

최 중
연구보고서

고품질 복분자술 제조를 위한
새로운 발효기술 개발 및 복분자를 이용한
기능성 식품소재 개발에 의한 사업 다각화

Development of new fermentation techniques for
manufacturing high quality *Rubus coreanus* wine and
products diversification by the development of functional
food materials from *Rubus coreanus* fruits

연구기관
(주) 연수당

농림수산식품자료실



0016232

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고품질 복분자술 제조를 위한 새로운 발효기술 개발 및 복분자를 이용한
기능성 식품소재 개발에 의한 사업 다각화” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2008 년 04 월 24 일

주관연구기관명 : (주)연 수 당

총괄연구책임자 : 임 의 재

세부연구책임자 : 임 의 재

연 구 원 : 이 동 병

연 구 원 : 김 상 진

연 구 원 : 박 영 민

협동연구기관명 : 송 원 대 학

협동연구책임자 : 유 맹 자

협동연구기관명 : 전 남 대 학

협동연구책임자 : 문 제 학

요 약 문

I. 제 목

고품질 복분자술 제조를 위한 새로운 발효기술 개발 및 복분자를 이용한 기능성 식품소재 개발에 의한 사업 다각화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

복분자는 미네랄 중에서 칼륨성분을 다량 함유하고 있으며, 다양한 비타민류를 비롯하여 항암성의 안토시아닌, 시스토프스테롤, 탄닌, 폴리페놀 등의 유용한 성분이 다량 함유되어 있어 미국, 유럽 등지에서는 연구개발이 심도 있게 이루어지고 있으며, 건강식품으로써 애용되고 있을 뿐만 아니라 약용성 건강보조식품 등으로 제조되어 판매되고 있다. 이러한 우수성이 국내에서도 널리 알려져 웰빙 식품으로서 인기를 끌고 있다. 그러나 조금하계 개발된 상품은 질적인 저하를 가져오고 국내산 berry류인 복분자와 그 가공품의 판매량 증가에 부정적인 영향을 미치고 있다. 따라서 복분자의 체계적인 연구를 통하여 복분자의 고유의 기능성을 유지하면서 소비자들의 기호에 적합한 상품을 개발하고자 하였다.

첫 번째로 현재 생산되는 복분자의 소모는 대부분이 복분자술을 제조하는데 사용되고 있고 복분자술 생산업체들은 완숙된 복분자 열매를 사용하여 이미 개발 판매되는 효모에 의존된 발효기법으로 복분자술을 제조하고 있다. 따라서 복분자술의 품질 개선이 필요한데, 본 연구에서는 복분자를 성숙시기별로 채취하여 천연 발효시킨 후, 우수효모 분리 및 동정을 하고 우수 균주를 사용하여 최적발효 조건을 확립하고 한약재의 생리활성 물질의 기능성을 이용하여 자양강장 및 축취해소가 강화된 고품질의 복분자술을 제조하고자 한다.

두 번째로 날로 증가하고 있는 복분자 재배 및 생산량을 고려하여 과잉생산에

대비하여 성숙 시기별 복분자를 이용하여 가공식품 개발에 이용할 기능성 식품 소재를 개발하고 애플, 음료, 과립 등의 가공식품을 개발하고자 하였다.

세 번째로 『성숙 시기별』 복분자로부터 생물활성 검증을 통하여 복분자의 기능성을 규명함으로써 복분자술 및 복분자 가공식품의 상품성 향상과 관련 사업의 활성화를 도모하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 고품질 복분자술 제조를 위한 새로운 발효기술 개발하고 상품화하기 위하여 제1세부과제에서는 우수 발효효모 개발에 의한 발효기술 확립 및 한약추출액 제조, 고품질 복분자술의 최적 발효 조건 확립 및 블랜딩, 대량 생산 및 사업화 방안을 마련하였다. 제1협동과제에서는 복분자 고유의 특성을 유지하면서, 소비자의 기호도에 적합한 복분자 가공식품을 개발하기 위한 기능성 복분자 가공 소재를 개발하고 이를 이용한 전통 한과류와 떡과 같은 전통가공식품을 개발하여 상품화하고자 하였다. 제2협동과제에서는 복분자술에 함유되어 있는 기능성물질을 단리·구조결정하고 생리활성을 평가함으로써 복분자주가 지니는 기능성을 구명하고자 한다. 또 제조공정에 따른 화합물의 변화 및 안정성을 화학적으로 밝히고 정량화함으로써 복분자술의 과학적인 품질평가지표를 확립하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 우수 발효효모를 개발하여 발효기술을 확립하고 제조방법의 표준화 방안을 설정하였다.

가. 복분자술 우수 발효효모의 선정

복분자술 제조에 적합한 야생효모를 선정하기 위하여, 복분자를 자연발효한 발효액으로부터 발효균주를 분리하였다. 분리된 균주 중 알코올 내성, 알코올이 첨가된 배지에서의 발효능, 알코올 생성능이 우수한 균주 3종을 선별하고,

그 특성을 비교하였다.

나. 우수 발효효모의 복분자술 발효조건 확립

양조용 효모와 3종의 분리균주를 이용하여 복분자를 발효한 후 알코올함량, pH, 당도의 변화를 비교·관찰하여 분리된 균주의 발효조건을 확립하였다. 또한, 기호도 평가를 통해 분리균주 중 1종을 우수 발효효모로 선정하였다.

다. 제조방법의 표준화 방안 설정

복분자에서 분리한 우수 발효효모를 이용하여 발효원액을 제조할 경우 필요한 공정을 확립하고, 공정별 기능과 소요시간 등을 확립하였다.

2. 고품질 복분자술의 최적 발효 조건과 제조 기술을 확립하였다.

가. 분리효모의 발효능에 대한 안정성 평가

발효시 온도, pH, 당도, 알코올 함량 변화에 따른 효모의 생육도를 비교하여, 우수 발효효모의 생육이 안정한 범위를 조사한 결과, 우수 발효효모 *S.cerevisiae* Y-1은 20~40°C의 온도, pH 3.0~7.0, 당 함량 20%이하, 알코올 함량 8%이하에서 가장 안정한 것으로 나타났다.

나. 고품질 복분자술을 위한 최적 발효조건 선정

복분자로부터 분리한 *S.cerevisiae* Y-1을 이용하여 발효할 경우 발효온도, 초기 pH, 초기 당도에 따른 pH, 당도, 알코올 함량 변화를 비교·분석하고, 각 조건별 관능평가를 통해 최적발효조건을 선정하였다. *S.cerevisiae* Y-1의 최적 발효조건은 발효온도 20°C, 초기 pH 5.0이하, 초기 당도 20°Brix로 나타났다.

다. 복분자술의 제조기술 확립

복분자 발효원액의 제조기술을 확립하고, 발효원액을 이용한 복분자술 제조 기술 및 브래딩 기술을 표준화하였다. 각 공정별 소요시간과 설비들을 점검하고, 복분자술 제조시 발효원액의 희석비율과 최적 여과기준을 설정하였다.

라. 생산된 복분자술의 품질 특성

제조된 복분자술의 비중, 주정분, 불휘발분 등을 분석하고, 기존제품과 개발된 고품질 복분자술의 기호도 및 강장효과와 숙취해소에 대한 관능평가를 비교하였다. 복분자 술의 비중은 0.994, 주정분은 16.2%(V/V%), 불휘발분은 5.7(W/V%)로 나타났으며, 개발품이 기존품과의 비교시 향, 색, 맛에서 모두 우수하였고, 숙취해소와 강장효과에서도 약 10% 향상된 것으로 나타났다.

3. 복분자주의 대량 생산 체계화 및 사업화를 추진하였다.

가. 최적발효조건에 의한 고품질 복분자술의 대량생산

복분자에서 분리한 *S.cerevisiae* Y-1의 개발효모를 이용하여 최적 발효조건에서 복분자를 발효하고, 최적화된 발효원액 제조공정에 따라 복분자 발효원액을 제조하였다. 복분자 발효원액에 정제주정, 물, 한약 추출물, 첨가물료 등을 혼합하고 여과하여 복분자술을 제조하고, 제품화하여 대량생산체제를 구축하였다.

나. 고품질 복분자술의 관능평가

생산된 고품질 복분자술과 기존품, 인지도가 높은 몇몇 복분자술 제품을 관능평가한 결과 가장 인지도가 높은 B사의 제품과 개발품이 가장 높은점수를 받아 개발품의 품질 경쟁력을 확인하였고, 사업화의 성공가능성도 매우 높은 것으로 나타났다.

다. 복분자 술의 상품화 및 사업화

개발된 복분자술의 라벨, 병디자인 등을 결정하여 제품화를 실현하였고, 개발품의 홍보전략 및 유통망을 확보함으로써 사업화를 진행하였다.

4. 복분자 열매로부터 기능성 복분자 앰플을 제조하고 그 특성을 분석하였다.

가. 복분자 앰플용 추출액의 제조

냉동된 복분자열매를 해동한 후 마쇄하고 추출용매로 물과 50% 주정을 10배량 사용하여 80℃에서 60분 동안 추출하였고 원심분리와 여과하여 상등액을 얻어 복분자 시료 양의 2배가 될 때까지 45℃에서 감압 농축하여 복분자 앰플을 제조하였다.

나. 복분자 앰플의 제조조건 확립

당도, 색도, 가용성 고형물 함량을 기준으로 분석한 결과 추출용매로는 복분자열매와 물과의 비율이 10배일 때 추출 수율이 가장 좋았고 추출시간은 60분이 가장 적당하였다.

다. 복분자 앰플의 특성 분석

물로 추출한 복분자 앰플은 계속적으로 산도와 pH가 변화하는 경향을 나타냈지만 50% ethanol로 추출한 복분자 앰플은 초기에만 변화하다가 그 이후에는 큰 변화가 없었다. 물로 추출한 복분자 앰플의 색도는 변화의 폭이 커 불안정하였으나 50% ethanol로 추출한 복분자 앰플은 명도의 변화는 컸지만 대체적으로 적색도와 황색도는 안정하게 변화하였다. 갈변도 역시 색도의 변화와 유사한 경향을 보였다. 항세균활성은 물추출물에서는 *L. monocytogenes* KCTC 3569, *E. coli* ATCC 43888, *Bacillus cereus* 1014 순으로 활성이 강하였고 50% ethanol 추출물에서는 *E. coli* ATCC 43888, *L. monocytogenes* KCTC 3569, *Bacillus cereus* 1014 순으로 활성이 강하였다

5. 복분자 열매로부터 복분자 분말소재를 개발하고 그 특성을 분석하였다.

가. 복분자 분말 제조용 추출물의 제조

냉동된 복분자열매를 해동한 후 마쇄하고 10배량의 물 또는 50% ethanol을 사용하여 환류냉각추출장치에서 80℃에서 60분 동안 추출하였다. 추출물은 다시 실온에서 12시간 추출하여 4겹의 cheese cloth에 여과하고 여과된 액을 원심분리한 후 얻어진 상등액을 여과하여 물추출물과 50% ethanol 추출물을 제조하였다

나. 복분자 분말의 제조공정 및 조건 확립

복분자 분말은 급속 냉동된 생 복분자열매, 복분자 물추출물, 또는 복분자 50% ethanol 추출물을 동결건조기에서 48시간 동안 건조하고 grinding하여 20 mesh체로 씨를 제거한 후, 다시 80 mesh체로 입자를 고르게 하여 복분자 분말(RP), 복분자 물추출분말(WP), 또는 복분자 주정추출분말(EP)을 각각 제조하였다.

다. 제조된 복분자 분말소재의 특성 분석

RP, WP, EP 각각의 수율은 6.97%, 9.94%, 9.11%로 복분자 물추출분말(WP), 복분자 주정추출분말(EP), 복분자 분말(RP)순으로 크게 나타났고 환원당 함량은 0.70 g/ml, 0.96 g/ml, 1.01 g/ml로 EP, WP, RP순으로 크게 나타났다. 색도는 RP, WP, EP가 모두 유의적인 차이가 있었고 RP, WP, EP순으로 밝은 적색을 나타냈다. 적정산도는 11.71%, 8.55%, 8.64%로 WP와 EP는 유의적인 차이가 없었으나 RP는 WP와 EP에 비해 산도가 더 높게 나타났다. *Bacillus cereus* KCTC 1092에 대한 항균활성은 아주 낮았으나 *Listeria monocytogens* KCTC 3569에 대해서는 높은 활성을 보였고 특히 WP, EP보다 RP에서 더 큰 항균활성을 보였다. *Staphylococcus aureus* KCTC 13566 및 *Escherichia coli* ATCC 43888에 대한 항균활성은 높았고 특히 WP, EP보다

RP에서 항균활성이 더 컸다. 복분자 분말에 대해서 *Salmonella typhimurium* KCTC 1925와 *Shigella dysenteriae* KCTC 2915는 서로 비슷한 항균 활성을 나타냈다. *Candida albicans* KCTC 1940 및 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552에 대한 항균활성은 상대적으로 약간 낮았고 WP와 EP간의 유의적인 차이도 없었고 WP, RP에 비해 EP에서 더 낮은 활성을 보였다.

6. 복분자 애플 및 분말소재를 이용한 가공식품을 개발하였다.

가. 복분자 애플소재를 이용한 가공식품의 제조

복분자 애플을 첨가소재로 사용하여 복분자 곡물식빵, 복분자 단과자빵, 복분자 카스테라, 복분자 머핀, 복분자 산자 및 강정의 5가지 종류의 가공식품을 제조하였는데 복분자애플의 사용량을 가공식품의 종류 및 특성에 따라 조직감 및 색깔을 기준으로 평가 비교하여 최적량을 결정하고 그 최적량을 첨가하여 제조하였다.

나. 복분자 분말소재를 이용한 가공식품의 제조

복분자 분말을 첨가소재로 사용하여 복분자 무지개떡, 복분자 인절미, 복분자 경단, 복분자 다식, 복분자 산자 및 강정의 5가지 종류의 가공식품을 제조하였는데 복분자분말의 사용량을 가공식품의 종류 및 특성에 따라 조직감 및 색깔을 기준으로 평가 비교하여 최적량을 결정하고 그 최적량을 첨가하여 제조하였다.

7. 복분자술로부터 생리활성물질을 단리·정제하였다.

가. 복분자 와인 11 L (신선 복분자 15.7 kg 상당량)의 농축물 H₂O 현탁액을 *n*-hexane, EtOAc, 수포화 BuOH로 순차 용매분획하고, 얻어진 각획분을

대상으로 Amberlite XAD-2, silica gel, Sephadex LH-20 및 ODS를 이용한 column chromatography와 반복적인 HPLC를 행하여 총 27종의 항산화 활성 화합물을 단리·정제하였다.

8. 복분자술로부터의 생리활성물질의 구조를 결정하고 활성을 평가하였다.

가. 단리·정제된 총 27종의 화합물들을 대상으로 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 및 다양한 two dimensional NMR, 그리고 MS 분석을 행하여 총 16종 화합물의 구조결정을 완성하였으며, 3종의 추정구조를 제시하였다. 그리고 그 화합물들 모두는 DPPH-TLC method에 의해 항산화 활성 양성임을 확인하였다.

▶ 구조결정 화합물: 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-(2-hydroxy-ethyl)-phenol, catechol, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester, ethyl succinate, vanillic acid, ethyl 3,4-dihydroxybenzoate, furan-2-ol, 4-(3-hydroxybutyl)phenol, 3,4-dihydroxy-benzoic acid 2-(2-hydroxy-propionyloxy)-1-methyl-propyl ester, gallic acid, 3'-O-benzoyl-(O- β -D-glucopyranosyl)(1'' \rightarrow 6')- β -D-psicofuranose, (E)-8-O- β -D-glucopyranosylcinnamic acid, (R) ethyl-2-hydroxy-3-phenylpropanoate, (Z)-ethyl-4-amino-3-(2-hydroxyphenyl) but-3-enoate.

▶ 추정구조 화합물: 4-(2-hydroxyethyl) naphthalene-1,2-diol의 2량체 화합물, 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,8,10-trihydroxy-2,4-dimethyl-1,10b-dehydro-2H-oxireno[2,3]chromeno[3,4-d]pyrimidin-3(4H)-one 1-O-L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, 그리고 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,7,8,9,10-pentahydroxy-2,4-dimethyl-1,10b-dehydro-2H-oxireno[2,3]chromeno[3,4-d]pyrimidin-3(4H)-one 1-O-L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside.

나. GC-MS 분석법에 의해 복분자 와인으로부터 추가로 12종 화합물의 존재를 밝혔다. 그 동정된 화합물들은 다음과 같다.

▶ 원재료 복분자에 함유된 화합물: benzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid.

▶ 복분자 와인에 함유된 화합물: benzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid, 4-(2-hydroxyethyl)phenol, ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate, 3-(ethoxycarbonyl) propanoic acid

▶ 원재료 복분자와 복분자 와인에 공통으로 함유된 화합물: benzoic acid, 3,4-dihydroxy benzoic acid, gallic acid.

▶ 단리·구조결정된 화합물 이외에 새롭게 동정된 화합물: butanedioic acid, propanedioic acid, 2-hydroxypropanoic acid, 2-hydroxypropanoic acid, 3-hydroxy-3-phenylpropanoic acid, 1,1-dimethoxy-3-phenylpropane

▶ 복분자 와인으로부터만 동정된 화합물: benzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid, 4-(2-hydroxyethyl)phenol, ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate, 3-(ethoxycarbonyl)propanoic acid, butanedioic acid, propanedioic acid, 2-hydroxy- propanoic acid, 2-hydroxypropanoic acid, 3-hydroxy-3-phenylpropanoic acid, 1,1-dimethoxy-3-phenylpropane.

다. 원재료 복분자 및 복분자 와인의 생리활성을 평가하고, 그들의 활성을 비교하기 위하여 항동맥경화 예방에 초점을 맞추어 쥐 혈장에 첨가한 각 시료들의 cholesteryl ester hydroperoxide (CE-OOH)의 생성 억제 효과를 검토하였다. 그 결과 원재료 복분자 추출물은 농도의존적으로 활성을 보였음에 반해, 복분자 와인 농축물은 오히려 특정 농도에서 prooxidant 효과를 보였다. 이것은 원재료 복분자에 함유되어 있던 성분들이 발효과정동안 변하여 환원력이 강한 화합물을 생성했기 때문으로 해석되었다. 그래서 두 시료를 여러 조건으로 조제하여 직접 쥐에게 경구투여하고, 1시간 후에 개복하여 대동맥으로부터 채혈한 다음, 얻어진 혈장을 대상으로 피산화성을 비교·검토하였다. 그 결과 복분자의 형태보다는 복분자 와인의 형태로 섭취하는 것이, 그리고 수용액 형태로 보다 16% 알콜 용액의 형태로 섭취하는 것이 혈장 산화 억제에 보다 효과적임을 알 수 있었다. 이것은 복분자 와인 섭취가 동맥경화 예방에 유의하게 작

용할 것이라는 매우 흥미로운 결과로 해석되었다.

9. 복분자술의 제조공정에 따른 생리활성물질의 생성기구 해명 및 품질평가지표를 확립하였다.

가. 복분자 와인제조에 이용되는 미생물(*Saccharomyces cerevisiae*)을 (주)연수당으로부터 분양받아 신선 복분자 추출물과 함께 배양한 결과, 배양시간의 경과와 함께 원재료 복분자에 함유되어 있던 성분들이 감소 또는 소실되었으며, 새로운 화합물이 생성되어짐을 확인하였다.

나. 신선 복분자 추출물 및 복분자 와인 농축물을 대상으로 TMS 유도체화 후, GC-MS 분석을 행하여 원재료 복분자로부터 확인되지 않았던 화합물들 12종의 존재를 밝힌 결과에 더하여, gallic acid 및 3,4-dihydroxybenzoic acid가 원재료 복분자에 비해 복분자 와인에 그들 함량이 약 6배 정도 높아짐을 확인하였다. 이에 복분자를 발효 및 숙성시켜 복분자 와인이 제조되는 45일간을 12단계로 나누어 매 단계별 두 화합물의 함량변화를 검토하였다.

다. 제조 단계별 gallic acid (GA) 및 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBA)의 함량변화를 분석한 결과, 발효가 진행되는 동안에는 GA와 DHBA가 증가하는 경향을 보이다 숙성 초기에 약간 감소하는 경향을 보였다가 다시 거의 직선적인 증가 경향을 보였다. 즉 초기 3단계까지의 발효과정에 있어 GA와 DHBA의 함량증가는 복분자에 함유되어 있는 anthocyan 등의 flavonoid가 미생물 대사에 의해 분해되는 과정에서 나타난 현상으로 생각되었다. 그리고 발효 후 4단계에서의 감소는 미생물의 작용이 멈추고 숙성되는 과정에서 GA와 DHBA가 산화되어짐으로써 발생하는 일시적인 현상으로 판단되었다. 그리고 5단계에서부터 GA와 DHBA의 꾸준한 증가는 잔존해 있는 flavonoid가 산화와 환원 등을 거듭하는 화학적 반응을 거쳐 생성되었을 가능성이 시사되었다. 즉

GA와 DHBA의 발효과정과 숙성과정에서의 생성 기전은 서로 다를 가능성이 높을 것으로 사료되었다. 이처럼 GA와 DHBA가 발효와 숙성 과정 중 특징적인 거동을 보임이 확인되어져 추후 복분자 와인의 품질관리 및 품질평가에 유용한 지표 화합물로의 이용이 기대되어진다.

SUMMARY

I. Title

Development of new fermentation techniques for manufacturing high quality *Rubus coreanus* wine and products diversification by the development of functional food materials from *Rubus coreanus* fruits

II. The purposes and needs for the research and development

Rubus coreanus contain much calcium, one of mineral, various vitamin.

Also because it contains a useful element anti-cancer anthocyanin, sitosterol, tannin, polyphenol, in United states and Europe it is studying at some length. This is loved health foods and was selling medical functional food. This superiority becomes known widely in the country and it is gaining ground as the healthy foodstuffs. But the goods which is developed quickly brings a quality decrease and has a bad effect sale quantity increase both *Rubus coreanus* and its processed good. By scientific research of the *Rubus coreanus*, it must develope the goods supported specific function characteristic of *Rubus coreanus*, suitable in the demand of the consumers. First, currently the *Rubus coreanus* which is produced was consumed in the place where the most manufactures *Rubus coreanus* alcoholic beverage, *Rubus coreanus* alcoholic beverage productor uses *Rubus coreanus* which is fully ripened and fermentation of *Rubus coreanus* is used the fermantation technique which depends on wine yeast developed in the past. On this account, it is necessary the quality improvement of *Rubus coreanus* alcoholic beverage, in this study, after *Rubus coreanus* would be fermented naturally we will be isolating and identifying superior fermentative yeast, and establishing optimum fermentative condition, optimizing manufacture process, manufacturing high quality wine of *Rubus coreanus*. Second, considering extensive cultivation and the yield, we will develope various process food of *Rubus coreanus* for example ampoules, drink, granules. Third, by the studying of bioactivity of *Rubus coreanus*, it

investigates functional specific, leads to improvement of alcoholic beverage and to revitalization of relative business.

III. The contents and limit of the research

For developing new fermentive technology and manufacturing, the one study is consists of developmnet of superior fermentive yeast, establishment of optimum fermentive condition and blending technology of high quality wine of *Rubus coreanus*, preparation of mass production and commercialization.

For development of process food included proper specific and was suitable demand of customer, the one cooperative study is consists of development of process material and development and commercialization of traditional process food utilizing process material like korean cookie and rice cake. In the two cooperative study, by Structural determination and activity determination of the functional material included wine of *Rubus coreanus*, it must investigate functional characteristic of wine of *Rubus coreanus*. Also it will be establish the scientific quality rating index of *Rubus coreanus* alcoholic beverage by quantifying and investigating chemically change and safety of the compound for each manufacturing process

IV. Research development and Results

1. Superior fermentation yeast developed, it is established fermentation technique and standardized manufacturing method.

가. To manufacture *Rubus coreanus* alcoholic beverage superior fermentation yeast selecting.

It was isolated fermentative yeast from *Rubus coreanus* fermented naturally to choose wild yeast a suitable for wine of *Rubus coreanus*.

Among the species isolated, the three yeasts were chosen which were observed to have an excellent ability of fermentation from the media added alcohol, tolerance from alcohol and of alcohol producing and it is compared the characteristic

ㄴ. The establishment of fermentation condition of *Rubus coreanus* using superior fermentation yeast.

After *Rubus coreanus* was fermented using brewing yeast and three species yeast isolated, it investigated change of pH, glucose content, alcohol content, compared and observed. In the result, the fermentation condition of isolated yeast was established. Also by a sensory test, a yeast isolated was selected.

ㄷ. Standardization of manufacturing method.

In the case unprocessed wine fermented was manufactured utilizing superior fermentation yeast which it isolated from *Rubus coreanus*, the required process, the role of process and required time of process was established,

2. It established the *Rubus coreanus* optimum fermentation condition and a manufacture technique of the high quality alcoholic beverage.

ㄱ. The stability evaluation of isolated yeast.

By fermentation temperature, the pH, and alcohol content change, the growth of yeast was compared.

The result which investigates the scope where the growth of superior fermentation yeast is stabilized, superior fermentation yeast, *S.cerevisiae*

Y-1 was stabilized from the temperature of 20~40°C, the pH of the 3.0~7.0, glucose content of 20% and below, and alcohol content of 8% and below.

나. Selecting of optimum fermentation condition for the high quality *Rubus coreanus* alcoholic beverage.

After it is fermented using the *S.cerevisiae* Y-1 isolated from the *Rubus coreanus*, it was investigated and compared change of the pH, glucose content, alcohol content by the fermentation temperature, the initial pH, and the initial glucose, selected optimum fermentation condition by the sensory test. The optimum fermentation condition of *S.cerevisiae* Y-1 was observed the fermentation temperature of 20°C, the initial pH of 5.0 and below, and the initial glucose of 20°Brix

다. The establishment of manufacturing technic of *Rubus coreanus* alcoholic beverage.

It was established manufacturing technic of fermented *Rubus coreanus* solution, standardized manufacturing technic and blending of wine of *Rubus coreanus*. It was inspected required equipment, dilution ratio of fermented *Rubus coreanus* solution and optimum filtration condition to manufacture wine of *Rubus coreanus*.

라. Quality characteristics of the *Rubus coreanus* alcoholic beverage which is produced.

It was analyzed the specific gravity, alcohol content, nonvolatility and compared the sensory test about taste, solving the hangover, hardihood effect of *Rubus coreanus* alcoholic beverage produced. The specific gravity which is 0.994, the alcohol content which is 16.2%, the nonvolatility which

is 5.7% of *Rubus coreanus* alcoholic beverage was investigated, the development was superior than the preexistence about aroma, color, taste and the development was improved about 10% to solving the hangover, hardihood effect.

3. The mass production and business of *Rubus coreanus* alcoholic beverage was promoted.

가. The mass production of the high quality *Rubus coreanus* alcoholic beverage by the optimum fermentation condition.

Using *S.cerevisiae* Y-1 isolated from *Rubus coreanus*, *Rubus coreanus* was fermented by the optimum fermentation condition and fermented *Rubus coreanus* solution was produced by the optimum producing process. The *Rubus coreanus* alcoholic beverage was manufactured to blend with fermented *Rubus coreanus* solution, purified alcohol, water, the extract of Oriental medicine, additive, and to filter. The mass producing system was established,

나. The sensory test of the high quality *Rubus coreanus* wine

In the result it was investigated the sensory test of the developed *Rubus coreanus* wine, the preexistence, and the some papular goods, the good of initial 'B' manufactures and the developed *Rubus coreanus* wine was evaluated the best. By this result, the quality competitiveness of the development was demonstarated, the good possibility of success to the business was observed.

다. the manufacture and the business of *Rubus coreanus* wine.

The manufacture was carried out by decision of label and bottle-design of the developed *Rubus coreanus* wine. The business was carried out by confirming to market system and advertisement.

4. Developed *Rubus coreanus* ampoule from *Rubus coreanus* fruits and analyzed its properties

ㄱ. Prepared the extract making for *Rubus coreanus* ampoule

Frozen *Rubus coreanus* fruits were melted, grinded, and then ten times volume of water or 50% ethanol added to it and extracted for 60 minutes at 80°C. The aliquot was separated from centrifugation and filtration of the extract. The aliquot was evaporated under vacuum until the volume reduced to two times volume of raw fruit sample.

ㄴ. Established the manufacturing condition of *Rubus coreanus* ampoule

According to the analysis results based on the sweetness, color, and soluble solid content, one to ten mixed ratio of *Rubus coreanus* fruit and water was showed the best extracting yield as an extracting solvent, and the best extracting period was one hour.

ㄷ. Properties analysis of *Rubus coreanus* ampoule

Acidity and pH of *Rubus coreanus* ampoule extracted with water were continuously changed, but those of 50% ethanol extract were changed only at initial period and then did not significantly changed. The color of *Rubus coreanus* ampoule extracted with water was very unstable. The color of *Rubus coreanus* ampoule extracted with 50%

ethanol was relatively stable in a and b values, but L values were very unstable. Browning index was showed a similar trend in color changes. Antimicrobial activities in water extract were strong in order of *L. monocytogenes* KCTC 3569, *E. coli* ATCC 43888, and *Bacillus cereus* 1014, and those in 50% ethanol extract were strong in order of *E. coli* ATCC 43888, *L. monocytogenes* KCTC 3569, *Bacillus cereus* 1014.

5. Developed *Rubus coreanus* powder from *Rubus coreanus* fruits and analyzed its properties

ㄱ. Prepared the extract making for *Rubus coreanus* powder

Frozen *Rubus coreanus* fruits were melted, grinded, and then ten times volume of water or 50% ethanol added to it and extracted for 60 minutes at 80°C. The extraction was continued for 12 hours at room temperature and the extract filtered with 4 folds of cheese cloth. The filtrate was centrifuged and separated the supernatant to prepare the water extract or 50% ethanol extract of *Rubus coreanus*.

ㄴ. Established the manufacturing process and condition of *Rubus coreanus* powder

Rubus coreanus powder(RP), *Rubus coreanus* water extract powder(WP), *Rubus coreanus* 50% ethanol extract powder(EP) were prepared as follows; quick frozen raw *Rubus coreanus* fruits were dried in freeze drier for 48 hours, grind and removed the seeds with 20 mesh sieve and then sieved with 80 mesh

ㄷ. Properties analysis of *Rubus coreanus* powder

The extracting yields of RP, WP, EP were 6.97%, 9.94%, and 9.11%, respectively, which was in order of WP, EP, RP. Reducing sugar contents in EP, WP, and RP were 0.70 g/ml, 0.96 g/ml, and 1.01 g/ml, respectively. The colors of RP, WP, and EP were not significantly different and the bright redness showed was in order of RP, WP, and EP. The acidity of RP, WP, EP were 11.71%, 8.55%, and 8.64%, there was no significant difference between WP and EP, but the acidity of RP was higher than those of WP and EP. Antimicrobial activity against *Bacillus cereus* KCTC 1092 was very weak, but that against *Listeria monocytogens* KCTC 3569 was very strong, especially antimicrobial activity in RP was stronger than those in WP and EP. Antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* KCTC 13566 and *Escherichia coli* ATCC 43888 were relatively strong, especially RP showed higher activities than WP or EP. Antimicrobial activities against *Salmonella typhimurium* KCTC 1925 and *Shigella dysenteriae* KCTC 2915 were very similar. Antimicrobial activities against *Candida albicans* KCTC 1940 and *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552 were comparatively weak and there were no significant differences among RP, WP, and EP.

6. Developed processed foods utilizing *Rubus coreanus* ampoule and powder

ㄱ. Prepared processed foods utilizing *Rubus coreanus* ampoule

Five kinds of processed foods of *Rubus coreanus* grain bread, *Rubus coreanus* sweet cookie bread, *Rubus coreanus* castella, *Rubus coreanus* muffin, *Rubus coreanus* glutinous rice cake were made with *Rubus coreanus* ampoule used as a functional food gradient. The amounts of *Rubus coreanus* ampoule used were decided depend on the kinds and properties precessed foods such as texture and color, etc.

ㄱ. Prepared processed foods utilizing *Rubus coreanus* powder

Five kinds of processed foods of *Rubus coreanus* rainbow rice cake, *Rubus coreanus* glutinous rice cake, *Rubus coreanus* rice cake dumpling covered with bean paste, *Rubus coreanus* cookie eating with tea, *Rubus coreanus* glutinous rice cake were made with *Rubus coreanus* powder used as a functional food gradient. The amounts of *Rubus coreanus* powder used were decided depend on the kinds and properties precessed foods such as texture and color, etc.

7. Isolation and purification of biological active compounds from Korean black raspberry wine (KBRW)

ㄱ. H₂O-suspension of concentrate of KBRW 11 L [fresh Korean black raspberry (KBR) 15.7 kg eq.] was successively solvent-fractionated with n-hexane, EtOAc, and water-saturated BuOH. Each layer was subjected to column chromatography using Amberlite XAD-2, silica gel, Sephadex LH-20, and ODS. The fractions finally purified by repeated HPLC to give 27 antioxidative active compounds.

8. Structural determination and activity determination of bioactive compounds isolated from KBRW

ㄱ. Structural determination of the isolated 27 compounds was achieved by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, two dimensional NMR, and MS analyses. Structures of the compounds is as follows:

► Structurally determined compounds: 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-(2-hydroxyethyl)-phenol, catechol, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester, ethyl succinate, vanillic acid, ethyl 3,4-dihydroxybenzoate, furan-2-ol, 4-(3-hydroxybutyl)phenol, 3,4-dihydroxybenzoic acid 2-(2-hydroxypropionyloxy)-1-methyl-propyl ester, gallic acid, 3'-O-benzoyl-(O-β-D-glucopyranosyl)(1"→6')-β-D-psicofuranose, (E)-8-O-β-D-glucopyranosylcinnamic acid, (R) ethyl-2-hydroxy-3-phenylpropanoate, (Z)-ethyl-4-amino-3-(2-hydroxyphenyl) but-3-enoate.

► Estimated structures: 4-(2-hydroxyethyl) naphthalene-1,2-diol in d i m e r , 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,8,10-trihydroxy-2,4-dimethyl-1,10b-dehydro-2H-oxireno[2,3] chromeno[3,4-d]pyrimidin-3(4H)-one 1-O-L-rhamnopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranoside, and 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,7,8,9,10-pentahydroxy-2,4-dimethyl-1,10b-dehydro-2H-oxireno[2,3]chromeno[3,4-d]pyrimidin-3(4H)-one 1-O-L-rhamnopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside.

► Antioxidative activity of the compounds was positive in the DPPH-TLC experiment.

↳. Twelve compounds were additionally detected by GC-MS analysis of KBRW. The identified compounds are as follows:

► Compounds detected from KBR: benzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid.

► Compounds detected from KBRW: benzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid, 4-(2-hydroxyethyl)phenol, ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate, 3-(ethoxycarbonyl) propanoic acid

▶ Compounds detected in common from KBR and KBRW: benzoic acid, 3,4-dihydroxy benzoic acid, gallic acid.

▶ Newly identified compounds except for compounds determined by NMR: butanedioic acid, propanedioic acid, 2-hydroxypropanoic acid, 2-hydroxypropanoic acid, 3-hydroxy-3-phenylpropanoic acid, 1,1-dimethoxy-3-phenylpropane

▶ Compounds detected from only KBRW: benzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid, 4-(2-hydroxyethyl)phenol, ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate, 3-(ethoxycarbonyl)propanoic acid, butanedioic acid, propanedioic acid, 2-hydroxy- propanoic acid, 2-hydroxypropanoic acid, 3-hydroxy-3-phenylpropanoic acid, 1,1-dimethoxy-3-phenylpropane.

다. To determine the antioxidative activity of KBR and KBRW, oxidation of rat plasma was induced by copper ion with presence or absence of KBR and KBRW. Changes in concentration of cholesteryl ester hydroperoxides (CE-OOH) in the rat plasma was analyzed by HPLC. Inhibition effect against CE-OOH formation in rat plasma added KBR extract was dose-dependently accelerated with increase of the KBR extract concentration. However, KBRW showed prooxidant effect. It was suggested because reducing ability of KBRW was elevated during fermentation of KBR. Therefore, each sample prepared by various conditions directly intubated into stomach of rat. The blood was collected from the aorta of rat 1 hr after oral administration of KBR and KBRW. Oxidation of plasma prepared from the blood was induced by copper ion and the inhibition patterns against CE-OOH formation were compared. The inhibition effect of KBRW was superior to that of KBR. Moreover, 16% EtOH solution showed higher inhibition effect of CE-OOH formation than that of H₂O solution. In conclusion, it appears likely that KBRW is partly responsible

for the elevation of antioxidant activity. Therefore, KBRW may contribute to the antioxidant defense in the blood circulation.

9. Clarification of formation mechanism of bioactive compounds in manufacturing process of KBRW and establishment of guide for quality evaluation of KBRW

ㄱ. KBR extract was incubated with *Saccharomyces cerevisiae*, which is used for the fermentation in preparation of KBRW and was supplied from Yeonsudang Co., Ltd.. Compounds contained in KBR extract reduced and/or disappeared with the elapse of incubation time. As well, appearance of new compounds also observed from HPLC chromatograms after the incubation.

ㄴ. By GC-MS analyses of KBR and KBRW, contents of gallic acid (GA) and 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBA) in KBRW increased in about 6 folds in comparison with those in KBR. Therefore, the change in content of the compounds was plotted with the elapse of fermentation and ageing time.

ㄷ. Contents of GA and DHBA increased during the fermentation period (stage 1) and decreased in early ageing stage (stage 2) just after fermentation. However, they again linearly increased during other stages (stage 3) after early ageing stage. Increase in contents of GA and DHBA in stage 1 may be caused by metabolism of microorganism. Decrease of GA and DHBA in stage 2 may be induced by oxidation. On the other hand, it was suggested that the increase in contents of GA and DHBA in stage 3 may be caused by chemical conversion of residual anthocyanins or

flavonoids in wine during ageing. Consequently, it was considered that the changes in content of GA and DHBA during preparing of KBRW can be expected to use as indicators for quality management and quality evaluation.

CONTENTS

Summery(Korean)	2
Summery(English)	13
Contents(English)	26
Contents(Korean)	29

Part One. The outline for research and development 32

Chapter One. The purpose and limit	
for research and development	32
Chapter Two. The need of research and development	32

Part Two. The present condition of technical development 34

Part Three. Research development and results 38

<제1세부과제>

Chapter One. Development of fermentative technics and Standardization of manufactural process	38
1. Establishment of fermentation technic	38
가. Isolation and Identification of yeast	38
나. Establishment of fermentation conditions	45
다. Standardization of manufactural method	50
2. Optimization of fermentation conditions and Establishment of manufactural technics	52
가. Safety of isolated yeast	52
나. Optimization of fermentation conditions	58
다. Establishment of manufactural technics	65
라. Characteristics of <i>Bokbunja</i> wine developed	71
3. Manufacture and Commercialization	78
가. Manufacture at optimal conditions	78
나. Property analysis of <i>Bokbunja</i> wine developed	97
다. Commercialization of <i>Bokbunja</i> wine developed	101

<제1협동과제>

Chapter Two. Development of functional food materials for processed foods from <i>Rubus coreanus</i> fruits	104
1. Preparation of <i>Rubus coreanus</i> ampoule from <i>Rubus coreanus</i> fruits and analysis of the properties	104
가. Materials	104
나. Methods	104
다. Results	112
2. Preparation of <i>Rubus coreanus</i> powder from <i>Rubus coreanus</i> fruits and analysis of the properties	125
가. Materials	125
나. Preparation of <i>Rubus coreanus</i> powder	126
다. Analysis of physicochemical properties of <i>Rubus coreanus</i> powder	128
라. Determination of antimicrobial activities of <i>Rubus coreanus</i> powder	129
3. Development of processed foods using <i>Rubus coreanus</i> powder	144
가. Preparation of <i>Rubus coreanus</i> powder	144
마. Development of processed foods using <i>Rubus coreanus</i> powder	154

<제2협동과제>

Chapter Three. Isolation and purification, Structural determination, Clarification of formation mechanism, establishment of guide for quality evaluation of biological active compounds from Korean black raspberry wine	164
1. Isolation and purification	164
가. Extraction and Concentration	164
나. Solvent fraction	165
다. Isolation and purification	166
라. Consideration	188
2. Structural determination and Evaluation of biological active	189
가. Structural determination of biological active compound	189
3. Clarification of formation mechanism, establishment	

of guide for quality evaluation	238
가. Additive Structural determination	238
나. Compound isolated and purified, determined structure ..	267
다. Report and Compare chemical profile	272
라. Element change Test by yeast	310
마. Evaluate the effect of antioxidation	315
바. Compare and Examine antioxidation	330
Part Four. Achievements of the purpose and	
the rest of relative fields	339
Chapter One. Achievement of the purpose of research	339
Chapter Two. The rest of relative fields	341
Part Five. Application plan of the results of	
research and development	342
Part Six. References	343

목 차

제출문	1
요약문	2
영문요약서	13
제 1 장 연구개발과제의 개요	32
제 1 절 연구개발과제의 목적	32
제 2 절 연구개발과제의 필요성	32
제 2 장 국내외 기술개발 현황	34
제 1 절 국내외 관련분야에 대한 기술개발 현황	34
제 2 절 연구결과가 국내외 기술개발에서 차지하는 위치	35
제 3 절 기술개발에 따른 경제·산업적 효과	36
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	38
제 1 절 고품질 복분자술 제조를 위한 새로운 발효기술 개발 및 제조공정 표준화	38
1. 우수 발효효모 개발에 의한 발효기술 확립	38
가. 복분자술 우수 발효효모 선정	38
나. 우수 발효효모의 복분자술 발효조건 확립	45
다. 제조 방법의 표준화 방안 설정	50
2. 고품질 복분자술의 최적 발효 조건 및 제조기술 확립	52
가. 분리효모의 발효능에 대한 안정성 평가	52
나. 고품질 복분자술을 위한 최적 발효조건 설정	58
다. 복분자술의 제조기술 확립	65
라. 생산된 복분자술의 품질특성 분석	71
3. 대량 생산 및 사업화	78
가. 최적 발효조건에 의한 고품질 복분자술의 대량생산	78
나. 고품질 복분자술의 관능성 평가	97
다. 복분자술의 상품화 및 사업화	101
제 2 절 복분자열매로부터 가공식품용 기능성 식품소재의 개발	104
1. 복분자열매로부터 기능성 복분자 앰플의 제조 및 특성 분석	104
가. 실험재료	104

나. 실험방법	104
다. 연구결과	112
2. 복분자열매로부터 복분자 분말소재의 개발 및 특성 분석	125
가. 실험재료	125
나. 복분자분말의 제조	126
다. 복분자분말의 이화학적 특성 분석	128
라. 복분자 분말의 항균 활성 측정	129
3. 복분자 분말소재를 이용한 가공식품의 개발	144
가. 복분자애플의 제조	144
나. 복분자분말의 제조	144
다. 복분자 가공식품에 대한 관능검사	144
라. 복분자애플을 이용한 가공식품의 개발	144
마. 복분자분말을 이용한 가공식품의 개발	154
제 3 절 복분자술의 생리활성물질의 단리, 정제, 구조결정, 생성기구 해명 및 품질평가지표 확립	164
1. 복분자술의 생리활성물질 단리·정제	164
가. 생리활성물질의 추출 및 농축	164
나. 추출물의 용매분획	165
다. 생리활성물질 단리·정제	166
라. 고찰	188
2. 복분자술의 생리활성물질 구조결정 및 활성 평가	189
가. 생리활성물질 구조결정	189
3. 복분자술의 제조공정에 따른 생리활성물질의 생성기구 해명 및 품질평가지표 확립	238
가. 단리된 화합물들의 추가 구조결정	238
나. 단리·구조결정된 화합물	267
다. 복분자와 복분자 와인의 Chemical Profile 작성·비교	272
라. 복분자 추출물의 미생물에 의한 성분 변화 실험	310
마. 쥐 혈장에 복분자 및 복분자 와인 추출물들의 첨가에 의한 산화억제효과 평가	315
바. 복분자와 복분자 와인 투여 쥐 혈장의 피산화성 비교·검토	330
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	339
제 1 절 연구목표 달성도	339

제 2 절 관련분야에의 기여도	341
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	342
제 1 절 추가연구의 필요성	342
제 2 절 기업화 추진 방안	342
제 6 장 참고문헌	343

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발과제의 목적

Berry류인 복분자는 미네랄 중에서 칼륨성분을 다량 함유하고 있으며, 다양한 비타민류를 비롯하여 항암성의 안토시아닌, 시스토크테롤, 탄닌, 폴리페놀 등의 유용한 성분이 다량 함유되어 있어 미국, 유럽 등지에서는 연구개발이 심도 있게 이루어지고 있으며, 건강식품으로써 애용되고 있을 뿐만 아니라 약용성 건강보조식품 등으로 제조되어 판매되고 있다. 이러한 우수성이 국내에서도 널리 알려져 웰빙 식품으로서 인기를 끌고 있다. 그러나 조급하게 개발된 상품은 질적인 저하를 가져오고 국내산 berry류인 복분자와 그 가공품의 판매량 증가에 부정적인 영향을 미치고 있다. 따라서 복분자의 체계적인 연구를 통하여 복분자의 고유의 기능성을 유지하면서 소비자들의 기호에 적합한 상품을 개발하고자 한다.

첫 번째로 현재 생산되는 복분자의 소모는 대부분이 복분자술을 제조하는데 사용되고 있고 복분자술 생산업체들은 완숙된 복분자 열매를 사용하여 이미 개발 판매되는 효모에 의존된 발효기법으로 복분자술을 제조하고 있다. 따라서 복분자술의 품질 개선이 필요한데, 본 연구에서는 복분자를 성숙시기별로 채취하여 천연 발효시킨 후, 우수효모 분리 및 동정을 하고 우수 균주를 사용하여 **최적발효조건을 확립**하고 복분자술을 제조하는 공정에 있어서 **표준화**를 이루고 한약재를 사용하여 **자양강장 및 숙취해소가 강화된 복분자술**을 제조하고자 한다.

두 번째로 날로 증가하고 있는 복분자 재배 및 생산량을 고려하여 과잉생산에 대비하여 성숙 시기별 복분자를 이용하여 가공식품 개발에 이용할 **기능성 식품 소재를 개발**하고 애플, 음료, 과립 등의 가공식품을 개발하고자 한다.

그리고 세 번째로 『성숙 시기별』 복분자로부터 생물활성 검증을 통하여 복분자의 기능성을 규명함으로써 복분자술 및 복분자 가공식품의 **상품성 향상과 관련 사업의 활성화**를 도모하고자 한다.

제 2 절 연구개발과제의 필요성

New millenium 시대에 들어 인간 GENOM의 유전자 서열이 무려 2만 4천 - 4만으로 알려지면서 생명공학의 시대가 급진적으로 가속화되고 있다. 이에 따라 생명 공학은 인간 생활 여러 분야에서 해야 할 일이 많아졌고 그 중 농업 생명공학 기술에 대한 기대는 향후 인류의 생존문제를 결정하는 과제가 되었다. 현재 WTO

출범, UR협상 체결 등 급속히 변해 가는 국제농업 환경변화에 따라 우리나라의 농산물분야도 생존을 위한 경쟁력 제고가 절실했다. 이러한 당연한 문제를 극복하는 방법으로 특용작물 재배는 농가에게 고소득을 보장해 주는 해결방안 중 하나이다. 특히, 복분자는 이러한 어려운 상황을 극복하기 위한 대체작물로서 농민들에게 인식 되어 많은 농가에서 재배되고 있다.

복분자는 미네랄 중에서 칼륨성분을 다량 함유하고 있으며, 다양한 비타민류를 비롯하여 시력향상, 기억력증진, 혈관보호, 관절염 완화, 항궤양 기능을 갖는 안토시아닌, 강심, 이뇨, 담즙분비를 촉진하는 시스토스테롤, 독성성분의 체내 흡수를 막는 탄닌성분, 항암효과, 노화억제, 동맥경화 예방하는 폴리페놀 등의 유용한 성분이 다량 함유되어 있다. 또한 한방에서 복분자는 기미가 평(平)하고 감산(甘酸)하며 귀경은 간(肝), 신장(腎), 비장(脾臟)으로 되어 있고 강장제, 강정제, 보간(補刊)의 요약으로서 귀한 약으로 알려지고 있다. 그렇기 때문에 유사생약을 혼입시키는 경우가 허다하다. 신체허약, 양위, 유정(遺精), 빈뇨(瀕尿)등에 실용되는 약물이다. 고서에는 "복분자란 남자의 정력을 도와서 쟁반을 뒤엎을 정도로 힘이 좋아진다고 하는 데서 붙은 이름으로서, 여자의 불임증을 고치고 간을 보해서 눈이 밝아지며 기운이 솟아 몸이 가뿐하고 머리털이 검게 된다." 고 말하고 있다.

복분자는 이러한 기능적인 측면뿐만 아니라 관능적 측면에서도 우수하기 때문에 음료, 과자류 등의 다양한 식품으로서 개발이 기대되고 있다. 반면 현재 복분자 열매를 이용하여 가공된 식품이 일부 판매되고 있으나 소재 개발의 미비성 및 기술개발의 역부족, 소비자의 기호도 다양화 등으로 인하여 복분자 소비증가에 많은 도움을 주지 못하고 있는 실정이다.

따라서 복분자의 가공적 특성 변화에 따른 전반적인 영양학적 특성, 이들 성분의 상호간의 작용에 의해 일어나는 복합적 작용 등에 관한 체계적인 연구를 통하여 원천적인 소재 개발 및 기술개발을 통하여 복분자술을 제조함에 있어서 표준화를 이룰 뿐만 아니라 식품차원의 효용가치를 확대하고 개발된 식품의 상품적 가치를 증가시켜 지방 자치제의 시대를 맞이하여 지자체 활성화를 기하고 국제 경쟁력을 갖춘 상품 개발이 요구되고 있다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발 현황

복분자(berry류)의 용도로는 식용 및 약용 등으로 사용되고 있는데 특히 열매는 식용 및 청량 음료원료로 이용되고 있고 밀원자원으로도 이용되고 있다. 식품분야의 연구결과를 보면 이미 복분자 열매에는 안토시아닌의 함량이 포도보다 훨씬 많은 함량이 존재함이 밝혀졌다.

한국농촌경제연구원부설 농림수산물기술관리센터 연구과제에서 홍재식 등(1995)은 복분자주 제조기술에 대하여 연구한 바 있고, 해양수산부의 정영철 등(1998)은 복분자를 첨가한 멸치 발효 액화물 가공식품을 개발하였으며 고려대 양성우 등(2004)은 위염과 위궤양의 일차적 발병인자로 알려진 *Helicobacter pylori*의 생육을 억제하는 물질을 분리하였다.

중앙대학교 김광호 등(2000)은 복분자의 탄닌화합물의 항산화 작용을 보였다. 상품화에는 전국적으로 선운산 복분자주를 비롯하여 30여개의 업체가 복분자주를 제조하여 판매하고 있으며, (주)일화에서는 복분자 음료, (주)농본에서는 복분자 농축액, 근화제약, 동성제약 등에서 복분자추출물을 이용하여 누에분말을 주성분으로 하여 정력제를 제조하여 판매하고 있다.

한편 국외에서는 미국의 경우 Oregon Fruit Products에서 berry류의 대량생산과 체계적인 관리로 전세계적인 물량을 공급하고 있으며, 일본, 유럽의 독일, 핀란드 등지에서도 안토시아닌과 같은 기능성물질로 인하여 건강식으로 인식되어 즐겨 먹을 뿐만 아니라 심도 있는 연구개발을 하여 각종 가공식품으로 제조되어 판매되고 있다.

기능성 식품류와 더불어 미국, 유럽의 국가들의 연구개발로 berry류의 복분자 우수성이 국내에서도 널리 알려져 웰빙식품으로써 인기를 끌고 있다. 그러나 조금 하게 개발되어 판매되는 상품은 질적인 저하를 가져오고 이러한 환경 하에 개발 판매되고 있는 복분자 가공식품은 소비자들에게 부정적인 영향을 초래하게 된다. 지속적인 연구를 거치지 않은 국내산 berry류인 복분자와 그 가공품의 개발은 향후 시장의 미래를 어렵게 하고 있다. 따라서 복분자에 대한 좋은 호감도를 지속적으로 유지할 수 있도록 복분자의 체계적인 연구 및 홍보가 요구되고 있다.

제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발에서 차지하는 위치

국내에서 현재 시판되고 있는 전통주 및 대중주를 살펴보면 인체에 이로운 한약재와 같은 첨가물을 추가하는 기술의 수준이다. 복분자 열매의 특성을 최대한으로 살린 복분자 발효주의 개발 (생리활성물질 단리·정제, 생리활성물질 구조결정 및 활성평가, 제조공정에 따른 생리활성물질의 생성기구 해명 및 품질평가지표 확립)이 기존 민속주 및 전통주 제조장의 기술발전에 기여하게 될 것이며, 새로운 식품소재 및 가공기술 개발은 농산물 등을 이용하여 가공제품을 제조하는 관련 산업체에 기초기술 자료를 제공하게 되어 천연물 가공기술 발전에 기여하게 될 것이다.

1. 고품질의 발효 복분자술의 개발

1990년 이전까지는 소주, 맥주가 대표하는 술 시장에 그나마 명맥을 유지해 가는 농주(막걸리) 및 약주가 민속주의 전부였는데 90년대 이후 농림부의 민속주 개발로 우리 고유의 전통주들이 탄생하게 되어 현재 약100여 군데에서 민속주 및 전통주를 생산하고 있다. 전통주 및 민속주를 주조할 수 있는 주조 기술자들이 부족한 탓에 좋은 술을 만들기란 쉬운 일이 아니었으며 각 제조장의 노력으로 몇몇 전통주 및 민속주들이 개발되었으며, 복분자술도 그중 하나이다. 그러나 복분자술의 생산업체들은 완숙된 복분자 열매를 사용하고 있으며, 또한 발효주에 사용되는 *Saccharomyces* 속종에서 널리 알려져 있고, 사용되고 있는 대표 종으로 *S. cerevisiae*의 발효기법으로 복분자술을 제조하고 있어 천연 복분자 발효의 깊은 맛과 향에 있어서 만족스럽지 못한 측면이 있다.

따라서 최적의 발효 조건 및 제조공정(배합공정)의 표준화를 수립한 후 복분자를 채취하여 천연효모를 투여하여 발효주를 제조함으로써 복분자의 고유한 술 맛과 향이 그윽한 고품질의 복분자술을 개발하게 될 것이다.

2. 복분자술의 생리활성물질 단리·정제

복분자술은 그 주원료인 복분자를 효모발효와 숙성 과정을 거쳐 제품화되어지기 때문에 제조공정을 거치는 동안 원료 중의 내생효소와 효모유래 효소 등의 작용뿐만 아니라 산화·환원 등의 화학적 반응이 수반되어질 것으로 판단된다. 그로 인해 생원료 중에 함유되어 있던 화합물들은 중합·분해되어 전혀 다른 종류의 화합물로 변환되어질 가능성이 매우 높다. 그래서 응용하고 있는 복분자에 함유된 화합물들은 생원료에 함유된 화합물들과 그 조성에 있어 많은 차이를 보일 가능성이 높고, 신규의 기능성 화합물이 함유되어져 있을 가능성 또한 대단히 높을 것으로 판단된다.

3. 새로운 식품소재 및 가공기술 개발

복분자는 기능적인 측면뿐만 아니라 관능성에서도 우수하기 때문에 음료, 과자류 등의 다양한 식품으로서 개발이 기대되고 있다. 그러나 일부 복분자를 이용한 가공된 식품이 판매되고 있으나 기술개발의 부족, 소비자의 기호도, 소재개발의 미비성 등으로 인하여 복분자 소비증가에 거의 도움을 주지 못하고 있는 실정이다. 따라서 복분자 고유의 특성을 유지하면서, 소비자의 기호도에 적합한 복분자 가공식품을 개발하여 제조 판매할 수 있는 새로운 기술 및 식품소재를 개발하게 되고 이러한 기술은 천연물의 산업화 기술발달에 기여하게 될 것이다.

제 3 절 기술개발에 따른 경제·산업적 효과

약화되고 있는 지역농업의 대체작목으로 복분자를 이용한 전통약용 과실주의 담금 방법을 현대 미생물학과 대량생산 및 상품성 향상을 위한 산업차원에서 과학기술의 접목을 통한 제조기술혁신, 품질개선, 기호성 개선 및 저장유통성 증진 기술을 개발함으로써 향토 과실주의 관광 상품화가 가능하며 나아가 대외적으로 경쟁력을 가진 보건 기능성 토종과실주의 제품화가 가능할 것이다.

우리의 전통주류는 우리 농산물을 이용하여 제조하는 우리만의 고유 양조기호 식품이므로 원료를 생산하는 농민의 소득향상은 물론 활로를 찾지 못하는 농촌 경제에 고용창출 효과가 기대되며, 전통식문화의 계승발전과 우리 고유 국산과실주의 명맥을 이어갈 것이다.

1. 복분자 생산농가 및 가공업체 소득 증대에 이바지한다.

새로운 발효기술 개발에 의해 제조된 복분자술은 기호도와 기능성을 고루 갖춘 고품질의 전통 민속주로서 국민 건강을 위한 틈새시장을 공략하고 복분자의 건강 가공식품의 개발은 현대인의 건강에 대한 관심이 날로 증가함에 따라 그 시장성은 점점 증가하게 되어 관련농가 및 가공업체의 소득증대에 이바지하게 될 것이다.

2. 지자체의 활성화에 도움이 될 것이다.

대체 작물로 새롭게 부각되는 복분자의 활용기술 개발은 국가적으로 농산물의 가공기술 수준을 한 단계 향상시킴으로써 각 지역의 관련 산업 발전을 통해 지자체 활성화에도 큰 힘이 될 것이다.

3. 한국을 대표하는 국제 경쟁력을 갖는 브랜드 개발에 일조한다.

외국산 포도주의 경우에 생산된 지역, 계절, 수확시기, 숙성, 제조방법 등에 따라 상품이 분류되어 있으며, 이러한 제품의 품질관리는 국제적인 경쟁력을 갖게 하여 전 세계적인 브랜드를 갖는 포도주의 개발을 가능하게 하고 있다. 그러나 소주, 맥주가 국민주 아닌 국민주로 대변하면서 외국 출장에서 돌아오면 최고의 선물이 양주가 되어 버린 것을 인정하지 않을 수 없다. 이는 국내에서 국제적으로 통할 수 있는 유명하고 전통 있는 민속전통주가 없다는 사실이고 이에 따라 좁은 국내 시장을 고려할 때 상품개발은 한계를 벗어나지 못하고 있다는 것이다. 따라서 이러한 원천적인 기술 개발은 수많은 양주 수입을 줄일 수 있을 것이며, 국제적 명성을 갖는 브랜드의 개발에 일조를 하여 전 세계적으로 수출하여 무한한 시장성을 갖게 하는 데에 도움이 될 것으로 확신한다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 고품질 복분자술 제조를 위한 새로운 발효기술 개발 및 제조공정 표준화 (제1세부과제)

1. 우수 발효효모 개발에 의한 발효기술 확립

가. 복분자술 발효 우수효모 선정

1) 재료 및 방법

가) 복분자

2005년 07월 전남지방에서 복분자를 구입하여 효모선별과 자연발효에 이용하였으며, 복분자 과실 착즙액을 sampling 하여 성분분석을 실시하였다.

나) 효모분리

복분자를 500L 탱크에 넣고 25℃에서 30일간 부패시킨 후 부패된 복분자에서 야생효모를 순수 분리하였다. 시료 중의 미생물군으로부터 효모만을 선택적으로 분리하기 위하여 YPD agar[yeast extract 1%(w/v), peptone 2%, glucose 2%, agar 2%]를 이용하였다. 즉, 시료를 YPD agar에 약 100~1000여 개의 colony가 형성되도록 평판도말한 후 30℃에서 48시간 정치배양한 다음 colony를 계대배양하여 순수분리하였고, 순수 분리된 효모는 4주에 한번씩 계대배양하면서 냉장보존(5℃)하며 사용하였다.

다) 효모선별

분리된 균주를 평판배지에 도말하여 48시간 다시 배양하고, 독립된 colony를 분리한 후 알코올내성, 에탄올 첨가 배지에서의 발효능, 에탄올 생성능을 측정·비교하여 선별하였다. **알코올 내성**은 YPD agar를 멸균한 후 95% 에탄올을 최종 에탄올 농도가 12%가 되도록 첨가하여 고체배지를 만들고 균주를 접종하여 30℃에서 48시간 배양시킨 다음 성장여부를 측정하였고, **에탄올 첨가 배지에서의 발효능**은 YPD broth에 에탄올 12%(v/v)를 첨가한 배지 10ml를 15ml cap tube에 넣고 Durham fermentation tube를 넣어 30℃에서 CO₂ 기포가 형성되는지 관찰하였고, **알코올생성능**은 300ml 삼각플라스크에 알코올생성능측정배지(malt extract 1%, glucose 25%, peptone 2%, pH 4.5)

100ml를 분주하여 121℃로 15분간 살균한 후, 균주를 각각 접종하고 진탕인큐베이터에서 30℃, 7일 동안 배양하였다. 배양액을 원심분리, 여과하여 그 액을 GC (gas chromatograph, Hewlett Packard 5890)에서 알코올 함량을 측정하고 알코올 생성능이 높은 균주를 선별하였다. 칼럼은 80/120 Carbopack B on 5% Carbowax 20M(3m×4mm)으로 oven 온도 60℃, 주입온도 250℃였고, 60℃에서 195℃까지 분당 5℃의 속도로 온도를 상승시켰다. 운반기체로는 N₂를 사용하였다. 검출기는 FID를 사용하였고 에탄올의 함량은 외부표준법으로 정량하였다.

라) 효모 동정

분리된 효모중 알코올내성과 알코올생성능, 발효능이 우수한 균주를 BUY agar에 접종한 후, 26℃에서 24시간, 48시간, 72시간 배양하여 automatic reader로 분석하여 Data Library와 비교분석하여 동정한다.

2) 결과 및 고찰

가) 복분자, 복분자 착즙액, 복분자 발효액의 성분분석

복분자 열매의 성분분석은 표1~4와 같다. 일반성분 분석 결과 당과 단백질 함량이 가장 높았으며, 무기성분은 칼륨, 마그네슘, 나트륨순으로 나타났고, 복분자 열매의 신맛은 유기산중 가장 많은 양을 나타낸 구연산이 결정하는 것으로 생각된다. 복분자 과실 착즙액을 sampling 하여 성분분석을 실시한 결과는 다음 표5와 같다. 착즙액 중 수분함량이 가장 높았으며, 조섬유, 조단백질, 조회분, 조지방순으로 함량이 많이 나타냈다.

표 1. 복분자 열매의 일반성분

총당	환원당 (포도당,과당,맥아당)	조단백질	조지방	조섬유	조회분
17.3	8.6	10.6	3.1	3.9	4.5

표 2. 복분자 열매의 유리당 함량 (unit : %)

자당	과당	포도당
1.52	3.98	1.24

표 3. 복분자 열매의 유기산 함량 (unit : %)

과루빈산	수산	말론산	푸마르산	호박산	사과산	구연산
0.04	6.29	0.08	0.01	0.21	1.94	10.2

표 4. 복분자 열매의 무기성분 함량 (unit : ppm)

K	Mg	Na	Ca	Mn	Fe	Cu
38,789	6,857	3,122	2,415	1,150	70.3	4.4

표5. Sample의 성분분석 (unit : %)

항목	시료명	복분자 과실 착즙액	비 고
	용해성 고형물	7.7±0.1/7.2±0.1	
	산 도	1.44±0.01	
	수 분	72.4±2.43	
	조회분	1.01±0.04	
	조지방	0.087±0.001	
	조단백질	2.58±0.15	
	조섬유	10.83±0.23	
안토시아닌 색소	최대흡수 파장	516.0	
	흡광도	0.383	
색소성분	Cyanidin	516.0	단위 : ppm
	Peonidin	0.383	"

나) 효모의 분리 및 선별

복분자술 제조에 적합한 야생효모를 획득하기 위하여, 부패시킨 복분자를 이용하여 20개의 균주를 순수분리 하였으며, 표6과 같이 20개의 분리주에 대하여 알코올 내성, 알코올이 첨가된 배지에서의 발효능, 알코올 생성능을 조사하였다. 12%의 에탄올 존재하에 성장을 보인 7균주중 6%의 이상의 에탄올을 생성하는 균주는 Y-1, Y-4, Y-19 세 균주뿐이었고, 나머지는 최저 1.54%를 비롯해 대부분 6% 이하의 낮은 에탄올량을 생산하는 것으로 나타났다. 또한 에탄올 내성을 보이는 균주 6종 중에서 높은 알코올 생성능을 나타낸 균주 역시 Y-1, Y-4, Y-19 세 균주였다. 따라서 알코올 내성이 높고, 알코올 존재하에서 발효능이 우수하며, 알코올 생성능이 좋은 Y-1, Y-4, Y-19 세 균주를 선별하였다.

표 6. 복분자로부터 분리한 효모의 발효특성

Strains No.	Fermentation in 12% ethanol	Ethanol tolerant	Alcohol (%)
Y-1	+	+	8.75
Y-2	-	-	2.49
Y-3	-	-	4.09
Y-4	+	+	9.36
Y-5	-	-	5.05
Y-6	+	-	3.55
Y-7	-	-	5.87
Y-8	-	-	1.54
Y-9	+	-	5.85
Y-10	-	-	4.21
Y-11	-	+	6.08
Y-12	-	-	3.80
Y-13	-	-	4.98
Y-14	+	+	5.13
Y-15	-	-	3.11
Y-16	+	-	4.66
Y-17	-	-	5.42
Y-18	-	-	5.30
Y-19	+	+	7.76
Y-20	-	+	6.14

다) 효모균주의 동정

최종적으로 선발된 Y-1, Y-4, Y-19 세 개의 야생효모 분리주를 동정하였다. 현미경에서의 관찰과 배양특성, 당발효능, 다양한 탄소원과 질소원을 이용

한 생존여부 등을 조사하고, 표7~9에 요약하였다. 표7~9에 나와있는 결과를 토대로 하여 분류동정기준에 따라 상기효모들을 동정한 결과 Y-1, Y-19는 *Saccharomyces cerevisiae*, Y-4는 *Saccharomyces ellipsoideus*로 동정되었다 (표10).

표 7. 분리된 균주의 형태학적 특성

	Yeast isolates		
	Y-1	Y-4	Y-19
Color	creamy	creamy	
Surface	smooth	smooth	smooth
Elevation	slightly raised	slightly raised	slightly raised
Surface membrane	Absent	Absent	Absent
Sediment	Present	Present	Present
Cell shape	globose	ellipsoidal	globose
Ascospore shape	globose to ellipsoidal	globose to ellipsoidal	globose to ellipsoidal

표 8. 분리된 균주들의 탄소화합물 발효

Carbon compounds	Characteristics	yeast isolates		
		Y-1	Y-4	Y-19
Cellobiose	Gas formation	-	-	-
	Acid production	-	-	-
Raffinose	Gas formation	+	+	+
	Acid production	+	+	+
Melibiose	Gas formation	-	-	-
	Acid production	-	-	-
Xylose	Gas formation	-	-	-
	Acid production	-	-	-
Mannose	Gas formation	+	+	+
	Acid production	+	+	+
Galactose	Gas formation	+	+	+
	Acid production	+	+	+
Glucose	Gas formation	+	+	+
	Acid production	+	+	+
Lactose	Gas formation	-	-	-
	Acid production	-	-	-
Sucrose	Gas formation	+	+	+
	Acid production	+	+	+
Fructose	Gas formation	+	+	+
	Acid production	+	+	+
Ribose	Gas formation	-	-	-
	Acid production	-	-	-
Maltose	Gas formation	+	+	+
	Acid production	+	+	+

표 9. 분리된 균주들의 탄소원, 질소원을 이용한 생육여부

Carbon or nitrogen compounds	yeast isolates		
	Y-1	Y-4	Y-19
Ethanol as sole carbon source	+	+	+
Nitrate as sole Nitrogen source	-	-	-
Ethylamine	-	-	-
Cellobiose	-	-	-
Raffinose	+	+	+
Melibiose	-	-	-
Mannose	+	+	+
Citric acid	-	-	-
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Lactose	-	-	-
Sucrose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Ribose	-	-	-
Mannitol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
inositol	-	-	-
Maltose	+	+	+

표 10. 분리된 균주들의 동정

yeast isolates	Identify	Strain designation
Y-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-1
Y-4	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> Y-4
Y-19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-19

나. 우수효모를 이용한 복분자술 발효조건 확립

1) 재료 및 방법

가) 우수효모를 이용한 복분자술 제조 및 성분분석

복분자 발효는 다음과 같이 실시하였다. 복분자 생과에 sucrose를 가하여 최종 당농도가 20%가 되도록 하였으며, 발효기질 1000ml당 YM broth (Difco, USA)에 배양시킨 각각의 효모 배양액을 2%수준으로 접종한 다음, 28℃~30℃ 발효조 탱크에서 30일간 발효시켰다. 각 조건변화에 따른 발효수율과 발효력을 측정하고, 알코올 함량, 당도, pH 변화와 기호도 평가를 기준으로 발효조건을 확립하였다.

나) 관능검사

잘 훈련된 10명의 관능요원들에게 향기를 맡게하였으며, 관능검사 평가항목은 종합적인 기호도에 대하여 5단계 평점법으로 실시하였고, 그 평균값으로 유의성차이를 DMRT 검정으로 실시하였다.

2) 결과 및 고찰

가) 우수효모를 이용한 발효조건 확립

(1) Y-1를 이용한 복분자술 제조

효모 Y-1를 이용하여 복분자 열매를 30일간 발효시켜 복분자술을 제조하였으며, Y-1를 이용한 복분자술의 pH, 당도, 알코올변화는 표11, 그림1와 같다.

표 11. Y-1을 이용한 복분자 발효시 pH, 당도, 알코올 함량 변화

	초기	3일	6일	9일	12일	15일	18일	21일	24일	27일	30일	종료
pH	3.80	3.82	3.83	3.86	3.90	3.92	3.93	3.99	4.02	4.03	4.05	4.08
당도	20.0	18.6	14.8	11.5	9.0	20.0	18.8	17.2	16.2	15.5	15.0	13.5
알콜분	-	-	5.0	7.6	10.0	11.0	13.5	13.7	14.5	15.8	17.0	18.6
비고	12일째 되는 날 brix가 9.0로 되어 보당하여 20brix 까지 올림.											

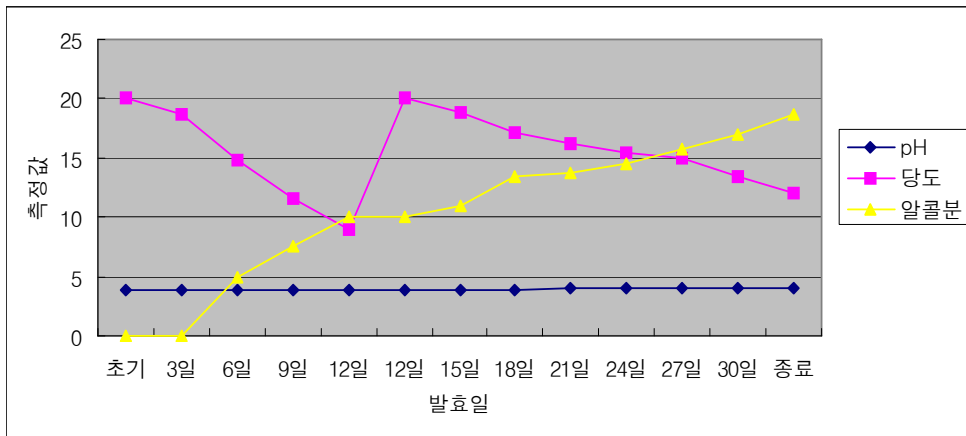


그림 1. Y-1을 이용한 복분자 발효시 pH, 당도, 알코올 함량 변화

(2) Y-4을 이용한 복분자술 제조

효모 Y-4를 이용하여 복분자 열매를 30일간 발효시켜 복분자술을 제조하였으며, Y-4를 이용한 복분자술의 pH, 당도, 알코올변화는 표12, 그림2과 같다.

표 12. Y-4을 이용한 복분자 발효시 pH, 당도, 알코올 함량 변화

	초기	3일	6일	9일	12일	15일	18일	21일	24일	27일	30일	종료	
pH	3.80	3.82	3.85	3.86	3.90	3.94	3.96	4.01	4.03	4.05	4.12	4.12	
당도	20.0	16.0	13.0	9.5	20.0	18.5	16.5	16.0	15.2	14.8	12.5	12.5	11.0
알콜분	-	-	6.5	10.0	11.0	12.4	14.6	16.2	17.3	18.2	19.2	19.3	
비고	9일째 되는 날 brix가 9.5로 되어 보당하여 20brix 까지 올림.												

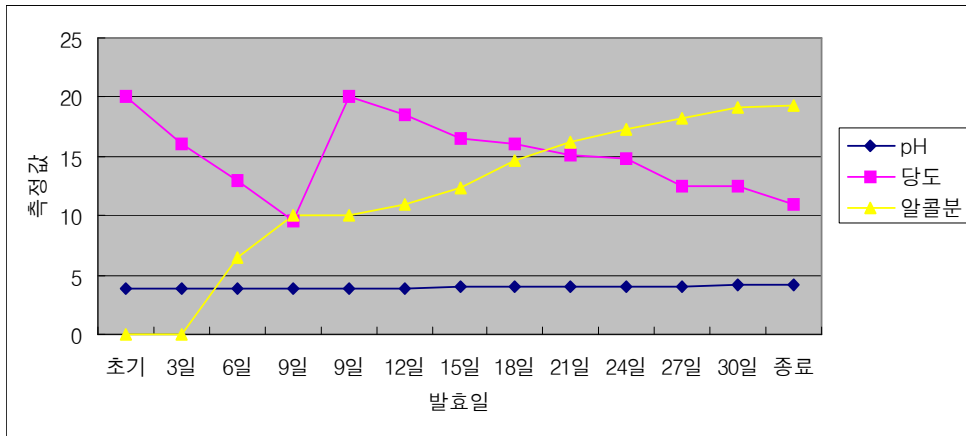


그림 2. Y-4을 이용한 복분자 발효시 pH, 당도, 알코올 함량 변화

(3) Y-19를 이용한 복분자술 제조

효모 Y-19를 이용하여 복분자 열매를 30일간 발효시켜 복분자술을 제조하였으며, Y-19를 이용한 복분자술의 pH, 당도, 알코올변화는 표13, 그림3와 같다.

표 13. Y-19를 이용한 복분자 발효시 pH, 당도, 알코올 함량 변화

	초기	3일	6일	9일	12일	15일	18일	21일	24일	27일	30일	종료
pH	3.80	3.80	3.81	3.81	3.83	3.85	3.89	3.91	3.93	3.94	3.97	4.01
당도	20.0	19.6	18.4	16.6	12.2	9.8	20.0	17.5	16.8	15.8	13.6	13.0
알콜분	-	-	2.4	3.5	6.8	9.6	12.0	12.8	14.2	16.3	16.5	16.6
비고	15일째 되는 날 brix가 9.8로 되어 보당하여 20brix 까지 올림.											

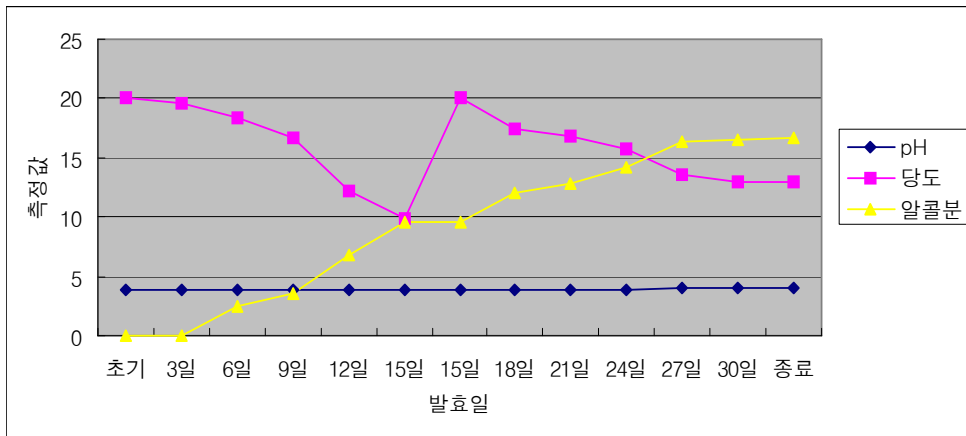


그림 3. Y-19를 이용한 복분자 발효시 pH, 당도, 알코올 함량 변화

(4) 양조용 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 복분자술 제조

대조구로서 현재 복분자술 제조에 가장 많이 이용되고 있는 양조용 *S. cerevisiae*를 이용하여 복분자술을 제조하여 30일간 발효하면서 표14과 그림 4와 같이 pH, 당도, 알코올분의 변화를 측정하였다.

표 14. *S. cerevisiae*를 이용한 복분자 발효시 pH, 당도, 알코올 함량 변화

	초기	3일	6일	9일	12일	15일	18일	21일	24일	27일	30일	종료
pH	3.80	3.80	3.81	3.82	3.86	3.88	3.91	3.94	3.96	3.99	4.00	4.01
당도	20.0	19.0	16.8	14.6	11.2	9.5 20.0	17.0	16.2	14.8	14.2	13.6	13.5
알콜분	-	-	3.0	5.2	8.8	10.0	12.5	13.2	15.5	16.3	16.8	17.5
비고	15일째 되는 날 brix가 9.5로 되어 보당하여 20brix 까지 올림.											

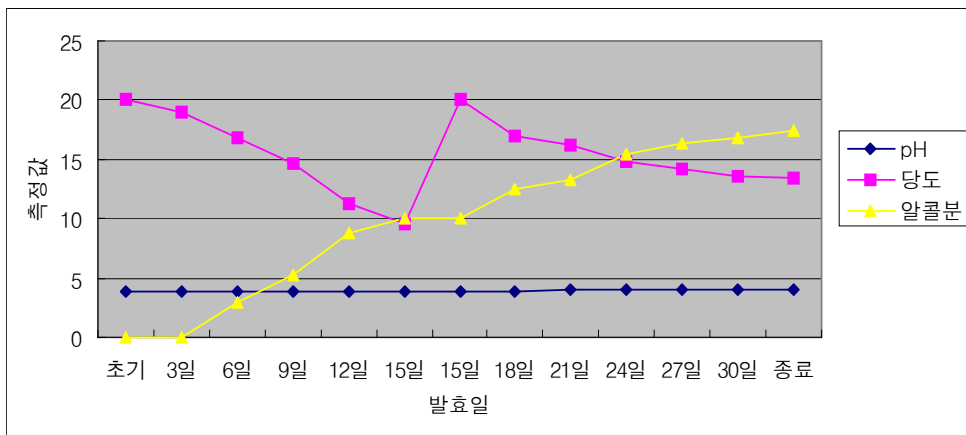


그림 4. *S. cerevisiae*를 이용한 복분자 발효시 pH, 당도, 알코올 함량 변화

나) 관능검사

각각 효모를 달리한 복분자술의 관능검사결과 Y-1로 만든 복분자술은 4.21, Y-4로 만든 복분자술은 4.01, Y-19로 만든 복분자술은 3.98이었으며, 대조구인 양조용 *S.cerevisiae*로 제조한 복분자술은 4.00으로 나타났다. 양조용 효모로 제조한 복분자술과 Y-4, Y-19로 제조한 복분자술은 유의적인 차이가 인정되지 않았으며, Y-1은 5% 수준에서 유의성이 인정되었다. 향미는 Y-1로 제조

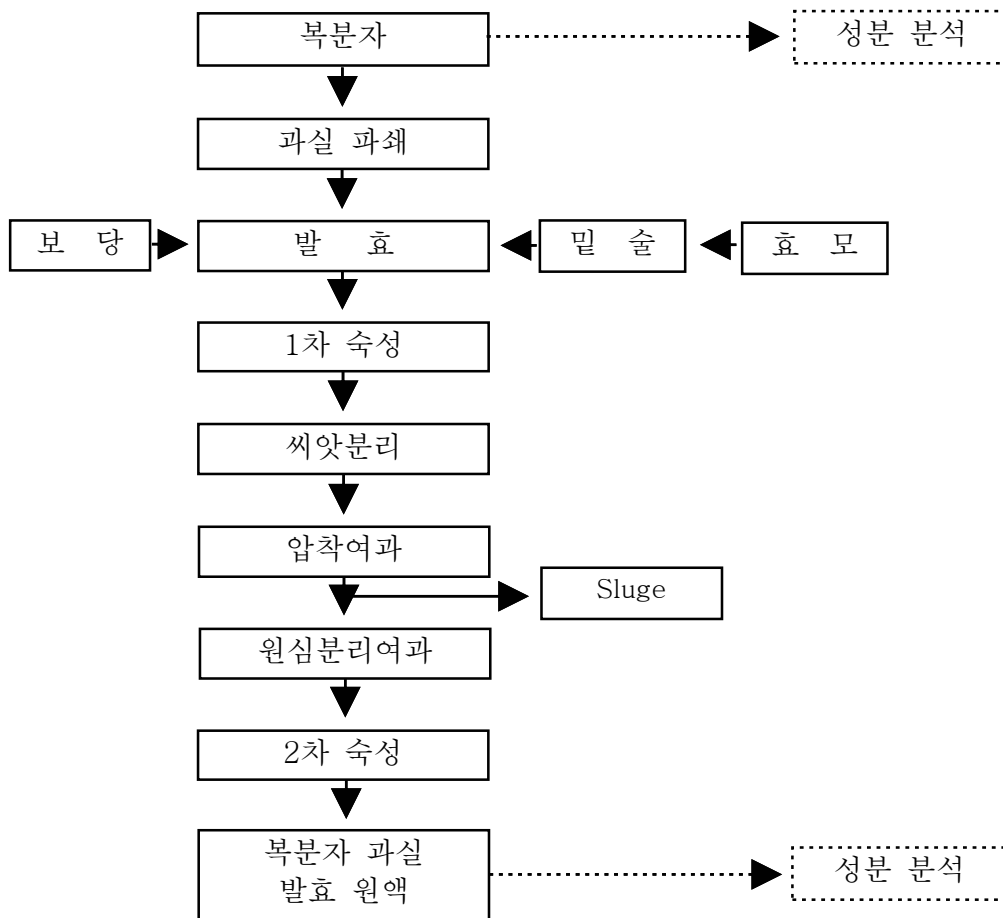
한 복분자술이 가장 높은 점수를 나타냈으며, 신맛은 실험구 모두 대조구와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

다. 제조방법의 표준화 방안설정

1) 선별된 우수 발효효모를 이용한 복분자술 제조 공정의 표준화 방안

가) 복분자술 원액 제조

(1) 공정도



(2) 공정별 상세 설명

(가) 제1공정 : 원료의 선별공정

⇒ 잘익은 복분자를 수확하여 이물질 제거한 복분자를 선별한다.

(나) 제2공정 : 과실 파쇄 공정

⇒ 선별된 복분자는 파쇄기를 사용하여 제경 분쇄한 후 메타중아황산칼륨을 넣어 충분히 교반하여 준다.

(다) 제3공정 : 밀술제조공정

⇒ 제2공정에서 제조된 과즙에 효모를 넣고 발효를 시켜 밀술을 제조한다.

(라) 제4공정 : 발효 공정

⇒ 분쇄된 복분자 과즙에 미리 준비된 밀술을 혼합하고 발효시킨다.

(마) 제5공정 : 1차 숙성 공정

⇒ 발효가 끝나면 최소 60일 이상 숙성시킨다.

(바) 제6공정 : 씨앗 분리 및 압착여과 공정(착즙 공정)

⇒ 발효 및 숙성 공정이 끝난 복분자는 씨앗을 분리하고 압착기를 이용하여 압착여과 한다.

(사) 제7공정 : 원심분리 공정

⇒ 압착 여과로 얻은 발효 원액을 원심분리기를 이용하여 여과한다.

(아) 제8공정 : 2차 숙성 공정

⇒ 1차 숙성공정에서는 복분자 씨앗과 과피가 있는 상태에서 숙성하는 것을 말하며 씨앗과 과피가 있는 상태에서 장기숙성할 경우 맛, 향, 색상이 현저히 떨어지게 되므로 이에 분리 및 여과를 통해 복분자 원액 상태의 2차 숙성을 약90일 동안 소요되며 일반적으로 자연숙성은 9개월 정도 이루어진다. 실험의 단축을 위해 발효조 교반 탱크를 이용하여 숙성도를 활성화시킴.

(자) 제9공정 : 복분자 과실 발효 원액

2. 고품질 복분자술의 최적 발효조건 확립 및 제조기술 확립

1차년도에 복분자로부터 효모를 분리하고 분리된 효모의 발효능을 비교한 결과 *Saccharomyces cerevisiae* Y-1이 복분자 발효에 가장 적합한 것으로 나타났다. 따라서 2차년도에는 *S. cerevisiae* Y-1의 발효능에 대한 안정성을 평가하고, *S. cerevisiae* Y-1를 이용한 복분자 발효조건을 최적화하였다. 또한 1차년도에 확립한 복분자술 제조방법에 따라 에탄올 최적첨가량, 첨가물선정 및 투입량을 결정하고, 최적 여과공정을 확립하여 고품질 복분자술을 개발하였다. 개발된 고품질 복분자술은 물리화학적 특성, 관능평가, 생리효능성 평가에서 우수성을 나타내어 3차년도에는 고품질 복분자술의 사업화가 가능할 것으로 예상된다.

가. 분리효모의 발효능에 대한 안정성 평가

1) 재료 및 방법

가) 균주 및 배지

복분자로부터 분리된 *Saccharomyces cerevisiae* Y-1를 시험균주로 사용하였으며, 효모 배양을 위해서는 20%의 glucose를 함유한 YPD배지를 사용하였다.

나) 실험방법

생육정도는 분광분석기로 660nm에서 흡광도를 측정하였고, 에탄올 정량은 *S. cerevisiae* Y-1의 전배양액을 5% 첨가하여 발효한 후 일반 수증기 증류법으로 측정하였다.

(1) 온도에 대한 효모의 안정성 평가

20%의 glucose를 함유한 pH 5.0 YPD 배지에 효모를 접종하여 배양온도를 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50℃로 달리하고 각각 3일간 배양하고, 생육정도와 에탄올 함량을 측정하였다.

(2) pH에 대한 효모의 안정성 평가

20%의 glucose를 함유한 YPD 배지에 효모를 접종하여 초기 pH를 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0로 달리하여 각각 30℃ 3일간 배양하고, 생육정도와 에탄올 함량을 측정하였다.

(3) 당도에 대한 효모의 안정성 평가

10%, 20%, 30%, 40%, 50%로 glucose 함량이 다른 pH 5.0 YPD 배지에 효모를 접종하고 30℃에서 3일간 배양하고, 생육정도와 에탄올 함량을 측정하였다.

(4) 에탄올에 대한 효모의 안정성 평가

20%의 glucose를 함유한 pH 5.0 YPD 배지에 에탄올을 2~12% 혼합하여 효모를 접종하여 30℃에서 3일간 배양하여 생육정도와 에탄올 함량을 측정하였다.

2) 결과 및 고찰

가) 실험결과

(1) 온도에 대한 효모의 안정성

일반적으로 에탄올 발효에서 효모의 생육온도가 높을수록 초기 에탄올 생성량은 증가하지만 최고 생육온도에서는 생육저해와 함께 급격히 발효력이 떨어지는 것으로 알려져 있다. *S.cerevisiae* Y-1의 온도에 대한 안정성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같이 40℃에서 생육이 가장 좋았고 40℃이상의 온도보다는 40℃이하의 온도에서 더 잘 생육하였다. 에탄올 생성량은 Fig. 2와 같이 13.3%로 30℃가 가장 높은 수치를 나타냈다.

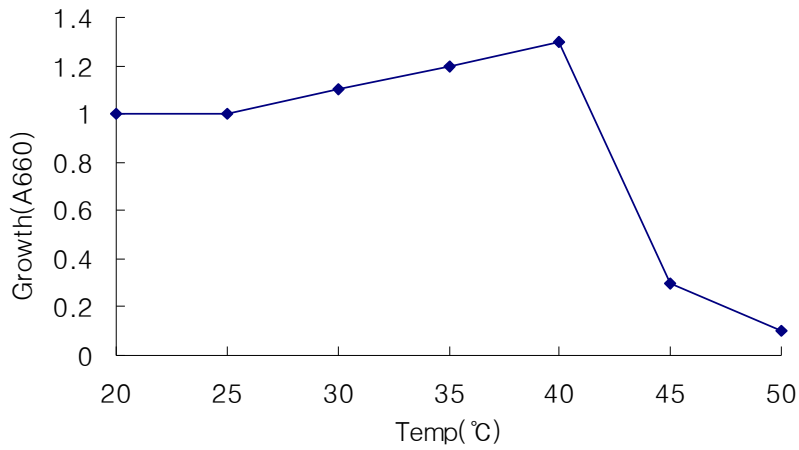


Fig. 1. 온도에 따른 *S.cerevisiae* Y-1 균주의 생육도

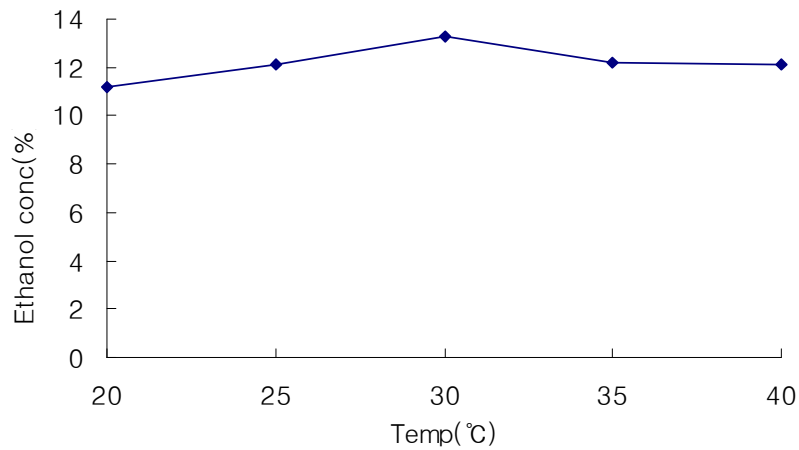


Fig. 2. 온도에 따른 *S.cerevisiae* Y-1이 생성하는 에탄올 함량

(2) pH에 대한 효모의 안정성

YPD 배지의 초기 pH를 3.0에서 7.0까지 각각 조정하여 시험균주의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 5.0에서 생육이 제일 좋았고 중성보다는 산성 영역에서 생육이 양호하였다(Fig. 3). 또한 pH에 따른 에탄올 생성량에서도 Fig. 4와 같이 pH 5.0에서 가장 많은 양을 생성한 것으로 나타났다.

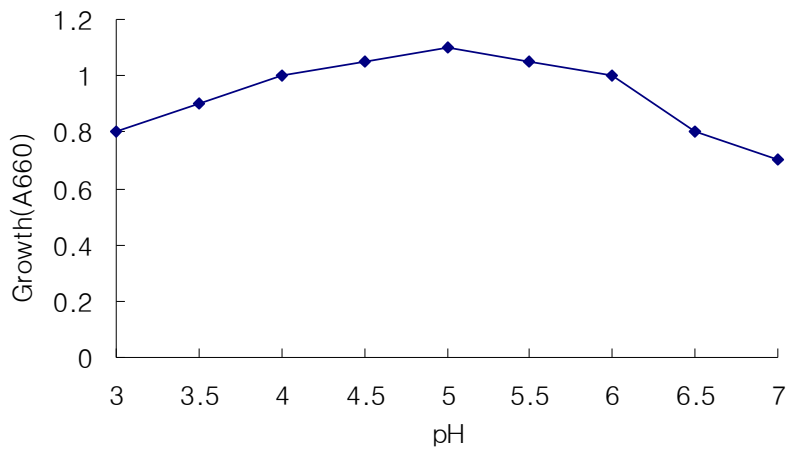


Fig. 3. pH에 따른 *S.cerevisiae* Y-1 균주의 생육도

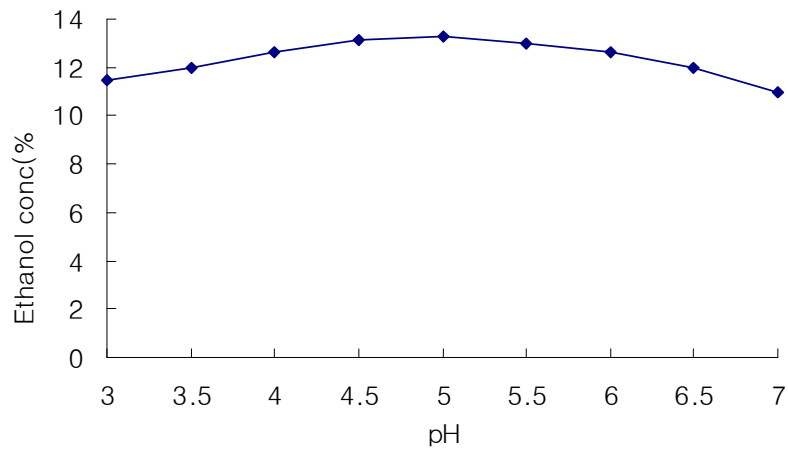


Fig. 4. pH에 따른 *S.cerevisiae* Y-1이 생성하는 에탄올 함량

(3) 당도에 대한 효모의 안정성

당에 대한 효모의 내성은 초기 발효속도와 최종알콜농도에 영향을 주므로 산업적으로 매우 중요하다. 또한 발효시 최적 당도를 결정하는데 중요한 요인이 된다. 따라서 *S.cerevisiae* Y-1의 생육에 미치는 당의 영향을 조사한 결과 Fig. 5와 같았다. 40%의 glucose를 함유하는 YPD 배지에서는 생육을 보

였으나 50%에서는 매우 미약하였으며, 10%일때 가장 좋은 생육정도를 나타냈다. 하지만 에탄올 생성량은 생육이 가장 좋았던 10%보다 20%일때 가장 많은 양을 생성하였다(Fig. 6).

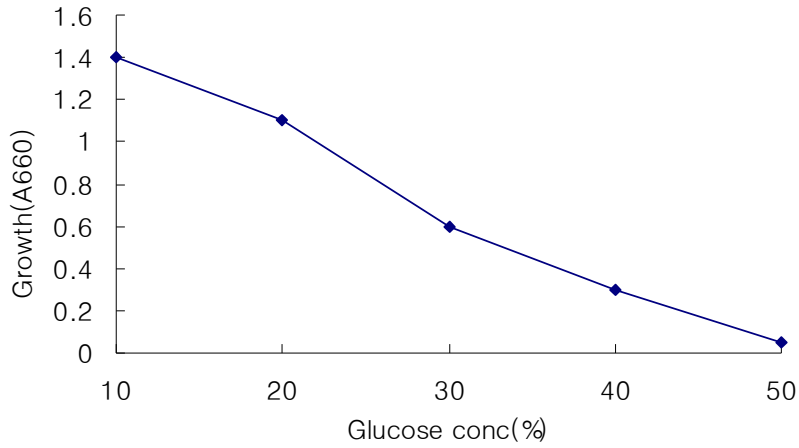


Fig. 5. 당 함량에 따른 *S.cerevisiae* Y-1 균주의 생육도

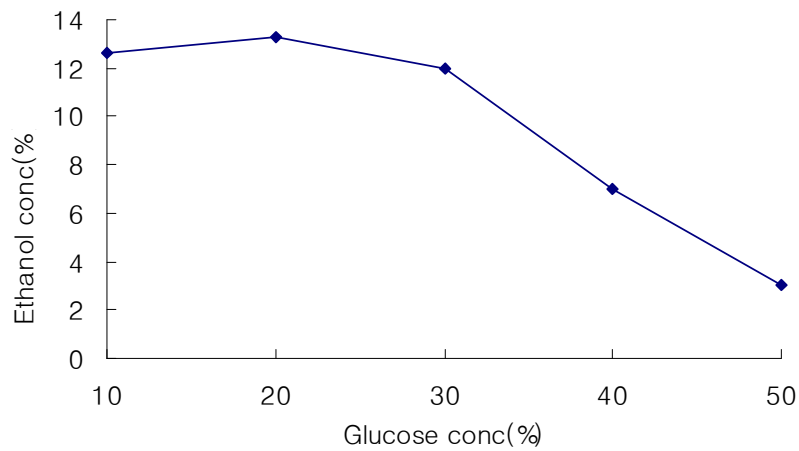


Fig. 6. 당 함량에 따른 *S.cerevisiae* Y-1이 생성하는 에탄올 함량

(4) 에탄올에 대한 효모의 안정성

YPD 배지에 에탄올 함량을 달리하여 생육도를 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. 복분자 발효액으로부터 분리한 균주인 *S.cerevisiae* Y-1는 6% 이상의 에탄올에 내성을 갖기 못하는 일반적인 효모에 비해 다소 높은 에탄올 내성을 나타냈으며 10%이상의 에탄올에는 내성이 거의 없는 것으로 나타났다.

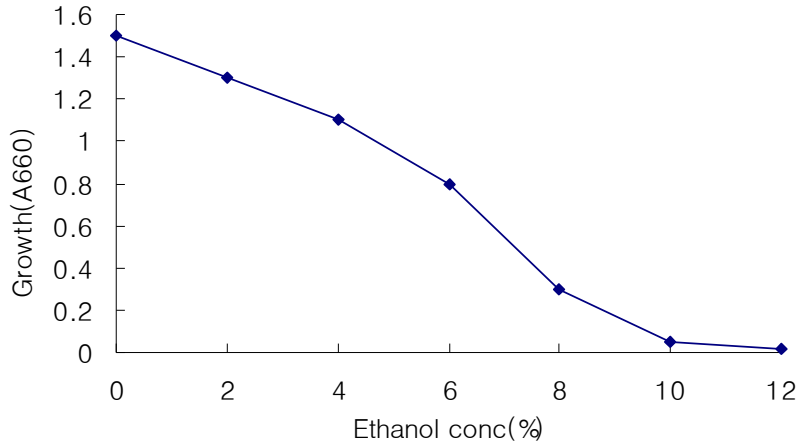


Fig. 7. 에탄올 함량에 따른 *S.cerevisiae* Y-1 균주의 생육도

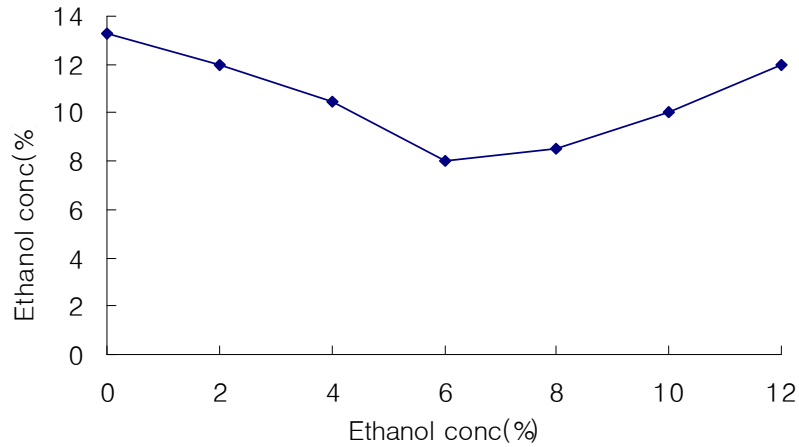


Fig. 8. 에탄올 함량에 따른 *S.cerevisiae* Y-1이 생성하는 에탄올 함량

3) 요약

시험균주 *S.cerevisiae* Y-1은 20~40°C의 온도에서 안정하였고, 30°C일때 가장 높은 생육을 나타냈다. pH 3.0~7.0에서 모두 안정하였으며, 중성보다는 산성에서 더 안정한 것으로 나타났고 pH 5.0의 배지에서 생육정도와 에탄올 생성량이 가장 많았다. 당도에 대한 안정성은 당의 함량이 20%를 초과하는 환경에서는 생육이 현저히 저하되었으며 당 함량이 20%일때 가장 높은 에탄올 생성량을 나타냈다. 또한 *S.cerevisiae* Y-1 균주는 0~8%의 에탄올을 함유하는 배지에서도 생육이 관찰되었다.

나. 고품질 복분자술을 위한 최적발효조건 선정

1) 재료 및 방법

가) 발효조건 최적화

복분자로부터 분리한 *S.cerevisiae* Y-1의 안정성을 토대로 발효온도, 초기 pH, 초기 당도 등 발효조건을 최적화 하였다. *S.cerevisiae* Y-1 균주의 생육이 안정한 범위인 20~40°C에서 복분자 발효에 가장 적합한 발효온도를 결정하고자 발효온도를 각각 20°C, 30°C, 40°C로 달리하여 복분자 발효를 진행한 후 pH, 당도, 알코올 함량변화를 관찰하였고, 초기 pH는 *S.cerevisiae* Y-1이 가장 안정하였던 pH 4.5, pH 5.0, pH 5.5에서 각각 발효하여 pH, 당도, 알코올 함량 변화를 비교하였다. 초기 당도는 *S.cerevisiae* Y-1의 생육이 왕성했던 20%이내에서 최적 초기당도를 결정하고자 각각 10Brix, 15Brix, 20Brix로 달리하여 발효하여 pH, 당도, 알코올 함량 변화를 비교하였다. 또한 각각의 조건 별로 관능평가를 통해 복분자 발효액의 기호성을 비교하였다.

2) 결과 및 고찰

가) 발효온도 최적화

발효온도에 따른 pH 변화는 Fig. 9와 같다. 발효온도가 높을수록 발효 초기에 낮은 pH 값을 나타냈으며 이는 발효온도가 높을수록 효모의 발효작용이 빠른속도로 진행되고 있음을 보여주는 결과이다. 당도변화 역시 온도가 높을수록 효모의 발효작용이 촉진되어 초기 당도가 온도가 높을수록 빠른 소비가 진행됨을 알수 있었다(Fig. 10). 하지만 발효온도가 높을수록 효모의 노쇄화

현상이 빨리 나타나 발효중반 이후 당 소비가 저하되고 알코올 생성이 저조한 것으로 나타났다. Fig. 11에서와 같이 발효 초반 40℃에서 발효한 sample이 많은 알코올을 생성하였으나 발효 중반 이후 알코올 함량에 큰 변화가 없었고, 20℃에서 발효한 sample은 발효가 진행됨에 따라 서서히 알코올 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

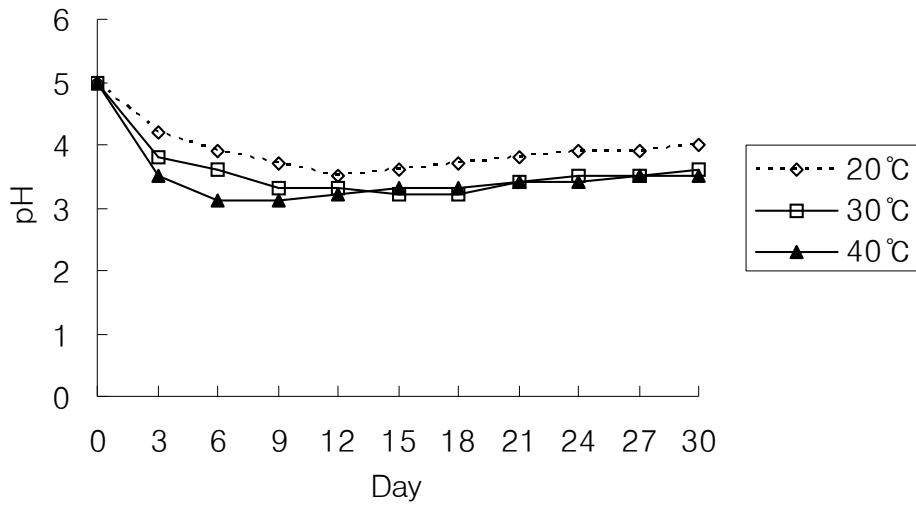


Fig. 9. 발효시 온도에 따른 pH 변화

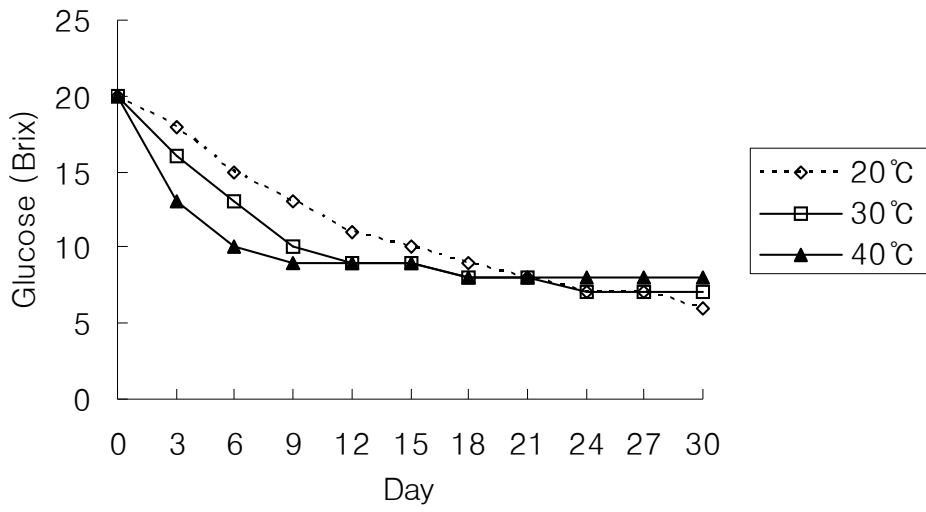


Fig. 10. 발효시 온도에 따른 당도 변화

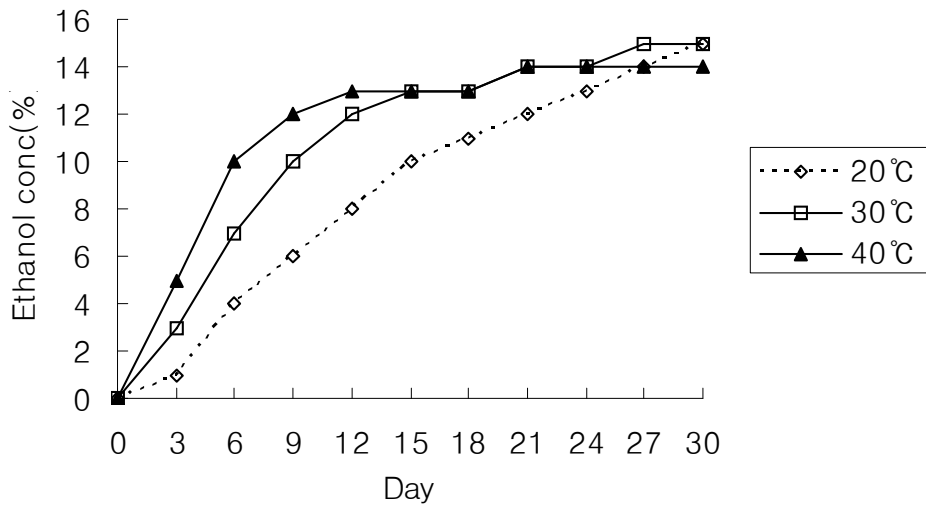


Fig. 11. 발효시 온도에 따른 알코올 함량 변화

나) 초기 pH 최적화

초기 pH에 따른 pH, 당도, 알코올 함량 변화는 Fig. 12~14와 같다. 발효초기 pH 변화는 다소 차이를 보였으나 당도와 알코올 함량에서는 큰 차이가 나타나지 않았다. 하지만 초기 pH는 발효초기 효모에 의한 산생성과 관련되어 있어 발효액의 향미에 관여하는 것으로 판단된다.

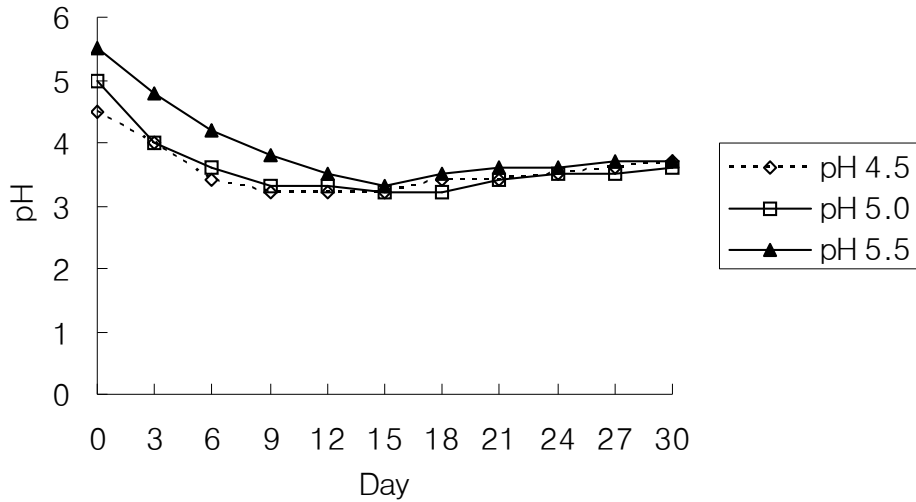


Fig. 12. 발효시 초기 pH에 따른 pH 변화

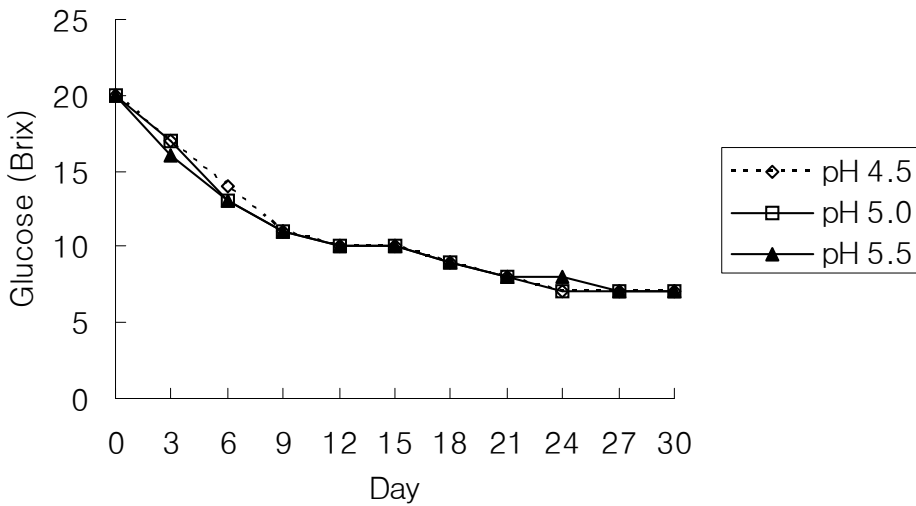


Fig. 13. 발효시 초기 pH에 따른 당도 변화

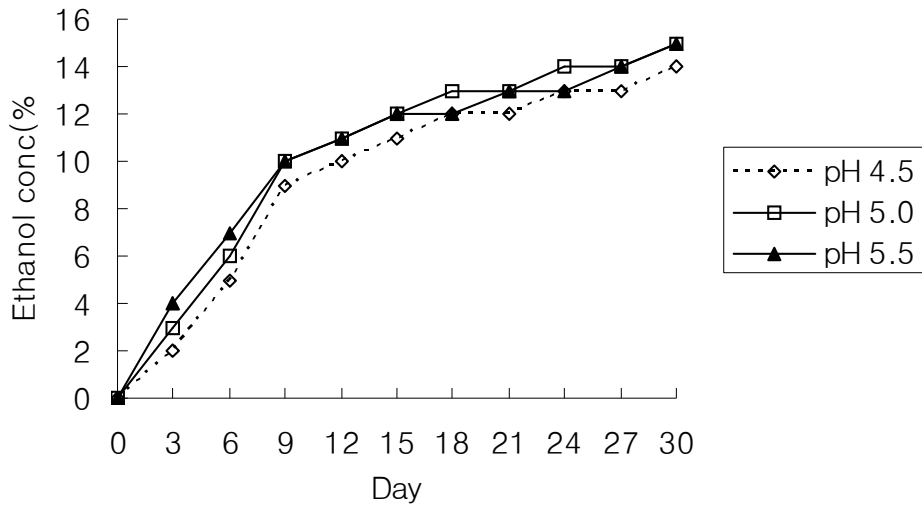


Fig. 14. 발효시 초기 pH에 따른 알코올 함량 변화

다) 초기 당도 최적화

당도는 발효에 있어 알코올 생성과 밀접한 관련이 있다. 즉 얻고자 하는 알코올 함량에 따라 당 함량이 결정된다고 할 수 있다. 초기 당도에 따른 pH, 당도, 알코올 함량 변화는 Fig. 15~17과 같다. pH 변화는 큰 차이가 나타나지 않았으나 초기 당도가 낮을수록 발효 중반 이후 효모가 이용할 수 있는 당이 결핍되어 산 생성이 감소하고 이에 따라 다른 비교군에 비해 pH 값이 더 높은 수치를 나타내었다. 또한 초반 당도가 낮을 경우 효모가 사용할 수 있는 당이 적기 때문에 생성하는 알코올 함량도 줄어드는 것으로 나타났다.

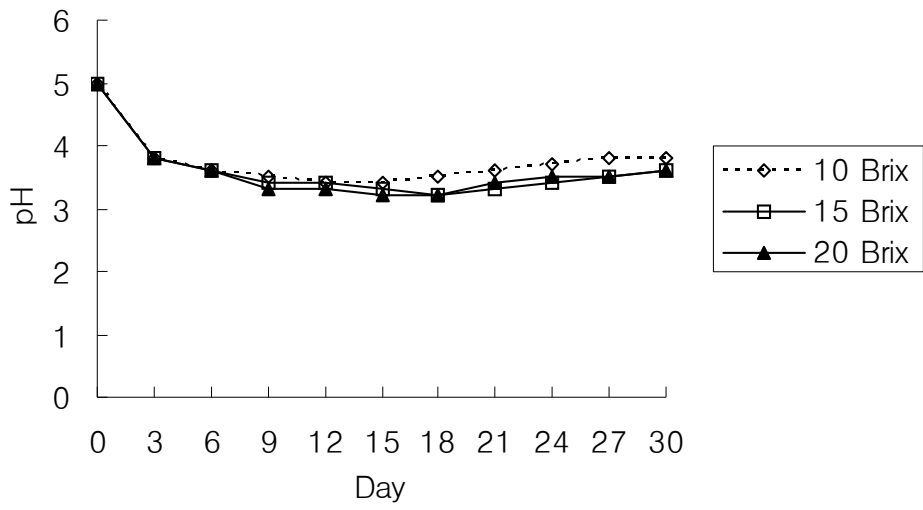


Fig. 15. 발효시 초기 당도에 따른 pH 변화

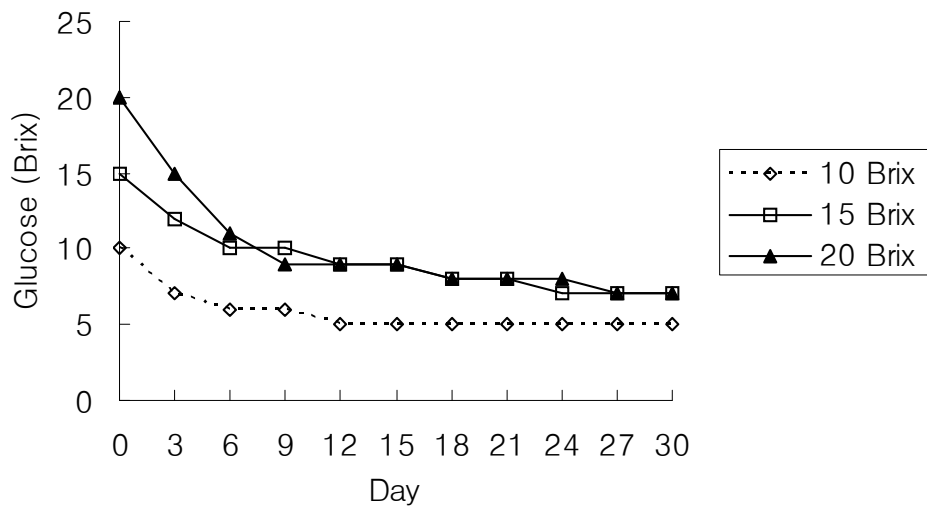


Fig. 16. 발효시 초기 당도에 따른 당도 변화

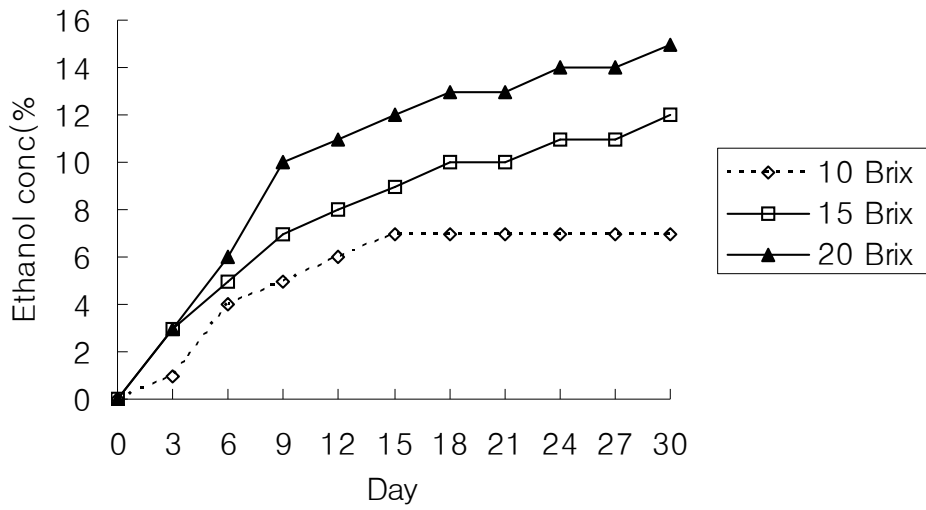


Fig. 17. 발효시 초기 당도에 따른 알코올 함량 변화

라) 관능평가

관능평가 방법은 아주 좋다 : 5점, 좋다 : 3.5점, 보통이다 : 2.5점, 나쁘다 : 1.5점, 아주 나쁘다 : 0점으로 절대평가 누적하여 각 항목당 100점 만점으로 환산하였다. 평가에 참여한 패널 요원은 20~50대 성인으로, 술을 본인의 주량에 맞게 마시게 한 후, 관능검사를 실시한 결과 발효온도는 20℃, 초기 pH는 5.0, 초기 당도는 20Brix가 가장 높은 평가를 받았다.

Table 1. 발효조건을 달리한 발효액의 관능평가

구분		향	색	맛	총점	비 고
발효 온도	20℃	68.5	61	60	189.5	
	30℃	60	57.5	50	167.5	
	40℃	58	58	42	158.0	
초기 pH	4.5	58.5	63	65	186.5	
	5.0	67	66.5	69	202.5	
	5.5	66	64	64	194.0	
초기 당도	10	50	60	41	151.0	
	15	59	61	53	173.0	
	20	60	60	65	185.0	

3) 요약

복분자로부터 분리한 *S.cerevisiae* Y-1의 안정성을 토대로 복분자의 발효조건을 최적화하였다. 발효온도는 20℃, 초기 pH는 5.0, 초기 당도는 20Brix일때 가장 발효능이 좋은 것으로 나타났으며, 관능평가 결과 역시 위의 조건에서 발효한 sample이 가장 우수한 평가를 받았다. 따라서 *S.cerevisiae* Y-1을 이용한 복분자 발효에서는 초기 pH를 5.0, 초기 당도는 20Brix로 하여 20℃에서 발효하는 것이 고품질 복분자주를 제조하는데 적합한 것으로 판단된다.

다. 복분자술의 제조기술 확립

1) 복분자 발효원액 제조

가) 제1공정 : 원료의 선별공정

⇒ 잘익은 복분자를 수확하여 이물질을 제거한 복분자를 선별한다.

나) 제2공정 : 과실 파쇄 공정

⇒ 선별된 복분자는 파쇄기를 사용하여 제경 분쇄한 후 메타중아황산칼륨을 넣어 충분히 교반하여 준다.

다) 제3공정 : 밀술제조공정

⇒ 제2공정에서 제조된 과즙에 효모를 넣고 발효를 시켜 밀술을 제조한다.

라) 제4공정 : 발효 공정

⇒ 분쇄된 복분자 과즙에 미리 준비된 밀술을 혼합하고 발효시킨다.

마) 제5공정 : 1차 숙성 공정

⇒ 발효가 끝나면 최소 60일 이상 숙성시킨다.

바) 제6공정 : 씨앗 분리 및 압착여과 공정(착즙 공정)

⇒ 발효 및 숙성 공정이 끝난 복분자는 씨앗을 분리하고 압착기를 이용하여 압착여과 한다.

사) 제7공정 : 원심분리 공정

⇒ 압착 여과로 얻은 발효 원액을 원심분리기를 이용하여 여과한다.

아) 제8공정 : 2차 숙성 공정

⇒ 1차 숙성공정에서는 복분자 씨앗과 과피가 있는 상태에서 숙성하는 것을 말하며 씨앗과 과피가 있는 상태에서 장기간 숙성할 경우 맛, 향, 색상이 현저히 떨어지게 되므로 이에 분리 및 여과를 통해 복분자 원액 상태의 2차 숙성을 약 60~90일 동안 소요되며 일반적으로 자연숙성은 6개월 정도 이루어져 한다. 실험의 단축을 위해 발효조 교반 탱크를 이용하여 숙성도를 활성화시킴.

자) 제9공정 : 복분자 과실 발효 원액

2) 복분자술 제조

가) 제1공정 : 원료의 준비 공정

⇒ 복분자 발효원액, 한약 추출물, 급수, 정제 주정을 준비한다.

나) 제2공정 : 혼합 및 교반공정

⇒ 혼합된 원료들을 충분히 교반하여 준다.
⇒ 이때 제조하고자 하는 알콜분과 당도를 맞추어 준다.

다) 제3공정 : 여과공정
⇒ 규조토 및 활성탄을 사용하여 여과한다.

라) 제4공정 : 브랜딩 공정
⇒ 술맛의 강화를 위하여 첨가물을 투여하고 용해시킨다.

마) 제5공정 : 정밀여과 공정
⇒ Pore-size 0.5~1.0 μ m 이하의 여과지를 이용하여 정밀여과 한다.

바) 제6공정 : 제성공정
⇒ 복분자주 제성 완료

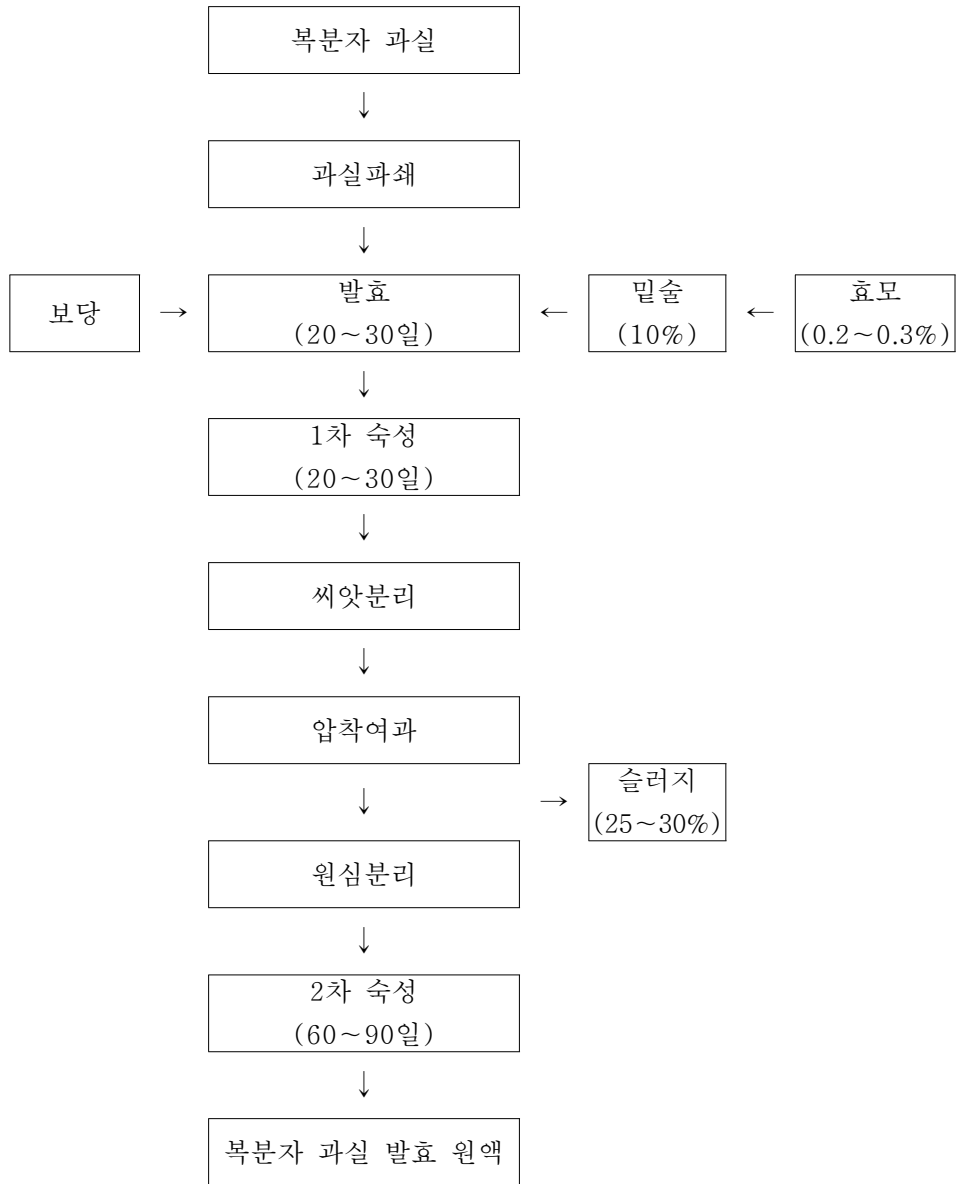


Fig. 18. 복분자 발효 원액 제조 공정도

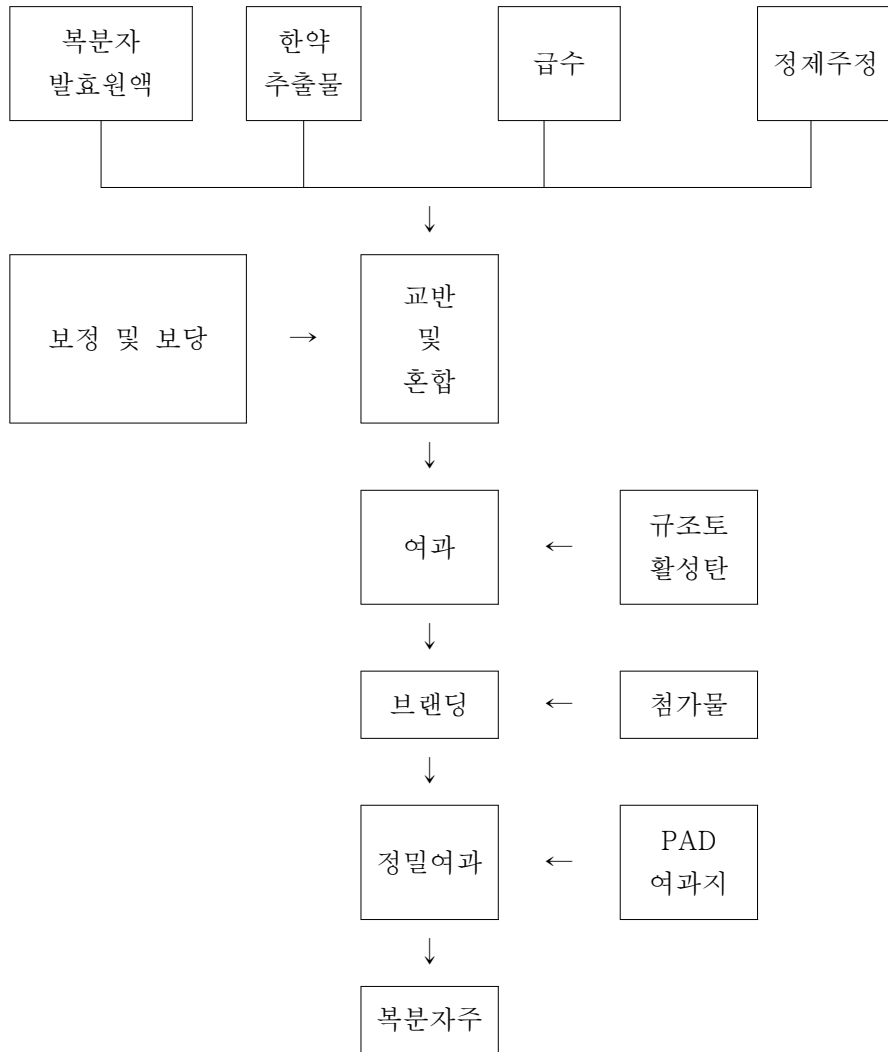


Fig. 19 복분자술 제조 공정도

3) 에탄올 함량, 첨가제 선정 및 투입량 최적화

품목	함량 (%)
복분자 발효원액	18~20
주정	25~30
급수	45~50
과당	4~5
한약 추출물 (17종)	3
첨가제 (아스파탐외 7종)	3~5

4) 여과 공정 최적화

가) 1차 여과 공정

복분자술 1, 000L 기준			
탱크살포용	활성탄 : 1kg Standard 규조토 : 10kg, Filtercell 규조토 : 5kg		
코팅용	Standard 규조토 : 7kg, Filtercell 규조토 8kg		
P500D 여과포	700 × 700 : 14장		
소요시간	기능	압력	비고
10분	Standard 코팅	0.20 kgf/cm ²	
30분	Filtercell 코팅	0.60 kgf/cm ²	
여과 시작	여과	0.80 kgf/cm ²	
여과 1시간 경과	"	1.05 kgf/cm ²	
여과 2시간 경과	"	1.20 kgf/cm ²	
여과 3시간 경과	여과 종료	1.30 kgf/cm ²	

나) 2차 여과 공정

복분자술 1, 000L 기준			
탱크살포용	Standard 규조토 : 1kg		
코팅용	Standard 규조토 : 1kg		
P500D 여과포	400 × 400 : 10장		
No. 28 여과지	400 × 400 : 10장		
소 요 시 간	기 능	압 력	비 고
10분	Standard 코팅	0.50 kgf/cm ²	
여과 시작	여과	1.00 kgf/cm ²	
여과 1시간 경과	"	1.30 kgf/cm ²	
여과 2시간 경과	"	1.49 kgf/cm ²	
여과 2시간30분 경과	여과 종료	1.51 kgf/cm ²	

다) 정밀여과 공정

복분자술 1, 000L 기준			
NA 500 Pad	400 × 400 : 15장		
소 요 시 간	기 능	압 력	비 고
5분	순환	1.00 kgf/cm ²	
순환 5분 경과	Sampling	0.90 kgf/cm ²	현미경 관찰
여과 시작	여과	1.25 kgf/cm ²	
여과 1시간 경과	"	1.15 kgf/cm ²	
여과 2시간 경과	"	1.25 kgf/cm ²	
여과 2시간30분 경과	여과 종료	1.50 kgf/cm ²	

라. 생산된 복분자술의 품질특성 분석

1) 물리화학적 특성

가) 분석방법

(1) 비중

검체를 실린더에 취하고 비중계를 사용하여 15℃에서 그 도수를 읽어 비중

으로 한다.

(2) 주정분

15℃에서 검정한 100ml 메스플라스크의 눈금까지 취하고 이것을 약 300~500 ml 플라스크에 옮긴 다음 이 메스플라스크를 약 15ml의 물로 2회 씻은 액을 플라스크에 합치고 냉각기에 연결한 다음 메스플라스크를 받는 용기로 하여 증류한다. 유액이 70ml(소요시간은 약 20분 내외)가 되면 증류를 중지하고 물을 가하여 15℃에서 메스플라스크의 눈금까지 채운다음 잘 흔들어 실린더에 옮긴 후 15℃에서 주정계를 사용하여 측정한다.

(3) 불휘발분

시료 10ml(15℃)를 미리 평량한 니켈 또는 자제 증발접시에 취하여 수욕상에서 가열하여 충분히 증발시킨 후 건조기를 이용하여 105℃에서 4시간 건조시킨다. 이것을 데시케타에서 식힌 후(30분 방치) 칭량하여 증발접시 무게를 제외하고 10배하여 100ml중의 g량을 산출한다.

나) 분석 결과

복분자로부터 분리한 *S.cerevisiae* Y-1을 이용하여 제조한 복분자술의 물리화학적 특성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 비중은 0.994, 주정분은 16.2%로 16% 제품기준에 적합하였으며, 불휘발분은 5.7로 나타났다.

Table 2. 복분자술의 물리화학적 특성

분석 항목	주세법 기준	분석 결과	비 고
비중 (15℃)	—	0.994	
주정분 (V/V%)	±0.5이하	16.2	
불휘발분 (W/V%)	—	5.7	

2) 기호도(관능) 평가

가) 평가 방법

평가 방법은 아주 좋다 : 5점, 좋다 : 3.5점, 보통이다 : 2.5점, 나쁘다 : 1.5점, 아주 나쁘다 : 0점으로 절대평가 누적하여 각 항목당 100점 만점으로 환산하였다. 평가에 참여한 패널 요원은 20~50대 성인으로, 술을 본인의 주량에 맞게 마시게 한 후, 관능검사를 실시하였다.

나) 평가 결과

기존품과 개발품의 기호도 평가 결과는 Table 3, 4와 같다. 향, 색, 맛 모두 기존품보다 개발품이 좋은 평가를 받았다. 향은 기존품이 평점 62.04인데 반해 개발품은 68.61로 나타났고, 색은 기존품이 평점 61.61, 개발품이 64.32로 나타났으며, 맛은 기존품이 55.93, 개발품이 71.79를 나타내어 전체적인 기호도는 개발품이 더 우수한 것으로 나타났다.

Table 3. 기존품의 기호도(관능) 평가 결과

패널 No.	향	색	맛
1	68.5	61	48
2	60	57.5	46
3	69.5	64.5	67
4	58.5	63	45
5	67	66.5	69
6	66	64	64
7	60	60	61
8	59	61	53
9	60	60	50
10	56	61	60
11	57	60	45
12	65	62	65
13	55	59	43
14	67	63	67
합계	868.5	862.5	783
평균	62.04	61.61	55.93

Table 4. 개발품의 기호도(관능) 평가 결과

패널 No.	향	색	맛
1	68.5	62	70
2	69	63.5	72
3	69	65.5	72.5
4	68	65	72
5	66	65.5	69
6	68	65.5	72
7	68	65	72
8	69	65	72.5
9	68	65	71
10	69	63	71
11	69	64	73
12	71	64.5	74
13	69	64	72
14	69	63	72
합계	960.5	900.5	1,005
평균	68.61	64.32	71.79

3) 생리활성도 평가

가) 평가 방법

평가 방법은 아주 좋다 : 5점, 좋다 : 3.5점, 보통이다 : 2.5점, 나쁘다 : 1.5점, 아주 나쁘다 : 0점으로 절대평가 누적하여 각 항목당 100점 만점으로 환산하였다. 평가에 참여한 패널 요원은 20~50대 성인으로, 약 10일에 걸쳐 일반주류 및 개발품을 시음케 했다. 술은 본인의 주량에 맞게 마시게 한 후, 관능검사를 실시하였다.

나) 평가 결과

생리활성도 평가 결과는 Table 5, 6과 같다. 10일간 시음 후 10일간의 강장효과를 조사한 결과 개발품은 평점 70, 일반주류는 60.29를 받아 개발품의 강장효과에서 일반주류보다 우수한 것으로 나타났으며, 숙취해소력에 있어서도 평점 71.75로 일반주류에 보다 더 높은 점수를 얻었다.

Table 5. 개발품과 일반주류의 강장효과 관능평가 결과

패널 No.	개발품	일반 주류	비 고
1	67	52	
2	69	72	
3	71.5	51	
4	72	69	
5	72.5	49	
6	72.5	58	
7	71.5	61	
8	69	67	
9	70	67	
10	69	53	
11	69	68	
12	69	56	
13	69	68	
14	69	53	
합계	980	844	
평균	70.00	60.29	

Table 6. 개발품과 일반주류의 숙취해소에 대한 관능평가 결과

패널 No.	개발품	일반 주류	비고
1	69	57	
2	71.5	72.5	
3	74.5	52	
4	74	70.5	
5	74.5	48.5	
6	73.5	53	
7	72.5	60	
8	70	67	
9	71	68	
10	70	56	
11	71	70	
12	71	56	
13	70.5	68	
14	71.5	54.5	
합계	1,004.5	853	
평균	71.75	60.93	

4) 요약

복분자술의 물리화학적 분석 결과 비중은 0.994, 주정분은 16.2, 불휘발분은 5.7로 나타났다. 기존복분자술과 개발된 복분자술의 관능평가에서는 개발품이 향, 색, 맛 모든 부문에서 기존품보다 기호성이 우수하였으며, 또한 생리활성 관능평가에서 일반 주류제품에 비해 강장효과나 숙취해소 효과가 우수한 것으로 나타났다.

3. 대량생산 및 사업화

가. 최적 발효조건에 의한 고품질 복분자술의 대량 생산

1) 대량생산체제 구축

고품질 복분자술의 대량생산은 복분자 과실을 발효하여 고품질 복분자 발효원액을 제조하는 발효공정, 제조된 복분자 발효원액, 물, 정제주정, 한약추출물 등을 배합하고 여과하여 고품질 복분자술을 제조하는 제성공정, 복분자술을 병입하고 포장하는 병입포장공정으로 이루어진다. 따라서 대량생산을 위해 각 공정을 살펴보고 확립된 최적조건하에서 고품질 복분자술을 제조하였다.

가) 발효공정 - 복분자 발효원액 제조

복분자에서 분리한 *Saccharomyces cerevisiae* Y-1 효모를 이용하여 2008년 생산된 복분자 2000kg을 발효하였다. 복분자 발효원액 제조과정은 Fig. 1과 같이 구매한 복분자를 과쇄한 후 복분자량의 20%인 400kg을 분리하여 주모로 사용하였고, 주모를 20Brix로 보당한 후 *Saccharomyces cerevisiae* Y-1을 배양한 효모 배양액을 주모에 접종하였다. 주모를 제외한 과쇄된 복분자는 주모와 혼합한 후 20~25°C에서 약 10일간 발효한 다음 씨앗을 분리하고 원심분리하여 슬러지를 분리하고 약 20~30일간 숙성하였다. 숙성이 종료된 발효액은 압착여과를 통해 숙성 중 침전물을 분리하였고, 맑은 원주상태로 60~90일간 2차숙성하였다. 이와 같은 공정을 통해 발효원액 약 1500 L를 제조하였다.

Saccharomyces cerevisiae Y-1 효모의 최적 발효조건인 발효온도 20~25°C, 초기 pH 5.0이하, 초기당도 20Brix의 조건에서 발효를 진행하였으며, 그 결과 14%의 복분자발효원액을 제조하였다.

발효 중 pH, 당도, 알콜분 함량 변화는 Table 1, Fig.2~4에서와 같고, 발효가 종료된 발효원액은 pH 3.91, 당도 9.0, 알콜분 14.4%로 나타났다.

Table 1. 복분자 발효 중 발효액의 물성변화

Day	pH		당도(Brix)		알코올분(%)	
	보당 전	보당 후	보당 전	보당 후	보당 전	보당 후
1	4.03	-	20.6	-	0.0	-
2	3.83	-	16.3	-	3.0	-
3	3.60	-	11.8	-	7.0	-
4	3.63	3.72	8.9	13.0	10.7	10.0
5	-	3.70	-	11.2	-	12.2
6	-	3.77	-	10.0	-	13.5
7	-	3.85	-	9.3	-	14.1
8	-	3.88	-	9.2	-	14.3
9	-	3.90	-	9.0	-	14.4
10	-	3.91	-	9.0	-	14.4

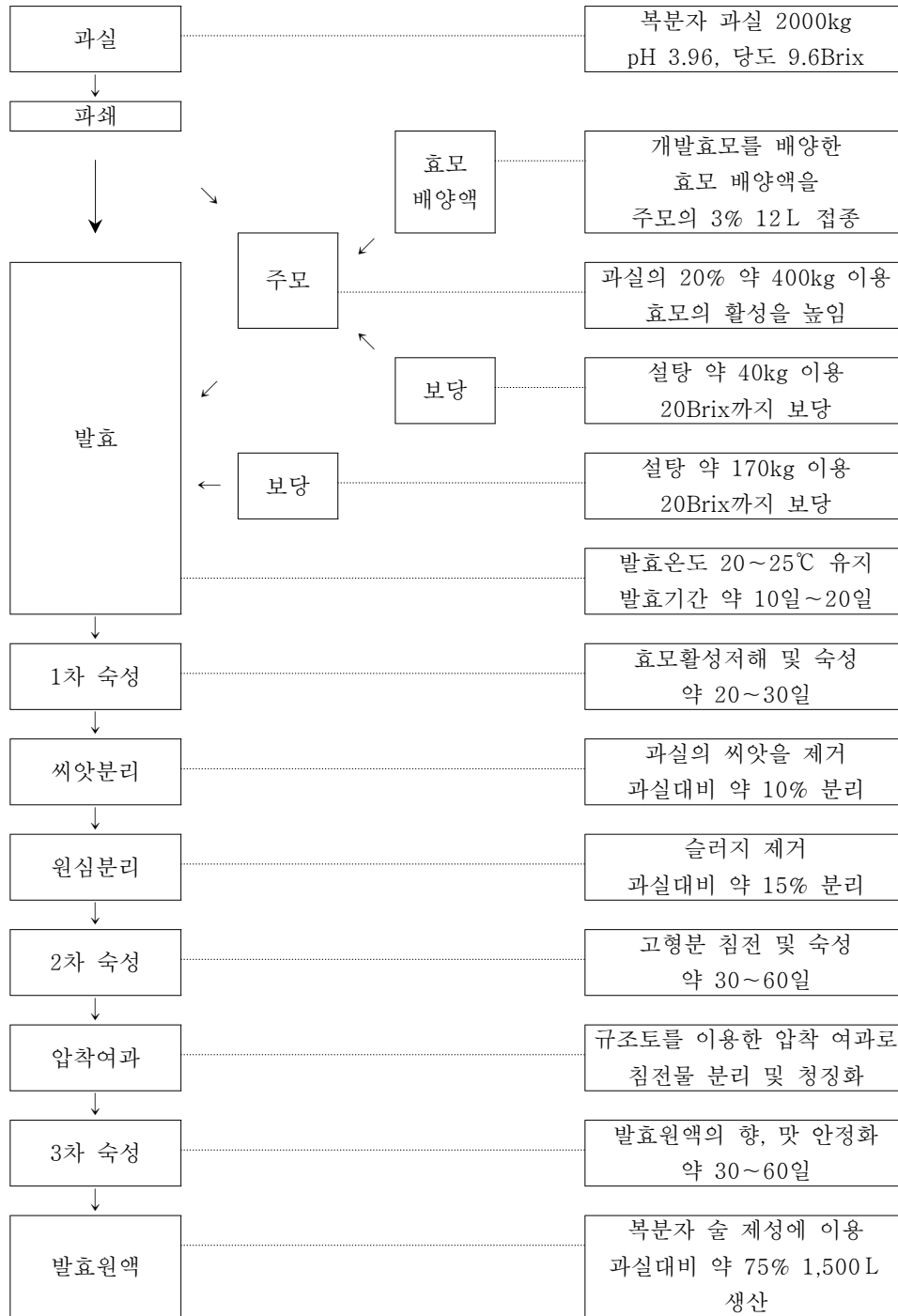


Fig. 1. 복분자 발효원액 제조과정

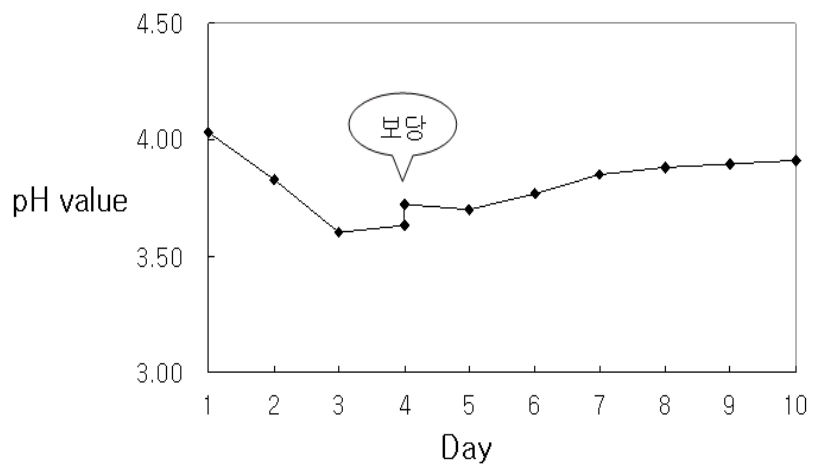


Fig. 2. 복분자 발효 중 발효액의 pH 변화

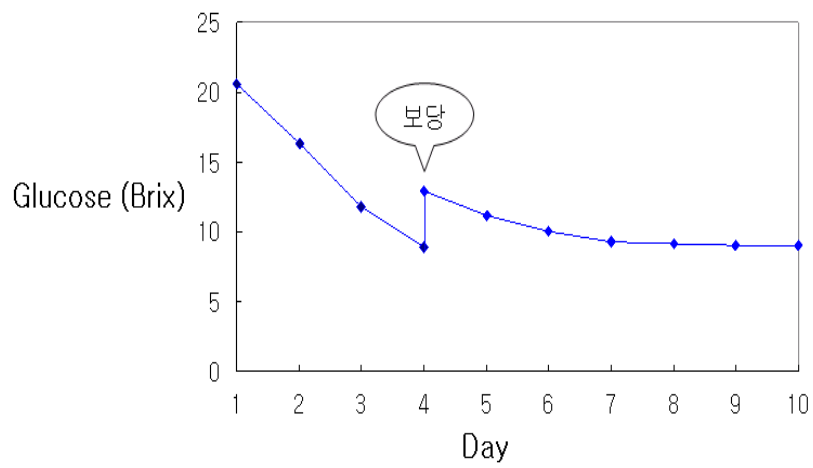


Fig. 3. 복분자 발효 중 발효액의 당도 변화

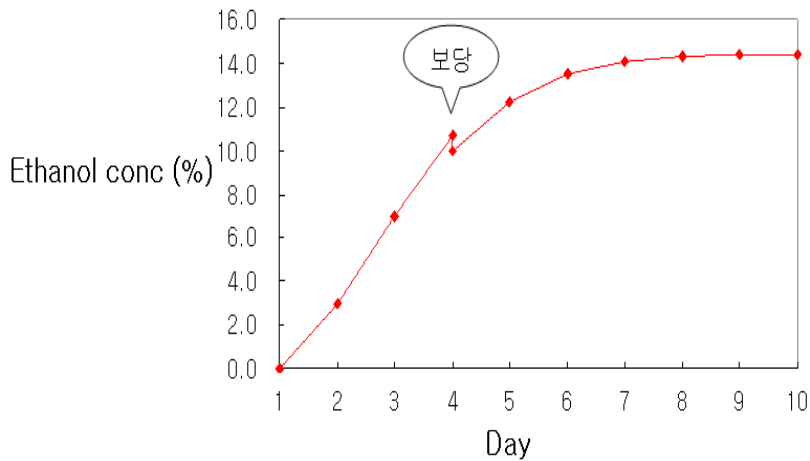


Fig. 4 복분자 발효 중 발효액의 알코올 함량 변화

나) 제성공정 - 복분자술 제조

복분자 술의 배합비율은 Table 2와 같다. 복분자 발효원액의 함량을 24~26%, 정제주정의 함량을 27~32%, 물의 함량을 43~45%, 과당 함량은 5~10%, 한약 추출물의 함량은 약 1%, 감미용 첨가물 약 1% 수준에서 배합하여 16% 과실주인 복분자주를 제조하였다.

한약 추출물은 자사의 특허등록을 기준한 것으로 ‘단맛이 보강된 알코올 함유 건강음료’, ‘녹용을 포함하는 건강주 및 그의 제조방법’, ‘약용버섯과 식물약재를 함께 이용한 건강 복분자주 및 그의 제조방법’의 특허권에서 입증된 식물약재를 사용하였다. 사용된 식물약재 17종은 Table 3과 같다.

복분자 술의 제성과정은 Fig. 5와 같이 가장 먼저 발효원액과 물 그리고 주정을 혼합한 다음 한약 추출물을 혼합한다. 혼합 후 여과공정 중 알코올과 당분의 손실을 감안하여 적정 알코올 함량과 적정당도를 유지하기 위해 당이나 주정 혹은 물을 추가하는 단계가 필요하며, 부유물질 등에 의한 제품의 혼탁을 방지하고, 청징상태를 유지하기 위해 2번의 여과공정을 거치게 된다. 또한 복분자의 고유한 맛과 기호도를 높이기 위해 소량의 감미제가 첨가된다.

복분자 술의 여과공정은 2차년도에 확립한 최적 여과조건 아래서 여과를 진행하였으며, 여과 공정별 여과조건은 Table 4~5와 같다. 1차 규조토·활성탄을 이용한 여과에서는 여과시간이 총 3시간 가량 소요되었으며, 여과시 압력변화가 최적 여과 조건과 유사한 경향을 나타내어 정상적인 여과가 진행된 것으로 판단되었고, 정밀여과에서도 유사한 압력수치 변화를 보이면서 정상적인 여과가 이루어졌다.

위와 같은 공정을 거쳐 여과까지 완료된 복분자 술이 최종 완제품이다. 여과된 복분자 술은 완제품 탱크로 이송되고 충전기를 거쳐 병입되어 최종제품 생산에 이용된다

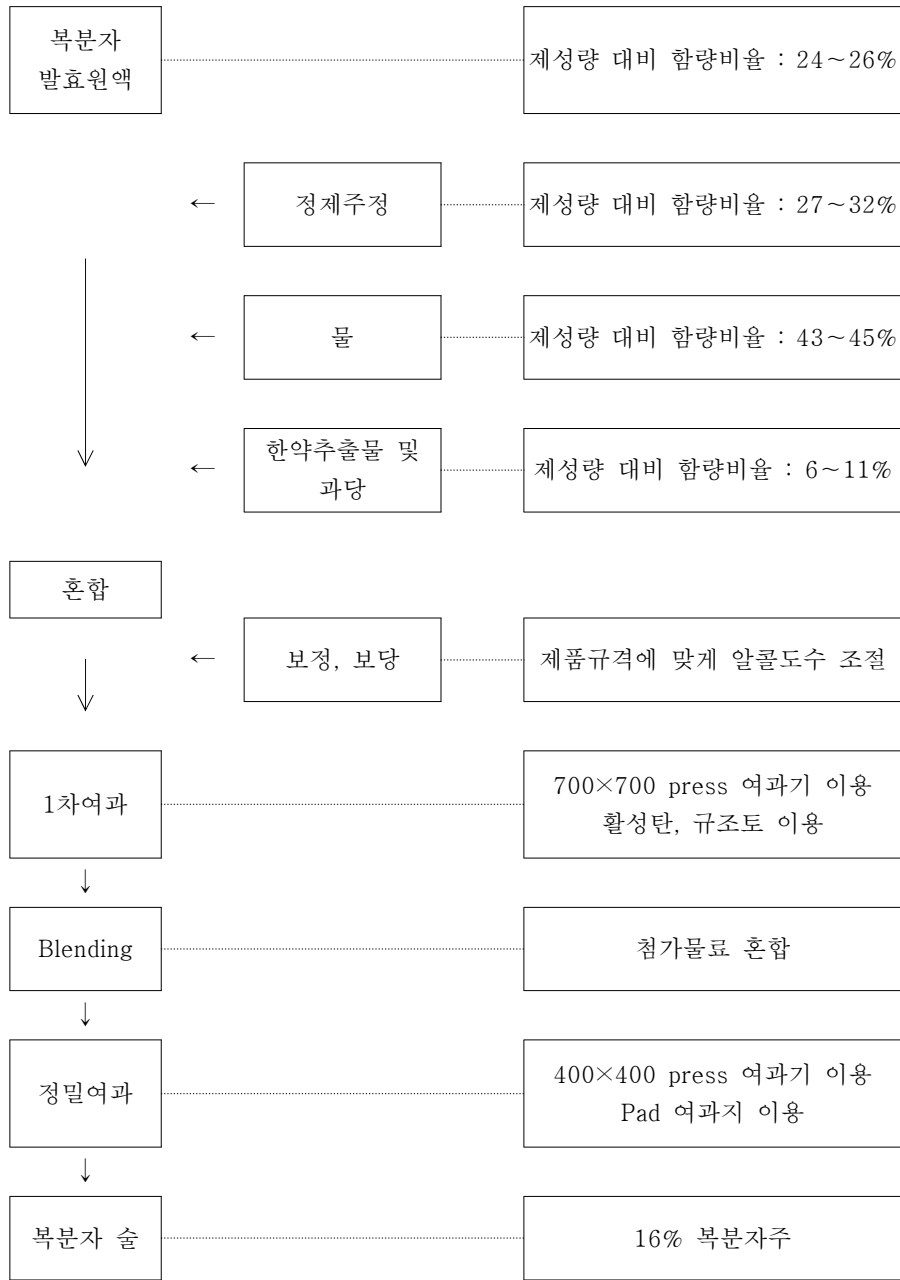


Fig. 5. 복분자 술 제조공정

Table 2. 복분자 술의 원료 혼합비 (6000 L 제성기준)

품목	함량(%)	함량(ℓ)
복분자 발효원액	24~26	1,400~1,600
정제 주정	27~32	1,600~1,900
물	43~45	2,500~2,700
과당	5~10	100~200
한약 추출물 + 감미제	1	50

Table 3. 복분자 술의 한약추출물에 이용되는 식물약재 종류

식물약재 17종	
백작약	오매
박하	계피
황기	용안육
갈근	창출
당귀	대추
곽향	진피
천궁	감초
생강	사인
숙지황	-
식물약재 4kg + 물 100 L → 농축 → 식물약재 추출물 50 L	

Table 4. 1차 여과 조건

복분자술 6, 000L			
탱크살포용	활성탄 : 1.5kg Standard 규조토 : 14kg, Filtercell 규조토 : 7kg		
코팅용	Standard 규조토 : 10kg, Filtercell 규조토 : 11kg		
P500D 여과포	700 × 700 : 14장		
소 요 시 간	기 능	기 준 압 력(1000 L)	압 력
10분	Standard 코팅	0.20 kgf/cm ²	0.20 kgf/cm ²
30분	Filtercell 코팅	0.60 kgf/cm ²	0.65 kgf/cm ²
여과 시작	여과	0.80 kgf/cm ²	0.80 kgf/cm ²
여과 1시간 경과	”	1.05 kgf/cm ²	1.10 kgf/cm ²
여과 2시간 경과	”	1.20 kgf/cm ²	1.25 kgf/cm ²
여과 3시간 경과	여과 종료	1.30 kgf/cm ²	1.35 kgf/cm ²

Table 5. 정밀 여과 조건

복분자술 6, 000L 기준			
NA 500 Pad	400 × 400 : 20장		
소 요 시 간	기 능	기 준 압 력(1000 L)	압 력
5분	순환	1.00 kgf/cm ²	1.00 kgf/cm ²
순환 5분 경과	Sampling	0.90 kgf/cm ²	1.00 kgf/cm ²
여과 시작	여과	1.25 kgf/cm ²	1.25 kgf/cm ²
여과 1시간 경과	”	1.15 kgf/cm ²	1.30 kgf/cm ²
여과 2시간 경과	”	1.25 kgf/cm ²	1.40 kgf/cm ²
여과 2시간30분 경과	여과 종료	1.50 kgf/cm ²	1.45 kgf/cm ²

다) 포장공정 - 복분자술 제조

여과가 종료된 복분자 술은 생산라인과 연결된 탱크에 이송되어 Fig. 6과 같은 생산공정을 거쳐 제품화 된다. 완성품 보관 탱크에 충진기가 연결되어 있으며, 생산전 10~15분 동안 완제품 탱크를 교반후에 충진기로 술을 충진한

다음 라벨이 부착된 병에 일정량 술을 주입하고 다음 마개를 막은 후 포장되어 소비자에게 전달 되는 것이다.

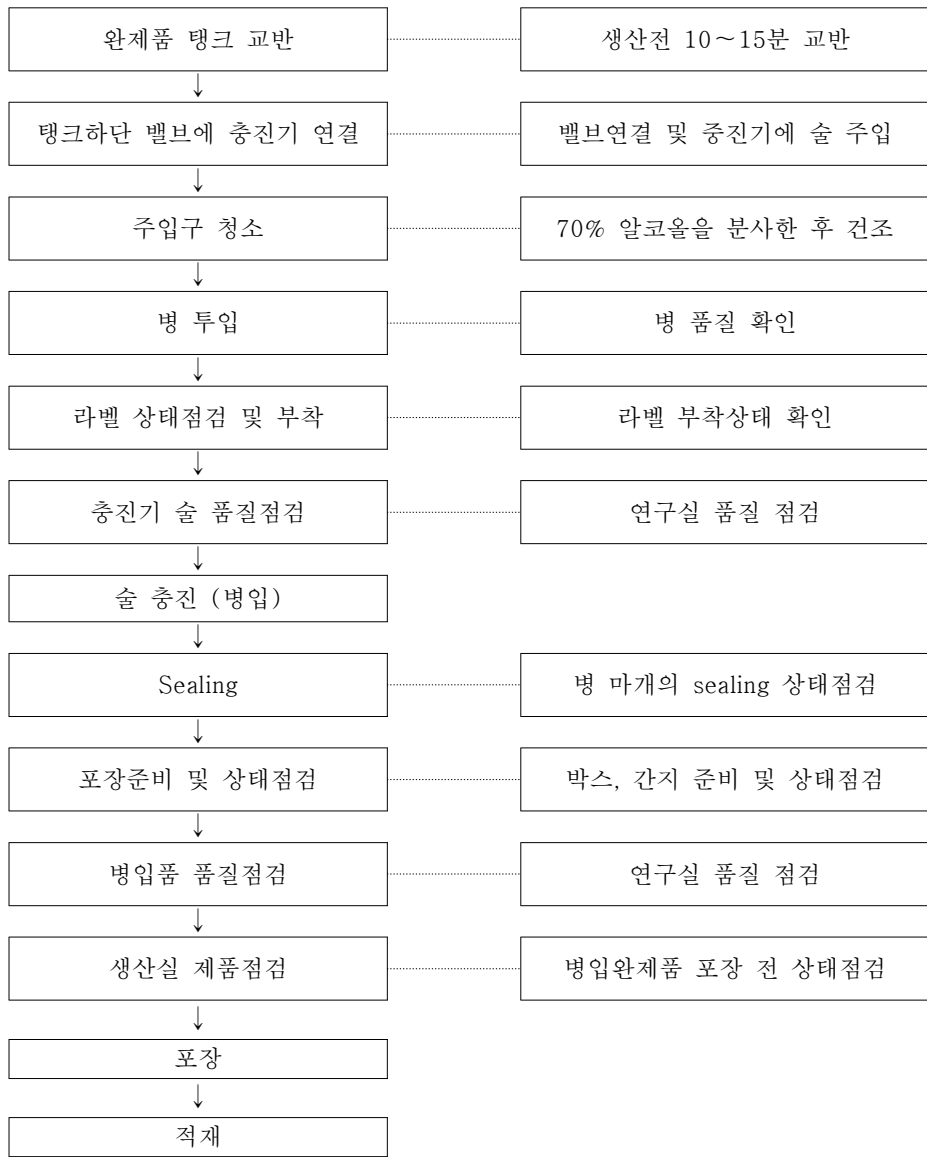


Fig. 6. 복분자 술 병입포장 과정

라) 결론

위와 같이 복분자 발효원액 제조부터 복분자 술 생산까지 각 공정별 최적화를 통해 고품질 복분자주를 생산하였고, 대량생산 체제를 구축함으로써 고품질 복분자 술의 대량생산 및 제품화를 가능케 하였다.

2) 생산성 및 품질비교

가) 생산성 비교

복분자 과실 2톤을 발효한 결과 복분자 발효원액 1500 L를 얻었다. 복분자 발효원액 1500 L에 정제주정, 물, 한약추출물, 과당 등을 혼합하여 복분자 술을 제성한 결과 약 6000 L의 복분자 술을 제조하였고 이를 이용하여 복분자 술 300ml 제품을 약 20,000병 생산하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 복분자 과실 10톤을 발효할 경우 복분자 발효원액은 7,500 L 제조할 수 있으며, 복분자 술 3만L를 제성하여 복분자 술 300ml 제품을 약 5천Box 생산할 수 있을 것으로 추정된다(Table 6).

Table 6. 복분자 과실양에 따른 복분자 술 생산량 비교

복분자 과실	복분자 발효원액	복분자 술	300ml 제품 생산량 (20ea/Box)	비고
2,000kg	1,500 L	6,000 L	20,000병 (1,000Box)	
10,000kg	7,500 L	30,000 L	100,000병 (5,000Box)	

나) 공정별 대량생산 설비

공정	설비	수량	기능	비고
발효공정	발효탱크 - 재료 : SUS 원형 - 용량 : 13,000 L	10	복분자 과실발효 온도조절가능	Fig.7.
	온도계기판	1	발효탱크 온도표시	Fig.8.
	보일러 - 처리용량 : 500kg/Hr	1	발효탱크에 온수공급	Fig.9.
	간이탱크 - 재료 : SUS 원형 - 용량 : 1,200 L	30	과실 및 술 이송 및 소량 저장탱크	Fig.10.
	숙성탱크 - 재료 : SUS 원형 - 용량 : 13,000 L	8	발효원액 및 술 숙성	Fig.7.
	저장탱크 - 재료 : SUS 원형 - 용량 : 23,000 L	4	발효원액 및 술 저장	Fig.7.
	씨앗분리기 - Seperator	1	발효원액에서 씨앗분리	Fig.11.
	원심분리기 - Screw Decanter Centrifuge - Model : DSD-360Type - Bowl speed : 3,500rpm	1	발효원액에서 Sluge 분리	Fig.11.
	압착여과기 - 구조토 프리코트 여과기 - 처리용량 : 1.5ton/Hr	1	활성탄, 구조토를 이용한 압착여과	Fig.12.
제성공정	에어공급장치 - Comperssor - 이동식 3.7kw	1	에어공급 및 조절장치	Fig.13.
	정밀여과기 - Plate×29ea - Hydraulic Motor : 1.5kw - 압력펌프 : 0.7kw	1	Pad를 이용한 정밀여과	Fig.14.
병입·포장공정	라벨부착기 - Labelling M/C	1	라벨 및 상표 부착	Fig.15.
	충진기 - 자동화 충전씰링기계 - 주입기 노즐본수 : 28본	1	병입	Fig.16
	자동화 충전씰링기계 - Capper Head : 8ea	1	마개 씰링	Fig.17
	박스 포장기 - Tape Packing M/C 상하부	1	박스 테이핑 포장	Fig.18 Fig.19



Fig. 7. 탱크 현황 사진 - 발효탱크, 저장탱크, 숙성탱크



Fig. 8. 발효탱크 온도계기판



Fig. 9. 보일러



Fig. 10. 간이탱크



Fig. 11. 씨앗분리기(좌), 원심분리기(우)



Fig. 12. 압착여과기 - 규조토 프리코트 여과기



Fig. 13. 에어공급장치

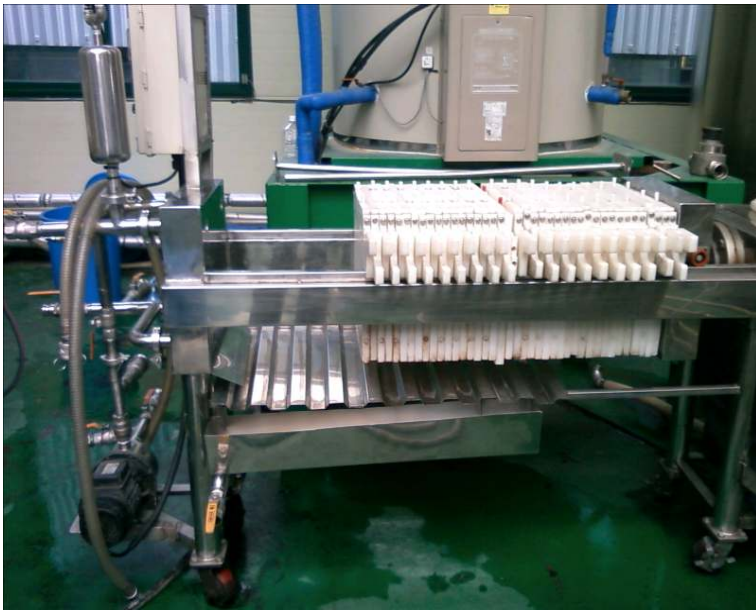


Fig. 14. 정밀여과기



Fig. 15. 자동화 라인중 라벨 부착기



Fig. 16. 충전기 병입부분(좌), 충전기 술 주입 부분(우)



Fig. 17 충전기에서 술 주입 후 병 마개 sealing 부분



Fig. 18. 박스포장 자동화 설비



Fig. 19. 박스포장 자동화 설비



Fig. 20. 입고된 공병 사진



Fig. 21. 생산된 제품의 출고전 적재모습(좌), 제품 출고 모습(우)

나. 고품질 복분자술의 관능성 평가

1) 개발품과 기존품 및 타사제품과의 비교·관능평가

관능검사는 광주 광산구에 주거하는 30~50세 주민 20명을 선별하여 실시하였으며, *Saccharomyces cerevisiae* Y-1 효모를 이용하여 개발한 고품질 복분자 술과 기존의 본사제품 그리고 현재 인지도가 높은 2개 업체의 복분자 술 제품을 구매하여 각각 라벨을 제거한 다음 똑같은 병에 담아 3일간격으로 3회 반복 평가한 후 제품별 평점을 산출하였다. 3회의 관능검사시 매번 제품의 식별 표시를 변경하여 시음하였고, 경향이 일관되지 못하여 신뢰성이 떨어지는 항목은 평점 산출시 제외하였다. 평점산출은 매우좋다 5점, 좋다 4점, 보통이다 3점, 나쁘다 2점, 매우 나쁘다 1점으로 계산하였다.

관능검사 결과는 Table 6~9과 같다. 모든 부분에서 H사의 복분자 술은 가장 낮은 점수를 받았고, 본사의 기존제품은 H사 제품보다는 높은 점수를 받았으나 개발품과 B사의 제품에 비해서는 낮은 점수를 받았다. 개발품과 B사의 복분자 술은 좋은 점수를 나타냈다. 색 부분에서는 B사의 제품이 93점, 개발품이 91점으로 B사의 제품이 다소 높았으며, 향 부분에서는 개발품이 90점, B사의 제품이 89점으로 비슷한 점수를 받았다. 맛은 87점, 전체적인 기호도 면에서는 93점으로 개발품과 B사의 제품이 같은 평점을 받아 개발품과 B사의 제품이

유사한 경향을 나타내었다.

B사의 복분자 술이 가장 큰 호응을 받고 있는 것을 감안한다면 본 개발품도 품질면에서 B사의 제품에 뒤처지지 않는 충분한 시장성을 갖고 있는 것으로 판단되었다. 또한 본사의 기존제품에 비해 품질면에서 더 큰 경쟁력을 갖는 것으로 볼 때, 개발품의 사업화 성공가능성은 매우 밝다고 생각되어진다.

Table 6. 개발품과 기존품 및 타사제품들의 색 관능평가 결과

No.	개발품	B사 복분자 술	H사 복분자 술	기존품
1	5	5	4	4
2	4	5	3	5
3	5	5	3	5
4	5	4	4	4
5	4	5	5	4
6	3	5	5	4
7	4	4	3	4
8	4	4	4	3
9	5	5	4	5
10	5	4	4	5
11	4	5	5	5
12	4	5	5	4
13	5	4	4	4
14	5	4	4	4
15	5	4	4	4
16	5	5	4	5
17	4	5	3	4
18	5	5	4	4
19	5	5	4	4
20	5	5	4	4
합계	91	93	80	85

Table 7. 개발품과 기존품 및 타사제품들의 향 관능평가 결과

No.	개발품	B사 복분자 술	H사 복분자 술	기존품
1	5	5	5	4
2	5	5	4	4
3	5	4	4	5
4	4	4	4	5
5	5	5	4	5
6	4	5	5	4
7	5	5	4	4
8	5	5	4	5
9	5	5	4	5
10	5	5	5	5
11	5	5	4	5
12	- ^{a)}	-	-	-
13	4	4	4	4
14	5	4	4	5
15	5	4	3	4
16	5	5	4	5
17	4	5	4	5
18	5	5	4	4
19	4	4	3	4
20	5	5	3	5
합계	90	89	76	87

a) : 3회의 관능검사 결과 일관성이 없어 평점 산출에서 제외

Table 8. 개발품과 기존품 및 타사제품들의 맛 관능평가 결과

No.	개발품	B사 복분자 술	H사 복분자 술	기존품
1	4	5	4	4
2	5	5	3	5
3	5	5	5	3
4	4	4	5	3
5	4	4	5	4
6	5	5	5	4
7	5	5	3	5
8	5	5	3	5
9	5	4	5	5
10	4	4	3	4
11	4	5	4	4
12	- ^{a)}	-	-	-
13	5	5	3	5
14	4	5	4	4
15	5	4	4	4
16	5	4	4	4
17	4	5	3	4
18	5	4	3	4
19	4	5	4	4
20	5	4	4	4
합계	87	87	74	79

a) : 3회의 관능검사 결과 일관성이 없어 평점 산출에서 제외

Table 9. 개발품과 기존품 및 타사제품들의 기호도 관능평가 결과

No.	개발품	B사 복분자 술	H사 복분자 술	기존품
1	4	5	4	5
2	4	5	5	5
3	5	5	4	5
4	5	4	4	4
5	5	4	4	4
6	5	5	3	4
7	5	5	4	4
8	4	5	3	5
9	4	4	3	4
10	4	4	4	5
11	5	5	4	5
12	5	4	4	5
13	5	5	5	4
14	5	4	5	5
15	5	5	4	4
16	5	5	4	5
17	5	5	4	4
18	5	4	3	5
19	4	5	4	4
20	4	5	4	4
합계	93	93	79	90

다. 복분자술의 상품화 및 사업화

1) 개발된 복분자 술의 제품화

과실주 시장은 복분자 술이 매우 큰 비중을 차지하고 있다. 따라서 본 개발품의 우수성을 알려 인지도를 높이는 것이 필요하며, 이를 위해서는 상표 이름과 제품 디자인이 매우 중요하다. 본사에서 조사한 결과 최근 복분자 술의 제품성향이 와인형태로 변화하고 있으며, 독한 주류보다는 알코올 함량이 낮은 저도주를 선호하는 것으로 나타났다. 이에 따라 개발품의 디자인은 투명한 와인병으로 깔끔한 인상을 남겨주는 병을 채택하고, 복분자의 검은색을 강조한 ‘블랙복분자 와인’으로 상표이름을 결정하였다.

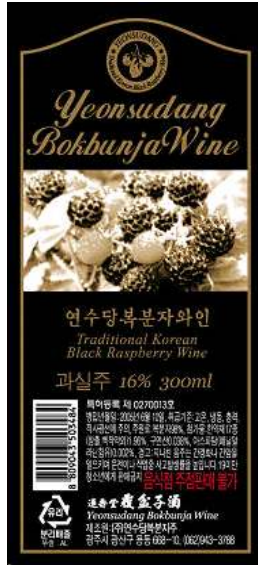


Fig. 22. 개발된 복분자 술의 상표 디자인



Fig. 23. 개발된 복분자 술의 광고 포스터

2) 개발된 복분자 술의 사업화

본사의 유통망을 이용하여 개발품을 사업화 할 예정이다. 전국에 분포되어있는 50여개의 대리점을 통해 전국 식당가에 입점시키고, 유통회사 6개를 통해 대형 마트에 납품할 계획이다. 또한 본사 직영점을 통하여 주문 및 통신 판매를 진행할 것이며, 본사 영업팀을 중심으로 홍보전략 및 광고 기획을 세워 개발된 고품질 복분자 술의 판촉에 매진할 것이다(Fig.24).

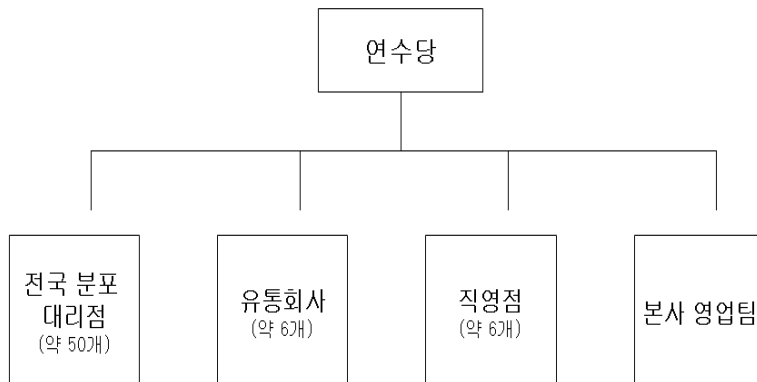


Fig. 24. 개발품의 판촉을 위한 유통망 구조

제 2 절 복분자 열매로부터 가공식품용 기능성 식품소재의 개발

1. 복분자열매로부터 기능성 복분자 애플의 제조 및 특성 분석

가. 실험 재료

본 실험에 사용한 복분자 (*Rubus coreanus* Miquel) 열매는 전남 신안군 압면도에서 수확한 2005도산을 (주)연수당 냉동고에 -20°C 에서 동결 저장된 시료를 제공 받아 본 연구실의 -20°C 냉동고에 저장하면서 냉장온도에서 해동시킨 후 일정량을 취하여 실험에 사용하였다.

복분자 애플 제조에 용매로 사용한 물은 일반 수돗물을 일단 끓였다가 식힌 후에 사용하였고 95% 주정은 전남 장성 소재의 (주)보해양조에서 직접 구입하여 사용하였다.

나. 실험 방법

1) 복분자 애플의 제조

가) 복분자 적정 추출 용매비와 시간 결정

복분자 애플의 적정 추출 용매비를 결정하기 위하여 복분자에 대한 water의 비율을 5배, 10배, 15배, 20배로 달리하고, 환류 냉각 추출 장치를 이용하여 80°C 로 3시간 동안 가열 추출하면서 가용성 고형분량의 변화를 측정하였다. 가용성 고형분은 굴절당도계인 Digital refractometer (PR-1 ATAGO, Japan)를 사용하여 상온에서 3회 측정한 후 $^{\circ}\text{Brix}$ 로 나타내었으며 각 처리 조건별로 추출 수율을 구하여 적정 용매 비율과 추출 시간을 결정하였다.

나) 복분자 애플제조

(1) 시료 조제

복분자 애플을 제조하기 위해 먼저 냉동된 시료를 12시간 냉장 온도에서 해동하고 복분자를 일정량을 마쇄하였다. 마쇄된 복분자에 적정 용매비의 물과 주정과 물로 주정농도를 희석한 30%, 50%, 70% 주정인 총 4가지 다른 용매로 수욕 상태에서 80°C , 적정시간동안 추출하였다. 애플은 4겹의 cheese cloth에 여과하고 여과된 액을 원심분리(4°C , $3,000\times\text{g}$, 30min) 하여 다시 Buchner funnel에 filter paper(Whatman No. 2)를 얹어 상등액을 여과하였다. 이를 복분자 시료 양의 2배가 될 때까지 45°C 에서 감압 농축하여 애플을 제조하였다. 제조된 애플은 vial에 나누어 담아 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

(2) 가용성 고형물 함량 측정

각 다른 용매에서 얻어진 앰플의 가용성 고형물 함량은 시료에 대한 건물량(%)으로 3회 반복하여 측정하였다. 즉 앰플 1ml를 항량을 구한 수기에 취하여 105℃에서 증발 건조시켜 그 무게를 측정하여 복분자 앰플 양에 대한 백분율로써 고형물 수율(%)을 구하였다.

2) 저장 기간동안 추출조건에 따른 복분자 앰플의 특성 분석

가) pH

복분자 앰플의 냉장 저장 과정 중의 pH 변화는 pH meter (Orion model 520A, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

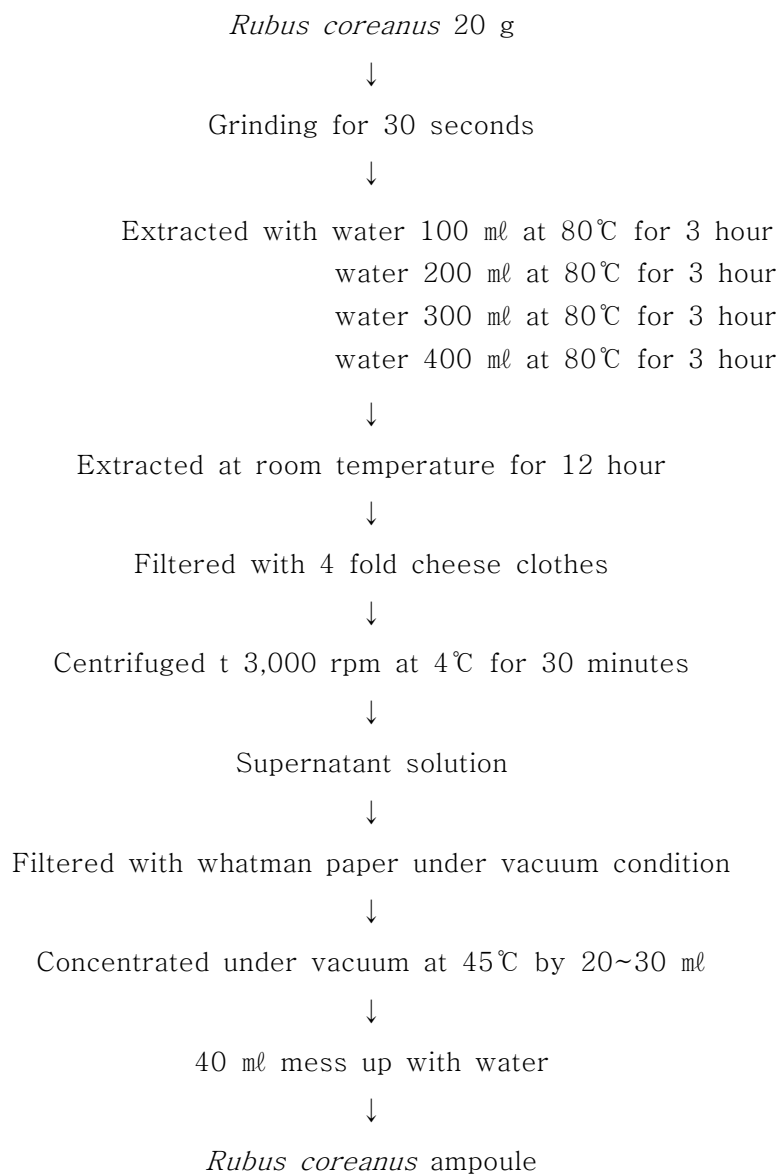


Fig. 2-1. Procedure for the preparation of *Rubus coreanus* ampoule to determine the ratio of solvent extraction and the extracting time.

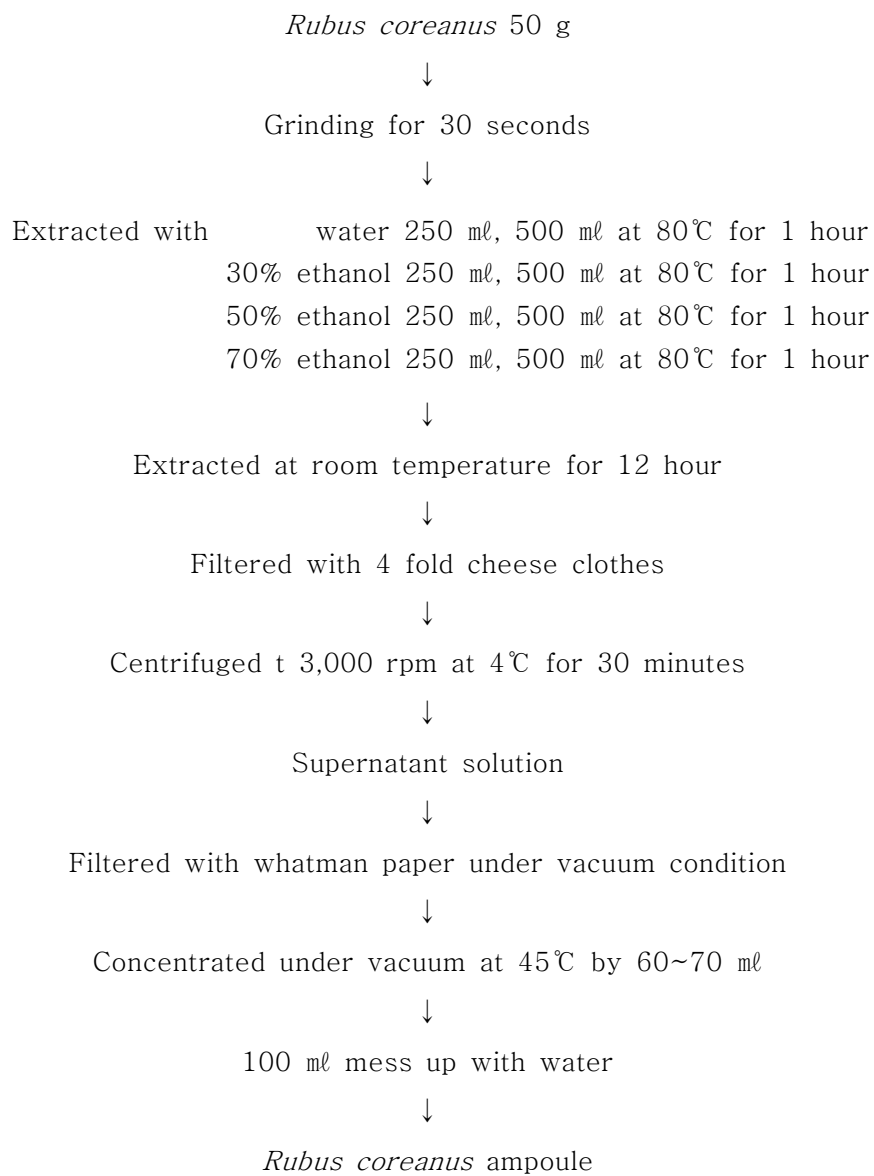


Fig. 2-2. Procedure for the preparation of *Rubus coreanus* ampoule to measure the changes of the characteristics of various solvent extracts during cold storage.

나) 산도

복분자 애플의 냉장 저장 과정 중의 산도 변화는 AOAC법에 준하여서 애플 5ml에 증류수로 50ml정용한 다음 0.1N-NaOH로 pH 8.3이 될 때까지 적정한 후 소요된 0.1N-NaOH의 양을 다음 식에 따라 lactic acid(%)로 환산하여 회석배수를 곱하여 산도를 산출하였다.

$$\text{Acidity (\%)} = \frac{\text{ml of NaOH} \times \text{Normality of NaOH} \times 0.09}{\text{Weight of sample (ml)}} \times 100$$

다) 색도

복분자 애플의 냉장 저장 과정 중의 색도 변화는 Color & Color Spectrophotometer (3500d, Minolta Co., LTD, Japan)를 사용하여 Hunter color value, 즉 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 측정하였다. 사용된 표준 백색판의 L, a, b값은 각각 90.2, 1.3, 3.2였다.

라) 갈변도 측정(Browning Index)

복분자 애플의 anthocyanin 색소의 안정성을 조사하기 위하여 애플을 15배 희석하여 이것을 Spectrophotometer (UV-9100, Human Inc., Korea)를 이용하여 복분자 anthocyanin 색소와 갈색 색소가 각각 최대 흡광도를 나타내는 520nm와 420nm에서의 흡광도 비로부터 다음과 같이 BI를 계산하여 복분자 애플의 anthocyanin 색소의 안정성을 평가하였다.

$$\text{Browning Index} = \frac{A_{520}}{A_{420}}$$

A₅₂₀: Absorbance at 520nm

A₄₂₀: Absorbance at 420nm

마) 유기산 및 유리당

애플의 냉장 저장 과정 중의 유기산과 유리당 함량 변화는 애플 2ml를 증류수 10ml로 정용하여 (membrane filter(Milipore, 0.45μm)로 여과시켰다. 이것을 HLB Sep-pak cartridge(Waters Co., USA)를 통과 시켜 HPLC에서 정량 하였다. 유기산의 HPLC 분석조건은 Table 2-1, 유리당의 분석은 Table 2-2의 조건에서 행하였다.

Table 2-1. Analytical condition of HPLC for organic acids

Model :	Waters
Column :	Aminex HPX87H
Mobile phase :	0.009N H ₂ SO ₄
Flow rate :	0.6 ml/min
Detector :	UV 210nm
Sensitivity :	0.1 AUFS
Attenuation :	1034
Chart speed :	0.5 cm/min
Injection volume :	10 μ l

Table 2-2. Analytical condition of HPLC for free sugars

Instrument :	Waters Associate
Column :	Carbohydrate analysis (4 mm \times 30 cm)
Solvent :	Acetonitrile-water (80 : 20, v/v)
Flow rate :	2.0 ml/min
Detector :	Differential Refractometer
Injection volume :	20 μ l

바) 유리 아미노산 함량

애플의 냉장 저장 과정 중의 유리 아미노산 함량 변화는 애플 2ml를 증류수 10ml로 정용하여 SSA (5-sulfosalicylic acid) 50mg/ml 첨가하였다. 이것을 membrane filter(Milipore, 0.2 μ m)로 여과시켜 아미노산 분석용 시료로 사용하였다. 유리 아미노산의 분석조건은 Table 2-3과 같다.

Table 2-3. Analytical condition of HPLC for free amino acids

Instrument :	SYCAM S433
Column :	Cation Dimension 150 × 4.6 nm
Reagent flow rate :	0.25 ml/min
Buffer flow rate :	0.45 ml/min
Injection volume :	100 μ l

3) 복분자 애플의 항세균 활성 측정

가) 사용 균주 및 배지

복분자 애플에 대한 항세균 활성을 검색하기 위해 사용된 균주는 저온에서도 성장이 가능하며 열처리 공정에서 생존할 수 있어 식품의 가공 및 저장 중에 식중독 발생에 관여하는 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569였다. 그리고 현재 연구 보고 된 바 있는 복분자 애플에 있어서 항균성을 보인 *Bacillus cereus*와 *E. coli* 균주를 통하여 복분자 애플에서의 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569와 항균성 정도를 비교하였다. 배지로는 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569는 brain heart infusion broth를 *Bacillus cereus*는 nutrient broth, *E. coli*는 tryptic soy broth를 사용하였고, Agar 배지는 agar powder를 1.8% 첨가하여 4℃에서 selective agar slant에서 보관하며 1개월마다 계대배양하여 항세균 활성 assay에 이용하였다.

나) 항세균 활성 측정

항세균 활성 측정은 paper disc(\varnothing 8mm, Whatman)법을 사용하였다. 우선, 사면배지 상태의 각각의 균주를 1백금이씩 취하여 5 ml의 액체배지에 넣은 후 37℃에서 24시간 배양한 후 새로운 액체배지에 옮기고 24시간 동안 배양하여 접종 균액으로 사용하였다. 항세균 측정에 사용할 접종액의 균 농도는 접종균액 1 ml씩을 취하여 0.1% peptone water로 희석하여 균수가 약 10^4 cfu/ml 되도록 하였다. 희석된 균액 0.1 ml를 취하여 petridish에 넣고 BHI, NB, TSA 배지를 미리 멸균하여 응고되기 직전에 15 ml 정도 분주하여 좌우로 잘 혼합한 후 응고시켰다.

복분자 애플은 멸균된 paper disc에 30 mg/disc을 loading시키고 추출용매

는 완전히 증발시킨 다음 미리 *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *E. coli* 를 접종하여 만들어 놓은 agar배지 위에 놓아 밀착시키고 0.85% 생리식염수로 앰플을 paper disc 주위에 확산 시켰다. 이것을 *Bacillus cereus*는 30°C 나머지 균은 37°C에서 24시간 동안 배양시킨 다음 disc 주위의 clear zone (mm)의 크기를 측정하여 항세균 활성을 나타냈다. 대조구로는 용매에 benzoic acid를 녹여서 paper disc당 0.5 mg을 loading했고 용매자체에 의한 항세균 활성을 확인하고자 물, 30%, 50%, 70% 주정도 각각 paper disc에 loading시킨 후 같은 방법으로 항세균 활성을 측정하였다.

4) 최소저해 농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

가) 사용 균주 및 배지

복분자 앰플 항세균 활성 검색에 이용한 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569와 *Bacillus cereus*와 *E. coli* 균주와 brain heart infusion, nutrient broth, tryptic soy broth 배지를 사용하였다.

나) MIC 측정

복분자 앰플의 MIC 측정은 항세균 활성 측정에서 이용한 paper disc법을 이용하였다. 우선 전 배양한 접종균들을 pour-plate method를 이용하여 접종한 후 각 앰플을 농도별로 paper disc에 loading시킨 후 용매를 증발시켜 건조시킨 paper disc를 배지 표면 위에 올려놓고 0.85% 생리 식염수로 확산시켜 *Bacillus cereus*는 30°C, 나머지 균주들은 37°C에서 24시간동안 배양하여 paper disc 주변에 clear zone(mm)이 생성되는 최저 농도를 MIC로 결정하였다.

5) 항균 활성물질의 열안정성 측정

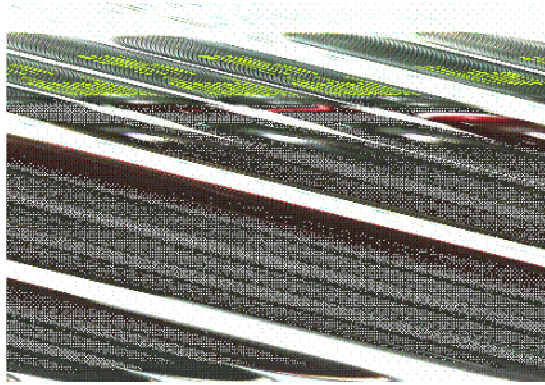
항균활성이 비교적 뛰어난 복분자 앰플의 열안정성을 조사하기 위하여 실온에서 3시간 추출하여 만든 복분자 앰플을 50mg/ml의 농도로 증류수에 녹여 제균한 후 80°C, 100°C에서 각각 30분 동안 수욕상에서 열처리한 시료와 121°C에서 15분간 autoclave한 시료를 냉각시킨 후 열안정성을 비교하였다. 각 시료들은 8mm paper disc에 50 μ l씩 흡수 및 건조시킨 후 *Listeria monocytogenes*와 *Bacillus cereus*, *E. coli*를 검정균으로 사용하여 paper disc method를 이용하여 inhibition zone(mm)을 측정하였다.

다. 연구결과

1) 복분자 앰플의 제조

가) 추출 용매를 달리하여 제조한 복분자 앰플

추출 용매를 달리하여 제조한 복분자 앰플은 Fig. 2-3과 같다.



water 30% ethanol 50% ethanol 70% ethanol

Fig. 2-3. Prepared *Rubus coreanus* ampoules extracted with different mixtures of the solvents.

나) 복분자 적정 추출 용매비와 시간 결정

복분자 앰플의 적정 추출 용매비를 결정하기 위하여 복분자에 대한 water의 비율을 5배, 10배, 15배, 20배로 달리하여 80℃로 3시간 동안 가열 추출하면서 측정한다. 당도의 변화는 Fig. 2-4와 같다. 5배, 10배, 15배, 20배 모두 60분까지는 당도가 증가하다가 105분까지 다시 감소하여 안정한 값을 갖는 것으로 보였다. 따라서 복분자 앰플을 제조하기 위한 용매로 복분자를 추출하

는 시간은 60분이 적당하다고 할 수 있다.

용매 비율에 있어서는 시료량에 대한 용매의 양이 증가 할수록 당도가 작아지는 것을 전제로 둔다면 5배, 10배로 추출하는 것은 서로 비슷한 양상을 보이나 5배, 10배로 추출하는 것에 비하여 15배 20배 추출하는 동안 당도 감소량이 더 크므로 5배나 10배의 용매로 추출하는 것이 적당하다고 볼 수 있다. Table 2-4에는 5배, 10배, 15배, 20배의 용매로 추출하여 만들어진 복분자 앰플의 색도와 가용성 고형분 함량을 비교하였다. 색도에 있어서는 5배와 10배의 복분자 앰플의 색은 별다른 차이를 보이지는 않았지만 대체적으로 복분자에 대한 용매의 비율이 증가 할수록 L, a, b 값이 모두 감소하였다. 그리고 각 시료의 5배, 10배, 15배, 20배 처리구별 추출 수율은 6.557%, 8.810%, 5.062%, 4.225%로 나타나 물과의 비율이 10배일 때 추출 수율이 가장 좋은 것으로 나타났다. 이는 상황 버섯 분말의 추출에서 추출시간이 증가 할수록 가용성 성분이 증가하다가 추출평형 시점 이후부터는 일정하였다는 연구 보고와 가수량이 10배수 일 때 가용성 성분의 함량이 가장 높았다는 오미자 추출 특성 연구보고와 유사한 결과를 보여 주었다.

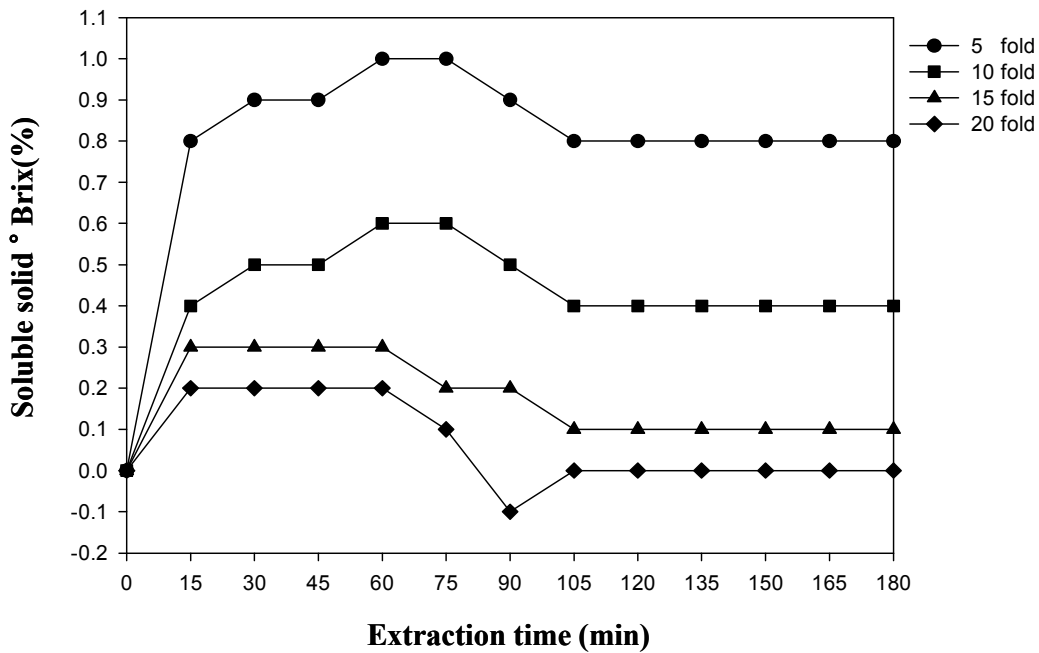


Fig. 2-4. Changes in soluble solid contents of *Rubus coreanus* ampoules extracted with different ratio of water.

Table 2-4. Total yields and Hunters value of *Rubus coreanus* ampoules extracted with different ratio of ethanol

	Total yield (g/100ml)	Hunter`s value		
		L value	a value	b value
5 fold	6.557	4.21±0.0058	28.50±0.0458	7.55±0.0651
10 fold	8.810	4.18±0.0153	28.44±0.0907	7.48±0.0100
15 fold	5.062	3.53±0.0100	24.05±0.0436	6.34±0.0651
20 fold	4.225	2.97±0.0153	20.23±0.0153	5.43±0.0346

다) 가용성 고형물 함량

복분자 앰플 제조과정 중 추출의 최적 용매 비로 사료되는 5배와 10배의 용매비로 서로 다른 4종류의 용매 water, 30% ethanol, 50% ethanol, 70% ethanol로 복분자 앰플을 만들었다. 이들 각각의 가용성 고형물 함량은 Table 2-5와 같다.

용매 종류별로 5배와 10배의 용매비로 추출하여 만든 앰플의 각각의 수율을 구한 결과 10배의 용매비로 추출하여 만든 복분자 앰플이 최적의 제조 조건으로 사료되었다. 따라서 복분자 앰플의 최적 제조 조건으로 판단되는 10배의 용매비로 서로 다른 용매 종류별로 80℃ 30분 추출하여 만든 복분자 앰플의 25일 동안 냉장저장하면서 특성을 분석하였다.

Table 2-5. Total yields of *Rubus coreanus* ampoules extracted with various solvent and solvent extraction ratio

Solvent	Total yield (g/ml)	
	5 fold	10 fold
water	6.555	8.812
30% ethanol	9.391	13.845
50% ethanol	5.203	5.257
70% ethanol	6.693	6.631

2) 저장 기간동안 추출조건에 따른 복분자 앰플의 특성

가) pH와 적정 산도

Water, 30% ethanol, 50% ethanol, 70% ethanol의 서로 다른 용매로 복분자 시료의 10배에 해당하는 용매비율로 추출하여 만든 복분자 앰플의 냉장 저장 기간동안의 pH와 적정 산도의 변화정도는 Fig. 2-5 와 Fig. 2-6과 같다. water로만 추출한 복분자 앰플은 계속적으로 산도가 낮아지는 경향을 나타냈지만 30%, 50%, 70% ethanol로 추출하여 만든 복분자 앰플은 제조한 당일부터 5일까지는 산도가 감소하다가 5일 이후부터는 다시 증가하여 초기와 유사한 경향을 나타냈다.

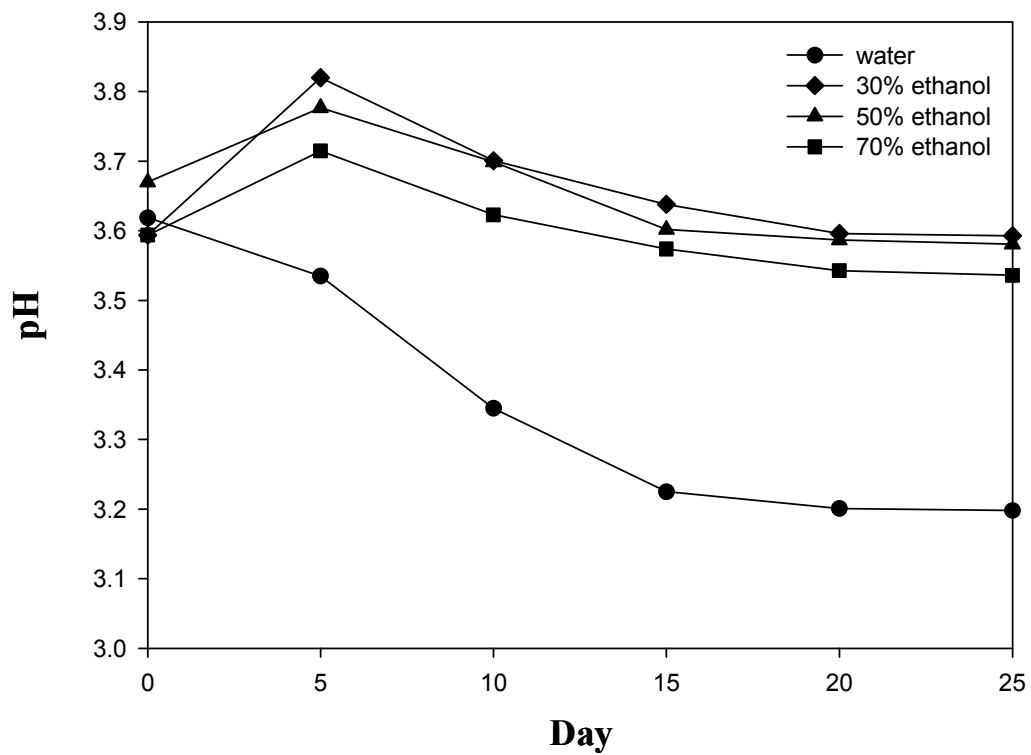


Fig. 2-5. Changes in pH of *Rubus coreanus* ampoules extracted with various solvents in 10 fold solvent extraction during cold storage.

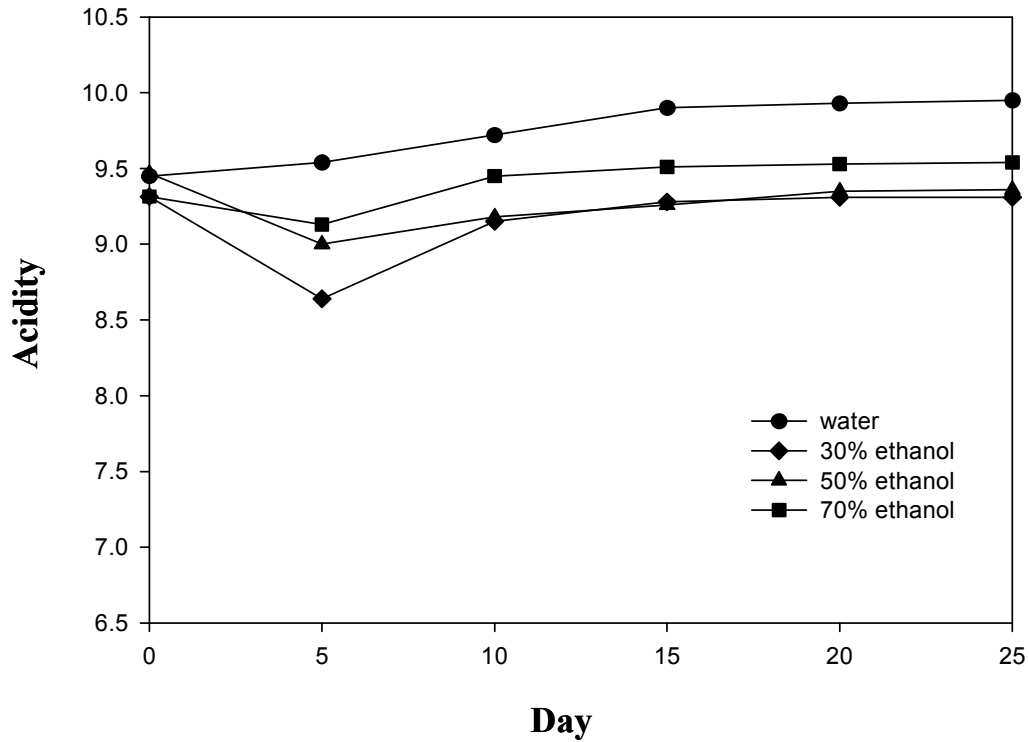


Fig. 2-6. Changes in acidity of *Rubus coreanus* ampoules extracted with various solvents in 10 fold solvent extraction during cold storage.

나) 색도

10배의 용매비로 용매 종류별로 만든 복분자 앰플의 색은 Fig. 2-7과 같다. 각 복분자 앰플의 냉장저장 기간동안의 변화는 Hunter s value 에 따라서 L(명도), a(적색도), b(황색도) 값의 변화를 측정하여 각각 Fig. 2-8, Fig. 2-9, Fig. 2-10에 나타내었다. 대체적으로 30%, 50%, 70% ethanol 보다 물로 추출한 복분자 앰플의 L, a, b 값이 높았지만 변화의 폭이 가장 심하여 불안정함을 알 수 있었고, 70% ethanol로 추출한 복분자 앰플도 불안정한 경향을 보였다. 이에 비해 30%, 50% ethanol로 추출한 복분자 앰플은 명도의 변화는 컸지만 대체적으로 적색도와 황색도는 안정하게 변화하는 것을 알 수 있었다.

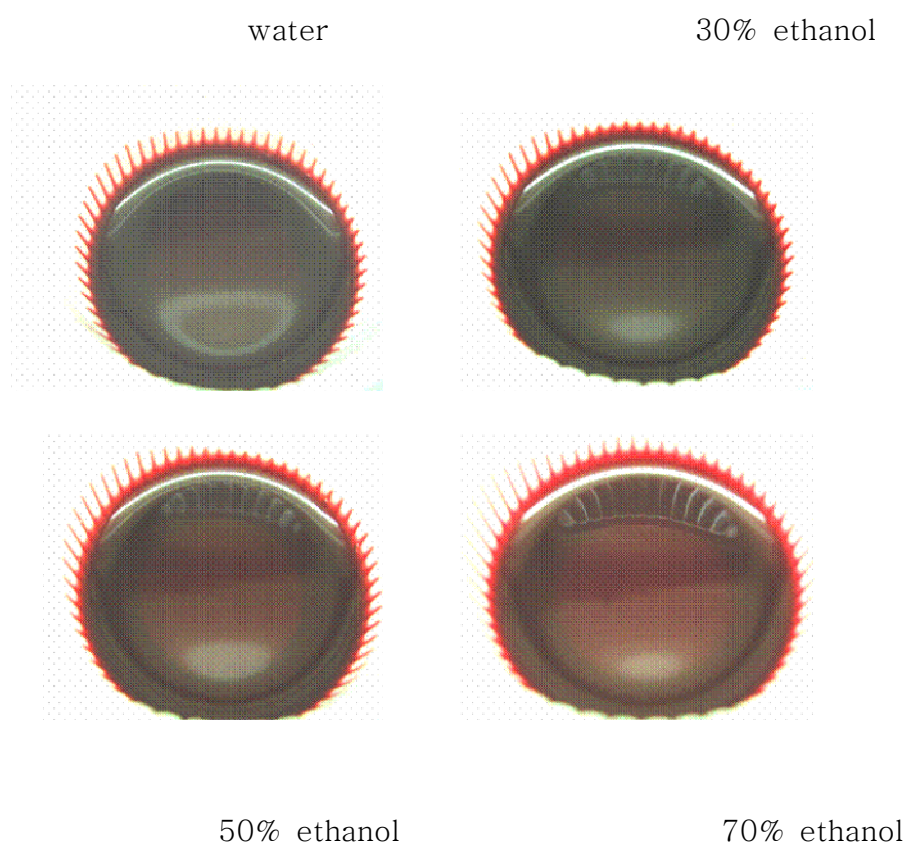


Fig. 2-7. Color of *Rubus coreanus* ampoules extracted with various solvents in 10 fold solvent extraction.

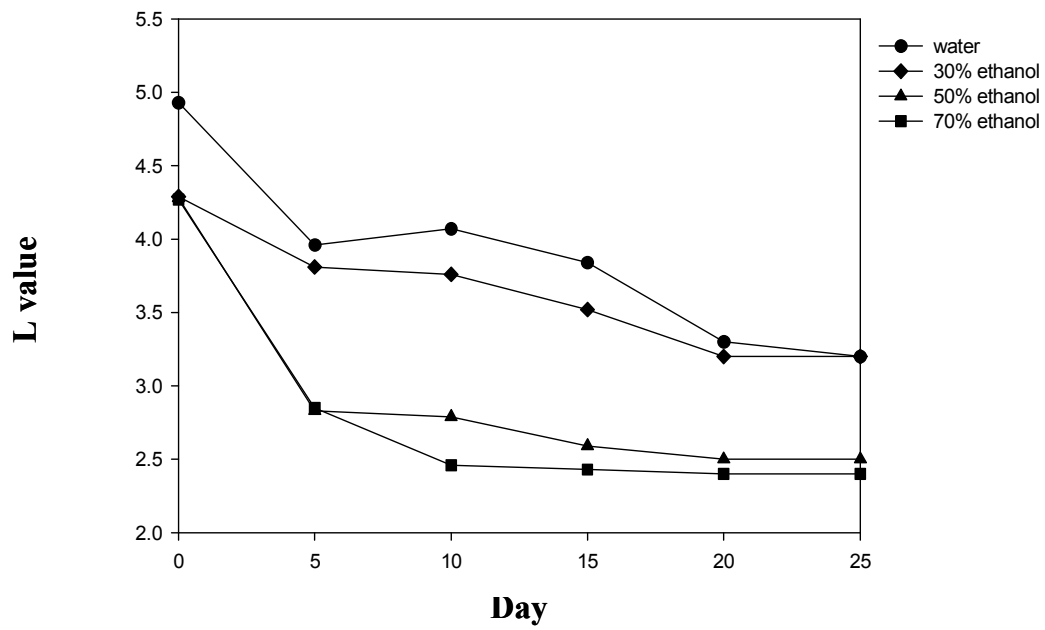


Fig. 2-8. Changes in color(L value) of *Rubus coreanus* ampoules extracted with various solvents in 10 fold solvent extraction during cold storage.

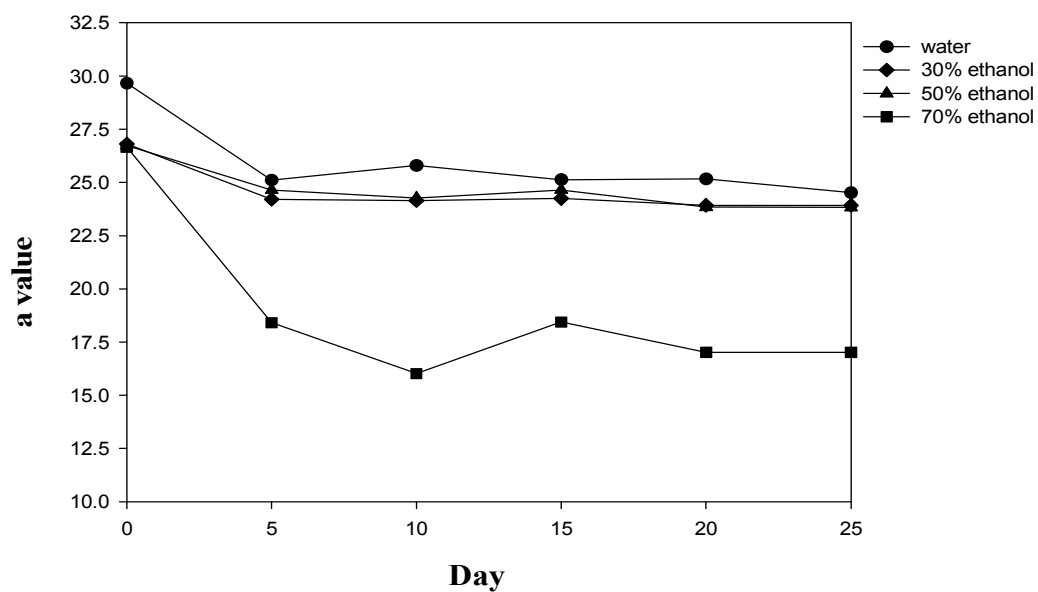


Fig. 2-9. Changes in color(a value) of *Rubus coreanus* ampoules extracted with various solvents in 10 fold solvent extraction during cold storage.

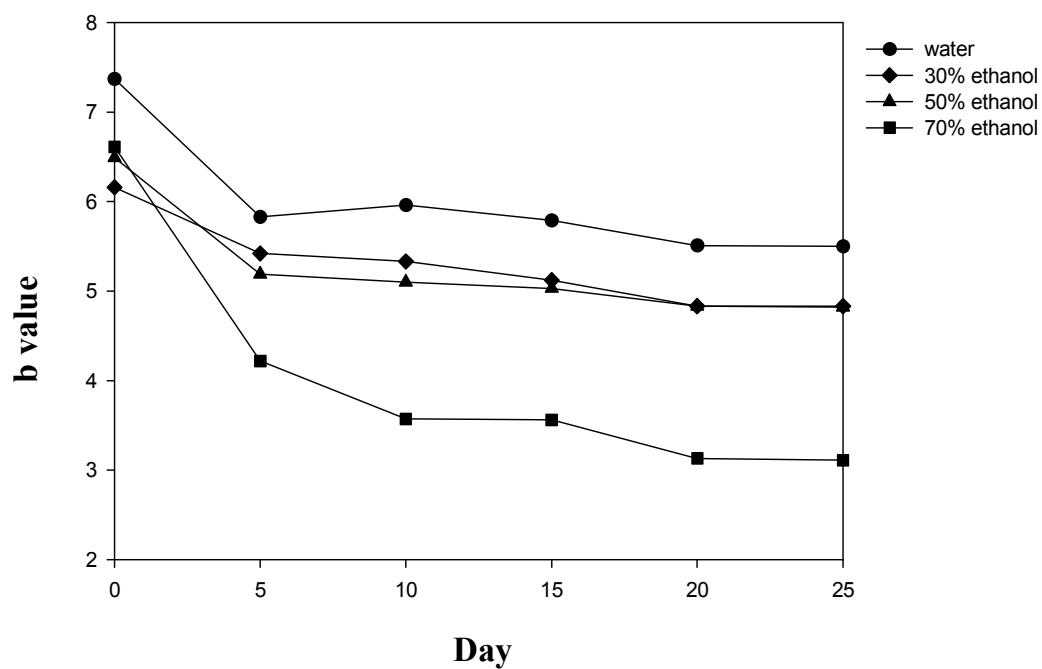


Fig. 2-10. Changes in color(b value) of *Rubus coreanus* ampoules extracted with various solvents in 10 fold solvent extraction during cold storage.

다) 갈변도

복분자 앰플의 주요 색소인 안토시아닌 색소의 안정성을 평가할 수 있는 갈변도의 변화를 Fig. 2-11에 나타내었다. 갈변도 역시 색도의 변화와 유사하게 물과 70% ethanol로 추출하여 만든 복분자 앰플이 30%, 50% ethanol로 추출하여 만든 복분자 앰플보다 불안정한 경향을 보였다.

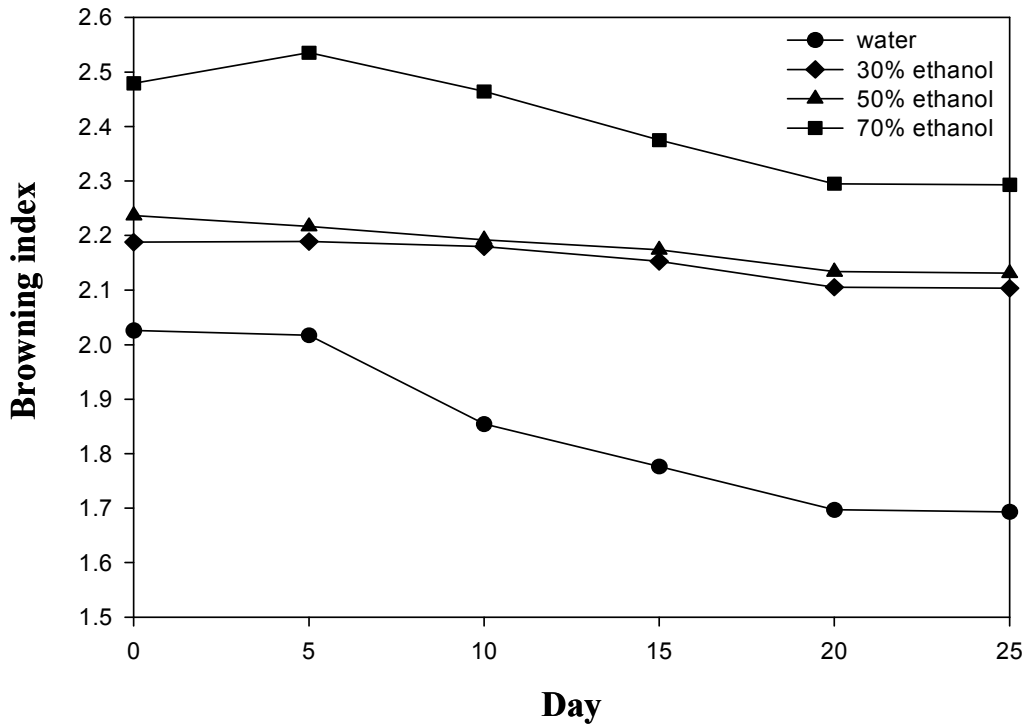


Fig. 2-11. Changes in browning index of *Rubus coreanus* ampoules extracted with various solvents in 10 fold solvent extraction during cold storage.

라) 일반성분

복분자열매로부터 제조한 복분자 앰플의 일반성분을 분석한 결과는 Table 2-6에서와 같이 총당 23.8%, 환원당 11.7%, 조단백질 13.1%, 조회분 6.7%, 조지방 5.2%, 조섬유 6.0%로 분석되었다.

Table. 2-6. Approximate composition of *Rubus coreanus* ampoule

Component	Amount(%)
Total sugar	23.8
Reducing sugar	11.7
Crude protein	13.1
Crude fat	6.7
Crude fiber	5.2
Ash	6.0

마) 유리당 함량

복분자열매로부터 제조한 복분자 앰플의 주요 유리당은 Table 2-7에서와 같이 sucrose, fructose, glucose인 것으로 분석되었는데, 이들 당의 함량을 보면 sucrose는 2.83%, fructose는 5.87%, glucose는 2.25%였다. 일반적으로 과일에 함유되어 있는 유리당 함량은 사과의 경우 sucrose 0.93%, fructose 4.63%, glucose 3.65%이고, 포도의 경우 fructose 5.14%, glucose 5.08%이며, 복숭아의 경우 sucrose 0.33%, fructose 0.94%, glucose 0.93%로 보고된 것과 비교하면 복분자 열매보다 유리당 함량이 더 높다. 하지만 과일과 채소류는 수확시기, 재배방법, 재배환경에 따라 그 성분 함량이 다른 것으로 보고 되고 있다.

Table. 2-7. Free sugar contents of *Rubus coreanus* ampoule

Free sugar	Amount(%)
Sucrose	2.83
Fructose	5.87
Glucose	2.25

바) 유기산 함량

복분자열매로부터 제조한 복분자 앰플의 유기산 함량은 Gas Liquid Chromatography로 분석하였는데 그 결과는 Table 2-8에서와 같이 citric acid 12.98%로 가장 많이 함유된 것으로 분석되었고 그 다음으로 oxalic acid 8.31%, malic acid 2.95%의 순으로 함유되어 있었으며 pyruvic acid, malonic acid, succinic acid는 소량 함유된 것으로 분석되었다.

Table. 2-8. Contents of organic acids in *Rubus coreanus* ampoule

Organic acid	Amount(%)
Citric acid	12.98
Oxalic acid	8.31
Malic acid	2.95
Succinic acid	0.39
Malonic acid	0.16
Pyruvic acid	0.07
Fumaric acid	0.02

3) 복분자 앰플의 항세균 활성

복분자를 물과 30%, 50%, 70% ethanol로 추출하여 만든 앰플을 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, *Bacillus cereus* 1014, *E. coli* ATCC 43888에 대한 항세균 활성을 측정한 결과는 Table 2-9와 같다. 이 세 균주에 대해 모두 비슷한 항세균 활성이 인정되었는데 water와 30% ethanol에서는 *L. monocytogenes* KCTC 3569, *E. coli* ATCC 43888, *Bacillus cereus* 1014 순으로 활성이 강하였고, 50%와 70% ethanol에서는 *E. coli* ATCC 43888, *L. monocytogenes* KCTC 3569, *Bacillus cereus* 1014 순으로 활성이 강하였다. 대조구로 사용한 benzoic acid에서는 *E.coli* 43888에서만 약간 높은 활성을 보임으로써 복분자 앰플이 benzoic acid와 비슷한 항세균 활성이 있는 것으로 사료되었다. 그리고 현재 복분자 앰플에 *Bacillus*와 *E. coli*가 높은 항균활성을 나타낸다는 연구보고와 비교하여 *L. monocytogenes* 역시 복분자 앰플에서 높은 항균활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

Table 2-9. Antibacterial activities of *Rubus coreanus* ampoules against tested food poisoning bacteria

Extraction solvent	Inhibitory zone (mm)		
	<i>Listeria monocytogens</i> KCTC 3569	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1014	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43888
water ^a	14 ^c	9	14
30% ethanol ^a	15	13.5	14
50% ethanol ^a	14.5	14	14.5
70% ethanol ^a	15.5	13	16
BA ^b	13	9	18

^a30mg/disc

^bBenzoic acid 0.5mg/disc (control)

^cInhibitory zone of paper disc (mm)

2. 복분자열매로부터 복분자 분말소재의 개발 및 특성 분석

가. 실험 재료

1) 복분자

전남 신안군 압면도에서 수확한 2006년산 복분자(*Rubus coreanus* Miq.)를 (주)연수당 냉동고에 -20°C 에서 동결 저장된 시료를 제공 받아 본 연구실의 -20°C 냉동고에 저장하면서 냉장온도에서 해동시킨 후, 일정량을 취하여 실험에 사용하였다.

2) 주정

전남 장성 소재의 (주)보해양조에서 생산되는 95% 주정을 사용하였다.

3) 물

일반 수돗물을 일단 끓였다가 20℃로 식힌 후에 사용하였다.

나. 복분자 분말의 제조

1) 복분자 분말(Powder of *Rubus coreanus*, RP)

복분자 분말은 생 복분자 열매를 freezer에서 -40℃까지 급속 냉동시킨 후 동결건조기(EYELA, freeze dryer, FDU-540)를 이용하여 48시간 동안 건조하였다. 이를 grinding하여 20 mesh체로 씨를 제거한 후, 다시 80 mesh체로 입자를 고르게 하여 복분자 분말(RP)을 제조하였다. 제조된 복분자 분말(RP)은 para film으로 밀봉하여 -20℃에 냉동보관하면서 사용하였다.

2) 복분자 물추출분말(Water extract Powder of *Rubus coreanus*, WP)

복분자 물추출분말을 제조하기 위해 먼저 냉동된 시료를 12시간 냉장온도에서 해동하고 복분자를 일정량 마쇄하였다. 마쇄된 복분자(g)에 10배에 해당하는 물(ml)을 섞고, 환류 냉각 추출 장치를 이용하여 80℃에서 60분 동안 추출하였다. 추출물은 다시 실온에서 12시간 추출하여 4겹의cheese cloth에 여과하고 여과된 액을 원심분리(4℃, 3,000 rpm, 30 min)한 후, 얻어진 상등액을 여과(No. 2, Whatman)하였다. 여액을 freezer에서 -40℃까지 급속 냉동시킨 후 동결건조기(EYELA, freeze dryer, FDU-540)에서 48시간 동안 건조하여 80 mesh체로 입자를 고르게 하여 복분자 물추출분말(Water extract Powder of *Rubus coreanus*, WP)을 제조하였다. 제조된 복분자 물추출분말은 Para film으로 밀봉하여 -20℃에 냉동 보관하면서 사용하였다.

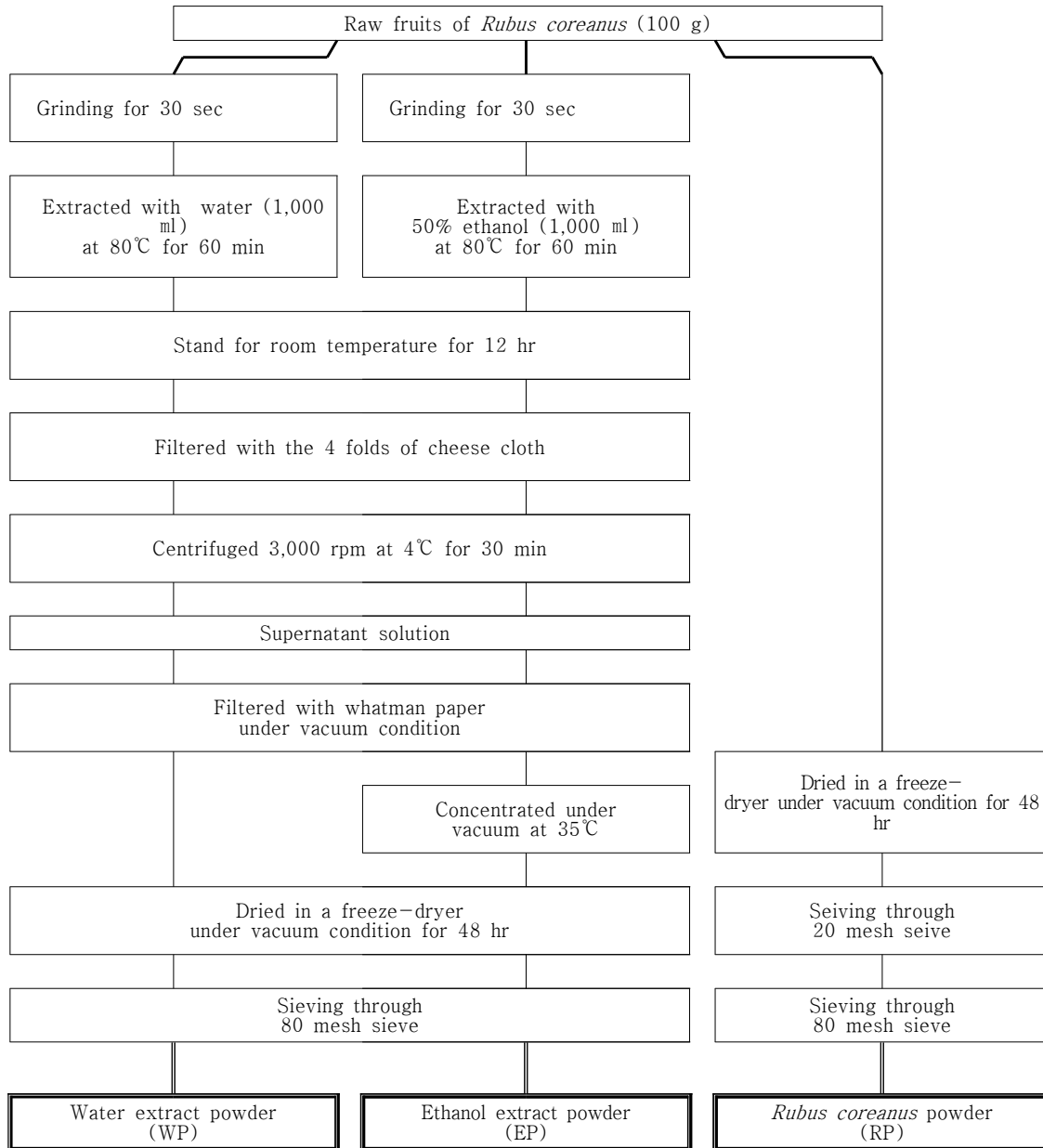


Fig. 2-12. Manufacturing procedures of the powders of *Rubus coreanus*.



3) 복분자 주정추출분말(Ethanol extract Powder of *Rubus coreanus*, EP)

복분자 주정추출분말(EP)은 복분자 물추출분말의 제조 과정과 동일하게 제조하였으나 추출 용매로 물 대신에 50% 주정을 사용한 것이 다르다. 동결건조 전에 여액에 포함된 주정을 제거하기 위하여 cooling aspirator(EYELA COOL ACE CA-111)를 장착한 vacuum evaporator(EYELATYPE N-N)를 사용하여 35℃에서 감압 농축하여 복분자 주정추출분말(Ethanol extract Powder of *Rubus coreanus*, EP)을 제조하였다.

다. 복분자 분말의 이화학적 특성 분석

1) 일반성분 분석

생복분자 분말, 복분자 물추출물분말, 복분자 주정추출물분말(RP, WP, EP)의 수분 함량은 상압가열 건조법, 조단백질은 micro-kjeldahl분해법, 조지방은 soxhlet 추출법, 조회분은 450℃ 직접 회화법으로 각각 함량을 측정하였다.

2) 환원당 분석

복분자 분말(RP, WP, EP)의 환원당 함량은 Dinitrosalicylic acid(DNS)법에 의하여 측정하였다. 즉 시험관에 DNS시약 1.5 ml와 5×10^2 배로 희석한 시료용액 0.5 ml를 혼합한 후 boiling water bath에서 정확히 5분간 방치하고 급냉시킨 다음 증류수를 섞어 12.5 ml로 정용 혼합한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하고 D-(+)-glucose의 표준곡선으로부터 환원당 함량을 산출하였다.

3) 색도

복분자 분말(RP, WP, EP)의 색도는 Color & Color Spectro photometer(3500d, Minolta Co., LTD, Japan)를 사용하여 Hunter color value, 즉 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 측정하였다.

4) pH 및 적정산도

복분자 분말(RP, WP, EP)의 pH와 적정산도는 시료를 증류수로 100배 희석하여 pH는 pH meter(Orion model 520A, U.S.A)를 이용하여 적정산도는 복분자 추출액의 적정산도를 구하는 방법과 동일하게 측정하였다.

라. 복분자 분말의 항균 활성 측정

1) 사용균주 및 배지

복분자 분말(RP, WP, EP)에 대한 항균 활성을 검색하기 위해 사용된 균주와 배지는 복분자 추출액의 항균 Test에서 항균 활성이 인정된 것을 사용하였다.

2) 복분자 분말의 항균 활성 측정

복분자 분말(RP, WP, EP)에 대한 항균 활성을 검색하기 위해 *Bacillus cereus* KCTC 1092, *Candida albicans* KCTC 1940, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552는 30°C, 나머지 균주들은 37°C에서 15~18시간 전 배양하여 신선한 broth 10 ml에 접종한 후 무균 처리한 RP, WP, EP를 배지의 1%가 되도록 0.1 g씩 주입하였다. 다시 *Bacillus cereus* KCTC 1092, *Candida albicans* KCTC 1940, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552는 30°C, 나머지 균주들은 37°C에서 진탕배양하면서 3시간 간격으로 배양액의 증식도 변화를 spectrophotometer(UV-9100, Human Inc., Korea)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분말을 첨가한 각 균주에 대한 growth curve는 분말 자체에 대한 흡광도 값이 다르므로 나중 흡광도 값과 초기 흡광도 값의 차에 대한 백분율로 나타내어 분말을 첨가하지 않은 균주의 growth curve와 비교하였으며, 최종 흡광도 변화량의 차에 대한 백분율로서 growth inhibition rate(%)를 구하여 항균 활성을 검색하였다.

마. 통계분석

복분자 추출액과 분말의 이화학적 특성 검사와 항균 활성 Test는 총 3회 반복하였고, 이 결과에 대해 SPSS(12.0) 프로그램을 이용하여 분산분석을 수행하였으며 평균 간 유의성 검정은 Duncans` multiple comparison test($p < 0.05$)와 LSD(least significant difference)를 실시하여 분석하였다.

바. 연구수행 내용 및 결과

1) 일반성분 함량

동결건조 하여 제조한 복분자 분말(RP), 복분자 물추출분말(WP), 복분자 주정추출분말(EP)의 수율 및 일반성분은 Table 2-10과 같다. 복분자 분말 (RP, WP, EP)의 수율은 분말 조제에 사용된 원료량에 대한 최종 얻어진 시료량의 백분율로써 수율(%)을 구하였다. RP, WP, EP 각각의 수율은 6.97%, 9.94%, 9.11%로 복분자 물추출분말(WP), 복분자 주정추출분말 (EP), 복분자 분말(RP) 순으로 크게 나타났으나 LSD방법에 의한 다중 비교결과 WP와 EP간의 유의한 차이는 없었다.

대부분의 과실이나 채소는 수확 기간이 한정되어 있고 수확된 과채류는 부패하기 쉬워 이를 건조하는 주 목적은 저장성을 높이는데 있으므로 완전히 건조되지 않더라도 미생물이 번식하지 않을 정도면 된다. 과실과 채소 건조 정도는 과실이 24%, 채소는 5~10%의 수분함수량이 되도록 하는 것이 표준으로 되어있으나 복분자 분말(RP, WP, EP)의 수분 함량은 표준 보다 더 높았는데 이는 제조 과정 중 동결건조가 갖는 다공성 조직 때문에 복분자가 분말이 되어도 큰 흡습성은 피할 수 없기 때문이라고 판단되어진다. 분말식품의 경우 아무리 건조가 잘 되었다하더라도 저장조건에 따라 품질이 달라지며, 대기 중의 수분을 흡습하여 건조식품의 품질에 영향을 주게 된다. 흡습은 식품의 종류와 성분 구성, 모양, 크기 등에 따라 달라지며, 또한 같은 식품일지라도 저장 상대 습도와 온도, 가공형태에 따라 서로 달라지기 때문에 흡습특성에 대한 정확한 연구는 어려운 실정이다. 목 등은 오미자 분무건조 분말 제조시 건조 보조제로 텍스트린을 첨가하였을 때 분말의 질이 현격하게 개선되었다고 보고하였는데, 복분자 분말에 대해서도 이러한 건조 보조제에 대한 연구 뿐 아니라 흡습을 효과적으로 막을 수 있는 포장재 등 흡습을 개선하기위한 좀 더 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 2-10. Proximate composition of the powders of *Rubus coreanus* (unit: %)

	RP ¹⁾	WP	EP
Yield	6.97±0.50 ^a	9.94±0.39 ^b	9.11±0.62 ^b
Moisture	80.64±1.88 ^b	79.87±0.31 ^a	75.14±0.53 ^a
Crude protein	2.91±0.97 ^a	4.60±0.35 ^b	2.28±0.43 ^a
Crude lipid	4.38±0.48 ^a	4.21±0.10 ^a	4.09±0.55 ^a
Crude Ash	3.74±0.03 ^a	4.19±0.35 ^a	4.16±0.81 ^a

¹⁾ RP: Powder of *Rubus coreanus* was not extracted.

WP: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by water.

EP: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by 50% ethanol.

^{a-b} Means with the same superscript in a row are not significantly different at $p < 0.05$.

Data were presented as mean±standard deviation.

복분자 분말 RP, WP, EP 조단백질의 함량은 각각 2.91%, 4.60%, 2.28%로 WP, RP, EP순으로 많았으며 RP와 EP간의 유의한 차이($p > 0.05$)는 없었다. RP, WP, EP 각각의 조지방의 함량은 각각 4.38±0.48%, 4.21±0.10%, 4.09±0.55% 조회분의 함량은 각각 3.74±0.03%, 4.19±0.35%, 4.16±0.81%로 분말간의 조지방과 조회분은 유의차가 없었다($p > 0.05$). 이와 같은 결과로 볼 때 수율과 조단백질에서 높은 수치를 보인 복분자 물추출분말이 다른 분말에 비해 우수하다고 사료된다. 김 등은 미숙 복분자 분말의 조단백질은 11%, 조지방은 13%, 조회분은 4%로 보고하였는데, 본 실험 결과와의 차이는 복분자 분말 채취시기와 복분자 분말의 제조방법 차이 등이 원인인 것으로 생각된다.

2) 환원당 함량

복분자 분말(RP, WP, EP)의 환원당 함량은 Table 2-11에 나타내었다. RP, WP, EP 각각의 환원당 함량은 0.70 g/ml, 0.96 g/ml, 1.01 g/ml로 EP, WP, RP 순으로 크게 나타났다($p < 0.05$).

3) 색도

복분자 분말(RP, WP, EP)의 색도는 Table 2-11과 같다. RP, WP, EP 각각의 L값은 23.84, 22.80, 20.52, a값은 25.57, 14.71, 7.52, b값은 7.98, 4.25, 2.69였다. RP, WP, EP의 L, a, b값은 모두 유의적인 차이가 있었으며($p < 0.05$) RP, WP, EP순으로 RP가 가장 밝은 적색을 나타냈다. 복분자의 색소인 anthocyanin은 중성 또는 알칼리 용액에서 불안정하며 산성 용액이라도 빛에 노출되면 서서히 탈색되는 현상을 나타내어 저장 가공 중에 빨리 변색하는 구조적으로 가장 불안정한 물질 중 하나이다. 따라서 복분자 주정추출분말에서 어두운 적색을 나타낸 것은 주정에 의한 복분자를 추출하는 동안에는 다른 과정에 비해 중성인 상태에 오래 있었으며 RP 보다는 그 제조과정이 길고 복잡한데에 기인하는 것으로 생각된다.

4) pH와 적정산도

복분자 분말(RP, WP, EP)의 pH와 적정산도는 Table 2-11과 같다. RP, WP, EP 각각의 pH는 3.11, 3.40, 3.38이었으며 적정산도는 11.71%, 8.55%, 8.64%로 WP와 EP는 유의적인 차이가 없었으나($p > 0.05$) RP는 WP와 EP에 비해 산도의 정도가 더 크게 나타남을 알 수 있었다.

Table 2-11. Quality characteristics of the powders of *Rubus coreanus*

	RP ¹⁾	WP	EP
Reducing sugar (g/ml)	0.70±0.01 ^a	0.96±0.02 ^b	1.01±0.03 ^c
Color	L	23.84±0.03 ^c	22.80±0.02 ^b
	a	25.57±0.04 ^c	14.71±0.03 ^b
	b	7.98±0.03 ^c	4.25±0.04 ^b
pH	3.11±0.01 ^a	3.40±0.02 ^b	3.38±0.01 ^b
Titrateable acidity (%)	11.71±0.06 ^b	8.55±0.01 ^a	8.64±0.02 ^a

¹⁾ RP: Powder of *Rubus coreanus* was not extracted.

WP: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by water.

EP: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by 50% ethanol.

^{a-c} Means with the same superscript in a row are not significantly different at $p < 0.05$.

Data were presented as mean±standard deviation.

5) 복분자 분말의 항균활성

복분자 분말(RP, WP, EP)에 대한 항균 활성은 복분자 추출액에서 항균활성이 인정되었던 *Bacillus cereus* KCTC 1092, *Listeria monocytogens* KCTC 3569, *Staphylococcus aureus* KCTC 13566, *Escherichia coli* ATCC 43888, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Shigella dysenteriae* KCTC 2915, *Candida albicans* KCTC 1940, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552에 대하여 growth curve를 작성하여 분말 종류별 증식억제효과를 측정하였다.

가) *Bacillus cereus* KCTC 1092 & *Listeria monocytogens* KCTC 3569

Bacillus cereus KCTC 1092 에 대한 복분자 분말(RP, WP, EP)의 증식억제효과는 Fig. 2-13과 같다. 복분자 분말을 첨가하지 않은(control) nutrient broth에서 자란 *Bacillus cereus* KCTC 1092에 대하여 RP, WP, EP는 각각 1.32%, 17.11%, 0%의 낮은 억제 효과를 보였다. *Bacillus cereus* KCTC 1092에 대하여 복분자 추출액은 대체적으로 높은 항균활성을 보였으나 분말의 형태에서는 가장 낮은 증식억제효과를 보여 항균활성이 현저히 감소되었음을 알 수 있었다.

우유 관련 제품과 함께 육류, 생선, 야채, 각종 가공 식품에 오염되어 사람과 동물에게 유산, 패혈증, 또는 화농성 뇌막염 등 Listeriosis를 유발시키는 치명적인 병원성 세균으로 알려져 있는 *Listeria monocytogens* KCTC 3569 에 대한 복분자 분말(RP, WP, EP)의 증식억제효과는 Fig. 2-14와 같다. RP에 비해 WP, EP는 성장 9시간 후부터 거의 증식이 없이 일정수준으로 유지되어 *Listeria monocytogens* KCTC 3569 증식을 더 빨리 멈추는 것을 알 수 있었다. 복분자 분말을 첨가하지 않은(control) brain heart infusion broth에서 자란 *Listeria monocytogens* KCTC 3569 에 대하여 RP, WP, EP순으로 각각 83.04%, 72.57%, 67.43%의 증식억제효과를 보여 WP, EP보다 RP에서 더 큰 항균활성을 보였다. Kent 등은 *L. monocytogens*의 성장 억제 최대 pH는 온도에 관계없이 4.4 이하라고 보고하였는데 WP, EP보다 RP에서 더 큰 항균활성이 나타난 이유는 WP, EP에 비해 RP의 pH가 낮은 것으로 미루어 보아 *Listeria monocytogens* KCTC 3569의 생육에 분말의 pH가 영향을 미치는 것으로 생각된다.

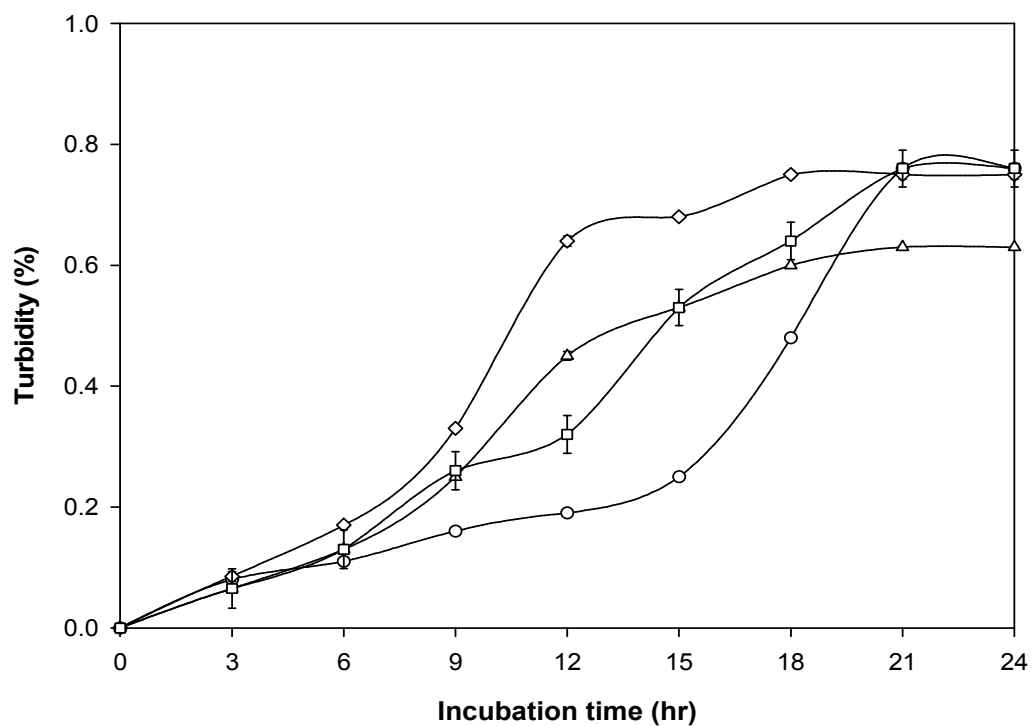


Fig. 2-13. Antimicrobial effect of the powders of *Rubus coreanus* on the growth of *Bacillus cereus* KCTC 1092.

- : Broth was not contained the powder of *Rubus coreanus* (control).
- ◇: Powder of *Rubus coreanus* was not extracted (RP).
- △: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by water (WP).
- : Powder of *Rubus coreanus* was extracted by 50% ethanol (EP).

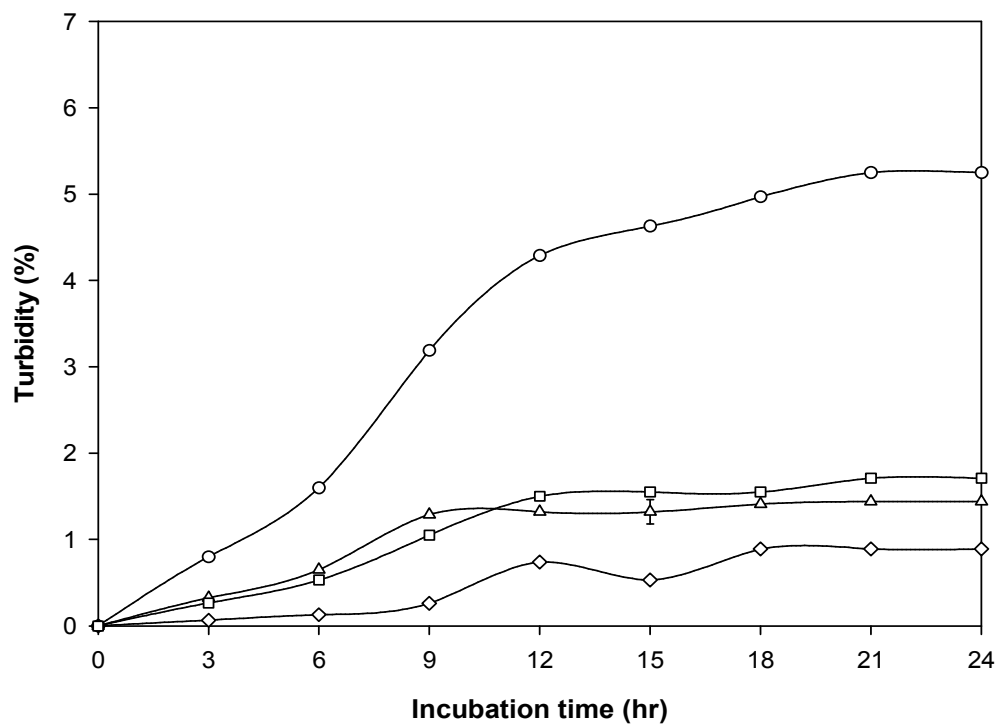


Fig. 2-14. Antimicrobial effect of the powders of *Rubus coreanus* on the growth of *Listeria monocytogenes* KCTC 3569.

- : Broth was not contained the powder of *Rubus coreanus* (control).
- ◇: Powder of *Rubus coreanus* was not extracted (RP).
- △: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by water (WP).
- : Powder of *Rubus coreanus* was extracted by 50% ethanol (EP).

나) *Staphylococcus aureus* KCTC 13566 & *Escherichia coli* ATCC 43888

Staphylococcus aureus KCTC 13566에 대한 복분자 분말(RP, WP, EP)의 증식억제효과는 Fig. 2-15와 같다. 복분자 분말을 첨가하지 않은 (control) nutrient broth에서 자란 *Staphylococcus aureus* KCTC 13566에 대하여 RP, WP, EP순으로 각각 78.35%, 64.94%, 36.47%의 증식억제효과를 보여 RP에서 항균활성이 가장 크게 나타났다.

Escherichia coli ATCC 43888에 대한 복분자 분말(RP, WP, EP)의 증식억제효과는 Fig. 2-16과 같다. 복분자 분말을 첨가하지 않은(control) tryptic soy broth에서 자란 *Escherichia coli* ATCC 43888에 대하여 RP, EP, WP순으로 각각 88.62%, 66.90%, 61.82%의 증식억제효과를 보여 WP, EP보다 RP에서 항균활성이 더 컸다. 복분자 분말에 대해서 *Staphylococcus aureus* KCTC 13566보다 *Escherichia coli* ATCC 43888에 대하여 더 큰 억제 효과가 있었는데 이는 향신료 분말에서도 *S. aureus*보다 *E. coli*에 대하여 더 큰 항균활성이 있다는 김 등의 보고와 유사한 경향을 보였다.

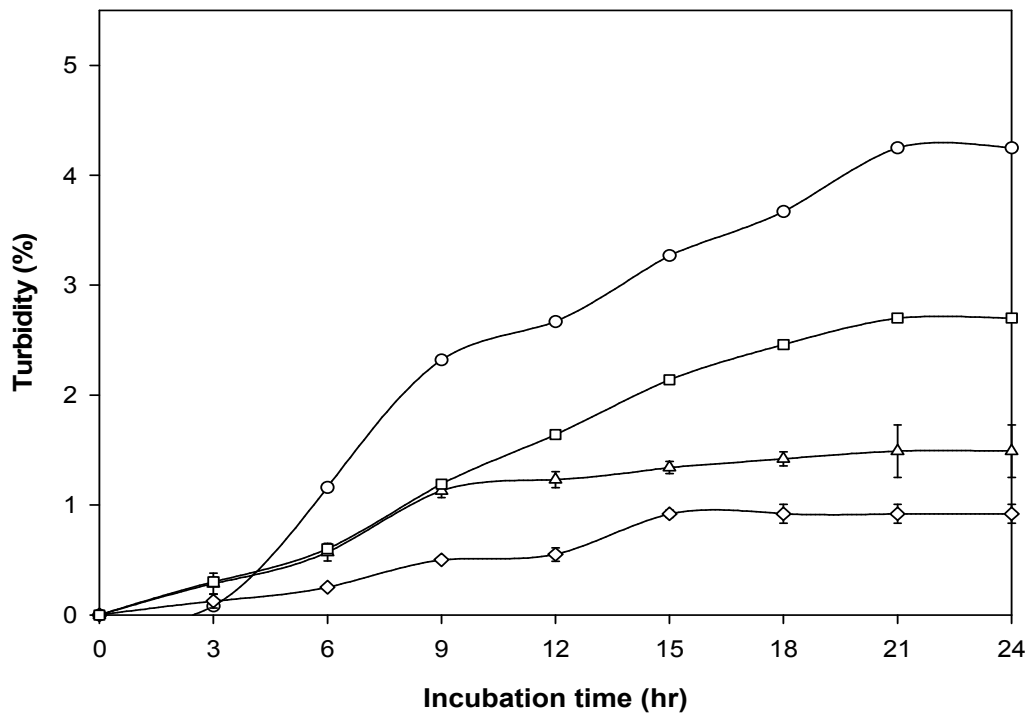


Fig. 2-15. Antimicrobial effect of the powders of *Rubus coreanus* on the growth of *Staphylococcus aureus* KCTC 13566.

- : Broth was not contained the powder of *Rubus coreanus* (control).
- ◇: Powder of *Rubus coreanus* was not extracted (RP).
- △: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by water (WP).
- : Powder of *Rubus coreanus* was extracted by 50% ethanol (EP).

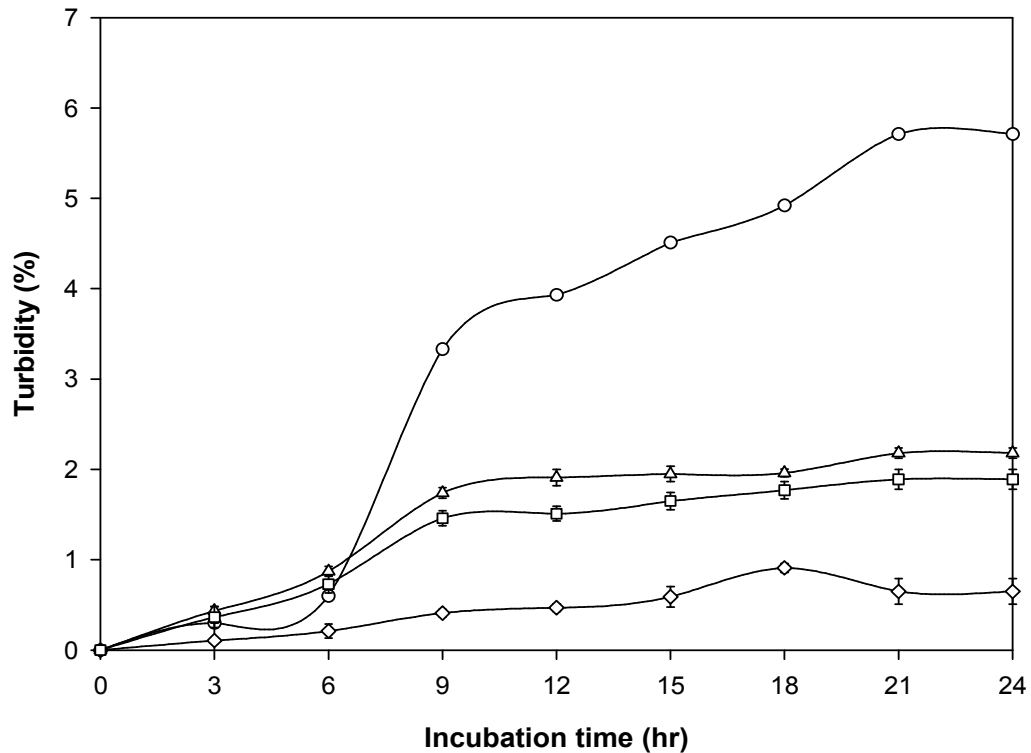


Fig. 2-16. Antimicrobial effect of the powders of *Rubus coreanus* on the growth of *Escherichia coli* ATCC 43888.

- : Broth was not contained the powder of *Rubus coreanus* (control).
- ◇: Powder of *Rubus coreanus* was not extracted (RP).
- △: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by water (WP).
- : Powder of *Rubus coreanus* was extracted by 50% ethanol (EP).

다) *Salmonella typhimurium* KCTC 1925 & *Shigella dysenteriae* KCTC 2915

Salmonella typhimurium KCTC 1925와 *Shigella dysenteriae* KCTC 2915에 대한 복분자 분말(RP, WP, EP)의 증식억제효과는 Fig. 2-17 및 Fig. 2-18과 같다. 복분자 분말을 첨가하지 않은(control) nutrient broth에서 자란 *Salmonella typhimurium* KCTC 1925에 대하여 RP, WP, EP순으로 각각 84.31%, 83.61%, 78.69%의 증식억제 효과를 보였으나 이들 간의 유의적인 차

이는 없었고 *Shigella dysenteriae* KCTC 2915에 대하여는 RP, EP, WP순으로 각각 82.38%, 79.52%, 72.25%의 증식억제효과를 보여 RP, EP에 비해 WP에서 항균 활성이 더 낮음을 알 수 있었다. 복분자 분말에 대해서 *Salmonella typhimurium* KCTC 1925와 *Shigella dysenteriae* KCTC 2915는 서로 비슷한 항균 활성을 나타냈다($p>0.05$). 본 실험의 복분자 추출액에서는 균주들 중 *Salmonella typhimurium* KCTC 1925이 가장 큰 항균활성을 나타냈었는데 복분자 분말에서도 역시 가장 큰 활성이 나타났다.

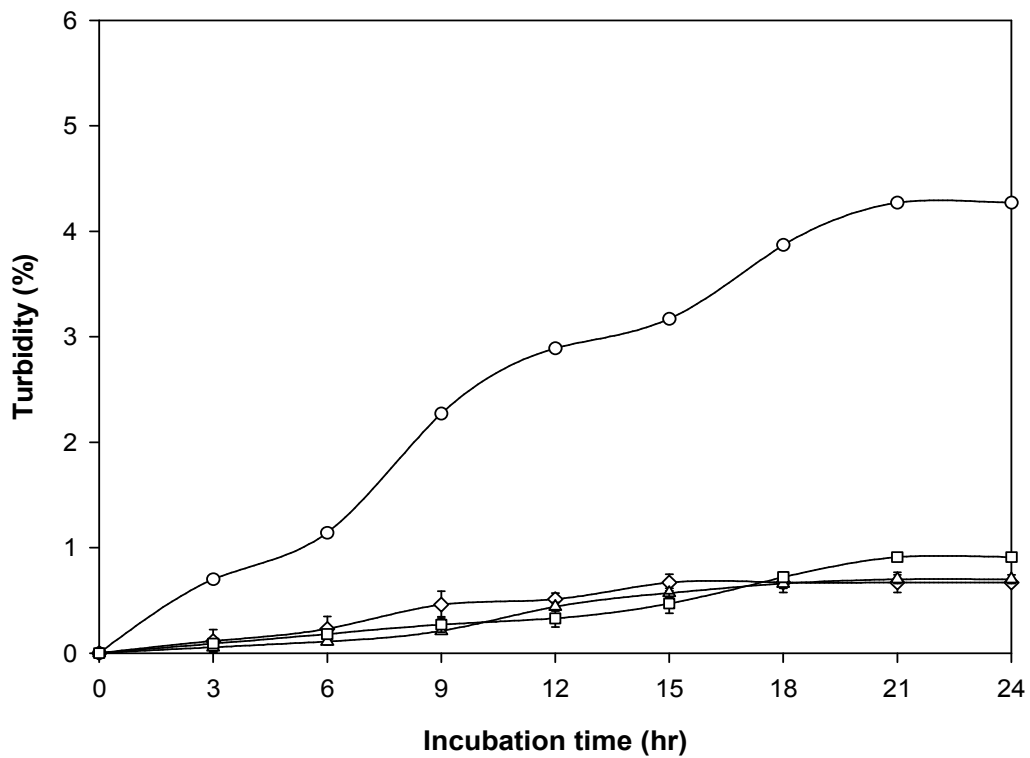


Fig. 2-17. Antimicrobial effect of the powders of *Rubus coreanus* on the growth of *Salmonella typhimurium* KCTC 1925.

- : Broth was not contained the powder of *Rubus coreanus* (control).
- ◇: Powder of *Rubus coreanus* was not extracted (RP).
- △: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by water (WP).
- : Powder of *Rubus coreanus* was extracted by 50% ethanol (EP).

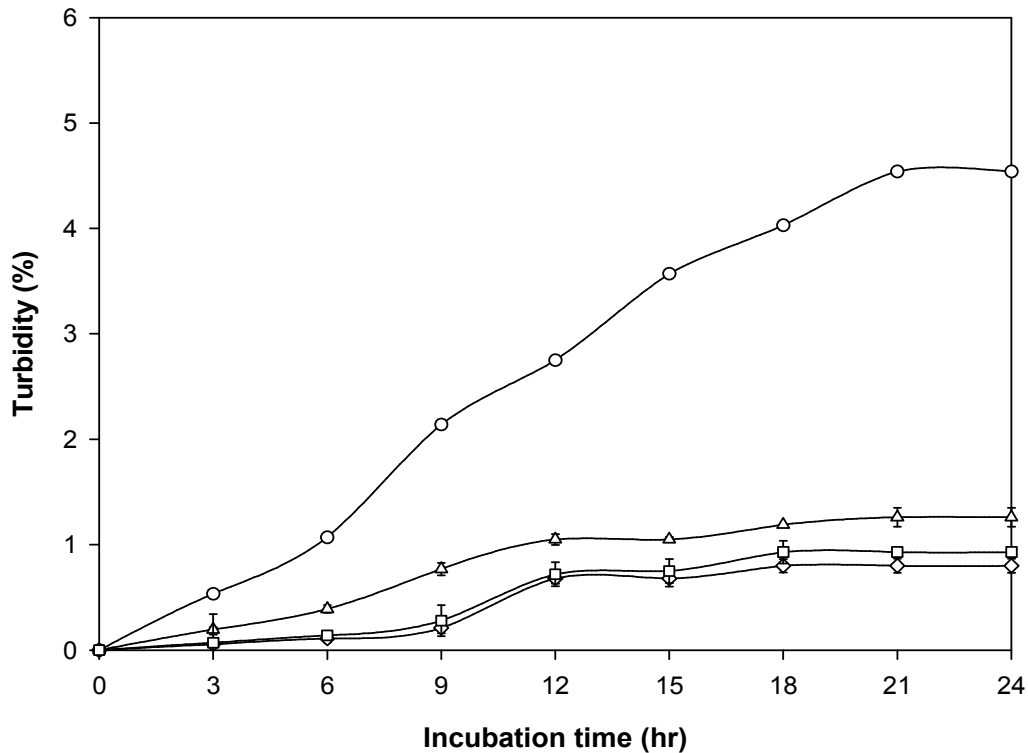


Fig. 2-18. Antimicrobial effect of the powders of *Rubus coreanus* on the growth of *Shigella dysenteriae* KCTC 2915.

- : Broth was not contained the powder of *Rubus coreanus* (control).
- ◇: Powder of *Rubus coreanus* was not extracted (RP).
- △: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by water (WP).
- : Powder of *Rubus coreanus* was extracted by 50% ethanol (EP).

라) *Candida albicans* KCTC 1940 & *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552

Candida albicans KCTC 1940와 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552에 대한 복분자 분말(RP, WP, EP)의 증식억제효과는 Fig. 2-19 및 Fig. 2-20과 같다. 복분자 분말을 첨가하지 않은(control) YM broth에서 자란 *Candida albicans* KCTC 1940에 대하여 RP, WP, EP 순으로 각각 63.58%, 57.95%,

57.28%의 증식억제효과를 보였으나 WP와 EP간의 유의적인 차이는 없었고 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552에 대하여 WP, RP, EP 순으로 각각 69.79%, 64.35%, 57.40%로 증식억제효과를 보였으며 WP, RP에 비해 EP에서 항균활성이 더 낮음을 알 수 있었다. 본 실험의 복분자 추출액에서 균주들 중 *Candida albicans* KCTC 1940와 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552는 대체적으로 큰 항균활성을 나타냈지만 복분자 분말 상태에서는 낮은 항균활성을 보였다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 균주에 대한 복분자 분말 종류별 항균활성은 RP, WP, EP순으로 크게 나타났다. 복분자 추출액과 복분자 분말에 있어서 항균활성의 차이를 보이는 것은 복분자 추출액은 서로 비슷한 pH아래 추출용매의 주정 농도에 의존적인 경향이었으나 복분자 분말은 서로 다른 pH 아래에 있어서 추출용매의 영향이 보다는 pH 및 유기산 조성에 더 의존적이기 때문이라 생각된다. 분말에 대한 균주별 항균활성은 *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Shigella dysenteriae* KCTC 2915, *Listeria monocytogens* KCTC 3569, *Escherichia coli* ATCC 43888, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552, *Staphylococcus aureus* KCTC 13566, *Candida albicans* KCTC 1940, *Bacillus cereus* KCTC 1092순으로 크게 나타났다. 이는 각각의 가공 형태에 따른 복분자 성분의 차이에 따라 세균의 미세구조에 작용하는 항균활성에 차이가 있는 것이라고 사료된다.

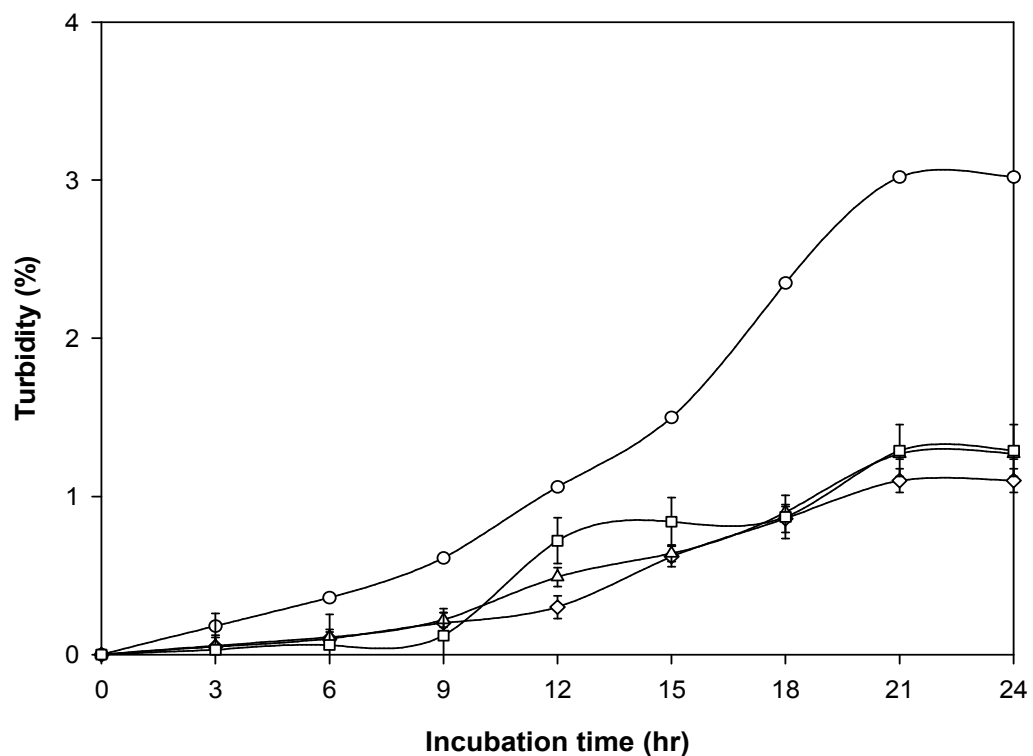


Fig. 2-19. Antimicrobial effect of the powders of *Rubus coreanus* on the growth of *Candida albicans* KCTC 1940.

- : Broth was not contained the powder of *Rubus coreanus* (control).
- ◇: Powder of *Rubus coreanus* was not extracted (RP).
- △: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by water (WP).
- : Powder of *Rubus coreanus* was extracted by 50% ethanol (EP).

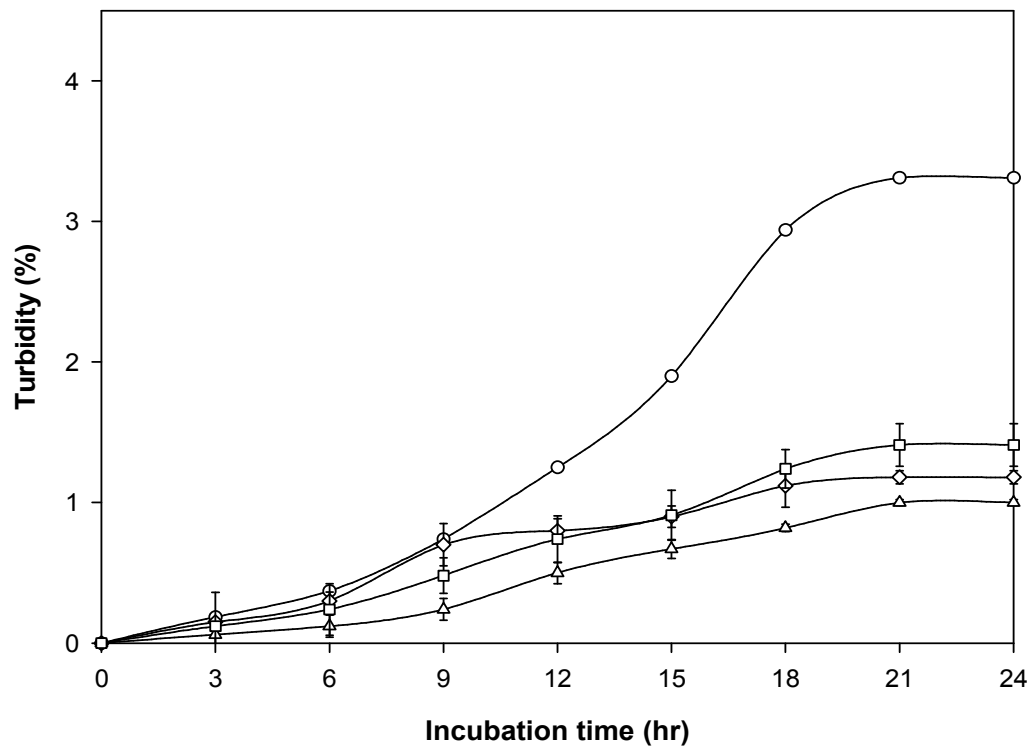


Fig. 2-20. Antimicrobial effect of the powders of *Rubus coreanus* on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552.

- : Broth was not contained the powder of *Rubus coreanus* (control).
- ◇: Powder of *Rubus coreanus* was not extracted (RP).
- △: Powder of *Rubus coreanus* was extracted by water (WP).
- : Powder of *Rubus coreanus* was extracted by 50% ethanol (EP).

3. 복분자 분말소재를 이용한 가공식품의 개발

가. 복분자앰플의 제조

복분자앰플을 제조하기 위해 먼저 냉동된 시료를 12시간 냉장 온도에서 해동하고 복분자를 일정량을 마쇄하였다. 마쇄된 복분자에 적정 용매비의 물로 수욕 상태에서 80℃에서 적정시간동안 추출하였다. 앰플은 4겹의 cheese cloth에 여과

하고 여과된 액을 원심분리(4℃, 3,000×g, 30min) 하여 다시 Buchner funnel에 filter paper(Whatman No. 2)를 얹어 상등액을 여과하였다. 이를 복분자 시료 양의 2배가 될 때까지 45℃에서 감압 농축하여 앰플을 제조하였다.

나. 복분자분말의 제조

복분자분말은 생 복분자 열매를 freezer에서 -40℃까지 급속 냉동시킨 후 동결건조기(EYELA, freeze dryer, FDU-540)를 이용하여 48시간 동안 건조하였다. 이를 grinding하여 20 mesh체로 씨를 제거한 후, 다시 80 mesh체로 입자를 고르게 하여 복분자 분말(RP)을 제조하였다. 제조된 복분자 분말(RP)은 para film으로 밀봉하여 -20℃에 냉동보관하면서 사용하였다.

다. 복분자 가공식품에 대한 관능검사

관능검사는 송원대학 호텔영양계열 학생 20명을 검사원으로 선정하여 제조한 복분자 가공식품의 색깔, 맛, 조직감, 종합적 기호도에 대하여 7점 평점법으로 평가하여 가장 좋다 7, 가장 나쁘다 1의 점수로 표시하였다. 모든 값은 SPSS Ver. 10.0 package program을 이용하여 각 시험구의 평균과 표준편차를 산출하고 Tukey법을 이용하여 각 시험구간의 유의차를 5% ($p < 0.05$) 유의 수준에서 검증하였다.

라. 복분자앰플을 이용한 가공식품의 개발

복분자앰플을 이용하여 빵류로는 복분자 곡물식빵, 복분자 단과자빵, 복분자 카스테라, 복분자 머핀의 4종류를 제조하였으며 한과류로는 복분자 산자와 강정을 각각 제조하였다. 이들 개발된 가공식품의 제조 레시피는 다음과 같다.

1) 복분자 곡물식빵

가) 재료 및 분량

복분자 곡물식빵을 제조하기 위한 복분자앰플의 첨가량은 강력분밀가루 400g에 140 g, 160 g, 180 g을 첨가하여 제조하였고 다른 재료들의 비율은 아래 표와 같다.

재 료 명	비율(%)	무 계(g)
강 력 분	100	400
곡 물 믹 스	25	100
인스턴트 드라이스트	4	15
소 금	2.5	10
설탕	12.5	50
달 갈	12.5	50
버 터	18	75
복분자애플	40	160
호 두	37	150
물	16	65

나) 제조방법

- (1) 버터를 제외한 모든 재료를 믹싱볼에 넣고 1~2분정도 믹싱한다.
- (2) 반죽이 한 덩어리가 되면 버터를 넣고 보통 식빵 반죽의 80%정도까지 믹싱한다.
- (3) 1차 발효를 한다.(온도 27℃, 습도 75~80%, 60분)
- (4) 1차 발효가 끝난 반죽을 250 g씩 분할한다.
- (5) 반죽을 둥글리고 10분정도 중간 발효한다.
- (6) 식빵 모양으로 성형한다.
- (7) 식빵 팬에 팬닝한다.
- (8) 2차 발효한다.(온도 32℃, 습도 85~90%, 60분)
- (9) 200℃로 예열된 오븐에서 40분정도 구워준다.

다) 관능검사

복분자애플을 농도별로 첨가하여 만든 복분자 곡물식빵에 대한 관능평가를 실시한 결과 강력분 밀가루 400 g에 복분자애플 160 g을 첨가한 복분자 곡물 식빵이 색깔, 조직감 등 모든 평가항목에서 가장 우수한 것으로 나타났다.

Table 2-12. Sensory evaluation¹⁾ of grain bread made with different ratios of *Rubus coreanus* ampoule.

<i>Rubus coreanus</i> ampoule added	Color	Texture	Taste	Overall acceptability
140 g	4.70±0.44 ^{2)a}	4.70±0.42 ^a	4.10±0.51 ^a	4.54±0.64 ^a
160 g	5.41±0.58 ^b	4.86±0.41 ^a	4.35±0.43 ^a	5.22±0.66 ^b
180 g	5.32±0.39 ^b	4.80±0.53 ^a	4.30±0.57 ^a	4.63±0.59 ^a

¹⁾ 7, like extremely; 1, dislike extremely.

²⁾ Mean ± SD.

^{a-d} Values in the same column not sharing a common superscript are significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

라) 제조된 복분자 곡물식빵



Fig. 2-24. 복분자 곡물식빵

2) 복분자 단과자빵

가) 재료 및 분량

복분자 단과자빵을 제조하기 위한 복분자앰플의 첨가량은 강력분밀가루 1,200 g에 200 g, 240 g, 280 g을 각각 첨가하여 제조하였고 다른 재료들의 비율은 아래 표와 같다.

재 료 명	비 율(%)	무 계(g)
강 력 분	100	1,200
물	23	276
생 이 스투	4	48
재 빵 계 량 제	1	12
설탕	12	144
달 갈	20	240
버 터	10	120
복 분 자 앰 플	20	240
탈 지 분 유	3	36

나) 제조방법

- (1) 버터를 제외한 모든 재료를 믹싱볼에 넣고 1~2분정도 믹싱한다.
- (2) 반죽이 한 덩어리가 되면 버터를 넣고 반죽 표면이 매끈해질 때까지 약 25분정도 믹싱한다.
- (3) 1차 발효를 한다.(온도 27℃, 습도 75~80%, 60분)
- (4) 1차 발효가 끝난 반죽을 60 g씩 분할한다.
- (5) 반죽을 둥글리고 10분 정도 중간 발효한다.
- (6) 단과자 모양으로 성형한다.
- (7) 평철판에 팬닝한다.
- (8) 2차 발효한다.(온도 32℃, 습도 85~90%, 60분)
- (9) 200℃로 예열된 오븐에서 20분정도 구워준다.

다) 제조된 복분자 단과자빵



Fig. 2-25. 복분자 단과자빵

3) 복분자 카스테라

가) 재료 및 분량

복분자 카스테라를 제조하기 위한 복분자앰플의 첨가량은 박력분밀가루 700 g에 190 g, 210 g, 230 g을 각각 첨가하여 제조하였고 다른 재료들의 비율은 아래 표와 같다.

재료명	비율(%)	무게(g)
박력분	100	700
물엿	19	135
설탕	157	1,100
달걀	171	1,200
소금	1	8
물	7	50
정종	21	150
복분자앰플	30	210

나) 제조방법

- (1) 믹싱볼에 달걀, 설탕, 소금, 물엿을 넣고 중탕하여 설탕을 완전히 녹여준다.
- (2) 반죽기를 이용해 (1)을 휘핑하여 거품을 최대한 만들어 준다.
- (3) 박력분을 체에 내려 섞어준다.
- (4) 물, 정종, 복분자 즙을 섞어준다.
- (5) 나무로 만들어진 카스테라 틀에 반죽을 팬닝한다.
- (6) 200℃로 예열한 오븐에 넣어 60분정도 구워준다.

다) 제조된 복분자 카스테라



Fig. 2-26. 복분자 카스테라

4) 복분자 머핀

가) 재료 및 분량

복분자 머핀을 제조하기 위한 복분자애플의 첨가량은 박력분밀가루 240 g에

60 g, 72 g, 84 g을 각각 첨가하여 제조하였고 다른 재료들의 비율은 아래 표와 같다.

재 료 명	비 율(%)	무 계(g)
박 력 분	100	240
버 터	83	200
설 탕	73	175
달 갈	100	240
베이킹 파우더	4	10
럼 주	4	10
레 몬 필	4	10
건 포 도	12.5	30
호 두	29	70
복분자앰플	30	72

나) 제조방법

- (1) 믹싱볼에 실온상태의 버터를 넣고 핸드 믹서기로 부드럽게 풀어준다.
- (2) 설탕, 소금을 2~3회 나누어 섞는다.
- (3) 달걀을 노른자 흰자 순서로 섞어준다.
- (4) 박력분과 베이킹 파우더를 체에 내려 섞어준다.
- (5) 복분자 즙, 럼주, 레몬필, 건포도, 호두를 한데 섞어준다.
- (6) 반죽을 찰주머니에 넣어 머핀 팬에 70%정도 팬닝한다.
- (7) 180℃ 로 예열한 오븐에 넣어 25분정도 굽는다.

다) 제조된 복분자 머핀



Fig. 2-27. 복분자 머핀

5) 복분자 산자·강정

가) 재료 및 분량

복분자 산자·강정을 제조하기 위한 복분자애플의 첨가량은 찹쌀 800 g에 80 g, 100 g, 120 g을 각각 첨가하여 제조하였고 다른 재료들의 비율은 아래 표와 같다.

●바탕 찹쌀		5컵(800g)
소금		5 g
소주		100 g
복분자애플		100 g
설탕		5 g
식용유		10 g
녹말가루		200 g
●콩물		
흰콩		20 g
물		100 g

● 고물		
찰벼		200 g
쌀 튀밥 가루		40 g
● 즈청시럽		
물엿		460 g
설탕		200 g
꿀		40 g
생강즙		60 g
● 튀김기름		500 g

나) 제조방법

- (1) 찹쌀은 씻지 않고 1~2주일 물에 담가 골마지가 끼면 여러 번 씻어 간을 하여 고운 가루로 빻아 체에 내린다
- (2) 체에 내린 찹쌀가루에 소주, 설탕, 식용유, 분쇄기에 간 콩물을 넣고 섞는다.
- (3) 찹통에 젖은 면보를 깔고 반죽을 찌내어 그릇에 쏟아 방망이로 파리가 일도록 친다.
- (4) 안반에 녹말가루를 뿌리고 반죽을 펴서 0.4cm 두께로 밀어 산자용은 4cm 정도로 네모지게, 손가락 강정용은 길이 4cm 폭1cm로 썬다
- (5) 산자와 강정바탕은 채반 위에 한지를 깔고 갈라지지 않을 때까지 말려 냉동 보관한다
- (6) 말린 산자와 강정바탕을 미지근한 튀김기름에 각각의 바탕을 5~10분 정도 담가 불려 놓는다
- (7) 불린 바탕을 90℃ 정도의 낮은 기름에 넣어 바탕이 부풀기 시작하면 손가락으로 네 귀퉁이를 눌러서 모양을 반듯하게 한다.
- (8) 다른 튀김 기름팬에 새 기름을 넣어 170~180℃가 되면 산자바탕을 넣고 완전히 부풀도록 튀겨 기름을 빼다.
- (9) 튀겨낸 바탕을 뜨거운 즈청시럽에 담갔다가 시럽을 묻혀 튀겨낸 찰나라과 쌀 튀밥 고물을 묻힌다.

◆ 복분자애플을 이용할 때 : ②번 소주 200 g 대신 복분자즙 100 g과 소주 100 g을 찹쌀가루에 혼합하여 반죽을 찌다

다) 제조된 복분자 산자강정



Fig. 2-28. 복분자 산자·강정

마. 복분자분말을 이용한 가공식품의 개발

복분자분말을 이용하여 떡류로는 복분자 무지개떡, 복분자 인절미, 복분자 경단의 3종류를 제조하였고 한과류로는 복분자 산자와 강정을 각각 제조하였다. 이들 개발된 가공식품의 제조 레시피는 다음과 같다.

1) 복분자 무지개떡

가) 재료 및 분량

복분자 무지개떡을 제조하기 위한 복분자분말의 첨가량은 멥쌀가루 600 g에 12.5 g, 15.0 g, 17.5 g, 20.0 g을 각각 첨가하여 제조하였고 다른 재료들의 비율은 아래 표와 같다.

멥쌀가루	6 컵(600 g)
복분자 분말	3½ 큰술(17.5 g)
소금	6 g
●설탕 시럽	

설탕		½ 컵
물		½ 컵

나) 제조방법

- (1) 멥쌀가루는 멥쌀을 6시간 정도 불렀다가 물기를 뺀 다음 소금을 넣고 곱게 빻아 체에 내린 가루를 준비하고, 시럽은 설탕과 물을 혼합하여 ½컵이 될 때까지 끓인 후 식힌다.
- (2) 멥쌀가루에 시럽 ½컵(120 g)을 혼합하여 체에 내려 3 등분 한 뒤 복분자 분말을 각각 10 g(4.0%), 5 g(2.0%), 2.5 g(1%)을 섞어 손으로 비벼서 골고루 색을 들인 다음 각각을 체에 친다.
- (3) 시루에 시루 밑을 칸 다음 짙은 색이 아래로 놓이게 하여 떡가루의 순서대로 편편하게 안친다.
- (4) 김 오른 솥에 시룻번을 붙인 다음 센 불에서 찌다가 김이 오르면 뚜껑을 덮고 20분간 더 찌는다.
- (5) 대꼬지를 떡에 넣어 흰 가루가 묻어나지 않으면 불을 끄고 5분 정도 뜸을 들인 뒤 쏟아 한 김 식힌 후에 네모지게 썰어 그릇에 담는다.

◆ 참 고

- 쌀가루에 복분자즙을 넣어 떡을 하면 가열에 의해 색이 황변되어 색감이 크게 저하된다.(오른쪽 사진 중간층이 복분자 즙을 이용한 것)
- 쌀가루를 체에 내려 고운 가루를 만들어야 질감이 좋고, 쌀가루에 물을 들일 때는 색이 진하면 좋지 않으므로 상태를 보아가며 색이 나도록 조절한다.

다) 관능검사

복분자분말을 농도별로 첨가하여 만든 복분자무지개떡에 대한 관능평가를 실시한 결과 멥쌀가루 600 g에 복분자분말 17.5 g을 첨가한 무지개떡이 색깔, 조직감 등 모든 평가항목에서 가장 우수한 것으로 나타났다.

Table 2-13. Sensory evaluation¹⁾ of rainbow rice cake made with different ratios of *Rubus coreanus* powder.

<i>Rubus coreanus</i> powder added	Color	Texture	Taste	Overall acceptability
12.5 g	4.70±0.53 ^{2)a}	4.70±0.70 ^c	4.10±0.92 ^c	4.50±0.88 ^c
15.0 g	5.00±0.33 ^c	4.80±0.41 ^d	4.20±0.73 ^d	4.30±0.71 ^d
17.5 g	5.22±0.33 ^c	4.80±0.71 ^b	4.30±0.74 ^b	4.60±0.77 ^b
20.0 g	4.90±0.45 ^b	4.30±0.48 ^a	3.30±0.94 ^a	3.60±0.79 ^a

¹⁾ 7, like extremely; 1, dislike extremely.

²⁾ Mean ± SD.

^{a-d} Values in the same column not sharing a common superscript are significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

라) 제조된 복분자 분말을 이용한 복분자 무지개떡



Fig. 2-29. 복분자 분말을 이용한 복분자 무지개떡

2) 복분자 인절미

가) 재료 및 분량

복분자 인절미를 제조하기 위한 복분자분말의 첨가량은 찹쌀 800 g에 15.0 g, 20.0 g, 25.0 g, 30.0 g을 각각 첨가하여 제조하였고 다른 재료들의 비율은 아래 표와 같다.

찹쌀	5 컵(800 g)
복분자 분말	5 큰술(25 g)
소금	7 g
● 고물	
돈부고물	2 컵(560 g)

나) 제조방법

- (1) 찹쌀을 깨끗이 씻어 물에 6시간 이상 불렸다가 건진 다음 김이 오른 찜통에 안쳐서 1시간 정도 찜다.
- (2) 절구에 찜 찰밥과 복분자 분말을 넣고 절구공이에 소금물을 적셔가며 밥알이 뭉개지도록 골고루 친다.
- (3) 도마에 고물을 뿌리고 찰 쳐진 떡을 편편하게 모양을 만든다.
- (4) 가로 2cm 세로 4cm 크기로 썰어 고물을 무친다.

◆ 참 고

·복분자 인절미는 즙을 이용할 경우 찹쌀가루에 즙을 첨가하여 찌야 하는데 가열에 의해 색상이 갈변되어 식감이 떨어지므로 떡을 치달 때 분말을 첨가하여 치대면 색을 조절할 수도 있고 색과 향을 살릴 수 있어서 좋다.

다) 관능검사

복분자분말을 농도별로 첨가하여 만든 복분자인절미에 대한 관능평가를 실시한 결과 찹쌀 800 g에 복분자분말 25.0 g을 첨가한 인절미의 색깔, 조직감 등 모든 평가항목에서 가장 우수한 것으로 나타났다.

Table 2-14. Sensory evaluation¹⁾ of *Ingulmi* made with different ratios of *Rubus coreanus* powder.

<i>Rubus coreanus</i> powder added	Color	Texture	Taste	Overall acceptability
15.0 g	5.20±0.42 ^{2)a}	4.82±0.51 ^c	5.15±0.74 ^c	5.54±0.63 ^c
20.0 g	5.62±0.31 ^c	4.95±0.46 ^d	5.23±0.58 ^d	5.38±0.62 ^d
25.0 g	6.22±0.44 ^c	4.97±0.62 ^b	5.34±0.55 ^b	5.71±0.68 ^b
30.0 g	5.41±0.39 ^b	4.73±0.37 ^a	4.42±0.63 ^a	4.78±0.53 ^a

¹⁾ 7, like extremely; 1, dislike extremely.

²⁾ Mean ± SD.

^{a-d} Values in the same column not sharing a common superscript are significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

라) 제조된 복분자 인절미



Fig. 2-30. 복분자 인절미

3) 복분자 경단

가) 재료 및 분량

복분자 경단을 제조하기 위한 복분자분말의 첨가량은 찹쌀가루 1,000 g에

25.0 g을 첨가하여 제조하였고 다른 재료들의 비율은 아래 표와 같다.

참쌀가루		10컵(1000 g)
복분자분말		5 큰술(25 g)
소금		7 g
잣	다진것	1 컵
해바라기씨	다진것	1 컵
대추	채썬것	1 컵
볶은흑임자		1 컵
땅콩	다진것	1 컵

나) 제조방법

- (1) 참쌀가루는 참쌀을 깨끗이 씻어 물에 6시간 정도 불렀다가 소쿠리에 건져 소금을 넣고 가루로 뿜아 체에 내려 고운 가루를 준비한다.
- (2) 끓는 물과 복분자 분말을 넣고 익반죽하여 직경 2cm 정도로 동그랗게 빚고 끓는 물에 넣어 삶는다. 다 익어서 떠오르면 건져내어 찬물에 따듯한기가 없어질 때까지 행군 뒤 물기를 뺀다.
- (3) 삶아 낸 복분자 경단을 다섯 분량으로 나누어서 5가지 견과류 고물을 묻혀 그릇에 담아낸다.

◆ 참 고

·일반 경단의 고물은 팔고물·대추·밤·녹두고물·흑임자 등을 사용하기도 하나 복분자 경단에는 견과류를 이용하여 쉽게 상하지 않고, 영양도 고루 섭취할 수 있어 고급스런 경단을 만들 수 있다..

다) 제조된 복분자 경단



Fig. 2-31. 복분자 경단

4) 복분자 산자·강정

가) 재료 및 분량

복분자 산자·강정을 제조하기 위한 복분자분말의 첨가량은 찹쌀 800 g에 10 g, 15 g, 20 g을 각각 첨가하여 제조하였고 다른 재료들의 비율은 아래 표와 같다.

●바탕 찹쌀		5컵(800g)
소금		5 g
소주		100 g
복분자분말		15 g
설탕		5 g
식용유		10 g
녹말가루		200 g
● 콩물		
흰콩		20 g
물		100 g
● 고물		

찰벼		200 g
쌀 튀밥 가루		40 g
● 증청시럽		
물엿		460 g
설탕		200 g
꿀		40 g
생강즙		60 g
● 튀김기름		500 g

나) 제조방법

- (1) 찰쌀은 씻지 않고 1~2주일 물에 담가 골마지가 끼면 여러 번 씻어 간을 하여 고운 가루로 빻아 체에 내린다
- (2) 체에 내린 찰쌀가루에 소주, 설탕, 식용유, 분쇄기에 간 콩물을 넣고 섞는다.
- (3) 찜통에 젖은 면보를 깔고 반죽을 찌내어 그릇에 쏟아 방망이로 파리가 일도록 친다.
- (4) 안반에 녹말가루를 뿌리고 반죽을 펴서 0.4cm 두께로 밀어 산자용은 4cm 정도로 네모지게, 손가락 강정용은 길이 4cm 폭1cm로 썬다
- (5) 산자와 강정바탕은 채반 위에 한지를 깔고 갈라지지 않을 때까지 말려 냉동 보관한다
- (6) 말린 산자와 강정바탕을 미지근한 튀김기름에 각각의 바탕을 5~10분 정도 담가 불려 놓는다
- (7) 불린 바탕을 90°C 정도의 낮은 기름에 넣어 바탕이 부풀기 시작하면 손가락으로 네 귀퉁이를 눌러서 모양을 반듯하게 한다.
- (8) 다른 튀김 기름팬에 새 기름을 넣어 170~180°C가 되면 산자바탕을 넣고 완전히 부풀도록 튀겨 기름을 빼다.
- (9) 튀겨낸 바탕을 뜨거운 증청시럽에 담갔다가 시럽을 묻혀 튀겨낸 찰나락과 쌀 튀밥 고물을 묻힌다.

◆ 복분자 분말을 이용할 때 : (3)번 반죽을 치낼 때 복분자 분말 15 g을 혼합하여 치낸다

다) 제조된 복분자 산자·강정



Fig. 2-32. 복분자 산자강정

5) 복분자 다식

가) 재료 및 분량

복분자 다식을 제조하기 위한 복분자분말의 첨가량은 배설기가루 700 g에 18.0 g, 21.5 g, 25.0 g을 각각 첨가하여 제조하였고 다른 재료들의 비율은 아래 표와 같다.

백설기 가루		700 g
꿀		280 g
설탕시럽		140 g
복분자 분말		21.5 g

나) 제조방법

- (1) 쌀가루를 찌서 만든 백설기는 말려 곱게 가루내어 7등분 한다.
- (2) 백설기 가루 100g, 복분자 분말 0.5g, 꿀 40 g, 시럽 20 g을 넣고 반죽하여 다식판에 눌러서 박아낸다. (0.3%)

- (3) 백설기 가루 100g, 복분자 분말 1 g, 꿀 40 g, 시럽 20 g을 넣고 반죽하여 다식판에 눌러서 박아낸다. (0.6%)
- (4) 백설기 가루 100g, 복분자 분말 2 g, 꿀 40 g, 시럽 20 g을 넣고 반죽하여 다식판에 눌러서 박아낸다. (1.2%)
- (5) 백설기 가루 100g, 복분자 분말 3 g, 꿀 40 g, 시럽 20 g을 넣고 반죽하여 다식판에 눌러서 박아낸다. (1.8%).
- (6) 백설기 가루 100g, 복분자 분말 4 g, 꿀 40 g, 시럽 20 g을 넣고 반죽하여 다식판에 눌러서 박아낸다. (2.4%).
- (7) 백설기 가루 100g, 복분자 분말 5 g, 꿀 40 g, 시럽 20 g을 넣고 반죽하여 다식판에 눌러서 박아낸다. (3.0%)
- (8) 백설기 가루 100g, 복분자 분말 6 g, 꿀 40 g, 시럽 20 g을 넣고 반죽하여 다식판에 눌러서 박아낸다. (3.6%)

◆ 참 고

- 복분자 분말 농도가 4%이상이면 색깔을 육안으로 구분하기가 어렵다.
- 관능검사 결과 1.2%와 1.8%농도의 다식을 선호하였다.

다) 제조된 복분자 다식



Fig. 2-33. 복분자 다식

제 3 절 복분자술의 생리활성물질의 단리, 정제, 구조결정, 생성기 구 해명 및 품질평가지표 확립 (제2협동과제)

1. 복분자술의 생리활성물질 단리·정제

가. 생리활성물질의 추출 및 농축

1) 실험재료

본 실험에 이용된 복분자(*Rubus coreanum* Miquel)는 광주(광산구 일원)·전남(나주, 화순, 담양 일원)에서 2004년 6월에서 7월초에 채취한 것을 이용하였으며, 복분자술은 동일 복분자를 이용하여 (주)연수당에서 조제된 시료를 이용하였다. 이 복분자술은 15.7 kg의 복분자로부터 11 L의 복분자술 원액이 얻어진 것으로 희석되지 않은 상태의 것을 이용하였다.

2) 원재료 복분자의 추출물 조제

신선 복분자 220 g에 EtOH 300 mL를 가하고 homogenizer (BM-2 Nissei boi-mixer, Nihonseiki Kaiseiki LTD., Japan)로 균질화한 후, 흡입여과(Whatman, No. 2)하여 여과액과 잔사를 분리하였다. 이어 회수한 잔사에 EtOH 300 mL를 가하여 균질화와 여과를 재차행하여 얻어진 여과액을 합한 후 진공농축하여 19.97 g의 추출물을 얻었다.

3) 복분자술의 여과 및 농축

복분자술 11 L (복분자 생체중량 15.7 kg eq.)를 Büchner 여과장치를 이용하여 흡입여과(Whatman, No. 2)하였다. 그 여액을 진공농축기를 이용하여 복분자중에 함유된 EtOH이 제거될 때 까지 농축하여 2.8 L의 농축용액을 얻었다.

4) TLC 분석에 의한 원재료 복분자와 복분자술의 항산화활성 화합물의 존재 경향 비교

Takao 등(Ref.)의 방법에 의해 정제된 획분이나 단리된 물질을 TLC (thin-layer chromatograph) plate에 spotting하여 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (5 : 2, v/v)로 전개한 후, DPPH ethanol 용액(200 μM)을 plate에 분무하여 보라색이 탈색 되어진 획분이나 물질을 항산화활성의 양성으로 판정하였다 (TLC-DPPH법).

본 TLC-DPPH법에 의해 신선 복분자 EtOH 추출물과 복분자술 여과액을 대상으로 그들 각각에 함유되어 있는 화합물들의 존재 경향을 비교분석한 결과(Fig. 1), 원재료의 복분자에 함유된 화합물과 복분자 중에 함유된 화합물의 TLC 거동에 현저한 차이가 관찰되었다. 즉, 원재료 복분자 추출물은 R_f 0.25 이하에서 대부분의 화합

물이 검출되었으며, R_f 0.25 이상에서는 거의 화합물의 존재가 확인되지 않았다. 반면 복분자술의 경우에는 원재료에서 관찰되었던 spots 대부분이 소실되었으며, R_f 0.5 이상의 부분에서 항산화 활성을 보이는 다양한 화합물들이 검출되었다. 뿐만 아니라 R_f 0.5 이하의 부분에서도 다양한 항산화 활성화합물의 존재가 시사되었다. 이것은 원재료에 함유되어 있는 화합물들이 술 제조에 필요한 발효 및 숙성과정을 거치는 동안 변화되어진 결과라 판단되어진다. 그 변화는 발효에 관여하는 효모의 작용 및/또는 산화·환원에 의한 화학적 변화일 가능성이 시사되어진다.

이 결과로부터 복분자술에 함유되어 있는 화합물들은 원재료에 함유되어 있는 그것들과는 큰 차이가 있음이 확인되어진 바, 복분자술에 의해 발현되어지는 생리활성은 원재료 복분자에 의한 생리활성과는 큰 차이를 보일 가능성이 강하게 시사되었다. 그래서 본 연구에서는 복분자술 중에 함유되어 있는 항산화 활성 화합물에 초점을 맞추어 그들 항산화 화합물의 단리·정제에 착수하였다.

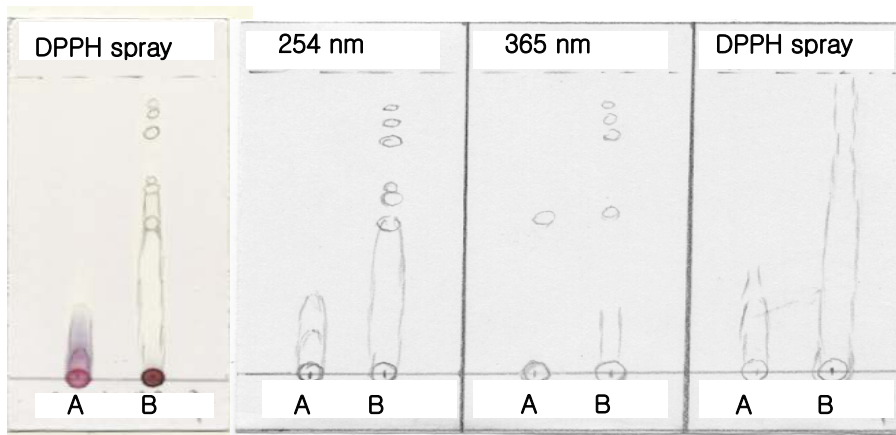


Fig. 1. TLC analyses of Korean black raspberry raw material EtOH extract (A) and concentrate of Korean black raspberry wine filtrate (B). Development solvent, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 5 : 2$ (v/v); TLC plate, Kiesel Gel 60 F₂₅₄.

나. 추출물의 용매분획

1) 복분자술의 용매분획

농축용액 2.8 L에 *n*-hexane 3 L를 가하여 용매분획 후 상층(*n*-hexane 층)과 하층(H_2O 층)을 분리하였다. 본 조작을 4회 행하여 얻어진 *n*-hexane 층을 합하여 농축한 결과 0.2 g의 농축물을 얻었다 (Fig. 2). 이어 EtOAc와 수포화 BuOH 3 L씩을 각각 *n*-hexane에 의한 용매분획과 동일한 방법에 의해 순차 분획하여 EtOAc 층

56.2 g, BuOH 층 138.5 g 및 H₂O 층 731.5 g을 얻었다 (Fig. 2).

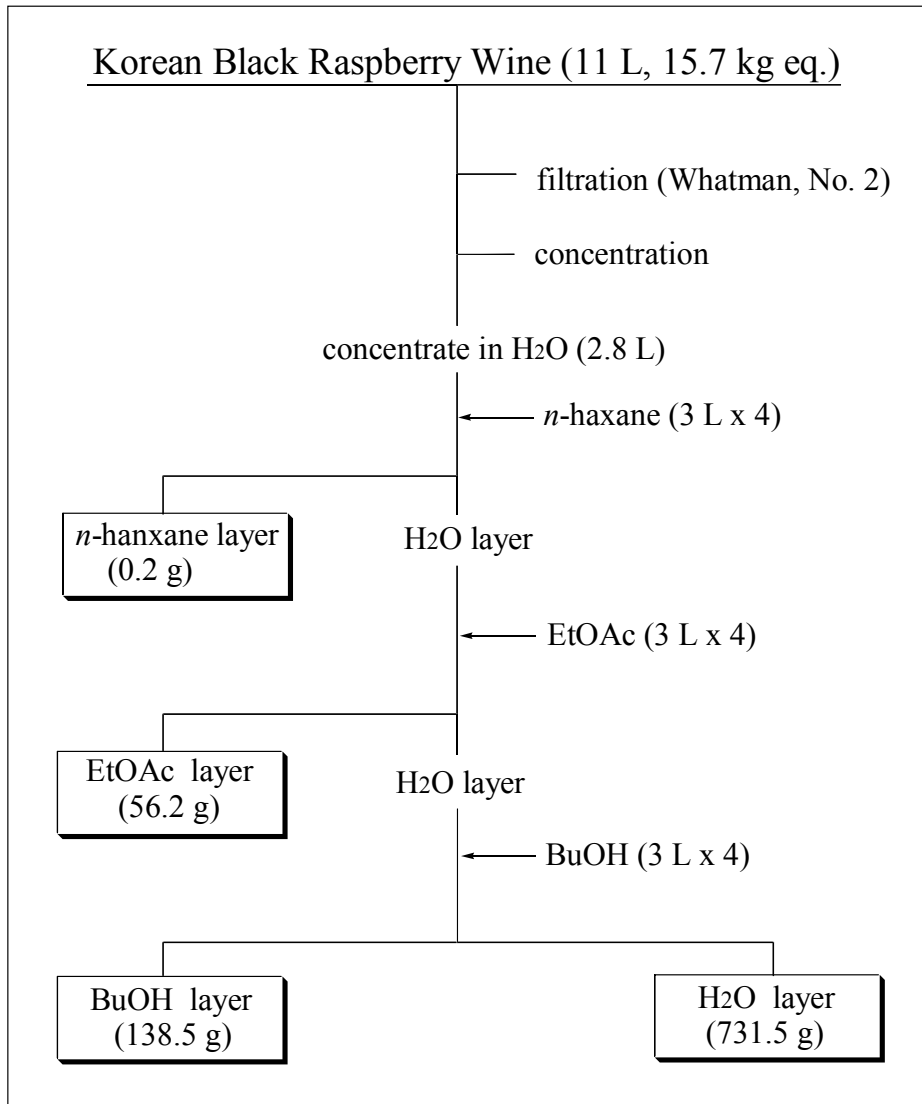


Fig. 2. Solvent fractionation procedure of Korean black raspberry wine filtrate.

다. 생리활성물질 단리·정제

- 1) 복분자술 용매분획 후 각 획분의 TLC 분석 및 항산화 활성 평가
용매분획에 의해 얻어진 각 획분을 대상으로 TLC-DPPH법에 의해 항산화 화합

물의 존재 경향을 비교·검토하였다 (Fig. 3). 그 결과 *n*-hexane 층 및 H₂O 층에는 강한 항산화 활성을 나타내는 화합물이 다른 획분에 비해 매우 미량 존재하는 것으로 판단되었다. 그러나 EtOAc 층에는 다양한 화합물의 존재가 확인되었으며, 그들의 함량 또한 다른 획분에 비해 월등히 높은 것으로 확인되었다. 그리고 BuOH 층은 EtOAc 층에는 미치지 못하나 EtOAc 층에 존재하는 화합물들과는 다른 종류의 화합물로 판단되어지는 spots가 검출되었다. 이 결과로부터 복분자술 중에 함유되어 있는 항산화 화합물은 EtOAc 획분에 가장 많이 이행되었으며, BuOH 층에도 적지 않은 양의 항산화 화합물이 존재하는 것으로 판단되었다.

이에 항산화 화합물이 가장 다량 존재하고 있는 것으로 판단된 EtOAc 층과 BuOH 층을 대상으로 항산화 활성 본체들의 구명을 시도하였다.

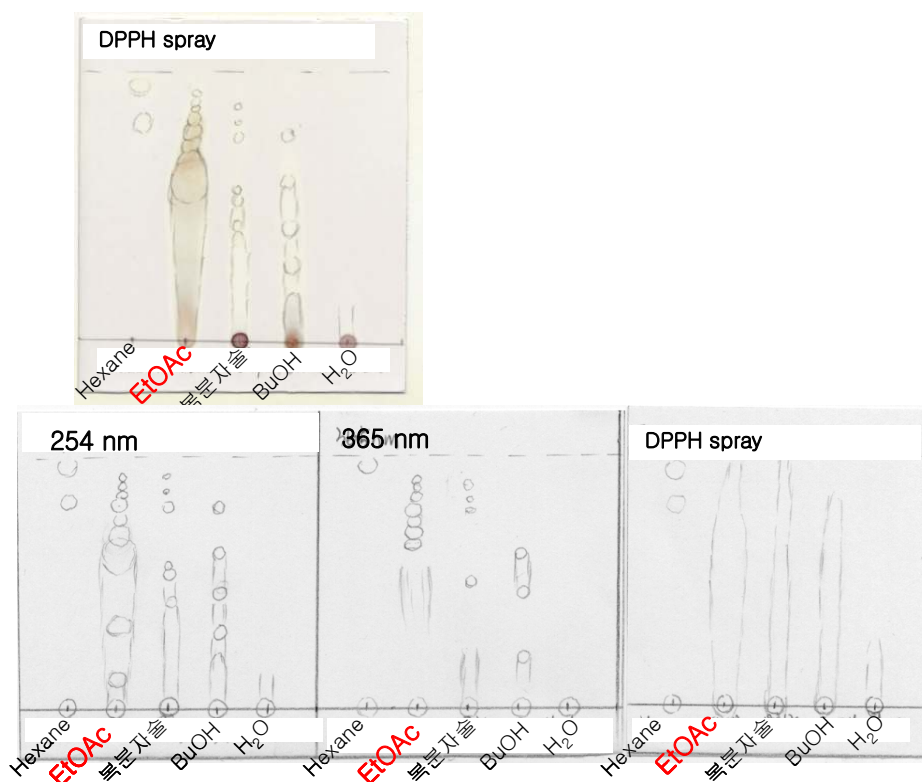


Fig. 3. TLC analyses of each fractions after solvent fractionation of Korean black raspberry wine filtrate.

Development solvent, CHCl₃/MeOH = 5 : 2 (v/v); TLC plate, Kiesel Gel 60 F₂₅₄.

2) EtOAc 획분의 Silica Gel Column Chromatography

EtOAc 층 56.2 g 중 약 1/3의 상당량(20 g)을 대상으로 silica gel column chromatography (71.5 × 4 cm)를 행하였다. 시료의 약 20배량에 상당하는 silica gel (400 g, 70~230 mesh, Kiesel gel 60, column chromatography용, Merck, Darmstadt, Germany)을 CHCl₃으로 slurry를 만들어 column에 충전한 후, EtOAc 중에 CHCl₃의 함량을 100%에서 부터 0%까지, 그리고 MeOH 중에 EtOAc의 함량이 100, 50 및 0%의 용액을 각각 2 L씩 용출시키고, 이어 MeOH/H₂O/Acetic acid (50 : 48 : 2, v/v)의 혼합용액을 2 L 용출시켰다.

얻어진 각 획분을 TLC-DPPH 분석한 결과, Fig. 4에 나타낸 바와 같이 fr. EL-D~J (CHCl₃/EtOAc = 80:20 ~ 20:80, v/v)에서 대부분의 항산화 활성화합물이 용출됨을 확인하였다. 그 중 상대적으로 함량이 높은 fr. EL-F (CHCl₃/EtOAc = 60:40, v/v; 2.3 g)를 대상으로 더욱 정제를 행하기로 하였다.

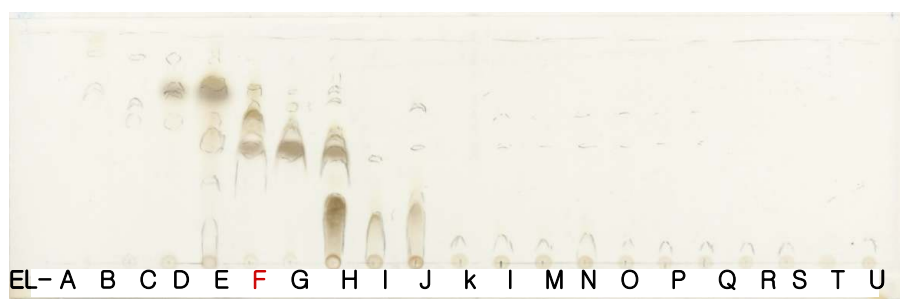


Fig. 4. TLC analyses of each fraction after silica gel column chromatography of EtOAc fraction of Korean black raspberry wine.

Development solvent, CHCl₃/MeOH = 5 : 2 (v/v); TLC plate, Kiesel Gel 60 F₂₅₄.

3) EL-F 획분의 Silica Gel Column Chromatography

활성 획분 EL-F (2.3 g)를 상기 G 항과 용매계를 달리하여 silica gel column chromatography (1.5 × 25 cm)를 재차 행하였다. 이동상은 MeOH 중에 CHCl₃이 100, 90, 80, 70, 60, 50, 그리고 0%인 용액을 각각 75 mL씩 용출시켰다. 그 외의 조건은 상기 G 항과 동일하다. 얻어진 각 획분을 TLC-DPPH 분석을 행한 결과(Fig. 5), ELF-3 (1.8 g, CHCl₃/MeOH = 9 : 1, v/v)에서 가장 현저한 항산화 활성이 관찰되었다.

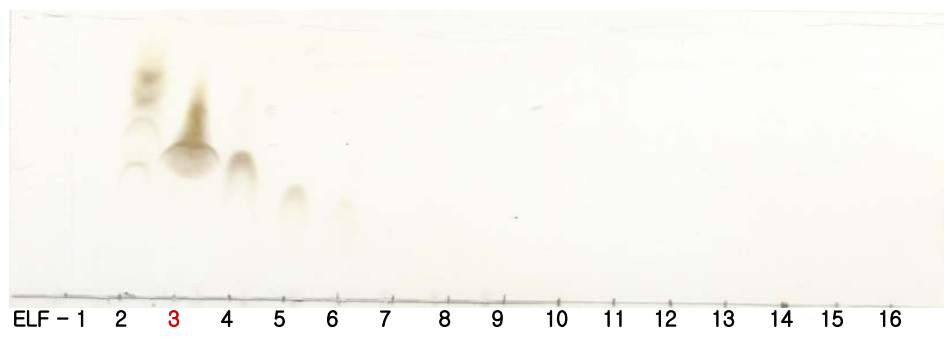


Fig. 5. TLC analyses of each fraction after silica gel column chromatography Of ELF-3.

Development solvent, CHCl₃/MeOH = 5 : 2 (v/v); TLC plate, Kiesel Gel 60 F₂₅₄.

4) ELF-3 획분의 Sephadex LH-20 Column Chromatography

활성 획분 ELF-3 (1.8 g)을 더욱 정제하기 위해 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하였다. Sephadex LH-20 (70~230 mesh, Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 MeOH로 팽윤시킨 후 column (1.6 × 25)에 충전하고, 시료를 소량의 MeOH에 녹여 column에 charge한 후 동 용매계로 용출분획하여 정제하였다.

얻어진 각 획분을 TLC 분석한 결과(Fig. 6), V_e/V_t 0.45~0.61 (ELFS-3, 1.0 g) 및 V_e/V_t 0.62~0.72 (ELFS-4, 3.0 mg)의 용출획분에서 활성 화합물이 검출되었다. 그 중 보다 함량이 많은 ELFS-3은 ODS open column chromatography를, 그리고 ELFS-4는 HPLC에 의하여 각각 정제를 행하였다.

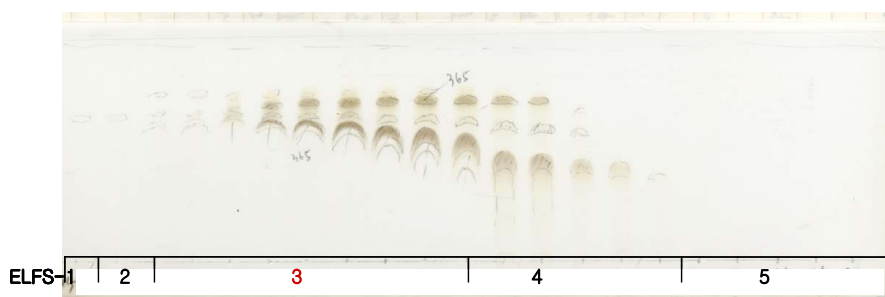


Fig. 6. TLC analyses of each fraction after sepadex LH-20 column chromatography Of ELF-3.

Development solvent, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 5 : 2$ (v/v); TLC plate, Kiesel Gel 60 F₂₅₄.

5) ELFS-4 획분의 HPLC에 의한 화합물 1의 분리

ELFS-4의 정제를 위해 μ Bondapak C₁₈ column (7.8 × 300 mm, Waters, USA)을 이용하여 20% MeOH을 이동상으로 isocratic 용출(flow rate, 2.5 mL/min; 214 nm)을 행하였다. 얻어진 활성 획분(t_R 8.1 min, 2.0 mg)을 ODS 80Ts column (4.6 × 150 mm, Tosoh, Japan)을 이용하여 재정제를 행한 결과, t_R 15.2 min에서 단일 화합물 0.1 mg (화합물 1)을 분리하였다(Fig. 7).

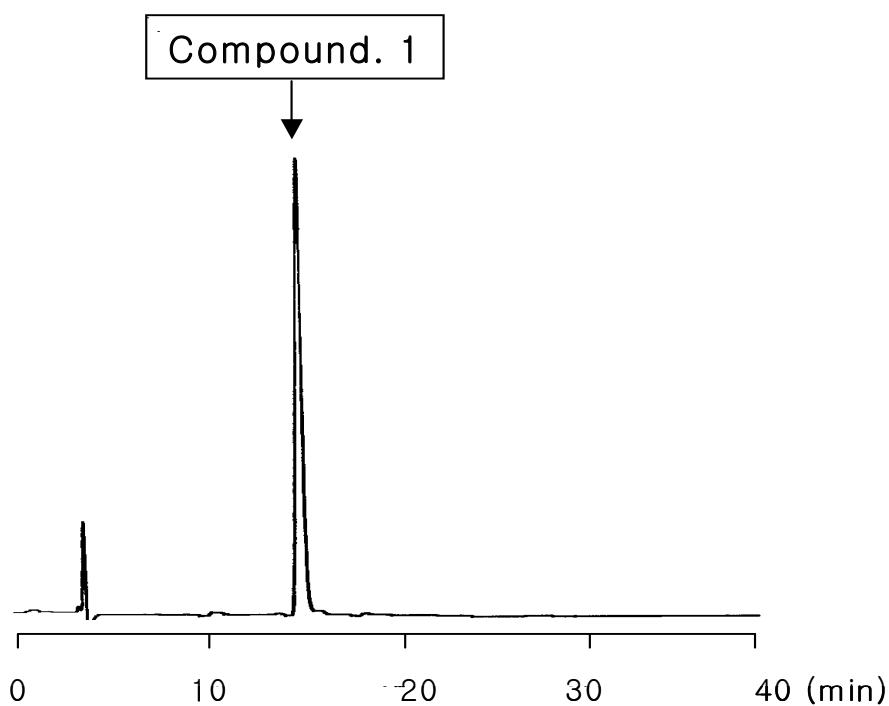


Fig. 7. HPLC chromatogram of fr. ELFS-4-6.

Column: ODS-80Ts, Tosoh
Column size: 4.6 x 150 mm
Mobile phase: 20% MeOH
Flow rate: 1 ml/min
Detection: 214 nm

6) ELFS-3 획분의 ODS Open Column Chromatography

상기 I 항의 Sephadex LH-20 column chromatography로부터 얻어진 활성획분 ELFS-3 (1 g)을 더욱 정제하기 위하여 ODS (Octadecylsilane) open column chromatography를 행하였다. 시료의 200배량에 상당하는 ODS (70~230 mesh, 200 g, YMC, Kyoto, Japan)를 100% MeOH로 slurry를 만들어 column에 충전시킨 후, 20% MeOH로 평행화하였다. 활성획분 ELFS-3을 20% MeOH에 용해하여 ODS column에 charge한 후, MeOH 농도를 20%에서 100%까지 20%씩 증가시키는 step-wise 용출법에 의해 용출시켰다. 얻어진 각 획분들을 TLC-DPPH법에 의해 항산화 활성 물질의 경향을 검토한 결과(Fig. 8), ELFSO-11부터 15의 각 획분에서 화합물들의 존재 경향이 다르게 나타나 그들 각각의 획분을 대상으로 HPLC에 의해 활성 화합물을 단리하기로 하였다.

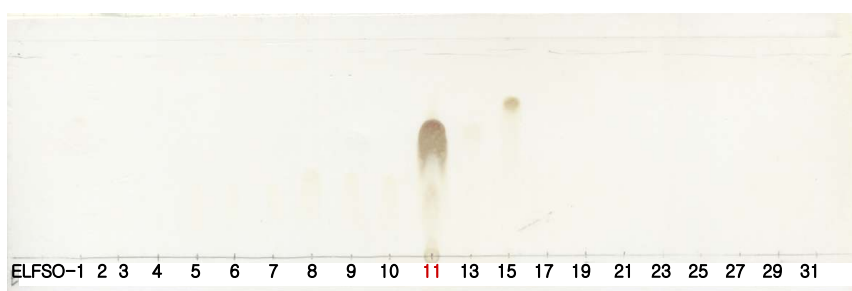


Fig. 8. TLC analyses of eash fraction after ODS column chromatography of fr. ELFSO-11
Development solvent, $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 5 : 2$ (v/v); TLC plate, Kiesel Gel 60 F254.

7) ELFSO-12 획분의 HPLC에 의한 화합물 **2**, **3** 및 **4**의 단리

ELFSO-12 획분(1.8 mg)을 μ Bondapak C₁₈ column (7.8 × 300 mm, Waters, USA)을 이용하여 HPLC에 의한 분리(20% MeOH, 2.5 mL/min, 214 nm)를 행하여 3종의 주요 peak [t_R 9.4 min (peak 2), t_R 12.4 min (peak 4), t_R 20.9 min (peak 6)]를 각각 분취하였다(Fig. 9). 이들 세 획분을 ODS 80Ts column (4.6 × 150 mm, Tosoh, Japan; 20% MeOH, pH 2.65 by trifluoroacetic acid; 1.0 mL/min; 214 nm)을 이용한 동일조건에서 각각 재정제를 행하여 t_R 9.4 min의 획분으로부터 화합물 **2** (0.3 mg, Fig. 10)를, t_R 12.4 min의 획분으로부터 화합물 **3** (t_R 13.5 min, 0.6 mg, Fig. 11)을, 그리고 t_R 20.9 min의 획분으로부터 화합물 **4** (t_R 30.7 min, 0.3 mg, Fig. 12)를 각각 단리하였다.

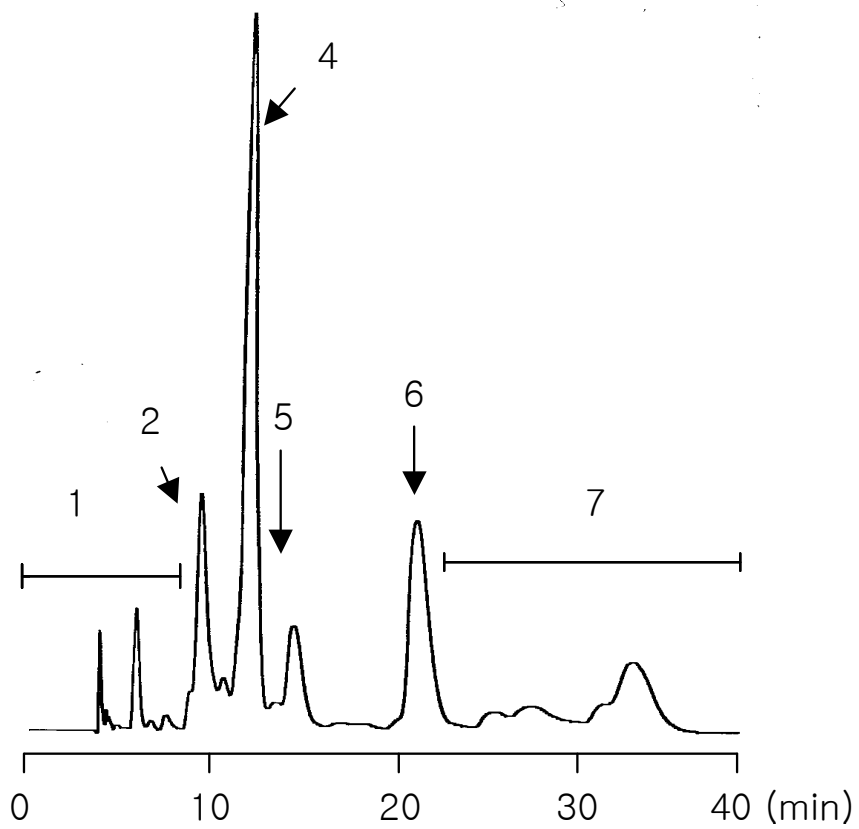


Fig. 9. HPLC chromatogram of fr. ELFSO-12.

Column: ODS-80Ts, Tosoh

Column size: 4.6 × 150 mm

Mobile phase: 20% MeOH (pH 2.65)

Flow rate: 1 ml/min

Detection: 214 nm

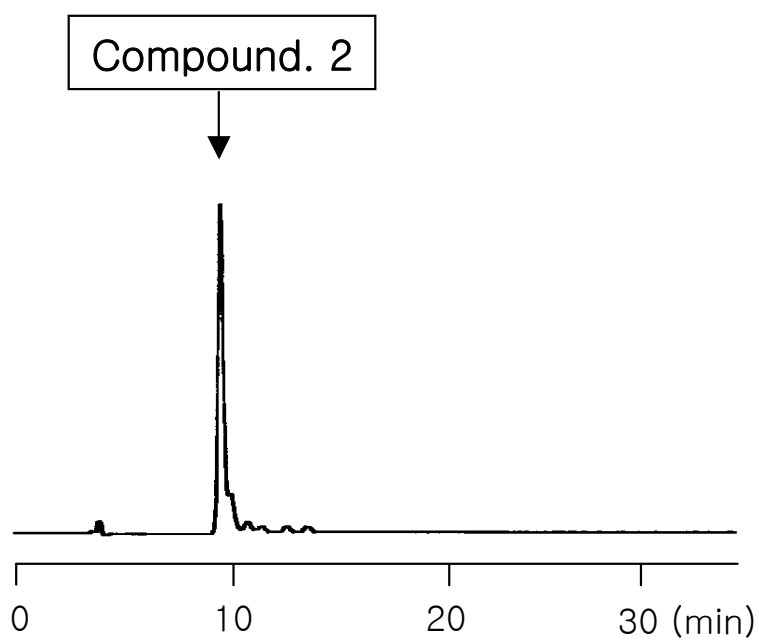


Fig. 10. HPLC chromatogram of fr. ELFSO-12-2.

Column: ODS-80Ts, Tosoh

Column size: 4.6 × 150 mm

Mobile phase: 20% MeOH (pH 2.65)

Flow rate: 1 ml/min

Detection: 214 nm

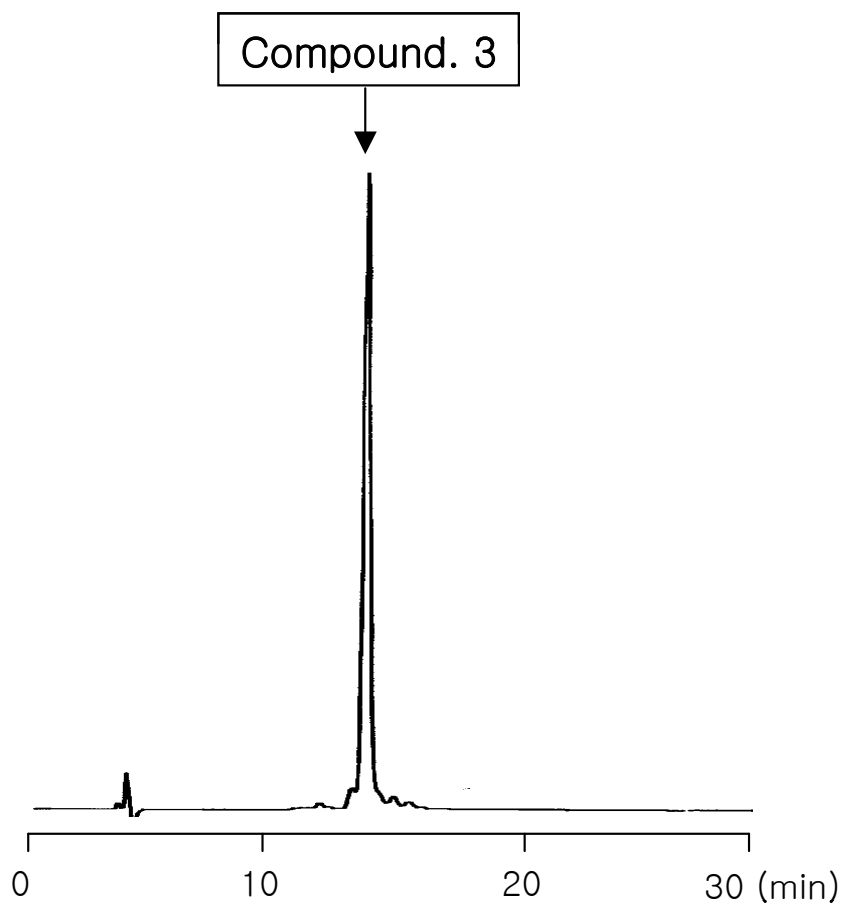


Fig. 11. HPLC chromatogram of fr. ELFSO-12-4.

Column: ODS-80Ts, Tosoh

Column size: 4.6 × 150 mm

Mobile phase: 20% MeOH (pH 2.65)

Flow rate: 1 ml/min

Detection: 214 nm

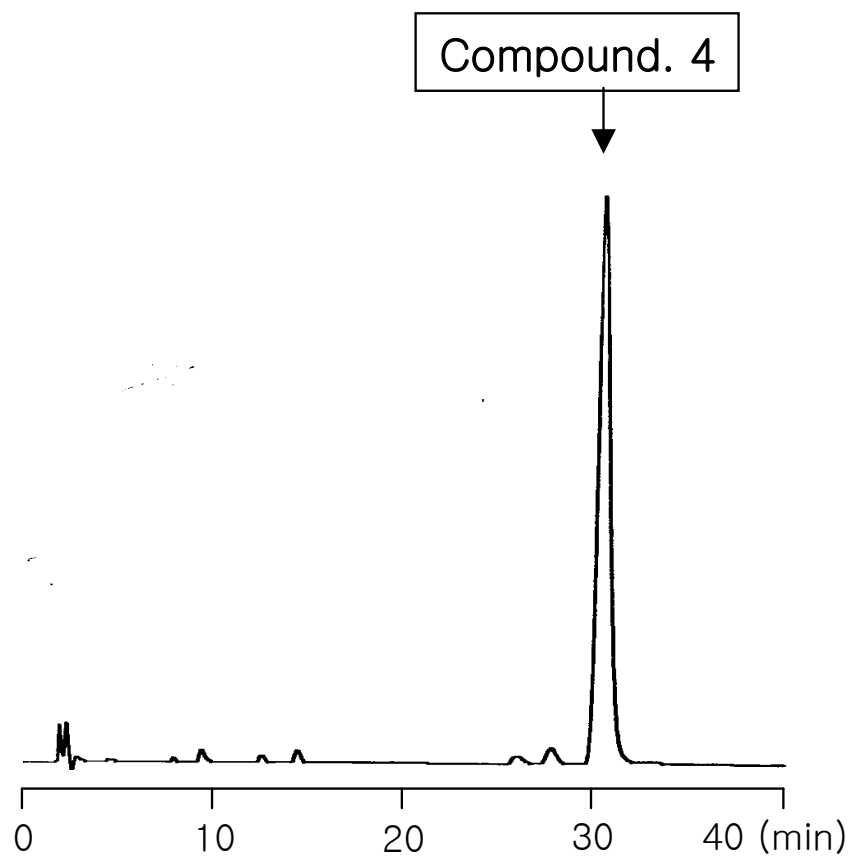


Fig. 12. HPLC chromatogram of fr. ELFSO-12-6.

Column: ODS-80Ts, Tosoh

Column size: 4.6 × 150 mm

Mobile phase: 20% MeOH (pH 2.65)

Flow rate: 1 ml/min

Detection: 214 nm

8) ELFSO-15 획분의 HPLC에 의한 화합물 5의 단리

ELFSO-15 획분(2.3 mg)을 더욱 정제하기 위하여 ODS 80Ts column (4.6 × 150 mm, Tosoh, Japan; 20% MeOH; 1.0 mL/min; 214 nm)을 이용한 HPLC (Fig. 13)를 행하여 화합물 5 (t_R 15.6 min, 0.6 mg)를 단리하였다(Fig. 14).

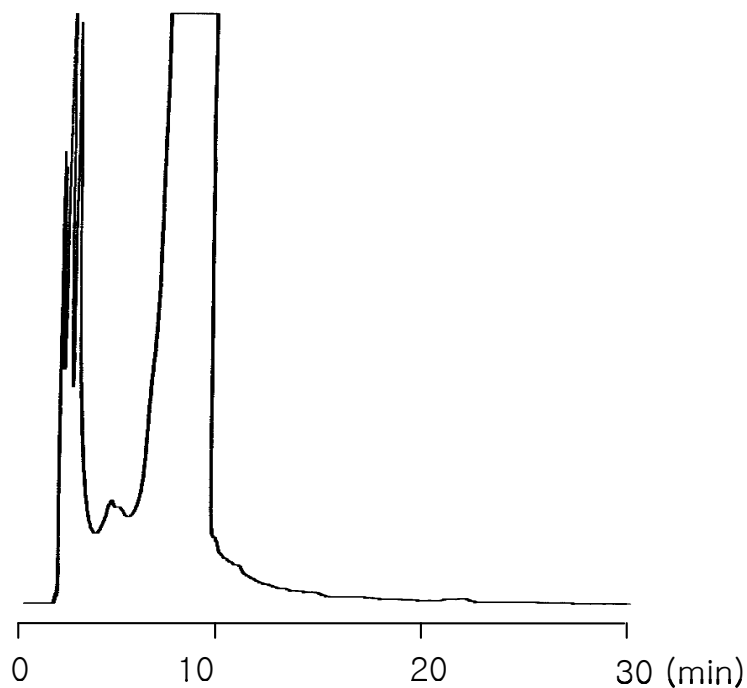


Fig. 13. HPLC chromatogram of fr. ELFSO-15

Column: ODS-80Ts, Tosoh

Column size: 4.6 × 150 mm

Mobile phase: 27% MeOH

Flow rate: 1 ml/min

Detection: 214 nm

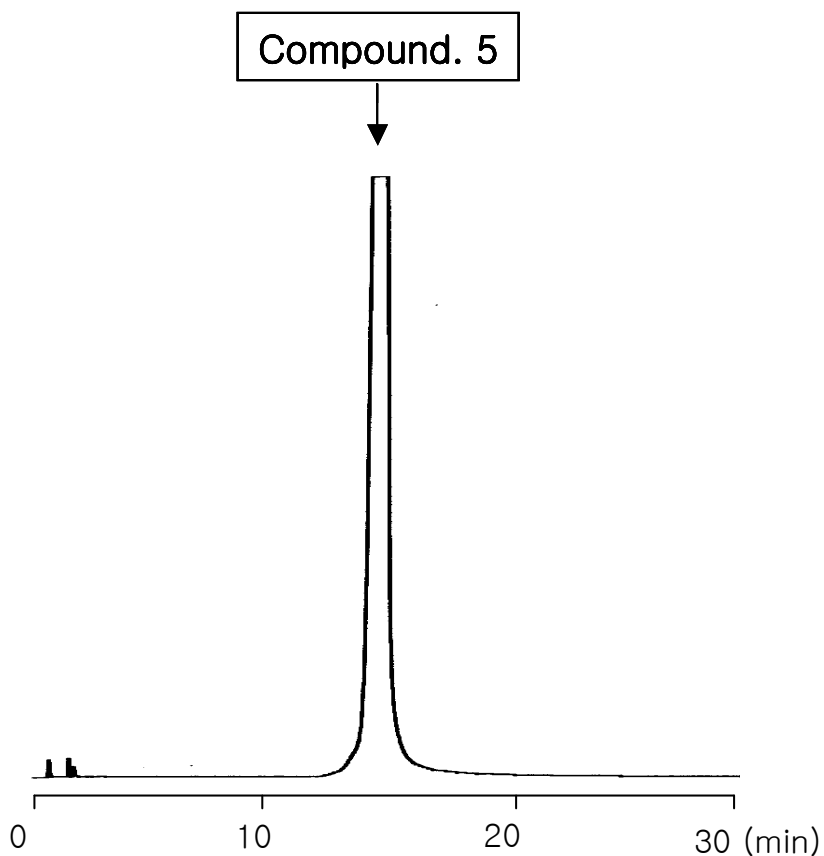


Fig. 14. HPLC chromatogram of fr. ELFSO-15-6.

Column: ODS-80Ts, Tosoh

Column size: 4.6 × 150 mm

Mobile phase: 20% MeOH (pH 2.65)

Flow rate: 1 ml/min Detection: 214 nm

9) ELFSO-11 회분의 HPLC에 의한 화합물 6의 분리

ELFSO-11 회분(2.9 mg)을 GPC column (HF-2003, Shodex Packed Column, 20 × 500 mm, tetrahydrofuran, 3.5 mL/min, 214 nm)을 이용하여 정제를 행한 결과 (Fig. 15), t_R 30.0 min에서 단일물질(화합물 6, 1.9 mg)을 분리하였다.

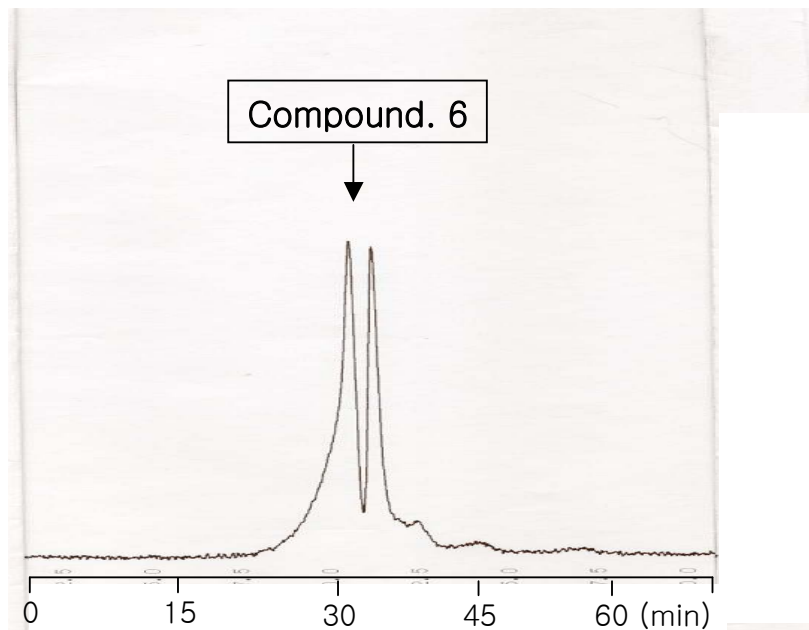


Fig. 15. HPLC chromatogram of fr. ELFSOG-1.

Column: GPC HF-2003, Japan
Column size: 20 x 500 mm
Mobile phase: THF 100%
Flow rate: 3.5 ml/min
Detection: 214 nm

이상의 복분자술 EtOAc 획분 중에 존재하는 항산화 화합물의 단리·정제 과정을 Fig. 16에 나타내었다.

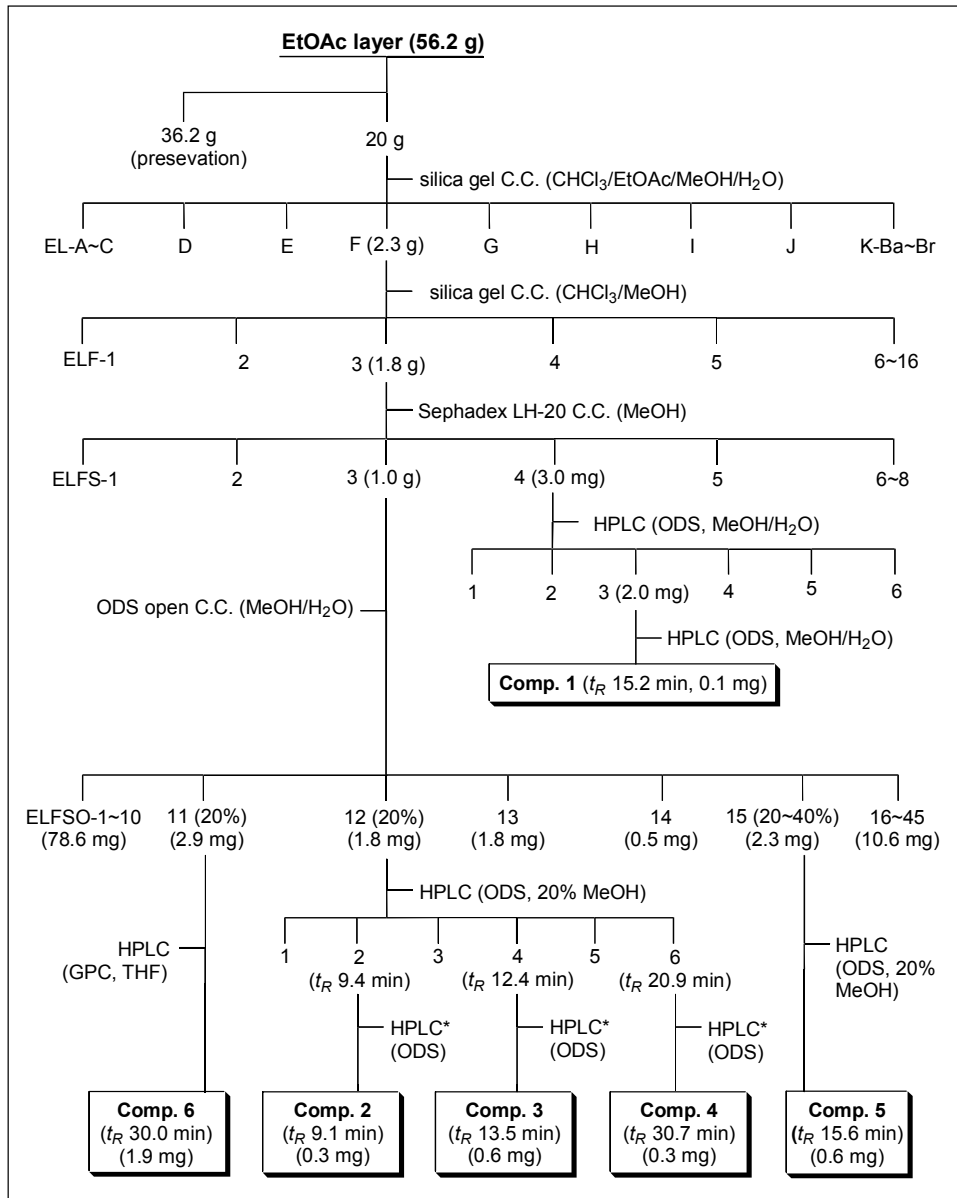


Fig. 16. Isolation procedure of antioxidants from EtOAc layer of Korean black raspberry wine filtrate. *: Mobile phase, 20% MeOH (pH 2.65 by trifluoroacetic acid).

10) 화합물 1의 구조동정

화합물 1의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum상(Table 1)에서 δ 7.88 및 6.82에서 등가의 doublet signal이 관찰되었다. 이들 signal은 para 치환체의 aromatic proton 유래로

추측되었다. 즉, 2H의 등가 proton이 한 쌍씩 존재하는 화합물로서 para 위치에 각각 다른 관능기가 결합된 phenol성 화합물로서 4-hydroxybenzoic acid일 가능성이 시사되었다. 그래서 시판품의 4-hydroxybenzoic acid 표준화합물을 동일 조건에서 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 행하였다. 그 결과(Table 1), 화합물 1의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 표준품의 그것과 일치하였다. 또 화합물 1을 TMS 유도체화한 후 GC-MS 분석을 행한 결과(Fig. 17), m/z (int., %) 73 (TMS^+ , 100), 91 $\{[\text{M-COO}(\text{TMS})_2]^+$, 9.3}, 105 $\{[\text{M-}(-\text{OTMS})_2]^+$, 2.5}, 165 $[(\text{M-COOTMS})^+$, 0.8], 193 $\{[\text{M-}(\text{CH}_3)_6]^+$, 49.5}, 207 $[(\text{M-TMS})^+$, 5.1], 223 $\{[\text{M-}(\text{CH}_3)_4]^+$, 79.9}, 267 $[(\text{M-CH}_3)^+$, 97.2], 282 (M^+ , 21.2) 등의 특징적인 fragment ion이 검출되어 화합물 1을 4-hydroxybenzoic acid로 동정하였다.

Table 1. ¹H-NMR data (500 MHz, CD₃OD, TMS) of compounds isolated from EtOAc layer of MeOH extract of Korean black raspberry wine

Compounds	d _H (mult, <i>J</i>)
4-Hydroxybenzoic acid (1)	7.88 (2H, <i>J</i> = 8.5 Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, <i>J</i> = 8.5 Hz, H-3, 5)
4-Hydroxybenzoic acid standard compound	7.88 (2H, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-3, 5)
3,4-Dihydroxybenzoic acid (2)	7.43 (1H, br. s, H-2), 7.42 (1H, dd, <i>J</i> = 8.5, 2.5 Hz, H-6), 6.79 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H-5)
4-(2-Hydroxyethyl)-phenol (3)	7.03 (2H, br. d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-3, 5), 6.70 (2H, br. d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-2, 6), 3.68 (2H, t, <i>J</i> = 7.0 Hz, - <u>CH₂</u> -OH), 2.71 (2H, t, <i>J</i> = 7.0 Hz, C ₄ - <u>CH₂</u> -)
Catechol (4)	6.75 (2H, m, H-4, 5), 6.65 (2H, m, H-3, 6)
Catechol standard compound	6.75 (2H, m, H-4, 5), 6.65 (2H, m, H-3, 6)
3,4,5-Trihydroxy-benzoic acid ethyl ester (5)	7.04 (2H, s, H-2, 6), 4.27 (2H, q, <i>J</i> = 7.0 Hz, - <u>CH₂</u> -), 1.34 (3H, t, <i>J</i> = 7.0 Hz, - <u>CH₃</u>)

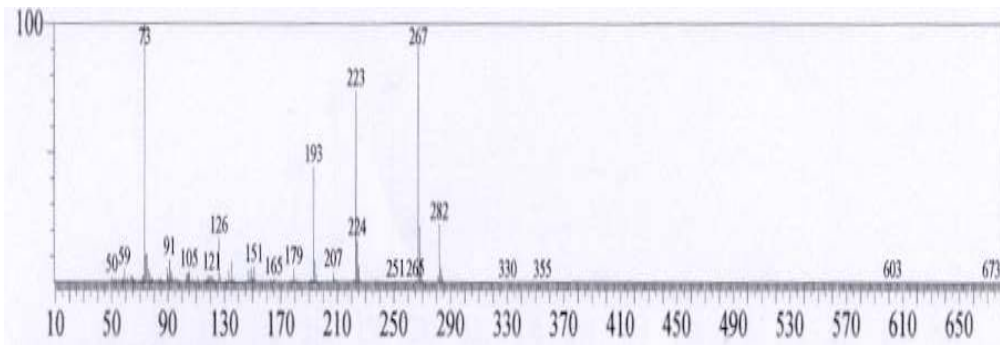


Fig. 17. GC-MS spectrum of the trimethylsilylated 4-hydroxybenzoic acid.

11) 화합물 2의 구조동정

화합물 2의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum(Table 1)상에서 δ 7.44부터 6.79의 sp^2 carbon proton signal 3H분이 검출되어 방향족 화합물일 가능성이 시사되었다. d 6.79의 doublet (1H, d, $J = 8.5$ Hz), δ 7.42의 dd form의 1H ($J = 8.5, 2.5$ Hz) 및 δ 7.43의 br. s form의 1H signal이 관찰되었던 것으로부터 방향족환의 1, 3 및 4위에 치환체가 결합된 3,4-dihydroxybenzoic acid일 가능성이 시사되었다. 본 화합물의 더욱 정확한 구조 동정을 위해 TMS 유도체화 후 GC-MS 분석을 행한 결과(Fig. 18), m/z (int., %) 73 (TMS^+ , 100), 165 $\{[\text{M}-(\text{-OTMS})_2-(\text{-C=O})]^+$, 4.8}, 193 $\{[\text{M}-(\text{-OTMS})_2]^+$, 42.6}, 223 $\{[\text{M}-(\text{TMS})_2]^+$, 4.9}, 281 $\{[\text{M}-(\text{CH}_3)_6]^+$, 1.8}, 311 $\{[\text{M}-(\text{CH}_3)_4]^+$, 7.5}, 355 $[\text{M}-(\text{CH}_3)]^+$, 9.7], 370 (M^+ , 20.1)의 fragment ion이 검출되어 화합물 2를 3,4-dihydroxybenzoic acid로 동정하였다.

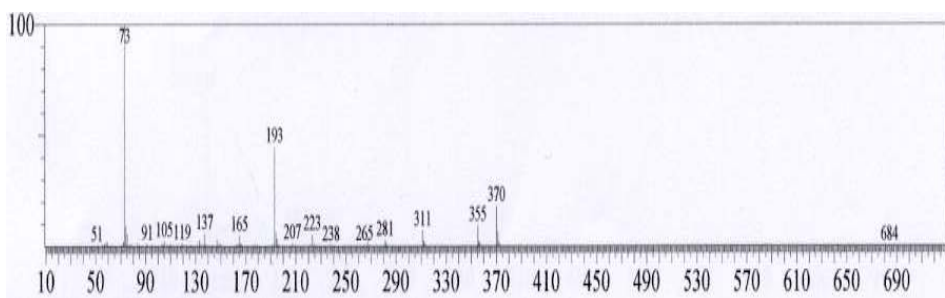


Fig. 18. GC-MS spectrum of the trimethylsilylated 3,4-dihydroxybenzoic acid.

12) 화합물 3의 구조동정

화합물 3의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum(Table 1)상에서 δ 7.03과 6.70에 등가의 doublet signal (2H, br. d, $J = 8.3$ Hz)가 관찰되었다. 그 signal 등의 경향이 화합물 1의 경우와 유사하였으나 이들 signal의 chemical shift가 다르게 검출되었던 것으로부터 화합물 1과는 다른 관능기가 para 치환된 방향족 화합물일 가능성이 매우 강하게 시사되었다. 그리고 δ 3.68과 δ 2.71에 각각 나타난 2중 2H의 triplet signal ($J = 7.0$ Hz)의 존재로부터 AB type의 alcoholic 관능기가 존재함을 알 수 있었다. 이에 본 화합물은 4-(2-hydroxyethyl)-phenol일 가능성이 강하게 시사되었다. 이 화합물을 TMS화하여 GC-MS 분석을 행한 결과(Fig. 19), m/z (int., %) 73 (TMS^+ , 100), 103 $\{[\text{M}-(\text{-OTMS})_2]^+$, 19.3}, 117 $\{[\text{M}-(\text{-Ph-OTMS})]^+$, 1.1}, 149 $\{[\text{M-OTMS}-(\text{CH}_3)_3]^+$, 4.3}, 179 $\{[\text{M}-(\text{-CH}_2\text{-OTMS})]^+$, 86.5}, 193 $\{[\text{M}-(\text{-OTMS})]^+$, 6.8}, 209 $[(\text{M-TMS})^+$, 0.3], 235 $\{[\text{M}-(\text{CH}_3)_3]^+$, 0.2}, 252 $\{[\text{M}-(\text{CH}_3)_2]^+$, 0.1}, 267 $[(\text{M-CH}_3)^+$, 11.2], 282 (M^+ , 16.1)의 fragment ion이 검출되어 4-(2-hydroxyethyl)-phenol로 동정하였다.

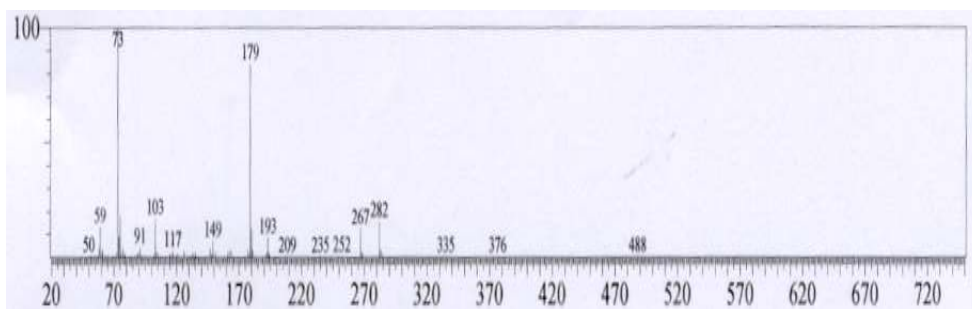


Fig.19 . GC-MS spectrum of the trimethylsilylated 4-(2-hydroxyethyl)-phenol.

13) 화합물 4의 구조동정

화합물 4의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum(Table 1)상에서 δ 6.75와 6.65에 등가의 multiplet signal 한 쌍만이 검출되었다. 이 signal들은 방향족환에 동일한 관능기가 ortho 치환된 화합물의 전형적인 pattern이라 판단되어 catechol일 가능성이 시사되었다. 그래서 시판품의 catechol을 동일조건의 $^1\text{H-NMR}$ 을 분석한 결과(Table 1), 그들 spectrum이 일치됨을 확인할 수 있었다. 이에 본 화합물을 catechol로 동정하였다.

14) 화합물 5의 구조동정

화합물 5의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum상에서 δ 7.04에 2H의 br. singlet signal에 더하여 carboxyl group에 ester 결합된 methylene carbon proton 유래로 추측되어지는 2H의 quartet signal (d , 4.27, $J = 7.0$ Hz) 및 δ 1.34에 3H의 triplet signal ($J = 7.0$ Hz)이 관찰되었던 것으로부터 ethyl group이 ester화 되어진 4치환체의 방향족 화합물일 가능성이 시사되었다. 즉 본 화합물은 방향족환의 meta 위에 등가의 proton이 존재하는 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester로 추정되었다. 이 화합물을 TMS 화하여 GC-MS 분석한 결과(Fig. 20), m/z (int., %) 73 (TMS^+ , 100), 237 $\{[\text{M}-(\text{-CH}_2\text{CH}_3)-(\text{TMS})_2]^+$, 6.3}, 267 $\{[\text{M}-(\text{TMS})_2]^+$, 1.2}, 281 $\{[\text{M}-\text{OTMS}-(\text{CH}_2\text{CH}_3)-\text{CH}_3]^+$, 62.5}, 311 $\{[\text{M}-(\text{CH}_2\text{CH}_3)-\text{TMS}]^+$, 7.0}, 369 $\{[\text{M}-(\text{CH}_3)_3]^+$, 5.4}, 399 $[(\text{M}-\text{CH}_3)]^+$, 3.2], 414 (M^+ , 37.6) 등에서 특징적인 fragment ion이 검출되어 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester로 동정하였다.

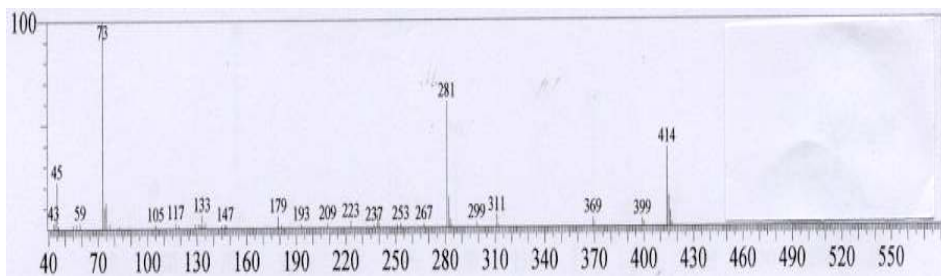


Fig. 20. GC-MS spectrum of the trimethylsilylated 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester.

15) 화합물 6의 구조동정

본 화합물은 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 에 더하여 $^1\text{H}-^1\text{H COSY}$, $^{13}\text{C}-^1\text{H COSY}$, HMBC 등의 2D NMR 분석을 완료하여 현재 구조결정이 진행 중에 있다.

이상 복분자술의 EtOAc 획분으로부터 단리·구조동정된 항산화 화합물 5종의 구조식을 Fig. 21에 나타내었다.

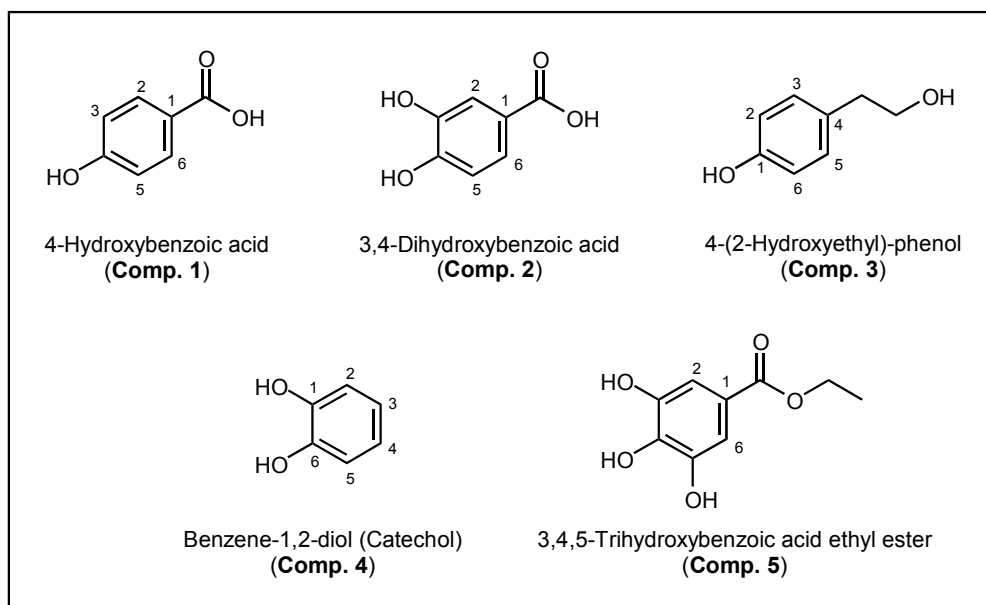


Fig. 21. Structure of compounds isolated from EtOAc layer of Korean black raspberry wine filtrate.

16) BuOH 획분으로부터 항산화 활성 화합물 단리·정제

용매분획 후에 얻어진 BuOH 획분의 농축물(138.5 g)을 200 mL MeOH로 5회 세척하여 (과량의 당으로 추정된) 불용성 화합물을 제거하고 그 용해물을 농축(115.6 g)한 후, TLC-DPPH법을 지표로 XAD-2 column chromatography (8 x 58 cm; bed vol., 2.8 L; mobile phase, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$), Sephadex LH-20 column chromatography (30 x 73 cm, bed vol., 515 mL; mobile phase, MeOH) 및 ODS open column chromatography (2.3 x 53 cm; bed vol., 200 mL; mobile phase, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$)를 순차적으로 행하고, 분리된 여러 활성 획분 중 적자색을 띠면서 항산화능을 보이는 활성획분(25% MeOH 용출물, 51.1 mg)을 ODS column을 이용한 HPLC로 정제하여 단일 피크를 보인 화합물(3.7 mg)을 단리하여 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 행하였다. 그 결과 본 획분은 약 3종의 flavonoid 배당체가 혼합된 상태로 판단되었

으며, 보다 고순도로 정제를 행해야 할 필요성이 판단되었다. 이에 본 획분의 정제가 현재 진행 중에 있다.

라. 고찰

복분자술 농축물과 원재료 복분자의 EtOH 추출물을 대상으로 TLC 분석을 행하여 그들 각각에 존재하는 화합물의 pattern을 비교·검토한 결과, 전혀 다른 화합물의 존재경향이 관찰되었다. 이것은 원재료 중에 함유되어 있던 성분들이 복분자술의 제조과정 중에 효모의 작용 및 화학적 변화에 의해 분해 또는 중합 등을 거쳐 변화되어졌기 때문이라 판단되었다. 그들 변화 성분 중에는 천연에 존재하지 않는 유용 생리활성 화합물이 존재할 가능성이 높다고 판단되어 항노화에 관여하는 항산화 활성 물질에 초점을 맞추어 활성분체의 구명에 착수하였다.

복분자술을 극성의 차이에 근거하여 순차 용매분획한 후 얻어진 각 획분들 중 가장 항산화 활성 물질을 다양하게 다량 함유한 EtOAc 획분을 대상으로 그 활성 분체의 구명을 행한 결과, 4-(2-hydroxyethyl)-phenol (화합물 1), 3,4-dihydroxybenzoic acid (화합물 2), 4-hydroxybenzoic acid (화합물 3), catechol (화합물 4), 그리고 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester (화합물 5)과 같은 일련의 저분자 화합물들이 단리·동정되었다. 이것은 원재료 복분자 중에 함유된 다양한 flavonoid 유도체들이 발효 과정 중에 분해되어 생성된 화합물일 가능성이 높다고 판단되었다. 그러나 본 연구로부터 단리된 화합물들만으로는 복분자술 중에 함유된 생리활성물질의 동정이 충분히 수행되어졌다고 판단하기는 어렵다. 즉 복분자술 중에는 특징적인 적색 색소가 다량 함유되어 있음에도 불구하고 EtOAc 획분으로부터 전혀 그 색소 성분이 탐색 대상으로서 검출되지 않았다. 이는 색소성분이 항산화 활성을 발현하지 않을 가능성이 있거나 분획 과정에서 넓은 범위에 걸쳐 용출되어져 농도가 저하되어 주요 화합물로 검출되지 못하였을 가능성이 시사되었다. 그러나 현 단계에서는 보다 자세한 검토가 필요하다고 판단된다.

한편 복분자술의 BuOH 획분을 대상으로 항산화 활성 물질을 정제하는 과정에서 ¹H-NMR 분석을 행한 결과, 그 spectrum 상의 거동으로 보아 anthocyanidin 배당체일 가능성이 높게 시사되었다. 이 화합물은 적자색의 항산화 활성 물질이었음을 고려할 때, 복분자술 중에 함유된 색소성분으로서 anthocyan이 주요 화합물로 존재할 가능성이 시사되었다. 이러한 정황으로 미루어 보아 anthocyan은 복분자술의 발효과정 중에 대체로 안정성을 유지하고 있을 가능성 또한 배제할 수 없다고 판단되어 이후 보다 폭넓은 화합물군의 분석이 이루어져야 할 것으로 판단되었다. 또 이 화합물 이외에도 복분자술 중에 함유된 다양한 색소화합물이 BuOH 획분에 다종 존재하고 있어 그들 화합물의 구조 및 생리활성에도 흥미가 모아진다.

2. 복분자술의 생리활성물질 구조결정 및 활성평가

1차년도에 복분자술과 원재료 복분자의 추출물을 대상으로 TLC 분석을 행하여 그들에 존재하는 화합물들의 pattern을 비교·검토한 결과, 원재료의 복분자 추출물로부터 검출되지 않은 화합물이 복분자술의 추출물로부터 다종 검출되었다. 이것은 원재료 중에 함유되어 있던 성분들이 복분자술의 제조과정 중에 효모의 작용 및 화학적 변화에 의해 분해 또는 중합 등을 거쳐 변화가 일어난 것으로 판단되었다. 그래서 복분자술 중에는 원재료인 복분자에 함유되어 있지 않은 화합물들이 다양하게 존재할 가능성이 있다고 판단되어 항산화 활성 물질에 초점을 맞추어 활성본체의 구명에 착수하였다. 1차년도에 복분자술의 EtOH 추출물을 용매분획하여 *n*-Hexane 층, EtOAc 층, BuOH 층 및 H₂O 층으로 나눈 후, 얻어진 EtOAc 층을 대상으로 항산화활성 화합물을 단리·동정한 결과, (2-hydroxyethyl)-phenol (화합물 1), 3,4-dihydroxybenzoic acid (화합물 2), 4-hydroxybenzoic acid (화합물 3), catechol (화합물 4), 그리고 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester (화합물 5)와 같은 일련의 저분자 화합물들이 단리·동정되었다(Fig. 1과 2).

1차년도의 연구에 이어 2차년도에는 EtOAc 층을 대상으로 한 추가실험은 물론, *n*-Hexane 층 및 BuOH 층에 함유된 항산화 화합물의 구명을 시도하였다.

(Fig. 1)

(Fig. 2)

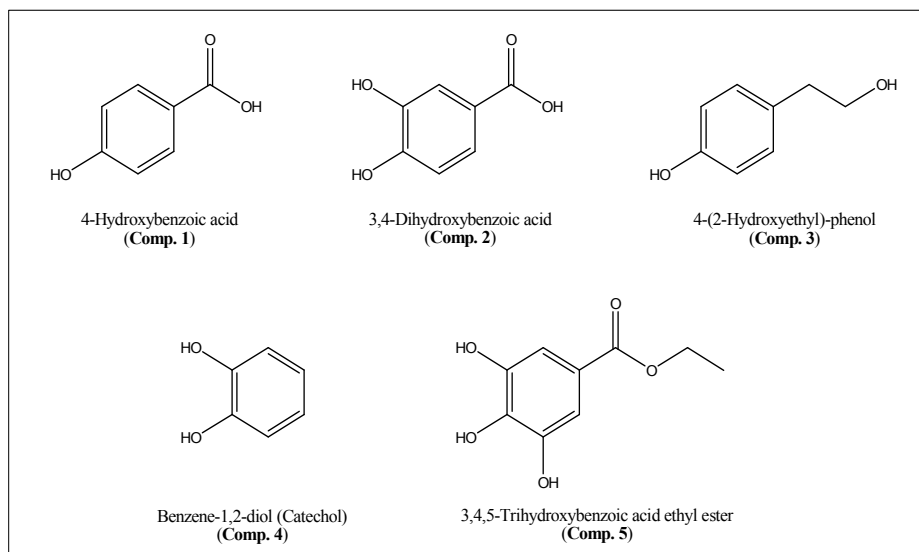


Fig. 1. Structure of compounds isolated from EtOAc layer of Korean black raspberry wine.

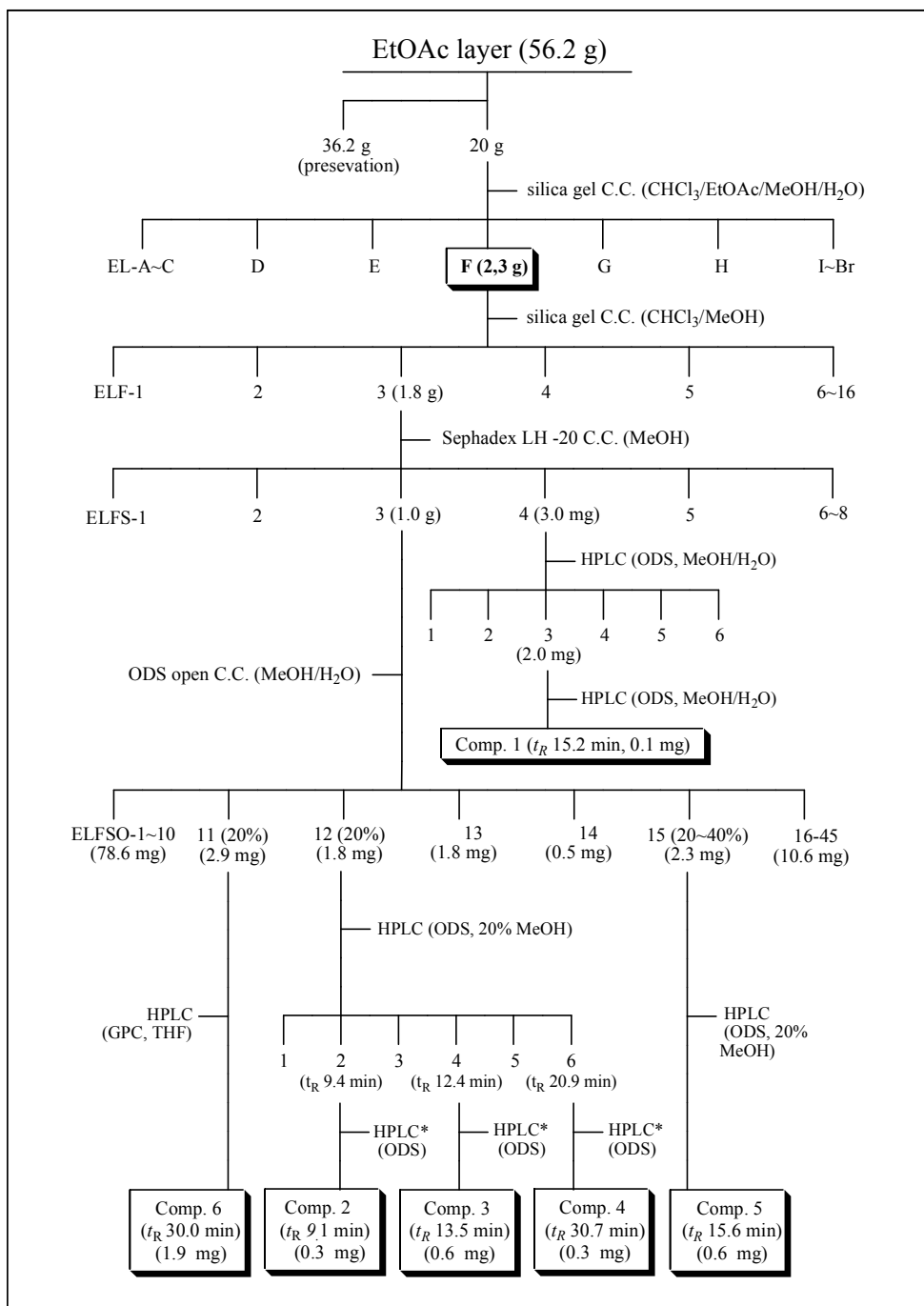


Fig 2. Isolation process of antioxidants from EtOAc layer of Korean black raspberry wine. *: Mobile phase, 20% MeOH (pH 2.65 by trifluoroacetic acid).

가. 생리활성물질의 구조결정

1) 실험재료

본 실험에 이용된 복분자(*Rubus coreanum* Miquel)는 전남 나주에서 2004년 6월에 채취한 것을 이용하였으며, 복분자술은 동일 복분자를 이용하여 (주)연수당에서 조제된 시료를 이용하였다. 이 복분자술은 15.7 kg의 복분자로부터 11 L의 복분자술 원액이 얻어진 것으로 희석되지 않은 상태의 것을 이용하였다.

2) 복분자술로부터 항산화활성화합물의 단리·정제

가) 복분자술의 EtOAc 획분으로부터 항산화 물질의 단리·정제

(1) EL-E 획분의 HPLC를 이용한 활성물질의 단리

1차년도에는 복분자술의 EtOAc 층을 대상으로 silica gel column chromatography를 행하여 얻어진 EL-F 획분을 정제하여 화합물 1~5를 단리·정제하였다. 이어진 2차년도의 실험에서는 EtOAc 층을 silica gel column chromatography 후의 EL-E 획분(36 mg)을 먼저 정제하기로 하였다. 그 EL-E 획분을 μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 × 300 mm, Waters, USA)을 이용하여 5분간 15% MeOH [pH 2.65 by trifluoroacetic acid (TFA)]을 용출시킨 후, 50% MeOH까지 30분 동안 gradient 용출시키고, 100% MeOH까지 5분 동안 gradient 용출시킨 후, 15분 동안 100% MeOH을 유지시키는 이동상으로, 유속 2.0 ml/min (Medel 600 pump, Waters, USA)로 UV detector (280 nm, SPD 10A, SHIMADZU, Japan)를 이용한 조건에서 HPLC를 행하였다. 그 결과(Fig. 3) 3종의 화합물[화합물 7 (EL-E4, t_R 19.4 min, 13.1 mg), 화합물 8 (EL-E6, t_R 22.8 min, 2.6 mg), 화합물 9 (EL-E12, t_R 34.3 min, 13.1 mg)]을 각각 단리하였다. 순도가 높지 않은 것으로 확인된 2 획분(EL-E2, t_R 13.2 min; EL-E9, t_R 27.1 min)은 다른 조건의 HPLC를 이용하여 재정제를 행하였다.

(Fig. 3)

(2) EL-E2 획분의 HPLC를 이용한 화합물 10과 11의 단리

EL-E2 획분(5.9 mg)의 정제를 위해 Discovery[®] Ap Amide C₁₆ column (4.6 × 250 mm, SUPELCO, USA)을 이용하여 15% MeOH (pH 2.65 by TFA)을 이동상으로 isocratic 용출(flow rate, 1.0 mL/min, LC-20AD, SHIMADZU, Japan; 280 nm, SPD-20A, SHIMADZU, Japan)을 행하였다. 그 결과(Fig. 4), t_R 7.2 분에서 단일 화합물 1.3 mg (EL-E2-2, 화합물 10)과 t_R 8.6 분에서 단일 화합물 6.3 mg (EL-E2-4, 화합물 11)을 각각 단리하였다.

(Fig. 4)

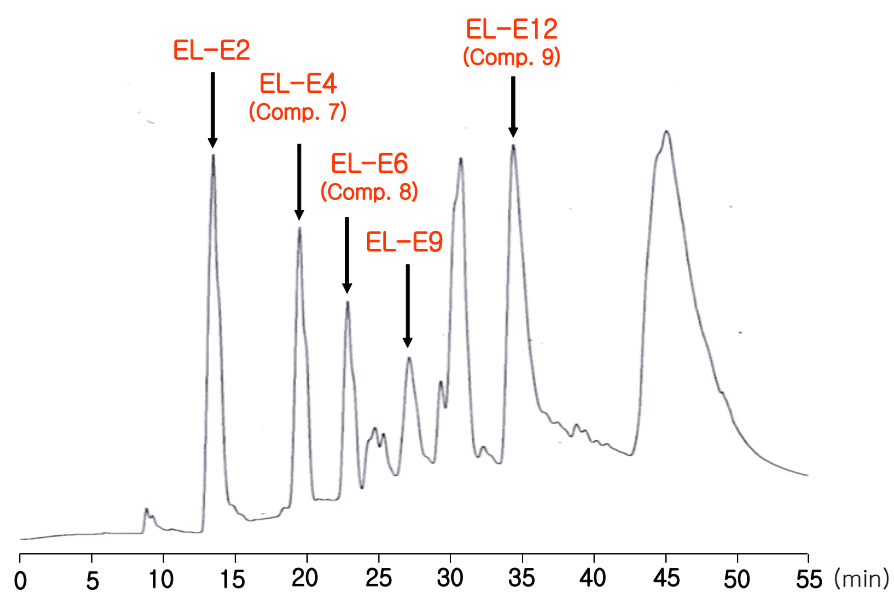


Fig. 3. HPLC chromatogram of fr. EL-E.

Column: μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 × 300 mm)

Flow rate: 2.0 ml/min

Detection: 280 nm

Mobile phase:

15% MeOH (pH 2.65 by TFA) ---> 50% MeOH ---> 100% MeOH
(5 min) (30 min) (5 min) (15 min)

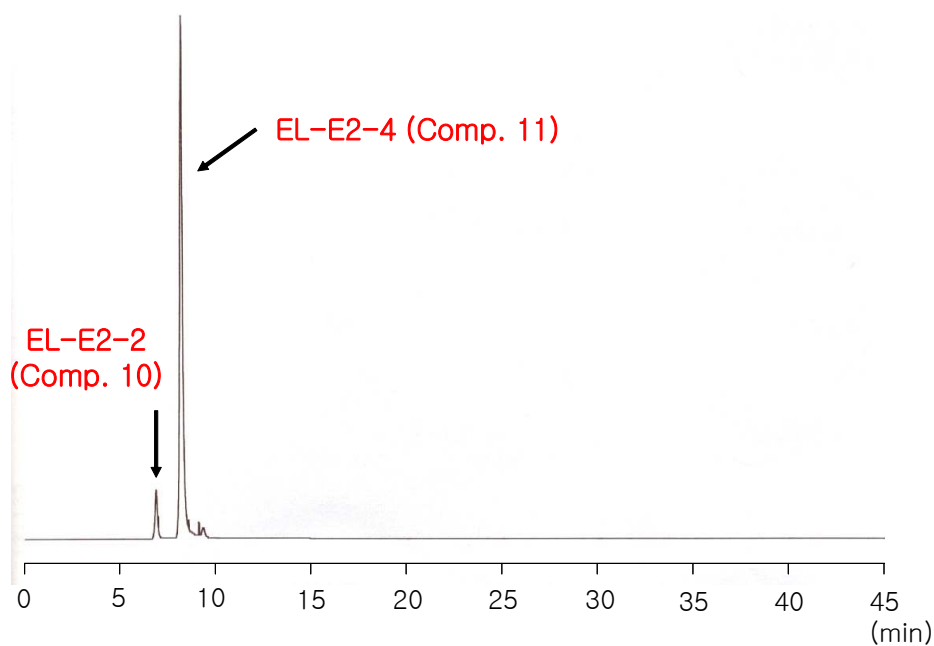


Fig. 4. HPLC chromatogram of fr. EL-E2.

Column: Discovery[®] Ap Amide C₁₆ column (4.6 × 250 mm)

Flow rate: 1.0 ml/min

Detection: 280 nm

Mobile phase: 15% MeOH (pH 2.65 by TFA)

(3) EL-E9 획분의 HPLC를 이용한 화합물 **12**와 **13**의 단리

EL-E9 획분(4.5 mg)을 더욱 정제하기 위하여 Discovery[®] Ap Amide C₁₆ column (4.6 × 250 mm, SUPELCO, USA; 40% MeOH; 1.0 mL/min, LC-20AD, SHIMADZU, Japan; 280 nm, SPD-20A, SHIMADZU, Japan)을 이용한 HPLC를 행하여 화합물 **12** (EL-E9-2, *t_R* 6.9 min, 1.1 mg)와 화합물 **13** (EL-E9-3, *t_R* 7.2 min, 1.9 mg)을 각각 단리하였다(Fig. 5).

(Fig. 5)

(4) EL-H 획분의 HPLC를 이용한 화합물 **14**의 단리

EL-E 획분의 HPLC를 이용한 화합물의 단리에서와 동일한 HPLC 조건으로 EL-H 획분(245 mg)을 단리하였다. 그 결과(Fig. 6), 2종의 main peak [EL-H2 (t_R 9.8 min, 19.1 mg), EL-H4 (t_R 14.6 min, 2.2 mg)]를 분취하여 순도를 확인하였다. EL-H4 (화합물 **14**)는 단일물질이었음에 비해 EL-H2는 불순물을 함유하고 있음이 확인되어 재정제를 행하기로 하였다.

(Fig. 6)

(5) EL-H2 획분의 HPLC를 이용한 화합물 **15**의 단리

EL-H2 획분(19.1 mg)을 정제하기 위하여 Discovery[®] Ap Amide C₁₆ column (4.6 × 250 mm, SUPELCO, USA) 및 UV detector (280 nm, SPD-20A, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 15% MeOH (pH 2.65 by TFA)을 이동상(1.0 ml/min, LC-20AD, SHIMADZU, Japan)으로 한 HPLC를 행하였다. 그 결과(Fig. 7), 화합물 **15** (EL-H2-2, t_R 7.4 min, 14.7 mg)를 단리하였다.

(Fig. 7)

이상 EtOAc 층으로부터 단리된 화합물 **7~15**의 단리과정을 Fig. 8에 정리하였다.

(Fig. 8)

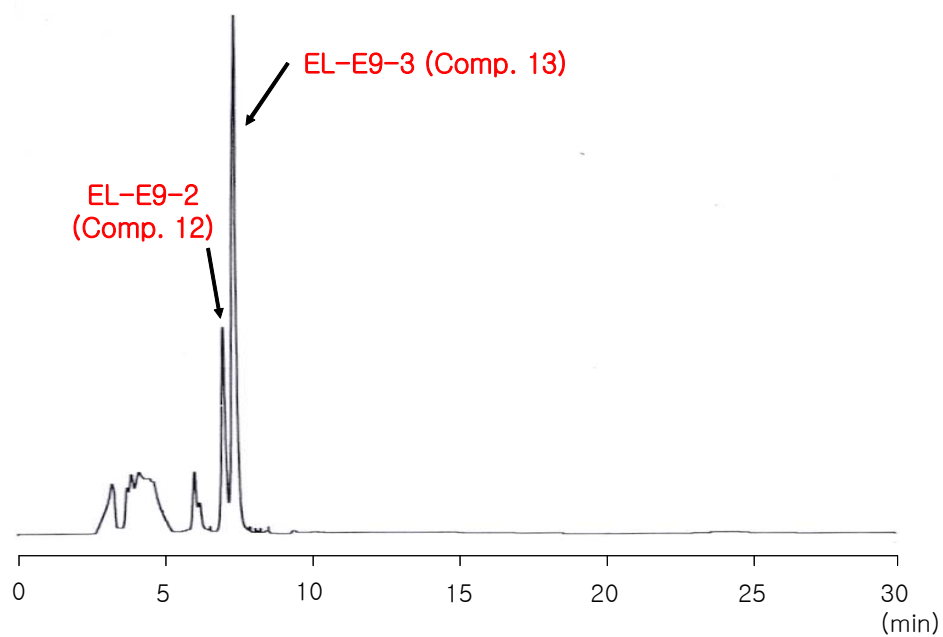


Fig. 5. HPLC chromatogram of fr. EL-E9.

Column: Discovery[®] Ap Amide C₁₆ column (4.6 × 250 mm)

Flow rate: 1.0 ml/min

Detection: 280 nm

Mobile phase: 40% MeOH

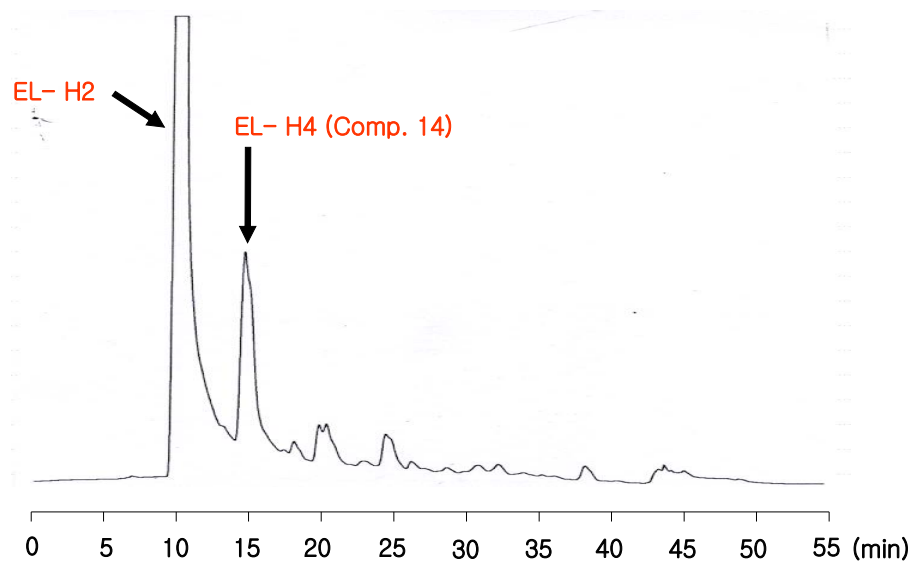


Fig. 6. HPLC chromatogram of fr. EL-H.

Column: μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 × 300 mm)

Flow rate: 2.0 ml/min

Detection: 280 nm

Mobile phase:

15% MeOH (pH 2.65 by TFA) ---> 50% MeOH ---> 100% MeOH
 (5 min) (30 min) (5 min) (15 min)

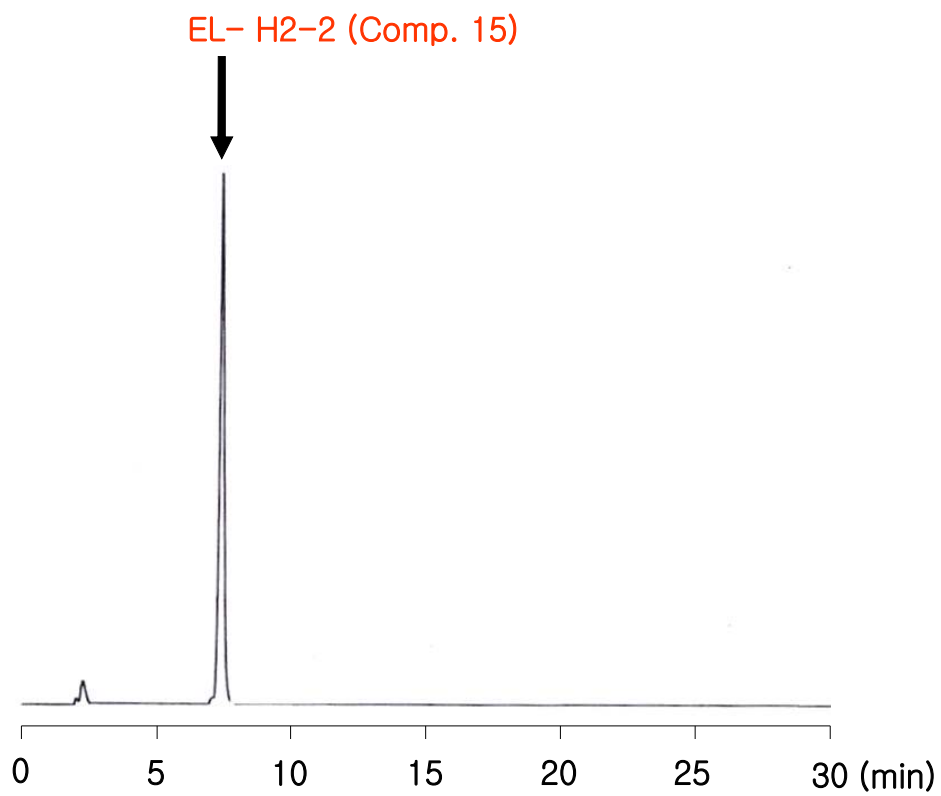


Fig. 7. HPLC chromatogram of fr. EL-H2.

Column: Discovery[®] Ap Amide C₁₆ column (4.6 × 250 mm)

Flow rate: 1.0 ml/min

Detection: 280 nm

Mobile phase: 15% MeOH (pH 2.65 by TFA)

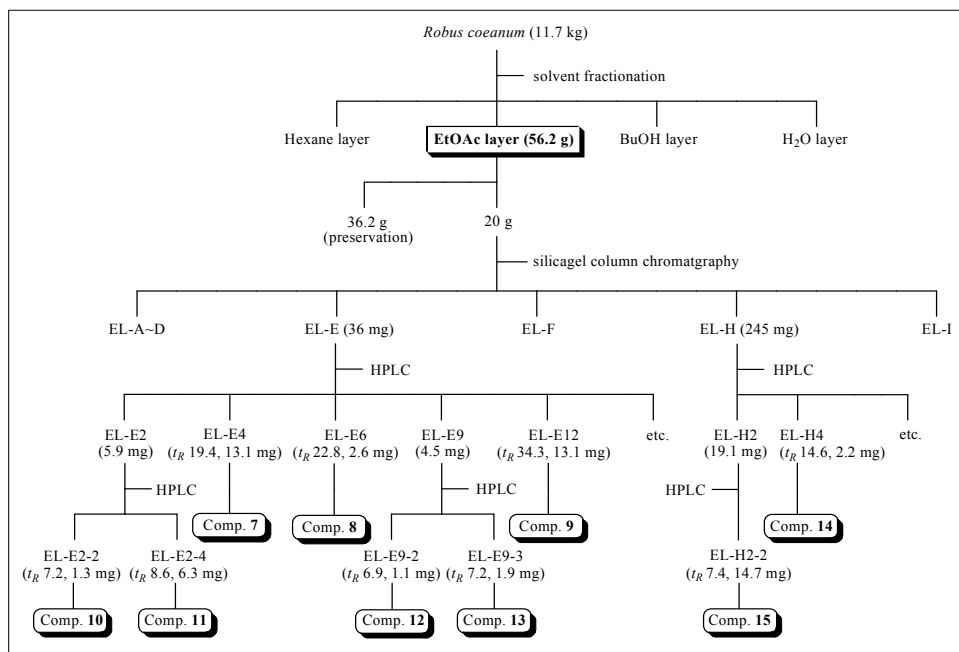


Fig 8. Isolation process of antioxidants from EtOAc layer of Korean black raspberry wine.

나) 복분자술의 BuOH 획분으로부터 항산화 물질의 단리·정제

(1) BL 8~12 획분의 Sephadex LH-20 Column Chromatography

복분자술 BuOH 획분의 Amberlite XAD-2 column chromatography 후의 활성 획분 BL 8~12 (4.9 g)를 대상으로 Sephadex LH-20 column chromatography (73 × 3 cm)를 행하였다. 시료의 약 100배량에 상당하는 Sephadex LH-20 (515 ml, 25-100 mesh, pharmacia Biotech AB, Uppsals, Sweden)을 MeOH로 slurry를 만들고, 동 용매계를 이동상으로 용출시켜 분획하였다. 얻어진 각 획분을 TLC-DPPH법[Takao T. *etc*, Biosci. Biotech. Bioch. 58, 1780~1783 (2000)]에 의해 분석을 행한 결과(data 생략), V_e/V_t 0.3~0.5 (BL-A-16~19, 1.02 g)와 V_e/V_t 0.5~0.8 (BL-A-20~25, 2.17 g), 그리고 V_e/V_t 0.8~1.0 (BL-A-26~34, 785 mg)의 용출획분에서 가장 강한 활성이 인정되었다. 이들 각 획분을 더욱 정제하기 위하여 ODS 또는 다른 조건의 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하였다.

(2) BL-A-20~25 획분의 Sephadex LH-20 Column Chromatography

BL 8~12 획분의 Sephadex LH-20 column chromatography 후에 얻어진 활성 획분 BL-A-20~25 (2.17 g)를 대상으로 다시 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하였다. Sephadex LH-20 (70~230 mesh, Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 MeOH로 팽윤시킨 후 column (69 × 2.3 cm)에 충전하고, 시료를 소량의 MeOH에 녹여 column에 charge한 후, 동 용매계로 용출·분획하여 정제하였다. 얻어진 각 획분을 TLC-DPPH법에 의해 항산화활성을 비교한 결과 (data 생략), V_e/V_t 0.6~0.72 (fr. BL-X-16~18, 464 mg)의 용출획분에서 화합물들의 존재경향이 비교적 단순하면서도 강한 활성이 인정되었다. 그래서 이 획분을 대상으로 ODS column chromatography를 행하기로 하였다.

(3) BL-X-16~18 획분의 ODS Column Chromatography

BL-A-20~25 획분의 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하여 얻은 BL-X-16~18까지의 활성획분(464 mg)을 대상으로 ODS column chromatography를 행하였다. 시료 약 200배량의 ODS gel (110 g, 12 nm, YMC-GEL Liquid chromatography 용, Waters, USA)을 10% MeOH (pH 2.6 by TFA)로 slurry를 만들어 column (53 × 2.3 cm)에 충전하였다. 시료를 소량의 10% MeOH (pH 2.6 by trifluoroacetic acid)로 용해하여 charge하고, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 그리고 100% MeOH을 각각 350 ml씩 순차 용출·분획하여 정제하였다. 얻어진 각 획분들을 TLC-DPPH법에 의해 항산화 활성 물질의 용출경향을 검토하였다(data 생략). 그 결과 25% MeOH 용출 획분(fr. BL-Y-63~68, 51.1 mg)에서 강한 항산화활성이 인정되었다. 이에 활성화합물을 단리하기 위해 BL-Y-63~68의 활성획분을 대상으로 HPLC

를 이용한 정제를 행하기로 하였다.

(4) BL-Y-63~68 획분의 HPLC에 의한 화합물 **16**와 **17**의 단리

BL-X-16~18 획분을 대상으로 ODS column chromatography를 행하여 얻은 활성 획분 BL-Y-63~68 (51.1 mg)을 대상으로 μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 × 300 mm, Waters, USA)을 UV detector (254 nm, SPD-20A, SHIMADZU, Japan)와 연결하고, 15% MeOH 용매계를 이동상(2.5 ml/min, LC-20AD, SHIMADZU, Japan)으로 반복적인 HPLC를 행하여 2종의 주요 peak [BL-Y-63~68-1, t_R 20.0 min (2.4 mg); BL-Y-63~68-2, t_R 25.5 min (2.4 mg)]를 각각 분취하였다(Fig. 9).

(Fig. 9)

(가) 화합물 **16**의 단리

상기 항에서 정제된 BL-Y-63~68-1의 획분(t_R 20.0 min, 2.4 mg)을 대상으로 ODS 80Ts column (4.6 × 150 mm, Tosoh, Japan)을 사용하여 12% MeOH을 이동상으로 1.0 ml/min (LC-20AD, SHIMADZU, Japan)의 유속과 254 nm (SPD-20A, SHIMADZU, Japan)의 검출조건에서 반복적으로 HPLC를 행하여 화합물 **16** (t_R 15.3 min, 2.4 mg)을 단리하였다(Fig. 10).

(Fig. 10)

(나) 화합물 **17**의 단리

상기 항에서 정제된 BL-Y-63~68-2의 획분(t_R 25.5 min, 2.4 mg)을 대상으로 μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 × 300 mm, Waters, USA) 및 UV detector (254 nm, SPD-20A, SHIMADZU, Japan)를 연결하고, 15% MeOH을 2.5 ml/min (LC-20AD, SHIMADZU, Japan)의 유속으로 반복적인 HPLC를 행하여 t_R 14.5 min에서 화합물 **17** (2.4 mg)을 단리하였다(Fig. 11).

(Fig. 11)

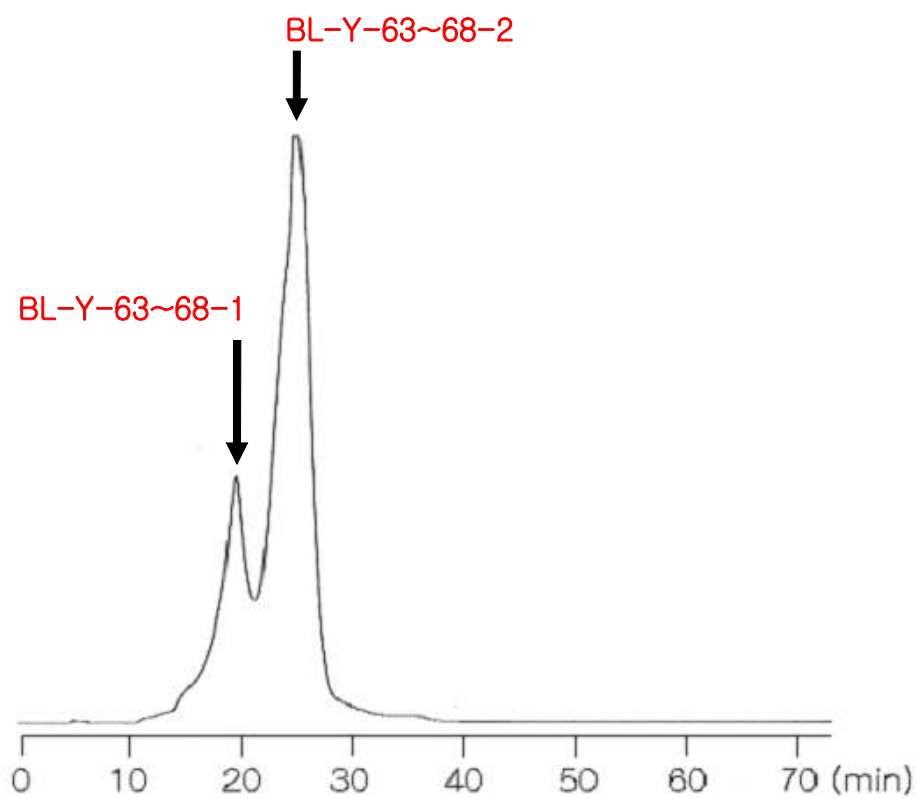


Fig. 9. HPLC chromatogram of fr. BL-Y-63~68.
Column: μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 × 300 mm)
Flow rate: 2.5 ml/min
Detection: 254 nm
Mobile phase: 15% MeOH

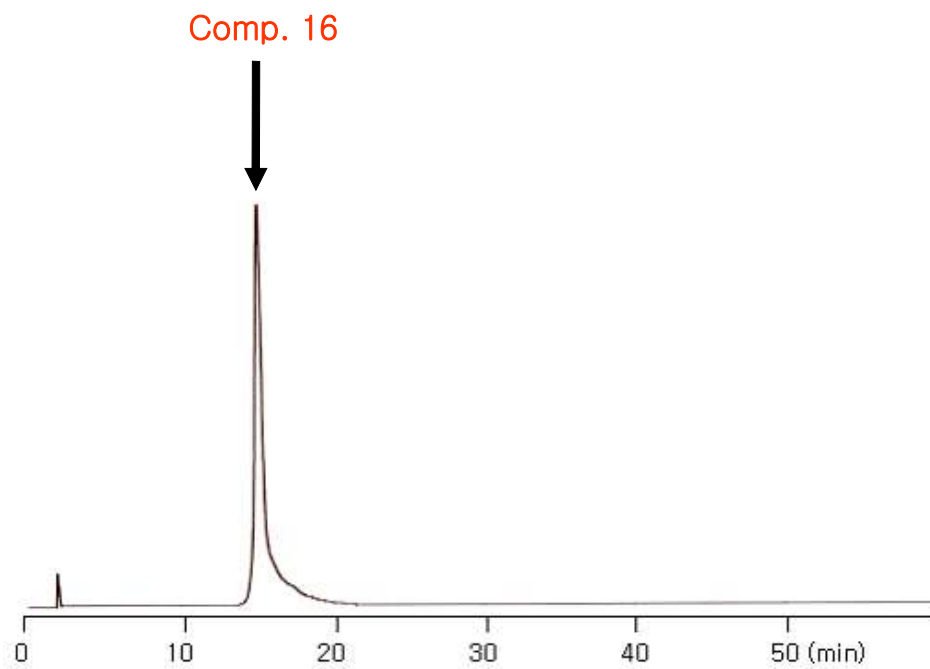


Fig. 10. HPLC chromatogram of fr. BL-Y-63~68-1.

Column: ODS-80Ts (4.6 × 150 mm)

Flow rate: 1.0 ml/min

Detection: 254 nm

Mobile phase: 12% MeOH

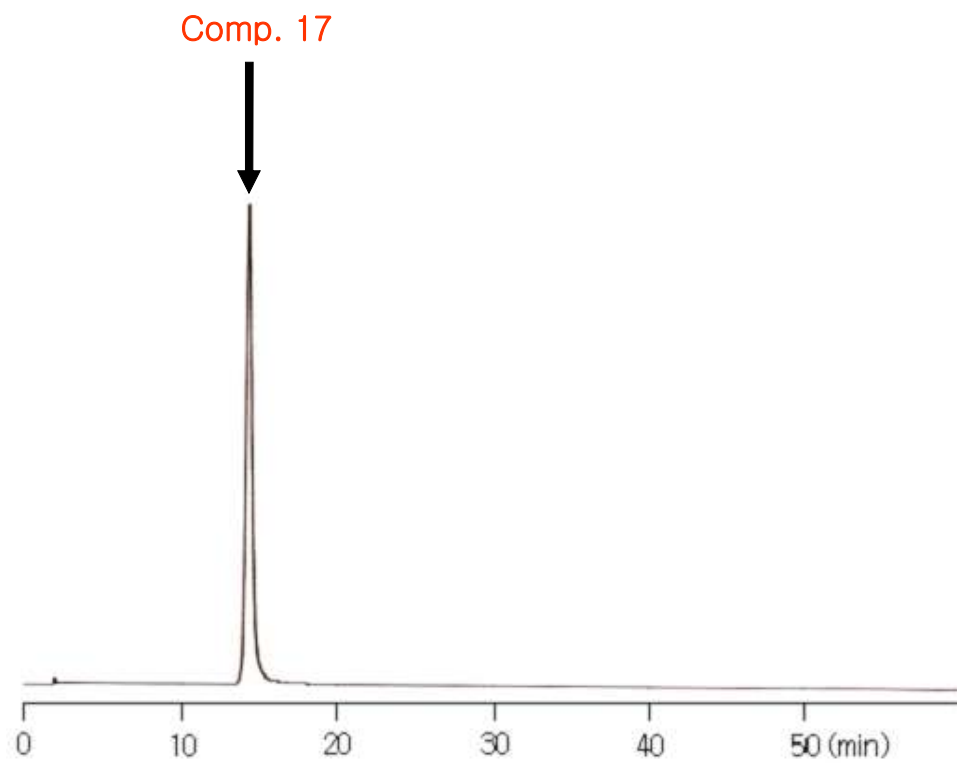


Fig. 11. HPLC chromatogram of fr. BL-Y-63~68-2.
Column: μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 × 300 mm)
Flow rate: 2.5 ml/min
Detection: 254 nm
Mobile phase: 15% MeOH

(5) BL-Y-93~115 획분의 HPLC에 의한 활성화합물의 단리

BL-X-16~18 획분의 ODS column chromatography에 의해 얻어진 BL-Y-93~115 획분을 ODS-80Ts column (4.6 × 300 mm, Tosoh, Japan) 및 UV detector (280 nm, SPD 10A, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 30% MeOH (pH 2.66 by TFA)에서 80% MeOH까지 40분 동안 gradient 용출시킨 후, 80% MeOH을 20분 동안 유지시키는 이동상을 1.0 ml/min (Medel 600 pump, Waters, USA)의 조건에서 HPLC에 의한 활성 화합물의 단리를 행하였다. 그 결과 (Fig 12), 4종의 화합물 **18** (t_R 12.9 min, 1.1 mg), 화합물 **19** (t_R 13.8 min, 13 mg), 화합물 **20** (t_R 14.8 min, 1.6 mg) 및 화합물 **21** (t_R 18.2 min, 3 mg)을 각각 단리하였다.

(Fig. 12)

(6) BL 14~15 획분의 Sephadex LH-20 Column Chromatography

Amberlite XAD-2 column chromatography 후의 활성 획분 BL 14~15 (4.3 g)를 대상으로 Sephadex LH-20 column chromatography (84 × 3.5 cm)를 행하였다. 시료의 약 130배량에 상당하는 Sephadex LH-20 (580 ml, 25~100 mesh, pharmacia Biotech AB, Uppsals, Sweden)을 MeOH로 slurry를 만들고, 동 용매계를 이동상으로 용출시켜 분획하였다. TLC 분석결과(data 생략), V_e/V_t 0.22~0.28 (BL-S4, 1.33 g)과 V_e/V_t 0.28~0.37 (BL-S5, 0.78 g)의 용출획분에서 가장 강한 활성이 인정되었으며, 그 양 또한 상대적으로 많았다. 그래서 이 획분들을 대상으로 HPLC를 이용한 단리·정제를 행하기로 하였다. 그리고 BL-S5 획분은 항산화 활성물질의 정제를 수행하지 못하였다. 추후 이 획분 또한 추가 실험을 행할 계획이다.

(7) BL-S4 획분의 HPLC를 이용한 정제

BL 14~15 획분의 Sephadex LH-20 Column Chromatography 후의 BL-S4 획분 (1.33 g)을 더욱 정제하기 위해서 μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 × 300 mm, Waters, USA)을 이용하여, 20% MeOH (pH 2.56 by TFA)을 5 분간 유지시키고 60% MeOH 까지 30분 동안 gradient 용출시킨 후에 100% MeOH까지 5분 동안 gradient 용출시켜 100% MeOH을 10분동안 유지시키는 이동상으로 유속 2.0 ml/min (Medel 600 pump, Waters, USA)로 UV detector (280 nm, SPD 10A, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 정제를 행하였다. 그 결과(Fig. 13), 6종의 주요 peak들을 분취하여 보다 순도 높은 정제를 위하여 각각 다른 조건의 HPLC를 행하기로 하였다.

(Fig. 13)

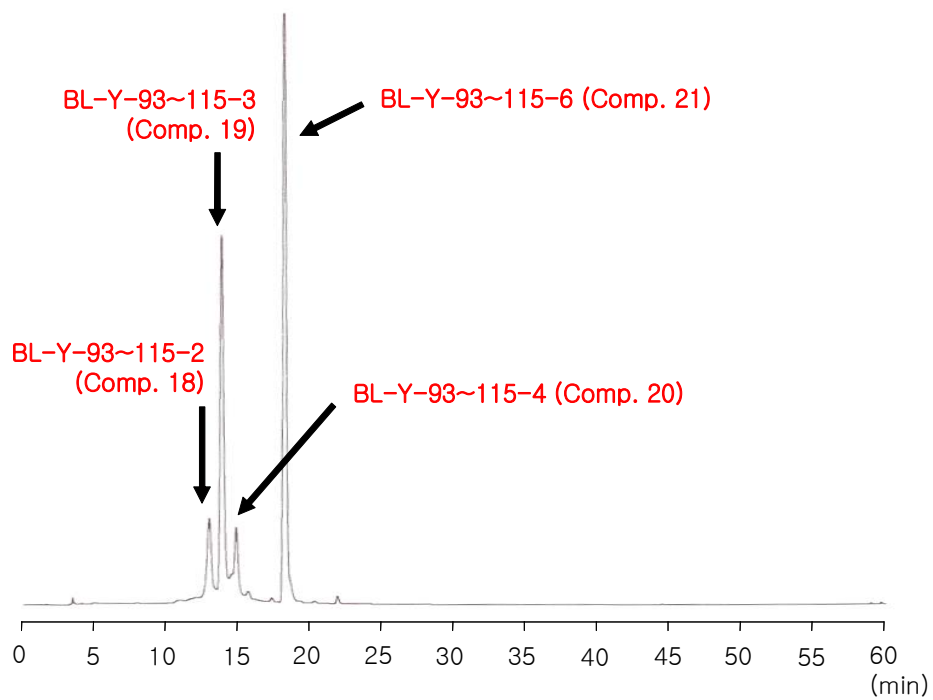


Fig. 12. HPLC chromatogram of fr. BL-Y-93~115.

Column: ODS-80Ts (4.6 × 150 mm)

Flow rate: 1.0 ml/min

Detection: 280 nm

Mobile phase: 30% MeOH (pH 2.65 by TFA) $\xrightarrow{\quad}$ 80% MeOH
 (40 min) (20 min)

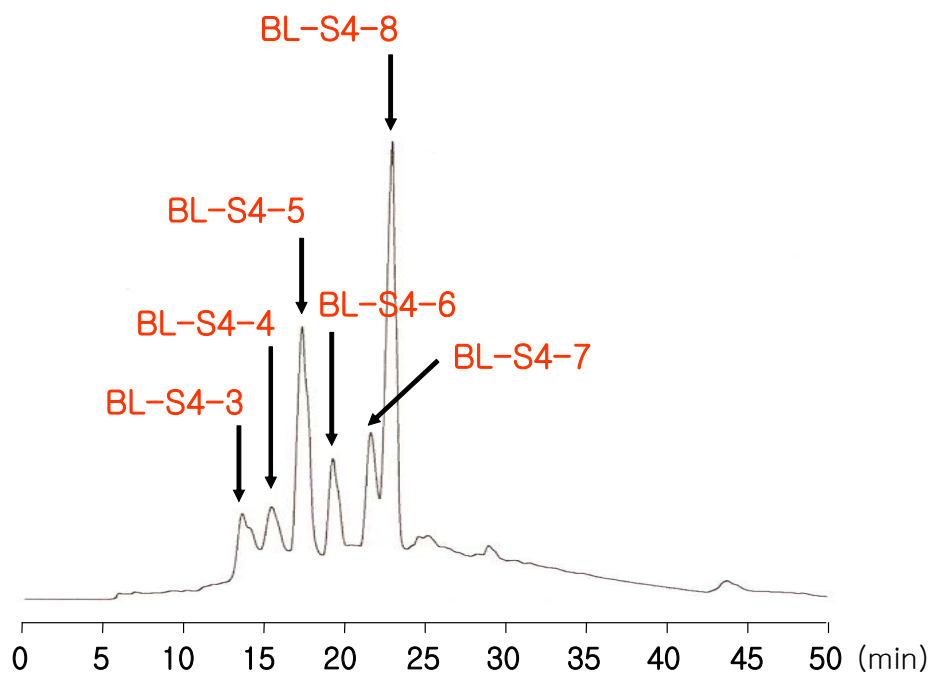


Fig. 13. HPLC chromatogram of fr. BL-S4.
Column: μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 × 300 mm)
Flow rate: 2.0 ml/min
Detection: 280 nm
Mobile phase: 15% MeOH (pH 2.65 by TFA)

(8) BL-S4-3 획분의 HPLC를 이용한 정제

BL-S4 획분을 HPLC로 정제한 후에 얻어진 BL-S4-3 획분(48.9 mg)을 더욱 정제하기 위해 μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 × 300 mm, Waters, USA) 및 UV detector (280 nm, SPD 10A, SHIMADZU, Japan), 그리고 15% MeOH (pH 2.65 by TFA)의 이동상(2.0 ml/min, Medel 600 pump, Waters, USA)을 이용하여 반복적인 HPLC를 행하였다(Fig. 14). 그러나 정제된 획분의 순도가 높지 않다고 판단되어 다른 조건에 의한 정제를 행하기로 하였다.

(Fig. 14)

(9) BL-S4-3-2 획분의 HPLC를 이용한 화합물 **22**의 단리

BL-S4-3 획분을 정제한 후의 BL-S4-3-2 획분(19.0 mg)을 더욱 정제하기 위해 Discovery[®] Ap Amide C₁₆ column (4.6 × 250 mm, SUPELCO, USA)과 UV detector (280 nm, SPD-20A, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 5% MeOH (pH 2.65 by TFA)을 이동상(2.0 ml/min, LC-20AD, SHIMADZU, Japan)으로 용출시키는 조건에서 HPLC를 행하였다. 그 결과(Fig. 15), 화합물 **22** (t_R 15.3 min, 13.4 mg)를 단리하였다.

(Fig. 15)

(10) BL-S4-4~8의 정제

BL-S4 획분을 HPLC로 정제한 후에 얻어진 BL-S4-4~8의 각 획분들은 현재 정제가 진행중에 있다.

(11) BL-A-16~19 획분의 ODS Column Chromatography

BL 8~12 획분을 대상으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하여 얻은 BL-A-16~19까지의 활성획분(1.02 g)을 더욱 정제하기 위하여 ODS column chromatography를 행하였다. 시료 약 200배량의 ODS gel (220 g, YMC-GEL Liquid chromatography 용, Waters, USA)을 10% MeOH (pH 2.65 by TFA)로 slurry를 만들어 column (75 × 2.3 cm)에 충전하였다. 시료를 소량의 10% MeOH (pH 2.6 by TFA)로 용해하여 charge하고, 10 (pH 2.65 by TFA), 10, 20, 40, 60, 80, 그리고 100% MeOH을 각각 380 ml씩 순차 용출하여 각각 10 ml씩 분획하였다. 분획한 각 획분들을 TLC-DPPH법으로 항산화 활성을 검토하여 유사한 pattern을 보이는 획분들을 grouping 하였다(data 생략). 현재 그들 각각의 획분을 대상으로 HPLC에 의한 활성 화합물의 단리가 진행 중에 있다.

이상 복분자술의 BuOH 획분으로부터 화합물 16~22의 단리과정을 Fig. 16에 정리하였다.

(Fig. 16)

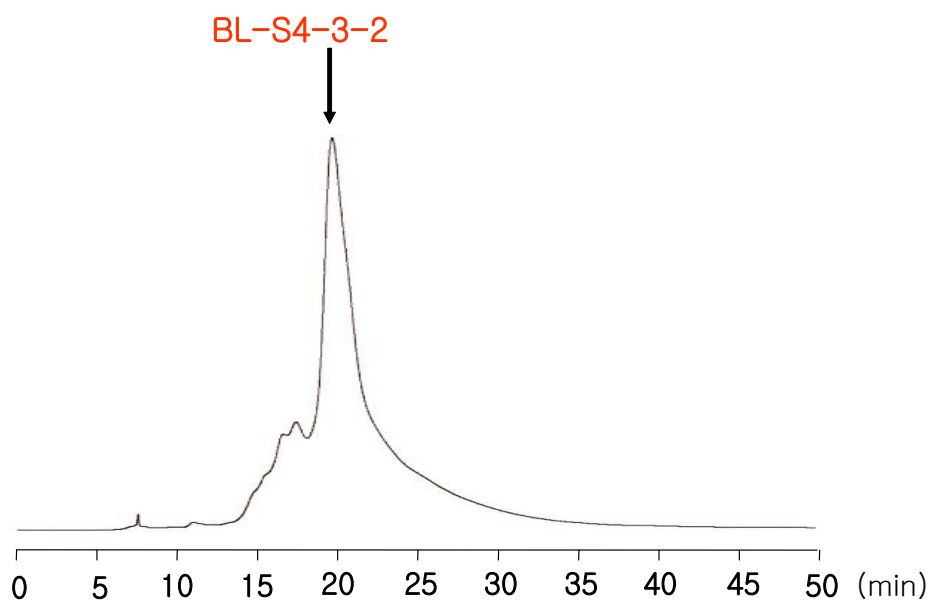


Fig. 14. HPLC chromatogram of fr. BL-S4-3.
Column: μ BondapakTM C₁₈ column (7.8 \times 300 mm)
Flow rate: 2.0 ml/min
Detection: 280 nm
Mobile phase: 15% MeOH (pH 2.65 by TFA)

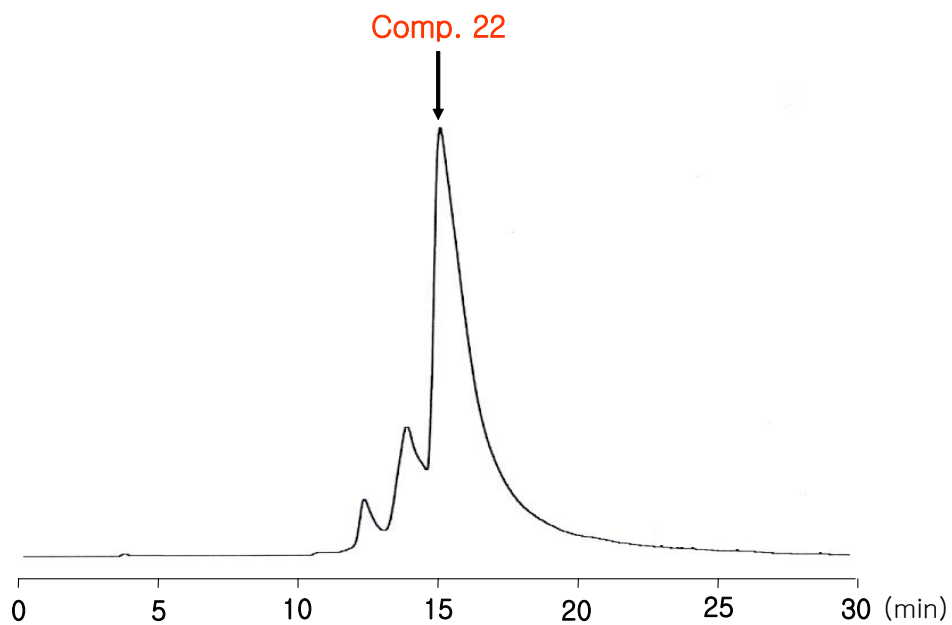


Fig. 15. HPLC chromatogram of fr. BL-S4-3-2.

Column: Discovery[®] Ap Amide C₁₆ column (4.6 × 250 mm)

Flow rate: 1.0 ml/min

Detection: 280 nm

Mobile phase: 5% MeOH (pH 2.65 by TFA)

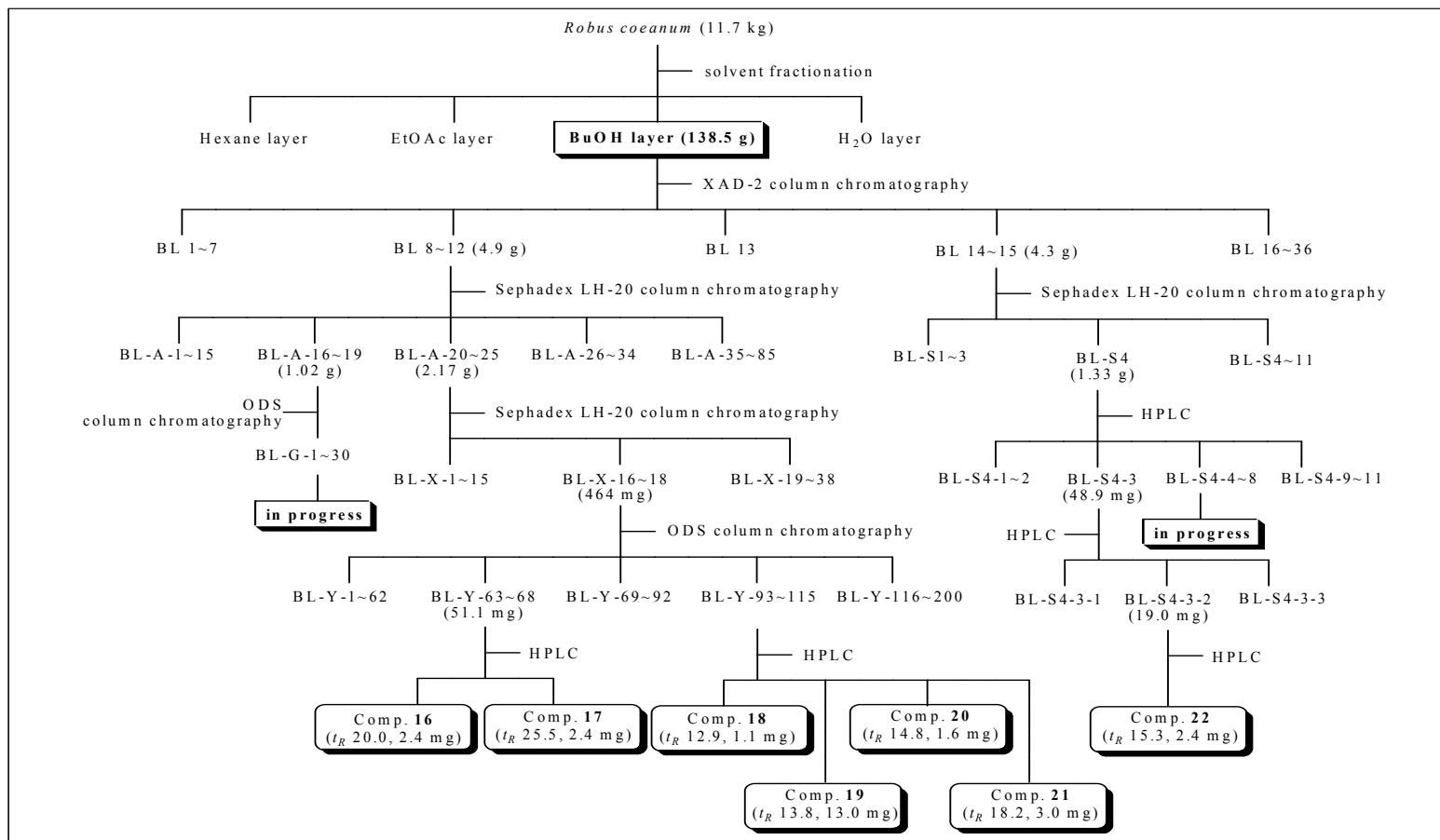


Fig 16. Isolation process of antioxidants from BuOH layer of Korean black raspberry wine.

다) 복분자술의 *n*-Hexane 획분의 활성물질의 단리·정제

복분자술의 *n*-hexane 획분(0.2 g)으로부터 항산화물질을 단리하기 위하여 μ PorasilTM column (19 × 150 mm, Waters, USA)을 이용하여 100% *n*-hexane을 5분간 유지시키고, *n*-hexane/*iso*-propanol/EtOH (8:1:1, v/v)까지 25분 gradient 용출 후, *n*-hexane/*iso*-propanol/EtOH (8:1:1, v/v)을 10분간 유지시키는 용매계를 이동상(10.0 ml/min)으로 HPLC를 행하였다. UV/VIS 검출기(UVD 170S, DIONEX, Germany)를 이용하여 215 nm에서 단리·정제를 행하여 8종의 주요 peak들을 분취하였다(Fig. 17). 먼저 비교적 순도가 높은 것으로 판단되는 peak들을 대상으로 단리·정제를 행하기로 하였다.

(Fig. 17)

(1) HL-5 획분의 HPLC를 이용한 활성물질의 단리

n-Hexane 획분을 HPLC에 의해 분취한 후 얻어진 HL-5 획분(4.8 mg)을 정제하기 위하여 YMC-Pack column (5.0 × 150 mm, Waters, USA)을 이용하여 2.0 ml/min (Medel 600 pump, Waters, USA)의 유속과 215 nm (SPD 10A, SHIMADZU, Japan), 그리고 *n*-hexane/*iso*-propanol/EtOH (499:0.5:0.5, v/v) 용매계를 이용하여 HPLC를 행하였다. 그 결과(Fig. 18), 2종의 주요 peak (t_R 22.6, 미량, 화합물 **23**; t_R 25.5 min, 2.1 mg, 화합물 **24**)를 단리하였다.

(Fig. 18)

이상 복분자술의 *n*-Hexane 획분으로부터 화합물 **23**~**24**의 단리과정을 Fig. 19에 정리하였다.

(Fig. 19)

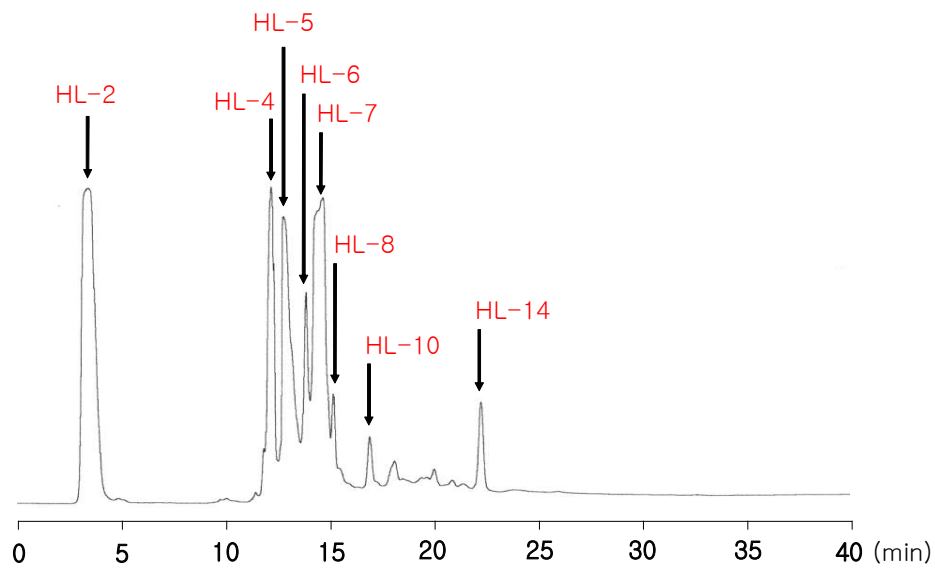


Fig. 17. HPLC chromatogram of *n*-Hexane layer.

Column: μ PorasilTM column (19 × 150 mm)

Flow rate: 10.0 ml/min

Detection: 215 nm

Mobile phase:

100% *n*-Hexane \longrightarrow *n*-Hexane/*iso*-propanol/EtOH (8:1:1, v/v)
 (5 min) (25 min) (10 min)

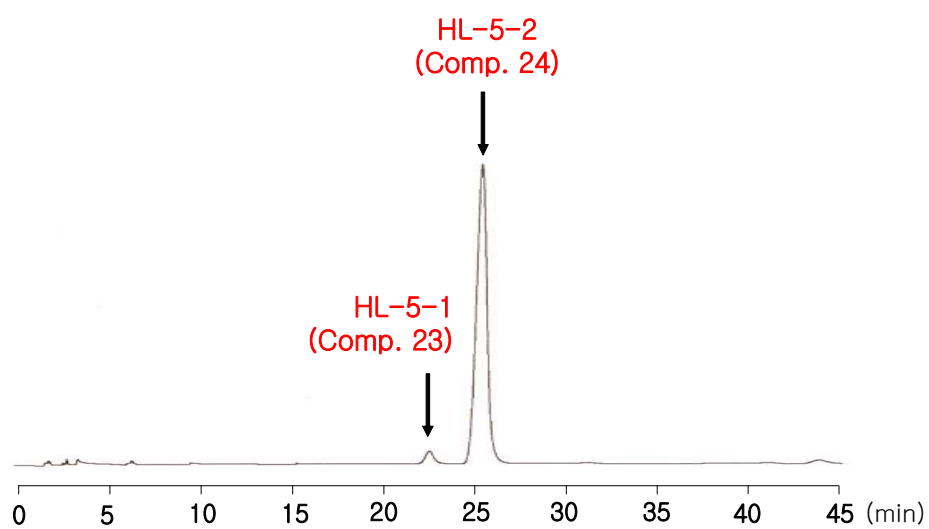


Fig. 18. HPLC chromatogram of fr. HL-5.

Column: YMC-Pack column (5.0 × 150 mm)

Flow rate: 2.0 ml/min

Detection: 215 nm

Mobile phase: *n*-Hexane/*iso*-propanol/EtOH (499:0.5:0.5, v/v)

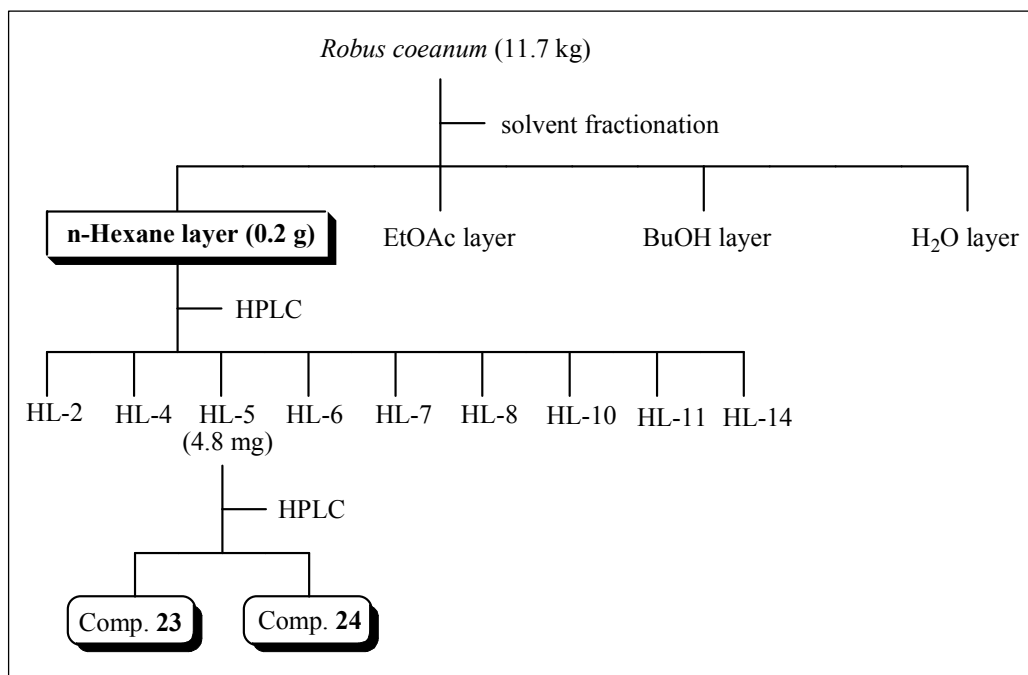


Fig 19. Isolation process of antioxidants from *n*-Hexane layer of Korean black raspberry wine.

3) 복분자술로부터 단리된 화합물의 구조해석

가) 화합물 8의 구조동정

화합물 8의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Fig. 20, Table 1)으로부터 6H의 proton signal들이 관찰되었다. 그 중 방향족의 sp^2 탄소에 결합된 proton으로 추정되는 3종의 signals [δ 6.83 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.55 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.55 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz)]의 분열 패턴으로부터 3치환체 벤젠환의 존재가 강하게 시사되었다. 그리고 δ 3.89 (3H, s)의 sp^3 carbon signal로부터 methoxyl 기의 존재가 시사되었다. 이에 본 화합물은 천연에 널리 존재하는 vanillic acid일 가능성이 시사되어 시판품의 vanillic acid를 동일조건에서 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 행하여 그들의 spectra (Fig. 20)를 비교하였다. 그 결과 화합물 8의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 표준품의 vanillic acid의 그것과 완벽한 일치를 보였다. 이에 화합물 8을 vanillic acid로 동정하였다.

(Fig. 20)

(Table 1)

나) 화합물 9의 구조동정

화합물 9의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Fig. 21, Table 1)에서 화합물 8과 유사한 sp^2 carbon proton signals [δ 6.80 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 7.41 (1H, dd, $J = 9.3, 2.0$ Hz), 7.42 (1H, br. s)]를 보였다. 따라서 이 화합물 9 또한 3치환체 벤젠환의 부분구조를 취하고 있다고 판단되었으며, δ 1.35 (3H, t, $J = 7.0$ Hz)와 δ 4.28 (2H, q, $J = 7.0$ Hz)의 sp^3 carbon proton signals로부터 benzoic acid에 ethanol이 ester 결합한 ethyl 3,4-dihydroxybenzoate로 추정되었으며, 더 정확한 구조동정을 위해서 MS 분석을 행할 예정이다.

(Fig. 21)

다) 화합물 11의 구조동정

화합물 11의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Table 1) 상에서 δ 6.75와 6.65에 각각 2H분의 multiplet signal 한 쌍만이 검출되었다. 이것은 ortho 치환체의 benzen 환에서 검출되는 전형적인 signal들로서 1차년도에 구조동정한 화합물 4의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum과 일치하여, 이 화합물 11을 catechol로 동정하였다.

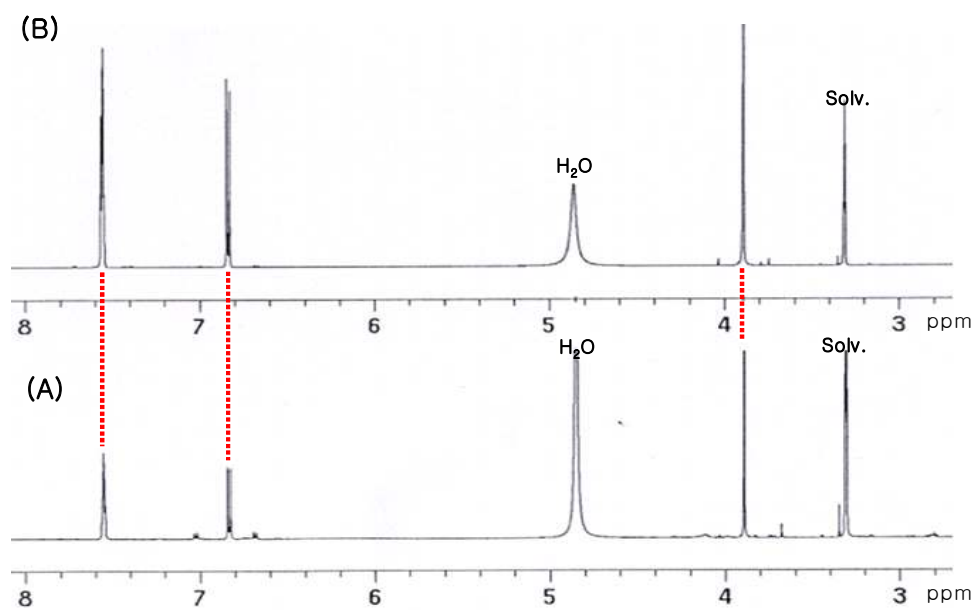


Fig. 20. ¹H-NMR spectra (500 MHz, CD₃OD, TMS) of compound **8** (A, EL-E6) and vanillic acid (B).

Table 1. ¹H-NMR data (500 MHz, CD₃OD, TMS) of compound **8**, **9**, and **12** isolated from EtOAc layer of EtOH extract of Korean black raspberry wine.

Compounds	δ_{H} (mult, <i>J</i>)
Compound 8	6.83 (1H, d, 8.8 Hz), 7.55 (1H, d, 2.0 Hz), 7.55 (1H, dd, 8.8, 2.0 Hz), 3.89 (3H, s)
Vanillic acid	6.83 (1H, d, 8.8 Hz), 7.55 (1H, d, 2.0 Hz), 7.55 (1H, dd, 8.8, 2.0 Hz), 3.89 (3H, s)
Compound 9	1.35 (3H, t, 7.0 Hz), 4.28 (2H, q, 7.0 Hz), 6.80 (1H, d, 9.3 Hz), 7.41 (1H, dd, 9.3, 2 Hz), 7.42 (1H, br. s)
Compound 11	6.75 (2H, m, H-4, 5), 6.65 (2H, m, H-3, 6)
standard compound (Catechol)	6.75 (2H, m, H-4, 5), 6.65 (2H, m, H-3, 6)

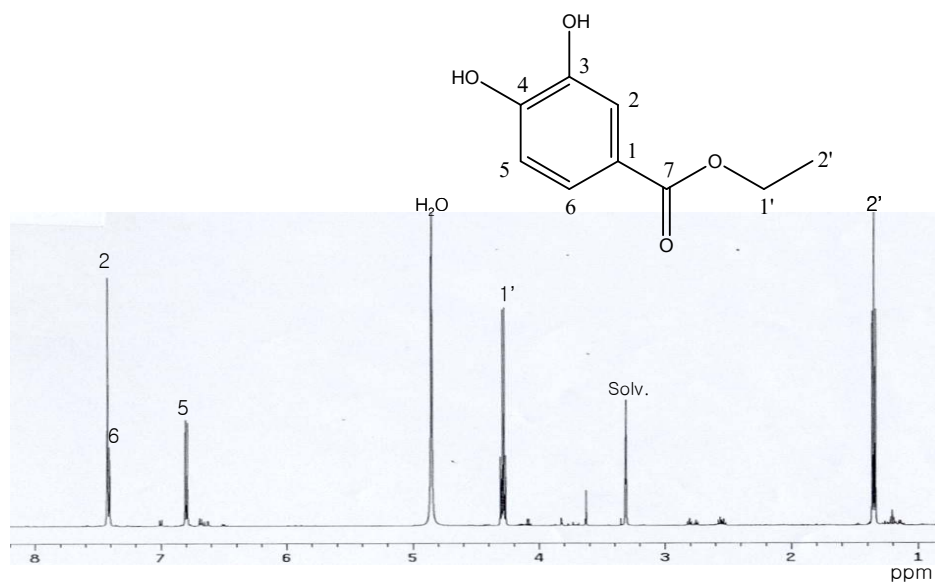


Fig. 21. ¹H-NMR spectrum (500 MHz, CD₃OD, TMS) of compound 9.

라) 화합물 **12**의 구조동정

화합물 **12**의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Fig. 22, Table 2)으로부터 총 12H에 상당하는 proton signal들이 관찰되었다. 그 중 방향족 탄소에 결합된 proton들로 추정되는 δ 7.00과 6.68에 등가의 doublet signals (2H, br. d, $J = 8.5$ Hz)의 존재로부터 para 치환된 방향족 화합물의 존재 가능성이 강하게 시사되었다. 그리고 δ 3.71 (1H, m, H-3')의 sp^3 carbon proton signal로부터 methine group의 존재가 시사되었고, δ 2.62 (1H, m, H-1'a), 2.53 (1H, m, H-1'b), 그리고 1.64 (2H, m, H-2')에 두 geminal methylene group의 존재가 관찰되었다. 또 δ 1.17 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)에서 doublet의 methyl group의 존재를 확인할 수 있었다. 그리고 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (Fig. 22, Table 2)에서도 벤젠환 유래의 6종의 sp^2 carbon signal들과 4종의 sp^3 carbon signal들이 관찰되었다. 그래서 proton과 carbon 간의 연결성을 확인하기 위하여 gCOSY (data 생략), gHSQC (data 생략) 및 gHMBC 분석(Fig. 23)을 행하였다. 그 결과 benzene 환과 butyl 기의 연결성 및 말단의 methyl 기의 결합위치가 확인되어 화합물 **12**는 4-(3-hydroxybutyl)phenol로 동정되었다.

(Fig. 22)

(Table 2)

마) 화합물 **13**의 구조결정

화합물 **13**의 구조결정을 위하여 $^1\text{H-}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 및 2D-NMR 분석을 행하였다. $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 24, Table 3)에서 총 9H의 proton signal들이 관찰되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 benzene 유래의 proton signals 5종 [δ 7.52 (1H, br. d, $J = 8.0$ Hz), 7.31 (1H, br. d, $J = 8.0$ Hz), 7.06 (1H, dt, $J = 1.0, 8.0$ Hz), 7.06 (1H, s), 6.98 (1H, dt, $J = 1.0, 8.0$ Hz)]이 관찰되어 4종의 proton이 benzene 환에 연속되어 존재함을 알 수 있었다. 한편 δ 7.06에서 관찰된 1H의 sp^2 carbon proton이 singlet을 보였던 것으로부터 이웃한 결합 원소에 proton이 존재하지 않는 부분구조가 존재함이 추측되었다. 또 δ 3.80 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$) 및 2.97 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2-$)의 signal들로부터 ethanol의 부분구조가 존재함이 시사되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (Fig. 24, Table 3)으로부터 δ 138.28~112.30의 범위에 10종의 sp^2 carbon signal들이 검출된 것으로부터 2종의 벤젠환이 결합된 naphthalene 골격의 부분구조를 가지고 있는 것으로 시사되었다. 보다 자세한 구조결정을 위해 gCOSY (data 생략), gHSQC (data 생략) 및 gHMBC (Fig. 25) 분석을 행하여 proton과 carbon들 간의 연결성을 확인한 결과, 화합물 **13**은 4-(2-hydroxyethyl)naphthalene-1,2-diol로 구조결

정되었다. 이 화합물 **13**은 신규화합물로 판명되었다.

(Fig. 24)

(Table 3)

(Fig. 25)

바) 화합물 **14**의 구조결정

화합물 **14**의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Fig. 26, Table 4)으로부터 16H의 proton signal들이 관찰되었다. 3종의 sp^2 carbon proton signals [δ 6.80 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.42 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz), 7.43 (1H, br. s)]가 관찰되었던 것으로부터 3치환체 벤젠환의 부분구조가 존재함을 알 수 있었고, sp^3 carbon proton signals [δ 4.8 (2H, m, H-1'), 4.25 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 3.74 (1H, m, H-2'), 1.39 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-2''), 1.21 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-4') , 1.15 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-5')]로부터 ethylester와 2-methoxyl butanoate가 부분구조를 이루고 있는 것으로 판단되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (Fig. 26, Table 4) 상에서 carboxylic carbon 유래로 판단되는 2종의 signals (δ 170.33와 δ 176.08)가 관찰되었다. 그리고 6종의 sp^2 carbon signals (δ 115.89, 117.86, 123.34, 124.02, 146.19, 151.67)가 검출되었으며, 6종의 sp^3 carbon signal들이 관찰되었다. 이것은 dihydroxybenzoic acid를 부분구조로 가지고 있으며, butanyl 기와 에탄올이 에스테르 결합되어 있을 가능성이 시사되었다. 그래서 gHSQC 분석(data 생략)에 의해 carbon signal이 direct로 결합된 proton들을 귀속하였으며, gCOSY (data 생략)와 gHMBC 분석(Fig. 27)을 행하여 proton과 carbon 간의 연결성을 확인하였다. Fig. 27에서 나타낸 바와 같이 dihydroxybenzoic acid와 butanyl, 그리고 ethanol이 순차적으로 ester 결합된 양상이 확인되어 화합물 **14**는 3-(ethoxycarbonyl)butan-2-yl-3,4-dihydroxybenzoate으로 결정하였다. 이 화합물은 신규화합물로 판명되었다.

(Fig. 26)

(Table 4)

(Fig. 27)

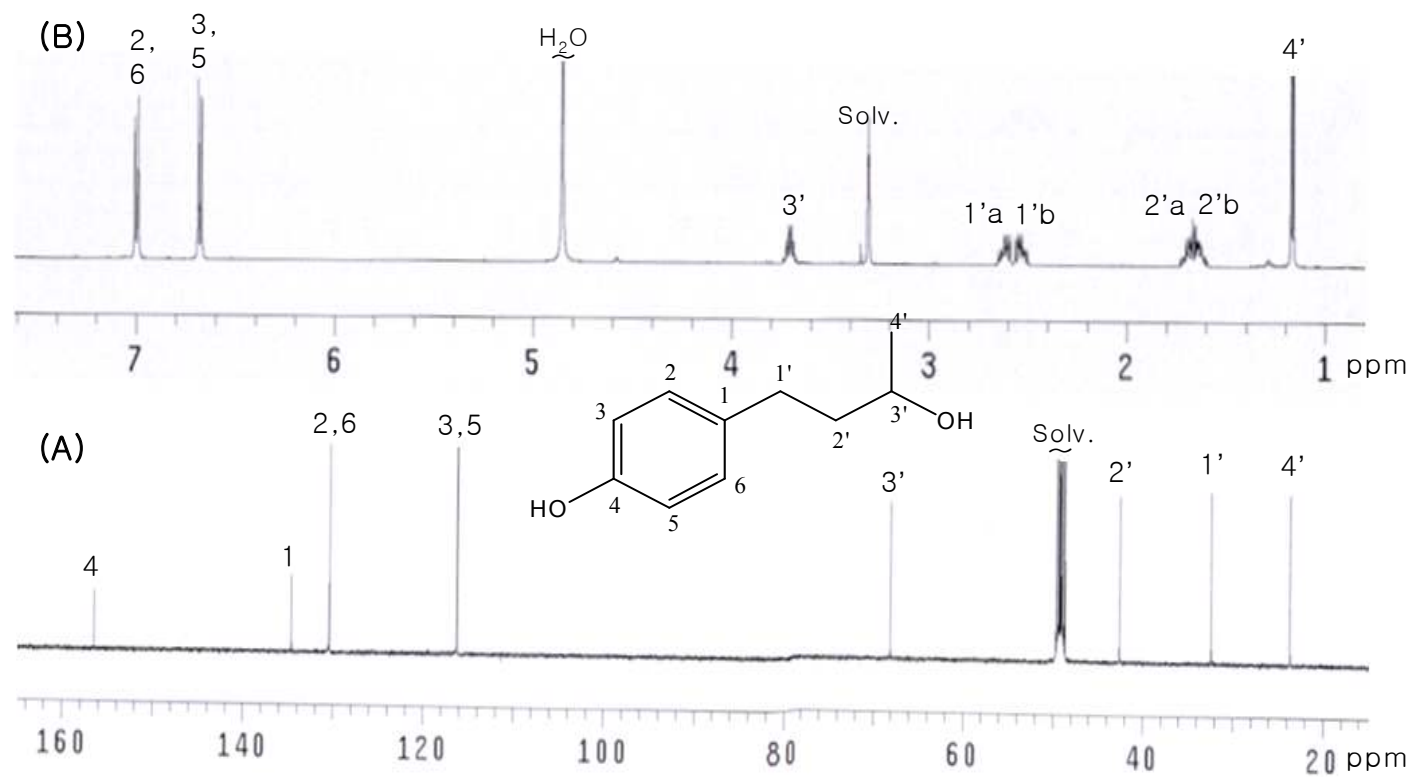


Fig. 22. ¹H- (500 MHz, B) and ¹³C-NMR (125 MHz, A) spectra of compound **12** (CD₃OD, TMS).

Table 2. ^1H - (500 MHz) and ^{13}C - NMR (125 MHz) data of compound **12** (CD_3OD).

Carbon	δ_{H} (mult, J)	δ_{C}
1	-	134.6
2, 6	7.00 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	130.4
3, 5	6.68 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.2
4		156.4
1'a	2.62 (1H, m)	32.4
1'b	2.53 (1H, m)	
2'a	1.69 (1H, m)	42.5
2'b	1.64 (1H, m)	
3'	3.71 (1H, m)	68.0
4'	1.17 (3H, d, $J = 6$ Hz)	23.7

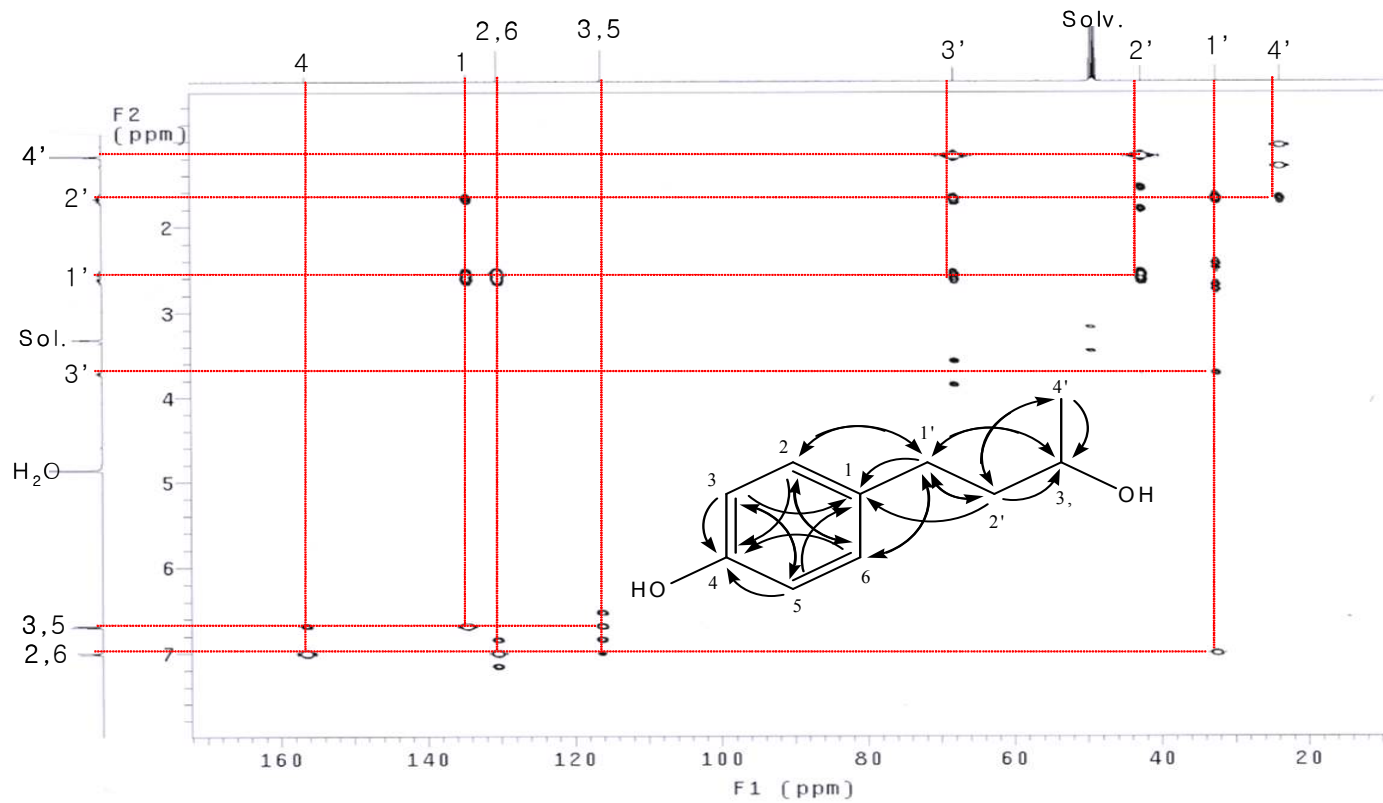


Fig. 23. HMBC correlations of compound **12**.

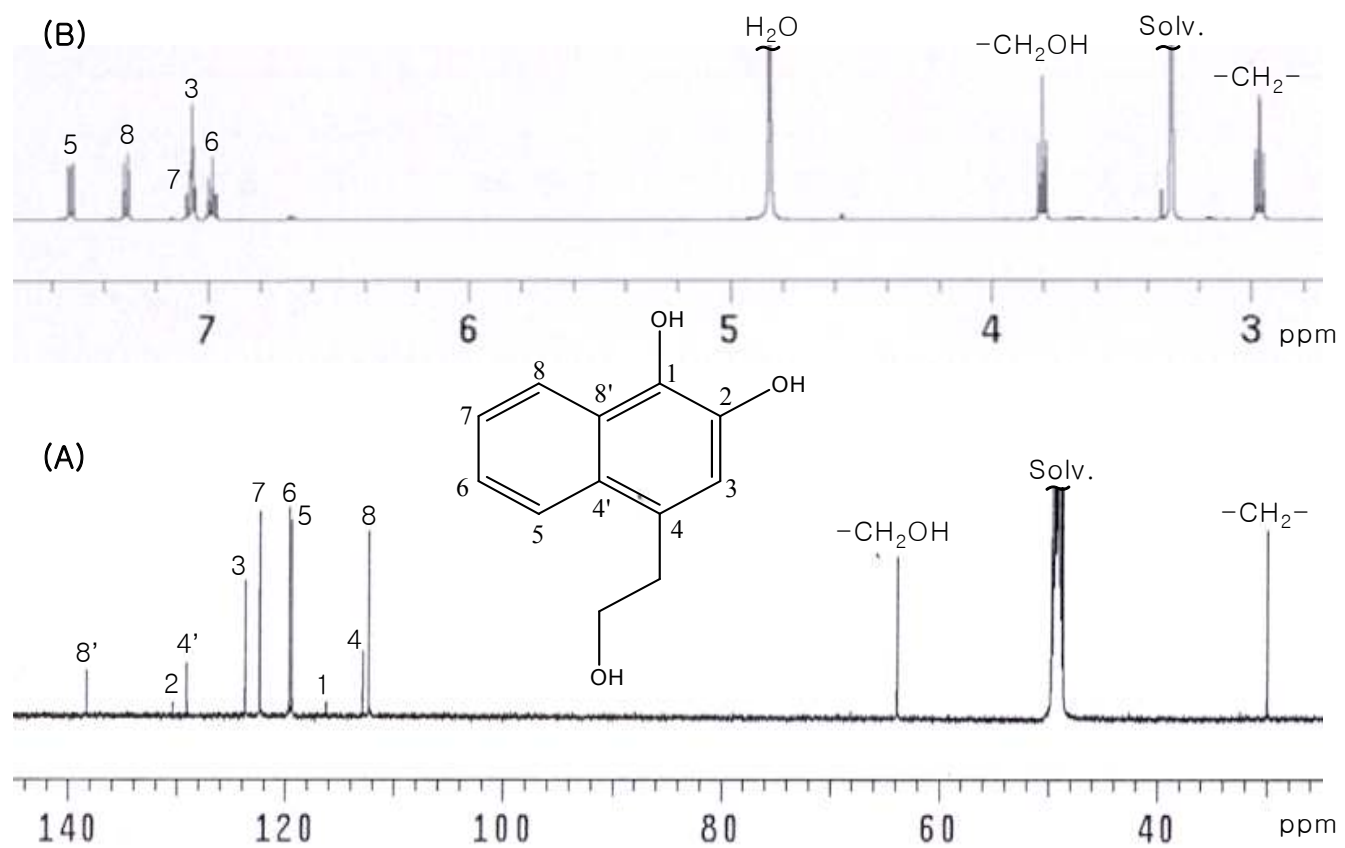


Fig. 24. ^1H - (500 MHz, B) and ^{13}C -NMR (125 MHz, A) spectra of compound **13** (CD_3OD , TMS).

Table 3. ^1H - (500 MHz) and ^{13}C - NMR (125 MHz) data of compound **13** (CD_3OD).

Carbon	δ_{H} (mult, J)	δ_{C}
1	-	116.26
2	-	130.48
3	7.06 (1H, s)	123.69
4	-	112.86
4'	-	119.38
5	7.52 (1H, br. d, $J = 8.0$ Hz)	119.62
6	6.98 (1H, dt, $J = 1.0, 8.0$ Hz)	122.34
7	7.06 (1H, dt, $J = 1.0, 8.0$ Hz)	112.30
8	7.31 (1H, br. d, $J = 8.0$ Hz)	129.07
8'	-	138.28
-CH₂OH	3.80 (2H, t, $J = 7.4$ Hz)	63.83
-CH₂	2.97 (2H, t, $J = 7.4$ Hz)	29.96

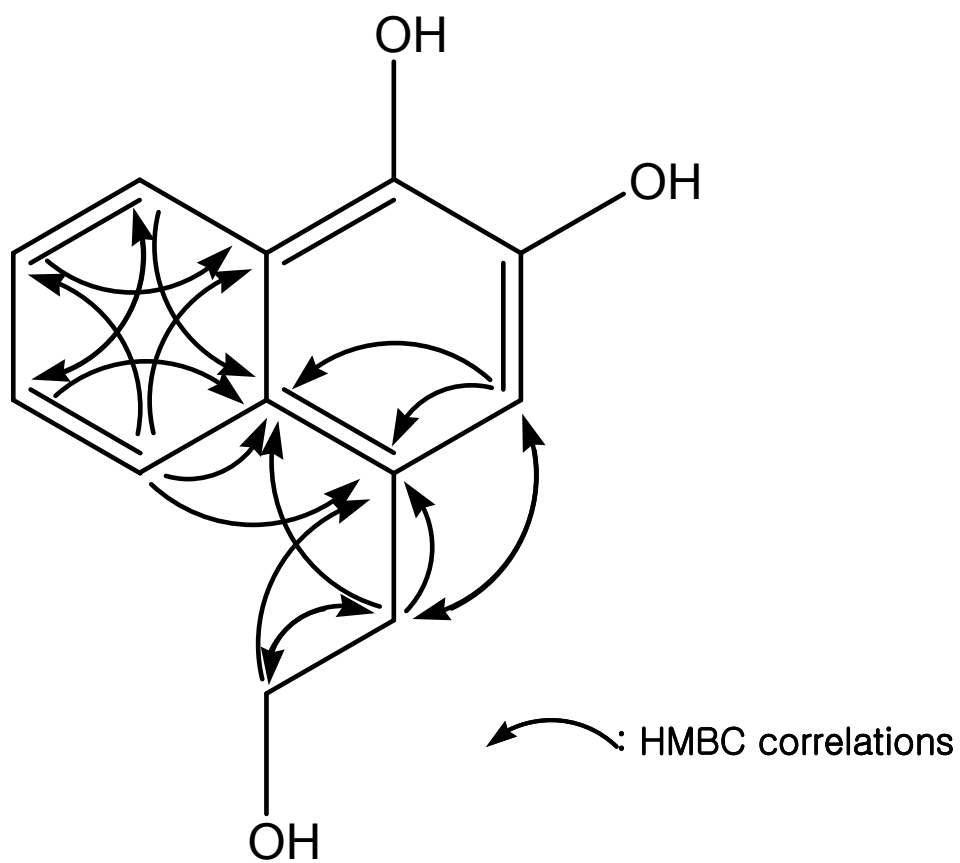


Fig. 25. HMBC correlations of compound 13.

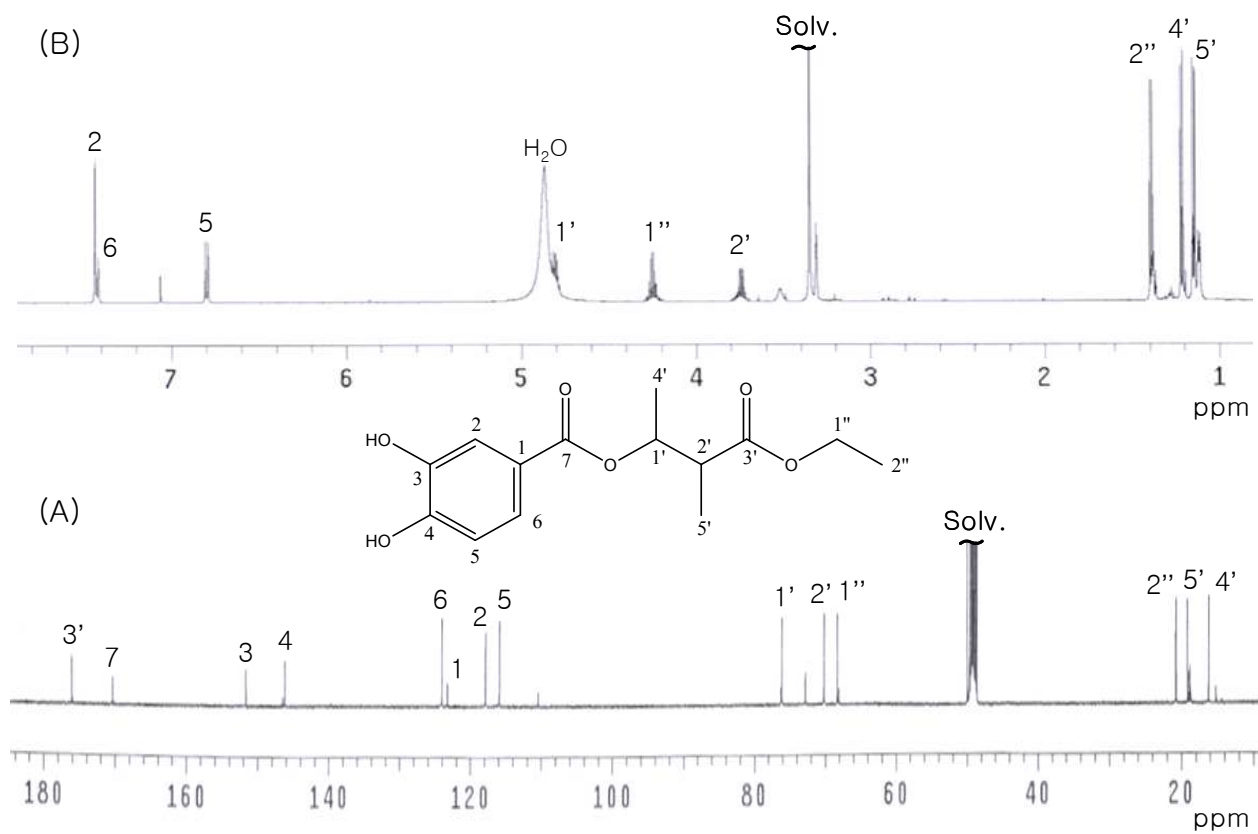


Fig. 26. ^1H - (500 MHz, B) and ^{13}C -NMR (125 MHz, A) spectra of compound **14** (CD_3OD , TMS).

Table 4. ^1H - (500 MHz) and ^{13}C -NMR (125 MHz) data of compound **14** (CD_3OD).

Carbon	δ_{H} (mult, J)	δ_{C}
1	-	123.34
2	7.43 (1H, br. s)	117.86
3	-	151.67
4	-	146.19
5	6.80 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	115.89
6	7.42 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz)	124.02
7	-	170.33
1'	4.80 (2H, m)	76.12
2'	3.74 (1H, m)	70.15
3'	-	176.08
4'	1.21 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	16.24
5'	1.15 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	19.17
1''	4.25 (1H, q, $J = 7.0$ Hz)	68.30
2''	1.39 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	20.80

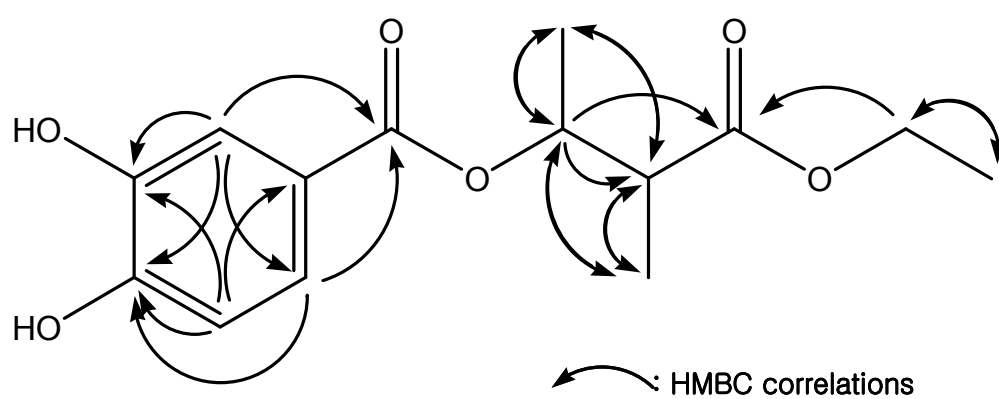


Fig. 27. HMBC correlations of compound 14.

사) 화합물 **16**의 구조결정

화합물 **16**의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Fig. 28, Table 5) 상에서 δ 8.1 ~ 7.4의 범위에 전형적인 1치환체의 방향족 탄소에 결합된 5H분의 3중 등가 proton signals [δ 8.08 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.49 (2H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz), 7.60 (1H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz)]가 관찰되었다. 그 외에 2종의 당의 존재를 시사하는 일련의 proton signal들이 δ 5.32 ~ 3.25의 범위에서 검출되었다. 또 화합물 **16**의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (Fig. 29, Table 5) 상에서 carboxyl기 유래의 carbon signal (δ 168.0)을 포함하여 방향족 환 탄소유래의 6종 탄소 signals [δ 131.8 (C-1), 131.0 (C-2, 6), 129.7 (C-3, 5), 134.4 (C-4)]까지 총 7종의 sp^2 carbon signal들이 검출되었다. HSQC 분석에 의해 1종의 4차탄소 (δ 99.2), 고립된 1종의 methylene [δ 3.96 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-2'a), δ 3.84 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-2'b)], 이웃한 탄소에 axial form의 methine proton을 갖는 2종의 methylene [4.17 (1H, dd, $J = 1.0, 12.0$ Hz, H-5"a), 3.78 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, H-5"b); 3.85 (1H, dd, $J = 1.5, 12.0$ Hz, H-5"a), 3.66 (1H, dd, $J = 3.0, 12.0$ Hz, H-5"b)], 그리고 당의 부분구조로써 일련의 연결성을 갖는 4종의 methine proton들 두 그룹이 각각 존재함을 확인할 수 있었다. 그리고 $^1\text{H-NMR}$ 상에서 관찰된 당의 anomeric proton들의 분열패턴 [δ 5.32 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-1"), 4.42 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'')]으로부터 α form과 β form이 각각 1종씩 존재하는 것으로 확인되었다. 이 화합물의 proton들과 carbon들 간의 상호 결합양상을 확인하기 위해 HMBC 분석을 행한 결과 (Fig. 30), 최종적으로 화합물 **16**의 구조는 1'-Hydroxy-1'-C-(β -D-arabinopyranosyl)-2-O-(α -D-arabinopyranosyl)-ethylbenzoate로 결정되었다(Fig. 31). 본 화합물 또한 **16**은 신규로 확인되었다.

(Fig. 28)

(Table 5)

(Fig. 29)

(Fig. 30)

(Fig. 31)

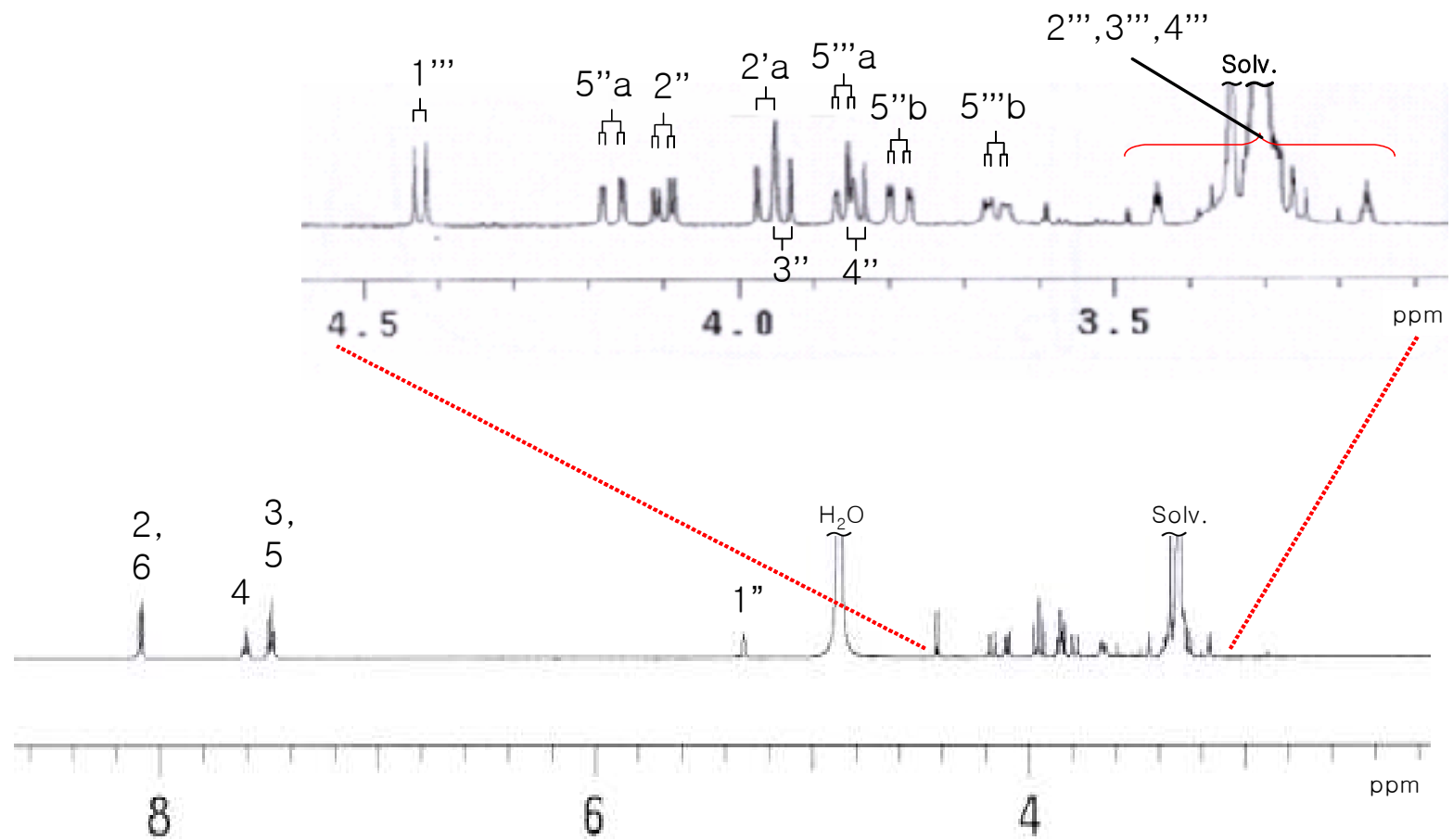


Fig. 28. ^1H -NMR spectrum (500 MHz, CD_3OD , TMS) of compound **16**.

Table 5. ¹H- (500 MHz) and ¹³C- NMR (125 MHz) data of compound **16** (CD₃OD).

Carbon	δ_H (mult, J)	δ_C
1	-	131.8
2, 6	8.08 (2H, d, 8.0 Hz)	131.0
3, 5	7.49 (2H, dd, 8.0, 8.0 Hz)	129.7
4	7.60 (1H, dd, 8.0, 8.0 Hz)	134.4
-COO-	-	168.0
1'	-	99.2
2'a	3.96 (1H, d, 12.5 Hz)	72.9
2'b	3.84 (1H, d, 12.5 Hz)	74.7
1''	5.32 (1H, d, 3.5 Hz)	70.8
2''	4.10 (1H, dd, 3.5, 10.0 Hz)	70.0
3''	3.94 (1H, dd, 10.0, 10.0 Hz)	78.1
4''	3.84 (1H, m)	62.5
5'a	4.17 (1H, dd, 1.0, 12.0 Hz)	104.8
5'b	3.78 (1H, dd, 2.0, 12.0 Hz)	75.3
1'''	4.42 (1H, d, 8.0 Hz)	78.2
2'''^{a)}	3.25-3.35	71.7
3' '''^{a)}	3.25-3.35	62.8
4' '''^{a)}	3.25-3.35	
5'''a	3.85 (1H, dd, 1.5, 12.0 Hz)	
5'''b	3.66 (1H, dd, 3.0, 12.0 Hz)	

^{a)} Chemical shifts of **2'''**– **5'''** are overlapped and interchangeable.

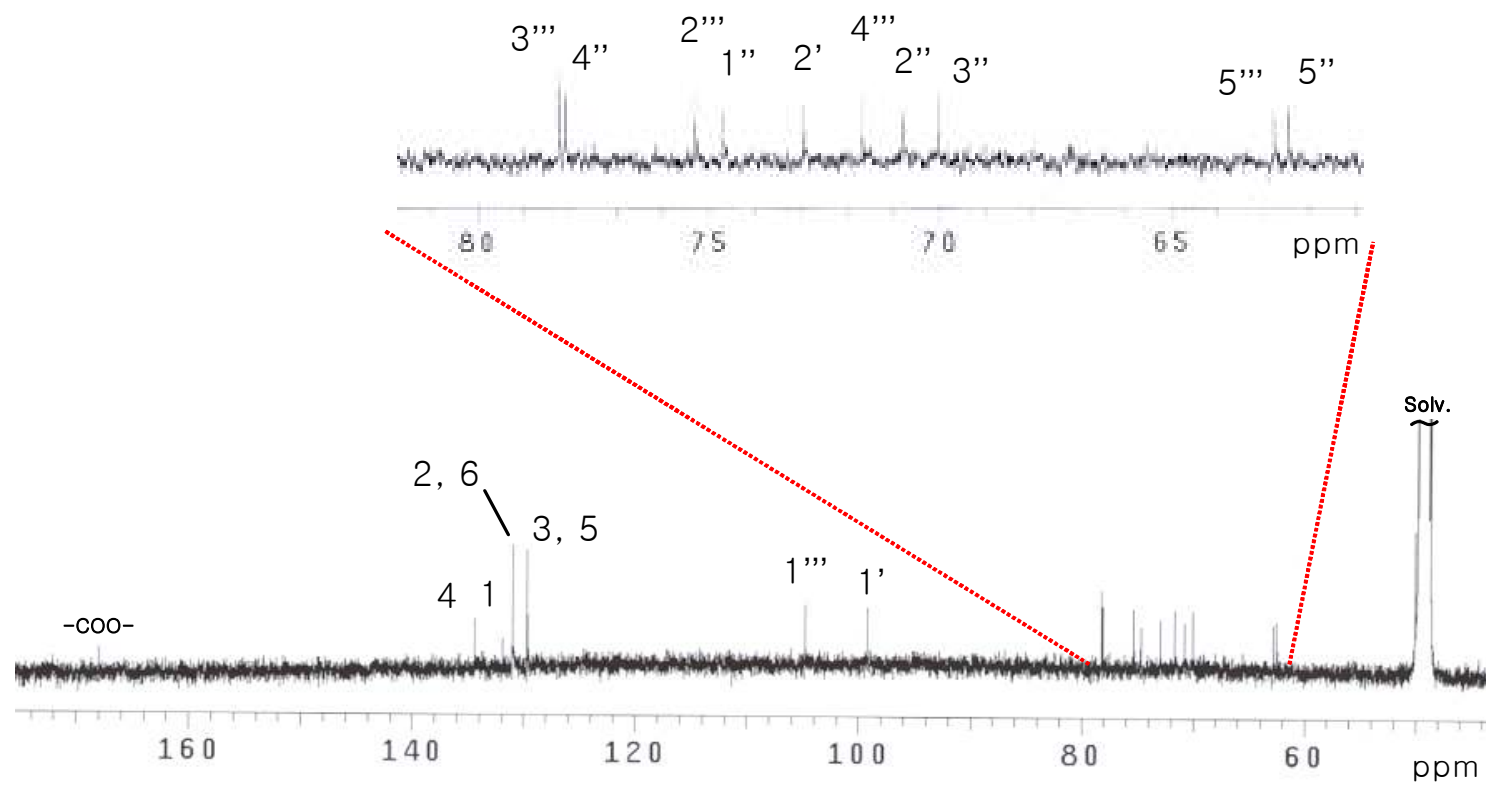


Fig. 29. ^{13}C -NMR spectrum (125 MHz, CD_3OD , TMS) of compound **16**.

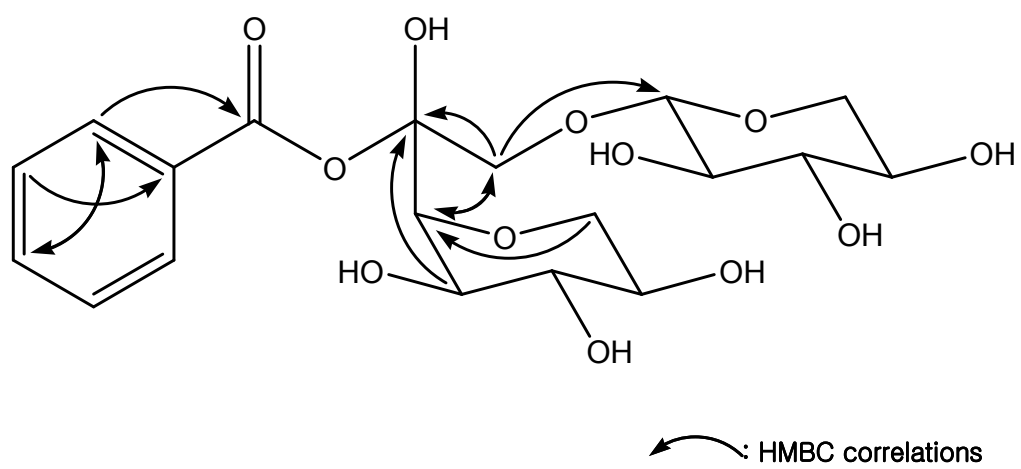


Fig. 30. HMBC correlations of compound 16.

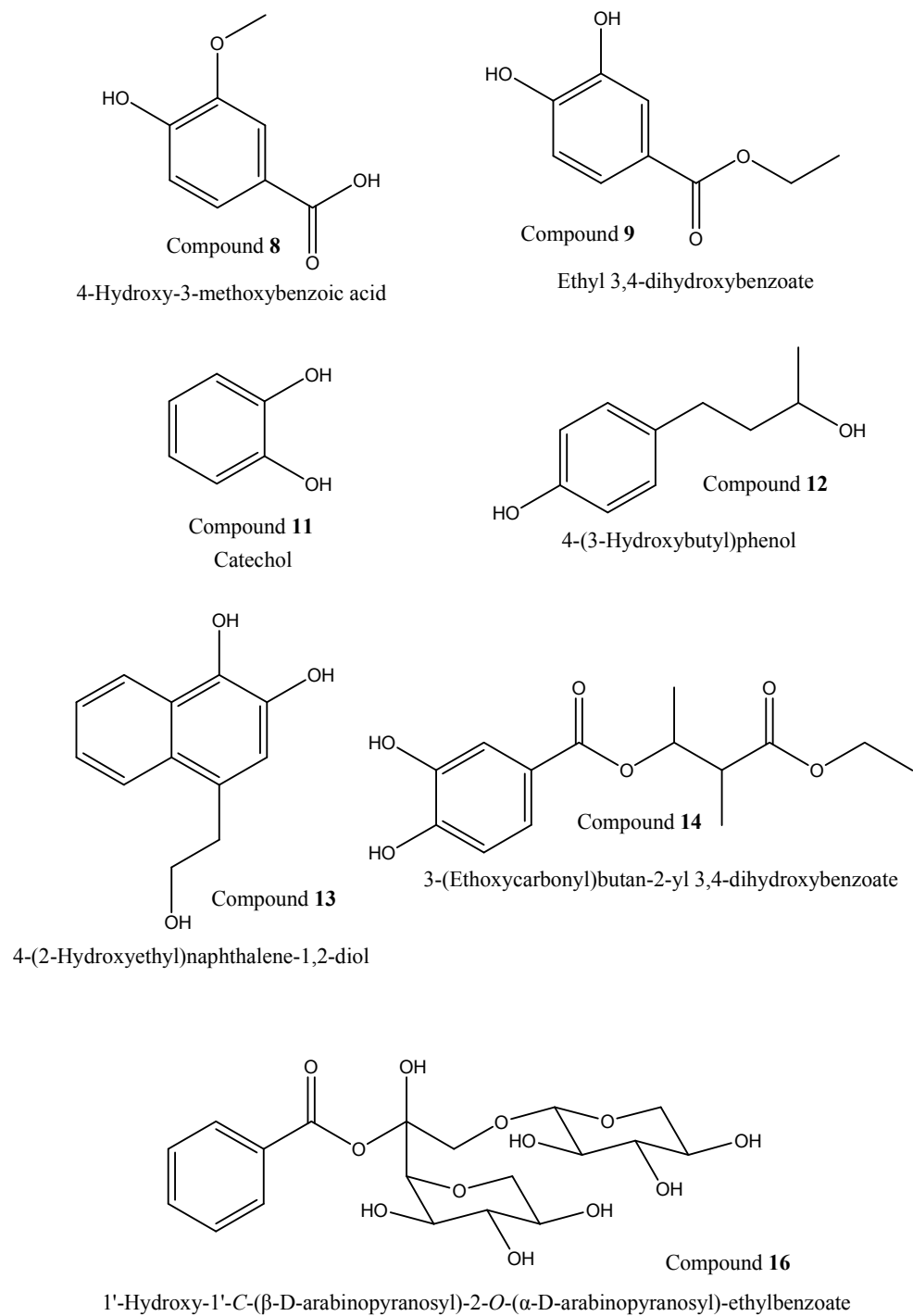


Fig. 31. Structure of compounds isolated from Korean black raspberry wine.

아) 화합물 17~21의 구조동정

화합물 17의 구조결정을 위해 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 및 각종 2D-NMR 분석을 행한 결과, 1종의 방향족 환에 2중결합을 갖는 7원환 구조가 결합된 구조일 가능성이 시사되었다. 그러나 이 화합물의 proton들과 carbon들 간의 연결성을 나타내는 2D-NMR의 분석결과들이 불분명한 부분이 있어 정확한 구조결정에는 이르지 못하였다. 현재 그 구조결정을 위해 보다 상세한 기기분석이 진행 중에 있다.

4) 고찰

복분자술은 원재료인 복분자를 효모와 함께 발효시킨 후 숙성과정을 거쳐 제품이 완성된다. 그래서 본 세부과제에서는 원재료에 함유되어 있던 성분이 발효와 숙성과정을 통해 분해·중합 등의 반응을 거쳐 새로운 성분이 생성될 가능성이 높다고 판단하였다. 만약 그렇다면, 일반적으로 응용하는 복분자술의 생리활성은 원재료인 복분자의 그것과는 많은 차이가 있을 것이라고 추측되었다.

그래서 1차년도에 TLC에 의한 간이 분석법을 이용하여 원재료 복분자와 발효·숙성 후 복분자술의 추출물을 대상으로 성분 분석을 행한 결과, 복분자술에 함유되어 있는 성분들 대부분은 복분자에는 존재하지 않음을 확인할 수 있었다. 즉 이것은 원재료 복분자에 함유되어 있던 성분들이 발효와 숙성 과정을 통해 변형되어 생성된 화합물들이 복분자술에 존재함이 시사된 결과라 판단되었다. 그래서 복분자술의 생리활성 또한 복분자 원재료의 그것과는 다를 가능성이 매우 높은 것으로 추측되었다. 이에 복분자술 중에 함유되어 있는 성분들 중 항산화 화합물에 초점을 맞추어 복분자술의 EtOH 추출물을 용매분획한 후, 얻어진 EtOAc 획분을 대상으로 항산화 활성물질의 단리·정제를 행하였다. 그 결과, 1차년도에 5종의 화합물을 단리·구조 동정하여 보고하였다. 이어, 2차년도에도 복분자술의 각 획분들을 대상으로 항산화 활성 화합물의 단리·정제를 행하여 19종의 화합물을 추가로 단리·구조해석 하였다. 그 결과, 구조 해석된 7종의 화합물들 중 4종(화합물 8, 9, 11, 12)은 기지화합물이었으나, 그 외의 3종 화합물(화합물 13, 14, 16)은 신규로 판명되었다. 그리고 구조 미해석 상태의 화합물들은 현재 그 구조결정이 진행 중에 있다.

1차년도와 2차년도에 복분자술로부터 구조가 구명된 화합물들은 현재로써 복분자 원재료 유래인지, 아니면 복분자술에만 특이적으로 존재하는 화합물인지 확정지을 수 없는 상황이다. 그러나 1차년도의 TLC 분석 결과를 고려해 보았을 때, 복분자술 특유의 성분들일 가능성이 매우 높은 것으로 추측되어지며, 또 복분자 원재료에는 함유되어져 있던 성분들이라 할지라도 원재료와 복분자술에 있어 함유량에 차이가 클 가능성이 높다고

판단되었다.

3차년도에는 2차년도까지 구명된 화합물들의 유래를 밝힘은 물론, 복분자 원재료와 복분자술 간의 생리활성을 비교할 계획이다. 또 복분자술 중에만 특이적으로 다량 함유된 성분들을 밝힘으로써, 복분자술의 제조에 있어 품질관리의 지표물질로 이용하는 방안을 모색할 계획이다.

3. 복분자술의 제조공정에 따른 생리활성물질의 생성기구 해명 및 품질평가지표 확립

가. 단리된 화합물들의 추가 구조결정

2차년도에 복분자 와인으로부터 단리된 화합물들 중 구조결정이 이루어지지 못한 다종의 화합물들이 있었다. 추가 기기분석을 행하여 보다 상세한 해석을 통해 그들의 일부가 구조결정되었다. 또 추가 분석에 의해 2차년도에 제시된 화합물들의 구조에 수정사항이 있음이 발견되어 추가 구조결정된 화합물에 대하여 그 수정된 구조들에 대해서도 함께 보고한다.

1) 화합물 13 (EL-E9-3)의 구조수정

2차 년도에 제시되었던 화합물 13의 구조식에 수정의 필요성이 발견되었다.

$^1\text{H-NMR}$ (그림 II-1, 표 II-1) 에서 총 9H의 proton signal들이 관찰되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 benzene 유래의 proton signals 5종 [δ 7.52 (1H, br. d, $J = 8.0$ Hz), 7.31 (1H, br. d, $J = 8.0$ Hz), 7.06 (1H, dt, $J = 1.0, 8.0$ Hz), 7.06 (1H, s), 6.98 (1H, dt, $J = 1.0, 8.0$ Hz)]이 관찰되어 4종의 proton이 benzene 환에 연속되어 존재함을 알 수 있었다. 한편 δ 7.06에서 관찰된 1H의 sp^2 carbon proton이 singlet을 보였던 것으로부터 이웃한 결합 원소에 proton이 존재하지 않는 부분구조가 존재함이 추측되었다. 또 δ 3.80 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$) 및 2.97 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2-$)의 signals로부터 ethanol의 부분구조가 존재함이 시사되었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (그림 II-1, 표 II-1) 으로부터 δ 138.28~112.30의 범위에 10종의 sp^2 carbon signal들이 검출된 것으로부터 2종의 벤젠환이 결합된 naphthalene 골격의 부분구조를 가지고 있는 것으로 시사되었다. 보다 자세한 구조결정을 위해 COSY, HSQC 및 HMBC 분석을 행하여 proton과 carbon들 간의 연결성을 확인하다. 그 결과

naphthalene과 ethanol의 연결관계를 확인하여 화합물 **13**은 전년도에 4-(2-hydroxyethyl) naphthalene-1,2-diol로 구조결정 하였다 (그림 II-2). 그러나 3차년도에 MS분석을 실시한 결과, 예상 구조식에 해당하는 분자량 signal이 검출되지 않고, 그 2량체에 해당하는 분자량 m/z 413.3 $[M+Na]^+$ 이 관찰되어 화합물 **13**은 2차년도에 제시되었던 구조식 [4-(2-hydroxyethyl) naphthalene-1,2-diol, 그림 II-3]이 2량체를 형성하고 있음을 알 수 있었다. 그래서 그 구조식은 그림 II-3에 나타낸 3종 중의 하나로 추측되어진다. 그러나 현재까지 얻어진 분석 자료들로는 그 ether 결합된 위치를 확정짓지 못하고 있는 상황이다. 이에 추가적인 NMR 분석을 행하여 완벽한 구조해석이 현재 진행 중에 있다.

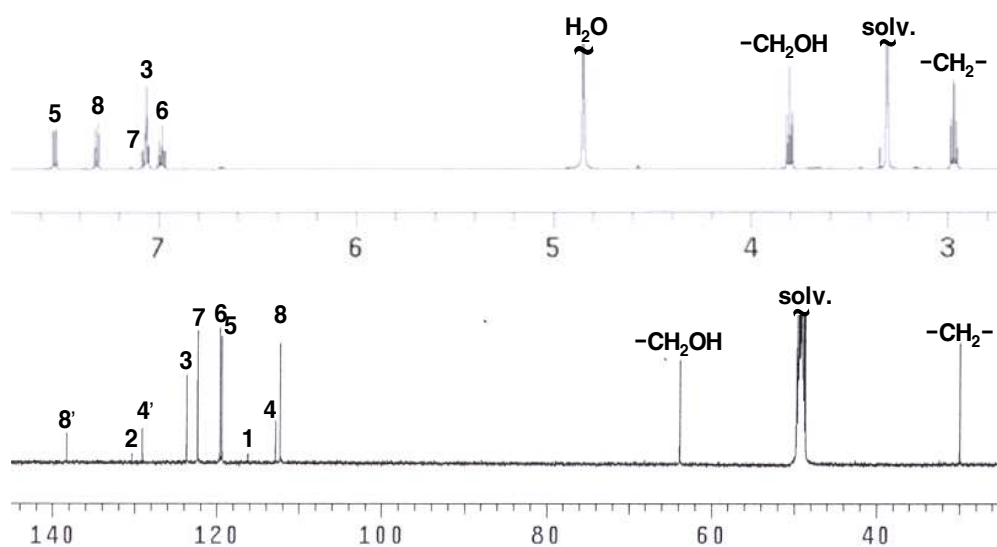


그림 II-1. 화합물 **13**의 ^1H - (상) 및 ^{13}C -NMR (하) spectra.

표 II-1. 화합물 **13**의 ^1H - (500 MHz) 및 ^{13}C - (125 MHz) NMR data (CD_3OD)

Carbon	δ_{H} (<i>rel. int., multi, J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	116.26
2	-	130.48
3	7.06 (1H, s)	123.69
4	-	112.86
4'	-	119.38
5	7.52 (1H, br. d, $J = 8.0$ Hz)	119.62
6	6.98 (1H, dt, $J = 1.0, 8.0$ Hz)	122.34
7	7.06 (1H, dt, $J = 1.0, 8.0$ Hz)	112.30
8	7.31 (1H, br. d, $J = 8.0$ Hz)	129.07
8'	-	138.28
-CH₂OH	3.80 (2H, t, $J = 7.4$ Hz)	63.83
-CH₂	2.97 (2H, t, $J = 7.4$ Hz)	29.96

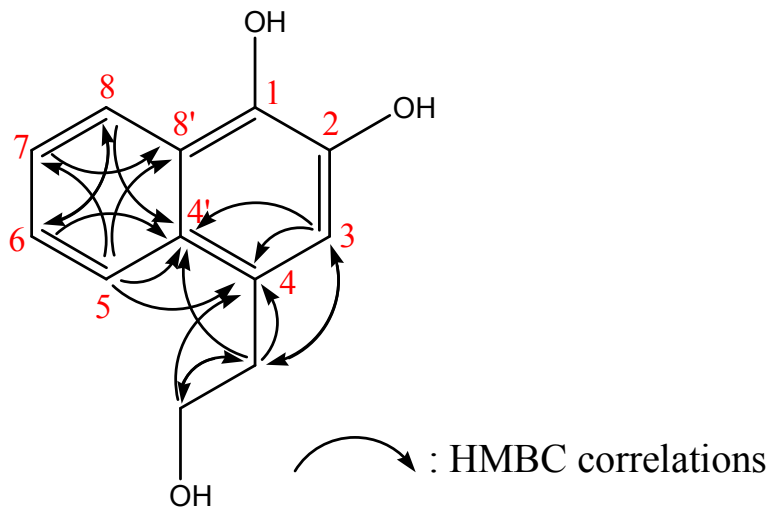


그림 II-2. 2차년도에 제시된 화합물 13의 구조식 및 HMBC 상관관계.

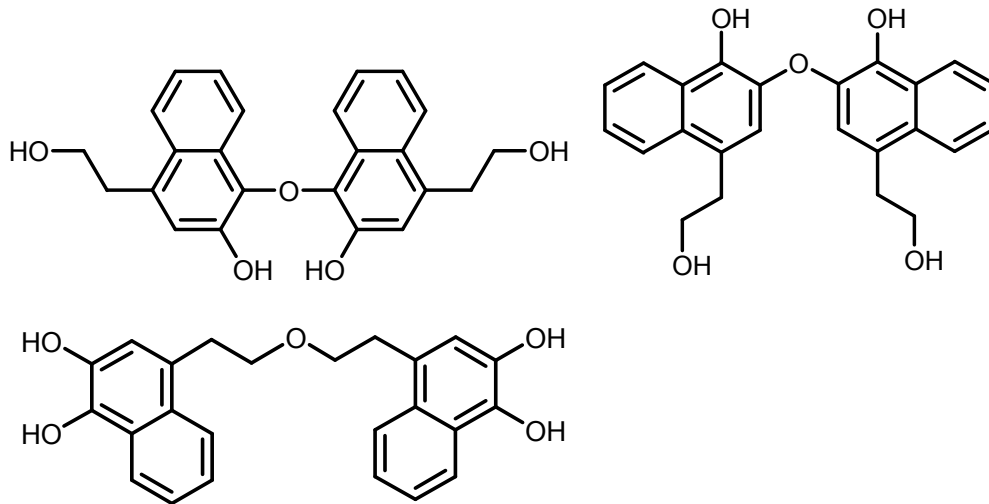


그림 II-3. 화합물 **13**의 예상 구조식들.

2) 화합물 14 (EL-H4)의 구조 수정

화합물 **14**의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (그림 II-4, 표 II-2)으로부터 9종의 총 15H분에 해당되는 proton signals가 관찰되었다. 그중 3종의 sp^2 carbon proton signals [δ 6.80 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.42 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz), 7.43 (1H, br. s)]가 관찰되었던 것으로부터 3종의 치환기를 갖는 벤젠환의 부분구조가 존재함을 알 수 있었으며, 3종의 methine proton signals [δ 4.80 (1H, m, H-1'), 3.74 (1H, m, H-2'), 4.25 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, H-2'')]와 3종의 methyl proton signals [δ 1.39 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-2''), 1.21 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-4'), 1.15 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-5')]가 관찰되었다. 이들 methine proton (δ 4.25, H-2'')과 methyl proton (δ 1.39, H-2'') 간의 coupling constant값이 등가의 $J = 7.0$ Hz를 나타내 서로 이웃하는 proton들임을 알 수 있었다. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum에서 δ 1.21 (3H, H-4'), 4.80 (1H, H-1'), 3.74 (1H, H-2'), 1.15 (H-3') 간에 서로 상관관계를 나타내어 2종의 치환기를 갖는 butyl기의 존재가 확인되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (그림 B-4, 표 B-2) 상에서도 6종의 sp^2 carbon signals (δ 151.67~115.89), 3종의 oxygenated methine carbon signals (δ 151.67~115.89), 그리고 3종의 methyl

carbon signals (δ 151.67~115.89)가 관찰되어 ^1H -NMR 결과를 뒷받침하였다. 또한 ^{13}C -NMR spectrum에서 carboxylic carbon 유래로 판단되는 2종의 signals (δ 170.33와 δ 176.08)가 관찰되었다.

이어 HMBC 분석을 행하여 proton과 carbon들 간의 연결성을 확인한 결과, 화합물 **14**의 부분구조는 3,4-dihydroxybenzoic acid, 2-hydroxypropanoic acid, 2,3-dihydroxybutane으로 해석할 수 있었다. 또한 2,3-dihydroxybutane의 methine proton signal (δ 3.74, H-2')로부터 2-hydroxypropanoic acid의 carbonyl carbon (δ 176.08, C-1'')에, 그리고 2,3-dihydroxybutane의 methine proton signal (δ 4.80, H-1')로부터 3,4-dihydroxybenzoic acid의 carbonyl carbon (δ 10.33, C-7)에 cross peak가 검출되었다. 이어 2차년도에 제시되었던 구조식을 수정하여 화합물 **14**의 구조를 3,4-dihydroxy-benzoic acid 2-(2-hydroxy-propionyloxy)-1-methyl-propyl ester로 해석하였으며(그림 II-5), 신규화합물로 판명되었다.

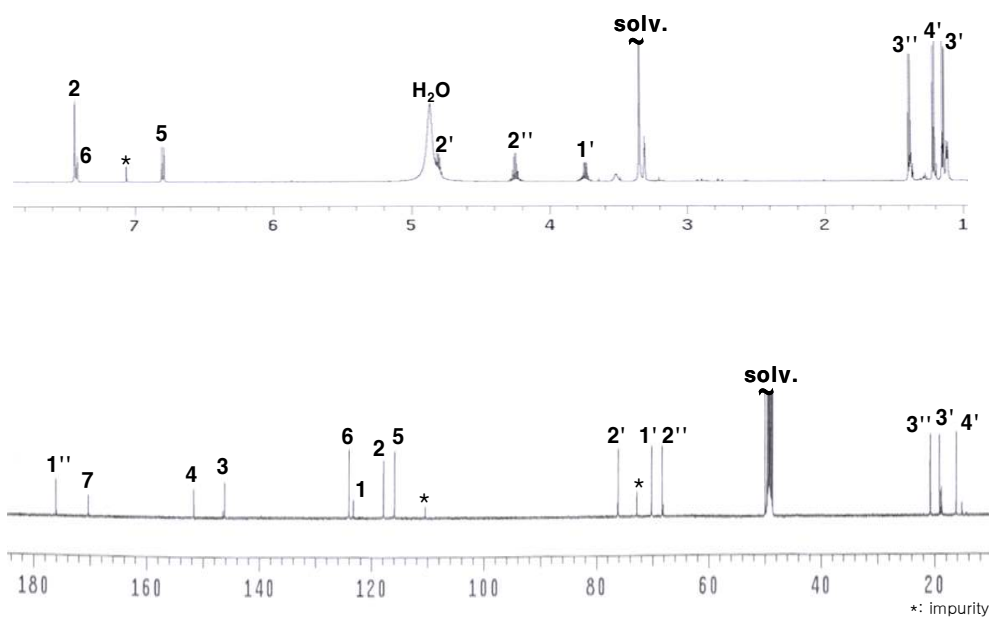


그림 II-4. 화합물 **14**의 ^1H - (상) 및 ^{13}C -NMR (하) spectra.

표 II-2. 화합물 14의 ^1H - (500 MHz,) 및 ^{13}C - (125 MHz) NMR data (CD_3OD)

Carbon	δ_{H} (<i>rel. int.</i> , <i>multi</i> , <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	123.24
2	7.43 (1H, br. s)	117.86
3	-	146.19
4	-	151.67
5	6.80 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	115.89
6	7.42 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz)	124.02
7	-	170.33
1'	3.74 (1H, m)	70.15
2'	4.80 (1H, m)	76.12
3'	1.15 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	19.7
4'	1.21 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	16.24
1''	-	176.08
2''	4.25 (1H, q, $J = 7.0$ Hz)	68.30
3''	1.39 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	20.80

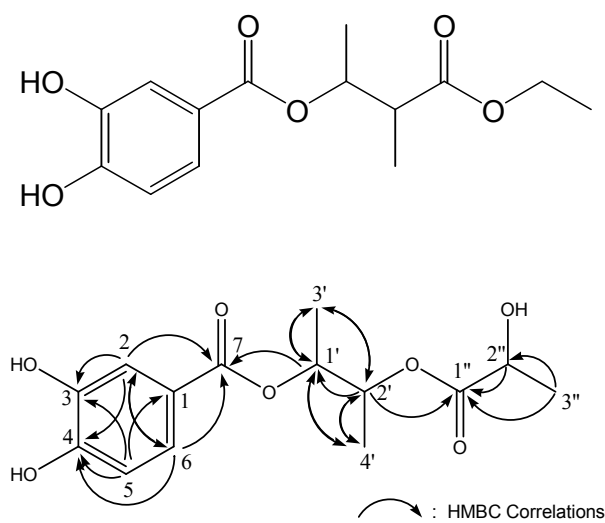


그림 II-5. 2차년도에 제시된 화합물 14의 구조식(상)과 수정된 화합물 14의 구조식(하) 및 그 HMBC 상관관계(하).

3) 화합물 7 (EL-E4)의 구조결정

화합물 7의 ^{13}C -NMR 분석 결과(표. II-3), carboxyl기 유래로 추측되는 2종의 탄소 signals [δ 176.16 (C-1), 174.46 (C-4)]에 더하여 4종의 sp^3 탄소 유래로 판단되는 4종의 signals [61.83 (C-1'), 30.22 (C-2 and C-3), 14.59 (C-2')]까지 총 6종의 탄소 signal들이 관찰되었다. 화합물 7의 ^1H -NMR spectrum (표. II-3)으로부터 δ 2.58에 4H분의 예리한 singlet signal (H-2와 3)이 관찰되어 등가 methylene의 존재가 시사되었다. 또 ethanol 유래로 추정되는 2종의 proton signals [δ 4.12 (2H, q, $J = 14.3, 7.5$ Hz, H-1'), 1.24 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2')]가 관찰되었다. 이 결과들로부터 화합물 7은 succinic acid의 한쪽 말단에 ethyl기가 ester 결합한 화합물일 가능성이 강하게 시사되었다. 보다 상세한 구조 해석을 위하여 HSQC 분석(그림 II-6)을 행하여 proton과 carbon들 간의 direct 연결성을 확인한 후, HMBC 분석(그림 II-6)을 행한 결과, ethyl기가 succinic acid에 ester 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 그래서 시판품의 ethyl succinate를 ^1H -NMR 분석을 행하여 화합물 7의 ^1H -NMR spectrum과 비교한 결과, 그들이 일치함을 확인할 수 있었으며, 화합물 7의 MS spectrum으로부터도 m/z 145.0 $[\text{M}-\text{H}]^+$ 이 관찰되어 화합물 7을 ethyl succinate로 동정하였다.

표 II-3. 화합물 7의 ^1H - (500 MHz) 및 ^{13}C - (125 MHz) NMR data (CD_3OD)

Carbon	δ_{H} (<i>rel. int.</i> , <i>multi</i> , <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	176.16
2	2.58 (2H, s) ¹⁾	30.22 ²⁾
3	2.58 (2H, s) ¹⁾	30.22 ²⁾
4	-	174.46
1'	4.12 (2H, m)	61.83
2'	1.24 (3H, t, 7.5 Hz) ⁴⁾	14.59

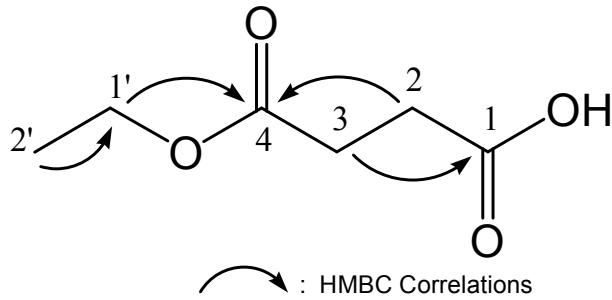


그림 II-6. 화합물 7의 구조식 및 HMBC 상관관계.

4) 화합물 10 (EL-E2-2)의 구조결정

화합물 10의 ^{13}C -NMR spectrum (표 II-4)으로부터 총 4종의 double bond의 carbon signals [δ 161.85 (C-2), 148.15 (C-5), 119.17 (C-3), 113.09 (C-4)]가 관찰되어 furan의 존재가 시사되었다. 그 ^1H -NMR spectrum (표 II-4)으로부터 각각 1H 분의 적분치를 보인 3종의 sp^2 carbon proton signals [δ 7.72 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-5), 7.20 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-3), 6.56 (1H, dd, $J = 3.5, 1.5$ Hz, H-4)]의 분열 패턴 및 coupling constant 값으로부터 그들은 일련의 연결성을 갖는 것으로 추측되었으며, 화합물 10은 1종의 4차탄소(δ 161.85, C-2)를 함유한 furan일 가능성이 시사되었다. 그리고 gCOSY spectrum으로부터 그들 3종 proton들의 연결성이 확인되었으며, HMBC spectrum (그림. II-7)으로부터 proton과 carbon들 간의 연결성, 특히 H-5의 proton signal로부터 C-2의 4차탄소 간에 cross peak가 검출되어 화합물 10은 C-2위에 치환기를 갖는 furan 동족체일 가능성이 강하게 시사되었다. 그래서 그 최종적인 구조 확인을 위해 MS 분석을 행한 결과, furan에 수산기가 결합된 화합물에 귀속되어지는 분자량 ion peak로 m/z 85.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 이 관찰되어 화합물 10은 furan-2-ol로 동정하였다.

표 II-4. 화합물 10의 ^1H - (500 MHz) 및 ^{13}C - (125 MHz)

NMR data (CD_3OD)

Carbon	δ_{H} (<i>rel. int.</i> , <i>multi</i> , <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
2	-	161.85
3	7.20 (1H, d, 1.5 Hz)	119.17
4	6.56 (1H, dd, 1.5, 3.5 Hz)*	113.09
5	7.72 (1H, d, 1.5 Hz)	148.15

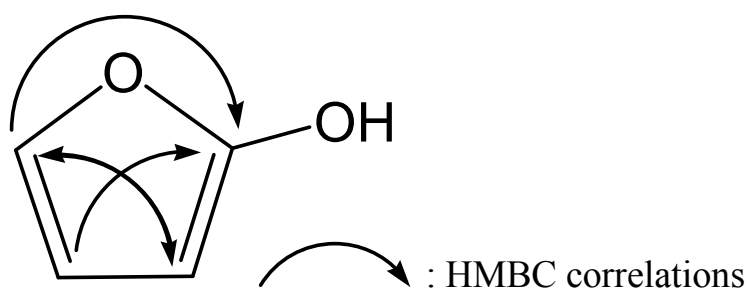


그림 II-7. 화합물 10의 구조식 및 HMBC 상관관계.

5) 화합물 15 (EL-H2-2)의 구조결정

화합물 16의 ^{13}C -NMR (125 MHz, acetone- d_6) spectrum 상에서 carboxyl 기 유래의 carbon signal (δ 167.76)을 포함하여 방향족 환 탄소유래의 6종 탄소 signals [δ 122.20 (C-1), 110.19 (C-2, 6), 146.09 (C-3, 5), 138.70 (C-4)]까지 총 7종의 sp^2 carbon signal들이 검출되어 벤젠환에 carboxyl기가 결합되어 있는 화합물일 가능성이 시사되었다. 그리고 ^1H -NMR (500 MHz, acetone- d_6) 분석결과, δ 7.142에 sp^2 carbon proton의 singlet 1종만의 signal이 검출되었다. 그래서 벤젠환의 meta위에 등가 proton이 존재하는 gallic acid일 가능성이 시사되었다. 한편 HMBC 분석 결과(그림 II-8) 또한 그 가능성을 더욱 강하게 시사하였다. 이어 direct ESI-MS 분석을 행한 결과, m/z 169.0 $[\text{M}-\text{H}]^+$ 이 관찰된 것으로부터 화합물 15는 gallic acid임이 거의 확실해졌

다. 그래서 시판품의 gallic acid와 화합물 15의 ^{13}C -NMR을 비교분석한 결과, 그들의 data가 일치하여 화합물 15는 gallic acid로 동정하였다.

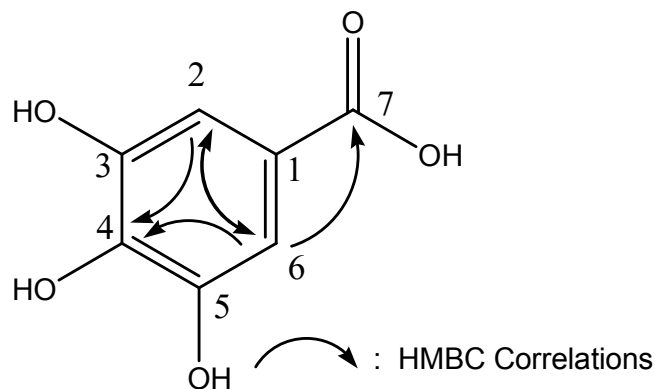


그림 II-8. 화합물 15의 구조식 및 HMBC 상관관계.

6) 화합물16 (BL-Y-6368-1)의 구조수정 및 화합물22 (BL-S4-3-2)의 구조결정
 화합물 22의 ^1H -NMR spectrum (그림 II-9, 표 II-5)으로부터 5종의 sp^2 proton signals [δ 7.61 (1H, dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz), 7.49 (2H, dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz), 8.08 (2H, d, $J = 7.5$ Hz)]가 관찰되었던 것으로부터 1치환체 벤젠환의 부분 구조가 존재하는 것으로 추측되었다. 또 그 ^{13}C -NMR spectrum (그림 II-9, 표 II-5) 상에서 carboxylic carbon 유래로 판단되는 1종의 signal (δ 168.0)이 관찰되었다. 이로부터 화합물 22는 benzoic acid를 부분구조로 취하고 있는 것으로 추측되었다.

그리고 그 부분구조로써 β -glucoside에 귀속되어지는 proton signal들, 즉 δ 4.43 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)에 당의 β -형 anomeric proton 유래 (H-1''), δ 3.86 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, H-6a'')과 δ 3.65(1H, dd, $J = 5.0, 12.0$ Hz, H-6b'')의 당의 6위의 AB type의 proton 유래, 그리고 그 외의 3.31-4.43에 나타난 4H분의 일련의 연결성을 갖는 proton signal들이 관찰되었다.

그 외에도 또 다른 당의 존재가 시사되었다. 즉 1'와 6'의 두 쌍의 AB type의 proton signals [δ 4.17 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-1a'), δ 3.79(1H, d, $J = 12.8$

Hz, H-1b'), δ 3.96 (1H, br. d, $J = 12.5$ Hz, H-6a''), δ 3.84 (1H, br.d, $J = 12.5$ Hz, H-6b'')]가 관찰된 점, 2'가 4차탄소인 점, 그리고 3', 4', 5'가 일련의 연결성을 갖는 coupling constant 값을 나타냈던 것으로부터 psicofuranose의 부분 구조를 갖는 것으로 추측되었다.

그리고 HMBC spectrum (그림 II-10) 상에서 β -glucose의 H-1''로부터 psicofuranose C-6'의 signal들 간에 cross peak가 검출된 점, psicofuranose H-3'로부터 benzoic acid C-7 cross peak가 검출된 것으로부터 benzoic acid, psicofuranose 및 β -glucoside의 연결 관계를 확인하였다.

또 COSY, gHSQC 및 HMBC 분석을 행하여 proton과 carbon들 간의 연결성을 더욱 자세하게 확인하였고, HRFABMS를 분석을 실시하여 C₁₉H₂₆O₁₂Na의 분자식과 m/z 469[M+Na]⁺의 signal이 관찰되어 화합물 22는 3'-O-benzoyl-(O- β -D-glucopyranosyl)(1'' \rightarrow 6')- β -D-psicofuranose로 구조결정하였다(그림 II-10). 본 화합물 22는 신규화합물로 판명되었다.

화합물 16과 22는 각각 다른 획득으로부터 단리되었다. 그러나 그들 각각의 기기분석분석 data들이 일치함이 확인되어진 바, 그들은 동일 화합물로 판명되었다.

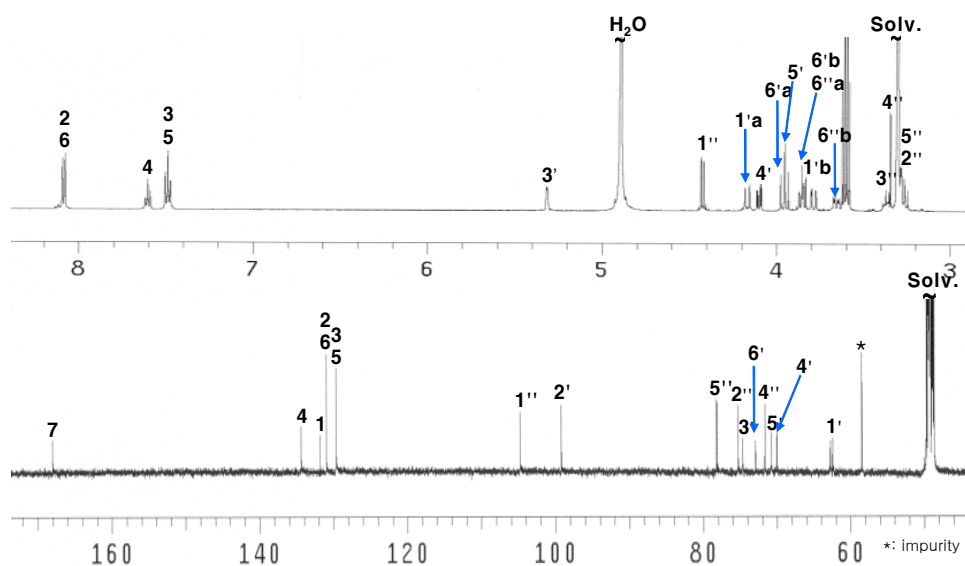


그림 II-9. 화합물 22의 ¹H- (상) 및 ¹³C-NMR (하) spectra.

표 II-5. 화합물 22의 ^1H - (500 MHz) 및 ^{13}C - (125 MHz) NMR data (CD_3OD)

Carbon	δ_{H} (<i>rel. int., multi, J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	131.8
2, 6	8.08 (2H, d, 8.0 Hz)	131.0
3, 5	7.49 (2H, dd, 8.0, 8.0 Hz)	129.7
4	7.60 (1H, dd, 8.0, 8.0 Hz)	134.4
7	-	168.0
1'a	4.17 (1H, d, 12.8 Hz)	
1'b	3.79 (1H, d, 12.8 Hz)	62.4
2'	-	99.2
3'	5.31 (1H, d, 3.5 Hz)	74.7
4'	4.10 (1H, d, 10.0 Hz)	70.0
5'	3.94 (1H, d, 10.0 Hz)	70.8
6'a	3.96 (1H, br. d, 12.5 Hz)	72.9
6'b	3.84 (1H, br. d, 12.5 Hz)	
1''	4.43 (1H, d, 7.5 Hz)	104.8
2''	3.26 (1H, dd, 7.5, 9.0 Hz)	75.3
3''	3.37 (1H, dd, 7.5, 9.0 Hz)	78.1
4''	3.31	71.6
5''	3.28 (1H, m)	78.2
6''a	3.86 (1H, dd, 1.2, 12.0 Hz)	62.8
6''b	3.65 (1H, dd, 5.0, 12.0 Hz)	

^{a)} Overlapped with the signal of analyzed solvent.

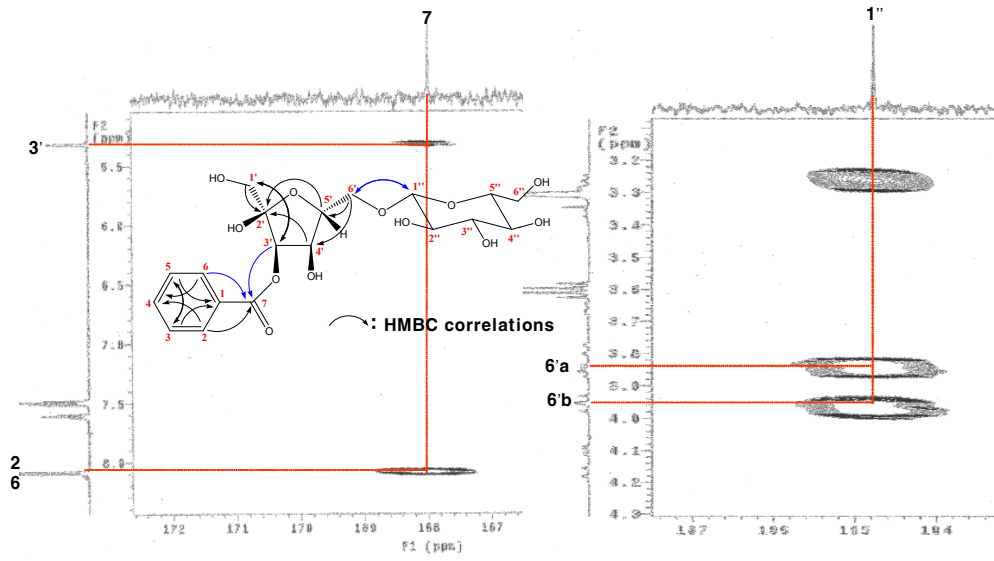


그림 II-10. 화합물 22의 HMBC 일부 spectra와 구조식 및 HMBC 상관관계.

7) 화합물 18 (BL-Y-93115-2)의 구조결정

BL-Y93115-2 (화합물 18)의 ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) spectrum (표. II-6)에서 1종의 carbonyl carbon signal (δ 216.1, C-3), 12종의 sp^2 carbon signals (δ 159.5~98.6), 2종의 quaternary carbon으로 추정되는 signals (δ 110.2, C-5; 103.9, C-4a), 1종의 oxygenated methine carbon signals (δ 84.0, C-1), 1종의 methine carbon signals (δ 46.5, C-10a), 2종의 methyl carbon signals (δ 26.6, C-2-CH₃; 21.8, C-4-CH₃), 그리고 3당의 carbon으로 추정되는 18종의 carbon signals (δ 103.8~67.9, 18.3)를 포함하여 총 37종의 carbon이 존재함을 알 수 있었다.

^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) spectrum (표. II-6)에 나타난 proton signal들은 ^{13}C -NMR spectrum을 뒷받침하였다. 즉, 3종의 aromatic proton signals [δ 6.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 7.02 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6'), 7.02 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-2')]가 관찰되어 3종의 치환기를 갖는 benzene환의 부분 구조가 존재함을 알 수 있었다. 또한 ^1H -NMR spectrum에서 benzene환의 para 위치에 존재하는 등가의 2종 double bond proton signals [δ 5.94 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-7), 5.78 (1H, d, $J = 2.0$, H-9)]가 관찰되었고, 상기 1종의 benzene환에 더하여 총 12종의 sp^2 carbon signals (δ 159.5~116.0)가 존재하여 2종의 benzene 환이 존재함을 알 수 있었다.

또한, ^1H -NMR spectrum에서 3당으로 추정되는 proton signals의 존재가 관찰되었다. 이들의 coupling constant 값과 ^1H - ^1H COSY spectrum (그림. II-12)에서 이웃한 탄소에 결합한 proton들 간의 상관관계를 확인하여 이 당들은 2종의 glucose와 1종의 rhamnose로 구성되어 있는 것으로 해석되었다. 즉, glucose의 2종 anomeric proton signal (δ 4.09, 1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''; δ 4.44, 1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''')과 일련의 연결성을 갖는 12종의 glucose에 귀속되어지는 proton signal들(δ 4.44~3.17)이 관찰되었다. Glucose의 2종의 anomeric proton의 coupling constant 값이 각각 7.5 Hz로 관찰되어 2종의 glucose는 β -형임을 알 수 있었다. 그 외의 1종의 당은 anomeric proton signal (δ 4.71, 1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-1''')과 methyl proton signal (δ 1.26, 1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6''')이 관찰되어 rhamnose일 가능성이 제시되었으며, 이 당에 귀속되는 일련의 proton signals의 분열패턴으로부터 rhamnose는 L-form임을 알 수 있었다.

^1H -NMR spectrum에서 관찰된 2종의 benzene 환 및 3종의 당의 proton signals를 제외하고, 그 외에 2종의 methyl proton signals (δ 2.42, 3H, s, H-2-CH₃; δ 1.16, 3H, s, H-4-CH₃)와 2종의 methine proton signals (δ 4.21, 1H, s, H-10a; δ 4.50, 1H, s, H-1)가 추가로 관찰되었다.

^1H -과 ^{13}C -NMR spectra의 분석결과들로부터 화합물 18의 구조는 flavonoid가 변형되어 2종의 glucose와 1종의 rhamnose가 결합된 3당 배당체임이 확인되었다.

이어 화합물 18의 보다 정확한 구조해석을 위해 HMBC 분석(그림 II-12)을 통하여 proton과 carbon들 간의 상관관계를 확인하였다. 이 화합물의 aglycone은 flavonoid의 2, 3위에 epoxy화 되어지고, 3, 4위에 1,3-dimethylpyrimidinone형의 환상구조를 갖는 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,8,10-trihydroxy-2,4-dimethyl-1,10b-dehydro-2H-oxireno[2,3]chromeno[3,4-d]pyrimidin-3(4H)-one으로 확인되었다(그림 II-9). 특히, HMBC spectrum에서 rhamnose의 anomeric proton signal (δ 4.71, H-1''')과 1종의 glucose 6위 carbon signal (δ 67.9, C-6'') 간에, 그리고 이 glucose의 anomeric proton signal (δ 4.44, H-1'')과 다른 1종의 glucose 6위 carbon signal (δ 66.8, C-6'') 간에 각각 cross peak가 관찰되어, 3종의 당은 rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -(glucopyranosyl(1 \rightarrow 6))- β -glucopyranoside임을 알 수 있었다. 이어 glucose의 anomeric proton signal (δ 4.09, H-1'')로부터 aglycone의 oxygenated methine carbon signal (δ 84.0, C-1)에 상관관계가 관찰되어 aglycone의 1위에 glucose의 1위가 결합되어 있음을 알 수 있었다(그림 II-12).

이상의 NMR 분석에 의해 화합물 18의 구조는 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,8,10-trihydroxy-2,4-dimethyl-1,10b-dehydro-2H-oxireno[2,3]chromeno[3,4-d]pyrimidin-3(4H)-one 1-O-L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside로 잠정 결정(신규 화합물)되었다. 그러나 5위와 4a위 간에 epoxide 구조를 취하고 있는 점에 대해 아직 정확한 근거를 확인하지 못하였다. 이에 구성원소들의 조성 및 분자량 확인 등의 추가분석을 통해 보다 정확한 구조결정이 현재 진행 중에 있다.

표 II-6. 화합물 18의 ^1H - (500 MHz) 및 ^{13}C - (125 MHz) NMR data (CD_3OD)

Carbon	δ_{H} (<i>rel. int.</i> , <i>multi</i> , <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	4.50 (1H, s)	84.0
2-CH ₃	2.42 (3H, s)	26.6
3	-	216.1
4-CH ₃	1.16 (3H, s)	21.8
4a	-	103.9
5	-	110.2
6a	-	156.7
7	5.94 (1H, d, 2.0 Hz)	96.8
8	-	159.5
9	5.78 (1H, d, 2.0 Hz)	95.8
10	-	155.1
10a	-	98.6
10b	4.21 (1H, s)	46.5
1'	-	129.4
2'	7.16 (1H, d, 2.5 Hz)	116.6
3'	-	145.6
4'	-	146.7
5'	6.77 (1H, d, 8.0 Hz)	116.0
6'	7.02 (1H, dd, 2.5, 8.0 Hz)	120.9
1''	4.09 (1H, d, 7.5 Hz)	102.6
2''	3.21 (1H, dd, 7.5, 8.5 Hz) ¹⁾	76.7
3''	3.33 (1H, dd, 8.5, 8.5 Hz) ²⁾	78.9
4''	3.21 (1H, dd, 8.5, 9.0 Hz) ¹⁾	71.2
5''	3.17 (1H, m) ¹⁾	78.2
6''a	2.97 (1H, dd, 1.0, 12.0 Hz)	66.8
6''b	3.69 (1H, dd, 6.0, 12.0 Hz)	
1'''	4.44 (1H, d, 7.5 Hz)	104.7
2'''	2.98 (1H, dd, 8.0, 8.0 Hz)	75.3
3'''	3.19 (1H, dd, 8.5, 8.5 Hz) ¹⁾	80.5
4'''	3.21 (1H, dd, 8.5, 8.5 Hz) ¹⁾	71.3
5'''	3.18 (1H, m) ¹⁾	78.2
6'''a	3.50 (1H, dd, 5.0, 12.0 Hz)	67.9
6'''b	3.94 (1H, dd, 2.0, 12.0 Hz)	
1''''	4.71 (1H, d, 1.5 Hz)	102.1
2''''	3.83 (1H, dd, 1.5, 3.5 Hz)	72.3
3''''	3.68 (1H, dd, 3.5, 9.5 Hz) ³⁾	72.5
4''''	3.30 (1H, dd, 9.5, 9.5 Hz) ²⁾	74.6
5'''' ¹⁾	3.66 (1H, m) ³⁾	69.9
6''''	1.26 (3H, d, 6.0 Hz)	18.3

¹⁾ Overlapped with the signals of H-2'', H-4'', H-5'', H-3''', H-3''', and H-5'''.

²⁾ Overlapped with the signals of H-3'', H-4''', and CD_3OH .

³⁾ Overlapped with the signals of H-3'''' and H-5''''.

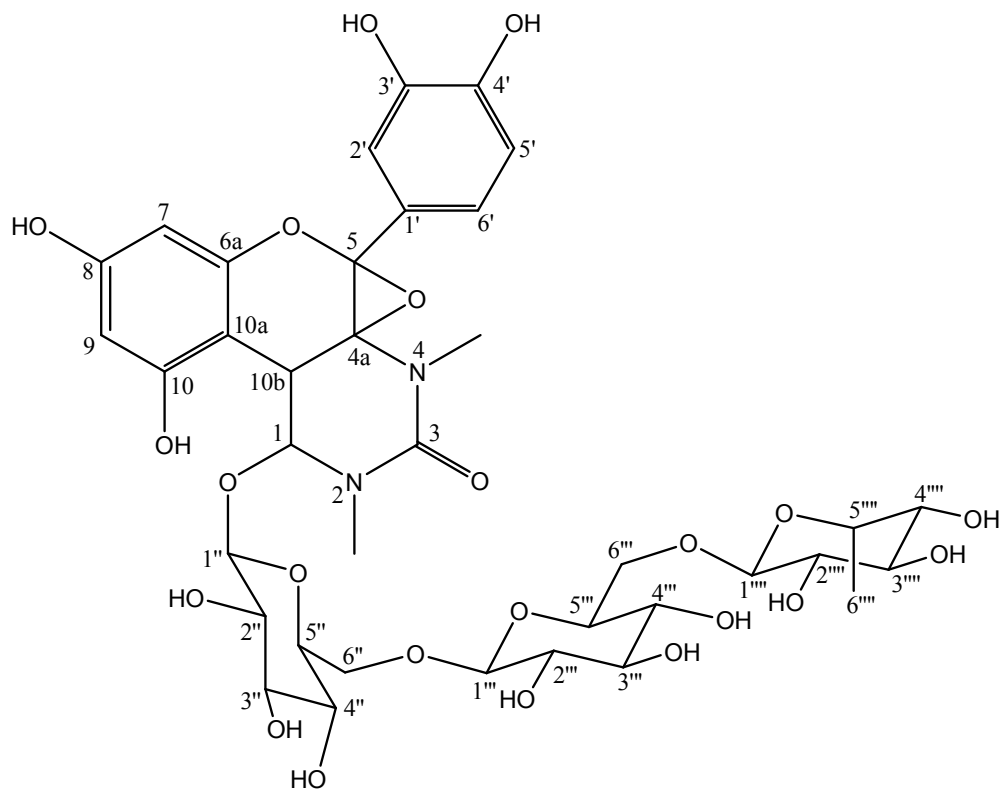


그림 II-11. 화합물 18의 추정 구조식.

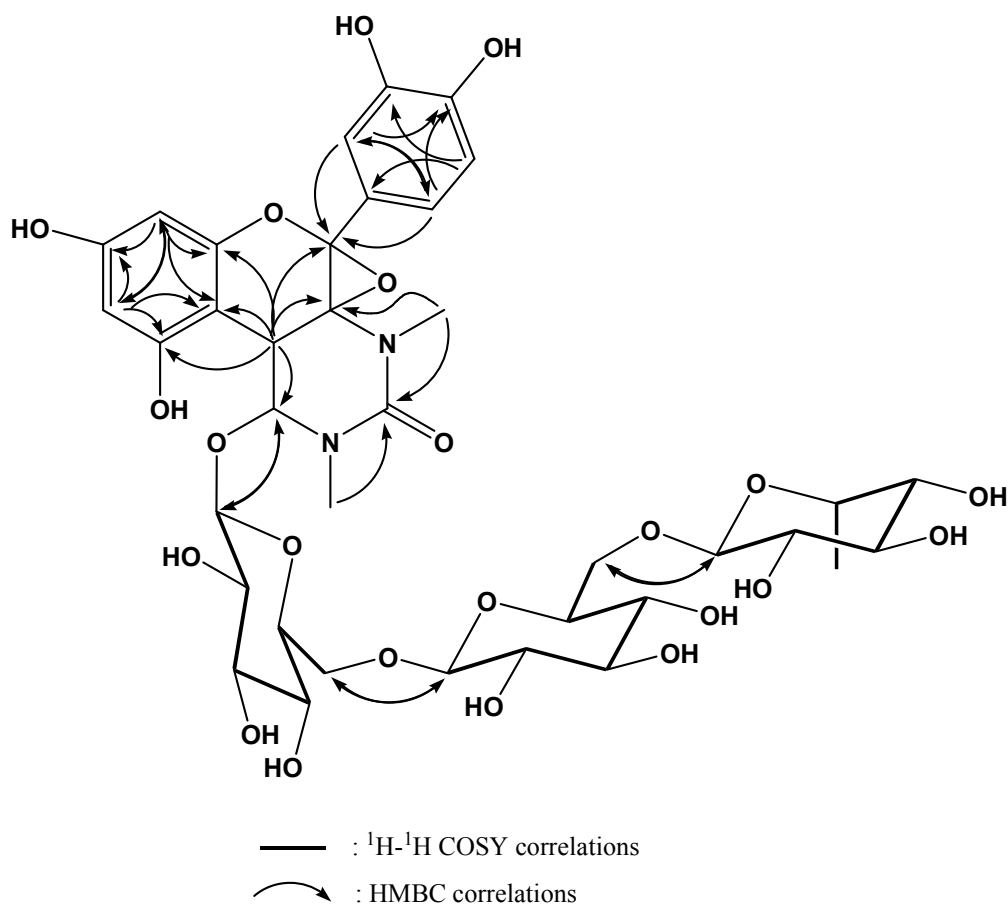


그림 II-12. 화합물 18의 추정구조식과 ^1H - ^1H COSY 및 HMBC 상관관계.

8) 화합물 19 (BL-Y-93115-3)의 구조결정

BL-Y-93115-3 (화합물 19)의 ^1H - 및 ^{13}C -NMR spectra는 화합물 18의 그것들과 매우 유사하였다. 즉 화합물 19의 ^1H -과 ^{13}C -NMR (CD_3OD) spectra (표 II-7)는 2종의 sp^2 methine carbon proton signals와 1종의 glucose carbon proton signals가 없는 화합물 18의 data와 유사한 경향을 보였다. 이 화합물의 구조는 화합물 18의 구조에서 A환에 para 형태로 존재하던 7위와 9위의 proton대신 2종의 hydroxyl기가 결합되고 화합물 18과 동일한 위치에 1종의

glucose와 1종의 rhamnose가 연결된 2당 배당체 α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose로 강하게 시사되었다. 또한, 화합물 **19**의 2당으로 추정되는 glucose와 rhamnose는 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^1\text{H-}^1\text{H COSY spectra}$ 로부터 glucose는 β -형이고 rhamnose는 L-form임을 확인하였다.

화합물 **19**의 HMBC 분석(그림 II-14)을 통하여 proton과 carbon들 간의 상관관계를 확인하였다. 특히, HMBC spectrum에서 rhamnose의 anomeric proton signal (δ 4.73, H-1)과 1종의 glucose 6위 carbon signal (δ 67.9, C-6") 간에 cross peak가 관찰되어 이 화합물의 2당의 구조는 rhamnose가 glucose 6위에 결합된 rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside로 해석되었다. 또한 glucose의 anomeric proton signal (δ 3.91, H-1")로부터 aglycone 1위가 oxygenated methine carbon signal (δ 83.5, C-1)에 상관관계를 나타내 glucose의 1위가 aglycone 부분의 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,7,8,9,10-pentahydroxy-2,4-dimethyl-1,10b-dehydro-2H-oxireno[2,3]chromeno[3,4-d]pyrimidin-3(4H)-one의 1위에 결합되어 있음을 알 수 있었다(그림 II-14).

이상의 NMR 분석에 의해 화합물 **19**의 구조는 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,7,8,9,10-pentahydroxy-2,4-dimethyl-1,10b-dehydro-2H-oxireno[2,3]chromeno[3,4-d]pyrimidin-3(4H)-one 1-O-L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside로 잠정 결정(신규 화합물)되었으나, 화합물 **18**과 같이 aglycone의 부분구조에 아직 의문점이 남아있는 상태이다. 그래서 추가분석을 통해 보다 정확한 구조해석이 현재 진행 중에 있다.

표 II-7. 화합물 19의 ^1H - (500 MHz,) 및 ^{13}C - (125 MHz) NMR data (CD_3OD)

Carbon	δ_{H} (<i>rel. int.</i> , <i>multi</i> , <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	4.53 (1H, s)	83.5
2-CH ₃	2.39 (3H, s)	26.5
3	-	215.1
4-CH ₃	1.19 (3H, s)	21.4
4a	-	98.6
5	-	110.1
6a	-	156.8
7	-	155.0
8	-	159.5
9	-	155.0
10	-	156.8
10a	-	103.4
10b	4.17 (1H, d, 1.0)	46.4
1'	-	129.2
2'	7.20 (1H, d, 2.5)	116.1
3'	-	146.1
4'	-	147.3
5'	6.81 (1H, dd, 8.0)	116.0
6'	7.09 (1H, dd, 2.5, 8.0)	120.5
1''	3.91 (1H, d, 8.0)	103.8
2''	2.89 (1H, dd, 8.0, 8.5)	75.3
3''	3.08 (1H, dd, 8.5, 8.5)	77.8
4''	3.21 (1H, dd, 8.5, 8.5)	71.3
5''	3.17 (1H, m)	76.7
6''a	3.54 (1H, dd, 6.0, 12.0)	67.9
6''b	3.94 (1H, dd, 2.0, 12.0)	
1'''	4.72 (1H, d, 1.5)	102.2
2'''	3.86 (1H, dd, 1.5, 3.5)	72.2
3'''	3.68 (1H, dd, 3.5, 9.5) ¹⁾	72.5
4'''	3.36 (1H, dd, 9.5, 9.5)	74.4
5''' ¹⁾	3.68 (1H, m) ¹⁾	69.9
6'''	1.26 (3H, d, 6.5)	18.2

¹⁾ Overlapped with the signals of H-3''' and H-5'''.

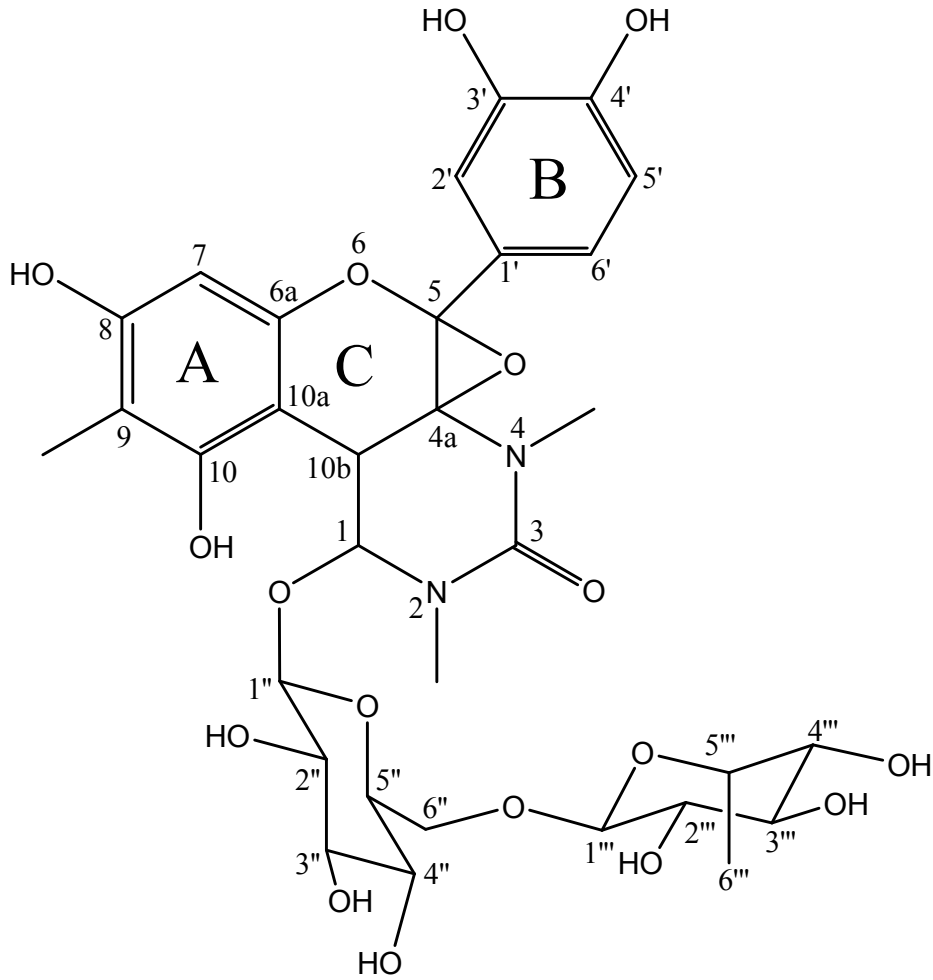


그림 II-13. 화합물 19의 추정 구조식.

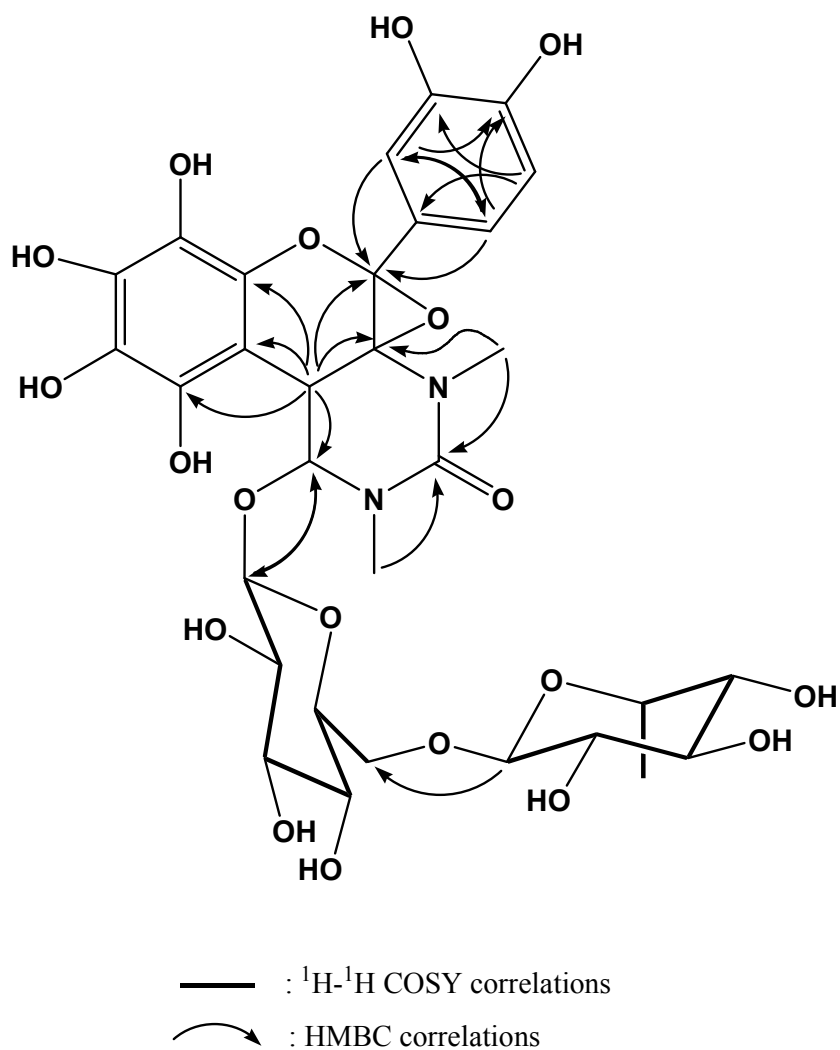


그림 II-14. 화합물 19의 추정 구조식과 ^1H - ^1H COSY 및 HMBC 상관관계.

9) 화합물 21 (BL-Y-93115-6)의 구조결정

화합물 21의 ^1H -NMR spectrum (그림. B-15, 표. II-8)에서는 5종의 sp^2 proton signals [δ 7.30 (1H, dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz), 7.35 (2H, dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz), 7.86 (2H, d, $J = 7.5, 7.5$ Hz)]가 관찰되어 1차환체 벤젠환 부분구조의 존

제와 함께 그 외에 1종의 sp² proton signal (δ 7.05, 1H, s, H-7)이 추가로 관찰되었다. 또한 부분구조로써 β -glucose에 귀속되어지는 proton signal들, 즉 δ 5.21 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)에 당의 β -형 anomeric proton 유래 (H-1'), δ 3.75 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, H-6a')와 δ 3.61(1H, dd, $J = 5.0, 12.0$ Hz, H-6b')의 당의 6위의 AB type의 proton 유래, 그리고 그 외의 δ 3.23-3.49에 나타난 4H분의 일련의 연결성을 갖는 proton signal들이 관찰되었다. 이 외에도 ¹H-NMR spectrum에서 ¹³C-NMR spectrum (그림 II-15, 표 II-8) 상에서 carboxylic acid carbon 유래로 판단되는 1종의 signal (δ 167.3)이, 그리고 8종의 sp² carbon signals (δ 134.9-142.9)가 검출되어 cinnamic acid가 부분구조로 존재할 가능성 제시되었다.

HMBC spectrum (그림 II-16)에서 β -glucose의 H-1'로부터 cinnamic acid C-8의 cross peak가 검출되어 β -glucose의 anomeric 탄소가 cinnamic acid의 8위에 에테르 결합되어 있음을 확인하였다. 그리고 NOESY 분석에 의해 anomeric proton (δ 5.21, H-1')과 methine proton (δ 7.05, H-7)간의 상관관계를 보여 이 화합물에 결합된 glucose은 (E) form으로 판명되었다. 또한 HRFABMS 분석에 의해 C₁₅H₈O₈의 분자식과 m/z 327 [M+H]⁺signal이 검출되었다. 이상의 NMR 및 HRFABMS 분석결과, 화합물 21은 (E)-8-O- β -D-glucopyranosylcinnamic acid로 구조결정 되었으며, 신규화합물로 판명되었다(그림 II-16).

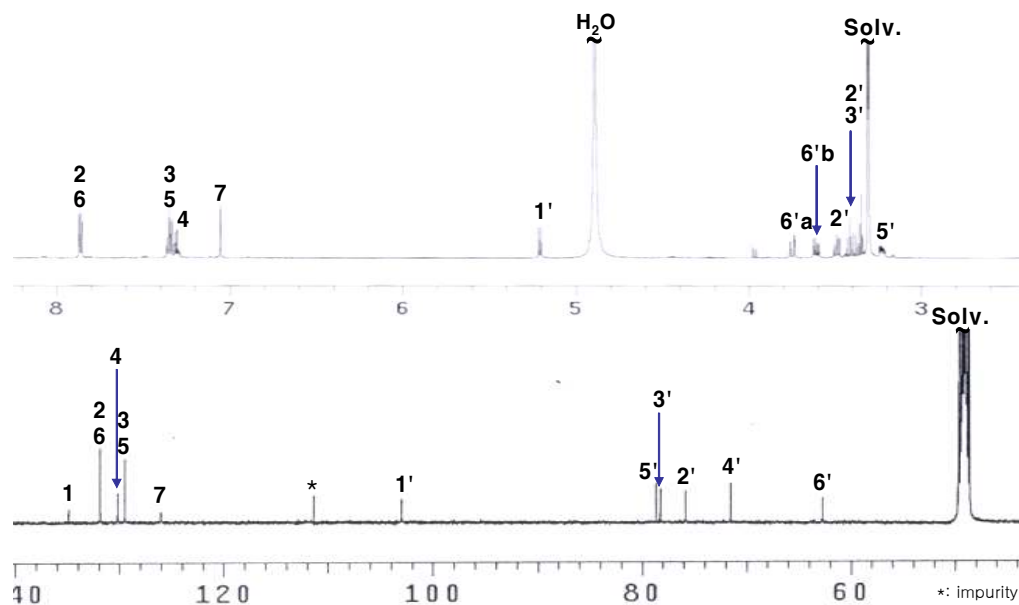


그림 II-15. 화합물 21의 ¹H- (상) 및 ¹³C-NMR (하) spectra.

표 II-8. 화합물 21의 ^1H - (500 MHz) 및 ^{13}C - (125 MHz)
NMR data (CD_3OD)

Carbon	δ_{H} (<i>rel. int.</i> , <i>multi</i> , <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	134.9
2, 6	7.86 (2H, d, 7.5 Hz)	131.8
3, 5	7.35 (2H, dd, 7.5, 7.5 Hz)	129.5
4	7.30 (1H, dd, 7.5, 7.5)	130.2
7	7.05 (1H, s)	126.0
8	-	142.9
9	-	167.3
1'	5.21 (1H, d, 8.0)	103.0
2'	3.49 (1H, dd, 8.0, 9.0)	75.8
3'	3.41 (1H, dd, 9.0, 9.0)	78.2
4'	3.36 (1H, dd, 9.0, 9.0)	71.5
5'	3.23 (1H, ddd, 2.0, 5.0, 9.0)	78.8
6'a	3.75 (1H, dd, 2.0, 12.0)	62.7
6'b	3.61 (1H, dd, 5.0, 12.0)	62.7

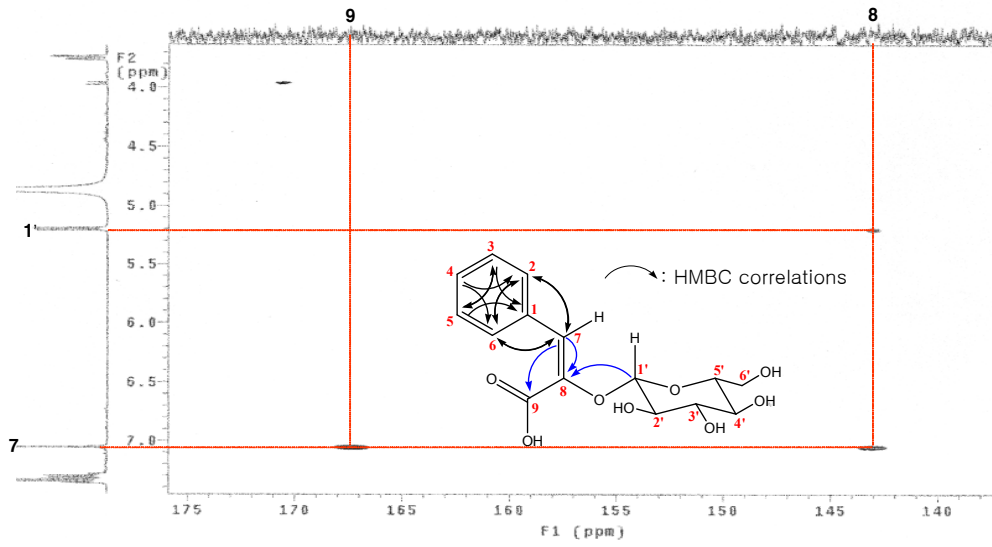


그림 II-16. 화합물 21의 HMBC spectrum과 구조식 및 상관관계.

10) 화합물 24 (HL-5-2)의 구조결정

화합물 24의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (표 II-9) 상에서 서로 중첩되어 있는 5H분의 sp^2 carbon proton signals (δ 7.20~7.27)가 관찰되어 1종의 치환기를 갖는 벤젠환의 부분구조가 존재하는 것으로 추측되었다. 또 1종의 methine proton signal (δ 4.35, H-2)과 1종의 methylene proton signal (δ 1.26 (3H, t, H-2")) 간의 split pattern으로부터 상호 이웃하는 원소에 결합된 proton들의 존재가 시사되었다. 그리고 또 다른 1종의 methylene proton signal (δ 4.12, 2H, dd, $J = 7.1, 14.1$ Hz, H-1")과 1종 methyl proton signal (δ 1.19 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2")) 간의 split pattern으로부터 ethanol의 부분구조가 존재함이 확인되었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에 나타난 carboxylic carbon 유래 signal (δ 171.98), 6종의 sp^2 carbon signals (δ 136.06-108.75)와 3종의 sp^3 carbon signals (δ 60.74, 31.42, 14.24)로 총 11 carbon의 존재가 시사되었다. 이상의 결과로부터 이 화합물의 구조는 에탄올과 phenylhydroxypropanoic acid가 결합된 화합물일 가능성이 강하게 시사되었다.

이어 HMBC spectrum (그림 II-17)에서 ethanol의 methylene proton signal (δ 4.12, H-1")로부터 carboxylic carbon signal (δ 171.98) 간에 cross peak가 관찰되어 ethanol은 phenylhydroxypropanoic acid의 carbonyl carbon과 에스테르 결합하고 있음을 알 수 있었다. 그래서 이 화합물은 ethyl-2-hydroxy-3-phenyl propanoate로 평면 구조가 결정되었다.

이어 본 화합물의 2위에 결합된 hydroxyl group의 절대구조는 Chang 등의 문헌 (Jia-Wen Chang et al., *Organic letters* 1(13): 2061-2063,1999)에 제시한 (*R*) ethyl-2-hydroxy-3-phenyl propanoate의 $^{13}\text{C-NMR}$ 결과와 일치하였다. 따라서 이 화합물의 구조는 (*R*) ethyl-2-hydroxy-3-phenyl propanoate로 동정되었다(그림 II-17).

표 II-9. 화합물 24의 ^1H - (500 MHz) 및 ^{13}C - (125 MHz) NMR data (acetone)

Carbon	δ_{H} (<i>rel. int.</i> , <i>multi</i> , <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	174.45
2	4.35 (1H, dt, J=5.0, 7.3 Hz)	72.63
3a	3.05 (1H, dd, J=5.0, 13.7 Hz)	41.47
3b	2.92 (1H, dd, J=7.3, 13.7 Hz)	
1'	-	138.60
2'	7.26 (1H, s)	128.99
3'	7.27 (1H, s)	130.48
4'	7.20 (1H m)	127.26
5'	7.27 (1H, s)	130.48
6'	7.26 (1H, s)	128.99
1''	4.12 (2H, dd, J=7.1, 14.1 Hz)	61.36
2''	1.19 (3H, t, J=7.1 Hz)	14.53
-OH	4.20(1H, d, J=6.0 Hz)	

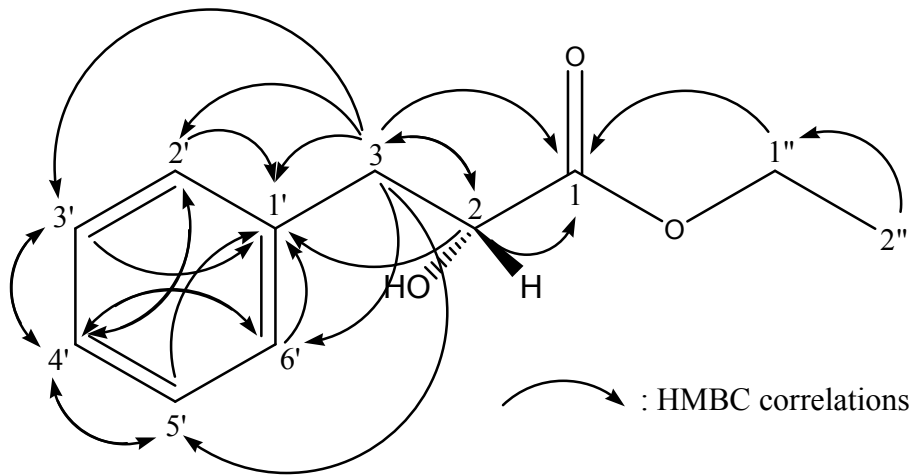


그림 II-17. 화합물 24의 구조식 및 HMBC 상관관계.

나. 단리·구조결정된 화합물

1) HL-5 획분으로부터 HPLC를 이용한 화합물 26(HL-7-10)의 단리

n-Hexane 획분을 HPLC에 의해 분취한 후 얻어진 HL-7 획분(7.3 mg)을 더욱 정제하기 위하여 YMC-Pack SIL column (6.0 × 150 mm, YMC, Japan)을 이용하여 2.0 ml/min (Medel P580 pump, DIONEX, Germany)의 유속과 215 nm (UVD170S, DIONEX, Germany), 그리고 *n*-hexane/*iso*-propanol/EtOH (499:0.5:0.5, v/v) 용매계를 이용하여 HPLC (그림 II-18)를 행하여, t_R 58.36분에 용출된 화합물(화합물 26, 0.5 mg)을 단리하였다.

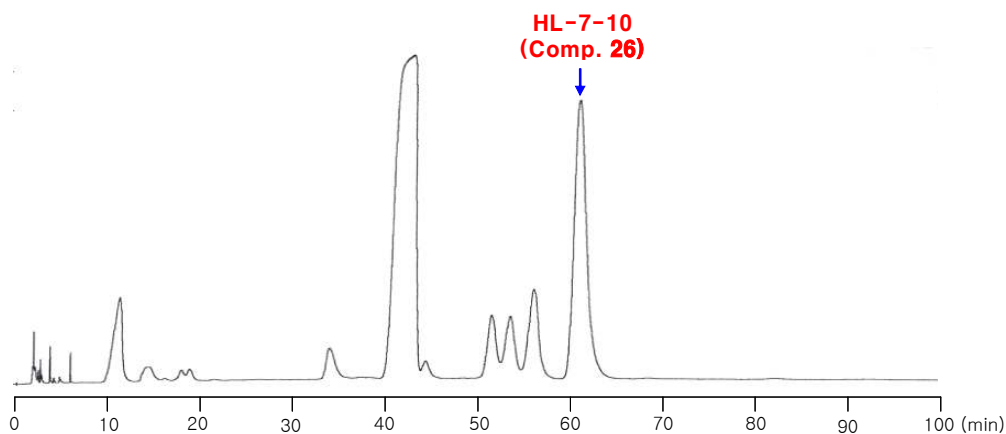


그림. II-18. HL-7 획분의 HPLC chromatogram.

Column: YMC-Pack SIL column (6.0 × 150 mm).

Flow rate: 2.0 mL/min.

Detection: 215 nm.

Mobile phase: *n*-hexane/*iso*-propanol/EtOH (499:0.5:0.5, v/v).

2) 화합물 26의 구조결정

화합물 26의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (그림 II-19, 표 II-10)으로부터 12H의 proton signal들이 관찰되었다. 4종의 sp^2 carbon proton signals [δ 7.14 (1H, br. t, $J = 8.0$ Hz), 7.21 (1H, br. t, $J = 8.0$ Hz), 7.37(1H, br. d, $J = 8.0$ Hz), 7.63 (1H, br. d $J = 8.0$ Hz)]가 관찰되었던 것으로부터 2치환체 벤젠환의 부분구조가 존재하는 것으로 추측되었다. 또 δ 3.77 (2H, s,)의 sp^3 carbon proton signals로부터 AB type의 고립된 methylene group의 존재가 시사되었고, 4.17 (2H, q)와 δ 1.26 (3H, t, $J = 7.5$ Hz)으로부터 ethanol group의 부분구조의 존재를 확인할 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (그림 II-19, 표 II-10) 상에서 carboxylic carbon 유래로 판단되는 signal (δ 171.98)이 관찰되었다.

그리고 HMBC spectrum 상에서 그림 II-20에 나타낸 바와 같은 cross peak 들의 검출을 통해 각 부분구조의 연결 관계를 확인하였다. gCOSY, gHSQC 및 gHMBC 분석을 행하여 proton과 carbon들 간의 보다 정확한 연결성을 확인되어 화합물 26은 (*Z*)-ethyl-4-amino-3-(2-hydroxyphenyl)but-3-enoate로 구조결정 하였다.

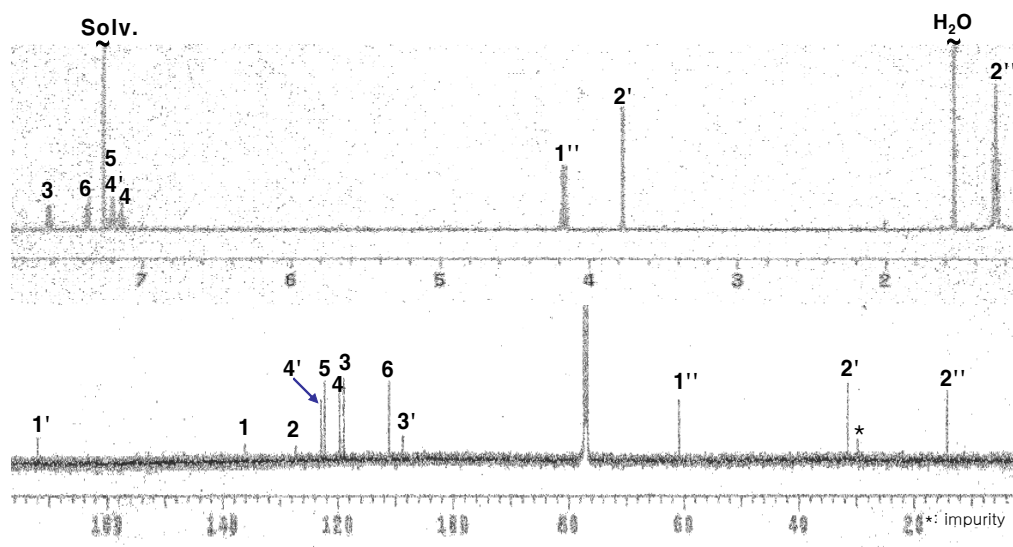


그림 II-19. 화합물 26의 $^1\text{H-NMR}$ (상) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (하) spectra.

표 II-10. 화합물 26의 ^1H - (500 MHz) 및 ^{13}C - (125 MHz) NMR data (CDCl_3)

Carbon	δ_{H} (<i>rel. int.</i> , <i>multi</i> , <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	136.09
2	-	127.28
3	7.63 (1H, br.d, 8.0)	118.95
4	7.14 (1H, br.t, 8.0, 8.0)	119.66
5	7.21 (1H, br.t, 8.0, 8.0)	122.21
6	7.37 (1H, br.d, 8.0)	111.10
3'	-	108.75
4'	7.20 (1H, s)	122.92
2'	3.77 (2H, s)	31.42
1'	-	171.98
1''	4.17 (2H, q)	60.74
2''	1.26 (3H, t, 7.5)	14.24

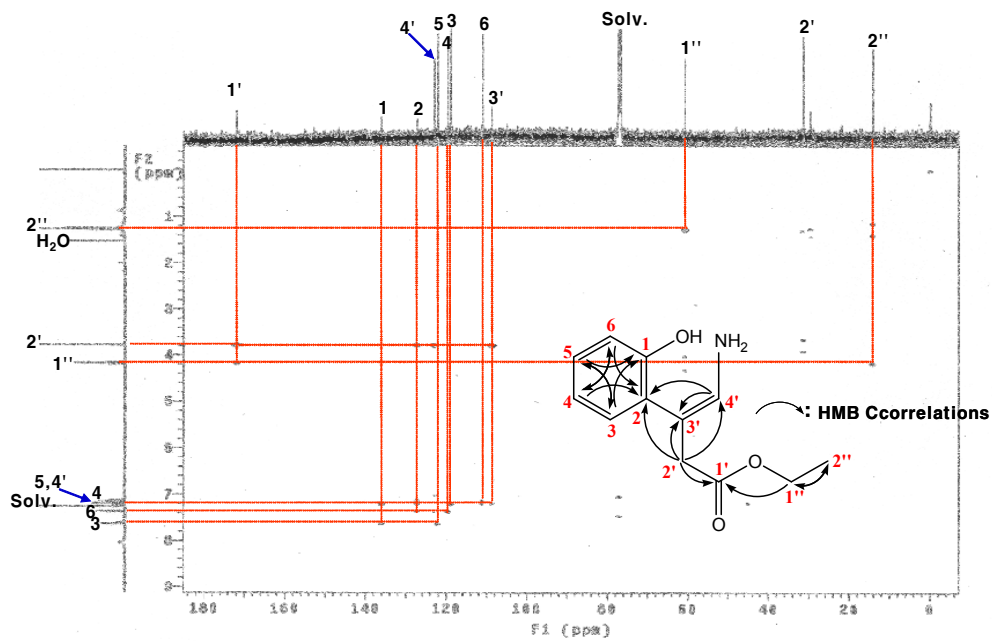


그림 II-20. 화합물 26의 HMBC spectrum과 구조식 및 상관관계.

이상 3차년도에 결정된 화합물들의 구조식 및 구조결정 과정 중에 있는 추정 구조식들을 그림 II-21에 정리하였다.

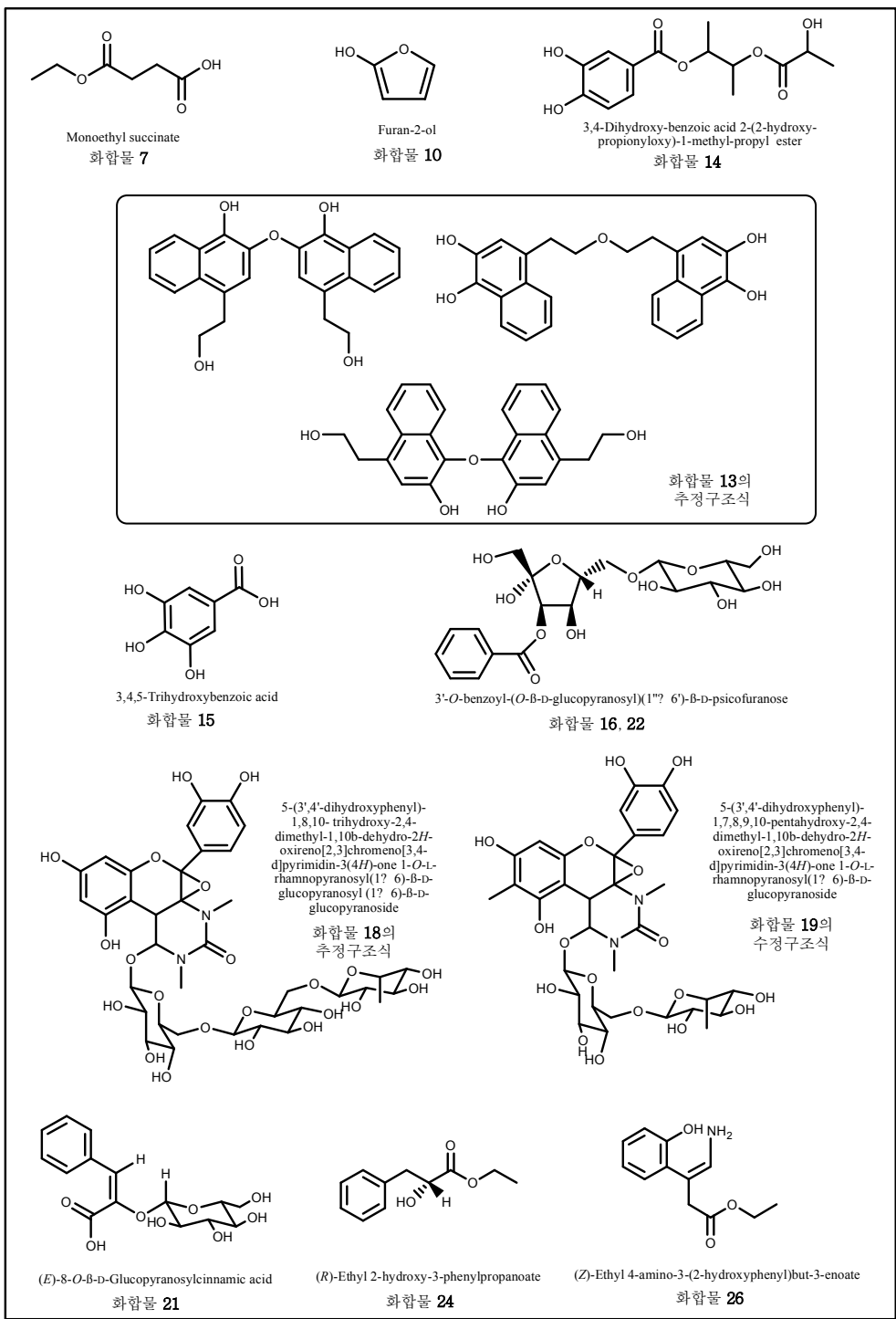


그림 II-21. 3차년도에 결정된 화합물들의 구조식 및 추정구조식(13, 18, 19).

다. 복분자와 복분자 와인의 Chemical Profile 작성 · 비교

1) 배 경

- 가) 복분자 와인은 원재료 복분자 열매를 발효 · 숙성시켜 제조한다.
- 나) 그래서 제조과정 중 원재료 복분자에 함유되어 있던 성분들이 변화되었을 가능성이 매우 높다.
- 다) 이러한 성분변화의 가능성 검토는 발효식품의 기능성 해명 차원에서 매우 중요하며,
- 라) 발효식품 및 발효음료나 주류의 생리활성 평가 측면에 있어 대단히 중요한 자료를 제공할 것이다.
- 마) 또 함유성분들 또는 특정 성분의 발효에 따른 변화 경향은 대상 식품의 품질평가 지표 또는 품질관리를 위한 유용한 수단으로 적용이 가능하다.

2) 목 적

- 가) 1, 2차년도의 복분자 와인 중에 함유된 다양한 성분 구명에 관한 내용을 바탕으로
- 나) 원재료 복분자와 복분자 와인의 존재 성분의 차이를 비교하기 위해
- 다) 용매의 극성차에 의한 용매분획법, 해리성에 의한 분획법, 고상추출법 등을 적용함으로써
- 라) HPLC 및 GC를 이용한 분석법을 확립하여
- 마) 발효에 따른 성분변화의 추이를 관찰함과 동시에
- 바) 특정 성분을 복분자 와인의 품질평가 및 품질관리의 지표로 삼고자 함.

3) 재 료

본 실험에 사용한 시료는 원재료 복분자, 발효중간, 발효끝, 숙성시작, 숙성 1차중간, 숙성끝, 숙성종료후 씨앗분리전, 씨앗분리후, 원심분리후, 2차숙성 15일, 2차숙성 30일, 그리고 2차숙성 45일 후의 복분자를 이용하였으며, 복분자와인 7L에는 복분자 10 kg에 상당하는 양이 함유되어있는 용액을 매 단계의 분석에서 이용하였다.

4) 방법, 결과 및 고찰

가) HPLC 분석을 이용한 원재료 복분자와 복분자 와인의 제조과정 중 성분변화 검토

(1) 방법

원재료 복분자는 homogenizer (BM-2 Nissel bio-mixer, Nihonseiki Kaiseiki Ltd., Japan)를 이용하여 마쇄한 다음, filter (No. 2, Whatman)로 여과하여 여액과 잔사를 분리하여 얻어진 잔사에 EtOH을 가하여 다시 추출·여과하여 EtOH 100 mL에 원재료 복분자 100 g 상당량이 함유되도록 조제하였다. 조제된 원재료 복분자 원액 (복분자 10 mg eq./10 μ l), 2차 숙성 45일 후의 복분자 (복분자 10 mg eq./EtOH 10 μ l), 그리고 복분자 와인 (복분자 10 mg eq./H₂O 10 μ l)을 각각 아래와 같은 조건하에서 HPLC 분석을 행하였다.

-HPLC conditions-

Chromatography: DIONEX (ASI-100 automated sample injector)

Column: ODS column (4.6 \times 250 mm, Tsk-gel, ODS-80Ts, Tosoh Co., Japan)

Flow rate: 1 mL/min

Detection: 254, 280 nm (UVD170S, DIONEX)

Mobile phase

	A (10% MeOH, containing 2% AcOH)	B (100% MeOH)
0	100	0
5	100	0
35	30	70
40	0	100
50	0	100

(2) 결과 및 고찰

원재료 복분자, 2차숙성 45일 후의 복분자 와인, 숙성이 완료된 복분자 와인의 3종 시료를 대상으로 각 시료에 함유된 화합물들의 존재경향을 비교하기 위해 넓은 극성 범위의 용출용액을 이용하여 HPLC 분석을 행하였다.

그림 III-1은 254 nm에서, 그리고 그림 III-2는 280 nm에서 검출한 data이다. 그들의 chromatogram에서 알 수 있듯이 254 nm에서 보다 감도가 높게 검출되는 경향이 관찰되었다. 그래서 각 시료에 함유되어 있는 화합물들은 페놀성 성분이 주종을 이루고 있을 가능성이 시사되었다.

보다 감도가 좋은 254 nm에서의 data(그림 III-1)를 기준으로 세 시료간의 페틴을 비교하면, t_R 30~40 min 사이의 원재료 복분자에서 보이던 peak들이 발효와 숙성을 거치는 동안 현저히 감소되어짐을 알 수 있었다. 반면에 t_R 9~18 min 사이에서 원재료 복분자에서는 보이지 않았던 peak들이 2차숙성 45일후와 복분자 와인에서 관찰되었다. 이는 발효 및 숙성을 거치는 동안 극성의 페놀성 화합물들의 함량이 증가할 가능성을 시사하는 결과라 판단되었다.

그러나 본 방법으로는 분리능이 낮아 각 시료에 함유되어 있는 성분들을 정확히 동정하기 어렵다고 판단되었다. 이것은 아무런 분획이나 정제과정을 거치지 않아 다양하게 존재해 있는 혼합물들에 의한 영향 때문일 것으로 생각되었다. 그래서 보다 분리능이 향상된 분석조건을 검토하기 위해 각 시료를 극성이 다른 유기용매와 용매분획을 행한 후 얻어진 각 획분들을 분석에 이용하기로 하였다.

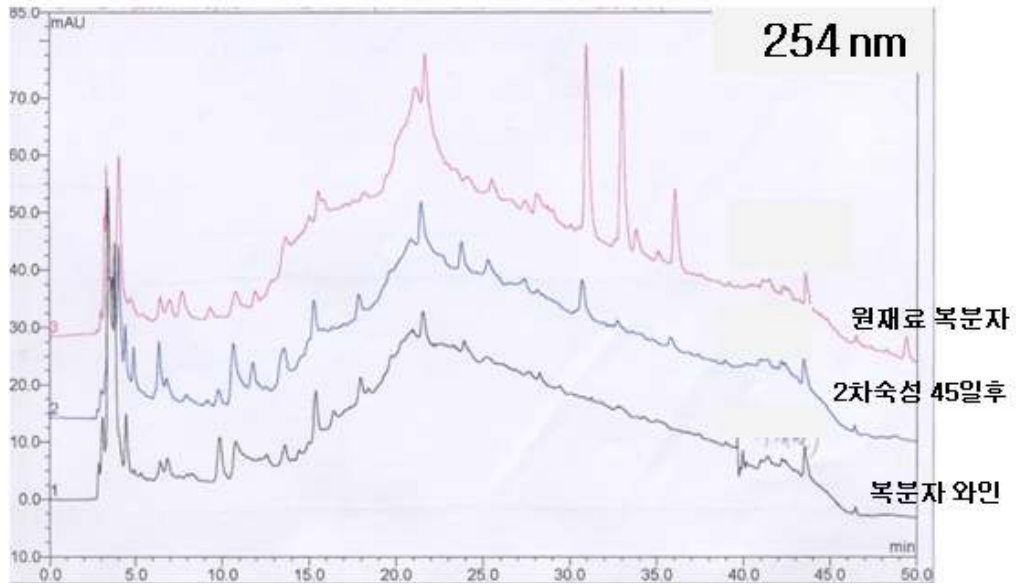


그림 III-1. 원재료 복분자, 2차숙성 45일후, 복분자 와인의 HPLC (254 nm) 결과.

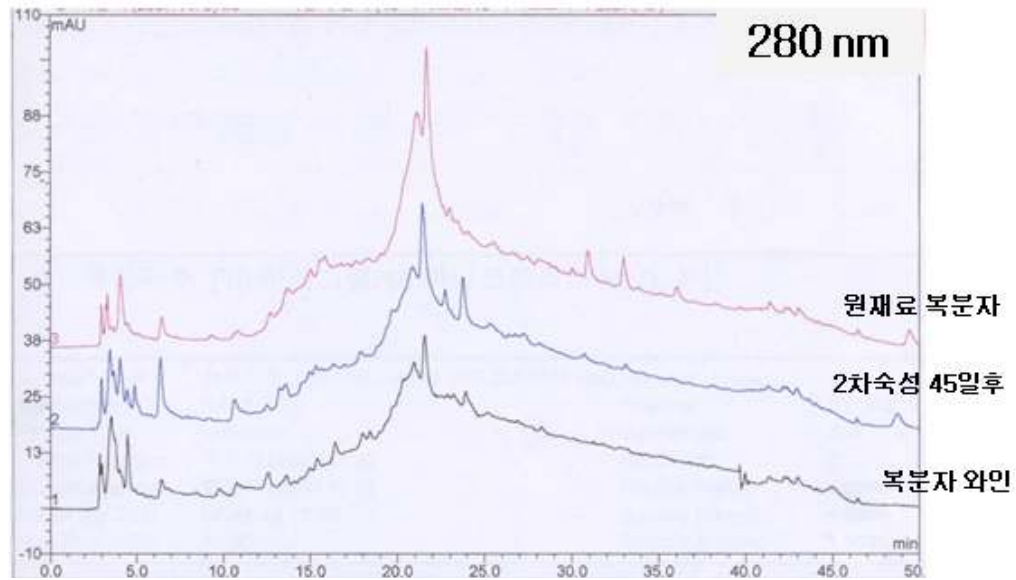


그림 III-2. 원재료 복분자, 2차숙성 45일후, 복분자 와인의 HPLC (280 nm) 결과.

나) 복분자와 복분자 와인의 극성에 따른 용매분획물의 HPLC 분리 경향 검토

대상 시료의 HPLC 상에서의 함유성분들의 거동을 검토하는데 있어 보다 좋은 분리능을 확보하기 위해 극성이 다른 유기용매를 순차적으로 이용하여 분획된 시료들을 분석에 이용하였다.

(1) 방법

원재료 복분자 (3 g) 추출물과 복분자 와인 (원재료 복분자 3 g eq.) 각각에 H₂O을 첨가하여 3 mL로 정용한 후, *n*-hexane, EtOAc, 그리고 수포화 *n*-BuOH 각각 4 mL씩으로 3회 반복하여 순차적으로 용매분획하였다 (그림 III-3, 4). 그리고 용매분획하여 얻어진 각 획분 중 EtOAc층과 BuOH층 각각을 동일 상당량(원재료 복분자 10 mg eq.)이 되도록 조제한 후 아래의 조건을 이용하여 HPLC 분석을 행하였다.

-HPLC conditions-

Chromatography: DIONEX (ASI-100 automated sample injector)

Column: ODS column (4.6 × 250 mm, Tsk-gel, ODS-80Ts, Tosoh Co., Japan)

Flow rate: 1 mL/min

Detection: 254 nm (UVD170S, DIONEX)

Mobile phase

	A (10% MeOH, added 2% AcOH)	B (100% MeOH)
0	100	0
5	100	0
35	30	70
40	0	100
50	0	100

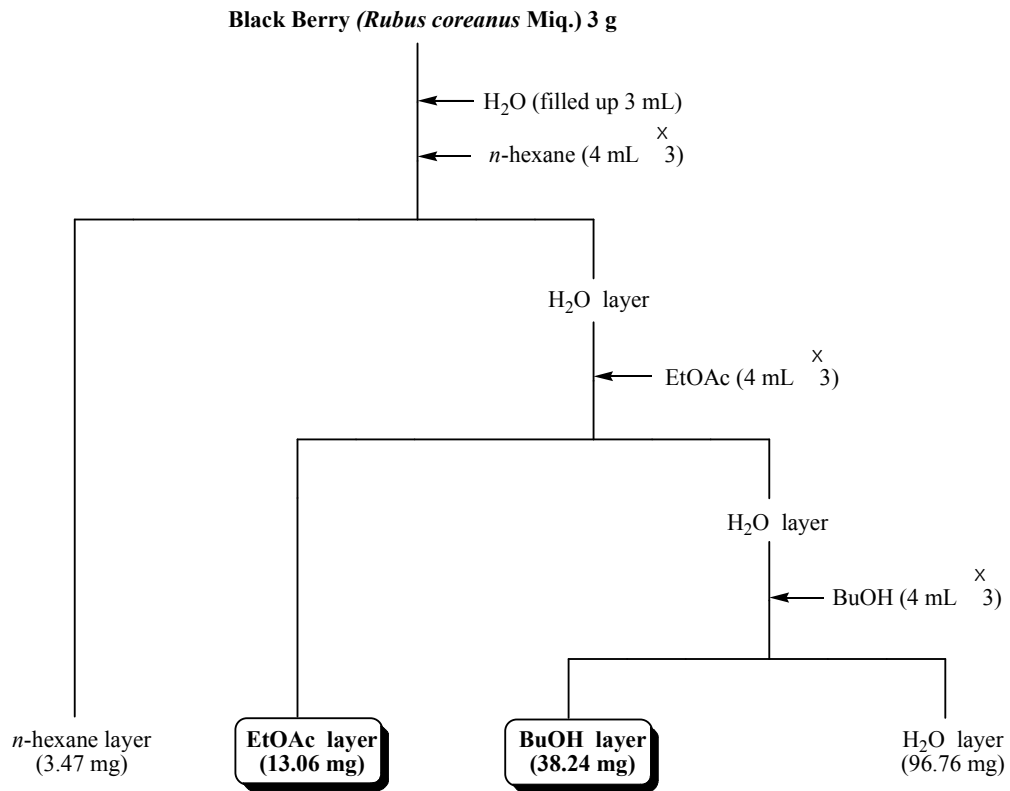


그림 III-3. 원재료 복분자의 용매분획 flow chart.

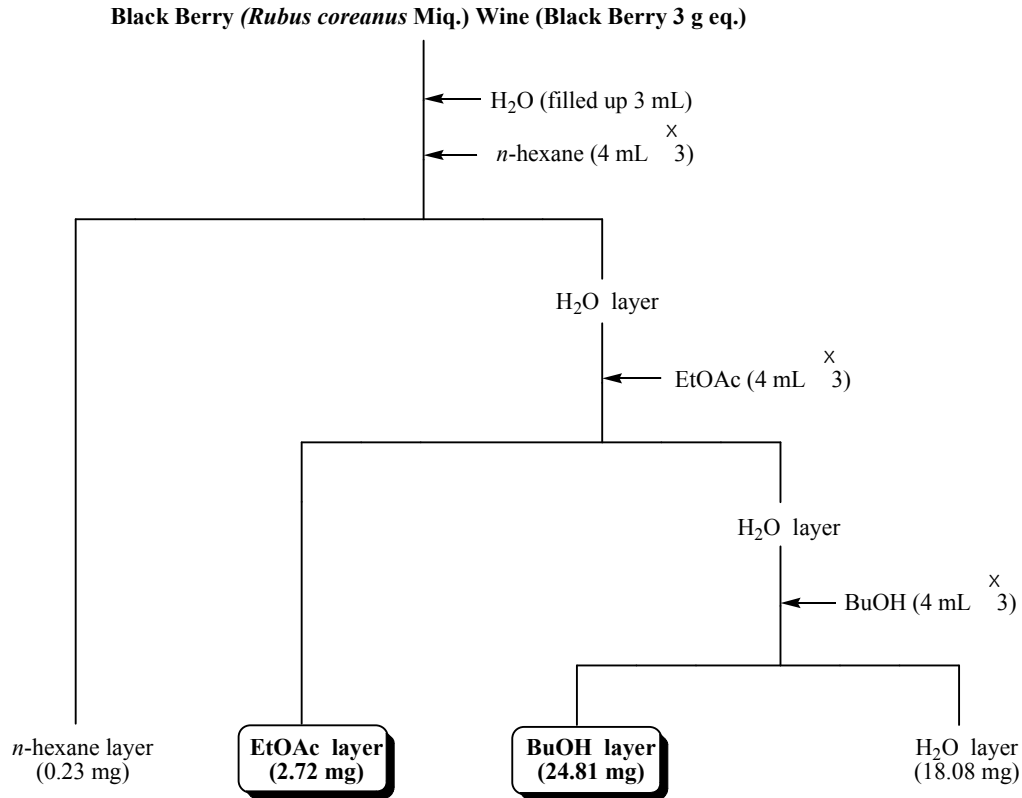


그림 III-4. 복분자 와인의 용매분획 flow chart.

(2) 결과 및 고찰

원재료 복분자 추출물(그림 III-5의 상), 복분자 추출물의 용매분획 후 EtOAc층(그림 III-5의 중) 및 BuOH층(그림 III-5의 하)을 HPLC 분석한 결과, 용매분획에 의해 t_R 32 min을 기준으로 화합물이 분리된 경향을 보였다. 즉 EtOAc층은 t_R 32 min 이후의 비극성 부분에서, 그리고 BuOH층은 t_R 32 min 이전의 극성 부분에서 화합물들이 용출되는 경향을 보였다. 그러나 t_R 18~22 min 경에 용출되는 화합물 군의 분석 및 t_R 19 min 전과 t_R 40 min 이후에서 용출된 화합물들의 분석을 위해에서 각각 다른 조건의 분석 용매 및 gradient 조건의 검토가 필요하다고 판단되었다. 특히 본 방법에 의해 t_R

18~22 min 사이의 peak가 분리되기를 기대하였으나 상기 1의 그림 III-1 및 2와 마찬가지로 용매분획 방법으로도 그 분리능은 좋아지지 않았다. 그리고 동일한 방법을 복분자 와인에 적용하였을 때(그림 III-6), HPLC 상에서의 분리능은 더욱 바람직하지 못한 패턴을 보였다.

이에 본 방법 또한 복분자 와인의 일괄적인 성분분석에는 적합하지 못하다고 판단되어 원재료 복분자와 복분자 와인을 해리성을 이용한 용매분획을 통하여 HPLC 분석에 있어 그 분리능을 향상시키고자 하였다.

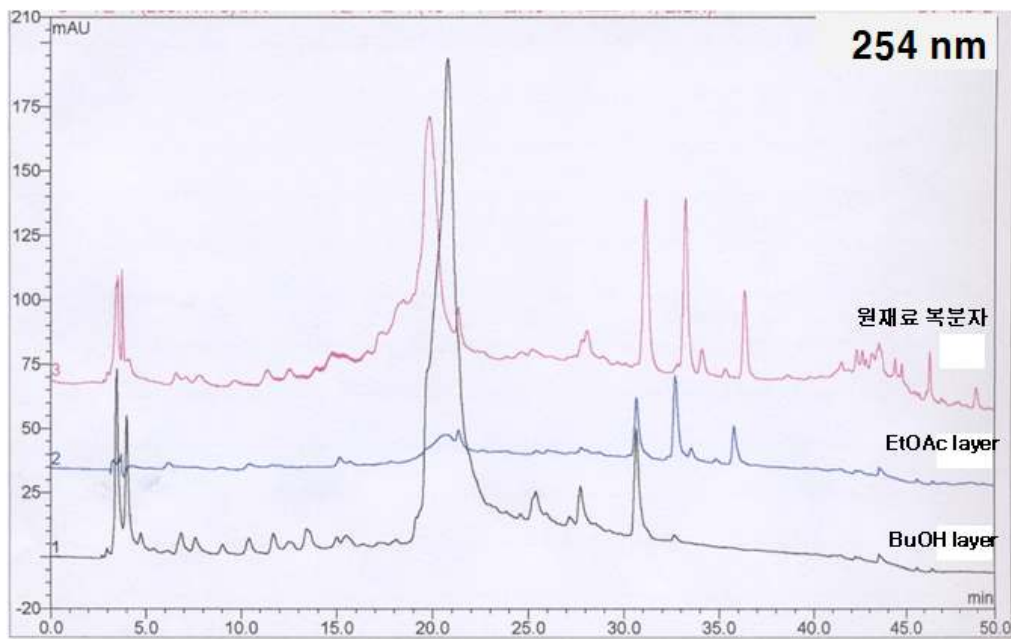


그림 III-5. 원재료 복분자 추출물(상), 복분자 추출물의 용매분획 후 EtOAc층(중), BuOH층(하)의 HPLC 분석 결과.

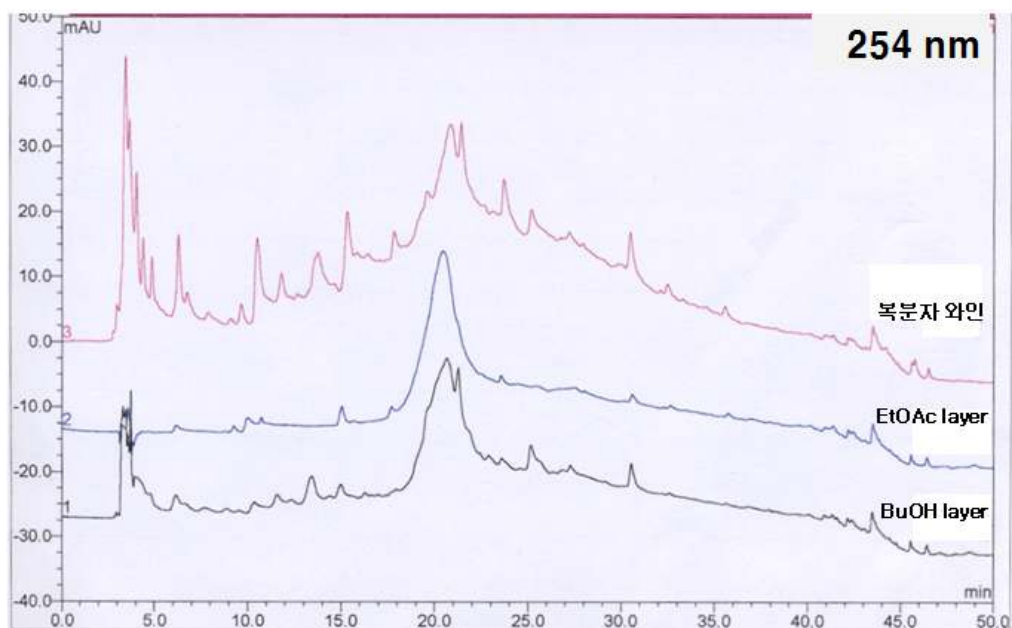


그림 III-6. 용매분획 전의 복분자 와인(상)과 용매분획한 복분자 와인의 EtOAc층(중), BuOH층(하)의 HPLC 분석 결과.

다) 해리성을 이용한 원재료 복분자와 복분자 와인의 용매분획 및 그 획분들의 HPLC 상에서의 분리능 검토

(1) 방법

원재료 복분자(3 g) 추출물과 복분자 와인 (원재료 복분자 3 g eq.) 각각을 그림 III-7에 나타낸 바와 같은 방법에 의해 해리성의 차이를 이용하여 용매분획을 행하였다. 먼저 원재료 복분자 추출물과 ethanol을 제거한 복분자 와인 각각을 EtOAc (10 mL×2)와 buffer 용액 (0.2 M glycine-0.2 M HCl, pH 3.0, 10 mL×2)을 이용하여 수용액 획분과 EtOAc획분으로 분획하였다. EtOAc획분을 buffer 용액(0.2 M Na₂HPO₄-0.2 M NaH₂PO₄, pH 8.0, 10mL×2)으로 재분배하여 EtOAc 중성, 페놀성획분, 그리고 수용액 획분으로 분획하였다. 수용액 획분은 1.0 N HCl을 이용하여 pH 3.0으로 조절한 후

EtOAc (10 mL×2)로 분배하여 EtOAc 산성획분을 얻었으며, 이어 EtOAc 중성, 페놀성획분은 buffer 용액(0.2 M KCl-0.2M NaOH, pH 12.0, 10 mL×2)으로 분배하여 EtOAc 중성획분과 수용액획분으로 분획하였다. 이 수용액획분을 다시 1.0 N HCl을 이용하여 pH 6.0으로 조절한 후 EtOAc (10 mL×2)로 분배하여 EtOAc 페놀성획분을 얻었다 (그림 III-7). 이렇게 얻어진 각 획분들을 동일 상당량(원재료 복분자 10 mg eq.)이 되도록 조제한 후 아래의 조건을 이용하여 분석하였다.

-HPLC conditions-

Chromatography: DIONEX (ASI-100 automated sample injector)

Column: ODS column (4.6 × 250 mm, Tsk-gel, ODS-80Ts, Tosoh Co., Japan)

Flow rate: 1 mL/min

Detection: 280 nm (UVD170S, DIONEX)

Mobile phase

	A (10% MeOH, added 2% AcOH)	B (100% MeOH)
0	100	0
5	100	0
35	30	70
40	0	100
50	0	100

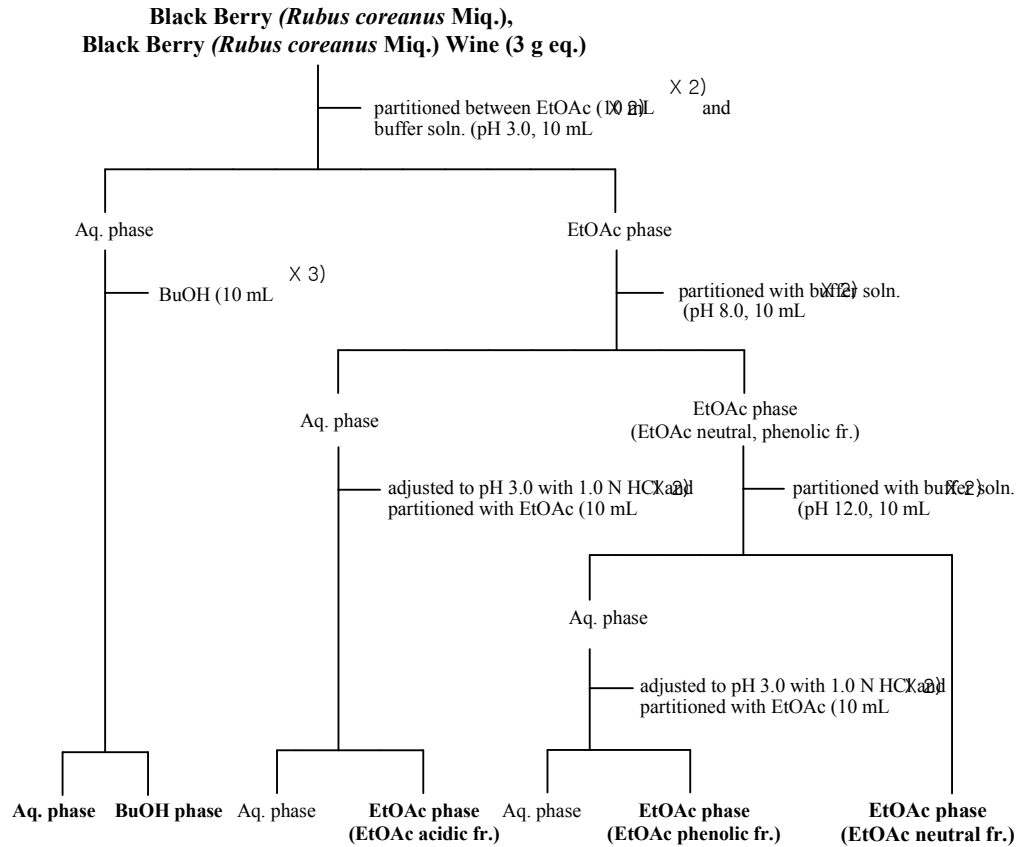


그림 III-7. 원재료 복분자 추출물과 복분자 와인의 해리성을 이용한 용매분획.

(2) 결과 및 고찰

그림 III-8과 9의 결과로부터 알 수 있듯이 원재료 복분자와, 복분자 와인 각각은 수용성 획분, BuOH 획분, EtOAc acidic 획분, EtOAc 페놀성획분, 그리고 EtOAc 중성획분 모두에서 뚜렷한 차이는 보이지 않았으며, 특히 분리하고자 하였던 t_R 18~22 min의 큰 peak는 상기의 다른 방법들과 마찬가지로 여전히 분리가 이루어지지 않았음을 알 수 있었다.

그래서 t_R 18~22 min 사이의 peak를 보다 선명하게 분리하고자 이동상의 조건을 바꾸어 분리능을 향상시키는 방법을 검토하였다.

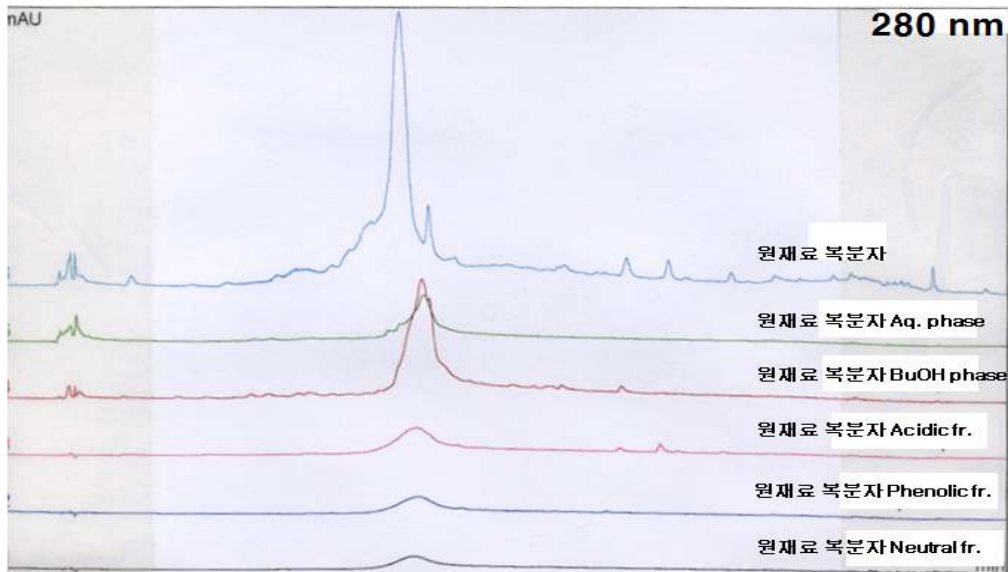


그림 III-8. 원재료 복분자 추출물의 해리성을 이용한 용매분획 후 각 획분들의 HPLC 분석 결과.

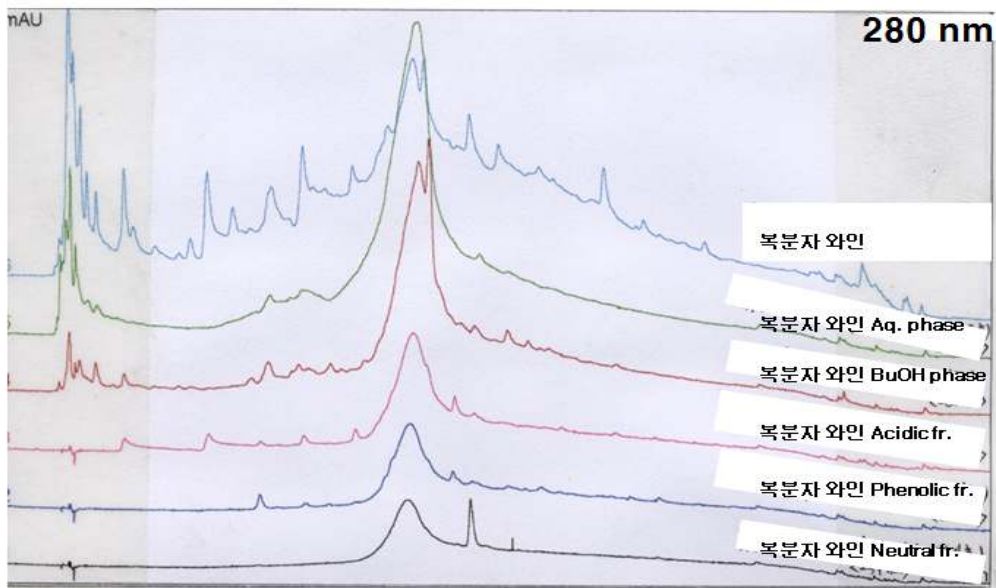


그림 III-9. 복분자 와인의 수용액에서의 해리성을 이용한 용매분획 후 각 획분들의 HPLC 결과.

라) 원재료 복분자 성분의 HPLC 분석을 위한 분리능 검토: 이동상의 용매조성 변화

상기 가)~다)의 방법에 의해 원재료 복분자와 복분자 와인 성분들의 동시 분석에 적합한 분리능이 확보되지 않았으며, 특히 t_R 18~22 min의 peak 분리에 적합한 방법이 얻어지지 않아 우선 원재료 복분자 추출만을 이용하여 이동상 조건을 바꿈으로써 보다 양호한 분석 조건을 검토하고자 하였다.

(1) 방법

원재료 복분자(10 mg)는 상기 가)~다)와 모두 동일하게 조제하고, 이동상의 조건만 다음과 같이 바꾸었다. 그리고 파장은 254, 280, 365 및 535 nm로 4파장 동시검출법을 이용하였다.

-HPLC conditions-

Chromatography: DIONEX (ASI-100 automated sample injector)

Column: ODS column (4.6 × 250 mm, Tsk-gel, ODS-80Ts, Tosoh Co., Japan)

Flow rate: 1 mL/min

Detection: 254, 280, 365, 535 nm (UVD170S, DIONEX)

Mobile phase

	A (3% MeCN, added 2% AcOH)	B (50% MeCN)	C (100% MeCN)
0	100	0	0
5	100	0	0
40	0	100	0
50	0	0	100
60	0	0	100

(2) 결과 및 고찰

그림 III-10에 나타낸 바와 같이 용매조성을 바꾸어 분석을 행한 결과, 다른 조건에 비해 전반적으로 분리능이 향상되었다. 특히 254 nm에 있어서의 분리 경향은 지금까지의 다른 조건에 비해 매우 개선된 경향을 보였으며, t_R 18~22 min 사이의 peak들 또한 상기의 분석방법으로는 분리가 잘 이루어지지 않았으나 본 실험의 결과에서는 어느 정도 분리가 이루어졌음을 확인하였다.

보다 훌륭한 용매조건을 확보하기 위해 보고서에 제시한 분석조건 이외에도 10여 가지의 다른 용매조건 하에서 분리능 검토를 행하였으나 그림 III-10의 용매조건에서 얻어진 결과보다 양호한 분석조건을 확보할 수 없었다. 그래서 보다 상세한 분석조건을 확립을 위해 그림 III-10의 분석조건을 이용하여 고상추출에 의한 간이 정제법을 검토하기로 하였다.

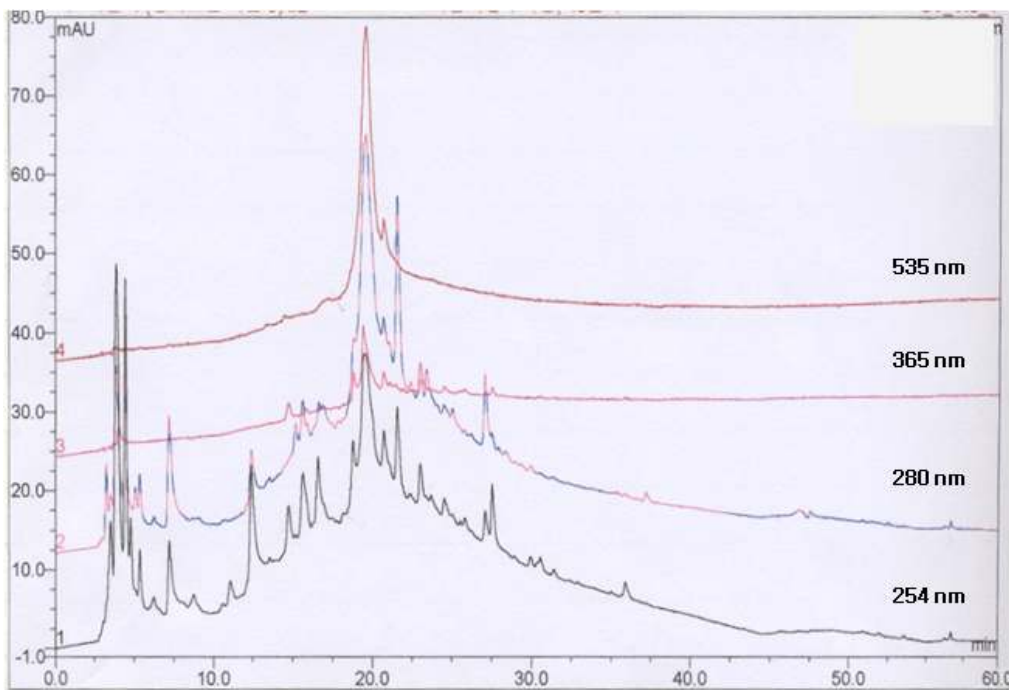


그림 III-10. 용매조건을 달리하여 분석한 원재료 복분자의 HPLC 분석 결과.

마) 원재료 복분자와 복분자 와인의 고상추출에 의한 분리능 검토

(1) 방법

MeOH 10 mL를 용출시킨 후, pH 2.65 [by trifluoroacetic acid (TFA)] 수용액 10 mL를 미리 용출시켜 둔 고상추출장치(Varian, 1 g)에 복분자 와인(복분자 250 mg eq.) 농축물을 pH 2.65 수용액 1 mL에 용해시켜 charge한 다음, ODS 고상추출장치를 H₂O (pH 2.65 by TFA), 10% MeOH (pH 2.65 by TFA), 20% MeOH (pH 2.65 by TFA), 30% MeOH (pH 2.65 by TFA), 40% MeOH (pH 2.65 by TFA), 50% MeOH, 100% MeOH, 그리고 acetone 으로 순차적으로 10 mL씩 용출하였다(그림 III-11). 용출한 각 획분들을 아래의 조건들을 이용하여 HPLC 분석을 행하였다.

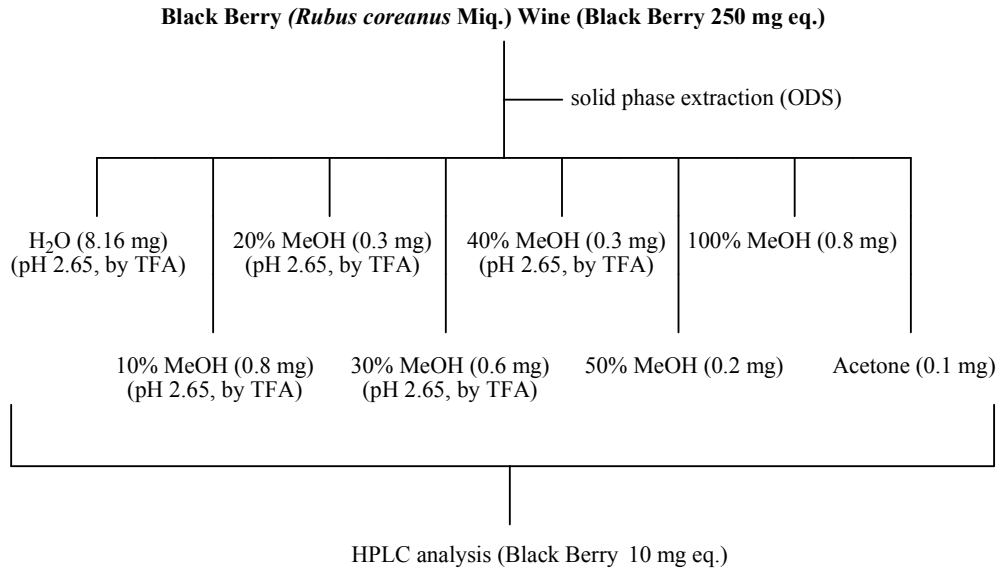


그림 III-11. 복분자 와인의 고상추출법에 의한 분획.

-HPLC conditions-

Chromatography: DIONEX (ASI-100 automated sample injector)

Column: ODS column (4.6 × 250 mm, Tsk-gel, ODS-80Ts, Tosoh Co., Japan)

Flow rate: 1 mL/min

Detection: 254 nm (UVD170S, DIONEX)

Mobile phase

	A (3% MeCN added 2% AcOH)	B(50% MeCN)	C(100% MeCN)
0	100	0	0
5	100	0	0
40	0	100	0
50	0	0	100
60	0	0	100

(2) 결과 및 고찰

복분자 와인의 고상추출 후 각 획분을 대상으로 HPLC 분석을 행한 결과, 그림 III-11에 나타낸 바와 같이 각 용출용매의 극성 정도에 따라 복분자 와인에 함유된 성분들이 어느 정도 분리되어졌음을 알 수 있었다. 그러나 t_R 18~22 min의 화합물들 대부분은 그리 좋지 못한 분리능과 함께 40% MeOH (pH 2.65 by TFA)에서 용출되었다. 그리고 그 외의 획분들 또한 기대와는 달리 고상추출 후에도 분리능이 개선되어지지 않았다.

지금까지 검토한 다양한 방법들의 결과를 종합해 보았을 때, 원재료 복분자 추출물과 복분자 와인에 함유된 성분들을 HPLC로 동일조건에서 손쉽게 높은 분리능을 유지시킨 채로 분석하기에는 보다 다양한 조건 검토가 필요하다고 판단되었다. 그리고 무엇보다도 훌륭한 분리능이 확보되지 않는 한, 다종의 화합물이 선행연구를 통해 단리·구조결정 되었다고 하더라도 HPLC 상에서 정확성이 확보된 동정을 수행한다는 것은 어렵다고 판단하였다.

그래서, 유도체화 등의 번거로운 조작이 요구되지만, 미량분석이 가능한 고감도 분석법으로써 물질들의 library가 구축된 GC-MS 분석을 통하여 복분자 및 복분자 와인에 함유되어 있는 성분들의 분석법을 검토하기로 하였다.

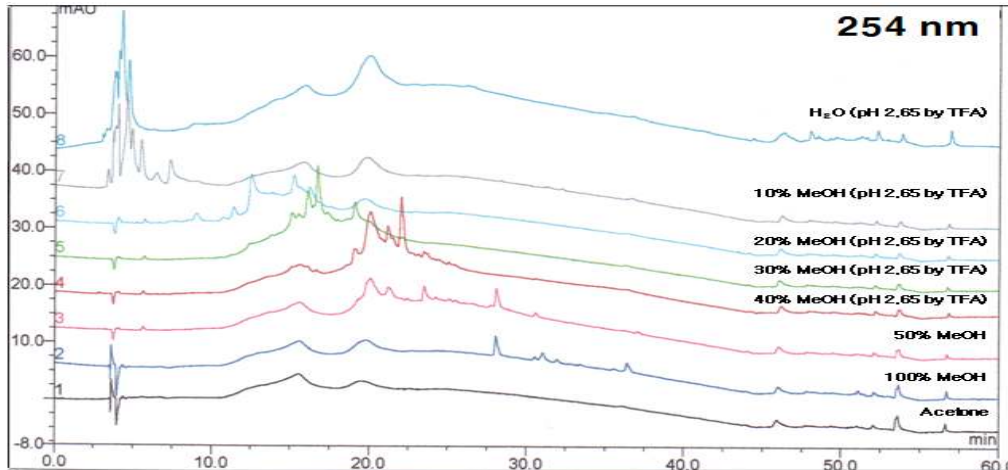


그림 III-11. 복분자 와인 고상추출 후 각 획분들의 HPLC 분석 결과.

바) 원재료 복분자와 복분자 와인 고상추출의 Grouping

(1) 방법

상기 마)에서 얻어진 고상추출물의 HPLC 패턴이 유사한 획분들(그림 III-11)을 grouping하였다. 즉 H₂O (pH 2.65 by TFA) 획분과 10% MeOH (pH 2.65 by TFA) 획분을 합하여 group 1, 20% MeOH (pH 2.65 by TFA) 획분과 30% MeOH (pH 2.65 by TFA) 획분을 합하여 group 2, 40% MeOH (pH 2.65 by TFA) 획분과 50% MeOH 획분을 합하여 group 3, 그리고 100% MeOH 획분과 acetone 획분을 합하여 group 4로 하여 총 4개의 group으로 grouping하였다.

원재료 복분자 역시 GC-MS 분석을 위하여 복분자 와인과 같은 방법으로 고상추출을 행하였으며, 얻어진 각 획분들을 동일한 방법으로 grouping을 행하였다. 즉 H₂O (pH 2.65 by TFA) 획분과 10% MeOH (pH 2.65 by TFA) 획분을 합하여 group 5, 20% MeOH (pH 2.65 by TFA) 획분과 30% MeOH (pH 2.65 by TFA) 획분을 합하여 group 6, 40% MeOH (pH 2.65 by TFA) 획분과 50% MeOH 획분을 합하여 group 7, 그리고 100% MeOH 획분과 acetone 획분을 합하여 group 8로 총 4개의 group으로 grouping하였다.

얻어진 총 8개의 group들을 대상으로 유도체화를 행한 후, GC-MS 분석을

통해 원재료 복분자와 복분자주에 함유된 성분들의 비교를 행하였다.

사) 고상추출 후 grouping 한 원재료 복분자와 복분자 와인의 GC-MS 분석

(1) 방법

고상 추출 후 얻어진 총 8 group의 획분들을 다음 방법에 의해 분석하였다. Group 1~8의 각 시료별 10 μ g (복분자 40 mg eq.)당 유도체화 시약 [무수 pyridin:*N,O*-bis (trimethylsilyl) acetamide:trimethylchlorosilane, 10:5:1, v/v] 20 μ l를 가하여 잘 혼합한 후, 50°C의 heating block에서 30분 동안 반응시켜 TMS화한 후 그 중 1 μ l를 아래의 조건하에서 GC-MS로 분석하였다.

GC 분석은 EI-MS (QP2010, SHIMADZU, Japan)에 GC (GC2010, SHIMADZU, Japan)가 연결된 기기로서, VB-1 capillary column (0.25 mm \times 60 mm, Valco instruments Co. Inc., USA)을 장착하였으며, ion source 온도는 200°C, ionizing voltage는 70eV, split ratio는 20, column oven의 온도는 60°C에서 분당 4°C씩 240°C까지 증가시킨 다음, 240°C를 10분간 유지하도록 하는 조건에서 분석하였다. 그 조건에 아래와 같다.

-GC-MS conditions-

Column: VB-1 0.25 \times 60 mm

Column oven temp.: 60°C

Injection mode: split

Carrier gas flow: 1 mL/min

Split ratio: 20

Oven temp, program

Rate	Temp. (°C)	Hold time (min)
-	60	0
4	240	10

(2) 결과 및 고찰

(Group 1 화합물 동정)

복분자 와인을 고상추출한 group 1을 TMS 유도체화하여 GC 분석을 행한 결과(그림 III-12), 유도체화 시약의 피크들(data 생략)을 제외하고 가장 현저하게 검출된 t_R 42.3 min 피크의 MS data를 대상으로 library 검색을 행하였다. 그 결과 t_R 42.3 min 피크의 MS data는 gallic acid의 library MS data와 일치하여 gallic acid가 복분자 와인의 group 1 획분에 주요 화합물임이 시사되었다.

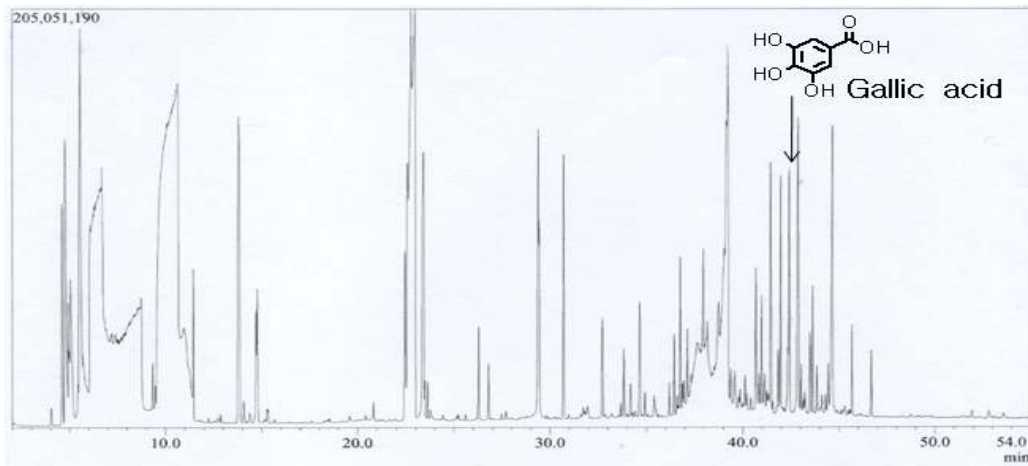


그림 III-12. 복분자 와인의 고상추출 후 group 1의 GC-MS 분석결과.

(Group 2 화합물 동정)

복분자 와인 고상추출물 group 2 역시 group 1과 마찬가지로 TMS 유도체화 후 GC-MS 분석을 행하였다. TIC 상에서 TMS 유도체화 시약 유래 이외 피크들(그림 III-13)의 MS data를 library data와 비교한 결과, 3-(ethoxycarbonyl)propanoic acid, 4-(2-hydroxyethyl)phenol, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 그리고 상기 group 1에서 검출되었던 gallic acid로 각각 동정되었다.

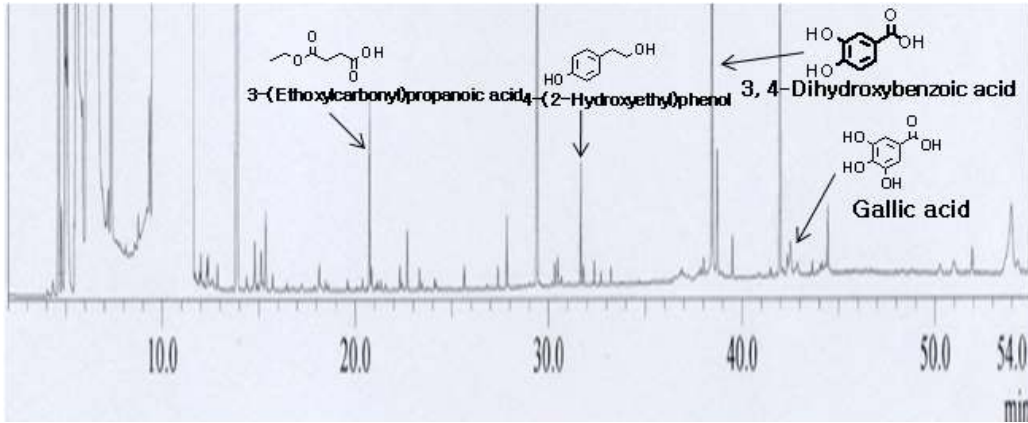


그림 III-13. 복분자 와인의 고상추출 후 group 2의 GC-MS 분석결과.

(Group 3 화합물 동정)

복분자 와인 고상추출물 group 3을 TMS 유도체화하여 GC 분석을 행하여 TIC 상에서 TMS 유도체화 시약 유래 이외 피크들(그림 III-14)의 MS data를 library data와 비교한 결과, t_R 41.74 min에서 검출된 피크의 MS data가 ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate의 library data와 일치하여 gallic acid에 ethanol이 ester 결합한 화합물이 그룹 3에 함유되어 있음을 알 수 있었다.

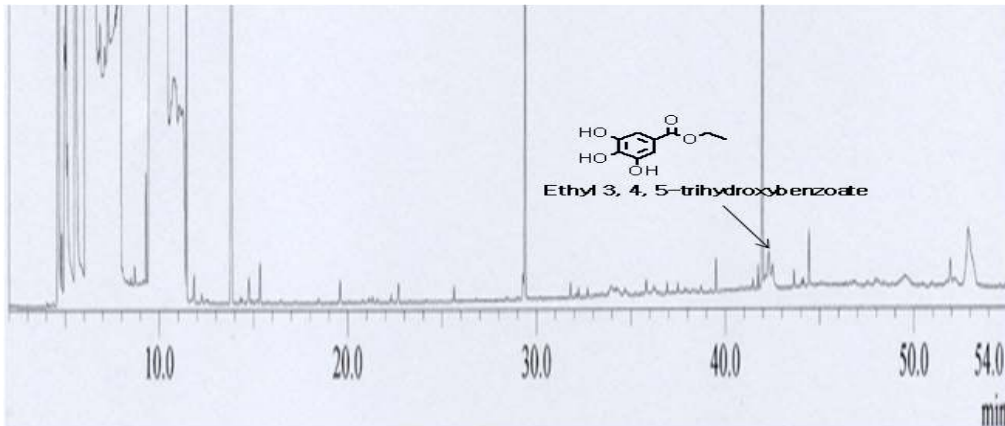


그림 III-14. 복분자 와인의 고상추출 후 group 3의 GC-MS 분석 결과.

(Group 4 화합물 동정)

복분자 와인 고상추출물 group 4를 TMS 유도체화하여 GC-MS 분석을 행한 후, 그 TIC 상에서 검출된 피크들을 대상으로 MS 상의 fragment ion들을 검토해 본 결과, TMS 유도체화 시약 유래 피크들 이외의 화합물이 검출되지 않았다 (그림 III-15).

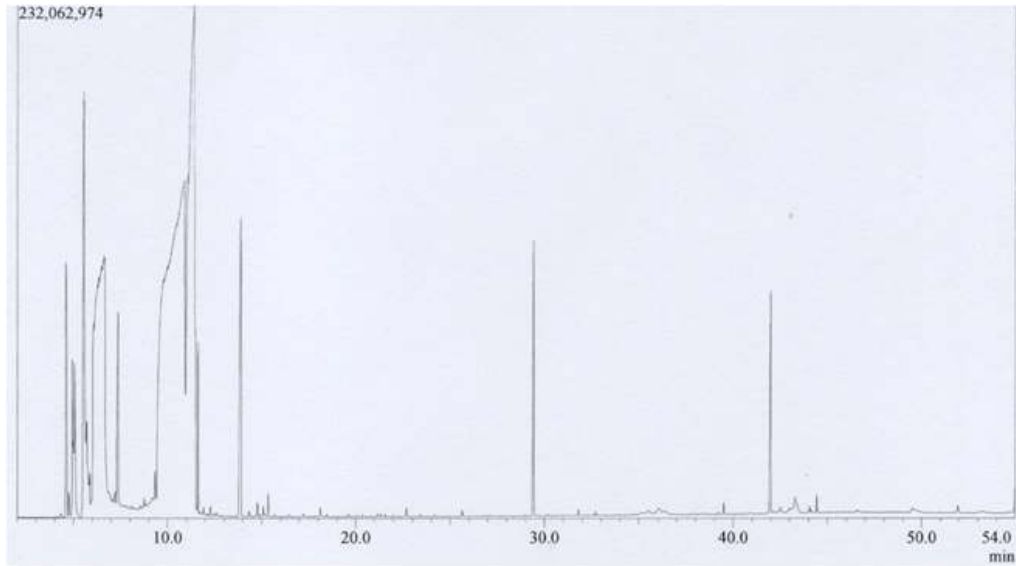


그림 III-15. 복분자 와인의 고상추출 후 group 4의 GC-MS 분석 결과.

(Group 5 화합물 동정)

원재료 복분자 고상추출물 group 5를 TMS 유도체화하여 GC 분석을 행한 결과(그림 III-16), 다종의 당 성분들이 검출되어지는 특징을 보인 반면, 그 외의 주목할 만한 화합물의 존재가 확인되지 않았다.

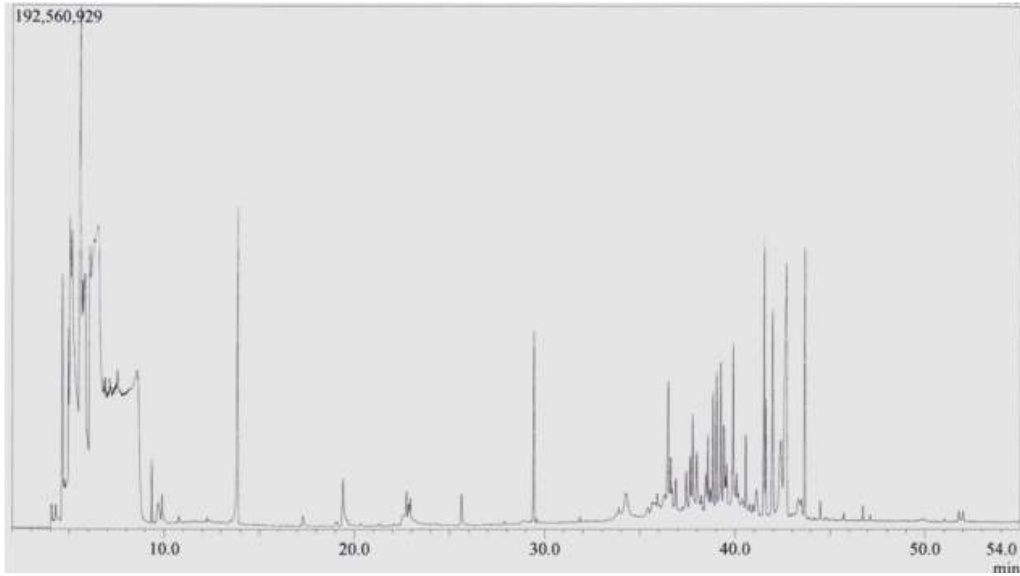


그림 III-16. 원재료 복분자의 고상추출 후 group 5의 GC-MS 분석 결과.

(Group 6 화합물 동정)

원재료 복분자 고상추출물 group 6을 TMS 유도체화하여 group 1~5와 동일한 방법으로 화합물들의 존재를 검토한 결과, 그림 III-17에 나타낸 바와 같이 benzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 그리고 복분자 와인에서 검출되었던 gallic acid가 원재료 복분자에서도 검출되었다.

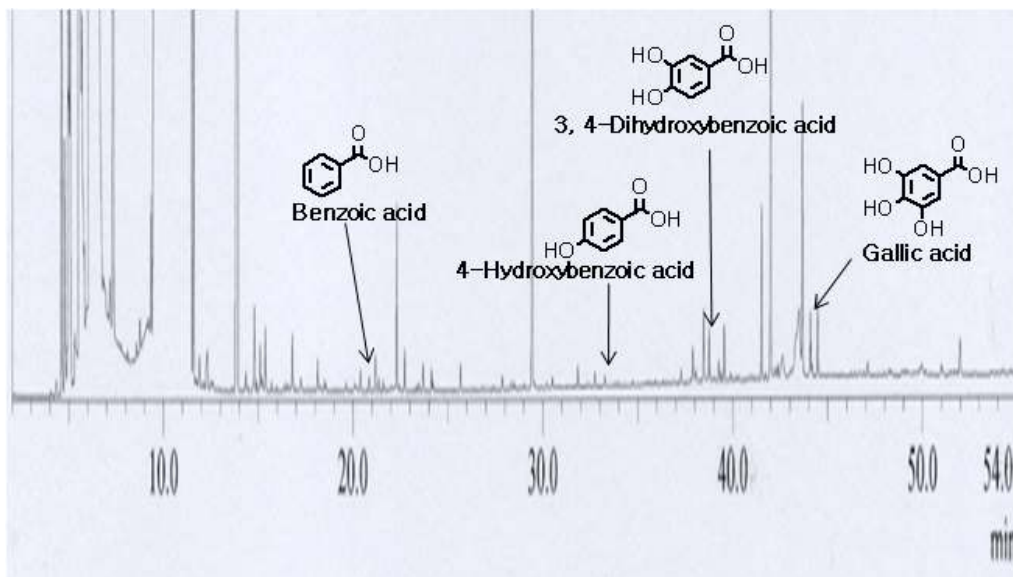


그림 III-17. 원재료 복분자의 고상추출 후 group 6의 GC-MS 분석결과.

(Group 7 화합물 동정)

원재료 복분자 고상추출물 group 7을 TMS 유도체화하여 group 1~6과 동일한 방법으로 함유 화합물들을 분석한 결과, 그림 III-18에 나타낸 바와 같이 상기 group 6에서 검출되었던 benzoic acid와 3,4-dihydroxybenzoic acid, 그리고 복분자 와인에서 검출되었던 gallic acid가 검출되었다.

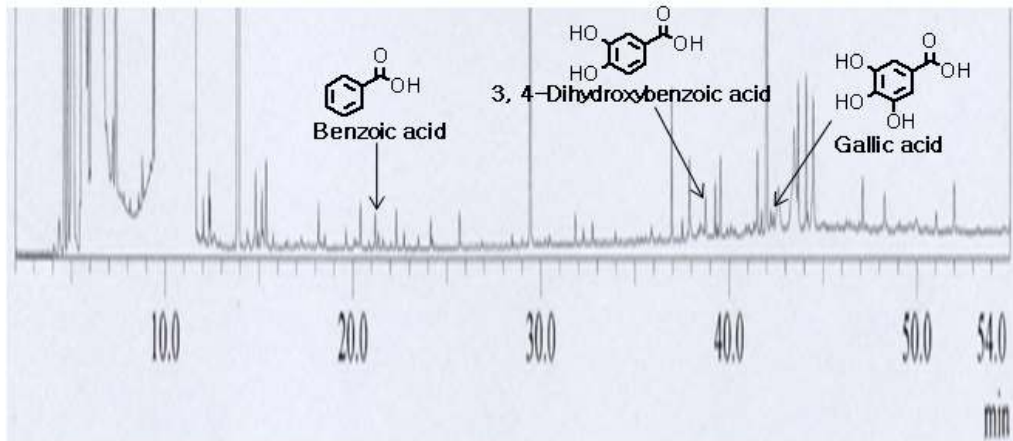


그림 III-18. 원재료 복분자의 고상추출 후 group 7의 GC-MS 분석결과.

(Group 8 화합물 동정)

원재료 복분자 고상추출물 group 8을 TMS 유도체화하여 상기와 동일한 GC-MS 분석을 행한 결과(그림 III-19), 수종의 미량 지방산들의 존재가 확인된 이외에 특징적인 화합물들의 존재는 침출되지 않았다. 이로써 원재료 복분자에 함유된 특징적인 화합물들은 20~50% MeOH 용출 범위에서 대부분 용출됨을 알 수 있었다.

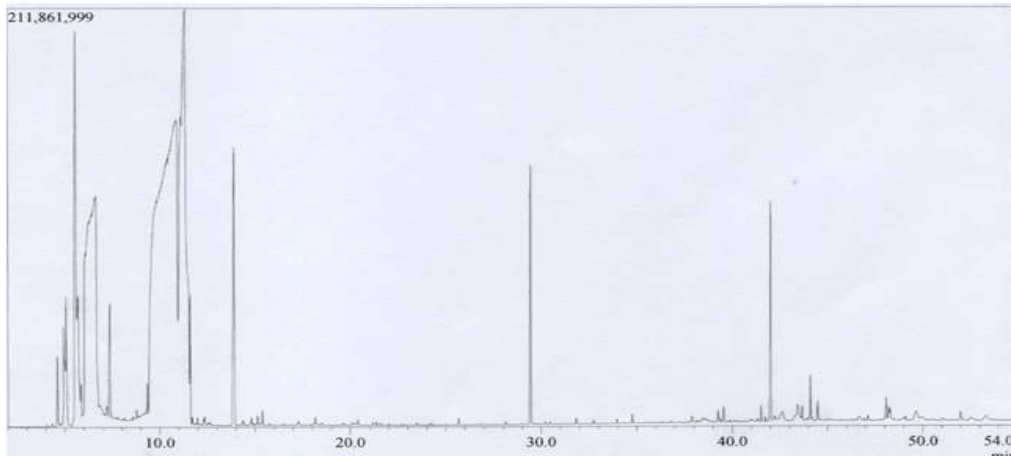


그림 III-19. 원재료 복분자의 고상추출 후 group 8의 GC-MS 분석 결과.

지금까지 GC-MS 분석을 통하여 복분자 와인에서는 gallic acid, 3-(ethoxycarbonyl)propanoic acid, 4-(2-hydroxyethyl)phenol, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 그리고 ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate가 검출되었으며, 원재료 복분자에서는 benzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 그리고 gallic acid가 검출되었다.

그리고 자세한 설명은 생략하였으나 1,2년차의 단리·구조결정에서 검출되지 않았던 화합물들 또한 본 GC-MS 분석을 통해 미량 화합물들이 다수 검출되었다. 그 화합물들을 위에서 설명한 화합물들과 함께 그림 III-20에 나타내었다.

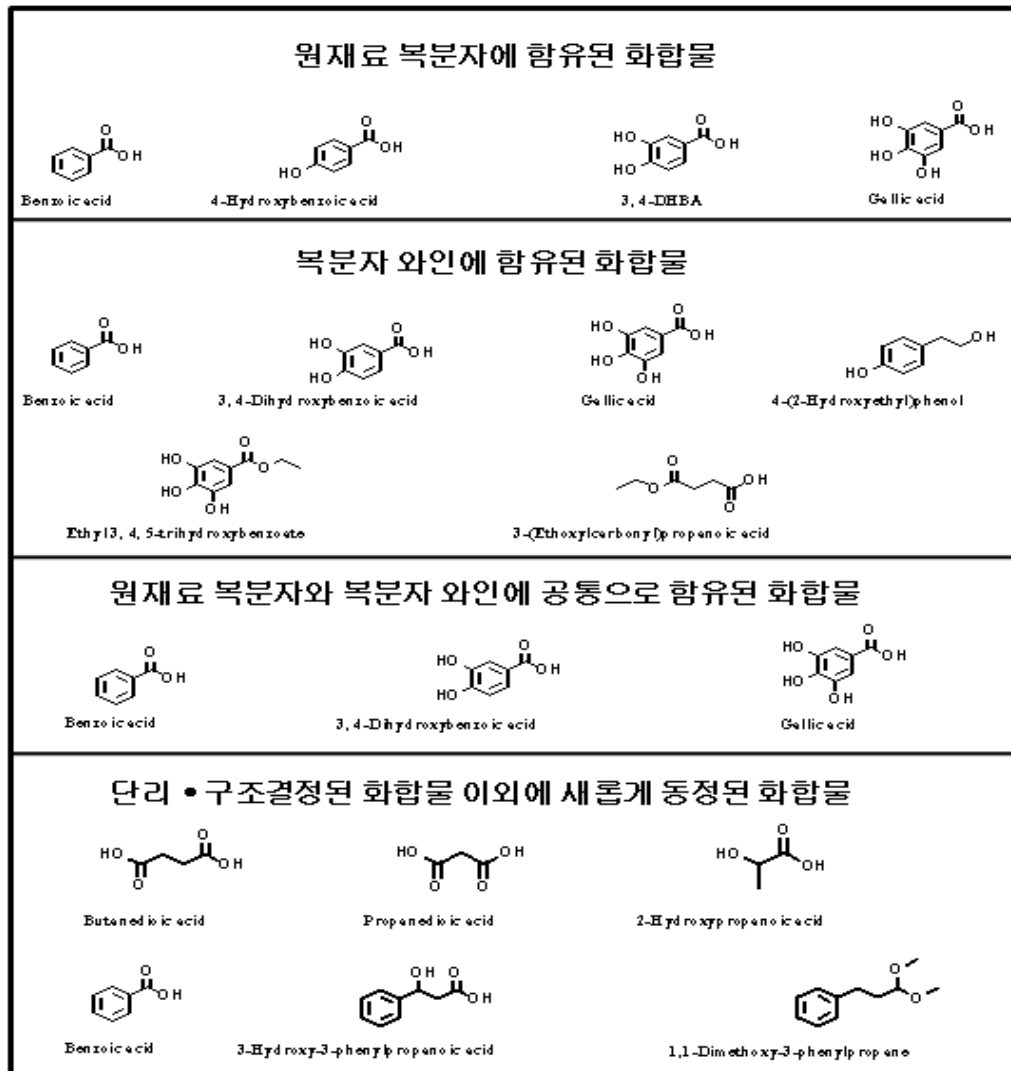


그림 III-20. GC-MS분석을 통해 동정한 화합물들.

아) 복분자 와인의 품질평가지표 설정을 위한 HPLC 분석

상기의 GC-MS 분석을 통해 동정한 화합물들 중 복분자 와인에만 함유된 4-(2-hydroxyethyl)phenol, 3-(ethoxycarbonyl)propanoic acid 및 ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate를 복분자 와인의 발효에 따른 품질평가지표로 선택하는 것은 의미있는 판단이라 생각된다. 그러나 이 화합물들은 시판되고 있지 않아 품질평가지표로 삼기에 어려움이 있다. 이에 원재료 복분자와 복분자 와인에 공통으로 함유되어 있으며, GC-MS 분석 결과, 원재료 복분자 보다 복분자 와인 쪽에 보다 그 함량이 높다고 판단된 gallic acid (GA)와 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBA)를 품질평가지표 화합물로 선정할 수 있을 것인지를 검토하기 위해 복분자 와인을 대상으로 발효·숙성 시기별로 GA와 DHBA의 함량 변화를 분석하였다.

(1) Gallic acid와 DHBA의 추출률 확인

(가) 방법

GA와 DHBA 0.5 mg씩을 각각 취하여 1 mL의 MeOH에 용해한 후, 그 중 20 μ l를 HPLC로 분석하여 각 화합물의 피크 면적을 확인하였다.

그리고 추출률은 산처리하여 pH를 각각 2.8, 3.0 그리고 3.6으로 조정한 물 5 mL에 각 화합물을 용해하고 EtOAc/EtOH (4:1, v/v) 10 mL로 용매분획한 후, 그 중 EtOAc/EtOH 층을 농축하였다. 그리고 다시 MeOH 1 mL 용해하여 그 중 20 μ l를 아래의 조건하에서 HPLC 분석을 행하여 확인하였다(그림 III-21).

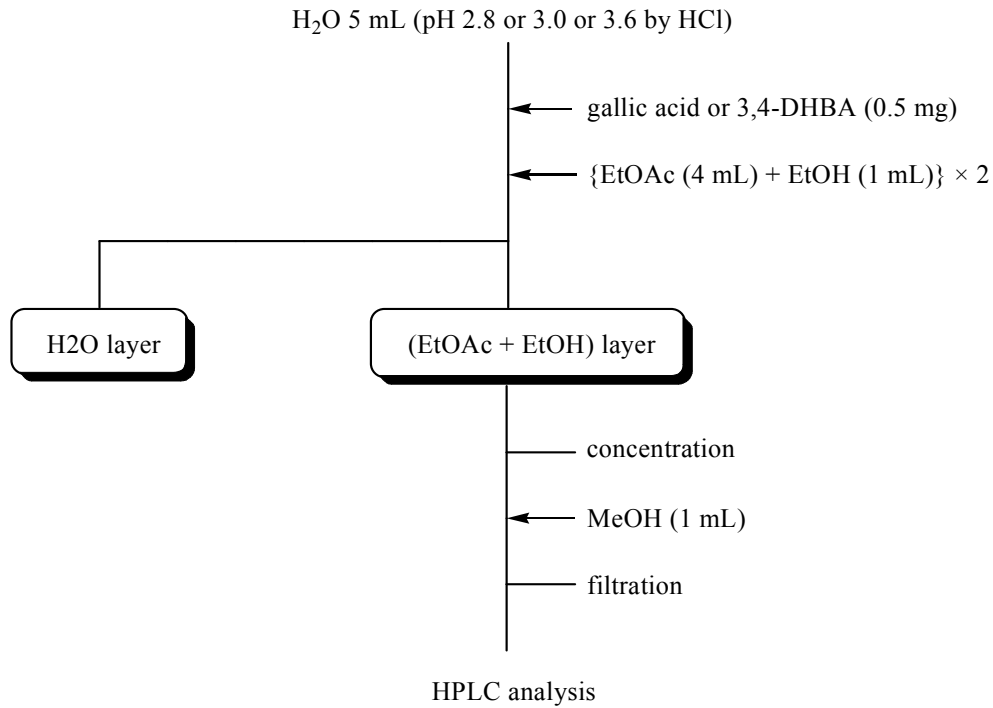


그림 III-21. GA와 DHBA 추출과정.

—HPLC conditions—
 Chromatography: Waters (Model 510)
 Column: ODS column (4.6 × 250 mm, Tsk-gel, ODS-80Ts, Tosoh Co., Japan)
 Flow rate: 1 mL/min
 Detection: 254 nm (Waters Model 441)
 Mobile phase: 6% MeOH (pH 2.65 by TFA)

(나) 결과 및 고찰

HPCL 분석 후 추출물을 확인한 결과, pH 3.6으로 산 처리한 H₂O에서는

추출률이 GA 49.0%, DHBA 89.7%였고, pH 3.0으로 산 처리한 H₂O에서의 추출률은 GA 85.3%, DHBA 92.8%였으며, pH 2.8로 산 처리한 H₂O에서의 추출률은 GA 89.6%, DHBA 100%로 확인되었다. 이에 가장 좋은 추출조건은 물의 pH를 2.8로 맞춘 후 추출하였을 때 그 추출률이 가장 높음이 확인되어 이후의 복분자 및 복분자 와인으로부터 GA와 DHBA의 분석 시, 각 시료 용액을 pH 2.8로 조정하여 EtOAc로 추출하는 방법을 적용하기로 하였다.

(2) Gallic acid와 DHBA의 순도확인

원재료 복분자와 복분자 와인의 발효·숙성별 성분의 함량변화를 정확히 분석하기 위해서는 각 화합물의 순도를 확인할 필요성이 있다고 사료되어진다. 이에 원재료 복분자와 복분자 와인의 분석 후, 품질평가지표 화합물인 GA, DHBA와 동일 retention time을 갖는 peak들의 순도를 확인하였다.

(가) 방법

품질평가지표 화합물인 GA와 DHBA를 설정된 HPLC 조건 하에서 분석하여 검출되는 retention time을 확인하였다. 그리고 원재료 복분자와 복분자 와인을 동일조건에서 분석하여 그들의 chromatogram과 비교하여 동일 retention time을 갖는 peak를 GA와 DHBA로 판단하였으며, 더욱 정확한 동정을 위하여 원재료 복분자와 복분자 와인의 품질평가지표 화합물로 삼고자 하는 GA와 DHBA를 첨가하여 spike 분석을 행함으로써 피크 면적의 상승 여부를 확인하였다. 그리고 각 peak의 순도는 photodiode array detector (PDA)가 장착된 HPLC 분석을 통하여 확인하였다. 모든 실험은 동일조건에서 행하였으며, HPLC 분석은 아래의 조건을 이용하여 행하였다.

-HPLC conditions- (화합물 동정)

Chromatography: Waters (Model 510)

Column: ODS column (4.6 × 250 mm, Tsk-gel, ODS-80Ts, Tosoh Co., Japan)

Flow rate: 1 mL/min

Detection: 254 nm (Waters Model 441)

Mobile phase: 6% MeOH (pH 2.65 by TFA)

-HPLC conditions- (화합물 순도 확인)
Chromatography: Shimadzu (SPD 20A)
Column: ODS column (4.6 × 250 mm, Tsk-gel, ODS-80Ts, Tosoh Co., Japan)
Flow rate: 1 mL/min
Detection: 254 nm (Photodiode array detector, SPD-M20A, Shimadzu, Japan)
Mobile phase: 8% MeOH (pH 2.65 by TFA)

(나) 결과 및 고찰

GA와 DHBA의 t_R 은 그림 III-22의 chromatograms에서와 같이 각각 약 10 min과 20 min경임을 확인하였다. 그리고 원재료 복분자와 복분자 와인 용액을 동일조건에서 분석하였다. 그 결과 그림 III-23의 chromatogram들의 결과에서와 같이 표준화합물들의 t_R 과 동일한 위치에 각각 피크가 검출되어 그 피크들이 각각 GA와 DHBA일 가능성이 매우 높다고 판단하였다. 그리고 더욱 정확한 동정을 위해서 농도와 피크면적을 알고 있는 GA와 DHBA를 원재료 복분자와 복분자 와인의 분석 용액에 첨가한 후, 증가 면적을 확인한 결과(그림 III-24), 두 peak는 각각 GA와 DHBA 피크들만의 높이와 면적을 변화시킴이 확인되어 그들 각각은 GA와 DHBA로 동정할 수 있었다.

그러나 이 두 화합물의 경시적 변화를 검토하기 위해서는 분석조건에 있어서의 순도가 확보되어야 한다. 그래서 이 두 peak의 순도를 확인하고자 PDA 시스템의 HPLC를 이용하여 각 피크의 spectrum을 표준품 피크의 spectrum과 비교하였다 (그림 III-25, 26).

먼저 원재료 복분자와 복분자 와인에 함유된 각각의 GA와 DHBA를 3D로 확인한 결과, 두 화합물 모두 분석과장인 254 nm에서 다른 불순물이 첨가되지 않았음을 확인하였고, UV/VIS spectra 또한 각 표준품과 일치하고 있어 본 분석조건에서 검출된 GA와 DHBA 피크들은 매우 순도가 높은 상태임을 알 수 있었다. 그래서 본 PDA 분석조건을 이용하여 복분자 및 복분자 와인에 함유된 GA와 DHBA의 분석에 적용 가능하다고 판단하였다.

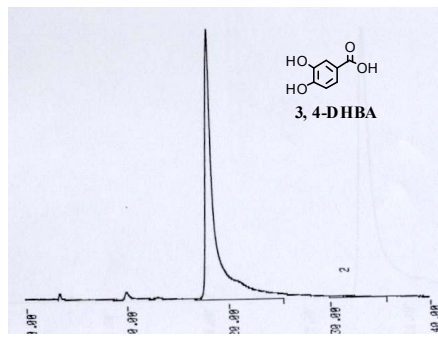
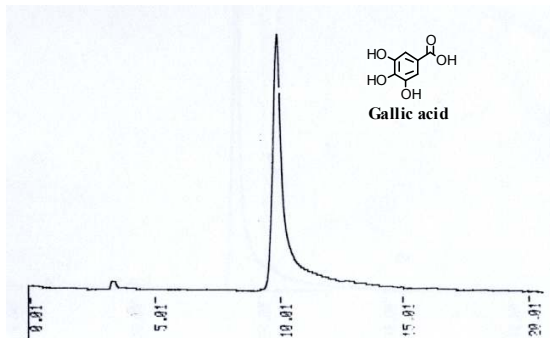


그림 III-22. 표준품 GA와 DHBA의 HPLC chromatograms.

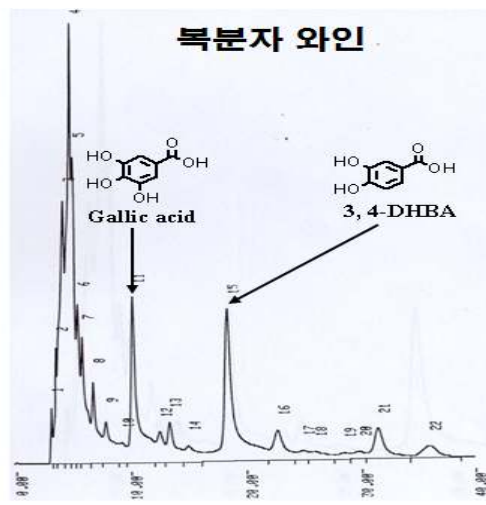
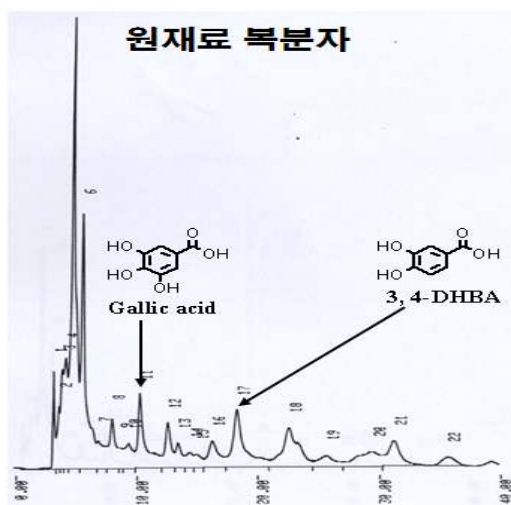


그림 III-23. 원재료 복분자와 복분자 와인의 HPLC chromatograms.

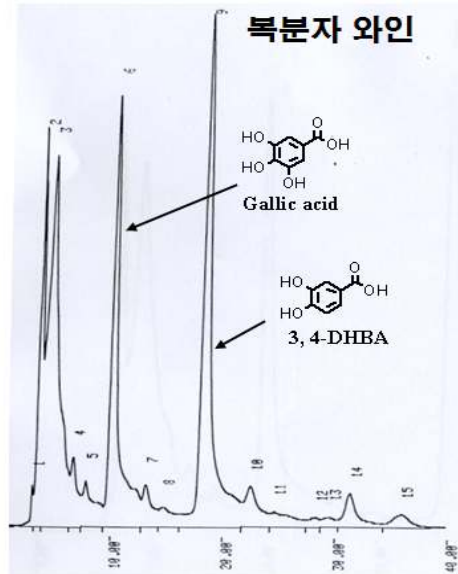
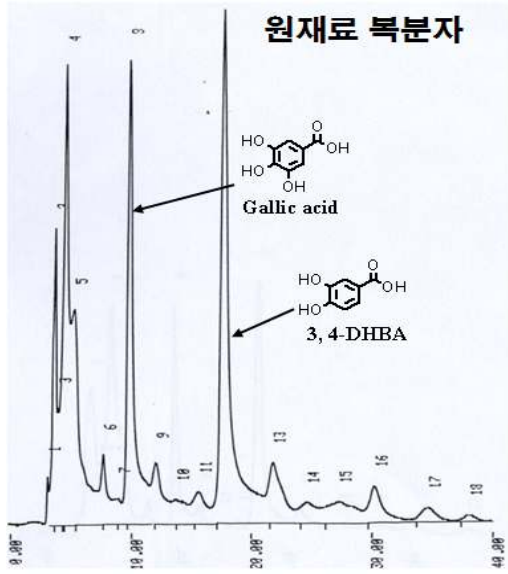
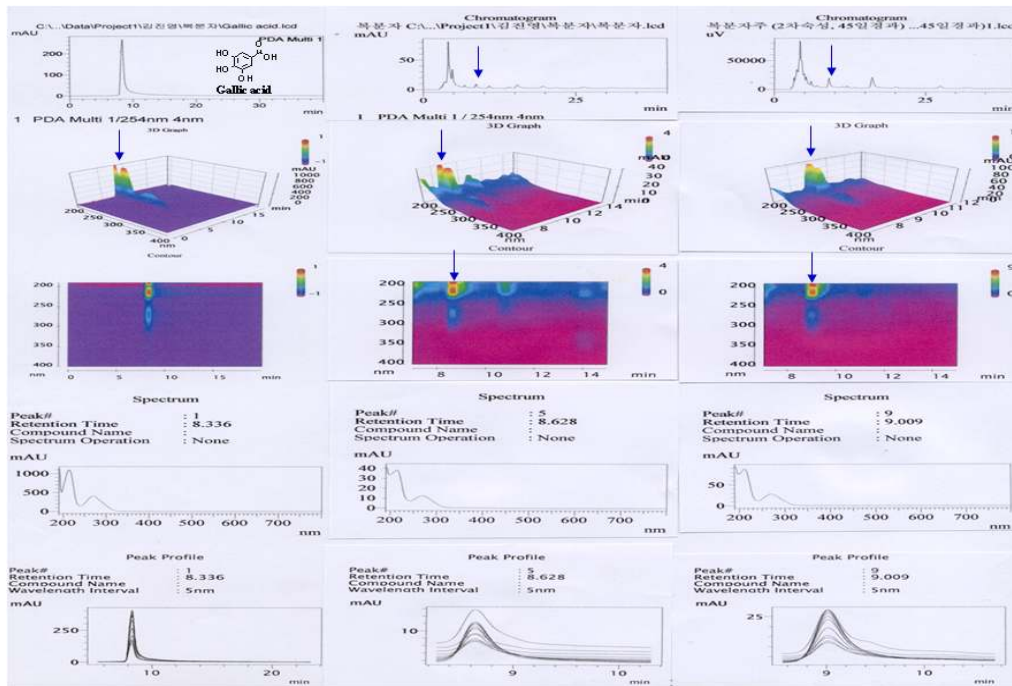
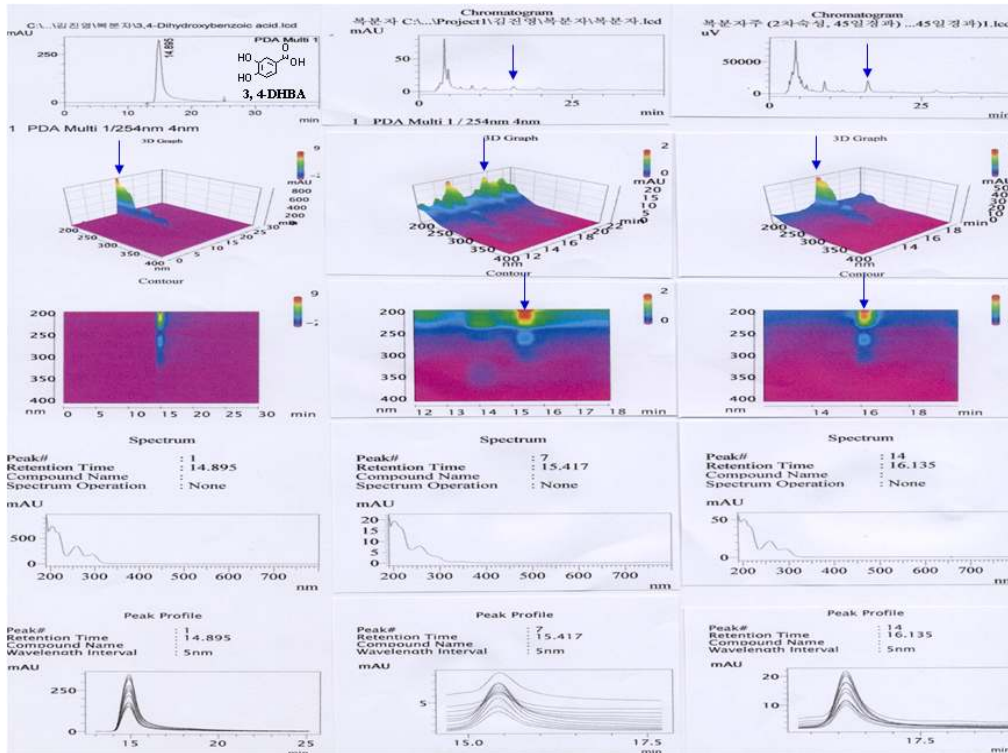


그림 III-24. 원재료 복분자와 복분자 와인 에 GA와 DHBA를 spik한 HPLC chromatograms.



Standard GA 원재료 복분자 복분자 와인
 그림 III-25. PDA를 이용한 원재료 복분자와 복분자 와인에 함유된 GA의 순도 확인.



Standard DHBA 원재료 복분자 복분자 와인
 그림 III-26. PDA를 이용한 원재료 복분자와 복분자 와인에 함유된 DHBA의 순도 확인.

(3) 복분자 와인의 제조과정 중 GA와 DHBA의 경시적 함량변화 확인

GC-MS 분석을 통해 GA와 DHBA가 원재료 복분자에 비해 발효 후의 복분자 와인에 함량이 높음을 알 수 있었다. 이 GC-MS 분석법은 감도는 높으나 유도체화 및 시료 조제 등에 번거로움이 수반되기 때문에 가능한 전처리 조작이 간단하고, 분석 대상 성분의 순도가 높은 분석조건은 실험 효율을 높여줄 것으로 판단되었다. 이에 소량의 시료로 간단한 용매분획에 의한 정제 조작만을 거쳐 HPLC로 GA와 DHBA를 분석하는 방법이 확립되어졌기에 본 방법을 적용하여 GA와 DHBA의 발효·숙성 공정별 경시적 함량 변화를 확인하고자 하였다.

(가) 방법

발효·숙성 과정 중 GA와 DHBA의 경시적 함량변화를 확인하기 위하여 발효와 숙성 정도에 따라 총 12단계(그림 III-29)로 나누어 복분자 와인을 채취한 후, 각 시료 5 mL를 pH 2.8로 조정하고 그림 III-21 및 III-27의 방법에 의해 GA와 DHBA를 추출하여 HPLC 분석에 이용하였다. 함량은 HPLC 결과를 표준곡선(그림 III-28)에 의해 계산하였다. HPLC 분석조건은 다음과 같다.

-HPLC conditions-

Chromatography: Waters (Model 510)

Column: ODS column (4.6 × 250 mm, Tsk-gel, ODS-80Ts, Tosoh Co., Japan)

Flow rate: 1 mL/min

Detection: 254 nm (Waters Model 441)

Mobile phase: 6% MeOH (pH 2.65 by TFA)

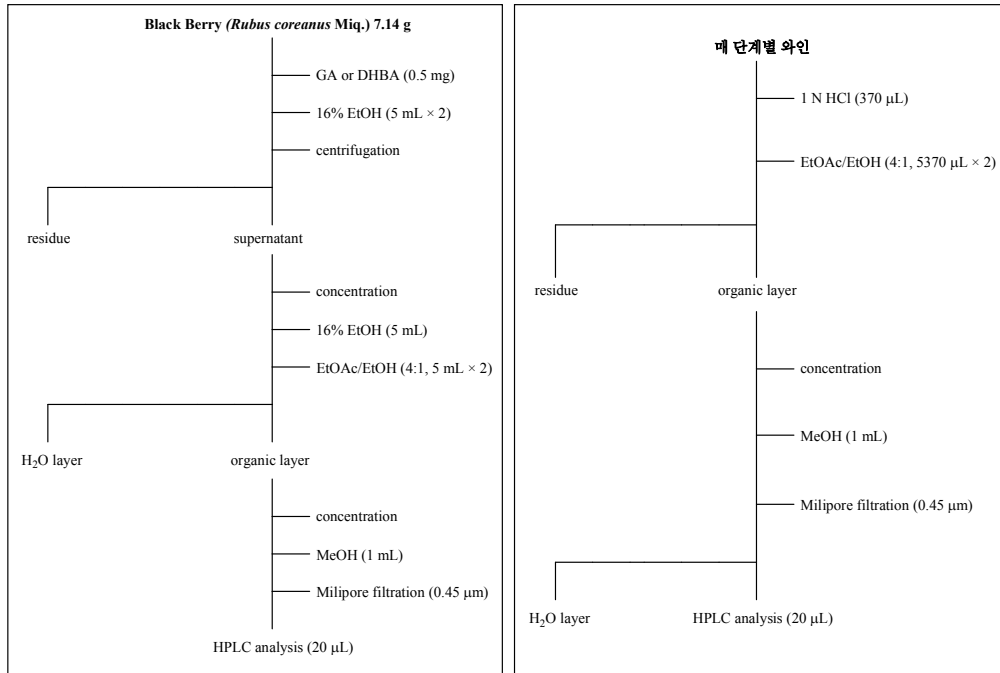


그림 III-27. 복분자(왼쪽)와 복분자 와인(오른쪽)의 발효·숙성 공정단계별 GA와 DHBA 추출방법. 매 단계별 와인

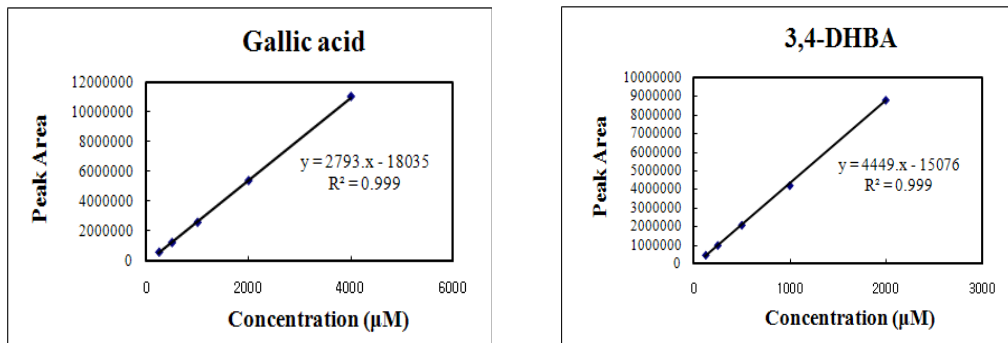


그림 III-28. GA와 DHBA의 표준곡선.

(나) 결과 및 고찰

GA와 DHBA는 원재료 복분자보다 발효와 숙성 후의 복분자 와인 중에 함량이 더 높은 것으로 본 연구를 통해 확인되었으며, 또 이들 화합물은 항산화력이 강한 저분자 phenolic acid로도 잘 알려져 있다. 그래서 이들 화합물을 복분자 와인의 품질평가를 위한 지표 중의 하나로 이용할 만한 가치가 있다고 판단하였다. 이에 발효 및 숙성 정도에 따라 총 12단계로 시료를 취하여 그들 시료 중에 함유된 GA와 DHBA의 함량을 분석하였다.

그 결과 그림 III-29에 나타낸 바와 같이 발효와 숙성 과정을 거쳐 최종적으로 GA와 DHBA의 함량이 증가한다는 것을 재확인할 수 있었다. 그러나 GA와 DHBA의 함량변화 경향을 자세히 보면 발효가 진행되는 동안에는 GA와 DHBA가 증가하는 경향을 보이다 숙성 초기에 약간 감소하는 경향을 보였다가 다시 거의 직선적인 증가 경향을 보였다. 이 결과는 대단히 흥미로운 현상을 시사하는 것으로 판단되었다.

즉 초기 3단계까지의 발효과정에 있어 GA와 DHBA의 함량증가는 복분자에 함유되어 있는 anthocyan 등의 flavonoid가 미생물 대사에 의해 분해되는 과정에서 나타난 현상으로 생각되었다. 그리고 발효 후 4단계에서의 감소는 미생물의 작용이 멈추고 숙성되는 과정에서 GA와 DHBA가 산화되어 짐으로써 발생하는 일시적인 현상으로 판단되었다. 그리고 5단계에서부터 GA와 DHBA의 꾸준한 증가는 잔존하는 flavonoid가 산화와 환원 등을 거듭하는 화학적 반응을 거쳐 생성되었을 가능성이 시사되었다. 즉 GA와 DHBA의 발효과정과 숙성과정에서의 생성 기전은 서로 다를 가능성이 높을 것으로 사료되었다. 본 연구에서 그들 화합물의 생성기전에 대한 해명에까지는 이르지 못하였으나 추후의 중요한 흥미의 대상으로 여겨진다.

이처럼 GA와 DHBA가 발효와 숙성 과정 중 특징적인 거동을 보임이 확인되어져 추후 복분자 와인의 품질관리 및 품질평가에 유용한 지표 화합물로의 이용이 기대되어진다.

(Unit: mg/100 g)

	1 복분자	2 발효중간	3 발효끝	4 숙성시작	5 숙성 1차중간	6 숙성끝	7 숙성종료후 씨앗 분리전	8 씨앗분리후	9 원심분리후	10 2차숙성 (15일)	11 2차숙성 (30일)	12 2차숙성 (45일)
Gallic acid	70	132	169	124	127	146	204	229	238	230	291	205
3,4-DHBA	31	67	94	52	75	83	110	116	157	187	211	197

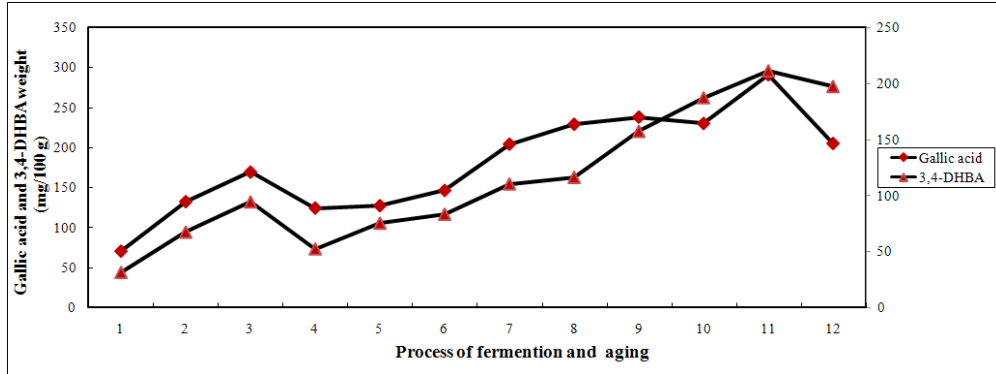


그림 III-29. 복분자 와인의 발효 및 숙성 과정 중 GA와 DHBA의 경시적 함량변화.

라. 복분자 추출물의 미생물에 의한 성분 변화 실험

1) 실험목적

복분자 중에 함유된 화합물들이 복분자 와인 제조과정 중에 미생물의 작용에 의해 변화되는지를 확인하고자 함.

2) 실험방법

가) 이용 효모 및 배양

효모는 (주)연수당이 복분자 와인 제조에 이용하고 있는 *Saccharomyces cerevisiae*를 (주)연수당에서 제공받아 이용하였다. 배양은 YPD broth 배지를 이용하여 30°C에서 12 시간 배양하였다. 효모 배양액을 600 nm에서 흡광도를 측정해가면서 그 값이 0.6이 되도록 배양시킨 후, 시료 0.1 g을 효모배양액 (100 mL)에 가하여 30°C에서 shaking incubation 시켰다.

나) 배양액의 용매분획 및 HPLC 분석조건

배양액 4 mL를 12시간 간격으로 48시간까지 경시적으로 취해 5000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 그 상층액을 취해 *n*-hexane, EtOAc, 수포화 BuOH 각각을 4 mL로 3회씩 순차적으로 추출한 후, 얻어진 유기용매층 및 H₂O층을 각각 농축하였다. 각 농축물을 50% MeOH 1 mL로 용해하여 TLC 분석과 HPLC 분석에 이용하였다. TLC 분석은 마이크로 실린지를 사용하여 10 uL씩 spotting 하였고, HPLC 분석은 각 시료 74 µg을 injection 하였다. HPLC 분석조건은 다음과 같다.

▷ HPLC conditions

- system: p580 pump, ASI-100 Automated sample injector, DIONEX
- column: Shim-pack prep-ODS (H) kit, 4.6x250, SHIMADZU, Tokyo, Japan
- flow rate: 1.0 mL/min
- column temp.: room temp.
- injection volume: 74 ug

- wavelength: 254 nm, 280 nm, 365 nm, 535 nm
- mobile phase:

Time (min)	A (100% MeOH, containing 2% AcOH)	B (100% MeOH)
0	100	0
5	100	0
35	30	70
40	0	100
50	0	100

다) 원재료 복분자 추출물의 용매분획

복분자 EtOH 추출물 (g/mL) 50 g 상당량(농축무게 4.7 g)을 취하여 농축한 후, 그 H₂O (300 mL) 현탁액을 *n*-hexane, EtOAc, 수포화 BuOH, H₂O 300 mL로 각각 3회씩 순차 용매분획 하였다. 이 분획물들 중 *n*-hexane층을 제외한 각 층을 농축하여 분석시료로 사용하였다. 그 분석조건은 나)에서의 그것과 동일하다.

3) 결과 및 고찰

가) 복분자 용매분획물의 미생물에 의한 성분변화: TLC 분석결과

(복분자 EtOAc층의 결과)

배지(A), 배지와 효모 배양액(B~E)의 추출물과 복분자 EtOAc층을 효모와 배양한 후 추출물(G~J)들의 TLC 경향을 비교한 결과(그림 IV-1), G~J로부터 새로운 화합물들의 존재(R_f 0.6~0.8)가 확인되었다. 즉 복분자의 EtOAc층에 함유된 화합물들은 복분자 와인 제조에 이용되는 *S. cerevisiae*와의 배양에 의해 복분자 EtOAc층에 함유된 화합물들을 변화시킴으로써 원재료 복분자와는 다른 화합물들의 조성을 갖는 것으로 판단되었다.

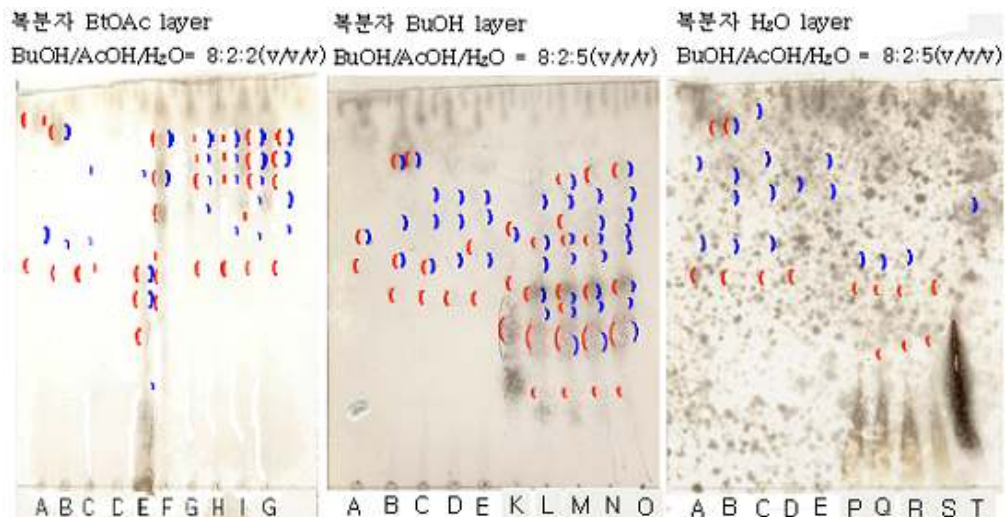


그림 IV-1. TLC 분석에 의한 복분자 용매분획물의 미생물에 의한 성분변화.

발색시약 : cerium(III) sulfate hydrate

(: Long wave

) : Short wave

- A: 배지
- B: 배지+효모 12 hr
- C: 배지+효모 24 hr
- D: 배지+효모 36 hr
- E: 배지+효모 48 hr
- F: 복분자 EtOAc layer
- G: 배지+효모+복분자 EtOAc layer 12 hr
- H: 배지+효모+복분자 EtOAc layer 24 hr
- I: 배지+효모+복분자 EtOAc layer 36 hr
- J: 배지+효모+복분자 EtOAc layer 48 hr
- K: 복분자 BuOH layer
- L: 배지+효모+복분자 BuOH layer 12 hr
- M: 배지+효모+복분자 BuOH layer 24 hr
- N: 배지+효모+복분자 BuOH layer 36 hr
- O: 배지+효모+복분자 BuOH layer 48 hr
- P: 복분자 H₂O layer
- Q: 배지+효모+복분자 H₂O layer 12 hr
- R: 배지+효모+복분자 H₂O layer 24 hr
- S: 배지+효모+복분자 H₂O layer 36 hr
- T: 배지+효모+복분자 H₂O layer 48 hr

(복분자 BuOH층의 결과) 배지(A), 배지와 효모 배양액(B~E)의 추출물과 복분자 BuOH층을 효모와 배양한 후 추출물(L~O)들의 TLC 경향을 비교한 결과(그림 IV-1), L~O로부터 복분자의 BuOH층에서는 검출되지 않았던 새로운 화합물의 존재(R_f 0.2~0.4)가 확인되었다. 이것 또한 원재료 복분자에 함유되어 있는 성분들이 배양에 의해 변환된 것으로 판단되었다.

(복분자 H₂O층의 결과) H₂O층에 있어서도 원재료에 함유되어 있던 성분들이 발효 후에 변화되었음이 확인되었다. 즉 발효 전 H₂O층의 R_f 0.5~0.9에서 검출되었던 화합물들이 발효 후에는 대부분 사라지고 R_f 0.5 이하의 부분에 새로운 화합물들이 검출되었다.

복분자의 발효 전후의 용매분획물들을 대상으로 TLC 분석을 행하여 화합물들의 존재 경향을 비교한 결과, 모든 획분에서 발효 후에 화합물들의 변화가 관찰되었다. 이것은 배양을 거치는 동안 미생물이 대사되어지는 과정에서 발생하는 현상으로 판단되어지며, 복분자를 발효시켜 제조되는 복분자 와인의 제조에 있어서도 같은 현상이 발생할 것으로 추측되었다. 이러한 화합물들의 변화경향을 보다 자세히 검토하기 위해 HPLC 분석을 행하였다.

나) 복분자 용매분획물 중 EtOAc층의 미생물에 의한 성분변화 HPLC 분석결과

복분자 EtOAc층(즉 미생물에 의한 작용이 가해지기 전의 복분자 EtOAc층)의 HPLC chromatogram (그림 IV-2)에 비해 발효가 진행되어 가는 과정에 있어서의 chromatogram (그림 IV-2)으로부터 많은 변화가 관찰되었다. 즉 발효 전에 관찰되었던 피크들이 소실 또는 감소(◆)되거나 발효 전에 없었던 피크(▼)들이 새롭게 검출되어짐을 확인할 수 있었다.

그 변화를 보인 피크들이 어떤 화합물들인지 동정은 행하지 않았으나, 원재료 복분자에 함유되어 있는 화합물들이 복분자 와인 제조에 이용되는 미생물과 배양되어짐으로써 함유성분들에 다양한 변화가 발생된다는 것이 확인되었다.

이 결과로부터 복분자 와인 제조 과정동안 원재료 복분자에 함유되어 있는 성분들이 발효가 진행되어짐에 따라 변화되어짐이 재차 확인되었다.

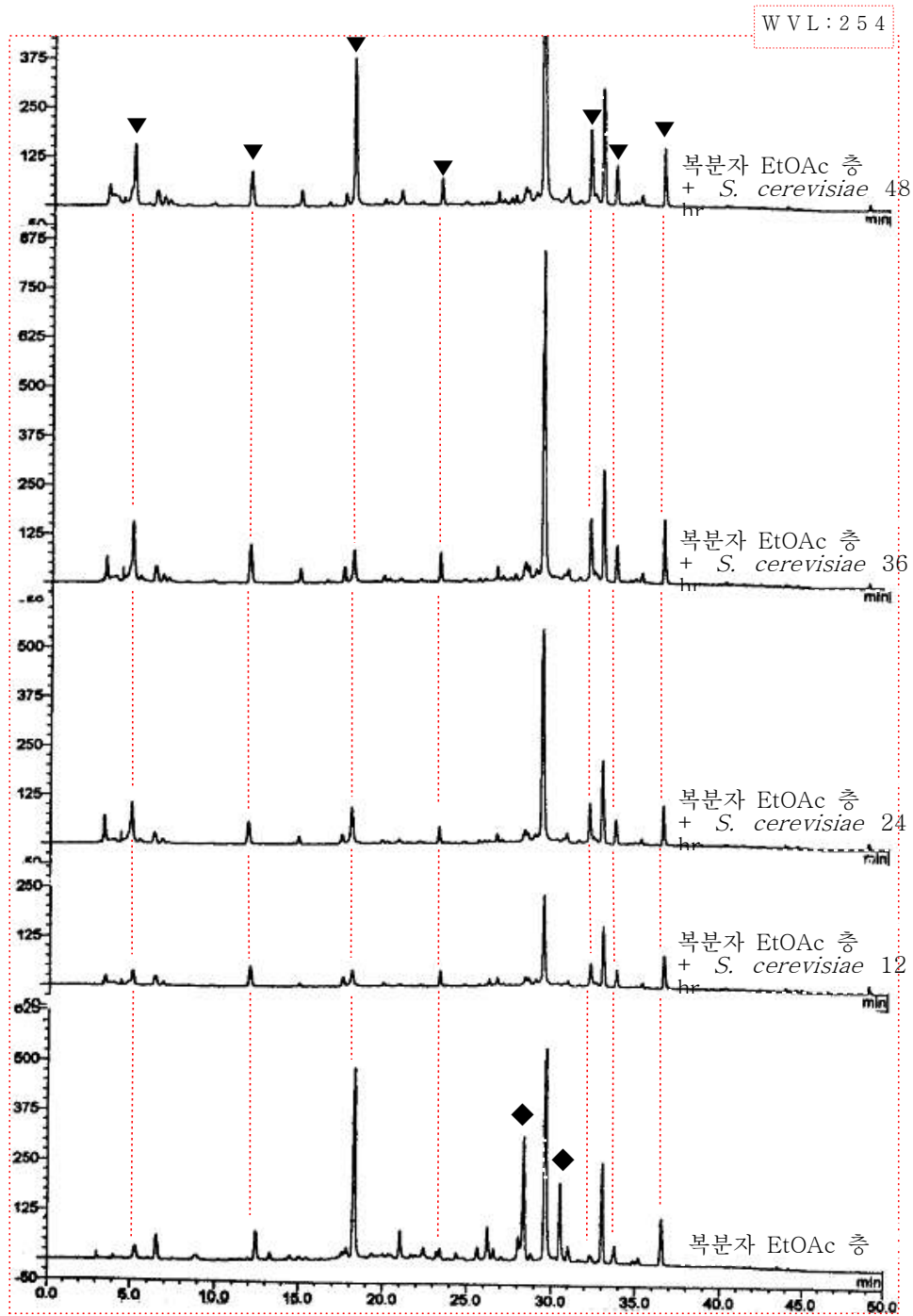


그림 IV-2. 복분자 EtOAc층과 그 *S. cerevisiae*와의 배양액의 HPLC chromatogram 들의 비교.

마. 쥐 혈장에 복분자 및 복분자 와인 추출물들의 첨가에 의한 산화억제효과 평가

1) 배경

- ◎ 상기의 연구결과들로부터 복분자에 함유되어 있는 성분들이 복분자 와인 제조과정 중에 변화되어짐을 확인할 수 있었다.
- ◎ 이로부터 복분자와 복분자 와인의 생리활성에 차이가 있을 것으로 예상되었다.
- ◎ 그러나 관련 연구 대부분은 원재료 복분자를 대상으로 이루어져 왔다.
- ◎ 일상적으로 복분자의 상당량이 복분자 와인 형태로 섭취되고 있음을 고려할 때
- ◎ 복분자 와인의 성분 연구에 더하여 그 생리활성 또한 와인을 중심으로 구명되어야 할 필요가 있다.

가) 순환기계질환의 연구배경

- ◎ 삶의 질 향상과 의료서비스의 개선으로 수명이 연장됨에 따라
- ◎ 심장질환, 암, 당뇨, 정신질환 등 만성 또는 난치성 질환이 증가하고 있다.
- ◎ 그중 순환기계질환은 전 세계 주요 사망원인 중 가장 높은 비율(41%)을 차지하고 있다. (2005년 사망원인통계결과, 통계청, 2006)
- ◎ 그 순환기계질환의 원인으로써 식사의 불균형, 고도의 스트레스, 대사이상 등이 알려져 있으며,
- ◎ 특히 동맥경화는 혈액 내에서 활성산소종의 공격으로 low density lipoprotein (LDL)이 산화되어 혈관벽에 플라크 침착이 그 원인 중의 하나로 보고되어지고 있다 (그림 V-1). (Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Jurgens G. Biochemecal, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.* 1990, 3, 77-92)
- ◎ 즉 이러한 질환은 혈중 활성산소종에 의한 생체막의 산화를 적극 억제함으로써 예방·개선되어진다. (Abbey M, Nestel PJ, Baghurst PA. Antioxidant vitamins and low-density-lipoprotein oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 525-532, 1993)
- ◎ 그래서 vitamin C (ascorbic acid), vitamin E (tocopherols), flavonoid, phenol 성 화합물 및 carotenoid와 같은 천연 항산화제의 적극적인 섭취는 활성산소종

에 의한 순환기계질환 예방과 직결되는 것으로 밝혀져 있다.

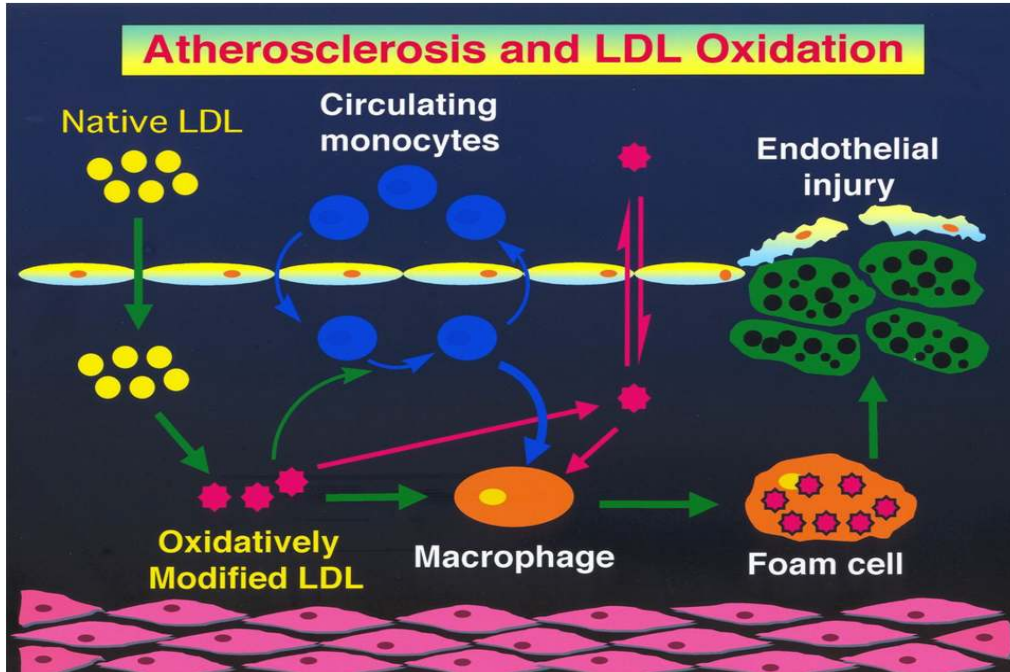


그림 V-1. 저비중리포단백 (Low density lipoprotein: LDL) 산화에 의한 동맥경화 발병기전의 모식도.

2) 목적

- 본 연구에서 복분자 와인으로부터 다양한 항산화 화합물이 단리·구조결정되었으며,
- 복분자에 함유된 화합물들이 발효에 이용되는 미생물의 작용에 의해 발효과정 동안 변화되어짐을 확인하였다.
- 이에 발효 후의 복분자 와인도 항산화활성을 유지하는지, 그리고 그 활성 정도는 발효 전의 원재료 복분자와 어느 정도 차이가 있는 것인지를 비교하기 위해
- 복분자와 복분자 와인으로부터 제조된 추출시료들의 쥐 혈장 동이온 유도 산

화에 대한 억제효과를 비교·평가하고자 하였다.

3) 실험방법

가) 복분자 및 복분자 와인 추출물들의 조제

신선 복분자 220 g의 EtOH (300 mL) 추출물(19.97 g)을 농축 후 EtOH 220 mL에 녹여 시료로 이용하였다. 그리고 복분자 2차숙성 45일 후의 복분자 와인 154 mL (신선 복분자 220 g 상당량)를 여과(Whatman No. 2)후 농축한 다음 복분자와 동일한 농도로 조제하여 시료로 이용하였다.

나) 실험동물 및 혈장의 분리

7주령 쥐(♂, Sprague-Dawley, 샘타코, 경기도 오산시)를 15시간 절식 후, ether 마취 하에서 개복한 다음, 대동맥으로부터 헤파린이 첨가된 주사기로 채혈하여 원심분리(3000 rpm, 4°C, 20분, VS-15 CFN, VISION, KOREA)를 행하여 얻어진 상층을 취하여 사용 직전까지 -38°C에서 냉동 저장하였다.

다) 쥐 혈장의 산화 및 과산화물 분석

쥐 혈장 250 µL에 PBS buffer (pH 7.4) 640 µL를 가하고, 복분자 및 복분자 와인 추출물이 0, 10, 50, 100, 200 µg 상당량이 되도록 EtOH 10 µL에 각각 용해하여 첨가한 다음, 동이온(CuSO₄)이 최종적으로 100 µM가 되도록 PBS buffer (pH 7.4) 용액으로 조제하여 100 µL를 첨가함으로써 산화를 개시하였다. 혼합 용액은 37°C에서 shaking incubation 시키면서 30분 간격으로 100 µL씩을 취하여 2.5 mM 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT)을 함유한 MeOH과 *n*-hexane을 각각 3 mL씩 가한 후 vortex로 혼합하였다. 상층액을 농축용기에 취한 후, 하층 용액에 다시 *n*-hexane 3 mL를 가하고 다시 vortex로 혼합하였다. 그 상층액을 취하여 전단계의 *n*-hexane층과 혼합하여 농축한 다음 얻어진 농축물을 MeOH/CHCl₃ (95:5, v/v) 용액 100 µL로 녹여 HPLC에 주입(20 µL)하였다. 그 HPLC 분석조건은 다음과 같다. 그리고 본 혈장 과산화물(cholesteryl ester hydroperoxide; CE-OOH)의 분석 방법을 그림 V-2에 정리하였다.

4) 결과 및 고찰

(쥐 혈장의 산화시간 설정을 위한 CE-OOH의 경시적 변화 검토)

복분자 및 복분자 와인의 쥐 혈장 산화에 대한 억제효과를 검토하기 위해 먼저 그 조건 설정이 필요하였다. 그래서 복분자 및 복분자 와인 어느 쪽도 첨가하지 않은 쥐 혈장(비교구)의 동이온에 의해 유도된 산화를 개시하고, CE-OOH의 생성량을 경시적으로 검토하였다.

그림 V-3에 나타낸 바와 같이 반응 30분 후부터 CE-OOH가 생성되기 시작(lag time)해 180분까지 그 함량이 증가하였다. 그래서 복분자 및 복분자 와인에 의한 쥐 혈장의 산화억제 평가 실험은 CE-OOH가 생성되기 시작하여 더 이상 그 농도가 증가하지 않을 때까지 걸리는 시간의 절반 부근의 시간, 즉 반응시작 약 2.5시간 후를 기준으로 설정하여 행하기로 하였다.

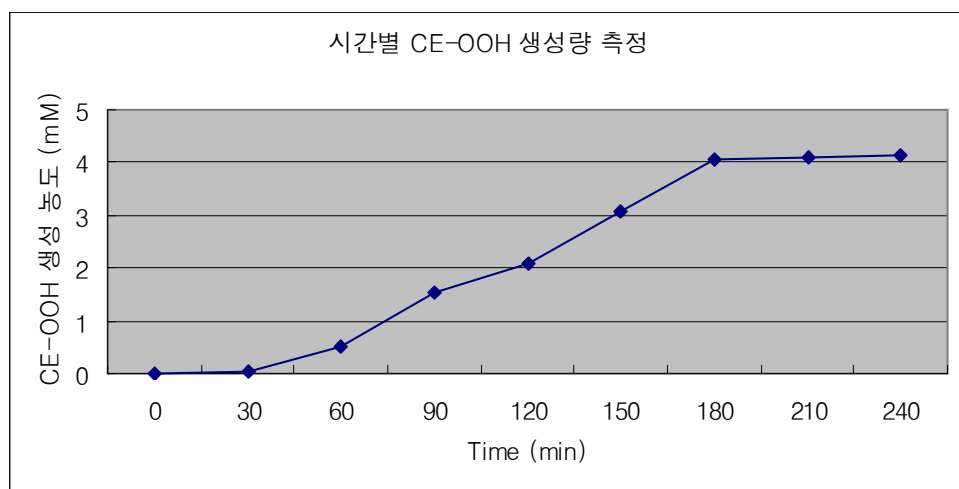


그림 V-3. 비교구 쥐 혈장의 경시적 CE-OOH 생성량 변화.

(복분자 추출액의 쥐 혈장 산화억제에 대한 농도의존성 평가)

이어 복분자 추출물이 쥐 혈장 산화억제에 대해 농도의존적으로 작용하는지를 검토하였다. 복분자 추출물을 0~200 µg 신선 복분자 상당량이 되도록 쥐 혈장에 첨가한 후, 그림 V-2의 방법에 의해 2.5시간동안 반응시킨 다음, CE-OOH의 생성량을 분석하였다. 그 결과(V-4), 복분자 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 CE-OOH의 생성량은 감소하였으며, 그 경향은 직선적인 농도의존성을 명확히 보였다.

이에 본 방법에 의해 복분자 및 복분자 와인의 항산화 활성을 평가할 수 있다고 판단되었으며, 그 평가를 위한 시료 첨가량 또한 10~200 µg 상당량으로 설정하였다. 그래서 농도별 복분자와 복분자 와인 추출물의 쥐 혈장 산화 억제효과를 보다 상세히 검토하기 위해 경시적인 CE-OOH 생성 억제효과를 평가하였다.

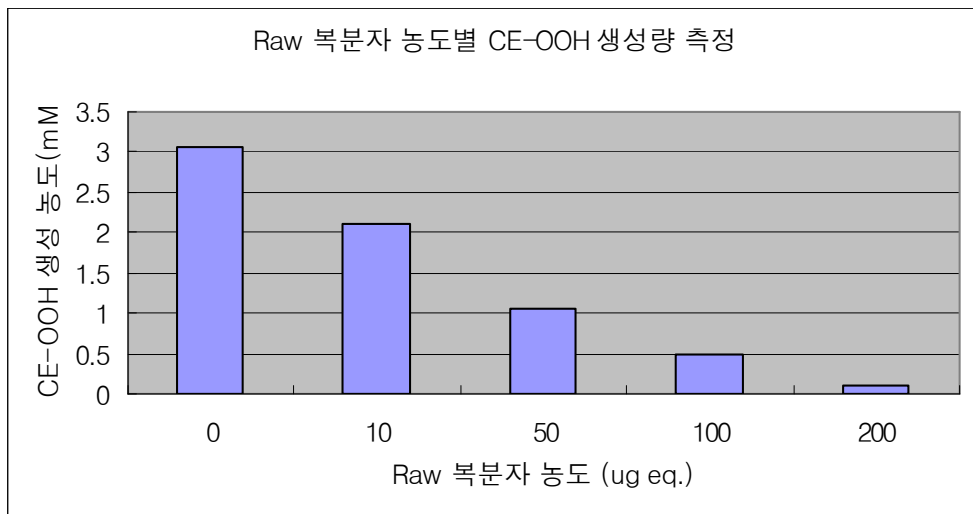


그림 V-4. 쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 복분자 추출물의 농도별 억제효과.

(쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 농도별 복분자 추출물의 경시적 CE-OOH 생성억제효과)

상기 그림 V-2에서 설명한 방법에 의해 쥐 혈장 4배 (최종 희석배수) 희석 용액에 신선 복분자 추출물을 0 (대조구), 10, 50, 100, 200 μg 상당량이 되도록 첨가한 후 100 μM (최종농도) 동이온에 의해 산화시켜 가면서 경시적으로 CE-OOH의 생성경향을 분석하였다.

그 결과(그림 V-5), 모든 복분자 추출물 첨가구는 대조구에 비해 높은 CE-OOH 생성억제효과를 보였다. 그리고 복분자 50 μg 과 100 μg 상당량 간의 활성은 거의 유사한 경향을 보였으며, 전반적으로 시료의 첨가 농도에 비례하여 CE-OOH 생성억제효과도 높아지는 경향이 관찰되었다.

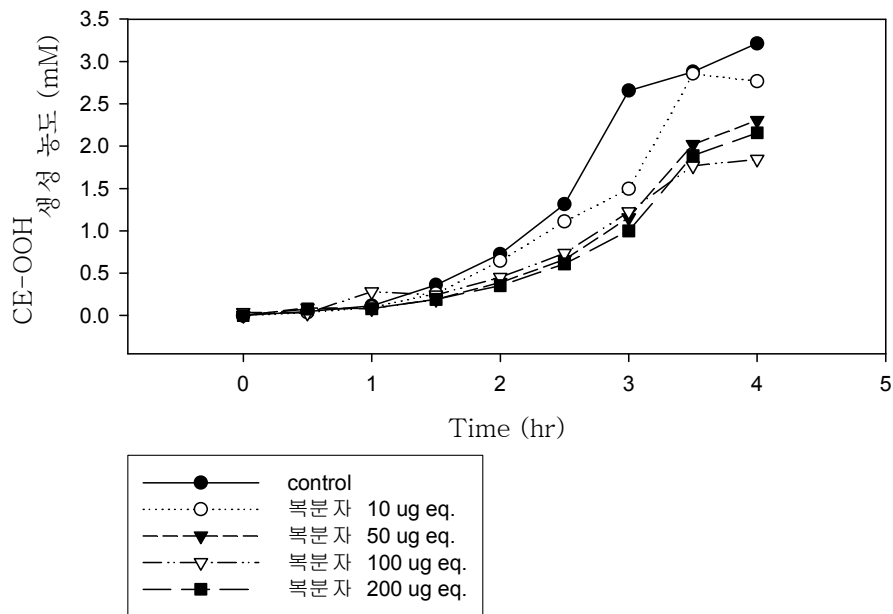


그림 V-5. 쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 농도별 복분자 추출물의 경시적 CE-OOH 생성억제효과.

(쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 농도별 복분자 와인 추출물의 경시적 CE-OOH 생성억제효

과)

다음은 농도별 복분자 와인의 쥐 혈장 산화억제효과를 상세히 검토하기 위해 동이온 산화에 의한 CE-OOH 생성량의 경시적 변화를 검토하였다.

그림 V-6에 나타낸 바와 같이 상기 그림 V-5의 복분자 추출물 첨가 시와는 매우 다른 경향의 결과가 관찰되었다. 즉 복분자 와인 추출물의 신선 복분자 10 µg 상당량은 대조구와 거의 같거나 약간 높은 정도의 활성을 보였다. 그리고 200 µg 상당량 첨가구에 있어서도 대조구에 비해 현저히 높은 정도의 활성을 보이지 않았다. 또 특이하게도 500 µg과 100 µg 상당량 첨가구에 있어서는 오히려 산화 촉진현상(prooxidant 효과)이 관찰되었다. 이것은 마치 α-tocopherol (참고문헌 ①~④)이나 gallic acid (참고문헌 ⑤~⑧)와 같이 환원력이 강한 화합물들이 한정된 반응조건에서 과량으로 존재할 경우 나타나는 현상과 유사한 경향을 보였다. 복분자 추출물의 경우에 관찰되지 않았던 prooxidant 효과가 복분자 와인 추출물의 경우에 관찰된 것은 상기의 II-3-D-8 항의 그림 III-29에서 관찰된 바와 같이 발효가 진행되어짐으로써 그 함량이 증가하는 저분자 phenol성 화합물들의 함량이 상대적으로 증가되어짐으로써 복분자 보다 복분자 와인에 함유되어 있는 성분들의 총 환원력이 더 강해진 것 때문에 발생한 현상으로 추측되어진다.

그래서 복분자 추출물과 복분자 와인 추출물 간의 쥐 혈장 산화억제효과에 대한 그림 V-5와 V-6의 결과들을 각 농도별로 비교하여 그 반응 경향을 검토하였다.

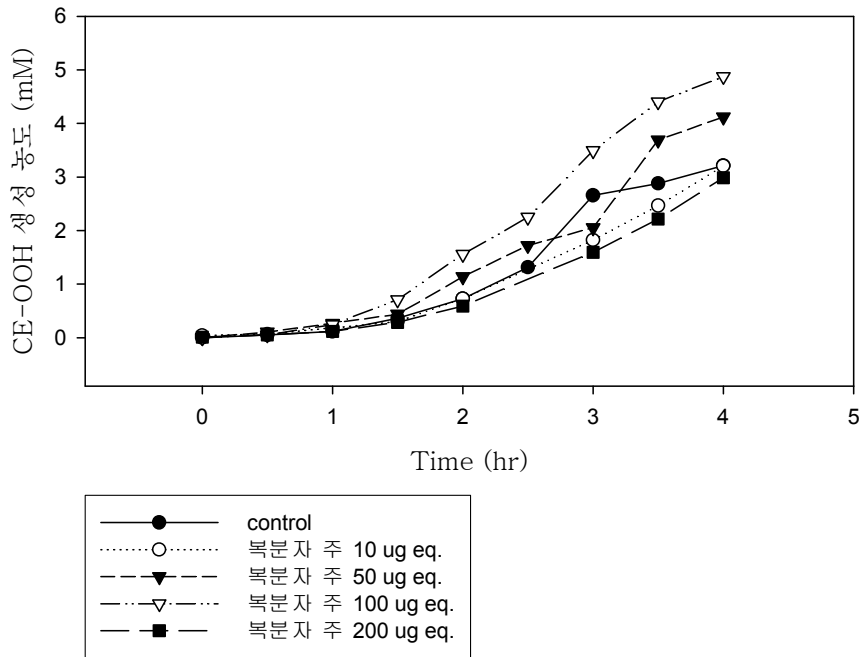


그림 V-6. 쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 농도별 복분자 와인 추출물의 경시적 CE-OOH 생성억제효과.

(참고문헌)

- ① Kim, H. J.; Lee, H. O.; Min, D. B. Effects and prooxidant mechanisms of oxidized α -tocopherol on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Science* (2007), **72**(4), 223-C230.
- ② Petrosyan, E. A.; Sergienko, V. I.; Sukhinin, A. A.; Zakharchenko, I. S.; Oganessian, S. S. Effect of Combined Treatment with Sodium Hypochlorite and α -Tocopherol on Prooxidant and Antioxidant System of the Blood during Experimental Bile Peritonitis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* (2005), **139**(4), 400-403.
- ③ Skibsted, L. H.; Carlsen, Charlotte U.; Kroeger-Ohlsen, Maiken V.; Hedegaard, Rikke V.; Bibby, B. M.; Kristensen, Dorthe. Antioxidants and prooxidants in milk-like emulsions: effect of ascorbate, urate, α -tocopherol and β -carotene on early events in lipid oxidation.

Milchwissenschaft (2005), **60**(1), 44-48.

- ④ Ohkawa, Sakae; Yoneyama, Takashi; Shimoi, Kayoko; Takita, Takako; Maruyama, Yukitaka; Kumagai, Hiromichi. Pro-oxidative effect of α -tocopherol in the oxidation of LDL isolated from co-antioxidant-depleted non-diabetic hemodialysis patients. *Atherosclerosis* (Amsterdam, Netherlands) (2004), **176**(2), 411-418.
- ⑤ Yoshino, M.; Haneda, M.; Naruse, M.; Htay, H. H.; Iwata, S.; Tsubouchi, R.; Murakami, K. Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Toxicology in Vitro* (2002), **16**(6), 705-709.
- ⑥ Lapidot, Tair; Walker, Michael D.; Kanner, Joseph. Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic β -Cells in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002), **50**(25), 7220-7225.
- ⑦ Yen, Gow-Chin; Duh, Pin-Der; Tsai, Hui-Ling. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry* (2002), **79**(3), 307-313.
- ⑧ Murakami, Keiko; Ito, Masae; Htay, Hla Hla; Tsubouchi, Ryoko; Iwata, Shouko; Yoshino, Masataka. Antioxidant and prooxidant actions of gallic acid derivatives: effect on metal-dependent oxidation of lipids and low density lipoprotein. *Biomedical Research* (2000), **21**(5), 291-296.

(쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 복분자와 복분자 와인 추출물 10 μ g 상당량 첨가 시 경시적 CE-OOH 생성경향 비교)

복분자와 복분자 와인 추출물의 동일 상당량 첨가 시의 쥐 혈장 동이온 산화에 대한 산화경향을 비교하기 위해, 먼저 복분자와 복분자 와인 추출물 10 μ g 상당량 첨가 시의 경시적 CE-OOH 생성경향을 비교 하였다. 그 결과(그림 V-7), 두 시료 모두 대조구와 거의 같거나 약간 높은 정도의 CE-OOH 생성 억제 경향을 보였다. 즉 이것은 소량의 첨가 시료에 의해서는 그 반응성에 큰 영향이 없으며, 10 μ g 상당량 첨가에 의해서는 의미있는 활성을 기대하기 어려운 조건임을 시사하는 결과라 판단되었다.

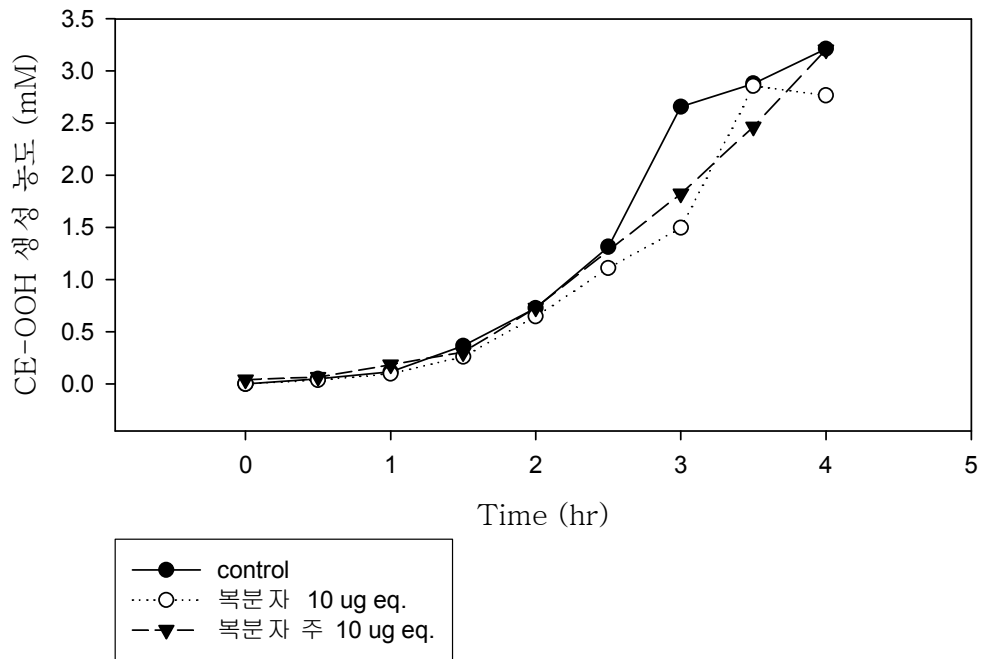


그림 V-7. 쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 복분자와 복분자 와인 추출물 10 μg 상당량 첨가 시 경시적 CE-OOH 생성경향 비교.

(쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 복분자와 복분자 와인 추출물 50 μg 상당량 첨가 시 경시적 CE-OOH 생성경향 비교)

그림 V-8은 복분자와 복분자 와인 추출물 50 μg 상당량 첨가 시의 경시적 CE-OOH 생성경향을 비교한 결과이다. 여기에서도 복분자 와인은 대조구와 유사한 산화경향을 보였다. 오히려 복분자 추출물의 경우에 있어 대조구에 비해 높은 CE-OOH 생성억제 효과가 관찰되었다. 즉 50 μg 상당량 첨가에 있어서는 복분자 와인보다 복분자 추출물을 첨가하는 쪽이 보다 우수한 항산화 활성을 발휘하는 것으로 판단되었다.

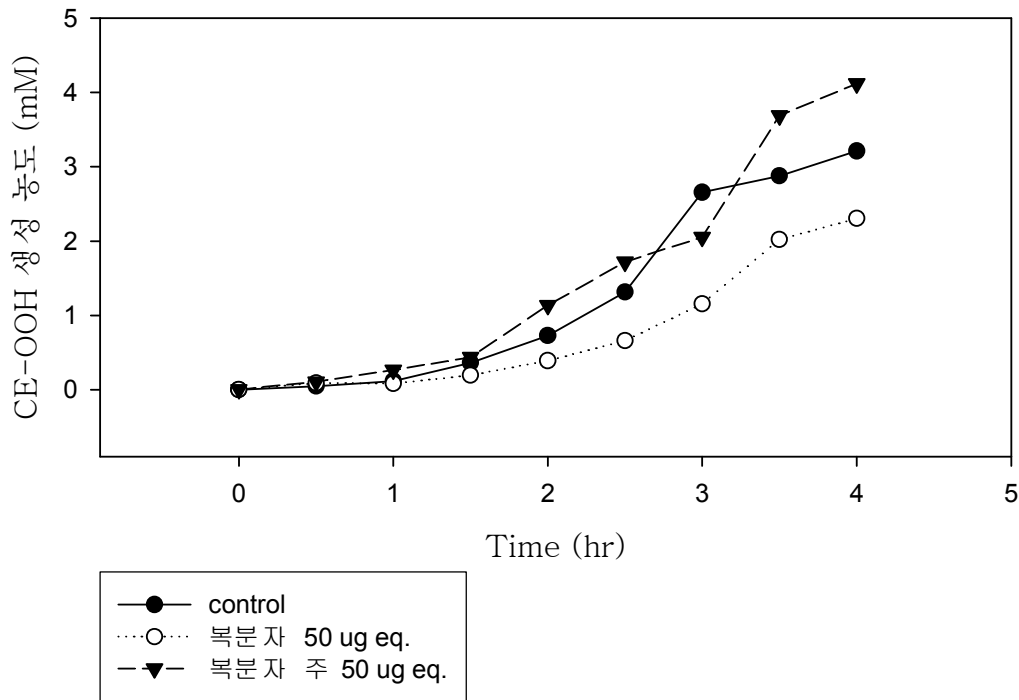


그림 V-8. 쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 복분자와 복분자 와인 추출물 50 μg 상당량 첨가 시 경시적 CE-OOH 생성경향 비교.

(쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 복분자와 복분자 와인 추출물 100 μg 상당량 첨가 시 경시적 CE-OOH 생성경향 비교)

다음 그림 V-9는 100 μg 상당량의 복분자와 복분자 와인 추출물 첨가구의 경시적 CE-OOH 생성량 변화를 검토한 결과이다. 본 결과는 10 μg 이나 50 μg 상당량을 첨가했던 것들과는 전혀 다른 경향을 보였다. 즉 100 μg 상당량 첨가 시 대조구에 비해 복분자는 CE-OOH 생성 억제효과를 보인 반면, 복분자 와인 첨가구는 오히려 대조구에 비해 CE-OOH 생성이 촉진된 경향을 보였다. 즉 이것은 설정된 실험 모델의 조건에 있어 50 μg 상당량 첨가에 비해 100 μg 상당량 첨가에 의해 환원력이 급격히 증가하여 나타난 proxidant 효과로 해석되어진다.

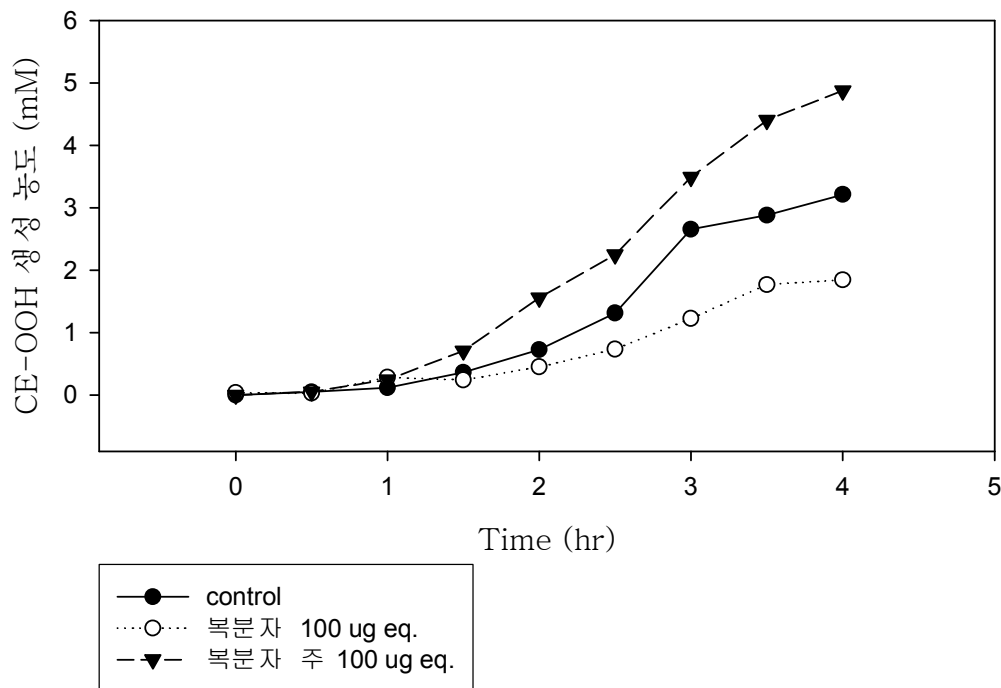


그림 V-9. 쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 복분자와 복분자 와인 추출물 100 μg 상당량 첨가 시 경시적 CE-OOH 생성경향 비교.

(쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 복분자와 복분자 와인 추출물 200 μg 상당량 첨가 시 경시적 CE-OOH 생성경향 비교)

다음은 200 μg 상당량의 복분자와 복분자 와인 첨가구들 간의 경시적 CE-OOH 생성량 변화를 비교한 결과(그림 V-10)이다. 여기에서도 복분자 추출물 첨가구가 복분자 와인 첨가구보다 높은 활성을 보였다. 그러나 100 μg 상당량 첨가 시에는 복분자 와인이 proxidant 효과를 보였던 반면, 본 200 μg 상당량 첨가의 경우 proxidant 효과는 나타나지 않고 다소나마 대조구에 비해 산화 지연 효과를 보였다. 이것은 proxidant 효과에 기여하는 환원성이 높은 화합물들이 산화 후 반응액 내에서 2차반응을 일으켜 나타내는 전형적인 현상으로 해석되어진다.

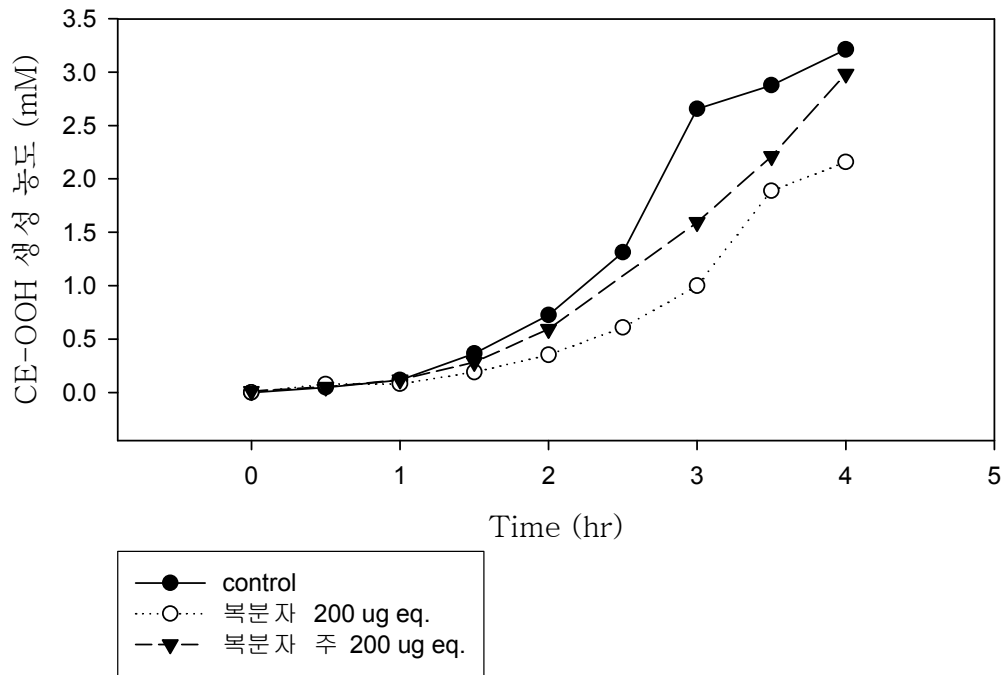


그림 V-10. 쥐 혈장의 동이온 산화에 대한 복분자와 복분자 와인 추출물 200 μg 상당량 첨가 시 경시적 CE-OOH 생성경향 비교.

이상 II-5 항에서 행해진 “쥐 혈장에 복분자 및 복분자 와인 추출물들의 첨가에 의한 산화억제효과 평가” 실험을 종합하면, 전반적으로 복분자 와인 보다 복분자가 더 높은 쥐 혈장 산화 억제 효과가 있음이 관찰되었다. 그러나 복분자 와인 100 µg 상당량 첨가 시 현저한 prooxidant 효과가 관찰되었던 결과로부터 본 모델 실험 조건에 있어 복분자 와인 50~200 µg 상당량 첨가 범위에서 항산화적 측면에 있어 최적의 농도가 존재할 것으로 추측되었다. 즉 *in vitro* 상에서 추출물을 쥐 혈장에 첨가하여 관찰된 결과만으로는 생체 내에서 발현되어질 복분자 및 복분자 와인의 항산화 활성을 평가하기에는 한계가 있다고 판단되었다.

그래서 보다 생리적 조건에 접근된 평가법을 적용하고자 복분자와 복분자 와인 추출물들을 각각 쥐에 투여하여 얻어진 혈장을 대상으로 *ex vivo* 평가를 행하였다.

바. 복분자와 복분자 와인 투여 쥐 혈장의 피산화성 비교·검토

1) 배경

복분자 및 복분자 와인 추출물을 쥐 혈장에 첨가하여 과산화물의 생성 억제 효과를 검토한 결과, 복분자 추출물은 농도의존적으로 CE-OOH 생성 억제 효과를 보였음에 반해, 복분자 와인 추출물은 농도에 따라 prooxidant 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이것은 복분자에 함유되어 있던 성분들이 발효 및 숙성 과정동안 변화되어 환원력이 강한 화합물을 생성하여 복분자 와인 자체의 환원력이 증가되었기 때문일 것으로 추측하였다. 그래서 분리된 쥐 혈장에 대상 시료를 첨가하여 검토한 데이터만으로는 충분한 효능 평가에 한계가 있다고 판단되었다. 이에 각 대상 시료를 직접 쥐에 투여한 후, 그들로부터 얻어진 혈장을 대상으로 생리활성을 평가하고자 하였다.

즉 지금까지의 실험결과에 의해 복분자가 발효·숙성을 거쳐 복분자 와인이 제조되는 과정에서 성분 변화가 초래되어짐이 확인된 바, 일상적으로 많이 음용되고 있는 복분자 와인을 음용 시에 그에 함유되어 있는 성분들이 실제로 생체 내에서 유용한 항산화능을 발휘할 것인지를 평가하는 중요한 지표가 될 수 있을 것이다.

2) 실험재료 및 방법

가) 투여 시료 조제

신선 복분자 57 g에 100% EtOH 200 mL를 가하여 homogenizer (BM-2 Nissei bio-mixer, Nihonseiki Kaiseiki Ltd., Japan)로 마쇄한 다음, 암실 상온에서 24시간 방치 후 흡인 여과(Whatman No. 2)하였다. 회수한 잔사에 50% EtOH 200 mL를 가하여 다시 homogenization 후 여과(Whatman No. 2)하였다. 여과액을 합하여 EtOH이 제거될 때까지 진공농축한 다음, 얻어진 농축액을 2등분하여 16% EtOH과 물로 각각 10 mL가 되도록 정용하였다. 그들 각각은 6.5 g/10 mL였으며, 각각 신선 복분자 28.5 g/10 mL에 상당하는 양이다.

한편 복분자 와인은 시판용 200 mL (신선 복분자 57 g 상당량)를 흡인 여과(Whatman No. 2)한 후, EtOH이 제거될 때까지 진공농축한 다음, 얻어진

농축액을 2등분하여 신선 복분자의 경우와 마찬가지로 16% EtOH과 물로 각각 10 mL가 되도록 정용하였다. 그들 각각은 8 g/10 mL였으며, 각각 신선 복분자 28.5 g/10 mL에 상당하는 양이다.

(참고)

	신선 복분자 EtOH 추출물		복분자 와인 농축물	
	16% EtOH 용액	H ₂ O 용액	16% EtOH 용액	H ₂ O 용액
쥐 1마리 당 투여량	0.97 g/1.5 mL	0.97 g/1.5 mL	1.2 g/1.5 mL	1.2 g/1.5 mL
	신선 복분자 4.3 g 상당량		복분자 와인 15 mL 상당량 (신선 복분자 4.3 g 상당량)	
	※ 복분자 와인 15 mL는 신선 복분자 4.3 g 상당량이다.			

신선 복분자 추출물의 1회 경구투여량인 0.97 g/1.5 mL는 16% EtOH 용액 및 H₂O 용액 각각 신선 복분자 4.3 g 상당량이다. 그리고 복분자 와인 농축물의 1회 경구투여량인 1.2 g/1.5 mL는 16% EtOH 용액 및 H₂O 용액 각각 복분자 와인 15 mL로부터 조제된 것이며, 신선 복분자 4.3 g에 상당하는 양이다.

나) 실험동물 및 시료 투여

실험동물은 6주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 샘타코(경기도 오산시)로부터 30마리를 구입하여 3마리씩 cage에 담아 하루 안정화를 시킨 후 본 실험에 들어갔다. 10시간의 절식과 3시간의 절수 후, 다음과 같이 6군(A~F군)으로 나누어 각 그룹 당 5마리씩 시료를 위내에 존대를 이용하여 직접 투여하였다.

- ▶ A군: 신선 복분자 추출물 16% EtOH 용액 1.5 mL 투여.
- ▶ B군: 신선 복분자 추출물 H₂O 용액 1.5 mL 투여.
- ▶ C군: 복분자 와인 농축물 16% EtOH 용액 1.5 mL 투여.
- ▶ D군: 복분자 와인 농축물 H₂O 용액 1.5 mL 투여.
- ▶ E군: 16% EtOH 1.5 mL 투여.
- ▶ F군: H₂O 1.5 mL 투여.

다) 혈액 채취

경구 투여 1시간 후의 실험동물을 ether 마취 하에서 개복한 후 대동맥으로부터 헤파린이 첨가된 주사기로 채혈하여 원심분리(3000 rpm, 20분, 4°C, VS-15 CFN, VISION, KOREA)를 행하였다. 얻어진 상층의 혈장은 분석 직전까지 -38°C에 냉동 보존하였다.

라) 분석 시료의 조제 및 분석 방법

동일 시료를 투여한 각각의 쥐로부터 얻은 혈장 120 µL씩을 취하여 각 군 별로 합하였다. 군 별로 합하여진 혈장 (n=5) 600 µL에 PBS buffuer (1560 µL)와 CuSO₄ PBS 용액(240 µL)을 그림 V-2에 나타낸 바와 같은 비율로 혼합한 후, 37°C에서 shaking incubation하였다. 배양 용액을 30분 간격으로 100 µL씩 취하여 그림 V-2와 동일한 방법으로 CE-OOH 분석 시료를 조제한 다음, 다음에 나타낸 HPLC 조건에 의해 CE-OOH의 경시적 변화를 분석하였다.

-HPLC conditions

column: Octyl-80 Ts (Tosoh, TSK-gel, 4.6 × 150 mm).

mobile phase: 97% MeOH

Pump: Model 510 solvent delivery system, Waters, USA.

flow rate: 1.0 mL/min

column temp.: room temp. (TCM, Waters, USA)

detection: 235 nm (Model 486 tunable absorbance detextor, Waters, USA).

injection volumn: 20 µL

3) 결과 및 고찰

(신선 복분자 추출물 16% EtOH 용액과 H₂O 용액 투여군 간의 피산화성 비교)

먼저 신선 복분자 추출물 16% EtOH 용액 투여군(A군)과 신선 복분자 추출물 H₂O 용액 투여군(B군) 간의 피산화성을 비교한 결과(그림 VI-1), 그들의 lag time 은 거의 유사한 경향을 보였으나, 전반적인 산화 억제 효과는 A군 즉 신선 복분자 추출물을 16% EtOH 용액에 용해시켜 투여한 군이 동일 시료를 수용액 상태로 투여한 군(B군)보다 더 높은 경향을 보였다. 이것은 복분자에 함유되어 있는 성분들이 물보다 16% EtOH 용액 상태로 섭취하였을 때 보다 혈 중 흡수율을 높일 수 있음을 시사하는 결과라 판단되었다.

이것은 복분자 와인을 섭취했을 때의 효과를 상승시킬 가능성을 시사하는 결과라 판단되어 복분자 와인 농축물에 대해서도 같은 비교를 행하였다.

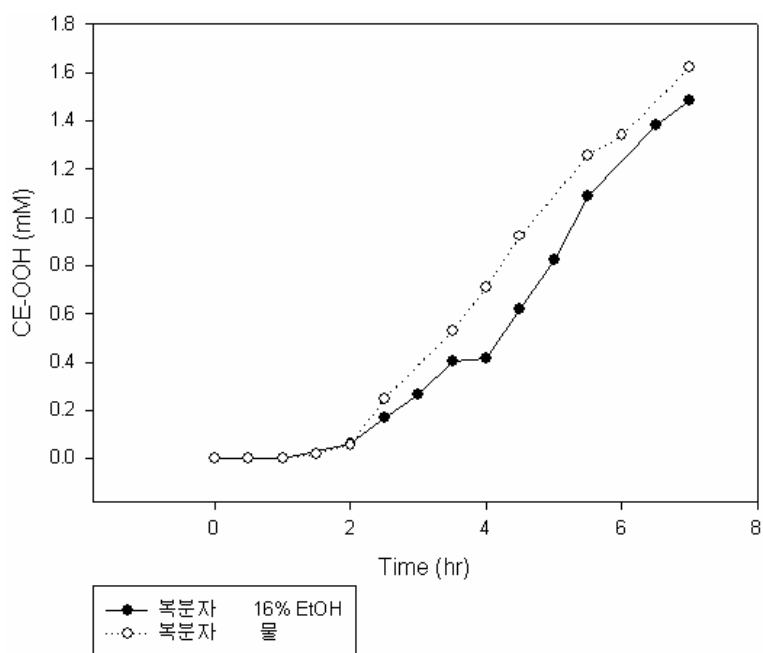


그림 VI-1. 신선 복분자 추출물 16% EtOH 용액과 H₂O 용액 투여군 간의 피산화성 비교.

(복분자 와인 농축물 16% EtOH 용액과 H₂O 용액 투여군 간의 피산화성 비교)

복분자 와인 농축물 16% EtOH 용액 투여군(C군)과 복분자 와인 농축물 H₂O 용액 투여군(D군) 간의 피산화성을 비교한 결과이다. 두 군 간의 전반적인 CE-OOH 생성 억제 효과는 유사한 경향을 보였다. 그러나 복분자 와인 농축물 16% EtOH 용액 투여군(C군)이 복분자 와인 농축물 H₂O 용액 투여군(D군)에 비해 lag time이 더 연장되었음을 알 수 있었다. 이것은 동일 시료를 이용하였음에도 불구하고 그 시료를 용해한 용매의 차이에서 유래한 결과로 판단된다. 즉 상기 그림 VI-1의 경우에서와 마찬가지로 복분자 와인 농축물에 함유되어 있는 성분들은 수용액 상태로 섭취하는 것보다 일상적으로 음용하는 와인의 알콜 농도(16% 부근)에서 음용하는 것이 혈액의 항산화적 측면에서 더 효율적임을 시사하는 결과라 생각된다.

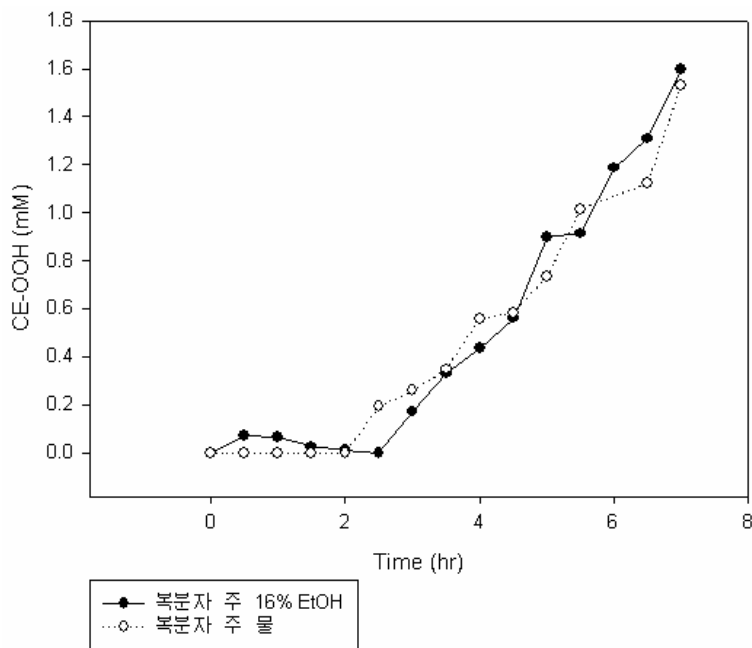


그림 VI-2. 복분자 와인 농축물 16% EtOH 용액과 H₂O 용액 투여군 간의 피산화성 비교.

(신선 복분자 추출물과 복분자 와인 농축물의 16% EtOH 용액 투여군 간의 피산화성 비교)

복분자와 복분자 와인을 각각 다른 용액에 용해시켜 쥐에게 투여했음에도 불구하고 16% EtOH 용액에 용해시켜 투여한 군에서 높은 항산화활성이 인정되었다. 그래서 이번에는 발효 전의 신선 복분자 추출물(A군)과 발효 후의 복분자 와인 농축물(C군)을 각각 16% EtOH에 녹여 투여한 군들 간의 활성을 비교하였다.

그림 VI-3에 나타낸 바와 같이 A군과 C군 모두 대조구(E군)에 비해 CE-OOH 생성 억제 효과를 보였다. 그러나 A군의 경우에는 대조구와 유사한 lag time을 보인 반면, C군은 A군 보다 lag time을 보다 연장시키는 효과를 보였다. 이것은 발효 전의 복분자보다 발효 후의 복분자 와인이 혈중 항산화능 향상에 기여도가 높음을 시사하는 매우 흥미로운 결과라 판단되었다.

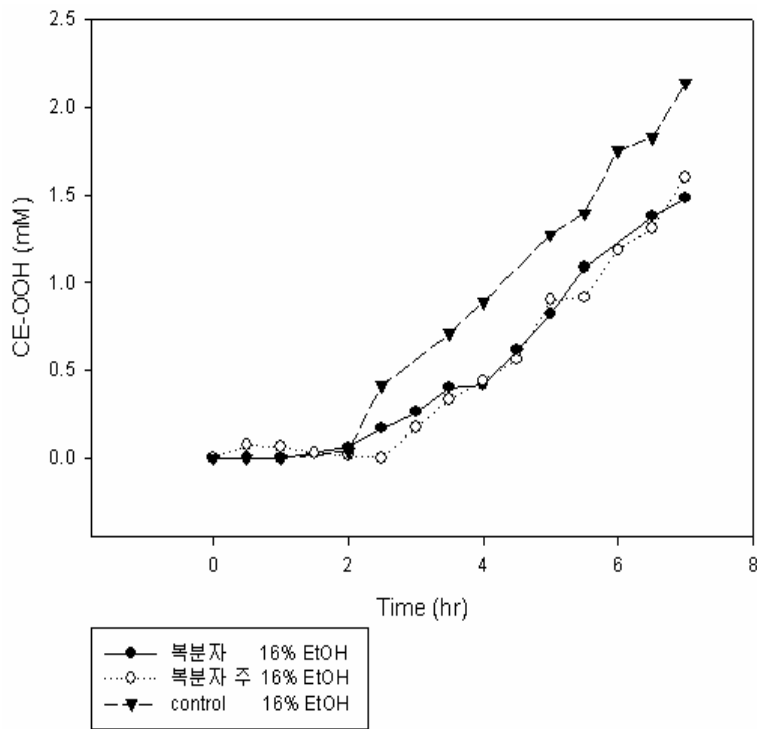


그림 VI-3. 신선 복분자 추출물과 복분자 와인 농축물의 16% EtOH 용액 투여군 간의 피산화성 비교.

(신선 복분자 추출물과 복분자 와인 농축물의 H₂O 용액 투여군 간의 피산화성 비교)

다음은 복분자 추출물과 복분자 와인 농축물을 각각 수용액 상태로 하여 투여하였을 때의 효과를 비교하였다. 본 비교는 매우 흥미로운 결과를 보였다. 즉 대조군(F)에 비해 복분자 와인 농축물의 수용액 투여군(D)은 대조군(F)에 비해 정도는 미약하나마 높은 항산화 효과를 발휘하였다. 그러나 복분자 추출물의 수용액 투여군(B)은 오히려 대조군에 비해 산화를 촉진시키는 현상이 나타났다. 이것은 시료를 투여하지 않고 *in vitro* 상에서 쥐 혈장에 복분자와 복분자 와인 시료를 첨가하여 항산화능을 검토하였던 II-5 항에서 관찰되었던 결과와는 상반되는 효과가 관찰되었다.

이것은 *in vitro* 실험 결과와 시료를 동물에 직접 투여하여 관찰되는 결과들이 상반되는 현상을 보이는 의미있는 결과라 여겨진다. 즉 동일 원료라 할지라도 발효전의 상태와 발효 후의 상태가 발휘하는 생리활성에는 차이가 있으며, 그것을 어떤 형태로 섭취할 것이고, 또 그들 현상을 어떤 방법으로 평가했는가에 따라 결과는 달리 해석될 수 있음을 보이는 매우 중요한 시사성을 제시하였다.

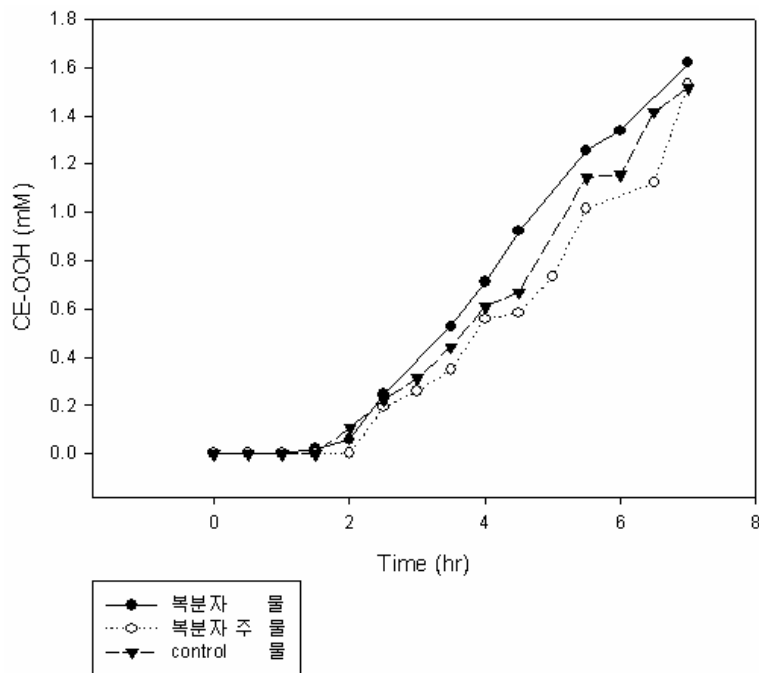


그림 VI-4. 신선 복분자 추출물과 복분자 와인 농축물의 H₂O 용액 투여군 간의 피산화성 비교.

(신선 복분자 추출물 H₂O 용액과 복분자 와인 농축물 16% EtOH 용액의 투여군 간의 피산화성 비교)

마지막으로 신선 복분자 추출물 H₂O 용액 투여군(B)과 복분자 와인 농축물 16% EtOH 용액 투여군(C) 간의 피산화성을 비교하였다. 그림 VI-5에 나타낸 바와 같이 C군이 현저히 높은 활성을 보였다. 이것은 동일량의 복분자를 기준으로 섭취하였을 때 신선 복분자보다 복분자 와인의 형태로 섭취하였을 때 혈중 항산화능 향상 측면에 있어 보다 효과적임을 시사하는 결과라 판단되었다. 그러나 이것은 주어진 본 실험의 조건에서 관찰된 결과이기 때문에 각 시료의 섭취량이 달라짐으로써 발생될 수 있는 변수는 충분히 고려되어야 할 사항으로 생각된다.

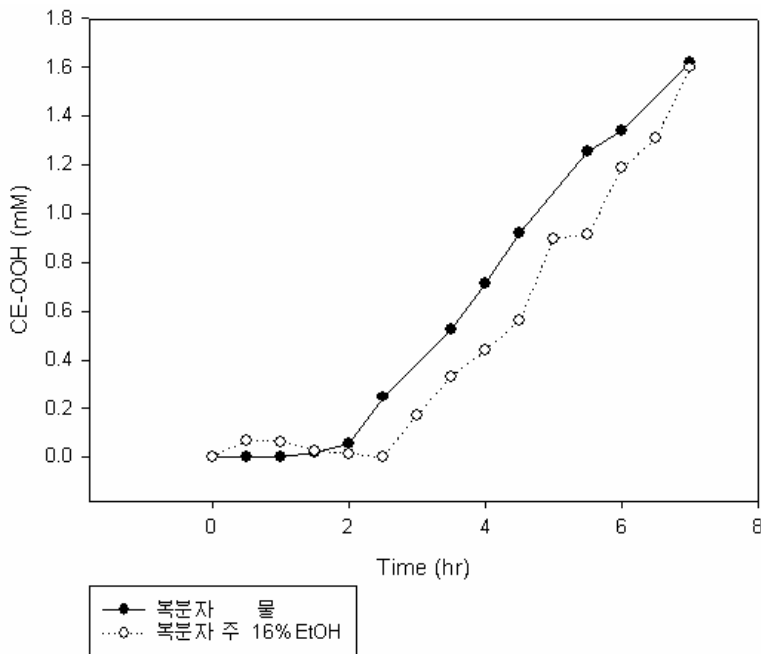


그림 VI-5. 신선 복분자 추출물과 H₂O 용액과 복분자 와인 농축물 16% EtOH 용액의 투여군 간의 피산화성 비교.

본 방향의 결과를 종합해보면, 결론적으로 복분자 와인의 섭취는 혈중 항산화능 향상에 기여함이 시사되었다. 그리고 그 활성은 신선 복분자를 섭취했을 때보다 와인 형태로 섭취했을 때 효과적일 가능성 또한 시사되었다.

이러한 가능성들은 상기 II-V 항의 연구배경에서도 기술하였듯이 일상적으로 섭취하는 식음료들의 혈중 항산화능 향상은 산화에 민감하여 동맥경화 유발의 주요 요인으로 작용하는 LDL의 산화를 억제함으로써 동맥경화를 예방하는 수단으로 작용한다. 그래서 복분자 와인의 적정량의 섭취는 혈 중 항산화능을 향상 시킴으로써 동맥경화를 예방하는 인자로서 작용할 가능성이 시사되었다.

그러나 이러한 결과들은 복분자 와인을 다량 섭취해도 좋다는 것을 의미하지는 않는다. 본 연구의 동물실험에서 설정된 시료의 투여량은 실제로 우리들이 일상적으로 섭취하는 양보다 훨씬 높은 농도의 시료를 복분자 와인의 알코올 함량에 맞추어 투여한 것이기 때문에 보다 dramatic한 결과가 얻어질 수 있었다고 생각된다. 이러한 결과들은 복분자 와인의 섭취가 건강에 유의할 것이라는 가능성을 충분히 시사하지만 장기간의 섭취, 다량 섭취 등에 대한 염려스러운 사항에 대해서는 추후 보다 충분한 검토가 요구되어진다.

또 발효 및 숙성을 거친 후의 복분자 와인으로부터 다양한 phenolic compound들이 단리·동정되었으며, 여러 종의 신규 화합물들 또한 구명되었다. 일부 그 구조식의 복잡함 때문에 구조결정이 아직 진행 중에 있는 화합물들도 있으나 그들의 완벽한 구조가 밝혀지는 대로 논문화되어질 것이며, 발효 후의 와인으로부터 다양한 신규 화합물들이 단리된 것은 복분자 와인 이외의 타종의 과일 발효주 등의 성분연구에도 시사하는 바가 큰 성과라 생각된다.

그리고 발효과정동안 관찰된 gallic acid와 3,4-dihydroxybenzoic acid의 변화 경향 또한 복분자 와인의 품질관리 측면에서 지표화합물로서의 이용 가능성을 제시한 성과라 판단된다.

이러한 성분연구, *in vitro* 및 *ex vivo* 상에서의 생리활성 평가 연구 등이 복분자 및 복분자 와인의 품질관리 및 소비촉진을 위한 홍보자료로 활용되어짐으로써 농가소득증대 및 농촌경제의 활성화로 연결되어지는 유용한 기초자료로 이용되어지길 기대한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구에서는 현행 복분자술의 품질을 개선하기 위하여 새로운 발효기술을 개발함으로써 현재 사용하고 있는 복분자열매의 사용량과 술맛의 상호관계를 유지하면서도 소비자의 기호도에 맞고 경제적 측면에서도 생산자에게 유리한 고품질의 복분자술을 제조하였고 복분자술에 함유된 생리활성물질을 검색하였으며 과잉 생산되는 복분자 열매를 이용하여 기능성 가공식품을 개발하여 상품화하고 음료, 식품 등에 접목하여 기능성 제품을 확대 개발하여 판매가능하게 함으로써 본 연구의 당초 목표도 충실하게 달성하였다.

제 1 절 연구목표 달성도

1. 제 1 차 년도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도(%)
○ 고품질 복분자술 제조를 위한 새로운 발효기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 복분자술 발효 우수 효모의 선정 ▶ 한약재 선정 및 추출액 제조 ▶ 우수 발효효모의 복분자술 발효조건 확립 	100
○ 복분자열매로부터 가공식품용 기능성 식품소재의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 복분자 앰플용 추출액의 제조 ▶ 복분자 앰플의 제조조건 확립 ▶ 복분자 앰플의 특성 분석 	100
○ 복분자술의 생리활성물질 의 단리, 정제, 구조결정, 생성기구 해명 및 품질평가 지표 확립	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 복분자술의 생리활성물질 추출 ▶ 복분자술의 생리활성물질 단리·정제 	100

2. 제 2 차 년도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도(%)
○ 고품질 복분자술 제조를 위한 새로운 발효기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 최적발효조건에서의 고품질 복분자술의 생산 ▶ 생산된 복분자술의 품질 특성 분석 ▶ 블렌딩 기술 개발 	100
○ 복분자열매로부터 가공식품용 기능성 식품소재의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 복분자 분말 제조용 추출물의 제조 ▶ 복분자 분말의 제조공정 및 조건 확립 ▶ 제조된 복분자 분말소재의 특성 분석 	100
○ 복분자술의 생리활성물질의 단리, 정제, 구조결정, 생성기구 해명 및 품질평가지표 확립	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 복분자술의 생리활성물질 구조결정 ▶ 조추출물 및 단리 화합물의 생리활성평가 	100

3. 제 3 차 년도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도(%)
○ 고품질 복분자술 제조를 위한 새로운 발효기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 최적발효조건에 의한 고품질 복분자술의 대량생산 ▶ 고품질 복분자술의 관능평가 ▶ 복분자 술의 상품화 및 사업화 	100
○ 복분자열매로부터 가공식품용 기능성 식품소재의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 복분자 분말소재를 이용한 기능성 복분자 떡의 제조 ▶ 복분자 분말소재를 이용한 기능성 복분자 빵의 제조 ▶ 복분자 분말소재를 이용한 기능성 복분자 한과의 제조 	100
○ 복분자술의 생리활성물질의 단리, 정제, 구조결정, 생성기구 해명 및 품질평가지표 확립	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 생리활성물질의 분석법 확립 ▶ 생리활성물질의 생성기구 해명 ▶ 품질평가지표 확립 	100

제 2 절 관련분야에의 기여도

본 연구의 제1세부과제인 “고품질 복분자술 제조를 위한 새로운 발효기술 개발”에서 현행 발효균주보다 우수한 효모 균주를 선발하고 한약재 선정 및 추출액을 제조하여 복분자주의 최적제조조건을 확립하고 대량생산체제를 확립하였다. 그리고 검증된 최적 발효조건에서 복분자주를 생산하여 생산된 복분자주의 특성을 분석함으로써 그 가치와 상품화 가능성을 밝혀내 지역 경제 활성화에 큰 공헌을 하였다고 평가받고 있다.

본 연구의 제1협동과제인 “복분자열매로부터 가공식품용 기능성 식품소재의 개발”에서 복분자열매로부터 복분자 앰플과 복분자 분말을 개발하여 그 특성을 분석하였고 이들을 이용한 떡, 빵, 한과 등의 가공식품을 개발함으로써 과잉 생산되고 있는 복분자열매의 부가가치를 향상시켰다.

본 연구의 제2협동과제인 “복분자술의 생리활성물질의 단리, 정제, 구조결정, 생성기구 해명 및 품질평가지표 확립”에서 복분자주에 함유된 복분자술의 생리활성물질 추출, 복분자술의 생리활성물질 단리·정제, 생리활성물질의 구조결정, 조추출물 및 단리화합물의 생리활성을 평가하여 복분자술의 기능성을 입증하고 생리활성물질의 분석법을 확립하고 생리활성물질의 생성기구 해명, 품질평가지표를 확립함으로써 복분자주의 대량생산 및 산업화에 크게 활용될 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

해당사항 없음

제 2 절 기업화 추진 방안

본 연구에서 개발한 복분자주 생산기술은 (주)연수당복분자주에서 새로운 생산기술로 산업화하는 것이 가장 타당하고 그 향과 맛이 소비자들에게 호평을 받고 있고 산업화한다면 소비자의 폭도 확대할 수 있을 것으로 기대되기 때문에 산업화에 대한 노력이 필요하다.

제 6 장 참고문헌

1. Kang GH, Noh BS, Suh JH, Hawer S. Food Analysis. Sungkyunkwan University Press, Seoul, Korea. pp. 126–129 (1989)
2. Kim IH, Park WS, Koo YJ. Comparison of fermentation characteristics of Korean traditional alcoholic beverage with different input step and treatment of rice and Nuruk. Korean J. Dietary Cult. 11: 330–348 (1996)
3. Kim JH, Lee SH, Kim NH, Choi SY, Lee JS. Manufacture and physiological functionality of Korea traditional liquors by using dandelion. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 28: 367–371 (2000)
4. Park JM, Oh HI. Changes in microflora and enzyme activities of traditional Kochujang meju during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 56–62 (1995)
5. Kim UJ, Ku KH. Sensory Evaluation Techniques Food, Hyoil Moonhacsa Co., Seoul, Korea. pp. 68–72 (2001)
6. SPSS. SPSS for Windows. Rel. 10.0. SPSS Inc., IL, USA (1999)
7. Jung CY, Choi LG. SPSSWIN for Statistics Analysis, Version 10.0, Forth ed., Muyok Publishing Co., Seoul, Korea, pp. 276–283 (2002)
8. Um DH, Chang HG, Kim JG, Kim WJ. Optimal temperature and salt concentration for low salt Dongchimi juice preparation. Korean J. Soc. Food Sci. 13: 578–584 (1997)
9. Rozes N, Larue F, Ribereau–Gayon P. Effect of a variation of grape must temperature on the fermentative ability and the neutral lipid content of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotech. Lett. 10: 821–824 (1988)
10. Kim WJ, Chang SK, Ko SN, Choi HS, Kim JG. Effect of fermentation temperature and salt concentration on the rate of Takju. J. Korean Agric. Chem. Biotech. 39: 398–402 (1996)

11. Kang HA, Chang KS, Min YK, Choi YH. Value addition of jujube wine using microfiltration and ultrafiltration. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1146–1151 (1998)
12. 보건복지부 : 식품공전. 한국식품공업협회, 713, 1995
13. Kim, H. J.; Lee, H. O.; Min, D. B. Effects and prooxidant mechanisms of oxidized α -tocopherol on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Science* (2007), 72(4), 223–C230.
14. Petrosyan, E. A.; Sergienko, V. I.; Sukhinin, A. A.; Zakharchenko, I. S.; Oganesyanyan, S. S. Effect of Combined Treatment with Sodium Hypochlorite and α -Tocopherol on Prooxidant and Antioxidant System of the Blood during Experimental Bile Peritonitis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* (2005), 139(4), 400–403.
15. Skibsted, L. H.; Carlsen, Charlotte U.; Kroeger-Ohlsen, Maiken V.; Hedegaard, Rikke V.; Bibby, B. M.; Kristensen, Dorthe. Antioxidants and prooxidants in milk-like emulsions: effect of ascorbate, urate, α -tocopherol and β -carotene on early events in lipid oxidation. *Milchwissenschaft* (2005), 60(1), 44–48.
16. Ohkawa, Sakae; Yoneyama, Takashi; Shimoi, Kayoko; Takita, Takako; Maruyama, Yukitaka; Kumagai, Hiromichi. Pro-oxidative effect of α -tocopherol in the oxidation of LDL isolated from co-antioxidant-depleted non-diabetic hemodialysis patients. *Atherosclerosis (Amsterdam, Netherlands)* (2004), 176(2), 411–418.
17. Yoshino, M.; Haneda, M.; Naruse, M.; Htay, H. H.; Iwata, S.; Tsubouchi, R.; Murakami, K. Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Toxicology in Vitro* (2002), 16(6), 705–709.

18. Lapidot, Tair; Walker, Michael D.; Kanner, Joseph. Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic b-Cells in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002), 50(25), 7220-7225.
19. Yen, Gow-Chin; Duh, Pin-Der; Tsai, Hui-Ling. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry* (2002), 79(3), 307-313.
20. Murakami, Keiko; Ito, Masae; Htay, Hla Hla; Tsubouchi, Ryoko; Iwata, Shouko; Yoshino, Masataka. Antioxidant and prooxidant actions of gallic acid derivatives: effect on metal-dependent oxidation of lipids and low density lipoprotein. *Biomedical Research* (2000), 21(5),291-296.
21. 민경희, 박소영, 최순영, glucoamylase 생성효모의 분리와 효소학적특성, 한국균학회, 한국균학회지, Vol. 27, No. 6, 386~393
22. Jone M.A., and Ingledew W.M., Fuel alcohol production optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation, *Apple, Environ. Microbiol.*, 60, 1048, 1994
23. 박영민, 김철호, 이상기, Selection of an ethanol tolerant Clostridium thermohydrosulfuricum strain., 한국미생물생명공학회(구 한국산업미생물학회), *Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol. 2, No. 3, 226~229, 1992
24. 손석민, 김인규, 변유량, 응집성 효모에 의한 고생산성 알코올 발효, 한국미생물생명공학회(구 한국산업미생물학회), *산업미생물학회지*, Vol. 20, No. 5, 607~613, 1992
25. 정용진, 서권일, 신승렬, 서지형, 강미정, 김광수, 감과실 알코올 발효를 위한 효모의 분리 및 동정, *아시아식생활학회지*, Vol. 7, No. 4, 538~543, 1997