 이 효소가 저해되는 경우 탄수화물의 흡수를 지연시킴으로써 혈당을 감소시킨다(24). 기존 연구들에서 사과와 젖산세균은 각각 알파 글루코시데이스 저해능을 가진다고 보고되어(8,33,34), 이 두 원료를 함께 이용한 경우 상승적으로 알파 글루코시데이스 저해능을 보일 것으로 판단하였다. 따라서 선발된 균주들의 항당뇨 특성을 비교하기 위해 사과 발효물의 알파 글루코시데이스 저해능을 비교하였다(Table 3). JBE245 균주를 이용한 발효물의 경우 가장 높은 저해능(47.4%)을 보였으며, JBE457 균주(36%)를 제외한 균주들과 평균 20.5%의 큰 폭의 차이를 보였다. Ramchandran 등(34)은 알파 글루코시데이스 저해능을 갖는 요인이 세포벽 표면에 분포하는 exopolysaccharides (EPS)로 보고하였는데, EPS를 생성하는 균주가 비생성 균주보다 높은 저해능을 가지는 것으로 보고되었다. 또한 Lebeer 등(35)은 동일한 종 내에서도 균주간 EPS 합성 유전자들의 차이가 큰 것으로 보고하였다. 따라서 균주마다 저해능의 차이를 보이는 이유로 EPS 구성 차이로 추측되며 보다 명확한 규명을 위해서 향후 저해능과 EPS의 연관성에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

선발 균주들의 산화방지 활성

산화방지 물질들은 체내에서 반응성이 큰 free radical에 대신 반응하여 건강 증진효과를 얻을 수 있는 물질들을 말하며 과채류에 많이 포함되어 있는 플라보노이드와 비타민 등이 대표적이다(36,37). 균주간 산화방지 활성을 비교하기 위해 과채류에 분포하는 대표적인 산화방지 물질인 총 폴리페놀량과 산화방지능을 확인하기 위하여 DPPH 소거능을 확인하였다(Table 3). 선발 균주 가운데 JBE245, JBE426, JBE468 균주가 총 폴리페놀과 DPPH 소거능 모두 증가하였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 단백질에 결합된 폴리페놀 또는 고분자 폴리페놀이 발효를 통해 저분자 폴리페놀로 전환되거나 세포벽 성분에 결합되어 있는 글리코사이드 형태의 폴리페놀이 가수분해 되면서 활성을 갖는 구조로 전환되어 총 폴리페놀의 양이 증가한 것으로 판단된다(38,39). JBE468 균주를 이용한 발효 음료가 가장 높은 총 폴리페놀 함량(594.2 mg GAE/L)과 DPPH 소거능(49.9%)을 보였으며, 생육 속도와 항당뇨 활성이 우수한 JBE245의 경우 다른 균주보다 높은 총 폴리페놀 함량(505.4 mg GAE/L)과 DPPH 소거능(44.8%)을 보였다.

일차 선발 균주들의 증식속도, 항당뇨 활성, 산화방지 활성을 고려하여, 메주에서 분리한 JBE245 균주를 사과 발효 음료 제조 균주로 최종 선발하였다. 전통 재래식 메주는 제조 환경에 따라

Table 3. Comparison of total polyphenol contents, DPPH scavenging activities and α -glucosidase inhibitory activity of fermented apple juice by selected LAB strains

	Control	Unfermented	Fermented apple juice					
			ATCC 14917 ^T	JBE245	JBE426	JBE457	JBE466	JBE468
α -Glucosidase inhibitory activity (%)	65.1 \pm 8.8 ¹⁾	18.5 \pm 6.0 ^a	24.0 \pm 6.8 ^a	47.4 \pm 3.6 ^c	17.4 \pm 3.2 ^a	36.2 \pm 2.5 ^b	19.9 \pm 3.0 ^a	20.8 \pm 4.7 ^a
Total polyphenols (mg GAE/L)		424.5 \pm 19.5 ^a	435.9 \pm 3.1 ^a	505.4 \pm 11.5 ^b	505.2 \pm 58.8 ^b	461.1 \pm 28.4 ^{ab}	408.5 \pm 16.0 ^a	594.2 \pm 23.6 ^c
DPPH scavenging activities (%)	47.0 \pm 2.2 ²⁾	29.9 \pm 4.2 ^a	50.0 \pm 4.7 ^c	44.8 \pm 3.4 ^b	42.1 \pm 4.6 ^{bc}	33.6 \pm 4.7 ^a	31.7 \pm 3.1 ^a	49.9 \pm 3.7 ^c

Values are mean \pm SD ($n=3$). Different small letters in the same property indicate a significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾0.04 mM ascorbic acid

²⁾0.5% acarbose

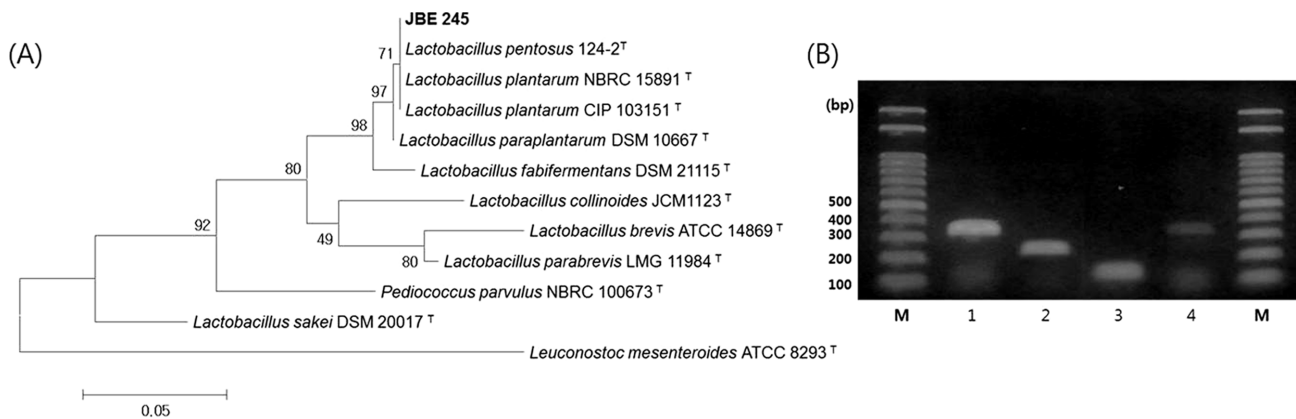


Fig. 2. (A) Phylogenetic tree constructed from comparative analysis of 16S rRNA gene sequences showing the relationships of selected strains with other type strains. Bootstrap values (percentage from 1,000 replicates) are indicated at the nodes. The scale bar indicates the nucleotide change per site. **(B) Gel electrophoresis of the *recA* gene products by multiplex PCR for differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum*.** Lane 1, JBE245 strain; 2, *L. pentosus* KACC12428^T; 3, *L. paraplantarum* KACC12373^T; 4, *L. plantarum* KACC11451^T; M, 100 bp DNA ladder.

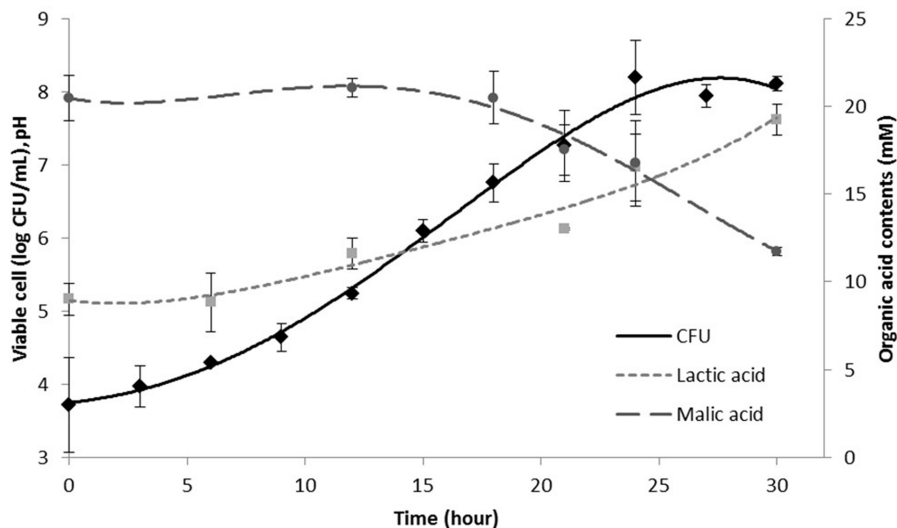


Fig. 3. Growth of the *L. plantarum* JBE245 and change of malic acid and lactic acid concentration during fermentation of apple juice. Experiments were performed in triplicate, and error bars indicate standard deviation.

발효 및 숙성 과정에서 다양한 토종 미생물들이 분포하며 많은 젖산세균들이 분포하고 있으나 다른 미생물에 비해 젖산세균에 대한 연구가 부족한 형편이다(23,40). 전통 발효제인 메주의 중요성과 젖산세균의 분포와 역할을 볼 때, 체계적인 연구가 필요할 것으로 보이며 JBE245 균주 또한 이러한 연구의 일환으로 이용될 수 있을 것이다.

JBE245 균주의 동정

JBE245 균주의 생화학적 동정을 위해 API 50 CHL kit를 이용하여 당 대사능을 확인한 결과 API web (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 등록된 *L. plantarum*의 당 대사능과 99.9% 일치하였다. 또한 분자생물학적 동정을 위해 16S rRNA 유전자 염기 서열을 표준 균주들의 서열과 비교하였다(Fig. 2A). 그 결과 JBE245는 표준 균주들인 *L. plantarum* NBRC15891, CIP103151, *L. pentosus* 124-2, *L. paraplantarum* DSM10667 등과 염기서열이 99.9% (1,417-1,419/1,419 bp) 이상 각각 일치하였다. *L. plantarum*, *L.*

pentosus, *L. paraplantarum* 균주 간에는 높은 유전학적 상동성을 갖기 때문에, 16S rRNA 유전자 염기서열로는 중 수준에서 JBE245의 동정에 한계가 있음이 보고 되었다(41,42). 이에 Torriani 등(30)은 이들 중 간에 DNA 수선 및 유지에 관여하는 *recA* 유전자의 가변 영역에 차이가 있음을 발견했고, 이 영역의 PCR을 수행한 결과 *L. paraplantarum*는 107 bp, *L. pentosus*는 218 bp, *L. plantarum*는 318 bp의 PCR 산물을 보였다. 동일한 영역의 JBE245 균주의 PCR 산물을 전기영동한 결과, 318 bp에서 밴드가 나타나 *L. plantarum*으로 동정하였다(Fig. 2B). *L. plantarum*은 자연계에 존재하는 대부분의 단당류와 올리고당을 이용할 수 있는 것으로 알려져 있으며(43), *L. plantarum*은 식품의약품안전처에서 식용 가능한 식품 원재료로 고시되어 있으며(44), 건강기능식품의 기준 및 규격고시(제2014-203호)에는 프로바이오틱 원료로 이용 가능한 미생물로 등록되어 발효 음료 제조에 적합한 균주로 판단된다.

사과 발효 음료의 제조 특성

JBE245 균주의 사과발효 음료의 제조 특성을 확인하기 위하여, 발효시간에 따른 생균수 및 유기산 변화량을 측정하였다(Fig. 3). 발효 전(5.2×10^3 CFU/mL)에서 3시간(9.1×10^3 CFU/mL)까지 생균수 변화는 크지 않고, 6시간(2.0×10^4 CFU/mL)부터 증식기에 진입하였다. 24시간 발효 시 생균수는 1.5×10^8 CFU/mL였고 이후 발효를 종료할 때까지 비슷하게 유지되어 24시간 후 정지기에 도달한 것으로 판단하였다. 식품공전(45)에서 젖산세균수를 10^6 CFU/mL 이상을 포함한 경우에 발효 음료로, 건강기능식품의 규격 및 기준에서 10^8 CFU/g 이상 함유한 제품을 프로바이오틱 식품으로 정의하였다. 따라서 JBE245 균주를 이용하여 약 24시간 이상 발효시켜 제조한 사과 음료는 이 두 기준을 모두 만족할 것으로 보인다. 발효 음료의 유기산 변화를 비교하였을 때, 발효 전 말산과 젖산의 함량은 각각 20.5, 9.0 mM로 말산의 함량이 젖산의 함량보다 높았으나 발효가 진행 됨에 따라 말산은 11.7 mM로 감소하였고 젖산은 19.2 mM로 증가하였다(Fig. 3). *L. plantarum*을 포함한 대부분의 젖산세균들은 젖산 발효와 동시에 말로락트 발효를 하는 특성을 보인다(15). 말로락트 발효는 2개의 카르복실기 구조를 가진 말산을 1개의 카르복실기를 가진 젖산으로 전환하여 산도를 감소시키면서 신맛이 부드러워진다. 말로락트 발효의 결과 발효 음료의 pH는 발효 초기(4.04)보다 발효 후 소폭 증가(4.11)하였다. 말산을 첨가한 배지를 이용한 연구들(40,46)에서 발효 중 말로락트 발효가 진행되는 것을 확인하였으며, de Souza Ellendersen 등(1)은 사과즙 발효 중 말산의 감소 및 pH의 증가를 보고하였다. 이러한 연구들을 토대로 높은 농도의 말산이 말로락트 발효를 촉진하는 것으로 보이며 본 연구에서 젖산의 증가는 주로 말로락트 발효의 결과로 보인다.

온도, 초기 접종량, scale-up에 따른 사과 발효 음료의 제조 특성

사과 발효 음료의 최적 배양 온도를 확인하기 위해 온도별 생균수 변화량을 확인하였다(Fig. 4A). 30°C와 37°C 조건에서 생균수는 18시간에 증식기에 도달하여 이후 24시간에 최대 생육하였다. 24시간에서 생균수는 각각 2.0×10^8 CFU/mL, 3.3×10^8 CFU/mL로 37°C에서 65% 생균수가 더 높았으나 30시간에서 각각 2.0×10^8 CFU/mL, 1.7×10^8 CFU/mL로 오히려 낮았다. 20°C에서 발효 시 24시간에서는 3.2×10^6 CFU/mL로 생균수가 30°C보다 100 배 이상 낮았으며 48시간 이후 정지기(1.7×10^8 CFU/mL)에 도달하는 것으로 보인다. de Souza Ellendersen 등(1)은 *L. casei*를 이용한 사과 발효 음료에서 최적 발효 온도가 30°C로 더 높은 온도에서는 생균수의 감소를 보고하였다. JBE245 균주도 마찬가지로 30°C에서 가장 높은 생균수를 보였으나 최대 생균수에 도달하는 시간은 37°C에서 더 빠르게 나타났다. 따라서 산입과 과정에서 30°C에서 최대 생균수를 보이나, 증식기에 도달하는 시간은 37°C에서 더 빠르기 때문에 비용, 시간 등의 효율을 고려하여 최적 온도를 결정하는 것이 필요할 것으로 판단되었다.

발효 음료 제조에 적절한 종균(seed-culture)량을 확인하기 위해, 균체의 초기 접종량을 달리하여 발효 음료를 제조하였다(Fig. 4B). 초기 접종량이 10^5 CFU/mL이 되도록 접종한 경우, 20시간 발효 시 5.2×10^8 CFU/mL로 정지기에 도달했고, 24시간에서 2.2×10^8 CFU/mL로 감소하였다. 10^4 CFU/mL을 접종한 경우, 24시간까지 증가하여 최대 생균수(3.3×10^8 CFU/mL)를 보였다. 초기 접종량이 10^3 CFU/mL을 접종한 경우, 발효 시간에 따라 점차 증가하였으나 발효를 종료한 24시간 시점에서는 2.0×10^7 CFU/mL로 건강기능식품 규격에 따른 프로바이오틱스 조건보다 낮은 생균수를 보였다. 따라서 초기 생균수를 최소 10^4 CFU/mL 이상 접종

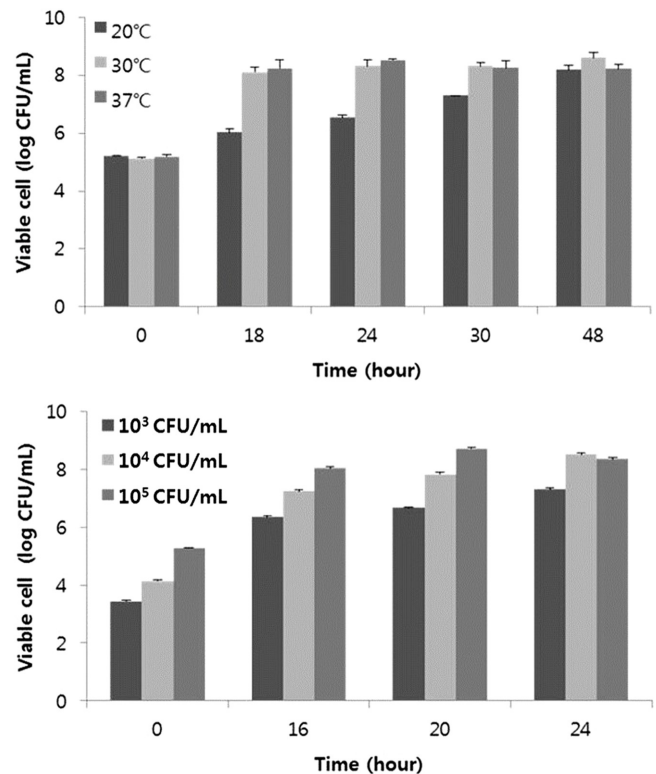


Fig. 4. Effect of temperature (A) and initial inoculum concentration (B) on the growth of the *L. plantarum* JBE245 during fermentation of apple juice. Initial inoculum concentrations were 10^3 , 10^4 , and 10^5 CFU/mL, respectively. Experiments were performed in triplicate.

하는 것이 프로바이오틱스 식품에 부합할 것으로 보인다. 결과적으로 다른 연구들(2,3)의 초기 접종량(10^7 CFU/mL)과 달리 JBE245 균주는 10^4 CFU/mL의 낮은 접종량으로 발효하여도 유사한 생균수까지 증가하는 장점을 가지고 있다.

최적 발효 온도와 종균량을 각각 30°C와 10^4 CFU/mL로 판단하였으며, 발효 용량이 발효 속도에 미치는 영향을 확인하기 위해 10 L 사과즙을 정지 발효하였다. 1 L의 사과즙을 발효한 결과와 비교하였을 때, 24시간에서는 2.6×10^7 CFU/mL로 생육 속도는 느리나 지속적으로 증가하여 48시간에서 최대 생육(2.0×10^9 CFU/mL)을 보였다.

냉장 유통 과정 중 생균수의 급격한 변화는 음료의 품질을 변화시킬 수 있고, 냉장 유통 중 생균수의 급격한 감소는 프로바이오틱 기능을 상실시킬 수 있다(2). JBE245 균주를 이용하여 10 L 조건에서 48시간 발효시킨 발효 음료의 저온 저장 중 생균수 감소를 확인하기 위해 4°C에서 냉장 보관 중 14일간 생균수 변화를 확인하였다. 발효 초기(2.0×10^9 CFU/mL)에서 시간에 따라 소폭 감소하며 실험을 종료한 14일까지 생균수는 1.3×10^8 CFU/mL로 감소하였다. 냉장 기간 동안 급격한 생균수 감소가 이루어지지 않고 14일까지 10^8 CFU/mL 이상을 유지하는 경향은 *L. rhamnosus*를 이용하여 제조한 사과 음료와 유사하다(2). JBE245 균주를 이용한 사과 발효 음료는 냉장 유통을 통해 14일 정도까지 프로바이오틱스 규격을 유지할 수 있을 것으로 보인다.

발효 과정 중 항당뇨 활성 측정

최적 발효 조건에서 발효 시간에 따른 사과 발효물의 알파 글

Table 4. Changes in α -glucosidase inhibitory activity, total polyphenol contents and DPPH radical-scavenging activity during fermentation of apple juice by JBE245

	0h	18h	24h	30h	48h	72h
α -Glucosidase inhibitory activity (%)	68.7 \pm 6.1 ¹⁾	18.5 \pm 6.0 ^a	27.7 \pm 43.8 ^b	38.1 \pm 7.9 ^c	40.4 \pm 2.2 ^c	37.9 \pm 3.3 ^c
Total polyphenols (mg GAE/L)		424.5 \pm 19.5 ^a	468.5 \pm 18.2 ^{ab}	491.2 \pm 31.4 ^{ab}	583.7 \pm 11.2 ^{bc}	550.4 \pm 110.5 ^{abc}
DPPH scavenging activities (%)	47.0 \pm 2.2 ²⁾	43.5 \pm 3.4 ^a	44.6 \pm 3.9 ^a	51.6 \pm 3.3 ^b	52.0 \pm 3.7 ^b	39.5 \pm 3.9 ^{ac}

Values are mean \pm SD ($n=3$). Different small letters in the same property indicate a significant difference ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾0.04 mM ascorbic acid

²⁾0.5% acarbose

루코시테이스 저해능을 확인하였다(Table 5). 발효 전 저해능은 18.5%이었으나 발효 과정 중 점차 증가하여 30시간에서 최대 40.4%로 증가하였고 이후 72시간까지 큰 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과는 발효 적합 균주 선발 실험보다 낮은 값을 보였으나 유의적으로 큰 차이를 보이지 않았으며 발효 중 생균수 변화와 유사하였다. Tallon 등(47)은 젖산세균의 생장과 EPS 생성량이 비례하여 증가하는 것으로 보고하였고, Ramchandran과 Shah (34)은 EPS가 알파 글루코시테이스 저해능에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. JBE245 균주가 정지기에 도달하는 24시간에서 알파 글루코시테이스 저해능이 가장 높게 나타나는 것을 확인하였기 때문에 높은 항당뇨 활성을 유지하기 위해 균체가 최대 생육한 시점에서 발효를 종료할 필요가 있다.

발효 과정 중 산화방지 측정

최적 발효 조건에서 발효 시간에 따른 발효물의 산화방지 활성 변화를 확인하였다(Table 4). 총 폴리페놀은 발효 전 424.5 mg GAE/mL였고 발효가 진행될수록 30시간에서 583.6 mg GAE/mL, 72시간에서 622.59 mg GAE/mL로 점차 증가하였다. DPPH 소거능은 발효 전 43.5%에서 30시간 발효 후 0.4 mM ascorbic acid (47.0%)보다 높은 52.0%로 증가하였다. DPPH 소거능은 총 폴리페놀과 달리 발효가 진행될수록 점차 증가하다가 생균수가 감소하는 30시간 이후부터 72시간 발효까지 점차 감소하였다. 발효 중 균주가 사멸기에 들어가는 시기와 DPPH 소거능이 감소하는 시기가 유사하였는데, 이러한 특징은 유청을 원료로 젖산세균들의 발효 과정에서 *Lactobacillus* 속 균주들의 DPPH 소거능 변화(48)와 합성 배지에서 사멸기는 확인하지 못하였으나 *L. plantarum* 균주의 DPPH 소거능 변화(49)와 유사하였다. 이러한 결과들을 통해 DPPH 소거능 변화와 생균수 변화가 밀접한 연관성을 보이는 것으로 보이며, 발효 음료의 높은 산화방지 활성을 갖기 위해 높은 생균수를 유지하는 시기에 발효를 종료하는 것이 적절한 것으로 보인다.

기호도 평가

사과 음료의 발효 전후 소비자에 대한 기호도 평가를 실시하기 위해 82명의 대학생 패널을 대상으로 기호도 평가를 실시하였다(Fig. 5). 발효 전후의 선호도 결과를 비교하였을 때 발효 후 단맛(-0.37), 신맛(-0.28)은 감소한 반면 짭은맛(0.22), 청량감(1.36)이 증가한 것으로 평가 받았으며 종합적 기호도 평가 결과는 각각 4.72와 4.22로 발효 음료가 비발효 음료보다 더 낮은 점수를 받았다. 그러나 모든 항목에 대한 t-test를 수행한 결과 유의수준 하에서 기호도 차이는 없다. 특히 종합적 기호도에서 82명 중 40명이 발효 음료를 비발효 음료보다 더 높거나 동일한 점수로 평가하여 두 음료간의 차이는 보이지 않는 것으로 판단된다. 발효 음료의 pH가 증가하였으나 관능 평가에서 차이를 크게 인지하지

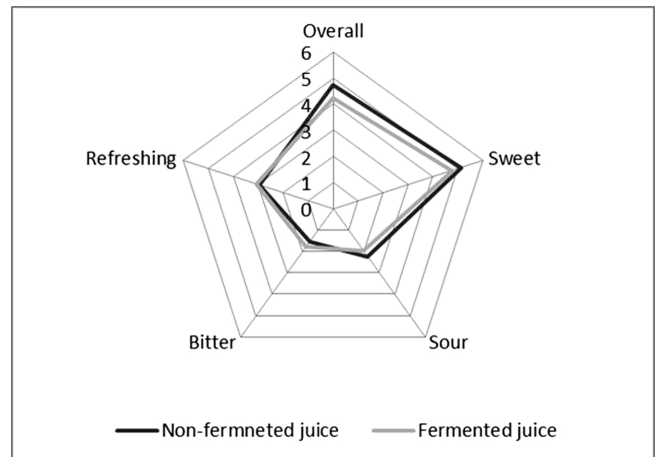


Fig. 5. Consumer preference rating of non-fermented and fermented apple juice. Non-fermented apple juice was indicated in a black line and fermented apple juice was indicated in a grey line.

못하는 것으로 판단된다. 본 실험에서 발효 음료와 비 발효 음료 간 관능 평가의 차이는 크지 않았으나, 사용된 균주의 종류 및 소비 연령층에 따라 기호도가 다를 수 있으므로 추후 다양한 발효 조건과 소비자층을 대상으로도 기호도 평가를 수행할 필요가 있다.

요 약

젖산세균을 이용한 사과 발효 음료는 건강 증진을 위한 기능성 식품으로 이용할 수 있다. 이에 따라 본 연구에서는 젖산세균을 선발하여 발효 음료 제조를 시도하였다. 국내 전통 발효 식품에서 분리된 84종의 젖산세균 가운데 사과 음료에서 생육이 가장 우수하고 항당뇨 활성이 우수한 JBE245 균주를 최종 선발하였다. 메주에서 분리된 JBE245 균주는 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었으며 사과 발효 음료의 생균수는 24시간 배양 후 3.6×10^8 CFU/mL로 이후 생균수를 유지하였다. 항당뇨 활성의 지표인 알파 글루코시테이스 저해능은 발효전 18.5%에서 증가하여 최대 40.4%까지 증가하였다. 산화방지 활성 지표인 총 폴리페놀 함량은 583.6 mg GAE/mL로 발효 전(424.5 mg GAE/mL)보다 증가하였으며, DPPH 소거활성은 52.0%로 발효 전(43.5%) 보다 높았다. 발효 음료의 기호도를 조사한 결과, 발효 전후 모든 항목에서 유의적 차이는 없었으며 종합적 선호도는 각각 4.72, 4.22로 나타났다($p<0.05$). 이러한 결과들을 토대로 JBE245 균주를 이용한 발효 음료가 산화방지 및 항당뇨 기능이 향상된 프로바이오틱 발효 식품이라는 점에서 유용할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 지역 전략 식품산업 육성사업(과제명: 동부권 고기능 토종발효미생물과 향토자원을 이용한 발효제품 개발 및 기능성 분석, 과제번호: MIFI 2015-1)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

- de Souza Ellendersen L, Granato D, Guergoletto KB, Wosiacki G. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. Eng. Life Sci. 12: 475-485 (2012)
- Champagne CP, Raymond Y, Gagnon R. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in an apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. J. Food sci. 73: 221-226 (2008)
- Pereira ALF, Maciel TC, Rodrigues S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. Food Res. Int. 44: 1276-1283 (2011)
- Hwang TY, Son SM, Lee CY, Moon KD. Quality changes of fresh-cut packaged fuji apples during storage. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 469-473 (2001)
- Bang HY, Cho SD, Kim DM, Kim GH. Comparison of antioxidative activities of Fuji apples parts according to production region. J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr. 44: 557-563 (2015)
- Rezk BM, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A. The antioxidant activity of phloretin: The disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 295: 9 - 13 (2002)
- Kern M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G, Marko D. Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. Mol. Nutr. Food Res. 49: 317 - 328 (2005)
- Tabak C, ARTS IC, Smit HA, Heederik D, Kromhout D. Chronic obstructive pulmonary disease and intake of catechins, flavonols, and flavones: The MORGEN Study. Am. J. Clin. Nutr. 164: 61-64 (2001)
- Bortolotto V, Piangiolino C. Apple biophenol synergistic complex and its potential benefits for cardiovascular health. Nutrafoods 12: 71-79 (2013)
- Violeta NOUR, Trandafir I, Ionica ME. Compositional characteristics of fruits of several apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 38: 228-233 (2010)
- Gerritse K, Posno M, Schellekens MM, Boersma WJ, Claassen E. Oral administration of TNP-Lactobacillus conjugates in mice: A model for evaluation of mucosal and systemic immune responses and memory formation elicited by transformed lactobacilli. Res. Microbiol. 141: 955 - 962 (1990)
- Mital BK, Garg SK. Anticarcinogenic, hypocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. Critical Rev. Microbiol. 21: 174 - 214 (1995)
- Kaizu H, Sasaki M, Nakajima H, Suzuki Y. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. J. Dairy. Sci. 76: 2493-2499 (1993)
- Rao DR, Chawan CB, Pulusani SR. Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterologenesis in rats. J. Food Sci. 46: 1339-1341 (1981)
- Davis CR, Wibowo D, Eschenbruch R, Lee TH, Fleet GH. Practical implications of malolactic fermentation: A review. Am. J. Enol. Vitic. 36: 290-301 (1985)
- Kim NJ, Yoon KY. Qualities and antioxidant activity of lactic acid fermented-potato Juice. J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr. 42: 542-549 (2013)
- Park MJ, Lee SB. Physicochemical characteristics of cheonnyuncho fruit (*Opuntia humifusa*) fermented by *Leuconostoc mesenteroides* SM. Korean J. Food Sci. Technol. 45: 434-440 (2013).
- Kim HJ, Park KB. Apple-fermented product and food, and production method of the same. Korea Patent 10-0676855 (2007)
- Park BB, Kim JI, Oh JY, Choi CI, Choi HS. Lactic acid bacteria fruit fermented liquor, lactic acid bacteria fermentation fruit beverage and manufacturing method thereof. Korea Patent 10-2015-0041519 (2015)
- Lee HL, Kang KW, Seo DH, Jung JH, Jung DH, Kim GW, Park SY, Shin WC, Shim HS, Park CS. Diversity of Lactic Acid Bacteria (LAB) in *Makgeolli* and Their Production of γ -Aminobutyric Acid. Korean J. Food Sci. Technol. 47: 204-210 (2015)
- Park JH, Chung CH. Characteristics of takju (a cloudy Korean rice wine) Prepared with nuruk (a traditional Korean rice wine fermentation starter), and Identification of Lactic Acid Bacteria in nuruk. Korean J. Food Sci. Technol. 46: 153-164 (2014)
- Heo J, Ryu MS, Jeon SB, Oh HH, Jeong DY, Uhm TB. Characterization of *Lactobacillus brevis* JBE 30 as a starter for the brewing of traditional liquor. Korean J. Microbiol. 50: 233 - 238 (2014)
- Jeong JK, Zheng Y, Choi HS, Han GJ, Park KY. Catabolic enzyme activities and physiological functionalities of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional meju. J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr. 39: 1854-1859 (2010).
- Tibbot Brian K, Ronald W. Skadsen. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. Plant. Mol. Biol. 30: 229-241 (1996)
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. Am. J. Enol. Vitic. 16: 144-158 (1965)
- Blios MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 26: 1199-1203 (1958)
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680 (1994)
- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 10: 512-526 (1993)
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731 - 2739 (2011)
- Torriani S, Felis GE, Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3450-3454 (2001)
- van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 82: 187-216 (2002)
- McDonald LC, HP Fleming, HM Hassan. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2120-2124 (1990)
- Chen P, Zhang Q, Dang H, Liu X, Tian F, Zhao J, Chen Y, Zhang H, Chen W. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity. Food Control 35: 65-72 (2014)
- Ramchandran L, Shah NP. Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic, angiotensin-I-converting enzyme-and α -glucosidaseinhibitory activities as well as on textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. Dairy Sci. Technol. 89: 583-600 (2009)
- Lebeer S, Verhoeven TL, Francius G, Schoofs G, Lambrichts I, Dufrene Y, Vanderleyden J, de Keersmaecker SC. Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. Appl. Environ. Microbiol. 75: 3554-3563 (2009)
- Mathangi T, Prabhakaran P. DPPH free radical scavenging activity of the extracts of the aquatic fern *Marsilea quadrifolia* Linn. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2: 534-536 (2013)
- Jeong SJ, Shim RS, Lee JS, Nam HS, Lee HG. Antioxidant and synergistic activities of fruit and vegetable concentrates. Korean J. Food Sci. Technol. 47: 240-245 (2015)
- Aruoma OI, Cuppett SL. Antioxidant methodology: *In vivo* and

- in vitro* concepts. The American Oil Chemists Society, Urbana, IL, USA (1997)
39. In MJ, Kim HM, Jin HJ, Kim DC, Oh NS, Chae HJ. 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 (2010).
 40. Heo J, Lee CM, Park MK, Jeong DY, Uhm TB. Isolation of indigenous *Lactobacillus plantarum* for malolactic fermentation. Korean J. Microbiol. 51: 169 - 176 (2015)
 41. Curk MC, Hubert JC, Bringel F. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. Int. J. Syst. Evol Microbiol. 46: 595-598 (1996)
 42. Zanon P, Farrow JA, Phillips BA, Collins MD. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Evol Microbiol. 37: 339-341 (1987)
 43. Bringel F, Qune P, Tailliez P. Polyphasic investigation of the diversity within *Lactobacillus plantarum* related strains revealed two *L. plantarum* subgroups. System. Appl. Microbiol. 24: 561-571 (2001)
 44. Ministry of Food and Drug Safety. Food raw material DB. Available from: <http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/foodMaterial/foodMaterialDB.do>. Accessed Sep. 29, 2016.
 45. MFDS. Food standard codex. Ministry of Food and Drug Safety. Cheongju, Korea. pp. 5-18-4 (2012)
 46. Garcera G, Jose MA, Campos MA, Zuniga MA, Uruburu FE. Growth and metabolism of L-malic acid by *Lactobacillus plantarum* CECT 220 in a defined medium. J. food sci. 57: 778-780 (1992)
 47. Tallon R, Bressollier P, Urdaci MC. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Res. Microbiol. 154: 705-712 (2003)
 48. Virtanen T, Pihlanto A, Akkanen S, Korhonen H. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol. 102: 106 - 115 (2006)
 49. Lee NK, Kim HW, Chang HI, Yun CW, Kim SW, Kang CW, Paik HD. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* NK181 isolated from jeotgal, a Korean fermented food. Food Sci. Biotechnol. 15: 227-231 (2006)