

119117
-01

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003416-01

국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및
가공기술 등 공통 애로사항 해결 과제

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 애로사항 해결 과제

2021. 02. 26.

주관연구기관 / (재)순천천연물의약소재개발연구센터

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 애로사항 해결 과제” (개발기간 : 2019 . 12 . 02. ~ 2020 . 12 . 01.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021 . 02 . 26.

주관연구기관명 : (재)순천천연물의약소재개발연구센터 (대표자) 허 석



참여기관명 : (주)호성농업회사법인 (대표자) 홍기풍



(주)힘찬걸음 (대표자) 김병현



농업회사법인(주)생생초 (대표자) 권승혁



주관연구책임자 : 박 경 옥

참여기관책임자 : 홍 기 풍

참여기관책임자 : 김 병 현

참여기관책임자 : 권 승 혁

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	119117-01	해 당 단 계 연구 기 간	2019-12-02 ~ 2020-12-01	단 계 구 분	1단계/1단계
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	2019년도 고부가가치 기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 애로사항 해결 과제			
연구 책임 자	박경욱	해당단계 참여연구원 수	총: 17명 내부: 9명 외부: 8명	해당단계 연구개발비	정부:150,000천원 민간: 50,000천원 계:200,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17명 내부: 9명 외부: 8명	총 연구개발비	정부:150,000천원 민간: 50,000천원 계:200,000천원
연구기관명 및 소속 부서 명	(재)순천천연물의약소재개발연구센터 연구개발실			참여기업명 (주)호성농업회사법인 (주)힘찬결음 농업회사법인(주)생생초	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	n	2	1	n	n	n	n	n	n	n	n

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

- 아로니아의 발효를 통한 표준화 소재 개발 및 기능성 확보 (특허 출원)
 - 발효 공정 표준화를 통한 산업화 기반 마련
 - 발효 정제물 생산 기술 확보
 - 아로니아의 지표물질 표준화 분석법 개발
 - 개발 소재의 표준화 분석법 개발을 통한 신뢰성 확보 (유기산, 페놀릭 화합물)
 - 아로니아 발효원액과 발효 정제물에 대한 항염증활성 검증
 - 개발 소재의 항염증에 관련한 활성 검증을 통한 기능적 측면 확보
- 아로니아 발효 정제물의 및 발효액등의 개발 소재를 이용한 식품 조성물 및 제형 개발
 - 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 식품 제조 공정 및 품질관리기준 설정
 - 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 시제품 생산
 - 상품화 가능한 제품화 5건 진행 (아로니아와인, 아로니아식초, 아로니아엑사 음료, 아로니아고상젤리, 아로니아 농축액)
 - 기술이전 5건 진행(전용실시권 1건 : 10,000천원, 통상실시권 4건)

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>◆ 본 연구과제의 목적은 아로니아를 이용한 천연 발효를 통한 생성되는 정제물에 대한 지표물질 분석을 통한 소재의 표준화 분석법을 개발하고 항염증에 도움을 주는 소재를 활용한 제품을 개발하고자 함</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 아로니아의 발효 공정 및 발효 정제물 제조공정 확립 2. 아로니아의 지표물질 표준화 분석법 개발 3. 아로니아 발효원액과 발효 정제물에 대한 항염증활성 검증 4. 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 식품 조성물 및 제형 개발 5. 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 식품 제조 공정 및 품질관리 기준 설정 6. 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 시제품 생산 				
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 아로니아 효모 발효 와인 제조 기술 방법 2. 아로니아 초산 발효 식초 제조 기술 및 항염증 효능 조성물 3. 아로니아 천연 발효 부산물을 이용한 액상 음료 제조 방법 4. 아로니아 천연 발효 부산물을 이용한 고상 제품 제조 방법 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활용계획 <ol style="list-style-type: none"> 1. 효모발효를 통한 아로니아와인 소재 개발 가능 2. 초산발효를 통한 아로니아식초 소재 개발 가능 3. 초산발효를 통한 생성되는 아로니아 정제물의 정제 공정을 통한 의약 소재 개발 가능 4. 아로니아 발효 정제물의 지표물질 표준화를 통한 바이오헬스케어 소재 산업화 가능 5. 아로니아 발효 정제물의 고 기능성 화장품 소재 또는 건강기능식품 소재로 활용 가능 ○ 기대효과 <ol style="list-style-type: none"> 1. 잉여의 국내산 아로니아 재배 농가의 안정적 판로 개척 확보 효과 2. 발효 기술을 통한 아로니아 열매의 저장성 문제점 해결 효과 3. 아로니아 식품소재 산업화 3종 이상 개발 효과 4. 국내산 아로니아의 발효 공정 발생하는 부산물에 대한 산업화 활용 효과 5. 바이오헬스케어소재의 국내외 기술인증 확보 효과 6. 먹고 바르는 슬리밍 케어 신개념 제품의 차별성화하여 국내외 수익 사업 활용 효과 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	아로니아	효모발효	초산발효	안토시아닌	항염증
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Aronia	Yeast fermentation	Acetic acid fermentation	Anthocyanin	Anti-inflammatory

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	5
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	121
4. 연구결과의 활용 계획 등	131
붙임. 참고 문헌	133

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

<본문작성 양식>

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가. 본 연구과제의 최종 목표는 아로니아를 이용한 효모 및 초산 발효 과정의 변화를 측정하여 최적 발효 조건을 확립하고 이때 발생하는 대사산물의 측정방법을 설정하고자 함. 또한 초산 발효 정제물에 대한 지표물질 표준화 분석법을 개발하고 항염증 활성기능이 검증된 소재를 이용하여 소비자가 편하고 쉽게 휴대하면서 먹을 수 있는 액상 및 분말 스틱 시제품을 개발하고자 함

1-2. 연구개발의 필요성

가. 아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 북부 아메리카 지역에서 자생하는 장미과(Rosaceae)에 속하는 베리류의 열매로, 블랙초크베리(Black chokeberry)라고도 불림. 아로니아는 안토시아닌이라는 강력한 항산화물질과 다양한 플라보노이드를 함유하고 있어 미국과 유럽 등에서 이를 활용한 제품 개발이 활발하게 이루어짐

나. 동유럽과 러시아, 덴마크에서는 주로 주스와 와인으로 소비되고 있으며, 현재 아로니아를 가장 많이 생산하는 국가는 폴란드로 생산량의 90%를 주스로 가공해 미국을 비롯한 여러 나라에 수출하고 있음

다. 국내 아로니아 시장 규모는 약 1,000 억원으로 추정되며, 국내 아로니아 가공제품은 폴란드, 독일 등 아로니아 농축액(65 Brix)을 수입하고 있으며 가격은 국내산과 약 3배 정도 차이가 있어 대부분 국내 아로니아 제품으로 판매되고 있는 원료는 수입에 의존하고 있어 연간 2,000 톤 이상의 농축액이 수입되고 있음



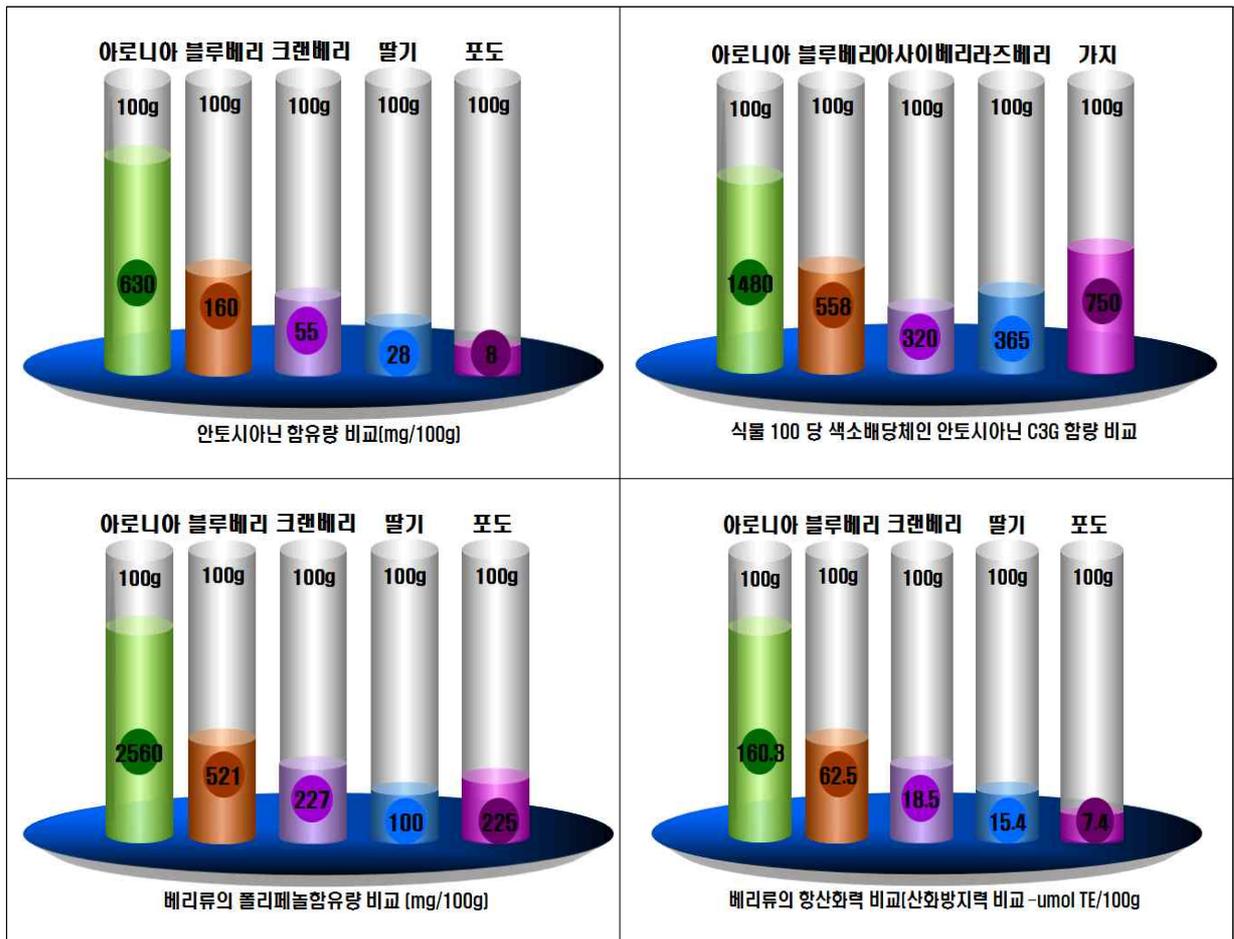
○ 국내외 아로니아 특허등록 현황

구분	가공기술	재배기술	식품	의약	화장료	계
한국	26	2	14	3	5	27
일본	2	1	4	4	-	11
미국	1	-	9	9	-	19
유럽	-	1	2	4	-	7

라. 아로니아 주요 기능 물질

(1) 서구화 식생활 문화로 식문화가 바뀌면서 혈관계 질환으로 많은 질병이 증가하고 있는 현재 아로니아 또는 초크베리는 불리우는 북아메리카 열매는 유럽에서 심혈관질환 예방을 위한 정부시책 사업으로 폴란드는 아로니아 재배를 권장하고 있으며, 항산화 효능이 뛰어난 타임지 10대 슈퍼푸드에 전세계적으로 인기 있는 식품으로 알려짐

마. 아로니아의 일반성분은 수분 84.36%, 단백질 0.7%, 지질 0.14%, 탄수화물 14.37%, 회분 0.44%를 함유하고 있으며, 각종 항산화 활성의 지표가 되는 안토시아닌, 탄닌, 클로로제닌산, 네오크로로제닌산 등이 함유되어 있어 항산화능이 매우 우수한 것으로 보고됨. 특히, 베리류의 안토시아닌 함량을 비교했을 때 블루베리의 약 5배, 복분자, 클랜베리의 20~40배, 포도의 80~100배, 바나나의 1,000~2,000배로 안토시아닌을 많이 함유하고 있음



바. 또한 Cyanidin-3-Oxyloside, 에피카테킨, 에피갈로카테킨 등 탄닌 및 카테킨류 성분을 녹차의 10배 이상 함유하고 있어 짙은 맛이 매우 강하고, 카테킨류 성분들이 생명체의 방어 기능 및 해독기능을 가지고 있어 세균 감염에 쉽게 노출되지 않음

사. 아로니아 생산 및 수입 현황

- (1) 농림축산식품부 자료에 따르면 2013년 국내 아로니아 생산량은 117톤이었으나, 매년 2,000톤 가량씩 늘어나 2017년 8,779톤으로 약 75배 정도 생산량이 증가
- (2) 한-EU FTA 협정으로 인한 폴란드산 아로니아 분말, 주스, 농축액 등 다양한 제품이 별도로 수입되고 있는 실정



한-EU FTA 타결 아로니아 동결 분말 및 농축액 수입 급증
 ↓
 국내산 아로니아의 가격 하락에 의한 농가 수확 포기

연도별 아로니아 생산 및 수입현황 (단위: ha, 톤)

	2013	2014	2015	2016	2017	비고
분말수입 (생과환산량)	0(0)	2(32)	200(3,160)	420(6,636)	520(8,216)	
가격	-	5,650	6,623	4,555	4,054	
국내재배면적 (생과생산량)	151(117)	548(1,198)	1,017(3,623)	1,436(6,481)	1,831(8,779)	

자료출처 : 농림축산식품부, 농림축산검역본부

- 1. 가격 5,048원보다 미만인 4,054원은 지급기준에 해당
- 2. 총 수입량은 3개년 평균 수입량 207톤보다 520톤은 지급기준에 해당

(3) 아로니아 과일 생산과 수입으로 인한 문제점 해결 방안 필요

- (가) 차별화된 기능 소재 개발
- (나) 우리나라의 발효 기술을 이용한 소재 개발
- (다) 차별화된 소재를 이용한 시장 트렌드 맞춤형 소비자 선호 제품 개발

아. 안토시아닌은 착색료로서 식품 및 음료에서 폭넓게 사용되고 있으며, 항산화 작용, 항염증 작용 등 의 건강 작용이 주목 받고 있음. 시장은 소비자의 건강 의식 고양, 건강식품 수요에 의해서 촉진되고 있으며, 세계의 안토시아닌 시장은 2017년에 2억 9,500만 달러에 달했으며, 2017-2022년 예측기간 중 4.7%의 연평균 성장률(CAGR)로 성장할 전망이다

자. 식품용 색소의 세계시장은 10억 2,100만 유로를 넘어서는 것으로 추정되고 있으며, 천연색소는 매년 4~5%의 성장을 보이는 것으로 추정되고 있음. 이는 합성색소의 2% 정도의 성장률에 비해 2배 이상되는 것임. 시장점유율을 살펴보면 타르계 41%, 천연계 28%, 천연품과 같은 구조를 갖는 합성품 20%, 캐러멜 11%를 차지함

차. 국내 착색제 시장은 약 100억원 규모로서 천연색소보다 합성색소가 더 많이 사용되고 있는 실정이지만, 천연색소 사용량의 급증은 두드러지고 있음

카. 협동기관의 자체 선행 연구 개발 기술을 이용한 문제점 해결 방안

- 주관기관 (재)순천천연물의약소재개발연구센터는 2017년도 자체 연구개발사업을 통해 아로니아 착즙 농축액을 희석하고 배농축액을 보당으로 이용한 발효 관련 기술을 보유하고 있으나, 아로니아 100% 발효 기술은 본 연구과제를 통해 문제점을 보완할 필요가 있음

국내산 아로니아의 시장 경쟁력 문제점

1. 제품 가격 경쟁력 약화(국내산 제품보다 수입산 제품의 가격이 3~5배 저렴함)
2. 가공기술의 단조로움(1차 가공품 착즙 및 분말 주스 등 한정됨)
3. 베리류 중 맛이 없음(탄닌 성분이 많아 떫은 맛이 강함)

국내산 아로니아의 기술적 문제점

1. 제품의 안전성 확보가 어려움(재배 농가 직접 1차 가공기술의 단조로움)
2. 원료의 표준화가 어려움(지역별 성분의 변화와 당도 및 크기의 차이를 보임)
3. 소재의 지표물질 및 유용성분에 대한 표준화 분석이 되어 있지 않음
4. 바이오헬스케어소재 개발관련 효능평가가 전문한 실정임
5. 의약품, 식품, 화장품 등 다양한 분야의 소재 개발이 되어 있지 않음
6. 새로운 재형과 유형의 제품 개발이 되어 있지 않음



1-3. 연구개발 범위

가. 아로니아의 발효 공정 및 발효 정제물 제조공정 확립

- (1) 알코올 함량 8-10%이상, 총산 함량 5%이상

나. 아로니아의 유용성분 표준화 분석법 확립

- (1) 폴리페놀 함량 mg/100g, 탄닌함량 mg/100g, 안토시아닌함량 13.64 mg/100g, 플라보노이드 함량 mg/100g

다. 아로니아 발효액과 아로니아 정제물에 대한 항염증 활성 검증

- (1) 대식세포주 (RAW264.7) 에 대한 세포독성
 - (가) 발효원액 500 ug/mL, 발효 정제물에 대한 희석비율 1,000 v/v 독성유무 확인
 - (나) 발효원액 + DMSO 500 ug/mL, 발효 정제물 + DMSO 1,000v/v에 대한 독성 유무 확인

- (2) 대식세포주 (RAW264.7) 의 NO inhibition 양 측정

(가) 0.8 μ M에서부터 100 μ M의 Nitric Oxide 농도에서 아로니아 발효액과 정제물 처리시 positive control (LPS) 군에 비해 약 70% 미만 억제율을 나타낼 것으로 예상됨

(3) 대식세포주 (RAW264.7)의 사이토카인 (Cytokine) 생성량 측정

(가) 1 μ g/ml 미만 Cytokine (IL-6, TNF- α , GM-CSF, IL-1 β) 농도에서 아로니아 발효액과 정제물 처리시 positive control (LPS) 군에 비해 약 70% 미만 억제율을 나타낼 것으로 예상됨

(4) 대식세포주 (RAW264.7)에서 iNOS, COX-2 발현 억제율 측정

(가) iNOS/ β -actin, COX-2/ β -actin 로 환산하였을 때 아로니아 발효액과 정제물 처리시 positive control (LPS) 군에 비해 약 70% 미만 억제율을 나타낼 것으로 예상됨

(5) 대식세포주 (RAW264.7)에서 MARKs 신호전달경로와 관련된 단백질 발현량 측정

(가) MARKs 신호전달경로와 관련된 단백질 (JNK, ERK, p38)/ β -actin 로 환산하였을 때 아로니아 발효액과 정제물 처리시 positive control (LPS) 군에 비해 약 70% 미만 증가율을 나타낼 것으로 예상됨

라. 아로니아의 발효 정제물을 이용한 식품 조성물 및 제형 개발

(1) 아로니아 발효 정제물에 대한 항염증 활성 효과를 가지면서 첨가 조성물 또한 천연물 소재로서의 항염증에 도움을 주는 소재를 첨가하여 조성물 조건을 확립하고자 함. 또한 아로니아 발효 정제물의 제형으로는 액상과 분말 소재로 개발하여 다양한 바이오헬스케어소재로서의 활용 범위를 높이고자 함

마. 아로니아의 발효 정제물의 대량 생산 공정 확립

(1) 최적 Lab 발효 조건에 대한 발효탱크를 이용한 대량 발효 배양 공정을 확립하고 초산 발효 공정에서 생성된 정제물의 산업적 분리 방법을 확립하고자 함

바. 아로니아의 발효 정제물을 이용한 시제품 생산

(1) 아로니아 발효 정제물의 표준화 물질 안토시아닌 함량 20% 상향된 소재를 이용한 액상, 분말 스틱 시제품 개발 및 상품화

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 아로니아 원료 표준화 및 소재 개발 공정 확립

가. 아로니아의 전처리 공정

- (1) 아로니아 수확 후 4℃에서 약 7일간 냉동보관한 후 아로니아를 버블 세척하고 이물질을 제거함. 또한 나무 가지를 분리한 후 아로니아 열매 자체를 파쇄하여 파쇄물을 제조함

나. 아로니아 원료의 일반성분 및 유효성분 분석

- (1) 아로니아 원물에 대한 일반성분을 알아보기 위해 수분, 조단백, 조지방, 조회분, pH, 산도, 무기질 성분을 공인시험기관을 통해 분석하고자 함. 또한 유효성분으로 폴리페놀 함량, 플라보노이드함량, 축합형 탄닌함량, 안토시아닌 함량을 분석하고자 함
- (2) 아로니아 원물의 시험·검사 결과 유기산의 경우 구연산, 젖산, 초산, 주석산, 옥살산, 호박산은 불검출로 나타났으며 사과산 9.10 mg/g, 개미산 1.84 mg/g으로 나타남. 영양성분의 경우 당류 32.33 mg/g, 수분 84.03%, 조단백질 0.80%, 조지방 0.57%, 조회분 0.28%, 조섬유 1.96%로 나타났고 루테인은 불검출로 나타남. 중금속의 경우 납 0.0125 mg/kg, 비소 0.0023 mg/kg, 카드뮴 0.0290 mg/kg으로 매우 미비하게 검출되었으며 수은과 타르색소는 불검출로 나타남. 미생물의 경우 세균수 260000/g으로 나타났으나 대장균, 대장균군, 황색포도상구균은 음성으로 나타남.

제 D2020112933 호 분석확인 D691-C819-6933			
시험·검사성적서			
제품명	아로니아원물	제조일자 (통용기준)	2020-09-02
업체명	제단법인순천원향유미연구소(제단법인구본외)	상 명	희석
주 소	전라남도 순천시 중랑로 255(석원동)	검사항목	일반성분
제조번호		검사일자	2020-11-25
입사희석회차	유교용	검사번호	1930M011993
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사를 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 완료일: 2020-12-15 시험·검사 책임자: 가희현, 이경구, 이원영, 정정은 검사관련 총 책임자: 김진희</p>			
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사항목	
사과산(mg/g)	9.10 mg/g	검출된	
구연산(mg/g)	불검출	검출된	
젖산(mg/g)	불검출	검출된	
초산(mg/g)	불검출	검출된	
주석산(mg/g)	불검출	검출된	
개미산(mg/g)	1.84 mg/g	검출된	
옥살산(mg/g)	불검출	검출된	
호박산(mg/g)	불검출	검출된	
당류(과당,포도당,자당,핵사당,유당)(mg/g)	32.33 mg/g	백검출	
루테인(mg/g)	불검출	검출된	
수분(%)	84.03 %	준제인	
조단백질(%)	0.80 %	미지인	
조지방(%)	0.57 %	장제인	
조회분(%)	0.28 %	준제인	
조섬유(%)	1.96 %	미지인	
납(mg/kg)	0.0125 mg/kg	정다운	
비소(mg/kg)	0.0023 mg/kg	정다운	
카드뮴(mg/kg)	0.0290 mg/kg	정다운	
타르색소	불검출	장제인	

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사항목
대장균	음성	장제인
대장균군	음성	장제인
황색포도상구균	음성	장제인
세균수(/g)	260 000 /g	장제인

분석법-[루테인] 건열기능식품분석(아로니아)분류기준

2020년 12월 15일

한국기농식품연구원

(사)한국기농식품연구원 (주)한국기농식품연구원 http://www.khri.re.kr 전화번호: 010-331628-0400-1



다. 아로니아 착즙액 및 농축액 제조 공정 확립

- (1) 아로니아 안토시아닌 추출조건 및 추출, 농축액제조공정 확립

(가) 아로니아 추출을 위한 전처리

① 아로니아 원과를 선별하여 세척 후 20 g으로 정량함. 정량한 아로니아 원과는 과육, 씨앗, 껍질을 포함하여 파쇄함. 추출용매는 주정 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%를 사용하며 아로니아 원과 대비 10배 수로 정용함. 추출은 24℃에서 24시간 동안 교반추출을 진행하며 추출 후 Polypropylene filter를 이용하여 추출액을 여과함

- 추출용매 : Fermentation Ethanol 10~100%
- 추출방법 : Incubator 교반 추출, rpm 140
- 추출온도 : 24℃
- 추출시간 : 24 시간
- 추출 후 여과 : 45X50(cm) Polypropylene filter

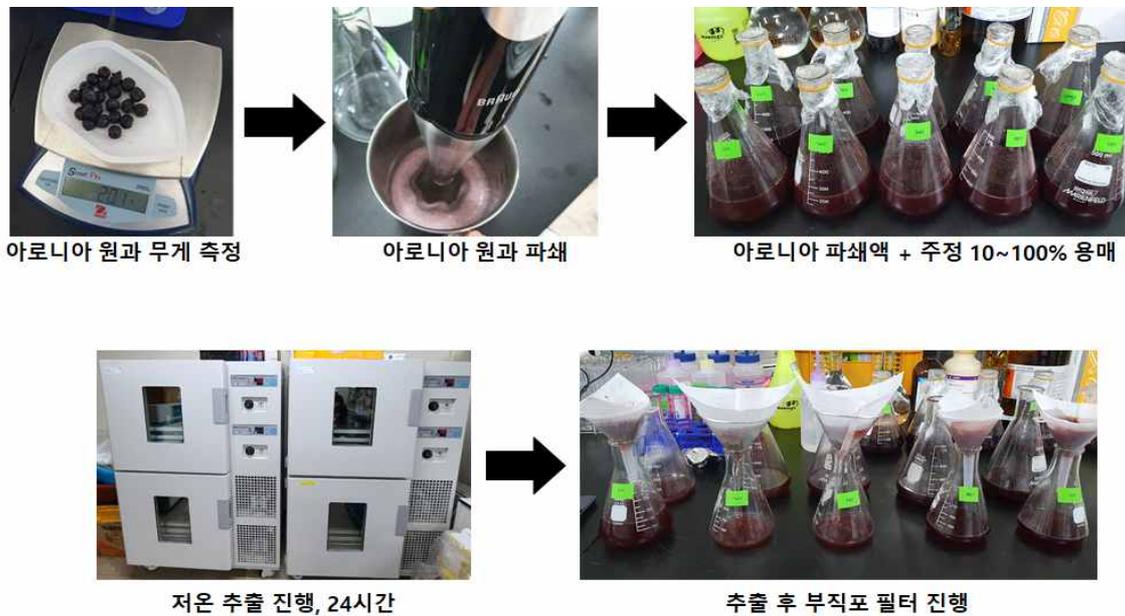
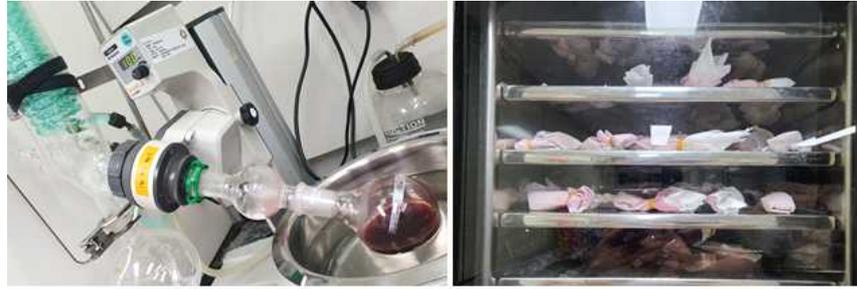


그림 1. 안토시아닌 함량측정을 위한 아로니아 전처리 과정

(나) 동결건조

① 여과 후 농축이 완료된 아로니아 추출물은 -81℃ Deep freezer에 선 동결 후 동결건조를 진행함. -125℃의 Vacuum trap을 통하여 15℃에서 24시간 후 완전히 진공상태로 만든 다음, 기압이 최저로 떨어진 상태에서 추가로 48시간 동안 동결건조를 진행하여 분말 제형으로 제조함. 이 후 분말 제형은 진공 포장하여 보관함



아로니아 추출 여과액 농축, 동결건조 진행

그림 2. 안토시아닌 함량측정을 위한 시료전처리

(다) 아로니아의 대량 착즙 및 농축액 제조 공정도

- ① 아로니아 1차 선별한 다음 버블 세척하고 껍질과 아로니아즙을 스크루 착즙기를 이용하여 분리한 후 그 착즙액을 냉동 -4℃에서 보관함
- ② 아로니아 착즙액은 95℃에서 45분간 정도 살균 후 0.5 μm 여과 필터한 다음 농축기를 이용하여 최종 아로니아 착즙 농축액 60Brix 제조하고자 함



그림 3. 아로니아 대형 농축액 제조 공정 및 제조 과정

(2) 아로니아 추출물에 대한 안토시아닌 함량 분석

(가) Total Anthocyanin content

- ① 총 안토시아닌 함량은 측정을 위해 1% HCl을 첨가한 Ethanol을 넣어 15분간 sonication 하여 안토시아닌을 추출하며, 4000 rpm에서 10 분간 원심분리를 진행하여 얻어진 상층 액을 실험에 사용함. 시료를 실험 농도에 맞춰 희석한 뒤, 0.025 M Potassium Chloride buffer (pH 1.0) 과 0.4 M Sodium acetate buffer (pH 4.5)를 혼합한 후 15 분 동안 반응

시키고 510, 700 nm 흡광도에서 측정함. 표준물질은 최고흡광도 확인 후 측정 시 안토시아닌 램다맥스 값을 적용함.

$$\text{Total anthocyanin content(mg/gram)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / \delta \times V$$

$$A (\text{Absorbance}) = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 1.0}} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 4.5}}$$

$$MW (\text{Molecular weight of cyanidine-3-glucoside}) = 322.17$$

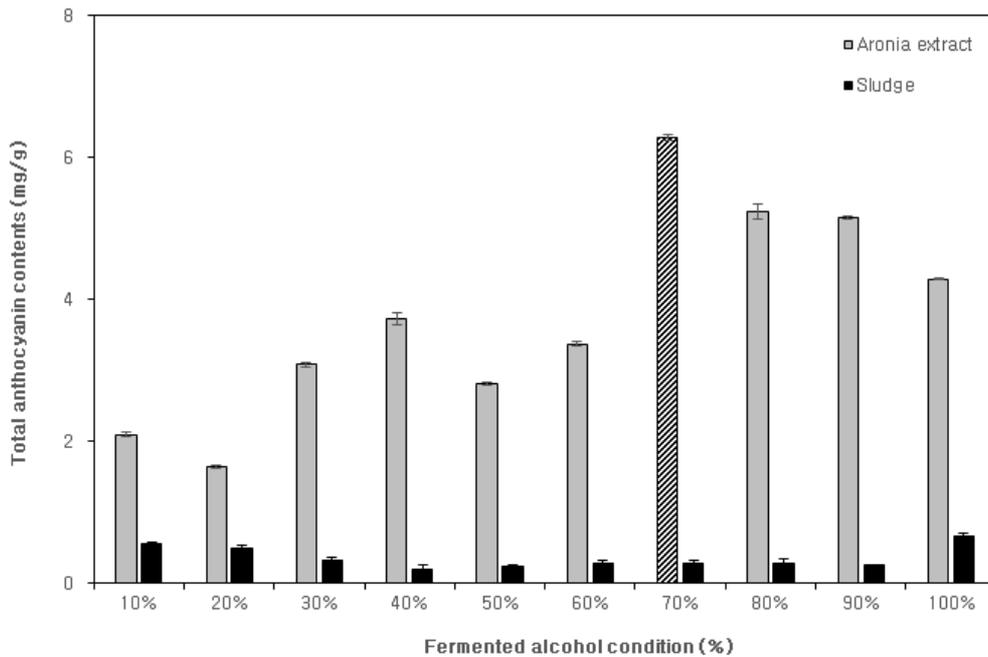
DF: Dilution factor

$$\epsilon (\text{cyanidin chloride molar absorbance}) = 24,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

V = final volume of sample

(나) Total Anthocyanin content 결과

- ① 총 안토시아닌 함량은 최고 흡광도 확인 후 측정 시 안토시아닌 램다맥스 값을 적용함. 10%-100% 주정 추출물의 안토시아닌 함량 측정을 비교한 결과, 70% 주정 추출물에서 안토시아닌 함량이 가장 높게 나타났으며, 슬러지의 안토시아닌 함량 측정 결과와 비교했을 때에도 70% 주정 추출물의 함량이 낮은 측에 속한 것으로 보아 용출도가 가장 높은 것을 확인함 (그림 4)



Concentration (1000µg/mL)	Total Anthocyanin Content (CE ^a mg/gram)		
	여액	슬러지	여액+슬러지
10%	2.095±0.03	0.559±0.02	2.654
20%	1.641±0.02	0.489±0.04	2.130
30%	3.082±0.04	0.332±0.03	3.414
40%	3.728±0.08	0.201±0.05	3.929
50%	2.811±0.02	0.236±0.03	3.047
60%	3.370±0.03	0.288±0.03	3.658
70%	6.286±0.05	0.271±0.06	6.557
80%	5.247±0.11	0.279±0.05	5.527
90%	5.160±0.03	0.253±0.02	5.413
100%	4.287±0.02	0.672±0.04	4.959

^a = Values are expressed as mg Cyanidin chloride equivalents per gram of sample (CE) (n=3)

그림 4. 아로니아 주정 추출물의 총 안토시아닌 함량

(3) 아로니아 추출, 농축액에 대한 성분 분석 결과

(가) 아로니아원물의 시험·검사 결과 유기산의 경우 구연산, 초산, 주석산, 옥살산은 불검출로 나타났으며 사과산 44.26 mg/g, 젖산 2.05 mg/g, 개미산 1.84 mg/g, 호박산 6.26 mg/g으로 나타남. 영양성분의 경우 당류 67.91 mg/g, 수분 83.40%, 조단백질 0.34%, 조지방 0.38%, 조회분 0.48%, 조섬유 0.14%로 나타났고 루테인은 불검출로 나타남. 중금속의 경우 납 0.0159 mg/kg, 비소 0.0024 mg/kg, 카드뮴 0.0178 mg/kg, 수은 0.0001 mg/kg으로 매우 미비하게 검출되었으며 타르색소는 불검출로 나타남. 미생물의 경우 세균수 2200 /g으로 나타났으나 대장균, 대장균군, 황색포도상구균은 음성으로 나타남.

(나) 아로니아농축액(열매)의 시험·검사 결과 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 어두운 자주색의 액상이며 중금속의 경우 비소 0.0022 mg/kg, 납 0.0281 mg/kg, 수은 0.0038 mg/kg, 카드뮴 0.0060 mg/kg로 미비하게 나타났으며 타르색소는 불검출로 나타남. 미생물의 경우 세균수, 대장균, 대장균군 모두 음성으로 나타남

제 D2020112934 호
분서확인 9LSC-1179-5000

시험·검사성적서

제품명	아르니아추출액	제조일자 (유통기한)	2020-07-21
의뢰인	업적명: 계단법인순천원통리약소계열법인연구센터 주소: 전라남도 순천시 중앙로 255(서원동)	성명	최익
제조번호		검수년월일	2020-11-25
검사의뢰유치	참고용	검수번호	D333212534

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 번호일: 2020-12-15
 시험·검사 책임자: 기미원, 이경구, 이현영, 장정순
 검사관련 총 책임자: 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
사과산(mg/g)	44.26 mg/g	장동희
구연산(mg/g)	불검출	장동희
포산(mg/g)	2.05 mg/g	장동희
공산(mg/g)	불검출	장동희
주석산(mg/g)	불검출	장동희
카미산(mg/g)	11.51 mg/g	장동희
옥살산(mg/g)	불검출	장동희
포아산(mg/g)	6.26 mg/g	장동희
당분(과당,포도당,치당,액아당,유당)(mg/g)	87.91 mg/g	박유진
통채인(mg/g)	불검출	김정숙
수분(%)	83.40 %	윤재민
조단백질(%)	0.34 %	이지연
포시알(%)	0.38 %	장재민
조지방(%)	0.48 %	윤재민
조섬유(%)	0.14 %	이지연
납(mg/kg)	0.0159 mg/kg	정다운
비소(mg/kg)	0.0024 mg/kg	정다운
수은(mg/kg)	0.0021 mg/kg	박정연
카드뮴(mg/kg)	0.0178 mg/kg	정다운
티오세소	불검출	장대원

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
대장균	음성	장지민
대장균군	음성	장지민
황세로도상구균	음성	장지민
세균수(CFU)	2200 /g	장지민

분서확인-1추대인] 건강기능식품군원/아리굴드분추출물

※ 위 결과는 의뢰한 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 본 성적서는 광고용 성격이 없습니다. 시험·검사결과에 시험·검사항목 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자기용량검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용될 수 없습니다.
 ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정에 준하여 발급합니다.
 ※ 시험이 부족한 경우 시험·검사 및 결과받은 별지로 작성 가능합니다.

2020년 12월 15일

한국기농식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기농식품연구원 <http://www.khsl.or.kr> 전화번호 031-3628-0400-1



제 D2020092326 호
분서확인 539-3896-1D46

시험·검사성적서

제품명	아르니아농축액(열매)	제조일자 (유통기한)	2020-09-20
의뢰인	업적명: 계단법인순천원통리약소계열법인연구센터 주소: 전라남도 순천시 중앙로 255(서원동)	성명	최익
제조번호		검수년월일	2020-09-26
검사의뢰유치	참고용	검수번호	D600062326

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 번호일: 2020-09-02
 시험·검사 책임자: 기미원, 이경구, 이현영, 장정순
 검사관련 총 책임자: 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납	이미, 이치가 없고 고유의 향미가 있는 어두운 파우더의 색상	윤재민
비소(mg/kg)	0.0022 mg/kg	정다운
납(mg/kg)	0.0281 mg/kg	정다운
수은(mg/kg)	0.0038 mg/kg	박정연
카드뮴(mg/kg)	0.0050 mg/kg	정다운
티오세소	불검출	장대원
해관수(mL)	0	김정숙
대장균	음성	김희숙
대장균군	음성	김희숙

※ 위 결과는 의뢰한 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 본 성적서는 광고용 성격이 없습니다. 시험·검사결과에 시험·검사항목 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자기용량검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용될 수 없습니다.
 ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정에 준하여 발급합니다.
 ※ 시험이 부족한 경우 시험·검사 및 결과받은 별지로 작성 가능합니다.

2020년 09월 02일

한국기농식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기농식품연구원 <http://www.khsl.or.kr> 전화번호 031-3628-0400-1



라. 아로니아 발효원액 및 발효 정제물 제조 공정 확립

(1) 아로니아 추출물을 이용한 효모발효 조건 확인

(가) 아로니아 Lab scale 효모 발효 진행

Jar fermentor를 이용한 발효공정 최적화를 위해 선행적으로 Lab scale 플라스크 발효를 진행함. 아로니아는 원과를 파쇄하여 주정 70%로 10 배수 정용하여 추출함. 추출은 24°C 에서 24시간 동안 교반추출을 진행하며 추출 후 Polypropylene filter를 이용하여 추출액을 여과한 뒤 여과된 추출액은 농축하여 주정을 제거하여 사용함. 아로니아 효모발효 시 아로니아 추출액에 아로니아 농축액, 배 농축액, 아로니아 슬러지를 첨가하여 22~23 brix(%)로 당도를 보정하여 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* LP 효모 0.1% 접종함. 대조구 실험군은 배농축액을 22~23 Brix(%)로 보정하여 사용하며 발효조건은 온도 30°C, 140 rpm, 배양시간 6일로 (Shaking incubator, (주) 대원 과학, Jaecheon, Korea)를 사용하여 진행함

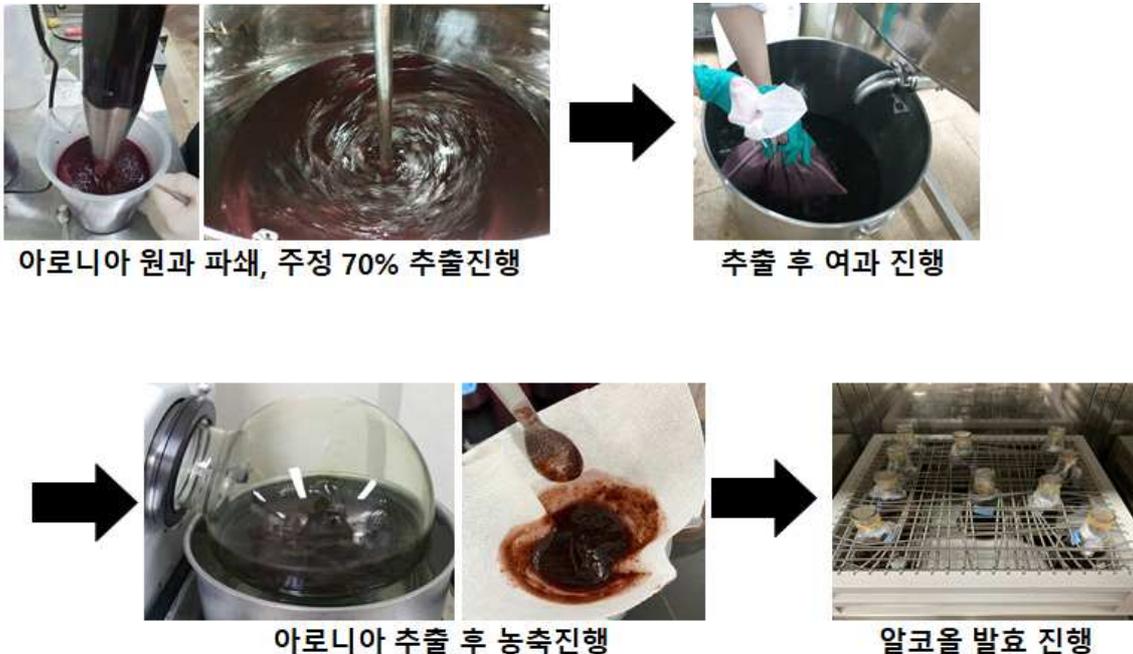


그림 5. 아로니아 Lab scale 효모발효 진행과정

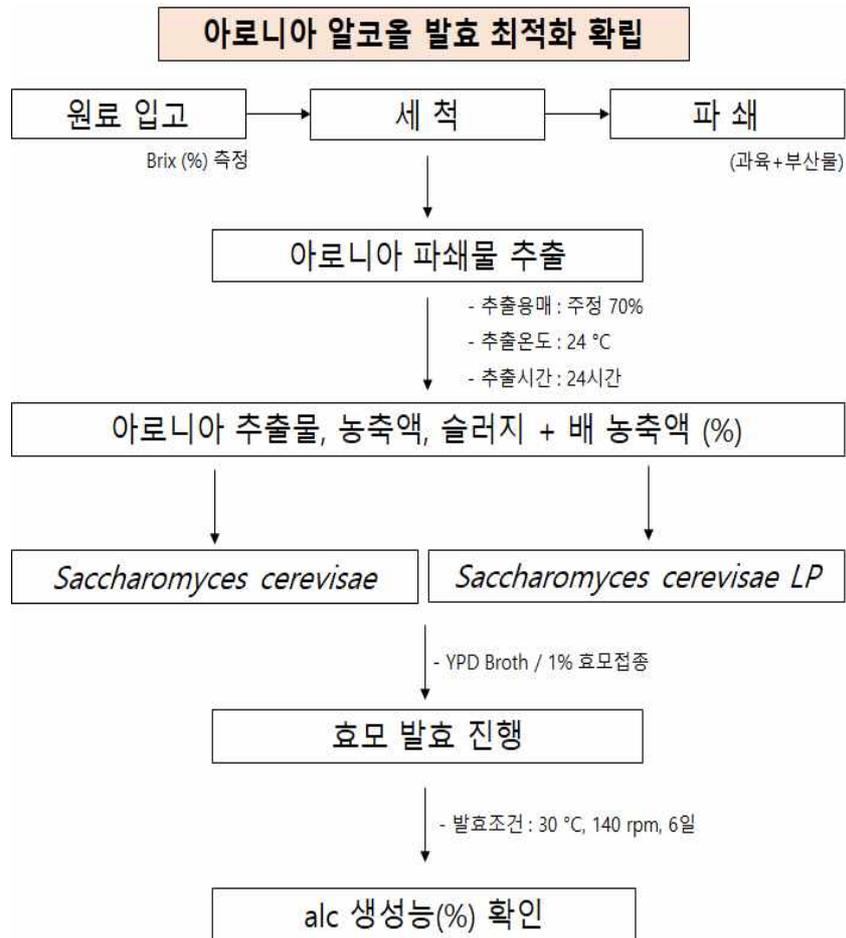


그림 6. 아로니아 Lab scale 효모발효 공정도

(나) 아로니아 추출물 효모발효에 대한 분석 (Lab scale/Flask)

① pH 측정

발효물의 pH는 시료 20 mL를 취해 pH meter (SevenEasy, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정함

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

당도는 발효물 500 μ L를 취해 당도계 (ATAGO, Pocket Refractometer, PAL-2)를 이용하여 측정함

③ 환원당 함량 측정

환원당 함량은 dinitrosalicylic acid(DNS)법에 따라 측정함. 발효 물을 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 희석한 시료액 1 mL에 DNS 시약 2 mL을 혼합한 후 15분간 100°C에서 발색시킨 뒤 상온에서 충분히 냉각시킴. 냉각한 후 증류수 7 mL을 넣어 540 nm에서 흡광도를 측정하며 환원당 함량은 glucose를 표준물질로 사용하여 표준 곡선을 작성한 후 산출함

④ 알코올 함량 측정

알코올 함량 측정은 국제청 주류분석규정에 따라 측정함. 메스실린더에 발효물 100 mL

를 취한 후 등근 플라스크에 옮김. 발효물이 넣어서 있던 메스실린더를 증류수 10 mL로 3회 이상 씻은 후 그 액을 합침. Soxhlet heater를 이용하여 발효물이 들어있는 등근 플라스크에 열을 가하여 증류함. 증류액이 70 mL가 되면 증류를 정지하고 증류수를 보충하여 100 mL가 되도록 함. 이 후 교반하여 주정계 (ATAGO, PAL-2REFRACTOMETER)를 이용하여 알코올 함량을 나타냄

⑤ Total Anthocyanin content

총 안토시아닌 함량은 측정을 위해 1% HCl을 첨가한 Ethanol을 넣어 15분간 sonication 하여 안토시아닌을 추출하며, 4000 rpm에서 10 분간 원심분리를 진행하여 얻어진 상층액을 실험에 사용함. 시료를 실험 농도에 맞춰 희석한 뒤, 0.025 M Potassium Chloride buffer (pH 1.0) 과 0.4 M Sodium acetate buffer (pH 4.5)를 혼합한 후 15 분 동안 반응시키고 510, 700 nm흡광도에서 측정함. 표준물질은 최고흡광도 확인 후 측정 시 안토시아닌 랩다맥스 값을 적용함

$$\text{Total anthocyanin content(mg/gram)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / \epsilon \times V$$

$$A \text{ (Absorbance)} = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 1.0}} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 4.5}}$$

$$MW \text{ (Molecular weight of cyanidine-3-glucoside)} = 322.17$$

DF: Dilution factor

$$\epsilon \text{ (cyanidin chloride molar absorbance)} = 24,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

V = final volume of sample

(다) 아로니아 추출물 효모발효에 대한 분석 결과 (Lab scale/Flask)

① pH 측정

아로니아 효모발효시간에 따른 pH 변화는 표 1, 2와 같음. 효모균주는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* LP 두 종류를 사용했으며 24시간 간격으로 시료를 채취함. a, b 대조군의 초기 pH는 4.59~4.62로 나타났으며 그 외 모든 균의 발효개시 전 pH는 3.72~3.82로 비슷함. 대조군의 경우 발효 48~72시간까지 pH가 소폭 감소하였으나 발효종료까지 완만한 상태를 유지함. a-1~a-3, b-1~b-3 시료군 또한 발효초기 일정 pH를 유지하였으나 발효가 진행됨에 따라 발효종료지점인 144시간에서 3.94~4.05로 조금 증가하는 것으로 나타남

표 1. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* LP 효모발효 시간에 따른 pH 변화

아로니아 효모발효 시간에 따른 pH 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
a-0 ²⁾	4.593	4.399	4.320	4.339	4.413	4.417	4.446
a-1 ³⁾	3.822	3.863	3.878	4.000	4.062	4.025	4.054
a-2 ⁴⁾	3.781	3.855	3.927	3.987	4.026	4.080	4.042
a-3 ⁵⁾	3.735	3.772	3.832	3.913	3.936	3.910	3.938

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae* LP, ²⁾대조군(배농축액), ³⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%, ⁴⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 12.5%+배농축액 12.5%, ⁵⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 15%+배농축액 10%

표 2. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 pH 변화

아로니아 효모발효 시간에 따른 pH 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
b-0 ²⁾	4.618	4.422	4.417	4.394	4.361	4.473	4.456
b-1 ³⁾	3.808	3.830	3.833	3.965	4.019	4.009	4.019
b-2 ⁴⁾	3.757	3.794	3.810	3.937	3.985	3.957	3.979
b-3 ⁵⁾	3.725	3.766	3.819	3.896	3.939	3.931	3.943

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾대조군(배농축액), ³⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%, ⁴⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 12.5%+배농축액 12.5%, ⁵⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 15%+배농축액 10%

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

아로니아 효모발효시간에 따른 pH 변화는 표 3, 4와 같음. 효모균주는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* LP 두 종류를 사용했으며 모든 시료군의 발효초기 Brix(%)는 22~23%까지 보정하여 사용함. 대조군의 경우 효모발효가 진행됨에 따라 지속적으로 당도가 감소하여 발효종료 지점인 144시간에서의 당도는 11.0~11.7%로 약 11% 감소함. a-1~a-3의 경우 발효 48시간까지 14%로 급격하게 떨어지는 경향을 나타내었으나 발효 72시간에서 120시간까지 큰 변화는 나타나지 않음. 이후 a-1과 a-2는 13.7%까지 당도가 감소하였으나 a-3은 14.2%로 거의 변화가 없었음. b-1~b-3의 경우 발효 48시간까지 17~18%로 a군과 비교하여 약 3% 높은 당도로 나타났으나 발효종료지점까지 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었으며 13.7~13.9%로 나타남. 또한 대조군을 제외한 a, b군의 시료 중 b-1군이 13.7%로 가장 낮게 나타남

표 3. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* LP 효모발효 시간에 따른 당도 변화

아로니아 효모발효 시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
a-0 ²⁾	22.5	19.0	14.1	12.3	11.2	11.2	11.0
a-1 ³⁾	22.8	22.0	15.1	14.1	14.2	14.1	13.8
a-2 ⁴⁾	22.3	21.4	14.4	14.2	14.2	14.1	13.8
a-3 ⁵⁾	22.3	21.4	14.5	14.4	14.4	14.3	14.2

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae* LP, ²⁾대조군(배농축액), ³⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%, ⁴⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 12.5%+배농축액 12.5%, ⁵⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 15%+배농축액 10%

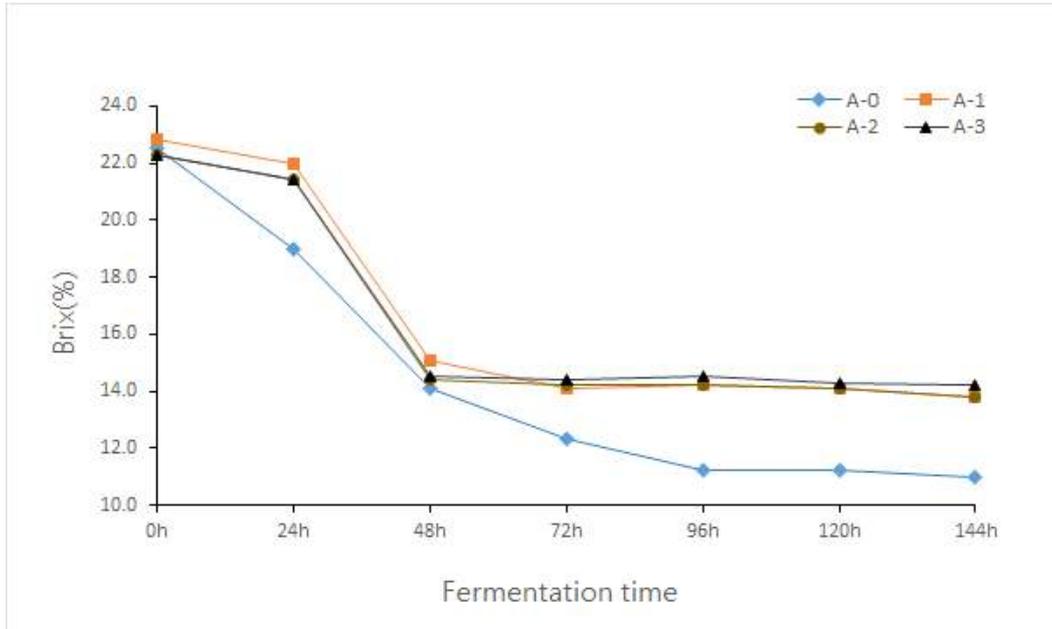


그림 7. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* LP 효모발효 시간에 따른 당도 변화

표 4. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 당도 변화

아로니아 효모발효 시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
b-0 ²⁾	22.1	18.8	15.0	13.2	12.4	11.9	11.7
b-1 ³⁾	23.0	22.5	18.5	14.4	14.2	14.1	13.7
b-2 ⁴⁾	22.6	22.1	17.6	14.5	14.3	14.0	13.9
b-3 ⁵⁾	22.1	21.7	17.2	14.4	14.2	14.0	13.9

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾대조구(배농축액), ³⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%, ⁴⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 12.5%+배농축액 12.5%, ⁵⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 15%+배농축액 10%

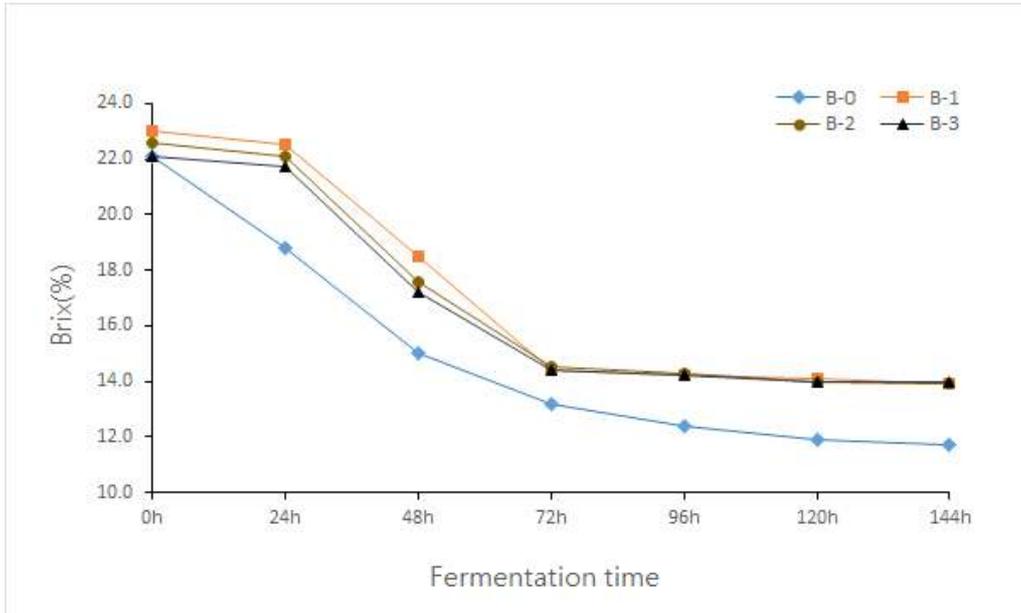


그림 8. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 당도 변화

③ 환원당 함량 측정

아로니아 효모발효기간에 따른 환원당 함량 변화는 표 5, 6과 같음. 환원당은 원료 전분의 당화 amylase 작용으로 작은 분자로 분해되고 다시 glucose로 분해됨. 또한 알코올 발효 기질로 이용되어 감미도에 영향을 주는 중요한 성분이 됨. 환원당 함량은 48시간 간격으로 시료를 채취하여 측정함. a군의 경우 발효 48시간에서 7.36~11.85 mg/mL, b군의 경우 8.28~22.36 mg/mL로 급격하게 감소하였으며 군주의 차이에 의해 환원당 감소량은 차이를 보였으나 발효가 진행됨에 따라 효모 발효에 의한 당분의 소비로 지속적으로 감소하는 경향으로 나타남

표 5. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* LP 효모발효 시간에 따른 환원당 함량 변화

아로니아 효모발효 시간에 따른 환원당 함량 ¹⁾ (mg/mL)				
Time	0h	48h	96h	144h
a-0 ²⁾	110.75±0.02 ⁶⁾	7.36±0.03	3.16±0.01	2.95±0.02
a-1 ³⁾	110.61±0.02	6.80±0.02	5.97±0.02	5.27±0.01
a-2 ⁴⁾	103.47±0.03	8.42±0.04	6.88±0.01	5.83±0.03
a-3 ⁵⁾	96.46±0.02	11.85±0.05	11.57±0.03	6.39±0.02

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae* LP, ²⁾대조군(배농축액), ³⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%, ⁴⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 12.5%+배농축액 12.5%, ⁵⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 15%+배농축액 10%, ⁶⁾All values are mean±SD.

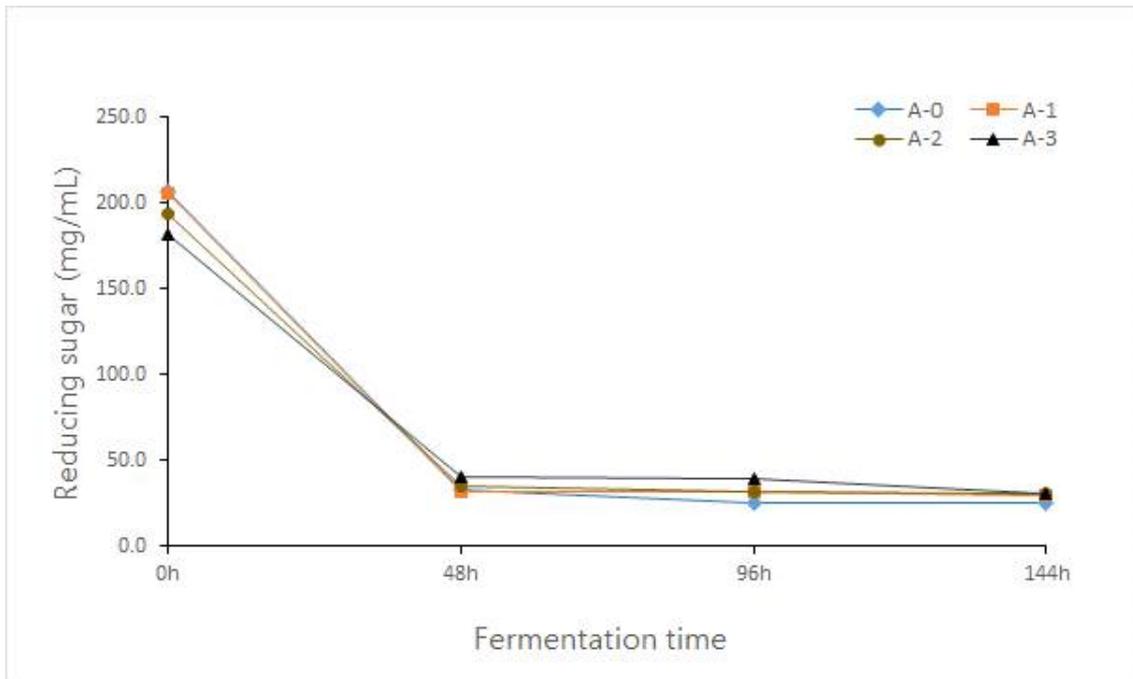


그림 9. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* LP 효모발효 시간에 따른 환원당 함량 변화

표 6. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 환원당 함량 변화

아로니아 효모발효 시간에 따른 환원당 함량 ¹⁾ (mg/mL)				
Time	0h	48h	96h	144h
b-0 ²⁾	102.00±0.05 ⁶⁾	22.36±0.01	3.24±0.03	2.82±0.02
b-1 ³⁾	100.32±0.02	12.06±0.01	6.18±0.02	4.71±0.01
b-2 ⁴⁾	98.42±0.02	8.91±0.02	6.81±0.01	5.34±0.03
b-3 ⁵⁾	96.74±0.01	8.28±0.02	6.6±0.01	5.76±0.04

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾대조구(배농축액), ³⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%, ⁴⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 12.5%+배농축액 12.5%, ⁵⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 15%+배농축액 10%, ⁶⁾All values are mean±SD.

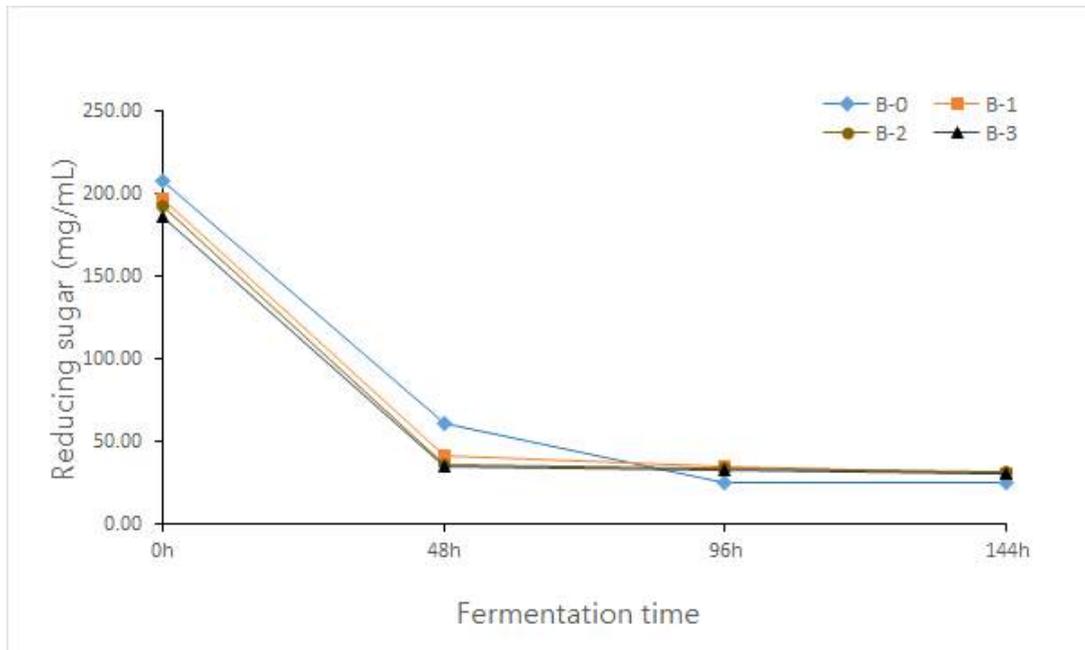


그림 10. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 환원당 함량 변화

④ 알코올 함량 측정

아로니아 효모발효기간에 따른 알코올 함량 변화는 표 7, 8과 같음. *Saccharomyces cerevisiae*는 산업용 알코올생산에 널리 사용되어지고 있으며 효모발효에 의한 알코올 생성은 주로 포도당, 과당 등 당류에 의해 알코올, 이산화탄소로 변하는 혐기적 변화임. a군의 경우 발효 48시간에서 a-1, a-2가 8% 이상 측정되었으나 발효 종료까지의 알코올 함량은 거의 변하지 않음. 이는 발효초기 당도의 소비가 급격하게 이루어 졌으나 이후 당도의 감소가 서서히 진행되는 것과 유사한 결과로 생각됨. b군의 경우 발효 48시간에서의 알코올 함량이 4.5~7.5%로 a군에 비해 낮게 나타났으나 발효 96시간, 144시간 까지 지속적으로 증가하는 경향으로 나타남. 대조구를 제외한 a군과 b군을 비교하였을 때 b군의 알코올 함량이 더 높게 나타난 것으로 확인 되었으며 b-1 시료에서 알코올 10%로 가장 높게 나타남

표 7. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* LP 효모발효 시간에 따른 알코올 함량 변화

아로니아 효모발효 시간에 따른 알코올(%) 변화 ¹⁾				
Time	0h	48h	96h	144h
a-0 ²⁾	0	6.5	8.5	9.0
a-1 ³⁾	0	8.5	9.0	9.0
a-2 ⁴⁾	0	8.0	8.0	8.5
a-3 ⁵⁾	0	5.5	7.5	7.5

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae* LP, ²⁾대조군(배농축액), ³⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아

아 농축액 10%+배농축액 15%, ⁴정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 12.5%+배농축액 12.5%, ⁵정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 15%+배농축액 10%

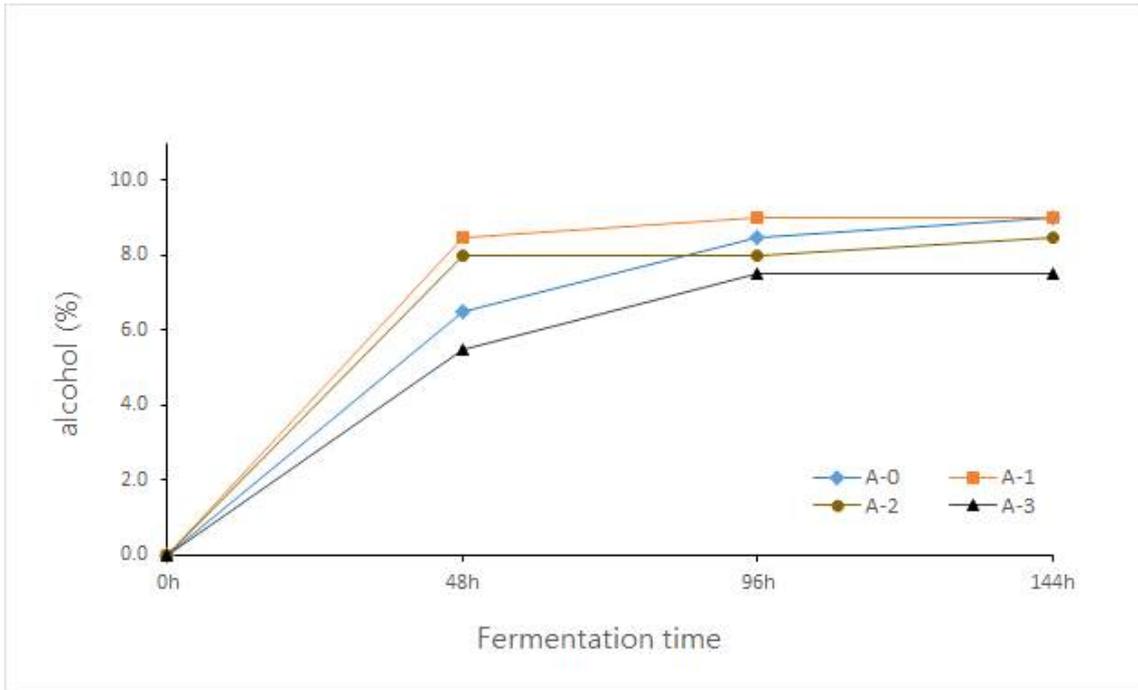


그림 11. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* LP 효모발효 시간에 따른 알코올 함량 변화

표 8. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 알코올 함량 변화

아로니아 효모발효 시간에 따른 알코올(%) 변화 ¹⁾				
Time	0h	48h	96h	144h
b-0 ²⁾	0	4.5	6.5	8.5
b-1 ³⁾	0	4.5	6.5	10.0
b-2 ⁴⁾	0	7.5	8.0	8.5
b-3 ⁵⁾	0	6.5	8.5	9.0

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾대조구(배농축액), ³⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%, ⁴⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 12.5%+배농축액 12.5%, ⁵⁾정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 15%+배농축액 10%

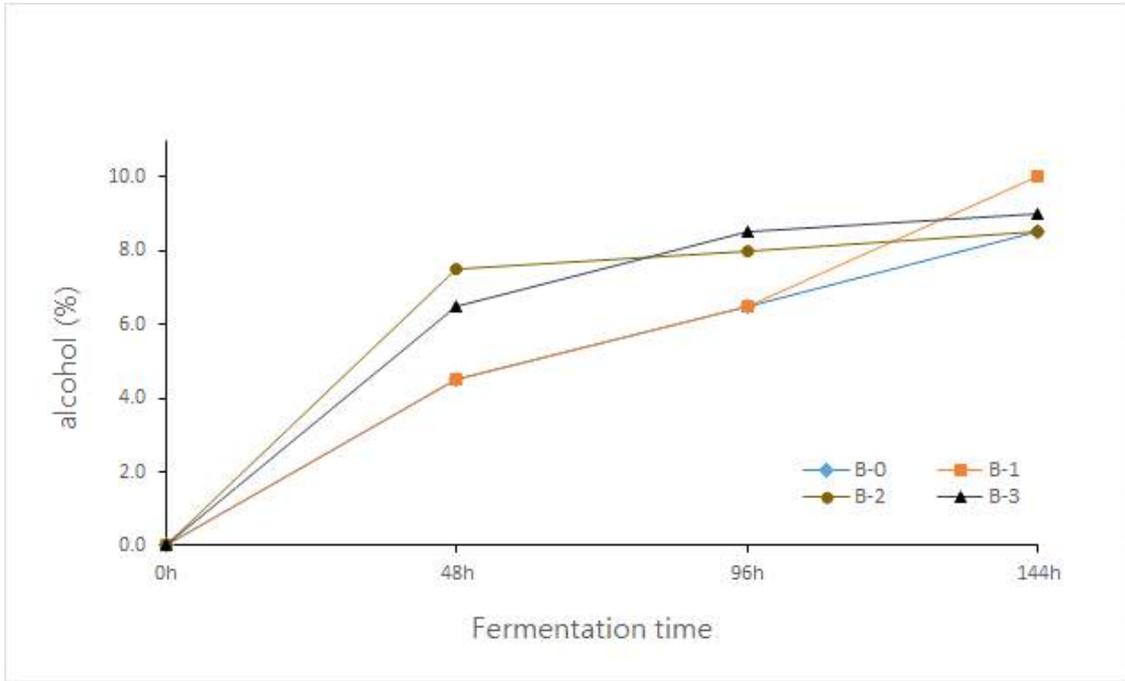


그림 12. 아로니아 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 알코올 함량 변화

(라) 아로니아 추출물 제조와 균주에 따른 효모발효에 대한 결론 및 제언

- ① 본 실험에서는 안토시아닌 함량 수율이 높은 아로니아 추출물 제조 공정 확립과 아로니아 추출물을 이용한 발효를 통하여 최적 발효조건을 설정하기 위한 기초자료 결과를 나타냄
- ② 아로니아 추출물 제조는 30℃ 이하에서 24시간 동안 교반하여 주정 비율(0~100%)에 따라 추출을 진행하였으며 안토시아닌 함량 측정 결과 70%주정 추출이 가장 높았음
- ③ 효모발효는 *Saccharomyces*속 균주 2종류(LP, KSH-Y141029)를 사용함. 발효 개시전 당도보정을 위해 아로니아 추출물, 농축액, 배농축액, 아로니아 슬러지의 비율을 설정하여 효모발효를 진행하였으며 알코올 함량의 경우 *Saccharomyces cerevisiae* KSH-Y141029의 균주를 첨가하였을 때 10%로 나타남
- ④ 최종 배양 조건은 144시간이며, 효모발효 진행을 위한 배합은 아로니아 추출물 50%, 아로니아 농축액 10%, 배 농축액 15%, 추출수율을 확인하여 아로니아 슬러지 10% 첨가로 확정함
- ⑤ Jar fermentor를 이용하여 발효 공정의 최적조건을 확인하고 이후 산업적(Bulk) 효모발효를 진행함. 발효 종료 후 오크통 숙성을 통해 아로니아 와인을 제조함

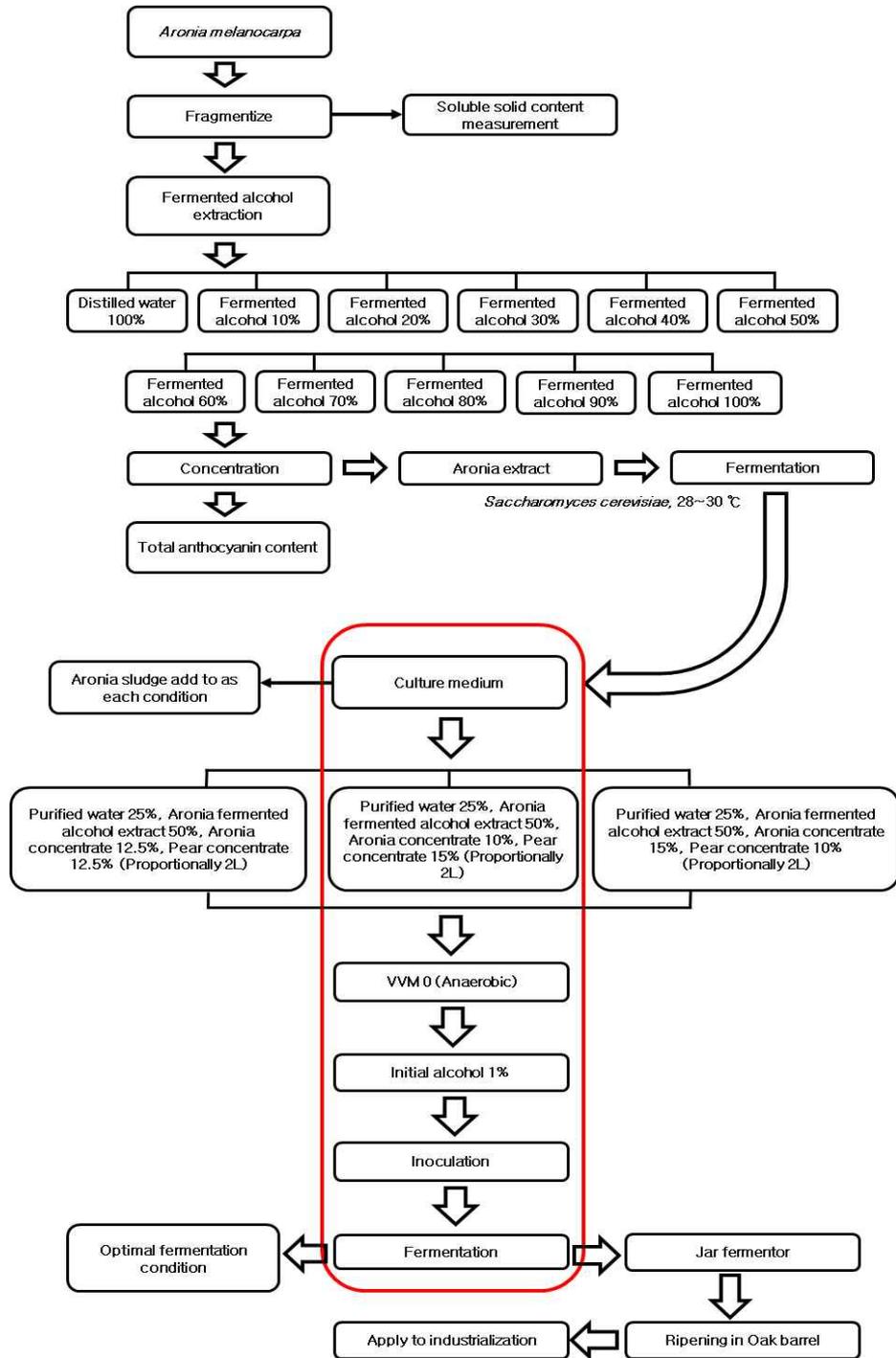


그림 13. 아로니아 효모발효 최종 공정도

(2) 배 농축액을 이용한 주모 제조 공정 확립

(가) 배 농축액에 대한 효모발효 공정의 최적 조건을 확인하기 위하여 (주)코바이오텍의 5 L Jar fermentor를 사용하여 진행함. Jar fermentor 발효 진행 시간에 따라 성상확인, pH, 당도(brix%), 알코올함량(%), 환원당, DO, BOD를 측정함. 배 농축액은 충북원예협동조

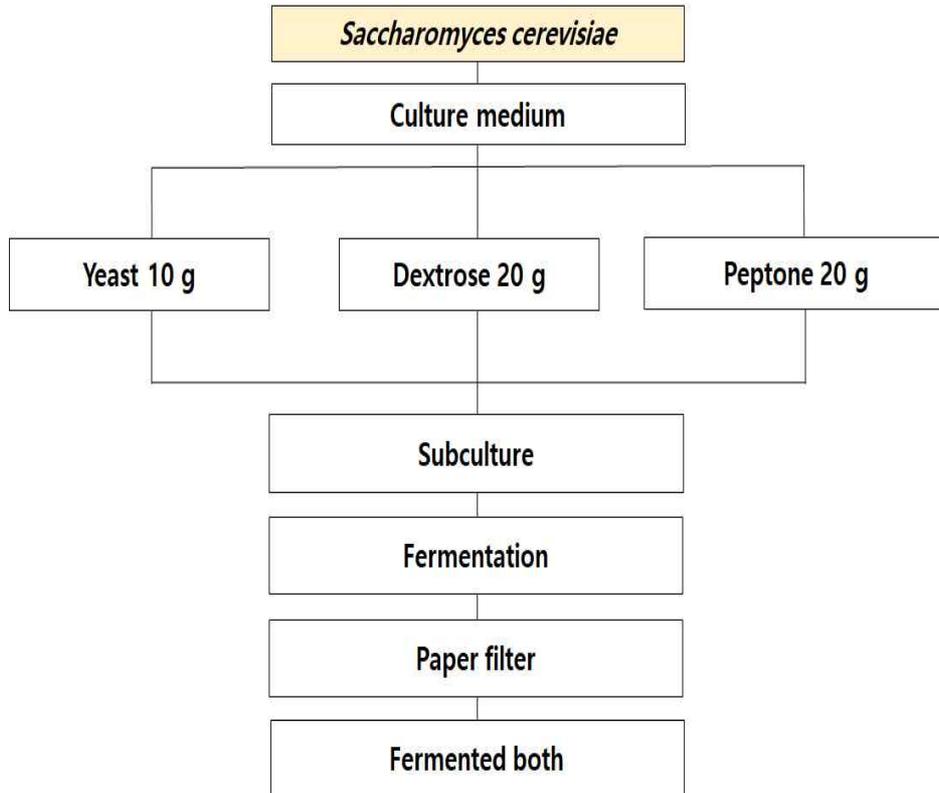


그림 15. *Saccharomyces cerevisiae* 균주 계대배양 공정 확립

(나) 효모 균주에 대한 계대배양 진행 및 배 농축액 효모발효

- ① 식품의 효모 발효를 위해 산업적 이용가능 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였으며 균주의 활성을 높이고자 단일 Colony를 얻기 위해 액상배양부터 고체배양까지 계대배양을 진행함. 배 농축액은 Brix(%)를 조정하여 Lab scale 효모배양 Jar fermentor에서 최적 배양조건 확립을 하였으며 대형발효기를 통하여 Bulk scale 효모발효를 진행함

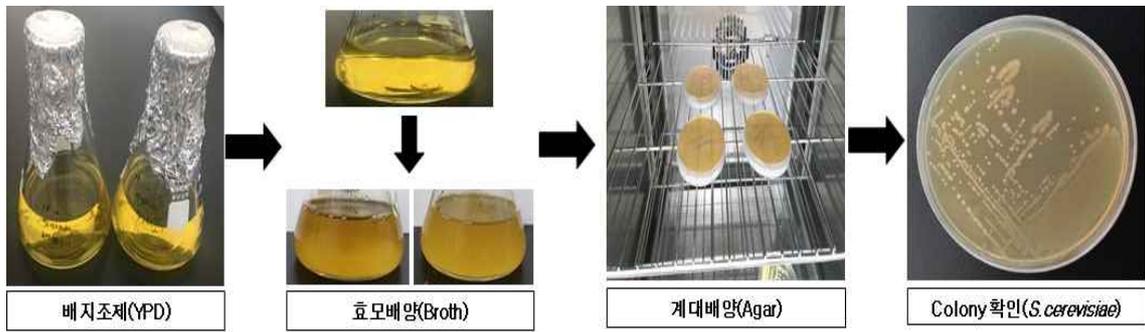


그림 16. 효모 균주 계대배양 진행 과정



그림 17. 배 농축액을 이용한 효모발효 진행 과정(Lab scale)

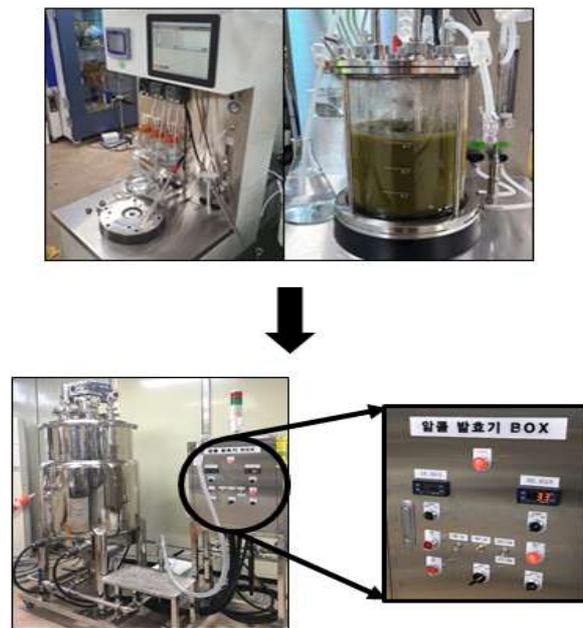


그림 18. 효모발효 조건 확인 후 산업적(Bulk) 발효 진행

(다) 배 농축액 효모 발효액에 대한 분석 진행 (주모제조)

① pH 측정

발효물의 pH는 시료 20 mL를 취해 pH meter (SevenEasy, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정함

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

당도는 발효물 500 μ L를 취해 당도계 (ATAGO, Pocket Refractometer, PAL-2)를 이용하여 측정함

③ 환원당 함량 측정

환원당 함량은 dinitrosalicylic acid(DNS)법에 따라 측정함. 발효 물을 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 희석한 시료액 1 mL에 DNS 시약 2 mL을 혼합한 후 15분간 100°C에서 발색시킨 뒤 상온에서 충분히 냉각시킴. 냉각한 후 증류수 7 mL을 넣어 540 nm에서 흡광도를 측정하며 환원당 함량은 glucose를 표준물질로 사용하여 표준 곡선을 작성한 후 산출함

④ 알코올 함량 측정

알코올 함량 측정은 국제청 주류분석규정에 따라 측정함. 메스실린더에 발효물 100 mL를 취한 후 둥근 플라스크에 옮김. 발효물이 넣어져 있던 메스실린더를 증류수 10 mL로 3회 이상 씻은 후 그 액을 합침. Soxhlet heater를 이용하여 발효물이 들어있는 둥근 플라스크에 열을 가하여 증류함. 증류액이 70 mL가 되면 증류를 정지하고 증류수를 보충하여 100 mL가 되도록 함. 이 후 교반하여 주정계 (ATAGO, PAL-2REFRACTOMETER)를 이용하여 알코올 함량을 나타냄

⑤ DO, BOD 측정

발효액의 용존산소량 및 생물화학적 산소요구량 측정은 (DO-31P, (주) TOADKK, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정함. 발효액 15 mL 정량하여 용존산소량을 측정하며, 발효 0일 차의 용존산소량은 100%, 생물학적 산소요구량은 0%로 환산하여 산출함

(라) 배 농축액 효모 발효액에 대한 분석 결과 (주모제조)

① pH 측정

배 농축액 효모발효시간에 따른 pH 변화는 표 9과 같음. 배 농축액은 정제수를 첨가하여 Brix(%)를 보정하여 사용하였으며 24시간 간격으로 시료를 채취함. 초기 pH는 4.61로 나타났으며 발효가 진행됨에 따라 pH 수치가 감소하여 96시간의 pH는 4.52으로 나타남. 이후 발효종료지점까지 pH는 4.53~4.56으로 조금 증가하였으나 pH 수치상 큰 변화는 나타나지 않음

표 9. 배 농축액 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 pH 변화

합에서 제공받아 사용하였으며 통기량을 주지 않는 VVM 0, 180 rpm, 28°C로 6일간 발효를 진행함. 효모발효가 완료된 발효액은 아로니아 와인 제조를 위한 주모로 사용함

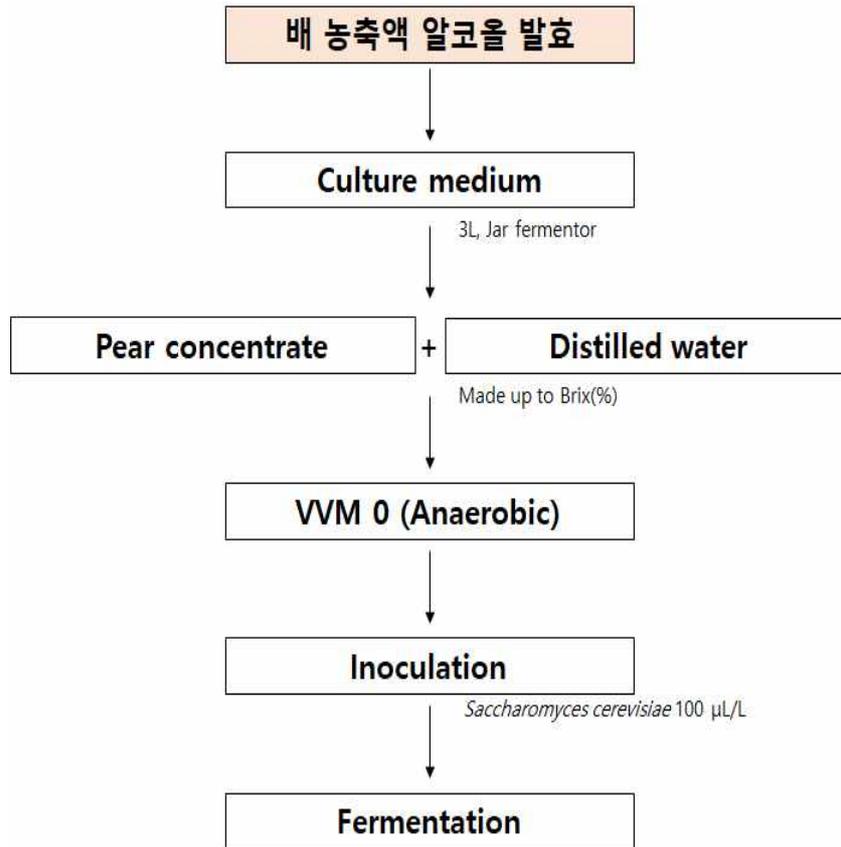


그림 14. Jar fermentor를 이용한 배 농축액 효모발효 확립 공정도

효모발효 시간에 따른 pH 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
PF ²⁾	4.61	4.58	4.55	4.54	4.52	4.53	4.56

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾배농축액+정제수

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

배 농축액 효모발효시간에 따른 당도 변화는 표 10와 같음. 배 농축액은 정제수를 첨가하여 Brix(%)를 보정하여 사용하였으며 24시간 간격으로 시료를 채취함. 발효개시 전 당도는 23.4%로 나타났으며 발효 72시간까지 당도가 급격하게 감소하여 14.6%로 나타남. 당도의 경우 발효가 진행됨에 따라 지속적으로 감소하는 경향을 보였으며 발효 종료시 11.5%로 나타남

표 10. 배 농축액 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 당도 변화

효모발효 시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
PF ²⁾	23.4 ±0.07 ³⁾	20.7 ±0.14	16.4 ±0.00	14.6 ±0.07	12.8 ±0.00	12.2 ±0.00	11.5 ±0.00

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾배농축액+정제수, ³⁾All values are mean±SD.

③ 환원당 함량 측정

배 농축액 효모발효기간에 따른 환원당 함량 변화는 표 11과 같음. 환원당은 원료 전분의 당화 amylase 작용으로 작은 분자로 분해되고 다시 glucose로 분해됨. 또한 알코올 발효 기질로 이용되어 감미도에 영향을 주는 중요한 성분이 됨. 환원당 함량은 48시간 간격으로 시료를 채취하여 측정함. 환원당 함량 또한 발효가 진행됨에 따라 당도가 감소하는 것과 유사한 경향으로 나타났으며 발효초기 223.06 mg/mL에서 발효 종료 후 28.44 mg/mL로 나타남

표 11. 배 농축액 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 환원당 함량 변화

효모발효 시간에 따른 환원당 함량 ¹⁾ (mg/mL)				
Time	0h	48h	96h	144h
PF ²⁾	223.06±0.86 ³⁾	86.69±0.81	29.78±0.49	28.44±0.23

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾배농축액+정제수, ³⁾All values are mean±SD.

④ 알코올 함량 측정

효모발효기간에 따른 알코올 함량 변화는 표 12와 같음. *Saccharomyces cerevisiae*는 산업용 알코올생산에 널리 사용되어지고 있으며 효모발효에 의한 알코올 생성은 주로 포도당, 과당 등 당류에 의해 알코올, 이산화탄소로 변하는 혐기적 변화임. 발효종료 후 알코올 함량은 9.0%로 나타났으며 알코올 함량의 경우 지속적인 당분의 소비가 이루어짐에 따라 지속적으로 증가하는 경향으로 나타남

표 12. 배 농축액 *Saccharomyces cerevisiae* 효모발효 시간에 따른 알코올 함량 변화

효모발효 시간에 따른 알코올(%) 변화 ¹⁾				
Time	0h	48h	96h	144h
PF ²⁾	0±00 ³⁾	4.5±0.00	7.5±0.00	9.0±0.00

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾배농축액+정제수, ³⁾All values are mean±SD.

⑤ DO, BOD 측정

미생물의 발효 중 용존산소량과 생화학적 산소요구량은 미생물의 호흡, 대사작용과 밀접한 관련이 있음. 미생물은 초기성장기에서 빠른 성장과 원활한 대사를 위해 많은 산소를 요구함. 또한 미생물의 성장 정지와 사멸기에 접어들어 생균수가 감소함에 따라 용존산소량은 증가하게 됨. 배 농축액의 통기량은 VVM0 으로 설정하였으며, 발효 0시간에서 용존산소량과, 생화학적 산소요구량은 각각 100%, 0%으로 환산하여 나타냄. 효모발효 48시간 까지 용존산소 수치는 70.3%로 나타났으며 발효 72시간에서 30.8%로 용존산소의 수치가 급격히 감소함. 또한 발효 120시간에서 용존산소 수치는 0%로 나타남. 생화학적 산소요구량의 경우 발효가 진행됨에 따라 지속적으로 증가하는 경향으로 나타났으며 이는 *Saccharomyces cerevisiae*가 지속적으로 생육하고 있는 것으로 판단됨

표 13. 배 농축액 효모발효액의 발효기간에 따른 DO 변화

효모발효 시간에 따른 DO(%) 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
PF ²⁾	100.0	74.9	70.3	30.8	13.8	0.0	0.0

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾배농축액+정제수

표 14. 배 농축액 효모발효액의 발효기간에 따른 BOD 변화

효모발효 시간에 따른 BOD(%) 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
PF ²⁾	0.0	25.1	29.7	69.2	86.8	100	100

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾배농축액+정제수

(3) 기능성 소재의 대량생산 공정 확립을 위한 효모발효 공정 표준화

(가) 아로니아 최적 효모발효 공정 확립

아로니아 효모발효 공정의 최적 조건을 확인하기 위하여 (주)코바이오텍의 5 L Jar fermentor를 사용하여 진행함. Jar fermentor 발효 진행 시간에 따라 성상확인, pH, 당도 (brix%), 알코올함량(%), 환원당, 베타글루칸, DO, BOD를 측정함. 아로니아는 전남 및 경남의 아로니아 생산 농가에서 구매하여 원과 세척 후 과육, 껍질, 씨앗을 포함하여 파쇄 후 추출을 진행함. 아로니아 추출물은 파쇄액을 주정농도에 따라 다르게 추출한 후 안토시아닌 함량을 측정하여 가장 높은 조건을 확인하여 사용함. 이후 껍질, 씨앗(슬러지)을 여과하여 감압농축으로 주정을 제거 후 효모발효를 진행함. 발효조건은 통기량을 주지

않는 VVM 0, 180 rpm, 28~30°C로 6일간 발효를 진행함

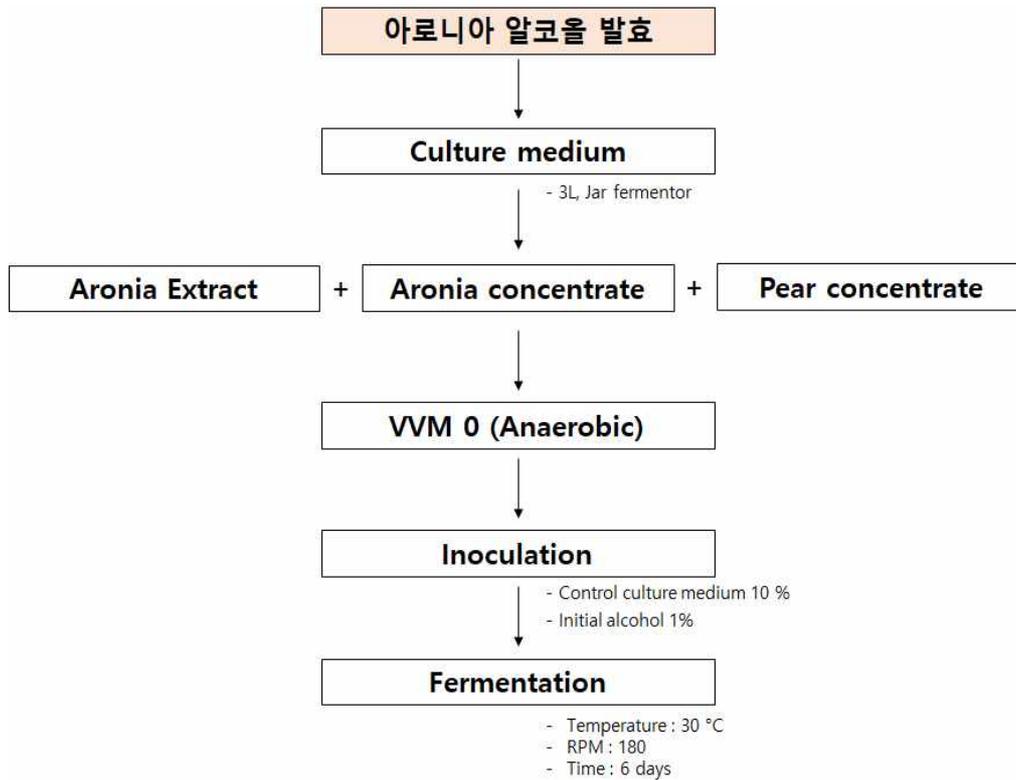


그림 19. Jar fermentor를 이용한 아로니아 최적 효모발효 확립 공정도

(나) 아로니아 최적 효모발효에 대한 분석 (Jar fermentor)

① pH 측정

발효물의 pH는 시료 20 mL를 취해 pH meter (SevenEasy, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정함

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

당도는 발효물 500 μ L를 취해 당도계 (ATAGO, Pocket Refractometer, PAL-2)를 이용하여 측정함

③ 환원당 함량 측정

환원당 함량은 dinitrosalicylic acid (DNS)법에 따라 측정함. 발효 물을 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 희석한 시료액 1 mL에 DNS 시약 2 mL을 혼합한 후 15 분간 100°C에서 발색시킨 뒤 상온에서 충분히 냉각시킴. 냉각한 후 증류수 7 mL을 넣어 540 nm에서 흡광도를 측정하며 환원당 함량은 glucose를 표준물질로 사용하여 표준 곡 선을 작성한 후 산출함

④ 알코올 함량 측정

알코올 함량 측정은 국제청 주류분석규정에 따라 측정함. 메스실린더에 발효물 100 mL

를 취한 후 등근 플라스크에 옮김. 발효물이 넣어져 있던 메스실린더를 증류수 10 mL로 3회 이상 씻은 후 그 액을 합침. Soxhlet heater를 이용하여 발효물이 들어있는 등근 플라스크에 열을 가하여 증류함. 증류액이 70 mL가 되면 증류를 정지하고 증류수를 보충하여 100 mL가 되도록 함. 이 후 교반하여 주정계 (ATAGO, PAL-2REFRACTOMETER)를 이용하여 알코올 함량을 나타냄

⑤ DO, BOD 측정

발효액의 용존산소량 및 생물화학적 산소요구량 측정은 (DO-31P, (주) TOADKK, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정함. 발효액 15 mL 정량하여 용존산소량을 측정하며, 발효 0일 차의 용존산소량은 100%, 생물학적 산소요구량은 0%로 환산하여 산출함

(다) 아로니아 최적 효모발효에 대한 분석 결과 (Jar fermentor)

① pH 측정

최적 효모발효 조건에 따른 pH 변화는 표 15과 같음. pH는 24시간 간격으로 측정하였으며 Jar fermentor를 2회 가동 하여 효모발효를 진행함. fermentor의 1차, 2차 발효개시 전의 pH는 3.87, 3.82로 나타났으며 발효 96시간부터 AF-1 시료군은 3.99로 발효종료지점까지 일정하게 유지 되었다. AF-2의 시료군의 경우 pH 3.90에서 pH 3.92로 약간 증가한 후 발효 종료까지 일정하게 나타났으며 두 시료군은 효모발효가 진행됨에 따라 pH 수치가 일정하게 증가하는 패턴을 나타냄

표 15. Jar fermentor 발효시간에 따른 pH 변화

1차 아로니아 효모발효시간에 따른 pH 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
AF-1 ²⁾	3.87	3.89	3.97	3.98	3.99	3.99	3.99
2차 아로니아 효모발효시간에 따른 pH 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
AF-2 ²⁾	3.82	3.83	3.84	3.86	3.90	3.92	3.92

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Jar fermentor/정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%+아로니아 슬러지 10%

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

최적 효모발효 조건에 따른 당도 변화는 표 16과 같음. 당도는 72시간 간격으로 측정하였으며 Jar fermentor를 2회 가동 하여 효모발효를 진행함. AF-1의 초기 당도는 26.3%, AF-2의 초기 당도는 27.7%로 진행하였으며 AF-1의 경우 발효 종료 시 14.8%로 총 56.3%의 당도가 감소하였으며 AF-2 당도는 144시간에서 16.9%로 61.1%가 감소하는 것으로 나타남. 이는 2차 Jar fermentor 발효에서 효모균주가 주모에 조금 더 안정적으로 활성이 나타난 차이로 사료되나 두 시료군의 당도가 감소하는 패턴은 동일한 것으로 나타남

표 16. Jar fermentor 발효시간에 따른 당도 Brix(%) 변화

1차 아로니아 효모발효시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
AF-1 ²⁾	26.3±0.00 ³⁾	15.8±0.07	14.8±0.07
2차 아로니아 효모발효시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
AF-2 ²⁾	27.7±0.00	19.3±0.00	16.9±0.14

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Jar fermentor/정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%+아로니아 슬러지 10%, ³⁾All values are mean±SD.

③ 환원당 함량 측정

최적 효모발효 조건에 따른 환원당 함량의 변화는 표 17과 같음. 환원당 측정은 72시간 간격으로 시료를 채취하여 진행함. 환원당 함량의 경우 당도 측정 결과와 유사한 경향으로 나타났으며 발효가 진행됨에 따라 124.55~131.34 mg/mL에서 7.02~11.62 mg/mL로 지속적으로 감소하는 경향을 나타냄. 두 시료군의 환원당 함량 차이는 발효 개시 전 발효 배지 배합에 의한 초기 당도 설정의 차이로 사료됨

표 17. Jar fermentor 발효시간에 따른 환원당(mg/mL) 함량 변화

1차 아로니아 효모발효시간에 따른 환원당(mg/mL) 함량 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
AF-1 ²⁾	124.55±1.03 ³⁾	10.42±0.49	7.02±0.89
2차 아로니아 효모발효시간에 따른 환원당(mg/mL) 함량 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
AF-2 ²⁾	131.34±1.08	30.86±1.30	11.62±0.45

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Jar fermentor/정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%+아로니아 슬러지 10%, ³⁾All values are mean±SD.

④ 알코올 함량 측정

최적 효모발효 조건에 따른 알코올 함량 변화는 표 18과 같음. 알코올 측정은 72시간 간격으로 시료를 채취하여 진행함. 효모발효에 의한 알코올 생성은 주로 포도당, 과당 등 당류에 의해 알코올, 이산화탄소로 변하는 혐기적 변화임. 두 시료군의 알코올 함량을 비교하였을 때 AF-2의 알코올 함량이 조금 더 높게 나타났으며 AF-1의 최종 알코올 함량은 10%, AF-2의 최종 알코올 함량은 11.2%로 나타남. 이는 효모가 알코올을 생성하는 에너지원은 당의 소비로 보고되어지며 AF-2군의 당도 소모량이 AF-1보다 조금 높은 것에 의한 차이로 사료됨

표 18. Jar fermentor 발효시간에 따른 알코올 함량(%) 변화

1차 아로니아 효모발효시간에 따른 알코올(%) 함량 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
AF-1 ²⁾	0.0±0.00 ³⁾	9.0±0.00	10.0±0.00
2차 아로니아 효모발효시간에 따른 당도 알코올(%) 함량 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
AF-2 ²⁾	0.0±0.00	8.5±0.00	11.2±0.30

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Jar fermentor/정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%+아로니아 슬러지 10%, ³⁾All values are mean±SD.

⑤ DO, BOD 측정

최적 효모발효 조건에 따른 환원당 DO/BOD 변화는 표 19, 20과 같음. 용존산소량(DO) 과, 생화학적 산소요구량(BOD)은 각각 100%, 0%으로 환산하여 나타내었으며 24시간 간격으로 측정함. 미생물의 발효 중 용존산소량과 생화학적 산소요구량은 미생물의 호흡, 대사 작용과 밀접한 관련이 있음. 미생물은 초기성장기에 빠른 성장과 원활한 대사를 위해 많은 산소를 요구함. 용존산소량은 발효 72시간에서 AF-1 22.8%, AF-2 9.4%로 급격하게 감소하였으며 두 시료군 모두 발효 96시간에서 0%로 나타남. 생화학적 산소요구량은 DO%가 감소함에 따라 지속적으로 증가하는 경향으로 나타났으며 이는 효모균주가 지속적으로 생육하고 있는 것으로 판단됨

표 19. Jar fermentor 발효시간에 따른 DO(%) 변화

1차 아로니아 효모발효시간에 따른 DO(%) 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
AF-1 ²⁾	100.0	64.7	33.9	22.8	0.0	0.0	0.0
2차 아로니아 효모발효시간에 따른 DO(%) 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
AF-2 ²⁾	100.0	56.5	21.9	9.4	0.0	0.0	0.0

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Jar fermentor/정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%+아로니아 슬러지 10%

표 20. Jar fermentor 발효시간에 따른 BOD(%) 변화

1차 아로니아 효모발효시간에 따른 BOD(%) 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
AF-1 ²⁾	0.0	35.3	66.1	78.0	100.0	100.0	100.0
2차 아로니아 효모발효시간에 따른 BOD(%) 변화 ¹⁾							
Time	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
AF-2 ²⁾	0.0	43.5	78.1	90.6	100.0	100.0	100.0

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Jar fermentor/정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%+아로니아 슬러지 10%

(4) 산업적 효모발효 진행

(가) Jar fermentor를 이용한 효모발효 종료 후 기능성 소재의 대량생산을 위한 산업적 효모 발효를 진행함. 대형 알코올 발효통의 rpm 특성을 고려하여 아로니아 슬러지의 양을 5%로 설정하여 첨가함

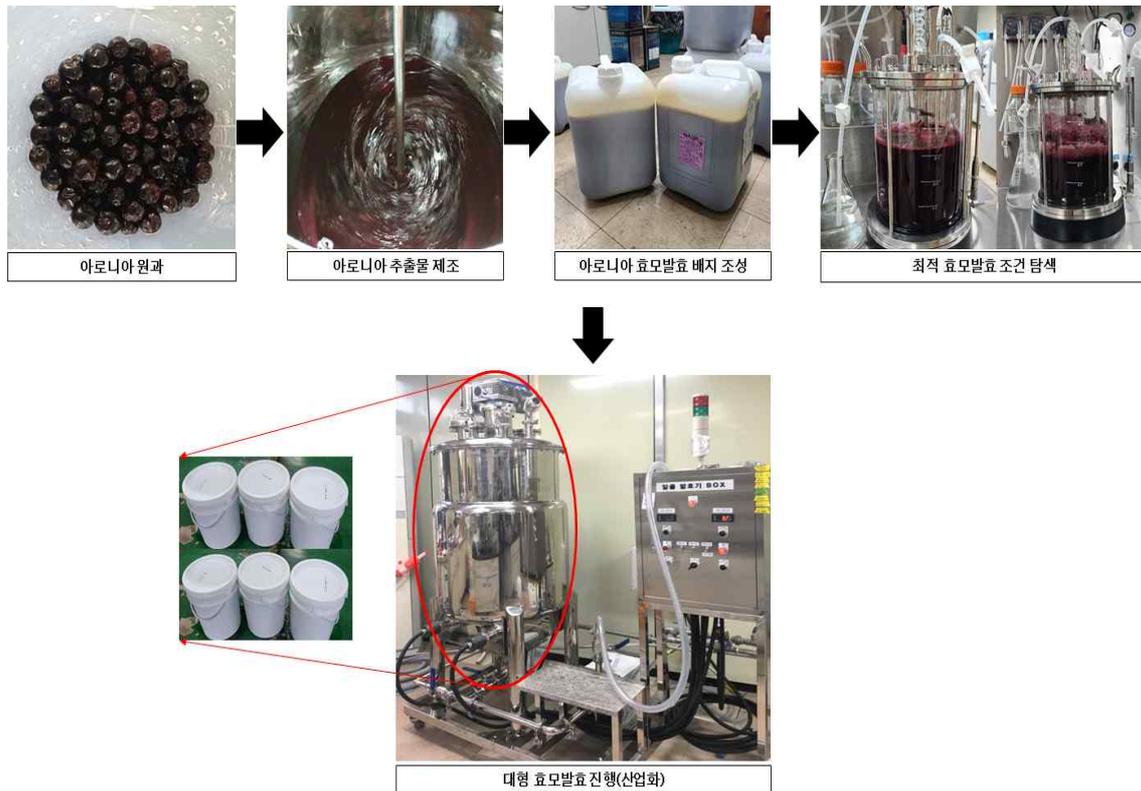


그림 20. 최적 효모발효 조건 탐색 및 산업적 효모발효 진행 과정

(나) 아로니아 최적 효모발효에 대한 분석 (산업화 Bulk scale)

① pH 측정

발효물의 pH는 시료 20 mL를 취해 pH meter (SevenEasy, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정함

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

당도는 발효물 500 μ L를 취해 당도계 (ATAGO, Pocket Refractometer, PAL-2)를 이용하여 측정함

③ 환원당 함량 측정

환원당 함량은 dinitrosalicylic acid(DNS)법에 따라 측정함. 발효 물을 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 희석한 시료액 1 mL에 DNS 시약 2 mL을 혼합한 후 15분간 100°C에서 발색시킨 뒤 상온에서 충분히 냉각시킴. 냉각한 후 증류수 7 mL을 넣어 540 nm에서 흡광도를 측정하며 환원당 함량은 glucose를 표준물질로 사용하여 표준 곡선을 작성한 후 산출함

④ 알코올 함량 측정

알코올 함량 측정은 국제청 주류분석규정에 따라 측정함. 메스실린더에 발효물 100 mL

를 취한 후 등근 플라스크에 옮김. 발효물이 넣어져 있던 메스실린더를 증류수 10 mL로 3회 이상 씻은 후 그 액을 합침. Soxhlet heater를 이용하여 발효물이 들어있는 등근 플라스크에 열을 가하여 증류함. 증류액이 70 mL가 되면 증류를 정지하고 증류수를 보충하여 100 mL가 되도록 함. 이 후 교반하여 주정계 (ATAGO, PAL-2REFRACTOMETER)를 이용하여 알코올 함량을 나타냄

⑤ DO, BOD 측정

발효액의 용존산소량 및 생물화학적 산소요구량 측정은 (DO-31P, (주) TOADKK, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정함. 발효액 15 mL 정량하여 용존산소량을 측정하며, 발효 0일 차의 용존산소량은 100%, 생물학적 산소요구량은 0%로 환산하여 산출함

(다) 아로니아 최적 효모발효에 대한 분석 결과 (Bulk scale)

① pH 측정

산업적 아로니아 효모발효 조건에 따른 pH 변화는 표 21과 같음. 대형발효기의 특성상 72시간 간격으로 시료를 채취하여 pH를 측정하였으며 3회 가동 하여 효모발효를 진행함. 대형효모발효 1차, 2차, 3차 발효개시 전의 pH는 3.77~3.81로 큰 차이는 나타나지 않음. 발효 72시간에서 3군의 pH 모두 3.90 이상의 수치를 나타내었으며 발효 종료까지 지속적으로 pH 수치는 증가함. 이는 Jar fermentor의 pH 수치의 증가 패턴과 유사한 경향을 나타내었고 144시간의 pH 또한 4.02, 3.99, 3.97로 유사한 수치를 나타냄

표 21. 대형 발효시간에 따른 pH 변화

1차 산업적 효모발효시간에 따른 pH 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-1 ²⁾	3.814	3.996	4.015
2차 산업적 효모발효시간에 따른 pH 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-2 ²⁾	3.811	3.987	3.993
3차 산업적 효모발효시간에 따른 pH 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-3 ²⁾	3.769	3.901	3.968

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Bulk 알코올발효기/정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%+아로니아 슬러지 5%

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

산업적 아로니아 효모발효 조건에 따른 당도 변화는 표 22과 같음. 당도는 72시간 간격으로 측정하였으며 3회 가동 하여 효모발효를 진행함. 발효 개시 전 대형발효 1차, 2차, 3차의 초기 당도는 26.4~27.2%로 진행함. 대형 효모발효 72시간의 당도함량은 17.6%, 18.2%, 20.0%로 나타났으며 최종 발효 종료시간인 144시간에서 17.0~17.5%로 나타남. 발효 종료 후 Jar fermentor의 당도보다 대형발효기의 당도함량이 조금 더 높게 나타났는

데 이는 fermentor의 발효조건설정이 산업적 대형발효기보다 더욱 안정적인 것으로 생각
되어지며 두 기기의 효모발효시간에 따라 당도 함량이 감소하는 패턴은 일치하는 경향으
로 나타남

표 22. 대형 발효시간에 따른 당도 Brix(%) 변화

1차 산업적 효모발효시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-1 ²⁾	26.4±0.0 ³⁾	17.6±0.1	17.0±0.0
2차 산업적 효모발효시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-2 ²⁾	26.6±0.0	18.2±0.0	17.5±0.1
3차 산업적 효모발효시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-3 ²⁾	27.2±0.0	20.0±0.1	17.4±0.0

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Bulk 알코올발효기/정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농
축액 10%+배농축액 15%+아로니아 슬러지 5%, ³⁾All values are mean±SD.

③ 환원당 함량 측정

산업적 아로니아 효모발효 조건에 따른 환원당 함량 변화는 표 23과 같음. 시료는 72시
간 간격으로 채취하여 측정하였으며 3회 가동 하여 효모발효를 진행함. 대형효모발효 개
시 전 1차, 2차의 환원당 함량은 143.18~145.31 mg/mL로 나타났으며 3차의 경우 159.36
mg/mL로 나타남. 환원당 초기 함량의 차이는 대형배합의 차이로 인한 대형발효 3차 시
료군의 brix%가 1, 2차보다 높은 것의 차이로 생각됨. 환원당 함량의 경우 효모발효시간
에 따라 당도의 함량이 감소하는 것과 동일한 패턴을 나타내었으며 발효종료 시 대형 1
차, 2차의 환원당 함량은 8.70 mg/mL, 10.92 mg/mL, 3차의 환원당 함량은 13.07 mg/mL
까지 감소하였고 이는 Jar fermentor 실험군과 비교하였을 때의 패턴과 동일한 경향으로
나타남

표 23. 대형 발효시간에 따른 환원당(mg/mL) 함량 변화

1차 산업적 효모발효시간에 따른 환원당(mg/mL) 함량 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-1 ²⁾	143.18±5.32 ³⁾	26.89±1.38	8.70±0.51
2차 산업적 효모발효시간에 따른 환원당(mg/mL) 함량 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-2 ²⁾	145.31±4.51	12.95±0.42	10.92±0.25
3차 산업적 효모발효시간에 따른 환원당(mg/mL) 함량 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-3 ²⁾	159.36±8.06	35.99±4.12	13.07±5.34

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Bulk 알코올발효기/정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농
축액 10%+배농축액 15%+아로니아 슬러지 5%, ³⁾All values are mean±SD.

④ 알코올 함량 측정

산업적 아로니아 효모발효 조건에 따른 알코올 함량 변화는 표 24과 같음. 시료는 72시간 간격으로 채취하여 측정하였으며 3회 가동 하여 효모발효를 진행함. 효모발효에 의한 알코올 생성은 주로 포도당, 과당 등 당류에 의해 알코올, 이산화탄소로 변하는 혐기적 변화이며 대형 1차, 2차, 3차 시료군 모두 효모발효가 진행됨에 따라 알코올 함량은 지속적으로 증가하는 것으로 나타남. 발효 종료 시 대형 1차의 알코올 함량은 9.0%, 대형 2차, 3차 시료군의 알코올 함량은 9.5%로 나타남. 대형효모발효의 경우 fermentor보다 알코올이 조금 낮은 함량으로 나타났는데 이는 Jar fermentor의 완전한 혐기적조건, 대형발효기의 발효환경에 의한 차이로 사료되며 Jar fermentor와 같이 발효시간이 증가함에 따라 알코올 또한 증가하는 패턴은 일치하는 경향으로 나타남

표 24. 대형 발효시간에 따른 알코올(%) 함량 변화

1차 산업적 효모발효시간에 따른 알코올(%) 함량 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-1 ²⁾	0.0±0.00	7.5±0.00	9.0±0.00
2차 산업적 효모발효시간에 따른 알코올(%) 함량 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-2 ²⁾	0.0±0.00	8.5±0.00	9.5±0.00
3차 산업적 효모발효시간에 따른 알코올(%) 함량 변화 ¹⁾			
Time	0h	72h	144h
ABF-3 ²⁾	0.0±0.00	7.5±0.00	9.5±0.00

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Bulk 알코올발효기/정제수 25%+아로니아 추출물 50%+아로니아 농축액 10%+배농축액 15%+아로니아 슬러지 5%, ³⁾All values are mean±SD.

(5) 아로니아의 발효액의 시험분석 검증(공인인증기관)

(가) 발효 과정에서의 표준화 및 검증을 위하여 공인인증시험기관을 통하여 유기산 및 당류 등의 함량을 측정함

(나) 아로니아효모발효액(0일)의 시험·검사 결과 사과산 14.42 mg/g, 구연산 1.54 mg/g, 젖산 0.25 mg/g, 개미산 3.86 mg/g, 옥살산 0.03 mg/g, 호박산 2.55 mg/g으로 나타났으며 초산, 주석산은 불검출로 나타남. 또한 당류 121.02 mg/g, 루테인은 불검출로 나타났음. 아로니아효모발효액(3일)의 시험·검사 결과 사과산 15.50 mg/g, 구연산 2.02 mg/g, 젖산 0.50 mg/g, 개미산 3.97 mg/g, 옥살산 0.06 mg/g, 호박산 2.76 mg/g으로 나타났으며 초산, 주석산은 불검출로 나타남. 또한 당류는 1.02 mg/g로 감소하였으며 루테인은 불검출로 나타났음. 아로니아효모발효액(3일)의 시험·검사 결과 사과산 15.14 mg/g, 구연산 1.16 mg/g, 젖산 0.60 mg/g, 개미산 4.12 mg/g, 호박산 3.13 mg/g으로 나타났으며 초산, 주석산, 옥살산은 불검출로 나타남. 또한 당류는 0.57 mg/g로 감소하였으며 루테인은 불검출로 나타났음. 위의 결과로 비추어 볼 때 당류의 감소는 효모발효가 정상적으로 진

행되었음을 나타내는 척도로 볼 수 있으며, 유기산의 함량을 약간 증가함을 확인 할 수 있었음

제 T20200112001 호 분석제인 Y521-5141-4620			
시험·검사성적서			
제명	아로니아효모발효액(10일)	제조일자 (제조기간)	
제원	대한민국순천광역시곡성군곡성읍안곡리1-1로11	일명	차의
주소	전라남도 순천시 장성로 255(서면동)		
검사목적	합격용	검사방법	2020-11-26
		검사번호	T202012001
국가의 우리 연구원에 시험·검사위원회 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 번호일: 2020-12-14 시험·검사 책임자: 이명일 검사위원: 박희진, 김은영			
	시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비
	아세트산(mg/L)	14.12 mg/L	당도측정
	구연산(mg/L)	1.51 mg/L	당도측정
	포도당(mg/L)	3.25 mg/L	당도측정
	프락토스(mg/L)	불검출	당도측정
	유제인(mg/L)	불검출	당도측정
	말산(mg/L)	3.05 mg/L	당도측정
	황산(mg/L)	20.03 mg/L	당도측정
	유산(mg/L)	2.10 mg/L	당도측정
	당화력(포도당, 사과당, 배당)(mg/L)	121.02 mg/L	백당측정
	무산당(mg/L)	불검출	당도측정
국가의 우리 연구원에 시험·검사위원회 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 번호일: 2020-12-14 시험·검사 책임자: 이명일 검사위원: 박희진, 김은영			
한국기능식품연구원 2020년 12월 14일			

제 T20200112001 호 분석제인 Y521-5141-4620			
시험·검사성적서			
제명	아로니아효모발효액(10일)	제조일자 (제조기간)	
제원	대한민국순천광역시곡성군곡성읍안곡리1-1로11	일명	차의
주소	전라남도 순천시 장성로 255(서면동)		
검사목적	합격용	검사방법	2020-11-26
		검사번호	T202012001
국가의 우리 연구원에 시험·검사위원회 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 번호일: 2020-12-14 시험·검사 책임자: 이명일 검사위원: 박희진, 김은영			
	시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비
	아세트산(mg/L)	15.50 mg/L	당도측정
	구연산(mg/L)	2.02 mg/L	당도측정
	포도당(mg/L)	3.50 mg/L	당도측정
	프락토스(mg/L)	불검출	당도측정
	유제인(mg/L)	불검출	당도측정
	말산(mg/L)	3.07 mg/L	당도측정
	황산(mg/L)	20.06 mg/L	당도측정
	유산(mg/L)	2.70 mg/L	당도측정
	당화력(포도당, 사과당, 배당)(mg/L)	119.02 mg/L	백당측정
	무산당(mg/L)	불검출	당도측정
국가의 우리 연구원에 시험·검사위원회 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 번호일: 2020-12-14 시험·검사 책임자: 이명일 검사위원: 박희진, 김은영			
한국기능식품연구원 2020년 12월 14일			

제 T20200112001 호 분석제인 Y521-5141-4620			
시험·검사성적서			
제명	아로니아효모발효액(10일)	제조일자 (제조기간)	
제원	대한민국순천광역시곡성군곡성읍안곡리1-1로11	일명	차의
주소	전라남도 순천시 장성로 255(서면동)		
검사목적	합격용	검사방법	2020-11-26
		검사번호	T202012001
국가의 우리 연구원에 시험·검사위원회 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 번호일: 2020-12-14 시험·검사 책임자: 이명일 검사위원: 박희진, 김은영			
	시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사비
	아세트산(mg/L)	15.14 mg/L	당도측정
	구연산(mg/L)	1.16 mg/L	당도측정
	포도당(mg/L)	3.60 mg/L	당도측정
	프락토스(mg/L)	불검출	당도측정
	유제인(mg/L)	불검출	당도측정
	말산(mg/L)	4.12 mg/L	당도측정
	황산(mg/L)	20.03 mg/L	당도측정
	유산(mg/L)	3.13 mg/L	당도측정
	당화력(포도당, 사과당, 배당)(mg/L)	119.07 mg/L	백당측정
	무산당(mg/L)	불검출	당도측정
국가의 우리 연구원에 시험·검사위원회 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 번호일: 2020-12-14 시험·검사 책임자: 이명일 검사위원: 박희진, 김은영			
한국기능식품연구원 2020년 12월 14일			

(6) 아로니아의 발효원액의 숙성라인 구축

(가) 오크통 숙성 진행

오크통은 1일 주기로 정제수를 교환해주며 5일간 불림처리를 하며 완료 후 잡균의 생육을 억제하기 위해 아황산나트륨(1 g/l L)으로 내부소독을 진행함. 발효가 완료된 아로니아 발효액은 오크통으로 이동하여 6°C에서 숙성을 진행함

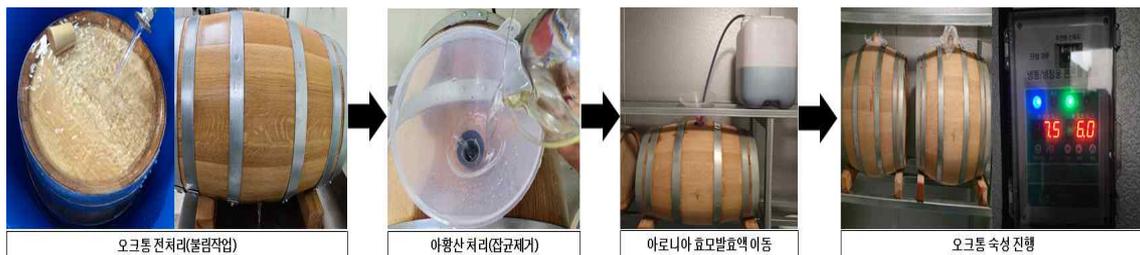


그림 21. 효모발효 종료 후 오크통 숙성 과정

(나) 아로니아 와인 숙성에 대한 분석 (오크통 숙성)

① 총산 및 pH측정

총산함량은 초산 발효 기간 중 시료를 원심분리 후 상층액 1 mL를 취해 1% Phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 용액으로 중화 적정하고 acetic acid 환산 계수로 계산하여 산도(%)를 나타냄. 발효물의 pH는 시료 20 mL를 취해 pH meter (SevenEasy, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정함

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

당도는 발효물 500 μL를 취해 당도계 (ATAGO, Pocket Refractometer, PAL-2)를 이용하여

여 측정함.

③ 알코올 함량 측정

알코올 함량 측정은 국제청 주류분석규정에 따라 측정함. 메스실린더에 발효물 100 mL를 취한 후 등근 플라스크에 옮김. 발효물이 넣어져 있던 메스실린더를 증류수 10 mL로 3회 이상 씻은 후 그 액을 합침. Soxhlet heater를 이용하여 발효물이 들어있는 등근 플라스크에 열을 가하여 증류함. 증류액이 70 mL가 되면 증류를 정지하고 증류수를 보충하여 100 mL가 되도록 함. 이 후 교반하여 주정계 (ATAGO, PAL-2REFRACTOMETER)를 이용하여 알코올 함량을 나타냄

(다) 아로니아 와인 숙성에 대한 분석 결과 (오크통 숙성)

① 총산 및 pH측정

오크통 숙성기간에 따른 아로니아 와인의 총산 및 pH 변화는 표 25과 같음. 효모발효가 종료된 산업화 scale의 아로니아 효모발효액을 오크통으로 이동시킨 후 숙성하여 1달 주기로 시료를 채취함. 산도의 경우 숙성 전 1.55~1.57%로 나타났으며 숙성 1달의 산도는 Oak-1, Oak-2 각각 1.52%, 1.57% 숙성 2달의 산도는 1.50%, 1.55%로 나타남. 산도(%)의 경우 숙성 2달까지 일정하게 유지 되는 것으로 나타남. pH의 경우 숙성 전 3.936~4.001의 수치를 나타내었으며 숙성 2달에서 4.014~4.045로 pH 수치가 약간 증가하는 경향을 보였으나 큰 차이는 없는 것으로 나타남

표 25. 오크통 숙성기간에 따른 pH 변화

숙성기간에 따른 아로니아 와인의 산도(%) 변화 ¹⁾			
Time	숙성 전	숙성 1달	숙성 2달
Oak-1 ²⁾	1.55±0.01 ³⁾	1.52±0.01	1.50±0.01
Oak-2	1.57±0.01	1.57±0.00	1.55±0.01
숙성기간에 따른 아로니아 와인의 pH 변화			
Time	숙성 전	숙성 1달	숙성 2달
Oak-1 ²⁾	4.001	4.032	4.045
Oak-2	3.936	4.002	4.014

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Bulk scale 아로니아 효모발효 종료 후 오크통 숙성진행, ³⁾All values are mean±SD.

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

오크통 숙성기간에 따른 아로니아 와인의 당도 변화는 표 26과 같음. 효모발효가 종료된 산업화 scale의 아로니아 효모발효액을 오크통으로 이동시킨 후 숙성하여 1달 주기로 시료를 채취함. 당도의 경우 숙성 전 Oak-1, Oak-2 각각 17.0%, 17.5%로 산업적 대형효모 발효의 당도 %와 일치하였고 숙성 2달차에서 각각 16.8%, 17.4%로 약간 감소하나 수치상 큰 차이는 없었으나 숙성이 더욱 지속될수록 당도함량은 감소할 것이라 생각됨

표 26. 오크통 숙성기간에 따른 당도 (Brix%) 변화

숙성기간에 따른 아로니아 와인의 당도(Brix%) 변화 ¹⁾			
Time	숙성 전	숙성 1달	숙성 2달
Oak-1 ²⁾	17.0±0.0 ³⁾	16.8±0.0	16.8±0.0
Oak-2	17.5±0.0	17.4±0.0	17.4±0.0

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Bulk scale 아로니아 효모발효 종료 후 오크통 숙성진행, ³⁾All values are mean±SD.

③ 알코올 함량 측정

오크통 숙성기간에 따른 아로니아 와인의 알코올 함량(%) 변화는 표 27과 같음. 효모발효가 종료된 산업화 scale의 아로니아 효모발효액을 오크통으로 이동시킨 후 숙성하여 1달 주기로 시료를 채취함. 숙성이 진행될수록 알코올의 함량은 증가하는 경향으로 나타남. 숙성 2달차에서의 알코올 함량은 Oak-1, Oak-2 각각 10.5%, 11.0%까지 증가하였으며 저온환경과 오크통의 영향의 의한 후발효가 지속적으로 진행되어 지는 것으로 사료됨

숙성기간에 따른 아로니아 와인의 알코올(%) 함량 변화 ¹⁾			
Time	숙성 전	숙성 1달	숙성 2달
Oak-1 ²⁾	9.0±0.0 ³⁾	10.0±0.0	10.5±0.0
Oak-2	9.5±0.0	10.5±0.0	11.0±0.0

¹⁾접종효모 : *Saccharomyces cerevisiae*, ²⁾Bulk scale 아로니아 효모발효 종료 후 오크통 숙성진행, ³⁾All values are mean±SD.

(7) 초산 균주에 대한 계대배양 진행 및 종초 제조 과정

(가) 식품의 초산 발효를 진행하기 전 산업적 이용가능 균주인 *Gluconobacter intermedius*(KSH-B141031)를 사용하였으며 균주의 활성을 높이고자 단일 Colony를 얻기 위해 액상배양부터 고체배양까지 계대배양을 진행함. 아로니아 효모발효액은 알코올(%)을 8%로 조정하여 Lab scale 에서 종초 배양을 진행함

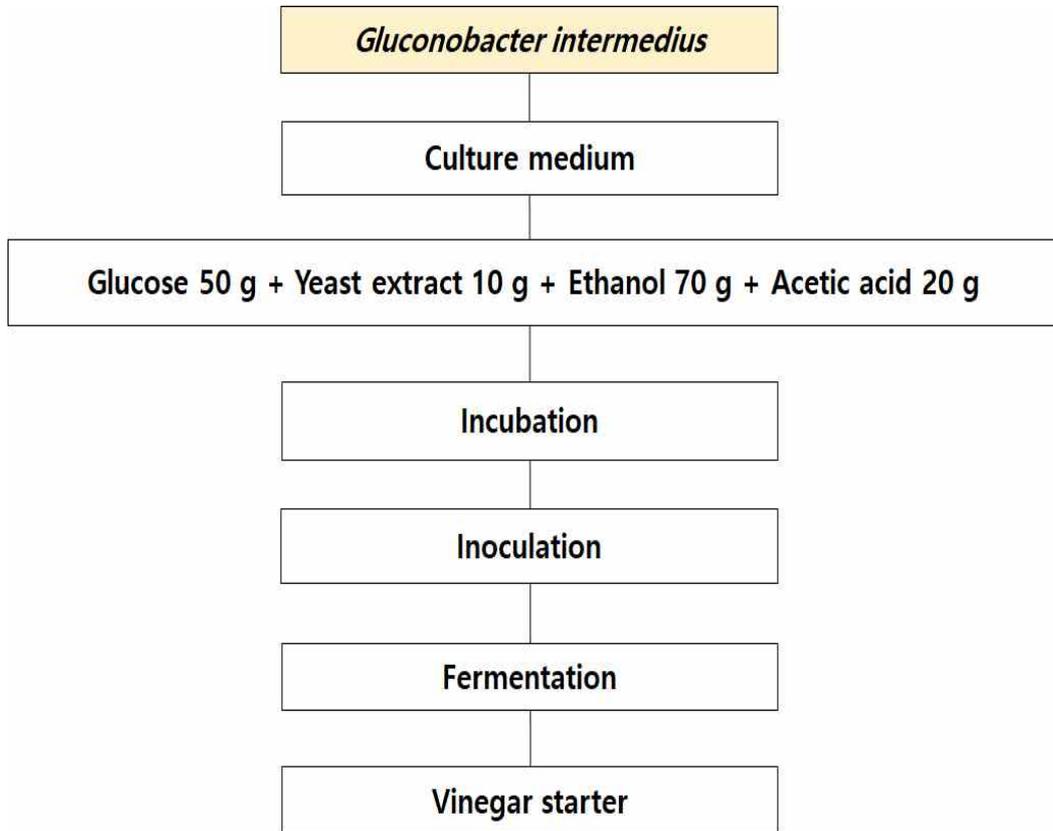


그림 22. 아로니아 효모발효액을 이용한 증초 제조 공정

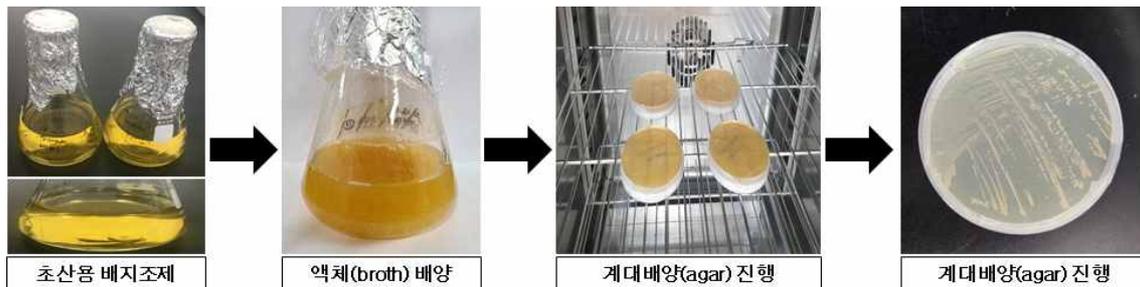


그림 23. 초산 균주 계대배양 진행 과정

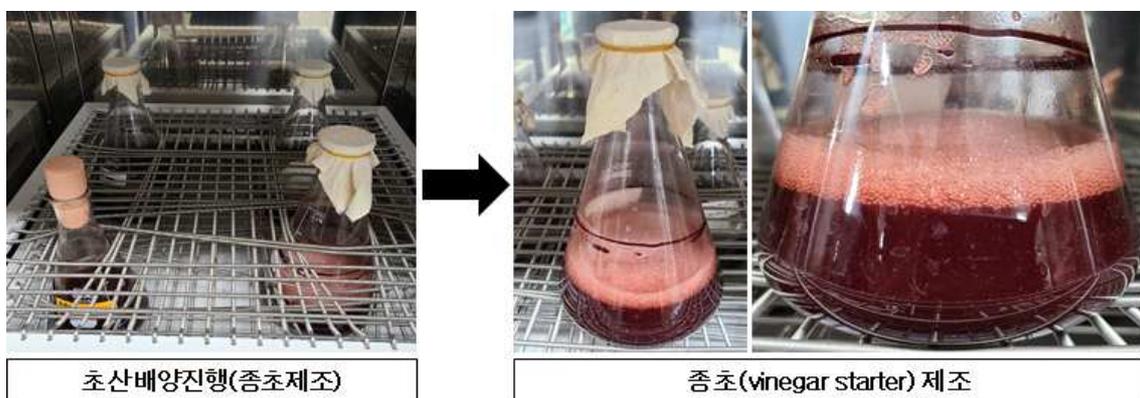


그림 24. 아로니아 알코올발효물을 이용한 증초배양 과정(Lab scale)

(나) 초산발효를 통한 아로니아 식초 제조

아로니아 식초 제조를 위한 초산발효 공정의 최적 조건을 확인하기 위해 (주)코바이오텍의 5 L Jar fermentor를 사용하여 진행함. Jar fermentor의 발효 진행 시간에 따라 총산도, pH, 당도(Brix%), 알코올함량(%), DO, BOD를 측정함. 초산발효가 진행되기 앞서 선행적으로 연구된 아로니아 추출물을 이용한 효모발효액으로 사용하여 초기산도를 1.5~2.0%으로 보정한 뒤 250 rpm, 30°C에서 통기량 VVM 0.5, VVM 1.0으로 호기적 발효를 진행함

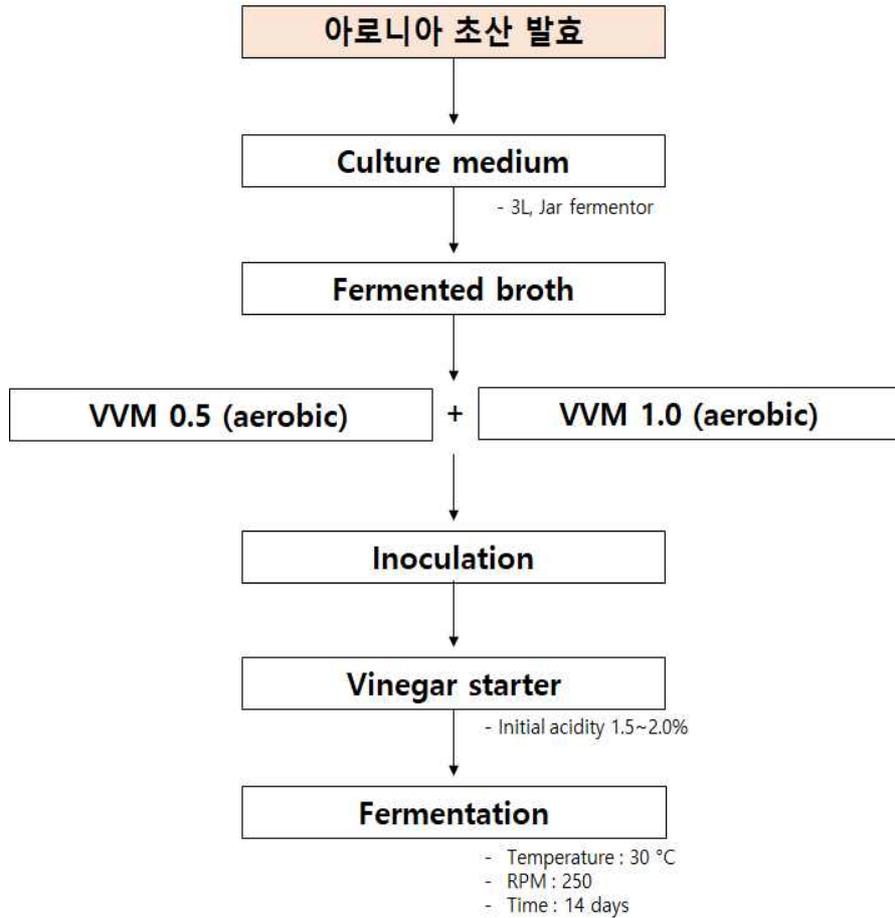


그림 25. Jar fermentor를 이용한 아로니아 초산발효 공정

(나) 아로니아 초산발효에 대한 분석 (Lab scale_Jar fermentor)

① 총산 및 pH측정

총산함량은 초산 발효 기간 중 시료를 원심분리 후 상층액 1 mL를 취해 1% Phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 용액으로 중화 적정하고 acetic acid 환산 계수로 계산하여 산도(%)를 나타냄. 발효물의 pH는 시료 20 mL를 취해 pH meter (SevenEasy, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정함

$$\text{Acidity (\%)} = \frac{0.1\text{N-NaOH Consumption} \times 0.006\text{g} \times F}{\text{Sample volume (mL)}} \times 100$$

F : 0.1N-NaOH factor

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

당도는 발효물 500 μ L를 취해 당도계 (ATAGO, Pocket Refractometer, P AL-2)를 이용하여 측정함

③ 알코올 함량 측정

알코올 함량 측정은 국세청 주류분석규정에 따라 측정함. 메스실린더에 발효물 100 mL를 취한 후 둥근 플라스크에 옮김. 발효물이 떨어져 있던 메스실린더를 증류수 10 mL로 3회 이상 씻은 후 그 액을 합침. Soxhlet heater를 이용하여 발효물이 들어있는 둥근 플라스크에 열을 가하여 증류함. 증류액이 70 mL가 되면 증류를 정지하고 증류수를 보충하여 100 mL가 되도록 함. 이 후 교반하여 주정계 (ATAGO, PAL-2REFRACTOMETER)를 이용하여 알코올 함량을 나타냄

④ DO, BOD 측정

발효액의 용존산소량 및 생물화학적 산소요구량 측정은 (DO-31P, (주) TOADKK, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정함. 발효액 15 mL 정량하여 용존산소량을 측정하며, 발효 0일 차의 용존산소량은 100%, 생물학적 산소요구량은 0%로 환산하여 산출함

(다) 아로니아 초산발효에 대한 분석

① 총산 및 pH측정

아로니아 와인을 이용한 초산발효의 기간에 따른 산도와 pH변화는 표 28, 29와 같음. 초산발효 개시 전 AF-0.5, AF-1.0 시료군의 초기 산도는 약 1.7~1.8%로 조정함. 두 시료군의 산도변화는 발효 8일까지 AF-1.0의 산도가 약 0.2~0.3% 정도 높게 나타났으나 이후 초산발효 14일에서 AF-0.5군의 산도가 4.15%, AF-10군의 산도가 2.98%로 AF-0.5군의 산도가 0.71배 높은 초산수율을 나타냄. 이는 통기량을 달리하였을 때 VVM 0.5의 조건이 VVM 1.0보다 적정조건임을 나타내었으며 식품공전에서 고시한 초산 함량 규격 4.0~20.0 w/v에 적합함. pH의 경우 두 시료군 모두 초산발효가 진행됨에 따라 수치가 낮아지는 것을 확인하였으며 초기 3.81에서 AF-0.5군의 경우 3.56, AF-1.0군의 경우 3.67로 나타남. pH의 경우 초산생성이 증가됨에 따라 수치가 감소한다고 보고되어지고 있으며 AF-0.5의

초산함량이 높은 것에 따른 경향으로 사료됨

표 28. 아로니아 초산발효 시간에 따른 총산도 함량 변화

초산발효 시간에 따른 산도(%) 함량 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AF-0.5 ²⁾	1.75±0.01 ³⁾	2.07±0.02	2.46±0.01	4.15±0.01
AF-1.0	1.76±0.01	2.24±0.01	2.74±0.02	2.98±0.01

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량, ³⁾All values are mean ±SD.

표 29. 아로니아 초산발효 시간에 따른 pH 변화

초산발효 시간에 따른 pH 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AF-0.5 ²⁾	3.81	3.74	3.71	3.56
AF-1.0	3.82	3.72	3.69	3.67

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량.

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

아로니아 와인을 이용한 초산발효의 기간에 따른 당도 변화는 표 30과 같음. 발효 초기 0일의 당도는 17.0~17.2%로 나타났으며 초산발효가 진행됨에 따라 서서히 감소하는 경향으로 나타남. 이는 당도가 초기 탄소원으로 작용하는 것으로 판단되어 진다. AF-0.5군의 당도는 4일차에서 15.7%, 8일 15.5%로 나타났으며 발효종료 14일에서는 15.2%로 나타남. AF-1.0군의 경우 AF-0.5시료군 보다 발효 4일에서 더 낮은 당도 %를 보였으나 발효 8일, 14일에서 당도는 변하지 않는 것으로 나타남

표 30. 아로니아 초산발효 시간에 따른 당도 변화

초산발효 시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AF-0.5 ²⁾	17.0±0.06 ³⁾	15.7±0.06	15.5±0.00	15.2±0.06
AF-1.0	17.2±0.06	15.5±0.06	15.3±0.00	15.3±0.00

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량, ³⁾All values are mean ±SD.

③ 알코올 함량 측정

아로니아 와인을 이용한 초산발효의 기간에 따른 알코올 변화는 표 31과 같음. 알코올 성분은 발효를 통해 초산으로 전환되는 물질이며 일반적으로 초산발효가 진행됨에 있어 알코올 함량은 4~8%로 보고되어 진다. AF-0.5, AF-1.0 시료군의 초기 알코올 함량은 8%로 나타났으며 두 시료군의 알코올 함량은 초산발효가 진행 될수록 지속적으로 감소하는 경향으로 나타났으나 AF-1.0군의 경우 발효 8일에서 발효 14일의 알코올 함량은 변화가

없는 것으로 나타남. 이는 AF-1.0이 발효 8일에서 발효 14일까지 산도변화가 거의 없는 것에 대한 이유로 나타난 결과로 판단됨

표 31. 아로니아 초산발효 시간에 따른 알코올(%) 함량 변화

초산발효 시간에 따른 알코올(%) 함량 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AF-0.5 ²⁾	8.0±0.06 ³⁾	4.3±0.29	2.5±0.00	0.5±0.00
AF-1.0	8.0±0.00	4.0±0.00	3.0±0.00	3.0±0.00

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량, ³⁾All values are mean ±SD.

④ DO, BOD 측정

아로니아 와인을 이용한 초산발효의 기간에 따른 DO, BOD 변화는 표 32, 33과 같음. 초산균은 초기성장기에서 빠른 성장과 원활한 대사를 위해 많은 산소를 요구함. 또한 미생물의 성장 정지와 사멸기에 접어들어 생균수가 감소함에 따라 용존산소량은 증가하게 됨. 통기량은 VVM 0.5, 1.0으로 설정하였으며, 발효 0시간에서 용존산소량과, 생화학적 산소요구량은 각각 100%, 0%으로 환산하여 나타냄. 초산발효 4일차에서 AF-0.5와 AF-1.0의 용존 산소량은 45.3%, 50.8%으로 생화학적 산소요구량은 AF-1.0군이 더 높게 나타났으나 발효 8일차에서는 AF-0.5군 1.5%, AF-1.0군 37.6%으로 AF-0.5의 생화학적 산소요구량은 98.5%, AF-1.0의 생화학적 산소요구량은 62.4%로 AF-0.5의 통기량 조건이 더 높은 것으로 나타남. 발효 종료지점인 14일차에서는 AF-0.5군이 100%의 생화학적 산소요구량을 나타내었으나 AF-1.0은 69.2%로 8일차 산소요구량과 큰 차이는 나타나지 않음. 이는 초산균주의 생육의 차이로 생각되어지며 VVM 0.5의 초산발효 조건이 VVM 1.0보다 더 적합한 것으로 판단되어짐

표 32. 아로니아 초산발효 시간에 DO(%) 변화

초산발효 시간에 따른 DO(%) 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AF-0.5 ²⁾	100.0	45.3	1.5	0.0
AF-1.0	100.0	50.8	37.6	30.8

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량.

표 33. 아로니아 초산발효 시간에 BOD(%) 변화

초산발효 시간에 따른 BOD(%) 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AF-0.5 ²⁾	0.0	44.7	98.5	100.0
AF-1.0	0.0	49.2	62.4	69.2

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량.

(라) 아로니아 식초제조를 위한 초산발효 조건에 대한 결론 및 제언

- ① 본 실험에서는 아로니아 효모발효액을 이용하여 초산균주를 접종함으로써 아로니아 식초 제조 공정 확립과 통기량을 달리 하여 식초제조의 최적 발효조건을 설정하기 위한 기초자료 결과를 나타냄
- ② 초산발효는 *Gluconobacter intermedius*(KSH-B141031) 균주를 사용함. 발효 개시 전 통기량(VVM)을 0.5와 1.0으로 설정하여 진행하였으며 초기산도 보정을 위해 아로니아 종초 10%를 첨가하였고 초기 알코올 함량의 경우 8%로 나타남
- ③ 통기량(VVM) 0.5, 1.0의 조건에서의 산도측정 결과 각각 4.15%, 2.98%로 나타났으며 통기량 0.5 발효조건의 초산수율이 더 높게 나타남
- ④ 식품공전에서 고시한 초산 함량 규격 4.0~20.0 w/v에 적합한 조건은 통기량(VVM) 0.5이며 최종 배양 조건은 14일로 나타남. 당도와 알코올 함량의 경우 초산발효가 진행됨에 따라 지속적으로 감소하는 경향으로 나타남
- ⑤ Jar fermentor를 이용하여 발효 공정의 최적조건을 확인하고 이후 산업적(Bulk) 초산 발효를 진행함. 발효 종료 후 연속원심분리기를 이용하여 아로니아 식초에 대한 침전 부산물을 분리함

(8) 기능성 소재의 대량생산 공정 확립을 위한 초산발효 공정 표준화

(가) 아로니아 최적 초산발효 공정 확립

아로니아 초산발효 공정의 최적 조건을 확인하기 위하여 (주)코바이오텍의 5 L Jar fermentor를 사용하여 진행함. Jar fermentor의 발효 진행 시간에 따라 총산도, pH, 당도 (brix%), 알코올함량(%), DO, BOD를 측정함. 초산발효는 선행적으로 연구된 아로니아 효모발효액을 사용하여 종초를 첨가한 후 초기 산도를 1.5~2.0%로 보정한 뒤 통기량 VVM 0.5, 250 rpm, 30°C로 발효조건을 설정하여 14일간 호기성 발효를 진행함

아로니아 식초 제조 최적 공정 확립

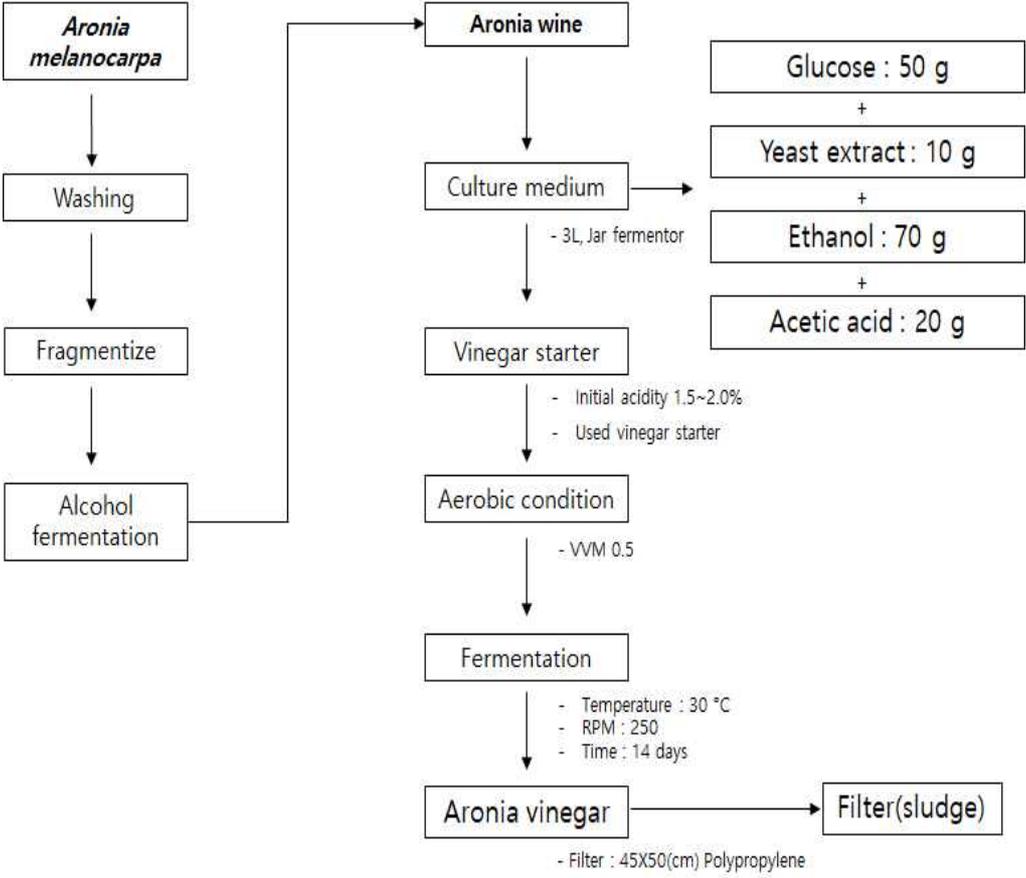


그림 26. Jar fermentor를 이용한 아로니아 초산발효 최적 발효조건 확립

(나) 아로니아 초산발효에 대한 분석 (Jar fermentor VVM 0.5)

① 총산 및 pH측정

총산함량은 초산 발효 기간 중 시료를 원심분리 후 상층액 1 mL를 취해 1% Phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 용액으로 중화 적정하고 acetic acid 환산 계수로 계산하여 산도(%)를 나타냄. 발효물의 pH는 시료 20 mL를 취해 pH meter (SevenEasy, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정함

$$\text{Acidity (\%)} = \frac{0.1\text{N-NaOH Consumption} \times 0.006\text{g} \times F}{\text{Sample volume (mL)}} \times 100$$

F : 0.1N-NaOH factor

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

당도는 발효물 500 μL 를 취해 당도계 (ATAGO, Pocket Refractometer, P AL-2)를 이용하여 측정함

③ 알코올 함량 측정

알코올 함량 측정은 국세청 주류분석규정에 따라 측정함. 메스실린더에 발효물 100 mL를 취한 후 등근 플라스크에 옮김. 발효물이 떨어져 있던 메스실린더를 증류수 10 mL로 3회 이상 씻은 후 그 액을 합침. Soxhlet heater를 이용하여 발효물이 들어있는 등근 플라스크에 열을 가하여 증류함. 증류액이 70 mL가 되면 증류를 정지하고 증류수를 보충하여 100 mL가 되도록 함. 이 후 교반하여 주정계 (ATAGO, PAL-2REFRACTOMETER)를 이용하여 알코올 함량을 나타냄

④ DO, BOD 측정

발효액의 용존산소량 및 생물화학적 산소요구량 측정은 (DO-31P, (주) TOADKK, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정함. 발효액 15 mL 정량하여 용존산소량을 측정하며, 발효 0일 차의 용존산소량은 100%, 생물학적 산소요구량은 0%로 환산하여 산출함

(다) 아로니아 초산발효에 대한 분석 결과 (Jar fermentor VVM 0.5)

① 총산 및 pH측정

아로니아 와인을 이용한 초산발효의 기간에 따른 산도와 pH변화는 표 34, 35와 같음. 초산발효 개시 전 AAF-0.5 시료군의 초기 산도는 1.78%로 나타남. 산도변화는 발효 8일까지 2.13%로 약 0.4%만큼 증가하였으나 발효 14일에서 산도 4.14%로 급격하게 증가함. pH의 경우 초산발효가 진행됨에 따라 수치가 낮아지는 것을 확인하였으며 초기 3.87에서 초산발효 종료 후 3.60로 나타남

표 34. 아로니아 초산발효 시간에 따른 총산도 함량 변화

초산발효 시간에 따른 산도(%) 함량 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AAF-0.5 ²⁾	1.78±0.01 ³⁾	1.99±0.01	2.13±0.01	4.14±0.01

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량(VVM 0.5), ³⁾All values are mean±SD.

표 35. 아로니아 초산발효 시간에 따른 pH 변화

초산발효 시간에 따른 pH 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AAF-0.5 ²⁾	3.87	3.78	3.72	3.60

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량(VVM 0.5).

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

아로니아 와인을 이용한 초산발효의 기간에 따른 당도 변화는 표 36과 같음. 발효 초기 0일의 당도는 16.1%로 나타났으며 초산발효가 진행됨에 따라 서서히 감소하는 경향으로 나타남. 이는 당도가 초기 발효에 필요한 탄소원 으로서 초산발효에 작용하는 것으로 판단되어지며 발효 4일차에서 15.1%, 8일 14.5%로 나타났고 발효종료 14일에서는 14.5%로 발효 8일차와 동일하게 나타남

표 36. 아로니아 초산발효 시간에 따른 당도 변화

초산발효 시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AAF-0.5 ²⁾	16.1±0.00 ³⁾	15.1±0.00	14.5±0.00	14.5±0.00

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량(VVM 0.5), ³⁾All values are mean±SD.

③ 알코올 함량 측정

아로니아 와인을 이용한 초산발효의 기간에 따른 알코올 변화는 표 37과 같음. 알코올 성분은 발효를 통해 초산으로 전환되는 물질이며 일반적으로 초산발효가 진행됨에 있어 알코올 함량은 4~8%로 보고되어 진다. AAF-0.5 시료군의 초기 알코올 함량은 8.2%로 나타났고 발효 4일에서 4.0%, 발효 8일에서 1.7%까지 감소하였으며 발효종료 14일의 알코올함량은 0.5%로 나타남

표 37. 아로니아 초산발효 시간에 따른 알코올(%) 함량 변화

초산발효 시간에 따른 알코올(%) 함량 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AAF-0.5 ²⁾	8.2±0.29 ³⁾	4.0±0.00	1.7±0.29	0.5±0.00

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량(VVM 0.5), ³⁾All values are mean±SD.

④ DO, BOD 측정

아로니아 와인을 이용한 초산발효의 기간에 따른 DO, BOD 변화는 표 38, 39과 같음. 초산균은 초기성장기에서 빠른 성장과 원활한 대사를 위해 많은 산소를 요구함. 또한 미생물의 성장 정지와 사멸기에 접어들어 생균수가 감소함에 따라 용존산소량은 증가하게 됨. 통기량은 VVM 0.5 설정하였으며, 발효 0시간에서 용존산소량과, 생화학적 산소요구량은 각각 100%, 0%으로 환산하여 나타냄. 초산발효 4일차에서 AAF-0.5의 용존 산소량은 73.5%로 생화학적 산소요구량은 26.5%로 나타났으며 초산발효가 진행됨에 따라 용존 산소량은 감소하여 발효 14일에서 1.2%로 나타난 반면 생화학적 산소요구량의 경우 98.8%까지 증가하는 경향으로 나타남

표 38. 아로니아 초산발효 시간에 DO(%) 변화

초산발효 시간에 따른 DO(%) 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AAF-0.5 ²⁾	100.0	73.5	26.3	1.2

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량(VVM 0.5).

표 39. 아로니아 초산발효 시간에 BOD(%) 변화

초산발효 시간에 따른 BOD(%) 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
AAF-0.5 ²⁾	0.0	26.5	73.7	98.8

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedium*(KSH-B141031), ²⁾Jar fermentor 통기량(VVM 0.5).

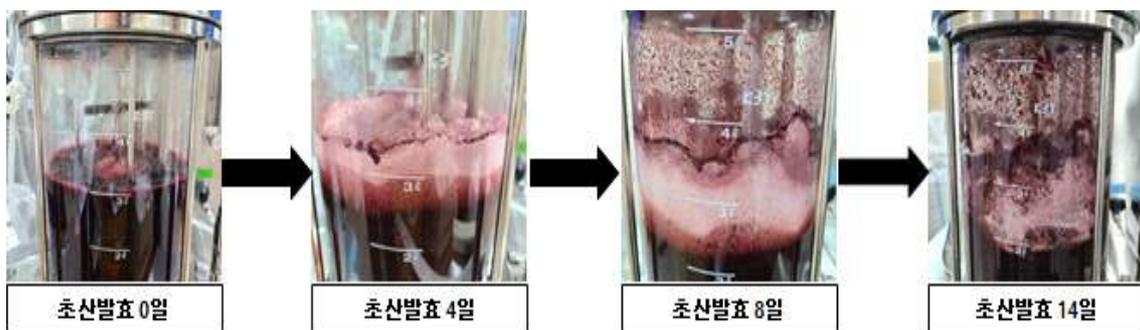


그림 27. 초산발효 기간에 따른 Jar fermentor 외형 확인

(라) 아로니아 초산발효에 대한 분석 (Bulk scale)

① 총산 및 pH 측정

총산함량은 초산 발효 기간 중 시료를 원심분리 후 상층액 1 mL를 취해 1% Phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 용액으로 중화 적정하고 acetic acid 환산 계수로 계산하여 산도(%)를 나타냄. 발효물의 pH는 시료 20 mL를 취해 pH meter

(SevenEasy, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정함

$$\text{Acidity (\%)} = \frac{0.1\text{N-NaOH Consumption} \times 0.006\text{g} \times F}{\text{Sample volume (mL)}} \times 100$$

F : 0.1N-NaOH factor

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

당도는 발효물 500 μL 를 취해 당도계 (ATAGO, Pocket Refractometer, PAL-2)를 이용하여 측정함

③ 알코올 함량 측정

알코올 함량 측정은 국제청 주류분석규정에 따라 측정함. 메스실린더에 발효물 100 mL를 취한 후 둥근 플라스크에 옮김. 발효물이 떨어져 있던 메스실린더를 증류수 10 mL로 3회 이상 씻은 후 그 액을 합침. Soxhlet heater를 이용하여 발효물이 들어있는 둥근 플라스크에 열을 가하여 증류함. 증류액이 70 mL가 되면 증류를 정지하고 증류수를 보충하여 100 mL가 되도록 함. 이 후 교반하여 주정계 (ATAGO, PAL-2REFRACTOMETER)를 이용하여 알코올 함량을 나타냄

(마) 아로니아 초산발효에 대한 분석 결과 (Bulk scale)

① 총산 및 pH 측정

아로니아 와인을 이용한 산업적 초산발효의 기간에 따른 산도와 pH 변화는 표 40, 41와 같음. 시료는 0일, 4일, 8일, 14일 간격으로 시료를 채취하여 측정하였으며 초산발효 개시 전 BAF-1의 초기 산도는 1.79%로 나타남. 산도변화는 발효 8일까지 3.08%로 증가하여 발효 14일에서 산도 4.20%로 초기산도보다 약 46.61%의 초산수율이 증가하는 것으로 나타남. pH의 경우 초산발효가 진행됨에 따라 수치가 낮아지는 것을 확인하였으며 초기 pH 4.01에서 초산발효 종료 후 pH 3.61로 나타남

표 40. 아로니아 대형초산발효 시간에 따른 총산도 함량 변화

초산발효 시간에 따른 산도(%) 함량 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
BAF-1 ²⁾	1.79±0.00 ³⁾	1.97±0.00	3.08±0.02	4.20±0.01

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedius*(KSH-B141031), ²⁾Bulk scale 초산발효, ³⁾All values are mean±SD.

표 41. 아로니아 대형초산발효 시간에 따른 pH 변화

초산발효 시간에 따른 pH 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
BAF-1 ²⁾	4.01	3.93	3.75	3.61

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedius*(KSH-B141031), ²⁾Bulk scale 초산발효.

② Brix (Soluble solid content) 함량 측정

아로니아 와인을 이용한 산업적 초산발효의 기간에 따른 당도 변화는 표 42과 같음. 발효 초기 0일의 당도는 16.7%로 나타났으며 초산발효가 진행됨에 따라 지속적으로 감소하여 발효 4일 14.8%, 발효 8일 13.9%, 발효 14일 13.2%로 나타났으며 Lab scale에서 진행되었던 당도 변화의 경향과 동일한 패턴을 나타냄

표 42. 아로니아 대형초산발효 시간에 따른 당도 변화

초산발효 시간에 따른 당도 Brix(%) 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
BAF-1 ²⁾	16.7±0.00 ³⁾	14.8±0.00	13.9±0.00	13.2±0.00

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedius*(KSH-B141031), ²⁾Bulk scale 초산발효, ³⁾All values are mean±SD.

③ 알코올 함량 측정

아로니아 와인을 이용한 산업적 초산발효의 기간에 따른 알코올 변화는 표 43과 같음. 알코올 성분은 발효를 통해 초산으로 전환되는 물질이며 일반적으로 초산발효가 진행됨에 있어 알코올 함량은 4~8%로 보고되어 진다. BAF-1 시료군의 초기 알코올 함량은 8.0%로 나타났고 발효 4일에서 6.2%, 발효 8일에서 3.5%까지 감소함. 알코올 함량 또한 Lab scale에서의 알코올함량 변화가 동일하게 감소하는 패턴을 나타내었으나 발효종료 14일의 알코올함량은 1.83%로 나타남. 이는 Jar fermentor와 다르게 발효기기 형상에 의한 air 주입의 차이로 사료됨

표 43. 아로니아 대형초산발효 시간에 따른 알코올(%) 함량 변화

초산발효 시간에 따른 알코올(%) 함량 변화 ¹⁾				
Time	0일	4일	8일	14일
BAF-1 ²⁾	8.0±0.00 ³⁾	6.2±0.29	3.5±0.00	1.83±0.29

¹⁾접종효모 : 종초+*Gluconobacter intermedius*(KSH-B141031), ²⁾Bulk scale 초산발효, ³⁾All values are mean±SD.

(9) 산업적 초산발효 진행 및 아로니아 식초 정제물(부산물) 필터 진행

(가) Jar fermentor를 이용한 초산발효 종료 후 기능성 소재의 대량생산을 위한 산업적 초산 발효를 진행함. 발효조건 중 온도 30℃를 제외한 나머지 대형 발효통의 rpm 특성과 발효기환경을 고려하여 1일당 1시간씩 air 주입을 진행함. 초산발효가 종료된 발효액은 산업용 연속원심분리기를 이용하여 아로니아 발효 부산물과 발효액을 분리함. 분리된 부산물은 열풍건조를 진행하여 분말화를 진행함

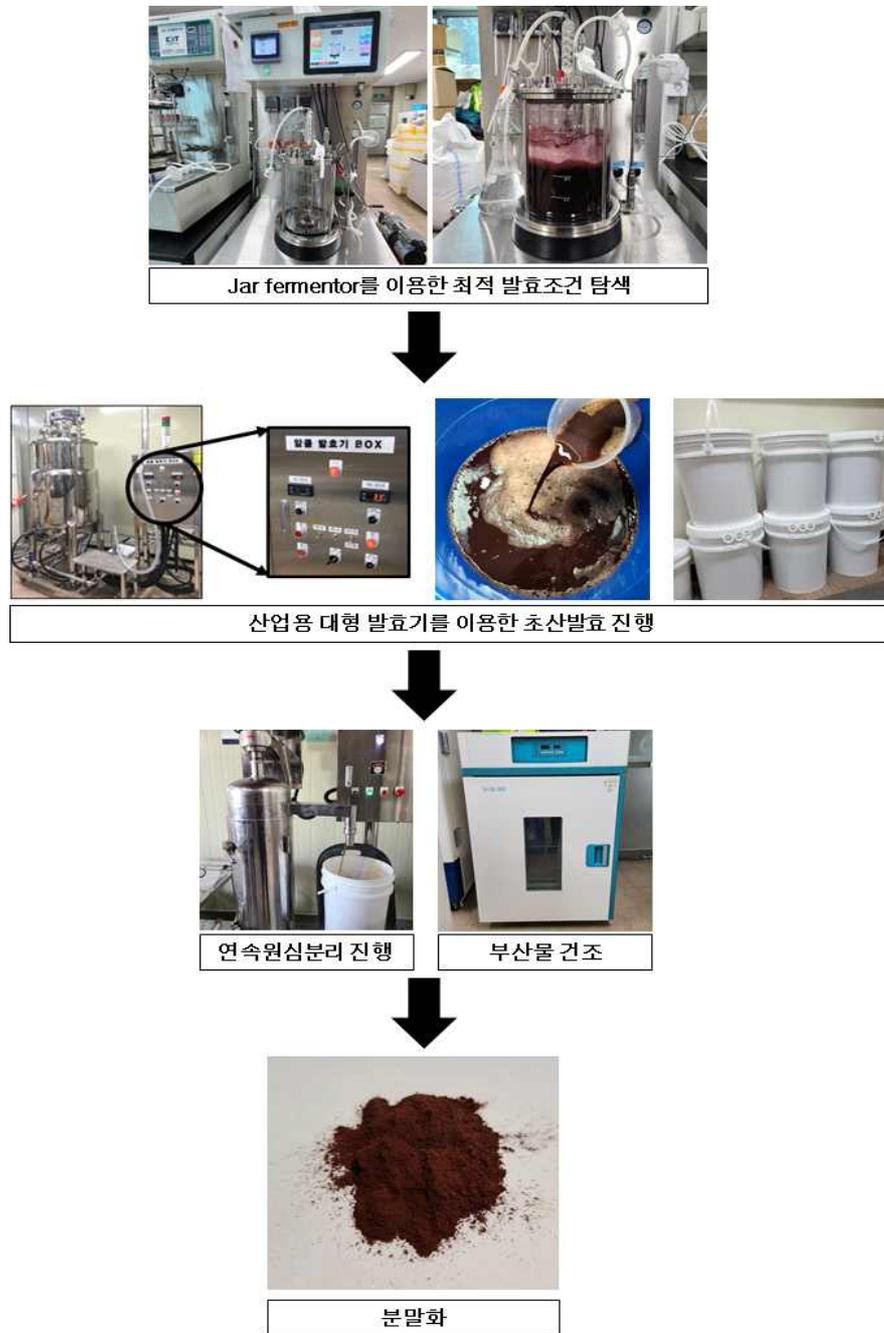


그림 28. 산업적 Bulk scale 초산발효 진행 후 초산발효 부산물 분말화 진행

2-2. 아로니아 원물 및 개발 소재에 대한 표준물질 분석법 개발 및 유효성(효능)평가

가. 표준물질 분석법 개발

(1) 유기계 화합물 함량 분석

(가) 총 폴리페놀 함량

아로니아 다량 함유되어 있는 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정함. 아로니아 발효 정제물 시료에 Folin- ciocalteu' s phenol reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) 를 넣어 실온에서 3분간 반응 한 후 1M Na_2CO_3 용액을 혼합하여 암실에서 90

분간 반응시킨 다음 micro plate reader를 사용하여 765 nm에서 흡광도를 측정함. 페놀 화합물 함량은 표준물질 gallic acid를 사용하여 작성된 표준 검량 곡선에 적용하였으며 gallic acid equivalents (GAE) 로 나타냄

(나) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량 분석은 Aluminum colorimetric method를 이용하여 측정함. 즉 시료 25 μ L에 증류수 135 μ L를 혼합한 후 5% Sodium nitrite 10 μ L를 추가한 후 5분간 반응시킨 다음 10% Aluminum chloride를 15 μ L 첨가하여 6분간 반응시킨 후 1 M Sodium hydroxide 50 μ L와 증류수 50 μ L를 첨가한 후 510 nm에서 흡광도를 측정함. 표준물질은 Quercetin을 이용하여 mg QE (Quercetin equivalents) 로 나타냄

(다) 축합형 탄닌 함량

총 탄닌 함량은 아로니아 식초+갈대순 추출물 혼합 시료 50 μ L에 1% vanillin 과 7 M H₂SO₄를 100 μ L 첨가한 다음 혼합하여 15분 후 500 nm에서 흡광도를 측정함. Catechin 을 이용하여 mg CE (Catechin equivalents) 로 나타냄

(라) 총 안토시아닌 함량

총 안토시아닌 함량은 측정을 위해 1% HCl을 첨가한 Ethanol을 넣어 15분간 sonication 하여 안토시아닌을 추출하였으며, 15000 rpm에서 10분간 원심분리를 진행하여 얻어진 상층액을 실험에 사용함. 농도에 맞게 희석한 시료에 0.025 M Potassium Chloride buffer (pH 1.0) 과 0.4 M Sodium acetate buffer (pH 4.5)를 혼합한 뒤 15 분 동안 반응시키고 510, 700 nm에서 측정함. 실험 농도는 단일 농도 1000 μ g/mL으로 설정하였으며, 표준물질은 최고흡광도 확인 후 측정 시 안토시아닌 램다맥스값을 적용함.

$$\text{Total anthocyanin content(mg/gram)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / \epsilon \times V$$

$$A (\text{Absorbance}) = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 1.0}} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 4.5}}$$

$$MW (\text{Molecular weight of cyanidine-3-glucoside}) = 322.17$$

DF: Dilution factor

$$\epsilon (\text{cyanidin chloride molar absorbance}) = 24,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

V = final volume of sample

(2) 유기계 화합물 함량 분석 결과

(가) 총 폴리페놀 함량

Folin-Ciocalteu's phenol reagent가 각 시료의 페놀성 화합물에 의해 환원되어 청색으로 발색하는 것이 원리이며 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 mg GAE 당량으로 나타냄. 측정 결과, 아로니아 효모 발효 진행 후에는 발효 시간이 지남에 따라 효모 발효물에서 폴리페놀 함량이 다소 증가하였으나, 아로니아 초산 발효 과정을 거친 후에는 폴리페놀 함량이 감소함 (표 44)

표 44. 시간에 따른 아로니아 효모발효 및 초산발효의 총 폴리페놀 함량

Total Polyphenol Content (GAE ^a mg/gram)				
		0일차	3일차	6일차
아로니아 효모 발효물 (와인)	1차	22.67±0.08	27.99±0.11	27.94±0.68
	2차	23.01±0.31	28.47±0.36	27.37±0.25
	3차	22.04±0.31	27.93±1.90	27.34±0.56
아로니아 효모 발효 부산물	1차	17.29±0.48	14.17±0.57	13.51±0.47
	2차	15.31±0.53	18.20±0.12	16.67±0.19
	3차	21.93±0.04	16.93±0.18	19.08±0.84

Total Polyphenol Content (GAE ^a mg/gram)					
		0일차	4일차	8일차	14일차
아로니아 초산 발효물(식초)		54.22±0.56	32.98±0.34	29.15±0.77	25.51±0.57
아로니아 초산 발효 부산물		11.08±0.19	10.29±0.55	10.73±0.13	9.43±0.16

^a Values are expressed as mg Gallic acid equivalents per gram of sample (GAE) (n=3) N.D.=Not Detection.

(나) 총 플라보노이드 함량

플라보노이드의 함량은 Quercetin을 이용한 표준곡선을 이용하였으며, mg QE equivalents per gram으로 나타냄. 측정 결과, 총 폴리페놀 함량의 결과와 동일하게 효모 발효 진행 후 발효물의 플라보노이드 함량이 증가하는 결과와 초산 발효 진행 후 플라보노이드 함량이 감소하는 결과가 나타남 (표 45)

표 45. 시간에 따른 아로니아 효모발효 및 초산발효의 총 플라보노이드 함량

		Total Flavonoid Content (QE ^a mg/gram)		
		0일차	3일차	6일차
아로니아 효모 발효물(와인)	1차	137.27±1.94	157.89±2.33	148.28±0.85
	2차	124.98±1.94	157.46±2.33	150.26±8.09
	3차	120.04±3.53	149.41±1.71	147.72±3.60
아로니아 효모 발효 부산물	1차	98.99±3.42	91.93±0.73	72.86±0.85
	2차	75.97±2.69	98.00±5.26	88.40±2.82
	3차	117.63±3.60	93.20±1.53	109.58±3.07

		Total Flavonoid Content (QE ^a mg/gram)			
		0일차	4일차	8일차	14일차
아로니아 초산 발효물(식초)		1432.07±25.99	594.70±13.47	463.38±21.01	386.62±12.15
아로니아 초산 발효 부산물		185.61±8.02	182.58±6.60	196.72±4.63	174.49±2.31

^a Values are expressed as mg Quercetin equivalents per gram of sample (QE) (n=3) N.D.=Not Detection.

(다) 축합형 탄닌 함량

축합형 탄닌 함량은 Vanillin 방법을 변형하여 측정함. Catechin을 이용한 표준곡선으로 mg CE equivalents per gram으로 나타냄. 측정 결과, 두 종류의 발효 과정 모두 발효물과 발효 부산물이 발효 전과 비교하였을 때 축합형 탄닌 함량이 감소하는 패턴을 확인하였으며, 초산 발효 부산물은 표준 곡선 내에서 함량이 검출되지 않았음 (표 46)

표 46. 시간에 따른 아로니아 효모발효 및 초산발효의 축합형 탄닌 함량

		Condensed Tannin Content (CE ^a mg/gram)		
		0일차	3일차	6일차
아로니아 효모 발효물(와인)	1차	4.78±0.18	3.71±0.10	3.05±0.12
	2차	4.63±0.36	4.08±0.29	3.21±0.06
	3차	4.34±0.20	4.30±0.08	2.87±0.05
아로니아 효모 발효 부산물	1차	7.06±0.33	3.05±0.24	2.79±0.22
	2차	4.81±0.16	5.29±0.13	2.81±0.07
	3차	10.64±0.25	4.22±0.09	4.05±0.18

Condensed Tannin Content (CE ^a mg/gram)				
	0일차	4일차	8일차	14일차
아로니아 초산 발효물 (식초)	116.62±4.86	8.75±0.48	N.D.	N.D.
아로니아 초산 발효 부산물	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

^a Values are expressed as mg Catechin equivalents per gram of sample (CE) (n=3) N.D.=Not Detection.

(라) 총 안토시아닌 함량

총 안토시아닌 함량은 최고 흡광도 확인 후 측정 시 안토시아닌 램다맥스값을 적용함. 측정 결과, 아로니아 효모 발효 과정에서는 발효물보다 발효 부산물이 더 많은 안토시아닌 함량을 나타냈으며, 발효 시간이 지남에 따라 안토시아닌 함량이 줄어드는 패턴을 나타냄. 이는 아로니아 초산 발효 과정에서도 동일하게 나타남 (표 47)

표 47. 시간에 따른 아로니아 효모발효 및 초산발효의 총 안토시아닌 함량

Total Anthocyanin Content (CE ^a mg/gram)				
		0일차	3일차	6일차
아로니아 효모 발효물(와인)	1차	0.18±0.01	0.24±0.04	0.06±0.00
	2차	0.11±0.00	0.08±0.00	0.11±0.00
	3차	0.03±0.00	0.06±0.00	0.08±0.00
아로니아 효모 발효 부산물	1차	1.24±0.01	0.52±0.01	0.29±0.00
	2차	0.45±0.01	0.39±0.01	0.38±0.01
	3차	0.89±0.01	0.64±0.01	0.36±0.01

Total Anthocyanin Content (CE ^a mg/gram)				
	0일차	4일차	8일차	14일차
아로니아 초산 발효물(식초)	0.46±0.07	0.03±0.01	0.01±0.00	0.01±0.01
아로니아 초산 발효 부산물	0.12±0.01	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00

^a Values are expressed as mg Cyanidin chloride equivalents per gram of sample (CE) (n=3) N.D.=Not Detection.

(3) 안토시아닌 분석 함량 분석

(가) 실험재료 및 추출

시료 1 g을 취하여 0.1% HCl이 들어가 있는 methanol 10 mL을 가하여 세차게 흔들었다. 이를 원심분리 (35,000 rpm, 15분)하여 상층액을 시험용액으로 사용함

(나) 안토시아닌 분석

HPLC 분석에는 Agilent 1260 Infinity (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며 컬럼은 phenomenex Gemini column (150 x 4.6 mm, 3 μ m)을 이용함. 검출기는 Photo diode array detector(PDA)를 사용하여 파장 306 nm에서 측정하였으며, 이동상 유량은 0.8 mL/min으로 함. 이동상 A는 100% water이며, B는 acetonitrile : water = 7 : 3을 사용함. 이동상 A, B에는 동일하게 0.5% TFA(per 1 L)를 넣어 사용함. 분석조건은 표 48에 나타낸 조건을 이용하여 분석함

표 48. Anthocyanin HPLC 분석조건

Injection volume: 10 μ L

Flow: 0.8 mL/min

Column: Phenomenex Gemini C18, 3 μ m, 4.6 x 150 mm

Time (min)	A% ^a	B% ^b
0	85	15
5	85	15
20	70	30
23	70	30
25	0	100
30	0	100
31	85	15
35	85	15

※A/B solvents included 0.5% TFA^c (per 1 L)

a: 100% water/ b : acetonitrile 7 : water 3/ c : trifluoroacetic acid

(4) 안토시아닌 분석 함량 분석 결과

(가) 아로니아 용매별 추출조건에 따른 안토시아닌 함량 분석

효모 발효시 첨가되는 아로니아 주정 추출물을 제조하기 위하여 아로니아를 파쇄하여 식품에 사용할 수 있는 주정을 활용하여 주정 %별 아로니아 추출을 진행 하였고, 아로니아에 가장 많이 함유한 지표 Anthocyanin 3종의 함량을 확인함. 그 결과 유의적이진 않지만 주정 %가 높아질수록 추출되는 Anthocyanin함량이 늘어나는 것을 확인 할 수 있었고,

이 결과와 함께 문헌조사^{1,3} 및 가공을 위한 최적 추출방법을 주정 70%로 확정함

표 49. 효모 발효에 사용할 아로니아 추출물 최적 추출조건 확립을 위한 추출용매 별 Anthocyanin의 함량

주정 비율	mg/100 mL			
	cyanidin-3-O- galactoside chloride	cyanidin-3-O- glucoside chloride	cyanidin-3-O- arabinoside chloride	Total
10%	0.29±0.01	0.77±0.05	0.39±0.00	1.46±0.04
20%	0.83±0.05	0.85±0.05	0.61±0.04	2.30±0.08
30%	14.48±0.36	5.68±0.34	6.95±0.15	27.11±0.19
40%	23.02±0.58	9.32±1.75	9.73±0.28	42.07±1.47
50%	48.33±2.81	15.58±2.24	17.85±0.95	81.76±5.16
60%	19.70±0.48	7.97±1.59	7.58±0.26	35.25±0.86
70%	34.77±3.23	10.43±1.63	11.92±1.08	57.11±1.91
80%	56.09±2.12	19.49±3.07	19.63±0.86	95.21±0.34
90%	41.76±0.68	14.19±3.10	14.09±0.37	70.05±2.11
100%	51.12±4.41	20.60±4.72	16.96±1.78	88.68±1.87

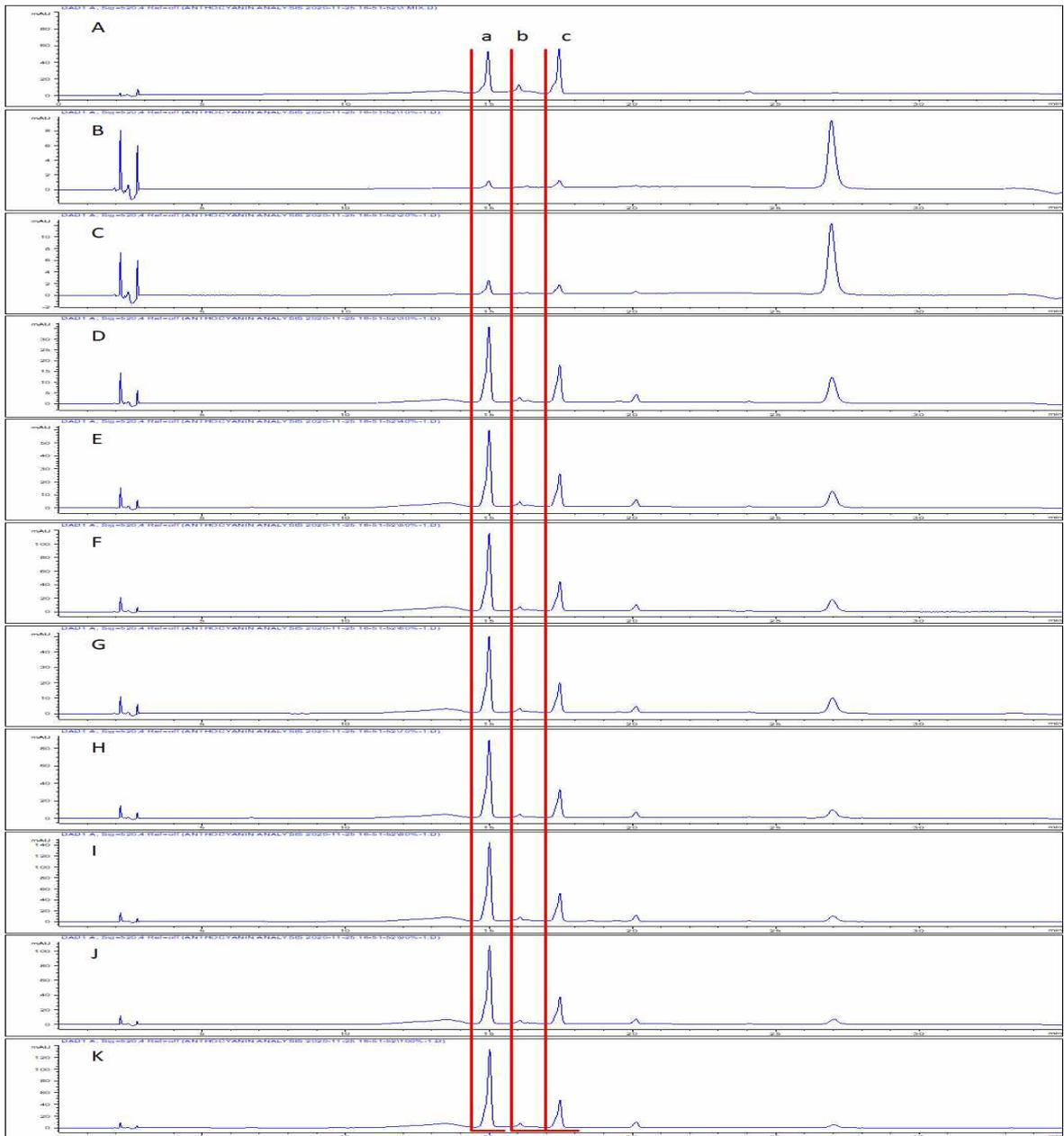


그림 29. 효모 발효에 사용할 아로니아 추출물 최적 추출조건 확립을 위한 추출용매 별 Anthocyanin 크로마토그램

A: 표준품, B: 주정 10% 추출물, C: 주정 20% 추출물, D: 주정 30% 추출물, E: 주정 40% 추출물, F: 주정 50% 추출물, G: 주정 60% 추출물, H: 주정 70% 추출물, I: 주정 80% 추출물, J: 주정 90% 추출물, K: 주정 100% 추출물, a: cyanidin-3-O-galctoside chloride, b: cyanidin-3-O-glucoside chloride, c: cyanidin-3-O-arabinoside chloride.

(나) 아로니아 효모발효시 첨가되는 조성물들의 안토시아닌 함량 분석

아로니아 효모 발효시 사용되는 원 재료들의 Anthocyanin 함량을 분석하기 위하여 원과 (Fruit), 아로니아 주정 70%추출물(Extract), 아로니아 농축액(Concentrate), 아로니아 주정 70%추출 슬러지(Sludge), 효모발효 전 최종배합 배지(Medium)들을 분석함. 그 결과 표 50. 과 같으며, 이러한 함량을 이용하여 아로니아 효모 발효과정과 발효 종료시점에서의 Anthocyanin함량의 변화를 확인하였으며, 이러한 원물의 지표물질 정량 데이터를 활용하

여 최종 소재에서의 Anthocyanin 함량이 어떻게 변화 했는지를 확인 할 수 있었음
 표 50. 효모 발효시 조성물들의 Anthocyanin 함량

	cyanidin-3-O-galctoside chloride	cyanidin-3-O-glucoside chloride	cyanidin-3-O-arabinside chloride	Total
Fruit	662.83 ± 24.99	110.40 ± 5.60	175.96 ± 8.27	949.20 ± 38.84
Extract	103.46 ± 5.80	36.30 ± 2.30	42.52 ± 2.67	182.27 ± 7.18
Concentrate	30.57 ± 1.56	15.88 ± 1.21	10.69 ± 1.01	57.13 ± 3.13
Sludge	35.73 ± 2.75	12.83 ± 5.05	18.16 ± 1.39	66.71 ± 8.86
Medium	38.80 ± 4.06	11.49 ± 2.37	16.43 ± 1.83	66.72 ± 7.56

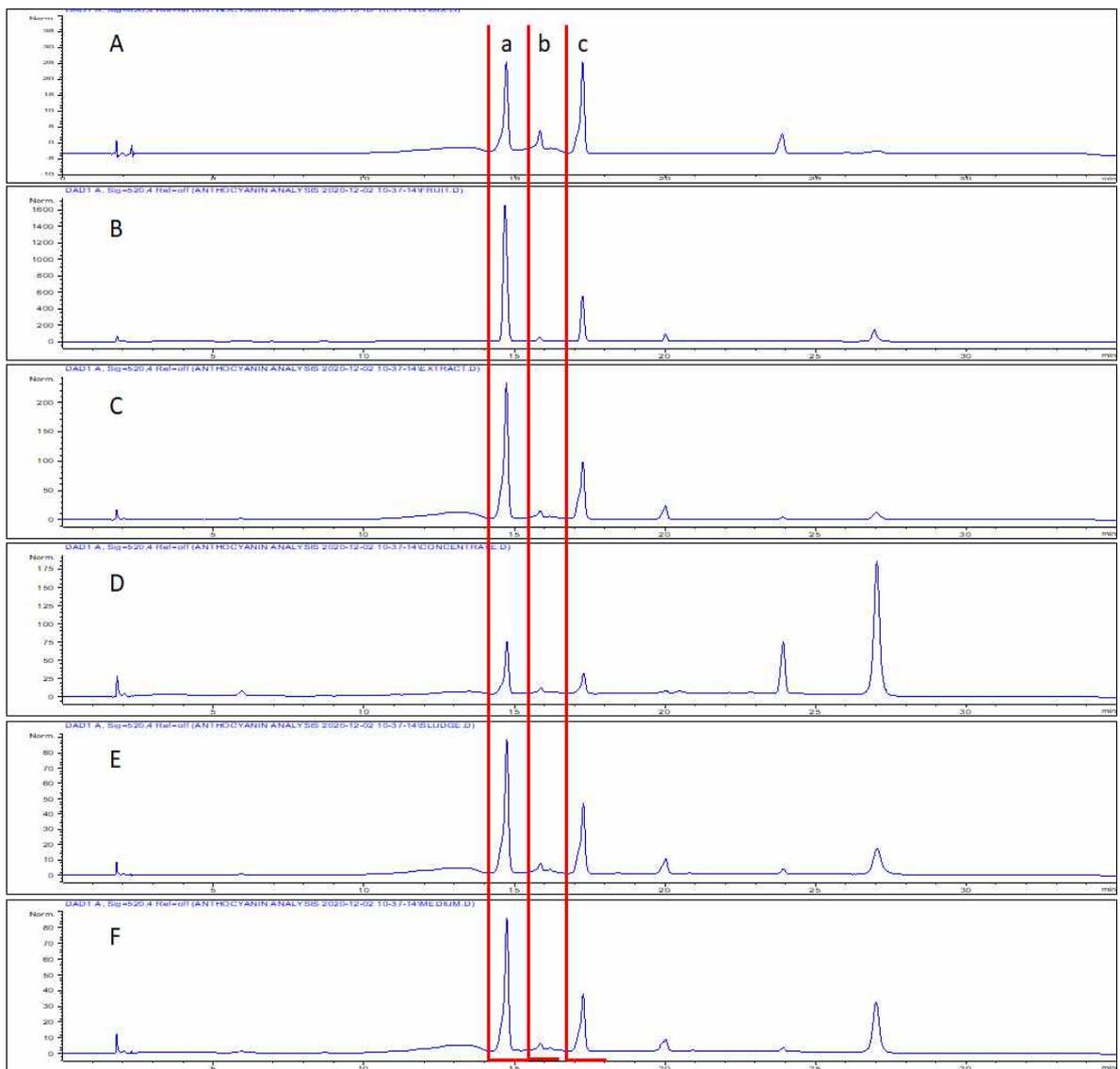


그림 30. 효모 발효시 조성물들의 Anthocyanin 크로마토그램

A: 표준품, B: 원과 파쇄물, C: 추출물, D: 농축액, E: 슬러지, F: 초기 조성물, a: cyanidin-3-O-galctoside chloride, b: cyanidin-3-O-glucoside chloride, c: cyanidin-3-O-arabinside chloride.

(다) 아로니아 효모발효시 시간에 따른 안토시아닌 함량 분석

아로니아 효모 발효의 산업화 조건을 확립하기 위하여, 발효배양기(Jar Fermentor)를 이용하여 효모발효를 먼저 진행 한 후 교반식 대형 발효탱크를 이용하여 산업화 조건을 확립함. 이 과정에서 아로니아의 지표 Anthocyanin 3종의 함량을 확인한 결과, 발효배양기를 이용하여 효모발효 하였을 때와 대형 발효탱크를 이용한 산업화 조건에서의 발효에서 동일하게 발효 시간이 지날수록 3종의 Anthocyanin 함량은 줄어드는 pattern을 보였다. 이러한 결과로, 반복 효모 발효시의 산업화 공정의 개연성과 최적화의 적합성을 확인 할 수 있었음

표 51. 시간에 따른 효모 발효의 Anthocyanin 함량

차 수	발효 일차	mg/100 mL			
		cyanidin-3-O-galactoside chloride	cyanidin-3-O-glucoside chloride	cyanidin-3-O-arabinoside chloride	Total
1	0	44.38±2.31	16.88±1.28	18.47±1.00	79.73±4.58
1	3	22.39±0.36	5.76±0.78	13.57±0.28	41.73±1.19
1	6	10.22±0.81	2.88±0.03	6.52±0.54	19.62±1.33

2	0	36.66±0.56	14.00±0.32	14.42±0.22	65.08±0.94
2	3	13.27±0.46	3.86±0.18	6.16±0.24	23.29±0.85
2	6	3.79±0.60	1.51±0.13	2.06±0.30	7.37±1.02

1	0	45.87±4.07	16.56±1.31	19.03±1.63	81.46±5.50
1	3	21.41±0.92	4.09±0.39	11.37±0.44	36.87±0.98
1	6	14.70±0.38	3.29±0.20	8.08±0.23	26.06±0.79

2	0	40.71±2.08	13.79±1.96	16.75±0.84	71.26±3.93
2	3	23.42±1.69	4.69±0.49	12.33±0.79	40.44±2.28
2	6	12.44±0.38	2.90±0.28	6.92±0.22	22.26±0.86

3	0	43.78±3.14	15.81±0.73	17.33±1.29	76.91±5.16
3	3	26.40±2.24	6.63±0.76	12.89±1.03	45.92±2.54
3	6	13.98±0.02	3.63±0.06	7.70±0.02	25.31±0.06

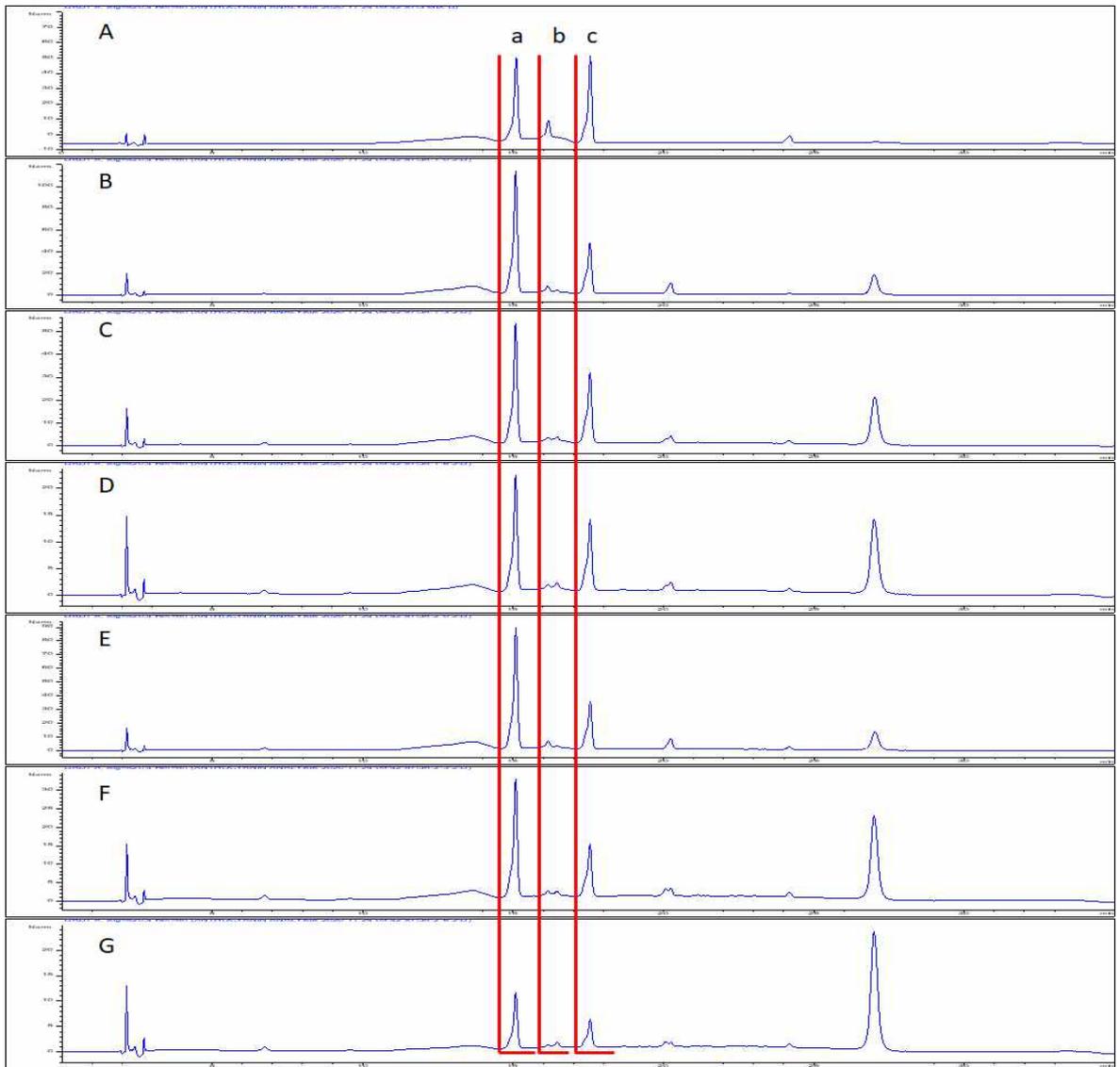


그림 31. 시간에 따른 효모 발효의 Anthocyanin 크로마토그램 (자포메타 발효)

A: 표준품, B: 1차 0일차, C: 1차 3일차, D: 1차 6일차, E: 1차 0일차, F: 1차 3일차, G: 1차 6일차, a: cyanidin-3-O-galctoside chloride, b: cyanidin-3-O-glucoside chloride, c: cyanidin-3-O-arabinoside chloride.

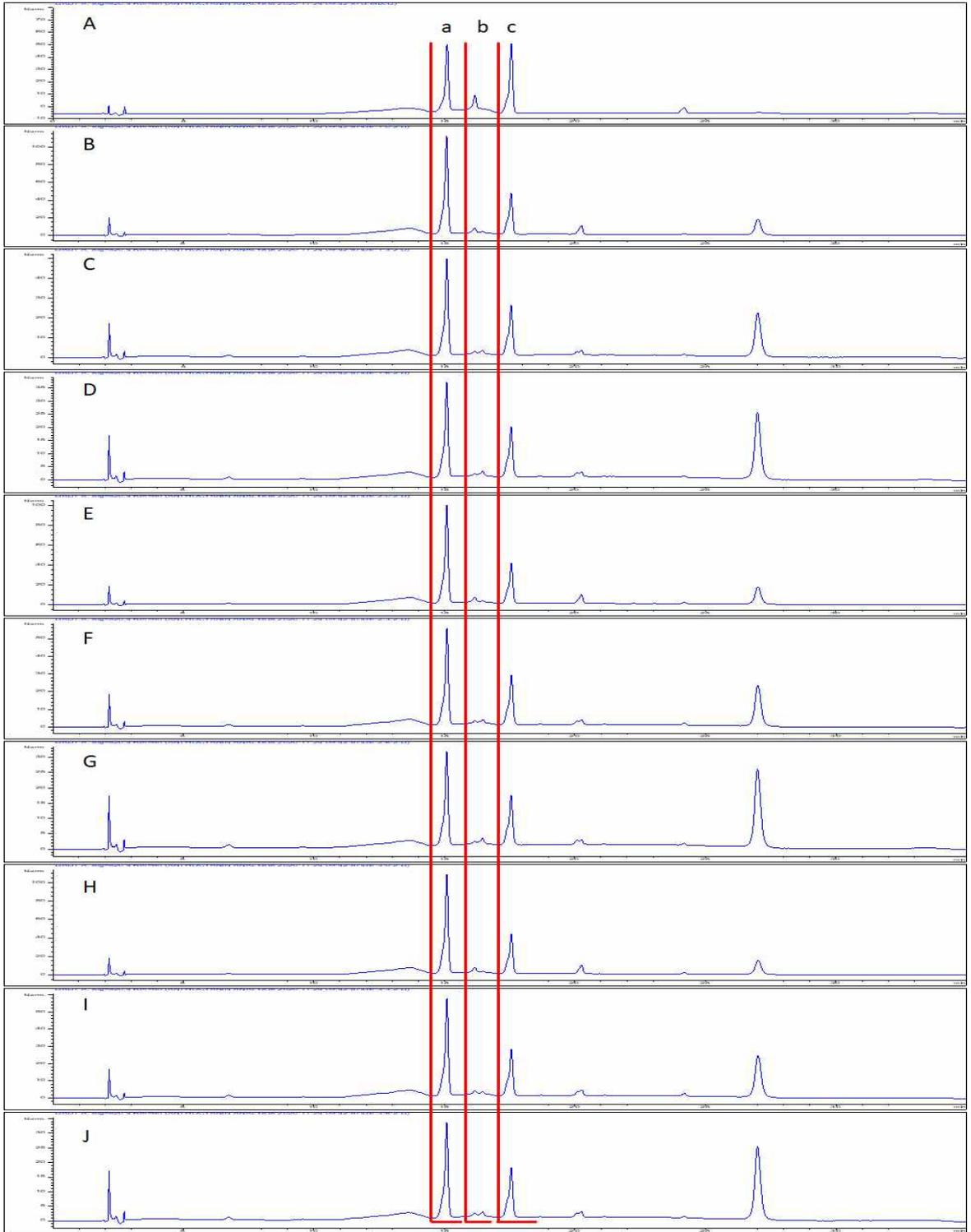


그림 32. 시간에 따른 효모 발효의 Anthocyanin 크로마토그램 (대형 발효)

A: 표준품, B: 1차 0일차, C: 1차 3일차, D: 1차 6일차, E: 2차 0일차, F: 2차 3일차, G: 2차 6일차, H: 3차 0일차, I: 3차 3일차, J: 3차 6일차, a: cyanidin-3-O-galctoside chloride, b: cyanidin-3-O-glucoside chloride, c: cyanidin-3-O-arabinoside chloride.

(라) 아로니아 초산발효시 생성되는 소재에 대한 안토시아닌 함량 분석

발효배양기 초산 발효시 Anthocyanin 함량 변화는 표 52.와 같음. 발효시간이 지남에 따라 감소하는 경향은 동일하게 나타남. 하지만 발효 차수에 따라 차이를 보이는 것으로 나타

났으며, 시간이 지남에 따라 그 차이는 더욱 커지는 것으로 나타남. 발효물의 전액과 원심분리 후 상등액을 비교한 결과 전액의 함량이 높은 것으로 나타났으며, 초산 발효물의 제품으로 처리가공 중 상등액만을 사용하는 것을 감안하였을 때, 침전물에도 Anthocyanin이 잔존하는 것으로 예상되어 이를 활용할 방법을 검토하는 것이 바람직하다고 판단됨

표 52. 시간에 따른 초산 발효물의 Anthocyanin 함량 (자포메타)

		mg/100 mL				
차 수	일 차	cyanidin-3-O-	cyanidin-3-O-	cyanidin-3-O-a	Total	
		galctoside chloride	glucoside chloride	rabinoside chloride		
전액	1	0	10.16±0.38	2.96±0.29	5.62±0.29	18.74±0.97
		4	6.54±0.13	1.62±0.12	3.71±0.16	11.87±0.20
		8	2.57±0.26	1.04±0.11	2.02±0.19	5.63±0.50
		14	0.55±0.02	0.00±0.00	0.73±0.08	1.28±0.10
	2	0	8.51±0.55	2.40±0.13	4.41±0.29	17.32±1.57
		4	5.42±0.36	1.57±0.07	2.77±0.21	11.76±0.56
		8	3.36±0.04	1.16±0.04	1.77±0.04	8.30±0.90
		14	0.06±0.01	0.00±0.00	0.10±0.02	2.83±0.59
상등액	1	0	7.93±0.05	2.10±0.11	4.34±0.09	14.36±0.10
		4	5.16±0.31	1.42±0.05	2.81±0.23	9.40±0.56
		8	0.98±0.04	0.72±0.03	0.71±0.02	2.41±0.09
		14	0.26±0.00	0.00±0.00	0.30±0.01	0.56±0.01
	2	0	7.06±0.57	2.19±0.13	3.62±0.25	12.87±0.68
		4	4.12±0.26	1.36±0.06	2.05±0.11	7.54±0.32
		8	2.63±0.17	1.01±0.05	1.31±0.10	4.96±0.31
		14	0.02±0.01	0.00±0.00	0.08±0.03	0.09±0.02

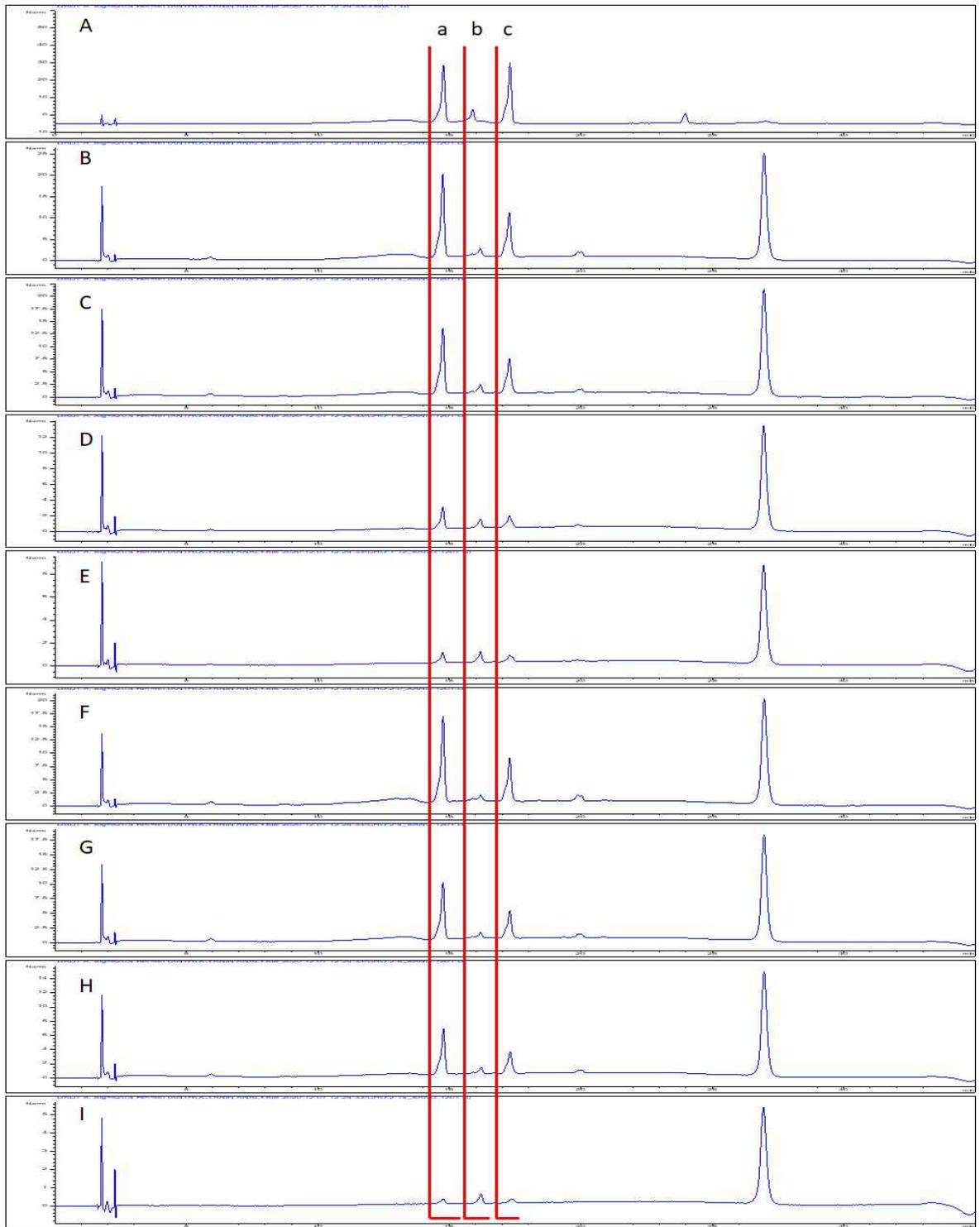


그림 33. 시간에 따른 초산 발효물의 Anthocyanin 크로마토그램 (자포메타 발효, 전액)

A: 표준품, B: 1차 0일차, C: 1차 4일차, D: 1차 8일차, E: 1차 14일차, F: 2차 0일차, G: 2차 4일차, H: 2차 8일차, I: 2차 14일차, a: cyanidin-3-O-galctoside chloride, b: cyanidin-3-O-glucoside chloride, c: cyanidin-3-O-arabinoside chloride.

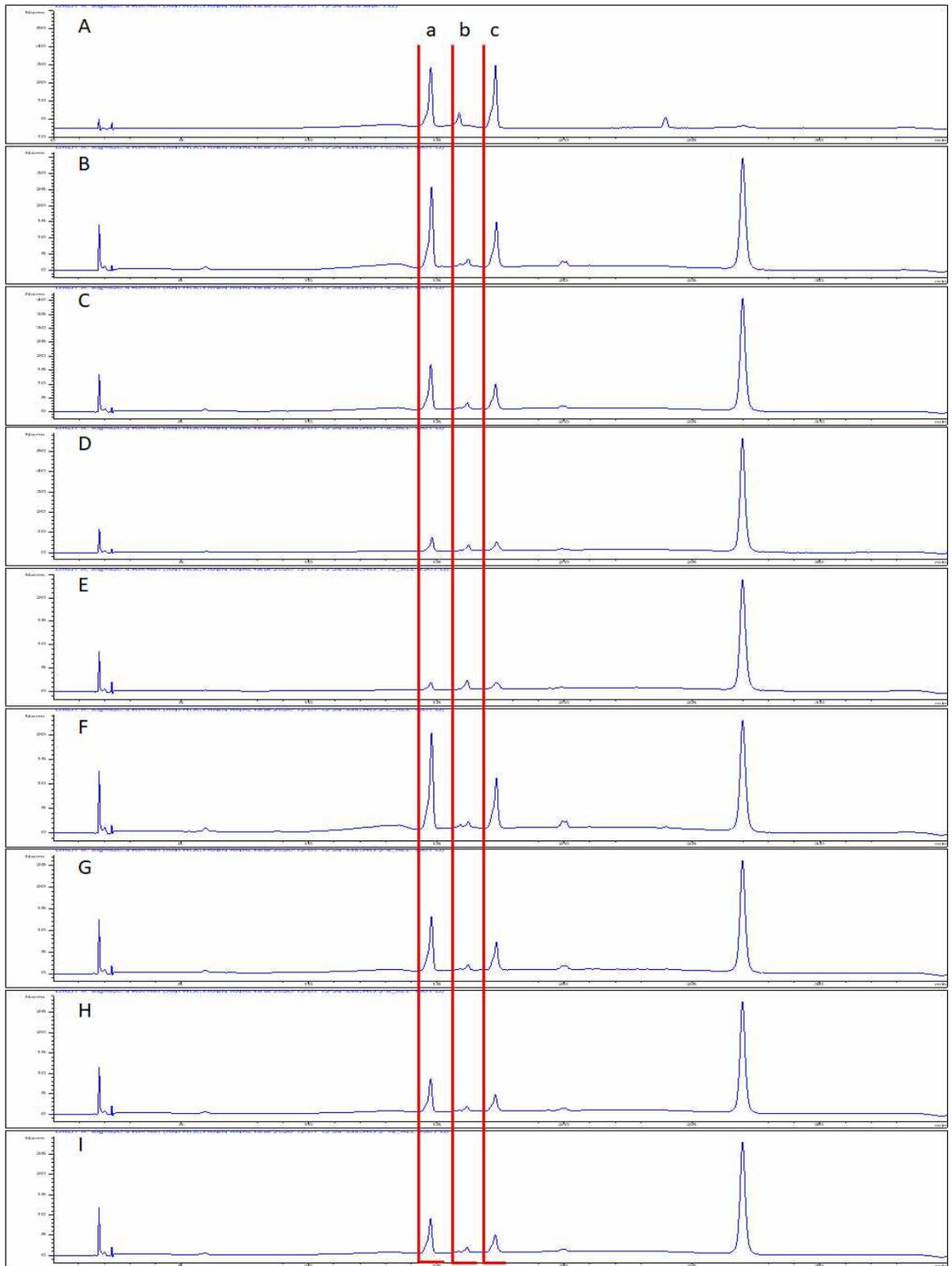


그림 34. 시간에 따른 초산 발효물의 Anthocyanin 크로마토그램 (자포메타 발효, 상등액)
 A: 표준품, B: 1차 0일차, C: 1차 4일차, D: 1차 8일차, E: 1차 14일차, F: 2차 0일차, G: 2차 4일차, H: 2차 8일차, I: 2차 14일차, a: cyanidin-3-O-galactoside chloride, b: cyanidin-3-O-glucoside chloride, c: cyanidin-3-O-arabinoside chloride.

초산 발효물 14일차의 원심분리 후 남은 부산물을 동결건조하여 실험하였으며, 이 함량은 표 53.와 같음. cyanidin-3-O-glucoside chloride는 검출되지 않았으나, cyanidin-3-O-galctoside chloride와 cyanidin-3-O-arabinoside chloride는 잔존하는 것을 알 수 있었다. 이에 이 부산물을 활용한 연구를 추가 진행하는 것이 좋을 것으로 판단됨

표 53. 초산 발효 부산물에 대한 Anthocyanin 함량 (자포메타)

차수	발효 일차	mg/100 g (dry wet.)			
		cyanidin-3-O-galctoside chloride	cyanidin-3-O-glucoside chloride	cyanidin-3-O-arabinoside chloride	Total
1	14	4.11±0.13	0.00±0.00	3.44±0.05	7.55±0.18
2	14	0.59±0.04	0.00±0.00	0.85±0.09	1.44±0.14

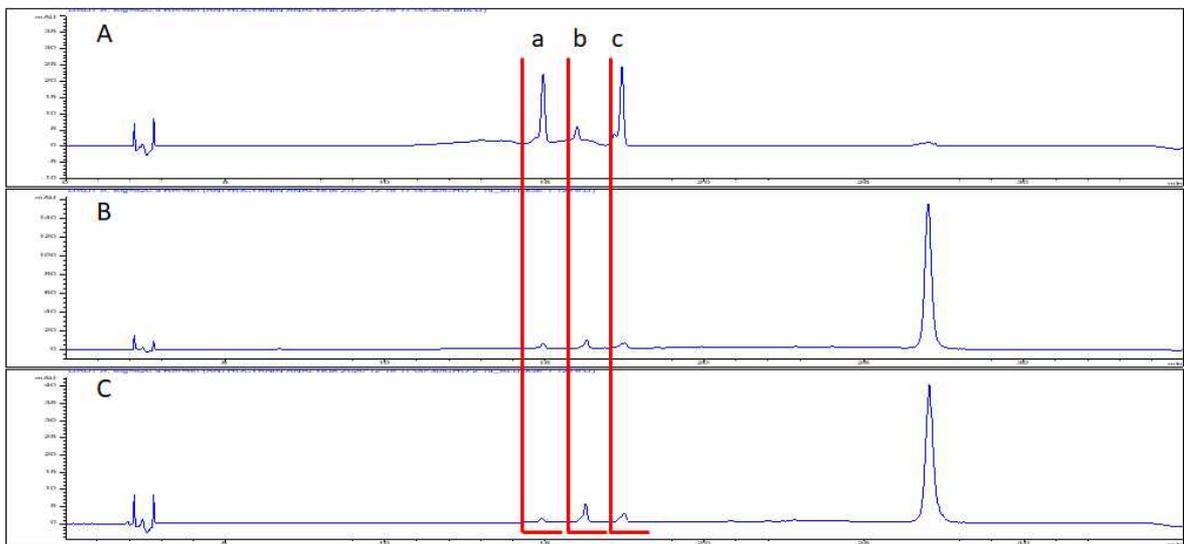


그림 35. 초산 발효 부산물에 대한 Anthocyanin 크로마토그램 (자포메타 발효)

A: 표준품, B: 1차 부산물, C: 2차 부산물, a: cyanidin-3-O-galctoside chloride, b: cyanidin-3-O-glucoside chloride, c: cyanidin-3-O-arabinoside chloride.

대형 초산 발효시 Anthocyanin 함량 변화는 표 54.와 같음. 발효시간이 지남에 따라 감소하는 경향은 동일하게 나타남. 발효물의 전액과 원심분리 후 상등액을 비교한 결과 그 차이는 미미한 것으로 나타남. 하지만 퍼멘터 발효와 달리 대형 발효에서는 4일차부터 급격하게 감소하는 것을 확인할 수 있었음

표 54. 시간에 따른 초산 발효물의 Anthocyanin 함량 (대형)

					mg/100 mL
	일차	cyanidin-3-O- galctoside chloride	cyanidin-3-O- glucoside chloride	cyanidin-3-O- arabinoside chloride	Total
전 액	0	5.51±0.04	1.54±0.02	2.89±0.10	9.94±0.12
	4	0.12±0.00	0.00±0.00	0.09±0.01	0.21±0.01
	8	0.06±0.01	0.00±0.00	0.04±0.00	0.10±0.02
	14	0.07±0.00	0.00±0.00	0.04±0.01	0.11±0.01
상 등 액	0	5.62±0.36	1.45±0.13	2.82±0.21	9.89±0.370
	4	0.07±0.01	0.00±0.00	0.05±0.01	0.12±0.01
	8	0.07±0.02	0.00±0.00	0.02±0.00	0.09±0.02
	14	0.07±0.00	0.00±0.00	0.03±0.01	0.10±0.01

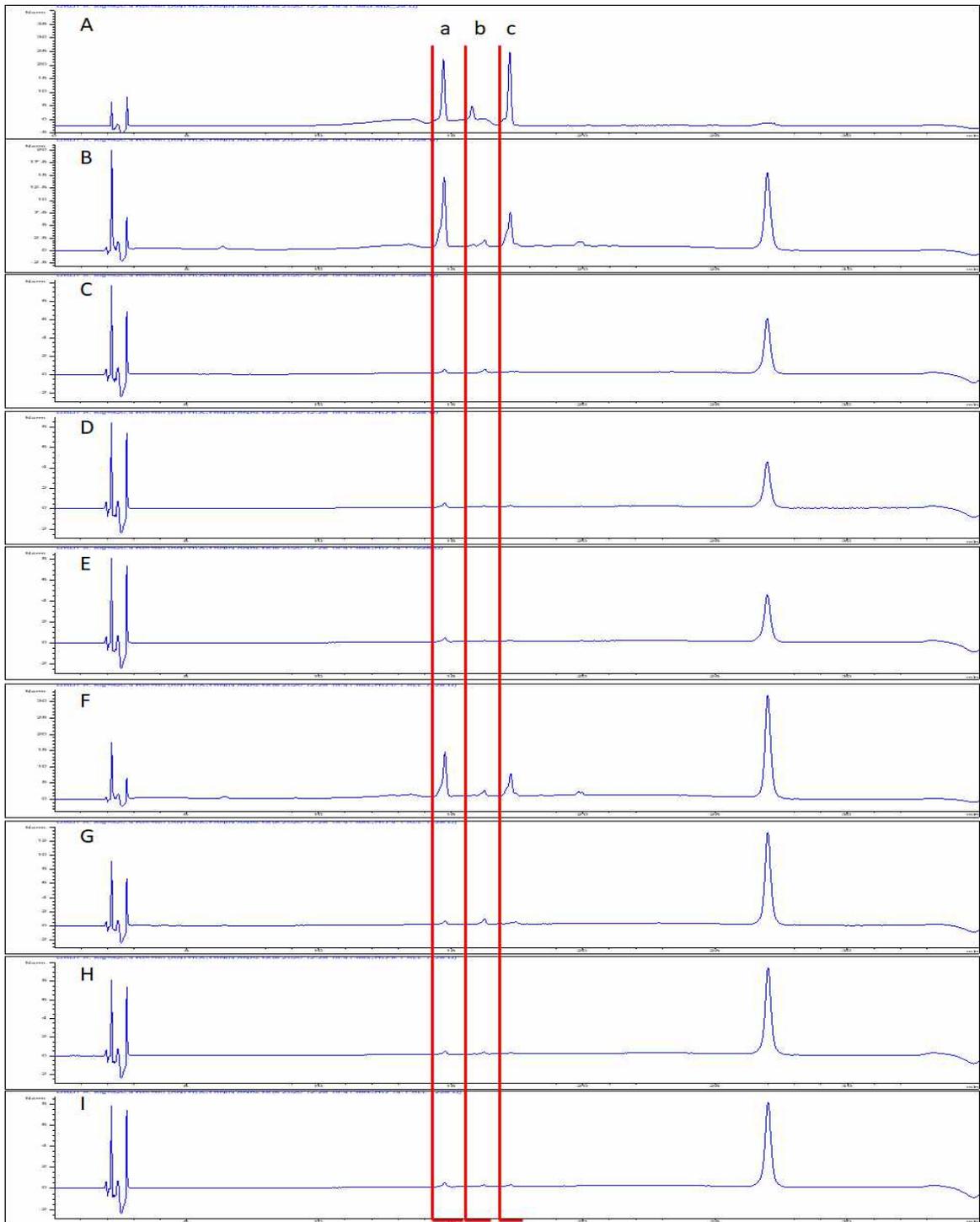


그림 36. 시간에 따른 초산 발효물의 Anthocyanin 크로마토그램 (대형, 전액과 상등액)

A: 표준품, B: 0일차 상등액, C: 4일차 상등액, D: 8일차 상등액, E: 14일차 상등액, F: 0일차 전액, G: 4일차 전액, H: 8일차 전액, I: 14일차 전액, a: cyanidin-3-O-galactoside chloride, b: cyanidin-3-O-glucoside chloride, c: cyanidin-3-O-arabinside chloride.

초산 발효물 14일차의 원심분리 후 남는 부산물을 동결건조하여 실험하였으며, 이 함량은 표 55와 같음. cyanidin-3-O-glucoside chloride는 검출되지 않았으나, cyanidin-3-O-galactoside chloride와 cyanidin-3-O-arabinside chloride는 잔존하는 것을 알

수 있었다. 하지만 퍼멘터 발효에 비교하였을 때 잔존하는 함량이 낮아진 것을 알 수 있었음

표 55. 초산 발효 부산물에 대한 Anthocyanin 함량 (대형)

일차	mg/100 g (dry wet.)			
	cyanidin-3-O-galactoside chloride	cyanidin-3-O-glucoside chloride	cyanidin-3-O-arabinoside chloride	Total
14	1.68±0.07	0.00±0.00	0.66±0.01	2.34±0.07

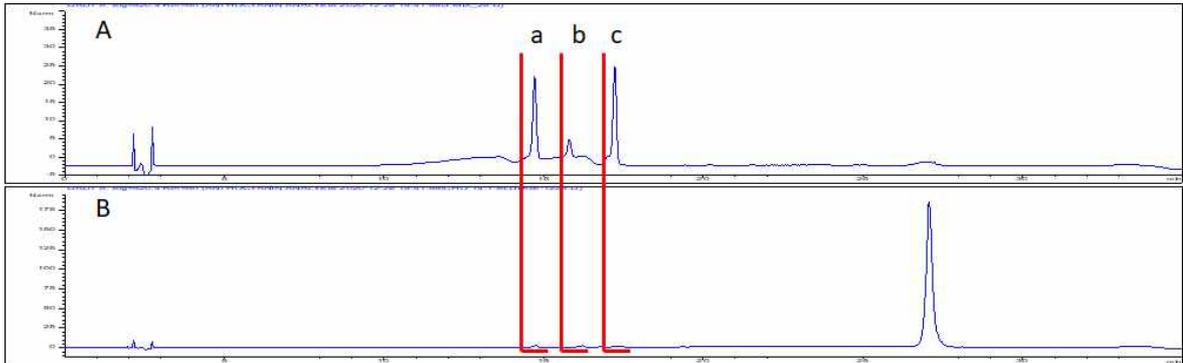


그림 37. 초산 발효 부산물에 대한 Anthocyanin 크로마토그램 (대형)

A: 표준품, B: 부산물, a: cyanidin-3-O-galactoside chloride, b: cyanidin-3-O-glucoside chloride, c: cyanidin-3-O-arabinoside chloride.

(5) 유기산 분석 함량 분석

(가) 실험재료 및 추출

표준품은 oxalic acid, D-tartaric acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, succinic acid를 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용함. 시료 5 g을 취하여 0.4% HCl 5 mL을 첨가한 후 초음파 추출기를 이용하여 20분간 추출함. 이를 원심분리 (30,000 rpm, 15분)하여 상층액을 필터(0.22 μm)한 후 시험용액으로 사용함

(나) 유기산 분석

HPLC 분석에는 Agilent 1220 Infinity LC(Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며 컬럼은 Phenomenex Synergi™ Hydro-RP 80 Å (250 x 4.6 mm, 4 μm)을 이용하였으며 온도는 40°C로 설정함. 검출기는 UV detector를 사용하여 파장 220 nm에서 측정하였으며, 이동상 유량은 1.0 mL/min으로 함. 이동상 A는 20 mM Potassium phosphate이며, B는 acetonitrile 을 사용함. 용매혼합조건은 표 1에 나타낸 조건을 이용하여 분석함

표 56. 유기산 혼합조건

Time (min)	A% ^a	B% ^b
0	100	0
15	100	0
25	65	35
30	100	0
40	100	0

^a 20 mM Potassium phosphate

^b Acetonitrile

(6) 유기산 분석 함량 분석 결과

(가) 시간에 따른 효모 발효의 유기산 함량

효모 발효시 첨가되는 아로니아 주정 추출물을 제조하기 위하여 아로니아를 파쇄하여 식품에 사용할 수 있는 주정을 활용하여 주정 %별 아로니아 추출을 진행 하였고, 함유하고 있는 유기산 함량을 확인함. 이 결과와 함께 가공을 위한 최적 추출방법을 주정 70%로 확정함

표 57. 효모 발효에 사용할 아로니아 추출물 최적 추출조건 확립을 위한 추출용매 별 유기산의 함량

주정 비율	mg/100 mL							
	Oxalic acid	D-Tartaric acid	D-Malic acid	Lactic acid	Acetic Acid	Citric acid	Succinic acid	Total
10%	0.68±0.14	2.93±0.10	31.70±0.99	0.00±0.00	1.02±0.38	10.79±1.50	1.99±0.10	48.11±0.99
20%	1.37±0.07	6.38±0.24	82.67±2.91	0.00±0.00	2.98±0.29	31.15±0.51	5.09±0.24	127.95±1.84
30%	1.33±0.00	5.17±0.17	65.02±2.72	0.00±0.00	4.69±0.87	27.03±3.18	4.55±0.67	104.28±9.13
40%	1.21±0.02	6.85±0.16	68.98±6.00	0.00±0.00	3.03±0.08	28.34±5.47	5.42±0.54	110.61±6.16
50%	1.29±0.03	5.99±0.12	115.22±6.04	0.00±0.00	5.82±1.05	37.73±0.44	6.25±0.44	169.79±2.31
60%	1.46±0.60	4.27±0.09	53.12±2.73	0.00±0.00	2.57±0.33	20.82±3.02	3.17±0.43	83.87±6.52
70%	2.73±0.18	8.69±0.15	64.06±1.85	0.00±0.00	15.83±2.50	22.55±2.77	5.25±0.55	117.35±5.60
80%	0.68±0.40	6.51±0.16	94.49±3.98	0.00±0.00	3.27±0.59	30.61±0.46	6.15±0.52	139.45±4.04
90%	3.30±0.49	8.65±0.06	81.74±1.66	0.00±0.00	22.11±3.50	10.23±0.97	6.21±1.23	119.39±15.36
100%	0.48±0.29	3.50±0.03	69.99±4.31	0.00±0.00	0.00±0.00	14.83±0.60	5.66±0.00	87.47±7.85

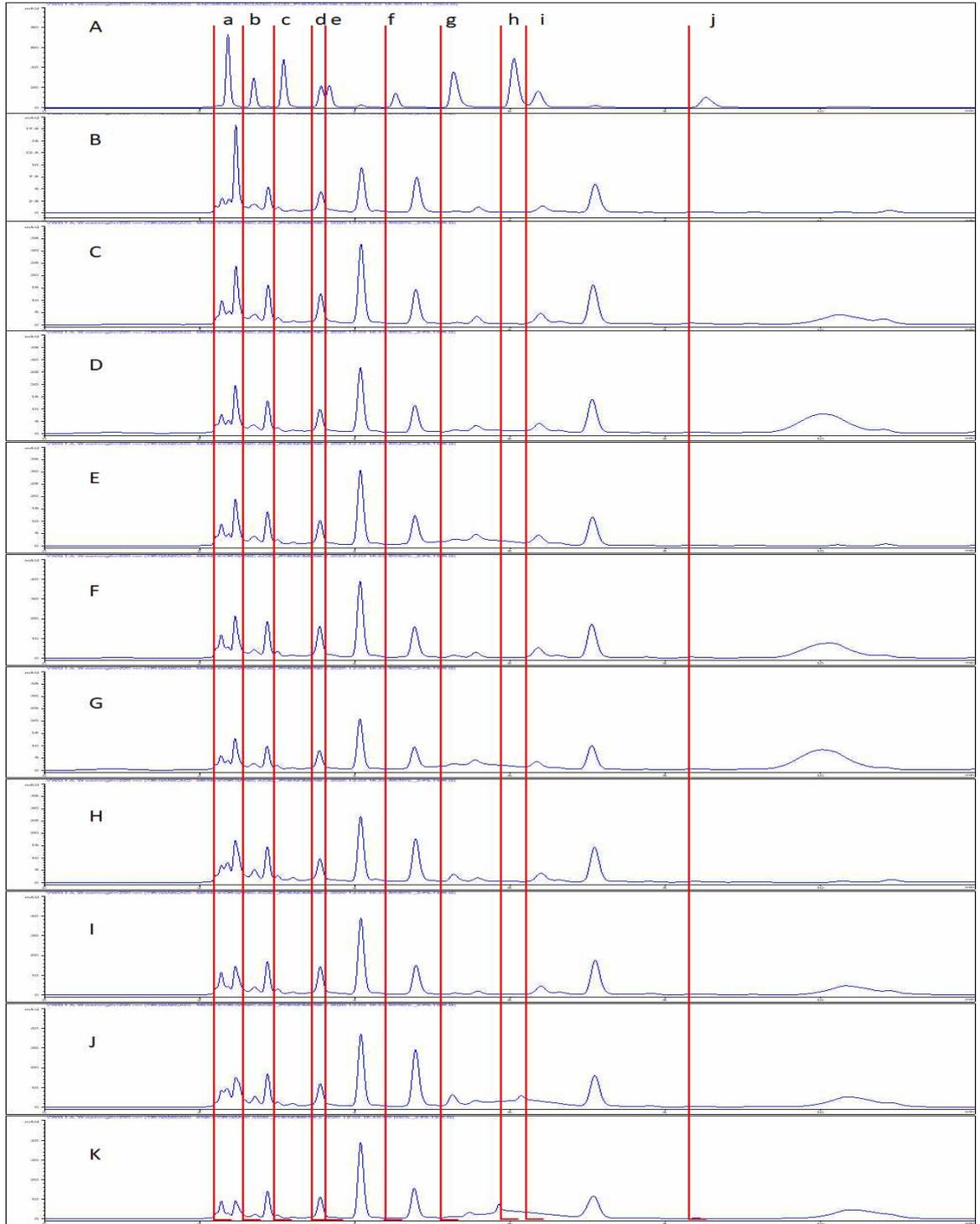


그림 38. 효모 발효에 사용할 아로니아 추출물 최적 추출조건 확립을 위한 추출용매 별 유기산 크로마토그램

A: 표준품, B: 주정 10% 추출물, C: 주정 20% 추출물, D: 주정 30% 추출물, E: 주정 40% 추출물, F: 주정 50% 추출물, G: 주정 60% 추출물, H: 주정 70% 추출물, I: 주정 80% 추출물, J: 주정 90% 추출물, K: 주정 100% 추출물, a: Oxalic acid, b: D-Tartaric acid, c: Formic acid, d: D-Malic acid, e: Malonic acid, f: Lactic acid, g: Acetic acid, h: Maleic acid, I: Citric acid, j: succinic acid.

(나) 시간에 따른 효모 발효의 유기산 함량

아로니아 효모 발효의 산업화 조건을 확립하기 위하여, 발효배양기(fermentor)를 이용하여 효모발효를 먼저 진행 한 후 교반식 대형 발효탱크를 이용하여 산업화 조건을 확립함. 이 과정에서 유기산 함량을 확인한 결과, 발효배양기를 이용하여 효모발효 하였을 때와 대형 발효탱크를 이용한 산업화 조건에서의 발효에서 동일하게 oxalic acid, acetic acid는 검출되지 않았으며, D-malic acid, citric acid에서는 변화가 보이지 않음. D-Tartaric acid는 발효시간에 따라 감소하는 경향을 보였으나, Lactic acid, succinic acid는 증가하는 경향을 나타냄

표 58. 시간에 따른 효모 발효의 유기산 함량

차수	발효	일차	mg/100 mL							
			Oxalic acid	D-Tartaric acid	D-Malic acid	Lactic acid	Acetic Acid	Citric acid	Succinic acid	Total
1		0	0.00±0.00	6.34±1.05	1222.78±47.48	31.88±1.48	0.00±0.00	232.62±47.73	31.31±7.49	1414.87±167.23
1		3	0.00±0.00	3.19±0.61	1010.62±33.54	53.05±3.89	0.00±0.00	216.16±21.67	80.18±9.99	1622.80±13.78
1	자포	6	0.00±0.00	3.38±0.40	1278.85±2.31	34.90±6.12	0.00±0.00	167.69±18.36	65.37±2.51	1695.44±43.36
2	메타	0	0.00±0.00	6.10±1.33	1235.71±42.04	42.17±13.39	0.00±0.00	195.68±80.52	21.78±7.27	1459.25±171.87
2		3	0.00±0.00	3.19±0.59	1114.39±33.25	49.07±7.01	0.00±0.00	243.01±10.53	78.37±6.52	1499.95±31.05
2		6	0.00±0.00	2.65±0.12	1106.76±29.08	55.99±5.78	0.00±0.00	261.49±31.75	72.50±4.07	1472.40±178.27
1		0	0.00±0.00	5.82±0.02	1222.97±51.40	24.44±0.52	0.00±0.00	233.07±46.86	24.53±2.16	1513.53±179.27
1		3	0.00±0.00	3.49±0.36	1244.34±34.33	52.88±2.88	0.00±0.00	285.25±28.68	83.45±23.06	1480.75±4.80
1		6	0.00±0.00	3.36±0.33	1278.85±3.27	50.51±5.33	0.00±0.00	269.95±33.58	93.89±15.17	1561.35±17.33
2		0	0.00±0.00	6.58±1.09	1261.90±48.23	29.80±4.11	0.00±0.00	237.83±32.00	21.82±10.59	1424.22±182.54
2	대형	3	0.00±0.00	3.26±0.21	1163.00±43.20	46.08±4.42	0.00±0.00	240.94±25.06	71.63±7.21	1344.45±66.34
2		6	0.00±0.00	3.41±0.66	1183.58±35.31	46.83±4.98	0.00±0.00	246.97±20.68	75.07±10.24	1104.70±23.01
3		0	0.00±0.00	6.41±1.17	1296.52±51.03	33.24±0.43	0.00±0.00	250.04±37.87	23.88±3.07	1492.15±124.30
3		3	0.00±0.00	3.19±0.90	1125.09±34.81	43.89±3.26	0.00±0.00	254.41±13.77	82.86±5.01	1470.62±60.69
3		6	0.00±0.00	3.52±0.91	1193.98±34.66	55.14±5.61	0.00±0.00	258.31±26.86	77.38±1.21	1479.84±81.68

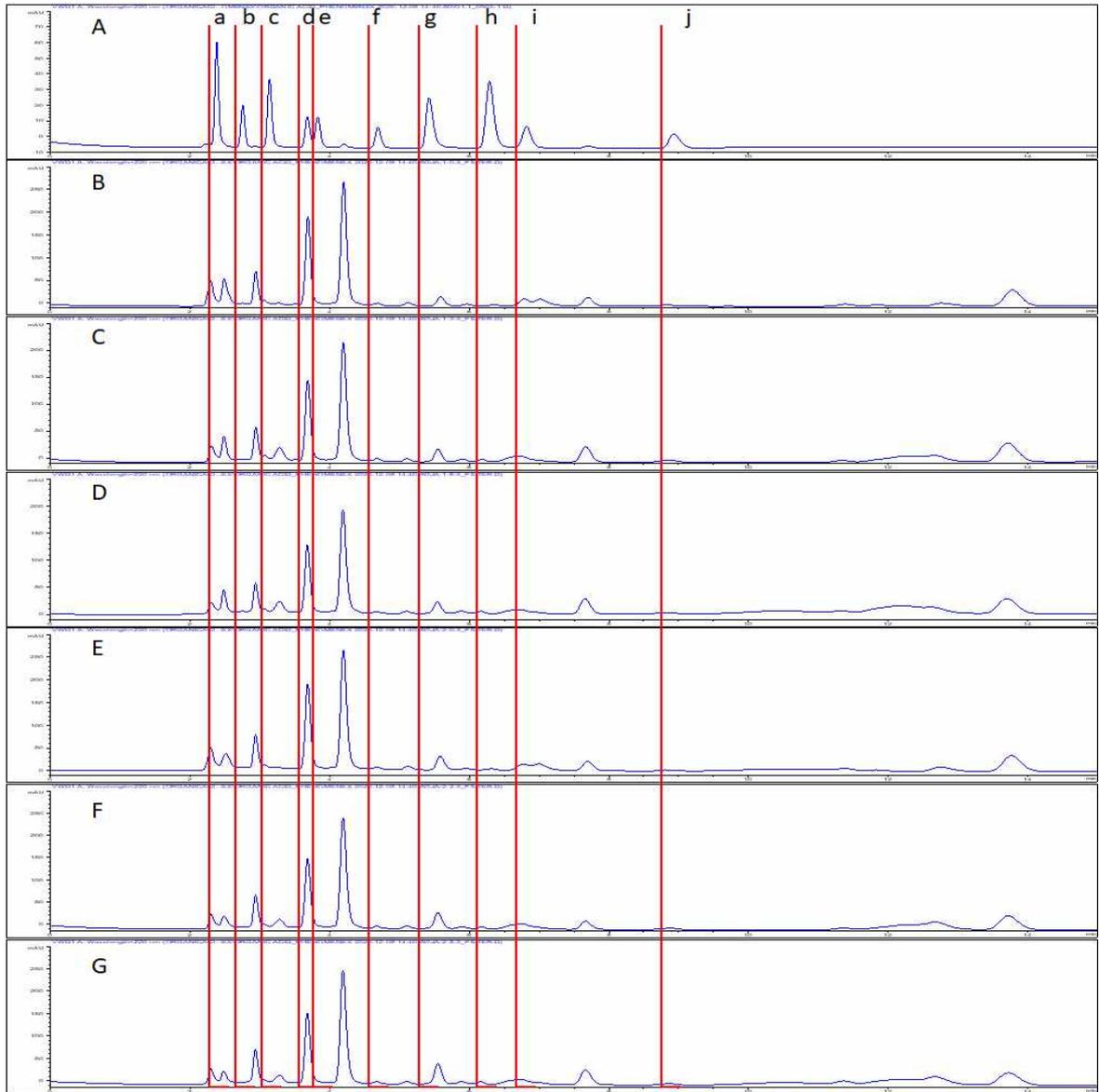


그림 39. 시간에 따른 효모 발효의 유기산 크로마토그램 (자포메타 발효)

A: 표준품, B: 1차 0일차, C: 1차 3일차, D: 1차 6일차, E: 1차 0일차, F: 1차 3일차, G: 1차 6일차, a: Oxalic acid, b: D-Tartaric acid, c: Formic acid, d: D-Malic acid, e: Malonic acid, f: Lactic acid, g: Acetic acid, h: Maleic acid, I: Citric acid, j: succinic acid.

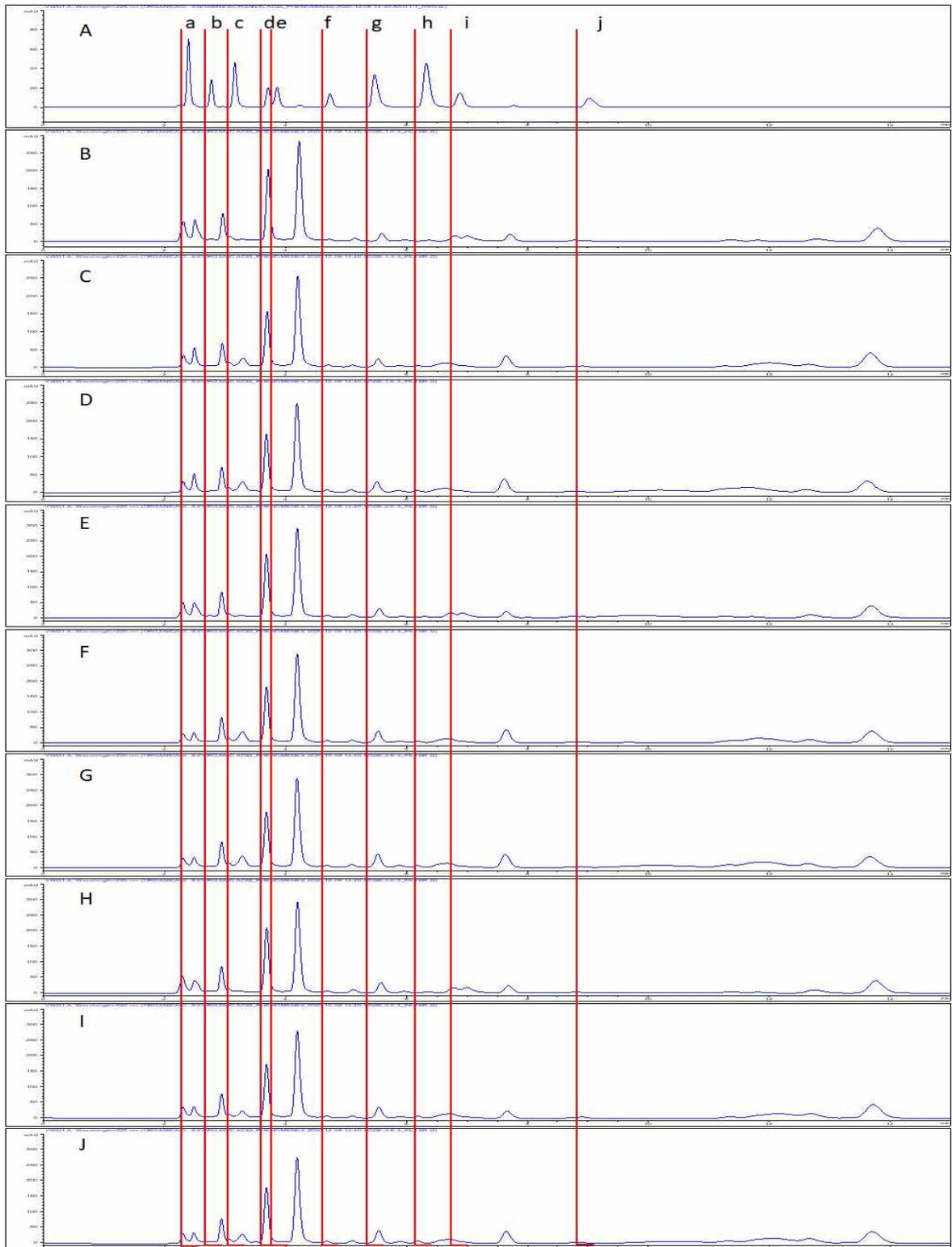


그림 40. 시간에 따른 효모 발효의 유기산 크로마토그램 (대형 발효)

A: 표준품, B: 1차 0일차, C: 1차 3일차, D: 1차 6일차, E: 2차 0일차, F: 2차 3일차, G: 2차 6일차, H: 3차 0일차, I: 3차 3일차, J: 3차 6일차, a: Oxalic acid, b: D-Tartaric acid, c: Formic acid, d: D-Malic acid, e: Malonic acid, f: Lactic acid, g: Acetic acid, h: Maleic acid, I: Citric acid, j: succinic acid.

(다) 시간에 따른 효모 발효의 유기산 함량

발효배양기 초산 발효시 유기산함량 변화는 표 59.와 같음. 발효시간이 지남에 따라 변화가 없거나 감소하는 경향은 동일하게 나타남. 하지만 acetic acid의 경우 발효일수가 지남에 따라 증가하는 것으로 나타남. 또한 발효 전체액과 원심분리하여 분리한 상등액의 차이는 없는 것으로 나타남

표 59. 시간에 따른 초산 발효물의 유기산 함량 (자포메타)

		mg/100 mL								
차 수	일 차	Oxalic acid	D-Tartaric acid	D-Malic acid	Lactic acid	Acetic Acid	Citric acid	Succinic acid	Total	
상 등 액	1	0	0.00±0.00	3.37±0.20	1136.52±9.17	40.95±2.46	309.49±1.93	247.01±24.90	75.75±2.73	1709.93±159.04
		4	0.00±0.00	3.34±0.23	1174.06±8.25	41.63±3.46	368.82±1.49	242.72±11.22	83.36±6.43	1791.00±207.35
		8	0.00±0.00	2.38±0.10	1212.99±20.96	20.91±4.22	550.64±4.61	245.57±12.89	74.35±2.57	1922.49±351.74
		14	0.00±0.00	2.57±0.38	1156.34±16.40	3.21±0.38	1027.85±128.51	248.19±11.97	74.39±2.67	2511.47±138.19
	2	0	0.00±0.00	3.32±0.54	1019.89±15.57	38.30±2.89	301.06±0.71	233.49±18.68	75.31±1.38	1571.02±174.74
		4	0.00±0.00	3.60±0.49	1086.48±16.25	40.65±3.37	333.98±0.46	222.95±13.80	80.13±1.44	1656.46±204.09
		8	0.00±0.00	3.67±0.51	1151.49±15.49	43.63±3.99	362.01±0.81	229.53±3.34	87.04±3.96	1756.70±215.23
		14	0.00±0.00	2.48±0.30	1161.25±21.77	4.52±0.64	1047.94±93.84	259.31±17.02	81.43±30.03	2528.28±66.60
전 체 액	1	0	0.00±0.00	3.14±0.54	1127.56±5.10	42.06±3.17	306.45±9.45	240.59±27.37	76.63±3.90	1694.29±162.26
		4	0.00±0.00	3.31±0.32	1165.14±8.62	42.66±4.14	362.09±9.48	242.68±4.58	84.18±81.17	1776.35±202.21
		8	0.00±0.00	2.50±0.16	1204.49±21.90	19.82±4.20	547.15±4.91	250.18±8.24	87.41±10.94	1899.20±320.22
		14	0.00±0.00	2.42±0.37	1155.34±13.59	4.29±0.23	1047.84±84.73	264.31±12.45	77.29±21.31	2523.48±89.20
	2	0	0.00±0.00	3.57±0.52	1024.02±5.00	39.44±2.53	300.78±6.99	268.73±39.92	71.85±4.35	1517.37±147.37
		4	0.00±0.00	3.77±0.50	1088.74±11.53	42.12±2.80	332.75±8.56	226.33±9.95	78.20±3.51	1633.68±247.64
		8	0.00±0.00	3.48±0.44	1146.41±12.10	43.48±2.86	360.78±5.36	230.27±11.32	86.86±7.82	1751.02±203.49
		14	0.00±0.00	2.33±0.26	1157.21±13.04	4.38±1.06	1061.01±55.86	266.45±34.60	81.63±20.29	2571.54±44.22

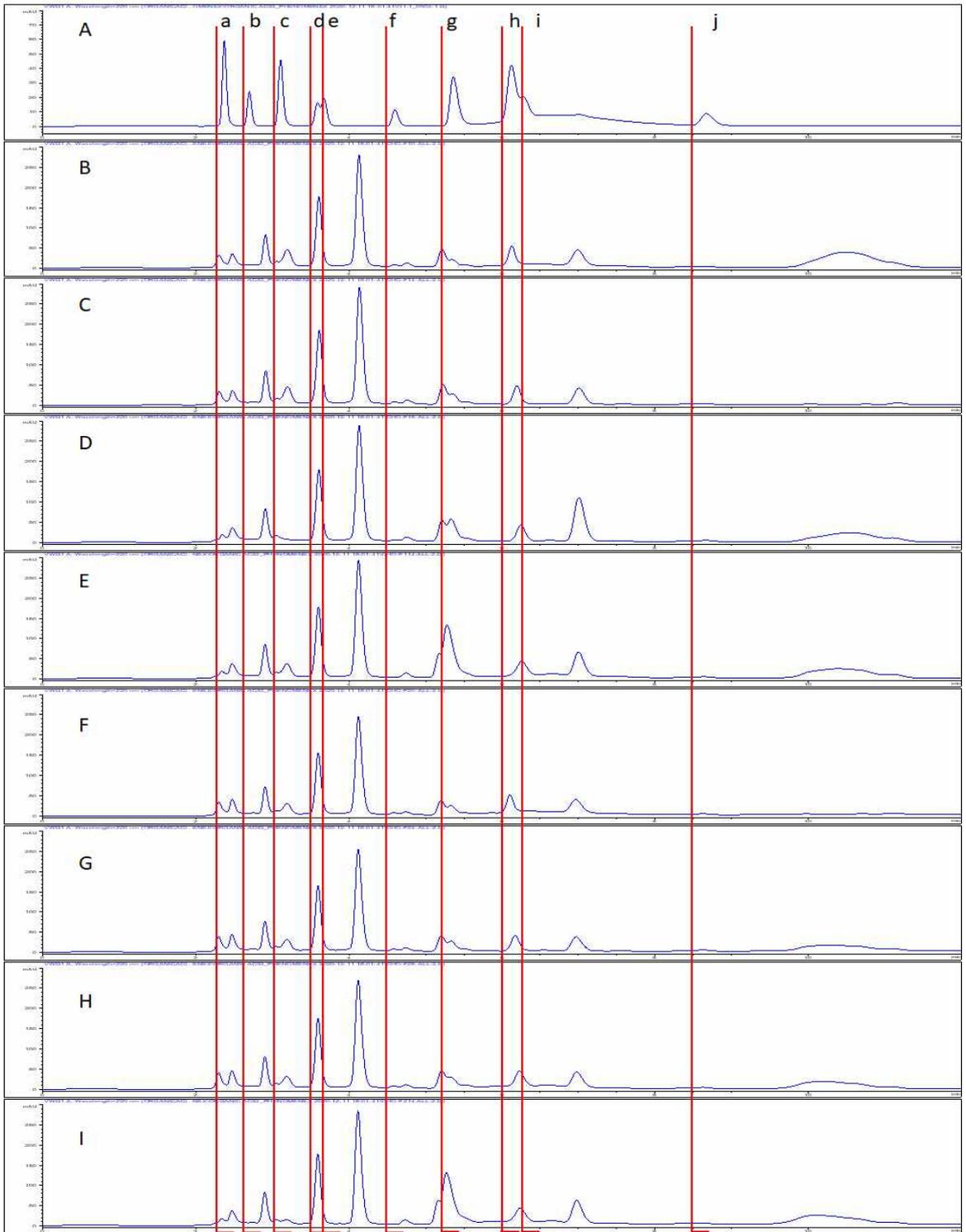


그림 41. 시간에 따른 초산 발효물의 유기산 크로마토그램 (자포메타 발효, 전액)

A: 표준품, B: 1차 0일차, C: 1차 4일차, D: 1차 8일차, E: 1차 14일차, F: 2차 0일차, G: 2차 4일차, H: 2차 8일차, I: 2차 14일차, a: Oxalic acid, b: D-Tartaric acid, c: Formic acid, d: D-Malic acid, e: Malonic acid, f: Lactic acid, g: Acetic acid, h: Maleic acid, i: Citric acid, j: succinic acid.

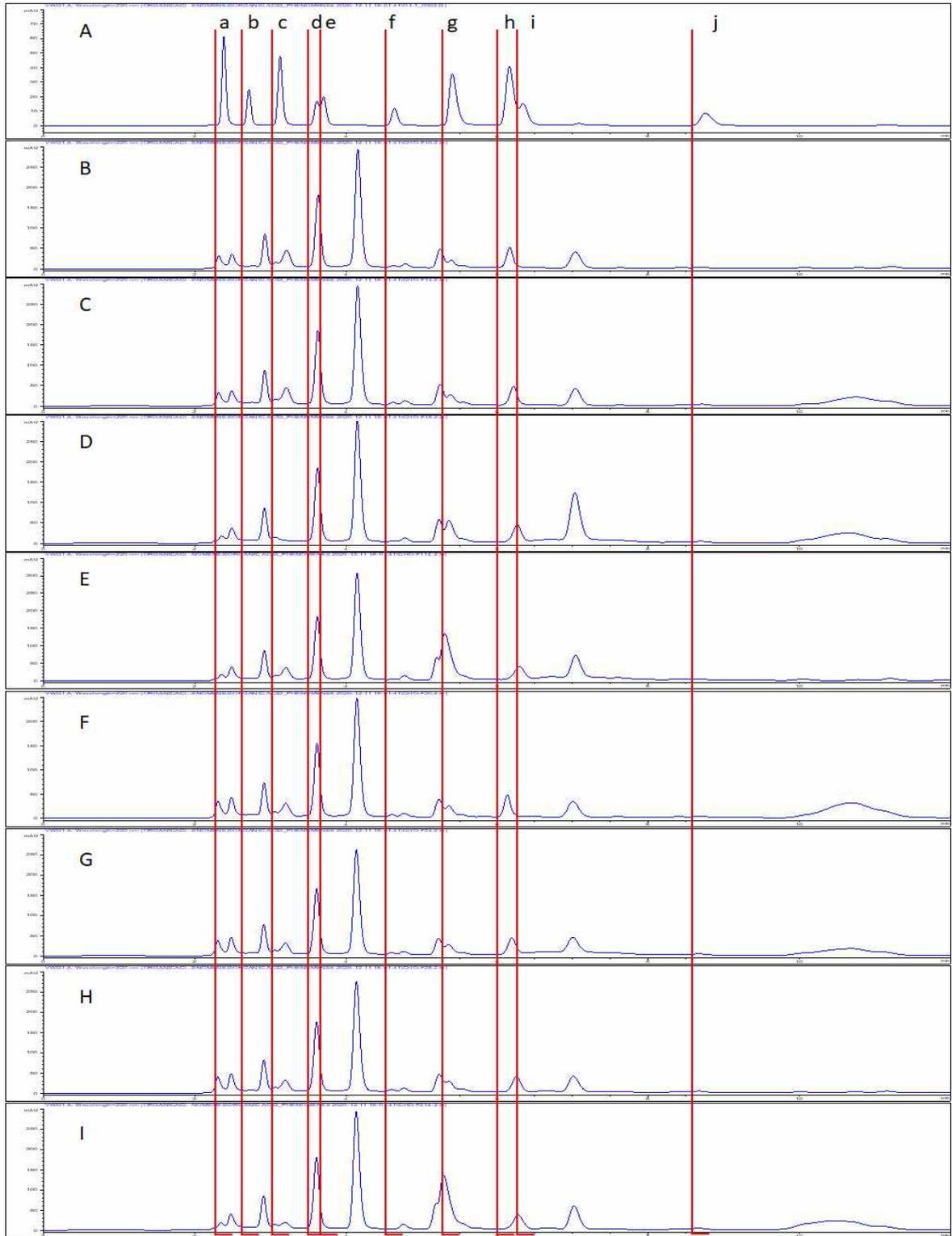


그림 42. 시간에 따른 초산 발효물의 유기산 크로마토그램 (자포메타 발효, 상등액)

A: 표준품, B: 1차 0일차, C: 1차 4일차, D: 1차 8일차, E: 1차 14일차, F: 2차 0일차, G: 2차 4일차, H: 2차 8일차, I: 2차 14일차, a: Oxalic acid, b: D-Tartaric acid, c: Formic acid, d: D-Malic acid, e: Malonic acid, f: Lactic acid, g: Acetic acid, h: Maleic acid, i: Citric acid, j: succinic acid.

(라) 시간에 따른 초산 발효물의 유기산 함량 (대형)

발효배양기 초산 발효시 유기산함량 변화는 표 60.와 같음. 발효시간이 지남에 따라 변화가 없거나 감소하는 경향은 동일하게 나타남. 하지만 acetic acid의 경우 발효일수가 지남에 따라 증가하는 것으로 나타남. 또한 발효 전체액과 원심분리하여 분리한 상등액의 차이는 없는 것으로 나타남

표 60. 시간에 따른 초산 발효물의 유기산 함량 (대형)

									mg/100 mL
	일차	Oxalic acid	D-Tartaric acid	D-Malic acid	Lactic acid	Acetic Acid	Citric acid	Succinic acid	Total
상 등 액	0	0.00±0.00	4.44±0.03	1279.67±0.71	55.13±0.43	372.41±0.35	210.39±8.40	88.91±0.92	2010.95±6.29
	4	0.00±0.00	4.10±0.09	1185.86±0.70	59.25±1.28	527.11±4.01	267.38±0.42	95.30±0.14	2139.00±2.35
	8	0.00±0.00	5.27±0.05	1051.57±0.96	61.93±1.32	812.95±0.49	341.46±1.11	98.37±0.59	2371.55±1.93
	14	0.00±0.00	5.68±0.06	951.50±3.27	68.83±0.86	1143.99±0.46	386.31±1.62	91.06±0.98	2647.38±5.14
전 체 액	0	0.00±0.00	2.91±0.07	1160.73±0.16	53.05±0.15	334.06±0.30	245.24±0.66	70.36±1.06	1866.36±0.80
	4	0.00±0.00	2.40±0.11	1091.31±1.12	58.41±1.34	487.04±0.26	258.64±0.31	77.76±1.59	1975.55±3.03
	8	0.00±0.00	3.70±0.16	1010.45±3.78	66.25±0.15	737.92±0.83	287.15±42.11	65.47±0.66	2170.96±39.86
	14	0.00±0.00	4.22±0.02	860.47±5.66	65.06±0.42	1090.43±2.75	371.95±2.84	57.34±1.07	2449.45±11.93

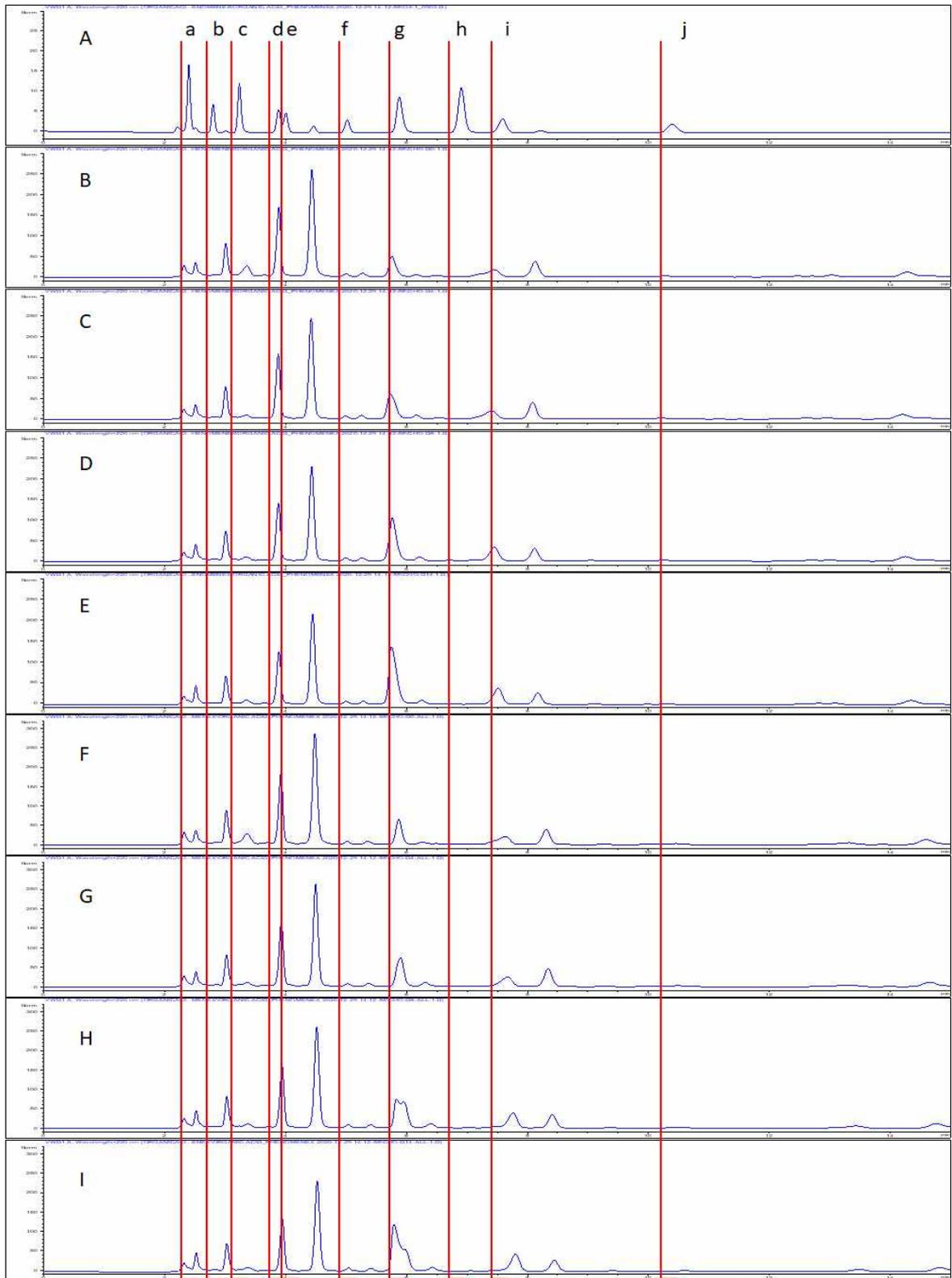


그림 43. 시간에 따른 초산 발효물의 유기산 크로마토그램 (대형, 전액과 상등액)

A: 표준품, B: 0일차 상등액, C: 4일차 상등액, D: 8일차 상등액, E: 14일차 상등액, F: 0일차 전액, G: 4일차 전액, H: 8일차 전액, I: 14일차 전액, a: Oxalic acid, b: D-Tartaric acid, c: Formic acid, d: D-Malic acid, e: Malonic acid, f: Lactic acid, g: Acetic acid, h: Maleic acid, i: Citric acid, j: succinic acid.

나. 유효성(효능)평가

(1) 세포 내 독성 유무 확인

(가) 세포내 독성 실험 방법

① 대식세포주(RAW 264.7) 세포의 배양법

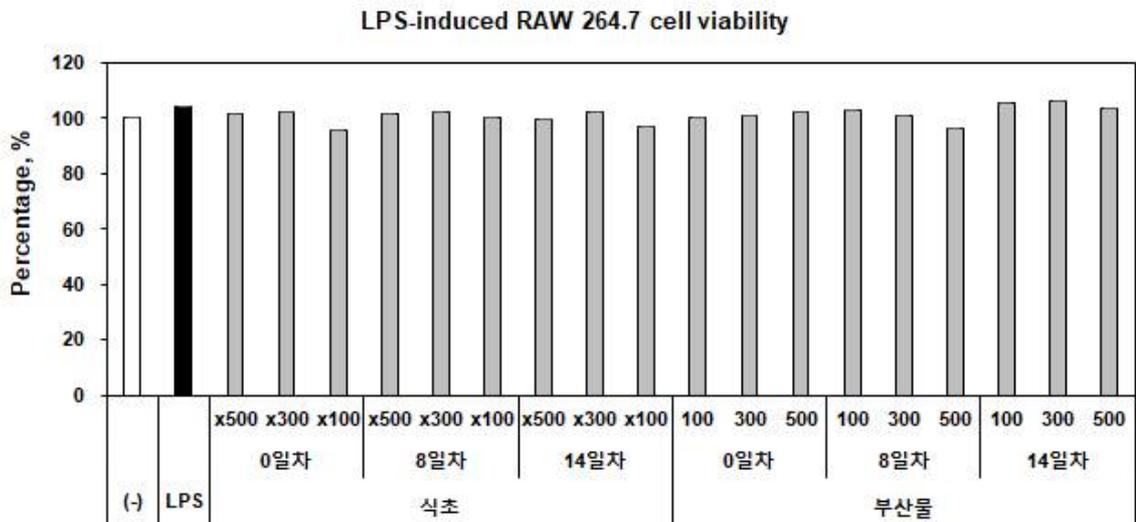
실험에 사용한 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 분양받아 10% FBS (fetalbovine serum), 1% 항생제, 2-ME (2-mercaptoethanol)를 함유한 RPMI 1640배지를 이용하여 37°C, 4% CO₂에서 조절된 incubator에서 배양함

② 실험시료의 세포독성 유무 확인

마우스의 대식세포주 (RAW264.7)를 96well plate에 well당 5X10⁴ cells/100 μl씩 분주한 뒤, overnight 함. LPS를 1 μg/ml 농도로 처리한 후 1시간 뒤, 준비한 시료를 농도별로 처리하고 24시간 동안 CO₂ incubation 함. 그 다음 조건 당 배양 상층액을 제거하고, CCK-8 시약을 처리하여 Microplate reader기를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정함

(나) 세포내 독성 실험 결과

시료가 세포독성을 나타내는지 실험시료를 LPS로 활성화 된 대식세포주 (RAW 264.7)에 처리하여 확인한 결과, 실험에 사용한 농도에서 세포 독성이 없는 것을 확인하였음 (그림 44)



		Concentration (dilution factor)			
medium	LPS	식초			
	1 μ g/ml	X500	X300	X100	
		0일차	101.84 \pm 0.00	102.28 \pm 0.02	95.70 \pm 0.01
		8일차	101.90 \pm 0.01	102.50 \pm 0.01	100.05 \pm 0.02
		14일차	99.51 \pm 0.01	102.06 \pm 0.02	97.07 \pm 0.02
		Concentration (μ g/mL)			
100.00 \pm 0.02	104.31 \pm 0.03	부산물			
		100	300	500	
		0일차	100.09 \pm 0.04	101.05 \pm 0.02	102.39 \pm 0.02
		8일차	102.93 \pm 0.02	101.12 \pm 0.00	96.47 \pm 0.03
		14일차	105.29 \pm 0.02	106.32 \pm 0.02	103.38 \pm 0.02

Data are represented as mean \pm SD for triplicates

그림 44. 시간에 따른 초산 발효 및 초산 발효 부산물의 LPS로 유도된 마우스 대식세포주(RAW264.7) 세포 생존율

(2) 항염증 효능 확인

(가) 항염증 효능 확인 방법

① NO inhibition양 측정법

안정화된 NO산화물인 NO₂ (Nitrite)는 Griess 반응을 이용하여 측정함. 먼저 RAW 264.7 세포를 96well plate에 well당 5X10⁴ cells/100 μ l씩 분주한 뒤, overnight 함. LPS를 1 μ g/ml 농도로 처리하고 1시간 CO₂ incubation 한 뒤 준비한 시료를 농도별로 처리하여 24 시간 CO₂ incubation 함. 그 다음 조건 당 배양 상층액을 96 well plate에 넣고 여기에 동량의 Griess 시약 (0.1% N-1-naphtyl-ethyldiamine in H₂O : 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ = 1 : 1)을 첨가하여 10분간 반응시킨 후, Microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정함

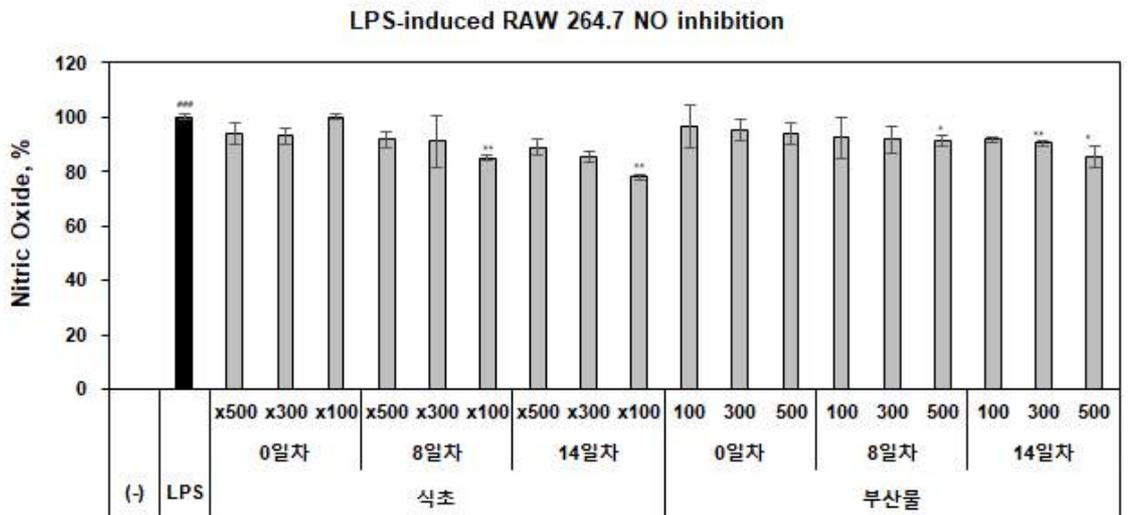
② Cytokine 생성량 측정법

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 seeding 후, overnight 함. 이후 well에 LPS를 1 μ g/ml 농도, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 CO₂ incubation 함. 그 다음 세포배양 상층액을 수거 함. 상층액에 포함된 cytokine인 IL-6, TNF- α , GM-CSF, IL-1 β 를 효소항체법 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)을 이용하여 측정 함. 즉, plate-bottom micro-well에 1차 항체 capture antibody를 coating buffer에 희석하여 100 μ l/well로 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 Overnight 후, washing 용액으로 세척함. 세척된 micro-well은 10% FBS가 첨가된 PBS로 blocking 하였으며, 실험에서 채취한 배양 상층액을 적당한 비율로 희석한 후 각 well에 분주하여 상온에서 반응시켰다. 그 다음, biotin이 부착된 2차 항체 100 μ l/well와 일정시간 상온에서 반응시킨 후, enzyme reagent 100 μ l/well을 첨가함. 마지막으로 기질을 첨가하여 발색시킨 다음 Microplate reader를 이용하여 측정함. 측정된 IL-6, TNF- α , GM-CSF, IL-1 β 의 농도는 표준곡선을 이용하여 환산함

(나) 항염증 효능 결과

① NO inhibition양 측정 결과

대식세포에서는 LPS와 같은 외부 자극 등에 의해 염증반응이 일어나면 NO를 분비하고 염증성 cytokine과 같은 다양한 물질을 생성 하고, 염증반응을 조절하는 다양한 병리적인 반응이 일어난다. LPS로 염증반응을 유도한 RAW264.7 세포에서 실험시료를 처리하여 항염증 효능을 조사함. NO 생성 저해 활성을 측정한 결과, 아로니아 초산 발효가 끝난 14일차 시료에서 식초와 부산물 각각 약 21%, 14%의 NO 생성 억제율을 확인하였음 (그림 45)



		Concentration (dilution factor)			
medium	LPS	식초			
	1 μ g/ml	X500	X300	X100	
		0일차	93.8. \pm 3.88	93.15 \pm 2.91	100.00 \pm 0.97
		8일차	91.78 \pm 2.91	91.09 \pm 9.69	84.92 \pm 0.97
		14일차	89.04 \pm 2.91	85.61 \pm 1.94	78.07 \pm 0.97
		Concentration (μ g/mL)			
N.D.	100.00 \pm 0.97	부산물			
		100	300	500	
		0일차	96.57 \pm 7.75	95.20 \pm 3.88	93.83 \pm 3.88
		8일차	92.46 \pm 7.75	91.78 \pm 4.85	91.09 \pm 1.94
		14일차	91.78 \pm 1.94	90.41 \pm 0.97	85.61 \pm 3.88

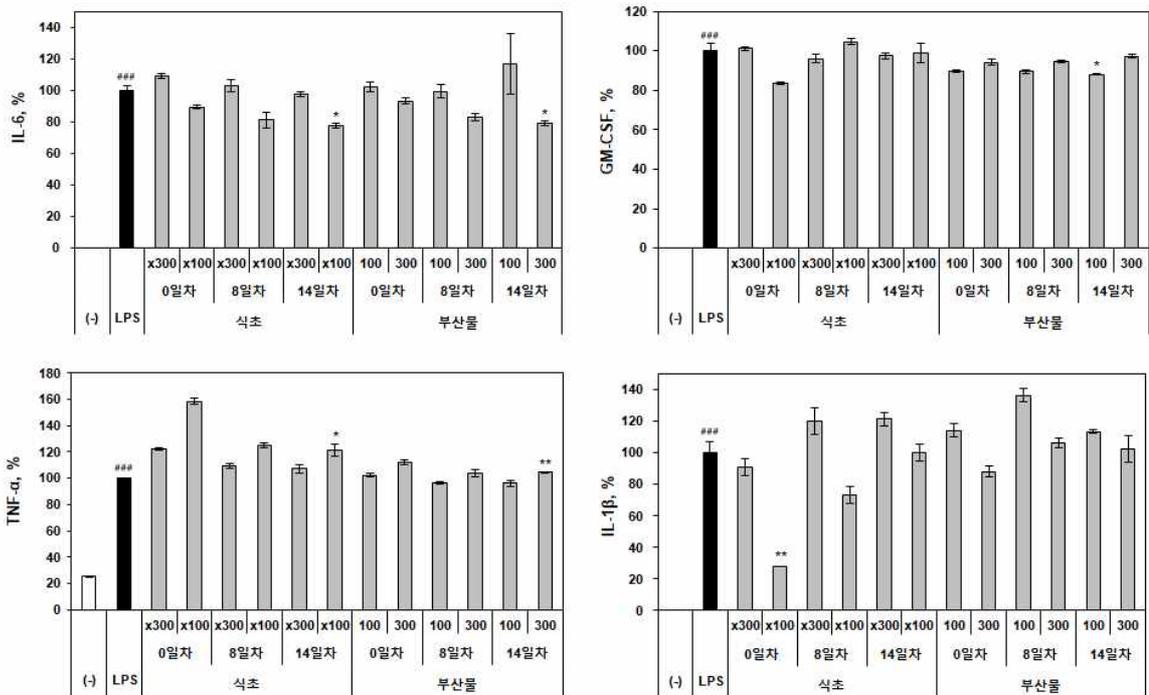
Data are reepresentes as mean \pm SD for triplicates

그림 45. LPS로 유도된 마우스 대식세포주(RAW264.7)의 NO 억제에 대한 시간에 따른 초산 발효 및 초산 발효 부산물의 효과

② Cytokine 생성량 측정 결과

염증반응은 과도한 면역반응으로 인한 염증성 사이토카인 증가로 유도되는데, 대표적인

cytokine으로는 TNF- α , IL-6, IL-1 β , GM-CSF 가 있음. 대식세포에서 LPS에 의해 분비되는 pro-inflammatory cytokines 중 IL-6는 B cell을 형질세포로 분화시켜 항체 생산을 촉진하여 급성염증 반응을 만성 단계로 전환시키게 됨. 또한 TNF- α 는 전신성 염증에 관여하는 cytokine으로, 대식세포 이외에도 NK cell이나 CD4 T 세포 에서서도 생산되는데 과량 생산시 발열, 세포사멸을 유도함. IL-1 β 는 활성화된 대식세포에서 caspase-1을 활성화시켜 염증 반응의 주요 매개체로 작용하며, 특히 Th cell을 활성화시켜 과도한 염증 반응을 유도함. Pro-inflammatory cytokines의 과량 분비 시 패혈증, 알츠하이머, 암, 염증성 장 질환 등의 다양한 질병의 요인이 됨. 실험시료가 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 염증성 cytokine에 미치는 영향을 확인한 결과, IL-6를 제외한 cytokine 생성량에는 영향을 미치지 않음을 확인하였음 (그림 46)



		Concentration (dilution factor)			Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
	medium	LPS	식초		부산물	
		1 $\mu\text{g/ml}$	X300	X100	100	300
IL-6	N.D.	0일차	109.23 \pm 1.34	89.35 \pm 1.34	101.89 \pm 3.01	93.14 \pm 2.01
		8일차	102.84 \pm 3.68	81.06 \pm 5.02	99.29 \pm 4.02	82.96 \pm 2.34
		14일차	97.40 \pm 1.34	77.51 \pm 1.34	116.81 \pm 19.41	79.17 \pm 1.67
GM-CSF	N.D.	0일차	101.09 \pm 1.03	83.46 \pm 0.77	89.75 \pm 0.41	94.26 \pm 1.64
		8일차	95.89 \pm 2.11	104.69 \pm 1.70	89.68 \pm 0.93	94.73 \pm 0.46
		14일차	97.46 \pm 1.44	98.84 \pm 5.14	88.00 \pm 0.41	97.20 \pm 0.87
TNF- α	25.42 \pm 0.27	0일차	122.49 \pm 0.82	158.36 \pm 2.38	102.46 \pm 1.74	12.15 \pm 2.10
		8일차	108.98 \pm 1.83	124.62 \pm 1.83	96.45 \pm 0.91	103.75 \pm 2.83
		14일차	107.43 \pm 3.29	121.46 \pm 4.30	96.38 \pm 2.29	104.46 \pm 0.55
IL-1 β	N.D.	0일차	91.10 \pm 5.24	28.05 \pm 0.00	114.09 \pm 4.20	88.13 \pm 3.15
		8일차	120.03 \pm 8.39	73.30 \pm 5.24	136.34 \pm 4.20	88.13 \pm 3.15
		14일차	121.51 \pm 4.20	100.00 \pm 5.24	113.35 \pm 1.05	102.23 \pm 8.39

Data are represented as mean \pm SD for triplicates

그림 46. LPS로 유도된 마우스 대식세포주(RAW264.7)의 염증성 cytokine 생성 억제에 대한 시간에 따른 초산 발효 및 초산 발효 부산물의 효과

(3) 항염증에 관련된 signal pathway 확인

(가) 항염증 관련 단백질 발현 측정 방법

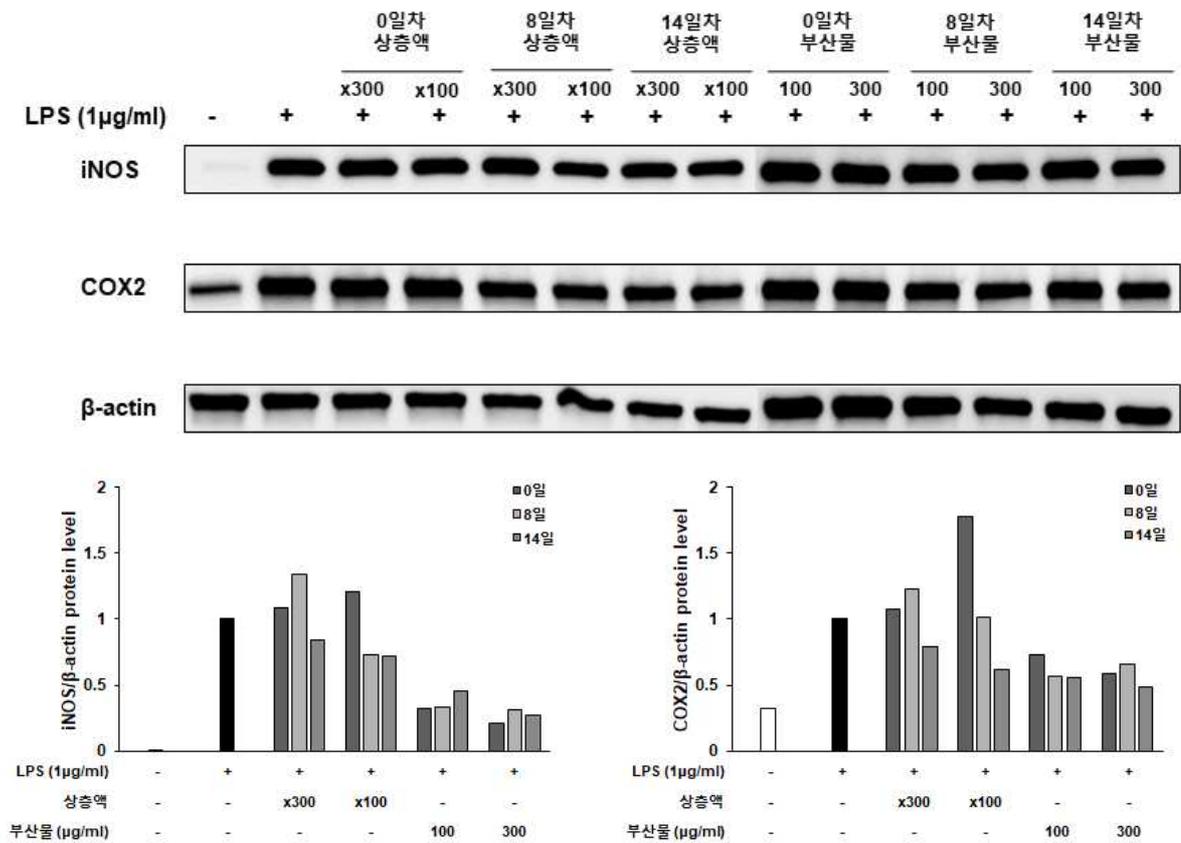
① 세포 내 Western blot 측정법

배양이 끝난 세포를 수거하여 3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후 lysis buffer 를 이용하여 lysis 시킨 후, 15000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 침전물은 제거 후 상층액만 회수함. 회수된 lysates는 BCA protein assay kit (Pierce, USA)를 사용하여 정량하였으며, 20 μl 의 lysate를 10% SDS-PAGE로 분리함. 4X Laemmli sample buffer와 lysates를 혼합한 뒤, 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 denaturation시켰으며, 이를 10% polyacrylamide gel에 loading하여 단백질을 전기영동함. 분리된 단백질은 PVDF membrane에 transfer한 다음, 3% non-fat dry milk로 blocking 후, 1차 항체의 경우 anti-rabbit iNOS, COX-2, p-P38, P38, p-ERK1/2, ERK1/2, p-JNK, JNK, β -actin로 overnight, 그 후 goat anti-rabbit-HRP을 이용하여 반응 후 TBS-T buffer로 washing한 뒤, ECL substrates를 처리하여 단백질 발현을 확인함

(나) 항염증 관련 단백질 발현 측정 결과

① iNOS, COX-2 발현량 억제 효과

iNOS는 LPS, 박테리아, 체내 염증반응이 일어나는 경우 발현되며 L-arginine을 L-citrullin으로 전환시키며 NO를 생성하게 되며, 이는 신경손상, 조직 손상 등과 함께 혈관 투과성이 증가되어 부종 및 발열 등의 염증반응을 촉진시킨다. COX-2는 염증 매개 물질인 PGE2의 형성에 관여하여 염증반응을 일으키게 됨. LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7세포에 아로니아 초산 발효물과 발효 부산물을 처리하여 세포질에서의 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, 아로니아 초산 발효 부산물이 iNOS 발현 억제하는 것을 확인하였음 (그림 47)

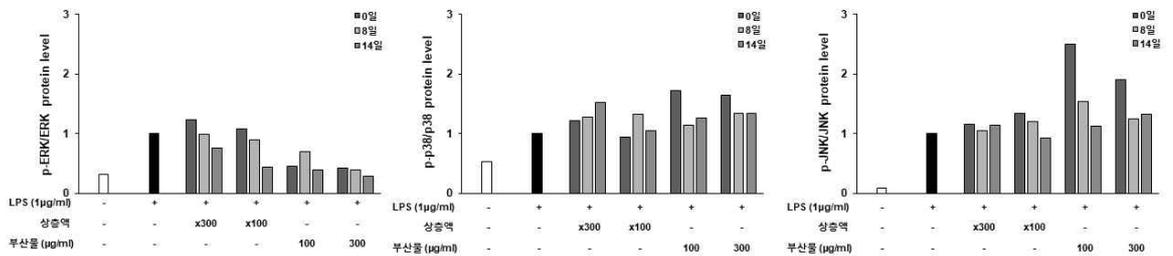
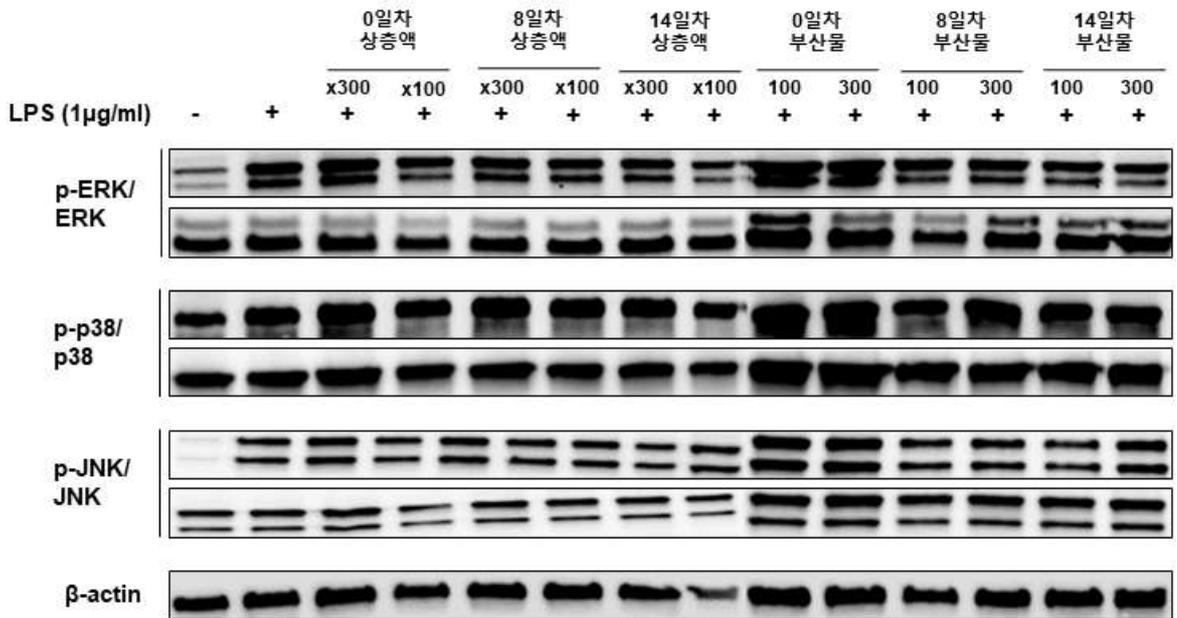


		LPS		Concentration (dilution factor) 식초		Concentration (μg/mL) 부산물	
iNOS/ β-actin	medium	1		X300	X100	100	300
		μg/ml					
			0일차	1.088	1.207	0.323	0.213
	0.003	1.000	8일차	1.339	0.728	0.332	0.314
			14일차	0.846	0.723	0.456	0.275
COX-2/ β-actin	medium	1		X300	X100	100	300
		μg/ml					
			0일차	1.076	1.775	0.730	0.583
	0.325	1.000	8일차	1.230	1.013	0.561	0.657
			14일차	0.786	0.614	0.556	0.484

그림 47. LPS로 유도된 마우스 대식세포주(RAW264.7)의 iNOS, COX-2 단백질 발현에 대한 시간에 따른 초산 발효 및 초산 발효 부산물의 효과

② MARKs 신호전달경로와 관련된 단백질 발현 억제 효과

MARKs (JNK, ERK, p38)는 세포질에서 인산화되지 않은 상태로 존재하다가 LPS 등에 의해 자극되면 인산화 되어 핵으로 전위함. MARKs는 pro-inflammatory cytokine에 중요한 조절인자로 세포 내에서 활성화 되어 염증성 cytokine 및 염증매개 물질의 분비를 촉진함. 따라서 아로니아 초산 발효물과 발효 부산물이 인산화된 MARKs 단백질에 미치는 영향을 알아보기 위해, western blot을 통해 확인함. 그 결과, 실험 시료는 인산화된 MARKs 단백질 중 ERK 외에는 영향을 미치지 않음을 확인함 (그림 48)



	Concentration (dilution factor)						Concentration (μg/mL)	
	medium	LPS		식초		부산물		
		1 μg/ml		X300	X100	100	300	
p-ERK/ERK			0일차	1.226	1.072	0.447	0.420	
	0.310	1.000	8일차	0.990	0.898	0.689	0.390	
			14일차	0.757	0.444	0.394	0.282	
p-P38/P38			0일차	1.215	0.939	1.719	1.642	
	0.528	1.000	8일차	1.283	1.320	1.136	1.344	
			14일차	1.520	1.048	1.256	1.343	
p-JNK/JNK			0일차	1.148	1.342	2.498	1.897	
	0.081	1.000	8일차	1.044	1.208	1.543	1.254	
			14일차	1.142	0.919	1.129	1.323	

그림 48. LPS로 유도된 마우스 대식세포주(RAW264.7)의 MAPKs 신호전달경로와 단백질 발현에 대한 시간에 따른 초산 발효 및 초산 발효 부산물의 효과

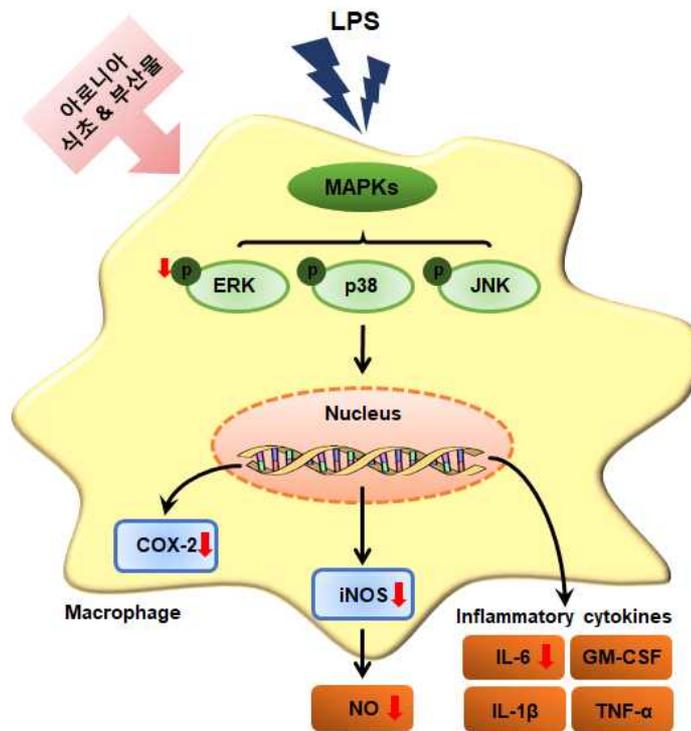
(4) 통계분석

모든 실험은 3반복으로 측정하여 측정치를 평균값±표준편차로 나타내었으며 실험 결과의 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단함

#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 compared with medium.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with LPS.

(5) 아로니아 식초 및 정제물의 효능 요약



항염증 활성을 확인하기 위하여 염증 매개물질인 NO와 inflammatory cytokine인 IL-6와 IL-1 α , GM-CSF, TNF α , 의 생성량을 측정함. 그 결과 NO와 IL-6의 생성을 저해하였지만, IL-1 α , GM-CSF, TNF- α 의 경우 유의적인 활성이 나타나지 않음. 또한, 아로니아 초산 발효물의 염증 반응과 관련된 iNOS와 COX2 발현과 MAPKs의 활성화에 미치는 영향을 측정한 결과 iNOS와 COX2는 농도 유의적으로 그 발현이 감소되었으며, MAPK의 ERK의 인산화 를 효과적으로 감소시킴. 이상의 결과로부터 아로니아 초산 발효물은 항산화 및 항염증 활성을 가진 기능성 소재로 활용이 가능할 것으로 사료됨

2-3. 아로니아 개발 소재를 활용한 제품 개발

가. 아로니아 발효액을 이용한 와인 및 식초 제조 공정

(1) 아로니아 발효액을 이용한 와인 제조 방법

(가) 아로니아 효모발효 와인 제조 방법은 아로니아는 원과를 파쇄하여 주정 70%로 10 배수 정용하여 추출함. 추출은 30°C에서 24시간 동안 교반추출을 진행하며 추출 후 Polypropylene filter를 이용하여 추출액을 여과한 뒤 여과된 추출액은 농축하여 주정을 제거하여 사용함. 아로니아 효모발효 시 아로니아 추출액에 아로니아 농축액, 배 농축액, 아로니아 슬러지를 첨가하여 22~23 Brix(%)로 당도를 보정하여 *Saccharomyces cerevisiae*, 효모 0.1% 접종함. 대조구 실험군은 배농축액을 22~23 Brix(%)로 보정하여 사용하며 발효조건은 온도 30°C, 140 rpm, 배양시간 6일로 효모 발효 탱크를 사용하여 알코올 함량 약 11%의 아로니아 와인을 제조한 다음 오크에 아로니아 발효와인을 충전하고 4°C의 저온고에서 3개월 이상 숙성을 통해 최종 12% 아로니아와인을 제조하였음. 그리고 그 결과 알코올 함량 11%의 아로니아 효모 발효 와인을 제조하였으며, 미생물에 대한 안전성 검사는 주관기관 자체 안전성 검사 결과 세균수 불검출, 대장균군 불검출, 대장균 불검출, 황색포도상구균 불검출, 살모넬라균 불검출로 미생물 검사 결과 안전함을 확인함

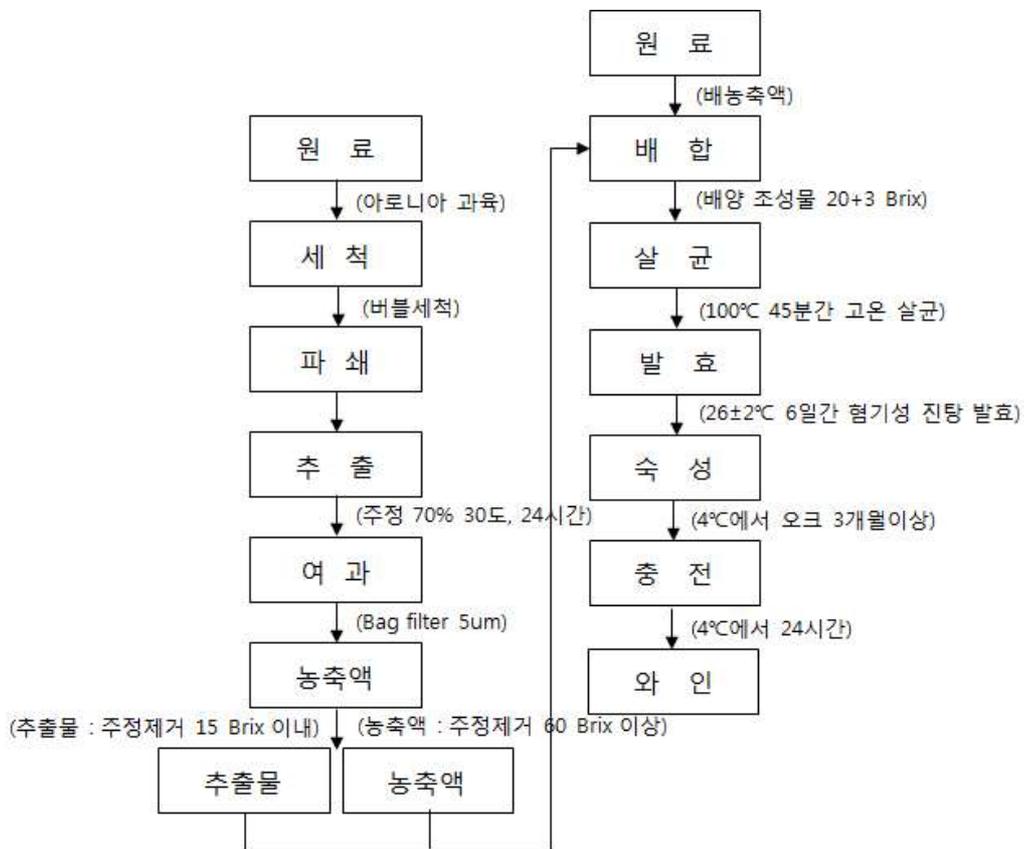
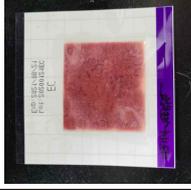


그림 49. 아로니아 발효 조성물 및 효모 발효 와인 제조 방법

표 61. 아로니아 효모 발효 와인 제조에 대한 미생물 안전성 자체 검사 결과

실험날짜	실험종류	결과	사진
20.12.08	Total Bacteria 일반세균	검출되지 않음	
20.12.08	Total Coliform 대장균군	검출되지 않음	
20.12.08	<i>Escherichia coli</i> 대장균	검출되지 않음	
20.12.08	<i>Staphylococcus aureus</i> 황색포도상구균	검출되지 않음	
20.12.08	<i>Salmonella</i> 살모넬라균	검출되지 않음	

(나) 숙성된 아로니아 와인을 충전하기 전 2단계 필터 시스템으로 1단계 백필터 1 um, 2단계 카트리지필터 0.45 um를 순차적 필터를 통해 침전물 및 균주를 제거하였음. 그리고 와인병 750 mL에 충전 후 라벨 및 수축필름을 입혀 시제품을 제작하였음



ARW 1. 아로니아 와인



ARW 1. 아로니아 와인

DESIGN POINT
제품의 이미지를 보다 더 멋지게 표현하기 위하여
고급스러운 분위기를 연출 할 수 있도록 디자인하여
제품의 품격을 높이기 위하여 디자인하였습니다



8타입 1. 아로니아 와인

8타입 1. 아로니아 와인



DESIGN POINT
 동일 브랜드의 유사성이 적도록 색상을 차별하는
 방법으로 색상을 보라빛을 가지며 검붉은색과
 짙은 보라빛이 들어 있는 디자인



아로니아 와인의 라벨 디자인 선정결과는 아로니아를 발효 와인의 고유의 색은 보라빛을 가지고 있는 검붉은색과 맛은 짙은맛과 신맛이 있어 스위트와인과는 차별화된 느낌을 주었으며 그리고 오크에서 숙성된 와인을 표현할 수 있는 이미지로 B 디자인으로 선정하였음

(다) 아로니아 와인은 주류제조신청 및 허가증이 있어야하기 때문에 현재 기술실시(이전) 업체를 통한 판매가 어렵지만 농림축산부장관 추천서를 통해 제조 허가 신청이 가능하며 이로 인해 아로니아 소모량이 가장 높은 아로니아와인을 제조 판매할 수 있게 된다면 아로니아를 재배하고 있는 많은 농가의 가장 큰 판로 개척의 애로 문제점을 해결할 수 있을 것으로 판단됨. 그리고 기술실시(이전) 받은 기업체들은 주관기관의 해외 중국 바이어를 통해 중국 수출 개척도 진행 가능하게 될 것임

제조 가공방법 (공정규격)

No	공정명	작업 내용 및 방법	공정조건 (온도/시간/압력/체류시간)	주요설비명	검사방법	주기	이탈시 조치사항	비고
1	원료	원부재료의 기준 규격에 적합하지 검토하고 이상없을 시 입고한다.	원료 시험성적서에 따른 보관온도 설정 (실온, 냉장, 냉동)	원료 전 처리 실	시험성적서	입고시	반송조치	기록
2	배합 원료투입①	1) 제조 매뉴얼에 의거하여 원료별로 정확히 계량한다. 2) 계량이 끝난 원료는 뚜껑을 덮어 이물질 유입이 없도록 하여 믹싱탱크로 이송한다.	- 물온도 : 60~65℃	- 계량기 - 보조믹싱배합탱크	물온도 체크 원료무게측정	batch시	폐기	기록
3	가열/살균	살균 공정을 통해 살균을 실시한다.	- 100℃, 45분간 고온살균	- 살균기 - 살균 탱크	살균 온도 체크	batch시	폐기	기록
4	발효	발효 조건에 따른 6일간 효모 발효를 진행한다	- 26+2℃, 6일간 혐기성 교반	- 효모 발효 탱크	탱크 온도 체크 및 균주 확인	1일간	폐기	기록
5	숙성	제조 매뉴얼에 의거하여 숙성 저장성 기간에 따른 표시사항 준수한다.	- 4℃, 3~6개월간 오크 숙성	- 저온저장고 - 오크통	pH, 알코올 함량, 당도	2주간	폐기	기록
6	검병	용기의 깨짐 및 불량 확인 (육안확인)	육안검사	-depalettzer	-깨짐 및 불량 확인	생산시	폐기	기록
7	용기투입	용기를 세척 및 가온에 주기 위해 투입	-	-	-	생산시	폐기	기록
8	용기세척	용기의 이물질 제거 및 따뜻한 물로 가온세척 (물로만 세척한다 다른것을넣지않는다)	- 용기 품온 50~60℃	-rinsler	온도체크	생산시	폐기	기록
9	충진	1) 유리병 충전시 병목에 rack 들어가는 홈부분을 오염이 되지 않은 물로 충전후로 수세한다. 2)충진시,충진액의온도를 반드시 90 ℃ 이상 유지하며 충전한다. 3)충진시액이 넘쳐 흐르지 않게 액면관리를 한다.	- 80℃ 이상	- 충전기	- 충전 수 량	batch시	폐기	기록
10	밀봉	준비된 뚜껑으로 밀봉한다.	-	- 밀봉기	진공도 측정	batch시	폐기	기록
11	규격확인	살균된 액의 규격을 확인한다.	-	- 분석기기	- 항목 : 산도, 당도, pH	batch시	폐기	기록
12	냉각	냉각존을 이용한 품온 30℃이하로 단계적 냉각한다.	- 4℃이하 1일간	- 냉각수	- 냉각 온도	batch시	폐기	기록
13	포장	라벨 포장 및 박싱, 테이핑 후 적재한다.	-	- 라벨기 - 박싱기 - 적재기	라벨 디자인 생산일시 생산수량 박싱	batch시	폐기	기록

규 격

구분	품명	법적 유형	원산지	공급업체	관리항목	위해요소 구분	세부항목	법적규격항목	
								개별규격	공통규격
시제품	아이케어 아로니아 RED	혼합음료	한국	-	성상	P	색상	검붉은색	-
						P	외관	보라빛	-
						P	맛	뽕고깔곰	-
						P	냄새	와인향	-
						P	조직감	부드러움	-
						P	이물	-	-
					보존료	C	파라옥시안 식향산계6종(식품공전 규격)	불검출	-
타르색소	C	식품공전	불검출	-					
					이화학 분석		산도 (% w/w)	1.5%	-
							pH	4.0+0.02	-
							당도 (brix)	17.4	-

규 격

자가규격	자가관리규격 내용	입고주기	보관조건 (온도등)	시험성적서	입고검사	분석
색상	고유의 색과 향미가있음	입고시	서늘하고 동풍이 잘되며 햇볕이 직접달지 않는곳	OEM 입고시 반드시제출	입고시	- 공급업체 : 공인분석기관 의뢰 - OEM업체: 시험 성적서 확인필
외관						
맛						
냄새						
조직감						
이물	없음					
파라옥시안식향산 6종 (식품공전규격)	불검출					
식품공전	불검출					
산도	4%이상					
pH	±0.2					
당도	bx 이상					
				1회/분기		
				납품시		

(2) 아로니아 발효액을 이용한 식초 제조 방법

(가) 아로니아의 식초 제조 방법은 아로니아 와인 필터된 발효원액을 아로니아 식초 4%이상을 첨가하여 초기산도 1%로 만들고 균주 접종은 종초 + *Gluconobacter intermedius* (KSH-B141031) 1%로 접종한 후 발효탱크 O₂ 공급량은 10 NL/Min 공급하고 30°C에서 2주간 교반 발효하여 아로니아 식초 산도 4%이상을 제조하였음. 다음으로 아로니아 식초와 아로니아 부산물을 얻기 위해 산업용 원심분리기 15,000 rpm으로 상층액 식초와 초산발효 부산물을 분리하였음. 그리고 상층액 아로니아 식초는 오크에 아로니아 발효 식초를 충전하고 4°C의 저온고에서 1개월 이상 숙성을 통해 최종 4±0.2% 이상의 아로니아 식초를 제조하였음

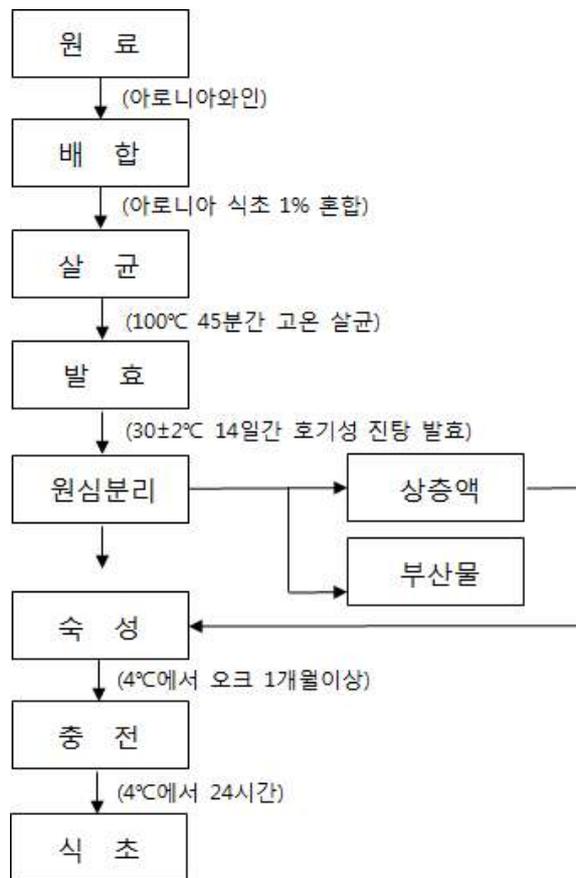


그림 50. 아로니아 발효 와인을 이용한 초산 발효 식초 제조 방법

(나) 최종 아로니아 식초 시제품에 대한 안전성, 기타 분석 검사 결과

① 아로니아 초산 발효 식초 시제품에 대한 결과는 정상 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 액상, 그리고 안전성 검사로 중금속 검사 결과는 납 0.0196 mg/kg, 비소 0.0215 mg/kg, 수은 0.0025 mg/kg, 카드뮴 0.0057 mg/kg 식품 기준 범위안에 있었으며 미생물 검사로는 세균수 0, 대장균 음성, 대장구균 음성 등을 공인시험기관을 통해 안전성 시험성적 결과를 확인함

제 D2020082325 호
문서확인 HJWH-F128-7J22

시험·검사성적서

제품명	발효식초	제조일자 (유통기한)	2020-08-20
의뢰인	업체명	재단법인순천원료의약소재개발연구원	실명
	주소	전라남도 순천시 중앙로 255(석현동)	
제조번호		접수년월일	2020-08-26
검사·의뢰목적	참고용	접수번호	D2020082325

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험 - 검사 완료일: 2020-09-02
 시험 - 검사 책임자: 가미현, 이경구, 이현영, 장정순
 검사관련 총 책임자: 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
성상	이취, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 액상	유재별
비소(mg/kg)	0.0215 mg/kg	김다운
납(mg/kg)	0.0196 mg/kg	김다운
수은(mg/kg)	0.0025 mg/kg	박경덕
카드뮴(mg/kg)	0.0057 mg/kg	김다운
다르셀소	불검출	장태원
색관수(ml.)	0	연희숙
대장균	음성	연희숙
대장균군	음성	연희숙

※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 본 성적서는 필요용 성격을 실었습니다. 시험·검사결과는 시험·검사목적 이외의 참고 및 용도 등에 이용할 수 없으며, 재사용성검사 또는 정무기관 외 제출 용도로 활용될 수 없습니다.
 ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정목 권한이 없습니다.
 ※ 어떤이 부족한 경우 시험·검사 및 결과원은 별도로 작성 가능합니다.

2020년 09월 02일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <http://www.khfsre.kr> 전화번호: 051-831-3628-0400-1



(다) 최종 아로니아식초 시제품 상품화

- ① 아로니아 식초 시제품은 pH 2.5±0.3 범위 기준으로 조리할 때 사용하는 식초보다는 드레싱 식초의 개념으로 시제품을 제작하였으며, 식초의 용기 및 라벨 디자인 선별 작업을 통해 선정하였으며, 심플한 이미지를 사용하여 젊은층부터 중년 소비자가 선호 할 수 있는 디자인으로 사용하기에도 편한 원터치 캡을 사용하였음



AB타입 2. 아로니아 식초

DESIGN POINT
 자연의 색 아로니아를 강조하여 판매
 촉진 시키는 요소로 감칠맛 배합과
 일리우스의 스타일을 통하여 디자인



AB타입 2. 아로니아 식초

제조 가공방법 (공정규격)

No	공정명	작업 내용 및 방법	공정조건 (온도/시간/압력/체류시간)	주요설비명	검사방법	주기	이탈시 조치사항	비고
1	원료	원부재료의 기준 규격에 적합한지 검토하고 이상없을 시 입고한다.	원료 시험성적서에 따른 보관온도 설정 (실온, 냉장, 냉동)	원료 전처리 실	시험성적서	입고시	반송조치	기록
2	배합 원료투입①	1) 제조 매뉴얼에 의거하여 원료별로 정확히 계량한다. 2) 계량이 끝난 원료는 뚜껑을 덮어 이물질 유입이 없도록 하여 믹싱탱크로 이송한다.	- 물온도 : 60~65℃	- 계량기 - 보조믹싱배합탱크	물온도 체크 원료무게측정	batch시	폐기	기록
3	가열/살균	살균 공정을 통해 살균 실시한다.	- 100℃, 45분간 고온살균	- 살균기 - 살균 탱크	살균 온도 체크	batch시	폐기	기록
4	발효	발효 조건에 따른 6일간 초산 발효를 진행한다.	- 30+2℃, 14일간 호기성 교반	- 초산 발효 탱크	탱크 온도 체크 및 균주 확인	2일간	폐기	기록
5	숙성	제조 매뉴얼에 의거하여 숙성 저장성 기간에 따른 표시사항 준수한다.	- -4℃, 3~6개월간 오크 숙성	- 저온저장고 - 오크통	pH, 알코올 함량, 당도	2주간	폐기	기록
6	검병	용기의 깨짐 및 불량 확인 (육안확인)	육안검사	-depalettzer	-깨짐 및 불량 확인	생산시	폐기	기록
7	용기투입	용기를 세척 및 가온에 주기 위해 투입	-	-	-	생산시	폐기	기록
8	용기세척	용기의 이물질 제거 및 따뜻한 물로 가온세척 (물로만 세척한다 다른것을넣지않는다)	- 용기 품온 50~60℃	-rinsrer	온도체크	생산시	폐기	기록
9	충진	1) 유리병 충전시 병목에 rack 들어가는 홈부분을 오염이 되지 않은 물로 충전후로 수세한다. 2)충진시,충진액의온도를 반드시 90℃ 이상 유지하며 충전한다. 3)충진시액이 넘쳐 흐르지 않게 액면관리를 한다.	- 80℃ 이상	- 충전기	- 충전 수 량	batch시	폐기	기록
10	밀봉	준비된 뚜껑으로 밀봉한다.	-	- 밀봉기	진공도 측정	batch시	폐기	기록
11	규격확인	살균된 액의 규격을 확인한다.	-	- 분석기기	- 항목 : 산도, 당도, pH	batch시	폐기	기록
12	냉각	냉각존을 이용한 품온 30℃이하로 단계적 냉각한다.	- 4℃이하 1일간	- 냉각수	- 냉각 온도	batch시	폐기	기록
13	포장	라벨 포장 및 박싱, 테이핑 후 적재한다.	-	- 라벨기 - 박싱기 - 적재기	라벨 디자인 생산일시 생산수량 박싱	batch시	폐기	기록

규격

구분	품명	법적 유형	원산지	공급업체	관리항목	위해요소 구분	세부항목	법적규격항목	
								개별규격	공통규격
시제품	아이케어 배로니아 Vingar	혼합음료	한국	-	성상	P	색상	붉은빛	-
						P	외관	보라빛	-
						P	맛	신맛	-
						P	냄새	고유의향	-
						P	조직감	부드러움	-
						P	이물	-	-
					보존료	C	파라옥시안식향산계6종(식품공전 규격)	불검출	-
타르색소	C	식품공전	불검출	-					
					이화학 분석		산도 (% w/w)	4%이상	4~29%
							pH	3.61	-
							당도 (brix)	13.2	-

규격

자가규격	자가관리규격 내용	입고주기	보관조건 (온도등)	시험성적서	입고검사	분석
색상	고유의 색과 향미가있음	입고시	서늘하고 통풍이 잘되며 햇빛이 직접달지 않는곳	OEM 입고시 반드시제출	입고시	- 공급업체 : 공인분석기관 의뢰 - OEM업체: 시험 성적서 확인필
외관						
맛						
냄새						
조직감						
이물	없음					
파라옥시안식향산 6종 (식품공전규격)	불검출					
식품공전	불검출					
산도	4%이상					
pH	±0.2					
당도	bx 이상					
				1회/분기		
				납품시		

나. 아로니아 발효액을 이용한 발효 음료 제조 공정

(1) 발효액 및 개발 소재 첨가 음료 레시피 개발

(가) 아로니아 초산 발효 식초 0.5~4.5% 범위를 주원료로한 부원료는 아로니아 개발 소재 농축액 1.0~2.5%, 감미제는 배농축액 2.0% 기준으로 말토덱스트린 2.0%, 체내 흡수가 되지 않는 사탕수수원당 9.5% 및 에리스리톨 0.02%를 사용하였으며, 식품영양강화제는 니코틴산아미드 0.03%, 무수구연산 0.35%, 구연산나트륨 0.04%, 비타민A 0.0004%, 비타민B1 0.0006%, 비타민B6 0.0006%, 비타민C 0.08%를 사용하고 이너뷰티 콜라겐 생합성 물질 원료는 글리신 0.1%, L-프롤린 0.002%, 세포결합 재생물질 원료로 히알루론산 0.0001% 아로니아 향료는 0.22% 배합비에 따른 최적 아로니아 발효액 및 개발 소재 첨가 음료 레시피를 개발하였음. 그 결과 주원료인 아로니아 효모발효 식초는 4.0%와 아로니아 농축액 1.5%가 가장 적합한 것으로 선정되었음

표 62. 아로니아 효모발효 식초와 아로니아농축액을 주원료로 한 액상음료 레시피 개발

I CARE BEAUTY ANTIPOLA 제조 레시피									
원료명	1차	2차	3차	4차	5차	6차	7차	8차	9차
아로니아농축액	1.0	1.0	1.5	1.5	1.5	2.0	2.0	2.5	2.5
아로니아식초	0.5	1.0	1.5	3.0	4.0	4.0	4.0	4.5	4.5
배농축액	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
말토덱스트린	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
원당(사탕수수)	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5
니코틴산아미드	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
무수구연산	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
구연산나트륨	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
에리스리톨	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
글리신	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
비타민 A	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004
비타민 B1	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006
비타민 B6	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006
비타민 C	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
히알루론산-KD	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
L-프롤린	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
아로니아합성착향료	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
정제수	84.16	83.66	83.16	81.16	81.16	80.66	79.66	78.66	78.66
합계(%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

(2) 발효액 및 개발 소재 첨가 음료 제조 방법

(가) 아로니아 발효 음료 제조 공정은 아로니아 1차 효모발효 와인 12%이내 제조하고 후 백 필터 0.45 um로 필터한 후 아로니아 2차 초산 발효 식초원액 4.0%이상을 원심분리하여 아로니아식초와 발효에 생성된 부산물을 함유하는 조성물로서 산업용 원심분리기를 통해 15,000 rpm 유속 100으로 상층액과 부산물을 분리하여 상층액 아로니아식초는 첨가 함유량에 따라 배합을 통해 원재료를 첨가함. 부재료는 농도가 높은 순에서 농도가 낮

은 순서로 첨가 배합하고 필터는 백필터를 통해 1 um로 필터한 후 살균은 100도에서 45분간 고온살균법으로 살균한 다음 액상 음료 용기 파우치에 용량 충전 후 1일간 4도에서 냉장하여 초산의 강한 맛을 약하게 만들어 신 맛을 감소시킨다. 마지막으로 포장하여 제철을 출고할 수 있도록 함

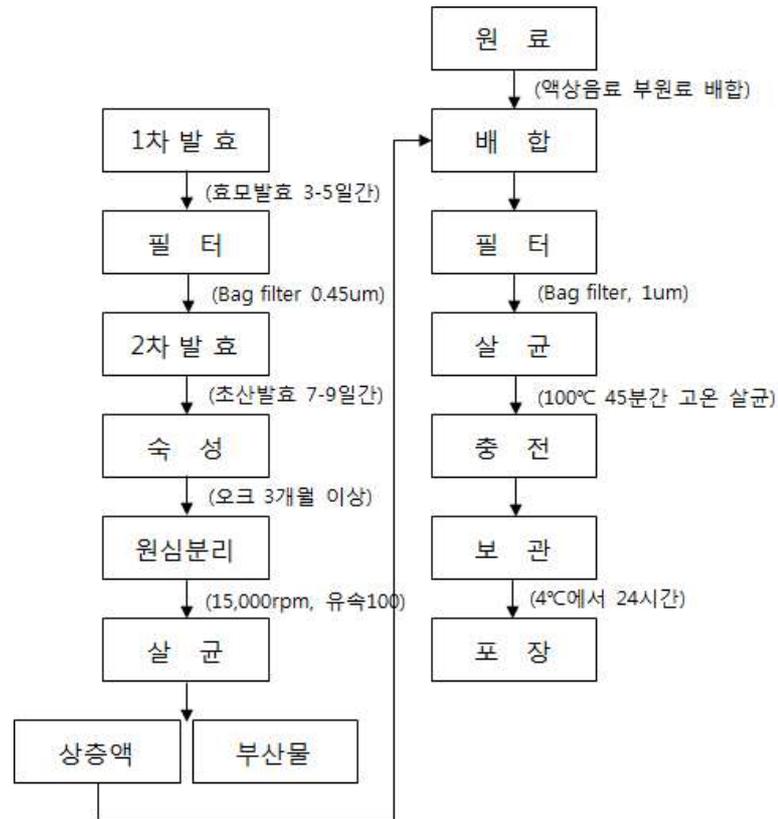


그림 51. 발효액 및 개발 소재 첨가 음료 제조 공정도

(나) 최종 레시피에 대한 안전성, 영양성분, 기타 분석 검사 결과

- ① 발효액 및 개발 소재 첨가 음료의 최종 레시피에 대한 안전성 검사로 중금속 검사 결과는 납 0.0033 mg/kg, 비소 0.0027 mg/kg, 수은 0.0059 mg/kg, 카드뮴 0.0028 mg/kg와 미생물 검사로는 세균수 0, 대장균 음성, 대장구균 음성 등을 공인시험기관을 통해 안전성 시험성적 결과를 확인함
- ② 발효액 및 개발 소재 첨가 음료의 최종 레시피에 대한 영양성분을 알아보기 위해 열량 56.84 Kcal/100g, 탄수화물 13.89%(식이섬유 0.18% 함유), 당류 121.81 mg/g, 식이섬유 0.18%, 조단백 0.23%, 포화지방산 불검출, 트랜스지방산 불검출, 콜레스테롤 불검출, 무기질 칼슘 0.04 mg/g, 칼륨 0.50 mg/g 나트륨 10.16 mg/100g 비타민D 불검출 등의 성분을 공인시험기관을 통해 시험성적 결과를 확인함

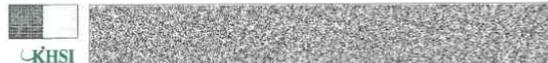
- ③ 발효액 및 개발 소재 첨가 음료를 시제품으로 활용하기 위해 착색료 타르색소 불검출을 공인시험기관을 통해 시험 검사성적 결과를 확인함
- ④ 발효액 및 개발 소재 첨가 음료 아이케어뷰티안티폴A를 시제품으로 활용하기 위해 공인인증기관을 통한 시험 분석을 진행한 결과 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 빨간색의 액상이며 중금속의 경우 비소 0.0027 mg/kg, 납 0.0033 mg/kg, 수은 0.0059 mg/kg, 카드뮴 0.0028 mg/kg로 매우 미비하게 나타났으며 타르색소는 불검출로 나타남. 미생물의 경우 세균수, 대장균, 대장균군 모두 음성으로 나타남. 영양성분의 경우 탄수화물 13.89%, 조단백질 0.23%, 조지방 0.08%, 나트륨 10.16 mg/100g, 당류 121.81 mg/g, 칼슘 0.04 mg/g, 칼륨 0.50 mg/g, 식이섬유 0.18%로 나타났으며 열량은 56.84 Kcal/100g로 나타남. 포화지방산, 트랜스지방산, 콜레스테롤, 비타민D의 경우 불검출로 나타났음

표 63. 아로니아 효모발효 식초와 아로니아농축액을 주원료로 한 액상음료 레시피 영양성분 및 공인 시험성적 안전성 검사 결과

I CARE BEAUTY ANTIPOL A		
열량(Kcal/100g)		56.84Kcal/100g
탄수화물(%)		13.89%
조단백질(%)		0.23%
조지방(%)		0.08%
나트륨(mg/100g)		10.16mg/100g
당류(과당,포도당,자당,맥아당,유당)(mg/g)		121.81mg/g
포화지방산(g/100g)		불검출
트랜스지방산(g/100g)		불검출
콜레스테롤(g/100g)		불검출
비타민D(μg/100g)		불검출
칼슘(mg/g)		0.04mg/g
칼륨(mg/g)		0.50mg/g
식이섬유(%)		0.18%
납(mg/kg)		0.0033mg/kg
비소(mg/kg)		0.0027mg/kg
수은(mg/kg)		0.0059mg/kg
카드뮴(mg/kg)		0.0028mg/kg
타르색소		불검출
세균수(/mL)		0
대장균		음성
대장균 군		음성

제 D2020121031 호 문서특성 M92-1529-2925																																													
제품명		아이케어뷰티안티콜A	제조일자 (유통기한)																																										
제외일자			2020-11-27																																										
시험인	업체명	재단법인순천천연물리약소재개발연구센터	성명																																										
	주소	전라남도 순천시 중앙로 255(석현동)																																											
제외번호		검수연월일	2020-12-08																																										
검사의뢰목적	참고용	검수번호	D000021031																																										
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 완료일 : 2020-12-23 시험·검사 책임자 : 이원성 검사관련 총 책임자 : 김원희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>열량(Kcal/100g)</td> <td>56.84 Kcal/100g</td> <td>박은</td> </tr> <tr> <td>탄수화물(%)</td> <td>13.89 % (식이섬유 0.16 % 함유)</td> <td>최순</td> </tr> <tr> <td>크산틴염(%)</td> <td>0.23 %</td> <td>백영민</td> </tr> <tr> <td>조지방(%)</td> <td>0.08 %</td> <td>양재민</td> </tr> <tr> <td>나트륨(mg/100g)</td> <td>10.16 mg/100g</td> <td>윤재민</td> </tr> <tr> <td>당류(과당,포도당,자당,백아당,유당(Kmg/g))</td> <td>121.81 mg/g</td> <td>박윤진</td> </tr> <tr> <td>포화지방산(g/100g)</td> <td>불검출</td> <td>김민영</td> </tr> <tr> <td>트랜스지방산(g/100g)</td> <td>불검출</td> <td>김민영</td> </tr> <tr> <td>콜레스테롤(mg/100g)</td> <td>불검출</td> <td>장동희</td> </tr> <tr> <td>카티엔(Dmg/100g)</td> <td>불검출</td> <td>김혜숙</td> </tr> <tr> <td>알콜(mg/g)</td> <td>0.04 mg/g</td> <td>김하나</td> </tr> <tr> <td>인분(mg/g)</td> <td>0.50 mg/g</td> <td>김하나</td> </tr> <tr> <td>식이지방(%)</td> <td>0.18 %</td> <td>박윤진</td> </tr> </tbody> </table> <p>분석법-[식이섬유]석출공법/제8.2.1.4.3.식이섬유(나.액체크로마토그래피를 이용한 수층형 식이섬유) 측정법]</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	열량(Kcal/100g)	56.84 Kcal/100g	박은	탄수화물(%)	13.89 % (식이섬유 0.16 % 함유)	최순	크산틴염(%)	0.23 %	백영민	조지방(%)	0.08 %	양재민	나트륨(mg/100g)	10.16 mg/100g	윤재민	당류(과당,포도당,자당,백아당,유당(Kmg/g))	121.81 mg/g	박윤진	포화지방산(g/100g)	불검출	김민영	트랜스지방산(g/100g)	불검출	김민영	콜레스테롤(mg/100g)	불검출	장동희	카티엔(Dmg/100g)	불검출	김혜숙	알콜(mg/g)	0.04 mg/g	김하나	인분(mg/g)	0.50 mg/g	김하나	식이지방(%)	0.18 %	박윤진
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																																											
열량(Kcal/100g)	56.84 Kcal/100g	박은																																											
탄수화물(%)	13.89 % (식이섬유 0.16 % 함유)	최순																																											
크산틴염(%)	0.23 %	백영민																																											
조지방(%)	0.08 %	양재민																																											
나트륨(mg/100g)	10.16 mg/100g	윤재민																																											
당류(과당,포도당,자당,백아당,유당(Kmg/g))	121.81 mg/g	박윤진																																											
포화지방산(g/100g)	불검출	김민영																																											
트랜스지방산(g/100g)	불검출	김민영																																											
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	장동희																																											
카티엔(Dmg/100g)	불검출	김혜숙																																											
알콜(mg/g)	0.04 mg/g	김하나																																											
인분(mg/g)	0.50 mg/g	김하나																																											
식이지방(%)	0.18 %	박윤진																																											

제 D2020121030 호 문서특성 F925-254T-2529Y																																	
제품명		아이케어뷰티안티콜A	제조일자 (유통기한)																														
제외일자			2020-11-27																														
시험인	업체명	재단법인순천천연물리약소재개발연구센터	성명																														
	주소	전라남도 순천시 중앙로 255(석현동)																															
제외번호		검수연월일	2020-12-08																														
검사의뢰목적	참고용	검수번호	D000021030																														
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 완료일 : 2020-12-14 시험·검사 책임자 : 가미원, 이정구, 이현영, 장정순 검사관련 총 책임자 : 김원희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>지방</td> <td>고유의 향미가 있고, 이취, 이취가 없는 맑은 액상액의 액상</td> <td>송요진</td> </tr> <tr> <td>납(mg/kg)</td> <td>0.0033 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>비소(mg/kg)</td> <td>0.0027 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>수은(mg/kg)</td> <td>0.0059 mg/kg</td> <td>박경희</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.0028 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>타르펜스</td> <td>불검출</td> <td>장대원</td> </tr> <tr> <td>페균수/mL</td> <td>0</td> <td>박혜지</td> </tr> <tr> <td>대장균</td> <td>음성</td> <td>박혜지</td> </tr> <tr> <td>대장균군</td> <td>음성</td> <td>박혜지</td> </tr> </tbody> </table> <p>■ 위 제품은 최원희 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ■ 본 성적서는 참고용 성격서입니다. 시험·검사항목은 시험·검사목적 이외의 용도 및 용량 등에 적용할 수 없습니다. ■ 가장정밀한 결과는 정수기용 액체를 용도로 활용될 수 있습니다. ■ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인증서 소반이 없습니다. ■ 시험의 정확도 관련 시험·검사 및 결과물은 별첨도 작성 가능합니다.</p> <p>2020년 12월 14일 한국기능식품연구원 <small>[사]한국기능식품연구원 품질관리국/한국기능식품연구원 http://www.kbfri.re.kr 전화번호 50-031-6228-0400-1</small></p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	지방	고유의 향미가 있고, 이취, 이취가 없는 맑은 액상액의 액상	송요진	납(mg/kg)	0.0033 mg/kg	정다운	비소(mg/kg)	0.0027 mg/kg	정다운	수은(mg/kg)	0.0059 mg/kg	박경희	카드뮴(mg/kg)	0.0028 mg/kg	정다운	타르펜스	불검출	장대원	페균수/mL	0	박혜지	대장균	음성	박혜지	대장균군	음성	박혜지
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																															
지방	고유의 향미가 있고, 이취, 이취가 없는 맑은 액상액의 액상	송요진																															
납(mg/kg)	0.0033 mg/kg	정다운																															
비소(mg/kg)	0.0027 mg/kg	정다운																															
수은(mg/kg)	0.0059 mg/kg	박경희																															
카드뮴(mg/kg)	0.0028 mg/kg	정다운																															
타르펜스	불검출	장대원																															
페균수/mL	0	박혜지																															
대장균	음성	박혜지																															
대장균군	음성	박혜지																															



(다) 최종 레시피의 제품화

- ① 아로니아 발효 정제물을 이용한 액상스틱 시제품의 물성은 점성도에 따른 선별작업을 진행 할 것이며, 인케이스와 아웃케이스 크기를 선별하기 위해서는 용기의 용량을 설정하여 야함. 또한 수출포장 파렛트 길이를 고려하여 최종 아웃케이스 사이즈를 선정하고자 함





아로니아 발효 음료로 고급화된 디자인과 기능성을 높인 제품인 제품명으로 아이케어 뷰티안티폴A라 명하였으며 이는 이너뷰티 아로니아 발효음료 제품이라는 것을 강조하였음. 포장은 10개 파우치를 담을 수 있는 인케이스를 제작하여 세트 구성보다 소비자가 저렴한 가격으로 구매할 수 있도록 하였음

- ② 아로니아 가지고 있는 천연 색상을 사용하고 먹었을 때 건강에 도움을 줄 수 있는 브랜드 이름을 선별한 후 먹고 싶다는 느낌의 이미지를 활용한 포장디자인을 제작하고자 함
- ③ 최종 아로니아 발효 정제물을 이용한 액상 음료 시제품명은 아이케어 뷰티안티폴A 에 대한 품목제조신고번호 2017048750438 식품의 유형은 혼합음료 및 타사 유사 제품에 대한 유통기한 2년(24개월) 설정하여 최종 레시피 표기에 대한 품목제조신고를 진행함. 그리고 시제품의 표시사항은 제품명 아이케어 뷰티안티폴A 식품유형은 혼합음료, 내용량은 100 mL 포장재질은 용기(내면)-폴리에틸렌(PE), 원재료명 및 함량은 아로니아농축액 1.5%, 아로니아식초 4%, 배농축액 2%, 말토덱스트린 2%, 사탕수수원당 9.5%, 니코틴산 아마이드 0.03, 무수구연산 0.35%, 에리스리톨 0.02%, 구연산나트륨 0.04%, 비타민A 0.0004%, 비타민B1 0.0006%, 비타민B6 0.0006%, 비타민C 0.08%, 히알루론산 0.0001%, 글리신 0.1%, L-프롤린 0.0002%, 아로니아합성착향료 0.22%, 정제수 80.1581%으로 하여 표시사항을 표. 로 제시하였음

표 64. 아로니아 효모발효 식초와 아로니아농축액을 주원료로 한 액상음료 시제품 표시사항

제품명	아이케어뷰티안티폴A		식품유형	혼합음료	
내용량	100mL	포장재질	용기(내면)-폴리에틸렌(PE)		
원재료명 및 함량	아로니아농축액 1.5%, 아로니아식초 4%, 배농축액 2%, 말토덱스트린 2%, 사탕수수원당 9.5%, 니코틴산아미드 0.03, 무수구연산 0.35%, 에리스리톨 0.02%, 구연산나트륨 0.04%, 비타민A 0.0004%, 비타민B1 0.0006%, 비타민B6 0.0006%, 비타민C 0.08%, 히알루론산 0.0001%, 글리신 0.1%, L-프롤린 0.0002%, 아로니아합성착향료 0.22%, 정제수 80.1581%				
제조원	힘찬걸음 / 전라북도 익산시 왕궁면 광암리 1409 식품벤처센터				
유통전문 판매원	(재)순천천연물의약소재개발연구센터 / 전라남도 순천시 중앙로 255 힘찬걸음 / 전라북도 익산시 왕궁면 광암리 1409 식품벤처센터				
유통기한	전면표기일까지		반품 및 교환	판매처 및 구입처	
품목보고번호	2017048750438		고객상담실	061-750-5445	
섭취방법	1일 2~3회, 식사대용으로 음용하십시오.				
보관방법	직사광선 및 고온다습한 곳을 피해 서늘한 곳에 보관하십시오				
<p>섭취시 주의사항 ▶원재료 고유성분에 의해 침전물 또는 부유물이 생길 수 있으나 이물질이 아니므로 안심하고 드셔도 됩니다. ▶제품을 전자레인지 또는 불에 가열하거나 데우지 마십시오. ▶용기가 팽창 또는 변형된 제품은 드시지 마십시오. ▶개봉 단면이 어린이의 손에 닿지 않도록 주의하십시오. 드시고 남은 제품은 냉장 보관하거나 가급적 빨리 드시길 바랍니다.</p> <p>본 제품은 토마토, 복숭아를 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조하고 있습니다. 본 제품은 공정거래위원회 고시 소비자분쟁 해결 기준에 의거 교환 또는 보상 받을 수 있습니다. 부정·불량식품 신고 국번없이 1399</p>					
					
열량	57kcal	탄수화물	14g 4.4%	당류	12g
식이섬유	0.2g 0.8%	단백질	0.2g 0.3%	지방	0g 0%
포화지방	0g, 0%	트랜스지방	0g 0%	콜레스테롤	0g 0%
나트륨	10mg 1.4%	1일 영양성분 기준치에 대한 비율(%)은 2,000kcal 기준이므로 개인의 필요 열량에 따라 다를 수 있습니다.			

		로 깨끗이 녹여낸다. 3)아로니아농축액->배농축액->아로니아식초순으로 투입한다.						
	원료투입③	1) 원료를 계량한 용기에 소량의 정제수로 씻어 배합탱크에 넣는다. 2)남은정제수를 채우고 배합 총량을 확인한다.						
5	교반	최종 원료의 투입에 따라 교반을 시작한다.	- 수온 : 65℃ - 시간 : 30분 - 교반 : 30-60rpm	- 믹싱 메인 탱크	※ 교반 완료 후 24시간 이상 살균 연시	batch시	폐기	기록
6	규격확인	배합된 액의 규격을 확인한다.	-	분석기기	- 항목 : 산도, 당도, pH	1batch시	폐기	기록
7	여과 및 이송	교반이 완료되면 여과를 거치며 살균 공정을 위해 이송한다 - 믹싱탱크와 살균라인 이송 전 단계	- 1 마이크로 필터	이송 펌프 및 라인	이물질 여부 확인	batch시	폐기	기록
8	가열/살균	살균 공정을 통해 살균을 실시한다.	- 100℃, 45분간 고온살균	- 살균기 - 살균 탱크	살균 온도 체크	batch시	폐기	기록
9	검별	용기의 깨짐 및 불량 확인 (육안확인)	육안검사	-depalettzer	-깨짐 및 불량 확인	생산시	폐기	기록
10	용기투입	용기를 세척 및 가운데 주기 위해 투입	-	-	-	생산시	폐기	기록
11	용기세척	용기의 이물질 제거 및 따뜻한 물로 가운데 세척 (물로만 세척한다 다른것을넣지않는다)	- 용기 품온 50~60℃	-rinsor	온도체크	생산시	폐기	기록
12	충진	1) 유리병 충전시 병목에 rack 들어가는 흉부분을 오염이 되지 않은 물로 충전후로 수세한다. 2)충진시,충진액의온도를 받드시 90 ℃ 이상 유지하며 충전한다. 3)충진시액이 넘쳐 흐르지 않게 액면관리를 한다.	- 80℃ 이상	- 충전기	- 충전 수량	batch시	폐기	기록
13	밀봉	준비된 뚜껑으로 밀봉한다.	-	- 밀봉기	진공도 측정	batch시	폐기	기록
14	규격확인	살균된 액의 규격을 확인한다.	-	- 분석기기	- 항목 : 산도, 당도, pH	batch시	폐기	기록
15	냉각	냉각존를 이용한 품온 30℃이하로 단계적 냉각한다.	- 4℃이하 1일간	- 냉각수	- 냉각 온도	batch시	폐기	기록
16	포장	라벨 포장 및 박싱, 테이핑 후 적재한다.		- 라벨기 - 박싱기 - 적재기	라벨 디자인 생산일시 생산 수량 박싱	batch시	폐기	기록
17	규격확인	완제품의 규격을 확인한다.	-	- 분석기기	- 항목 : 산도, 당도, pH, 미생물 확인	batch시	폐기	기록
18	보관출하		-					

규 격

구분	품명	법적 유형	원산지	공급업체	관리항목	위해요소 구분	세부항목	법적규격항목	
								개별규격	공통규격
시제품	아이케어 뷰티안티 플A	혼합음료	한국	-	성상	P	색상	-	-
						P	외관	-	-
						P	맛	-	-
						P	냄새	-	-
						P	조직감	-	-
						P	이물	-	-
					보존료	C	파라옥시안 식향산계6종(식품공전 규격)	불검출	-
타르색소	C	식품공전	불검출	-					
					이화학 분석	산도 (% w/w)	4%이상	4~29%	
						pH	3.36	-	
						당도 (brix)	15.5	-	

규 격

자가규격	자가관리규격 내용	입고주기	보관조건 (온도등)	시험성적서	입고검사	분석
색상	고유의 색과 향미가있음	입고시	서늘하고 통풍이 잘되며 햇빛이 직접 닿지 않는곳	OEM 입고시 반드시제출	입고시	- 공급업체 : 공인분석기관 의뢰 - OEM업체: 시험 성적서 확인필
외관						
맛						
냄새						
조직감						
이물						
파라옥시안식향산 6종 (식품공전규격)	불검출			1회/분기		
식품공전	불검출			납품시		
산도	4%이상					
pH	±0.2					
당도	bx 이상					

(2) 발효액 및 개발 소재 첨가 젤리 제조 방법

(가) 발효액 및 개발 소재 첨가 젤리 제조 공정은 아로니아 2차 초산 발효 원액을 원심분리하여 아로니아식초와 발효에 생성된 부산물을 함유하는 조성물로서 산업용 원심분리기를 통해 15,000 rpm으로 분리하여 첨가 함유량에 따라 2차 배합을 통해 원재료를 첨가함. 부재료는 1차 배합을 통해 첨가하고 필터는 백필터를 통해 1um로 필터한 후 살균

은 100도에서 45분간 고온살균법으로 살균한 다음 2차 원재료 발효 원료 및 부산물을 첨가함. 그리고 용기에 충전 후 1일간 4도에서 냉장하여 초산의 강한 맛을 약하게 만들어 신 맛을 감소시킨다. 마지막으로 포장하여 제출을 출고할 수 있도록 함.

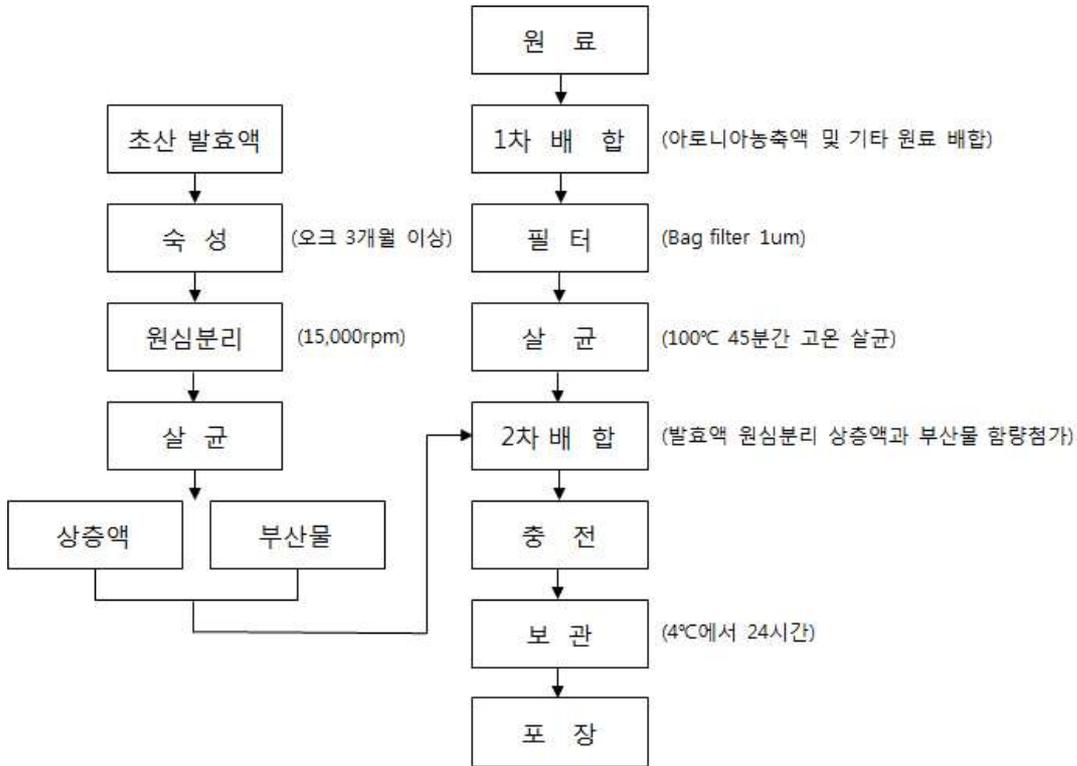


그림 52. 발효액 및 개발 소재 첨가 젤리 제조 공정도

다. 아로니아 발효액을 이용한 발효 음료 제조 공정

(1) 발효액 및 개발 소재 첨가 음료 레시피 개발

(가) 아로니아 초산 발효 식초 1.5~4.0% 범위를 주원료로한 부원료는 아로니아 개발 소재 농축액 2.0~3.0%, 아로니아부산물 0.2% 감미제는 배농축액 2.0~6.0% 기준으로 말토덱스트린 1.0~2.0%, 체내 흡수가 되지 않는 사탕수수원당 9.5~13% 및 에리스리톨 0.02~0.04%를 사용하였으며, 식품영양강화제는 니코틴산아미드 0.03%, 무수구연산 0.35%, 구연산나트륨 0.04%, 비타민A 0.0004%, 비타민B1 0.0006%, 비타민B6 0.0006%, 비타민C 0.08%를 사용하고 이너뷰티 콜라겐 생합성 물질 원료는 글리신 0.1%, L-프롤린 0.0002%, 세포결합 재생물질 원료로 히알루론산 0.0001% 아로니아 향료는 0.22%, 검믹스 1.5% 배합비에 따른 최적 아로니아 발효액 및 개발 소재 첨가 음료 레시피를 개발하였음. 그 결과 주원료인 아로니아 효모발효 식초는 4.0%와 아로니아 농축액 3.0% 및 아로니아 부산물 0.2%가 가장 적합한 것으로 선정되었음

표 65. 아로니아 효모발효 식초와 부산물을 주원료로 한 고상 젤리 레시피 개발

I CARE ANTHOCYA JELLY 제조 레시피												
원료명	1차	2차	3차	4차	5차	6차	7차	8차	9차	10차	11차	12차
아로니아농축액	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0
아로니아부산물	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
아로니아식초	1.5	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	4.0
배농축액	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	4.0	6.0
말토덱스트린	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0
원당(사탕수수)	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	11.5	13
니코틴산아미드	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
무수구연산	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.15	0.15
구연산나트륨	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05
에리스톨	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.04
글리신	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
히알루론산-KD	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
L-프롤린	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
비타민 A	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004
비타민 B1	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006
비타민 B6	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006
비타민 C	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
프락토올리고당	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	6.0
아로니아합성착향료	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
젤라틴	1.7	1.0	1.0	1.3	1.3	1.5	2.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0
글루코만난(곤약)	0.3	1.5	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
잔탄검	1.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
검믹스	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	2.0	1.5	1.5
정제수	78.96	79.26	80.46	80.26	80.16	79.96	79.46	81.16	80.96	80.46	0.0	0.0
아로니아주출물 1brix%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	73.13	64.63
합계(%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

(나) 최종 레시피에 대한 안전성, 영양성분, 기타 분석 검사 결과

- ① 아로니아 발효 정제물을 이용한 액상스틱의 최종 레시피에 대한 안전성 검사로 중금속 검사로는 와 미생물 검사로는 세균수, 대장균, 대장구균 등을 공인시험기관을 통해 분석하고자 함
- ② 아로니아 발효 정제물을 이용한 액상스틱의 최종 레시피에 대한 영양성분을 알아보기 위해 열량, 콜레스테롤, 식이섬유, 지방산, 무기질, 포화지방산, 불포화지방산, 당류, 비타민A, 비타민C 등의 성분을 공인시험기관을 통해 분석하고자 함
- ③ 아로니아 발효 정제물을 이용한 액상스틱 시제품으로 활용하기 위해 착색료 타르색소를 공인시험기관을 통해 분석하고자 함
- ④ 발효액 및 개발 소재 첨가 음료 아이케어안토시아젤리를 시제품으로 활용하기 위해 공인인증기관을 통한 시험 분석을 진행한 결과 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 빨간색의 젤리이며 중금속의 경우 비소 0.0080 mg/kg, 납 0.0072 mg/kg, 수은 0.0082 mg/kg, 카드뮴 0.0039 mg/kg로 매우 미비하게 나타났으며 타르색소는 불검출로 나타남. 미생물의 경우 세균수, 대장균, 대장균군 모두 음성으로 나타남. 영양성분의 경우 탄수화물 27.94%, 조단백질 0.40%, 조지방 0.08%, 나트륨 28.42 mg/100g, 당류 259.55 mg/g, 칼슘 0.17 mg/g, 칼륨 1.23 mg/g, 식이섬유 0.87%로 나타났으며 열량은 112.34 Kcal/100g

(다) 최종 레시피의 제품화

- ① 아로니아 발효 정제물을 이용한 액상스틱 시제품의 물성은 점성도에 따른 선별작업을 진행 할 것이며, 인케이스와 아웃케이스 크기를 선별하기 위해서는 용기의 용량을 설정하여야 함. 또한 수출포장 파렛트 길이를 고려하여 최종 아웃케이스 사이즈를 선정하고자 함
- ② 아로니아 가지고 있는 천연 색상을 사용하고 먹었을 때 건강에 도움을 줄 수 있는 브랜드 이름을 선별한 후 먹고 싶다는 느낌의 이미지를 활용한 포장디자인을 제작하고자 함

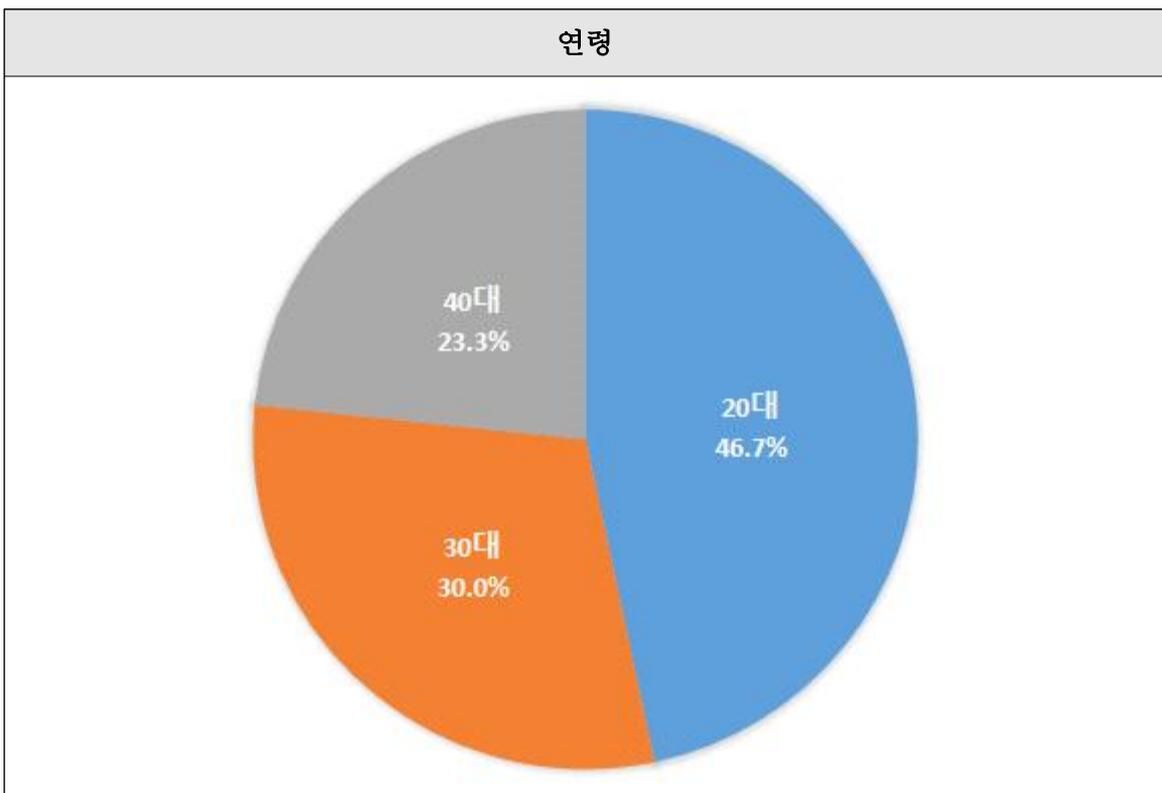


아로니아 발효 음료로 심플한 디자인과 기능성을 높인 제품인 제품명으로 아이케어 안토시아젤라라 명하였으며 특징은 아로니아식초와 아로니아부산물물을 사용하여 아로니아에 함유되어 있는 기능적 소재를 사용한 것뿐만 아니라 이너뷰티 아로니아 발효음료 제품이라는 것을 강조하였음. 포장은 10개 파우치를 담을 수 있는 인케이스를 제작하여 세트 구성보다 소비자가 저렴한 가격으로 구매할 수 있도록 하였음

③ 아로니아 발효액을 이용한 발효 음료 레시피 구성물에 대한 관능평가

이너뷰티 제품은 대부분 여성 소비자층에서 구매하고 있으며 연령은 20-30대에서 가장 선호도가 높은 것으로 조사되어 본 아로니아 발효 음료 레시피 구성물에 대한 관능평가는 20-30대 중점 조사되었음

설문에 응한 응답자는 총 30명으로 남녀 비율은 각각 15명이었다. 연령은 20대 14명으로 46.7%, 30대 9명으로 30.0%, 40대 7명으로 23.3%였음

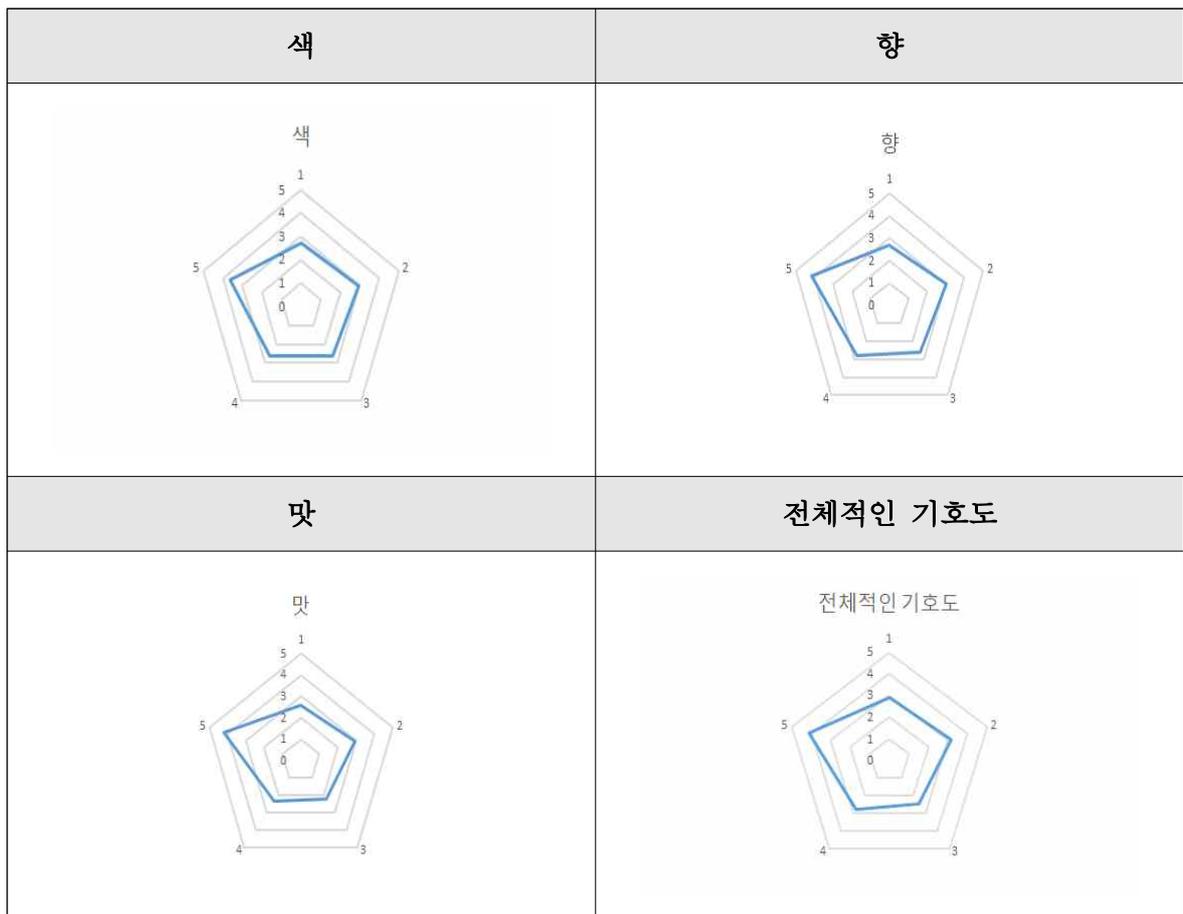


시제품의 관능평가를 실시한 결과 색과 향은 5번 시제품이 가장 높은 점수를 나타냈으며, 나머지는 유의적인 차이를 보이지 않았음. 맛과 전체적인 기호도에서도 5번 시제품이 가장 높은 점수를 나타냈으며 다음으로 2번 시제품이 높은 점수를 나타내었음. 따라서 최종 아로니아 발효 음료 최종 레시피는 5번으로 선정하였으며 최종 시제품 조성물로 선정하였음

표 66. 시제품의 관능평가

	색	향	맛	전체적인 기호도
1	2.70±0.92 ^{b1)}	2.70±0.70 ^b	2.57±0.90 ^{bc}	2.93±0.64 ^b
2	2.93±1.11 ^b	3.03±0.89 ^b	2.93±1.08 ^b	3.17±0.83 ^b
3	2.60±0.67 ^b	2.63±0.67 ^b	2.20±0.89 ^c	2.43±0.82 ^c
4	2.60±0.86 ^b	2.77±0.68 ^b	2.37±1.13 ^c	2.80±0.96 ^{bc}
5	3.67±0.99 ^a	4.17±0.75 ^a	4.20±0.76 ^a	4.13±0.73 ^a

¹⁾ Values with different superscript on same column are significantly different (p<0.05, a>b>c)



④ 최종 아로니아 발효 정제물을 이용한 액상스틱 시제품에 대한 품목제조신고 및 타사

유사 제품에 대한 유통기한 설정하여 최종 레시피 표기에 대한 품목제조신고를 진행하고자 함

표 67. 아로니아 효모발효 식초와 아로니아농축액을 주원료로 한 고상 젤리 시제품 표시사항

제품명	아이케어안토시아젤리		식품유형	혼합음료	
내용량	20g	포장재질	용기(내면)-폴리에틸렌(PE)		
원재료명 및 함량	아로니아농축액 3%, 아로니아추출분말 0.2%, 아로니아식초 4%, 배농축액 6%, 말토덱스트린 1%, 사탕수수원당 13%, 니코틴산아미드 0.03%, 무수구연산 0.15%, 구연산나트륨 0.05%, 에리스리톨 0.04%, 글리신 0.1%, 히알루론산 0.0001%, L-프롤린 0.0002%, 비타민A 0.0004%, 비타민B1 0.0006%, 비타민B6 0.0006%, 비타민C 0.08%, 프락토올리고당 6%, 아로니아합성착향료 0.22%, 검믹스 1.5%, 아로니아추출액(1brix%) 64.6281%				
제조원	농업회사법인(주)생생초 / 경상북도 청도군 화양읍 남성현로 291-15				
유통전문 판매원	(재)순천천연물의약소재개발연구센터 / 전라남도 순천시 중앙로 255 농업회사법인(주)생생초 / 경상북도 청도군 화양읍 남성현로 291-15				
유통기한	전면표기일까지		반품 및 교환	판매처 및 구입처	
품목보고 번호	-		고객상담실	061-750-5445	
섭취방법	1일 2~3회, 식사대용으로 음용하십시오.				
보관방법	직사광선 및 고온다습한 곳을 피해 서늘한 곳에 보관하십시오				
<p>섭취시 주의사항 ▶원재료 고유성분에 의해 침전물 또는 부유물이 생길 수 있으나 이물질이 아니므로 안심하고 드셔도 됩니다. ▶제품을 전자레인지 또는 불에 가열하거나 데우지 마십시오. ▶용기가 팽창 또는 변형된 제품은 드시지 마십시오. ▶개봉 단면이 어린이의 손에 닿지 않도록 주의해주십시오. 드시고 남은 제품은 냉장 보관하거나 가급적 빨리 드시길 바랍니다.</p> <p>본 제품은 토마토, 복숭아를 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조하고 있습니다. 본 제품은 공정거래위원회 고시 소비자분쟁 해결 기준에 의거 교환 또는 보상 받을 수 있습니다. 부정·불량식품 신고 국번없이 1399</p>					
					
열량	22kcal	탄수화물	5.6g 5.0%	당류	5g
식이섬유	0.2g 0.8%	단백질	0g 0%	지방	0g 0%
포화지방	0g, 0%	트랜스지방	0g 0%	콜레스테롤	0g 0%
나트륨	5.7mg 0.8%	1일 영양성분 기준치에 대한 비율(%)은 2,000kcal 기준이므로 개인의 필요 열량에 따라 다를 수 있습니다.			

식품·식품첨가물 품질제조보고서			(원재료명 또는 성분명 및 배합비율)				통도용법	
보고인	원료 원순복 주소 경상북도 청도군 현암면 남영리길 291-15	생산물명 2020년 12월 19일	No.	원재료 또는 성분명	배합비율 (%)	No.	원재료 또는 성분명	배합비율 (%)
발효소	발효(상온) 발효(상온) 주식회사 생연초 20120567001	제조일자 2020년 12월 15일	1	아로니아추출물 (아로니아추출액)	64.6%	16	니코틴산아미드	0.03%
제품정보	제품명 아로니아 영양사과물	제조일자 2020년 12월 15일	2	설탕 (백당)	13%	17	비타민B6총합체 (비타민B6)	0.0008%
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	3	프락토올리고당	6%	18	비타민B6총합체 (비타민B6)	0.0008%
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	4	세송죽액	6%	19	비타민B6총합체 (비타민B6)	0.0004%
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	5	발효사과 (아로니아발효사과)	4%	20	L-프롤린	0.0002%
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	6	아로니아농축액	3%	21	차일부르신 (차일부르신-4)	0.0001%
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	7	훈장제제 (감귤즙)	1.5%	22	황제수	0.0081%
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	8	발효제스프용총합체 (발효제스프용)	1%			
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	9	아로니아향	0.02%			
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	10	아로니아추출물분말	0.2%			
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	11	주유구연산	0.15%			
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	12	콜라겐	0.1%			
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	13	비타민 C	0.08%			
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	14	구연산삼나트륨	0.05%			
	제조일자 2020년 12월 15일	제조일자 2020년 12월 15일	15	세라시라블	0.04%			
<p>제조방법</p> <p>1. 원재료 및 포장재질 : 병뚜껑 기재</p> <p>2. 포장방법 및 포장단위 : 병당 1개</p> <p>3. 원상 : 제품 크기의 5% 이하로 잘라내고, 나머지는 잘라내어 쓴다.</p> <p>4. 용액의 농도</p> <p>5. 고갈량 : 저갈량 시용 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p> <p>6. 중 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p> <p>7. 분 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p> <p>8. 분 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p> <p>9. 분 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p> <p>10. 분 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p> <p>11. 분 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p> <p>12. 분 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p> <p>13. 분 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p> <p>14. 분 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p> <p>15. 분 : 100mg / 100ml (이제갈량 : 100mg)</p>			<p>품질보증서</p> <p>제37호 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45호 제1항에 따른 식품 (식품첨가물) 품질제조 사항을 보고합니다.</p> <p>2020년 12월 28일 보고인 권순복</p> <p>품질보증서 번호 : 20120567001205 처리부서 : 품질관리팀 / 사회보장팀 / 자립지원팀 / 한빛유 / 처리일자 : 2020년 12월 28일</p>				<p>통도용법</p> <p>1일 1회, 1회 1포(20g)를 섭취하십시오. (바탕입니다.)</p> <p>보관방법 및 포장재질 : 직사광선을 피하여 실온보관. 개봉 후에는 냉장보관하고 빨리 음용하십시오. (PE) 포장용기</p> <p>포장방법 및 포장재질 : 밀봉포장, 포장단위 : 100mL, 박스포장 : 100mL*30개입</p>	

⑤ 최종 아로니아 발효 정제물을 이용한 액상스티크 시제품 생산은 제조공정도에 따른 품질 관리기준을 설정하고 사업종료 후 본 제품의 생산은 OEM 생산을 진행 할 계획임

영업비밀1급

제조 가공방법 (공정규격)

No	공정명	작업 내용 및 방법	공정조건 (온도/시간/압력/체류시간)	주요설비명	검사방법	주기	이탈시 조치사항	비고
1	입고	원부재료의 기준 규격에 적합하지 검토하고 이상없을 시 입고한다.	원료 시험성적서에 따른 보관온도 설정 (실온, 냉장, 냉동)	원료 전처리 실	시험성적서	입고시	반송조치	기록
2	보관	- 과일 원과는 즉시 작업시 실온보관, 과즙 농축액은 반드시 냉동 보관한다. - 기본적으로 깨끗하고 오염되지 않는 곳에 보관한다.	- 액상 : 농축액은 냉동 조건으로 보관한다. (-18℃ 이하)	- 실온보관실 - 냉장고 - 냉동고	과일 원료 성상 확인, 성적서 검수	생산시	폐기	기록
3	해동	- 냉동원료의 해동주의 <냉장해동방안> 1. 해동시점 - 생산 전에 해동 실시	- 해동 (상온)	- 실온보관실 - 냉장고	성상 확인	생산시	폐기	기록
4	배합 원료투입①	1) 제조 매뉴얼에 의거하여 원료별로 정확히 계량한다. 2) 계량이 끝난 원료는 뚜껑을 덮어 이물유입이 없도록 하여 믹싱탱크로 이송한다.	- 물온도 : 60~65℃	- 계량기 - 보조믹싱배합탱크	물온도 체크 원료무게측정	batch시	폐기	기록
	배합 원료투입②	1) 배합탱크에 아로니아식초와 농축액 주원료를 투입한다. 2) 농축액을 투입시 마지막에 bag에 남아있는 것을 정제수 또는 식초	- 계급 (배합량, 정량확인등)	- 계량비 - 믹싱 메인 탱크	물온도 체크	batch시	폐기	기록

		로 깨끗이 녹여낸다. 3)아로니아농축액->배농축액->아로니아식초순으로 투입한다.						
	원료투입③	1) 원료를 계량한 용기에 소량의 정제수로 씻어 배합탱크에 넣는다. 2)남은정제수를 채우고 배합 총량을 확인한다.						
5	교반	최종 원료의 투입에 따라 교반을 시작한다.	- 수온 : 65℃ - 시간 : 30분 - 교반 : 30-60rpm	- 믹싱 메인 탱크	※ 교반 완료 후 24시간 이상 살균 연시	batch시	폐기	기록
6	규격확인	배합된 액의 규격을 확인한다.	-	분석기기	- 항목 : 산도, 당도, pH	1batch시	폐기	기록
7	여과 및 이송	교반이 완료되면 여과를 거치며 살균 공정을 위해 이송한다 - 믹싱탱크와 살균라인 이송 전 단계	- 1 마이크로 필터	이송 펌프 및 라인	이물질 여부 확인	batch시	폐기	기록
8	가열/살균	살균 공정을 통해 살균을 실시한다.	- 100℃, 45분간 고온살균	- 살균기 - 살균 탱크	살균 온도 체크	batch시	폐기	기록
9	검별	용기의 깨짐 및 불량 확인 (육안확인)	육안검사	-depalettzer	-깨짐 및 불량 확인	생산시	폐기	기록
10	용기투입	용기를 세척 및 가운데 주기 위해 투입	-	-	-	생산시	폐기	기록
11	용기세척	용기의 이물질 제거 및 따뜻한 물로 가운데 세척 (물로만 세척한다 다른것을넣지않는다)	-용기 품온 50℃-60,	-rinsler	온도체크	생산시	폐기	기록
12	충진	1) 유리병 충전시 병목에 rack 들어가는 흥부분을 오염이 되지 않은 물로 충전후로 수세한다. 2)충진시,충진액의온도를 받드시 90 ℃ 이상 유지하며 충전한다. 3)충진시액이 넘쳐 흐르지 않게 액면관리를 한다.	- 80℃ 이상	- 충전기	- 충전 수량	batch시	폐기	기록
13	밀봉	준비된 뚜껑으로 밀봉한다.	-	- 밀봉기	진공도 측정	batch시	폐기	기록
14	규격확인	살균된 액의 규격을 확인한다.	-	- 분석기기	- 항목 : 산도, 당도, pH	batch시	폐기	기록
15	냉각	냉각존를 이용한 품온 30℃이하로 단계적 냉각한다.	- 4℃이하 1일간	- 냉각수	- 냉각 온도	batch시	폐기	기록
16	포장	라벨 포장 및 박싱, 테이핑 후 적재한다.		- 라벨기 - 박싱기 - 적재기	라벨 디자인 생산일시 생산 수량 박싱	batch시	폐기	기록
17	규격확인	완제품의 규격을 확인한다.	-	- 분석기기	- 항목 : 산도, 당도, pH, 미생물 확인	batch시	폐기	기록
18	보관출하		-					

규 격

구분	품명	법적 유형	원산지	공급업체	관리항목	위해요소 구분	세부항목	법적규격항목	
								개별규격	공통규격
시제품	아이케어 안토시아 젤리	혼합음료	한국	-	성상	P	색상	-	-
						P	외관	-	-
						P	맛	-	-
						P	냄새	-	-
						P	조직감	-	-
						P	이물	-	-
					보존료	C	파라옥시안 식향산계6종(식품공전 규격)	불검출	-
					타르색소	C	식품공전	불검출	-
					이화학 분석	산도 (% w/w)	4%이상	4~29%	
						pH	3.83	-	
						당도 (brix)	27.8	-	

규 격

자가규격	자가관리규격 내용	입고주기	보관조건 (온도등)	시험성적서	입고검사	분석
색상	고유의 색과 향미가있음	입고시	서늘하고 통풍이 잘되며 햇빛이 직접 닿지 않는 곳	OEM 입고시 반드시 제출	입고시	- 공급업체 : 공인분석기관 의뢰 - OEM업체 : 시험 성적서 확인필
외관						
맛						
냄새						
조직감						
이물	없음			1회/분기	납품시	
파라옥시안식향산 6종 (식품공전규격)	불검출					
식품공전	불검출					
산도	4%이상					
pH	±0.2					
당도	bx 이상					

2-4. 사업화성과 및 매출실적

가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	10억원
		관련제품	개발후 현재까지	0.3억원
			향후 3년간 매출	10억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 70 % 국외 : 30 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 60 % 국외 : 40 %
			향후 3년간 매출	국내 : 50 % 국외 : 50 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		100 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		50 위

나. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2021.01.06.~2022.01.05			
	소요예산(백만원)	500			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.3	10.0	27.8	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.3	7	18.8
국외		0	3	9	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	① 효모 발효를 통한 저분자 콜라겐 제조 기술로 식품 소재 개발 ② 초산 발효 부산물을 이용한 미백 및 주름개선 화장품 소재 개발 ③ 베트남 차잎에서 분리한 균주를 이용한 스코비 컴퓨터차 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0.3	3	8.4	
	수 출	0	1.5	4.5	

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- ◆ 본 연구과제의 최종 목표는 아로니아를 이용한 천연 발효를 통한 생성되는 정제물에 대한 지표물질 분석을 통한 소재의 표준화 분석법을 개발하고 항염증에 도움을 주는 소재를 활용한 제품을 개발하고자 함
- 가. 아로니아의 발효 공정 및 발효 정제물 제조공정 확립
- 나. 아로니아의 지표물질 표준화 분석법 개발
- 다. 아로니아 발효원액과 발효 정제물에 대한 항염증활성 검증
- 라. 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 식품 조성물 및 제형 개발
- 마. 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 식품 제조 공정 및 품질관리 기준 설정
- 바. 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 시제품 생산

3-2. 목표 달성여부

가. 지식재산권 특허출원 2건

관인생략	관인생략
출원번호통지서	출원번호통지서
<p>출원일자 2021.01.07</p> <p>특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)</p> <p>출원번호 10-2021-0002222 (접수번호 1-1-2021-0022665-64) (DAS합근코드1156)</p> <p>출원인명칭 (재) 순천천연물의약소재개발연구센터(1-2013-065252-3)</p> <p>대리인성명 정성중(9-2006-000773-3)</p> <p>발명자성명 박경욱 강경운</p> <p>발명의명칭 아로니아 식초를 포함하는 항염증용 조성물</p>	<p>출원일자 2021.01.07</p> <p>특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)</p> <p>출원번호 10-2021-0002223 (접수번호 1-1-2021-0022666-10) (DAS합근코드0038)</p> <p>출원인명칭 (재) 순천천연물의약소재개발연구센터(1-2013-065252-3)</p> <p>대리인성명 정성중(9-2006-000773-3)</p> <p>발명자성명 박경욱 강경운</p> <p>발명의명칭 아로니아 식초 음료 조성물 및 이의 제조 방법</p>
특허청장	특허청장
<< 안내 >>	<< 안내 >>
<p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.</p> <p>2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.</p> <p>3. 납부자번호 : 013(기관코드) + 접수번호</p> <p>3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 (특허고객번호 정보변경(경청), 정정신고서)를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.</p> <p>4. 특허(patent.go.kr) 접속 > 민원사실다우로드 > 특허비행규칙 별지 제5호 서식</p> <p>4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.</p> <p>5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 의뢰서에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.</p> <p>※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr 특허마당-PC/마드리드</p> <p>※ 우선권 인정기간 : 특허실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내</p> <p>※ 미국특허상정형의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장을 할 시, 선출원이 미국계상정이면 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상정형(전자자료관리기사(PD)S/39)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.</p> <p>6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.</p> <p>※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000</p> <p>7. 출원일이 직무수행과정에서 개발된 발명을 사용처(기업)가 명확하게 공개하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라, 심사단계에서 특허가결결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다. 8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 유동별 안내서를 참조하시기 바랍니다.</p>	<p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.</p> <p>2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.</p> <p>3. 납부자번호 : 013(기관코드) + 접수번호</p> <p>3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 (특허고객번호 정보변경(경청), 정정신고서)를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.</p> <p>4. 특허(patent.go.kr) 접속 > 민원사실다우로드 > 특허비행규칙 별지 제5호 서식</p> <p>4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.</p> <p>5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 의뢰서에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.</p> <p>※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr 특허마당-PC/마드리드</p> <p>※ 우선권 인정기간 : 특허실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내</p> <p>※ 미국특허상정형의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장을 할 시, 선출원이 미국계상정이면 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상정형(전자자료관리기사(PD)S/39)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.</p> <p>6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.</p> <p>※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000</p> <p>7. 출원일이 직무수행과정에서 개발된 발명을 사용처(기업)가 명확하게 공개하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라, 심사단계에서 특허가결결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다. 8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 유동별 안내서를 참조하시기 바랍니다.</p>

아로니아 식초를 포함하는 항염증용 조성물

아로니아 식초 음료 조성물 및 이의 제조방법

나. 기술실시(이전) 통상실시권 4건, 전용실시권 1건 총 5건 기술이전 실시 및 기술료 1천만원

기술이전(특허출원) 계약서

■ 계약명 : 아로니아 식초 음료 조성물 및 그 제조 방법

2021년 01월 06일

(재)순천천연물의약소재개발연구센터 · ㈜마린테크노

기술실시(이전) 전용실시권-마린테크노 :
아로니아 식초 음료 조성물 및 이의 제조방법

기술이전(특허출원) 계약서

■ 계약명 : 아로니아 식초를 함유하는 항염증용 조성물

2021년 01월 06일

(재)순천천연물의약소재개발연구센터 · ㈜마린테크노

기술이전(특허출원) 계약서

■ 계약명 : 아로니아 식초를 함유하는 항염증용 조성물

2021년 01월 06일

(재)순천천연물의약소재개발연구센터 · ㈜호성영농조합법인

기술실시(이전) 통상실시권-마린테크노 :
아로니아 식초를 포함하는 항염증용 조성물

기술실시(이전) 통상실시권-호성영농조합법인 :
아로니아 식초를 포함하는 항염증용 조성물

기술이전(특허출원) 계약서

■ 계약명 : 아로니아 식초를 함유하는 항염증용 조성물

2021년 01월 06일

(재)순천천연물약소재개발연구센터 · ㈜생생초

기술이전(특허출원) 계약서

■ 계약명 : 아로니아 식초를 함유하는 항염증용 조성물

2021년 01월 06일

(재)순천천연물약소재개발연구센터 · ㈜힘찬걸음

기술실시(이전) 통상실시권-생생초
아로니아 식초를 포함하는 항염증용 조성물

기술실시(이전) 통상실시권-힘찬걸음
아로니아 식초를 포함하는 항염증용 조성물

다. 사업화 제품화 총 7건(아로니아와인, 아로니아식초, 아로니아액상음료, 아로니아고상젤리, 아로니아 농축액, 아이케어 아로니아, 아이케어 홍삼아로니아)

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 예로서할 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터	참여기관	1. ㈜호성농업회사법인 2. ㈜원찬걸음 3. 농업회사법인(주)생생초	
연구책임자	박경욱	연구기간	19년 12월 ~ 20년 12월(총 1년)	
총 정부출연금	150,000,000원			
해당 기술의 제품출시 유형				
신제품(제품출시 예정)	(O)	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
아로니아 식초		식품류 (발효식초)	예정	100
<p>*첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2020년 01월 06일

연구책임자 : 박경욱 (서명 또는 인)

아로니아 식초

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 예로서할 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터	참여기관	1. ㈜호성농업회사법인 2. ㈜원찬걸음 3. 농업회사법인(주)생생초	
연구책임자	박경욱	연구기간	19년 12월 ~ 20년 12월(총 1년)	
총 정부출연금	150,000,000원			
해당 기술의 제품출시 유형				
신제품(제품출시 예정)	()	기존 제품 공정개선	(O)	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
아로니아 농축액		식품류 (농축액, 채즙(또는 과, 채분))	예정	100
<p>*첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2020년 01월 06일

연구책임자 : 박경욱 (서명 또는 인)

아로니아 농축액

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 예로서할 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터	참여기관	1. ㈜호성농업회사법인 2. ㈜원찬걸음 3. 농업회사법인(주)생생초	
연구책임자	박경욱	연구기간	19년 12월 ~ 20년 12월(총 1년)	
총 정부출연금	150,000,000원			
해당 기술의 제품출시 유형				
신제품(제품출시 예정)	(O)	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
아로니아 와인		주류 (과실 발효주)	예정 (허기 문제로 품목제조 신고 내용 없음)	100
<p>*첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2020년 01월 06일

연구책임자 : 박경욱 (서명 또는 인)

아로니아 와인

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 예로서할 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터	참여기관	1. ㈜호성농업회사법인 2. ㈜원찬걸음 3. 농업회사법인(주)생생초	
연구책임자	박경욱	연구기간	19년 12월 ~ 20년 12월(총 1년)	
총 정부출연금	150,000,000원			
해당 기술의 제품출시 유형				
신제품(제품출시 예정)	(O)	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
아이케어 안토시아젤리		식품류 (과, 채 가공품)	예정	100
<p>*첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2020년 01월 06일

연구책임자 : 박경욱 (서명 또는 인)

아이케어 안토시아젤리

<첨부>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 예로서할 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터	참여기관	1. ㈜효성농업회사법인 2. ㈜일천걸음 3. 농업회사법인(주)생생초	
연구책임자	박경욱	연구기간	19년 12월 ~ 20년 12월(총 1년)	
총 정부출연금	150,000,000원			
해당 기술의 제품출시 유형				
신제품(제품출시 예정)	(O)	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
아이케어 안티폴 A		식품류 (혼합음료)	예정	100
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2020년 01월 06일

연구책임자 : 박경욱 (서명 또는 인)

아이케어 안티폴 A

<첨부>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 예로서할 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터	참여기관	1. ㈜효성농업회사법인 2. ㈜일천걸음 3. 농업회사법인(주)생생초	
연구책임자	박경욱	연구기간	19년 12월 ~ 20년 12월(총 1년)	
총 정부출연금	150,000,000원			
해당 기술의 제품출시 유형				
신제품(제품출시 예정)	()	기존 제품 공정개선	(O)	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
아이케어 아로니아		식품류 (음료믹스)	예정	20
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2020년 01월 06일

연구책임자 : 박경욱 (서명 또는 인)

아이케어 아로니아

<첨부>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 예로서할 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터	참여기관	1. ㈜효성농업회사법인 2. ㈜일천걸음 3. 농업회사법인(주)생생초	
연구책임자	박경욱	연구기간	19년 12월 ~ 20년 12월(총 1년)	
총 정부출연금	150,000,000원			
해당 기술의 제품출시 유형				
신제품(제품출시 예정)	()	기존 제품 공정개선	(O)	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
아이케어 홍삼아로니아		식품류 (인삼-홍삼음료)	예정	20
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2020년 01월 06일

연구책임자 : 박경욱 (서명 또는 인)

아이케어 홍삼아로니아

라. 사업화 매출액 약 3.8천만원

<첨부4>

농림축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 예로서항 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터	참여기관	1. ㈜호성농업회사법인 2. ㈜일진걸음 3. 농업회사법인(주)생생초	
연구책임자	박 경 옥	연구기간	19년 12월 ~ 20년 12월(총 1년)	
기업 정보	기업 매출 총액 : 10,171,000원			
관련 실적	특허(O), 표준(), 소프트웨어(), 디자인(), 상표(), 기타(상세)			
	명칭(번호) : 아로니아 식초 음료 조성물 및 이의 제조 방법 (10-2021-0002223)			
	기술실시 명칭 : 아로니아 농축액 제조 및 이를 활용한 제품 개발			
해당제품의 매출 실적				
제품명	제품사진	매출액(원)	해당 과제의 매출액 기여율(%)	
아로니아 농축액		국내	10,171,000	100
		국외	0	
* 첨부 : 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출전표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.				

2021년 01월 06일
연구책임자 : 박 경 옥 (서명 또는 인)

아로니아 농축액 매출 확인서

<첨부4>

농림축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 예로서항 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터	참여기관	1. ㈜호성농업회사법인 2. ㈜일진걸음 3. 농업회사법인(주)생생초	
연구책임자	박 경 옥	연구기간	19년 12월 ~ 20년 12월(총 1년)	
기업 정보	기업 매출 총액 : 12,885,100원			
관련 실적	특허(O), 표준(), 소프트웨어(), 디자인(), 상표(), 기타(상세)			
	명칭(번호) : 아로니아 식초를 함유하는 항염증용 조성물 (10-2021-0002222)			
	기술실시 명칭 : 아로니아 식초를 첨가한 음료 개발			
해당제품의 매출 실적				
제품명	제품사진	매출액(원)	해당 과제의 매출액 기여율(%)	
아이케어 아로니아		국내	12,885,100	20
		국외	0	
* 첨부 : 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출전표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.				

2021년 01월 06일
연구책임자 : 박 경 옥 (서명 또는 인)

아이케어 아로니아 매출 확인서

<첨부4>

농림축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 예로서항 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터	참여기관	1. ㈜호성농업회사법인 2. ㈜일진걸음 3. 농업회사법인(주)생생초	
연구책임자	박 경 옥	연구기간	19년 12월 ~ 20년 12월(총 1년)	
기업 정보	기업 매출 총액 : 15,698,600원			
관련 실적	특허(O), 표준(), 소프트웨어(), 디자인(), 상표(), 기타(상세)			
	명칭(번호) : 아로니아 식초를 함유하는 항염증용 조성물 (10-2021-0002222)			
	기술실시 명칭 : 아로니아 식초를 첨가한 음료 개발			
해당제품의 매출 실적				
제품명	제품사진	매출액(원)	해당 과제의 매출액 기여율(%)	
아이케어 홍삼아로니아		국내	15,698,600	20
		국외	0	
* 첨부 : 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출전표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.				

2021년 01월 06일
연구책임자 : 박 경 옥 (서명 또는 인)

아이케어 홍삼아로니아 매출 확인서

마. 사업화 고용창출 총 3명

1 / 1

발급번호 : G202012290653522

건강보험자격득실확인서

확인청구자	성명	주민등록번호

자격득실확인내역

No	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	재단법인순천원천의료사회복지개발연구원 이하이백	2019.12.18	

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인 합니다.
2020.12.29

국민건강보험공단 이사장

※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr)에서 직접 발급이 가능합니다.
(공인인증서 필요)
※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)

1 / 1

발급번호 : G202012290653520

건강보험자격득실확인서

확인청구자	성명	주민등록번호

자격득실확인내역

No	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	재단법인순천원천의료사회복지개발연구원 이하이백	2020.02.03	

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인 합니다.
2020.12.29

국민건강보험공단 이사장

※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr)에서 직접 발급이 가능합니다.
(공인인증서 필요)
※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)

1 / 1

발급번호 : G202012290653521

건강보험자격득실확인서

확인청구자	성명	주민등록번호

자격득실확인내역

No	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	재단법인순천원천의료사회복지개발연구원 이하이백	2020.06.08	

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인 합니다.
2020.12.29

국민건강보험공단 이사장

※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr)에서 직접 발급이 가능합니다.
(공인인증서 필요)
※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)

바. 정책활용 홍보 전시 총 2건

2020 국내 활동내역 (박람회, 광고물 게재)	
행사명	2020 CI KOREA(제 6회 국제화장품원료·기술전)
날짜	2020.07.27.~2020.07.30.
장소	경기 고양시 KINTEX
행사 개요	화장품 원료(아로니아 발효액, 곤충 천연물), 소재 OEM/ODM, 화장품 용기, 패키지 관련 최신제품을 소개하는 B2B 전문 전시회로 해외바이어 초청을 통한 온/오프라인 1:1 수출상담회 등 관련 산업 종사자 간의 글로벌 교류의 장 마련을 통해 비즈니스 활성화를 추진하고자 개최됨.
관련사진	

2020 국내 활동내역 (학회, 드라마 PPL 광고)	
행사명	2020 한국식품영양과학회 국제정기학술대회 전시참여
날짜	2020.10.21.~2020.10.23.
장소	제주도 국제컨벤션센터
행사 개요	한국식품영양과학회는 식품과학과 영양학을 융합하는 대표적인 학회이다. 지난 1971년 창립돼 현재 약 2,000명의 회원이 활동하고 있으며 국민건강증진, 식생활 개선, 식품산업 발전 등 식품영양학 분야의 학술발전에 매진하고 있다. 제주도 국제컨벤션센터에서 진행되어 센터 연구진들이 협업하여 만든 포스터 게재 및 부스 운영을 진행하였고 고부가가치 과제 관련 포스터 발표를 함.
관련사진	

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허출원 1건	10	200	특허출원 2건
기술실시(이전) 1건	10	500	기술실시(이전) 통상실시권 4건, 기술실시(이전) 전용실시권 1건
기술실시(이전) 기술료 2천만원	10	50	1천만원
사업화 제품화 2건	30	350	제품화 7건(아로니아와인, 식초, 액상음료, 고상제품 등)
사업화 매출액 3천만원	20	126	사업화 매출액 약 3.8천만원
사업화 고용창출 1명	10	300	사업화 고용창출 3명
정책활용 홍보 1회	10	200	정책활용 홍보 2회
합계	100점		

◆ 본 연구과제를 통한 이점 및 개선 내용 요약

	수입산 아로니아	국내산 아로니아	비고
제조방법	아로니아 농축액 70Brix이상으로 보존제와 당을 사용하여 완전 살균 되어서 수입됨 아로니아 분말은 아로니아착즙액을 부용제와 함께 스프레이 분사하여 분말화하여 살균 되어서 수입됨	아로니아 농축액 60Brix이상으로 보존제와 당을 사용하지 않고 완전 살균됨 아로니아 분말은 아로니아를 파쇄하여 추출 후 동결건조하여 분말화하여 진공포장상태에서 살균됨	
단점	아로니아의 농축액과 분말은 공온 살균을 통해 수입되며 보존제와 부용제를 사용하는 단점을 가지고 있음	아로니아 열매 자체 당도가 낮아 농축액 농도가 최대 60Brix 이상 높이기 어려움	
장점	가격 경쟁력이 낮아 가공원료로 많이 사용되며 감미제가 첨가되어 소비자의 기호도도 높음	국내산 아로니아의 가격 하락으로 시장 경쟁력이 있으며 가공원료로는 수입산은 농축액과 분말로 한정되어 있으나 국내 발효원료로 판매시장을 확대할 수 있음	
차별성	수입산 아로니아는 고온 완전 살균에 의한 수입으로 유효성 물질의 손실이 높고 보존제에 의한 발효 소재로 활용할 수 없음	국내산 아로니아는 단맛은 약하나 과육의 유효성분이 풍부하여 가공공정에서 유효성분의 손실이 낮고 아로니아 100%로 가공 처리가 가능하여 발효 소재로 활용이 가능함	
시장성	독일에서도 현재 동남아시아 아로니아 판로가 어려워지면서 중국 시장을 겨냥한 아로니아 와인 판매를 준비 중에 있으며 새로운 제형의 제품 개발 중에 있음	국내산 아로니아 국내 시장 경쟁력 약화로 아로니아 판로가 어려운 상황이며 중국 시장을 겨냥한 아로니아 음료와 와인을 수출 준비 중에 있음	

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

가. 목표 미달성 원인

- (1) 코로나 19로 인한 기업 경기 침체로 기술실시(이전)의 기술료에 대한 현금지급 애로사항이 있었음. 하지만 1차적으로 계획의 50% 수준의 1,000만원을 기술료, 경상기술료 매출의 순이익 3%로 계약을 진행하였으며, 그 외 4개 기업을 통한 기술실시(이전)의 통상실시권으로 경상기술료 매출의 2%로 계약을 체결하였음

나. 차후대책 및 필요성

(1) 차후 연구개발 부분

(가) 본 사업을 통해 개발된 소재의 다양한 활성 검증 및 in vivo를 통한 활용방안의 다변화를 모색할 필요할 것으로 판단됨

: 아로니아 농축액 : 피부개선(노화) 및 다양한 기능성 효능 검증

: 아로니아 와인 : 혈행개선 및 고지혈증 관련 노인성 질환에 관한 연구

: 아로니아 식초 : 비만 및 항당뇨 관련 성인병 질환에 관한 연구

(2) 본 사업을 통해 개발된 소재 중 국내산 아로니아 재배농가의 판로 시장개척에 가장 적합한 소재는 아로니아 와인으로 이를 활용한 국내·외 유통 및 마케팅에 도움이 될 수 있도록 기업지원을 할 수 있을 것으로 판단됨 (주관기관 보유 국내·외 유통망 활용)

(3) 본 사업을 통해 개발된 소재 활용을 위한 생산시설 확보 및 구축에 관한 논의 및 계획이 필요할 것으로 사료됨

(가) 아로니아 농축액 대량 생산 설비 구축

(가) 아로니아 와인 및 식초 생산 설비 구축

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 개발된 기술이전 방식

가. 1안 내용

(1) 참여기업 호성영농법인을 통한 통상실시권에 따른 기술이전 진행

발명명칭 : 아로니아 식초를 포함하는 항염증용 조성물

기술이전 형태 : 기업으로 통상실시권 기술이전

기술이전료 : 0원, 경상기술료 : 매출의 2%

기술이전 계약 : 본사업의 종료 후 (특허출원)

기술이전 기간 : 특허등록 이후 3년간

기술이전에 따른 사업화 : 소재의 산업화 진행

아로니아농축액(60Brix 이상) 상품화

아로니아와인(알코올함량 12%) 상품화

아로니아식초(산도 4%이상) 상품화

(2) 참여기업 (주)힘찬걸음을 통한 통상실시권에 따른 기술이전 진행

발명명칭 : 아로니아 식초를 포함하는 항염증용 조성물

기술이전 형태 : 기업으로 통상실시권 기술이전

기술이전료 : 0원, 경상기술료 : 매출의 2%

기술이전 계약 : 본사업의 종료 후 (특허출원)

기술이전 기간 : 특허등록 이후 3년간

기술이전에 따른 사업화 : 소재의 산업화 진행

아로니아농축액(60Brix 이상) 상품화
아로니아와인(알코올함량 12%) 상품화
아로니아식초(산도 4%이상) 상품화
아로니아식초와 부산물을 이용한 액상음료 제품 상품화

(3) 참여기업 농업회사법인(주)생생초를 통한 통상실시권에 따른 기술이전 진행

발명명칭 : 아로니아 식초를 포함하는 항염증용 조성물

기술이전 형태 : 기업으로 통상실시권 기술이전

기술이전료 : 0원, 경상기술료 : 매출의 2%

기술이전 계약 : 본사업의 종료 후 (특허출원)

기술이전 기간 : 특허등록 이후 3년간

기술이전에 따른 사업화 : 소재의 산업화 진행

아로니아농축액(60Brix 이상) 상품화

아로니아와인(알코올함량 12%) 상품화

아로니아식초(산도 4%이상) 상품화

아로니아식초와 부산물을 이용한 고상음료 제품 상품화

(4) 참여기업 (주)마린테크노를 통한 통상실시권에 따른 기술이전 진행

발명명칭 : 아로니아 식초를 포함하는 항염증용 조성물

기술이전 형태 : 기업으로 통상실시권 기술이전

기술이전료 : 0원, 경상기술료 : 매출의 2%

기술이전 계약 : 본사업의 종료 후 (특허출원)

기술이전 기간 : 특허등록 이후 3년간

기술이전에 따른 사업화 : 소재의 산업화 진행

아로니아농축액(60Brix 이상) 상품화

아로니아와인(알코올함량 12%) 상품화

아로니아식초(산도 4%이상) 상품화

아로니아식초와 부산물을 이용한 고상음료 제품 상품화

(5) 참여기업 (주)마린테크노를 통한 전용실시권에 따른 기술이전 진행

발명명칭 : 아로니아 식초 음료 조성물 및 이의 제조 방법

기술이전 형태 : 기업으로 전용실시권 기술이전

기술이전료 : 1천만원, 경상기술료 : 매출의 이익 3%

기술이전 계약 : 본사업의 종료 후 (특허출원)

기술이전 기간 : 특허등록 이후 3년간

기술이전에 따른 사업화 : 소재의 산업화 진행

아로니아농축액(60Brix 이상) 상품화

아로니아와인(알코올함량 12%) 상품화

아로니아식초(산도 4%이상) 상품화

아로니아식초와 부산물을 이용한 고상음료 제품 상품화

나. 2안 내용

(1) 주관기관 (재)순천천연물의약소재개발연구센터은 기업체를 통한 유통판매 시장 확대

기술이전 기업체를 통한 전문 유통 판매 시장 확대

(가) 국내 유통 판매 전략

① 오픈마켓 시장 유통 : 대형편의점 (GS, CU, 세븐일레븐 중급 마트 등) 입점 진행

② B2B 시장 유통 : 기업체 특관 판촉물 및 홍보물 제품 입점 진행

(국내 은행 및 대형기업 전용 상품 기획)

③ 온라인마켓 시장 유통 : 인스타 홍보를 통한 네이버스토어, 11번가, 쿠팡, G마켓, 옥션 등 다양한 온라인 사이트를 개설하고 홈페이지 제작을 통한 제품 홍보 판매 진행

④ 홈쇼핑 시장 유통 : 다양한 홈쇼핑 채널(NS, SSG, 홈앤, 11번가, 아이)를 통해 제품 홍보 및 유통 채널 개설 진행

(나) 국외 유통 판매 전략

① 주관기관 (재)순천천연물의약소재개발연구센터는 기업지원 목적으로 해외 바이어(중국 - JHE GLOBAL, 신미상바이오테크, 상해귀싸이투자관리유한공사, 청도서신과학기술유한공사 유럽 불가리아 - 초이스, 동남아시아 베트남 - NTEA GROUP, MB GROUP, 미국 - 레이니어 엔터프라이즈, 홍콩 - 스킨비타 등)를 통한 오픈 판매 시장 입점 진행

② 해외 온라인마켓 시장 유통 : 중국의 타오바오, 미국의 아마존 사이트에 이미 주관기관은 입점 진행하였으며, 이를 기술이전 기업을 통해 판매 활용에 도움을 줄 수 있도록 진행

붙임. 참고문헌

1. Agnieszka Szopa, Kokotkiewicz A, Kubica P, Banaszczak P, Wojtanowska-Krośniak A, Krośniak M, Marzec-Wróblewska U, Badura A, Zagrodzki P, Bucinski A, Luczkiewicz M, Ekiert H. Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of Aronia sp.: A. melanocarpa, A. arbutifolia, and A. ×prunifolia and their antioxidant activities. Eur. Food Res. Technol. 243: 1645-1657 (2017)
2. Bang SI, Gwon GH, Cho EJ, Lee AY, Seo WT. Characteristics of fermented vinegar using

- mulberry and its antioxidant activity. *Korean J. Food Preserv.* 27(5): 651-662 (2020)
3. Choi JH, Lim BR, Kang JE, Kim CW, Kim YS, Jeong ST. Changes in microbial community and physicochemical characterization of Makgeolli during fermentation by yeast as a fermentation starter. *Korean J. Food Sci. Technol.* 52(5): 529-537 (2020)
 4. EOM HJ, Kwon NR, Yoon HS, Cheon SW, Kim SY, Kim YH. Quality characteristics of melon jams mixed with various fruits. *Korean J. Food Nutr.* 33(2): 159-166 (2020)
 5. Han HA, Choi SR, Song YE, Lee SY, Shin SH, Yu YJ, Kim MK. Tannin-Reducing effect and changes of physicochemical properties in Aronia homogenate after treatment with liquid cultured mushroom mycelia. *Korean J. Food Nutr.* 33(3): 339-346 (2020)
 6. Hwang ES, Nhuan Do Thi. Quality characteristics and antioxidant activity of vinegar by the addition of Aronia juice (*Aronia melanocarpa*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 49(2): 167-176 (2020)
 7. Jeong YJ, Kim OM, Seo JH, Lee MH, Jung SH, Kim TH. Characteristics of alcohol fermentation yeast isolated from potatoes. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 7: 228-232 (2000)
 8. KFDA. Korea food standard code. Korea Food and Drug Administration. Cheongwon. Korea. pp 5-21-1 (2012)
 9. Kim JK, Lee MJ, Lee YJ, Kim HJ, Jeong MH, and Kim HJ. Development of HPLC-UV method for detection and quantification of seven organic acids in animal feed. *Anal. Sci. Technol.* 29: 202-208 (2016)
 10. Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park SH, Jang MR, Im MH, Ahn DH. Anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Sargassum miyabei* Yendo via inhibition of NF- κ B and MAPK activation. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 44(4): 442-451 (2016)
 11. Kim MJ, Kim KBWR, Park SH, Park SY, Choi HD. Anti-inflammatory effect of ethanolic extract from *polyopes affinis* through suppression of NF- κ B and MAPK activation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 46(5): 537-544 (2017)
 12. Kulling SE, and Rawel HM. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.* 74: 1625-1634 (2008)
 13. Lee GE, Kim SM, Huh CK, Cho IK, Kim YD. Comparison of quality properties and identification of acetic acid bacteria for black waxy rice vinegar. *Korean J. Food Preserv.* 22: 443-451 (2015)
 14. Park CS, Lee TS. Quality characteristic of Takju prepared by wheat flour Nuruks. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 296-302 (2002)
 15. Yoo YC, Lee GW, Cho YH. Antioxidant and anti-inflammatory effects of extracts from the flowers of *Weigela subsessilis* on RAW 264.7 macrophages. *Korean J. Life Sci.* 26(3): 338-345

(2016)

16. ZHENG W and WANG SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *J. Agric. Food Chem.* 51: 502-509 (2003)

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 애로사항 해결 과제				
	(영문)				
주관연구기관	(재)순천천연물의약소재개발 연구센터	주 관 연 구 책 임 자	(소속) 연구개발실		
참 여 기 업	(주)호성농업회사법인 (주)힘찬걸음 농업회사법인(주)생생초		(성명) 박경욱		
총연구개발비 (200,000천원)	계	200,000,000	총 연구 기간	2019.12.02. ~ 2020.12.01.(1년)	
	정부출연 연구개발비	150,000,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인원	15
	기업부담금	50,000,000		내부인원	7
	연구기관부담금	0		외부인원	8

○ 연구개발 목표 및 성과

1. 연구개발목표

본 연구과제의 최종 목표는 아로니아를 이용한 천연 발효를 통한 생성되는 정제물에 대한 지표물질 분석을 통한 소재의 표준화 분석법을 개발하고 항염증에 도움을 주는 소재를 활용한 제품을 개발하고자 함

2. 연구개발성과

- 1) 지식재산권 특허출원 2건
- 2) 기술실시(이전) 통상실시권 3건, 전용실시권 1건 총 4건 기술이전 실시 및 기술료 1천만원
- 3) 사업화 제품화 총 4건(아로니아와인, 아로니아식초, 아로니아액상음료, 아로니아고상젤리)
- 4) 사업화 매출액 약 3.8천만원
- 5) 사업화 고용창출 총 3명
- 6) 정책활용 홍보 전시 총 2건

○ 연구내용 및 결과

1. 연구개발내용

- 1) 아로니아의 발효 공정 및 발효 정제물 제조공정 확립
- 2) 아로니아의 지표물질 표준화 분석법 개발
- 3) 아로니아 발효원액과 발효 정제물에 대한 항염증활성 검증
- 4) 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 식품 조성물 및 제형 개발
- 5) 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 식품 제조 공정 및 품질관리기준 설정
- 6) 아로니아 발효 정제물의 소재를 이용한 시제품 생산

2. 연구결과

- 1) 아로니아 효모 발효를 통한 아로니아와인 제조 방법 및 안토시아닌 지표물질 분석법 확립
- 2) 아로니아와인을 이용한 초산 발효를 통해 아로니아식초 제조 방법 및 대사부산물 정제 방법 확립
- 3) 아로니아식초를 이용한 액상 음료 제조 방법 및 항염증 효능 입증
- 4) 아로니아식초와 대사부산물을 이용한 고상 제품 제조 방법 확립

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 1) 아로니아 효모 발효 와인은 향 후 중국 닝보시를 통한 발효원료 국내 및 수출 사업 가능
- 2) 아로니아 식초는 기술실시(이전) 통상실시권을 통해 원료 및 제품으로 국내외 판매 사업 가능
- 3) 아로니아 식초 및 부산물 액상음료는 기술실시(이전) 전용실시권 제품으로 국내외 판매 사업 가능
- 4) 아로니아 식초 및 부산물 고상음료는 기술실시(이전) 전용실시권 제품으로 국내 및 수출 판매 가능

[별첨 2]

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		119117-1	
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	고부가가치식품기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공동 애로사항 해결 과제		과제유형	(개발)	
연구기관	(재)순천천연물약소재개발연구센터		연구책임자	박경욱	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2019.12~2020.12	150,000	50,000	200,000
	2차연도				
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계		150,000	50,000	200,000
참여기업	(주)호성농업회사법인, (주)힘찬결음, 농업회사법인(주)생생촌				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021. 01 07

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(재)순천천연물약소재개발연구센터	사무국장	박 경 욱

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확인하여, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

화 약 

1. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 아로니아 단일 균주를 이용한 발효와인 알코올 12% 제조 방법 및 대사산물 베타글루칸 생성능을 측정하고 발효와인의 오크통의 숙성기간에 따른 저장성 시험을 통해 안전성과 와인의 맛과 향을 향상시켰음
2. 아로니아 단일 균주를 이용한 발효식초 초산 4%이상 제조 방법 및 안토시아닌류와 유기산 분석을 하고 발효식초의 오크통의 숙성을 통해 안전성과 식초의 맛과 향을 향상시켰음
3. 아로니아 발효 식초제조 공정에 따른 인위적으로 산가수분해 없이 부산물의 제조 공정 확립과 이를 이용한 액상과 고상 제품 제조 조성물에 대한 특허를 통해 중국, 미국으로 수출 사업 확대

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 바이오헬스케어소재산업화는 *Saccharomyces cerevisiae* 발효 제조 공정에 따른 1차 소재로 아로니아와인 생산하고 2차 소재로 *Acetobacter aceti* 발효 제조 공정을 통한 아로니아식초 생산되며 마지막 3차 소재로 발효 부산물로부터 다량 기능성 물질이 함유된 소재 생산이 가능함
2. 3종 유형의 소재를 활용한 바이오헬스케어소재산업화를 위한 재형으로 1차 소재로 12% 아로니아와인과 산도 4%이상 아로니아식초 그리고 안토시아닌 정제물의 농축액과 분말 제조 가능함
3. 3종 유형의 소재의 정제 기술을 이용한 의약, 식품, 화장품, 반려동물관련 다양한 분야로 3종 유형의 소재를 이용한 제품 개발이 가능함

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 아로니아 효모 발효 와인은 2019년 12월 중국 닝보시 업체를 방문하여 원료 납품 협의 진행하여 2021년 수출 성과 활용 가능
2. 아로니아 초산 발효 식초는 이미 식초음료 선행 유통 판매 경험을 토대로 국내 및 중국 광저우 수출 성과 활용 가능
3. 아로니아 식초를 이용한 액상 음료 제품을 중국 광저우 업체를 통해 수출 성과 활용 가능
4. 아로니아 식초와 부산물을 이용한 고상 제품을 홈쇼핑 및 미국 온라인 오픈마켓 수출 성과 활용 가능

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

효모와 초산 발효 조건별(균주별, 추출조건별, 배합조건별)에 대한 최적 발효 조건을 확립하였으며, 발효시간에 따른 베타글루칸 함량 및 안토시아닌류 정성 분석으로 대사부산물의 변화를 측정하고 식품으로 활용할 수 있도록 정제 조건도 정리하였음. 하지만 미생물 발효에 의한 안토시아닌류의 분해로 발효 시간에 따른 감소 경향을 보였으며 항염증 활성도 높지 않은 결과를 보였음. 그리고 초산발효를 통해 생성된 대사부산물의 정제로 액상과 고상 음료 레시피 조성물에 대한 전용실시권으로 기업 지원을 진행함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

지식재산권 특허출원 2건에 따른 통상실시권 4건, 전용실시권 1건 기술료 1천만원
 식품영양학회 포스터 발표 1건 및 식품영양학회와 IC KOREA 홍보부스 제품 홍보 2회

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허출원 1건	10	200	특허출원 2건
기술실시(이전) 1건	10	500	기술실시(이전) 통상실시권 4건, 기술실시(이전) 전용실시권 1건
기술실시(이전) 기술료 2천만원	10	50	1천만원
사업화 제품화 2건	30	350	제품화 7건(아로니아와인, 식초, 액상음료, 고상제품 등)
사업화 매출액 3천만원	20	126	사업화 매출액 약 3.8천만원
사업화 고용창출 1명	10	300	사업화 고용창출 3명
정책활용 홍보 1회	10	200	정책활용 홍보 2회
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구개발결과는 “국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 애로사항 해결과제”를 통해 국내 아로니아 재배 농가의 문제점 해결을 통한 재배 농가의 매출 증대와 소재 4건으로 저장성 문제점 해결, 고부가가치 표준화 소재 판매가 가능할 것으로 판단되며, 다양한 식품 개발 및 가공기술로 활용 범위 확대가능함. 차 후 다양한 소재의 효능 검증이 필요하고 정제 기술을 통한 표준 소재 및 의약 소재로 활용 가치를 높이는 연구가 진행되어야 함

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

1차년 연구결과에 따른 개발 성과는 높았으나, 단기간 연구기간에 따른 유효성 평가가 다각도로 생체 대사체 효능평가 및 *in vivo* 효능평가가 더 진행할 수 있는 사업이 병행되어야 할 것으로 판단됨

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

아로니아 가공기술에 따른 소재 개발 4종에 대한 식품 소재 활용 가치성이 높을 것으로 판단되며 이는 국내외 판매 매출로 국내 아로니아 재배 농가의 안정적 고부가가치 수익 창출이 가능할 것으로 판단되며 개발된 제품 4종에 대한 기술이전 참여기업의 국내외 수익창출 할 수 있도록 새로운 제품 개발에도 지속적인 컨설팅을 진행할 계획임

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	국내산 아로니아를 활용한 식품 제조 및 가공기술 등 공통 애로사항 해결 과제			
주관연구기관	(재)순천천연물의약소재개발연구센터	주관연구책임자	박경욱	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	150,000,000	50,000,000	0	200,000,000
연구개발기간	2019.12.02. ~2020.12.01			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(홍보전기) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: _____)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 특허출원 1건	① 특허출원 2건
② 기술실시(이전) 1건	② 기술실시(이전) 5건
③ 기술실시(이전) 기술료 20,000,000원	③ 기술실시(이전) 기술료 10,000,000원
④ 사업화 제품화 2건	⑤ 사업화 제품화 7건
⑤ 사업화 매출액 30,000,000원	⑤ 사업화 매출액 38,754,700원
⑥ 사업화 고용창출 1명	⑥ 사업화 고용창출 3명
⑦ 정책활용 홍보 1건	⑦ 정책활용 홍보 2건

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10			10	10	30	20		10									1		
최종목표	1			1	20	2	30		1									1		
연구기간내 달성실적	2			5	10	7	38		3									2		
달성율(%)	200			500	50	350	126		300									200		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	아로니아 효모 발효 와인 제조 기술 방법
②	아로니아 초산 발효 식초 제조 기술 및 항염증 효능 조성물
③	아로니아 천연 발효 부산물을 이용한 액상 음료 제조 방법
④	아로니아 천연 발효 부산물을 이용한 고상 제품 제조 방법

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v					v	v		
②의 기술		v				v	v			
③의 기술		v					v	v	v	
④의 기술		v				v	v		v	

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	아로니아 효모 발효 와인은 향 후 중국 닝보시를 통한 발효원료 수출 사업 가능
②의 기술	아로니아 식초는 기술실시(이전) 통상실시권 원료 판매 사업 가능
③의 기술	아로니아 식초 및 부산물 액상음료는 기술실시(이전) 전용실시권 제품 판매 가능
④의 기술	아로니아 식초 및 부산물 고상음료는 기술실시(이전) 전용실시권 제품 판매 가능

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	10			10	10	30	20		10									1	
최종목표	1			1	20	2	30		1									1	
연구기간내 달성실적	2			5	10	7	38		3									2	
연구종료 후 성과창출 계획							<u>100</u>	<u>50</u>				<u>1</u>						<u>1</u>	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	아로니아 식초를 함유하는 항염증용 조성물		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	0천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2021.01.06. ~ 2024.01.05	실용화예상시기 ³⁾	2021.06.01
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	① 기술지도는 주관기관 기술이전 계약 체결 후 핵심기술을 이전업체에 대한 특허출원 자료를 송부하고 별도의 핵심기술 요약서 및 제조 방법에 대한 기술지도를 실시함 ② 핵심기술의 제조방법에 대한 공정도 및 설비 구축 방안을 기술 이전 업체에게 제시함 ③ 기술실시(이전) 통상실시권에 대한 기술료는 없으나 경상기술료는 매년 매출에 대한 다음 해 3월에 자료 제공하고 계약제품에 대한 총 매출액의 2%를 경상기술료로 지급함		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

핵심기술명 ¹⁾	아로니아 식초 음료 조성물 및 그 제조 방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2021.01.06. ~ 2024.01.05	실용화예상시기 ³⁾	2021.06.01
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	① 기술지도는 주관기관 기술이전 계약 체결 후 핵심기술을 이전업체에 대한 특허출원 자료를 송부하고 별도의 핵심기술 요약서 및 제조 방법에 대한 기술지도를 실시함 ② 핵심기술의 제조방법에 대한 공정도 및 설비 구축 방안을 기술 이전 업체에게 제시함 ③ 기술실시(이전) 전용실시권에 대한 기술료는 1천만원으로 하고 경상기술료는 매년 매출에 대한 다음 해 3월에 자료 제공하고 계약제품에 대한 총 매출액의 1%를 경상기술료로 지급함		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.