

Leuconostoc mesenteroides KCTC3505를 이용한 발효자몽 추출물 생산 조건의 최적화

홍 경 표[†]

중부대학교 호텔외식산업학과

Optimum Conditions for Production of Fermented Grapefruit Extract using *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505

Kyung-Pyo Hong[†]

Dept. of Hotel & Food Service Industry, Joongbu University, Chungnam 312-702, Korea

Abstract

This study was conducted in order to determine the optimum conditions for the production of fermented grapefruit extract showing high cell growth, antioxidant activity and total flavonoid content. Five lactic acid bacterial strains - *Lactobacillus plantarum* KCTC3104, *Lactobacillus brevis* KCTC3102, *Weisella cibaria* KCTC3746, *Leuconostoc citreum* KCTC3526 and *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505 - were evaluated first in order to determine the optimum strain able to grow with high efficiency on grapefruit as a substrate and possesses higher antioxidant activity and flavonoids content. Among these strains, *L. mesenteroides* KCTC3505 was selected as a starter culture. To estimate the available or effective content of grapefruit in basal medium, the effects of 30%, 50%, and 70% grapefruit contents on the performance of fermentation were tested, and it was found that grapefruit can be added at 70% levels to medium. In this study, three factors of fermentation conditions - incubation time, sucrose, and glucose contents - were evaluated for their effects on fermentation performance. Taguchi experiment design was employed and the responses of experiments were calculated using signal and noise ratio calculation with larger-the-best characteristics. Finally, the optimum conditions for the manufacture of fermented grapefruit extract were as follows: grapefruit 70%, sucrose 10 g/L, glucose 10 g/L, sodium acetate 1 g/L, NaCl 1 g/L, dipotassium phosphate 0.1 g/L, magnesium sulfate 0.01 g/L and 16 hr of incubation.

Key words : Grapefruit, fermentation, antioxidant, total flavonoid, *Leuconostoc mesenteroides*.

서 론

과일 및 야채 등에는 폴리페놀, 플라보노이드 및 카로티노이드와 같은 다양한 식물화학물질들(phytochemicals)이 존재하고, 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 비만 등의 생활습관병의 발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 밝혀지면서 이러한 과일 및 야채에 대한 관심이 증가하고 있다. 자몽, 귤, 레몬, 오렌지 등의 감귤류에는 비타민, 무기질, 섬유질 등이 많이 함유된 과일로 알려져 있으며, flavonoid 및 carotenoid 등이 많이 함유되어 있어 건강 기능성 식품 개발의 소재로 널리 이용되고 있다(Vanamala *et al* 2006). 특히 자몽(Grapefruit, *Citrus paradisi* Macf.)에는 비타민 C의 함량이 매우 높으며, 항산화 기능이 우수하고, 사람의 건강에 도움이 되는 flavonoids, coumarin 및 limonoids 등이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Yu *et al* 2005). Flavonoid는 polyphenol 화합물로서 flavonols, flavones, flavonones, isoflavones, anthocyanins 및 fla-

vans 등의 6가지로 구분된다(Peterson & Dwyer 1998). 이들 중에서 flavonones가 감귤류에 많이 함유되어 있으며, 감귤류의 독특한 향과 맛을 결정짓는다(Igual *et al* 2011). 이러한 flavonoid들은 ATP와 유사한 구조적 특징을 가지고 있어 다양한 효소들의 ATP 결합 부위와 결합함으로써 세포증식을 억제하고, 분화를 촉진시키는 기능을 가지고 있으며, 강력한 항산화제의 역할을 한다(Vanamala *et al* 2006).

식물에 함유된 기능성 물질 혹은 생리활성을 증진시키는 방법으로 발효를 들 수 있다(Chang *et al* 2010). 발효 과정 중에 다양한 미생물들이 관여하여 식물체에 함유되어 있는 유용 성분들이 증가하고, 결과적으로는 생리활성이 향상되는 것으로 보고되었다(de Castro *et al* 1998, Sato *et al* 2006).

이에 본 연구는 감귤류 중에서 flavonoid 함량이 높은 자몽을 소재로 하여 flavonoid 함량을 향상시킬 수 있는 발효 조건을 찾기 위하여 수행되었다. 비록 자몽은 국내에서 재배되지 않고 수입해야 하는 농산물이지만, 전 세계적으로 널리 소비되고 있는 과일 중 하나이다. 따라서 자몽의 기능성을 향상시키는 발효 기술의 개발은 다양한 식품산업에 활용될 수 있을 것이다.

[†] Corresponding author : Kyung-Pyo Hong, Tel : +82-41-750-6716, Fax : +82-41-750-6380, E-mail:kphong@joongbu.ac.kr

재료 및 방법

1. 자몽

실험에 사용한 자몽(미국산, 2011년 생산)은 시중 대형 시장에서 구매하였고, 과피를 제거한 후, 칼날 분쇄기(Philips HR2860, Netherlands)를 이용하여 균질화 시킨 후에 사용하였다.

2. 균주 및 종균 배양 조건

발효자몽 추출물 제조를 위하여 5종의 유산균들을 이용하여 자몽 발효 효율을 조사하였다. 실험에서 사용한 균주들은 *Lactobacillus plantarum* KCTC3104, *Lactobacillus brevis* KCTC 3102, *Weissella cibaria* KCTC3746, *Leuconostoc citreum* KCTC 3526 및 *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505이다. 실험에 사용된 모든 유산균들은 한국미생물자원센터(Korea Collection for Type Culture)에서 분양을 받아 사용하였다. 각 균주들의 종균 배양은 MRS(Difco, USA) 액상배지를 이용하여 실시하였으며, 30°C에서 24시간 동안 배양한 후에 종균으로 사용하였다.

3. 균주 선발을 위한 배양

자몽 발효에 있어 가장 적합한 3균주를 찾기 위하여 자몽을 30% 함유한 배지에서 5종의 유산균들의 성장성과 발효액 내 총 flavonoid 생산량 및 항산화 활성을 평가하였다. 배양에 사용된 기초 배지 조성은 자몽 30%(v/v), sodium acetate 1 g/L, dipotassium phosphate 0.1 g/L, magnesium sulfate 0.01 g/L 및 NaCl 1 g/L로 구성하였으며, 초기 pH는 10 N NaOH를 이용하여 6.5로 고정하였고, 준비된 배지는 121°C에서 15분간 가압 멸균한 뒤에 사용하였다. 배지성분으로 이용된 시약들은 모두 Sigma(USA) 제품을 사용하였다. 배양 부피는 50 mL 삼각플라스크에 30 mL 배양액 부피를 사용하였으며, 30°C 진탕배양기에서 24시간 동안 150 rpm으로 교반하며 배양하였다.

4. 생균수의 측정

배양액을 멸균된 0.8% NaCl 용액에 10^{-7} 이 되도록 희석한 후 뒤에 MRS 평판 배지에 도말한 후, 30°C 항온기에서 20시간 이상 배양하여 평판배지에 집락이 형성되도록 하였다. 형성된 집락의 개수가 30개에서 300개 정도인 평판 배지를 균체량 평가용으로 선택하였고, \log_{10} (CFU/mL)로 균체량을 계산하였다.

5. 항산화 활성 측정

항산화 활성은 배양 상등액의 free radical scavenging 활성

을 DPPH(α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl, Sigma, USA) 용액을 이용하여 평가하였다. 발효자몽액을 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후에 그 상등액을 분리하여 발효자몽 추출물을 분리하였다. 발효 자몽 추출물과 멸균 증류수, 99.9% 에탄올 그리고 4×10^{-4} M DPPH를 0.1 : 0.4 : 1 : 1의 비율로 혼합한 후에 상온에서 15분간 반응시킨 후 분광광도계(UV-1601, SHIMADZU, Japan)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 발효자몽 추출물 대신 멸균 증류수를 사용하여 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성의 정도는 ascorbic acid(Sigma, USA)의 항산화 활성을 표준활성으로 회귀 방정식을 산출한 후, 시료의 항산화 활성을 평가하였고, ascorbic acid equivalent(μ M)로 나타내었다.

6. 표준정규분포를 이용한 표준화 활성수치의 산출

자몽 발효에 있어 5가지 균주들의 성장 및 항산화 활성 특성을 이용하여, 자몽 발효에 가장 적합한 균주를 찾기 위하여 표준정규분포를 이용한 상대적 활성지수를 산출하였다. 세포 성장의 결과와 항산화 활성에 대한 결과는 서로 다른 크기를 가지고 있어, 단순한 산술적 합산으로는 동일한 크기의 상호평가가 불가능하다. 이에 본 실험에서는 표준정규분포를 이용하여 두 변인(세포성장 및 항산화활성)을 모두 평균이 0이고, 표준편차가 1인 Z점수로 변환시키는 표준화 방법을 사용하여 상대적 활성지수를 계산하였다(문수백 2010, 배석주 2008). 표준화에 사용된 수식은 다음과 같다.

$$Z_n = \frac{A_n - \bar{A}}{\sigma_A} + \frac{B_n - \bar{B}}{\sigma_B}$$

위 수식에서 Z_n 은 n 번째 균주의 표준화된 활성수치의 합을 의미한다($n=1,2,\dots,5$ 이며, 1,2, \dots ,5번은 각각 *L. plantarum* KCTC3104, *L. brevis* KCTC3102, *W. cibaria* KCTC3746, *L. citreum* KCTC3526 및 *L. mesenteroides* KCTC3505를 의미함). A_n 과 B_n 은 각각 n 균주의 세포성장 및 항산화활성 수치를 의미한다. \bar{A} 와 \bar{B} 는 각각 $n=1$ 에서 5번까지의 균주들의 세포성장 및 항산화활성에 대한 평균값을 의미한다. σ_A 와 σ_B 는 각각 $n=1$ 에서 5번까지의 균주들의 세포성장 및 항산화활성에 대한 표준편차값을 의미한다.

7. Total Flavonoid의 분석

발효자몽 추출물에 포함되어 있는 총 flavonoid의 함량은 Juan & Chou (2009)의 방법에 따라서 측정하였고, 대략적인 방법은 다음과 같다. 발효자몽 추출물 250 μ L와 10 mM Tris-HCl(pH 7.0) 1 mL 그리고 5% NaNO₃ 용액 75 μ L를 혼합한 뒤, 상온에서 6분간 반응시켰다. 반응이 완료된 혼합액에 10%

$AlCl_3$ 용액 150 μL 를 첨가하고, 다시 5 분간 상온에서 반응시켰다. 반응이 완료된 혼합액에 1 M NaOH 500 μL 와 증류수 275 μL 를 첨가한 후에 분광광도계(UV-1601, SHIMADZU, Japan)를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoid의 표준물질로는 quercetin(Sigma, USA)을 사용하였다.

8. 배지 내 자몽 함량이 선발균주의 발효에 미치는 영향 상대적 성능지수를 통하여 균주를 선발한 후에 자몽의 농도별 발효성장 및 효율을 분석하였다. 실험에 사용된 자몽의 농도는 30%, 50% 그리고 70%로 설정하였고, 발효 효율은 선발된 균주의 성장성, 발효자몽 추출물의 항산화활성 및 총 flavonoid 함량을 분석하여 평가하였다.

9. Taguchi Design을 이용한 배지성분들의 효과 측정 자몽발효에 있어 세포성장, 항산화활성 그리고 총 flavonoid 함량의 생산에 영향을 미치는 발효 조건 인자들을 조사하기 위하여 Taguchi 실험 계획법을 사용하였다. Taguchi 실험계획법은 일본의 다구찌 겐이찌(田口玄一)가 고안한 실험 방법으로, 개발하려는 시스템의 조건을 탐색하기 위하여 설정된 요인들의 효과를 추정하는 방법이다(이승훈 2008). Taguchi 실험 계획법은 특히 요인들에 대한 시스템의 반응을 신호대 잡음비(signal and noise ratio, SN ratio)로 변환하여 산포를 작게 하면서도 각 요인들의 효과를 도출하는 특징을 가지고 있다. 또한 실험 목적에 따라서 망목(nominal-is-best), 망소(smaller-the-best) 그리고 망대(larger-the-best) 특성 등 중에서 가장 적합한 방법을 선택하여 실험 결과를 해석할 수 있는 장점이 있다(Lee *et al* 2010, Lim & Yang 2006).

본 연구에서는 설계된 실험을 통하여 얻어진 결과들을 망대 특성을 이용한 신호대 잡음비로 나타내었으며, 망대특성의

분석 방법은 아래와 같은 수식으로 산출하였다.

$$SN = -10 \log \left(\frac{1}{r} \sum_{i=1}^r \frac{1}{(y)^2} \right)$$

위 수식에서 SN은 신호대 잡음비, r은 반복수, y는 실험 결과로 얻어진 반응치이다.

10. 통계 분석

균주별 발효 효율, 자몽 농도별 발효 효율에 대한 통계 분석은 PASW Statistics 18(Release 18.0.0) 프로그램의 일반 선형 모형(general linear model)과 Duncan 사후검정 방법을 사용하였다. Taguchi 실험 설계 및 신호대 잡음비 분석, 분산분석은 MINITAB version 14를 이용하여 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 발효자몽 추출물 생산을 위한 균주 선발

본 실험은 항산화 활성이 우수하며, 생리활성 물질인 총 flavonoid 함량을 향상시킬 수 있는 발효자몽 추출물의 생산 조건을 개발하기 위하여 수행되었다. 발효 효율을 향상시키기 위하여서는 종균의 선택이 매우 중요하다. 본 실험에서는 5종의 유산균을 대상으로 발효자몽 추출물의 발효 효율을 평가하였다. 유산균 종류에 따른 발효 효율 중에서 세포성장 과 발효 추출물의 항산화활성에 대한 결과는 Fig. 1에서 보는 것과 같다. 세포 성장은 *L. mesenteroides* KCTC3505, *L. citreum* KCTC3526, *L. plantarum* KCTC3104, *W. cibaria* KCTC 3746 그리고 *L. brevis* KCTC3102의 순으로 우수하게 나타났으며, *L. mesenteroides* KCTC3505와 *L. citreum* KCTC 3526

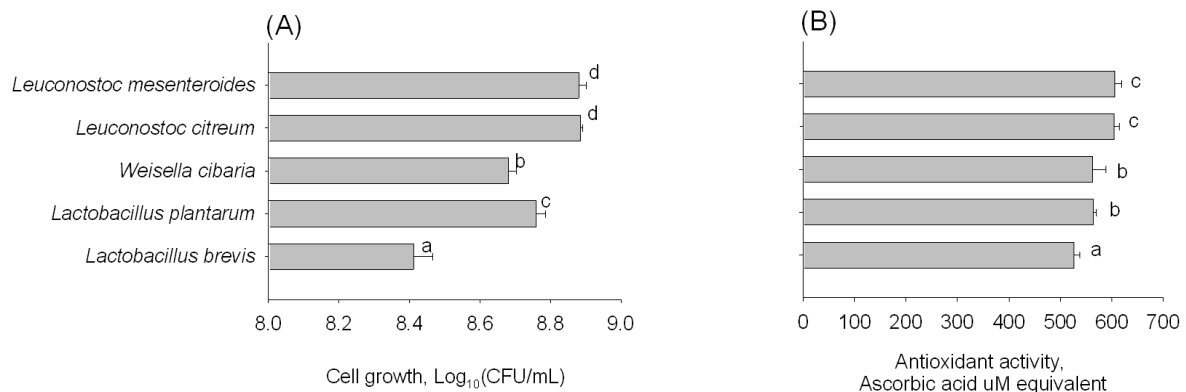


Fig. 1. Cell growth and antioxidant activities of lactic acid bacteria.

Five strains of lactic acid bacteria were used as inoculant for the fermentation of grapefruit and their individual performances of growth (A) and antioxidant (B) activities.

The different letters at the end of each bar mean significantly different ($p < 0.05$).

간의 세포 성장에 대한 유의적인 차이는 발견되지 않았다. 발효 자몽 추출물의 항산화 활성은 *L. brevis* KCTC3102에서 가장 낮게 나타났고, *L. plantarum* KCTC3104과 *W. cibaria* KCTC 3746은 서로 유사한 항산화 활성을 나타내었다. 그리고 *L. citreum* KCTC3526과 *L. mesenteroides* KCTC3505도 서로 유사한 항산화 활성을 나타내었다. 모든 균주에서 세포성장 효율이 우수할수록 배양상등액의 항산화 활성이 높게 나타났다. 이러한 결과는 각 균주들의 세포성장효율이 배양액 속의 항산화 물질 합성효율 혹은 생산효율과 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다.

실험에 사용된 각 유산균들의 세포성장 및 항산화 활성의 결과값들을 표준정규분포를 이용하여 표준화한 후에 그 값들을 합산하여 상대적 성능지수를 나타내었다(Fig. 2). 그 결과, *L. brevis* KCTC3102가 가장 낮은 상대적 성능을 나타내었으며, *L. citreum* KCTC3526과 *L. mesenteroides* KCTC 3505가 가장 높은 상대적 성능을 나타내었다. 두 종의 *Leuconostoc* 균주 사이에서는 통계적 차이가 발견되지 않았다.

실험에 사용된 유산균들을 이용한 발효자몽 추출물의 총 flavonoid 함량을 분석한 결과는 Fig. 3에서 보는 것과 같다. 본 실험에서는 발효 전 자몽을 포함하는 배지에 함유된 총 flavonoid를 기준으로 발효 효율을 분석하였다. 그 결과, *L. brevis* KCTC3102와 *L. plantarum* KCTC3104는 오히려 발효 전에 비하여 총 flavonoid의 함량이 감소하였다. *W. cibaria* KCTC3746 균주를 이용한 발효에서는 발효 전과 비교하여 총 flavonoid 함량은 감소하였으나, 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 반면, *L. citreum* KCTC3526을 접종한 발효자몽에서는 발효 전에 비하여 총 flavonoid 함량이 1.28배 향상하였고, *L. mesenteroides* KCTC3505를 접종한 발효자몽에서는 발효 전에 비하여 1.31배 증가하였다. 그러나 두 균주 간의 통계적 유의성은 발견되지 않았다. 식물에 함유된 flavonoid의 단점 중 하나로 낮은 수용성을 들 수 있으며, 그

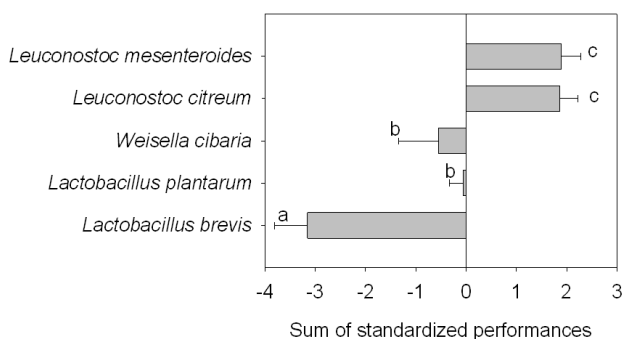


Fig. 2. Sum of standardized growth and antioxidant activities from lactic acid bacteria.

The different letters at the end of each bar mean significantly different ($p < 0.05$).

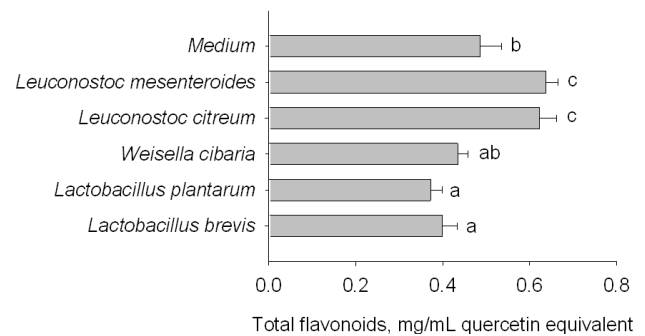


Fig. 3. Total flavonoid production from five different lactic acid bacteria and total flavonoid content in basal medium containing 30% of grapefruit.

The different letters at the end of each bar mean significantly different ($p < 0.05$).

수용성은 효소적 glycosylation을 통하여 향상될 수 있다고 보고된 바 있다(Bertrand *et al* 2006). Flavonoid의 효소적 glycosylation에는 glucansucrase(GS, EC 2.4.1) 및 dextransucrase(E.C. 2.4.1.5) 등의 효소가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이들은 *L. mesenteroides*에서 분비되는 주요 효소들 중 하나로 알려져 있다(Bertrand *et al* 2006, Dols *et al* 1997, Rabelo *et al* 2009).

일련의 실험 결과를 통하여 발효자몽 추출물 생산을 위한 최적 균주로 *L. mesenteroides* KCTC3505가 선택되었다. 일반적으로 *L. mesenteroides* 균주는 heterofermentative 유산균으로서 *Lactobacillus* 속이나 *Pediococcus* 속의 균주들과 함께 식물 발효에서 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 김치 발효에 있어 매우 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Cho *et al* 2006).

2. 배지 내 자몽 농도가 발효 효율에 미치는 영향

배지 내 자몽의 첨가 농도가 *L. mesenteroides* KCTC3505를 이용한 발효 효율에 미치는 영향을 조사하였다. 배지 내 자몽의 농도를 30%, 50% 및 70%로 증가시킨 후에 *L. mesenteroides* KCTC3505를 접종하여 발효시킨 후, 균체 성장과 발효자몽 추출물의 항산화 활성 및 총 flavonoid 함량을 분석하였다. 그 결과, 배지 내 자몽의 함량이 증가할수록 균체 성장, 항산화 활성 및 총 flavonoid 함량이 모두 유의성 있게 향상되었다(Fig. 4). 자몽 함량에 따른 발효 효율 실험을 통하여 *L. mesenteroides* KCTC3505는 배지 내 자몽을 성장을 위한 기질로서 잘 이용하는 것으로 나타났다.

3. 최적 발효자몽 추출물 생산 조건

본 실험에서는 발효자몽 추출물 생산조건을 알아보기 위하여 배양 시간과 탄소원으로 sucrose와 glucose의 효과를 조

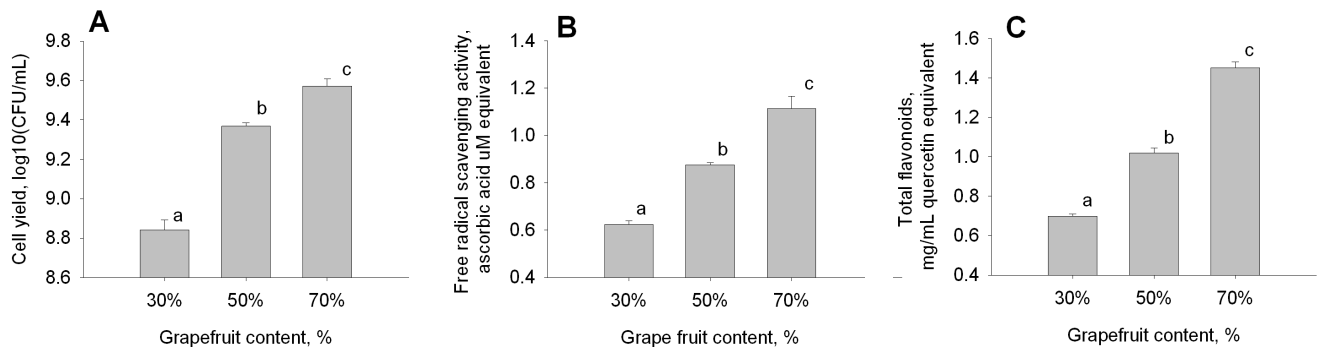


Fig. 4. Effect of grapefruit content in medium on the cell yield, free radical scavenging activity and total flavonoid content in fermented grapefruit extract by using *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505. The different letters at the end of each bar mean significantly different ($p < 0.05$).

사하였다. 생산 조건들의 효과를 조사하기 위하여 Taguchi 실험 설계법을 사용하였으며, 망대특성을 이용하여 신호대 잡음비를 산출하였다. Taguchi 실험설계법에는 망목, 망소 및 망대특성으로 실험결과들에 대한 신호대 잡음비를 산출할 수 있으며, 망목특성은 반응값들이 특정한 목표치가 되도록 해석하는 방법이며, 망소특성은 반응값들이 작을수록 좋은 특성으로 해석하고, 망대특성은 반응값들이 클수록 좋은 특성으로 해석하는 방법이다(이승훈 2008).

본 연구에서 사용된 생산 조건 요인들의 종류와 수준들은 Table 1에서 보는 것과 같다. 선택된 요인으로 sucrose와 glucose는 탄소원으로 *Leuconostoc* 균주의 대사효율과 밀접한 관계가 있어 선택되었다. *Leuconostoc* 속의 균주들이 배지 내 탄소원의 종류, 특히 이당류와 단당류의 비율에 따라서 성장 효율 및 대사효율이 달라진다고 보고되었다(Dols *et al* 1997). *Leuconostoc* 균주는 sucrose가 포함된 배지에 다른 탄수화물을 첨가하여 주면 dextransucrase라는 효소에 의하여 dextran 과 같은 oligosaccharide를 생산하게 되고, 이 효소의 생산 효율은 세포성장과 밀접한 관계를 가지게 된다. 즉, 배지에 첨

Table 1. Variables and their levels used in Taguchi experiment design

Variables	Factors	Levels and their assigned conditions of factors		
		1	2	3
X1	Incubation time (h)	8	16	24
X2	Sucrose (g/L)	1	5	10
X3	Glucose (g/L)	1	5	10

Used basal medium consisted of grapefruit 70%, dipotassium phosphate 0.1 g/L, magnesium sulfate 0.01 g/L, sodium acetate 1 g/L and NaCl 1 g/L. The initial pH of culture was adjusted to 6.5 by using 10 N NaOH.

가되는 탄수화물의 종류와 그 비율에 따라서 oligosaccharide 생산 효율 혹은 세포성장 효율이 다르게 나타난다(Dols *et al* 1997, Rabelo *et al* 2009).

각 요인들의 수준들을 직교배열법에 따라 배치하여 총 9 가지의 실험들을 Table 2에서 보는 것과 같이 설계하였고, 각 실험들에서 얻어진 세포 성장, 항산화 활성 및 총 flavonoid 함량에 대한 반응들을 망대특성을 이용하여 신호대 잡음비를 계산하였다(Table 2).

Taguchi 실험의 결과로 나타난 세포성장, 항산화 활성 및 총 flavonoid 함량 값들에 대한 분산분석을 수행하여 각 요인들의 효과에 대한 통계적 유의성을 분석하였다. 각 반응들의 분산분석 결과는 Table 3에서 보는 것과 같다. 세포성장에 있어서는 glucose를 제외한 sucrose, 배양 시간에서는 유의성이 관찰되었다. 항산화 활성에 있어서는 모든 요인들이 유의적인 효과를 나타내었다. 총 flavonoid 함량에 있어서는 배양시간과 sucrose에서만 유의성이 나타났다.

세포성장에 대한 각 요인들의 수준별 효과는 Fig. 5에서 보는 것과 같다. *L. mesenteroides* KCTC3505의 성장에 있어서는 배양시간 16시간(수준 2) 이후에는 오히려 균체 성장 효율이 떨어지는 결과를 나타내었다. Sucrose의 함량에 있어서는 제 3수준인 10 g/L에서 가장 우수한 결과를 나타내었다. Glucose의 함량은 제 1수준(1 g/L)과 제 2수준(5 g/L)에서는 서로 유사한 결과를 나타내었으나, 제 3수준(10 g/L)에서는 오히려 세포성장이 저해되는 결과를 나타내었다.

항산화 활성에 대한 각 요인들의 수준별 효과는 Fig. 6에서 보는 것과 같다. 배양시간은 시간이 증가할수록 효과가 커지는 결과를 나타내었고, sucrose 함량은 제 2수준(5 g/L)까지 증가하다가 제 3수준은 제 2수준과 유사한 결과를 나타내었다. Glucose 함량은 수준이 증가할수록 항산화 활성을 향상시키는 결과를 나타내었다.

총 flavonoid 함량에 대한 각 요인들의 수준별 효과는 Fig. 7

Table 2. Taguchi experiment design matrix with three variables and the responses of cell yield, free radical scavenging activity and total flavonoid assigned to each run

Runs	Variables ¹			Cell yield					Free radical scavenging activity					Total flavonoid				
	X ₁	X ₂	X ₃	Log ₁₀ (CFU/mL)				SN ²	Ascorbic acid μ M equivalent				SN	Quercetin mg/mL equivalent				SN
				C ₁	C ₂	C ₃	Mean		A ₁	A ₂	A ₃	Mean		F ₁	F ₂	F ₃	Mean	
1	1	1	1	9.41	9.28	9.45	9.38	19.44	0.25	0.24	0.24	0.24	-12.32	1.41	1.63	1.44	1.49	3.43
2	1	2	2	9.15	9.34	9.20	9.23	19.30	0.25	0.28	0.29	0.28	-11.25	1.39	1.59	1.61	1.53	3.63
3	1	3	3	9.43	9.45	9.51	9.46	19.52	0.27	0.29	0.31	0.29	-10.88	1.70	1.88	1.75	1.78	4.97
4	2	1	2	9.64	9.69	9.56	9.63	19.67	0.25	0.26	0.27	0.26	-11.70	1.81	1.90	1.92	1.88	5.46
5	2	2	3	9.52	9.54	9.43	9.50	19.55	0.31	0.34	0.33	0.33	-9.78	1.93	2.05	1.97	1.99	5.95
6	2	3	1	9.56	9.63	9.69	9.63	19.67	0.29	0.29	0.29	0.29	-10.76	1.97	2.11	2.04	2.04	6.19
7	3	1	3	9.38	9.38	9.23	9.33	19.40	0.31	0.30	0.30	0.30	-10.42	1.81	1.90	1.90	1.87	5.42
8	3	2	1	9.53	9.48	9.46	9.49	19.55	0.29	0.29	0.30	0.29	-10.66	1.85	1.89	1.91	1.89	5.51
9	3	3	2	9.65	9.65	9.60	9.64	19.68	0.31	0.32	0.31	0.31	-10.11	1.94	1.93	2.04	1.97	5.88

¹ Factors used for variables and the conditions related to each levels were represented in Table 1.

² SN means signal to noise ration which is calculated by the equation of larger-the-best characteristics in MINITAB version 14 program.

Table 3. Analysis of variance for the results from Taguchi experiment design

Responses	Sources	DF	SS	MS	F	P
Cell yield	Incubation time	2	0.234	0.117	13.55	<0.001
	Sucrose	2	0.139	0.069	8.04	0.003
	Glucose	2	0.028	0.014	1.67	0.214
	Error	20	0.173	0.009		
	Total	26	0.574			
Free radical scavenging activity	Incubation time	2	0.006	0.003	13.92	<0.001
	Sucrose	2	0.005	0.003	12.81	<0.001
	Glucose	2	0.004	0.002	10.73	0.001
	Error	20	0.004	0.001		
	Total	26	0.019			
Total flavonoid	Incubation time	2	0.702	0.351	58.26	<0.001
	Sucrose	2	0.160	0.080	13.31	<0.001
	Glucose	2	0.037	0.018	3.08	0.068
	Error	20	0.121	0.006		
	Total	26	1.020			

에서 보는 것과 같다. 배양 시간은 16시간인 제 2수준까지는 증가하다가, 이후에는 큰 변화를 나타내지 않았다. Sucrose 함량은 그 수준이 증가할수록 총 flavonoid 함량이 증가하는 결

과를 나타내었고, glucose 함량은 제 1수준과 제 2수준은 서로 유사한 효과를 나타내었으나, 제 3수준에서 총 flavonoid 함량이 크게 증가하였다.

결론

본 연구는 항산화 활성과 총 flavonoid 함량이 높은 발효 자몽 추출물 생산을 위한 발효 조건 개발을 위하여 수행되었다. *Lactobacillus plantarum* KCTC3104, *Lactobacillus brevis* KCTC 3102, *Weissella cibaria* KCTC3746, *Leuconostoc citreum* KCTC 3526 및 *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505를 이용하여 자몽을 발효시킨 후, 세포성장 및 발효자몽 추출물의

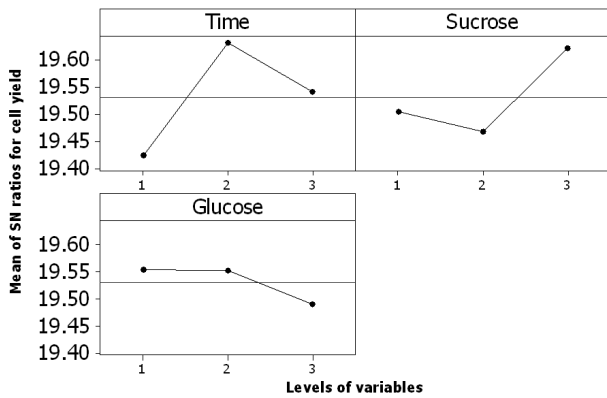


Fig. 5. Mean of SN ratios from the effects of medium ingredients and incubation times on the cell yield during the fermentation of grapefruit with *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505. SN ratios were calculated by using larger-the-best characteristics. The numbers denoted on x-axis mean the levels of each variable and the conditions assigned to each level of variables were represented in Table 1.

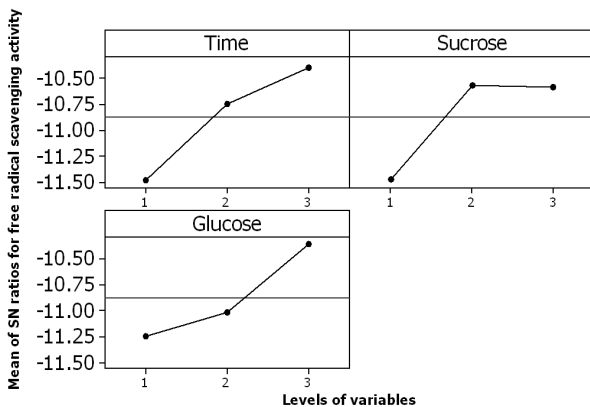


Fig. 6. Mean of SN ratios from the effects of medium ingredients and incubation times on free radical scavenging activity during the fermentation of grapefruit with *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505. SN ratios were calculated by using larger-the-best characteristics. The numbers denoted on x-axis mean the levels of each variable and the conditions assigned to each level of variables were represented in Table 1.

항산화활성과 총 flavonoid 함량을 조사하여 우수한 균주를 선발하였다. 그 결과, *L. mesenteroides* KCTC3505가 자몽 발효에 있어 가장 적합한 균주로 나타났다. 이 후 배지에 첨가할 수 있는 자몽의 함량을 조사하였으며, 자몽 함량 70%에서 균체 성장 및 발효자몽 추출물의 항산화 활성과 총 flavonoid 함량이 높게 나타났다. *L. mesenteroides* KCTC3505를 이용한 자몽 발효에 있어 배양시간, 배지 내 sucrose 및 glucose 함량이 세포 성장 및 발효자몽 추출물의 항산화 활성과 총 flavonoid 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, sodium acetate 1 g/L, NaCl 1 g/L, dipotassium phosphate 0.1 g/L 및 magnesium sulfate 0.01 g/L를 포함하는 기초배지에, sucrose와 glucose를 각각 10 g/L씩 첨가시킨 최종배지에서 16시간 동안 배양할 경우에 가장 우수한 총 flavonoid 함량의 증가 효과를 얻을 수 있었다. 또한 위 조건으로 자몽을 발효시키게 되면 pH는 4.0 이하로 낮아지게 된다. 또한 발효 과정을 통하여 자몽 배지가 gel 상태로 변화되는 것을 관찰할 수 있다(Fig. 8).

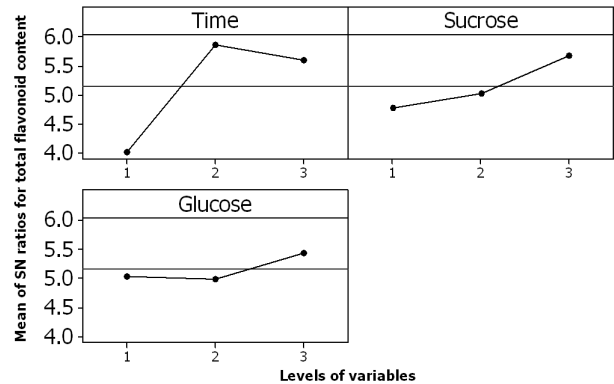


Fig. 7. Mean of SN ratios from the effects of medium ingredients and incubation times on total flavonoid content during the fermentation of grapefruit with *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505. SN ratios were calculated by using larger-the-best characteristics. The numbers denoted on x-axis mean the levels of each variable and the conditions assigned to each level of variables were represented in Table 1.



Fig. 8. Picture of fermented grapefruit extract after fermentation.

감사의 글

본 논문은 중부대학교 2009년도 교내연구개발비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 문수백 (2010) 구조방정식모델링의 이해와 적용. 학지사, 서울. pp 84-85.
- 배석주 (2008) 이공학도를 위한 확률과 통계. CENGAGE Learning, 서울. pp 206-207.
- 이승훈 (2008) 공학통계 자료분석. 이레테크, 경기도. pp 825-935.
- Bertrand A, Morel S, Lefoulon F, Rolland Y, Monsan P, Remaud-Simon M (2006) *Leuconostoc mesenteroides* glucan-sucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents. *Carbohydr Res* 341: 855-863.
- Chang WK, Cho SB, Kim DW, Lee SS, Kim SK (2010) Cell growth and antioxidant activity on onion juice fermentation by using *Lactobacillus plantarum* as animal probiotics. *J Life Sci* 20: 1729-1737.
- Cho J, Lee D, Yang C, Jeon J, Kim J, Han H (2006) Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiol Lett* 257: 262-267.
- de Castro A, Montañó A, Sánchez AH, Rejano L (1998) Lactic acid fermentation and storage of blanched garlic. *Int J Food Microbiol* 39: 205-211.
- Dols M, Chraibi W, Remaud-Simeon M, Lindley N, Monsan P (1997) Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Appl Environ Microbiol* 63: 2159-2165.
- Igual M, Garcí-Martíez E, Camacho MM, Martíez-Navarrete N (2011) Changes in flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage. *Innovative Food Sci Emerg Technol* 12: 153-162.
- Juan MY, Chou CC (2009) Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food Microbiol* 27: 586-591.
- Lee SB, Kim YS, Yoon S (2010) The development of Taguchi and response surface model combined model. *IE Interfaces* 23: 257-263.
- Lim P, Yang GE (2006) Optimal cutting conditions of tool life in the high speed machining by Taguchi design of experiments. *J of KSMPE* 5: 59-64.
- Peterson J, Dwyer J (1998) Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res* 18: 1995-2018.
- Rabelo MC, Fontes CPML, Rodrigues S (2009) Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. *Biores Technol* 100: 5574-5580.
- Sato E, Kohno M, Hamano H, Niwano Y (2006) Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. *Plant Foods for Human Nutrition* 61: 157-160.
- Vanamala J, Reddivari L, Yoo KS, Pike LM, Patil BS (2006) Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. *J Food Compos Anal* 19: 157-166.
- Yu J, Wang L, Walzem RL, Miller EG, Pike LM, Patil BS (2005) Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *J Agric Food Chem* 53: 2009-2014.

접 수: 2011년 6월 16일
 최종수정: 2011년 9월 6일
 채 택: 2011년 9월 19일