

산약으로부터 혈류개선 소재 개발 및 이를
이용한 가공제품개발

Development of processing products and functional
components on blood stream improvement effect
from *Dioscorea batatas*

연구기관
한국식품연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “산약으로부터 혈류개선 소재 개발 및 이를 이용한 가공제품개발”
과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 이 명 기

연 구 원 : 김 병 목

연 구 원 : 김 동 수

연 구 원 : 김 영 명

연 구 원 : 이 영 철

연 구 원 : 도 정 룡

연 구 원 : 조 승 목

연 구 원 : 조 용 선

위 축 연 구 원 : 김 수 경

위 축 연 구 원 : 양 혜 정

위 축 연 구 원 : 김 유 리

위탁연구기관명 : 성균관대학교

위탁연구책임자 : 박 영 민

연 구 원 : 김 영 구

연 구 원 : 강 나 나

요 약 문

I. 제목

산약으로부터 혈류개선 소재 개발 및 이를 이용한 가공제품개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적 및 필요성

분말 및 단순가공제품에 주력하고 있는 산약에 대한 활용을 높이기 위해, 효소가 수분해 및 발효 등의 방법으로 분류하여 혈류개선 효과의 기능성이 부가된 고부가 가치 혈류개선 소재를 개발하여 이를 이용한 다양한 혈류개선 기능성 산약 가공제품을 개발하여 산약에 대한 섭취 및 소비를 증가시키고자 한다. 산약의 기능성 소재를 탐색하기 위하여 산약 및 산약발효물의 추출, 정제 등의 과정을 거쳐 이들 분획물의 혈류개선 등의 기능성을 탐색하고, 활성 분획의 분리를 통하여 기능성 물질에 대한 조사를 시행하고자 한다. 또한 제품개발은 *in-vitro* 및 *in-vivo* 조사에서 입증되었던 기능성 소재를 원료로 하여 보관기능이 편리하도록 한 장기 유통형 제품과 액상형 및 gel형으로 probiotics 기능을 겸비한 식사대용 즉석 편이식인 단기 유통형 제품으로 나누어 제조하여 산약에 대한 가공제품 개발 및 소비촉진을 도모하고자 한다.

마과의 덩굴성 다년생 식물인 산약(*Dioscorea batatas*)은 산약과 초원에 나는 덩굴 식물로 자(♀) 웅(♂) 이주식물로써 자연배(自然胚)가 이루어져 다양한 유전변이가 일어나며, 마속 식물은 약 600여종으로 보고되어있다.

현재 산약은 국내에서 생산량의 80% 이상을 차지하는 경상도 지역의 새로운 소득 작물로 기대되며, 산약 고유의 품질특성, 기호성, 균일성, 저장안전성 등 다양한 원료 특성을 포함한 주요 상품화 요소기술에 대한 집중적 연구를 필요로 한다.

산약은 혈전감소, 혈압정상화, 학습능력증진, 혈당저하, 정력강화, 자양강장 등의 탁월한 효과가 있어 대단히 유용한 생약제로 알려져 있고, 중국의 “신농본초경”에는

몸에 가장 좋다는 상품(上品)약 가운데 산약이 들어 있으며, 오래된 산약은 산삼과 버금갈 정도의 효능이 있다고 전해진다.

따라서 현재까지 알려진 산약의 여러 약효는 물론 새로운 생리적 기능을 과학적으로 구명함으로써 산약의 식품학적 우수성을 입증함과 함께 이를 이용한 고부가가치 식품소재 및 가공 식품을 개발하는 것은 학문적, 기술적 측면 뿐 아니라 경제적 면에서 그 의의가 매우 클 것이다.

가. 기술적 측면

산약을 이용한 식품으로는 우리나라에서 한약재로 이용될 때, 굽거나 찌서 먹고, 생으로 갈아 먹었으며, 강판에 갈아서 계란의 노른자와 곁들여 요리나 과자의 재료로 사용되고, 산약을 알맞은 크기로 잘라 기름에 튀긴 후 물엿을 입혀 먹었으며, 최근 미국 등지에서는 마의 전분을 이용한 칼로리 공급원이나 건강식품으로 이용하고 있는 실정이다. 즉, 혈류개선효과가 있는 유효성분을 함유한 산약의 고부가가치성을 밝히고 이를 유효성분으로 하는 식품소재를 개발하는 것이 필요할 것으로 판단된다.

다양한 유용성분을 함유한 산약에서 수용성 식이섬유의 일종인 glucomannan과, 당단백질의 일종인 mucin, 비타민의 일종인 choline, 아미노산의 일종인 arginine 등은 혈중 콜레스테롤 저하 및 생리활성 기능이 있는 것으로 잘 알려져 있으나, 이들의 과학적인 입증은 밝히는 연구에 대해서는 아직 미미한 실정이다.

따라서 마의 유효성분을 규명하여 산약의 기능적 우수성을 밝히고 나아가 가공기술을 접목한 새로운 가공식품을 개발함과 아울러 산약의 유효성분을 이용한 기능성식품 개발로 우수식품자원의 효과적인 활용 및 고부가가치화 기술 기반확립이 요구된다.

나. 경제·산업적 측면

산약은 중·남부를 비롯하여 도서지방에도 분포하고 참마와 왕마는 북부지방까지도 자라서 전국 어디서나 재배는 가능하지만 생육기간이 길수록 그리고 장일 보다는 단일에서 뿌리의 비대가 잘 된다.

지난해 전국 연간 산약 생산량은 4311 ton으로 이중 절반 가까이가 안동에서 생산되었다. 재배면적만으로 볼 때는 전국의 70%를 넘는다. 재배농민들은 지난해 10 a (1,000 m²)당 평균 370만원의 소득을 올렸으며, 현재 24개 작목반 920가구의 농가에서 마를 재배하고 있고, 수확된 산약은 세척·절단 등 1차 가공 뒤 판매되고 있다.

산약의 효능이 외국에도 알려지면서 가공제품 형태로 수출이 많이 되고 있으며, 특히 안동 북후 농협 산약가공공장에서 지난해 차와 은행마죽 등 50여 종류의 마 가공제품 33만 6000여 달러 상당을 미국, 동남아 등지로 수출했다. 또 국내시장에도 50억 원어치를 판매하는 등 마를 지역 특산물로 지정하고 품종개발과 가공제품개발에 주력해 왔다.

이처럼 마의 경제적 가치도 점점 높아지고 있어 새로운 소득 작물로 매우 기대되는 품목이다. 따라서 본 연구 결과 산약의 새로운 가능성을 밝히고 효과적 이용을 위한 신기술이 개발되면 고부가가치화에 따른 농민 및 생산자 단체의 소득증진과 지역경제 활성화에 기여함은 물론 해외수출증대에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 국내·외 기술개발 현황

가. 국내 현황

산약은 마과의 덩굴성 다년생 초본으로 여러 지역의 산지에 자생하며, 학명은 *Discorea batatas* 이다. 국내외 연구 및 기술은 대부분 밭에서 재배하는 품종을 대상으로 이루어져 왔고, 산약의 기능적 연구는 미비한 실정이다. 산약의 성분으로 수용성식이섬유의 일종인 글루코만난, 뮤신, 아르기닌 및 비타민류인 콜린 등이 함유되어 있어 혈중 혈행 저하 및 생리활성 기능이 있으나, 이들의 기능 특성에 대한 과학적 연구는 아직 미미한 실정이므로 산약의 생리학적 및 다양한 기능적 우수성을 밝히는 연구가 절실한 실정이다. 산약은 동의보감, 본초경, 향약집성방, 명의별록, 급유방 등의 한방서에서 기력증진, 기억력 증진, 혈전제거효과, 자양강장효과 등의 작용이 있는 것으로 보고되었다. 그러나, 산약에 관한 연구는 아미노산과 지방산의 성분분석, 전분의 이화학적 특성 등이 보고되어있으나, 수용성식이섬유의 일종인 *glucomannan*과 콜린, 뮤신, 아르기닌 등의 혈행 저하 작용에 관한 생리 기능적 특성 연구가 미흡한 실정이므로 산약에 관한 연구 지원이 중요하다 하겠다.

따라서 본 연구에서는 활성물질을 분리하여 그 구조와 기능의 상관관계를 밝히는 것이 필요할 것으로 사료된다. 산약의 기능적 유효성분의 추출조건과 생리활성 효과, 가공식품의 제조조건에 대한 연구는 미흡하나 인삼, 더덕, 도라지 등 국내 농·임산물의 추출방법과 가공방법 등을 참고로 할 경우, 산약에서 유효성분을 효과적으로 추출할 수 있을 것으로 기대되며, 유효성분의 증량과 기호도를 고려한 *formulation*을 검토

한다면 본 연구를 성공적으로 수행할 수 있을 것으로 생각된다.

나. 국외 현황

국외에서 마를 이용한 소재로 일본에서는 산약틀 강판에 갈아서 계란의 노른자와 약간의 간장을 곁들여 먹으며 일본요리나 과자의 재료로 사용하고, 중국에서는 알맞은 크기로 잘라 기름으로 튀겨서 물엿을 입혀 먹기도 한다.

서부 아프리카에서는 식용산약이 주요한 탄수화물 급원이며, 특히 Nigeria 에서는 뜨거운 stew 형태로 제공되는 진미식품으로 알려져 있다. 최근 미국 등지에서는 참마 전분을 이용하여 소화율이 높은 칼로리 공급원 또는 건강식품으로서 어린이나 병약자를 위한 제빵, 비스킷, 소스, 스프 등의 원료로 쓰이고 있다.

즉, 산약의 혈행 개선효과 등의 혈류개선작용이 있음에도 불구하고 단순가공제품으로 생산되고 있으며 산약의 유효성분을 잘 활용한 기능성 식품으로의 활용방안에 대한 연구가 이루어진다면 고부가가치의 제품을 개발할 수 있고 새로운 소득원으로 자리 잡으리라 기대하고 있다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 산약의 기능성 식품 소재화 연구

- 1) 기능성물질 추출 분리작업 전단계 및 혈류개선 특성 조사
 - (1) 가공공정개선 및 기능성물질의 추출을 위한 전처리조건 조사
 - (2) 기능성물질선정을 위한 효소가수분해물의 일반성분 및 혈류개선효과 조사

- 2) 혈류개선효과가 있는 기능성물질의 분리정제 및 소재의 안정화 검토
 - (1) 효소가수 분해물로부터 기능성물질의 분리정제
 - (2) 기능성식품소재의 안정화

- 3) 혈류개선효과가 있는 기능성식품소재의 저장안정성 확인 및 품질개선
 - (1) 기능성식품소재개발과 품질개선
 - (2) 개발제품의 저장안정성 확인

- (3) 기능성식품소재 개발을 위한 가공공정의 확립
- (4) 경제성분석 및 산업화 연구

2. 산약발효물의 기능성 식품 소재화 연구

- 1) 산약발효물의 분리작업 전단계 및 혈류개선 특성 조사
 - (1) 기능성물질의 분리를 위한 발효조건 조사
 - (2) 기능성물질선정을 위한 발효산물의 일반성분 및 혈류개선효과 조사

- 2) 산약발효물로부터 기능성물질의 분리정제 및 소재의 안정화 검토
 - (1) 발효산물로부터 기능성물질의 분리정제
 - (2) 기능성식품소재의 안정화

- 3) 고부가가치 상품개발을 위한 산약발효물의 안정성 및 품질개선
 - (1) 기능성식품소재개발과 품질개선
 - (2) 개발제품의 저장안정성 확인
 - (3) 기능성식품소재 개발을 위한 가공공정의 확립
 - (4) 경제성분석 및 산업화 연구

3. 산약원료 및 기능성물질의 혈류개선효과 (*In vivo test*)

- 1) 제조공정 및 분획물에서 선별된 물질의 혈류개선효과
 - 제조공정 및 분획물에서 콜레스테롤억제효과

- 2) 각 공정별로 분리정제된 기능성물질의 혈류개선효과
 - 각 공정별로 분리정제된 기능성물질의 콜레스테롤억제효과

- 3) 최종개발제품의 혈류개선효과
 - 최종개발제품의 콜레스테롤억제효과

IV. 연구 개발 결과

1. 산약의 기능성 소재의 혈류개선효과 연구

산약의 기능성 증진 및 이를 바탕으로 한 소재를 개발하기 위하여 탄수화물, 단백질 분해효소를 이용하여 최적 효소분해 농도, 온도 및 시간을 탐색하였다. 그 결과 효소마다 차이는 있었지만 주로 1% 농도에서 60℃, 90분 반응시간일 때 각종 수율 및 *in-vitro*상에서 혈류개선 효과가 우수하였고, 특히 8종의 가수분해 효소 중 단백질 분해효소인 newtrase와 protamex 분해물의 효과가 우수하였다. 효소분해물을 이용하여 동물실험을 실시한 결과, protamex 분해물의 혈중 콜레스테롤 저하 효과가 높아 이를 이용하여 혈류개선에 효과가 있는 분획물을 분리하였다. Hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 및 ethanol을 이용하여 용매분획을 실시, HMG-CoA reductase inhibition과 bile acid binding capacity를 측정한 결과 ethylacetate 분획과 ethanol 분획물에서 효과가 높았으며, 이들을 동물실험하여 최종적으로 ethanol 분획물을 선정하였다. Ethanol 분획물을 이용하여 한외여과를 실시한 결과, 30,000 dalton 이하의 크기에서 HMG-CoA reductase inhibition 및 bile acid binding capacity가 우수하였으며, gel filtration을 통한 최종적인 분자량 확인 결과 29,000 dalton과 16,000 dalton 이하의 물질인 것으로 확인되었다.

2. 산약 젖산 발효물을 이용한 기능성 소재의 혈류개선효과 연구

33종의 산약 젖산균을 이용하여 발효시킨 산약 발효물의 *in-vitro* 혈류개선 효과를 측정한 결과, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus faecalis* var. *liquefaciens*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* 를 이용한 5개의 발효물이 효과가 우수하였다. 이를 동물실험을 진행하여 혈중 콜레스테롤 제어 효과가 우수한 발효물로 *Lactobacillus acidophilus* 발효물을 선정하였다. 발효물의 활성성분 분리를 위하여 용매분획을 실시한 결과, ethanol 분획물과 butanol 분획물에서 혈류개선 효과가 우수하였으며, 이를 다시 동물실험을 통하여 ethanol 분획물을 최종 선정하였다. Ethanol 분획물을 한외여과 방법을 이용하여 분리한 결과, 30,000~50,000 dalton 사이에서 혈류개선 효과가 우수하였으며 이를 다시 gel chromatography를 이용하여 분리한 결과 66,000 dalton 이하의 물질인 것으로 확인되었다.

3. 산약 기능성 소재의 가공식품 개발 연구

산약의 소비증진과 제품개발 확대를 위하여 다양한 종류의 가공제품을 개발하였다. 첫째로 장기간 보관기능이 편리한 장기유통형 혈류개선 산약제품으로 산약 효소분해물을 이용한 초콜릿과 산약 젓산 발효물을 이용한 양갱을 제조하였다. 초콜릿과 양갱의 원료는 산약 기능성 소재뿐만 아니라, 가공하지 않은 생산약, 분말 산약 및 증자과정을 거친 산약 등 다양한 종류의 산약을 이용할 수 있도록 그 제조방법을 원료별로 표준화 하였다. 둘째로 식사대용 편이식으로서 산약 발효물을 이용한 발효음료와 죽을 개발하였으며 이들 가공제품은 동물실험을 거쳐 고지방 식이와 동반으로 섭취하였을때도 일반식이 수준의 콜레스테롤 함량을 보였으며 관능평가를 통하여 기호도 또한 우수한 것으로 확인되었다.

V. 주요 연구실적 및 성과

1. 학회 논문 게재 : 총 1건

가. Myung-Ki Lee, *et al.* Inhibition of Browning and Preference Improvements of *Dioscorea batatas* through the Addition of Sugar Alcohols and Organic Acids. *J Food Sci Nutr.* 14: 220-2005 (2009)

2. 특허 출원 및 등록 : 총 8건

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2008	산약 발효주 및 그의 제조방법	이명기	대한민국	10-2008-0027294
2009	산약 발효물을 포함하는 혈류 개선용 조성물, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 건강기능 식품	이명기	대한민국	10-2009-1008563
	산약 효소 분해물을 포함하는 혈류 개선용 조성물, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 건강기능식품	이명기	대한민국	10-2009-0118564
2010	혈류 개선용 조성물, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 건강기능식품	이명기	대한민국	10-2010-0019350
	혈류 개선용 조성물, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 건강기능식품	이명기	대한민국	10-2010-0019351
	산약을 이용한 식품 조성물 및 이의 제조 방법	이명기	대한민국	10-2010-0054336
	산약 초콜릿 조성물 및 이의 제조 방법	이명기	대한민국	10-2010-0054337

3. 학회발표 : 총 9건

가. 이명기 외 4인: 산약 젖산발효물의 이화학적 특성 및 생리기능성. 2008. 한국식품과학회 학술대회. 광주

나. 이명기 외 5인: 산약 효소분해물이 고콜레스테롤 유발 Mouse의 혈중지질에 미치는 영향. 2008. 한국식품과학회 학술대회. 광주

다. 이명기 외 5인: 산약 젖산발효물이 고콜레스테롤 유발 Mouse의 혈중지질에 미치는 영향. 2008. 한국식품과학회 학술대회. 광주

- 라. 이명기 외 4인: 산약분말 제조시 갈변억제와 기호도에 미치는 당알코올류와 유기산의 영향. 2009. 미강식량화연구회. 순천향대학교
- 마. 이명기 외 3인: *Lactobacillus acidophilus*를 이용한 산약 젖산발효물의 혈류개선 효과. 2009. 한국식품과학회. 대전
- 바. 이명기 외 6인: 혈류개선소재로서 산약 젖산발효물의 기능성 및 유용물질의 분리. 2010. 한국식품과학회. 인천
- 사. 이명기 외 5인: 산약 효소 분해물의 혈류개선 물질 정제 및 분리 특성. 2010. 한국식품과학회. 인천
- 아. 이명기 외 5인: 혈류개선 물질 소재를 이용한 산약 젖산 발효 음료 개발 및 관능적 특성. 2010. 한국식품과학회. 인천
- 자. 이명기 외 5인: 혈류개선 물질 소재를 이용한 산약 주 개발 및 관능적 특성. 2010. 한국식품과학회. 인천

4. 기술이전 : 총 1건 (진행중)

- 기술이전 업체 : 북안동농협산약가공공장
- 기술이전 금액 : 무상

SUMMARY

I . Title of Research

Development of products using functional components and hematocele improvement effect from *Dioscorea batatas*

II . Objectives and Significance of Research

1. Objectives and significance of research

For the aims to broaden the utilization of *Dioscorea batatas*, this study developed enzyme hydrolysate and fermented product manufacturing methods, and performed separation and purification of elements that potentially have functional effects on improvement blood stream. Furthermore, we developed diversity processed food with these functional elements to increase the *Dioscorea batatas* consumption. Products development was performed with raw materials that having functionality evidenced by *in-vitro* and *in-vivo* experiments. As a long-term market circulation product which can preserved for a long period, *Dioscorea batatas* chocolate was developed, and as a short-term market circulation products which can be easily prepared for substitute meal and have a probiotic benefits, beverage, pottage, and sweet jelly were developed. These applications on processed food promote consumption and commercialization of *Dioscorea batatas*.

Dioscorea batatas, belongs to Dioscoreaceae family, is grown in mountain field and grassland which is hermaphrodites, has both male and female reproductive organs, proliferate themselves and occurring various heritable variations. Approximately, 600 species of Dioscoreaceae family have been reported.

More than 80% of *Dioscorea batatas* domestically produced in Gyeongsang province, and therefore advanced studies of unique quality properties, preference, uniformity, stable preservation of *Dioscorea batatas* are required for promoting as a new indigenous crop.

Dioscorea batatas is used in Asia as the herbal medicine, which is utilized after

processing such as uncooked or steamed-and-dried its periderm after peeling. There have been several reports of beneficial effects on anti-oxidative and glucose regulating, anti-cancer, obesity, immune-regulation, intestinal function, and lipid metabolism. *Sinnongbonchokyung*, Chinese medical book, says pharmacological effect of old *Dioscorea batatas* is placed after wild ginseng. Therefore, it seems to be a worthwhile subject to investigate biological functionality and nutritional superiority of *Dioscorea batatas* and develop high value food material as well as processed foods, in terms of academical, technical, and economical aspects.

A. Technical aspects

Dioscorea batatas is eaten raw, steamed and cooked, or grated *Dioscorea batatas* served with the yolk, fried and coated with syrup. Lately, its starch used as a energy source and healthy food in the US. Thus, it has become important to investigate particular active constituent for improving blood flow and develop a new food as a high valuable material.

Variety elements such as glucomannan, one of mucous polysaccharides, mucin, choline, arginine in *Dioscorea batatas* have been reported have various bioactive benefits include lowering blood cholesterol. However, few studies have been conducted to support these functional superiorities scientifically. Therefore, there are a lot of studies required to establish technology for increasing effective use of *Dioscorea batatas*.

B. Economic and industrial aspects

Dioscorea batatas grows over the central-south region, and some species even grows in north area in Korea. Almost 4,311 tons of *Dioscorea batatas* produced in last year(2008), and half of them are from Andong in Gyeongbuk province of Korea. In terms of producing area, it is over 70% of total area in Korea. Farmers make 3.7 million won per 10 a (1,000 m²) on average in last year, currently more than 920 farm households growing *Dioscorea* and sell after cleaning and cutting process.

Beneficial effects of *Dioscorea batatas* became known to the world, more than 50 kinds of processed products such as powder, tea, and soup, are exported to the US and

Southeast Asia, which worth of more than 336,000 dollars, through *Dioscorea* Processing Plant in Andong Nonghyup. As well as, record 5 billion won in domestic sales rewards for their effort of product development and improvement of species of *Dioscorea* as a regional specialty.

As above, economical value of *Dioscorea* is drastically rising that could revive local economy and increase export by effective utilization.

2. Current domestic and international technology

A. Preliminary research

a. Domestic preliminary research

Dioscorea batatas is a perennial herbaceous plant belonging to Dioscoreaceae family grown over the country mountain. Most studies on *Dioscorea batatas* are performed with variety cultivated in fields, and few studies on functional aspects found in the literature.

Some of main components contained in *Dioscorea batatas* include glucomannan, mucin, arginine, and choline, are known to effective for diabetes, pulmonary tuberculosis, disinfection, antidote, rheumatism. Scientific research, however, has not been sufficiently investigated.

Thus, we attempt to purify the active components and establish the functional effects of *Dioscorea batatas*. We expecting effective extraction of bioactive compounds based on advanced information on how to separate functional component from ginseng, ballon flower, and lanceolata.

b. International preliminary research

In Japanese cuisine, *Dioscorea* is eaten raw and grated, after only a relatively minimal preparation. The raw vegetable is starchy and bland, mucilaginous when grated, and may be eaten plain as a side dish, added to noodle, or using for confectionary source. In China, fried *Dioscorea* eaten coated with sweet syrup.

Dioscorea batatas is a main carbohydrate source for West African, particularly in Nigeria, it is a gourmet food served as hot stew. Recently in America, *Dioscorea* starch

is a good source of energy which is easily digest, and use as an ingredient in bread, biscuit, and soup, especially for children and the infirm.

As described, *Dioscorea batatas* is consumed as a simply process food, without a consideration of the functionality on blood flow improvement. So, more efforts needed to develop products that can maximize the health benefits of *Dioscorea batatas*.

III. Scope and Contents of Research

1. Blood stream improvement effects of isolated functional material using hydrolysis enzymes from *Dioscorea batatas*.
2. Blood stream improvement effects of isolated functional material using lactic acid bacteria from *Dioscorea batatas*.
3. Development of processed foods using *Dioscorea batatas* and their functional materials.

IV. Conclusion and recommendations

- 1. Blood stream improvement effects of isolated functional material using hydrolysis enzymes from *Dioscorea batatas*.**

To develop functional material from *Dioscorea batatas*, observed optimal concentration, temperature and time using 8 types of carbohydrate and protein hydrolysis enzyme. As a result, the optimal condition difference for 8 type of each enzyme, but mainly in the 1% of concentration, 60°C and 90 min of enzyme reaction condition, especially protein enzymatic hydrolysates (newtrase, protamex) showed the most blood stream improvement effects. The result of animal experiments using enzymatic hydrolysates, protamex hydrolyzate had the highest blood cholesterol-lowering effect. So we conducted solvent separation using protamex hydrolyzate. Hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and ethanol solvent fractionation carried out, and HMG-CoA reductase inhibition and bile acid binding capacity were measured. The ethylacetate fraction and ethanol fraction were higher their effects, through the animal experiments,

ethanol fraction was finally selected. The ultrafiltration of ethanol fraction, 30,000 dalton in size that HMG-CoA reductase inhibition and bile acid binding capacity were superior to, gel filtration through confirm the final result of molecular size less than 29,000 dalton and 16,000 dalton, respectively.

2. Blood stream improvement effects of isolated functional material using lactic acid bacteria from *Dioscorea batatas*.

Fermented *Dioscorea batatas* used by 33 species of lactic acid bacteria and observed improvement of in-vitro blood flow effects, fermentation materials of *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus faecalis* var. *liquefaciens*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* had a good activity of HMG-CoA reductase inhibition and bile acid binding capacity, respectively. And animal experiment, the effect of cholesterol control in the *Lactobacillus acidophilus* fermented material was excellent, therefore we selected. For Separation of the active components from fermented material, we enforced solvent fractionation. And ethanol and butanol fractions were the best improvement in the blood flow effect and animal experiments were selected for the final fraction of ethanol fraction. Ethanol fraction was separated by ultrafiltration method, 30,000~50,000 dalton was excellent for the improvement in the blood flow effect. The final step, separated by gel chromatography, and substance were found to be less than 66,000 dalton.

3. Development of processed foods using *Dioscorea batatas* and their functional materials.

For increase consumption promotion and expansion of processed food on *Dioscorea batatas*, we development various kinds of products. First, as a long-term storage capabilities in a convenient product, chocolate (using protamex hydrolysate) and sweet jelly (using lactic acid bacteria fermented material) prepared. The raw material of chocolate and jelly, can used not only functional components but the raw, powder and steamed *Dioscorea batatas* for take advantage of a wide variety of manufacturing methods and materials that were standardized basis. Second, for spread as a convenient

meals, prepared by fermented beverage and portage. Almost products had a good activity of control blood flow effect in the animal experiments. The serum cholesterol level showed similar with normal fat diet group. Although these products evaluated a good sensory properties.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	32
Chapter 2. Materials and Methods	35
1. Development powder processing of <i>Dioscorea batatas</i>	35
A. Materials	35
B. General ingredients analysis of <i>Dioscorea batatas</i>	35
C. Change of ingredients in <i>Dioscorea batatas</i> by dry procedure	37
D. Effect of additives for antibrowning and improvement of sensory properties	38
2. Determination optimal condition of functional components isolation from <i>Dioscorea batatas</i> hydrolysate	40
A. Manufacturing of <i>Dioscorea batatas</i> hydrolysate	40
B. Optimization for enzyme hydrolysis of <i>Dioscorea batatas</i>	40
3. Determination optimal condition of functional components isolation of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	43
A. Manufacturing of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	43
B. Preparation and optimization of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	43
4. Functional properties of enzyme hydrolysate and fermented product in selected optimum conditions	45
A. DPPH radical scavenging effect	45
B. Fibrinolytic effect	45
C. HMG-CoA reductase inhibition activity	46
D. Bile acid binding capacity	46
5. Purification of functional components and stabilization on blood stream improvement	

activity	49
A. Solvent fractionation of hydrolysate <i>Dioscorea batatas</i>	49
B. Solvent fractionation of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	50
C. Ultrafiltration of solvent fraction	50
D. Gel chromatography	52
E. <i>In-vitro</i> investigation of blood stream improvement activity	52
F. Quantitative analysis of carbohydrates from components	52
G. Quantitative analysis of protein from components	53
H. Quantitative analysis of lipid from components	53
I. Molecular weight observation of components	54
K. Stabilization of functional fractions	
6. Development of processed products using <i>Dioscorea batatas</i>	55
A. Manufacture of <i>Dioscorea batatas</i> wine	55
B. Development of long term storage products	57
1) Manufacture of <i>Dioscorea batatas</i> chocolate	57
2) Manufacture of <i>Dioscorea batatas</i> sweet jelly	62
C. Development of short term storage products	70
1) Manufacture of <i>Dioscorea batatas</i> fermented beverage	70
2) Manufacture of <i>Dioscorea batatas</i> pottage	76
D. Quality characteristics of products	81
E. Storage stability of processed products	
F. Research for application of developed functional food	83
7. <i>In-vivo</i> experimentation of blood stream improvement activity	84
A. <i>In-vivo</i> experimentation of hydrolysate and fermented <i>Dioscorea batatas</i>	84
B. <i>In-vivo</i> experimentation of functional fraction from <i>Dioscorea batatas</i>	85
C. <i>In-vivo</i> experimentation of processed products	86
D. Determination of blood stream improvement activity	87

Chapter 3. Results and Discussion	93
1. Development powder processing of <i>Dioscorea batatas</i>	93
A. General ingredients analysis of <i>Dioscorea batatas</i>	93
B. Change of ingredients in <i>Dioscorea batatas</i> by dry procedure	94
C. Effect of additives for antibrowning and improvement of sensory properties	96
2. Determination optimal condition of functional components isolation from <i>Dioscorea batatas</i> hydrolysate	100
A. Effect of temperature and type on hydrolytic enzyme	100
B. Effect of concentration and type on hydrolytic enzyme	103
C. Effect of time on hydrolytic enzyme	107
3. Determination optimal condition of functional components isolation of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	111
A. pH, titratable acidity, total bacteria and lactic acid bacteria of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	111
B. Sugar, glucose and reducing sugar content of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	112
4. Functional properties of enzyme hydrolysate and fermented product in selected optimum conditions	121
A. Fibrinolytic effect and HMG-CoA reductase inhibition effect of hydrolysate ..	121
B. Bile acid binding capacity of hydrolysate	123
C. Fibrinolytic effect of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	125
D. HMG-CoA reductase inhibition effect of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	126
E. Bile acid binding capacity of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	127
5. Purification of functional components and stabilization on blood stream improvement activity	131
A. Blood stream improvement activity of hydrolysate	131
B. Blood stream improvement activity of solvent fraction from hydrolysate	133

C. Blood stream improvement activity of fermented <i>Dioscorea batatas</i>	139
D. Blood stream improvement activity of solvent fraction from <i>Dioscorea batatas</i>	141
E. Blood stream improvement activity of ultrafiltration components	145
F. Quantitative analysis and blood stream improvement activity of gel chromatography components	145
G. Stabilization of functional fractions	
6. Development of processed products using <i>Dioscorea batatas</i>	176
A. Physicochemical properties of <i>Dioscorea batatas</i> wine addition with rice	176
B. Physicochemical properties of <i>Dioscorea batatas</i> wine addition with oriental herbs	179
C. Quality properties of chocolate	181
D. Quality properties of sweet jelly	184
E. Quality properties of fermented beverage	190
F. Quality properties of pottage	197
G. Storage stability of processed products	
H. Research for application of developed functional food	203
7. <i>In-vivo</i> experimentation of blood stream improvement activity	208
A. <i>In-vivo</i> experimentation of hydrolysate and fermented <i>Dioscorea batatas</i>	208
B. <i>In-vivo</i> experimentation of functional fraction from <i>Dioscorea batatas</i>	216
C. <i>In-vivo</i> experimentation of processed products	223
Chapter 4. Conclusion	238
Chapter 5. References	240

목 차

제출문
요약문
SUMMARY
CONTENTS
목 차

제 1 장 서론

제 2 장 재료 및 방법

1. 산약의 분말 제품화를 위한 조건 검토
가. 실험 재료
나. 산약의 일반성분분석
다. 건조방법에 따른 산약의 성분변화
라. 건조처리 산약의 갈변억제 및 기호도 향상을 위한 첨가제 영향 조사
2. 산약 효소 가수분해물의 기능성 물질 분리 조건 탐색
가. 효소 가수분해물 제조
나. 최적 효소 가수분해 조건 설정
3. 산약 발효물의 기능성 물질 분리 조건 탐색
가. 산약 젖산발효물 제조
나. 산약 발효물의 전처리 및 최적 발효 조건 설정
4. 선정된 조건에서의 산약 효소물과 발효물의 기능적 특성 조사
가. DPPH 라디칼 소거능
나. 혈전용해능 (Fibrinolytic activity)
다. HMG-CoA (3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A) reductase 저해활성
라. 담즙산 흡착능 (Bile acid binding capacity)

5. 혈류개선 효과가 있는 기능성물질의 분리정제, 기능적 특성 및 소재 안정화 조사
 - 가. 물질 분리를 위한 효소분해물의 용매 분획
 - 나. 물질 분리를 위한 젯산발효물의 용매 분획
 - 다. 혈류개선효과가 있는 용매분획물의 한외여과
 - 라. 혈류개선효과가 있는 한외여과물의 gel chromatography
 - 마. 혈류개선 평가 분석
 - 바. Gel chromatography 분리물의 탄수화물 정량
 - 사. Gel chromatography 분리물의 단백질 정량
 - 아. Gel chromatography 분리물의 지질 정량
 - 자. 최종 활성물질의 분자량 측정
 - 차. 혈류개선효과가 있는 분획물의 안정화 검토

6. 산약 및 산약의 기능성 소재 이용 혈류개선 산약제품 개발
 - 가. 산약을 이용한 발효주 개발
 - 나. 장기유통형 산약제품 개발
 - 1) 장기유통형 산약 초콜릿 개발
 - 2) 장기유통형 산약 양갱개발
 - 다. 단기유통형 산약제품 개발
 - 1) 단기유통형 산약 발효음료 개발
 - 2) 단기유통형 산약 죽 개발
 - 라. 개발제품의 특성 조사
 - 마. 개발제품의 저장안정성 확인
 - 바. 산약을 이용한 기능성 가공 제품의 활용방안 연구

7. 산약의 기능성 소재 및 가공제품 *in-vivo* 혈류개선효과 조사
 - 가. 산약 효소분해물과 젯산발효물의 혈류개선 효과
 - 나. 산약 기능성 소재의 혈류개선 효과
 - 다. 산약 가공제품의 혈류개선 효과
 - 라. 혈류 개선 효과 측정방법

제 3 장 결과 및 고찰	
1. 산약의 분말 제품화를 위한 검토 결과	
가. 생산약의 일반성분분석	
나. 건조방법에 따른 산약의 성분변화	
다. 건조처리 산약의 갈변억제 및 기호도 향상을 위한 첨가제 영향조사	
2. 산약 효소가수분해물의 기능성물질 분리 조건 탐색 결과	
가. 가수분해온도와 가수분해효소 종류에 따른 영향	
나. 가수분해효소 종류와 농도에 따른 영향	
다. 가수분해 시간에 따른 영향	
3. 산약 발효물의 기능성 물질 분리 조건 탐색 결과	
가. 산약발효물의 pH, 산도, 총균수 및 젖산균수의 변화	
나. 산약발효물의 당도, 총당 및 환원당함량 변화	
4. 선정된 조건에서 산약 효소물과 발효물의 기능적 특성 조사결과	
가. 효소물의 혈전용해능과 HMG-CoA reductase 저해활성	
나. 효소물의 담즙산 흡착능 (Bile acid binding capacity)	
다. 발효물의 혈전용해능	
라. 발효물의 HMG-CoA reductase 저해활성	
마. 발효물의 담즙산 흡착능	
5. 혈류개선 효과가 있는 기능성 물질의 분리정제 및 기능특성 조사 결과	
가. 산약효소분해물의 혈류개선 효과	
나. 산약효소분해물의 용매 분획을 통한 분리물의 혈류개선 효과	
다. 산약 발효물의 용매 분획물의 혈류개선 효과	
라. 산약 젖산 발효물의 용매 분획을 통한 분리물의 혈류개선 효과	
마. 한외여과에 따른 산약 분리물의 혈류개선 효과	
바. Gel chromatography 분리물의 성분확인 및 혈류개선효과	
사. 혈류개선효과가 있는 분획물의 안정화 검토	

6. 산약 및 산약의 기능성 소재이용 혈류개선 산약제품 개발 결과	
가. 산약과 쌀의 혼합비율에 따른 발효주의 이화학적 특성	
나. 당귀와 오미자 첨가비율에 따른 발효주의 이화학적 특성	
다. 장기유통형 산약 초콜릿의 특성	
라. 장기유통형 산약 양갱의 특성	
마. 단기유통형 산약 발효음료의 특성	
바. 단기유통형 산약 죽의 특성	
사. 산약을 이용한 기능성 가공제품의 활용방안 연구 결과	
7. 산약의 기능성 소재 및 가공제품 in-vivo 혈류개선 효과 조사 결과	
가. 산약 효소물과 젖산 발효물의 혈류개선 효과	
나. 산약 기능성 소재의 혈류개선 효과	
다. 산약 가공제품의 혈류개선 효과	

제 4 장 결 론

제 5 장 참고문헌

제 1 장 서론

산약은 *Dioscorea batatas* 또는 *Dioscorea japonica*의 주피를 제거한 담근체를 그대로 또는 썬서 말린 약재로서, 주로 점질성 다당류인 mannan과 이외 단백질, 무기질 및 steroid성 saponin 및 phenanthrene 유도체 등으로 구성되어 있다. 예로부터 산약은 자양, 강정, 당뇨, 폐결핵, 소염, 해독, 신경통 및 류마티즘에 효과적인 것으로 알려져 있으며, 현재까지의 약리학적 연구를 통해 항산화, 항염, 항암, 고혈당, 비만, 면역조절, 장 기능 및 지질대사 등의 질환 개선 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 산약은 우리나라에서 경상도 부근의 지역 특산품으로서 점차 재배 및 상품개발이 확장되고 있는 추세이지만, 그 범위가 미약한 편이며, 산약에 대한 기능성 연구 또한 점질성 다당류를 제외하고는 부족한 실정이다.

국외현황으로 마를 이용한 소재로 일본에서는 산약을 강판에 갈아서 계란의 노른자와 약간의 간장을 곁들여 먹으며 일본요리나 과자의 재료로 사용하고, 중국에서는 알맞은 크기로 잘라 기름으로 튀겨서 물엿을 입혀 먹기도 한다. 서부 아프리카에서는 식용산약이 주요한 탄수화물 급원이며, 특히 Nigeria에서는 뜨거운 stew 형태로 제공되는 진미식품으로 알려져 있다. 최근 미국 등지에서는 참마 전분을 이용하여 소화율이 높은 칼로리 공급원 또는 건강식품으로서 어린이나 병약자를 위한 제빵, 비스킷, 소스, 스프 등의 원료로 쓰이고 있다. 즉, 산약의 혈행 개선효과 등의 혈류개선작용이 있음에도 불구하고 단순가공제품으로 생산되고 있으며 산약의 유효성분을 잘 활용한 기능성 식품으로의 활용방안에 대한 연구가 이루어진다면 고부가가치의 제품을 개발할 수 있고 새로운 소득원으로 자리 잡으리라 기대하고 있다.

국내현황으로 산약은 국내외 연구 및 기술은 대부분 밭에서 재배하는 품종을 대상으로 이루어져 왔고, 산약의 기능적 연구는 미비한 실정이다. 또한 산약의 성분으로 수용성 식이섬유의 일종인 글루코만난, 뮤신, 아르기닌 및 비타민류인 콜린등이 함유되어 있어 혈류개선 및 생리활성 기능이 있으나, 이들의 기능 특성에 대한 과학적 연구는 아직 미미한 실정이므로 산약의 생리학적 및 다양한 기능적 우수성을 밝히는 연구가 절실한 실정이다. 한편 산약은 동의보감, 본초경, 향약집성방, 명의별록, 급유방 등의 한방서에서 기력증진, 기억력 증진, 혈행제거효과, 자양강장효과 등의 작용이 있는 것으로 보고되었다. 그러나, 산약에 관한 연구는 아미노산과 지방산의 성분분석, 전분의 이화학적 특성 등이 보고되어있으나, 수용성 식이섬유의 일종

인 glucomannan과 콜린, 뮤신, 아르기닌 등의 혈행 저하 작용에 관한 생리 기능적 특성 연구가 미흡한 실정이므로 산약에 관한 연구 지원의 필요성이 대두되고 있다.

따라서 본 연구에서는 산약의 활성물질을 분리하여 그 구조와 기능의 상관관계를 밝히며, 아울러 산약 및 산약에서 추출, 분리한 기능성 소재를 이용하여 소비자 여건에 따른 맞춤형 가공제품을 개발하고자 하였다. 산약의 효능 중 혈류개선효과를 나타내는 기능성물질을 효소가수분해 및 발효 등의 방법으로 분리하였다. 특히 단백질 가수분해효소를 활용하거나 젖산균발효를 통하여 얻어진 기능성물질을 고부가가치의 혈류개선 소재로 발전시키고자 하였으며, 최종적으로, 산약에 대한 다양한 이용방법을 위하여 소재화 및 제품개발 자료를 수집하고 여러 가지 형태의 가공식품 개발연구를 통해 산약의 효능과 이용에 대한 체계적인 연구 성과 및 수집을 위하여 본 연구를 실시하였다. 산약의 기능적 유효성분의 추출조건과 생리활성 효과, 가공식품의 제조조건에 대한 연구는 현재 국내,외적으로 미흡하나 인삼, 더덕, 도라지 등 국내 농·임산물의 추출방법과 가공방법 등을 참고로 할 경우, 산약에서 유효성분을 효과적으로 추출할 수 있을 것으로 기대되며, 유효성분의 증량과 기호도를 고려하여 가공제품으로 개발하기 위한 formulation을 검토한다면 본 연구를 성공적으로 수행할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 분말 및 단순가공제품에 주력하고 있는 참여기업에 혈류개선 기능성식품소재개발 기술을 이전함으로써 산약의 다양한 소비를 촉진하고 기업 및 지역민 소득증대에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

제 2 장 재료 및 방법

1. 산약의 분말 제품화를 위한 조건 검토

가. 실험 재료

산약의 이화학적 성분조사를 통하여 산약의 성분을 정성, 정량하고자 하며, 산약을 분말로 제조하기 위하여 진행되는 열풍건조 공정 시 발생하는 갈변을 억제하고 기호도가 우수한 산약 분말을 제조하기 위하여 연구를 실시하였다. 실험에 사용된 생산약은 2007년 참여기업인 북 안동 농협산약 가공 공장에서 구입한 것을 사용하였으며, 생산약은 수돗물로 세척한 후 잔뿌리를 제거하고 박피하였으며 박피한 산약을 절단기로 두께 1~2mm가 되게 세절하여 사용하였다. 산약의 분석 및 기타 조사를 위한 시약은 분석용 1급 시약을 사용하였다.

나. 산약의 일반성분분석

1) 수분 정량

수분함량은 AOAC법에 따라 105℃ 상압가열건조법으로 분석하였다. 즉, 미리 가열하여 항량으로 한 칭량접시에 검체 2 g을 정밀히 달아 뚜껑을 약간 열어 놓고 105℃ dry oven에 넣어 3~5시간 건조한 후 데시케이터에서 약 30분간 방냉 후 무게를 달았다. 다시 칭량접시를 1~2시간 건조하여 항량이 될 때까지 같은 조작을 반복하였다.

2) 회분 정량

회분측정은 식품공전(식품의약품안전청, 2005) 방법에 따라 실험하였다. 미리 항량 시킨 회화용기에 시료 약 2 g을 정밀히 취한 후 550~600℃ 회화로에서 여러 시간 가열하여 백색~회백색의 회분이 얻어질 때까지 회화하였다. 회화가 끝난 후, 가열을 그치고 그대로 식혀 온도가 약 200℃로 되었을 때 데시케이터에 옮겨 방냉 후 회분무게를 칭량하였다.

3) 조단백질 정량

조단백질 분석은 AOAC법에 따라 행하였다. 질소(N) 함량이 2~3 mg에 해당하는 양의 시료를 정밀히 취하여 킬달플라스크에 넣고 여기에 분해촉진제 약 0.5 g을 넣은

후 플라스크 내벽을 따라 황산 약 10 mL를 넣고 분해하였다. 검체의 탄화물이 보이지 않을 때까지 온도를 높여 끓이고 분해액이 투명한 담청색이 되면 다시 1~2시간 가열을 계속하였다. 분해가 끝난 분해액은 냉각시킨 후 증류장치에 연결하여 조단백질 함량을 측정하였다. 같은 방법으로 공시험을 하여 시료 측정량을 보정하였다.

4) 조지방 정량

산약의 조지방 함량은 식품공전 방법에 따라 분석하였다. 미세한 분말로 한 시료 2~10 g을 원통여과지에 칭량하고, 시료 위에 탈지면을 가볍게 충전한 후 100~105°C의 건조기에서 2~3시간 건조하였다. 시료를 방냉한 후 속시렛추출관에 연결하여 무수에테르로 시료 중의 조지방을 추출하였다. 8시간 정도 추출하여 추출이 완료된 조지방 추출 수기는 표면을 거즈로 깨끗이 닦아, 98~100°C의 건조기에 넣어 약 1시간 항량이 될 때까지 건조하였다. 이후 수기를 방냉하고 수기 무게를 칭량하여 조지방 함량을 측정하였다.

5) 탄수화물 정량

탄수화물 함량은 100에서 수분, 회분, 조단백, 조지방 함량을 뺀 값으로 구하였다.

6) 총당 함량

총당함량은 phenol-sulfuric acid method를 이용하여 측정하였다. Sample 1mL에 10% phenol solution 1mL을 넣고 10초간 와동 후에 진한 H₂SO₄ 5mL을 직하하고 30분 동안 실온에서 방치한다. 그 후에 470nm에서 흡광도를 측정한다. Glucose standard curve를 이용하여 총당 함량(%)을 구하였다.

7) 환원당 함량

Sample 1mL에 알칼리성동시약 1mL를 넣고 10분간 Boiling 한 후에 식히고 비소 폴리브덴산염 시약 1mL을 첨가한 후 520nm에서 그 흡광도를 측정한다. Glucose standard curve를 이용하여 환원당 함량(%)을 구하였다.

8) 색도 측정

산약의 색도를 알아보기 위하여 색차계(CR-300 series, Minolta, Japan)를 사용하여 색도를 측정하였고 Hunter system에 의하여 L(명도, Lightness), a(적색도, Redness)와

b(황색도, Yellowness) 값으로 나타내었다. 이때의 표준 백색판은 L=97.57, a=0.00, b=1.79을 기준으로 하였다.

다. 건조방법에 따른 산약의 성분변화

세절된 생산약을 열풍건조기에서 각각 50, 55, 60℃로 12시간동안 건조하면서 2시간 간격으로 시료를 채취하였으며 시료를 불밀로 분쇄하고 200 mesh에서 거른 후 성분분석용 시료로 사용하였다. 채취한 시료는 수분함량과 색도를 측정하여 수분감소 정도 및 갈변속도를 확인하였다.

라. 건조처리 산약의 갈변억제 및 기호도 향상을 위한 첨가제 영향 조사

1) 산약의 건조 및 분말 제조

최적 조건의 열풍건조 시간 및 온도 설정에도 발생하는 갈변현상을 제어하고 분말의 기호도를 높이며 낮은 온도에서도 현탁력이 뛰어난 분말을 제조하기 위하여 본 실험을 실시하였다. 산약에 첨가되는 첨가제는 당알코올류인 erythritol, maltitol, sorbitol, xylitol(Mitsubishi, Japan), mannitol(Dae-Jung, Korea)와, 유기산류인 citric acid(Sigma, USA), fumaric acid 및 malic acid(Dae-Jung, Korea), tartaric acid(Kanto, Japan), succinic acid(Hayashi, Japan)를 사용하였다. 분말 산약 제조는 생산약을 2~3 mm 두께로 세절한 후 당알코올인 erythritol, maltitol, mannitol, sorbitol 및 xylitol을 각각 10%, 유기산인 citric acid, fumaric acid, malic acid, succinic acid 및 tartaric acid를 각각 0.2%씩 도포하여 60℃로 조정된 열풍건조기(HK-DO1000F, Korean Eng. Corp, Korea)로 16시간 열풍건조 하였고, 이때의 당알코올과 유기산 첨가비율은 산약의 건조수율(18%)에 맞추어 혼합하였다. 모든 실험의 대조군은 첨가물을 첨가하지 않고 건조시킨 산약을 사용하였으며, 열풍건조 후의 건조 절편 산약은 마쇄기(HMF-985, Hanil, Korea)에 1분간 마쇄한 후 200 mesh로 통과시킨 분말로 제조하였다.

2) 색도, 용해도 및 팽윤력 측정

각 분말 처리구의 색상 변화를 알아보기 위하여 색차계(CR-300 series, Minolta, Japan)를 사용하여 색도를 측정하였고 Hunter system에 의하여 L(명도, Lightness), a(적색도, Redness)와 b(황색도, Yellowness) 값으로 나타내었다. 이때의 표준 백색판은 L=97.57, a=0.00, b=1.79을 기준으로 하였다. 또한 첨가물을 혼합한 산약의 현탁 속

도를 확인하기 위하여 용해도 및 팽윤력을 측정하였다. 실험방법은 Schoch의 방법을 토대로한 Kim의 방법을 일부 수정하였다. 즉, 산약 분말의 용해도(%)는 시료 0.5 g에 증류수 40 mL을 끌고루 분산시킨 후 30°C 로 고정시킨 항온수조에서 30 분간 120 rpm으로 진탕하여 4°C 냉장고에서 20분간 냉각시킨 후 2,000 × g의 속도로 30 분간 원심 분리하여 상정액을 취하고, 상정액의 총당함량을 산출하여 측정하였다. 총당 실험의 경우, phenol-sulfuric acid법을 이용하였고, 이를 바탕으로 팽윤력(g/g)을 계산하였다.

$$\text{Water solubility} = \frac{\text{Weight of total glucose in supernatant sample (g)}}{\text{Sample weight (g)}} \times 100$$

$$\text{Swelling power} = \frac{\text{Weight of swollen sample (g)}}{\text{Sample weight (g)} \times (100 - \% \text{water solubility})} \times 100$$

3) 분말의 관능평가

산약 분말의 관능평가는 숙련된 패널 30 명을 대상으로 실시하였다. 관능검사는 강도측정과 기호도평가로 나누어 실시하였다. 강도평가의 경우 산약 분말의 밝기 (brightness), 조직감, 단맛, 신맛으로 나누어 측정하였다. 기호도평가는 분말의 색과 맛에 대한 기호도로 나누어 측정하였으며 강도측정과 기호도측정 모두 likert 9점 척도법을 이용하였다.

4) 통계분석

모든 실험은 3반복 실험으로 진행하였고, 관능평가 결과는 statistical Analysis System(SAS)의 분산 분석을 통해 유의적 차이가 발견된 경우 Duncan's multiple range test로 실험군간의 유의성을 검증하였다.

2. 산약 효소 가수분해물의 기능성 물질 분리 조건 탐색

가. 효소 가수분해물 제조

효소가수분해물 제조는 분말산약 100 g에 1.5배량의 물을 첨가하고 증자한 후 원료중량의 10배량의 물을 첨가하여 homogenizer로 마쇄하였다. 마쇄된 산약증자액

100 mL에 효소를 각각의 조건에 따라 첨가한 다음 shaking water bath에서 가수분해 온도 (40, 50, 60, 70℃)에 따라 각각 반응시켰다. 이때 효소제 첨가량은 산약건물중량에 대한 %(v/w)로 하였다. 반응이 끝난 용액은 효소 불활성화를 위하여 100℃에서 15분간 끓인 후 6,000×g에서 30분간 원심분리하였고 얻어진 상등액을 분석용 시료로 사용하였다.

나. 최적 효소 가수분해 조건 설정

1) 가수분해 온도에 따른 영향

산약 최적 효소가수분해물 조건을 설정하기 위하여 온도에 따른 영향을 조사하였다. 마쇄된 산약증자액 100 mL에 효소제를 각각 1%(w/w)씩 첨가하여 혼합한 다음 40, 50, 60, 70℃ 각각의 온도에서 3시간동안 가수분해하였다. 한편, 효소처리를 하지 않은 것을 대조구로 하여 비교하였다. 분석은 효소분해물의 당도, 고형분함량, 총당, 환원당 및 가수분해도를 측정하였다.

2) 효소 종류에 따른 영향

Table 1에 나타낸 각각의 효소를 1%(v/v)씩 첨가하여 사용하였고, 각각의 효소 조건으로 설정한 후 shaking water bath에서 3시간동안 가수분해시킨 후 이화학적 특성을 비교하였다. 분석은 효소분해물의 당도, 고형분함량, 총당, 환원당 및 가수분해도를 측정하였다.

3) 효소 농도에 따른 영향

효소제를 각각 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0% (w/w)의 농도로 첨가하여 산약 가수분해물의 이화학적 특성을 조사하였다. 분석은 효소분해물의 당도, 고형분함량, 총당, 환원당 및 가수분해도를 측정하였다.

4) 가수분해 시간에 따른 영향

산약증자액을 제조하여 상기에서 최적조건으로 설정된 효소제를 첨가한 후 설정된 온도에서 가수분해 시간에 따른 가수분해물의 이화학적 특성을 측정하였다. 분석은 효소분해물의 당도, 고형분함량, 총당, 환원당 및 가수분해도를 측정하였다.

Table 1. 가수분해 효소 종류 및 특징

효소종류	Optimal		분해특징	
	Temp (°C)	pH		
단백질분해효소	Alcalase	55~70	6.5~8.5	<i>Bacillus licheniformis</i> 내열성액화효소, 전분당, 물엿, 약주제조
	Neutrase	45~55	5.5~7.5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 기원의 효소복합제
	Flavourzyme	50	5.0~7.0	(N-말단에서부터 제거하는 효소) <i>Aspergillus oryzae</i> 기원의 효소복합제
	Protamex	35~60	5.5~7.5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> 내열성액화효소, 전분당, 물엿, 약주제조

3. 산약 발효물의 기능성 물질 분리 조건 탐색

가. 산약 젖산발효물 제조

본 연구에 사용된 33종의 균(Table 2) 즉 젖산균종 33종은 *Enterococcus* 속 5종, *Lactobacillus* 속 14종, *Lactococcus* 속 2종, *Leuconostoc* 속 6종, *Pediococcus* 속 2종, *Weissella* 속 3종은 KCTC에서 분양받은 젖산균으로 보존 및 계대배양을 위해 MRS 배지(Difco, USA)를 사용하여 30°C에서 2회 배양하여 사용하였다. 200 mesh크기의 분말산약을 원료에 대해 1.5 배량의 물을 첨가하고 실온에 방치한 후 1시간동안 증자하였다. 멸균된 분쇄기에 분말산약 원료의 4.5 배량의 멸균수를 첨가한 후 분쇄하였고, 무균적으로 각 젖산균을 원료중량의 2%(v/v)가 되도록 첨가한 후 37°C에서 8일동안 발효시켰으며, 1일 간격으로 발효액의 품질특성을 분석하였다.

나. 산약 발효물의 전처리 및 최적 발효 조건 설정

37°C에서 발효하면서 경시적인 변화를 관찰하기 위해 성분분석용 시료는 각 젖산균별 발효되고 있는 발효물을 그대로 사용하였고, 생리활성측정용 시료는 발효물을 6,000×g, 10°C에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 취하고 다시 0.45 um syringe filter로 여과한 후 1.8 mL eppendorf tube에 넣어 -20°C 냉동보관하면서 발효물의 특성을 조사하였다. 산약 발효물의 최적 발효조건 설정 평가는 1일 간격으로 발효물의 pH, 산도, 총균수, 젖산균수, 당도, 총당 및 환원당 함량을 측정하여 비교, 선택하였다.

Table 2. 산약 발효를 위한 젓산균의 종류

No	Strain	Scientific name
1	KCTC 3638	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
2	KCTC 3195	<i>Enterococcus faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>
3	KCTC 3552	<i>Enterococcus flavescens</i>
4	KCTC 3102	<i>Enterococcus hirae</i>
5	KCTC 3641	<i>Enterococcus malodoratus</i>
6	KCTC 3102	<i>Enterococcus mundtii</i>
7	KFRI 150	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
8	KFRI 238	<i>Lactobacillus amylophilus</i>
9	KCTC 3102	<i>Lactobacillus bervis</i>
10	KFRI 1030	<i>Lactobacillus bifermantans</i>
11	KFRI 346	<i>Lactobacillus casei</i>
12	KFRI 1182	<i>Lactobacillus collinoides</i>
13	KFRI 654	<i>Lactobacillus curvatus</i>
14	KCTC 1047	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>
15	KCTC 3112	<i>Lactobacillus fermentum</i>
16	KCTC 3602	<i>Lactobacillus maltaromicus</i>
17	KFRI 481	<i>Lactobacillus pentosus</i>
18	KCTC 1048	<i>Lactobacillus plantarum</i>
19	KCTC 3594	<i>Lactobacillus reuteri</i>
20	KCTC 3205	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
21	KFRI 684	<i>Lactococcus lactis</i>
22	KCTC 201	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
23	KCTC 3524	<i>Leuconostoc carnosum</i>
24	KCTC 3526	<i>Leuconostoc citreum</i>
25	KCTC 3102	<i>Leuconostoc gelidum</i>
26	KCTC 3528	<i>Leuconostoc lactis</i>
27	KCTC 3530	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranum</i>
28	KCTC 3100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
29	KFRI 832	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
30	KCTC 3507	<i>Pediococcus pentosacius</i>
31	KCTC 3807	<i>Weissella cibaria</i>
32	KFRI 1184	<i>Weissella confusa</i>
33	KCTC 3531	<i>Weissella paramesenteroides</i>

4. 선정된 조건에서의 산약 효소물과 발효물의 기능적 특성 조사

가. DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 Blois (1958)의 방법에 따라 종 화합물이 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical에 전자를 공여함으로써 radical 을 소거하는 효과를 517 nm 에서 흡광도를 측정하여 계산한 후 나타내었다. 즉, 0.1 mM DPPH soln (99.8% Methanol)을 제조한 후, 이 용액이 517 nm 파장에서 대조군의 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 농도를 조정하였다. 농도를 조정한 0.1 mM DPPH soln (99.8% Methanol) 3 mL 에 각각의 시료 1 mL 를 첨가한 후 30분간 실온에서 방치하였다가 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 반응물에 대한 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 흡광도 감소치를 DPPH radical 소거활성으로 하여 항산화 활성도를 나타내었다.

$$\text{scavenging effect (\%)} = \left[1 - \frac{\text{Absorbance of sample}_{517\text{nm}}}{\text{Absorbance of control}_{517\text{nm}}} \right] \times 100$$

나. 혈전용해능 (Fibrinolytic activity)

Fibrin(혈전)용해활성은 Astrup 등의 방법을 일부 수정한 방법에 의해 측정하였다. 50 mM 인산완충용액(pH 7.4, 0.15M NaCl 포함)에 Fibrinogen을 최종농도 0.3%가 되도록 완전히 용해시킨 용액 5 mL에 동량의 2% agarose (멸균한천용액) 5 mL을 첨가하여 혼합하였다. 혼합한 용액에 thrombin(100NIH unit/mL) 0.1 mL을 첨가하여 충분히 혼합한 후 즉시 petri-dish에 붓고 30~60분 동안 실온에서 고화시켜 Fibrin plate를 제조하였다. 활성측정을 위해 fibrin plate에 pasteur pipette으로 지름 5 mm의 구멍을 7개 만들어 각 추출액 시료 20 uL를 주입하고 37°C에서 12시간 반응시킨 다음 이때 생성된 투명한 면적을 계산하였으며, 대조구로서는 정제된 혈전용해효소인 plasmin (1.0 unit/mL)을 사용하였다. 추출액의 혈전용해활성은 대조구의 용해면적에 대한 시료의 용해면적의 상대적인 비율로 환산하여 산출하였다.

$$\text{혈전용해활성 (\%)} = \frac{\text{시료의 용해영역}}{\text{plasmin의 용해영역}} \times 100$$

다. HMG-CoA (3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A) reductase 저해활성

HMG-CoA reductase 억제활성은 Kleinsek 등(1989)의 방법에 따라 측정하였다. 1 mL Cuvette에 각 시료 20 uL, 0.5 uM 인산완충용액 pH 7.0 100 uL, DTT(20 mM)100 uL, NADPH(3 mM) 100 uL, 효소원 100 uL을 가하고 반응액의 온도를 37°C로 일정하게 한 후 HMG-CoA(3 mM)를 100 uL 가하여 효소반응을 시작하면서 340 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 기록하였다. 각 시료는 DMSO에 용해시켜 반응액에 첨가하였다.

$$\text{억제활성(\%)} = 1 - \frac{(\text{sample O.D} - \text{sample blank O.D})}{(\text{control의 흡광도} - \text{control blank O.D})} \times 100$$

라. 담즙산 흡착능 (Bile acid binding capacity)

Bile acid binding capacity는 Camire 등(1993)의 방법을 수정하여 측정하였다. 즉, 시료 0.1 g을 증류수 5 mL에 녹여 0.1 N-HCl 용액 2 mL 를 가하여 37°C 항온수조에서 1시간 동안 진탕교반하고 1 N-NaOH 용액으로 pH를 7.0으로 조절하고 여기에 cholic acid, deoxycholic acid, glycocholic acid, taurocholic acid 의 농도가 각각 31.25 μ mol/mL 되도록 조제한 0.1 M phosphate buffer 용액 (pH 7.0) 4 mL와 porcine pancreatin의 농도가 10 mg/mL 되도록 조제한 0.01 M phosphate buffer 용액 (pH 7.0) 5 mL 를 각각 가한 후 37°C 항온수조에서 1시간 동안 진탕교반 시켰다. 교반된 용액에 1.33 M phosphoric acid 2 mL 가하고 26,890 \times g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하였고 또한 남은 잔사에 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) 5 mL 를 가한 후 vortex mixer 로써 잘 혼합하고 다시 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 모두 혼합하고 1N-NaOH 용액으로 pH를 7.0으로 다시 조절하였다. 위의 용액 0.28 mL와 증류수 3 mL를 시험관에 넣고 test reagent(nitroamide dinucleotide, nitro blue tetrazolium salt, diaphorase, 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase) 0.5 mL 를 가하였다. 그러나 sample blank 는 test reagent 중에서 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase 를 제외한 시약만을 첨가하였다. control 과 control blank 는 시료 대신 증류수만을 넣고 시료의 경우와 동일한 방법으로 처리하였는데, control blank 에는 dehydrogenase를 제외한 동일한 시약을, control에는 시료분석의 경우와 동일한 시약을 각각 0.5 mL 를 가한 후 37°C에서 5분간 반응시켰다. 그 다음 1.33 M phosphoric acid 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시키고 530 nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선을 통하여 시료의 bile

acid 결합력을 계산하였다. 각각의 bile acid에 대한 검량곡선은 Fig. 1 과 같다.

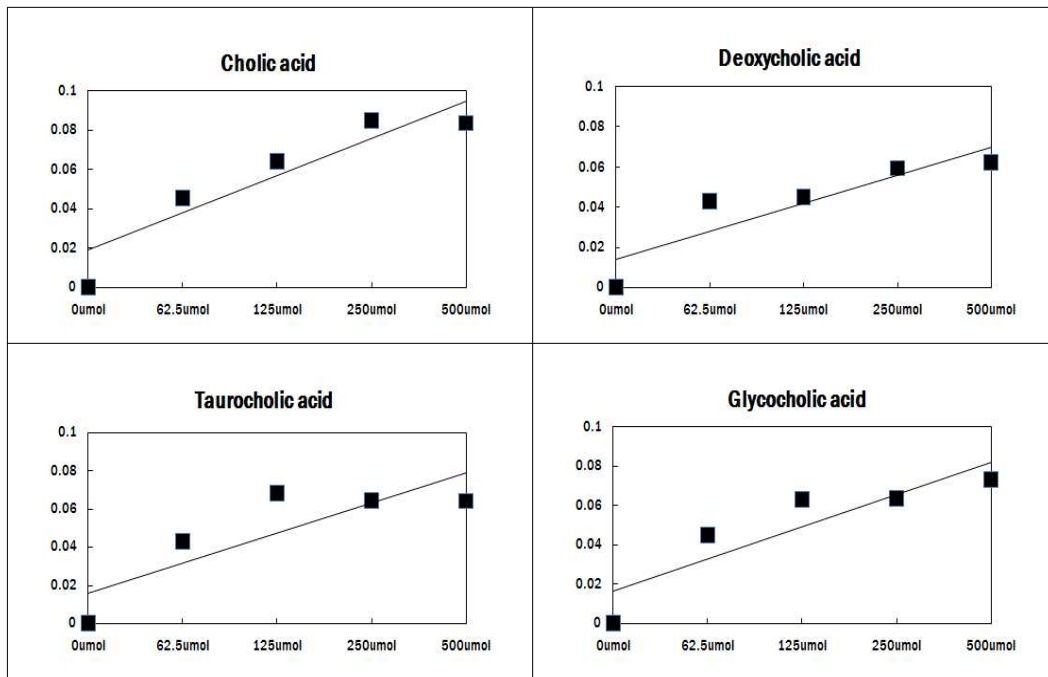


Fig. 1. 담즙산 흡착능 검량곡선

5. 혈류개선 효과가 있는 기능성물질의 분리정제 및 기능적 특성 조사

가. 물질 분리를 위한 효소분해물의 용매 분획

단백질효소분해물을 만들기 위하여 산약 100g에 9배에 달하는 증류수를 첨가하였고, 효소 첨가는 Fig. 2의 결과와 같이 총 증량의 1%를 첨가하여 60°C shaking water bath에서 90분간 분해한 것이 분해력이 크게 나타나 이와 같은 조건으로 효소분해하였다. 효소분해가 끝난 후 8,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 분리하고 침전물을 재 원심 분리하여 그 여액을 먼저 분리한 상등액에 포함시켜 최종 상등액으로 만들었으며 나머지를 산약 침전물로 하여 실험시료로 사용하였다. 산약 효소분해물을 원심 분리하여 얻어진 상등액과 침전물에 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol 및 ethanol 을 사용하여 용매분획 하였다. 각각의 용매는 효소분해물의 상등액 50 mL과 용매 100 mL 씩 첨가하고, 침전물은 20 mL과 용매 40 mL 첨가하여 교반한 후 상온에서 5시간 방치하였다. 용매 분획물은 다시 상등액과 침전물로 나누어서 농축기로 용매를 날린 후 최종 부피 30 mL의 증류수로 정용하여

실험에 사용하였다.

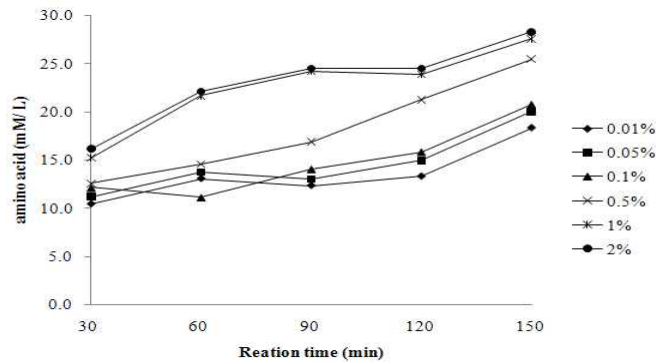


Fig. 2. Protamex의 가수분해 활성도

나. 물질 분리를 위한 젖산발효물의 용매 분획

산약 100g에 9배에 달하는 증류수를 첨가하여 교반시킨 후 *Lactobacillus acidophilus*를 총 중량의 1%를 첨가하였다 (이때 미생물 접종량은 1.7×10^7 cfu/g이 되도록 하였다). 미생물을 첨가한 산약은 4일간 37 °C에서 incubator에서 배양한 후 8000 rpm에서 30분 원심 분리하여 상등액을 분리하고 침전물을 재 원심 분리하여 그 여액을 먼저 분리 상등액에 포함시켜 최종 상등액으로 만들고 나머지를 산약 침전물로 하여 실험에 사용하였다. 산약 발효물의 상등액과 침전물을 각각 이용하여 혈류개선실험을 수행한 결과 산약 발효물의 상등액이 활성이 높아 이를 이용하여 여러 가지 방법으로 분리를 수행하였다. 첫 번째 방법으로 극성과 비극성의 차이를 이용하여 분리하는 방법인 용매분획을 실시하였다. 사용한 용매는 n-hexane, chloroform, n-butanol, ethyl acetate 및 ethanol으로 5개의 separated funnel에 각각 발효 상등액 40 mL과 용매 80 mL씩을 넣은 후 흔들어 분리하였다. 5시간 동안 방치하여 분리한 용매는 농축기로 완전히 날린 후 20 mL의 증류수로 정용하였고, 분리하고 남은 침전물 또한 농축하여 30 mL로 양을 맞추어 후 보관하였다.

다. 혈류개선효과가 있는 용매분획물의 한외여과

한외여과 (ultrafiltration, UF)는 발효생성물, 효소 및 기타 단백질 분리에 많이 사용하는 효율적이고 경제적인 분리방법으로 막의 분자량 size-cut off에 따라 물질을 분리하는데 사용한다. 이는 막의 양면에 걸리는 압력 차이에 의하여 진행되는 공정

으로서 고분자량의 용질은 막을 통과하지 못하고 물과 저분자량의 용질은 막을 통과하는 원리를 이용한 것이다. 한외여과를 하기위해 산약발효물의 상등액용매 분획물과 산약효소물의 상등액 용매 분획물을 각각 15 mL씩 micro centrifuge tube 형태의 membrane cell (ultrafree-15, Millipore)을 사용하여 3000 xg 에서 원심분리하였다.

이때 분자량의 크기의 범위는 300,000 dalton 이상, 300,000 dalton 이하, 100,000~300,000 dalton, 100,000 dalton 이하, 50,000~100,000 dalton, 50,000 dalton 이하, 30,000~50,000 dalton, 30,000 dalton 이하, 10,000~30,000 dalton, 10,000 dalton 이하의 크기로 순차적으로 여과한 후 그 분리물을 사용하여 본 실험에 사용하였다.

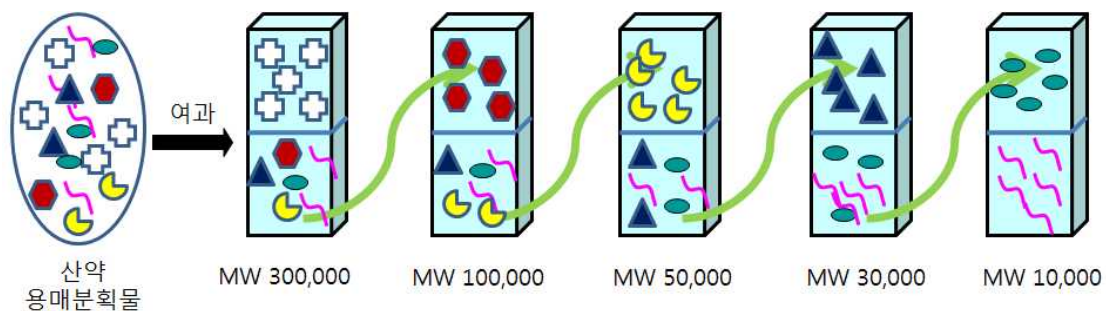


Fig. 3. 한외여과 분리

라. 혈류개선효과가 있는 한외여과물의 gel chromatography

겔 여과 크로마토 그래피(gel filtration chromatography)는 분자의 크기가 다른 혼합물을 부풀린 겔 입자층을 통과시켜 큰 분자는 빨리 통과하고 작은 분자는 느리게 통과하는 원리를 이용하여 물질을 분리하는 방법이다. 본 실험에서는 기능특성이 확인된 시료의 활성 희분을 확인하기 위해 Sephadex G-75(3-80 kDa)를 이용하여 겔 크로마토그래피를 행하였다. 유리칼럼($\phi 2.8 \times 50$ cm)에 수지를 충전한 다음, 시료를 동결건조하여 일정량을 buffer(5 mL)에 녹인 후 칼럼에 loading하여 증류수(pH 7.0)로 용출시켰다. 용출된 시료를 fraction collector를 이용하여 튜브에 각각 6 mL씩 분획하였다. 얻어진 분획물을 단백질, 총탄수화물, 지질함량을 측정하였고, 이 함량에 따라 용출분획을 분리하여 HMG-CoA reductase 저해활성, 담즙산 흡착능력(Bile acid binding capacity)을 재 측정하였다.

마. 혈류개선 평가 분석

산약 효소물 및 발효물을 이용하여 분리한 분리물은 각 단계별로 콜레스테롤 합성 저하를 측정할 수 있는 HMG-CoA reductase inhibition과 담즙산 흡착 능력을 평가할 수 있는 bile acid binding capacity를 측정하여 혈류개선 효과를 확인하였으며, 분획물 중 기능적 특성이 우수한 분리물을 점차 compound 단위로 분리하였다.

바. Gel chromatography 분리물의 탄수화물 정량

총 탄수화물은 페놀-황산법을 이용하였다. 시료 용액 0.5 mL에 5% phenol 용액 1 mL를 첨가하여 섞은 후 황산 5 mL를 직하시켜 20분간 상온 방치하여 발색시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선으로부터 탄수화물 함량을 측정하였다.

사. Gel chromatography 분리물의 단백질 정량

BCA법은 Lowry법을 계량한 것으로 Folin 시약의 반응대신 BCA가 구리이온과 복합체를 형성해 자색으로 발색되는 반응을 이용한 것이다. BCA(bicinchoninic acid)용액과 4% CuSO₄를 50:1의 비율로 교반한 후, 이를 Standard Working Reagent(SWR)로 하였다. 1 well당, SWR을 142 uL을 첨가한 후 바로 각 시료는 8 uL를 첨가하여 37°C 인큐베이터에서 30분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 562 nm에서 흡광도 측정한 후 Calibration Curve를 작성하고, 시료의 단백질 함량을 작성된 Curve로 구한다. 이때, 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

아. Gel chromatography 분리물의 지질 정량

총 지질의 추출은 Folch 등의 방법에 따라 추출하였다. 즉, 시료 2 g에 chloroform/methanol(2:1, v/v)혼합 용매 20 mL를 가하여 자석교반기에서 30분간 stirring한 다음 하룻밤 방치한 후 여과(Whatman No.2)하였다. 잔사에 다시 혼합용매에 20mL를 가하여 반복하여 재추출한 후 여액을 모았다. 여액에 부유하는 분말입자를 제거하기 위하여 Buchner funnel로 흡인여과한 다음, 칭량한 round bottom flask에 넣고 rotary vacuum evaporator로 용매를 제거하여 조지질로 사용하였다. 추출한 조지질은 Folch 등의 방법에 따라 조지질에 chloroform/methanol(2:1, v/v)혼합 용매를 가하고 분액깔대기에 옮겨 20 mL 증류수를 가하여 흔들어 준 다음 방치하였다.

Chloroform층과 물층이 완전히 분리된 후 chloroform층만을 회수하고 물층은 다시 동일한 방법으로 두 번 반복하여 재추출하였다. Chloroform층을 모두 합하여 evaporator로 용매를 제거하여 정제된 총지질로 하였으며, 함량은 중량법으로 정량하였다.

자. 최종 활성물질의 분자량 측정

분자량은 Sepadex G-75 column으로 겔 여과 크로마토그래피로 측정하였다. Sepadex G-75column(2.8×50cm)을 100mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)용액으로 평형시켜 blue dextran으로 void volume(V_o)을 구하였다. 표준물질을 column에 주입하여 각각의 elution volume(V_e)을 구한 다음, 표준물질의 분자량에 대한 V_e/V_o 을 작성한 후 검량선에 의해서 각 물질의 분자량을 측정하였다. 분자량 표준물질로는 Somatostatin(1.6 kDa), Aprotinin(6.5 kDa), Cytochrome C(12.4 kDa), Carbonic Anhydrase(29 kDa), Albumin(66 kDa)를 사용하였다.

$$K_{av} = \frac{V_r - V_o}{V_t - V_o}$$

* Total bed volume(V_t) ; 겔 column의 volume

Elution volume(V_e) ; 원하는 물질이 용출될 때까지의 volume

Void volume(V_o) ; 겔 입자들 사이의 공간 volume

Inner volume(V_i) ; 수분을 포함한 겔 입자들의 volume

차. 혈류개선효과가 있는 분획물의 안정화 검토

용매분획과 한외여과를 통하여 분리한 분획물들을 이용하여 물리적 특성 조사를 실시하였다. 특성은 광선과 산소의 영향에 따라 변화되는 시료들의 갈변 정도를 흡수 스펙트럼을 통하여 실시하였다. 광선에 대한 영향은 데시케이터를 24시간 조명등을 설치한 항온기 내에 두면서 (시료와의 거리: 30 cm) 일정시간대에 시료를 채취하여 분석하였다. 산소에 대한 물리적 특성 변화 실험은 500 mL 비커에 500 mL의 시료를 넣은 후 지속적인 산소공급을 위해 비커 입구를 산소가 투과되는 막으로 덮었으며, 시료를 취할 때마다 1분 동안 저어줌으로써 산소공급을 촉진시키며 시료액을 균일하게 섞이게 하였다. 광선에 의한 영향과 산소에 의한 영향은 이틀간격으로

총 10일 동안 실시하였으며 채취한 시료들은 420 nm에서 흡수 스펙트럼을 이용한 갈변도를 측정하여 그 변화 값을 산출하였다.

6. 산약 및 산약의 기능성 소재 이용 혈류개선 산약제품 개발

가. 산약을 이용한 발효주 개발

1) 발효주 제조방법

먼저 원재료인 산약은 중량의 3~6 배의 물을 혼합하고, 멥쌀은 수세 및 침지 후 탈수하여 100~120℃의 온도에서 1 hr 동안 증자하였다. 증자 후 산약 증자물은 산약 중량의 1~4 배의 물을 가하고, 쌀 증자물은 쌀 중량의 1~2 배의 물을 가하여 멸균된 분쇄기 (HMF-985, Hanil, Korea)로 함께 분쇄하였다. 원재료인 산약과 쌀의 증자하기 전 총 중량에 대하여 당귀 또는 오미자를 각각 0.1~2%를 첨가하여 혼합하고, 개량누룩 0.5~3%, 효모 0.5~1%를 첨가하여 25±2℃에서 24 hr 동안 발효하여 효모증식 및 당화하였다. 여기에 효모증식 및 당화단계에 사용된 주원료인 산약, 멥쌀, 누룩, 당귀 또는 오미자를 한 번 더 첨가하고, 당화작용과 알콜 발효작용을 병행하여 전분질 원료를 에탄올과 향미물질로 전환시키기 위해 25±2℃에서 10 days 동안 발효하였다. 발효 후 여과단계를 거쳐 60~70℃에서 10~30 min 동안 살균하여 산약 전통 발효주를 제조하였다. 여과단계에서는 희석되어 발효주의 맛이 변할 수 있기 때문에 물을 첨가하지 않았다.

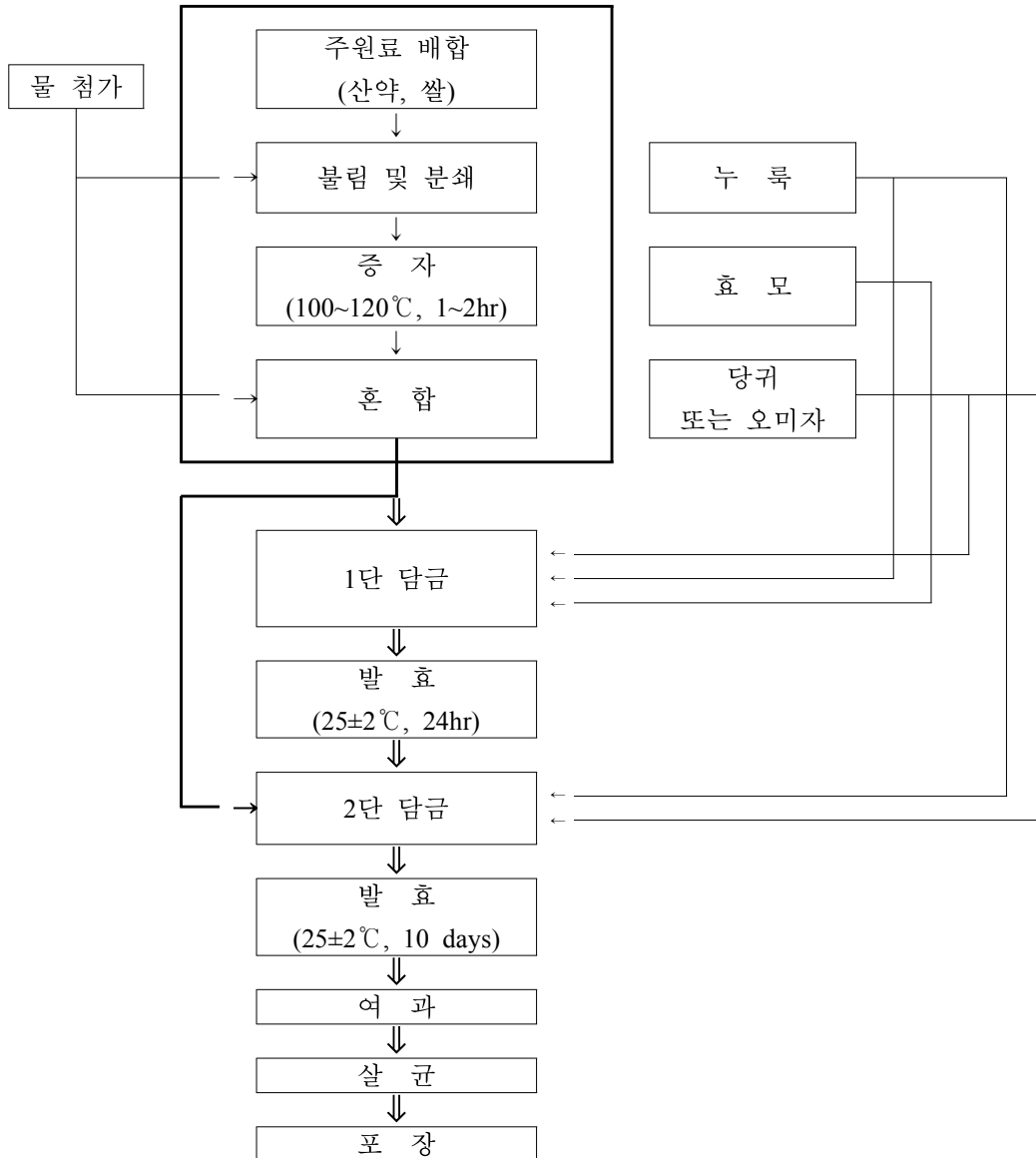


Fig. 4 . 산약 전통 발효주 제조 공정

나. 장기유통형 산약제품 개발

1) 장기유통형 산약 초콜릿 개발

(1) 산약효소분해물을 이용한 초콜릿 제조

콜레스테롤 합성저해효과와 담즙산 흡착효과가 있는 산약 효소분해물은 저분자 크기의 단백질 생성으로 인하여 특유의 쓴맛이 특징이다. 일반적으로 쓴맛은 식품의 기호도를 떨어뜨리는 요소이지만, 최근에는 쓴맛을 오히려 살려 초콜릿, 차 및 커피 등의 기호식품을 개발하는 사례가 증가하고 있으며, 본 연구에서도 효소분해

물 특유의 쓴맛을 장점으로 부각시키고자 이를 원료로하여 초콜릿을 개발, 제조하였다. 초콜릿은 폴리페놀류가 함유된 카카오 매스의 양을 조절하여 화이트, 밀크 및 다크 초콜릿으로 제조할 수 있으며 본 초콜릿은 쓴맛을 지닌 카카오 매스가 함유되지 않은 화이트 커버춰 초콜릿을 기본 원료로 사용하였다. 화이트 커버춰 초콜릿에 고형분 함량 50%로 제조한 효소물 농축액을 넣어 제조하였다. 먼저 녹기 쉽게 조각낸 화이트 초콜릿을 중탕가열하여 40~42℃까지 온도를 상승시킨 후 얼음물에서 25℃까지 냉각하여 Tempering 하고 다시 중탕하여 29℃로 안정·유지 시키고 산약 효소물을 Table 3의 배합비율과 같이 혼합하였다. 혼합 후 일정한 크기(2.5×2.5×2 cm)의 초콜릿 몰드에 채우고 4℃에서 35 min 동안 두어 완전히 굳혀 산약 초콜릿을 제조하였다.

Table 3. 효소 분해물 첨가량에 따른 초콜릿 제조 비율

Ingredients	Conc.	5%	10%	15%	20%	25%	30%
	¹⁾ EH-D		50	100	150	200	250
White chocolate		950	900	850	800	750	700
Total		1000	1000	1000	1000	1000	1000

¹⁾EH-D: enzyme hydrolysate of *Dioscorea batatas*

(2) 증자산약을 이용한 초콜릿 제조

산약을 증자한 경우, 고구마와 유사한 물성을 나타내며, 식감 또한 부드럽고 단맛이 증가되어 높은 기호성을 나타낸다. 산약의 가공제품 개발 확장 가능성을 탐색하기 위하여 증자 산약을 이용하여 초콜릿을 제조하였다. 증자산약의 경우 녹기 쉽게 조각낸 화이트 초콜릿을 중탕가열하여 40~42℃까지 온도를 상승시킨 후 얼음물에서 25℃까지 냉각하여 Tempering 하고 다시 중탕하여 29℃로 안정·유지 시키고 증자 산약을 Table 4의 배합비율과 같이 혼합하였다. 혼합 후 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)의 초콜릿 몰드에 채우고 4℃에서 35 min 동안 두어 완전히 굳혀 산약 초콜릿을 제조하였다.

Table 4. 증자산약 첨가량에 따른 초콜릿 제조 비율

Ingredients	Conc.	5%	10%	15%	20%	25%	30%
	¹⁾ S-D		50	100	150	200	250
White chocolate		950	900	850	800	750	700
Total		1000	1000	1000	1000	1000	1000

¹⁾S-D: Steamed *Dioscorea batatas*

(3) 분말산약을 이용한 초콜릿 제조

주로 물 또는 음료에 현탁하는 방법으로 섭취하는 분말산약의 소비 증대를 위하여 분말산약을 이용하여 장기유통형 초콜릿을 제조하였다. 녹기 쉽게 조각낸 화이트 초콜릿을 증탕가열하여 40~42 °C까지 온도를 상승시킨 후 얼음물에서 25°C까지 냉각하여 Tempering 하고 다시 증탕하여 29°C로 안정·유지 시키고 산약분말을 Table 5의 배합비율과 같이 혼합하였다. 혼합 후 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)의 초콜릿 몰드에 채우고 4°C에서 35 min 동안 두어 완전히 굳혀 산약 초콜릿을 제조하였다.

Table 5. 분말 산약 첨가량에 따른 초콜릿 제조 비율

Ingredients	Conc.	1%	3%	5%	7%	10%
	¹⁾ P-D		10	30	50	70
White chocolate		990	970	950	930	900
Total		1000	1000	1000	1000	1000

¹⁾P-D: Powder of *Dioscorea batatas*

(4) 산약 초콜릿의 품질평가

산약 효소분해물, 증자산약 및 분말산약을 원료로 하여 제조한 초콜릿의 관능평가를 실시하였다. 평가는 초콜릿의 단맛, 쓴맛, 조직감 및 전체 기호도로 나누어 평가하였으며, 훈련된 패널 30명을 구성하여 likert 9점 척도법으로 측정하였다.

(5) 산약 초콜릿 최적 가공공정 확립

산약 효소 분리물 특유의 쓴맛을 살리기 위하여 쓴맛을 지닌 카카오 매스가 함유되지 않은 화이트 커버춰 초콜릿을 기본 원료로 사용하였다. 화이트 커버춰 초콜릿

에 고품분 함량 50%로 제조한 효소물 농축액을 넣어 제조하였다. 산약 초콜릿을 제조할 경우 효소물 10%, 증자 산약15% 및 산약 분말 3%의 함량으로 첨가하는 것이 조직감과 기호도가 가장 우수하였으며, 효소물 20%와 증자 산약 20% 및 산약 분말 5%의 함량이 첨가된 산약 초콜릿의 경우 약하고 부드러운 물성과 강하고 오랫동안 지속되는 산약효소물의 쓴맛을 완화하기 위하여 다크 초콜릿으로 한 번 더 코팅하여 제조하였다.

먼저 녹기 쉽게 조각낸 다크 초콜릿을 중탕가열하여 45~50℃에서 녹인 후 얼음물에서 27℃까지 냉각하여 Tempering 하고 다시 중탕하여 32℃로 안정·유지 시키고, 경우 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)의 초콜릿 몰드에 부어 상온에서 15 min 동안 굳힌 후 초콜릿 몰드를 뒤집어서 중간 부분의 초콜릿 일부를 떨어내어 준비한다. 녹기 쉽게 조각낸 화이트 초콜릿을 중탕가열하여 40~42℃까지 온도를 상승시킨 후 얼음물에서 25℃까지 냉각하여 Tempering 하고 다시 중탕하여 29℃로 안정·유지 시킨 후 산약 효소물과 증자 산약을 Table 6의 배합비율과 같이 혼합하였다. 효소물 10%, 증자 산약15% 및 산약 분말 3%의 함량이 첨가된 산약 초콜릿의 경우 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)의 초콜릿 몰드에 채우고, 효소물 20%와 증자 산약 20% 및 산약 분말 5%의 함량이 첨가된 산약 초콜릿의 경우 미리 준비한 다크 초콜릿이 코팅된 초콜릿 몰드에 2/3를 붓고 위의 남은 1/3을 다크 초콜릿으로 채운 후 4℃에서 35 min 동안 두어 완전히 굳혀 산약 초콜릿을 제조하였다.

*tempering : 광택을 부여하고 카카오 버터의 결정을 안정화 시켜 블룸현상을 방지하기 위하여 초콜릿의 온도를 조절해 주는 과정으로 초콜릿의 종류마다 tempering 의 온도가 다르다.

Table 6. 초콜릿 최적 제조 비율

Ingredients	Conc.	¹⁾ EH-D		²⁾ S-D		³⁾ P-D	
		10%	20%	15%	20%	3%	5%
EH-D		100	200	-	-	-	-
S-D		-	-	150	200	-	-
P-D		-	-	-	-	30	50
White chocolate		900	800	850	800	970	950
Dark chocolate		-	○	-	○	-	○
Total		1000	1000	1000	1000	1000	1000

¹⁾EH-D: enzyme hydrolysate of *Dioscorea batatas*

²⁾S-D: Steamed *Dioscorea batatas*

³⁾P-D: Powder of *Dioscorea batatas*

2) 장기유통형 산약 양갱개발

(1) 한천 첨가 비율을 달리한 산약 양갱 제조

한천가루 첨가량에 따른 산약양갱의 물성 특성을 조사하기 위해 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%로 한천가루 첨가량을 달리하여 산약양갱을 제조하였다. 양갱의 당 함량은 임의로 40%를 첨가하여 Table 7과 같이 제조하였다. 먼저 산약 젖산 발효물에 정제수를 첨가하고 분쇄기(HMF-985, Hanil, Korea)로 곱게 갈아 50 mesh 체를 이용해 입자를 균질화한 후 한천가루를 첨가하여 30 min 동안 교반, 수화한다. 교반시 한천가루가 완전히 수화되도록 유도한다. 설탕 30%를 첨가하고 증기솥에서 100℃까지 가열하여 gel화가 되기 전 가열을 중지하고 제품의 윤기를 부여하기 위해 이소말토 올리고당을 10% 첨가, 교반하여 반듯한 사각 성형틀에 부어 냉각시킨다. 냉각 후 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)로 절단하여 양갱을 완성한다.

Table 7. 한천 첨가량에 따른 양갱 제조비율

Ingredients	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	2.5%	3.0%
Agar powder	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
¹⁾ LF-D	59.5	59	58.5	58	57.5	57
Sugar	30	30	30	30	30	30
Oligosachharide	10	10	10	10	10	10
Total	100					

¹⁾LF-D: Lactic acid bacteria fermented by *Dioscorea batatas*

(2) 당 함량을 달리한 산약 양갱 제조

당 함량에 따른 산약양갱의 물성과 기호도 특성을 조사하기 위해 30%, 35%, 40%, 45%, 50%로 당 첨가량을 달리하여 산약양갱을 제조하였다. 당 함량에 포함된 이소말토 올리고당의 첨가량은 임의로 10 중량%를 첨가하고, 설탕의 첨가량을 조절하는 방법으로 Table 8와 같이 제조하였다. 먼저 산약 젖산 발효물에 정제수를 첨가하고 분쇄기(HMF-985, Hanil, Korea)로 곱게 갈아 50 mesh 체를 이용해 입자를 균질화한 후 한천가루를 첨가하여 30 min 동안 교반, 수화한다. 교반 시 한천가루가 완전히 수화되도록 유도한다. 설탕을 첨가하고 증기솥에서 100℃까지 가열하여 gel화가 되기 전 가열을 중지하고 제품의 윤기를 부여하기 위해 이소말토 올리고당을 10% 첨가, 교반하여 반듯한 사각 성형틀에 부어 냉각시킨다. 냉각 후 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)로 절단하여 양갱을 완성한다.

Table 8. 당 함량에 따른 양갱 제조 비율

Ingredients	30%	35%	40%	45%	50%
Agar powder	2	2	2	2	2
¹⁾ LF-D	68	63	58	53	48
Sugar	20	25	30	35	40
Oligosachharide	10	10	10	10	10
Total	100				

¹⁾LF-D: Lactic acid bacteria fermented by *Dioscorea batatas*

(3) 발효물 함량을 달리한 산약 양갱 제조

산약 젖산 발효물 함량에 따른 산약 양갱의 물성과 기호도 특성을 조사하기 위해 Table 9와 같이 제조하였다. 먼저 산약 젖산 발효물에 정제수를 첨가하고 분쇄기(HMF-985, Hanil, Korea)로 곱게 갈아 50 mesh 체를 이용해 입자를 균질화한 후 한천가루를 첨가하여 30 min 동안 교반, 수화한다. 교반 시 한천가루가 완전히 수화되도록 유도한다. 설탕을 첨가하고 증기솥에서 100℃까지 가열하여 gel화가 되기 전 가열을 중지하고 제품의 윤기를 부여하기 위해 이소말토 올리고당을 10% 첨가, 교반하여 반듯한 사각 성형틀에 부어 냉각시킨다. 냉각 후 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)로 절단하여 양갱을 완성한다.

(4) 생산약 함량을 달리한 산약 양갱 제조

생 산약 함량에 따른 산약 양갱의 물성과 기호도 특성을 조사하기 위해 Table 9와 같이 제조하였다. 먼저 생 산약에 정제수를 첨가하고 분쇄기(HMF-985, Hanil, Korea)로 곱게 갈아 50 mesh 체를 이용해 입자를 균질화한 후 한천가루를 첨가하여 30 min 동안 교반, 수화한다. 교반 시 한천가루가 완전히 수화되도록 유도한다. 설탕을 첨가하고 증기솥에서 100℃까지 가열하여 gel화가 되기 전 가열을 중지하고 제품의 윤기를 부여하기 위해 이소말토 올리고당을 10% 첨가, 교반하여 반듯한 사각 성형틀에 부어 냉각시킨다. 냉각 후 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)로 절단하여 양갱을 완성한다.

(5) 증자산약 함량을 달리한 산약 양갱 제조

증자 산약 함량에 따른 산약 양갱의 물성과 기호도 특성을 조사하기 위해 Table 9와 같이 제조하였다. 먼저 증자 산약에 정제수를 첨가하고 분쇄기(HMF-985, Hanil, Korea)로 곱게 갈아 50 mesh 체를 이용해 입자를 균질화한 후 한천가루를 첨가하여 30 min 동안 교반, 수화한다. 교반 시 한천가루가 완전히 수화되도록 유도한다. 설탕을 첨가하고 증기솥에서 100℃까지 가열하여 gel화가 되기 전 가열을 중지하고 제품의 윤기를 부여하기 위해 이소말토 올리고당을 10% 첨가, 교반하여 반듯한 사각 성형틀에 부어 냉각시킨다. 냉각 후 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)로 절단하여 양갱을 완성한다.

Table 11. 산약발효물, 생산약 및 증자산약 함량에 따른 양갱 제조 비율

Ingredients	Concentration (%)		
	10	20	30
¹ NF-D / ² NP-D / ³ S-D	10	20	30
Water	40	30	20
Agar powder	2	2	2
Granulated sugar	38	38	38
Oligosaccharide	10	10	10
Total	100		

¹NF-D: Lactic acid bacteria fermented by *Dioscorea batatas*

²NP-D: Not processed of *Dioscorea batatas*

³S-D: Steamed *Dioscorea batatas*

(6) 분말산약 함량을 달리한 산약 양갱 제조

산약 분말 함량에 따른 산약 양갱의 물성과 기호도 특성을 조사하기 위해 Table 12과 같이 제조하였다. 먼저 산약 분말에 정제수를 첨가하고 분쇄기(HMF-985, Hanil, Korea)로 곱게 갈아 50 mesh 체를 이용해 입자를 균질화한 후 한천가루를 첨가하여 30 min 동안 교반, 수화한다. 교반 시 한천가루가 완전히 수화되도록 유도한다. 설탕을 첨가하고 증기솥에서 100℃까지 가열하여 gel화가 되기 전 가열을 중지하고 제품의 윤기를 부여하기 위해 이소말토 올리고당을 10% 첨가, 교반하여 반듯한 사각 성형틀에 부어 냉각시킨다. 냉각 후 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)로 절단하여 양갱을 완성한다.

Table 12. 분말산약 함량에 따른 양갱 제조 비율

Ingredients	3%	5%	7%
P-D	3	5	7
Water	47	45	43
Agar powder	2	2	2
Sugar	38	38	38
Oligosaccharide	10	10	10
Total		100	

¹⁾P-D: Powder of *Dioscorea batatas*

(7) 기호도 증진을 위한 부재료 첨가에 따른 양갱 제조 및 최적 가공 공정 확립

산약 양갱의 제조는 수회의 예비실험을 거쳐 이루어 졌으며, 예비실험 결과 산약 젓산 발효물 10%, 생 산약 20%, 증자 산약 30%, 산약 분말 5%의 첨가비율이 가장 좋은 색깔을 나타냄을 확인하였고, 또한 설탕 사용량을 줄이고 건강기능성을 고려하여 대체당으로 솔비톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 이소말토올리고당을 첨가하였다. 한천의 함량은 예비실험을 통해 가장 조직감이 좋았던 2%로 결정하였다. 산약 젓산 발효물, 생 산약, 증자 산약, 산약 분말에 각각 당류 48%(설탕 14%, 솔비톨 8%, 자일리톨 8%, 에리스리톨 8%, 이소말토올리고당 10%), 한천가루 2%의 비율로 첨가하여 제조하였다. 각 양갱의 배합비율은 Table 13에 나타내었다.

먼저 산약 젖산 발효물 10%, 생 산약 20%, 증자 산약 30%, 산약 분말 5%를 각각 정제수를 넣고 분쇄기 (HMF-985, Hanil, Korea)로 곱게 갈아 50 mesh의 체를 이용해 입자가 균질화 하였다. 균질화한 후 한천가루를 2% 첨가하여 30 min 동안 교반, 수화시킨뒤 설탕 및 대체당을 첨가하고 증기솥에서 100℃까지 가열하였다. gel 화가 되기 전에 올리고당 10%를 첨가하여 잘 교반한 다음, 반듯한 사각 스테인레스 용기에 부어 굳힌 후 일정한 크기(2.5×2.5×2cm)로 절단하여 양갱을 제조하였다.

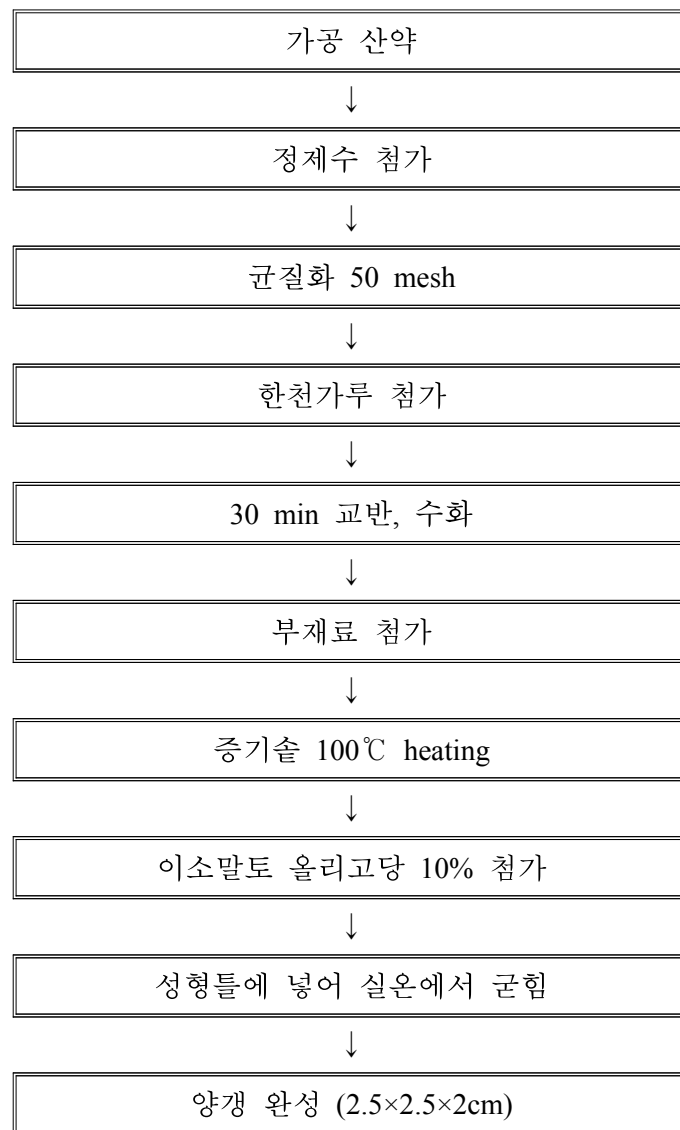


Fig. 5. 양갱 최적 공정

Table 13. 양갱 최적 제조 비율

Ingredients	⁵⁾ WH-SJ	⁶⁾ SK-SJ	⁷⁾ CB-SJ	⁸⁾ CS-SJ	⁹⁾ PE-SJ
¹⁾ LF-D	10	10	10	10	10
²⁾ NP-D	30	30	30	30	30
³⁾ S-D	20	20	20	20	20
⁴⁾ P-D	5	5	5	5	5
Water	40	40	40	40	40
Agar	1	1	1	1	1
Xanthan gum	1	1	1	1	1
Sugar	38	38	38	38	38
Oligosaccharide	10	10	10	10	10
whey powder	5	-	-	-	-
skim milk	-	5	-	-	-
cocoa butter	-	-	5	-	-
Citrus syrup	-	-	-	5	-
plum extract	-	-	-	-	5
Total	100				

¹⁾LF-D: Lactic acid bacteria fermented by *Dioscorea batatas*

²⁾NP-D: Not processed of *Dioscorea batatas*

³⁾S-D: Steamed *Dioscorea batatas*

⁴⁾P-D: Powder of *Dioscorea batatas*

⁵⁾WH-SJ, ⁶⁾SK-SJ, ⁷⁾CB-SJ, ⁸⁾CS-SJ and ⁹⁾PE-SJ means added with whey powder, skim milk, cocoa butter, citrus syrup, plum extract in sweet jelly, respectively.

*Each sweet jelly included a *Dioscorea batatas* products(¹⁻⁵⁾) respectively.

다. 단기유통형 산약제품 개발

1) 단기유통형 산약 발효음료 개발

(1) 당화방법에 따른 산약 발효음료 제조

산약 발효음료의 맛을 결정하기 위한 첫 단계로 산약 발효음료의 맛 증진과 기호도를 높이기 위한 당화방법으로 옛기름을 이용하여 당화처리한 발효음료와 당화처리를 하지 않고 설탕을 첨가한 발효음료를 제조하였다. 옛기름 제조는 맥아 (보리

70%, 밀 30% 혼합) 200 g을 정제수 800 mL과 혼합하여 60℃ 항온수조에서 2 hr 침출한 후 여과하여 제조하였으며 이를 산약 발효음료의 당화를 위한 효소액으로 사용하였다. 엿기름의 농도는 10 °Brix로 하여 사용하였다. 이 후, 산약발효물에 엿기름을 첨가한 후 60℃ 항온수조에서 6 hr 당화시킨 후 100℃에서 30분 가열하여 당화를 중지시켰다. 발효음료의 starter는 당화처리 후 활성화된 *Lactobacillus acidophilus*($\geq 1 \times 10^{5-6}$ CFU/mL)을 총량의 1%가 되게 첨가한 뒤 37℃에서 24-48 hr 발효하여 발효음료를 제조하였다. 대조구로 당화처리를 하지 않은 발효음료를 제조하였다.

Table 14. 당화방법에 따른 발효음료 제조 비율

Ingredients	Control	Malt-B	Sugar-B
¹⁾ LF-D	500	500	500
Water	500	500	500
Malt solution (10 °Brix)	-	100	-
Sugar	-	-	100
1% <i>L. acidophilus</i>	10	10	10
Total	1010	1110	1110

¹⁾LF-D: Lactic acid bacteria fermented by *Dioscorea batatas*

(2) 발효방법에 따른 산약 발효음료 제조

산약 발효음료의 맛 증진과 기능성 향상을 위해 발효종균을 달리하여 제조하였다. 일반적인 발효음료는 음료 원료에 스타터를 첨가하여 한 번에 발효시키는 공정이지만 본 발효음료는 산약을 *Lactobacillus acidophilus*로 1차 발효시킨 발효물에 음료의 기호도를 높이기 위한 재료를 첨가한 후 2차 종균으로 *Lactobacillus amylophilus*와 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*를 접종하여 *Lactobacillus amylophilus*는 전분 당화를 촉진시키는 역할을 하여 생성된 전분이 *Lactobacillus acidophilus*의 당화원으로 사용되도록 하며 이로 인한 기능성을 높일 수 있다. 또한 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*는 이형발효로 탄산미를 부여하며 발효음료의 기호도를 상승시킬 수 있다. 이러한 다단발효는 종래에는 없는 기술로서 선행연구에서 수행한 1단계 발효보다 더욱 기호도면에서도 우수한 것으로 확인되었다. 그리하여 점질성 다당류가 함유되어 각종 기능성이 우수한 산약에 발효종균을 접종하여 제

조, 분리한 산약 발효물을 주원료로 2차 발효를 거친 발효음료를 제조하여 더욱 기능성을 높이고 기호도를 증진시킨 산약발효음료를 제조할 수 있다. 산약발효물에 활성화되어있는 *Lactobacillus acidophilus*($\geq 1 \times 10^{5-6}$ CFU/mL), *Leuconostoc mesenteroids* subsp. *mesenteroids*($\geq 1 \times 10^{5-6}$ CFU/mL) 및 *Lactobacillus amylophilus*($\geq 1 \times 10^{5-6}$ CFU/mL) 등을 아래 Table 14과 같이 총량의 1%가 되게 첨가한 뒤 37°C에서 24-48 hr 발효하여 발효음료를 제조하였다.

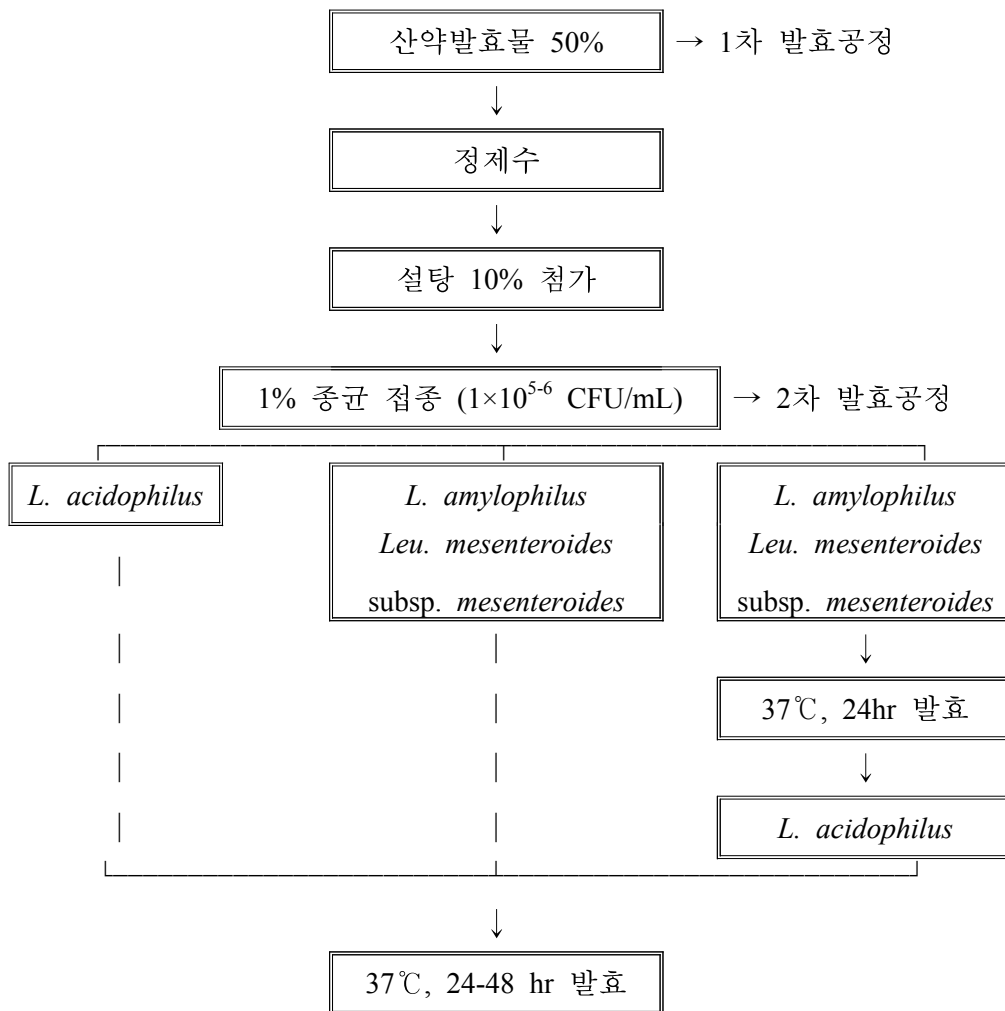


Fig. 6. 종균 및 발효공정에 따른 발효음료 제조 방법

(3) 젖산 발효물 농도에 따른 산약 발효음료 제조

산약 발효음료의 적정 음용농도를 결정하기위해 산약 발효물의 농도를 각각 10%, 20%, 30%, 40%, 50%로 달리하여 제조하였다. 산약발효물에 활성화 되어 있는 *Leuconostoc mesenteroids* subsp. *mesenteroids*($\geq 1 \times 10^{5-6}$ CFU/mL) 및 *Lactobacillus amylophilus*($\geq 1 \times 10^{5-6}$ CFU/mL) 등을 총량의 1%가 되게 첨가한 뒤 37°C에서 24-48 hr 발효하여 발효음료를 제조하였다.

Table 15. 산약 발효물 함량에 따른 발효음료 제조 비율

	10%	20%	30%	40%	50%
¹⁾ LF-D	100	200	300	400	500
Water	790	690	590	490	390
Granulated sugar	100	100	100	100	100
<i>L. amylophilus</i>	5	5	5	5	5
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	5	5	5	5	5
Total	1000	1000	1000	1000	1000

¹⁾LF-D: Lactic acid bacteria fermented by *Dioscorea batatas*

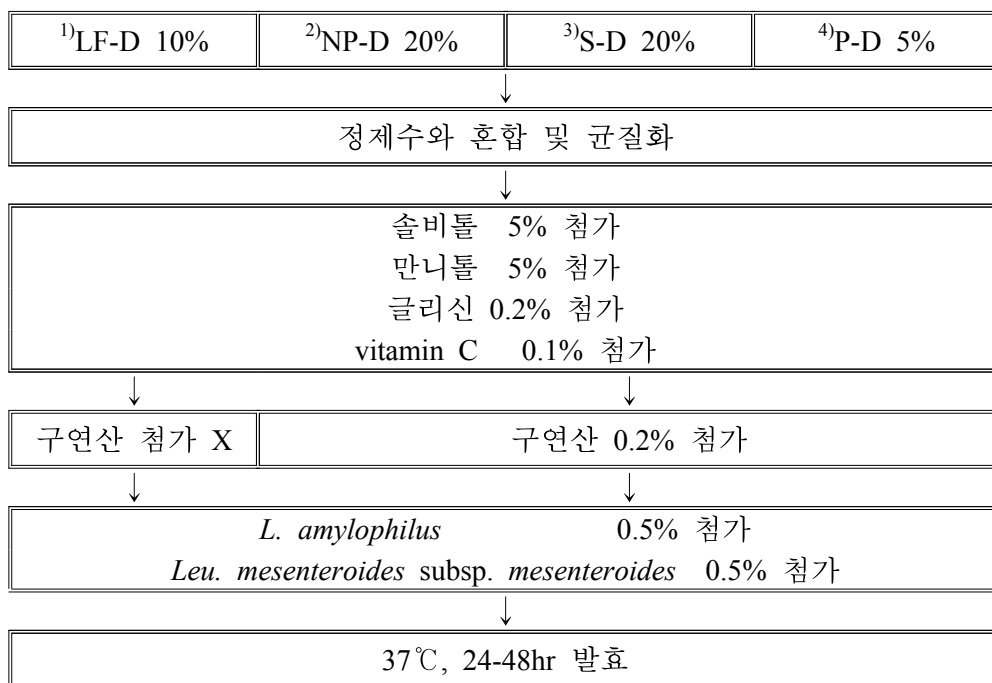
(4) 가공방법에 따른 산약 발효음료 제조

산약 활용도를 증대시키기 위하여 생산약, 증자산약 및 산약 분말을 각각 이용하여 농도별 음료를 제조한 뒤 가장 적합한 함량을 선정하였다. 먼저 생 산약의 농도는 각각 20%, 40%, 60%로, 증자 산약의 농도를 각각 20%, 40%, 60%로, 산약 분말의 농도를 각각 5%, 10%, 15%로 달리하여 제조하였다. 산약발효물에 활성화되어있는 *Leuconostoc mesenteroids* subsp. *mesenteroids*($\geq 1 \times 10^{5-6}$ CFU/mL) 및 *Lactobacillus amylophilus*($\geq 1 \times 10^{5-6}$ CFU/mL) 등을 총량의 1%가 되게 첨가한 뒤 37°C에서 24-48 hr 발효하여 발효음료를 제조하였다.

(5) 산약 발효음료 최적 가공공정 확립

수차례의 예비실험을 통한 산약발효음료의 품질 및 기호도 평가 결과를 바탕으로 하여 각 각의 전처리를 달리하여 제조한 산약발효음료의 최적 음료 배합비를 확인할 수 있었다. 산약발효음료의 최적 산약 첨가량은 산약 젖산 발효물 10%, 생 산약

20%, 증자 산약 20%, 산약 분말 5%이었다. 생 산약 200 g, 증자 산약 200 g, 산약 분말 50 g, 증자 산약분말 100 g, 산약 발효물 100 g에 각각 정제수 700 mL, 700 mL, 850 mL, 800 mL, 800 mL 씩 넣고 분쇄기 (HMF-985, Hanil, Korea)로 곱게 갈아 50 mesh의 체를 이용해 입자가 균질화 되도록 하여 900 mL을 음료제조에 사용하였다. 산약과 정제수를 혼합하여 같은 것 900 mL에 각 음료의 배합비율에 따라 건강기능성을 위해 대체당으로 솔비톨, 만니톨을 첨가하고, 구연산, 글리신, vitamin C, *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*를 첨가하여 37°C에서 24 hr 발효시켜 제조하였다.



¹LF-D: Lactic acid bacteria fermented by *Dioscorea batatas*

²NP-D: Not processed of *Dioscorea batatas*

³S-D: Steamed *Dioscorea batatas*

⁴P-D: Powder of *Dioscorea batatas*

Fig. 7. 산약 최적 가공공정 방법

2) 단기유통형 산약 죽 개발

(1) 젓산 발효물을 이용한 산약 죽 제조

산약젓산발효물을 이용한 산약죽의 제조에 있어서 산약 젓산 발효물과 이소말토

올리고당 및 쌀가루의 최적의 첨가량을 확인하기 위하여 제조하였다. 산약 젖산 발효물을 5 중량%, 7 중량%, 10 중량%로 첨가하여 농도를 줄이고, 각 각의 농도별 이소말토 올리고당 첨가량을 5 중량%, 10 중량%, 15 중량%로 달리하여 Table 16과 같이 제조하였다. 쌀가루는 5 중량%로 줄여 모두 동일하게 첨가하였다.

Table 16. 발효물 및 당 첨가량에 따른 죽의 제조 비율

Ingredients	5%			7%			10%		
¹⁾ LF-D	50	50	50	70	70	70	100	100	100
Water	850	800	750	830	780	730	800	750	700
Oligosachharide	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Rice powder	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Total	1000								

¹⁾LF-D: Lactic acid bacteria fermented by *Dioscorea batatas*

(2) 생산약을 이용한 산약 죽 제조

생산약을 이용한 산약죽의 제조에 있어서 산약젖산발효물과 이소말토 올리고당 및 쌀가루의 최적의 첨가량을 확인하기 위하여 제조하였다. 예비실험 시, 10 중량% 첨가구의 경우 물성이 약하게 나타났고, 20 중량% 첨가구의 경우 약간 강한 물성을 나타냈으며, 30 중량% 첨가구의 경우 강한 물성을 띄는 것을 확인하였다. 이에 쌀가루 첨가량을 줄이고 생산약의 농도와 이소말토 올리고당 첨가량을 조절하여 Table 17과 같이 제조하였다.

Table 17. 생산약 및 당 첨가량에 따른 죽의 제조 비율

Ingredients	10%			15%			20%		
¹⁾ NP-D	100	100	100	150	150	150	200	200	200
Water	800	750	700	750	700	650	700	650	600
Oligosaccharide	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Rice powder	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Total	1000								

¹⁾NP-D: Not processed *Dioscorea batatas*

(3) 증자산약을 이용한 산약 죽 제조

증자산약을 이용한 산약죽의 제조에 있어서 산약젓산발효물과 이소말토 올리고당 및 쌀가루의 최적의 첨가량을 확인하기 위하여 제조하였다. 예비실험 결과, 증자산약의 첨가량을 달리하여 제조한 산약죽의 기호도 평가 결과, 세 가지 경우 모두 강한 물성을 나타내었다. 이에 쌀가루를 첨가하지 않고, 증자산약과 이소말토 올리고당의 첨가량을 조절하여 Table 18과 같이 제조하였다.

Table 18. 증자산약 및 당 첨가량에 따른 죽의 제조 비율

Ingredients	20%			40%			60%		
¹⁾ S-D	200	200	200	400	400	400	600	600	600
Water	750	700	650	550	500	450	350	300	250
Oligosaccharide	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Rice powder	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	1000								

¹⁾S-D: Steamed *Dioscorea batatas*

(4) 분말산약을 이용한 산약 죽 제조

산약분말을 이용한 산약죽의 제조에 있어서 산약젓산발효물과 이소말토 올리고당 및 쌀가루의 최적의 첨가량을 확인하기 위하여 제조하였다. 예비실험결과, 산약분말의 첨가량이 증가할수록 기호도가 좋지 않았다. 물성은 세 가지 경우 모두 강하게 나타났는데 이는 쌀가루 첨가량이 많음을 알 수 있었다. 이에 쌀가루 첨가량과 산약분말의 농도를 줄이고 이소말토 올리고당 첨가량을 조절하여 Table 19와 같이 제조하였다.

Table 19. 분말산약 및 당 첨가량에 따른 죽의 제조 비율

Ingredients	3%			5%			7%		
¹ P-D	30	30	30	50	50	50	70	70	70
Water	870	820	770	850	800	750	830	780	730
Oligosaccharide	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Rice powder	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Total	1000								

¹P-D: Powder of *Dioscorea batatas*

(5) 산약 죽 최적 가공공정 확립

산약 죽 제조에 사용한 쌀가루는 백미를 3회 수세하여 쌀 중량의 2배에 해당하는 양을 가수하여 실온에서 1시간 동안 침지한 다음 30분간 체에 받쳐 물기를 제거한 후, 분쇄기 (HMF-985, Hanil, Korea)를 이용하여 약 50 mesh가 되도록 마쇄하여 죽 제조에 사용하였다. 생 산약 150 g, 증자 산약 200g, 산약 분말 30 g, 산약 발효물 50 g에 각각 정제수 700 mL, 700 mL, 820 mL, 800 mL 씩 넣고 분쇄기 (HMF-985, Hanil, Korea)로 곱게 갈아 50 mesh의 체를 이용해 입자가 균질화 되도록 하였다. 여기에 각 죽의 배합비율에 따라 올리고당과 쌀가루를 첨가하여 약불에서 나무주걱으로 계속 교반하면서 40~50분간 가열하여 총 수분함량이 80%가 되도록 죽을 제조하였다. 각 죽의 배합비는 Table 20과 같다.

Table 20. 산약 죽 최적 제조 비율

Ingredients	Conc.	¹ LF-D 5%	² NP-D 15%	³ S-D 20%	⁴ P-D 3%
	<i>Dioscorea batatas</i>		50	150	200
Water		800	700	700	820
Oligosaccharide		100	100	100	100
Rice powder		50	50	-	50
Total		1000	1000	1000	1000

¹LF-D: Lactic acid bacteria fermented by *Dioscorea batatas*

²NP-D: Not processed of *Dioscorea batatas*

³S-D: Steamed *Dioscorea batatas*

⁴P-D: Powder of *Dioscorea batatas*

라. 개발제품의 특성 조사

1) 관능평가

산약제품의 관능적 특성을 확인하기 위하여 강도특성 (intensity characteristics)과 기호도 특성 (sensory characteristics)으로 구분하여 평가를 실시하였다. 30명의 패널을 선정하여 Likert 9점 척도법으로 평가하였으며 강도 특성의 경우 1점을 "매우 약함 (extremely weak)", 9점을 "매우 강함 (extremely strong)"으로, 기호도 특성의 경우 1점을 "매우 나쁨 (extremely bad)", 9점을 "매우 좋음 (extremely good)" 으로 하였다.

2) pH 측정

시료 10 mL을 pH meter (Metrohm 827)를 이용하여 측정하였다.

3) 적정산도 측정

산도는 시료 10 mL을 취하여 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 소비된 0.1 N NaOH 용액의 양을 측정한 후 lactic acid(%)로 환산하였다.

4) 당도측정

당도는 굴절당도계 (PDX-1, Vee-gee corp., U.S.A) 를 이용하여 시료 100 uL를 취하여 측정하였다.

5) 색도측정

색차계(CR-300 series, Minolta, Japan)를 사용하여 색도를 측정하였고 Hunter system에 의하여 L(명도, Lightness), a(적색도, Redness)와 b(황색도, Yellowness) 값으로 나타내었다. 이때의 표준 백색판은 L=97.57, a=0.00, b=1.79을 기준으로 하였다.

6) 수분함량측정

수분함량은 수분측정기 (MB45, Moisture analyzer, OHAUS Corp., Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

7) 점도측정

점도계 (DV-II + RV viscometer, Brookfield, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

8) 미생물측정

미생물 측정은 시료를 0.85% 멸균 생리식염수로 10배 희석하는 10단 희석법으로 희석하고 pH를 5.5로 조절한 MRS 한천배지에 도말하여 30℃에서 24-48 hr 배양하여 형성된 젖산균 집락을 계수하여 측정하였다. 발효음료의 스타터로 사용한 *Lactobacillus amylophilus*의 균수는 starch agar (Difco, USA)를, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 균수는 PES 배지를 제조하여 확인하였다. 산약 젖산발효물의 경우 *Lactobacillus acidophilus*로 1차 발효한 분리물로서, 이들 균주를 확인하기 위하여 m-LBS 배지를 제조하여 starch 배지에서 생성된 균수를 제외하여 측정하였다.

마. 개발제품의 저장안정성 확인

1) 장기유통형 산약제품의 저장안정성

초콜릿과 양갱은 일반적으로 당함량이 높고 낮은 수분함량으로 장기간 저장할 수 있는 특성이 있으며, 본 개발제품인 초콜릿과 양갱 또한 단기유통형 제품에 비하여 저장기간이 긴 장점이 있다. 하지만 초콜릿의 경우, 저장기간이 지나면서 초콜릿 표면의 광택이 없어져 회백색이 되거나 흰색 반점이 생겨 외관상 상품가치가 떨어지는 경우가 있는데 이러한 현상을 블룸(bloom)이라 한다. Bloom현상의 대표적 원인은 fat-bloom과 sugar-bloom이 있으며, 이러한 원인은 초콜릿 tempering시 온도와 수분의 영향도 포함된다. 초콜릿의 원료로 사용하는 산약 효소물, 증자산약에 수분이 함유되어 있으며, 수분의 영향으로 인하여 초콜릿 제조 또는 저장 시 초콜릿에 bloom 현상이 발생할 수 있지만, 본 연구에서는 산약 효소물의 경우 10%, 증자산약의 경우 15% 첨가시에도 수분에 의한 bloom 현상은 발생되지 않았다. 그리하여 bloom 현상의 또 다른 원인인 tempering 온도변화를 고려하여 tempering 온도를 각각 30℃, 40℃, 50℃, 60℃로 하여 초콜릿을 제조한 후 저장 1주일 후 관능평가를 통하여 외관 평가에 의한 bloom 발생정도 및 조직감 변화를 측정하였다.

2) 단기유통형 산약제품의 저장안정성

본 연구의 단기유통형 개발제품인 발효음료는 생균이 음료에 포함되어 있기 때문에 probiotics 기능을 부가할 수 있지만, 저장일수가 길어질수록 미생물의 과도한 증식 및 사멸로 인하여 맛이 떨어지며 개인에 따라서는 설사 및 복통을 유발할 수

있다. 일반적인 발효음료의 유통기한은 5일로 알려져 있으며, 본 발효음료의 저장 안정성을 확인하기 위하여 실온에서 7일간 음료를 보관한 후 젖산균의 총균수를 측정하여 저장일수에 따라 변화하는 미생물의 양을 측정하였다.

죽은 가장 저장기간이 짧은 단기 유통형 제품으로, 저장 시 발생하는 노화정도와 이미생성으로 인하여 저장기간 설정이 필수적이며, 이를 확인하기 위하여 상온에서 죽을 보관하며 1일 단위로 총 7일간 관능평가를 실시하였다.

바. 산약을 이용한 기능성 가공 제품의 활용방안 연구

산약을 다양한 방법으로 가공처리하여 기호도를 높이거나 기능성을 높인 소재를 개발하였다. 이러한 소재를 이용하여 갈변을 제어한 분말, 발효주, 보관기능이 우수한 장기유통형 혈류개선 산약제품과 식사대용 편이식으로서의 단기 유통형 혈류개선 산약제품을 개발하였다. 이들 제품의 시장 확보 가능성과 소비자 접근도를 높이기 위한 방법을 탐색하기 위하여 시중에 판매되고 있는 다양한 종류의 가공제품 및 시장추세를 조사하여 산약을 이용한 기능성 제품의 활용방안을 모색하였다.

7. 산약의 기능성 소재 및 가공제품 *in-vivo* 혈류개선효과 조사

가. 산약 효소분해물과 젖산발효물의 혈류개선 효과

1) 실험동물 선별 및 식이 조제

산약 효소분해물과 젖산발효물의 혈류개선 효과 측정은 실험은 3주령의 ICR mouse male을 사용하였다. 쥐는 10마리씩 10개의 group으로 실험하였다. 각 group은 정상사료와 cholesterol과 마 추출물을 비율별로 배합하여 pellet으로 만들어 건조하여 제조한 뒤 free feeding이 가능토록 공급하였다.

Table 21. 동물실험 식이

Group	Diets
Group I	정상사료 처리군
Group II	고지방식을 위해 cholesterol 2%를 함유된 처리구
Group III	cholesterol 2% + 산약 5%
Group IV	cholesterol 2% + <i>LB. casei</i> 발효물 5%
Group V	cholesterol 2% + <i>Lc. lactis</i> 발효물 5%
Group VI	cholesterol 2% + <i>En. flavescens</i> 발효물 5%
Group VII	cholesterol 2% + <i>Lb. acidophilus</i> 발효물 5%
Group VIII	cholesterol 2% + protamex 분해물 5%
Group IX	cholesterol 2% + Newtruse 분해물 5%
Group X	cholesterol 2% + <i>En. liqifaciens</i> 발효물 5%

나. 산약 기능성 소재의 혈류개선 효과

1) 실험동물 선별 및 식이 조제

실험은 8주령의 수컷 SD rat을 60마리 구입하여 환경에 적응시킨 후 체중에 따라 각 처리구당 10마리씩 6군으로 나누고 한 cage당 한 마리씩 넣어 현재까지 6주 동안 사육하여 실험하였다. 실험시작 시 쥐의 평균체중은 300 g으로 동일하도록 배치하였고 사육실의 온도(22℃)와 습도(60%)는 일정하게 유지하였으며 조명은 12시간 간격으로 조절하였다. 물과 사료의 양은 제한 없이 공급하였으며 3주에 한번 씩 같은 시간대에 체중을 측정하였다. 또한 사료는 냉장온도에서 보관하면서 공급하였다. 동물실험 사료는 일반식이사료, cholesterol, lard 및 혈류개선 효과가 높았던 분획물들을 비율별로 배합하여 pellet으로 제조한 뒤 free feeding이 가능토록 공급하였다.

Table 22. 동물실험 식이

Group	Diets
Group I : NFD	일반 식이 사료군 (지방 4.3% 함유)
Group II : HFD	cholesterol 2% + 지방 10%
Group III : FEt-HFD	cholesterol 2% + 지방 10% + 젖산균 발효 상등액 ethanol 분획 10%
Group IV : FBu-HFD	cholesterol 2% + 지방 10% + 젖산균 발효 상등액 butanol 분획 10%
Group V : PEA-HFD	cholesterol 2% + 지방 10% + protamex 분해 상등액 ethyl acetate 분획 10%
Group VI : PEt-HFD	cholesterol 2% + 지방 10% + protamex 분해 상등액 ethanol 분획 10%

다. 산약 가공제품의 혈류개선 효과

1) 실험동물 선별 및 식이 조제

실험은 4주령의 SD rat (male)을 10마리씩 9개의 group으로 총 90마리를 구입하여 7일간 일반사료로 순화 사육기간을 거쳐 실험에 사용하였다. 실험직전, 순화 사육기간 동안 관찰하면서 증상이 없으며, 체중감소가 없는 건강한 동물을 골라 일정한 무게의 실험군으로 배치하였고, 사육실은 실내온도 22±2℃, 습도 55±5%, 12시간 light-dark cycle 조건으로 조절하였다. 본 실험에 사용한 식이는 AIN-93G (Haral Teklad, Madison, USA)를 기본으로 하여 Table 23과 같이 사용하였다. 실험은 12주 동안 진행하였으며, 기간 동안 실험식이와 식수는 제한 없이 공급하였다.

Table 23. 동물실험 식이

Group	Diets	Items
G1	일반식이	-
G2	고지방식이 (일반식이 + 10% lard + 2% cholesterol)	-
G3	고지방식이 + 식이섬유 10%	-
G4	고지방식이 + 죽 10%	산약 발효물
G5	고지방식이 + 발효음료 10%	산약 발효물
G6	고지방식이 + 양갱 10%	산약 발효물
G7	고지방식이 + 초콜릿 base 10%	-
G8	고지방식이 + 카카오매스 10%	-
G9	고지방식이 + 산약초콜릿 10%	산약 효소물

라. 혈류 개선 효과 측정방법

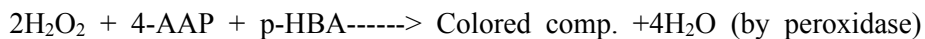
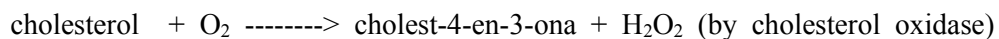
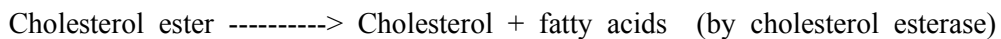
1) Body weight 측정

각 group 쥐들의 body weight를 g 단위의 전자저울을 이용하여 측정하였다.

2) 혈중 total Cholesterol 측정

아산제약에서 판매하는 total choleaterol 측정 kit를 이용하여 측정한다.

실험동물을 이용하여 대조군과 고지방식, 고지방식에 마의 추출물을 배합한 사료를 공급하였을 경우 각 실험군에 따른 혈중 total cholesterol 변화를 확인하였다. 쥐에서 blood를 얻어 이 중 serum만을 분리하여 total cholesterol이 양을 측정하였다. Cholesterol ester는 가수분해 되어 cholesterol을 생성하고 이 cholesterol은 산화되어 H₂O₂를 만들게 된다. 이 hydrogen peroxide가 peroxidase에 의해 붉은 색으로 반응이 나타난다.



적색의 키논형 색소 형성

Serum 20 uL와 kit로부터 제조한 효소시액을 3 mL 넣어 잘 혼합한 후 37°C에서 5

분간 incubation한 후 spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 측정하며, endpoint 방법을 이용한다.

3) 혈중 HDL-cholesterol 측정

cholesterol 조절이란 체내 cholesterol 수준을 적절한 범위로 조절하여 혈장과 조직(특히 혈관)에 cholesterol 축적이 일어나지 않게 함을 말한다. 체내 cholesterol이 축적될 경우 고콜레스테롤혈증이 나타나면 장기간에 걸쳐 cholesterol이 조절되지 않을 경우 동맥경화증으로 이어진다. 이 중 HDL (high density lipoprotein) cholesterol은 고콜레스테롤혈증 뿐만 아니라 동맥경화위험 감소에 주요한 역할을 하게 된다. HDL 입자는 동맥혈관 벽으로부터 잉여의 cholesterol을 제거하며 혈관의 플라그 형성을 억제해 주고 혈관에 형성된 플라그도 안정화 시켜 더 이상의 플라그의 형성을 막아준다. 또한 HDL 입자 자체에 항산화 효소(paraoxonase)가 결합되어 있어 혈장과 동맥벽 내부의 LDL이 산화되어 변화는 것을 막고 PAFAH(platelet activation factor acetylhydrolase)는 혈장과 동맥벽에 존재하는 산화 지단백입자를 분해시켜 산화된 지단백입자를 제거하는 역할도 해준다. HDL cholesterol을 측정하는 원리는 다음과 같다. Kit에 포함되어 있는 분리시액 중 인텅스텐과 마그네슘 양이온의 작용으로 lipoprotein중 특히 apo-lipoprotein B를 가지고 있는 LDL (Low-Density lipoprotein)을 침전시킨후 상층에 남은 HDL (High-Density lipoprotein) 중의 cholesterol을 정량한다. 고지방식에서 각 성분의 역할을 좀 더 구체적으로 확인하게 위해 HDL level을 측정하였다. 아산제약에서 판매하는 HDL-CHO assay kit를 이용하여 500 nm에서 그 흡광도를 측정함으로써 control과 각 실험군을 비교하였다. Serum 100 uL와 분리시액 100 uL를 혼합하여 실온에서 10분간 반응을 시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 100 uL를 옮기고 여기에 효소시액 3 mL을 첨가한 후 잘 혼합하여 37 °C에서 5분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 측정하며, endpoint 방법을 이용한다.

4) LDL-cholesterol 측정

LDL cholesterol 농도는 total cholesterol, HDL cholesterol 및 triglycerides 측정치를 바탕으로 friede-wald 방식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{LDL cholesterol} = [\text{total cholesterol} - (\text{HDL cholesterol} + (\text{triglyceride}/5))]$$

5) 혈중 Triglyceride 측정

중성지방은 serum내에서 자유롭게 이동하지 못하고 단백질과 complex형태에 lipoprotein의 형태로 이동을 한다. 이런 이유로 인해 triglyceride determination은 triglyceride를 glycerol과 free fatty acid로 enzymatic 혹은 alkaline hydrolysis법을 통해서 release된 glycerol을 측정함으로써 얻어야한다. 그 원리는 다음과 같다

중성지방 → 글리세린 + 지방산 → L-a-글리세로인산 → H₂O₂ + 4-아미노안티피린 + ESPT → 키노이드 색소

아산제약의 중성지방 측정용 시액을 이용하여 serum 20 uL와 요소시액 3 mL를 혼합한 뒤 37°C에서 10분간 반응을 시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 550 nm에서 측정하며, endpoint 방법을 이용한다.

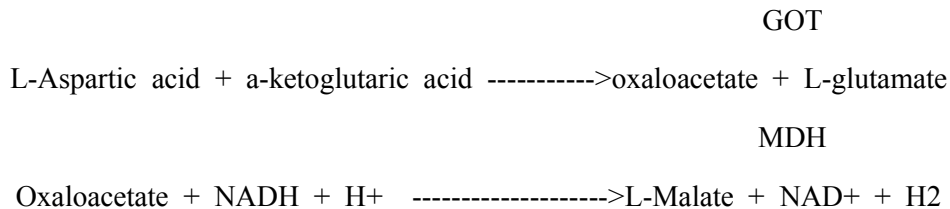
6) GOT 및 GPT 측정

GOT는 간에 존재하고 있을 뿐만 아니라 심장, 신장, 뇌, 근육 등에 포함되어 있는 효소로써 세포가 파괴되면 혈중 농도의 증가가 나타나며, 주로 심근, 골격근, 적혈구에 많이 존재하기 때문에 심근경색, 용혈 등을 진단하는데 이용된다. GPT는 주로 간세포내부에 존재하는 효소로써 일반적인 경우 간세포의 재생하는 과정 중에 아주 소량이 혈중에서 측정이 될 뿐 평소 혈액내의 GPT의 양은 매우 적게 관찰된다. 하지만 간에 염증이 생기거나 다른 이유로 간세포가 손상을 입어 파괴가 되게 되면 간세포내 효소인 GPT의 혈액 내 농도가 증가된 상태로 관찰되게 된다. 하지만 다시 간세포가 정상으로 돌아오게 되면 다시 혈중 농도가 낮아지게 된다. 다시 말해 간세포가 정상의 경우보다 더 많이 파괴되고 있으면 GPT의 양이 증가하고 파괴되는 세포가 많을수록 그 수치는 커지게 된다. GPT는 주로 간에 분포하기 때문에 간장질환의 중요한 지표가 된다. 따라서 이 두 지표는 간의 질환을 예측하는 지표가 되고, GOT의 경우는 앞서 말한 것과 같이 심근이나 골격근의 이상에서도 증가하게 된다.

그러나 간경변증, 만성 비활동성 간염 등에서는 이런 수치가 거의 증가하지 않거나 조금 증가 하는 경우가 많다. 건강한 사람의 경우 GOT 가 GPT보다 높는데 질병의 종류나 시기에 따라 역전되기도 하는데, 일반적으로 간에 질병이 있으면 GPT

가 상승하고 GOT 는 심장 질환의 경우에 주로 상승한다고 알려져 있다. Cholesterol 을 통한 고지방식과 마 성분의 혼합 사료의 공급이 쥐에게 미치는 전반적인 vital response를 확인코자 GOT, GPT level을 측정을 해 보았다.

측정 원리는 다음과 같다



위의 원리를 기반으로 영동제약에서 생산된 GOT kit, GPT kit를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 sample 10 uL와 reagent R1+R2 (4:1) 혼합액을 100 uL 첨가한 후, microplate reader (Molecular Device thermomax)를 이용하여 340 nm에서 측정하였다. 반응은 1분 동안 37°C에서 incubation 한 뒤에 다시 1분 동안 37°C에서 kinetic을 이용하여 OD값의 변화를 측정하였다.

7) 산약 가공제품의 간내 HMG-CoA reductase inhibition 측정

기존 1, 2차년도에서는 콜레스테롤 합성의 율속효소인 HMG-CoA reductase의 저해 활성을 *in-vitro* 방법으로 측정하여 산약 발효물과 산약 효소분해물이 콜레스테롤 합성을 저해하는데 효과가 있는 것을 확인하였다. 본 3차년도에서는 HMG-CoA reductase의 활성도를 직접적으로 측정하기 위하여 *in-vivo* 방법으로 측정하였다. HMG-CoA reductase 활성 측정은 Kleinsek 등의 방법에 준하여 진행하였다. 300 mL KCl, 6 mM EDTA, 15 mM dithiothretol을 함유한 240 mM potassium phosphate buffer 에 2 mM NADPH 100 uL, 1 mM HMG-CoA 100 uL 및 100 uL 효소액을 첨가하여 37°C, 240 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자흡광계수 6.22 mM/cm/L를 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1 분당 1 mg protein이 분해하는 NADPH 의 양을 pmol로 표시하였다.

8) 통계처리

모든실험은 3반복 실험하여 mean+standard deviation으로 산출하였으며, 동물실험에

서 얻은 결과는 statistical Analysis System(SAS) 통계 프로그램을 이용하여 분산 분석을 통해 유의적 차이가 발견된 경우 Duncan's multiple range test로 결과치에 대한 실험군간의 유의성을 검증하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. 산약의 분말 제품화를 위한 검토 결과

가. 생산약의 일반성분분석

참여기업에서 구입한 생산약과 분말산약을 시판되는 분말산약의 품질특성을 비교하고자 일반성분, 색도, 총당, 환원당을 각각 측정하여 Table 24 에 나타내었다. 그 결과, 시판되는 분말산약의 수분함량은 5.66%로 참여기업에서 생산되는 분말산약의 수분함량 4.70%보다 높게 나타났고, 회분함량은 참여기업에서 생산되는 제품이 6.57%로 시판분말산약 5.09%보다 높게 나타났다. 조단백질함량은 참여기업제품이 12.11%로 시판분말산약 9.88%보다 약 3%가량 높았고, 조지방함량은 참여기업제품이 0.36%로 시판분말산약 0.15%보다 2배가량 높았으며 탄수화물함량은 참여기업제품이 76.26%로 시판분말산약 79.23%보다 조금 낮았다. 색도는 L(밝기)값이 시판분말산약이 85.32로 참여기업제품 84.39보다 조금 높았고 a(적색도)값은 시판분말산약 및 참여기업제품이 각각 +1.60, +1.63 으로 비슷하였으며, b(황색도)값은 시판분말산약이 +10.76, 참여기업제품이 +10.34로 비슷한 결과를 보였다. 총 당함량은 시판분말산약이 0.51%로 참여기업제품 0.43%보다 높았고 환원당함량은 참여기업제품이 0.14%로 시판분말산약 0.10%보다 높았다. 이상 시판제품과 참여기업제품의 품질분석결과 다소 차이가 있었고 이러한 결과는 산약의 품종과 생산지, 건조방법 등에 따라 차이가 나는 것으로 판단된다.

Table 24. 산약의 일반성분

Items	생산약	분말산약(공장)	분말산약(시판)
Moisture (%)	86.11	4.70	5.66
Ash (%)	1.04	6.57	5.09
Crude protein (%)	2.31	12.11	9.88
Crude lipid (%)	1.21	0.36	0.15
Carbohydrate (%)	9.34	76.26	79.23
L	78.54	84.39	85.32
Color a	-0.87	+1.63	+1.60
b	+3.19	+10.34	+10.76
Total sugar content (%)	0.25	0.43	0.51
Total Reducing sugar (%)	0.37	0.14	0.10

나. 건조방법에 따른 산약의 성분변화

건조온도를 낮추어 건조하는 과정에서 발생하는 에너지 소비를 줄이면서 품질은 참여기업에서 생산되는 분말산약을 유지하도록 하고자하는 일환으로 건조온도에 따른 생산약의 수분함량과 색도를 측정하여 각각 Table 25, Table 26 에 나타내었다. 50℃에서 건조하는 동안 나타나는 수분함량을 측정한 결과, 2시간까지는 수분함량의 변화가 거의 없었고 이후부터 급격히 감소하여 건조 8시간째 수분함량이 6.57%로 나타났으며, 건조 12시간째에는 4.90%였다. 55℃에서 건조하는 동안 나타나는 수분함량은 시간이 지남에 따라 급격히 감소하였고 건조 6시간째 수분함량이 8.56%였고 건조 12시간째는 4.78%로 나타났다. 60℃에서 건조하는 동안 나타나는 수분함량 또한 시간이 지남에 따라 급격히 감소하였고 건조 6시간째 수분함량은 7.35%였고, 건조 12시간째는 4.62%로 건조온도 중 가장 낮은 수분함량을 보였다.

Table 25. 온도 및 건조시간에 따른 수분함량

Dry time (hr) \ Sample	Dry Temperature (°C)		
	50	55	60
0	87.37	87.37	87.37
2	83.79	57.53	33.78
4	45.52	37.94	19.65
6	18.05	8.56	7.35
8	6.57	5.66	4.70
10	5.77	5.18	4.61
12	4.90	4.78	4.62

색도는 건조 8시간째의 것을 측정하여 나타내었다. 그 결과 전체적인 색도의 차이는 50°C에서 건조한 제품이 낮았고, 55°C와 60°C에서 건조한 제품의 색도는 거의 유사한 결과를 보였다. 특히 50°C에서 건조한 제품의 L값은 82.11로 55°C, 60°C에서 건조한 제품의 L값(밝기)보다 낮았고, a(적색도)값 또한 2.03으로 가장 높았으며, b(황색도)값도 12.20으로 가장 높은 값을 보였다.

Table 26. 건조온도에 따른 색도

Dry time (hr) \ Sample	Dry Temperature (°C)		
	50	55	60
L (Lightness)	82.11	85.32	84.39
a (Redness)	+2.03	+1.60	+1.63
b (Yellowness)	+12.20	+10.76	+10.34

다. 건조처리 산약의 갈변억제 및 기호도 향상을 위한 첨가제 영향조사

1) 분말산약의 색도, 용해도 및 팽윤력

당알코올 및 유기산을 각각 첨가한 후 열풍건조한 산약분말의 색도 차이는 Table 27과 같다. 첨가제를 첨가한 모든 실험군은 대조구에 비해 갈변정도가 덜하여 백색도가 높았으며 특히 mannitol과 erythritol의 Hunter-L값이 각각 91.66과 89.64로 대조구(79.41)에 비하여 큰 차이를 보였고, 겉보기 색상도 유백색에 가까웠다. 유기산류를 첨가한 산약 분말은 모든 실험구의 측정치가 크게 차이나지 않았고, 이 중 tartar-

ric acid첨가 분말의 Hunter-L값이 87.88로 가장 밝게 측정되었다.

Table 27. 첨가제에 따른 분말산약의 색도

Sample powder	color value			
	L(Lightness)	a(Redness)	b(Yellowness)	
Control	79.41±1.63	3.25±0.40	19.28±1.92	
sugar alcohol	Erythritol	89.64±0.31	1.13±0.08	10.46±0.22
	Mannitol	91.66±0.29	0.61±0.04	7.06±0.22
	Maltitol	84.63±1.41	1.66±0.06	18.24±0.83
	Sorbitol	83.05±0.43	1.34±0.15	16.02±0.43
	Xylitol	83.52±2.00	1.28±0.18	12.99±0.55
organic acid	Citric acid	86.80±0.42	0.92±0.10	12.45±0.28
	Fumaric acid	86.48±0.43	0.67±0.05	11.17±0.65
	Malic acid	85.70±0.46	0.78±0.06	11.33±0.37
	Succinic acid	85.88±0.22	1.01±0.06	12.80±0.20
	Tartaric acid	87.88±1.12	0.75±0.17	11.56±0.27

용해도 실험결과, 당알코올을 첨가한 경우 erythritol 첨가 분말이, 유기산을 첨가한 경우 tartaric acid를 첨가한 분말이 가장 용해도가 높았으며, 전체적으로 당알코올을 첨가한 산약분말이 실험구 별로 용해력 차이가 나는 반면 유기산 첨가 산약분말의 경우는 모든 실험구가 비슷한 수치를 나타내었다. 당알코올의 경우 분자량이 클수록 용해도가 낮아지기 때문에 실험구중 가장 분자량이 낮은 erythritol 첨가 분말의 용해도가 가장 크고 분자량이 큰 maltitol 첨가 분말의 용해도가 가장 낮게 측정된 것으로 사료되었다. 산약 분말입자가 최대로 수분을 흡수하여 팽윤하는 현상을 나타내는 팽윤력의 경우 역시 erythritol 첨가 분말이 가장 높은 값을 나타내었으며 당알코올을 첨가한 산약분말이 유기산을 첨가한 분말에 비해서 팽윤력이 높은 것을 확인하였다.

Table 28. 첨가제에 따른 분말산약의 용해도 및 팽윤력

Sample powder	Water solubility (%)	Swelling power (g/g)
Control	5.94±0.07	4.12±0.02
sugar alcohol	Erythritol	10.37±0.12
	Mannitol	6.61±0.03
	Maltitol	5.61±0.02
	Sorbitol	6.32±0.10
	Xylitol	6.91±0.17
organic acid	Citric acid	6.34±0.16
	Fumaric acid	6.71±0.71
	Malic acid	6.00±0.10
	Succinic acid	6.53±0.05
	Tartaric acid	6.75±0.36

2) 관능평가

아무것도 첨가하지 않은 산약 분말의 경우에는 씹쓸하며 아린 맛이 강하여 거부감이 생기는 경우가 있다. 이러한 거부감을 제어하면서 기호도가 높은 첨가제를 선별하기 위하여 관능검사를 실시하였다. 실험 결과, 가장 기호도가 우수하였던 물과 산약 분말의 현탁 비율 10 : 1을 선정하였다(Table 29).

Table 29. 물과 산약분말 비율에 따른 관능평가

Ratio (water : powder)	color	viscosity	taste	overall acceptability
1 : 1	4.00±0.82	9.00±0.82	2.75±2.06	3.00±0.82
3 : 1	4.25±1.26	7.00±0.82	2.50±0.58	3.00±1.41
5 : 1	4.50±0.58	6.25±0.50	2.00±0.82	3.00±0.82
7 : 1	6.25±0.50	5.25±0.96	3.50±1.00	5.25±1.26
10 : 1	6.25±0.50	3.25±0.96	5.75±0.50	6.75±1.26

첨가제 첨가 산약 분말의 관능검사 결과는 Table 30과 같았다. 당류 중 mannitol, maltitol, sorbitol 및 erythritol 첨가 분말의 현탁액 생식이 대조군에 비해 약 2배가량 밝게 평가되었다. 당알코올 첨가제 중 가장 단맛이 느껴지는 첨가물은 erythritol이었

으며 기호도 역시 erythritol이 가장 높은 것으로 확인되었다. 유기산 첨가 분말의 경우 신맛으로 인해 산약 고유의 냄새를 감소시켰지만 신맛이 강하게 평가된 succinic acid, tartaric acid, malic acid 첨가 분말은 오히려 전체 기호도가 대조구보다 낮게 나타났다. 하지만 fumaric acid와 citric acid첨가 분말의 경우 맛에 대한 기호도가 높게 평가되어 이들을 선택하여 혼합하면 산약의 풍미를 더욱 증진시킬 수 있을거라고 사료되었다. 관능평가 결과, 당알코올 및 유기산을 첨가하여 건조시킨 산약 분말이 기존 산약분말(대조구)보다 기호도가 높은 것으로 확인 되었다.

Table 30. 첨가제에 따른 분말의 관능평가

Sample powder	Brightness	Color preference	Sweetness	Sourness	Taste preference	
Control	3.83±2.14 ^{ab}	4.67±1.37 ^a	5.33±1.97 ^c	3.50±2.07 ^c	5.83±1.83 ^{bc}	
Sugar alcohol	Erythritol	6.00±2.83 ^b	5.00±2.83 ^a	8.00±1.79 ^a	2.17±1.17 ^c	7.67±1.63 ^{abc}
	Maltitol	7.33±1.97 ^{ab}	6.33±1.97 ^a	7.00±2.00 ^a	2.83±1.94 ^c	7.33±1.75 ^a
	Mannitol	7.75±0.50 ^b	5.25±0.50 ^a	7.75±0.96 ^a	1.50±0.58 ^c	6.75±2.06 ^{abc}
	Sorbitol	6.75±1.71 ^{ab}	5.75±0.96 ^a	5.25±1.71 ^c	2.50±3.00 ^c	5.75±2.22 ^{bc}
	Xylitol	3.17±1.47 ^a	4.33±2.34 ^a	7.50±2.35 ^{ab}	3.00±2.53 ^c	6.67±2.16 ^{abc}
Organic acid	Citric acid	5.25±1.26 ^{ab}	4.25±2.06 ^a	2.75±1.50 ^c	5.00±2.16 ^a	5.50±0.58 ^c
	Fumaric acid	4.67±2.58 ^{ab}	5.00±2.10 ^a	3.00±1.10 ^c	4.50±1.76 ^{bc}	7.33±2.42 ^{bc}
	Malic acid	6.17±1.17 ^{ab}	5.00±2.53 ^a	2.83±1.33 ^c	5.33±2.42 ^{bc}	5.17±0.98 ^c
	Succinic acid	6.25±1.71 ^b	5.00±1.83 ^a	1.00±0.00 ^c	7.00±0.82 ^{ab}	4.25±0.50 ^c
	Tartaric acid	6.75±2.36 ^{ab}	4.50±2.65 ^a	2.25±2.50 ^c	7.00±0.82 ^a	5.25±0.96 ^c

* Superscript letters indicate significant difference at $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiplerange test.

2. 산약 효소가수분해물의 기능성물질 분리 조건 탐색 결과

가. 가수분해온도와 가수분해효소 종류에 따른 영향

가수분해온도와 효소제 종류에 따른 영향을 조사하기 위해 마에 효소제 무처리구 (대조구)와 효소제(AMG, Viscozyme, Pectinex, Celluclast 각각 1.0%(w/w))처리구를 40, 50, 60, 70℃의 온도에서 가수분해하였다. 그 결과, 당도(Table 31)와 고형분함량 (Table 32)은 무처리구에 비해 Celluclast를 제외한 효소제 처리구가 2~4배 높게 나타났다으며 마 증자로 전분이 분해되어 효소작용을 받을 수 있는 기질이 증가했기 때문

으로 추측되고 온도에 대한 차이는 크지 않았으나 효소종류에 따라 큰 차이를 보였다. 특히, AMG 처리구에서 가장 높은 당도를 보였고 Viscozyme, Pectinex, Celluclast 처리구 순으로 나타났다. 총당함량(Table 33)은 무처리구에서 0.5% 함량을 보였으나 Celluclast를 제외한 효소처리구는 1.0~3.6% 함량을 나타나 무처리구에 비해 2배 이상 높은 함량을 보였으며, 모든 효소처리구의 50, 60℃에서 가장 높은 함량을 보였으나, 온도에 대한 차이보다는 효소종류에 따른 차이가 더 큰 것으로 나타났다. 특히, 효소처리구 중 AMG처리구에서 가장 높은 총당함량을 보였다. 환원당함량(Table 34)은 무처리구에서 0.15% 함량을 보였으나 효소처리구는 0.3~1.34% 함량을 보여 무처리구에 비해 2배 이상 높은 함량을 보였으나, 온도에 대한 차이보다는 효소종류에 따른 차이가 더 큰 것으로 나타났다. 특히 모든 효소처리구 중 AMG처리구에서 가장 높은 환원당 함량을 보였고, 60℃에서 가장 높게 나타났다. 가수분해도(Table 35)는 모든 효소처리구의 60℃에서 가장 높게 나타났고, AMG처리구를 제외한 Viscozyme, Pectinex, Celluclast 처리구는 40, 60℃에서 20% 이하의 가수분해율을 보였다. 특히 AMG 처리구는 모든 온도에서 30% 정도의 가수분해도를 보여 효소처리구 중 가장 높은 가수분해율을 보였다. 이상의 결과 온도에 따른 차이는 크지 않았으나 효소제 처리구에 따른 영향은 큰 것으로 나타나 최적 온도를 60℃로 설정하였다.

Table 31. 효소종류 및 반응시간에 따른 산약의 당도 (°Brix)

Hydrolysis temp	Carbohydrate enzyme			
	AMG	Viscozyme	Pectinex	Celluclast
before	1.1	1.1	1.1	1.1
40	3.8	2.7	2.0	1.3
50	4.1	2.8	2.3	1.5
60	4.1	3.1	2.6	1.4
70	4.1	2.8	2.6	1.5

Table 32. 효소종류 및 반응시간에 따른 산약의 고형분 (°Brix)

Hydrolysis temp	Carbohydrate enzyme			
	AMG	Viscozyme	Pectinex	Celluclast
before	0.98	0.98	0.98	0.98
40	3.44	2.42	1.76	1.47
50	3.74	2.61	2.23	1.30
60	3.79	2.88	2.07	1.78
70	3.83	2.53	2.47	1.46

Table 33. 효소종류 및 반응시간에 따른 산약의 총당 (°Brix)

Hydrolysis temp	Carbohydrate enzyme			
	AMG	Viscozyme	Pectinex	Celluclast
before	0.54	0.54	0.54	0.54
40	3.40	1.71	1.40	1.22
50	3.83	2.44	1.93	0.81
60	3.76	2.34	2.17	1.07
70	3.36	2.24	1.89	1.23

Table 34. 효소종류 및 반응시간에 따른 산약의 환원당 함량 (°Brix)

Hydrolysis temp	Carbohydrate enzyme			
	AMG	Viscozyme	Pectinex	Celluclast
before	0.15	0.15	0.15	0.15
40	1.16	0.29	0.28	0.31
50	1.07	0.30	0.29	0.28
60	1.32	0.29	0.29	0.29
70	0.78	0.30	0.29	0.30

Table 35. 효소종류 및 반응시간에 따른 산약의 가수분해율 (%)

Hydrolysis temp	Carbohydrate enzyme			
	AMG	Viscozyme	Pectinex	Celluclast
before	31.15	24.87	26.62	19.25
40	28.90	17.00	15.00	21.78
50	31.98	17.30	17.82	18.47
60	31.98	30.63	23.89	23.50
70	30.38	30.57	27.05	14.33

2. 산약 효소가수분해물의 기능성물질 분리 조건 탐색 결과

가. 가수분해온도와 가수분해효소 종류에 따른 영향

가수분해온도와 효소제 종류에 따른 영향을 조사하기 위해 마에 효소제 무처리구 (대조구)와 효소제(Alcalase, Neutrased, Flavourzyme, Protamex 각각 1.0%(w/w))처리구를 40, 50, 60, 70℃의 온도에서 가수분해하였다. 그 결과, 당도(Table 31)와 고형분 함량(Table 32)은 무처리구에 비해 Alcalase를 제외한 효소제 처리구가 2~4배 높게 나타났으며 마 증자로 전분이 분해되어 효소작용을 받을 수 있는 기질이 증가했기 때문에 추측되고 온도에 대한 차이는 크지 않았으나 효소종류에 따라 큰 차이를 보였다. 특히, Protamex 처리구에서 가장 높은 당도를 보였고 Neutrased, Flavourzyme, Alcalase 처리구 순으로 나타났다. 총당함량(Table 33)은 무처리구에서 0.5% 함량을 보였으나 Alcalase를 제외한 효소처리구는 1.0~3.6% 함량을 나타나 무처리구에 비해 2배 이상 높은 함량을 보였으며, 모든 효소처리구의 50, 60℃에서 가장 높은 함량을 보였으나, 온도에 대한 차이보다는 효소종류에 따른 차이가 더 큰 것으로 나타났다. 특히, 효소처리구 중 Protamex 처리구에서 가장 높은 총당함량을 보였다. 환원당함량(Table 34)은 무처리구에서 0.15% 함량을 보였으나 효소처리구는 0.3~1.34% 함량을 보여 무처리구에 비해 2배 이상 높은 함량을 보였으나, 온도에 대한 차이보다는 효소종류에 따른 차이가 더 큰 것으로 나타났다. 특히 모든 효소처리구 중 Protamex 처리구에서 가장 높은 환원당 함량을 보였고, 60℃에서 가장 높게 나타났다. 가수분해율(Table 35)은 모든 효소처리구의 60℃에서 가장 높게 나타났고, Protamex 처리구를 제외한 Neutrased, Flavourzyme, Alcalase 처리구는 40, 60℃에서 20% 이하의 가수분해율을 보였다. 특히 Protamex 처리구는 모든 온도에서 30% 정도의 가수분해도를

보여 효소처리구 중 가장 높은 가수분해율을 보였다. 이상의 결과 온도에 따른 차이는 크지 않았으나 효소제 처리구에 따른 영향은 큰 것으로 나타나 최적 온도를 60°C로 설정하였다.

Table 31. 효소종류 및 반응시간에 따른 산약의 당도 (°Brix)

Hydrolysis temp	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	1.1	1.1	1.1	1.1
40	3.8	2.7	2.0	1.3
50	4.1	2.8	2.3	1.5
60	4.1	3.1	2.6	1.4
70	4.1	2.8	2.6	1.5

Table 32. 효소종류 및 반응시간에 따른 산약의 고형분 (°Brix)

Hydrolysis temp	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	0.98	0.98	0.98	0.98
40	3.44	2.42	1.76	1.47
50	3.74	2.61	2.23	1.30
60	3.79	2.88	2.07	1.78
70	3.83	2.53	2.47	1.46

Table 33. 효소종류 및 반응시간에 따른 산약의 총당 (°Brix)

Hydrolysis temp	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	0.54	0.54	0.54	0.54
40	3.40	1.71	1.40	1.22
50	3.83	2.44	1.93	0.81
60	3.76	2.34	2.17	1.07
70	3.36	2.24	1.89	1.23

Table 34. 효소종류 및 반응시간에 따른 산약의 환원당 함량 (°Brix)

Hydrolysis temp	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	0.15	0.15	0.15	0.15
40	1.16	0.29	0.28	0.31
50	1.07	0.30	0.29	0.28
60	1.32	0.29	0.29	0.29
70	0.78	0.30	0.29	0.30

Table 35. 효소종류 및 반응시간에 따른 산약의 가수분해율 (%)

Hydrolysis temp	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	31.15	24.87	26.62	19.25
40	28.90	17.00	15.00	21.78
50	31.98	17.30	17.82	18.47
60	31.98	30.63	23.89	23.50
70	30.38	30.57	27.05	14.33

나. 가수분해효소 종류와 농도에 따른 영향

효소종류와 농도에 따른 영향을 조사하기 위해 0.05~2.0%(w/w)의 범위에서 90분 간 처리하여 마 가수분해물의 특성을 비교하였다. 당도(Table 36)와 고형분함량 (Table 37)은 효소처리전에 비해 효소의 농도가 증가할수록 증가하였고, Alcalase를 제외한 모든 효소처리구에서는 효소처리전에 비해 1.5배 이상 높은 당도 및 고형분 함량을 보였다. 특히 Protamex 처리구는 모든 처리구 중 가장 높은 당도 및 고형분 함량을 보였고, 0.5% 농도까지는 지속적인 증가를 보이다가 이후부터는 차이를 보이지 않았다. 반면 Neutrased 처리구는 0.5%까지 당도 및 고형분 함량이 큰 차이를 보이지 않았으나 이후부터 급격한 차이를 보였다. 즉, Neutrased 처리구를 제외한 모든 효소처리구는 효소농도에 대한 차이보다는 효소종류에 대한 차이가 큰 것으로 나타났다. 총당함량(Table 38)은 Alcalase 처리구를 제외한 모든 효소처리구에서 효소처리전에 비해 2배 이상 높은 함량을 보였고 0.05% 농도까지 큰 함량 차이를 보

이다가 이후부터는 차이를 보이지 않았다. Protamex 처리구는 모든 효소처리구 중 가장 높은 총당함량을 보였고, 0.5%농도에서 2.8g/100g으로 Neutrased, Flavourzyme 처리구에 비해 3배 높은 함량을 보였다. 반면, Neutrased 처리구는 0.5%까지 큰 변화를 보이지 않다가 이후부터 총당함량이 증가하였다. 즉, Neutrased 처리구를 제외한 모든 효소처리구는 효소농도에 대한 차이보다는 효소종류에 대한 차이가 큰 것으로 나타났다. 환원당함량(Table. 39)은 모든 효소처리구에서 효소농도가 증가할수록 증가하였고, 0.5%까지 지속적인 증가를 보이다가 이후부터 큰 변화가 없었다. 특히 Protamex 처리구는 모든 농도에서 효소처리구 중 가장 높은 환원당함량을 보였고, 0.5% 농도에서 1.6g/100g으로 나머지 효소처리구보다 4배 높은 것으로 나타났으나, Neutrased, Flavourzyme, Alcalase 처리구 서로간의 환원당함량은 유의적인 차이가 없었다. 가수분해도(Table 40)는 모든 효소처리구에서 효소농도가 증가할수록 증가하였고 0.05%까지 급상승하였으나 이후부터 큰 변화는 없었다. 특히 Protamex 처리구는 0.5%까지 큰 증가를 보이다가 이후 완만한 변화를 보였고 모든 효소처리구 중 가장 높은 가수분해도를 보였다. Neutrased 처리구는 0.5%까지 지속적인 증가를 보이다가 이후 완만한 변화를 보였고 2% 농도에서 가장 높은 가수분해도를 보였다. 즉, 모든 효소처리구의 가수분해도는 효소간의 차이가 더 크고, 효소농도간의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

Table 36. 효소종류 및 농도에 따른 당도

Hydrolysis Conc.	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	1.1	1.1	1.1	1.1
0.05	2.9	1.4	1.5	1.2
0.1	3.2	1.7	1.9	1.3
0.5	3.8	1.8	1.8	1.3
1	3.8	2.4	1.8	1.4
2	3.7	2.9	2.1	1.3

Table 37. 효소종류 및 농도에 따른 고형분

Hydrolysis Conc.	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	1.80	1.80	1.80	1.80
0.05	3.09	2.18	2.34	2.08
0.1	3.26	2.25	2.07	2.07
0.5	3.76	2.24	2.32	2.04
1	3.78	2.95	2.22	2.05
2	3.68	3.30	2.41	2.07

Table 38. 효소종류 및 농도에 따른 총당

Hydrolysis Conc.	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	0.95	0.95	0.95	0.43
0.05	2.70	1.17	1.16	0.46
0.1	2.42	1.30	1.13	0.45
0.5	2.92	1.27	1.33	0.71
1	2.92	1.95	1.30	0.59
2	2.60	2.09	1.77	0.67

Table 39. 효소종류 및 농도에 따른 환원당

Hydrolysis Conc.	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	0.21	0.21	0.21	0.21
0.05	0.84	0.31	0.33	0.29
0.1	0.83	0.31	0.31	0.29
0.5	1.57	0.31	0.30	0.29
1	1.54	0.31	0.31	0.30
2	1.75	0.43	0.57	0.32

Table 40. 효소종류 및 농도에 따른 가수분해율

Hydrolysis Conc.	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrase	Flavourzyme	Alcalase
before	0.54	0.54	0.54	0.54
0.05	18.80	11.54	19.39	17.13
0.1	23.90	14.23	16.54	18.51
0.5	25.91	19.80	19.39	18.46
1	27.40	20.67	19.46	18.03
2	27.27	27.89	25.14	18.58

다. 가수분해 시간에 따른 영향

온도 60℃로 고정한 후 최적 가수분해시간을 설정하기 위해 30~240분까지 처리하여 마 가수분해물의 특성을 비교하였다. 그 결과, 당도(Table 41)와 고형분 함량(Table 42)은 가수분해시간이 증가할수록 증가하였고 가수분해시간에 대한 차이보다는 효소종류에 따른 차이가 더 크게 나타났다. 당도는 가수분해 60~90분까지 가수분해전에 비해 1.5배 이상 증가하였으나 이후부터는 완만한 증가를 보였고 고형분 함량은 가수분해전에 비해 가수분해 30분까지 2배 증가하였으나 30분 이후부터는 거의 변화가 없었다. 총당함량(Table 43)은 모든 효소처리구에서 가수분해시간이 증가함에 따라 증가하였고 가수분해시간에 따른 함량차이보다는 효소종류에 대한 차이에 의한 함량차이가 더 크게 나타났다. 특히 Protamex 처리구의 총당함량은 가수분해 60분때부터 Neutrase, Flavourzyme, Alcalase 처리구에 비해 유의적인 차이로 증가하였고 가수분해 180분때에는 1.5배 높은 함량을 보였다. Neutrase 처리구는 가수분해 60분때부터 지속적인 증가를 보이다가 180분 이후부터는 완만한 증가를 보였다. Flavourzyme, Alcalase 처리구의 총당함량은 가수분해시간이 지남에 따라 조금씩 증가하였으나 전반적으로 가수분해 60분 이후부터는 분해시간에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 환원당함량(Table 44)은 가수분해시간이 증가할수록 증가하였고 가수분해전에 비해 3배 이상 증가한 것으로 보였다. 가수분해시간에 따른 가수분해도 변화(Table 45)는 모든 효소처리구에서 60분째까지 완만한 증가를 보이다가 90분째까지 급격히 증가하였고 이후부터는 거의 변화가 없었다. 효소종류에 대한 유의적인 차이는 없었으나 가수분해시간에 대한 차이가 있는 것으로 나타났다. 모든 효소

처리구의 가수분해도는 효소처리전에 비해 유의적인 차이를 보이며 증가하였고 가수분해 60분때에는 50% 정도의 가수분해율을 보였다.

Table 41. 가수분해 시간에 따른 당도

Hydrolysis time (min)	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	0.33	0.33	0.33	0.33
30	0.33	0.33	0.33	0.34
60	0.40	0.37	0.36	0.33
90	0.41	0.38	0.38	0.37
120	0.50	0.39	0.39	0.36
150	0.53	0.42	0.39	0.37
180	0.61	0.45	0.41	0.36
210	0.63	0.46	0.40	0.36
240	0.64	0.48	0.41	0.36

Table 42. 가수분해 시간에 따른 고형분

Hydrolysis time (min)	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	0.030	0.030	0.030	0.030
30	0.060	0.058	0.058	0.057
60	0.060	0.060	0.060	0.058
90	0.062	0.059	0.059	0.059
120	0.059	0.059	0.059	0.059
150	0.061	0.061	0.061	0.061
180	0.061	0.059	0.059	0.059
210	0.059	0.059	0.059	0.059
240	0.062	0.061	0.061	0.061

Table 43. 가수분해 시간에 따른 총당

Hydrolysis time (min)	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	0.33	0.33	0.33	0.33
30	0.33	0.33	0.33	0.34
60	0.40	0.37	0.36	0.33
90	0.41	0.38	0.38	0.37
120	0.50	0.39	0.39	0.36
150	0.53	0.42	0.39	0.37
180	0.61	0.45	0.41	0.36
210	0.63	0.46	0.40	0.36
240	0.64	0.48	0.41	0.36

Table 44. 가수분해 시간에 따른 환원당

Hydrolysis time (min)	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	0.11	0.11	0.11	0.11
30	0.14	0.11	0.15	0.11
60	0.15	0.13	0.16	0.15
90	0.29	0.28	0.29	0.29
120	0.29	0.29	0.29	0.28
150	0.30	0.29	0.30	0.29
180	0.31	0.29	0.29	0.29
210	0.30	0.29	0.29	0.29
240	0.30	0.29	0.30	0.29

Table 45. 가수분해 시간에 따른 가수분해율

Hydrolysis time (min)	Protein enzyme			
	Protamex	Neutrased	Flavourzyme	Alcalase
before	0.0	0.0	0.0	0.0
30	5.4	29.1	31.9	42.2
60	53.1	51.4	51.4	54.3
90	55.1	53.1	53.1	52.4
120	54.8	51.1	50.6	49.0
150	56.3	51.5	50.8	49.3
180	57.0	51.7	51.7	47.5
210	57.8	50.3	50.3	47.5
240	55.1	53.0	53.0	46.0

3. 산약 발효물의 기능성 물질 분리 조건 탐색 결과

가. 산약발효물의 pH, 산도, 총균수 및 젖산균수의 변화

Table 46은 33종의 젖산균에 의한 산약발효물의 발효시간에 따른 pH로 발효초기 pH 6.1 였으나 발효 2일 후 pH 4.2~5.5로 감소하였고, 발효 2일 이후부터는 pH 변화가 거의 없었고 이는 적정산도의 변화와 상반되는 결과로 나타났다. 젖산균에 의한 산약발효물의 발효시간에 따른 적정산도(Table 47)는 발효초기 0.5% 정도였으나 발효 2일 후 0.1~0.5% 부근까지 증가하였고, 발효 2일 이후부터는 증가되는 경향없이 거의 일정하였다. 산약발효물의 발효시간에 따른 총균수(Fig. 8)와 젖산균수(Fig.

9)는 발효초기 약 $10^6\sim 10^7$ CFU/mL이었으나 발효 2일째까지 각각 2.1×10^9 CFU/mL, 1.3×10^9 CFU/mL로 급격히 증가하였다가 발효 2일 이후부터는 거의 변화가 없거나 약간 감소하는 경향이었고 발효기간 동안 거의 변화가 없었다. KFRI 150 (*Lactobacillus acidophilus*)은 발효 2일째 가장 많은 젖산균수와 총균수를 보였다. 즉, 총균수와 젖산균수가 가장 왕성하게 활동한 발효 2일째 pH는 급격히 감소하였고 적정산도는 급격히 증가하였고 발효 2일 이후부터는 총균수 및 젖산균수의 변화가 거의 없었으며 pH 및 적정산도의 변화도 거의 없었다.

나. 산약발효물의 당도, 총당 및 환원당함량 변화

산약발효물의 발효시간에 따른 당도를 나타낸 것으로 발효초기 산약의 당도(Table 48)는 1.5 °Brix 부근이었으나 발효가 시작되고 발효 2일째에는 모든 발효물이 2.0~6.0 °Brix 까지 증가하였다. 특히 KCTC 3102 (*Enterococcus mundtii*)로 발효한 발효물의 당도는 발효기간 동안 5.7~6.3 °Brix로 나타나 젖산발효물 중 가장 높았고 KCTC 3195 (*Enterococcus faecalis* var. *liquefaciens*), KCTC 3102 (*Lactobacillus bervis*), KFRI 832 (*Pediococcus pentosaceus*) 등으로 발효한 발효물들은 발효 3일째까지는 4.0 Brix°이하였으나 발효 4일째부터는 4.0~5.3 °Brix 정도로 증가하였다. 또한 KCTC 3524 (*Leuconostoc carnosum*), KCTC 3205 (*Lactobacillus sanfranciscensis*), KCTC 201 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), KCTC 3112 (*Lactobacillus fermentum*), KFRI 238 (*Lactobacillus amylophilus*), KFRI 150 (*Lactobacillus acidophilus*) 등은 2.4~3.7 °Brix로 나타나 발효초기보다 2배정도 증가하였다. 이들을 제외한 나머지 젖산발효물의 당도는 2.0 °Brix 이하로 나타났고 발효초기의 당도와 비슷하였다. 총당함량(Table 49)은 발효초기 10.0% 정도였으나 발효 2일째 26.5~206.1%까지 증가하였고 발효 2일 이후부터는 큰 변화없이 비교적 일정한 경향을 보였다. KCTC 3638 (*Enterococcus casseliflavus*), KCTC 1048 (*Lactobacillus plantarum*)로 발효한 발효물은 발효초기 각각 8.06, 8.95 g/100g이었으나 발효 2일째까지 급격히 증가하여 총당함량은 각각 202.15, 131.21 g/100g이었고 이후부터 서서히 감소하다가 더 이상 감소되지는 않고 일정한 경향을 보였다. KCTC 3102 (*Lactobacillus bervis*), KFRI 238 (*Lactobacillus amylophilus*), KFRI 481 (*Lactobacillus pento*년), KCTC 3594 (*Lactobacillus reuteri*), KCTC 201 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)로 발효한 발효물은 발효초기 7.2~9.8 g/100g이었고 발효가 진행되면서 총당함량은 증가하다가 발효 6일째 135.4~180.6

g/100g으로 가장 높은 값을 보였으며 이후 감소하였다. 나머지 산약발효물들은 발효 기간동안 서서히 증가하였으나 발효기간동안 총당함량은 10.05~70.1 g/100g으로 앞서 기술한 발효물들에 비해 낮았다.

발효시간에 따른 산약발효물의 환원당 함량(Table 50)은 발효초기 3.0 g/100g 정도였으나 발효기간 동안 꾸준히 증가하는 경향을 보였다. 특히 KFRI 238 (*Lactobacillus amylophilus*)로 발효한 발효물은 발효초기 3.48 g/100g 이었으나 발효시간이 지나면서 서서히 증가하였고 발효 5, 6일째 15.4 g/100g으로 가장 높게 나타났으며 이후 커다란 변화는 없었다. KFRI 481 (*Lactobacillus pentosus*), KFRI 684 (*Lactococcus lactis*), KCTC 3507 (*Pediococcus pentosacius*)로 각각 발효한 발효물은 발효초기 3.5 g/100g 이었으나 발효가 진행되면서 서서히 증가하였고 발효 6일째 10.10 g/100g 정도로 높게 나타났으며 이후 약간의 감소를 보였으나 유의적인 차이는 없었다.

Table 46. 발효시간에 따른 산약발효물의 pH변화

Strain	Fermentation time (days)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
KCTC 3638	6.12	5.24	5.11	5.02	4.82	4.67	4.62	4.60
KCTC 3195	6.08	6.10	5.74	5.15	4.95	4.91	4.82	4.80
KCTC 3552	6.09	4.66	4.62	4.60	4.62	4.64	4.62	4.62
KCTC 3102	6.10	5.98	6.18	5.02	4.72	4.51	4.42	4.40
KCTC 3641	6.08	5.72	4.73	4.56	4.46	4.49	4.43	4.37
KCTC 3102	6.08	6.08	5.63	5.50	5.15	4.75	4.65	4.64
KFRI 150	6.08	5.07	5.20	5.00	5.00	4.93	5.00	5.04
KFRI 238	6.16	5.85	5.00	4.61	4.49	4.36	4.41	4.40
KCTC 3102	6.08	5.95	5.68	5.09	5.03	4.95	4.85	4.80
KFRI 1030	6.13	4.61	4.52	4.50	4.50	4.43	4.50	4.52
KFRI 346	6.12	5.51	4.96	4.86	4.79	4.67	4.57	4.45
KFRI 1182	6.13	5.57	4.61	4.52	4.40	4.32	4.30	4.30
KFRI 654	6.10	5.30	5.13	5.06	5.01	4.96	4.89	4.85
KCTC 1047	6.04	4.88	4.35	4.36	4.27	4.23	4.24	4.25
KCTC 3112	6.08	6.01	6.02	5.40	5.05	5.00	4.80	4.72
KCTC 3602	6.15	4.52	4.47	4.44	4.43	4.34	4.34	4.25
KFRI 481	6.20	5.64	4.63	4.45	4.34	4.35	4.37	4.40
KCTC 1048	6.13	5.37	4.44	4.37	4.26	4.21	4.18	4.20
KCTC 3594	6.08	4.87	4.88	4.74	4.82	4.83	4.73	4.50
KCTC 3205	6.10	5.81	5.71	5.54	5.34	5.21	4.95	4.91
KFRI 684	6.08	5.21	4.48	4.42	4.33	4.29	4.29	4.30
KCTC 201	6.13	5.50	4.85	4.73	4.65	4.56	4.61	4.60
KCTC 3524	6.10	5.94	5.60	5.38	5.22	4.99	4.98	4.93
KCTC 3526	6.07	4.64	4.61	4.61	4.60	4.46	4.49	4.46
KCTC 3102	6.04	5.41	5.17	5.04	5.00	4.95	4.71	4.61
KCTC 3528	6.06	4.67	4.65	4.65	4.61	4.58	4.69	4.72
KCTC 3530	6.04	4.75	4.70	4.65	4.44	4.37	4.33	4.34
KCTC 3100	6.16	4.97	4.75	4.71	4.70	4.66	4.66	4.67
KFRI 832	6.20	6.34	5.65	5.28	5.20	4.75	4.57	4.56
KCTC 3507	6.21	5.54	5.33	5.51	5.35	5.11	5.00	4.95
KCTC 3807	6.12	5.32	4.90	4.83	4.75	4.68	4.48	4.40
KFRI 1184	6.03	5.05	4.76	4.60	4.56	4.43	4.43	4.42
KCTC 3531	6.1	4.83	4.71	4.50	4.37	4.33	4.31	4.40

Table 47. 발효시간에 따른 산약발효물의 적정산도변화

Strain	Fermentation time (days)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
KCTC 3638	0.09	0.17	0.23	0.38	0.38	0.41	0.47	0.47
KCTC 3195	0.02	0.05	0.09	0.14	0.18	0.18	0.19	0.19
KCTC 3552	0.09	0.24	0.23	0.25	0.24	0.38	0.41	0.40
KCTC 3102	0.00	0.01	0.02	0.14	0.16	0.20	0.23	0.25
KCTC 3641	0.02	0.14	0.36	0.35	0.35	0.38	0.39	0.40
KCTC 3102	0.02	0.05	0.10	0.11	0.14	0.17	0.17	0.16
KFRI 150	0.09	0.17	0.14	0.16	0.18	0.25	0.23	0.25
KFRI 238	0.09	0.11	0.27	0.34	0.36	0.38	0.36	0.45
KCTC 3102	0.02	0.09	0.09	0.15	0.16	0.17	0.16	0.16
KFRI 1030	0.09	0.19	0.18	0.18	0.25	0.29	0.25	0.25
KFRI 346	0.05	0.23	0.36	0.41	0.41	0.39	0.39	0.45
KFRI 1182	0.05	0.18	0.45	0.46	0.45	0.45	0.49	0.50
KFRI 654	0.09	0.14	0.36	0.20	0.20	0.22	0.21	0.20
KCTC 1047	0.05	0.23	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.42
KCTC 3112	0.02	0.06	0.05	0.11	0.15	0.14	0.18	0.20
KCTC 3602	0.09	0.25	0.32	0.27	0.25	0.29	0.30	0.29
KFRI 481	0.05	0.14	0.41	0.41	0.45	0.47	0.47	0.50
KCTC 1048	0.02	0.14	0.41	0.41	0.41	0.41	0.45	0.45
KCTC 3594	0.05	0.27	0.38	0.39	0.41	0.41	0.40	0.41
KCTC 3205	0.02	0.09	0.09	0.09	0.11	0.12	0.14	0.16
KFRI 684	0.05	0.23	0.35	0.36	0.36	0.41	0.41	0.41
KCTC 201	0.09	0.14	0.23	0.23	0.25	0.34	0.23	0.27
KCTC 3524	0.02	0.05	0.12	0.12	0.14	0.14	0.15	0.16
KCTC 3526	0.09	0.20	0.23	0.25	0.21	0.22	0.25	0.29
KCTC 3102	0.02	0.09	0.14	0.16	0.15	0.14	0.16	0.14
KCTC 3528	0.10	0.22	0.29	0.23	0.20	0.23	0.18	0.18
KCTC 3530	0.09	0.19	0.23	0.23	0.29	0.31	0.30	0.30
KCTC 3100	0.09	0.18	0.27	0.29	0.27	0.27	0.27	0.29
KFRI 832	0.00	0.02	0.10	0.13	0.14	0.17	0.20	0.23
KCTC 3507	0.01	0.09	0.09	0.10	0.11	0.15	0.14	0.15
KCTC 3807	0.05	0.18	0.38	0.38	0.39	0.41	0.41	0.41
KFRI 1184	0.09	0.17	0.23	0.27	0.27	0.34	0.32	0.32
KCTC 3531	0.05	0.19	0.41	0.45	0.41	0.41	0.41	0.45

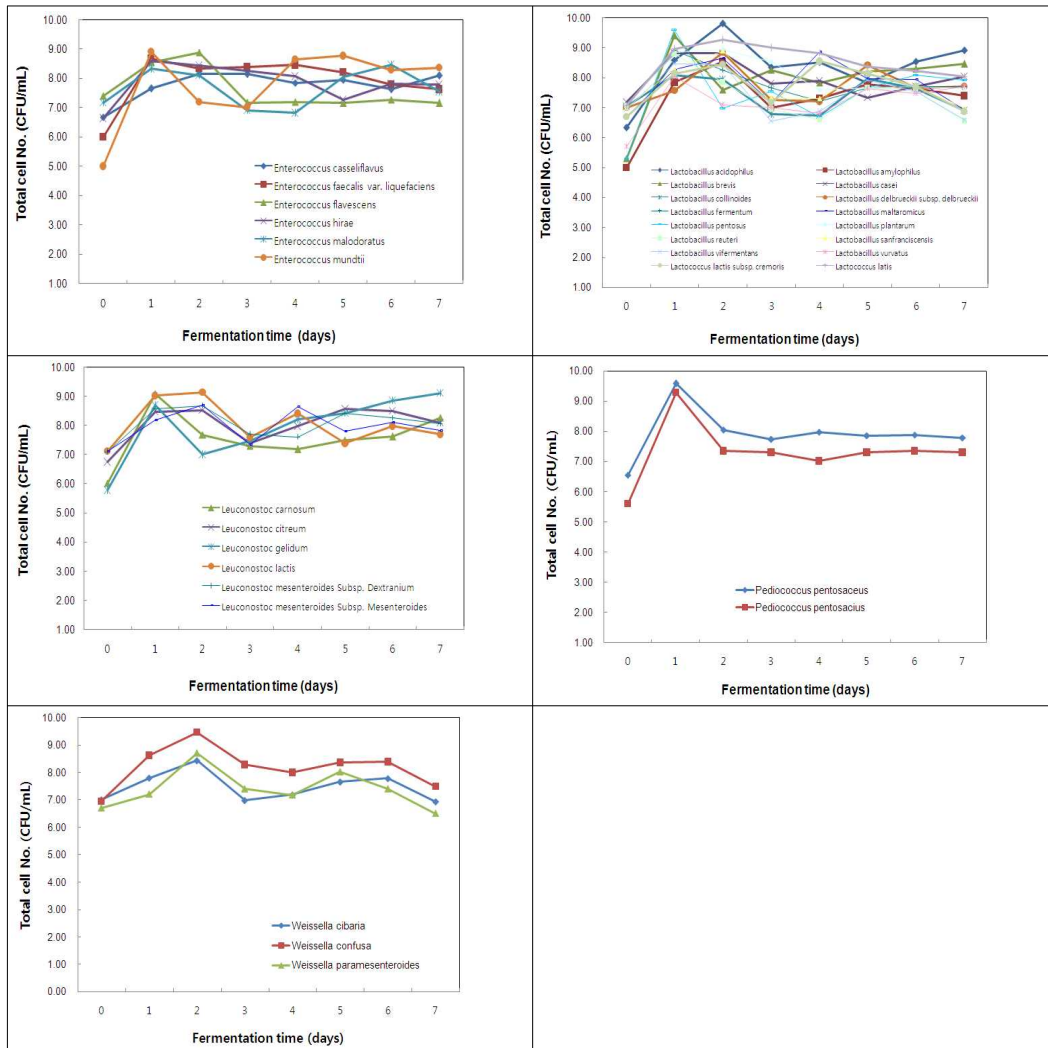


Fig. 8. 발효시간에 따른 산약발효물의 총균수 변화

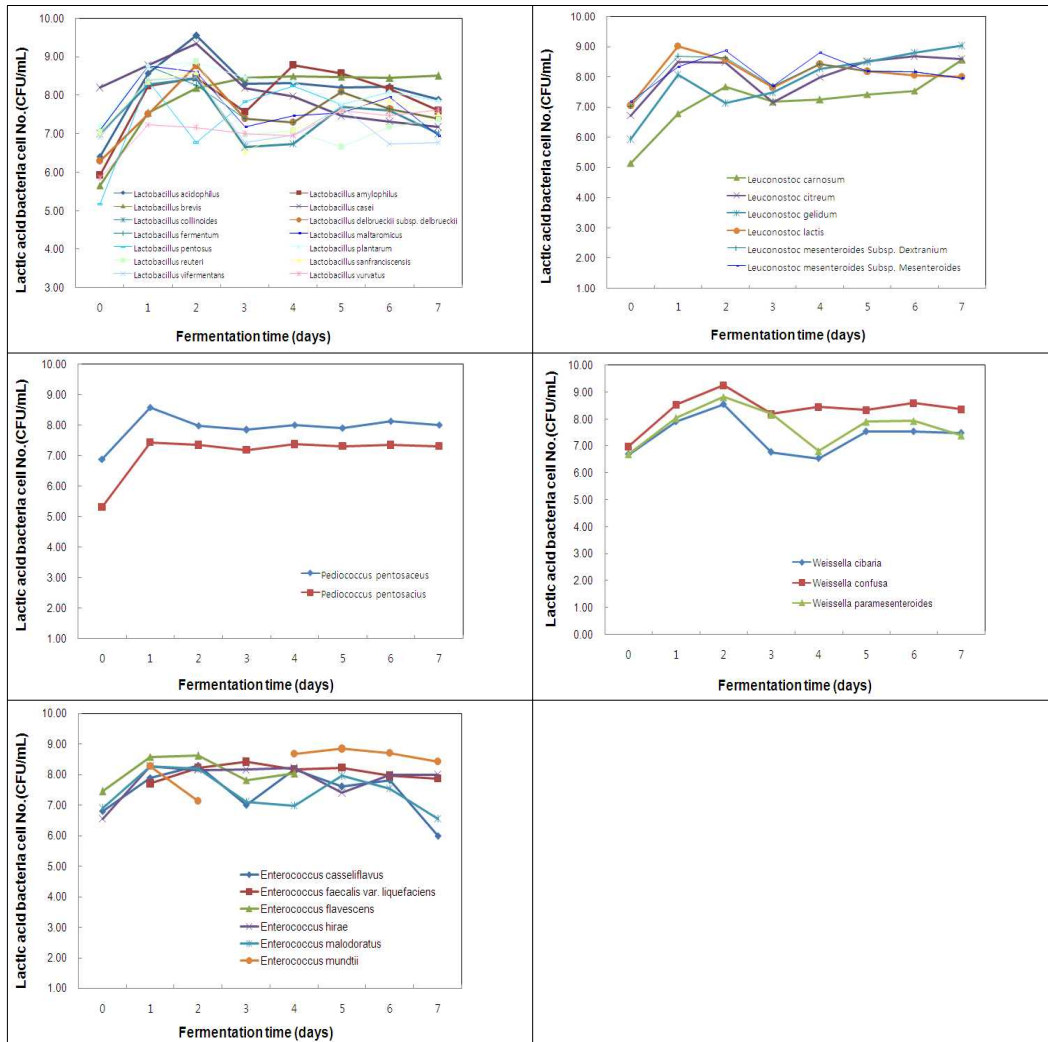


Fig. 9. 발효시간에 따른 산약발효물의 젖산균수 변화

Table 48. 발효시간에 따른 산약발효물의 당도

Strain	Fermentation time (days)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
KCTC 3638	1.2	2.5	2.7	2.7	3.1	2.9	3.0	3.0
KCTC 3195	1.9	3.0	3.8	4.8	5.0	4.8	5.1	5.2
KCTC 3552	1.2	2.1	1.8	1.8	1.9	1.9	2.0	2.0
KCTC 3102	1.7	1.9	2.1	2.4	3.5	4.2	4.7	5.4
KCTC 3641	1.2	1.4	1.7	1.8	1.7	1.8	1.8	1.7
KCTC 3102	1.9	3.1	5.7	6.0	6.3	6.0	6.1	6.2
KFRI 150	1.4	1.6	2.2	2.6	3.4	2.7	2.8	2.8
KFRI 238	1.4	3.0	2.9	3.0	3.1	3.3	3.7	3.7
KCTC 3102	1.8	4.0	3.5	4.0	4.4	4.0	4.1	4.1
KFRI 1030	1.2	1.7	1.6	1.7	1.9	1.8	1.8	1.8
KFRI 346	1.2	1.7	1.6	1.7	1.9	1.8	1.8	1.8
KFRI 1182	1.2	2.1	1.8	1.8	1.9	1.9	2.0	2.0
KFRI 654	1.3	1.5	1.4	1.5	1.7	1.8	1.8	1.8
KCTC 1047	1.4	1.5	1.5	1.7	1.8	1.9	1.8	1.8
KCTC 3112	1.8	2.7	2.4	2.0	2.6	2.3	2.4	2.6
KCTC 3602	1.3	1.6	1.5	1.7	1.8	2.0	1.9	1.9
KFRI 481	1.2	1.7	1.6	1.7	1.9	1.8	1.8	1.8
KCTC 1048	1.3	1.7	1.6	1.9	2.1	2.4	2.1	2.1
KCTC 3594	1.2	2.1	1.8	1.8	1.9	1.9	2.0	2.0
KCTC 3205	1.8	2.6	3.0	3.3	3.2	3.0	3.4	3.2
KFRI 684	1.2	1.4	1.7	1.8	1.7	1.8	1.8	1.7
KCTC 201	1.3	1.7	1.6	2.2	2.4	2.4	2.8	2.8
KCTC 3524	2.0	2.4	3.0	3.0	3.4	3.4	3.4	3.0
KCTC 3526	1.3	1.6	1.5	1.6	1.7	1.7	1.7	1.7
KCTC 3102	2.0	2.4	2.3	3.0	3.0	3.8	4.0	4.7
KCTC 3528	1.3	1.6	1.6	1.6	1.5	1.6	1.7	1.7
KCTC 3530	1.4	1.5	1.5	1.7	1.8	1.9	1.8	1.8
KCTC 3100	1.3	1.6	1.5	1.6	1.6	1.7	1.8	1.7
KFRI 832	1.8	3.4	3.8	3.8	4.9	4.5	4.9	4.9
KCTC 3507	1.7	2.2	2.0	2.0	2.2	2.3	2.3	2.1
KCTC 3807	1.2	1.7	1.9	2.0	2.1	2.1	2.0	2.1
KFRI 1184	1.3	1.7	1.6	1.9	2.1	2.4	2.0	2.0
KCTC 3531	1.4	1.5	1.5	1.7	1.8	1.9	1.8	1.8

Table 49. 발효시간에 따른 산약발효물의 총당

Strain	Fermentation time (days)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
KCTC 3638	8.95	98.41	202.15	120.14	125.89	132.20	126.87	110.61
KCTC 3195	7.20	33.93	67.71	71.78	78.79	101.50	135.56	95.61
KCTC 3552	8.06	61.87	131.21	68.13	65.47	62.80	60.14	57.48
KCTC 3102	9.88	111.21	124.21	120.47	127.20	150.47	180.65	141.96
KCTC 3641	9.56	35.89	36.73	39.25	55.37	60.56	73.32	64.77
KCTC 3102	10.05	28.50	32.52	33.50	43.18	47.38	55.65	57.06
KFRI 150	10.98	35.14	81.59	103.04	145.09	122.80	122.66	123.64
KFRI 238	9.88	131.12	120.42	125.05	128.97	153.50	183.22	147.90
KCTC 3102	9.56	35.89	36.73	39.25	55.37	60.56	73.32	64.77
KFRI 1030	9.56	15.28	16.13	29.50	25.27	30.36	33.52	34.74
KFRI 346	10.05	28.50	32.52	33.50	43.18	47.38	51.65	53.06
KFRI 1182	11.54	20.84	29.30	26.50	43.18	45.64	43.88	57.03
KFRI 654	10.79	38.32	28.60	26.64	42.76	48.64	51.65	50.76
KCTC 1047	10.07	29.63	38.13	31.68	49.63	48.40	49.65	49.73
KCTC 3112	11.54	20.84	29.30	26.50	23.27	28.64	33.88	35.75
KCTC 3602	10.86	34.02	55.37	38.41	51.87	55.65	57.06	57.76
KFRI 481	7.20	33.93	67.71	71.78	78.79	101.50	135.56	95.61
KCTC 1048	8.06	61.87	131.21	68.13	65.47	62.80	60.14	57.48
KCTC 3594	9.88	111.21	124.21	120.47	127.20	150.47	180.65	141.96
KCTC 3205	9.56	35.89	36.73	39.25	55.37	60.56	73.32	64.77
KFRI 684	10.05	28.50	32.52	33.50	43.18	47.38	55.65	57.06
KCTC 201	7.20	33.93	67.71	71.78	78.79	101.50	135.56	95.61
KCTC 3524	12.48	34.02	53.13	68.13	63.08	87.90	76.54	83.13
KCTC 3526	10.05	28.50	32.52	33.50	43.18	47.38	55.65	57.06
KCTC 3102	11.54	20.84	29.30	26.50	43.18	48.64	43.88	57.06
KCTC 3528	9.28	39.91	26.78	32.10	32.38	41.92	57.76	60.98
KCTC 3530	10.07	29.63	38.13	31.68	49.63	43.88	55.65	57.76
KCTC 3100	11.54	20.84	29.30	26.50	23.27	48.64	43.88	35.75
KFRI 832	10.79	38.32	28.60	26.64	42.76	43.18	55.65	57.76
KCTC 3507	10.07	29.63	38.13	31.68	49.63	49.63	55.65	57.76
KCTC 3807	11.54	20.84	29.30	26.50	23.27	48.64	43.88	35.75
KFRI 1184	12.48	34.02	53.13	68.13	63.08	87.90	76.54	83.13
KCTC 3531	11.54	20.84	29.30	26.50	43.18	48.64	43.88	57.06

Table 50. 발효시간에 따른 산약발효물의 환원당

Strain	Fermentation time (days)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
KCTC 3638	3.50	5.52	5.45	6.43	6.47	5.14	5.16	3.59
KCTC 3195	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3552	3.50	3.60	3.28	2.01	2.50	0.00	0.00	0.00
KCTC 3102	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3641	3.46	3.5	4.48	2.30	1.00	0.95	1.13	1.33
KCTC 3102	3.5	3.74	2.98	2.04	1.85	1.66	1.47	1.28
KFRI 150	3.62	3.70	8.50	10.06	12.09	10.8	10.45	10.71
KFRI 238	3.48	7.98	10.29	12.19	12.87	15.41	15.11	14.6
KCTC 3102	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 1030	3.56	3.73	5.86	1.55	2.40	2.18	1.93	2.11
KFRI 346	3.46	3.50	4.48	2.30	1.00	0.95	1.13	1.33
KFRI 1182	3.5	3.74	2.98	2.04	1.85	1.66	1.47	1.28
KFRI 654	3.48	3.54	3.92	3.42	2.92	2.42	2.07	2.11
KCTC 1047	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3112	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3602	3.48	3.62	3.37	1.42	2.07	0.95	1.13	1.33
KFRI 481	3.56	4.17	5.54	5.81	8.13	9.04	11.51	9.16
KCTC 1048	3.48	3.60	0.85	0.97	0.93	0.94	0.10	0.94
KCTC 3594	3.50	3.59	5.56	1.61	1.92	1.85	1.61	1.79
KCTC 3205	3.48	3.62	3.37	1.42	2.07	0.95	1.13	1.33
KFRI 684	3.57	3.77	5.41	4.87	7.01	8.97	10.01	9.16
KCTC 201	3.50	5.52	5.45	6.43	6.47	5.14	5.16	3.59
KCTC 3524	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3526	3.46	3.48	1.12	1.06	1.22	1.13	1.18	1.24
KCTC 3102	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3528	3.46	3.50	4.48	2.30	1.00	0.95	1.13	1.33
KCTC 3530	3.50	3.74	2.98	2.04	1.85	1.66	1.47	1.28
KCTC 3100	3.48	3.60	0.85	0.97	0.93	0.94	0.10	0.94
KFRI 832	3.47	4.95	5.15	6.33	5.97	5.40	5.16	3.59
KCTC 3507	3.57	3.77	5.84	4.87	7.53	9.44	11.11	9.16
KCTC 3807	3.48	3.60	0.85	0.97	0.93	0.94	0.10	0.94
KFRI 1184	3.50	3.59	5.56	1.61	1.92	1.85	1.61	1.79
KCTC 3531	3.46	3.50	4.48	2.30	1.00	0.95	1.13	1.33

4. 선정된 조건에서 산약 효소물과 발효물의 기능적 특성 조사결과

가. 효소물의 혈전용해능과 HMG-CoA reductase 저해활성

Table 51은 가수분해조건을 달리하여 제조한 가수분해물의 혈전용해능 결과를 토대로 선별한 효소가수분해물의 혈전용해능과 HMG-CoA reductase 저해활성을 나타낸 것이다. 즉 단백질 가수분해물은 분해온도 50℃, 효소농도 0.5%, 분해시간 90분 일때 가수분해온도, 시간, 효소농도에 따라 총당, 환원당, 가수분해도, 혈전용해능이 가장 우수한 것으로 나타나 이의 조건으로 분해한 효소가수분해물의 혈전용해능과 HMG-CoA reductase 저해활성을 조사하였다. 단백질 효소가수분해물의 혈전용해능을 측정할 결과 대조구의 투명한 크기가 1.6 cm로 나타났고 효소가수분해물에서는 투명한이 나타나지 않았다.

Table 51. 효소분해물의 혈전분해능 및 HMG-CoA reductase 저해활성

효소분류	분해물의 종류	Fibrinolytic activity (cm)	HMG-CoA reductase 저해활성 (%)
단백질 분해효소	Control	1.6	14.86
	Alcalase	-	45.32
	Flavourzyme	-	-11.42
	Protamex	-	234.96
	Neutrase	-	32.90

각 효소들로 분해한 분해물의 HMG-CoA reductase 저해활성을 측정할 결과 단백질가수분해효소 중 Protamex로 분해한 가수분해물의 저해활성은 234.96%로 나타나 가수분해효소들 중 가장 활성이 강한 것으로 나타났고, Alcalase는 45.32%, Neutrase는 32.90%로 나타났으며 Flavourzyme로 분해한 가수분해물의 저해활성은 없는 것으로 나타났다. 단백질 효소가수분해물은 control보다 HMG-CoA reductase 저해활성이 우수한 것으로 나타났다.

나. 효소물의 담즙산 흡착능 (Bile acid binding capacity)

담즙산은 콜레스테롤 대산의 산물로서 정상인의 담즙산은 41% cholate, 39% chenodeoxycholat, 15% deoxycholate, 4% ursodeoxycholate, 1% lithocholate 로 구성되어 있다. 실험에 쓰인 담즙산염은 간에서 합성되어 얻어지는 1차 담즙산 중 3개의 수

산기를 가진 cholic acid sodium salt와 이것의 일부가 glycine 또는 taurine과 작용해서 glycocholic acid sodium salt 혹은 taurocholic acid sodium salt의 형태로 변환되며, 이들 1차 담즙산은 장내분비되어 장내세균에 의해 7-a-dehydroxylation으로 생긴 2차 담즙산으로 2개의 수산기를 가진 deoxycholic acid sodium salt로 실험하였다. 담즙산은 지질이나 지용성 비타민을 유화시키고, 회장부근에서 흡수되어 간으로 순환하는 장간 순환과정을 거치면서 일부 (약 1%)는 배설되는 경로를 가지고 있다. 이때 흡착제를 사용하여 회장부근에서 담즙산의 흡수를 막아 체내 콜레스테롤의 소비를 촉진시키고 또한 feedback 효과에 의해 장점막에서 생성된 콜레스테롤의 흡수를 차단, 배설 시킴으로써 혈중콜레스테롤 값을 낮추는 방법으로 혈류개선용 마커로서 적합한 것으로 판단된다. Table 52는 선정된 가수분해조건으로 분해한 효소가수분해물의 담즙산 흡착능을 나타낸 것이다. 그 결과 가수분해물의 담즙산흡착능은 대부분 낮은 것으로 나타났고 담즙산의 종류와 가수분해물의 종류에 따라 흡착능은 다소 차이를 보이는 것으로 나타났다. 대조구는 cholic acid는 5.89%로 나타났으나 deoxycholic acid, taurocholic acid, glycocholic acid에 대한 흡착효과는 없는 것으로 나타났다. 단백질가수분해효소로 분해시킨 가수분해물은 Protamex로 분해한 가수분해물의 glycocholic acid에 대한 흡착효과가 15.91%로 가장 우수하였고, deoxycholic acid는 12.07%로 나타나 단백질가수분해효소 중 가장 우수한 효과를 보였다. Neutrased로 분해한 가수분해물의 glycocholic acid에 대한 흡착효과도 9.63%로 나타나 Protamex로 분해한 가수분해물의 glycocholic acid에 대한 흡착효과를 제외한 나머지 실험군에 비해 우수한 흡착효과가 있었다. 실험결과, protamex로 분해한 가수부해물은 4개의 담즙산 중 glycocholic acid와 deoxycholic acid에 대한 흡착효과가 뛰어났다.

Table 52. 산약 효소분해물의 담즙산 흡착능

분 류	Enzyme	Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
	Control	5.89	0.00	0.00	0.00
단백질	Alcalase	5.81	6.89	6.55	4.54
	Flavourzyme	7.02	4.56	7.59	4.13
분해효소	Protamex	6.11	12.07	6.87	15.91
	Neutrased	5.74	6.84	6.77	9.63

다. 발효물의 혈전용해능

발효시간에 따른 산약발효물의 Fibrinolytic activity을 관찰한 결과(Table 53), KFRI 150 (*Lactobacillus acidophilus*), KCTC 3552 (*Enterococcus flavescens*), KCTC 3100 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)에서 각각 발효 3일, 발효 2일, 발효 4일째 혈전용해능이 강하게 나타났다. 혈전생성은 혈관이 손상을 받아 출혈이 일어나면 혈액이 응고되는 체내방어 작용이 작동하게 되는데 이 과정은 활성화된 thrombin에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 유도된다. 이렇게 생성된 혈전(fibrin clots)은 상처회복 후 plasmin과 같은 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)에 의해 용해되는데, 만약 생성된 혈전이 체내에 과도하게 축적되거나 혈전용해 기작이 원활하게 작동하지 못할 경우 혈전증(thrombosis)을 유발하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수도 있다. 이러한 맥락에서 살펴볼 때 산약발효물의 혈류개선효과 스크리닝을 위해서 적당한 분석 마커라고 판단되며, 33종의 젓산균에 의해 발효된 발효물의 혈전용해능 분석 결과를 토대로 활성물질에 대한 분리분석이 필요할 것으로 판단된다.

라. 발효물의 HMG-CoA reductase 저해활성

Table 54는 발효시간에 따른 산약발효물의 HMG-CoA reductase 저해활성을 나타낸 것이다. 그 결과 KCTC 3552 (*Enterococcus flavescens*)로 발효한 발효물은 발효 4일째 281.96%의 저해활성을 보여 산약발효물 중 가장 우수한 저해활성을 나타내었고 KCTC 3195 (*Enterococcus faecalis* var. *liquefaciens*)로 발효한 발효물은 발효 4일째 219.53%의 저해활성을 보여 KCTC 3552 (*Enterococcus flavescens*)와 비슷한 저해활성이 있는 것으로 나타났다. 또 KFRI 150 (*Lactobacillus acidophilus*)로 발효한 발효물은 발효 4일째 120.66% 저해활성을 보였고, KCTC 3112 (*Lactobacillus fermentum*)로 발효한 발효물은 114.48%, KFRI 654 (*Lactobacillus curvatus*)로 발효한 발효물은 90.1%의 저해활성을 나타내었으며 KCTC 3526 (*Leuconostoc citreum*)로 발효한 발효물은 59.17%의 저해활성을 보였으나 이들을 제외한 나머지 산약발효물은 HMG-CoA reductase 저해활성이 없는 것으로 나타났다. 또한 모든 산약발효물의 저해활성은 발효 4일째까지 나타났고 이후 나타나지 않아 추가실험을 통해 보완할 것이다.

마. 발효물의 담즙산 흡착능

Table 55는 발효시간에 따른 산약발효물의 4개의 담즙산에 대하여 흡착능을 나타낸 것이다. 대조구의 담즙산 흡착능은 발효시간이 지남에 따라 거의 변화가 없었고 발효초기와 비슷한 수준이었고 33종의 젖산균으로 발효한 발효물의 담즙산 흡착능은 발효시간이 지남에 따라 차츰 증가하였다. KFRI 150 (*Lactobacillus acidophilus*)로 발효한 발효물은 발효 4일째 cholic acid에 대해서 8.12%, deoxycholic acid 9.80%, taurocholic acid 7.60%, glycocholic acid 6.98%로 다른 발효물들에 비해 높은 담즙산 흡착능을 보였다. KCTC 3507 (*Pediococcus pentosacius*)로 발효한 발효물은 cholic acid 9.58%, deoxycholic acid 8.02%, taurocholic acid 7.41%, glycocholic acid 6.30%의 흡착능을 보였다.

Table 53. 산약 껌산 발효물의 혈전용해능

Strain	Fermentation time (days)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
KCTC 3638	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3195	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3552	-	-	+++++	-	-	-	-	-
KCTC 3102	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3641	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3102	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 150	-	+++++	-	-	-	-	-	-
KFRI 238	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3102	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 1030	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 346	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 1182	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 654	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 1047	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3112	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3602	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 481	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 1048	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3594	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3205	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 684	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 201	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3524	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3526	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3102	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3528	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3530	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3100	-	-	-	+++++	-	-	-	-
KFRI 832	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3507	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3807	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 1184	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3531	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 54. 산약 낫산발효물의 HMG-CoA reductase 저해활성

Strain	Fermentation time (days)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
KCTC 3638	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3195	-	105.49	-	219.53	-	-	-	-
KCTC 3552	-	-	-	281.96	-	-	-	-
KCTC 3102	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3641	-	222.72	-	-	-	-	-	-
KCTC 3102	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 150	-	91.38	-	120.66	-	-	-	-
KFRI 238	-	110.61	-	-	-	-	-	-
KCTC 3102	-	53.99	-	23.65	-	-	-	-
KFRI 1030	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 346	-	406.86	-	-	-	-	-	-
KFRI 1182	-	27.15	-	-	-	-	-	-
KFRI 654	-	171.97	-	90.01	-	-	-	-
KCTC 1047	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3112	-	119.85	-	114.48	-	-	-	-
KCTC 3602	-	-157.9	-	-	-	-	-	-
KFRI 481	-	-44.63	-	-	-	-	-	-
KCTC 1048	-	17.790	-	-	-	-	-	-
KCTC 3594	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3205	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 684	-	138.82	-	-	-	-	-	-
KCTC 201	-	64.419	-	-	-	-	-	-
KCTC 3524	-	40.57	-	-	-	-	-	-
KCTC 3526	-	-	-	59.17	-	-	-	-
KCTC 3102	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3528	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3530	-	378.83	-	-	-	-	-	-
KCTC 3100	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 832	-	7.49	-	-	-	-	-	-
KCTC 3507	-	203.30	-	-81.58	-	-	-	-
KCTC 3807	-	136.45	-	-238.1	-	-	-	-
KFRI 1184	-	34.39	-	-	-	-	-	-
KCTC 3531	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 55. 산약 젖산발효물의 담즙산 결합능력

Strain	Fermentation time (days)											
	0				2				4			
	C	D	T	G	C	D	T	G	C	D	T	G
Control	2.64	3.59	3.01	3.30	2.87	2.98	3.01	2.81	2.51	2.98	2.72	2.81
KCTC 3638	-	-	-	-	4.58	5.81	5.95	5.28	-	-	-	-
KCTC 3195	2.95	3.42	3.17	3.14	3.70	4.92	4.17	4.18	5.10	6.93	5.83	6.21
KCTC 3552	2.93	3.17	3.15	2.53	-	-	-	-	7.65	8.71	8.82	6.90
KCTC 3528	-	-	-	-	4.57	5.49	5.39	5.38	-	-	-	-
KCTC 3641	-	-	-	-	4.86	6.03	5.47	5.73	6.32	7.66	7.89	6.28
KCTC 3630	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 150	2.49	3.16	2.91	3.41	4.96	6.52	6.45	6.15	8.12	9.80	7.60	6.98
KFRI 238	-	-	-	-	3.93	4.69	4.13	3.88	5.94	8.55	6.70	6.12
KCTC 3102	-	-	-	-	3.14	3.92	3.63	4.89	5.45	5.90	6.39	6.19
KFRI 346	-	-	-	-	4.96	6.29	6.29	5.69	-	-	-	-
KFRI 1182	-	-	-	-	4.26	5.22	4.96	4.70	-	-	-	-
KCTC 1047	-	-	-	-	-	-	-	-	5.59	7.30	7.02	6.41
KCTC 3112	-	-	-	-	3.26	4.08	3.85	3.59	6.59	8.11	7.47	7.25
KCTC 3602	-	-	-	-	4.78	6.21	6.15	5.57	-	-	-	-
KFRI 481	-	-	-	-	3.99	5.00	4.61	4.33	5.95	7.74	7.45	6.61
KCTC 1048	-	-	-	-	3.63	4.41	4.51	4.19	-	-	-	-
KCTC 3594	-	-	-	-	4.47	6.23	5.71	5.37	-	-	-	-
KCTC 3205	-	-	-	-	4.78	6.27	6.05	5.68	-	-	-	-
KFRI 1030	-	-	-	-	4.04	4.79	4.81	4.96	-	-	-	-
KFRI 654	-	-	-	-	3.54	4.77	4.29	3.89	5.44	7.55	7.30	6.79
KCTC 201	-	-	-	-	4.82	6.09	6.04	5.74	-	-	-	-
KFRI 684	-	-	-	-	7.45	6.30	5.55	5.32	-	-	-	-
KCTC 3524	-	-	-	-	4.15	5.06	3.95	5.35	6.28	7.03	7.27	7.23
KCTC 3526	-	-	-	-	-	-	-	-	6.29	7.71	7.58	6.79
KCTC 3527	-	-	-	-	-	-	-	-	6.12	6.76	7.18	6.56
KCTC 3528	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3530	3.21	2.95	3.27	3.17	-	-	-	-	-	-	-	-
KCTC 3100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 832	-	-	-	-	3.53	5.08	4.37	4.13	6.53	7.67	6.88	6.71
KCTC 3507	-	-	-	-	3.94	4.34	4.62	4.09	9.58	8.02	7.41	6.30
KCTC 3807	-	-	-	-	-	-	-	-	6.33	7.64	6.90	6.50
KFRI 1184	-	-	-	-	4.76	6.19	5.59	5.08	-	-	-	-
KCTC 3531	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C : Cholic acid, D : Deoxycholic acid, T : Taurocholic acid, G : Glycocholic acid

5. 혈류개선 효과가 있는 기능성 물질의 분리정제 및 기능특성 조사 결과

가. 산약효소분해물의 혈류개선 효과

단백질 효소 종류 중 하나인 protamex를 이용하여 분해한 산약효소분해물의 상등액과 침전물을 HMG-CoA reductase 저해활성, bile acid 결합능력, 혈전용해활성과 DPPH 전자공여능 실험을 통하여 그 효과를 확인하였다.

HMG-CoA reductase 저해활성실험 결과를 Table 56. 에서 보면 효소분해물의 상등액과 침전물 모두 저해활성이 높은 값으로 유사하게 측정되었다. Bile acid 결합능력의 실험결과의 경우 또한 상등액과 침전물 모두 혈류개선 효과가 나타났으며 특히 glycocholic acid의 결합능력이 가장 큰 것으로 확인되었다. 그러나 plate를 이용한 혈전용해활성에서는 상등액과 침전물 모두 효과가 없었으며 DPPH 전자공여능에서는 상등액이 43.2%로 측정되어 침전물에 비하여 거의 2배의 효과를 보였다.

Table 56. 효소 상등액 및 침전물의 HMG-CoA reductase 저해활성

Sample	Inhibition activity (%)
Supernatant	84.5
Precipitate	75.1

Table 57. 효소 상등액 및 침전물의 담즙산 흡착능

Sample	Binding capacity (uM)			
	Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
Supernatant	16.2	19.6	17.4	19.7
Precipitate	15.2	18.1	17.1	19.1

Table 58. 효소 상등액 및 침전물의 혈전용해능

Sample	Fibrinolytic activity (cm)
Supernatant	-
Precipitate	-

Table 59. 효소 상등액 및 침전물의 DPPH 소거능

Sample	DPPH radical scavenging effect (%)
Supernatant	43.2
Precipitate	23.5

나. 산약효소분해물의 용매 분획을 통한 분리물의 혈류개선 효과

1) HMG-CoA reductase 저해활성 측정 결과

산약효소분해물을 용매 분획한 후 상등액과 침전물을 나누어 실험한 결과를 Table 60과 같이 나타내었다. 가장 높은 저해 활성을 갖는 층은 효소분해물 상등액의 상등액 층이었으며 이 중에서도 ethanol 분획이 76.5%로 가장 높은 저해 활성값을 나타내는 것으로 확인되었다. 기타 분획물은 저해활성이 10~30% 내외로 측정되면서 큰 저해 활성을 보이지 않는 것으로 측정되었다.

Table 60. 효소 용매분획물의 HMG-CoA reductase 저해활성

Item	Solvent	Inhibition activity (%)
상-상 ¹⁾	n-Hexane	31.0
	CHCl ₃	34.4
	E.A	51.9
	n-BuOH	36.4
	EtOH	76.5
상-침 ²⁾	n-Hexane	13.9
	CHCl ₃	15.2
	E.A	21.2
	n-BuOH	13.1
	EtOH	20.7
침-상 ³⁾	n-Hexane	12.7
	CHCl ₃	12.9
	E.A	18.8
	n-BuOH	15.2
	EtOH	33.2
침-침 ⁴⁾	n-Hexane	5.3
	CHCl ₃	6.1
	E.A	10.6
	n-BuOH	4.5
	EtOH	5.9

1) 산약 효소 분해 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물

2) 산약 효소 분해 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

3) 산약 효소 분해 침전물을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물

4) 산약 효소 분해 침전물을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

2) 담즙산 흡착능 측정 결과

Bile acid binding capacity의 실험 결과를 Table 61에 나타내었다. 실험 결과 효소 분해물 상등액을 분획한 분획물이 가장 결합능이 높았다. 특히 ethanol 분획과 ethyl acetate 분획의 결합능이 가장 높았으며 4가지 담즙산 중 deoxycholic acid와 glycocholic acid 결합능이 가장 높은 것으로 확인되었다.

Table 61. 효소 용매분획물의 담즙산 결합능

Item	Binding capacity (uM)				
	Solvent	Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
상-상 ¹⁾	n-Hexane	14.8	16.2	15.4	15.2
	CHCl ₃	13.5	15.3	14.1	13.4
	E.A	18.5	23.3	22.0	20.2
	n-BuOH	17.0	20.7	19.4	18.2
	EtOH	20.8	25.2	23.1	24.2
상-침 ²⁾	n-Hexane	8.4	10.9	10.1	8.7
	CHCl ₃	10.2	11.7	11.0	10.5
	E.A	11.3	12.5	12.1	10.8
	n-BuOH	7.8	8.8	7.9	7.2
	EtOH	7.2	7.7	7.7	6.7
침-상 ³⁾	n-Hexane	8.1	9.6	9.3	8.8
	CHCl ₃	6.8	10.3	9.6	9.1
	E.A	10.9	10.7	10.2	8.6
	n-BuOH	10.9	13.3	14.0	10.4
	EtOH	9.6	18.4	18.1	22.3
침-침 ⁴⁾	n-Hexane	7.5	9.1	7.4	5.8
	CHCl ₃	9.7	12.6	11.6	8.6
	E.A	10.5	14.0	12.2	12.0
	n-BuOH	5.6	6.8	7.6	5.6
	EtOH	5.0	6.0	5.5	4.9

1) 산약 효소 분해 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물

2) 산약 효소 분해 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

3) 산약 효소 분해 침전물을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물

4) 산약 효소 분해 침전물을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

3) 혈전용해능 측정결과

산약 효소 분해 상등액의 용매분획물의 상등액의 혈전용해능을 측정한 결과를 Table 62에 나타내었다. 그 결과 혈전용해능의 효과를 확인 할 수 없었다.

Table 62. 효소 용매분획물의 혈전용해능

Sample		Fibrinolytic activity (cm)
상-상 ¹⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	-
	E.A	-
	n-BuOH	-
	EtOH	-
상-침 ²⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	-
	E.A	-
	n-BuOH	-
	EtOH	-
침-상 ³⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	-
	E.A	-
	n-BuOH	-
	EtOH	-
침-침 ⁴⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	-
	E.A	-
	n-BuOH	-
	EtOH	-

- 1) 산약 효소 분해 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물
- 2) 산약 효소 분해 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물
- 3) 산약 효소 분해 침전물을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물
- 4) 산약 효소 분해 침전물을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

4) 항산화 활성 측정 결과

산약 효소 분해의 상등액과 침전물의 용매분획별 항산화 활성은 상등액의 경우 Ethyl acetate분획물이 69.2%로 항산화 활성이 가장 효과적으로 나타났으며, Ethanol 분획물은 50.9%로 다음으로 높게 나타났으며 n-Butanol로 분획한 상등액도 45.1%로 항산화 활성의 효과가 나타남을 확인 할 수 있었다. 침전물은 상등액보다는 낮은 항산화 활성을 나타내었다. 산약 효소분해 침전물은 거의 항산화 활성이 나타나지 않는 것으로 확인 하였다.

Table 63. 효소 용매분획물의 DPPH 소거능

Sample		DPPH radical scavenging effect (%)
상-상 ¹⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	4.7
	E.A	69.2
	n-BuOH	45.1
	EtOH	50.9
상-침 ²⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	-
	E.A	4.5
	n-BuOH	-
	EtOH	6.7
침-상 ³⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	-
	E.A	-
	n-BuOH	16.9
	EtOH	-
침-침 ⁴⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	-
	E.A	-
	n-BuOH	-
	EtOH	-

1) 산약 효소 분해 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물

2) 산약 효소 분해 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

3) 산약 효소 분해 침전물을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물

4) 산약 효소 분해 침전물을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

다. 산약 발효물의 용매 분획물의 혈류개선 효과

1) 산약발효물의 상등액과 침전물의 혈류개선 효과

산약을 젓산균을 이용하여 발효시킨 발효물의 상등액과 침전물을 HMG-CoA reductase 저해활성, bile acid 결합능력, 혈전용해활성과 DPPH 전자공여능 실험을 통하여 그 효과를 확인하였다. 실험결과 산약 발효 침전물보다 상등액이 모든 실험에서 그 활성이 높은 것으로 확인되었다. HMG-CoA reductase 저해활성에서는 상등액이 72.3%로 높게 측정되었고 bileacid 결합능력에서도 상등액이 4가지 담즙산 모두 결합능이 높았으며, 혈전용해능의 결과에서는 투명환이 나타나지 않았다. 항산화 활성에서 또한 상등액에서만 65.1%의 항산화 효과를 나타내었다.

Table 64. 발효 상등액 및 침전물의 HMG-CoA reductase 저해활성

Sample	Inhibition activity (%)
Supernatant	72.3
Precipitate	9.7

Table 65. 발효 상등액 및 침전물의 담즙산 흡착능

Sample	Binding capacity (uM)			
	Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
Supernatant	7.1	8.7	7.3	5.9
Precipitate	5.5	6.2	6.2	5.7

Table 66. 발효 상등액 및 침전물의 혈전용해능

Sample	Fibrinolytic activity (cm)
Supernatant	-
Precipitate	-

Table 67. 발효 상등액 및 침전물의 DPPH 소거능

Sample	DPPH radical scavenging effect (%)
Supernatant	65.1
Precipitate	-

라. 산약 젖산 발효물의 용매 분획을 통한 분리물의 혈류개선 효과

1) HMG-CoA reductase 저해활성 측정 결과

산약 젖산 발효물을 용매별로 분획한 HMG-CoA reductase inhibition의 실험결과이다. 용매 분획을 한 후 상등액과 침전물을 나뉘어 실험하여 분획물의 상등액과 침전물에 대한 결과는 Table 68과 같이 나타내었다. 상등액의 저해 비율이 침전물의 저해비율보다 높은 것으로 보아 HMG-CoA reductase를 저해하는 물질들은 주로 상등액에 분포되어 있는 것을 확인 하였으며 이들 중 활성이 가장 높은 것은 ethanol 분획물 (95.2%)인 것으로 확인 되었다.

Table 68. 발효 용매분획물의 HMG-CoA reductase 저해활성

Item	Solvent	Inhibition activity (%)
상-상 ¹⁾	n-Hexane	46.6
	CHCl ₃	60.1
	E.A	87.9
	n-BuOH	84.0
	EtOH	95.2
상-침 ²⁾	n-Hexane	39.8
	CHCl ₃	49.1
	E.A	40.9
	n-BuOH	39.8
	EtOH	47.2

1) 산약 젖산발효 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물

2) 산약 젖산발효 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

2) 담즙산 흡착능 측정 결과

산약 젖산균 발효 상등액의 용매분획물을 이용하여 Bile acid binding capacity를 측정한 결과를 Table 69에 나타내었다. 그 결과 cholic acid, deoxycholic acid, taurocholic acid 및 glycocholic acid 모두 n-Butanol로 분획한 상등액에서 가장 결합능력이 높게 측정되었고 Ethanol 분획물이 그 다음으로 높게 측정되었다. 용매 분획 침전물의 경우 n-Hexane 분획이 가장 결합능이 높았지만 분획 상등액에 비하여 그 결합능이 낮은 것으로 확인되었다.

Table 69. 발효 용매분획물의 담즙산 결합능

Item	Binding capacity (uM)				
	Solvent	Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
상-상 ¹⁾	n-Hexane	6.5	7.9	6.8	6.6
	CHCl ₃	7.2	8.3	7.9	7.1
	E.A	8.7	9.9	11.3	9.0
	n-BuOH	11.8	17.7	13.1	17.6
	EtOH	10.3	16.4	9.9	10.1
상-침 ²⁾	n-Hexane	7.4	7.8	7.2	7.4
	CHCl ₃	6.1	7.0	6.6	6.1
	E.A	7.0	7.7	7.8	7.0
	n-BuOH	4.4	4.9	5.1	4.5
	EtOH	3.4	4.1	4.0	3.7

1) 산약 젖산발효 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물

2) 산약 젖산발효 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

3) 혈전용해능 측정결과

산약 젖산균 발효 상등액의 용매분획물의 혈전용해능을 측정한 결과를 Table 70에 나타내었다. 그 결과 모든 실험군에서 혈전용해능이 나타나지 않았다.

Table 70. 발효 용매분획물의 혈전용해능

Sample		Fibrinolytic activity (cm)
상-상 ¹⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	-
	E.A	-
	n-BuOH	-
	EtOH	-
상-침 ¹⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	-
	E.A	-
	n-BuOH	-
	EtOH	-

1) 산약 젖산발효 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물

2) 산약 젖산발효 침전물을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

4) 항산화 활성 측정 결과

산약 짓산균의 발효상등액의 상등액과 침전물의 용매분획별 항산화 활성은 Table 71에 나타내었다. 상등액의 경우 Ethanol 분획물이 68.9%로 항산화 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다. 이외 다른 실험군들은 n-Butanol로 분획한 상등액이 53.3%의 항산화활성을 보였다. 그 중 가장 낮은 활성을 보인 실험군은 n-Hexane 분획물이 4.2%로 낮게 나타났다. 용매 분획 침전물의 경우는 대체적으로 상등액보다 낮은 항산화 활성을 보였어 n-Hexane 및 chloroform 분획물의 경우는 활성이 전혀 나타나지 않았고, 그 중 Ethanol 분획물이 9.1%로 효과가 나타났지만 이는 침전물 속에 남아 있는 상등액 물질로 인한 효과일 것으로 추정되었다.

Table 71. 발효 용매분획물의 DPPH 소거능

Sample		DPPH radical scavenging effect (%)
상-상 ¹⁾	n-Hexane	4.2
	CHCl ₃	12.1
	E.A	34.4
	n-BuOH	53.3
	EtOH	68.9
상-침 ²⁾	n-Hexane	-
	CHCl ₃	-
	E.A	5.2
	n-BuOH	3.6
	EtOH	9.1

¹⁾ 산약 짓산발효 상등액을 이용하여 용매분획한 후 얻은 상등액 분획물

²⁾ 산약 짓산발효 침전물을 이용하여 용매분획한 후 얻은 침전물 분획물

마. 한외여과에 따른 산약 분리물의 혈류개선 효과

1) 효소물과 발효물의 한외여과별 HMG-CoA reductase 저해활성

산약의 발효물과 효소물의 용매분획 후 가장 활성이 높았던 ethanol 분획을 이용하여 한외여과에 따른 분자량별 HMG-CoA 저해 활성효과를 알아 본 결과를 table 72에 나타내었다. 산약발효물의 경우 한외여과 분리를 하지 않은 대조구의 HMG-CoA reductase 저해활성이 93.4%로 측정되었으며 분리가 진행될수록 저해활성은 감소하였다. 고분자에 속하는 분자량 100,000이상의 분리물들은 저해활성이

5.7~18.9%로 낮았지만 30,000~ 50,000 범위에 속하는 분리물의 저해활성이 64.4%로 가장 높게 측정되었고 그 이하 분자범위에서는 저해활성이 미미하였다. 그리하여 산약 발효 ethanol 분획물 안에는 분자량 30,000~50,000 사이의 물질이 혈류개선효과를 가지고 있음을 추정하였다.

효소물의 경우 한외여과를 실시하지 않은 대조구는 89.9%의 저해활성을 보였다. 효소물 역시 분자량이 작아질수록 저해활성이 감소하는 추세를 나타내었으며 분자량 30,000 이하의 분획물에서 66.5%의 가장 높은 저해활성이 측정되었고 그 이하 분자량에서는 저해활성이 절반 수치로 비슷하게 측정되어 분자량 30,000 이하의 분리물에서 혈류개선 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

Table 72. 산약 발효물 및 효소물의 ethanol 용매분획 후 한외여과에 따른 HMG-CoA reductase 저해 효과

분자크기 (dalton)	Inhibition activity (%)	
	발효물	효소물
Control*	93.4	89.9
300,000 이상	5.7	4.5
300,000 이하	88.3	82.0
100,000-300,000	18.9	17.0
100,000 이하	73.0	71.3
50,000-100,000	7.3	7.5
50,000 이하	60.1	67.2
30,000-50,000	64.4	9.6
30,000 이하	12.9	65.0
10,000-30,000	9.1	33.6
10,000 이하	-5.7	26.7

Control*: 한외여과 처리 전 산약 발효물과 효소물 ethanol 분획

2) 산약 효소물과 발효물의 한외여과별 담즙산 흡착능

산약발효물 ethanol분획물의 분자량에 따른 담즙산 결합능 실험결과 HMG-CoA reductase 저해활성과 마찬가지로 분자량 30,000~50,000 사이의 분리물에서 담즙산 결합능력이 가장 우수한 것으로 확인되었다. 특히 4종류의 담즙산 중 deoxycholic acid의 흡착능력이 가장 우수하였으며 30,000이하의 분리물에서는 모든 담즙산의 흡

착능력이 미미한 것으로 측정되었다. HMG-CoA reductase 저해활성과 담즙산 결합능 실험결과를 종합해보면 산약 ethanol 발효물 중 혈류개선 능력이 우수한 물질은 분자량 30,000~50,000 사이의 크기를 지니고 있으며 이 분리물을 이용하여 gel-filtration 을 통한 더 세부적인 분리를 진행할 수 있을것으로 사료되었다.

Table 73. 산약 발효물의 ethanol 용매분획 후 한외여과에 따른 bile acid binding capacity 결과

분자크기	Binding capacity (uM)			
	Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
Control*	10.6	17.2	9.2	10.1
300,000 이상	3.0	2.8	1.1	0.9
300,000 이하	8.6	14.0	7.8	8.4
100,000-300,000	1.7	3.0	1.1	1.3
100,000 이하	6.9	11.2	7.2	7.0
50,000-100,000	1.2	0.1	1.3	1.8
50,000 이하	6.5	9.4	6.2	5.6
30,000-50,000	5.7	7.7	6.8	5.3
30,000 이하	1.0	1.9	0.7	0.2
10,000-30,000	0.3	0.7	0.3	0.2
10,000 이하	0.0	0.1	0.3	0.1

Control*: 한외여과 처리 전 산약 발효물과 효소물 ethanol 분획

Table 74. 산약 효소물의 ethanol 용매분획 후 한외여과에 따른 bile acid binding capacity 결과

분자크기	Binding capacity (uM)			
	Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
Control*	21.4	26.1	24.0	23.6
300,000 이상	1.2	2.0	1.7	2.2
300,000 이하	19.4	25.0	23.2	18.6
100,000-300,000	4.4	2.5	3.6	3.1
100,000 이하	18.7	22.2	19.2	18.2
50,000-100,000	2.7	1.4	4.7	4.4
50,000 이하	15.8	20.2	15.2	12.2
30,000-50,000	1.5	1.4	1.7	1.4
30,000 이하	14.8	17.8	11.5	11.1
10,000-30,000	4.8	4.8	3.2	4.6
10,000 이하	5.9	8.3	8.0	5.5

Control*: 한외여과 처리 전 산약 발효물과 효소물 ethanol 분획

바. Gel chromatography 분리물의 성분확인 및 혈류개선효과

1) Gel chromatography 분리물의 성분분석 시료 선정

Gel filtration을 시행한 산약발효물의 물질 분포양상을 확인하기 위하여 280 nm에서 O·D값을 측정하였다(Fig. 10, Fig. 11). 한외여과한 후 혈류개선효과가 가장 우수하였던 산약발효물 50,000~30,000 dalton사이의 분리물을 gel filtration을 한 후 280 nm에서 흡광도를 측정한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 산약발효물의 경우 10~30번 분획과 40~50번 분획의 peak가 높게 나타나 이들을 시료로 선정하였다. 혈류개선 효과가 가장 우수하였던 산약효소물 30,000 dalton 이하의 분리물을 gel filtration을 한 후 흡광도 수치를 나타낸 결과를 Fig. 11에 나타내었다. 산약효소분획물은 4개의 획분(I 분획: 10~45, II 분획: 51~60, III 분획: 86~100, IV 분획: 121~125)로 분리되었다. 따라서 이 4개의 분획을 선정하여 성분분석을 하기로 선정하였다.

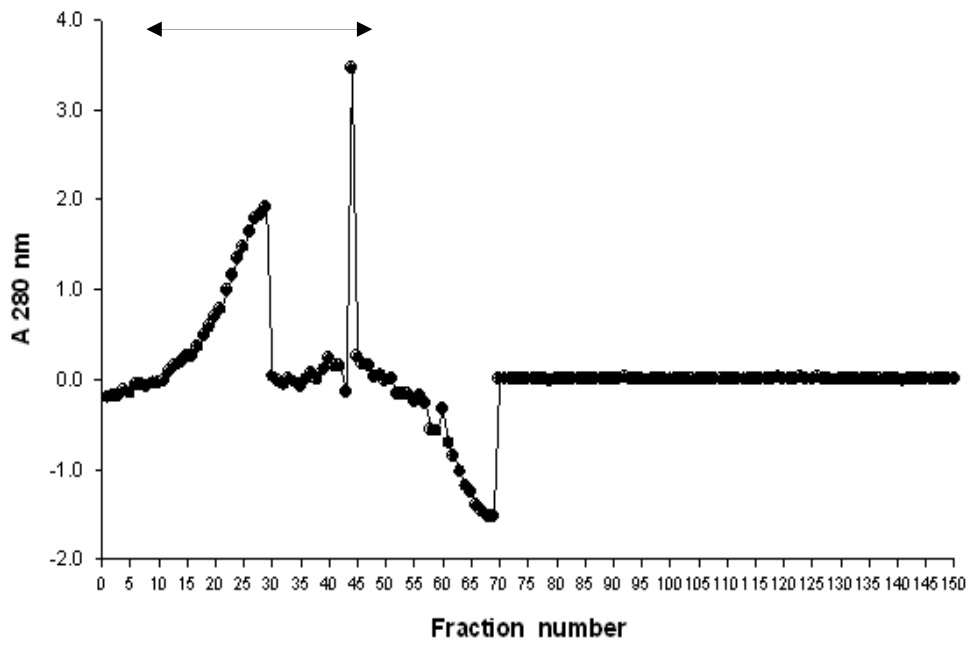


Fig. 10. Gel chromatography 발효 분리물을 Sephadex G-75에서 분리한 분획물의 흡광도수치(280 nm)

*↔ : 탄수화물, 지질, 단백질 측정 fraction

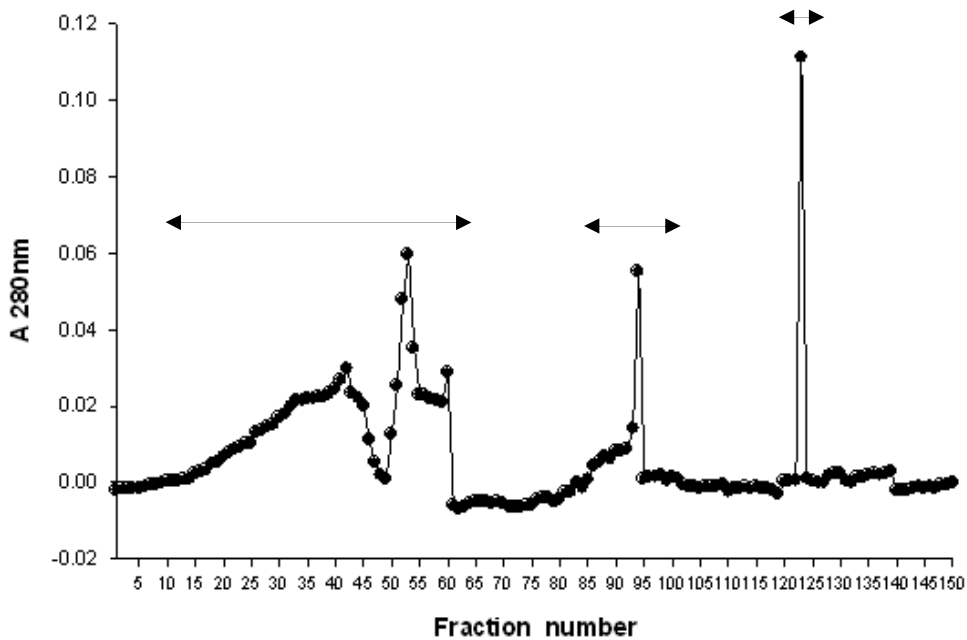


Fig. 11. Gel chromatography 효소 분리물 Sephadex G-75에서 분리한 분획물의 흡광도수치(280 nm)

*↔ : 탄수화물, 지질, 단백질 측정 fraction

2) 탄수화물 정량

산약 발효물의 fraction No. 11~30과 41~50번 분획의 총 탄수화물정량을 조사한 결과, fraction No. 16~28의 분획에서 가장 탄수화물 함량이 높았으며 이중에서도 22번과 23번 분획이 45.5%로 가장 높게 측정되었다. 산약 효소물의 경우 네 부분(I분획: 11~45, II분획: 51~60, III분획: 86~100, IV분획: 121~125)의 fraction을 조사한 결과, I분획의 34~40번이 약 15%, II분획의 52~58번에서 약 22%로 탄수화물 함량이 높았으며, 분획 III과 IV는 탄수화물 양이 적은 것으로 확인되었다. 산약발효물과 산약효소물을 비교했을 때 산약 효소물보다는 발효물의 분획물에서 탄수화물의 함량이 더 높은 것으로 확인되었다.

Table 75. Gel chromatography 발효 분리물의 탄수화물 함량

Fraction number		Total carbohydrate (%)
I 분획	11	7.8
	12	8.0
	13	8.2
	14	8.0
	15	8.2
	16	10.0
	17	11.2
	18	15.0
	19	16.0
	20	17.0
	21	34.0
	22	45.5
	23	45.9
	24	16.8
	25	16.5
	26	15.5
	27	14.2
	28	13.2
	29	5.5
	30	5.4
II 분획	41	0.9
	42	1.5
	43	1.5
	44	1.6
	45	8.7
	46	1.7
	47	1.5
	48	1.0
	49	0.6
	50	0.2

Table 76. Gel chromatography 효소 분리물의 탄수화물 함량

Fraction number		Total carbohydrate (%)	
	11	1.2	
	12	3.3	
	13	3.5	
	14	3.6	
	15	4.4	
	16	4.6	
	17	6.2	
	18	6.2	
	19	6.3	
	20	7.0	
	21	7.1	
	22	7.3	
	23	7.5	
	24	7.6	
	25	7.7	
I 분획	26	8.0	
	27	8.1	
	28	8.3	
	29	9.0	
	30	9.3	
	31	8.5	
	32	6.0	
	33	9.1	
	34	12.1	
	35	13.3	
	36	14.0	
	37	14.3	
	38	14.5	
	39	14.8	
		40	15.9
		41	6.0
		42	6.0
		43	4.1
		44	3.5
	45	3.2	

continued

Ⅱ분획	51	8.9
	52	22.5
	53	23.5
	54	23.6
	55	22.5
	56	22.0
	57	21.2
	58	20.1
	59	15.9
	60	0.1
Ⅲ분획	85	0.1
	86	5.1
	87	6.2
	88	7.5
	89	9.0
	90	7.9
	91	7.9
	92	6.8
	93	6.5
	94	7.6
	95	3.2
	96	1.7
	97	1.6
	98	1.0
99	2.0	
Ⅳ분획	100	1.2
	121	1.2
	122	1.4
	123	1.6
	124	1.5
125	1.2	

3) 단백질 정량

산약발효물의 gel filtration 분획물의 단백질 함량 측정결과, 분획 I의 fraction No. 26~29에서 약 10.0~13.2%의 단백질 함량을 나타냈으며, 분획Ⅱ의 45번에서 11%의 단백질 함량이 측정되었다. 이를 탄수화물 함량과 비교하였을때 비슷한 분획에서 탄수화물 및 단백질이 정량되었지만 그 양은 탄수화물이 더 많이 함유되어 있는 것으로 측정되었다. 산약 효소물의 단백질 함량 측정결과 I분획에서는 10%이하의 단백질 함량을 보였으며 Ⅱ분획에서는 54~56번 분획이 약 15%로 가장 많은 단백질을 함유하였다. 탄수화물 양이 미미하였던 Ⅲ와 Ⅳ분획에서는 각각 95번과 123번에서 10.2% 및 17.2%로 가장 높게 측정되었다.

Table 77. Gel chromatography 발효 분리물의 단백질 함량

Fraction number		Total protein (%)
I 분획	11	0.0
	12	1.2
	13	1.3
	14	1.4
	15	2.3
	16	2.5
	17	2.7
	18	2.9
	19	3.4
	20	5.0
	21	6.0
	22	6.3
	23	6.9
	24	7.9
25	9.3	
26	10.0	
27	11.0	
28	12.5	
	29	13.2
	30	8.0
II 분획	41	1.2
	42	3.5
	43	4.6
	44	4.5
	45	11.0
	46	3.0
	47	2.8
	48	2.5
	49	2.0
	50	1.0

Table. 78. Gel chromatography 효소 분리물의 단백질 함량

Fraction number		Total protein (%)
I 분획	11	0.1
	12	0.1
	13	0.1
	14	1.0
	15	1.0
	16	1.2
	17	1.3
	18	2.1
	19	2.2
	20	3.1
	21	3.3
	22	4.2
	23	4.3
	24	5.8
	25	5.8
	26	6.0
	27	6.0
	28	6.1
	29	6.3
	30	6.5
	31	6.8
	32	7.9
	33	7.8
	34	8.0
	35	8.0
	36	8.1
	37	8.2
	38	9.0
	39	9.1
	40	9.2
	41	9.2
	42	9.4
	43	10.0
	44	10.3
	45	5.1

continued

Ⅱ분획	51	2.1
	52	13.9
	53	14.9
	54	15.9
	55	16.0
	56	15.2
	57	13.1
	58	10.9
	59	5.9
	60	0.0
Ⅲ분획	85	0.2
	86	3.3
	87	3.5
	88	3.0
	89	4.0
	90	5.5
	91	6.2
	92	7.9
	93	8.0
	94	9.8
	95	10.2
	96	2.2
	97	2.0
	98	1.9
99	1.5	
Ⅳ분획	100	1.2
	121	1.0
	122	6.5
	123	17.2
	124	5.4
125	2.3	

4) 지질 정량

산약발효물의 지질함량을 알아본 결과, 분획 I 낮은 것으로 측정되었다. 이중에서 가장 높은것은 23번 분획으로 5.3%가 측정되었다. 산약 효소물 네 부분의 fraction을 조사한 결과, I 획분에서 fraction No.36~37에서 12.0~13.2%으로 가장 높은 함량이 나타났으며, II 획분과 III 획분에서는 지질의 함량이 미비한 것으로 나타났다. 지질함량은 산약 발효물보다는 효소물의 분획물에서 함량이 더 높게 나타나는 것으로 사료되었다.

Table. 79. Gel chromatography 발효 분리물의 지질 함량

Fraction number		Total lipid (%)
I 분획	11	0.3
	12	0.3
	13	0.3
	14	0.4
	15	0.5
	16	0.7
	17	0.7
	18	0.8
	19	0.7
	20	0.9
	21	3.5
	22	4.5
	23	5.3
	24	2.0
	25	1.8
	26	1.6
	27	1.0
	28	1.2
	29	0.9
	30	1.0
II 분획	41	0.3
	42	0.5
	43	0.5
	44	0.5
	45	3.0
	46	1.0
	47	0.5
	48	0.4
	49	0.2
	50	0.0

Table 80. Gel chromatography 효소 분리물의 지질 함량

Fraction number		Total protein (%)
	11	1.3
	12	3.0
	13	3.0
	14	3.1
	15	3.2
	16	4.6
	17	4.7
	18	4.8
	19	5.0
	20	5.1
	21	5.2
	22	5.4
	23	5.5
	24	5.2
	25	5.4
	26	6.0
	27	6.3
I 분획	28	6.4
	29	7.0
	30	8.0
	31	8.0
	32	8.4
	33	8.6
	34	8.9
	35	9.0
	36	12.0
	37	13.2
	38	6.3
	39	6.9
	40	8.0
	41	8.6
	42	8.6
	43	7.0
	44	6.8
	45	6.6

continued

II 분획	51	4.5
	52	4.6
	53	4.0
	54	4.0
	55	4.0
	56	4.0
	57	3.0
	58	2.0
	59	1.0
	60	0.0
III 분획	85	0.6
	86	0.3
	87	-0.2
	88	0.0
	89	0.1
	90	0.3
	91	-0.1
	92	0.3
	93	0.2
	94	0.1
	95	0.0
	96	-0.5
	97	0.2
	98	0.3
99	0.2	
100	0.4	
IV 분획	121	-0.5
	122	0.0
	123	0.3
	124	0.3
	125	0.0

산약 발효물 30,000~50,000 dalton과 효소분해물 30,000 dalton 이하 물질을 gel filtration 처리한 후 280 nm에서 구성물질의 분포를 조사한 결과 산약 발효물의 경우 2개의 분획이, 효소분해물은 4개의 분획이 분리되었다. 이들 분획의 구성성분을 확인하기 위하여 탄수화물, 단백질 및 지질의 정량을 분석한 결과 산약 발효물의 분획 I 은 21~25번 사이가 가장 구성성분이 밀집되어 있었으며 탄수화물이 약 45%, 단백질이 약 13%, 지질이 5% 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 산약 발효물의 분획 II는 전반적으로 분획 I 보다 구성성분의 양이 적었으며 주로 45번 대에서 농도가 높은 것으로 확인되어 탄수화물 약 9%, 단백질 약 11%가 검출되었으며 지질의

양은 1% 미만으로 측정되었다.

효소 분해물의 경우 분획 I 은 35~40번대가 가장 고농도로 물질이 축적되어 있으며 탄수화물 15%, 단백질이 8%, 지질이 13.2%로 측정되었고 분획 II의 경우 주로 55번대에서 물질이 구성되어 있어 탄수화물 약 23%, 단백질 16%가 정량되었다. 지질은 5% 미만으로 확인되었다. 분획III는 95번 사이에 밀집되어 있으며 탄수화물과 지질의 양은 미미한데 반해 단백질이 10%대로 측정되었다. 분획IV 역시 분획III와 비슷하게 탄수화물과 지질의 양은 미미하였으며 단백질이 약 17%로 측정되었다. 그리하여 산약발효물의 경우 분획 I 과 II는 탄수화물과 단백질의 복합체 또는 탄수화물로 구성된 물질과 단백질로 구성된 물질이 혼합되어 있을 것을 추정하였고 산약효소분해물은 분획 I 은 탄수화물, 단백질 및 지질의 복합체 또는 각기 다른 물질이 혼합되어 있을 것으로, 분획II는 탄수화물과 단백질의 복합체 또는 각기 다른 물질의 혼합물로 추정되었다. 분획 III와 IV는 주로 단백질로 구성되어 있는 물질이 함유되어 있는 것으로 사료되었다.

5) HMG-CoA reductase 저해활성

산약발효물의 단백질, 총탄수화물, 지질함량을 측정한 후 그 중 peak가 높은 fraction만 선정하여 혈류개선효과를 알아보기 위해서 HMG-CoA reductase 저해활성을 측정하였다. 산약발효물을 두 분획으로 나누어 그중에서도 단백질, 탄수화물 및 지질의 함량이 10% 이상대인 분획을 선별하여 HMG-CoA reductase 저해활성을 측정한 결과, 분획 I 의 fraction No. 21~22에서 약 52% 정도로 효과가 가장 높았다. 산약효소물의 경우 4개의 분획 중 탄수화물, 단백질 및 지질의 농도가 높았던 분획을 선별하여 HMG-CoA reductase 저해활성을 실험한 결과, 분획 I 과 IV는 전반적으로 10~20%대의 저해활성을 나타내었다. 분획II의 경우 56번이 49.0%로 가장 저해활성이 높았으며 분획III는 95번이 58.9%의 저해활성으로 산약 효소물 분획 중 가장 콜레스테롤 합성 저해효과가 높은 것으로 측정되었다.

Table 81. Gel chromatography 발효 분리물의 HMG-CoA reductase 저해 활성 결과

Fraction number		Inhibition activity (%)
분획 I	16	30.2
	17	35.0
	18	36.1
	19	45.8
	20	50.2
	21	52.1
	22	52.6
	23	40.0
	24	30.2
	25	28.5
	26	26.0
	27	26.8
	28	24.0
	29	22.0
30	20.1	
분획 II	45	19.0

Table 82. Gel chromatography 효소 분리물의 HMG-CoA reductase 저해 활성 결과

Fraction number		Inhibition activity (%)
분획 I	34	17.5
	35	18.2
	36	18.6
	37	19.0
	38	20.1
	39	23.3
	40	18.9
분획 II	52	10.2
	53	11.3
	54	13.0
	55	35.2
	56	49.0
	57	44.0
	58	43.0
59	40.5	
분획 III	91	32.6
	92	29.5
	93	38.6
	94	43.5
	95	58.9
분획 IV	123	10.0

6) 담즙산 흡착능

산약발효물 2개의 분획의 담즙산 결합능 실험결과 HMG-CoA reductase 저해활성과 비슷하게 fraction No. 24가 담즙산 결합능력이 가장 우수한 것으로 확인되었다. 특히 4종류의 담즙산 중 Taurocholic acid의 흡착능력이 가장 우수하였으며 그 외 담즙산의 흡착능력은 미미한 것으로 측정되었다. 산약 효소물 4개 분획의 담즙산 합성 측정결과 HMG-CoA reductase 저해활성결과와 비슷한 양상으로 분획 I, IV는 5 uM이하로 결합능력이 측정되었다. 분획II의 경우 55~57번 분획이 가장 담즙산 결합능력이 높았으며 분획III는 93~95번 분획이 가장 높은 것으로 확인되었다.

Table 83. Gel chromatography 발효 분리물의 담즙산 흡착능 결과

Fraction number		Binding capacity (uM)			
		Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
분획 I	16	5.5	6.4	5.1	3.5
	17	6.6	4.3	8.3	5.4
	18	7.3	8.4	11.0	3.9
	19	7.3	6.1	10.9	7.6
	20	8.9	15.2	19.0	7.7
	21	6.5	7.1	20.0	7.9
	22	5.0	10.5	25.0	6.6
	23	7.2	11.0	26.5	7.1
	24	8.7	9.9	11.3	9.0
	25	6.0	5.2	3.2	3.2
	26	5.2	5.0	3.0	2.2
	27	5.1	4.1	2.9	1.0
	28	5.3	4.3	2.5	2.4
29	4.0	3.0	1.2	1.0	
30	3.5	2.8	1.0	1.0	
분획 II	45	4.5	3.2	1.0	0.9

Table 84. Gel chromatography 효소 분리물의 담즙산 흡착능 결과

Fraction number		Binding capacity (uM)			
		Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
분획 I	34	5.4	4.3	2.8	2.5
	35	3.6	3.8	4.2	4.1
	36	4.5	5.3	6.5	4.0
	37	4.6	6.2	7.1	6.5
	38	2.0	1.9	2.3	4.3
	39	3.8	3.3	2.9	3.2
	40	4.3	4.5	6.2	3.1
분획 II	52	5.6	6.3	6.4	6.0
	53	6.0	7.0	6.3	5.5
	54	6.5	6.5	6.7	6.8
	55	7.0	6.9	6.3	7.4
	56	7.8	10.2	10.0	9.6
	57	7.2	9.0	9.2	6.5
	58	6.3	3.6	4.1	6.6
	59	5.0	3.0	4.6	4.5
분획 III	91	5.4	5.3	3.3	4.5
	92	3.8	3.3	4.5	2.4
	93	6.7	6.5	7.2	4.5
	94	7.8	8.2	6.5	7.6
	95	9.8	8.3	8.7	6.5
분획 IV	123	4.5	5.6	5.4	5.5

7) 최종 분리물의 분자량 측정

정제된 산약발효물과 효소물의 분자량 측정을 위하여 겔여과크로마토그래피 (Sephadex G-75, ((3-80 kDa))를 이용하였다. Fig. 12는 표준물질을 280nm에서 측정한 결과를 나타내었다. 표준물질은 gel filtration chromatography가 molecular weight가 큰 물질은 gel column을 빨리 통과하고 molecular weight이 작은 물질은 gel column에 오랫동안 머물러 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이를 이용하여 표준물질들이 각각 용출될때까지의 volume값과 K_{av} 을 나타내었다(Table 85). 표준물질은 molecular weight가 무거운 순서대로 빠져나오게 되며 Fig. 12 에서 그 순서를 보면 Albumin(66 kDa), Carbonic Anhydrase(29 kDa), Cytochrome C(12.4 kDa), Aprotinin S(6.5 kDa), Aomatostatin(1.6 kDa)순으로 나타나는 것으로 확인되었다.

Table 85. Gel filtration 표준물질의 V_e 값 및 K_{av} 값

Sample	Molecular weight (Da)	Log molecular weight	최종부피 (mL)	K_{av}
Somatostatin	1640.0	3.2	476.0	0.36
Aprotinin	6500.0	3.8	388.0	0.28
Cytochrome C	12400.0	4.1	340.0	0.24
Carbonic Anhydrase	29000.0	4.5	292.0	0.20
Albumin	66000.0	4.8	212.0	0.13

* $V_t = \pi r^2 \times \text{길이}$, 공식에서 $r=2.8 \text{ cm}$, 길이=50 cm

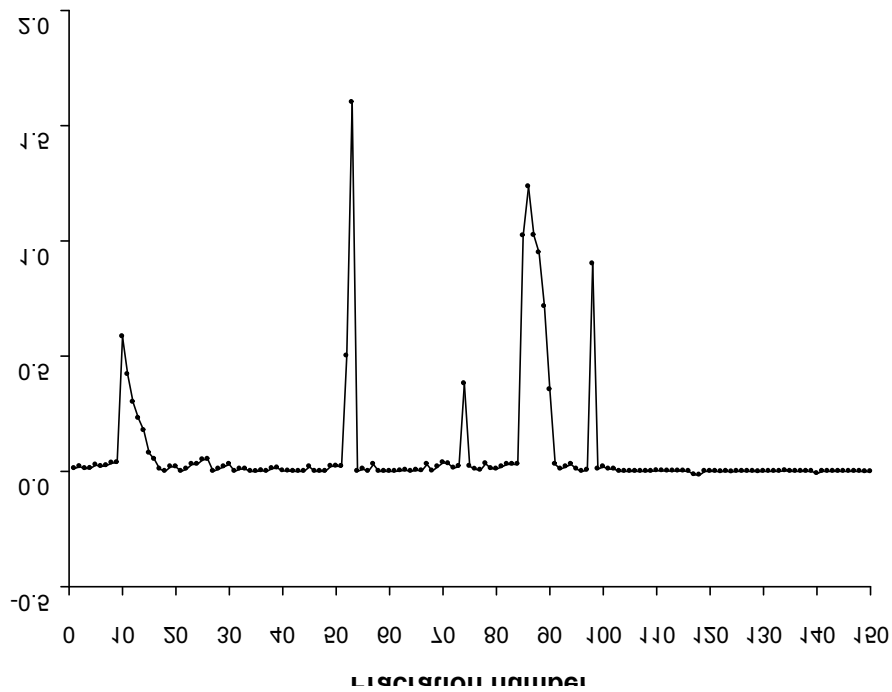


Fig. 12. Sephadex G-75를 이용한 gel filtration 표준품의 peak 확인

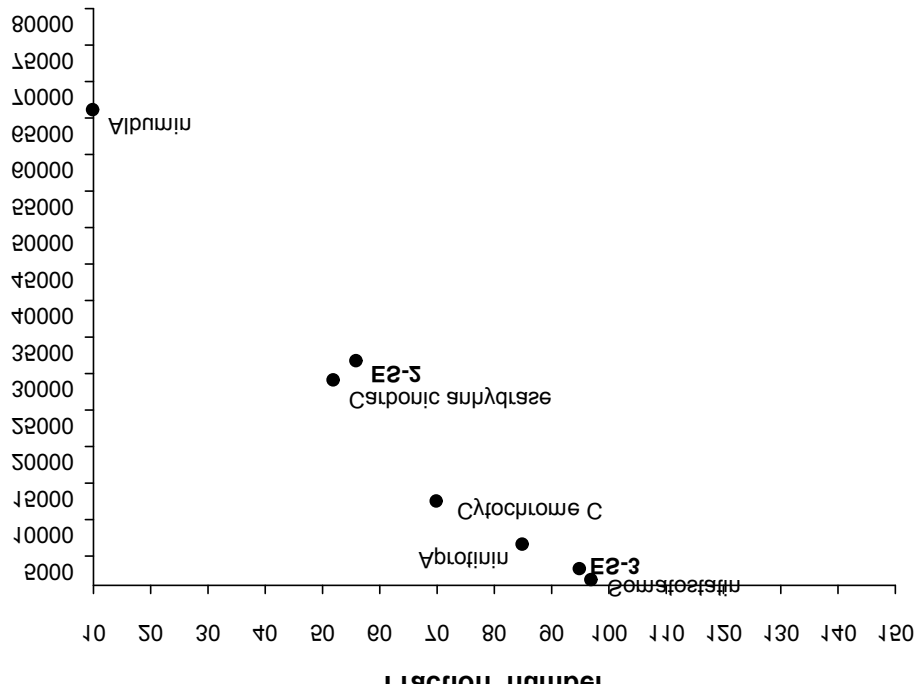


Fig. 13. 표준물질과 최종 효소 분해 분리물의 molecular weight 비교

*ES-2: enzyme hydrolysis sample from *Dioscorea batatas* (no. 56)

*ES-3: enzyme hydrolysis sample from *Dioscorea batatas* (no. 95)

산약 효소물의 경우 4개의 분획 중 분획II와 분획III의 혈류개선 활성능력이 유사한 것으로 확인되었다. 특히 분획II 56번의 경우 담즙산 결합능력이, 분획III 95번의 경우 HMG-CoA reductase 저해활성이 가장 높았으며 이를 표준품 peak와 대조하면 56번은 29 kDa의 Carbonic Anhydrase보다 분자량이 높으며, 95번은 1.6 kDa의 Somatostatin과 분자량이 유사한 것으로 확인되었다.

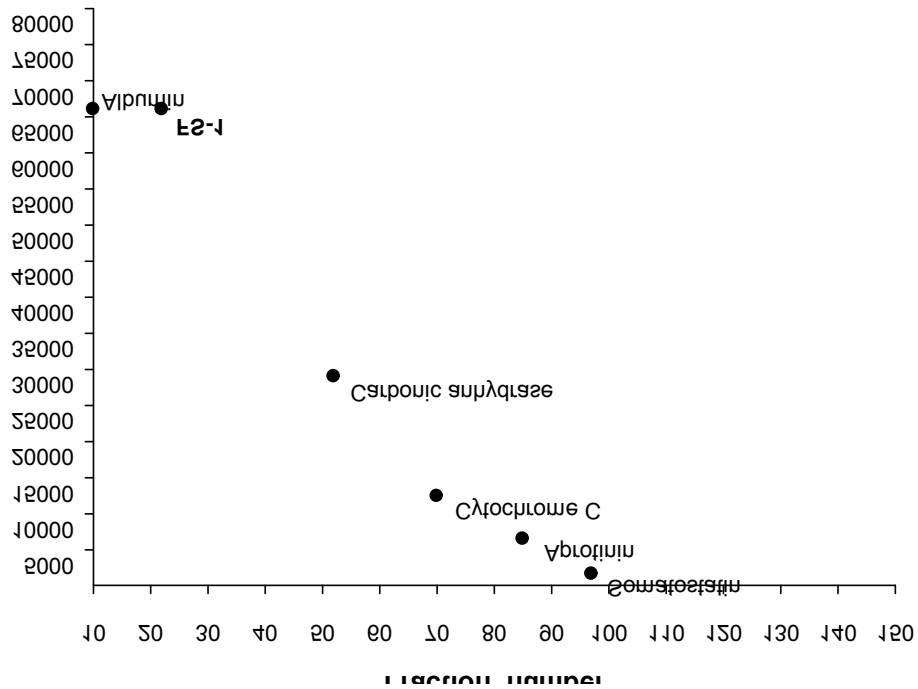


Fig. 14. 표준물질과 최종 산약발효 분리물의 molecular weight 비교

*FS-1: fermented sample from *Dioscorea batatas* (no. 22)

산약발효물과 산약효소물의 혈류개선 효과가 높은 분획을 표준물질과 비교하여 M.W를 확인하였다 (Fig. 14). 산약 발효물은 두 개의 분획 중 분획 I 이 HMG-CoA reductase 저해활성과 담즙산 결합능력이 분획II보다 높았으며 그중에서도 22번 분획이 가장 높은 것으로 확인되었다. Fig. 12의 표준품 peak와 비교하였을 때 22번 분획은 분자량 66 kDa의 albumin보다 낮은 것으로 확인하였다.

사. 혈류개선효과가 있는 분획물의 안정화 검토

1) 산약 효소물의 광선 및 산소에 따른 갈변도 조사

산약 효소 분해 상등액의 용매분획물을 이용하여 물리적 특성을 조사한 결과 ethyl acetate 분획과 ethanol 분획물이 가장 갈변도가 높은 것으로 측정되었다. 이는 maillard reaction에 의한 갈변현상의 주 물질인 단백질과 당의 분포가 이들 분획에 주로 포함되어 있을 것이라 사료되었다.

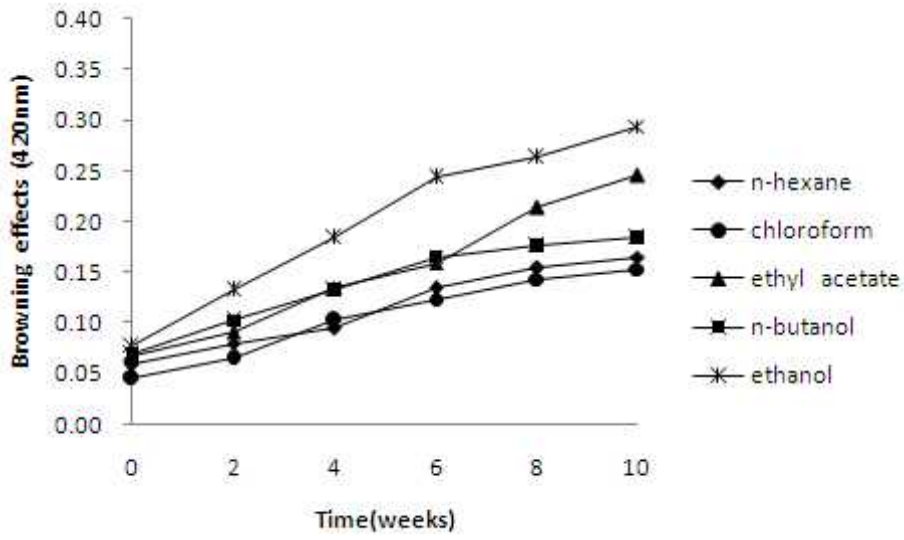


Fig. 15. 광선에 따른 효소 용매분획물의 갈변도 조사결과

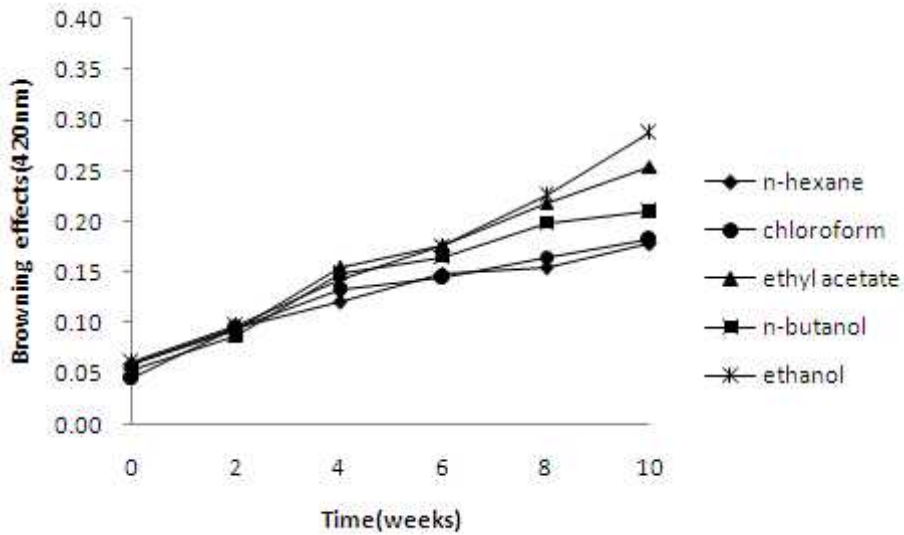


Fig. 16. 산소에 따른 효소 용매분획물의 갈변도 조사결과

산약 효소 분해물의 한외여과물을 이용하여 물리적 특성을 조사한 결과는 산약 효소분해물의 경우 protamex의 작용으로 인하여 산약의 성분이 잘라지면서 분자량

이 줄어들기 때문에 분자량이 작은 경우 갈변현상이 증가하는 것을 확인하였다. 특히 가장 갈변현상이 큰 것은 100,000 dalton 이었으며 50,000 dalton, 30,000 dalton, 10,000 dalton 순으로 갈변도가 증가하는 것을 확인하였다.

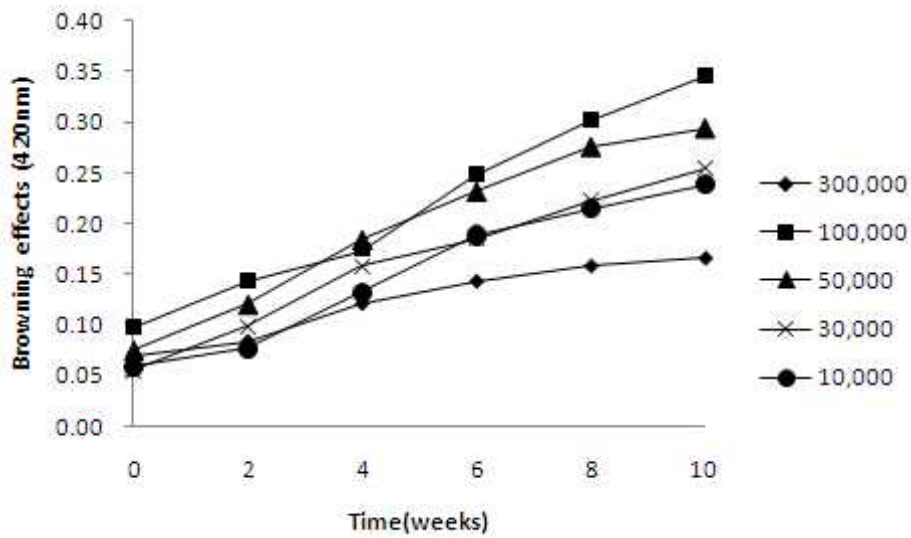


Fig. 17. 광선에 따른 효소 한외여과 분획물의 갈변도 조사결과

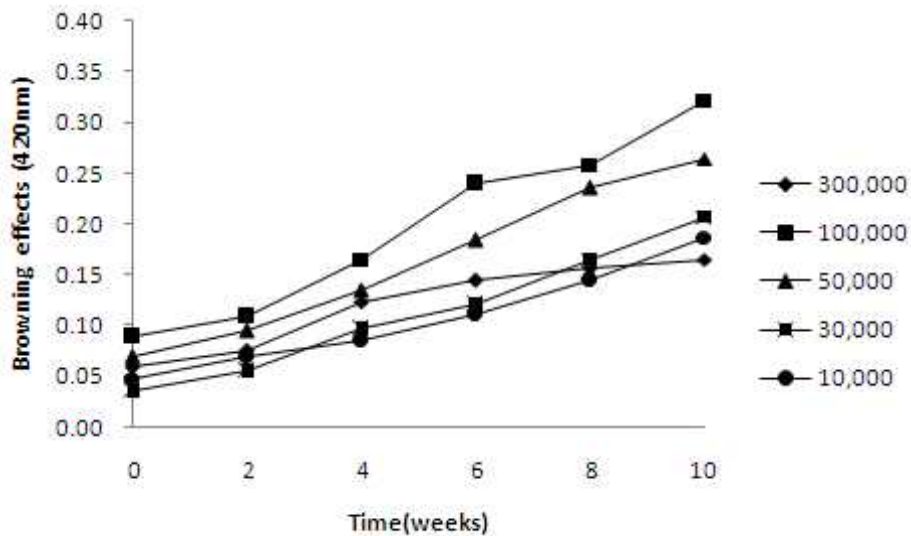


Fig. 18. 산소에 따른 효소 한외여과 분획물의 갈변도 조사결과

2) 산약 발효물의 광선 및 산소에 따른 갈변도 조사

산약 발효 상등액의 용매분획물을 이용하여 광선 및 산소 노출 시간에 따른 갈변도 조사 결과 가장 갈변도가 높은 분획물은 n-butanol 분획이었으며 ethanol, ethyl acetate 분획 순으로 확인되었다. 이는 갈변작용의 주된 메커니즘인 maillard reaction에 의하여 단백질 및 당이 많이 분포되어 있는 분획물에서 갈변도가 증가하는 것으로 추정되었다.

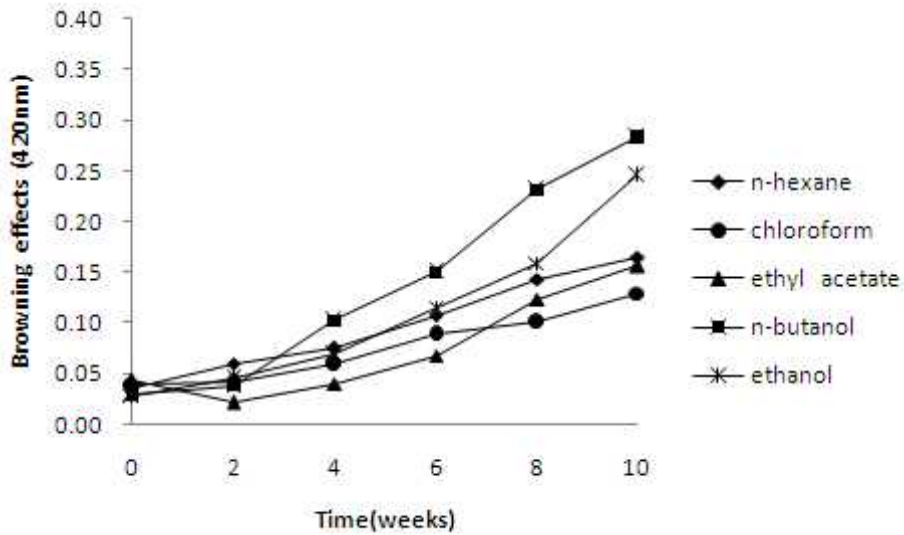


Fig. 19. 광선에 따른 발효 용매분획물의 갈변도 조사결과

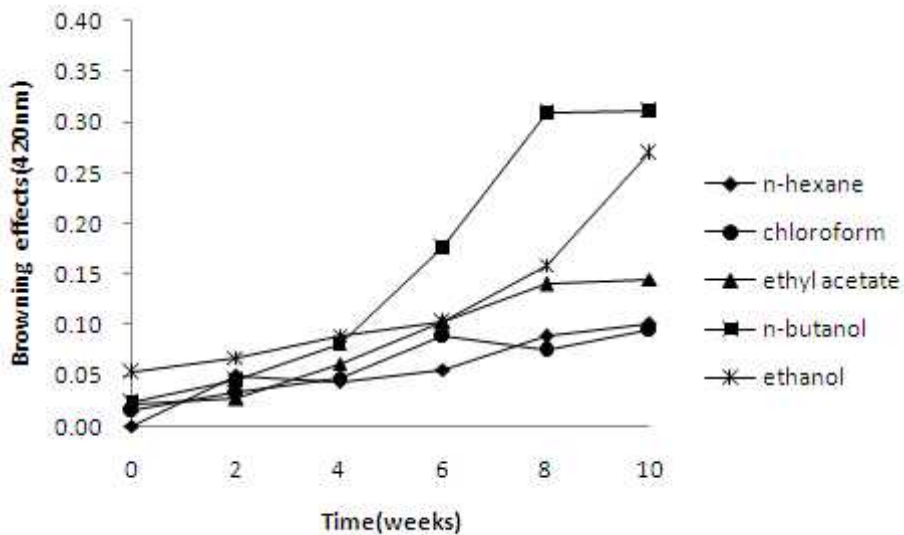


Fig. 20. 산소에 따른 발효 용매분획물의 갈변도 조사결과

광선 및 산소의 노출에 의한 한외여과 분리물들의 갈변도 조사 결과 고분자일수록 갈변도가 증가하는 양상을 보이면서 이 중, 가장 갈변도가 높은 것은 100,000 dalton 분리물인 것으로 확인되었다. 또한 광선 및 산소의 노출로 인한 갈변도는 큰 차이가 나지 않는 것으로 나타났다.

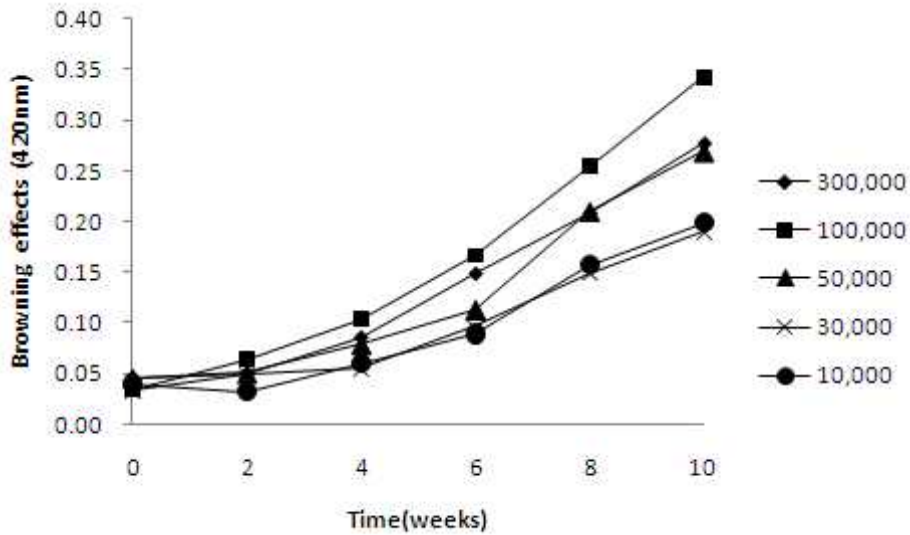


Fig. 21. 광선에 따른 발효 한외여과 분획물의 갈변도 조사결과

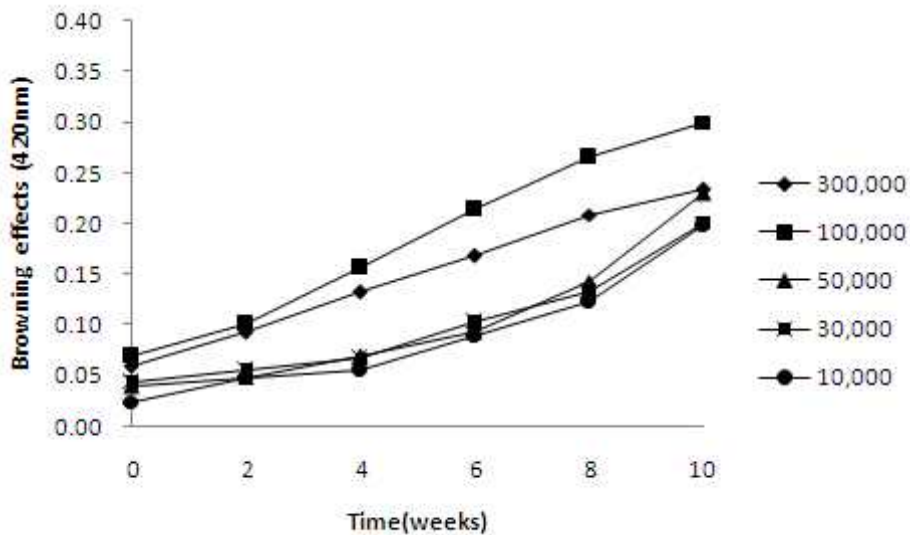


Fig. 22. 산소에 따른 발효 한외여과 분획물의 갈변도 조사결과

6. 산약 및 산약의 기능성 소재이용 혈류개선 산약제품 개발 결과

가. 산약과 쌀의 혼합비율에 따른 발효주의 이화학적 특성

1) 산약과 쌀의 혼합비율에 따라 제조된 산약 발효주의 pH

산약과 쌀의 혼합비율을 달리하여 제조한 5가지 산약 전통 발효주의 pH를 측정
한 결과, 산약과 쌀의 혼합비율이 100:0, 80:20, 50:50, 20:80 인 경우 발효초기 pH
6.2~6.5, 발효종료 후 pH 4.3 범위를 나타내 유의적인 차이가 없었고, 산약을 첨가하
지 않고 쌀만으로 제조한 0:100 의 경우 발효초기 pH 6.89, 발효종료 후 pH 5.21로
다른 4가지 경우에 비해 높은 것으로 확인되었다.

Table 86. 산약과 쌀의 혼합 비율에 따른 발효주의 pH

발효일	산약 : 쌀				
	100:0	80:20	50:50	20:80	0:100
0	6.25	6.21	6.22	6.49	6.89
1	5.83	6.02	6.03	6.12	6.71
2	5.72	5.81	5.83	5.61	5.85
3	4.79	4.56	4.95	5.33	5.41
4	4.52	4.42	4.45	5.25	5.25
5	4.41	4.34	4.41	4.59	5.13
6	4.35	4.33	4.36	4.35	4.99
7	4.32	4.33	4.35	4.34	5.06
8	4.28	4.32	4.35	4.32	5.21

2) 산약과 쌀의 혼합비율에 따라 제조된 산약 발효주의 산도측정

발효초기 산도의 경우 5가지 경우 모두 유의적인 차이가 없었고, 발효종료 후 산
도는 산약과 쌀의 혼합비율 100:0, 80:20, 50:50, 20:80, 0:100 순으로 쌀의 함량이 많
을수록 산도값이 높은 것으로 확인되었다.

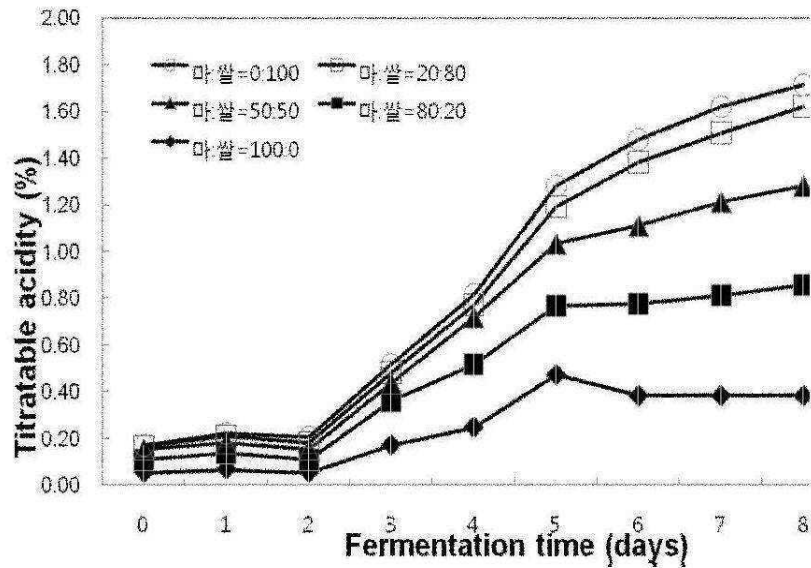


Fig. 23. 산약과 쌀의 혼합 비율에 따른 발효주의 적정산도 측정

3) 산약과 쌀의 혼합비율에 따라 제조된 산약 발효주의 관능평가

산약의 혼합비율이 증가할수록 단맛 강도, 알코올 강도 뿐만 아니라 전체적인 기호도가 낮아지는 것을 알 수 있었다. 이는 산약을 발효하였을 경우 쓴맛과 신맛이 강하여 소비자 기호도에 적합하지 않아 나타난 결과이다. 산약이 너무 많이 첨가되면 떼은맛과 쓴맛이 강하게 나타나고, 너무 적게 첨가되면 누룩취가 나타나며 산약의 향과 맛이 느껴지지 않았다. 또한 산약을 넣지 않고 쌀만으로 밀술을 제조하였을 때 산약향이 미미하였으며, 산약을 넣고 밀술을 제조한 발효주에 비해 낮은 기호도를 나타내었다. 전체적 기호도의 경우 산약과 쌀의 혼합비율이 20:80인 경우가 가장 높은 것으로 확인되었다.

Table 87. 산약과 쌀의 혼합 비율에 따른 발효주의 관능평가 측정

구분	산약 : 쌀				
	100:0	80:20	50:50	20:80	0:100
쓴맛 강도	6.4	6.4	5.4	4.6	3.4
뽀은맛 강도	7.5	7.5	6.2	4.5	3.5
산약향 강도	4.0	3.2	3.0	2.4	1.6
단맛 강도	1.8	2.0	2.5	3.8	4.2
알코올 강도	5.0	5.3	6.0	7.2	7.4
전체적 기호도	3.2	3.0	4.2	6.0	5.2

나. 당귀와 오미자 첨가비율에 따른 발효주의 이화학적 특성**1) pH, 적정산도, 알코올 함량**

당귀와 오미자 첨가비율에 따라 제조된 산약 발효주의 pH와 적정산도 및 알코올 함량 측정 결과 4가지 모두 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 이에 당귀와 오미자의 첨가가 산약 전통 발효주의 품질특성에는 크게 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 최종 발효된 산약 전통 발효주의 품질특성은 pH 4.3, 산도 0.33, 알코올 함량 15%인 것으로 확인되었다.

Table 88. 당귀와 오미자 첨가비율에 따른 발효주의 pH, 적정산도, 알코올 함량

구분	당귀 : 오미자			
	0:0	0:1	1:0	1:1
pH	4.4	4.3	4.3	4.4
적정산도 (%)	0.34	0.33	0.32	0.33
알코올 함량 (%)	14.7	14.9	14.9	15.0

2) 관능평가

당귀와 오미자 첨가비율에 따라 제조된 산약 발효주의 관능평가 결과, 당귀와 오미자를 포함하지 않은 것에 비하여 색, 맛, 전체적 기호도가 상승하였으며, 특히 오미자와 당귀를 동시에 첨가하였을 때 그 효과가 더욱 높아지는 것을 알 수 있었다. 당귀와 오미자 이외에도 소비자의 기호도에 따라 숙성단계에서 다양한 원료를 첨가하여 각 원료가 가지는 특유의 향과 효능을 가미한 전통 발효주를 제조할 수도 있을 것으로 사료된다.

Table 89. 당귀와 오미자 첨가비율에 따른 발효주의 관능평가

구분	당귀 : 오미자			
	0:0	0:1	1:0	1:1
산약향 강도	7	7	8	9
뽀은맛 강도	8	7	7	6
쓴맛 정도	8	6	5	4
단맛 정도	6	7	7	8
알코올 강도	6	6	7	7
전체적 기호도	5	7	6	8

다. 장기유통형 산약 초콜릿의 특성

1) 산약 효소물 농도에 따른 산약 초콜릿 제조결과

Table 90과 같이 산약 효소분해물을 이용한 경우 효소분해물의 쓴맛으로 인하여 함량이 높을수록 쓴맛이 강해지고 단맛이 감소하는 것으로 확인되었으며, 5중량%의 산약효소분해물이 첨가된 산약초콜릿의 경우 산약효소분해물의 맛이 미미하였고, 20중량% 이상의 산약효소분해물이 첨가된 산약초콜릿의 경우 조직감이 약하고 쓴맛이 오래 지속되어 기호도가 낮았으며, 산약효소분해물 10중량%가 첨가된 산약초콜릿은 전체적으로 맛과 풍미에 있어서 탁월한 기호도를 나타냄을 확인 할 수 있었다.

Table 90. 산약 효소물 첨가량에 따른 초콜릿의 관능평가 결과

재료	산약 효소물					
	5%	10%	15%	20%	25%	30%
단맛	7.63	6.34	5.23	4.98	3.87	2.46
쓴맛	1.12	2.54	4.65	5.43	6.54	8.03
조직감 (씹힘성)	6.74	6.28	5.15	2.84	1.95	1.21
전체 기호도	5.43	6.53	4.51	4.72	3.37	2.62

2) 증자 산약 농도에 따른 산약 초콜릿 제조결과

Table 91과 같이 증자산약을 초콜릿의 원료로 사용하는 경우, 증자 산약 특유의 맛과 풍미로 인하여 전반적으로 기호도가 우수하였다. 초콜릿의 쓴맛도 적을뿐더러, 증자산약의 함량을 높일수록 산약이 부드러워져 씹힘성이 낮게 평가되었으며, 가장 기호도가 우수한 함량은 15%인 것으로 확인되었다.

Table 91. 증자 산약 첨가량에 따른 초콜릿의 관능평가 결과

재료	증자 산약					
	5%	10%	15%	20%	25%	30%
단맛	6.87	7.88	8.43	8.67	8.85	8.97
쓴맛	2.80	3.27	4.21	4.56	4.64	4.72
조직감 (씹힘성)	6.91	5.85	5.02	4.27	4.07	3.78
전체 기호도	7.05	7.31	7.95	6.19	6.33	6.24

3) 산약분말 농도에 따른 산약 초콜릿 제조결과

Table 92와 같이 산약분말을 첨가한 초콜릿의 관능평가의 경우 산약 분말 함량이 높을수록 단맛이 낮아지고 쓴맛이 올라가며, 전반적으로 강한 조직감과 산약분말 특유의 불쾌한 냄새로 기호도가 낮게 평가가 되었다. 가장 바람직한 함량은 산약 분말 3%인 것으로 확인되었다.

Table 92. 산약분말 첨가량에 따른 초콜릿의 관능평가 결과

재료	산약 분말				
	1%	3%	5%	7%	10%
단맛	7.64	6.53	5.42	5.44	4.76
쓴맛	3.79	4.57	5.88	6.98	7.02
조직감 (씹힘성)	8.25	7.89	7.21	6.87	3.64
전체 기호도	4.59	4.68	3.25	3.11	2.15



Fig. 24. 산약 초콜릿의 단면

라. 장기유통형 산약 양갱의 특성

1) 한천 가루 첨가 비율을 달리한 산약 양갱 제조 결과

산약양갱의 한천가루 첨가량 결정을 위한 양갱의 기호도 평가 결과, 한천가루를 2% 첨가한 산약양갱이 가장 적절한 물성을 나타내었다. 한천가루를 1.5% 이하로 첨가한 경우 약한 물성을 나타냈으며, 2.5% 이상으로 첨가한 경우 강한 물성으로 기호도가 낮았다.

Table 93. 한천 함량에 따른 양갱의 관능평가

구 분		신맛 강도	단맛 강도	물성 강도	색 기호도	전체 기호도
한천 가루 첨가량	0.5%	7.23	5.23	2.01	7.41	2.35
	1.0%	7.34	5.30	4.41	7.50	5.61
	1.5%	7.19	5.26	4.76	7.43	6.28
	2.0%	7.20	5.37	5.25	7.56	8.47
	2.5%	7.31	5.34	7.68	7.39	4.65
	3.0%	7.28	5.31	7.92	7.51	2.31

2) 당 함량을 달리한 산약 양갱 제조 결과

산약양갱의 당 함량 결정을 위해 설탕을 기준으로하여 그 첨가량을 달리하여 제조한 산약 양갱의 기호도 평가 결과, 총 당 함량이 50%인 경우 가장 높은 기호도와 물성을 나타내었으며, 당 함량이 증가할수록 물성 강도와 기호도가 증가함을 알 수 있었다.

Table 94. 당 함량에 따른 양갱의 관능평가

구 분		신맛 강도	단맛 강도	물성 강도	색 기호도	전체 기호도
당 함량	30%	6.59	4.10	4.08	6.71	6.65
	35%	6.52	4.28	4.16	6.63	6.94
	40%	6.34	5.34	4.35	7.21	7.23
	45%	6.12	5.86	5.27	7.18	7.58
	50%	5.97	6.45	5.65	7.34	8.14

3) 산약 젓산 발효물을 이용한 산약 양갱 제조 결과

산약 젓산 발효물을 이용한 산약양갱의 기호도 평가 결과, 산약 젓산 발효물의 함량이 가장 적은 10%가 신맛과 단맛이 잘 어우러져 기호도가 높게 나타났으며 20%와 30%가 첨가된 산약양갱의 경우 강한 신맛으로 낮은 기호도를 나타내었다.

Table 95. 발효물 함량에 따른 양갱의 관능평가

구 분		신맛 강도	단맛 강도	물성 강도	색 기호도	전체 기호도
산약	10%	6.09	6.87	5.32	8.51	8.12
젓산	20%	6.34	6.63	5.25	8.39	7.68
발효물	30%	6.62	5.89	5.33	8.27	7.59

4) 생 산약을 이용한 산약 양갱 제조 결과

생 산약을 이용한 산약양갱의 경우 20%가 가장 좋은 기호도를 나타냈고, 30% 첨가구는 생산약 특유의 아린맛이 남아있어 기호도가 낮게 나타났다.

Table 96. 생 산약 첨가 양갱의 관능평가

구 분		신맛 강도	단맛 강도	물성 강도	색 기호도	전체 기호도
생 산약	10%	1.13	6.15	5.39	6.86	7.98
	20%	1.07	6.16	5.43	6.73	8.35
	30%	1.18	6.21	5.50	6.69	8.07

5) 증자 산약을 이용한 산약 양갱 제조 결과

증자 산약을 이용한 산약양갱의 경우 30%가 전체적으로 맛과 풍미에 있어서 탁월한 기호도를 나타냄을 확인 할 수 있었다.

Table 97. 증자 산약 첨가 양갱의 관능평가

구 분		신맛 강도	단맛 강도	물성 강도	색 기호도	전체 기호도
증자 산약	10%	1.23	7.31	5.47	7.42	6.32
	20%	1.11	7.29	5.58	7.58	6.54
	30%	1.26	7.24	5.69	7.72	6.81

6) 분말 산약을 이용한 산약 양갱 제조 결과

산약 분말을 이용한 산약양갱의 경우 5%의 기호도가 가장 좋은 것으로 나타났으나, 산약분말 특유의 불쾌한 냄새로 세 가지 모두 전체적인 기호도는 낮았다.

Table 98. 분말 산약 첨가 양갱의 관능평가

구 분		신맛 강도	단맛 강도	물성 강도	색 기호도	전체 기호도
산약	3%	1.61	4.87	5.15	5.97	3.57
	5%	1.64	4.78	5.24	5.68	3.83
분말	7%	1.78	4.66	5.39	5.34	3.19

7) 최적 비율 산약 양갱의 관능평가 결과

산약양갱의 외관 기호도는 산약젓산발효물, 증자산약, 생산약, 산약분말 순이었고, 전체적인 기호도는 증자산약, 산약젓산발효물, 생산약, 산약분말 순으로 나타났다.

이에 증자산약 및 산약젖산발효물을 이용한 산약양갱의 제조가 가장 바람직함을 확인할 수 있었다. 상기 산약양갱의 품질 및 기호도 평가 결과를 바탕으로 하여 하기 표 2에 각 각의 전처리를 달리하여 제조한 산약양갱의 최적 배합비를 나타내었다. 한천가루 2 중량%, 당류 50 중량%로 하여 각 각 산약젖산발효물 10 중량%, 생산약 20 중량%, 산약분말 5중량%로 제조하는 것이 바람직하다. 상기 산약양갱의 당류는 건강기능성을 고려하여 설탕의 첨가량을 줄이고 대체당으로 솔비톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 이소말토 올리고당을 첨가하였으나 설탕으로 사용하여도 무방하다.

Table 99. 분말 산약 첨가 양갱의 관능평가

구분	산약 발효물	생산약	증자산약	산약분말
	10%	20%	30%	5%
신맛 강도	6.09	1.07	1.26	1.64
단맛 강도	6.87	6.16	7.24	4.78
물성 강도	5.32	5.43	5.69	5.24
외관 기호도	8.51	6.73	7.72	5.68
전체적인 기호도	8.12	8.35	6.81	3.83

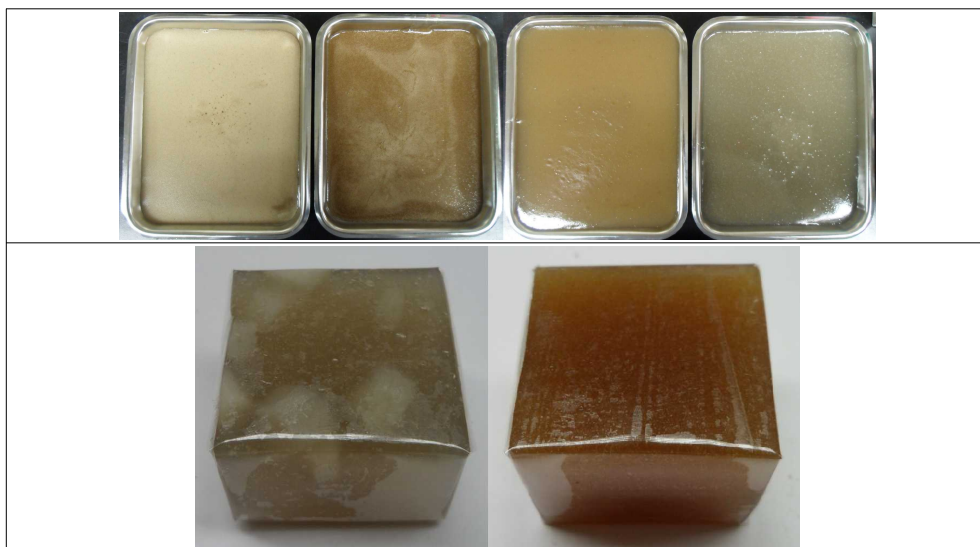


Fig. 25. 산약 양갱

마. 단기유통형 산약 발효음료의 특성

1) 당화방법에 따른 산약 발효음료 제조 결과

기호도 평가 결과 대조구와 당화처리구간의 유의적인 차이는 없었고, 설탕첨가구의 기호도가 가장 높게 나타났다.

설탕과 당화처리를 하지 않았던 대조구와 엿기름을 첨가하여 당화처리를 했던 당화처리구간의 단맛의 유의적인 차이는 없었고, 설탕첨가구의 기호도가 가장 높게 나타났다.

Table 100. 당화 방법에 따른 산약 발효음료의 관능평가

관능평가	신맛 강도	단맛 강도	이물감 강도	색 기호도	전체 기호도
대조구	7.02	4.69	4.12	3.23	4.03
당화 처리구	6.44	5.29	3.93	3.47	4.47
설탕 첨가구	6.18	6.31	4.09	3.26	5.83

2) 설탕 첨가 비율에 따른 산약 발효음료 제조 결과

5%의 설탕첨가구는 단맛이 미미했으며 15%와 20%의 설탕첨가구는 단맛이 너무 강해 기호도가 낮았고 10%의 설탕첨가구가 가장 좋은 단맛 기호도를 나타냄을 확인할 수 있었다.

Table 101. 설탕 함량에 따른 산약 발효음료의 관능평가

관능평가	신맛 강도	단맛 강도	이물감 강도	색 기호도	전체 기호도
5%	7.01	4.98	3.96	3.81	3.17
10%	6.79	5.41	4.12	3.67	4.21
15%	6.02	6.37	4.31	3.79	6.02
20%	5.11	7.24	4.86	3.75	5.76

3) 발효종균에 따른 산약 발효음료 제조 결과

L. acidophilus 단일종균을 접종하여 발효, 숙성한 처리구보다 *L. amylophilus*, *Leu. mesenteroids* subsp. *mesenteroids*, *L. acidophilus* 세 가지 균주를 혼합 발효한 경우의 기호도가 우수하였으며, 혼합균주 1차발효와 2차발효의 경우 유의적인 차이가 나타

나지 않아 공정상으로 좀 더 간단한 혼합균주 1차발효의 경우가 바람직함을 알 수 있었다.

Table 102. 종균 접종방법에 따른 산약 발효음료의 관능평가

관능평가	신맛 강도	단맛 강도	이물감 강도	색 기호도	전체 기호도
단일종균	6.21	6.42	4.26	3.75	5.98
혼합종균 1차발효	5.89	6.53	4.34	3.58	6.34
혼합종균 2차발효	5.88	6.48	4.15	3.67	6.27

4) 산약 젖산 발효물 함량에 따른 산약 발효음료 제조 결과

산약젖산발효물의 강한 신맛으로 농도가 가장 낮은 산약젖산발효물 10%의 산약 발효음료의 기호도가 가장 우수하였다.

Table 103. 발효물 함량에 따른 산약 발효음료의 관능평가

관능평가	신맛 강도	단맛 강도	이물감 강도	색 기호도	전체 기호도
10%	3.26	6.5	3.98	5.59	6.81
20%	4.90	6.5	4.03	5.45	6.23
30%	5.11	6.5	4.27	4.97	5.99

5) 생 산약 함량에 따른 산약 발효음료 제조 결과

생 산약의 함량이 증가할수록 높은 이물감의 영향으로 기호도가 낮게 나타났으며, 농도가 가장 낮은 생산약 20%의 기호도가 가장 높았다.

Table 104. 생 산약 함량에 따른 산약 발효음료의 관능평가

관능평가	신맛 강도	단맛 강도	이물감 강도	색 기호도	전체 기호도
20%	1.10	7.12	6.21	7.45	6.14
40%	1.23	7.35	6.40	7.58	5.75
60%	1.12	7.41	6.98	7.61	5.32

6) 증자 산약 함량에 따른 산약 발효음료 제조 결과

증자 산약의 함량이 증가할수록 높은 이물감의 영향으로 기호도가 낮게 나타났으며, 농도가 가장 낮은 증자산약 20%의 기호도가 가장 높았다.

Table 105. 증자 산약 함량에 따른 산약 발효음료의 관능평가

관능평가	신맛 강도	단맛 강도	이물감 강도	색 기호도	전체 기호도
20%	0.98	7.59	5.45	6.64	7.65
40%	0.98	7.52	5.68	6.80	6.97
60%	1.19	7.63	6.10	6.93	7.04

7) 산약 분말 함량에 따른 산약 발효음료 제조 결과

산약분말 5%이 가장 좋은 기호도를 나타냈으나 산약분말 특유의 불쾌한 냄새로 인하여 기호도 증진 및 냄새의 masking을 위한 첨가제 선별이 추가로 필요할 것으로 사료되었다.

Table 106. 증자 산약 함량에 따른 산약 발효음료의 관능평가

관능평가	신맛 강도	단맛 강도	이물감 강도	색 기호도	전체 기호도
5%	1.56	4.76	7.56	1.58	1.59
10%	1.73	4.42	7.62	1.64	1.01
15%	1.94	4.59	7.81	1.23	0.87

8) 산약 발효음료 품질 측정 결과

Table 107. 산약 발효음료 pH 측정결과

구분	산약 발효물 10%	생산약 20%	증자산약 20%	산약분말 5%
pH	0hr	5.13	6.76	6.81
	24hr	4.02	4.84	5.37
	48hr	3.73	4.42	4.61

Table 108. 산약 발효음료 적정산도 측정결과 (%)

구분		산약 발효물	생산약	증자산약	산약분말
		10%	20%	20%	5%
적정산도	0hr	0.76	0.45	0.27	0.36
	24hr	1.98	1.35	1.17	1.46
	48hr	3.24	2.58	2.24	2.63

Table 109. 산약 발효음료 당도 측정결과 (°Brix)

구분		산약 발효물	생산약	증자산약	산약분말
		10%	20%	20%	5%
당도	0hr	9.8	11.7	13.5	10.2
	24hr	9.5	11.6	12.8	10.1
	48hr	9.7	11.7	12.7	10.4

Table 110. 산약 발효음료 미생물 측정결과 (CFU/mL)

구분		산약 발효물	생산약	증자산약	산약분말
		10%	20%	20%	5%
<i>L. amylophilus</i>	0 hr	3.5×10^5	7.2×10^5	1.6×10^5	1.0×10^5
	24hr	5.1×10^6	3.1×10^6	8.0×10^6	2.2×10^6
	48hr	2.0×10^7	7.0×10^7	3.6×10^7	1.3×10^7
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	0 hr	1.2×10^5	1.0×10^5	1.5×10^5	2.1×10^5
	24hr	2.0×10^6	1.8×10^6	3.1×10^6	4.2×10^6
	48hr	1.2×10^7	3.4×10^7	5.0×10^7	2.1×10^7
<i>L. acidophilus</i>	0 hr	3.0×10^7	$< 1.0 \times 10^1$	$< 1.0 \times 10^1$	$< 1.0 \times 10^1$
	24hr	4.3×10^8	$< 1.0 \times 10^1$	$< 1.0 \times 10^1$	$< 1.0 \times 10^1$
	48hr	6.1×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	$< 1.0 \times 10^1$	$< 1.0 \times 10^1$
Total lactic acid bacteria	0 hr	7.2×10^7	3.2×10^6	2.8×10^6	1.1×10^6
	24hr	5.9×10^8	1.4×10^7	2.8×10^7	3.0×10^7
	48hr	3.2×10^9	2.0×10^8	6.1×10^8	1.0×10^8

Table 111. 산약 발효음료 관능평가 결과

구분	산약 발효물 10%	생산약 20%	증자산약 20%	산약분말 5%
신맛 강도	3.26	1.10	0.98	1.56
단맛 강도	6.50	7.12	7.59	4.76
이물감 강도	3.98	6.21	5.45	7.56
외관 기호도	5.59	7.45	6.64	1.58
전체적인 기호도	6.81	6.14	7.65	1.59

관능평가 결과 산약분말과 증자산약분말을 이용한 산약발효음료의 경우 산약 찻산 발효물, 생산약, 증자산약을 이용한 산약발효음료와 비교해 볼 때, 산약발효음료로 제조하는 것은 바람직하지 못함을 알 수 있었다. 산약분말 특유의 불쾌한 냄새를 제거하기 위해 산약분말을 증자하였음에도 불구하고 낮은 기호도를 나타내었다. 산약발효음료의 외관 기호도는 생산약, 증자산약, 산약 찻산 발효물, 산약분말 순이었으며, 전체적인 기호도는 증자산약, 산약 찻산 발효물, 생산약, 산약분말 순으로 나타났다. 이에 증자산약과 산약 찻산 발효물을 이용한 산약발효음료의 제조가 가장 활용가능성이 높을 것으로 사료되었다.

바. 단기유통형 산약 죽의 특성

1) 산약 발효물 및 당 함량에 따른 관능평가 결과

산약 찻산 발효물의 첨가량이 증가할수록 신맛이 강하여 5% 첨가구가 가장 기호도가 높았고 산약찻산발효물의 7%, 10% 첨가구의 경우 기호도가 낮았다. 이소말토 올리고당의 경우 10% 첨가구가 적절하게 신맛과 단맛이 잘 어우러져 기호도가 가장 높게 나타났고 5% 첨가구의 경우 단맛이 미미하고 신맛이 강해 기호도가 낮았으며 15% 첨가구의 경우 강한 단맛으로 기호도가 낮게 나타났다. 상기 결과와 같이 산약 찻산 발효물을 이용한 산약죽 제조에 있어서 산약 찻산 발효물 5%, 이소말토 올리고당 10% 및 쌀가루 5%를 첨가하는 것이 바람직하다.

Table 112. 산약 발효물 및 당 함량에 따른 관능평가 결과

산약 젖산 발효물	관능평가	신맛	단맛	물성	색	전체
	이소말토 올리고당	강도	강도	강도	기호도	기호도
5%	5%	5.32	2.78	5.07	6.34	6.39
	10%	5.07	5.43	5.17	6.52	6.87
	15%	4.85	7.29	5.29	6.49	6.13
7%	5%	5.63	2.65	5.13	5.61	5.34
	10%	5.34	5.28	5.26	5.73	5.68
	15%	5.11	7.04	5.37	5.88	5.70
10%	5%	6.25	2.31	5.31	4.74	4.76
	10%	6.03	5.19	5.39	4.83	5.11
	15%	5.86	6.87	5.50	4.97	5.03

2) 생 산약을 이용한 산약 죽 제조 결과

생산약의 첨가량이 15%인 경우 가장 높은 기호도와 적절한 물성을 나타내었다. 이소말토 올리고당의 경우 산약 젖산 발효물의 경우와 같이 10 중량% 첨가구의 기호도가 가장 높게 나타났다. 관능평가 결과, 생산약을 이용한 산약죽 제조에 있어서 생산약 15%, 이소말토 올리고당 10% 및 쌀가루 5%를 첨가하는 것이 바람직하다.

Table 113. 생 산약 및 당 함량에 따른 관능평가 결과

생 산약	관능평가	신맛	단맛	물성	색	전체
	이소말토 올리고당	강도	강도	강도	기호도	기호도
10%	5%	1.05	2.92	5.29	5.99	7.84
	10%	0.98	5.35	5.31	6.21	7.95
	15%	0.91	7.43	5.36	6.35	7.88
15%	5%	1.23	2.76	5.45	7.14	8.70
	10%	1.19	5.31	5.52	7.26	8.98
	15%	1.07	7.54	5.59	7.19	8.86
20%	5%	1.34	2.69	5.66	7.16	8.11
	10%	1.29	5.25	5.79	7.08	8.24
	15%	1.21	7.63	5.84	7.23	8.35

3) 증자 산약을 이용한 산약 죽 제조 결과

증자산약의 첨가량이 20%인 경우 가장 높은 기호도와 적절한 물성을 나타내었다. 증자산약 40%와 60% 첨가구의 경우 강한 물성을 띄어 기호도가 낮았으며, 이소말토 올리고당의 경우 10% 첨가구의 기호도가 가장 높게 나타났다. 관능평가 결과와

같이 증자산약의 경우 쌀가루를 첨가하지 않아도 죽의 제조가 가능했으며, 증자산약을 이용한 산약죽 제조에 있어서 증자산약 20% 및 이소말토 올리고당 10%를 첨가하는 것이 바람직하다.

Table 114. 증자 산약 및 당 함량에 따른 관능평가 결과

증자산약	관능평가	신맛 강도	단맛 강도	물성 강도	색 기호도	전체 기호도
	이소말토 올리고당					
20%	5%	1.33	3.02	5.72	5.76	4.82
	10%	1.37	5.51	5.80	5.90	5.33
	15%	1.28	7.58	5.89	5.86	5.19
40%	5%	1.42	2.75	5.81	5.64	4.53
	10%	1.39	5.64	5.94	5.61	4.62
	15%	1.31	7.62	6.23	5.73	4.71
60%	5%	1.50	2.58	5.97	5.59	4.29
	10%	1.45	5.71	6.11	5.54	4.54
	15%	1.38	7.74	6.35	5.57	4.48

4) 산약 분말을 이용한 산약 죽 제조 결과

산약분말의 첨가량이 3%인 경우 가장 높은 기호도와 적절한 물성을 나타냈으며, 이소말토 올리고당의 경우 10% 첨가구의 기호도가 가장 높게 나타났다. 관능평가 결과와 같이 산약분말을 이용한 산약죽 제조에 있어서 산약분말 3%, 이소말토 올리고당 10% 및 쌀가루 5%를 첨가하여 제조 할 수 있다. 그러나 산약젓산발효물, 생산약, 증자산약을 이용한 산약죽과 비교해 볼 때 산약분말 특유의 불쾌한 냄새로 인한 거부감으로 낮은 기호도를 나타내어 산약분말을 이용한 산약죽의 제조는 바람직하지 못함을 알 수 있었다.

Table 115. 분말 산약 및 당 함량에 따른 관능평가 결과

산약 분말	관능평가	신맛 강도	단맛 강도	물성 강도	색 기호도	전체 기호도
	이소말토 올리고당					
3%	5%	1.55	2.19	5.49	3.94	3.62
	10%	1.49	5.04	5.61	3.91	3.84
	15%	1.41	6.42	5.74	3.86	3.69
5%	5%	1.63	2.05	5.65	3.54	3.38
	10%	1.58	4.93	5.73	3.49	3.46
	15%	1.52	6.18	5.77	3.56	3.51
7%	5%	1.76	1.94	5.73	3.18	2.72
	10%	1.69	4.86	5.79	3.25	2.80
	15%	1.61	5.91	5.84	3.31	2.97

5) 산약 죽 품질 측정 결과

Table 116. 산약 죽 색도 측정결과

구분	산약 발효물 5%	생산약 15%	증자산약 20%	산약분말 3%
L-value	23.32	48.26	40.54	20.61
색도 a-value	3.71	-0.91	-0.37	1.06
b-value	1.49	-1.75	-2.41	-0.67

Table 117. 산약 죽 수분함량 측정결과

구분	산약 발효물 5%	생산약 15%	증자산약 20%	산약분말 3%
수분함량 (%)	82.30	80.45	78.59	79.61

Table 118. 산약 죽 점도 측정결과

구분	산약 발효물 5%	생산약 15%	증자산약 20%	산약분말 3%
점도 cP(mps)	3326	3498	4749	3950

Table 119. 산약 죽 관능평가 측정결과

구분	산약 발효물 5%	생산약 15%	증자산약 20%	산약분말 3%
신맛 강도	5.07	1.19	1.37	1.49
단맛 강도	5.43	5.31	5.51	5.04
물성 강도	5.17	5.52	5.80	5.61
외관 기호도	6.52	7.26	5.90	3.91
전체적인 기호도	6.87	8.98	5.33	3.84

산약죽의 관능평가 결과 외관 기호도는 생산약, 증자산약, 산약젓산발효물, 산약분말 순이었고, 전체적인 기호도는 생산약, 산약젓산발효물, 증자산약, 산약분말 순으로 나타났다. 이에 생산약 및 산약젓산발효물을 이용한 산약죽의 제조가 가장 바람직함을 확인 할 수 있었다.

사. 개발제품의 저장안정성 확인 결과

1) 장기유통형 산약제품의 저장안정성

산약 효소물 10%를 첨가하여 제조한 non-coverture 초콜릿의 30℃, 40℃, 50℃ 및 60℃로 tempering 온도를 조절하여 제조한 non-coverture 초콜릿의 저장 초기와 저장 일주일 후 관능평가를 확인하였다. 실험결과 40℃부근에서 tempering한 초콜릿이 저장 7일 후에도 bloom 현상이 덜하며, 조직감이 부드러운 것으로 확인되었다. 50℃ 및 60℃에서 tempering한 초콜릿의 경우 초콜릿 내부에 결정이 발생하여 조직감이 40℃ 처리 초콜릿보다 부드럽지 못한 것으로 확인되었으며 일부 발생된 bloom으로 인하여 기호도도 비교적 낮게 평가되었다.

Table 120. 장기유통형 산약제품의 저장안정성 관능평가 결과

항목		Tempering 온도			
		30℃	40℃	50℃	60℃
외관	저장일수 (day) 0	6.82	7.53	6.27	5.57
	7	6.47	7.31	5.26	4.29
조직감	0	6.25	8.92	5.36	5.73
	7	5.26	7.89	4.62	4.86
기호도	0	6.98	7.83	6.36	6.00
	7	6.36	7.11	5.26	5.01

2) 단기유통형 산약제품의 저장안정성

산약 음료의 총균수는 대체적으로 저장 7일 때 까지 감소율이 미미한 것으로 확인되었으며 저장 7일 때에도 원료에 따른 차이가 있지만 대체적으로 $10^7 \sim 10^9$ CFU/mL로 젖산 총균수가 유지되었다.

Table 121. 단기유통형 산약 발효음료의 저장안정성 총균수 함량

종류	총균수 함량 (CFU/mL)								
	저장일수 (day) 0	1	2	3	4	5	6	7	
산약 발효물 음료	3.2×10^9	5.1×10^9	4.7×10^9	2.1×10^9	2.3×10^9	1.8×10^9	1.8×10^9	1.1×10^9	
생 산약 음료	2.0×10^8	1.8×10^9	1.9×10^9	7.2×10^8	6.0×10^8	6.2×10^8	2.1×10^8	2.3×10^8	
증자산약 음료	6.1×10^8	2.4×10^9	1.1×10^9	9.1×10^8	8.2×10^8	5.1×10^8	5.1×10^8	4.4×10^8	
분말산약 음료	1.0×10^8	1.7×10^8	2.0×10^8	4.1×10^8	8.0×10^7	9.2×10^7	2.0×10^7	2.3×10^7	

죽의 경우 저장 5일째부터 이미가 느껴져 맛에대한 기호도가 낮아졌으며, 조식감의 경우 저장 2일째부터 노화로 인하여 물성이 단단해지는 저, 이로 인하여 조식감도 낮아지는 것으로 확인하였다. 전체 기호도 역시 맛과 기호도에 따라 저장일수가 증가할수록 낮아졌으며 유통기한을 늘리기 위한 인공 첨가물이 들어있지 않아 죽의 저장기간을 늘려야 할 경우, 노화속도를 제어할 수 있는 곡류 및 기타 부재료 첨가에 관한 연구가 필요할 것으로 사료되었다. 일반적으로 제조 후 2~3일 정도는 섭취할 수 있는 것으로 확인되었다.

Table 122. 단기유통형 산약 주의 저장안정성 관능평가 결과

항목 저장일수 (day)	Tempering 온도							
	0	1	2	3	4	5	6	7
맛	6.52	6.06	5.10	5.62	5.32	4.76	4.22	4.08
조직감	7.56	6.57	5.84	4.33	3.24	4.55	3.56	2.31
기호도	5.87	5.76	5.01	5.21	4.14	3.11	3.13	2.15

아. 산약을 이용한 기능성 가공제품의 활용방안 연구 결과

소비자들의 식품 선택 기준이 과거와 달리 위생·안전성 및 “웰빙”에 초점이 맞춰지고 있고, 더구나 여성들의 사회 진출이 활발해지는데다 이른바 “싱글족”과 노령인구가 늘어나면서 편리성을 요구하고 있다. 선진국 사례를 볼 때 국민소득이 증가하고 인구구조와 생활 패턴에 변화가 생기면서 식품의 소비도 건강과 편리함을 추구하는 쪽으로 바뀐다. 우리나라는 이런 변화 속도가 선진국보다 더 빠르다는 점을 염두에 두고 식품산업 전략을 세워야 할 것으로 사료된다.

1) 보관기능이 편리한 장기유통형 혈류개선 산약제품의 개발

(1) 기능성 산약 효소물 초콜릿

건강기능식품은 중·장년층 및 노년층을 위한 기력보강 선물로 각광받아왔지만, 최근 들어서는 면역력 증강 식품으로 전 연령층에게 사랑받고 있는 것이 특징이다. 실례로 2010년 1월, 대표적인 건강기능식품인 홍삼 관련 매출을 분석한 결과, 중·장년층을 위한 상품과 청소년·어린이용 상품의 판매비중이 6:4 수준인 것으로 조사되었다. 이는 2009년 1월의 9:1과 비교되는 수치로 지난해 하반기 유행했던 신종 플루로 인한 면역력에 대한 관심의 증가와 함께 건강기능식품이 각광받기 시작했으며, 특히 자녀의 건강을 염려하는 부모들이 건강기능식품을 찾으면서, 노년층을 위한 식품으로만 여겨지던 건강기능식품이 최근 들어서는 어린이와 청소년에게까지 확대되어 온 가족을 위한 건강기능식품으로 각광받고 있는 것으로 사료된다. 이에 산약 기능성 소재를 이용하여 산약초콜릿으로 가공하여 제공함으로써, 달콤함과 부드러운 맛을 부여하고 산약 효소 분해물 특유의 쓴맛을 상쇄하여 남녀노소 누구나 섭취하기에 거부감이 없고, 맛과 영양을 동시에 충족시킬 수 있다. 산약초콜릿은 선

물용 건강기능식품으로 브랜드화 할 수 있다. 주는 이의 마음을 전하면서 받는 이의 기호도에 맞는 선물을 고르기란 쉽지 않다. 산약초콜릿 선물세트를 건강기능식품의 섭취를 꺼리는 아이가 있는 가정에 선물하거나, 어버이날, 스승의 날 등 과 같은 기념일이나 명절 또는 수능선물용으로 활용한다면 좋은 반응을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 공부하느라 쉽게 지칠 수 있는 수험생들의 두뇌 당분공급을 위한 영양간식으로도 각광 받을 것으로 사료된다. 또한 등산과 같은 많은 양의 땀을 흘린 후 가볍게 허기를 채울 수 있는 양갱이나 초콜릿으로 당분을 보충하는 것도 피로 회복에 효과적이다. 이 처럼 모든 계층을 소비계층으로 설정하여 각종 기념일을 위한 산약 초콜릿 선물세트를 전문브랜드화하여 제공한다면 맛과 영양적 측면뿐만 아니라 산업적 측면에서도 성장 가능성이 클 것으로 사료된다.

(2) 기능성 산약 양갱

양갱은 1945년에 탄생한 국내 최장수 과자 제품으로 그 동안 소비자들의 변함없는 사랑을 받아왔지만 60년의 역사로 인해 중장년층에게 그 인기가 한정돼 있던 것이 사실이었다. 그러나 양갱은 지난 2~3년 간 마라토너의 기능성 영양 보충식으로, 어린이들의 영양 간식으로 소비층이 점차 확대되더니 올해 초 60년 만에 처음으로 시도 한 양갱의 코믹 TV CF를 통해 젊고 신선한 이미지를 확보하면서 신세대들의 입맛까지도 잡아내며 화려한 부활에 성공하였다. 소리 없이 입안에 착 달라붙는 달콤한 맛으로 중장년층의 간식으로 사랑 받아 온 장수식품 양갱이 웰빙 간식으로 화려한 부활에 성공하면서 히트상품으로 거듭나고 있다. 전통 발렌타인데이라는 칠월 칠석에 신세대 웰빙 연인들이 초콜릿 대신 양갱을 선물하는 등 양갱이 많은 젊은 세대들이 찾는 인기 상품이 되었다. 신제품 출시와 마케팅 강화에 힘입어 양갱 매출이 작년 200억원 대에서 올해는 400억원 대로 큰 폭으로 증가하였다. 이처럼 중장년층에 이어 젊은 층에까지 폭발적인 인기를 끌고 있는 복고풍 웰빙 간식 양갱의 시장 확대가 어디까지 지속될지 제과업계의 관심이 쏠려 있다. 어버이날, 스승의 날 등 과 같은 기념일이나 명절 또는 수능선물용으로 활용한다면 좋은 반응을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 공부하느라 쉽게 지칠 수 있는 수험생들의 두뇌 당분공급을 위한 영양간식으로도 각광 받을 것으로 사료된다. 또한 등산과 같은 많은 양의 땀을 흘린 후 가볍게 허기를 채울 수 있는 양갱이나 초콜릿으로 당분을 보충하는 것도 피로 회복에 효과적이다. 이에 산약초콜릿의 경우와 같이 산약 젓산 발효

물을 이용한 산약 양갱의 경우도 각종 기념일을 위한 산약 양갱 선물세트를 전문브랜드화하여 제공한다면 맛과 영양적 측면뿐만 아니라 산업적 측면에서도 성장 가능성이 클 것으로 사료된다.

2) 식사대용 즉석 편이식의 단기유통형 혈류개선 산약제품의 개발

(1) 기능성 산약 발효음료

젊은 20~30대 여성들을 주요 소비계층으로 하여 건강기능발효음료의 브랜드화 / 1990년대 말 외국 유명 커피 체인점의 등장은 테이크아웃(take-out)이라는 새로운 커피 음용 문화와 동시에 된장녀라는 신조어까지 만들어 냈다. 한국의 커피는 2010년 현재, 2조 규모의 큰 시장과 한국인 한 사람당 연간 350잔을 마시는 생활필수품이 됐다. 1990년대 외국 브랜드의 커피 속에 문화를 만들어 갔다면 이제는 토종 브랜드들이 커피 문화를 주도하고 있다. 최근 건강에 대한 관심도가 높아지면서 커피시장의 예와 같이 건강기능음료 시장에도 브랜드화가 필요하다. Take-out 문화를 즐기는 젊은 20~30대 여성들을 주요 소비계층으로 하여 건강기능발효음료를 전문 브랜드화한다면 맛과 영양적 측면에서도 산업적 성장 가능성이 클 것이다.

(2) 기능성 산약 죽

아침에는 공복 시간이 길기 때문에 혈당 수준이 하루 중 가장 낮을 수 밖에 없다. 따라서 활기찬 하루를 시작하려면 아침식사가 필수이다. 하지만 등교나 출근 준비로 바쁜 아침에 제대로 된 식사를 챙겨 먹기란 쉽지 않다. 그러나 “건강을 위해 아침을 먹는 것이 좋다”는 인식이 점점 확산되면서 아침대용식과 아침배달 서비스가 호응을 얻고 있다.

작년 통계청 사회조사 결과, 우리 국민 네 명 중 한 명은 아침식사를 제대로 챙겨 먹지 못하는 것으로 나타났다. 기능성 산약 죽은 영양이 풍부하고 위장에 부담이 없어 입맛 없는 아침 식사대용식에 알맞다. 이에 Take out 형태의 제품으로 간편한 아침 대용 식품으로 제공할 수 있다.

7. 산약의 기능성 소재 및 가공제품 in-vivo 혈류개선 효과 조사 결과

가. 산약 효소물과 젖산 발효물의 혈류개선 효과

1) Body weight 측정 결과

실험 기간동안 mouse의 body weight을 측정하였다. 성장기의 쥐이기 때문에 정상 의 경우 기간이 지날수록 몸무게의 증가가 나타날 것이 예상되고 실험군별로 body weight의 변화를 관찰함으로써 고지방식의 체중 증가 효과와 더불어 시료의 첨가로 나타나는 효과를 확인하고자 하였다. 각 시료의 각 그룹별 몸무게 변화를 측정하였 다. 7주 후에 각 group별로 몸무게 차이는 거의 나타나지 않았다.

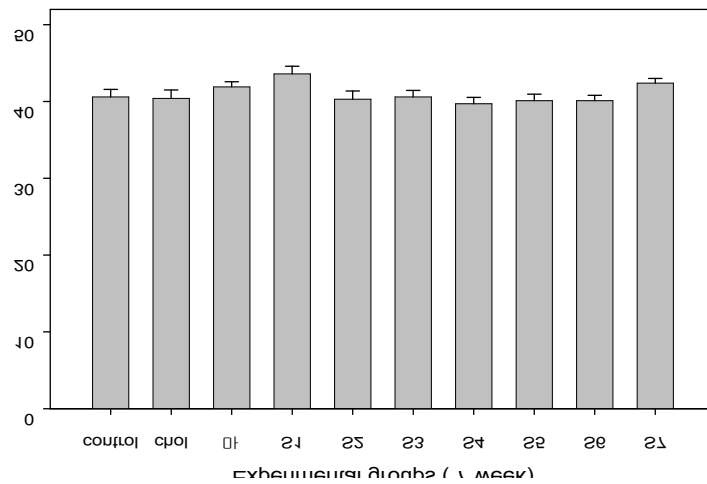


Fig. 26. Body weight

control: normal diet, chol: high fat diet 마: high fat diet + Dioscorea batatas (5%), S1~S7: fermented material by *Lb. casei*, *Lc. lactis*, *En. flavescens*, *Lb. acidophilus* and hydrolysis material by protamex, newtrase, and fermented material by *En. liquefaciens* based on high fat diet, respectively.

2) Liver weight 측정 결과

간무게는 control에 비해 cholesterol 만 먹인 group에서는 11.8%, 마 control group에서는 19.4%, cholesterol과 sample 1의 혼합식에서는 11%가 증가하였다. 또한 cholesterol과 sample 3의 혼합식에서는 6.6 %, sample 5에서는 6.6%, sample 7은 4.2%가 증가된 경향을 보였다. 반면 cholesterol과 sample 2의 혼합식에서는 6.5%, sample 4의 경우는 2.1%, sample 6은 8.4%의 감소를 나타냈다(Fig. 20).

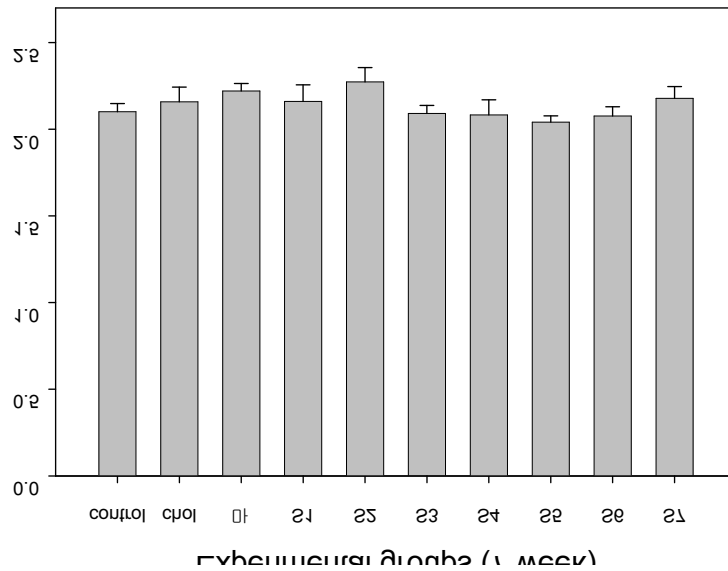


Fig. 27. Liver weight

control: normal diet, chol: high fat diet 마: high fat diet + Dioscorea batatas (5%), S1~S7: fermented material by *Lb. casei*, *Lc. lactis*, *En. flavescens*, *Lb. acidophilus* and hydrolysis material by protamex, newtrase, and fermented material by *En. liquefaciens* based on high fat diet, respectively.

3) 혈중 Total cholesterol 함량 측정 결과

각 group별 total cholesterol의 양은 control을 100%로 두었을 때 sample 4의 실험군만 제외하고 차례대로 14.8%(chol), 19.1%(마 control), 14.5%(sample 1), 19.7%(sample 2), 9.5%(sample 3), 7.4%(sample 5), 23.5%(sample 6), 7.9% (sample7) 씩 증가하였다(Fig. 21).

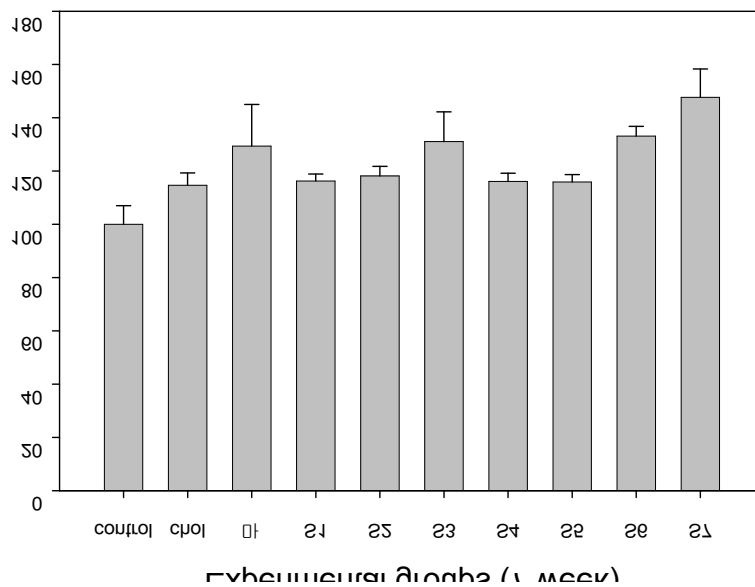


Fig. 28. Total cholesterol

control: normal diet, chol: high fat diet 마: high fat diet + *Dioscorea batatas* (5%), S1~S7: fermented material by *Lb. casei*, *Lc. lactis*, *En. flavescens*, *Lb. acidophilus* and hydrolysis material by protamex, newtrase, and fermented material by *En. liquefaciens* based on high fat diet, respectively.

4) 혈중 HDL-cholesterol 측정 결과

7주후는 전체적으로 control보다 증가한 경향을 보이는데 각각 32.5%(cholesterol), 49.7%(마 control), 48.7%(sample 1), 30.2%(sample 2), 34.4%(sample 3), 50.3%(sample 4), 49.9%(sample 5), 29.5%(sample 6), 35.9%(sample 7)만큼의 증가량을 보였다(Fig. 22).

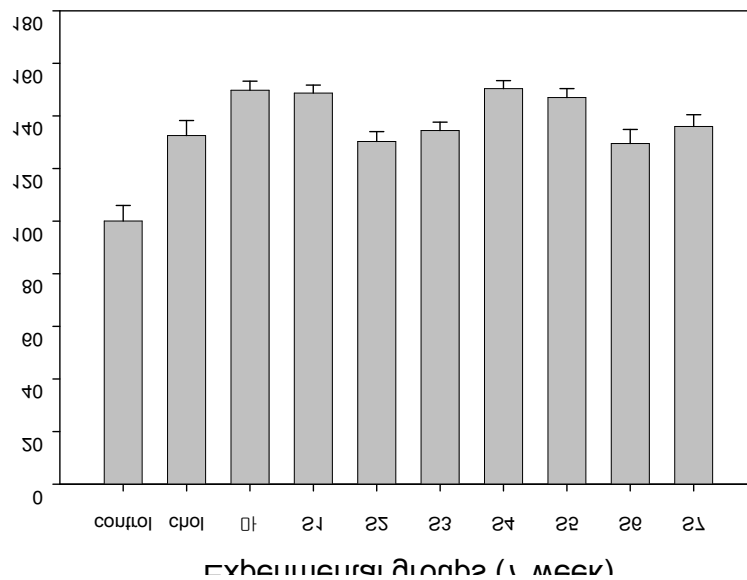


Fig. 29. HDL-cholesterol

control: normal diet, chol: high fat diet 마: high fat diet + *Dioscorea batatas* (5%), S1~S7: fermented material by *Lb. casei*, *Lc. lactis*, *En. flavescens*, *Lb. acidophilus* and hydrolysis material by protamex, newtrase, and fermented material by *En. liquefaciens* based on high fat diet, respectively.

5) 혈중 LDL-cholesterol 결과

섭식 7주 후에는 control을 기준으로 모든 실험에서 증가하는 경향을 보였다 그 비율은 12.4%(cholesterol), 27.7%(마 control), 14.8%(sample 1), 23.8%(sample 2), 23.3%(sample 3), 29.6%(sample 4), 14.4%(sample 5), 48.9%(sample 6), 35%(sample 7) 이다(Fig. 23).

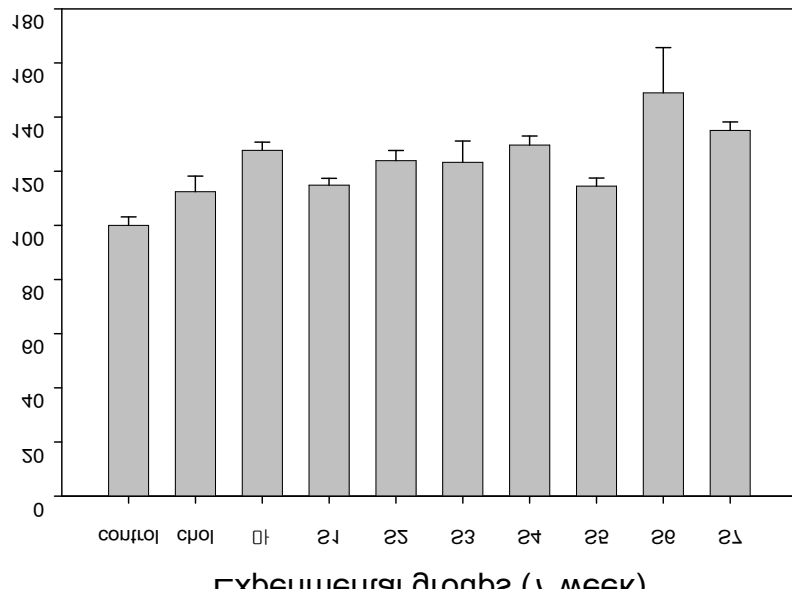


Fig. 30. LDL-cholesterol

control: normal diet, chol: high fat diet 마: high fat diet + *Dioscorea batatas* (5%), S1~S7: fermented material by *Lb. casei*, *Lc. lactis*, *En. flavescens*, *Lb. acidophilus* and hydrolysis material by protamex, newtrase, and fermented material by *En. liquefaciens* based on high fat diet, respectively.

6) 혈중 Tryglyceride 측정 결과

7주 후의 결과는 각 그룹에서 32%(마 control), 21.2%(sample 1), 6.6%(sample 5), 4%(sample 7)의 증가를 보이고 cholesterol(5.6%), sample 2(12.2%), sample 3(8.8%), sample 4(9%), sample 6 (5.9%)의 감소를 보였다(Fig. 24).

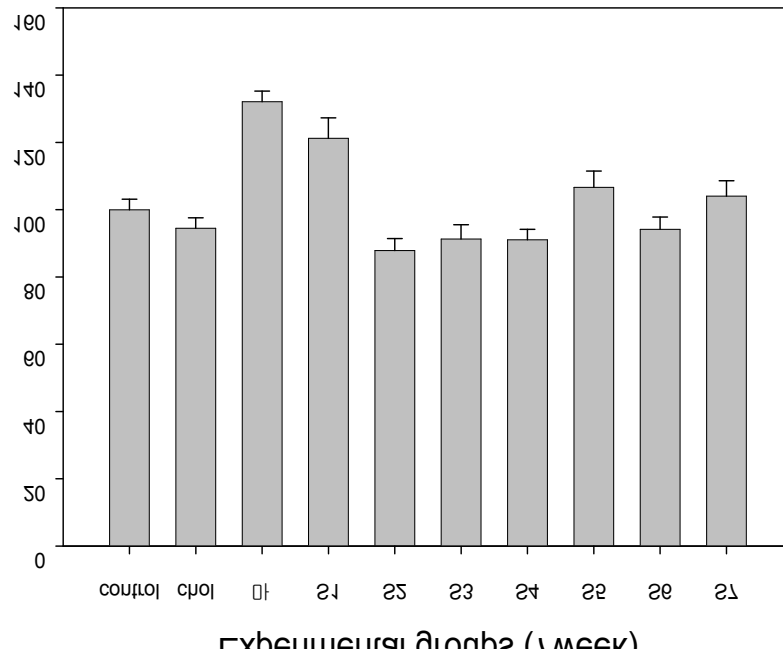


Fig. 31. Triglyceride

control: normal diet, chol: high fat diet 마: high fat diet + Dioscorea batatas (5%), S1~S7: fermented material by *Lb. casei*, *Lc. lactis*, *En. flavescens*, *Lb. acidophilus* and hydrolysis material by protamex, newtrase, and fermented material by *En. liquefaciens* based on high fat diet, respectively.

7) GOT와 GPT 측정 결과

GOT, GPT 는 정상범위가 각각 0-37U/L, 0-40U/L 로 알려져 있다. 실험결과, GOT 는 모든 group에서 정상범위에 속해 있고, GPT의 경우는 sample 7 의 경우 정상범 위보다 약간 웃도는 값을 보이고 있다. GOT와 GPT의 경우 실험군마다 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 25, Fig. 26).

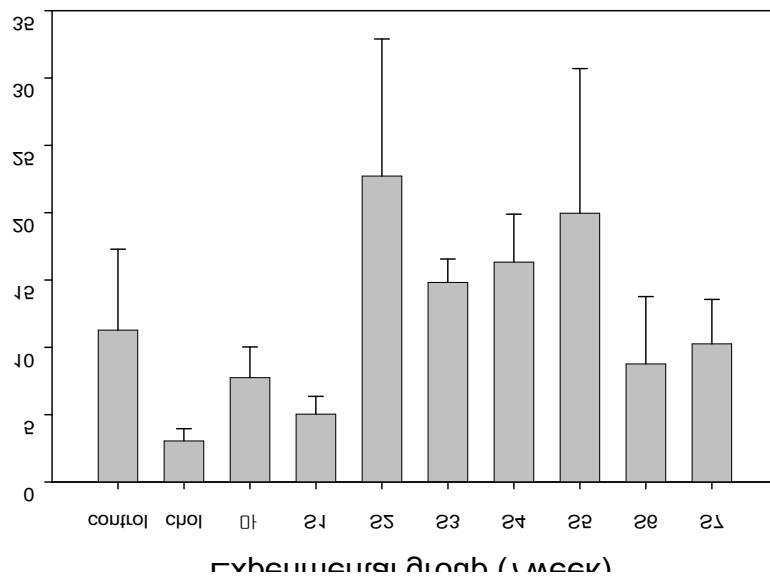


Fig. 32. GOT

control: normal diet, chol: high fat diet 마: high fat diet + *Dioscorea batatas* (5%), S1~S7: fermented material by *Lb. casei*, *Lc. lactis*, *En. flavescens*, *Lb. acidophilus* and hydrolysis material by protamex, newtrase, and fermented material by *En. liquefaciens* based on high fat diet, respectively.

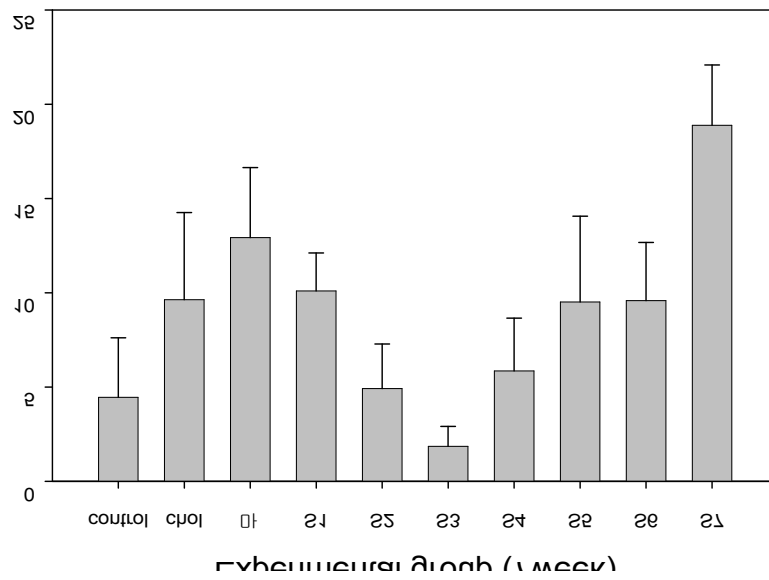


Fig. 33. GPT

control: normal diet, chol: high fat diet 01: high fat diet + Dioscorea batatas (5%), S1~S7: fermented material by *Lb. casei*, *Lc. lactis*, *En. flavescens*, *Lb. acidophilus* and hydrolysis material by protamex, newtrase, and fermented material by *En. liquefaciens* based on high fat diet, respectively.

나. 산약 기능성 소재의 혈류개선 효과

1) Body weight 측정 결과

실험 기간 동안 rat의 body weight를 측정하였다. 성장기의 쥐이기 때문에 정상인 경우 기간이 지날수록 몸무게의 증가가 나타날 것이 예상되고 실험군 별로 body weight의 변화를 관찰함으로써 고지방식의 체중 증가 효과와 더불어 시료의 첨가로 나타나는 효과를 확인하고자 하였다. 각 시료의 섭취 3주 후, 6주 후의 각 그룹별 몸무게 변화를 측정하였다. 3주 후의 몸무게 변화는 모든 실험군이 NFD에 비해 유의한 수준 (^a $p < 0.05$, paired t-test)의 몸무게 증가를 보였고, HFD와 비교했을 경우 발효물의 EtOH 분획(FEt-HFD), 발효물의 BuOH 분획(FBu-HFD), 효소 분해물의 E.A 분획(PEA-HFD), 효소 분해물의 EtOH 분획(PEt-HFD) 실험군에서 유의한 수준 (^b $p < 0.05$, paired t-test)의 몸무게 증가를 볼 수 있다. 6주 후의 몸무게 변화는 control과 비교하였을 경우 고지방 실험군을 제외한 나머지 실험군에서 유의한 몸무게 증가를 보였고 (^c $p < 0.05$, paired t-test) 고지방 실험군과 비교했을 경우는 비슷한 정도의 몸무게 증가를 보였다. 현재까지의 결과는 산약 기능성 분획의 첨가와 관계없이 rat의 성장에 따라 몸무게 증가 현상이 일어나고 있다고 사료되었다.

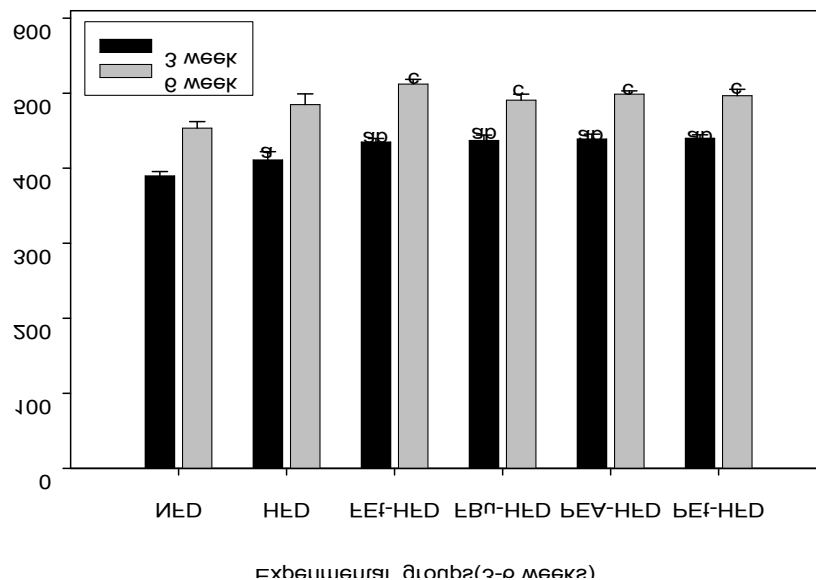


Fig. 34. 섭취 3, 6주 후 각 group별 몸무게 변화

NFD: normal fat diet, HFD: high fat diet, FEt: ethanol fraction of fermented material, FBu: butanol fraction of fermented material, PEA: ethyl acetate fraction of protamex hydrolysis material, PEt: ethanol fraction of protamex hydrolysis material

2) 혈중 Total cholesterol 함량 측정 결과

섭식 3주 후 각 실험군별 total cholesterol의 양은 NFD에 비하여 모든 group이 유의한 수준 ($p < 0.05$, paired t-test)의 증가를 나타내었고 HFD의 total cholesterol 함량과 비슷하였다. 섭식 6주 후에는 NFD에 비하여 20%~40% 함량이 크게 증가하였지만 HFD보다 cholesterol 함량이 줄어드는 것을 확인하였으며 실험군 중 FBu-HFD 식이군의 total cholesterol 함량이 가장 낮은 것으로 측정되었다.

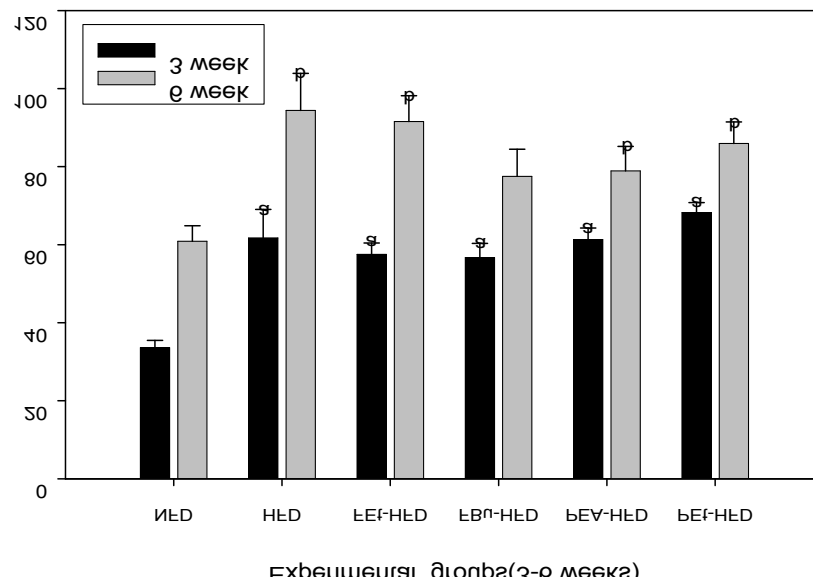


Fig. 35. 섭식 3, 6 주후 각 group별 혈중 total cholesterol 변화

NFD: normal fat diet, HFD: high fat diet, FEF: ethanol fraction of fermented material, FBu: butanol fraction of fermented material, PEA: ethyl acetate fraction of protamex hydrolysis material, PET: ethanol fraction of protamex hydrolysis material

3) 혈중 HDL-cholesterol 측정 결과

섭식 3주 후 HDL-cholesterol의 농도는 NFD와 HFD에 비하여 증가하는 양상을 나타내면서 PEA-HFD 식이군의 HDL-C의 함량이 가장 높게 측정되었지만 6주 후에는 모든 실험군의 HDL-cholesterol 함량이 대조구 함량과 비슷하게 측정되어 계속 사육하면서 확인하여야 할 것으로 사료되었다.

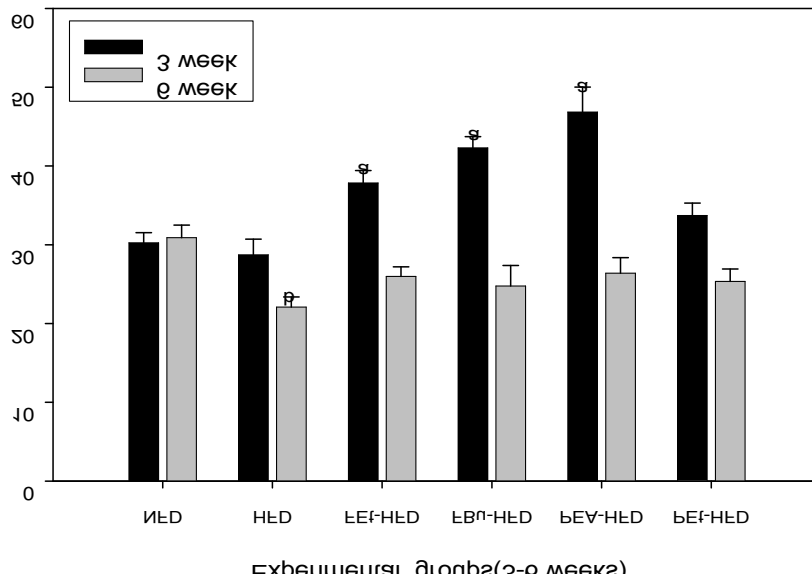


Fig. 36. 섭식 3, 6 주후 각 group별 혈중 HDL-cholesterol 변화

NFD: normal fat diet, HFD: high fat diet, FEF: ethanol fraction of fermented material, FBU: butanol fraction of fermented material, PEA: ethyl acetate fraction of protamex hydrolysis material, PEF: ethanol fraction of protamex hydrolysis material

4) 혈중 LDL-cholesterol 결과

섭식 3주 후의 LDL-cholesterol 수치는 HDL-cholesterol의 고 함량으로 인하여 그 양이 적은 것으로 계산되었으며 반대로 6주 후의 수치는 HDL-cholesterol의 감소로 인하여 높게 계산되었다. 하지만 산약 기능성 분획물을 첨가한 4개의 실험군에서 6주 후 total cholesterol과 triglyceride의 함량이 줄어드는 것을 측정하여 LDL-cholesterol 역시 HFD에 비하여 낮은 것으로 확인되었으며 FBu-HFD, PEA-HFD 및 PET-HFD가 비슷한 수치로 가장 낮았다.

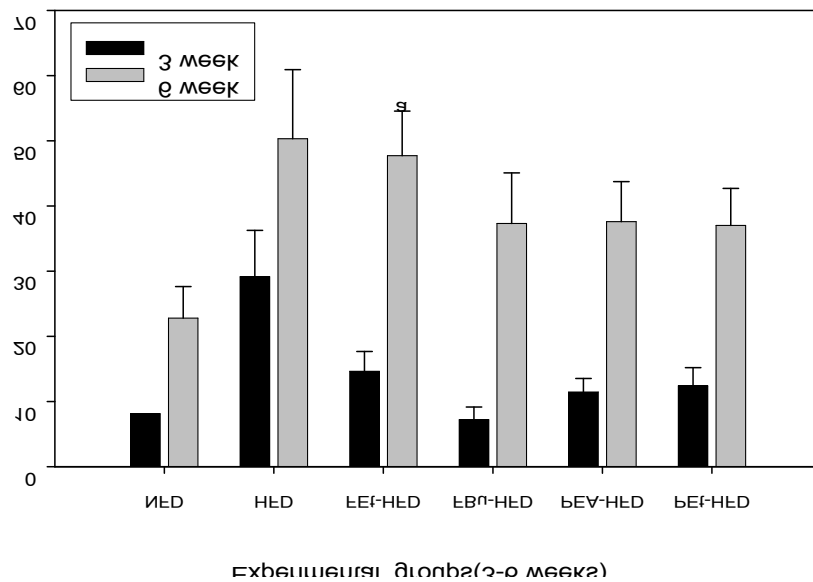


Fig. 37. 섭식 3, 6 주후 각 group별 혈중 LDL-cholesterol 변화

NFD: normal fat diet, HFD: high fat diet, FEF: ethanol fraction of fermented material, FBu: butanol fraction of fermented material, PEA: ethyl acetate fraction of protamex hydrolysis material, PET: ethanol fraction of protamex hydrolysis material

5) 혈중 Tryglyceride 측정 결과

실험 초기인 3주째 측정된 triglyceride의 함량은 모든 실험군이 대조구보다 높은 수치를 나타내었고 HFD의 triglyceride 함량이 오히려 NFD보다 낮게 측정이 되었다. 하지만 사육 6주후에는 HFD의 중성지질양이 급격히 증가한 것을 확인하였으며 FEt-HFD와 PEt-HFD의 중성지질 함량은 HFD와 비슷하였지만 FBu-HFD와 PEA-HFD의 중성지질양이 HFD에 비하여 40% 이상 줄어드는 것을 확인하였다.

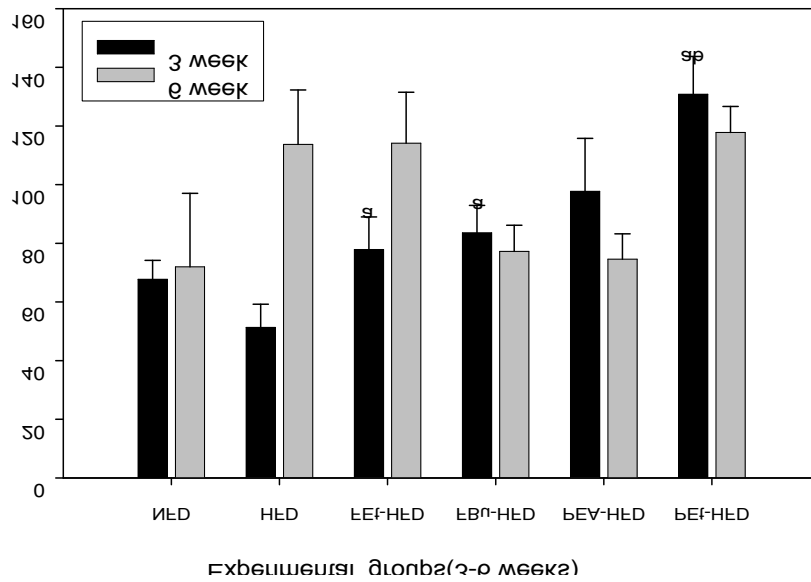


Fig. 38. 섭식 3, 6 주후 각 group별 혈중 중성지방 변화

NFD: normal fat diet, HFD: high fat diet, FEt: ethanol fraction of fermented material, FBu: butanol fraction of fermented material, PEA: ethyl acetate fraction of protamex hydrolysis material, PEt: ethanol fraction of protamex hydrolysis material

6) GOT와 GPT 측정 결과

GOT, GPT 는 정상범위가 각각 0-37U/L, 0-40U/L 로 알려져 있다. 실험결과 3주 및 6주 후의 GOT 및 GPT 모두 정상범위에 속해 있는것을 확인하였다. 식이별 차이는 나지 않았지만 고지방식이 간을 파괴할 정도의 병적 증상을 유발하지 않는 것으로 사료되었다(Fig. 32).

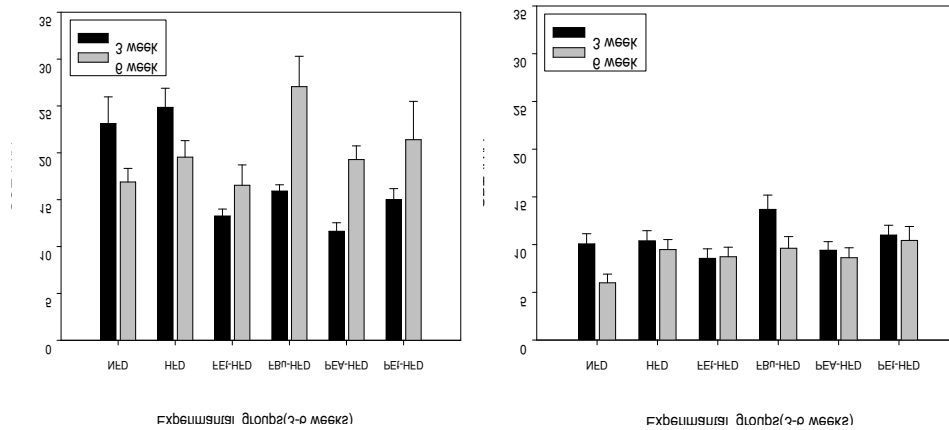


Fig. 39. 섭취 3, 6 주후 각 group별 혈중 GOT, GPT 변화

NFD: normal fat diet, HFD: high fat diet, FEF: ethanol fraction of fermented material, FBu: butanol fraction of fermented material, PEA: ethyl acetate fraction of protamex hydrolysis material, PEt: ethanol fraction of protamex hydrolysis material

다. 산약 가공제품의 혈류개선 효과

1) Body weight 측정결과

12주 동안 사육하며 0주, 6주 및 12주째에 실험군들의 몸무게를 측정한 결과, 실험초기에는 9군의 쥐의 몸무게가 평균 77~19 g으로 유의적인 차이가 없었다. 사육 기간이 증가됨에 따라 몸무게 역시 증가하였으며, 6주차부터는 식이에 따라 몸무게가 변화하는 양상을 보여 실험군들마다 유의적인 차이가 있는 것으로 확인되었다. 6주차에는 쥐의 몸무게가 평균 437.1 g~501.8 g으로 측정되었으며 이중 가장 무게가 적게나가는 group은 일반식이를 섭취한 G1이었고, 가장 무게가 많이 나가는 group은 양갱을 섭취한 G6였다. 12주차에는 쥐의 무게가 평균 550.8 g~ 617.7 g이었으며 무게변화 양상은 6주차와 유사한 것으로 확인되었다 (Fig. 33).

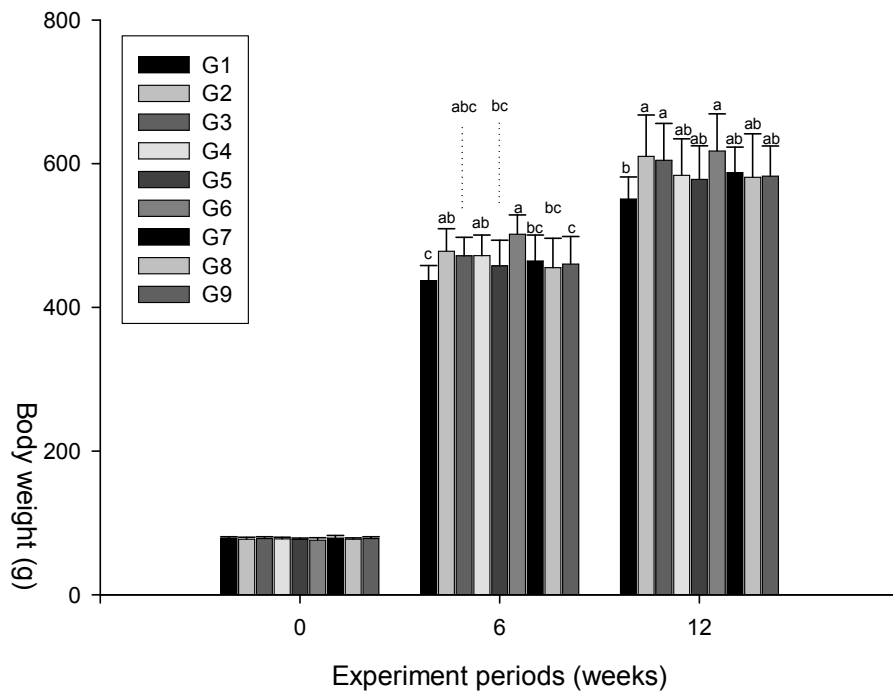


Fig. 40. Body weight

G1: 일반식이, G2: 고지방식이, G3: 식이섬유+고지방식이, G4: 죽+고지방식이,
 G5: 발효음료+고지방식이, G6: 양갱+고지방식이, G7: 초콜릿base+고지방식이,
 G8: 카카오매스+고지방식이, G9: 산약초콜렛+고지방식이

2) 혈중 Total Cholesterol 측정결과

산약 가공제품을 섭취한 쥐의 혈청 내 total cholesterol 함량을 측정한 결과, 실험 초기에는 모든 실험군의 쥐의 total cholesterol 함량이 평균 60.2~81.3 mg/dL로 유사하였다. 실험이 진행되면서 6주차에는 오히려 양갱 섭취군인 G6의 total cholesterol 함량이 131.2 mg/dL로 고지방 식이만을 섭취한 G2 97.1 mg/dL보다 높게 측정되었으며, 이는 양갱에 함유되어 있는 식이섬유의 함량은 낮고 설탕에 대한 영향으로 높게 측정된 것으로 추정되었다. 하지만 지속적인 식이섬유 섭취로 인하여 12주차에는 양갱 섭취군이 117.3 mg/dL로 안정되는 경향을 나타내었으며 고지방 식이군인 G2가 145.2 mg/dL로 실험이 진행되면서 계속 증가하는 추세를 나타내었다. 산약 발효물과 산약 효소물을 이용하여 제조한 가공식품은 고지방식이로 인한 콜레스테롤 생성을 저해하여 G2보다 낮은 값을 유지하는 것으로 확인되었다 (Fig. 34).

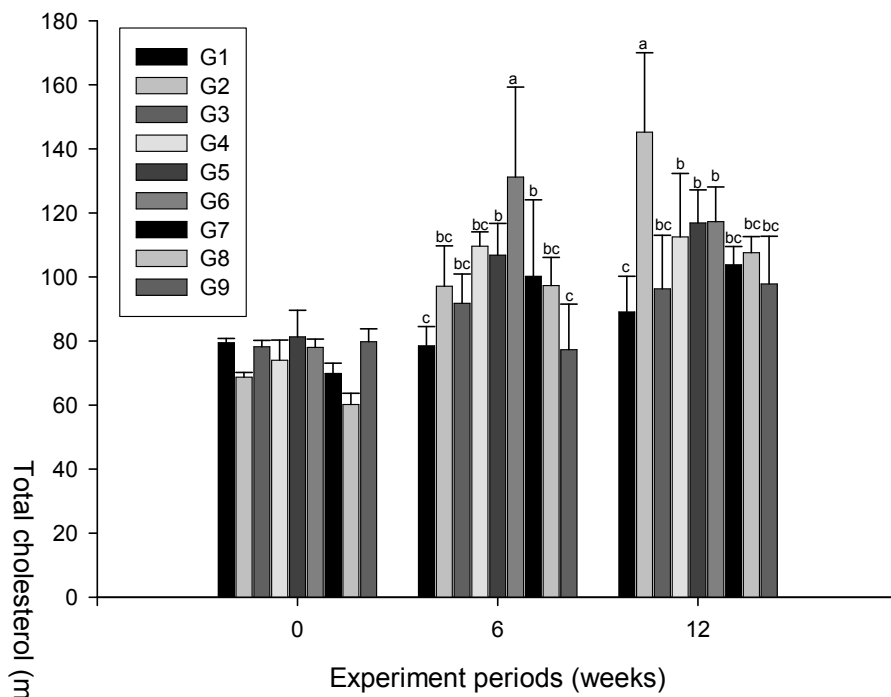


Fig. 41. Total cholesterol effects

G1: 일반식이, G2: 고지방식이, G3: 식이섬유+고지방식이, G4: 죽+고지방식이, G5: 발효음료+고지방식이, G6: 양갱+고지방식이, G7: 초콜릿base+고지방식이, G8: 카카오매스+고지방식이, G9: 산약초콜릿+고지방식이

3) 혈중 HDL-Cholesterol 측정결과

HDL-cholesterol 함량을 측정한 결과, G7군은 실험 초기부터 HDL-cholesterol 함량이 다른 실험구에 비하여 높은 것으로 확인되었다. 그리하여 12주차에도 G6의 수치는 초기 영향을 받은 것으로 사료되었다. 실험이 진행될수록 HDL-cholesterol 수치는 고지방 식이인 G2에 비하여 증가하는 것으로 사료되었으며, 산약 발효물과 산약 효소물이 고지방 식이와 병행하여 섭취하였을때 일반식이와 유사한 효과를 나타내어 콜레스테롤 함량 조절에 효과가 있는 것으로 평가되었다 (Fig. 35).

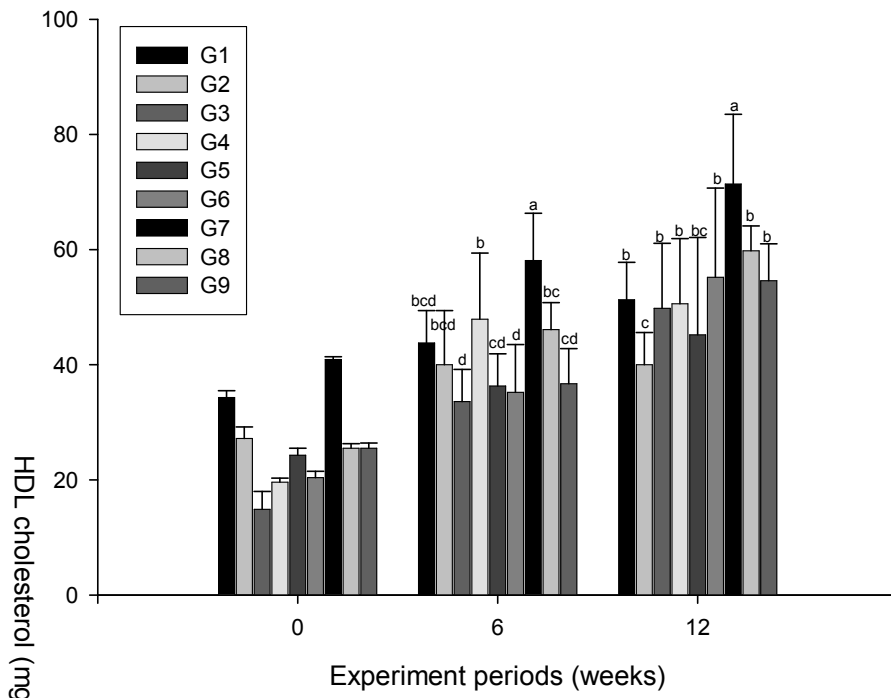


Fig. 42. HDL cholesterol effects

G1: 일반식이, G2: 고지방식이, G3: 식이섬유+고지방식이, G4: 죽+고지방식이, G5: 발효음료+고지방식이, G6: 양갱+고지방식이, G7: 초콜릿base+고지방식이, G8: 카카오매스+고지방식이, G9: 산약초콜릿+고지방식이

4) 혈중 LDL-Cholesterol 측정결과

LDL-cholesterol 함량의 경우 friede-wald의 계산식을 이용하여 산출한 결과로, 실험 6주차 시기에 높게 측정되었던 total cholesterol 함량에 의하여 6주차의 LDL-cholesterol도 높게 측정되었다. 하지만 실험기간이 지속될수록 cholesterol 및 triglyceride의 함량은 안정적으로 변화하여 LDL-cholesterol 함량에도 영향을 미쳤으며, 실험 12주차에는 G2의 LDL cholesterol 수치가 72.4 mg/dL로 산출된 것에 반해 대부분 그 이하 또는 일반식이 (G1)의 8 mg/dL과 유사하게 평가되었다 (Fig. 36).

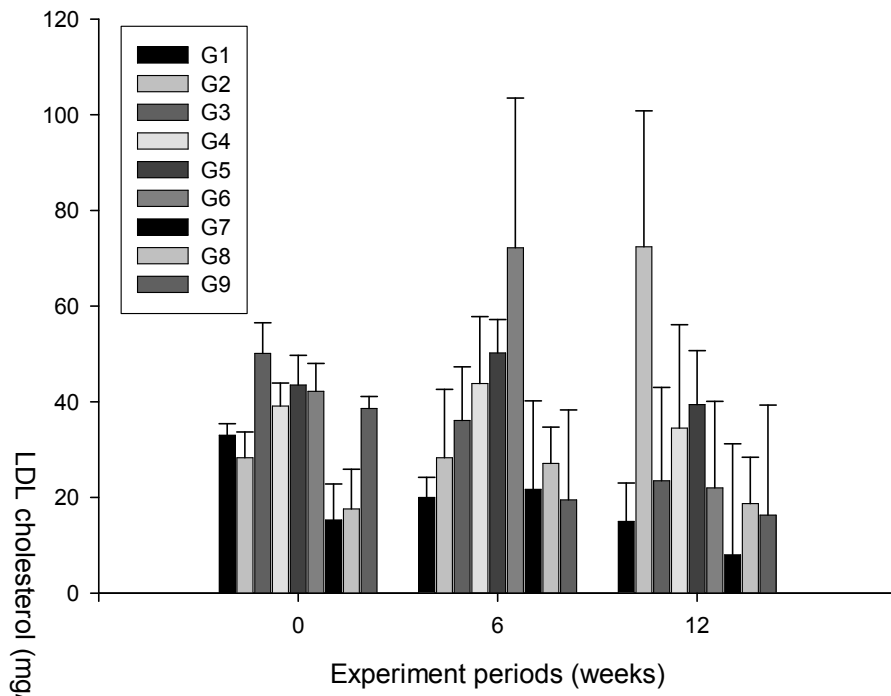


Fig. 43. LDL cholesterol effects

G1: 일반식이, G2: 고지방식이, G3: 식이섬유+고지방식이, G4: 죽+고지방식이, G5: 발효음료+고지방식이, G6: 양갱+고지방식이, G7: 초콜릿base+고지방식이, G8: 카카오매스+고지방식이, G9: 산약초콜렛+고지방식이

5) 혈중 Triglyceride 측정결과

Triglyceride 함량은 실험 6주후부터 고지방식이군인 G2가 급격히 증가하는 것으로 확인되어 12주차에는 163.7 mg/dL로 측정되었다. 고지방식이와 병행하여 섭취한 다른 실험군의 경우 일반식이군인 G1과 유사하거나 약간 높아지는 것으로 확인되었으며, 이는 고지방식이군에 비하여 현저히 낮은 것으로 확인되었다. 설탕함량이 높은 양갱 실험군(G6)과 초콜렛 첨가구(G7, G8, G9)는 당 함량과는 무관하게 산약 발효물 및 효소물에 의하여 Triglyceride 함량이 조절되는 것으로 확인되었으며 죽 첨가구인 G4와 발효음료인 G5군도 일반식이군과 유사하여 혈중 콜레스테롤을 조절하는 데 효과가 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 37).

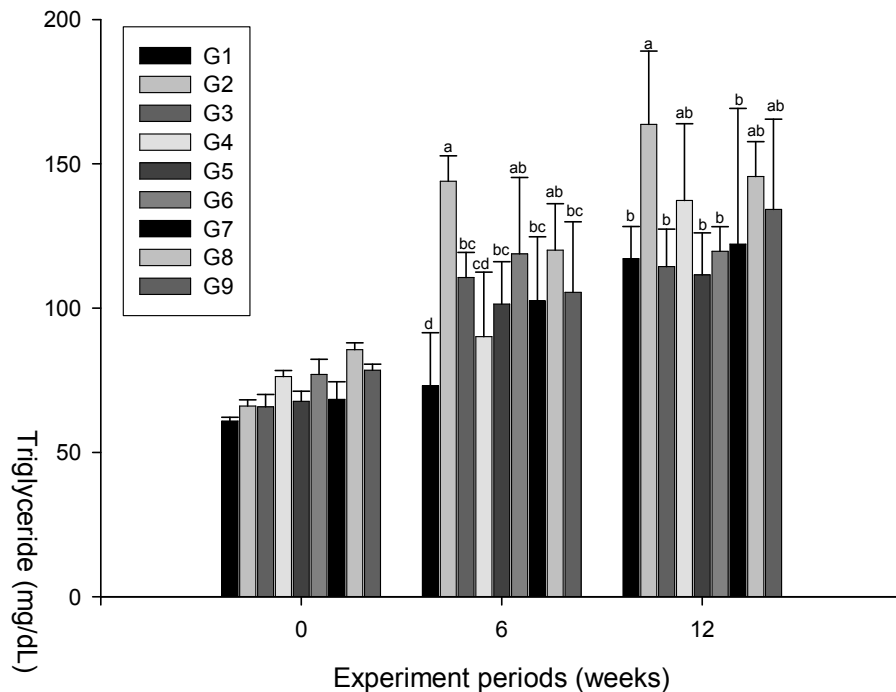


Fig. 44. Triglyceride effects

G1: 일반식이, G2: 고지방식이, G3: 식이섬유+고지방식이, G4: 죽+고지방식이, G5: 발효음료+고지방식이, G6: 양갱+고지방식이, G7: 초콜릿base+고지방식이, G8: 카카오매스+고지방식이, G9: 산약초콜렛+고지방식이

6) GOT와 GPT 측정결과

GOT는 세포가 파괴되면 용출되는 효소로서, 주로 심근, 골격근, 적혈구에 많이 존재하기 때문에 심근경색, 용혈 등을 진단하는데 이용된다. 12주 동안 공급된 식이 및 실험 환경으로 인하여 파괴되어 용출되는 GOT의 함량을 측정한 결과, 실험구에 의한 유의적인 변화는 나타나지 않았으며, 실험기간이 증가할수록 GOT 함량이 증가하는 경향이 나타났으나 실험초기와 유사한 것으로 확인되었다(Fig. 38).

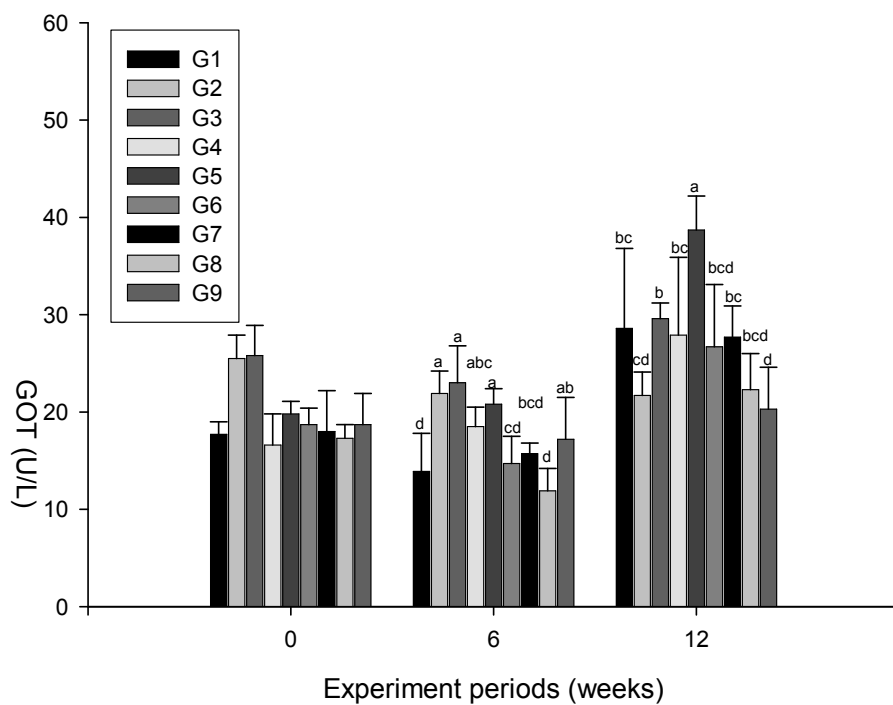


Fig. 45. GOT effects

G1: 일반식이, G2: 고지방식이, G3: 식이섬유+고지방식이, G4: 죽+고지방식이, G5: 발효음료+고지방식이, G6: 양갱+고지방식이, G7: 초콜릿base+고지방식이, G8: 카카오매스+고지방식이, G9: 산약초콜릿+고지방식이

GPT는 생체 장기내에 고루 퍼져있는 GOT와 달리 주로 간세포내부에 존재하는 효소로서 일반적인 경우 간세포의 재생하는 과정 중에 아주 소량이 혈중에서 측정 이 될 뿐 평소 혈액내의 GPT의 양은 매우 적게 관찰된다. 하지만 간에 염증이 생기거나 다른 이유로 간세포가 손상을 입어 파괴가 되게 되면 간세포내 효소인 GPT의 혈액 내 농도가 증가된 형태로 관찰되게 된다. 12주 동안 고지방식이 및 산약 가공 제품을 섭취한 실험동물의 경우 실험기간동안 GPT의 현저한 증가는 나타나지 않는 것으로 확인되었으며(Fig. 39), 이는 산약 가공제품으로 인하여 간세포가 손상되는 경우가 미미하다는 것으로 판단되었다.

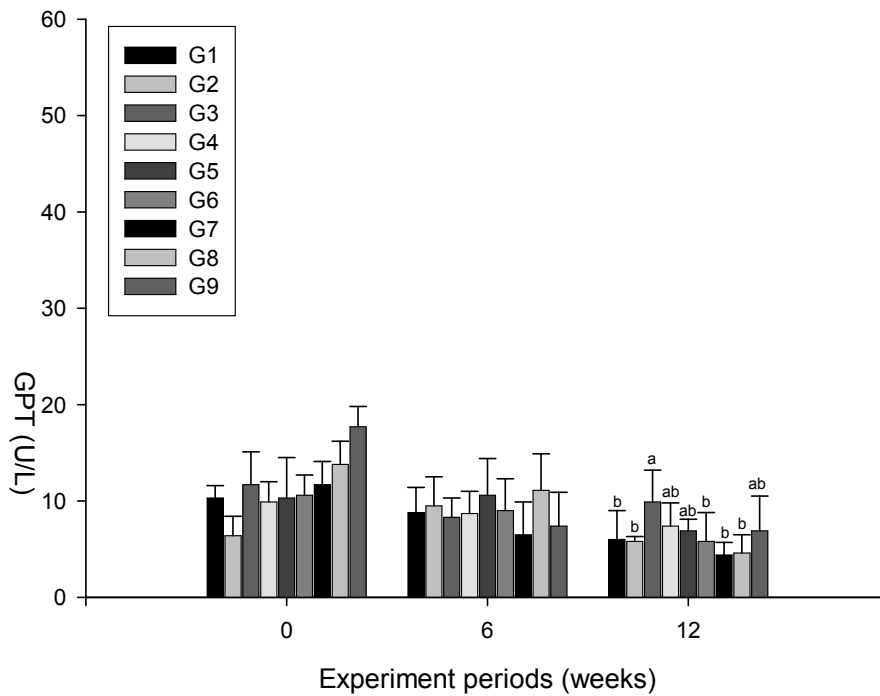


Fig. 46. GPT effects

G1: 일반식이, G2: 고지방식이, G3: 식이섬유+고지방식이, G4: 죽+고지방식이, G5: 발효음료+고지방식이, G6: 양갱+고지방식이, G7: 초콜릿base+고지방식이, G8: 카카오매스+고지방식이, G9: 산약초콜렛+고지방식이

7) 간 HMG-CoA reductase inhibition activity 측정 결과

HMG-CoA reductase의 활성을 측정한 결과, 일반식이군(G1)이 가장 활성이 높게 측정되었다. 고지방식이군(G2)의 효소활성이 가장 낮게 측정되며, 고지방식으로 인하여 효소활성 저해가 낮은 것으로 확인되었다. G3~G9 실험구의 경우 일반식이군에 비하여 유의적인 감소가 나타났지만, 반대로 고지방식이군과 비교하면 유의적으로 증가되는 것을 확인하였으며, 이를 바탕으로 산약 가공제품이 콜레스테롤 합성 경로에 관여하여 율속효소인 HMG-CoA reductase의 활성 저해를 촉진하는 것으로 확인되었다. 산약을 첨가하지 않은 G3, G7 및 G8 실험구는 고지방식이군 보다는 높지만 산약 첨가구에 비하여 저해활성이 낮은 것으로 확인되었으며, 이 역시 산약 첨가에 따라 효소활성 저해 효과가 더욱 높아질 수 있는 것으로 사료되었다(Fig. 40).

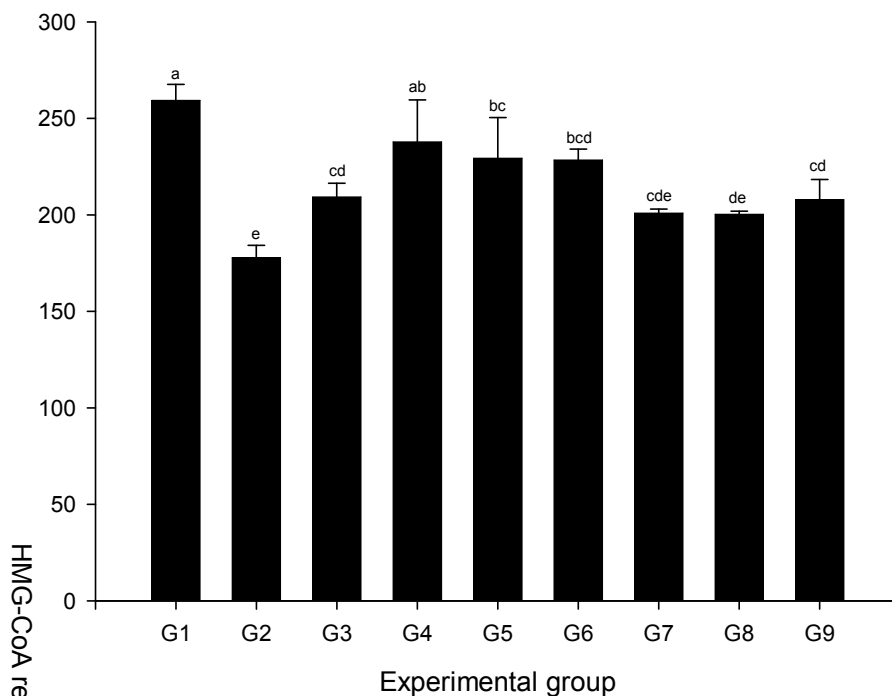


Fig. 47. HMG-CoA reductase inhibition effects (Oxidized NADPH/mg protein/min)

G1: 일반식이, G2: 고지방식이, G3: 식이섬유+고지방식이, G4: 죽+고지방식이, G5: 발효음료+고지방식이, G6: 양갱+고지방식이, G7: 초콜릿base+고지방식이, G8: 카카오매스+고지방식이, G9: 산약초콜렛+고지방식이

제 4 장 결 론

산약의 기능성 증진 및 이를 바탕으로 한 소재를 개발하기 위하여 탄수화물, 단백질 분해효소를 이용하여 최적 효소분해 농도, 온도 및 시간을 탐색하였다. 그 결과 효소마다 차이는 있었지만 주로 1% 농도에서 60℃, 90분 반응시간일 때 각종 수율 및 *in-vitro*상에서 혈류개선 효과가 우수하였고, 특히 8종의 가수분해 효소 중 단백질 분해효소인 newtrase와 protamex 분해물의 효과가 우수하였다. 효소분해물을 이용하여 동물실험을 실시한 결과, protamex 분해물의 혈중 콜레스테롤 저하 효과가 높아 이를 이용하여 혈류개선에 효과가 있는 분획물을 분리하였다. Hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 및 ethanol을 이용하여 용매분획을 실시, HMG-CoA reductase inhibition과 bile acid binding capacity를 측정한 결과 ethylacetate 분획과 ethanol 분획물에서 효과가 높았으며, 이들을 동물실험하여 최종적으로 ethanol 분획물을 선정하였다. Ethanol 분획물을 이용하여 한외여과를 실시한 결과, 30,000 dalton 이하의 크기에서 HMG-CoA reductase inhibition 및 bile acid binding capacity가 우수하였으며, gel filtration을 통한 최종적인 분자량 확인 결과 29,000 dalton과 16000 dalton 이하의 물질인 것으로 확인되었다. 33종의 산약 젯산균을 이용하여 발효시킨 산약 발효물의 *in-vitro* 혈류개선 효과를 측정한 결과, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus faecalis* var. liquefaciens, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* 를 이용한 5개의 발효물이 효과가 우수하였다. 이를 동물실험을 진행하여 혈중 콜레스테롤 제어 효과가 우수한 발효물로 *Lactobacillus acidophilus* 발효물을 선정하였다. 발효물의 활성성분 분리를 위하여 용매분획을 실시한 결과, ethanol 분획물과 butanol 분획물에서 혈류개선 효과가 우수하였으며, 이를 다시 동물실험을 통하여 ethanol 분획물을 최종 선정하였다. Ethanol 분획물을 한외여과 방법을 이용하여 분리한 결과, 30,000~50,000 dalton 사이에서 혈류개선 효과가 우수하였으며 이를 다시 gel chromatography를 이용하여 분리한 결과 66,000 dalton 이하의 물질인 것으로 확인되었다. 산약의 소비증진과, 제품개발 확대를 위하여 다양한 종류의 가공제품을 개발하였다. 첫째로 장기간 보관기능이 편리한 장기유통형 혈류개선 산약제품으로 산약 효소분해물을 이용한 초콜릿과 산약 젯산 발효물을 이용한 양갱을 제조하였다. 초콜릿과 양갱의 원료는 산약 기능성 소재뿐만 아니라, 가공하지 않은 생산약, 분말 산약 및 증자과정을 거친 산약 등 다양한 종류의 산약을 이

용할 수 있도록 그 제조방법을 원료별로 표준화 하였다. 둘째로 식사대용 편이식으로서 산약 발효물을 이용한 발효음료와 죽을 개발하였으며 이들 가공제품은 동물실험을 거쳐 고지방 식이와 동반으로 섭식하였을때도 일반식이 수준의 콜레스테롤 함량을 보였으며 관능평가를 통하여 기호도 또한 우수한 것으로 확인되었다.

제 5 장 참고문헌

1. MC Jeong, SW Jeong, YC Lee. Quality of Ginger Powder as Affected by Concentration and Dehydration Methods of Ginger Extracts, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 31(6): 1589-1595 (1999)
2. KY Kim, JK Shin, SW Lee, SR Yoon, HS Chung, YJ Jeong, NS Choi, CM Lee, KD Moon, JH Kwon. Quality and Functional Properties of Red Ginseng Prepared with Different Steaming Time and Drying Methods, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 39(5): 494-499 (2007)
3. DK Kang, SK Kim, SH Chung, SP Lee, BS Choi. Inhibitory Effects of Some Treatments on Browning During Yam(*Discorea Batatas* Decne)Tuber Processing, Korean journal of medicinal crop science. 6(1): 33-37 (1998)
4. JM Kim, YC Lee, KO Kim. Effects of Convection Oven Dehydration Conditions on the Physicochemical and Sensory Properties of Ginkgo Nut Powder, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 35(3): 393-398 (2003)
5. NS Choi, SY Seo, SH Kim. Screening of Mushrooms Having Fibrinolytic Activity, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 31(1): 219-223 (1999)
6. Sun-Ae Jang, Myung-Hee Kim, Myung-sun Lee, Myung-Ja Lee, Ok-Hwa Jhee, Tae-Kwang Oh and Cheon-Bae Shon : Isolation and Identification of Fibrinolytic Enzyme Producing Strain from Shrimp Jeot-Gal, a Tiny Salted Shrimps, and Medium Optimization for Enzyme Production, KOREAN J. FOOD SCI. THCHNOL. Vol. 31, No. 6, 1648-1653 (1999)
7. Jin-Hee Chang, Youn-Young Shim, Seung-Ho Kim, Kyoo-Man Chee, and Seong-Kwan Cha : Fibrinolytic and Immunostimulating Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated From *Chungkuk-jang*, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL, VOL. 37, No. 22, 255-260 (2005)
8. Xian-Zhang, Fan-Zhu Lee, Jun-Seok Kum and Jonf-Bang Eun : The Effect of Processing Condition on Physicochemical Characteristics in Pine Nut Gruel, KOREAN J. FEED SCI. TECHNOL, Vol. 34, No. 2, 225-231 (2002)
9. Astrup TS, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity.

- Arch. Biochim. Biophys. 40, 346-351 (1991)
10. Won-Keuk Kim, Screening and Identification of the Fibrinolytic Bacterial Strain from Jeot-Gal, Salt-fermented Fish. Korean J. Food Sci. Technol. Vol.30, No. 3, pp. 655~659 (1998)
 11. Hou, W.-C., Chen, H.-J., and Lin, Y.-H. Dioscorins, the major tuber storage proteins of yam(*Dioscorea batatas* Decne), with dehydroascorbate reductase and monodehydroascorbate reductase activities. Plant Sci. 149, 151-156. (1999)
 12. Hou, W.-C., Lee, M.-H., Chen, H.-J., Han, C.-H., Liu, Y.-W., and Lin, Y.-H. Antioxidant activities of dioscorins, the storage protein of yam(*Dioscorea batatas* Decne). J. Agric. Food. Chem., 49, 4956-4960. (2001)
 13. McAnuff , N. A., Harding, W. W., Omoruyi, F. O., Jacobs, H., Morrison, E. Y., and Asemota, H. N. Hypoglycemic effects of steroidal sapogenins isolated from Jamaican bitter yam, *Disocorea polygonides*. Food Chem. Toxicol., 43, 1667-1672. (2005)
 14. Kwon, C.-s., Sohn, H.-Y., Kim, S.-H., Kim, J.-H., Son, K.-H., Lee, J.-S. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 1451-1456. (2003)
 15. Chen, H.-L., Wang, C.-H., Chang, C.-T., and Wang, T.-C. Effects of Taiwanese yam(*Dioscorea japonica* Thunb var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice. Nutrition 19, 646-651. (2003)
 16. Lee, J. M., Lee, J.S., Choi, H. G, Kim, J. Y., Kim, S. E., Lin, S. K., and Nam, E. H. Effect of ethanol extract from dried chinese yam(*Dioscorea batatas*) flour on gastrointestinal function in rat model. Arch. Pharm, Res., accepted. (2005)
 17. Schoch, T,J. Swellign power and solubility of granular starches, Vol. 4, P. 106. In: Method in Carbohydrate Chemistry, Academic Press. New York, USA (1964)
 18. Kwang-Ok Kim, Effects of Convection Oven Dehydration Conditions on the Physicochemical and Sensory Properties of Ginkgo Nut Powder. Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 35, No. 3, pp. 393-398 (2003)
 19. Jee, J.H., Lee, H.D., Chung, S.K. and Choi., S.K. and Choi, J.U. : Changes in color value and chemical components of hoelen by various drying methods. Korean

- J. Food Sci. Technol. 31(3), 575-580 (1999).
20. M. E. Hull. : Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. (1947)
 21. Y.C. LIN and C.J. WASHAM et al. : Vakaleris-price and Hull methods for determining soluble tyrosine and tryptophan in blue cheese. J. Dairy Sci 65:707-711 (1982)
 22. Kwon EK, Choi EM and Koo SJ. : Effects of Mucilage from Yam(*Dioscorea batatas* DECENE) on Blood Glucose and Lipid Composition in Alloxan-induced Diabetic Mice. Korean J. Food sci. Technol. 33(6), 795-801 (2001)
 23. Nam DH, Son KH, Kim JY, Kim SD and Lim SK. : Quantitative Determination of Diosin from *Dioscorea rhizoma*. Kor. J. Pharmacogn. 37(1), 33-36 (2006)
 24. Lee BY, Park DJ, Ku KH, Kim HK and Mok CY. : Mucilage Separation of Korean Yam Using Microparticulation/Air Classification Process. Korean J. Food Sci. Technol. 26(5), 596-602 (1994)
 25. Kim MH. : Hypoglycemic Effect of *Dioscorea japonica* thumb on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Duksung Women's Univ(Korea) Thesis for the Degree of Philosophy (1995)
 26. McAnuff NA, Harding WW, Omoruyi FO, Jacobs H, Morrison EY and Asemota HN. : Hypoglycemic Effects of Steroidal Saponins Isolated from Jamaican Bitter Yam, *Dioscorea polygonoides*. Food Chem. Toxicol. 43, 1667-1672 (2005)
 27. Kwon CS, Sohn HY, Kim SH, Kim JH, Son KH and Lee JS. : Anti-Obesity Effect of *Dioscorea nipponica* Makino with Lipase-Inhibitory Activity in Rodents. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, 1451-1456 (2003)
 28. Hou WC, Chen HJ and Lin YH. : Dioscorins, The Major Tuber Storage Proteins of Yam(*Dioscorea batatas* Decene) with Dehydroascorbate Reductase and Monodehydroascorbate Reductase Activities. Plant Sci. 149, 151-156 (1999)
 29. Hou WC, Lee MH, Chen HJ, Han CH, Liu YW and Lin YH. : Antioxidant Activities of Dioscorins, The Storage Protein of Yam(*Dioscorea batatas* Decene). J. Agric. Food. Chem. 49, 4956-4960 (2001)
 30. Choi EM, Koo SJ and Hwang JK. : Immune Cell Stimulating Activity of

- Mucopolysaccharide Isolated from Yam(*Dioscorea batatas*). *J. Ethnopharmacol.* 91, 1-6 (2004)
31. Zhao G, Kan J, Li Z and Chen Z. : Structural Features and Immunological Activity of a Polysaccharide from *Dioscorea oppositifolia* Thunb roots. *Carbohydr. Polymers.* 61, 125-131 (2005)
 32. Yin J, Tezuka Y, Kouda K, Tran QL, Miyahara T, Chen Y and Kadota S. : Antiosteoporotic Activity of The Water Extract of *Dioscorea spongiosa*. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 583-586 (2004)
 33. Chen HL, Wang CH, Chang CT and Wang TC. : Effects of Taiwanese Yam(*Dioscorea japonica* Thunb var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper Gut Function and Lipid Metabolism in Balb/c Mice. *Nutrition* 19, 646-651 (2003)
 34. Lee JM, Lee JS, Choi HG, Kim JY, Kim SE, Lin SK and Nam EH. : Effect of Ethanol Extract from Dried Chinese Yam(*Dioscorea batatas*) Flour on Gastrointestinal Function in Rat Model. *Arch. Pharm. Res.* accepted (2005)
 35. Chung SK, Chung YY and Jeong WS. : Studies on the browning inhibition of yam(*Dioscorea alata*) during hot air dehydration. *Agric. Chem and Biotech.* 39:5. 384-388
 36. Jin TY, Oh DH and Eun JB. 2006. Change of Physicochemical Characteristics and Functional Components in the Raw Materials of Saengsik, Uncooked Food by Drying Methods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38(2), 188-196 (1996)
 37. Park YM. : Characteristics of Sugar-Alcohol and Process Situation of Sorbitol(Inhibitory dental caries Sweetener). *Bioindustry news.* 11(2), 44-52 (1998)
 38. Kang KJ, Oh GS, Go YS, Seo IW, Kim YJ and Park DH. : Inhibition of Enzymatic Browning in Medical Herb(Crude Drug Materials) by Organic Acid. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35(3), 532-535 (2003)
 39. Chung SH, Kang DK, Min GG, Kim SK and Choi BS. : Development of Granular Inulin Using *Dioscorea* Rhizome, Korean *Angelica* and Jujube. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 6(3), 171-180 (1998)
 40. Schoch TJ. : Swelling Power and Solubility of Granular Starches. 4, 106. *Method in Carbohydrate Chemistry.* Academic Press. New York. USA (1964)

41. Kwak YK. 1998. Screening of rheology and functionality of yam(*Dioscorea batatas* DECENE) mucilage. Keimyung Univ(Korea). Thesis for the degree of master
42. Chung HY. 1995. Carbohydrates analyses of Korean yam(*Dioscorea*) tubers. *Korean J Food Sci Technol* 27: 36-40
43. Kwon EK, Choi EM and Koo SJ. 2001. Effects of mucilage from yam(*Dioscorea batatas* DECENE) on blood glucose and lipid composition in alloxan-induced diabetic mice. *Korean J Food sci Techonl* 33: 795-801
44. Kim MH. 1995. Hypoglycemic effect of *Dioscorea japonica* thumb on streptozotocin -induced diabetic rats. Duksung Women's Univ(Korea). Thesis for the Degree of Philosophy
45. Oh PS and Lim KT. 2009. Glycoprotein isolated from *Dioscorea batatas* Decene modulates expressions of IL-4 and IL-10 in primary-cultured mouse lymphocytes. *Cell Biochem Funct* 27: 316-322.
46. Yoon KB and Jang JK. 1989. Wild vegetables good for health, Seokoh Pub. 334
47. Hou WC, Chen HJ and Lin YH. 1999. Dioscorins, the major tuber storage proteins of yam(*Dioscorea batatas* Decene) with dehydroascorbate reductase and mono-dehydroascorbate reductase activities. *Plant Sci* 149: 151-156
48. Hou WC, Lee MH, Chen HJ, Han CH, Liu YW and Lin YH. 2001. Antioxidant Activities of Dioscorins, The Storage Protein of Yam(*Dioscorea batatas* Decene). *J Agric Food Chem* 49: 4956-4960
49. Choi M, Kim DJ, Lee HJ, You JK, Seo DJ, Lee JH and Chung MJ. 2008. A study on the glucose-regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medical herbs. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 87:542-547
50. Nam DH, Son KH, Kim JY, Kim SD and Lim SK. 2006. Quantitative determination of diosin from *Dioscorea rhizoma*. *Kor J Pharmacogn* 37: 33-36
51. Kwon CS, Sohn HY, Kim SH, Kim JH, Son KH and Lee JS. 2003. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1451-1456
52. Choi EM, Koo SJ and Hwang JK. 2004. Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam(*Dioscorea batatas*). *J Ethnopharmacol* 91: 1-6

53. Zhao G, Kan J, Li Z and Chen Z. 2005. Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots. *Carbohydr Polymers* 61: 125-131
54. Chen HL, Wang CH, Chang CT and Wang TC. 2003. Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in balb/c Mice. *J Nutr* 19: 646-651
55. Lee JM, Lee JS, Choi HG, Kim JY, Kim SE, Lin SK and Nam EH. 2005. Effect of ethanol extract from dried Chinese yam (*Dioscorea batatas*) flour on gastrointestinal function in rat model. *Arch Pharm Res* accepted
56. McAnuff NA, Harding WW, Omoruyi FO, Jacobs H, Morrison EY and Asemota HN. 2005. Hypoglycemic effects of steroidal saponins isolated from Jamaican bitter Yam, *Disocorea polygonides*. *Food Chem Toxicol* 43: 1667-1672
57. Chung SK, Chung YY and Jeong WS. 1996. Studies on the browning inhibition of yam (*Dioscorea alata*) during hot air dehydration. *Agric Chem and Biotech* 39:5: 384-388
58. Jin TY, Oh DH and Eun JB. 2006. Change of physicochemical characteristics and functional components in the raw materials of *saengsik*, uncooked food by drying methods. *Korean J Food Sci Technol* 38: 188-196
59. Song TH, Choi W, Choi HS, Kim JH, Shin DH and Park HK. 2003. Food chemistry. *Hyoilbooks*. 252-265
60. Kang DK, Kim SK, Chung SH, Lee SP and Choi BS. 1998. Inhibitory effects of some treatments on browning during yam (*Dioscorea batatas* Decene) tuber processing. *Korean J Medical Crop Sci* 6: 33-37
61. Park YM. 1998. Characteristics of sugar-Alcohol and process situation of sorbitol (Inhibit dental caries Sweetener). *Bioindustry news* 11: 44-52
62. Kang KJ, Oh GS, Go YS, Seo IW, Kim YJ and Park DH. 2003. Inhibition of enzymatic browning in medical herb (Crude Drug Materials) by organic acid. *Korean J Food Sci Technol* 35: 532-535
63. Dubois M, Giles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356

64. Leach HW, McCowen LD and Schoh T. 1959. Structure of starch granule 1, swelling and solubility patterns of various starches. *Cereal Chem* 36: 534-544
65. Moon SW and Park SH. 2008. Quality characteristics of white pan bread with *chungkukjang* Powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 633-639
66. Kim HS and Yoon JY. 2004. Effects of various sugar alcohols on the sensory properties of mulberry rice cake. *Korean J Food Cookery Sci* 20: 520-528
67. Lee KJ and Kim MR. 2004. Quality evaluation of pumpkin jam replaced sucrose with sugar alcohols during storage. *J East Asian Soc Dietary Life* 14: 123-130

주 의

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