

흑미 첨가 막걸리의 항산화 및 발효 특성

김옥선¹ · 박성순² · 성정민^{2*}

¹장안대학교 식품영양과

²한국식품연구원

Antioxidant Activity and Fermentation Characteristics of Traditional Black Rice Wine

Ok-Sun Kim¹, Seong-Soon Park², and Jung-Min Sung^{2*}

¹Dept. of Food Nutrition, Jangan University, Gyeonggi 445-746, Korea

²Korean Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

Abstract

In this study we examined the antioxidant activity and fermentation characteristics of black rice wine. The antioxidant activity of black rice wine was higher than the control, and DPPH radical scavenging activity showed a correlation with the anthocyanin content of rice wine. The pH remarkably decreased until 3 days of fermentation, and the gradually decreased. The reducing sugar and free sugar content reached a maximum at 1 day of fermentation due to enzyme activity. The amount of organic acids, especially lactic acid, increased during the fermentation period. Lactic acid bacteria and yeast count increased with time and amount of black rice. The L color value increased during fermentation regardless of treatments, and the a color value increased with ratio of black rice due to anthocyanin. For this reason, color was given a high score in black rice wine. But overall preference was high in rice wine made with less than 20% of black rice.

Key words: black rice wine, anthocyanin, lactic acid bacteria, organic acid, sensory evaluation

서 론

막걸리는 역사상 가장 오래된 술중에 하나로 맑지 않고 탁하기 때문에 탁주라고 부르기도 한다(1). 막걸리는 주원료가 쌀이며 누룩에 포함된 미생물 중 곰팡이의 효소에 의하여 당화되며 동시에 분해된 당분은 효모가 이용하여 알코올로 전환하는 병행발효주에 해당한다(2). 알코올 농도는 발효 조건에 따라 달라지고 최종 12~15%이며 여기에 물을 첨가하여 6~8%의 알코올 농도를 유지하고 있다(3). 막걸리에는 비타민 B군, 유기산 및 미량의 생리활성물질과 효모가 함유되어 영양적, 기능적 가치가 높으며, 최근에는 막걸리에 대한 혈중지질 감소 효과, 암세포 성장 억제 및 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(4-6). 식생활의 서구화로 전통 발효주의 소비가 감소하였으나, 최근 막걸리의 영양적, 기능적 가치를 인정받아 국내외에서 막걸리의 소비가 증가하여 2010년 막걸리 출고량은 412톤으로 2002년에 131톤보다 314%, 2009년 260톤보다 58.1% 증가한 수준이다. 막걸리 수출량 또한 2009년 7톤에서 2010년 19톤으로 178% 증가하였으며 국가는 일본, 미국, 중국 순으로 우리나라 전통주인

막걸리가 세계적으로 주목 받고 있음을 알 수 있으며 앞으로 성장의 가능성이 높을 것으로 생각되는 바 다양한 종류의 고품질 막걸리 개발이 요구되고 있다(7).

흑미(black rice, BR)는 독특한 향과 색을 갖는 유색미로 단백질, 섬유소 함량이 높고 무기질과 비타민이 풍부하다(8). 흑미에는 anthocyanins 등 색소 성분들을 함유하고 있으며 이들은 α -tocopherol과 유사한 항산화능을 지니고 있다고 보고(9)되었을 뿐만 아니라 혈전 용해 활성, 노화방지 등의 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되었다(10,11). 또한 흑미 미강의 에탄올 추출물과 색소 분획물의 항산화, 항암, 항염증 활성이 백미보다 우수하다고 보고되었다(12). 최근에는 이런 항산화성을 가진 흑미를 이용하여 기능성을 향상시키기 위해 쿠키(13,14), 인절미(12), 배추김치(15) 등에 흑미를 첨가하여 품질 특성 및 항산화에 대한 연구가 이루어 졌다.

이에 본 연구에서는 다양한 기능성 물질을 함유하고 있는 흑미를 활용할 수 있는 연구로 막걸리를 제조하여 항산화성 및 발효 특성 등을 살펴보았다.

*Corresponding author. E-mail: jmsung421@hottmail.com
Phone: 82-31-780-9150, Fax: 82-31-780-9144

Table 1. The mixing ratio of raw ingredients for preparation of black rice wine

Materials	Sample			
	Control	BR-20	BR-40	BR-60
Nuruk (g)	100	100	100	100
Rice (g)	1,000	800	600	400
Black rice (g)	0	200	400	600
Yeast (g)	4	4	4	4
Water (mL)	1,500	1,500	1,500	1,500
Total	2,604	2,604	2,604	2,604

재료 및 방법

막걸리 제조

백미와 흑미는 실온에서 2시간 침지시킨 후 찜통에서 40분간 쪄 다음 상온에서 30분간 뜸을 들여 35°C로 냉각하여 시료로 사용하였다. 대조구는 백미만을 사용하였으며 BR-20, 40, 60 처리구는 전체 쌀 함량의 20, 40, 60%의 흑미를 혼합하여 막걸리를 제조하였다. 누룩, 이스트, 물을 잘 혼합하여 발효하였으며 배합비는 Table 1에 나타내었다. 백미의 품종은 화선찰벼로 강화도에서 재배된 찰쌀을 사용하였으며 흑미는 흑진주벼로 충북 괴산에서 재배된 찰흑미를 사용하였다. 누룩은 서울에 소재한 한국전통주연구소에서 생산된 재래누룩을 이용하였으며, 효모는 시중에 판매하는 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였다. 막걸리 제조에 사용된 발효용기는 10 L 크기의 전통항아리를 사용하였으며, 제조된 막걸리는 18°C에서 저장하면서 발효특성을 살펴보았다.

안토시아닌 함량 측정

안토시아닌 함량은 Jang 등(16)의 방법을 변형하여 막걸리를 용매(에탄올 : 증류수 : HCl = 13:85:2)로 상온에서 1시간 동안 추출하였다. 추출액을 여과하여 암소에서 1시간 동안 방치한 후 파장 530 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음 식으로 총 안토시아닌 함량을 계산하였다.

$$\text{Total anthocyanin (\%)} = A/W \times 100 \times 1/65.1$$

A, absorbance measured at 530 nm; W, weight; 65.1, coefficient of absorption

DPPH 라디칼 소거능 및 환원력 분석

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, D9132, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 라디칼 소거능은 원심분리한 시료의 상등액 0.2 mL와 0.15 mM DPPH 용액 0.8 mL를 혼합하여 실온 암상태에서 30분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정한 다음 시료 첨가구와 대조구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 구하였다. 환원력은 Oyaizu의 방법(17)에 준하여 측정하였다. 시료액 2.5 mL에 sodium phosphate buffer(pH 6.6) 2.65 mL와 1% potassium ferricyanide 2.5 mL를 각각 혼합하였다. 이 혼합물을 50°C water bath에서 20분 반응시킨 다음 10% trichloroacetic acid 2.5

mL를 첨가하여 반응액을 원심분리 하였다. 상등액 5 mL와 혼합한 다음 0.1% ferric chloride 1 mL 첨가하고 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 나타내었다. 환원력은 흡광도의 값으로 나타내었다.

pH 및 산도 측정

pH는 시료를 원심분리 하여 상등액을 pH meter(AB 15, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)로 측정하였다. 총산 함량은 원심분리한 시료의 상등액 10 mL를 취하여 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 pH 8.3이 될 때까지 중화 적정한 후 환산계수가 0.009인 젓산 함량(%)으로 나타내었다.

유리당 함량 분석

유리당 함량은 시료를 0.45 µm syringe filter(Xpertek, Rivonia, ZAF)로 여과하여 HPLC에 주입하여 분석하였다. 이때 표준물질은 fructose, glucose 및 sucrose, maltose (Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. HPLC 조건은 Table 2와 같다.

유기산 함량 분석

유기산은 김치 여과액 2 mL에 증류수 20 mL와 vortex mixer(VXR B, Janke & Kunkel, Rio de Janeiro, Brasil)로 혼합한 후 원심분리기(Centrikon T-324, Kontron Instruments, Milano, Italy)를 이용하여 8,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 0.45 µm filter로 여과한 후 적당히 희석하여 HPLC에 주입하여 분석하였다. 이때 표준물질은 citric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid 및 acetic acid(Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. Column은 Aminoex HPX-87H(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였고, solvent는 0.025 M H₂SO₄를 사용하였으며 flow rate는 0.6 mL/min이었다. UV 조건은 210 nm, injection volume은 20 µL였다(18).

미생물수 측정

무균적으로 시료를 10 g을 취한 후 멸균된 0.85% saline 용액으로 10배 희석하여 stomacher(Bagmixer R400, Interscience, Saint Nom, France)로 균질화 한 후 단계 희석하여 실험을 실시하였다. 시험용액 및 각 단계 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시에 무균적으로 취하여 agar를 약 15 mL를 분주하여 pouring culture method로 접종한 다음 일반세균과 젓산균은 37°C에서 48시간 배양하며 대장균은 37°C에서

Table 2. HPLC conditions for free sugar analysis

Instrument	PU 980 (Jasco, Tokyo, Japan)
Solvent	Acetonitrile : Water = 87:13 (v/v)
Flow rate	1.2 mL/min
Detector	RI detector (830-RI, Jasco)
Oven temperature	39°C
Column	Carbohydrate analysis (Waters, Milford, MA, USA) 3.9×300 mm, 10 µm
Injection volume	20 µL

24시간 배양한 후 colony 수를 측정하여 colony forming unit(CFU/g)으로 표시하였다. 사용한 배지는 효모 및 곰팡이는 potato dextrose agar(Difco, Detroit, MI, USA), 젖산균은 MRS agar(Difco)였다.

색도 측정

색도는 표준백판(L=97.75, a=-0.49, b=1.96)으로 보정된 색도계(CR-200, Minolta Co., Osaka, Japan)를 사용하여 측정하였다. Hunter 색채계인 L, a 및 b 값을 측정하였으며 ΔE 값은 아래의 식을 이용하여 산출하였다(14).

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$$

관능평가 및 통계처리

관능평가는 흑미를 0%(대조군), 20%, 40%, 60%를 각각 첨가한 막걸리의 관능성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 외관(appearance), 향미(flavor), 맛(taste), 종합적 기호도(overall acceptability)에 대하여 최저 1점, 최고 9점으로 9단계 기호도 척도법으로 실시하였다. 관능검사원은 다양한 기호도를 평가하기 위하여 한국식품연구원 직원 15명을 대상으로 실시하였다. 결과의 유의성 검증은 SAS version 8.01 (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA)을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 하였으며 각 처리구간 유의성은 Duncan's multiple range test 방법을 사용하여 0.05% 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

안토시아닌 함량과 DPPH 라디칼 소거능 및 환원력

발효기간 동안 항산화 성분인 안토시아닌 함량은 Fig. 1과 같다. 초기의 안토시아닌 함량은 0.00~23.71 mg/mL로 흑미 함량이 높을수록 유의적으로 증가하였다. 안토시아닌은 수용성 색소로서 플라보노이드 계통으로 자색, 적색, 청색 등을 나타내며 C₆-C₃-C₆의 기본구조를 갖고 수산기의 수, 위치, 메틸화에 따라 다양한 종류가 자연계에 존재한다. 식품 등의 색 등 관능적 특성뿐만 아니라 항산화 활성, 항균 활성, 항변이원성, 혈전 용해 활성, 노화 방지 효과 등 다양한 생리

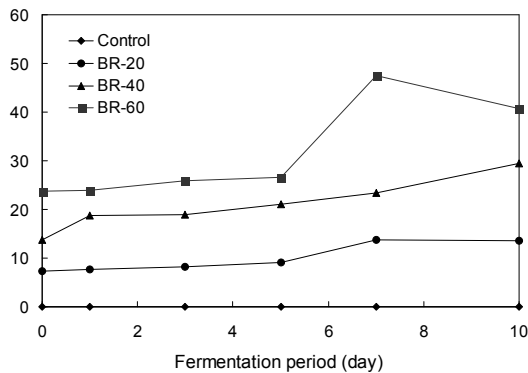


Fig. 1. Total anthocyanin of black rice wine during fermentation.

활성이 있는 것으로 보고되었다(12,19,20). 흑미의 안토시아닌은 쌀겨층에 존재하며 95% 이상이 cyanidin-3-glucoside와 같은 배당체를 주성분으로 구성되어 있다(12,21,22). 항산화 성분 분석 결과, 발효기간 동안 흑미 첨가구의 안토시아닌 함량은 증가하는 경향을 나타내었다. 흑미 첨가구의 안토시아닌 함량을 분석한 결과, 발효 10일째 13.52~40.71 mg/mL로 초기에 비해 약 171~213% 수준이었는데 이는 발효가 진행되면서 생성된 알코올에 의해 안토시아닌이 추출되었기 때문으로 사료된다. 추출용매별 복분자의 페놀성 화합물에 대한 연구에서 총 페놀성 화합물 함량은 물추출에 비해 에탄올 추출에서 높은 함량을 나타내었으며 DPPH 라디칼 소거능도 에탄올 추출에서 높았다고 보고하였다(23). DPPH 라디칼은 항산화 물질의 전자공여능에 의하여 수소 혹은 전자를 받아 짙은 자색이 탈색된다. DPPH 라디칼 소거능 결과 5.64~57.50%로 나타났으며 흑미 첨가량이 증가할수록 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였다(Fig. 2). 이는 흑미에 있는 안토시아닌이 강력한 항산화 성분이기 때문이며 발효기간 동안에도 소거능이 증가하는 경향을 보여 안토시아닌과 함량이 증가하는 경향과 일치하였다. 막걸리의 항산화 성분은 4-hydroxybenzaldehyde, 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol, trans-ferulic acid, cis-ferulic acid 1H-indole-3-ethanol, dimethyl succinate, succinic acid 그리고 mono-methyl succinate로 동정되었으며 이들 성분 중에는 쌀에 함유된 페놀 화합물 성분뿐만 아니라 미생물의 대사산물로 생성되는 것들도 있다(24). 환원력은 자유 라디칼의 발생을 차단시킬 수

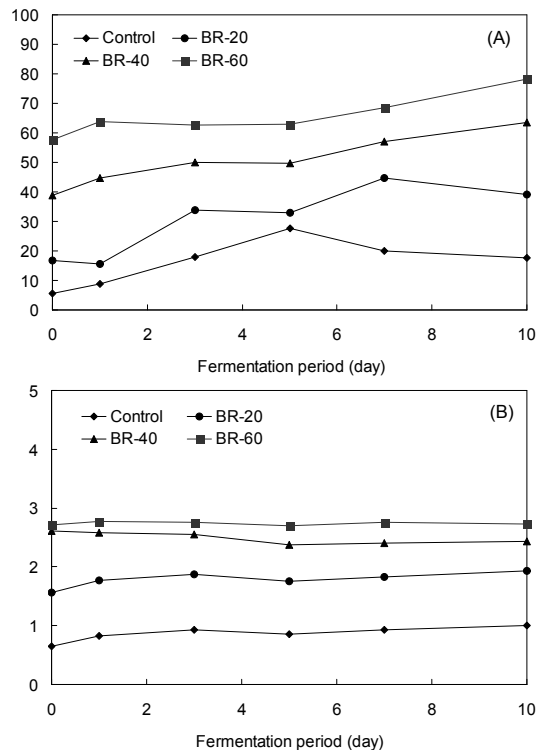


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity (A) and reducing power (B) of black rice wine during fermentation.

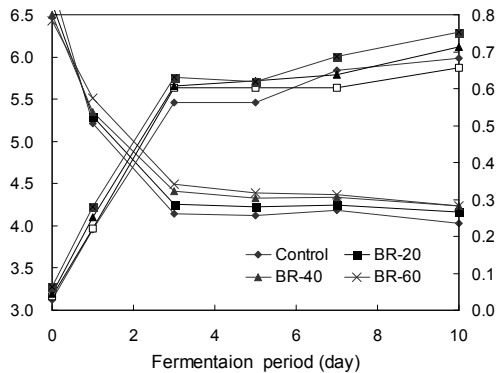


Fig. 3. pH and acidity of black rice wine during fermentation.

있는 능력으로 reduction이 제공하는 수소원자가 자유 라디칼 사슬을 분해함으로써 항산화 능력을 나타내며(25) 환원력 분석 결과, 흑미 첨가량이 높을수록 높게 나타났으며 발효 동안은 큰 변화를 나타내지 않았다(Fig. 2).

pH 및 산도

발효 동안 흑미 첨가 막걸리의 pH와 산도는 Fig. 3에 나타내었다. 담금 직후 pH는 6.42~6.86으로 흑미를 첨가하지 않은 대조구의 pH가 가장 높았고 흑미 첨가량이 많을수록 낮아지는 경향을 보였다. 저장 3일까지는 급격히 낮아지는 경향을 보였으며 최종 pH는 4.03~4.23 수준으로 나타났다. pH는 발효진행 상황과 알코올을 생성 정도를 짐작할 수 있는 중요한 지표가 된다(26). 주세법상의 막걸리의 pH 범위는 3.8~4.7로 본 연구에서 발효 10일째까지 적합한 pH 규격 범위에 속함을 알 수 있었다(27). 누룩을 사용하여 제조되어지는 막걸리의 경우, pH가 발효 동안 3.4~4.5 수준으로 낮아지는 이유는 발효 동안 미생물이 증식하면서 만들어 내는 유기산 때문이다(28). 발효 동안 막걸리의 산도를 측정한 결과, 초기에 0.03~0.06% 수준으로 낮은 값을 나타내었으며 pH와 반대 경향으로 흑미 첨가량이 많을수록 산도가 높았다. 발효 3일째까지 급격히 증가하는 경향을 보였으며 그 이후 완만히 증가하였다.

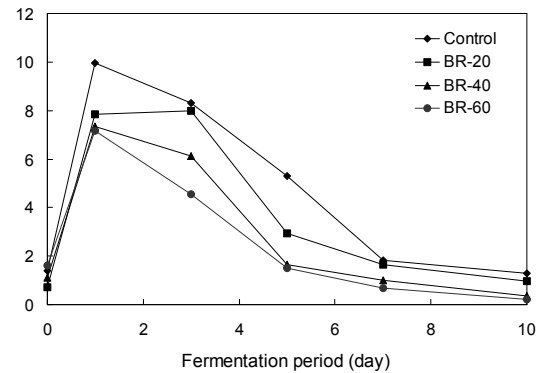


Fig. 4. Reducing sugar of black rice wine during fermentation.

환원당과 유리당

발효기간에 따른 환원당의 변화는 Fig. 4에 나타내었다. 환원당은 저장 1일째 7.17~9.97% 수준으로 최대값을 나타냈고 그 이후 급격히 감소하여 저장 10일째는 초기와 비슷한 수준으로 감소되었다. 처리구별 환원당 변화는 저장 1일째 대조구가 가장 높았으며 흑미 함량이 높을수록 낮아지는 경향을 보였다. 유리당의 변화 결과는 Table 3에 나타내었다. Glucose와 maltose 함량은 초기에는 0.89~1.24% 및 0.89~1.59%로 비슷한 수준을 나타내었으나 저장 1일째 각각 1.05~1.70% 및 8.31~12.99%로 최고 수준에 도달하였다. 발효가 진행되면서 생성된 유리당 성분 중 대부분은 glucose와 maltose로 나타났는데 이는 누룩 중 곰팡이인 *Rhizopus*와 *Aspergillus*에 의해 생성된 당화 효소인 α -amylase와 glucoamylase가 관여하기 때문으로 판단된다(29). 유리당 중 maltose가 glucose 함량에 비해 높게 나타났는데 Kim 등(30)의 연구에서도 발효시간이 진행되면서 유리당 함량은 증가하였으며 maltose가 glucose 함량에 비해 높다고 보고하였다. 저장 7일째부터는 maltose는 거의 검출되지 않았으며 glucose 함량이 높았다. 발효기간 동안 유리당 함량은 환원당과 마찬가지로 흑미 함량이 많을수록 낮았다. 이는 흑미가 일반 백미와 달리 길쭉질만 제거되어 현미상태로 도정되기 때문에 성분 중 식이 섬유소가 백미에 비해 높아 당화 효소 작용이 다소 낮았을 것으로 판단된다(31). 발효 초기 당 함량

Table 3. Free sugars of black rice wine during fermentation

(Unit: %)

Treatments ¹⁾	Fermentation period (day)						
	0	1	3	5	7	10	
Glucose	Control	1.14±0.01 ^{2) bB3)}	1.70±0.08 ^{aA}	0.57±0.03 ^{bDE}	0.63±0.09 ^{CD}	0.70±0.06 ^{aC}	0.53±0.00 ^{aE}
	BR-20	0.89±0.00 ^{cB}	1.05±0.20 ^{cA}	0.47±0.01 ^{cCD}	0.59±0.05 ^C	0.36±0.00 ^{bcDE}	0.36±0.00 ^{bE}
	BR-40	0.91±0.02 ^{cB}	1.33±0.01 ^{bA}	0.59±0.05 ^{bc}	0.49±0.09 ^D	0.43±0.09 ^{BD}	0.20±0.03 ^{bE}
	BR-60	1.24±0.09 ^{aB}	1.70±0.00 ^{aA}	0.77±0.04 ^{aC}	0.43±0.00 ^D	0.34±0.04 ^{cE}	0.22±0.01 ^{bF}
Maltose	Control	1.59±0.08 ^{aD}	12.99±0.52 ^{bA}	12.19±0.38 ^{aB}	3.32±0.35 ^{aC}	0.20±0.01 ^E	—
	BR-20	1.36±0.00 ^{bC}	14.06±0.66 ^{aA}	9.76±0.07 ^{bB}	1.13±0.04 ^{bC}	—	—
	BR-40	0.89±0.04 ^{dC}	12.54±0.72 ^{bA}	6.34±0.46 ^{cB}	0.28±0.09 ^{cD}	—	—
	BR-60	1.12±0.21 ^{cC}	8.31±0.07 ^{cA}	3.72±0.08 ^{dB}	0.10±0.06 ^{cD}	—	—

¹⁾See Table 1.

²⁾Average±standard deviation of triplicate determinations.

³⁾Means with different letters in a row (A-F) and a column (a-d) are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 4. Organic acids of black rice wine during fermentation (Unit: mg/mL)

Treatments ¹⁾	Fermentation period (day)						
	0	1	3	5	7	10	
Citric acid	Control	0.13±0.00 ^{2)aB3)}	0.18±0.01 ^{cB}	0.10±0.01 ^{dB}	0.11±0.01 ^B	0.14±0.01 ^{cB}	0.31±0.13 ^{bA}
	BR-20	0.21±0.01 ^{bD}	0.75±0.03 ^{bA}	0.27±0.00 ^{cD}	0.36±0.04 ^{BC}	0.41±0.00 ^{bB}	0.37±0.12 ^{bB}
	BR-40	0.37±0.03 ^{cD}	0.79±0.05 ^{bA}	0.42±0.03 ^{bCD}	0.38±0.02 ^D	0.46±0.03 ^{bC}	0.59±0.05 ^{ab}
	BR-60	0.46±0.08 ^{dC}	0.91±0.03 ^{aA}	0.62±0.02 ^{aB}	0.49±0.01 ^C	0.64±0.05 ^{aB}	0.60±0.02 ^{aB}
Malic acid	Control	0.11±0.02 ^{bD}	0.11±0.03 ^{abD}	0.18±0.02 ^C	0.30±0.05 ^B	0.31±0.01 ^{cB}	0.40±0.03 ^{bA}
	BR-20	0.11±0.01 ^{bc}	0.17±0.02 ^{aC}	0.16±0.02 ^C	0.33±0.05 ^B	0.42±0.00 ^{bA}	0.43±0.10 ^{bA}
	BR-40	0.18±0.00 ^{aD}	0.07±0.02 ^{bE}	0.23±0.03 ^{CD}	0.29±0.03 ^C	0.40±0.06 ^{bB}	0.56±0.07 ^{aA}
	BR-60	0.09±0.01 ^{bD}	0.07±0.06 ^{bD}	0.33±0.03 ^C	0.35±0.01 ^C	0.63±0.05 ^{aA}	0.49±0.00 ^{abB}
Succinic acid	Control	0.22±0.01 ^{dF}	0.67±0.03 ^{cE}	0.95±0.03 ^{cD}	1.44±0.00 ^C	2.36±0.00 ^{bB}	2.66±0.06 ^{cA}
	BR-20	0.29±0.01 ^{cF}	0.75±0.01 ^{bE}	0.91±0.04 ^{cD}	1.50±0.02 ^C	2.55±0.05 ^{aB}	2.89±0.03 ^{bA}
	BR-40	0.38±0.01 ^{bF}	0.74±0.01 ^{bE}	1.29±0.06 ^{bD}	2.00±0.06 ^C	2.32±0.00 ^{bB}	3.11±0.01 ^{aA}
	BR-60	0.46±0.03 ^{aE}	1.14±0.04 ^{aD}	1.65±0.06 ^{aC}	1.90±0.02 ^B	2.73±0.20 ^{aA}	2.69±0.12 ^{cA}
Lactic acid	Control	0.17±0.01 ^{abF}	0.46±0.01 ^{bE}	2.10±0.15 ^{cD}	2.59±0.31 ^C	3.43±0.13 ^{cB}	4.75±0.10 ^{bA}
	BR-20	0.18±0.02 ^{aD}	0.28±0.00 ^{dD}	2.47±0.09 ^{cC}	4.19±0.70 ^B	4.89±0.13 ^{bA}	4.82±0.03 ^{bA}
	BR-40	0.15±0.01 ^{bE}	0.37±0.02 ^{cD}	3.45±0.05 ^{bC}	5.40±0.09 ^B	5.35±0.22 ^{bB}	5.77±0.04 ^{aA}
	BR-60	0.12±0.01 ^{cC}	0.52±0.04 ^{aC}	4.01±0.14 ^{aB}	5.41±0.35 ^A	5.86±0.41 ^{aA}	5.74±0.34 ^{aA}
Acetic acid	Control	0.56±0.02 ^{aC}	0.61±0.05 ^{aBC}	0.61±0.02 ^{BC}	0.63±0.04 ^{bB}	0.65±0.01 ^{cB}	0.80±0.02 ^{bA}
	BR-20	0.44±0.01 ^{bD}	0.42±0.01 ^{bcD}	0.61±0.02 ^C	0.82±0.06 ^{aA}	0.72±0.01 ^{bcB}	0.73±0.02 ^{cB}
	BR-40	0.34±0.01 ^{bc}	0.38±0.05 ^{cC}	0.88±0.04 ^B	0.88±0.01 ^{ab}	0.95±0.05 ^{aA}	0.83±0.00 ^{ab}
	BR-60	0.41±0.03 ^{dB}	0.49±0.07 ^{bB}	0.80±0.10 ^A	0.78±0.07 ^{abA}	0.80±0.07 ^{bA}	0.73±0.01 ^{cA}

¹⁾See Table 1.

²⁾Average±standard deviation of triplicate determinations.

³⁾Means with different letters in a row (A-E) and a column (a-d) are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

이 증가한 것은 효모에 의한 알코올 발효과정보다 전분의 당화효소에 의한 활성이 높았을 것으로 생각된다. 발효 중 효모나 젖산균의 영양원 및 발효 기질로 이용되어 발효가 진행됨에 따라 감소한 것으로 추측된다.

유기산 함량

흑미를 첨가한 막걸리의 발효기간 동안 유기산 함량의 변화는 Table 4에 나타내었다. 발효기간 동안 lactic acid 함량은 초기 0.12~0.18 mg/mL 수준에서 발효 10일째 2.66~3.11 mg/mL 수준으로 유기산들 중 가장 많은 증가를 보였다. Lactic acid는 저장 3일째 급격히 증가하여 2.10~4.01 mg/mL로 총 유기산의 60.07~65.00% 수준이었으며 그 후에도 완만히 증가하는 경향을 나타내었다. Lee 등(32)과 Choi 등(33)의 연구에서도 lactic acid의 함량이 가장 높았다고 보고하였다. Citric acid의 함량은 발효 1일째 증가하였으나 3일째부터 초기와 비슷한 수준으로 유지되었으며 흑미의 함량이 높을수록 citric acid의 함량이 높게 나타났다. Malic acid 함량은 발효 초기 0.09~0.18 mg/mL이며 저장기간 동안 증가하는 경향을 나타내었다. 저장 10일째 흑미를 첨가한 막걸리의 malic acid의 함량은 0.43~0.56 mg/mL로 대조구 0.40 mg/mL보다 높았다. Succinic acid 함량 또한 저장기간 동안 증가하였으며 lactic acid와 함께 막걸리의 주 유기산인 것으로 분석되었다. 발효 7일째 succinic acid 함량은 2.32~2.73 mg/mL로 초기에 비해 6~10배 정도 증가하는 경향을 나타내었다. 유기산은 술에서 신맛을 내는 성분으로 소량 존재할

경우 막걸리의 맛과 향을 높이는 역할을 하지만 acetic acid 함량이 다량 존재할 경우 알코올 성분의 산화로 인해 초산발효단계로 진행되기 때문에 주질을 저하시키는 요인이 된다(33,34). 본 연구에서 acetic acid 함량은 발효 동안 저장 7일째 0.65~0.95 mg/mL 수준에 도달하였다. 시중에 판매하는 탁주의 유기산을 분석한 결과, acetic acid의 함량이 19.8~190.9 mg% 수준으로(35) 본 연구에서 제조한 막걸리와 비슷한 결과를 나타내어 품질에 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

미생물

흑미를 첨가한 막걸리의 발효기간 동안 효모와 젖산균의 변화는 Table 5에 나타내었다. 초기 효모는 6.85~6.95 log CFU/g이며 발효 3일째 7.68~7.83 log CFU/g으로 증가하였으며 그 이후 비슷한 수준을 유지하였다. Lee 등의 연구(32)에서도 4일째부터 효모의 수가 급격하게 증가하여 본 연구의 결과와 일치하였다. 젖산균수는 초기 5.69~5.78 log cfu/g 수준으로 발효 3일째 초기에 비해 2 log scale 수준 증가한 7.32~7.78 log CFU/g으로 최대에 달하였으며 그 이후 감소하였다. 흑미를 첨가할수록 젖산균수 또한 증가하였으며 이는 젖산 함량이 대조구에 비해 흑미 첨가구에서 높게 나타나 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 발효 초기에는 누룩에서 유래한 일반세균, 곰팡이 및 효모가 공생관계에 있다가 젖산균의 생육으로 인하여 젖산이 생성됨으로써 환경이 산성화되고, 이에 따라 효모만이 폭발적으로 증가하는

Table 5. Microorganism of black rice wine during fermentation

(Unit: CFU/g)

Treatments ¹⁾	Fermentation period (day)						
	0	1	3	5	7	10	
Yeast	Control	6.91±0.03 ^{2)abB3)}	6.87±0.02 ^{cB}	7.76±0.14 ^A	7.68±0.03 ^{bA}	7.68±0.09 ^{bA}	7.75±0.01 ^{aA}
	BR-20	6.85±0.00 ^{bE}	7.06±0.02 ^{aD}	7.79±0.08 ^A	7.74±0.03 ^{bAB}	7.67±0.03 ^{bB}	7.40±0.03 ^{bC}
	BR-40	6.97±0.04 ^{aD}	6.96±0.05 ^{bcD}	7.67±0.09 ^{BC}	7.92±0.02 ^{aA}	7.80±0.03 ^{aAB}	7.63±0.08 ^{aC}
	BR-60	6.95±0.00 ^{aE}	6.98±0.03 ^{abE}	7.83±0.08 ^B	7.95±0.06 ^{aA}	7.70±0.04 ^{aC}	7.48±0.02 ^{bD}
Lactic acid bacteria	Control	5.69±0.03 ^E	6.59±0.10 ^C	7.32±0.01 ^{cA}	7.00±0.01 ^{dB}	6.59±0.02 ^{cC}	6.28±0.03 ^{bD}
	BR-20	5.73±0.01 ^E	6.24±0.02 ^D	7.39±0.01 ^{bA}	7.07±0.00 ^{cB}	6.79±0.04 ^{bC}	6.24±0.04 ^{bD}
	BR-40	5.78±0.10 ^E	6.59±0.05 ^D	7.79±0.02 ^{aA}	7.18±0.02 ^{bB}	6.93±0.03 ^{aC}	6.68±0.01 ^{aD}
	BR-60	5.78±0.06 ^D	6.55±0.66 ^C	7.78±0.03 ^{aA}	7.35±0.01 ^{aAB}	6.98±0.01 ^{aBC}	6.66±0.07 ^a

¹⁾See Table 1.²⁾Average±standard deviation of triplicate determinations.³⁾Means with different letters in a row (A-E) and a column (a-d) are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

것으로 보고되었다(36).

색도

흑미를 첨가한 막걸리의 발효기간 동안 색도 변화는 Table 6과 같다. 대조구의 경우 L값, a값 및 b값은 각각 58.82, 1.30과 5.72로 나타났으나 흑미를 첨가한 경우 안토시아닌의 붉은 색소로 인해 a값은 증가하였으며 L값과 b값은 감소하였다. L값은 모든 처리구에서 발효기간 동안 증가하는 경향을 나타냈다. a값은 대조구는 감소하는 경향은 나타낸 반면 흑미 첨가구는 증가하는 경향을 보였다. 이는 흑미 첨가 막걸리의 발효 중 안토시아닌 색소가 증가하는 경향과 일치하였다. b값은 대조구가 흑미 첨가구에 비해 유의적으로 높았으며 발효 동안 증가하였는데 이는 쌀의 카로티노이드 색소 추출에 기인한 것으로 생각된다.

관능검사

흑미를 첨가한 막걸리의 관능검사는 Table 7에 나타내었다. 외관은 흑미를 첨가할수록 높았으며 안토시아닌 함량이 관능에 영향을 미친 것으로 사료된다. 향미는 대조구와 20% 흑미 첨가구가 비슷한 평가를 받았으며 20% 이상의 흑미 첨가는 향미 기호도에 좋지 못한 영향을 끼쳤다. 단맛 또한 40%, 60% 흑미 첨가구에 비해 대조구와 20% 첨가구가 높게 나타났다. 이는 흑미 첨가구에 비해 대조구의 유리당 함량이 높은 결과와 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 전반적인 기호도는 20% 흑미 첨가구가 가장 높은 결과를 나타내었다.

요약

본 연구는 흑미를 첨가하여 막걸리를 제조하여 항산화 및 발효특성을 살펴보았다. 항산화 활성은 대조구에 비해 흑미

Table 6. Color values of black rice wine during fermentation

Treatments ¹⁾	Fermentation period (day)						
	0	1	3	5	7	10	
L	Control	58.82±0.22 ^{2)aC3)}	59.52±0.38 ^{aC}	62.02±0.77 ^{aB}	62.84±0.63 ^{aAB}	63.51±0.86 ^{aA}	63.42±0.53 ^{aA}
	BR-20	46.32±4.69 ^{bB}	45.88±0.58 ^{bB}	47.81±1.75 ^{bAB}	49.76±1.37 ^{bAB}	51.22±1.06 ^{bA}	51.66±0.14 ^{bA}
	BR-40	42.70±2.52 ^{bB}	42.82±0.72 ^{bB}	44.78±1.19 ^{bAB}	46.17±1.64 ^{cA}	45.79±1.22 ^{cAB}	46.69±1.82 ^{cA}
	BR-60	41.35±1.79 ^{bB}	42.10±1.94 ^{cAB}	44.52±3.50 ^{bAB}	43.96±0.89 ^{cAB}	43.34±1.21 ^{dAB}	45.64±2.13 ^{cA}
a	Control	1.03±0.03 ^{bA}	1.16±0.01 ^{cA}	0.55±0.09 ^{bB}	0.19±0.11 ^{bC}	0.22±0.15 ^{cC}	0.13±0.16 ^{bC}
	BR-20	4.27±0.83 ^a	4.96±4.05 ^a	6.10±0.27 ^a	7.41±1.07 ^a	7.63±0.99 ^a	7.76±0.8 ^a
	BR-40	4.00±0.44 ^{aC}	5.73±0.15 ^{abB}	7.92±0.53 ^{aA}	7.36±0.73 ^{aA}	7.74±0.83 ^{bA}	7.79±0.82 ^{aA}
	BR-60	3.55±0.26 ^{aD}	5.42±0.46 ^{bC}	6.69±1.17 ^{aBC}	7.17±0.59 ^{aAB}	7.39±0.36 ^{bAB}	8.34±1.21 ^{aA}
b	Control	5.72±0.59 ^a	5.73±0.64 ^a	5.99±1.26 ^a	6.22±0.84 ^a	5.45±0.92 ^a	6.21±0.84 ^a
	BR-20	-0.45±0.31 ^{bE}	-0.08±0.11 ^{bDE}	0.56±0.40 ^{bBC}	1.09±0.47 ^{bCD}	1.56±0.44 ^{bAB}	2.06±0.41 ^{bA}
	BR-40	-1.53±0.08 ^{cC}	-1.14±0.01 ^{cC}	0.27±0.47 ^{bcAB}	-0.44±0.19 ^{bB}	-0.29±0.27 ^{cAB}	0.07±0.23 ^{cA}
	BR-60	-1.92±0.05 ^{cD}	-1.39±0.10 ^{cC}	-1.17±0.20 ^{cBC}	-0.95±0.12 ^{cB}	-0.93±0.04 ^{cB}	-0.06±0.41 ^{cA}
ΔE	Control	0.48±0.24 ^{bC}	0.85±0.47 ^{cC}	3.39±0.86 ^{bB}	4.18±0.71 ^{cAB}	4.83±0.86 ^{dA}	4.77±0.46 ^{cA}
	BR-20	14.48±3.97 ^{aAB}	15.06±0.56 ^{bA}	13.77±1.72 ^{aAB}	12.17±1.35 ^{bABC}	11.00±1.05 ^{bBC}	9.49±1.29 ^{bC}
	BR-40	17.95±2.30 ^{aAB}	18.04±0.68 ^{aB}	16.76±1.07 ^{aAB}	15.45±1.54 ^{aAB}	15.86±1.24 ^{bAB}	15.01±1.73 ^{aB}
	BR-60	19.25±1.64 ^a	18.71±1.79 ^a	16.92±3.22 ^a	17.41±0.92 ^a	18.02±1.14 ^a	16.18±2.11 ^a

¹⁾See Table 1.²⁾Average±standard deviation of triplicate determinations.³⁾Means with different letters in a row (A-E) and a column (a-d) are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 7. Sensory evaluation of black rice wine during fermentation

Treatments ¹⁾	Control	BR-20	BR-40	BR-60
Appearance	5.93±1.69 ²⁾	6.00±1.62	6.79±1.19	6.93±1.38
Flavor	6.71±1.44	6.14±1.70	6.79±1.31	6.14±1.51
Sweet taste	6.58±1.51 ^{A3)}	6.58±1.16 ^A	5.58±1.78 ^{BC}	4.92±1.44 ^C
Sour taste	5.79±1.72	5.50±2.03	6.00±1.66	6.07±1.73
Bitter taste	5.64±2.31	5.36±2.10	5.71±1.77	5.36±2.17
Overall acceptance	6.27±1.42	6.64±1.12	5.73±1.68	5.73±1.27

¹⁾See Table 1.

²⁾Average±standard deviation of triplicate determinations.

³⁾Means with different letters in a row (A-C) is significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

첨가구가 높았으며 특히 DPPH 라디칼 소거능은 안토시아닌 함량과 비례하였다. 발효 3일째, pH는 급격히 감소하였으며 대조구에 비해 흑미 첨가구가 낮았다. 환원당과 유리당은 1일째 급격히 증가하였다가 그 이후 감소하는 경향을 나타내었는데 이는 발효 초기에 당화 효소 활성으로 쌀의 전분이 glucose와 maltose 등으로 분해되기 때문이다. 모든 유기산은 발효 동안 증가하였으며 lactic acid가 가장 높은 증가율을 나타내었다. 발효 동안 흑미 첨가 막걸리의 lactic acid와 succinic acid는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다. 발효 초기 젖산균수가 증가하여 3일째 최대에 달하였으며 이는 lactic acid가 급증한 시기와 일치하였다. 또한 흑미 첨가량이 많을수록 젖산균수가 높았다. 색도는 흑미의 붉은색의 영향으로 대조구에 비해 흑미 첨가구의 a값이 높았다. 관능 검사 결과 외관은 흑미 첨가구가 높은 점수를 받았으나 전체적으로 단맛과 신맛의 영향을 받아 대조구와 20% 첨가구를 선호하는 것으로 나타났다. 흑미를 첨가할수록 항산화 성분은 증가하나 관능평가 결과로 보았을 때 흑미는 20% 수준 첨가하는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

문 헌

- Song JC, Park HJ. 2003. Takju brewing using the uncooked germed brown rice at second stage mash. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 847-854.
- Rhee SJ, Lee CYJ, Kim KK, Lee CH. 2003. Comparison of the traditional (*Samhaejju*) and industrial (*Chongju*) rice wine brewing in Korea. *Korean J Food Sci Technol* 12: 242-247.
- Kwon RH, Chae GY, Ha BJ. 2011. The effects of the Makgeolri on the antioxidant activity in the endotoxin LPS-treated rats. *J Fd Hyg Safety* 26: 166-170.
- Kim MH, Kim WH, Bae SJ. 2001. The effects of *Makkoli* on serum lipid concentration in male rats. *J Nat Sci Silla Univ* 9: 73-84.
- Shin MO, Kang DY, Kim MH, Bae SJ. 2008. Effect of growth inhibition and quinone reductase activity stimulation of *Makgeoly* fractions in various cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 288-293.
- Wang SJ, Lee HJ, Cho JT, Jang MY, Park KH, Moon JH. 2012. Inhibition effect against the rat blood plasma oxidation of the *makgeolli* (*takju*) Korean rice wine. *Korean J Food Preserv* 19: 116-122.
- NTS. 2011. *Alcoholic liquors factory trends*. National Tax Service, Seoul, Korea.
- Defa G, Xu M. 1992. A study on special nutrient of purple glutinous rice. *Scientia Agric Sinica* 25: 36-41.
- Wang H, Cao G, Prior RL. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem* 45: 304-309.
- Fardet A, Rock E, Remesy C. 2008. Is the *in vitro* antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected *in vivo*? *J Cereal Sci* 48: 258-276.
- Park YS, Kim SJ, Chang HI. 2008. Isolation of anthocyanin from black rice (*Heugjinjubyeo*) and screening of its anti-oxidant activities. *Korean J Microbiol Biotechnol* 36: 55-60.
- Cho JA, Cho HJ. 2000. Quality properties of *Injulmi* made with black rice. *Korean J Soc Food Sci* 16: 226-231.
- Moon BK, Kim EA, Park MS, Lee DK, Lee MS, Choi BR. 2007. Quality characteristics of cookies with black rice powder. *J Hum Ecol* 26: 21-28.
- Joo SY, Choi HY. 2012. Antioxidant activity and quality characteristics of black rice bran cookies. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 182-191.
- Mo EK, Kim SM, Yang SA, Jegal SA, Choi YS, Ly SY, Sung CK. 2010. Properties of *baechu kimchi* treated with black rice water extract. *Korean J Food Preserv* 17: 50-57.
- Jang KI, Lee JH, Kim KY, Jeong HS, Lee HB. 2006. Quality of stored grape (*Vitis labruscana*) treated with ethylene-adsorbent and activated charcoal. *J. Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1237-1244.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
- Sung JM, Lim JH, Park KJ, Jeong JW. 2008. Effects of semi-dried red pepper with a different seed ratio on the quality of Kimchi. *Korean J Food Preserv* 15: 427-436.
- Nam SH, Kang MY. 1998. Comparison of inhibitory effect of rice bran-extracts of the colored rice cultivars on carcinogenesis. *Agric Chem Biotechnol* 41: 78-83.
- Ichkawa H, Ichianagi T, Xu B, Yoshii Y, Nakajima M, Konishi T. 2001. Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. *J Med Food* 4: 211-218.
- Lee JC, Kim JD, Hsieh FH, Eun JB. 2008. Producing of black rice cake using ground black rice and medium-grain brown rice. *Int J Food Sci Technol* 43: 1078-1082.
- Im JS, Lee YT. 2010. Quality characteristics of rice bread substituted with black rice flour. *J East Asia Soc Dietary Life* 20: 903-908.
- Lee SM, You Y, Kim K, Park J, Jeong C, Jhon DY, Jun W. 2012. Antioxidant activities of native Gwangyang *Rubus coreanus* Miq. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 327-332.
- Wang SJ, Lee HJ, Cho JY, Park KH, Moon JH. 2012. Isolation and identification of antioxidants from *makgeolli*. *Korean J Food Sci Technol* 44: 14-20.
- Gordon MF. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In *Food Antioxidants*. Hudson BJJF, ed. Elsevier

- Applied Science, London, UK. p 1-18.
26. Song JC, Park HJ, Shin WC. 1997. Changes of *Takju* qualities by addition of cyclodextrin during the brewing and aging. *Korean J Food Sci Technol* 29: 895-900.
 27. Lee SB, Ko GH, Yang JY, Oh SH. 2001. *Food fermentation*. Hyoil Publishing Co, Seoul, Korea. p 217-218.
 28. Lee SJ, Kwon YH, Kim HR, Ahn BH. 2007. Chemical and sensory characterization of Korean commercial rice wines (*yakju*). *Food Sci Biotechnol* 16: 374-380.
 29. Cho GY, Lee CW. 1997. Isolation and identification of the fungi from *Nuruk*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 759-766.
 30. Kim SC, Kim HS, Kang YJ. 1999. Changes of components in the rice-porridge fermented by *nuruk*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 1017-1021.
 31. Chang JO, Ryu HJ, Othani KK, Lee OK. 2001. Non-starch polysaccharides of cell walls in glutinous rice, rice and black rice. *J Korean Home Economics Association* 39: 91-102.
 32. Lee TJ, Hwang DY, Lee CY, Son HJ. 2009. Changes in yeast cell number, total acid and organic acid during production and distribution processes of *makgeolli*, traditional alcohol of Korea. *Korean J Microbiol* 45: 391-396.
 33. Choi SH, Kim OK, Lee MW. 1992. A study on the gas chromatographic analysis of alcohols and organic acids during *Takju* fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 24: 272-278.
 34. Woo SM, Shin JS, Seong JH, Yeo SH, Choi JH, Kim TY, Jeong YJ. 2010. Quality characteristics of brown rice *Takju* by different *Nuruks*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 301-307.
 35. Park CW, Jang SY, Park EJ, Yeo SH, Kim OM, Jeong YJ. 2011. Comparison of the quality characteristics of commercial *makgeolli* type in South Korea. *Korean J Food Preserv* 18: 884-890.
 36. Seo MY, Lee JK, Ahn BH, Cha SK. 2005. The changes of microflora during the fermentation of *Takju* and *Yakju*. *Korean J Food Sci Technol* 37: 61-66.

(2012년 8월 29일 접수; 2012년 9월 25일 채택)