

최 종
연구보고서

현대인의 기호에 맞는 전통안동식혜의 다양화 제품 개발

Development of Diverse Traditional Andong sikhe Suit for
Present Generation's Taste

연 구 기 관

주관연구기관 : 아시아대학교

협동연구기관 : 영남대학교

위탁연구기관 : 한국식품연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “현대인의 기호에 맞는 전통안동식혜의 다양화 제품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 7월 14일

주관연구기관명 : 아시아대학교

총괄연구책임자 : 김 성

세부연구책임자 : 김 성

연 구 원 : 손 준 호

연 구 원 : 윤 혜 정

협동연구기관명 : 영남대학교

협동연구책임자 : 최 청, 김 상 달

연 구 원 : 최 희 진

연 구 원 : 박 정 혜

위탁연구기관명 : 한국식품연구원

위탁연구책임자 : 김 현 구

책 임 연 구 원 : 홍 석 산

책 임 연 구 원 : 하 태 열

책 임 연 구 원 : 한 찬 규

선 임 연 구 원 : 도 정 룡

연 구 원 : 안 지 윤

위 축 연 구 원 : 나 경 민

위 축 연 구 원 : 한 호 석

요 약 문

I. 제목

현대인의 기호에 맞는 전통안동식혜의 다양화 제품개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

전통음료의 하나인 전통안동식혜는 일반식혜제조 및 원료가 다른 경북 안동지방 향토식품으로써 쌀 전분, 무, 고추가루, 생강 및 엿기름을 원료로 하여 숙성한 맛과 향이 잘 조화된 정장작용을 갖는 전통 기호젓산음료 식품이었다. 안동을 중심으로 경북 북부지방의 기호식품으로 국민소득과 문화수준의 향상에 따른 식생활 양식의 개선에 수반되어 점차 감소되어 가는 추세이며 더구나 이들 전통적인 제조법은 고령 주부들에 의하여 민속절을 중심으로 제조되고 있다. 점차 사라져 가는 전통안동식혜의 제법을 계승, 보존하고 외국 농산물에 대응하여 국내 농산물의 부가가치 향상 및 전통식품의 재조명이 요구되고 있는 상황에서 전통안동식혜의 제조기술 향상 및 공정표준화를 통하여 현대인의 입맛에 맞는 전통안동식혜 제품의 다양화에 관하여 제품 및 생산기술의 기반확보가 필요하다.

이에 본 연구의 목적은 점차 사라져 가는 우리 고유의 전통발효 식품인 전통안동식혜의 전통적인 제법을 과학화하여 계승, 보존하고 그 품질향상을 도모하여 국민건강 증진 및 농어민 소득 증대 및 쌀 소비 촉진을 위하여 젓산균과 효모를 분리·동정하여 이들 균주간의 배양특성을 조사하여 단독발효 및 혼합발효를 통하여 가장 이상적인 전통안동식혜의 제조공정 및 표준화를 연구·검토하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 주요 내용은 전통안동식혜로부터 생리기능 물질의 생리활성검증 및 향

암효과, 발효에 관여하는 미생물의 분리 및 동정 및 생약재가 첨가된 기능성 음료의 개발의 세 가지 연구분야로 이루어졌으며, 각 연구분야의 내용과 범위는 다음과 같다.

1차년도

제 1 세부과제 : 전통안동식혜의 생리기능 물질의 생리활성검증 및 항암효과

1. 생리활성물질의 분리
2. 효소저해 활성측정
 - 1) ACE 저해효과
 - 2) Xanthine oxidase 저해효과
 - 3) Tyrosinase 저해효과
3. 암세포주에 대한 항암효과
 - 1) 마우스 암세포에 의한 cytotoxicity 검색
 - 2) 사람유래 암세포주(뇌암, 간암, 신장암, 유방암 세포)에 대한 cytotoxicity 검색

제 2 세부과제 : 전통안동식혜의 발효에 관여하는 미생물의 분리 및 동정

1. 발효용 전통안동식혜의 제조
 - 1) 성분분석
 - 일반성분
2. 젖산균의 순수분리 및 동정
 - 1) 젖산균의 순수분리 및 동정
 - 2) 성장특성
3. 효모의 순수분리 및 동정
 - 1) 효모의 순수분리 및 동정
 - 2) 성장특성

제 3 세부과제 : 생약재가 첨가된 기능성 전통안동식혜의 제조조건 확립

1. 생약재 적정 추출조건 설정
2. 전통안동식혜 제조시 필요한 부재료인 생약류의 선발(황기, 계피, 대추, 건강, 당귀 등)
3. 국내생산량이 많고 저렴한 생약류의 선발
4. 생약류 추출을 위한 전처리 조건 검토
5. 생약류 추출물 농축방법 검토

2차년도

제 4 세부과제 : 생리활성 물질의 superoxide dismutase 활성화 및 항암·암예방효과

1. 암세포주에 대한 항암효과
 - 1) MTT assay에 의한 항암효과 측정
 - Cytotoxicity of breast cancer cells
 - Cytotoxicity of liver cancer cell
 - Cytotoxicity of colon cancer cell
2. *In vitro*에서 암예방(chemoprevention)효과에 대한 검색
 - 1) 항산화 Phase II enzymes 활성 측정
 - Quinone reductase (QR)
 - Glutathione S-transferase (GST)
 - Glutathione (GSH)

제 5 세부과제 : Starter를 이용한 안동식혜 제조

1. Starter를 이용한 안동식혜 제조
 - 1) 제법을 달리한 식혜의 발효

- 2) 젖산균 및 효모의 단독발효
- 3) 젖산균의 효모의 혼합발효
- 4) 젖산균과 젖산균의 혼합발효
2. 성분분석
 - 1) 일반성분
 - 2) 알코올 및 유리당
 - 3) 비휘발성 유기산
 - 4) 지방산
 - 5) 질소화합물
 - 6) 유리 아미노산
 - 7) 수용성 및 염용성 단백질의 아미노산
3. 효소활성 변화
 - 1) Protease
 - 2) 액화효소
 - 3) 당화효소
4. 관능검사
5. Starter를 이용한 표준화 공정

제 6 세부과제 : 생약재가 첨가된 기능성 전통안동식혜의 제조조건 확립

1. 전통안동식혜 제조를 위한 전처리 조건 검토
2. 생약재가 보강된 음료의 제조
3. 기호성 증진을 위한 적정 배합비 결정
4. 신선도 저하 방지를 위한 음료의 살균조건 검토
5. 기능성 전통안동식혜 제조공정 확립 및 식혜 제조

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1) 전통안동식혜의 생리기능 물질의 생리활성검증 및 항암효과

본 연구에서는 전통안동식혜의 생리기능 물질의 생리활성 검증 및 항암효과를 검토하기 위하여 효소활성측정, 암세포주에 대한 항암효과 및 *in vitro*에서 암예방 효과를 검토하였다.

고혈압 저해능을 보기 위하여 ACE에 대한 저해능을 살펴본 결과 각각의 분획물, 즉 hexane, ethyl acetate, butanol, water층에서 9.5%, 13.3%, 30.0%, 6.3%의 순으로 나타나 부탄올층에서 가장 높은 저해능을 나타내었다. 각 분획별 tyrosinase 저해 효과는 ethyl acetate, heaxan 및 water층 동일하게 10% 전후의 낮은 저해효과를 나타내어 안동식혜에서는 melanin 합성에 관여하는 tyrosinase에 대한 저해능은 약한 것으로 나타났다.

Superoxide dismutase(SOD) 항산화효소 활성 측정 결과 hexane 및 water분획에서는 낮은 활성을 나타내었으나, ethyl acetate와 butanol 층에서 30%의 높은 활성을 나타내었다. 항산화 활성 및 활성 산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있는 전자공여능은 ethyl acetate 층에서만 유일하게 1,000 ppm에서 27% 정도의 공여능을 나타내었다.

암세포에 대한 전통안동식혜의 세포증식 억제율을 측정하였다. 암세포 SK-MEL-2(Malignant melanoma), SK-MEL-31 (Malignant melanoma)에 대한 저해율은 시료의 농도가 증가함에 따라 세포증식 억제율이 유의적으로 증가하였으며, 1,000 ppm에서 모두 20%이상의 성장 저해가 나타났다. 또한 유선암(MDA-MB-231), 간암(Hep G2), 대장암(HT-29)에 대한 암세포 증식 억제율은 1ppm의 시료농도에서

는 낮은 억제율을 나타내었으나 1,000ppm에서는 20~30%의 생장 저해를 나타내었다.

*In vitro*에서 암예방 효과를 측정하기 위하여 quinine reductase(QR), glutathione S-transferase(GST), glutathione(GSH)의 활성을 측정하였다. QR 활성 유도능의 경우 안동식혜 추출물, 생강 추출물 그리고 고추 추출물에서 100ppm 농도에서 10ppm 농도의 경우보다 3배 가량 증가 하였으며, 안동식혜 추출물이 다소 높은 활성을 나타내었다. GST 활성 측정결과 시료 1ppm에서 1000ppm의 농도에서 안동식혜 추출물은 2.5배의 유도 효과를 나타내었으나, 부재료인 생강, 고추 등은 1.6배의 유도효과를 나타내었다. 또한 GSH 생성량 측정 결과 안동식혜 추출물 및 부재료 추출물에서는 1.0배의 유도 효과를 나타내었다.

2) 전통안동식혜의 발효에 관여하는 미생물의 분리 및 동정

전통안동식혜의 제조법을 계승 보존하고 제조 공정 및 상품성을 높여 보다 우수한 가공식품으로 개발할 목적으로 식혜제조시 식혜의 발효에 관여하는 젖산균과 효모를 분리하여 starter로 접종하여 식혜를 숙성시키면서 성분 및 품질변화를 살펴봄으로서 발효를 촉진시키고, 발효숙성의 조기화, 제품의 균일화 가능성을 검토하였다.

전통안동식혜로부터 분리·동정된 균주는 젖산균주로서는 *Lac. bulgaricus* SML 47, *Lac. acidophilus* SML 10 및 *Lc. lactis* SEC 56의 3균주와 효모 *S. cerevisiae* SY5 1종을 분리하여 starter로 사용하였다.

Lactobacilli는 MRS broth, Lactococci는 Elliker broth, 효모는 malt extract broth에 각각 1.0%(v/v)의 종균을 접종하여 pH, 적정산도 및 세포수의 변화를 관찰한 결과 *Lc. lactis* SEC 56이 배양 4시간에 pH 4.50으로 가장 낮았으며 적정산도의 변화는 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10의 적정산도의 변화는 48시간 배양결과 배양 초기 0.40~2.30%로 *Lc. lactis* SEC 56보다 큰 변화를 나타내었다. *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10의 세균성장변화는 두 균주 모두 배양 20시간대에 1.7×10^9 cfu/mL로 성장 정지기에 도달하였다. *Lc. lactis* SEC

56은 배양 12시간에 4.8×10^6 cfu/mL로 정지기에 도달하여 *Lc. lactis* SEC 56이 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10에 비해 세균성장은 유사하였으나 세포수에 있어서는 낮은 결과를 나타내었다.

효모의 적정성장온도는 30℃에서 가장 높게 나타났다. pH와 적정산도의 변화는 배양 12시간에 pH 4.50과 적정산도 1.23%의 빠른 산생성을 보였으며, 세포수의 변화는 배양 32시간에 4.9×10^9 cfu/mL로 세포의 성장정지기에 도달하였다.

처리방법을 달리한 식혜의 pH변화는 처리구 모두 초기숙성기인 2일에서 3일 사이에 적정산도의 변화가 크게 나타났으며 전통제법에 의한 시험구가 가장 낮은 pH 3.52를 나타냈다. 적정산도의 변화는 초기 숙성일 2일에서 3일 사이에 쌀을 제외한 모든 재료를 균질처리한 시험구가 0.80%에서 0.84%로 높게 나타났으며 저온 살균처리한 구는 0.40%에서 0.42%로 가장 낮게 나타났다.

세포수의 변화는 전통제법에 의한 시험구는 초기숙성 1일째 4.9×10^7 cfu/mL, 2일째 1.4×10^6 cfu/mL로 나타났으며, 달리 처리한 3구의 시험구는 저장 4일째 1.0×10^6 cfu/mL에서 3.5×10^4 cfu/mL로 세포수의 급격한 감소를 나타내었다.

식혜에서의 젖산균 및 효모의 단독 발효에서 젖산균 중 *Lc. lactis* SEC 56을 접종한 구가 pH 4.40으로 가장 낮게 나타났다. *S. cerevisiae* SY 5는 *Lac. bulgaricus* SML 47와 *Lac. acidophilus* SML 10 처리구에 비해 pH는 가장 높은 결과를 보였다. 적정산도의 변화는 숙성 2일과 3일째에 *Lc. lactis* SEC 56은 0.40%에서 0.41%로 가장 높게 나타났고 *S. cerevisiae* ST 5는 숙성 2일째 0.25%에서 3일째 0.18%로 급격한 변화를 나타내었다.

세포수의 변화는 *Lc. lactis* SEC 56이 초기숙성 1일에서 2일째 2.4×10^9 cfu/mL, 1.9×10^9 cfu/mL로 나타났으며 *S. cerevisiae* SY 5는 숙성 1일째 6.2×10^6 cfu/mL의 세포수를 보이었는데가 숙성 4일째 7.9×10^3 cfu/mL로 급격한 변화를 나타내었다.

식혜제조시 젖산균과 효모의 혼합발효에서 *Lac. bulgaricus* SML 47와 *S. cerevisiae* SY 5를 혼합접종한 경우는 초기숙성 3일에 pH 3.58과 적정산도 0.44%로 *Lac. acidophilus* SML 10과 *S. cerevisiae* SY 5를 혼합접종한 경우보다는 pH는 높게 적정산도는 낮게 나타났으며, *Lc. lactis* SEC 56과 *S. cerevisiae* SY5를 혼합

접종한 구보다는 낮게 적정산도는 높은 결과를 보였다.

세포수의 변화는 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *S. cerevisiae* SY 5의 혼합접종구에서 숙성 3일에 5.0×10^8 cfu/mL로 세포의 성장정지기에 *Lac. acidophilus* SML 10과 *S. cerevisiae* SY 5의 혼합 접종구는 숙성 3일에 1.2×10^9 cfu/mL로 *Lc. lactis* SEC 56과 *S. cerevisiae* SY 5의 혼합 접종구는 3일째 3.4×10^8 cfu/mL보다 높은 세포수의 최대를 나타내었다.

식혜제조시 젖산균과 젖산균의 혼합발효에서 *Lac. bulgaricus* SML 47와 *Lc. lactis* SEC 56을 혼합 발효하였을 경우 저장 3일에는 pH 4.02, 4일에 pH 4.01로 높은 변화를 보였으며 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10의 혼합발효경우 저장 3일에 pH 3.49로 pH가 높게 나타났다.

세포수의 변화는 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10에 의한 혼합 발효시 저장초기에는 6.9×10^6 cfu/mL로 3개의 시험구보다 높은 세포수를 나타내었으나 저장 5일에 8.3×10^1 cfu/mL로 다른 시험구에 비하여 세포수가 가장 낮게 나타내었다. *Lac. bulgaricus* SML 47, *Lac. acidophilus* SML 10과 *Lc. lactis* SEC 56에 의한 혼합발효시에는 초기 5.4×10^4 cfu/mL, 1.3×10^4 cfu/mL에서 저장 5일에 5.2×10^2 cfu/mL, 2.8×10^2 cfu/mL로 급격한 세포수의 변화를 나타내었다.

관능검사 결과 LB+SC군에 LB 0.5%와 SC 0.5%를 혼합하여 1.0%(v/v)를 접종했을 경우에 가장 좋은 성적을 얻었다. 이상의 젖산균과 효모를 이용한 단독발효 및 혼합발효에 의한 안동식혜를 제조한 후 관능검사를 실시한 결과 조단백질, 당도 및 산도가 잘 조화된 젖산균주 *Lac. bulgaricus* SML 47과 효모 *S. cerevisiae* SY 5에 의한 혼합발효가 가장 좋은 성적을 나타내었다.

숙성기간동안 일반 성분의 변화는 조단백질의 함량은 주발효기간인 4일까지는 증가하였으나 그 이후로는 차차 감소하였고 pH는 급격히 감소하여 2일째 4.02, 3일째 3.87이었으며 적정산도는 1일과 2일째 0.43%로 가장 높게 나타났으며, 유리당의 조성은 maltose를 포함한 6종류였으며 미확인 물질도 1개 검출되었다. Maltose의 함량은 4일까지 증가하여 76.34%였으나 그 후로는 감소하였다. 지방산 조성은 linoleic, palmitic 및 oleic acid가 주요 지방산으로 총지방산의 90%를 차지하였다. 아미노태질소는 시간이 경과할수록 증가하였으며 2일째 37.50mg였으며 이때 식혜의 맛이 가장

좋았다. 수용성 및 염용성 단백질은 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다. 주요 아미노산은 proline 및 aspartic acid였으며 methionine은 시간이 경과함에 따라 점차 증가하였으나 lysine은 감소하였다. 수용성 및 염용성 단백질의 아미노산 조성은 glutamine acid 및 aspartic acid의 함량이 가장 많았다. 염용해성 단백질의 경우 arginine은 시간이 경과함에 따라 점차 증가하였다. 효소의 활성은 acid protease는 숙성 4일째 liquefying amylase는 숙성 3일째 saccharogenic amylase와 lipase는 숙성 2일째 가장 높았다.

안정제의 침전 억제 효과는 Na-Alginate가 가장 우수하였다. 침전 안정제를 넣어서 관능 검사를 한 결과 균질화 하지 않은 식혜의 경우는 Na-alginate는 0.1에서 0.15% 처리했을 때 carrageenan은 0.05%첨가했을 때 가장 맛이 우수하였으며 식품 안정제의 종류 및 첨가 농도간의 상호 효과는 침전 효과는 침전 안정제의 종류간에는 통계적 유의성이 없으나 첨가 농도간에는 유의성이 있었다. 식혜의 현탁안정성을 증진시킬 목적으로 안정제를 첨가하여 숙성시켰을 때 CMC, Na-alginate은 2일째 Carrageenan은 비균질화 식혜는 2일에서 4일째 균질화한 식혜는 1일째 최고의 점도를 나타내었다.

Lactobacillus bulgaricus SML 47과 *Saccharomyces cerevisiae* SY 5를 혼합발효하여 각각 0.5%(v/v)를 접종하여 안동 식혜의 제조시 발효초기에는 젖산균이 숙성 2일 이후부터는 효모의 증식이 급격히 성장함으로 해서 숙성이 빨라 제조 시간이 단축되고 상품의 균일성이 있으며 관능검사 결과 맛도 좋았다.

3) 생약재가 첨가된 기능성 전통안동식혜의 개발

본 실험의 재료인 생약재로는 감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 등의 8가지 생약재를 선정하였으며, 생약재의 추출방법 및 water와의 비율을 결정하기 위하여 생약재에 대한 water의 비율을 8배, 10배, 12배, 14배로 달리하여 환류냉각 추출장치로 가열 추출하면서 시간대 별로 추출되어 나오는 가용성 고형분량을 측정하여 추출 수율을 비교하였다. 생약재에 대한 water의 비율이 10배일 때 추출수율이 가장 우수한 것으로 나타났다. water, 50% ethanol, 75% ethanol을 각각

가하여 3시간 동안 추출하면서 가용성 고형분량의 변화를 측정하였으며, 그 결과 water 추출시는 모든 생약재에서 높은 가용성 고형분량을 나타내었다.

8가지 생약재 추출액의 생리활성을 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 모든 생약재가 50% ethanol 추출액에서 가장 높았으며, 구기자 추출액이 가장 많은 함량을 나타내었다. 전자공여 작용은 감초의 50% ethanol 추출액이 가장 우수하였으며, superoxide dismutase(SOD) 유사활성은 결명자가 가장 높은 활성을 보였다. 결명자, 건마늘, 건강은 50% ethanol 추출액이 다른 두 용매 보다 우수한 것으로 나타났고, 감초, 두충, 구기자, 오미자, 인삼은 water 추출액이 다른 용매에 비해 우수한 것으로 나타났다. 아질산염 소거작용은 pH가 증가할수록 소거율이 크게 감소하는 것으로 나타났다. 또한 용매별 소거능은 뚜렷한 차이를 보이지 않았지만 water 추출액이 다른 두 용매 추출액에 비해 소거능이 높은 것으로 나타났다. ACE 저해작용은 생약재 별로 큰 차이를 보이지 않았으나 두충은 다른 생약재들에 비해 낮은 저해율을 나타내었다. 용매별로는 50% ethanol 추출액이 다른 용매에 비해 ACE 저해활성이 우수한 것으로 나타났다.

생약재 혼합 기능성 전통안동식혜 개발에서 A type 식혜의 최종 배합비는 안동식혜가 6.0%, 두충 추출액 0.06%, 건강 추출액 0.03%, 구기자 추출액 0.3%, 설탕 4.0%, 구연산 0.1%, 물 89.60%로 제조되었으며, B type 식혜는 안동식혜 6.0%, 오미자 추출액 1.0%, 건마늘 추출액 0.15%, 인삼 추출액 0.24%, 설탕 5.0%, 구연산 0.05%, 물 87.61%로 제조하였다.

구기자 혼합음료 개발에서는 구기자 추출액 0.9%, 두충 추출액 0.09%, 결명자 추출액 0.16%, 건강 추출액 0.06%, 설탕 8.0%, 구연산 0.2%, 물 90.79%로 제조하였으며, 홍삼 혼합음료 개발에서는 홍삼 농축액 0.6%, 감초 추출액 0.24%, 오미자 추출액 0.12%, 건마늘 추출액 0.1%, 설탕 9.0%, 구연산 0.07%, 물 89.87%로 제조하였다.

2. 활용에 관한 건의

본 연구를 통하여 전통안동식혜의 생리활성 물질규명과 부가가치제고를 위한 가공제품 다양화 기술개발·생산함으로써 국민 식생활 개선과 보건향상에 기여할 수 있다. 본 연구를 통해서 전통안동식혜의 제조법을 계승 보존하고, 전통안동식혜 추출물의 항산화 효과 및 항암, 암 예방 효과를 검증함으로써 성인병 예방 및 신소재 식품으로써 홍보·활용한다. 또한 식혜의 발효에 관여하는 젖산균과 효모를 분리하여 starter로 접종·숙성함으로써 성분 및 품질 향상, 발효 촉진효과, 발효숙성의 조기화, 제품의 균일화를 도모한다.

산·학·연의 관련 전문 인력을 유기적으로 연결하여 전문 기술 인력의 양성과 연구 수행중에 수집한 고급정보와 기술은 국내 전통안동식혜의 생리활성물질 관련분야 정보의 데이터베이스로 활용할 수 있다. 2년간의 기반연구가 완료되었으므로 기업체와 협동연구를 통하여 대량생산을 위한 산업화에 대한 연구를 수행할 예정이다. 또한 상기의 생리적 효능이 있는 전통 안동 식혜를 이용한 제품화 기술을 산업체에 이전하여 제품화 할 수 있도록 표준화 공정 기술지원을 하여 상품화 할 수 있다. 또한 기능성 신소재로써 뿐만 아니라 고기능성 전통안동식혜 제품의 발명특허를 제출함으로써 산업재산권 확보를 할 계획이며, 전통안동식혜의 생리활성물질의 우수성을 적극적으로 홍보하여야 할 것이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Development of diverse traditional Andong *sikhe* suit for present generation's taste

II. Objectives and Importance of the project

One of the traditional beverage, Andong *sikhe*, is a regional food in Andong area, Kyungbuk-Do with different processing procedure and raw materials. The Andong *sikhe* was a traditional favorite lactic acid beverage with well-harmonized taste and odor using rice starch, radish, hot pepper powder, ginger, and malt. The production of taste food in the north area of Kyungbuk-Do including Andong has been gradually decreased by changes of people's eating habit and life style. Moreover, the methods for manufacturing traditional foods are only used by aged housewives at traditional ceremonies. Thus it is necessary to establish the foundation of the manufacturing technology for traditional foods, which has been disappeared. It is also needed a standardization of processing procedures and development of diverse products. From this effort, we could maintain our tradition and agriculture against foreign products.

Therefore, the objective of the present study was to establish and standardize the manufacturing process of a traditional Andong *sikhe* by purifying and isolating lactic acid bacteria and yeasts, investigating the characteristics of growth between these microorganisms, and comparing the single or combined fermentation techniques. This study will be helpful for enhancing a public health and welfare, for increasing a farmer's income, and also for promoting a rice

consume in our country.

III. Results of the Project

Section 1. Physiological Activities and Anticancer of Traditional Andong *sikhe* Extracts

This study was examined enzyme activity, *in vitro* cancer prevention effect and cancer cell week in order to investigate physiological active and anticancer of traditional Andong *sikhe*.

Angiotensin converting enzyme(ACE) inhibition effect, to see inhibition effect of high blood-pressure, it is showed 9.5%, 13.3%, 30.0% and 6.3% in hexane, ethyl acetate, butanol, water layer, respectively.

Tyrosinase inhibition effect of each fraction was approximately 10%, showed lower inhibition, so traditional Andong *sikhe* was low inhibition activity of tyrosinase

The superoxide dismutase(SOD) it showed a low activity of hexane and water layer, 30% high activity at ethyl acetate and butanol layer.

Electron donating ability(EDA), anti-oxidation and purging active oxygen, was about 27% activity at 1000 ppm only at ethyl acetate layer.

On the basis of the log phase cell concentration, the anti-cancer effect on the human cancer cell, SK-MEL-2(Malignant melanoma), SK-MEL-31(Malignant melanoma), breast cancer(MDA-MB-231), liver cancer(Hep G2), intestine cancer(HT-29) was detected using the traditional Andong *sikhe*. The inhibition against SK-MEL-2 (Malignant melanoma), SK-MEL-31 (Malignant melanoma) were increased significantly.

In order to measure cancer prevention effect, quinine reductase(QR), glutathione S-transferase(GST), glutathione(GSH) was determined. The GST active result was 2.5 times from 1ppm to 1000ppm, ginger, pepper etc were 1.6 times.

Section 2. Manufacture of Traditional Andong *sikhe* with Mixed Fermentation of Lactic Acid Bacteria and Yeast

The aim of this reserch is to select and develop a new lactic acid bacteria and yeast strain for manufacture of Andong sikhe.

The changes in life style today appear many ways. Many housewives turn away from home preparation of the time consuming traditional foods, such as □□ Andong sikhe□□. The importance, however, of succeeding the traditional cuisines is getting appreiated widely nowadays.

This study aimed to investigate of Andong sikhe by use of pure culture inoculation and the improvement of storage stability by the addition of stabilizers to the product. Microorganisms was selected for the pure culture inoculation in the fermentation. The changes in chemical composition such as total acidity, sugar content, amino acid and various forms of nitrogen during fermentation were determined. The changes in pH of the product, the enzyme activities and the population of lactic acid bacteria and yeast were also followed in the process of fermentation.

Microorganisms were collected to isolated from 4 kinds of traditional Andong sikhe. The optimal growth temperture of *sikhe* yeast No. SY 5 was 30°C and this also grew well in Andong sikhe of pH 4.5. SY5 produced CO₂ gas 15% of alcohol in malt extract broth. SY5 was identified as *S. cersvisiae* by

characterization of shape of vegetative reproduction, morphological and cultural characteristics, fermentation and assimilation of carbon sources, and physiological characteristics.

The crude protein content increased up to the 4th day of fermentation but slowly decreased thereafter.

The pH of the product rapidly decreased to 4.02 by the 2nd day of fermentation. The total acidity reached to the 0.43% by the 2nd day of fermentation and kept on increasing slowly during the fermentation. The free sugar consisted of 6 kinds including maltose and one unknown sugar.

The amino form nitrogen increased up to 37.50 mg% at the 2nd day of fermentation and the product tasted best at this time. The ammonia form nitrogen, water soluble and salt soluble protein decreased during fermentation.

Proline and aspartic acid were the two major free amino acids. The free methionine increased while the free lysine decreased in the process of fermentation. The major amino acids of water soluble and salt soluble protein were glutamic acid and aspartic acid. The arginine content of salt soluble protein increased as the fermentation proceeded.

Linoleic, palmitic and oleic acid were the three major fatty acids and occupy 90% or more of the total fatty acids. The activities of acid protease and liquefying amylase reached to the maximum at the 4th day of fermentation while those of saccharogenic amylase and lipase reached to the peak at the 2nd day of fermentation.

Among the stabilizers added to the traditional Andong sikhe the Na-alginate appeared to be the best. When the product was evaluated by the sensory panel, the addition of stabilizers up to 0.1% level actually increased the acceptability of the product, while the concentration of more than 0.2% stabilizers affected the acceptability of the negatively. The viscosity of the product fermented with the CMC and Na-alginate added reached to the maximum on the 2nd day of

fermentation, while that of the homogenized Andong sikhe fermented with Carrageenan reached to the peak on the first day of fermentation.

The lactic acid bacterial count reached to $4.7 \times 10^8/\text{mL}$ after 15 days of storage. The use of mixed culture inoculum of *Lac. bulgaricus* SML 47 and *S. cerevisiae* SY5 supported the rapid build up of the lactic acid bacteria and consequently the whole process of the fermentation was shortened. The acceptability and product quality were improved by the use of inoculum.

Section 3. Development of the Functional Traditional Andong Sikhe Containing Medicinal Plants Extracts.

This study was carried out to development of extraction technology for functional active components and determination of combination ratio for traditional beverage containing medicinal plants extracts.

The physiological activity of 8 kinds medicinal plants extracts were examined. Total polyphenol content showed highest value in 50% ethanol extracts. Electron donating ability showed highest value in 50% ethanol extracts of *Glycyrrhiza uralensis*. SOD-like activity showed highest activity in 50% ethanol extracts of *Cassia tora* L. Medicinal plants extracts showed different nitrite scavenging abilities under different pH conditions. Medicinal plants extracts showed highest value in nitrite scavenging ability at pH 1.2. The maximum nitrite scavenging effect was found at pH 1.2 and decreased as pH increased. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity showed highest value in 50% ethanol extracts.

Each of traditional beverages were made of four type combination ratios that were used of medicinal plants. Combination ratio of A type product on Sikhe was Andong sikhe (6.0%), *Eucommia ulmoides* ext.(0.06%), and dried ginger

ext.(6.7%), and that of B type product was Andong sikhe(6.0%), *Schiznadra chinensis* ext.(1.0%), dried *garlic* ext.(0.15%) and *Ginseng* ext.(0.24%). Combination ratio of A type product on medicinal plants was *Lycium chinense* ext.(0.9%), *Eucommia ulmoides* ext.(0.09%), dried *ginger* ext.(0.06%) and *Cassia tora L.* ext.(0.16%), and that of B type product was *red ginseng* conc.(0.6%), *Glycyrrhiza uralensis* ext.(0.24%), dried *garlic* ext.(13.72%) and *Schiznadra chinensis* ext.(0.2%).

CONTENTS

(영 문 목 차)

Abstract	2
Summary	13
I . Title	37
II . Goal and Importance of the research	41
III. Research contents and scope	49
1. Physiological activities and anticancer of traditional Andong <i>sikhe</i> extracts	49
2. Isolation and identification of fermented Andong <i>sikhe</i>	69
3. Optimum extraction condition of medicinal plants	89
4. Superoxide dismutase, anticancer and cancer prevention of physiological ingredients.	143
5. Andong <i>sikhe</i> fermentation using starter	157
6. Development of the traditional Andong <i>sikhe</i> containing medicinal plants extracts	219
IV. Results and their application	274
Chapter 1. Introduction	41
Chapter 2. The Present Technical State	47

Chapter 3. Materials and Results	49
Section 1. Physiological activities and anticancer of traditional Andong	
<i>Sikhe</i> extracts	49
1. Method and scope	49
A. Material	49
B. Enzyme inhibition effect measurement	49
1) Angiotensin converting enzyme(ACE) inhibition effect	49
2) Tyrosinase inhibition effect	50
3) Electron donating ability	50
4) Superoxide dismutase(SOD) ability	50
C. Anti cancer effect of cancer cell	51
1) Cell culture	51
2) Anticancer effect using MTT assay	51
D. Statistic	51
2. Results	53
A. Enzyme inhibition effect measurement	53
1) Angiotensin converting enzyme(ACE) inhibition effect	53
2) Tyrosinase inhibition effect	55
3) Electron donating ability	59
4) Superoxide dismutase(SOD) ability	61
B. Anti cancer effect of cancer cell	66
1) Anticancer effect using MTT assay	66
Section 2. Isolation and identification of fermented Andong <i>sikhe</i>	69
1. Method and scope	69
A. Materials	69
B. Componential analysis	69

1) General composition	69
C. Isolation of lactic acid bacteria	69
1) Lactic acid bacteria isolated from Andong <i>sikhe</i>	69
D. Isolation of <i>Sacchromyces cerevisiae</i>	70
1) <i>Sacchromyces cerevisiae</i> isolated from Andong <i>sikhe</i>	70
2) Morphological and culture characteristics	70
2. Results	73
A. Componential analysis	73
1) General composition	73
B. Isolation and Identification of lactic acid bacteria	73
1) Lactic acid bacteria isolation from Andong <i>sikhe</i>	73
2) Growth, pH and Titratable activity	74
C. Isolation and Identification of Yeast	81
1) Yeast isolation from Andong <i>sikhe</i>	81
2) Morphological and culture characteristics	85
 Section 3. Optimum extraction condition of medicinal plants	 89
1. Method and scope	89
A. Materials	89
B. Reflux extraction and extraction condition	89
C. Choice of Optimum extraction solvents	89
1) Water extraction	89
2) 50% ethanol extraction	89
3) 75% ethanol extraction	90
D. Properties of medicinal plants extract	90
1) Soluble solid	90
2) Turbidity	90
3) Color	90

4) Titratable acidity	90
5) Free sugar content	91
E. Measurement of physiological activity	91
1) Total polyphenol content	91
2) Electron donating abilities	91
3) Superoxide dismutase(SOD) activity	92
4) Nitrite scavenging activity	92
5) Angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory activity	93
2. Results	94
A. Determination of Optimum extraction solvent ratio	94
1) Water extraction	94
2) 50% ethanol extraction	98
3) 75% ethanol extraction	98
B. Properties of medicinal plants extract	105
1) Turbidity	105
2) Color	114
3) Titratable acidity	123
4) Free sugar content	123
C. Measurement of physiological activity	126
1) Total polyphenol content	126
2) Electron donating ability	128
3) Superoxide dismutase(SOD) activity	130
4) Nitrite scavenging activity	132
5) Angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory activity	141
 Section 4. Superoxide dismutase, anticancer and cancer prevention of	
physiological ingredients.	143
1. Method and scope	143

A. Materials	143
B. Anti cancer effect of cancer cell	143
1) Cell culture	143
2) Anticancer effect using MTT assay	143
C. <i>In vitro</i> preventing cancer	144
1) Antioxidative Phase II enzymes activity	144
(a) Quinone reductase	144
(b) Glutathione S-transferase	145
(c) Glutathione	145
2. Results	147
A. Anti cancer effect of cancer cell	147
B. <i>In vitro</i> preventing cancer	151
1) Antioxidative Phase II enzymes activity	151
(a) Quinone reductase	151
(b) Glutathione S-transferase	153
(c) Glutathione	155
Section 5. <i>Andong sikhe</i> fermentation using starter	157
1. Method and scope	157
A. Preparation of <i>Andong sikhe</i> using starter	157
1) <i>Andong sikhe</i> fermentation of different processing	157
2) Each single culture in <i>Andong sikhe</i>	157
3) Mixed culture of lactic acid bacteria and yeast in <i>Andong sikhe</i>	158
B. Componential analysis	158
1) General composition	158
2) Alcohol and free sugar	158
3) Organic acid	159
4) Fatty acid	159

5) Nitrogen compounds	160
6) Free amino acid	160
7) Amino acids of water soluble protein and salt soluble protein	160
C. Enzyme activity	167
1) Protease	167
2) Liquefying amylase	167
3) Saccharogenic amylase	167
4) Lipase	167
D. Stabilizing effect	167
1) Sedimentation	167
2) Viscosity	168
E. Standard processing	168
F. Sensory evaluation	168
2. Results	169
A. Preparation of Andong <i>sikhe</i> using starter	169
1) Andong <i>sikhe</i> fermentation of different processing	169
2) Each single culture in Andong <i>sikhe</i>	174
3) Mixed culture of lactic acid bacteria and yeast in Andong <i>sikhe</i>	178
4) Mixed culture of lactic acid bacteria and lactic acid bacteria in Andong <i>sikhe</i>	182
B. Componential analysis	186
1) General composition	186
2) Alcohol and free sugar	189
3) Organic acid	189
4) Fatty acid	190
5) Nitrogen compounds	195
6) Free amino acid	195
7) Amino acids of water soluble protein and salt soluble protein	195

C. Enzyme activity	201
D. Stabilizing effect	203
1) Sedimentation	203
2) Viscosity	211
E. Standard processing	214
F. Sensory evaluation	215

Section 6. Development of the traditional Andong *sikhe* containing

medicinal plants extracts	219
1. Method and scope	219
A. preparation of medicinal plants extracts	219
B. preparation of Andong <i>sikhe</i>	219
C. Determination of optimum concentration on main materials	221
1) preparation of <i>Sikhe</i> containing medicinal plants extracts	221
2) preparation of <i>Lycium chinense</i> beverage	221
3) preparation of <i>red ginseng</i> beverage	221
D. Choice of additional materials and determination of combination ratio	221
1) preparation of <i>Sikhe</i> containing medicinal plants extracts	221
(a) A type <i>Sikhe</i>	222
(b) B type <i>Sikhe</i>	222
2) preparation of <i>Lycium chinense</i> beverage	222
3) preparation of <i>red ginseng</i> beverage	222
E. Determination of optimum concentration on sugar	222
1) preparation of <i>Sikhe</i> containing medicinal plants extracts	222
2) preparation of <i>Lycium chinense</i> beverage	222
3) preparation of <i>red ginseng</i> beverage	223
F. Control of pH	223
1) preparation of <i>Sikhe</i> containing medicinal plants extracts	223

2) preparation of <i>Lycium chinense</i> beverage	223
3) preparation of <i>red ginseng</i> beverage	223
2. Results	224
A. preparation of <i>Sikhe</i> containing medicinal plants extracts	224
1) A type <i>Sikhe</i>	224
(a) Determination of optimum concentration on main materials	224
(b) Choice of additional materials and determination of combination ratio	226
(1) Determination of optimum concentration on <i>Eucommia</i> <i>ulmoides</i> extracts	226
(2) Determination of optimum concentration on dried ginger extracts	228
(3) Determination of optimum concentration on <i>Lycium</i> <i>chinense</i> extracts	230
(4) Determination of optimum concentration on sugar	232
(5) Final Combination ratio for preparation of Atype <i>Sikhe</i>	234
2) B type <i>Sikhe</i>	235
(a) Determination of optimum concentration on main materials	235
(b) Choice of additional materials and determination of combination ratio	237
(1) Determination of optimum concentration on <i>Schiznadra</i> <i>chinensis</i> extracts	237
(2) Determination of optimum concentration on dried <i>garlic</i> extracts	239
(3) Determination of optimum concentration on <i>Ginseng</i> extracts	241
(4) Determination of optimum concentration on sugar	243
(5) Final Combination ratio for preparation of B type <i>Sikhe</i>	245
B. Preparation of <i>Lycium chinense</i> beverage	246
1) Determination of optimum concentration on main materials	246
2) Choice of additional materials and determination of combination ratio	248
(a) Determination of optimum concentration on <i>Eucommia</i> <i>ulmoides</i> extracts	248

(b) Determination of optimum concentration on dried <i>ginger</i> extracts	250
(c) Determination of optimum concentration on <i>Cassia tora L.</i> extracts	252
(d) Determination of optimum concentration on sugar	254
(e) Determination of optimum concentration on citric acid for pH control	256
(f) Final Combination ratio for preparation of <i>Lycium chinense</i> beverage	258
C. Preparation of <i>red ginseng</i> beverage	259
1) Determination of optimum concentration on main materials	259
2) Choice of additional materials and determination of combination ratio	261
(a) Determination of optimum concentration on <i>Glycyrrhiza uralensis</i> extracts.	261
(b) Determination of optimum concentration on dried <i>garlic</i> extracts	263
(c) Determination of optimum concentration on <i>Schiznadra</i> <i>chinensis</i> extracts	265
(d) Determination of optimum concentration on sugar	267
(f) Final Combination ratio for preparation of <i>red ginseng</i> beverage	269
 Section 7. Conclusion	 271
 Chapter 4. Object achievement	 274
 Chapter 5. Application	 278
 Chapter 6. Technical information of foreign countries	 280
 Chapter 7. References	 282

목 차

요약문	2
영문요약문	13
서 론	37
제 1 장 연구개발 과제의 개요	41
제 1 절 연구개발의 목적	41
제 2 절 연구개발의 필요성	41
제 3 절 연구개발의 범위	44
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	47
제 1 절 국내외 관련 기술의 현황과 문제점	47
제 2 절 앞으로의 전망	48
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	49
제 1 절 전통안동식혜의 생리기능 물질의 생리활성검증 및 항암효과	49
1. 실험방법 및 연구내용	49
가. 실험재료	49
나. 효소저해 활성측정	49
1) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해효과	49
2) Tyrosinase 저해효과	50

3) 전자공여능(DPPH) 측정	50
4) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성	50
다. 암세포주에 대한 항암효과	51
1) 세포배양	51
2) MTT assay에 의한 항암 효과 측정	51
라. 통계처리	51
2. 연구개발 결과	53
가. 효소저해 활성측정	53
1) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해	53
2) Tyrosinase 저해효과	55
3) 전자공여능(DPPH) 측정	59
4) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정	61
나. 암세포주에 대한 항암효과	66
1) MTT assay에 의한 항암 효과 측정	66
 제 2 절 전통안동식혜의 발효에 관여하는 미생물의 분리 및 동정	69
 1. 실험방법 및 연구내용	69
가. 발효용 전통안동식혜의 제조	69
나. 성분 분석	69
1) 일반성분	69
다. 젖산균의 순수분리 및 동정	69
1) 젖산균의 순수분리 및 동정	69
라. 효모의 순수분리 및 동정	70
1) 분리균의 동정	70
2) 성장 특성	70
 2. 연구개발 결과	73
가. 성분분석	73

1) 일반성분	73
나. 젖산균의 순수분리 및 동정	73
1) 순수분리 및 동정	73
2) 균수 측정, pH 및 적정산도	74
다. 효모의 순수분리 및 동정	81
1) 분리균의 동정	81
2) 분리균의 특성	85
 제 3 절 생약재가 첨가된 기능성 전통안동식혜의 제조 조건 확립	89
 1. 실험방법 및 연구내용	89
가. 실험재료	89
나. 생약재 적정 추출조건 설정	89
1) 환류냉각 추출 장치 및 추출 조건	89
다. 적정 용매 선정	89
1) 열수 추출	89
2) 50% ethanol 추출	89
3) 75% ethanol 추출	90
라. 생약재 추출액의 이화학적 분석	90
1) 가용성 고형분 측정	90
2) 탁도 측정	90
3) 색도 측정	90
4) 산도 측정	90
5) 유리당 함량	91
마. 생리활성 성분측정	91
1) 총 폴리페놀 함량 측정	91
2) 전자공여작용 측정	91
3) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성	92

4) 아질산염 소거작용 측정	92
5) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해작용 측정	93
2. 연구개발 결과	94
가. 생약재의 적정 추출조건 설정	94
1) 적정 추출 용매비 결정	94
2) 적정 추출 용매결정	98
가) 열수 추출	98
나) 50% ethanol 추출	98
다) 75% ethanol 추출	98
나. 생약재 추출액의 이화학적 분석	105
1) 탁도	105
2) 색도	114
3) 산도	123
4) 유리당 함량	123
다. 생리활성 성분	126
1) 총 폴리페놀함량	126
2) 전자공여 작용	128
3) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성	130
4) 아질산염 소거작용	132
5) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 작용	141
 제 4 절 생리활성 물질의 superoxide dismutase 활성화 및 항암·암예방효과	143
 1. 실험방법 및 연구내용	143
가. 실험재료	143
나. 암세포주에 대한 항암효과	143
1) 세포배양	143
2) MTT assay에 의한 항암효과 측정	143

다. <i>In vitro</i> 에서 암예방효과에 대한 검색	144
1) 항산화 Phase II enzymes 활성 측정	144
가) Quinone reductase(QR) 활성 측정	144
나) Glutathione S- transferase 활성 측정	145
다) Glutathione(GSH) 활성 측정	145
2. 연구개발 결과	147
가. 암세포주에 대한 항암효과	147
나. <i>In vitro</i> 에서 암예방효과에 대한 검색	151
1) 항산화 Phase II enzymes 활성 측정	151
가) Quinone reductase(QR) 활성 측정	151
나) Glutathione S- transferase 활성 측정	153
다) Glutathione(GSH) 활성 측정	155
 제 5 절 Starter를 이용한 안동식혜 제조	157
 1. 실험방법 및 연구내용	157
가. Starter를 이용한 안동식혜 제조	157
1) 제법을 달리한 식혜의 발효	157
2) 젖산균 및 효모의 단독발효	157
3) 젖산균과 효모의 혼합발효	158
나. 성분 분석	158
1) 일반성분	158
2) 알코올 및 유리당	158
3) 비휘발성 유기산	159
4) 지방산	159
5) 단백질 분리 및 정량	160
6) 유리 아미노산	160
7) 수용성 및 염용해성 단백질의 아미노산 분석	160

다. 효소활성 측정	167
1) Protease	167
2) Liquefying amylase	167
3) Saccharogenic amylase	167
4) Lipase	167
라. 저장 안정성	167
1) 안정제에 의한 침전억제 효과	167
2) 점도 측정	168
마. 안동식혜 공정의 표준화	168
바. 관능검사	168
2. 연구개발 결과	169
가. Starter를 이용한 안동식혜 제조	169
1) 제법을 달리한 식혜의 발효	169
2) 젖산균 및 효모의 단독발효	174
3) 젖산균과 효모의 혼합발효	178
4) 젖산균과 젖산균의 혼합발효	182
나. 성분 분석	186
1) 일반성분	186
2) 알코올 및 유리당	189
3) 비휘발성 유기산	189
4) 지방산	190
5) 질소화합물	195
6) 유리 아미노산	195
7) 수용성 및 염용해성 단백질의 아미노산 분석	195
다. 효소활성의 변화	201
라. 저장안정성	203
1) 안정제에 의한 침전억제 효과	203
2) 점도 측정	211

마. 안동식혜 공정의 표준화	214
바. 관능검사	215
제 6 절 생약재 혼합 전통안동식혜의 개발	219
1. 실험방법 및 연구내용	219
가. 생약재 추출	219
나. 안동식혜 제조	219
다. 주재료의 적정 음용 농도 결정	221
1) 생약재 혼합식혜	221
2) 구기자 혼합음료	221
3) 홍삼 혼합음료	221
라. 부재료 종류의 선정 및 배합비 결정	221
1) 생약재 혼합식혜	221
가) A type 식혜	222
나) B type 식혜	222
2) 구기자 혼합음료	222
3) 홍삼 혼합음료	222
마. 당 농도 결정	222
1) 생약재 혼합식혜	222
2) 구기자 혼합음료	222
3) 홍삼 혼합음료	223
바. pH 조절	223
1) 생약재 혼합식혜	223
2) 구기자 혼합음료	223
3) 홍삼 혼합음료	223
2. 연구개발 결과	224
가. 생약재 혼합식혜	224

1) A type 식혜	224
가) 주재료의 적정 음용 농도 결정	224
나) 부재료 종류의 선정 및 배합비 결정	226
(1) 두충 추출액의 적정 음용 농도 결정	226
(2) 건강 추출액의 적정 음용 농도 결정	228
(3) 구기자 추출액의 적정 음용 농도 결정	230
(4) 적정 음용 당 농도 결정	232
(5) A type 식혜의 최종 배합비	234
2) B type 식혜	235
가) 주재료의 적정 음용 농도 결정	235
나) 부재료 종류의 선정 및 배합비 결정	237
(1) 오미자 추출액의 적정 음용 농도 결정	237
(2) 건마늘 추출액의 적정 음용 농도 결정	239
(3) 인삼 추출액의 적정 음용 농도 결정	241
(4) B type 식혜의 적정 당 농도 결정	243
(5) B type 식혜의 최종 배합비	245
나. 구기자 혼합음료	246
1) 주재료의 적정 음용 농도 결정	246
2) 부재료 종류의 선정 및 배합비 결정	248
가) 두충 추출액의 적정 음용 농도 결정	248
나) 건강 추출액의 적정 음용 농도 결정	250
다) 결명자 추출액의 적정 음용 농도 결정	252
라) 구기자 혼합음료의 적정 당 농도 결정	254
마) 구기자 혼합음료의 pH 조절을 위한 구연산 첨가량 결정	256
바) 구기자 혼합음료의 최종 배합비	258
다. 홍삼 혼합음료	259
1) 주재료의 적정 음용 농도 결정	259
2) 부재료 종류의 선정 및 배합비 결정	261

가) 감초 추출액의 적정 음용 농도 결정	261
나) 건마늘 추출액의 적정 음용 농도 결정	263
다) 오미자 추출액의 적정 음용 농도 결정	265
라) 홍삼 혼합음료의 적정 당 농도 결정	267
마) 홍삼 혼합음료의 최종 배합비	269
 제 7 절 결론	 271
 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도	 274
제 1 절 목표달성도	274
제 2 절 관련분야 기여도	276
 제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획	 278
 제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보	 280
 제 7 장 참고문헌	 282

서론

최근 현대사회는 식생활 패턴의 변화와 심각한 환경오염, 스트레스 등으로 인해 각종 성인병 및 암 발생이 급격히 증가하는 추세이며, 이로 인한 약품의 오남용에 따른 부작용이 널리 인식됨에 따라 건강 증진 내지 질병예방을 위한 접근 방법의 하나로 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있다.

기능성 식품이란 식품의 성분이 갖는 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 의미하며, 그 범위는 식품으로서 통상 이용되는 소재나 성분으로 구성되며 동시에 통상의 형태 및 방법에 의하여 섭취되는 것이며 식품으로서 일상적으로 섭취되는 것으로 한정되어 있다.¹⁾ 이제는 식품도 단순한 먹거리 차원을 넘어 신체 특정 생리작용을 촉진시키는 물질이 포함된 기능성 식품에 대한 소비자들의 인식이 널리 확산됨에 따라 관련제품의 개발 및 상품화가 크게 증가하고 있어 기능성 식품 시장은 매년 두 자리 수 이상의 성장을 하고 있다. 이에 따라 전통음료 및 대표적인 기능성 식품 원료인 생약재에 대한 관심이 고조되고, 재배기술이 향상되면서 국내 생약재의 재배 및 생산량이 증가하는 추세이다.

생약재는 농경문화가 발생하면서 주변의 식물을 채집하여 섭취하는 생활에서 우연히 특정 식물의 효능을 발견하게 되어 현재까지 동양의학의 재료로 사용되고 있으며, 동의보감에는 1,400여종, 방약합편의 약성가에는 500여종이 수록되어있다.²⁾ 본 연구에서 사용된 생약재를 살펴보면 다음과 같다.

감초(*Glycyrrhiza uralensis*)는 콩과에 속하는 여러해살이 풀인 감초 또는 곧은 감초의 뿌리를 말린 것으로 맛은 달고 성질은 평하여 온갖 약의 독을 풀어주고 한약재의 강한 약성을 완화시키고, 처방 내에서 다른 약들이 서로 잘 조화될 수 있도록 도와주는 효능이 있다. 각종 통증을 완화시킬 목적으로 다른 처방에 배합되어 들어 가는데, 폐를 윤회케 하고, 해열 작용을 하며, 목이 아픈 것을 치료하는데 사용된다. 비위기능의 허약을 도와주며 정신을 안정시키는데 사용하며 독극성 물질의 해독에도 많이 사용한다. 성분으로 그리틸리틴 배당체인 구루크론산 사포닌과 글리시레트산, 그 밖에 칼슘, 칼륨, 당질, 섬유질, 회분 등이 들어 있다.

두충(*Eucommia ulmoides*)은 두충나무과에 속하는 잎이 지는 키나무인 두충나무의 껍질을 말린 것이다. 맛은 맵고 달며 성질은 따뜻하며 간, 신장에 작용하여 간과 신을 보하고 힘줄과 뼈를 튼튼하게 하며 태아를 안정시킨다. 정기의 쇠퇴로 인한 요통, 무릎이 차고 시린 증상과 몽정, 조루, 소변이 잘 안나오는 것에 뛰어난 효과가 있다. 강장 효과가 있어 몸을 튼튼하게 하고 신장과 간 기능을 촉진시킨다. 또한 등과 허리, 다리의 통증, 생식 기능의 증진에도 효과적이다. 두중교(gutta-percha) 6-10%, 수지, alkaloid, 유기산, 비타민 C 등이 함유되어 있다.

구기자(*Lycium chinense*)는 가지과에 속한 구기자나무의 성숙한 과실을 건조한 것으로 달며 성질은 차며 간과 신장에 작용하여 시력을 개선하고 눈이 아찔하고 눈물이 많은 증상과 요통, 슬관절통, 유정 등을 다스린다. 과실에는 비타민 B1, B2, 비타민C, 카로틴 등을 함유하고 있다.

오미자(*Schizandra chinensis*)는 목련과에 속한 낙엽 목질등목인 오미자 또는 화중오미자의 성숙한 과실로 맛은 시고 달며 성질은 따뜻하다. 폐와 심장, 신장에 작용한다. 오미자는 폐에 작용하여 폐의 기를 수렴하여 기침을 멈추게 하는 작용이 있으며, 또한 신장에 작용하여 설사와 유정을 멎게 하고 인체의 진액을 보충해주는 작용을 가지고 있다. 또한 몸이 허약하여 식은 땀을 흘리는 등의 증상에도 효과가 있다. 주성분은 sesquicarene, β -bisabolene, β -chamigrene, α -ylangene 등이 함유되어 있다.

건강(dried ginger)은 생강과에 속하는 여러해살이 풀인 생강의 뿌리줄기를 말린 것으로 맛은 맵고 성질은 따뜻하며 비, 위, 폐에 작용하며 맵고 따뜻한 성질이 비위를 덥혀 주고 음식을 소화시키며 양기를 돋구어 주는 작용을 한다. 또한 풍한습(風寒濕; 바람, 추움, 습기의 나쁜 기운, 현대의학에서 virus나 세균과 유사한 개념) 사기를 없애고 경맥을 잘 통하게 하며 담을 삭이고 폐를 따뜻하게 해준다. 정유 성분으로 zingiberene, zingiberone, phellandrene, camphene 등이 있고 매운맛으로 gingerol, shogaol, gingerone 등이 있으며, asparagin, pipecolic acid, glutamic acid, asparagin acid 등도 함유되어 있다.

결명자(*Cassia tora L.*)는 콩과에 속하는 한해살이 풀인 결명초의 성숙한 씨를 말린 것으로 달고 쓰며 짜고 성질은 약간 차고 독은 없으며 간과 대장에 작용한다. 또

한 간의 열기를 제거하고 대장의 연동운동을 활발히 하여 눈이 충혈되어 붓고 아프며 햇빛을 꺼리고 눈물이 흐르는 데나 시력감퇴, 야맹증이나 기타 두통, 어지럼증 가슴이 답답한 증상, 또는 변비에 좋다. 주성분으로 에모딘, 토라크리손, 단백질, 지방, 점액질 등이 포함되어 있다.

인삼(Ginseng)은 맛이 달고 약간 쓰며 성질은 약간 따뜻하고, 두릅나무과에 속하는 여러해살이 풀인 인삼의 뿌리이다. 인삼은 기를 보하는 약 중에서 으뜸으로 인체 오장육부의 원기를 보하는 중요한 약재이다. 강장작용, 중추신경 흥분작용, 면역글로불린과 임파 세포수 증가작용, 혈압 상승작용, 혈구수 증가작용, 강혈당작용, DNA, RNA생합성 증가작용, 동맥경화예방작용 등의 작용을하며, 주요한 성분으로 인삼 사포닌(ginsenoside), 폴리아세틸렌(polyacetylene), 항산화활성 페놀계 화합물, 간장 보호작용을 하는 고미신(gomisin-N, -A), 인슐린 유사작용을 하는 산성펩티드, 강압작용을 하는 cholin 등이 들어 있다.^{3,4)}

국내 식품 산업에 있어서 생약자원의 이용은 민간 전통요법에서 비롯되었기 때문에 민간에서 전해오던 생약재를 산업화하기 위한 기초연구 및 제품화 연구가 활발히 진행되어 돌연변이 억제⁵⁾ 및 항 염증⁶⁾, 항산화, 항보체 활성⁷⁾, 항 고혈압⁸⁾, 해독작용⁹⁾, 콜레스테롤 및 혈청 지질 저하물질¹⁰⁾ 등 다양한 생리 활성물질이 함유되어 있음이 규명되었다.

인체의 노화와 질병을 유발하는 free radical은 인체 내에서 정상적인 대사과정 중 생물학적반응으로 형성되며, 세포와 조직에 해로운 독성을 일으켜 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 이러한 유해 free radical을 억제하는 생리작용으로는 전자공여작용, SOD유사활성 등이 있으며, 이외에 발암, 고혈압과 관련한 아질산염 소거능과 ACE 저해작용 등이 있다. 전자공여능은 산화성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하며, SOD 유사활성은 생체 내에서 생성되며, 전자환원으로 반응성과 파괴성이 매우 큰 superoxide anion radical을 제거하기 위해 분비되는 superoxide dismutase (SOD)와 유사한 역할을 하여 superoxide anion radical을 정상상태의 산소로 전환시켜 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 따라서 생약재 내의 이러한 작용을 하는 유효물질들을 섭취함으로써 인해 산화적 장해를 방어하고 노화를 억제하는 효과를 기대할 수 있다.¹³⁾ 또한 발암과 관련한 아질산염 소거작용

은 체내 및 체외에서 효소 작용에 의해 환원된 nitrite가 amine류와 반응하여 발암 물질인 nitrosamine을 생성하고, 혈액 중의 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 각종 중독을 일으키는^{14,15)} 것으로 알려진 nitrite를 제거하여 발암을 억제하는 작용이며, 고혈압과 관련한 ACE 저해작용은 renin의 작용으로 Angiotensinogen으로부터 생성된 Angiotensin I을 Angiotensin II로 전환시켜 강력한 혈관수축 작용을 일으키며, 혈관 이완 작용을 돕는 bradykinin을 분해하여 불활성화시켜 혈압을 상승시키는 Angiotensin converting enzyme의 활성을 억제하는 작용이다.^{16,17)}

최근 바이오산업의 급성장과 건강 지향적 관심의 증대에 힘입어 생약재의 유효성에 대한 연구가 크게 각광 받고 있다. 따라서 생약재를 이용한 기능성식품의 개발 최첨단 생명 공학적 기술을 이용하여 부가가치의 창출과 그 기능성을 극대화하려는 방향으로 진행되고 있다. 이러한 현상은 음료시장에서도 나타나고 있으며, 다각적인 효능의 규명에 따른 차(茶)·음료 소재의 개발과 더불어 체질개선, 다이어트, 숙취해소 등의 특정한 기능성과 관련한 기능성 음료 개발이 계속될 것으로 전망하고 있다.

따라서 본 연구에서는 생약재의 식품 소재화 및 전통음료의 고품질 제품 다양화 기술 개발을 목적으로 전통안동식혜의 젖산균과 효모의 분리동정, 생리활성 효과를 검증, 유효성분 추출기술의 개발 및 기호성 증진을 위한 배합비를 결정하여 생약재의 기능성 유효성분을 이용한 전통안동식혜를 개발하고자한다.

제1장 연구 개발 과제의 개요

제1절 연구 개발의 목적

전통안동식혜는 엿기름으로부터 추출되어 나온 맥아효소가 쌀 전분을 분해하여 생성된 단맛과 숙성과정에서 젖산균에 의해 생성된 산미와 맥아향, 무우, 고추가루 및 생강의 맛과 향이 잘 조화된 기호음료로서 안동을 중심으로 한 경북북부지방에서 현재 겨울철에 많이 애용되고 있다.^{18,19)} 김 등²⁰⁾은 신라시대를 전후하여 일반적으로 청량음료로 사용되었던 것으로 알려진 漿水의 제조방법을 재민요술에 근거하여 발효학적 특징을 규명하였고, 목 등²¹⁾은 호화시킨 쌀을 액·당화한 후 젖산 발효하고 균질화하여 쌀 젖산발효물을 제조하여 이화학적 특성을 조사하였다. 이 등²²⁾이 *Bacillus laevolactis*와 *Sacchromyces cerevisiae*를 이용하여 쌀과 콩을 혼합 발효한 음료를 제조하였다. 유 등²³⁾이 보리와 맥아당화액을 이용한 젖산균 음료를 개발하였다. 이 등^{24,25)}은 우리 조상들의 지혜와 슬기를 전승, 발전시켜 온 전통안동식혜에 관하여서는 한국식품문화사적인 측면에서 향토음식속의 식혜의 종류 등에 대한 보고와 윤²⁶⁾의 안동식혜의 조리법에 관하여 조리법의 유래에 따른 사적고찰이 있으나 전통안동식혜에 관하여 체계적인 연구는 아직도 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 점차 사라져 가는 우리 고유의 전통발효식품인 전통안동식혜의 전통적인 제법을 과학화하여 계승, 보존하고 그 품질향상을 도모하여 국민건강 증진 및 농어민 소득 증대 및 쌀 소비 촉진을 위하여 젖산균과 효모를 분리 동정하였으며, 이들 균주간의 배양특성을 조사하여 단독발효 및 혼합발효를 통하여 가장 이상적인 전통안동식혜의 제조공정 및 표준화를 위하여 연구검토하고자 한다.

제2절 연구 개발의 필요성

- 오늘날 우리 식품공업은 주로 외국에서 연구 개발되고 양산되고 있는 가공식품

을 우리나라로 이전해 와서 그것을 모방하기에 바빴을 뿐 유감스럽게도 우리는 그 동안 전통음료에 대한 연구가 이루어지지 못한 것이 사실이었다.

- 전통음료의 하나인 전통안동식혜는 일반 식혜제조 및 원료가 다른 경북 안동지방 향토식품으로써 쌀 전분, 무, 고추가루, 생강 및 엿기름을 원료로 하여 숙성한 맛과 향이 잘 조화된 정장작용을 갖는 전통 기호젓산음료 식품이었다.
- 전통안동식혜는 안동을 중심으로 경북 북부지방의 기호식품으로 국민소득과 문화수준의 향상에 따른 식생활 양식의 개선에 수반되어 점차 감소되어 가는 추세이며 더구나 이들 전통적인 제조법은 고령 주부들에 의하여 민속질을 중심으로 제조되고 있다.
- 우리나라 음식 문화는 오랜 세월을 걸친 우리조상들의 지혜와 슬기로 전승, 발전해 온 우리의 귀중한 전통식품의 하나인 전통안동식혜는 한국식품문화사적인 측면에서 향토 음식속에 식혜의 설명 및 조리법의 유래에 따른 사적 고찰을 밝혔으나 이에 관한 연구 등은 국내외적으로 전무한 상태에 있다.
- 그러므로 점차 사라져 가는 전통음료의 제법을 계승, 보존하고 외국 농산물에 대응하여 국내 농산물의 부가가치 향상 및 전통식품의 재조명이 요구되고 있는 상황에서 전통안동식혜의 제조기술 향상 및 공정표준화를 통하여 현대인의 입맛에 맞는 전통안동식혜 제품의 다양화에 관하여 제품 및 생산기술의 기반확보가 필요한 실정이었다.

1) 기술적 측면

- 전통안동식혜의 현대인의 기호에 맞는 제품의 다양화로 인한 노하우 함양
- 전통안동식혜에 함유된 새로운 물질 규명
- 생리기능 실험에 의한 대사경로 규명

- 그러므로 우리나라의 오랜 역사를 지닌 전통안동식혜로부터 현대인에 기호에 맞는 고기능성 물질 규명 및 대량생산 기술확립이 가능함

2) 경제 · 산업적 측면

- 전통안동식혜로부터 현대인의 기호에 알맞은 전통안동식혜를 개발함으로써 이에 함유된 생리기능물질이 매우 다양하다는 것을 보여주므로 세계속의 우리 상품으로 인정받을 계기를 마련
- 전통안동식혜의 구성성분을 확실히 규명함으로써 이 성분을 이용한 또 다른 용도로써 산업화에 기여
- 전통음료를 이용한 약리효과는 아직 체계적이지 않고 근거가 미흡하여, 생리 기능을 밝히기 쉽고, 간단하게 접할 수 있는 식품개발로 농가소득에 기여
- 전통안동식혜를 현대인에게 이용함으로써 농가소득 증대와 수출로 국익 선양

3) 사회 · 문화적 측면

- 현대인의 성인병에 대처 할 수 있고 친근하며 쉽게 접할 수 있는 성인병 예방 식품으로서의 효과에 기대
- 젊은 여성들의 피부미용에 좋다는 결론을 규명함으로써 우리 향토 식품의 확산과 외래식품보다 우수함을 인식시키는데 기여
- 전통안동식혜에 함유된 성분이 충치 및 구강 질환예방에 관한 효과입증으로 국민구강보건에 기여 할 뿐만 아니라 민족의식 고취에 기여
- 전통안동식혜의 항암효과 성분을 규명함으로써 새로운 차원의 전통음료 개발 모델화에 기여

제3절 연구 개발의 범위

- 전통안동식혜는 엿기름으로부터 추출되어 나온 아밀라제에 의하여 쌀 전분이 분해되어 나온 단맛과 숙성과정 중에 생성되는 젖산균에 의한 신미에다 맥아향, 무, 향신료인 고춧가루 및 생강의 맛과 향이 잘 조화된 음료로써 예로부터 안동을 중심으로 한 경상북도 북부지방에서 널리 애용되어 왔다.
- 전통안동식혜는 서울식혜와는 달리 그 제조방법부터 다른 향토식품으로서 숙성과정 중에 생성되는 감미와 젖산균에 의한 산미가 잘 조화된 전통음료의 하나이었다. 안동식혜에 첨가되는 무, 엿기름 및 생강에 존재하는 효소들에 의하여 소화능력을 더해 줄뿐만 아니라 젖산균에 의한 정장작용을 갖는 우리고유의 건강식품이었다.
- 그러므로 본 연구에서는 우리나라 경상도의 전통안동식혜의 전통적인 제조법을 계승, 보존하고 그 식품향상을 도모하기 위한 연구의 일환으로 전통안동식혜의 생리기능물질을 분리하여 검증함으로써 보다 품질이 좋은 가공식품으로 개발하고자 젖산균 및 효모의 starter를 이용하여 현대인의 입맛에 맞는 전통안동식혜의 다양화 제품을 개발할 뿐만 아니라 표준화 하고자 하였다.

○ 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003년)	1. 전통안동식혜의 생리기능물질의 생리활성검증 및 항암효과 (주관과제)	1. 생리활성물질의 분리 2. 효소저해 활성측정 ○ ACE 저해효과 ○ Tyrosinase 저해효과 ○ Electron donating ability ○ SOD 유사활성 측정 3. 암세포주에 대한 항암효과 ○ 마우스 암세포에 의한 cytotoxicity 검색 ○ 사람유래 암세포주(뇌암, 간암, 신장암, 유방암 세포)에 대한 cytotoxicity 검색
	2. 전통안동식혜의 발효에 관여하는 미생물의 분리 및 동정 (협동과제)	1. 발효용 전통음료의 제조 ○ pH 및 적정산도 ○ 알코올 및 유리당 ○ 비휘발성 유기산 ○ 유리아미노산 2. 효소활성 측정 ○ Protease ○ 액화효소 ○ 당화효소 3. 젖산균의 순수분리 및 동정 ○ 젖산균의 순수분리 및 동정 ○ 성장특성 4. 효모의 순수분리 및 동정 ○ 효모의 순수분리 및 동정 ○ 성장특성
	3. 생약재가 첨가된 기능성 전통안동식혜의 개발 (위탁과제)	1. 생약재 적정 추출조건 설정 2. 식혜제조시 필요한 부재료인 생약류의 선별 (황기, 계피, 대추, 건강, 당귀 등) 3. 국내생산량이 많고 저렴한 생약류의 선별 4. 생약류 추출을 위한 전처리 조건 검토 5. 생약류 추출물 농축방법 검토

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2004년)	1. 생리활성 물질의 superoxide dismutase 활성화 및 항암·암예 방 효과 (주관과제)	1. 암세포주에 대한 항암효과 ○ Mouce liver Hepa, mouce sarcoma 180 ascitic tumor cells에 의한 cytotoxicity 검색 ○ 사람유래 암세포주(human colon HT-29, human liver HepG2, human breast MDA, 등)에 대한 cytotoxicity 검색 2. <i>In vitro</i>에서 암예방(chemoprevention)효과에 대한 검색 ○ 항산화 Phase II enzymes 활성 측정 · Quinone reductase (QR), · Glutathione S-transferase (GST) · Glutathione (GSH) ○ Polyamine metabolism inhibition에 대한 검색
	2. Starter를 이용한 전통안동식혜의 제조 (협동과제)	1. Starter를 이용한 전통안동식혜 제조 ○ 제법을 달리한 전통음료의 발효 ○ 젖산균 및 효모의 단독발효 ○ 젖산균의 효모의 혼합발효 ○ 젖산균과 젖산균의 혼합발효 2. 재료를 달리한 전통안동식혜 제조 3. 균체의 생육 및 성분분석 ○ 일반성분 ○ 알코올 및 유리당 ○ 비휘발성 유기산 ○ 유리아미노산 4. 효소활성 변화 ○ Protease ○ 액화효소 ○ 당화효소 5. 관능검사 6. Starter를 이용한 표준화 공정
	3. 생약재가 첨가된 기능성 전통안동식혜의 개발 (위탁과제)	1. 전통안동식혜 제조를 위한 전처리 조건 검토 2. 생약재가 보강된 전통안동식혜의 제조 3. 기호성 증진을 위한 적정 배합비 결정 4. 신선도 저하 방지를 위한 전통안동식혜의 살균조건 검토 5. 기능성 전통안동식혜의 제조공정 확립 및 전통안동식혜 제조

제2장 국내외 기술 개발 현황

제1절 국내외 관련 기술의 현황과 문제점

1. 국내 기술현황

- 일반 음료의 경우 각 가정에서 또는 지역별, 몇 개의 기업체에서 제조되고 있으나 전통안동식혜는 경북 북부지방인 안동을 중심으로 맥이 이어지고 있는 형편이었다.
- 점차 사라져 가는 전통안동식혜의 전통적인 제조방법을 계승, 보존하고 그 품질향상을 위한 개발목적으로 본인의 연구실에서 최종제품의 맛과 향 등 관능적인 요소와 그 관계해결을 위하여 그 제조방법을 확립하였으나 단편적인 연구에 그치고 있는 실정이었다.
- 전통음료로 산업화를 원하고 있으나 이에 부응하는 연구가 미비하여 개발되지 못하고 있음
- 그러므로 안동식혜는 토속 전통음료로써 그 맛을 먹어보지 못한 사람들에게는 붉은색에 무, 생강 등이 함께 발효한 식품이므로 처음은 거부감이 있으므로 서양의 요구르트와 같이 먹어본 경험이 있는 사람에게는 매우 좋아하는 젓산음료식품이므로 현대인의 기호에 알맞게 제품을 다양화하여 개발할 필요성을 느낀다.

2. 국외 기술현황

- 국외기술은 전혀 이루어지지 않고 있음

제2절 앞으로의 전망

- 전통안동식혜의 생리기능 탐색으로 신규화합물을 분리함으로써 물질특허 획득.
- 고혈압 억제물질 규명으로써 민간요법의 정당성을 뒷받침하고 궁극적으로 고혈압을 예방할 수 있는 식품신소재로써의 원료로 공급.
- 콜레스테롤, 지방산화 억제효과의 활성이 검증되므로 현대 성인병 예방에 일조.
- 멜라닌 색소억제 등의 피부미용에 탁월한 효과 입증으로 여성음료와 화장품의 원료로서 개발 가능.
- 구강내 충치균 억제와 냄새제거 효과로 치약 및 구강청정에 원료로서 개발 가능.
- 항암효과 검증으로 새로운 식품모델로서 검증.

제3장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 전통안동식혜의 생리기능물질의 생리활성검증 및 항암효과

1. 실험방법 및 연구내용

가. 실험재료

본 실험에 사용한 시료는 참쌀(*Japonica type*), 무(*Raphanus sativus L. radish*), 생강(*Zingiber officinale Ginger*), 고추가루(*Capsicum annum L.*)는 2003년 9월에 대구시 농협공판장에서 구입한 것을 공시재료로 사용하였다. 안동식혜의 제조는 Fig. 1과 같이 실시하였다. 안동식혜의 생리기능 물질은 hexane, ethyl acetate, butanol, water을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(1,690×g, 30min)하여 상정액과 침전물을 분리하였다. 침전물은 다시 각각의 용매를 첨가한 후 위의 추출 과정을 3회 반복하였다. 각각의 상정액을 모아 농축 여과한 후 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

나. 효소저해 활성 측정

1) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해

Angiotensin converting enzyme 저해 효과 측정은 Cushman²⁷⁾ 등의 방법을 변형하여 행하였다. 즉, 반응구는 0.3M NaCl을 함유하는 0.1M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 기질인 Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL) 2.5mM을 녹인 액 0.15mL, ACE(0.2unit/mL) 0.1mL와 각 추출시료 용액 0.1mL를 혼합하며, 대조구는 추출시료 대신 증류수 0.1mL를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시키고, 1N HCl 0.25mL 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 1.5mL의 ethylacetate를 첨가하였다. Ethylacetate층으로부터 용매를 증류시킨 잔사에 1mL의 증류수를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 흡광도 228nm에서 측정한 후 저해율(%)을 구하였다.

2) Tyrosinase 저해효과

Tyrosinase 활성저해 측정 방법은 tyrosinase의 작용결과 생성되는 dopachrome을 비색법에 의해 측정하였다. Mushroom tyrosinase(100unit/mL)를 0.2mL, 기질로서 DOPA 0.4mL, buffer 0.2mL의 혼합액에 시료용액 0.2mL을 첨가 37, 15분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 Dopa chrome을 475nm에서 측정하였다. tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

3) 전자공여능(DPPH) 측정

전통안동식해추출물의 전자공여작용은 Blois²⁸⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 1mL에 0.2mM diphenyl-picryl-hydrazyl(DPPH) 1mL를 넣고 교반한 후 30분 동안 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

4) SOD(Superoxide Dismutase) 유사활성 측정

Superoxide dismutase 유사활성능은 Marklund²⁹⁾의 방법에 따라 각 시료액 0.2mL에 Tris-HCl의 완충용액(50mM Tris, 10mM EDTA, pH 8.5) 3.0mL와 7.2mM pyrogallol 0.2mL를 가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후, 1.0N HCl 0.1mL를 가하여 반응을 정지시킨 후 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420nm에서 측정하였다. SOD 유사활성능은 시료 첨가구와 첨가하지 않은 경우의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

다. 암세포주에 대한 항암효과

1) 세포배양

본 실험에 이용한 세포 SK-MEL-2(Malignant melanoma), SK-MEL-31(Malignant melanoma)은 Korean Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하였다. 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100unit/mL의 penicillin/streptomycin을 1%를 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2) MTT assay에 의한 항암 효과 측정

추출물의 암세포주에 대한 증식 억제효과는 Carmichael 등³⁰⁾의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 즉, 암세포주를 96 well plate에 1×10^4 cells/well이 되게 180uL 분주하고 시료를 농도별로 조제하여 20uL 첨가한 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였고, 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 20uL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO:EtOH(1:1) 150uL를 가하여 30분간 교반한 뒤 ELISA reader로 550nm에서 흡광도를 측정하여 암세포주의 성장억제 효과를 측정하였다.

라. 통계 처리

통계 처리를 위해 SPSS10.0 for windows program을 사용하여 각각의 시료에 대해 평균±표준편차로 나타내었으며, 각 군에 따른 유의차 검증은 Duncan의 다중검증법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검증하였다.

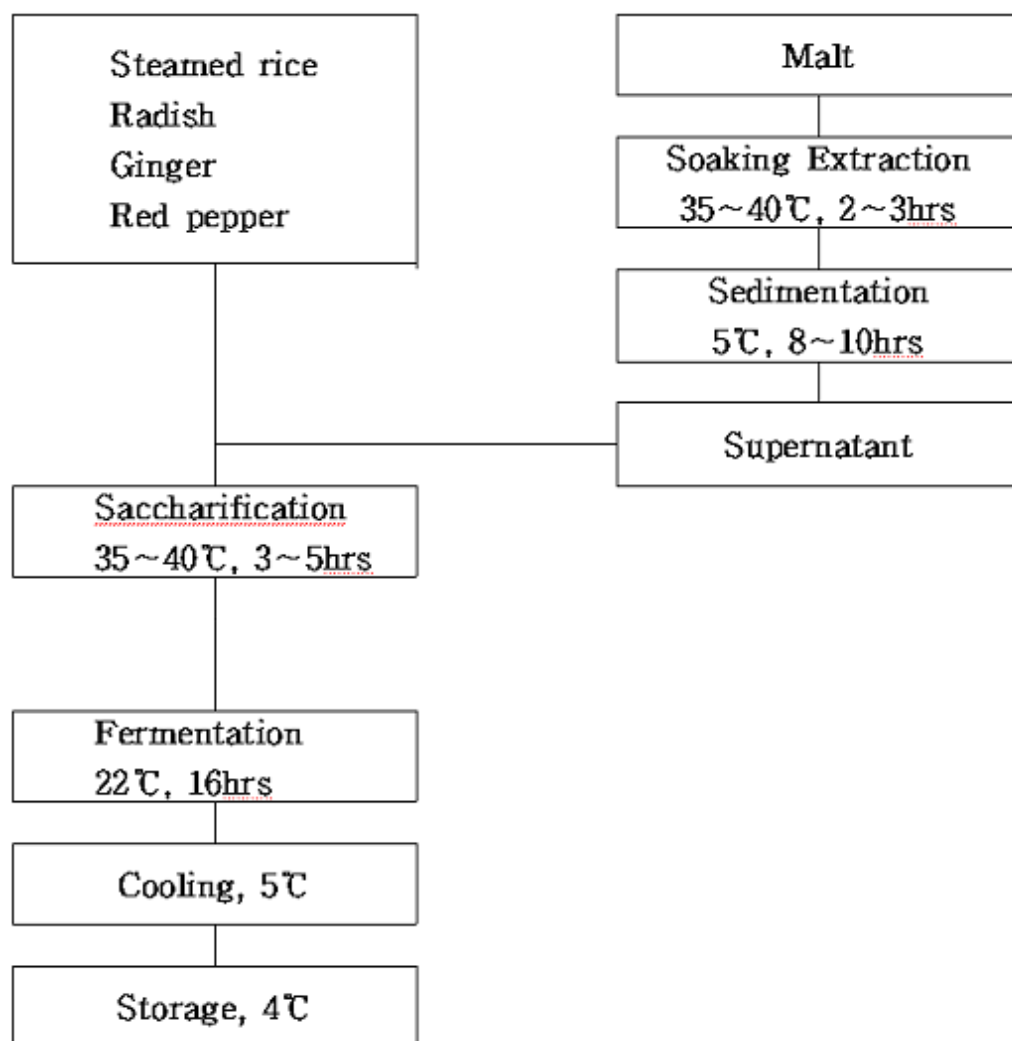


Fig. 1. Protocol for the Preparation of Andong *sikhe*.

2. 연구개발 결과

가. 효소저해 활성 측정

1) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해

전통안동식혜의 고혈압 저해능을 보기 위하여 ACE에 대한 저해능을 살펴본 결과 Fig. 2에 나타내었다. 각각의 분획물, 즉 hexane, ethyl acetate, butanol, water층에서 9.5%, 13.3%, 30.0%, 6.3%의 순으로 나타나 부탄올층에서 가장 높은 저해능을 나타내었다.

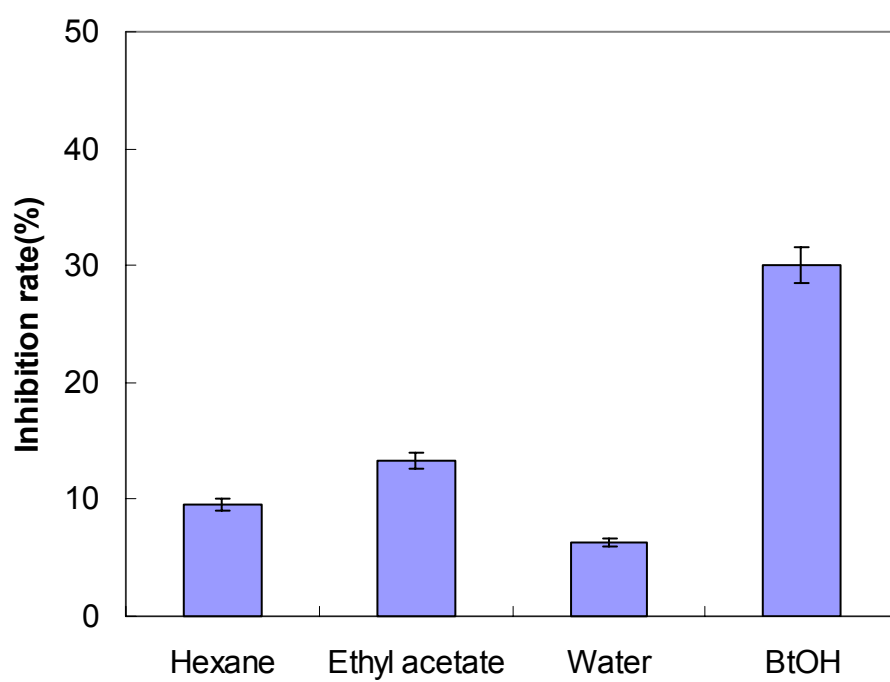


Fig. 2. Inhibition rate of fractions extracted from traditional *Andong sikhe* on angiotensin converting enzyme.

2) Tyrosine 저해효과

Tyrosinase(monophenol, dihydroxy-L-phenylalanin : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 구리를 함유한 효소로 melanin 합성에 관여하며 동물에서 melanin은 피부병과 악성 melanomas와 관계있으며 체내에서 melanin 합성은 L-tyrosine에서 L-3,4-dihydro-xyphenylalanin(DOPA)을 생성시키고 다시 L-dopaquinone으로 전이시키는 연속된 효소적 산화가 진행된 후 중합반응에 의해 생성 된다. 각 분획별 tyrosinase 저해 효과는 Fig. 3~5 에 나타내었다. Ethyl acetate, heaxan 및 water층 동일하게 10% 진후의 낮은 저해효과를 나타내어 안동식체에서는 melanin 합성에 관여하는 tyrosinase에 대한 저해능은 약한 것으로 나타났다.

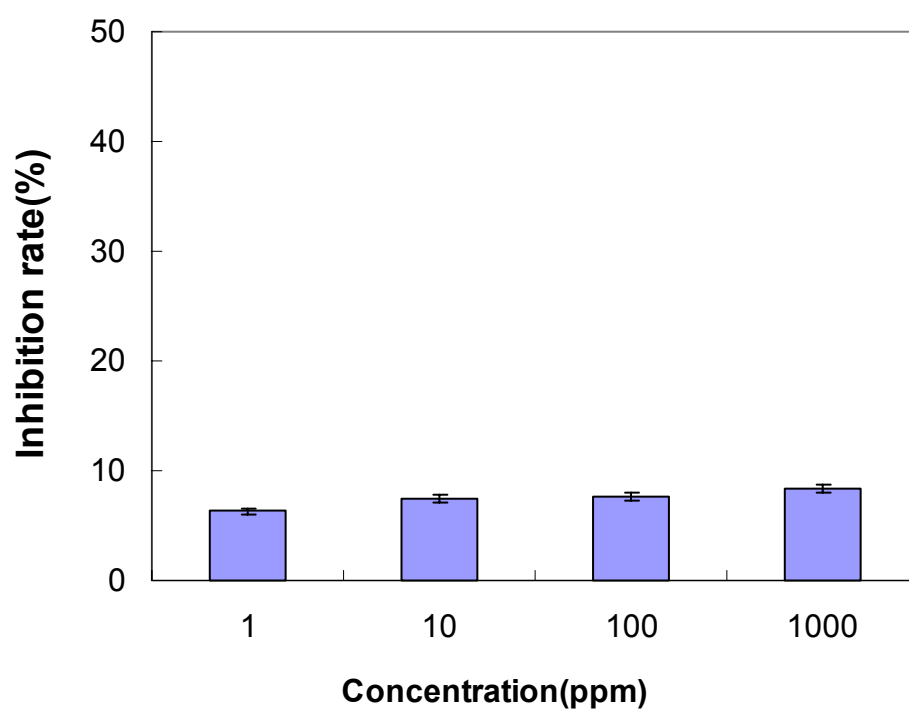


Fig. 3. Inhibition rate of water fraction extracted from traditional Andong *sikhe* on tyrosinase.

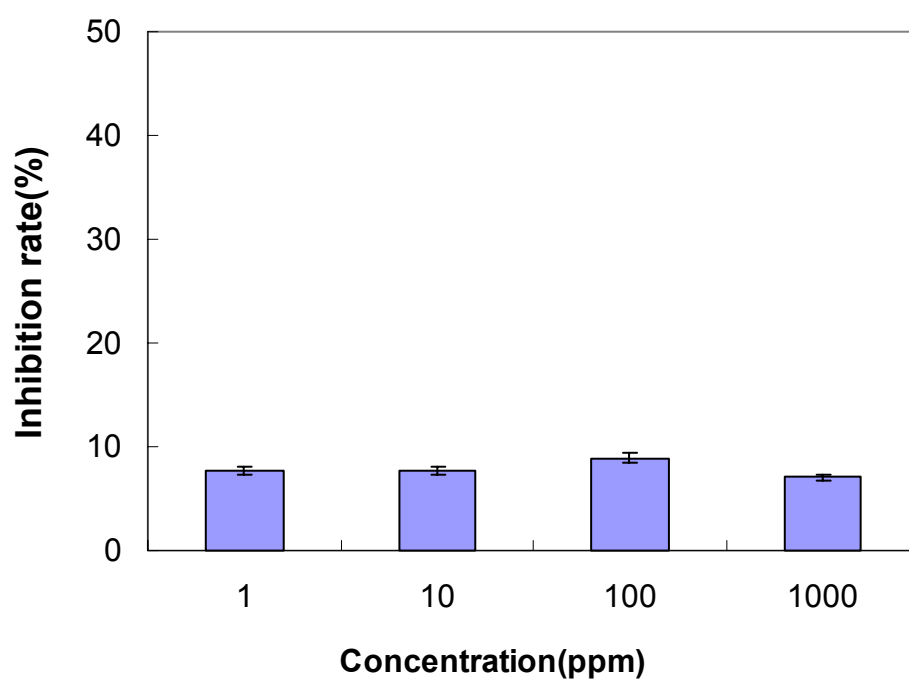


Fig. 4. Inhibition rate of hexane fraction extracted from traditional Andong *sikhe* on tyrosinase.

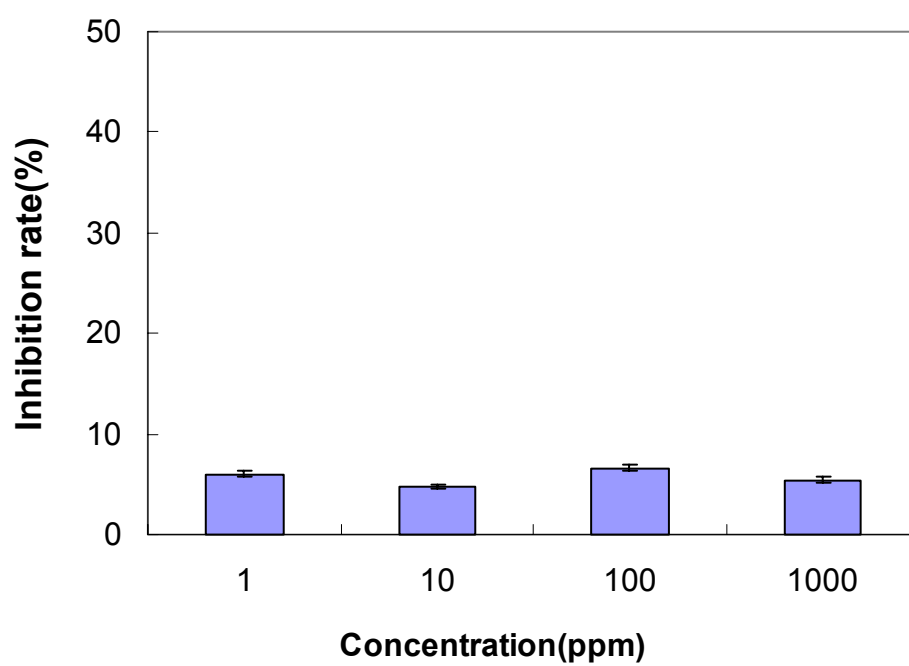


Fig. 5. Inhibition rate of ethyl acetate fraction extracted from traditional *Andong sikhe* on tyrosinase.

3) 전자공여능(DPPH) 측정

전자공여능 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 안정한 자유 라디칼로서 그것의 비공유전자로 인해 517 nm 부근에서 최대 흡수치를 나타내며, 전자 또는 수소를 받으면 517 nm 부근에서 흡광도가 감소하며 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성 산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다. 본 실험결과는 Fig. 6에 나타내었다. ethyl acetate 층에서만 유일하게 1,000 ppm에서 27%정도의 전자공여능을 나타내었다.

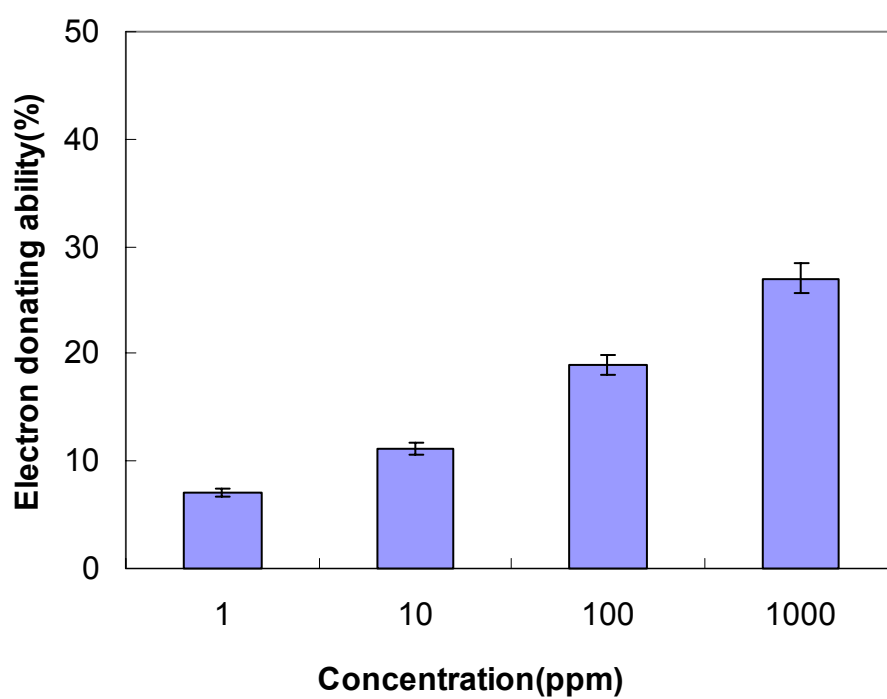


Fig. 6. Electron donating ability activities of ethyl acetate fraction extracted from traditional Andong *sikhe*.

4) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

Superoxide dismutase(SOD)는 항산화 효소로서 세포에 해로운 환원 산소종을 과산화수소로 전환 시키는 반응($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매하는 효소이며, SOD에 생성된 H_2O_2 는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환시켜 산소상해로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다. 이러한 항산화효소 활성을 살펴본 결과는 Fig. 7~10에 나타내었다. ethyl acetate와 butanol 층에서 높은 활성을 나타내었다.

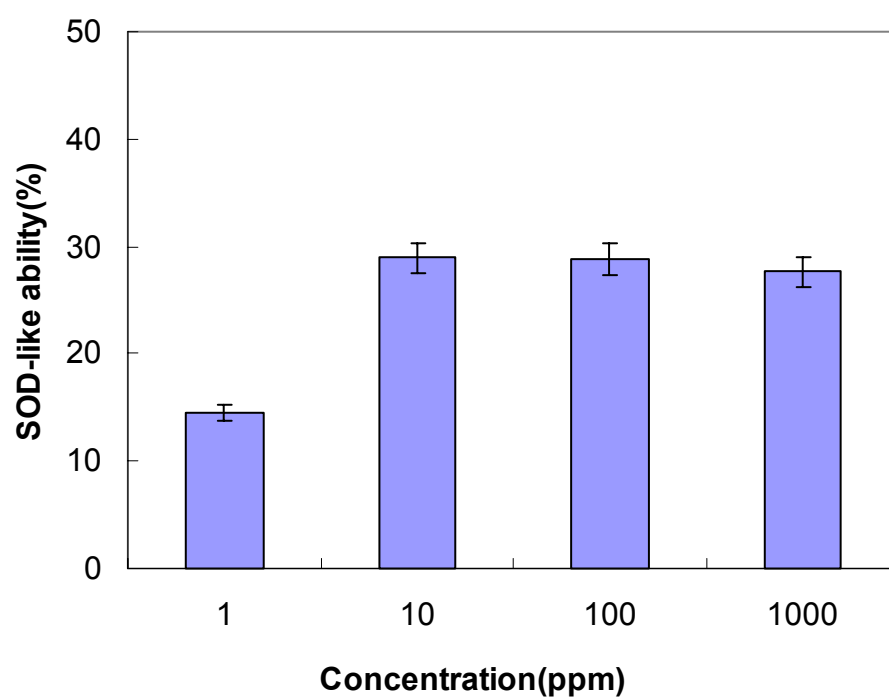


Fig. 7. SOD-like activities of ethyl acetate fraction extracted from traditional Andong *sikhe*.

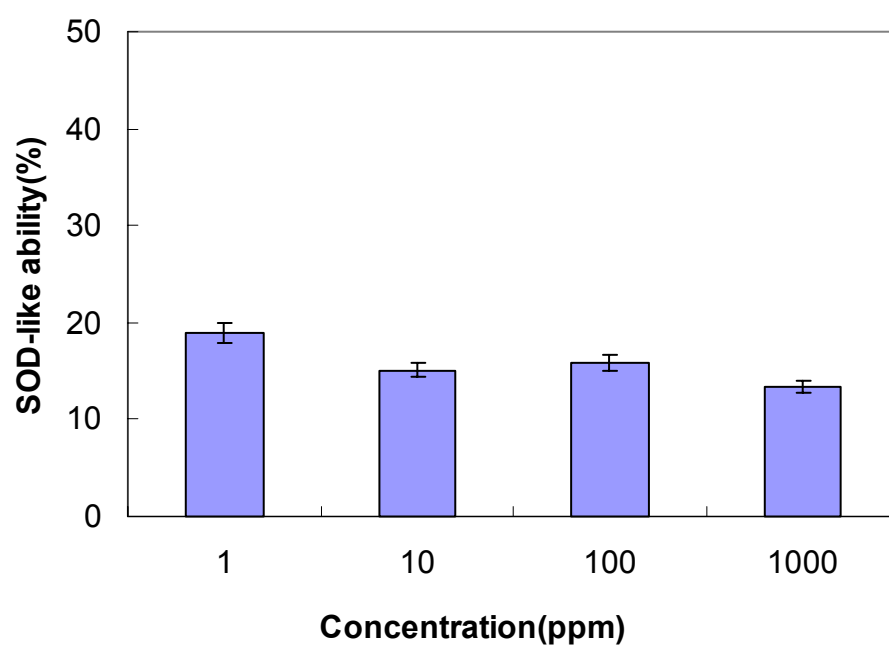


Fig. 8. SOD-like activities of hexane fraction extracted from traditional Andong *sikhe*.

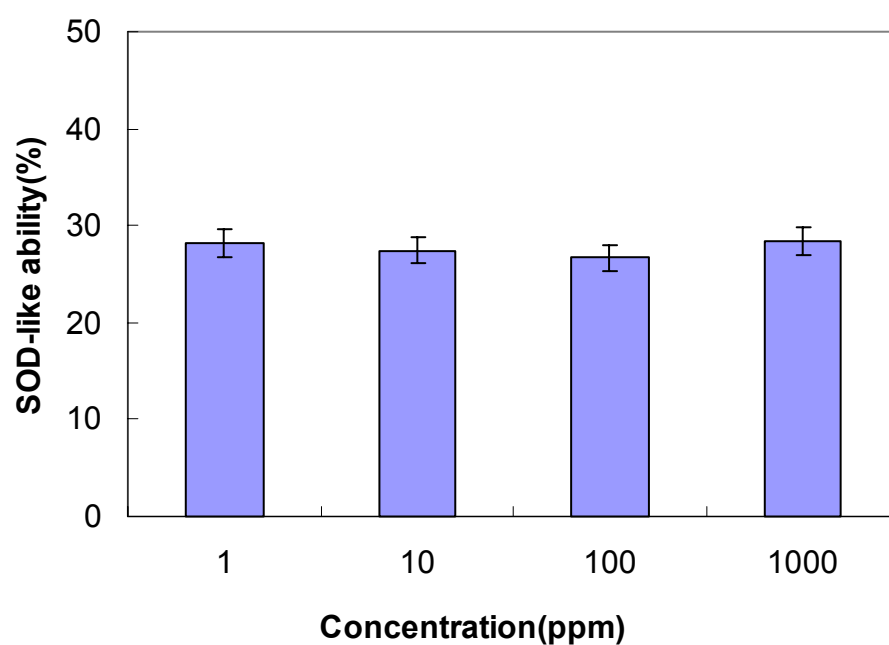


Fig. 9. SOD-like activities of butanol fraction extracted from traditional Andong *sikhe*.

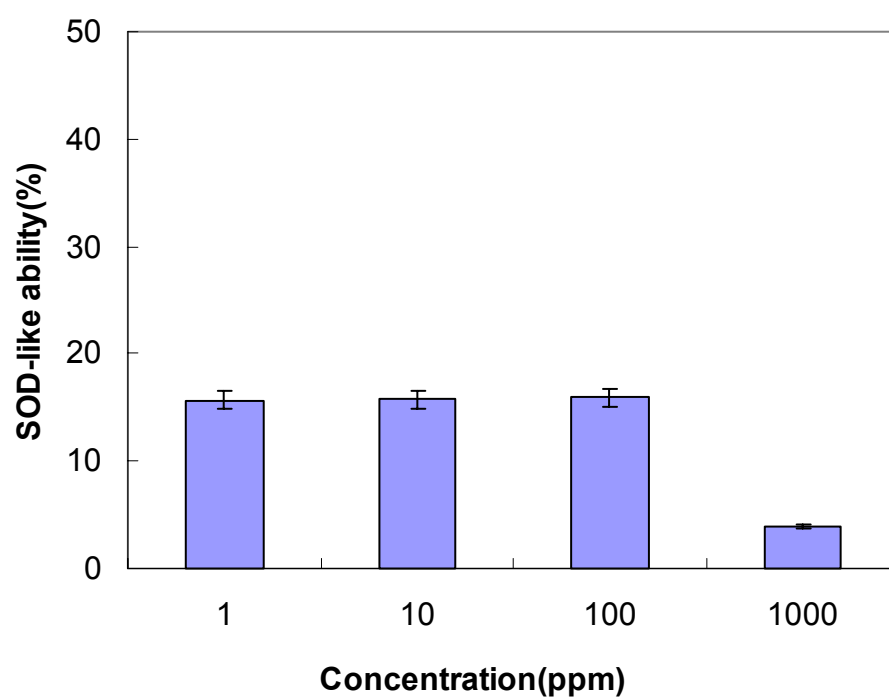


Fig. 10. SOD-like activities of water fraction extracted from traditional Andong *sikhe*.

나. 암세포주에 대한 항암효과

1) MTT assay에 의한 항암효과 측정

전통안동식혜의 암세포에 대한 세포증식 억제율은 Fig. 11~12과 같이 나타났다. 암세포, SK-MEL-2(Malignant melanoma), SK-MEL-31 (Malignant melanoma)에 대한 저해율은 시료의 농도가 증가함에 따라 세포증식 억제율이 유의적으로 증가하였으며, 1,000 ppm에서 모두 20%이상의 성장 저해가 나타났다.

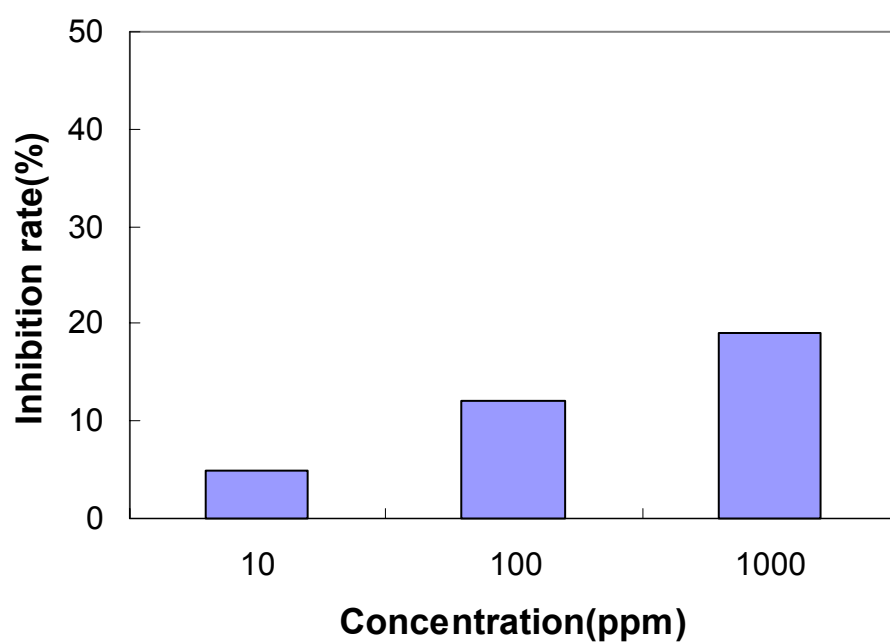


Fig. 11. Growth inhibition rate of fractions extracted from traditional Andong *sikhe* (SK-MEL-2).

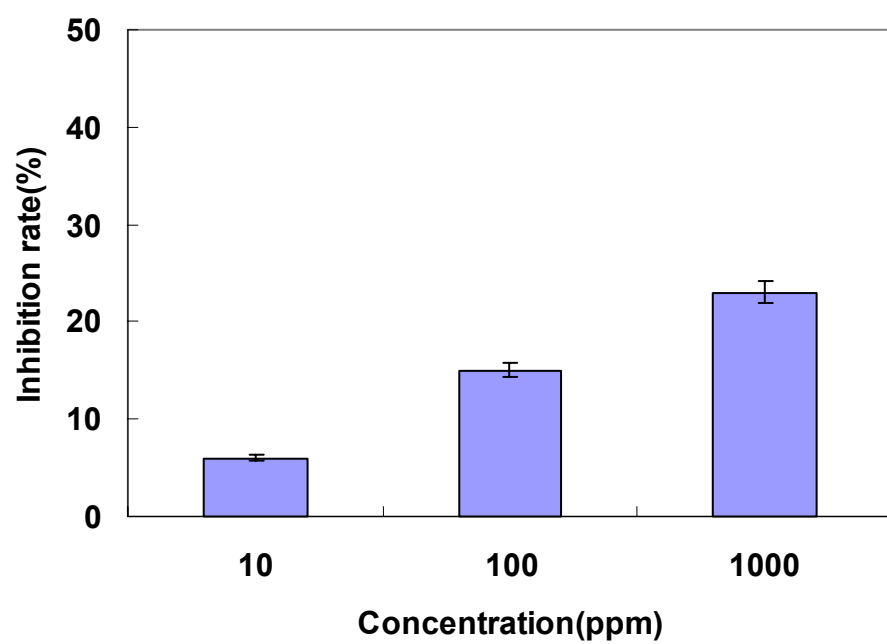


Fig. 12. Growth inhibition rate of fractions extracted from traditional Andong sikhe (SK-MEL-31).

제 2 절 전통안동식혜의 발효에 관여하는 미생물의 분리 및 동정

1. 실험방법 및 연구내용

가. 발효용 전통안동식혜의 제조

안동식혜의 제조는 찹쌀(*Japonica type*), 무우(*Raphani semen*), 생강(*Jingiberis rhizoma*), 고추가루(*Capsicum annum L.*)를 2003년 9월에 대구시 농협공판장에서 구입하여 최 등³¹⁾이 보고한 방법에 따라 Fig. 13과 같이 하였으며 제조된 식혜의 고형분과 액상분의 비율은 약 1:2 였다.

나. 성분분석

1) 일반성분

식혜의 수분, 조단백, 조지방, 조섬유, pH, 적정산도, 총당, 환원당 및 회분함량 분석은 AOAC³²⁾에 준하여 측정하였으며, 아미노태 질소는 formol적정법³³⁾, 암모니아태 질소는 Folin법³⁴⁾으로 측정하였다.

다. 젖산균의 순수분리 동정

1) 젖산균의 순수분리 동정

宮尾 등³⁵⁾의 방법 따라 선택배지로서는 m-Enterococcus agar를 사용하여 시료 0.1mL를 도말하여 30℃에서 3일간 배양하여 집락을 관찰하였다. *Lactococcus* sp.는 붉은색의 집락을 나타내고 *Pediococcus* sp.는 흰색을 나타내는 것을 분리하였다.

Lactobacillus sp.와 *Leuconostoc* sp.는 MRS broth에 0.002% bromophenol blue를 첨가한 배지에 시료액 0.1mL을 도말하여 37℃에서 2~3일 배양하여 전체적으로 담청색 혹은 전체적으로 흰색의 집락을 전체적으로 암청색의 환이 나타나지 않는 집락을 *Leuconostoc* sp.으로 분리 하였다.

젖산균의 동정은 시료즙액을 Elliker broth(Difco), MRS broth(Difco) 한천 평판배지위에 도말하여 30℃와 37℃에서, 48시간 동안 각각 배양한 후 발생하는 집락 중

산 생성능이 크고 산생성에 의한 환이 뚜렷한 집락을 순수분리 하였다. Gram염색을 하여 크기, 모양, 배열상태와 균의 염색성질에 대해 조사를 하고 litmus milk의 변화, catalase test, diacetyl 생성검사, salt-tolerant test, arginine으로부터 NH_3 생성등을 실시하고 그 결과를 Bergey's manual³⁶⁾, Sharpe³⁷⁾, Gibbs³⁸⁾ 등 분리방법에 따라 동정하였다.

라. 효모의 순수분리 및 동정

1) 분리균의 동정

전통안동식혜로부터 효모를 순수분리 동정하기 위하여 안동식혜를 균질화하여 냉각된 증류수에 혼합한 후 cheese cloth로 여과하여 malt extract broth (3% malt extract, 0.5% bacto peptone)배지에 1.0%(v/v) 접종하여 48시간 배양하였다. Malt-extract agar를 pH 3.5로 조절하여 다른 균의 오염을 막았으며 배양물을 백금이에 취하여 agar 배지위에 streaking한 후 30℃에서 48시간 배양시킨 다음 생성된 하나의 집락마다 현미경 검사를 하면서 단일 균주의 집락이 나타날 때까지 streaking을 반복하여 단일 균주로 형성된 집락을 얻었다.

효모의 동정은 현미경 관찰과 고형배지에서의 특징을 조사한 형태학적 검사와 Analytical Profile Index(API) 20C AUX (bioMérieux, France)에 의한 생화학적 검사를 실시하여, Lodder³⁹⁾와 Kreger-van Rij⁴⁰⁾의 분류기준에 의하여 동정하였다.

2) 성장 특성

상기의 200개의 순수분리된 효모 집락의 CO_2 가스생성량 조사를 위해 각각 malt extract broth에 한 백금이씩 접종한 후 진탕배양(120 strokes/min)하면서 Durham tube⁴¹⁾를 사용하여 CO_2 가스 생성정도를 측정하였다.

알코올 생성량 조사는 Bassete와 Ward⁴²⁾의 방법에 따라 30℃에서 28시간 배양하여 얻은 계대 배양물을 malt extract broth(pH 4.6)에 각각 접종하여 28℃에서 배양하면서 4시간 간격으로 채취한 시료 10 mL를 증류용 플라스크에 넣고 5분 동안에 5 mL의 증류액을 받을 수 있는 증기발생용 플라스크에 연결하였으며, 농축기 끝은 얼음을 가득 채운 ice bath에 넣은 원추형 시험관에 연결하여 4℃이하로 유지

하였다. 열을 가하여 5 mL의 증류액을 모아 gas chromatography 분석용 시료로 하였다. 표준물질로는 ethanol을 각각 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0%의 농도로 하여 시료제조와 동일한 방법으로 제조된 증류액을 같은 조건으로 분석하였고, 분석한 peak의 보유시간과 비교하여 동정하였다. 알코올 함량은 표준성분의 peak area에 대한 시료 peak area와의 비율에 의해 정량하였다.

안동식혜로부터 순수 분리된 효모의 배양특성을 관찰하기 위하여 성장배지인 malt extract broth(3% malt extract, 0.5% bacto peptone) 배지에 성장시키면서 적정 성장온도, 배양특성, 탄소원 종류에 따른 효소 생산의 변화 질소원 종류에 따른 효소 생산의 변화와 배양시간의 경과에 따른 배지의 pH변화 적정산도 및 세포의 성장곡선에 대하여 조사하였다.

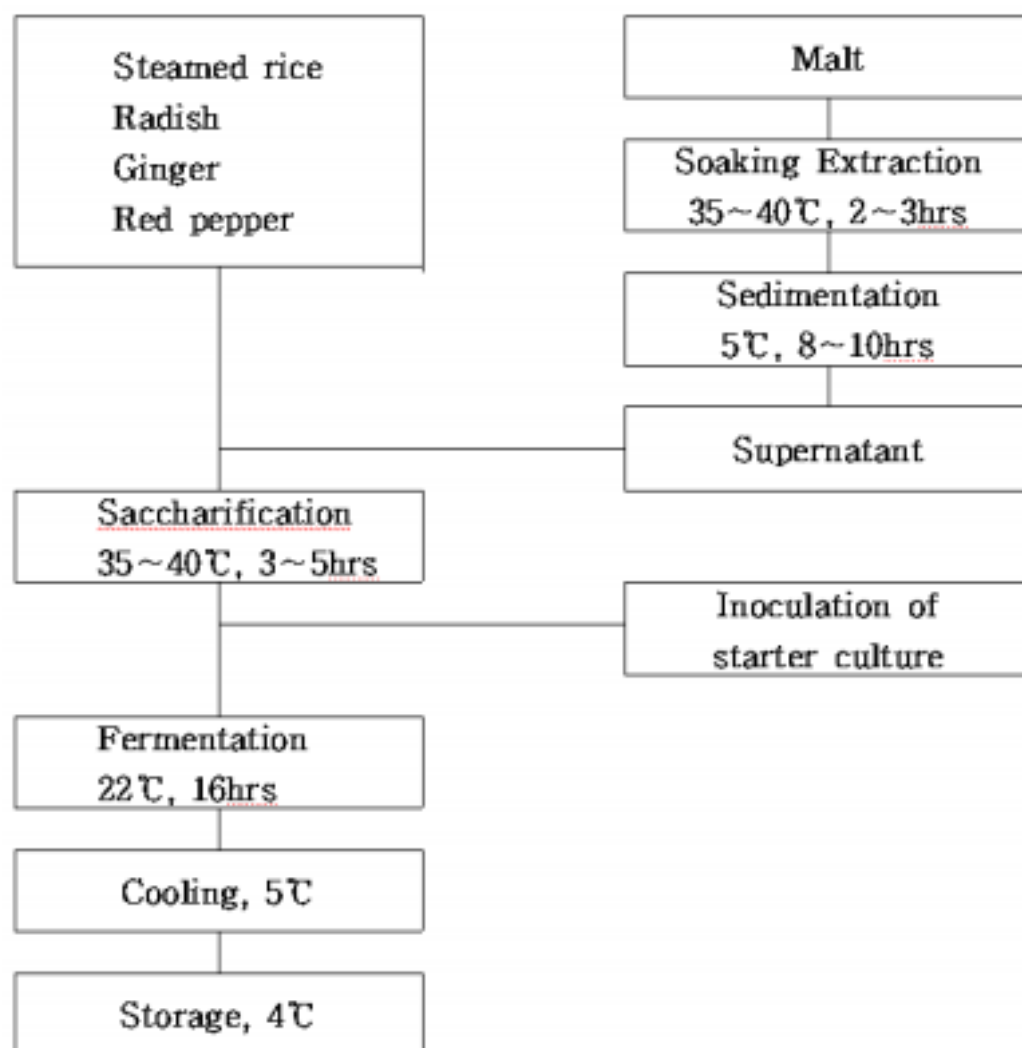


Fig. 13. Protocol for the Preparation of Andong *sikhe*.

2. 연구개발 결과

가. 성분분석

1) 일반성분

전통제법으로 제조한 안동식혜의 숙성 3일째의 일반성분은 Table 1과 같다. 수분 함량은 88.17%, 조지방 함량은 0.51%, 조단백 함량은 1.16%를 나타내었다. 적정산도와 pH는 각각 0.84, 3.52로 나타났고, 당도는 11.2%를 나타내었다.

나. 젖산균의 순수분리 및 동정

1) 순수분리 및 동정

전통적인 방법에 따라 제조된 안동식혜를 시료로부터 세균 72 균주를 1차 분리하였고 이중 성장이 우수하고 산 생성력이 강한 3 균주를 2차 분리하여 이들을 SEC 56, SML 10 및 SML 47이라 명명 하였다. 분리 선정된 3개의 분리주들의 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 검토한 결과는 Table 2, 3에 나타내었다. 3개의 분리주들은 gram 양성이고, 운동성이 없으며, 포자를 형성하지 않는 통성협기성의 간균과 구균이었다. Catalase와 oxidase는 음성이었고, glucose에서 젖산을 생성하는 등 모든 특성들이 젖산균의 일반적인 특성들과 잘 일치하였다.

SEC 56은 쌍 또는 연쇄상 구균이고 arginine에서 NH_3 를 생성하고, lactose, galactose, maltose 및 fructose는 발효하였으나 sucrose, cellobiose, inositol, inulin은 발효하지 못하였다. 이상과 같은 SEC 56의 특성은 *Lactococcus lactis*와 거의 일치하므로 *Lactococcus lactis* SEC 56으로 명명하였으며, SML 10과 SML 47의 2균주에 대하여 발효의 형태 구분과 관련된 특성들은 포도당에서 CO_2 를 생성하지 못하였고, lactose, galactose, mannitol, maltose, sucrose, fructose는 공통으로 발효하였으나 SML 10은 sorbitol, cellobiose, malate, citrate는 발효하지 못했다. 이러한 결과로 SML 47은 *Lactobacillus bulgaricus* SML 47로 SML 10은 *Lactobacillus acidophilus* SML 10으로 각각 명명하였다.

2) 균수측정, pH 및 적정산도

식혜에서 분리한 젓산균들의 pH 및 적정산도의 변화를 관찰한 결과 Fig. 14~15와 같다. *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10은 MRS broth(pH 6.5)에서 37℃에 배양하여 조사하였으며, *Lc. lactis* SEC 56은 Elliker broth(pH 6.5)에서 30℃에 배양한 결과 *Lc. lactis*가 다른 균주에 비해 pH가 급격히 떨어져서 배양 4시간에 pH 4.50으로 낮았으며, 배양 12시간에 pH 4.20에 달하여 일정하게 유지되었고, *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10은 배양 12시간에 pH 4.40, 4.30이었고 그 후 48시간에 pH 3.7까지 완만하게 낮아졌다. 3균주 모두 배양 12시간에서 48시간까지는 pH의 변화는 3.70~4.20으로 큰 변화는 나타나지 않았다. 적정산도의 변화는 *Lc. lactis* SEC 56 균주가 배양 4시간에서 8시간에 0.40~0.62%의 약간 증가하였을 뿐, 그 이후에는 거의 변화가 없었으나, *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10의 경우는 배양 48시간까지 배양초기 0.40~2.30%의 급격하고도 지속적인 증가를 나타내어 *Lc. lactis* SEC 56과는 전혀 다른 양상을 보였다.

Lac. bulgaricus SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10을 MRS배지에 각각 단독 접종하여 세균의 성장의 변화를 나타낸 결과 Fig. 16과 같다. 두 균주 모두 배양 12시간대에 5.2×10^8 cfu/mL, 2.8×10^8 cfu/mL로 성장유도기였으며 배양 20시간에 1.7×10^9 cfu/mL로 성장정지기에 도달하였다. *Lc. lactis* SEC 56는 Elliker배지에 단독 접종하여 배양한 결과 배양 12시간에 5.1×10^6 cfu/mL로 성장유도기로 나타났으며 배양 24시간에 4.8×10^6 cfu/mL로 정지기에 도달하여 *Lc. lactis* SEC 56이 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10에 비해 세균성장은 유사하였으나 세포수에 있어서는 낮은 결과를 보였다.

이러한 결과는 Mikolajcik 등⁴³⁾에 의한 *Lac. acidophilus*의 세포성장 정지기 12시간과 비슷하였으며, Subramania 등⁴⁴⁾에 의한 *Lac. acidophilus*-111과 1899의 37℃ 배양에서 산도 0.19%와 0.24%보다 높게 나타났다.

Table 1. General composition of Andong *sikhe* at the 3rd day of fermentation

	<i>Andong sikhe</i>
Moisture	88.17
Crude fat	0.51
Crude protein	1.16
Crude fiber	0.08
NFE ¹⁾	9.90
Ash	0.19
pH	3.52
TA ²⁾	0.84
BX ³⁾	11.2

¹⁾ NFE : Nitrogen free extraction

²⁾ TA : Titratable acidity

³⁾ Bx : Brix of sugar

Table 2. Morphological and cultural characteristics of lactic acid bacteria isolated from *Andong sikhe*

	<i>Lac. bulgaricus</i> SML 47	<i>Lac. acidophilus</i> SML 10	<i>Lc. lactis</i> SEC 56
Morphological			
1. characteristics			
:			
Gram stain	+ ¹⁾	+	+
Shape	rods & chain	rods	pair & chain
Cell size	1.4 μ m	0.9 μ m	0.3 μ m
Motility	– ²⁾	–	–
2. Colony characteristics			
:			
Agar plate ;			
Form	circular	circular	circular
Elevation	raised	raised	raised
Margin	convex	convex	smooth
Pigment	yellow	yellow	white
Broth	sediment	sediment	sediment

¹⁾positive, ²⁾negative

Table 3. Physiological characteristics of lactic acid bacteria
isolated from Andong *sikhe*

	<i>Lac. bulgaricus</i> SML 47	<i>Lac. acidophilus</i> SML 10	<i>Lc. lactis</i> SEC 56
Gelatin	–	–	–
Catalase	–	–	–
Oxidase	–	–	–
Ammonium from arginine	–	–	+
Growth at 50°C	+ ¹⁾	+	–
Growth at 10°C	+	+	+
Growth at pH 9.5	– ²⁾	–	–
Starch	–	–	–
Carbon sources for growth			
Lactose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Sorbitol	+	–	v ³⁾
Mannitol	+	+	v
Maltose	+	+	+
Sucrose	+	+	–
Fructose	+	+	+
Cellobiose	+	–	–
Inositol	–	–	–
Inulin	–	–	–
L-Arginine	–	–	+
D-Glucose	+	+	+
Malate	–	–	–
Citrate	–	–	–

¹⁾positive response, ²⁾negative response, ³⁾variable response

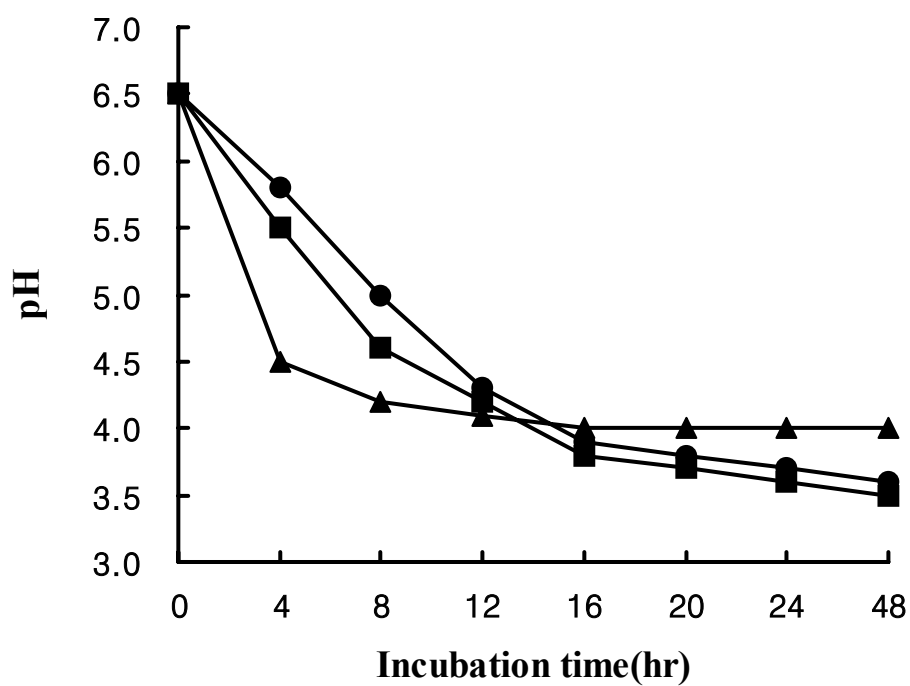


Fig. 14. pH changes during fermentation with single cultures.

- : *Lac. bulgaricus* SML 47
- : *Lac. acidophilus* SML 10
- ▲—▲ : *Lc. lactis* SEC 56

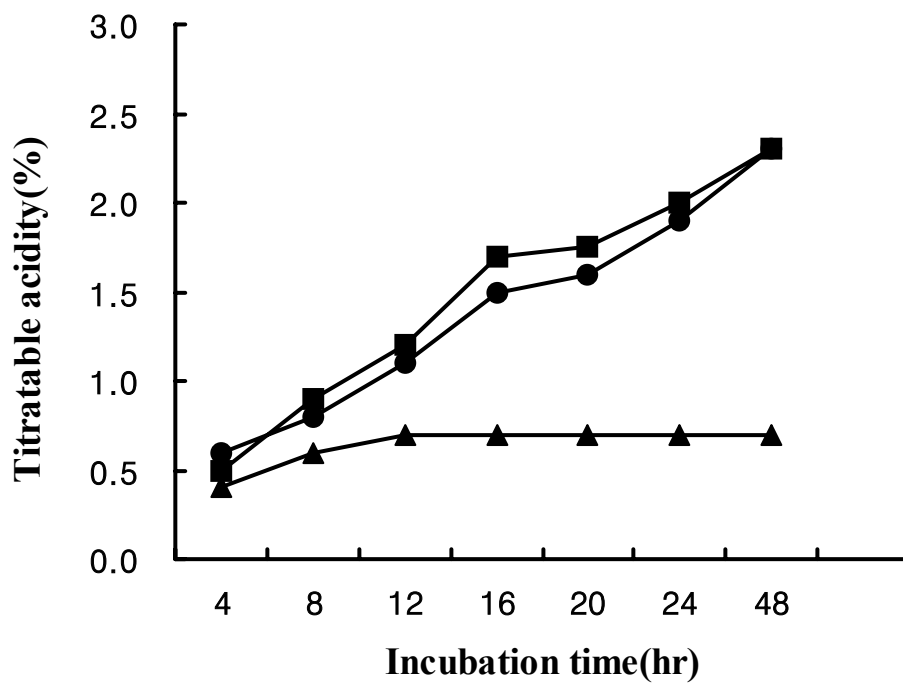


Fig. 15. Titratable acidity changes during fermentation with single cultures.

- : *Lac. bulgaricus* SML 47
- : *Lac. acidophilus* SML 10
- ▲—▲ : *Lc. lactis* SEC 56

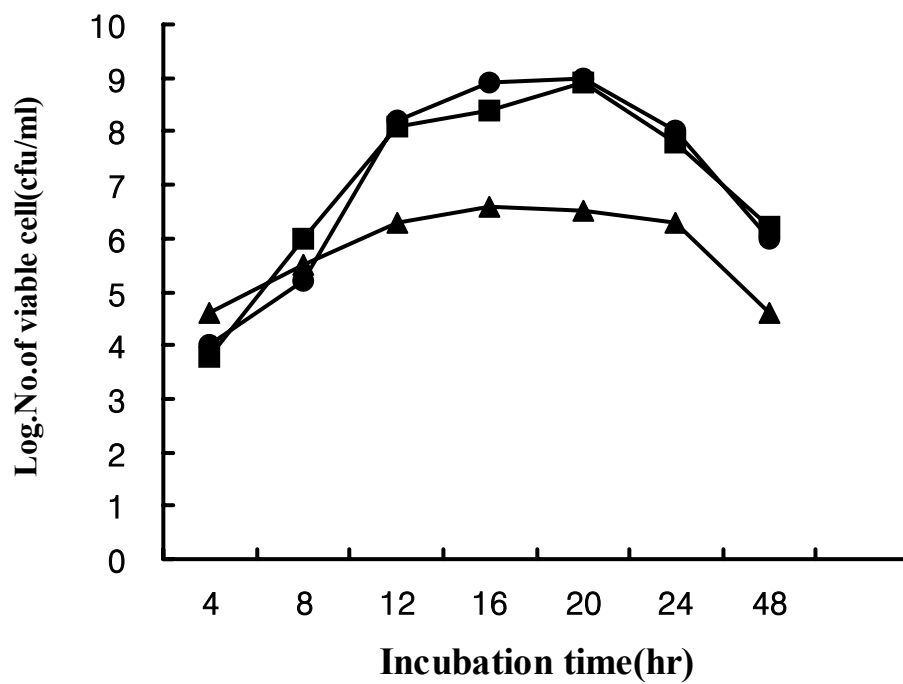


Fig. 16. Growth of during incubation with each single cultures.

- : *Lac. bulgaricus* SML 47
- : *Lac. acidophilus* SML 10
- ▲—▲ : *Lc. lactis* SEC 56

다. 효모의 순수분리 및 동정

1) 분리균의 동정

식혜에서 분리한 효모가 지니는 특성을 조사하기 위하여 CO₂ 가스생성과 알코올 생산능을 검사하였다. CO₂ 가스생성 여부를 조사하기 위하여 각 시험관에 순수 분리된 효모를 malt extract broth(pH 5.4)에 접종하여 30℃에서 48시간 배양한 식혜 효모 SY5에서 가장 많은 양의 CO₂ 가스를 생성하는 것을 분리하였다.

식혜에서 분리된 효모 SY5는 Table 3에서 보는 바와 같이, 형태학적으로는 약간 긴 ovoid형이며 분열은 多面(multilateral)에 의해 분열되는 것으로 나타났다. 고형배지 위에서의 특징 중 집락의 형태는 원형으로서, 가운데 부위는 약간 볼록하며, 가장자리는 매끄럽게 나타났다. carotenoid색소의 반응색채는 황갈색을 띄었고, 집락의 표면과 색채는 흐리면서도 부드럽게 나타났으며, 조직은 점성이 있었다.

API 20C AUX analytab kits를 이용하여 분석 프로필 색인(API)에 의한 SY5의 생화학적 검사는 Table 4, 5와 같다. 탄소원에 따른 이용능은 glucose, galactose, maltose, sucrose 및 raffinose 등은 발효하나, cellobiose, lactose, trehalose 및 melizitose 등은 발효하지 못하였다. glucose, galactose, solbitol, α-methyl-D-glucoside, maltose, sucrose 및 raffinose 등은 자화하나, glycerol, 2-keto-D-gluconate, L-arabinose, D-xylose, adonitol, xylitol, inositol, N-acetyl-D-glucosamine, cellobiose, lactose, trehalose 및 melizitose 등은 자화하지 못하였다. 이상의 실험에서 나타난 결과들로 보아 식혜에서 분리된 SY 5는 *Sacchromyces serevisiae* SY 5로 명명하였다.

Table 3. Morphological and cultural characteristics of
S. cerevisiae SY 5 isolated from Andong *sikhe*

	Characteristics
1. Liquide media(MP ¹⁾ broth)	
Shape of vegetative cells	ovoid
Vegetative reproduction	budding(multilateral)
Cell size	2.5-5.5 μ m
Ascospore	absent
Pseumycellium	present
True-mycellium	absent
2. Solid media(MP agar)-colony	
Surface	circular
Margin	entire
Elevation	tan
Color	shiny
Mucoid	coherent

¹⁾MP : malt extract + bacto peptone

Table 4. Fermentation of carbohydrates by *S. cerevisiae* SY 5
isolated from Andong *sikhe*

Carbohydrates	Fermentation	
	24 hr.	48 hr.
Glucose	+ ¹⁾	+
Galactose	+	+
Cellobiose	- ²⁾	-
Lactose	-	-
Maltose	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	-	-
Melizitose	-	-
Raffinose	+	+

¹⁾positive,

²⁾negative

Table 5. Assimilation of carbon compounds by *S. cerevisiae*
SY 5 isolated from Andong *sikhe*

Carbon compounds	Assimilation	
	24 hr.	48 hr.
Glucose	+ ¹⁾	+
Glycerole	- ²⁾	-
2-Keto-D-gluconate	-	-
L-Arabinose	-	-
D-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
Xylitol	-	-
Galactose	+	+
Inositol	-	-
Sorbitol	+	+
α-Methyl-D-glucoside	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-
Cellobiose	-	-
Lactose	-	-
Maltose	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	-	-
Melezitose	-	-
Raffinose	+	+

¹⁾positive , ²⁾negative

2) 분리균의 특성

Durham tube를 이용하여 *S. cerevisiae* SY 5의 CO₂ 가스 생성여부를 조사한 결과 470개의 순수 효모 집락 중 가장 강한 CO₂ 가스 생성을 나타내었으므로 식혜 제조에 이용하였다.

시험균 *S. cerevisiae* SY 5를 Malt extract broth(pH 5.4)에서의 알코올 생성 정도를 측정한 결과 Fig. 16에 나타내었다. 배양 4시간대에 약 10 %의 알코올이 생성되기 시작하여 배양 32시간대에는 약 15 %의 알코올이 생성되었다.

Malt extract 배지(pH 5.4)에 *S. cerevisiae* SY 5의 적정 성장온도를 관찰한 결과 Fig. 17과 같다. 1.0%(v/v)의 배양물을 접종하여 진탕배양하면서 4~45℃의 범위에서 36시간 배양한 후 660nm에서 균의 성장을 측정한 결과, 15℃에서 40℃의 넓은 범위에서 성장을 하였으나 30℃에서 가장 높게 나타났다.

이러한 결과는 Mahoney 등⁴⁵⁾에 의한 *Kluyveromyces fragilis*의 적정성장온도 30℃, Itoh 등⁴⁶⁾에 의한 *Candida pseudotropicalis* 1357과 A60, *Toliopsis versatilis* M6과 *Tolulopsis sphaericae* J28의 30℃, Castillo와 Moreno⁴⁷⁾에 의한 *Candida pseudotropicalis* NCYC 744 의 적정배양온도 30℃, 그리고 Dickson 등⁴⁸⁾에 의한 *Kluyveromyces lactis*의 30℃의 적정성장온도 30℃라는 결과와 비슷하였다.

세포수의 변화는 1.0%(v/v)의 배양물을 접종하고 진탕배양하면서 8시간 간격으로 채취한 배양물의 세포수를 측정한 결과 Fig. 18에서 보는바와 같이 배양 32시간에 4.9×10^9 cfu/mL로 세포의 성장정지기에 도달하였으며 배양 40시간에 1.8×10^9 cfu/mL로 서서히 사멸기로 접어들었다. *S. cerevisiae* SY 5 배양물을 malt extrat 배지에 1.0%(v/v)접종하여 28시간 동안 배양하면서 pH와 적정산도의 변화를 관찰한 결과 Fig. 19에 나타내었다. pH와 적정산도의 변화는 배양 12시간에 pH 4.50과 적정산도 1.23%의 빠른 산생성을 보였으며, 12시간에서 24시간까지는 뚜렷한 pH와 산도의 변화는 나타나지 않았으며, 배양 28시간에는 pH 3.30과 산도 0.45%로 나타났다.

이러한 결과는 Subramanian 등⁴⁴⁾에 의한 *S. fragilis*의 경우 33℃에서 배양 20시간에 산도 0.34 %보다도 높게 나타났으며, 37℃에서 산도 3.38 %보다는 낮게 나타났다.

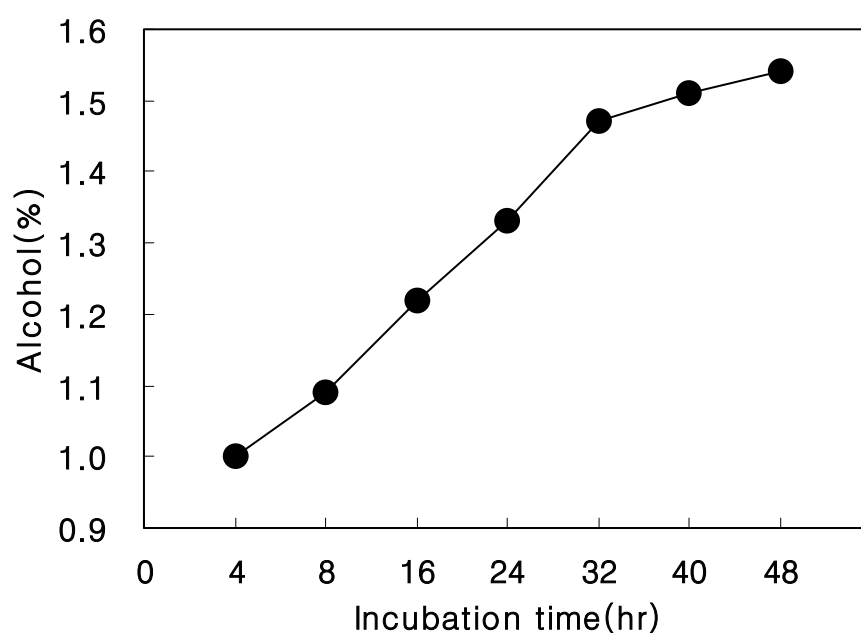


Fig. 17. Alcohol production of *S. cerevisiae* SY 5 during incubation at 30°C in malt extract broth (pH 5.4).

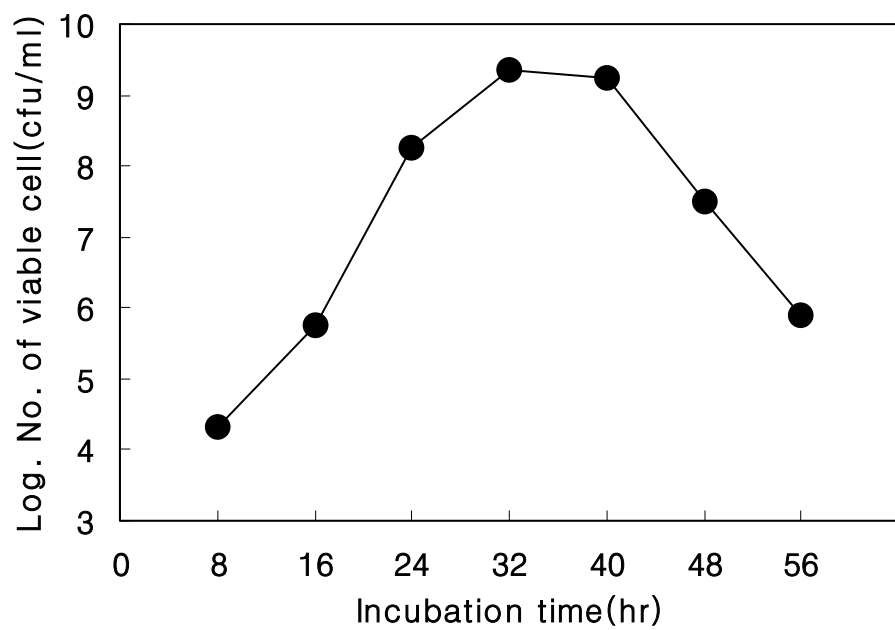


Fig. 18. Cell growth of *S. cerevisiae* SY 5 in malt extract broth at 30°C.

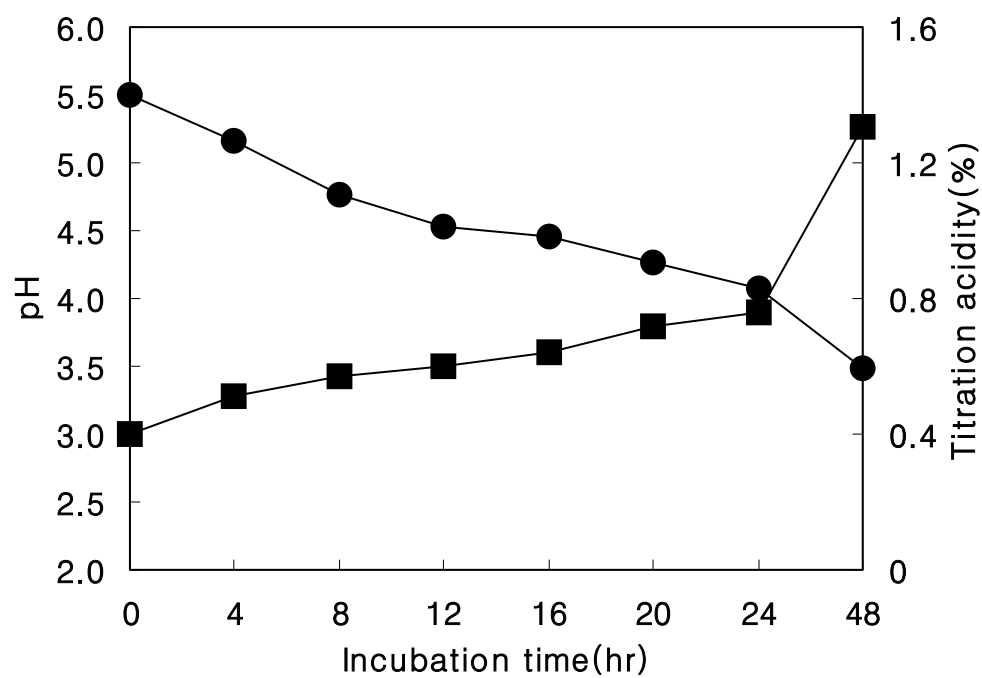


Fig. 19. Changes of pH and titratable acidity during incubation with *S. cerevisiae* SY 5 in malt extract broth at 30°C.

●—●: pH, ■—■: TA

제 3 절 생약재가 첨가된 기능성 전통안동식혜의 제조 조건 확립

1. 실험방법 및 연구내용

가. 실험재료

본 실험에서 사용된 감초, 두충, 오미자, 구기자, 결명자, 건마늘 및 건강 등의 국내산 생약재는 실험에 사용하기 위해 경동 시장에서 구입하였으며, 홍삼 농축액, 설탕, 구연산은 각각 (주)한국인삼공사, (주)제일제당, (주)홍성에서 판매되는 제품을 구입하여 사용하였다.

나. 생약재 적정 추출조건 설정

1) 환류냉각 추출 장치 및 추출 조건

생약재 적정 추출방법 및 용매와의 비율을 결정하기 위하여 생약재(감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자)에 대한 물의 비율을 8배, 10배, 12배, 14배로 달리하고, 환류냉각 추출 장치를 이용하여 100℃로 3시간 동안 가열하면서 시간별로 추출되어 나오는 가용성 고형분량을 측정하였다.

다. 적정 용매 선정

1) 열수추출

감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 등에 10배의 water를 가하여 100℃에서 3시간 동안 추출하면서 시간별 가용성 고형분량의 변화를 측정하였다.

2) 50% ethanol 추출

감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 등에 10배의 50% ethanol을 가하여 100℃에서 3시간 동안 추출하면서 시간별 가용성 고형분량의 변화를 측정하였다.

3) 75% ethanol 추출

감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 등에 10배의 75% ethanol 을 가하여 100℃에서 3시간 동안 추출하면서 시간별 가용성 고형분량의 변화를 측정 하였다.

라. 생약재 추출액의 이화학적 분석

1) 가용성 고형분 측정

가용성 고형분(soluble solid)은 굴절당도계(Hand refractometer, model N1, range : 0~35%, Atago, Japan)를 사용하여 상온에서 3회 측정한 후 °Brix로 나타내었다.

2) 탁도 측정

추출액의 탁도(turbidity)는 water, 50% ethanol, 75% ethanol 추출시 추출 완료시점에서 spectrophotometer(V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 650nm에서 측정하여 흡광도로 나타내었다.

3) 색도 측정

추출액의 색도는 색차계(Color difference meter, Color QUEST II Sphere System, USA)를 이용하여 water, 50% ethanol, 75% ethanol 추출시 추출 완료시점에서 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 측정하였다. 이때 표준 백색판의 L, a, b값은 99.93, -0.09, -0.02 이었다.

4) 산도 측정

추출액의 산도는 water, 50% ethanol, 75% ethanol 추출시 추출 완료 시점에서 산도를 측정하였다. 적정 용액으로는 0.1N NaOH용액을 사용하였으며, 적정 시 pH 8.3의 종말점까지 소비된 0.1N NaOH 용액의 양을 측정하여 사과산(malic acid)함량으로 환산하였다.

5) 유리당 함량 측정

추출액의 유리당 함량은 HPLC(TCM, Waters, Japan)를 사용하여 측정하였다. 이때 이동상은 78% acetonitrile 이었고, flow rate는 1.0mL/min 이었으며, 분석에 사용한 column은 carbohydrate column (4.60×250mm, Waters, U.S.A), 검출기는 RI detector(RI-903, Jasco, JAPAN)를 사용하였다.

마. 생리활성 성분측정

1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀의 함량(total polyphenol content)은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis방법⁴⁹⁾으로 측정하였으며, 각각의 추출조건에 따라 제조된 추출액의 2배 희석액을 사용하였다. 즉, 희석액 5mL에 Folin reagent 5mL을 가하고 3분간 정지한 다음 5mL의 10% Na₂CO₃용액을 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 정지한 후 분광광도계를 사용하여 760nm에서 흡광도를 측정하고 (+)catechin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

2) 전자공여작용 측정

추출물의 전자공여작용(electron donating abilities, EDA)은 강 등⁵⁰⁾의 방법을 변형하여 각각의 추출물에 대한 DPPH(2,2-diphenyl-picrylhydrazyl)의 전자공여효과로 각 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 추출물 0.2mL에 4×10⁻⁴M DPPH용액(99.9% EtOH에 용해) 0.8mL, 0.1M phosphate buffer(pH 6.5) 2mL와 99.9% EtOH 2mL을 가하여 총액의 부피가 5mL가 되도록 하였다. 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에 10분 방치한 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여효과는 추출물의 첨가 전·후의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

3) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성의 측정은 Marklund와 Marklund의 방법을 변형한 Kim 등⁵¹⁾의 방법을 이용하여 실시하였다. 즉, 각 추출물을 감압농축한 tris-HCl buffer(50mMtris [hydroxymethyl]amino-methane+10mM EDTA, pH 8.5)를 이용하여 pH 8.5로 조절된 시료액을 만들었다. 각 시료 0.2mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50mMtris[hydroxymethyl] amino-methane+10mM EDTA) 3mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2mL를 가하고 25℃에서 10분간 방치 후 1N HCl 1mL로 반응을 정지시킨 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료 첨가 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$SOD\text{유사활성}(\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

단, A, B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

4) 아질산염 소거작용의 측정

아질산염 소거효과(nitrite-scavenging effect)는 Gray 등⁵²⁾의 방법으로 측정하였다. 즉, 1mM 아질산나트륨 용액 1mL에 각각의 추출물을 2mL를 가하고 여기에 0.1N 염산(pH 1.2) 및 0.2 N 구연산 완충용액(pH 3.0, 4.2 및 pH 6.0)을 7mL 가하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0으로 달리하여 반응용액의 부피를 10mL로 하였다. 이를 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 다음 반응액을 1mL씩 취하고 여기에 2% 초산 5mL, Griess 시약(acetic acid에 1% sulfonyl acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것으로 사용 직전에 제조) 0.4mL를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에서 방치시킨 후 분광 광도계를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 그리고 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4mL를 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염 소거능은 추출액 첨가전후의 아질산염 백분율(%)로 표기하였다.

$$N(\%) = (1 - \frac{(A-C)}{B}) \times 100$$

N : 아질산염 소거율

A : 1mM NaNO₂ 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B : 1mM NaNO₂ 용액에 시료대신 증류수를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

C : 시료 추출물 자체의 흡광도

5) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 작용 측정

ACE(angiotensin I-converting enzyme) 저해작용은 Cushman과 Cheung의 방법²⁷⁾을 변형하여 측정하였다. 즉, 추출물 50 μ l에 450mM NaCl을 함유하는 100mM sodium borate buffer(pH 8.3) 100 μ l를 가하고 5mM hippuryl-histidyl-leucine 용액 (300mM NaCl을 함유하는 100mM sodium borate buffer(pH 8.3)에 용해) 50 μ l를 가한 후 37℃에서 10분간 전배양하였다. 이 반응액에 ACE조효소액 50 μ l를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1.75N HCl 100 μ l를 가하여 반응을 종료시켰다. 여기에 ethyl acetate 1mL를 가하여 진탕한 후 상등액 0.5mL를 취하여 100℃에서 1시간가량 건조시켜 증류수 1mL를 가하여 용해시킨 다음 228nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같이 계산하였다. 이때 공시험은 추출물 대신 증류수 50 μ l를 가하였고 대조구는 1.75N HCl 100 μ l를 가한 후 ACE조효소액 50 μ l를 첨가하여 반응시켰다. ACE 저해 효과는 추출물의 첨가 전·후의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$ACE\text{저해율} = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

단, A,B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임

2. 연구개발 결과

가. 생약재의 적정 추출조건 설정

1) 적정 추출 용매비 결정

생약재의 추출방법 및 용매와의 비율을 결정하기 위하여 구기자, 오미자, 결명자에 대한 용매의 비율을 8배, 10배, 12배, 14배로 달리하여 환류냉각 추출장치로 가열 추출하면서 시간별로 추출되어 나오는 가용성 고형분량을 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 20~22에 나타내었다. 구기자는 8배 water를 가했을 때 30분까지 급격하게 상승하다가 100분 이후에는 평형에 도달하였으며 10배의 water를 가했을 때는 30분까지 급격하게 상승하다가 50분 이후 평형에 도달하였다. 12배와 14배는 60분까지 완만하게 상승하다가 이후에는 평형에 도달하였다. 오미자는 구기자와 비슷한 결과를 보였다. 결명자는 8배, 10배, 12배 water를 가했을 때 120분까지 완만하게 상승하다가 이후에 평형에 도달하였다. 14배 water를 가했을 때 90분까지 완만하게 상승하다가 이후 평형에 도달하였다. 각 시료의 8배, 10배, 12배, 14배 처리구별 추출 수율은 구기자는 51.2%, 52.0%, 51.6%, 51.8%, 오미자는 48.8%, 50.0%, 48.0%, 47.6%, 결명자는 24.0%, 25.0%, 22.8%, 21.0%로 각각 나타나 용매와의 비율이 10배일 때 추출수율이 가장 좋은 것으로 나타났다.

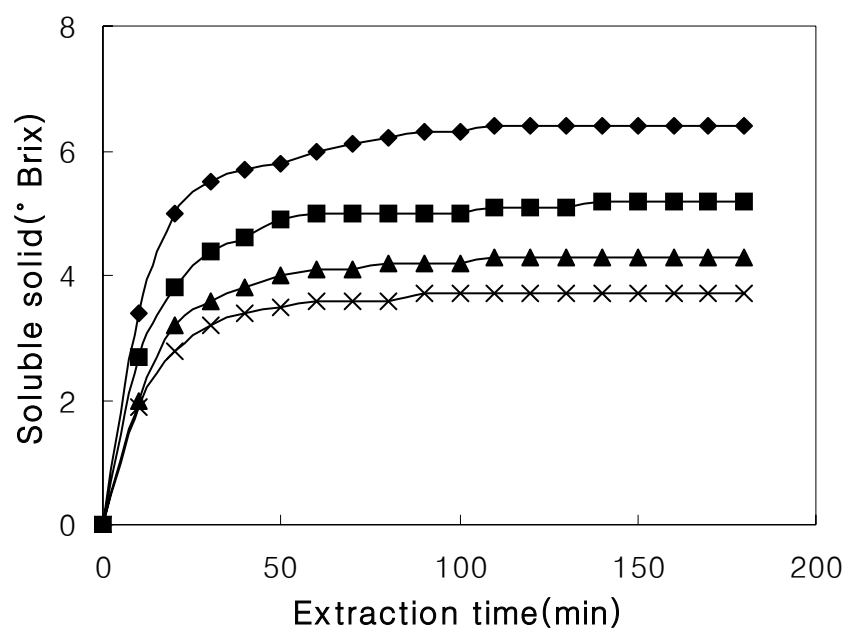


Fig. 20. Changes in soluble solid contents of *Lycium chinense* with water extraction ratio.

—◆— : 8 fold, —■— : 10 fold, —▲— : 12 fold, —×— : 14 fold

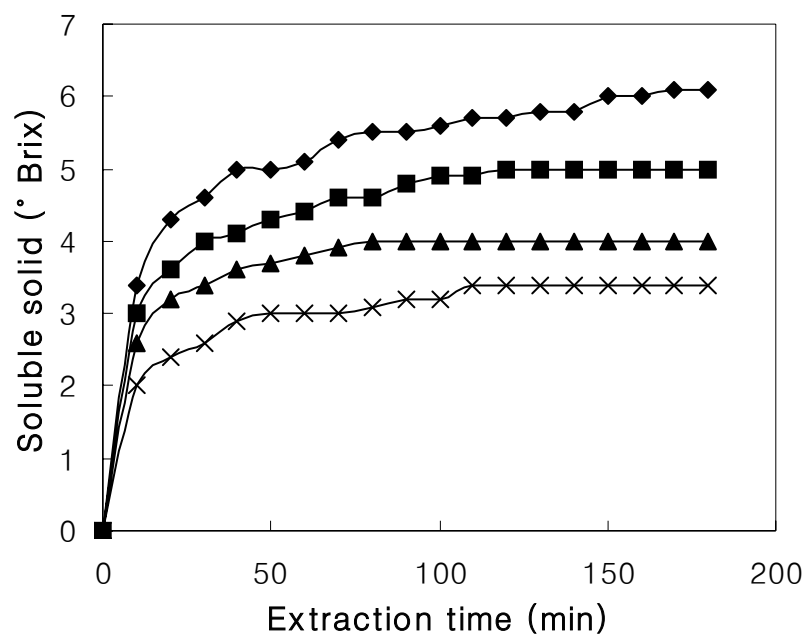


Fig. 21. Changes in soluble solid contents of *Schiznadra chinensis* with water extraction ratio.

—◆— : 8 fold, —■— : 10 fold, —▲— : 12 fold, —×— : 14 fold

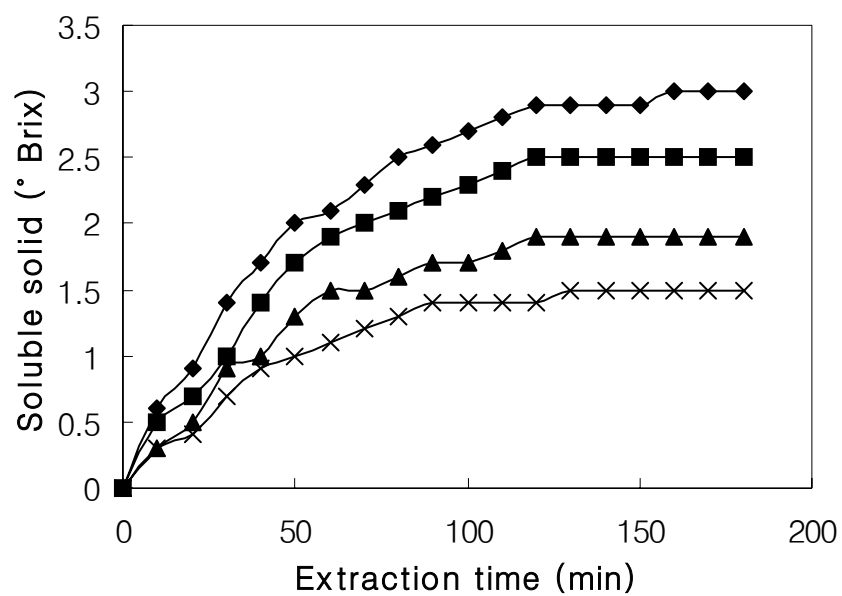


Fig. 22. Changes in soluble solid contents of *Cassia tora L.* with water extraction ratio.

—◆— : 8 fold, —■— : 10 fold, —▲— : 12 fold, —×— : 14 fold

2) 적정 추출 용매결정

감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 등에 10배의 water, 50% ethanol, 75% ethanol을 가하여 3시간 동안 추출하면서 가용성 고형분량의 변화를 측정하여 Fig. 23~24에 나타내었다. 50%와 75% ethanol 추출시 인삼, 건강, 구기자, 두충은 오미자와 같이 50% ethanol 추출시 보다 75% ethanol 추출시에 가용성 고형분량이 더 높았으며, 감초와 결명자는 건마늘과 같이 50% ethanol 추출시에 더 높은 것으로 나타났다. water 추출시는 모든 생약재에서 높은 가용성 고형분량을 나타내어 생약재 추출에 적당한 용매라고 판단되었다.

가) 열수추출

감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 등에 10배의 water를 가하여 3시간 동안 추출하면서 가용성 고형분량의 변화를 측정하여 Fig. 25에 나타내었다. 건마늘이 가장 높은 값을 나타내었으며, 건강이 가장 낮은 값을 나타내었다. 건마늘과 감초는 120분까지 완만하게 증가하다가 이후 평형에 도달하였으며 다른 생약재들은 50분 이후 평형에 도달하였다. 과육이 약한 건마늘, 구기자, 오미자는 높은 가용성 고형분량을 나타내었고 상대적으로 단단한 감초, 두충, 결명자, 인삼, 건강은 낮은 가용성 고형분 함량을 나타내었다.

나) 50% ethanol

감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 등에 10배의 50% ethanol을 가하여 3시간 동안 추출하면서 가용성 고형분량의 변화를 측정하여 Fig. 26에 나타내었다. 전체적으로 열수 추출에 비해 가용성 고형분량은 낮았고 감초, 구기자, 오미자, 건마늘은 다른 생약재에 비해 높은 함량을 나타내었다. 건마늘과 감초를 제외한 생약재들은 추출초기에 대부분의 가용성 고형분이 추출되어 평형을 이루었으나 건마늘과 감초는 추출 후반인 140분 후에 평형을 이루었다.

다) 75% ethanol

감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 등에 10배의 75% ethanol

을 가하여 3시간 동안 추출하면서 가용성 고형분량의 변화를 측정하여 Fig. 27에 나타내었다. 가용성 고형분량은 50% ethanol과 비슷한 경향을 보였으나 건마늘은 현저하게 낮은 함량을 나타내었다. 감초는 50% ethanol 추출시와 마찬가지로 140분 이후 평형에 도달하여 가용성 고형분의 추출시간이 가장 긴 것으로 나타났다. 이 결과에서 ethanol 함량이 낮을수록 가용성 고형분 함량은 높고 추출시간은 감소하여 생약재 추출시 열수 추출이 가장 효율적인 방법이라 판단된다.

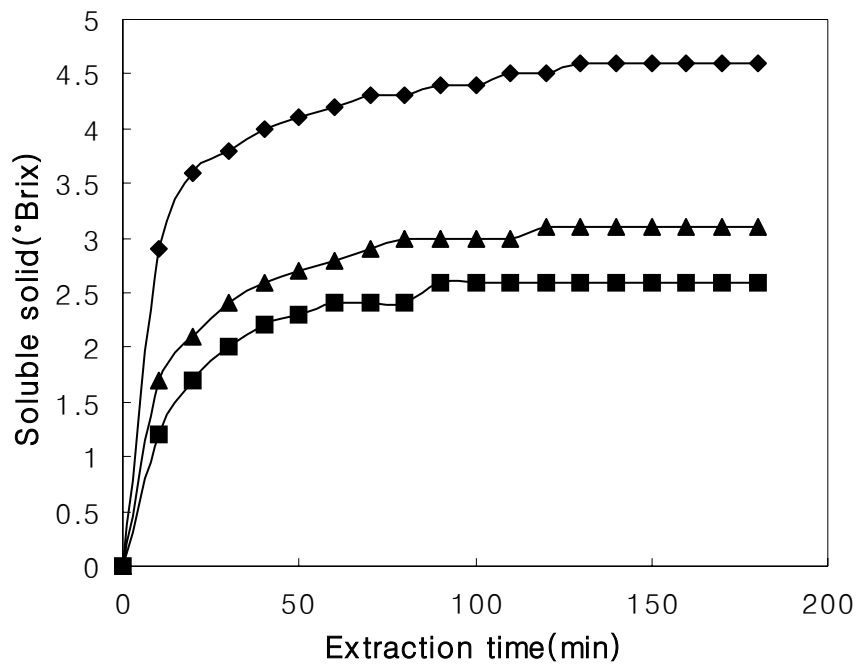


Fig. 23. Changes in soluble solid contents of *Schiznadra chinensis* extraction with various solvents.

—▲— : water, —■— : 50% ethanol, —◆— : 75% ethanol

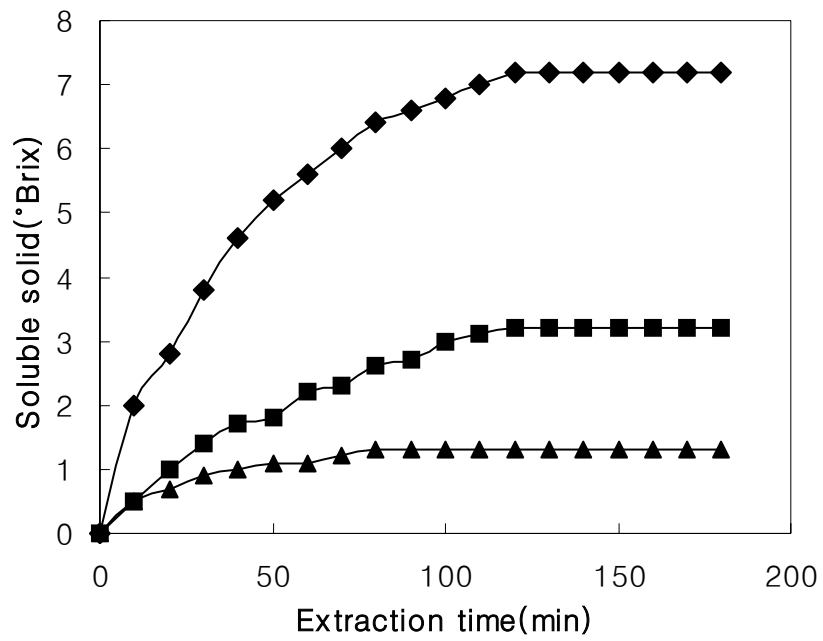


Fig. 24. Changes in soluble solid contents of dried garlic extraction with various solvents.

—▲— : water, —■— : 50% ethanol, —◆— : 75% ethanol

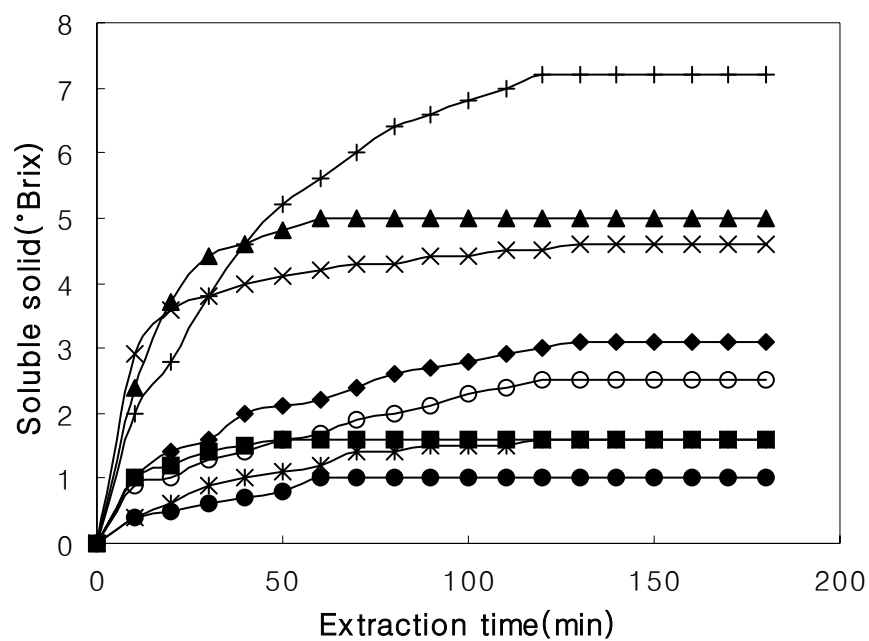


Fig. 25. Changes in soluble solid contents of various medicinal plants with water extraction.

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| —◆— : Glycyrrhiza uralensis, | —■— : Eucommia ulmoides, |
| —▲— : Lycium chinense, | —×— : Schizandra chinensis, |
| —*— : Cassia tora L, | —●— : Dried ginger, |
| —+— : Dried garlic, | —○— : Ginseng |

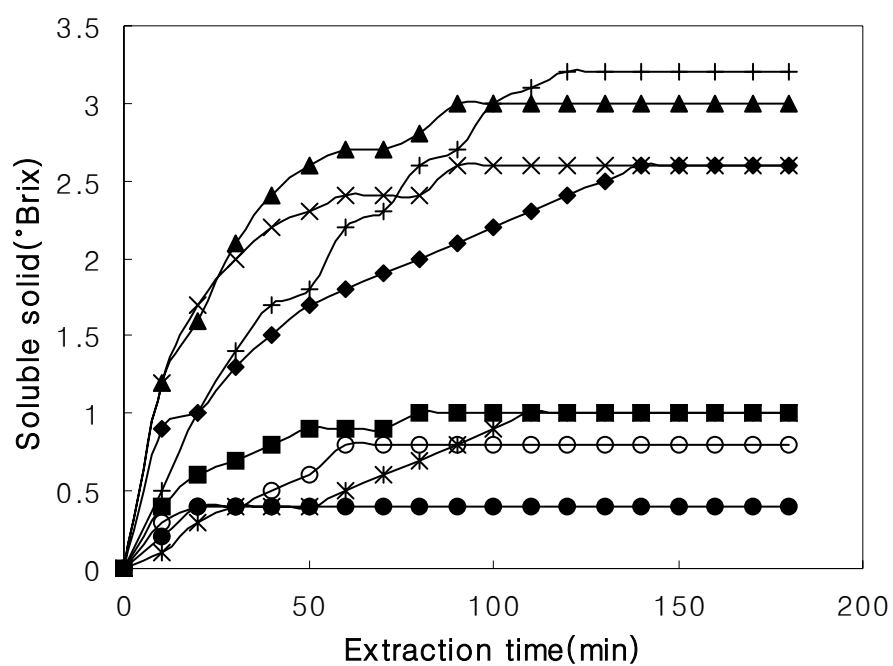


Fig. 26. Changes in soluble solid contents of various medicinal plants with 50% ethanol extraction.

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| —◆— : Glycyrrhiza uralensis, | —■— : Eucommia ulmoides, |
| —▲— : Lycium chinense, | —×— : Schizandra chinensis, |
| —*— : Cassia tora L, | —●— : Dried ginger, |
| —+— : Dried garlic, | —○— : Ginseng |

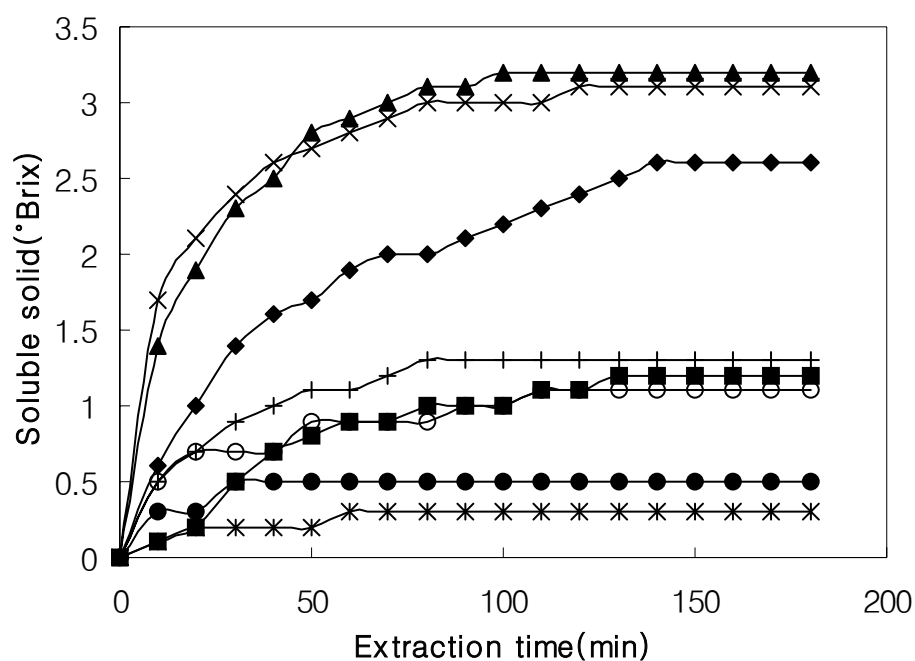


Fig. 27. Changes in soluble solid contents of various medicinal plants with 75% ethanol extraction.

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| —◆— : Glycyrrhiza uralensis, | —■— : Eucommia ulmoides, |
| —▲— : Lycium chinense, | —×— : Schizandra chinensis, |
| —*— : Cassia tora L., | —●— : Dried ginger |
| —+— : Dried garlic, | —○— : Ginseng |

나. 생약재 추출액의 이화학적 분석

1) 탁도

감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 추출액의 탁도(turbidity)는 water, 50% ethanol, 75% ethanol 추출시 추출 완료시점에서 spectrophotometer를 이용하여 650nm에서 측정하였다. 감초 추출액의 탁도는 Fig. 28에 나타내었다. 50% ethanol 추출시 가장 높은 값을 나타내었으며, 75% ethanol 추출시에는 가장 낮은 값을 나타내었다. 두충 추출액의 탁도는 Fig. 29에 나타내었으며 50% ethanol 추출시 가장 높은 값을 나타내었고 열수 추출시 가장 낮은 값을 나타내었다. 구기자 추출액의 탁도는 Fig. 30에 나타내었으며 50% ethanol 추출시 탁도가 가장 높았고, 75% ethanol 추출시 탁도가 가장 낮았다. 오미자 추출액의 탁도는 Fig. 31에 나타내었으며 water 추출시 탁도가 가장 높았고 50% ethanol 추출시 가장 낮은 값을 나타내었다. 결명자 추출액의 탁도는 Fig. 32에 나타내었으며 ethanol 함량이 증가할수록 탁도가 낮아지는 경향을 나타내어 water 추출시 가장 높은 값을 나타내었고 75% ethanol 추출시 가장 낮은 값을 나타내었다. 건마늘의 탁도는 Fig. 33에 나타내었으며 50% ethanol 추출시 가장 높은 값을 나타내었고 75% ethanol 추출시에는 값이 0.0087로 나타나 생약재 추출액 중 가장 낮은 값을 나타내었다. 건강 추출액의 탁도는 Fig. 34에 나타내었으며 50% ethanol에서 탁도가 높았고 75% ethanol에서 가장 낮게 나타나 구기자와 비슷한 경향을 보여 주었다. Fig. 35은 인삼 추출액의 탁도를 나타낸 것이며 결명자와 마찬가지로 ethanol 함량이 증가할수록 탁도가 낮아지는 경향으로 나타났다.

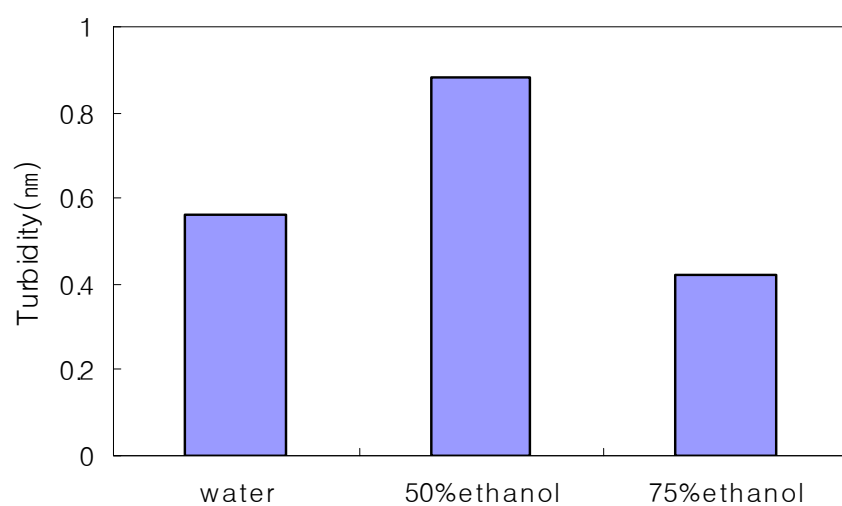


Fig. 28. Changes in turbidity of *Glycyrrhiza uralensis* extraction with various solvents.

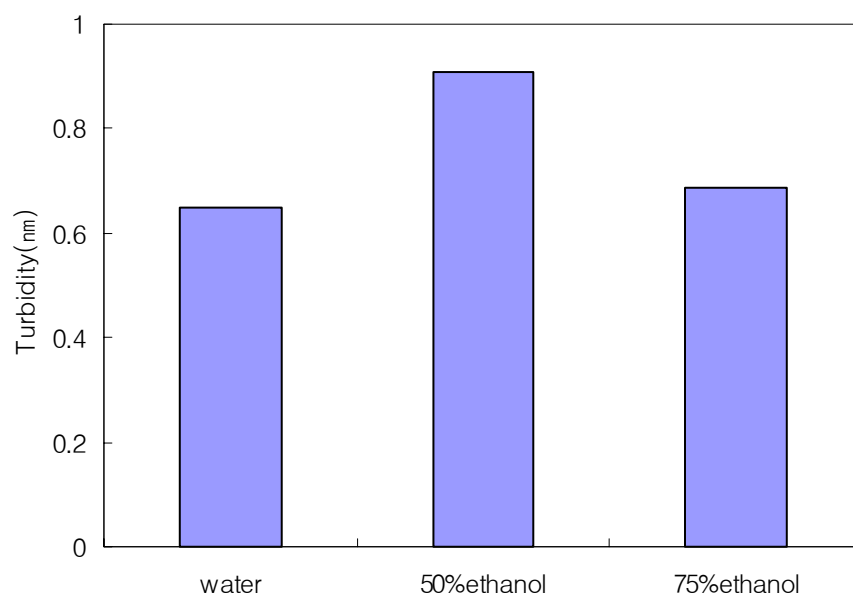


Fig. 29. Changes in turbidity of *Eucommia ulmoides* extraction with various solvents.

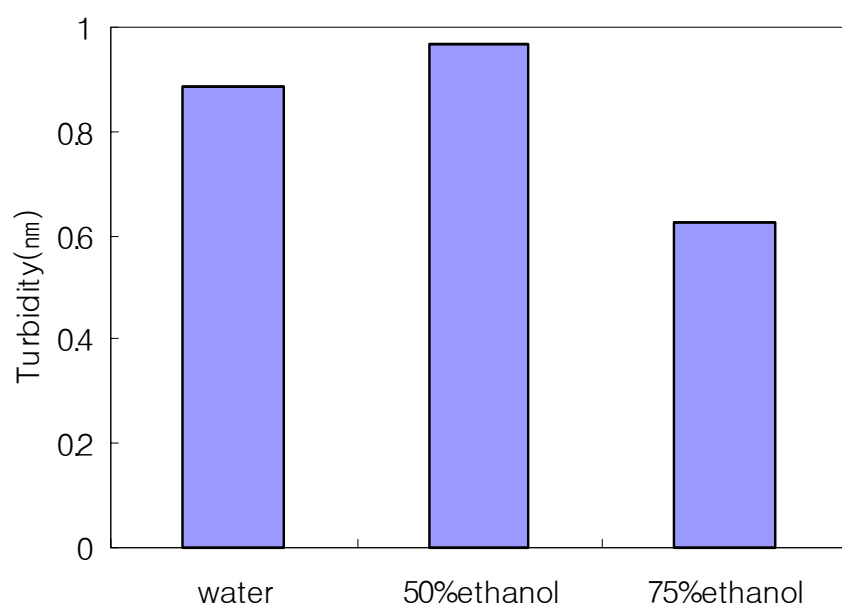


Fig. 30. Changes in turbidity of *Lycium chinense* extraction with various solvents.

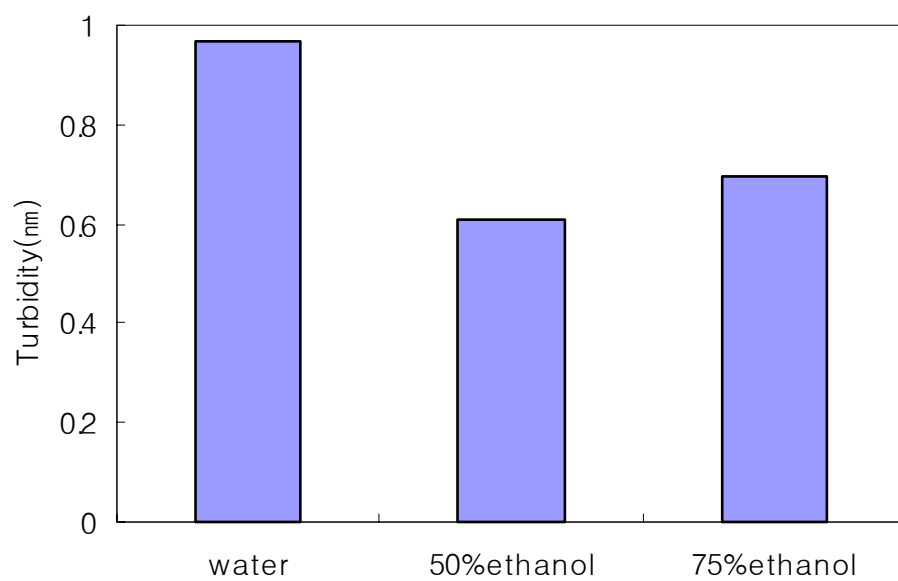


Fig. 31. Changes in turbidity of *Schiznadra chinensis* extraction with various solvents.

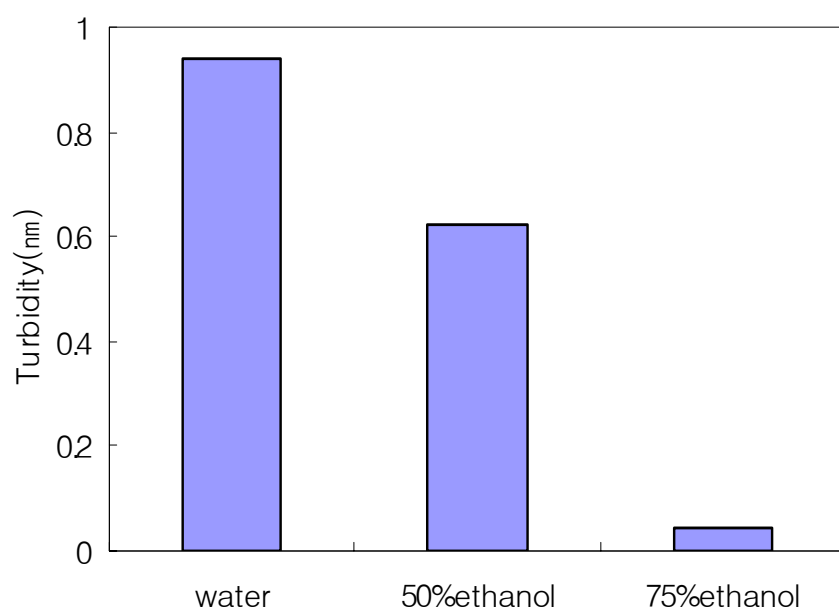


Fig. 32. Changes in turbidity of *Cassia tora L.* extraction with various solvents.

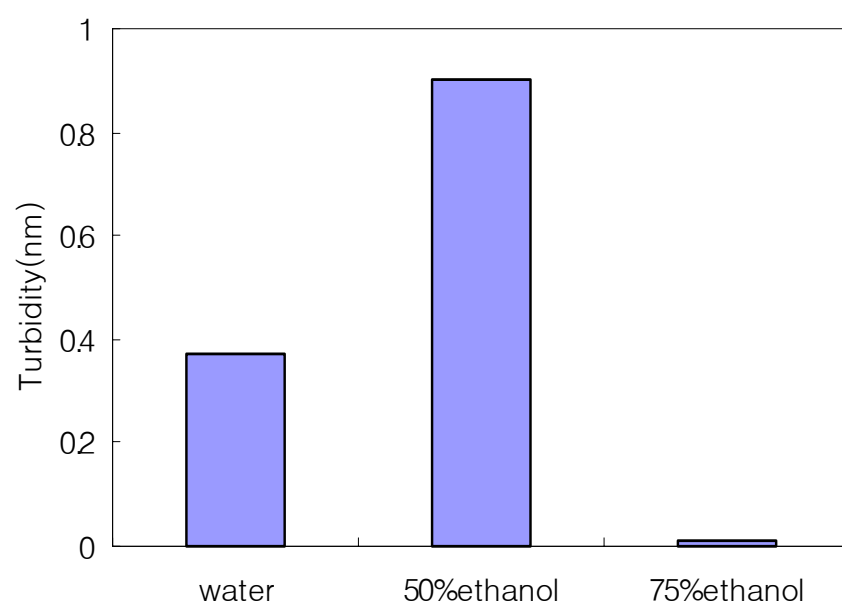


Fig. 33. Changes in turbidity of dried garlic extraction with various solvents.

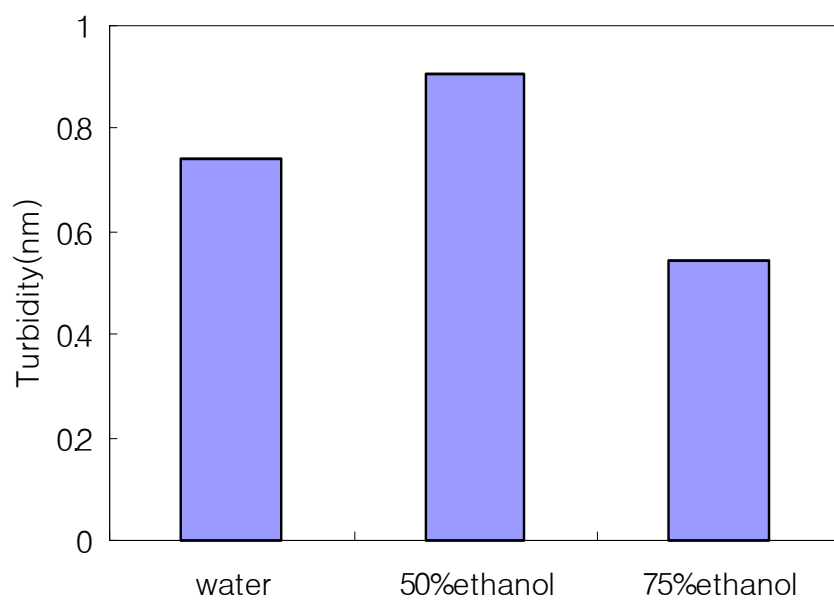


Fig. 34. Changes in turbidity of dried ginger extraction with various solvents.

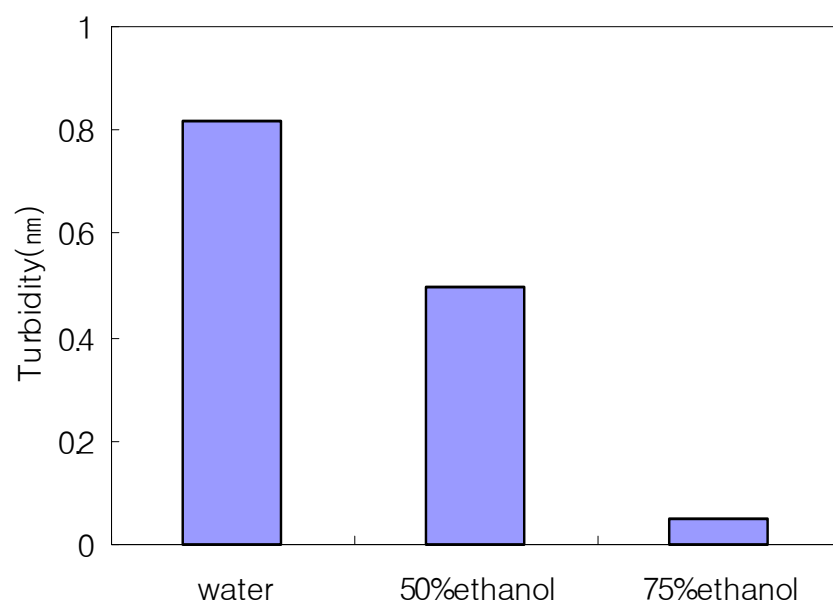


Fig. 35. Changes in turbidity of ginseng extraction with various solvents.

2) 색도

색도는 색차계를 이용하여 water, 50% ethanol, 75% ethanol 추출시 추출완료 시점에서 색도를 측정하였다. Fig. 36은 감초 추출액의 색도 변화를 나타낸 것으로 water 추출시 L값이 가장 높고 a값이 가장 낮았다. water와 75% ethanol 추출시에는 비슷한 경향을 나타내었으나 50% ethanol 추출시에는 water와 75% ethanol 추출시 보다 L값과 b값은 낮았으나 a값은 높게 나타났다. Fig. 37은 두충의 색도 변화를 나타낸 것으로 75% ethanol 추출시 L값과 b값이 가장 높게 나타났고 a값은 가장 낮게 나타났다.

water와 50% ethanol 추출시에는 L값과 b값은 차이가 없었으나 a값이 water가 낮게 나타났다. Fig. 38은 구기자의 색도 변화를 나타낸 것으로 두충과 마찬가지로 75% ethanol 추출시 L값과 b값이 가장 높게 나타났고 a값은 가장 낮게 나타났으며 water와 50% ethanol 추출시에는 비슷한 값을 나타내었다. Fig. 39는 오미자 추출액의 색도 변화를 나타낸 것으로 water와 50% ethanol 추출시 색도는 비슷한 값을 보였으나, 75% ethanol 추출시에는 L값이 가장 높게 나타나 약간의 차이를 보였다. Fig. 40은 결명자의 색도 변화를 나타낸 것으로 water와 50% ethanol 추출시에는 비슷한 값을 나타내었고 75% ethanol 추출시 a값이 (-)값을 나타내었다. Fig. 41은 건강의 색도 변화를 나타낸 것으로 두충과 구기자와 비슷한 경향을 나타내었다. Fig. 42는 건마늘의 색도 변화 값을 나타낸 것으로 L값과 b값은 ethanol 함량이 높을수록 감소하였으며 a값은 0에 가깝게 나타났다. Fig. 43은 인삼의 색도 변화를 나타낸 것으로 50% ethanol 추출시 L값이 가장 높았고 a값은 (-)값을 나타내었다. 75% ethanol 추출액의 a값과 b값이 가장 낮았으며 a값은 (-)값을 나타내었다.

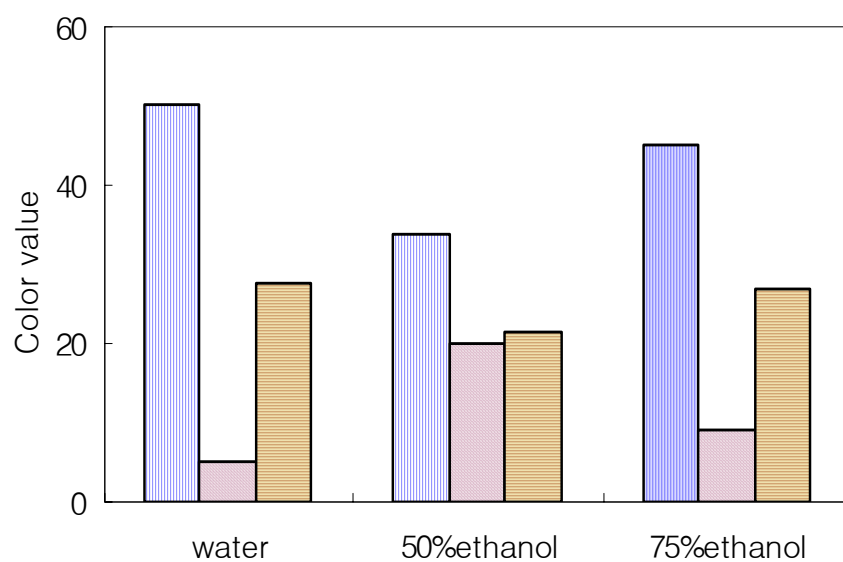


Fig. 36. Changes in hunter's value of *Glycyrrhiza uralensis* extraction with various solvents.

L
 a
 b

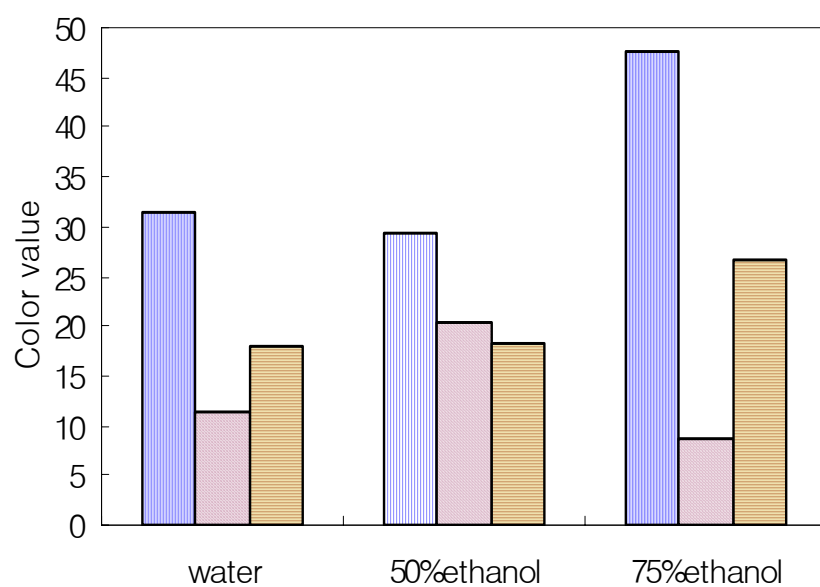


Fig. 37. Changes in hunter's value of *Eucommia ulmoides* extraction with various solvents.

L
 a
 b

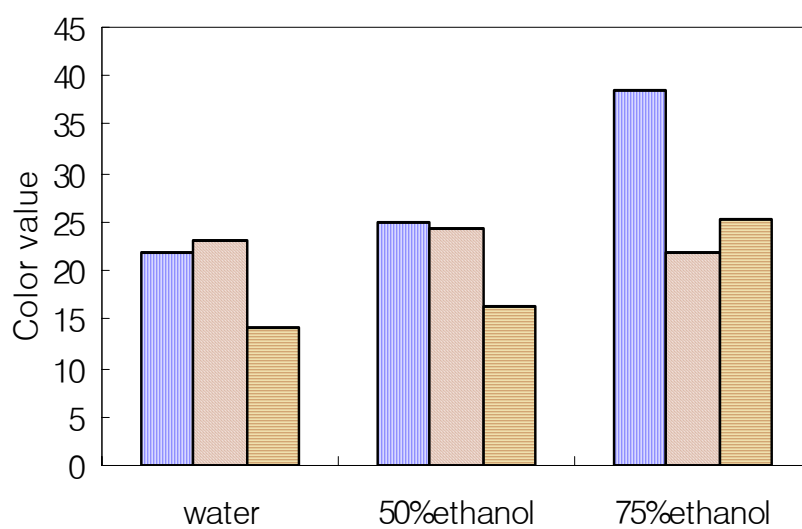


Fig. 38. Changes in hunter's value of *Lycium chinense* extraction with various solvents.

L
 a
 b

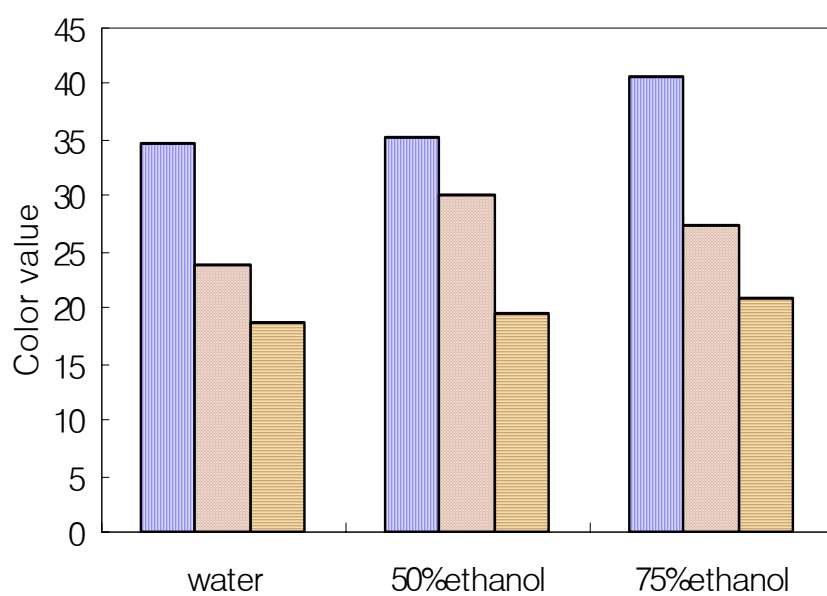


Fig. 39. Changes in hunter's value of *Schiznadra chinensis* extraction with various solvents.

L
 a
 b

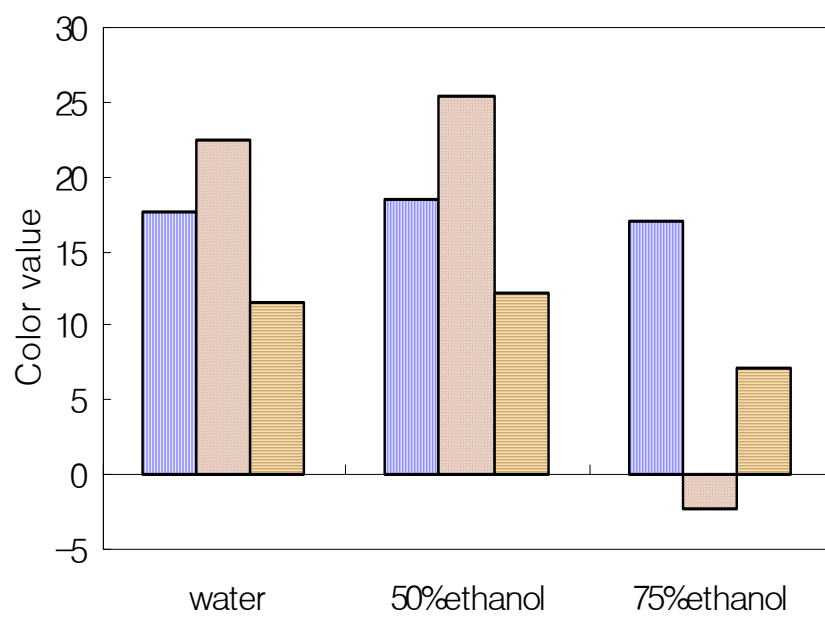


Fig. 40. Changes in hunter's value of *Cassia tora L.* extraction with various solvents.

L
 a
 b

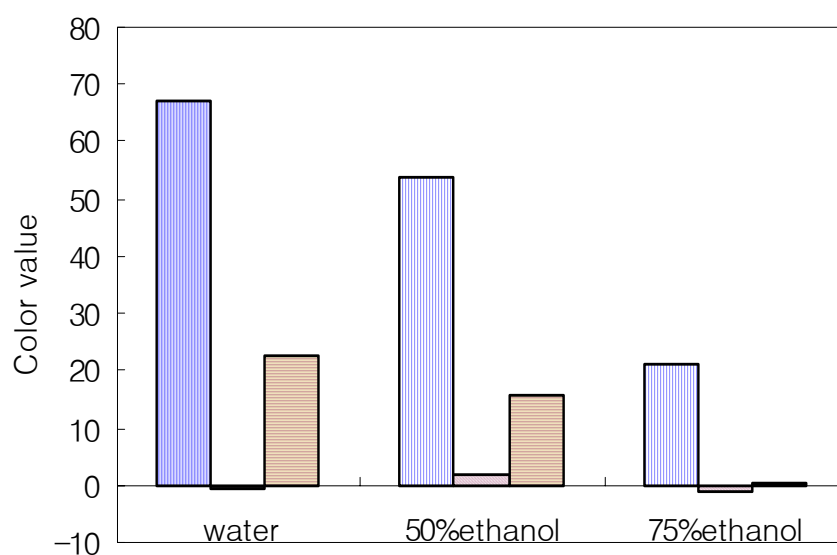


Fig. 41. Changes in hunter's value of dried garlic extraction with various solvents.

L
 a
 b

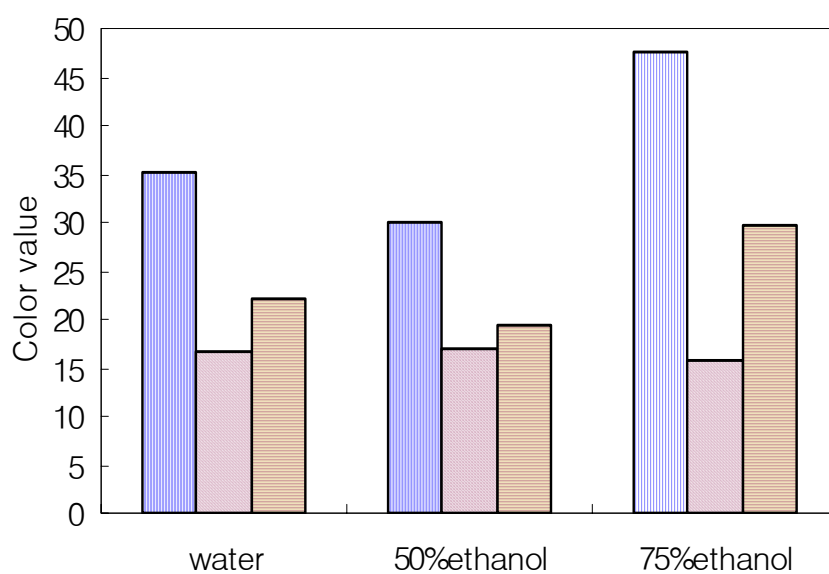


Fig. 42. Changes in hunter's value of dried ginger extraction with various solvents.

▨ L ▨ a ▨ b

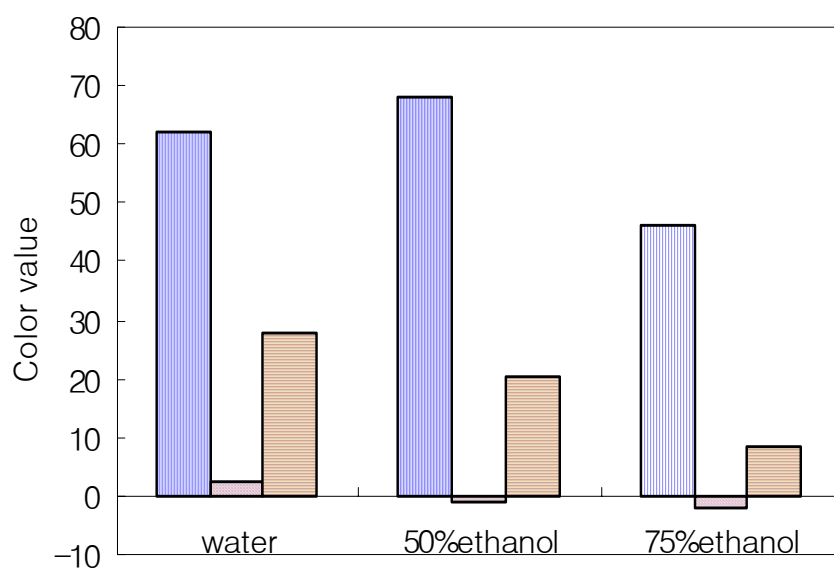


Fig. 43. Changes in hunter's value of ginseng extraction with various solvents.

L
 a
 b

3) 산도

적정 용액으로는 0.1N NaOH용액을 사용하였으며, 적정시 pH 8.3을 종말점으로 하여 종말점까지 소비된 0.1N NaOH 용액의 양을 측정하여 사과산(malic acid)함량으로 환산하여 Table 6에 나타내었다. 감초와 결명자는 50% ethanol 추출시 산도가 높게 나타났으며 두충은 ethanol 함량이 증가할수록 산도가 증가하는 것으로 나타났다. 이와 반대로 구기자, 오미자, 건마늘, 인삼은 ethanol 함량이 증가할수록 산도가 낮게 나타났다. 건강 추출액은 추출 완료시 pH가 8.3이 넘어 적정 산도를 측정할 수 없었다.

4) 유리당 함량

감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 등에 10배의 water, 50% ethanol, 75% ethanol을 가하여 추출 후 유리당 함량 측정 결과를 Table 7에 나타내었다. 구기자와 오미자의 유리당 함량이 매우 높았으며, 특히 fructose와 glucose의 함량이 높은 것으로 나타났다. 추출 용매별 유리당의 함량은 water 추출액이 다른 추출 용매에 비해 높게 나타났으며 ethanol 함량이 증가할수록 유리당 함량은 감소하는 것으로 나타났다. 감초의 water추출액에서sucrose의 함량이 가장 높았으며, 건강은 0.08~0.11%로 유리당 함량이 매우 낮게 나타났고, sucrose는 검출되지 않았다.

Table 6. Titratable acidity in medicinal plants extractions with various solvents

Unit : (mg%)

	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	<i>Eucommia ulmoides</i>	<i>Lycium chinense</i>	<i>Schiznadra chinensis</i>	<i>Cassia tora L.</i>	Dried ginger	Dried garlic	Ginseng
water	0.20	0.17	0.75	1.81	0.08	–	0.49	0.45
50% ethanol	0.26	0.18	0.72	1.77	0.10	–	0.42	0.28
75% ethanol	0.25	0.19	0.69	1.74	0.05	–	0.27	0.21

Table 7. Free sugar contents of medicinal plants extraction
with various solvents

Unit (%)				
	solvents	fructose	glucose	sucrose
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	water	1.81	1.98	5.85
	50% ethanol	1.18	1.94	4.37
	75% ethanol	1.00	1.15	3.85
<i>Eucommia ulmoides</i>	water	0.58	2.95	1.86
	50% ethanol	0.53	2.49	1.82
	75% ethanol	0.43	2.37	1.35
<i>Lycium chinense</i>	water	5.22	4.40	1.18
	50% ethanol	4.57	3.16	1.04
	75% ethanol	4.53	2.79	0.35
<i>Schiznadra chinensis</i>	water	4.42	4.71	1.69
	50% ethanol	3.84	4.56	1.49
	75% ethanol	1.24	3.65	0.89
<i>Cassia tora L.</i>	water	0.11	0.32	1.26
	50% ethanol	0.08	0.30	0.87
	75% ethanol	0.09	0.09	0.08
Dried ginger	water	0.08	0.09	–
	50% ethanol	0.08	0.09	–
	75% ethanol	0.11	0.09	–
Dried garlic	water	1.47	0.53	4.24
	50% ethanol	0.73	0.20	3.89
	75% ethanol	0.83	–	2.72
Ginseng	water	0.27	1.63	2.99
	50% ethanol	0.19	0.81	2.30
	75% ethanol	0.14	0.54	1.78

다. 생리활성 성분

1) 총 폴리페놀 함량

식품 유래의 기능성물질의 대표적인 성분중의 하나로서 플라보노이드, 프로시아니딘, 탄닌, 안토시아닌 및 페놀산과 같은 페놀성분이 있다. 이들 폴리페놀은 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl를 가진 방향족 화합물이며 항암, 항염증 및 항혈전 작용을 지니고 있는 항산화성 생리활성 물질이었다. Fig. 44는 생약재 용매별 추출액의 총 폴리페놀 함량을 나타낸 것으로 구기자의 50% ethanol 추출액에서 2.93%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 결명자는 75% ethanol에서 0.02%로 water 1.61%와 50% ethanol 2.03% 보다 현저하게 낮은 함량을 나타내었다. 전체적으로 인삼이 가장 낮은 함량을 나타내었으며, 추출 용매별 함량은 각각의 시료에서 50% ethanol 추출액이 가장 높은 함량을 나타내었고 75% ethanol 추출액이 낮은 함량을 나타내었다.

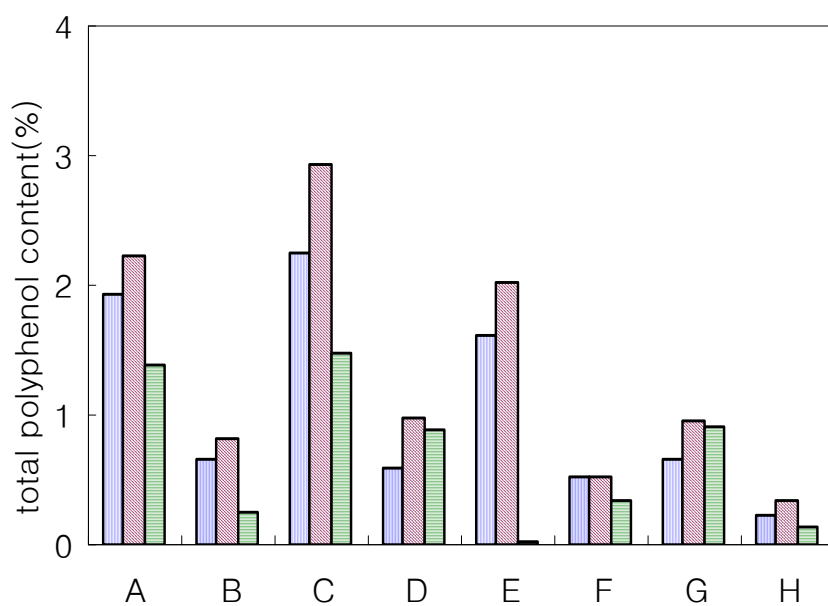


Fig. 44. Total polyphenol content of medicinal plants extraction with various solvents.

water
 50% ethanol
 75% ethanol

A: *Glycyrrhiza uralensis*, B: *Eucommia ulmoides*,

C: *Lycium chinense*, D: *Schiznadra chinensis*,

E: *Cassia tora L.*, F: Dried ginger

G: Dried garlic H: Ginseng

2) 전자공여 작용

산소는 에너지획득 반응의 말단에 관여하여 superoxide를 생성하며 이렇게 생성된 superoxide는 식품중의 지질산화와 생체의 산화적 장애를 초래하는데, 항산화 물질은 superoxide 생성과정에서 oxidative free radical과 전자를 공여하여 oxidative free radical을 소거·분해하는 항산화 작용을 함으로서 전자공여능은 항산화력의 척도로 이용된다. 전자공여능 측정은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 라디칼 소거법으로 측정하는데 DPPH는 분자 내 radical을 함유하여 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만들고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되며 이때의 DPPH의 고유의 청남색이 옅어지는 특성이 있고 이 색차를 비색 정량하여 전자공여능력을 측정하였다. Fig. 45는 생약재의 추출 용매별 전자공여능 측정결과를 나타낸 것이었다. 감초가 water와 50% ethanol에서 81.81%와 77.44%로 가장 높은 전자공여능을 나타냈으며, 건마늘은 water와 50% ethanol, 75% ethanol에서 각각 18.66%, 25.46%, 20.17%로 가장 낮은 전자공여 효과를 나타내었다. 또한 두충, 구기자, 오미자, 결명자는 비슷한 전자공여효과를 나타내었으며, 인삼과 건마늘은 전체적으로 다른 생약재에 비해 전자공여 효과가 낮게 나타났다. 추출 용매별 전자공여 효과에서 감초, 건강, 오미자는 water 추출액이 다른 용매에 비해 높은 전자공여 효과를 보였으며, 두충, 구기자, 결명자, 건마늘, 인삼은 50% ethanol에서 다른 용매에 비해 높은 전자공여 효과를 나타내었다. 일반적으로 폴리페놀 함량이 높을수록 전자공여능도 높아지는 것으로 알려져 있는데 본 실험에서 전자공여능이 폴리페놀 함량과 일치하지 않은 결과로 나타나 시료의 성분 중 전자공여능에 영향을 미치는 물질인 폴리페놀이외에 다른 성분이 추출되어 영향을 미쳤기 때문으로 판단된다.

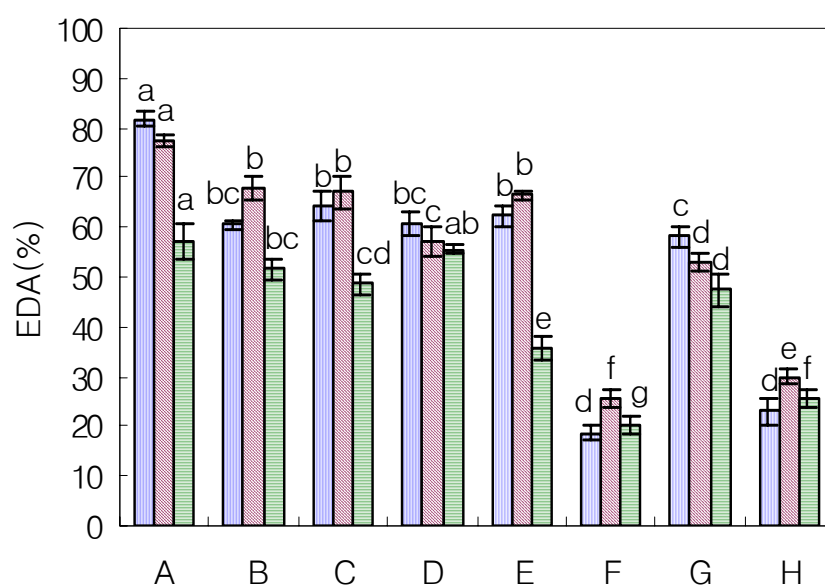


Fig. 45. Electron donating ability of medicinal plants extraction with various solvents.

Values represent mean±S.D. of 3 replications.

▨ water ▤ 50% ethanol ▧ 75% ethanol

A: *Glycyrrhiza uralensis*, B: *Eucommia ulmoides*,

C: *Lycium chinense*, D: *Schiznadra chinensis*,

E: *Cassia tora L.*, F: Dried ginger

G: Dried garlic, H: Ginseng

3) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

Superoxide dismutase는 생체내 superoxide radical(O_2^-)을 정상상태의 산소로 환원시켜 주는 천연 항산화제로서, 세포내 활성 산소를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이었다. SOD 유사활성 물질은 활성 산소의 시발물질로, superoxide anion의 저해물질로는 생체내 SOD라는 효소가 있지만, 이의 일종으로 SOD와 작용기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD유사활성 물질이라 부른다. 일반적으로 과일, 채소류에는 비타민 C가 다른 식품소재에 비해 풍부하게 함유되어 있으며 비타민 C는 그 자체가 높은 SOD 유사활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. Fig. 46은 생약재의 추출 용매별 SOD 유사활성 측정결과를 나타낸 것이었다. water와 50% ethanol에서 결명자가 48.16%와 50.56%로 가장 높은 활성을 나타냈었으나, 75% ethanol에서는 7.16%로 가장 낮은 활성을 나타내어 다른 용매와 현저한 차이를 보였다. 이는 Fig. 44의 총 폴리페놀 함량과 같은 경향으로 나타났다. 결명자, 건마늘, 건강은 50% ethanol 추출액이 다른 두 용매 보다 우수한 것으로 나타났다. 감초, 두충, 구기자, 오미자, 인삼은 water 추출액이 다른 용매에 비해 우수한 것으로 나타났다.

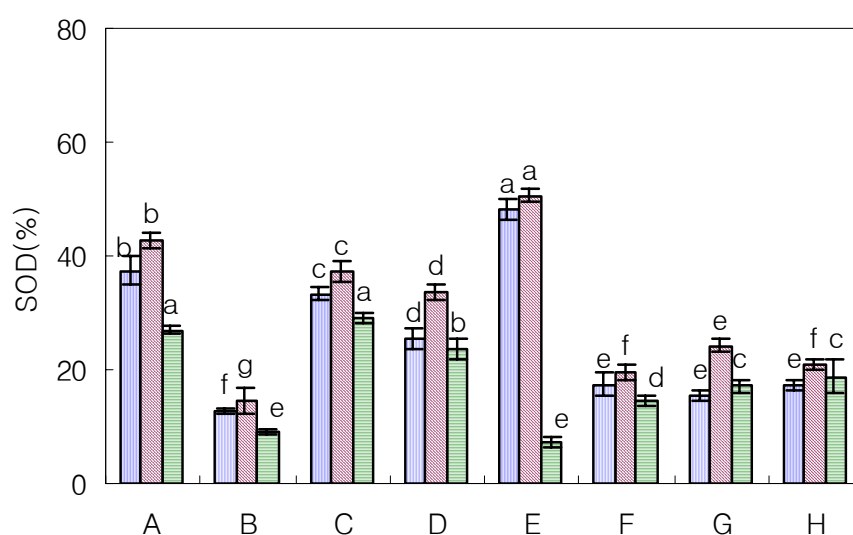


Fig. 46. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of medicinal plants extraction with various solvents.

Values represent mean±S.D. of 3 replications.

▨ water ▩ 50% ethanol ▤ 75% ethanol

A: *Glycyrrhiza uralensis*, B: *Eucommia ulmoides*,

C: *Lycium chinense*, D: *Schiznadra chinensis*,

E: *Cassia tora L.*, F: Dried ginger

G: Dried garlic H: Ginseng

4) 아질산염 소거작용

발암에 관련된 물질로 알려진 nitrite는 독성을 가지고 있고, nitrate도 체내, 체외에서 효소작용에 의해 nitrite로 환원되기 때문에 일정농도 이상 섭취할 경우, 식품내의 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성하고, 또한 혈액 중의 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 methemoglobin증 등 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 아질산염을 소거·제거하여 그에 동반되는 질병을 억제할 수 있는 천연물 검색에 대한 연구가 필요하다. Ascorbate와 같은 환원물질이 아질산염과 반응하면 nitrosamine의 생성을 저해할 수 있으며, Gray 등⁴¹⁾은 phenolic 화합물인 tannic acid 유도체를 식품 보존료 및 N-nitrosamine 형성 저해제로 사용하였다. 또한 야채류나 향신료 등의 추출액이 nitrite를 제거하여 그 위험성을 저하시킬 수 있는 능력이 있는 것으로 알려져 있다.

Fig. 47~54는 생약재의 용매별 추출액의 아질산염 소거능을 나타낸 것으로 전체적으로 pH1.2에서 76.31~26.31%의 소거율을 나타냈으며, pH6.0에서 0~12.02%로 나타나 pH가 증가할수록 소거율이 크게 감소하는 것으로 나타났다. 또한 용매별 소거능은 뚜렷한 차이를 보이지 않았지만 water 추출액이 다른 두 용매 추출액에 비해 소거능이 높은 것으로 나타났다.

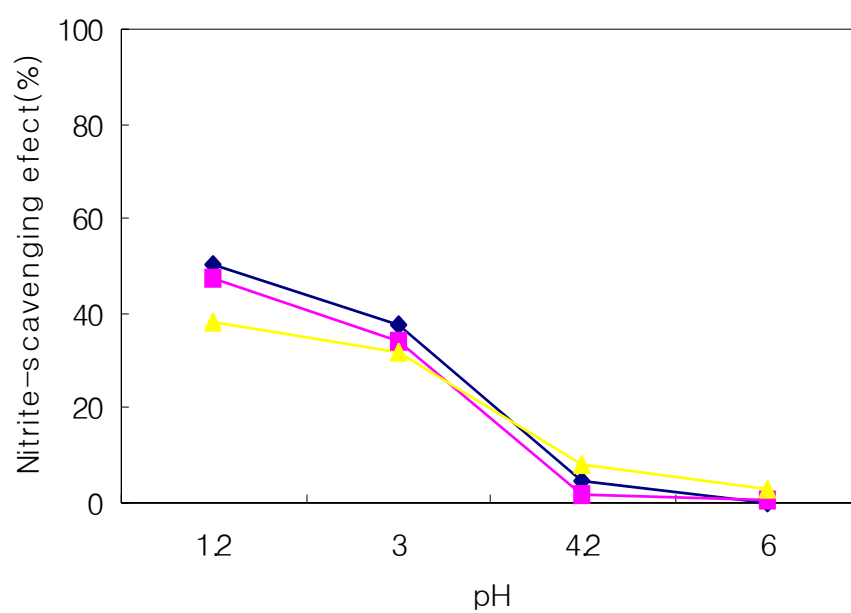


Fig. 47. Nitrite scavenging activity of *Glycyrrhiza uralensis* extraction with various solvents.

—◆— : water, —■— : 50% ethanol, —▲— : 75% ethanol

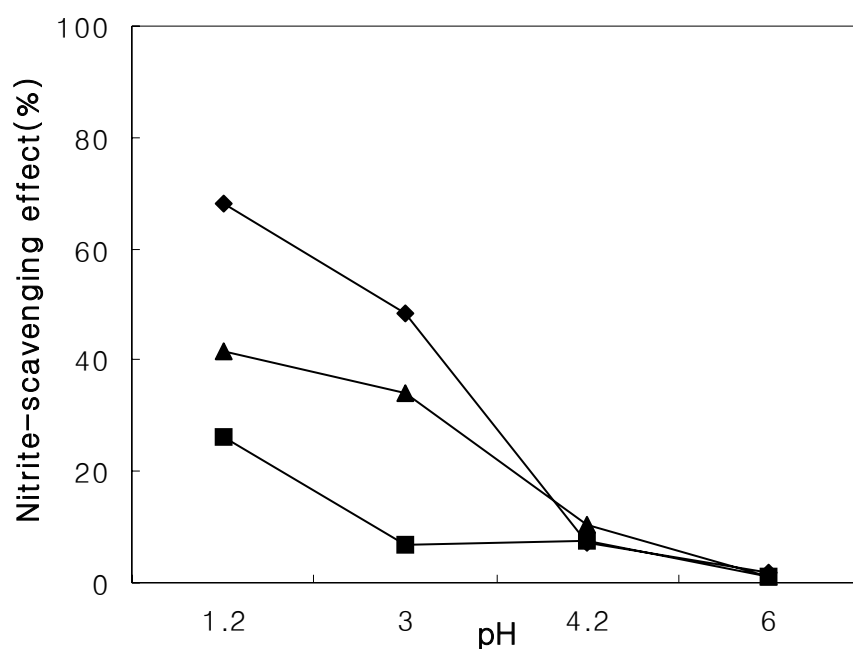


Fig. 48. Nitrite scavenging activity of *Eucommia ulmoides* extraction with various solvents.

—◆— : water, —■— : 50% ethanol, —▲— : 75% ethanol

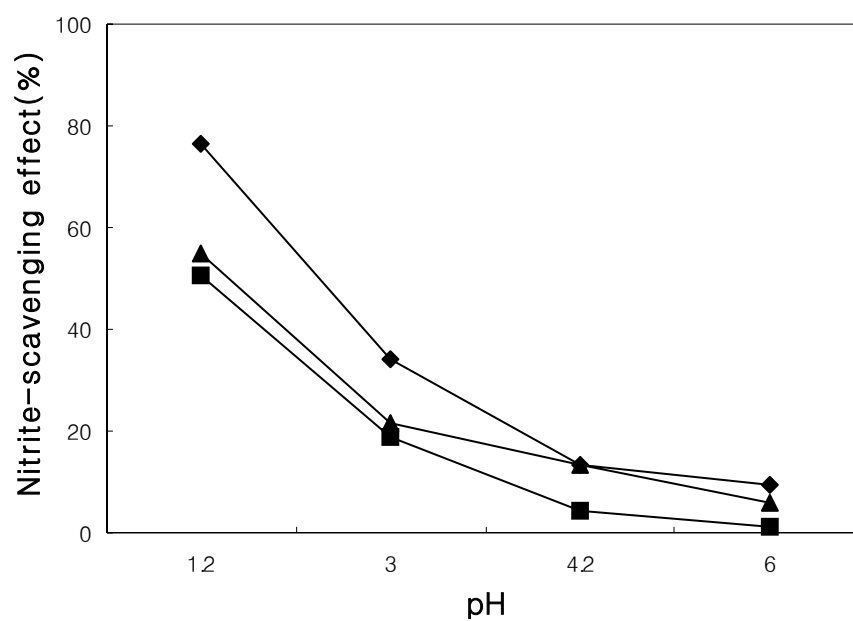


Fig. 49. Nitrite scavenging activity of *Lycium chinense* extraction with various solvents.

—◆— : water, —■— : 50% ethanol, —▲— : 75% ethanol

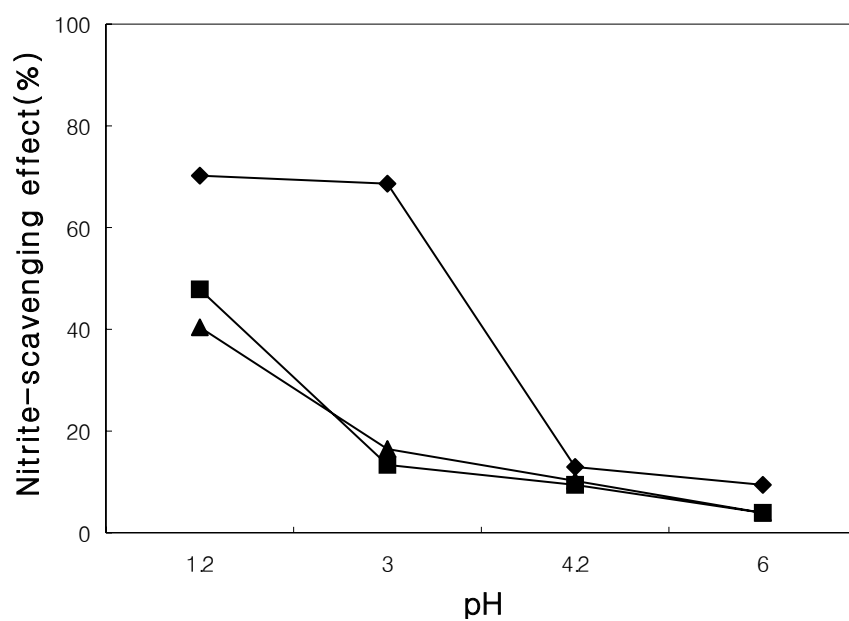


Fig. 50. Nitrite scavenging activity of *Schiznadra chinensis* extraction with various solvents.

—◆— : water, —■— : 50% ethanol, —▲— : 75% ethanol

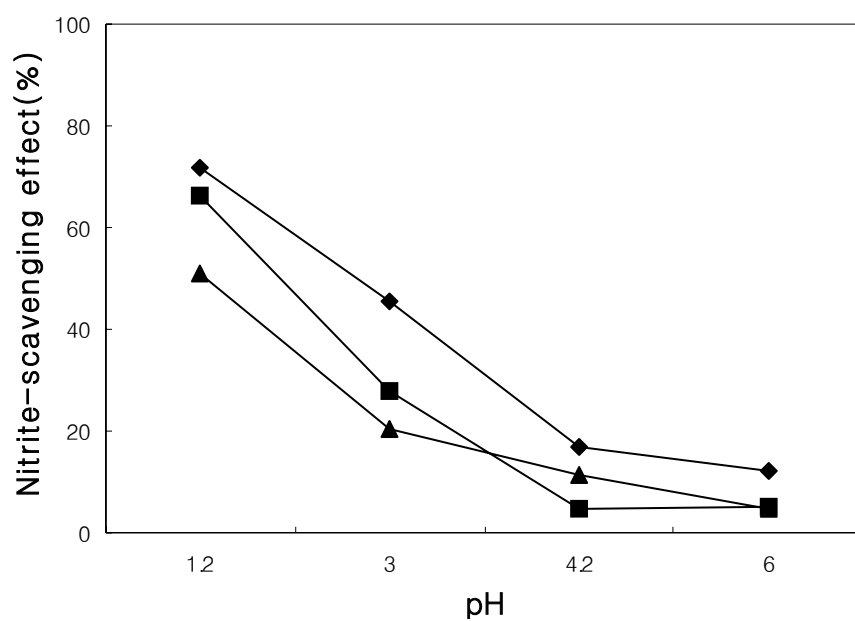


Fig. 51. Nitrite scavenging activity of *Cassia tora L.* extraction with various solvents.

—◆— : water, —■— : 50% ethanol, —▲— : 75% ethanol

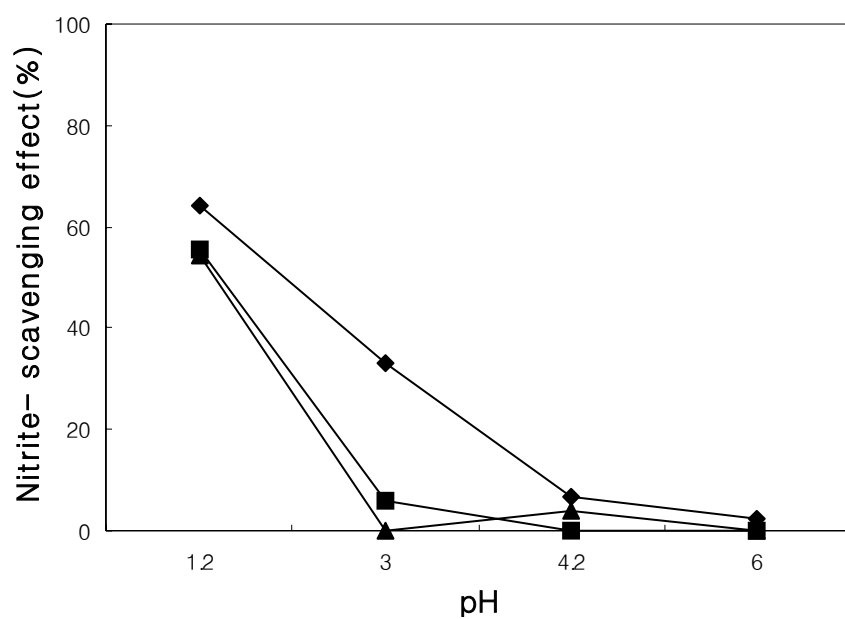


Fig. 52. Nitrite scavenging activity of dried garlic extraction with various solvents.

—◆— : water, —■— : 50% ethanol, —▲— : 75% ethanol

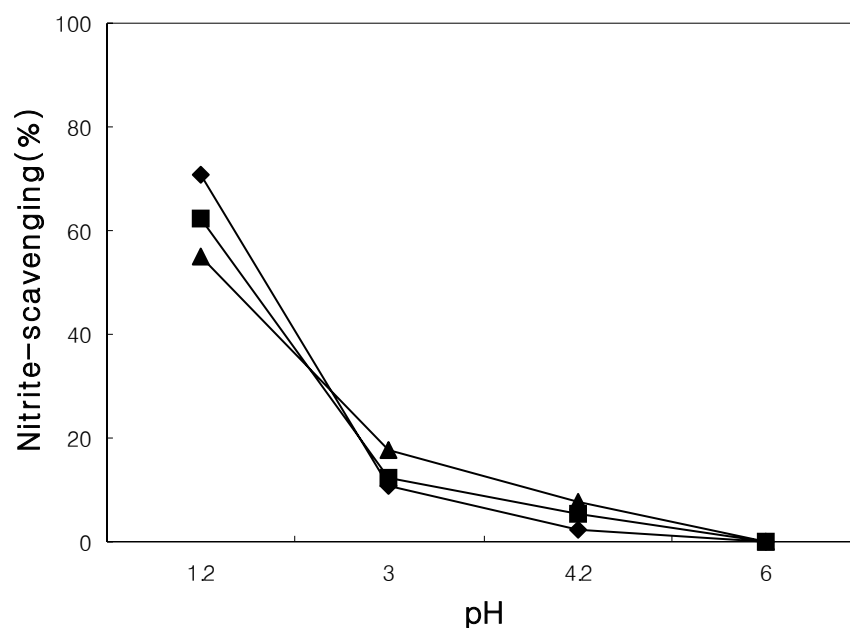


Fig. 53. Nitrite scavenging activity of dried ginger extraction with various solvents.

—◆— : water, —■— : 50% ethanol, —▲— : 75% ethanol

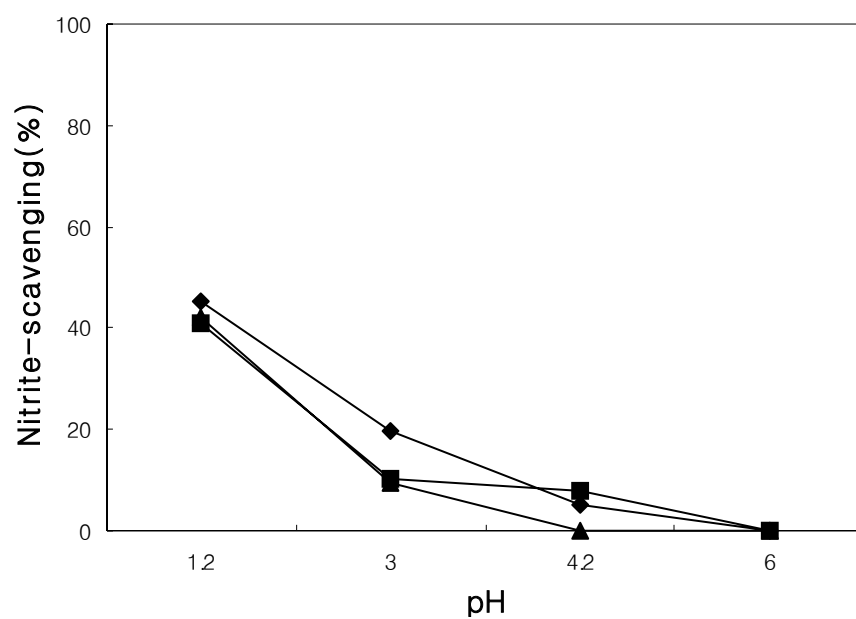


Fig. 54. Nitrite scavenging activity of ginseng extraction with various solvents.

—◆— : water, —■— : 50% ethanol, —▲— : 75% ethanol

5) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 작용

고혈압의 발생기작 중의 하나가 혈압을 조절하는 renin-angiotensin system 이며, 혈압 상승과 유지에 매우 중요한 역할을 하는 효소가 angiotensin converting enzyme(ACE)이었다. 이 효소는 renin에 의해 생성된 decapeptide인 angiotensin I 으로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해시킴으로서 강력한 혈관수축작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 단계에 관여하는 효소이었다. 생성된 angiotensin II는 강력한 혈관수축작용을 가지며, ACE는 또한 혈관이완작용을 가진 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화시킴으로서 결과적으로 혈압을 상승시키는 작용을 가진다. Angiotensin II가 증가되면 catecholamine 값이 증가되고, 혈관이 수축되며 동시에 항이뇨 호르몬인 aldosterone의 분비가 촉진된다. 이에 따라 Na^+ 및 수분배설이 억제되어 순환혈액량이 증가되어 혈압상승을 일으킨다. 따라서 ACE 작용억제는 혈관수축을 막고 체내 수분저류를 막아 혈압을 낮추는 효과를 나타낸다. Fig. 55는 생약재 시료에 대한 용매별 추출액들의 ACE 저해 효과를 나타낸 것으로 water 추출액은 결명자가 28.92%로 가장 높은 저해율을 보였으며, 50% ethanol과 75% ethanol에서는 건마늘이 37.16%와 25.27%로 가장 높은 저해율을 나타내었다. 각각의 시료에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 두충은 다른 생약재들에 비해 낮은 저해율을 나타내었다. 전체적으로 다른 용매에 비해 50% ethanol 추출액이 ACE 저해활성이 우수한 것으로 나타났다.

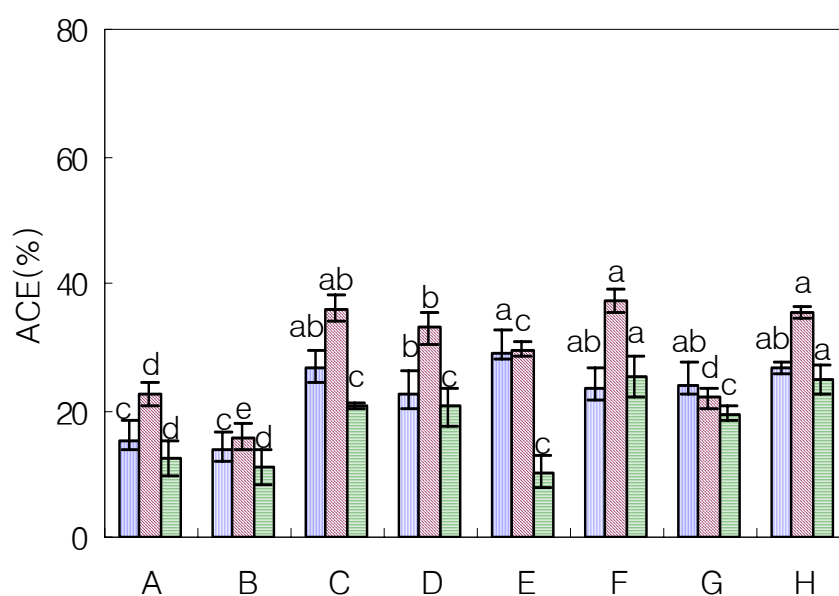


Fig. 55. Angiotensin I-converting enzyme inhibition activity of medicinal plants extraction with various solvents.

Values represent mean±S.D. of 3 replications.

□ water ▨ 50% ethanol ▤ 75% ethanol

A: *Glycyrrhiza uralensis* B: *Eucommia ulmoides*

C: *Lycium chinense* D: *Schiznadra chinensis*

E: *Cassia tora* L. F: Dried ginger

G: Dried garlic H: Ginseng

제 4 절 생리활성 물질의 superoxide dismutase 활성화 및 항암 · 암예방효과

1. 실험방법 및 연구내용

가. 실험재료

안동식혜는 찹쌀(*Japonica type*), 무(*Raphanus sativus L. radish*), 생강(*Zingiber officinale Ginger*), 고추가루(*Capsicum annum L.*)를 이용하여 제조하였다. 안동식혜 추출물의 제조는 water를 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(1,690×g, 30min)하여 상징액과 침전물을 분리하였다. 침전물은 다시 각각의 용매를 첨가한 후 위의 추출과정을 3회 반복하였다. 각각의 상징액을 모아 농축 여과한 후 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

나. 암세포주에 대한 항암효과

1) 세포배양

추출물의 암세포 억제효과에 사용된 암세포는 liver cancer Hep G2, breast cancer MDA-MB-231, colon cancer HT 29이며 한국세포주은행에서 분양받아 실험하였다. Hep G2, MDA-MB-231 그리고 HT 29의 경우는 플라스크 바닥에 단층으로 부착하여 자라는 세포주이며, 이와 같은 부착 세포인 경우 trypsin-EDTA 처리 후 계대배양하였다. 배양액은 RPMI 1640 배지에 10% Fetal Bovine Serum(FBS), Sodium bicarbonate, 100unit/mL의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator로 배양하였다.

2) MTT assay에 의한 항암효과 측정

MTT assay 실험은 Carmichael등³⁰⁾의 방법에 따라 실시하였다. 96 well plate bottom microtiter의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 암세포주를 적정농도로 180 uL 되게 분

주하고 24시간 동안 배양시킨 후 시료를 적정 농도별로 조제하여 첨가한 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 다시 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT용액을 20 uL씩 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후 조심스럽게 상등액을 제거하고 각 well당 DMSO 150 uL를 첨가하여 30분간 교반하여 formazan을 녹인 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포의 성장억제효과를 측정하였다.

다. *In vitro*에서 암예방효과에 대한 검색

1) 항산화 Phase II enzyme 활성 측정

가) Quinone reductase(QR) 활성 측정

- **QR assay** : QR 활성 유도 측정은 Prochaska 등⁵³⁾의 방법에 따라 실시하였다. 1×10^4 개의 Hepalclc7 세포를 200uL의 MEM(FBS 100mL, antibiotics 10mL, NaHCO₃ 0.22%, distilled water 890mL)에 부유시켜 96-well microtiter plater에 접종시키고 CO₂ incubator에서 24시간 배양 후, MEM배지를 제거하였다. 여기에 새로운 MEM 배지 200mL 에 녹인 시료를 각 well에 첨가하였다. 시료가 첨가된 배양액을 48시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 3회의 freeze-thaw cycles에 의해 세포를 용해시켰다. 여기에 reaction mixture [0.5M Tris-HCl(pH 7.4), 100mg bovine serum albumin, 1.5% tween-20, 7.5mM FAD, 150mM glucose-6-phosphate, 45mg dimethylthazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), 50mM menadione] 200uL를 각 well에 넣고 5분간 반응하였다. 반응 후, 0.5% DMSO에 녹인 0.3mM dicumarol과 5mM potassium phosphate가 함유된 용액 50uL를 첨가하여 반응을 중지시켰으며, microplate reader(Boehring BL 311, Germany)를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하였다.

- **세포 독성 측정** : 세포수에 대한 QR 생성량 측정은 96 well plate에 세포를 접종하여 24시간 배양한 후 시료를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 2% 에탄올에 녹인 0.2%(w/w) crystal violet에 10분간 담근 다음 2분간 흐르는 물에 씻었다. 50% 에탄올에 녹인 0.5%(w/w) sodium dodecyl sulfate(SDS)를 200uL씩 각 well에 첨가하고 37℃, CO₂ incubator에서 1시간 반응시킨 후 630nm에서 흡광도를 측정하였다.

- **QR 활성 유도** : QR 활성은 환원된 MTT와 crystal violet에 의한 흡광도를 산정하였고, QR 활성유도는 시료를 첨가하지 않은 대조군의 QR 활성에 대한 시료를 처리한 QR 활성의 비로 나타내었다.

나) Glutathione S- transferase 활성 측정

GST 활성은 Hepalcl7 세포를 이용하여 Habig 등⁵⁴⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 1×10^4 개의 세포를 200uL의 MEM(FBS 100mL, antibiotics 10mL, NaHCO_3 0.22%, distilled water 890mL)에 부유시켜 96-well microtiter plater에 접종시키고 CO_2 incubator에서 24시간 배양 후, MEM배지를 제거하였다. 여기에 새로운 MEM 배지 200mL 에 녹인 시료를 각 well에 첨가하였다. 시료가 첨가된 배양액을 48시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 세포를 용해시켰다. GST 활성 측정을 위한 reaction mixture [0.1M potassium phosphate buffer에 녹인 2.5mM GSH, 1mM 1-chloro-2,3-dinitro benzene(CDNB), pH 6.5] 100uL을 첨가하고 1분간 plate shaker에서 shaking 한 다음, 405nm에서 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader에서 측정하였다. 단백질 함량은 GST 활성 측정을 한 plate와 같이 처리한 plate에서 binchinchonic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다. GST 활성은 $\text{slop/min/mg protein}$ 으로 계산하여 시료를 첨가하지 않은 대조군의 GST 활성에 대한 시료를 처리한 GST 활성의 비로 나타내었다.

다) Glutathione(GSH) 활성 측정

세포내 총 GSH 함량은 Griffith⁵⁵⁾의 방법을 96 well microtiter plate에서 사용할 수 있게 변형하여 측정하였다. Hepalcl7세포를 96 well plate에 접종하여 24시간 배양한 후, 시료를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양한 후 배지를 제거하고 세포를 용해시켰으며, 여기에 stock buffer [125mM sodium phosphate, 6.3mM ethylenediaminetetra-acetic acid(Na-EDTA), pH 7.4] 40uL와 stock buffer에 녹인 6mM 5-5'-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid)(DTNB), glutathione reductase 용액 (stock buffer 100mL당 50unit), NADPH-generating system [0.5M Tris-HCl buffer(pH 7.4), 150mM glucose-6-phosphate, 50mM NADP^+ , glucose-6-phosphate

dehydrogenase in distilled water] 170uL 를 첨가하여 상온에서 5분간 shaking한 다음 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, 단백질 함량은 GSH 활성 측정을 한 plate와 같이 처리한 plate에서 binchin-choninic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다. GSH 함량은 GSH 표준곡선에 의하여 산출하였고, nmol/mg protein으로 계산하여 대조군의 GSH 생성량에 대한 시료를 처리한 GSH 생성량의 비로 나타내었다.

2. 연구개발 결과

가. 암세포주에 대한 항암효과

MTT 검사법은 96-well plate를 사용하며 검사결과를 ELISA reader(multiwell micro reader)를 이용하여 많은 시료를 간단하게 판독할 수 있어 세포 독성 및 세포 증식 검색법으로서 sulforhodamin B(SRB) 검색법과 더불어 널리 사용되고 있는 방법 중의 하나이었다. 암세포의 경우 대사과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색의 비수용성 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 540 nm 근처에서 최대가 되며, 이는 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하였다.

안동식혜 추출물에 대한 암세포 증식억제능을 Fig. 56~58에 나타내었다. 유선암 세포인 MDA-MB-231에 대하여 1ppm의 시료농도에서는 낮은 증식억제능을 나타내었으나, 1,000ppm 농도에서는 25%의 증식억제능을 나타내었다. 간암 세포인 Hep G2 및 대장 세포인 HT-29에 대해서도 1,000ppm의 시료 농도에서 각각 28, 22%의 암세포 증식억제능을 나타내었다.

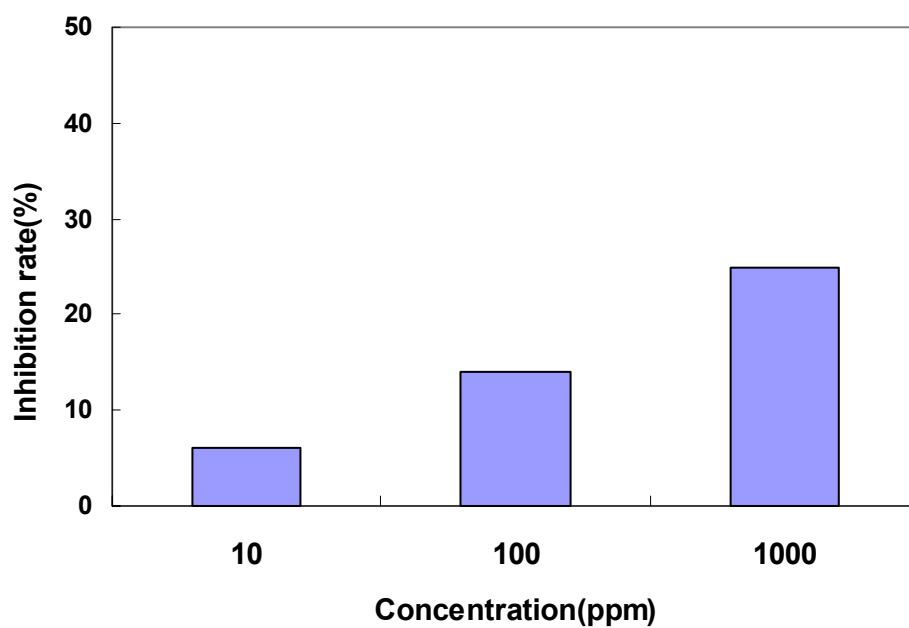


Fig. 56. Growth inhibition rate of fractions extracted from traditional Andong *sikhe* (MDA-MB-231).

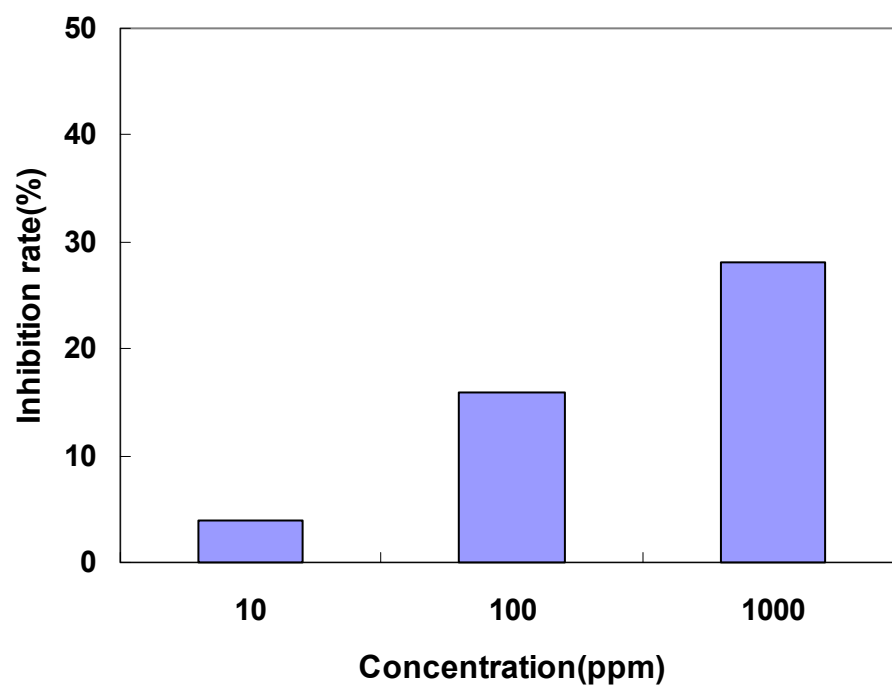


Fig. 57. Growth inhibition rate of fractions extracted from traditional Andong *sikhe* (Hep G2).

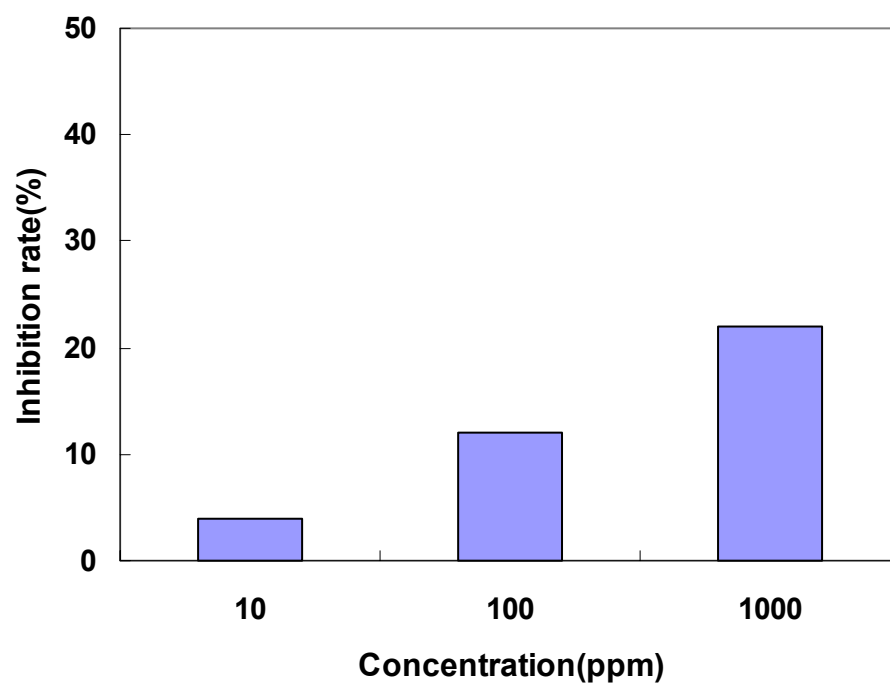


Fig. 58. Growth inhibition rate of fractions extracted from traditional Andong *sikhe* (HT 21).

나. In vitro에서 암예방효과에 대한 검색

1) 항산화 Phase II enzyme 활성 측정

가) Quinone reductase(QR) 활성 측정

QR은 cytosol속에 다량 함유된 플라본단백질로서 생체내에 유입되는 다양한 quinone과 그 대사산물인 quinone-imine을 환원시켜 신진대사 단계의 세포독성 (cytotoxicity)으로부터 세포를 보호하는 역할을 하였다. 이 효소는 GST, UDP-glucuronosyltransferase와 같은 phase II enzymes으로서 돌연변이 유발억제와 발암물질에 의해 유발된 종양세포로부터 정상세포를 보호하는 작용을 하며, 활성은 간에서 가장 높게 나타나며 신장과 뇌에서 비교적 높게 나타난다. 본 연구에서는 전통안동식혜 추출물의 암예방 효과를 측정하기 위하여 Hepalclc7 murine hepatoma cell의 배양에서 QR 활성 유도 효과를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 59에 나타내었다. QR 활성 유도는 안동식혜 추출물, 생강 추출물 그리고 고추 추출물에서 100ppm 농도에서 10ppm 농도의 경우보다 3배 가량 증가 하였으며, 안동식혜 추출물이 다소 높은 활성을 나타내었다. 김등⁵⁶⁾의 연구에서도 채소 추출물의 QR 활성측정 결과 2.5mg/mL과 5.0mg/mL의 농도에서 1.4배 이상 증가하였다. 본 연구 결과 안동식혜 추출물 및 lactic acid bacteria는 돌연변이 물질이나 발암물질에 의한 세포내의 독성을 제거하며 DNA 손상에 의한 돌연변이 유발을 억제하며 암으로 진행되는 과정을 억제하는 암 억제 효과가 있을 것으로 생각된다.

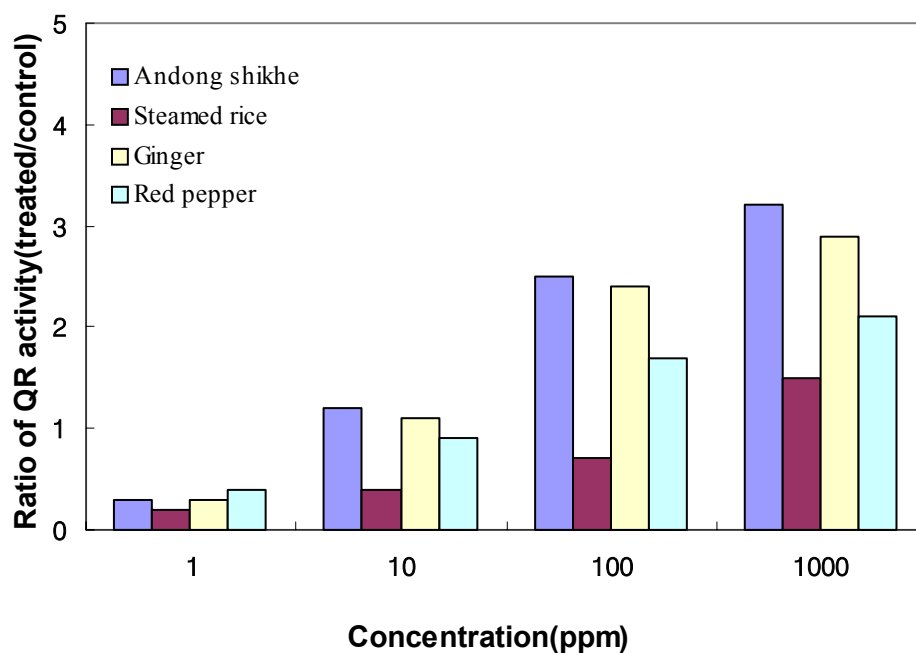


Fig. 59. Effect of extracts from traditional *Andong sikhe* on induction of quinone reductase(QR) activity in mouse hepatoma Hepalclc7 cells. Cells were treated with samples for 48hrs, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean $\pm$ SD(standard deviation) of three separate experiments.

나) Glutathione S- transferase 활성 측정

안동식혜 추출물 및 lactic acid bacteria에 대한 암예방 효과를 측정하기 위하여 Hepalclc7 세포를 이용하여 GST 활성을 측정하였다. GST는 외부 이물질의 대사과정 중 생성된 친전자성 대사산물을 GSH와 결합하여 용해되기 쉬운 수용성 물질로 만들어 배설시키는 효소로, 세포질 내에서 다량으로 존재하며 여러 종류의 isozyme이 밝혀져있다. 이는 생체내의 GSH를 기질로 이용하여 발암의 직접적인 원인이 되는 활성중간 대사산물을 제거능과 항산화 활성을 가진다. 따라서, 암예방 물질을 검색하는데 있어서 GST는 phase II enzymes 중의 하나로 개시단계의 생물학적 지표(biomarker)로 이용되고 있다. 본 연구에서는 안동식혜의 암 예방효과를 측정하기 위하여 Hepalclc7세포를 이용하여 GST 활성을 측정하여 Fig. 60에 나타내었다. 1ppm에서 1000ppm의 농도에서 안동식혜 추출물은 2.5배의 유도 효과를 나타내었으나, 부재료인 생강, 고추 추출물등은 1.6배의 유도를 나타내었다.

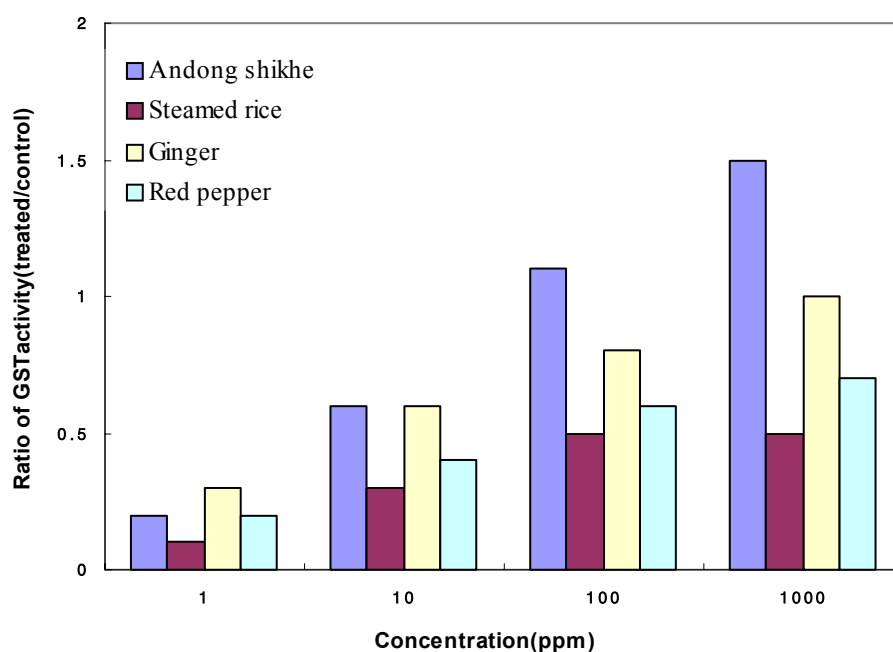


Fig. 60. Effect of extracts from traditional *Andong sikhe* on induction of glutathione S-transferase (GST) activity in mouse hepatoma Hepalclc7 cells. Cells were treated with samples for 48hrs, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean $\pm$ SD (standard deviation) of three separate experiments.

다) Glutathione(GSH) 활성 측정

GSH는 GSH-Px와 GST의 기질로 사용되며, 독성이 있는 친전자성 대사산물과 직접 반응 함으로써 세포내에서 중요한 암 억제 기능을 가진다. 전통안동식혜 추출물과 lactic acid bacteria의 암예방 효과를 측정하기 위하여 Hepalclc7 세포를 이용하여 GSH 생성량을 측정하였다. 그 결과를 Fig 61에 나타내었다. 안동식혜 추출물 및 부재료 추출물에서는 1.0배의 유도 효과를 나타내었다. 체내 GSH 함량의 저하는 간 세포내 단백질 분비의 손상과 지방간, 간 괴사, 섬유아 증식과 같은 간질환을 일으킨다. 또한, 세포내 GSH가 고갈되면 독성이 강한 대사산물이 생성되어 세포내 손상과 암의 발생이 일어난다. Sulfur를 함유한 화합물은 체내 GSH 함량을 증가시켜 GST, QR 같은 독성억제 효소의 활성을 증가시키고, 발암물질의 생성을 억제시키는 것으로 Benson⁵⁷⁾에 의해 보고되고 있다. 따라서 본 연구 결과, GSH 생성량이 증가한 것으로 보아 독성억제 효소의 활성을 증가시켜 세포내 독성물질 및 발암물질 생성을 억제하는데 기여할 것으로 판단된다.

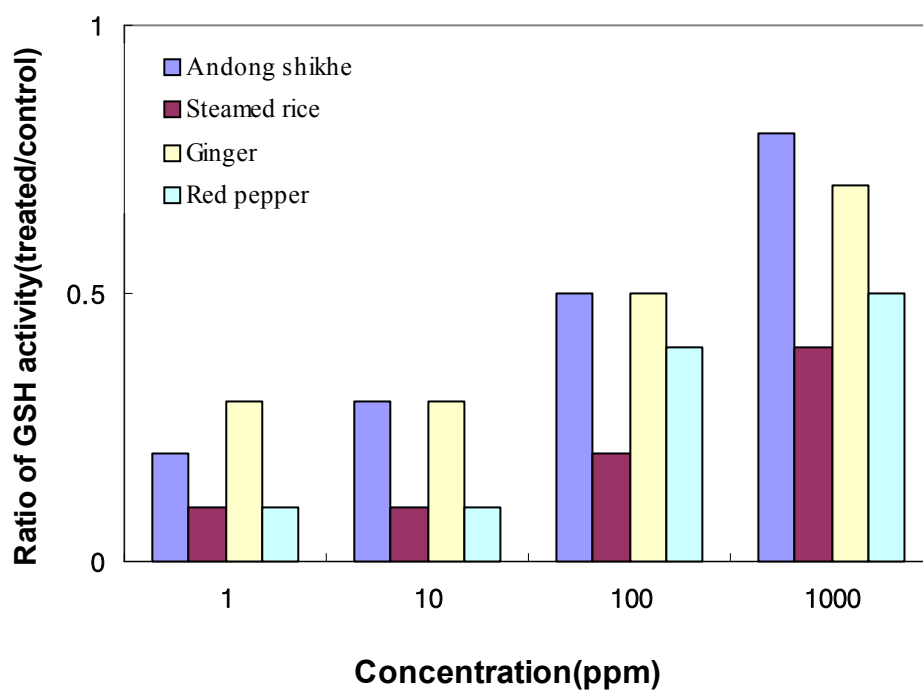


Fig. 61. Effect of extracts from traditional Andong *sikhe* on induction of glutathione(GSH) activity in mouse hepatoma Hepalclc7 cells. Cells were treated with samples for 48hrs, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean $\pm$ SD(standard deviation) of three separate experiments.

제 5 절 Starter를 이용한 전통안동식혜의 제조

1. 실험방법 및 연구내용

가. Starter를 이용한 전통안동식혜 제조

전통안동식혜의 제조시 재료의 조성은 Table 8과 같이 증자된 쌀, 맥아, 무, 생강, 고추가루를 사용하였으며, 제조방법은 Fig. 62와 같이 쌀은 12시간 침지후 흡수량이 쌀과 물이 1 : 2(w/w)로하여 물빼기를 한 다음 100℃에서 30~40분간 증자하여 식혜밥을 만들었다. 맥아는 15℃에서 7일간 발아시킨 것을 분쇄기로 갈아 20 mesh이상을 분리하여 35~40℃ 물에 2~3시간 교반한 후 5℃에서 9 시간 정도 정치시킨 다음 cheese cloth로 여과하여 상정액을 얻는다. 고추가루는 여과된 엿기름 물에 넣어 고추물을 추출하였다. 이상과 같이 준비된 따뜻한 식혜밥과 크기 3 mm로 잘게 썬 무우를 함께 넣어 섞은 다음 생강즙과 고추가루 추출물을 혼합하여 엿기름 물을 넣어 조정하고 40℃에서 4시간 발효한 후 5℃에서 2일 동안 저온발효시킨 후 4℃ 냉장고에서 저장하였다.

1) 제법을 달리한 식혜의 발효

최 등³¹⁾이 보고한 전통안동식혜의 제법 즉, 전통제법(이하 cotrol), 전통식혜의 재료를 80~85℃에서 15분간 저온살균처리(이하 SS), 전통식혜를 제조한 후 젖산균의 초기성장 pH 6.5로 1N NaOH로 조정, 젖산균의 성장 초기 pH인 6.5로 조정(이하 SA), 쌀을 제외한 모든 재료를 균질화하여 상등액으로 제조(이하 SH)한 식혜를 각각 1일에서 15일간 숙성 및 저장하였을 경우에 pH, 적정산도 및 세포수의 변화를 조사하였다.

2) 젖산균 및 효모의 단독발효

안동식혜에서 분리한 젖산균 *Lac. bulgaricus* SML 47, *Lac. acidophilus* SML 10, *Lc. lactis* SEC 56과 효모 *S. cerevisiae* SY 5에 의한 단독발효 *Lac. bulgaricus* SML 47(이하 LB), *Lac. acidophilus* SML 10(이하 LA), *Lc. lactis* SEC 56(이하SL),

S. cerevisiae SY 5(이하 SC)를 이용하여 전통적인 식혜제법에서 당화직후 1%의 배양물을 단독 접종하여 pH, 적정산도 및 세포수의 변화를 관찰하였다.

3) 젖산균과 효모의 혼합발효

식혜로부터 분리동정된 젖산균과 효모를 젖산균과 젖산균의 상호 혼합발효 양상을 조사하기 위하여 *Lac. bulgaricus* SML 47 + *Lac. acidophilus* SML 10(이하 LB+LA), *Lac. bulgaricus* SML 47 + *Lc. lactis* SEC 56(이하 LB+SL), *Lac. acidophilus* SML 10 + *Lc. lactis* SEC 56(이하 LA+SL)과 젖산균과 효모의 혼합발효 *Lac. bulgaricus* SML 47 + *S. cerevisiae* SY 5(이하 LB+SC), *Lac. acidophilus* SML 10 + *S. cerevisiae* SY 5(이하 LA+SC), *Lc. lactis* SEC 56 + *S. cerevisiae* SY 5(이하 SL+SC)를 통하여 식혜의 숙성 및 저장과정 중 pH, 적정산도 및 세포수의 변화를 조사하기 위하여 당화직후 전체 1.0%(v/v)의 배양물의 접종량이 되도록 각각 0.5%(v/v)접종하여 식혜를 제조하였다.

나. 성분분석

1) 일반성분

식혜의 수분, 조단백, 조지방, 조섬유, pH, 적정산도, 총당, 환원당 및 회분함량 분석은 AOAC³²⁾에 준하여 측정하였으며, 아미노태 질소는 Formol적정법³³⁾, 암모니아태 질소는 Folin법³⁴⁾으로 측정하였다.

2) 알코올 및 유리당

알코올의 정량은 Bassette와 Ward⁴²⁾의 방법에 따라 실시하였으며 유리당 분석은 시료 200g을 5℃에서 30분간 homogenizer로 마쇄한 후 여과하여 여액 250 mL를 취하여 Damon^{58,59)} 등의 방법에 준하여 분석하였다. 즉 Sepak-C18과 Sepak silica를 이용하여 정제시킨 후 0.45 μ m 막 여과기로 여과하여 여액 10 μ L를 HPLC에 주입하여 분석하였으며 이때 분석 조건은 Table 9와 같이 하였다.

3) 비휘발성 유기산

Turkelson⁶⁰⁾등과 Buslig⁶¹⁾등의 방법에 따라 일정량의 시료를 Waring blender로 마쇄하고 10,000 g에서 10분간 원심분리한 후 그 상정액 10 mL를 음이온 교환수지 (Amberlite IRA-900, Sigma) column(300×15mm)에 흡착시킨 후 증류수로 수회 세척하여 당류를 제거하였다. Column에 남아 있는 유기산은 6 N formic acid로 용출하여 감압 농축기로 건조시킨 후 인산용액 5 mL로 정용하고 이를 0.45 μ membrane filter로 여과한 후 그 여액은 high performance liquid chromatography(HPLC)로 분석하였다. 이때 분석조건은 Table 10과 같다. 표준 유기산으로는 lactic, succinic, oxalic, fumaric, malonic, malic, citric acid를 각 10mg/5mL씩 사용하였으며 internal standard로는 glutaric acid를 사용하였다.

4) 지방산

조지방의 추출은 안동식혜를 동결건조한 후 Folch⁶²⁾법에 따라 분쇄한 시료에 20배의 chloroform : methanol(2 : 1, v/v)용매를 가하여 균질화 한 것을 여과하여 잔사를 분리하고 이 잔사를 같은 용매로 한번더 추출하여 여액을 합하였다. 여기에 증류수를 가한 다음 분리되는 chloroform층을 취하여 여과한 다음 40℃ 이하에서 rotary evaporator로 농축한 것을 조지질로 하였다. 추출한 조지질은 Sephadex G-25에 의하여 비 지방질 성분을 제거한 후 지방질의 분석시료로 사용하였다. 추출 정제한 지질의 지방산조성은 이 등⁶³⁾의 방법에 따라 gas chromatography(GC)로 분석하였다. 일정량의 시료를 ester화 시험관에 취하고 H₂SO₄ : C₆H₆ : CH₃OH (1 : 30 : 90, v/v/v) 용액을 가하여 용해시켰다. 시험관을 밀봉하고 2시간 30분동안 methyl ester화 한후 냉각하여 증류수를 가하고 석유 ether층을 분리하여 Na₂SO₄로 탈수시켰다. Rotary evaporator로 용매를 제거한 후 소량의 chloro-form에 녹여 GC 분석시료로 사용하였다. 이때 사용한 GC 조건은 Table 11과 같이 하였고 GC 분석 결과에서 얻은 각 peak는 같은 조건의 표준지방산 peak의 retention time과 비교하여 동정하고 면적을 구하였으며 그 합계량에 대한 각 peak의 면적비는 백분율로 나타내었다.

5) 단백질 분리 및 정량

안동식혜를 균질기로 균질화시킨 다음 Wang 분류법⁶⁴⁾에 따라 Fig. 63에서와 같이 수용성 및 염용해성 단백질을 분리하였다. 단백질 정량은 Lowry 등⁶⁵⁾의 방법에 의하여 측정하였으며 단백질 함량은 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

6) 유리 아미노산

유리아미노산의 추출은 허 등⁶⁶⁾의 방법에 따라 시료 5mL에 탈이온 증류수 100 mL를 가하고 마쇄한 후 여과하고 그 여액에 20% trichloroacetic acid(TCA)를 15 mL 가한 다음 24시간 냉장고에서 방치시켜 단백질을 침전제거 하였다. 상정액에 diethyl ether를 가하여 TCA, 지용성 방해물질등을 제거한 후 수용액층을 40℃ 이하에서 감압농축시키고 0.2 mol sodium citrate buffer (pH 2.2)를 가하여 용해시켰다. 그리고 0.45 μ m millipore filter로 여과한 다음 아미노산 자동분석기 (LKB 4151 Alpha plus amino acid analyzer, England)에 주입하였다.

7) 수용성 및 염용해성 단백질의 아미노산 분석

수용성 및 염용해성 단백질의 아미노산 분석은 5 mL크기의 유리관에 20 mg의 각각의 단백질을 넣은 후 6N 염산으로 24시간 동안 가수분해하였다. 가수분해한 분해액을 여과하여 40℃ 이하에서 rotary evaporator를 사용하여 염산을 완전히 증발시킨 다음 10 mL sodium citrate buffer에 용해시킨 것을 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

Table 8. Ingredients of Andong *sikhe* used in this study

Ingredients	
Steamed rice	1.6kg
Malt	1.0kg
Radish	2.0kg
Ginger	0.16kg
Red pepper powder	0.08kg
Water	10L

Table 9. Analytical condition of HPLC for free sugar of
Andong sikhe

Items	Operating condition
Instrument	Water M 244
Column	Carbohydrate analysis
Solvent	Acetonitrile–Water(82:18 V/V)
Flow rate	2mL/min
Detector	RI

Table 10. Analytical condition of HPLC for organic acids of
Andong sikhe

Items	Operating condition
Instrument	Young-in HPLC 9500 system
Column	Supelco C-610H
Solvent	0.1% H ₃ PO ₄
Flow rate	0.5mL/min.
Detector	UV 210nm

Table 11. The operating conditions of GC for fatty acids analysis

Items	Operating conditions
Column support	Chromosorb WAW
Column temp.	185°C
Detector	FID
Carrier gas	N ₂ gas
Injector port temp.	150°C
Detector temp.	275°C
substrate	10% sp-2330

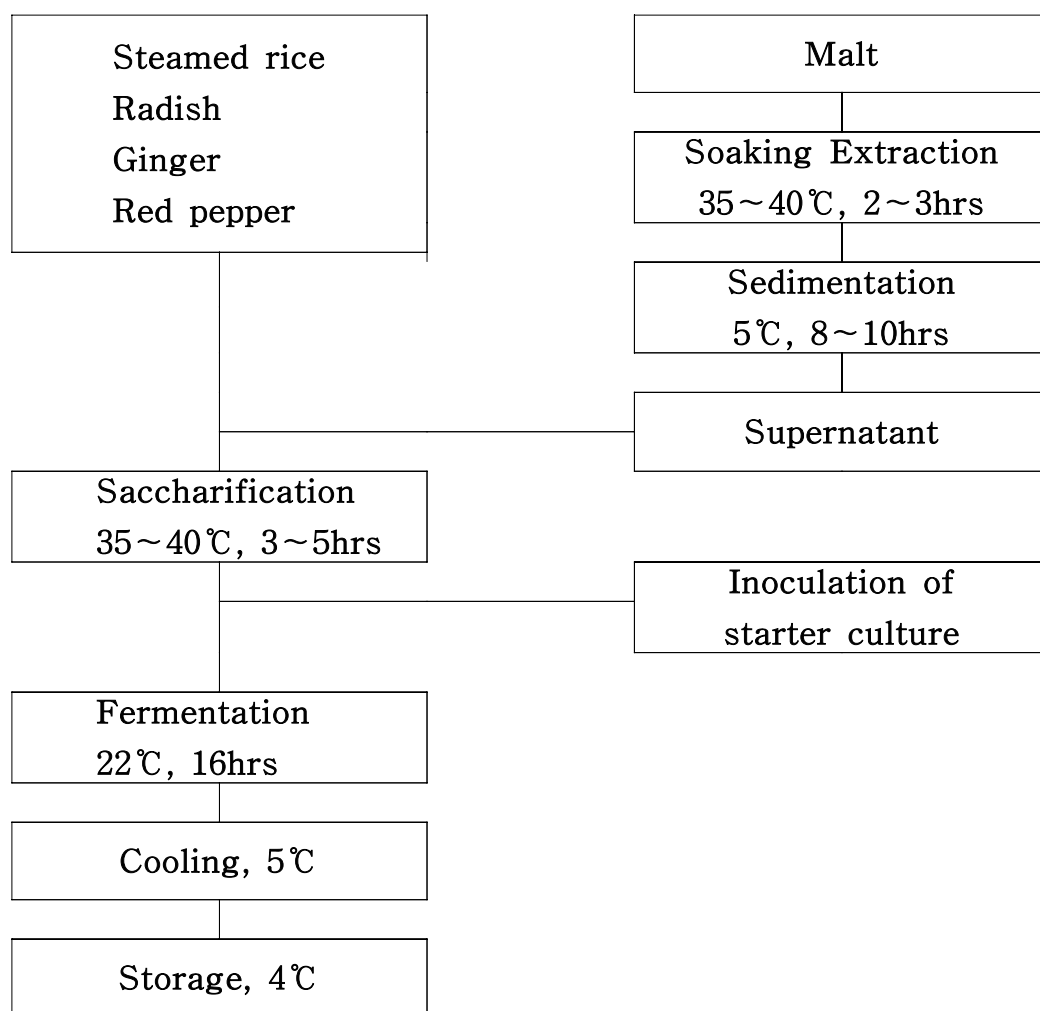


Fig. 62. Protocol for the Preparation of Andong *sikhe*

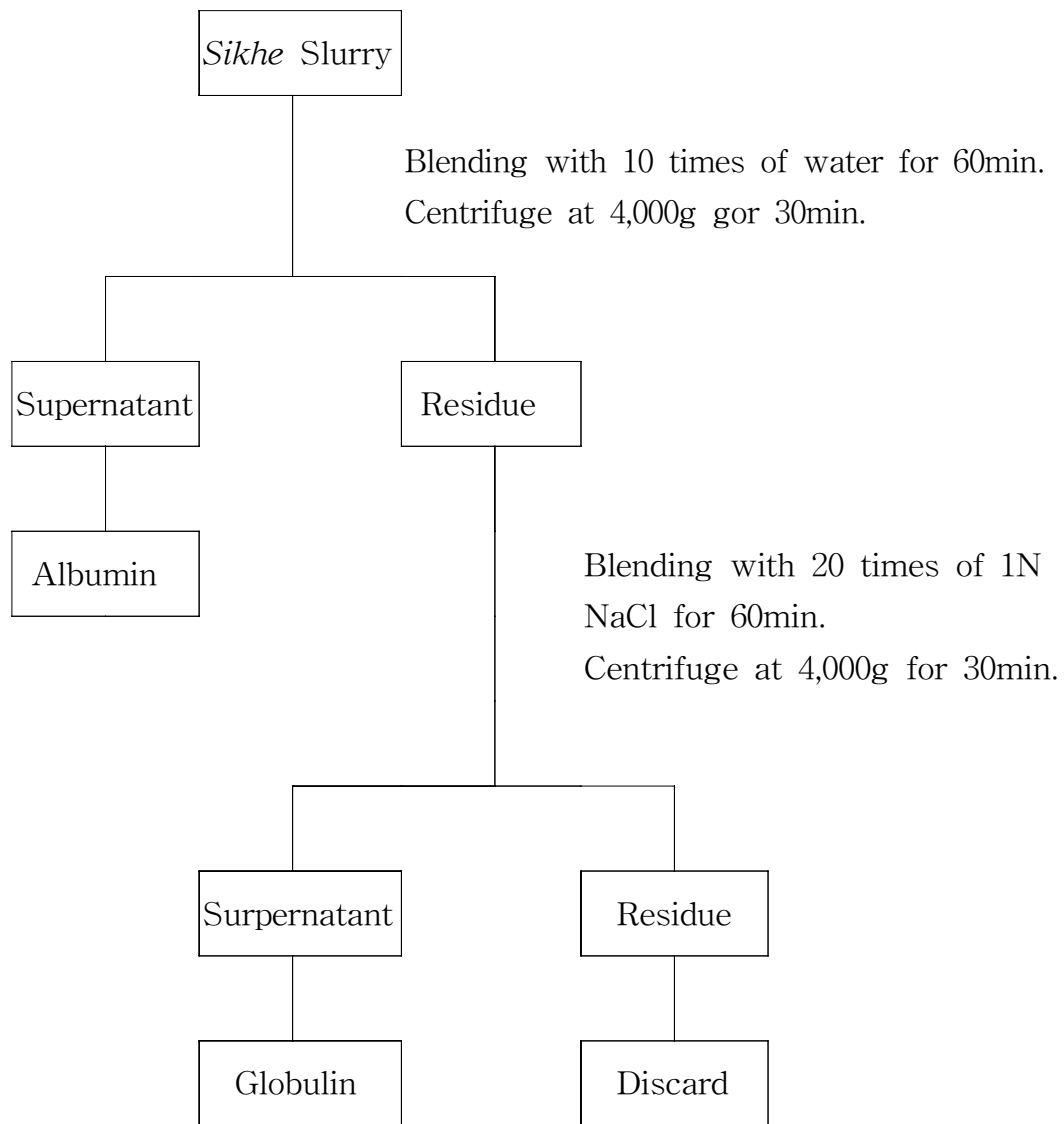


Fig. 63. Flow chart for the fractionation of soluble protein from Andong *sikhe*

다. 효소활성 측정

1) Protease

Anson⁶⁷⁾ 및 萩源⁶⁸⁾의 방법에 따라 0.6% casein을 기질로 30℃에서 10분간의 반응조건으로 pH 3.0에서 산성 protease활성을 측정하였다. 상기 반응조건에서 효소액 1 mL가 나타내는 660nm의 흡광도 값을 protease역가단위로 표시하였다.

2) Liquefying amylase

액화효소의 활성도는 1% 가용성 전분액을 기질로하여 pH 5.0, 40℃에서 30분간 반응시킨 뒤 I₂로써 발색시켜 효소활성을 측정하였으며 이때 효소활성은 효소액 1 mL가 30분 동안 분해하는 1% 가용성 전분액의 mL수로서 액화형 amylase의 작용력을 D⁴⁰로서 표시하였다⁶⁹⁾.

3) Saccharogenic amylase

당화효소의 활성도는 芳賀⁷⁰⁾ 등의 방법에 준하여 2.0% 가용성 전분액을 기질로 pH 4.4에서 30℃, 60분간 반응시켜 당화효소의 활성을 측정하였으며 이때 효소단위는 효소액 1 mL가 1분간에 1u의 환원당을 생성하는 것을 1 unit로 정하였다.

4) Lipase

Funatsu 등⁷¹⁾의 방법에 의하여 실시하였다. 즉 0.5 M KCl 1.0 mL, 5×10^{-3} M CaCl₂ 1.0 mL, 효소용액 0.5 mL, H₂O 7.3 mL 의 혼합액을 35 ℃에서 10분간 가온한 후 tributyrin 0.2 mL를 넣어 다시 15분간 반응시킨 다음 100℃에서 2분간 끓여 효소작용을 정지시키고 생성된 지방산을 0.05 N NaOH로 phenolphthalein을 지시약으로 하여 적정함으로써 효소활성을 측정하였다. 효소역가는 매 분당 기질 중의 ester결합 1 u mol.을 가수분해하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

라. 저장성

1) 안정제에 의한 침전억제 효과

침전도 측정은 백 등⁷²⁾의 방법에 따라 실시하였다. 침전도의 시료는 관능검사의

시료와 성분조성은 동일하나 Na-carboxymethyl cellulose (CMC), Na-alginate와 Carrageenan을 각각 0.0-1.0%씩 함유하도록 제조하였다. 준비된 시료는 100 mL mess cylinder에 정확히 100 mL씩 넣고 정치한 상태에서 시간마다 상징액의 분리 상태를 관찰하여 표준구(안정제가 첨가되지 않은 액상의 안동식혜)와 비교하여 침전억제효과를 관찰하였다. 침전의 정도는 mess cylinder의 윗부분에 생기는 상징액의 mL수로 나타내었다.

2) 점도 측정

점도는 Brookfield viscometer(model-DV II, Brookfield Engineering Labs., USA)를 사용하여 20℃에서 spindle No.2로 100 rpm에서 2분간 회전시키면서 점도(cps)를 측정하였으며 이때 시료는 침전안정제를 0.1%넣고 안정제를 첨가하지 않은 액상의 안동식혜와 비교하여 측정하였다.

마. 안동식혜 공정의 표준화

전통안동식혜의 공정 표준화를 위하여 안동지역내 10개소로부터 구입한 시료를 가지고 관능시험을 실시하여 맛, 색도 및 향이 가장 우수한 시료를 선택하여 젓산균과 효모를 분리·동정하고, 분리된 균을 단독, 혼합배양하여 성분분석, 효소활성 측정, 저장성 및 관능검사를 실시하여 안동식혜의 공정 표준화를 실시하였다.

바. 관능검사

영남대학교 대학원생 및 교직원을 대상으로 10~50대 연령별로 각 20명을 panel로 선정하여 제조한 식혜를 4℃에서 30분간 두었다가 제공하여 맛, 향, 설탕, 속도 등 종합적 기호도로 실시하였다. 평가는 아주 나쁘다(1점), 나쁘다(2점), 보통이었다(3점), 좋다(4점), 매우 좋다(5점)로 하였으며, 관능검사의 유의성은 ANOVA test, data간의 유의성은 Duncan's multiple range test⁷³⁾에 의하였다.

2. 연구개발 결과

가. Starter를 이용한 안동식혜 제조

1) 제법을 달리한 식혜의 발효

식혜에서 분리동정한 젖산균 *Lac. bulgaricus* SML 47, *Lac. acidophilus* SML 10, *Lc. lactis* SEC 56과 효모 *S. cerevisiae* SY5를 이용하여 전통제법 및 처리를 달리한 방법과 젖산균과 효모를 단독발효 및 혼합발효에 의해 발효과정중 pH 및 적정산도와 세균수의 변화를 관찰하였다.

전통식혜의 처리방법을 달리하여 1일에서 15일간의 저장 및 숙성하였을 경우에 pH, 적정산도 및 세포수의 변화를 조사하기위하여 다음과 같이 처리하였다. 즉 전통제법, 전통식혜의 재료를 80~85℃에서 15분간 저온살균처리, 전통식혜를 제조한 후 젖산균의 초기성장 pH 6.5로 1N NaOH로 조정, 쌀을 제외한 모든 재료를 균질화하여 상징액으로 제조하여 실험한 결과 Fig. 64~66과 같다

처리를 달리한 식혜의 pH변화는 처리구 모두 저장 및 숙성 15일 동안 pH 3.50에서 4.00으로 뚜렷한 변화를 나타내지 않았으나 시험구 모두 초기숙성기인 2일에서 3일 사이에 적정산도의 변화가 크게 나타났으며 전통제법에 의한 시험구가 가장 낮은 pH 3.52를 저온살균처리한 시험구가 pH 4.00으로 나타났다. 그러나 적정산도의 변화는 초기 숙성일 2일에서 3일 사이에 쌀을 제외한 모든재료를 균질처리한 시험구가 0.80%에서 0.84%로 높게 나타났으며 저온 살균처리한구는 0.40%에서 0.42%로 가장 낮았다.

세포수의 변화를 조사하기 위하여 젖산균은 Bromocresol purple (BCP) agar에서 효모는 malt extract agar(pH 3.5)에서 SPC방법으로 측정하여 젖산균수와 효모의 수를 합한 결과 Fig. 11과 같다. 전통제법에 의한 시험구는 초기숙성 1일째 4.9×10^7 cfu/mL, 2일째 1.4×10^6 cfu/mL로 나타났으며, 달리 처리한 3구의 시험구는 저장 4일째 1.0×10^6 cfu/mL에서 3.5×10^4 cfu/mL로 세포수의 급격한 감소를 나타내었으며 저장 15일까지 계속 감소하는 경향을 나타내었다.

이러한 결과는 Teotiste 등⁷⁴⁾에 의한 20℃에서 3달간 저장후 키위 주스의 pH3.5~3.7과 비슷하였으며 적정산도는 0.50~0.78%로 저온열처리하여 제조한 식혜를 제

외한 나머지는 모두 높게 나타났다. 이러한 결과는 열처리한 경우 식혜내 재료에 존재하는 젖산균과 효모를 사멸한 결과로 보아진다.

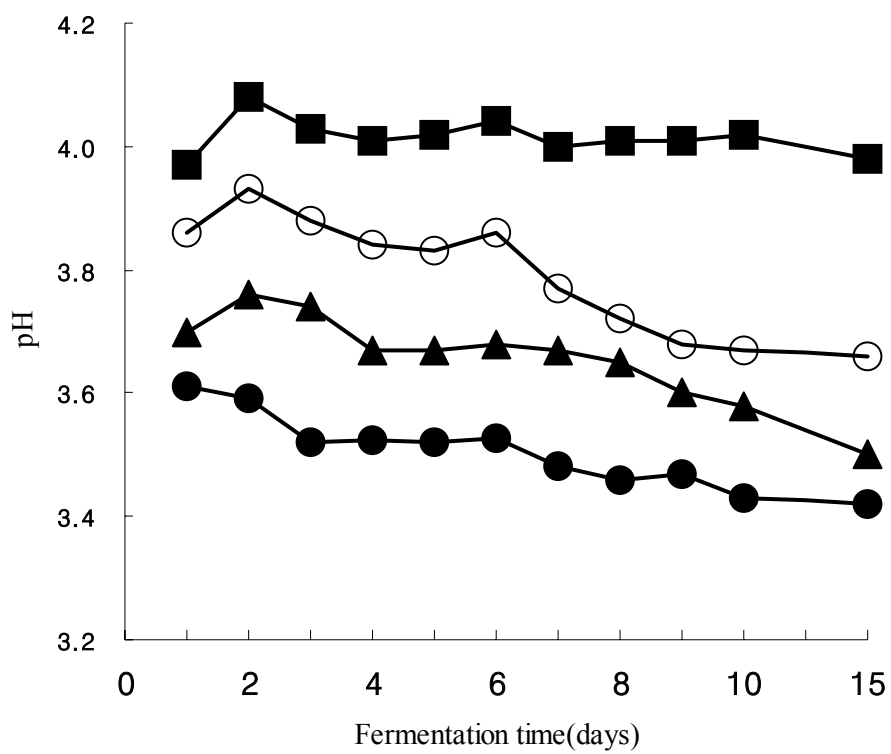


Fig. 64. Changes of pH of Andong *sikhe* during incubation with each treatment

●—● : control ■—■ : LTLT
 ▲—▲ : adjusted at pH 6.5, ○—○ : Homogenized

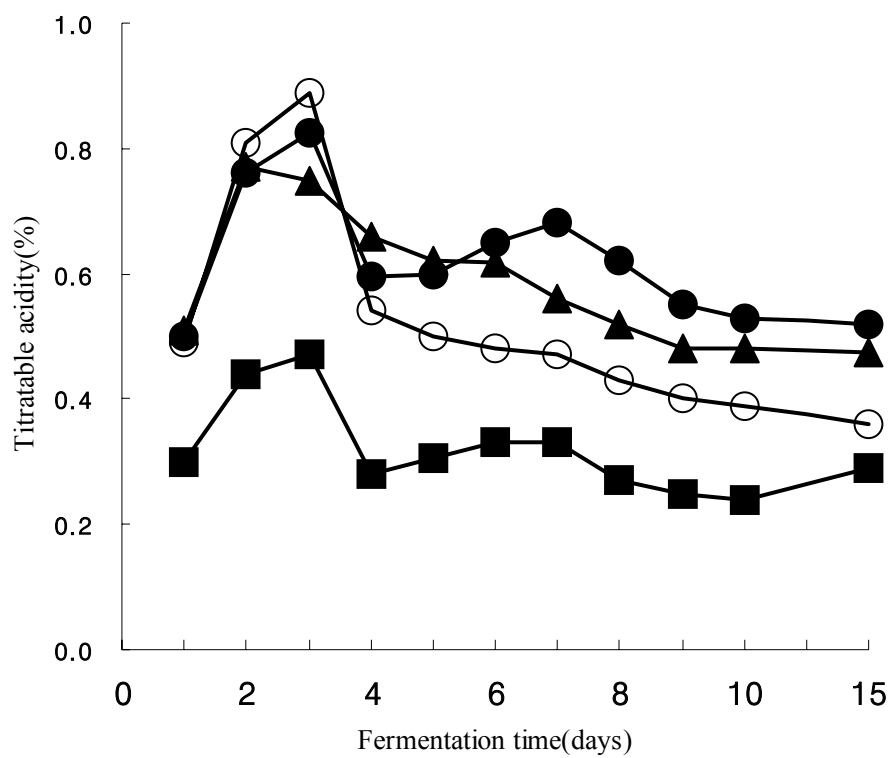


Fig. 65. Changes of titratable acidity of Andong *sikhe* during incubation with each treatment

●—● : control ■—■ : LTLT
 ▲—▲ : adjusted at pH 6.5, ○—○ : Homogenized

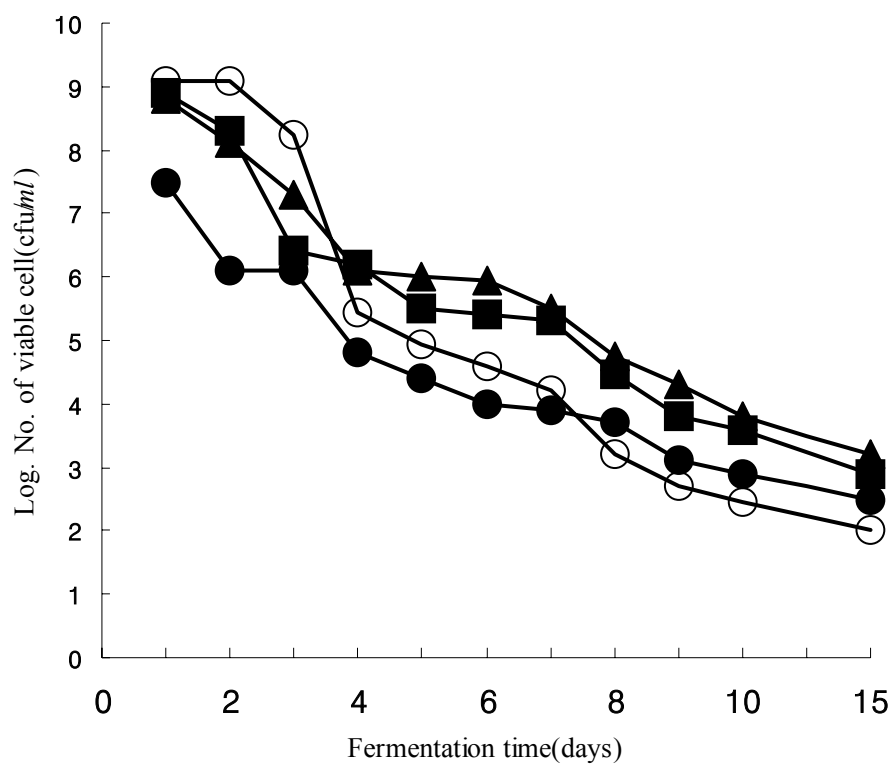


Fig. 66. Cell growth of Andong *sikhe* during incubation with each treatment

●—● : control ■—■ : LTLT
 ▲—▲ : adjusted at pH 6.5, ○—○ : Homogenized

2) 젖산균 및 효모의 단독 발효

젖산균 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10 및 *Lc. lactis* SEC 56과 효모 *S. cerevisiae* SY 5를 각각 식혜 제조시 1.0%(v/v) 단독 접종하여 pH, 적정산도 및 세포수의 변화를 관찰한 결과 Fig. 67~69과 같다. *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10은 숙성 및 저장기간 동안 pH 5.20에서 pH 4.90으로 큰 변화는 없었으며 *Lc. lactis* SEC 56을 접종한 구는 pH 4.40으로 가장 낮게 나타났다. *S. cerevisiae* SY 5는 저장기간 동안 pH 5.30으로 뚜렷한 변화를 보이지 않았지만 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10처리구에 비해 pH는 가장 높은 결과를 보였다. 적정산도의 변화는 젖산균 처리구가 초기숙성 2일에서 3일 사이에 *Lc. lactis* SEC 56은 0.40%에서 0.41%로 가장 높게 나타났고 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10처리구도 초기숙성 2일에서 3일에 0.27%에서 0.28%, 0.31%에서 0.29%로 저장기간 중 높은 값을 나타내었다. *S. cerevisiae* SY 5는 숙성 2일째 0.25%에서 3일째 0.18로 급격한 변화를 나타내어 3개의 젖산균에 비해 가장 낮은 값을 나타내었다. 세포수의 변화는 *Lc. lactis* SEC 56이 초기숙성 1일에서 2일째 2.4×10^9 cfu/mL, 1.9×10^9 cfu/mL로 나타났으며 *S. cerevisiae* SY 5는 숙성 1일째 6.2×10^6 cfu/mL의 세포수를 보이었는데가 숙성 4일째 7.9×10^3 cfu/mL로 급격한 변화를 나타내어 저장기간 동안 큰 변화는 나타내지 않았다.

Gilliland 등⁷⁵⁾에 의한 *Lac. acidophilus*가 저장 중 세포수의 변화보다는 낮은 세포수를 나타내었으며, Abraham 등⁷⁶⁾에 의한 *Lac. bulgaricus*의 밀크배지에서 배양 5시간 이후 pH 5.0이하로 낮아졌으며, Mikolajcik⁴³⁾에 의한 *Lac. acidophilus*의 세포 성장이 배양 12시간까지는 증가하였으나, 그 이후 저장 14일 동안에는 세포수의 변화는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 우유와 식혜재료의 배지성분의 차이와 식혜의 낮은 pH에 기인하였다고 사료된다.

Fleming 등^{77,78)}은 채소발효물의 저장에서 발효물내에 존재하는 모든 당을 배제하고 pH는 3.8이하로 유지하며 혐기적 조건으로 저장하여야 하였다고 하였다.

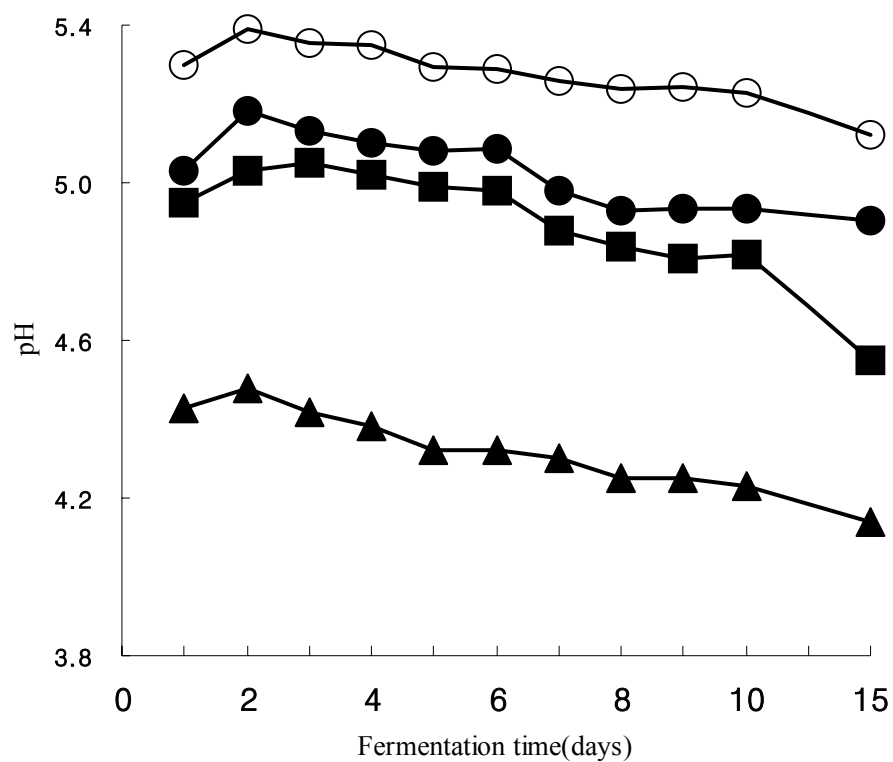


Fig. 67. Changes in pH of Andong *sikhe* during incubation with each single culture

●—● : *Lac. bulgaricus* SML 47, ■—■ : *Lac. acidophilus* SML 10
 ▲—▲ : *Lc. lactis* SEC 56, ○—○ : *S. cerevisiae* SY 5

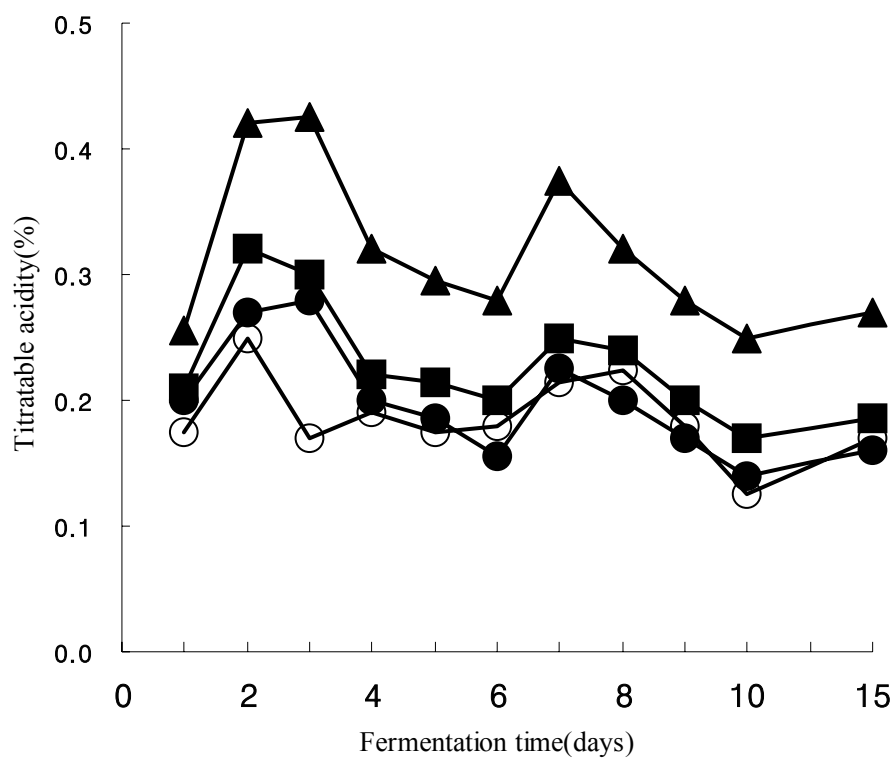


Fig. 68. Changes in titratable acidity of Andong *sikhe* during incubation with each single culture

●—● : *Lac. bulgaricus* SML 47, ■—■ : *Lac. acidophilus* SML 10
 ▲—▲ : *Lc. lactis* SEC 56, ○—○ : *S. cerevisiae* SY5

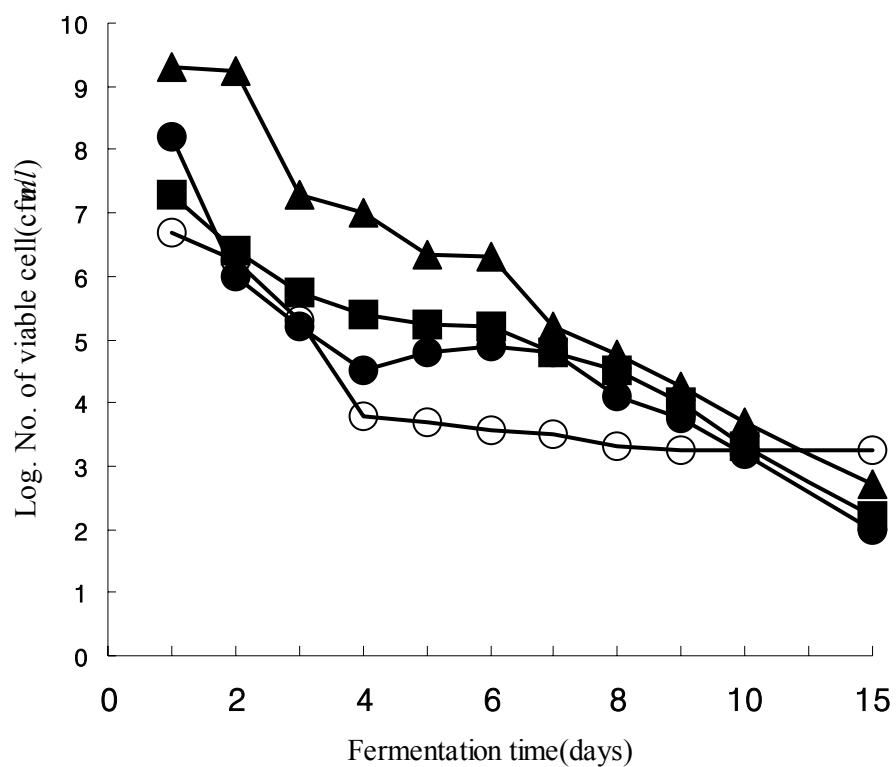


Fig. 69. Growth of during incubation with each single culture in Andong *sikhe*

●—● : *Lac. bulgaricus* SML 47, ■—■ : *Lac. acidophilus* SML 10
 ▲—▲ : *Lc. lactis* SEC 56, ○—○ : *S. cerevisiae* SY 5

3) 젖산균과 효모의 혼합발효

저장기간 동안 젖산균과 효모와의 혼합발효를 통하여 식혜의 숙성 및 저장과정 중 pH, 적정산도 및 세포수의 변화를 조사하기 위하여 각각 0.5%(v/v) 접종하여 식혜를 제조하였을 경우 관찰한 결과 Fig. 70~72와 같다. *Lac. bulgaricus* SML 47과 *S. cerevisiae* SY5를 혼합접종한 경우는 초기숙성 3일에 pH 3.58과 적정산도 0.44%로 *Lac. acidophilus* SML 10과 *S. cerevisiae* SY5를 혼합접종한 경우보다는 pH는 높게 적정산도는 낮게 나타났으며, *Lc. lactis* SEC 56과 *S. cerevisiae* SY 5를 혼합접종한 구보다는 낮게 적정산도는 높은 결과를 보였다. 시험구 3개의 혼합 접종구에서 숙성 2일과 3일 사이에 모두 적정산도의 변화가 높게 나타났으나 3일 이후 15일까지는 큰 변화는 나타내지 않았다.

세포수의 변화는 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *S. cerevisiae* SY5의 혼합 접종구에서 숙성 3일에 5.0×10^8 cfu/mL로 세포의 성장정지기에 도달하여 저장 5일 이후 세포수가 감소하는 경향을 나타내었으며, *Lac. acidophilus* SML 10과 *S. cerevisiae* SY5의 혼합 접종구는 숙성 3일에 1.2×10^9 cfu/mL로 *Lc. lactis* SEC 56과 *S. cerevisiae* SY5의 혼합 접종구는 3일째 3.4×10^8 cfu/mL보다 높은 세포수의 최대를 나타내었다.

이러한 결과는 Subramanian 등⁴⁴⁾에 의한 *Lac. acidophilus*-111과 *C. pseudotropicalis*의 혼합배양시 37℃에서 20시간 배양하였을 경우 산도 0.52 % 보다 낮은 결과를 보였다. 이러한 것은 안동식혜의 숙성 및 저장기간 동안 젖산균이 생성하는 젖산이 효모가 분비하는 알코올과의 완충작용에 기인하였다고 사료된다.

Vegarud 등⁷⁹⁾에 의하면 발효 채소물내에 존재하는 탄소원인 lactose가 glucose로 전환하였을 때 젖산균의 성장과 자가소화율이 증가된다고 하였다.

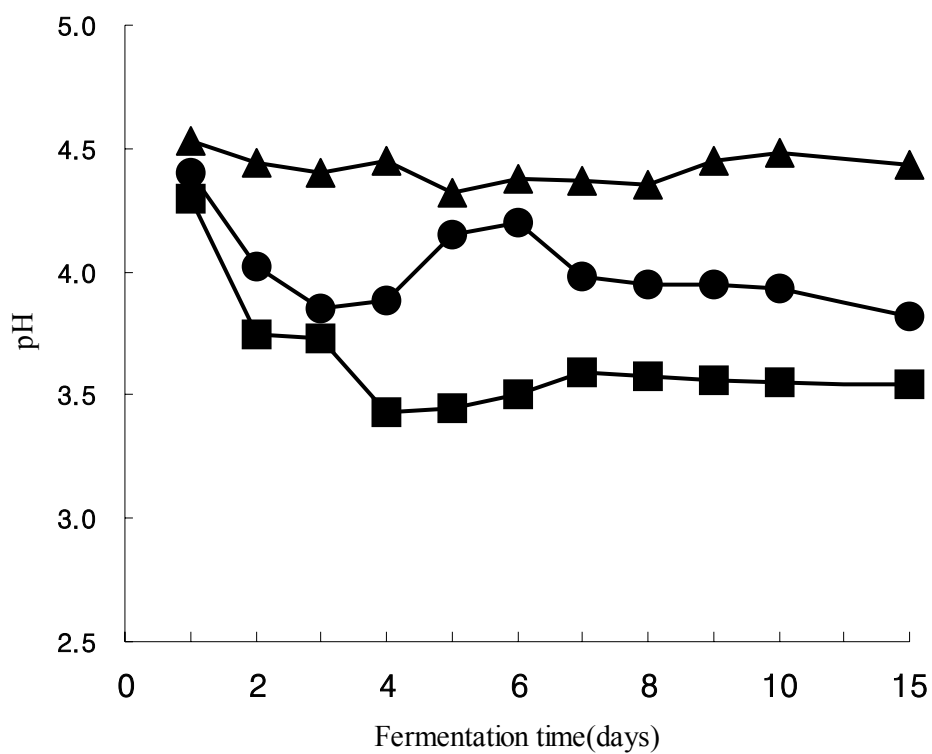


Fig. 70. Changes of pH during incubation with mixed culture of lactic acid bacteria and yeast in Andong *sikhe*.

- : *Lac. bulgaricus* SML 47 + *S. cerevisiae* SY 5
- : *Lac. acidophilus* SML 10 + *S. cerevisiae* SY 5
- ▲—▲ : *Lc. lactis* SEC 56 + *S. cerevisiae* SY 5

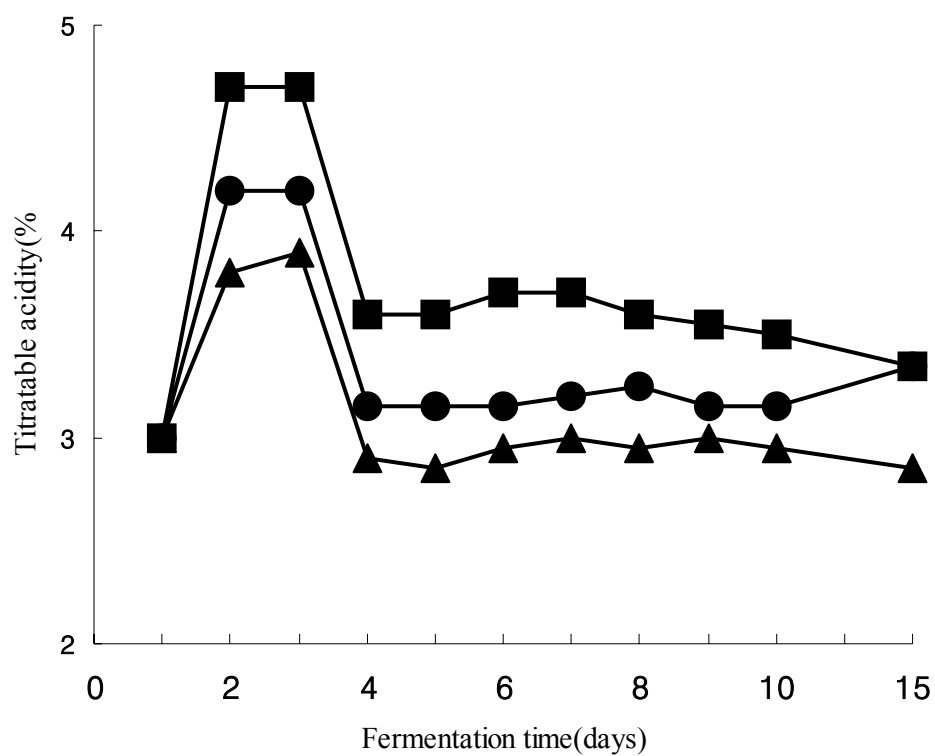


Fig. 71. Changes of titratable acidity during incubation with mixed culture of lactic acid bacteria and yeast in Andong sikhe.

- : *Lac. bulgaricus* SML 47 + *S. cerevisiae* SY 5
- : *Lac. acidophilus* SML 10 + *S. cerevisiae* SY 5
- ▲—▲ : *Lc. lactis* SEC 56 + *S. cerevisiae* SY 5

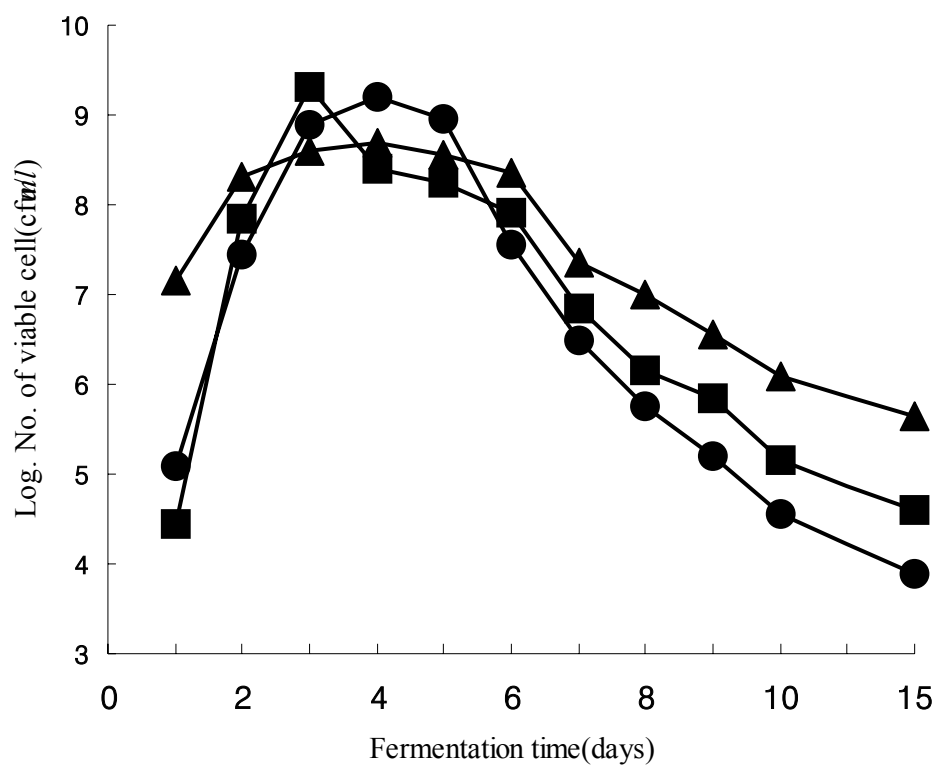


Fig. 72. Growth of during incubation with mixed culture of lactic acid bacteria and yeast in Andong sikhe.

- : *Lac. bulgaricus* SML 47 + *S. cerevisiae* SY 5
- : *Lac. acidophilus* SML 10 + *S. cerevisiae* SY 5
- ▲—▲ : *Lc. lactis* SEC 56 + *S. cerevisiae* SY 5

4) 젖산균과 젖산균의 혼합발효

식혜에서 분리된 3개의 젖산균을 서로 혼합발효하여 숙성 및 저장 중 pH, 적정 산도 및 세포수의 변화를 관찰한 결과 Fig. 73~75과 같다. *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lc. lactis* SEC 56을 혼합발효하였을 경우 숙성 1일에서 2일에는 pH 3.50이었으나 저장 3일에는 pH 4.02, 4일에 pH 4.01로 높은 변화를 보이였다가 저장 기간동안에는 pH 3.50으로 큰 변화는 나타나지 않았다. *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10의 혼합발효경우 저장 3일에 pH 3.49로 pH가 높게 나타났으며 숙성 4일까지 유지하였다. 젖산균과의 혼합발효에서 *Lactobacilli* sp.간의 혼합발효가 *Lactobacilli* sp.와 *Lactococci* sp. 간의 혼합발효보다 낮은 pH변화를 나타내었다.

세포수의 변화는 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *Lac. acidophilus* SML 10에 의한 혼합발효시 저장초기에는 6.9×10^6 cfu/mL로 3개의 시험구보다 높은 세포수를 나타내었으나 저장 5일에 8.3×10^1 cfu/mL로 다른 시험구에 비하여 세포수가 가장 낮게 나타내었다. *Lac. bulgaricus* SML 47, *Lac. acidophilus* SML 10과 *Lc. lactis* SEC 56에 의한 혼합발효시에는 초기 5.4×10^4 cfu/mL, 1.3×10^4 cfu/mL에서 저장 5일에 5.2×10^2 cfu/mL, 2.8×10^2 cfu/mL로 급격한 세포수의 변화를 보이였다가 5일 이후 저장기간 15일 동안 큰 변화는 없었다.

Nancy 등⁸⁰⁾에 의하면 *Lac. bulgaricus*와 *Lacto. thermophilus*의 혼합발효시 배양 12시간에 산도 0.75 %의 결과 보다 높게 나타났다. 젖산균간의 상호혼합발효는 유제품에 있어서 요구르트 제조시 많이 이용되어왔는데 배양동안 상호 성장촉진인자와 산생성을 높이기 위하여 사용되었다. 그러나 본 실험에 이용한 젖산균간의 상호 성장관계는 나타나지 않았다.

Hull 등⁸¹⁾에 의한 애시도필러스 요구르트 제조에 있어서 3달간의 저장기간 동안 *Lac. acidophilus*의 세포수변화와 비슷한 결과를 나타내었다. 저장중의 세포수의 급격한 저하는 식혜내의 *lactobacilli* sp.에 의한 과산화수소 때문에 *Lac. acidophilus*의 불안정성에 기인하였다고 판단되어진다.

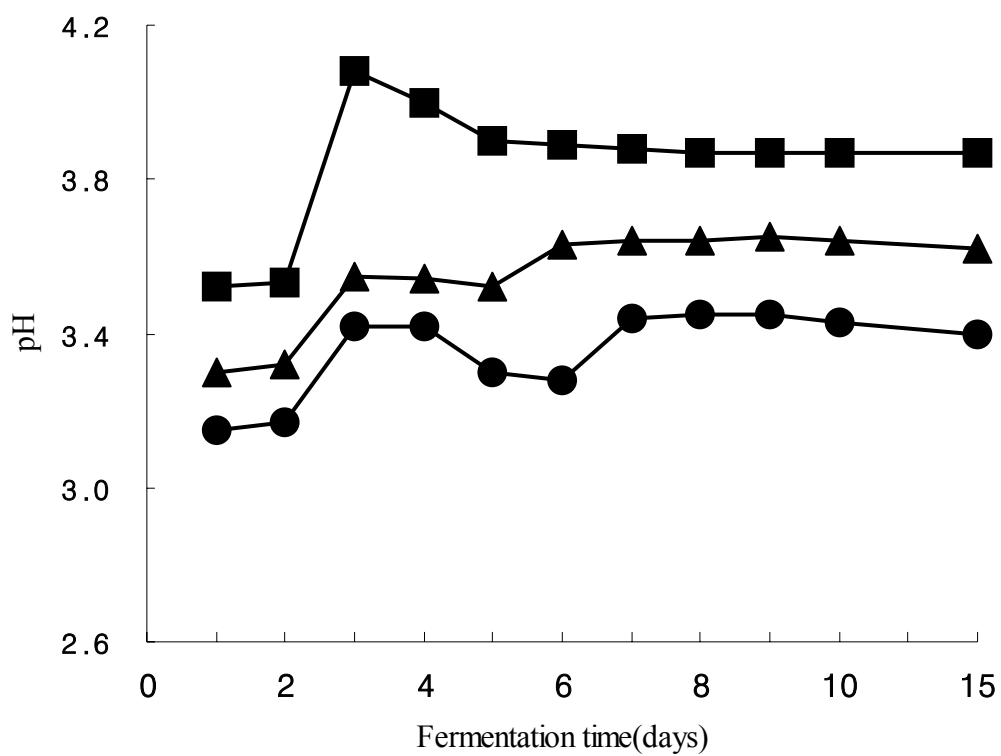


Fig. 73. Changes of pH during incubation with mixed culture of lactic acid bacteria and yeast in Andong *sikhe*.

●—● : *Lac. bulgaricus* SML 47 + *Lac. acidophilus* SML 10

■—■ : *Lac. bulgaricus* SML 47 + *Lc. lactis* SEC 56

▲—▲ : *Lac. acidophilus* SML 10 + *Lc. lactis* SEC 56

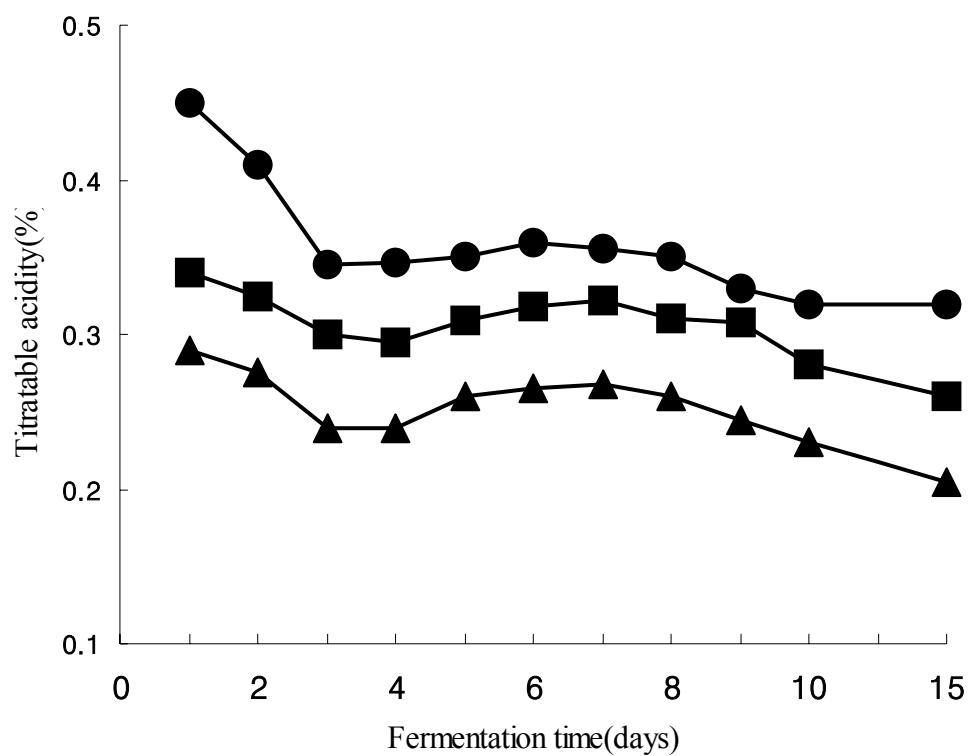


Fig. 74. Changes of titratable acidity during incubation with mixed culture of lactic acid bacteria and yeast in Andong *sikhe*.

- : *Lac. bulgaricus* SML 47 + *Lac. acidophilus* SML 10
- : *Lac. bulgaricus* SML 47 + *Lc. lactis* SEC 56
- ▲—▲ : *Lac. acidophilus* SML 10 + *Lc. lactis* SEC 56

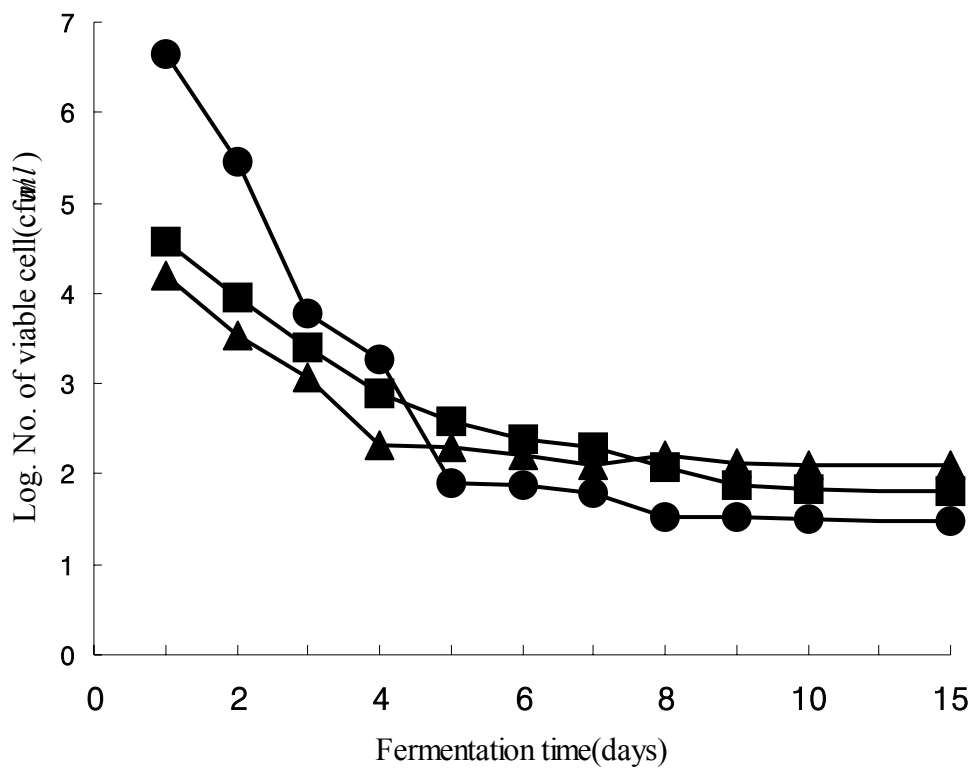


Fig. 75. Growth of during incubation with mixed culture of lactic acid bacteria and yeast in Andong *sikhe*.

- : *Lac. bulgaricus* SML 47 + *Lac. acidophilus* SML 10
- : *Lac. bulgaricus* SML 47 + *Lc. lactis* SEC 56
- ▲—▲ : *Lac. acidophilus* SML 10 + *Lc. lactis* SEC 56

나. 성분분석

1) 일반성분

젖산균과 효모를 이용하여 맛과 향이 우수한 안동식혜를 제조하기 위하여 전통 제법 및 처리를 달리한 방법, 분리 균주의 단독배양 및 혼합배양에 의한 숙성 3일째의 일반성분은 Table 12와 같다. 조지질의 함량은 젖산균이 효모의 단독발효와 젖산균과 효모에 의한 혼합발효 보다 조금 높게 나타났으며 효모 단독발효와 젖산균과 효모에 의한 혼합발효에서 가장 낮게 나타났으며, LB+SC첨가균이 가장 낮게 나타났다. 조단백의 함량은 대조군보다 젖산균과 효모에 의한 단독 첨가균과 혼합 발효첨가균이 대체로 높게 나타났다. pH와 적정산도의 변화는 저장 3일째 LA+SL균이 3.49로 가장 낮았으며, 적정산도는 대조군이 0.84로 높게 나타났고, 젖산균 단독 발효시에는 pH 4.51에서 5.24로 나타났다. 당도는 대조군이 11.2%인데 비하여 LB+SC첨가균은 12.3로 가장 높았으며, 혼합 발효시에서 pH는 LA+SL첨가균이 3.49로 가장 낮게 나타났고 LB+SC는 pH 3.80으로 나타났다. 총 산도는 SC첨가균이 0.17%로 가장 낮았으며 SH균이 0.89%로 가장 높게 나타났으며 LB+SC에 의한 혼합발효시에는 0.43%로 나타났다. 0.38로 대조군에 비해 LD균이 0.38로 가장 높았다.

이러한 결과는 Teotiste⁷⁴⁾에 의한 저장 3달 후 키위쥬스의 당도 13.9~14.0과 수분 85.3~85.5보다 당도는 낮게 수분함량은 높은 결과를 나타내었다.

**Table 12. General composition of Andong *sikhe* fermented
with various treatment at the 3rd day of fermentation**

Strain	Moisture	Crude fat	Crude protein	Crude fiber	NFE¹⁾	Ash	pH	TA²⁾	BX³⁾
Control	88.17	0.51	1.16	0.08	9.90	0.19	3.52	0.84	11.2
LB	89.07	0.45	1.17	0.08	9.64	0.18	5.24	0.28	12.2
LA	89.06	0.41	1.18	0.08	9.31	0.18	5.10	0.30	11.9
SL	89.09	0.42	1.18	0.08	9.12	0.18	4.51	0.42	11.8
SC	88.00	0.38	1.19	0.08	9.20	0.18	5.10	0.17	10.4
LB+SC	88.07	0.31	1.20	0.09	9.31	0.19	3.82	0.43	12.3
LA+SC	88.04	0.33	1.19	0.07	9.24	0.19	3.74	0.45	11.9
SL+SC	88.03	0.39	1.18	0.08	9.42	0.18	4.42	0.39	11.7
LB+LA	89.08	0.41	1.19	0.08	9.14	0.19	3.47	0.35	11.2
LB+SL	89.06	0.48	1.19	0.07	9.27	0.19	4.20	0.31	11.3
LA+SL	89.07	0.49	1.17	0.07	9.31	0.20	3.49	0.26	11.6

¹⁾ NFE : Nitrogen free extraction

²⁾ TA : Titratable acidity

³⁾ Bx : Brix of sugar

Table 13. General composition during the fermentation and storage at 4°C of *sikhe* fermentation with mixed culture.

	Days								
	0	1	2	3	4	6	8	10	15
Moisture	88.06	88.07	89.07	88.07	88.24	88.61	88.74	88.87	88.93
Crude fat	0.23	0.29	0.30	0.31	0.41	0.51	0.52	0.51	0.52
Crude protein	1.13	1.13	1.18	1.19	1.19	1.18	1.12	1.06	1.05
NFE¹⁾	9.49	9.38	9.36	9.31	8.71	8.39	8.36	8.28	8.21
Ash	0.19	0.20	0.20	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.20
pH	5.20	4.40	4.02	3.82	3.88	4.29	4.07	4.05	4.02
TA²⁾	0.18	0.43	0.43	0.43	0.30	0.34	0.32	0.30	0.33

¹⁾ NFE : Nitrogen free extraction

²⁾ TA : Titratable acidity

2) 알코올 및 유리당

안동식혜의 숙성 및 저장과정에 있어서 알코올의 함량의 변화는 Table 14에서 보는바 같이 ethyl alcohol을 포함하여 3 종류가 동정 되었다. Ethyl alcohol의 함량은 숙성 및 저장이 진행됨에 따라 증가하였고 amyl alcohol의 함량은 차차 감소하였다. 이와 같은 결과는 유 등⁸²⁾이 재료의 종류에 따른 김치의 알코올 함량의 변화에 있어서 비슷한 결과를 얻었으며 이러한 결과는 ethyl alcohol은 효모에 의하여 당이 분해되어 acetaldehyde를 거쳐 생성되기도 하며 젖산균에 의하여 acetylphosphate를 통하여 생성되기 때문이라 생각된다. 유리당의 변화를 분석한 결과는 Table 15와 같다. Glucose를 포함하여 6종류였으며 그 외 maltotriose이상의 분자량이 큰 물질로 추정되어 미확인 물질도 1개 검출되었다. 환원당의 함량은 maltose가 가장 많았으며 점차 증가하여 4일째 가장 많았으며 그 후 점차 감소하였다. 이러한 결과들은 육 등⁸³⁾이 새로운 식혜의 제조법에 있어서 숙성과정 중 maltose의 함량 49.5%보다는 많았고 최 등⁸⁴⁾의 식혜 중 maltose의 함량과 비슷하였다.

Livi⁸⁵⁾에 의하면 lactose는 모든 발효산물들에서 감소를 나타내며 요구르트의 경우 저장 11일 후 lactose의 함량은 4.8g에서 2.3g으로 감소하였다고 하였다.

3) 비휘발성 유기산

전통안동식혜의 숙성 및 저장과정에 있어서 비휘발성 유기산 함량의 변화는 Table 16과 같다. 젖산과 fumaric acid의 함량 증가가 관찰되었고, 특히 젖산의 증가는 다른 유기산 보다 현저 하였다. 이러한 양상으로 보아 젖산은 충분한 발효과정이 진행되면서 생성되는 반면 다른 유기산들은 충분히 발효가 일어나기 전에 이미 상당량 존재하고 있는 것으로 생각되며 이러한 결과는 유 등⁸²⁾이 보고한 김치의 유기산 함량의 변화에서도 비슷한 결과를 얻었으며, Chen 등⁸⁶⁾이 보고한 *Lac. cellobiosis*에 의한 푸른콩 발효에서 젖산의 함량과 비슷한 결과를 나타내었고 Wang 등⁸⁷⁾에 의한 복숭아의 숙성과정중의 유기산 함량은 높게 나타났다. 산도변화의 경향이 젖산의 함량변화와 유사한 점으로 보아 안동식혜의 산도는 주로 젖산의 생성과 상관이 있을 것으로 생각된다.

4) 지방산

안동식혜의 숙성 및 저장과정 중 지방산의 함량변화는 Table 17과 같이 linoleic acid, palmitic acid, oleic acid가 주요 지방산으로서 각각 43.3~44.8%, 26.7~31.5% 및 19.0~24.5%를 차지하여 총지방산의 90%이상을 차지하였다. oleic acid는 시간이 경과함에 따라서 점차 감소하였고 palmitic acid는 시간이 지남에 따라서 점차 증가하여 대조를 이루었으며 linoleic acid를 포함한 다른 지방산들은 숙성 및 저장 중 함량의 변화는 거의 없었다.

Table 14. Contents of alcohol in Andong *sikhe* during fermentation and storage at 4℃

Unit : ppm(w/v)

	Fermentation and storage(days)			
	0	1	3	6
Ethyl alcohol	2.02	4.90	10.69	11.28
Amyl alcohol	2.52	0.62	0.48	0.43

Table 15. The free sugar of Andong *sikhe* with mixed culture during fermentation and storage at 4°C

Free sugar	Days								
	0	1	2	3	4	6	8	10	15
Fructose	5.12	4.42	3.85	3.63	3.53	3.48	3.44	3.10	3.40
Glucose	10.12	9.26	8.83	8.70	8.60	8.69	8.82	8.55	10.51
Sucrose	0.65	1.08	0.72	0.28	0.24	0.18	0.14	0.13	0.13
Maltose	71.52	71.94	74.73	75.77	76.34	75.24	74.62	74.22	73.94
Lactose	3.45	3.01	2.27	1.67	1.01	0.80	0.86	1.10	1.32
Maltotriose	8.68	10.14	10.20	10.81	10.90	11.07	11.06	11.60	11.81
Unknown	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace

Table 16. Contents of organic acid in Andong *sikhe* during fermentation and storage at 4℃

Unit : mg/100g

	Fermentation and storage(days)			
	0	1	3	6
Lactic acid	0.49	6.25	18.10	19.37
Oxalic acid	1.24	1.18	1.04	0.99
Succinic acid	0.41	0.51	0.72	0.88
Citric acid	1.27	1.32	1.37	1.50
Malic acid	0.17	0.15	0.12	0.13
Fumaric acid	0.03	0.17	0.26	0.45
Malonic acid	1.35	1.03	0.70	0.65

Table 17. Composition of fatty acid of Andong *sikhe* with mixed culture during fermentation and storage at 4°C

Fatty acid	Days								
	0	1	2	3	4	6	8	10	15
12	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
14	1.23	1.29	1.33	1.32	1.32	1.31	1.39	1.28	1.30
16	26.53	28.50	30.08	30.33	30.42	30.36	31.16	31.22	31.38
18	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
18(1)	24.38	23.36	22.02	21.74	21.47	21.29	18.87	19.47	19.50
18(2)	44.67	44.06	43.59	43.15	43.81	43.87	44.15	44.38	44.16
18(3)	2.19	2.09	1.98	2.46	2.00	2.14	2.80	2.65	2.66

5) 질소화합물

안동식혜의 숙성 및 저장과정 중 질소화합물의 변화는 Table 18과 같다. 아미노태질소는 시간이 경과할수록 증가하였으며 15일째 42.68mg %였다. 암모니아태질소, 수용성단백질과 염용성 단백질의 함량은 시간이 경과함에 따라 차차 감소하였다. 조단백질의 함량의 변화는 숙성과정 4일째 1.27%로 그 함량이 가장 많았으나 그 후 차차 감소하였다. 이는 최 등⁸⁴⁾의 숙성 4일째 안동식혜의 조단백질함량 1.67%보다 적으며 문 등⁸⁸⁾이 보고한 식혜제조의 과학적 연구에서 조단백질 함량이 1.85%보다 본 실험결과가 대체로 낮았다. 안동식혜의 조단백질의 함량이 원료배합비 등에 의하여 상이된 결과를 얻었다고 생각된다.

6) 유리 아미노산

안동식혜의 숙성 및 저장과정 중 유리아미노산의 함량의 변화는 Table 19와 같다. 유리아미노산의 함량은 proline, aspartic acid가 100mL당 각각 64.5, 25.8mg으로 가장 많았으며 proline함량은 3일째 114.0mg으로써 약 2배 가량 증가되었으며 그 후 시간이 지남에 따라 차차 감소하였다. 이것은 염용해성 단백질에 함유된 많은 proline이 단백질 분해효소 작용으로 분해되어 생성된 것으로 생각된다. Methionine은 시간이 경과함에 따라 점차 증가하였으나 lysine은 오히려 감소하였다. Threonine, leucine 및 alanine의 함량은 거의 일정하였으며 그외 대부분의 유리아미노산들의 함량은 숙성 및 저장기간 동안 대체로 증가하였다.

7) 수용성 및 염용해성 단백질의 아미노산 분석

안동식혜의 숙성 및 숙성과정 중 수용성 및 염용해성 단백질의 아미노산 함량의 변화는 Table 20, 21과 같다. 수용성 단백질의 아미노산 함량은 glutamic acid와 aspartic acid가 각각 119.2, 105.4 mg/g로 가장 많았으며 methionine과 histidine은 저장 및 숙성기간 중 거의 일정하였으며 대부분의 아미노산들의 함량은 숙성 및 저장기간 동안 차차 감소하는 경향을 나타내었다. 염용해성 단백질의 아미노산 함량은 glutamic acid, aspartic acid 및 proline의 함량이 각각 142.7, 102.6 및 76.1mg/g으로서 가장 많았다. Cystine과 methionine의 함량이 낮은 것은 산분해 과정에 있어서 분

해진 것으로 생각되며 methionine, tyrosine 및 phenylalanine의 함량은 거의 일정하였으며 arginine은 시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 최 등⁸⁴⁾의 결과와는 상이하였으며 그외 대부분의 아미노산의 함량은 숙성과정 중 감소하였다.

Table 18. Changes of nitrogen compounds during fermentation and storage at 4°C of Andong *sikhe* with mixed cultures

Nitrogen compound	Days								
	0	1	2	3	4	6	8	10	15
Crude protein (%)	1.10	1.10	1.16	1.19	1.27	1.17	1.10	1.04	1.03
Amino nitrogen (mg%)	36.50	36.80	37.50	39.88	40.02	40.02	41.28	42.40	42.68
Ammonia nitrogen (%)	0.21	0.20	0.19	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.02
Water soluble protein (mg/mL)	1.83	1.43	1.24	1.08	1.01	0.97	0.95	0.94	0.93
Salt soluble protein (mg/mL)	3.11	3.02	2.86	2.71	2.59	2.52	2.45	2.40	2.32

Table 19. Free amino acids of Andong *sikhe* with mixed cultures during fermentation and storage at 4°C

Unit : mg/100mL

Amino acid	Days								
	0	1	2	3	4	6	8	10	15
Aspartic acid	25.8	26.1	26.3	27.2	27.7	27.9	28.1	28.2	28.3
Threonine	21.1	21.5	21.5	21.6	21.7	21.7	21.6	21.5	22.5
Serine	10.8	11.1	14.7	15.0	16.6	16.5	16.5	15.2	13.6
Glutamic acid	10.7	10.0	10.9	10.9	11.0	11.2	11.3	11.6	11.8
Proline	64.5	95.3	97.2	114.0	105.2	105.9	106.7	104.1	97.6
Glycine	8.2	11.0	11.2	11.2	11.3	11.8	11.9	12.1	12.3
Alanine	14.0	15.1	15.3	15.5	15.6	17.5	15.7	15.2	14.9
Cysteine	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Valine	10.9	11.0	12.0	11.1	11.3	11.5	12.1	10.3	10.0
Methionine	1.7	2.1	2.4	2.4	2.4	2.8	3.0	3.2	3.4
Isoleucine	7.9	9.0	10.0	10.1	10.3	10.5	10.7	9.0	7.3
Leucine	13.6	13.6	13.7	13.6	13.8	13.7	13.7	13.6	13.5
Tyrosine	9.2	11.2	11.5	11.8	11.4	11.2	9.5	8.0	7.7
Phenylalanine	12.0	14.4	13.6	14.7	15.0	15.0	15.0	15.1	14.9
Histidine	14.1	16.3	16.9	17.2	17.5	17.5	17.7	18.0	19.1
Lysine	6.7	6.7	5.4	5.3	5.2	5.2	5.1	5.1	5.0
Arginine	13.9	16.2	19.1	24.2	20.3	20.5	20.3	20.2	12.7

Table 20. Amino acids of water soluble protein from Andong *sikhe*
with mixed cultures during fermentation and storage at 4°C

Unit : mg/g

Amino acid	Days								
	0	1	2	3	4	6	8	10	15
Aspartic acid	105.4	100.6	96.7	94.6	92.3	87.1	83.1	78.5	77.8
Threonine	54.3	51.0	48.2	46.1	44.3	44.3	39.9	37.7	37.2
Serine	46.0	46.0	45.2	44.9	44.1	41.2	34.7	33.9	30.5
Glutamic acid	119.2	111.2	108.7	108.2	107.1	104.3	102.1	96.7	92.1
Proline	83.7	84.8	89.2	93.8	99.5	97.3	89.9	82.3	70.7
Glycine	54.6	49.5	47.2	45.1	44.7	43.9	43.4	41.0	39.2
Alanine	53.1	51.9	50.6	49.6	49.2	49.6	48.2	42.0	40.9
Cysteine	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Valine	45.2	45.9	45.9	46.9	47.6	48.7	47.2	45.5	43.2
Methionine	2.5	2.6	2.4	2.4	2.5	2.5	2.4	2.4	2.8
Isoleucine	50.2	49.8	46.1	44.3	43.4	42.0	38.4	34.3	32.9
Leucine	73.6	72.6	69.2	68.7	67.5	66.9	61.3	55.4	54.9
Tyrosine	36.7	31.0	21.9	17.3	14.9	13.1	15.5	21.3	26.6
Phenylalanine	84.2	83.1	67.5	66.0	61.7	58.3	55.4	46.0	39.9
Histidine	47.8	48.0	48.1	48.0	48.2	48.2	48.0	47.9	47.8
Lysine	52.2	52.6	52.9	53.0	56.0	59.0	48.7	47.7	47.0
Arginine	79.1	70.5	66.2	64.2	63.9	61.9	57.9	52.0	49.2

Table 21. Amino acids of salt soluble protein from Andong *sikhe* with mixed cultures during fermentation and storage at 4°C

Unit : mg/g

Amino acid	Days								
	0	1	2	3	4	6	8	10	15
Aspartic acid	102.6	100.4	98.5	93.1	93.2	91.9	91.7	91.4	91.3
Threonine	40.3	41.6	41.9	36.5	35.4	31.7	33.1	33.1	33.1
Serine	45.9	45.7	50.5	48.4	47.3	46.2	45.3	44.3	41.9
Glutamic acid	142.7	136.9	134.9	117.9	109.9	105.2	104.8	104.7	104.5
Proline	76.1	70.6	67.2	64.3	62.9	60.0	58.0	54.9	52.2
Glycine	62.2	59.2	57.9	55.4	54.9	53.6	50.0	46.2	44.1
Alanine	57.2	55.9	54.3	52.0	50.2	47.9	47.6	41.1	41.8
Cysteine	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Valine	69.7	66.0	58.4	53.3	52.2	51.9	51.5	51.0	50.7
Methionine	4.9	5.1	5.2	6.0	6.2	6.4	6.0	5.7	5.4
Isoleucine	46.0	45.2	44.4	41.9	39.2	37.2	34.6	32.1	31.9
Leucine	71.5	66.6	57.9	56.2	49.3	45.9	55.9	57.9	63.2
Tyrosine	34.5	34.4	34.5	34.4	34.4	34.5	34.4	34.3	34.1
Phenylalanine	42.3	42.2	42.2	42.3	42.2	42.2	42.3	42.2	42.2
Histidine	64.1	61.3	59.8	57.7	54.4	52.2	49.9	46.2	44.2
Lysine	68.8	66.2	65.2	63.9	61.5	59.5	56.6	54.6	52.9
Arginine	39.9	40.0	41.5	42.1	43.9	44.2	45.9	49.6	52.1

다. 효소활성의 변화

안동식혜의 숙성 및 저장과정 중에 있어서 산성 protease, 전분액화 및 당화 효소력 그리고 lipase의 활성을 측정한 결과는 Table 22와 같다. 식혜의 protease의 주체인 산성 protease는 3일째 1.92 unit/mL로서 식혜의 아미노태질소의 함량이 대체로 낮은 사실로 보아 본 실험에 사용한 식혜의 산성 protease의 활성이 낮은것으로 추측된다. Liquefying amylase의 활성은 발효 2일째 12.94 D⁴⁰였으며, 3일째 13.79 D⁴⁰로서 최고치를 나타내었으며 그 후부터 차차 감소하는 경향을 나타내었다.

Sacchrogenic amylase의 활성은 3일째 3.56 unit/mL로서 최대의 활성을 나타내었으며 그 후 부터는 차차 감소하였다. lipase의 활성은 전 발효과정을 통하여 미약하였다. 본 실험의 결과에서 안동식혜의 amylase 활성등은 남과 김⁸⁹⁾이 서울식혜에 있어서 당화력을 측정한 보고의 결과보다 훨씬 높았다.

Table 22. The activities of protease, amylase and lipase of Andong *sikhe* with mixed culture during fermentation and storage at 4°C

Enzyme activity	Days								
	0	1	2	3	4	6	8	10	15
Acid protease (unit/mL)	0.69	1.79	1.83	1.92	1.94	1.89	1.88	1.84	1.71
Liquefying amylase (D ⁴⁰)	6.57	11.00	12.94	13.79	11.68	11.57	9.91	8.86	8.43
Saccharogenic amylase (unit/mL)	0.96	2.33	3.56	3.16	3.05	2.94	2.76	2.33	2.25
Lipase (unit/mL)	0.06	0.07	0.09	0.09	0.08	0.08	0.07	0.06	0.05

라. 저장안정성

1) 안정제에 의한 침전억제 효과

안동식혜의 저장과정 중 시간이 경과함에 따라 고형질이 침전하여 품질상의 문제가 되므로 이를 개선할 목적으로 식혜제조시 재료를 균질화한 구와 균질화하지 않은 시험구에 대하여 *Lac. bulgaricus* SML 47과 효모 *S. cerevisiae* SY5 를 접종하여 CMC, Na-alginate 및 Carrageenan과 같은 안정제를 첨가하여 침전억제효과를 시험한 결과 Table 23, 24, 25, 26, 27, 28과 같다. 균질화 하지 않은 식혜(Table 23~25)에 있어서 대조군은 12시간까지는 상당한 침전이 있었고 그 후에는 그다지 침전이 일어나지 않았다. CMC첨가의 경우 0.70% 농도에서 24시간까지는 전혀 침전이 없었으나 그 후에는 침전이 있었으며 1.0% 농도에서는 침전이 없었다. Na-alginate 첨가구는 0.30%의 농도부터는 침전이 일어나지 않았으며 Carrageenan은 침전억제 효과가 없었다.

균질화한 안동식혜(Table 26~28)에 있어서 대조군은 24시간 이후부터 상당한 침전이 있었다. CMC를 첨가할 경우 낮은 농도에서는 오히려 침전이 촉진되었으며 1.0% 농도에서는 48시간까지는 침전이 없었다. Na-alginate의 경우 0.1%와 0.15%에서는 오히려 침전촉진효과가 나타났으며 0.7% 농도에서는 24시간까지는 침전이 없었으며 1.0%에서는 침전이 일어나지 않았다. Carrageenan은 0.15에서 0.3% 농도에서는 침전촉진결과가 나타났고 1.0%에서도 완전히 침전을 억제시키지 못하였다. 안정제의 침전억제효과는 균질화하지 않은 식혜의 경우 CMC, Carrageenan 및 Na-alginate모두 0.01%에서 침전억제효과를 나타내었으나 Na-alginate가 가장 우수하였으며 균질화한 식혜의 경우는 CMC가 0.20%, Na-alginate가 0.3%에서 효과를 나타내었고, 저농도에서는 오히려 침전촉진효과가 나타났다.

우리나라에서 생산되는 우유, 요구르트의 경우 대부분의 회사가 단백질의 침전을 방지하는 안정제로서 CMC, Na-alginate 및 Carrageenan을 사용하고 있으며, 우리나라 요구르트에 함유한 Na-alginate의 농도는 0.15~0.4%범위내에 있는데 본 실험의 균질화하지 않은 안동식혜의 침전을 억제할 수 있는 농도는 Na-alginate가 0.3% 농도로 완전히 침전을 억제할 수 있었으며 균질화시킨 식혜의 경우에도 마찬가지로 Na-alginate가 1.0%의 농도에서 완전히 침전억제를 나타내었다. 즉 균질화시킨 안동

식혜의 침전을 방지하기 위해서는 다소 높은 농도의 Na-alginate 첨가가 필요하였다.

우리나라의 우유, 요구르트에는 현재 대부분의 제품이 0.2~1.0%의 CMC를 함유하고 있는데 본 실험의 결과에서 나타난 식혜의 침전을 억제할 수 있는 농도인 0.4~1.0%와 대체로 일치하였다고 생각되나 균질화하지 않은 식혜에서는 1.0%를 넣어도 침전억제효과가 없으나 균질화한 식혜에서는 0.7%이상에서는 침전을 억제하였다는 최 등²⁶⁾의 보고와는 다소 다르게 나타났다.

Table 23. Stabilizing effect of Na-carboxymethyl cellulose(CMC)
in Andong *sikhe* with mixed cultures

Time (hr.)	CMC(%)										
	0.00	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.50	0.70	1.00
	Degree of sedimentation(mL supernatant)										
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	30	26	22	16	13	16	10	5	2	0	0
3	35	30	27	19	16	21	14	7	4	0	0
6	37	32	28	20	18	22	16	9	6	0	0
12	39	34	29	21	18.5	23	17	11	8	0	0
24	40	36	30	29.5	19	24	17.5	13	10.5	0	0
48	41	36	30	22	18	25	18	14	13	4	0
72	40	38	32	23	19	26	20	15	15	4	0

Table 24. Stabilizing effect of Na-alginate in Andong *sikhe* with mixed cultures.

Time (hr.)	Na-alginate(%)										
	0.00	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.50	0.70	1.00
Degree of sedimentation(mL supernatant)											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	30	23	19	20	23	9	2	0	0	0	0
3	35	27	21	23	24	14	3	0	0	0	0
6	37	29	21	24	25	15	4	0	0	0	0
12	39	30	22	25	25.5	16	4	0	0	0	0
24	40	31	23	25.5	26	17.5	5	0	0	0	0
48	41	31	24	26	26	18	7	0	0	0	0
72	43	34	25	27	27	20	9	0	0	0	0

Table 25. Stabilizing effect of Carrageenan in *Andong sikhe* with mixed cultures

Time (hr.)	Carrageenan(%)										
	0.00	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.50	0.70	1.00
Degree of sedimentation(mL supernatant)											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	30	21	20	21	17	22	15	14	10	5	3
3	35	25	23	23	18	27	16	15	13	6	4
6	37	26	25	24	19	28	17	16	14	8	6
12	39	27	26	25	20	29	18	17	16	10	7
24	40	28	27	26	21	30	19	18	16	10.5	8
48	41	30	28	27	22	30	18	19	16	10	8
72	43	30	30	27	23	30	20	19.5	16	11	8

Table 26. Stabilizing effect of Na-carboxymethyl cellulose(CMC)
in homogenized Andong *sikhe* with mixed cultures

Time (hr.)	CMC(%)										
	0.00	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.50	0.70	1.00
	Degree of sedimentation(mL supernatant)										
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	3	3	2	2	2	1	1	0	0	0
3	3	5	3	2	2.5	2	2	1	1	0	0
6	4	7	5	4	3.5	3.5	2	2	1.5	0	0
12	6	13	9	6	5	4.5	3	2	1.5	1	0
24	9	20	14.5	9	8	7	10	4	2	1	0
48	20	28	26	18	15	13	10	5	3.5	2	0
72	27	27	30	24	21	18.5	26	8	5	3	2

Table 27. Stabilizing effect of Na-alginate in homogenized Andong *sikhe* with mixed cultures

Time (hr.)	Na-alginate(%)										
	0.00	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.50	0.70	1.00
Degree of sedimentation(mL supernatant)											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	2	1.5	1.5	2.5	4	4	1	1	0	0
3	3	3	3	2	3	4	3	2	0.5	0	0
6	4	3	4	2.5	4.5	5	3	1	0	0	0
12	6	6	5.5	5.5	7.5	8	6	2	0	0	0
24	9	9.5	9	10	11	10	7	4	3	0	0
48	20	18	18	20	17	13	9	4	5	2	0
72	27	26	25	26	20	15	11	5	4	3	0

Table 28. Stabilizing effect of Carrageenan in homogenized
Andong *sikhe* with mixed cultures

Time (hr.)	Carrageenan(%)										
	0.00	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.50	0.70	1.00
	Degree of sedimentation(mL supernatant)										
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	1.5	1	1	1	1.5	1.5	1	2	1	0
3	3	2	2	2.5	2	2	4	3	3.5	2.5	0
6	4	3	2.5	3.5	3	4	5	5	4	4	0
12	6	5	5	6	6	7	10.5	11	6	6	0
24	9	8	8	9	9	14	18	18	9	8	0
48	20	17	19.5	20	20	24	25	22.5	18	10	4
72	27	25	26.5	27.5	27	27	27	24	19	11	4

2) 점도측정

안동식혜의 침전을 억제시킬 목적으로 CMC, Na-alginate 및 Carrageenan을 시료에 대해서 0.1%를 첨가하여 20일간 발효 후 저장하였을 때 식혜의 점도의 변화를 측정한 결과는 Table 29, 30과 같다. 균질화시키지 않은 식혜의 경우 CMC와 Na-alginate는 2일째, Carrageenan은 2일에서 4일까지 최고의 점도를 나타내었으며 균질화한 식혜의 경우 CMC와 Na-alginate는 2일째, Carrageenan은 1일째 최고의 점도를 나타내었다. 즉 amylase에 의하여 전분이 액화 및 당화되어 점도는 차차 감소되었다고 생각하였다. Lin 등⁹⁰⁾에 의하면 Carrageenan이 단백질과 반응하여 안정된 현탁액을 만드는 반응은 Carrageenan 구조 중에 3,6-anhydro-D-galactose기와 우유성분 κ 및 β -casein이 반응하여 칼슘에 안정된 복합체를 만든다고 하였다. 그러나 식혜의 숙성과정에 있어서 단백질과 Carrageenan의 반응에 대하여 밝혀진 바가 없다.

Table 29. Changes of viscosity of Andong *sikhe* with mixed cultures after the addition of 0.1% stabilizers during fermentation and storage at 4°C

Stabilizer	Days								
	0	1	2	3	4	6	8	10	15
Control	1.24	1.31	1.28	1.23	1.21	1.21	1.20	1.20	1.19
CMC ¹⁾	1.26	1.42	1.45	1.41	1.38	1.36	1.35	1.35	1.35
Na-alginate	1.38	1.41	1.44	1.40	1.40	1.36	1.35	1.35	1.35
Carrageenan	1.41	1.45	1.43	1.41	1.40	1.37	1.38	1.38	1.38

¹⁾Na-carboxymethyl cellulose

Table 30. Changes of viscosity of homogenized *Andong sikhe* with mixed cultures after the addition of 0.1% stabilizers during fermentation and storage at 4°C

Stabilizer	Days								
	0	1	2	3	4	6	8	10	15
Control	1.34	1.34	1.36	1.36	1.36	1.35	1.33	1.33	1.32
CMC ¹⁾	1.39	1.40	1.45	1.38	1.37	1.36	1.35	1.36	1.35
Na-alginate	1.30	1.33	1.38	1.37	1.36	1.36	1.36	1.36	1.35
Carrageenan	1.32	1.35	1.38	1.38	1.38	1.36	1.36	1.36	1.36

¹⁾Na-carboxymethyl cellulose

마. 안동식혜의 공정의 표준화

전통안동식혜의 가장 이상적인 제조공정은 증자된 쌀 1.6kg, 물 10ℓ의 함량의 비율에 무 2.0kg, 생강 0.16kg, 고춧가루 0.08kg을 사용하여 쌀은 12시간 침지 후 흡수량이 쌀과 물이 1 : 2(w/v)로 하여 물빼기를 한 다음 100℃에서 30~40분간 증자하여 식혜밥을 만든다. 맥아는 15℃에서 7일간 발아시킨 것을 분쇄기로 갈아 20mesh이상을 분리하여 35~40℃ 물에 2~3시간 교반한 후 5℃에서 9시간 정도 정지한 후 cheese cloth로 여과하여 상징액을 얻는다. 고춧가루는 여과된 엿기름 물에 넣어 고추물을 추출하고, 무는 크기 3mm로 잘게 썬 후 식혜밥과 함께 섞어 생강즙과 고춧가루 추출물을 혼합하여 엿기름물을 넣어 조정하고 40℃에서 4시간 당화한 후 전체 1.0%(v/v)의 배양물의 접종량이 되도록 *Lac. bulgaricus* SML 47과 *S. cerevisiae* SY 5를 각각 0.5%(v/v)접종하여 22℃에서 16시간 발효한 후 5℃로 냉각한 다음 4℃에서 숙성 및 저장하였다.

바. 관능검사

안동식혜에 현탁 안정성과 침전억제를 증진시킬 목적으로 안정제인 CMC, Na-alginate 및 Carrageenan을 0.01~0.30%첨가하여 숙성시키면서 맛에 대한 관능검사를 실시한 결과 Table 31, 32와 같다.

Table 31. Sensory evaluation of traditional Andong *sikhe* with mixed culture containing various stabilizers

Stabilizer	Concentration(%)							
	0.00	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30
CMC ¹⁾	3.8 ^{b2)}	3.9 ^{ab}	4.1 ^{ab}	4.3 ^{ab}	4.5 ^a	4.2 ^{ab}	4.1 ^{ab}	3.9 ^{ab}
Na-alginate	3.8 ^b	4.1 ^{ab}	4.2 ^{ab}	4.2 ^{ab}	4.6 ^a	4.3 ^{ab}	4.2 ^{ab}	3.8 ^b
Carrageenan	3.9 ^a	4.1 ^a	4.2 ^a	4.1 ^a	4.4 ^a	4.3 ^a	4.2 ^a	4.0 ^a

¹⁾Na-carboxymethyl cellulose

²⁾In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level

Table 31. Sensory evaluation of Andong *sikhe* with mixed culture containing various stabilizers

Stabilizer	Concentration(%)							
	0.00	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30
CMC ¹⁾	3.8 ^{b2)}	3.9 ^{ab}	4.1 ^{ab}	4.3 ^{ab}	4.5 ^a	4.2 ^{ab}	4.1 ^{ab}	3.9 ^{ab}
Na-alginate	3.8 ^b	4.1 ^{ab}	4.2 ^{ab}	4.2 ^{ab}	4.6 ^a	4.3 ^{ab}	4.2 ^{ab}	3.8 ^b
Carrageenan	3.9 ^a	4.1 ^a	4.2 ^a	4.1 ^a	4.4 ^a	4.3 ^a	4.2 ^a	4.0 ^a

¹⁾Na-carboxymethyl cellulose

²⁾In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level

Table 32. Sensory evaluation of homogenized Andong *sikhe* with mixed culture containing various stabilizers

Stabilizer	Concentration(%)							
	0.00	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30
CMC ¹⁾	4.0 ^{a2)}	4.1 ^a	4.2 ^a	4.3 ^a	4.5 ^a	4.2 ^a	4.1 ^a	3.9 ^a
Na-alginate	3.7 ^c	3.8 ^c	4.1 ^{abc}	4.5 ^{ab}	4.5 ^a	3.7 ^c	3.9 ^{bc}	4.1 ^{abc}
Carrageenan	3.8 ^b	4.0 ^{ab}	4.2 ^{ab}	4.6 ^a	4.5 ^{ab}	4.3 ^{ab}	4.2 ^{ab}	4.1 ^{ab}

¹⁾CMC : Na-carboxymethyl cellulose

²⁾In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level

제 6 절 생약재 혼합 전통안동식혜의 개발

1. 실험방법 및 연구내용

가. 생약재 추출

생약재 추출은 생약재에 대해 10배의 물을 첨가하여 환류 냉각추출장치를 이용하여 100℃에서 2시간 동안 추출한 후 여과하여 사용하였다.

나. 안동식혜 제조

안동식혜의 제조시 재료의 조성은 증자된 쌀 1.6 kg, 맥아 1.0 kg, 무 2.0 kg, 생강 0.16 kg, 고춧가루 0.08 kg, 물 10 L를 사용하였으며, 제조방법은 Fig. 76과 같이 쌀을 침지, 물빼기 및 증자하여 식혜밥을 만들었다. 맥아는 15℃에서 7일간 발아시켜 분쇄한 다음 당화 후 5℃에서 냉각 후 cheese cloth로 여과하여 상정액을 이용하였고 고춧가루는 여과된 엿기름 물에 넣어 고춧물을 추출하였다. 이상과 같이 준비된 식혜밥, 3mm³로 잘게 썬 무, 생강즙과 고춧가루 추출물을 혼합하여 엿기름물을 넣어 조정하고 40℃에서 4시간 당화한 후 공시균주를 0.5% 접종한 후 5℃에서 2일 동안 저온 발효시켜 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

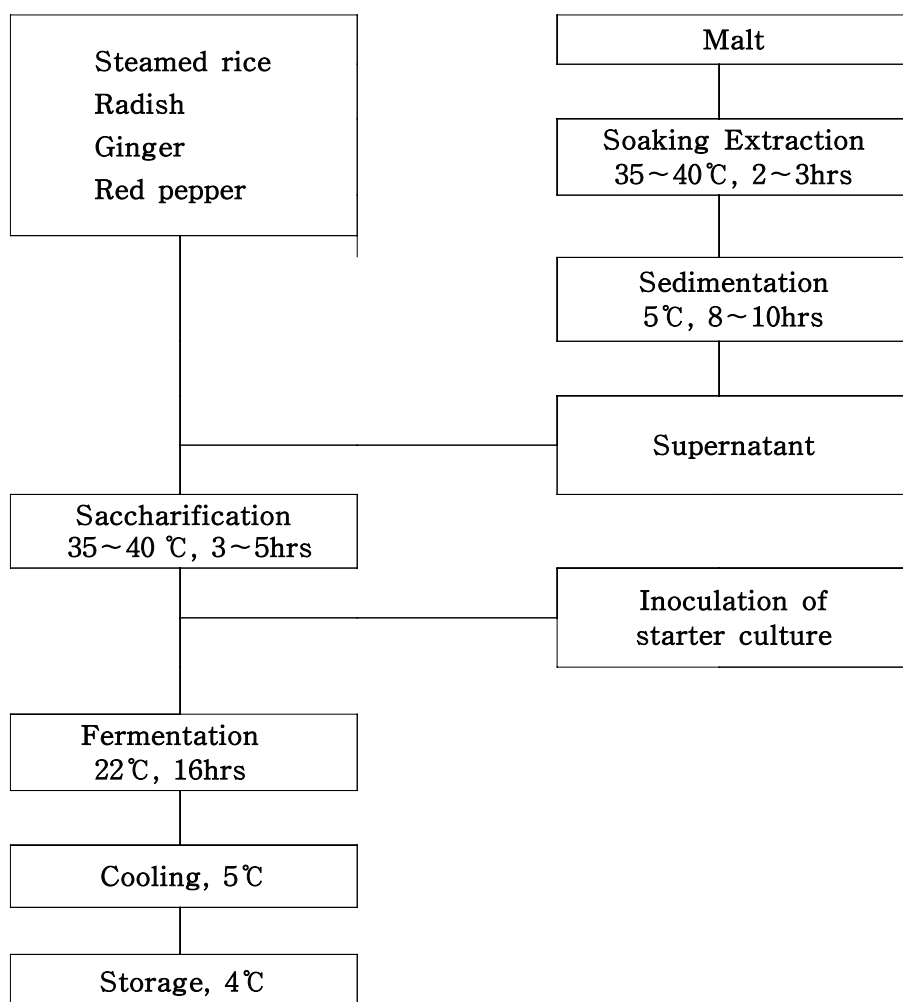


Fig. 76. A process for making of Andong *sikhe*.

다. 주재료의 적정 음용 농도의 결정

생약재 혼합음료는 전통음료인 안동식혜를 주재료로 각기 다른 생약재를 혼합한 식혜 A type과 B type 두 종류와 식혜를 첨가하지 않고 구기자를 주재료로 한 혼합음료와 홍삼을 주재료로 한 혼합음료 등 주재료에 따라 4가지 종류로 개발하였다.

1) 생약재 혼합 식혜

전통적인 방법으로 제조된 안동식혜의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 안동식혜를 2.0%, 4.0%, 6.0%, 8.0%로 각각 함유한 처리구마다 4%의 설탕을 혼합하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하여 주재료인 안동식혜의 적정 음용 농도를 결정하였다.

2) 구기자 혼합 음료

구기자의 적정 음용 농도를 결정하기 위하여 구기자 추출액을 0.3%, 0.6%, 0.9%, 1.2%로 각각 함유한 처리구 마다 9%의 설탕을 혼합하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하여 주재료인 구기자의 적정 음용 농도를 결정하였다.

3) 홍삼 혼합 음료

홍삼의 적정 음용 농도를 결정하기 위하여 홍삼 농축액을 0.2%, 0.4%, 0.8%, 0.9%로 각각 함유한 처리구 마다 6%의 설탕을 혼합하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하여 주재료인 홍삼의 적정 음용 농도를 결정하였다.

라. 부재료의 선정 및 배합비의 결정

1) 생약재 혼합 식혜

적정 음용 농도의 안동식혜에 생약재 추출액을 혼합하여 관능검사를 실시하여 부재료의 종류 및 농도를 결정하였다.

(가) A type 식혜

선정된 생약재인 두충, 구기자, 건강 추출액을 안동식혜에 혼합하여 각각의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 관능검사를 실시하였다.

(나) B type 식혜

선정된 생약재인 오미자, 인삼, 건마늘 추출액을 안동식혜에 혼합하여 각각의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 관능검사를 실시하였다.

2) 구기자 혼합 음료

구기자 추출액의 적정 음용 농도를 결정한 후 구기자 추출액의 농도를 고정하고 관능검사를 실시하여 구기자와 잘 어울리는 부재료의 종류 및 농도를 결정하였다.

3) 홍삼 혼합 음료

홍삼 농축액의 적정 음용 농도를 결정한 후 홍삼 농축액의 농도를 고정하고 관능검사를 실시하여 홍삼과 잘 어울리는 부재료의 종류 및 농도를 결정하였다.

마. 당 농도 결정

1) 생약재 혼합 식혜

생약재 혼합 식혜 A type과 B type의 주재료 및 부재료의 적정 음용 농도를 결정한 후 설탕을 2.0%, 4.0%, 6.0%, 8.0%로 각각 첨가한 후 관능검사를 실시하여 적정 당 농도를 결정하였다.

2) 구기자 혼합 음료

구기자 혼합 음료의 주재료 및 부재료의 적정 음용 농도를 결정한 후 설탕을 4%, 8%, 12%, 16%로 각각 첨가한 후 관능검사를 실시하여 적정 당 농도를 결정하

였다.

3) 홍삼 혼합 음료

홍삼 혼합 음료의 주재료 및 부재료의 적정 음용 농도를 결정한 후 설탕을 3%, 6%, 9%, 12% 로 각각 첨가한 후 관능검사를 실시하여 적정 당 농도를 결정하였다.

바. pH 조절

1) 생약재 혼합 식혜

생약재 혼합 식혜 A type과 B type의 배합비를 결정한 후 혼합음료의 pH를 3.8 이하로 맞추기 위해 구연산 첨가량을 조절하여 관능검사와 pH 측정을 통해 구연산 첨가량을 결정하였다.

2) 구기자 혼합 음료

구기자 혼합 음료의 배합비를 결정한 후 혼합음료의 pH를 3.8 이하로 맞추기 위해 구연산 첨가량을 조절하여 관능검사와 pH 측정을 통해 구연산 첨가량을 결정하였다.

3) 홍삼 혼합 음료

홍삼 혼합 음료의 배합비를 결정한 후 혼합음료의 pH를 3.8이하로 맞추기 위해 구연산 첨가량을 조절하여 관능검사와 pH 측정을 통해 구연산 첨가량을 결정하였다.

2. 연구개발 결과

가. 생약재 혼합 식혜

1) A type 식혜

가) 주재료의 적정 음용 농도 결정

전통음료의 개발을 위해 예로부터 즐겨 마셔오던 전통음료 중 하나인 안동식혜를 주재료로 선정하여 전통적인 방법으로 제조하였으나 배합비 결정을 위해 당은 첨가하지 않았다. 안동식혜는 맛이 진하지 않아 부재료 첨가 시 고유의 맛을 잃을 것으로 판단하여 첨가 농도를 2%, 4%, 6%, 8%로 제시하였으며, 그 배합비는 Table 33과 같다. 식혜의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 배합비에 따라 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다.

관능검사 결과 2.0%와 4.0%는 식혜 고유의 맛이 약해 구연산 첨가로 인한 신맛이 강해 적정 음용 농도로는 적합하지 않았다. 6.0%와 8.0%는 식혜 고유의 맛을 느낄 수 있어 적정 음용 농도로 적합하였으나, 8.0%농도에서 부재료 배합 시 총량이 100 g 을 넘는 문제가 있어 6.0%를 적정 음용 농도로 결정하였다. pH는 구연산 첨가로 인해 매우 낮게 나타났으나, 식혜의 맛에는 큰 영향을 주지 않았으며, 식혜 첨가 농도가 높을수록 pH가 높아졌다. 또한 부재료 첨가시 pH가 적정 수준을 나타낼 것으로 판단되어 구연산 첨가량은 조절하지 않았다.

Table 33. Combination ratio for preparation of Andong *sikhe*

Unit : g

Ingredient	Content of Sikhe(%)			
	2.0	4.0	6.0	8.0
Andong sikhe ¹⁾	18.86	37.73	56.60	75.47
Distill water	71.14	58.27	39.40	20.53
Sugar	4.0	4.0	4.0	4.0
Citric acid	0.1	0.1	0.1	0.1
Sum ²⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	2.91	2.96	3.03	3.13

¹⁾Andong sikhe : 10.6. Brix

²⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

나) 부재료 선정 및 음용 농도 결정

부재료는 전통 음료인 안동식혜와 잘 어울리면서 맛을 향상시키고 기능성을 부여할 수 있는 생약재로 선정하였으며, 그 결과 두충(*Eucommia ulmoides*), 구기자(*Lycium chinense*), 건강(dried ginger) 등이 선정되었다.

(1) 두충 추출액의 적정 음용 농도 결정

부재료로 선정된 두충 추출액은 쓴맛과 특유의 향이 강하나 예비 실험을 통해 식혜에 저 농도 첨가 시 두충의 맛과 향이 식혜의 맛을 향상시키는 것으로 판단되어 첨가 농도를 0.04%, 0.06%, 0.08%, 0.10%로 제시하였으며, 설탕과 구연산의 고정된 첨가량을 배합하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하여 두충의 적정 음용 농도를 결정하였다. 그 배합비는 Table 34에 나타내었다.

관능검사 결과 0.04%농도에서 두충 추출액의 맛은 매우 약하게 느껴졌으며, 식혜의 맛 또한 약해지는 것으로 나타나 적정 음용 농도로는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.08%와 0.10%농도에서는 두충 추출액의 쓴맛과 향이 강하게 느껴져 식혜의 맛을 감소 시켰으며, 거부감도 주어 적정 음용 농도로는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.06%농도에서는 식혜의 단맛과 두충 특유의 맛이 잘 어울려 단맛과 청량감을 동시에 느낄 수 있어 0.06%를 적정 음용 농도로 결정하였다.

Table 34. Combination ratio for preparation of Andong *sikhe* with *Eucommia ulmoides* extracts

Unit : g(%)

Ingredient	Content of <i>Eucommia ulmoides</i> extract(%)			
	0.04	0.06	0.08	0.10
Andong <i>sikhe</i> ¹⁾	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	4	6	8	10
Distill water	35.4	33.4	31.4	29.4
Sugar	4	4	4	4
Citric acid	0.1	0.1	0.1	0.1
Sum ³⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.09	3.13	3.14	3.17

¹⁾Andong *sikhe* : 10.6. Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.0. Brix

³⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

(2) 건강 추출액의 적정 음용 농도 결정

건강은 식혜의 맛을 향상시키는 효과가 있어 안동식혜 제조시 널리 사용되고 있으며, 향이 강하고 맛 또한 강해 거부감을 주므로 건강 추출액을 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08%로 낮은 첨가 농도를 제시하였으며, 식혜와 두층의 결정된 적정 음용 농도와 배합하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였으며, 그 배합비는 Table 35와 같다.

관능검사 결과 0.02%농도에서는 첨가 농도가 낮아 식혜의 맛에 아무런 영향을 주지 못했으며, 0.06%와 0.08%농도에서는 건강 추출액의 맛과 향이 강해 식혜의 맛이 전혀 느껴지지 않아 적정 음용 농도로는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.04%농도에서는 건강 추출액의 맛과 향이 식혜의 맛과 향을 개선시키고 두층 추출액의 청량감을 향상시켜 주는 것으로 판단되어 0.04%를 적정 음용 농도로 결정하였다. pH는 건강 추출액의 첨가 농도가 증가할수록 높아지는 것으로 나타났으며 적정 음용 농도의 pH는 3.39로 낮게 나타났다.

Table 35. Combination ratio for preparation of Andong *sikhe*
with dried *ginger* extracts

Unit : g (%)

Ingredient	Content of dried ginger extract(%)			
	0.02	0.04	0.06	0.08
Andong <i>sikhe</i> ¹⁾	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	6(0.06)	6(0.06)	6(0.06)	6(0.06)
Dried ginger ext. ³⁾	1.67	3.34	5.0	6.67
Distill water	31.73	30.06	28.40	26.73
Sugar	4	4	4	4
Citric acid	0.1	0.1	0.1	0.1
Sum ⁴⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.35	3.39	3.48	3.63

¹⁾Andong *sikhe* : 10.6。 Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.0。 Brix

³⁾Dried ginger ext. : 1.2。 Brix

⁴⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

(3) 구기자 추출액의 적정 음용 농도 결정

구기자는 맛이 구수하고 물엿과 같은 냄새가 나 구기자 추출액을 식혜에 첨가 시 구수한 맛과 단맛이 증가할 것으로 판단되어 첨가 농도를 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%로 제시하였으며, 그 배합비는 Table 36과 같다. 구기자 추출액의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 배합비에 따라 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다.

관능검사 결과 0.1%와 0.2%농도에서는 구기자 추출액의 맛이 매우 약하게 느껴졌으며, 음료의 전체적인 맛을 감소시켜 적정 음용 농도로는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.3%와 0.4%농도에서는 음료의 구수한 맛과 단맛을 증가시켜 관능적 평가가 우수하였으나, 0.4%농도의 pH가 적정 수준인 pH 3.80보다 높아 살균 시 문제가 되므로 적정 음용 농도를 0.3%로 결정하였다.

Table 36. Combination ratio for preparation of Andong *sikhe*
with *Lycium chinense* extracts

Unit : g (%)

Ingredient	Content of <i>Lycium chinense</i> extract(%)			
	0.1	0.2	0.3	0.4
Andong <i>sikhe</i> ¹⁾	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	6(0.06)	6(0.06)	6(0.06)	6(0.06)
Dried ginger ext. ³⁾	3.34(0.04)	3.34(0.04)	3.34(0.04)	3.34(0.04)
<i>Lycium chinense</i> ext. ⁴⁾	2.27	4.55	6.82	9.09
Distill water	27.79	25.51	23.24	20.97
Sugar	4.0	4.0	4.0	4.0
Citric acid	0.1	0.1	0.1	0.1
Sum ⁵⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.64	3.72	3.80	3.91

¹⁾Andong *sikhe* : 10.6。 Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.0。 Brix

³⁾Dried ginger ext. : 1.2。 Brix

⁴⁾*Lycium chinense* ext : 4.4。 Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

(4) 적정 음용 당 농도 결정

안동식혜에 부재료인 생약재들의 적정 음용 농도를 결정하고 그 배합비로 제조한 음료의 당 농도를 결정하기 위해 당 첨가 농도를 2.0%, 4.0%, 6.0%, 8.0%로 제시하였으며, 그 배합비를 Table 37에 나타내었다. 결정된 배합비에 따라 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다.

관능검사 결과 2.0%농도에서는 배합된 생약재들의 쓴맛이 강하게 느껴졌으며, 6.0%와 8.0%농도에서는 단맛이 강해 주재료와 부재료의 맛이 감소하여 적정 음용 당 농도로 적합하지 않았다. 4.0%농도에서는 식혜에 혼합된 생약재의 쓴맛은 감소시키고, 전체적인 음료의 맛은 향상 시켜주는 것으로 판단되어 적정 음용 당 농도를 4.0%로 결정하였다.

Table 37. Combination ratio for preparation of Andong *sikhe* with sugar

Unit : g(%)

Ingredient	Content of Sugar(%)			
	2.0	4.0	6.0	8.0
<i>Andong sikhe</i> ¹⁾	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	6(0.06)	6(0.06)	6(0.06)	6(0.06)
Dried ginger ext. ³⁾	3.34(0.04)	3.34(0.04)	3.34(0.04)	3.34(0.04)
<i>Lycium chinense</i> ext. ⁴⁾	6.82(0.3)	6.82(0.3)	6.82(0.3)	6.82(0.3)
Distill water	25.24	23.24	21.24	19.24
Sugar	2.0	4.0	6.0	8.0
Citric acid	0.1	0.1	0.1	0.1
Sum ⁵⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.80	3.80	3.80	3.80

¹⁾Andong *sikhe* : 10.6。 Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.0。 Brix

³⁾Dried ginger ext. : 1.2。 Brix

⁴⁾*Lycium chinense* ext : 4.4。 Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

(5) A type 식혜의 최종 배합비

Table 38. Final combination ratio for preparation of A type *Sikhe*

Unit : (%)

Ingredient	Content
<i>Andong sikhe</i> ¹⁾	6.0
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	0.06
Dried ginger ext. ³⁾	0.04
<i>Lycium chinense</i> ext ⁴⁾	0.3
Distill water	89.60
Sugar	4.0
Citric acid	0.1
Sum ⁵⁾	100
pH	3.80

¹⁾Andong *sikhe* : 10.6. Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.0. Brix

³⁾Dried ginger ext. : 1.2. Brix

⁴⁾*Lycium chinense* ext : 4.4. Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

2) B type 식혜

가) 주재료의 적정 음용 농도 결정

주재료인 안동식혜의 적정 음용 농도는 A type과 같으나, 구연산 첨가량은 A type과 달리 오미자 추출액의 첨가로 인해 낮은 pH를 유지할 것으로 판단되어 구연산의 첨가량을 A type의 50%인 0.05 g 으로 결정하였으며, 그 배합비는 Table 39와 같다. 식혜의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 배합비에 따라 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다. pH는 적정 음용 농도에서 A type 보다 높은 pH3.37로 나타났다.

Table 39. Combination ratio for preparation of *Sikhe*

Unit : g

Ingredient	Content of Sikhe(%)			
	2.0	4.0	6.0	8.0
Andong <i>sikhe</i>¹⁾	18.86	37.73	56.60	75.47
Distill water	71.14	58.27	39.40	20.53
Sugar	4.0	4.0	4.0	4.0
Citric acid	0.05	0.05	0.05	0.05
Sum²⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.21	3.25	3.37	3.53

¹⁾Andong sikhe : 10.6. Brix

²⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

나) 부재료 선정 및 적정 음용 농도 결정

부재료는 A type의 부재료와 중복되지 않으면서 전통음료인 안동식혜의 맛과 잘 어울리고 기능성을 부여할 수 있는 생약재로 오미자(*Schiznadra chinensis*), 건마늘(dried garlic), 인삼(ginseng)등이 선정되었다.

(1) 오미자 추출액의 적정 음용 농도 결정

오미자(*Schiznadra chinensis*)는 신맛이 강하고 쓴맛과 떼은맛이 동시에 느껴져 오미자 추출액 첨가시 낮은 농도에서는 상큼한 맛을 부여 할 것으로 판단되나, 높은 농도에서는 강한 신맛이 거부감을 줄 것으로 판단되어 첨가 농도를 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20%로 제시하였으며, 그 배합비는 Table 40에 나타내었다. 오미자 추출액의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 배합비에 따라 음료를 제조 후 관능검사를 실시하였다. 관능검사 결과 0.05%농도에서는 오미자 추출액의 신맛만 약하게 느껴졌으며, 0.15%와 0.20%에서는 신맛과 쓴맛이 강해 거부감을 주어 적정 음용 농도로 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.10%농도에서는 오미자 추출액의 특유의 맛이 식혜의 맛과 잘 어울려 상큼한 맛을 느낄 수 있어 적정 음용 농도로 결정하였다. pH는 오미자 추출액의 농도가 증가할수록 낮아졌으며, 적정 음용 농도에서는 pH 3.23으로 측정되었다.

Table 40. Combination ratio for preparation of Andong *sikhe* with *Schiznadra chinensis* extracts

Unit : g(%)

Ingredient	Content of <i>Schiznadra chinensis</i> extract(%)			
	0.05	0.10	0.15	0.20
Andong <i>sikhe</i>¹⁾	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)
<i>Schiznadra chinensis</i> ext.²⁾	1.39	2.78	4.17	5.56
Distill water	35.4	33.4	31.4	29.4
Sugar	4	4	4	4
Citric acid	0.05	0.05	0.05	0.05
Sum³⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.39	3.23	3.14	3.12

¹⁾Andong *sikhe* : 10.6. Brix

²⁾*Schiznadra chinensis* ext. : 3.6. Brix

³⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

(2) 건마늘 추출액의 적정 음용 농도 결정

건마늘은 맛과 향이 자극적이어서 거부감을 주지만, 추출액의 향은 건마늘에 비해 자극적이지 않고 느끼한 맛을 띄며, 높은 농도에서는 건마늘과 마찬가지로 거부감을 주지만 낮은 농도에서는 식혜의 맛에 좋은 영향을 줄 것으로 판단되어 첨가 농도를 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20%로 제시하였으며, 그 배합비는 Table 41에 나타내었다. 건마늘 추출액의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 배합비에 따라 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 관능검사 결과 0.05%와 0.10%농도에서는 건마늘 추출액의 맛이 매우 약하게 느껴졌으며, 0.20%농도에서는 건마늘 추출액의 향과 맛이 강해 거부감을 주어 적정 음용 농도로는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.15%농도에서는 오미자 추출액의 신맛을 부드럽게 하는 효과가 있는 것으로 판단되어 적정 음용 농도로 결정하였다. pH는 적정 음용 농도에서 pH 3.40으로 측정되었다.

Table 41. Combination ratio for preparation of Andong *sikhe*
with dried garlic extracts

Unit : g (%)

Ingredient	Content of dried garlic extract(%)			
	0.05	0.10	0.15	0.20
Andong <i>sikhe</i> ¹⁾	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)
<i>Schiznadra chinensis</i> ext. ²⁾	2.78(1.0)	2.78(1.0)	2.78(1.0)	2.78(1.0)
Dried garlic ext. ³⁾	0.68	1.35	2.03	2.7
Distill water	35.94	35.27	34.59	33.92
Sugar	4	4	4	4
Citric acid	0.05	0.05	0.05	0.05
Sum ⁴⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.38	3.39	3.40	3.42

¹⁾Andong *sikhe* : 10.6。 Brix

²⁾*Schiznadra chinensis* ext. : 3.6。 Brix

³⁾Dried garlic ext. : 7.4。 Brix

⁴⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

(3) 인삼 추출액의 적정 음용 농도 결정

인삼은 향은 좋으나 쓴맛으로 인해 높은 농도에서 거부감을 줄 것으로 판단되어 첨가 농도를 0.08%, 0.16%, 0.24%, 0.32%로 제시하였으며, 그 배합비를 Table 42에 나타내었다. 인삼 추출액의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 배합비에 따라 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 관능검사 결과 0.08%와 0.16%농도에서는 인삼 추출액의 맛을 느낄 수 없어 적정 음용 농도로는 적합하지 않은 것으로 판단되며, 0.24%와 0.32%농도에서는 전체적으로 음료와 맛이 잘 어울렸으나, 0.32%농도가 0.24%농도에 비해 쓴맛이 강해 0.24%를 적정 음용 농도로 결정하였다. pH는 적정 음용 농도에서 pH 3.64로 측정되어 음료의 pH 조건을 만족시켰으며, 낮은 pH로 인한 신맛은 음료의 맛과 잘 어울려 구연산의 첨가량을 조절하지 않아도 될 것으로 판단되었다.

Table 42. Combination ratio for preparation of Andong *sikhe* with ginseng extracts

Unit : g (%)

Ingredient	Content of ginseng extract(%)			
	0.08	0.16	0.24	0.32
Andong <i>sikhe</i> ¹⁾	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)
<i>Schiznadra chinensis</i> ext. ²⁾	2.78(1.0)	2.78(1.0)	2.78(1.0)	2.78(1.0)
Dried garlic ext. ³⁾	2.03(0.15)	2.03(0.15)	2.03(0.15)	2.03(0.15)
Ginseng ext. ⁴⁾	2.85	5.71	8.57	11.43
Distill water	31.74	28.88	26.02	23.16
Sugar	4.0	4.0	4.0	4.0
Citric acid	0.05	0.05	0.05	0.05
Sum ⁵⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.50	3.54	3.64	3.71

¹⁾Andong *sikhe* : 10.6。 Brix

²⁾*Schiznadra chinensis* ext. : 3.6。 Brix

³⁾Dried garlic ext. : 7.4。 Brix

⁴⁾Ginseng ext. : 2.8 。 Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

(4) 생약재 혼합 안동식혜의 적정 당 농도 결정

주재료와 부재료의 적정 음용 농도로 결정하기 위해 첨가한 당 농도를 생약재 혼합으로 인하여 변화된 맛에 적합하지 않다고 판단되어 첨가 당 농도를 3.0%, 4.0%, 5.0%, 6.0%로 제시하여 음료 제조 후 관능검사를 실시하여 적정 당 농도를 결정하였으며, 그 배합비는 Table 43에 나타내었다.

관능검사 결과 3.0%농도에서는 단맛이 약해 음료의 쓴맛이 강했으며, 6.0%농도에서는 단맛이 강해 배합재료들의 맛이 감소하여 적정 당 농도로는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 4.0%와 5.0%농도에서는 4.0%농도 보다 5.0%가 관능적 평가가 우수하여 5.0%농도를 적정 당 농도로 결정하였다.

Table 43. Combination ratio for preparation of Andong *sikhe* with sugar

Unit : g(%)

Ingredient	Content of Sugar(%)			
	3.0	4.0	5.0	6.0
Andong <i>sikhe</i> ¹⁾	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)	56.60(6.0)
<i>Schiznadra chinensis</i> ext. ²⁾	2.78(1.0)	2.78(1.0)	2.78(1.0)	2.78(1.0)
Dried garlic ext. ³⁾	2.03(0.15)	2.03(0.15)	2.03(0.15)	2.03(0.15)
Ginseng ext. ⁴⁾	8.57(0.24)	8.57(0.24)	8.57(0.24)	8.57(0.24)
Distill water	25.24	23.24	21.24	19.24
Sugar	3.0	4.0	5.0	6.0
Citric acid	0.05	0.05	0.05	0.05
Sum ⁵⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.64	3.64	3.64	3.64

¹⁾Andong *sikhe* : 10.6. Brix

²⁾*Schiznadra chinensis* ext. : 3.6. Brix

³⁾Dried garlic ext. : 7.4. Brix

⁴⁾Ginseng ext. : 2.8 . Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

(5) B type 식혜의 최종 배합비

Table 44. Final Combination ratio for preparation of B type *Sikhe*

Unit : (%)

Ingredient	Content
Andong <i>sikhe</i> ¹⁾	6.0
<i>Schiznadra chinensis</i> ext. ²⁾	1.0
Dried garlic ext. ³⁾	0.15
Ginseng ext. ⁴⁾	0.24
Distill water	87.61
Sugar	5.0
Citric acid	0.05
Sum ⁵⁾	100
pH	3.64

¹⁾Andong *sikhe* : 10.6. Brix

²⁾*Schiznadra chinensis* ext. : 3.6. Brix

³⁾Dried garlic ext. : 7.4. Brix

⁴⁾Ginseng ext. : 2.8. Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

나. 구기자 혼합음료의 개발

1) 주재료의 선정 및 적정 음용 농도 결정

적정 추출조건에서 추출한 구기자(*Lycium chinense*) 추출액은 물엿 냄새가 나며 맛이 구수하여 거부감을 주지 않으므로 주재료로 선택하여 0.3%, 0.6%, 0.9%, 1.3%의 비율로 각각 9%의 설탕과 배합하고 pH를 3.8이하로 낮추기 위해 구연산 0.16g 첨가하여 관능검사를 실시하였으며, 그 배합비는 Table 45와 같다. 관능검사 결과 0.3%, 0.6%농도에서는 구기자 특유의 구수한 맛보다 신맛이 강하고, 1.2%농도에서는 구기자의 맛과 향이 매우 강해 적정 음용 농도로는 적합하지 않은 것으로 판단된다. 0.9%농도에서는 구기자 특유의 향과 맛이 신맛과 조화를 이루어 구기자 추출액 0.9%농도에서 구기자 특유의 구수한 맛과 향에 대한 거부감이 없으면서 다른 부재료와 배합 시 구기자 특유의 맛이 감소하지 않는 농도로 판단되어 적정 음용 농도로 결정하였다.

Table 45. Combination ratio for preparation of *Lycium chinense* beverage

Unit : g

Ingredient	Content of <i>Lycium chinense</i> extract(%)			
	0.3	0.6	0.9	1.2
<i>Lycium chinense</i> ext. ¹⁾	6.25	12.5	18.75	25.0
Distill water	84.75	78.50	72.25	66.00
Sugar	9.0	9.0	9.0	9.0
Citric acid	0.16	0.16	0.16	0.16
Sum ²⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.02	3.40	3.64	3.77

¹⁾*Lycium chinense* ext. : 4.8。 Brix

²⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

2) 부재료 종류의 선정 및 배합비 결정

구기자 특유의 맛을 개선하고, 기능성 강화를 위하여 구기자와 맛이 잘 어울리면서 기능성을 부여할 수 있는 생약재를 선정하고 적정 음용 농도로 배합하여 생약재 혼합 음료를 개발하고자 하였다. 부재료로는 두충(*Eucommia ulmoides*), 결명자(*Cassia tora* L), 건강(dried ginger)이 선정되었으며, 선정된 생약재들은 적정 추출 조건에서 추출하여 사용하였다.

가) 두충 추출액의 적정 음용 농도 결정

두충은 특유의 나무 향이 나고, 쓴맛이 강해 거부감을 주기 때문에 높은 농도 첨가 시에는 구기자의 맛을 감소시킬 수 있으나 낮은 농도의 첨가 시에는 구기자 음료에 기능성과 맛, 향을 개선할 수 있을 것으로 판단되어 두충 추출액의 첨가 농도를 0.03%, 0.06%, 0.09%, 0.12%로 제시하였으며, 그 배합비는 Table 46에 나타내었다. 두충 추출액의 적정 음용 농도결정을 위해 배합비에 따라 음료를 제조한 후 구기자 추출액과의 맛의 조화에 중점을 두고 관능검사를 실시하였다.

관능검사 결과 0.03%농도에서는 두충 추출액의 맛이 느껴지지 않았으며 0.06%농도에서는 두충 추출액의 맛이 매우 약해 구기자 추출액의 맛에는 영향을 주지 못했으며, 0.12%농도에서는 두충 추출액의 쓴맛이 강하게 느껴져 적정 음용 농도로 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.09%농도에서는 구기자 추출액의 구수한 맛이 두충 추출액의 맛과 조화를 이루어 구수하면서 약간의 청량감을 느끼게 하여 적정 음용 농도로 결정하였다. pH는 3.80이하를 유지하였으나 두충 추출액의 첨가 농도가 증가할수록 높아졌다.

Table 46. Combination ratio for preparation of *Lycium chinense* beverage with *Eucommia ulmoides* extracts

Unit : g(%)

Ingredient	Content of <i>Eucommia ulmoides</i> extract(%)			
	0.03	0.06	0.09	0.12
<i>Lycium chinense</i> ext. ¹⁾	18.75(0.9)	18.75(0.9)	18.75(0.9)	18.75(0.9)
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	1.88	3.75	5.63	7.50
Distill water	70.37	69.25	66.62	64.75
Sugar	9.0	9.0	9.0	9.0
Citric acid	0.16	0.16	0.16	0.16
Sum ³⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.65	3.66	3.67	3.69

¹⁾*Lycium chinense* ext. : 4.8。 Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.6。 Brix

³⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

나) 건강 추출액의 적정 음용 농도 결정

구기자 추출액과 두충 추출액 각각의 적정 음용 농도인 0.9%, 0.09%로 고정하고 부재료로 선정된 건강 추출액의 적정 음용 농도를 결정하고자 하였다. 건강 추출액은 향과 맛이 매우 강해 거부감 또한 강하므로 첨가 농도를 0.03%, 0.06%, 0.09%, 0.12%로 제시하였으며, 음료 제조 후 관능검사를 실시하였다. 그 배합비는 Table 47과 같다. 관능검사 결과 0.03%농도에서는 건강 추출액의 맛은 느껴지지 않았으나, 약간의 향은 느낄 수 있었고, 0.09%와 0.12%의 농도에서는 건강 특유의 맛과 향이 강해 다른 재료들의 향과 맛을 감소시켰으며, 거부감을 주어 적정 음용 농도로 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.06%농도에서는 건강 추출액의 향과 맛이 구기자, 두충 추출액과 잘 조화되어 적정 음용 농도로 결정하였다. pH는 건강 추출액의 농도가 증가할수록 높아져 pH 8.0 이하를 유지하지 못했다. 따라서 배합비 결정 후 구연산을 첨가량을 조절해야 할 것으로 판단되었다.

Table 47. Combination ratio for preparation of *Lycium chinense* beverage with dried ginger extracts

Unit : g (%)

Ingredient	Content of dried ginger extract(%)			
	0.03	0.06	0.09	0.12
<i>Lycium chinense</i> ext. ¹⁾	18.75(0.9)	18.75(0.9)	18.75(0.9)	18.75(0.9)
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	5.63(0.09)	5.63(0.09)	5.63(0.09)	5.63(0.09)
Dried ginger ext. ³⁾	2.5	5.0	7.5	10
Distill water	64.12	61.62	59.12	56.62
Sugar	9.0	9.0	9.0	9.0
Citric acid	0.16	0.16	0.16	0.16
Sum ⁴⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.74	3.83	3.87	3.91

¹⁾*Lycium chinense* ext. : 4.8。 Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.6。 Brix

³⁾Dried ginger ext. : 1.2。 Brix

⁴⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

다) 결명자 추출액의 적정 음용 농도 결정

구기자, 두충, 건장 추출액 각각의 적정 음용 농도 0.9%, 0.09%, 0.06%로 고정하고 부재료로 선정된 결명자 추출액의 음용 농도 결정하고자 하였다. 낮은 농도의 결명자 추출액 첨가 시에는 맛이 구수하지만 높은 농도 첨가 시에는 쓰고 떫은맛이 강해 결명자 추출액의 첨가 농도를 0.08%, 0.16%, 0.24%, 0.32%농도로 제시하였다. 결명자 추출액의 적정 음용 농도 결정을 위한 배합비는 Table 48과 같으며 이와 같은 배합비로 제조된 음료의 관능검사를 실시하였다.

관능검사 결과 0.08%농도에서는 결명자 추출액의 맛이 매우 약하게 느껴졌으며, 0.24%와 0.32%농도에서는 떫은맛이 느껴져 음용 농도로는 적당하지 않은 것으로 판단된다. 0.16%농도에서는 구기자 추출액의 구수한 맛을 향상시키는 효과를 나타내어 결명자 추출액의 음용 농도를 0.16%로 결정하였다.

Table 48. Combination ratio for preparation of *Lycium chinense* beverage with *Cassia tora* L. extracts

Unit : g (%)

Ingredient	Content of <i>Cassia tora</i> L. extract(%)			
	0.08	0.16	0.24	0.32
<i>Lycium chinense</i> ext. ¹⁾	18.75(0.9)	18.75(0.9)	18.75(0.9)	18.75(0.9)
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	5.63(0.09)	5.63(0.09)	5.63(0.09)	5.63(0.09)
dried ginger ext. ³⁾	5.0(0.06)	5.0(0.06)	5.0(0.06)	5.0(0.06)
<i>Cassia tora</i> L. ext ⁴⁾	4	8	12	16
Distill water	57.62	53.62	49.62	45.62
Sugar	9.0	9.0	9.0	9.0
Citric acid	0.16	0.16	0.16	0.16
Sum ⁵⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.81	3.87	3.91	3.95

¹⁾*Lycium chinense* ext. : 4.8。 Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.6。 Brix

³⁾Dried ginger ext. : 1.2。 Brix

⁴⁾*Cassia tora* L. ext : 2.0 。 Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

라) 구기자 혼합 음료의 적정 당농도 결정

주재료와 부재료의 적정 음용 농도로 결정된 배합비에 당 농도 결정을 위해 설탕 첨가량을 4.0%, 8.0%, 12.0%, 16.0%로 달리하여 관능검사를 실시하였으며, 그 배합비는 Table 49와 같다.

관능검사 결과 당함량 4%농도에서는 음료의 쓴맛을 감소시키지 못해 거부감을 주었으며, 12.0%와 16%농도에서는 단맛이 강해 음료 특유의 맛을 감소시켜 적정 당함량으로는 적당하지 않다고 판단되었다. 8.0%농도에서는 단맛과 음료의 맛이 조화를 이루었으며, 단맛이 배합액의 맛을 상승시켜 주었다. 따라서 8.0%농도를 적정 당함량으로 결정하였다.

Table 49. Combination ratio for preparation of *Lycium chinense* beverage with sugar

Unit : g(%)

Ingredient	Content of Sugar(%)			
	4.0	8.0	12.0	16.0
<i>Lycium chinense</i> ext. ¹⁾	18.75(0.9)	18.75(0.9)	18.75(0.9)	18.75(0.9)
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	5.63(0.09)	5.63(0.09)	5.63(0.09)	5.63(0.09)
dried ginger ext. ³⁾	5.0(0.06)	5.0(0.06)	5.0(0.06)	5.0(0.06)
<i>Cassia tora</i> L. ext. ⁴⁾	8.0(0.16)	8.0(0.16)	8.0(0.16)	8.0(0.16)
Distill water	58.62	54.62	50.62	46.62
Sugar	4.0	8.0	12.0	16.0
Citric acid	0.16g	0.16g	0.16g	0.16g
Sum ⁵⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.87	3.87	3.87	3.87

¹⁾*Lycium chinense* ext. : 4.8。 Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.6。 Brix

³⁾Dried ginger ext. : 1.2。 Brix

⁴⁾*Cassia tora* L. ext : 2.0 。 Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

마) 구기자 혼합 음료의 pH조절을 위한 구연산 첨가량 결정

주재료와 부재료의 배합비를 결정하고 pH를 3.8이하로 조절하기 위해 생약재 혼합 음료의 맛을 감소시키지 않는 범위에서 구연산 첨가량을 조절한 후 관능검사와 pH측정을 실시하여 구연산의 첨가량을 결정하였으며, 그 배합비는 Table 50과 같다.

관능검사와 pH 측정 결과 0.12 g 과 0.16 g 의 구연산 첨가 시 음료의 맛은 좋았으나 청량감이 부족하였으며, pH가 높아 음료 제조 공정에서 살균에 문제가 되므로 음료로 활용하기에 부적절한 것으로 판단되며, 0.24 g 첨가 시에는 신맛이 강해 거부감을 주었다. 0.20 g 첨가 시에는 음료의 맛과 청량감이 조화를 이루어 맛이 우수하였으며, pH 7.5로 나타나 음료로 활용하기에 가장 적합한 것으로 판단되어 구연산 첨가량을 0.20 g 으로 결정하였다.

Table 50. Combination ratio for preparation of *Lycium chinense* beverage with citric acid

Unit : g(%)

Ingredient	Content of citric acid(g)			
	0.12	0.16	0.20	0.24
<i>Lycium chinense</i> ext. ¹⁾	18.75(0.9)	18.75(0.9)	18.75(0.9)	18.75(0.9)
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	5.63(0.09)	5.63(0.09)	5.63(0.09)	5.63(0.09)
Dried ginger ext. ³⁾	5.0(0.06)	5.0(0.06)	5.0(0.06)	5.0(0.06)
<i>Cassia tora</i> L. ext. ⁴⁾	8.0(0.16)	8.0(0.16)	8.0(0.16)	8.0(0.16)
Distill water	54.62	54.62	54.62	54.62
Sugar	8.0(8.0)	8.0(8.0)	8.0(8.0)	8.0(8.0)
Citric acid	0.12	0.16	0.20	0.24
Sum ⁵⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	4.10	3.91	3.75	3.64

¹⁾*Lycium chinense* ext. : 4.8。 Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.6。 Brix

³⁾Dried ginger ext. : 1.2。 Brix

⁴⁾*Cassia tora* L. ext. : 2.0 。 Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

바) 구기자 혼합 음료의 최종 배합비

지금까지의 방법으로 결정된 최종 배합비는 Table 51에 나타내었다.

Table 51. Final combination ratio for *Lycium chinense* beverage

Unit : (%)

Ingredient	Content
<i>Lycium chinense</i> ext. ¹⁾	0.9
<i>Eucommia ulmoides</i> ext. ²⁾	0.09
Dried ginger ext. ³⁾	0.06
<i>Cassia tora</i> L. ext. ⁴⁾	0.16
Distill water	90.79
Sugar	8.0
Citric acid	0.20
Sum ⁵⁾	100
pH	3.75

¹⁾*Lycium chinense* ext. : 4.8. Brix

²⁾*Eucommia ulmoides* ext. : 1.6. Brix

³⁾Dried ginger ext. : 1.2. Brix

⁴⁾*Cassia tora* L. ext. : 2.0. Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

다. 홍삼 혼합음료 개발

1) 주재료의 선정 및 음용 농도 결정

홍삼(red ginseng)은 약리 효과가 뛰어나며 거부감을 주지 않는 맛과 향을 가지고 있어 주재료로 적합하다고 판단되어 홍삼 농축액을 주재료로 선정하였다. 홍삼 농축액은 쓴맛이 강해 적정 음용 농도 결정하기 위한 첨가 농도를 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%로 제시하였으며, 설탕과 구연산을 각각 6.0%와 0.07g 으로 고정하여 첨가한 후 관능검사를 통해 적정 음용 농도를 결정하였다. 그 배합비는 Table 52와 같다.

관능검사 결과 0.2%와 0.4%농도에서는 홍삼 농축액의 맛이 약하고 신맛이 강했으며, 0.8%농도에서는 쓴맛이 강해 적정 음용 농도는 적당하지 않은 것으로 판단되었다. 0.6%농도에서는 홍삼특유의 맛이 나면서 쓰지 않아 음용 농도로 적합하다고 판단되었다. 따라서 0.6%를 적정 음용 농도로 결정하였다.

Table 52. Combination ratio for preparation of red ginseng beverage

Unit : g

Ingredient	Content of red ginseng concentration(%)			
	0.2	0.4	0.6	0.8
Red ginseng conc. ¹⁾	0.31	0.63	0.94	1.25
Distill water	93.69	93.37	93.06	92.75
Sugar	6.0	6.0	6.0	6.0
Citric acid	0.07	0.07	0.07	0.07
Sum ²⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.20	3.40	3.57	3.81

¹⁾Red ginseng conc. : 64. Brix

²⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

2) 부재료 선정 및 적정 음용 농도 결정

홍삼 특유의 쓴맛을 개선하고, 기능성을 강화시키기 위하여 홍삼과 맛이 잘 어울리면서 약리적 효과를 향상시킬 수 있는 생약재를 선정하고 적정 음용 농도로 배합하여 생약재 혼합 음료를 개발하고자 하였다. 부재료로는 감초(*Glycyrrhiza uralensis*), 오미자(*Schiznadra chinensis*), 건마늘(dried garlic)등을 선정하였다.

가) 감초 추출액의 적정 음용 농도 결정

감초 추출액은 단맛이 강하나 높은 농도에서는 거부감을 주기 때문에 첨가 농도를 0.08%, 0.16%, 0.24%, 0.32%로 제시하였으며, 그 배합비는 Table 53과 같다. 감초 추출액의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 배합비에 따라 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다.

관능검사 결과 0.08%농도에서는 감초 추출액의 맛이 전혀 느껴지지 않았고, 0.16%농도에서는 쓴맛이 약간 증가하였으며, 0.32%농도에서는 감초 추출액의 맛이 강하게 느껴져 거부감을 주어 적정 음용 농도 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.24%농도에서는 감초 추출액의 단맛이 홍삼 추출액의 쓴맛을 감소시켜 홍삼 추출액의 맛을 개선하는 효과가 있는 것으로 판단되어 0.24%농도를 적정 음용 농도로 결정하였다.

Table 53. Combination ratio for preparation of red ginseng beverage with *Glycyrrhiza uralensis* extracts

Unit : g

Ingredient	Content of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> extract(%)			
	0.08	0.16	0.24	0.32
Red ginseng conc. ¹⁾	0.94(0.6)	0.94(0.6)	0.94(0.6)	0.94(0.6)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> ext. ²⁾	2.35	4.71	7.05	9.41
Distill water	90.71	88.35	86.01	83.65
Sugar	6	6	6	6
Citric acid	0.07	0.07	0.07	0.07
Sum ³⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.67	3.72	3.79	3.84

¹⁾Red ginseng conc. : 64. Brix

²⁾*Glycyrrhiza uralensis* ext. : 3.4. Brix

³⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

나) 건마늘 추출액의 적정 음용 농도 결정

건마늘 추출액은 향이 강하며 맛은 느끼하여 적정 음용 농도 결정을 위해 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20%농도로 제시하였으며, 그 배합비는 Table 54와 같다. 건마늘 추출액의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 배합비에 따라 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다.

관능검사 결과 0.05%농도에서는 건마늘 추출액의 맛이 느껴지지 않았고 0.15%와 0.20%농도에서는 건마늘 추출액의 향과 느끼한 맛이 강해 적정 음용 농도 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.10%농도에서는 건마늘 추출액의 향이 약하게 느껴졌으며, 홍삼 추출액의 맛을 부드럽게 해주는 효과가 있어 적정 음용 농도 결정하였다.

Table 54. Combination ratio for preparation of *red ginseng* beverage with dried *garlic* extracts

Unit : g(%)

Ingredient	Content of dried garlic extract(%)			
	0.05	0.10	0.15	0.20
Red ginseng conc. ¹⁾	0.94(0.6)	0.94(0.6)	0.94(0.6)	0.94(0.6)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> ext. ²⁾	7.05(0.24)	7.05(0.24)	7.05(0.24)	7.05(0.24)
Dried garlic ext. ³⁾	0.58	1.16	1.74	2.33
Distill water	85.43	84.85	84.27	83.68
Sugar	6	6	6	6
Citric acid	0.07	0.07	0.07	0.07
Sum ³⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.82	3.84	3.86	3.88

¹⁾Red ginseng conc. : 64. Brix

²⁾*Glycyrrhiza uralensis* ext. : 3.4. Brix

³⁾Dried garlic ext. : 8.6. Brix

⁴⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

다) 오미자 추출액의 적정 음용 농도 결정

오미자 추출액은 강한 신맛과 쓰고, 떼은맛이 동시에 느껴지며 낮은 농도 첨가 시에는 상큼한 맛을 부여 할 것으로 판단되나, 높은 농도 첨가 시에서는 강한 신맛이 거부감을 줄 것으로 판단된다. 따라서 첨가 농도를 0.04%, 0.08%, 0.12%, 0.16%로 제시하였으며, 그 배합비는 Table 55와 같다. 오미자 추출액의 적정 음용 농도를 결정하기 위해 배합비에 따라 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다.

관능검사 결과 0.04%농도에서는 오미자 추출액의 맛이 느껴지지 않았고, 0.08%농도에서는 혼합 음료의 신맛만 약간 증가하였으며, 0.16%농도에서는 오미자 추출액의 강한 신맛이 거부감을 주어 적정 음용 농도 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 0.12%농도에서는 오미자 추출액의 신맛이 혼합 음료의 맛에 상큼함을 부여하면서 혼합 음료의 맛을 개선하는 효과를 나타내었다. pH의 경우 다른 부재료 첨가 시와는 반대로 추출액 첨가 농도가 높을수록 낮아졌으며, 첨가 농도에 따른 pH 범위는 pH 3.71~3.49로 나타나 음료 제조 시 pH 3.80 이하를 유지해야 하는 조건을 만족시켰다. 따라서 0.12%농도를 적정 음용 농도로 결정하였다.

Table 55. Combination ratio for preparation of red ginseng beverage with *Schiznadra chinensis* extracts

Unit : g(%)

Ingredient	Content of <i>Schiznadra chinensis</i> (%)			
	0.04	0.08	0.12	0.16
Red ginseng conc. ¹⁾	0.94(0.6)	0.94(0.6)	0.94(0.6)	0.94(0.6)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> ext. ²⁾	7.05(0.24)	7.05(0.24)	7.05(0.24)	7.05(0.24)
Dried garlic ext. ³⁾	1.16(0.10)	1.16(0.10)	1.16(0.10)	1.16(0.10)
<i>Schiznadra chinensis</i> ext. ⁴⁾	0.95	1.90	2.86	3.81
Distill water	83.9	82.95	82.05	81.04
Sugar	6	6	6	6
Citric acid	0.07	0.07	0.07	0.07
Sum ⁵⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.71	3.60	3.51	3.49

¹⁾Red ginseng conc. : 64. Brix

²⁾*Glycyrrhiza uralensis* ext. : 3.4. Brix

³⁾Dried garlic ext. : 8.6. Brix

⁴⁾*Schiznadra chinensis* ext. : 4.2. Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

라) 홍삼 혼합 음료의 적정 당 농도 결정

홍삼 혼합 음료의 적정 당 농도를 결정하기 위해 설탕의 첨가 농도를 3%, 6%, 9%, 12%농도로 제시하고 주재료와 부재료의 적정 음용 농도로 결정된 배합비를 이용하여 음료를 제조한 후 관능검사를 통해 적정 당 농도를 결정하였으며, 그 배합비는 Table 56과 같다.

관능검사 결과 3%와 6%농도에서는 단맛이 약해 생약재들의 쓴맛이 강하게 느껴졌으며, 12%농도에서는 단맛이 강해서 음료의 맛을 감소시켜 적정 당 농도로는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 9%농도에서는 단맛이 음료의 쓴맛을 감소시키며 음료의 전체적인 맛의 상승시키는 효과를 나타내어 9%를 적정 당 농도로 결정하였다.

Table 56. Combination ratio for preparation of red ginseng beverage with sugar

Unit : g(%)

Ingredient	Content of Sugar(%)			
	3.0	6.0	9.0	12.0
Red ginseng conc. ¹⁾	0.94(0.6)	0.94(0.6)	0.94(0.6)	0.94(0.6)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> ext. ²⁾	7.05(0.24)	7.05(0.24)	7.05(0.24)	7.05(0.24)
dried garlic ext. ³⁾	1.16(0.10)	1.16(0.10)	1.16(0.10)	1.16(0.10)
<i>Schiznadra chinensis</i> ext. ⁴⁾	2.86(0.12)	2.86(0.12)	2.86(0.12)	2.86(0.12)
Distill water	84.99	81.99	78.99	75.99
Sugar	3	6	9	12
Citric acid	0.07	0.07	0.07	0.07
Sum ⁵⁾	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.51	3.51	3.51	3.51

¹⁾Red ginseng conc. : 64. Brix

²⁾*Glycyrrhiza uralensis* ext. : 3.4. Brix

³⁾Dried garlic ext. : 8.6. Brix

⁴⁾*Schiznadra chinensis* ext. : 4.2. Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

마) 홍삼 혼합 음료의 최종 배합비

홍삼 혼합 음료의 최종 배합비는 Table 57에 나타내었다. 홍삼 혼합 음료는 구연산을 첨가량을 조절하지 않아도 최종 배합시 pH가 3.51을 나타내어 음료 제조시 필요한 pH조건을 만족시켰으며, 관능적 평가에서도 맛이 우수하여 구연산 첨가량을 0.07 g 으로 결정하였다.

Table 57. Final Combination ratio for preparation of red ginseng beverage

Unit : (%)

Ingredient	Content
Red ginseng conc. ¹⁾	0.6
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> ext. ²⁾	0.24
Dried garlic ext. ³⁾	0.10
<i>Schiznadra chinensis</i> ext. ⁴⁾	0.12
Distill water	89.87
Sugar	9.0
Citric acid	0.07
Sum ⁵⁾	100.0
pH	3.51

¹⁾Red ginseng conc. : 64. Brix

²⁾*Glycyrrhiza uralensis* ext. : 3.4. Brix

³⁾Dried garlic ext. : 8.6. Brix

⁴⁾*Schiznadra chinensis* ext. : 4.2. Brix

⁵⁾Sum of amount of all ingredients except citric acid

제 7 절 결 론

본 연구는 현대인의 기호에 맞는 전통안동식혜의 다양화 제품개발을 위하여 전통안동식혜의 기능성 물질의 활용을 위한 기능성 중간 소재화 개발 연구를 실시하였다. 제 1단계 전반기 연구에서는 전통안동식혜의 발효과정에 관여하는 미생물의 분리 및 동정, 생리기능물질의 분리, free radical 제거물질 탐색 및 항암효과, 가공제품의 다양화 기술에 대한 설정조건 검토 등을 실시하였다. 제 2단계 후반기 연구에서는 전통안동식혜 생리활성 추출물의 항암·암 예방효과, 분리된 젖산균과 효모를 접종한 안동식혜의 관능적 품질특성 및 표준화 공정 확립 그리고 생약재가 첨가된 전통안동식혜 개발을 실시하였다.

고혈압 저해능을 보기 위하여 ACE에 대한 저해능은 분획물 중 butanol층에서 30.0%의 가장 높은 저해능을 나타내었다. 각 분획별 tyrosinase 저해 효과는 ethyl acetate, heaxan 및 water층 동일하게 10% 전후의 낮은 저해효과를 나타내어 안동식혜에서는 melanin 합성에 관여하는 tyrosinase에 대한 저해능은 약한 것으로 나타났다. 항산화 활성, 활성 산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성 및 인체내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있는 Superoxide dismutase(SOD) 항산화효소 활성 측정 결과 ethyl acetate와 butanol 층에서 30%의 높은 활성을 나타내었으며, 전자공여능은 ethyl acetate 층에서만 유일하게 1,000 ppm에서 27%정도의 공여능을 나타내었다.

전통안동식혜 생리활성물질 추출물에 의한 암세포증식 억제율은 암세포 SK-MEL-2(Malignant melanoma), SK-MEL-31 (Malignant melanoma)에 대한 저해율은 시료의 농도가 증가함에 따라 세포증식 억제율이 유의적으로 증가하였으며, 1,000 ppm에서 모두 20%이상의 성장 저해가 나타났다. 또한 유선암(MDA-MB-231), 간암(Hep G2), 대장암(HT-29)에 대한 암세포 증식 억제율은 1,000ppm의 농도에서 20~30%의 암세포 성장저해를 나타내었다.

*In vitro*에서 암예방 효과를 측정은 quinine reductase(QR), glutathione S-transferase(GST), glutathione(GSH)의 활성을 측정하였다. QR 활성 유도능은 안동식혜 추출물, 생강 추출물 그리고 고추 추출물에서 100ppm 농도에서 10ppm 농도

의 경우보다 3배 가량 증가 하였으며, 안동식혜 추출물이 다소 높은 활성을 나타내었다. GST 활성 측정결과 시료 1ppm에서 1000ppm의 농도에서 안동식혜 추출물은 2.5배의 유도 효과를 나타내었으나, 부재료인 생강, 고추 등은 1.6배의 유도효과를 나타내었다. 또한 GSH 생성량 측정 결과 안동식혜 추출물 및 부재료 추출물에서는 1.0배의 유도 효과를 나타내었다.

전통안동식혜로부터 분리·동정된 균주는 젖산균주로서는 *Lac. bulgaricus* SML 47, *Lac. acidophilus* SML 10 및 *Lc. lactis* SEC 56의 3균주와 효모 *S. cerevisiae* SY 5 1종을 분리하여 starter로 사용하였다.

식혜제조시 젖산균과 효모의 혼합발효에서 *Lac. bulgaricus* SML 47와 *S. cerevisiae* SY 5를 혼합접종한 경우는 초기숙성 3일에 pH 3.58과 적정산도 0.44%로 *Lac. acidophilus* SML 10과 *S. cerevisiae* SY 5를 혼합접종한 경우보다는 pH는 높게 적정산도는 낮게 나타났으며, *Lc. lactis* SEC 56과 *S. cerevisiae* SY 5를 혼합접종한 구보다는 낮게 적정산도는 높은 결과를 보였다.

관능검사 결과 *Lac. bulgaricus* SML 47와 *S. cerevisiae* SY 5를 각각 0.5% 혼합하여 1.0%(v/v)를 접종했을 경우에 가장 좋았으며, 발효초기에는 젖산균이 숙성 2일 이후부터는 효모의 증식이 급격히 성장함으로 해서 숙성이 빨라 제조 시간이 단축되고 상품의 균일성이 있으며 관능검사 결과 맛도 좋았다.

숙성기간동안 일반 성분의 변화는 조단백질의 함량은 주발효기간인 4일까지는 증가하였으나 그 이후로는 차차 감소하였고, pH는 급격히 감소하여 2일째 4.02, 3일째 3.87이었으며 적정산도는 1일과 2일째 0.43%로 가장 높게 나타났으며, 유리당의 조성은 maltose를 포함한 6종류였으며 미확인 물질도 1개 검출되었다. Maltose의 함량은 4일까지 증가하여 76.34%였으나 그 후로는 감소하였다. 지방산 조성은 linoleic, palmitic 및 oleic acid가 주요 지방산으로 총지방산의 90%를 차지하였다. 아미노태질소는 시간이 경과할수록 증가하였으며 2일째 37.50mg이었으며, 이때 식혜의 맛이 가장 좋았다. 주요 아미노산은 proline 및 aspartic acid였으며 methionine은 시간이 경과함에 따라 점차 증가하였으나 lysine은 감소하였다. 수용성 및 염용성 단백질의 아미노산 조성은 glutamine acid 및 aspartic acid의 함량이 가장 많았다. 염용해성 단백질의 경우 arginine은 시간이 경과함에 따라 점차 증가하였다. 효소의 활성은 acid

protease는 숙성 4일째 liquefying amylase는 숙성 3일째 saccharogenic amylase와 lipase는 숙성 2일째 가장 높았다.

안정제의 침전 억제 효과는 Na-Alginate가 가장 우수하였다. 침전 안정제를 넣어서 관능 검사를 한 결과 균질화 하지 않은 식혜의 경우는 Na-alginate는 0.1에서 0.15% 처리했을 때 carrageenan은 0.05%첨가했을 때 가장 맛이 우수하였으며 식품 안정제의 종류 및 첨가 농도간의 상호 효과는 침전 효과는 침전 안정제의 종류간에는 통계적 유의성이 없으나 첨가 농도간에는 유의성이 있었다. 식혜의 현탁안정성을 증진시킬 목적으로 안정제를 첨가하여 숙성시켰을 때 CMC, Na-alginate은 2일째 Carrageenan은 비균질화 식혜는 2일에서 4일째 균질화한 식혜는 1일째 최고의 점도를 나타내었다.

생약재가 첨가된 기능성 안동식혜 제조를 위한 생약재로는 감초, 두충, 구기자, 오미자, 결명자, 건강, 건마늘, 인삼 등의 8가지 생약재를 선정하였으며, 생약재에 대한 water의 비율이 10배일 때 추출수율이 가장 우수하였고, water 추출시 8종의 생약재에서 높은 가용성 고형분량을 나타내었다.

총 폴리페놀 함량 및 전자공여 작용은 모든 생약재가 50% ethanol 추출액에서 가장 높았으며, superoxide dismutase(SOD) 유사활성은 결명자가 가장 높은 활성을 보였다. 아질산염 소거작용은 pH가 증가할수록 소거율이 크게 감소하였으며 water 추출액이 다른 두 용매 추출액에 비해 소거능이 높은 것으로 나타났다. ACE 저해작용은 50% ethanol 추출액이 다른 용매에 비해 우수한 저해작용을 나타내었다.

생약재 혼합 기능성 전통안동식혜 개발에서 A type 식혜의 최종 배합비는 안동식혜가 6.0%, 두충 추출액 0.06%, 건강 추출액 0.03%, 구기자 추출액 0.3%, 설탕 4.0%, 구연산 0.1%, 물 89.60%로 제조되었으며, B type 식혜는 안동식혜 6.0%, 오미자 추출액 1.0%, 건마늘 추출액 0.15%, 인삼 추출액 0.24%, 설탕 5.0%, 구연산 0.05%, 물 87.61%로 제조하였다.

구기자 혼합안동식혜 개발에서는 구기자 추출액 0.9%, 두충 추출액 0.09%, 결명자 추출액 0.16%, 건강 추출액 0.06%, 설탕 8.0%, 구연산 0.2%, 물 90.79%로 제조하였으며, 홍삼 혼합음료 개발에서는 홍삼 농축액 0.6%, 감초 추출액 0.24%, 오미자 추출액 0.12%, 건마늘 추출액 0.1%, 설탕 9.0%, 구연산 0.07%, 물 89.87%로 제조하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도

제 1 절 목표달성도

1차년도

과제명	평가의 착안점 및 척도		
	착안사항	척도 (점수)	달성도
1. 전통안동식혜의 생리 기능물질의 생리활성 검증 및 항암효과 (주관과제)	1. 생리활성물질의 분리 2. 효소저해 활성측정 3. 암세포주에 대한 항암효과	40%(40) 30%(30) 30%(30)	100%
2. 전통안동식혜의 발효에 관여하는 미생물의 분리 및 동정 (협동과제)	1. 발효용 전통안동식혜의 제조 2. 효소활성 측정 3. 젖산균의 순수분리 및 동정 4. 효모의 순수분리 및 동정	25%(25) 25%(25) 25%(25) 25%(25)	100%
3. 생약재가 첨가된 기능성 전통안동식혜 개발 (위탁과제)	1. 생약재 적정 추출조건 설정 2. 적정 추출조건 설정 3. 생약재 추출액의 이화학적 분석 4. 생리활성 성분 측정	25%(25) 25%(25) 25%(25) 25%(25)	100%

2차년도

과제명	평가의 착안점 및 척도		
	착안사항	척도 (점수)	달성도
1. 생리활성 물질의 superoxide dismutase 활성화 및 항암· 암예방 효과 (주관과제)	1. 암세포주에 대한 항암효과 2. <i>In vitro</i> 에서 암예방(chemoprevention)효과 에 대한 검색	50%(50) 50%(50)	100%
2. Starter를 이용한 전통안동식혜의 제조 (협동과제)	1. Starter를 이용한 전통안동식혜 제조 2. 균체의 생육 및 성분분석 3. 효소활성 변화 4. 저장성 5. Starter를 이용한 표준화 공정 6. 관능검사	20%(20) 20%(20) 15%(15) 15%(15) 15%(15) 15%(15)	100%
3. 생약재가 첨가된 기능성 전통안동식혜 개발 (위탁과제)	1. 전통안동식혜제조를 위한 전처리 조건 검토 2. 생약재가 보강된 전통안동식혜의 제조 3. 기호성 증진을 위한 적정 배합비 결정 4. 신선도 저하 방지를 위한 전통안동식혜의 살균 조건 검토 5. 기능성 전통안동식혜의 제조공정 확립 및 전통음료 제조	20%(20) 20%(20) 20%(20) 20%(20) 20%(20)	100%

제 2 절 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

- 전통안동식혜의 새로운 현대인의 기호에 맞는 제품의 다양화로 인한 노하우 함양
- 생리기능 실험에 의한 대사경로 규명
- 우리나라의 오랜 역사를 지닌 전통음료로부터 현대인에 기초에 맞는 고기능성 물질규명 및 대량생산 기술확립

2) 경제·산업적 측면

- 전통음료로부터 현대인의 기호에 알맞은 전통안동식혜를 개발함으로써 이에 함유된 생리기능물질이 매우 다양하다는 것을 보여 주므로 세계속의 우리 상품으로 인정받을 계기를 마련
- 전통안동식혜의 구성성분을 확실히 규명함으로써 이 성분을 이용한 또 다른 용도로써 산업화에 기여
- 전통안동식혜를 이용한 약리효과는 아직 체계적이지 않고 근거가 미흡하여, 생리기능을 밝히기 쉽고, 간단하게 접할 수 있는 식품개발로 농가소득에 기여
- 전통안동식혜를 현대인에게 이용함으로써 농가소득 증대와 수출로 국익 선양

3) 사회·문화적 측면

- 현대인의 성인병에 대처 할 수 있고 친근하며 쉽게 접할 수 있는 성인병 예방 식품으로서의 효과에 기대
- 젊은 여성들의 피부미용에 좋다는 결론을 규명함으로써 우리 향토 식품의 확산

과 외래식품보다 우수함을 인식시키는데 기여

- 전통안동식혜에 함유된 성분이 충치 및 구강 질환예방에 관한 효과입증으로 국민구강보건에 기여 할 뿐만 아니라 민족의식 고취에 기여
- 전통안동식혜의 항암효과 성분을 규명함으로써 새로운 차원의 전통음료 개발 모델화에 기여

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

연구결과에서 얻어진 핵심기술

1. 생리활성물질의 분리
2. 효소저해 활성측정
3. 암세포주에 대한 항암효과
4. *In vitro*에서 암예방(chemoprevention)효과에 대한 검색
5. 발효용 전통안동식혜의 제조
6. 효소활성 측정
7. 젖산균 및 효모의 순수분리 및 동정
8. Starter를 이용한 전통안동식혜 제조 및 표준화 공정
9. 저장성 및 관능검사
10. 생약재 적정 추출조건 설정
11. 생약재 추출액의 이화학적 분석 및 생리활성 성분 측정
12. 전통음료제조를 위한 전처리 조건 검토
13. 생약재가 보강된 전통안동식혜의 제조
14. 기호성 증진을 위한 적정 배합비 결정
15. 신선도 저하 방지를 위한 전통안동식혜의 살균조건 검토
16. 기능성 전통음료의 제조공정 확립 및 전통안동식혜제조

본 연구를 통하여 전통안동식혜의 생리활성과 고부가가치 가공제품의 다양화 기술개발 함으로써 국민의 식생활 개선과 보건향상에 기여할 수 있다. 본 연구에 의하여 이루어진 기술은 전통 안동 식혜로부터 산 생성능과 발효능이 우수한 젖산균과 효모 분리, 항산화 효과 및 항암·암 예방효과를 검증, 기능성 전통음료의 표준화 및

공정을 확립하였으므로 성인병예방 신소재 식품으로써 홍보·활용한다.

산·학·연의 관련 전문인력을 유기적으로 연결하여 전문 기술인력의 양성과 연구 수행중에 수집한 고급정보 기술은 한국전통식혜 분야 정보의 데이터베이스로 활용 할 수 있다. 2년간의 기반연구가 완료되었으므로 기업체와 협동연구로 대량생산을 위한 산업화에 대한 연구를 수행할 예정이다.

기능성 전통음료로써 뿐만 아니라 젓산균과 효모를 이용한 발효식혜 및 제조방법에 대한 발명특허를 제출하였으며 산업재산권 확보 및 전통안동식혜의 생리활성의 우수성을 적극적으로 홍보할 것이다.

전통안동식혜를 이용하여 생리활성과 기호성을 증진시킨 생약재 혼합 식혜 제조 표준화 공정 확립으로 인해 가공식품의 품질향상에 기여하고, 국민건강 증진 및 농가소득 증대를 기하고자 한다.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술정보

전통안동식혜의 생리기능 물질과 고부가가치 재고를 위한 가공제품 다양화 기술 개발을 함에 있어 안동식혜에 존재하는 생리활성 물질을 용매분획별로 분리하고, 그 생리활성을 검증, 산생성능과 발효능이 우수한 균주의 분리·동정 및 생약재가 첨가된 표준화 공정을 확립함으로써 고부가가치의 전통안동식혜 가공식품 개발 뿐만 아니라 소비 촉진으로 인한 농가소득을 증진시킬 것이다. 따라서 본 연구에서 다루는 전통안동식혜의 발효 및 젖산균의 생육특성에 관련된 정보들을 연구관련 학회지와 문헌을 통하여 다음과 같이 수집하였다.

Fleming⁹¹⁾은 곡물과 채소류의 발효는 재료중에 함유되어 있는 발효관계 미생물의 종류, 발효조건, 당의 형태와 농도, 등이 최종 제품의 품질에 크게 영향을 미친다고 하였다.

DeMan 등⁹²⁾과, Kvasnikov 등⁹³⁾은 젖산균의 발효는 배지의 선택에 많이 좌우되며 특히 Kvasnikov와 Sudenco⁹⁴⁾는 식물 특히 채소나 향신료의 즙액이나 추출물을 인공 배지에 첨가하면 젖산균의 생육이 촉진된다고 보고하였다. Stamer등⁹⁵⁾과 Zaika와 Kissinger⁹⁶⁾는 식물의 젖산균 증식 촉진물질은 Mn^{2+} 이라 보고한 이후 thiamine, vitamin B₆와 B₁₂ 등의 비타민⁹⁷⁾, thymine, deoxyribose, purine, pyrimidine 등을 포함하는 핵산관련물질^{98,99)}, phenylalanine과 같은 아미노산¹⁰⁰⁾이라고 하였다.

합성배지에 있어서 Cogan 등⁹⁹⁾은 토마토 주스가 젖산균의 생육을 촉진한다고 하였고, Thornhill 등¹⁰¹⁾은 오렌지가 젖산균의 성장에 미치는 영향을 검토하였다. Colio 등¹⁰²⁾은 양배추, 고추, 시금치에서의 젖산균 생육 보조인자에 관하여 연구하였다.

Brian¹⁰³⁾은 젖산균이 발효 최종산물로 초산과 젖산 등의 산을 생산함으로써 발효 유제품이나 채소류의 발효에 주로 이용되고 있다고 하였으며, 젖산균의 하나인 *Lactobacillus acidophilus*는 인류건강의 소화기관에 커다란 이익을 가져다 주고있다. Elie Metchnikoff¹⁰⁴⁾는 신체의 강건함과 장수는 창자속에 *Lactobacilli*의 번창에 있다고 하였으며, Anand 등¹⁰⁵⁾과 Shahani 등¹⁰⁶⁾은 *Lactobacilli*는 비병원성균으로 건강을 증진시키는 미생물로서 사람이나 동물의 창자속에 항상 발견된다. *Lactobacillus acidophilus*는 동물의 창자내에서 *E. coli*를 현저하게 감소시키며, 시험관내에서

Salmonellas, *Shigellas*, *Staphylococci* 및 *Pseudomonas*의 장내병원균의 성장을 억제한다고 보고 한바 있다.

Lewus 등¹⁰⁷⁾과 Collins와 Koichiro¹⁰⁸⁾는 젖산균은 diacetyl, 과산화수소 및 젖산과 같은 향미생물질을 생산하기 때문에 다른 미생물에 대해 우세할 수 있다고 하였으며, Kanda 등¹⁰⁹⁾은 젖산 발효시 산도가 높아야 풍미가 좋으며 Angeles 등¹¹⁰⁾과 Mital 등¹¹¹⁾은 젖산 발효의 산 생성은 균체수, 균생육속도, 당 이용성 등에 의하여 결정된다고 보고하였다.

Steinkraus 등¹¹²⁾은 젖산균으로 젖산 발효시킬때 젖산균에 의해 단독 발효하는 것보다 효모와 함께 혼합 발효하는 것이 균 생육속도가 빠르다.

Daeshel 등¹¹³⁾과 Fleming¹¹⁴⁾은 젖산균과 효모의 혼합발효시 두 균주의 상호작용을 보면, 젖산균은 주로 1차 발효에 관여하며 효모 또한 1차 발효시 증식하나 젖산균의 성장이 거의 중단된 후 잔유당이 있을때 독점적으로 성장할 수 있다 하였다. Mefeeter 등¹¹⁵⁾은 주 발효동안 당은 젖산균과 효모에 의해 산과 알콜 및 다른 최종 대사 생산물로 전환되는데 당이 1차 발효동안 불충분하게 발효될 경우 그 대사 생산물들은 효모에 의해 2차 발효가 일어난다. Fleming 등¹¹⁶⁾은 pH가 낮아져 젖산균의 생육이 억제되어도 효모는 생육하면서 잔유당을 소비함으로써 발효당의 이용성이 높아지며 당을 ethanol로 전환시켜 젖산균의 단독 발효로 인해 생산되는 젖산의 양을 조절해 주며 그밖에 적당한 산도와 향미를 부여해 준다고 하였다.

제 7 장 참고문헌

1. 노완섭, 허석현 공저, 건강보조 식품과 기능성 식품, 효일, 2000.
2. 손은수, 한약재를 이용한 기능성식품의 개발 동향, 기술동향분석보고서, 2003.
3. 임응규 등저, 자원식물학, 서일, 1996.
4. 농촌 자원 개발 연구소, <http://www.rlsi.go.kr/>
5. 송근섭, 안병용, 이갑상, 맹경일, 최동성, 간접변이원의 돌연변이원에 대한 생약재 열수 추출물의 효과. Korean J. Food Sci Technol. 29(6), 1288-1294(1997)
6. 최수임, 이윤미, 허태련, 생약재 추출물의 hyaluronidase 저해 및 라디칼 소거 활성 검색. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 18(4), 282-288(2003)
7. 김현구, 김영언, 도정룡, 이영철, 이부용, 국내산 생약추출물의 항산화 효과 및 생리활성. Korean J. Food Sci Technol. 27(1), 80-85(1995)
8. 도정룡, 김선봉, 박영호, 김동수, 기호음료 성분의 Angiotensin-I 전환효소 저해작용. Korean J. Food Sci Technol. 25(5), 456-460(1993)
9. 박기문, 황진국, 신경민, 김현석, 송채환, 생약재 추출물의 nicotine 및 dioxin 해독 효과. Korean J. Food Sci Technol. 35(5), 980-987(2003)
10. 박종대, 위재준, 김만옥, 이형주, 인삼의 에칠아세테이트 추출분획의 조혈 활성 특성 및 구성 성분 동정. 한국농화학회지, 32, 137(1989)
11. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Ifree radicals in Biology and Medicine. Oxford. Clarendon Press. (1989)
12. Devy, C. and Gautier, R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutase. Biochem. Pharmacol., 39, 399-405(1990)
13. Kuramoto, T. Development and application of food materials from plant extract such as SOD. Upto date Food Processing, 27(3), 22-23(1992).
14. Rorald, W. Naturally occurring nitrite in food. J. Japan Soc, Food Agric., 26, 1735-1742(1975).

15. Peter, F. Swann. The toxicology of nitrate and N-nitroso compounds. J.Sci. Fd. Agric. 26, 1761-1770(1975).
16. Ganten, D and Gross, F. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. Handbook of Experimental Pharmacology 39, 571-522(1977).
17. Yokoyama, K Chiba, H. and Yoshikawa, M. Peptide inhibitors for angiotensin-converting enzyme from thermolysin digest of dried Bonito. Biotech Biochem. 56,1541-1545(1992)
18. 이미영, 이효지 : 한국식문화학회지, 문헌에 기록된 식해의 분석적 고찰, 4, 39(1989)
19. 이성우, 조준하 : 요록해결편, 한국생활과학연구소, 한양대학교, 2, 73(1983)
20. Kim, S. Y., Moussa souane, Kim, G. E. and Lee, C. H. : Microbial characterization of Jangsu, Korean J. Food Sci. Technol., 23(6), 689(1991)
21. 31. Mok, C. K., Han, J. S., Kim, Y. J., Kim, N. S., Kwon D. Y. and Nam, Y. J. : Lactic Acid Fermentation of Rice and Quality Improvement by Amylolytic Enzyme Treatment during Fermentation, Korean J. Food Sci. Technol., 23(6), 739(1991)
22. Lee, C. H., Moussa souane and Rhu, K. H., : Effects of prefermentation and Extraction Cooking on the Lactic Fermentation of Rice-Soybean Based Beverage, Korean J. Food Sci. Technol., 20(5), 666(1988)
23. 이성우 : 한국식생활 연구, p.193, 향문사(1978)
24. 이성우 : 한국식품문화사, p.136, 향문사(1984)
25. 이성우, 이현구 : 한국식문화학회지, 1, 403(1986)
26. 윤숙경 : 안동식해의 조리법에 관한 연구, 한국식문화학회지, 3, 101(1988)
27. Cushman, D.W. and Chung, H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol. 20, 1637-1648(1971).
28. Blois, M.S., : Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature., 26, 1199-1200(1958)

29. Marklund, S. and Marklund, G. : Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47, 468(1974)
30. Charmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Michell, J. B. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay assisment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942(1987)
31. 최 청, 석호문, 조영제, 임성일, 이우제 : 전통안동식혜의 제조공정 확립에 관한연구, *한국식품과학회지*, 22, 724(1990)
32. Willam, H. : A.O.A.C, Geory Banta Co. Inc., Mensha, Wisconsin(1980)
33. 유주현, 양권철, 정동호, 양용.: *식품과학실험*, p.728. 탐구당(1984).
34. Wilson. : HPLC determination of fructose, glucose and sucrose in potatoes, *J. food. sci.* 46, 300(1981).
35. 宮尾茂雄・小川敏男, 醱酵漬物中の各種乳酸菌群の選擇計數, *Nippon Shokuhin Gakkaishi*, 35(9), 610(1988)
36. Kandler, O. and Weiss, N. : Regular, nonsporing Gram positive rods. In *Bergeys's Manual of systematic Bacteriology*, Sneath, P. H. A., Mair, N. S., sharpe, M. E. and Holt, J. G.(ed.), williams and wilkins, Baltimore, 1(2), 1208(1986)
37. Sharpe, M. E. : Enumeration and Studies on Lactobacilli in Food products, *Dairy Sci. Abstr.* 24(4), 165(1962)
38. Gibbs, B. M. and Skinner, F. A. : *Identification Methods for microbiologisis*, A.P. London, New York., 1966
39. Lodder, T. : *The yeasts*, North-Holland publishing Co., Netherand, 1st., 1970
40. Kreger-van Rij, N. J. W. : *The yeasts : A taxonomic study*, Elserier Science publishers B. V., Amsterdam., 1984
41. Bensen, H. J. : *microbiological applications ; A laboratory manual in general microbiology*, 4th ed. Wm. C. Brown Publishers., 1985
42. Bassette, R. and ward, G. : Measuring parts per billon of volatile materials in

- milk, J. Dairy Sci., 58, 428(1975)
43. Mikolajcik, E. M., and Hamdan, I. Y. : Lactobacillus acidophilus, I : Growth characteristics and metabolic products, Cultured dairy products J. 11(1975)
 44. Subramanian, P. and Shanker, P. A. : Commensalistic interaction between Lactobacillus acidophilus and lactose-fermenting yeasts in the preparation of acidophilus-yeast milk, Cultured dairy products J. 17(1985)
 45. Mahoney, R. R., Nickerson, T. A. and Whitaker, J. R. : Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactose from Kluyveromyces fragilis, J. dairy sci., 58(11), 1620(1975)
 46. Itoh, T., Suzuki, M. and Adachi, S. : Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeast, agric. Biol. chem., 46(4), 899(1982)
 47. Castillo, F. J. and Moreno, B. : Properties of lactose produced by Candida pseudotropicalis NCYC 744, J. Dairy sci., 66, 1616(1983)
 48. Dickson, R. C., Dickson, L. R. and Markin, J. S. : Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast Kluyveromyces lactis, J. Bacterial., 137(1), 51(1979)
 49. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J. Biol. Chem. 12:239-249 (1912).
 50. Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 232-239 (1996).
 51. Kim SM, Cho YS, Sung SK. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 626-632 (1996).
 52. Gray, J.I. and Dugan, Jr.L.R. Inhibition of N-nitrosamine formation on model food system. J. Food Sci., 40, 981-984(1975).
 53. Prochaska, H. J., Talalay, P. and Sies, H. Direct protective effect of NAD(P)H : quinone reductase against menadione-induced chemiluminescence of

- posmitochondrial fraction of mouse liver. J. Biol. Chem. 262, 1931-1943(1987)
54. Habig, W. H., Pabst, M. H. and Jacoby, W. B. Glutathione S-transferase : the first enzymatic step mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130-7139(1974)
 55. Griffith, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal. Biochem. 106, 207-212(1980)
 56. Kim, H. S., Kacew, S. and Lee, B. M. In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides(Aloe barbadensis Miller, Lentinus edodes, Ganoderma lucidum and Coriaria versicolor). Carcinogenesis. 20, 1637-1640(1999)
 57. Benson, A. M. and Barreto, P. B. Effects of disulfiram, diethyldithiocarbamate, bisethylxanthogen and benzyl isothiocyanate on glutathione transferase activities in mouse organs. Cancer Res. 45, 4219-4223(1985)
 58. A.O.A.C : official Methods Analysis 14th ed. Association of official analytical chemists, Washington D.C.(1984)
 59. Damon and Perfit : HPLC determination of fructose, Glucose and Sucrose in Molasses, J. Assoc. of off and chem. 63(3), 476(1980)
 60. V.T. Turkelson and M. Richards. Anal. chem., 50:11, 1978.
 61. B.S. Buslig, C.W. Wilson and P.E. Shaw. J. Agric. Food chem. 30:342, 1982.
 62. Folch, J., Lee, M., and Sloane Stanley, G. H. : A simple Method for the Isolation and purification of total lipids from animal tissues, J. Biol. chem., 226, 497(1958).
 63. 이상영, 신호철 : 감자의 지방질 성분에 관한 연구, 제 1번 유리 및 결정지방 중의 지방질 조성에 관하여, 11, 291(1979).
 64. Wang, H. L., Swain, E. W., Hesseltine, C. W. and Gumbmann, M. R. : Protein quality of wild rice, J. Agric. Food Chem., 26, 309(1987)
 65. Lowry, C. H. and Rosebrough, N. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265(1951).

66. 허우덕, 하재호, 석호문, 남영중, 신동화 : 전통고유식품의 향과 맛 성분의 규명 및 개선시험, 농개공 식품연구 사업보고서, 14(1987).
67. Anson, M. L. : The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin, J. physiol., 22, 79(1938)
68. 秋源文二 : 赤堀編, 酵素研究法, 第二卷, p.240, 朝倉書店, 日本 (1956)
69. 秋源文二 : 江上編, 標準生化學實驗書, p.207, 文光堂, 日本(1953)
70. 芳賀宏, 伊藤美智子, 管原孝志, 佐佐本重夫 : 放線菌酵素를 利用し た 醬油釀造試驗, 日調味科學, 11, 10(1964)
71. Funatsu, M., Aizono, Y., Hayashi, K., watanabe, M. and Et., M. : Biochemical studies on rice bran lipase. Part I. purification and physical properties, Agr. Biol. Chem., 35, 735(1974)
72. 백인숙, 임숙자, 고영태 : 농축대두단백으로 제조된 유산균음료의 저장성, 한국식품과학회지, 17, 45(1985)
73. Larmond, E. : Methods for sensory evaluation of foods. Canada, Department of Agriculture(1970)
74. Teotiste, W. and Luh, B. S. : Effect of sweetner types on quality and composition of canned kiwi nectars, J. of food sci., v.46 387(1981)
75. Gilliland S. E. and Rich, C. N. : Stability during frozen and subsequent refrigerated storage of Lac. acidophilus growth at different pH., J. Dairy sci., 73, 1187(1990)
76. Abraham, A. G., Graciela L. De Anatoni, and Añon, M. C. : Proteolytic activity of Lactobacillus bulgaricus growth in milk, J. Dairy sci, 76, 1498(1993)
77. Fleming, H. P., Mcfeeters, R. F. and Thompson, R. L. : Test for susceptibility of fermented vegetables to secondary fermentation, J. of food sci. 48, 982(1983)
78. Fleming, H. P., Mcfeeters, R. F., Thompson, R. L. and Sanders, D. C. : Storage stability of vegetables fermented with pH control, J. of food sci., 48,

- 975(1983)
79. Vegarud, G., Castberg, H. B. and Langsrud, T. : Autolysis of Group N streptococci. Effects of media composition modifications and temperature, J. Dairy sci., 66, 2294(1983)
 80. Nancy J. M. and Reinbold, G. W. : Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, Milk food technol., 39, 5, 337(1976)
 81. Hull, R. R., Roberts, A. V. and Mayes, J. J. : Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt, The Australian J. of Dairy Technology, p.164(1984)
 82. 유재정, 이해성, 이해수 : 한국식품과학회지 16, 2(1984)
 83. 육철, 황육회, 백운화, 박관화 : 새로운 제조방법, 식품과학과 산업, 22, 94(1989)
 84. 최청, 석호문, 조영제, 임성일, 이우제 : 전통안동식혜의 제조공정 확립에 관한 연구, 한국식품과학회지, 22, 724(1990)
 85. Livia, A. : Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals, J. Dairy sci. 65, 346(1982)
 86. Chen, K. H., Mcfeeters, R. F. and Fleming, H. P. : Complete heterolactic acid fermentation of green beans by *Lactobacillus cellobiosus*, J. of food sci., 48, 967(1983)
 87. Wang, T., Gonzalez, A. R., Gbur, E. E. and Aselage, J. M. : Organic acid changes during ripening of processing peaches, J. of food sci., 58, 3, 631(1993)
 88. 문수재, 조혜경 : 식혜에 대한 조리과학적 연구, 대한 가정학회지, 16, 43(1978)
 89. 남상주, 김광옥 : 재료의 양과 감미료를 달리한 식혜의 관능적 특성, 한국식품과학회지, 21, 197(1989)
 90. Lin, M. H. Y., Humbert, E. S. and Sosalski, F. W. : Certain functional properties of sunflower meal products, J. Food sci., 39, 368(1974)
 91. Fleming, H. P. Vegetable Fermentations. In "economic Microbiology" Vol. 7,

- Academic press Inc., London, England, (1982)
92. de Man, J. C., Rogosa, M., and sharpe, M. E. : A medium for the cultivation of lactobacilli, J. Appl. Bacteriol., 23, 130(1960)
 93. Kvasnikov, E. I. and sudenco, V. I. : Antibiotic properties of lactobacillus brevis, Dairy sci. Abstr., 29, 3972(1967)
 94. Yoo, J. Y., Min, B. T., Suh, K. B. and Hah, D. M. : Effect of spices on the growth of lactic acid bacteria, Korean J. Food sci. Technol., 10, 124(1978)
 95. Stamer, J. R., Albury, M. N. and pederson, C. S. : Substitution of manganese for tomato juice in the cultivation of lactic acid bacteria, Appl. Microbiol., 12, 165(1964)
 96. Zaika, L. L. and Kissinger, J. C. : Fermentation enhancement by spices : identification of active component, J. Food Sci., 49, 5(1984)
 97. Shorb, M. S. : Activity of vitamin B the growth of Lactobacillus lactis, Science, 107, 397(1948)
 98. Heimbuch, A. H., Aurand, L. W. and Speck. M. L. : Some characteristics of a frowth stimulant in corn steep liquor for Lactobacillus casei, J. Bacteriol., 72, 543(1956)
 99. Cogan, T. M., Gililand, S. E. and Speck. M. L. : Identification of stimulants for Lacrobacillus bulgaricus in tomato juice, Appl. Microbiol., 16, 1215(1968)
 100. Zuraw, E. A., Speck. M. L., Aurand, L. W. and Tove, S. G. : Purification of stimulants from condensed corn fermentation solubles active for Lactobacillus casei in milk, J. Bacteriol., 80, 457(1960)
 101. P. Thornhill and T.M.Cogan Effect of fruit on growth of Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus, J. of Dairy Research, 44, 155(1977)
 102. Colio, L. G. , V. Babb : Study of a new stimulatory growth factor, J. Biol. chem., 174, 405(1948)
 103. Brian, J. B. wood. Yeast-Lactic acid bacteria interaction and their

- contribution to fermented foodstuffs, In "microbiology of fermented foods". Elsevier applied science publishers London and new York, (1985)
104. Metchnikoff, E. The prolongation of life. optimistic studies. William Heinemann, Ltd., London, (1907)
 105. Anad, S. K., Srinivasan, R. A. and Rao, L. K. : Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*, Cultured dairy products journal, 6(1981)
 106. Shahani, K. M., Vakil, J. R. and Kilara, A. : Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*, Cultured dairy products journal, Vol. 11(4), 14(1976)
 107. Lewus, C. B., Sun, S. and Montville, T. J. : Production of an amylase-sensitive bacteriocin by atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. Appl. Environ. Microbiol. 58, 143(1992)
 108. Collins E. B. and Koichiro aramaki : Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*, J. Dairy Sci., 63, 353(1980)
 109. Kanda, H., Wang, H. L., Hesseltine. C. W. and Warner, K. : Yoghurt production by *Lactobacillus* fermentation of soybean milk. process. Biochem., 11(4), 23(1976)
 110. Angeles, A. G. and Marth, E. H. : Growth and activity of lactic acid bacteria in soymilk J. milk Food Technol., 34, 30(1971)
 111. Mital, B. K. and Steinkraus, K. H. : Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soymilk J. Food sci., 40, 1149(1975)
 112. Mital, B. K. and Steinkraus, K. H. : Growth of lactic acid bacteria in soy milks, J. Food prot., 42(11), 895(1979)
 113. Daeschel, M. A., Fleming, H. P. and Mcfeeters, R. F. : Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts, J. Food sci., 53(3), 862(1988)
 114. Fleming. H. P. : Vegetable fermentations In "Economic Microbiology", Vol. 7,

Academic press Inc., London, England, (1982)

115. Fleming, H. P., Mcfeeters, R. F. and Thompson, R. L. : Test for susceptibility of fermented vegetables to secondary fermentation, J. Food sci., 45, 982(1983)
115. Fleming, H. P., Mcfeeters, R. F., Thompson, R. L. and Sanders, D.C. : Storage stability of vegetable fermented with pH control, J. Food sci., 48, 975(1983)

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.