

최 종  
연구보고서

GOVP1200708731

# 밤술 품질개선에 관한 연구

Studies on quality improvement of chestnut wine

연구 기관

순천대학교

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “밤술 품질개선에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 김 용 두

세부연구책임자 : 김 용 두

세부연구책임자 : 서 재 신

연 구 원 : 최 옥 자

연 구 원 : 현 규 환

연 구 원 : 강 성 훈

연 구 원 : 김 경 제

연 구 원 : 서 경 순

연 구 원 : 황 태 연

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

밤술 품질개선에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

1960년대 이후 정부시책에 의거 밤을 장려함에 따라 재배면적이 급격히 증가하다가 80년대에 들어서면서 밤의 과잉생산으로 인해 조립면적 및 재배면적이 감소하고 있는 추세를 보이고 있다. 주요 생산지역은 전남 광양, 순천, 경남 산청, 진주, 하동의 섬진강유역과 공주, 부여의 충청권에서 주로 생산이 이루어지고 있다. 광양지역이 11,000톤(M/T)으로 총생산량의 9%를 생산하고 있으며, 산청 10%, 진주 8%, 하동 7%, 순천 4%를 차지하고 있고, 충청지역의 공주가 5%, 부여가 5%로 나타났다. 밤은 80년대까지는 간밤으로 일본에 수출하였으나 현재는 중국산의 가격 경쟁에 밀려 수출이 여의치 못한 실정에 있다.

밤의 전통적 소비방법은 생밤, 군밤, 밤통조림 등이었으나 최근 가공법을 개발하여 죽, 국수, 빵 등의 가공식품이 있다. 현재의 밤가공 식품의 대부분은 박피된 밤을 이용하여 가공하고 있으므로, 많은 인력이 소모되는 실정이다. 밤은 다른 전분 식품에 비하여 점성이 없고 단백질 함량이 낮아 분말 가공시 성형의 어려움이 많고 감칠맛이 적은 식품이다. 이와 같은 저단백질 고전분을 함유한 밤은 약주제조에 바람직한 성분특성을 갖고 있으나 생밤은 수분이 60%~65%, 전분함량이 25%~35%로 보당제를 첨가하지 않고는 약주를 제조하기가 어려운 원료임으로 보당제의 선택이 시급하다. 현재 밤술 공장의 제조기술은 아직 초기단계이며 양조학적 기술이 너무 빈약한 상태로 미생물학적 연구와 원료인 밤전분의 이화학적 연구가 시급한 실정이다. 최근 우리의 농촌은 다양한 국제적 협상으로 작목 선택에 많은 어려움을 겪고있어 그 대안 방법의 일환으로 밭과 야산에 밤나무 식재가 증가하고 있어 그 소비 책을

모색하여야 한다.

밤은 재배 방법과 수확시기에 따라서 선별시 병해과와 크기가 적은 등의 과실이 많은 양 발생되며, 이들 등의 과일을 이용함으로써 생산가격을 낮출 수 있을 뿐만 아니라 폐기에 따른 많은 문제를 동시에 해결할 수 있음. 현재 우리나라 주류는 소주, 맥주 및 양주 등이 주류를 이루고 있으나, 최근 다양한 약주가 생산되어 그 수요가 점차 증가하고 있는 추세이므로 밤을 이용한 고품질의 약주를 개발함으로써 우리 전통술의 소비증대에 크게 기여할 수 있음.

전남 광양지역의 주된 밤 생산지는 많은 관광자원을 동시 가지고 있는 지역이므로, 밤을 이용한 다양한 종류의 술을 개발하여 관광 상품화함으로써 생산농가의 소득 향상과 지역홍보에도 기여할 수 있음. 국민생활수준의 향상으로 건강에 대한 관심과 더불어 자연식품과 건강식품에 대한 선호도가 날로 증대하고 있으며, UR 등 농산물과 식품시장의 개방에 따라 많은 수입식품이 범람하고 있다. 주류제품의 경우도 고급술이 수입되고 있어 국산 전통주는 상대적으로 경쟁력이 약화되는 위기에 놓여있다. 이와 같은 여건 변화에 보다 능동적으로 대응하기 위해서는 우리농업이 수세적인 방어만 취할 것이 아니라 수입대체 품목개발을 통하여 보다 적극적이고 구체적인 대책이 요구된다고 하겠다. 따라서 이 지역의 특산물인 밤을 전통술로 개발하여 산업화한다면, 현대인에게는 건강 증진을, 산업체에서는 수입가공식품에 대한 대체품목을, 농가에서는 소득향상을 꾀할 수 있고, 더 나아가 국제경쟁력이 강한 가공식품으로 발전시킬 수 있을 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 주요내용은 밤술의 품질개선을 위하여 밤술의 발효특성 및 성분분석과 밤 전분의 이화학적 특성을 규명하고자 하였으며 각 분야별 연구개발 내용 및 범위는 아래와 같다. 밤술의 양조학적 특성 규명, 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색, 밤의 성분분석 및 유용물질탐색, 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색등으로 진행하였다.

#### 1. 밤술의 양조학적 특성 규명

### 1) 밤술의 미생물학적 특성

밤술 제조에 필요한 미생물을 탐색하여 분리하며, 밤전분 당화에 우수한 곰팡이 발효가 우수한 효모를 선정한다. 우수발효 미생물의 형태적, 생리적 특성 규명하고 당화효소 고역가 균일품 대량생산 기술 개발한다.

### 2) 밤술의 양조학적 특성

밤술 제조시 술덧의 산패 원인을 분석하고 해결책을 모색 하며, 우수 분리 균주에 의한 밤술의 제조법, 주모 제조법 및 1. 2단 담금방법을 확립한다. 주모 및 본 담금후 술덧의 변화 특성을 조사하고 원료처리 기준을 마련한다.

## 2. 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색

### 1) 밤의 일반성분 및 전분의 특성

밤의 일반 및 특수성분을 분석하고 밤의 저장 중 성분변화 측정 후 밤전분의 특성 및 전분의 분리법에 관하여 조사한후 물리적 특성 및 아밀로오스 함량을 측정하였다.

### 2) 밤의 기능성물질의 추출 및 분리정제

항균성물질을 추출하여 균주와 배지를 달리 사용하여 용매별 추출물로 항균성을 추출하였다.

## 3. 밤술의 발효적 특성 규명

### 1) 밤술의 발효특성

생산성 향상을 목표로 고농도 담금기술 개발하며 우수 분리 균주에 의한 밤술의 품질에 미치는 영향, 제조방법에 따른 밤술의 발효과정 중 성분 변화 및 우수분리 균주에 의한 밤술의 제조법을 확립한다.

### 2) 밤술의 발효 중 양조학적 특성

원료처리법 및 주모 제조법을 확립하고 주모 및 본 담금 후 술덧의 특성변화를 조사한 후 술덧의 산패 원인을 분석하고 해결방안을 제시한다.

### 3) 밤술의 보당제 선택

각종 보당제 첨가에 따른 밤술의 성분, 기호도 및 쌀을 비롯한 곡류의 첨가에 따른 수율을 조사하고 술의 수율을 향상시키기 위한 방안을 마련한다.

#### 4. 밤의 성분분석 및 유용물질탐색

##### 1) 밤전분의 호화 특성

가열에 의한 호화도 차이 및 DSC(Differential Scanning Calorimetry)를 측정하고 광투과도의 변화와 amylogram에 의한 호화특성을 조사한다.

##### 2) 밤의 기능성물질의 추출, 분리정제

항산화성 실험을 바탕으로 추출물의 제조, 분획을 통하여 항균성 물질을 측정하고 추출물을 분리 정제 후 구조를 규명한다.

#### 5. 밤술의 제성, 저장 연구 및 기호도 조사

##### 1) 밤술의 제성법

각종 보당제 첨가에 따른 밤술의 성분 및 기호도를 조사하고 쌀을 비롯한 곡류의 첨가에 밤술의 수율과 향상대책을 마련하고 술덧의 양금질 및 여과법 개선하고자 한다.

##### 2) 밤술의 저장 및 기호도

밤술의 살균 조건을 결정하고 밤술의 살균 및 저장에 따른 품질의 변화를 연구하고 제성된 밤술의 관능검사를 실시한다.

#### 6. 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색

##### 1) 밤전분의 알칼리에 의한 호화

NaOH 및 KSCN에 의한 호화를 조사하고 광투과도의 변화를 측정하였다.

##### 2) 밤의 기능성물질의 추출, 분리정제

항산화성 물질과 항균성 물질을 추출하여 분리정제 및 확인하였다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구개발 결과

#### 제 1 절 밤술의 양조학적 특성규명

1) 부패 밤에서 분리한 곰팡이 중 1차로 밀기울 배지에서 배양하여 밤 전분 당화력이 일정 수준이상(700 sp)인 *Rhizopus*속 4종, *Mucor*속 2종, *Aspergillus*속 5종을 분리하여 당화력을 비교한 결과 *Aspergillus* A-2가 밤전분의 당화력이 타 균주에 비하여 당화력이 우수하여 최종 선발하였다.

2) ITS의 염기서열 분석을 통한 동정 결과 *Aspergillus* sp. 의 전체 염기서열은 619 bp 로 나타나 *Aspergillus oryzae*와 100% 동일한 것으로 확인되었다.

3) *Aspergillus oryzae* A-2는 921 sp로 Novozyme 사의 Dextrozyme DX에 비하여 1/10정도의 역가를 나타냈으나 지속적인 균주 선발과 배양방법의 개선으로 효소 역가를 높일 수 있도록 연구를 계속 진행하고 있으며, *Aspergillus oryzae* A-2가 생산한 효소가 시판 효소 AMG 400와 Dextrozyme DX효소에 비하여 내산성 당화력이 더 강한 것으로 나타났으며, 밤술의 산패를 억제하는 측면에서 더 유리한 것으로 사료 되었다.

4) 알코올 생산력과 향기 생성능에 따라 자연에서 분리한 7종의 야생효모와 대조구로 사용한 *Saccharomyces cerevisiae*의 향기생성능과 관능검사를 실시한 결과 N-6균주가 가장 우수한 것으로 나타나 밤술의 주모균으로 N-6를 최종적으로 선발하였다. N-6균주의 발효성과 자화성 등을 검토한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되었으며 *Saccharomyces cerevisiae* N-6로 명명하였다.

5) 알코올 생성력이 우수한 *Saccharomyces cerevisiae* N-6균주의 최적 생육온도는 25℃~30℃범위로 나타났으며, 최적 생육 pH는 5~6일때의 흡광도가 최대 1.3으로 나타났다.

6) koji와 시판효소를 사용한 주모를 각각 20℃에서 10일간 발효시켜 2일 간격으로 알코올 함량을 측정된 결과 *Aspergillus oryzae* A-2의 효소의 역가가 AMG에 비하여 낮음에도 불구하고 발효 정도가 비슷하게 나타나 분리균주 A-2균주가 생산하는 당화효소가 밤 전분에 대하여 친화성이 큰 것으로 사료되었다.

7) 밤(겉피제거), 옥수수전분 및 쌀을 이용하여 술덧을 제조하여 pH에 따른 알코올 함량의 경시적 변화는 pH 3.5~4.5사이로 술덧의 산도를 조절하였을때 알코올 생성에서 좋은 결과를 보였으나 젖산 생성량은 발효가 진행되면서 함량이 증가하였는데 술덧의 pH를 4이하로 조절하면 pH가 높은 시험구에 비하여 젖산 함량이 적게 나타났다. 쌀과 옥수수전분을 사용한 쌀 술덧을 제조시 pH에 따른 알코올 함량을 경



시적으로 살펴본 결과 밤 술덧과 유사하였으나 쌀 술덧이 밤 술덧에 비하여 젖산과 젖산균수가 pH에 따라서 구분이 확실하였고, 밤술 제조시 주모의 제조는 밤, 옥수수전분 및 쌀의 순으로 좋았다. 따라서 주모는 쌀로 만든 것이 제일 좋은 결과를 보였다.

8) 밤술 발효 중 담금 직후 총산 함량이 0.2~0.23% 이었으며 점차 모든 시료구의 pH가 감소하였는데 감소하는 폭이 원료에 따라 조금 다른 양상을 보였으며, 발효가 끝나는 발효 8일째의 pH는 옥분을 이용해 담금한 밤술의 pH가 쌀을 이용해 담금한 밤술보다 높게 나타났다.

9) 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구의 색도를 비교해보면 발효 8일째의 L값은 밤을 첨가하지 않은 대조구가 50.07로 높게 나타났고 a값은 -0.70으로 낮게 나타났으며 b값은 17.63으로 높게 나타났다. 또한 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구의 색도는 밤을 첨가하지 않은 대조구가 L, a값 및 b값 모두 35.63, 2.37 및 11.63으로 전체적으로 값이 낮게 나타났다.

10) 쌀 koji를 이용한 밤술의 fusel oil의 함량은 밤을 첨가하지 않은 대조구에서 밤을 첨가한 밤술보다 전체적으로 높게 나타났고, 옥분 koji를 이용한 밤술에서도 대조구에서 높게 나타났다.

11) 밤술 발효과정 중 ethanol의 함량은 담금 직후 2.6~3.8%이었으나 발효 8일째 17.6~18.2%로 최대치를 나타냈다. koji를 이용해 담금한 밤술의 경우 ethanol함량이 발효 2~4일째에 최대치로 나타났으나 효소를 이용해 담금한 밤술의 경우 4~6일째에 높게 나타났다.

12) Lactic acid는 쌀 koji를 사용해 담금한 밤술이 460.2mg%로 가장 높게 나타났고, succinic acid는 쌀가루에 효소를 첨가하여 담금한 밤술이 283.1mg%로 가장 높게 나타났다.

13) 향에 대한 5점 채점법에 의한 관능평가는 쌀코지를 이용한 밤술(A), 옥분코지를 이용한 밤술(C)시료구가 4.4, 4.1로 높게 나타났고 쌀과 시판효소를 이용한 밤술(B), 옥분과 시판효소를 이용한 밤술(D)시료구는 3.4, 2.9로 낮게 나타났다. 색은 A, B, C, D시료구가 3.8, 3.8, 3.4, 3.3으로 비슷한 기호도를 나타냈고 맛에 대한 기호도에서는 향에 대하여 좋은 기호도를 보였던 A, C시료구가 4.5, 4.3으로 좋았으며 B시료구 3.7, D시료구 2.7순으로 나타났고, 전체적으로 보았을 때 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술이 향 및 맛에서 우수하게 나타났다.

14) 밤술의 여과시 냉각온도는 -5°C에서 7일간 저장한 후에 구조도 여과를 하는 것이 청정도가 가장 좋았다.

15) 처리온도 및 시간에 따른 미생물의 살균효과는 세균, 젖산균 및 효모의 살균효과가 모두 나타난 80°C에서 10분간 열 처리시 가장 적당하다고 사료된다. 색도 측정 결과는 처리 온도별로 보면 60°C~100°C까지 온도가 증가 할수록 생주와 비교해 L값은 감소하며 명도가 낮아졌을 때 a값은 증가하였으며 b값은 온도 증가와 관계없이

별 차이가 없었다. 처리 시간별로 볼 때도 온도 증가와 마찬가지로 시간이 증가할수록 L값은 감소하였고 a값은 증가하였으며 b값은 별 차이가 없었다.

16) 열처리 조건에 따른 관능평가 결과를 보면 색은 온도증가와 관련해 별 차이가 없었고 맛과 냄새는 60℃~80℃까지는 크게 저하되지 않았으나 90℃~100℃까지 열처리한 밤술은 생주보다 맛과 냄새가 유의적으로 떨어져 쓴맛과 화독 냄새가 강하게 나타났다. 처리 시간에 따른 결과를 보면 색은 처리 온도별과 마찬가지로 시간 증가에 관련해 별 차이가 없었고 맛과 냄새는 5분, 10분, 15분에서는 크게 저하되지 않았지만 20분, 30분에서는 뚜렷하게 저하됨을 알 수 있었다.

17) 저장 조건에 따른 색도의 변화는 가열 처리한 경우 L 값은 여과초기에 비하여 저장 4개월까지 감소하여 어두워지고 있으며 그 이후에는 안정화되는 것으로 나타났다. 가장 큰 변화를 보인 것은 b값으로 31.26에서 저장 기간이 길어짐에 따라 43.26까지 증가하였다. a 값은 저장 2개월까지 4.88로 감소하다가 그 이후에는 다시 증가하였다. 저장 기간이 길어짐에 따라 색에 대한 평가는 큰 차이가 없었으나 냄새 및 맛에 대한 평가에서는 살균한 제품과 비살균한 제품의 관능 평가결과가 다르게 나타났다. 살균한 제품의 경우 저장기간에도 기호도가 크게 변하지 않았으나 비 살균한 제품인 경우에는 저장기간이 길어짐에 따라 종합적인 기호도가 크게 저하되는 경향을 나타내었다.

## 제 2 절 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색

1) 밤의 각 부위별 중량비는 외피 17.5%, 내피 14.9%, 간밤 68.05%로 나타났고, 각각의 밤에 함유된 무기성분은  $K > Mg > Ca > Na > Fe > Zn > Cu$  순으로 검출되었으며 밤의 부위별 유리당의 함량은 이당류인 maltose와 sucrose가 주종이었으며 fructose와 glucose는 소량 함유되어 있었다. 외피와 속피에는 함유된 당류 종류에 관계없이 소량 함유되어 있었다.

2) 밤나무 각각의 부위중 구성아미노산은 aspartic acid 외 16종이 검출되었고 구성아미노산 총량은 전체 2,619 mg%, 외피 1,034 mg%, 내피 1,450 mg% 및 간밤 2,994 mg%로 나타났고 부위에 따른 유리 아미노산 총량은 전체 691.75 mg%, 외피 211.4 mg%, 내피 325.8 mg% 및 간밤 493.4 mg%이었으며 주된 아미노산은 aspartic acid, glutamic acid, proline 등으로 구성아미노산의 비율과 유사하였다.

3) 부위별 total polyphenol 함량은 밤나무 잎, 수피 및 내피에 많은량이 함유되어 있었으며 간밤과 외피에서는 미량 검출되었다. catechin함량은 내피에 epicatechin이 0.15 mg% 함유되어 있었다.

4) 에탄올 추출물의 최소저해농도, 추출물에 함유된 항균성물질의 열안정성 pH 등을 조사하였다. 밤 잎과 수피의 항균활성은 에탄올 추출물과 물 추출물이 10균주 중 세균에 대하여 항균활성이 강하였으나, 젖산균 및 효모에 대해서는 항균활성이 나타나지 않았다.

5) 밤잎과 수피를 hexan, diethyl ether, ethyl acetate 및 물로 용매계통분획하여 얻은 각 분획물의 항균활성은 ethyl acetate와 물층에서 강한 항균활성을 보였고 균주별로 일반세균은 항균활성이 나타났으나, 효모와 젖산균에서는 항균활성이 나타나지 않았다.

6) 밤잎과 수피 추출물의 최소저해농도는 세균은 1 mg/mL이었고, 효모와 젖산균은 2 mg/mL이었다. 밤 잎과 수피의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질은 121°C에서 15분간 가열한 후에도 그 활성이 유지된 것으로 보아 열에 안정하였으며, pH의 변화에도 항균활성의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다.

7) 항균성물질은 H-NMR 과 <sup>13</sup>C-NMR의 spectrum 에 의해 얻어진 정보와 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-COSY의 결과로부터 전형적인 flavonoids의 기본구조인 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>의 carbon skeleton을 가진 화합물로 밝혀졌으며, 항균성 있는 peak 2번은 flavanone의 유도체인 catechin으로 동정되었다.

8) Hemoglobin-induced linoleic acid system에서의 항산화 활성은 밤 수피, 밤 잎의 항산화활성이 기존의 항산화제로 알려진 tocopherol (0.05mg/ml)의 항산화 활성의 80%정도의 항산화 활성을 보였다.

9) Reducing power를 측정한 결과는 밤나무 수피가 5가지 밤 시료구중에서 가장 높았고 reducing power를 보였으며, 밤나무 잎과 밤 외피에서 비교적 높은 reducing power를 보였다.

10) 전자공여능을 비교한 결과 간밤에서 다른 밤 시료구에 비해 월등함을 알 수 있었고, Superoxide anion radical 소거능을 측정할 결과 밤나무 잎의 소거능이 0.90unit/mg 으로 가장 높은 소거능을 보였고 밤나무 수피는 0.80unit/mg이 었다.

11) 항산화력이 있는 분획에서 8개 peak를 얻었으며 그 중 6, 7, 8번 peak가 활성을 갖고 있었으며 그 중 항산화 활성은 peak 7에서 대조구인 tocopherol의 17%를 나타냈다.

### 제 3 절 전분 제조방법에 따른 밤 전분의 이화학적 특성

1) 밤 전분의 호화시 alkali처리에 따른 당화에서 약 50% 포도당함량이 증가하였다. 따라서 밤 전분의 당화도를 높이기 위하여 호화시 alkali처리가 수율을 증가시키는 효과적인 방법으로 사료된다.

2) 물결합력은 박피한 A전분의 경우 86.9%, 박피하지 않은 B전분은 80.66%로 박피한 A전분이 더 높은 물결합력을 나타냈다. A전분과 B전분의 팽윤력은 60°C에서 급격히 증가하기 시작하여 80°C까지 증가하다가 그 이후는 완만하게 변하였고, 용해도는 60°C에서부터 증가하기 시작하여 온도가 상승함에 따라 점점 증가하는 특성을 보였으며, A전분이 B전분 보다 팽윤력과 용해도가 더 높게 나타났다.

3) 요오드 반응은 A전분이 B전분 보다 더 높게 나타났다. X-선 회절도는 A전분은 C<sub>b</sub>도형, B전분은 B 도형으로 나타났고, 상대적 결정화도는 A전분이 36.2%, B전분은

37.0%로 B전분이 더 높게 나타났다.

4) DSC에 의하여 측정한 호화온도 및 호화엔탈피는 A전분의 경우 66.95°C~77.5°C, 2.04 cal/g, B전분의 경우 67.09°C~77.5°C, 2.29 cal/g로 나타났다. 6% 밤전분의 아밀로그램 특성은 A전분 보다 B전분이 호화개시온도가 더 높았고, peak viscosity, breakdown, setback은 A전분이 B전분 보다 더 높았다. 알칼리에 의한 호화 특성에서 A전분이 B전분 보다 점도, gel 부피 및 광투과도가 더 높게 나타났다.

## 2. 활용에 대한 건의

본 연구는 밤을 원료로 하여 발효법에 의한 밤술의 규격화와 품질을 개선함으로써 지역특산물의 부가가치 증대 및 농산 자원의 가공에 의한 효율적인 이용 측면에서 큰 의의를 가지며 밤을 이용한 전분식품의 가공에 활용자료로 이용될 수 있다. 이를 위해서 밤술과 밤을 이용한 전분식품에 대한 농민들의 인식을 고양시키고 가공기술에 대한 대 농민 지도기관의 교육이 요구된다.

### 3. 밤술 품질개선에 대한 목표달성 효과 및 연구결과 요약

#### 제 1 절 밤술의 양조학적 특성규명

계획 및 에로사항	목표달성 효과 및 연구 결과
1. 밤술의 산패 문제점 해결	<ul style="list-style-type: none"> <li>-주모제조시 밤을 사용하지 않고 쌀 koji를 사용함으로 발효 효율을 증가</li> <li>-1단 담금에서 쌀 또는 옥분(1단 담금시 밤을 첨가하지 않음)만으로 담금을 함으로서 발효속도와 효율을 높일 수 있었음.</li> <li>-본 연구에서 분리한 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> N-6을 주모용 효모로 사용함으로서 발효력이 왕성하고 밤 전분에 대한 발효력이 우수하여 잡균보다 효모가 우점 하였음.</li> </ul>
2. 밤 전분 미 발효	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Koji 제조시 본 연구에서 분리한 <i>Aspergillus oryzae</i> A-2를 접종하여 제조한 koji가 기존의 시판 액화효소에 비하여 효소활성이 높아 밤 전분 액화에 우수하였음.</li> <li>-시판 당화효소제 중 밤 전분 당화에 적합한 효소를 선택함으로서 밤 전분의 대부분이 발효되었음.</li> </ul>
3. 원료 처리법	<ul style="list-style-type: none"> <li>-쌀을 가루로 만들어 사용함으로서 발효력도 증가하고 산패 억제에 효과가 있었음.</li> <li>-시판되고 있는 효소별로 당화와 발효력을 측정하여 밤술에 적당한 시판효소를 선정함으로서 앞으로 산업에서 직접 이용할 수 있도록 하였음.</li> </ul>
4. 발효 및 양조 학적 특성	<ul style="list-style-type: none"> <li>-분리된 <i>Aspergillus oryzae</i> A-2를 이용한 koji제조하여 2단 담금에 밤전분을 액화 함으로서 발효 효율이 향상되었다.</li> <li>-분리한 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> N-6을 주모로 사용하여 발효과정 중의 성분변화를 분석하였다.</li> <li>-발효된 술의 성분 및 fusel oil 등을 분석하고 시험구별로 관능검사를 통하여 밤술의 양조학적 특성을 규명하였다.</li> </ul>
5. 밤술의 보당제 선택	<ul style="list-style-type: none"> <li>-보당제로 쌀, 옥분 및 밀가루 등을 이용하여 술을 제조하여 성분, 수율 및 관능적 조사를 통하여 쌀과 옥분을 보당제로 확정하였다.</li> </ul>
6. 밤술의 제성 과 저장방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>-양금질 방법은 -5℃에서 7일간 보관한 후에 여과한 것이 투명도가 가장 높았다.</li> <li>-저장을 위한 살균법으로는 80℃에서 10분간 살균이 미생물의 살균, 관능적 및 색도 등에 가장 적당하였다.</li> </ul>

## 제 2 절 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색

계획 및 에로사항	목표달성 효과 및 연구 결과
1. 밤의 항균활성 측정	<p>-밤의 부위별 total polyphenol 함량은 밤나무 잎, 수피 및 내피에 많은량이 함유되어 있었으며 껌밤과 외피에서는 미량 검출되었다. catechin함량은 내피에 epicatechin이 0.15 mg% 함유되어 있었다</p> <p>-밤잎과 수피의 항균활성은 에칠아세테이트와 물층에서 강한 항균활성을 보였고 균주별로 일반세균은 항균활성이 나타났으며, 효모와 젖산균에서는 항균활성이 나타나지 않았다.</p> <p>-밤잎과 수피 추출물의 최소저해농도는 세균은 1 mg/mL이었고, 효모와 젖산균은 2 mg/mL이었다. 밤 잎과 수피의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질은 121°C에서 15분간 가열한 후에도 그 활성이 유지된 것으로 보아 열에 안정하였다.</p> <p>-항균성물질은 H-NMR 과 <sup>13</sup>C-NMR의 spectrum 에 의해 얻어진 정보와 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-COSY의 결과로부터 전형적인 flavonoids의 기본 구조인 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>의 carbon skelton을 가진 화합물로 밝혀졌으며, 항균성 있는 peak 2번은 flavanone의 유도체인 catechin으로 동정되었다.</p>
2. 밤의 항산화성 측정	<p>-Hemoglobin-induced linoleic acid system에서의 항산화 활성은 밤 수피, 밤 잎의 항산화활성이 기존의 항산화제로 알려진 tocopherol (0.05mg/ml)의 항산화 활성의 80%정도의 항산화 활성을 보였다.</p> <p>-Reducing power를 측정한 결과는 밤나무 수피가 5가지 밤 시료 구중에서 가장 높은 reducing power를 보였으며, 밤나무 잎과 수피에서 높았고 밤 외피에서 비교적 높은 reducing power를 보였다.</p> <p>-전자공여능을 비교한 결과 껌밤에서 다른 밤 시료구에 비해 월등함을 알 수 있었고, Superoxide anion radical 소거능을 측정할 결과 밤나무 잎의소거능이 0.90unit/mg 로 가장 높은 소거능을 보였고 밤나무 수피는 0.80unit/mg이 었다.</p> <p>-항산화력이 있는 분획하여 8개 peak을 얻었으며 그 중 6, 7, 8번 peak가 활성을 갖고 있으며 그 중 항산화 활성은 peak 7에서 대조구인 tocopherol의 17%을 나타냈다.</p>

### 제 3 절 전분 제조방법에 따른 밤 전분의 이화학적 특성

계획 및 에로사항	목표달성 효과 및 연구 결과
1. 밤 전분의 일반적 특성	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 밤 전분의 호화시 alkali처리에 따른 당화에서 약 50% 포도당함량이 증가하였다. 따라서 밤 전분의 당화도를 높이기 위하여 호화시 alkali처리가 수율을 증가시키는 효과적인 방법으로 사료된다.</li> <li>- 물결합력은 박피한 A전분의 경우 86.9%, 박피하지 않은 B전분은 80.66%로 박피한 A전분이 더 높은 물결합력을 나타냈다.</li> <li>- A전분과 B전분의 팽윤력은 60℃에서 급격히 증가하기 시작하여 80℃까지 증가하다가 그 이후는 완만하게 변하였고, 용해도는 60℃에서부터 증가하기 시작하여 온도가 상승함에 따라 점점 증가하는 특성을 보였으며, A전분이 B전분 보다 팽윤력과 용해도가 더 높게 나타났다.</li> <li>- 요오드 반응은 A전분이 B전분 보다 더 높게 나타났다. X-선 회절도는 A전분은 C<sub>6</sub>도형, B전분은 B도형으로 나타났고, 상대적 결정화도는 A전분이 36.2%, B전분은 37.0%로 B전분이 더 높게 나타났다.</li> </ul>
2. 밤 전분의 호화특성	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DSC에 의하여 측정된 호화온도 및 호화엔탈피는 A전분의 경우 66.95℃~77.5℃, 2.04 cal/g, B전분의 경우 67.09℃~77.5℃, 2.29 cal/g로 나타났다.</li> <li>- 6% 밤전분의 아밀로그램 특성은 A전분 보다 B전분이 호화개시온도가 더 높았고, peak viscosity, breakdown, setback은 A전분이 B전분 보다 더 높았다.</li> <li>- 알칼리에 의한 호화 특성에서 A전분이 B전분 보다 점도, gel 부피 및 광투과도가 더 높게 나타났다.</li> </ul>

# SUMMARY

## I. Title

Studies on Quality Improvement of Chestnut Wine

## II. Purpose and significance

It has been required to produce high quality product in order to deal with the situation of accelerated agricultural marketing opening. And conducted to enhance the international competitive power with the improvement of industrial processing techniques and raise the income of farmhouses. This study was carried out to obtain the basic information for the production of chestnut wine. We planned to establish proper methods in processing of fermented from chestnut wine and determine the optimum processing conditions. Also, this study was carried out to obtain the various information and basic data utilizing chestnut starch as a raw material of new food and industrial products.

## III. Research summary

Microorganisms for degrading the chestnut starch were selected from chestnut, and the amylase productivities of each strain was test. *Aspergillus oryzae* A-2 produced the most potent saccharifying enzyme, which was identified by morphological study and PCR based identification methods. Sequence result that ITS regions of *Aspergillus oryzae* A-2 was identical, and that ITS sequence showed 100% homology, comparing with *Aspergillus oryzae*.

The maximum productive of  $\alpha$ -amylase was showed on the culture medium



consisted of 2% cellulose, 0.1% KNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.01% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. The optimum temperature and time for the enzyme production on wheat bran medium were 28°C and 3 days, respectively. The enzyme from *Aspergillus oryzae* CA 1-19 was showed stronger inhibit rancidity than Dextrozyme DX enzyme. *Saccharomyces cerevisiae* N-6 produced the most potent volatile compounds, which was determined by Fermentation ability. The best conditions of temperature and pH for growth of *Saccharomyces cerevisiae* N-6 were 25°C~30°C, pH 5~6.

Changes in pH showed decreasing pattern after secondary brewing stage compared with begining of fermentation. The pH of chestnut wine prepared with corn starch koji and saccharified corn starch showed higher value than those with rice koji and saccharified rice flour. The contents of total acid were 0.20~0.23% at the begining of fermentation, increasing to 0.33~0.40% after 8 days of fermentation.

The total acid content of chestnut wine preparad with rice koji and saccharified rice flour was higher compared with that of corn starch koji and saccharified corn starch. The reducing sugars in chestnut wine prepared with rice koji or with corn starch koji were rapidly decreased at the first brewing, decreasing slowly after 4 days of fermentation. The Hunter's values or L and a were high on chestnut wine prepared with corn starch koji, and b value was high on that with rice koji.

Methanol, iso-buthanol, n-buthanol, iso-amylalchol, n-hexanol, acetaldehyde, and ethyl acetate were detected by GC. The content of iso-amylalcohol was the highest the fusel oils in chestnut wine. The fusel oil containing minor alcohols increased during fermentation, while the content of n-hexanol decreased. Ethanol content was in the range of 2.6~3.8 % at the beginning of fermentation. increasing to 17.6~18.2 % after 8 days of fermentation. The ethanol content in chestnut wine prepared with rice koji or corn starch koji were rapidly increased during 2~4 days of fermentation, and the ethanol content in chestnut wine prepared with saccharified rice flour or saccharified corn starch were rapidly increased during 4~6 days of fermentation. The

content of lactic acid was the highest among organic acids in the chestnut wine. As a result of sensory test chestnut wine prepared with saccharified corn starch, in the flavor and taste items were scored the highest value, And colors of chestnut wines was not significantly different form each samples.

Effect of different heating temperature and time on inactivation of microorganisms in chestnut wine brewing was tested. Total bacteria was completely sterilized at 80°C for 10min, while lactic acid bacteria and yeast were completely sterilized at 60°C for 15min. The Hunter's values of chestnut wine treated with different heating temperature and time was changed; L value was decreased; and a value was increased as the sterilization temperature and time increased, while b value was not changed. As a result of sensory test of chestnut wine in after sterilization on different heating temperature and time, flavor and taste were scored higher values as long as the wine was heated at 80°C for 10min. The point showed that optimum sterilization temperature and time of chestnut wine was 80°C and 10min. The point showed that of overall quality aspects.

To obtain basic data utilizing chestnuts as a raw material of new food and industrial products, major chemical components were investigated. Chemical component of chestnut flesh were 63.60% moisture, 1.18% ash, 3.02% crude protein, 0.615% crude fat, 1.21% crude fiber, 30.37% nitrogen free extract, respectively. The weight ratio of tegmen, seed coat and flesh of chestnut sample were 17.05, 14.9, 68.05% respectively. The total amino acid contents of flesh and seed coat were 2,994 mg% and 1,450 mg%, respectively. The total amount of free amino acids was less than total amino acids. As a results of mineral analysis, the content of K was higher than any minerals. The contents of maltose and sucrose were higher than those of fructose and glucose. The total polyphenol contents of tegmen, seed coat, fresh, leaf and bark were 9.56 mg%, 0.047 mg%, 0.23 mg %, 15.44 mg% and 17.85 mg%, respectively.

To develop natural food preservatives, ethanol and water extracts were prepared from the Chestnuts and antimicrobial activities were examined against 10

microorganisms which were food borne pathogens and/or food poisoning microorganisms, food-related bacteria and yeasts. Ethanol extract exhibited antimicrobial activity for the microorganisms tested, except lactic acid bacteria and yeast. Especially, minimum inhibitory concentrations(MIC) of the ethanol extracts were determined as 0.25 mg/mL against bacteria and 2 mg/mL against target lactic bacteria and yeasts. Antimicrobial activity of the ethanol extracts was not destroyed by the heating at 121°C for 15 min. and not affected by pH. The ethanol extract of Chestnut exhibiting high antimicrobial activities was fractionated in the other of diethylether and butanol fractions to test antimicrobial activity. The highest antimicrobial activity against bacteria test was found in the ethanol fraction.

Antioxidant activities of chestnut leaf and bark were showed 80% at tocopherol in hemoglobin-induced linoleic acid system. Reducing power was highest in chestnut leaf and the highest scavenging effect on superoxide anion radical was observed in chestnut leaf. Electron donating ability was highest in fresh of chestnut.

The compound of antimicrobial activity in chestnut was identified as catechin by spectrophotometric methods in conjunction with  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -COSY.

This study was carried out to investigate the physicochemical properties of two kinds of chestnut starch, and to examine their gelatinization properties by both heat and alkali treatments. One kind is starch A made by alkali method from peeled chestnut. The other is starch B made from chestnut with the outer layer. The results are as follows. starch A has higher water binding capacity of 86.9% than starch B with 80.66%. Swelling powers of both starch A and B increased rapidly from 60°C to 80°C in both, and since then it has changed a bit. Both began to show their solubility at 60°C and increased continuously as the temperature went up. But starch A has higher swelling power and solubility than starch B. In iodine reaction, starch A has higher  $\lambda_{\text{max}}$  and absorbance at  $\lambda_{\text{max}}$  than starch B. X-ray diffraction patterns showed that starch A is type  $C_b$  and that starch B is type B. starch B has higher relative crystallinity of 37.0% than starch A with

36.2%. The results by differential scanning calorimetry revealed that starch A gelatinized from 66.95°C to 77.5°C, and its enthalpy is 2.04 cal/g. And starch B gelatinized from 67.09°C to 77.5°C. and its enthalpy is 2.29 cal/g. Amylograms of chestnut starch at 6% concentration indicated that starch B needs higher onset temperature when beginning to gelatinize than starch A does. But starch A shows much higher peak viscosity, breakdown, and setback than starch B does. starch A shows higher viscosity, gel volume, and optical transmittance in gelatinization properties by alkali than starch B does.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Summary (Korean) .....	3
Summary (English) .....	15
Contents (English) .....	20
Contents (Korean) .....	23
<b>Part 1. The Outline for Research &amp; Development .....</b>	<b>27</b>
<b>Part 2. The Present States of Technology and Development at Home and Abroad .....</b>	<b>29</b>
<b>Part 3. The Result of Research &amp; Development .....</b>	<b>30</b>
Chapter 1. Determination of Brewing Characteristic in Chestnut wine .....	30
1. Introduction .....	30
2. Materials and Methods .....	32
A. Testing Materials .....	32
B. Methods of Analysis .....	33
1) Isolation, identification and selection of best mold for saccharifying chestnut .....	33
2) Isolation, identification and selection of best yeast for chestnut wine .....	41
3) Improvement of productivity in chestnut wine .....	42
4) Brewing characteristic in chestnut wine .....	45
3. Results and Discussion .....	53
A. Isolation, identification and selection of best mold for	

saccharifying chestnut .....	53
B. Isolation, identification and selection of best yeast for chestnut wine ..	74
C. Improvement of productivity in chestnut wine .....	79
D. Brewing characteristic in chestnut wine .....	95
References .....	116

## Chapter 2. Analysis of Chestnut Compounds and Screening of Useful

Components .....	121
1. Introduction .....	121
2. Materials and Methods .....	122
A. Testing Materials .....	122
B. Methods of Analysis .....	122
1) Analysis of chestnut composition .....	122
2) Analysis of antimicrobial activity compounds in different parts of chestnut .....	126
3) Test of antioxidant activity in different parts of chestnut .....	129
3. Results and Discussion .....	133
A. composition of chestnut .....	133
B. Antimicrobial activity in different parts of chestnut .....	140
C. Antioxidant activity in different parts of chestnut .....	150
References .....	154

## Chapter 3. To Investigate the Physicochemical Properties of

Chestnut Starch by Different Manufacturing Methods .....	156
1. Introduction .....	156
2. Materials and Methods .....	157
A. Manufacturing of Chestnut Starch .....	157
B. Physicochemical Properties of Chestnut Starch .....	157
C. Gelatinization properties of chestnut starch by heating .....	159

D. Gelatinization properties of chestnut starch by alkali treatments .....	160
3. Results and Discussion .....	162
A. Physicochemical Properties of Chestnut Starch .....	162
B. Gelatinization of chestnut starch by heating .....	166
C. Gelatinization properties of chestnut starch by alkali treatments .....	170
References .....	174
Part 4. Achievements of Purpose and Contribution for Relative Field .....	177
Part 5. Results of Research & Development and Application Plan .....	178
Part 6. Collection of Technology information .....	179

# 목 차

제 출 문 .....	1
요 약 문 .....	3
SUMMARY .....	15
CONTENTS .....	20
목 차 .....	23
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	27
제 2 장 국내외 기술개발현황 .....	29
제 3 장 연구 개발 및 결과 .....	30
제 1 절 밤술의 양조학적 특성규명 .....	30
1. 서론 .....	30
2. 재료 및 방법 .....	32
가. 재료 .....	32
나. 분석 방법 .....	33
1) 밤 전분 당화력이 우수한 곰팡이 분리 및 당화력 실험 .....	33
2) 밤 전분 당화액의 우수한 발효 효모 분리 및 발효력 측정 .....	41
3) 밤술의 생산성 향상 방안 .....	42
4) 밤술의 발효 특성 .....	45
3. 결과 및 고찰 .....	53
가. 밤 전분 당화력이 우수한 곰팡이 분리 동정 및 당화력 실험 .....	53
나. 밤 전분에 발효력이 우수한 효모 분리 및 발효력 측정 .....	74
다. 밤술의 생산성 향상 방안 .....	79
라. 밤술의 발효 특성 .....	95



참고문헌 .....	116
제 2 절 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색 .....	121
1. 서론 .....	121
2. 재료 및 방법 .....	122
가. 재료 .....	122
나. 분석방법 .....	122
1) 밤의 성분 함량 분석 .....	122
2) 밤의 부위별 항균활성 물질 분석 .....	126
3) 밤의 부위별 항산화력 분석 .....	129
3. 실험 결과 .....	133
가. 밤의 성분함량 .....	133
나. 밤의 부위별 항균활성 .....	140
다. 밤의 부위별 항산화 활성 .....	150
참고문헌 .....	154
제 3 절 전분 제조방법에 따른 밤 전분의 이화학적 특성 .....	156
1. 서론 .....	156
2. 재료 및 방법 .....	157
가. 재료 .....	157
나. 분석방법 .....	157
1) 밤 전분의 제조 .....	157
2) 밤 전분의 이화학적 특성 .....	157
3) 밤 전분의 가열에 의한 호화특성 .....	159
4) 밤 전분의 알칼리에 의한 호화특성 .....	160
3. 실험결과 .....	162
가. 밤 전분의 이화학적 특성 .....	162
나. 밤 전분의 가열에 의한 호화 .....	166

다. 밤 전분의 알칼리에 의한 호화특성 .....	170
참고문헌 .....	174
제 4 장 목표달성도 및 관련 분야 기여도 .....	177
제 5 장 연구개발 결과 활용계획 .....	178
제 6 장 연구개발 과정에서 수입한 해외과학기술정보 .....	179

여 백

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

본 연구의 주요내용은 밤술의 품질개선을 위하여 밤술의 발효특성 및 성분분석과 밤 전분의 이화학적 특성을 규명하고자 하였으며 각 분야별 연구개발 내용 및 범위는 아래와 같다. 밤술의 양조학적 특성 규명, 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색, 밤의 성분분석 및 유용물질탐색, 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색 등으로 진행하였다.

### 1. 밤술의 양조학적 특성 규명

#### 1) 밤술의 미생물학적 특성

밤술 제조에 필요한 미생물을 탐색하여 분리하며, 밤전분 당화에 우수한 곰팡이 발효가 우수한 효모를 선정한다. 우수발효 미생물의 형태적, 생리적 특성을 규명하고 대량생산 기술을 개발한다.

#### 2) 밤술의 양조학적 특성

밤술 제조시 술덧의 산패 원인을 분석하고 해결책을 모색 하며, 우수 분리 균주에 의한 밤술의 제조법, 주모 제조법 및 1. 2단 담금방법을 확립한다. 주모 및 본 담금후 술덧의 변화 특성을 조사하고 원료처리 기준을 마련한다.

### 2. 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색

#### 1) 밤의 일반성분 및 전분의 특성

밤의 일반 및 특수성분을 분석하고 밤의 저장 중 성분변화 측정 후 밤전분의 특성 및 전분의 분리법에 관하여 조사한후 물리적 특성 및 아밀로오스 함량을 측정하였다.

#### 2) 밤의 기능성물질의 추출 및 분리정제

항균성물질을 추출하여 균주와 배지를 달리 사용하여 용매별 추출물로 항균성을 추출하였다.

### 3. 밤술의 발효적 특성 규명

#### 1) 밤술의 발효특성

생산성 향상을 목표로 고농도 담금기술 개발하며 우수 분리 균주에 의한 밤술의 품질에 미치는 영향, 제조방법에 따른 밤술의 발효과정 중 성분 변화 및 우수분리 균주에 의한 밤술의 제조법을 확립한다.

## 2) 밤술의 발효 중 양조학적 특성

원료처리법 및 주모 제조법을 확립하고 주모 및 본 담금 후 술덧의 특성변화를 조사한 후 술덧의 산패 원인을 분석하고 해결방안을 제시한다.

## 3) 밤술의 보당제 선택

각종 보당제 첨가에 따른 밤술의 성분, 기호도 및 쌀을 비롯한 곡류의 첨가에 따른 수율을 조사하고 술의 수율을 향상시키기 위한 방안을 마련한다.

## 4. 밤의 성분분석 및 유용물질탐색

### 1) 밤전분의 호화 특성

가열에 의한 호화도 차이 및 DSC(Differential Scanning Calorimetry)를 측정하고 광투과도의 변화와 amylogram에 의한 호화특성을 조사한다.

### 2) 밤의 기능성물질의 추출, 분리정제

항산화성 실험을 바탕으로 추출물의 제조, 분획을 통하여 항균성 물질을 측정하고 추출물을 분리 정제 후 구조를 규명한다.

## 5. 밤술의 제성, 저장 연구 및 기호도 조사

### 1) 밤술의 제성법

각종 보당제 첨가에 따른 밤술의 성분 및 기호도를 조사하고 쌀을 비롯한 곡류의 첨가에 밤술의 수율과 향상대책을 마련하고 술덧의 앙금질 및 여과법 개선하고자 한다.

### 2) 밤술의 저장 및 기호도

밤술의 살균 조건을 결정하고 밤술의 살균 및 저장에 따른 품질의 변화를 연구하고 제성된 밤술의 관능검사를 실시한다.

## 6. 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색

### 1) 밤전분의 알칼리에 의한 호화

NaOH 및 KSCN에 의한 호화를 조사하고 광투과도의 변화를 측정하였다.

### 2) 밤의 기능성물질의 추출, 분리정제

항산화성 물질과 항균성 물질을 추출하여 분리정제 및 확인하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 국내

밤의 저장 중 성분변화, 밤묵의 노화 특성, 밤전분의 물리화학적 특성 및 밤전분 호화액의 유동성 등에 관한 연구가 되어있다.

종래 밤의 이용은 보양식품으로 각종 한약제로 사용하였고, 가공식품으로는 군밤, 생밤, 밤떡, 밤통조림 및 과자제품의 원료 등에 이용 하고 있다.

### 외국

일본에서는 밤 발효주와 리쿠루주로 형태로 제조되어 시판되고 있다.

일본은 한국과 중국에서 수입한 깎밤을 다양한 형태의 감로자로 이용하고 있다.

일본에서는 빵과 양갱 제조시 밤을 다량 사용하고 있다.

서양에서는 밤을 설탕 절임하여 당과(Marron glaces)로 시판하고 있다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 밤술의 양조학적 특성 규명

#### 1. 서론

밤은 너도 밤나무과 밤나무속의 열매로서, 과수 중 재배역사가 가장 오래된 것 중의 하나이다.(1) 밤나무는 밤나무 잎, 밤꽃, 껍질 등 모든 부위가 한의학적인 약효가 있는 것으로 알려져 있으며, 밤은 한약재와 함께 넣어 보신용 식품재료로 이용되어 왔다(2). 현재 우리나라에서 생산 및 가공 수출되는 밤의 형태는 깎밤, 통조림, 냉동 밤, 생울의 순으로 실제 밤의 소비는 매우 낮고, 효과적인 밤 수확 기술의 개발도 미진한 상태에 있어 밤나무 재배농가는 의욕상실로 밤을 수확하지 않고 방치해 두는 실정이다(3,4).

그동안 밤에 관한 연구는 다양한 저장 방법에 따른 저장 기간의 연장과 그에 따른 특성 변화에 대한 연구에 국한되었으나 최근 밤의 가공에 관한 연구로는 밤 과육, 밤 통조림, 당침 밤(5)과 같은 밤 중간 제품에 관한 연구와 밤 목의 관능적 특성과 노화 특성, 밤 카스테라의 물성 측정(6) 및 밤을 이용한 국수제조(7) 등 밤의 가공적성을 평가한 연구 등이 있다. 또한 군밤 음료, 밤죽, 밤 스프레드, 밤 식빵과 같은 다양한 밤 제품 연구가 수행된 바 있다(8). 이처럼 국내소비를 촉진하기 위한 많은 노력으로 다양한 가공품이 개발되고 있으나, 아직은 생산량에 비하여 기대에 못 미치는 실정이다. 따라서 밤을 대량으로 사용할 수 있는 가공 상품 개발의 일환으로 밤술을 개발하여 밤 소비와 소득 증대를 촉진시킬 뿐만 아니라 선별시 생산되는 등외품을 활용하고자 한다.

밤은 다른 전분 식품에 비하여 점성이 없고 단백질 함량이 낮아 분말 가공시 성형의 어려움이 많고 감칠맛이 적은 반면, 전분 함량이 많고 단백질 함량이 적음에 따라 fusel oil 생성원인 물질인 isoleucine의 함량도 상대적으로 적어 약주 제조에 바람직한 성분 특성을 갖고 있다.

우리나라는 옛날부터 여러 종류의 전통주를 제조 음용하여 왔는데 대부분 쌀을 주 원료로 하고 있으며, 각 지역별로 지역의 특산물을 첨가하여 만든 술이 전승되어 왔

다<sup>13)</sup>. 우리 전통주에 관한 연구로는 인삼을 약량별로 첨가하여 제조한 인삼주(9), 인삼, 창포, 감초 등의 강장성분을 이용한 발효 약용주(10), 황정을 발효한 무국주(11), 전통 발효주를 증류하고 자초에 증류액을 통과시켜 만든 진도 홍주(12)등이 있다. 그리고 일반 발효주로 모과주(13), 오미자주(14), 오가피주(15), 꽃감주(16) 등이 보고되었다.

현재 우리 술을 세계 주류 시장에서 경쟁력을 갖춘 전통술로 상품성을 높이기 위해서는 우선적으로 누룩의 미생물학적 측면과 효소학적 측면에서 보다 체계적인 연구가 절실히 요구된다(17).

이에 전통주류 제조에 이용되고 있는 누룩에 관한 관심도 높아지고 있으나(18~21) 전통누룩은 가내공업으로 제조되기 때문에 다양한 사상균, 효모와 세균이 존재하여 미생물상이 대단히 복잡하고 비위생적이며 효소역가가 낮은 제품이 많은 문제점이 있다(18,22,23). 발효에 관여하는 여러 미생물들은 술의 품질을 좌우한다. 더욱이 전분질을 당분으로 전환시켜 술을 제조하는데 있어 사상균의 선택은 매우 중요한 위치에 있으며 그 종류 또한 매우 다양하다.

전분의 효소적 가수분해는 일차적으로 입자구조에 의해서 영향을 받고, 그 외에 결정형태나 입자크기, amylose, amylopectin 비율, 평균 분자량, 그리고 지방과 단백질의 존재, 반응조건, 효소적 특이성(24)에 의해서도 영향을 받는다고 알려져 있다.

이처럼 전분의 효소적 가수분해는 전분의 종류와 사상균의 효소적 특성에 큰 영향을 받는다. 따라서 전분의 특이적 기질에 맞는 효소를 생산할 수 있는 균주를 분리 동정하고 효소적 특성을 연구하는 것은 매우 중요한 일이라 하겠다.

이에 본 연구에서는 주요한 임산자원의 유실을 막고, 밤나무 재배농가의 의욕을 고취시키기 위해 밤을 이용한 약주를 개발하고자 밤 전분 당화력이 우수한 곰팡이와 밤 전분 발효력이 우수한 효모를 선발하여 형태학적 특성과 분자생물학적 기법을 통해 동정하였고 분리된 곰팡이에 의해 생산된 효소의 효소학적 특성과 효모의 생리적 특성을 살펴보았다.

분리된 균주를 이용하여 주모 제조법 검토, 보당제의 선택 및 발효 중 양조학적 특성을 검토하여 밤술 제조법을 확립하였고, 밤술의 살균 및 저장에 따른 품질의 변화 등을 살펴보았다.



## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험재료

#### 1) 재료

본 실험에 사용한 밤은 2003년 10월, 2004년 10월 및 2005. 10월에 전남 광양시 봉강면에서 수확한 중량 20 g내외의 생과를 구입하여(4℃에서 보관), 밤의 겉피, 속피, 박피 밤 및 밤(알밤)으로 구분하여 사용하였다. 쌀(순천농협, 2003. 9~2006. 6, 팔마미인), 옥분(삼양제넥스 사) 및 밀기울(주식회사한국제분)을 시료로 사용하였다.

#### 2) 실험균주분리

밤 전분의 당화력이 우수한 균주를 분리하기 위하여 전남일원의 밤 농장에서 곰팡이가 발생한 밤과 주변의 토양을 수집하여 균원 시료로 사용하였다.

#### 3) 사용배지

사상균 분리를 위한 고체배지는 PDA(potato dextrose agar) 배지를 사용하였고, 밤 전분 분해 활성이 우수한 미생물을 얻기 위해 사용한 분리용 배지는 Czapek 배지를 변형하여 사용하였으며, 효소 생산용 배지는 밀기울 1 kg과 물 600 mL를 잘 혼합하여 121℃에서 20분간 멸균한 기본배지에 탄소원, 질소원, 금속 염류의 양을 달리하여 최적조건을 찾은 후 이를 사용하였다.

Table A-1. Composition of media for isolation

Composition	Amounts
Chestnut starch	20 g
Peptone	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
NaNO <sub>3</sub>	2 g
Agar	20 g
Distilled water	1 L
Initial pH	6.0
Culture temperature	28℃

Table A-2. Composition of media for enzyme production

Composition	Amounts
Wheat bran	1 kg
KNO <sub>3</sub>	10 g
MnCl <sub>2</sub>	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Distilled water	600 mL
Culture temperature	28°C

#### 4) 시약

Ammonium persulfate, DEAE-cellulose, Tween 80, 3,5-dinitrosalicylic acid, branford reagent는 Sigma 사 (USA)제품을 사용하였다. 배지는 Difco 사 (USA) 제품을 구입하여 사용하였고, 그 외 시약은 시중의 특급시약을 사용하였다.

#### 5) 시판조효소 및 정제효소

분곡(한국효소주식회사), Fungamyl(Novozymes co), AMG(Novozymes co) 와 Termamyl-120(Novozymes co.), Dextrozyme DX(Novozymes co) 및 탁주 효소 액화효소 5000(주식회사바이오랜드)을 사용하였다.

### 나. 실험방법

#### 1) 밤 전분 당화력이 우수한 곰팡이 분리 및 당화력 실험

##### 가) 시험균주 분리

밤 전분의 당화력이 우수한 균주를 분리하기 위해 전남 일원의 밤 농장에서 수집한 곰팡이가 발생한 밤과 주변의 토양시료를 각 시험관에 넣고, 멸균 생리식염수 (0.85% NaCl)를 적당량 가하여 150 rpm으로 10분간 진탕시킨 후, 이를 PDA 배지에 도말하여 28°C에서 3일간 배양한 다음 나타난 균락을 선택하여 순수 분리하였다. 선정된 균주는 121°C에서 15분간 멸균된 분리용 한천배지에 포자현탁액( $1 \times 10^7$ )

spores/mL) 10  $\mu$ L를 접종하여 28°C에서 2일간 배양한 다음, 0.1 N iodine 용액을 분무하여 투명환의 크기로 분해력이 우수한 균주를 1차 screen 하였다. 1차 선정된 균주는 효소 생산용 밀기울 배지에 접종하여 효소활성을 측정한 후 활성이 우수한 균주를 선발하였다. 즉, 5 L 용량의 삼각 플라스크에 wheat bran 1 kg, KNO<sub>3</sub> 10 g, MnCl<sub>2</sub> 2 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g을 넣고 물 600 mL를 가하여 121°C에서 20분간 멸균한 후, 1차 screening된 균주의 포자현탁액( $1 \times 10^7$  spores/mL) 50 mL를 접종하고 효소의 활성을 측정하였다. 배양기간 중 균사증식에 의한 배지의 고형화를 방지하기 위하여 적당한 배양시간에 배지를 흔들어서 주었다(25). 효소활성은 3,5-dinitrosalicylic acid 환원당 측정법을 약간 변형하여 측정하였다.

## 나) 균주의 동정

### (1) 형태적 특성에 따른 균주의 동정

최종적으로 선정된 균주들은 yeast-malt extract agar(YM, Difco Co.)와 potato dextrose agar(PDA, Difco Co.)배지에 각각 평판배양하여 colony의 형태와 성장, 배양상의 특징 및 색깔의 변화 등을 배지에 따라 관찰하였고, 또한 PDA 배지로 슬라이드 배양하여 균사와 분생포자의 형태를 관찰하였다. 선별된 균주의 동정은 Ainsworth 등(26), Kenneth와 Fennel 등(27)에 준하여 동정하였다(28~31).

### (2) ITS 염기서열분석에 의한 동정

#### (가) 곰팡이의 DNA 추출

ITS (internal transcribed spacer)의 염기서열 분석을 통하여 확인 동정하기 위한 곰팡이의 genomic DNA 추출은 Cubero 등(32)과 Armaleo와 Clerc(33)에 의한 CTAB(Cethyl-trimethyl ammonium bromide)방법을 변형하여 추출하였다.

#### (나) PCR

PCR 반응액은 3  $\mu$ L의 template DNA, 2.5 unit *Taq* DNA polymerase(Takara Co.) 0.3  $\mu$ L, 10 $\times$  PCR buffer(100 mM Tris HCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, pH 8.3) 5  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP 5  $\mu$ L, 각각 100 pmole의 primer 0.5  $\mu$ L를 포함하여 멸균증류수로 최종 부피를 50  $\mu$ L로 조절하였다.

Primer는 진핵생물에 대한 universal primer로 White 등(34)에 의하여 고안된

'ITS1'과 'ITS4'를 이용하여 16S와 23S 사이의 rDNA ITS1 및 ITS2 부분과 5.8S 유전자를 증폭시켰다(Table A-3). PCR은 94°C에서 5분간 pre-denaturation을 시키고 94°C에서 2분간 denaturation을 행한 뒤, 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension과정을 35회 반복하였다. 35회 반복된 thermal cycle extention 이후, 72°C에서 3분간 final extension 과정을 첨가하여 반응을 완료하였다.

Table A-3. Primers for amplification and sequencing of the ITS

Primer	Nucleotide sequence (5'→ 3')	Reference
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White <i>et al.</i> (1990)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

#### (다) Plasmid DNA extraction

형질 전환된 단독콜로니를 ampicillin (50 µg/mL)이 첨가된 LB에 접종하고 37°C에서 하루 밤 진탕배양한 후, plasmid miniprep kit (Takara, Co.)를 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다.

#### (라) 염기서열 분석

Plasmid DNA 추출에 의해 얻어진 DNA를 ALF-Express automatic sequencer (Pharmacia Biotech, Lyon, France)를 이용하여 염기서열을 분석한 후, 염기서열의 상동성은 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program을 이용하여 상동성 유무를 파악하였다.

#### 다) 효소의 생산조건 탐색

##### (1) 균의 배양 및 조효소액 조제

효소 생산용 호화밀기울 배지를 121℃에서 20분간 고압멸균 후 분리된 시험균주 포자현탁액( $1 \times 10^7$  spores/mL)을 이용하여 접종하고 30℃에서 72시간 배양하였다. 배양한 밀기울국(koji)을 10배 가량의 40 mM acetate buffer(pH5.5)로 현탁하고 실온(20℃)에서 6시간 진탕(160 rpm)하여 효소를 추출하였다. 추출액을 Toyo No.2 filter paper로 여과하고 여액을 4℃에서 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여, 그 상정액을 조효소액으로 하였으며 4℃에서 보관하면서 사용하였다.

### (2) $\alpha$ - Amylase 활성 측정

효소활성은 3,5-dinitrosalicylic acid 환원당 측정법을 변형하여 측정하였다(65). 효소활성 측정을 위한 표준 곡선 작성은 다음과 같이 하였다. 즉, 각 시험관에 glucose의 함량이 0.05~2.0 mg/mL가 되도록 조제하고 표준용액 1.0 mL에 DNS 시약 1.0 mL씩 첨가하여 끓는 물에서 5분간 증탕한 후, 실온이 되게 식히고 total volume이 10 mL가 되도록 증류수로 희석하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성 측정에 사용된 기질 용액은 밤으로부터 분리한 chestnut starch의 농도가 1%가 되도록 조절하고, 2분간 boiling 하여 20℃로 식힌 후 사용하였다. 효소 활성 측정은 기질 용액 0.90 mL에 효소 용액 0.1 mL를 가하여 40℃에서 30분간 반응 시키고, 위의 방법에 따라 행하였으며 DNS 용액을 첨가한 후 효소 용액 0.1 mL를 넣고 측정된 잔류당의 값을 제한 후  $\alpha$ -amylase활성을 계산 하였다. 효소의 단위는 위의 방법으로 1분간 1  $\mu$ mol의 glucose를 생성한 효소량을 1 unit로 하였다.

### (3) 단백질의 정량

단백질 정량은 bovine serum albumine(BSA, Pierce, USA)을 표준 단백질로 하여 Bradford 방법(Bradford등, 1976)으로 정량하였다(35). 즉, 각 시험관에 BSA 함량이 0.25~1.0 mg/mL의 농도가 되도록 조절한 다음 각각 0.1 mL씩 취하고 Bradford reagent 3.0 mL을 첨가한 다음 vortex mixer를 이용하여 잘 섞은 후, 10분간 실온에서 방치하고 1시간 이내에 모든 시료를 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 위와 같은 방법으로 조효소의 흡광도를 측정하고 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 구하였다.

정제 과정중의 단백질은 흡광도 280 nm에서 측정하여 단백질의 농도를 표시하였다.

### (4) 효소의 생산조건

#### (가) 탄소원의 영향

효소 생산에 있어서 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 효소생산용 기본 배지에 glucose, fructose, maltose, raffinose, soluble starch, corn starch, chestnut starch, sucrose, lactose, cellulose, sorbitol 및 mannitol을 각각 2%씩 첨가하여 탄소원에 따른 효소생산 효과를 살펴보았다.

#### (나) 질소원의 영향

질소원의 영향은 최적 탄소원을 첨가한 기본 배지에 무기 및 유기 질소원의 효소 생산에 미치는 효과를 조사해 보기 위하여 yeast extract, malt extract, beef extract, peptone, casein,  $KNO_3$ ,  $NaNO_2$ ,  $NaNO_3$ ,  $NH_4Cl$  및  $(NH_4)_2SO_4$ 을 각각 0.1%씩 첨가하여 효소 생산효과를 살펴보았다.

#### (다) 인산염의 영향

최적 탄소원과 최적 질소원을 첨가한 기본 배지에 각종 인산염의 효소 생산에 미치는 효과를 알아보기 위하여  $KH_2PO_4$ ,  $NH_4H_2PO_4$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $(NH_4)_2HPO_4$  및  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 를 0.1% 씩 첨가하고 28°C에서 48시간 배양하여 효소 생산에 미치는 인산염의 효과를 살펴보았다.

#### (라) 금속이온의 영향

금속이온의 효소 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 금속염을 제외한 배지에  $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $MnCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4$ ,  $CuCl_2$  및  $AgNO_3$ 를 0.01%가 되도록 첨가하여 효소 생산효과를 살펴보았다.

#### (마) 배양온도의 영향

효소 활성에 미치는 배양 온도의 영향을 조사하기 위하여 최적 배지를 기본으로 하여 균을 접종한 후, 배양온도를 26, 28, 30 및 32°C에서 3일간 배양하여 효소의 역가를 측정함으로써 효소 생산 최적 배양온도를 결정하였다.

#### (바) 배양시간에 따른 영향

효소 생산의 최적 배양시간을 결정하기 위하여 최적 배지를 기본으로 28°C에서 10일간 배양하여 그 배양시간에 따른 효소 활성 변화를 살펴보았다.

#### 라) 분리 균주의 $\alpha$ -amylase의 정제

##### (1) $\alpha$ - amylase의 정제

##### (가) 염석 및 탈염

효소정제의 모든 과정은 4°C에서 실시하였고 전 과정은 Fig. 4와 같다.

조효소액으로부터 활성 단백질을 얻기 위하여 조효소액 500 mL에 황산암모늄을 20%로 포화시켜 4°C에서 12시간 정치한 후, 원심분리(12,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 비활성 단백질인 침전물을 제거하고, 상정액에 황산암모늄을 80%로 포화시켜 하룻밤 정치시켰다(Table 10). 황산암모늄이 80%로 포화된 효소액을 원심분리(12,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 얻어진 침전물을 40 mM Na-acetate buffer(pH 5.0)로 용해시켜 투석용 tube에 옮겨 넣고 동일 buffer에 담근 후 magnetic stirrer를 이용하여 교반하면서 2~3시간 마다 beaker내의 buffer를 3~4회 교환하여 황산암모늄을 제거시켰다. 투석된 효소액을 원심분리하고 cotton filter를 이용하여 여과한 후 불용성물질을 완전히 제거하였다.

##### (나) DEAE-cellulose column chromatography

DEAE-cellulose(capacity: 0.85 meq/g)의 평형화를 위하여 수지 4.6 g을 0.5 M HCl 70 mL(15배 부피)에 현탁하여 실온(25°C)에서 30분간 방치하였다. 이를 glass filter(No. 3)로 거른 다음 증류수 1 L를 통과시켜 pH 약 4.0이 되게 하였다. 이에 15배 가량의 0.5 M NaOH 에 현탁하여 실온에서 30분간 방치하였다가 흡인 여과 후 증류수 1.5 L로 세척하고, 40 mM Na-acetate buffer(pH 5.0)로 현탁하고 column(2.6×30 cm)에 충전하여 평형화시켜 실험에 사용하였다(36).

평형화된 column에 투석액을 충전하고 동일 buffer 400 mL로 세척한 다음 0.1~0.6 M NaCl을 함유한 buffer를 이용하여 linear gradient로 용출하였으며, 이때의 용출 속도는 20 mL/hr로 하였고 분획당 5 mL씩 받아 protein 및 효소활성도를 측정하였다.

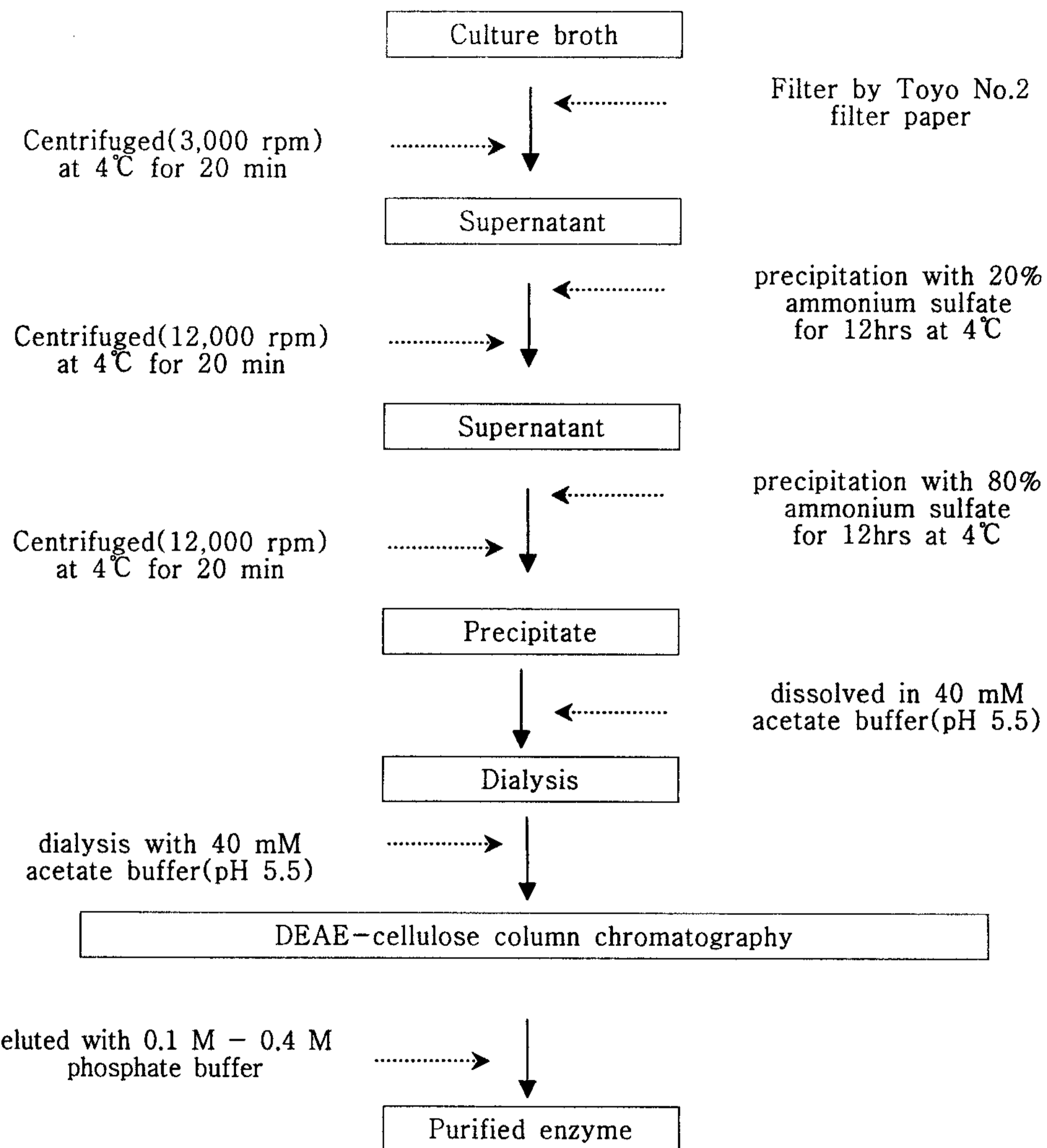


Fig. A-1. Process of purification for  $\alpha$ -amylase.

(2) 분해 생성물의 확인



분리균주에서 정제한 효소의 분해 생성물을 확인하고자 1% 밤전분 호화용액 2 mL에 정제 효소액 10  $\mu$ L 가하여 40  $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후, 급 냉각시켜 효소반응을 정지시키고 그 반응액을 원심분리(16,000 rpm, 20 min)하여 상정액을 취하여 0.45  $\mu$ m membrane filter(Millipore Co. USA)로 여과한 여액을 High performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 Table A-4와 같다.

Table A-4. The operating condition of HPLC for analysis of hydrolysis products

Item	Condition
Instrument	Waters associates M 244(U.S.A)
Detector	ELSD(Evaporative Light Scattering Detector)
Column	Sugar-pak column (Waters Co., 300mm L $\times$ 6.5mm ID)
Column temp.	80 $^{\circ}$ C
Solvent	Water
Flow rate	0.3 mL/min
Injection volume	20 $\mu$ L

### (3) 효소학적 특성 검토

분리 균주로부터 얻은 효소의 특성을 살펴보기 위해 pH 안정성, 열 안정성, 최적 pH, 최적 온도, 열 안정성에 미치는  $Ca^{2+}$ 의 영향을 조사하였다. pH 안정성을 검토하기 위하여 pH 1.0~13.0 까지 pH가 다른 여러 종류의 완충 용액과 동량의 효소액을 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치한 후 잔존 효소 활성을 측정하였고, 열 안정성은 효소액을 40 $^{\circ}$ C에서 80 $^{\circ}$ C까지 각 온도에서 20분간 열처리하고 급 냉각시켜 잔존 효소 활성을 측정하였다. 최적 pH는 효소 반응액의 pH를 2.0~10.0 까지 달리하여 40 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 효소 활성을 측정하였으며, 최적 온도는 각기 다른 온도에서 효소 반응시켜 활성을 측정하였다. 열 안정성에 미치는  $Ca^{2+}$ 의 영향을 살펴보기 위해 효소액과 동량의 20 mM  $CaCl_2$ 를 혼합하고 50~70 $^{\circ}$ C까지 120분간 열처리하면서 30분마다 잔존 효소 활성을 측정하였다.

전분 종류에 따른 효소의 활성도를 살펴보기 위해 wheat starch, rice starch, chestnut starch, soluble starch, corn starch 및 potato starch의 2% 전분현탁액을 만든 후 효소 활성을 측정하여 soluble starch를 기준으로 당화력을 비교하였다.

## 2) 밤 전분 당화액의 우수한 발효 효모 분리 및 발효력 측정

### 가) 우수 효모분리

밤술 제조에 사용할 우수 효모를 분리하기 위하여 밤 과수원에서 알코올 취가 있는 밤을 선택하여 일정량의 생리식염수로 세척하고 이 세척액을 malt agar 배지에 주가배양법을 이용하여 효모를 순수분리 하였다. 분리된 균주는 25%(밤 전분에 옥분을 가함)호화 밤 전분액에 당화제로 탁주용 효소를 밤 전분량 1%첨가하고 2일 전 배양한 분리균주를  $10^6$ /mL 되게 첨가하여 28°C에서 3일간 발효시켜 알코올 생산력을 Gas chromatography를 이용하여 측정하였고, 알코올분 10% 이상 생산하는 균주를 선발하고, 알코올 발력이 강한 균주 중 관능적으로 향기생산성이 우수한 균주를 최종 선발하여 malt agar slant에 옮겨 5°C에서 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

### 나) 효모의 동정

분리균주 중 알코올 생성능이 가장 우수하다고 판정된 균주를 Lodder의 The Yeast에 의한 동정과 ITS (internal transcribed spacer)의 염기서열 분석을 통하여 동정을 실시하였다.

### 다) 효모의 생육도 측정

분리한 균의 최적 배양온도를 검토하기 위해 malt extract배지에 균을 접종하여 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C에서 48시간 배양한 후 660nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생육도를 비교하였다.

### 라) 알코올 분석

알코올 분석은 gas chromatograph(GC, Hewlett-Packard 6890)로 분석하였다. 즉, 시료 50 mL를 취하여 3,600 rpm에서 30분간 원심분리 시킨 후 그 상등액 1 mL에 증류수를 가하여 100 mL로 정용한 후 GC에 의해 alcohol 함량을 측정하였다. Column은 Carbopack B/5% Carbowax 20M 3 M(L)×4 mm(φ)을 사

용하였으며, 분석조건은 initial temp. 80°C, final temp. 150°C, program rate 5°C/min, 그리고 carrier gas는 He을 사용하였다.

### 3) 밤술의 생산성 향상 방안

#### 가) 밤 술덧의 호화 처리 방법에 따른 알코올 함량

밤술에 사용되는 물료의 호화처리 방법을 탐색하기 위하여 담금 원료에 60°C, 85°C의 열수를 첨가하는 방법, 100°C까지 가열하여 호화시키는 방법을 비교 검토하였다. 즉 각각의 온도별로 호화 처리된 물료로 밤술을 제조하여 20±1°C의 항온기에 저장하면서 2일 간격으로 알코올 함량을 분석하였다.

#### 나) 생산성 향상과 고농도 담금 위한 점도 저하방법

##### (1) 시판효소와 분리균 koji에 따른 액화력 측정

시판효소와 분리균으로 만든 koji의 액화력을 측정하기 위하여 시판효소의 경우 단백질농도를 1 mg/mL로 조정하여 사용하였고, koji는 전술한 방법에 의해 얻어진 조효소액에 황산암모늄을 첨가하여 염석 후 탈염하고 시판효소의 단백질 농도와 동일하게 조정하여 액화력 측정 실험에 사용하였다.

액화력(dextrinogenic activity, DU)측정은 기질용액(2% 밤 전분호화액) 2mL를 40°C에서 5분간 예열하고, 각각의 효소액 0.1mL를 첨가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 효소반응을 정지 시켰다. 이 반응액을 분광 광도계를 사용하여 670nm에서 투과도를 측정한 후, Wohlgemuth value에 준한 아래의 식에서 효소의 활성화도(unit)를 산출하였다.

$$DU(\text{units/g koji}) = \{ 12.75 \times (T_{30\text{min}} - T_{0\text{min}})/30\text{min} \} \times \text{희석배율}$$

##### (2) 밤 전분 액화력 측정을 위한 점도측정

시판효소와 분리균으로 만든 koji의 점도저하 능력을 측정하기 위해 밤 500 g을 마쇄하고 121°C에서 1시간 증자하여 30°C로 냉각 후 물 1000 mL를 넣어 가열하면서 85°C에서 각각의 액화 효소를 첨가하고 15분간 처리한 후, 30°C로 냉각시켜 각각의 시료를 BROOKFIELD Viscometer를 이용하여(Model : RVT, N103870 spindle No. 6) 점도를 측정하였다.

분리균 으로부터 얻어진 조효소액의 경우는 반응 온도를 50℃로 하고 그 외 조건은 모두 동일하게 처리하여 점도를 측정하였다.

#### 다) 밤술의 발효특성 및 생산성 향상 방법

##### (1) 주모에 따른 밤술의 발효 특성

###### (가) 주모 제조방법에 따른 알코올 함량

주모 제조방법에 따른 밤술의 발효 특성을 살펴보고자 koji를 이용한 주모와 시판 효소를 이용한 주모를 제조하여 알코올 함량을 비교하였다. 즉, koji주모는 *Aspergillus oryzae* A-2를 이용한 koji 50 g과 겉피를 제거한 증자밤 1 kg, 쌀과 옥분 100 g, 물 1000 mL 및 순수 분리된 *Sacchromyces cerevisiae* N-6 배양액 50 mL를 혼합하여 사용하였고, 시판효소주모는 시판 효소 중 당화력이 가장 우수한 AMG(Novozymes) 0.5 mL를 위와 같은 조건으로 처리한 물료에 첨가한 후 pH를 4.0으로 조절하여 20℃에서 10일간 발효시켜 알코올 함량을 측정하였다.

###### (나) 분리균 koji를 이용한 밤술 발효 특성

주모의 원료에 따른 밤술의 발효 특성을 검토하기 위하여 쌀과 밤을 주원료로 주모를 제조하였다. 이때 사용한 당화제는 분리된 균주를 이용한 koji를 사용하였고, 제조된 주모는 20℃에서 10일간 발효시키면서 2일 간격으로 효모수, 젖산균수 변화를 측정하였다. 또한 각 원료의 주모를 이용하여 담근 밤술을 20℃에서 10일간 발효시키면서 2일 간격으로 술덧 중 젖산균수, 산도변화 및 알코올 함량을 측정하였다.

##### (2) 원료의 종류와 pH에 따른 술덧의 발효특성

원료 종류와 pH에 따른 술덧의 발효특성을 살펴보기 위하여 밤, 옥분 및 쌀의 전분질 함량이 동일하도록 조절하고, 젖산을 이용하여 pH 조절 후 밤술 술덧의 발효특성을 살펴보았다. 즉, 밤(밤 1 kg + 쌀 500 g), 쌀 1 kg 및 옥분 1 kg을 각각 증자하여 원료로 사용하고 당화제로 *Aspergillus oryzae* A-2를 이용한 koji 50 g과 물 1500 mL, *Sacchromyces cerevisiae* N-6의 증대 배양액 50 mL를 각각 첨가하여 20℃에서 10일간 발효시키면서 1일 간격으로 알코올 생성량, 젖산 및 젖산균수를 측정하였다. 알코올 함량은 G.C.로 분석하였고, 젖산은 적정법으로 정량하였으며 젖산균수 측정은 Rogosa SL agar에 추가평판배양하여 균수를 측정하였다.

(3) 담금 조건에 따른 발효특성

(가) 액화효소 종류에 따른 알코올 함량

액화효소 종류에 따른 밤술의 발효특성을 살펴보기 위하여 각각의 시판효소를 사용하여 밤술 양조 후 알코올 함량을 비교하였다. 즉, 밤 1 kg을 세척하여 마쇄한 후 121℃에서 1시간 증자하여 30℃로 냉각 후 증자한 쌀 500 g과 물 1000 mL를 넣고 85℃에서 각각의 시판 액화효소를 첨가하여 15분간 당화시킨 후 *Sacchromyces cerevisiae* N-6 배양액 50 mL를 혼합하여 20±1℃에서 10일간 발효시키면서 G.C.를 이용하여 2~3일 간격으로 알코올 함량을 측정하였다.

(나) *Aspergillus oryzae* A-2로 제조된 koji 첨가량에 따른 알코올 함량

증자한 밤 1 kg, 쌀 500 g, 전배양 효모(*Sacchromyces cerevisiae* N-6) 50 mL 및 물 1500 mL에 쌀koi(*Aspergillus oryzae* A-2)의 양을 1~10%로 달리하여 첨가 후 20±1℃의 항온기에서 발효시키면서 2~3일 간격으로 알코올 함량을 측정하였다.

(다) 시판액화효소 농도별 알코올 함량

시판 액화효소의 농도를 결정하고자 (주)바이오랜드의 액화효소 5000의 함량을 0.05~0.5%로 달리하여 당화시킨 후 알코올 함량을 측정하였다.

(라) 당화효소 종류와 농도에 따른 알코올 함량

다)-(3)-(가)항과 같이 처리한 밤 시료에 85℃에서 액화효소 5000을 0.3% 첨가한 후 그 중 가장 당화율이 좋은 효소로 선발된 탁주용 효소를 0.1~0.5%로 농도를 조절하여 알코올 함량을 GC로 분석 하였다.

(마) 효모 종류에 따른 알코올 함량

다)-(3)-(가)항과 같이 처리한 밤 시료에 액화효소 5000을 0.3%, 탁주용 효소를 0.3%의 농도로 처리하여 4종의 효모 배양액을 각각 100 mL 접종하여 20±1℃의 항온기에 넣어 2일 간격으로 알코올 함량을 분석 하였다.

#### 라) 제조방법에 따른 밤술의 기호도 조사

##### (1) 액화효소 및 당화효소 종류에 따른 기호도 조사

제조방법에 따른 밤술의 기호도를 결정하기 위하여 각각의 시판효소를 이용한 밤술과 배양 koji로 담금한 밤술에 대하여 관능평가를 실시하였다. 즉, 다)-(3)항과 같이 처리한 밤 시료를 액화효소 5000(0.3%)을 첨가하여 액화시킨 후 각각의 당화효소를 첨가하여 밤술을 제조하였다. 배양 koji (*Aspergillus oryzae* A-2)를 이용한 밤술은 다)-(3)-(나)항과 같이 담금 후  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 항온기에 넣어 10일간 발효시킨 후에 제성하여 시료로 사용하였다.

밤술의 관능적 품질은 식품공학과 재학생 10명을 패널로 선정하여 종합적 기호도에 대하여 5점 채점법으로 실시하였다. 이 때 채점기준은 아주 좋다 : 5점, 좋다: 4점, 보통이다: 3점, 나쁘다: 2점, 아주 나쁘다: 1점으로 하였으며, 관능검사 결과는 Duncan의 다중 비교법으로 평균치간의 유의성을 검정하였다.

##### (2) 효모 종류에 따른 기호도 조사

다)-(3)항과 같이 처리한 밤시료에 액화효소 5000을 0.3%를 첨가하여 액화시킨 후 배양 koji(*Aspergillus oryzae* A-2) 5%와 각각의 효모 배양액 100mL을 혼합하여 담금 하였다. 담금 후  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 항온기에 넣어 10일간 발효시킨 후에 제성하여 시료로 사용하였으며 밤술의 관능적 품질은 식품공학과 재학생 10명을 패널로 선정하여 종합적 기호도에 대하여 5점 채점법으로 실시하였다. 이 때 채점기준은 아주 좋다.: 5점, 좋다: 4점, 보통이다: 3점, 나쁘다: 2점, 아주 나쁘다: 1점으로 하였으며, 관능검사 결과는 Duncan의 다중 비교법으로 평균치간의 유의성을 검정하였다.

#### 4) 밤술의 발효 특성

##### 가) 밤술 담금 방법

###### (1) Koji 제조

###### (가) 쌀 koji 제조

본 실험에 사용된 쌀 koji는 쌀 1kg을 12시간동안 물에 침지시킨 후 30분간 증자하여  $30^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시킨 다음 *Aspergillus oryzae* A-2로 제조된 종국 0.1%를 접종하고  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 3일간 배양하여 밤술 양조용 코지로 사용하였다.

#### (나) 옥분 koji 제조

본 실험에 사용된 옥분 koji는 옥분 800g에 대해 40%의 물을 가하여 반죽한 다음 얇게 펴서 30분간 증자하여 30℃로 냉각시킨 다음 *Aspergillus oryzae* A-2로 제조된 종국 0.1%를 접종하고 20℃에서 3일간 배양하여 밤술 양조용 코지로 사용하였다.

#### (2) koji를 이용한 밤술제조

##### (가) 주모 제조

주모제조는 다)-(2)-(가)항의 쌀 주모 제법에 따라 제조하였다. 즉, 증자쌀 500g, 쌀kji 500g 및 물 800 mL를 가하고 전 배양된 *Saccharomyces cerevisiae* A-6 50 mL를 첨가하여 20℃에서 3일간 발효시켜 주모로 사용하였다.

##### (나) 술 1단 담금

쌀 주모에는 쌀 koji 500g과 증자한 쌀 500g, 물 1.5L를 넣어 1단 담금하였고, 옥분주모에는 옥분 koji 400g과 옥분 400g에 대해 50%의 물을 가해 반죽하여 증자한 것에 물 1.5L를 첨가하여 1단 담금하여 20℃에서 12시간 간격으로 교반하여 2일간 발효시켰다.

##### (다) 술 2단 담금

생밤 2.5kg을 세척하여 마쇄한 후 1시간 증자하여 30℃로 냉각하였다. 쌀 koji를 이용해 1단 담금 한 밤술에는 냉각 시킨 밤 2.5kg과 증자한 쌀 1kg, 물 1.5L를 첨가하였고, 옥분 koji를 이용해 1단 담금 한 밤술에는 냉각 시킨 밤 2.5kg과 옥분 800g에 300ml의 물을 가해 증자한 것, 물 1.5L를 첨가하였고, 대조구는 쌀과 옥분에 각각의 koji를 넣어 다른 시료구와 같은 방법으로 주모제조 및 1단 담금을 하였고 2단 담금은 밤을 첨가하지 않고 증자된 쌀 1kg과 옥분 800g에 300ml의 물을 가해 반죽하여 증자한 것에 각각 물 1.5L씩을 첨가하여 최대 품온을 20℃로 유지하고 8일간 발효시켰다.

#### (3) 시판효소를 이용한 밤술제조

#### (가) 주모제조

주모제조는 쌀가루 500g과 옥분 400g에 물 800ml씩 가해 가열하면서 85℃ 이상에서 액화 효소(액화효소 5000)를 0.3%씩 첨가한 후 10분간 가열하여 30℃로 냉각 시킨 다음 당화 효소(탁주용효소)를 0.3%씩 첨가하고 전 배양한 *Saccharomyces cerevisiae* A-6 50 ml을 각각 혼합하여 20℃에서 6시간 간격으로 교반하면서 3일간 발효시켜 주모를 제조하였다.

#### (나) 술 1단 담금

쌀가루에 효소를 첨가하여 담금한 주모에는 쌀가루 1kg에 물 1.5L를 가하여 85℃ 이상에서 액화효소(액화효소 5000) 0.3%를 첨가하고 100℃에서 15분간 유지한 후 30℃로 냉각 한 다음 당화효소(탁주용효소) 0.3%을 첨가한 시료를 주모에 첨가해 1단 담금하였고, 옥분에 효소를 첨가하여 담금한 주모에는 옥분 800g에 물 1.5L를 가하여 가열하면서 85℃ 이상에서 액화효소(액화효소 5000) 0.3%를 첨가한 후 15분간 유지하여 30℃로 냉각 한 다음 당화효소(탁주용효소) 0.3%을 첨가한 시료를 주모에 넣어 1단 담금 하여 20℃에서 12시간 간격으로 교반하여 3일간 발효시켰다.

#### (다) 술 2단 담금

생밤은 2.5 kg을 세척하여 마쇄한 후 1시간 증자하여 30℃로 냉각하였다. 쌀가루에 효소를 첨가하여 1단 담금한 밤술에는 쌀가루 1kg에 물 1.5L를 가하여 가열하면서 85℃ 이상에서 액화효소(액화효소 5000) 0.3%를 첨가한 후 15분간 가열하여 30℃로 냉각 한 다음 당화효소(탁주용효소) 0.3%을 첨가하여 냉각 시킨 밤 2.5kg과 함께 2단 담금하였고, 옥분에 효소를 첨가하여 1단 담금한 밤술에는 옥분 800g에 물 1.5L를 가하여 가열하면서 85℃ 이상에서 액화효소(액화효소 5000) 0.3%를 첨가한 후 15분간 유지한후 30℃로 냉각 한 다음 당화효소(탁주용효소) 0.3%을 첨가하여 냉각 시킨밤 2.5kg과 함께 2단 담금하여 최대 품온을 28℃로 유지시켜 8일간 발효시켰다.



## 나) 밤술의 성분분석

### (1) pH 및 총산 측정

밤술의 발효 기간 중 pH의 변화는 다음과 같이 분석하였다. 즉, 발효중인 술덧 여액 20ml를 취하여 pH meter(Orion 940. U.S.A)로 측정하였다.

밤술의 발효 기간 중 총산 함량은 상법(37)에 따라 측정하였다. 즉, 시료를 원심분리하여 상등액 10ml를 취해 0.1N NaOH 용액으로 적정한 후 0.009를 곱하여 lactic acid로 환산하였다.

### (2) 환원당 분석

밤술의 발효기간 중 환원당 함량 변화는 Somogyi변법에 준하여 측정하였다.

### (3) 색도 측정

밤술의 발효기간 중 색도측정은 다음과 같이 분석하였다. 즉, 시료 50ml를 원심분리하여 상정액을 여과하고 색도계(super color SP-80, Tokyo, Denshoku, JAPAN)를 이용해 Hunter값 L, a 및 b값을 측정 하였다.

### (4) Fusel oil 분석

밤술의 발효기간 중 생성된 fusel oil은 다음과 같이 분석하였다. fusel oil 표준물질은 15종을 각각 10ppm이 되도록 하였고 용매는 ethanol을 사용하였다. 술에서 fusel oil분석은 발효중인 술덧을 여과하여 여액 1 $\mu$ l를 GC에 주입하였고 표준품과 비교하여 외부 표준법으로 계산하였다. 분석조건은 Table A-5와 같다.

Table A-5. Operating conditions of gas chromatography for fusel oils

Items	Conditions
Instrument	: 5890 Series-II GC (Hewlett Packard Co, USA)
Detector	: Flame ionization detector(FID)
Column	: Ultra-2 Capillary column (250m×0.2mm ID) (Hewlett Packard Co, USA)
Carrier gas	: N <sub>2</sub>
Oven temp.	: 40°C (5min) → 8°C/min → 200°C (5min)
Injection temp.	: 220°C
Detector temp.	: 250°C
Injection volume	: 1.0 $\mu$ l

(5) Ethanol함량

밤술의 발효기간 중 ethanol의 함량 변화는 국세청 주류분석법(38)에 따라 시료 100ml에 증류수 30ml를 취하고 70ml를 증류하여 받은 후 100ml로 정용하여 실온에서 주정계를 사용하여 측정하였다.

(6) 유기산 분석

밤술의 유기산 분석은 시료를 일정량 취해 여과(Whatman No.2)하여 Sepak C<sub>18</sub>으로 정제시킨 다음 0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과한 여액을 HPLC를 이용하여 분석하였고 분석조건은 Table A-6과 같다.

(7) 관능검사

제조된 밤술의 관능검사는 예비검사를 통과한 순천대학교 학생 10명을 대상으로 panel을 구성하여 색, 향, 맛 및 전체 기호도를 5점 평점법으로 실시하였다. 이때 채점 기준은 아주좋다, 5점; 좋다, 4점; 보통이다, 3점; 나쁘다, 2점; 아주 나쁘다, 1점으로 하였고, 2시간 간격으로 시료의 번호를 바꾸어 같은 panel로 3회 반복하였으

며 각 반복시 가장 높은 점수와 가장 낮은 점수를 제외하고 평균 득점을 구하였다. 처리구별 유의성 검정은 SPSS프로그램(39)을 이용한 Duncan의 다중 비교법(40)으로 분석하였다.

Table A-6. HPLC analysis condition for organic acid

Items	Conditions
Instrument	: Waters associates M 244
Detector	: UV/VIS detector 220nm (Waters Co. U.S.A)
Column	: Prevail Organic Acid 5 $\mu$ (150m $\times$ 4.6mm ID) (Alltech. Part No. 88640)
Solvent	: 0.2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Flow rate	: 1ml/min
Injection volume	: 30 $\mu$ l

#### 라) 밤술의 앙금질 및 여과법

제조된 밤술을 압착 여과한 후 5°C에서 24시간 정치하여 1차 앙금을 제거하고 술을 5°C, 0°C, -5°C 및 -10°C에서 3일, 5일, 7 및 10일간 저장 후 규조토 여과기로 여과하였다. 이 때 여과 보조제는 일반적으로 사용한 술 100L에 셀라이트 300g을 첨가하여 여과하였으며 여과도는 660nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

#### 마) 밤술의 살균

##### (1) 열처리

원료비율을 달리하여 담금한 밤술의 품질특성을 비교한 결과 관능평가가 우수했던 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술을 100ml 용기에 채우고 60°C, 70°C, 80°C 및 90°C에서 각각 5분, 10분, 15, 20 및 30분간 가열하였고 100°C에서는 각각 5분, 10분 및 20분간 가열한 후 30°C로 급속 냉각하여 열처리하지 않은 밤술을 대조구로 하여 실험에 사용하였다.

## (2) 미생물 검사

밤술의 미생물은 평판한천배양법(41)으로 세균수, 젖산균수, 효모수를 측정하였다. 즉, 세균은 평판한천배지(plate count agar)에서, 젖산균은 0.133%의 초산을 가하여 최종 pH를 5.5로 조정된 Rogosa SL agar배지에서 37°C/72시간 배양하였다. 효모는 YM agar 배지에서 25°C/72시간 배양한 후 집락수 30~100개인 평판을 택하여 집락수를 측정하였고 희석배수를 곱하여 단위부피당 미생물수를 산출하였다.

## (3) 색도측정

살균조건에 따른 밤술의 색도를 비교하기 위해 다음과 같이 분석하였다. 즉, 시료 50ml를 원심분리하여 상정액을 여과하고 살균온도 및 시간을 달리하여 색도계(super color SP-80, Tokyo, Denshoku, JAPAN)를 이용해 Hunter값인 L, a 및 b값을 측정 하였다.

## (4) 관능검사

살균온도를 각각 60°C~100°C에서 10분간 가열처리한 밤술과 살균효과가 좋았던 80°C에서 각각 5분, 10분, 15분, 20분, 30분씩 가열처리한 밤술을 예비검사를 통과한 순천대학교 학생 10명을 대상으로 panel을 구성하여 색, 향, 맛 및 전체 기호도를 5점 평점법으로 실시하였다. 이때 채점 기준은 아주좋다: 5점, 좋다: 4점, 보통이다: 3점, 나쁘다: 2점, 아주 나쁘다: 1점으로 하였고, 2시간 간격으로 시료의 번호를 바꾸어 같은 panel로 3회 반복하였으며 각 반복시 가장 높은 점수와 가장 낮은 점수를 제외하고 평균 득점을 구하였다. 처리구별 유의성 검정은 SPSS프로그램을 이용한 Duncan의 다중 비교법으로 분석하였다.

### 바) 제성된 밤술의 저장시 품질 변화

#### (1) 성분분석

제성된 밤술의 저장기간 중 품질 변화를 살펴보았다. 즉, 쌀koji로 담금한 밤술을 규조토 여과하여 밀봉 후 65°C, 10분 동안 열탕에서 살균한 시료와 살균처리하지 않은 시료로 구분하여 환원당, 알코올함량, 총산, 가용성 고형분, pH를 조사하였다. 환원당은 Somogyi-Nelson법으로 측정하였고 알코올 함량은 GC로 분석하였으며 총산은 시료를 원심분리하여 상등액 10ml를 취해 0.1N NaOH 용액으로 적정한

후 0.009를 곱하여 lactic acid로 환산하였다. 가용성 고형분은 Abbe 굴절 당도계 (Atago Co., Japan)로 측정하였다.

### (2) 색도

색도는 색차계(Super Color SP-80, Tokyo Denshokul., Japan)에 의하여 L, a, b값을 측정하여 표시하였다. 저장중 성분변화는 실온에서 보관하면서 2주일마다 3개월 동안 측정하였다. 여과 실험은 2회 반복 실험을, 성분분석은 3회 반복 실험 평균값으로 표시하였다.

### (3) 관능검사

저장기간에 따른 밤술의 기호도차이 비교는 아주좋다: 5점, 좋다: 4점, 보통이다: 3점, 나쁘다: 2점, 아주 나쁘다: 1점으로 반복시 가장 높은 점수와 가장 낮은 점수를 제외하고 평균 득점을 구하였다. 처리구별 유의성 검정은 SPSS프로그램을 이용한 Duncan의 다중 비교법으로 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 밤 전분 당화력이 우수한 곰팡이 분리 동정 및 당화력 실험

##### 1) 시험균주 분리 및 당화력 실험

*Rhizopus*속, *Mucor*속 및 *Aspergillus*속을 집중적으로 순수 분리하였다. 선정된 균주를 변형된 Czapek 배지에 배양한 다음 0.1 N iodine 용액을 분무하여 투명환의 크기로 분해력이 우수한 균주를 1차 screen 하였다.

1차 선정된 균주는 효소 생산용 밀기울 배지에 접종하여 효소활성 측정 후 활성이 우수한 균주를 선발하였다. 선택된 균주를 이용하여 밀기울 배지에 접종하고 효소활성을 측정한 결과는 Table A-7과 같다.

*Rhizopus* R-2, R-4와 *Aspergillus* A-2, A-3, AN-2의 5개 균주가 당화력이 우수하였으나 AN-2는 흑국균이어서 선발에서 제외하였으며 *Rhizopus* R-2와 *Aspergillus* A-2가 밤전분의 당화력이 밀기울 koji 1 g당 R-2는 910.8, A-2는 921.6로 타 균주에 비하여 당화력이 우수하여 최종 선발하였다.

Table A-7. Dextrogenic activity of selected molds

Genus	Strains	DU (units/g)	
<i>Rhizopus</i> sp.	R-1	628.6	
	R-2	910.8	
	R-3	740.2	
	R-4	825.2	
<i>Mucor</i> sp.	M-1	705.0	
	M-2	784.8	
<i>Aspergillus</i> sp.	A-1	751.4	
	A-2	921.6	
	A-3	825.5	
	AN-1	785.0	<i>niger</i>
	AN-2	826.8	"

2) 균의 동정

가) 형태학적 특성에 따른 균의 동정

(1) 배양일수에 따른 colony의 형태학적 변화

최종적으로 선정된 균주 A-2를 yeast-malt extract agar(YM, Difco Co.)와 potato dextrose agar(PDA, Difco Co.)배지에 각각 평판 배양하여 colony 형태와 성장, 배양상의 특징 및 색깔의 변화 등을 조사한 결과는 Table A-8과 같다.

분리균주 A-2의 경우 배양초기에는 PDA배지와 YM배지 모두에서 백색의 colony를 형성하다가 시간이 지날수록 PDA배지에서는 colony의 중앙부를 중심으로 연한 황녹색에서 점차 진녹황색으로 변화하였으며, YM배지에서는 초기 연황색에서 배양이 진행됨에 따라 colony 중앙부를 중심으로 점차 진한 황녹색으로 변화하였다(Fig. A-2,3).

배지 후면의 색상은 초기에는 흰색을 띠다가 3 일째부터는 아이보리색으로, 배양 후기에는 탁한 연 노랑색으로 변화하였다. 분리균주의 성장속도는 YM배지가 PDA배지보다 다소 빠른 생육을 보였으나 큰 차이는 없었으며, colony 색상이 서로 다른 것은 PDA배지에는 탄소원 외에 소량의 potato infusion 만이 첨가 되어 있으나 YM배지에는 yeast extract, malt extract, pepton 등과 같은 다양한 유기질소원을 함유하고 있기 때문으로 보인다(25).

Table A-8. Morphological change of *Aspergillus oryzae* A-2

Incubation time (days)	Strain	
	<i>Asp. oryzae</i> A-2	
	PDA	YM agar
2	white	white
3	pale yellow	white
5	greenish	pale yellow
6	greenish	yellow
9	dark greenish	dark yellowish
12	dark greenish	brownish

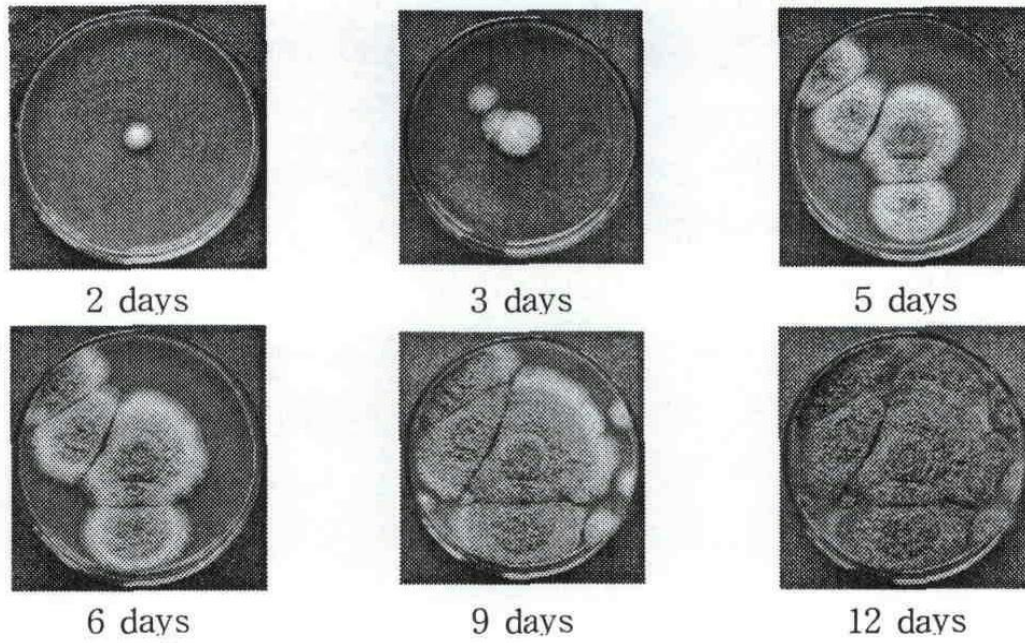


Fig. A-2. Morphological change of *Asp. oryzae* A-2 on PDA.

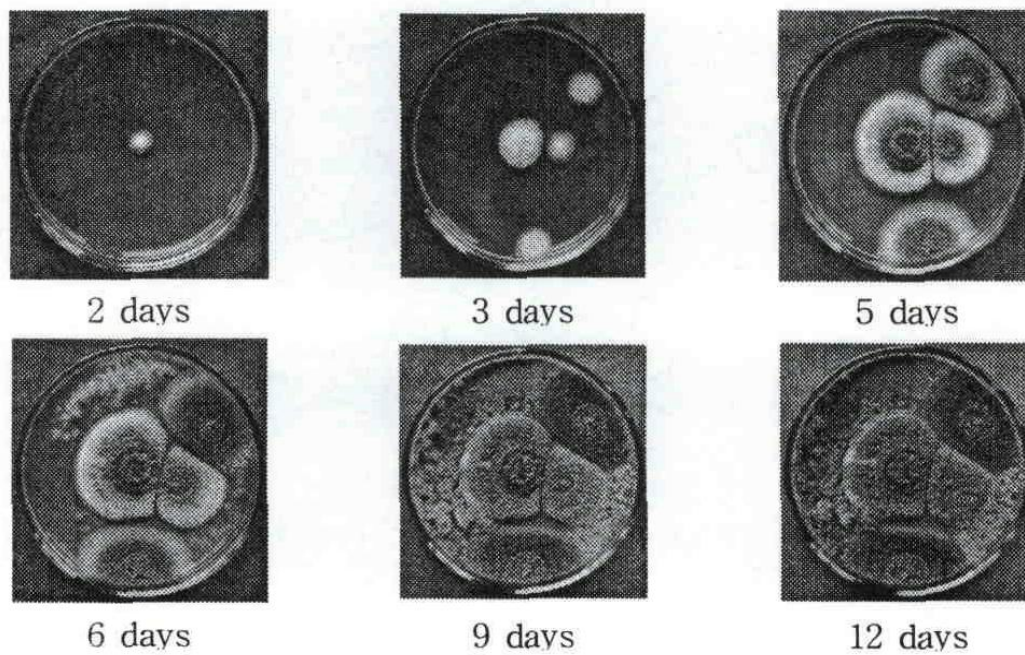


Fig. A-3. Morphological change of *Asp. oryzae* A-2 on YM agar.



(2) 형태적 특성에 따른 균의 동정

최종적으로 선정된 균주 A-2를 PDA 배지에 슬라이드 배양하여 균사와 분생포자의 형태를 관찰한 결과는 Fig. A-4와 같다.

균사에 격벽이 존재하며 분생자가 정낭위의 phialide에 착생하는 phialospore이고 foot cell이 존재하는 균주를 *Aspergillus* sp.로 1차 동정하였고 콜로니의 색이 녹색과 노란색 계통의 색을 띠고, conidial head는 전형적인 방사형이며, 정낭은 구형에 가깝고, phialide는 double 혹은 single layer로 기저경자 끝에 형성되고 분생자는 서양배 모양인 균주를 *Aspergillus oryzae*로 동정하였다(28,29).

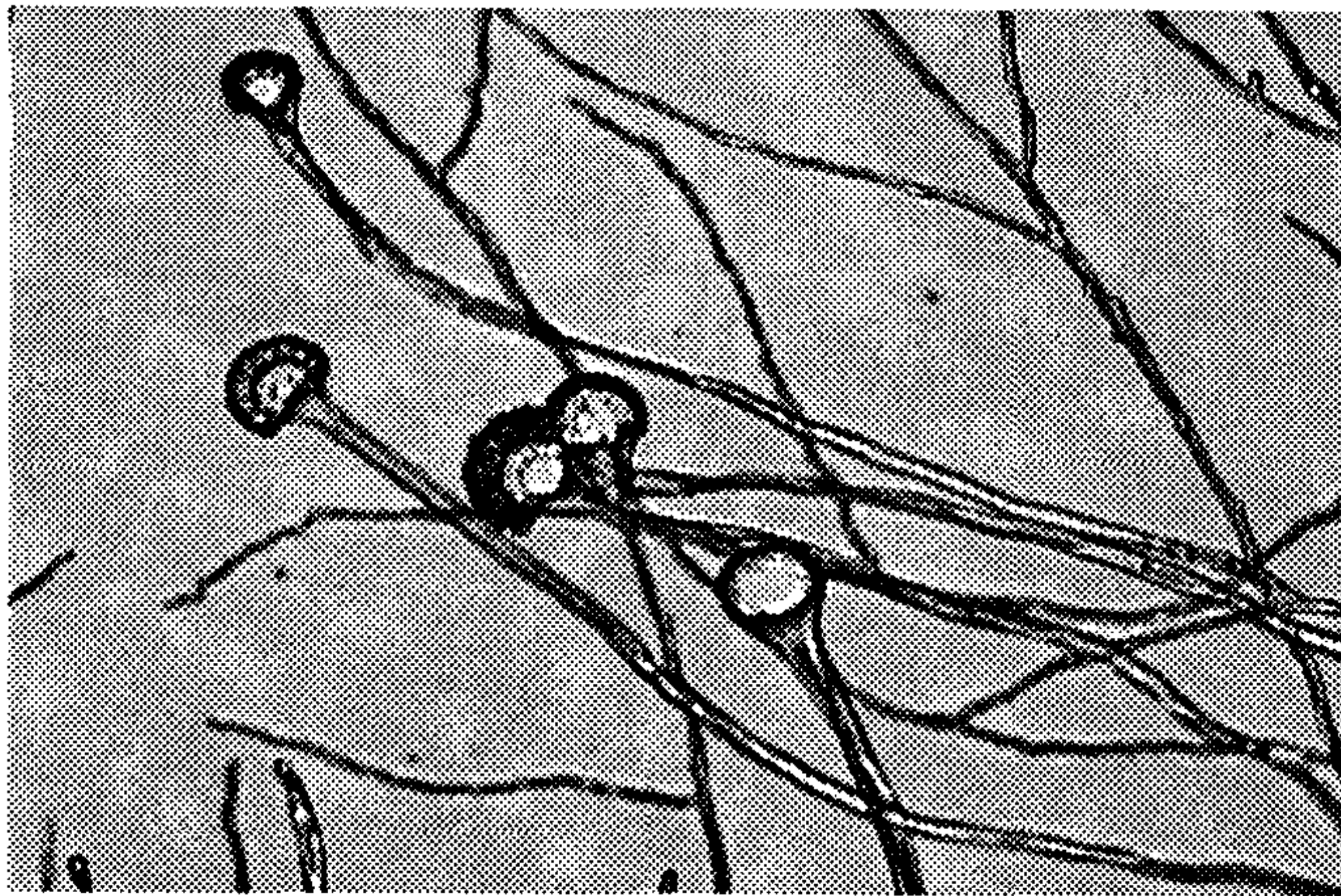


Fig. A-4. Scanning microscopic photogram of *Asp. oryzae* A-2 grown in PDA medium for 72 hrs at 28°C.

나) ITS 염기서열분석에 의한 동정

(1) 염기서열 분석

분리곰팡이, A-2, A-3 및 A-1의 ITS (internal transcribed spacer)의 염기서열 분석을 통한 동정 결과는 Table A-2와 같다. 곰팡이의 전체 염기 서열은 619bp 이며 분리균중 A-2, A-3는 *Aspergillus oryzae*와 100% 동일하고 A-1은 *Aspergillus oryzae* 와 1bp 차이로 99.9% 동일한 것으로 확인되었다. 따라서 균주명은 *Aspergillus oryzae* A-1, A-2, A-3로 명명하였다.

Table A-9. Nucleotide sequences of ITS region of *Aspergillus oryzae* A-2

	1							
A-2	TCGTAGGIG	AACTGCCGA	AGGATCATT	CCGAGTGTAG	GGTTCCTAGC	GAGCCCAACC	TCCACCCGT	GTTTACTGTA
A-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	81							
A-2	CCTTAGTTGC	TTCGGGGGC	CCGCCATCA	TGGGGCCGG	GGGCTCTCAG	CCCCGGCCC	GGGGGGCCG	GAGACACCAC
A-1	.....	TA.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	161							
A-2	GAATCTGTC	TGATCTAGT	AAGTCTGAGT	TGATTGTATC	GCAATCAGTT	AAAACCTTCA	ACAATGGATC	TCTTGGTTCC
A-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	241							
A-2	GGCATCGATG	AAGAACGCAG	CGAAATGCGA	TAAC TAGTGT	GAATTGCAGA	ATTCCGTGAA	TCATCGAGTC	TTTGAACGCA
A-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	321							
A-2	CATTCGGCCC	CCTGGTATTC	CGGGGGCAT	GCCTGTCCGA	GCGTCATTGC	TGCCCATCAA	GCACGGCTTG	TGTGTGGGT
A-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	401							
A-2	CGTCGTCCCC	TCTCCGGGG	CGACGGCCC	CAAAGCCAGC	GGGGCCACCG	CGTCGGATCC	TGAGCGGTAT	GGGCCTTTGT
A-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	481							
A-2	CACCGCTCT	GTAGGGCCG	CGGGGGCTTG	CCGAACGCAA	ATCAATCTTT	TTCCAGGTTG	ACCTCGGATC	AGGTAGGGAT
A-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	561							
A-2	ACCGCTGAA	CTTAAGCATA	TCAATAAGCG	GAGGAAAAGA	AACCAACCGG	GATTGCCTC	619	
A-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....		

### 3) 효소의 생산조건

#### 가) 탄소원의 영향

효소생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 효소 생산용 배지를 기본배지로 하고 각종 탄소원을 2%씩 첨가하여 28°C에서 72시간 배양 후 효소 활성도를 조사한 결과는 Fig. A-5와 같다.

본 균주는 cellulose, raffinose, soluble starch, corn starch 및 maltose 순으로 효소 활성을 보였다.

이는 강(42)의 cellulose, glucose 및 raffinose에서 균체의 생장이 활발하다는 보고와, Fengixie 등(43)의 raffinose, maltose에서 높은 활성을 보인다는 결과와 일치하였다.

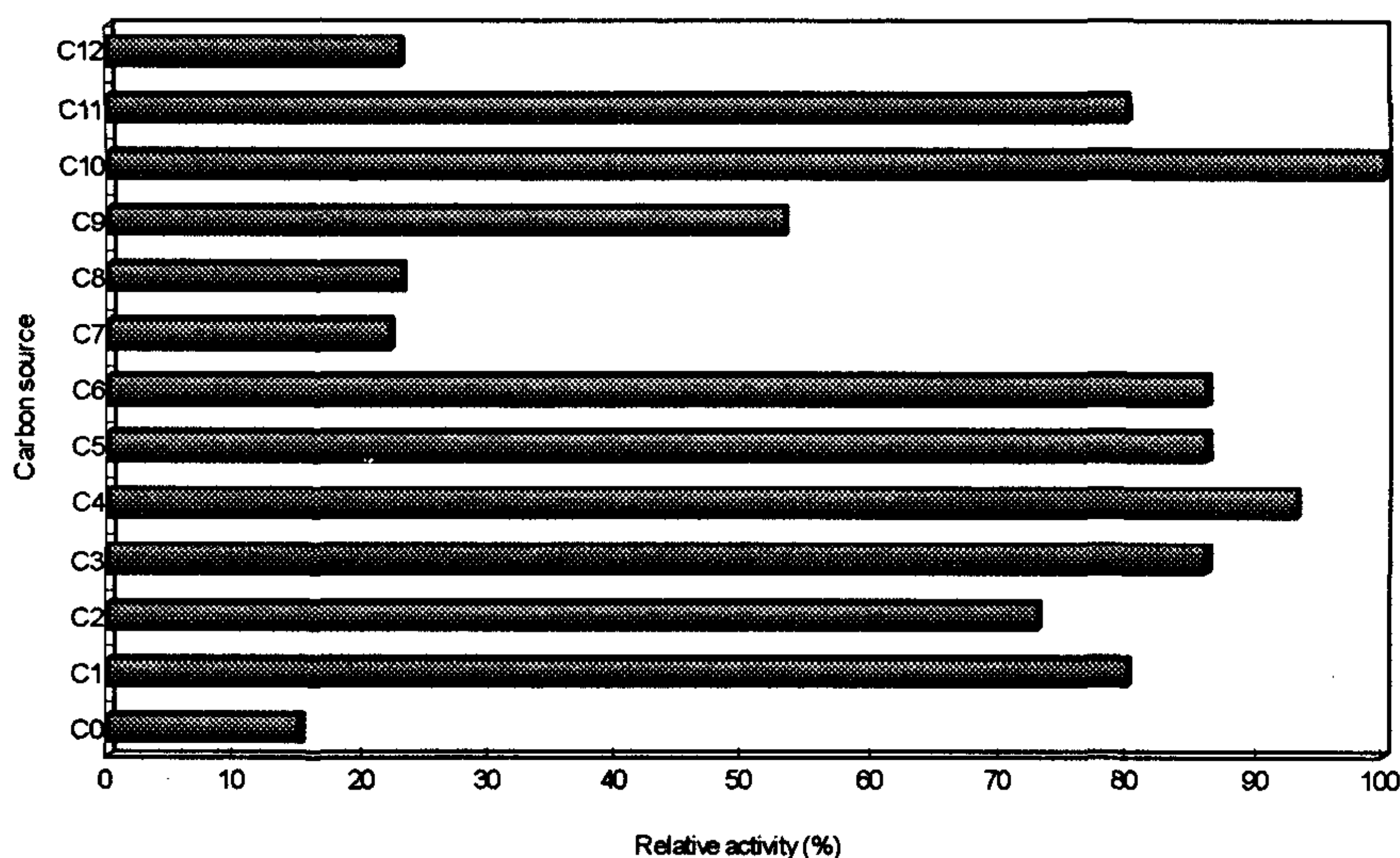


Fig. A-5. Effect of carbon source on  $\alpha$ -amylase activity of *Aspergillus oryzae* A-2.

The concentration of carbon source was 2% in basal medium and cultured for 72 hrs, at 28°C. The enzyme activity was determined by DNS method at 40°C. C0, control; C1, glucose; C2, fructose; C3, maltose; C4, raffinose; C5, soluble starch; C6, corn starch; C7, chestnut starch; C8, sucrose; C9, lactose; C10, cellulose; C11, sorbitol; C12, mannitol

나) 질소원의 영향

효소생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 최적 탄소원을 첨가한 효소 생산용 배지에 각종 질소원을 0.1%씩 첨가하여 28°C에서 72시간 배양 후 효소 활성을 조사한 결과는 Fig. A-6과 같다. 대체로 모든 질소원에서 활성을 보였으나 무기질소원인 KNO<sub>3</sub>에서 가장 큰 활성을 보였으며, 유기질소원인 beef extract와 무기질소원인 NH<sub>4</sub>Cl에서는 낮은 활성을 보였다.

정 등(44)은 polypepton, peptone등이 우수한 질소원 이었다고 보고하였고, 박 등(45)과 Sinsaku 등(46)은 yeast extract, malt extract가 우수하다고 보고하였으며, 강(42)은 soybean meal, tryptone, soytone 및 polypeptone에서 우수한 효소활성을 보였다고 보고하였다. 이러한 결과로 볼 때 각 균주마다 질소원에 대한 영양 요구성이 매우 다양함을 알 수 있었다.

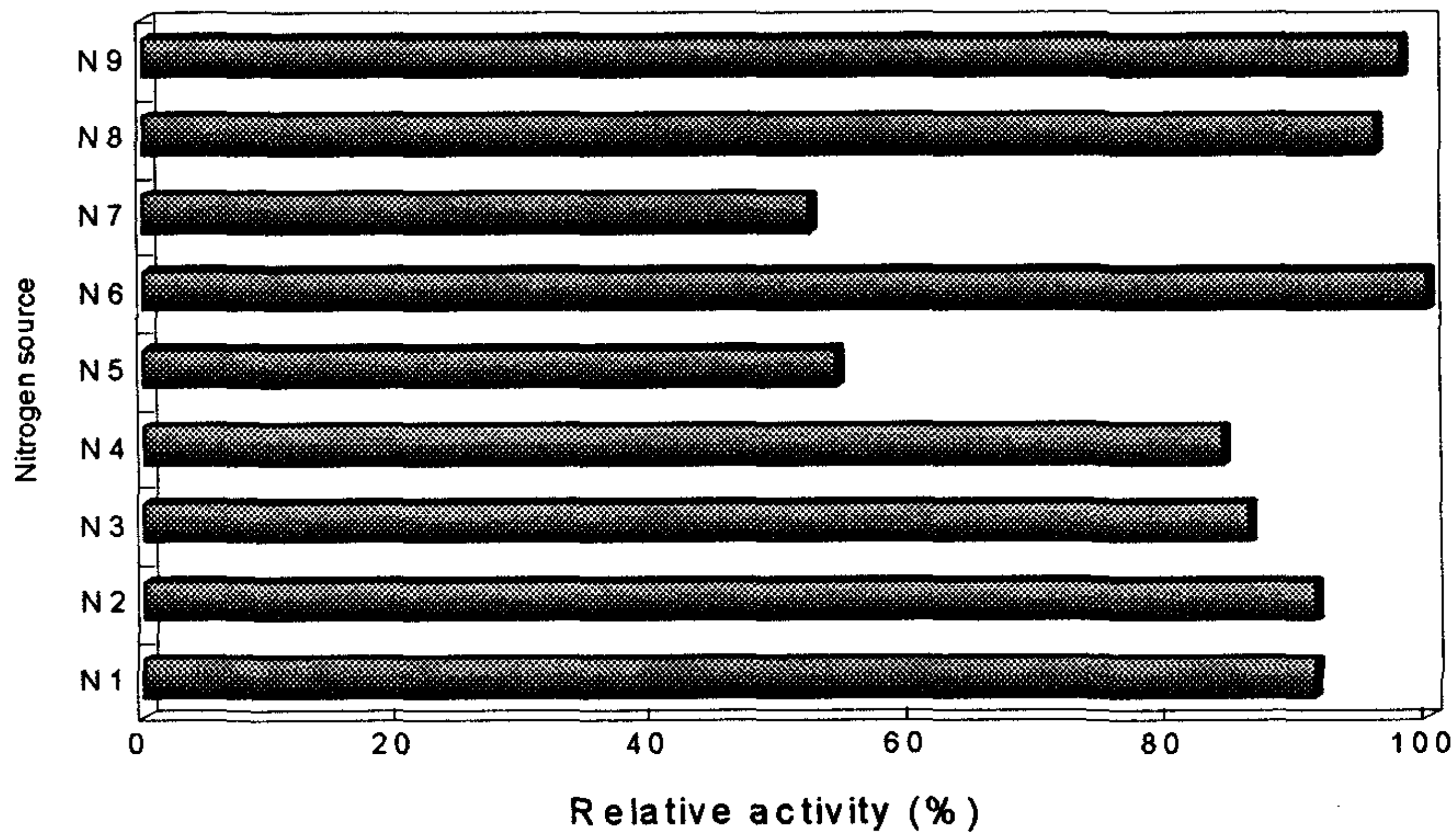


Fig. A-6. Effect of nitrogen source on  $\alpha$ -amylase activity of *Aspergillus oryzae* A-2.

The concentration of nitrogen source was 0.1% in medium containing of 2% cellulose and cultured for 72 hrs, at 28°C. The enzyme activity was determined by DNS method at 40°C. N1, casein; N2, yeast extract; N3, mat extract; N4, beef extract; N5, pepton; N6, KNO<sub>3</sub>; N7, NH<sub>4</sub>Cl; N8, NaNO<sub>3</sub>; N9, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

다) 인산염의 영향

최적 탄소원과 최적 질소원을 첨가한 효소 생산용 배지에 인산염의 영향을 알아보기 위하여 각종 인산염의 농도를 0.1%가 되도록 첨가하여 효소생산 효과를 살펴본 결과는 Fig. A-7과 같이  $K_2HPO_4$ 를 첨가했을 때 가장 높은 효소 활성을 보였다. 이는  $K_2HPO_4$ 의 농도가 0.02%에서 가장 좋다고 보고한 오 등(47)과 0.1%의 농도가 좋다고 보고한 강(42)의 결과와 일치하였다.

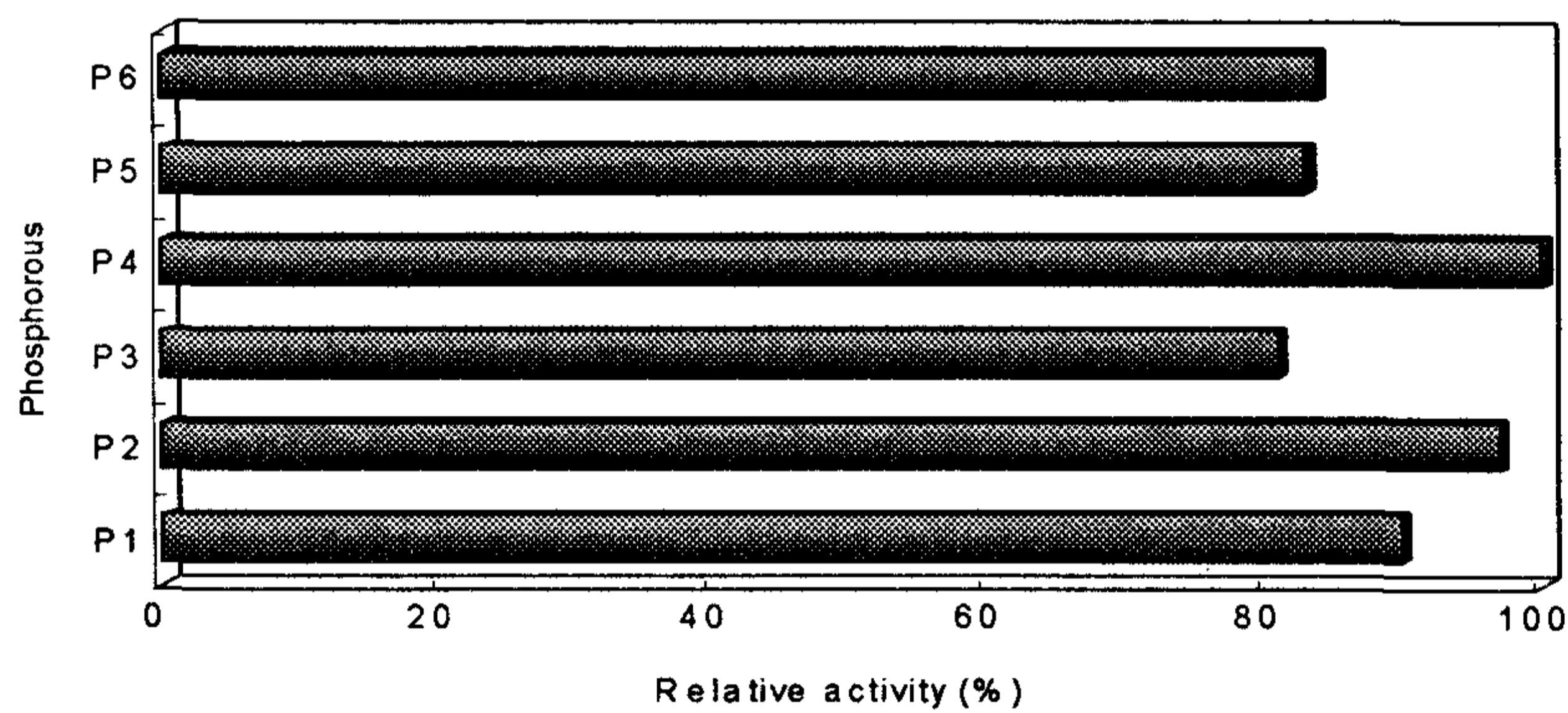


Fig. A-7. Effect of Phosphorous on  $\alpha$ -amylase activity of *Aspergillus oryzae* A-2.

The concentration of phosphorous was 0.1% in medium containing of 2% cellulose, 1%  $KNO_3$  and cultured for 72 hrs, at 28°C. The enzyme activity was determined by DNS method at 40°C. P1,  $KH_2PO_4$ ; P2,  $NH_4H_2PO_4$ ; P3,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ; P4,  $K_2HPO_4$ ; P5,  $(NH_4)_2HPO_4$ ; P6,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$

라) 금속이온의 영향

효소생산에 미치는 금속염의 영향을 알아보기 위하여 cellulose 2%,  $KNO_3$  1% 및  $K_2HPO_4$  0.1%가 들어있는 효소 생산용 배지에 금속염의 농도를 0.01%가 되도록 첨가하여 효소생산 효과를 살펴본 결과는 Fig. 17과 같다.

본 균주는 Fig. A-8에서 보는 것과 같이  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  순으로 효소생산이 우수하였고  $\text{AgNO}_3$  첨가시에는 그 활성이 저해되었다.

이와 같은 결과는 *Aspergillus usami*의 배양에서  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ 등이 우수하였다는 정등(44)의 보고와는 다르나 강(42)의  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  및  $\text{MgSO}_4$  등에서 우수하였다는 보고와  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$ 등이 우수 하였다는 Yasuji(48)의 보고와 유사하였다.

또한 본 균주의 경우  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 에서 효소 활성이 높게 나타나는 것은 특이하였다.  $\text{AgNO}_3$  첨가시 효소 활성이 낮게 나타난 것은  $\text{Ag}^{2+}$  등의 금속들이 균의 증식을 직접적으로 억제했기 때문으로 판단된다.

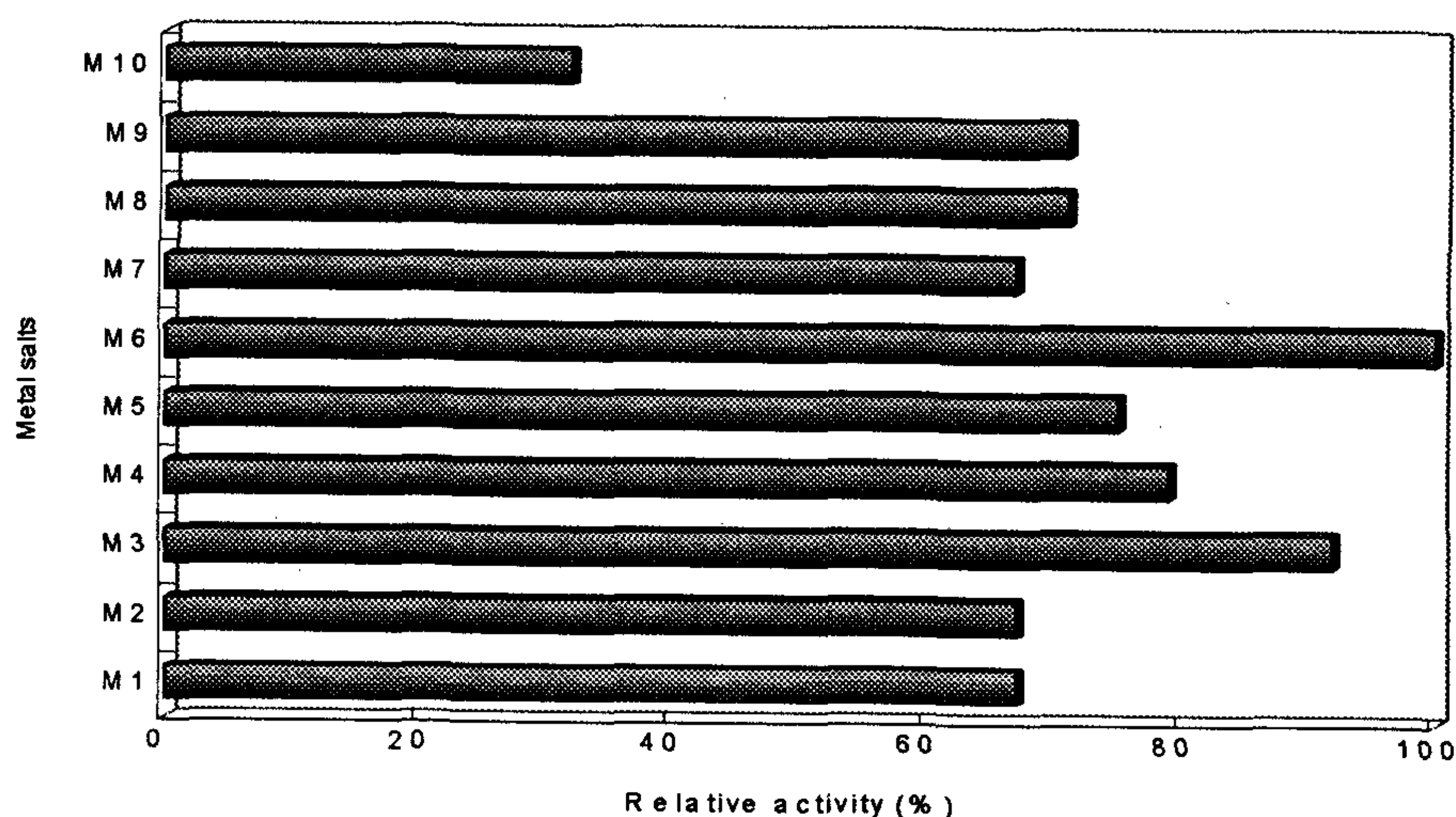


Fig. A-8. Effect of metal ion on  $\alpha$ -amylase activity of *Aspergillus oryzae* A-2.

The concentration of metal salts was 0.01% in medium containing of 2% cellulose, 1%  $\text{KNO}_3$ , 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and cultured for 72 hrs, at  $28^\circ\text{C}$ . The enzyme activity was determined by DNS method at  $40^\circ\text{C}$ . M1,  $\text{NaCl}$ ; M2,  $\text{KCl}$ ; M3,  $\text{MnCl}_2$ ; M4,  $\text{CaCl}_2$ ; M5,  $\text{CuSO}_4$ ; M6,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; M7,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; M8,  $\text{ZnSO}_4$ ; M9,  $\text{CuCl}_2$ ; M10,  $\text{AgNO}_3$

마) 배양온도의 영향

본 공시균주인 *Aspergillus oryzae* A-2의 배양온도에 따른  $\alpha$ -amylase 생산력을 검토하기 위하여 각각의 온도별로 72시간 배양하여 효소활성도를 측정한 결과는 Fig. A-9와 같다.

Fig. A-9에서 보는 바와 같이 28°C에서 배양하였을 때 효소활성도가 가장 높았다. 이와 같은 결과는 강(42)이 보고한 최적 배양온도가 28°C 였다는 결과와 유사하였으나, Yoshiki 등(49)과 Shinsaku 등(46)이 보고한 30°C에서 배양하였을 때 효소활성이 가장 높았다는 보고와는 상이하였다.

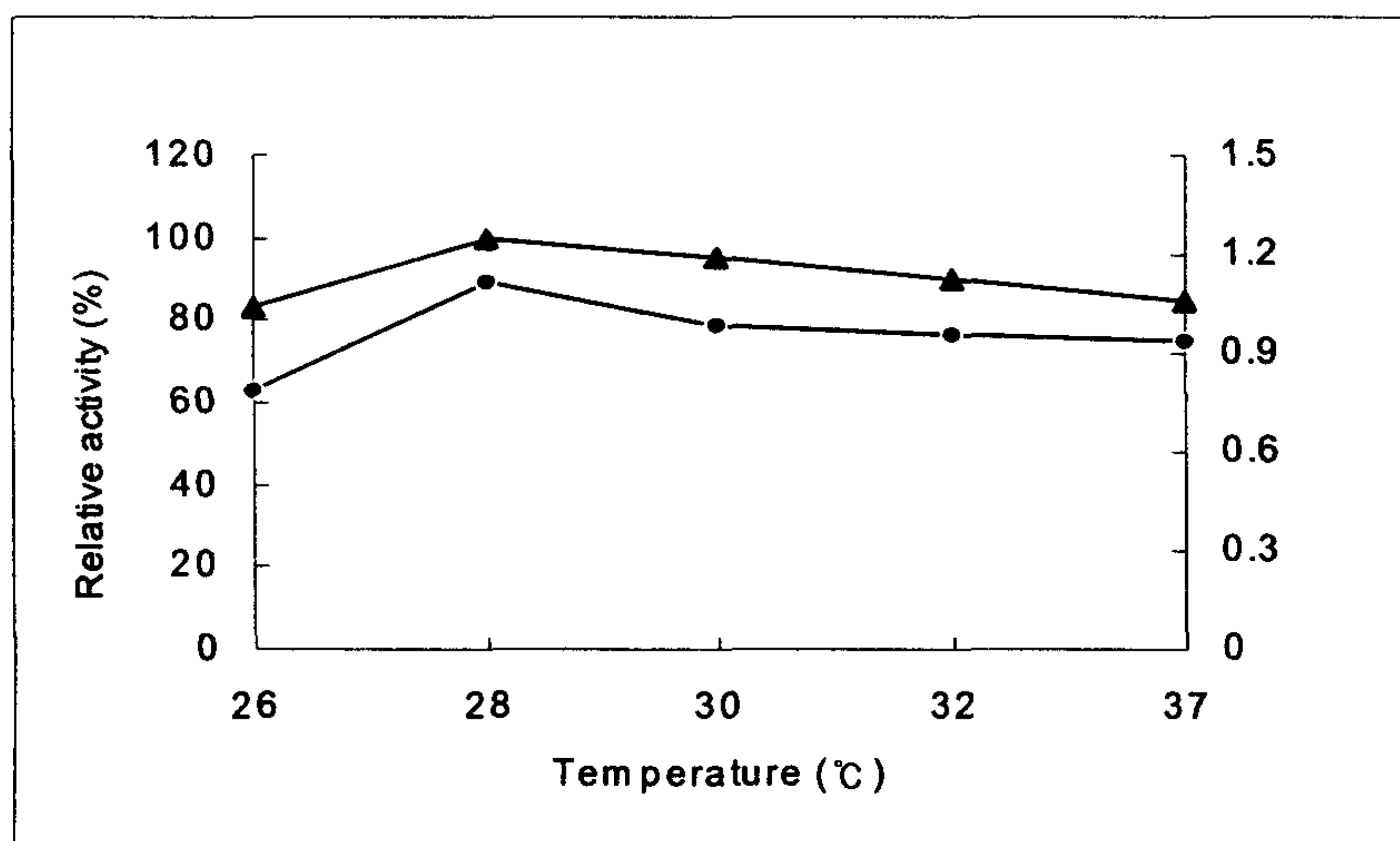


Fig. A-9. Effect of temperature on  $\alpha$ -amylase activity of *Aspergillus oryzae* A-2.

The cultured for 72 hrs, at 28°C. The enzyme activity was determined by DNS method at 40°C. The total protein was assayed with Bradford Reagent.

● : Relative activity    ▲ : Absorbance(O.D. 595 nm)

바) 배양 시간에 따른 영향

본 균주는 Fig. A-8에서 보는 것과 같이  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  순으로 효소생산이 우수하였고  $\text{AgNO}_3$  첨가시에는 그 활성이 저해되었다.

이와 같은 결과는 *Aspergillus usarii*의 배양에서  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ 등이 우수하였다는 정등(44)의 보고와는 다르나 강(42)의  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  및  $\text{MgSO}_4$  등에서 우수하였다는 보고와  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$ 등이 우수 하였다는 Yasuji(48)의 보고와 유사하였다.

또한 본 균주의 경우  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 에서 효소 활성이 높게 나타나는 것은 특이하였다.  $\text{AgNO}_3$  첨가시 효소 활성이 낮게 나타난 것은  $\text{Ag}^{2+}$  등의 금속들이 균의 증식을 직접적으로 억제했기 때문으로 판단된다.

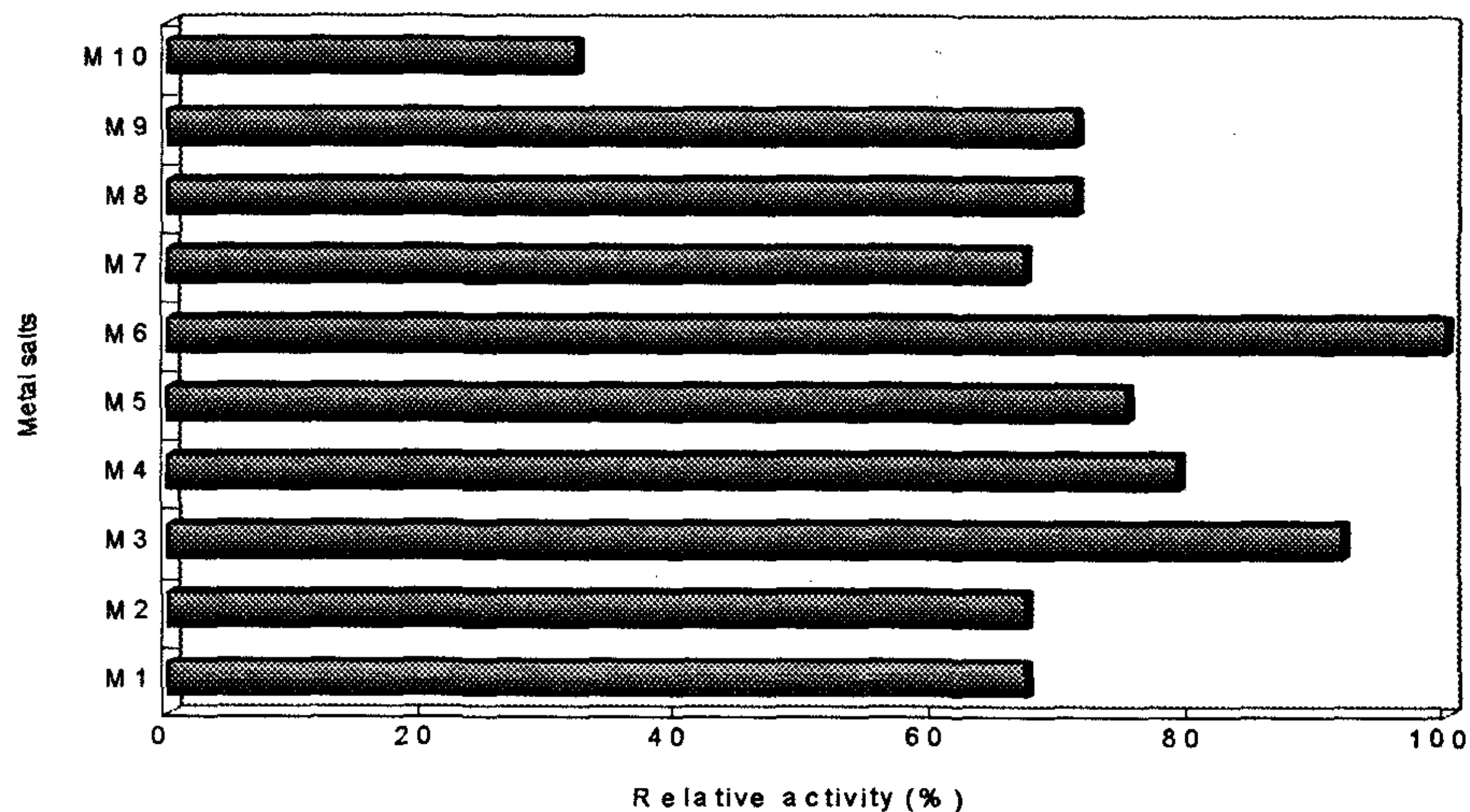


Fig. A-8. Effect of metal ion on  $\alpha$ -amylase activity of *Aspergillus oryzae* A-2.

The concentration of metal salts was 0.01% in medium containing of 2% cellulose, 1%  $\text{KNO}_3$ , 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and cultured for 72 hrs, at 28°C. The enzyme activity was determined by DNS method at 40°C. M1,  $\text{NaCl}$ ; M2,  $\text{KCl}$ ; M3,  $\text{MnCl}_2$ ; M4,  $\text{CaCl}_2$ ; M5,  $\text{CuSO}_4$ ; M6,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; M7,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; M8,  $\text{ZnSO}_4$ ; M9,  $\text{CuCl}_2$ ; M10,  $\text{AgNO}_3$

마) 배양온도의 영향



본 공시균주인 *Aspergillus oryzae* A-2의 배양온도에 따른  $\alpha$ -amylase 생산력을 검토하기 위하여 각각의 온도별로 72시간 배양하여 효소활성도를 측정한 결과는 Fig. A-9와 같다.

Fig. A-9에서 보는 바와 같이 28°C에서 배양하였을 때 효소활성도가 가장 높았다. 이와 같은 결과는 강(42)이 보고한 최적 배양온도가 28°C 였다는 결과와 유사하였으나, Yoshiki 등(49)과 Shinsaku 등(46)이 보고한 30°C에서 배양하였을 때 효소활성이 가장 높았다는 보고와는 상이하였다.

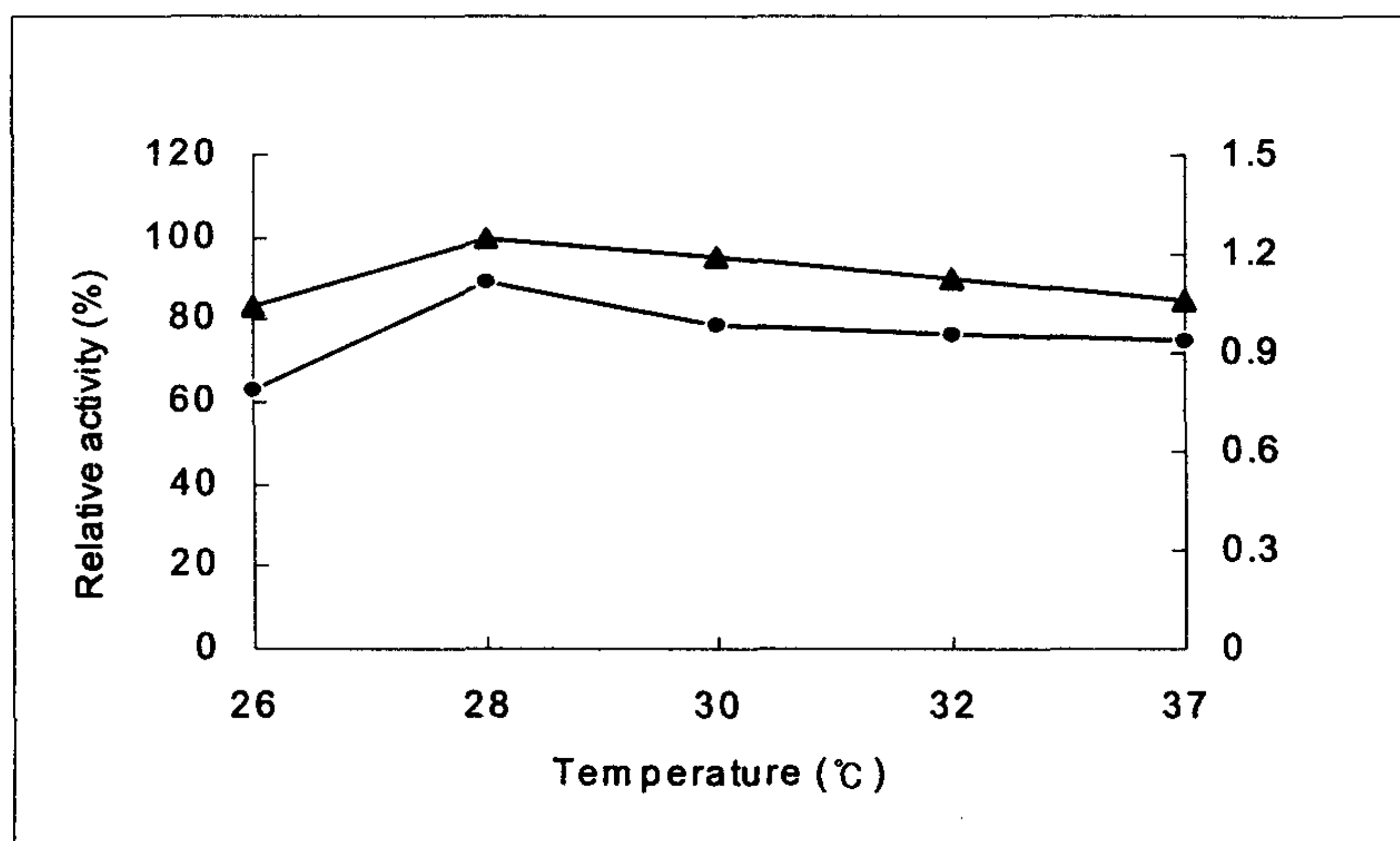


Fig. A-9. Effect of temperature on  $\alpha$ -amylase activity of *Aspergillus oryzae* A-2.

The cultured for 72 hrs, at 28°C. The enzyme activity was determined by DNS method at 40°C. The total protein was assayed with Bradford Reagent.

● : Relative activity    ▲ : Absorbance(O.D. 595 nm)

바) 배양 시간에 따른 영향

본 공시균주인 *Aspergillus oryzae* A-2의 배양 시간에 따른 효소 생산력을 검토하기 위하여 28°C에서 0~10일간 효소의 활성도를 측정한 결과는 Fig. A-10과 같다.

공시균주의 효소활성은 배양 30시간 후부터 서서히 진행되어 배양 3일째 가장 우수하였다.

이와 같은 결과는 정 등(43)과 박 등(44)이 보고한 *Aspergillus* sp.에서 72시간에 최고 활성치를 나타냈다는 내용과 일치하였다.

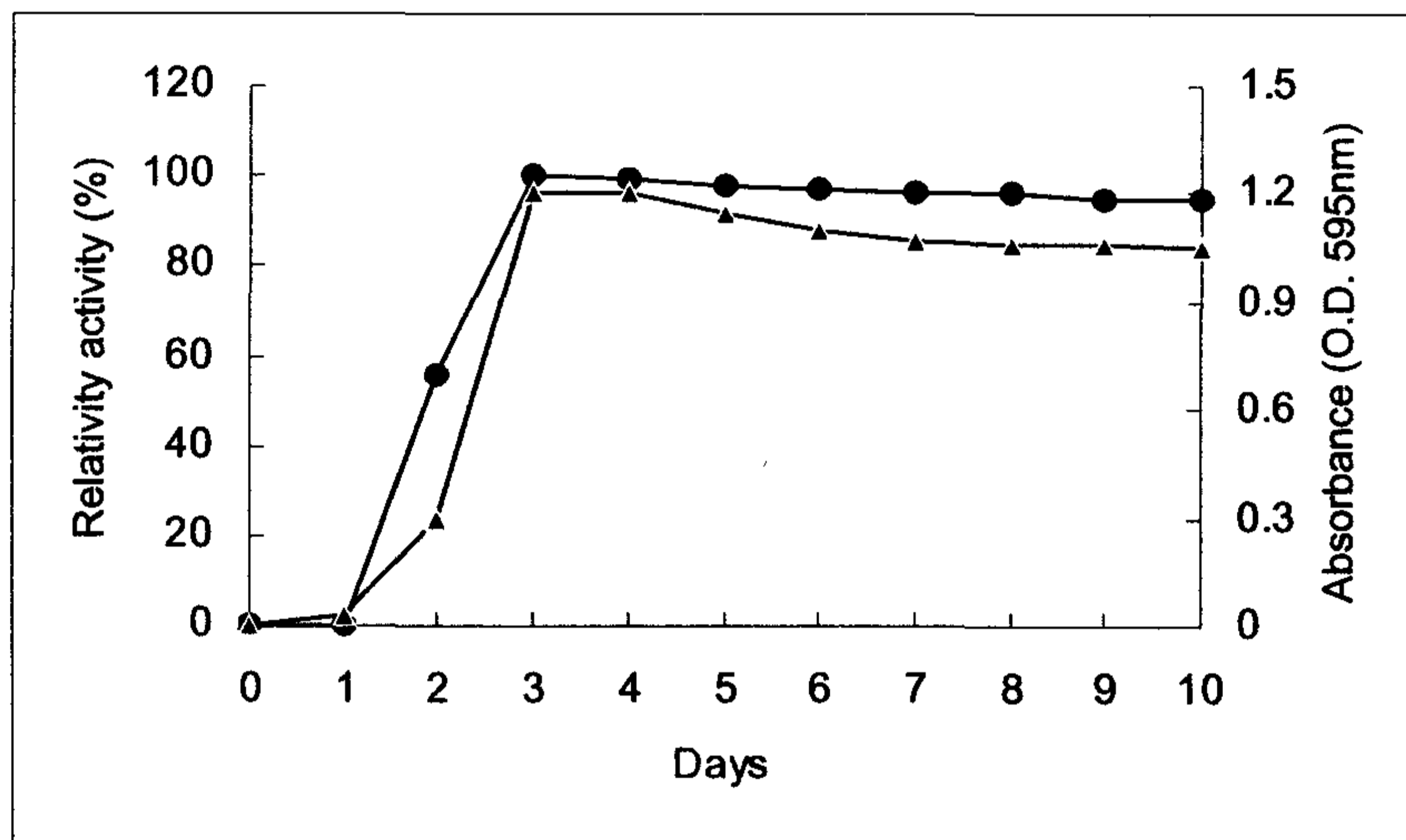


Fig. A-10. Effect of incubation times on  $\alpha$ -amylase activity of *Aspergillus oryzae* A-2.

The cultured for 72 hrs, at 28°C. The enzyme activity was determined by DNS method at 40°C. The total protein was assayed with Bradford Reagent.

● : Relative activity    ▲ : Absorbance(O.D. 595 nm)

#### 4) *Aspergillus oryzae* A-2가 생산하는 $\alpha$ -amylase의 정제

가)  $\alpha$ -amylase의 정제

(1) DEAE-cellulose column chromatography

조효소액 280 mL를 황산암모늄(20~80%)으로 포화시켜 얻은 효소액을 투석하여 황산암모늄을 제거한 후 40 mM Na-acetate buffer(pH 5.0)로 평형화시킨 효소액 30 mL를 DEAE-cellulose column에 충전 시키고, 동일 buffer 400 mL로 세척한 다음 0.1 M~0.6 M NaCl을 함유한 buffer로 linear gradient로 용출하여 protein 및 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. A-11에서 나타난 바와 같이 fraction No. 63~93번에서 효소활성이 나타났으며, 활성이 높은 부분(fraction No. 72~83)을 모아 실험에 사용하였다.

정제과정을 통하여 정제된 amylase의 specific activity 및 회수율은 Table A-10과 같다.

Table A-10. Summary of purification steps of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae* A-2

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	154	249,480	1,620	100	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (20~80%)	52	202,488	3,894	81.2	2.4
DEAE-cellulose chromatography	6.2	79,732	12,860	31.9	7.9

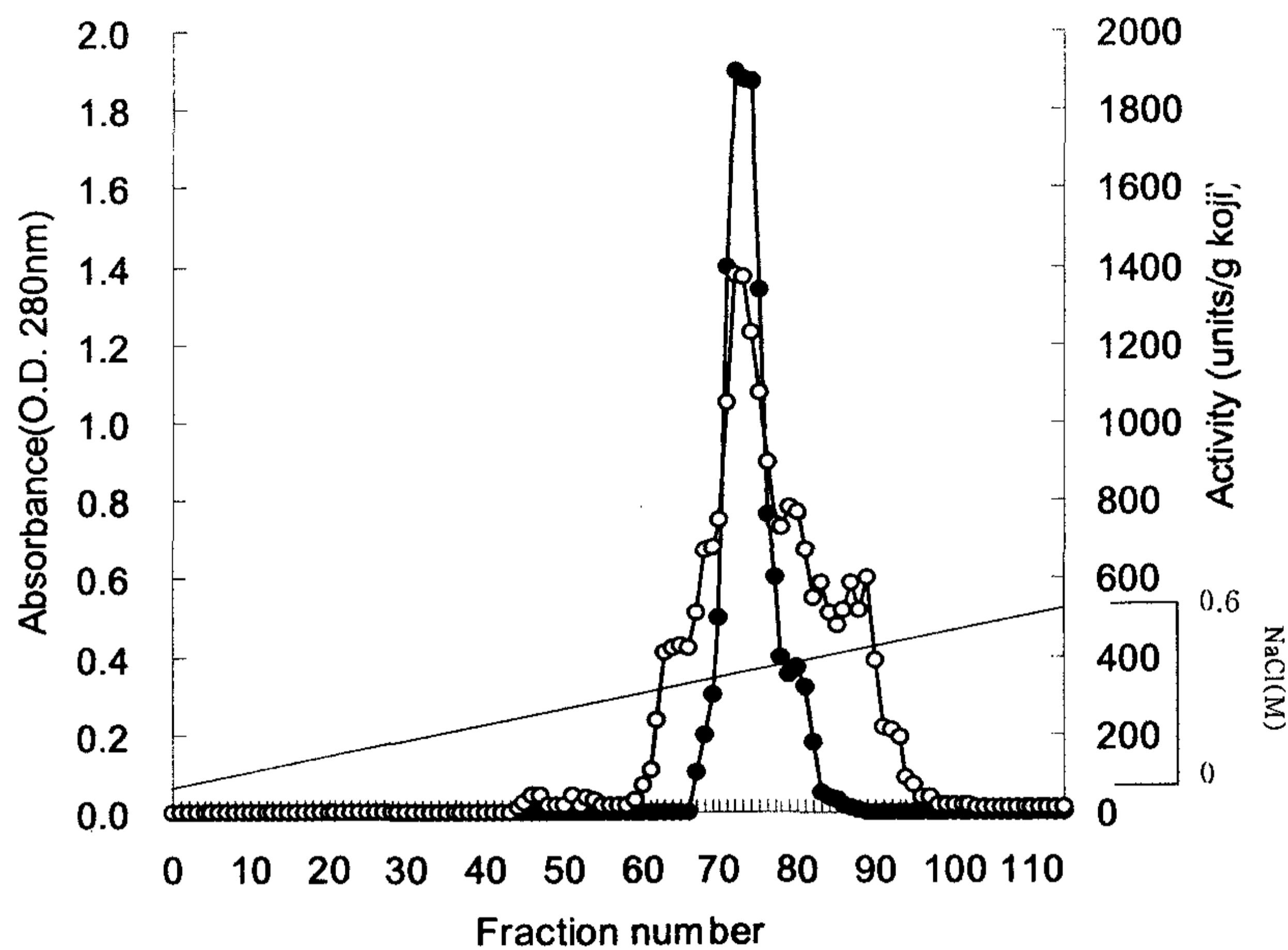


Fig. A-11. Elution profile of the enzyme on DEAE-cellulose column chromatography

The column was equilibrated with 40 mM Na-acetate buffer(pH 5.0). The enzyme absorbed was eluted with linear gradient from 0 M to 0.6 M NaCl concentration in 40 mM Na-acetate buffer(pH 5.0) and each fraction volume was 5 ml.

● : α-amylase activity      ○ : Absorbance at 280 nm

나) 분해 생성물의 확인

밤 전분에 대한 정제효소의 분해 생성물을 HPLC로 확인한 결과는 Fig. A-12와 같다.

초기 retention time에는 oligosaccharide와 maltotriose가 검출되었고 시간이 지남에 따라 maltose와 glucose를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 분해 산물로 maltose 만을 생성하는  $\beta$ -amylase와 같은 exo 형과는 확실하게 구별되고 일반적으로 알려져 있는  $\alpha$ -amylase의 특성과 같이 전분의  $\alpha$ -1, 4 glucoside 결합을 무작위로 절단하여 그 분해 산물로 maltose 이상의 oligosaccharide를 생성는  $\alpha$ -amylase의 특성을 확인할 수 있었다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 *Aspergillus oryzae* A-2가 생성하는 amylase는 Saito와 Morgan 등이 보고한  $\alpha$ -amylase임을 확인 할 수 있었다(42).

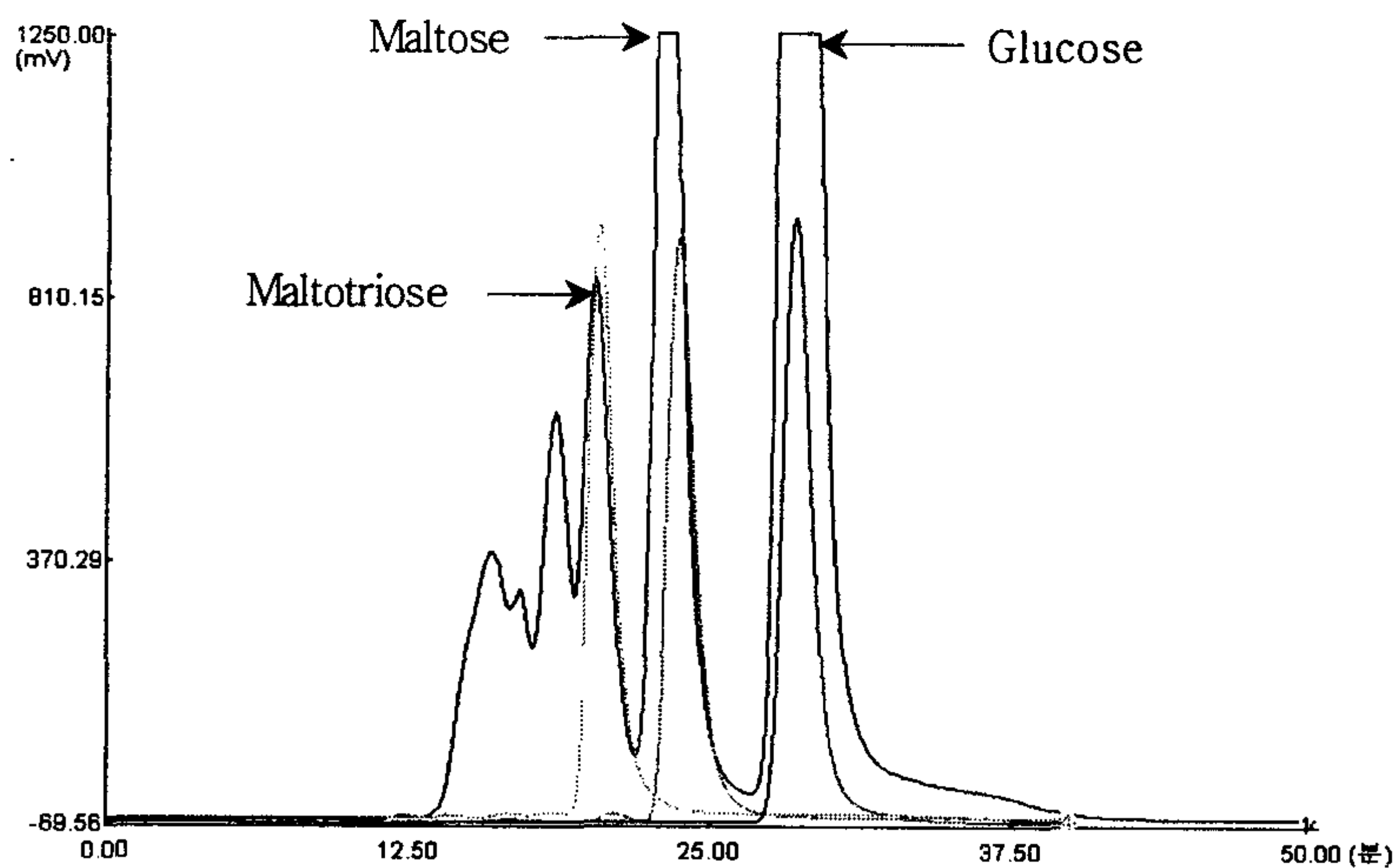


Fig. A-12. HPLC Chromatogram of the reaction product of chestnut starch hydrolyzed by the purified enzyme.

## 다) 효소학적 특성 검토

### (1) pH 안정성

효소의 안정성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH 1.0~13.0 까지의 pH가 다른 여러 종류의 buffer와 동량의 효소 용액을 혼합하여 37°C에서 한 시간 방치한 후 잔존 활성을 측정하였다.

사용한 buffer는 pH 1.0~3.0까지는 glycine-HCl buffer, pH 4.0~5.0까지는 Na-acetate buffer, pH 6.0은 citrate phosphate buffer, pH 7.0~8.0까지는 Tris-HCl buffer 및 pH 9.0~13.0까지는 glycine-NaOH buffer를 각각 사용하였다.

Fig. A-13에 나타난 바와 같이, *Aspergillus oryzae* A-2가 생산하는  $\alpha$ -amylase는 pH 3.0~12.0 범위에서 비교적 안정함을 보였다.

본 효소의 pH 안정성은 *Asp. coreanus* NR 15-1의  $\alpha$ -amylase가 pH 4.0~11.0 사이, *Asp. sp.* KH-49의  $\alpha$ -amylase는 pH 4.0~10.0 사이에서 안정하다는 결과와 유사하였고, *Bacillus sp.* KCM-101이 pH 5.5~8.5 사이, *Pediococcus sp.* SR-19는 pH 7.0~11.0 사이에서 안정하다는 결과와 비교해 볼 때 본 효소는 비교적 넓은 범위에서 pH 안정성을 나타내었다.

### (2) 열 안정성

본 효소의 안정성에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여, 효소액을 40°C에서 80°C까지 각 온도에서 20분간 열처리한 후, 급 냉각시켜 40°C에서 잔존 효소활성을 측정했다. Fig. A-14에서 보는 바와 같이 50°C에서는 95% 이상의 잔존 효소활성을 나타내었으나 60°C에서는 효소활성이 급격히 떨어졌다.

*Asp. coreanus* NR 15-1의  $\alpha$ -amylase의 경우 50°C 이하의 온도에서 비교적 안정하다고 보고되었고, *Asp. sp.* KH-49의  $\alpha$ -amylase는 30~40°C 까지, *Bacillus sp.* KCM-101의 경우 95°C에서 30분간 안정하다고 보고되어 각 균주에 따라 열안정성은 상당한 차이를 나타내고 있었다. 또한 이와 같은 결과는 곰팡이가 생산하는 amylase는 일반적으로 세균이나 방선균에 의해 생성되는 amylase 보다 열에 대한 안정성이 없다는 정(50), 오 등(51)의 연구와 일치하였다.

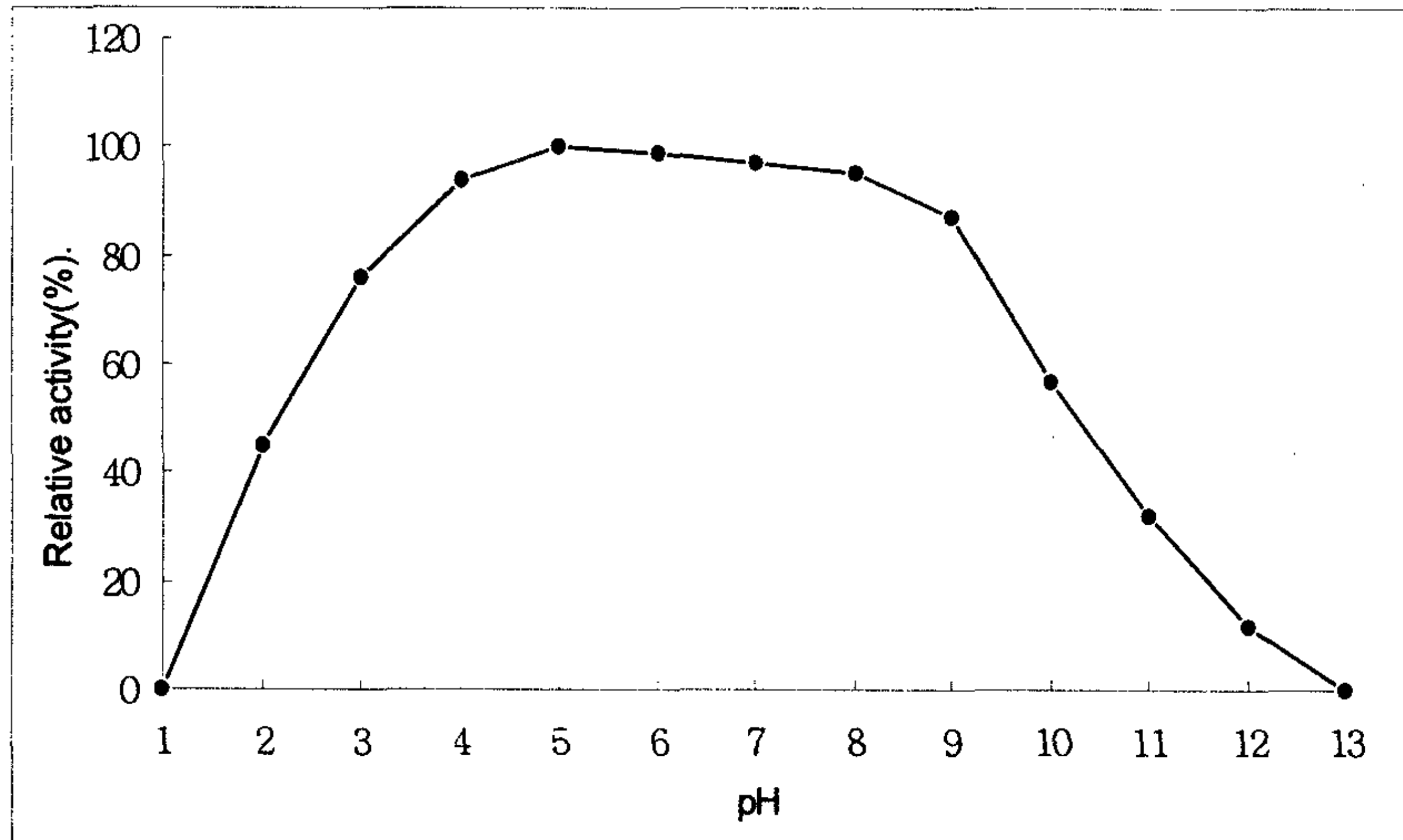


Fig. A-13. The pH stability of the purified enzyme activity.

Enzyme solutions were kept in 0.2 M buffer of pH 1.0 to 13.0 at 4°C for 24 hours. The residual activity was assayed under standard conditions using glycine-HCl buffer(pH 1.0 to 3.0), Na-acetate buffer(pH 4.0 to 5.0), citrate phosphate buffer(pH 6.0), Tris-HCl buffer(pH 7.0 to 8.0), glycine-NaOH buffer(pH 9.0 to 12.0)

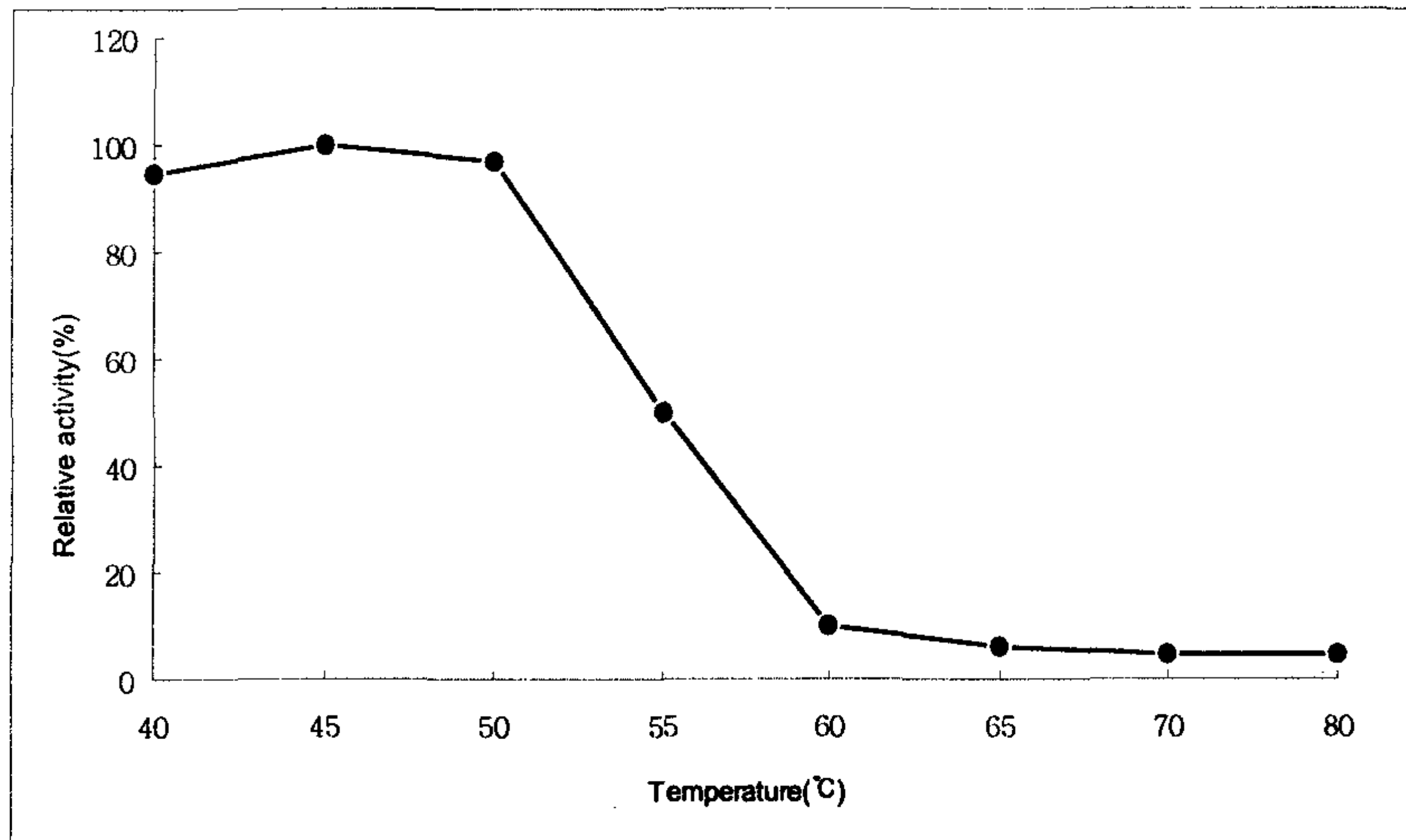


Fig. A-14. Thermal stability of the purified enzyme activity.

Enzyme solutions were kept in 0.2 M Na-acetate buffers(pH 5.0), and incubated at the indicated temperature for 20 min. The residual activity was assayed under standard reaction conditions.

### (3) 최적 pH

본 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 glycine-HCl buffer(pH 2.0~3.0), Na-acetate buffer(pH 4.0~5.0), citrate phosphate buffer(pH 6.0), Tris-HCl buffer(pH 7.0~8.0) 및 glycine-NaOH buffer(pH 9.0~10.0)를 사용하여 밤 전분 기질용액이 1% 농도가 되도록 희석하고 활성을 측정한 결과는 Fig. A-15와 같다.

pH 4.0~pH 6.0 사이에서 최적 활성을 나타냈으며, pH 3.0에서는 활성이 약하다가 pH 4.0에서부터 활성이 높게 나타나기 시작하여 pH 4.5~ pH 5.5 범위에서 효소 활성이 양호하였으며, pH 5.0에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

일반적으로  $\alpha$ -amylase는 최적 pH가 5.0~6.5로 알려졌는데(52) *Aspergillus foetitus*(53)와 *Alternaria* sp.(54)는 최적 pH가 5.0으로 본 효소와 동일한 결과를 보였고, *Aspergillus* sp.(55)과 *Aspergillus* sp. JP-1(56)의 pH 5.5 보다 약간 낮게 약산성으로 나타났으나, *Aspergillus* sp.(57)의 pH 6.5와 *Aspergillus*



*niger*(58)의 pH 4.0이라는 보고와는 차이가 있었다.

또한 효모류의 *Filobasidium capsuligenum*(59)의 pH 5.4~5.6 보다는 낮지만 *Paecilomyces* sp.(60)의 pH 5.0과 비교할 때 본 효소의 최적 pH는 균류와 효모류가 유사한 결과를 보였다.

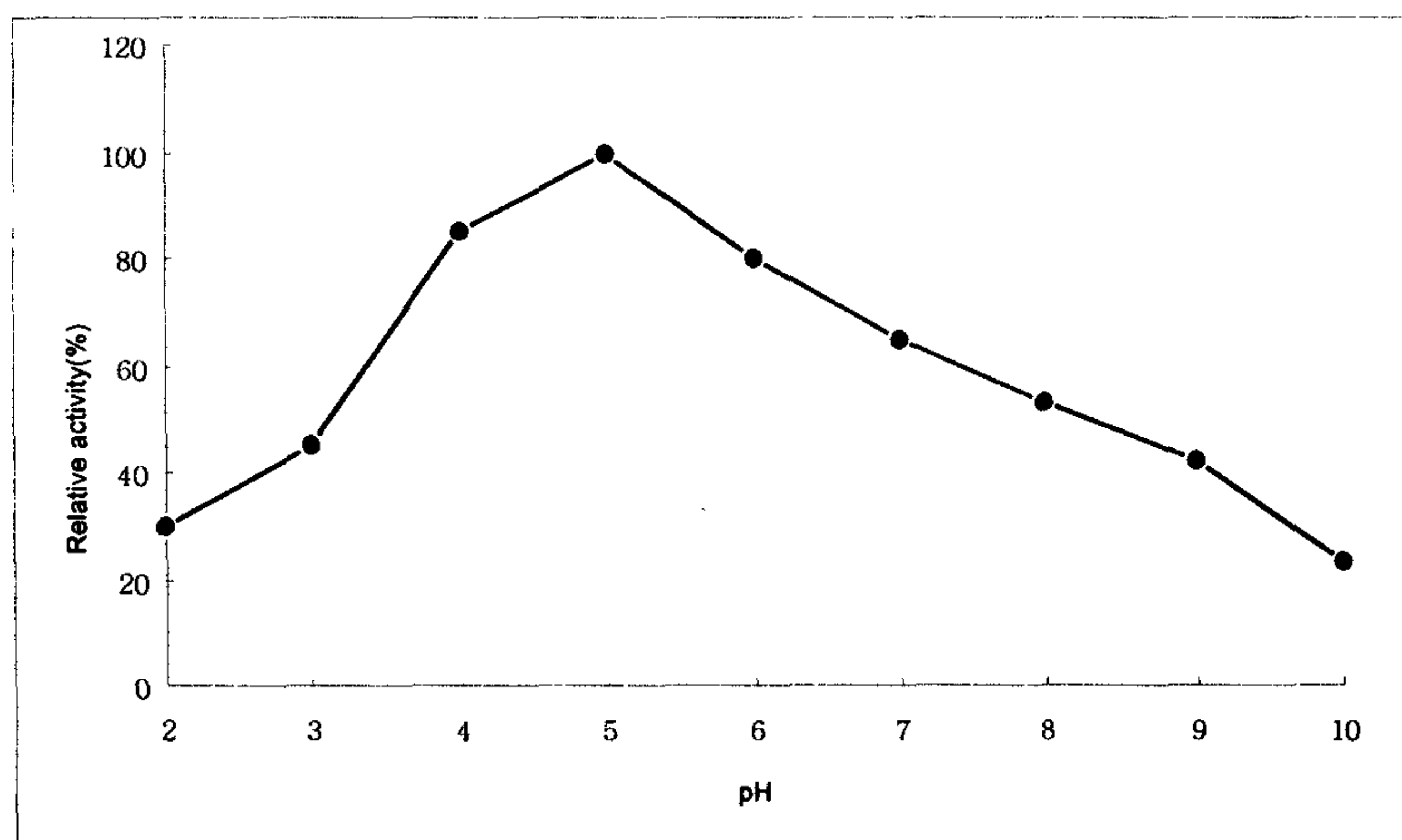


Fig. A-15. Effect of pH on the purified enzyme activity.

The enzyme activity was assayed under standard reaction conditions using glycine-HCl buffer(pH 2.0 to 3.0), Na-acetate buffer(pH 4.0 to 5.0), citrate phosphate buffer(pH 6.0), Tris-HCl buffer(pH 7.0 to 8.0), glycine-NaOH buffer(pH 9.0 to 12.0).

#### (4) 최적 온도

본 효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해 30°C에서 70°C까지 각 온도에서의 효소활성을 측정하였다. Fig. A-16에 나타난 바와 같이 45~50°C에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 35~45°C 에서도 90% 이상의 활성을 나타냈으나 5

5°C 이상에서는 활성이 크게 저하되었다. 이 결과는 *Aspergillus* sp.(57), *Aspergillus foetitus*(53) 및 *Aspergillus* sp.(55)의 최적온도가 45°C 였다는 보고와는 일치하였으나 *Alternaria* sp.(54)와 *Aspergillus* sp. JP-1(56)의 40°C와는 유사하였고 *Aspergillus niger*(58)의 60°C보다는 낮았으며, 효모류 *Paecilomyces* sp.(60)의 45°C와 *Filobasidium capsuligenum*(59)의 50°C와 유사하였다.

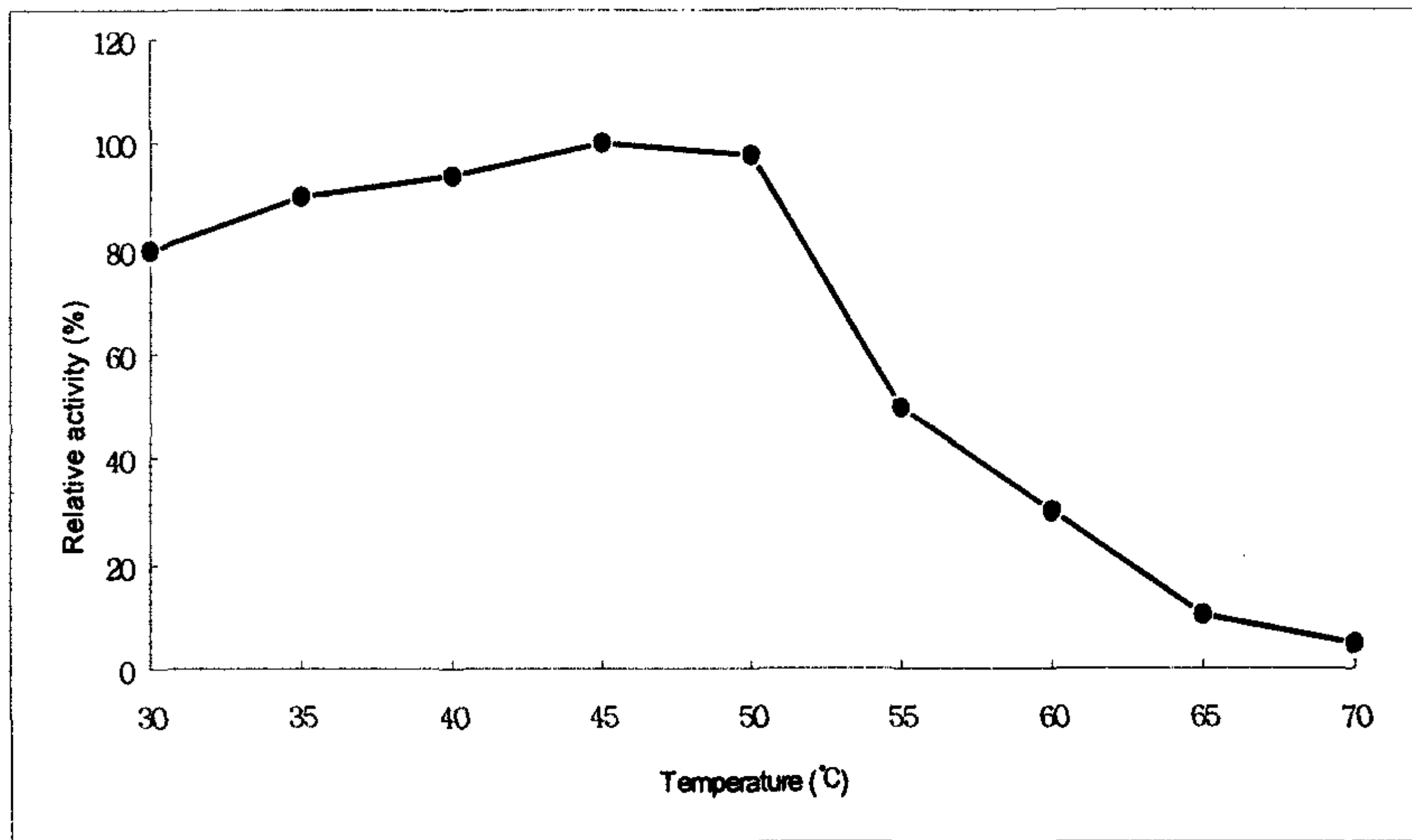


Fig. A-16. Effect of temperature on the purified enzyme activity.

The enzyme activity was assayed under standard reaction conditions at various temperature.

(5) 효소 안정성에 미치는  $Ca^{2+}$  이온의 영향

효소액과 동량의 20 mM  $CaCl_2$ 를 혼합하여 50~70°C 범위에서 각 온도별로 2시간 동안 열처리 하면서 30분 간격으로  $Ca^{2+}$  이온의 온도에 대한 효소 안정성에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Fig. A-17,18과 같다.

$Ca^{2+}$  이온을 첨가하지 않은 시료구의 경우 50°C에서는 30분 부터 서서히 활성이 감소함을 보였고, 60°C에서는 현저히 효소활성이 떨어졌으나,  $Ca^{2+}$  이온 첨가구에서는 50°C 뿐만 아니라 60°C에서도 전 구간에서 안정함을 보였다. 이는 amylase가

calcium 이온의 존재시에 온도, pH 또는 protease에 저항성을 가지며 안정화 된다는 여러 보고(42,52,55,63)와 일치하였다. 금속 이온중  $Ca^{2+}$ 은 효소 구조중에 포함되어 있어 disulfide bridge를 강화하고 전체적인 효소 구조의 안정성을 증가시킨다고 알려져 있다(52,61,62).

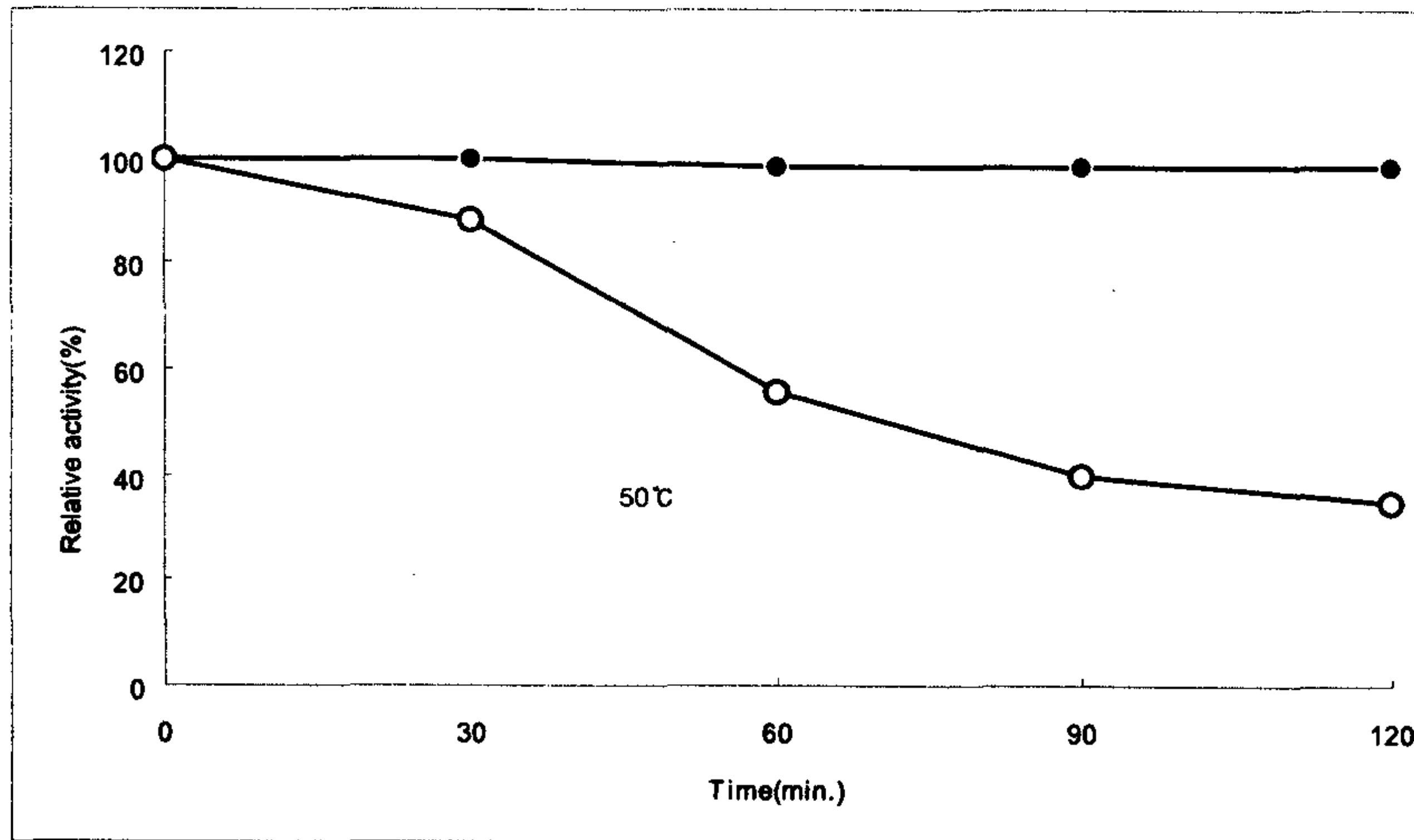


Fig. A-17. Effect of  $Ca^{2+}$  on thermal stability of the purified enzyme activity.

Enzyme solution were kept 400  $\mu$ L of 20 mM  $CaCl_2$ , and incubated at the indicated time at 50°C. The residual activity were assayed except  $CaCl_2$  of same conditions

● : with  $CaCl_2$     ○ : without  $CaCl_2$

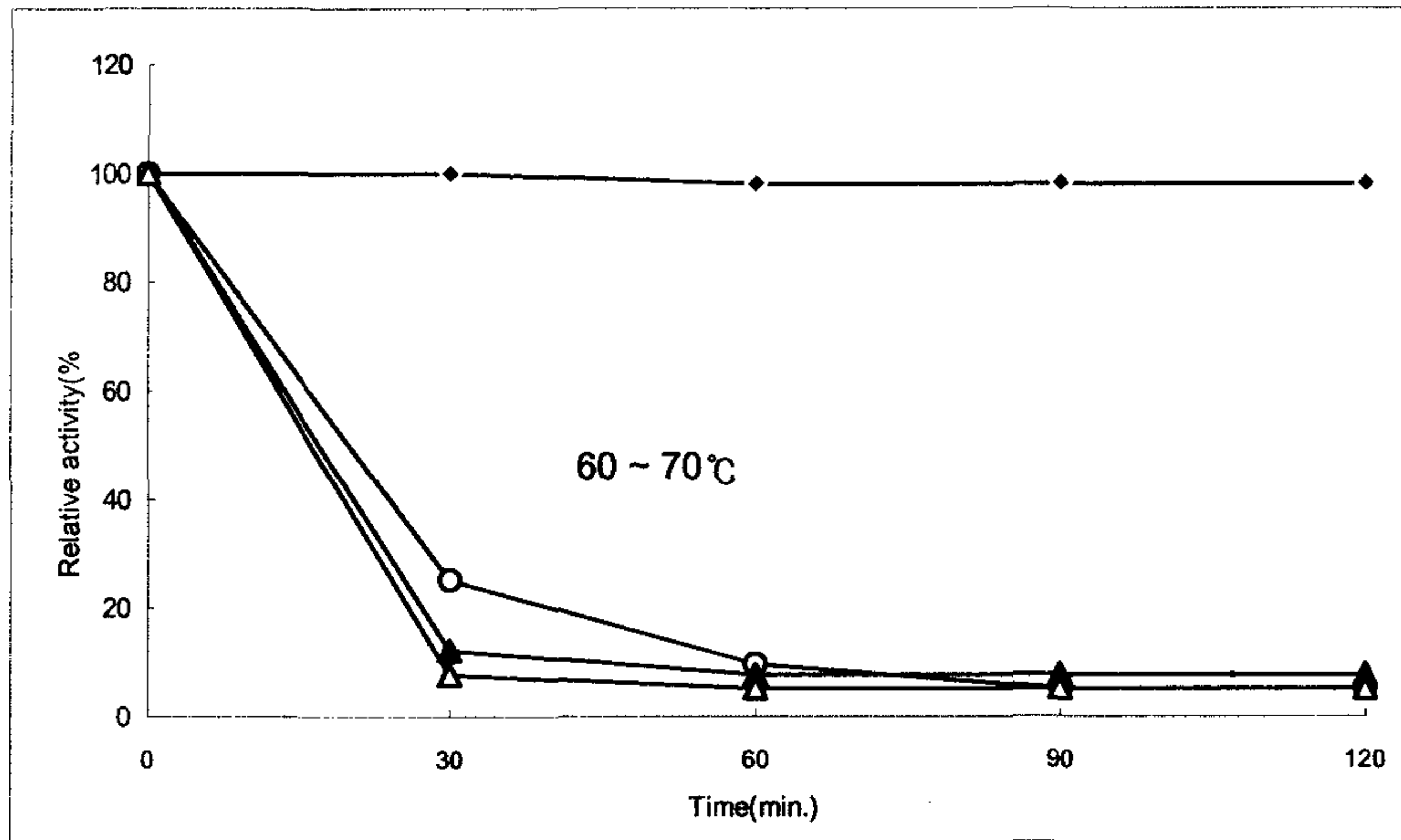


Fig. A-18. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on thermal stability of the purified enzyme activity.

● : with  $\text{CaCl}_2$     ○ : without  $\text{CaCl}_2$  (60°C)  
 ▲ : with  $\text{CaCl}_2$     △ : without  $\text{CaCl}_2$  (70°C)

(6) 전분별 정제효소의 활성비교

전분의 종류를 달리하여 정제효소의 활성을 비교해본 결과는 Fig. A-19와 같다. 각 전분 용액별 당화력은 soluble starch의 당화력을 100%로 했을 때 wheat starch와 rice starch는 soluble starch에 비해 1.5배의 당화력을 가졌고, chestnut starch, corn starch는 비슷하였으며, 분해되기 어려운 것으로 알려진 potato starch에 대해서는 80%의 당화력을 나타내었다. 전분의 종류에 따라 분해율이 다른 것은 전분의 특이적 입체구조에 기인하는 것으로 판단된다(64).

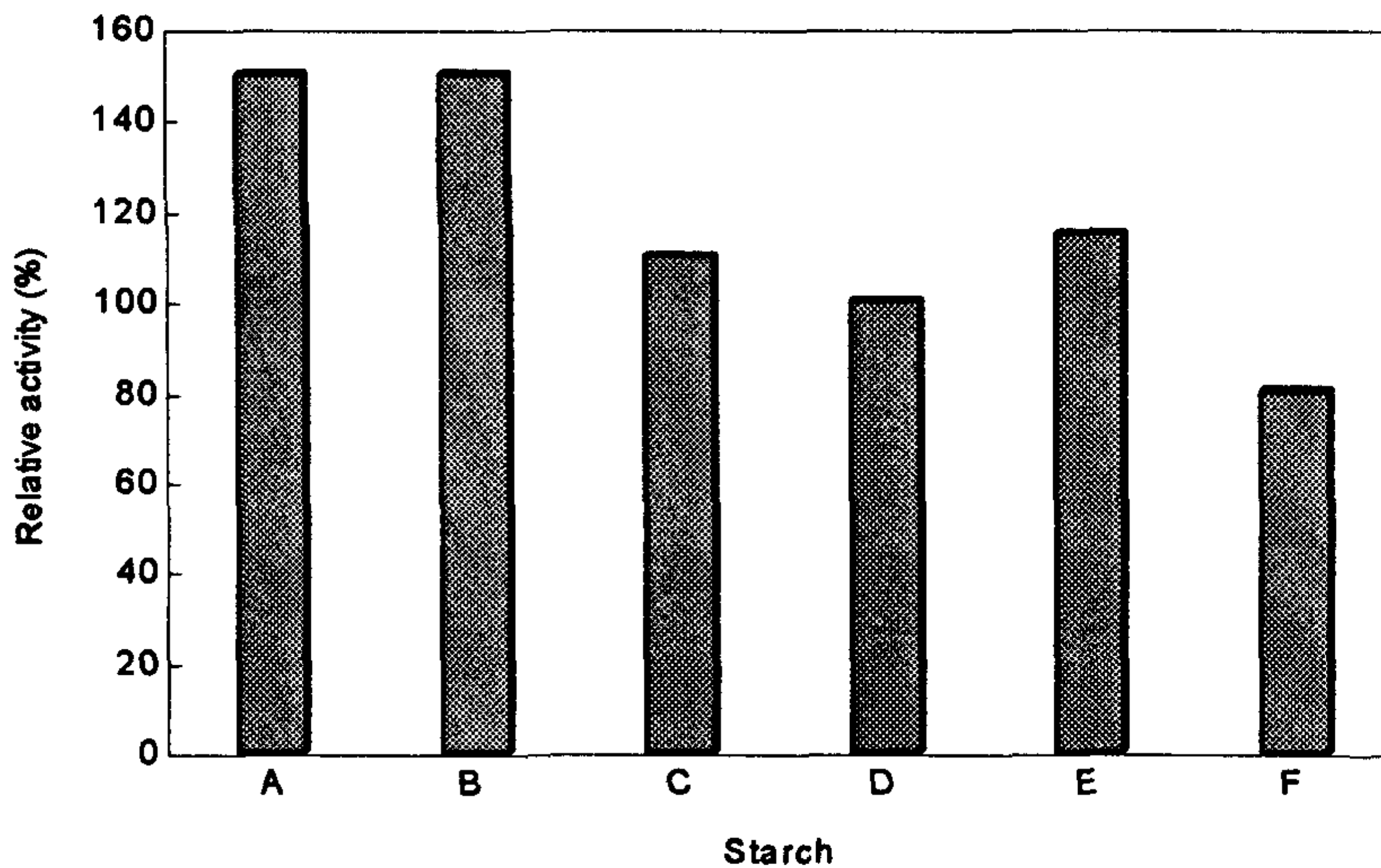


Fig. A-19.  $\alpha$ -amylase activity of the purified enzyme on starch.

The various kinds starch were as follows ;

- A, Wheat starch; B, Rice starch; C, Chestnut starch;  
D, Soluble starch; E, Corn starch F, Potato starch

나. 밤 전분에 발효력이 우수한 효모 분리 및 발효력 측정

1) 우수 효모 선발

야생효모인 *Saccharomyces*속 15균주를 분리하고 이들 효모 중 예비 실험에서 알코올 생성력이 10%이상인 7균주를 맥아 배지에 증대 배양 후 밤 당화액을 첨가

하여 배양하고, 알코올 생산력과 향기 생성능이 우수한 균주를 분리한 결과는 Table A-11과 같다.

자연에서 분리한 7종의 야생효모와 대조구로 사용한 *Saccharomyces cerevisiae*의 향기생성능은 7균중 N-6균주가 가장 좋은 결과를 보였다. 대조균주인 *Saccharomyces cerevisiae*는 발효력은 분리균주에 비하여 약간 높았으나 acetaldehyde, butanol, n-propanol 및 n-amylalcohol 등의 바람직하지 못한 물질을 밤에서 분리한 균주에 비하여 많이 생성한 반면, 좋은 향기에 속하는 ethyl acetate과 2-pentanol 등의 물질은 밤에서 분리한 효모가 많이 나타났다. 이 중에서 특히 N-6균주가 가장 우수한 결과를 보였다. 또한 이들 균주의 향기에 대한 관능검사를 실시한 결과도 N-6균주가 가장 우수한 것으로 나타나 밤술의 주모균으로 N-6를 최종적으로 선발하였다.

Table A-11. Alcohol and aroma constituents producing ability of the isolated strains

	N-1	N-2	N-3	N-6	N-9	N-11	N-12	S.c
Alcohol(%)	15	15	16	16	15	15	15	17.5
Aroma constituents(mg%)								
Acetaldehyde	16.3	15.2	13.5	12.8	14.1	12.8	18.1	14.7
Methanol	0.5	0.8	0.7	0.5	0.6	0.5	0.6	0.7
Iso-Propylol	1.6	1.2	2.8	2.3	1.5	4.4	1.6	1.8
Ethyl acetate	10.6	12.1	11.2	19.2	16.3	13.2	11.7	2.1
n-Propylol	2.5	2.7	3.1	2.5	3.7	3.8	4.2	10.7
Butanol	5.3	6.0	8.1	2.6	6.2	5.5	4.7	16.0
2-Pentanol	11.8	11.5	21.2	27.1	22.1	15.6	14.2	1.5
Iso-Amylalcohol	2.4	1.9	2.3	2.3	3.4	4.5	2.6	5.9
n-Amylalcohol	15.8	12.8	11.2	10.1	14.6	18.6	17.3	22.8

S. c : *Saccharomyces cerevisiae*

## 2) 분리효모의 동정

알코올과 향기생성능이 우수한 N-6균주의 형태적 특성은 Table A-12와 같다. N-6균주의 발효성과 자화성 등을 검토한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되었으며 *Saccharomyces cerevisiae* N-6로 명명하였다.

Table A-12. Morphological and physiological properties of strain N-6

Test	Strain N-6
Shape	Cerevisiae type
Fermentation	
Saccharose	+
Maltose	+
Lactose	-
D-(+)Raffinose	+
Inulin	+
Assimilation of carbon compounds	
Ethanol	-
Methanol	-
Inositol	-
D-(+)Raffinose	+
Saccharose	+
Maltose	+
L-(+)Arabinose	-
Citric acid	-
Soluble starch	+
D-(+)Xylose	-
Lactose	-
Mannitol	-
$\alpha$ -D(+)-Melibiose	-
$\alpha$ -(L)-Rahmnose	-
Growth at 37°C	+
Growth on 50% glucose-yeast extract agar	-

+ : Positive, - : Negative

분리 효모 N-6균주 ITS 염기서열을 통한 동정결과 Table A-13과 같이 전체 염기서열 753bp 이었으며 이것은 *Saccharomyces cerevisiae*와 100% 동일한 것으로 확인되었다. 따라서 분리균주명은 *Saccharomyces cerevisiae* N-6으로 명명하였다.

Table A-13. Nuclotide sequences of ITS region of *Saccharomyces cerevisiae*

N-6

1							
AAGAAATTTA	ATAATTTTGA	AAATGGATTT	TTTTGTTTTG	GCAAGAGCAT	GAGAGCTTTT	ACTGGGCAAG	AAGACAAGAG
81							
ATGGAGAGTC	CAGCCCGGCC	TCCGCTTAAG	TCCGCGGTCT	TGCTAGGCTT	GTAAGTTTCT	TTCCTGCTAT	TCCAAACCGT
161							
GAGAGATTTC	TGTGCTTTTG	TTATAGGACA	ATTAAAACCGT	TTCAATACAA	CACACTGTGG	AGTTTTTCATA	TCTTTTGCAAC
241							
TTTTTCTTTG	GCCATTCGAG	CAATCCGGCC	CCAGAGGTAA	CAAACACAAA	CAATTTTATC	TATTCATTAA	ATTTTTGTCA
321							
AAAACAAGAA	TTTTGTAAC	TGGAAATTTT	AAAATATTAA	AAACTTTCAA	CAACGGATCT	CTTGGTCTC	GCATCGATGA
401							
AGAACCACG	GAAATGCGAT	ACGTAATGTG	AATTGCAGAA	TTCGGTGAAT	CATCGAATCT	TTGAACGCAC	ATTGCGCCCC
481							
TTGGTATTCC	AGGGGCGATG	CCTGTTTGAG	CGTCATTTCC	TTCTCAAACA	TTCTGTTTGG	TAGTGAGTGA	TACTCTTTGG
561							
AGTTAACTTG	AAATGCTGG	OCTTTTCATT	GGATGTTTTT	TTTCCAAAGA	GAGGTTTCTC	TGGTGCTTIG	AGGTATAATG
641							
CAAGTACGGT	CGTTTTAGGT	TTTACCAACT	GCGGCTAATC	TTTTTTTATA	CTGAGCGTAT	TGGAACGTTA	TCGATAAGAA
721							
GAGACCGTC	TAGGCGAACA	ATGTTCTTAA	AGT				

### 3) 분리효모의 최적 생육 조건 검토

#### 가) 균의 최적 생육 온도

알코올 생성력이 우수한 *Saccharomyces cerevisiae* N-6균주의 최적 증식온도를 조사하기 위해 배양 온도를 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C로 각각 조절하여 48시간 동안 배양한 후 균의 증식도를 측정하기 위해 660 nm에서 흡광도를 살펴본 결과는 Fig. A-1과 같다.

*Saccharomyces cerevisiae* N-6균주는 10°C와 40°C에서 흡광도가 0.1이하로 나타나 균의 생육이 억제되는 것으로 나타났고 15~35°C에서 5°C간격으로 흡광도를 보면 0.35, 0.7, 1.3, 1.3, 0.7으로 나타난 결과로 볼 때 25°C~30°C가 최적 생육온도 범위로 나타났다. 그러나 밤술 제조시 발효온도는 20~25°C로 유지하는데 이는 술 발효 온도는 효모의 생육온도에 비하여 낮게 유지하는 것이 술의 맛과 향기 생성에 좋은 것으로 알려져 있기 때문이다.



나) 균의 생육 최적 pH

*Saccharomyces cerevisiae* N-6균주의 생육 최적 pH를 알아보기 위하여 배지의 pH를 3~8까지 조절하여 30℃에서 48시간 배양시킨 후 생육도를 본 결과는 Fig. A-20와 같다.

*Saccharomyces cerevisiae* N-6균주는 pH 5~7 범위에서 생육은 비교적 양호하였다. pH 3~pH 8까지의 흡광도를 살펴보면 0.6, 1.1, 1.30, 1.3, 1.2, 1.1으로 pH 5~6일때의 흡광도가 1.3으로 생육최적의 pH로 나타났다.

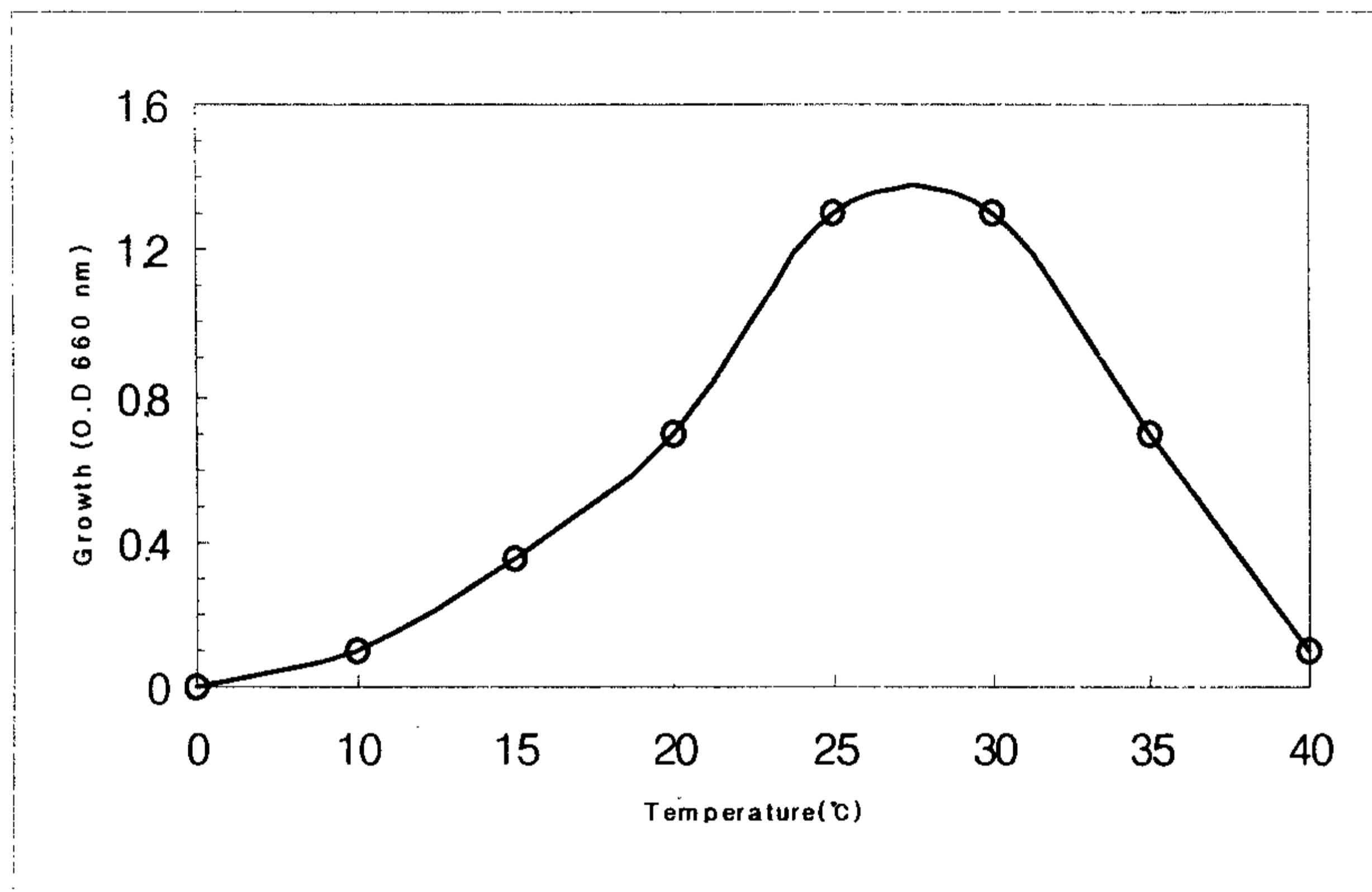


Fig. A-20. Effect of temperature on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* N-6.

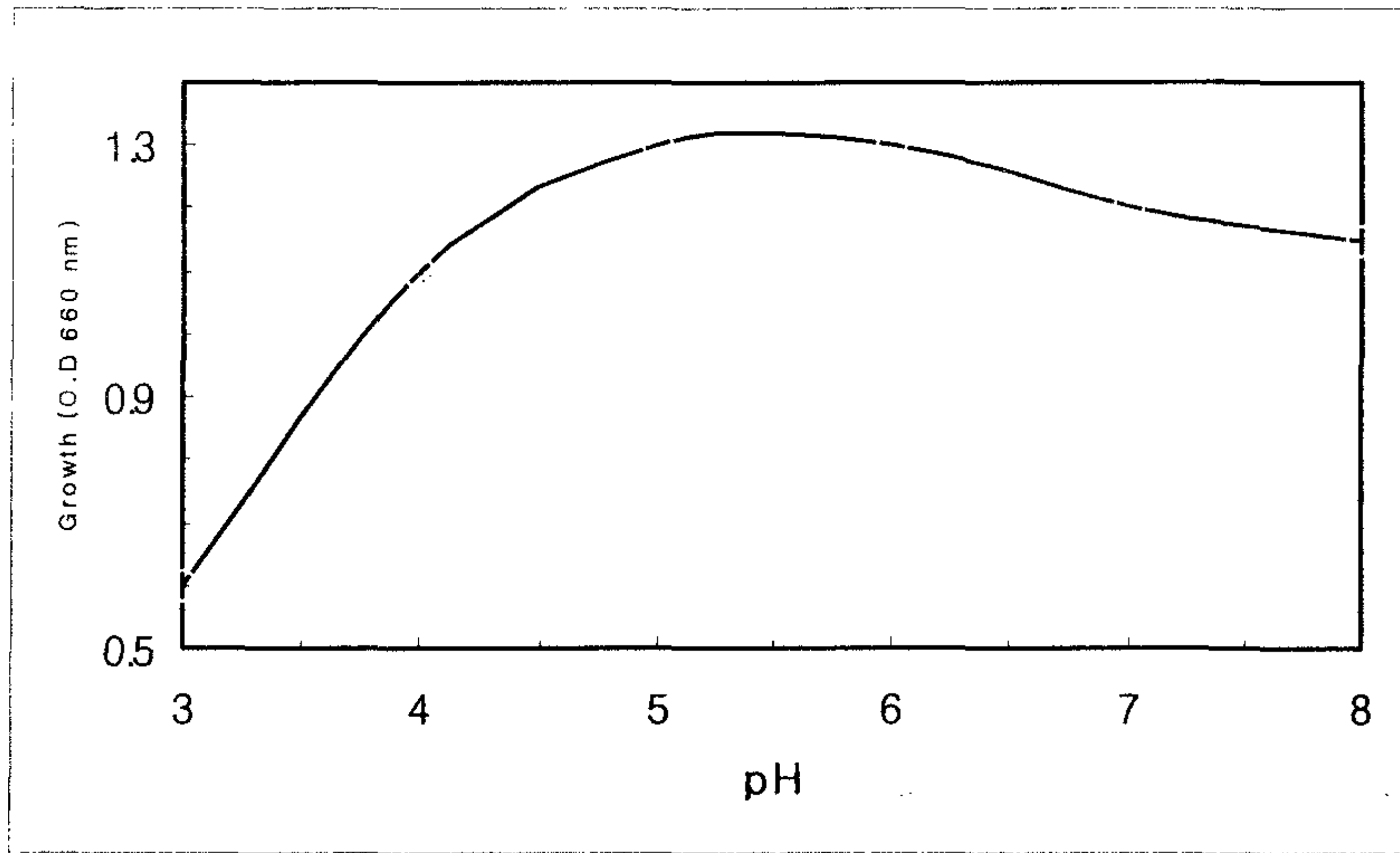


Fig. A-21. Effect of pH on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* N-6.

#### 다. 밤술의 생산성 향상 방안

##### 1) 밤 전분의 호화 처리에 따른 알코올 함량

60°C, 85°C, 및 실온에서 85°C까지 밤 술덧에 가열한 결과는 Table A-14와 같다. 60°C열수 첨가한 것은 알콜 수득율이 낮았으며 실온에서 85°C까지 가열시키면서 처리한 것이 알콜 수득율과 작업 편리성으로 보아 가장 적합하였다.

Table A-15. Changes in alcohol concentration of chestnut starch according gelatinization temperature.

fermentation time(day)	gelatinization			
	3	5	7	10
boiling(100 °C)	8.76	10.17	12.21	14.21
hot water (85°C)	9.34	10.03	12.10	14.08
hot water(60°C)	4.23	5.07	5.21	5.55

2) 생산성 향상과 고농도 담금을 위한 점도저하 방안

가) 시판효소와 분리균 koji에 따른 액화력

밤 전분에 대한 시판효소와 분리균 koji의 액화력 측정을 위하여 시판되고 있는 액화효소 0.3%와 koji(*Aspergillus oryzae* A-2)를 이용한 조효소액을 각각 첨가하여 실험한 결과는 Table A-16과 같다. 4가지 효소중 액화효소 5000((주)바이오랜드)이 타제품에 비하여 가장 효과가 컸으나 분리균 koji의 효소액이 조효소 상태인 것을 가만하면 앞으로 지속적인 개발 가능성을 지니고 있다고 판단된다.

Table A-16. Dextrogenic of commercial enzyme DU<sup>a)</sup>

Enzymes	DU <sup>a)</sup> (units/g)
Fungamyl <sup>3)</sup>	1483.5±10.25 <sup>a)1)2)</sup>
Termamyl-120 <sup>4)</sup>	1524.2±11.56 <sup>a)</sup>
Dextrogenic 5000 <sup>5)</sup>	1918.3±11.69 <sup>b)</sup>
koji	1883.2±10.52 <sup>b)</sup>

<sup>1)</sup>All value are mean±SD.

<sup>2)</sup>Values within a column with different superscripts are significantly each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test

<sup>3)</sup>Fungamyl(Novozymes Co), <sup>4)</sup>Termamyl-120(Novozymes Co),

<sup>5)</sup>Dextrose enzyme 5000((주)바이오랜드)

나) 밤 전분 액화력 측정 위한 점도 검토

밤 전분은 액화효소의 작용이 잘되지 않아 밤술의 발효과정에서 수율의 낮고 심한 경우에는 발효가 되지 않은 경우가 많아 밤 전분에 시판 액화효소 및 분리균으로 만든 koji를 첨가하여 점도를 측정하는 것은 Table A-17과 같다. 즉, 종류별 시판 액화효소를 각각 0.3%씩 첨가하고, 분리균으로(*Aspergillus oryzae* A-2) 만든 koji는 5%를 첨가하여 점도를 측정하는 결과 액화에 의한 점도저하는 액화효소 5000과 배양한 koji가 좋은 결과를 보였다.

Table A-17. Viscosity of chestnut mash by different commercial enzyme and rice koji

Content of chestnut starch(%)	0.3				5
	Control	Fungamyl <sup>2)</sup>	Termamyl-120 <sup>3)</sup>	Dextrose enzyme <sup>4)</sup> 5000	koji ( <i>Asp.oryzae</i> A-2)
Viscosity	N.D	43.0±2.5 <sup>1)</sup>	5.0±0.65	3.0±0.25	3.0±0.22

<sup>1)</sup>All value are mean±SD.

<sup>2)</sup>Fungamyl(Novozymes Co), <sup>3)</sup>Termamyl-120(Novozymes Co),

<sup>4)</sup>Dextrose enzyme 5000((주)바이오랜드)

시판 효소 중 밤 전분에 대한 액화력이 가장 우수한 액화효소 5000((주)바이오랜드)을 전분에 대한 0%~0.5%까지 첨가하여 반응 시킨 결과는 Table A-18과 같다. 효소농도를 0.3%이상 첨가시 점도는 더 이상 낮아지지 않아 밤 전분에 대한 한계농도는 0.3%이었다.

Table A-18. Viscosity of dextrose 5000 by concentration

Amount of enzyme	Control	0.05%	0.1%	0.3%	0.5%
Viscosity	N.D	17.0±0.5 <sup>1)</sup>	8.5±0.3	4.2±0.2	4.0±0.3

<sup>1)</sup>All value are mean±SD.

분리균인 *Aspergillus oryzae* A-2로 제조한 koji를 밤 전분에 대하여 1%~10%까지 첨가하여 점도를 측정 한 결과는 Table A-19와 같다. koji 를 5%첨가한 경우 점도가 최대로 낮아 졌으며 그 이상 첨가하여도 거의 점도 변화가 나타나지 않았다.

Table A-19. Viscosity of *Aspergillus oryza* A-2 by koji ratio

Amount of enzyme	Control	1%	3%	5%	10%
Viscosity	N.D	21±0.5 <sup>1)</sup>	5±0.1	3.6±0.2	3.5±0.2

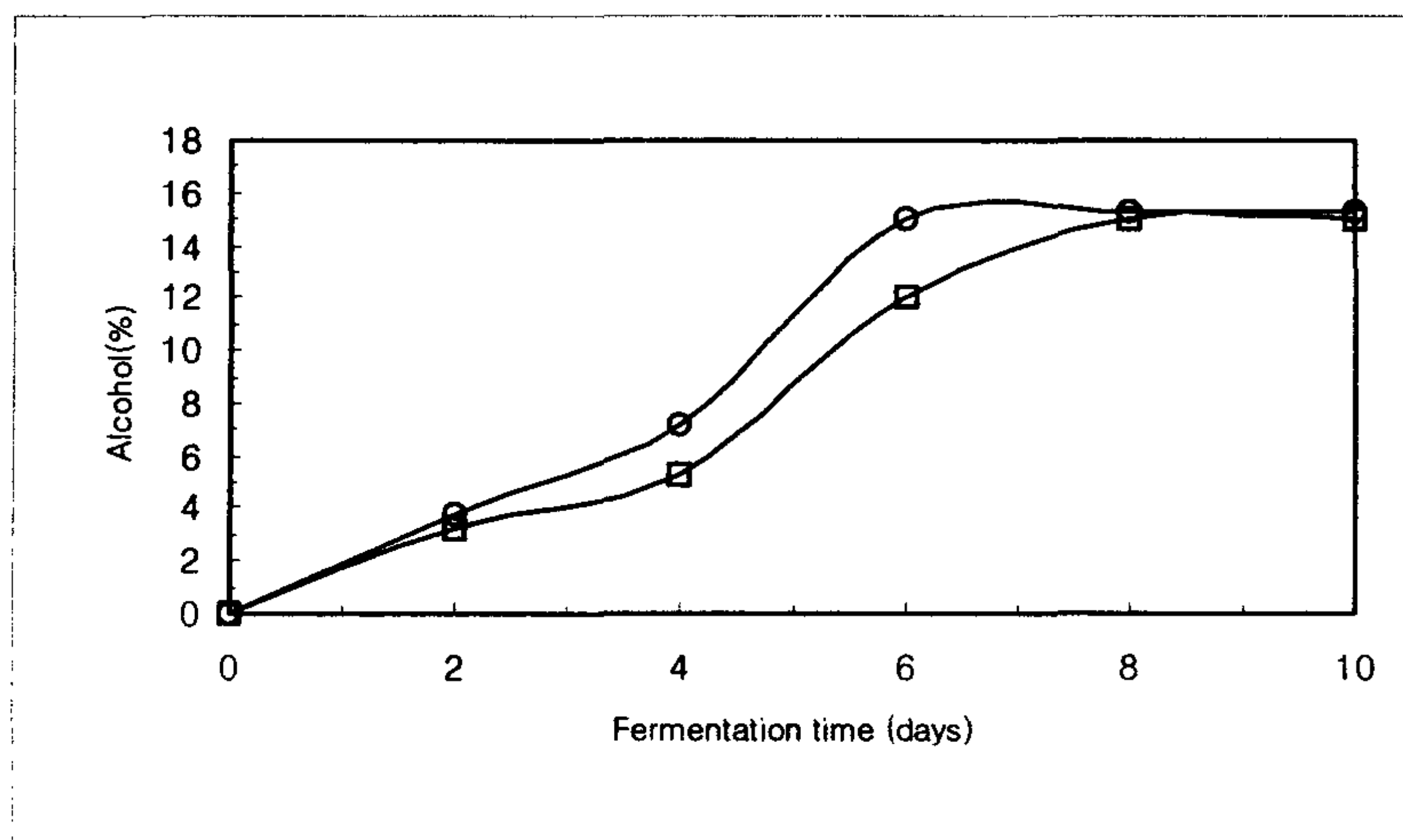
<sup>1)</sup>All value are mean±SD.

### 3) 밤술의 발효특성 및 생산성 향상 방법

#### 가) 주모에 따른 밤술의 발효특성

##### (1) 주모 제조 방법에 따른 알코올 함량

koji주모와 시판효소주모를 20℃에서 10일간 발효시켜 2일 간격으로 알코올 함량을 측정 한 결과는 Fig. A-22과 같다. 발효는 8일이 소요되었으며 시판효소주모가 2일 먼저 발효가 종료됨을 알 수 있으나 그 함량은 8일째에는 거의 같은 경향을 보였다. 이 같은 결과는 *Aspergillus oryzae* A-2의 효소의 역가가 AMG에 비하여 낮음에도 불과하고 발효 속도가 비슷한 것으로 보아 분리균주 A-2균주가 생산하는 당화효소가 밤 전분에 대하여 친화성이 큰 것으로 사료된다.



○-○ : 시판효소주모    □-□ : koji주모

Fig. A-22. Changes of alcohol content in different seed mash at 20°C.

다) 주모의 효모수 변화

밤과 쌀로 제조한 주모의 효모수를 경시적으로 살펴본 결과는 Fig. A-23과 같다. 밤을 이용한 주모는 쌀주모 보다 효모수가 적어 효모수로 보아 주모는 쌀 주모가 보다 좋았고 젖산균수도 쌀 주모가 밤 주모에 비하여 적은 것으로 보아 쌀 주모가 오염도가 낮은 것으로 생각되어 밤술의 주모는 쌀로 제조하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

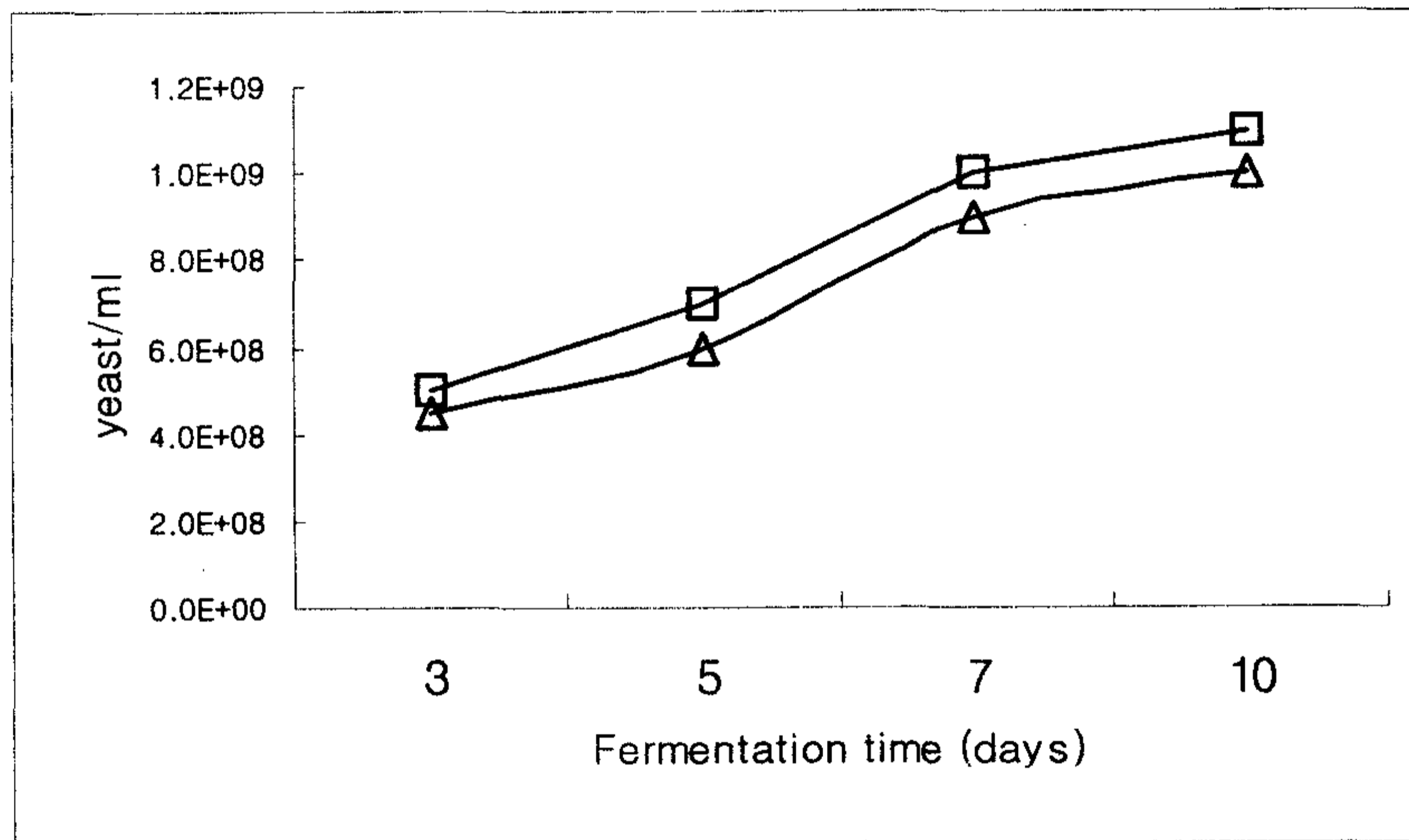


Fig. A-23. Changes of yeast numbers of seed mash.

□ : rice seed mash, △ : chestnut seed mash

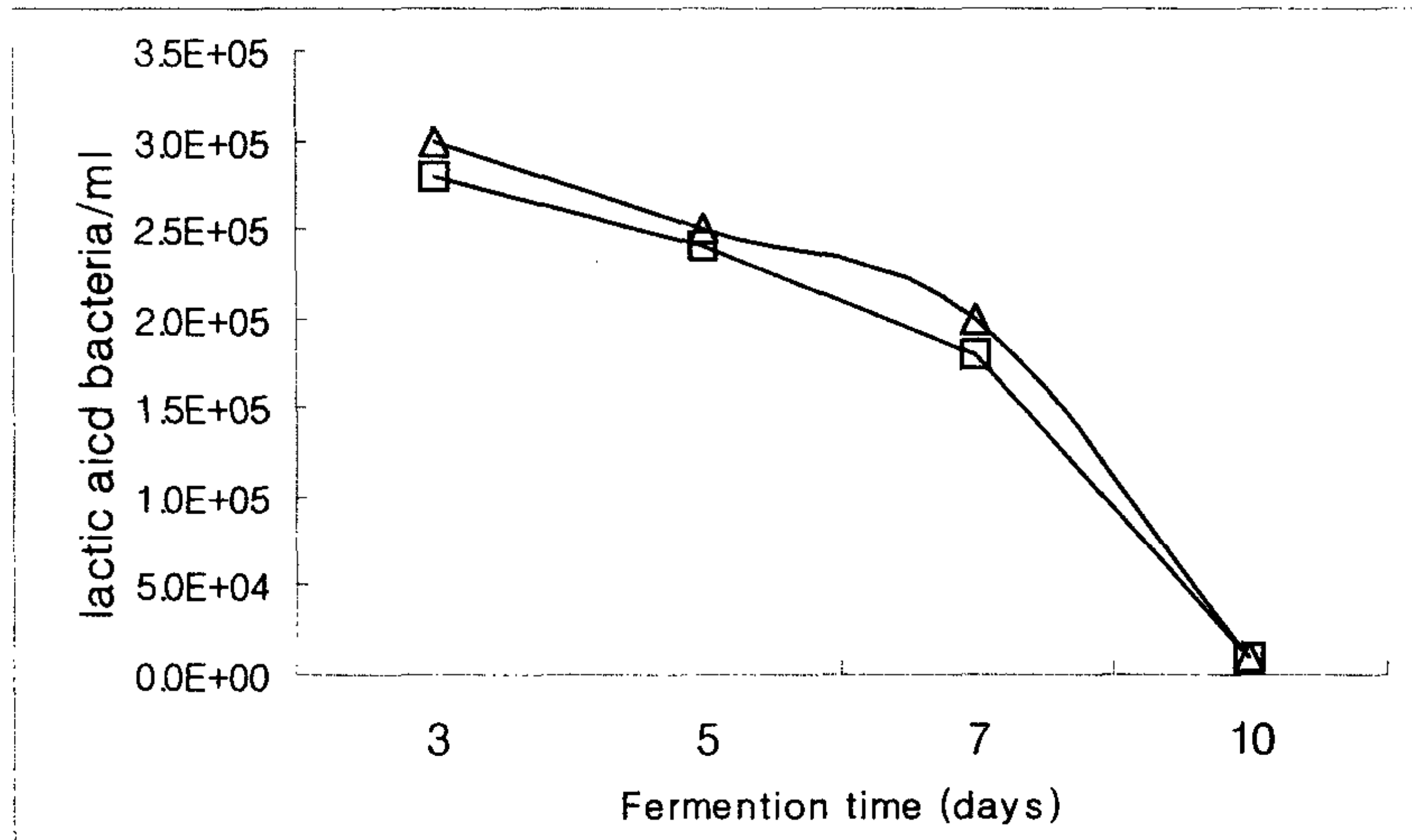


Fig. A-24. Changes of lactic acid bacteria numbers of seed mash.

□ : rice seed mash, △ : chestnut seed mash

라) 술덧의 성분변화

쌀 주모와 밤 주모로 밤술을 사입한 결과 젖산균수는 Fig. A-25, 술덧의 산도는 A-26, 밤술의 알코올 농도는 Table A-20과 같다. 쌀주모가 밤 주모에 비하여 젖산균수와 산도가 쌀 주모쪽이 좋은 것으로 나타났으며 알코올 수율도 쌀 주모쪽이 높은 것으로 나타나 주모는 쌀 주모로 사용하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

Table A-20. Changes of alcohol in rice seed mash and chestnut seed mash.

Fermentation time(day)	3	5	7	10
Seed mash				
Chestnut seed mash	8.24	10.17	13.13	13.94
rice seed mash	7.85	9.36	13.51	14.14

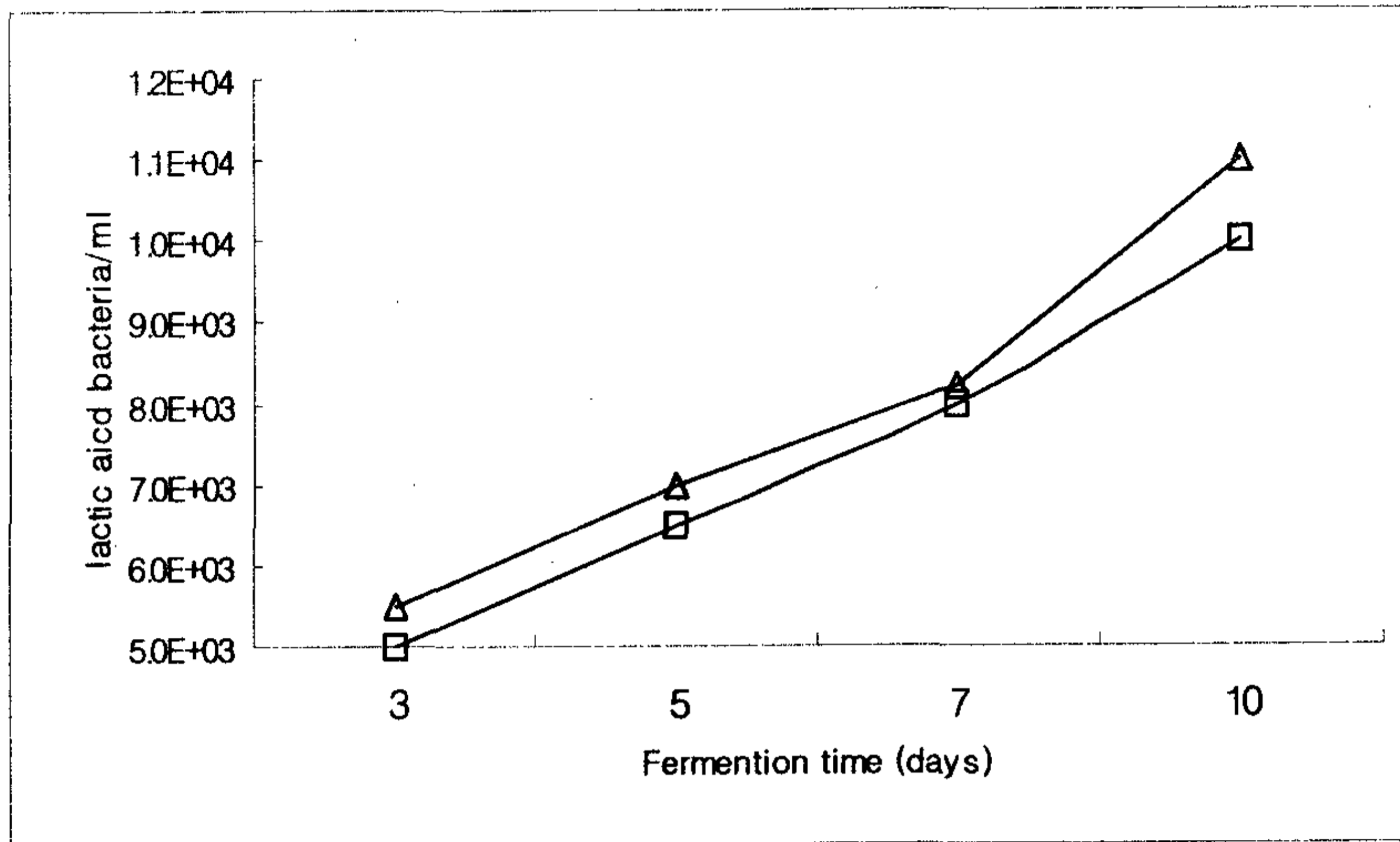


Fig. A-25. Changes of numbers in lactic acid bacteria at rice wine mash.  
 □ : rice seed mash, △ : chestnut seed mash

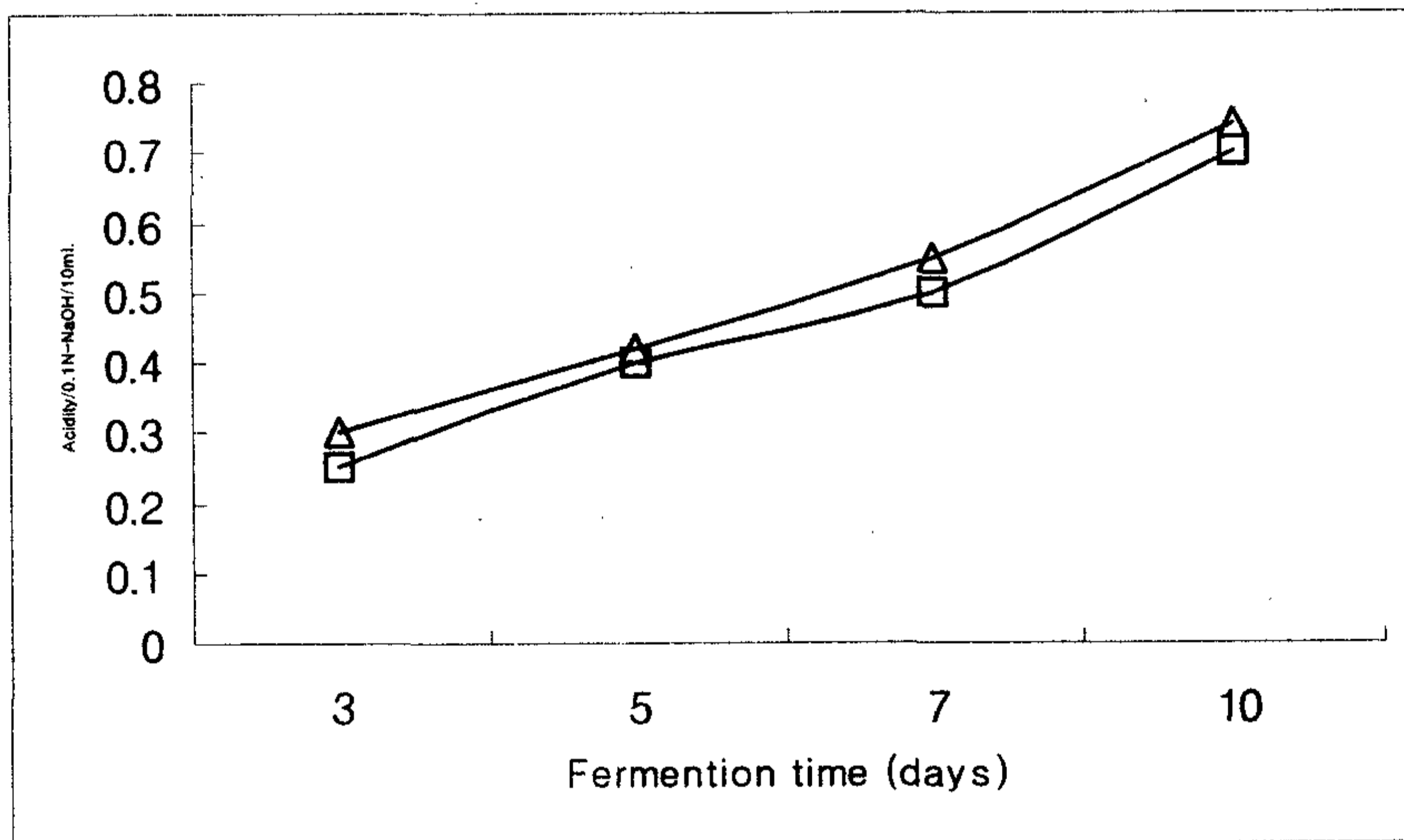


Fig. A-26 Changes of acidity in rice wine mash.  
 □ : rice seed mash, △ : chestnut seed mash



나) 원료와 pH에 따른 알코올, 젖산함량 및 젖산균수의 변화

밤(겉피제거), 옥수수전분, 및 쌀을 이용하여 술덧을 제조하여 pH에 따른 알코올 함량 경시적 변화는 Table A-21, 젖산 함량의 경시적 변화는 Fig. A-27, 젖산균수의 경시적 변화는 Fig. A-28에 각각 나타내었다. 밤술의 산패 현상을 막기 위하여 낮은 pH에서 주모를 만들기 위하여 pH 3.5~4.5사이로 술덧의 산도를 조절하면 알코올 생성에서 좋은 결과를 보였으며 젖산 생성량은 발효가 진행되면서 함량이 증가하였으나 술덧을 pH 4이하로 조절하면 높은 pH 시험구에 비하여 젖산 함량이 낮은 값을 나타내었다.

젖산균수는 발효초기에 pH가 높으면 균수가 많았고 pH가 낮은 시험구는 균수가 적었으며 발효가 진행되어 발효 4일째 젖산균수는 술덧의 pH에 관계없이 균수가 급감하고 일정수에 도달하여 안정되었다.

대조구로 쌀과 옥수수전분을 사용하였고 쌀 술덧을 제조하여 pH에 따른 알코올 함량을 경시적으로 살펴본 결과는 Table A-22와 같고, 젖산함량의 경시적 변화는 Fig. A-29, 젖산균수의 경시적 변화는 Fig. A-30에서 보는 바와 같다. 밤 술덧과 유사하였으나 쌀 술덧이 밤 술덧에 비하여 젖산함량이 pH에 따라서 구분이 확실하였고, 젖산균수도 밤 술덧에 비하여 pH에 따른 영향이 확실히 구분됨을 보여 주었으며 주모의 원료로는 밤 보다는 더 좋은 결과를 보였다.

대조구인 옥수수 술덧을 제조하여 pH에 따른 알코올 함량의 경시적 변화는 Table A-23, 젖산함량의 경시적 변화는 Fig A-31 및 젖산균수의 경시적 변화는 Fig. A-32에서 보는 바와 같다. 시험구인 밤 술덧에 비하여 쌀 술덧의 변화는 아주 유사하였다.

따라서 밤술 제조시 주모는 밤 보다는 쌀 주모를 이용하는 것이 밤술의 안정적 제조에 좋은 결과를 보일 것으로 사료된다.

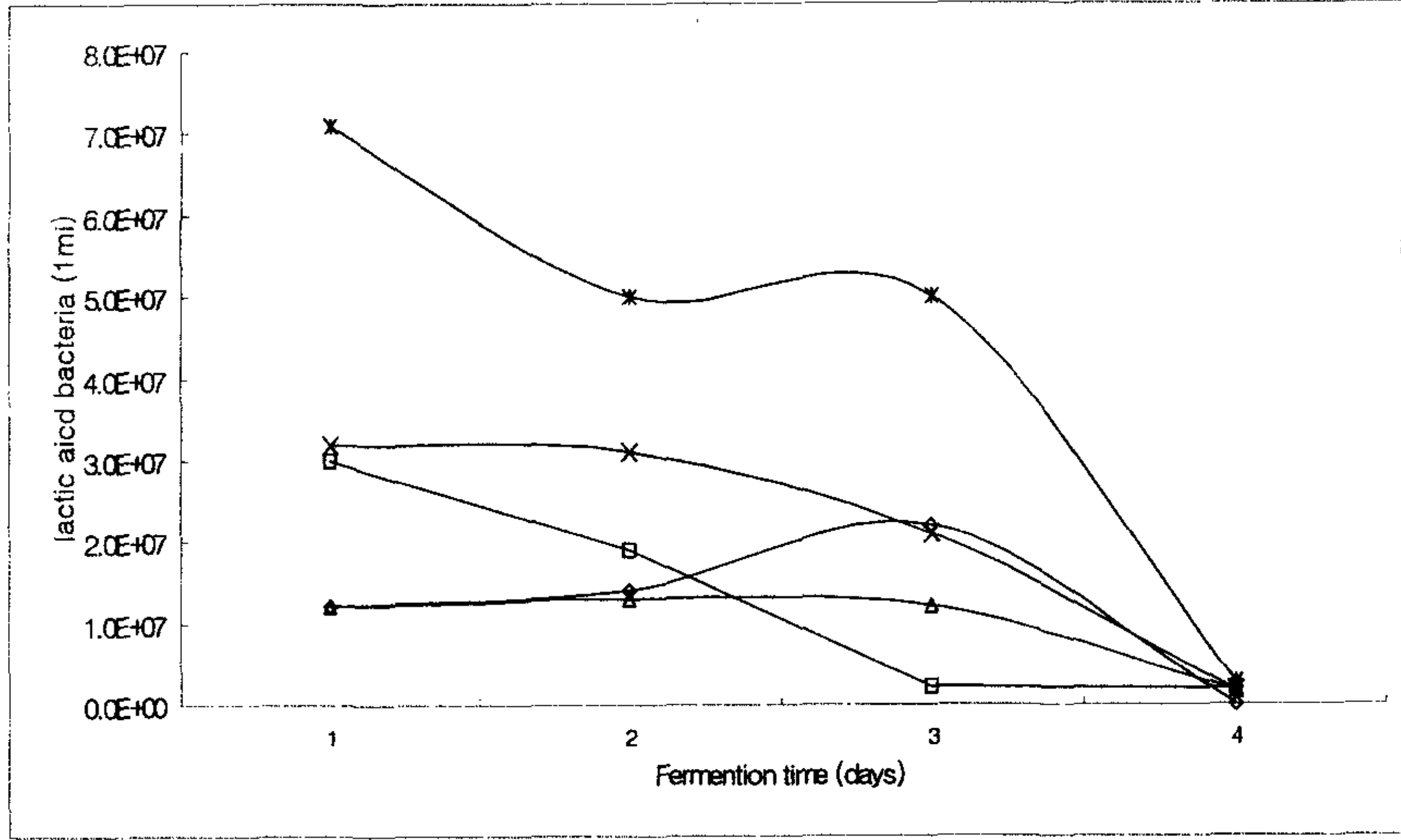


Fig. A-27. Changes of numbers in lactic acid bacteria by different pH at rice wine mash.

◇ : pH 3, □ : pH 3.5, △ : pH 4.0, × : pH 4.5, \* : pH 5.0

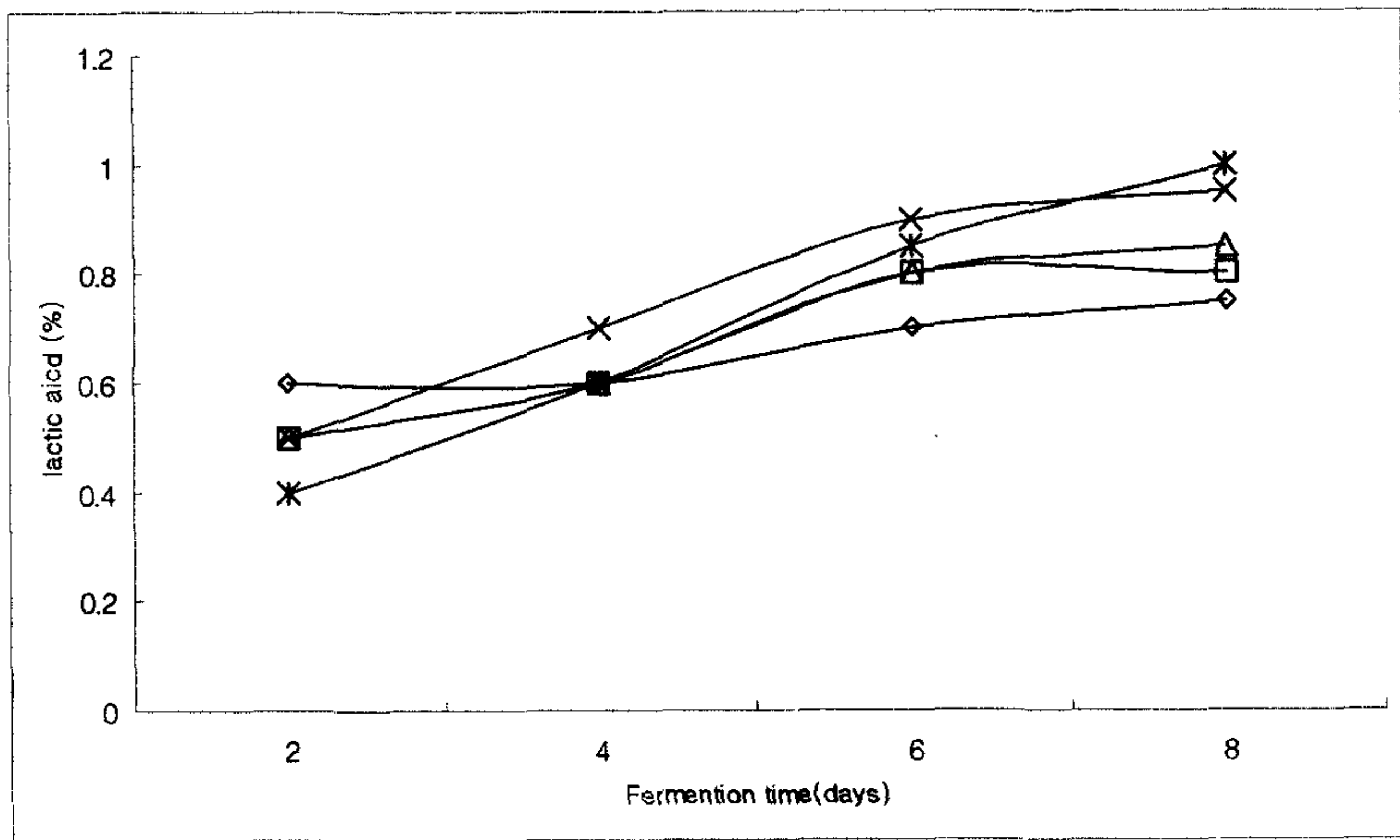


Fig A-28. Changes of content of lactic acid by pH of chestnut wine mash.

◇ : pH 3, □ : pH 3.5, △ : pH 4.0, × : pH 4.5, \* : pH 5.0

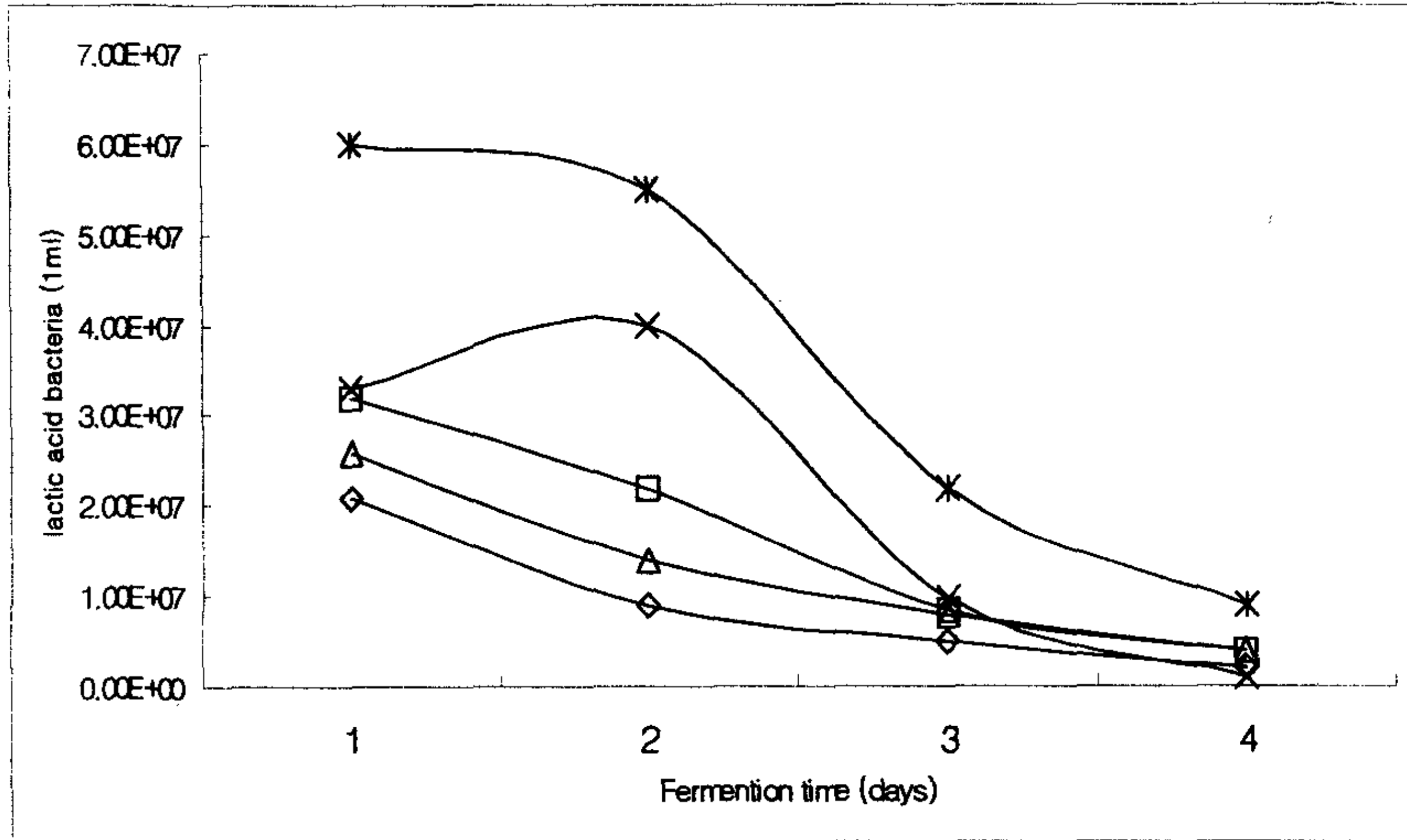


Fig. A-29. Changes of numbers in lactic acid bacteria by different pH at rice wine mash.

◇ : pH 3, □ : pH 3.5, △ : pH 4.0, × : pH 4.5, \* : pH 5.0

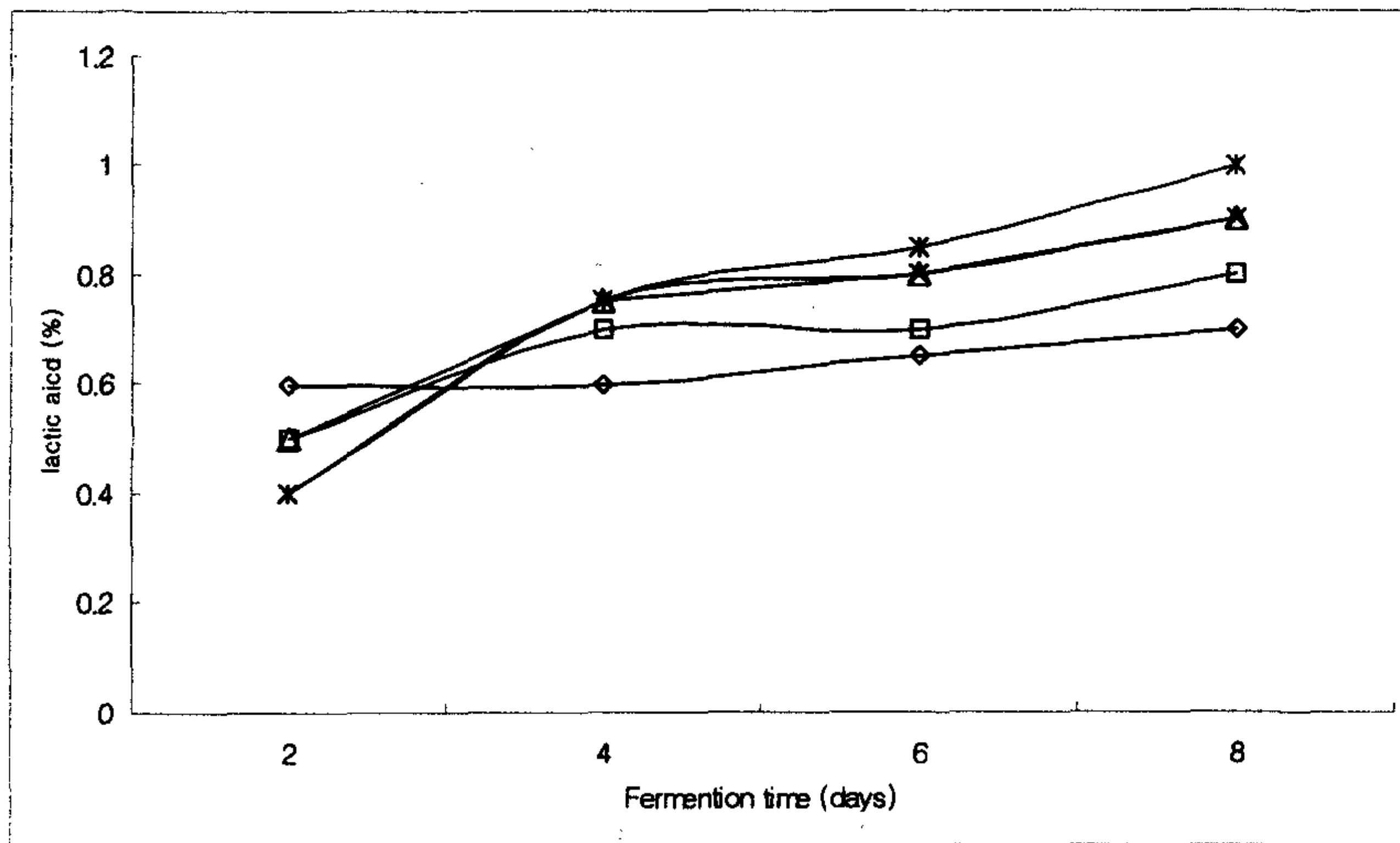


Fig. A-30. Changes of content of lactic acid by pH of rice wine mash.

◇ : pH 3, □ : pH 3.5, △ : pH 4.0, × : pH 4.5, \* : pH 5.0

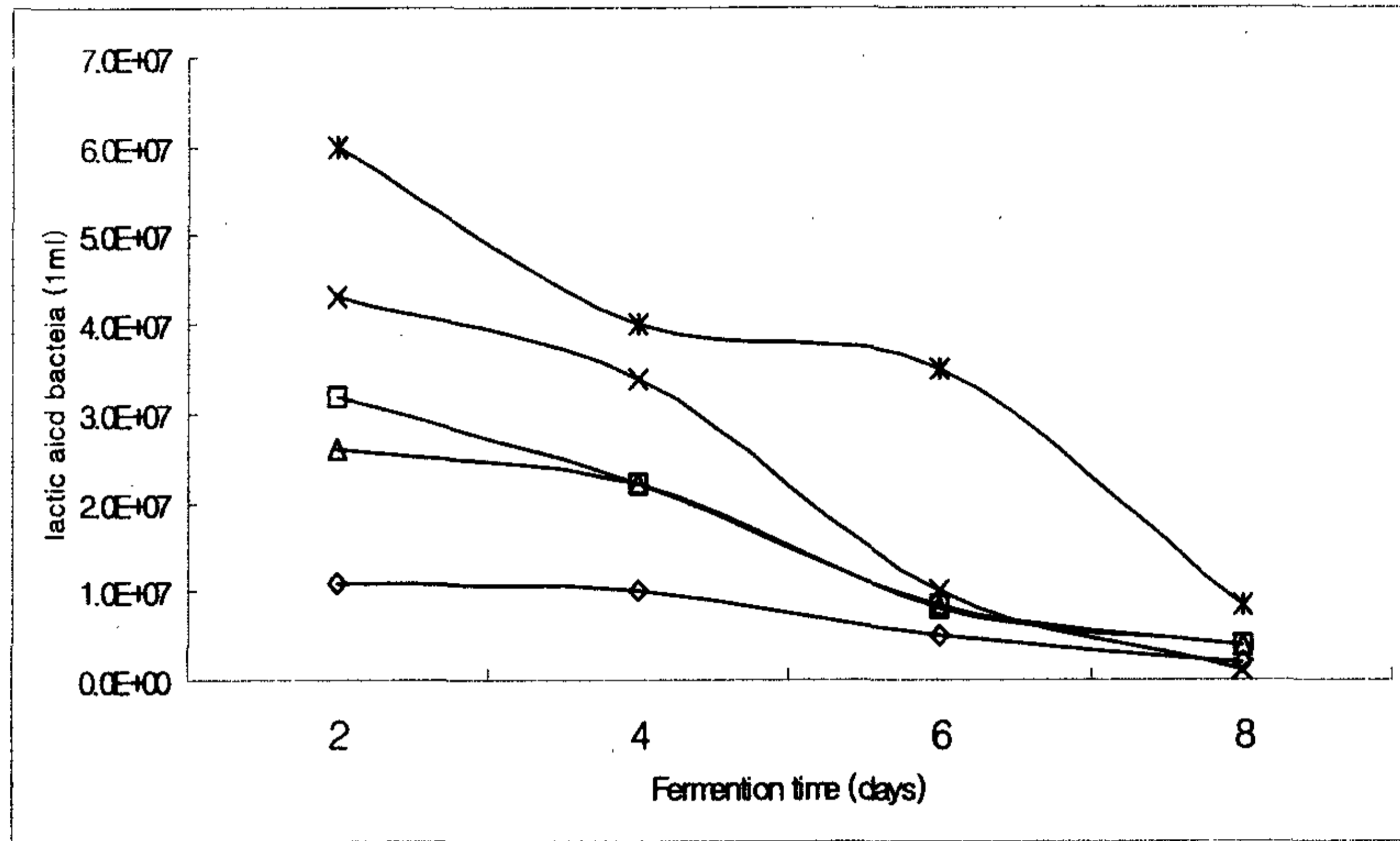


Fig A-31. Changes of numbers in lactic acid bacteria by different pH at corn starch wine mash.

◇ : pH 3, □ : pH 3.5, △ : pH 4.0, × : pH 4.5, \* : pH 5.0

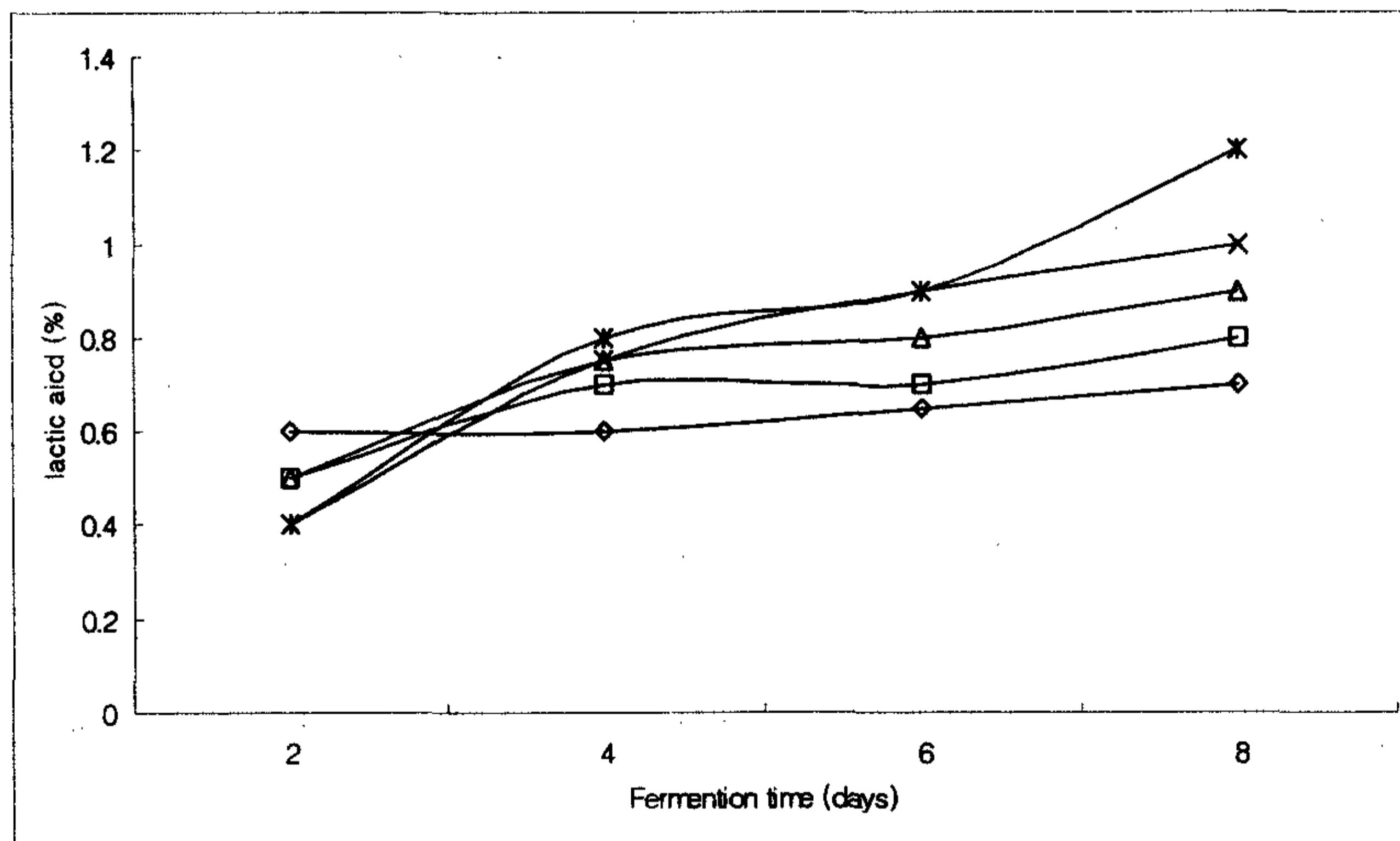


Fig. A-32. Changes in content of lactic acid by pH of corn starch wine mash.

◇ : pH 3, □ : pH 3.5, △ : pH 4.0, × : pH 4.5, \* : pH 5.0

Table A-21. Changes of alcohol contents according to different materials and different pH

		(%)				
Days	materials	pH				
		pH 3	pH 3.5	pH 4	pH 4.5	pH 5
2	chestnut	5.88	6.00	6.05	6.60	7.37
	corn starch	3.21	3.40	3.12	3.05	2.87
	rice	6.07	6.48	7.43	7.86	7.65
4	chestnut	7.11	8.90	8.44	8.94	8.63
	corn starch	7.34	7.20	7.77	7.75	7.68
	rice	9.31	10.65	11.84	11.01	11.74
6	chestnut	12.24	14.36	14.14	14.82	14.77
	corn starch	14.52	14.30	14.84	14.22	14.87
	rice	15.50	15.52	15.59	15.89	15.99
8	chestnut	14.41	14.36	14.38	14.35	14.20
	corn starch	15.74	15.45	15.58	15.77	15.21
	rice	15.55	15.89	15.52	15.98	15.87

다) 시판 액화효소별 알코올 함량측정

시판 액화효소를 종류별로 첨가하여 밤의 알코올 발효 결과는 Table A-22와 같다. 3가지 중 액화효소 5000이 타 효소에 비하여 발효력이 우수 하였다.

Table A-22. Contents of alcohol by different commercial viscosity enzyme

		(%)			
Enzymes	Fermentation time(day)	3	5	7	10
		Fungamyl	8.16	10.81	11.40
Termamyl-120	8.02	10.65	12.23	13.80	
액화효소 5000	8.21	10.67	14.27	14.21	

\*each enzyme 0.3%, Fungamyl(Novozymes Co), Termamyl-120(Novozymes Co), Dextrose enzyme 5000((주)바이오랜드)

라) 액화효소 농도별 알코올 함량측정

액화효소 5000을 0.05~0.5%의 농도별로, 배양코지는 5%를 각각 첨가하여 액화시킨 후 알코올 발효시킨 결과는 Table A-23과 같다. 액화효소 5000을 0.3% 이상 첨가하는 발효가 더 이상 향상되지 않는 것으로 나타났으며 배양코지와 5% 와 동일한 결과를 보였다.

Table A-23. Contents of alcohol by different concentration of enzyme and koji ( % )

Fermentation time(day)		enzyme concentration			
		3	5	7	10
액화효소 5000	0.05%	6.16	6.89	8.91	10.13
	0.1%	7.22	8.98	11.13	12.71
	0.3%	9.21	10.41	13.57	14.21
	0.5%	9.42	10.06	14.03	14.24
A-2 koji 5%		9.56	11.56	14.32	14.32

마) *Aspergillus oryzae* A-2의 koji 첨가량에 따른 알코올 함량측정

*Aspergillus oryzae* A-2로 배양한 코지를 1%~10% 까지 첨가하여 액화시킨 후 발효시킨 결과 5% 첨가가 가장 적합한 것으로 나타났으며 발효시킨 결과는 Table A-24과 같다.

Table A-24. Contents of alcohol by koji concentration of *Aspergillus oryzae*

A-2

(%)

Fermentation time(day) koji concentration	3	5	7	10
	1%	6.66	7.96	10.54
3%	8.54	10.65	13.13	13.71
5%	9.56	11.56	14.32	14.32
10%	9.23	12.54	14.12	14.42

바) 시판당화효소 종류 및 농도에 따른 알코올 함량

Table A-25는 시판하고 있는 각각의 당화효소 0.3%와 당화율 및 기호도가 가장 우수한 탁주용 당화효소를 농도별로 첨가하여 발효시킨 결과이다. 탁주용 당화효소의 농도는 0.3%가 가장 적합한 것으로 나타났다.

Table A-25. Contents of alcohol according to different enzyme concentration

(%)

enzyme concentration	Fermentation time(day)	3	5	7	10
		Fungamyl	0.3%	7.12	9.34
AMG-300	0.3%	7.63	10.56	13.96	14.34
Dextrozyme	0.3%	8.23	11.33	14.14	14.20
탁주용 정제효소	0.1%	5.16	7.89	10.91	12.13
	0.2%	6.22	9.64	12.13	13.11
	0.3%	8.01	10.23	14.00	14.24
	0.5%	8.33	10.96	14.20	14.25

Fungamyl(Novozymes Co), AMG-300(Novozymes Co),

Dextrozyme(Novozymes Co), 탁주용 정제효소((주)태평양화학)

사) 효모 종류 따른 알코올 농도 측정

Table A-26은 분리 효모 2종 *Saccharomyces cerevisiae* N-3과 N-6 및 *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* 2종을 포함한 총 4종을 당화된 밤에 첨가하여 발효시킨 결과이다.

알코올 농도는 *Saccharomyces bayanus*를 제외하고는 거의 같은 결과를 보이고 있다.

Table A-26. Changes of alcohol contents by different yeasts

(%)

Yeasts	Fermentation time(day)			
	3	5	7	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> N-6	8.24	10.17	13.13	13.94
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> N-3	7.85	9.36	13.51	14.14
<i>Saccharomyces bayanus</i> IFO 0615	8.23	10.03	9.67	12.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2044	8.01	9.24	11.89	14.10

4) 제조방법에 따른 밤술의 기호도

가) 시판효소 종류에 따른 기호도

액화효소와 당화효소 종류별로 기호도를 측정한 결과 액화효소는 배양코지가  $4.3 \pm 0.1$  으로 액화 효소 5000보다 좋은 결과를 보였다. 당화효소는 탁주효소가 타 효소에 비하여 좋은 결과를 보였다.



Table A-27. Sensory evaluation on chestnut wine made with different enzymes and *Asp. oryzae* A-2 koji

Enzymes	Sensory evaluation
<i>Asp. oryzae</i> A-2 koji	4.3±0.1 <sup>1)2)</sup>
액화효소 5000	3.9±0.2
Fungamyl	3.7±0.1 <sup>b)</sup>
AMG-300	3.6±0.2 <sup>b)</sup>
Dextrozyme	3.1±0.1 <sup>a)</sup>
탁주용 당화효소	4.3±0.1 <sup>c)</sup>

<sup>1)</sup>All value are mean±SD.

<sup>2)</sup>Values within a column with different superscripts are significantly each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test =a<b<c

나) 효모 종류에 따른 기호도

Table A-28은 효모종류에 따른 밤술의 기호도이며 *Saccharomyces cerevisiae* N-6이 4.3±0.1으로 타 효모에 비하여 높은 기호도를 보였다.

Table A-28. Sensory evaluation of chestnut wine made with different yeasts

Yiests	Sensory evaluation
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> N-6	4.3±0.1 <sup>c)1)2)</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> N-3	3.9±0.1 <sup>b)</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2044	3.6±0.2 <sup>b)</sup>
<i>Saccharomyces bayanus</i> IFO 0615	2.4±0.1 <sup>a)</sup>

<sup>1)</sup>All value are mean±SD.

<sup>2)</sup>Values within a column with different superscripts are significantly each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test =a<b<c

## 라. 밤술의 발효 특성

### 1) 밤술 발효 중 특성변화

#### 가) pH

원료 비율을 달리하여 담금한 밤술의 발효과정 중 pH 변화는 Fig. A-33과 같다. 2단 담금 직후 pH는 4.62~4.91이었고 발효 1~2일에는 모든 시료구의 pH가 감소하였는데 감소하는 폭이 원료에 따라 조금 다른 양상을 보였다. 보당제로서 쌀을 이용해 담금한 밤술의 경우 pH는 3.96, 3.81으로 급격히 감소하였고 옥분을 이용해 담금한 밤술의 경우 pH는 4.48, 4.34로 감소하는 폭이 조금 다르게 나타났다. 2일 이후에는 쌀을 이용해 담금한 밤술의 경우 완만히 감소하여 발효 8일에는 pH 3.77, 3.81로 나타났다. 옥분을 이용해 담금한 밤술의 경우에는 쌀을 이용해 담금한 밤술의 pH변화와 다르게 완만히 증가하여 발효 8일에는 pH 4.61, 4.62로 나타났다. 발효가 끝나는 발효 8일째의 pH는 옥분을 이용해 담금한 밤술의 pH가 쌀을 이용해 담금한 밤술보다 높게 나타났다. 그리고 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구와 비교해 pH는 비슷한 값을 나타내었고, 또한 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구와 비교해 비슷한 값을 나타내었다.

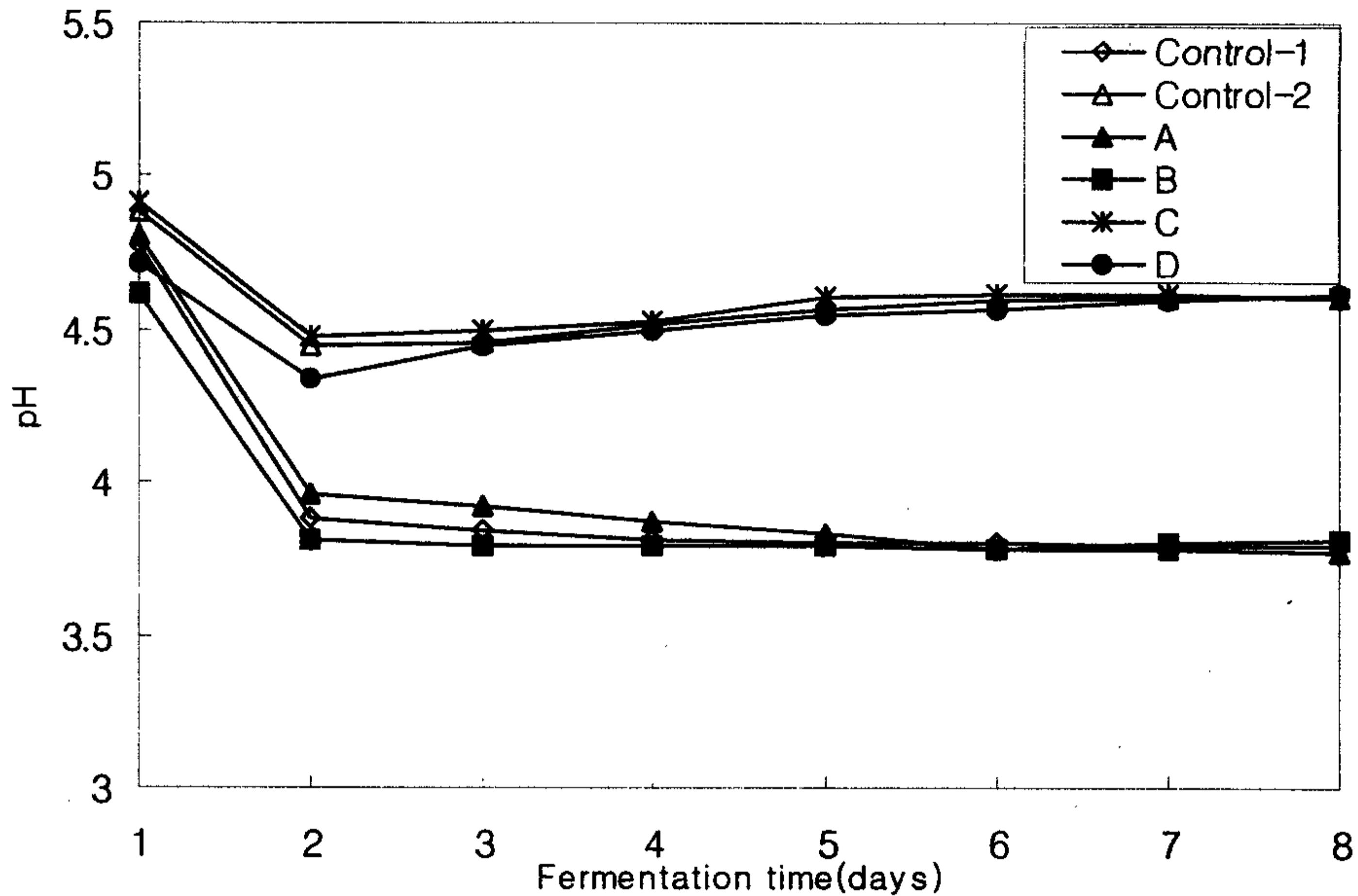


Fig. A-33. Changes of pH in chestnut wine during fermentation.

Control-1 : wine prepared with rice koji

Control-2 : wine prepared with corn flour koji

A : Chestnut wine prepared with rice koji

B : Chestnut wine prepared with saccharified rice flour

C : Chestnut wine prepared with corn flour koji

D : Chestnut wine prepared with saccharified corn flour

#### 나) 총산 함량

원료 비율을 달리하여 담금한 밤술의 발효과정 중 총산 함량의 변화는 Fig. A-34와 같다. 2단 담금 직후 밤술의 총산 함량은 0.2~0.23%이었으며 발효 2일에는 모든 시료구의 총산함량이 증가하였는데 pH변화에서와 마찬가지로 증가하는 폭이 원료에 따라 다른 양상을 보였다. 보당제로서 쌀을 이용해 담금한 밤술의 경우 0.38%, 0.39%로 급격히 증가한 반면에 옥분을 이용해 담금한 밤술의 경우 0.31%, 0.32%로 증가하였지만 쌀을 이용해 담금한 밤술의 경우보다 낮게 나타났다. 2일 이후에는 모든 시료구가 완만히 증가하여 발효 8일에는 쌀을 이용해 담금한 밤술의 경우 0.41%, 0.4%로 나타났고 옥분을 이용해 담금한 밤술의 경우에는 0.33%, 0.34%로 나타났다.

발효가 끝나는 발효 8일째의 총산 함량은 쌀을 이용해 담금한 밤술이 옥분을 이용해 담금한 밤술보다 높게 나타났다. 그리고 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구와 비교해 총산함량은 비슷한 값을 나타내었고, 또한 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구와 비교해 비슷한 값을 나타내었다.

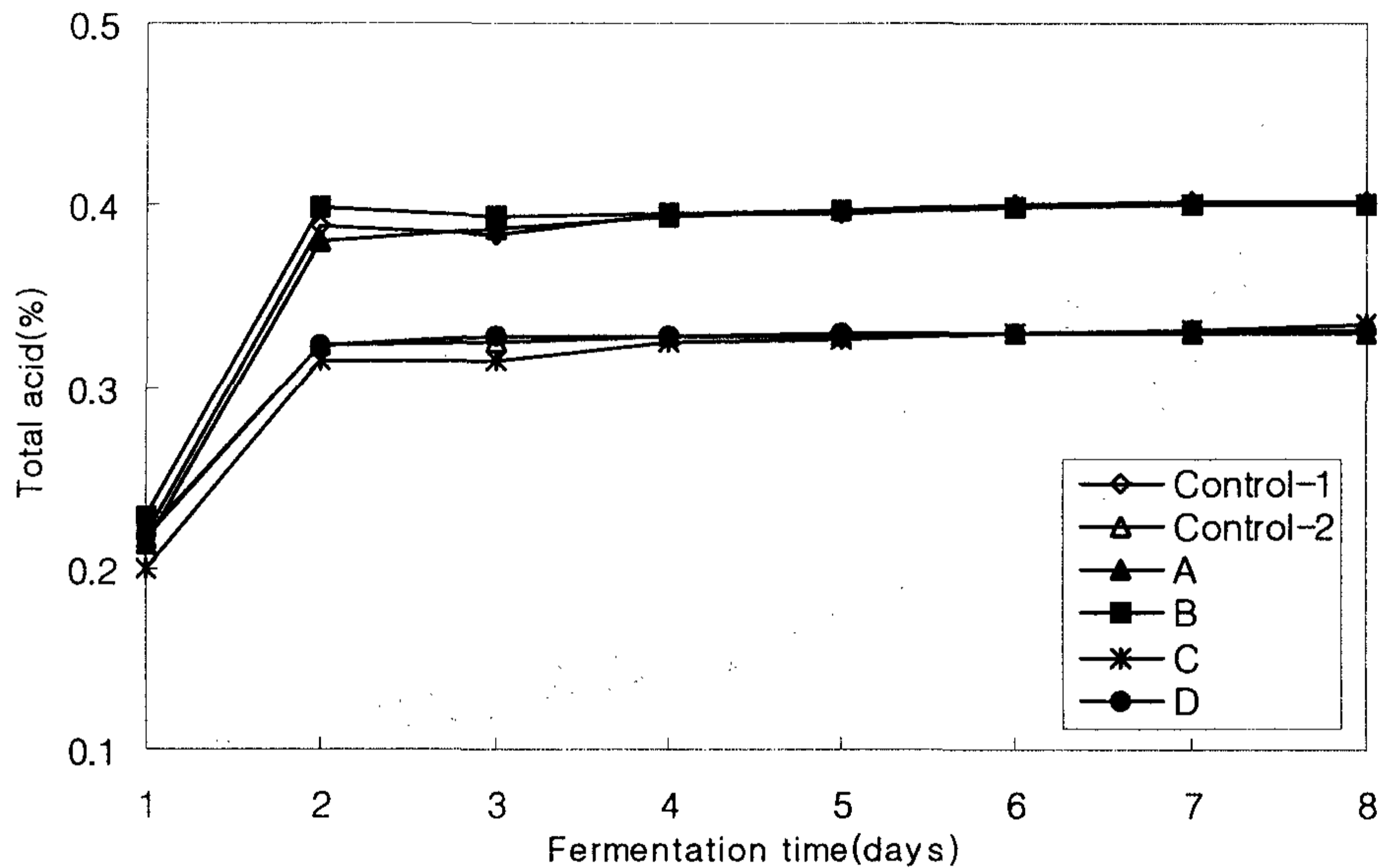


Fig. A-34. Changes of total acid contents in chestnut wine during fermentation.

Symbols are referred to Fig. A-33.

#### 다) 환원당 함량

원료 비율을 달리하여 담금한 밤술의 발효과정 중 환원당 함량의 변화는 Fig. A-35와 같다. 쌀 koji와 옥분 koji를 이용해 담금한 각각의 밤술과 밤을 첨가하지 않은 각각의 대조구는 발효 초기에서 중기까지 큰 폭으로 감소하다가 중기 이후부터 소폭으로 감소하는 경향을 나타내었고, 쌀가루와 옥분에 조효소 및 정제효소를 사용해 담금한 밤술인 경우 발효 초기에 환원당량이 급속히 증가하다가 2일 경과 후 큰 폭으로 감소하여 중기 이후부터는 소폭으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과

는 밤술의 제조과정에 사용된 코지와 효소의 당화력차이로 인해 발효능력이 다소 차이가 있는 것으로 사료된다. 술 제조과정중의 당 함량은 알코올의 발효기질로 이용되고 주류의 향기 생성과 감미도에 영향을 주는 성분이다. 본 실험 결과로 볼때 옥분에 조효소 및 정제효소를 사용해 담금한 밤술은 타시험구 보다 감미가 강한 술덧으로 추측된다.

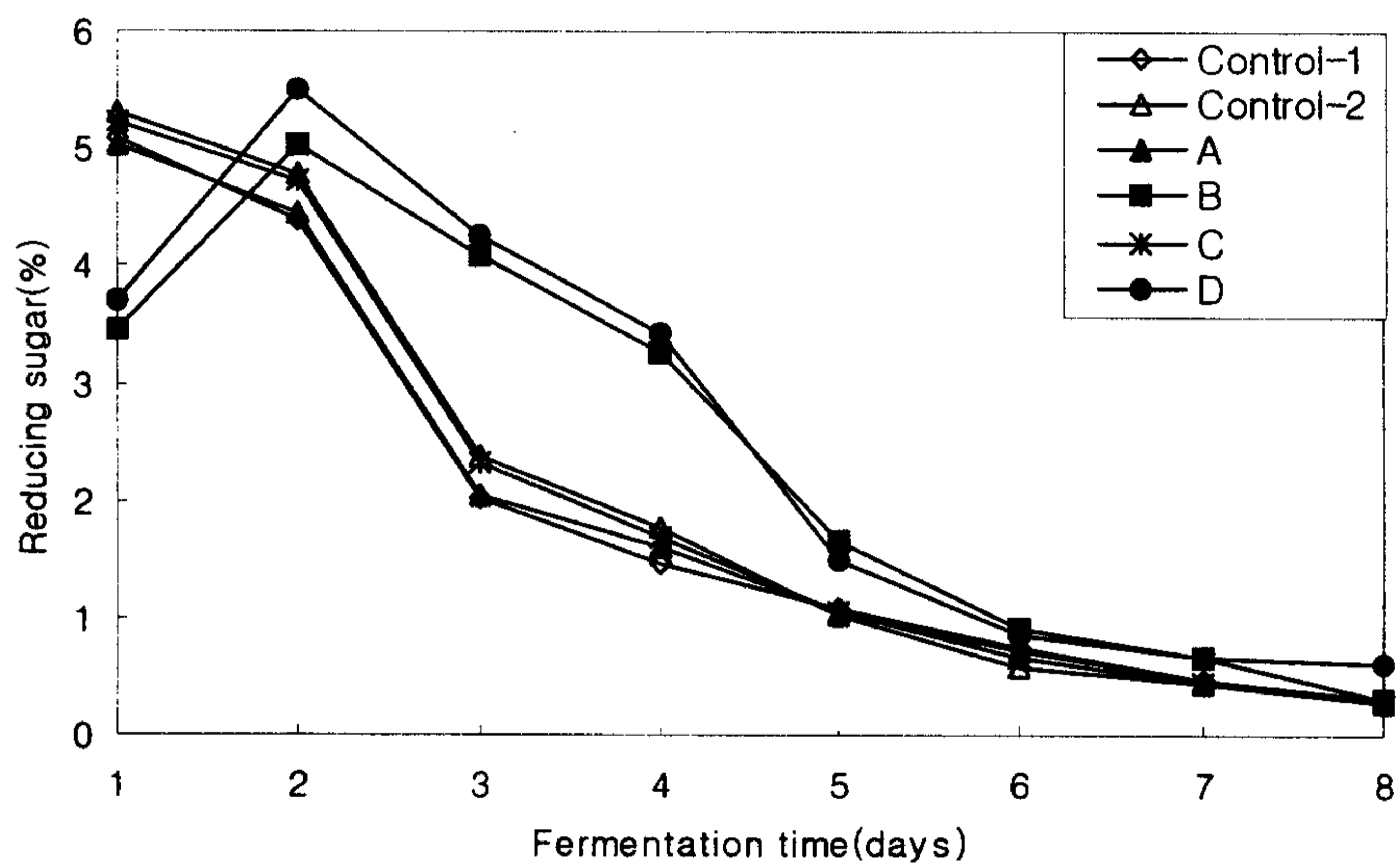


Fig. A-35. Changes of reducing sugar content in chestnut wine during fermentation.

Symbols are referred to Fig. A-33.

라) 색도 측정

원료 비율을 달리하여 담금한 밤술의 발효과정 중 색도의 변화는 Table A-29와 같다. 밝기를 나타내는 L값은 최종적으로 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술이 60.29로 가장 높았고 옥분에 효소를 첨가하여 담금한 밤술도 57.12로 비슷한 값을 나타냈으나 쌀가루에 효소를 첨가하여 담금한 밤술의 경우 0~4일까지 값이 전혀 측정되지 않았다. 이는 쌀가루의 혼탁의 정도가 다른 시료구보다 높아 L값이 적게 나타난 것으로 추측된다. 적색도를 나타내는 a값의 경우 L값과 마찬가지로 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술이 12.27로 가장 높았고 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술이 11.33으로 다음으로 높았다. 쌀가루에 효소를 첨가하여 담금한 밤술의 경우 L값의 변화와 마찬가지로 0~4일 까지 값이 전혀 측정되지 않다가 4일후부터 값이 나타났고 최종적으로 5.91으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 황색도를 나타내는 b값은 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술이 가장 높게 나타났고 옥분에 효소를 첨가하여 담금한 밤술, 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술, 쌀가루에 효소를 첨가하여 담금한 밤술 순으로 나타났다. 그리고 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구의 색도를 비교해보면 발효 8일째의 L값은 밤을 첨가하지 않은 대조구가 50.07로 높게 나타났고 a값은 -0.70으로 낮게 나타났으며 b값은 17.63으로 높게 나타났다. 또한 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구의 색도는 밤을 첨가하지 않은 대조구가 L, a값 및 b값 모두 35.63, 2.37 및 11.63으로 전체적으로 값이 다소 낮게 나타났다.

Table A-29. Hunter values of chestnut wine during fermentation

Different type of chestnut wine <sup>1)</sup>	Hunter value	Fermentation Time(days)				
		0	2	4	6	8
Control-1	L	31.59	40.40	45.60	47.06	50.07
	a	0.27	0.11	-0.16	-0.51	-0.70
	b	14.31	15.82	16.66	17.549	17.63
Control-2	L	18.97	23.10	25.68	29.56	35.63
	a	5.63	4.85	4.98	3.00	2.37
	b	18.48	16.33	15.90	11.70	11.63
A	L	27.83	36.69	34.33	36.72	41.72
	a	10.83	10.21	11.31	11.68	11.33
	b	38.71	37.05	41.09	42.75	41.32
B	L	-15.75	-15.75	22.54	35.00	40.21
	a	0.00	0.00	6.09	5.61	5.91
	b	0.01	0.01	29.63	26.33	27.85
C	L	35.26	46.28	46.61	53.81	60.29
	a	12.58	12.09	14.02	12.03	12.27
	b	42.54	40.27	37.96	37.51	36.87
D	L	38.85	49.37	47.02	50.72	57.12
	a	11.41	10.12	10.26	8.84	8.06
	b	46.03	43.35	41.76	40.15	39.40

<sup>1)</sup>Symbols are referred to Fig. A-33.

마) Fusel oil 함량

원료 비율을 달리하여 담금한 밤술의 발효과정 중 fusel oil 변화는 Table A-30과 같다. ethanol을 제외한 fusel oil성분으로 methanol, ethyl acetate, iso-buthanol, n-buthanol, iso-amylalchol, acetaldehyde, n-hexanol등 7종의 fusel oil이 정량되었다. 7종 중 가장 함유량이 높은 fusel oil은 iso-amylalchol로 나타났고 이는 이 등(44)이 발표한 원료를 달리하여 담금한 탁주에서 8종 fusel oil 성분을 분석한 결과 iso-amylalchol의 함량이 가장 높게 나타난 사실과 일치하였다. methanol의 경우 발효 8일에 쌀가루에 정제효소 및 조효소를 첨가하여 담금한 밤술이 2.4 mg%로 가장 높게 나타났고 ethyl acetate, n-buthanol, iso-amylalchol, n-hexanol 또한 3.1 mg%, 0.8 mg%, 0.2 mg%, 4.1 mg%로 높게 나타났다. Acetaldehyde는 옥분에 효소를 첨가하여 담금한 밤술에서만 검출되었다. n-hexanol은 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술에는 검출되지 않았고 나머지 세 시료구 경우 다른 fusel oil의 함량 변화와 다르게 발효초기에 다량 검출되어 발효가 진행 되면서 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구의 fusel oil함량을 비교해보면 발효 8일째 밤을 첨가하지 않은 대조구가 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술보다 전체적으로 높게 나타났고, 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술에서도 밤을 첨가하지 않은 대조구에서 높게 나타났다. 식품공전<sup>45)</sup>의 경우 주류 규격에는 주류 중의 fusel oil 함량이 100 mg%이하로 규정되어 있는데 본 실험에서 제조된 밤술에서는 11.2~14.3 mg%로 안전한 것으로 나타났다.



Table A-30. Changes of fusel oil contents in chestnut wine during fermentation

Different type of chestnut wine <sup>1)</sup>	Fermentation time(day)	Fusel oil(mg%) <sup>2)</sup>						
		MeOH	EtOAc	iso-Bu	n-Bu	iso-Amy	Acetal dehyde	n-Hex
Control-1	8	3.2	2.9	9.9	0.5	1.8	-	-
Control-2	8	2.7	3.1	5.8	3.0	0.2	-	4.6
A	1	1.3	1.8	4.7	- <sup>3)</sup>	2.3	-	-
	3	1.8	3.0	8.2	0.3	6.4	-	-
	5	2.6	3.4	9.6	0.4	3.2	-	-
	8	2.7	2.7	8.3	0.3	0.3	-	-
B	1	1.5	3.1	3.8	2.5	1.6	-	5.3
	3	3.1	3.9	3.7	3.8	1.6	-	7.8
	5	2.6	3.3	3.0	0.7	1.2	-	9.8
	8	2.4	3.1	3.3	0.8	0.9	-	4.1
C	1	1.1	0.9	1.8	2.0	1.4	-	0.3
	3	1.5	2.3	4.1	2.6	1.1	-	7.3
	5	2.4	1.1	1.5	0.1	0.9	-	9.6
	8	2.6	2.2	4.8	-	0.7	-	3.4
D	1	0.7	1.1	1.8	2.1	0.8	17	1.1
	3	3.0	3.1	4.2	2.9	0.7	1.4	8.1
	5	2.5	3.4	5.6	0.2	0.7	0.6	7.5
	8	0.2	3.1	5.2	0.1	0.6	0.4	1.6

<sup>1)</sup>Symbols are referred to Fig. A-33.

<sup>2)</sup>MeOH : methanol, EtOAc : ethyl acetate, iso-Bu: iso-butanol,  
n-Bu: n-butanol, iso-Amy : iso-amyl alcohol, n-Hex : n-hexanol.

<sup>3)</sup>- : no detection.

바) Ethanol 함량

원료 비율을 달리하여 담금한 밤술의 발효과정 중 ethanol의 함량 변화는 Fig. 5와 같다. 밤술의 담금시 주모에서 유래되어 담금 직후에 ethanol은 2.6~3.8% 함량을 보였고 발효 2일까지는 3.4~4.8%로 모든 시험구가 완만하게 증가하였다. 그러나 발효 4일부터는 쌀 koji와 옥분 koji를 이용해 담금한 각각의 밤술과 밤을 첨가하지 않은 각각의 대조구의 ethanol 함량은 14.3~15.7%로 급격히 증가하였고 이후에 완만히 증가하여 발효 8일에 17.6~17.9%로 최대치에 달했고, 쌀가루 및 옥분에 효소를 첨가해 담금한 밤술은 발효 4일까지는 7.4~8.8%로 완만히 증가하다가 4~6일 사이에 16.2~16.5%로 급격히 증가하여 koji를 사용해 담금한 밤술과 거의 같은 ethanol 함량에 달했고 이후 완만히 증가하다 발효 8일에는 18.2~18.3%로 오히려 코지를 사용한 밤술보다 높은 ethanol 함량을 보였다. 이는 환원당 함량변화에서의 효소를 사용한 밤술의 당화가 koji를 사용한 밤술의 당화보다 늦은 사실과 연관 지을 수 있었다.

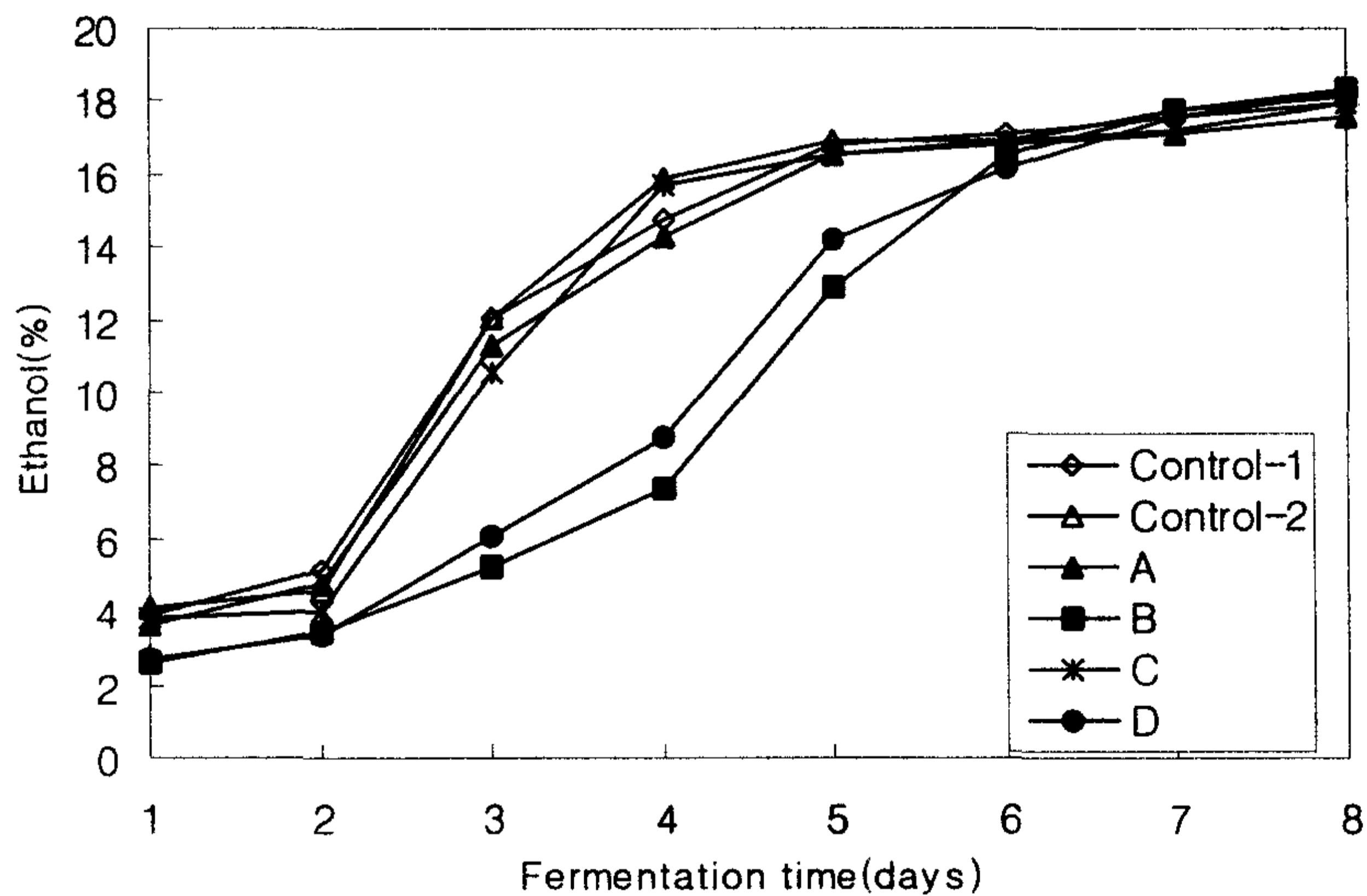


Fig. A-36. Changes of ethanol content in chestnut wine during fermentation.

Symbols are referred to Fig. A-33.

사) 유기산 함량

원료 비율을 달리하여 담금한 밤술의 유기산 함량 변화는 Table A-31과 같다. 밤술에서 확인된 유기산은 citric acid, malic acid, lactic acid, succinic acid 및 acetic acid였으며, 주요 유기산은 lactic acid 및 succinic acid로 나타났다. 시료구 별로 보면 lactic acid는 쌀 koji를 사용해 담금한 밤술이 460.2mg%로 가장 높게 나타났다고, succinic acid는 쌀가루에 효소를 첨가하여 담금한 밤술이 283.1mg%로 가장 높게 나타났다. 유기산 총량을 보면 쌀 koji를 사용해 담금한 밤술이 1,088.1mg%로 가장 높게 나타났고, 다른 시료구와 비교해 옥분에 효소를 첨가해 담금한 밤술을 제외한 두 시료구는 비슷한 함량을 보였다. 그리고 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구의 유기산함량을 비교해보면 citric acid가 밤을 첨가하지 않은 대조구에서 201.2mg%로 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술보다 높게 나타났고 또한 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구에서도 citric acid가 밤을 첨가하지 않은 대조구에서 187.2mg%로 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술보다 높게 나타났다.

Table A-31. Content of organic acids of chestnut wine

Organic acids	(mg%)					
	Control -1	Control -2	A	B	C	D
Citric acid	201.2	187.2	176.5	154.2	142.3	132.9
Malic acid	68.9	112.6	75.6	62.3	114.8	105.2
Lactic acid	435.8	356.2	460.2	435.2	394.2	352.3
Succinic acid	256.1	235.1	261.9	283.1	258.5	273.5
Acetic acid	124.7	118.3	113.9	83.5	103.6	76.8
Total	1,086.7	1,009.4	1,088.1	1,018.3	1,013.4	940.7

Symbols are referred to Fig. A-33.

아) 관능검사

순천대학교 학생 10명을 대상으로 원료 비율을 달리하여 담금한 밤술의 관능평가 결과는 Table A-32와 같다. 향에 대한평가는 A, C시료구가 4.4, 4.1로 높게 나타났고 B, D시료구는 3.4, 2.9로 낮게 나타났다. 색은 A, B, C, D시료구가 3.8, 3.8, 3.4, 3.3으로 비슷한 기호도를 나타냈고 맛에 대한 기호도에서는 향에 대하여 좋은 기호도를 보였던 A, C시료구가 4.5, 4.3으로 좋았으며 B시료구 3.7, D시료구 2.7순으로 나타났다. 종합적으로 보았을때 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술이 향 및 맛에서 우수하게 나타났다. 그리고 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구의 관능평가 결과를 비교해보면 밤을 첨가하지 않은 대조구가 맛, 색 및 향에서 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술보다 전체적으로 낮게 나타났고 또한 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술과 밤을 첨가하지 않은 대조구에서 밤을 첨가하지 않은 대조구가 옥분 koji를 이용해 담금한 밤술보다 다소 낮게 나타 낮지만 색은 비교적 많은 차이를 보였다.

Table A-32. Sensory evaluation of chestnut wine prepared with different recipes

Different type of chestnut wine <sup>1)</sup>	Sensory characteristics		
	smell	color	taste
Control-1	3.0±0.6 <sup>2)a)3)</sup>	3.9±0.5 <sup>b)</sup>	2.9±0.5 <sup>c)</sup>
Control-2	2.8±0.5 <sup>a)</sup>	2.3±0.8 <sup>a)</sup>	2.3±0.5 <sup>a)</sup>
A	4.4±0.5 <sup>b)</sup>	3.8±0.6 <sup>b)</sup>	4.5±0.5 <sup>c)</sup>
B	3.4±0.7 <sup>a)</sup>	3.8±0.6 <sup>b)</sup>	3.7±0.7 <sup>b)</sup>
C	4.1±0.8 <sup>b)</sup>	3.4±0.7 <sup>b)</sup>	4.3±0.5 <sup>c)</sup>
D	2.9±0.7 <sup>a)</sup>	3.3±0.5 <sup>b)</sup>	2.7±0.7 <sup>a)</sup>

<sup>1)</sup>Symbols are referred to Fig. A-33.

<sup>2)</sup>All value are mean±SD.

<sup>3)</sup>Values within a different superscripts are significant for each groups at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test =  $a < b < c$

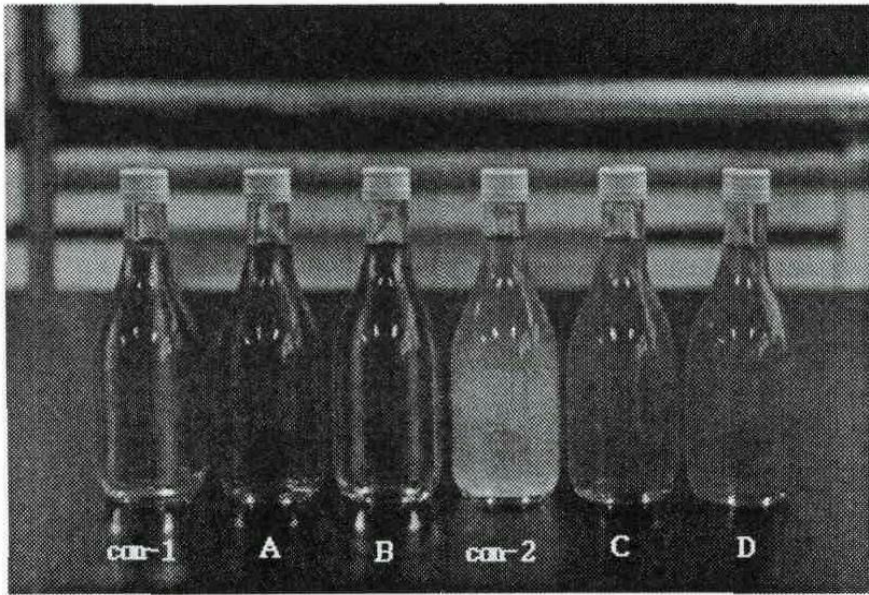


Fig. A-37. Comparing of chestnut wine.

Symbols are referred to Fig. A-33.

마. 여과법에 따른 밤술의 청징도

밤술을 압착 여과 후 5℃에서 24시간 정치하여 1차 앙금을 제거하고 온도별로 저장하여 규조토 여과하여 청징도를 측정한 결과는 Table A-33과 같다. 저장 온도가 낮아질수록 흡광도가 계속 낮아지다가 -5℃이하에서는 큰 변화가 없어 저장 온도는 -5℃에서 저장하는 것이 가장 좋을 것으로 판단된다. 시험구간별로 비교했을 때에도 비슷한 결과를 보였다.

밤술을 -5℃에서 저장 기간을 측정한 결과는 Table A-34와 같다. 저장 5일까지는 큰 변화가 없다가 5일 이후부터 7일까지 급속히 감소하기 시작하여 7일 이후부터는 완만함을 보였다. 각각의 시험구에서도 비슷한 결과를 보였다.

따라서 밤술의 여과시 냉각온도는 -5℃에서 7일간 저장한 후에 규조토 여과를 하는 것이 술의 청징도가 가장 좋은 결과를 보였다.

Table A-33. Changes of absorbance in chestnut wine at storage temperature  
(Abs.)

Storage Temp. (°C)	Control -1	Control -2	A	B	C	D
5	0.019	0.615	0.054	0.032	0.129	0.194
0	0.018	0.611	0.053	0.031	0.125	0.192
-5	0.013	0.578	0.041	0.023	0.117	0.188
-10	0.013	0.571	0.041	0.021	0.115	0.188

Symbols are referred to Fig. A-33.

Table A-34. Changes of absorbance in chestnut wine at storage time  
(Abs.)

Storage Time (days)	Control -1	Control -2	A	B	C	D
3	0.011	0.535	0.038	0.021	0.113	0.169
5	0.010	0.529	0.035	0.019	0.113	0.166
7	0.007	0.497	0.028	0.012	0.109	0.159
10	0.006	0.492	0.027	0.012	0.103	0.157

Symbols are referred to Fig. A-33.

#### 바. 밤술의 살균

##### 1) 처리온도 및 시간에 따른 미생물의 살균효과

원료비율을 달리하여 담금한 밤술의 품질특성을 비교한 결과 관능평가가 우수했던 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술에 대한 처리 온도 및 시간에 따른 미생물의 살균효과는 Table A-35와 같다. 열처리 하지 않은 생주의 세균은  $7.2 \times 10^5$  CFU/ml, 젖산균은  $1.6 \times 10^6$  CFU/ml, 효모는  $8.6 \times 10^5$  CFU/ml으로 나타났다. 이를 토대로 처리 온도별 미생물의 살균효과를 살펴 보면 세균은 80°C에서 젖산균과 효모는 6

0℃에서 살균효과가 나타났다. 또한 미생물의 살균효과를 시간대 별로 살펴보면 세균은 70℃에서 30분, 80℃에서 10분이후로 살균효과가 나타났고 젖산균은 60℃에서 10분, 효모는 60℃에서 15분이후로 살균효과를 나타냈다. 종합적으로 처리온도 및 시간에 따른 미생물의 살균효과는 세균, 젖산균 및 효모의 살균효과가 모두 나타난 80℃에서 10분간 열 처리하는게 가장 적당하다고 사료된다.

Table A-35. Changes of microorganisms in chestnut wine after pasteurization

Heating temperature (°C)	Heating time (min.)	Microbes		
		Total bacteria	Lactic acid bacteria	Yeast
Control		$7.2 \times 10^5$	$1.6 \times 10^6$	$8.6 \times 10^5$
60	5	$5.3 \times 10^2$	$5.2 \times 10^2$	$3.7 \times 10^2$
	10	$2.6 \times 10^5$	—	$1.3 \times 10^1$
	15	$8.5 \times 10^4$	—	—
	20	$5.6 \times 10^2$	—	—
	30	$2.5 \times 10^1$	—	—
70	5	$8.6 \times 10^4$	—	—
	10	$6.1 \times 10^3$	—	—
	15	$1.2 \times 10^2$	—	—
	20	$3.7 \times 10^1$	—	—
	30	—	—	—
80	5	$6.8 \times 10^1$	—	—
	10	—	—	—
	15	—	—	—
	20	—	—	—
	30	—	—	—
90	5	—	—	—
	10	—	—	—
	15	—	—	—
	20	—	—	—
	30	—	—	—
100	5	—	—	—
	10	—	—	—
	20	—	—	—

2) 처리 온도 및 시간에 따른 색도측정

원료비율을 달리하여 담금한 밤술의 품질특성을 비교한 결과 관능평가가 우수했던 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술에 대한 처리 온도 및 시간을 달리하여 살균한 밤술의 색도 측정 결과는 Table A-36과 같다. 처리 온도별로 보면 60°C~100°C까지 온도가 증가 할수록 생주와 비교해 L값은 감소하였고 a값은 증가하였으며 b값은 온도 증가와 관계없이 별 차이가 없었다. 처리 시간별로 볼 때도 온도 증가와 마찬가지로 시간이 증가할수록 L값은 감소하였고 a값은 증가하였으며 b값은 별 차이가 없었다. 이런 결과를 볼 때 밝기를 나타내는 L값이 생주와 비교해 감소였는데 이는 처리 온도 및 시간이 증가할수록 밤에 함유된 tannin성분의 용출량이 증가한 것으로 추측된다.

Table A-36. Hunter values of chestnut wine after pasteurization

Heating temperature(°C)	Heating time (min.)	Hunter value		
		L	a	b
Control		41.54	10.53	41.19
60	5	40.29	10.72	41.26
	10	39.81	10.96	41.55
	15	39.68	11.11	41.05
	20	38.92	11.31	41.56
	30	37.56	11.58	41.28
70	5	39.92	10.87	41.32
	10	39.65	11.14	41.79
	15	37.90	11.18	40.29
	20	37.22	11.23	41.27
	30	36.36	11.52	41.98
80	5	37.91	11.16	41.18
	10	36.87	11.22	40.03
	15	36.23	11.53	40.13
	20	35.19	11.78	41.26
	30	34.85	11.86	41.56
90	5	36.19	11.58	40.86
	10	35.51	11.61	40.84
	15	34.34	11.86	41.27
	20	33.69	12.06	40.83
	30	33.03	12.31	41.61
100	5	34.61	12.06	41.61
	10	33.08	12.23	42.44
	20	31.50	12.56	42.48



### 3) 처리 온도 및 시간에 따른 관능검사

원료비율을 달리하여 담금한 밤술의 품질특성을 비교한 결과 관능평가가 우수했던 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술에 대한 처리온도 및 시간을 달리하여 살균한 밤술의 관능평가 결과는 Table A-37, 38과 같다. 처리 온도별 관능평가 결과를 보면 색은 온도증가와 관련해 별 차이가 없었고 맛과 냄새는 60℃~80℃까지는 크게 저하되지 않았으나 90℃~100℃까지 열처리한 밤술은 생주보다 맛과 냄새가 유의적으로 떨어져 쓴맛과 화독 냄새가 강하게 나타났다. 이는 90℃이상 온도에서의 열처리는 관능적 품질의 변화를 의미하며 변화의 정도는 온도가 높을수록 뚜렷해졌다. 처리 시간별 관능평가 결과를 보면 색은 처리 온도별과 마찬가지로 시간증가에 관련해 별 차이가 없었고 맛과 냄새는 5분, 10분, 15분에서는 크게 저하되지 않았지만 20분, 30분에서는 뚜렷하게 저하됨을 알 수 있었다. 이는 처리온도와 마찬가지로 20분이상 열처리는 관능적 품질의 변화를 의미한다. 이로써 살균 효과를 종합적으로 보았을 때 80℃에 10분간 살균한 밤술이 미생물 살균 및 관능평가 면에서 우수하게 나타났다.

Table A-37. Sensory evaluation of Chestnut wine after pasteurization at different temperature

Heating temp. (°C)	Sensory characteristics		
	smell	color	taste
60	4.0±0.7 <sup>1)c)2)</sup>	4.2±0.7 <sup>b)</sup>	4.1±0.9 <sup>b)</sup>
70	3.9±0.7 <sup>c)</sup>	3.9±0.7 <sup>ab)</sup>	4.0±0.7 <sup>b)</sup>
80	3.8±0.6 <sup>c)</sup>	3.6±0.7 <sup>ab)</sup>	3.7±0.8 <sup>b)</sup>
90	1.8±0.6 <sup>b)</sup>	3.6±0.7 <sup>ab)</sup>	1.3±0.7 <sup>a)</sup>
100	1.1±2.9 <sup>a)</sup>	3.5±0.5 <sup>a)</sup>	0.8±0.6 <sup>a)</sup>

<sup>1)</sup>All value are mean±SD.

<sup>2)</sup>Values within a different superscripts are significant for each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test = a<b<c

Table A-38. Sensory evaluation of chestnut wine pasteurization at 80°C according to different times

Heating time (min.)	Sensory characteristics		
	smell	color	taste
5	4.2±0.4 <sup>1)c)2)</sup>	3.9±0.6 <sup>a)</sup>	4.1±0.9 <sup>d)</sup>
10	3.9±0.7 <sup>c)</sup>	3.8±0.6 <sup>a)</sup>	3.8±0.8 <sup>cd)</sup>
15	3.9±0.6 <sup>c)</sup>	3.9±0.7 <sup>a)</sup>	3.4±0.7 <sup>c)</sup>
20	1.7±0.5 <sup>b)</sup>	3.6±0.5 <sup>a)</sup>	1.3±0.7 <sup>b)</sup>
30	0.8±0.8 <sup>a)</sup>	3.5±0.5 <sup>a)</sup>	0.5±0.5 <sup>a)</sup>

<sup>1)</sup>All value are mean±SD.

<sup>2)</sup>Values within a different superscripts are significant for each groups at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test =  $a<b<c<d$

#### 사. 제성된 밤술의 저장시 품질 변화

##### 1) 저장 기간에 따른 환원당 함량 변화

원료비율을 달리하여 담금한 밤술의 품질특성을 비교한 결과 관능평가가 우수했던 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술을 살균한 것과 하지 않은 것으로 나누어 환원당 함량의 변화를 비교하여 본 결과는 Fig. A-37과 같다. 비 살균제품인 경우에도 저장 중 약간 감소는 있으나, 가열 살균제품에 비하여 감소정도가 상당히 약하게 나타났다.

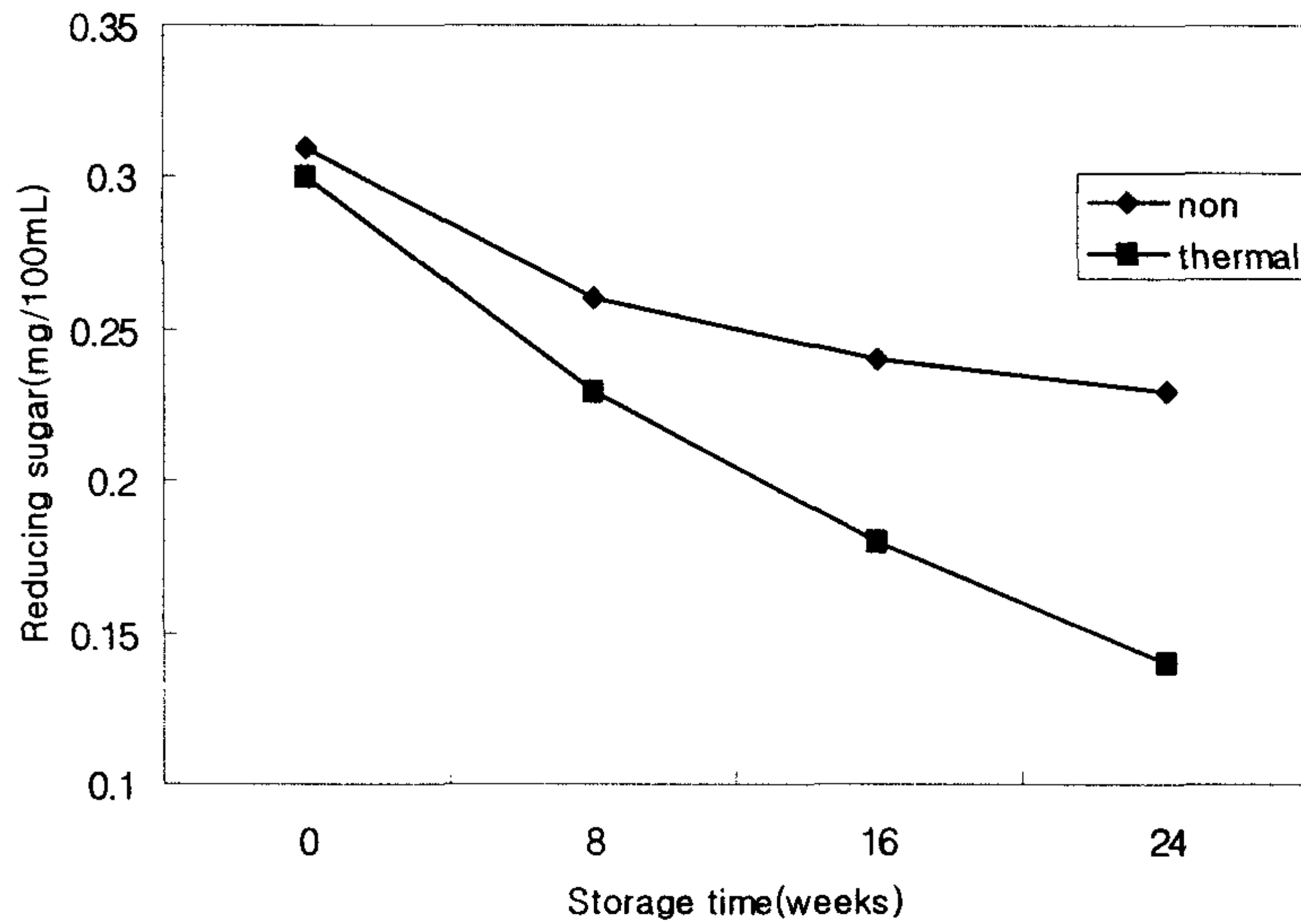


Fig. A-37. Changes in reducing sugar of chestnut wine during storage.

(2) 저장기간에 따른 색도변화

원료비율을 달리하여 담금한 밤술의 품질특성을 비교한 결과 관능평가가 우수했던 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술을 저장하면서 측정한 색택변화의 추이는 Fig. 38~40과 같다. 가열처리한 경우 L 값은 여과초기에는 44.0에서 저장 4개월에 37.02까지 감소하여 어두워지고 있으며 그 이후에는 안정화되는 것으로 나타났다. 가장 큰 변화를 보인 것은 b값으로 31.26에서 저장 기간이 길어짐에 따라 43.26까지 증가하였다. a 값은 저장 2개월까지 4.88로 감소하다가 그 이후에는 다시 증가하였다.

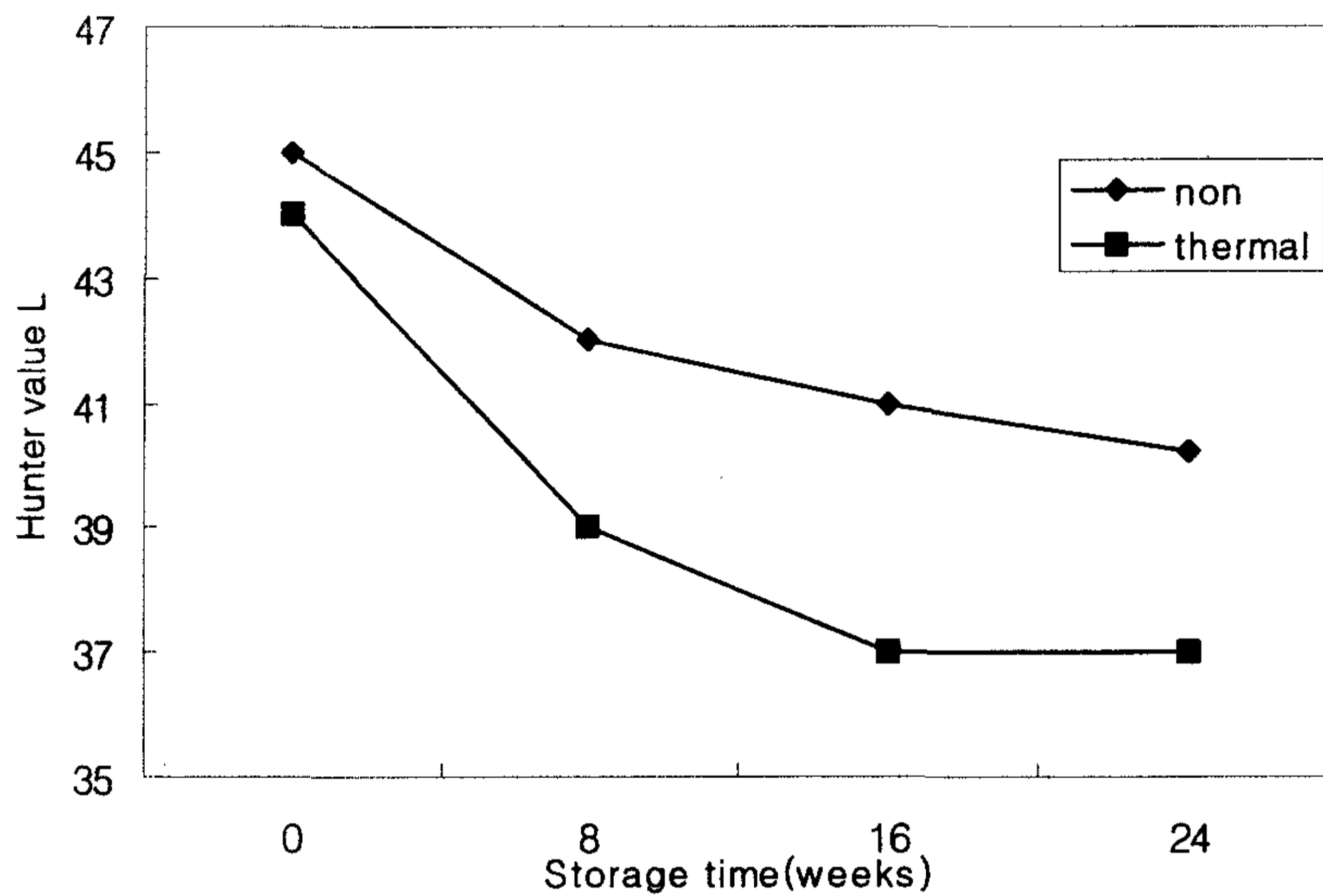


Fig. A-38. Changes in Hunter value L of chestnut wine by different treating.

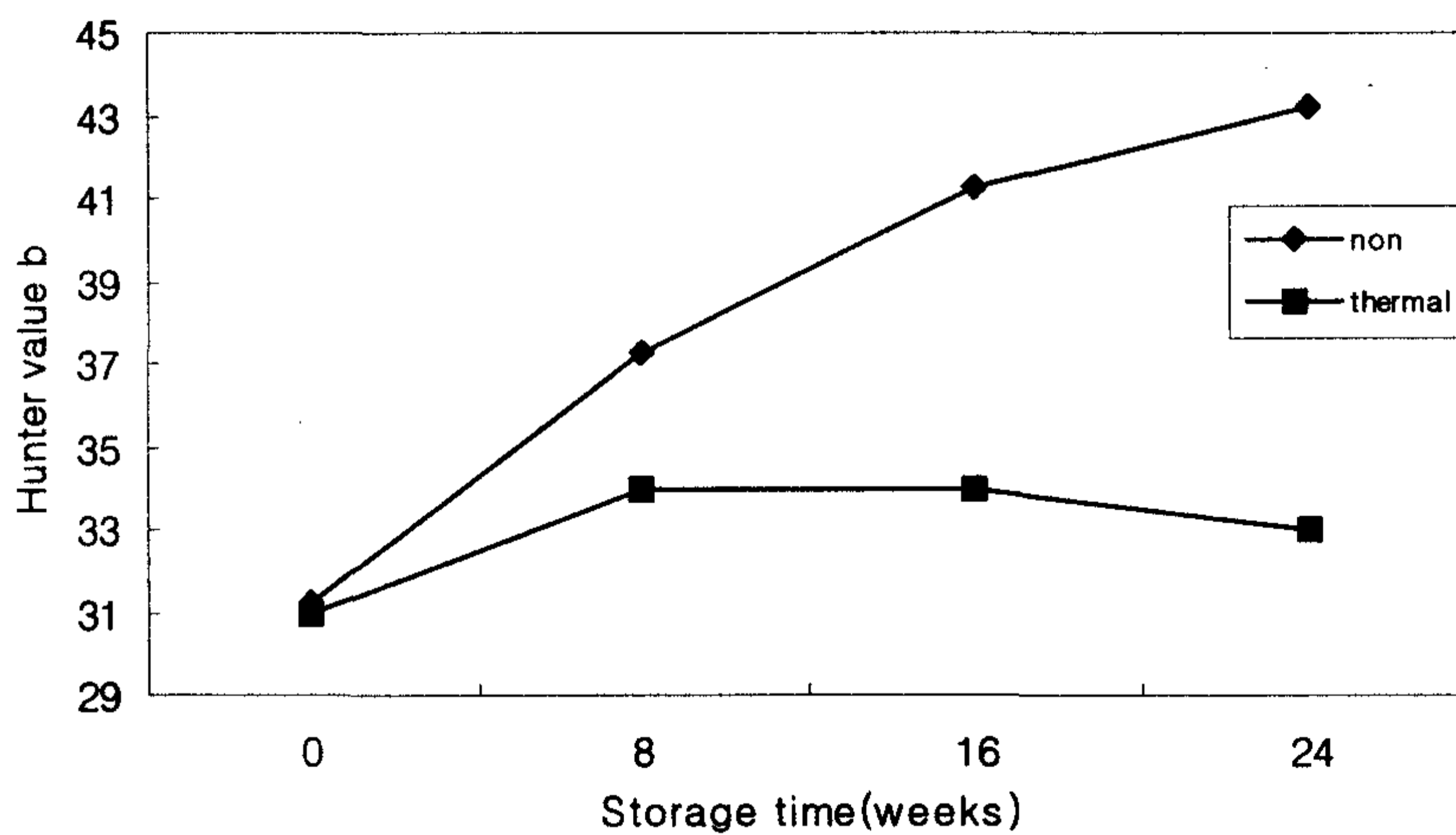


Fig. A-39. Changes in Hunter value b of chestnut wine by different treating.

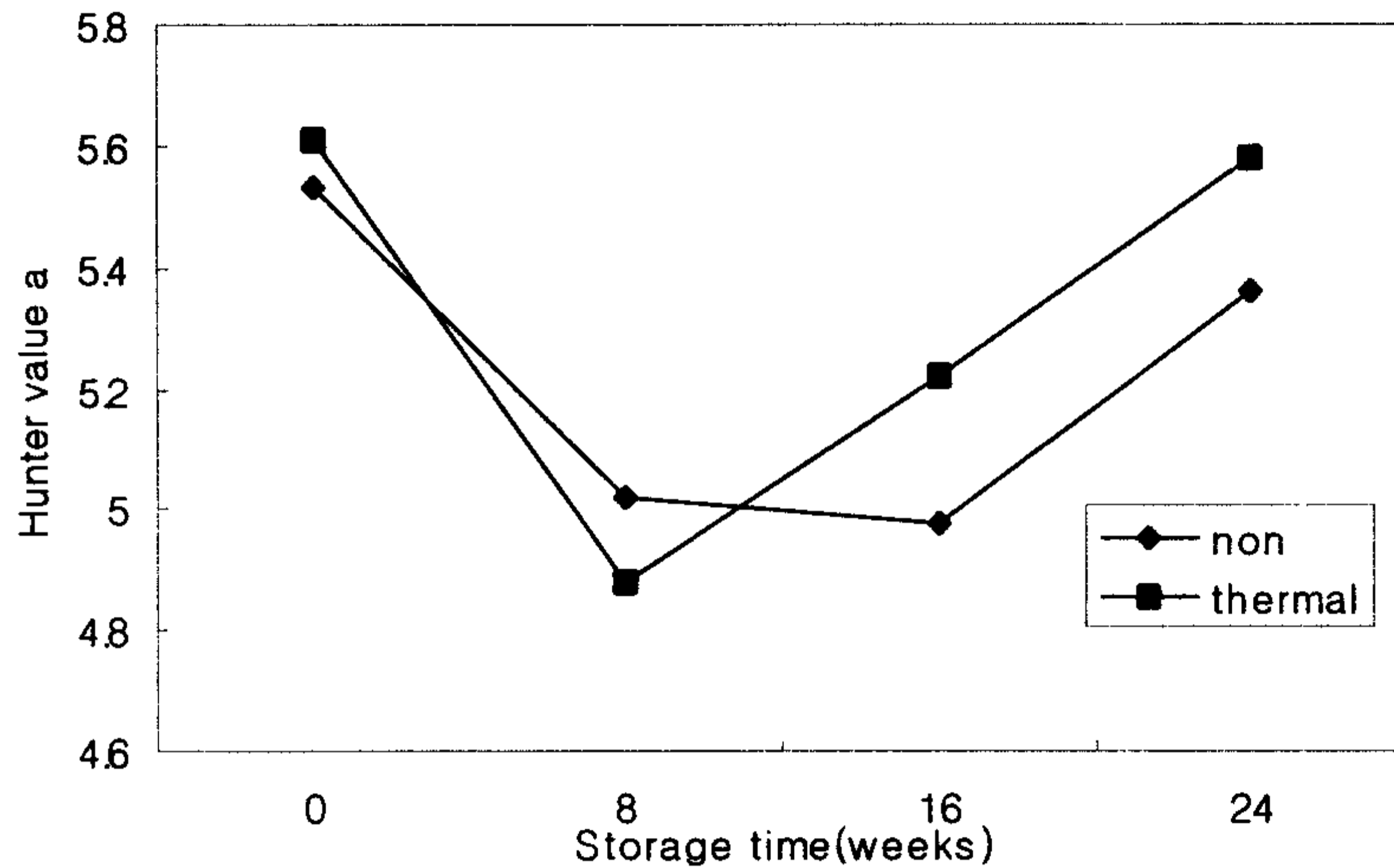


Fig. A-40. Changes in Hunter value a of chestnut wine by different treating.

### 3) 저장기간에 따른 기타 성분의 변화

원료비율을 달리하여 담금한 밤술의 품질특성을 비교한 결과 관능평가가 우수했던 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술의 저장 기간에 따른 기타 성분의 변화는 Table A-39와 같다. 에탄올의 함량은 저장에 따라 거의 변화가 없었으나, 총산도 및 가용성 고형분 함량은 약간 감소하고 pH는 약간 증가하는 등 오차 범위 내에서 증감의 영향을 나타내었다.

### 4) 저장 기간에 따른 관능평가

원료비율을 달리하여 담금한 밤술의 품질특성을 비교한 결과 관능평가가 우수했던 쌀 koji를 이용해 담금한 밤술을 살균한 제품과 비살균한 제품으로 나누어 저장하면서 관능평가를 실시한 결과는 Table A-40과 같다. 저장 기간이 길어짐에 따라 색에 대한 평가는 큰 차이가 없었으나 냄새 및 맛에 대한 평가에서는 살균한 제품과 비살균한 제품의 관능 평가결과가 다르게 나타났다. 살균한 제품의 경우 저장 기간에도 기호도가 크게 변하지 않았으나 비 살균한 제품인 경우에는 저장기간이 길어짐에 따라 종합적인 기호도가 매우 떨어지는 경향을 나타내었다.

Table A-39. Physical and chemical properties of chestnut wine during storage

	Storage time(weeks)			
	0	8	16	24
Ethanol(15°C), %	12.4	13.2	12.9	12.9
Total acidity(v/v), %	0.430	0.423	0.402	0.415
Soluble solid(°Brix)	10.9	10.4	10.2	10.3
pH	4.3	4.2	4.5	4.6

Table A-40. Sensory evaluation of chestnut wine during storage

Storage (weeks)		Sensory characteristics		
		smell	color	taste
0	non	4.2±0.7 <sup>1)c)2)</sup>	4.1±0.7 <sup>ab)</sup>	4.1±0.9 <sup>b)</sup>
	thermal	4.1±0.7 <sup>c)</sup>	4.0±0.5 <sup>ab)</sup>	4.0±0.7 <sup>b)</sup>
8	non	2.1±0.6 <sup>b)</sup>	4.2±0.6 <sup>b)</sup>	2.1±0.6 <sup>a)</sup>
	thermal	3.9±0.6 <sup>c)</sup>	4.0±0.9 <sup>ab)</sup>	4.0±0.5 <sup>b)</sup>
16	non	1.7±0.6 <sup>b)</sup>	4.1±0.6 <sup>ab)</sup>	1.3±0.7 <sup>a)</sup>
	thermal	3.8±0.5 <sup>c)</sup>	3.9±0.8 <sup>a)</sup>	4.0±0.5 <sup>b)</sup>
24	non	1.0±0.6 <sup>a)</sup>	4.0±0.6 <sup>ab)</sup>	0.7±0.7 <sup>a)</sup>
	thermal	3.8±0.5 <sup>c)</sup>	4.1±0.6 <sup>ab)</sup>	3.9±0.8 <sup>b)</sup>

<sup>1)</sup>All value are mean±SD.

<sup>2)</sup>Values within a different superscripts are significant for each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test = a<b<c

## 참 고 문 헌

1. 조재선. 1981. 식품재료학, 기전연구사 : 271.
2. 동의보감편찬위원회(1988) 허준 원저 동의보감, 잡병편, 탕액편, p.954, 학력 개발사
3. Hwang, T.Y., Kim, J.H., Kim, J.K. and Moon, K.D.(1998) The effects of microwave heating of the texture of sugared chestnuts. Korean J. Food Sci. Technol., 30, 569-573
4. 산림청자료(1998) 밤박피 기계개발에 관한 연구. 한국식품개발연구원. G147-0759
5. Hwang TY, Kim JH, Kim JK and Moon D. 1998. The effect of microwave heating on the texture of sugared chestnuts, Korean. J. Food Sci Technol., 30(3) : 569~573.
6. 심기환, 성낙계, 기우경, 허종화, 조성환, 정덕화, 최진상. 1990. 밤을 이용한 카스테라의 제조 및 관능검사, 경상대학교 농어촌개발연구소보., 7 : 1~6.
7. 심기환, 성낙계, 기우경, 허종화, 조성환, 정덕화, 최진상. 1989. 밤을 이용한 국수 제조 중 관능검사 및 물리적 특성, 경상대학교 농어촌개발연구소., 7 : 1~6.
8. 성낙계, 박윤중, 정지훈, 이종갑(1991) 최신발효공학, 형설출판사
9. 박웅렬(1983) 발효인삼주, 인삼연구보고(고려인삼연구소), p. 43
10. 손일암(1948) 주류제조용 강장성분추출방법. 한국특허
11. 민병승(1963) 황정의 발효로 무국주를 제조하는 방법. 한국특허 63 : 10-80
12. 정지훈(1992) 한국전통소주(진도홍주) 제조에 관한 연구. 한국 음식문화 연구원 논문집 3:63-81
13. 유태중, 한복려(1988) 모과주 제조에 관한 연구. 농림논문집. p. 211
14. 장은재(1985) 오미자 과실주 제조에 관한 연구. 고려대 석사 학위논문
15. 안미옥(1984) 오가피 과실주 제조에 관한 연구. 고려대 석사 학위논문
16. 우강용(1983) 꽃감주 개발에 관한 연구. 한국식품문화연구논문집 4:287-312

17. Kim KH and Park SH. 1995. Liquefaction and saccharification of tapioca starch for fuel ethanol production, Korean j. Biotechnol, Bioeng., 10(3) : 304~316.
18. Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP and Yu TS. 1997. Characteristics of useful fungi isolated from traditional korean *Nuruk*, J. Korean Food Sci. Nutr., 26(5) : 767~774.
19. Han EH, Lee TS, Noh BS and Lee DS. 1997. Quality characteristics in mash of *Takju* prepared by using different *Nuruk* during fermentation, Korean J. Food Sci. Technol., 29(3) : 555~562.
20. Kim JY. 1999. Isolation of brewing yeast and saccharogenic strains and its characteristics for *Foxtail Millet-wine* making, Graduate School of Cheju Nat'l University : 12~18.
21. Park CS and Lee TS. 2002. Quality characteristics of *Takju* prepared by wheat flour *Nuruk*, Korean J. Food SCI. Technol., 34(2) : 296~302.
22. 오만진, 송보현, 김교창, 민용규, 최갑성, 성창근. 1995. 전통발효식품의 과학화 연구, 과학기술처 보고서.
23. 이병노, 성창근, 오만진. 1997. 전통누룩곰팡이의 생화학적 및 양조학적 특성, 생물산업., 10(3) : 10~16.
24. Yook C. and Robyt, J. F. 2002. Reactions of alpha amylases with starch granules in aqueous suspension giving products in solution and in a minimum amount of water giving products inside th granule, Carbohydrate. Research., 337 : 1113~1117.
25. 이상훈. 2003. *Aspergillus coreanus* NR 15-1의 배양학적 특성 및  $\alpha$ -amylase의 효소학적 특성, 계명대학교 대학원 : 7~33.
26. Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K. and Sussaman, A. S. 1973. The Fungi. Academic press, New York, Vol. IV A.B.
27. Kenneth, B. R. and Fennell, D. I. 1973. The genus *Aspergillus*. Rober E. Krieger Publish Co, New York.
28. Park JW, Lee KH and Lee CY. 1995. Identification of filamentous



- molds isolated from korean traditional *Nuruk* and their amylolytic activities, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23(6) : 737~746.
29. The Brewing Society of Japan. 1993. The annotation of the official method of analysis of the national tax administration agency, pp. 218~226. 4th ed. Tokyo. (in Japanese)
  30. Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP and Yu TS. 1998. Enzymological characteristics and identification of useful fungi isolated from traditional korean *Nuruk*, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26(5) : 456~464.
  31. 성용찬. 1992. 생전분 분해성 *Rhizopus* sp. cy-7 koji를 이용한 전통 약주제조. 서울대학교 석사학위 논문.
  32. Cubero, O. F., Crespo, A., Fathi, J., Bridge, P. F. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized and other fungi, Plant Systematic Evolution 216 : 243~249.
  33. Armaleo, D., Clerc, P. 1995. A rapid and inexpensive method for the purification of DNA from lichens and their symbionts, Lichenologist 27 : 207~213.
  34. White, T.J., Bruns, S. Lee and T. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, S. Gelfand, J. Sninsky, and T. White(eds.), PCR protocols : A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego : 315~322.
  35. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72 : 248~254.
  36. 한국생화학회. 1997. 실험생화학, 탐구당 :73~92.
  37. 신귀례(1997) 효모에 따른 약주의 풍미에 관하여. 순천대 석사학위논문
  38. 국세청(1973) 국세청 기술연구소 주류분석규정, 국세청, 서울
  39. 허명희, 양경숙(2001) SPSS 다변량 자료분석, SPSS아카데미, 서울.
  40. Duncan, D. B.(1955) Multiple range and multiple F test. Biometrics, 11(1)

41. Park, H.J., Min, Y.K., Kim, K.Y. and Kang, S.W.(1998) Sterilization effects of hydrostatic pressure and low temperature treatments on the jujube wine. Food Engineering Progress. 2:163-170
42. Kang SH. 1992. Studies on the production and properties of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus sp.* KH-49, Master's Program in Microbial Engineering Graduate School of Kun-Kuk University : 1~42.
43. Simpson F. J. and E. McCoy. 1953. Appl. Microbiol, 1 : 228.
44. Jung MG, Huh WY, Jung JH and H. Taniguchi. 1990. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 18(3) : 251~259.
45. Park IS. and Chung Y. 1989, Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 17(5) : 519~523.
46. Shinsaku, H. and P.Q. Flor. 1981. Agric. Biol. Chem., 45 : 12
47. Fengxie Jin, Xianzhen Li, Chunzhi Zhang, Qiao Shu, Hua Wu, Ziqiang Liu, Xuezhong Zhang, Xiaoxia Wu and Yuhua Cheng. 1992. Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus sp.* JF Strain. J. Gen. Appl. Microbiol. 36. 415~424.
48. 養田泰治. 1953. 日本農藝化學會誌., 26 : 447.
49. Yoshiki, Y., Y.. Suzuki and J. Ozawa. 1977. Agric. Biol. Chem., 41 : 11.
50. 정동효. 1971. 건국학술지., 12 : 759.
51. Oh DH, Lee GP, Byun YL and Yoo JH. 1981. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 9(2) : 91~97.
52. Biotechnology Dictionary Compilation Cominittee. 1986. Biotechnology dictionary. Anastatic Printing Co. Tokyo.
53. Michelena, W., and F. J. Castillo. 1984. Production of amylase by *Aspergillus foetidus* on rice flour medium and characterization of the enzyme. J. Appl. Bacteriol., 56(3) : 395~407.
54. Song EJ. 1988. A study on the properties of  $\alpha$ -amylase produced from *Alternaria sp.* CU 87, Chung-Ju Univ. M. S. Thesis.
55. Abe. J. I., K. Nakajima, H. Nagano, S. Hizukuri, and K. Obata. 1988. Properties of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus sp.*

- K-27 : A synergistic action of glucoamylase and  $\alpha$ -amylase, Carbohydrate Research., 175 : 85~92.
56. Park DN. 1994. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus sp.* JP-1, Graduate School of Chosun University : 5~30.
57. Kim YS. 1983. Studies on the amylase produced by *Aspergillus sp.* Jung Ang Univ. Thesis.
58. Seu JH and Kim JK. 1967. Studies on acid stable  $\alpha$ -amylase producing by black *Aspergilli*, Kyungpook Univ. Theses Coll., 11 : 69~75.
59. De Mot, R., and H. Verachtert. 1985. Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the Yeast *Filobasidium capsuligenum*, Appl. Environ. Microbiol. 1474~1482.
60. Zenin, CT and Park, YK. 1983. Purification and characterization of acid stable  $\alpha$ -amylase from *Paecilomyces sp.* Ferm. Tech. 61 : 109~112.
61. Valle, E. L., E. A. Stein, W. N. Summerwell, and E. H. Fisher. 1959. Metal content of  $\alpha$ -amylase of various origins, J. Biol. Chem., 234 : 2901~2905.
62. Fisher, EH and EA Stein. 1960. In The Enzymes. 2nd edn (Boyer, P. D., Lardy, H., and Myrback, K., ed.), Academic Press. New York., vol. 4 : 313~343.
63. Kim TH. 1998. Purification and characteristics of glucoamylase from *Aspergillus oryzae* NR 3-6 isolated from traditional korean Nuruk, Graduate school of Keimyung University : 4~43.
64. 한영진. 2003. *Aspergillus coreanus* NR 15-1의 배양학적 특성 및  $\alpha$ -amylase의 효소학적 특성, 계명대학교 대학원 : 7~35.

## 제 2 절 밤의 성분분석 및 유용물질 탐색

### 1. 서론

밤나무속(*Castanea spp.*) 식물은 아시아, 유럽, 북아메리카, 북부아프리카 등지의 온대지역에 13종이 있으며, 그 중 재배하고 있는 것은 일본밤, 중국밤, 유럽밤, 미국밤 등이다. 우리나라는 옛 부터 밤나무를 많이 재배해 왔으나 1958년 밤나무 흑별이 발생하여 재래종은 거의 사라지고, 현재는 국내 종에 대한 내충성 개체 선발과 일본에서 내충성 품종이 도입되어 재배되고 있다. 밤은 옛 부터 관혼상제 등의 대사에 필수적으로 이용되었을 뿐만 아니라 영양가도 풍부하여 기호식품이나 대용식량으로 널리 이용되었다(1,2).

또한 식품산업의 발달에 따라 유통 및 저장 과정에서 발생하는 부패와 변질의 원인이 되는 미생물의 증식을 억제하기 위해 다양한 형태의 보존료를 첨가하고 있으나 최근 식품에 대한 건강 지향적인 욕구에 따라 화학적 합성 첨가물의 안전성이 문제시되어 합성 첨가물을 기피하는 현상이 강하게 일어나고 있다. 이러한 취지에서 인체에 무해하면서 변패를 억제하고 유통기한을 늘릴 수 있는 천연 보존료의 개발 필요성이 점차 강해지고 있는 실정이다(3,4). 식물 추출물이 항균활성을 갖고 있다는 것은 오래 전부터 알려져 왔고 그 대표적인 것이 향신료들이다(5). 최 등(6)은 국내산 식물들에서 이 등(7)은 정향 추출물에서 항균활성을 조사한 바 있고 이 등(8)은 올리브 잎 분획물의 항균활성을 보고하였다. 밤에 관한 연구로는 국내에서 밤에 함유된 peroxidase의 정제 및 특성에 관한연구(9), 밤 전분의 물리화학적 특성에 관한 연구(10), 임 등(11)과 양 등(12)의 밤의 저장에 관한 연구가 있으며, 조 등(13)은 밤나무 꽃과 잎의 화학성분 및 항균활성에 관하여 조사한 바 있다. 그리고 외국에서는 Attanasio 등(14)의 건조온도 조건에 따른 이화학적 성분변화에 관한 연구, Miguelez 등(15)의 HPLC를 이용한 스페인 지역의 밤의 종류별 당 성분 등이 조사 보고되었다.

밤나무는 밤나무 잎, 밤꽃, 껍질 등 모든 부위에 걸쳐 한의학적 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 밤은 한약재와 함께 넣어 보신용 식품재료로 사용하기도 한다. 그러나 현재 우리나라에서 생산 및 가공 수출되는 밤의 형태는 깎밤, 통조림, 냉동

밤, 생울의 순으로 밤의 고부가가치성 상품 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다  
따라서 본 실험에서는 이러한 밤의 이용가치를 높일 수 있는 가공식품 개발과 천연 보존료 개발을 위한 기초 자료로 제시하고자 밤나무 잎과 밤나무 수피 그리고 밤의 부위별 화학성분을 분석하고, 천연 보존료 개발의 일환으로 밤의 외피, 내피, 과육, 밤나무 잎과 수피의 추출물과 분획물을 몇 종의 병원균과 식중독균, 식품과 관련이 있는 10개 균주에 대한 항균활성 검색과 항균성이 강한 에탄올 추출물의 최소저해농도, 추출물에 함유된 항균활성 물질의 열과 pH 안정성을 조사하여 밤의 항균활성 물질에 대해 식품 보존료의 이용 가능성 검정하고 항산화성에 대한 기초 자료를 제공하여 밤의 기능성에 대한 홍보와 소비촉진을 하기위하여 본 실험을 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 재료

본 실험에 사용한 밤은 2003년 10월, 2004년 10월 및 2005년 10월에 전남 광양시 봉강면에서 수확한 중량 20 g내외의 생과를 구입하였고(4℃에서 보관), -40℃에 보관하면서 사용하였다. 알밤(A), 밤 외피(B), 밤 내피(C), 깎밤(D), 밤나무 잎(E) 및 밤나무 수피(F)(2004년 5월)로 총 6종의 시료로 구분하여 냉동보관하면서 사용하였고 실험에 사용한 분석시약은 특급시약을 사용하였다.

### 나. 분석 방법

#### 1) 밤의 성분함량 분석

##### 가) 일반성분 및 중량분석

시료를 6가지로 각각 구분하여 수분은 105℃ 직접건조법, 회분은 550℃ 직접 회화법으로, 조단백은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법으로, 조섬유의 함량은 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-NaOH 분해법으로 구하였다(16). 그리고 가용성 무질소물의 함량은 총량에서 수분, 조회분, 조단백질, 조지방, 조섬유의 함량을 뺀 값으로 계산하여 구하였다. 중량분석은 밤 시료 20개씩을 선택하여 외피, 내피, 깎밤으로 분리한 뒤 각각의 중량을 측정하여 중량비를 분석하였다.

나) 전분함량(가용성무질소물)분석

전분정량은 밤 10 g을 500 mL 환저플라스크에 넣고 물 200 mL와 25% HCl 20 mL를 가하고 환류냉각하면서 증탕에서 2시간 가열 후 냉각하여 10% NaOH로 중화하여 여과하고 유리당의 함량을 구하였다. 유리당 성분은 Wilson 등(17)의 방법에 따라 분석하였다. 즉, 각각의 시료 10 g에 증류수를 가하고 마쇄하여 교반, 침출시킨 후 100 mL로 정용한 다음 원심분리(6,000 rpm, 30 min)하였다. 원심분리한 상등액을 취하여 여과(Whatman No.2)하고 Sepak C<sub>18</sub>으로 정제시킨 다음 0.45 µm membrane filter(Millipore Co., USA)로 여과한 여액으로 HPLC를 이용하여 분석하였으며, 함량은 적분계에 의한 외부표준법으로 계산하였고, HPLC조건은 Table B-1과 같다.

Table B-1. HPLC analysis condition for free sugar

Items	Conditions
Instrument	Waters associates M 244
Detector	M410 RI detector
Column	Sugar-pak column (Waters Co., 300 mm L × 0.8 mm I.D)
Solvent	H <sub>2</sub> O
Column temp.	90°C
Flow rate	0.5 mL/min
Injection volume	30 µL

#### 다) 무기성분 분석

무기성분은 습식분해법으로 전처리하여 분석하였다. 즉, 밤의 겉껍질, 속껍질, 박피 밤 및 밤(전체)으로 구분하여 시료 0.5 g에 진한 질산 10 mL를 가하여 처음에는 낮은 온도로 가열하고 점차 고온으로 가열하면서 분해(Büchi Distillation Unit B-324)시켜 분해액이 백색 투명하게 되면 냉각시키고 분해액에 증류수를 가하여 100 mL로 정용한 다음 여액을 분석시료로 하였다. 각 무기성분의 정량은 원자흡광비색계(Perkin Elmer Analyst 300)로 분석하였다.

#### 라) 아미노산 분석

##### (1)구성아미노산

시료 1 g을 시험관에 넣고 6N HCl 용액 15 mL를 가한 후 110°C에서 24시간 가수분해시켜서 얻은 여액을 원심분리하고, 상등액을 50°C에서 농축하여 염산과 물을 완전히 증발시킨 후, 구연산나트륨 완충용액(pH 2.2)을 사용하여 5 mL로 정용한 다음 0.22 µm membrane filter로 여과한 여액을 취하여 분석시료로 사용하였다. 아미노산 분석기기의 조건은 Table B-2와 같다.

Table B-2. HPLC analysis condition for amino acid

Items	Conditions
Instrument	LKB 4150, alpha autoanalyzer Ultrapac 11 cation exchange resin
Buffer solution	pH3.2~pH4.25~pH10.0, sodium citrate
Flow rate	Buffer 35 mL/hr, ninhydrin 25 mL/hr
Column temp.	50~80°C
Chart speed	2 cm/min
Injection volume	40 µL

## (2)유리아미노산

유리아미노산의 분석은 시료는 유리당 정량과 같은 방법으로 얻은 여액을 Ohara와 Ariyosh(18)의 방법으로 분석하였다. 즉 여액 10 mL에 sulfosalicylic acid 25 mg을 첨가하여 4°C에서 4시간 동안 방치시킨 후 원심분리(50000 rpm, 30분)하여 단백질을 제거하고, 상등액을 0.22 µm membrane filter로 여과하여 얻은 여액을 취하여 분석시료로 사용하였다. 분석조건은 구성아미노산과 동일한 조건으로 분석하였다.

### 마) 유기산 분석

유기산의 정량은 시료액을 착즙, 원심분리한 후, 0.45 µm membrane filter를 통과시켜 HPLC로 정량하였으며, 분석조건은 Table B-3과 같다.

Table B-3. HPLC analysis condition for organic acid

Items	Conditions
Instrument	Waters associate M244
Detector	UV 210nm
Column	Privail Organic Acid, 5µm(Alltech Associates)
Mobile phase	25mM Phosphate buffer(pH 2.5)
Flow rate	1.0 mL/min
Chart speed	0.5 cm/min
Injection volume	30 µL

### 바) Total polyphenol 및 Catechin 분석

Total polyphenol 정량은 Folin-Denis 법으로 비색정량 하였다. 밤의 겉껍질, 속껍질, 박피 밤, 밤(전체), 밤나무 수피 및 밤나무 싹을 각각 20 g을 증류수를 넣고 homogenizer로 마쇄하여 추출하고 이를 100 mL로 정용한 다음 분석시료로 사용하였으며 분석은 100 mL 메스 플라스크에 시료를 1 mL 넣고 여기에 Folin 시약 5 mL를 가하고 3분간 방치한 다음 10%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 mL를 가하여 증류수를 눈



금까지 채우고 실온에 1시간 방치한다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준품은 D-catechin을 사용하여 표준곡선을 그리고 외부표준법으로 계산하였다.

Catechin 분석은 밤의 겉껍질, 속껍질, 박피 밤, 밤(전체), 밤나무 수피 및 밤나무 싹에 대한 각각의 분석은 시료 0.5 g에 물을 가해 마쇄 추출한 다음 80°C 항온 수조에서 추출후 여액을 여과하여 정용한 다음 원심분리(6,000 rpm, 30 min)시켜 상등액을 취하여 여과하고 Sepak C<sub>18</sub> 카트리지로 정제시킨 다음 0.45 µm membrane filter(Millipore Co. U.S.A.)로 여과한 여액을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 Table B-4 와 같으며, 함량은 외부표준법으로 계산하였다.

Table B-4. HPLC analysis condition for catechin

Items	Conditions
Instrument	Waters associates M 244
Detector	UV 280nm
Column	µ-Bondapack C18
Solvent	0.2M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : Acetonitril : THF =86 : 12 : 2
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	30 µL

## 2) 밤의 부위별 항균성 활성물질 분석

### 가) 사용균주 및 시약

시험에 사용한 균주는 그람 양성균 3종, 그람 음성균 3종, 젖산균 2종 및 효모 2종으로 총 10종을 선정하여 사용하였다. 균 생육배지로 세균은 Nutrient broth와 agar(Difco), 젖산균은 Lactobacillus MRS broth와 agar(Difco), 효모는 YM broth와 agar(Difco)를 각각 사용하였다.

### 나) 밤의 용매별 추출물

밤의 밤, 외피, 내피, 과육, 밤나무 잎과 수피의 물 가용성 성분의 추출 방법은

시료 100 g에 증류수 300 mL를 첨가하여 마쇄한 다음 상온에서 24시간 동안 교반, 침출시켜 1차 추출하고, 다시 증류수 300 mL를 가하여 동일한 방법으로 2차 추출한 후, 추출액 모두를 여과하였다. 이 여액을 회전감압농축기로 50°C 수욕상에서 농축하여 얻은 점조성의 추출물을 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 에탄올, 에칠아세테이트, 헥산, 디에틸에테르의 가용성 성분은 물 추출물과 같은 방법으로 추출하여 농축한 후 증류수 200 mL를 가하여 잘 혼합하고 냉장실(4°C)에서 24시간 방치한 다음, 6000 rpm 으로 원심분리하여 침전된 수지성분을 제거하였다. 또 다시 수용액을 회전감압농축기로 감압 농축하여 에탄올, 에칠아세테이트, 헥산 및 에테르 추출물 100 mL를 얻어 냉장실에 보관하면서 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 다) 에탄올 추출물의 용매분획

밤 내피, 밤나무 잎과 수피의 100 g을 상기 방법에 따라 에탄올 추출물 32.4 g을 얻었다. 이 에탄올 추출물을 분획여두에서 hexane:methanol:water=10:1:9(v/v) 1 L를 가하여 헥산층을 분리하였고, 이를 2회 반복하여 분획한 헥산층을 모두 여과, 농축하여 헥산 추출 분획물 3.6 g을 얻었다. 같은 방법으로 남은 수용액 층에 디에틸에테르, 에칠아세테이트 각 용매별로 순차적으로 추출한 후 감압 농축하여 디에틸에테르 분획물을 2.8 g, 에틸아세테이트 분획물 8.4 g을 얻고, 물분획물 10.8 g을 얻은 다음 냉장실(4°C)에 보관하면서 분획물을 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 라) 항균력 측정

밤의 밤, 외피, 내피, 과육, 밤나무 잎과 수피의 추출물의 항균활성 검색에 사용한 균주는 slant에 배양된 각각의 균주 1백금이를 취해 10 mL broth의 균 생육배지에 접종하고 각각 균주의 생육적온에서 10~18시간씩 3회 계대배양하여 사용하였다. 실험방법은 이등(15-20)의 방법에 준하였다.

#### 마) 밤나무 잎과 수피의 최소저해 농도 측정

밤나무 잎과 수피의 에탄올 추출물의 최소저해 농도측정은 액체배지 희석법(broth dilution method)을 이용하여 측정하였다. 즉, 에탄올 추출물의 고형분 함

량이 각각 0.1, 0.25, 0.5 1.0, 2.0 mg/mL의 농도가 되도록 조절한 액체배지를 준비하여 균 현탁액을 각각 0.1 mL 씩 접종하고 30°C에서 24시간 배양후 흡광도 (660nm)에서 측정하여 균 증식이 나타나지 않는 농도로 결정하였다.

#### 바) 항균성 물질의 열 및 pH 안정성 측정

밤나무 잎과 수피의 에탄올 추출물 열 안정성을 측정하기 위해 밤나무 잎과 수피의 에탄올 추출물을 50~100°C까지 10°C 간격으로 각각 1시간 동안, 121°C에서 15분 동안 열처리한 후 대조구와 같이 한천배지 확산법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다. 또한 pH 안정성은 밤나무 잎과 수피의 에탄올 추출물을 pH 3~9 까지 조절하고 상온에서 1시간 방치한 후 각 균주의 최적 pH로 중화시켜서 열 안정성과 동일한 방법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다.

#### 사) 항균활성 물질의 분리 및 확인

항균활성이 확인된 밤 에탄올 추출물을 활성화 시킨 C18 sep-pak에 통과 시켜 1차 정제한 후에 시료로 이용하였으며, 분취용 컬럼은  $\mu$ -Bondapak C18 column(Waters Co., 30cm L  $\times$  3cm ID)을 이용하였고, 이동상은 Me-OH:Water: Foric acid(40:60:0.1 v/v)을 분당 20ml, 시료량은 1ml을 주입하였으며 UV detector를 이용하여 280 nm에서 검출되는 peak를 분취하여 각각의 paek의 항균성을 측정하였다. 항균성이 확인된 paek을 물질 확인을 위하여 NMR로 구조를 확인하였다.

#### 아) NMR 기종 및 분석조건

사용기기는 Avance 400 FT NMR spectrometer (Bruker Co., Germany)를 사용하여 측정하였으며, 분석조건은 시료는 약 20 mg을 DMSO-D<sub>6</sub> (0.7mL) solvent에 용해시킨 후 5mm dual probe를 사용하여 25°C에서 spectral width 488.8 Hz, delay time 1.0 sec, acquisition time 6.711 sec. 그리고 scan 수는 <sup>1</sup>H-NMR은 32회, <sup>13</sup>C-NMR은 13,000회로 각각 하여 data를 얻었다. DMSO-D<sub>6</sub>의 2.49 ppm을 기준으로 하였고, integration 값은 0.7 mL의 DMSO-D<sub>6</sub>를 사용하여 측정하였을 때 9.124 ppm 부근에서 관측된 OH의 signal을 1로 하였다.

### 3) 밤의 항산화력 분석

밤의 5 부위(B, C, D, E, F)를 에탄올 추출물을 Fig. 1과 같이 separating funnel에 의한 용매별 분획으로 n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 물로 연속 추출 한 후 각 분획물을 농축하여 항산화활성 측정용 시료로 하였다. 용매 분획 중 예비실험 결과 물 추출물이 항산화 활성이 강하여 본 실험에서는 물 분획물을 시료로 사용하였다.

#### 가) Hemoglobin-induced linoleic acid system에서의 항산화 활성

Kuo등의 방법을 변형하여 측정하였다. 각각의 용매분획 시료 1ml에 반응액 200 $\mu$ l(1mM inoleic acid emulsion, 40mM phosphate buffer, pH 6.5, 0.0016% hemoglobin함유)를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 45분간 반응 후 2.5ml의 0.6% HCl을 가하여 지방의 산화를 정지하였다. 0.2M FeCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ l와 30% ammonium thiocyanate 50 $\mu$ l를 가한 후 480nm에서 흡광도를 측정하여 반응액에 생성된 과산화물의 양을 측정하였다.

#### 나) Reducing power

각각의 용매분획 시료 100 $\mu$ l를 0.2M phosphate buffer(pH 6.5) 200 $\mu$ l, 1% potassium ferricyanide 200 $\mu$ l와 혼합 후 50 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 250 $\mu$ l를 혼합액에 가한 다음 10분간 원심분리(3000 Xg)하여 얻은 상정액에 500 $\mu$ l의 이차증류수와 0.1% ferric chloride 100 $\mu$ l를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다. 반응물의 흡광도를 700nm에서 측정하였다.

#### 다) 전자공여능

전자공여능은 DPPH의 환원력을 이용한 Bios의 방법에 따라 측정하였다. 각각의 용매분획 시료 1ml에 DPPH용액 (DPPH 12.5mg을 에탄올에 용해)0.8ml를 가한 후 20분간 반응시키고 525nm에서 흡광도를 측정하여 시료 무첨가 대조구와 활성을 비교하였다.

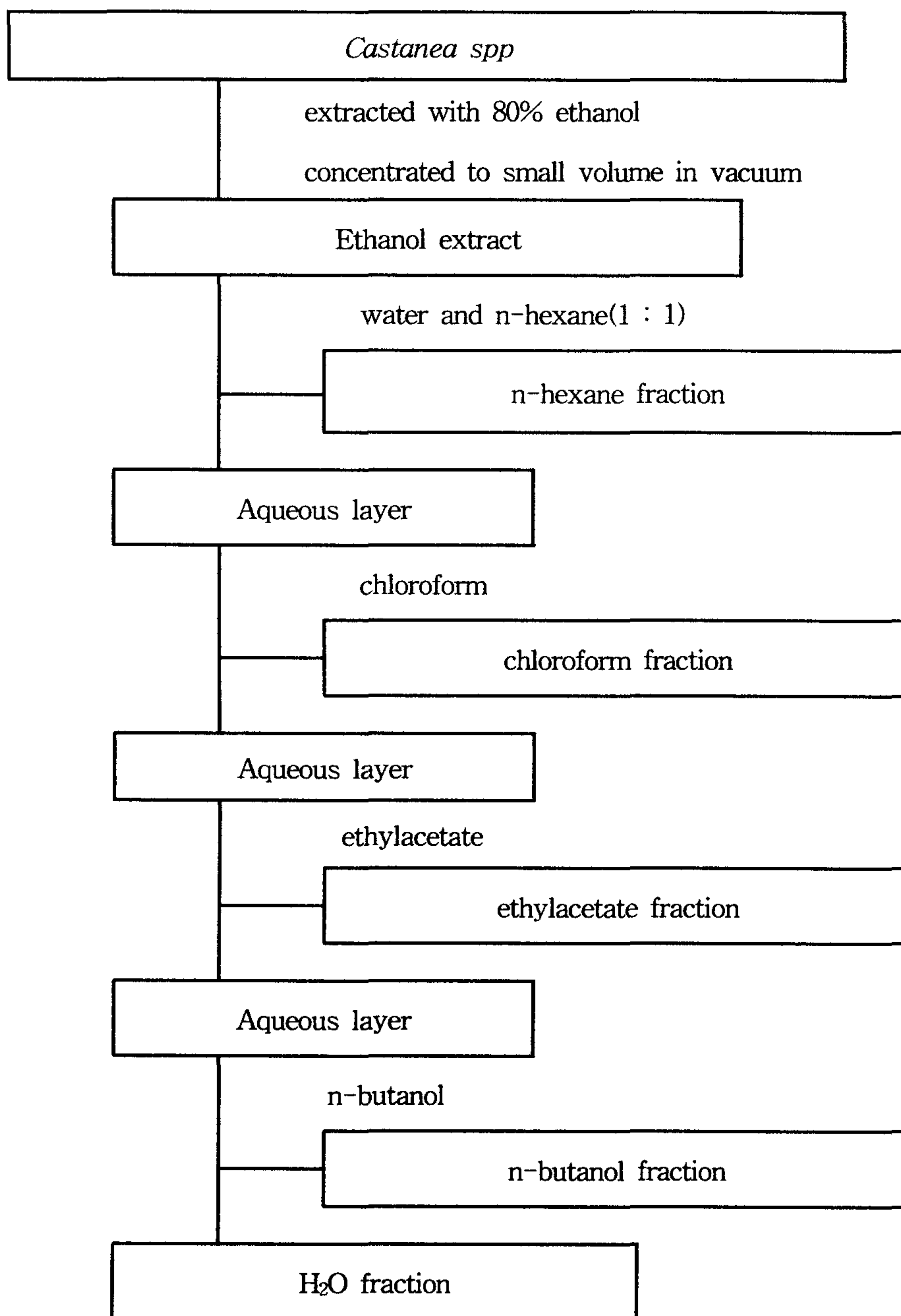


Fig. 1. Procedure for extraction and fractionation of *Castanea spp.* by various solvents.

#### 라) Superoxide anion radical 소거활성

Superoxide anion radical 소거활성은 xanthine/xanthine oxidase를 이용한 Superoxide를 이용한 superoxide dismutase 활성 측정법을 이용하였다. Phosphate buffer(pH 7.5), EDTA, cytochrome c, xanthine 이 혼합된 반응액 중에 각각의 용매분획 시료 1ml를 혼합한 후 xanthine oxidase 희석액 20 $\mu$ l를 가하여 반응을 개시하였다. 반응개시후 60초간 흡광도 변화를 550nm에서 측정하였다. 시료의 첨가량을 다르게 하여 5-10회 측정하고 각각에 대하여 550nm에서 cytochrome c 의 환원이 억제되는 비율로 검량선을 작성하였다. 반응액의 총 부피는 1 mL 가 되게 하였고 반응액중 함유물의 최종농도는 각각 0.87mM phosphate buffer, 0.00174 mM EDTA, 0.00174mM cytochrome c, 0.0348 mM xanthine 이 되게 하였다. 한편 xanthine oxidase는 550nm에서의 분당 흡광도 변화가 약 0.02가량 되도록 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 희석하여 첨가하였다. 활성은 cytochrome c 환원을 50% 억제하는 양을 1 unit 로 계산하였고 그때의 시료량을 IC<sub>50</sub>으로 나타내었다.

#### 마) 항산화력 활성 물질의 분리 정제

항산화력이 확인된 밤 수피의 물 분획을 순수분리 조건은 Table B-5에서 보는 바와 같이 분취용으로 컬럼  $\mu$ -Bondapak C18 column을 이용하여 Me-OH:Water을 이동상으로, ELSD detector에 분배기(9:1)를 부착하여 peak 검출과 분취를 동시에 실시하여 농축한 후 Hemoglobin-induced linoleic acid system으로 항산화 활성을 측정하였다.

Table B-5. The operating condition of pre HPLC for Antioxidation activity

Item	Condition
Instrument	Waters associates 600E(U.S.A)
Detector	ELSD(Evaporative Light Scattering Detector)
Column	$\mu$ -Bondapak C18 (Waters Co., 30cm L $\times$ 3cm ID)
Solvent	30%methanol/5min. $\rightarrow$ 80%methanol/30min.
Flow rate	20 mL/min
Injection volume	1ml

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 밤의 성분함량

##### 1) 밤의 부위별 일반성분 함량

밤의 각 부위별 일반성분 분석 결과 및 중량비는 Table B-6와 같다. 밤의 수분 함량은 밤의 외피, 내피, 껌밤, 밤, 밤나무 수피 및 밤나무 잎 중 밤나무 잎이 63.60%로 가장 높았고, 회분 함량은 밤의 각각의 부위가 비슷하게 나타났으나 내피가 1.95%로 가장 많은 함량을 보였다. 조단백질 함량은 각각의 부위 중 껌밤에서 3.02%로 가장 많은 함량을 보였고 조지방 함량은 외피에서 0.68%로 가장 많은 함량을 보였으며 조회분 함량은 밤나무 내피에서 1.60%로 가장 많은 함량을 보였다. 밤의 각 부위별 중량비는 외피 17.05%, 내피 14.9%, 껌밤 68.05%로 나타났다.

**Table B-6. Proximate composition and weight ratio in individual parts of chestnut (%)**

Component Sample <sup>1)</sup>	Moisture	Ash	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Nitrogen free extract	weight ratio
A <sup>1)</sup>	61.73	1.41	2.47	0.68	0.43	33.27	100
B <sup>2)</sup>	50.37	1.94	1.16	0.08	1.60	44.84	17.05
C <sup>3)</sup>	60.90	1.86	1.48	0.13	1.42	34.20	14.9
D <sup>4)</sup>	63.60	1.18	3.02	0.61	1.21	30.37	68.05
E <sup>5)</sup>	81.25	2.10	2.06	0.19	1.31	13.09	-
F <sup>6)</sup>	77.21	2.88	1.87	0.11	1.69	16.24	-

<sup>1)</sup>A : whole chestnut, <sup>2)</sup>B : tegmen of chestnut, <sup>3)</sup>C : seed coat of chestnut, <sup>4)</sup>D : fresh of chestnut, <sup>5)</sup>E : chestnut leaf, <sup>6)</sup>F : chestnut bark.

##### 2) 무기성분 함량

각각의 밤 시료 및 밤나무 수피, 밤나무 잎에 함유된 무기성분의 분석 결과는 Table B-7과 같다. 밤 전체를 기준으로 K>Mg>Ca>Na>Fe>Zn>Cu 순으로 검출되었으며, 시료구별로 K의 함량을 살펴보면 밤 793.3 mg%, 외피 195.9 mg%, 내피



763.9 mg%, 깎밤 948.3 mg%, 밤나무 잎 150.41 mg% 그리고 밤나무 수피에서 200.44 mg%로 나타났다. 이는 조 등(13)이 보고한 내용과 비교해 볼 때 함량에는 다소 차이가 있었으나 원소별 함량의 비중은 유사한 결과를 보였다. 또한 철분의 경우 밤과 외피에서만 검출되었는데, 이러한 결과로 볼 때 철분은 외피에만 함유되어 있는 것으로 추정된다. 반면 구리는 외피에서만 검출되지 않았다.

**Table B-7. Content of minerals in individual parts of chestnut**

Sample <sup>1)</sup>	(mg%)						
	K	Mg	Na	Ca	Fe	Zn	Cu
A	793.3	32.31	2.26	28.36	0.54	0.42	0.26
B	195.9	53.56	4.81	91.89	3.15	0.59	0
C	763.9	36.7	0	22.69	0	0.47	0.10
D	948.3	26.05	2.13	13.7	0	0.40	0.38
E	150.41	54.65	0	15.68	0	0.21	0.11
F	200.44	10.23	1.25	10.41	0	0.07	0.24

<sup>1)</sup>See the legends in Table B-6.

### 3) 유리당 함량

밤의 부위별 유리당의 함량은 Table B-8에서 보는 바와 같다. 깎밤에서는 이 당류인 sucrose와 maltose가 2.95 g/100 g, 1.64 g/100 g로 주종이었으며 Fructose과 glucose는 소량 함유되어 있었다. 외피와 내피에는 당 종류에 관계없이 소량 함유되어 있었고, 잎과 수피에서는 검출되지 않았다.

Table B-8. Content of free sugars in individual parts of chestnut

Sample <sup>1)</sup>	(g/100 g)			
	Fructose	glucose	sucrose	maltose
A	0.57	0.58	2.14	1.26
B	0.036	0.023	0.041	0.034
C	0.21	0.37	0.95	0.80
D	0.80	0.77	2.95	1.64
E	-	-	-	-
F	-	-	-	-

<sup>1)</sup>See the legends in Table B-6.

#### 4) 밤 아미노산 함량

##### 가) 구성 아미노산 함량

밤의 부위별 구성아미노산 분석결과는 Table B-9와 같다. 각 부위별 구성아미노산은 aspartic acid외 16종으로 검출되었으며, 각각의 총 구성아미노산은 밤 2,447 mg%, 외피 1,034 mg%, 내피 1,450 mg%, 껌밤 2,994 mg%로 나타났다. 각 부위별 구성아미노산의 함량을 살펴보면 외피에서는 proline 118.25 mg%, glutamic acid 107.67 mg% 순이었고, 내피와 껌밤에서는 glutamic acid, aspartic acid순으로 나타났으며, 그 함량을 살펴보면 glutamic acid가 각각 174.91 mg%, 423.33 mg%, aspartic acid가 117.16 mg%, 274.52 mg% 였다. 또한 밤 나뭇잎에서는 aspartic acid가 243.08 mg%, glutamic acid가 229.72 mg%순으로 나타났으며, 수피에서는 serine이 170.46 mg%, alanine이 130.66 mg% 순으로 나타났다. 이러한 결과로 볼때 각 부위별 구성 아미노산의 비율은 다소 차이가 있었으나 전체적인 주된 구성아미노산은 aspartic acid와 glutamic acid임을 알 수 있었다. 이는 조 등(13)이 보고한 내용과 유사한 결과를 보였다. 또한 가식부인 껌밤을 기준으로 총 아미노산 중 필수아미노산이 차지하고 있는 비율을 살펴본 결과 37.8%를 차지하였고, 밤나무 잎의 경우 32.6%, 수피는 25.4%로 나타났다.

#### 나) 유리 아미노산 함량

밤의 유리아미노산 분석의 함량은 Table B-10과 같다. 부위에 따른 아미노산 총량은 밤 691.75 mg%, 외피 211.4 mg%, 내피 325.8 mg% 및 깎밤 493.4 mg% 로 나타났다. 그 중 각 부위별 필수 아미노산의 비율을 살펴보면 외피 33.3%, 내피 17.9%, 깎밤 19.82%로 나타났으며 밤나무 잎의 경우 31.46%, 수피는 27.07%로 나타났다. 필수 아미노산이 차지하는 비율에 있어 구성 아미노산과 비교해 볼 때 밤나무 잎과 수피의 경우는 큰 차이가 없었으나 깎밤의 경우는 다소 차이를 보였다. 유리 아미노산에서의 부위별 주요 성분함량을 살펴보면 외피, 내피, 깎밤 모두 glutamic acid, aspartic acid 순으로 함량이 높게 나타났으며, 그 함량을 살펴보면 glutamic acid의 경우 각각 43.0 mg%, 111.0 mg%, 250.8 mg% 였고, aspartic acid에서는 24.2 mg%, 58.2 mg%, 71.2 mg% 로 나타났다. 또한 밤나무 잎과 수피의 경우 밤나무 잎은 threonine이 50.64 mg%로 가장 높은 함량을 차지했고, 수피에서는 다른 부위와 같이 glutamic acid가 40.48 mg%로 가장 높게 나타났다. 가장 큰 비중을 차지하고 있는 주요 유리 아미노산 역시 glutamic acid 와 aspartic acid로 구성아미노산의 비율과 유사하였다.

**Table B-9. Content of total amino acids in individual parts of chestnut**  
(mg%)

Amino acids	Sample <sup>1)</sup>					
	A	B	C	D	E	F
Aspartic Acid	247.86	96.39	117.16	274.52	243.08	107.34
Threonine	136.72	69.58	83.92	161.46	116.72	51.86
Serine	152.54	59.89	85.68	242.02	142.54	170.46
Glutamic acid	369.72	107.67	174.91	423.33	229.72	106.68
Proline	100.4	118.25	84.04	157.64	24.4	79.12
Glycine	142.2	61.59	43.74	107.13	42.2	52.46
Alanine	120.8	43.06	71.64	156.42	90.4	130.66
Cystine	146.34	72.32	72.88	184.66	46.3	90.9
Valine	12.44	6.05	102.59	23.75	6.44	13.08
Methionine	127.64	2.61	84.09	13.11	47.26	20.5
Isoleucine	201.64	43.43	70.65	166.49	21.64	49.08
Leucine	106.4	81.39	110.44	245.61	24.4	61.76
Tyrosine	140.16	56.01	81.93	197.54	64.16	50.24
Phenylalanine	18.06	6.98	0.16	5.35	10.06	90.42
Histidine	180.32	88.97	114.81	237.95	42.32	20.44
Lysine	244.41	73.49	98.28	284.62	184.42	90.46
Arginine	172.16	47.02	53.84	112.49	20.16	21.32
TAA <sup>2)</sup>	2,447.65	987.68	1,396.92	2,881.6	1,336.06	1,206.78
EAA <sup>3)</sup>	1,009.57	365.52	664.78	1,132.99	443.2	307.18
EAA/TAA(%)	38.53	35.33	45.82	37.84	32.67	25.45

<sup>1)</sup>See the legends in Table B-6.

<sup>2)</sup>TAA : total amino acid,

<sup>3)</sup>EAA : total essential amino acid (Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+His+Lys).

Each value is the average of three determinations.

**Table B-10. Content of free amino acids in individual parts of chestnut**  
(mg%)

Amino acids	Sample <sup>1)</sup>					
	A	B	C	D	E	F
Aspartic Acid	76.0	24.2	58.2	71.2	40.2	30.42
Threonine	31.5	21.2	19.8	41.2	50.64	31.32
Serine	47.0	22.6	25.0	39.0	22.42	21.3
Glutamic acid	293.75	43.0	111.0	250.8	50.42	40.48
Proline	57.75	14.6	35.4	50.0	11.28	11.36
Glycine	11.25	2.4	7.8	6.8	5.3	2.48
Alanine	47.25	2.6	18.6	26.8	20.48	20.48
Cystine	tr <sup>2)</sup>	tr	tr	tr	tr	tr
Valine	6.25	2.6	3.0	3.2	2.5	3.2
Methionine	11.5	11.2	6.8	7.2	4.64	4.6
Isoleucine	9.0	5.0	7.0	7.0	4.42	9.0
Leucine	13.75	7.2	5.4	8.2	2.42	2.4
Tyrosine	17.75	5.4	4.2	5.0	4.5	7.2
Phenylalanine	29.5	13.2	8.4	17.6	2.48	5.0
Histidine	25.75	7.2	12.6	12.8	10.8	5.0
Lysine	8.75	7.8	2.6	7.6	9.02	9.2
Arginine	58.0	21.2	31.8	39.0	20.7	21.0
TAA <sup>3)</sup>	691.75	211.4	323.2	493.4	262.22	224.44
EAA <sup>4)</sup>	127.0	70.4	58.6	97.8	82.5	60.72
EAA/TAA(%)	18.35	33.30	17.98	19.82	31.46	27.05

<sup>1)</sup>See the legends in Table B-6.

<sup>2)</sup>tr : trace, <sup>3)</sup>TAA : total amino acid, <sup>4)</sup>EAA : total essential amino acid (Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+His+Lys).  
Each value is the average of three determinations.

#### 5) Total polyphenol 및 Catechin함량

부위별 total polyphenol 함량은 Table B-11에서 보는 바와 같다. 즉, 밤나무 잎 15.55 mg%, 수피 17.85 mg%, 내피 9.56 mg% 로 나타났으며, 껌밤과 외피

에 있어서는 각각 0.047 mg%, 0.23 mg%로 미량 검출되었다. 이러한 결과로 볼 때 total polyphenol 은 과실보다는 밤나무 잎이나 수피에 더 많은 양이 함유 되었음을 알 수 있었다. catechin 분석결과 밤 부위중 polyphenol 함량이 많은 내피 의 catechin을 정량한 결과 epicatechin이 0.15 mg%로 나타났으며, 그 외 catechin류는 검출되지 않았다. 내피에 함유된 있는 catechin의 HPLC chromatogram은 Fig. B-2.와 같다.

**Table B-11. Content of total polyphenol in individual parts of chestnut**  
(mg%)

Sample <sup>1)</sup>	A	B	C	D	E	F
Total polyphenol	- <sup>2)</sup>	9.56	0.047	0.23	15.44	17.85
(-)-Epigallocatechin	-	-	-	-	-	-
(-) Catechin	-	-	-	-	-	-
(-)-Epicatechin	-	-	0.15	-	-	-
(-)-Epigallocatechin gallate	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup>See the legends in Table B-6.

<sup>2)</sup> Trace

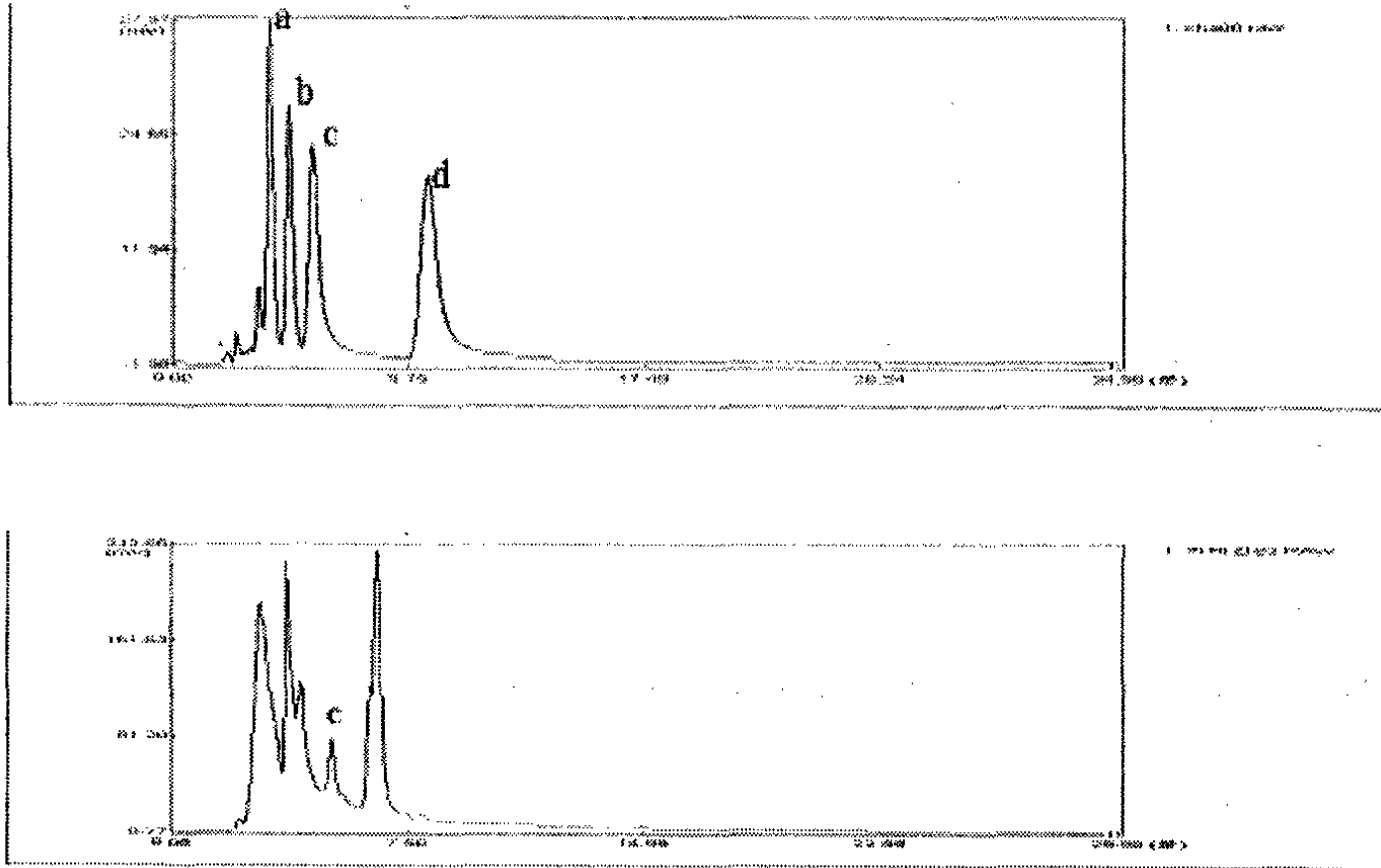


Fig. B-2. The HPLC chromatogram of catechin STD and seed coat of chestnut.

a : (-)-Epigallocatechin, b : (-) Catechin,  
 c : (-)-Epicatechin, d : (-)-Epigallocatechin gallate.

#### 나. 밤의 부위별 항균활성

##### 1) 밤의 각 부위별 항균활성 검색

추출 용매에 따른 항균활성 물질의 추출능을 확인하기 위하여 밤의 밤, 외피, 내피, 과육, 밤나무 잎과 수피로 부터 에탄올, 물, 헥산, 에칠아세테이트, 에테르 추출물의 항균활성 검색 결과는 Table B-12과 Fig. B-3에서 보는 바와 같다. 각 부위별 추출물에서 밤 외피와 밤 과육은 항균활성을 보이지 않았으며 밤 내피에서는 약한 항균활성을 보였고 밤나무 잎과 수피에서는 비교적 강한 항균활성을 나타내었다. 밤 내피와 밤나무 잎과 수피의 추출물의 항균활성 검색은 에탄올 추출물이 대표적인 gram 양성균인 *B. Subtilis* 에서 각각 9, 16, 17 mm이고 다른 gram 양성균도 비슷하게 나타났다. 대표적 gram 음성균인 *E. coli*에서는 clear zone이 9, 12, 13 mm로 항균활성이 나타났고 다른 gram 음성균도 비슷하게 나타났다. 전체적으로 gram 음성균보다 gram 양성균이 밤 내피, 밤나무 잎과 수피의 에탄올 추출물에 대해 항균활성이 강하게 나타났다. 물 추출물에서는 에탄올 추출물과 같은

양상을 보였으나 에탄올 추출물보다는 약한 항균활성을 보였다. 에칠아세테이트 추출물에서는 밤 내피는 항균활성을 보이지 않았으며 밤나무 잎과 수피에서는 약한 항균활성을 보였다. 헥산과 디에틸에테르 에서는 항균활성이 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 식품 부패 미생물을 억제하는 천연 항균성 물질의 검색, 홍 등(20)의 유백피의 연구, 박 등(21)의 한약재 추출물의 항균효과 검색에서 그람 음성균 보다 그람 양성균에서 항균활성이 더 크게 나타난다는 결과와도 비슷하게 나타났다. 밤나무 잎과 수피에서 추출된 주요한 항균 활성 물질의 추출에는 에탄올이 가장 적절한 용매로 생각되며, 앞으로 모든 식품에 강화되고 있는 각종 세균에 대한 규제에 대비하여 밤나무 잎이나 수피를 이러한 가공 식품의 천연 항균제의 대용으로 사용할 수 있을 것으로 추정되어진다.

Table B-12. Antimicrobial activity of Chestnut extracts by different solvents

Strains	Clear zone on plate (mm) <sup>7)</sup>																							
	(8.0 mg/disc)																							
	Ethanol extracts					Water extracts					Ethyl acetate extracts					Diethyl ether extracts								
	A <sup>1)</sup>	B <sup>2)</sup>	C <sup>3)</sup>	D <sup>4)</sup>	E <sup>5)</sup>	F <sup>5)</sup>	A <sup>1)</sup>	B <sup>2)</sup>	C <sup>3)</sup>	D <sup>4)</sup>	E <sup>5)</sup>	F <sup>5)</sup>	A <sup>1)</sup>	B <sup>2)</sup>	C <sup>3)</sup>	D <sup>4)</sup>	E <sup>5)</sup>	F <sup>5)</sup>	A <sup>1)</sup>	B <sup>2)</sup>	C <sup>3)</sup>	D <sup>4)</sup>	E <sup>5)</sup>	F <sup>5)</sup>
<i>B. cereus</i>	10	-	-	17	17		-	-	-	13	12		-	-	-	8.3	8.5	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	9	-	-	16	17		9	-	-	13	13		-	-	-	-	8.2	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	10	-	-	17	15		9	-	-	12	12		-	-	-	9	8.5	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	9	-	-	12	13		9	-	-	11	11		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	9	-	-	13	13		-	-	-	11	11		-	-	-	8.2	8.6	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	12	13		-	-	-	12	11		-	-	-	-	8.2	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. mesenteroides</i>	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. anomala</i>	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup>See the legends in Table B-6.

<sup>7)</sup>In diameter (mm)



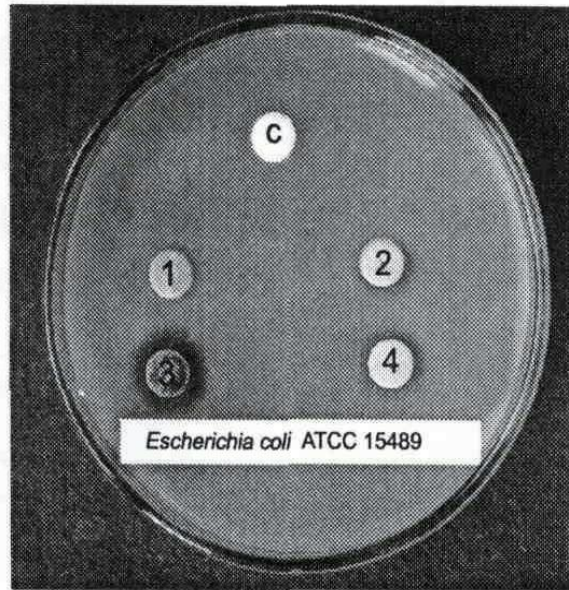


Fig. B-3. Antimicrobial activity with different solvent fractions of ethanol extract of chestnut leaf.

C : control, 1 : Hexane, 2 : Diethyl ether, 3 : Water 4: Ethylacetate

## 2) 밤의 잎과 수피 에탄올 추출물 분획의 항균활성

밤나무 잎과 수피의 에탄올 추출물을 극성에 따라 용매분획으로 추출한 다음 용매 분획물의 항균활성 검색 결과는 Table B-13과 같다. 밤나무 잎의 에칠아세테이트 분획물 항균활성은 *B. subtilis* 에서 clear zone이 9.6 mm로 가장 크게 나타났고, gram 음성균인에서는 약한 항균활성을 보였으며, 물분획물에서 *B. cereus* 에서 clear zone이 11.3 mm, gram 음성균인 *P. fluorescens*에서 11.5 mm로 가장 큰 항균력을 나타냈다. 밤나무 수피의 에칠아세테이트 분획물 항균 활성은 역시 gram 양성균은 *B. cereus*에서 나타났고, gram 음성균은 *P. fluorescens*에서 가장 큰 항균활성을 보였으며, 물 분획물에서 항균활성도 같은 양상을 보였다. 디에틸에테르 분획물에서는 gram 양성균에서 약한 항균활성을 보였고, hexan 분획물에서 항균활성을 보이지 않았다. 밤나무 잎과 수피의 용매별 분획물은 수피보다 잎이 조금 강하게 나타났다. 극성 용매인 물 분획물이 비극성인 에칠아세테이트에 비해서 강한 항균활성을 보였으므로 밤나무의 잎과 수피의 에탄올 추출물에 함유된 항균성

물질은 극성이 강한 것으로 추정할 수 있었다. 또한 균주별로는 gram 양성균과 gram 음성 균 모두 항균활성이 나타났으며, 효모와 젖산균에서는 항균활성이 없었다.

Table B-13. Antimicrobial activity of fractions from ethanol extracts of chestnut against target microorganisms

Strains	Clear zone on plate(mm) <sup>3)</sup>							
	n-Hexane extracts		Diethyl ether extracts		Ethyl acetate extracts		Water extracts	
	E <sup>1)</sup>	F <sup>2)</sup>	E <sup>1)</sup>	F <sup>2)</sup>	E <sup>1)</sup>	F <sup>2)</sup>	E <sup>1)</sup>	F <sup>2)</sup>
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	9.5	9.3	11.3	11.1
<i>B. subtilis</i>	-	-	8.5	8.3	9.6	9.0	10.3	10.5
<i>S. aureus</i>	-	-	8.6	8.3	9.0	8.6	10.2	10.1
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	8.5	8.2	11.1	10.2
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	8.3	8.3	10.3	10.4
<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	-	8.2	8.2	11.5	11.2
<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. mesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. anomala</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup>E: chestnut leaf <sup>2)</sup>F : chestnut bark <sup>3)</sup>In diameter (mm)

### 3) 에탄올 추출물의 미생물에 대한 최소저해농도

항균활성 검색에 사용된 10개 균주에 대해서 항균활성이 우수하였던 밤나무의 잎과 수피의 에탄올 추출물의 각 균주에 대한 최소 저해 농도를 조사한 결과는 Table B-14와 같다. 밤나무 잎과 수피의 에탄올 추출물의 최소저해농도는 밤나무 수피에서 세균의 gram 양성균과 gram 음성균 모두 1.0 mg/mL로 큰 차이를 보이지 않았으며, 밤나무 잎에서도 gram 양성균과 gram 음성균 모두 0.5 mg/mL로 균주간의 차이를 보이지 않았으나 잎과 수피와의 차이는 있었다. 효모와 젖산균은 세균에 비하여 높은 농도에서 생육이 저해됨을 보여 항균활성이 비교적 낮게 나타났다. 따라서 밤나무 잎과 수피의 에탄올 추출물에 함유된 항균활성 물질은 세균의 경우 항균활성이 강하였으나, 효모와 젖산균의 경우 항균활성이 아주 약한 결과를 나타내었다.

#### 4) 항균성 물질의 열 및 pH 안정성 측정

밤나무 잎과 수피의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질의 열 안정성을 조사하기 위한 실험 결과는 Table B-15와 같다. 밤나무 잎과 수피 에탄올 추출물을 100℃, 121℃로 열처리한 후 항균활성 검색 결과를 보면, *B. cereus* 에서 12.8, 12.4 mm로 대조구의 13 mm와 거의 비슷하였으며, *E. coli* 에서 12.0, 12.5 mm로 대조구의 12 mm와 비슷하게 나타났다. 즉, 밤나무 수피와 잎의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질은 열에 매우 안정한 것을 알 수 있었다.

밤나무 잎과 수피 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질의 pH 안정성을 조사하기 위한 결과는 Table B-16에서 보는 바와 같이 pH 3과 pH 9 에서 항균활성이 다소 감소하였으나 두 균주 모두 생육저해환의 크기가 대조구와 거의 비슷한 것으로 보아 밤나무 잎과 수피의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질은 pH변화에 따라서 항균활성 변화가 없는 것을 알 수 있었다.

Table B-14. Effect of heat treatment of ethanol extracts on the growth inhibitory activity of Chestnut against *B.cereus* and *E. coli*.

Strains		Growth at various concentration (mg/mL)						MIC (mg/mL)
		C <sup>1)</sup>	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	
<i>B. cereus</i>	E <sup>2)</sup>	+	+	+ <sup>4)</sup>	- <sup>5)</sup>	-	-	0.5
	F <sup>3)</sup>	+	+	+	± <sup>6)</sup>	-	-	1.0
<i>B. subtilis</i>	E <sup>2)</sup>	+	+	+	-	-	-	0.5
	F <sup>3)</sup>	+	+	+	+	-	-	1.0
<i>S. aureus</i>	E <sup>2)</sup>	+	+	+	-	-	-	0.5
	F <sup>3)</sup>	+	+	+	±	-	-	1.0
<i>E. coli</i>	E <sup>2)</sup>	+	+	+	±	-	-	1.0
	F <sup>3)</sup>	+	+	+	±	-	-	1.0
<i>S typhimurium</i>	E <sup>2)</sup>	+	+	±	-	-	-	0.5
	F <sup>3)</sup>	+	+	+	±	-	-	1.0
<i>P. fluorescens</i>	E <sup>2)</sup>	+	+	±	-	-	-	0.5
	F <sup>3)</sup>	+	+	+	±	-	-	1.0
<i>L. plantarum</i>	E <sup>2)</sup>	+	+	+	+	+	+	-
	F <sup>3)</sup>	+	+	+	+	+	+	-
<i>L mesenteroides</i>	E <sup>2)</sup>	+	+	+	+	+	+	-
	F <sup>3)</sup>	+	+	+	+	+	+	-
<i>S. cerevisiae</i>	E <sup>2)</sup>	+	+	+	+	+	+	-
	F <sup>3)</sup>	+	+	+	+	+	+	-
<i>H. anomala</i>	E <sup>2)</sup>	+	+	+	+	+	+	-
	F <sup>3)</sup>	+	+	+	+	+	+	-

<sup>1)</sup>C : control, <sup>2)</sup>E : chestnut leaf <sup>3)</sup>F : chestnut bark <sup>4)</sup>+ : growth,  
<sup>5)</sup>- : no growth, <sup>6)</sup>± : uncertain in growth

Table B-15. Effect of heat treatment of ethanol extracts on the growth inhibitory activity of Chestnut leaf and bark against *B.cereus* and *E. coli*.

strains		clear zone on plate (mm)								
		contro	heating temperature (°C)						(8.0mg/disc)	
			1	50	60	70	80	90	100	121
<i>B. cereus</i>	E <sup>2)</sup>	13	13.5	13.2	13	13	13.2	12.6	12.8	
	F <sup>3)</sup>	12	12.2	12	12	12	12.5	11.6	12.4	
<i>E. coli</i>	E <sup>2)</sup>	12	13	12.5	12	11.5	11.5	12	12	
	F <sup>3)</sup>	13	13	13	12.5	12.5	11.1	12.5	12.5	

<sup>1)</sup>C : control, <sup>2)</sup>E : chestnut leaf <sup>3)</sup>F : chestnut bark

Table B-16. Effect of pH change on the antimicrobial activity of ethanol extract *B.cereus* and *E. coli*.

strains		clear zone on plate (mm)					
		control	pH (8.0mg/disc)				
			3	5	7	9	11
<i>B.cereus</i>	E <sup>2)</sup>	13	10.9	13.2	13.1	12.3	11.2
	F <sup>3)</sup>	12	10.2	12	12.5	11.8	10.5
<i>E. coli</i>	E <sup>2)</sup>	12	9.8	11.5	12	12.4	10.3
	F <sup>3)</sup>	13	10.6	13	13.4	12.5	11.4

<sup>1)</sup>C : control, <sup>2)</sup>E : chestnut leaf <sup>3)</sup>F : chestnut bark

#### 5) 항균활성 물질의 분리 동정결과

분취용 column을 이용하여 밤 에탄올 추출물을 순수 분리하여 얻은 chromatogram은 Fig. B-4과 같다. 각각의 peak를 분취하여 항균활성을 측정한 결과는 Fig. B-5와 같으며 총 5개의 peak중 peak 2번에서 항균활성이 확인되었다.

#### 6) 항균성물질의 구조확인

항균성이 확인된 2번 peak를 분획하여 NMR에 의한 구조분석은 분획물을 용매 (DMSO)에 녹여 400 MHz NMR 기기(Bruker 400MHz)를 이용하여 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR를 측정한 결과는 Fig. B-6과 같다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum 에 의해 수소가 결합된 탄소가 존재하면 그들은 서로 cross peak를 나타내는 것을 이용하는 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-COSY 측정법을 이용한 2D NMR(HMQC)의 측정 결과는 Fig. B-6과 같다.

<sup>1</sup>H-NMR 과 <sup>13</sup>C-NMR의 spectrum에서 확인된 수소와 탄소의 수와 위치는 Table B-17과 Table B-18에 나타냈다.

<sup>1</sup>H-NMR 과 <sup>13</sup>C-NMR의 spectrum 에 의해 얻어진 정보와 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-COSY의 결과로부터 전형적인 flavonoidis의 기본구조인 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>의 carbon skelton을 가진 화합물로 밝혀졌으며, 참고문헌(19)과 비교한 결과 (+)catechin과 동일한 peak 임을 확인하였다. 따라서 항균성 있는 peak 2번은 flavanone의 유도체인 catechin으로 동정되었다.

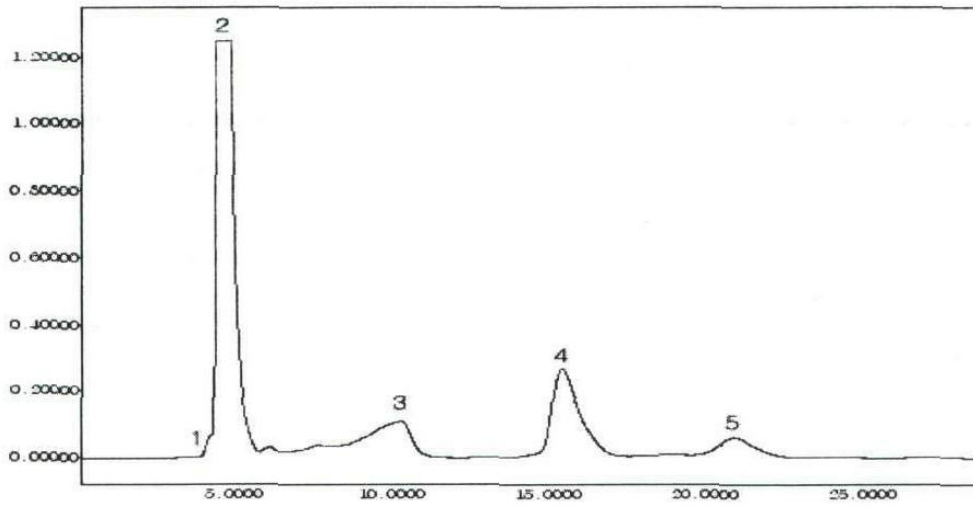


Fig. B-4. The HPLC chromatogram of antimicrobial activity compound of chestnut.

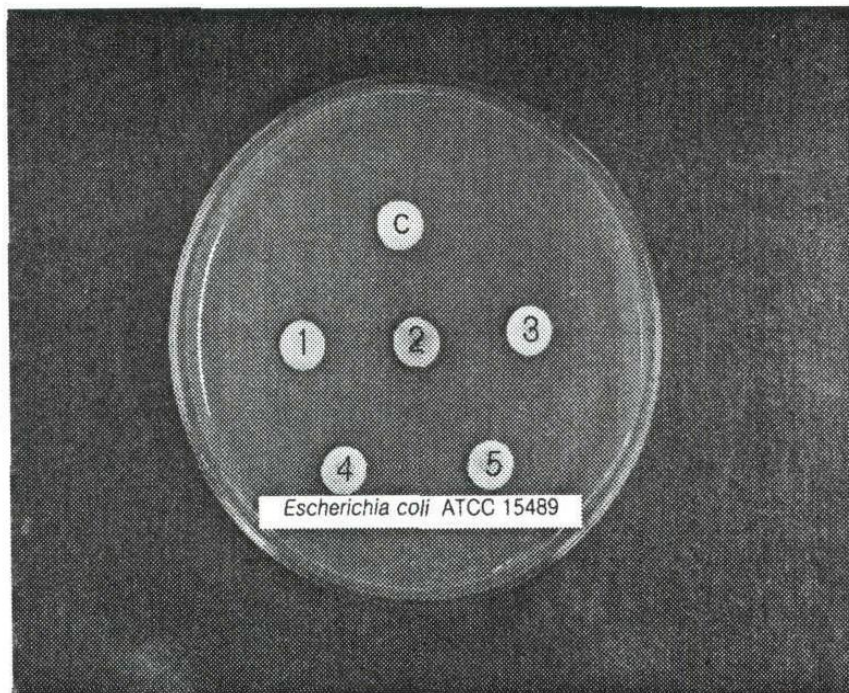


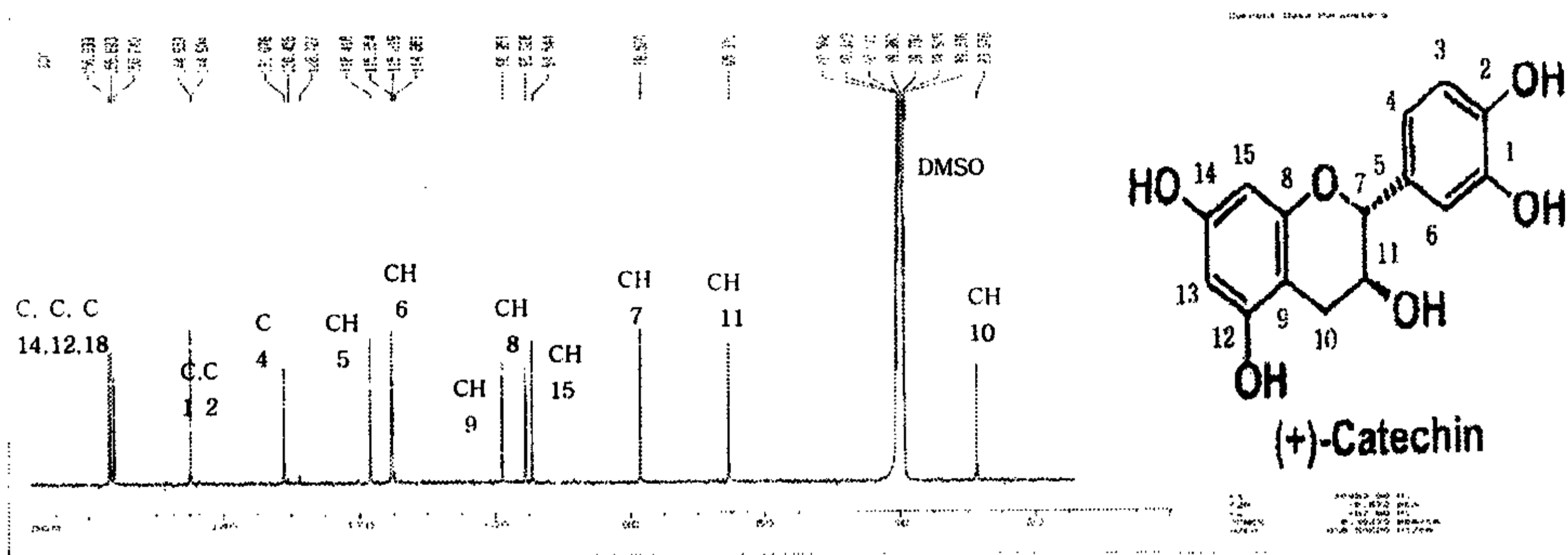
Fig. B-5. Antimicrobial activity by different HPLC peak of chestnut.

Table B-17.  $^1\text{H}$ -NMR chemical shift multiplicity of antimicrobial activity compound of chestnut.

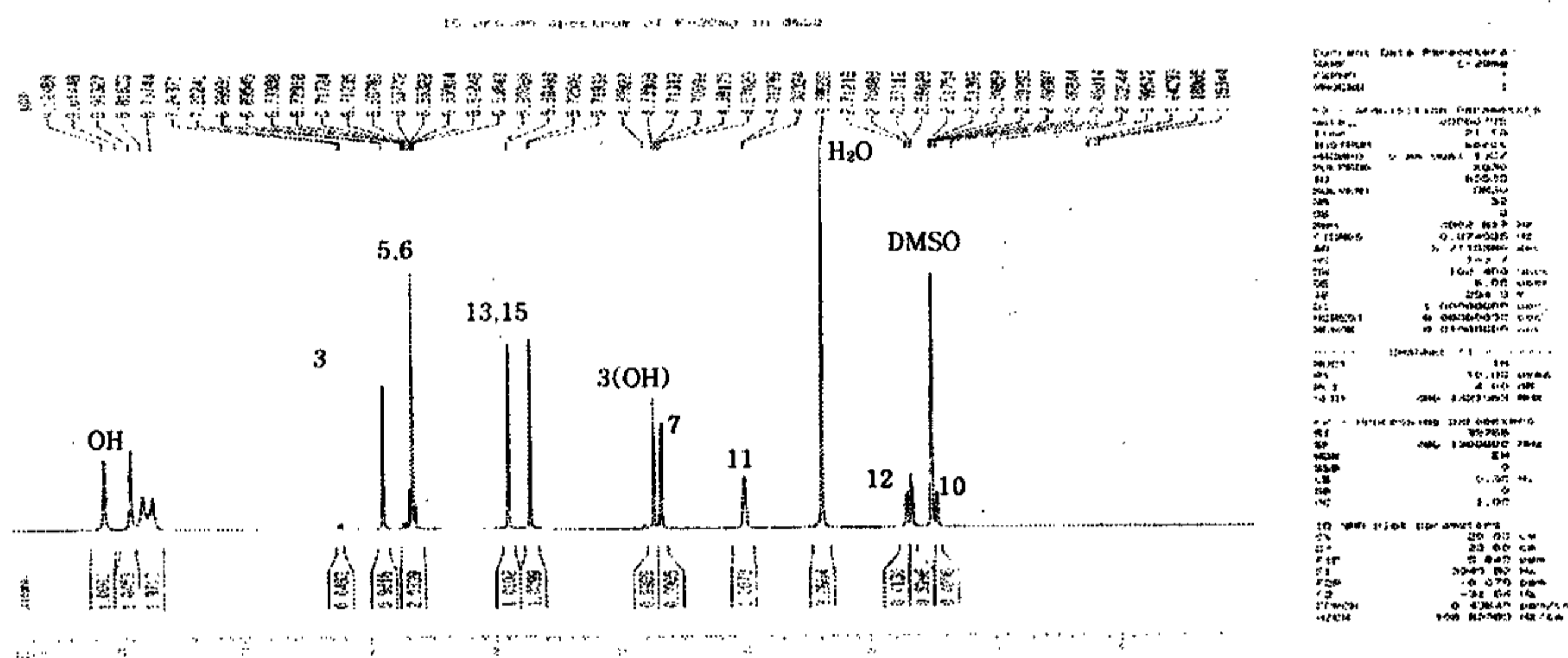
	Chemical shift multiplicity $\delta$ (ppm)
H-3	6.89
H-5	6.66
H-6	6.65
H-7	4.71
H-10	2.67
H-10	2.51
H-11	4.01
H-13	5.90
H-15	5.72

Table B-18.  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift multiplicity of antimicrobial activity compound of chestnut.

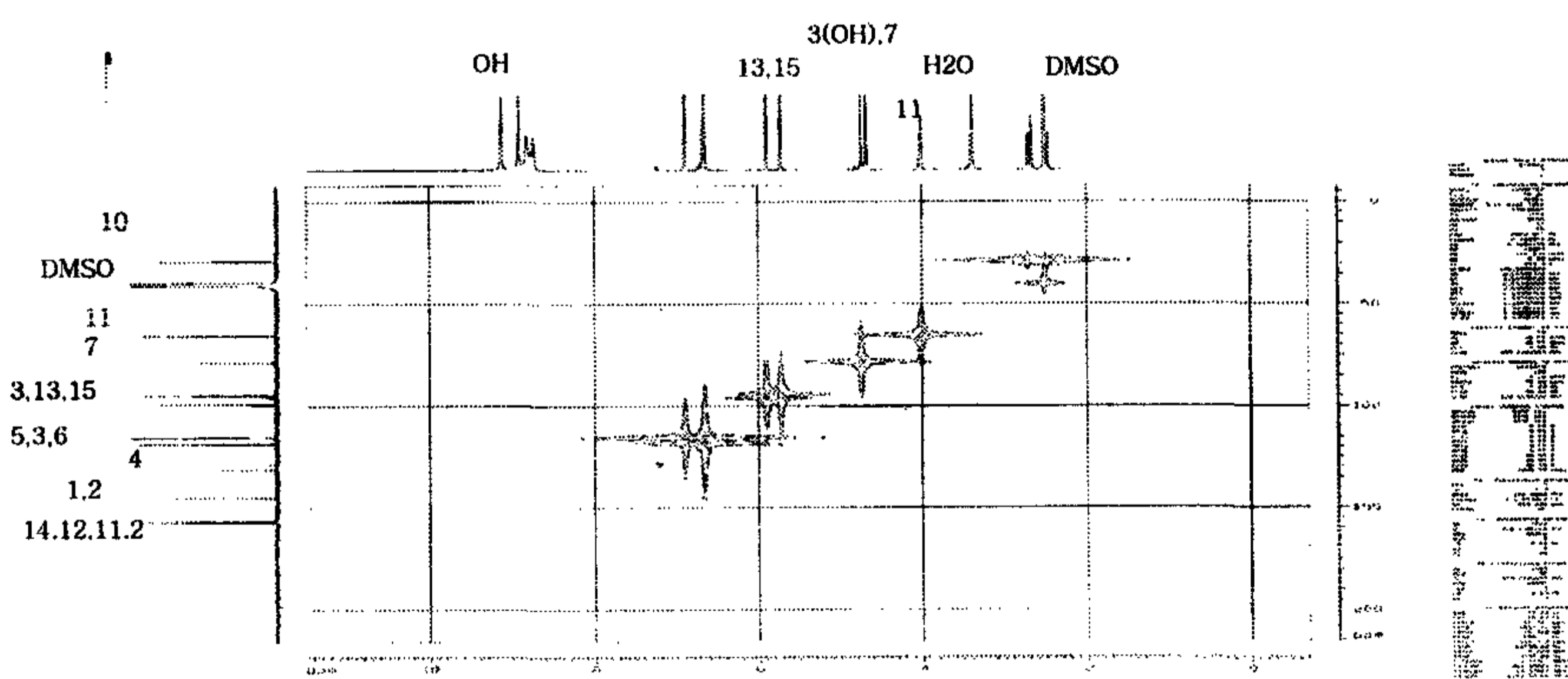
Carbon	Chemical shift multiplicity $\delta$ (ppm)
1	144.95
2	144.90
3	115.35
4	131.07
5	118.4
6	115.21
7	78.52
8	156.24
9	98.95
10	28.67
11	65.37
12	156.69
13	95.52
14	156.98
15	94.54



1D proton spectrum.



Carbon spectrum.



2D NMR

Fig. B-6. H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectrum of antimicrobial activity compound of chestnut.



## 다. 밤의 부위별 항산화 활성

### 1) Hemoglobin-induced linoleic acid system에서의 항산화 활성

항산화활성은 linoleic acid의 자동산화 억제를 측정하는 일반적인 방법으로 측정하였다. Fig. B-7에서 보는 바와 같이 밤 수피, 밤 잎의 항산화활성이 기존의 항산화제로 알려진 tocopherol (0.05mg/ml)의 항산화 활성의 80%정도의 항산화 활성을 보였고, 밤 속껍질에서도 약하게 항산화 활성이 나타나는 것을 알 수 있었다.

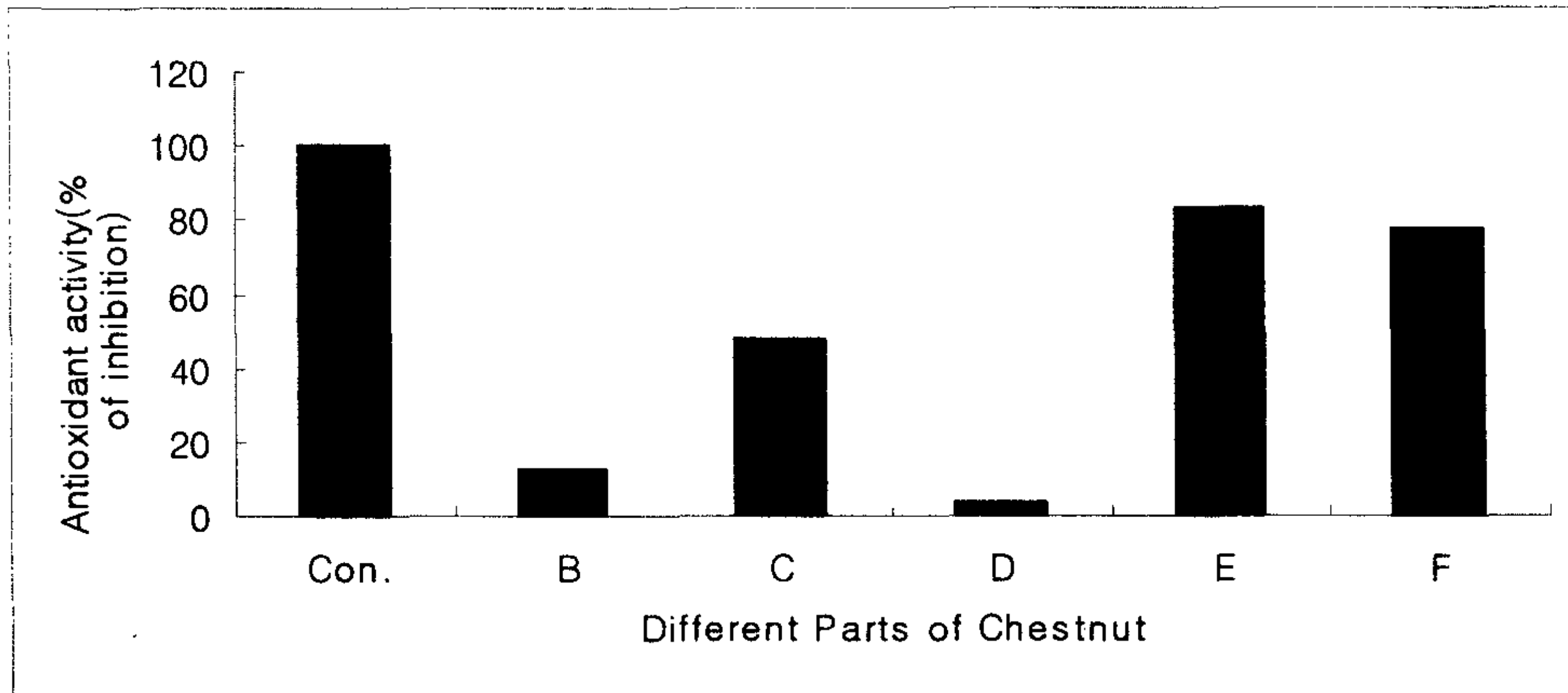


Fig. B-7. Antioxidation activity of chestnut in Hemoglobin-induced linoleic acid system.

Control : tocopherol, <sup>2)</sup>See the legends in Table B-6.

### 2) Reducing power

각각의 밤시료의 reducing power를 측정한 결과는 Fig. B-8 과 같다. E가 5가지 밤 시료구중에서 가장 높은 reducing power를 보였으며, 밤나무 잎과 수피에서 높았고 밤 외피에서 비교적 높은 reducing power를 보였다. 각각의 밤 시료추출물의 reducing power를 측정한 결과 Fig. B-6에서 측정한 항산화활성과 유사한 결과를 보였다. 이는 천연물 소재의 항산화활성이 reducing power와 밀접한 관계가 있다는 보고와 일치하는 경향을 보였다. Reducing power가 높은 밤 추출물에 함유된 물질이 전자공여체로 역할을 할 뿐만 아니라 free radicals과 반응하여 더욱 안정한 화합물로 전환시켜 결국 radical chain reaction을 종결시켜 항산화활성을 발휘하게 됨을 알 수 있었다.

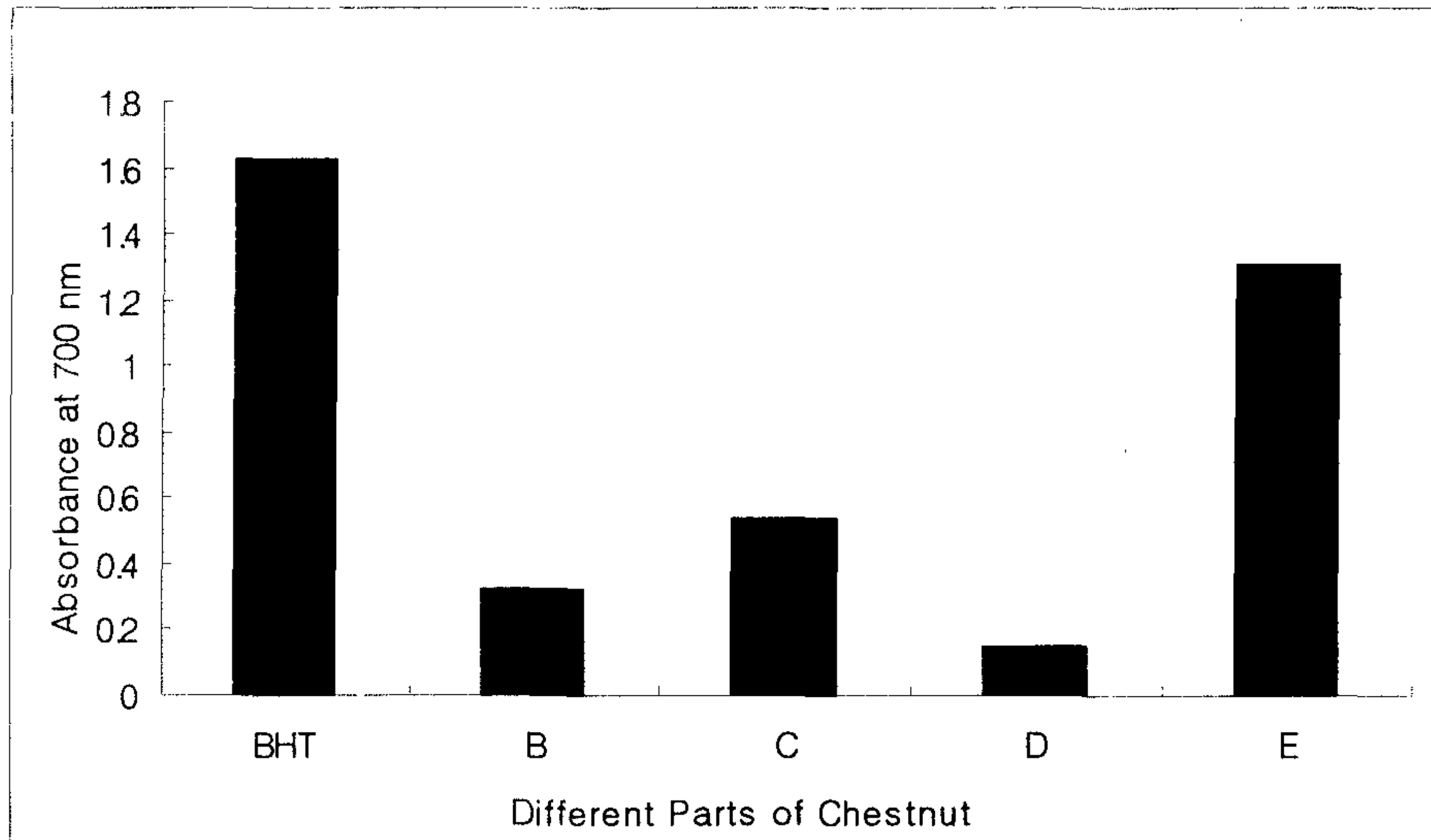


Fig. B-8. Reducing power of chestnut.

<sup>2)</sup>See the legends in Table B-6.

### 3) 전자공여능

전자공여능은 free radical 생성과정중의 초기반응을 저해하는 DPPH를 이용하여 측정하였으며 그 결과는 Table B-19와 같다. DPPH는 전자 또는 수소를 받아들이는 안정한 반자성분자(diamagnetic molecule)로 항산화제(AH)존재시 다음과 같이 환원된다.( $DPPH + AH \rightarrow DPPH-H + A$ ). 항산화활성을 평가하기 위해 DPPH와 반응을 시키면 항산화활성을 지닌 물질로부터 수소를 받아 DPPH는 환원되면서 515nm에서의 흡광도는 감소하게 된다. 따라서 radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크다면 높은 항산화활성을 기대할 수 있으며, 실제 DPPH radical에 대한 소거능과 과산화지질 형성억제 효과간의 상관관계도 보도된바 있다. 각각의 밤 시료의 전자공여능을 비교한 결과 간밤에서 다른 밤 시료구에 비해 월등함을 알 수 있었다.

Table B-19. Electron donating ability of chestnut

Treatment time(min.)	B.T	B <sup>2)</sup>	C <sup>3)</sup>	D <sup>4)</sup>	E <sup>5)</sup>	F <sup>6)</sup>
0	0.70	0.67	0.64	0.70	0.50	0.54
5	0.68	0.64	0.60	0.66	0.48	0.42
10	0.68	0.60	0.55	0.67	0.30	0.32
15	0.65	0.57	0.50	0.60	0.19	0.20
20	0.62	0.55	0.47	0.60	0.15	0.21

<sup>2)</sup>See the legends in Table B-6.

#### 4) Superoxide anion radical 소거활성

각각의 밤시료의 Superoxide anion radical 소거활성은 Superoxide dismutase 활성 측정법을 이용하고 그 결과는 Table B-20과 같다. 이 방법은 xanthine 과 xanthine oxidase 의 반응에 의해 Superoxide anino radical 이 형성되고 이 radical에 의해 cytochrome c 가 환원되는데 환원된 cytochrome c 는 550nm에서 피크를 나타낸다. 이 반응계에 Superoxide dismutase나 기타 Superoxide anino radical을 소거할수 있는 물질이 존재할 경우 cytochrome c의 환원력이 저해되고 그 저해농도를 측정함으로써 매우 민감하게 Superoxide anino radical 소거능을 측정할수 있다. 각각의 밤시료의 Superoxide anino radical 소거능을 측정할 결과 밤나무 잎의 Superoxide anino radical 소거능이 0.90unit/mg 로 가장 높은 소거능을 보였고 밤나무 수피는 0.80unit/mg 으로 두 번째로 높은 소거능을 보였다.

Table B-20. Scavenging activity of Superoxide anion radical

	Unit/mg solid	IC <sub>50</sub>
B <sup>2)</sup>	0.27	3.7
C <sup>3)</sup>	0.54	1.9
D <sup>4)</sup>	-	0
E <sup>5)</sup>	0.90	1.1
F <sup>6)</sup>	0.80	1.19

<sup>2)</sup>See the legends in Table B-6.

5) 항산화물질 분리

항산화력이 확인된 밤 수피의 물 분획을 분취용 HPLC에서 분취 후 농축하여 항산화성을 확인한 결과는 Table B-21 과 chromatogram은 Fig. B-7에서 보는 바와 같다. chromatogram의 총 paek는 8개 이었으며 그 중 6, 7, 8번 paek가 활성을 갖고 있으며 그 중 항산화 활성은 paek 7에서 대조구인 tocopherol의 17%을 나타냈다.

분취된 시료를 NMR에 분석하였으나 시료량과 순도가 낮아 결과를 얻지 못하였다.

Table B-21. Antioxidation activity of chestnut by different HPLC peak.

		(%)							
Control	1 <sup>*)</sup>	2	3	4	5	6	7	8	
100	- <sup>**)</sup>	-	-	-	-	5	17	6	

Control : tocopherol,    <sup>\*)</sup> : peak No.,    <sup>\*\*)</sup> : Non-detected

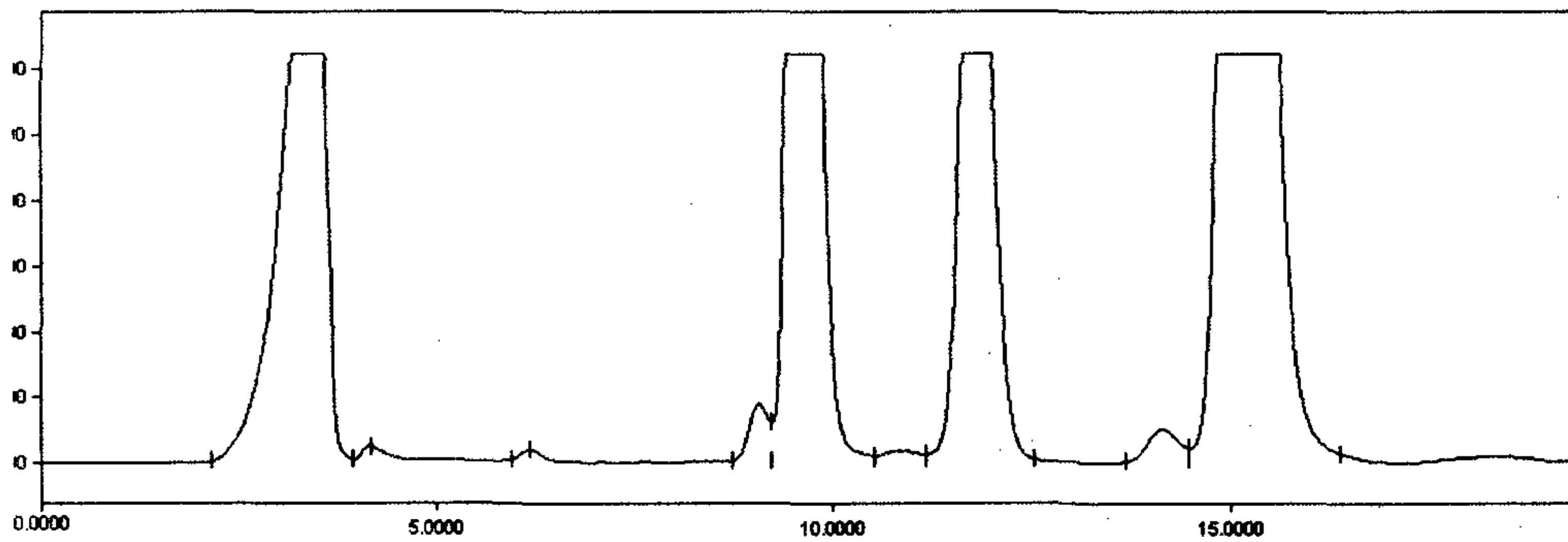


Fig. B-7. The HPLC chromatogram of antioxidation activity compound of chestnut.

## 참고문헌

1. 김월수, 박치선, 안창영, 이문호 (1999) 유실수 재배. 내외 출판사, 서울, p.75-192
2. 김정호, 김종천, 고헌출, 김규래, 이재창 (1999) 과수원예각론, 향문사, 서울, p.404-420
3. 芝崎勳. (1983) 抗菌性天然添加物開發の現狀と使用の上問題點. *New Food Industry* 25, 28-34
4. Nanayama M. (1996) Antibacterial substances in food. *Jpn J Food Microbial* 12, 209-213
5. Fromtling R.A., Bulmer G.S. (1978) In vitro of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) on the growth and viability of *Cryptococcus neformans*. *Mycologia* 70, 397
6. Choi, O.K., Kim, Y.S., Cho, G.S. and Sung, C.K.(2002) Screening for Antimicrobia Activity from Korean Plants. *Korean J. Food Sci Technol* 15, 300-306
7. Lee, O.K., Jung, S.H., and Son, J.Y.(2004) Antimicrobial Activity of Clove Extract by Extraction Solvents. *Korean J Food Sci Technol* 33, 494-499
8. Ueda, S., Yamashita, H., Nakajima, M. and Kuwabara, Y. (1982) Inhibition of microorganisms by spice extracts and flavouring compounds. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 29, 111-116
9. Kim, O.S. and Lee, Y.H. (1987) Purification and properties of the peroxidase in castonea semen. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 19, 506-514
10. Kim, S.K., Jeon, Y.J., Kim, Y.T., Lee, B.J. and Kang, O.J. (1995) Physicochemical and textural properties of chestnut starches. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24, 594-600
11. Yim, H., Kim, C.O., Shin, D.W. and Suh, K.B. (1980) Study on the storage of chestnut. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 12, 170-175

12. Nha, Y.A. and Yang, C.B. (1997) Changes of lipids in chesnut during storage. Korean J. Food Sci. Technol., 29, 437–441
13. Cho, G.S. and Kim, H.Y. (2003) Screening of antimicrobial activity from castanea crenata Sieb. et zucc. leaves and flowers. I. chemical composition. J. Korean Soc. Argric. Chem. Biotechol., 46, 262–267
14. Attanasio, G., Cinquanta, L., Albanese, D. and Matteo M.D. (2004) Effects of drying temperatures on physicochemical properties of dried and rehydrated chestnuts. Food Chemistry, 88, 583–590
15. Bernardez, M.M., Miguelez, J. De la M. and Queijeiro, J.G. (2004) HPLC determination of sugars in varieties of chestnut fruits from Galicia. J. Food Composition and Analysis, 17, 63–67
16. AOAC. (1985) Official method of analysis 16th ed. association of official nalytical chemists, washington D.C
17. Wilson, A.M., Work, T.M., Bushway, A.A. and Bushway, R.J. (1981) HPLC determination of fructose, glucose and sucrose in potatoes. J. Food Sci., 46, 300
18. Ohara, I. and Ariyoshi, S. (1979) Comparison of protein precipitants for the determination of free amino acid in plasma. Agric Biol. Chem., 43, 1473
19. Cecile Cren–Olive, Jean–Michel, Emmanuel Maes and Christian Rolando (2002) Catechin and epicatechin deprotonation followed by <sup>13</sup>C NMR. Tetrahedron Letters 43 4545–4549
20. Hong, N.D., Rho, YS., Kim, N.J. and Kim, J.S. (1990) A Study on Efficacy of Ulmi Cortex. J Korean Soc Pharm 21, 217–222
21. Park, U.Y., Chang, D.S. and Cho, H.R. (1992) Screening of Antimi–crobial Activity for Medicinal Herb Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 21. 91–96

### 제 3 절 전분 제조방법에 따른 밤전분의 이화학적 특성

#### 1. 서론

밤(*Castanea crenata s. et Z.*)은 농·임업 전체 수출품목 가운데 단일품목으로 수출액이 가장 많은 품목 중의 하나이며, 밤나무는 다른 과수에 비하여 재배관리에 노력이 적게 들고 경사가 급한 지형에서도 비교적 쉽게 재배할 수 있는 장점이 있다(1). 1960년대 이후 정부시책에 의하여 밤 생산을 장려함에 따라 재배면적이 급격히 증가하다가 2000년대에는 밤의 과잉생산으로 인해 조림면적 및 재배면적이 감소하고 있는 추세이다(2). 주요 생산지역은 전남의 광양, 경남의 산청, 진주, 하동, 충남의 공주, 부여이며 연간 총생산량은 2004년 기준 60,017톤(M/T)이다(2,3). 밤은 제수용, 통조림 및 앙금 등의 제과용으로 주로 이용되며 간밤의 형태로 일본에 수출하고 있다. 밤 가공 시 낱알의 밤을 하나씩 깎아내는 수작업으로 껍질을 박피하기 때문에 인건비 등으로 인하여 경쟁력이 떨어지고 있는 실정이며, 현재는 중국산 밤과의 가격경쟁으로 인하여 수출이 점점 어려운 상황에 놓여있다(4). 밤의 주성분은 전분으로서 다른 전분에 비하여 점성이 없고 단백질 함량이 낮아(5) 분말 가공 시 성형의 어려움이 있는 식품이지만, 저단백질, 고전분을 함유한 밤은 술, 식초 등 전분을 이용한 여러 가지 식품을 개발할 수 있는 가능성이 크다. 또한 2~5% 낮은 농도에서도 겔을 형성하는 특성을 지니고 있다(6). 그동안 보고된 밤 전분에 관한 연구로는 밤 전분의 물리화학적 특성과 텍스처 특성(5), 이화학적 성질(6), 밤 전분 수용액의 리올로지 특성(7), 밤 전분 및 전분겔의 성질(8), 호화액의 유동특성(9), 수분열처리에 의한 물리화학적 성질의 변화(10) 등이 보고되었다.

본 연구에서는 밤의 효율적인 이용을 모색하고자 박피하여 제조한 밤 전분과 박피하지 않고 제조한 밤전분의 물결합력, 팽윤력, X-ray 회절도, 입자의 형태 등의 이화학적 특성과 가열 및 알칼리에 의한 호화특성을 각각 비교하여 밤 전분의 다양한 이용을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 재료

2003. 10, 2004. 10월에 전남 광양시 봉강면에서 구입한 밤을 이용하였다

### 나. 분석방법

#### 1) 밤 전분의 제조

전분은 알칼리 침지법(11)에 의하여 제조하였다. 즉 박피한 밤을 잘게 썰은 다음 Waring blendor로 10분 마쇄한 후 60 mesh와 100 mesh로 잔사를 제거한 후, 4°C에서 뷰렛반응이 나타나지 않을 때까지 0.2% NaOH 용액으로 교환한 후, 중성이 될 때 까지 증류수로 교환한 다음 실온에서 건조하여 100 mesh로 하였다(A 시료). 박피하지 않은 밤전분은 밤을 그대로 Waring blendor에서 마쇄하여 A전분과 동일하게 제조하였다(B 시료).

#### 2) 밤 전분의 이화학적 특성

##### 가) 물결합력

물결합력은 Medcalf 및 Gilles 방법(12)으로 측정하였다. 즉, 미리 무게를 측정한 원심관에 시료 2 g을 넣고 증류수를 20배 가한 다음 실온에서 30분간 교반하였다. 이를 원심분리기(MF 600, Hanil Science Industrial, Korea)에서 3,000 rpm으로 30분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하고 침전된 시료의 무게(A)를 측정하여 처음 시료와의 중량비로 계산하였으며, 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타냈다. 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Water binding capacity (\%)} = \frac{\text{A - Sample weight(d.b)}}{\text{Sample weight(d.b)}} \times 100$$



나) 팽윤력과 용해도

팽윤력과 용해도는 Schoch 방법(13)을 개량하여 따라 측정하였다. 전분 0.25 g에 증류수 40 mL을 넣고 잘 분산시킨 후, 50°C에서 1°C/min으로 95°C까지 온도를 상승시키면서 가열 교반하였고 각 온도에서 30분 유지한 후, 4,500 rpm에서 30분 원심분리하였다. 상등액은 미리 무게를 측정한 증발접시에 옮겨 항온수조에서 증발시키고, 105°C 건조기에서 항량이 될 때까지 건조하여 증발접시에 남아있는 전분의 무게(A)와 원심분리 후 침전된 전분의 무게(B)로부터 다음 식에 의하여 용해도와 팽윤력을 구하였다.

$$\text{Solubility(\%)} = \frac{A \times 100}{\text{Sample weight(d.b.)}}$$

$$\text{Swelling power} = \frac{B \times 100}{\text{Sample weight(d.b.)} \times (100 - \% \text{ Solubility})}$$

다) 요오드반응

요오드반응은 Gilbert와 Spragg의 방법(14)에 따라 측정하였다. 전분 200 mg을 100 mL 매스 플라스크에 취하고 증류수로 정용한 후, 95°C에서 45분간 호화시킨 전분용액 1 mL를 50 mL 매스 플라스크에 취하고 N-NaOH 용액 0.5 mL를 가한 다음 끓는 물에서 3분간 중탕한 후 방냉하였다. 여기에 0.5 mL의 N-HCl을 가하여 중화하고 KHC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>(potassium bitartrate) 0.09 g, 증류수 45 mL를 넣은 다음 요오드 용액(2 mg I<sub>2</sub>/mL와 20 mg KI/mL) 0.5 mL를 넣고 다시 증류수를 넣어 50 mL로 정용하였다. 이 용액을 실온에서 20분간 발색시킨 다음 분광광도계(6300, Jenway, U.K.)를 사용하여 최대흡수파장(λ<sub>max</sub>)과 그 때의 흡광도 및 680 nm에서의 흡광도를 구하였다.

라) 전분입자의 형태

전분입자의 형태는 전분을 금으로 진공 coating한 후, 주사전자현미경(SEM,

JEOL JSM-T330A, Japan)을 이용하여 2,500배로 확대하여 관찰하였다.

#### 마) X-선 회절도 및 결정화도 측정

X-선 회절도는 X-ray diffractometer(D/Max 1200, Rigaku Co., Japan)를 사용하여 target : Cu-K<sub>α</sub>, filter : Ni, voltage : 36 kV, current : 16 mA, time constant : 1 sec, F.S.R. : 1×10<sup>3</sup>cps 조건에서 회절각도(2θ) 4°~40°까지 회절하여 분석하였다. 상대적 결정화도는 Nara 방법(15)에 준하여 Fig. 1과 같이 X-선 회절도에서 intensity가 최소가 되는 점들을 곡선으로 연결하여 윗부분의 면적(Ac)을 결정부분으로 아래 부분의 면적을 (Aa)을 비결정 부분으로 나누어 Ac/(Ac + Aa)로 상대적 결정화도를 계산하였다

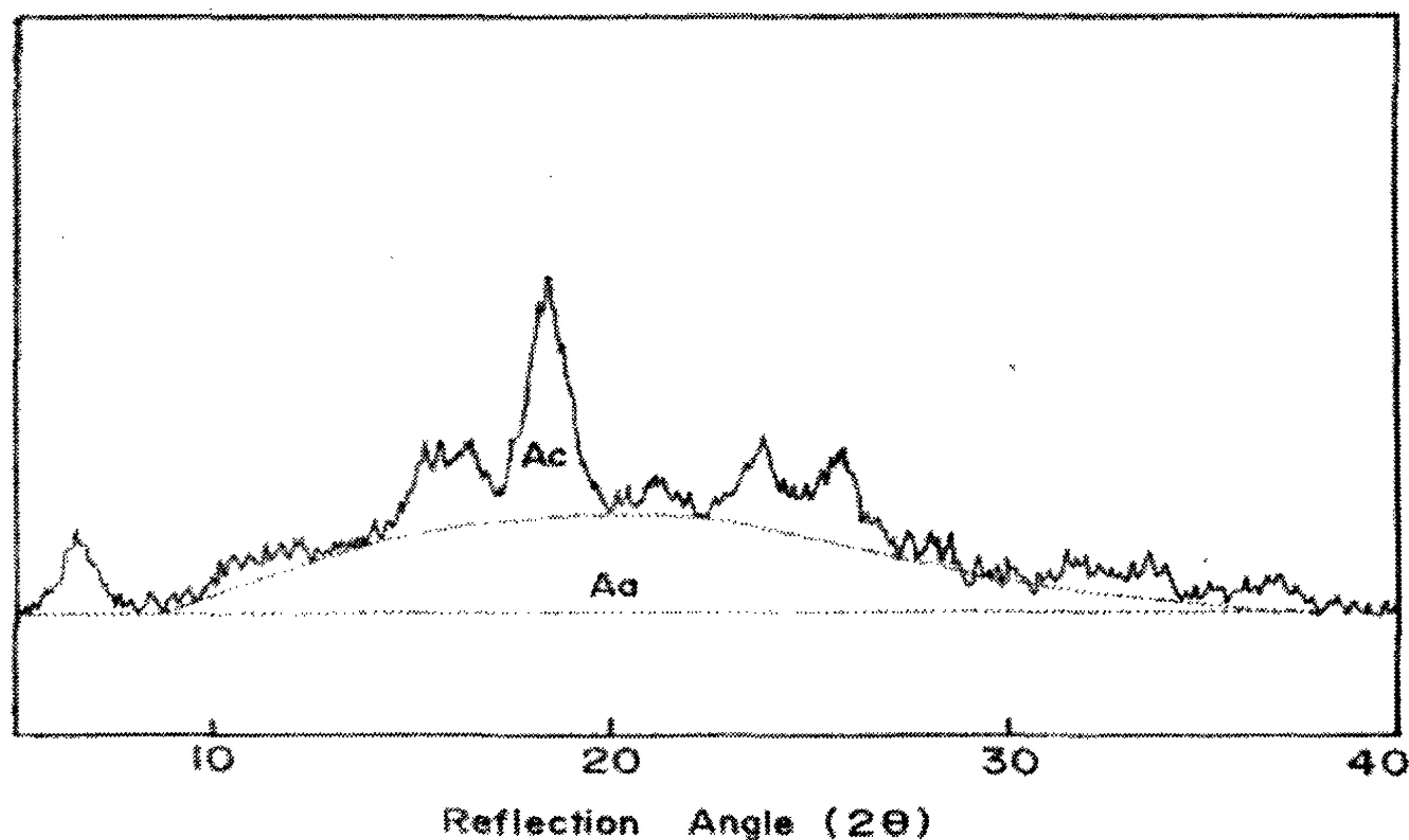


Fig. C-1. X-ray diffraction pattern for relative crystallinity.

Ac : Crystalline area    Aa : Amorphous area

#### 3) 밤 전분의 가열에 의한 호화특성

##### 가) DSC(Differential Scanning Calorimetry)분석

전분의 DSC(Differential Scanning Calorimetry)분석은 Donovan 등(16)의 방법에 따라 전분 3 mg을 aluminum pan에 취하고 여기에 전분의 3배에 해당하는

증류수를 microsyringe로 가하여 밀봉한 다음 12시간 방치한 후 DSC 2010(TA Instrument, USA)를 사용하여 분석하였고, 30°C부터 100°C까지 10.0°C/min 속도로 가열하여 흡열(endothermic) peak를 얻었다. 이 흡열곡선으로부터 호화개시온도( $T_o$ ), 호화정점온도( $T_p$ ), 호화종료온도( $T_c$ ) 및 호화엔탈피( $\Delta H$ )를 계산하였다.

#### 나) 광투과도

광투과도는 Wilson 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 0.2% 전분 현탁액을 50°C~95°C 범위에서 가열 호화시켜 625 nm에서 광투과도를 측정하였다.

#### 다) 아밀로그램

아밀로그램은 Micro Visco Amylograph(D-47055, Brabender, Germany)를 이용하여 Medcalf와 Gilles(12)방법에 따라 측정하였다. 6.5% 전분 현탁액을 bowl에 넣은 다음 30°C에서 10분간 교반한 후, 가열속도 5°C/min, 회전속도 250/min 조건으로 95°C까지 가열하고 15분간 교반한 후, 5°C/min 속도로 50°C까지 냉각하여 이 온도에서 15분 유지하였다. 이와 같이 얻은 amylogram으로부터 호화개시온도, 최고점도, 냉각점도 등 amylogram 특성값을 구하였다. 호화개시온도는 점도가 10 B.U.(Brander Units)에 도달한 온도로 나타냈다.

### 4) 밤 전분의 알칼리에 의한 호화 특성

#### 가) NaOH에 의한 점도변화

NaOH에 의한 점도변화는 Maher(17)와 Kim 등(19)의 방법에 따라 전분 2.4 g을 50 mL 실린더에 취하고 적당량의 증류수를 넣어 1분간 교반시킨 다음, 1.0 N NaOH용액을 가하여 최종농도 0.15 N의 6% 전분용액 40 mL가 되도록 하였다. 이것을 30초 동안 교반한 후, Brookfield 점도계(DV-I, U.S.A.)를 사용하여 spindle No. 5, 회전속도 10 rpm 조건으로 45분간 점도변화를 측정하였다.

#### 나) KSCN(Potassium thiocyanate)에 의한 호화

KSCN(Potassium thiocyanate)에 의한 호화는 Lindqvist(20)의 방법에 따라 전분 0.3 g을 50 mL 실린더에 취하고 적당량의 증류수를 가하여 교반한 후, 8 M

KSCN 용액을 가하여 최종농도가 1.5~4.0 M KSCN 범위의 0.6% 전분용액 50 mL가 되도록 하여 25℃에서 24시간 방치한 후에 형성된 gel의 부피를 측정하였다.

다) 알칼리 호화에 의한 광투과도

알칼리 호화에 의한 광투과도는 Wilson 등(17)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 전분 0.3 g을 300 mL 삼각 플라스크에 취하고 적당량의 증류수를 가하여 1분간 교반한 후, 1.0 N-NaOH 용액을 가하여 최종농도가 0.11 N NaOH 농도의 0.2% 전분용액 150 mL가 되도록 한 다음, 30초간 교반하고 30분간 유지하면서 1분 간격으로 625 nm에서 광투과도를 측정하였다.

### 3. 실험결과

#### 가. 밤전분의 이화학적 특성

##### 1) 물결합력

알칼리 침지법에 의하여 분리한 밤전분의 물결합력은 A전분의 경우 86.9%, 박피하지 않은 밤전분은 80.66%로 박피한 밤전분이 더 높은 물결합력을 나타냈다. 알칼리 처리하지 않은 밤전분의 경우 Kim 등(5)은 82.5%, Park 등(6)은 85.2% 라고 하여 알칼리 처리한 밤전분의 물결합력이 더 높은 경향을 나타냈다.

##### 2) 팽윤력 및 용해도

밤전분의 팽윤력은 Fig. C-2와 같다. 밤전분의 팽윤력은 60℃에서 급격히 증가하기 시작하여 80℃까지 증가하다가 그 이후는 완만하게 변화였고 A전분이 박피하지 않은 B전분보다 팽윤력이 높게 나타났다. 밤전분의 용해도는 Fig.C-3과 같이 60℃에서부터 증가하기 시작하여 온도가 상승함에 따라 점점 증가하는 특성을 보였으며 A전분이 B전분 보다 용해도가 더 높게 나타났다. Park 등(6)은 50℃부터 팽윤이 일어나며 55~60℃에서 급격히 증가되어 고온에서 억제되었다고 하였고 용해도도 55℃부터 증가하기 시작하여 계속적으로 증가하였다고 하였는데, 본 실험에서는 60℃에서 부터 팽윤이 되기 시작하였다. 이는 품종 및 전분의 제조 방법에 따른 차이라고 생각된다.

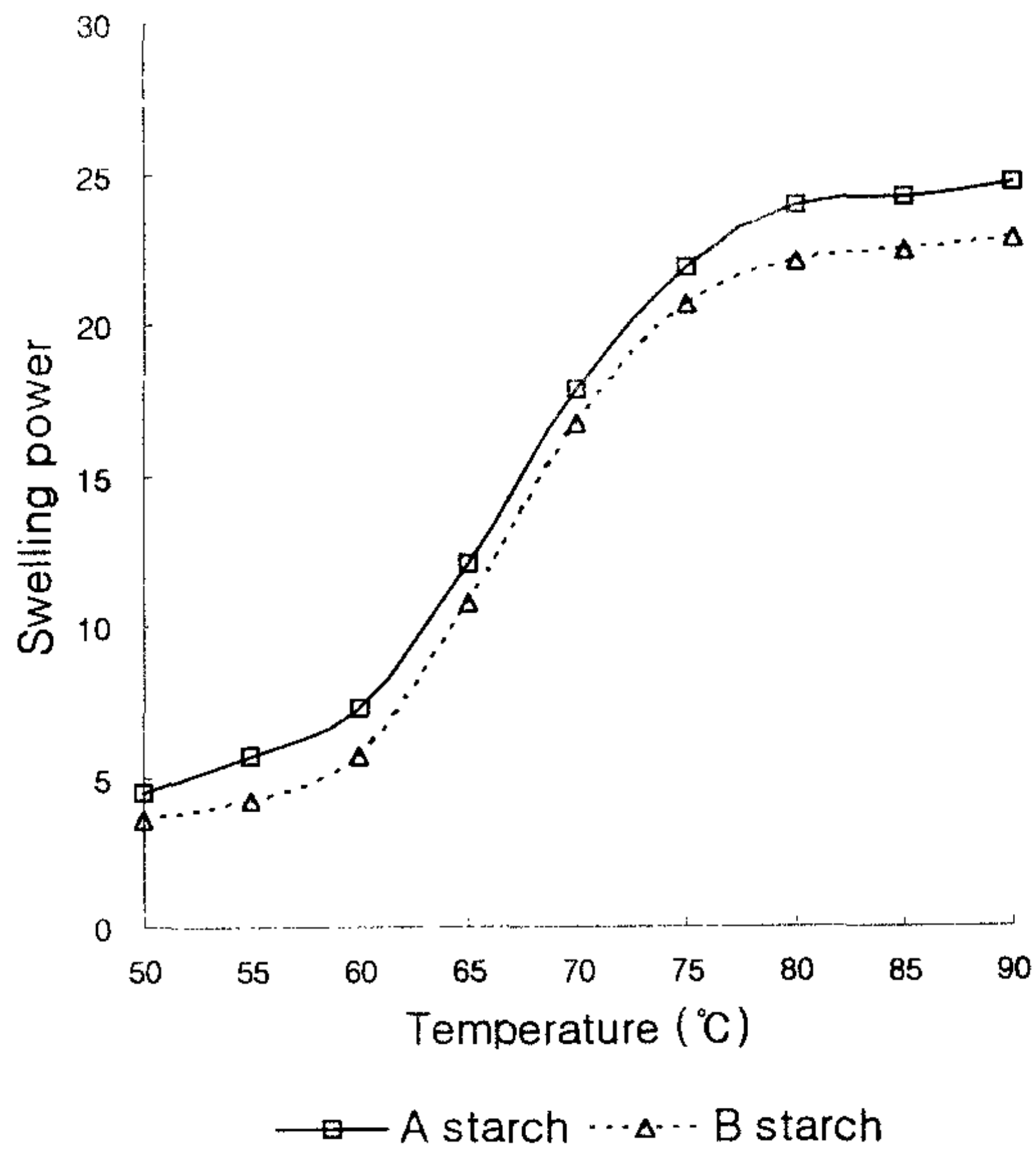


Fig. C-2. Swelling power patterns of chestnut starch.

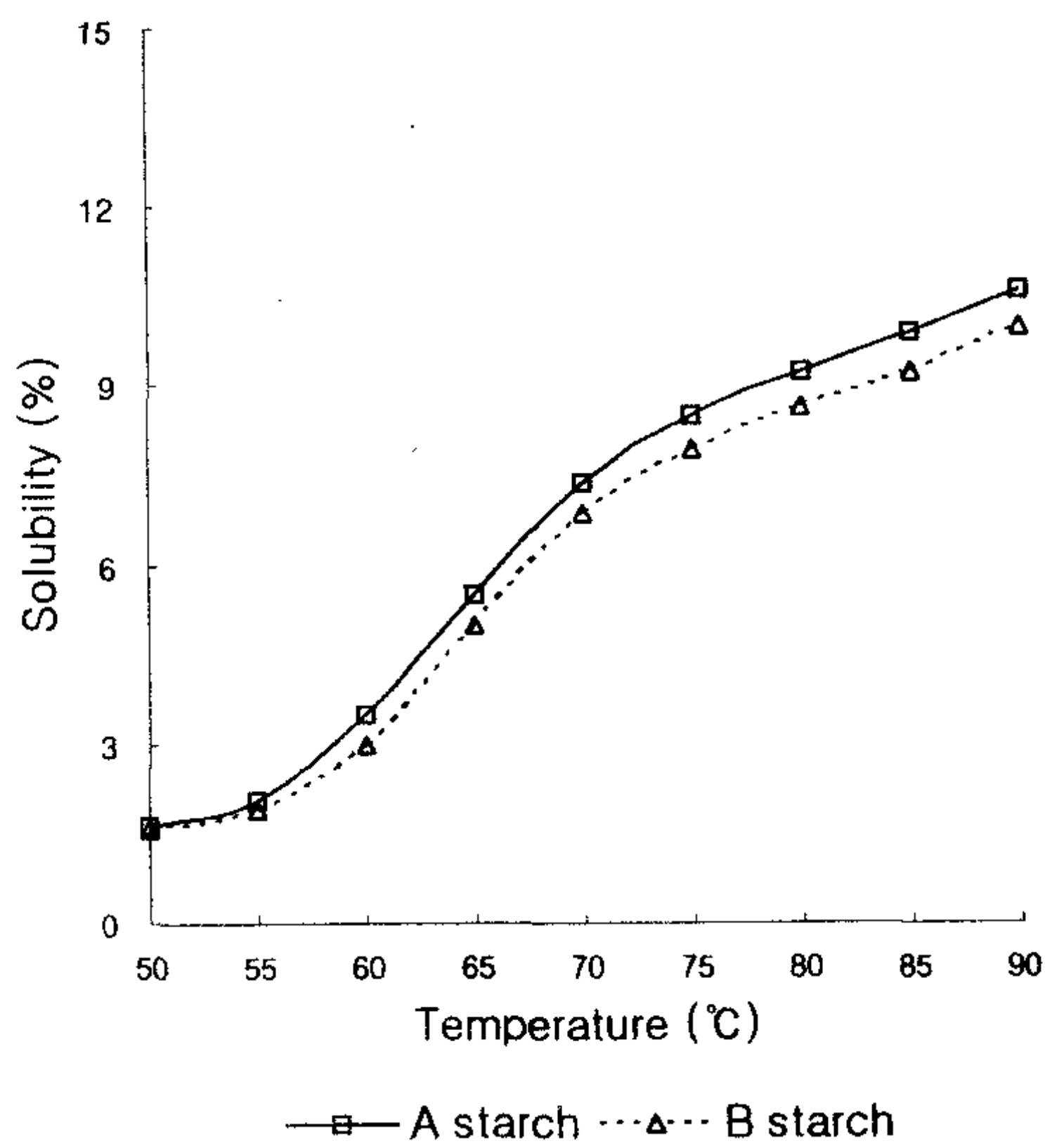


Fig. C-3. Solubility patterns of chestnut starch.

### 3) 요오드 반응

요오드 반응의 최대흡수파장과  $\lambda_{max}$ 에서의 최대흡광도는 Table C-1과 같다. 밤전분의 최대흡수파장과  $\lambda_{max}$ 에서의 최대흡광도는 A전분이 600 nm, 0.614, B전

분이 590 nm, 0.542로 각각 나타났으며, 625nm에서의 흡광도는 A전분이 0.608, B전분이 0.533으로 나타나 A전분이 박피한 B전분 보다 요오드 친화력이 더 높게 나타났다. 이 결과로 미루어 전분제조시 박피하지 않은 전분은 박피한 전분에 비하여 아밀로오스 용출이 잘되지 않는다고 생각된다. Higo 등(21)은 아밀로오스-지방산 등과 같이 아밀로오스 복합체의 함량이 증가하면 아밀로스 용출 억제로 인하여 최대흡수파장 및 흡광도가 감소한다고 하였고, Cura와 Krisman(22)은 요오드 반응의 최대흡수파장은 분지점( $\alpha$ -1,6)의 함량과 부의 관계를 보인다고 하였다.

Table C-1.  $\lambda_{\max}$  and absorbance at  $\lambda_{\max}$  of chestnut starch

Starch	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	A at $\lambda_{\max}$	A at 625(nm)
A	600	0.614	0.608
B	590	0.542	0.533

#### 4) 전분입자의 형태

가) 밤 전분 입자의 형태 및 크기는 Fig. C-4와 같다. 밤 전분 입자의 표면은 둥글고 매끄러웠으며 불규칙한 타원형모양을 나타냈다. 입자의 크기는 3~20  $\mu\text{m}$  정도이었으며 입자가 작을수록 원형에 가까운 모양을 나타냈으며 입자의 장축과 단축의 비는 1.4 : 1 정도 였다. Park 등(6)'은 2.9~21.4  $\mu\text{m}$ , 장축과 단축의 비는 1.4 : 1 정도라고 하였고, Seo 등(23)은 0.5~20  $\mu\text{m}$ 정도라고 하여 비슷한 경향을 나타냈다. 전분제조 시 박피한 것과 박피하지 않은 밤 전분 입자의 형태와 크기는 차이가 나지 않았다.

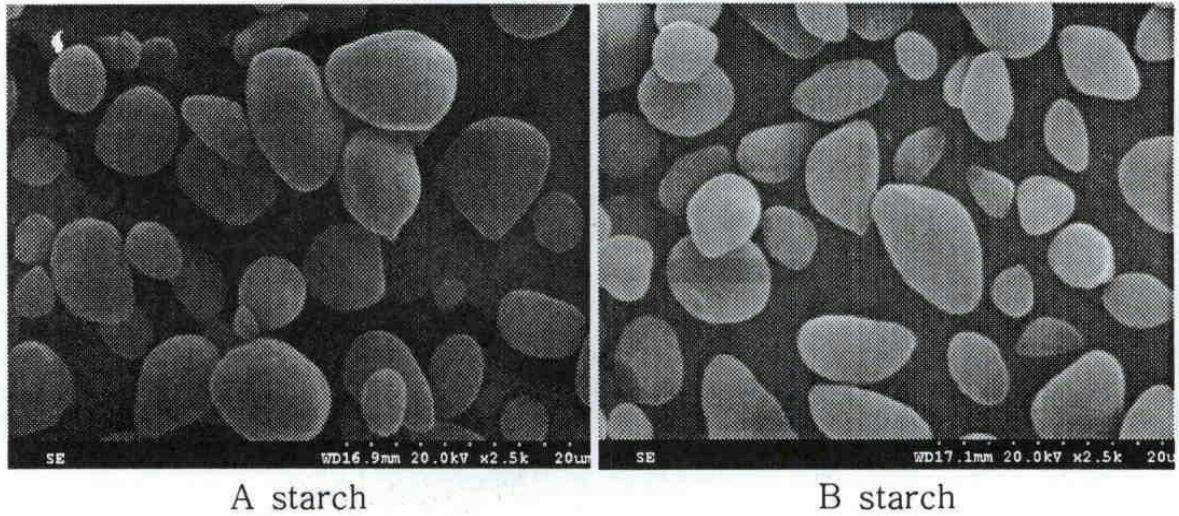


Fig. C-4. SEM photomicrograph of chestnut starch( X 2,500).

#### 5) X-선 회절특성 및 상대적 결정화도

밤전분의 X-선 회절도는 Fig. C-5와 같다. 박피하여 제조한 밤 전분은 회절각도 17.1°에서 강한 peak를, 15.1°, 23.5°에서 중간 peak를 나타내어 C<sub>b</sub>도형에 가까웠으며, 박피하지 않고 제조한 전분은 17.1°에서 강한 peak를 나타냈으며, 5.5°, 15.1°, 19.5°, 22.3°, 23.4°에서 중간 peak 피크가 나타나 B도형의 특성이 뚜렷하게 나타났다. 그러나 Park 등(6), Lee 등(24)은 밤전분을 B도형으로, Choo 등(8)과 Takeda 등(25)은 C<sub>b</sub>도형으로 구분하였다. X-ray 회절도로부터 구한 상대적 결정화도는 A전분이 36.2%, B전분은 37.0%로 박피하지 않고 제조한 밤전분이 약간 높게 나타났다. 이는 밤껍질에 함유된 탄닌성분이 전분 제조과정 중에 전분의 결정성에 영향을 미치기 때문이라고 생각된다.



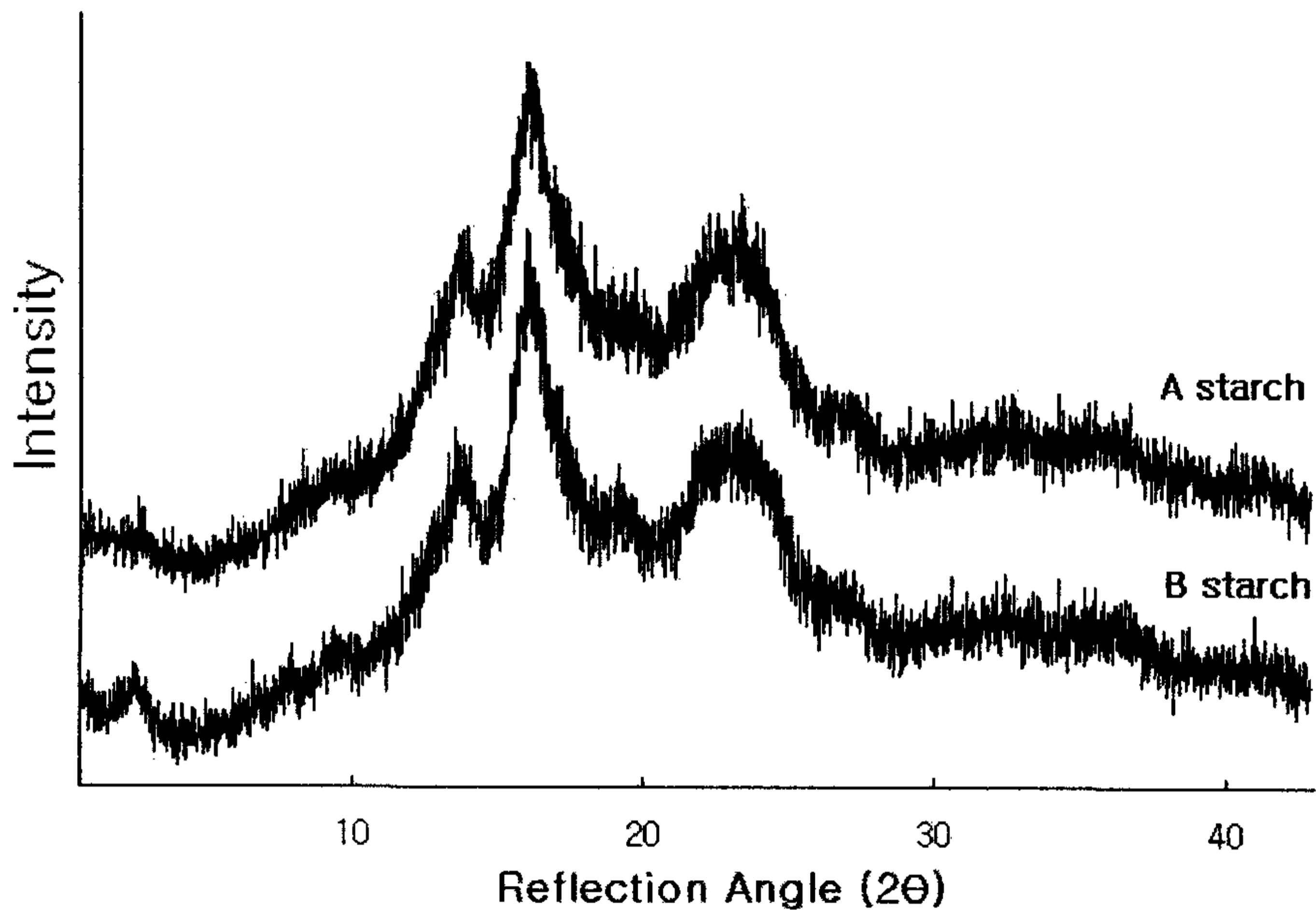


Fig. C-5. X-ray diffraction pattern of chestnut starch.

#### 나. 밤전분의 가열에 의한 호화

##### 1) DSC(Differential Scanning Calorimetry) 특성

전분과 물의 비율을 1 : 3으로 하여 분석한 결과는 Table C-2 및 Fig. C-6과 같다. A전분의 호화개시온도는 66.95°C, 호화온도 범위는 66.95°C~77.5°C, B전분은 호화개시온도는 67.09°C, 호화온도 범위는 67.09°C~77.5°C로 나타났다. 호화온도는 전분에 가한 물의 양, 입자의 크기, 가열속도, 첨가물 등에 영향을 받게 되는데(26), A전분보다 B전분은 호화온도가 더 높았다. 호화엔탈피는 A전분은 2.04 cal/g, B전분은 2.29 cal/g로 B전분이 더 높게 나타났으며, 일반 고구마 2.12cal/g(27)과 유사하였다. 박피하지 않은 전분이 호화온도와 호화엔탈피가 높은 것은 밤 껍질에 함유되어 있는 탄닌의 영향으로 생각된다.

Table C-2. Differential scanning calorimetry thermogram of chestnut starch

Starch	$T_o$	$T_p$	$T_c$	$\Delta H$ (cal/g)
A	66.95	71.21	77.5	2.04
B	67.09	71.24	77.5	2.29

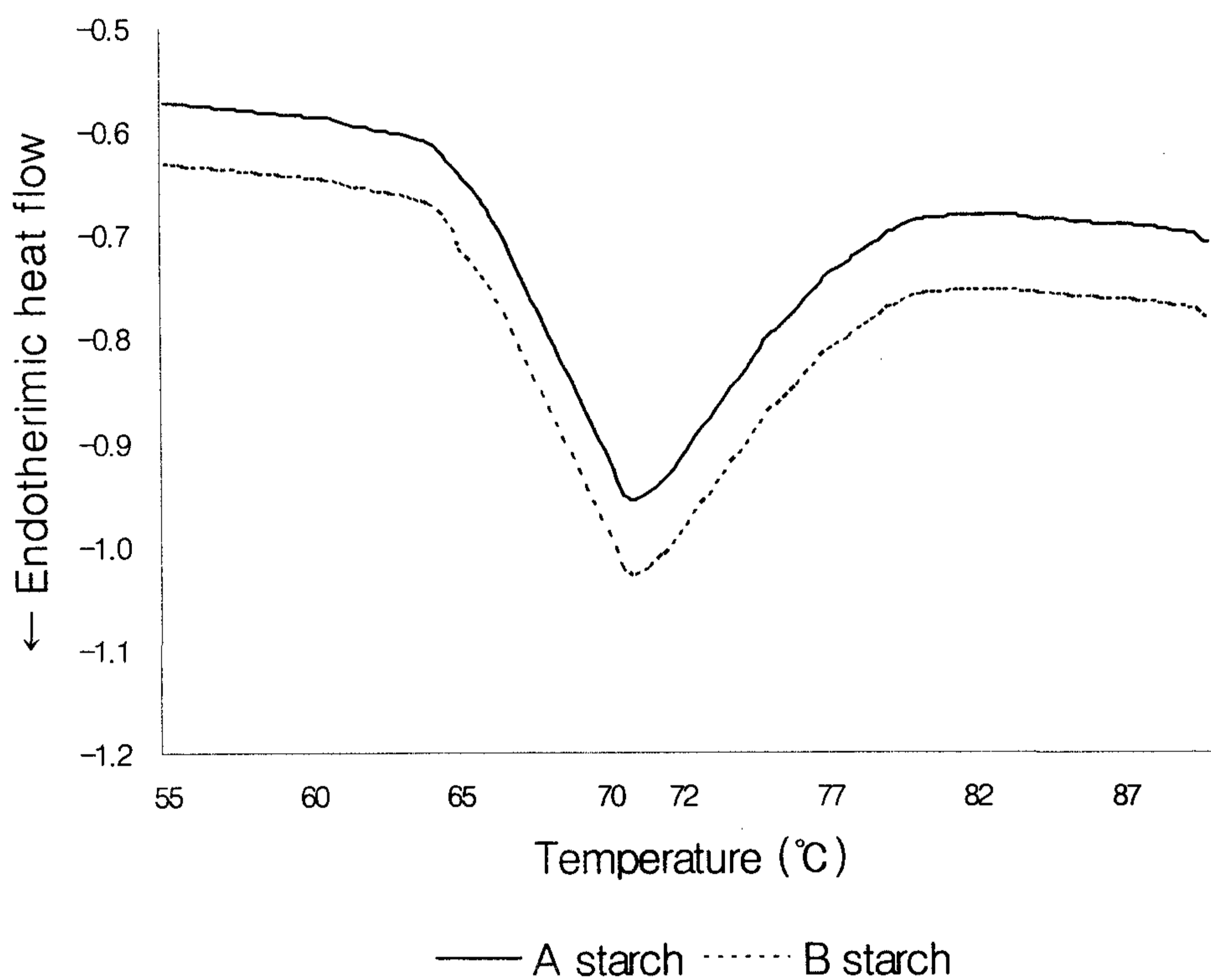


Fig. C-6. Differential scanning calorimetry thermogram of chestnut starch.

2) 가열에 의한 광투과도의 변화

0.2% 전분현탁액을 50°C~95°C까지 가열하면서 625 nm에서 광투과도를 측정  
한 결과는 Fig. C-7과 같다. 밤전분의 광투과도는 온도가 상승함에 따라 증가하였  
고 광투과도로 부터 구한 소화개시온도는 A전분, B전분 모두 60°C로 나타났다. 그  
러나 A전분은 B전분에 비하여 동일온도에서 광투과도가 더 높게 나타나 A전분이  
B전분 보다 호화가 더 잘되는 것으로 판단된다.

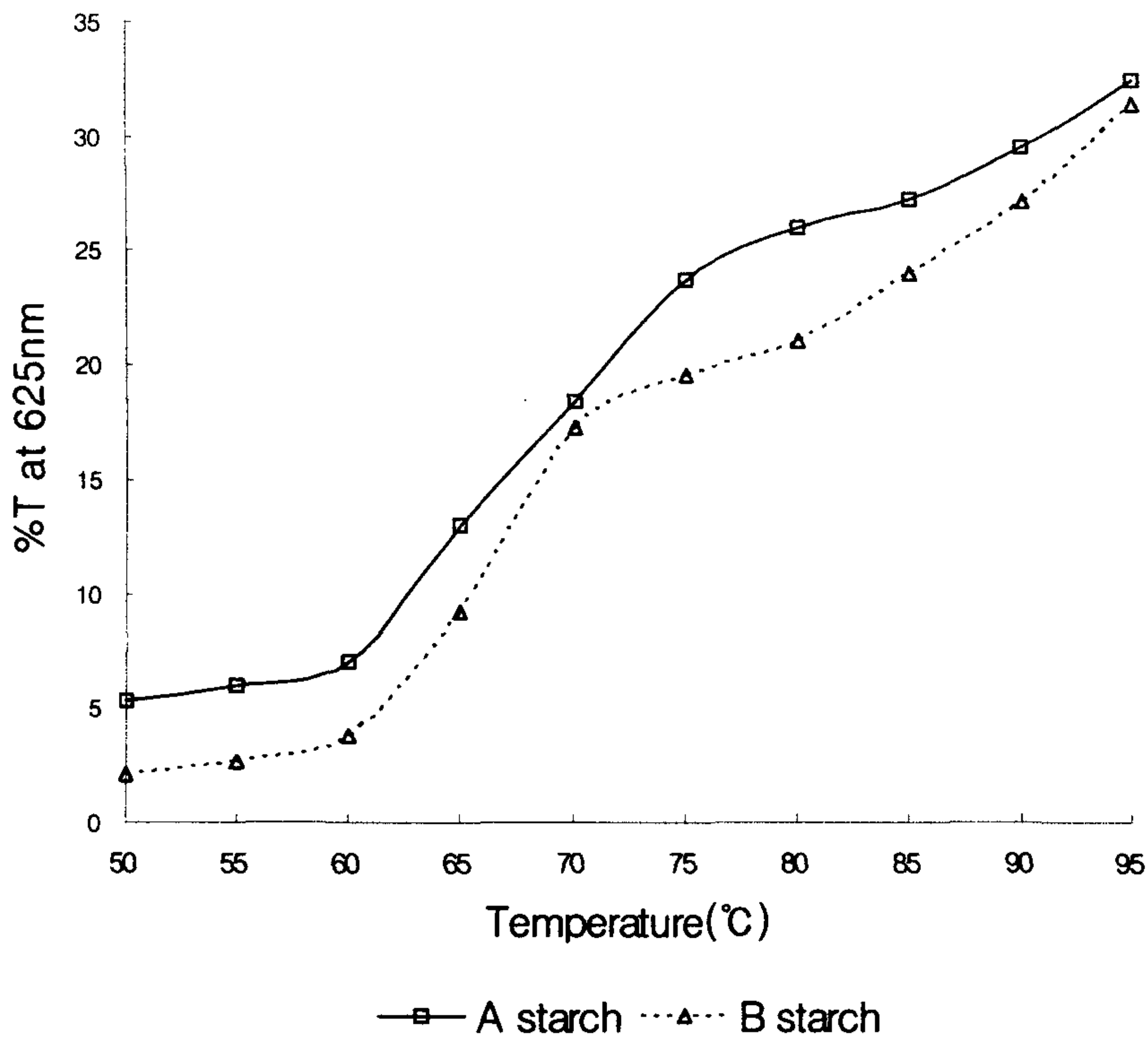


Fig. C-7. Changes in transmittance of chestnut starch at various temperature.

### 3) Amylograph에 의한 호화

6.5% 밤전분의 아밀로그래프의 특성치는 Table C-3 및 Fig. C-8과 같다. 박피한 A전분의 초기 호화온도 68.1°C으로 나타났고, 박피하지 않은 B전분은 68.6°C로 B전분의 초기 호화온도가 약간 높게 나타났다. A전분은 최고점도 1113 BU, 50°C에서는 1245 BU, B전분은 최고점도 786 BU, 50°C에서는 614 BU 각각 나타나 A전분의 점도가 더 높았다. 초기 호화개시온도는 아밀로오스 함량 및 무정형부분에서의 분자간의 회합정도 등에 영향을 받으며 전분입자 내의 내부구조가 치밀할수록 가열시 느리게 팽윤되어 높은 호화온도를 나타낸다고 하였는데(28), 본 실험의 경우는 박피하지 않은 밤전분인 B전분이 호화개시온도가 더 높고 전체적으로 점도가 낮았는데 이는 밤껍질에 함유된 탄닌성분에 의하여 호화가 억제되었기 때문이라고 생각된다. Hitomi 등(29)은 탄닌을 0.25~0.50% 첨가하였을 때 탄닌의 증가에 의하여 전분의 팽화가 억제되었다고 하였으며 첨가된 탄닌함량에 비례한다고 하였다. 한편 최고점도와 95°C에서 30분 유지시켰을 때와의 점도 차이인 breakdown은 A전분은 403, B전분은 386로 나타났는데 이는 8% 도토리 전분 100, 8% 동부전분 120(30)에 비하여 훨씬 높은 것으로 이들 전분에 비하여 팽윤된 전분입자가 열이나 전단에 매우 약한 것으로 나타났으며, A전분이 전분이 B전분 보다 더 약함을 알 수 있다. 노화의 특성을 나타내는 setback은 A전분은 528, B전분은 209 로 각각 나타나 A전분이 박피하지 않은 B전분 보다 노화가 더 잘 되는 것으로 나타났다. 따라서 박피하지 않고 제조한 전분은 박피하여 제조한 전분 보다 점도가 더 낮고 노화는 느리게 진행된다고 할 수 있다

Table C-3. Brabender amylogram data of chestnut starch

Starch	Initial pasting temp.(°C)	Peak viscosity (B.U.) P	Viscosity at 95°C	Viscosity after 30 min at 95°C H	Viscosity at 50°C (B.U.) C	Breakdown (P-H)	Setback (C-H)
A	68.1	1113	1034	708	1245	403	528
B	68.6	786	604	400	614	386	209

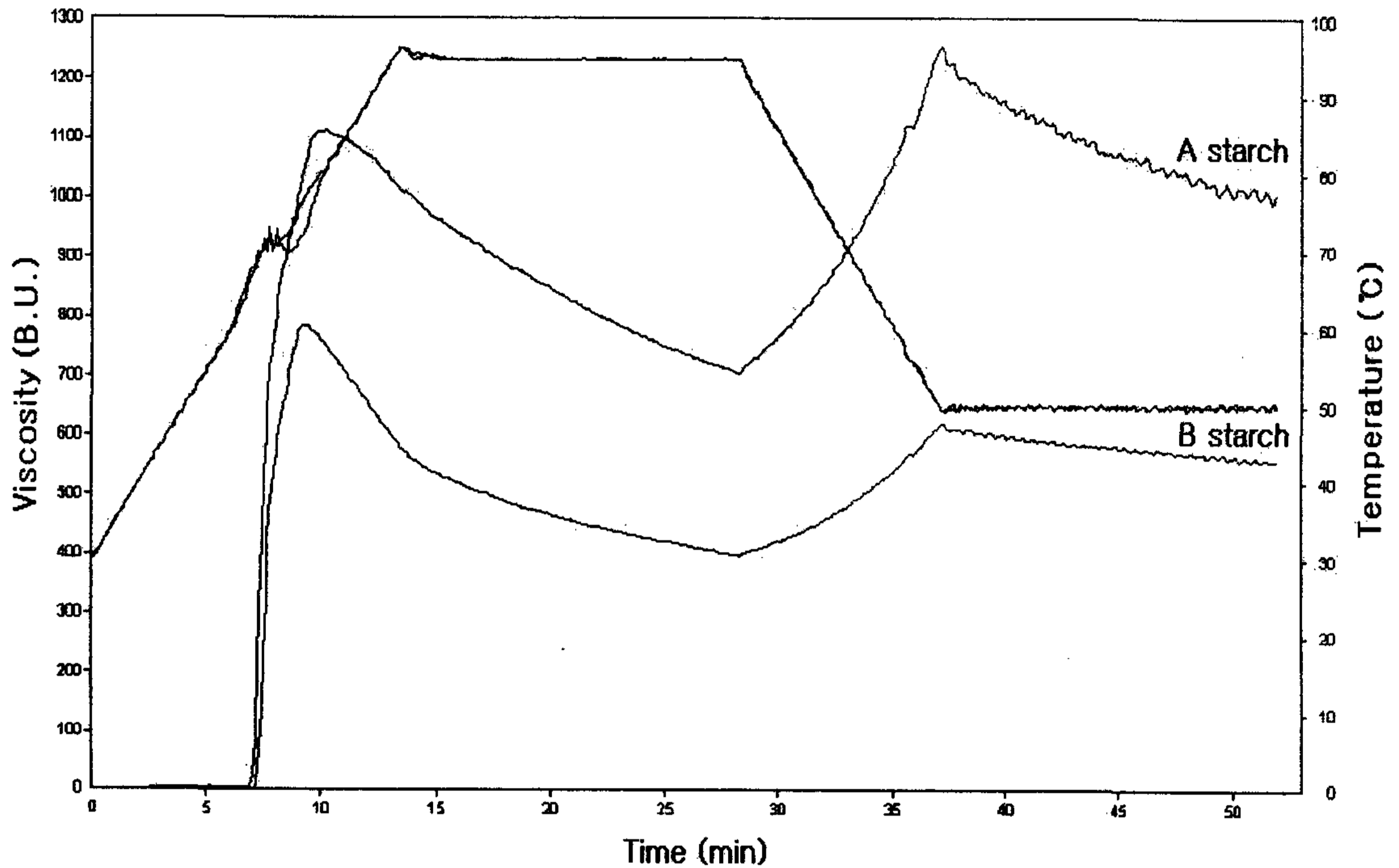


Fig. C-8. Brabender amylogram curve of chestnut starch.

#### 다. 밤전분의 알칼리에 의한 호화특성

##### 1) NaOH에 의한 점도 변화

밤전분 6% 현탁액을 0.15N NaOH용액 농도로 실온에서 45분간 알칼리 호화시키면서 점도의 변화를 측정된 결과는 Fig. 9와 같다. A전분은 20분 까지 점도가 급속하게 증가하다가 35분 이후 거의 변화가 없었고, B전분은 점진적으로 증가하였다. Choi 등(31)에 의하면 알칼리에 의한 호화는 OH기가 전분분자 사이로 들어가 결정부분을 무정형부분으로 변화시키므로 결정부분이 많거나 결합이 강할 경우 더 높은 농도의 알칼리가 필요하다고 하였다. 일반 고구마의 경우 0.17 N NaOH 용액에서 급격한 점도의 변화를 나타냈다고 하였고, 자색고구마의 경우(32) 0.21 N NaOH 용액에서 급격한 점도의 변화가 나타났고 0.17 N NaOH 용액에서는 거의 변화가 없었다고 하였는데 박피한 밤전분은 0.15 N NaOH 용액에서도 급격한 점도 변화를 나타냈다.

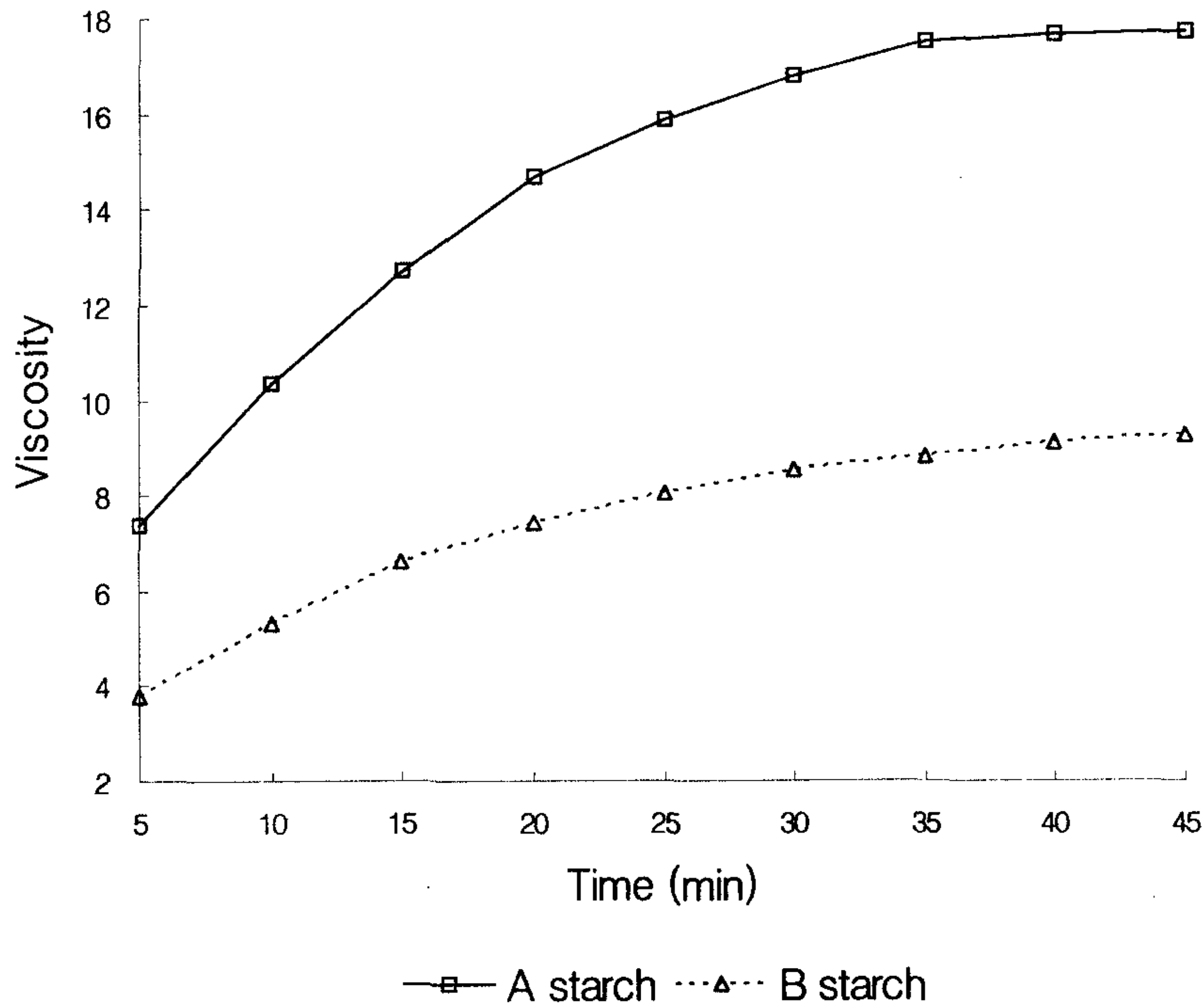


Fig. C-9. Changes in viscosity of chestnut starch at 0.15 N of sodium hydroxide.

## 2) KCN에 의한 호화 특성

전분 0.3 g을 1.6-4.0 M KSCN용액 50 mL로 처리한 다음 25°C에서 24시간 방치한 후 gel의 부피를 측정한 결과는 Fig. 10과 같다. A전분은 1.0 M에서 1.5 M까지 gel의 부피가 급격하게 증가하다가 2.0 M 이상의 농도에서 감소되는 특성을 보였고, B전분은 2.5 M까지 점진적으로 증가하다가 2.5 M이상의 농도에서 감소되었으며, gel 부피는 A전분 보다 적었다. KSCN에 의한 전분의 gel화 현상은 알칼리에 의하여 아밀로오스가 전분분자 밖으로 용출되어 일어나고 아밀로펙틴도 전분의 gel 형성에 관여한다고 하였다. A전분 보다 B전분의 알칼리에 의한 gel 부피가 적은 것은 Table C-1의 요오드 반응에서와 같이 아밀로오스 용출이 억제되기 때문으로 생각된다

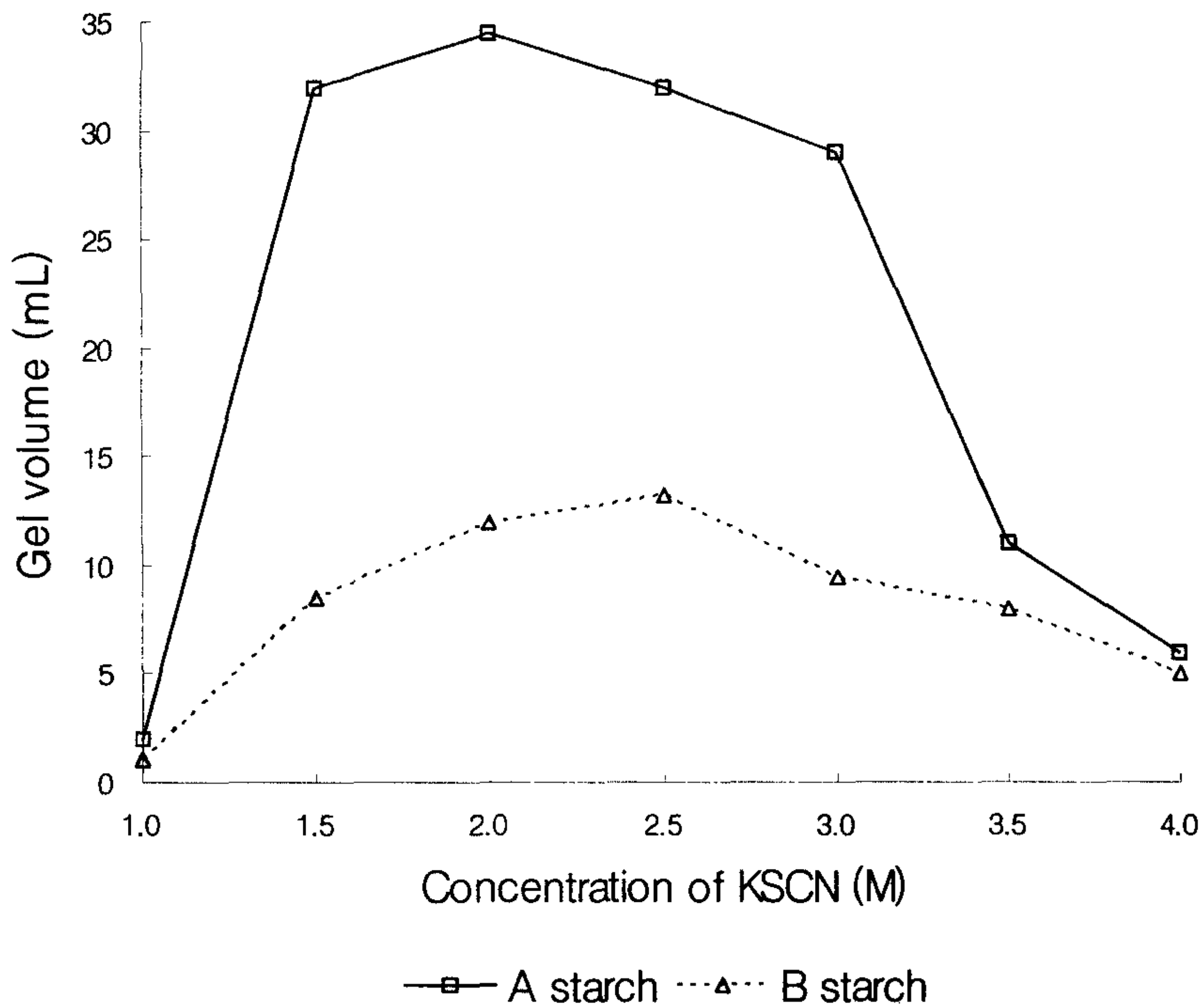


Fig. C-10. Changes in gel volume of chestnut starch at various KSCN concentration.

### 3) NaOH에 의한 광투과도의 변화

0.11 N NaOH 용액에서 0.2% 밤전분의 광투과도의 변화는 Fig. C-11과 같다. A전분은 1분째 부터 점점 광투과도가 증가하기 시작하여 20분째 부터 급격하게 증가한 반면, B전분은 1분째 부터 점진적으로 증가하였고 A전분에 비하여 광투과도는 낮게 나타났다. Choi(31) 등은 자색 고구마 전분의 경우 알칼리의 농도가 높을 수록 광투과도가 증가하였으며, 0.15 N 이하의 낮은 알칼리 농도에서는 변화가 극히 적었다고 하였는데 박피한 밤전분은 0.11 N 에서도 높은 광투과의 변화를 나타냈다.

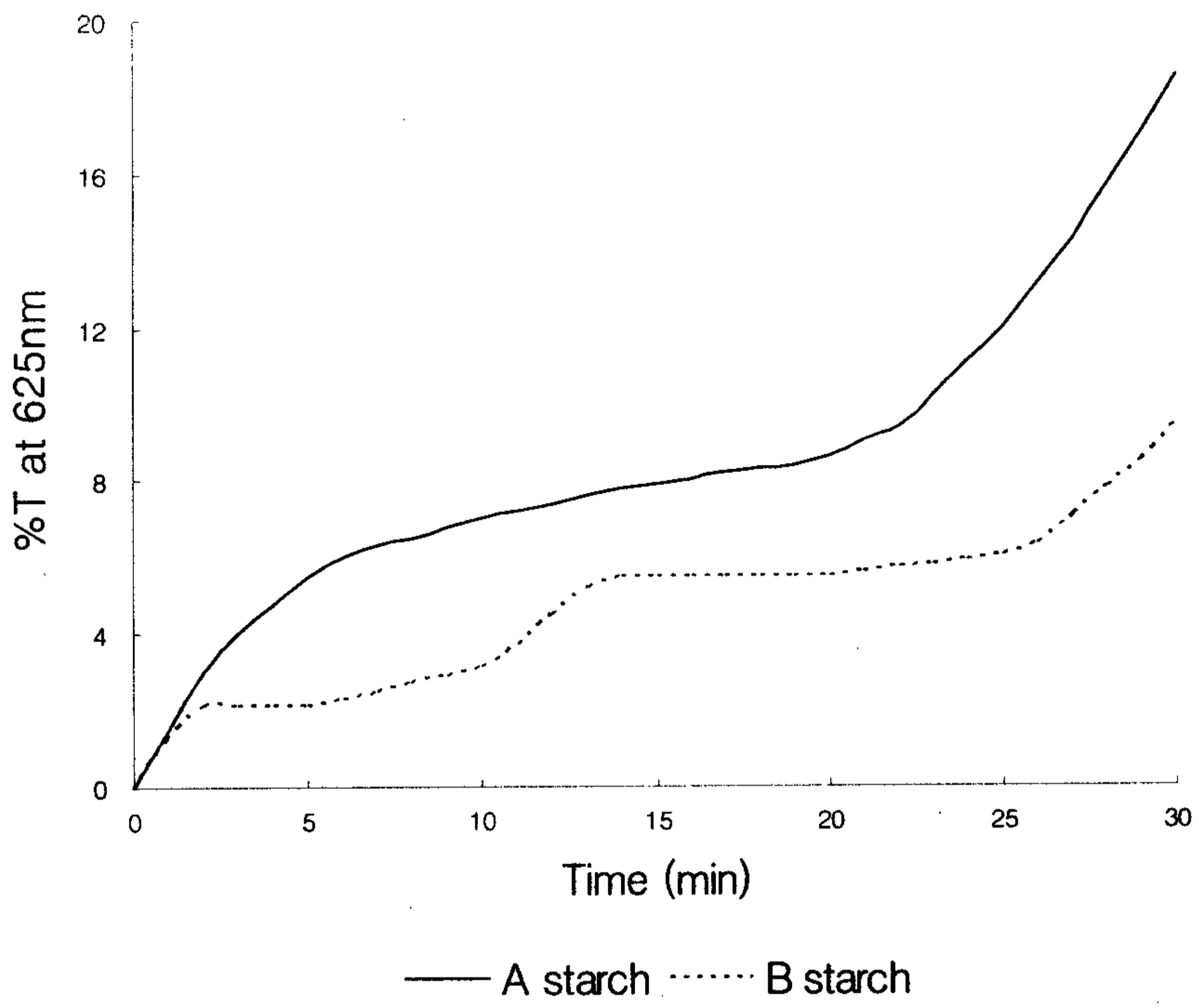


Fig. C-11. Changes in transmittance of chestnut starch at 0.11 N of sodium hydroxide.



## 참 고 문 헌

1. 손철호, 석현덕, 민경택. 2003. 국내 밤산업의 동향과 전망, 농촌경제연구소, 77-79.
2. Kim JS, Jung BH, Joo RW, Choi SI. 2004. Marketing of chestnut and economic analysis of chestnut cultivation. *Korean J of Forest Economics* 12: 12-21.
3. FAOSTAT, [Http://apps.fao.org](http://apps.fao.org)
4. Kim JH, Park JB, Choi CH. 1997. Development of chestnut peeling system. Annual meeting of The Biosystems Eng 150-154.
5. Kim SK, Jeon YJ, Kim YT, Lee Bj, Kang OJ. 1995. Physicochemical and texture properties of chestnut starches. *J Korean Soc. Food Nutr* 24: 594-600.
6. Park IS, Kim SK, Kim CS. 1982. Physicochemical properties of chestnut starch. *J Korean Agricultural Chemical Society* 25: 218-223.
7. Park HH, Kim SK, Pyun YR, Lee SY. 1989. Rheological properties of chestnut starch solution. *Korean J Food Sci Technol* 21(6): 815-819.
8. Choo NY, Ahn SY. 1995. Properties of chestnut starch and it's gel. *Korean J Food Sci Technol* 27: 1017-1027.
9. Park. YH, Kim SK, Lee SY, Kim JB. 1984. Rheological properties of gelatinized chestnut starch solution. *Korean J Food Sci. Technol* 16: 314-318.
10. Park HH, Lee KH, Kim SK. 1986. Effect of heat-moisture treatments on physico-chemical properties of chestnut starch. *Korean J Food Sci. Technol* 18: 437-442.
11. Yamamoto K, Sawada S, Onogaki T. 1973. Properties of rice starch prepared by alkali method with various conditions. *J Jpn Soc Starch Sci* 20: 99-104.
12. Medcalf DF, Gilles KA. 1965. Wheat starches, I. comparison of physicochemical properties. *Cereal Chem* 42: 558-568.

13. Schoch TJ. 1964. Swelling power and solubility of granular starches. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Whistler, Academic Press, New York. vol 4, p106–108.
14. Gilbert GA, Spragg SP. 1964. Iodimetric determination of amylose. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Whistler, Academic Press, New York. vol 4, p168–169.
15. Nara S, Mori A, Komiya T. 1978. Study on relative crystallinity of moist potato starch. *Starch* 30: 111–114.
16. Donovan, JW. 1979. Phase transitions of the starch–water system. *Biopolymer* 18: 263–267.
17. Wilson LA, Birmingham VA, Moon DP, Snyder HE. 1978. Isolation and characterization of starch from mature soybean. *Cereal Chem.* 55: 661–670.
18. Maher, G.G. 1983. Alkali gelatinization of starches, *Starch.* 35: 226–230.
19. Kim SK, Chung HM, Cho MH. 1984. Alkali gelatinization of rice, arrow root and ginger root starches, *Agric Chem Biotechnol.* 27: 214–216.
20. Lindqvist, I. 1979. Cold gelatinization of starch, *Starch*, 31, 195–200.
21. Higo A, Shmazaki M, Noguchi S. 1982. Hardening of food texture induced by microwave irradiation (part 6): Formation of starch–fatty acid methyl ester complexes. *J of Home Economics Jpn* 33: 297–303.
22. Cura JA, Krisman CR. 1990. Cereal grains: A study of their  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,6 glucopolysaccharide composition. *Starch* 42: 171–176.
23. Seo Ks, Hab PJ, Lee SJ. 1974. Studies on the processing of chestnut. *Korean J food sci technol.* 6: 98–108.
24. Lee HS, Rhee HS. 1990. Physicochemical properties of acorn and chestnut starches. *Korean J Soc Food Sci* 6: 1–7.
25. Takeda C, Takeda Y, Hizukuri S. 1987. Structure and properties of chestnut starch *J. jpn Soc. Starch Sci* 34: 31–37.
26. Kuge T, Kitamura S. 1985. Annealing of starch granules; Warm water

- treatment and heat-moisture treatment. *J Jpn Soc Starch Sci* 32: 65-83.
27. Ishida N, Kobayashi T, Kainuma K. 1988. Studies on the physical state of water in starch gel. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 35: 98-104.
28. Lee SK, Shin MS. 1991. Characteristics of defatted and lipid-reintroduced sweet potato starches. *Korean J Food Sci Technol* 23: 341-348.
29. Hitomi S, Yoshimi O, Taketoshi K. 1988. Effect of powdered green tea on qualities of bread. *Journal of cookery science of Japan* 21: 43-47.
30. Kweon MR. 1992. Molecular structure and gel properties of legume starches. *PhD Thesis*. Seoul National University.
31. Choi CR, Kim JO, Lee SK, Shin MS. 1995. Physicochemical properties of defatted high amylose corn starch. *Agric Chem Biotechnol* 38: 402-407.
32. Choi CR, Rhim JW, Park YK. 2000. Physicochemical properties of purple-fleshed sweet potato starch. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1-5.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구 목표		달성도	관련분야에 기여도
1. 밤술의 양조학적 특성 규명	미생물학적 특성	100%	밤 전분의 당화도를 높여 생성향상에 기여함.
	산패 원인분석과 해결법	100%	술 생산에 기본이 되는 주 모제조법을 확립하여 밤술의 안정적으로 생산 함.
	양조학적 특성	100%	1, 2단 담금시 효소 및 koji 처리법을 확립함.
	보당제 선택	100%	밤술의 부원료인 쌀과 옥분에 대한 양조학적 실험으로 술 제조이용
	제성법, 저장성 및 기호도	100%	여과법은 냉동여과법, 살균 방법은 가열살균법을 술 제성에 이용.
2. 밤의 성분분석 및 유용성분 탐색	밤의 성분분석	100%	성분분석을 밤 가공 산업의 기초자료로 이용
	기능성물질의 추출 및 분리정제	100%	밤에 함유된 항균성과 항산화성을 밤과 가공제품의 홍보자료로 이용
	전분의 특성과 호화특성	100%	밤전분을 이용한 식품가공의 기초자료로 이용

## 제 5 장 연구개발과 활용계획

본 연구는 밤을 원료로 하여 발효법에 의한 고품질의 밤술의 품질을 개선함으로써 지역특산물의 부가가치 증대 및 농산자원의 가공에 의한 효율적인 이용 측면에서 큰 의의를 가지며 밤을 이용한 전분식품의 가공에 활용자료로 이용될 수 있다.

연구 결과로 밤술 품질개선에 관한 활용방안은 다음과 같다.

1. 밤술 제조를 위한 양조학적 특성이 우수한 미생물을 분리하고 이들을 이용하여 밤술의 수율, 산패 및 기호도를 개선하여 우수한 밤술을 제조하고자 함.
2. 밤술 제조에 액화와 당화력이 우수한 분리균주에 의한 술의 제법 및 각종 시판 효소를 이용한 적정 담금 조건을 확립하여 수율과 맛이 우수한 밤술을 제조할 수 있어 산업체에서 직접 활용할 수 있을 것으로 기대됨.
3. 밤술 제조를 위한 주모제법을 확립함으로써 안정적인 밤술 제조를 할 수 있고, 밤에 부족한 당류를 곡류로 대체하기 위해 쌀을 보당제로 사용할 수 있도록 제법을 개발하여 양조에서 이용함으로써 쌀 소비촉진에 기여 할 수 있음.
4. 밤에 함유된 항균성과 항산화성을 규명함으로써 이들을 밤 제품의 홍보에 이용할 수 있음.
5. 밤 전분에 대한 실험으로 밤 전분을 이용한 가공제품 기초자료로 중요한 자료로 이용.
6. 밤은 등외품의 이용이 용이하지 않은데 본 연구는 이들을 이용할 수 있어 등외품을 이용함으로써 농민에게 도움이 될 것임.

## 제 6 장 개발과정에 수집한 해외과학기술 정보

일본의 庸縣市島町中竹田에 있는 (株)西山醸造場兵에서 “栗, Maroon liqueur”이란 상표로 밤술을 시판하고 있는데 그 지역에서는 소비자에게 상당히 좋은 반응을 보이고 있다.

일본의 “栗”주 제법은 밤, 매실 및 설탕을 혼합하여 1차 발효시킨 후에 주정을 첨가하여 주정도 14%의 liqueur를 생산하고 있다.

일본의 “栗”주와 같은 형태의 침출주는 우리의 주세법상 제조는 현재 불가능하지만 앞으로 허가에 대비하여 제품개발이 필요 할 것으로 생각되어 진다.

## 제 7 장 참고문헌

-각 절마다 뒷부분에 수록되어 있음-