



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0082003
(43) 공개일자 2016년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 2/38 (2006.01) C12J 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0193521
(22) 출원일자 2014년12월30일
심사청구일자 2014년12월30일

(71) 출원인
(주)제이온
전라북도 전주시 덕진구 기린대로 945-6 (여의동)
우석대학교 산학협력단
전라북도 완주군 삼례읍 삼례로 443 (우석대학교)
재단법인 전라북도생물산업진흥원
전라북도 전주시 덕진구 원장동길 111-18(장동)

(72) 발명자
이현기
전라북도 전주시 완산구 온고을로 119-1 (서신동)
정은선
전라북도 전주시 덕진구 신복3길 10-6, 102동 70
3호 (팔복동1가, 래미앙)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
황이남

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **복분자 주박과 오디 주박을 이용한 식초 및 식초음료의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 복분자 주박과 오디 주박을 이용한 식초 및 식초음료의 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 종초를 만드는 단계와, 복분자 주박과 오디 주박에 접종하여 식초 발효하는 단계로 구성된다. 상기의 식초 발효물에 부원료를 첨가하여 식초음료를 만드는 단계가 추가된다.

본 발명의 주정발효부산물을 이용한 식초 및 식초 음료는 무기질, 유기산, 비타민 C, 폴리페놀, 플라보노이드 등이 다량 함유되어 있어 면역증진효과, 항산화 및 항균효과 등 다양한 생리활성물질이 함유되어 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

황유경

전라북도 전주시 완산구 황강서원2길 21, 302호 (효자동3가)

김정욱

전라북도 전주시 덕진구 가리내8길 16-7, 202호 (덕진동2가, 하모니)

이근하

전라북도 완주군 봉동읍 둔산1로 131, 104동 202호 (모아엘가)

오찬호

전라북도 전주시 덕진구 송천로 31, 105동 102호 (송천동1가, 송천서호1차아파트)

이창현

전라북도 전주시 완산구 당산로 101, 111동 1006호 (서신동, 전주서신동아아파트)

오미진

전라북도 전주시 덕진구 송천로 31, 105동 102호 (송천동1가, 송천서호1차아파트)

김선웅

전라북도 익산시 선화로69길 59, 102동 1407호 (부송동, 삼성아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

초산균을 배지에 접종하여 종초를 만드는 단계와, 복분자 주박과 오디 주박 혼합물에 초산균을 접종하여 식초를 발효하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 복분자 주박과 오디 주박을 이용한 식초 음료의 제조방법

청구항 2

제 1항에 있어서, 초산균의 종류는 *Acetobacter pasteurianus* KCCM12654, *Acetobacter pasteurianus* KCCM12655 및 *Acetobacter aceti* KCCM32409 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 복분자 주박과 오디 주박을 이용한 식초 음료의 제조방법

청구항 3

제 1항에 있어서, 종초 배양시 초산균을 mannitol 배지에 접종하여 28℃ shaking incubator에서 72시간 배양하는 단계와, 상기의 배양물을 초산배지에 접종하여 28℃ shaking incubator에서 72시간 배양하는 단계와, 상기의 배양액을 청주배지에 접종하여 28℃ incubator에서 정치배양하여 초산 발효하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 복분자 주박과 오디 주박을 이용한 식초 음료의 제조방법

청구항 4

제 1항에 있어서, 초산발효물의 산도는 4% 이상 일 때 종초로 사용하는 것을 특징으로 하는 복분자 주박과 오디 주박을 이용한 식초 음료의 제조방법

청구항 5

제 1항에 있어서, 초산 발효는 *Aceto. pasteurianus* KCCM 12654 균주를 이용하여 복분자 주박과 오디 주박을 7:3~8:2로 배합한 후, 상기의 주박과 물을 8 : 2의 비율로 만들어 종초를 10% 첨가한 후, 28℃에서 10~18일 동안 초산 발효시키는 것을 특징으로 하는 복분자 주박과 오디 주박을 이용한 식초 음료의 제조방법

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 방법으로 만든 식초를 식품위생법에서 허용하는 부원료와 혼합하여 만든 식초 음료

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 복분자 주박과 오디 주박을 이용한 식초 및 식초음료의 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 초산균을 배지에 접종하여 종초를 만드는 단계와, 복분자 주박과 오디 주박 혼합물에 초산균을 접종하여 식초를 발효하는 단계로 구성되는 식초의 제조방법이다. 상기의 식초에 부원료를 첨가하여 식초음료를 만드는 단계가 추가된다.

[0002] 본 발명의 주정발효부산물을 이용한 식초 및 식초 음료는 무기질, 유기산, 비타민 C, 폴리페놀, 플라보노이드 등이 다량 함유되어 있어 면역증진효과, 항산화 및 항균효과 등 다양한 생리활성물질이 함유되어 있다.

배경 기술

[0003] 복분자(*Rubus Coreanus*)는 장미과의 낙엽관목이며 우리나라 남부 및 중부지방에서 재배되고, 6월 중순에서 7~8월에 열매가 성숙되는데 등글고 붉은색으로 익은 후 검붉은 색으로 완숙되어 단맛과 신맛, 독특한 향을 가지고 있으며, 인과 철, 칼륨, 유기산과 비타민 C가 많이 함유되어 있으며, phenol 화합물들로 kaemferol, sanguin H-5, 3-O-β-D-glucuronide, Quercetin, ferulic acid, coumaric acid, caffeic acid, rutin, luteolin 등이 보고 되었다. 복분자 나무에 관한 연구로는 잎과 줄기로부터 tannin 및 flavonoids 화합물 등에 관해 보고되

어 있다. 복분자는 식용 및 약용 등으로 사용되고 있는데 특히 열매는 식용, 음료 및 주류제품에 많이 이용되고 있으며, 한방과 민방(동의보감)에서는 열매는 간을 보호하고 눈을 맑게 하며 머리털을 검게 해주며 불임을 치료한다고 기록되어 있다. 복분자 열매에 관한 성분 및 생리활성에 대한 연구는 다양하며 현재까지 알려진 복분자 열매의 기능성으로는 항산화, 항균, 항알러지, 항암, 항염증, 호르몬조절, 피부미백, 비만, 간보호, 특히 대사성질환(혈당, 혈압, 콜레스테롤) 개선 효과가 뛰어나다.

[0004] 오디(mulberry, 학명;Morus bombycis Koidz)는 뽕나무의 열매로서 딸기와 비슷한 핵과상이고 핵과는 암나무에만 매달리며, 처음에는 파랑색이나 차차 붉어지고 다 익으면 자주색에서 흑자색으로 변한다. 색소는 안토시아닌 성분으로서 시아니딘(cyanidin)계에 속한다. 오디는 보진, 강장의 효과가 널리 인정되어 왔으며, 우리나라와 중국에서는 상삼주(桑酒)라고 해서 아주 귀한 술로 취급되어 왔다. 오디는 신맛이 거의 없으므로 빛이 고운 단술이 만들어진다. 오디술은 혈액순환을 도우며 신진대사를 활발히 해서 저혈압, 냉증, 불면증 등에 좋은 효과가 있다. 오디를 착즙하면 약 80%의 즙액이 만들어지는데 그 안에는 당분이 10% 이상이나 들어 있어 단맛이 강하다.

[0005] 전북의 복분자 연간 생산량은 2011년도 약 11,200톤으로 전국 생산대비 86% 차지하며, 이중 고창은 약 6,000톤으로 전국 생산대비 46%를 생산하고 있다. 전북의 오디 생산량은 연간 약 4,800톤으로 전국 생산대비 71% 차지하고 있다. 복분자주와 음료 제조 시 복분자의 10%(약 600톤) 정도의 부산물이 생성되며, 오디주 생산 후 남은 주정박의 양은 오디 중량대비 43%로 부안군에서만 연간 약 180톤에 이를 것으로 예상된다. 복분자 과실은 유리당, 인, 철 및 칼륨 등 무기질이 풍부하고, 유기산과 비타민 C가 많이 함유되어 있으며, 생리활성 물질로서 폴리페놀, 플라보노이드 등이 다량 함유되어 있어 항암활성 및 면역증진효과, 항산화 및 항균효과 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되어 있다. 오디는 유리당 및 유기산을 함유하고 있을 뿐 아니라, 항산화성 안토시아닌 색소, 플라보노이드 등 다양한 생리활성 물질 함유하고 있다.

표 1

베리류 주정발효부산물의 이화학적 성분

[0006]

소재	pH	당도 (brix)	초산 (%)	수분함량 (%)	에탄올함량(%)
복분자주박	3.77±0.03	8.0±0.06	1.20±0.06	59.35±0.92	7.0±0.5
오디 주박	3.84±0.03	14.6±0.15	0.45±0.05	66.76±2.11	5.0±0.4

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 복분자주 제조 시 주정박은 복분자의 10%(약 600톤) 정도의 부산물이 생성되며, 오디주 생산 후 남은 주정박의 양은 오디 중량대비 43%로 부안군에서만 연간 약 180톤에 이를 것으로 예상된다. 이들 주정발효부산물에는 에탄올이 함유되어 있어 식초로 발효시키면 자원을 재활용할 수 있는데도 불구하고, 폐기되고 있어 환경문제를 일으키고 있다. 더욱이 이들은 무기질, 유리당, 유기산, 항산화성 안토시아닌 색소, 폴리페놀, 플라보노이드 등이 함유되어 있어 면역증진효과, 항산화 및 항균효과 등 다양한 생리활성이 있어 재활용이 시급한 실정이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 복분자 주박과 오디 주박을 이용한 식초 및 식초음료의 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 증조를 만드는 단계와, 복분자 주박과 오디 주박 혼합물에 집중하여 식초 발효하는 단계와, 식초에 부원료를 첨가하여 식초음료를 만드는 단계로 구성된다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 주정발효 부산물을 이용한 식초 및 식초 음료는 무기질, 유기산, 비타민 C, 폴리페놀, 플라보노이드 등이 다량 함유되어 있어 면역증진효과, 항산화 및 항균효과 등 다양한 생리활성물질이 함유되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명은 주정발효 부산물인 복분자 및 오디 주박이다.

- 도 2는 DPPH radical 소거능 측정 결과이다.(복분자주박(RJ), 오디주박(MJ), 베리식초(BV) 대조구(BHT))
- 도 3은 세포생존율 측정을 나타낸 것이다.
- 도 4는 세포 내 Superoxide dismutase(SOD) 활성에 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 5는 세포 내 Catalase(CAT)의 활성 변화를 나타낸 것이다.
- 도 6은 세포 내 Xanthine oxidase(XOD)의 활성 변화를 나타낸 것이다.
- 도 7은 발효시간별 초산 생산을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 초산균을 배지에 접종하여 종초를 만드는 단계와, 복분자 주박과 오디 주박 혼합물에 초산균을 접종하여 식초를 발효하는 단계로 구성되는 식초의 제조방법이다.
- [0012] 상기의 식초에 부원료를 첨가하여 식초음료를 만드는 단계가 추가된다.
- [0013] <실시에 1>; 종초 제조
- [0014] 초산균의 종류는 *Acetobacter posteurianus* KCCM12654, *Acetobacter posteurianus* KCCM12655, *Acetobacter aceti* KCCM32409의 3종류를 사용하였다. 종초 제조시 배양조건은 다음과 같이 실시하였다.
- [0015] ① 초산균 200 ul를 10 ml mannitol 배지에 접종한다.
- [0016] ② 28℃ shaking incubator에서 72시간 배양한다.
- [0017] ③ 배양액 만니톨배지를 100 ml 초산배지에 접종한다.
- [0018] ④ 28℃ shaking incubator에서 72시간 배양한다.
- [0019] ⑤ 배양액 를 1000 ml 청주배지에 접종한다.
- [0020] ⑥ 28℃ incubator에서 정지배양한다.
- [0021] 상기에서 가 배양되는 동안 산도를 측정하여 산도 5~6%가 되었을 때 종초로 사용한다.

표 2

Mannitol 배지		초산배지		청주배지	
효모추출물	0.5g	효모추출물	0.5g	KCl	1.2g
peptone	0.5g	peptone	0.5g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.6g
mannitol	2.5g	glucose	0.5g	acetic acid	17.3g
D.W	100ml	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1g	D.W	577ml
		D.W	100ml	청주(알콜14%)	404ml

- [0022]
- [0023] 이상의 실험결과 *Acetobacter posteurianus* KCCM 12654 균주가 발효 23일째에 산도 4.0% 이상을 나타내었고, 주정발효부산물을 이용한 초산발효 실험에 이 균주를 종초로 사용하였다.
- [0024] <주정발효부산물의 안전성 검토; 미생물 분석>
- [0025] 주박 25g을 측정하여 멸균필터백에 넣고, 멸균생리식염수 225ml를 넣는다. 멸균필터백의 입구를 닫은 후 스토마커를 이용해 3분간 균질화한다. 균질화시킨 샘플의 여과액 1ml를 취하여 3M 건조필름에 접종한다. 각 희석배수 별로 3M 건조필름에 접종한 뒤 35℃ incubator에 24시간 배양한다.

표 3

실험결과

구 분	일반세균	대장균군	효모&곰팡이
복분자주박	3.4 logCFU/g	불검출	2.9 logCFU/g
오디주박	3.5 logCFU/g	불검출	3.0 logCFU/g

[0026]

[0027]

<실시에 2>; 주정발효부산물 함량에 따른 초산발효 실험

[0028]

Aceto. posteurianus KCCM 12654 균주를 이용하여 종초를 제조한다. 복분자 주박과 오디주박을 1:1로 섞은 뒤 주박과 물의 비율을 각각 달리하여 종초를 10%가 되게 첨가한다. 28℃에 정치배양하며 초산발효 시키면서 발효 기간에 따른 산도를 측정한다.

표 4

주박과 물의 함량에 따른 초산 발효

Sample	Strain	주박:물	종초함량
A	<i>Aceto. posteurianus</i> KCCM 12654	2 : 8	10%
B		4 : 6	
C		6 : 4	
D		8 : 2	

[0030]

[0031]

상기의 실험결과를 통해 주박함량에 따른 초산발효 실험 결과 주박과 물의 비율 8:2인 실험군에서 발효 4일째 6% 이상의 초산이 생성됨을 확인할 수 있었다. 이 외 실험군의 경우 발효 10일째에도 산도 2%를 나타내었다. 주박:물=8:2 실험군의 경우 복분자오디 주박의 배합비율 및 주박과 물의 비율을 달리하여 추가 실험을 진행하였다.

[0032]

<주정발효부산물의 배합비 결정>

[0033]

Aceto. posteurianus KCCM 12654 균주를 이용하여 종초를 제조한다. 복분자 주박과 오디주박의 비율을 달리하고, 주박과 물의 비율을 다르게 하여 종초를 10% 되게 첨가한다. 28℃에서 정치배양하며 초산발효 시키면서 발효기간에 따른 산도를 측정한다.

표 5

주박과 물 및 주박 비율에 따른 초산 발효

Strain	sample	주박: 물	주박비율		종초함량
			복분자	오디	
<i>Aceto. posteurianus</i> KCCM12654	A-1	7 : 3	8	2	10%
	A-2		7	3	
	B-1	8 : 2	8	2	
	B-2		7	3	

[0035]

주박의 배합비율 및 주박과 물의 비율을 달리하여 초산발효 시켰을 때, 복분자 주박과 오디주박의 비율이 7:3인 경우 발효 12일 짜 더 높은 초산 생성률을 보였다(A2, B2). 또한 주박과 물의 비율이 8:2인 실험군에서 7:3인 실험군보다 초산생성이 더 높았다(B1,B2). 실험결과를 종합했을 때, 복분자주박:오디주박=7:3으로 배합 후 주박:물=8:2의 비율로 배합하는 것(B2)이 최적 조건임을 확인하였다.(도 7)

[0036]

<최적조건의 설정을 통한 제조공정 표준화>

[0037]

대량 식초 제조를 위해 다음과 같이 실시하였다. *Aceto. posteurianus* KCCM 12654 균주를 이용하여 종초를 제조한다. 복분자주박:오디주박=7:3으로 배합 후, 주박:물=8:2의 비율로 제조하여 종초를 10%가 되게 첨가한다. 위

의 비율로 총 60kg 제조하여 28℃에서 초산발효시켰다.

[0038] 상기의 실험결과로부터 주정발효부산물을 이용하여 대량으로 식초 제조 시의 초산발효는 lab-scale일 경우보다 느리게 진행되었고, 발효 18일째 총산도 4.6%를 나타냈고, 이 때의 pH는 3.4를 나타내었다.

[0039] <적용예>; 식초 음료의 설계

[0040] 상기와 같이 발효하여 얻은 식초에 비타민과 아미노산 강화 식초음료를 개발하고자 기능성 부원료로 비타민B군, C 등 및 아미노산으로 L-cystein, L-arginine 종류를 고려하였다. 비타민 C(아스코르브산)강화음료는 일일권장 섭취량이 100 mg으로 제품 내 권장함량500 mg/1개(제품)로 하고, 아미노산 L-arginine은 1,000-2,000 mg/day으로 하고, 2,000 mg/1개(제품)하였다.

[0041] <실시에 3-6>; 식초 음료의 제조

[0042] 상기와 같이 발효한 식초에 복분자과즙, 오디과즙, 카라기난, 펙틴, 잔탄검, 로커스트콩검, 구연산, 스테비오사이드, 정제수를 혼합한 식초 음료를 제조하였다.

표 6

식초 음료 배합비

[0043]

구 분		실시에 3	실시에 4	실시에 5	실시에 6
주원료	주박 식초	3	3	3	3
과즙	복분자	5	4.5	4	6
	오디	5	5.5	6	4
검류	카라기난	0.6	0.5	0.4	0.3
	펙틴	0.2	0.3	0.4	0.5
	잔탄검	0.1	0.2	0.1	0.1
	로커스트콩검	0.1	-	0.1	0.1
산미료	구연산	0.1	0.1	0.05	0.05
	구연사나트륨	0.02	0.01	0.03	0.05
	사과산	-	0.01	0.04	0.02
당류	설탕	-	1	1.5	2
	스테비오사이드	0.11	0.1	-	-
	자일리톨	-	0.01	0.01	0.01
물	정제수	85.77	84.77	84.37	83.87
계		100	100	100	100

[0044] <시험예 1>; 식초 음료의 관능검사

[0045] 실시예 3-6과 같이 만든 식초 음료를 대상으로 시중에서 판매되고 있는 식초음료(C사제품)와 5점척도법으로 관능검사(10대, 20대, 30대 남녀 각 2명)를 실시하여 그 결과를 다음의 표 7에 나타냈다.

표 7

식초 음료의 관능검사 결과

[0046]

구 분	실시에 3	실시에 4	실시에 5	실시에 6	대조구
신맛	4.1	4.2	4.0	4.1	4.0
개운한맛	4.2	4.3	4.1	4.2	4.1
뒷맛	4.1	4.2	4.0	4.1	4.1
기호도	4.2	4.3	4.1	4.1	4.1

[0047] 상기의 관능검사 결과로부터 본 발명의 식초 음료가 시중에서 유통되고 있는 식초음료보다 신맛, 개운한맛, 뒷맛, 기호도 면에서 우수한 것으로 나타났다.

[0048] <시험예 2>; 원료 및 제품의 기능성 검증

[0049] 가. 재료 및 방법

[0050] 1. 재료

[0051] 본 실험에 사용한 시료는 전라북도 생물산업진흥원에서 제공받아 사용하였으며 시료의 종류는 다음과 같다(표 8).

표 8

[0052] 분석시료의 종류

순번	Sample	표기명
1	복분자 주박 (<i>Rubus coreanus jubak</i>)	RJ
2	오디 주박 (<i>Mulberry jubak</i>)	MJ
3	베리 식초 (<i>Berry vinegar</i>)	BV

[0053] 2. 세포주 및 세포배양

[0054] 실험에 사용한 Human keratinocyte 세포주인 HaCaT cell은 부산대학교 한의학전문대학원에서 분양받아 계대배양하여 실험에 사용하였다.

[0055] 3. 시약

[0056] Fetal bovine serum(FBS), penicillin streptomycin(P/S), Trypsin-EDTA, Dulbecco' s Modified Eagle(DMEM) medium은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Sodium dodecyl sulfate, DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), melanin, Mushroom tyrosinase, α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Amresco (USA), 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다. 실험에 사용한 kit는 xanthine oxidase activity assay kit (BioVison Inc., CA, USA), SOD determination kit (Sigma-Aldrich Inc. USA), Catalase assay kit (Cayman chemical, USA.)를 구입하여 사용하였다.

[0057] 4. 기기

[0058] 실험에 사용한 기기는 CO₂ incubator(Vision, Korea), Inverted microscope(Carl Zeiss Inc., Axiovert 25C, Germany), Microplate Reader(Molecular Device, VERSAmax, Sunnyville, CA), 20W Ultraviolet B(UVB) lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan), UV Light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan), Inverted microscope(Carl Zeiss Inc., Axiovert 25C, Germany) 등을 사용하였다.

[0059] 5. DPPH free radical 소거능 측정

[0060] DPPH free radical 소거활성은 Blois 등⁽¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액을 에탄올로 희석하여 농도별로 준비한 시료 600 μ L에 DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 200 μ L를 넣고 교반한 후 암조건에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 에탄올을 넣어 측정하였으며, 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 시료용액 무첨가군(에탄올 첨가군)의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0061]

[0062]

[0063] 6. 세포생존율 측정

[0064] 계대배양중인 HaCaT 세포를 96well plate에 3×10^4 cells/well이 되도록 세포수를 조정 한 다음, 각 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 37°C의 5% CO₂ incubator 내에서 배양하였다. 배양종료 4시간 전에 5 mg/ml 농도로

PBS (pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 처리하고, 0.1N HCl에 녹인 10% SDS 100 μ l로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 Microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해서 570nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다⁽²⁾.

[0065] 7. Ultraviolet B(UVB) 조사

[0066] HaCaT 세포를 3 \times 10⁵ cells/well이 되도록 세포수를 조정된 다음, 시료를 첨가하여 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂의 incubator에서 배양하였다. 배양 후 세포배양액을 버리고 PBS를 이용하여 세척하고 UV를 조사하였다. UV 조사는 20W Ultraviolet B(UVB) lamp에서 조사한 광원을 UV Light meter로 측정된 후, UVB 강도(intensity)가 0.3mW/cm²가 되는 높이에서 15 mJ/cm²를 10초간 조사하였다.

[0067] 8. 세포 내 Xanthine oxidase(XOD) 활성에 미치는 영향

[0068]
$$\text{XOD Activity} = \frac{B}{(T_2 - T_1) \times V} \times \text{dilution factor} = \text{nmol/min/ml} = \text{mU/ml}$$

[0069] UVB를 조사한 HaCaT세포내 XOD Activity를 알아보기 위해 xanthine oxidase activity assay kit (BioVison Inc., CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 사용방법은 제조회사의 지시에 따라 시행하며, 사용한 표준물질은 hydrogen peroxide (H₂O₂)를 사용하였다. Standard는 3차 증류수로 희석하여 0.1mM 농도로 조제한다. 조제한 표준물질과 세포의 lysate를 96well plate에 각각 50 μ l씩 넣은 후 xanthine oxidase mixture (46 μ l assay buffer, 2 μ l substrate mix, 2 μ l enzyme mix)를 50 μ l 처리하여 즉시 microlate reader를 이용해 570nm에서 측정하고(T₁, A₁), 차광하여 30분 후에 다시 측정한다(T₂, A₂). XOD 생성량은 다음과 같은 식을 이용하여 계산한다.

[0070] B: the amount of H₂O₂ generated by XO from standard curve (in nmol)

[0071] T₁: the time of the first reading (in min)

[0072] T₂: the time of the second reading (in min)

[0073] A₁: the absorbance of the first reading

[0074] A₂: the absorbance of the second reading

[0075] V: the pretreated sample volume added into the reaction well (in ml)

[0076] 9. Superoxide dismutase(SOD) 활성에 미치는 영향

[0077] UVB를 조사한 HaCaT세포내 SOD활성을 관찰하고자 SOD determination kit (Sigma-Ildrich Inc.)를 사용하여 제조회사의 지시에 따른 사용방법으로 시행한다. SOD 활성측정은 96 well plate에 각 시료를 20 μ l를 넣고 희석 buffer로 희석한 WST working solution을 200 μ l를 넣은 후 20 μ l의 Enzyme working solution을 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 후, microplate reader를 사용하여 450nm에서 측정하며, SOD농도는 bovine erythrocytes의 superoxide dismutase (Sigma-Aldrich Inc.)를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성한 후 구한다.

[0078] 10. Catalase(CAT)의 활성 변화

[0079] Catalase activity 활성도 측정은 Cayman Catalase assay kit를 이용하여 흡광도 540nm에서 측정하였으며 결과값은 1 nmol의 Formaldehyde를 생성하는데 필요한 Catalase의 양을 1 nmol로 하여 분당 활성정도를 단백질 1 mg 단위로 나타내었다.

[0080]
$$\text{CAT activity (nmol/min/mL)} = \frac{\text{Fomaldehyde } \mu\text{M}}{20 \text{ min}} \times \text{dilution factor}$$

[0081] 11. 소재 및 제품의 아미노산 함량 분석

[0082] 아미노산 분석은 Baum 등이 사용한 분석방법을 기본으로 하고 Park과 Oh의 분석방법을 약간 수정하여 사용하였

다. 복분자주박, 오디주박 200±5 mg, 베리식초 0.2 mL에 800 μL의 용매(methanol: chloroform: water=12:5:3)를 200 μL의 세포액 및 배양액 시료에 가하여 혼합 하였다. 혼합액을 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 10 min)하여 수용액 층인 상등액을 1차 회수하였고, 유기용매 층에 클로로포름과 물(1:2) 혼합액 600 μL을 가하여 혼합한 후 원심분리하여 상등액을 2차 회수하였다. 1, 2차 회수한 상등액을 합하여 혼합액을 동결건조 하였으며, 초순수로 용해하여 0.45 μm PVDF 막을 통과시켜 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. HPLC (Waters, USA) 분석을 위해 시료는 6-aminoquiolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbonate (AQC)로 유도체화 하였고, 3.9×150 mm AccQ· Tag™ (Nova-Pak™ C18, Waters) 칼럼으로 유도체들을 분리하였다. Column으로부터 유도체를 용출시키기 위하여 AccQTag Eluent A(Waters, USA)와 60% acetonitrile을 분당 1 mL의 유속으로 흘려주었다. 아미노산 함량은 표준 아미노산의 분석결과와 비교하여 산출하였다.

[0083] (11) 통계처리

[0084] 통계처리는 student's t-test로 하였으며, $p < 0.05$ 이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0085] <시험 결과>

[0086] 1. DPPH radical 소거능 측정 결과이다.(복분자주박(RJ), 오디주박(MJ), 베리식초(BV) 대조군(BHT))

[0087] DPPH radical 소거능에 사용되는 DPPH는 자색을 띠는 비교적 안정한 자유 라디칼로서 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 복분자 주박, 오디주박, 베리식초의 DPPH 라디칼 소거활성 결과는 다음과 같다(도 2). 양성대조군인 BHT는 농도별(1, 10, 100 μg/mL) 46.2 ~ 88.0 %의 범위를 나타내었으며, 복분자주박은 40.7 ~ 65.4 %, 오디주박은 34.8 ~ 61.7 %, 베리식초는 36.7 ~ 43.5 %의 범위였으며, 시료 중 복분자주박 100 μg/mL 첨가시에 65.4±2.7 %로 가장 높은 활성을 보였다. 베리식초는 농도에 따라 활성이 증가하였으나 그 차이가 크지는 않았다.

[0088] 2. 세포생존율 측정

[0089] HaCaT세포는 피부 재생, 미백과 관련된 실험에서 많이 사용되고 있는 인체유래 정상 피부각질세포주이다⁽⁹⁾. HaCaT 세포의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RJ, MJ, BV를 농도별로 처리하고, 24시간 배양한 후에 MTT assay 방법으로 세포의 생존율을 측정하였다(도 3). RJ는 10 μg/mL부터 50 μg/mL까지 약 90% 이상의 HaCaT 세포 생존율을 유지하였으며, 100 μg/mL의 농도에서는 HaCaT세포에 대해 미미한 세포독성을 나타냈다($p < 0.05$). 또한, MJ는 100 μg/mL 농도에서, BV는 50배 희석액에서 약간의 세포독성이 관찰되었으며($P < 0.001$), 10~50 μg/mL의 농도에서 MJ와 100~400배 희석한 BV에서 유의성이 관찰되었으나 세포 생존율이 90%이상으로 HaCaT 세포에 대해 독성을 나타내지 않는 것으로 관찰되었다. 따라서 이후에 진행된 실험에서는 10 μg/mL부터 50μg/mL까지의 RJ, MJ와 100~400배 희석한 BV를 사용하였다.

[0090] 3. 세포 내 Superoxide dismutase(SOD) 활성에 미치는 영향

[0091] SOD는 항산화 방어체계의 첫 번째 과정에서 독성이 강한 O_2^- 를 H_2O_2 로 전환시키는 과정을 촉매하는 효소이다⁽¹⁰⁾. UVB를 조사한 HaCaT 세포내 RJ, MJ, BV처리에 따른 Superoxide dismutase(SOD) 활성을 측정한 결과는 다음과 같다(도 4). RJ와 MJ 처리군은 10, 25 μg/mL의 농도에서, BJ 처리군은 200~400배 희석액에서 UVB를 조사한 대조군에 비하여 활성이 낮게 나타났으나 농도 의존적으로 활성이 증가하여 UVB조사에 의한 항산화 작용이 관찰되었다. SOD 활성은 으로 나타났고 RJ, BV, MJ 처리군 순서로 농도에 따라 증가하는 경향이 크게 나타났으며, 특히 MJ처리군에서 대조군에 비해 25.2% 증가하여 활성이 가장 증가하여 오디주박이 특히 항산화효능이 강한 것으로 나타났다.

[0092] 4. 세포 내 Catalase(CAT)의 활성 변화

[0093] Catalase(CAT)는 SOD로 인해 생성된 H_2O_2 를 물과 산소로 전환하는 작용을 촉매하는 역할을 한다⁽¹⁰⁾. UVB를 조사한 HaCaT 세포내 RJ, MJ, BV처리에 따른 Catalase(CAT) 활성을 측정한 결과는 다음과 같다(도 5). RJ, MJ처리군은 50 μg/mL에서 CAT 활성이 회복되었다. RJ, MJ와 BV처리군에서 Catalase의 활성이 농도 의존적으로 증가하였으며 특히, MJ처리군은 대조군에 비해 10 μg/mL에서 15.6%, 50 μg/mL 46.2%의 활성 증가를 보였다. 따라서 항산화 효소 활성이 회복되어 산화적 스트레스가 유발된 HaCaT 세포의 손상을 완화하는 것으로 확인된다.

[0094] 5. 세포 내 Xanthine oxidase(XOD)의 활성 변화

[0095] UVB를 조사한 HaCaT 세포내 RJ, MJ, BV처리에 따른 Xanthine oxidase 활성을 측정한 결과는 다음과 같다(도

6). RJ, MJ, BV에서 농도 의존적으로 XOD활성이 증가하였으며 MJ처리군에서 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 활성이 회복되었고, 특히 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 대조군에 비해 11.4% 증가하였다. RJ, BV처리군은 농도에 따라 활성이 증가하였으나 대조군에 비교해 볼 때 XOD 활성이 증가하지 않았다.

[0096] 6. 소재 및 제품의 아미노산 함량 분석

[0097] RJ, MJ, BV에 존재하는 아미노산 조성을 분석한 결과는 표 9에 나타난 바와 같이, 총 아미노산 함량은 MJ가 179.6 mg/100 g으로 가장 높았고, 그 다음이 BV(87.4 mg/100 g), RJ(35.6 mg/100 g) 순으로 나타났다.

[0098] RJ은 lysine (9.8 mg/100 g) > Tyrosine (7.6 mg/100 g) > Asparagine (4.7 mg/100 g)의 순이었으며, MJ은 Asparagine 함량이 70.7 mg/100 g으로 가장 높았으며, lysine (22.7 mg/100 g) > phenylalanine (19.4 mg/100 g) 순으로, RJ이나 BV에 비해 높은 아미노산 함량을 나타내었다.

[0099] BV는 Asparagine 함량이 37.9 mg/100 g으로 가장 높았으며, phenylalanine (8.9 mg/100 g) > lysine (5.6 mg/100 g) 순으로 분석되었다.

표 9

[0100] Amino acid composition of RJ, MJ, BV

Amino acids	Concentration (mg / 100g)		
	RJ	MJ	BV
Asparagine	4.7	70.7	37.9
Serine	0.6	13.5	1.3
Glutamine	0.6	5.0	5.1
Lysine	9.8	22.7	5.6
Glycine	0.5	3.3	4.4
Cystine	1.4	1.8	1.3
Histidine	1.3	4.8	3.8
Threonine	1.5	3.9	2.7
Arginine	2.5	0.9	2.6
Alanine	1.1	1.6	1.4
Proline	0.3	0.6	0.0
Tyrosine	7.6	4.3	2.9
Valine	0.0	4.7	0.8
Methionine	0.0	1.4	1.8
Isoleucine	0.0	1.1	1.5
Leucine	0.8	3.7	1.8
Phenylalanine	2.6	19.4	8.9
GABA	0.3	4.8	1.9
Ornithine	0.0	2.4	1.7
Total amino acids	35.6	170.6	87.4

[0101] <결론>

[0102] 1. RJ, MJ에서 DPPH 라디칼 소거능은 유의적으로 증가하였고 BV는 농도간 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

[0103] 2. RJ, MJ는 10~50 $\mu\text{g/mL}$, BV는 400, 200(dilution factor) 농도에서 세포 생존율이 85% 이상으로 세포독성을 나타내지 않았다.

[0104] 3. UVB를 조사한 HaCaT 세포 내 SOD활성은 MJ처리군에서 가장 높은 효소활성이 나타났다.

[0105] 4. UVB를 조사한 HaCaT 세포 내 Catalase함량은 MJ와 RJ순으로 활성이 높게 나타났으며 MJ 처리군은 대조군에 비해 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 46.2%의 활성 증가를 보인다.

[0106] 5. UVB를 조사한 HaCaT 세포 내 XOD 함량은 MJ의 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군에 비해 11.4% 증가하였고 RJ, BV는 별다른 영향을 보이지 않는다.

[0107] 6. 총 아미노산 함량은 MJ (179.6 mg/100 g), BV (87.4 mg/100 g), RJ (35.6 mg/100 g) 순으로 높게 나타났으며 MJ에서 Asparagine함량이 특히 높게 검출된다.

[0108] RJ, MJ, BV가 가지는 항산화 효과를 알아보기 위해 UVB를 조사하여 HaCaT 피부 각질세포주에서 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 피부 각질세포 보호효과를 조사하였다. RJ, MJ, BV에서 총 아미노산 함량을 분석한 결과 MJ와 RJ에서 Asparagine과 phenylalanin 등의 함량이 높게 나타났고, DPPH free radical 소거능은 RJ와 MJ에서 농도의존적으로 증가하였고 HaCaT 세포를 이용한 세포내 항산화효소 활성에서는 MJ와 RJ순으로 높은 효소활성을 나타내어 세포 지질과산화물질(MDA)의 생성을 억제하여 세포내 항산화효소의 활성을 증가시키는 효과를 가지는 것으로 보인다. 이상의 결과에서 오디주박 및 복분자주박에서 인체 피부각질 세포인 HaCaT세포에 대한 보호 작용과 항산화 능력이 있는 것으로 관찰되었다.

산업상 이용가능성

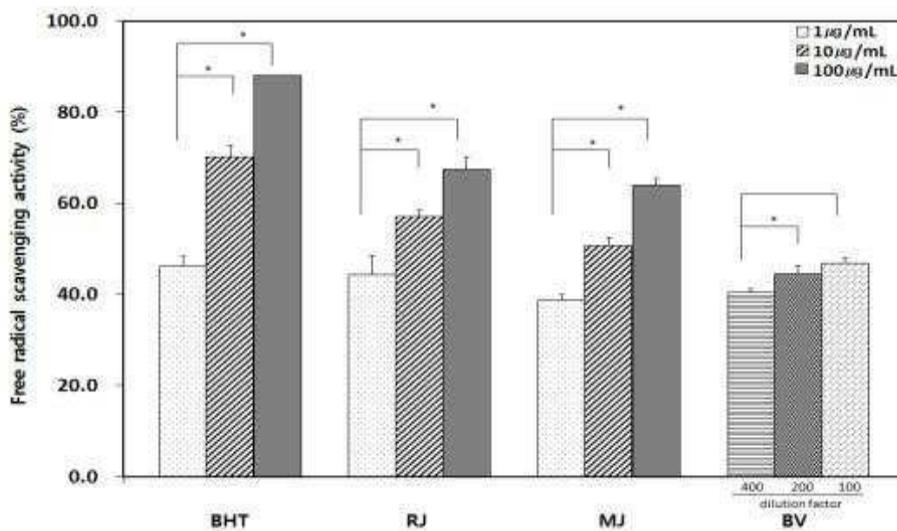
[0109] 본 발명의 주정발효부산물을 이용한 식초 및 식초 음료는 무기질, 유기산, 비타민 C, 폴리페놀, 플라보노이드 등이 다량 함유되어 있어 면역증진효과, 항산화 및 항균효과 등 다양한 생리활성물질이 함유되어 있다. 따라서 산업상 이용가능성이 있다.

도면

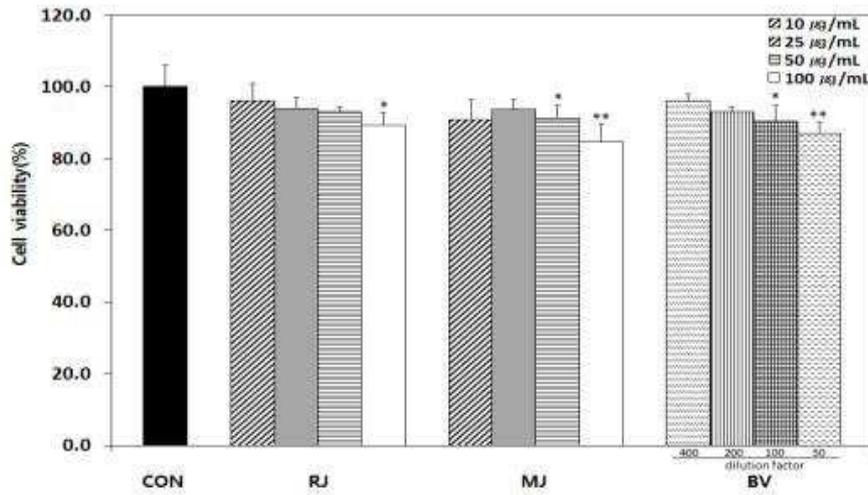
도면1



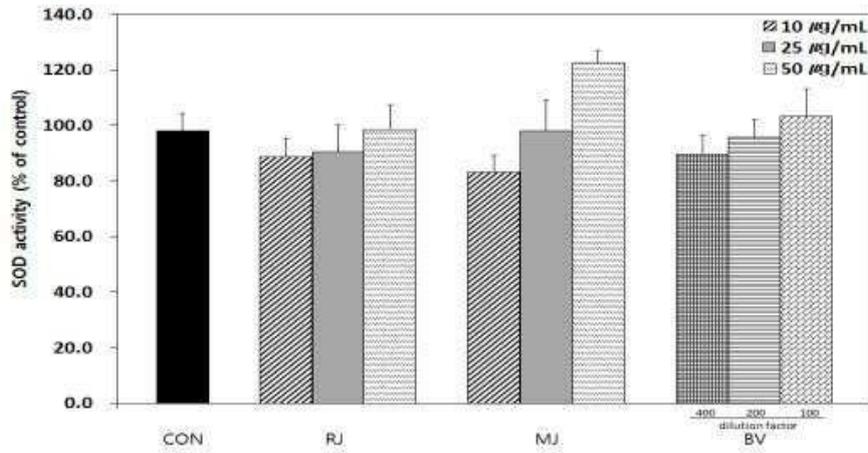
도면2



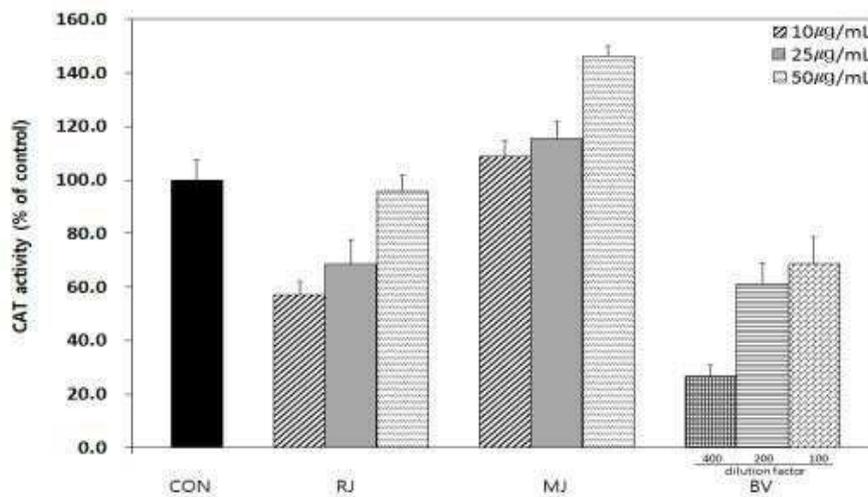
도면3



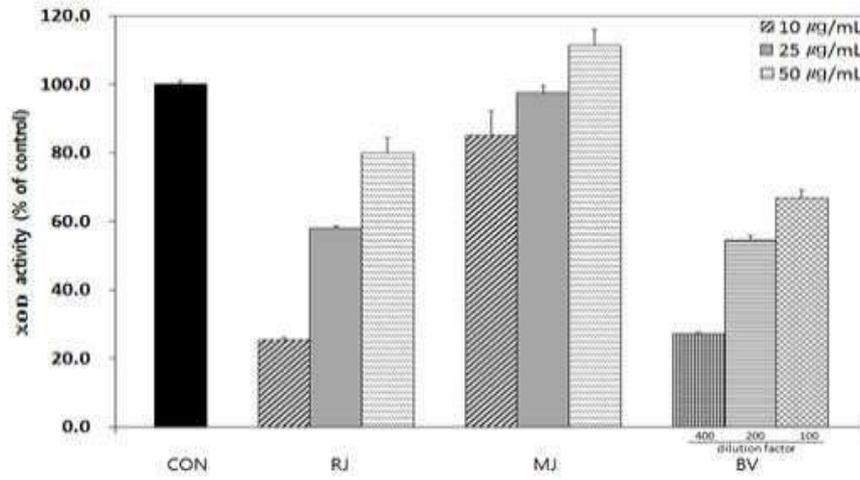
도면4



도면5



도면6



도면7

