

약초 추출액을 사용하여 제조한 감주의 젖산발효

조계만 · 안병용¹ · 서원택^{2,*}

경상대학교 농업생명과학연구원, ¹전북대학교 환경자원학부, ²진주산업대학교 식품과학과

Lactic Acid Fermentation of *Gamju* Manufactured Using Medicinal Herb Decoction

Kye Man Cho, Byung Yong Ahn¹, and Weon Taek Seo^{2,*}

Research Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

¹Division of Environmental and Resource, Chonbuk National University

²Department of Food Science, Jinju National University

Abstract In this study, the characteristics of the lactic fermentation of *gamju* manufactured using a medicinal herb decoction were assessed. A bacterial strain, LAB19, which is used for the induction of lactic fermentation into *gamju*, was isolated from dried persimmon and identified as *Leuconostoc mesenteroides* on the basis of morphological, physiological, and chemotaxonomical features, and 16S rRNA sequencing analysis. After 60 hours of lactic fermentation with *Leuconostoc mesenteroides* LAB19 at 25°C, the *gamju* was determined to contain 141.3 g/L of reducing sugar, 5.33 g/L of acids, and 1.19 g/L of soluble phenolics. Approximately 90% of reducing sugar and 58% of acids were maltose and lactic acid, respectively. Free radical scavenging activities were retained at levels between 76.6 to 75.7% during the lactic fermentation of *gamju*.

Key words: medicinal herb, *gamju*, *Leuconostoc mesenteroides*, lactic acid fermentation

서 론

현재 추구하고 있는 기능성식품은 영양, 기호적 기능 및 질병 예방 기능에 초점을 두고 개발되고 있다. 이러한 관점에서 젖산 발효는 기능성식품 개발을 위한 중요한 소재가 된다. 젖산발효는 식품의 저장성을 증가시킬 뿐만 아니라 맛, 풍미 및 조직감 등에서 바람직한 변화를 일으키게 된다. 또한 젖산균은 식중독 미생물 및 부패 미생물의 생육억제(1), 정장작용(2,3), 혈장 콜레스테롤 저하작용(4) 및 면역 활성 증가작용(5) 등이 있는 것으로 알려져 있다.

젖산균을 활용한 젖산발효음료에 관한 연구로는 요구르트 제조 등의 유제품 발효에 관한 연구가 대부분이며 사과, 당근, 셀러리, 돌미나리, 대추 및 구기자 등의 착즙액을 이용한 혼합과채 젖산발효 음료(6) 및 쌀을 이용한 젖산발효 음료(7), 밤을 이용한 젖산발효 음료(8) 등에 관한 연구가 보고되어 있다.

감주(식혜 혹은 단술)는 멥쌀이나 찰쌀로 지은 밥에 엿기름 추출물을 넣어 적당한 온도로 유지하면서 엿기름 추출액에 포함되어 있는 amylase의 작용으로 밥의 전분을 limit dextrin, maltotriose, maltose 및 glucose 등으로 당화시켜 특유의 감미와 풍미를 생성시킨 우리나라 특유의 음료 가운데 하나다(9-12). 따라서 감

주는 당분이 풍부하여 젖산발효를 위한 기질이 될 수 있다.

본 연구에서는 약리효과가 밝혀져 있으면서 식품소재로 사용이 가능한 한약재인 백출, 우슬, 오가피, 두릅나무, 엄나무, 화살나무, 제피, 감초 및 맥아를 일정비율로 배합하여 가열 추출한 한약재 추출액을 이용하여 한방감주를 제조하고 여기에 새로이 분리동정한 젖산균을 접종하여 젖산발효를 유도하여 건강을 지향하는 새로운 한방 젖산발효 음료를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서 사용한 한약 재료인 백출, 우슬, 오가피, 엄나무, 두릅나무, 화살나무, 제피, 감초 및 맥아는 2006년에 경남 산청군 지역 시장에서 구입하여 4°C 냉장실에 보관하면서 사용하였다. 한편, 본 실험에 사용한 미생물 배양용 배지는 Difco사(Detroit, MI, USA) 제품을 사용하였으며 분석시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

한약재 추출 및 한방감주 제조

백출 200 g, 우슬 200 g, 오가피 60 g, 화살나무 60 g, 두릅나무 60 g, 제피 60 g, 엄나무 60 g, 감초 2 g 및 맥아 20 g을 정량하고 재료무게의 20배에 해당하는 식수 14.4 L를 추출수로 사용하여 120°C에서 4시간 추출하여 한약재 추출액을 제조하였다.

엿기름 200 g을 물 700 mL와 혼합하여 60°C 항온수조에서 2시간 침출 후 여과하여 엿기름 추출액을 만들어 고두밥 당화를 위한 효소액으로 사용하였다.

멥쌀을 수세하고 30°C 정도의 물에 1시간 침지하여 수분을 흡

*Corresponding author: Weon Taek Seo, Department of Food Science, Jinju National University, Jinju, Gyeongnam 660-758, Korea
Tel: 82-55-751-3276
Fax: 82-55-751-3279
E-mail: wtseo@jinju.ac.kr
Received April 19, 2008; revised October 8, 2008;
accepted October 8, 2008

수시키고 30분간 증자하여 고두밥을 만들었다.

한약재 추출액 10L에 고두밥 3kg과 엿기름 추출액 500 mL를 가하고 60°C 항온수조에서 6시간 동안 당화시킨 후 100°C에서 30분 가열하여 당화를 중지시켰다. 당화액을 여과에 의해 입자가 제거된 투명한 상태로 한방감주를 제조하였다. 제조된 한방감주는 -40°C에서 냉동 보관하면서 필요에 따라 해동하여 80°C에서 30분 저온 살균한 후 사용하였다. 한약재 추출액 대신 식수를 사용하여 일반 감주를 제조하여 대조구로서 사용하였다.

젖산균 선별 및 동정

김치, 꽃감 및 젓갈류 등을 멸균 생리식염수에 희석한 후 MRS 한천배지에 도말하여 30°C에서 3일간 배양한 후 다양한 젖산균을 순수 분리하였다. 순수 분리한 젖산균은 20 mL MRS 배지가 들어 있는 100 mL Erlenmeyer flask에 접종하고 30°C 진탕 배양기에서 150 rpm의 조건으로 24시간 진탕 배양하여 종 배양을 한 후 한방감주 100 mL가 들어 있는 Erlenmeyer flask에 1 mL를 접종하여 30°C에서 3일간 정치하여 한방감주의 젖산발효를 유도하였다. 한방감주 젖산발효액의 풍미를 검토하여 최종적으로 LAB19 균주를 선별하였다. 선별균주는 20% glycerol을 포함하는 MRS 배지에 분산시켜 -40°C에서 동결보존하면서 필요에 따라 MRS 한천배지에서 활성화하여 사용하였다.

선별된 젖산균 LAB19 균주는 형태학적, 생리학적, 생화학적 특징 및 분자유전학적 방법을 통하여 동정하였다. 세포의 형태는 그람염색 후 명시야 현미경에서 관찰하였고 세포 지방산 분석을 위해 MRS 배지에서 30°C로 2일간 배양하여 MIDI Microbial Identification System(Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) 기술에 따라 전처리하여 지방산을 분석하였다. 지방산 분석은 GC(model 5890, Hewlett Packard) 및 phenylmethyl silicone fused silica capillary column(25 m×0.2 mm, Hewlett Packard)를 사용하여 분석하였다. 균주의 표현형적 특징은 API50 NE kit(BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France)를 사용하여 분석하였다. 한편, 선별된 균주를 MRS 배지에서 24시간동안 액체배양을 한 후 Intron Genomic DNA Purification kit(Intron Botechnol. Co., Suwon, Korea)을 사용하여 genomic DNA를 분리하고 이를 주형으로 하여 PCR를 통하여 16S rDNA 염기서열을 결정하였다. PCR 반응은 94°C에서 denaturation 1분, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 1분 동안 30 cycle을 수행하였다. Primer 제작은 bacteria의 16S rDNA conserved region에서 약 1,500 bp 정도가 되게 제작을 하였다. Forward oligonucleotide primer는 5'-CGGAGAGTTTGATCCTGG-3', reverse oligonucleotide primer는 5'-TACGGCTACCTTGTACGAC-3'을 사용하였다(13). PCR 반응이 끝난 후 전기 영동하여 16S rRNA 단편을 확인하고 Intron Gel Extraction Kit(Intron Botechnol. Co.)를 각 kit에 포함된 방법에 따라 gel에서 DNA를 분리하였다. 정제한 16S rRNA 단편을 주형으로 사용하여 염기서열 결정을 행하였다. 염기서열 결정은 PRISM Ready Reaction Dye terminator/primer cycle sequencing kit(Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA)를 사용한 dideoxychain termination method로 하였다. Sample은 automated DNA sequencer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 분석하였다. 결정된 염기서열 16S rRNA는 GeneBank database로부터 얻은 또 다른 세균의 16S rRNA와 비교 분석하였다. 16S rRNA 유사성 값은 DNAMAN analysis system(Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)를 사용하여 alignments, evolutionary distance로부터 계산하였다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining method와 distance matrix data를 사용하여 확인하였다.

종 배양과 한방감주의 젖산발효

엿기름 400 g를 증류수에 혼합하여 60°C 항온수조에서 2시간 침출한 후 여과 세척하여 추출액이 1L가 되도록 하였다. 추출액은 100°C에서 30분 가열하여 응고되는 침전물을 제거한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 한방감주의 젖산발효를 위한 종 배양 배지로 사용하였다. 종 배양 배지 50 mL가 들어 있는 250 mL-Erlenmeyer flask에 선별된 LAB19 균주를 접종한 후 30°C 진탕 배양기에서 150 rpm의 조건으로 48시간 진탕 배양하여 종 배양을 한 후 3 L의 한방감주가 들어 있는 5 L 발효조에 1-5%(v/v) 접종하여 20-30°C에서 한방감주의 젖산발효를 유도하였다.

Brix 당도와 환원당

감주 발효액을 원심분리기(Hanil micro-12, Korea)로 원심분리한 후 상등액을 취하여 굴절당도계(N-1 α , Atago, Tokyo, Japan)를 이용하여 °Bx 당도를 측정하였다. 환원당은 dinitrosalicylic acid 시약을 이용하는 방법을 사용하여 분석하였다(14). 발효액을 원심분리기로 원심분리한 후 상등액을 당 농도가 1.0 g/L 이하가 되게 희석한 후 dinitrosalicylic acid 시약을 1 mL 첨가하여 100°C의 끓는 물에서 10분 동안 발색시킨 후 냉각하여 분광광도계(Spectronic®20, Spectronic instruments, Rochester, NY, USA)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선과 비교하였다. 검량선 작성을 위한 표준물질로는 glucose를 사용하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

pH와 적정 산도

pH는 pH meter(model 3510, Jenway, Essex, UK)를 사용하여 측정하였다. 적정 산도는 발효액 10 mL를 pH 8.2±0.1까지 중화시키는데 소요되는 0.1N NaOH의 양으로 측정하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

생균수

감주 젖산발효 중의 생균수 측정은 발효액을 0.85% 멸균생리식염수로 10배 희석하는 10단 희석법으로 적당히 희석하고 MRS 한천배지에 도말하여 30°C에서 48시간 동안 배양하여 형성된 젖산균 집락을 계수하여 생균수를 측정하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

유리당과 유기산

유리당과 유기산의 분석은 Cho 등(15)의 방법에 준하여 HPLC(LC-10A, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

유리당 분석은 발효액을 원심분리한 후 deionized water(DW)로 10배 희석한 시료를 sep-pak NH₂ column(Waters Co., Milford, MA, USA)과 0.45 μ m-membrane filter(Dismic®-25CS, Toyoroshikaisha, Ltd., Japan)를 순차적으로 통과시켜 전처리하였다. 유리당 분석 칼럼(Shimadzu-NH₂)에 전처리한 시료 10 μ L를 주입하고 30°C에서 이동상 용매(acetonitrile: water=75:25(v/v))를 1.0 mL/min 속도로 이동시키면서 Reflective Index(RI) 검출기 상에서 유리당을 검출하였다.

유기산 분석은 발효액을 원심분리한 후 상등액을 0.2 μ m-membrane filter(Göttingen)를 통과시켜 입자를 제거하였다. 유기산 분석 칼럼(Rezex 8u 8% H. Org Acid, 300×7.8 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)에 전처리한 시료 10 μ L를 주입하고 55°C에서 이동상 용매(0.1% phosphoric acid)를 0.5 mL/min 속도로 이동시키면서 UV detector(UV730D, Youngin, Anyang, Korea)에서 유기산을 검출하였다.

총 수용성 phenolics 함량 측정

총 수용성 phenolics는 Folin-Ciocalteu법(16)으로 측정하였다. 발효액을 원심 분리한 후 0.2 µm-membrane filter(Göttingen) 여과하여 입자를 제거한 후 50배 희석하고 0.5 mL을 시험관에 분주하고 25% Na₂CO₃ 용액 0.5 mL를 첨가하여 3분간 정치시켰다. 다시 2N-Folin-Ciocalteu phenol 시약 0.25 mL 첨가하여 혼합한 다음 상온에서 1시간 동안 정치시켜 발색시켰다. 발색된 청색을 분광광도계(Spectronic2D)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 수용성 phenolics 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. Gallic acid를 이용한 표준곡선은 gallic acid의 최종농도가 0, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1,000 mg/L가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 750 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

전자 공여능에 의한 항산화 활성

Blois(17)의 방법을 약간 변형하여 전자 공여능을 측정하였다. 1.5×10⁻⁴ M DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 0.8 mL와 원심분리한 발효액을 적당히 희석한 후 0.2 mL를 가한 후 10초간 vortex하고 실온에서 30분 방치한 후 분광광도계(Spectronic 2D)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다. 음성 대조구 실험은 시료 대신에 증류수를 0.2 mL를 취하여 실험하였고 양성 대조구 실험은 상용항산화제인 L-ascorbic acid(1 mg/mL)를 이용하여 동일한 방법으로 실시하였다. 전자 공여능은 실험구와 음성 대조구의 흡광도를 구하여 아래와 같이 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{전자 공여능(\%)} = [1 - (\text{실험구의 흡광도} / \text{음성 대조구의 흡광도})] \times 100$$

통계처리

유리당과 유기산의 실험결과를 SPSS program을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 구하고 시료간의 차이 검증은 일원배치 분산 분석(ANOVA)을 사용하였으며 Duncan's multiple range test에 따라 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다(SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

결과 및 고찰

한방 감주 제조의 최적 조건 규명

한약재 추출액이 고두밥의 당화에 미치는 영향을 검토한 결과 Table 1과 같았다. 당화는 식수 또는 한약재 추출액에 고두밥을 20%(w/v) 또는 40%(w/v) 되도록 가하고 엿기름 추출액 5%(w/v)

가하여 60°C 항온 수조에서 당화를 진행시켰다. 당화시간이 증가함에 따라 당도도 증가하는 것을 보아 한약재 추출액이 당화에는 영향을 주지 않은 것으로 판단되었다. 한약재 추출액에 고두밥을 40%(w/v) 첨가하여 당화를 진행시킨 결과 당화 6시간째 15.0 °Bx의 당도와 1.2 g/L의 gallic acid에 상당하는 수용성 phenolics와 132 g/L의 glucose에 상당하는 가용성당을 함유하고 있었다. 한편 한약재 추출액 대신 식수에 고두밥을 40%(w/v) 첨가하여 당화를 진행시킨 결과 당화 6시간째 13.4°brix의 당도와 0.28 g/L의 gallic acid에 상당하는 수용성 phenolics와 116 g/L의 glucose에 상당하는 가용성당을 함유하고 있었다. 식수 및 한약재 추출액 모두에서 당 조성은 maltose가 주된 당이었으며, 이 밖에 maltotriose, fructose 및 glucose를 함유하고 있었다(자료 제시하지 않음).

젖산균의 선발 및 동정

김치, 꽃감, 짓갈류 등과 같은 각종 식품소재로부터 다양한 젖산균을 MRS 한천배지에서 순수분리하고 이들 젖산균을 각각 한방 감주에 발효시켜 향, 맛 등의 관능적 성질을 고려하여 최종적으로 균주 LAB19를 선발하였다.

꽃감으로부터 분리한 균주 LAB19는 그람양성의 연쇄구균으로서 MRS배지에서 증식시키는 경우 통성 혐기적 조건, 온도는 15°C와 35°C의 범위 및 NaCl 10%까지 증식하였다. 균주 LAB19는 L-arabinose 등의 여러 당을 이용할 수 있었으나 일반적인 *L. mesenteroides*와 달리 ribose를 이용할 수 없었다(Table 2). 한편 세포벽 지방산 분석결과 C_{16:0}이 28.05%, C_{18:1} ω9c가 22.17%, C_{19:0} Cyclo ω9c가 12.58%로 주요한 지방산으로 나타났다(자료 제시 않음).

16S rRNA 염기서열을 통하여 좀 더 정확한 균주 동정을 시도하였다. 균주 LAB19는 1,498 bp만큼 염기서열이 결정되었고 Phylogenetic tree 분석결과 *L. mesenteroides*(M23035)와 99.7%로 유연관계가 가장 가까움을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 형태학적, 생리학적, 생화학적 특징 및 분자유전학적 분석결과를 종합하여볼 때 *L. mesenteroides*와 가장 유사하여 균주 LAB19는 이형젖산발효균주인 *L. mesenteroides* 또는 그 근연종으로 판단되었다. 따라서 식품 발효에서 안전하게 사용할 수 있는 Generally Recognized As Safe(GRAS) 미생물이므로 한방감주의 젖산발효를 위한 균주로 사용이 기대되었다.

한방감주 젖산발효에 미치는 접종량과 온도의 영향

L. mesenteroides LAB19 균주의 접종량이 한방감주의 젖산발효에 미치는 영향을 검토한 결과 Table 3과 같았다. 접종량이 2.5-5.0%(w/v)에서 원활한 발효가 진행되었다. 접종량 2.5%(w/v) 경우, 발효 36시간째 생균수는 9.96×10⁹ CFU/mL까지 도달한 이후

Table 1. Effect of saccharification for gamju by a Korean herb medicine material extraction¹⁾

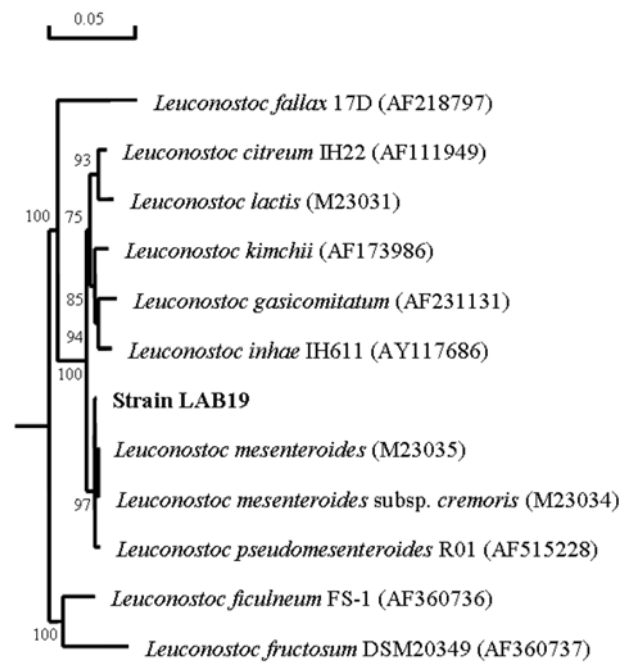
Saccharification condition ²⁾	°Bx						
	Saccharification time (hr)						
	0	1	2	3	4	5	6
Top water [stem rice 20 (% w/v)]	1.0	3.6	5.2	7	8	8.8	9.6
Korean herb medicine material extraction [stem rice 20 (% w/v)]	2.8	5.4	7.0	9.0	10.0	10.4	11.8
Top water [stem rice 40 (% w/v)]	1.0	5.2	7.8	10.4	11.2	12.6	13.4
Korean herb medicine material extraction [stem rice 40 (% w/v)]	2.8	7.8	10	12.2	13.2	14.4	15.0

¹⁾ Values indicate the mean's of three replications (n=3).

²⁾ 5%(v/v) malt extraction was added from 20 to 40%(v/v) into stem rice and top water or Korean herb medicine material extraction and saccharified at 60°C for 6 hr.

Table 2. Phenotypic characteristics of strain LAB19

Characteristics	Reaction	Characteristics	Reaction
Shape	cocci	<i>N</i> Acetyl glucosamine	+
Gram staining	positive	Amygdaline	-
Glycerol	- ¹⁾	Esculine	+
Erythritol	-	Salicine	+
D-Arabinose	-	Cellobiose	-
L-Arabinose	+ ²⁾	Maltose	+
Ribose	-	Lactose	-
D-Xylose	+	Melibiose	+
D-Xylose	-	Saccharose	+
Adonitol	-	Trehalose	+
β Methyl-xyloside	-	Inuline	-
Galactose	+	Melezitose	-
D-Glucose	+	D-Raffinose	+
D-Fructose	+	Amidon	-
D-Mannose	+	β Gentiobiose	-
L-Sorbose	-	D-Turanose	+
Rhamnose	-	D-Lyxose	-
Dulcitol	-	D-Tagatose	-
Inositol	-	D-Fucose	-
Mannitol	-	D-Arabitol	-
Sorbitol	-	L-Arabitol	-
α Ethyl-D-mannoside	-	Gluconate	-
α Methyl-D-glucoside	+	2 Keto-gluconate	-
Xylitol	-	5 Keto-gluconate	-
Glycogene	-	Arbutine	-

¹⁾ -, negative reaction²⁾ +, positive reaction**Fig. 1. Phylogenetic relationships of the strain LAB 19 and other closely related *Leuconostoc* species based on 16S rDNA gene sequences.** Numbers above each node are confidence levels (%) generated from 1,000 bootstrap trees.

감소하였다. 이때 당도는 14.7°Bx, 적정산도는 24.0 mL, pH는 3.68 이었다.

발효온도가 한방감주의 젖산발효에 미치는 영향은 Table 4와 같았다. 발효온도가 낮은 조건에서도 균 증식이 원활하였고 25°C

Table 3. Effect of inoculation concentration of strain LAB19 on lactic acid fermentation of *hanbang gamju*¹⁾

Fermentation time (hr)	Inoculation concentration (% v/v)	°Bx	pH	Titrateable acidity (mL) ²⁾	Visible cell (cfu/mL)
0	1.0	15.2	5.2	6.0	2.55×10 ⁶
	2.5	15.2	5.2	6.5	5.75×10 ⁶
	5.0	15.2	5.0	8.4	1.24×10 ⁷
12	1.0	15.1	3.87	16.8	1.85×10 ⁸
	2.5	15.1	3.87	19.2	8.15×10 ⁸
	5.0	15.1	3.87	19.2	1.13×10 ⁹
24	1.0	15.0	3.71	22.8	8.95×10 ⁸
	2.5	14.9	3.69	24.0	1.21×10 ⁹
	5.0	14.9	3.68	21.6	4.35×10 ⁹
36	1.0	14.7	3.67	22.8	3.68×10 ⁹
	2.5	14.7	3.68	24.0	9.96×10 ⁹
	5.0	14.6	3.66	25.2	8.87×10 ⁹
48	1.0	14.6	3.62	21.6	4.63×10 ⁹
	2.5	14.7	3.60	24.0	4.32×10 ⁹
	5.0	14.6	3.59	24.0	4.10×10 ⁹
60	1.0	14.4	3.61	23.8	5.63×10 ⁹
	2.5	14.3	3.59	29.6	3.72×10 ⁹
	5.0	14.3	3.59	27.8	2.98×10 ⁹

¹⁾ Values indicate the mean's of three replications ($n=3$). *L. mesenteroides* LAB19 was inoculated from 1.0 to 5.0%(v/v) into *hanbang gamju* and fermented at 30°C for 48 hr.

²⁾ Ten mL of *gamju* was titrated with 0.1 N NaOH to pH 8.2±0.1 for titrateable acidity.

Table 4. Effect of temperature on lactic acid fermentation of *hanbang gamju*¹⁾

Fermentation time (hr)	Fermentation temperature (°C)	°Bx	pH	Titration acidity (mL of 0.1N NaOH/10 mL) ²⁾	Visible cell (cfu/mL)
0	20	15.2	5.20	6.5	2.49×10 ⁶
	25	15.2	5.20	6.5	2.49×10 ⁶
	30	15.2	5.20	6.5	2.49×10 ⁶
12	20	15.1	4.10	14.4	1.24×10 ⁸
	25	14.9	4.21	13.2	3.92×10 ⁸
	30	14.9	3.87	19.2	1.00×10 ⁸
24	20	15.0	3.87	16.8	1.22×10 ⁹
	25	14.8	3.84	22.8	1.39×10 ⁹
	30	14.7	3.69	24.0	1.20×10 ⁹
36	20	14.9	3.71	20.4	4.71×10 ⁹
	25	14.6	3.58	27.6	5.10×10 ⁹
	30	14.6	3.68	24.0	4.90×10 ⁹
48	20	14.9	3.79	21.6	4.37×10 ⁹
	25	14.6	3.59	28.8	5.26×10 ⁹
	30	14.6	3.60	24.0	5.14×10 ⁹
60	20	14.6	3.71	23.5	2.97×10 ⁹
	25	14.3	3.61	30.6	3.86×10 ⁹
	30	14.3	3.61	28.2	3.34×10 ⁹

¹⁾Values indicate the mean's of three replications (n=3). *L. mesenteroides* LAB19 was inoculated the 2.5%(v/v) into *gamju* and fermented at 20, 25, and 30°C for 48 hr.

²⁾Ten mL of *gamju* was titrated with 0.1 N NaOH to pH 8.2±0.1.

Table 5. Changes of brix, reducing sugar, pH, titration acidity, and visible cell during lactic acid fermentation of *hanbang gamju*¹⁾

Fermentation time (hr)	°Bx	Reducing sugar (g/L)	pH	Titration acidity (mL) ²⁾	Visible cell (cfu/mL)
0	15.2	155.6	4.94	6.4	3.30×10 ⁶
4	15.0	153.2	4.68	8.8	7.62×10 ⁶
8	15.2	153.4	4.34	11.2	1.04×10 ⁷
12	14.9	151.3	4.04	13.6	4.58×10 ⁸
24	14.8	150.9	3.75	22.4	6.32×10 ⁹
36	14.6	150.2	3.65	24.0	1.3×10 ¹⁰
48	14.5	149.8	3.60	28.2	3.0×10 ⁹
60	14.2	141.3	3.61	30.4	1.1×10 ⁹

¹⁾Values indicate the mean's of three replications (n=3). 2.5%(v/v) of *L. mesenteroides* LAB 19 seed was inoculated into *hanbang gamju* and fermented at 25°C hr.

²⁾Ten mL of *gamju* was titrated with 0.1 N NaOH to pH 8.2±0.1.

에서 발효한 경우, 20°C와 30°C보다 균 증식정도가 빨랐으며 이에 상응하여 적정산도는 증가하였으나 pH는 30°C보다 느리게 감소하였다. 25°C에서 발효 48시간째 생균수는 5.26×10⁹ CFU/mL, 적정산도는 28.8 mL, 당도는 14.6°Bx, pH는 3.59로 가장 높았다. 이상의 결과로부터 한방감주의 젖산발효는 *L. mesenteroides* LAB19 균주를 2.5%(v/v) 접종하고 25°C에서 발효한 것이 생균수 및 적정산도가 가장 높아 최적조건일 것으로 판단되어 이후 실험의 조건으로 설정하였다.

한방감주의 젖산발효 경과

중 배양한 *L. mesenteroides* LAB19 균주를 한방감주 3 L에 2.5%(v/v)되게 접종하고 25°C에서 젖산발효를 시킨 결과 Table 5, 6 및 7과 같았다.

시간이 경과함에 따라 °Bx 당도 및 환원당은 약간 감소하여

발효 60시간 경과 시 °Bx 당도는 15.2에서 14.2, 환원당은 155.6 g/L에서 141.3 g/L로 감소하였다. 세포 증식은 발효경과와 함께 급격히 증가하여 발효시간이 36시간 경과하면서 1.3×10¹⁰ CFU/mL로 최대에 도달한 후 감소하였다. 한편, pH는 발효가 진행됨에 따라 초기 pH 4.94에서 60시간 경과 시 3.61로 낮아졌으며, 이에 상응하여 적정산도는 증가하여 발효시간 60시간 경과 시 30.4 mL가 되었다(Table 5).

발효경과에 따른 유기산의 변화는 Table 6과 같았다. 총 유기산 함량은 발효가 진행됨에 따라 급격히 증가하여 발효시간 60시간 경과 시 1.73 g/L에서 5.33 g/L로 증가하였다. 특히 lactic acid와 acetic acid의 증가가 현저하였는데, 이는 *L. mesenteroides* LAB19가 이형젖산발효를 하고 있음을 나타낸다. Lactic acid가 발효 60시간 경과 시 0.40 g/L에서 3.102 g/L로 증가하여 총 유기산의 58%를 구성하였고 acetic acid는 0.46 g/L에서 1.41 g/L로 증가

Table 6. Distributions of free organic acids during lactic acid fermentation of *hanbang gamju*¹⁾

Organic acid ²⁾ (g/L)	Fermentation time (hr)							
	0	4	8	12	24	36	48	60
Oxalic acid	0.084 ^{ab}	0.084 ^h	0.084 ^{bc}	0.084 ^{sh}	0.084 ^a	0.084 ^{abc}	0.084 ^s	0.084 ^f
Tartaric acid	0.343 ^s	0.343 ^h	0.314 ^{de}	0.340 ^{ede}	0.405 ^{def}	0.350 ^d	0.354 ^{ab}	0.347 ^c
Malic acid	0.288 ^b	0.251 ^{cd}	0.233 ^{cd}	0.252 ^{ab}	0.258 ^{hi}	0.247 ^{def}	0.246 ^{de}	0.247 ^{ab}
Ascorbic acid	0.017 ^{ef}	0.016 ^{ghi}	0.015 ^d	0.013 ^a	0.013 ^d	0.013 ^{ef}	0.015 ^{de}	0.014 ^{bc}
Lactic acid	0.404 ^{sh}	0.463 ^{bcd}	0.755 ^{cb}	1.582 ^b	2.561 ^c	2.755 ^h	2.851 ^s	3.102 ⁱ
Acetic acid	0.456 ^e	0.467 ^d	0.574 ^d	0.932 ^{abc}	1.353 ^{fg}	1.380 ^{gh}	1.393 ^f	1.405 ^{ac}
Citric acid	0.135 ^{de}	0.130 ^{bc}	0.130 ^c	0.099 ^d	0.132 ^a	0.138 ^b	0.131 ^b	0.135 ^{ac}
Total	1.727 ^{ac}	1.754 ^{cd}	2.105 ^{bc}	3.302 ^a	4.806 ^f	4.967 ^{de}	5.074 ^{ef}	5.334 ^{cd}

¹⁾2.5%(v/v) of *L. mesenteroides* LAB 19 seed was inoculated into *hanbang gamju* and fermented at 25°C hr.

²⁾Values indicate the mean's of three replications ($n=3$). A p value <0.05 was considered significant.

Table 7. Distributions of free sugars during lactic acid fermentation of *hanbang gamju*¹⁾

Free sugar ²⁾ (g/L)	Fermentation time (hr)							
	0	4	8	12	24	36	48	60
Fructose	7.38 ^{bc}	7.34 ^{gh}	5.76 ^{cd}	1.72 ^{abc}	0.32 ^{hi}	0.12 ^{efg}	0.06 ^a	ND ³⁾
Glucose	5.68 ^{ab}	1.74 ^a	0.88 ^a	7.74 ^{cd}	9.56 ^d	9.94 ^a	10.38 ^{de}	11.14 ^b
Sucrose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Maltose	137.41 ^{bc}	130.64 ^{gh}	131.48 ^{cd}	131.30 nd	128.02 ^d	134.28 ⁱ	130.12 ^{ji}	128.64 ^{efg}
Maltotriose	4.16 ^a	5.66 ^d	4.04 ^d	4.84 ^{bc}	4.86 ^f	5.12 ^{ac}	3.24 ^h	1.24 ^s
Total	154.63 ^{abc}	145.38 ^{hi}	142.16 ^{cd}	145.60 ^{cd}	142.76 ^{de}	149.46 ^{ac}	143.8 ^g	141.02 ^{def}

¹⁾2.5%(v/v) of *L. mesenteroides* LAB 19 seed was inoculated into *hanbang gamju* and fermented at 25°C hr.

²⁾Values indicate the mean's of three replications ($n=3$). A p value <0.05 was considered significant.

³⁾ND: not detected

하여 총 유기산의 26.3%를 구성하였다. 그 밖의 유기산은 증가하지 않는 것으로 보아 원료 한약 재료에서 유래한 유기산으로 판단되었다.

총 유리당 함량은 발효 초기 154.63 g/L에서 발효 60시간 경과 141.02 g/L로 감소하였다(Table 7). 발효 초기에 fructose 7.38 g/L, glucose 5.68 g/L, maltose 137.41 g/L, maltotriose 4.16 g/L로 구성되어 있었으나 발효 60시간 경과 시 fructose는 검출되지 않았으며 glucose 11.14 g/L, maltose 128.64 g/L, maltotriose 1.24 g/L 검출되었다. 발효 전 기간 동안 maltose가 총 유리당 함량의 약 89% (137.41 g/L, 발효초기)에서 91%(128.64 g/L, 발효 60시간 경과)로 존재하여 감주 젖산발효음료의 주요 당임을 알 수 있었다(Table 7). Glucose가 발효 초기에 감소하다가 다시 증가하는 경향을 나타낸 이유는 *L. mesenteroides* LAB19가 갖는 amylase 활성에 기인할 것으로 판단되었다. 한편, 본 연구에서의 한방감주 젖산 발효와는 다른 조건이지만 젖산균과 효모에 의해 제조되는 식혜의 경우 숙성과정 중 당화효소인 amylase 활성을 측정할 결과 숙성 3일째 3.56 unit/mL로서 최대의 활성을 나타냈었으며 그 후부터는 차차 감소하였다고 보고하여(18), 앞으로 연구에서 발효 중 amylase 활성에 관한 연구도 동시에 수반되어야 할 것으로 사료되어지며, 이 경우에도 maltose의 함량이 평균 73%의 고농도 존재하였지만 젖산균의 생육에 별 영향을 주진 않았다(18). 이런 결과는 본 연구의 선발 균주 LAB19 뿐만 아니라 대부분의 젖산균이 maltose의 당을 이용할 수 있기 때문인 것으로 추정된다(Table 2).

수용성 phenolics 함량과 전자 공여능

한방감주 젖산발효 중에 수용성 phenolics 함량 및 전자 공여능의 변화는 Fig. 2와 같았다. 발효 중 phenolics의 함량은 발효

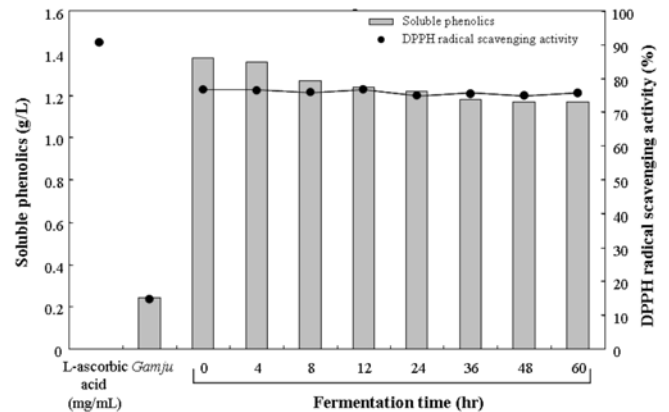


Fig. 2. Change of soluble phenolic contents and DPPH free radical scavenging activity during the lactic acid fermentation of *hanbang gamju* by *L. mesenteroides* LAB 19. Values indicate the mean's of three replications ($n=3$).

초기에 1.38 g/L에서 발효 60시간 경과 시 1.19 g/L로 감소하였다. 이는 적포도주에 함유되어 있는 페놀의 양에 필적할만한 것으로 본 연구에 사용한 한약재는 각종 flavonoid를 포함하여 saponin, phenolics, vitamin C 등의 다양한 생리활성 물질을 함유하여 여러 가지 약리효과가 밝혀져 있으며, 오래전부터 한방처방에 사용되어 왔다(15,19-22). 한편, 한방 감주 발효 중 전자 공여능은 76.6-75.7%로 L-ascorbic acid(92.4%)보다는 낮았으나 일반감주(14.4%) 보다는 상당히 높게 나타났다(Fig. 2). 한방 감주 발효 중 phenolics는 약간 감소하였으나 전자 공여능이 일정하게 유지된 것은 젖

산발효 중 생성된 유기산에 의한 것으로 추정되어졌다. 전자 공여능을 측정하는 DPPH는 ascorbic acid와 같은 유기산, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물(phenolics), 방향족 아민류와 같은 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 radical이 소거되며 이때 고유의 짙은 자색이 탈색됨으로 항산화물질의 전자 공여능을 측정할 때 사용되어 진다. 특히 대부분의 유기산은 carboxyl에 음전하(COO⁻)를 띄고 있어 전자(수소)를 공여할 수 있다(23).

앞으로 좀 더 많은 생리활성 검정실험이 수행되어야 할 것으로 사료되나 한약재 및 젓산균의 생리활성인 항산화활성, 항암활성, 치매예방, 면역기능 활성화 및 장내개선 등의 기능성을 가질 것으로 판단되며, 본 연구에 의해 개발된 한방 감주 젓산발효와 관련한 결과는 현대인의 건강 지향적 성향에 맞는 새로운 기능성 제품 개발을 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다.

요 약

한방발효음료를 제조하기 위하여 한방감주의 젓산발효를 유도하였다. 이를 위해 각종 시료로부터 다양한 젓산균을 순수 분리하여 발효적성을 검토한 결과 최적균주로서 LAB19 균주를 선별하였다. LAB19 균주는 꽃감으로부터 분리하였으며 생리 화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 *Leuconostoc mesenteroides*로 동정되었다. 한방감주에 종배양한 LAB19 균주를 2.5%(v/v) 접종하고 25°C에서 60시간 발효시켰을 때, 한방감주는 141.3 g/L의 환원당과 5.33 g/L의 유기산, 그리고 1.19 g/L의 가용성 페놀을 함유하고 있었다. 당과 유기산 구성을 살펴보면 당의 약 90%는 맥아당이었으며, 유기산의 58%는 젓산이었다. 수용성 phenolics 성분 등에 기인하는 라디칼 소거 활성은 L-ascorbic acid의 92.4% 보다 낮은 76.6-75.7% 범위를 유지하고 있었다.

감사의 글

이 논문은 2006년 산청군에서 시행한 약초연구개발지원사업의 연구비로 연구되었습니다.

문 헌

1. Abee T, Krockel L, Hill C. Bacteriocins: Modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 169-185 (1995)
2. Lidbeck JG, Nord CE. Impact of *Lactobacillus acidophilus* on the normal intestinal flora after administration of two antibiotic agents. *Infection* 16: 329-336 (1987)
3. Reid G, Bruce AW, McGroarty JA, Cheng KJ, Costerton JW. Is there a role for lactobacilli in prevention of urogenital and intestinal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 335-344 (1990)
4. Suzuki Y, Kaizu H. Effect of cultured milk on serum cholesterol concentration in rats which were fed high-cholesterol diets. *Anim. Soc. I. Technol.* 62: 565-567 (1991)
5. Seo JH, Lee H. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 681-687 (2007)
6. Kim SY, Choi EH. Optimization for the lactic acid fermentation of mixed fruit and vegetable juices. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 303-310 (2002)
7. Shin DH. A yogurt like product development from rice by lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 686-690 (1989)
8. Jin HS. Lactic acid fermentation of chestnut broth. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 162-168 (2001)
9. Lee HJ, Jun HJ. A study on the making of *sikhe*. *J. Korean Home Eco. Associ.* 14: 685-693 (1976)
10. Park SI. Application of green tea powder for *sikhe* preparation. *Korean J. Food Nutr.* 19: 227-233 (2006)
11. Ann YG. A study on sugars in Korean sweet rice drink *sikhe* (1). Sugar content and its composition. *Korean J. Food Nutr.* 10: 82-86 (1997)
12. Ann YG. Preparation of traditional malt *sikhe*. Preparation by malt and amylolytic enzymes. *Korean J. Food Nutr.* 12: 164-170 (1999)
13. Cho KM, Seo WT. Bacterial diversity in a Korean traditional soybean fermented foods (*doenjang* and *ganjang*) by 16S rRNA gene sequence analysis. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 320-324 (2007)
14. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428 (1959)
15. Cho KM, Lee JB, Kahng GG, Seo WT. A study on the making of sweet persimmon (*Diospyros kaki*, T) wine. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 785-792 (2006)
16. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16: 144-158 (1965)
17. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 119-200 (1958)
18. Choi C, Kim S, Choi HJ, Woo HS, Lee HD. Traditional andong *sikhe* preparation using lactic acid bacteria and yeast. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 948-956 (1998)
19. Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 135-140 (2004)
20. Lee HB, Kim HJ, Chong MS, Cho HE, Choi YH, Lim KS, Lee KN. Physiological activity of extracts from mixed culture of medical herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermentation. *Korean J. Herbol.* 23: 1-8 (2008)
21. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 80-85 (1995)
22. Park CS. Antioxidative and nitrite scavenging abilities of medicinal plant extracts. *Korean J. Food Preserv.* 12: 631-636 (2005)
23. Park SK, Jeong HJ, Kim HC, Lee SW. Physiological properties of extracts of traditional soybean *doenjang* prepared with Korean herb medicines. *Korean J. Food Preserv.* 13: 241-245 (2005)