

곡물 소재 팽화식품에서 장내 유익균의 증진 효과 분석 및 공초점 현미경을 이용한 부착능 평가

정명교¹ · 오도건¹ · 권오성² · 정준영² · 이임식³ · 김광엽¹

¹충북대학교 식품생명·축산과학부

²(주)지디앤와이

³식품의약품안전처

Analysis of Enhancement Effect and Attachment Ability of Beneficial Intestinal Microflora in Puffed Grain Foods Using Confocal Laser Scanning Microscopy

Myeong-Kyo Jeong¹, Do-Geon Oh¹, Oh-Sung Kwon², Jun-Young Jeong²,
Ym-Shik Lee³, and Kwang-Yup Kim¹

¹Division of Food and Animal Science, Chungbuk National University

²GD&Y Co., Ltd.

³Ministry of Food and Drug Safety

ABSTRACT This study examined the adhesiveness of beneficial intestinal bacteria to whole-grains using confocal scanning laser microscopy (CLSM), to demonstrate the prebiotic effects of whole-grains, and to develop prebiotic puffed snacks with these whole-grains. CLSM has been used to observe the adhesiveness of *Lactobacillus acidophilus*, which belongs to beneficial intestinal bacteria, to whole-grain powders using optical sectioning techniques. The enhanced effects on the growth of beneficial intestinal bacteria with the hot water grain extract were verified using an indirect count method. Finally, a puffed snack was produced with the prebiotic effect and the quality was evaluated by checking the chromaticity and degree of hardness. As a result, *L. acidophilus* exhibited adhesive ability to whole-grain powders and growth of selected beneficial intestinal bacteria were improved significantly. The Hunter L value of the developed puffed snack increased when seasoning was added. The hardness of the puffed snack with seasoning was higher than that of the control. The results of a sensory evaluation showed that the puffed snack with seasoning was highly rated in the overall preference compared to the control.

Key words: CLSM, intestinal microflora, puffed food, adhesiveness, prebiotic

서 론

포유류 동물들의 장내에는 면역력을 높여 숙주의 건강유지에 도움을 주는 유익균들과 장내 독소 생성, 노화 촉진, 식중독, 발암 등 숙주 건강에 유해한 영향을 끼치는 유해균들이 함께 존재한다(1). 인체에 존재하는 장내 미생물의 90% 이상은 혐기성 균주인 *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Bacteroides* spp.로 알려져 있고, *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp. 등은 10^{5-8} CFU/g 정도이며 *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp. 및 *Pseudomonas* spp. 등 병원성 및 유해 미생물은 10^4 CFU/g 이하로 존재한

다. 이런 장내 유익균과 유해균들은 함께 공생이나 길항작용을 통해 인체의 장내에서 일정한 균총을 지니게 되고 이들의 균형에 의해 건강상태가 조절된다(2-4). 따라서 장내에 유익한 세균을 강화시키거나 조화된 균총을 유지하는 것은 매우 중요하며, 이를 위해 최근엔 프로바이오틱스(probiotics)를 첨가한 식품이나 장내 유익균의 기질로 작용하는 올리고당, 식이섬유의 섭취 시 개선 효과와 관련된 연구 등 다양한 연구가 진행되고 있다(5-7).

섭취 시 장관 내에서 서식 가능하고 장내 균총을 개선시켜 인체에 유익한 효과를 주며 건강증진의 효과가 있는 장내 유익균을 프로바이오틱스라 부르며, 프로바이오틱스의 생육과 증식, 활성에 도움을 주어 숙주의 건강을 향상시키는 난소화성 다당류를 프리바이오틱스(prebiotics)라 부른다(8-10). 미생물들은 고체표면에 부착함으로써 풍부한 영양 환경 하에서 생존 가능성을 높일 수 있고, 생존에 불리하게 작용하는 독성 물질들로부터 보호받거나 군집을 이루는 데 방해가 되는 물리적인 요인들로부터 자기 보호를 할 수 있다

Received 13 June 2017; Accepted 10 July 2017

Corresponding author: Kwang-Yup Kim, Division of Food and Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea

E-mail: kimky@chungbuk.ac.kr, Phone: +82-43-261-2568

고 알려져 있다(11). 프로바이오틱스는 부착능을 가져(12) 장내에 부착하여 균총을 형성하여 항균작용, 유당불내증 감소, 설사 및 변비 개선, 면역력 증강, 알레르기와 아토피의 효과, 혈중콜레스테롤 감소, 항암효과, 공액리놀레산(conjugated linoleic acid) 전환력, γ -aminobutyric acid(GABA) 등을 생산하는 것으로 알려져 있다(13-17).

일반적으로 전자현미경은 광학현미경보다 고배율, 고해상도로 관찰이 가능하지만 시료손상, 진공상태 유지 등의 단점을 가지고 있다. 이에 비해 광학현미경은 박테리아, 조직 등이 살아있는 상태에서 관찰할 수 있는 장점이 있다(18). 공초점 현미경은 최근 생물학, 미생물학, 세포미생물학, 의학, 제지, 반도체 등 다양한 분야에서 널리 사용되고 있는 현미경으로(19,20), 시료에서 출발한 빛 중 필요한 한 점의 빛만 편홀(pin-hole)을 통해 통과시키고 나머지 불필요한 빛들은 제거되어 electronic detectors(photomultiplier)에 의해 감지되지 않으므로 통과된 빛을 제외한 나머지는 디지털화된 이미지에서도 나타나지 않게 되고, 그로 인해 공초점 현미경은 일반 광학현미경에 비하여 고해상도 이미지를 관찰할 수 있다.

통곡물(whole grain)은 겉겨 제거 또는 도정과정을 거치지 않아 겨, 외비, 배유, 배아 등을 함유하고 있어 각종 생리활성기능을 하는 성분들이 풍부하고, 도정곡에 비해 식이섬유를 다량 포함하고 있기 때문에 장내에서 소화지연으로 인한 장건강개선 및 면역 증강 효과를 기대할 수 있다(21). 곡류의 종류로는 귀리, 보리, 율무, 기장, 수수, 현미 등이 있으며, 항산화 활성 효과, 혈중 콜레스테롤 저하, 당뇨병 예방, 암세포 증식억제 효과, 돌연변이억제, 혈당 강하 등의 생리활성을 지니는 것으로 알려져 있다(22-25).

팽화(puffing)식품은 가압, 가열한 식품을 대기압으로 뽑아내어 부풀리는 공정으로 수분이 증발하면서 다공성 물질로 변화하게 되는 것을 이용하여 제조된 식품이다. 팽화과자 연구로는 베타글루칸 등의 풍부한 식이섬유를 포함하는 과자 제조(26), 곡류 및 잡곡류를 이용한 팽화과자의 생리활성 비교연구(27)가 진행되어 있다.

미생물이 부착하는 기전과 미치는 영향에 대한 연구는 그동안 많이 진행되었으나, 시각적인 영상을 통한 담체들과 장내 유익균의 부착여부와 부착방식에 대한 연구가 더 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 공초점 주사현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM)을 활용하여 장내 유익균과 국산 통곡물 소재들과의 부착을 통해 생육 환경에 있어 도움이 될 수 있는 서식공간을 제공받는 것을 시각적으로 제시하고, 소재들의 프리바이오틱스 효과를 *in vitro* 배양을 통해 확인하여 통곡물 소재들로 제조된 프리바이오틱스 팽화식품을 개발하는 것을 목표로 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

본 연구에서 사용한 균주로는 한국생물자원센터(Korean

Collection for Type Cultures, Jeonbuk, Korea)에서 분양 받은 공시균주로 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3164, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3636, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* KCTC 3658, *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3357 4종의 균주를 사용하였다. 균주의 생육배지로는 MRS broth(Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였고, *B. bifidum* 배양을 위한 배지로는 MRS broth에 L-cysteine을 0.05% 첨가한 배지를 사용하였다.

시약 및 기기

본 연구에서 사용한 시약으로는 식이섬유 함량 측정을 위해 MES/TRIS 완충용액(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), total dietary fiber assay kit(Megazyme, Bray, Ireland)을 사용하였다. 장내 유익균과 곡물의 부착성 확인을 위한 실험에 이용된 형광현미경은 공초점 주사현미경(LSM 710, Kr/Ar Ion Laser, Zeiss, Jena, Germany)을 사용하였고, 균체염색을 위한 염색 시약으로는 0.03% Fluorescein isothiocyanate(FITC, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다.

곡물 소재

균주배양 및 부착성 확인을 위한 사용 곡물로는 청주시 농협 하나로마트에서 구입한 햇뜰내 제품(2015년) 중 귀리(oat), 율무(adlay), 찰기장(glutinous millet), 찰보리(glutinous barley), 찰수수(glutinous sorghum), 현미(brown rice) 6종을 구매하여 진행하였다. 곡물은 분쇄기(DA-10000G, Hanil, Seoul, Korea)를 사용하여 100 mesh size 이하의 분말을 취하여 실험에 이용하였다. 곡물 추출물은 분쇄된 곡물분말에 10배의 증류수를 가한 후 55°C에서 24시간 온수 추출하였다. 이를 pH 6.5로 조정 후 거름종이(No. 3, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)를 이용하여 1차로 감압여과 하고, autoclave(121°C, 15분)로 멸균하여 추출물로 사용하였다. 동결건조 추출물은 분쇄된 곡물분말에 10배의 증류수를 가한 후 55°C에서 24시간 온수 추출하였다. 이를 pH 6.5로 조정 후 거름종이(No. 3, Whatman International Ltd.)를 이용하여 1차로 감압여과 하고, 여과된 추출물을 회전감압농축기(Rotavapor R-215, BUCHI, Flawil, Switzerland)로 감압농축 하였고, -85°C의 deep freezer(Ultra-low temperature freezer, MDF-192, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에 2시간 동안 예비 동결시킨 후 freeze dryer(Model FD5508, Ilshin Lab Co., Gyeonggi, Korea)를 사용하여 동결건조 하여 사용하였다.

프리바이오틱스 곡물 소재의 일반성분과 식이섬유 함량 분석

곡물 소재시료 6종의 일반성분은 AOAC method(28)를 참고하여 수행하였다. 수분 함량은 곡물분말 3 g을 칭량하여

105°C에서 상압가열건조법으로 건조시킨 후 5회 반복 측정 한 다음, 평균값으로 나타내었다. 조희분은 직접건식회화법을 이용하여 시료 3 g을 회화기에서 550°C로 완전 회화시켜 구하였다. 조단백질은 시료 1 g에 대하여 Micro-Kjeldahl 질소정량법으로 측정하였다. 그리고 조지방은 Soxhlet 추출법을 사용하여 분석하였다. 곡물 소재의 식이섬유 함량은 AOAC method를 응용하여 실험을 실시하였다. 시료 1 g에 MES/TRIS 완충용액(0.05 M MES, 0.05 M TRIS, 24°C에서 pH 8.2) 40 mL를 가하고 교반하여 충분히 분산시킨 후 내열성 α-amylase 50 μL를 가한 다음 95°C water bath에서 40분간 교반하였다. 그 후 온도를 60°C로 낮추고 protease 100 μL를 넣고 30분간 반응시킨 다음 0.561 N HCl 용액 5 mL를 가하여 pH를 4.0~4.7로 조정하며, amyloglucosidase 300 μL를 넣고 30분간 교반하였다. 불용성 식이섬유 함량은 105°C 수분건조로 항량을 구한 셀라이트를 넣은 유리 도가니에 효소분해 한 시료를 여과하였다. 그 뒤 잔사는 70°C의 물 10 mL로 2회 씻은 후 세척액은 여액에 합쳤다(여과액+ 물세척용액 20 mL). 그 잔사를 다시 90% ethanol과 acetone의 순으로 각각 15 mL씩 2회 세척한 후 무게를 측정하고, 이 잔사량에서 잔사의 회분량과 단백질량을 감하여 불용성 식이섬유 함량을 구하였다. 수용성 식이섬유 함량은 앞서 90% ethanol과 acetone의 순으로 각각 15 mL씩 2회 세척 전 얻은 여액에 90% ethanol 200 mL를 가하고(미리 증탕) 60°C에서 1시간 동안 정치하여 침전물을 형성하고, 105°C 수분건조로 항량을 구한 셀라이트를 넣은 유리 도가니에 다시 여과하여, 여과 후 남은 잔사를 90% ethanol과 acetone의 순으로 각각 15 mL로 2회 세척한 후 무게를 측정하였다. 그 뒤 잔사량에서 잔사의 회분량과 단백질량을 감하여 수용성 식이섬유 함량을 구하였다. 총 식이섬유 함량은 측정된 불용성 식이섬유 함량과 수용성 식이섬유 함량의 합을 구하여 분석하였다.

프리바이오틱스 소재 곡물분말과 장내 유익균 간의 부착능 관찰

장내 유익균과 곡물시료 간의 부착성을 확인하기 위해 균주로는 *L. acidophilus* KCTC 3164와 선정곡물 소재의 분말을 동일비율로 혼합하여 실험에 이용하였다. *L. acidophilus* KCTC 3164 균주를 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양 후 배양액 1 mL를 Eppendorf tube에 옮긴 다음, 원심분리기(W-100T, Hanil Co., Ltd., Gyeongbuk, Korea)로 4,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 균체만 회수하였다. 회수된 균체에 1× PBS buffer를 이용하여 피펫팅을 통해 수세한 후 4,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 균체의 염색을 위해 0.03% FITC에 10~15분간 암실에서 침지시킨 후 1× PBS buffer를 이용하여 피펫팅을 통해 수세한 다음, 4,000 rpm에서 5분간 원심분리 하는 과정을 3회 반복하여 염색약을 제거해 주었고, 곡물분말과 염색된 균체를 1분간 충분히 볼텍싱(vortexing)을 통해 혼합하였다. 그 뒤 약 100

μm 두께의 슬라이스 글라스와 커버 글라스 사이 공간에 염색된 균과 곡물분말 혼합물을 분주하여 CLSM을 이용해 광학적 절편(optical sectioning)으로 연속적 영상을 재구성하여 관찰하였다. 혼합물 속 곡물분말을 확인하기 위해 CLSM에 내장된 DIC(differential interference contrast) 필터를 사용하여 관찰하였다.

생장곡선을 통한 곡물 소재 추출물의 장내 유익균 활성 효과 검증

선정곡물 소재의 장내 유익균에 대한 생육 활성에 미치는 영향을 검증하기 위해 MRS broth에서 37°C, 24시간 동안 배양 후 2회 계대한 균주를 사용하여, 멸균된 4.5 mL MRS broth에 각각의 멸균된 곡물 추출물 4.5 mL를 혼합하고 1:1로 만든 배지에 시험균액을 멸균식염수로 균 현탁액을 만들어 균 농도를 650 nm에서 흡광도가 0.3~0.4가 되게 한 시험균액 1.0 mL를 접종하였다. 호기/혐기조건에서 배양하면서 시간에 따라 균 증식도를 spectrophotometer(UV-1650PC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

곡물 소재 동결건조 추출물의 장내 유익균 활성 효과 비교 검증

선정곡물 소재별 장내 유익균에 대해 미치는 영향을 비교하기 위해 MRS broth에서 37°C, 24시간 동안 배양 후 2회 계대한 균주를 사용하여, 멸균된 MRS broth 8.5 mL와 농도가 50 mg/mL인 곡물 소재 동결건조 추출물 1.0 mL를 가하여 균 농도를 650 nm에서 흡광도가 0.3~0.4가 되게 한 시험균액 0.5 mL를 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 균 증식도를 spectrophotometer를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혼합곡물 추출물의 장내 미생물 활성 검증

선정곡물 소재의 장내 유익균에 대한 생육 활성에 미치는 영향을 검증하기 위해 MRS broth에서 37°C, 24시간 동안 배양 후 2회 계대한 균주를 사용하여, 멸균된 4.5 mL MRS broth에 동일비율로 혼합된 6종의 곡물 추출물 4.5 mL를 혼합하여 1:1로 만든 배지에 시험균액을 멸균식염수로 균 현탁액을 만들어 균 농도를 650 nm에서 흡광도가 0.3~0.4가 되게 한 시험균액 1.0 mL를 접종한 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. Control은 50%의 MRS broth를 사용하였다. 생균수는 배양액을 0.85% NaCl(Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 용액을 이용해 십진법으로 희석 후 MRS agar(Difco) 배지에 평판도말법으로 접종한 뒤 37°C 배양기에 배양되어 나오는 집락수로 측정하였으며, 유효 집락수는 30~300개로 하여 계산하였다.

프리바이오틱스 곡물 소재 팽화과자의 제조

곡물을 분쇄기로 분쇄하여 체로 100 mesh size 이하의

Table 1. Ingredients of multi-grain puffed snack (%)

Source	Control ¹⁾	GPMS ²⁾
Oat	16.7	15
Adlay	16.7	15
Glutinous millet	16.7	15
Glutinous barley	16.7	15
Glutinous sorghum	16.7	15
Brown rice	16.7	15
Seasoning (cheese-taste)	0	10
Total	100	100

¹⁾Non-seasoning puffed snack.²⁾Seasoning puffed snack.

분말을 걸러 사용하였다. 곡물분말을 동일비율로 혼합하고 반죽, 성형한 후 40~50°C의 건조기에서 수분 함량이 18%의 중량이 될 때까지 건조시킨 다음 팽화하였다. 팽화성형기는 즉석팽화기(DDP-1, Delice Co., Ltd., Seongnam, Korea)를 사용하였으며, 팽화판으로 직경이 4.5 cm인 원형을 사용하였고, 운전조건은 예비실험을 통하여 가열온도 220~230°C에서 제조하였다. 곡물팽화과자의 기호도를 증진시키기 위해 10%의 치즈 맛 시즈닝(Dongbang Foodmaster Co., Ltd., Chungbuk, Korea)을 첨가하였고, 대조군으로 첨가하지 않은 100% 곡물팽화과자를 제조하였다(Table 1).

프리바이오틱스 곡물팽화과자의 품질특성 평가

제조된 곡물팽화과자의 색도는 색차계(Minolta CR-200, Konica Minolta Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 Hunter 색차계 값인 lightness를 나타내는 L값, redness를 나타내는 a값, yellowness를 나타내는 b값 및 색차(ΔE, color difference)값으로 나타내었다. 측정은 10회 이상 반복 측정된 후 평균값으로 나타내었으며, 이때 사용한 표준백판은 L=92.7, a=0.3137, b=0.3196의 값으로 구하였다. 조직감은 texture analyser(TA.XT Express Texture Analyser,

Stable Micro Systems, Godalming, UK)로 3-Point Bending Rig(HDP/3PB)를 사용하여 sample size 5×5×1.0 cm, pre-test speed 2.0 mm/s, test speed 3.0 mm/s, post-test speed 10.0 mm/s, distance 100%, force 100 g의 조건으로 시료당 10회 이상 측정하였다.

통계 처리

통계 분석은 SAS program(Statistical Analysis System 9.4 version, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였으며, ANOVA 분석과 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의수준 $P < 0.05$ 수준으로 검증하였다. 실험 결과 값은 3반복 이상의 데이터를 사용하여 표준편차 값으로 표현하였다.

결과 및 고찰

프리바이오틱스 곡물 소재의 일반성분과 식이섬유 함량 분석

실험에 사용한 6종 곡물들의 일반성분 함량 분석 결과는 Table 2로 나타내었다. 선정곡물들의 수분 함량은 8.99~12.19%로 찰수수가 12.19%로 가장 높게 나타났다. 조희분은 1.34~2.39%로 현미를 제외한 나머지 곡물들은 비슷한 함량을 나타냈다. 조단백질 함량은 7.34~15.38%로 나왔으며, 울무에서 가장 높은 15.38%의 함량을 보였고 현미에서 가장 낮은 7.34%의 함량을 가진 것으로 분석되었다. Hwang 등(29)의 연구에 따르면 울무의 조단백질 함량은 15.2%로 본 실험과 매우 유사한 것으로 분석되었다. 조지방은 1.84~8.12%로 귀리에서 가장 높은 8.12%의 함량을 보였고, 찰보리와 현미는 각각 1.84%, 2.06%로 함량이 분석되었다. 선정된 곡물들의 식이섬유 함량을 분석하여 Table 3에 나타내었다. 곡물 속에 포함된 수용성 식이섬유는 일반적으로 프로바이오틱스의 증식에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 하지

Table 2. Compositions of miscellaneous grain crops

	Moisture	Crude ash	Crude protein	Crude fat
Oat	8.99±0.81 ¹⁾	2.39±0.37	12.39±0.10	8.12±0.25
Adlay	9.72±1.41	2.20±0.33	15.38±0.47	6.90±0.02
Glutinous millet	11.25±0.38	1.97±0.46	8.69±0.31	3.34±0.01
Glutinous barley	10.84±1.53	2.22±1.14	10.35±0.29	1.84±0.13
Glutinous sorghum	12.19±0.37	2.07±0.04	9.62±0.16	3.04±0.03
Brown rice	10.86±0.05	1.34±0.08	7.34±0.42	2.06±0.13

¹⁾Values are the mean±standard deviation of triplication experiments.**Table 3.** Content of dietary fiber in miscellaneous grain crops

	Insoluble dietary fiber	Soluble dietary fiber	Total dietary fiber
Oat	18.62±1.68 ¹⁾	2.74±0.26	21.36±1.93
Adlay	3.08±0.51	2.78±0.12	5.86±0.63
Glutinous millet	4.50±0.47	0.46±0.22	4.95±0.29
Glutinous barley	7.79±0.41	3.13±0.32	10.92±0.63
Glutinous sorghum	6.58±0.09	0.59±0.09	7.17±0.14
Brown rice	5.16±0.15	0.10±0.03	5.26±0.15

¹⁾Values are the mean±standard deviation of triplication experiments.

만 2011년 국민영양통계에 따르면 우리나라 성인들의 하루 평균 조식이섬유(crude dietary fiber) 섭취량은 6~8 g 정도로 연령대가 낮을수록 식이섬유 섭취량이 낮은 것으로 나타나(1,000 kcal 기준 19~29세 2.94 g, 30~49세 3.46 g, 50~64세 3.98 g, 65세 이상 4.17 g)(30), 건강을 위해서는 하루 5~25 g의 수용성 식이섬유 섭취를 권장하였다(31, 32). 식이섬유 함량은 불용성 식이섬유와 수용성 식이섬유의 함량을 구한 후 합으로 총 식이섬유 함량을 분석하였다. 선정곡물별 식이섬유 함량은 불용성 식이섬유가 3.08~18.62%, 수용성 식이섬유는 0.10~3.13%, 그리고 총 식이섬유 함량은 5.26~21.36%로 확인되었다. 불용성 식이섬유 함량은 귀리가 18.62%로 가장 높았고, 수용성 식이섬유 함량은 3.13%로 찹보리가 가장 높게 확인되었으며, 이 둘을 합친 총 식이섬유 함량은 귀리가 21.36%로 다른 곡물에 비해 높은 식이섬유 함량을 가진 것으로 분석되었다. 귀리의 식이섬유 중 하나인 베타글루칸은 대표적인 프리바이오틱스로 귀리 배유 세포벽 안쪽에 자리 잡고 있기 때문에(33), 귀리에 함유된 고 식이섬유를 이용하기 위해서는 도정과정 없이 통곡물을 사용한다면 다량의 귀리 속 베타글루칸과 같은 프리바이오틱스 식이섬유를 식품성분으로 효율적으로 이용할 수 있다.

프리바이오틱스 소재 곡물분말과 장내 유익균 간의 부착능 관찰

조직 또는 물체의 표면에 부착한 세균을 관찰하는 방법으로는 주사전자현미경, 투과전자현미경 등의 전자현미경을 이용하거나 CLSM과 같은 형광현미경을 이용하는 방법이 있다. CLSM은 조직 표본 제작과정이 짧고, 고정이나 탈수 등의 과정을 거치지 않아 조직손상이 적다는 장점이 있다(34). 장관 내 음식물 상태와 유사한 유동액 상태에서 장내 유익균인 *L. acidophilus*와 프리바이오틱스 곡물분말의 부착 여부를 시각적으로 확인하기 위해 CLSM으로 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. Thomas와 McMeekin(35)이 조직의 수분 흡수과정에 의해 균이 부착된다고 하였고 Dickson과 Koohmarai(36)는 미생물 세포벽의 흡전하와 상대적 소수

성에 의하여 부착된다고 보고하였던 것과 같이 관찰 결과, 곡물분말과 혼합된 *L. acidophilus*는 곳곳에 산재되어 있었지만 주변 유동액 층보다 상대적으로 곡물분말 주변에 부착되어 존재하였다. 또한, 균체들이 곡물분말 표면과 틈사이로 골고루 부착되어 있는지 확인하기 위해 광학적 절편 이미지를 통해 초점거리에 따른 균주의 위치를 확인하였다(Fig. 2). 관찰 결과 초점거리에 따라 발현되는 염색된 박테리아 intensity의 강도와 위치가 변하는 것을 관찰할 수 있었고, 이는 균주가 곡물분말 표면상에만 부착되어 있는 것이 아니라 입체적으로 곡물의 틈 사이와 안쪽에도 부착되어 존재하는 것으로 확인하였는데, 이는 Jang 등(37)이 조직 등 담체의 주름진 틈 사이에 안쪽으로 들어가 부착되거나 수분에 의해 포집되어 존재한다고 보고한 것과 유사한 결과를 보였다. 종합적으로 *L. acidophilus*와 곡물분말 혼합 시 CLSM을 통해 부착능을 확인하였고, 이는 장내에서 장내 유익균들이 곡물분말과의 부착을 통해 서식공간을 제공받아 균총형성에 유리한 환경을 제공받을 수 있을 것이라 생각된다.

생장곡선을 통한 곡물 소재 추출물의 장내 유익균 활성 효과 검증

6종의 곡물 소재 추출물에 대한 장내 유익균의 생육곡선은 Fig. 3과 같다. *L. acidophilus*에서는 찹보리 추출물에서 가장 높은 흡광도 값을 보였고, 전반적으로 모든 추출물에서 control 값에 비해 일정수준의 높은 수치를 보였다. *L. delbrueckii* subsp. *lactis*에서 또한 24시간 이후 모든 추출물에서 control 값보다 다소 높은 생육효과를 보였고, 귀리 추출물에서 가장 높은 효과를 보였다. *S. salivarius* subsp. *thermophilus*에서도 전반적으로 control 값 이상의 값을 보였지만 두드러진 차이는 보이지 않았다. 앞선 3종의 균은 모두 24시간까지 흡광도 값이 증가한 후 일정하게 유지되거나 증가하였고, 이는 Sung 등(38)의 연구에서 *L. acidophilus*의 적정 생육 조건인 24~48시간과 유사하였다. 그리고 *B. bifidum*은 12시간까지 흡광도 값이 증가하였지만, 그 이후 흡광도 값은 일정하게 유지되는 경향을 보였다. 선정된 6종 곡물분말 추출물이 장내 유익균에 증식에 유의한 영향을 미

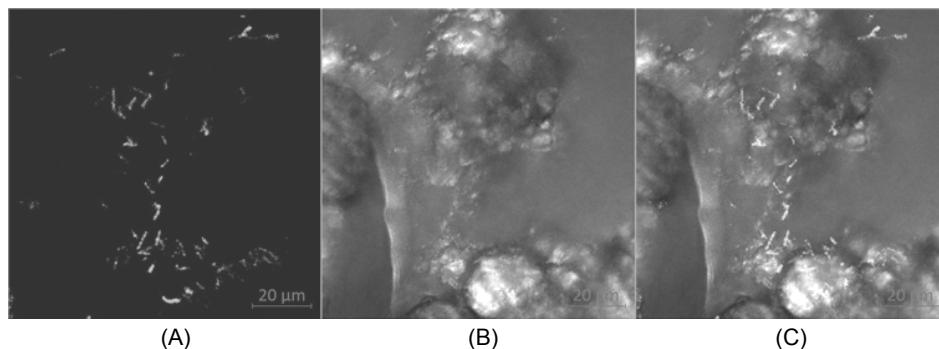


Fig. 1. Confocal laser scanning microscopy images showing the split images of *Lactobacillus acidophilus* attached to multi-grain powder. (A) *Lactobacillus acidophilus*. (B) Composite DIC image of multi-grain powder. (C) Combined image (A, B). Scale bar=20 μm.

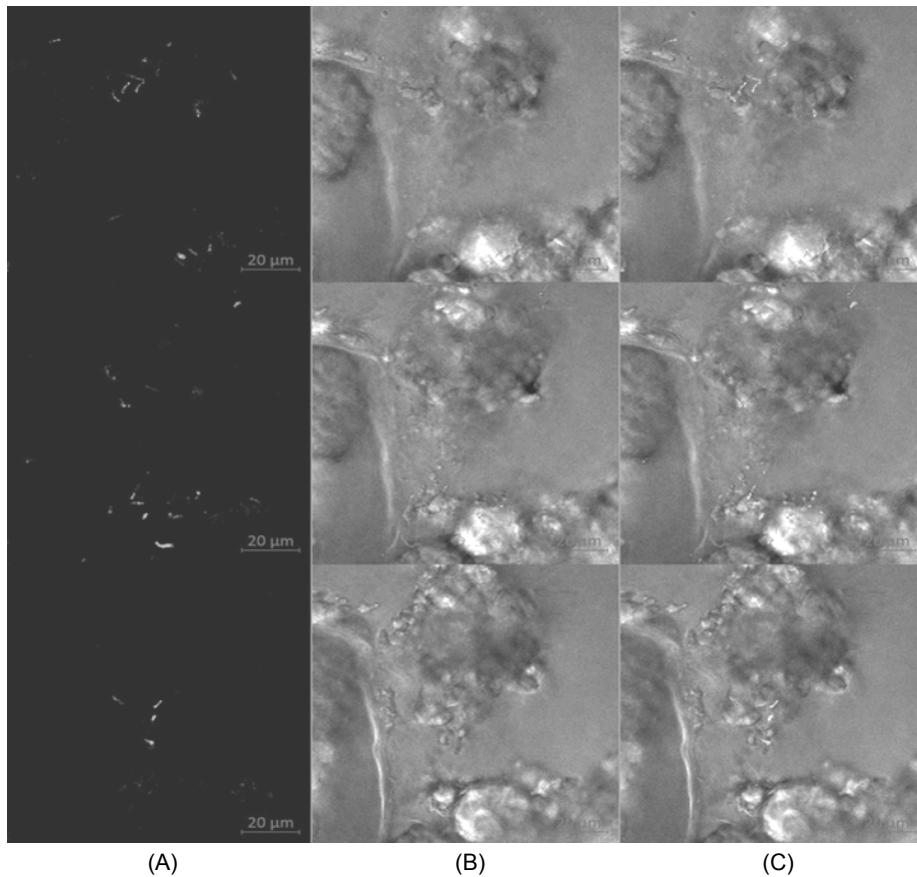


Fig. 2. Confocal laser scanning microscopy images of optical sections with different focal lengths of *Lactobacillus acidophilus* adhering to multi-grain powder (A: 0 μm , B: 6 μm , C: 13 μm). Scale bar = 20 μm .

치는 것으로 볼 때 선정곡물들 속에는 장내 유익균의 생육증진에 필요한 성분들이 존재한다는 것을 확인하였다.

곡물 소재 동결건조 추출물의 장내 유익균 활성 효과 비교 검증

곡물 소재 동결건조 추출물을 통한 추출물 간의 장내 유익균의 활성 정도를 비교한 실험 결과 Fig. 4에 나타내었다. 실험 결과 *L. acidophilus*에서는 찰보리와 울무에서 가장 높은 생육증진 효과를 보였고 현미를 제외한 다른 곡물 모두 유의한 증진 효과를 보였다. *L. delbrueckii* subsp. *lactis*에서는 울무에서 가장 높은 증진 효과를 보였고, *S. salivarius* subsp. *thermophilus*에서는 찰보리와 찰수수에서 가장 높은 증진 효과를 보였다. *B. bifidum*에서는 찰보리와 찰기장에서 높은 증진 효과를 보였으며, 다른 곡물 모두 유의한 장내 유익균 생육증진 효과를 보이는 것을 확인하였다. 결론적으로 선정 곡물 소재 6종을 모두 활용하여 고 식이섬유를 함유하면서 장내 유익균 생육을 증진시킬 수 있는 팽화식품 소재로 사용할 수 있다고 판단된다.

혼합곡물 추출물의 장내 미생물 활성 검증

팽화식품 제조 시 배합에 사용될 6종 혼합곡물의 장내

유익균 활성 효과를 검증하기 위해 동일비율로 혼합한 6종의 혼합곡물 열수 추출물과 1:1로 MRS와 배합하여 생균수를 측정 후 control 대비 균체 증가량을 알아보고 Table 4에 나타내었다. 실험 결과 24시간 배양 시 *L. acidophilus* control에 비해 1.72배 상승, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*는 1.89배, *S. salivarius* subsp. *thermophilus*는 1.66배 성장하였고, *B. bifidum* 또한 1.47배가량 상승한 것으로 분석되었다. 결론적으로 팽화식품 제조 시 프리바이오틱스 소재로서 혼합곡물은 충분히 이용 가능할 것으로 생각된다.

프리바이오틱스 곡물팽화과자의 품질특성 평가

프리바이오틱스 곡물 첨가 팽화과자의 색도 측정값의 결과는 Table 5와 같다. 현미가루와 같은 곡물분말을 첨가한 제품의 밝기는 낮아지는 경향을 보인다(33). 팽화과자의 색도는 밝기를 나타내는 L값이 치즈맛의 시즈닝을 첨가한 팽화과자에서 첨가하지 않은 대조군의 팽화과자보다 높게 나왔다. 적색도를 나타내는 a값은 대조군의 팽화과자에서 적색에 가깝게, 첨가균에 대해서는 녹색 쪽으로 나타났다. 황색도를 나타내는 b값은 두 제품에서 크게 유의한 차이를 보이지 않았다. 두 제품 간에 색도의 차이는 치즈맛 시즈닝의 색에 기인하는 것으로 보여 첨가균에 포함된 시즈닝의 배합

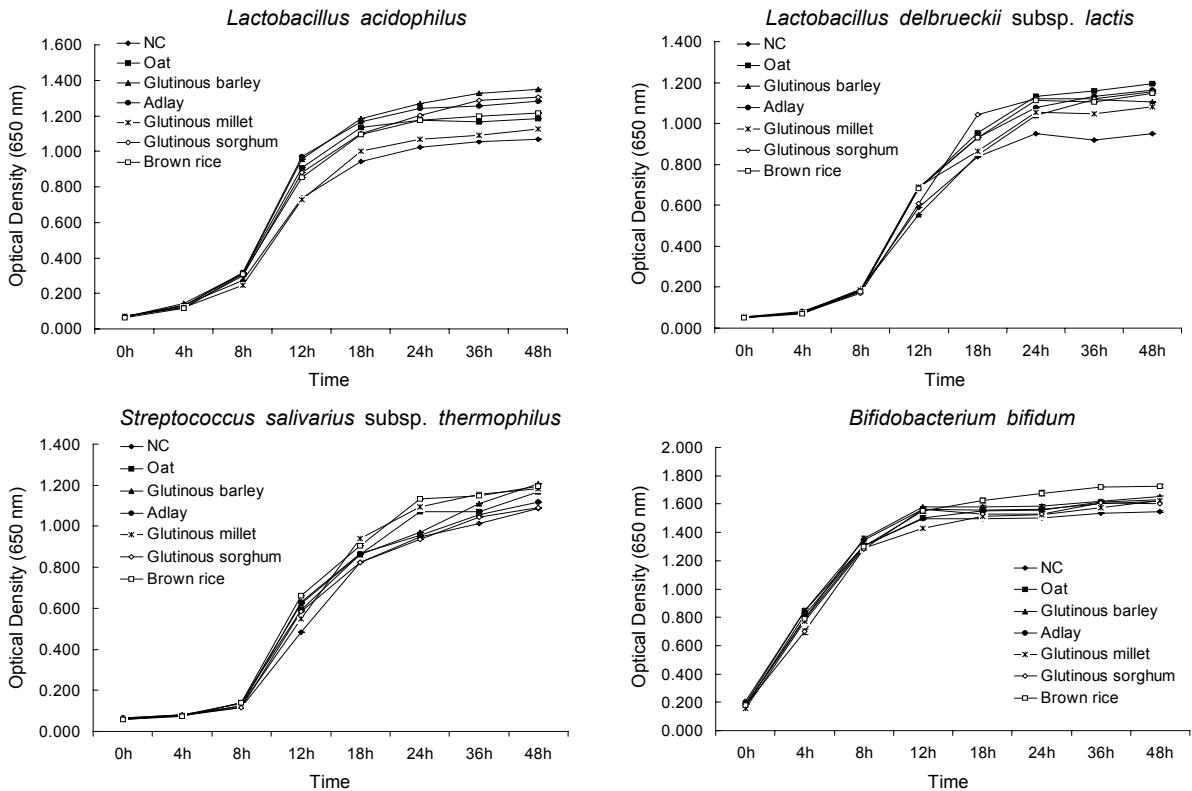


Fig. 3. Changes of optical densities of intestinal microorganisms grown with water extracts of grains at 37°C. NC: 50% (w/v) MRS broth+50% distilled water.

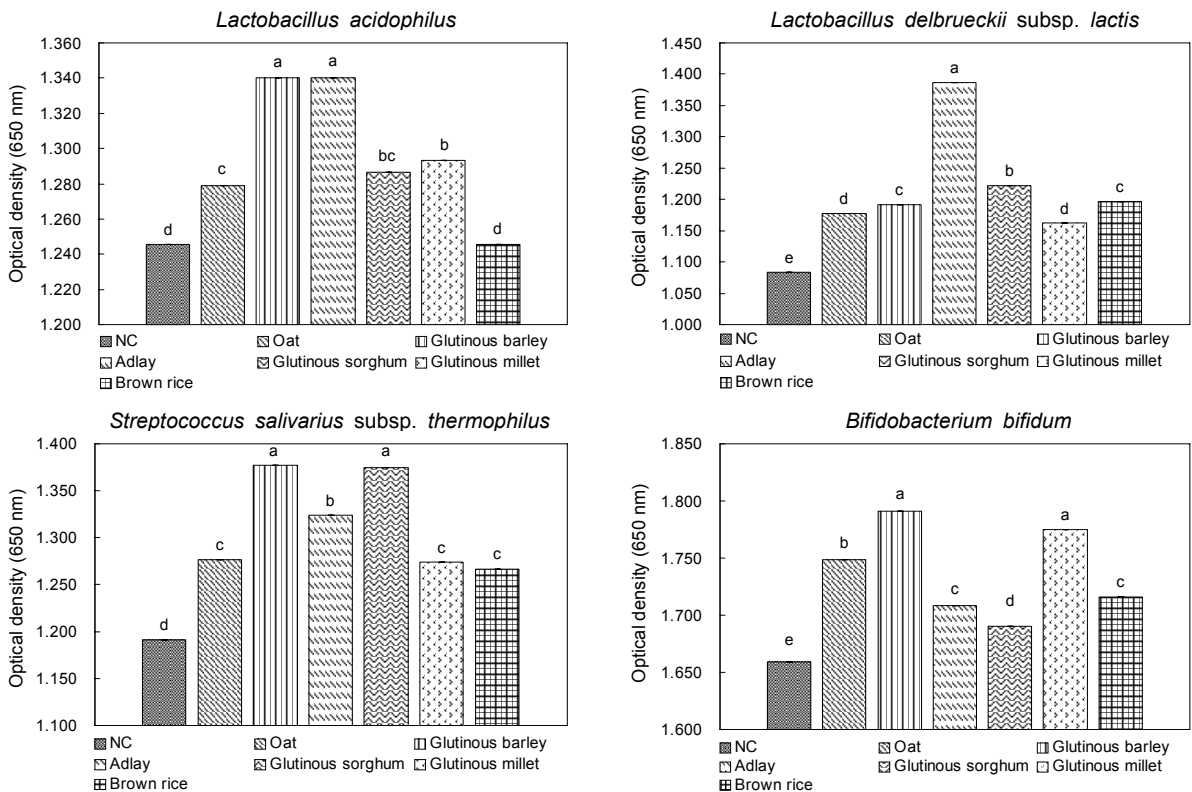


Fig. 4. Comparison optical density of intestinal microorganisms grown with freeze-dried extracts of grains (37°C, 24 hours). Different letters (a-e) above the bars mean significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. NC: 50% (w/v) MRS broth+50% distilled water.

Table 4. Effect of multi-grain extract on growth of intestinal bacteria by modified MRS broth

Strains	Control ¹⁾ (CFU/mL)	Sample ²⁾ (CFU/mL)	Compare of growth
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4.34×10^7	7.43×10^7	1.715 ³⁾
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	2.31×10^7	4.37×10^7	1.890
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	4.77×10^7	7.93×10^7	1.664
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1.85×10^8	2.71×10^8	1.466

¹⁾Control: 50% (w/v) MRS broth+50% distilled water.

²⁾Sample: 50% (w/v) MRS broth+50% water extract of grains.

³⁾Viable cell counts of sample / viable cell counts of control.

Table 5. Color value of multi-grain puffed snack added with seasoning powder

	L	a	b
Control	43.33±0.91 ²⁾	2.93±1.29	11.08±4.93
GPSM ¹⁾	59.15±0.48	-1.12±0.06	11.48±0.09

¹⁾Seasoning puffed snack.

²⁾Values are the mean±standard deviation of repetition experiments.

Table 6. Hardness of multi-grain puffed snack added with seasoning powder

	Hardness (g)	Crispness (peak)
Control	444.83±32.47 ^{a2)}	7.43±1.05 ^a
GPSM ¹⁾	545.99±38.02 ^b	5.00±0.76 ^b

¹⁾Seasoning puffed snack.

²⁾Values are the mean±standard deviation of repetition experiments. Different letters within a column mean significantly different at $P < 0.05$.

비만으로도 섭취 시 시각적인 맛의 차이가 있음을 확인할 수 있을 것으로 생각한다.

곡물팽화과자 제품의 조직감은 Table 6에 표시하였다. 팽화과자의 조직감 특성은 주된 구성인 분산매인 공기와 분산질 역할을 하는 전분막이 혼합된 교질식품에서 온다. 스낵류에 있어 경도는 섭취 시 식감에 영향을 미쳐 기호도의 중요한 인자로 작용한다(39). 곡물팽화과자의 경도는 대조군에 비해 시즈닝 첨가군이 높았는데, 이는 시즈닝에 들어 있는 지방 등과 같은 성분의 의해 변화되었을 것으로 생각된다.

바삭거림(crispness)은 texturogram이 나타내는 peak의 수를 계산하여 나타낼 수 있다(29). 곡물팽화과자의 바삭거림은 첨가군이 대조군보다 바삭거림이 약한 것으로 확인되었는데, 이는 바삭거림이 일반적으로 경도와 반대로 나타난다고 알려진 것과 일치한다고 볼 수 있다(40).

곡물팽화과자의 경도 및 조직감은 첨가재료의 배합에 따라 영향을 받는 것 이외에 온도와 시간, 수분 함량, 방법 등에 따라 복합적으로 영향을 미치기 때문에 조직감 향상을 위해서는 다양한 실험이 더 필요할 것으로 보인다.

요 약

본 연구에서는 공초점 주사현미경(CLSM)을 활용하여 장내 유익균과 국산 통곡물(whole grain) 소재들과의 부착을 통

해 생육환경에 있어 도움이 될 수 있는 서식공간을 제공받는 것을 시각화하고, 소재들의 프리바이오틱스 효과를 *in vitro* 배양을 통해 확인하여 통곡물 소재들로 제조된 프리바이오틱스 팽화식품을 개발하는 것을 목표로하였고, 그 결과 장 속에서 장내 유익균 균총을 향상시켜 인체의 건강증진에 유의한 팽화과자 제조에 필요한 기초 자료를 확보하였다. 선정곡물들의 일반성분 함량은 수분이 8.99~12.19%, 조희분 1.34~2.39%, 조단백질 7.34~15.38%, 조지방 1.84~8.12%로 함량이 분석되었고, 불용성 식이섬유 3.08~18.62%, 수용성 식이섬유 0.10~3.13%, 그리고 총 식이섬유 함량 5.26~21.36%로 확인되었다. 곡물분말의 프리바이오틱스 부착 여부를 CLSM으로 관찰한 결과 곡물분말과 혼합된 *Lactobacillus acidophilus*는 곳곳에 산재되어 있었지만, 주변 유동액 층보다 상대적으로 곡물분말 주변에 부착되어 존재하였다. 선정곡물들의 장내 유익균의 증진에 활성 효과가 있음을 검증한 결과 *L. acidophilus*에서는 찰보리 추출물에서 가장 높은 흡광도 값을 보였다. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*에서는 귀리 추출물에서 가장 높은 효과를 보였다. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*에서는 control보다 높은 수치를 보였지만, 두드러진 차이는 보이지 않았다. *Bifidobacterium bifidum*은 12시간 이후 흡광도 값은 일정하게 유지되었다. 곡물 소재 동결건조 추출물간의 장내 유익균 활성 정도를 비교한 실험 결과 *L. acidophilus*에서는 찰보리와 울무에서 가장 높은 생육증진 효과를 보였고 현미를 제외한 다른 곡물 모두 유의한 증진 효과를 보였다. *L. delbrueckii* subsp. *lactis*에서는 울무에서 가장 높은 증진 효과를 보였고, *S. salivarius* subsp. *thermophilus*에서는 찰보리와 찰수수에서 가장 높은 증진 효과를 보였다. 그리고 *B. bifidum*에서는 찰보리와 찰기장에서 높은 증진 효과를 보였다. 팽화식품 제조 시 배합에 사용될 6종의 혼합곡물의 장내 유익균 활성 효과를 알아본 결과, 24시간 배양 시 *L. acidophilus*는 control에 비해 1.72배 이상 상승하였고, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*는 1.89배, *S. salivarius* subsp. *thermophilus*는 1.66배 이상, *B. bifidum*는 1.47배가량 상승한 것으로 분석되었다. 제조된 팽화과자의 색도 측정결과 L값은 치즈맛의 시즈닝 첨가군이 대조군보다 높게 나왔다. a값은 대조군이 적색에 가깝게, 시즈닝 첨가군은 녹색 쪽으로 나타났다. b값은 두 제품에서 크게 유의한 차이를 보이지 않았다. 팽화과자의 경도는 첨가군이

대조군보다 높았고, 바삭거림은 첨가군이 대조군보다 약한 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구 ‘곡물 소재 팽화식품에서 장내 유익균의 증진 효과 분석 및 공초점 현미경을 이용한 부착능 평가’는 중소기업청에서 지원하는 2016년도 산학연협력 기술개발사업(C0395352)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

REFERENCES

- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-1412.
- Mitsuoka T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Biosci Microflora* 1: 3-24.
- Mitsuoka T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *J Ind Microbiol* 6: 263-267.
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. 2004. Probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18: 299-313.
- Lee KA, Kim MS, Cho HB. 2008. Effect of extract of fermented dropwort on intestinal bacteria and enzymes *in vitro*. *Korean J Microbiol* 44: 358-361.
- Cho NJ, Lee SK, Kim SK, Joo HK. 1998. Effect of wheat flour brew with *Bifidobacterium bifidum* on rheological properties of wheat flour dough. *Korean J Food Sci Technol* 30: 832-841.
- Lee HA, Lee SS, Shin HK. 1997. Effect of apple dietary fiber on the *in vitro* growth of intestinal bacteria. *Korean J Food Sci Technol* 29: 107-114.
- Park JM, Lee JH, Hong SI. 2014. A research trend analysis of probiotics and prebiotics. *Food Science and Industry* 47: 54-66.
- Cocolin L, Alessandria V, Dolci P, Gorra R, Rantsiou K. 2013. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *Int J Food Microbiol* 167: 29-43.
- Del Chierico F, Vernocchi P, Bonizzi L, Carsetti R, Castellazzi AM, Dallapiccola B, de Vos W, Guerzoni ME, Manco M, Marseglia GL, Muraca M, Roncada P, Salvatori G, Signore F, Urbani A, Putignani L. 2012. Early-life gut microbiota under physiological and pathological conditions: The central role of combined meta-omics-based approaches. *J Proteomics* 75: 4580-4587.
- Park YS, Song SK. 1998. Effect of polymer coating on initial microorganism attachment and the biofilm growth. *Korean J Env Hlth Soc* 24: 104-109.
- Kim YH, Park SO, Han KS, Oh SJ, You SK, Kim SH. 2004. Adhesion ability and inhibition of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 adhesion to intestinal epithelial cells in *Lactobacillus acidophilus*. *Korean J Food Sci Ani Resour* 24: 86-91.
- Shin HK, Shin OH, Koo YJ. 1992. Effects of potato protein on the growth of *Clostridium perfringens* and other intestinal microorganisms. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 20: 249-256.
- Biagi E, Candela M, Turrone S, Garagnani P, Franceschi C, Brigidi P. 2013. Ageing and gut microbes: Perspectives for health maintenance and longevity. *Pharmacol Res* 69: 11-20.
- Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. 1998. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 42: 39-44.
- Makras L, De Vuyst L. 2006. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int Dairy J* 16: 1049-1057.
- Inghin RC, Stevens MJA, Meile L, Lacroix C, Meile L. 2015. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J Microbiol Methods* 114: 26-29.
- Jung SH. 2006. Application of high-speed slit scanning confocal laser microscope in biology. Abstract No TP-VI3 presented at summer Meeting of the Institute of Optical Society of Korea. Yonsei University, Seoul, Korea.
- Jeong SH, Cho NS. 2002. Study on morphology and physical properties of Indian mallow (*Abutilon avicennae* Gaertner) fibers by CLSM (I). *J Korea TAPPI* 34: 61-66.
- Kim SH, Park JM, Kim CH. 1999. Effects of fiber wall thickness on paper properties using CLSM. *J Korea TAPPI* 31: 39-45.
- Bae HC, Renchinkhand G, Ku JH, Nam MS. 2011. Characterization of fermented milk added with green whole grains of barley, wheat, glutinous rice and common rice powders. *CNU J Agric Sci* 38: 485-491.
- Ham H, Woo KS, Lee B, Park JY, Sim EY, Kim BJ, Lee C, Kim SJ, Kim WH, Lee J, Lee YY. 2015. Antioxidant compounds and activities of methanolic extracts from oat cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1660-1665.
- Wood PJ, Anderson JW, Braaten JT, Cave NA, Scott FW, Vachon C. 1989. Physiological effects of beta-D-glucan rich fraction from oats. *Cereal Foods World* 34: 878-882.
- Lim SY. 2008. Inhibitory effects of methanol extracts from Korean *Oryza sativa* and *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* on mutagenicity and growth of human cancer cells. *J Life Sci* 18: 1415-1419.
- Ko JY, Song SB, Lee JS, Kang JR, Seo MC, Oh BG, Kwak DY, Nam MH, Jeong HS, Woo KS. 2011. Changes in chemical components of foxtail millet, proso millet, and sorghum with germination. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1128-1135.
- Brennan MA, Derbyshire E, Tiwari BK, Brennan CS. 2013. Integration of β -glucan fibre rich fractions from barley and mushrooms to form healthy extruded snacks. *Plant Foods Hum Nutr* 68: 78-82.
- Kang MY, Sung YM. 2000. Varietal differences in quality characteristics of Yukwa (fried rice cookie) made from fourteen glutinous rice cultivars. *Korean J Food Sci Technol* 32: 69-74.
- AOAC. 2000. *Official method of analysis*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA. Method 925.09, 923.03, 950.09, 963.15, 991.43.
- Hwang JB, Yang MO, Shin HK. 1997. Survey for approximate composition and mineral content of medicinal herbs. *Korean J Food Sci Technol* 29: 671-679.
- Korean Diabetes Association. 2012. *Diabetes fact sheet in Korea 2012*. Korea Centers for Disease Control and Prevention, Chungju, Korea.
- Grundy S. 2002. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106:

- 3143-3421.
32. Reiner Ž, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008-2010 and 2010-2012 Committees. 2011. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 32: 1769-1818.
 33. Jeong SY, Park MJ, Lee SY. 2011. Quality characteristics of brown rice *Jeung-pyun*. *Korean J Food Cult* 26: 86-93.
 34. Kim SH, Kim DJ. 2004. Analysis of nitrite oxidizing bacteria in a nitrite oxidizing biofilm by fluorescence *in situ* hybridization. Spring Meeting of the Korean Society for Biotechnology and Bioengineering. Daegu, Korea. p 120-124.
 35. Thomas CJ, McMeekin TA. 1984. Effect of water uptake by poultry tissues on contamination by bacteria during immersion in bacterial suspensions. *J Food Prot* 47: 398-402.
 36. Dickson JS, Koohmaraie M. 1989. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl Environ Microbiol* 55: 832-836.
 37. Jang KI, Chung DH, Ha SD, Kim KS, Lee KH, Kim MG, Kim CH, Kim KY. 2006. Assessment of inactivation for *Salmonella* spp. on chicken meat using confocal laser microscopy and flow cytometry. *Korean J Food Sci Technol* 38: 290-294.
 38. Sung SK, Rhee YK, Cho CW, Kim YC, Lee OH, Hong HD. 2013. Physicochemical properties and antioxidative activity of fermented *Rhodiola sachalinensis* and Korean red ginseng mixture by *Lactobacillus acidophilus*. *Korean J Food Nutr* 26: 358-365.
 39. Choi JJ, Park YR, Chung CH. 2014. Quality characteristics of snack with added *Dongchimi* powder. *J East Asian Soc Diet Life* 24: 819-826.
 40. Bae HS, Lee YK, Kim SD. 2002. Quality characteristics of *Yukwa* with citrus peel powder. *J East Asian Soc Diet Life* 12: 388-396.