

발간등록번호

11-1543000-001023-01

아로니아 함유 가공식품 개발을 위한
가공적합성 및 건강기능성 규명

Investigation on processing suitability and
health-functionality for development of processed
products of Aronia (*Aronia melanocarpa*)

한경대학교

농림축산식품자료실



0022594

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “아로니아 함유 가공식품 개발을 위한 가공적합성 및 건강기능성 규명” 과제
의 보고서로 제출합니다.

2015년 8월 9일

주관연구기관명 : 한경대학교

주관연구책임자 : 황 은 선

세부연구책임자 : 황 은 선

협동연구기관명 : 건양대학교

협동연구책임자 : 유 영 춘

요 약 문

I. 제 목

아로니아 함유 가공식품 개발을 위한 가공적합성 및 건강기능성 규명

II. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	사업화지표							연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출		투자유치	논문				학술발표	정책 활용	
			SCI					비 SCI								
최종목표	1		1	1					2	3					1	
연구기간 내 달성실적	1	1	2	2 ¹⁾					2	10	9		4		3	5 ²⁾
달성율(%)	100		200	200					100 ³⁾	333					333	

¹⁾참여기업에 기술이전한 막걸리와 양갱의 시제품 제작 완료 및 사업화 진행 준비 중

²⁾현재 투고 후 1차 교정 중 1건, 투고완료 논문 2편, 투고 준비중 논문 3편

³⁾출판 중인 논문 1편 포함(현재 교정 중인 논문과 투고 완료된 논문을 포함하면 실적은 더 늘어날 예정)

III. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구는 아로니아의 1) 생리적 특성 구명을 통한 **고품질 유지조건** 및 열매와 잎의 생리활성 물질 추출법을 확립, 가공에 따른 기능성 물질의 변화를 분석, 기능성 성분이 **최적화** 되는 가공방법을 확립하고, 2) 아로니아 열매 추출물에 의한 각종 **면역조절작용**을 조사하고, 이에 관련된 **활성분획(물질)의 동정과 생물학적 작용기전의 해석**을 통해 아로니아를 **고기능성 면역조절용 기능식품**으로 개발하고자 함. 이를 통해 아로니아의 우수성을 과학적으로 규명하고 기능성이 입증된 가공식품을 개발하여 **아로니아 재배 농가의 고부가가치 향상에 기여**하고자 함

2. 연구개발의 필요성

- 아로니아는 포도당, 과당 및 유기산을 비롯하여 anthocyanin 색소를 다량 함유하고 있을 뿐 아니라 cyanidin-3-glucoside, flavonoids, stilbenes, prenylflavonoids, coumarin 등의 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으나 이들 **유효성분의 효능에 대한 연구는 아직 미진한 실정임**. 따라서 유효 생리활성 물질들의 기능적 특성을 살려 **건강기능식품 소재 개발을 위한 과학적 근거 확립을 위한 연구가 필요함**

- 아로니아는 특유의 신맛과 떼은맛으로 생과보다는 가공용으로 적합함. 또한, 수확 후 생과로 판매할 수 있으나 저장 기간이 길지 않아 효율적인 저장법 및 가공기술 개발이 필요

- 기능성을 함유한 가공식품이나 식품가공 소재로 개발하여 부가가치를 높이고 다양한 소비처에 공급하는 전략이 필요함
 - 수확 후 냉장, 냉동 과일, 반건조품(뽕, 과자에 토피용), 정제품, 분말 등으로 활용이 가능
 - 높은 안토시아닌 함량과 카테킨 성분은 세포 생명력을 강화시켜 주고, 염증을 줄이며, 붓기를 방지해주기 때문에 파우더, 스킨로션, 팩 등 화장품에 응용이 가능함
 - 아로니아 열매는 고유의 적자색의 강렬한 색소를 포함하고 있어 식품 착색재료나 천연염료 등으로도 활용이 가능함

- 아로니아는 재배가 간편하고 큰 투자를 하지 않고도 유흥지 활용과 관비재배로 대량생산 체계를 갖출 수 있는 작물로 4~5년 전부터 국내에 아로니아 열풍이 불면서 많은 농가에서 아로니아를 재배하고 있음. 현재는 아로니아의 희소성 때문에 가격경쟁력이 있으나 향후 2~3년 후에 많은 농가에서 열매가 수확되게 되면 아로니아 생과의 가격하락이 예상됨. 따라서 **생과의 저장기간을 연장시킬 수 있는 기술을 개발하고 아로니아 열매와 잎을 활용한 적절한 가공품을 개발하여 부가가치를 높이는 전략이 필요함**

- 최근 우리나라는 고령화 사회로의 진입, 사회적 스트레스의 증가, 그리고 식생활 문화의 급격한 변화 등의 원인으로 알러지, 아토피 및 천식과 같은 면역학적 만성질환과, 염증성 질환과 같은 면역질환의 유병률이 크게 증가하는 추세임. 특히 인체관련 질환 중 **면역관련 질환에 대한 아로니아의 활성화에 대해서는 구체적인 연구보고가 매우 적어 면역반응에 대한 아로니아의 조절효과를 보다 과학적으로 분석함으로서 기능성 식품과 의약품 소재로서 개발할 필요성이 있음**

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 아로니아의 생리적 특성 구명을 통한 고품질 유지조건 확립 및 양갱 개발

- 아로니아 열매의 재배조건과 생산지에 따른 품질특성 및 유효성분 평가
- 저장온도와 저장기간에 따른 품질특성 및 유효성분 평가
- 건조조건에 따른 아로니아 분말의 품질 특성 및 가공적성 분석
- 일반성분 등 품질평가
- 생과와 저장과의 선호도 및 유효성분 비교
- 아로니아 함유 양갱 제조

2. 가공조건에 따른 아로니아의 기능성 물질 분석 및 막걸리 개발

- 아로니아 열매의 건조 방법에 따른 생리활성물질 함량 측정
- 아로니아 잎의 수확시기에 따른 생리활성물질 함량 측정
- 아로니아 잎의 수확시기에 따른 항산화 및 항암 활성 측정
- 아로니아 함유 기능성 막걸리 제조

3. 아로니아 함유 제품 개발 및 개발된 제품의 기능성 평가

- 아로니아 함유 발효음료 개발
- 아로니아 함유 설기떡 제조
- 아로니아 함유 기능성 잼 제조
- 개발된 제품의 기능성 평가

4. 아로니아 추출물의 면역세포 기능조절 작용

- Mouse를 통한 아로니아 추출물의 대사 기능 변화 및 독성 테스트
- 아로니아 추출물의 경구투여에 의한 혈액성분 변화 측정
- 아로니아 추출물의 경구투여에 의한 마우스의 PBMC 및 Splenocytes의 증식 및 면역관련 사이토카인 분비능 측정
- 사이토카인 분비능과 surface marker의 변화 등을 통한 활성화 유도 효과 측정

5. 아로니아 추출물의 항암활성

- B16-BL6 melanoma 암세포의 폐전이 및 암세포 증식의 억제활성
- Colon 26 암세포 폐전이 억제활성 시험
- 발암세포 주입 후 mouse의 spleen 증식도 분석
- in vivo에서의 암세포 증식억제 활성 측정
- 항암활성 작용기전에 대한 면역학적 분석

6. 아로니아 추출물의 항염증 작용

- TNF-a, IL-6, IL-1b 등의 분비에 대한 아로니아 추출물의 억제활성 측정
- 염증매개물질인 NO와 PGE2에 대한 아로니아 추출물의 분비억제 효과 측정
- iNOS, COX-2 활성 측정
- LPS에 의한 염증유도 관련 세포 내 신호전달 기전에 미치는 영향 분석
- 아로니아 추출물의 항염증 활성 작용기전 해석 및 항염증 작용의 최적화 기법 확립

7. 아로니아 추출물의 항알러지 활성

- 알러지 모델에서 아로니아 추출물의 항알러지 활성 판정
- 알러지 유발 마우스에서 아로니아 추출물 투여에 의한 T세포 반응의 변화 측정
- 아로니아 추출물이 천식유도에 미치는 억제효과 측정

V. 연구개발결과

1. 아로니아의 생리적 특성 구명을 통한 고품질 유지조건 확립 및 양갱 개발

- 아로니아 유래 안토시아닌 색소 대한 pH, 온도, 저장기간, 빛, 당 및 유기산에 대한 안정성을 조사하였다. 아로니아 색소는 pH 3.0에서 가장 안정하고 높은 흡수스펙트럼을 나타냈고 pH 4.0~7.0으로 증가함에 따라 색소의 강도가 감소하였다. 아로니아 색소는 고온에서 장시간 가열할수록 색소의 안정성은 감소하는 경향을 나타냈으며 암소보다는 일광에 노출하였을 때 색소의 파괴가 급격히 나타났다. 아로니아 색소는 냉동 온도에서 저장한 경우에는 저장기간이 경과하여도 비교적 안정하였으나 냉장온도에서는 저장기간이 경과함에 따라 아로니아 색소가 감소하는 경향을 보였다. 아로니아 색소에 당을 첨가한 경우 색소의 강도가 전반적으로 감소하였고, 0.1 M 당을 첨가시 색소의 강도는 maltose, galactose, sucrose, glucose 및 fructose 순으로 낮은 색소의 잔존율을 보였다. 아로니아 색소는 50 mM 농도의 유기산의 존재하에서 가장 안정하였으며 저장기간이 길어짐에 따라 첨가한 모든 유기산에서 색소의 강도가 감소하는 경향을 나타냈다. 이상의 결과는 향후 아로니아를 활용한 가공식품 및 천연 식품색소 개발을 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.
- 아로니아즙을 첨가한 양갱을 제조하여 이화학적 제품특성 및 항산화 활성을 분석하였다. 아로니아즙 첨가 양갱의 수분함량은 29.5~31.2%로 대조군과 차이를 나타내지 않았다. 아로니아즙 첨가량이 증가할수록 양갱의 pH는 5.99~5.18로 낮아지는 경향을 보이고 산도는 0.22%~0.47%로 증가하였다. 양갱의 당도는 아로니아즙의 첨가량이 증가할수록 5.3~5.6 °Brix까지 증가하였으며 대조군과 첨가군 사이에 유의적인 차이를 보였다. 양갱의 색

도 측정에서 명도(L)와 황색도(b)는 아로니아즙 첨가량이 증가함에 따라 감소한 반면에 적색도(a)는 증가하였다. 조직감 측정에서는 아로니아즙 함량이 증가함에 따라 대조군에 비해 경도가 1.6배~2.6배까지 증가하다. 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량은 아로니아즙 첨가량에 비례하여 증가하였고 대조군 및 각 실험군에서 통계적으로 유의성 있는 증가를 나타냈다. DPPH와 ABTS radical 소거능 측정 결과 모든 첨가군이 대조군에 비해 radical 소거활성이 높게 나타나 아로니아즙 첨가량이 증가할수록 항산화 활성도 증가하는 것으로 보인다. 관능검사에서 맛, 색, 질감 및 전반적인 기호도 평가에서 AJ 100이 가장 높은 점수를 받았다. 이상의 결과를 통하여 아로니아는 새로운 항산화 활성이 우수한 기능성 소재이며 아로니아즙을 첨가하여 기능성 양갱을 제조할 때 첨가하는 아로니아즙의 양은 AJ 100이 가장 적당할 것으로 사료된다.

2. 가공조건에 따른 아로니아의 기능성 물질 분석 및 막걸리 개발

- 아로니아 추출물 분말을 제조하여 가공식품에 적용하기 위한 방법을 모색하기 위하여 다양한 건조방법이 아로니아의 항산화 성분 함량 및 항산화 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 신선한 아로니아를 일광건조, 스팀 후 일광건조, 동결건조 및 오븐건조의 방법으로 완전히 건조시킨 후 분말로 제조하여 100℃에서 6시간동안 3회 반복 열수 추출하여 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량을 분석하였다. 아로니아의 총 폴리페놀 함량(mg gallic acid/g 기준)은 동결건조한 시료에서 가장 높았으며, 스팀 후 일광건조 > 일광건조 > 및 오븐건조의 순으로 높게 나타났다. 아로니아의 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 기준으로 동결건조한 시료에서 가장 높았으며, 스팀 후 일광건조 > 일광건조 > 오븐건조의 순으로 나타났다. 아로니아에 함유된 총 안토시아닌 함량은 cyanidin-3-glucoside를 기준으로 동결건조 > 일광건조 > 스팀 후 일광건조 > 오븐건조의 순으로 나타났다. 아로니아 열수 추출물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, hydroxyl 라디칼 소거능, superoxide anion 라디칼 소거능 및 환원력의 5가지 방법으로 측정하였다. 4가지 건조방법 중에서 동결건조 시료에서 항산화 활성이 유의적으로 높게 나타났으며, 오븐건조한 시료에서 가장 낮게 나타났다. 이상의 결과를 통하여 건조방법이 아로니아의 항산화 성분 함량과 항산화 활성에 영향을 주며 고온의 건조방법보다는 저온의 동결건조 방법이 아로니아의 유효성분 함량과 항산화 활성을 증대시키기 위한 최적의 방법으로 사료된다.
- 아로니아 잎 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 암세포 증식 억제 효능도 증가하였다. 또한, 아로니아 잎 추출물을 24시간 처리한 실험군에 비해 48시간 동안 처리한 실험군에서 암세포 성장 억제 효능이 증가하였다. 어린잎이 성숙한 잎에 비해

높은 암세포 저해활성을 보였으며, 물 추출물에 비해 80% 에탄올 추출물에서 암세포 증식 억제제가 비교적 높게 나타났다. 아로니아 잎 에탄올 추출물은 암세포의 침윤을 농도 (25~100 µg/mL) 의존적으로 억제하였고 암세포의 침윤을 억제하는 정도는 추출물의 농도와 비례하였다. 대조구에 비해 아로니아 어린잎의 에탄올 추출물은 인체 간암세포주인 SK-Hep1 세포의 이동을 처리 농도 및 처리 시간에 비례하여 억제하였다. 대조군에서는 암세포 배양 시간이 경과함에 따라 암세포의 이동이 일어나 48시간 처리군에는 암세포 사이의 간격이 없이 암세포가 이동함을 관찰하였다. 반면에, 아로니아 어린잎 추출물을 100 µg/mL 농도로 처리한 경우에는 암세포의 이동성이 매우 감소하였고, 암세포 배양 후 24 시간까지도 암세포의 이동이 거의 일어나지 않았고 24~48시간이 경과해서도 암세포의 이동이 미미하게 일어남을 확인하였다. 아로니아 어린잎 추출물의 농도가 200 µg/mL로 증가함에 따라 암세포의 이동이 48시간 배양한 군에서도 완벽히 억제됨을 확인하였다. MMP-2와 MMP-9은 암전이와 관련된 효소이며, 인체 간암세포주인 SK-Hep1 세포는 상당히 많은 양의 MMP-9과 약간의 MMP-2를 분비하는 것으로 알려져 있다. 아로니아 잎 추출물을 처리하지 않은 대조구에서 MMP-9과 MMP-2의 발현을 확인하였다. 아로니아 잎 추출물 농도별로 처리하고 48시간동안 배양한 결과, MMP-9 및 MMP-2의 발현이 감소함을 확인하였다.

- 막걸리 양조산업 현장에서 가장 많이 적용되고 있는 발효제인 입국과 개량누룩을 사용하여 막걸리 술덧 발효를 실시하고, 아로니아 안토시아닌의 안정성에 대하여 검토함으로써 아로니아의 안토시아닌 유래 색도 유지 및 기능성을 개선할 수 있는 아로니아 막걸리의 제조 조건을 제시하였다. 본 연구에서 사용한 아로니아의 안토시아닌은 cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-arabinoside, cyanidin-3-xyloside로 각각의 함량은 187.9, 3677.1, 1277.5 226.1 mg/kg 이었다. 아로니아 첨가량에 따른 막걸리 술덧 발효특성을 조사한 결과 발효제의 종류와 상관없이 아로니아 20% 첨가 시험군의 알코올 발효가 억제되는 것으로 나타났고, 아로니아 5% 첨가군의 적색도 a 값이 상대적으로 12, 20% 첨가 시험군에 비해 아로니아 고유 색도를 나타내기 어려운 것으로 관찰되어 아로니아 첨가량은 12%로 결정하여 후속실험을 실시하였다. 입국을 발효제로 사용한 시험군 A의 경우, 발효일수가 경과할수록 a 값이 감소하는 경향을 보였지만, 전반적으로 모든 개량누룩 시험군보다 높게 나타났다. 아로니아 막걸리 술덧 중 시험군 A에서 총 안토시아닌 함량이 가장 높았으며, 개량누룩을 발효제로 사용하고, 1단 담금 시 젖산으로 pH를 보정한 시험군들의 경우, 시험군 간 안토시아닌 조성 및 총 안토시아닌 함량에서 pH에 따른 큰 차이를 나타내지 않았다. 시험군 A에서 발효 2일차 cyanidin-3-O-galactoside 함량은 68.17 mg/L로 잔존 농도가 매우 높은 것으로 나타났고, cyanidin-3-O-arabinoside 함량은 발효기간에 상관없이 개량누룩 시험군 대비 3배 이상 잔존하는 것으로 확인되었으며, 미량 이기는 하지만 개량누룩 시험군에서는 검출되지 않는 cyanidin-3-O-xyloside가 검출되었다.

따라서 안토시아닌 함유 기능성 막걸리 양조 시 발효제로는 개량누룩보다는 입국의 사용이 안토시아닌 안정성 유지에 적합할 것으로 판단되었다.

3. 아로니아 함유 제품 개발 및 개발된 제품의 기능성 평가

- 아로니아 과즙과 당을 혼합하여 14~18 °brix가 되도록 한 후에 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 접종하여 주모를 제조하였다. 제조된 아로니아 과즙에 제조된 주모를 접종하여 알코올 발효를 한 후에 발효액을 원심분리 및 여과하였다. 여과액에 초산균을 접종하여 3~4주동안 발효시키면서 식초를 제조하였다. 품질 및 관능평가를 통하여 아로니아 식초는 유리당, 유기산 및 유리아미노산의 함량을 향상시킬 뿐만 아니라 우수한 향산화능을 갖는 것으로 나타났다.
- 아로니아 분말의 함량을 달리하여 설기떡을 제조하고 이화학적 품질특성, 관능적 특성, 기능성 성분의 함량, 항산화 활성 및 미생물 생육 정도를 측정하여 아로니아 분말 첨가 설기떡의 최적 배합비를 선정하고 제품화 가능성을 탐색하였다. 설기떡의 수분함량은 대조구에 비해 아로니아 분말 첨가량이 증가함에 따라 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 기계적인 조직감은 경도, 탄력성, 부착성, 응집성, 깨짐성은 대조구에 비해 아로니아 분말 첨가량이 증가함에 따라 감소하였다. 탄성은 각 시료간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 아로니아 분말 첨가 설기떡의 색도는 아로니아 분말 첨가량이 증가할수록 L값과 b값은 낮아지고 a값은 증가하였다. 총폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량은 대조군에 비해 아로니아 분말 첨가량이 증가할수록 높게 나타났다. 또한 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능으로 측정한 항산화 활성도 아로니아 분말 함량이 증가할수록 높게 나타났다. 설기떡을 4일 동안 저장하면서 일반세균과 대장균의 변화를 관찰한 결과 대조군에 비해 아로니아 함량이 높은 설기떡에서 이들 균의 증식이 유의적으로 억제됨을 확인하였다. 관능적인 특성은 아로니아 분말의 첨가량이 증가할수록 색, 맛, 향, 전반적인 선호도 등에서 높은 점수를 나타냈다. 이상의 결과로 볼 때, 아로니아 분말을 첨가한 설기떡의 제품화 가능성은 긍정적이라 사료되며 아로니아 분말 첨가 설기떡의 제조시에는 쌀가루 대비 5%의 분말을 첨가하는 것이 품질, 항산화활성, 미생물 생육억제 및 관능적인 측면에서 적합할 것으로 사료된다.
- 설탕과 설탕 대체 감미료를 첨가하여 아로니아잼을 제조하였으며 제조된 잼에 대한 이화학적 제품특성, 관능적 특성 및 항산화 활성을 분석하였다. 설탕과 에리스리톨을 첨가하여 제조한 잼의 수분함량(28.4~29.5%)은 유사하였고, 올리고당과 자일리톨을 첨가한 잼의 수분함량(31.6~32.3%)은 높게 나타났다. pH, 총산의 함량, 당도는 당의 종류와 차이가 없는 것으로 나타났다. 설탕을 첨가하여 제조한 잼의 퍼짐성이 가장 높았으며, 올리고당과 에리

스리톨을 첨가하여 제조한 잼의 퍼짐성이 가장 낮았다. 아로니아잼의 명도, 적색도 및 황색도는 설탕을 첨가하여 제조한 잼에서 가장 낮게 나타났으며, 올리고당, 자일리톨, 에리스리톨을 첨가하여 제조한 잼에서 증가하는 경향을 보였다. 첨가한 당류의 종류와 관계없이 아로니아잼에는 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌 함량이 높게 나타났으며, DPPH 및 ABTS radical 소거활성이 높은 것으로 확인되었다. 관능검사에서는 맛, 향미 및 전반적인 만족도 측면에서 자일리톨을 첨가한 잼이 비교적 높은 관능적인 선호도를 갖는 것으로 나타났으며, 에리스리톨은 색, 맛, 질감, 향미, 전반적인 만족도 측면에서 선호도가 낮은 것으로 나타났다. 이상의 결과를 통하여 아로니아를 함유하는 잼을 제조할 때 자일리톨이 설탕을 대체할 수 있는 주요 당류로 이용할 수 있음을 시사하고 있다.

4. 아로니아 추출물의 선천면역 조절작용

- 아로니아의 열매 및 잎을 냉수 혹은 열수에 의해 추출한 추출물을 이용하여, C57BL/6 마우스의 골수에서 분화시킨 골수유래 대식세포(BMDM; bone marrow-derived macrophage)와 복강 대식세포(PM; peritoneal macrophage)에 대한 활성화 유도효과를 측정하였다. 아로니아 추출물은 대식세포에 대해 500 mg/ml의 농도까지는 독성을 나타내지 않았으며(결과 미제시), 대식세포에 대해 각각의 추출물을 200 및 400 mg/mL의 농도로 24시간 처리하였으며, 양성 대조군으로 LPS(2 mg/mL)를 사용하였다. 각 추출물로 대식세포를 처리한 후, 세포배양액 중에 분비된 nitric oxide(NO)의 양을 측정하여 활성화 여부를 판정하였다. 그 결과 아로니아 열매 및 잎 추출물은 BMDM 및 PM에 대해 NO분비를 촉진하는 활성화 효과가 없는 것으로 나타났다.
- 림프구에 대한 아로니아 추출물의 기능조절 효과를 측정하기 위하여, 마우스(Balb/c) 비장 세포에 T세포와 B세포의 유사분열을 촉진하는 mitogen인 ConA와 LPS를 처리하고, 여기에 아로니아 추출물을 함께 배양하였다. 먼저 세포독성을 평가하기 위하여 MTT법에 의해 세포증식반응을 측정하였다. 그 결과 아로니아 열매 냉수 추출물은 500 mg/mL까지 세포독성을 나타내지 않았으며, 나머지 아로니아 추출물은 모두 100 mg/mL의 농도까지 안전한 것으로 확인되었다.
- 한편 T세포로부터 분비되는 면역조절물질인 사이토카인 생성에 미치는 아로니아 추출물의 영향을 조사하기 위하여, T세포에 아로니아 추출물을 12시간 전처리한 후 ConA로 24시간 처리하여 세포배양액 중에 분비된 사이토카인을 ELISA kit을 이용하여 정량하였다. 사이토카인은 Th1 type(IL-2, IFN-g)과 Th2 type(IL-4, IL-6)의 사이토카인을 비교, 정량하였다. 그 결과 아로니아 열매와 잎 추출물은 대체로 ConA로 자극한 T세포로부터 생성되는 사이토카인의 분비를 억제하는 경향을 나타내었으며, 특히 아로니아 잎 냉수 추출물이 가장 높은 억제활성을 지니는 것으로 확인되었다.

5. 아로니아 추출물의 항염증 활성 및 작용기전 해석

- 아로니아 추출물에 의한 항염증 활성은 RAW 264.7세포에 LPS(2 mg/mL)를 처리하는 염증모델을 통해 조사하였다. 아로니아 추출물은 LPS를 투여하기 12시간 전에 전처리하였다. 먼저 RAW 264.7세포의 생존에 영향을 주지 않는 농도를 결정하기 위하여 각 추출물을 500 mg/ml까지의 농도로 처리하고 MTT법에 의해 생존율을 측정하였다. 그 결과 모든 아로니아 추출물은 500 mg/mL의 농도까지는 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 염증반응에 대한 억제효과는 세포배양액 중에 분비되는 염증매개인자(NO, PGF₂, TNF- α 및 IL-6)의 농도를 정량하여 판정하였다. 그 결과 아로니아 열매와 잎 추출물은 대체로 항염증 활성을 나타내었으나, 가장 높은 활성을 지닌 것은 잎 냉수 추출물인 것으로 확인되었다.
- 대식세포의 염증반응에 있어서, LPS는 TLR-4를 통한 신호전달과 ATP처리에 의해 NLRP3 inflammasome이 활성화 되어 caspase-1 효소 활성화를 일으킨다. 이 효소는 pro-IL-1b를 분비형 IL-1b로 절단하여 세포 밖으로 분비하는 것으로 알려져 있다. 아로니아 추출물은 LPS로 자극하기 5시간 전에 200 또는 400 mg/mL의 농도로 전처리하였다. BMDM에서의 IL-1b의 분비에 있어서 모든 아로니아 추출물에서 억제활성이 관찰되었으나, 특히 잎 냉수 추출물이 가장 높은 억제활성을 보였다.
- 아로니아 잎 냉수추출물도 열매 냉수추출물과 동일하게, 세포독성을 나타내지 않는 농도에서 염증매개인자의 분비와 iNOS 및 COX-2의 세포내 발현을 유의하게 억제하는 것으로 관찰되었다. 또한 LPS자극에 의해 유도되는 염증관련 세포 내 신호전달에 대한 억제효과는 MAPK(ERK1/2, p38, JNK)와 NF- κ B의 활성화를 통해 조사하였다. 그 결과 아로니아 열매와 잎 냉수추출물은 MAPK에 대해서는 p38분자의 인산화를 약간 억제하였다. 한편 NF- κ B에 대해서는 아로니아 열매 및 잎 냉수추출물 모두 매우 높은 억제활성을 나타내었다. 이 결과로부터 아로니아 열매 및 잎 냉수추출물에 의한 항염증 활성에는 NF- κ B의 활성화 억제가 중요한 것으로 추정된다.

6. 아로니아 추출물의 항암활성 및 항당뇨 활성

- 아로니아 추출물의 항암활성은 B16-BL6 melanoma 암세포에 의한 마우스 폐전이 모델을 이용하여 암전이 억제효과의 관점에서 검토하였다. B16-BL 암세포(4×10^4 /mouse)를 마우스 미정맥에 투여하고 14일째에 폐에 형성되는 암전이 결절 수를 계측하였다. 아로니아 추출물은 암세포 이식 1일 후부터 3 mg/mouse로 1일 1회, 총 5일간 경구투여하였다. 아래 그림에서 보듯이, 아로니아 추출물의 경구투여는 암세포의 전이를 억제하는 항암활성은 나타내지 않았다.

- 아로니아 잎과 열매의 냉수 추출물 투여에 의한 항당뇨 활성을 측정한 결과, 이들 모두 alloxan 투여 3일째에 혈당의 억제가 관찰되었으며, 점차 억제효과가 약해지기는 하지만 9 일째까지 약하게 유지되는 것으로 나타났다. 이 때 당뇨에 의한 체중감소를 회복시키는 효과도 관찰되었다.

7. 아로니아 추출물의 항원 특이적 면역조절

- 2주 간격으로 KLH(20 μ g/mouse)를 면역할 때에 각 아로니아 추출물을 함께 투여하는 조건에서, 항원 투여 후 혈청 중의 항KLH 항체가를 측정하였다. 그 결과 아로니아 잎 열수 추출물에서 항원특이적인 항체유도(IgG+IgA+IgM)의 억제가 관찰되었다.
- 한편 항체 유도에 있어서 Th-1/Th-1형 중 어떠한 T세포 반응의 조절에 의한 것인지를 알아보기 위하여, IgG1과 IgG2a 항체가를 조사하였다. 그 결과 잎 열수추출물이 IgG1 항체 분비를 억제하며 Th-2 type의 면역작용을 억제하는 것으로 나타났다.
- OVA를 alum과 함께 2주 간격으로 복강주사하여 알러지 반응을 유발하는 모델에서 아로니아 추출물을 OVA면역 5시간 전과 동시에 투여하고 OVA에 대한 IgE항체 유도에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 열매와 잎 추출물 모두에서 약간의 알러지 억제활성이 관찰되었다. 특히 아로니아 잎의 열수 추출물이 가장 효과가 높은 것으로 나타났다.

8. 아로니아 가공 부산물의 면역조절

- 아로니아 식초를 투여한 마우스에서 alloxan 투여 3일째에는 안정된 혈당조절 효과가 나타났다. 특히 1:3으로 희석한 아로니아 식초가 더 효과적인 것으로 관찰되었고 체중에 있어서는 특별한 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.
- 혈중 지질성분에 대한 검사를 실시한 결과, total cholesterol과 HDL-cholesterol에는 어떤 시료도 별다른 영향을 미치지 않았으나, TG는 아로니아 식초 투여에 의해 현저하게 감소하였다.
- 아로니아 함유 막걸리 부산물의 항염증 활성을 측정한 결과, 누룩과 입국을 이용해 막걸리 발효한 아로니아 부산물 시료는 약간의 항염증 활성을 나타냈다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

<연구성과>

- 특허 : 특허등록 1건, 특허출원 1건, 특허준비 2건 등
- 논문 : 국내외 전문학술지에 논문 11편 게재완료, 출판 중 1건, 투고 후 심사 중 2편, 투고 준비 중 3편
- 학회발표 : 국내외 학술대회에 참석하여 9편의 연구결과 발표
- 기술이전 : 참여기업에 2건의 노하우 이전, 2건의 시제품 제작

<성과활용 계획>

- 아로니아의 기능성을 입증하고 고기능성 및 고부가가치 식품소재로 개발함에 따라 부산물의 부가가치를 높이고 아로니아 재배 농가의 소득증대 및 경제 활성화에 기여
- 국내에 유통되고 있는 아로니아의 선천면역세포 활성화증강, 염증작용 및 알러지 개선 기능성 식품소재의 개발을 통해 식품생명공학 관련 학문발전에 기여하고 국내의 연구기술을 해외에 널리 홍보함
- 아로니아의 기능성 성분을 증가시킬 수 있는 저장 및 가공기술을 개발 보급함으로써 가정에서 쉽게 응용할 수 있고, 건강기능성 식품의 원료로 개발할 수 있는 기초자료를 제공함
- 개발된 아로니아 제품 및 조리법은 국내소비 뿐만 아니라 해외 시장 개척을 통해 수출 상품화가 가능할 것으로 예측됨
- 아로니아를 통해 면역작용을 활성화하고 염증과 알러지와 같은 면역증상을 효율적으로 조절해 주는 기능성 식품소재를 개발하여 관련 식품산업의 활성화를 제고할 수 있음
- 국내에 유통되고 있는 아로니아의 항산화, 암예방, 면역증진 기능성 식품소재의 개발을 통해 식품생명공학 관련 학문발전에 기여하고 국내의 연구기술을 해외에 널리 홍보함
- 아로니아의 가공제품 개발로 아로니아 생산농가의 안정적인 생과(fresh fruit) 납품처 확보 및 매출 안정화와 가공제품 생산기업의 경제적 이윤을 확대하고 아로니아 및 아로니아 가공제품 홍보로 소비자 신뢰도 향상 및 지속적인 마케팅으로 매출액이 증대됨
- 본 과제를 통해 아로니아 가공품 개발 하여 이에 대한 노하우를 참여기업에 기술이전 함으로써 개발된 다양한 가공제품을 산업화함

SUMMARY

I. Title

Investigation on processing suitability and health-functionality for development of processed products of Aronia

II. Research Result Goal vs. Outcome

성과목표	사업화지표							연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화				기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출		투자유치	논문			학술발표	정책 활용		홍보 전시
			SCI					비 SCI								
최종목표	1		1	1					2	3				1		
연구기간 내 달성실적	1	1	2	2 ¹⁾					2	10	9		4		3	5 ²⁾
달성율(%)	100		200	200					100 ³⁾	333					333	

¹⁾Two prototypes, *Makgeolli* and *Yanggaeng* were developed.

²⁾1 paper in 1st revision, 2 paper in submission, 3 papers in preparation for submission.

³⁾1 *in press* manuscript included. (1 or 2 paper will be published shortly.)

III. Objectives and Significance

This research was designed to

- Establishment of optimal condition for isolation of active compounds from aronia leaves and fruits
- Screening bioactive compounds from aronia and manufacturing several processed products using aronia
- Assay for immunomodulating activity of the extracts of aronia leaves and fruits

- Determination of immunological mechanisms related to anti-inflammatory activity of aronia fruits and leaves
- Investigation of anti-diabetic effect by aronia extracts in alloxan-induced diabetic mice

IV. Scope and Contents

1. Determination of physiological characteristics of aronia and development of *Yanggaeng* with aronia
 - Determination of bioactive compounds of aronia in different growing area
 - Stability of the anthocyanin pigment extracted from aronia
 - Effects of storage condition on bioactive compound contents and antioxidant activity of aronia
 - Quality characteristics and antioxidant activities of *Yanggaeng* prepared with aronia

2. Analysis of bioactive compounds of aronia in different processing condition and development of *Aronia Makgeolli*
 - Determination of bioactive compound contents of aronia with different drying methods
 - Determination of bioactive compound contents of aronia leaves with collected fro the different growing stages
 - Determination of antioxidant and anti-cancer activities of aronia leaves with collected fro the different growing stages
 - Development of *Aronia Makgeolli*

3. Development and evaluation of functionality of aronia-containing products
 - Development of fermented beverage containing with aroina
 - Development of *Sulgidduk* prepared by the addition of aronia
 - Development of aronia jam replaced sucrose with sugar substances
 - Determination of quality characteristics and antioxidant activity of aronia-containing products

4. **Examination of activation of innate immunity and anti-tumor activityby aronia extracts**
 - Activatrion of innate immune cells by aronia extracts

- Suppression of non-specific activation of T lymphocytes by aronia extracts
- Antitumor activity of aronia extracts to inhibit tumor metastasis and growth

5. Anti-inflammatory activity of aronia extracts and related cellular mechanisms

- Inhibitory effect of aronia extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages
- Inhibition of NLRP3 inflammasome activation by aronia extracts in BMDM
- Assay for cellular mechanisms related to anti-inflammatory activity by aronia extracts

6. Modulatory effect of aronia extracts on antigen-specific immune reaction

- Suppression of antigen-specific antibody responses by aronia extracts
- Down-regulation of antigen-specific cell-mediated immunity by aronia extracts
- Anti-allergic effect of aronia extracts in OVA-induced allergy in mice

7. Biological activity of by-products of aronia-containing fermentation

- Anti-diabetic effect of aronia extracts in alloxan-induced diabetic mice
- Anti-diabetic effect of aronia extracts by a vinegar produced by aronia fermentation
- Anti-inflammatory activity by by-products from aronia fermentation

V. Results

1. Determination of physiological characteristics of aronia and development of *Yanggaeng* with aronia

- The purpose of this study was to investigate the effects of pH, temperature, light, sugars and organic acids on the stability of anthocyanin pigments extracted from the aronia (*Aronia melanocarpa*). Aronia pigment was more stable at pH 3.0 with highest absorbance at 514 nm. The higher temperature and longer heating time caused remarkable decreasing of the contents of anthocyanin. Anthocyanin was destroyed about 21.70% and 79.63% after 300 min heating at 30°C and 100°C, respectively. The sugars caused decreasing intensity of aronia pigment and under the maltose, the intensity of aronia pigment was the most stable followed by galactose, sucrose, glucose and fructose. Among the organic acids, citric acid was found to be the most effective in stabilizing the aronia pigment followed by tartaric acid, malic acid, formic acid and ascorbic acid. This result may be utilized as reference data to develop processed foods or a natural food colorant using aronia.
- Aronia juice was incorporated into yanggaeng at different levels (contained 50, 100, and 150 g of aronia juice in AJ 50, AJ 100, and AJ 150, respectively) based on the total weight of water. Total acidity and sugar contents were significantly increased but pH was decreased with increasing levels of aronia juice. Hardness also increased with higher amounts of aronia juice. As for texture profile analysis, hardness, springiness and chewiness of yanggaeng were increased but cohesiveness was almost similar compared to the control and aronia juice added treatments. In chromaticity determination, L and b values decreased but a value increased with increasing the levels of aronia juice. The total polyphenols, flavonoids and anthocyanin contents were proportionally increased with increasing the levels of aronia juice. The antioxidant activity measured by DPPH and ABTS radical scavenging activities were significantly higher than control and proportionally increased as the aronia juice concentration. The sensory evaluation indicated that the AJ 100 showed the best preference in color, taste, texture, flavor, and overall acceptance. These results, suggest that aronia juice may be useful ingredient in yanggaeng to improve quality and antioxidant potential.

2. Analysis of bioactive compounds of aronia in different processing condition and

development of *Aronia Makgeolli*

- This study investigated the antioxidant contents and antioxidant effects of aronia extracted from hot water or 80% ethanol according to different drying methods (sun drying, sun drying after steam treatment, freeze drying and oven drying). Total polyphenol contents were highest in freeze-dried sample (910 mg) followed by sun-dried after steam treatment (779 mg), sun-dried (769 mg) and oven-dried (757 mg) samples as determined by mg gallic acid equivalent. Similar patterns were observed in the measurement of total flavonoid and anthocyanin contents. Freeze-dried aronia contained highest polyphenols, flavonoids and anthocyanins compared to other dried samples. All antioxidant activities showed dose-dependent manner. The DPPH and ABTS radical scavenging activities of the hot water extract powder from freeze-dried aronia were 65.5% and 61.7% at 200 µg/mL of aronia. The hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of freeze-dried aronia extract powder (200 µg/mL) were 50.5% and 52.1%, respectively. These results suggest that freeze drying is an proper method for preserving bioactive compounds and antioxidant activities.
- Aronia extract inhibited SK-Hep1 cancer cell growth in a dose- and time-dependent manners, in cell numbers significantly reduced by 39.0~58.0 and 54.6~71.7 at 400 µg/mL aronia extracts for 24 hr and 48 hr incubation, respectively. In an invasion assay conducted in Transwell chambers, aronia extract showed 24.6% and 47.2% inhibition of cancer cell at 200 µg/mL and 400 µg/mL, respectively, compared to the control. The mRNA levels of both MMP-2 and MMP-9 were down-regulated by aronia extract treatment in a dose-dependent manner. Aronia extract at 400 µg/mL was inhibited MMP-2 and MMP-9 expression by 64.1% and 100%, respectively. There was inversely related in mRNA contents between MMP-2/-9 and TIMP-1/-2 expression in SK-Hep1 cells by aronia extract treatment. These results demonstrate the antimetastatic properties of aronia in inhibiting the adhesion, invasion, and migration of SK-Hep1 human hepatoma cancer cells.
- This study was conducted to investigate the effects of koji on the stability of anthocyanin pigments in *aronia makgeolli*. Adding a 12% amount of aronia was determined due to its feasible alcohol fermentation and color discrimination. Redness and total anthocyanin contents of *sul-dut* decreased with fermentation period. In the *nuruk* group, adjustment of initial pH to 3.0, 3.5, and 4.5 resulted in higher redness

and anthocyanin contents than non pH adjustment at the initial fermentation period, whereas no significant differences in redness and anthocyanin contents were found between the two groups at the termination of fermentation. The *ipguk* group showed higher stability of pigments than the *nuruk* group. The residual cyanidin-3-O-arabinoside of the *ipkuk* group was determined to be more than three times that of the *nuruk* group. Furthermore, cyanidin-3-O-xyloside was only detected in the *ipkuk* group at the termination of fermentation. Therefore, it was thought that *ipguk* was a more suitable leavening agent than *nuruk* for the maintenance of anthocyanin stability on brewing of *aronia makgeolli*.

3. Development and evaluation of functionality of aronia-containing products

- The study was conducted to investigate rheological and sensory characteristics of *Sulgidduk* added with aronia powder. The moisture content of *Sulgidduk* ranged from 40.86% to 44.40% and the addition of aronia powder in the *Sulgidduk* tended to decrease the moisture content. For the rheological properties, the addition of aronia powder in the *Sulgidduk* decreased the hardness, springness, adhesiveness, cohesiveness, chewiness, gumminess, and brittleness. In chromaticity determination, L and b values decreased but a value increased with the increasing level of aronia powder. The total polyphenol, total flavonoid and total anthocyanin contents increased with the increasing levels of aronia powder. The antioxidant activity measured by DPPH and ABTS radical scavenging activities were significantly higher than the control, and it proportionally increased as the amount of aronia powder increased. The growth of total aerobic colony and coliform content during 4 days of storage significantly decreased with the increasing levels of aronia powder in *Sulgidduk*. In sensory evaluation, the addition of 5% aronia powder had the best score in color, taste and overall acceptance. This result suggests that adding 5% aronia powder could be applied for making *Sulgidduk*.
- The effects of sugar substances (oligosaccharide, xylitol and erythritol) as alternative ingredients to sucrose on the quality characteristics and antioxidant activities of aronia jam were evaluated. The different types of sweeteners did not influence the pH, total acidity and sugar contents of the jam. The sucrose-containing jam showed the highest spreadness, while the oligosaccharide and erythritol-containing jams showed lower spreadness. In the chromaticity determination, the sucrose-containing jam showed the

lowest L, a and b values compared with the other sweetener groups. There were no significant differences in the total polyphenols, flavonoids and anthocyanin contents in the jams. The antioxidant activity indicated by the DPPH and ABTS radical scavenging activities was over 70%. Sensory evaluation indicated the xylitol-containing jam to have the best preference in taste, flavor and overall acceptance. These results suggested that xylitol may be a good sugar substance in aronia jam.

4. Examination of activation of innate immunity and anti-tumor activity by aronia extracts

- No extract of aronia has biological effect to activate innate immune cells
- Suppression of non-specific activation of T lymphocytes by aronia extracts
- Any aronia extracts did not show significant effect on inhibition of tumor metastasis and growth in mice

5. Anti-inflammatory activity of aronia extracts and related cellular mechanisms

- Aronia extracts inhibited TLR4-mediated inflammation in RAW 264.7 macrophages
- Aronia extracts suppressed IL-1 β secretion by inhibiting NLRP3 activation in BMDM
- Cellular mechanisms underlying anti-inflammatory activity by aronia extracts was associated with inhibition of MAPK and NF- κ B activation.

6. Modulatory effect of aronia extracts on antigen-specific immune reaction

- Aronia extracts partly suppressed antigen-specific antibody responses
- Aronia extracts also suppressed antigen-specific cell-mediated immunity
- Aronia extracts inhibited OVA-induced allergic reaction in mice

7. Biological activity of by-products of aronia-containing fermentation

- Aronia extracts showed anti-diabetic effect in alloxan-induced diabetic mice
- Vinegar produced by aronia fermentation showed anti-diabetic activity
- By-products from aronia fermentation showed a weak anti-inflammatory activity

VI. Research Outcome and Utilization Plan

Basic research results obtained from this research were used for presenting in scientific society and publishing in scientific journals. Some research results were submitted for patent. Newly developed processed products with aronia will be transferred to industry for commercial production.

- 11 research papers were published, one research paper is in pressing
- 3 research papers have been in submission, 3 research papers are in preparation for submission
- 9 posters were presented in scientific conference
- 2 processed products are ready for commercial production

CONTENTS

Chapter 1. Overview of research

Chapter 2. Current status of domestic and foreign technologies

Chapter 3. Contents and results

Chapter 4. Research goal attainment and contribution to related area

Chapter 5. Research outcome and utilization plan

Chapter 6. Overseas science and technology information

Chapter 7. Current status of research instrument or equipment

Chapter 8. References

목 차

요약문

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설 장비 현황

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

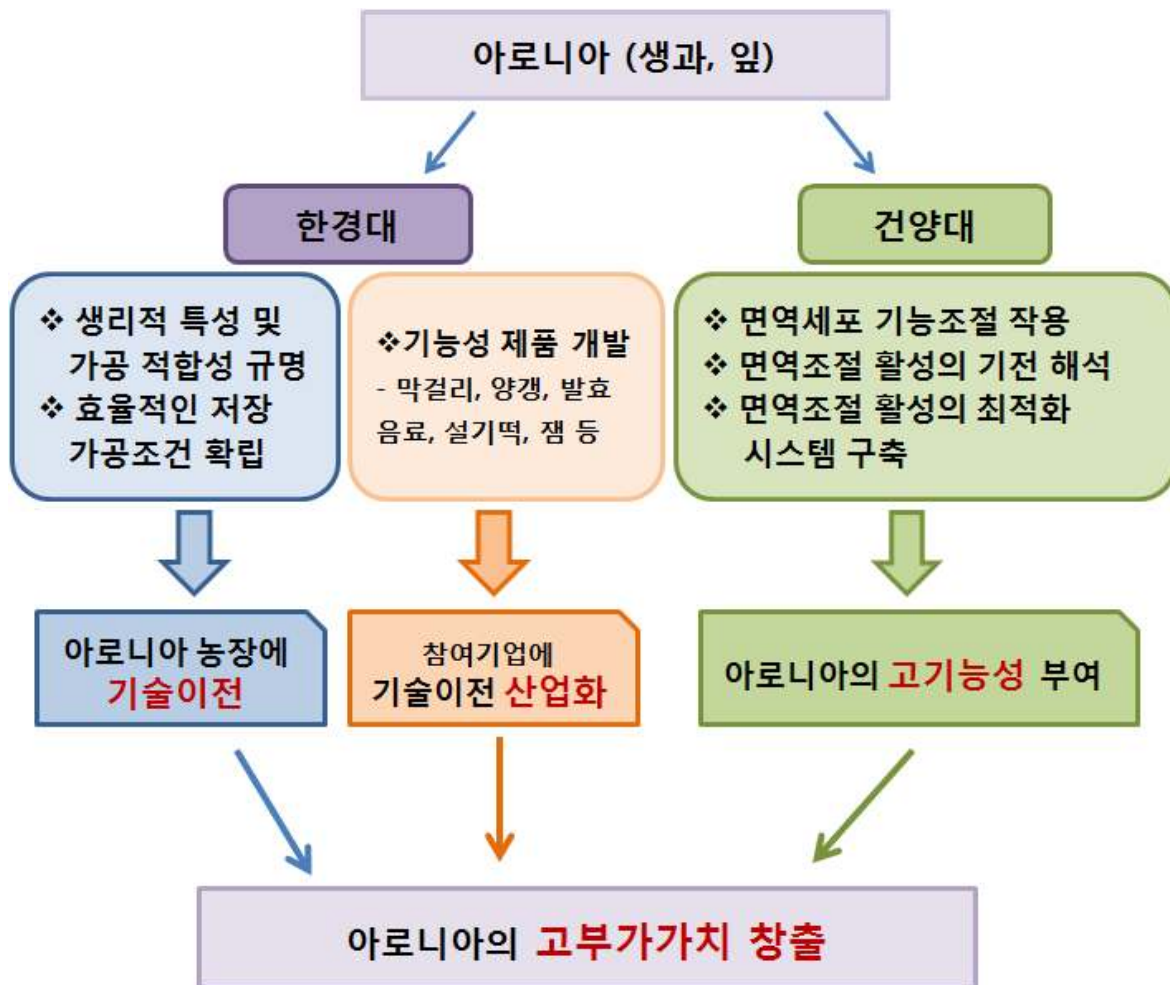
제 9 장 참고문헌

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1절 연구개발의 목적

본 연구는 아로니아의 1) 생리적 특성 구명을 통한 **고품질 유지조건** 및 생리활성 물질 추출법을 확립, 가공에 따른 기능성 물질의 변화를 분석하여 기능성 성분이 **최대화** 되는 가공방법을 확립하고, 2) 아로니아 추출물에 의한 각종 **면역조절작용**을 조사하고, 이에 관련된 **활성분획(물질)**의 동정과 생물학적 작용기전의 해석을 통해 아로니아를 **고기능성 면역조절용 기능식품**으로 개발하고자 함. 이를 통해 아로니아의 우수성을 과학적으로 규명하고 기능성이 입증된 가공식품을 개발하여 아로니아 재배 농가의 **고부가가치 향상에** 기여하고자 함



제 2절 연구개발의 필요성

1. 아로니아의 건강증진 효과

- 아로니아는 포도당, 과당 및 유기산을 비롯하여 anthocyanin 색소를 다량 함유하고 있을 뿐 아니라 cyanidin-3-glucoside, flavonoids, stilbenes, prenylflavonoids, coumarin 등의 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으나 이들 **유효성분의 효능에 대한 연구는 아직 미진한 실정**임. 따라서 유효 생리활성 물질들의 기능적 특성을 살려 **건강기능식품 소재 개발을 위한 과학적 근거 확립을 위한 연구가 필요**함

- 천연색소 중 anthocyanin은 식물체에서 적색, 자색 및 청색을 내는 플라보노이드계의 수용성 색소로서 2개의 benzene ring에 산소를 함유한 pyrone ring을 매개로 결합되어 있는 diphenyl propane (C6-C3-C6) 구조를 기본으로 하는 화합물로서, 자연계에서는 유리 상태로 존재하나 대개의 경우 rhamnose, glucose, rutinose 등의 당류와 결합하여 배당체 (glycoside)의 형태로 존재하고 있으며, pH에 따라 다양한 형태의 구조를 나타내는데, 일반적으로는 양이온을 띠는 flavylium cation의 형태로 존재함

- Anthocyanin은 천연 색소로서의 이용가치 뿐만 아니라, 생체 내에서도 생리활성에 도움을 주는 것으로 알려져 있는데, 항암작용, 면역증강, DNA손상 억제 등이 보고되고 있으며, 특히 항산화 효과에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있음. Anthocyanin은 -OH와 -OCH₃의 위치, 결합되어 있는 당의 개수와 위치 및 당의 acylation 정도에 따라 다양한 종류가 존재하며, 이러한 화학적 구조 차이에 의해 흡수 및 대사과정에서의 차이가 나타나는 것으로 보고되고 있음

- Anthocyanin이 다량 함유된 천연소재로는 *billberry, blackcurrant, strawberry, mulberry* 등과 같은 berry류, 머루, 포도를 포함하는 *grape*류, 검정콩, 적양배추, 적색감자 등이 있음. 최근 anthocyanin의 생리활성이 보고되면서 anthocyanin을 다량 함유한 식품에 대한 소비가 증가하고 있으며, anthocyanin의 생리활성 및 가공안전성에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있음

- Anthocyanin의 한 종류인 cyanidin-3-glucoside는 토코페롤보다 노화억제 효과가 5~7배 강하고 특히 아로니아에도 포도나 유색미에 비해 다량의 cyanidin-3-glucoside가 함유되어 있는 것으로 알려져 있음. Cyanidin-3-glucoside는 활성산소를 제거하여 뇌의 노화 및 신체의 노화를 예방시켜주며, 망막장애 치료 및 시력개선에도 효과가 있다고 보고되어 있어 기능성 식품소재로 활용가치가 매우 큼

- 아로니아는 polyphenols과 안토시아닌과 같은 물질이 주성분으로 알려져 있어, 이들 화합물이 항산화 작용을 비롯하여 심혈관계 및 소화기계 질환에 대해 높은 예방 및 치료 효과를 나타내는 것으로 알려져 있음
- 아로니아 열매 추출물의 생리활성과 구성성분에 대한 연구결과를 통해 식품 혹은 의약 소재로서 응용의 가능성이 높은 것으로 알려져 있으나, 생리활성에 관련된 활성물질의 동정은 물론 활성에 관련된 작용기전과 효능의 최적화 조건 등에 대해서는 밝혀지지 않은 부분이 많음
- 특히 인체관련 질환 중 면역관련 질환에 대한 아로니아의 활성에 대해서는 구체적인 연구보고가 매우 적어 면역반응에 대한 아로니아의 조절효과를 보다 과학적으로 분석함으로써 기능성 식품과 의약품 소재로서 개발할 필요성이 있음

2. 아로니아를 활용한 가공제품 개발의 필요성

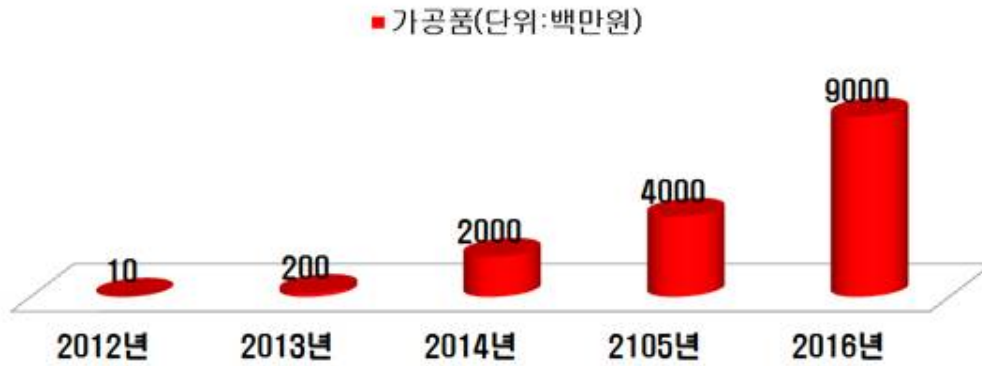
- 아로니아는 특유의 신맛과 떼은맛으로 생과보다는 가공용으로 적합함. 또한, 수확 후 생과로 판매할 수 있으나 저장 기간이 길지 않아 효율적인 저장법 및 가공기술 개발이 필요
- 기능성을 함유한 가공식품이나 식품가공 소재로 개발하여 부가가치를 높이고 다양한 소비처에 공급하는 전략이 필요함
 - 수확 후 냉장, 냉동 과일, 반건조품(뽕, 과자에 토핑용), 정제품, 분말 등으로 활용이 가능
 - 높은 안토시아닌 함량과 카테킨 성분은 세포 생명력을 강화시켜 주고, 염증을 줄이며, 붓기를 방지해주기 때문에 파우더, 스킨로션, 팩 등 화장품에 응용이 가능함
 - 아로니아 열매는 고유의 적자색의 강렬한 색소를 포함하고 있어 식품 착색재료나 천연염료 등으로도 활용이 가능함
- 다양한 가공식품 개발에 따른 소비확대가 가능할 것으로 예상됨
 - 잼, 젤리, 주스, 아이스크림, 와인, 요플레, 시럽, 통조림, 엑기스, 음료, 효소, 캡슐, 캔디, 쿠키, 이유식 등
- 아로니아 재배부산물인 잎에도 각종 생리활성 물질이 있을 것으로 예상되므로 유기농 잎차나 적합한 조리법을 개발하여 보급하는 것이 필요. 현재까지의 연구내용을 볼 때, 아로니아 재배 부산물에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았음. 본 연구를 통하여 아로니아

재배 부산물인 잎에서의 기능성이 입증될 경우, 부산물을 활용한 기능성 소재 개발이 가능하며 이는 아로니아 재배 농가에 있어 아로니아 뿐만 아니라 부산물도 소득원으로 활용할 수 있어 실질적인 부가가치 향상에 기여할 수 있을 것으로 사료됨.

- 아로니아는 항산화 활성이 우수하여 소비자들의 인지도가 점점 향상되고 있는 과정 중에 있으므로, 아로니아 재배 부산물인 잎을 이용한 음료 개발은 상업적 가능성이 있다고 사료됨. 음료의 개발에는 기능성과 더불어 기호성이 중요한 요인이므로 **아로니아 잎 추출물과 조합을 이룰 수 있는 천연 소재를 발굴**하여 기능성과 기호성을 동시에 충족시킬 수 있는 음료를 개발하고 이의 건강기능적인 특성, 기호도 검사 및 저장조건을 제시하여 상업성 있는 제품을 생산하고자 함.

3. 국내 연구개발의 필요성

- 최근 우리나라는 고령화 사회로의 진입, 사회적 스트레스의 증가, 그리고 식생활 문화의 급격한 변화 등의 원인으로 알러지, 아토피 및 천식과 같은 면역학적 만성질환과, 염증성 질환과 같은 면역질환의 유병률이 크게 증가하는 추세임
- 아로니아는 재배가 간편하고 큰 투자를 하지 않고도 유흥지 활용과 관비재배로 대량생산 체계를 갖출 수 있는 작물로 4~5년 전부터 국내에 아로니아 열풍이 불면서 많은 농가에서 아로니아를 재배하고 있음. 현재는 아로니아의 희소성 때문에 가격경쟁력이 있으나 향후 2~3년 후에 많은 농가에서 열매가 수확되게 되면 아로니아 생과의 가격하락이 예상됨. 따라서 **생과의 저장기간을 연장시킬 수 있는 기술을 개발하고 아로니아 열매와 잎을 활용한 적절한 가공품을 개발하여 부가가치를 높이는 전략이 필요함**
 - 2011년 기준으로 아로니아 1kg당 8만원 선에서 거래되었으나, 향후 4~5년 후에는 많은 농가에서 아로니아를 수확하여 물량이 많아지므로 1kg 당 4~5천원 정도로 가격형성이 될 것으로 예상됨. 따라서 부가가치를 높일 수 있는 가공식품을 개발하여 농가에 타격이 가지 않도록 하는 전략이 필요함
- 국내외 시장규모와 금후 성장 가능성
 - 아로니아 가공품 시장 규모는 2012년 기준으로 10백만원 정도이나 2016년까지 9,000백만원 규모로 성장할 것으로 기대됨
 - 아로니아 3kg을 가공할 경우, 1500 mL의 원액(엑기스) 추출이 가능하며, 가격은 100 mL(파우치 1포당) 100,000원선에 거래되고 있음
 - 27,000 kg x (부가가치 최소로 계산하여 100,000원/3kg 기준) = 9억원의 매출을 기대할 수 있을 것으로 추정됨



- 아로니아는 특유의 신맛과 떫은 맛 때문에 생과보다는 가공품으로 제조하기에 적합하며 가공과정 중에 아로니아의 기능성 성분이 잘 유지되도록 하는 기술 개발이 시급함. 아울러 해외에서 개발된 아로니아 가공품들은 개발국 소비자들의 취향과 입맛에 맞는 제품이 대부분이며 기술적인 부분에 대해서는 국내 일반 농가에서 쉽게 모방할 수 없는 내용들이 많이 있음
- 따라서 우리나라 실정에 부합하는 가공품 개발을 통하여 아로니아 재배 농가의 부가가치 향상에 기여할 수 있을 것으로 사료됨

제 3절 연구 범위

제1세부과제 : 아로니아의 생리적 특성, 가공적합성 규명 및 기능성 제품 개발

1. 아로니아의 생리적 특성 구명을 통한 고품질 유지조건 확립 및 양갱 개발

- 아로니아 열매의 재배조건과 생산지에 따른 품질특성 및 유효성분 평가
- 저장온도와 저장기간에 따른 품질특성 및 유효성분 평가
- 건조조건에 따른 아로니아 분말의 품질 특성 및 가공적성 분석
- 일반성분 등 품질평가
- 생과와 저장과의 선호도 및 유효성분 비교
- 아로니아 함유 양갱 제조

2. 가공조건에 따른 아로니아의 기능성 물질 분석 및 막걸리 개발

- 아로니아 열매의 건조 방법에 따른 생리활성물질 함량 측정
- 아로니아 잎의 수확시기에 따른 생리활성물질 함량 측정
- 아로니아 잎의 수확시기에 따른 항산화 및 항암 활성 측정
- 아로니아 함유 기능성 막걸리 제조

3. 아로니아 함유 제품 개발 및 개발된 제품의 기능성 평가

- 아로니아 함유 발효음료 개발
- 아로니아 함유 설기떡 제조
- 아로니아 함유 기능성 잼 제조
- 개발된 제품의 기능성 평가

제1협동과제 : 아로니아의 면역조절활성 및 작용기전 해석

1. 아로니아 추출물의 면역세포 기능조절 작용

- Mouse를 통한 아로니아 추출물의 대사 기능 변화 및 독성 테스트
- 아로니아 추출물의 경구투여에 의한 혈액성분 변화 측정
- 아로니아 추출물의 경구투여에 의한 마우스의 PBMC 및 Splenocytes의 증식 및 면역관련 사이토카인 분비능 측정
- 사이트카인 분비능과 surface marker의 변화 등을 통한 활성화 유도 효과 측정

2. 아로니아 추출물의 항암활성

- B16-BL6 melanoma 암세포의 폐전이 및 암세포 증식의 억제활성
- Colon 26 암세포 폐전이 억제활성 시험
- 발암세포 주입 후 mouse의 spleen 증식도 분석
- in vivo에서의 암세포 증식억제 활성 측정
- 항암활성 작용기전에 대한 면역학적 분석

3. 아로니아 추출물의 항염증 작용

- TNF- α , IL-6, IL-1 β 등의 분비에 대한 아로니아 추출물의 억제활성 측정
- 염증매개물질인 NO와 PGE₂에 대한 아로니아 추출물의 분비억제 효과 측정
- iNOS, COX-2 활성 측정
- LPS에 의한 염증유도 관련 세포 내 신호전달 기전에 미치는 영향 분석
- 아로니아 추출물의 항염증 활성 작용기전 해석 및 항염증 작용의 최적화 기법 확립

4. 아로니아 추출물의 항알러지 활성

- 알러지 모델에서 아로니아 추출물의 항알러지 활성 판정
- 알러지 유발 마우스에서 아로니아 추출물 투여에 의한 T세포 반응의 변화 측정
- 아로니아 추출물이 천식유도에 미치는 억제효과 측정

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 아로니아(*Aronia melanocarpa*, Black Chokeberry)는 북아메리카가 원산지로 장미과에 속하는 베리류로 원래는 북부 아메리카 지역 영하 20℃의 추위와 5개월간의 강렬한 자외선 등 가혹한 환경에서 자생하는 열매임
- 꽃은 산수유, 매실, 앵두와 같이 11~20일 정도 지속되고, 9~11월 작고 검의 자줏빛의 신맛이 나는 열매를 맺음. 아로니아 열매는 직경이 6.4mm 정도이고 단단하고 9월에 익기 시작하여 4~6주간 수확기간이 계속됨. 수정작업이나 시비 없이도 열매가 잘 열리고 열매나 잎은 병충해의 영향을 거의 받지 않는 것으로 알려져 있음



그림 1. 아로니아(*Aronia melanocarpa*)

- 아로니아는 20세기 초반 러시아 및 스칸디나비아 국가들을 거쳐 폴란드 및 오스트리아 지역으로 전파되었는데, 1930년대 초반 러시아의 식물학자인 이반 미츨린 교수에 의해 다양

한 식재료로서의 가치가 밝혀지기 시작했음

- 미국에서의 아로니아의 상업적 생산은 현재 초기 단계에 있으며, 상업적으로 재배되는 아로니아 총 면적은 30~40헥타 정도로 추정됨. 생산은 서부 아이오와에 집중되어 있으나 아직 수요를 충족할 정도는 아니며, 많은 사람들이 아로니아를 도입하려 준비 중에 있음
- 지난 수년간 추출물, 말린 열매, 분말의 형태로 동유럽에서 미국으로 수입되는 아로니아의 양이 점차 증가하고 있음. 아로니아 열매를 가공한 제품이 일본을 비롯한 아시아 국가에서도 점차 인지도를 높여가고 있음
- 국내에는 6~7년 전부터 아로니아 씨앗을 들여와 일부 농가에서 재배 중이며, 4~5년 전부터 아로니아 가공품이 수입되면서 국내에 알려지기 시작하였음. 최근 들어 **토양적용성이 뛰어나고 영농이 간편해 전국적으로 재배열기가 고조되고** 있으며, 우리 농촌 현실의 돌파구를 찾기 위해 **아로니아는 초고소득 작물로 새롭게 부상하고** 있음.

표 1. 아로니아 가격

묘목	크기	연생	일본	한국
아로니아	3.5호(10.5cm) 포트	삼목 2년생(40cm)	795엔(10,890원)	10,000원
아로니아	4.5호(13.5cm) 포트	삼목 3년생(70cm)		15,000원

	일본	한국	미국
열매	냉동 3kg 5,500엔 (75,000원)	생과 1kg 80,000원	250,000원 (엑기스 500mL)

- 건강한 먹거리, 항산화물질, 유기 농산물에 대한 대중의 관심이 상업적으로 재배하기 쉬운 아로니아에 대한 관심을 증가시키고 있음. 따라서 **아로니아를 기능성 원료로 활용하기 위한 가공방법 및 기능성 입증에 대한 과학적이고 체계적인 연구가 필요함**
- 국내에는 아로니아 재배가 활성화되지 않아 아직까지 지속적으로 생산되는 제품은 없음
- 현재 아로니아를 산업적으로 가장 활발하게 응용하고 있는 나라는 일본으로 1976년부터 러시아와의 농업기술교류사업을 통해 아로니아를 자국에 도입하였음. 도입 초기에는 북해도에서 제한적으로 러시아산 아로니아를 재배하여 일본 전역에 여러 형태로 제품화 하여 판매하였으나 점차로 일본 내 다른 지역에서도 아로니아의 재배가 증가하고 있음

- 일본에서는 항산화 활성을 지닌 기능성 식품 혹은 화장품 소재가 인기를 끌고 있으며, 아로니아도 안토시아닌을 많이 함유하고 있는 이유로 생산량과 관련제품의 매출이 크게 신장되고 있는 상황임
- 일본에서의 아로니아 관련제품 판매는 통신판매와 인터넷 판매가 주류를 이루고 있으며, 와인, 빵 및 과자류(롤케익, 샌드위치, 잼, 캔디 등), 음료(드링크, 주스, 시럽 등), 기능성 식품(눈 보호용 식품, 아토피 환자용 아로니아 동충화초, 다이어트 서프리트먼트, 건조 아로니아 열매 등), 기능성 화장품 및 향장품(비누, 샴푸, 먹는 화장품 등), 기타 제품(우동, 아이스크림, 국밥용 분말 등) 등 여러 제품에 적용되고 있음



다이어트식

먹는 화장품



건조 아로니아

국밥용 분말

아로니아 잼 및 주스



아로니아를 소재로 한 과자류

와인

그림. 일본 내에서 만들어진 아로니아를 활용 제품들

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 : 아로니아의 생리적 특성, 가공적합성 규명 및 기능성 제품 개발

(제1세부 : 한경대학교 황은선)

1. 아로니아의 생리적 특성 구명을 통한 고품질 유지조건 확립

가. 실험 방법

(1) 시료

본 연구에 사용한 아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 2012년 8월말에 국내 3개 지역의 아로니아 재배 농장에서 수확한 것을 직접 구입하였다. 깨끗이 세척한 아로니아를 food processor(Phillips Electronics, Seoul, Korea)를 이용하여 곱게 마쇄한 후, 3겹의 거즈로 여과하여 얻은 즙을 -20℃에서 보관하면서 사용하였다. 완충용액 제조 및 분석용 시약은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis MO, USA)로부터 구입하였고, 그 밖의 모든 시약은 분석에 적합한 특급시약을 사용하였다.

(2) 일반성분 분석

아로니아의 일반성분은 AOAC official method(1990)에 따라 분석하였다. 수분은 상압가열 건조법에 따라 105℃에서 건조하여 수분 함량을 구하였다. 회분은 550℃에서 회화하여 회분 함량을 구하였으며, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법으로, 조지방은 Soxhlet법으로 측정하였다.

(3) pH, 산도 및 당도 측정

pH와 산도 측정을 위하여 시료 10 g을 넣어 마쇄하여 거즈로 여과한 후 착즙한 액을 시료로 사용하였다. pH는 pH meter로 측정하였다. 총산의 함량은 시료액 10 mL를 취하여 0.1 N NaOH 용액으로 적정하며, 이 때 NaOH의 소요량에 대하여 citric acid(%) 양으로 환산하였다.

$$\text{Total acid content (\%)} = \frac{0.0064 \times \text{volume of 0.1 N NaOH} \times \text{factor of 0.1 N NaOH}}{\text{mL of sample}} \times 100$$

당도는 시료 10 g을 마쇄하여 거즈로 여과한 후 착즙한 액을 시료로 사용하여 당도계로 측정하여 °Brix%로 나타내었다.

(4) 색도 측정

아로니아의 색도측정은 색차계(Chrome Meter CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness) 값으로 표시하였다. 각 시료 당 3회 반복 측정하여 그 평균값을 나타내었으며, 이때 표준백색판의 L, a, b 값은 각각 97.10, +0.24, +1.75 이었다.

(5) 아로니아의 항산화 물질 함량 분석

국내의 3개 지역(A, B, C)에서 2012년 수확한 아로니아 (Nero 품종)의 총 폴리페놀, 총 플라보이드 및 총 안토시아닌 함량을 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

(6) 아로니아 생과의 관능적 특성 분석

생산지를 달리한 아로니아의 관능적 특성을 분석하기 위해 영양조리과학을 전공하는 훈련된 대학생 패널 15명을 대상으로 시료의 관능적인 특성을 9점 기호 척도로 평가하였으며, 특성이 좋을수록 높은 점수를 기록하는 방법으로 하였다. 검사항목은 색(color), 향(flavor), 맛(taste), 조직감(texture), 전체적인 기호도(overall quality)로 하였다.

(7) 맛 분석장치를 통한 아로니아 생과의 맛 분석

아로니아의 맛에 대한 관능검사 결과와 함께 보다 객관적으로 맛의 차이를 확인하기 위해 미각 센서(taste sensor)를 이용한 맛 분석 장치(Insent, Atsugi-shi, Japan)로 검사하였다. 아로니아 10 g을 믹서에 갈아 즙을 낸 후, 100배의 증류수를 넣고 초음파 추출한 후에 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 상등액 35 mL을 시료로 사용하였다. 측정 항목으로는 감칠맛(uami), 쓴맛(bitterness), 떫은맛(astringency), 짠맛(saltiness), 신맛(sourness)을 분석하였고, 센서의 전극으로 인해 측정된 결과는 다시 맛의 수치로 변환시켜 결과로 나타내었다. 아로니아 생과의 맛은 블루베리의 맛과 비교하여 나타내었다.



(8) 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS software package(Version 17.0)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 ANOVA를 이용하여 유의성을 확인한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test를 이용하여 분석하였다.

나. 실험 결과

(1) 일반성분 분석

국내 3개 지역에서 재배된 아로니아의 일반성분 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. A 지역에서 자란 아로니아에 함유되어 있는 수분과 회분 함량은 각각 31.6% 및 0.34%였으며, 조지방과 조단백질 함량은 1.04%와 1.54%로 나타났다. B 지역에서 자란 아로니아에 함유되어 있는 수분과 회분 함량은 각각 29.5% 및 0.45%였으며, 조지방과 조단백질 함량은 0.83%와 2.07%로 나타났다. C 지역에서 자란 아로니아에 함유되어 있는 수분과 회분 함량은 각각 31.2% 및 0.54%였으며, 조지방과 조단백질 함량은 1.01%와 1.33%로 나타났다. B 지역에서 재배한 아로니아는 타 지역에 비해 수분함량은 적고 조단백질 함량은 높은 것으로 나타났다. 이는 국내 재배 지역의 토양, 기후 조건 등이 다르며 이들이 아로니아 성분에도 직간접적으로 영향을 주는 것으로 사료된다.

Table 1. Proximate composition of aronia grown in different areas

Sample	A	B	C
Moisture (%)	31.6 ± 0.7 ^a	29.5 ± 0.7 ^a	31.2 ± 0.8 ^a
Ash (%)	0.34 ± 0.02 ^a	0.45 ± 0.05 ^a	0.54 ± 0.03 ^a
Crude lipid (%)	1.04 ± 0.01 ^a	0.83 ± 0.06 ^a	1.01 ± 0.07 ^a
Crude protein (%)	1.54 ± 0.16 ^a	2.07 ± 0.19 ^a	1.33 ± 0.15 ^a

(2) pH, 산도 및 당도

각기 다른 지역에서 자란 아로니아 생과의 pH, 총 산도 및 당도를 측정된 결과는 Table 2와 같다. A 지역에서 자란 아로니아의 pH는 3.70으로 3개 지역 중에서 pH가 가장 낮게 나타났으며 C 지역에서 자란 아로니아의 pH는 4.02로 3개 지역 중에서 가장 높게 나타났다. 총 산도는 A 지역에서 자란 아로니아가 7.33으로 가장 높았고, C 지역에서 자란 아로니아의 경우는 5.21로 가장 낮게 나타났다. pH와 총 산도는 반비례 관계를 나타냈다. 3개 지역 가운데 C 지역에서 자란 아로니아의 당도가 14.10 °Brix로 가장 높았으며, A 지역과 B 지역은 각각 12.20과 12.63 °Brix로 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

Table 2. pH, total acidity and sugar content of aronia grown in different areas

Sample	pH	Acidity(%)	Sugar contents (°Brix)
A	3.70 ± 0.02	7.33 ± 0.26	12.20 ± 0.01
B	3.88 ± 0.02	5.78 ± 0.13	12.63 ± 0.06

C	4.02 ± 0.02	5.21 ± 0.13	14.10 ± 0.17
---	-------------	-------------	--------------

(3) 색도

3개 지역에서 수확한 아로니아 생과의 색도 측정 결과는 Table 3과 같다. 명도를 나타내는 L값은 A 지역에서 자란 아로니아가 조구가 20.4로 가장 높게 나타났으며, B 지역과 C 지역에서 자란 아로니아는 A 지역보다는 다소 낮은 값을 보였다. 적색도를 나타내는 a값은 C 지역에서 자란 아로니아가 3.0으로 가장 높았고, A 지역에서 자란 아로니아가 2.6으로 가장 낮은 값을 보였다. 황색도를 나타내는 b값은 A 지역에서 자란 아로니아가 2.6으로 가장 높았고, C 지역에서 자란 아로니아가 1.3으로 가장 낮게 나타났다.

Table 3. Hunter's color values of aronia grown in different areas

Sample	L	a	b
A	20.4 ± 0.3 ^a	2.6 ± 0.1 ^b	2.6 ± 0.1 ^a
B	19.6 ± 0.4 ^{ab}	2.8 ± 0.1 ^{ab}	1.7 ± 0.1 ^b
C	19.2 ± 0.7 ^{ab}	3.0 ± 0.1 ^{ab}	1.3 ± 0.1 ^{bc}

(4) 아로니아의 품질특성 및 유효성분 함량 분석

각 지역에서 재배된 아로니아의 항산화 물질 함량은 Table 4와 같다. A 지역에서 수확한 아로니아는 타 지역에서 수확한 아로니아에 비해 총 폴리페놀, 총 플라보이드 및 총 안토시아닌 함량이 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 4. The total polyphenol, flavonoids, and anthocyanin contents of aronia grown in different areas

Growing region	Total polyphenol (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoid (mg QE ²⁾ /g)	Total anthocyanin (mg C3G ³⁾ /100 g)
A	412.11 ± 4.75	234.87 ± 6.33	16.48 ± 0.57
B	330.93 ± 2.74	180.71 ± 9.02	15.11 ± 3.17
C	276.73 ± 5.31	171.75 ± 6.44	13.75 ± 2.01

¹⁾GAE=gallic acid equivalent, ²⁾QE=quercetin equivalent, ³⁾C3G=cyanidin-3-glucoside equivalent

HPLC로 아로니아에 함유된 개별 안토시아닌 함량을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 각 성

분들은 재배지역에 따라 차이를 나타냈으며 A지역에서 수확한 아로니아에서 cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-arabinose, cyanidin-3-O-xylose의 함량이 가장 높게 나타났다. C 지역에서 수확한 아로니아는 A와 B지역에서 수확한 아로니아와 비교할 때 cyanidin-3-O-galactoside의 함량은 가장 낮았지만, cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-arabinose, cyanidin-3-O-xylose 함량은 B지역의 아로니아보다 높게 나타났다. 이러한 성분의 차이는 아로니아 재배지역의 토양성분, 일조량, 강수량 등과 같은 환경적인 요인과 관련이 있을 것으로 사료된다.

Table 5. Individual anthocyanin contents of aronia grown in different areas

Growing region	Concentration (mg/kg)			
	cyanidin-3-O-galactoside	cyanidin-3-O-glucoside	cyanidin-3-O-arabinose	cyanidin-3-O-xylose
A	9179.2±421.2	513.1±28.1	3924.2±180.0	812.3±43.1
B	7135.6±618.4	371.8±37.8	2963.6±260.4	561.8±55.9
C	6541.9±918.3	418.1±56.6	3088.3±434.8	617.4±93.5

HPLC로 아로니아에 함유된 개별 폴리페놀 함량을 분석한 결과는 Table 6과 같다. A지역에서 수확한 아로니아에서 chlorogenic acid, vanilic acid 및 rutin hydrate 함량이 가장 높게 나타났다. 이러한 성분의 차이는 아로니아 재배지역의 토양성분, 일조량, 강수량 등과 같은 환경적인 요인과 관련이 있을 것으로 사료된다.

Table 6. Individual polyphenol contents of aronia grown in different areas

Growing region	Concentration (mg/kg)		
	chlorogenic acid	vanilic acid	rutin hydrate
A	225.068±618.4	4.298±37.8	3.061±260.4
B	170.051±918.3	4.573±56.6	4.524±434.8
C	191.549±997.3	2.495±64.7	3.276±455.7

(5) 아로니아 생과의 관능적 특성 분석

3개 지역에서 재배된 아로니아 생과의 색, 맛, 질감, 향미, 전반적인 선호도에 대한 관능검사 결과는 Table 7과 같다. 색에 대한 선호도 측정 결과, C 지역에서 자란 아로니아가 6.8로 타 지역에 비해 다소 높은 값을 나타냈다. 맛, 질감, 향미 및 전반적인 선호도의 경우도 C 지역에서 자란 아로니아가 A 지역과 B 지역에서 자란 아로니아에 비해 높은 값을 보였다. A 지역에서 자란 아로니아는 색, 맛, 질감, 향미 및 전반적인 선호도에서 가장 낮은 값을 나타냈다.

Table 7. Sensory properties of aronia grown in different areas

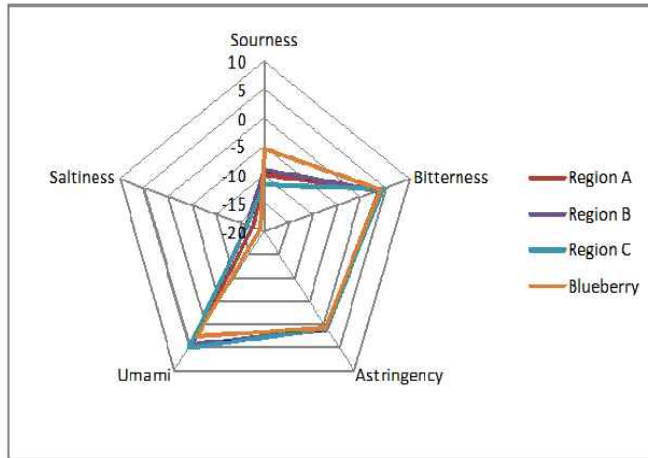
	A	B	C
Color	6.5 ± 0.5 ^b	6.5 ± 0.5 ^a	6.8 ± 0.5 ^{ab}
Taste	4.7 ± 0.2 ^b	6.5 ± 0.3 ^a	6.6 ± 0.3 ^a
Texture	4.8 ± 0.3 ^d	5.1 ± 0.3 ^c	7.1 ± 0.4 ^a
Flavor	5.4 ± 0.3 ^b	5.6 ± 0.2 ^{ab}	6.0 ± 0.3 ^a
Overall acceptance	4.8 ± 0.3 ^b	6.3 ± 0.3 ^a	6.9 ± 0.3 ^a

(6) 맛 분석장치를 통한 아로니아 생과의 맛 분석

3개 지역에서 생산된 아로니아 생과를 맛 분석장치를 이용하여 객관화된 맛을 측정된 결과는 Table 8과 같다. 아로니아 생과의 맛은 블루베리의 맛과 비교하여 나타내었다. B 지역에서 재배된 아로니아의 신맛이 -8.93으로 가장 낮게 나타났고 C 지역에서 재배된 아로니아의 신맛이 -11.59로 가장 높게 나타났다. 쓴맛의 경우는 B 지역에서 재배된 아로니아가 3.67로 가장 낮아고 A 지역과 C 지역에서 재배된 아로니아는 각각 4.21과 4.46으로 유사하게 나타났다. 수렴성 맛은 B지역에서 재배된 아로니아가 가장 낮았고, A 지역에서 재배된 아로니아가 가장 높았다.

Table 8. Taste sensing results of aronia grown in different areas

	sourness	bitterness	astringency	uami	saltiness
Aronia					
Region A	-9.78±0.02	4.21±0.40	1.15±0.30	4.51±0.10	-17.66±0.64
Region B	-8.93±0.11	3.67±0.23	0.98±0.17	4.27±0.07	-16.23±0.22
Region C	-11.59±0.11	4.46±0.09	1.04±0.08	5.13±0.02	-16.51±0.32
Blueberry	-5.51±0.09	3.8±0.01	0.71±0.14	2.63±0.01	-19.15±0.29



2. 아로니아의 가공조건에 대한 안정성 평가

가. 실험 방법

(1) 실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 2012년 8월말에 경북 영천의 아로니아 재배 농장에서 수확한 것을 직접 구입하였다. 깨끗이 세척한 아로니아를 food processor(Phillips Electronics, Seoul, Korea)를 이용하여 곱게 마쇄한 후, 3겹의 거즈로 여과하여 얻은 즙을 -20°C 에서 보관하면서 사용하였다. 완충용액 제조 및 분석용 시약은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis MO, USA)로부터 구입하였고, 그 밖의 모든 시약은 분석에 적합한 특급시약을 사용하였다.

(2) 총 안토시아닌 함량 분석

아로니아 즙 100 μL 을 적절한 농도로 희석하여 pH 1 완충용액 1,900 μL 와 pH 4.5 완충용액 1,900 μL 를 각각 첨가하여 vortexing 한 후, 520 nm와 700 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 총 안토시아닌 함량은 Giusti와 Wrolstad의 방법(2001)에 의해 계산하였다.

(3) 아로니아베리 수용액 제조

아로니아즙을 MacIlvaine 완충용액(0.1 M citric acid + 0.2 M Na_2HPO_4)과 혼합하여 10% 수용액을 제조하여 각 항목에 대한 안정성을 평가하였다. 유기산에 대한 안정성 평가에서는 MacIlvaine 완충용액에 함유된 citric acid로 인해 pH 감소가 나타날 수 있으므로 이를 방지하기 위하여 1 M glycine 완충용액(pH 3.0)을 사용하였다.

(4) pH에 따른 색소의 안정성 평가

아로니아 색소 안정성에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 Macllvaine 완충용액을 사용하여 pH를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0으로 조절하였다. 각 pH별로 아로니아즙을 첨가하여 10% 수용액을 제조하고, microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 450~850 nm 범위에서 각 pH에서의 흡수스펙트럼을 측정하여 최대 흡수파장을 알아보았다.

(5) 가열, 저장온도 및 저장기간에 대한 안정성 평가

가열온도와 시간에 따른 아로니아 색소의 안정성을 알아보기 위해 pH 3.0의 Macllvaine 완충용액을 사용하여 10% 아로니아 수용액을 제조하여 15 mL cap test tube에 10 mL씩 넣어 밀봉하였다. 각각의 시료를 30°C, 60°C, 및 100°C 항온기에 5시간 동안 보관하면서 30분 간격으로 꺼내 차가운 물에 냉각시킨 후, 514 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도의 변화를 측정하였다.

냉장 및 냉동온도에서 장기저장에 따른 아로니아 색소의 안정성을 알아보기 위하여 pH 3.0의 Macllvaine 완충용액에 10% 아로니아 수용액을 제조하여 15 mL 캡튜브에 10 mL씩 넣어 밀봉하였다. 각각의 시료를 4°C, -20°C, -75°C에서 10주 동안 보관하면서 1주 간격으로 514 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 저장 중 색소의 안정성을 알아보았다.

(6) 빛에 대한 안정성 평가

빛의 영향을 알아보기 위해 pH 3.0의 Macllvaine 완충용액을 사용하여 제조한 10% 아로니아 수용액을 cap test tube에 넣고 밀봉하였다. 시료의 일부는 일광에 노출시키면서 상온에 보관하였고, 일부는 알루미늄 호일에 싸서 암소에 보관하면서 수용액의 흡광도 변화를 514 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

(7) 당에 대한 안정성 평가

pH 3.0의 Macllvaine 완충용액을 사용하여 제조한 10% 아로니아 수용액에 glucose, galactose, fructose, maltose, sucrose를 0.1, 0.5, 1.0 M이 되도록 용해시켰다. 각각의 시료는 514 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하여 당의 종류 및 농도에 따른 색소의 강도를 비교하였다. 이들 중에서 색소의 강도가 가장 높은 0.1 M 농도의 아로니아 수용액을 선택하여 저장기간에 따른 색소

의 안정성을 조사하였다. 각종 당을 종류별로 첨가한 아로니아 수용액을 cap test tube에 넣고 밀봉하여 5일동안 4℃에 보관하면서 24시간 간격으로 514 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

(8) 유기산에 대한 안정성 평가

유기산에 대한 아로니아 수용액의 안정성을 알아보았다. 유기산으로 인한 pH의 감소를 방지하기 위하여 1 M glycine 완충용액 (pH 3.0)에 아로니아즙을 첨가하였고, 완충용액의 완충능을 유지할 수 있도록 5종의 유기산(acetic acid, citric acid, formic acid, malic acid, tartaric acid)을 0.01, 0.05, 0.1 M 농도로 넣은 후, pH를 재조정하였다. 각 시료의 흡광도를 514 nm에서 측정하여 유기산의 농도에 따른 색소의 안정성을 평가하였다.

이들 중에서 색소의 강도가 가장 높았던 유기산 0.05 M의 아로니아 수용액을 대상으로 저장기간에 따른 아로니아 수용액 색소의 안정성을 조사하였다. 각종 유기산을 종류별로 첨가한 아로니아 수용액을 cap test tube에 넣고 밀봉하여 5일 동안 4℃에 보관하면서 24시간 간격으로 514 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

(9) 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS software package(Version 17.0)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 ANOVA를 이용하여 유의성을 확인한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test를 이용하여 분석하였다.

나. 실험 결과

(1) 안토시아닌 함량

아로니아 즙에 함유되어 있는 총 안토시아닌 함량은 100 mL 당 cyanidin-3-glucoside를 기준으로 0.0908 mg으로 나타났다. 아로니아는 다른 베리류에 비해 더 많은 안토시아닌을 함유하고 있으며, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-arabioside, cyanidin-3-xyloside 등의 안토시아닌을 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다.

(2) pH에 따른 색소의 안정성 평가

아로니아에서 추출한 안토시아닌 색소의 안정성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 아로니아즙에 pH 3.0~7.0로 조절한 각각의 완충용액을 첨가하여 10% 수용액을 조제한 후, 450~850 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다(Fig. 1).

Fig. 1과 같이 pH 3.0에서 가장 높은 흡수스펙트럼을 나타냈으며 특히, 514 nm에서 가장 높은 흡광도를 보였다. pH 4.0의 경우, 518 nm, pH 5.0은 522 nm, pH 6.0은 532 nm, pH 7.0은 550 nm에서 최대흡광도를 나타내 pH가 높아질수록 최대 흡수파장이 장파장 쪽으로 이동하는 것을 관찰하였다.

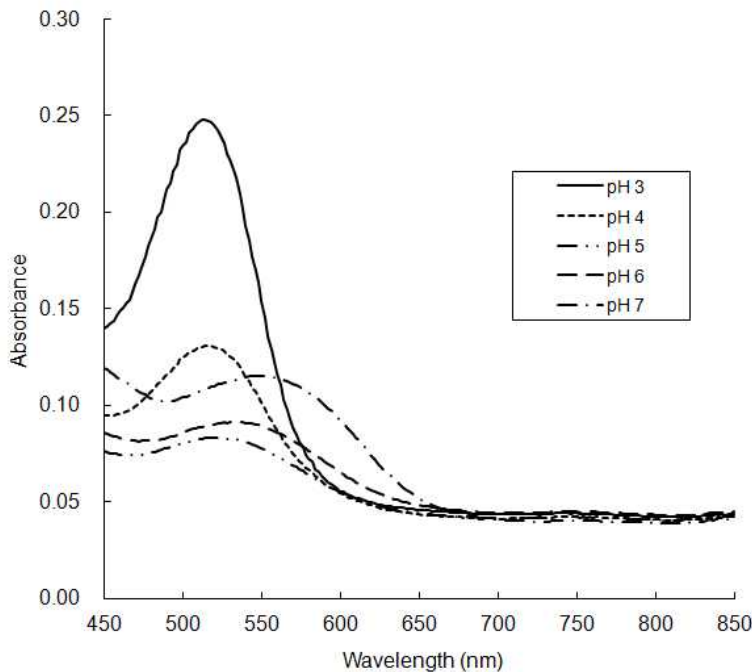


Fig. 1. Stability of anthocyanin extracted from aronia in different pHs at 450~850 nm.

pH가 높아짐에 따라 최대흡광도가 변화하는 것은 안토시아닌 색소의 전형적인 패턴으로 안토시아닌 색소는 pH가 높아지면 자주색에서 청색으로 변하기 때문이다. 일반적으로 안토시아닌 색소는 pH가 낮은 산성용액에서는 flavylium 양이온으로 존재하여 안정한 진한 적색을 나타낸다. pH가 증가할수록 flavylium 양이온이 수소이온을 잃고 pseudobase가 형성되어 무색의 carbinol pseudobase를 형성하고, pH 9 이상에서는 anhydrobase의 형태로 되어 푸른색을 나타낸다. 동일한 안토시아닌이라 할지라도 식물체의 종류 및 색소가 함유되어 있는 세포 내의 pH에 따라 색상이 다르게 나타난다. 아로니아는 안토시아닌 함량이 풍부하여 향후 천연색소로 식품에 적용할 가능성이 매우 높으므로 pH에 따른 색소의 안정성 및 고유한 색소를 유지하기 위한 최적 pH를 고려해야 할 것으로 사료된다.

(3) 가열에 대한 안정성 평가

pH에 따른 아로니아 색소의 안정성 실험에서 가장 높은 흡수스펙트럼을 나타낸 pH 3.0 완충용액을 이용하여 제조한 아로니아 10% 수용액을 제조하였다. 제조된 용액을 30℃, 60℃ 및 100℃에서 300분간 저장하면서 30분 간격으로 아로니아 색소의 흡광도를 측정하면서 온도에

대한 안정성을 확인하였다. 가열온도가 높아지고 가열시간이 길어질수록 아로니아 색소의 안정성은 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 2).

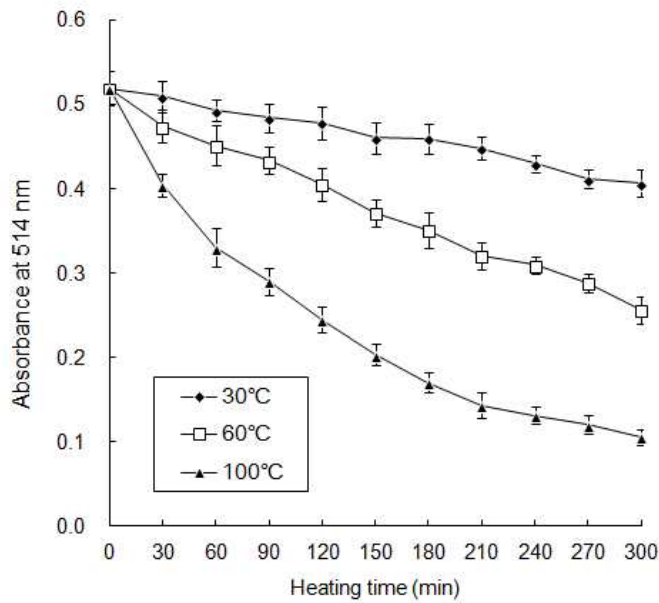


Fig. 2. Effect of temperature on the color intensity of aronia anthocyanin at different heating time. Each value is expressed as mean±SD of three separate measurements.

100°C에서 가열한 경우는 색소의 파괴가 급격히 나타나 150분과 300분이 경과하면서 아로니아 색소는 가열하기 전에 비해 각각 60.91%와 79.63% 감소하였다. 30°C에서는 비교적 안정성이 높게 나타났으며 가열하기 전에 비해 150분과 300분이 경과하면서 아로니아 색소는 초기에 비해 각각 11.27%와 21.70% 감소하였다.

안토시아닌은 온도에 매우 민감하여 10~30°C에서는 비교적 안정하나 40°C 이상에서는 색소의 파괴가 일어나고 고온에서는 glycoside 결합의 가수분해가 일어나 chalcone, α-diketone 등을 생성하는 것으로 알려져 있다.

(4) 저장온도 및 저장기간 따른 안정성 평가

pH 3.0 MacIlvaine 완충용액을 이용하여 제조한 10% 아로니아 수용액을 4°C, -20°C 및 -7°C에서 10주 동안 저장하면서 1주일 간격으로 아로니아 색소의 안정성을 측정하였다(Fig. 3).

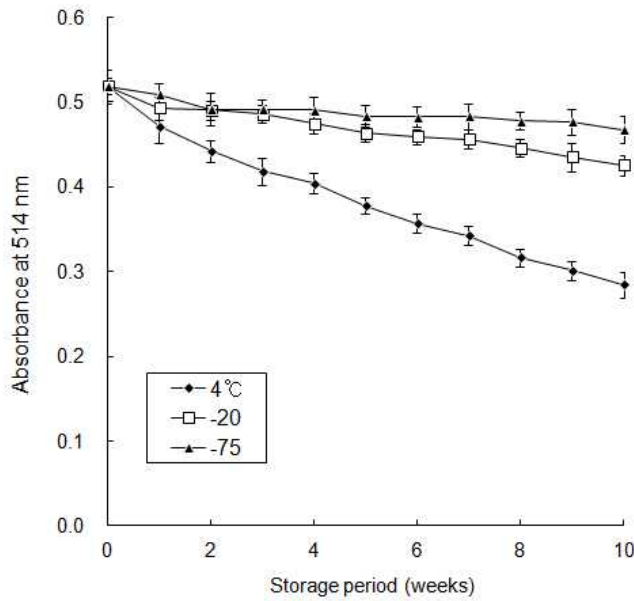


Fig. 3. Effect of storage temperature on the color intensity of aronia anthocyanin at different storage period. Each value is expressed as mean \pm SD of three separate measurements.

냉동 온도에서 저장한 경우에는 저장기간이 경과하여도 아로니아 색소가 비교적 안정하였으나 4°C의 냉장온도에서는 저장기간이 경과함에 따라 아로니아 색소가 감소하는 경향을 보였다. 아로니아 수용액을 -75°C 저장한 경우, 색소의 안정성이 다른 저장온도에 비해 비교적 높게 나타났다. 즉, 저장 초기에 비해 5주 및 10주가 경과하여도 아로니아 색소의 감소율은 저장 전에 비해 각각 6.86%와 9.98%로 비교적 낮았다. -20°C에서의 저장은 4°C에 비해 색소의 파괴가 적었으나, -75°C 저장에 비해서는 파괴정도가 다소 높았다. 4°C에서의 저장은 냉동온도에 비해 색소의 파괴가 급격히 나타나 5주와 10주가 경과하면서 아로니아 색소는 저장 초기에 비해 각각 27.21%와 45.24% 감소하였다. 따라서 아로니아를 장기간 저장하는 경우는 최대한 낮은 온도에서 냉동 저장하는 것이 안토시아닌 색소의 안정성을 유지하고 잔존율을 높이는데 도움이 될 것으로 사료된다.

(5) 빛에 대한 안정성 평가

아로니아에서 추출한 안토시아닌 색소의 빛에 대한 안정성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 일광에서는 안토시아닌 색소가 저장 1일째부터 25.40%나 감소하였고, 저장 2일에서는 50.21%의 감소를 나타낸 반면에 암실에서는 10일째까지 지속적으로 색도강도가 감소하였다. 이러한 결과로 볼 때, 아로니아에서 추출한 안토시아닌 색소는 일광에 대한 안정성이 매우 낮은 것으로 사료된다.

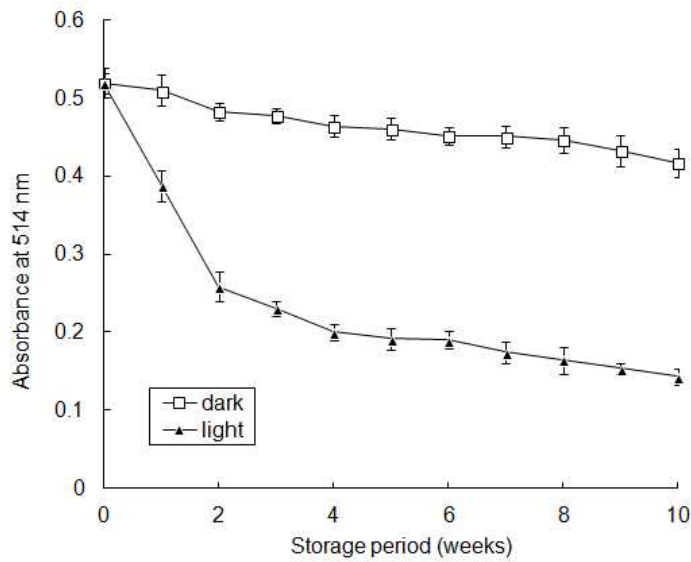


Fig. 4. Effect of light on the color intensity of aronia anthocyanin at different storage period. Each value is expressed as mean±SD of three separate measurements.

(6) 당에 대한 안정성 평가

아로니아 색소의 당에 대한 안정성을 측정하기 위해 농도를 달리하여 제조한 galactose, glucose, maltose, fructose, sucrose 용액을 첨가한 후에 아로니아 색소의 흡광도를 측정하였다 (Fig. 5).

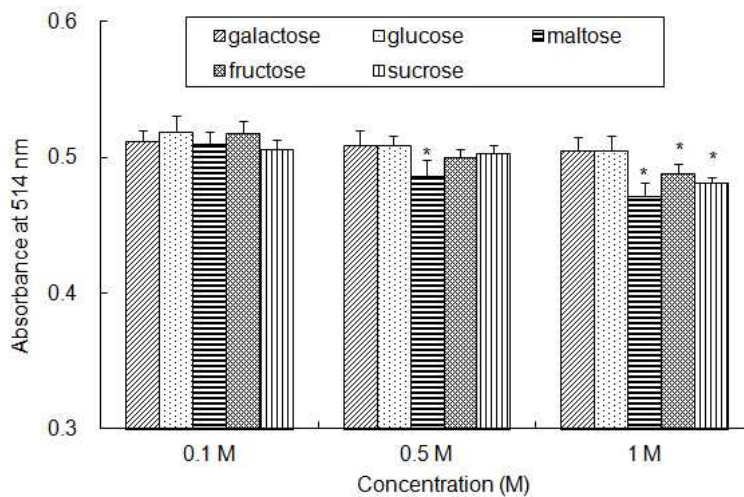


Fig. 5. Effect of different sugars on the color intensity of aronia anthocyanin at different concentration. Each value is expressed as mean±SD of three separate measurements. The asterisk symbol indicates that the means are significantly different from the control ($p < 0.05$).

아로니아에 galactose, glucose를 첨가했을 때는 농도에 따른 흡광도의 변화가 거의 없었으나 maltose, fructose 및 sucrose는 농도가 증가함에 따라 흡광도가 감소하는 경향을 보여 안토시아닌 색소의 안정성은 당의 종류에 따라서도 영향을 받는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 오디 색소에 대한 당류의 영향을 조사한 결과 maltose, sucrose, fructose 첨가 시 색소의 강도가 현저하게 감소되었다는 결과와 유사하였다. 첨가한 당의 농도가 낮을 때는 비교적 높은 흡광도를 보였으나, 당의 농도가 증가함에 따라 흡광도가 현저하게 감소하는 것으로 나타났다.

저장기간에 따른 각종 당에 대한 아로니아 색소의 안정성을 알아보기 위해 본 실험에서 안토시아닌 색소의 안정성이 가장 우수했던 0.1 M의 각 당류 용액을 첨가한 후 흡광도의 변화를 5일 동안 측정하였다(Fig. 6).

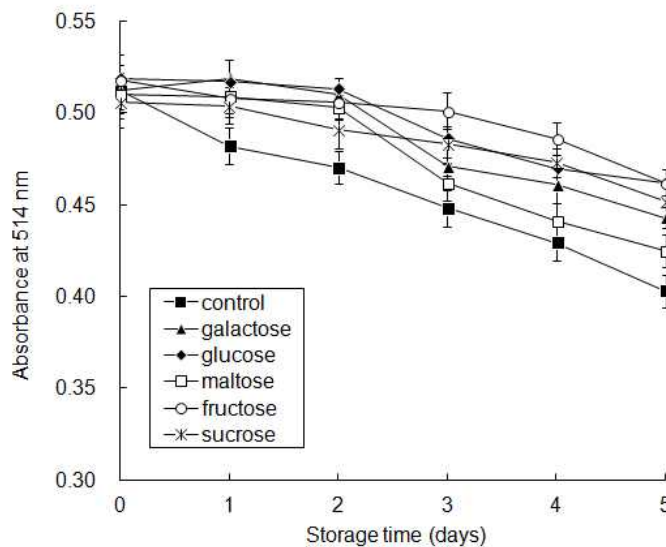


Fig. 6. Effect of different types of 0.1 M sugars on the color intensity of aronia anthocyanin at different storage period. Each value is expressed as mean \pm SD of three separate measurements.

전반적으로 저장기간이 길어짐에 따라 모든 당류에서 색소의 강도가 감소하는 경향을 관찰하였다. 첨가한 당의 종류에 따른 색소 강도는 당의 첨가 직후는 glucose, galactose, fructose, maltose 및 sucrose 순이었으나, 저장 5일 후에는 maltose, galactose, sucrose, glucose 및 fructose 순으로 낮은 색소의 잔존율을 보였다. 안토시아닌 색소는 당류, 유기산, 금속이온 등과 같이 함께 존재하는 물질의 종류에 따라 안정성에도 영향을 받는다. 선행연구에서 당은 안토시아닌 색소의 분해를 촉진하고 fructose가 다른 당류(glucose, maltose, galactose, sucrose)에 비해 안토시아닌 분해정도가 가장 높다고 보고되어 있다. 본 결과는 당에 대한 유색미, 오디 안토시아닌 색소의 안정성 결과와 다소 차이가 있는데 이는 각 식물체의 matrix 별로 안토시아닌 측쇄에 연결된 당의 종류가 다르기 때문으로 사료된다. 아로니아에 당을 첨가하여 가공제품

등을 만들 때 이 점을 본 결과를 고려하여 사용할 당의 종류 및 농도를 선택할 필요가 있을 것으로 사료된다.

(7) 유기산에 대한 안정성 평가

아로니아에서 추출한 안토시아닌 색소의 유기산에 대한 안정성을 알아보기 위해 ascorbic acid, citric acid, formic acid, malic acid 및 tartaric acid를 각각 10 mM, 50 mM 및 100 mM 첨가 후 색소의 변화를 측정하였다(Fig. 7).

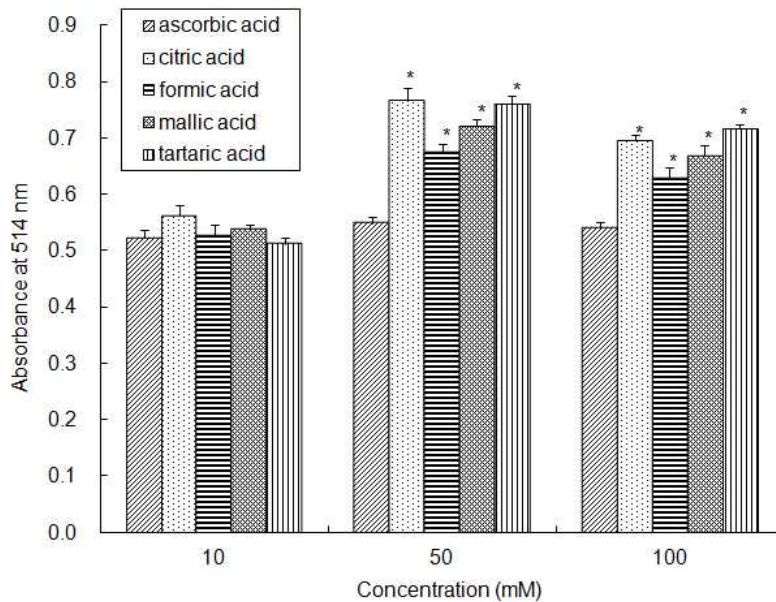


Fig. 7. Effect of different organic acids on the color intensity of aronia anthocyanin at different concentration. Each value is expressed as mean±SD of three separate measurements. The asterisk symbol indicates that the means are significantly different from the control ($p < 0.05$).

유기산의 종류 및 농도는 아로니아 유래 안토시아닌 색소의 안정성에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 유기산의 농도가 10 mM과 100 mM에 비해 50 mM에서 흡광도가 가장 높게 나타나 아로니아 유래 안토시아닌 색소는 50 mM의 유기산에서 안정함을 확인하였다. 50 mM 농도에서 citric acid, tartaric acid, malic acid, formic acid 및 ascorbic acid 순으로 높은 색소 강도를 보였다. 10 mM 유기산을 첨가시 색소 강도는 50 mM 첨가구에 비해 낮았지만, 100 mM 첨가구에 비해 높았으며, 유기산 간의 차이는 미미하였다. Citric acid는 50 mM과 100 mM에서 안정하였다. 이러한 결과를 통해 아로니아 색소의 안정성을 유지하기 위해 유기산을 첨가할 경우에는 50 mM 정도를 첨가하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

저장기간에 따른 각종 유기산에 대한 아로니아 색소의 안정성을 알아보기 위해 본 실험에서 안토시아닌 색소의 안정성이 가장 우수했던 50 mM의 각 유기산 용액을 첨가한 후 흡광도

의 변화를 5일 동안 측정하였다(Fig. 8).

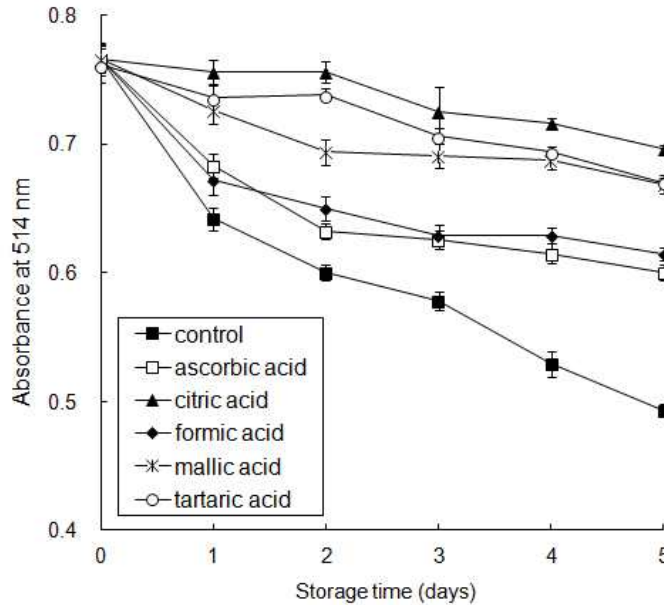


Fig. 8. Effect of different types of 50 mM organic acids on the color intensity of aronia anthocyanin at different storage period. Each value is expressed as mean \pm SD of three separate measurements.

전반적으로 저장기간이 길어짐에 따라 모든 유기산에서 색소의 강도가 감소하는 경향을 나타냈으며 전반적으로 저장기간이 길어짐에 따라 모든 유기산류 에서 색소의 강도가 감소하였다. 첨가한 유기산의 종류에 따른 색소 강도는 citric acid, tartaric acid, malic acid, formic acid 및 ascorbic acid의 순으로 낮은 색소의 잔존율을 나타냈다. 일반적으로 citric acid는 저장성 향상을 위해 식품가공에서 많이 사용하고 있으며 본 결과에서는 citric acid 존재 하에서 아로니아 색소가 가장 안정한 것으로 나타났다. 식물체에는 다양한 유기산이 존재하며, 각 식물체의 matrix 별로 안토시안 색소의 안정성에 기여하는 유기산의 종류에 차이가 있는 것으로 사료된다.

3. 저장온도와 저장기간에 따른 품질특성 및 유효성분 평가

가. 실험 방법

(1) 실험재료 및 시약

아로니아(*Aronia melanocarpa*, black chokeberry)는 2012년 9월초에 경북 영천의 아로니아 재배농장에서 완전히 익은 것을 직접 구입하였다. 아로니아의 이물질을 제거하고 깨끗이 세척하

여 플라스틱 지퍼백에 넣어 냉장과 냉동의 3개 온도(4℃, -20℃, -75℃)에서 20주 동안 저장하면서 4주 간격으로 항산화 물질 함량을 분석하였다.

(2) 시료의 추출

일정 온도에서 일정 기간동안 저장이 끝난 시료는 마쇄하여 시료에 시료 무게의 25배의 증류수 또는 80% 에탄올을 가한 후 100℃에서 환류냉각하면서 6시간 동안 3회 반복 추출하였다. 추출물은 여과 후 분석에 사용하였다.

(3) 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 발색되는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법에 따라 분석하였다(Singleton 등 1999). 아로니아 추출물(1 mg/mL) 0.5 mL에 Folin 시약 0.5 mL을 혼합한 뒤 3분간 실온에서 반응시킨 후 2% Na₃CO₃ 1.5 mL을 첨가한 뒤 2시간 동안 암소에서 반응시킨 후, 760 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도(OD)를 측정하였다. 시료에 함유된 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(6.25~100 µg/mL)의 표준곡선을 통하여 시료 g당 gallic acid equivalent(GAE)로 나타내었다.

(4) 총 플라보노이드 함량 분석

아로니아 추출물(1 mg/mL) 1 mL에 2% aluminium chloride methanolic solution 1 mL을 혼합한 뒤 15분간 실온에서 반응시킨 후 430 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 플라보노이드 함량은 quercetin(6.25~100 µg/mL)의 표준곡선을 통하여 시료 g당 quercetin equivalent(QE)로 나타내었다.

(5) 총 안토시아닌 함량 분석

총 안토시아닌 함량은 Giusti와 Wrolstad의 방법(2001)에 의해 분석하였다. 동결건조한 아로니아 시료 0.1 g에 0.1% formic acid를 함유한 methanol 5 mL을 넣어 20분간 sonication을 하여 상층액을 따로 모았다. 이 과정을 3회 더 반복하였다. 상층액을 40℃에서 rotary evaporator(EYELA N-1200A, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 추출용매를 이용하여 적절한 농도로 희석하였다. 시료 100 µL에 pH 1 완충용액 1,900 µL와 pH 4.5 완충용액 1,900 µL를 각각 첨가하여 vortexing 한 후, 520 nm와 700 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 아래 식에 의해 총 안토시아닌 함량을 계산하였다.

$$\text{총 안토시아닌 함량 (mg/100 g)} = (A \times 449.2 \times DF \times 12 \times 500) \div (26,900 \times 1)$$

A : (OD 520nm - OD 700nm) of pH 1.0 - (OD 520nm - OD 700nm) of pH 4.5

449.2 : cyanidin-3-glucoside의 1 mol 당 분자량 (g)

DF : 희석배수 = 20

12 : 총 부피

500 : 시료 100 g당으로 환산하기 위하여 12 mL 추출액의 시료 무게인 0.2 g으로 나눈 값

26,900 : cyanidin-3-glucoside의 molar absorbtivity

(6) HPLC를 분석한 안토시아닌 함량

시료를 원심분리기를 이용하여 4,500 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상등액을 취한 후 Syringe filter를 이용하여 여과한 후 시료 10 μ L를 Eclipse XDB-C18(4.5 x 250 mm, 5.0 μ m, Agilent Santa Clara, CA, USA) column을 사용하여 HPLC(HP 1200 series, Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였으며, diode array detectro(Agilent Santa Clara, CA, USA)를 검출기로 사용하였다.

나. 실험 결과

(1) 온도 및 저장기간에 따른 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총 안토시아닌 함량

저장온도 및 기간에 따른 총 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌 함량을 분석한 결과(Table 1), 저장기간이 짧고, 낮은 온도에서 저장할수록 총 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌 함량의 감소가 적은 것으로 나타났다. 저장기간이 길어질수록, 저장온도가 높을수록 생리활성 물질의 함량이 감소하는 것을 확인하였다.

Table 1. The total polyphenol, total flavonoid, and total anthocyanin contents of aronia by different temperature and storage periods

	Total polyphenol (mg GAE ¹ /g)	Total flavonoid (mg QE ² /g)	Total anthocyanin (mg C3G ³ /100 g)
4°C, 4 week	322.20±4.50	185.11±23.34	15.33±1.31
4°C, 8 week	307.09±4.61	171.30±9.90	15.05±2.35
4°C, 12 week	383.57±5.17	180.55±6.98	12.97±0.85
4°C, 16 week	376.74±3.01	171.75±7.96	11.60±0.59
4°C, 20 week	217.10±2.81	99.53±10.82	7.70±0.25
-20°C, 4 week	401.37±3.41	234.87±5.82	19.10±0.76
-20°C, 8 week	374.55±4.55	187.84±8.03	16.89±1.70

-20°C, 12 week	347.73±1.25	212.72±6.75	18.10±0.79
-20°C, 16 week	323.80±1.55	175.85±4.04	14.96±2.83
-20°C, 20 week	285.07±0.91	157.80±3.25	13.55±0.56
-75°C, 4 week	390.34±2.75	203.31±4.35	19.43±0.62
-75°C, 8 week	380.06±5.11	215.76±2.55	19.15±0.79
-75°C, 12 week	344.44±3.26	203.92±2.76	15.88±0.80
-75°C, 16 week	351.79±2.00	186.62±6.53	16.59±0.65
-75°C, 20 week	326.27±4.11	199.82±2.78	15.40±0.67

¹⁾GAE=gallic acid equivalent, ²⁾CE=catechin equivalent, ³⁾C3G=cyanidin-3-glucoside

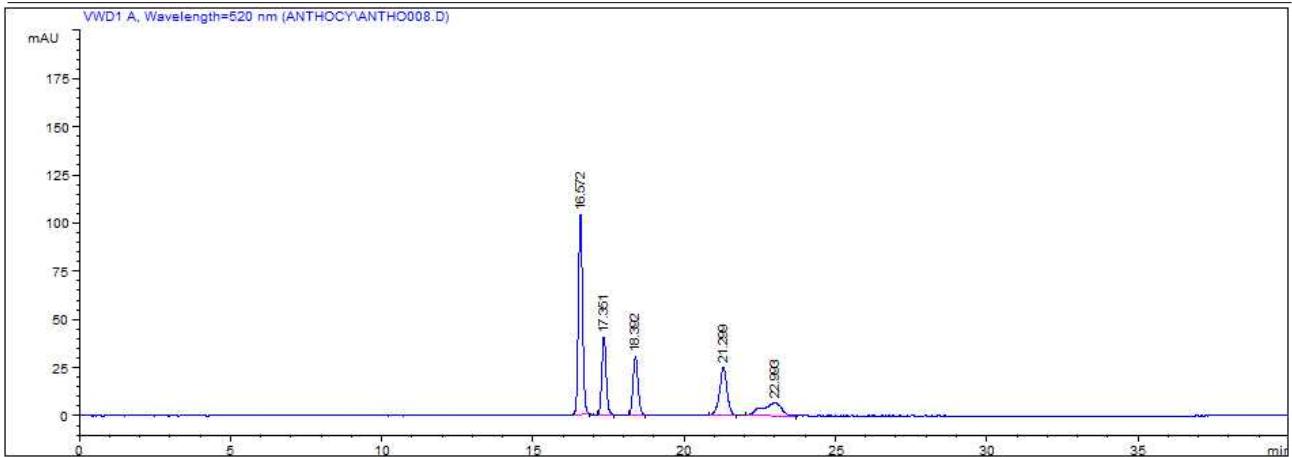
(2) 온도 및 저장기간에 따른 개별 안토시아닌 함량

저장온도 및 기간에 따른 개별 안토시아닌 함량을 HPLC로 분석한 결과(Table 2), cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-arabinose, cyanidin-3-O-xylose를 확인하였고, 이들 물질 가운데 cyanidin-3-O-galactoside 함량이 가장 높게 나타났다. 저장기간이 짧고, 낮은 온도에서 저장할수록 안토시아닌 함량의 감소가 적은 것으로 나타났다. 저장기간이 길어질수록, 저장온도가 높을수록 안토시아닌 함량이 감소하는 것을 확인하였다.

Table 2. The individual anthocyanin contents of aronia by different temperature and storage periods determined by HPLC

	Concentration (mg/kg)			
	cyanidin-3-O-galactoside	cyanidin-3-O-glucoside	cyanidin-3-O-arabinose	cyanidin-3-O-xylose
4°C, 4 week	7721.7±997.3	490.3±64.7	3631.9±455.7	733.9±105.4
4°C, 8 week	6598.9±504.9	414.3±28.6	3075.4±201.6	576.8±32.2
4°C, 12 week	6336.6±192.6	407.6±18.8	3000.6±90.1	585.0±24.9
4°C, 16 week	5955.5±671.1	379.3±37.3	2799.0±321.8	535.0±71.8
4°C, 20 week	3659.4±231.1	226.7±24.3	1714.0±123.3	324.9±14.3
-20°C, 4 week	8386.2±529.2	555.4±39.9	3930.7±249.8	777.8±45.6
-20°C, 8 week	8710.5±611.0	560.3±38.6	4065.0±288.1	817.7±55.7
-20°C, 12 week	8564.5±96.0	541.0±13.0	3943.8±50.8	796.3±40.2
-20°C, 16 week	6477.4±29.8	398.7±2.8	2999.4±8.3	572.7±5.8

-20°C, 20 week	6502.7±176.4	393.1±12.7	3012.2±88.5	560.4±17.9
-75°C, 4 week	9462.6±428.3	578.8±20.5	4376.8±147.0	850.6±10.9
-75°C, 8 week	9341.1±436.0	583.7±39.3	4305.1±217.6	837.0±69.9
-75°C, 12 week	8831.8±595.6	548.9±32.4	4041.0±271.9	792.4±45.8
-75°C, 16 week	8207.6±601.5	485.1±36.2	3750.8±283.6	709.4±70.8
-75°C, 20 week	8179.4±653.5	483.7±43.2	3697.1±289.9	707.2±61.3



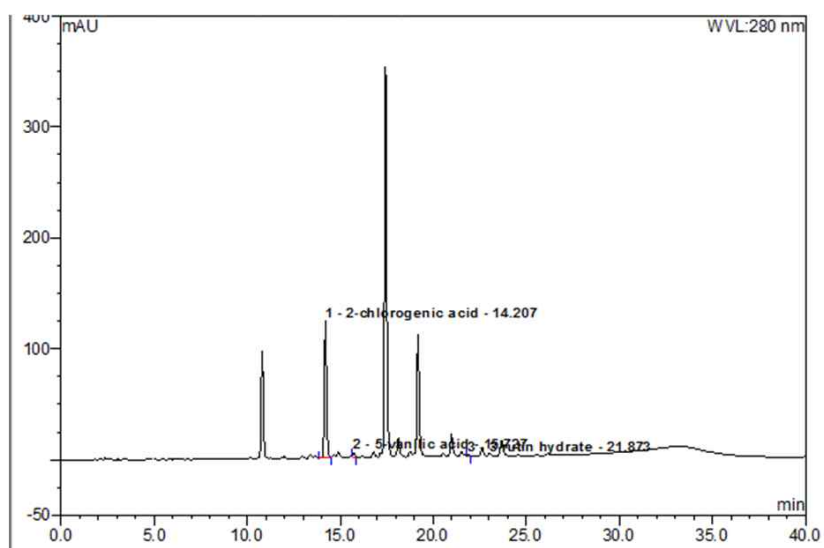
(3) 온도 및 저장기간에 따른 개별 폴리페놀 함량

저장온도 및 기간에 따라 개별 폴리페놀 함량 변화를 HPLC로 분석한 결과(Table 3), chlorogenic acid, vanilic acid 및 rutin hydrate를 확인하였고, 이들 물질 가운데 chlorogenic acid 함량이 가장 높게 나타났다. 저장기간이 짧고, 낮은 온도에서 저장할수록 폴리페놀 함량의 감소가 적은 것으로 나타났다. 저장기간이 길어질수록, 저장온도가 높을수록 폴리페놀 함량이 감소하는 것을 확인하였다.

Table 3. The individual polyphenol contents of aronia by different temperature and storage periods determined by HPLC

	Concentration (mg/kg)		
	chlorogenic acid	vanilic acid	rutin hydrate
4°C, 4 week	217.565±504.9	3.840±28.6	4.292±201.6
4°C, 8 week	184.836±192.6	3.412±18.8	5.285±90.1
4°C, 12 week	180.154±671.1	2.083±37.3	3.418±321.8
4°C, 16 week	148.534±231.1	1.948±24.3	4.262±123.3
4°C, 20 week	74.673±529.2	1.219±39.9	3.488±249.8
-20°C, 4 week	239.519±611.0	4.028±38.6	3.680±288.1

-20°C, 8 week	235.066±96.0	2.819±13.0	4.159±50.8
-20°C, 12 week	237.593±29.8	4.515±2.8	3.221±8.3
-20°C, 16 week	72.558±176.4	3.442±12.7	3.258±88.5
-20°C, 20 week	72.112±428.3	3.637±20.5	2.621±147.0
-75°C, 4 week	258.006±436.0	4.470±39.3	4.834±217.6
-75°C, 8 week	242.332±595.6	3.762±32.4	3.359±271.9
-75°C, 12 week	235.126±601.5	3.411±36.2	5.049±283.6
-75°C, 16 week	252.431±653.5	4.419±43.2	4.141±289.9
-75°C, 20 week	241.458±130.5	3.917±17.7	4.572±84.0



4. 건조조건에 따른 아로니아 분말의 품질 특성 및 가공적성 분석

가. 실험 방법

(1) 실험재료 및 시약

아로니아(*Aronia melanocarpa*, black chokeberry)는 2013년 9월말에 경북 영천의 아로니아 재배농장에서 완전히 익은 것을 직접 구입하였다. 아로니아의 이물질을 제거하고 깨끗이 세척하여 4가지 방법(일광건조, 스팀 후 일광건조, 동결건조 및 오븐건조)으로 건조시켰다. 일광건조는 25~27°C 실온에서 7일간 건조시켰고, 스팀 후 일광건조는 스팀 찜기(Tefal, Seoul, Korea)에 물을 붓고 가열하면서 수증기가 올라오면 아로니아를 넣어 5분 동안 찌 후에 25~27°C 실온에서 8~9일간 건조시켰다. 동결건조는 동결건조기(PVTFD20R, Ilshin Biomass, Gyeonggi, Korea)를 사용하여 12시간 건조시켰고, 오븐건조는 70°C의 드라이오븐에서 12시간 동안 건조시켰다. 건조시킨 시료는 식품분쇄기(Phillips Electronics, Seoul, Korea)를 이용하여 분말화하여 추출용 시료로 사용하였다. 본 실험에 사용된 Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, quercetin, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), ascorbic acid, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 그 밖의 모든 시약은 분석에 적합한 특급시약을 사용하였다.

(2) 시료의 추출

건조방법을 달리하여 얻은 4종의 아로니아 건조시료에 시료 무게의 25배의 증류수 또는 80% 에탄올을 가한 후 100°C에서 환류냉각하면서 6시간 동안 3회 반복 추출하였다. 추출물은 여과 후 회전감압농축기(EYELA, Rikakiki Co., Tokyo, Japan)로 농축한 후 동결건조시켜 분말화 한 후 -20°C에 보관하면서 향후 실험에 사용하였다.

(3) 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 발색되는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법에 따라 분석하였다(Singleton 등 1999). 아로니아 추출물(1 mg/mL) 0.5 mL에 Folin 시약 0.5 mL을 혼합한 뒤 3분간 실온에서 반응시킨 후 2% Na₃CO₃ 1.5 mL을 첨가한 뒤 2시간 동안 암소에서 반응시킨 후, 760 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도(OD)를 측정하였다. 시료에 함유된 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(6.25~100 µg/mL)의 표준곡선을 통하여 시료 g당 gallic acid equivalent(GAE)로 나타내었다.

(4) 총 플라보노이드 함량 분석

아로니아 추출물(1 mg/mL) 1 mL에 2% aluminium chloride methanolic solution 1 mL을

혼합한 뒤 15분간 실온에서 반응시킨 후 430 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 플라보노이드 함량은 quercetin(6.25~100 µg/mL)의 표준곡선을 통하여 시료 g당 quercetin equivalent(QE)로 나타내었다.

(5) 총 안토시아닌 함량 분석

총 안토시아닌 함량은 Giusti와 Wrolstad의 방법(2001)에 의해 분석하였다. 동결건조한 아로니아 시료 0.1 g에 0.1% formic acid를 함유한 methanol 5 mL을 넣어 20분간 sonication을 하여 상층액을 따로 모았다. 이 과정을 3회 더 반복하였다. 상층액을 40°C에서 rotary evaporator(EYELA N-1200A, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 추출용매를 이용하여 적절한 농도로 희석하였다. 시료 100 µL에 pH 1 완충용액 1,900 µL와 pH 4.5 완충용액 1,900 µL를 각각 첨가하여 vortexing 한 후, 520 nm와 700 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 아래 식에 의해 총 안토시아닌 함량을 계산하였다.

$$\text{총 안토시아닌 함량 (mg/100 g)} = (A \times 449.2 \times DF \times 12 \times 500) \div (26,900 \times 1)$$

$$A : (\text{OD } 520\text{nm} - \text{OD } 700\text{nm}) \text{ of pH } 1.0 - (\text{OD } 520\text{nm} - \text{OD } 700\text{nm}) \text{ of pH } 4.5$$

$$449.2 : \text{cyanidin-3-glucoside의 } 1 \text{ mol 당 분자량 (g)}$$

$$DF : \text{희석배수} = 20$$

$$12 : \text{총 부피}$$

$$500 : \text{시료 } 100 \text{ g당으로 환산하기 위하여 } 12 \text{ mL 추출액의 시료 무게인 } 0.2 \text{ g으로 나눈 값}$$

$$26,900 : \text{cyanidin-3-glucoside의 molar absorbtivity}$$

(6) 항산화활성 측정

① DPPH 라디칼 억제 활성 측정

아로니아 추출물의 전자공여능을 DPPH assay로 측정하였다(Cheung 등 2003). 96-well plate에 농도별 추출물 100 µL와 0.2 mM DPPH(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 용액 100 µL를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

② ABTS 라디칼 억제 활성 측정

아로니아 추출물의 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다(Re 등 1999). 96-well plate에 농도별

추출물 100 μ L와 0.2 mM ABTS(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 용액 100 μ L를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 사용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 ABTS 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도}/\text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

③ Hydroxyl 라디칼 억제 활성 측정

아로니아 추출물의 hydroxyl 라디칼 억제 활성을 Chung 등의 방법(1997)을 본 실험에 맞게 변형하여 측정하였다. 시험관에 1 mM FeSO₄/EDTA 용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 시료 0.2 mL, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 1.2 mL 및 10 mM H₂O₂ 0.2 mL를 차례로 가한 후에 37°C에서 1시간 반응시킨 후 2.8% TCA 용액 1 mL를 가하고 95°C 수욕상에서 10분간 반응시킨 후 급냉하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 라디칼 소거능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (\text{시료첨가구의 흡광도})/(\text{시료 무 첨가구의 흡광도})] \times 100$$

④ Superoxide 음이온 라디칼 억제 활성 측정

아로니아 추출물의 superoxide 음이온 소거능을 Wang 등의 방법(2007)으로 측정하였다. 시료 0.05 mL, 0.4 mM xanthin, 0.24 mM nitro blue tetrazolium in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0, 효소액(0.048 unit/mL xanthine oxidase in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0) 0.5 mL를 첨가하고 잘 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 1 mL의 70 mM sodium dodecyl sulfate를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 흡광도를 560 nm에서 측정하고 시료의 라디칼 소거능은 아래 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (\text{시료첨가구의 흡광도})/(\text{시료 무 첨가구의 흡광도}_i)] \times 100$$

⑤ 환원력 측정

아로니아의 환원력은 Oyaizu의 방법(1986)으로 측정하였다. 시료 1 mL에 인산 완충액(200 mM, pH 6.6) 및 1%의 potassium ferricyanide 1 mL를 차례로 가한 다음 50°C의 수욕상에서 20분간 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액을 1 mL 가하여 13,500 × g에서 15분간 원심분리한 후 얻은 상정액 1 mL에 증류수 및 ferric chloride를 각각 1 mL씩 가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 ascorbic acid를 시료와 동일농도로 제조하여 비교하였으며, 환원력은 흡광도의 값으로 나타내었다.

(7) 통계 분석

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS software package(Version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간에 ANOVA 분석을 실시하여 유의성을 확인한 후, 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple test로 $p < 0.05$ 의 수준에서 통계적인 유의성을 검정하였다.

나. 실험 결과

(1) 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량 분석

아로니아 건조방법에 따른 폴리페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량 분석결과는 Table 1과 같다.

Table 1. The total polyphenol, flavonoids, and anthocyanin contents in aqueous extract powder of aronia obtained by different drying methods

	Total polyphenol (mg GAE ¹ /g)	Total flavonoids (mg CE ² /g)	Total anthocyanins (mg C3G ³ /100g)
Sun drying	769 ± 34.5 ^b	76.9 ± 3.2 ^{bc}	0.10 ± 0.002 ^b
Sun drying after steam treatment	779 ± 37.1 ^b	85.5 ± 2.6 ^b	0.07 ± 0.001 ^c
Freeze drying	910 ± 43.2 ^a	90.1 ± 4.6 ^a	0.14 ± 0.005 ^a
Oven drying	757 ± 29.6 ^c	62.0 ± 3.9 ^c	0.08 ± 0.004 ^c

Data were the mean ± SD of three separate experiments.

^{a-c}Values with the different superscript within the same column are significantly different at $P < 0.05$.

¹GAE=gallic acid equivalent

²CE=catechin equivalent

³C3G=cyanidin-3-glucoside

아로니아의 총 폴리페놀 함량(mg gallic acid/g 기준)이 중량 1 g당 동결건조한 시료에서 910 mg으로 가장 높았으며, 스팀 후 일광건조(779 mg), 일광건조(769 mg) 및 오븐건조(757 mg)한 아로니아 순으로 높게 나타났다. 아로니아의 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 기준으로 중량 1 g당 동결건조한 시료에서 90.1 mg으로 가장 높았으며, 스팀 후 일광건조(85.5 mg), 일광건조(76.9 mg) 및 오븐건조(62.0 mg)한 아로니아 순으로 나타났다. 아로니아에 함유된 총 안토시아닌 함량은 중량 100 g당 cyanidin-3-glucoside 함량을 기준으로 동결건조한 시료에서 0.14 mg으로 가장 높았으며, 일광건조, 오븐건조 및 스팀 후 일광건조한 시료에서 각각 0.10, 0.08, 0.07 mg으로 감소하는 경향을 나타냈다.

이상의 결과를 통해 베리류의 폴리페놀 화합물의 함량은 베리류의 품종 및 성숙단계 등에 따라 다르며 미숙과의 떫은맛에 기여하고 있음을 알 수 있다.

(2) 건조방법에 따른 항산화 활성

건조방법을 달리하여 제조한 아로니아 열수추출물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, hydroxyl 라디칼 소거능, superoxide anion 라디칼 소거능 및 환원력의 5가지 방법으로 측정하였다. 아로니아 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 Table 2와 같다.

Table 2. The DPPH radical scavenging activity (%) of aronia extract powder obtained by different drying method

Conc. (µg/mL)	Sun drying	Sun drying after steam treatment	Freeze drying	Oven drying
12.5	6.3 ± 1.5 ^b	7.6 ± 1.2 ^b	9.2 ± 1.0 ^a	2.1 ± 1.1 ^c
25	10.2 ± 2.1 ^{ab}	11.4 ± 1.3 ^{ab}	12.9 ± 1.0 ^a	6.4 ± 2.1 ^b
50	18.5 ± 1.5 ^{bc}	21.6 ± 3.0 ^b	23.0 ± 0.6 ^a	16.3 ± 1.7 ^c
100	30.6 ± 1.8 ^c	35.9 ± 2.2 ^b	40.0 ± 2.4 ^a	30.8 ± 1.9 ^c
200	52.0 ± 1.8 ^c	59.7 ± 1.8 ^b	65.5 ± 2.9 ^a	53.1 ± 0.6 ^c

Data were the mean ± SD of three separate experiments.

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $P < 0.05$.

DPPH 라디칼은 보라색 화합물로 항산화 활성을 지닌 물질과 반응하여 전자나 수소를 받아 환원됨에 따라 보라색이 탈색되는 특성이 있다. 아로니아 추출물의 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거활성도 증가하였다. 동결건조한 아로니아 시료의 경우 200 µg/mL에서 65.5%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보여, 일광건조, 스팀 후 일광건조 및 오븐건조의 DPPH 라디칼 소거활성(52.0~59.7%)에 비해 높게 나타났다. 아로니아 추출물 200 µg/mL에서 오븐건조한 시료(53.1%)는 일광건조 시료(52.0%)에 비해 다소 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으나 일광건조와 오븐건조 사이에는 통계적인 유의차이가 없었다.

아로니아 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 Fig. 1과 같다. 아로니아 추출물의 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거활성도 증가하였고 동결건조한 아로니아 시료의 경우 200 µg/mL에서 75% 이상의 DPPH 라디칼 소거활성을 보여, 일광건조, 스팀 후 일광건조 및 오븐건조의 DPPH 라디칼 소거활성(52.0~59.7%)에 비해 높게 나타났다.

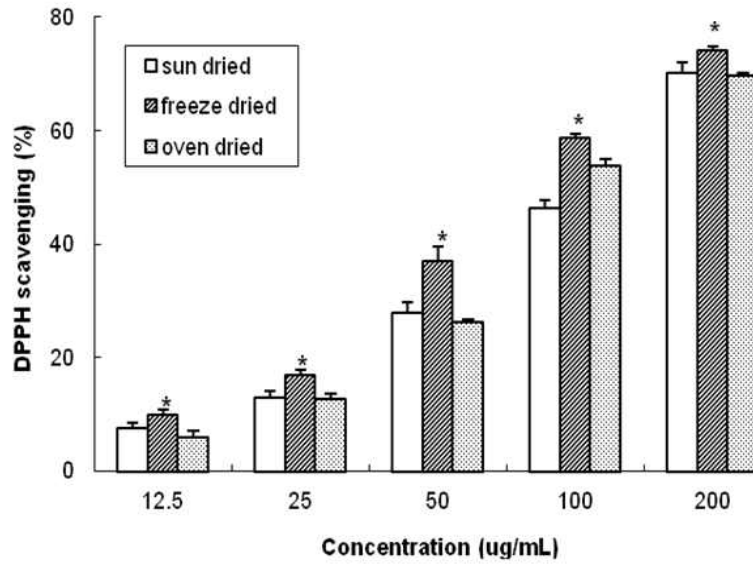


Fig. 1. The DPPH radical-scavenging activity of black chokeberries dried using 3 different methods (sun-, freeze-, and oven-drying). Each value is expressed as mean \pm SD of 3 separate experiments. The asterisk symbol indicates that the means are significantly different from the control ($p < 0.05$).

아로니아 열수추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 Table 3에 나타내었다.

Table 3. The ABTS radical scavenging activity (%) of aronia extract powder obtained by different drying method

Conc. (µg/mL)	Sun drying	Sun drying after steam treatment	Freeze drying	Oven drying
12.5	1.8 \pm 0.6 ^b	2.1 \pm 0.8 ^{ab}	3.3 \pm 1.6 ^a	2.3 \pm 1.6 ^{ab}
25	7.3 \pm 1.0 ^{ab}	5.7 \pm 0.8 ^c	8.8 \pm 1.4 ^a	6.4 \pm 4.8 ^b
50	13.0 \pm 2.4 ^b	12.2 \pm 2.0 ^b	19.3 \pm 0.9 ^a	7.9 \pm 2.9 ^c
100	30.7 \pm 2.1 ^b	29.1 \pm 0.5 ^b	36.9 \pm 2.2 ^a	23.1 \pm 0.8 ^c
200	52.9 \pm 3.6 ^b	51.3 \pm 2.0 ^b	61.7 \pm 2.4 ^a	45.0 \pm 1.8 ^c

Data were the mean \pm SD of three separate experiments.

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $P < 0.05$.

아로니아 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 아로니아 추출물의 농도(12.5~200 µg/mL)의존적으로 증가하였다. 아로니아 추출물 농도가 100 µg/mL 이하에서는 37.0% 이하의 ABTS 라디칼 소거능을 보였으나 아로니아 추출물 농도가 200 µg/mL으로 증가함에 따라 오븐건조한 시료를 제외하고 모든 건조방법의 시료에서 50% 이상의 높은 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 동결건조한 아로니아 시료의 경우 200 µg/mL에서 61.7%의 ABTS 라디칼 소거활성을 보여, 일광건조, 스팀 후 일광건조 및 오븐건조의 ABTS 라디칼 소거활성(45.0~52.9%)에 비해 유

의적으로 높게 나타냈다.

아로니아 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 Fig. 2와 같다. ABTS 라디칼 소거활성은 아로니아 추출물의 농도(12.5~200 µg/mL) 의존적으로 증가하였다. 아로니아 추출물 농도가 100 µg/mL 이하에서는 45% 이하의 ABTS 라디칼 소거능을 보였으나 아로니아 추출물 농도가 200 µg/mL으로 증가함에 따라 모든 건조방법의 시료에서 60% 이상의 높은 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 동결건조한 아로니아 시료의 경우 200 µg/mL에서 70% 이상의 ABTS 라디칼 소거활성을 보여, 일광건조, 및 오븐건조의 ABTS 라디칼 소거활성에 비해 유의적으로 높았다.

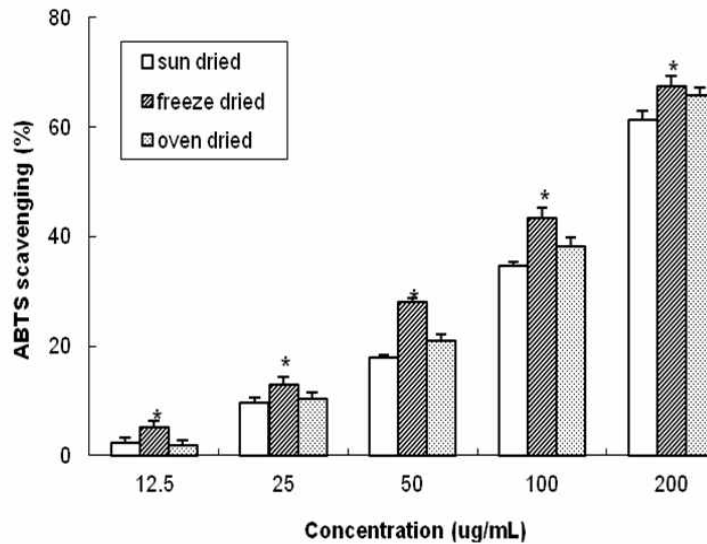


Fig. 2. The ABTS radical-scavenging activity of black chokeberries dried using 3 different methods (sun-, freeze-, and oven-drying). Each value is expressed as mean \pm SD of 3 separate experiments. The asterisk symbol indicates that the means are significantly different from the control ($p < 0.05$).

아로니아 열수추출물의 hydroxyl 라디칼 소거능은 Table 4에 나타냈다.

Table 4. The hydroxyl radical scavenging activity (%) of aronia extract powder obtained by different drying method

Conc. (µg/mL)	Sun drying	Sun drying after steam treatment	Freeze drying	Oven drying
12.5	4.8 \pm 0.9 ^b	4.5 \pm 0.7 ^b	7.4 \pm 0.5 ^a	3.4 \pm 0.2 ^b
25	8.7 \pm 0.6 ^b	9.8 \pm 0.3 ^b	12.2 \pm 0.4 ^a	7.9 \pm 0.2 ^{bc}
50	11.4 \pm 2.3 ^{bc}	14.4 \pm 1.5 ^b	24.4 \pm 2.0 ^a	13.0 \pm 1.2 ^b
100	22.8 \pm 2.4 ^b	24.1 \pm 2.0 ^b	45.4 \pm 2.4 ^a	20.3 \pm 2.5 ^b
200	37.0 \pm 2.5 ^b	40.8 \pm 2.8 ^b	50.5 \pm 2.0 ^a	33.0 \pm 2.2 ^c

Data were the mean \pm SD of three separate experiments.

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $P < 0.05$.

Hydroxyl 라디칼은 반감기가 매우 짧고 반응성이 강한 활성산소로 세포내 대부분의 물질과 쉽게 반응하여 세포에 심각한 손상을 주는 것으로 알려져 있다. 동결건조한 아로니아 추출물의 hydroxyl 라디칼 소거활성이 다른 건조방법에 비해 높게 나타났다. 오븐건조의 경우 다른 시료들에 비해 hydroxyl 라디칼 소거활성이 가장 낮았으며, 200 µg/mL 농도의 아로니아 추출물에서 시료간의 hydroxyl 라디칼 소거능의 차이는 동결건조(50.5%) > 스팀 후 일광건조(40.8%) > 일광건조(37.0%) > 오븐건조(33.0%) 순으로 높게 나타났다. 200 µg/mL의 아로니아 추출물 농도에서 스팀 후 일광건조한 시료의 hydroxyl 라디칼 소거능이 40.8% 나타나 일광건조 시료에서 나타난 37.0% 보다 다소 높은 hydroxyl 라디칼 소거활성을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다.

아로니아 열수추출물의 superoxide 음이온 라디칼 소거활성은 Table 5와 같다.

Table 5. The superoxide anion radical scavenging activity (%) of aronia extract powder obtained by different drying method

Conc. (µg/mL)	Sun drying	Sun drying after steam treatment	Freeze drying	Oven drying
12.5	3.9 ± 0.8 ^{bc}	5.1 ± 0.7 ^b	7.7 ± 0.4 ^a	2.1 ± 0.6 ^c
25	8.7 ± 0.9 ^b	9.4 ± 0.8 ^b	15.0 ± 1.2 ^a	7.5 ± 0.4 ^c
50	18.0 ± 0.6 ^b	13.1 ± 0.5 ^{bc}	27.9 ± 0.7 ^a	9.6 ± 0.7 ^c
100	33.3 ± 0.5 ^b	33.9 ± 0.9 ^b	43.1 ± 0.4 ^a	21.6 ± 0.9 ^c
200	40.0 ± 0.9 ^b	42.9 ± 0.7 ^b	52.1 ± 0.9 ^a	35.0 ± 0.5 ^c

Data were the mean ± SD of three separate experiments.

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $P < 0.05$.

Superoxide 음이온 라디칼($O_2^{\cdot -}$) 소거활성은 친수성이 강한 항산화물질이 생리적으로 관련 있는 라디칼과 얼마만큼 직접적으로 반응할 수 있는지를 측정하기 위해 널리 이용되고 있다 (Moure 등 2006). 동결건조한 시료의 경우 200 µg/mL에서 52.1%의 소거활성을 보여, 일광건조, 스팀 후 일광건조 및 오븐건조의 소거능(35.0~42.9%)에 비해 높은 항산화능을 나타냈다.

아로니아 에탄올 추출물의 superoxide anion 소거활성은 Fig. 3과 같다. 동결건조한 시료의 경우 200 µg/mL에서 35% 이상의 소거활성을 보여, 일광건조, 스팀 후 일광건조 및 오븐건조의 소거능에 비해 높은 항산화능을 보였다.

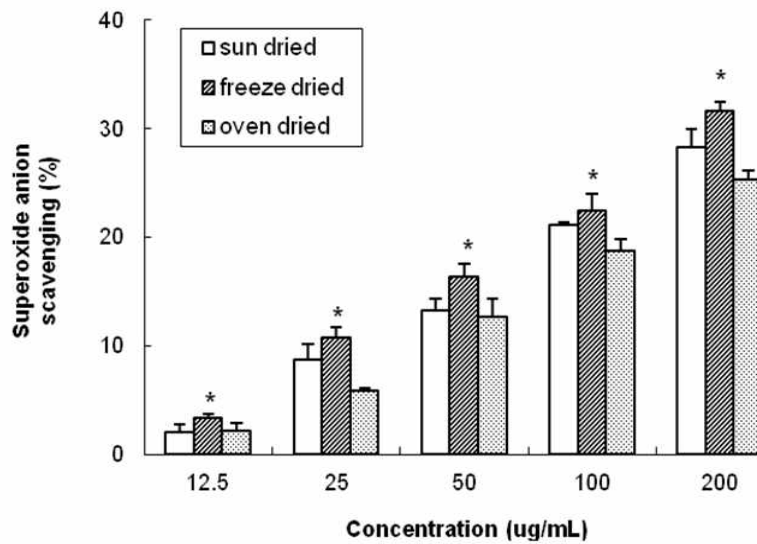


Fig. 3. The superoxide anion radical-scavenging activity of black chokeberries dried using 3 different methods (sun-, freeze-, and oven-drying). Each value is expressed as mean \pm SD of 3 separate experiments. The asterisk symbol indicates that the means are significantly different from the control ($p < 0.05$).

건조방법에 따른 아로니아 열수 추출물의 환원력은 Table 6에 나타났다.

Table 6. The reducing power (OD at 750 nm) on the Fe^{3+} to Fe^{2+} transformation of aronia extract powder obtained by different drying method

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Sun drying	Sun drying after steam treatment	Freeze drying	Oven drying
12.5	0.080 ± 0.001^a	0.079 ± 0.001^a	0.084 ± 0.001^a	0.076 ± 0.001^a
25	0.096 ± 0.002^{ab}	0.094 ± 0.001^b	0.102 ± 0.001^a	0.087 ± 0.001^b
50	0.163 ± 0.001^{ab}	0.156 ± 0.002^b	0.183 ± 0.002^a	0.150 ± 0.001^b
100	0.250 ± 0.006^b	0.237 ± 0.002^c	0.282 ± 0.003^a	0.227 ± 0.002^c
200	0.403 ± 0.003^b	0.361 ± 0.003^c	0.476 ± 0.003^a	0.351 ± 0.004^c

Data were the mean \pm SD of three separate experiments.

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $P < 0.05$.

환원력을 측정하는 방법은 항산화제 물질이 electron이나 hydrogen을 제공할 수 있는 능력을 측정하기 위해 널리 이용되고 있다. 환원력은 reductone이 제공하는 수소원자가 자유라디칼 사슬을 분해함으로써 시작되며 흡광도 수치 자체가 시료의 환원력을 나타내고, 높은 환원력을 가지는 물질일수록 흡광도의 값이 높게 나타난다. 낮은 농도(12.5 $\mu\text{g/mL}$)의 아로니아 추출물에서는 각각의 건조방법에 따른 환원력의 차이가 관찰되지 않았으나, 아로니아 추출물의 농도

가 증가함에 따라 환원력의 차이가 뚜렷이 관찰되었다. 다른 항산화 활성을 assay와 유사하게 동결건조 시료에서 가장 높은 환원력을 나타냈고 오븐건조 시료에서는 가장 낮은 환원력을 나타냈다. 아로니아 함량(12.5~200 µg/mL)이 증가함에 따라 농도 의존적으로 환원력이 증가하였다.

아로니아 에탄올 추출물의 환원력은 Fig. 4와 같다. 낮은 농도(12.5 µg/mL)의 아로니아 추출물에서는 각각의 건조방법에 따른 환원력의 차이가 크지 않았으나, 아로니아 추출물의 농도가 증가함에 따라 환원력의 차이가 뚜렷이 관찰되었다. 다른 항산화 활성을 assay와 유사하게 동결건조 시료에서 가장 높은 환원력을 나타냈고 오븐건조 시료에서는 가장 낮은 환원력을 나타냈다. 아로니아 함량(12.5~200 µg/mL)이 증가함에 따라 농도 의존적으로 환원력이 증가하였다. 오븐건조는 다른 건조방법에 비해 항산화물질 및 항산화 활성이 가장 낮게 나타났으며, 이는 장시간의 열처리를 통해 항산화 물질의 활성이 감소된 것으로 사료된다.

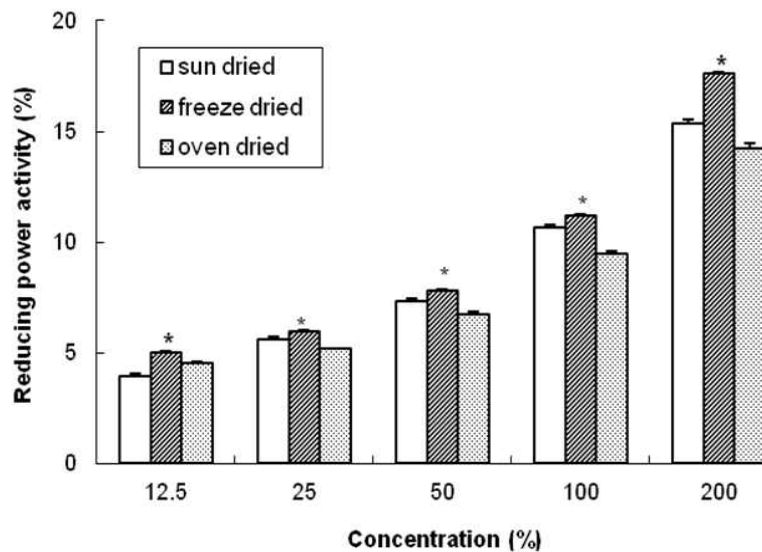


Fig. 4. The reducing power activity of black chokeberries dried using 3 different methods (sun-, freeze-, and oven-drying). Each value is expressed as mean ± SD of 3 separate experiments. The asterisk symbol indicates that the means are significantly different from the control ($p < 0.05$).

동결건조한 아로니아의 항산화 활성이 다른 건조방법에 비해 더 높게 나타났으며 이는 동결건조에 의해 총 페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량이 다른 시료에 비해 더 높게 나타난 것과 연관성을 가지고 있다. 건조방법에 따른 포도 가공부산물과 흰민들레의 부위별 건조방법에 따른 항산화활성 비교 등의 연구에서도 총 폴리페놀 화합물의 함량이 증가함에 따라 항산화 활성이 증가한다고 보고하고 있어 본 연구결과와 잘 일치하는 것으로 나타났다.

오븐건조는 다른 건조방법에 비해 항산화물질 및 항산화 활성이 가장 낮게 나타났다. 이는 장시간의 열처리를 통해 항산화 물질의 활성이 감소된 것으로 사료된다. 건조 및 추출방법은

항산화 효능에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서는 아로니아를 건조시킨 후 유효성분을 추출하기 위해 100℃에서 6시간 동안 3회에 걸쳐 추출을 진행하였는데, 이러한 과정도 항산화 물질의 함량 및 항산화 활성에 영향을 주었을 것으로 사료된다.

5. 아로니아 잎의 수확시기에 따른 생리활성물질 함량 측정

가. 실험 방법

(1) 시료 준비 및 추출

아로니아(*Aronia melanocarpa*, black chokeberry) 잎은 아로니아 재배농장에서 수확시기를 달리하여 직접 채취하였다. 아로니아 잎의 이물질을 제거하고 깨끗이 세척한 후 동결건조기(PVTFD20R, Ilshin Biomass, Gyeonggi, Korea)를 사용하여 12시간 건조시켰다. 건조시킨 시료는 식품분쇄기(Phillips Electronics, Seoul, Korea)를 이용하여 분말화하여 추출용 시료로 사용하였다. 아로니아 잎 시료에 시료 무게의 25배의 증류수(또는 80% 에탄올)를 가한 후 100℃에서 환류냉각(80% 에탄올은 85℃에서 2시간)하면서 6시간 동안 3회 반복 추출하였다. 추출물은 여과 후 회전감압농축기(EYELA, Rikakiki Co., Tokyo, Japan)로 농축한 후 동결건조시켜 분말화 한 후 -20℃에 보관하면서 향후 실험에 사용하였다.

(2) 유효 성분 분석 및 항산화활성 측정

수확시기를 달리하여 채취한 아로니아 잎을 분말로 제조하여 가공식품에 적용하기 위한 방법을 모색하기 위하여 열수추출물과 80% 에탄올 추출물의 항산화 성분 함량 및 항산화 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 아로니아 잎에 함유된 총 클로로필, 총 카로티노이드, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정하고, HPLC를 이용하여 개별적인 폴리페놀 함량을 측정하였다. 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, superoxide anion 라디칼 소거능 및 환원력의 4가지 방법으로 측정하였다.

(3) 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS software package(Version 17.0)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 ANOVA를 이용하여 유의성을 확인한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test를 이용하여 분석하였다.

나. 실험 결과

(1) 기기분석을 통한 생리활성 성분, 색소물질, 페놀화합물 패턴 분석

① 클로로필 및 카로티노이드 함량 분석

총 클로로필 함량(mg/g dry weight)은 성숙한 잎의 80% 에탄올 추출물에서 66.32 mg으로 가장 높았으며, 어린잎 에탄올 추출물(58.40 mg), 성숙한 잎 열수 추출물(10.36 mg) 및 어린잎 열수 추출물(8.48 mg)의 순으로 나타났다. 총 카로티노이드 함량도 총 클로로필 함량과 유사하게 나타나 성숙한 잎의 80% 에탄올 추출물에서 9.88 mg으로 가장 높았으며, 어린잎 에탄올 추출물(9.36 mg), 성숙한 잎 열수 추출물(2.04 mg) 및 어린잎 열수 추출물(1.36 mg)의 순으로 나타났다.

Table 1. The total chlorophyll and carotenoid contents (mg/g dry weight) in aronia leaves obtained by different growth stages

Growth stage	Extraction solvent	Chlorophyll <i>a</i>	Chlorophyll <i>b</i>	Total chlorophylls	Carotenoids
Young	Water	4.76±0.94 ^a	3.00±0.24 ^a	8.48±0.56 ^a	1.36±0.04 ^a
	80% EtOH	41.72±1.04 ^b	11.20±0.08 ^b	58.40±1.48 ^b	9.36±0.20 ^b
Old	Water	5.59±0.40 ^a	3.88±0.20 ^a	10.36±0.64 ^a	2.04±0.08 ^a
	80% EtOH	48.40±0.68 ^b	11.68±0.72 ^b	66.32±0.28 ^b	9.88±0.24 ^b

② 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석

총 폴리페놀 함량(mg gallic acid/g 기준)이 중량 1 g당 어린잎의 80% 에탄올 추출물에서 250.8 mg으로 가장 높았으며, 어린잎의 열수 추출물(250.8 mg), 성숙한 잎의 에탄올 추출물(139.3 mg) 및 성숙한 잎의 열수 추출물(69.5 mg)의 순으로 높게 나타났다. 총 카로티노이드 함량도 총 폴리페놀 함량과 유사하게 나타나 quercetin을 기준으로 중량 1 g당 어린잎의 80% 에탄올 추출물(163.7 mg), 어린잎의 열수 추출물(110.7 mg), 성숙한 잎의 에탄올 추출물(103.6 mg) 및 성숙한 잎의 열수 추출물(56.4 mg)의 순으로 나타났다.

Table 2. The total polyphenol and total flavonoid contents in aronia leaves obtained by different growth stages

Growing stage	Extraction solvent	Total polyphenols (mg GAE/g)	Total flavonoids (mg CE/g)
Young	Water	141.6 ± 0.9 ^b	110.7 ± 1.5 ^b
	80% EtOH	250.8 ± 2.4 ^c	163.7 ± 1.0 ^c
Old	Water	69.5 ± 2.7 ^a	56.4 ± 0.9 ^b
	80% EtOH	139.3 ± 2.1 ^{ab}	103.6 ± 1.8 ^b

GAE, gallic acid equivalent ; CE, catechin equivalent

③ HPLC 분석을 통한 개별 폴리페놀 함량 분석

HPLC로 아로니아 잎에 함유된 개별 폴리페놀 함량을 분석하였으며, chlorogenic acid가 major compound 였으며, 이외에도 rutin hydrate 및 vanilic acid를 확인하였다. Chlorogenic acid 함량은 총 폴리페놀 함량과 유사하게 어린잎의 80% 에탄올 추출물 > 어린잎의 열수 추출물 > 성숙한 잎의 에탄올 추출물 > 성숙한 잎의 열수 추출물의 순으로 높게 나타났다.

Table 3. The individual polyphenol compound content (mg/g dry weight) in aronia leaves obtained by different growth stages

Growing stage	Extraction solvent	Chlorogenic acid	<i>p</i> -Coumaric acid	Rutin hydrate
Young	Water	17.2 ± 0.51 ^b	ND	3.4 ± 0.05 ^{a,b}
	80% EtOH	22.8 ± 0.65 ^c	0.3 ± 6.7 ^a	4.1 ± 0.01 ^b
Old	Water	9.9 ± 0.23 ^a	ND	3.0 ± 0.06 ^a
	80% EtOH	10.8 ± 0.26 ^a	0.1 ± 5.8 ^a	2.9 ± 0.01 ^a

(2) 각종 assay를 통한 항산화 활성 평가

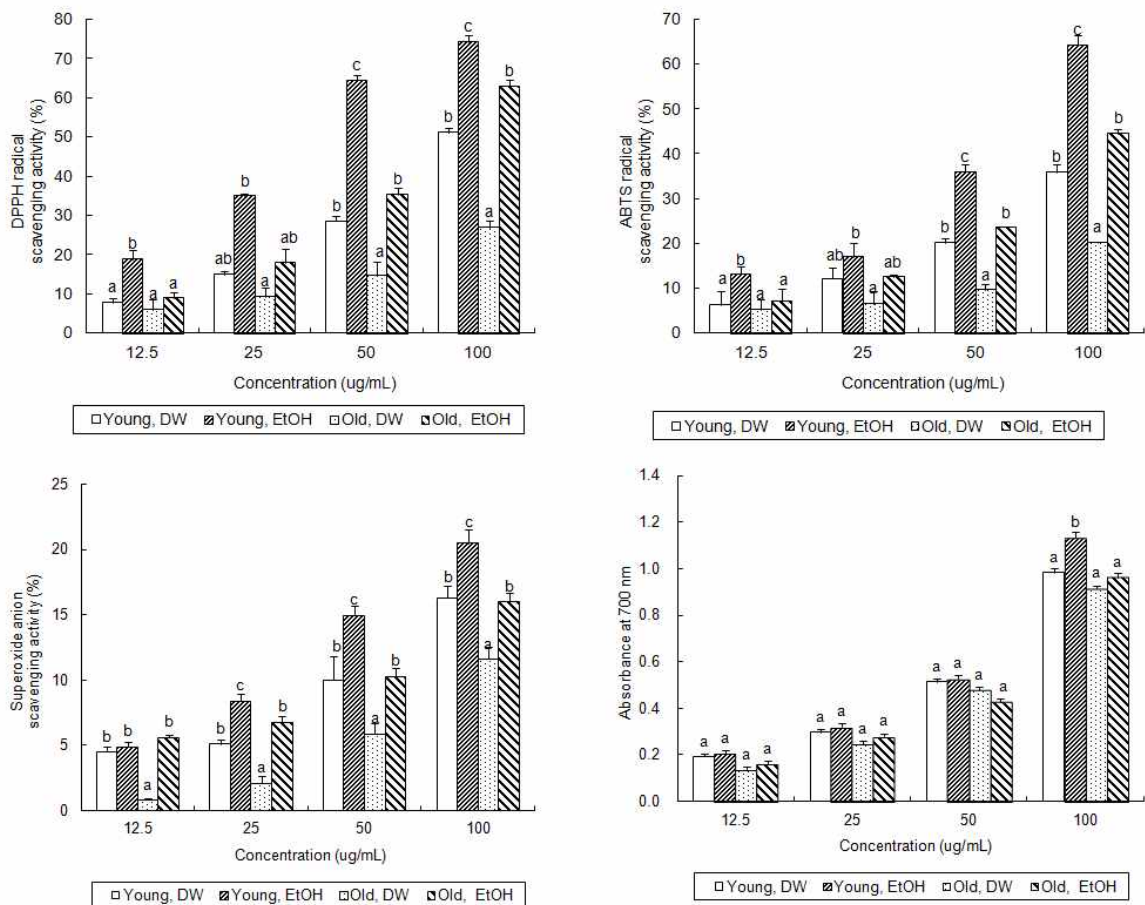


Fig. 1. Antioxidant activities of aronia leaves collected at different stages of growth measured by different assays. Data are the means ± SD of three separate experiments. Values with the same superscripts for each concentration are not significantly different at

$p < 0.05$.

항산화 활성은 어린잎의 80% 에탄올 추출물 > 성숙한 잎의 80% 에탄올 추출물 > 성숙한 잎의 열수 추출물 > 어린잎의 열수 추출물의 순으로 높게 나타났다.

이상의 결과를 통하여 아로니아 잎의 수확시기 및 추출용매의 종류는 아로니아 잎의 항산화 성분 함량과 항산화 활성에 영향을 주므로 유효성분 함량과 항산화 활성을 증대시키기 위한 최적의 방법을 선택하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

6. 아로니아 잎의 수확시기에 따른 항산화 및 항암 활성 측정

가. 실험방법

(1) 아로니아 잎 추출물의 *in vitro* 암세포 성장 억제 활성 탐색

수확시기(Young & old) 및 추출용매(water & 80% ethanol)를 달리하여 얻은 아로니아 잎 추출물이 SK-Hep1 인체 간암세포의 증식 억제정도를 MTT assay를 통한 세포독성 및 암세포 성장 억제 활성 측정하였다.

(2) 아로니아 잎 추출물의 암전이 억제 효과 측정

암세포의 침윤(invasion)과 전이(metastasis)는 암 치료의 가장 큰 장애 요인이며, 침윤과 전이의 억제는 암 치료 효율 향상을 위한 필수적인 과정이다. 침윤과 전이를 억제하는 가장 기본적인 방법이 암세포의 이동을 차단하는 것이므로 본 연구에서는 MTT assay 결과에서 암세포 억제활성이 뛰어난 아로니아 어린잎의 80% 에탄올 추출물을 대상으로 암세포의 침윤, 이동, 전이 억제능을 알아보았다.

① Invasion assay

아로니아 잎 에탄올 추출물의 암세포 침투억제능을 평가하기 위하여 Chemicon 사의 Cell Invasion Assay kit를 이용하였다. Invasion chamber를 상온에 맞춘 후 ECM층을 적시기 위해 serum free media 300 μ L를 insert 안쪽에 첨가하였다. Serum free media에 $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ cell/mL 의 농도로 준비한 SK-Hep1 인체 간암세포를 준비한 뒤 insert 하층부는 혈청을 함유한 배지를 첨가하고 상층부에는 준비한 세포를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 면봉을 이용하여 상층부의 비침투성 세포를 조심스럽게 제거한 뒤 약 20분간 염색시켰다. 염색약을 제거하고 세척한 뒤 말리고 현미경을 이용하여 세포를 관찰하였다.

② Wound migration assay

SK-Hep1 인체 간암세포를 6-well plate에 100% 짝 차도록 배양한 뒤 세포주기 억제제인

mitomycin 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 30분간 처리하고 세포 위에 injury line을 만들었다. Well을 PBS를 이용하여 세척한 뒤 배지 존재 하에 이동하도록 한 뒤 지정된 시점에서 현미경을 이용하여 48시간 동안 관찰하였다.

③ Adhesion assay

암세포 부착능을 평가하기 위하여 24-well의 culture plate에 세포에 matrigel을 25 $\mu\text{g}/\text{well}$ 농도로 도포한 후 실온에서 40분간 건조시켰다. Serum free media에 5×10^4 cell/well 의 농도로 준비한 SK-Hep1 인체 간암세포를 plate에 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. PBS buffer로 부착되지 않은 세포를 제거하고 hematoxylin과 eosin으로 약 20분간 염색시킨 후, 염색약을 제거하고 세척한 뒤 말리고 현미경을 이용하여 세포를 관찰하였다.

④ Zymography를 이용한 MMP 활성 측정

SK-Hep1 세포를 24 시간 배양한 후, PBS로 씻어내고 김 추출물을 농도별로 serum free media에 녹여 48 시간동안 배양하였다. 상층액을 모아서 원심분리하여 단백질을 정량한 후 동량의 total protein을 0.1% gelatin이 포함된 10% SDS-PAGE gel에 전기영동을 하였다. Gel은 2.5% triton X-100으로 세 번 씻어내고, 40 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 용액을 넣고 37°C 에서 18 시간동안 배양한 후, 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색하였다. 이때, 전체적인 배경은 보라색이고 gelatin이 분해된 부분은 흰색 밴드로 나타나게 된다.

나. 실험 결과

(1) 아로니아 잎 추출물의 암세포 증식 억제 효과

추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 암세포 증식 억제 효능도 증가하였다. 또한, 아로니아 잎 추출물을 24시간 처리한 실험군에 비해 48시간 동안 처리한 실험군에서 암세포 성장 억제 효능이 증가하였다. 어린잎이 성숙한 잎에 비해 높은 암세포 저해활성을 보였으며, 물 추출물에 비해 80% 에탄올 추출물에서 암세포 증식 억제가 비교적 높게 나타났다.

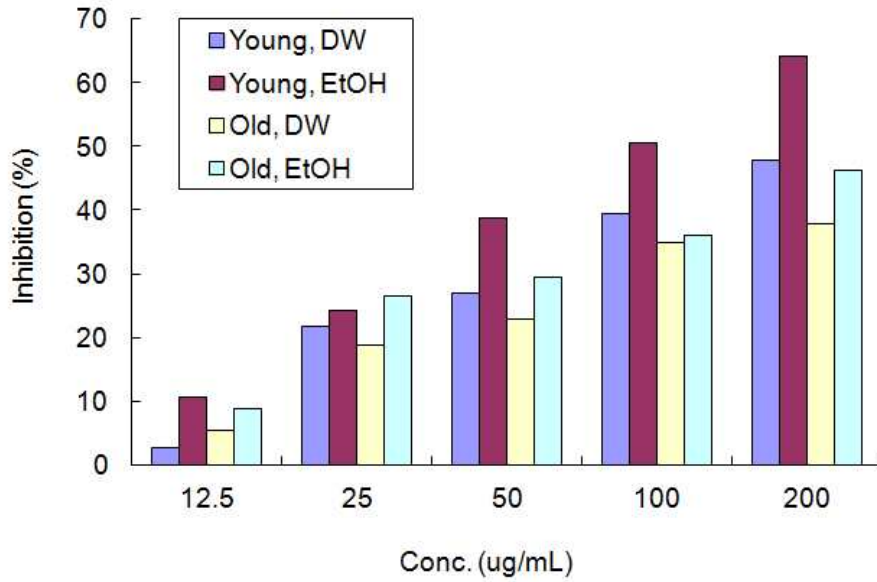


Fig. 1. Effect of aronia leaf extract on SK-Hep1 human hepatoma cancer cell proliferation as measured by MTT assay.

(2) 아로니아 잎 추출물의 암전이 억제 효과 측정

① Invasion assay

아로니아 잎 에탄올 추출물을 암세포의 침윤을 농도 (25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 의존적으로 억제하였음. 암세포의 침윤을 억제하는 정도는 추출물의 농도와 비례함을 확인하였다.

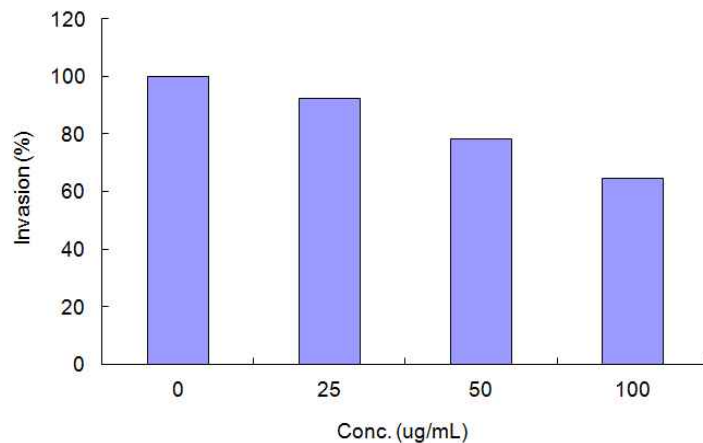


Fig. 2. Effects of aronia leaf extract on SK-Hep1 cell invasion.

② Wound migration assay

대조구에 비해 아로니아 어린잎의 에탄올 추출물은 인체 간암세포주인 SK-Hep1 세포의 이

동을 처리 농도 및 처리 시간에 비례하여 억제하였다. 대조군에서는 암세포 배양 시간이 경과함에 따라 암세포의 이동이 일어나 48시간 처리군에는 암세포 사이의 간격이 없이 암세포가 이동함을 관찰하였다. 반면에, 아로니아 어린잎 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 경우에는 암세포의 이동성이 매우 감소하였고, 암세포 배양 후 24시간까지도 암세포의 이동이 거의 일어나지 않았고 24~48시간이 경과해서도 암세포의 이동이 미미하게 일어남을 확인하였다. 아로니아 어린잎 추출물의 농도가 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가함에 따라 암세포의 이동이 48시간 배양한 군에서도 완벽히 억제됨을 확인하였다.

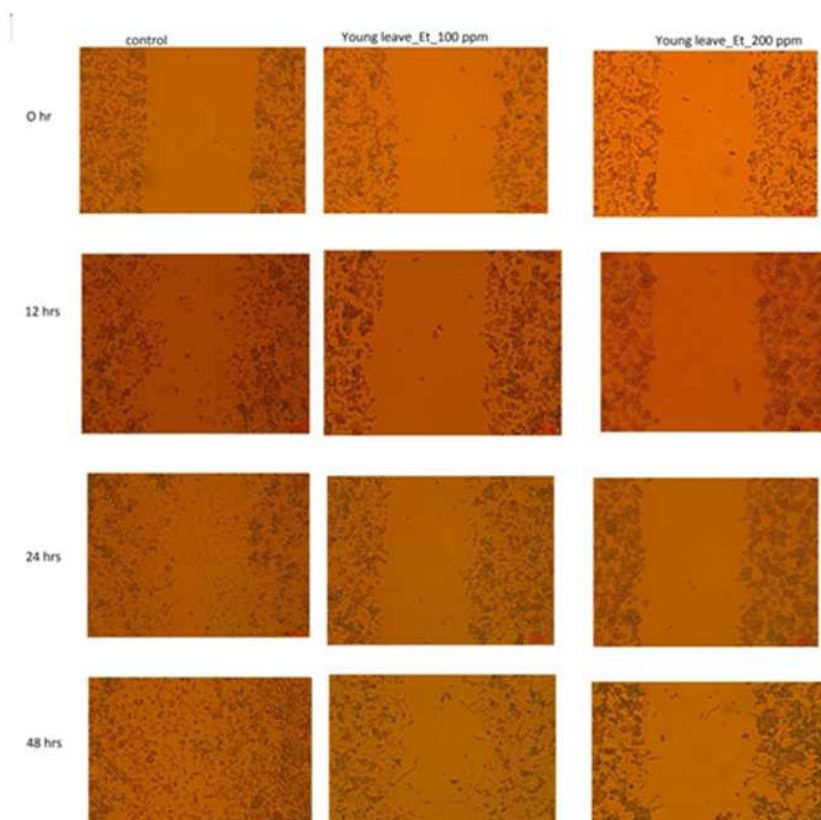


Fig. 3. Effects of aronia leaf extract on wound healing migration of SK-Hep1 cells.

③ Adhesion assay

대조구에 비해 아로니아 어린잎의 에탄올 추출물은 인체 간암세포주인 SK-Hep1 세포의 부착을 처리농도(25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 처리시간에 비례하여 억제하였다. 아로니아 어린잎 추출물의 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가함에 따라 암세포의 부착이 대조군이나 저농도 처리군에 비해 억제됨을 확인하였다.

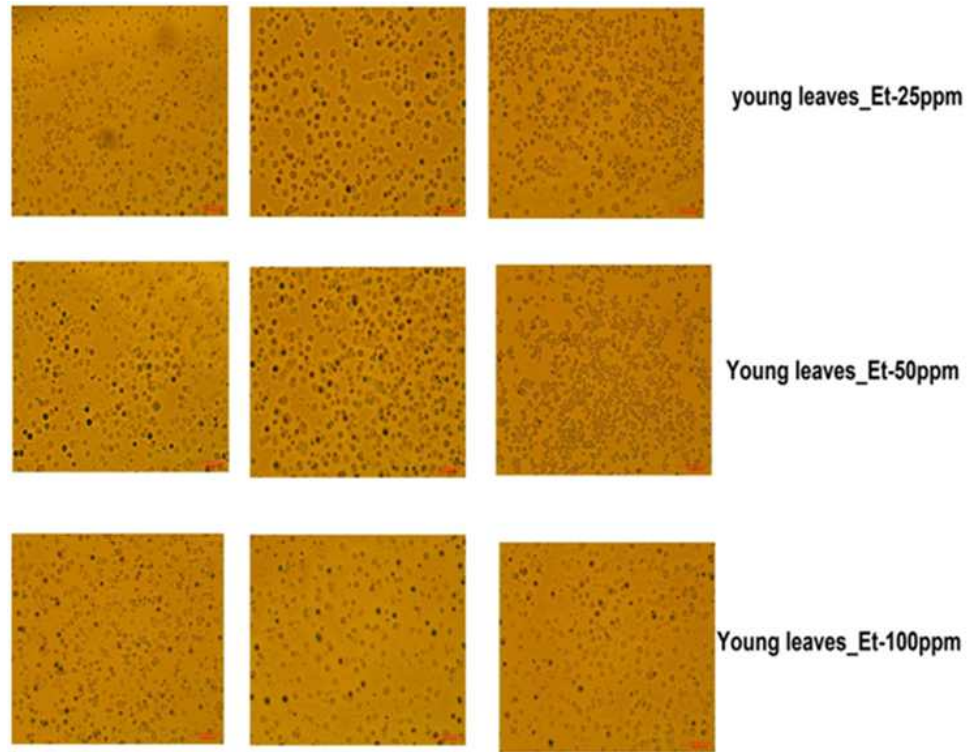


Fig. 4. Effect of arania leaf extract on cell adhesion on matrigel.

④ Zymography를 이용한 MMP 활성 측정

MMP-2와 MMP-9은 암전이와 관련된 효소이며, 인체 간암세포주인 SK-Hep1 세포는 상당히 많은 양의 MMP-9과 약간의 MMP-2를 분비하는 것으로 알려져 있다. 아로니아 잎 추출물을 처리하지 않은 대조구에서 MMP-9과 MMP-2의 발현을 확인하였다. 아로니아 잎 추출물 농도별로 처리하고 48시간동안 배양한 결과, MMP-9 및 MMP-2의 발현이 감소함을 확인하였다.

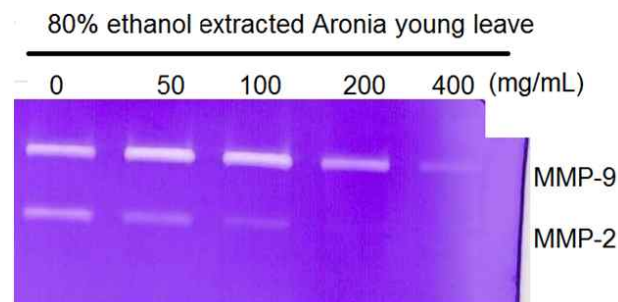


Fig. 5. Effects of aronia leaf extract on MMP-2 and MMP-9 expression analyzed by gelatin zymography.

7. 아로니아 함유 양갱 제조

가. 실험 방법

(1) 실험재료

본 연구에 사용한 아로니아(*Aronia melanocarpa*, black chokeberry)는 2012년 8월말에 경북 영천의 아로니아 농장에서 수확한 것을 직접 구입하였다. 깨끗이 세척한 아로니아를 food processor(Phillips Electronics, Seoul, Korea)를 이용하여 곱게 마쇄한 후, 액을 3겹의 거즈로 여과하여 얻어 양갱 제조용 시료로 사용하였다. 팥앙금(대두식품), 분말한천(화인한천, 국산), 백설탕 [(주)CJ 제일제당, 국산], 소금(해표, 국산)은 시판품을 구입하여 사용하였다.

(2) 아로니아 양갱 제조

양갱제조는 여러 차례 예비실험을 거쳐 Table 1과 같은 배합비로 제조하였다.

Table 1. Formular for yanggaeng with different levels of aronia juice

	Control	AJ ¹⁾ 50	AJ ¹⁾ 100	AJ ¹⁾ 150
Red bean angkeum (g)	300	300	300	300
Water (g)	300	250	200	150
Aronia Juice (g)	0	50	100	150
Sugar (g)	90	90	90	90
Agar (g)	9.85	9.85	9.85	9.85
Salt (g)	0.15	0.15	0.15	0.15

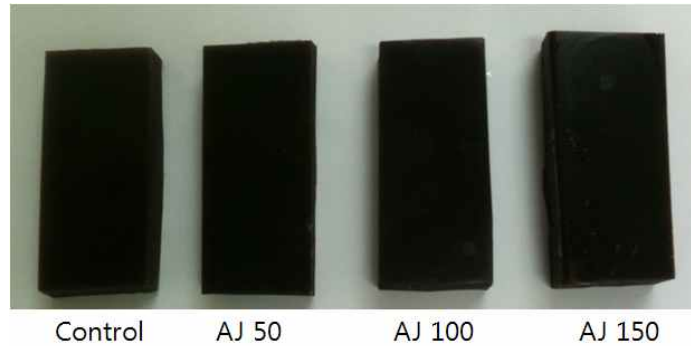
¹⁾AJ : Aronia juice

대조군은 아로니아즙을 첨가하지 않고 제조한 것으로 하였고, 실험군은 아로니아즙의 첨가량을 달리하여 양갱을 제조한 것으로 하였다. 물과 아로니아즙을 잘 혼합한 후 분말한천, 설탕, 소금이 잘 섞이도록 나무주걱으로 저어주면서 5분 동안 중불에서 가열하였다. 불을 끄고 나서 팥앙금을 넣고 앙금이 멎치지 않고 잘 풀어지도록 교반한 후 약한 불에서 다시 10분 동안 끓여주었다. 제조된 양갱은 직사각형 틀(15 x 15 x 7cm)에 넣고 실온에서 방치하면서 식히고 수분이 증발되지 않도록 뚜껑을 닫아 냉장조건에서 4시간 동안 굳힌 후 시료로 사용하였다.

(3) 수분 함량 측정

양갱의 수분함량은 AOAC 방법(1990)으로 105℃ 상압가열건조법에 따라 정량하였다.

(4) pH, 산도 및 당도 측정



pH 측정은 3 g의 양갱에 10배의 증류수를 넣고 교반한 다음 이를 시료로 하여 pH meter(420 Benchtop, Orion Research, Beverly, MA, USA)로 측정하였다. 산도는 AOAC 방법(1995)에 따라 시료 용액 10 mL에 pH meter 전극을 담그고 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 8.3 까지 도달하는데 필요한 NaOH 양(mL)을 lactic acid 함량으로 환산하여 나타내었다.

당도는 시료를 증류수로 5배 희석하여 균질화 하고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 당도계(PR-201a °Brix 0~32%, Atago Co., Tokyo, Japan)로 측정하였다.

(5) 색도 측정

양갱의 색도측정은 색차계(Chrome Meter CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness) 값으로 표시하였다. 각 시료 당 3회 반복 측정하여 그 평균값을 나타내었으며, 이때 표준백색판의 L, a, b 값은 각각 97.10, +0.24, +1.75 이었다.

(6) 조직감 측정

양갱의 기계적 물성 측정은 Texture analyzer(CT3 10K, Brookfield., Middleboro, MA USA)를 사용하여 texture profile analysis(TPA)로 경도(hardness), 탄력성(springiness), 응집성(cohesiveness), 씹힘성(chewiness)을 각각 측정하였다. 측정조건은 probe : TA25/1000, test type : TPA, target type : % deformation, target value : 60%, trigger load : 6 g, test speed : 0.50 mm/sec, sample height : 25 mm, sample width : 25 mm, sample length : 25 mm 이었다.

(7) 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 발색되는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법에 따라 분석하였다(Singleton and Lamuela-Raventos 1999). 양갱 추출물(1 mg/mL) 0.5 mL에 Folin 시액 0.5 mL을 혼합한 뒤 3분간 실온에서 반응시킨 후 2% Na₃CO₃ 1.5 mL을 첨가한 뒤 2시간 동안 암소에서 반응시킨 후, 760 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(6.25~100 µg/mL)의 표준곡선

을 통하여 시료 g당 gallic acid equivalent(GAE)로 나타내었다.

(8) 총 플라보노이드 함량 분석

양갱 추출물(1 mg/mL) 1 mL에 2% aluminium chloride methanolic solution 1 mL을 혼합한 뒤 15분간 실온에서 반응시킨 후 430 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 플라보노이드 함량은 quercetin(6.25~100 µg/mL)의 표준곡선을 통하여 시료 g당 quercetin equivalent(QE)로 나타내었다.

(9) 총 안토시아닌 함량 분석

총 안토시아닌 함량은 Giusti와 Wrolstad의 방법(2001)에 의해 분석하였다. 동결건조한 시료 0.1 g에 0.1% formic acid를 함유한 methanol 5 mL을 넣어 20분간 sonication을 하여 상층액을 따로 모았다. 이 과정을 3회 더 반복하였다. 상층액을 40°C에서 rotary evaporator(EYELA N-1200A, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 추출용매를 이용하여 적절한 농도로 희석하였다. 시료 100 µL에 pH 1 완충용액 1,900 µL와 pH 4.5 완충용액 1,900 µL를 각각 첨가하여 vortexing 한 후, 520 nm와 700 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 아래 식에 의해 총 안토시아닌 함량을 계산하였다.

$$\text{총 안토시아닌 함량 (mg/100 g)} = (A \times 449.2 \times DF \times 12 \times 500) \div (26,900 \times 1)$$

A : (OD 520nm - OD 700nm) of pH 1.0 - (OD 520nm - OD 700nm) of pH 4.5

449.2 : cyanidin-3-glucoside의 1 mol 당 분자량 (g)

DF : 희석배수 = 20

12 : 총 부피

500 : 시료 100 g당으로 환산하기 위하여 12 mL 추출액의 시료 무게인 0.2 g으로 나눈 값

26,900 : cyanidin-3-glucoside의 molar absorbtivity

(10) 항산화활성 측정

① DPPH 라디칼에 대한 전자공여능 측정

양갱 추출물의 전자공여능을 DPPH assay로 측정하였다. 96-well plate에 농도별 추출물 100 µL와 0.2 mM DPPH(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 용액 100 µL를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1\text{-시료첨가구의 흡광도}/\text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

② ABTS 라디칼에 대한 전자공여능 측정

양갱 추출물의 전자공여능을 ABTS assay로 측정하였다. 96-well plate에 농도별 추출물 100 μL 와 0.2 mM ABTS(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 용액 100 μL 를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 사용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 ABTS 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1\text{-시료첨가구의 흡광도}/\text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

(11) 관능검사

아로니아즙 첨가수준에 따른 양갱의 관능검사는 영양조리과학을 전공하는 훈련된 대학생 패널 15명을 대상으로 시료의 관능적인 특성에 대하여 평가하도록 하였다. 평가시 사용한 척도는 9점 기호 척도를 이용하였으며, 특성이 좋을수록 높은 점수를 기록하는 방법으로 하였다. 검사항목은 색(color), 향(flavor), 맛(taste), 조직감(texture), 전체적인 기호도(overall quality)로 하였다.

(12) 통계 분석

모든 결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation)로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS software package(Version 17.0)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 ANOVA를 이용하여 유의성을 확인한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test를 이용하여 분석하였다.

나. 실험 결과

(1) 수분 함량 측정

아로니아즙의 양을 달리하여 제조한 양갱들의 수분함량 측정 결과는 Table 2와 같다. 아로니아즙을 첨가하지 않은 양갱의 수분함량은 31.6% 이었고 아로니아즙을 첨가한 양갱은 즙의 첨가량에 따라 29.5~31.2%의 수분함량을 나타냈으나 통계적으로 유의성이 있는 결과는 아니었다. 선행연구에서 배즙, 배건조 분말 및 숙지황을 첨가하여 제조한 양갱 수분함량은 27.9~43.6%로 본 연구결과와 유사한 경향을 나타냈다.

Table 2. Proximate content of yanggaeng added different amount of aronia juice

Sample	Control	AJ ¹⁾ 50	AJ ¹⁾ 100	AJ ¹⁾ 150
Moisture (%)	31.6 ± 0.7 ^a	29.5 ± 0.7 ^a	31.2 ± 0.8 ^a	31.0 ± 0.3 ^a

^aValues with the same superscript within the same row are not significantly different at $p < 0.05$.

¹⁾AJ : Aronia juice

(2) pH, 산도 및 당도 측정

아로니아즙 첨가 양갱의 pH와 산도를 측정한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Values of pH, acidity and sugar contents of yanggaeng added different amount of aronia juice

Sample	pH	Acidity(%)	Sugar contents (°Brix)
Control	6.9 ± 0.1 ^a	0.1 ± 0.0 ^c	5.2 ± 0.0 ^b
AJ ¹⁾ 50	6.0 ± 0.1 ^b	0.2 ± 0.0 ^{bc}	5.3 ± 0.0 ^{ab}
AJ ¹⁾ 100	5.5 ± 0.0 ^{bc}	0.3 ± 0.0 ^b	5.5 ± 0.0 ^a
AJ ¹⁾ 150	5.2 ± 0.0 ^c	0.5 ± 0.0 ^a	5.6 ± 0.0 ^a

^{a-c}Values with the different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

¹⁾AJ : Aronia juice

아로니아즙 자체의 pH는 4.02로 나타났으며, 아로니아즙 무첨가 대조군의 pH는 6.87 였다. 이는 기능성 물질을 첨가하지 않고 제조한 일반적인 양갱의 pH가 6.67~6.71로 보고된 선행연구와 유사하였다. 아로니아즙 첨가량이 증가할수록 pH는 5.99~5.18로 낮아지는 경향을 보였다. 아로니아즙 자체의 산도는 5.21%이었고, 아로니아즙을 첨가하지 않은 대조군 양갱의 산도는 0.1% 였다. 아로니아즙 첨가량이 증가함에 따라 산도가 0.2~0.5%까지 높아졌다.

아로니아에는 chlorogenic acid, neochlorogenic acid 등이 풍부한 것으로 알려져 있고, 이들에 의해 pH가 감소하고 산도가 증가한 것으로 사료된다.

아로니아즙의 양을 달리하여 제조한 양갱의 당도 측정결과는 Table 3과 같다. 아로니아즙 무첨가군의 당도는 5.20 °Brix을 나타냈고, 아로니아즙의 첨가량이 증가할수록 당도도 증가하는 경향을 보였다. 아로니아 즙의 자체의 당도는 14.1 °Brix 였으며, 아로니아즙 함량이 증가함에 따라 양갱의 당도는 각각 5.3, 5.5 및 5.6 °Brix까지 증가하였다. 이는 아로니아에 함유된 당에 의한 것으로 양갱 제조시 첨가하는 물을 아로니아즙으로 대신하였기 때문에 아로니아즙 첨가량이 증가함에 따라 당도가 증가한 것으로 사료된다.

(3) 색도 측정

아로니아즙의 양을 달리하여 제조한 양갱의 색도 측정 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Hunter's color values of yanggaeng added different amount of aronia juice

Sample	L	a	b
Control	20.4 ± 0.3 ^a	2.6 ± 0.1 ^b	2.6 ± 0.1 ^a
AJ ¹⁾ 50	19.6 ± 0.4 ^{ab}	2.8 ± 0.1 ^{ab}	1.7 ± 0.1 ^b
AJ ¹⁾ 100	19.2 ± 0.7 ^{ab}	3.0 ± 0.1 ^{ab}	1.3 ± 0.1 ^{bc}
AJ ¹⁾ 150	19.0 ± 0.2 ^b	3.2 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^c

^{a-c}Values with the different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

¹⁾AJ : Aronia juice

명도를 나타내는 L값은 아로니아를 첨가하지 않은 대조구가 20.40으로 가장 높게 나타났으며, 아로니아즙의 첨가량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며 AJ 150에서는 18.98로 가장 낮게 나타났다($p < 0.05$). 아로니아즙의 첨가량이 증가할수록 명도가 감소하는 것은 아로니아에 함유되어 있는 안토시아닌 색소에 의한 것으로 사료된다. 적색도를 나타내는 a값은 아로니아즙을 첨가하지 않은 양갱에서는 2.55의 값을 나타냈다. AJ 50과 AJ 100에서는 각각 2.44, 2.58의 값으로 무첨가군에 비해 유의적인 증가를 보였다. AJ 150에서는 3.18로 유의적으로 가장 진한 붉은색을 나타냈다($p < 0.05$). 황색도를 나타내는 b값은 아로니아즙 무첨가 양갱에서는 2.55로 가장 높았고, 아로니아즙 첨가량이 증가함에 따라 낮은 수치를 나타냈다. 이는 아로니아에 함유된 안토시아닌에 의한 것으로 아로니아 첨가량에 비례하여 양갱색이 점점 짙은 자주색으로 변화된 결과로 사료된다.

선행연구에서도 안토시아닌 함량이 풍부한 자색고구마와 오디시럽을 첨가하여 제조한 양갱의 경우, 이들 성분의 첨가량이 증가할수록 명도(L)와 황색도(b)가 통계적으로 유의성 있게 감소하고 적색도(a)는 증가하는 것을 확인하여 본 연구와 유사한 결과를 나타냈다.

(4) 조직감 측정

아로니아즙으로 제조한 양갱의 물성측정 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Texture of yanggaeng added different amount of aronia juice

Sample	Control	AJ ¹⁾ 50	AJ ¹⁾ 100	AJ ¹⁾ 150
--------	---------	---------------------	----------------------	----------------------

Hardness (kgf)	0.19±0.02 ^d	0.30±0.09 ^c	0.31±0.07 ^b	0.48±0.0 ^a
Cohesiveness (-)	0.10±0.01 ^a	0.11±0.01 ^a	0.10±0.01 ^a	0.10±0.00 ^a
Springiness (mm)	0.35±0.23 ^b	0.41±0.08 ^a	0.44±0.24 ^a	0.41±0.07 ^a
Chewiness (J)	0.01±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a	0.02±0.02	0.01±0.00 ^a

^{a-d}Values with the different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

¹AJ : Aronia juice

아로니아즙 무첨가 양갱에 비해 아로니아즙 첨가량이 증가함에 따라 경도도 증가하였다. 아로니아즙 첨가량을 달리하여 제조한 AJ 50, AJ 100 및 AJ 150에서 경도는 0.295~0.483까지 증가하였다. 응집성의 경우, AJ 50에서 가장 높게 나타났으나, 대조군과 각 첨가군에서 나타낸 수치는 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이를 통해 아로니아즙의 첨가량은 양갱의 응집성에 큰 영향이 없음을 알 수 있었다. 탄력성은 대조군에 비해 아로니아즙 첨가군에서 증가하였으나, 아로니아즙 첨가량에 따른 차이는 관찰되지 않았다. 씹힘성은 AJ 100에서 가장 높은 값을 나타냈으나 아로니아즙 함량이 가장 높은 AJ 150에서는 대조군과 비슷한 수치를 보였다.

(5) 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량 분석

아로니아즙 첨가 양갱의 폴리페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량 분석결과는 Table 6과 같다.

Table 6. Total polyphenol, flavonoid and anthocyanin contents of yanggaeng extract

Sample	Total polyphenol (mg GAE ¹ /g)	Total flavonoid (mg QE ² /g)	Total anthocyanin (mg C3G ³ /100 g)
Control	37.0 ± 0.3 ^d	15.7 ± 0.4 ^d	0.3 ± 0.0 ^d
AJ ⁴ 50	63.6 ± 0.7 ^c	25.4 ± 0.5 ^c	0.6 ± 0.1 ^c
AJ ⁴ 100	107.0 ± 1.4 ^b	45.3 ± 0.9 ^b	1.1 ± 0.1 ^b
AJ ⁴ 150	128.8 ± 1.8 ^a	54.8 ± 0.5 ^a	1.4 ± 0.0 ^a

^{a-d}Values with the different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

¹GAE=gallic acid equivalent

²QE=quercetin equivalent

³C3G=cyanidin-3-glucoside equivalent

⁴AJ : Aronia juice

양갱의 총 폴리페놀 함량(mg gallic acid/g 기준)은 대조구의 경우 37.0 mg 이었으나, 아로

니아즙의 첨가량에 비례하여 증가하였다. 즉, 양갱의 총 폴리페놀 함량은 AJ 50, AJ 100 및 AJ 150에서 각각 63.6 mg, 106.9 mg 및 128.8 mg으로 이는 대조구에 비해 1.7~3.5배까지 증가한 수치였다. 양갱의 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 기준으로 중량 1 g당 대조군이 15.7 mg이었으나 아로니아즙을 첨가한 양갱에서는 25.4~54.8 mg으로 증가하였다. 양갱의 총 안토시아닌 함량도 아로니아즙의 첨가에 따라 1.9배 4.7배까지 증가하였다. 이는 아로니아에 함유되어 있는 neochlorogenic acid, chlorogenic acid, quercein-3-ruthnoside, quercetin, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabioside, cyanidin-3-xyloside 등의 안토시아닌 함량에 의한 것으로 사료된다.

(6) 항산화활성 측정

아로니아즙 함유 양갱의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능은 Fig. 1에 나타내었다.

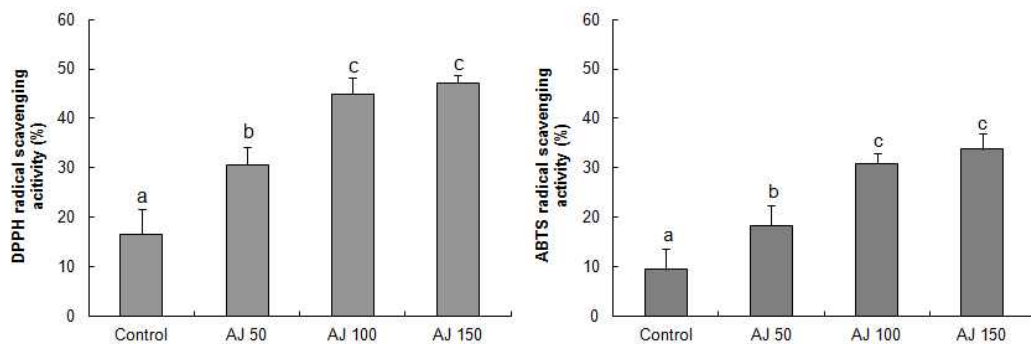


Fig. 1. DPPH and ABTS radical scavenging activity of Yanggaeng added different amount of aronia juice (AJ). Bars with different letters (a-c) are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

DPPH radical 소거활성은 대조구에서 16.6%로 가장 낮았고, AJ 50과 AJ 100에서 각각 30.7%와 45.0%를 나타내었으며, AJ 150에서는 47.2%로 가장 높은 DPPH radical 소거활성을 나타냈다. ABTS radical 소거활성도 DPPH radical 소거활성과 유사한 결과를 나타냈다. ABTS radical 소거활성은 대조구가 9.5%로 가장 낮은 값을 나타내었고, AJ 50과 AJ 100가 각각 18.3%와 30.9%를 나타내었으며, 아로니아즙 함량이 가장 높은 AJ 150이 33.8%를 나타내었다.

DPPH 및 ABTS radical 소거활성은 아로니아즙의 함량이 증가할수록 높은 것으로 확인되었다. 이는 아로니아즙에 함유된 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌 등과 같은 항산화물질들에 의한 것으로 사료된다. 아로니아에 함유된 안토시아닌, 폴리페놀, 플라보노이드 등과 같은 각종 생리활성 물질들에 의해 다양한 건강 기능성이 보고되고 있다. 아로니아는 항산화, 염증억제, 암 예방, 혈압 강하, 위장관 보호 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

(7) 관능검사

아로니아즙을 첨가하여 양갱을 제조하고 색, 맛, 질감, 향미, 전반적인 만족도에 대한 관능검사 결과는 Table 7과 같다.

Table 7. Sensory intensity results of yanggaeng added different amount of aronia juice

	Control	AJ ¹⁾ 50	AJ ¹⁾ 100	AJ ¹⁾ 150
Color	6.5 ± 0.5 ^b	6.5 ± 0.5 ^a	6.8 ± 0.5 ^{ab}	7.0 ± 0.6 ^a
Taste	4.7 ± 0.2 ^b	6.5 ± 0.3 ^a	6.6 ± 0.3 ^a	4.8 ± 0.3 ^b
Texture	4.8 ± 0.3 ^d	5.1 ± 0.3 ^c	7.1 ± 0.4 ^a	6.5 ± 0.5 ^b
Flavor	5.4 ± 0.3 ^b	5.6 ± 0.2 ^{ab}	6.0 ± 0.3 ^a	6.1 ± 0.3 ^a
Overall acceptance	4.8 ± 0.3 ^b	6.3 ± 0.3 ^a	6.9 ± 0.3 ^a	5.4 ± 0.3 ^{ab}

^{a-d}Values with the different superscript within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

¹⁾AJ : Aronia juice

색에 대한 선호도 측정 결과, 대조군에 비해 양갱에 대하여 아로니아즙의 첨가량이 증가할수록 높은 값을 나타냈다. AJ 50과 AJ 100에서 9점 만족도를 기준으로 각각 6.48 및 6.83을 보인 반면, AJ 150에서는 가장 높은 수치인 7.03을 나타냈다. 이는 아로니아의 고유 색소인 진한 자주색이 양갱의 색깔에 긍정적인 영향을 주어 선호도가 높게 나타난 것으로 판단된다. 맛의 경우는 AJ 50과 AJ 100에서는 대조군에 비해 높은 값을 보였으나 AJ 150에서는 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p < 0.05$). 질감의 경우는 대조군과 각 첨가군에서 유의적인 차이를 보였으며, AJ 100이 7.08로 가장 높은 점수를 나타냈다.

향미는 대조군에 비해 아로니아즙 첨가량이 증가할수록 높아지는 것을 관찰하였으나 AJ 100과 AJ 150에서는 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 전반적인 만족도는 대조군과 각 첨가군에서 유의적인 차이를 보였으며, AJ 100에서 6.90점으로 가장 높은 점수를 얻었다. AJ 150에서는 색, 맛, 질감, 향미 및 전반적인 만족도가 감소하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 아로니아 양갱 제조시 최적조건으로 AJ 100이 색, 맛, 질감, 향기 및 전반적인 만족도를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

8. 아로니아 함유 막걸리 제조

가. 실험 방법

(1) 실험 재료

막걸리 제조에 사용한 백미는 경기도 안성시 석정동 소재 농협 하나로마트에서 구매한 국내산 안성마춤쌀을 사용했으며, 아로니아는 경북 영천의 아로니아 재배농장에서 수확한 것을 구입하여 사용하였다. 발효제는 경기도 막걸리세계화사업단에서 제조한 입국과 한국효소에서 구입한 개량누룩을 사용하였으며, 효모는 La Parisienne (Brown yeast, Vision corporation, Seoul, Korea)를 사용하였다.

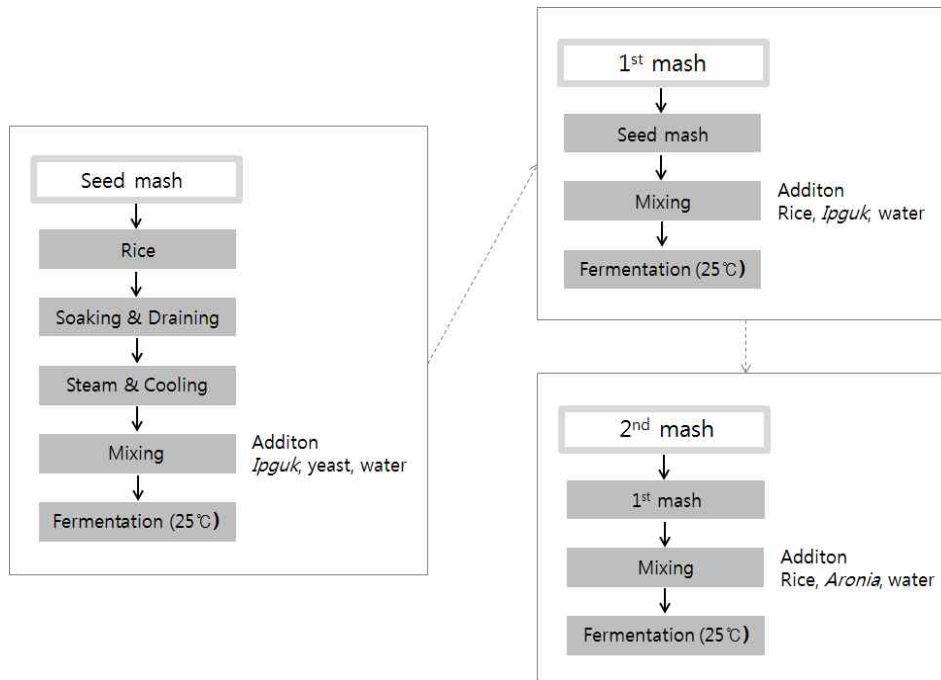
(2) 발효제의 효소 활성 및 수분 함량 분석

발효제의 당화력(SP)과 단백질 분해력(SAP)은 식품첨가물공전(KFAC, 2013)에 따라 분석하였다. 산도는 국세청 주류분석규정(NTS, 2010)에 따라 분석하였으며, 발효제의 수분함량은 적외선 수분측정기 (Model MX-50, AND, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

(3) 막걸리 술덧 담금

백미는 세미 후 2시간 동안 물에 침지하고 30분 동안 물빼기 후 100℃에서 증미기 (MODEL-1, Bluebrewlab, Seongnam, Korea)를 이용하여 2시간 동안 증미하고 실온에서 냉각한 다음 양조에 이용하였다. 아로니아는 믹서기(SY-3500, Samyang Electronics, Gimpo, Korea)를 이용하여 분쇄한 뒤 막걸리 술덧 담금 시 첨가하였다. 막걸리 담금 조건은 Table 1과 같으며, 담금 순서는 Fig. 1과 같다.

(a) *Ipguk* method



(b) *Nuruk* method

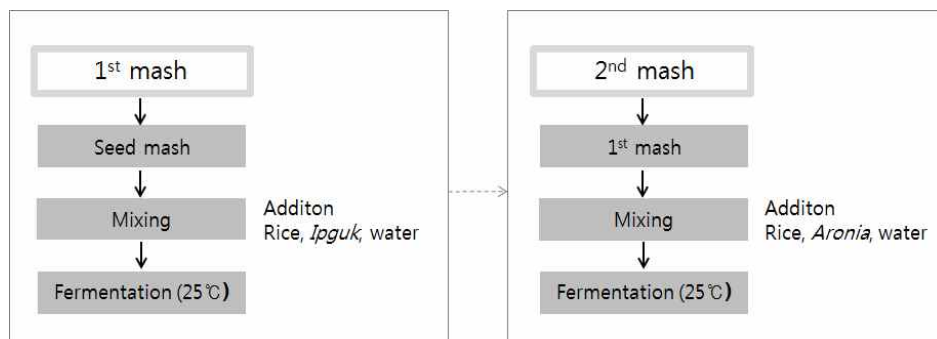


Fig. 1. Schematic diagram of *makgeolli sul-dut* fermentation

발효제에 따라 담금 방식의 차이가 있는데 입국을 사용할 때에는 주모 담금을 하여 48시간 발효 후 1단 담금을 실시하였다. 개량누룩을 사용한 막걸리 술덧 담금 시 보산은 1단 담금 시 젖산(lactic acid 85~92%, Samchun Chemical, Pyeongtaek, Korea)을 이용하여 pH를 조절하였다.

(4) 알코올 함량

막걸리 발효 기간 중 알코올 함량은 국세청 주류분석규정(NTS, 2010)에 따라 시료 100 mL을 메스실린더에 취하고 15 mL의 물로 2회 씻은 액을 합쳐서 500 mL 플라스크에 옮긴 후 냉각기에 연결하여 증류시킨 후 증류액 80 mL을 메스실린더에 회수한 다음 100 mL까지 증류수로 채운 후 density meter(DMA 35 portable density meter, Anton Paar, Wundschuh, Austria-Europe)를 이용하여 20℃에서 측정하였다.

(5) 적정 산도 및 pH

적정 산도는 국세청 주류분석규정에 따라 10 mL의 시료를 취하여 BTB & NR 혼합지시약(Bromothymol Blue 0.2 g, Neutral Red 0.1 g, 95% ethyl alcohol 300 mL)을 2~3 방울 떨어뜨린 다음 0.1 N NaOH로 중화 적정한 후 젖산으로 환산하여 표시하였다. pH는 pH meter로 측정하였다.

(6) 환원당 함량

시료의 환원당 함량은 Dinitrosalicylic acid(DNS)법에 따라 분광광도계를 이용하여 측정하였으며 표준당은 포도당으로 하여 환원당을 계산하였다.

(7) 당도

시료를 원심분리기를 이용하여 4,500 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상등액을 취하여 syringe filter(Nylon, 0.45 um, 13 mm)를 이용하여 여과한 후 당도계(HI 96811 Wine refractometer, HANNA Instruments, Woonsocket, RI, USA)를 이용하여 측정하였다.

(8) 색도

시료를 원심분리기를 이용하여 4,500 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상등액을 취하여 실험에 이용하였다. 색도는 색차계(CR-400, Konica Minolta, Osaka, Japan)를 이용하여 명도(L), 적색도(a), 황색도(b)를 측정하여 Hunter's color value로 나타내었다.

(9) 안토시아닌 조성

시료를 원심분리기를 이용하여 4,500 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상등액을 취한 후

Syringe filter를 이용하여 여과한 후 시료 10 μ L를 Eclipse XDB-C18(4.5 x 250 mm, 5.0 μ m, Agilent Santa Clara, CA, USA) column을 사용하여 HPLC(HP 1200 series, Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였으며, diode array detectro(Agilent Santa Clara, CA, USA)를 검출기로 사용하였다.

나. 실험 결과

(1) 아로니아 전처리 조건 확립

막걸리 담금에 사용하는 아로니아는 동결 보존 중인 과실을 믹서기로 파쇄한 후 파쇄액을 술덧에 첨가하였다. 본 연구에 사용된 아로니아의 색도 및 이화학적 분석 결과는 아래와 같다.

Table 1. Physicochemical properties of aronia used for manufacturing *makgeolli*

Sample	Hunter's color			Reducing sugar (mg/mL)	°Brix	Acidity (mL)	pH
	L	a	b				
Aronia	14.58	7.65	2.32	2.73	15.2	7.3	4.03

아로니아의 안토시아닌은 cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-arabinoside, cyanidin-3-xyloside의 총 4 종이었고, cyanidin-3-galactoside의 함량이 가장 높게 나타났으며, 총 안토시아닌 함량은 5368.6 mg/kg으로 나타났다.

Table 2. Anthocyanin content in aronia used for manufacturing *makgeolli*

Anthocyanins	Contents (mg/kg)
cyanidin-3-glucoside	187.9
cyanidin-3-galactoside	3677.1
cyanidin-3-arabinoside	1277.5
cyanidin-3-xyloside	226.1
Total	5368.6

(2) 발효제 종류에 따른 발효 패턴

① 발효제

발효제로 사용한 입국은 경기도 막걸리 사업단에서 개량누룩은 한국 효소에서 구입하여 사용하였음. 조효소제의 당화력, 단백질 분해력이 입국에 비해 높게 나타났으며, 산도는 입국이

8.4 mL로 높았고 수분함량은 조효소제와 입국이 각각 6.55, 7.51%로 나타났다.

Table 3. Characteristics of *koji*

Sample	SP ¹⁾	SAP ²⁾	Acidity ³⁾	MC ⁴⁾
<i>Ipguk</i>	85.89	6.47	8.4	6.55
<i>Nuruk</i>	1609.89	23.71	1.2	7.51

¹⁾SP : Saccharogenic power

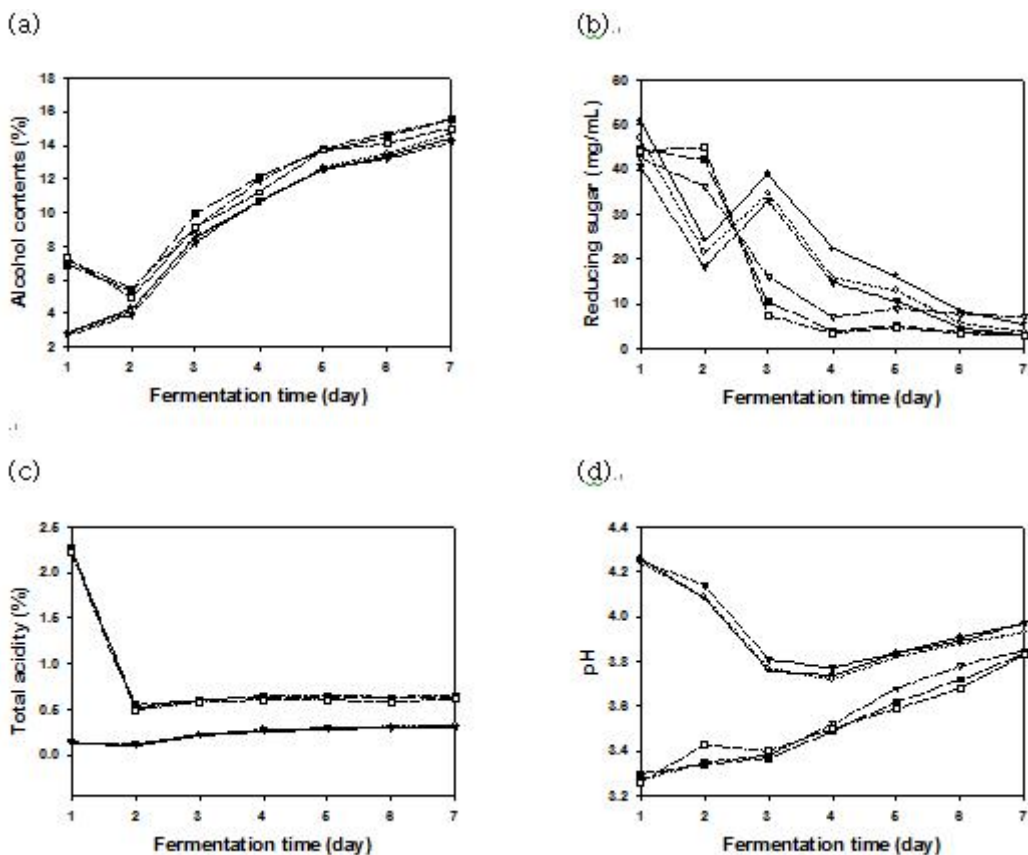
²⁾SAP : Spectrophotometric acid protease unit

³⁾Acidity : Titratable acidity (unit ; mL)

⁴⁾MC : Moisture content (unit ; %)

② 발효제와 아로니아 첨가량에 따른 술덧의 발효 특성

발효제로 입국과 개량누룩을 이용하여 각각 아로니아가 5, 12, 20%가 되도록 첨가하여 막걸리를 제조하였다. 발효과정 중의 알코올, 환원당, 산도 그리고 pH의 변화는 아래와 같이 나타났다.



●: N-5, *Nuruk*, *Aronia* 5%, ○: N-12, *Nuruk*, *Aronia* 12%,

▼: N-20, *Nuruk*, *Aronia* 20%, ▽: I-5, *Ipguk*, *Aronia* 5%,

■: I-12, *Ipguk Aronia* 12%, □: I-20, *Ipguk Aronia* 20%

Fig. 2. Alcohol contents (A), reducing sugar (B), total acidity (C) and pH (D) of *makgeolli sul-dut* during fermentation by different amounts of aronia and different kinds of koji.

7일 차의 알코올 함량은 I-5, I-12, I-20이 각각 15.5, 15.6, 15.0%, N-5, N-12, N-20이 각각 14.4, 14.7, 14.2%로 입국과 개량누룩 시험군 모두 아로니아 20%의 첨가군이 5, 12% 첨가군에 비해 알코올 함량이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 환원당 함량은 덧 담금을 실시하면서 증가하는 경향을 보였지만 발효 일수가 경과되면서 감소하는 경향을 보였다. 술덧의 발효 중 환원당의 감소는 알코올의 생성과 밀접한 관계를 가지며, 특히 발효 과정 중에는 당의 생성과 알코올로의 전환이 복합적으로 이루어지기 때문에 환원당의 감소와 비례하여 알코올 농도가 증가하였다. 7일 차의 산도는 입국 시험군에서는 I-20이 0.61%, 개량누룩 시험군에서는 N-20이 0.31%로 가장 낮게 나타났는데 이는 알코올 발효의 지연과 상관성이 있는 것으로 판단된다. pH의 변화는 입국 시험군이 3.27~3.85, 개량누룩 시험군이 3.72~4.26의 범위를 유지하며 발효된 것으로 보아 입국 사용 시험군이 보다 낮은 pH 값을 유지함을 볼 수 있었고 이는 발효 중 술덧의 산도에 의한 영향으로 판단된다.

(3) 색도

아로니아 첨가량 별 실험에서 20% 첨가군은 발효제의 종류에 상관없이 알코올 발효가 억제되는 것으로 보아 막걸리 발효에 있어 아로니아의 양은 20%보다 적게 첨가하는 것이 바람직할 것으로 생각됨. 또한 색도 분석에서 아로니아 5% 첨가군의 a값의 변화량을 보면 색소의 분해가 이미 평형에 도달한 것으로 생각되며, 따라서 발효 특성 및 색도 변화를 고려하여 아로니아의 첨가량은 12%로 선정하였다.

색도 분석에서 두 시험군 모두 아로니아 첨가량에 비례하여 a값과 b값이 증가하였으며, 발효제 간 색도를 비교해 보면 입국 시험군의 a값과 b값이 개량누룩 시험군에 비해 높게 나타났다. 이는 두 시험군의 발효 profile의 산도와 pH의 차이에 의한 것이라고 판단된다.

Table 4. Condition of *makgeolli sul-dut* (Unit : g)

Step	Sample materials	N-5 ¹⁾	N-12 ²⁾	N-20 ³⁾	I-5 ⁴⁾	I-12 ⁵⁾	I-20 ⁶⁾
Seed mash	<i>Ipguk</i>	-	-	-	264	264	264
	Yeast	-	-	-	11.25	11.25	11.25
	Water	-	-	-	396	396	396
1st	<i>Nuruk</i>	23.4	23.4	23.4	-	-	-

	<i>Ipguk</i>	-	-	-	1086	1086	1086
	Yeast	11.25	11.25	11.25	-	-	-
	Water	2250	2250	2250	1854	1854	1854
	Rice	1500	1500	1500	150	150	150
	<i>Nuruk</i>	46.8	46.8	46.8	-	-	-
2nd	Water	4500	4500	4500	4500	4500	4500
	Rice	3000	3000	3000	3000	3000	3000
	<i>Aronia</i>	225	540	900	225	540	900

¹⁾ N-5 : *Nuruk*, *Aronia* 5%, ²⁾ N-12 : *Nuruk*, *Aronia* 12%, ³⁾ N-20 : *Nuruk*, *Aronia* 20%, ⁴⁾ I-5 : *Ipguk*, *Aronia* 5%, ⁵⁾ I-12 : *Ipguk*, *Aronia* 12%, ⁶⁾ I-20 : *Ipguk*, *Aronia* 20%

(4) 색 안정성 증진 조건 확립

① 유기산과 pH에 따른 안토시아닌 안정성

안토시아닌 색의 안정화는 flavylum ring의 수화를 억제해야 하는데 이에 영향을 주는 인자로는 유기산, flavonoids, polyphenols 등의 copigment, 당류, 온도, pH, 금속이온 등이 보고되어 있다. 따라서 안토시아닌 색소의 안정성에 미치는 요인 중 구연산, 젖산 등 양조에 많이 사용되는 유기산 첨가와 pH와 에 따른 안정성을 색도와 안토시아닌 조성의 변화를 측정하여 조사하였다. 구연산으로 pH를 조정 한 시험군은 C-2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5로, 젖산으로 pH를 조정 한 시험군은 L-2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5로 나타내었다.

a. 색도 변화

아로니아 첨가 직후인 0일차의 a값은 C-2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5는 각각 15.71, 9.82, 8.19, 4.73, 5.63이었고, L-2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5의 적색도는 각각 14.66, 6.06, 4.60, 2.75, 2.96이었다. 전체적으로 젖산 처리군은 구연산 처리군에 비해 a값이 낮게 측정되었으며, 두 시험군 모두 pH가 높아질수록 적색도가 낮아지는 경향을 보였다. 7일차에 a값은 C-2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5는 각각 15.96, 10.64, 6.02, 3.25, 2.21이었고, L-2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5이 각각 16.00, 8.93, 3.17, 2.61, 2.56로 나타났다. 두 처리군 모두 pH가 높아짐에 따라 적색도는 감소하는 경향을 보였다. 또한, 구연산으로 pH를 조정 한 시험군이 젖산 시험군보다 전반적으로 a값이 높게 나타났으며, pH가 낮을수록 안정한 것으로 나타났다.

b. 안토시아닌 조성

1 일차에는 아로니아에 함유되어있는 4종의 안토시아닌이 모두 검출되었으며 각 시험군에서 가장 많은 양을 차지한 안토시아닌은 cyanidin-3-*O*-galactoside 이었다. 1일차의 총 안토시

아닌 함량은 C-2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5는 각각 155.3, 89.3, 75.9, 41.7, 38.4 mg/kg이었으며, L-2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 는 각각 162.8, 58.3, 43.6, 39.8, 35.7 mg/kg으로 나타났다. 전반적으로 시험군의 총 안토시아닌 함량이 0 day에 비해 높게 나타났는데 이는 시간이 지나면서 색소가 추출된 것으로 판단된다. 젓산과 구연산 처리군 모두 pH가 높아질수록 안토시아닌 함량은 감소하는 경향을 보였으며, 구연산 처리군의 총 안토시아닌의 함량이 젓산 처리군보다 높게 나타났고, 이는 색도의 결과와 동일하였다. 7일차의 총 안토시아닌 함량은 C-2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5이 각각 66.8, 23.5, 12.4, 3.0, 2.2 mg/kg 였으며, L-2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5이 각각 74.6, 28.2, 6.8, 4.0, 3.4 mg/kg으로 나타났다. 총 안토시아닌 함량은 1일차 결과와 같이 pH가 높아질수록 감소하는 경향을 보였다. 젓산, 구연산 시험군 모두 1일차에 비해 총 안토시아닌의 함량이 급격하게 감소하였으며, pH가 높아질수록 감소 비율도 증가하였다. 7일차 젓산 처리구는 pH 3.5, 4.0, 4.5 에서 cyanidin-3-*O*-glucoside가 pH 4.0, 4.5 에서 cyanidin-3-*O*-xyloside가 소실되었다. 7일차 구연산 처리구는 pH 4.0, 4.5 에서 cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-xylose가 소실되었다. 결론적으로 안토시아닌의 안정성은 젓산보다 구연산 처리군이 더 높게 나타났다.

Table 5. Anthocyanin contents of *makgeolli sul-dut* during fermentation by different kind of organ (mg/kg)

Day	Anthocyanin	Samples						
		L-2.5	L-3.0	L-3.5	L-4.0	L-4.5	C-2.5	C-3.0
0	Cyanidin-3-O-galactoside	54.3	28.1	25.2	17.3	16.2	73.9	36.0
	Cyanidin-3-O-glucoside	2.5	1.0	1.0	0.4	0.3	3.2	1.1
	Cyanidin-3-O-arabinoside	17.5	7.7	6.5	3.7	3.4	21.9	8.9
	Cyanidin-3-O-xyloside	2.6	0.8	0.7	-	-	3.1	0.5
	Total contents	76.9	37.6	33.4	21.5	19.8	102.0	46.5
1	Cyanidin-3-O-galactoside	112.4	44.8	34.6	30.8	28.1	109.3	64.0
	Cyanidin-3-O-glucoside	6.2	1.9	1.6	1.3	0.9	5.6	3.1
	Cyanidin-3-O-arabinoside	37.7	10.7	7.0	7.2	6.3	34.4	19.6
	Cyanidin-3-O-xyloside	6.4	0.9	0.4	0.5	0.3	6.0	2.6
	Total contents	162.8	58.3	43.6	39.8	35.7	155.3	89.3
7	Cyanidin-3-O-galactoside	46.6	17.7	4.6	2.7	2.4	43.8	14.0
	Cyanidin-3-O-glucoside	3.7	0.9	-	-	-	2.7	0.5
	Cyanidin-3-O-arabinoside	20.3	8.0	2.0	1.3	1.0	17.1	7.6
	Cyanidin-3-O-xyloside	4.1	1.6	0.2	-	-	3.2	1.4
	Total contents	74.6	28.2	6.8	4.0	3.4	66.8	23.5

② 담금 시 pH를 조절한 막걸리 술덧의 색소 안정성

아로니아 첨가량 별 실험에서 아로니아 첨가량은 12%로 결정하였으므로 아로니아가 12%가 되도록 첨가하여 발효를 실시하였다. 발효제에 따른 색 안정성에 대한 실험 결과, 입국을 발효제로 사용하는 실험군에서 색 안정성이 높게 유지되고, 유기산 함량이 높고, pH가 낮을수록 색 안정성이 높게 유지되는 것을 확인한 바 있으므로 입국 사용 시험군과 개량누룩 시험군의 pH를 보정한 시험구간 색 안정성을 비교하였다. 개량누룩 시험군의 pH 보정에는 막걸리 산업 현장에서 많이 사용하는 젖산을 사용하였다. 본 연구에서의 시험군은 입국을 사용한 시험군을 A, 개량누룩을 사용한 시험군을 B, C, D, E로 하였으며, B는 보산을 하지 않은 시험군이며, C, D, E는 각각 pH를 3.0, 3.5, 4.5로 보산을 한 시험군이었으며 결과는 아래 표와 같다.

a. 알코올 함량

알코올의 함량은 발효 2일차에 A, B, C, D, E 시험군 각각 7.0, 5.1, 6.2, 6.8, 6.3%로 측정되었는데, 입국 사용 시험군의 알코올의 함량이 누룩 사용 시험군의 알코올 함량보다 높게 나타났다. 발효 8일차에 알코올 함량은 입국 시험군 A가 17.8%로 가장 높았고, 보산을 하지 않은 B 시험군이 16.8%로 가장 낮았으며, 보산을 한 누룩 사용 C, D, E 시험군은 각각 17.6, 17.5, 17.3%로 보산을 하지 않은 누룩 사용 B 시험군보다 높은 함량을 나타내었다. 발효제 간의 알코올 함량은 입국 담금 방식과 누룩 담금 방식의 차이에서 기인하는 것으로, 입국 시험군의 발효 시 1단 담금 이전에 주모 담금을 함으로써 효모의 발육 상태가 누룩 시험군에 비해 양호하기 때문으로 판단된다. 또한 술덧의 품질 특성이 발효제에 따라 달라짐은 본 연구에서 확인한 바 있다.

b. 환원당 함량

환원당 함량은 발효 2일차에 A, B, C, D, E 시험군 각각 15.18, 13.78, 33.38, 29.00, 21.53 mg/mL로 개량누룩 시험군에서는 보산을 한 시험군의 환원당 함량이 높게 나타났다. 따라서 C, D, E 시험군이 보산을 하지 않은 B 시험군에 비해 알코올 함량이 높았던 것은 초기 환원당의 농도의 증가로 인해 발효 속도를 촉진시켰기 때문인 것으로 추정된다. 발효 5일차와 8일차 A 시험군의 환원당 함량은 각각 3.43, 5.05 mg/mL로 환원당 함량이 증가했음을 알 수 있는데, 이는 당의 생성속도보다 알코올 생성 속도가 느려짐에 따라 나타나는 것으로 판단된다.

c. 산도 및 pH

산도는 발효 2일차에 A 시험구가 6.7 mL로 가장 높았으며 pH는 3.11로 가장 낮았음. 또한 B, C, D, E 시험구의 산도는 각각 1.5, 2.7, 2.1, 1.9 mL이었으며, pH는 4.12, 3.55, 3.71, 3.89로 나타났다. 발효 초기의 산도는 주로 발효제나 원료에서 유래되는데 입국은 *Asp kawachii*를 쌀에 번식시킨 것으로 산도가 높아 술덧의 안전주조용으로 사용되기 때문에 A 시험군의 산도가 높게 나타난 것으로 판단된다. 또한 B, C, D, E 시험군의 산도는 pH가 낮을수록 높은 경향을

나타냈으며, 이는 초기 pH 조절을 위해 젖산을 첨가한 것에서 기인한 것으로 보인다. 발효 8 일차에 A 시험구의 산도, pH는 각각 7.4 mL, 3.83로 산도는 가장 높았고 pH는 가장 낮은 값을 보였다. B, C, D, E 시험구의 산도는 각각 3.90, 4.10, 3.50, 3.70 mL였으며, pH는 각각 4.02, 4.17, 4.20, 4.12로 나타났다. 발효가 진행되면서 술덧 중의 효모나 젖산균 등의 미생물 작용으로 생성된 각종 유기산들이 가산되므로 총산의 함량이 증가한 것으로 추측된다.

Table 6. Alcohol contents, reducing sugar, acidity and pH during fermentation by different kinds of koji and initial pH

Sample	Values	Fermentation time (day)		
		2	5	8
A ¹⁾	Alcohol contents (%)	7.00	16.80	17.80
	Reducing sugar (mg/mL)	15.18	3.43	5.05
	Acidity (mL)	6.70	7.60	7.40
	pH	3.11	3.59	3.83
B ²⁾	Alcohol contents (%)	5.10	13.6	16.8
	Reducing sugar (mg/mL)	13.78	6.16	1.81
	Acidity (mL)	1.50	3.25	3.90
	pH	4.12	3.84	4.02
C ³⁾	Alcohol contents (%)	6.20	15.60	17.60
	Reducing sugar (mg/mL)	33.38	4.34	1.38
	Acidity (mL)	2.70	3.90	4.10
	pH	3.55	3.83	4.17
D ⁴⁾	Alcohol contents (%)	6.80	15.6	17.50
	Reducing sugar (mg/mL)	29.00	5.52	1.51
	Acidity (mL)	2.10	3.30	3.50
	pH	3.71	3.92	4.20
E ⁵⁾	Alcohol contents (%)	6.30	14.80	17.30
	Reducing sugar (mg/mL)	21.53	5.57	1.49
	Acidity (mL)	1.90	3.30	3.70
	pH	3.89	3.86	4.12

¹⁾A : *Ipguk*-Aronia 12%, ²⁾B : *Nuruk*-Aronia 12%, ³⁾C : *Nuruk*-Aronia 12%, added lactic acid (pH3.0), ⁴⁾D : *Nuruk*-Aronia 12%, added lactic acid (pH3.5), ⁵⁾E : *Nuruk*-Aronia 12%, added lactic acid (pH4.5)

d. 색도 변화

L 값은 2일차에 A, B, C, D, E 각각 24.04, 28.43, 26.50, 27.43, 27.26이었던 것이 8일차에는 26.25, 27.93, 27.99, 28.05, 28.30로 B를 제외하고 모두 증가하였다. 8일차에서 시료 간의 차이는 E가 28.30로 가장 높았으며 가장 낮은 시료는 A로 나타났다. a 값은 2일차에 A, B, C, D, E 각각 11.02, 3.02, 5.79, 4.15, 3.92로 입국을 사용한 A 시험군이 가장 높았으며, 누룩을 사용한 B, C, D, E는 술덧의 pH가 높아질수록 적색도가 낮게 나타났다. 8일차에서는 A, B, C, D, E 각각 5.56, 2.16, 2.18, 1.91, 2.03로 2일차에 비해 적색도가 감소하였으며, 시료 간 적색도의 차이는 2일차의 경향과 비슷하였다. 유기산과 pH별 색소 안정성 실험에서 같은 pH 별로 각각 비교해보면 막걸리 술덧에서의 a값이 더 낮게 나타났는데, 이는 유기산과 pH 외에도 효소, 온도, 광 등의 여러 조건에 의해 안토시아닌이 분해되었기 때문이라고 판단된다. b값은 a값과 비슷한 경향을 보였는데 2일차에 A, B, C, D, E 각각 6.14, 2.16, 3.06, 2.49, 2.57로 A가 가장 높았으며, B가 가장 낮게 나타났다. 또한 8일차에는 A, B, C, D, E 각각 4.46, 2.97, 3.59, 3.27, 2.93로 A를 제외한 모든 시험군은 2일차에 비해 b값이 증가하였다.

젖산으로 pH를 보정한 결과 발효 초기(2 day)에는 색소 안정의 효과가 있었지만, 발효 후기(8 day)에는 모두 a값이 감소하여 pH 무보정 시험군과 차이를 나타내지 않았다. 입국 시험군도 발효일수가 경과할수록 a값이 감소하는 경향을 보였지만, 전반적으로 누룩 시험군보다 높게 나타났다.

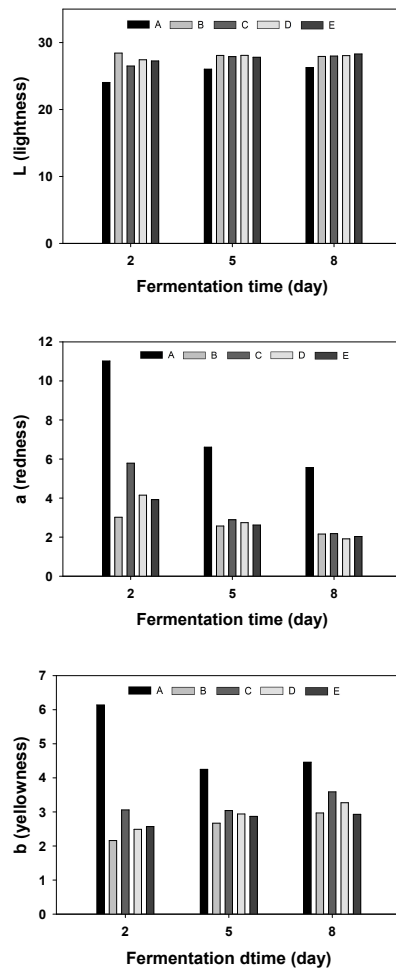


Fig. 3. Changes of Hunter's color by different kinds of koji and initial pH. (A: Ipguk, aronia 12%, B: Nuruk, aronia 12%, C: Nuruk, aronia 12%, added lactic acid (pH 3.0), D: Nuruk, aronia 12%, added lactic acid (pH 3.5), E: Nuruk, aronia 12%, added lactic acid (pH 4.5)).

① 안토시아닌 조성 및 함량

시험군 A에서 발효 2 일차 cyanidin-3-O-galactoside 함량은 68.17 mg/L로 타 시험군 대비 잔존 농도가 매우 높은 것으로 나타났고, cyanidin-3-O-arabioside 함량은 발효 진행에 상관 없이 타 시험군 대비 2배 이상 잔존하는 것으로 확인되었으며, 미량이지만 타 시험군에서는 검출되지 않는 cyanidin-3-O-xyloside가 검출되는 것으로 확인되었는데 이와 같은 결과는 발효 8 일 차 막걸리 술덧의 육안 관찰에 의한 색도 차이에도 반영되고 있는 것으로 사료된다 (data not shown). 한편, 안토시아닌의 안정성에 영향을 미치는 것으로 알려진 pH 효과를 확인하기 위하여 젖산으로 pH를 보정하여 발효를 진행시킨 개량누룩 시험군 전부에서 pH와 상관 없이 유사한 양상으로 안토시아닌 함량이 매우 낮은 것으로 나타났으므로 안토시아닌 함유 기능성 막걸리 양조 시 발효제로는 개량누룩보다는 입국의 사용이 안토시아닌 안정성 유지에 적합할 것으로 판단된다. 이와 같이 입국을 발효제로 사용한 시험군 A와 개량누룩을 발효제로

사용한 시험군들 간 색소 안정성 차이는 전술한 바와 같이 구연산 수용액과 젖산 수용액 중 아로니아 안토시아닌의 잔존 농도에 차이가 있었고, 입국 배양과 개량누룩 배양에 사용된 곰팡이 균종이 상이함 등을 고려한다면 막걸리 술덧의 유기산 조성 및 발효제에 함유된 β -glucosidase 등 배당체 분해 효소 활성 차이도 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

Table 7. Anthocyanin contents (mg/kg) of *makgeolli sul-dut* during fermentation by adjust with pH

Sample	Anthocyanin	Fermentation time (day)		
		2	5	8
A	Cyanidin-3-O-galactoside	68.17	2.73	0.84
	Cyanidin-3-O-glucoside	-	-	-
	Cyanidin-3-O-arabinoside	13.65	19.43	15.74
	Cyanidin-3-O-xyloside	0.66	0.78	0.56
	Total contents	82.48	22.94	17.14
B	Cyanidin-3-O-galactoside	4.26	0.74	0.29
	Cyanidin-3-O-glucoside	-	-	-
	Cyanidin-3-O-arabinoside	6.10	5.71	4.27
	Cyanidin-3-O-xyloside	-	-	-
	Total contents	10.36	6.45	4.56
C	Cyanidin-3-O-galactoside	0.05	0.69	0.20
	Cyanidin-3-O-glucoside	-	-	-
	Cyanidin-3-O-arabinoside	5.11	6.52	3.97
	Cyanidin-3-O-xyloside	-	-	-
	Total contents	5.16	7.21	4.17
D	Cyanidin-3-O-galactoside	0.92	1.30	0.43
	Cyanidin-3-O-glucoside	-	-	-
	Cyanidin-3-O-arabinoside	6.18	7.35	5.27
	Cyanidin-3-O-xyloside	-	-	-
	Total contents	7.1	8.65	5.7
E	Cyanidin-3-O-galactoside	1.93	1.06	0.21
	Cyanidin-3-O-glucoside	-	-	-
	Cyanidin-3-O-arabinoside	5.90	6.77	4.77
	Cyanidin-3-O-xyloside	-	-	-
	Total contents	7.83	7.83	4.98

¹⁾A : *Ipguk*-Aronia 12%, ²⁾B : *Nuruk*-Aronia 12%, ³⁾C : *Nuruk*-Aronia 12%, added lactic acid (pH3.0), ⁴⁾D : *Nuruk*-Aronia 12%, added lactic acid (pH3.5), ⁵⁾E : *Nuruk*-Aronia 12%, added lactic acid (pH4.5)

(5) 대량생산을 위한 최적의 생산조건 도출

① 시작품 레시피

아로니아 막걸리 술덧의 발효 시 발효제로는 개량누룩 대비 입국을 사용하는 경우에 색 안정성 유지에 효과적이었고, 아로니아 함량이 12%가 되도록 첨가하였을 때 술덧 발효에 영향을 주지 않으면서 아로니아 고유의 색도가 구현되는 것으로 확인되었으므로 다음 Table 8과 같은 조건으로 시작품 레시피를 결정하여 담금을 실시하였다.

Table 8. Recipe for *makgeolli*

Seed mash			1st			2nd		
<i>Ipguk</i>	Yeast	Water	<i>Ipguk</i>	Rice	Water	Rice	Aronia	Water
528g	22.5g	792mL	2172g	300g	3708mL	6000g	1080g	9000mL

② 시작품 아로니아 막걸리 술덧의 발효 profile

위의 레시피를 적용하여 담금을 실시한 다음 아로니아 막걸리 술덧의 발효 생성물을 분석한 발효 profile을 Table 9에 나타내어 당초 설계 품질이 구현될 수 있는 발효 profile을 나타내는 것으로 확인되었음.

Table 9. Fermentation profile for *makgeolli*

Fermentation day	Alcohol content (%)	Acidity (%)	pH	Reducing sugar (mg/mL)	Temperature (°C)
1	8.8	21	3.15	16.4	25.3
2	8.0	6.6	3.22	6.05	24.8
3	11.8	5.5	3.21	2.14	23.3
4	14.6	5.9	3.29	1.7	24.5
5	15.6	5.1	3.84	1.35	24.2
6	17.6	5.6	3.83	0.16	23.7
7	17.5	5.9	3.67	0.92	23.9

③ 시작품 제조

아로니아 막걸리 술덧을 적용하여 시중 유통 상품 중 대표적인 2 종의 상품과 알코올 함량이 동일하게 알코올 함량 6%가 되도록 조정한 다음 시작품의 최종 환원당 함량이 10 mg/mL

과 15 mg/mL이 되도록 이소말토올리고당을 첨가하고, 산도는 2.0 mg/m이 되도록 구연산을 첨가한 다음 아스파탐과 아세설팜 K를 첨가하여 시작품을 제조하였다.

Table 10. Mixing condition of *makgeolli*

Alcohol	Reducing sugar	Acidity (%)	Aspartame	Acesulfame K
6.0%	10mg/mL	2.0mL	70ppm	30ppm
6.0%	15mg/mL	2.0mL	70ppm	30ppm



Fig. 4. *Aronia makgeolli*

④ 관능평가

시작품을 대상으로 시중 유통중인 대표적인 막걸리 상품 2가지를 포함하여 한경대학교 식품생물공학과와 영양조리학과 학생 총 38명을 대상으로 관능평가를 실시하였다. 관능평가에 사용된 A와 C는 각각 환원당 함량이 10 mg/mL, 15 mg/mL인 시작품, B와 D는 시중 유통중인 대표적인 막걸리 상품 2종으로 하였다. 관능평가 결과, 색과 향에서는 시료간의 선호도에 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 맛에는 시료간의 유의적인 차이를 나타내었고, 본 연구의 시작품 A시료가 가장 높은 결과를 나타내었으며, 전체적인 선호도의 경우에도 가장 높은 선호도를 보였다. 이와 같은 결과는 아로니아 막걸리의 상품 개발 시 품질 측면의 경쟁력 확보가 가능함을 의미하는 것으로 사료된다.



그림 16. 시작품 및 시중 유통제품의 성상

Table 11. Sensory evaluation of *makgeolli*

Sample	Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
A ¹⁾	6.55±1.87 ^{a2)}	6.37±1.38 ^{a3)}	6.26±1.77 ^b	6.42±1.62 ^c
B	6.66±1.88 ^a	6.34±1.60 ^a	5.40±1.87 ^{ab}	6.08±1.58 ^{bc}
C	6.34±1.81 ^a	5.79±2.06 ^a	5.53±1.96 ^{ab}	5.50±1.81 ^{ab}
D	5.76±1.90 ^a	5.63±1.92 ^a	4.87±2.00 ^a	4.84±1.87 ^a

¹⁾A : Aronia *makgeolli*, RS 10 mg/mL. B : Commercial *makgeolli* 1, C: Aronia *makgeolli*, RS 15 mg/mL, D : Commercial *makgeolli* 2.

(6) 아로니아 막걸리의 항산화 물질 함량 분석

Table 12. Total polyphenol, total flavonoid and total anthocyanin content of *Aronia makgeolli*

	Total polyphenol (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoids (mg CE ²⁾ /g)	Total anthocyanins (mg C3G ³⁾ /100g)
<i>Ipguk</i> control	0.694±0.005	0.011±0.000	0.00±0.00
<i>Ipguk</i> aronia	0.461±0.025	0.040±0.003	0.011±0.004
<i>Nuruk</i> control	0.512±0.016	0.014±0.002	0.00±0.00
<i>Nuruk</i> aronia	0.407±0.010	0.034±0.003	0.004±0.002

¹⁾GAE=gallic acid equivalent, ²⁾CE=catechin equivalent, ³⁾C3G=cyanidin-3-glucoside equivalent

(7) 아로니아 막걸리의 항산화 효능 평가

발효제를 달리하여 제조한 아로니아 함유 막걸리의 항산화 활성을 DPPH radical과 ABTS radical 소거능으로 측정하였다. 누룩에 비해 입국을 사용한 아로니아 막걸리에서 free radical 소거활성이 높게 나타났다. DPPH radical 소거활성의 경우, 입국으로 발효시킨 아로니아 함유 막걸 리가 대조군에 비해 2배 이상 높게 나타났으며, ABTS radical 소거활성에도 아로니아를 함유한 막걸리에서 높게 나타났다. 누룩으로 발효시킨 막걸리는 입국으로 발효시킨 막걸리보다 는 항산화 활성이 낮았고, 아로니아를 함유한 막걸 리가 대조군에 비해 높은 항산화 활성을 보 였다.

Table 13. Antioxidant activities of *Aronia makgeolli*

	DPPH radical scavenging (%)	ABTS radical scavenging (%)
<i>Ipguk</i> control	20.6±0.7	46.1±1.5
<i>Ipguk</i> aronia	53.7±0.6	63.1±1.6
<i>Nuruk</i> control	15.9±1.2	42.5±2.5
<i>Nuruk</i> aronia	27.0±0.7	55.8±1.6

9. 아로니아 함유 식초음료 제조

가. 실험 방법

(1) 식초 제조용 시료

식초제조에 사용한 아로니아(*Aronia melanocarpa*, black chokeberry)는 2014년 9월초에 전북 고창의 아로니아 농장에서 수확한 것을 직접 구입하였다. 깨끗이 세척한 아로니아를 food processor(Phillips Electronics, Seoul, Korea)를 이용하여 곱게 마쇄한 후, 액을 3겹의 거즈로 여과하여 얻어 식초 제조용 시료로 사용하였다. 주모는 아로니아 착즙액에 갈색설탕을 첨가하여 초기당도를 15 °Brix로 조절한 후 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하여 25°C에서 7일간 정치배양하여 사용하였다. 종초는 아로니아 발효액을 여과한 후 그 여액에 초산균주 *Acetobacter sp.* PA97을 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 72시간 진탕배양하여 사용하였다.

(2) 알코올 발효 및 초산 발효

알코올 발효는 아로니아 착즙액 100%에 갈색설탕을 첨가하여 초기 당도가 15 °Brix가 되도록 조절한 후 주모 5%(w/v)를 접종하여 25°C 항온배양기에서 8일간 배양시켰다. 초산발효는 여

과된 아로니아 알코올 발효액에 종초 10%(v/v)를 접종하여 30℃에서 200 rpm으로 진탕배양기를 이용하여 28일간 배양하였다.



(3) pH, 총당 및 알코올 함량 측정

pH는 시료 10 mL을 취하여 pH meter를 이용하여 측정하였다. 당도는 시료 300 μ L를 취하여 당도계(ATAGO, PAL-3, Japan)를 이용하여 $^{\circ}$ Brix(%)로 측정하였다. 알코올 함량은 국제청주류분석규정에 따라 density meter(MDA 35 portable density meter, Anton Paar, Wundschuh, Austria-Europe)를 이용하여 20℃에서 측정하였다.

(4) 유리당 함량 및 유기산 함량

유리당 및 유기산 분석을 위하여 시료액을 원심분리 시킨 후, 0.45 μ m membrane filter와 Sep-pak C₁₈ cartridge로 여과하여 색소 및 단백질 성분을 제거한 후 분석하였다. 유리당은 Ultimate 3000 (Dionex, USA) HPLC와 sugar-pak (6.5 \times 300 mm, Waters, USA) column으로 분석하였다. 이동상은 3차 증류수를 사용하였고, flow rate는 0.5 mL/min, injection volume는 10 μ L, detector는 Shodex RI detector (Japan)를 사용하였다. 유기산은 Ultimate 3000 (Dionex, USA) HPLC와 C₁₈ column (4.6 \times 250 mm, 5 μ m, GL Sciences Inc., Tokyo, Japan)을 이용하였고 이동상은 20 mM KH₂PO₄ (pH 2.8)와 methanol을 사용하였고, flow rate는 0.8 mL/min, injection volume는 10 μ L, UV detector를 이용하여 210 nm에서 분석하였다.

(5) 유리 아미노산 분석

아미노산 분석을 위하여 시료액을 원심분리 시킨 후, 0.45 μ m membrane filter와 Sep-pak C₁₈ cartridge로 여과하여 색소 및 단백질 성분을 제거한 후 분석하였다. 아미노산은 Ultimate 3000 (Thermo dionex, USA) HPLC와 VDSpher 100 C18-E column (4.6 \times 150 mm, 3.5 μ m, VDS optilab, Germany)을 이용하였고 이동상은 40 mM sodium phosphate dibasic (pH 7.8)과 water:acetonitrile:methanol(10:45:45) 혼합액을 사용하였고, flow rate는 0.8 mL/min, injection volume는 0.5 μ L, UV detector를 이용하여 338 nm에서 분석하였다.

(6) 색도 측정

아로니아 식초의 색도는 색차계(Chrome Meter CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness) 값으로 표시하였다. 표준백색판의 L, a, b 값은 각각 97.10, +0.24, +1.75 였다.

(7) 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총 안토시아닌 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법에 따라 분석하였다. 아로니아 식초 0.1 mL에 Folin 시약 0.5 mL을 혼합한 뒤 3분간 실온에서 반응시켰다. 3분이 경과하면 2% Na₃CO₃ 1.5 mL을 첨가한 뒤 2시간 동안 암소에서 반응시킨 후 760 nm에서 microplate reader (Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 폴리페놀 함량은 gallic acid의 표준곡선(6.25~100 µg/mL)을 이용하여 시료 g당 gallic acid equivalent (GAE)로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량은 Woisky와 Salatino 방법에 따라 분석하였다. 아로니아 식초 0.1 mL을 취하여 2% aluminium chloride methanolic solution 1 mL을 첨가하여 15분간 실온에서 반응시킨 후 430 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 표준곡선(6.25~100 µg/mL)을 통하여 시료 g당 quercetin equivalent (QE)로 나타내었다.

총 안토시아닌 함량은 Giusti와 Wrolstad의 방법에 의해 분석하였다. 아로니아 식초 1 mL에 0.1% formic acid를 함유한 methanol 50 mL을 넣어 20분간 sonication을 하여 상층액을 따로 모았다. 이 추출 과정을 3회 반복하여 모은 상층액을 rotary evaporator (EYELA N-1200A, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C에서 농축한 후 추출용매를 이용하여 적절한 농도로 희석하였다. 시료 100 µL에 pH 1 완충용액 1,900 µL와 pH 4.5 완충용액 1,900 µL를 각각 첨가하여 vortexing 한 후, microplate reader를 이용하여 520 nm와 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래 식에 의해 총 안토시아닌 함량을 계산하였다.

$$\text{총 안토시아닌 함량(mg/100 g)} = (A \times 449.2 \times DF \times 12 \times 500) \div (26,900 \times 1)$$

A : (OD 520 nm - OD 700 nm) of pH 1.0 - (OD 520 nm - OD 700 nm) of pH 4.5

449.2 : cyanidin-3-glucoside의 1 mol 당 분자량 (g)

DF : 희석배수 = 20

12 : 총 부피

500 : 시료 100 g당으로 환산하기 위하여 12 mL 추출액의 시료 무게인 0.2 g으로 나눈 값

26,900 : cyanidin-3-glucoside의 molar absorbtivity

(8) 항산화 활성 측정

① DPPH 라디칼에 대한 전자공여능 측정

아로니아 함유 식초의 전자공여능을 DPPH assay로 측정하였다. 96-well plate에 농도별 추출물 100 μL와 0.2 mM DPPH 용액 100 μL를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

② ABTS 라디칼에 대한 전자공여능 측정

아로니아 식초의 전자공여능을 ABTS assay로 측정하였다. 96-well plate에 농도별 추출물 100 μL와 0.2 mM ABTS 용액 100 μL를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader를 사용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 ABTS 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

나. 실험 결과

(1) 알코올 발효 기간 중의 pH, 총당 및 알코올 함량 측정

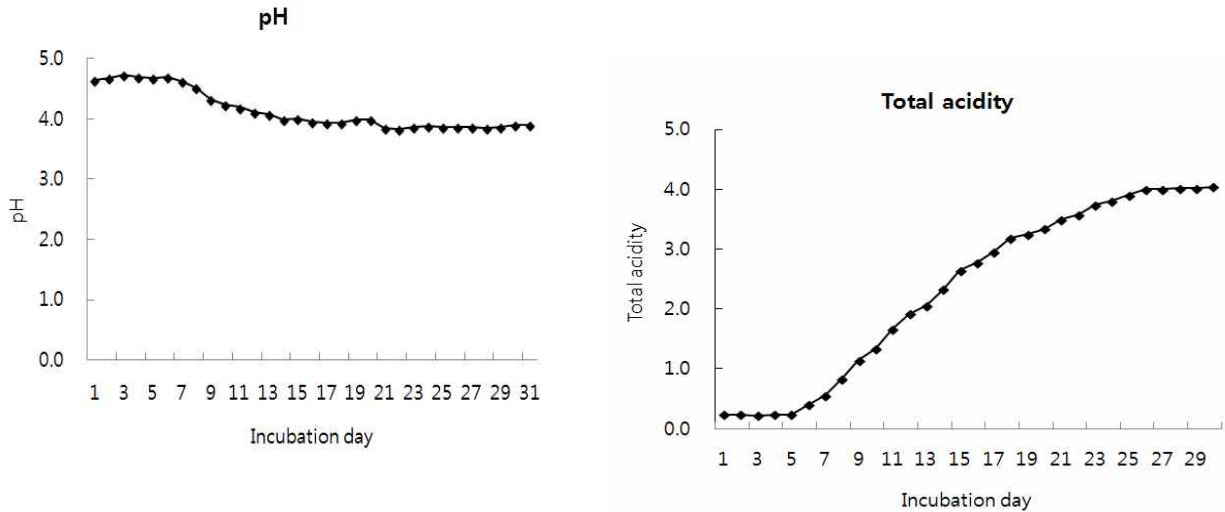
아로니아액의 알코올 발효 기간 중의 pH, 총당 및 알코올 함량 변화를 Table 1에 나타냈다. 알코올 발효 전의 pH는 4.68 이었고 발효기간이 증가함에 따라 4.23까지 감소하였다. 발효 전 총당 함량은 16.0이었고, 발효 1일에 급격히 감소하여 7.4를 나타냈다. 1일 이후에는 총당 함량의 감소는 거의 나타나지 않았다. 알코올 함량의 경우 발효 전에는 알코올이 없었으나 7일 동안 발효가 진행됨에 따라 알코올이 8.8%까지 증가하였다.

Table 1. Changes for pH, sugar and alcohol contents during the alcohol fermentation

Measurement	Incubation day				
	0	1	3	5	7
pH	4.68	4.55	4.46	4.38	4.23
Sugar content	16.0	7.4	7.3	7.3	7.2
Alcohol content	0.0	6.4	7.1	7.9	8.8

(2) 초산 발효 기간 중의 pH 및 총 산도의 변화

아로니아액의 초산 발효 기간 중의 pH의 변화를 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 알코올 발효 종료 후 pH는 4.64이었고, 초산발효 진행됨에 따라 서서히 감



소하여 발효 30일에서는 3.89로 나타났다. 아로니아액의 초산 발효 기간 중의 총산도의 변화는 그림 2에 나타내었다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 알코올 발효 종료 후 총 산도는 0.24이었고, 초산 발효 5일 쯤부터 발효 24일까지 비교적 빠르게 증가하다가 발효 25일 이후에는 거의 정체상태를 보였으며 발효 30일에서는 4.04로 나타났다.

Fig. 1. Changes of pH and total acidity during the acetic acid fermentation

(3) 아로니아 발효 식초의 유리당 함량 및 유기산 함량

아로니아 식초의 유리당 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 아로니아 식초의 총 유리당 함량은 L당 14765.0 mg 이었고, 이 중 Sorbitol 함량이 10868.8 mg으로 가장 높았고, Mannitol (3314.0 mg) 및 glucose (582.1 mg) 순으로 나타났다. 아로니아 식초에 함유된 주요 당 성분들은 알코올 및 초산 발효를 거치면서 당알코올로 전환된 것으로 사료된다.

Table 2. Free sugar contents in aronia vinegar

Free sugars	Contents (mg/L)
Glucose	582.1
Mannitol	3314.0
Sorbitol	10868.8
Total Free Sugars	14765.0

아로니아 식초의 유기산 함량을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 아로니아 식초에 함유된 주요 유기산은 acetic acid로 리터 당 41415.3 mg을 차지하였고, 이어서 malic acid, succinic acid, citric acid, tartaric acid 및 phosphoric acid의 순으로 나타났다. Acetic acid를 비롯한 이들 유기산들은 식초의 산미와 지미를 형성하며, TCA 회로를 활성화하여 젖산분해를 촉진하는 기능성이 있는 것으로 보고되고 있다.

Table 3. Organic acid contents in aronia vinegar

Organic acids	Contents (mg/L)
Acetic	41415.3
Malic	1470.6
Succinic	574.1
Citric	233.4
Tartaric	199.4
Phosphoric	115.6
Total Organic acids	44,008.4

(2) 유리아미노산 함량

아로니아 식초의 유리아미노산 함량을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 아로니아 식초로부터 총 21종의 유리아미노산이 검출되었으며 총 함량은 301.9 mg/L로 나타났다. 주요 아미노산은 leucine, alanine, phenylalanine, arginine, tyrosine, glutamic acid, threonine 등으로 나타났다.

Table 4. Free amino acid contents in aronia vinegar

Free amino acids	Contents (mg/L)
Aspartic acid	4.1020
Glutamic acid	21.1840
Asparagine	12.5691
Serine	9.2044
Glutamine	5.1185
Histidine	2.1161
Glycine	9.9178
Threonine	20.2905

Arginine	25.8483
Alanine	30.1587
Taurine	0.2104
GABA	7.8764
Tyrosine	23.3911
Valine	28.0069
Methionine	4.2915
Tryptophane	0.7606
Phenylalanine	28.0807
Isoleucine	16.8742
Leucine	37.3525
Lysine	10.7458
Proline	3.8391
Total Amino acids	301.939

(3) 색도 측정

아로니아 식초의 색도는 Table 5와 같다. 명도를 나타내는 L값은 39.88, 적색도를 나타내는 a값은 5.40, 황색도를 나타내는 b값은 1.91로 나타났다.

Table 5. Hunter's color value of aronia vinegar

L	39.88
a	5.40
b	1.91

(4) 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총 안토시아닌 함량

아로니아 식초 중에 함유된 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량을 측정하고 아래 Table 6에 나타내었다.

Table 6. Total polyphenol, total flavonoid, and total anthocyanin contents in aronia vinegar

Composition	Contents
Total Polyphenols	369.91 ± 4.05 mg GAE ¹ /g

Total Flavonoids 397.82 ± 6.85 mg QE²⁾/g

Total Anthocyanins 14.82 ± 0.07 mg C3G³⁾/100 g

¹⁾GAE=gallic acid equivalent, ²⁾QE=quercetin equivalent, ³⁾C3G=cyanidin-3-glucoside equivalent

Table 6에서 보는 바와 같이 아로니아 식초에 함유된 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 식초 1 mL 당 각각 369.91 mg과 397.82 mg으로 나타났다. 또한 총 안토시아닌은 식초 100 mL당 14.82 mg으로 나타났다. 아로니아에는 chlorogenic acid, neochlorogenic acid, quercetin, quercein-3-ruthnoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-xyloside 등이 함유된 것으로 보고되어 있으며 아로니아를 식초로 제조할 경우에도 다양한 생리활성 물질에 의한 기능성을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

(5) DPPH & ABTS 라디칼 소거능 측정

아로니아 식초의 DPPH 라디칼 소거활성을 결과는 Table 7에 나타내었다. 아로니아 식초의 DPPH 라디칼 소거활성은 68.01%로 positive control인 0.1% BHT 보다는 다소 낮았으나 0.1% α-tocopherol과 유사한 활성을 나타냈다.

Table 7. DPPH radical scacenging activity of aronia vinegar

Composition	Inhibition (%)
DPPH ¹⁾	68.01 ± 0.54
0.1% BHT	89.23 ± 0.41
0.1% α-tocopherol	69.83 ± 0.62

¹⁾DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

아로니아 식초의 ABTS 라디칼 소거활성을 결과는 Table 8에 나타내었다. 아로니아 식초의 ABTS 라디칼 소거활성은 65.1%로 positive control인 0.1% BHT나 0.1% α-tocopherol 보다는 낮았으나 positive control로 사용한 물질이 합성항산화제인 점을 감안할 때, 천연의 발효식초로는 항산화 기능성이 있는 것으로 사료된다.

Table 8. ABTS radical scacenging activity of aronia vinegar

Composition	Inhibition (%)
ABTS ¹⁾	65.1 ± 2.65

0.1% BHT

80.14 ± 0.46

0.1% α-tocopherol

75.28 ± 0.51

¹⁾ABTS = 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid

Table 7과 Table 8에서 보는 바와 같이 아로니아 식초는 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성이 있는 것으로 나타났다. 이는 아로니아에 함유된 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌과 같은 항산화물질들에 의한 것으로 위의 결과를 종합해 볼 때, 아로니아 식초는 항산화 기능이 있는 것으로 사료된다. 본 발명에 의하면 항산화 물질을 다량 함유하고 있는 아로니아즙을 알코올과 초산발효 과정을 거쳐 제조한 식초는 영양과 기능성 측면에서 기존 식초에 비해 항산화 기능성 식품으로서의 가치가 높을 것으로 기대된다.

10. 아로니아 함유 설기떡 제조

가. 실험 방법

(1) 실험재료 및 시약

본 연구에 사용한 아로니아(*Aronia melanocarpa*, black chokeberry)는 2012년 8월말에 경북 영천의 아로니아 농장에서 수확한 것을 직접 구입하였다. 멥쌀은 2013년도에 경기도 이천에서 수확한 것을 산지에서 직접 조달하였고, 백설탕(CJ Cheiljedang, Incheon, Korea)과 소금(Sajo Haepyo, Incheon, Korea)은 시판품을 구입하여 사용하였다.

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), gallic acid, catechin, nitro blue tetrazolium chloride (NBT), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), Tris-HCl, para-methyl styrene (PMS), sodium phosphate monobasic, and deoxy-d-ribose는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)는 Fluk (Heidelberg, Germany)에서 구입하였다. 그 외 시약들은 Sigma-Aldrich Chemical Co.와 Juncei chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 저장기간에 따른 미생물의 생육 정도는 건조필름 배지로 측정하였고 Petrifilm™ aerobic count plate (3M, St. Paul, MN, USA)와 Petrifilm™ coliform count plate (3M, St. Paul, MN, USA)를 사용하였다.

(2) 아로니아 분말 및 쌀가루 제조

아로니아는 흐르는 물에서 깨끗이 세척한 후 물기를 제거하여 -75℃ 초저온냉동고(DF-810, Ilshin Lab Co., Seoul, Korea)에서 냉동시킨 후에 동결건조기(Ilshin Biobase, Dongduchun,

Korea)를 이용하여 건조시켰다. 건조된 아로니아는 믹서분쇄기(Hanil, Seoul, Korea)로 곱게 마쇄한 후 30 mesh와 100 mesh 체에 2회 내려 분말형태로 만들어 설기떡 제조에 사용하였다. 멥쌀은 5회 수세하여 실온에서 8시간 동안 수침한 후, 체에서 약 30분간 물기를 빼고 쌀가루 무게의 1.2%의 소금을 첨가하여 roller mill을 이용하여 2회 분쇄하였다. 쌀가루는 30 mesh 체에 3회 통과시켜 사용하였다.

(3) 아로니아의 일반성분 분석

본 실험에 사용한 아로니아의 일반성분은 AOAC 방법(1990)에 따라 분석하였다. 수분은 상압가열건조법에 따라 105°C에서 건조하여 수분 함량을 구하였다. 회분은 550°C에서 회화하여 회분 함량을 구하였으며, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법으로, 조지방은 Soxhlet법으로 측정하였다.

(4) 설기떡 제조

쌀가루에 아로니아 분말을 9%까지 첨가하여 설기떡을 제조하여 예비 관능평가를 실시한 결과 맛과 떡의 형태 등을 고려할 때 아로니아 분말은 쌀가루 중량의 최대 5%까지 첨가하는 것이 적절한 것으로 결정하였다. 예비실험 결과에 따라 Table 1과 같은 배합 비율로 설기떡을 제조하였다. 아로니아 분말을 첨가하지 않고 제조한 설기떡을 대조군으로 하였고, 실험군은 쌀가루 무게에 대해 아로니아 분말을 1, 3 및 5%의 비율로 첨가하여 제조하였다.

Table 1. Formular for *Sulgidduk* with different levels of aronia powder

	Control	aronia powder ¹⁾ (%)		
		1	3	5
Rice powder (g)	1,000	990	970	950
Aronia powder	0	10	30	50
Water (g)	200	200	200	200
Sugar (g)	150	150	150	150
Salt (g)	2	2	2	2

¹⁾Aronia powder(1, 3 and 5%) was added based on the total weight of rice powder.

체에 내린 쌀가루 1 kg에 설탕 150 g을 동일하게 섞은 다음 대나무 찌기(지름 25 cm, 높이 8 cm)에 젖은 면포를 깔고 혼합한 재료를 넣고 표면을 고르게 하여 준비하였다. 냄비에 1 L의 물을 넣고 물이 끓으면 찌기를 냄비에 올리고 젖은 면포로 찌 뚜껑을 덮어 15분간 센 불에서 찌고, 불을 끈 뒤 5분간 뜸을 들였다. 완성된 설기떡은 실온에서 3시간 동안 냉각시킨 후 각종 분석 및 관능평가의 시료로 사용하였다.

(5) 수분 함량 측정

설기떡의 수분 함량은 AOAC 방법(1990)에 따라 105°C 상압가열건조법으로 정량하였다.

(6) 조직감 측정

제조된 설기떡의 기계적 물성 측정은 Texture analyzer (CT3 10K, Brookfield., Middleboro, MA, USA)를 사용하여 texture profile analysis (TPA)로 측정하였다. 아로니아 함량을 달리하여 제조한 설기떡을 2.5 × 2.5 × 2.5 cm로 잘라서 polypropylene wrap으로 싼 다음 평가 직전에 wrap을 벗겨 plate의 중앙에 놓고 반복 압착실험(Two-Bite test)을 하였다. 시료를 압착했을 때 얻어진 curve로부터 경도(hardness), 탄력성(springiness), 부착성(adhesiveness), 응집성(cohesiveness), 씹힘성(chewiness), 검성(gumminess), 깨짐성(brittleness), 탄성(resilience)을 3회 측정하여 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation)로 나타내었다.

(7) 주사전자현미경 이미지 분석

설기떡의 기공 상태를 관찰하기 위하여 주사전자현미경(Scanning electron microscope, S-3500N, Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 내부의 미세구조를 관찰하였다. 제조 후 3시간이 경과한 설기떡 시료를 1 × 1 × 1 cm로 잘라 코팅 없이 저진공 조건(70 pa)에서 1,000배 배율로 확대하여 내부 이미지를 관찰하였다.

(8) 색도 측정

설기떡의 색도는 색차계(Chrome Meter CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness) 값으로 표시하였다. 표준백색판의 L, a, b 값은 각각 97.10, +0.24, +1.75 였다.

(9) 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법(1999)에 따라 분석하였다. 시료 3 g에 12 mL의 증류수를 가하여 40°C에서 5분간 sonication 한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻어 설기떡 추출물로 하였다. 설기떡 추출물 0.5 mL에 Folin 시약 0.5 mL을 혼합한 뒤 3분간 실온에서 반응시켰다. 3분이 경과하면 2% Na₃CO₃ 1.5 mL을 첨가한 뒤 2시간 동안 암소에서 반응시킨 후 760 nm에서 microplate reader (Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 폴리페놀 함량은 gallic acid의 표준곡선(6.25~100 µg/mL)을 이용하여 시료 g당 gallic acid equivalent (GAE)로 나타내었다.

(10) 총 플라보노이드 함량 분석

총 플라보노이드 함량은 Woisky와 Salatino 방법(1998)에 따라 분석하였다. 설기떡 추출물 1

mL을 취하여 2% aluminium chloride methanolic solution 1 mL을 첨가하여 15분간 실온에서 반응시킨 후 430 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 표준곡선(6.25~100 µg/mL)을 통하여 시료 g당 quercetin equivalent (QE)로 나타내었다.

(11) 총 안토시아닌 함량 분석

총 안토시아닌 함량은 Giusti와 Wrolstad의 방법(2001)에 의해 분석하였다. 설기떡 1 g에 0.1% formic acid를 함유한 methanol 50 mL을 넣어 20분간 sonication을 하여 상층액을 따로 모았다. 이 추출 과정을 3회 반복하여 모은 상층액을 rotary evaporator (EYELA N-1200A, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C에서 농축한 후 추출용매를 이용하여 적절한 농도로 희석하였다. 시료 100 µL에 pH 1 완충용액 1,900 µL와 pH 4.5 완충용액 1,900 µL를 각각 첨가하여 vortexing 한 후, microplate reader를 이용하여 520 nm와 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래 식에 의해 총 안토시아닌 함량을 계산하였다.

$$\text{총 안토시아닌 함량(mg/100 g)} = (A \times 449.2 \times DF \times 12 \times 500) \div (26,900 \times 1)$$

A : (OD 520 nm - OD 700 nm) of pH 1.0 - (OD 520 nm - OD 700 nm) of pH 4.5

449.2 : cyanidin-3-glucoside의 1 mol 당 분자량 (g)

DF : 희석배수 = 20

12 : 총 부피

500 : 시료 100 g당으로 환산하기 위하여 12 mL 추출액의 시료 무게인 0.2 g으로 나눈 값

26,900 : cyanidin-3-glucoside의 molar absorbtivity

(12) 항산화 활성 측정

① DPPH 라디칼에 대한 전자공여능 측정

아로니아 함유 설기떡 추출물의 전자공여능을 DPPH assay로 측정하였다. 96-well plate에 농도별 추출물 100 µL와 0.2 mM DPPH 용액 100 µL를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

② ABTS 라디칼에 대한 전자공여능 측정

설기떡 추출물의 전자공여능을 ABTS assay로 측정하였다. 96-well plate에 농도별 추출물 100 µL와 0.2 mM ABTS 용액 100 µL를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader를 사용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 ABTS 라디칼에 대한 전자공여능

은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

(13) 저장기간에 따른 일반세균 및 대장균군(Coliforms) 변화 측정

설기떡을 25 g을 칭량하여 stomacher plastic filter bag (Nasco Whirl-pak filter bag, Vernon Hills, IL, USA)에 넣고 멸균된 0.85% 생리식염수 225 mL를 첨가하여 2분간 stomacher (MIX 2, AES Laboratoire, Combourg, France)를 사용하여 균질화한 후 액상 부위를 수거하여 분석에 사용하였다. 균질화된 액상 시료를 멸균된 생리식염수를 사용하여 적절한 농도로 희석한 후 1 mL를 취하여 일반세균과 대장균군 측정용 건조필름 배지에 각각 접종하였다. 접종된 건조필름은 30°C incubator에서 48시간 배양하여 형성된 집락수를 계수하고 시료 g 당 colony forming units (CFU/g)으로 나타내었다.

(14) 관능평가

아로니아 함량을 달리하여 제조한 설기떡의 관능검사는 영양조리과학을 전공하는 훈련된 대학생 및 대학원생 패널(20~45세) 20명을 대상으로 시료의 관능적인 특성에 대하여 평가하도록 하였다. 일정한 크기(3 cm × 3 cm × 3 cm)로 자른 설기떡은 시료에 대한 편견을 막기 위하여 무작위로 조합된 세자리 난수표로 구분하여 일회용 접시에 담아서 제시하였다. 시료의 제시 순서는 패널마다 랜덤하게 하였으며, 각 시료를 평가한 후에는 제공된 물로 입안을 헹구어 입에 남는 감각을 제거하고 다음 시료를 평가하도록 하였다. 시료의 색(color), 맛(taste), 조직감(texture), 향미(flavor), 전반적인 선호도(overall acceptance)에 대해 9점 기호 척도를 이용하였고 시료의 특성이 좋을수록 높은 점수를 기록하도록 하였다.

(15) 통계분석

모든 결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation)로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS software package (Version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 ANOVA를 이용하여 유의성을 확인한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test를 이용하여 분석하였다.

나. 실험 결과

(1) 아로니아의 일반성분 함량

설기떡 제조에 사용한 아로니아의 일반성분 분석 결과는 Table 2와 같다. 아로니아에 함유되어 있는 수분과 회분 함량은 각각 80.39% 및 0.45%였으며, 조단백질과 조지방 함량은 1.44%

와 0.84%로 나타났다.

Table 2. Proximate composition of aronia

Moisture (%)	Ash (%)	Crude protein (%)	Crude lipid (%)
80.39 ± 1.07	0.45 ± 0.28	1.44 ± 0.32	0.84 ± 0.06

Data are the mean±SD from three separate experiments.

(2) 설기떡의 수분 함량

아로니아 분말 첨가량을 달리하여 제조한 설기떡의 수분 및 회분 함량 분석 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Moisture and ash content of *Sulgidduk* prepared with different amount of aronia powder

(%)	Aronia powder ¹⁾ (%)			
	0	1	3	5
Moisture	44.40 ± 1.04 ^b	44.43 ± 1.27 ^b	44.26 ± 1.26 ^b	40.86 ± 0.58 ^a
Ash	0.74 ± 0.01 ^b	0.69 ± 0.01 ^a	0.72 ± 0.03 ^b	0.85 ± 0.01 ^c

¹⁾Aronia powder(1, 3 and 5%) was added based on the total weight of rice powder.

Data were the mean±SD of triplicate experiment.

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

설기떡의 수분함량은 대조군과 1% 및 3% 아로니아 분말을 첨가한 설기떡에서는 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나, 아로니아 분말을 5% 첨가한 설기떡에서는 수분함량이 다소 낮아지는 것을 관찰하였다. 이는 동결건조시켜 제조한 아로니아 분말의 수분함량이 쌀가루의 수분함량보다 낮아 아로니아 분말을 5% 첨가하여 제조한 설기떡의 수분함량이 대조군과 다른 실험군에 비해 낮게 나타난 것으로 사료된다.

(3) 조직감 측정

아로니아 분말 첨가량을 달리하여 제조한 설기떡의 물성측정 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Rheological properties of *Sulgidduk* prepared with different amount of aronia powder

Sample	Aronia powder ¹⁾ (%)			
	0	1%	3%	5%

Hardness	2787.72 ± 66.94 ^c	2217.00 ± 38.83 ^a	2372.43 ± 70.32 ^b	2308.44 ± 85.57 ^{ab}
Springiness	0.67 ± 0.06 ^c	0.54 ± 0.05 ^b	0.48 ± 0.02 ^b	0.38 ± 0.06 ^a
Adhesiveness	-558.32 ± 30.00 ^d	-739.02 ± 21.56 ^c	-853.21 ± 43.54 ^b	-932.71 ± 48.09 ^a
Cohesiveness	0.38 ± 0.00 ^b	0.35 ± 0.02 ^b	0.31 ± 0.02 ^a	0.29 ± 0.01 ^a
Chewiness	688.59 ± 21.63 ^d	532.17 ± 19.05 ^c	479.39 ± 34.56 ^b	360.60 ± 30.57 ^a
Gumminess	1080.89 ± 42.71 ^b	758.06 ± 62.72 ^a	753.37 ± 88.52 ^a	643.20 ± 46.44 ^a
Brittleness	2273.96 ± 38.02 ^c	1906.45 ± 85.33 ^{ab}	1976.04 ± 80.85 ^b	1804.02 ± 69.67 ^a
Resilience	0.10 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.00 ^a	0.09 ± 0.01 ^a

¹⁾Aronia powder(1, 3 and 5%) was added based on the total weight of rice powder.

Data were the mean±SD of triplicate experiment.

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

경도(hardness)는 아로니아 분말을 첨가하지 않은 대조군이 가장 높았고, 아로니아 분말 첨가량이 증가할수록 유의적으로 낮아졌다. 이는 설기떡 제조 시에 산수유, 밤, 표고버섯 등의 분말을 첨가량이 증가할수록 경도가 낮아진다는 보고와 일치하는 것으로 부재료의 첨가는 설기떡의 노화속도를 지연시켜 관능적인 특성에도 긍정적인 영향을 줄 것으로 사료된다. 느타리버섯 분말을 첨가하여 설기떡을 제조하고 1~72시간 동안 저장하면서 경도와 노화속도를 측정 한 결과, 느타리분말을 2~5%까지 첨가한 실험군은 대조군에 비해 경도가 감소하였고, 대조군보다 1~2일 정도 노화속도를 지연시킬 수 있음을 확인하였다.

탄력성(springiness)은 대조군이 0.67로 가장 높은 값을 나타내었고 아로니아 첨가량이 증가할수록 감소하는 경향을 나타냈다. 부착성(adhesiveness)은 대조군이 -558.32로 가장 높은 값을 나타내었고 아로니아 첨가량이 증가할수록 감소하는 경향을 나타냈다. 응집성(cohesiveness)은 대조군과 아로니아 분말 1% 첨가군에서는 통계적인 유의성은 관찰되지 않았으나, 아로니아 분말 첨가량이 3%~5%로 증가함에 따라 다소 감소하는 경향을 나타냈다. 씹힘성(chewiness)은 아로니아 분말을 첨가하지 않은 대조군이 가장 높았고, 아로니아 분말 첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하였다. 검성(gumminess)은 대조군이 1080.89로 가장 높은 값을 나타내었고 아로니아 첨가량이 증가할수록 감소하는 경향을 나타냈으며, 아로니아 분말을 5% 첨가하여 제조한 설기떡에서는 대조군에 비해 약 0.6배가 감소한 643.20를 나타냈다. 깨짐성(brittleness)도 대조군에서 가장 높은 값을 나타냈으며, 아로니아 분말 첨가량이 증가할수록 감소하는 경향을 나타냈다. 탄성(resilience)은 대조군과 아로니아 첨가량을 달리하여 제조한 실험군 사이에서 통계적으로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다.

(4) 주사전자현미경 이미지 분석

아로니아 분말을 첨가하여 제조한 설기떡의 내부 미세구조는 Fig. 1과 같다. 대조군은 기공 크기가 대체로 작고 기공의 비교적 적게 확인되었다. 아로니아 분말의 첨가량이 증가할수록 기공의 숫자가 증가하고 큰 기공이 군데군데 보이기 시작하고 거친 상태의 고르지 못한 기공을 관찰할 수 있었다. 아로니아 분말을 5% 첨가하여 제조한 설기떡에서는 대조군에 비해 기공이 크고 넓으며 기공의 숫자가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 떡 내부의 쌀전분 분자와 아로니아 분말 입자의 결합에 의해 엉킴 현상에 의한 것으로 조직감 측정에서 경도, 씹힘성, 부착성이 감소한 결과와 연관성이 있는 것으로 사료된다. 통밀가루나 생고구마 분말을 첨가하여 제조한 설기떡에서도 이들 부재료의 첨가량이 증가함에 따라 기공의 크기가 커지고 거친 형태의 기공을 관찰했다고 보고하고 있어 본 연구결과와 유사한 경향을 나타냈다.

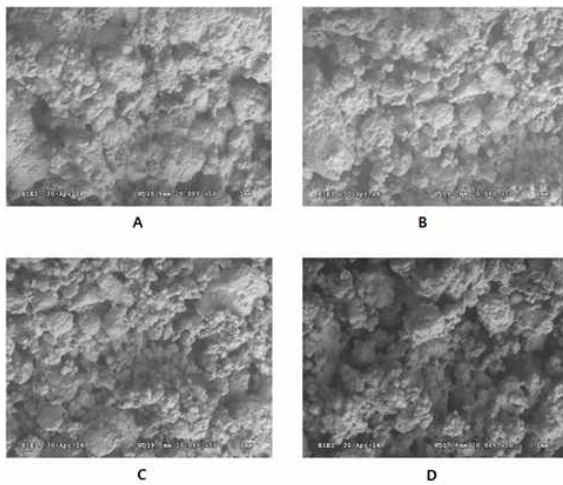


Fig. 1. Scanning electron microscope (SEM) images of *Sulgidduk* partially-substituted with different amount of aronia powder (A : control, B : 1% aronia powder added *Sulgidduk*, C : 3% aronia powder added *Sulgidduk*, D : 5% aronia powder added *Sulgidduk*)

(5) 색도 측정

아로니아 분말 첨가 설기떡의 색도 측정 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Hunter's color values of *Sulgidduk* prepared with different amount of aronia powder

Aronia powder ¹⁾ (%)	L	a	b
0	86.19 ± 0.55 ^c	-1.20 ± 0.03 ^a	7.86 ± 0.15 ^c
1	66.35 ± 0.47 ^b	7.18 ± 0.19 ^b	6.30 ± 0.14 ^b
3	53.89 ± 0.69 ^a	11.49 ± 0.34 ^c	4.95 ± 0.10 ^a
5	52.60 ± 0.52 ^a	13.30 ± 0.27 ^d	4.54 ± 0.07 ^a

¹⁾Aronia powder(1, 3 and 5%) was added based on the total weight of rice powder.

Data were the mean±SD of triplicate experiment.

^{a-d}Means with the different superscript within the same column are significantly different at

$p < 0.05$.

설기떡의 밝은 정도를 나타내는 L값은 아로니아 분말을 첨가하지 않은 대조군이 86.19로 가장 높게 나타났으며, 아로니아 분말 첨가량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며 아로니아 분말을 5% 첨가한 설기떡에서는 52.60으로 가장 낮게 나타났다($p < 0.05$). 아로니아 분말의 첨가량이 증가할수록 명도가 감소하는 것은 아로니아 분말에 함유되어 있는 색소에 의한 것으로 사료된다. 설기떡에 클로렐라, 자색양파 등 색깔을 지닌 부재료를 첨가하여 제조한 설기떡에서도 이들 부재료의 첨가량이 증가함에 따라 명도가 낮아짐을 확인하였다.

적색도를 나타내는 a값은 아로니아 분말을 첨가하지 않은 설기떡에서는 -1.20으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 아로니아 분말 첨가량이 1%에서 3%로 증가함에 따라 a 값도 7.18에서 11.49로 증가하였다. 아로니아 분말을 5% 첨가하여 제조한 설기떡은 대조군에 비해 a 값이 13.30으로 가장 진한 붉은색을 나타냈다($p < 0.05$). 이는 아로니아에 함유된 안토시아닌에 의한 것으로 아로니아 첨가량에 비례하여 설기떡이 점점 짙은 자주색으로 변화된 결과로 사료된다. 황색도를 나타내는 b값은 아로니아 분말을 첨가하지 않고 제조한 설기떡에서 7.86으로 가장 높았고, 아로니아 분말의 첨가량이 증가함에 따라 낮은 수치를 나타냈다.

(6) 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량 분석

아로니아 분말 첨가 설기떡의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량 분석 결과는 Table 6과 같다.

Table 6. Total polyphenol, flavonoid and anthocyanin contents of *Sulgidduk* prepared with different amount of aronia powder

Aronia powder ¹⁾ (%)	Total polyphenol (mg GAE ²⁾ /g)	Total flavonoid (mg QE ³⁾ /g)	Total anthocyanin (mg C3G ⁴⁾ /100 g)
0	4.55 ± 0.66 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.02 ^a
1	23.02 ± 0.83 ^b	0.01 ± 0.00 ^b	11.7 ± 0.13 ^{ab}
3	54.36 ± 0.43 ^c	0.02 ± 0.00 ^c	30.9 ± 0.11 ^b
5	90.91 ± 1.94 ^d	0.04 ± 0.00 ^d	58.4 ± 0.46 ^c

¹⁾Aronia powder(1, 3 and 5%) was added based on the total weight of rice powder.

²⁾GAE=gallic acid equivalent

³⁾QE=quercetin equivalent

⁴⁾C3G=cyanidin-3-glucoside equivalent

Data were the mean±SD of triplicate experiment.

^{a-d}Means with the different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

아로니아 분말을 첨가하지 않고 제조한 설기떡의 총 폴리페놀 함량은 중량 1 g 당 gallic acid 를 기준으로 4.55 mg 이었으나 아로니아 분말의 첨가량에 비례하여 설기떡에 함유된 총 폴리페놀 함량이 증가하였다. 즉, 아로니아 분말을 1, 3 및 5% 첨가한 설기떡에서 총 폴리페놀 함량은 각각 23.02, 54.36 및 90.91 mg으로 이는 아로니아 분말을 첨가하지 않은 설기떡에 비해 총 폴리페놀 함량이 5.1~20.0 배까지 증가하였다.

아로니아 분말을 첨가하지 않고 제조한 설기떡의 총 플라보노이드 함량은 중량 1 g 당 quercetin을 기준으로 검출되지 아니하였으나 아로니아 분말의 첨가량에 비례하여 설기떡에 함유된 총 플라보노이드 함량이 약간 증가함을 확인하였다. 즉, 아로니아 분말을 1, 3 및 5% 첨가한 설기떡에서 총 플라보노이드 함량은 각각 0.01, 0.02 및 0.04 mg으로 확인되었다.

아로니아 분말을 첨가하지 않고 제조한 설기떡에서는 안토시아닌이 검출되지 아니하였으나, 아로니아 분말을 첨가하여 제조한 설기떡에서는 아로니아 분말의 첨가량에 비례하여 총 안토시아닌 함량이 증가하였다. 총 안토시아닌 함량은 중량 100 g 당 cyanidin-3-glucoside를 기준으로 아로니아 분말을 1, 3 및 5% 첨가한 설기떡에서 총 안토시아닌 함량은 각각 11.7, 30.9 및 58.4 mg으로 나타났다. 선행연구에서 아로니아에 함유되어 있는 생리활성 물질들을 HPLC 로 분석한 결과 chlorogenic acid, vanillic acid, rutin hydrate와 같은 폴리페놀 화합물과 cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-arabinoside, cyanidin-3-O-xylose 등과 같은 안토시아닌 화합물이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 따라서 이들 물질들을 포함하고 있는 아로니아 함유 설기떡에서도 폴리페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌과 같은 성분이 나타난 것으로 사료된다.

(7) 항산화활성 측정

아로니아 분말을 첨가하여 제조한 설기떡의 항산화활성을 DPPH 라디칼 소거능으로 측정하였고 그 결과는 Table 7에 나타내었다.

Table 7. DPPH and ABTS radical scavenging activity of *Sulgidduk* prepared with different amount of aronia powder

Aronia powder ¹⁾ (%)	DPPH radical scavenging activity (%)	ABTS radical scavenging activity (%)
0	5.60 ± 0.64 ^a	2.75 ± 0.32 ^a
1	18.55 ± 0.83 ^b	14.88 ± 2.86 ^b
3	40.25 ± 0.97 ^c	29.72 ± 1.26 ^c
5	56.06 ± 0.76 ^d	53.68 ± 1.67 ^d

¹⁾Aronia powder(1, 3 and 5%) was added based on the total weight of rice powder. Data were the mean±SD of triplicate experiment.

^{a-d}Means with the different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

DPPH radical 소거활성은 아로니아 분말을 첨가하지 않은 대조군에서 5.60%로 나타났고, 아로니아 분말을 1%, 3% 및 5%까지 첨가한 설기떡에서는 DPPH radical 소거활성이 각각 18.55%, 40.25% 및 56.06로 증가하였다.

ABTS radical 소거활성도 아로니아 분말 첨가량이 증가함에 따라 높게 나타났으며, DPPH radical 소거활성과 비슷한 양상을 보였다. 아로니아 분말을 첨가하지 않은 설기떡의 ABTS radical 소거활성은 2.75%로 가장 낮은 값을 나타내었고, 아로니아 분말을 1%와 3%로 첨가하여 제조한 설기떡에서는 각각 14.88%와 29.72%의 ABTS radical 억제활성을 나타냈다. 아로니아 분말 함량이 5%인 설기떡에서는 53.68%의 ABTS radical 소거활성을 보여 아로니아 분말의 첨가량에 비례하여 ABTS radical 소거활성이 증가함을 확인하였다.

DPPH와 ABTS radical 소거활성을 통해 살펴본 아로니아 함유 설기떡의 항산화 활성은 아로니아 분말 함량이 증가할수록 높게 나타나며 설기떡에 함유된 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다. 아로니아에 함유된 다양한 폴리페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 화합물은 항산화 활성을 증가시키고 암과 염증의 억제작용에 효능이 있는 것으로 보고되고 있다.

(8) 저장기간에 따른 일반세균 및 대장균 변화 측정

아로니아 분말 첨가량을 달리하여 제조한 설기떡을 실온에서 4일간 저장하면서 전반적인 미생물 오염도를 확인하기 위해서 일반세균 수(aerobic colony count)를 측정하였고 그 결과는 Table 8과 같다.

Table 8. Changes of total bacteria count in *Sulgidduk* prepared with different amount of aronia powder during the storage at room temperature (CFU/g)

Aronia powder ¹⁾ (%)	Storage time (hr)				
	0.5	24	48	72	96
0	0 ^A	4.7 ± 10 ^{2bB}	6.3 ± 10 ^{3cC}	5.9 ± 10 ^{4cD}	6.4 ± 10 ^{5cE}
1	0 ^A	2.9 ± 10 ^{2bB}	6.1 ± 10 ^{3cC}	6.1 ± 10 ^{4cD}	6.2 ± 10 ^{5cE}
3	0 ^A	0 ^{aA}	3.4 ± 10 ^{2bB}	2.5 ± 10 ^{3bC}	5.0 ± 10 ^{4bD}
5	0 ^A	0 ^{aA}	0 ^{aA}	5.5 ± 10 ^{2aB}	6.3 ± 10 ^{3aC}

¹⁾Aronia powder(1, 3 and 5%) was added based on the total weight of rice powder.

Data were the mean±SD of triplicate experiment.

^{a-c}Means with the different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

^{A-E}Means with the different superscript within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

설기떡 제조 30분 후에 일반세균을 측정된 결과 대조군과 실험군 모두에서 검출되지 않았다. 이는 설기떡이 제조가 고온에서 찌는 과정을 거치기 때문으로 사료된다. 그러나 24시간이 경과 후에는 대조군에서 4.7×10^2 CFU의 일반세균이 검출되었고 아로니아 분말을 1% 첨가하여 제조한 설기떡에서는 2.9×10^2 CFU의 일반세균이 검출된 반면에 아로니아 분말을 3%와 5% 첨가하여 제조한 설기떡에서는 일반세균이 검출되지 않았다. 아로니아 분말을 3% 첨가하여 제조한 설기떡에서는 48시간부터 일반세균이 검출되기 시작하였고, 아로니아 분말 5% 첨가군에서는 72시간이 경과한 후에 일반세균이 검출되었다. 저장 4일 째에는 대조군과 모든 실험군에서 일반세균이 검출되었으나, 검출된 일반세균의 숫자는 첨가한 아로니아 분말 함량에 반비례하는 것으로 나타났다. 아로니아에는 일반세균의 성장을 억제하는 항균물질이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구결과는 쌀가루만으로 제조한 설기떡에 비해 복분자, 녹차, 알로에 등과 같은 부재료를 첨가한 경우 일반세균의 수가 적게 검출되었다는 선행연구와 유사한 경향을 나타냈다.

아로니아 분말 첨가량을 달리하여 제조한 설기떡을 실온에서 4일간 저장하면서 전반적인 미생물 오염도를 확인하기 위해서 측정된 대장균 수(*Esherichia coli* count)를 측정하였고 그 결과는 Table 9와 같다.

Table 9. Changes of *Esherichia coli* count in *Sulgidduk* prepared with different amount of aronia powder during the storage at room temperature (CFU/g)

Aronia powder ¹⁾ (%)	Storage time (hr)				
	0.5	24	48	72	96
0	0 ^A	1.2 ± 10^{2bb}	7.3 ± 10^{2bcC}	4.5 ± 10^{3cD}	6.1 ± 10^{4dE}
1	0 ^A	0 ^{aA}	2.7 ± 10^{2bB}	9.2 ± 10^{2bC}	3.2 ± 10^{3cD}
3	0 ^A	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	4.1 ± 10^{2bB}
5	0 ^A	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	1.5 ± 10^{2aB}

¹⁾Aronia powder(1, 3 and 5%) was added based on the total weight of rice powder.

Data were the mean±SD of triplicate experiment.

^{a-d}Means with the different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

^{A-E}Means with the different superscript within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

설기떡을 제조한 직후 대장균군(coliform)은 총 세균에서와 같이 대조군과 실험군 모두에서 검출되지 않았다. 그러나 저장 24시간 후 대조군에서는 1.2×10^2 CFU의 대장균군이 검출되기

시작하여 저장 96시간 후에는 6.1×10^4 CFU 까지 검출되었다. 아로니아 분말을 1% 첨가하여 제조한 설기떡에서는 저장 24시간 동안 대장균군이 검출되지 않았고, 저장 후 48시간에 2.7×10^2 CFU의 대장균군이 검출되었다. 반면에 아로니아 분말을 3%와 5% 첨가하여 제조한 설기떡에서는 저장 72시간까지도 대장균군이 검출되지 않았다. 아로니아 분말을 3%와 5% 첨가하여 제조한 설기떡에서는 저장 96시간부터 대장균군이 검출되었으나 검출된 대장균군의 숫자는 첨가한 아로니아 분말 함량에 반비례하는 것으로 나타났다. 아로니아 함량이 높은 설기떡에서는 대장균군의 증식이 유의적으로 억제됨을 확인하였다.

(9) 관능평가

아로니아 분말을 첨가하여 제조한 설기떡의 색, 맛, 질감, 향 및 전반적인 만족도에 대한 관능검사 결과는 Table 10과 같다.

Table 10. Sensory intensity results of *Sulgidduk* prepared with different amount of aronia powder

Characteristics	Aronia powder ¹⁾ (%)			
	0	1	3	5
Color	5.85 ± 1.23 ^b	4.15 ± 1.76 ^a	5.80 ± 1.67 ^b	7.00 ± 1.62 ^c
Taste	6.15 ± 1.73 ^a	6.01 ± 1.76 ^a	5.95 ± 1.70 ^a	6.45 ± 1.10 ^b
Flavor	5.95 ± 1.79 ^a	5.80 ± 1.64 ^a	6.15 ± 1.46 ^a	6.25 ± 1.25 ^b
Texture	6.00 ± 1.78 ^a	5.90 ± 2.05 ^a	6.15 ± 2.08 ^a	6.05 ± 2.37 ^a
Overall acceptance	5.85 ± 2.08 ^a	5.90 ± 1.89 ^a	5.95 ± 1.70 ^a	6.55 ± 2.09 ^b

¹⁾Aronia powder(1, 3 and 5%) was added based on the total weight of rice powder.

Data were the mean±SD of triplicate experiment.

^{a-c}Means with the different superscript within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

색에 대한 선호도 측정 결과, 대조군에 비해 아로니아 분말 첨가량이 증가할수록 높은 값을 나타냈다. 아로니아 분말을 1% 첨가하여 제조한 설기떡에서는 9점 만족도를 기준으로 대조군에 비해 낮은 4.15를 나타냈으나 아로니아 분말을 3% 첨가한 설기떡에서는 5.80으로 대조군(5.85)과 비슷한 점수를 나타냈다. 아로니아 분말을 5% 첨가한 설기떡에서는 7.00으로 가장 높은 값을 나타냈다. 이는 아로니아를 쌀가루 중량의 1% 정도로 소량 첨가하였을 때는 백색의 설기떡보다 선호도가 낮았으나 아로니아 분말을 3~5% 첨가한 설기떡은 아로니아의 고유한

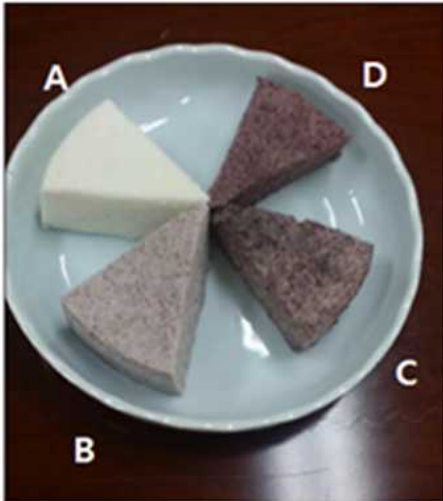


Fig. 2. *Sulgidduk* partially substituted with different amount of aronia powder (A : control, B : 1% aronia powder added *Sulgidduk*, C : 3% aronia powder added *Sulgidduk*, D : 5% aronia powder added *Sulgidduk*)

색소가 설기떡 색깔에 긍정적인 영향을 주어 선호도가 높아진 것으로 사료된다. 맛의 경우는 아로니아 분말을 1~3% 첨가한 설기떡은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았으나($p < 0.05$), 아로니아 분말을 5% 첨가한 설기떡에서는 6.45점으로 선호도가 높게 나타났다. 향은 아로니아 분말을 5% 첨가한 설기떡이 6.45점으로 대조군에 비해 높은 선호도 점수를 보였다. 질감(쫄득 거리는 정도)은 정도는 대조군과 아로니아 분말 첨가군 사이에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 전반적인 선호도는 대조군과 아로니아 분말 1%와 3% 첨가군에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 아로니아 분말 5% 첨가군에서 6.55로 가장 높은 점수를 보였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 설기떡에 아로니아 분말을 첨가할 때는 쌀가루 중량의 5% 수준에서 첨가하는 것이 색, 맛, 향 및 전반적인 만족도를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

11. 아로니아 함유 기능성 잼 제조

가. 실험 방법

(1) 실험재료

본 연구에 사용한 아로니아는 2012년 8월말에 경북 영천의 아로니아 농장에서 수확한 것을 직접 구입하였다. 백설탕(CJ 제일제당), 프락토올리고당(CJ 제일제당), 자일리톨(이든타운 F&B), 에리스리톨(삼양제넥스), 펙틴(남영상사), 소금(CJ 제일제당)은 시판품을 구입하여 사용하였다.

(2) 아로니아잼 제조

잼 제조에 사용한 아로니아의 당도는 7.8, pH는 4.5로 나타났다. 아로니아 자체로도 산성조건이 형성되었으므로 구연산을 별도로 첨가하지 않고 잼을 제조하였다. 잼 제조시 첨가할 설탕 대체 물질로 설탕에 비해 칼로리가 적고 현재 식품산업에서 널리 이용되고 있는 올리고당, 자일리톨 및 에리스리톨을 선정하였다. 아로니아를 첨가한 잼은 여러 차례 예비실험과 선행연구

(Kim 등 2012; Na 등 2012) 등을 참고하여 Table 1과 같은 배합비로 제조하였다.

Table 1. Formular for aronia jam replaced sucrose with different sugar substances

	Sucrose	Oligosaccharides	Xylitol	Erythrytol
Aronia fruit (g)	600	600	600	600
Sugar (g)	300	0	0	0
Oligosaccharide (g)	0	300	0	0
Xylitol (g)	0	0	300	0
Erythritol (g)	0	0	0	300
Pectin (g)	9	9	9	9

깨끗이 세척한 아로니아를 food processor(Phillips Electronics, Seoul, Korea)를 이용하여 고속에서 3분간 3회에 걸쳐 곱게 마쇄한 후, 잼 제조용 시료로 사용하였다. 마쇄한 아로니아를 스테인레스 냄비에 넣고 센불에서 10분간 가열하였다. 약 50% 정도의 수분이 증발한 후에 설탕 및 설탕 대체 당류를 3회에 나누어 넣으면서 중불에서 약 15분간 나무주걱으로 저어주었다. 소량의 아로니아 주스에 용해시킨 펙틴을 첨가하고 약불에서 5분간 가열하였다. 잼을 제조하는데 걸린 시간은 약 30분이 소요되었다. 굴절당도계를 이용하여 65 °Brix가 되면 잼이 완성된 것으로 하였다. 제조한 잼을 식힌 후 미리 소독한 락앤락 용기에 담아 이후의 실험에 사용하였다.

(3) 수분 함량 측정

아로니아잼의 수분함량은 잼의 중심부를 취하여 AOAC 방법(1990)으로 정량하였다.

(4) pH, 산도 및 당도 측정

당류의 종류를 달리하여 제조한 아로니아잼의 pH 측정은 5 g의 잼에 10배의 증류수를 넣고 Vortex mixer(Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)로 교반한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리(Mega 17R, Hanil Co., Incheon, Korea)하고 상등액을 취하여 pH meter(420 Benchtop, Orion Research, Beverly, MA, USA)로 측정하였다. 산도는 AOAC 방법(1995)에 따라 원심분리한 상등액 10 mL에 pH meter 전극을 담그고 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 8.3까지 도달하는데 필요한 NaOH 양(mL)을 citric acid 함량으로 환산하여 나타내었다.

당도는 시료를 증류수로 5배 희석하여 균질화 하고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 당도계(PR-201a, Atago Co., Tokyo, Japan)로 측정하였다.

(5) 아로니아잼의 퍼짐성 측정

아로니아잼의 퍼짐성은 스프레드판(유리판) 중심부에 상하부가 개방된 직경 9.6 cm의 원통관을 장착한 뒤, 시료 300 g을 원통관에 넣어 원통관을 바로 위로 빼는 순간부터 2분 경과 후에 퍼져있는 상태를 중심으로부터 8방향으로 동시에 측정된 평균값으로 하였다.

(6) 색도 측정

아로니아잼의 색도측정은 색차계(Chrome Meter CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness) 값으로 표시하였다. 각 시료당 3회 반복 측정하여 그 평균값을 나타내었으며, 이때 표준백색판의 L, a, b 값은 각각 97.10, +0.24, +1.75 이었다.

(7) 항산화물질 함량 측정

① 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 발색되는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법에 따라 분석하였다. 아로니아잼 3 g에 12 mL의 증류수를 가하여 40°C에서 5분간 sonication 한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻어 아로니아잼 추출물로 하였다. 아로니아잼 추출물(1 mg/mL) 0.5 mL에 Folin 시액 0.5 mL을 혼합한 뒤 3분간 실온에서 반응시킨 후 2% Na₃CO₃ 1.5 mL을 첨가한 뒤 2시간 동안 암소에서 반응시킨 후, 760 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(6.25~100 µg/mL)의 표준곡선을 통하여 시료 g당 gallic acid equivalent(GAE)로 나타내었다.

② 총 플라보노이드 함량 분석

총 플라보노이드 함량은 Woisky & Salatino (1998)에 따라 분석하였다. 아로니아잼 추출물(1 mg/mL) 1 mL을 취하여 2% aluminium chloride methanolic solution 1 mL을 첨가하여 15분간 실온에서 반응시킨 후 430 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 플라보노이드 함량은 quercetin(6.25~100 µg/mL)의 표준곡선을 통하여 시료 g당 quercetin equivalent(QE)로 나타내었다.

③ 총 안토시아닌 함량 분석

총 안토시아닌 함량은 Giusti와 Wrolstad의 방법(2001)에 의해 분석하였다. 아로니아잼 0.1 g에 0.1% formic acid를 함유한 methanol 5 mL을 넣어 20분간 sonication을 하여 상층액을 따로 모았다. 이 과정을 3회 더 반복하였다. 상층액을 40°C에서 rotary evaporator(EYELA N-1200A, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 추출용매를 이용하여 적절한 농도

로 희석하였다. 시료 100 μL 에 pH 1 완충용액 1,900 μL 와 pH 4.5 완충용액 1,900 μL 를 각각 첨가하여 vortexing 한 후, 520 nm와 700 nm에서 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 안토시아닌은 시료 100 g당 cyanidin-3-glucoside 함량으로 나타내었다.

(8) 항산화활성 측정

① DPPH 라디칼에 대한 전자공여능 측정

아로니아잼 추출물의 전자공여능을 DPPH assay로 측정하였다(Cheung 등 2003). 96-well plate에 ethanol로 40배 희석한 잼 추출물 100 μL 와 0.2 mM DPPH(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 용액 100 μL 를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

② ABTS 라디칼에 대한 전자공여능 측정

아로니아잼 추출물의 전자공여능을 ABTS assay로 측정하였다(Re 등 1999). 증류수에 용해시킨 7 mM ABTS(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) stock solution에 2.45 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 를 혼합하여 알루미늄 호일로 표면을 싸서 약 12시간 동안 실온에서 반응시켰다. 12시간 경과 후, 732 nm에서 흡광도가 0.7 ± 0.03 이 되도록 94% 에탄올로 희석한 용액을 ABTS 라디칼 소거능 측정을 위한 시약으로 사용하였다. 96-well plate에 ethanol로 40배 희석한 잼 추출물 100 μL 와 흡광도를 0.7 ± 0.03 로 조절한 ABTS 용액 100 μL 를 첨가한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. Microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd. San Jose, CA, USA)를 사용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 ABTS 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

(9) 관능검사

당류의 종류를 달리하여 제조한 잼의 관능검사는 영양조리과학을 전공하는 훈련된 대학생 패널 20명을 대상으로 시료의 관능적인 특성에 대하여 평가하도록 하였다. 동일한 분량의 잼을 무작위로 조합된 세자리 난수표로 구분하여 일회용 접시에 담아서 제시하였다. 평가시 사용한 척도는 9점 기호 척도를 이용하였으며, 특성이 좋을수록 높은 점수를 기록하는 방법으로 하였다. 검사항목은 색(color), 맛(taste), 조직감(texture), 향미(flavor), 전반적인 선호도(overall

acceptance)로 하였다.

(10) 통계 분석

모든 결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation)로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS software package(Version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 ANOVA를 이용하여 유의성을 확인한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test를 이용하여 분석하였다.

나. 실험 결과

(1) 아로니아잼의 수분 함량

당류의 종류를 달리하여 제조한 아로니아잼의 수분함량 측정 결과는 Table 2와 같다. 설탕을 첨가하여 제조한 잼의 수분함량은 28.4% 이었고, 올리고당과 자일리톨을 첨가한 잼의 수분함량은 각각 31.6%와 32.3%로 설탕을 첨가하여 제조한 잼에 비해 수분함량이 높게 나타났다. 에리스리톨을 첨가하여 제조한 잼의 수분함량은 29.5%로 설탕을 넣어 제조한 잼과 유사하게 나타났다.

Table 2. Moisture content of aronia jam replaced sucrose with different sugar substances

Sample	Sucrose	Oligosaccharides	Xylitol	Erythritol
Moisture (%)	28.4 ± 0.3 ^{1b}	31.6 ± 0.5 ^a	32.3 ± 0.8 ^a	29.5 ± 0.7 ^b

^{1)a-b}Values with the different superscript within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

설탕 대체 감미료로 제조한 양갱의 수분함량에서도 설탕에 비해 올리고당, 자일리톨, 에리스리톨 및 스테비오시드 등과 같은 대체 감미료로 제조한 양갱의 수분함량이 높게 나타나 본 연구결과와 유사한 경향을 나타냈다. 잼의 보습성에 영향을 미치는 것은 당류의 -OH기와 수분과의 수소결합에 의한 것으로, 당알코올의 일종인 자일리톨과 에리스리톨은 설탕에 비해 -OH기 많아서 이들을 첨가한 제품의 보수력을 높일 수 있을 사료된다. 설탕 대체 감미료의 보수력 차이가 이들 감미료를 첨가하여 제조한 잼의 수분함량에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

(2) pH, 산도 및 당도

잼 제조에 사용한 아로니아 자체의 pH는 4.5 였고, 아로니아잼의 pH와 산도를 측정한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Values of pH, acidity and sugar contents of aronia jam replaced sucrose with different sugar substances

Sample	pH	Total acidity(%)	Sugar contents (°Brix)
Sucrose	4.14 ± 0.1 ^{1)a}	0.94 ± 1.04 ^a	65.2 ± 0.0 ^a
Oligosaccharides	4.13 ± 0.1 ^a	0.97 ± 1.12 ^a	65.3 ± 0.0 ^a
Xylitol	4.18 ± 0.0 ^a	0.95 ± 1.03 ^a	65.1 ± 0.0 ^a
Erythritol	4.12 ± 0.0 ^a	0.92 ± 0.95 ^a	65.3 ± 0.0 ^a

¹⁾Values with the same superscript within the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

설탕을 첨가하여 제조한 아로니아잼의 pH는 4.14로 나타났으며, 설탕대신 올리고당을 첨가한 잼의 pH는 4.13 이었다. 자일리톨과 에리스리톨을 첨가하여 제조한 잼의 pH는 각각 4.18과 4.12로 당류의 종류에 따른 pH의 차이는 통계적으로 유의적인 변화를 나타내지 않았다.

설탕을 첨가하여 제조한 아로니아잼의 산도는 0.94였고, 설탕대신 올리고당을 첨가한 잼의 산도는 0.97로 나타났다. 자일리톨과 에리스리톨을 첨가하여 제조한 잼의 산도는 각각 0.95와 0.92로 당류의 종류에 따른 산도는 통계적으로 유의성 있는 보이지 않았다. 잼 제조에 사용한 아로니아의 산도 5.1과 비교할 때, 각종 당류를 첨가하여 잼을 제조하면 당도가 증가하면서 산도가 감소하는 것을 알 수 있다. 이상의 결과에서 볼 때, 첨가하는 당의 종류에 따른 잼의 총산도의 차이는 관찰되지 않는 것으로 사료된다.

본 실험에 사용된 아로니아 자체의 당도는 14.1 °Brix 였으며, 설탕 및 설탕 대체 당류를 첨가하여 제조한 아로니아잼의 당도 측정 결과는 Table 4와 같다. 설탕을 첨가하여 제조한 아로니아잼의 당도는 65.2 °Brix을 나타냈고, 올리고당을 첨가하여 제조한 잼의 당도는 65.3 °Brix로 나타났으며, 자일리톨 및 에리스리톨을 첨가한 잼의 당도는 각각 65.1 °Brix와 65.3 °Brix를 나타냈다. 감미료의 종류에 따른 아로니아잼의 당도의 차이는 5% 수준에서 유의적인 차이를 나타내지 않았는데 이는 최종 당도가 65 °Brix가 되면 잼이 완성된 것으로 하였고 기 때문으로 사료된다.

(3) 퍼짐성

퍼짐성은 잼의 바름성, 안정성 및 품질유치의 척도가 되며 펙틴함량, 당류의 종류, 수분함량, pH, 산도 등에 따라 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 당류의 종류를 달리하여 제조한 아로니아잼의 퍼짐성은 Table 4와 같다.

Table 4. Spreadness of aronia jam added different amount of aronia jam replaced sucrose with different sugar substances

Sample	Sucrose	Oligosaccharides	Xylitol	Erythritol
Spreadness	7.32 ± 0.19 ^{1)a}	6.93 ± 0.34 ^b	7.35 ± 0.22 ^a	6.34 ± 0.12 ^c

^{1)a-b}Values with the same superscript within the same row are not significantly different at $p < 0.05$.

설탕을 첨가하여 제조한 잼의 퍼짐성이 가장 높았으며, 올리고당과 에리스리톨을 첨가하여 제조한 잼의 퍼짐성이 가장 낮았다. 올리고당은 내부의 수분함유량으로 인해 잼 제조를 위한 가열시간이 길고, 퍼짐성이 감소한다고 보고하고 있다. 에리스리톨은 수분을 흡수하고 보유하는 능력이 낮아 퍼짐성의 감소로 나타난 것으로 사료된다

(4) 색도

설탕 및 설탕 대체 당류를 첨가하여 제조한 아로니아잼의 색도 측정 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Hunter's color values of aronia jam added different amount of aronia jam replaced sucrose with different sugar substances

Sample	L	a	b
Sucrose	20.96 ± 1.57 ^{1)b}	0.32 ± 0.13 ^c	0.21 ± 0.02 ^c
Oligosaccharides	23.82 ± 1.44 ^a	0.60 ± 0.20 ^b	0.32 ± 0.10 ^b
Xylitol	24.19 ± 0.40 ^a	0.43 ± 0.19 ^{bc}	0.34 ± 0.09 ^b
Erythritol	21.29 ± 1.58 ^{ab}	2.03 ± 0.36 ^a	0.80 ± 0.07 ^a

^{1)a-c}Values with the different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

명도를 나타내는 L값은 설탕을 첨가하여 제조한 잼에서 20.96으로 가장 낮게 나타났으며, 올리고당, 자일리톨, 에리스리톨을 첨가하여 제조한 아로니아잼에서 21.29~24.19로 다소 증가하는 경향을 보였다.

적색도를 나타내는 a값은 설탕을 첨가한 아로니아잼에서는 0.32를 나타냈으나 설탕 대신 자일리톨과 올리고당을 첨가한 잼에서는 각각 0.43과 0.60으로 높은 값을 나타냈다. 특히, 에리스리톨을 첨가한 잼에서는 2.03을 나타내 설탕을 첨가한 잼에 비해 통계적으로 유의성 있는 가장 높은 값을 보였다($p < 0.05$). 황색도를 나타내는 b값은 설탕을 첨가한 아로니아잼에서는 0.21로 가장 낮았고, 올리고당과 자일리톨을 첨가한 잼에서는 각각 0.32와 0.34로 다소 높은 수치를 나타냈다. 에리스리톨을 첨가한 잼에서는 0.80으로 다른 실험군에 비해 높은 값을 보였다. 아로니아는 짙은 붉은색의 안토시아닌 색소를 함유하고 있어 잼의 적색도에 기여하며, 당류의 종류에

따라 안토시아닌 색소의 안정성과 분해에 미치는 영향이 다른 것으로 보고되어 있다. 비환원당인 설탕은 갈색화 반응이 더딘 반면에 설탕 대체 당류들은 환원성을 가지고 있어 설탕보다 쉽게 갈색화 반응이 일어나 적색도와 황색도가 높게 나타난 것으로 사료된다.

(5) 항산화물질 함량

아로니아잼의 폴리페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량 분석결과는 Table 6과 같다.

Table 6. Total polyphenol, flavonoid and anthocyanin contents of aronia jam replaced sucrose with different sugar substances

Sample	Total polyphenol (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoid (mg QE ²⁾ /g)	Total anthocyanin (mg C3G ³⁾ /100 g)
Sucrose	1,112.15 ± 5.32 ^{4)c}	651.42 ± 9.37 ^a	232.96 ± 5.20 ^a
Oligosaccharides	1,187.68 ± 6.03 ^b	640.29 ± 9.18 ^{ab}	228.18 ± 3.84 ^a
Xylitol	1,256.15 ± 5.66 ^a	643.36 ± 11.29 ^{ab}	223.40 ± 5.38 ^a
Erythritol	1,008.15 ± 38.94 ^d	623.29 ± 9.70 ^b	216.76 ± 15.02 ^a

¹⁾GAE=gallic acid equivalent

²⁾QE=quercetin equivalent

³⁾C3G=cyanidin-3-glucoside equivalent

^{4)a-b}Values with the different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

설탕 첨가 아로니아잼의 총 폴리페놀 함량(mg gallic acid/g 기준)은 1,112.15 mg 이었으며, 설탕 대신 올리고당과 자일리톨을 첨가하여 제조한 잼에서도 각각 1,187.68 mg과 1,256.15 mg 으로 높게 나타났다. 그러나 에리스리톨을 첨가한 잼에서는 1,008.15 mg으로 다른 실험군에 비해 다소 낮게 나타났다. 아로니아잼의 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 기준으로 중량 1 g 당 설탕을 첨가한 잼에서 651.42 mg, 올리고당과 자일리톨을 첨가한 잼에서는 640.29~643.36 mg으로 나타났다. 에리스리톨을 첨가한 잼에서는 623.29 mg으로 나타나 총 플라보노이드 함량은 잼에 첨가한 당류의 종류에 따라 다소 차이가 있음을 알 수 있었다. 총 안토시아닌 함량의 경우는 cyanidin-3-glucoside를 기준으로 중량 100g 당 설탕을 첨가하여 제조한 아로니아잼에서는 232.96 mg 이었으며, 설탕 대신 올리고당과 자일리톨을 첨가하여 제조한 잼에서는 각각 228.18 mg과 223.40 mg으로 나타났다. 에리스리톨을 첨가한 잼에서도 216.76 mg으로 당류의 종류에 따른 총 안토시아닌 함량 변화는 나타나지 않았다.

(6) 항산화활성 측정

에탄올로 40배 희석한 아로니아잼 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능은 Table 7에 나타내었다.

Table 7. DPPH and ABTS radical scavenging activity (%) of aronia jam replaced sucrose with different sugar substances

Sample	DPPH	ABTS
Sucrose	73.71 ± 0.88 ^{1)a}	69.99 ± 1.70 ^a
Oligosaccharides	74.39 ± 0.89 ^a	69.34 ± 1.37 ^a
Xylitol	74.31 ± 0.47 ^a	69.38 ± 1.57 ^a
Erythritol	73.48 ± 0.34 ^a	66.62 ± 1.50 ^a

¹⁾Values with the same superscript within the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

DPPH radical 소거활성은 대조군과 실험군에서 73.48~74.39%로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다. ABTS radical 소거활성도 DPPH radical 소거활성과 유사한 결과를 나타냈다. ABTS radical 소거활성은 설탕을 첨가한 아로니아 잼에서 69.99%로 비교적 높은 ABTS radical 소거활성을 보였고, 올리고당과 자일리톨을 첨가한 잼에서 각각 69.34와 69.38로 높은 소거활성을 보였다. 에리트리톨을 첨가하여 제조한 잼에서는 66.62%로 다소 낮은 ABTS 소거능을 나타냈으나 통계적으로 유의성 있는 수치는 아니었다.

이상의 결과를 통하여 당의 종류와는 관계없이 아로니아 잼의 DPPH 및 ABTS radical 소거활성은 높은 것으로 확인되었다. 이는 아로니아가 농축된 잼에는 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌 등과 같은 항산화물질의 함량도 매우 높기 때문으로 사료된다.

(7) 관능검사

아로니아에 설탕 및 설탕 대체 당류를 첨가하여 잼을 제조하고 색, 맛, 질감, 향미, 전반적인 선호도에 대한 관능검사 결과는 Table 8과 같다.

Table 8. Sensory intensity results of aronia jam replaced sucrose with different sugar substances

	Sucrose	Oligosaccharides	Xylitol	Erythritol
Color	6.7 ± 1.9 ^{1)a}	6.6 ± 1.6 ^a	6.5 ± 1.7 ^a	5.1 ± 2.3 ^b
Taste	6.3 ± 1.1 ^a	6.1 ± 1.5 ^a	6.4 ± 1.6 ^a	5.1 ± 2.1 ^b

Texture	6.4 ± 1.3 ^a	6.0 ± 1.6 ^a	6.3 ± 1.9 ^a	3.5 ± 1.4 ^b
Flavor	5.7 ± 1.1 ^b	6.4 ± 1.2 ^a	6.5 ± 1.5 ^a	5.2 ± 2.2 ^c
Overall acceptance	6.1 ± 1.8 ^b	5.7 ± 1.1 ^{bc}	6.4 ± 2.1 ^a	4.7 ± 2.0 ^c

^{1) a-c} Values with the different superscript within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

색에 대한 선호도를 측정한 결과, 설탕을 첨가한 잼에서 9점 scale을 기준으로 6.7점으로 가장 높은 값을 보였고, 에리스리톨을 첨가한 잼에서는 5.1점으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 맛의 경우는 자일리톨을 첨가한 잼에서 6.4점으로 가장 높았고, 설탕(6.3), 올리고당(6.1) 및 에리스리톨(5.1)을 첨가한 잼의 순으로 낮게 나타났다.

질감의 경우는 설탕과 자일리톨 첨가군에서 높았고, 에리스리톨을 첨가한 잼에서 가장 낮게 나타났다. 이는 에리스리톨은 다른 당류에 비해 흡습성이 높고, 설탕처럼 끈적거리는 성질이 없어서, 시간이 지남에 따라 잼에 함유되어 있는 수분을 흡수하여 잼 특유의 끈적이는 특성이 사라지고 서걱거리는 질감이 나타나기 때문인 것으로 사료된다. 향미는 설탕을 첨가한 잼에서 5.7점으로 나타났으며, 올리고당과 자일리톨을 첨가한 잼에서 각각 6.4점과 6.5점을 보였다. 전반적인 선호도는 자일리톨 > 설탕 > 올리고당 > 에리스리톨을 첨가한 잼의 순으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 자일리톨을 첨가한 잼은 설탕 첨가한 잼과 함께 비교적 높은 관능적인 선호도를 갖는 것으로 나타났으며, 이는 향후 설탕을 대체하는 잼의 주요 당류로의 이용가능성을 시사하고 있다. 반면에, 에리스리톨은 색, 맛, 질감, 향미, 전반적인 만족도 측면에서 선호도가 낮은 것으로 나타나 설탕을 대체할 수 있는 당류로는 부적합한 것으로 사료된다.

제 2절 : 아로니아의 면역조절활성 및 작용기전 해석

(제1협동 : 건양대학교 유 영춘)

1. 아로니아 추출물의 선천면역 조절작용

가. 실험 방법

(1) 마우스 대식세포에 대한 아로니아 추출물의 활성화 유도

- Balb/c 마우스의 복강 대식세포 혹은 골수에서 분리한 대식세포(BMDM)에 시료를 처리하여 사이토카인 분비능과 surface marker의 변화 등을 통해 활성화 유도 효과를 측정함. 사이토카인 분비는 TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ 등 ELISA kit과 RT-PCR을 통해 측정하며, 세포 표면분자의 발현은 FACS를 통해 분석함

(2) Mouse 비장세포에 대한 아로니아 추출물의 활성화 유도

- 마우스(Balb/c) 비장세포에 T 및 B 세포 mitogen인 ConA 혹은 LPS를 처리하여 활성화를 유도하는 모델에서, 아로니아의 잎 혹은 열매의 열수 및 냉수 추출물을 함께 처리함으로써 림프구의 활성화에 대한 아로니아 추출물의 영향을 측정함.
- 활성화 유도는 세포증식반응에 미치는 영향과, T세포가 분비하는 사이토카인의 정량을 통해 분석함.

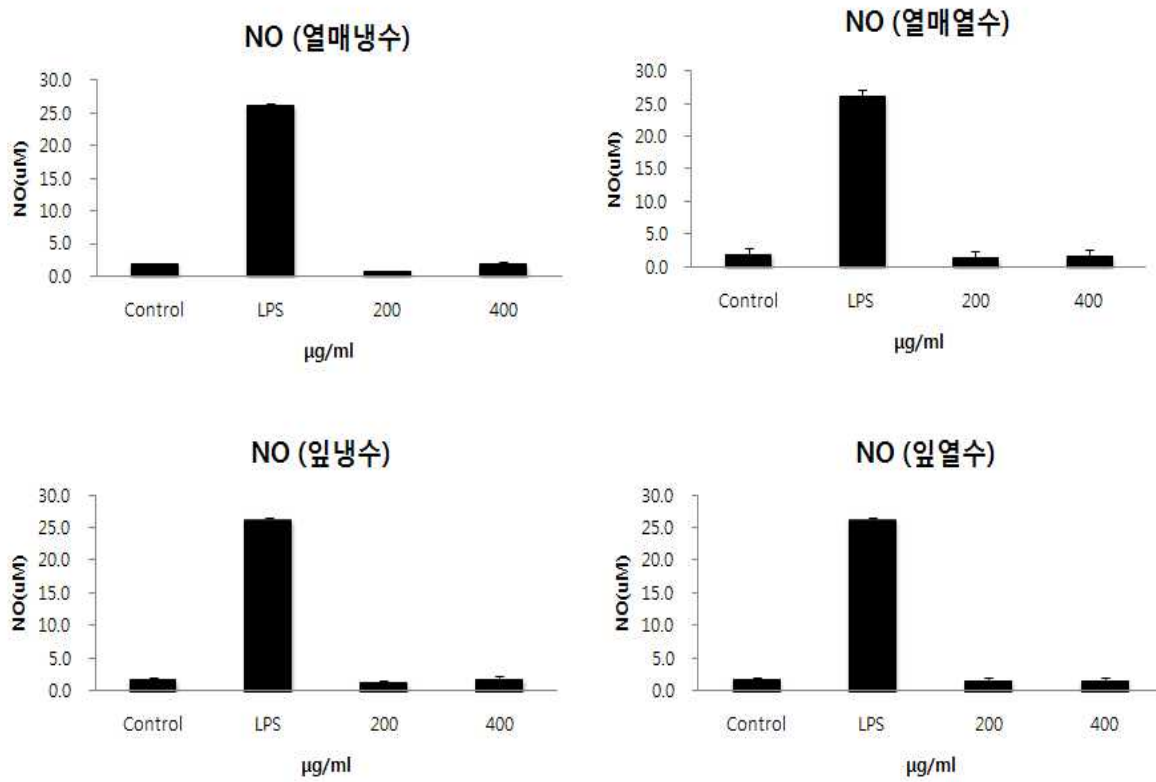
(3) 아로니아 추출물 투여에 의한 면역세포 활성화 측정

- 마우스(Balb/c)를 7주령부터 아로니아 추출물의 각 농도 별(500 μ g, 1 mg, 2 mg) 실험군의 경구투여를 실시하여 마우스의 PBMC 활성 반응을 분석하며, 마우스의 Spleen을 primary culture하여 Splenocyte를 아로니아 추출물을 처리 후 LPS와 Concanavalin A를 통한 발현을 UV-spectrometer 분석. 그리고 혈액 내 IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ 등의 발현 양 ELISA kit를 이용하여 분석함. 또한 각 사이토카인에 대한 mRNA를 RT-PCR을 통해 조사함
- 사이토카인 분비에 있어서는 Th1/Th2 반응의 균형을 분석하여, 면역조절에 있어서 세포성 면역 또는 체액성 면역이 강하게 유도되는 것을 측정함
- 마우스(Balb/c) 7주령을 구입 후 1주 적응 기간 후 8주령부터 아로니아 추출물에 대한 마우스의 대조군과 아로니아 추출물의 각 농도 별(500 μ g, 1 mg, 2 mg) 경구투여를 실시하여 실험 기간 내 이들 동물의 증체량과 사료효율, mouse 혈액 성분 내 IgA와 IgG의 증가량을 분석함
- 점막면역 조절의 관점에서 면역관련세포의 활성화를 측정함. Payer's patch 세포와 비장세포에 대한 mitogenic response 및 사이토카인 분비 기능을 측정함

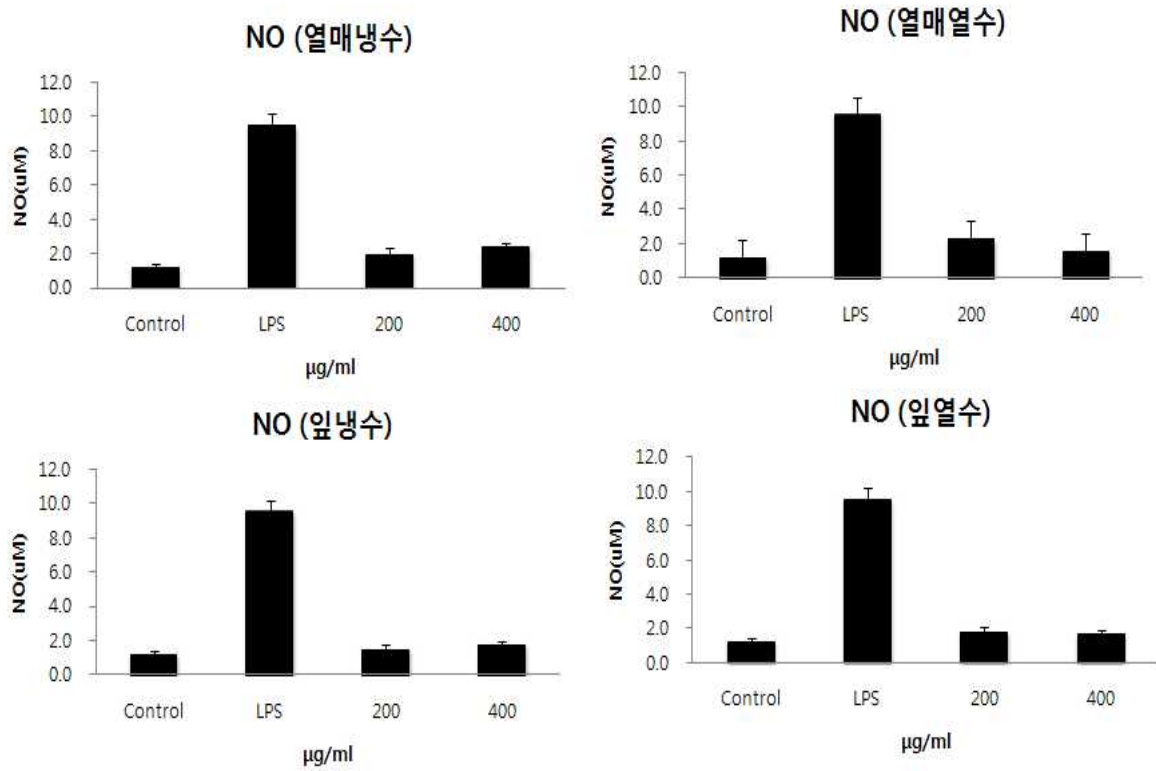
나. 실험 결과

1) 아로니아 추출물의 대식세포 활성화 유도

- 아로니아의 열매 및 잎을 냉수 혹은 열수에 의해 추출한 추출물을 이용하여, C57BL/6 마우스의 골수에서 분화시킨 골수유래 대식세포(BMDM; bone marrow-derived macrophage)와 복강 대식세포(PM; peritoneal macrophage)에 대한 활성화 유도효과를 측정하였다. 아로니아 추출물은 대식세포에 대해 500 mg/ml의 농도까지는 독성을 나타내지 않았으며(결과 미제시), 대식세포에 대해 각각의 추출물을 200 및 400 mg/ml의 농도로 24시간 처리하였으며, 양성 대조군으로 LPS(2 mg/ml)를 사용하였다. 각 추출물로 대식세포를 처리한 후, 세포배양액 중에 분비된 nitric oxide(NO)의 양을 측정하여 활성화 여부를 판정하였다. 그 결과 아로니아 열매 및 잎 추출물은 BMDM 및 PM에 대해 NO분비를 촉진하는 활성화 효과가 없는 것으로 나타났다.



<그림> BMDM에 대한 아로니아 추출물의 NO분비유도 효과

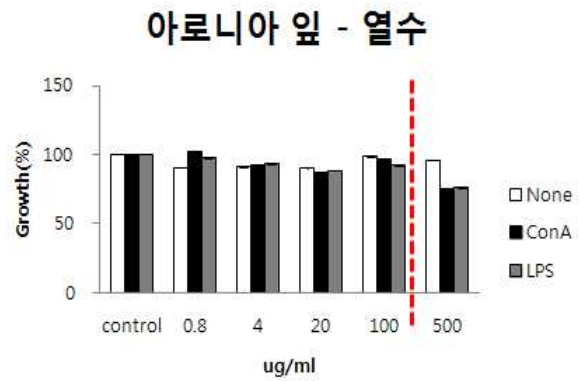
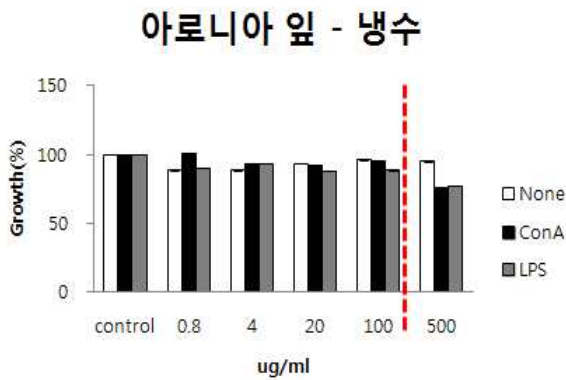
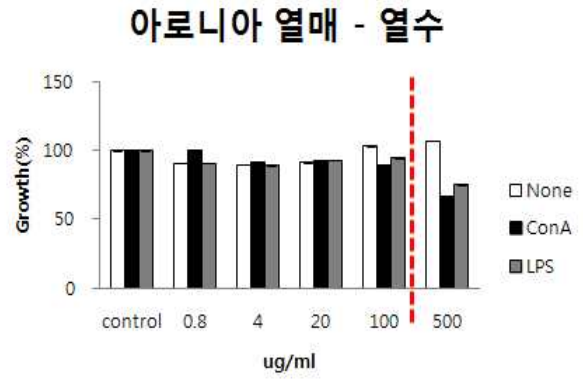
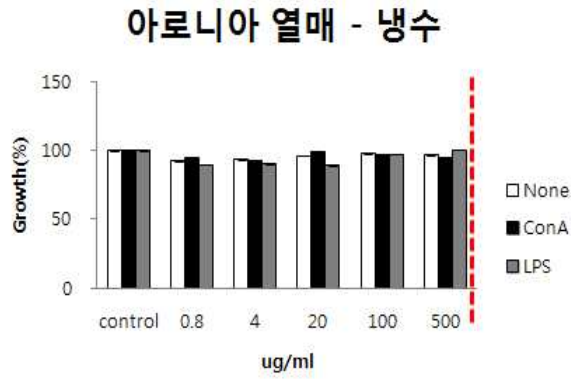


<그림> PM에 대한 아로니아 추출물의 NO분비유도 효과

- 이상의 결과로부터 아로니아의 잎 및 열매를 열수 혹은 냉수로 추출한 추출물은 대식세포를 자극하여 활성화를 유도하는 활성은 갖지 않는 것으로 판단되었음.

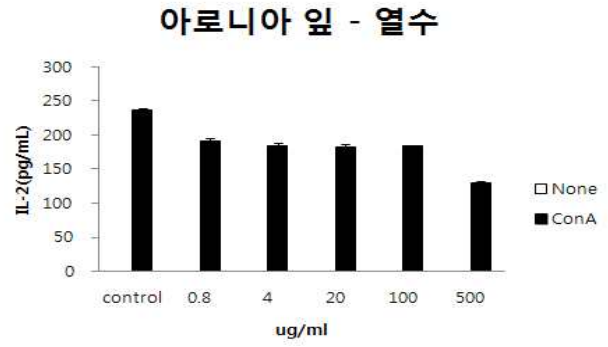
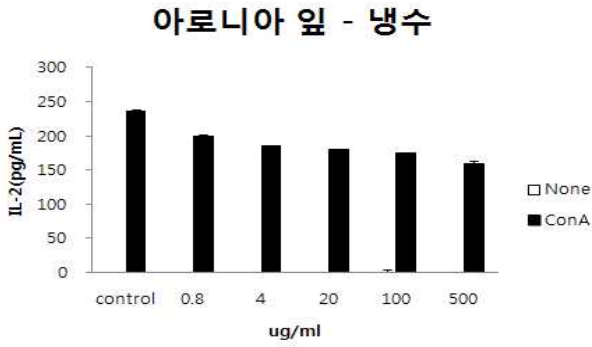
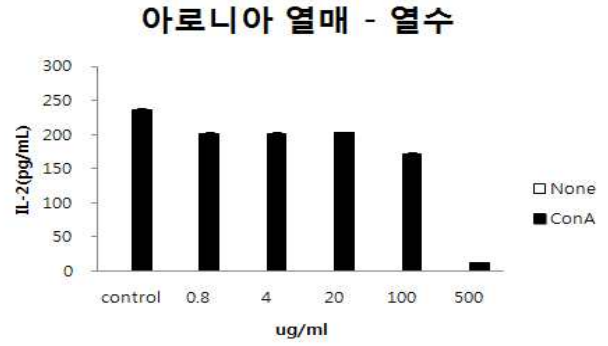
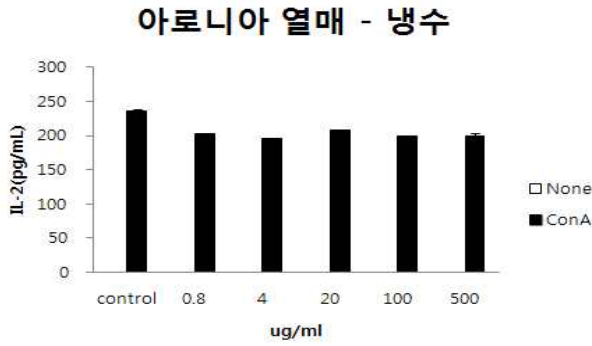
2) 아로니아 추출물에 의한 T림프구 기능조절효과

- 림프구에 대한 아로니아 추출물의 기능조절 효과를 측정하기 위하여, 마우스(Balb/c) 비장세포에 T세포와 B세포의 유사분열을 촉진하는 mitogen인 ConA와 LPS를 처리하고, 여기에 아로니아 추출물을 함께 배양하였다. 먼저 세포독성을 평가하기 위하여 MTT법에 의해 세포증식반응을 측정하였다. 그 결과 아로니아 열매 냉수 추출물은 500 mg/ml까지 세포독성을 나타내지 않았으며, 나머지 아로니아 추출물은 모두 100 mg/ml의 농도까지 안전한 것으로 확인되었다.

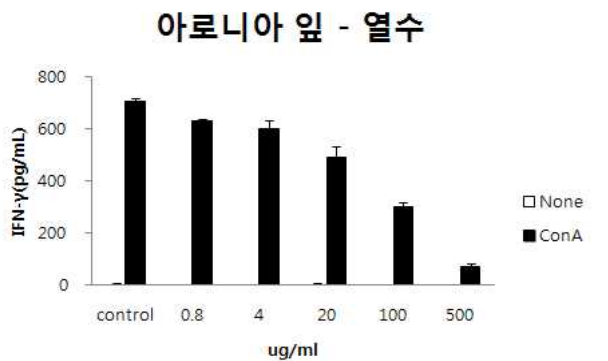
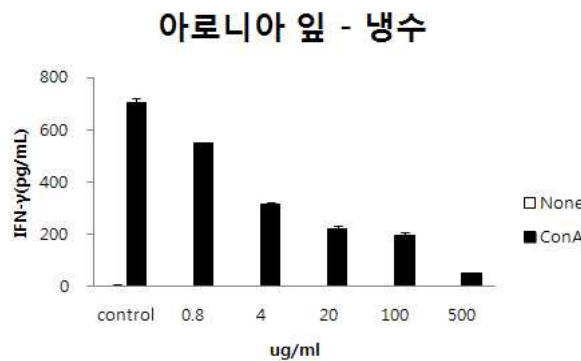
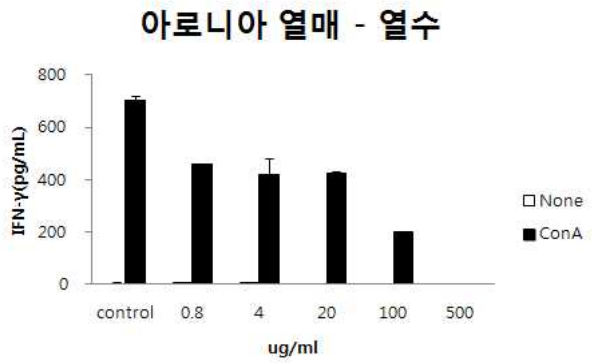
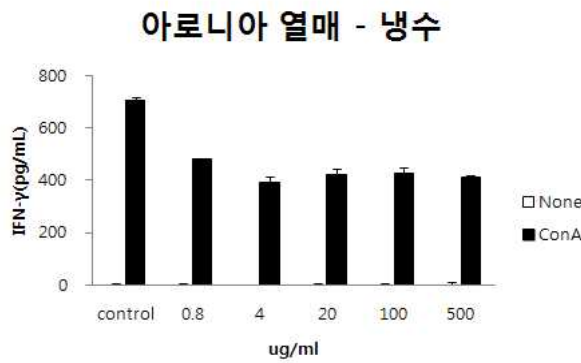


<그림> 비장세포에 대한 아로니아 추출물의 세포독성

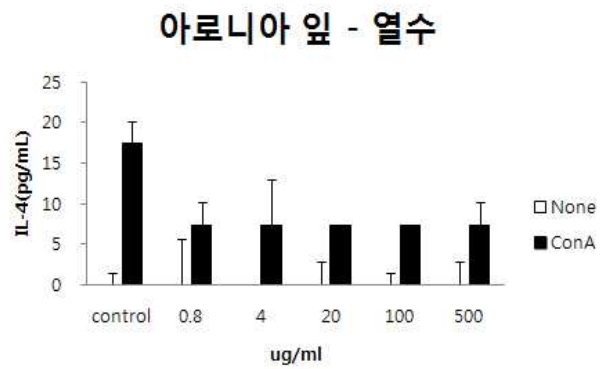
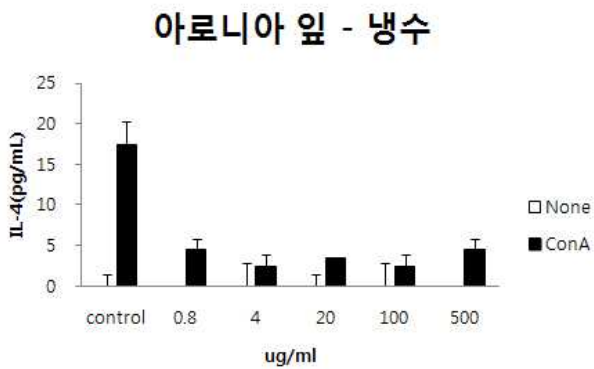
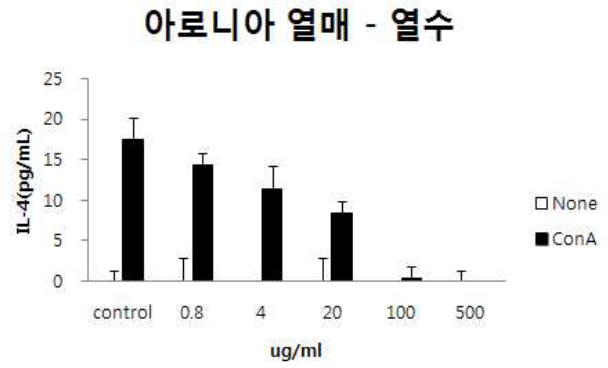
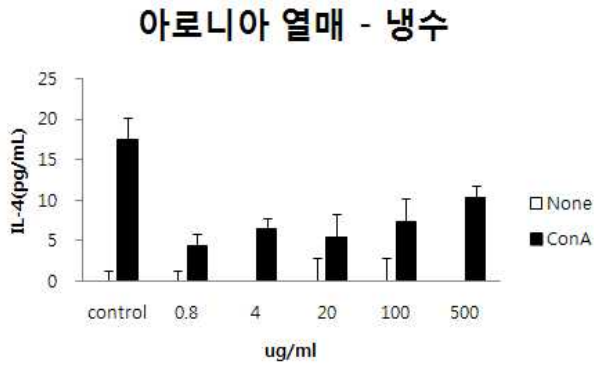
- 한편 T세포로부터 분비되는 면역조절물질인 사이토카인 생성에 미치는 아로니아 추출물의 영향을 조사하기 위하여, T세포에 아로니아 추출물을 12시간 전처리한 후 ConA로 24시간 처리하여 세포배양액 중에 분비된 사이토카인을 ELISA kit을 이용하여 정량하였다. 사이토카인은 Th1 type(IL-2, IFN-g)과 Th2 type(IL-4, IL-6)의 사이토카인을 비교, 정량하였다. 그 결과 아로니아 열매와 잎 추출물은 대체로 ConA로 자극한 T세포로부터 생성되는 사이토카인의 분비를 억제하는 경향을 나타내었으며, 특히 아로니아 잎 냉수 추출물이 가장 높은 억제활성을 지니는 것으로 확인되었다.



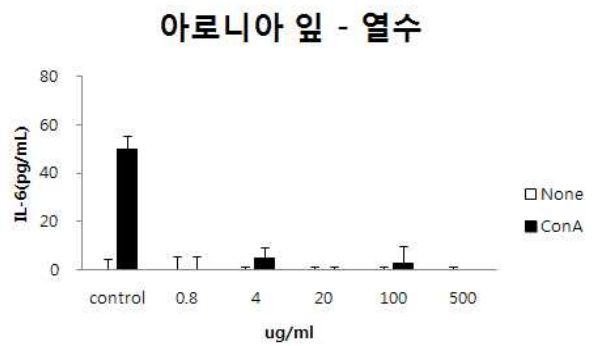
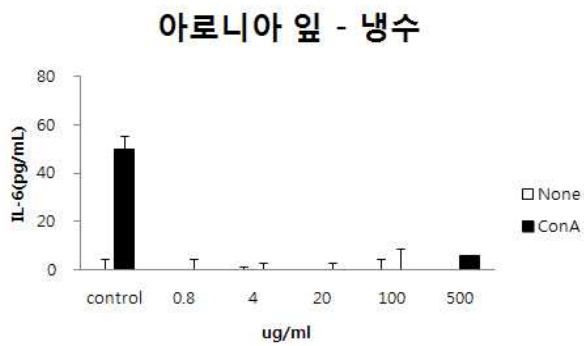
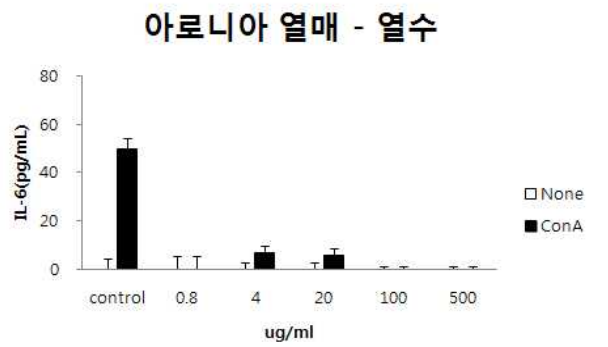
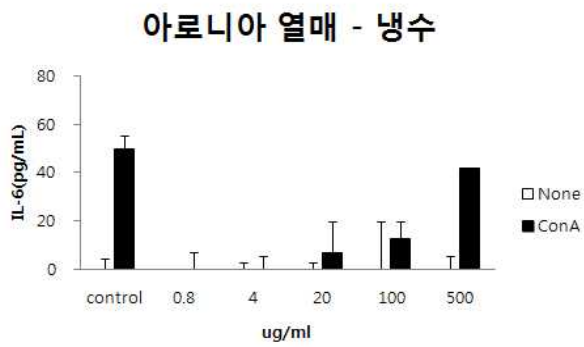
<그림> ConA자극 T세포에 대한 아로니아 추출물의 IL-2분비 억제효과



<그림> ConA자극 T세포에 대한 아로니아 추출물의 IFN-g분비 억제효과



<그림> ConA자극 T세포에 대한 아로니아 추출물의 IL-4분비 억제효과

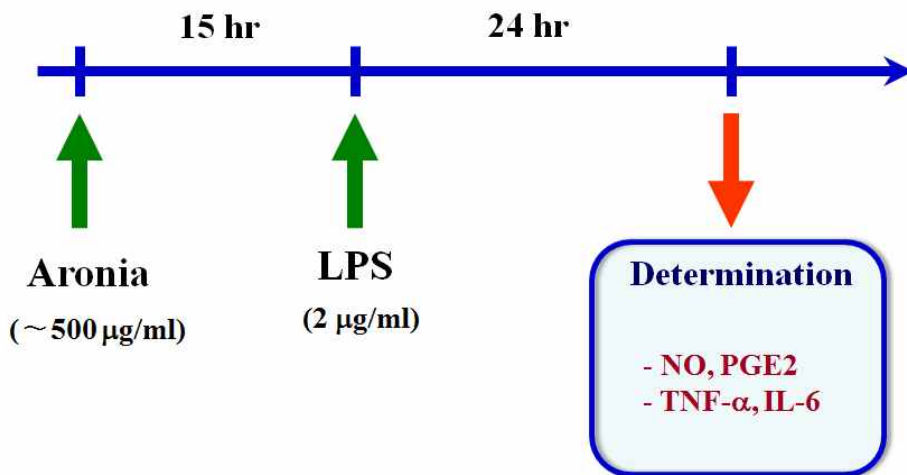


<그림> ConA자극 T세포에 대한 아로니아 추출물의 IL-6분비 억제효과

2. 아로니아 추출물의 항염증 활성 분석

가. 실험 방법

- (1) LPS의 자극에 의해 대식세포로(RAW 264.7세포)부터 유도되는 염증모델을 이용하여, 이들 염증세포에서 생성되는 pro-inflammatory cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등의 분비에 대한 아로니아 추출물의 억제활성을 측정함 (ELISA법에 의한 측정)
- (2) 세균내독소의 자극에 의해 염증반응을 일으키는 RAW 264.7세포로부터 분비되는 염증매개물질인 NO와 PGE2에 대한 아로니아 추출물의 분비억제 효과를 ELISA법에 의해 측정함
- (3) 아로니아 추출물의 항염증 활성은 아로니아의 열매 및 잎을 열수 및 냉수로 추출하여 얻은 추출물을 이용하여, RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유도하기 전에 각 아로니아 추출물을 500 mg/ml의 농도로 하여 15시간 전처리함. LPS 처리 24시간 후에 세포 배양상청을 회수하여 염증매개인자의 농도를 정량하여 판정함.



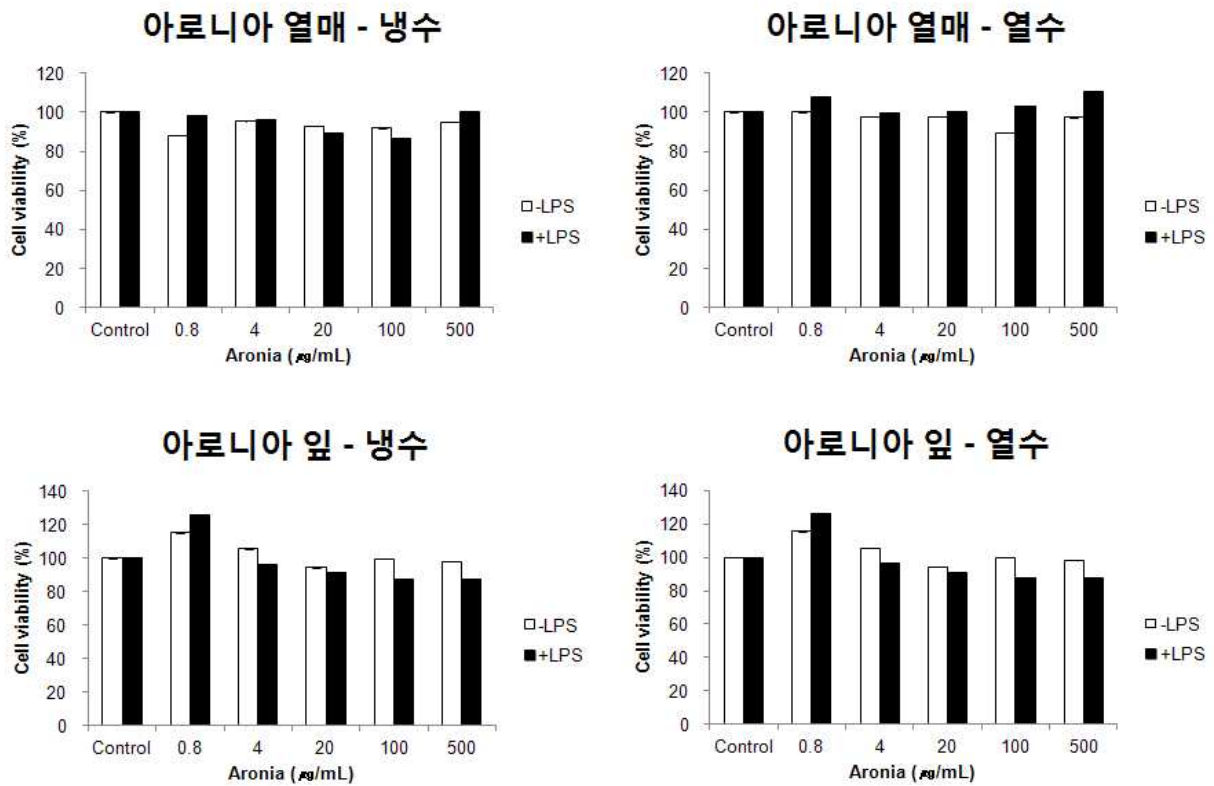
<그림> 아로니아 추출물의 항염증 활성 측정실험

- (4) 한편 아로니아 추출물에 의한 세포수준에서의 분석결과를 기초로 하여, *in vivo*에서의 항염증 활성을 조사함. LPS를 마우스에 정맥주사하여 유발하는 세균내독소 패혈증 모델에서 아로니아 추출물을 경구투여한 후 생존율(survival rate)과 혈중 사이토카인의 정량을 통해 아로니아 추출물 투여에 의한 항패혈증 효과를 조사함

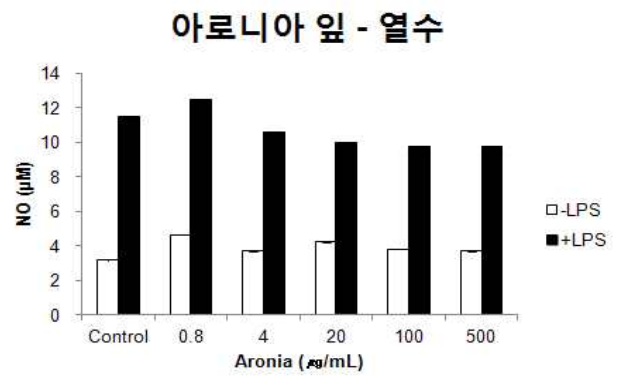
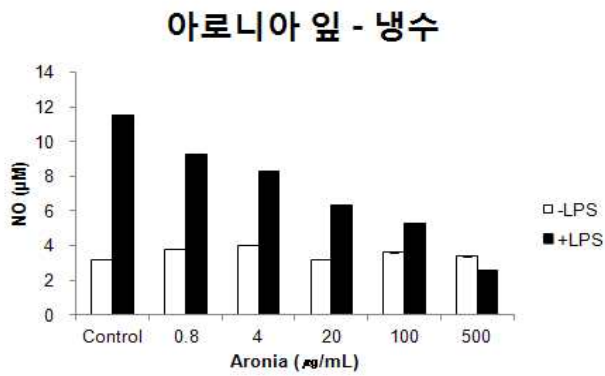
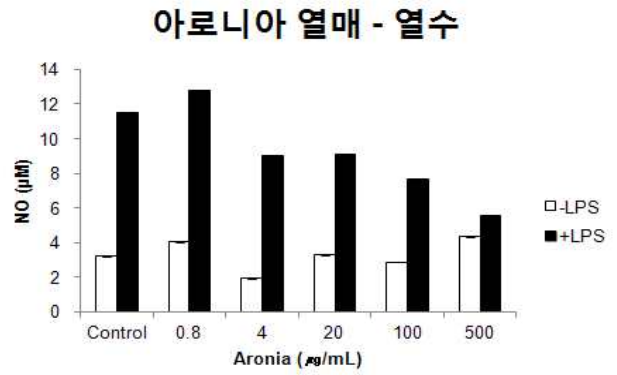
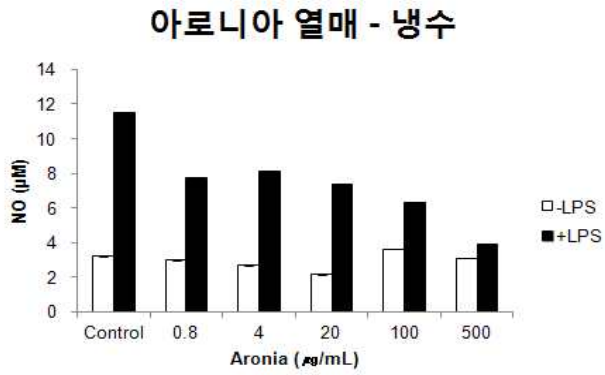
나. 실험 결과

1) 아로니아 추출물의 항염증 작용

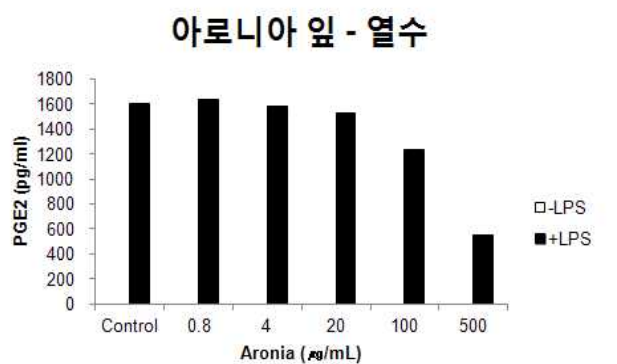
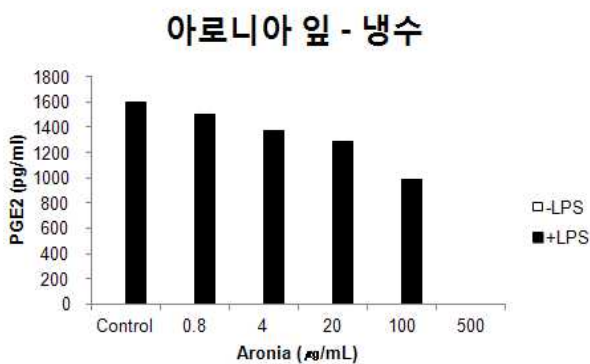
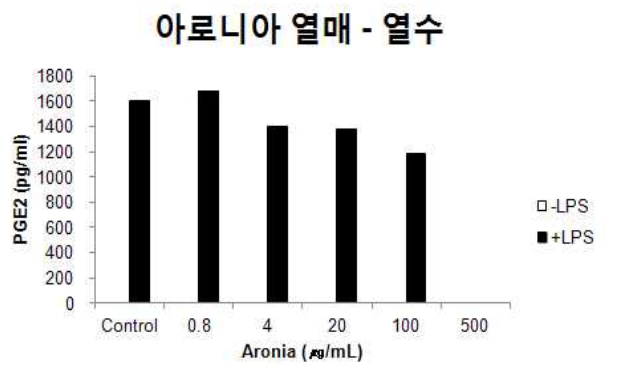
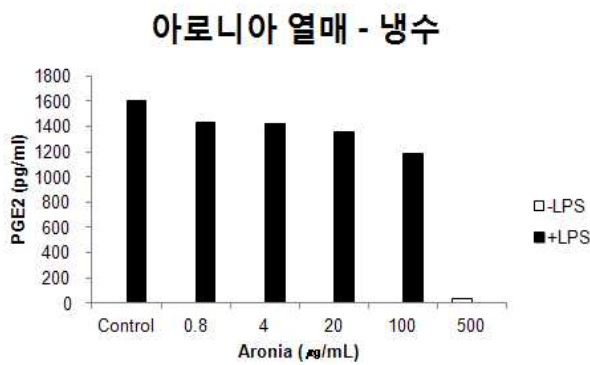
- 아로니아 추출물에 의한 항염증 활성은 RAW 264.7세포에 LPS(2 mg/ml)를 처리하는 염증모델을 통해 조사하였다. 아로니아 추출물은 LPS를 투여하기 12시간 전에 전처리하였다. 먼저 RAW 264.7세포의 생존에 영향을 주지 않는 농도를 결정하기 위하여 각 추출물을 500 mg/ml까지의 농도로 처리하고 MTT법에 의해 생존율을 측정하였다. 그 결과 모든 아로니아 추출물은 500 mg/ml의 농도까지는 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 염증반응에 대한 억제효과는 세포배양액 중에 분비되는 염증매개인자(NO, PGF₂, TNF- α 및 IL-6)의 농도를 정량하여 판정하였다. 그 결과 아로니아 열매와 잎 추출물은 대체로 항염증 활성을 나타내었으나, 가장 높은 활성을 지닌 것은 잎 냉수 추출물인 것으로 확인되었다.



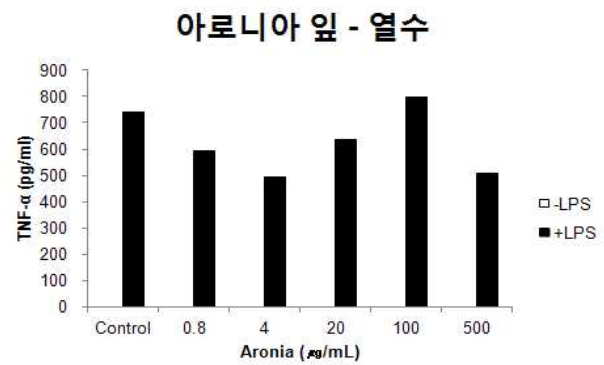
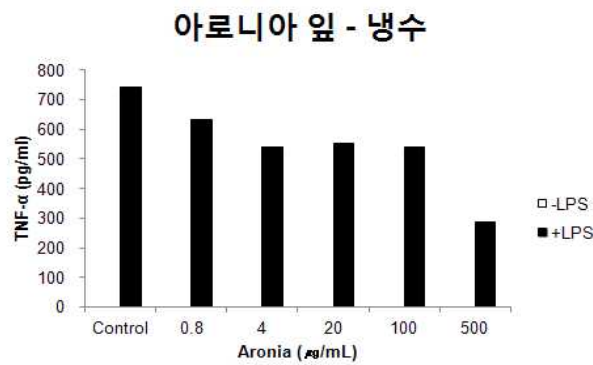
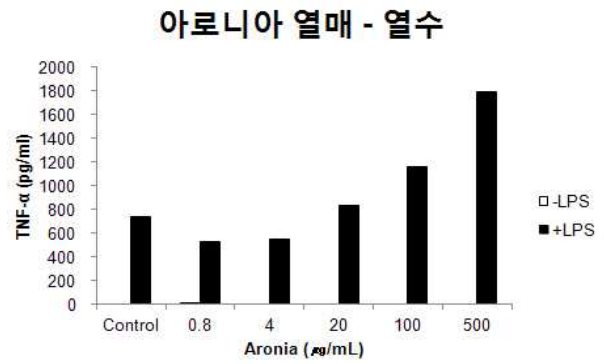
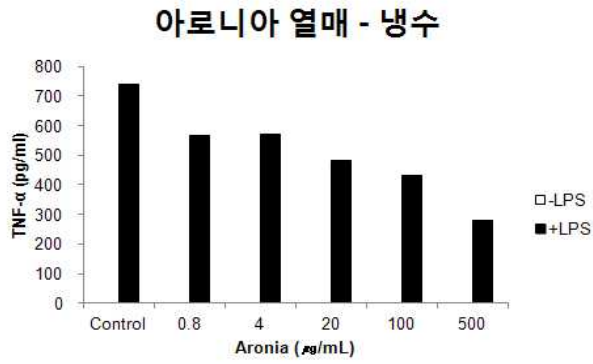
<그림> RAW 264.7 세포에 대한 아로니아 추출물의 세포독성 시험



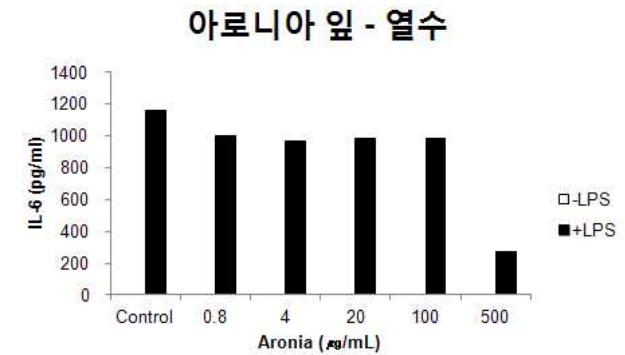
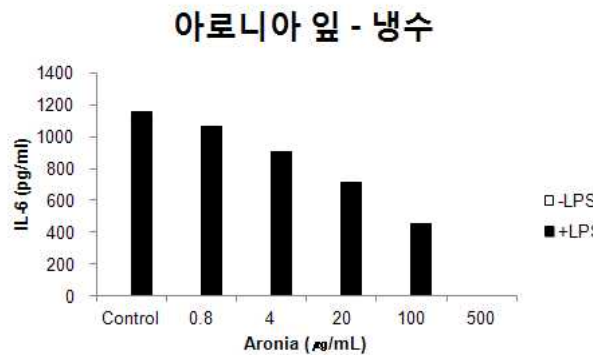
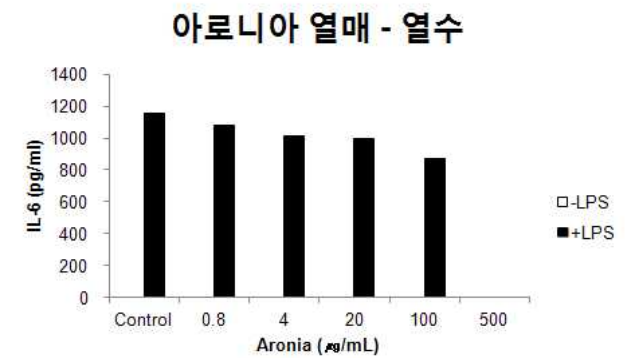
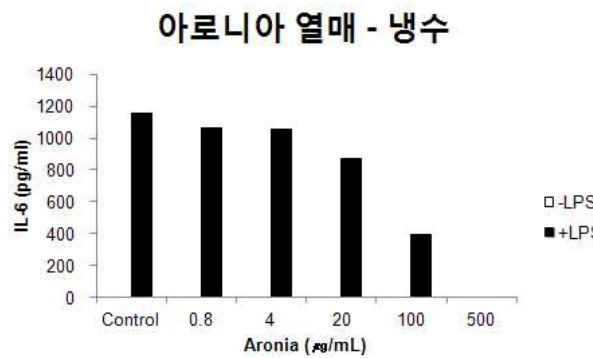
<그림> LPS자극 RAW 264.7 세포에서 아로니아 추출물의 NO분비 억제활성



<그림> LPS자극 RAW 264.7 세포에서 아로니아 추출물의 PGE2분비 억제활성



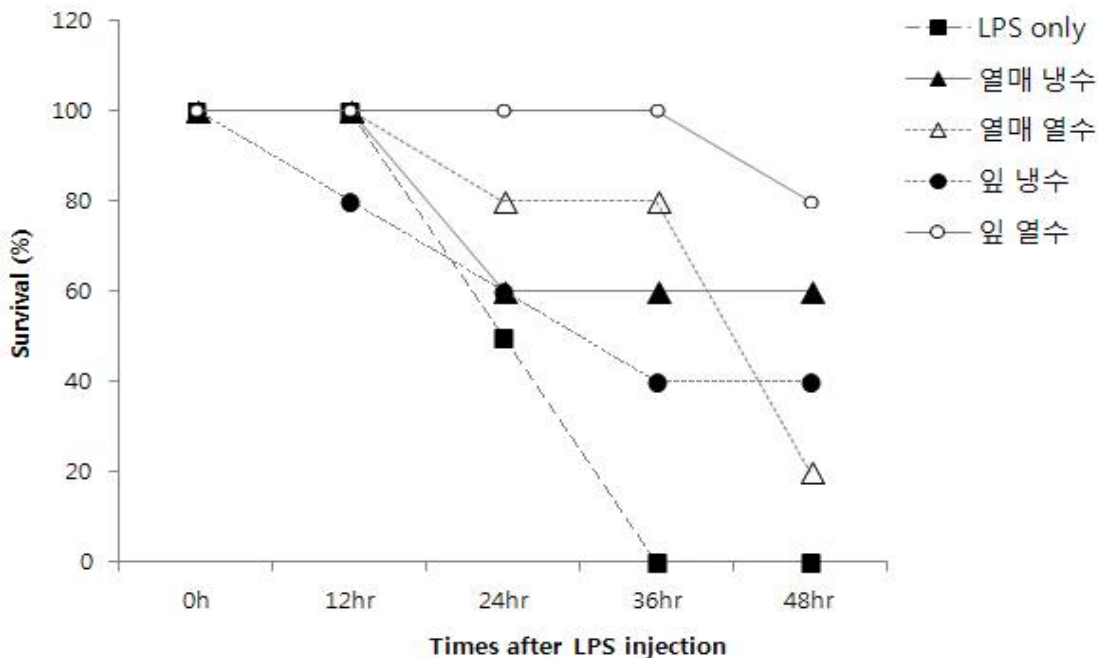
<그림> LPS자극 RAW 264.7 세포에서 아로니아 추출물의 TNF-α분비 억제활성



<그림> LPS자극 RAW 264.7 세포에서 아로니아 추출물의 IL-6분비 억제활성

2) 아로니아 추출물의 패혈증 억제효과

- 한편 아로니아 추출물에 의한 항염증 활성을 LPS 투여에 의한 in vivo 패혈증 모델에서 관찰하였다. 패혈증 실험에서는 LPS를 20 mg/kg으로 정맥주사하였으며, 아로니아 추출물은 2 mg/mouse로 LPS를 투여하기 48시간, 24시간 그리고 4시간 전에 각각 경구투여하였다. 패혈증 억제효과는 LPS 투여 48시간 후의 survival rate로 판정하였다. 그 결과 모든 아로니아 추출물이 패혈증 억제효과를 나타내었으며, 특히 잎 열수 추출물이 가장 높은 억제효과를 보였다.

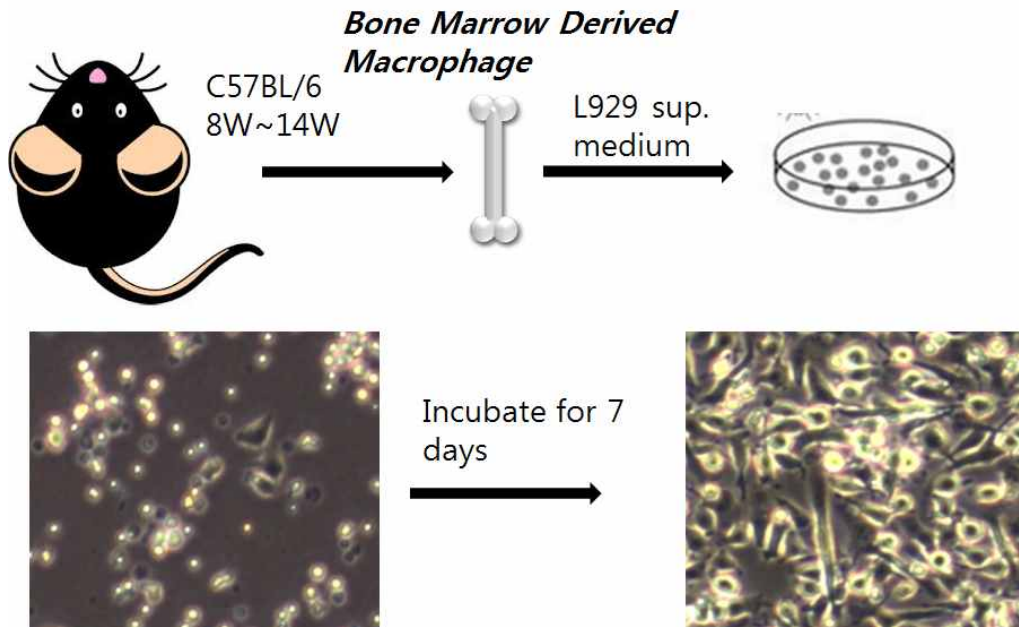


<그림> LPS에 의한 패혈증 모델에서 아로니아 추출물의 항패혈증 효과

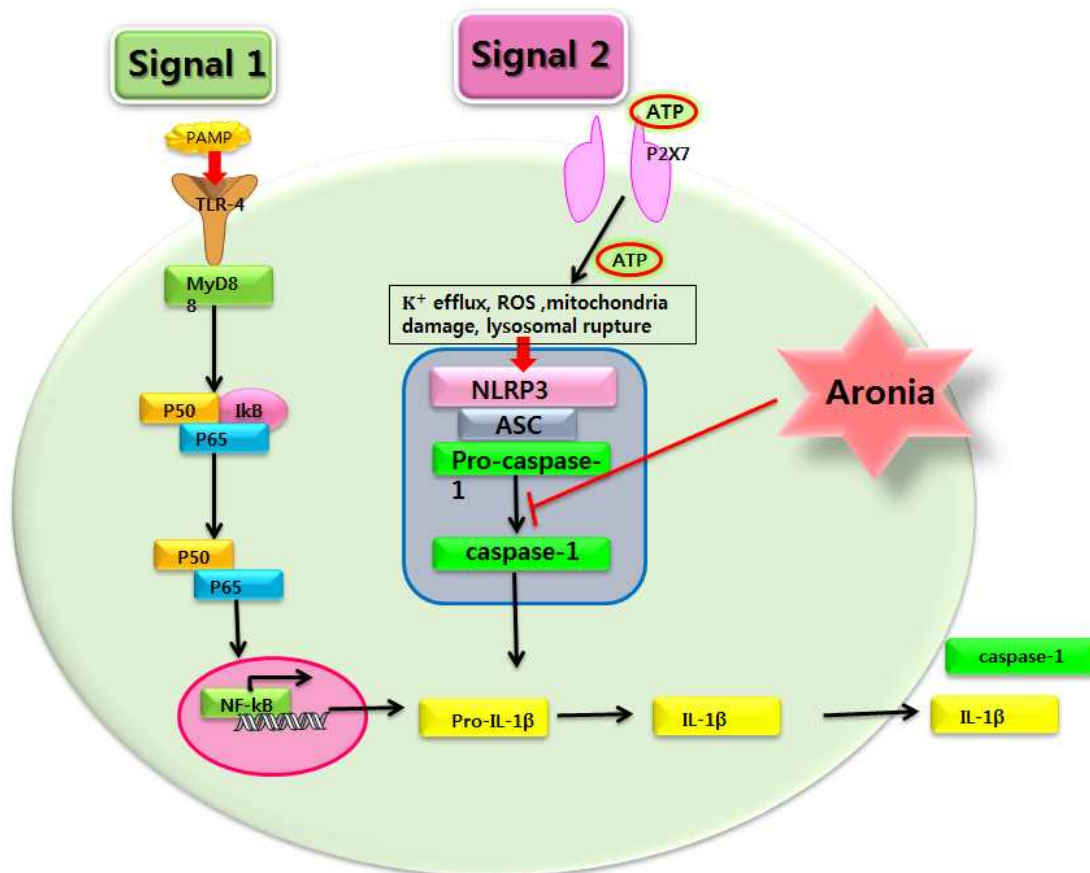
3) NLRP3 inflammasome 활성화에 대한 아로니아 추출물의 억제효과

- 염증반응에 있어서 최근 NLRP3 inflammasome 활성화에 의한 IL-1b의 분비가 많은 주목을 받고 있음. 이 반응은 LPS와 같은 세균관련 병원성 물질(PAMP)이 signal-1으로 작용하고, ATP와 같은 물질이 signal-2로 작용하여 macrophage나 dendritic cell을 활성화시켜 염증매개물질인 IL-1b를 분비하는 기전임. 이들에 자극된 세포는 세포질 내에서 NLRP3가 활성화되어 caspase-1이라는 IL-1b 전환효소를 활성화하고, 이 효소에 의해 염증성 사이토카인의 하나인 IL-1b가 inactive form에서 active form으로 전환되어 세포 밖으로 분비되어 염증을 주도함.

- 아로니아 추출물의 항염증 활성을 NLRP3 inflammasome 억제 관점에서 해석하기 위하여, 아로니아 잎과 열매의 냉수 및 열수 추출물을 BMDM세포에 LPS와 ATP를 자극하여 NLRP3를 활성화시키기 전에 전처리하여 IL-1b의 분비에 미치는 영향을 분석함.



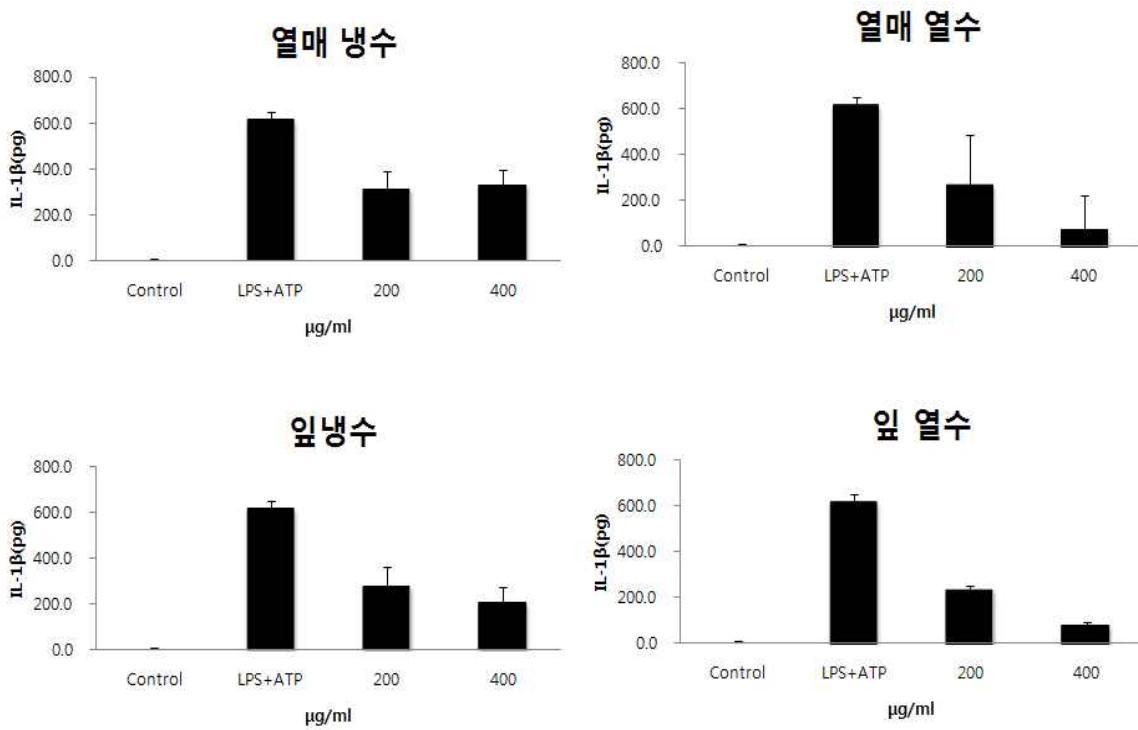
<그림> 골수세포로부터 BMDM의 분화유도 과정



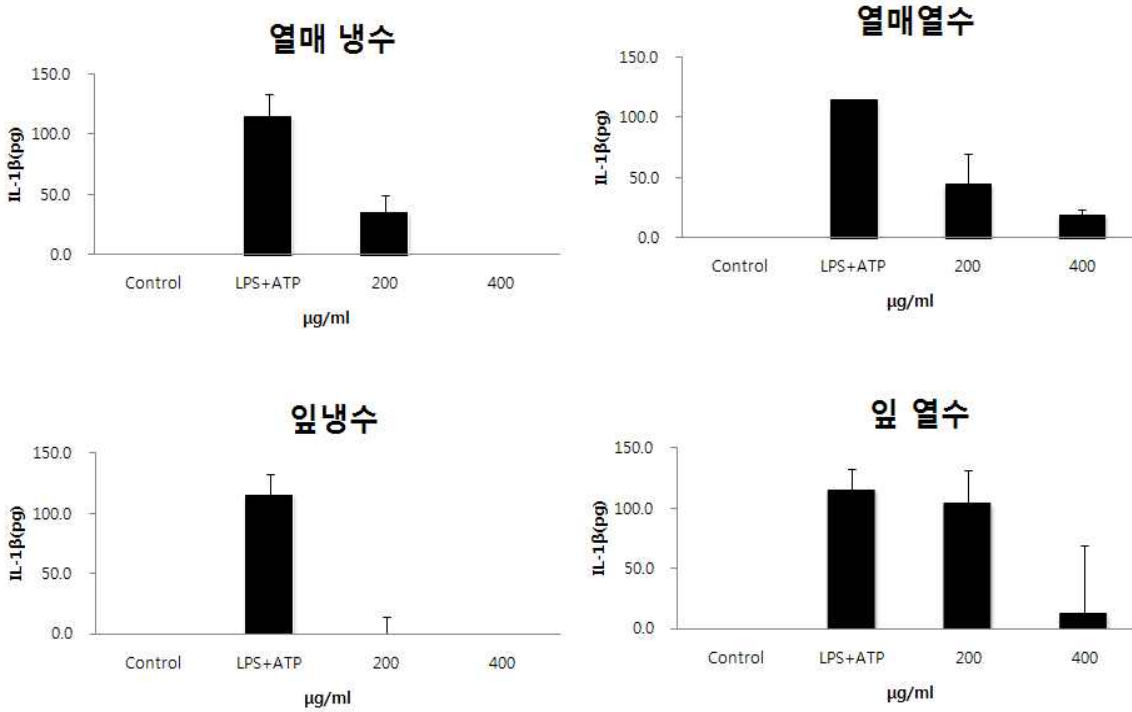
<그림> 아로니아 추출물에 의한 NLRP3 inflammasome 활성화 억제 모식도

- 대식세포의 염증반응에 있어서, LPS는 TLR-4를 통한 신호전달과 ATP처리에 의한 caspase-1 활성화를 통해 pro-IL-1b가 IL-1b로 활성화되어 세포 밖으로 분비되는 것으로 알려져 있다. 그래서 아로니아에 의한 항염증 활성을 IL-1b분비 억제 관점에서 검토하였다. 대식세포는 골수유래 대식세포(BMDM)과 복강 대식세포(PM)를 이용하였으며, LPS(1 mg/ml)로 2시간 동안 자극한 후 ATP(5 mM)를 40분간 처리하여 분비형 IL-1b를 유도하였다. 아로니아 추출물은 LPS로 자극하기 5시간 전에 200 또는 400 mg/ml의 농도로 전처리하였다. BMDM에서의 IL-1b의 분비에 있어서 모든 아로니아 추출물에서 억제활성이 관찰되었으나, 특히 잎 냉수추출물이 가장 높은 억제활성을 보였다. 그리고 이러한 억제활성은 PM에서도 거의 동일하게 관찰되었다.

- 이상의 결과는 아로니아 잎 냉수 추출물은 강력한 항염증 활성을 지니며, 특히 NLRP3 inflammasome 활성화 차단을 통해 IL-1b의 분비를 억제하는 활성을 갖는 것으로 확인됨. 현재 이 작용에 관련된 작용기전을 해석중에 있음.



<그림> BMDM에서 아로니아 추출물의 IL-1b 분비억제 효과



<그림> PM에서 아로니아 추출물의 IL-1b 분비억제 효과

3. 아로니아 추출물 항염증 활성 기전연구

가. 실험 방법

(1) 각종 염증성 사이토카인의 mRNA와 NO분비에 관한 iNOS의 발현에 대한 아로니아 추출물의 억제활성을 RT-PCR에 의해 분석함. 또한 PGE2의 분비억제에 있어서는 이 염증성 물질의 생성을 촉진하는 COX-2분자의 발현억제를 조사함.

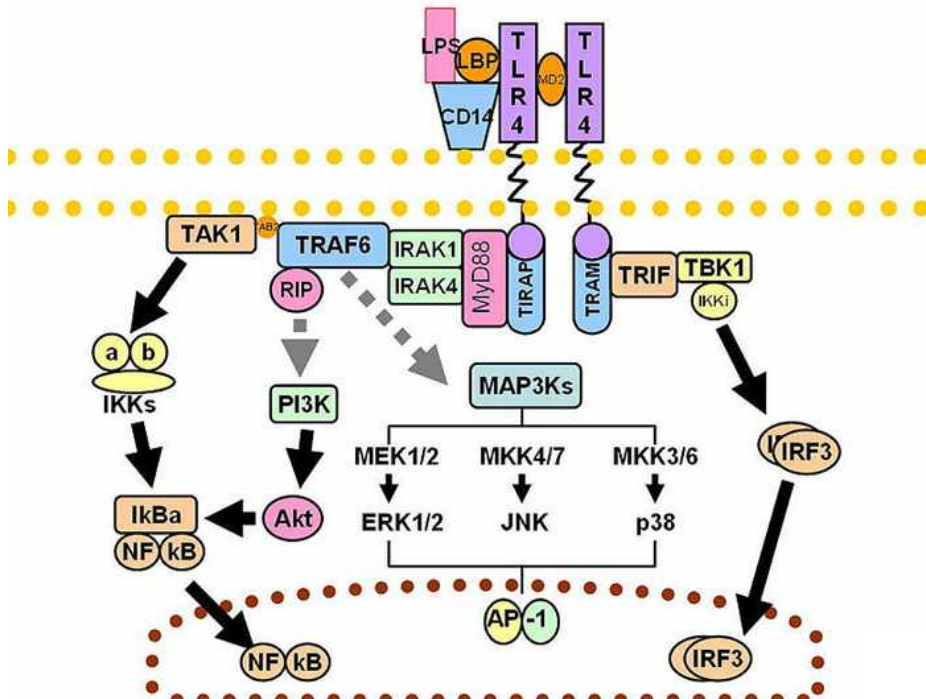
(2) 아로니아 추출물의 항염증 활성을 세포 내 분자수준에서 해석하기 위하여, 아래 그림에서 보이듯이, LPS 관련 세포 내 신호전달 활성화에 대한 억제 관점에서 해석함. 즉 아로니아 추출물 처리에 의한 LPS와 세포와의 결합과 LPS에 의한 염증유도에 관련된 세포 내 신호전달 기전에 미치는 영향을 다음과 같이 분석함

① LPS의 세포결합 억제

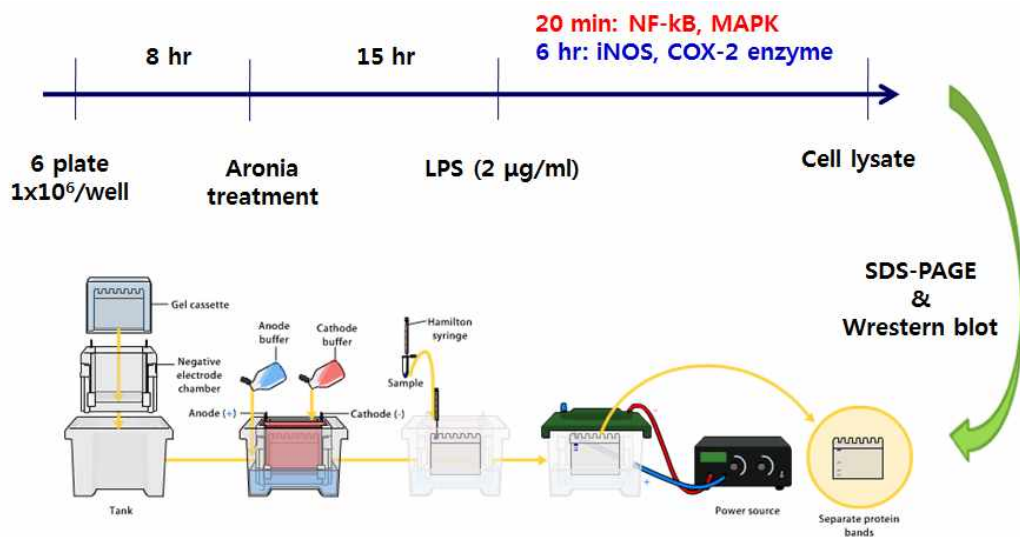
- LPS와 세포와의 결합저해 조사 (FACS에 의해 분석)
- 아로니아 추출물 처리에 의한 LPS수용체(TLR4)의 발현감소 조사

② MAP kinase의 활성화에 미치는 영향 (Western blot법)

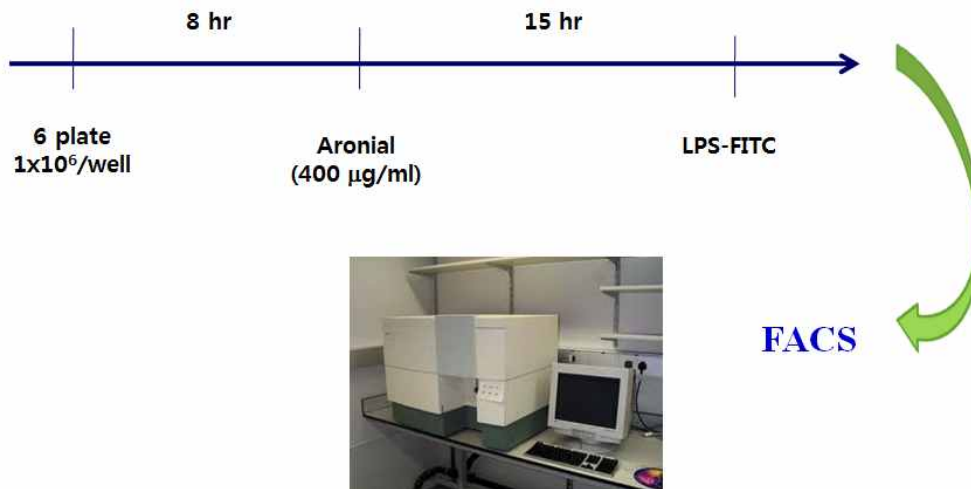
- ERK의 인산화 억제
 - JNK의 인산화 억제
 - p38분자의 인산화 억제
- ③ NF-κB관련 활성화 경로 억제
- IκB의 인산화 억제
 - NF-κB의 세포질 발현 및 핵내 전위 측정
 - NF-κB 생성에 미치는 영향(Luciferase assay로 측정)



<그림> LPS 자극에 의한 염증반응의 세포 내 기전



<그림> Western blot법에 의한 세포 내 단백질 발현 분석법 모식도

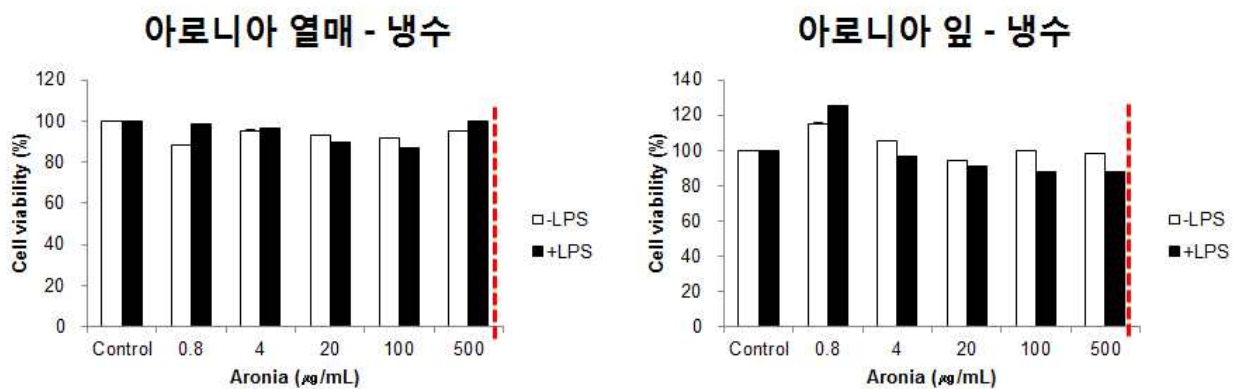


<그림> FACS에 의한 세포표면 분석법 모식도

나. 실험 결과

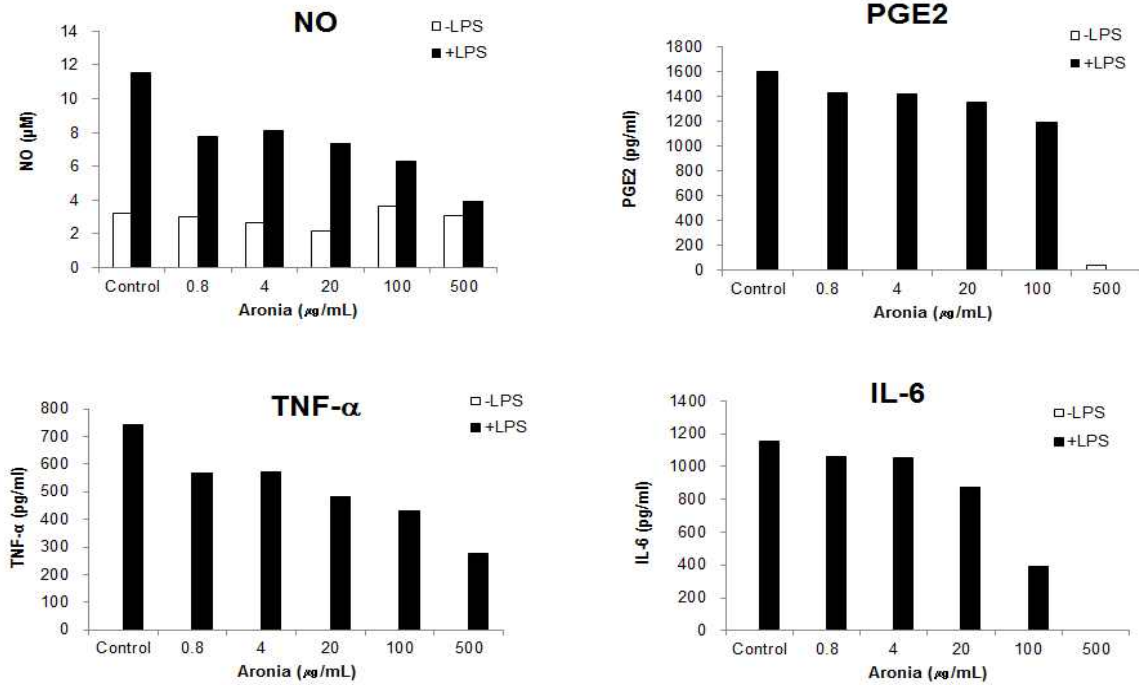
1) 아로니아 열매 냉수추출물의 항염증 활성 작용기전

- 1차 년도의 연구에서 아로니아 열매와 잎의 냉수 추출물이 항염증 활성이 높은 것으로 나타나, 이들 추출물에 의한 항염증 활성 작용기전을 해석함. 아로니아 열매 및 잎 냉수추출물은 500 ug/ml의 농도까지 세포독성이 없어 이 농도에서 실험을 진행함.

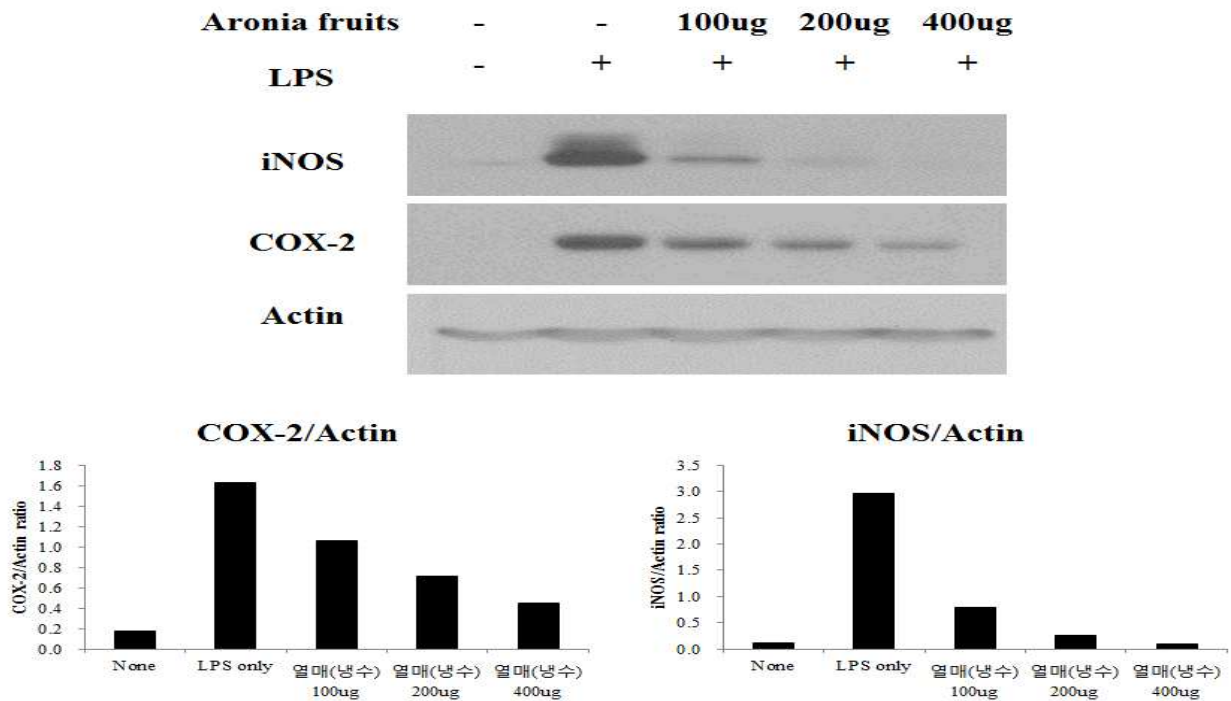


<그림> 아로니아 열매 및 잎 냉수추출물의 세포독성

- 먼저 열매 냉수추출물의 항염증 활성에서는 NO, PGE2, TNF-α, IL-6 등 염증성 매개인자 분비를 유의하게 억제하였으며, iNOS와 COX-2와 같은 염증관련 세포내 효소의 발현이 현저하게 억제되는 것으로 나타남.



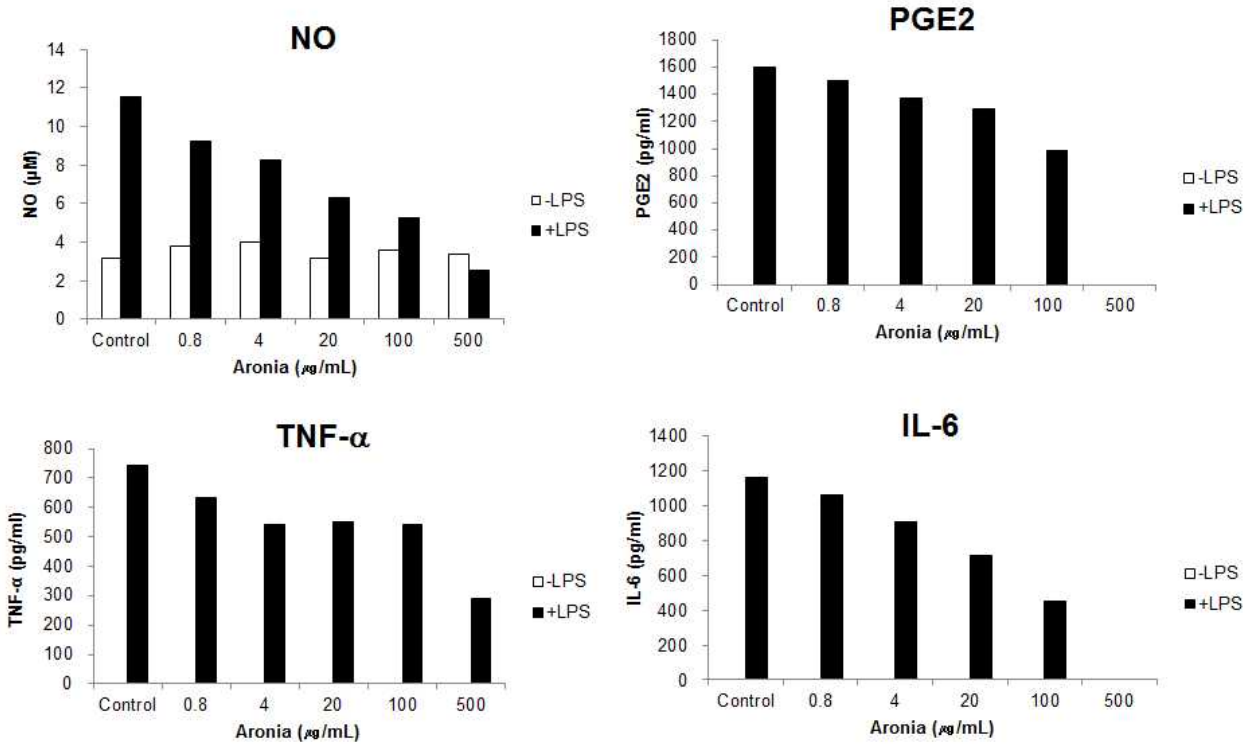
<그림> 아로니아 열매 냉수추출물에 의한 염증매개인자의 분비억제 효과



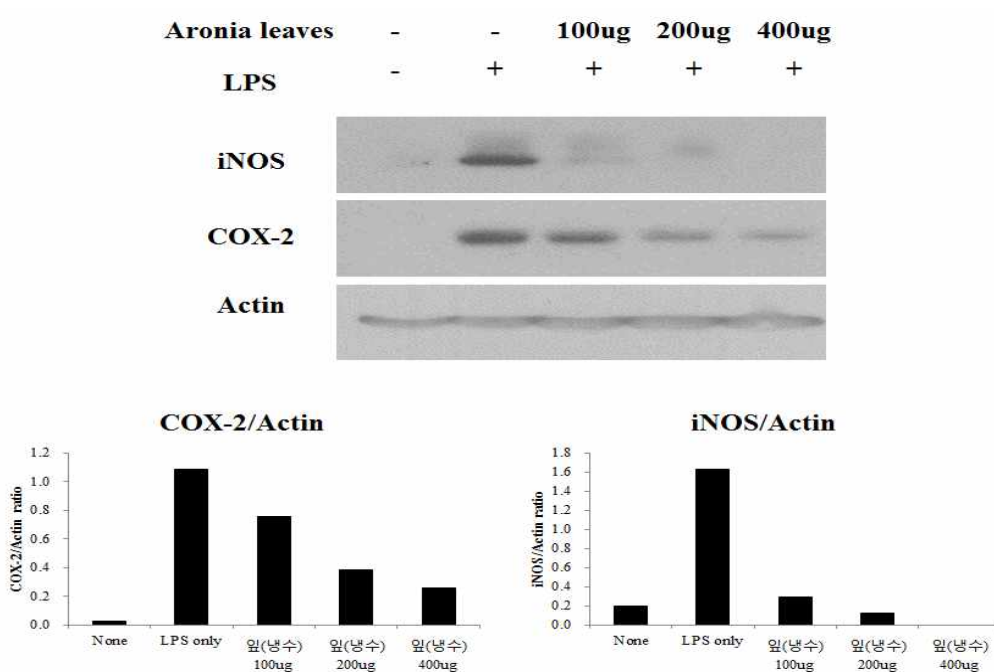
<그림> 아로니아 열매 냉수추출물에 의한 iNOS 및 COX-2 세포내 발현 억제

2) 아로니아 잎 냉수추출물의 항염증 활성 작용기전

- 아로니아 잎 냉수추출물도 열매 냉수추출물과 동일하게, 세포독성을 나타내지 않는 농도에서 염증매개인자의 분비와 iNOS 및 COX-2의 세포내 발현을 유의하게 억제하는 것으로 관찰됨.



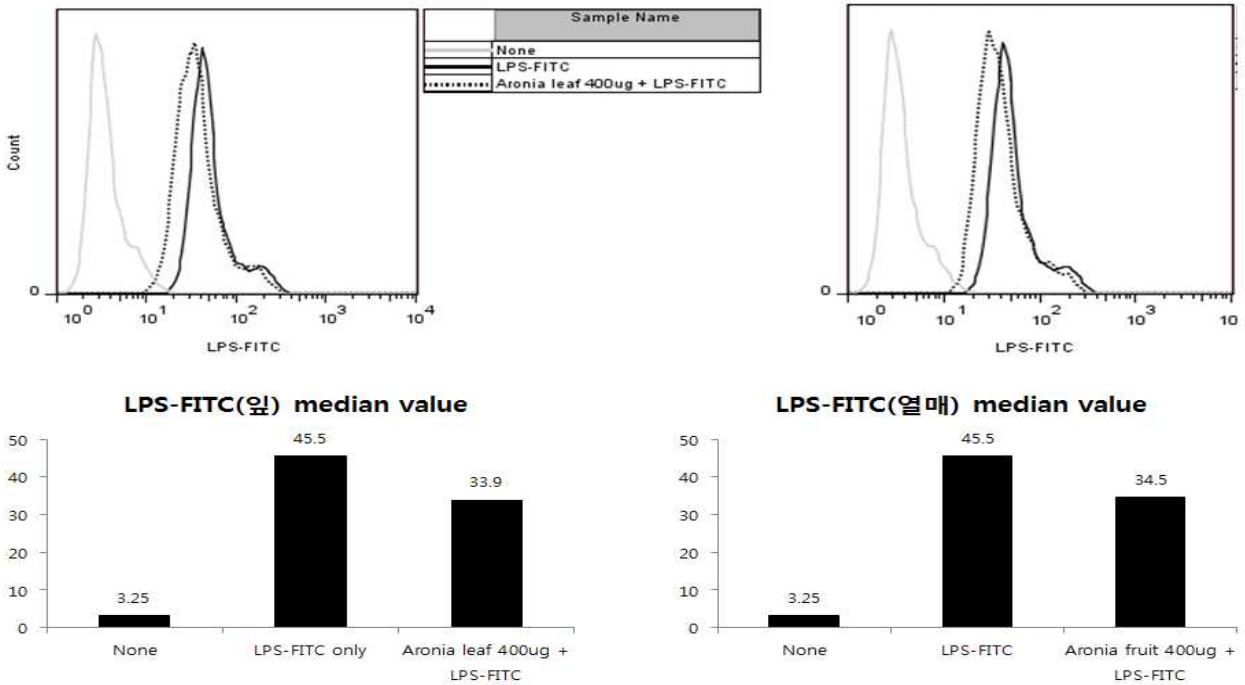
<그림> 아로니아 잎 냉수추출물의 염증매개인자 분비 억제활성



<그림> 아로니아 잎 냉수추출물에 의한 COX-2 및 iNOS 억제

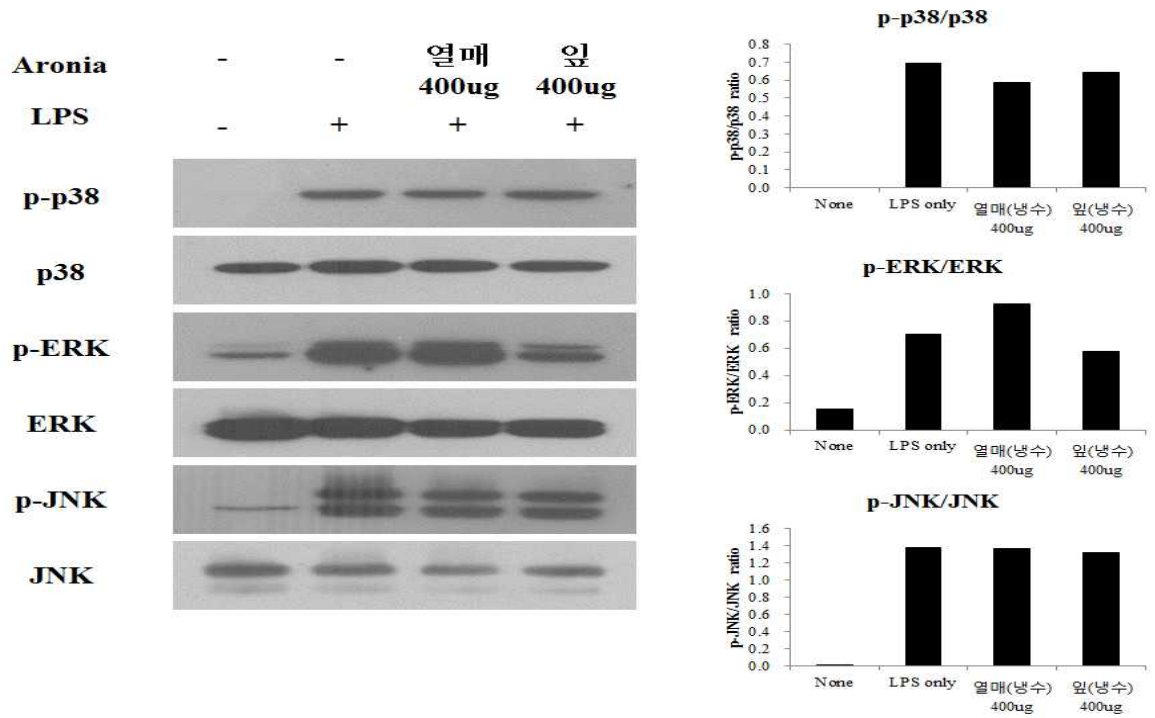
3) 아로니아 열매 및 잎 냉수추출물에 의한 세포내 신호전달 억제

- 아로니아 열매 및 잎 냉수추출물에 의한 항염증 활성 작용기전을 LPS자극에 의해 유도되는 세포 내 신호전달의 억제와, 아로니아 추출물 전처리에 따른 LPS와 세포와의 결합억제 관점에서 해석함. 먼저 LPS의 세포결합에 대해서는 유의한 결합억제가 확인되지 않음.

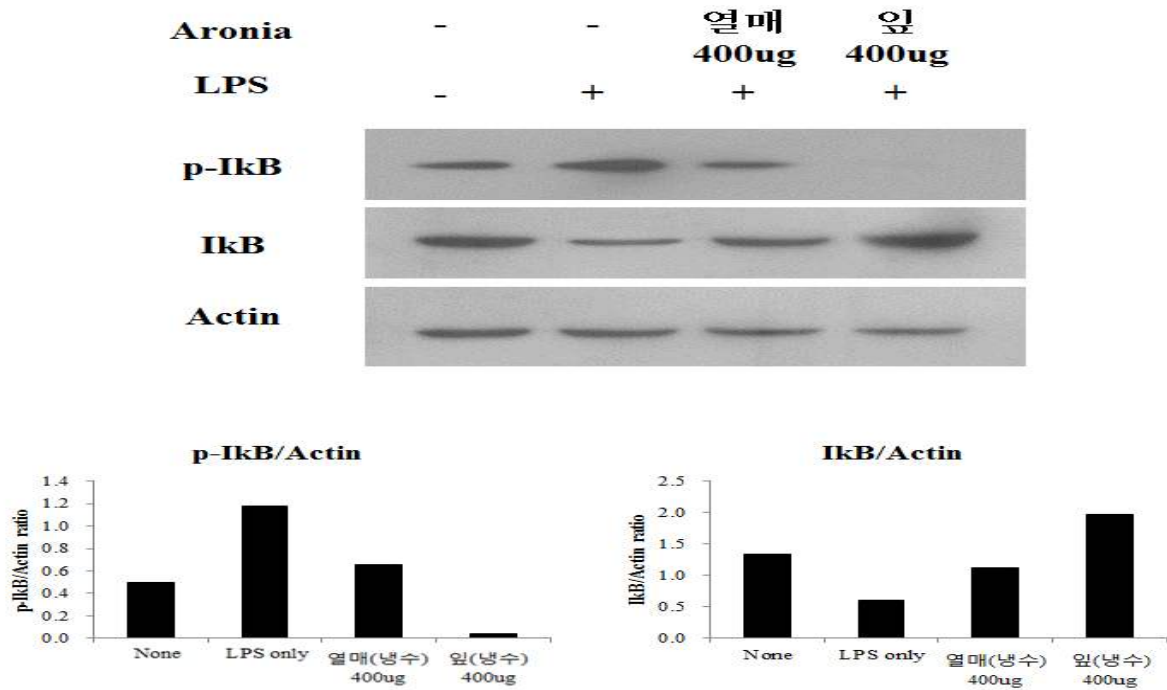


<그림> 아로니아 추출물 전처리가 LPS-세포 결합에 미치는 영향

- LPS자극에 의해 유도되는 염증관련 세포 내 신호전달에 대한 억제효과는 MAPK(ERK1/2, p38, JNK)와 NF-kB의 활성화를 통해 조사함. 그 결과 아로니아 열매와 잎 냉수추출물은 MAPK에 대해서는 p38분자의 인산화를 약간 억제하였음. 한편 NF-kB에 대해서는 아로니아 열매 및 잎 냉수추출물 모두 매우 높은 억제활성을 나타냄. 이 결과로부터 아로니아 열매 및 잎 냉수추출물에 의한 항염증 활성에는 NF-kB의 활성화 억제가 중요한 것으로 추정됨.



<그림> 아로니아 추출물에 의한 MAPK 활성화 억제



<그림> 아로니아 추출물에 의한 NF-κB의 활성화 억제

4. 아로니아 추출물의 항암활성

가. 실험 방법

(1) B16-BL6 melanoma 암세포의 폐전이 및 암세포 증식의 억제활성

- 암세포(B16-BL6)를 미정맥을 통해 이식한 후(실험적 폐전이) 아로니아 추출물의 경구투여에 의한 마우스의 항암활성에 관한 작용기전 연구
- 암세포를 마우스의 footpad에 암세포를 이식한 후 21일째에 원발소(primary tumor)를 제거하고, 원발소 제거 14일째에 폐에 전이된 전이소를 계측하는 자연적 폐전이 모델에서 아로니아 추출물을 암세포 이식 후에 경구투여함으로써 자연적 암전이의 억제활성을 측정
- Mouse(C57BL/6)의 피부 표층 내 암세포를 주입 후 대조군과 각 농도(500 μ g, 1mg, 2mg) 실험군의 경구투여 실시 후 주 별 발암세포 크기 측정 및 암세포 전이 능력 측정

(2) Colon 26 암세포 폐전이 억제활성 시험

- Balb/c 마우스에 colon 26 세포를 정맥주사를 통해 이식하여 폐전이를 유발하는 모델에서 아로니아 추출물을 여러 투여량으로 경구투여하여 암전이에 대한 예방 및 치료 효과에 대해 조사함

(3) 발암세포 주입 후 mouse의 spleen 증식도 분석

- Mouse(C57BL/6)의 피부 표층 내 암세포 주입 후 대조군과 각 농도 별(500 μ g, 1mg, 2mg) 경구투여 실시 후 spleen 증식도 측정

(4) in vivo에서의 암세포 증식억제 활성 측정

- C57BL/6 마우스에 B16-BL6 암세포를 피하주사하고 아로니아 추출물을 경구적으로 투여한 후, 7~10일 후에 형성되는 종양괴(tumor mass)의 크기를 측정하여 in vivo에서의 암세포 증식억제 활성을 측정한다. 이때 양 주위에 형성되는 신생혈관의 수를 계측하여 항혈관신생 효과도 판정함

(5) 항암활성 작용기전에 대한 면역학적 분석

- 아로니아 추출물의 항암활성을 면역학적 관점에서 해석하기 위하여, 시료를 정상 마우스 혹은 담암 마우스에 경구투여 한 후 마우스 NK세포의 세포상해 활성을 측정함
- NK세포의 활성화가 아로니아 추출물의 항암활성과 관련되어 있는가를 확인하기 위하여, anti-asialo GM1 항체를 투여하여 NK세포를 in vivo에서 제거한 상태에서 암전이 억제활성의 유무를 관찰함

나. 실험 결과

1) 아로니아 추출물에 의한 암전이 억제효과

- 아로니아 추출물의 항암활성은 B16-BL6 melanoma 암세포에 의한 마우스 폐전이 모델을 이용하여 암전이 억제효과의 관점에서 검토하였다. B16-BL 암세포(4×10^4 /mouse)를 마우스 미정맥에 투여하고 14일째에 폐에 형성되는 암전이 결절 수를 계측하였다. 아로니아 추출물은 암세포 이식 1일 후부터 3 mg/mouse로 1일 1회, 총 5일간 경구투여하였다. 아래 그림에서 보듯이, 아로니아 추출물의 경구투여는 암세포의 전이를 억제하는 항암활성은 나타나지 않았다. 한편 아로니아 추출물을 3 mg/mouse로 5회 연속투여한 마우스에서 체중의 변화는 인정되지 않았다.

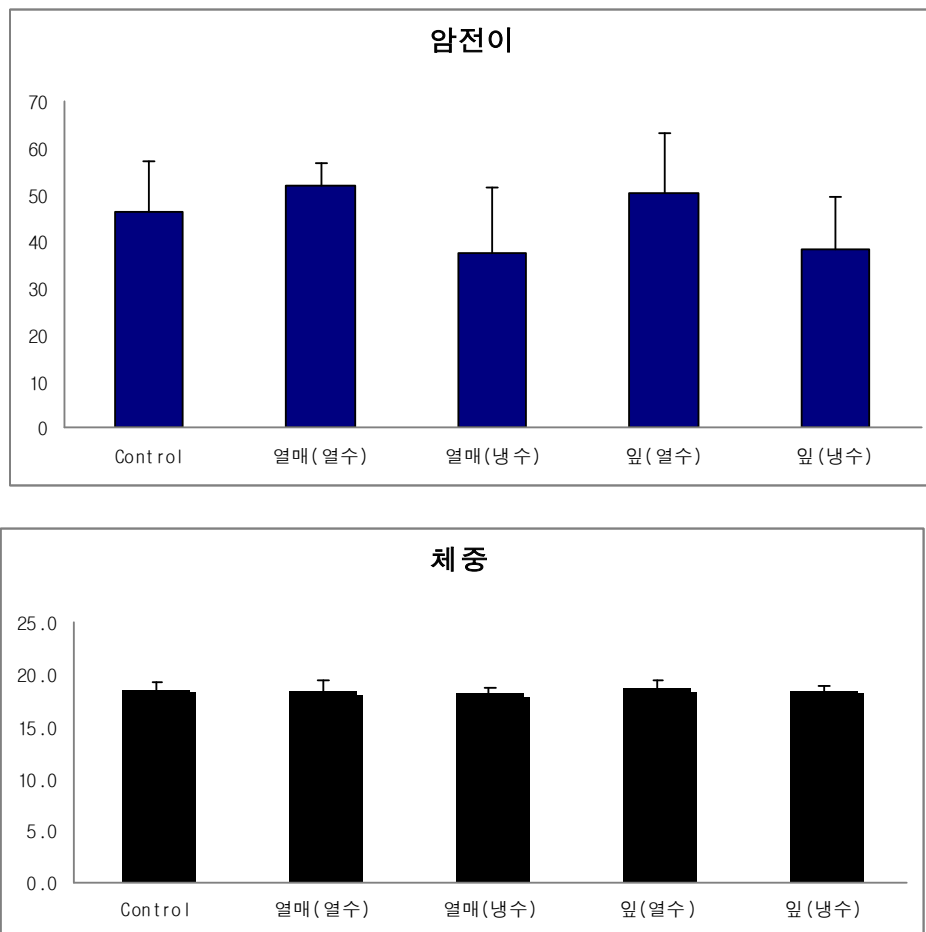


그림-8. 아로니아 추출물의 암전이 억제활성 및 체중에 미치는 영향

- *In vivo* 암전이 억제실험에서 유효한 억제활성이 관찰되지 않았으므로, 더 이상의 *in vivo* 실험은 진행하지 못하였으며, 또한 *in vitro*에서의 암세포에 대한 세포독성 시험에서도 아로니아 추출물의 암세포 증식억제 활성은 인정되지 않았음.

5. 항원특이 면역작용에 대한 아로니아 추출물의 효과

가. 실험 방법

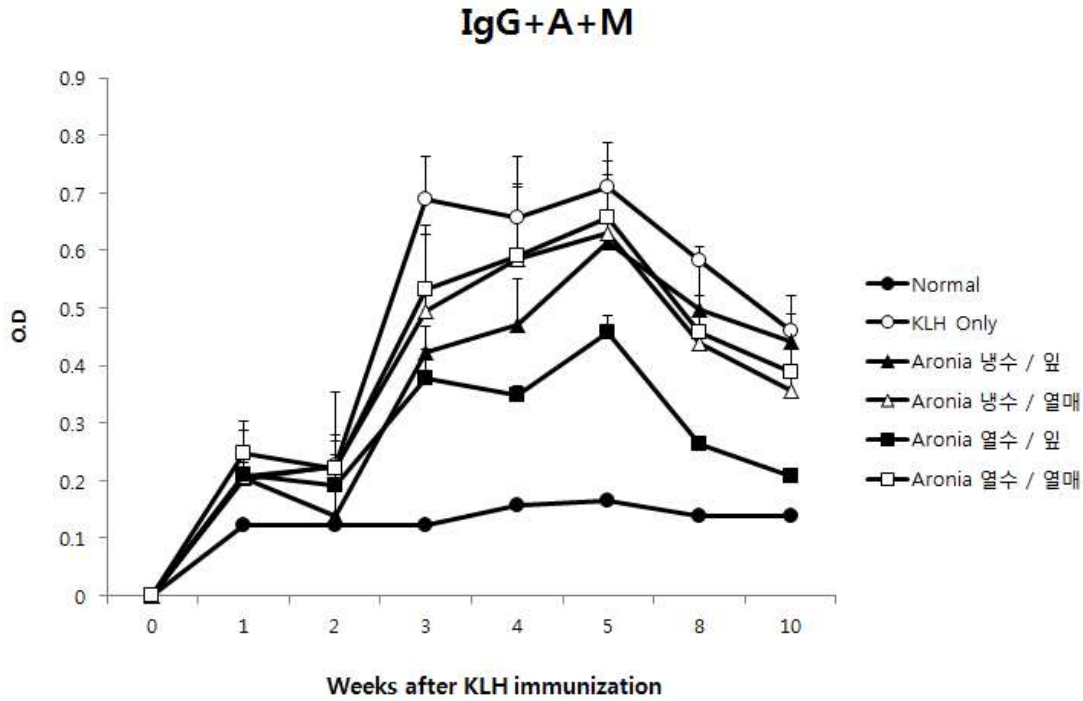
- (1) 항원특이적인 면역반응에 대한 아로니아 추출물의 활성을 측정하기 위하여, KLH단백을 마우스에 면역한 후, 이 KLH에 대한 항체반응과 세포면역반응에 미치는 아로니아 추출물의 증강작용을 측정하였음.
- (2) 항체면역은 마우스의 혈청을 채취하여 ELISA법에 의해 분석함. 즉 KLH를 10 ug/ml의 농도로 ELISA plate에 코팅하고, 3% BSA를 처리하여 blocking 하였다. 그 후 마우스 혈청을 500배로 희석하여 ELISA plate에 well당 100 ul씩 넣고 37°C에서 2시간 배양하였다. 항체 배양 종료후, PBS-Tween 20 buffer로 washing하고 immunoglobulin G+A+M에 대한 이차항체를 100 ul/well로 넣고 2시간 배양함. Palte를 washing한 후, 기질용액인 TMB solution을 각 well에 첨가한 후 1시간 배양하고, stopping solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader에서 450 nm의 흡광도로 흡광도를 측정함.
- (3) T세포 증식반응은 KLH 면역 5주째의 마우스로부터 비장세포를 회수한 후, 비장세포 (5×10^5 /well)에 KLH를 10 ug/ml의 농도로 첨가하였다. 24시간 배양 후 MTT법에 의해 항원에 대한 세포의 증식반응을 측정하였으며, 세포 배양상청을 이용하여 T세포가 분비한 사이토카인을 ELISA kit을 이용하여 정량하였다.

나. 실험 결과

1) 항 KLH항체 유도에 미치는 영향

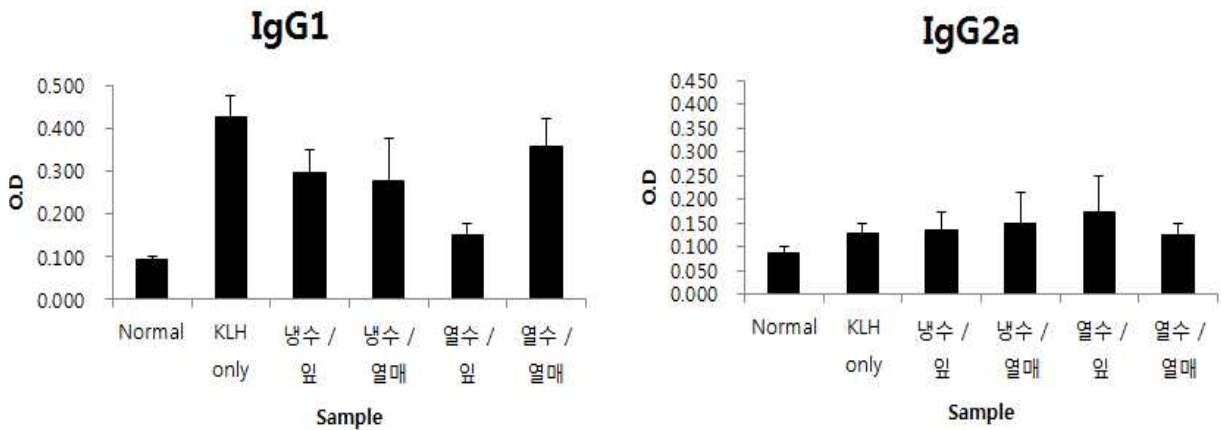
- 아로니아 추출물의 항원특이 면역작용에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 아로니아의 열매와 잎의 냉수 및 열수추출물을 이용하여, KLH항원에 대한 항체유도와 세포성 면역조절에 대해 분석함.

- 2주 간격으로 KLH(20 ug/mouse)를 면역할 때에 각 아로니아 추출물을 함께 투여하는 조건에서, 항원 투여 후 혈청 중의 항KLH 항체가를 측정함. 그 결과 아로니아 잎 열수추출물에서 항원특이적인 항체유도(IgG+IgA+IgM)의 억제가 관찰됨.



<그림> 아로니아 열매 및 잎 추출물의 KLH 특이적인 항체유도에 미치는 영향

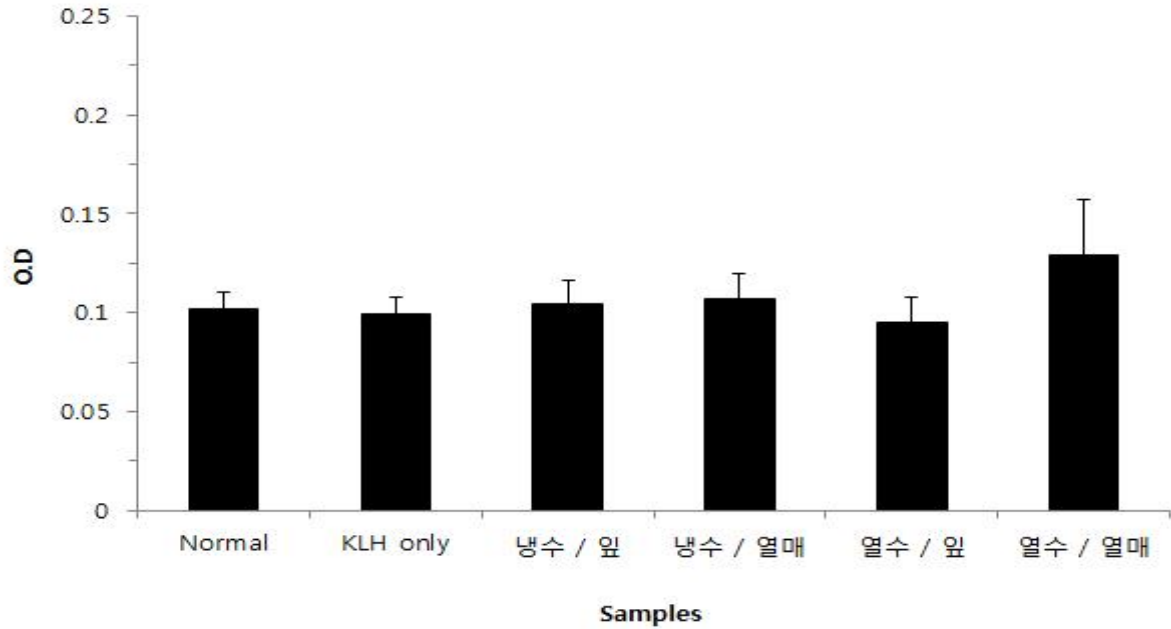
- 한편 항체 유도에 있어서 Th-1/Th-1형 중 어떠한 T세포 반응의 조절에 의한 것인지를 알아보기 위하여, IgG1과 IgG2a 항체를 조사함. 그 결과 잎 열수추출물이 IgG1 항체분비를 억제하며 Th-2 type의 면역작용을 억제하는 것으로 나타남.



<그림> 아로니아 잎 열수 추출물에 의한 Th-2 면역반응 억제

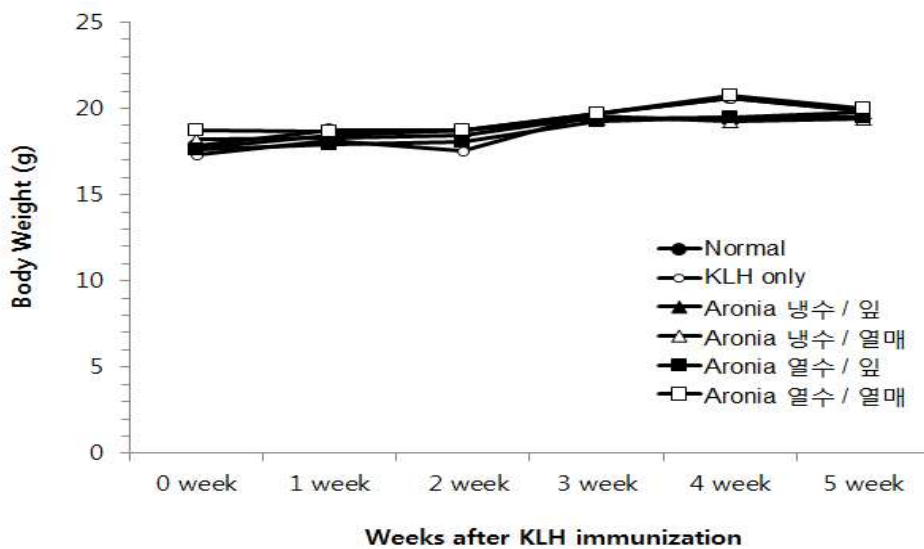
- 아로니아 추출물을 항원과 함께 면역하는 경우, 항원에 대한 항체면역이 억제되는 현상이 관찰되었으므로,혹 시 아로니아 추출물이 알러지를 억제하는 작용이 있지 않을까 하는 가능성이 시사됨. 이를 확인하기 위하여 KLH와 함께 면역한 마우스의 혈청을 이용하여 항원 특이적인

IgE를 측정하였음. 하지만 항원 특이적인 IgE 항체분비에 대해서는 별다른 영향을 미치지 않았음. 그 이유는 아마도 KLH라는 항원이 IgE를 잘 분비하지 않는 단백질이기 때문인 이유와, 아로니아 추출물이 항원에 대한 IgG, IgA, IgM 등의 항체유도에 대해서는 억제활성이 있지만, IgE로의 isotype switch에는 별다른 영향을 미치지 않는 가능성이 시사됨.



<그림> 아로니아 추출물에 의한 항 KLH IgE 분비억제

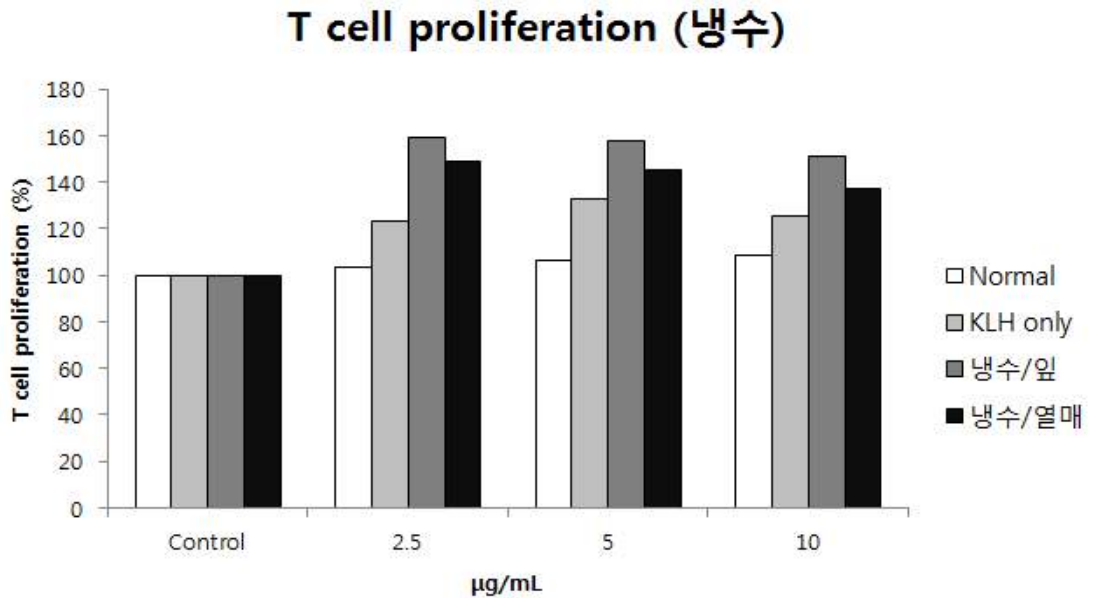
- 또한 KLH와 아로니아를 함께 면역한 마우스에서, 아로니아 추출물에 의한 독성발현 여부를 조사함. 그 결과 아로니아 추출물을 투여한 마우스에서의 in vivo독성을 보기 위하여, 면역 후 5주간 동안 체중변화를 조사한 결과, 아로니아 추출물의 투여는 별다른 in vivo독성을 나타내지는 않는 것으로 확인됨.



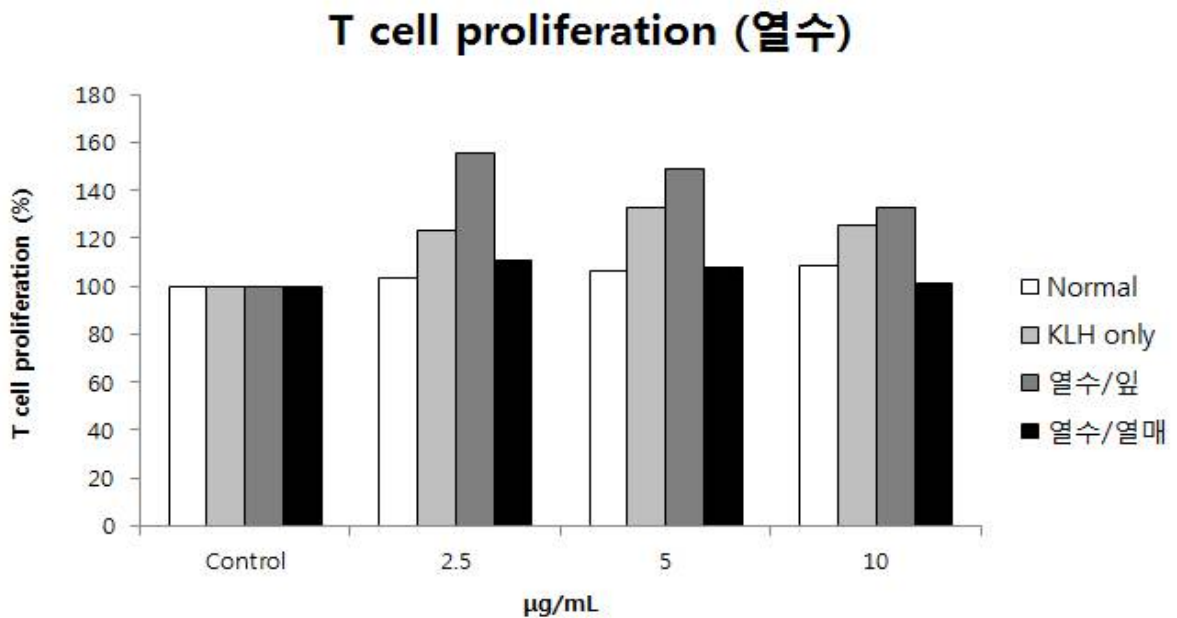
<그림> 아로니아 추출물 투여가 체중변화에 미치는 영향

2) 세포성면역에 미치는 아로니아 추출물의 영향

- 아로니아 잎과 열매 냉수 추출물을 KLH와 함께 면역한 마우스로부터 5주째에 비장세포를 이용하여 T세포 증식반응에 미치는 영향을 측정한 결과, 세포성 면역에 있어서는 약간의 상승효과가 관찰되었으나, 통계학적으로 유의하지는 않았음. 열수 추출물에 있어서는 거의 동일한 결과가 확인됨.



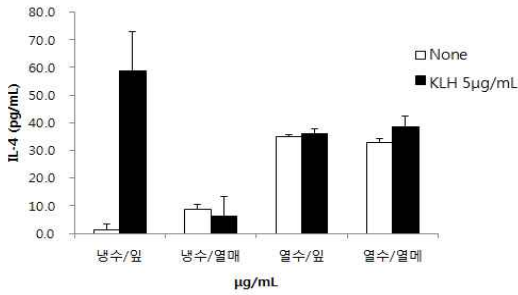
<그림> 아로니아 잎 및 열매 냉수 추출물의 T세포 증식반응에 미치는 영향



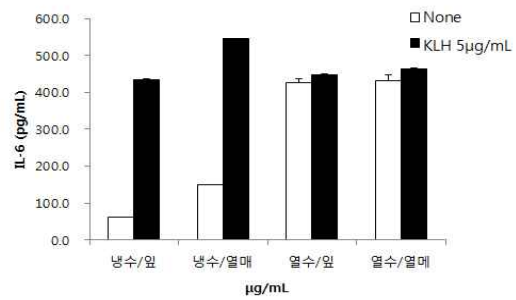
<그림> 아로니아 잎 및 열매 열수 추출물의 T세포 증식반응에 미치는 영향

- 한편 T세포 증식반응 실험에서 회수된 세포배양 상청액 중의 사이토카인 측정에서도 특이한 작용은 관찰되지 않았고, 단지 KLH 항원 특이적인 IL-2 분비에 있어서 잎과 열매의 열수 추출물에서 약간의 억제가 관찰됨.

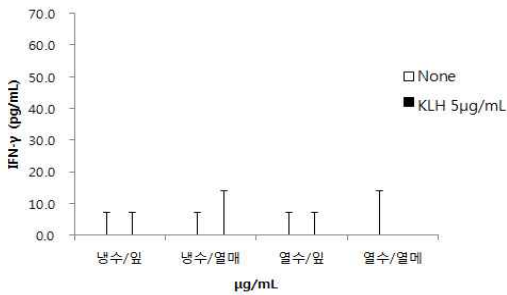
IL-4



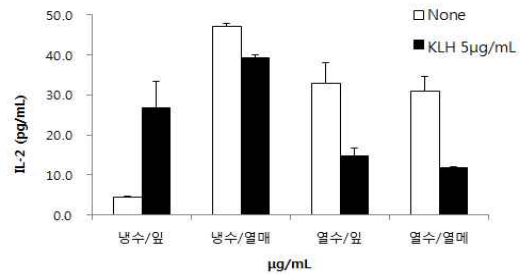
IL-6



IFN-γ

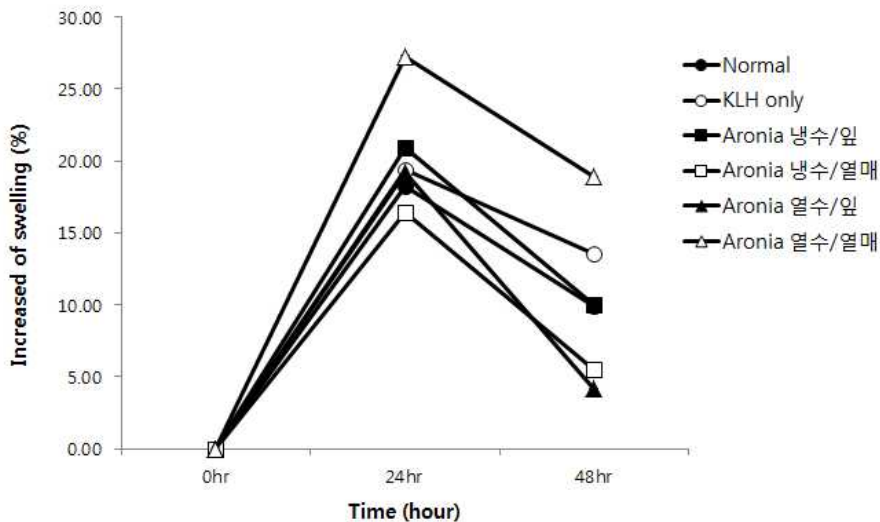


IL-2



<그림> 항원 재자극에 의한 T세포 사이토카인 분비에 미치는 아로니아 추출물의 영향

- 한편 면역 17주째 마우스를 이용하여 지연형 과민반응(DTH; delayed type hypersensitivity)을 측정 한 결과, 어떠한 아로니아 추출물에서도 유의한 변화는 관찰되지 않았음.



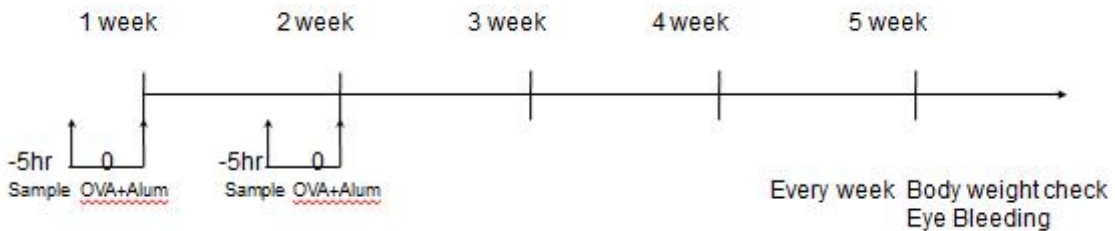
<그림> 항원 특이적인 DTH 반응에 대한 아로니아 추출물의 영향

- 이상의 결과로부터 아로니아 추출물은 항원에 대한 세포면역반응에 대하여 높이거나 낮추는 강한 조절효과를 지니지는 않는 것으로 나타남.

3) 아로니아 추출물의 항알러지 활성

- KLH 항원에 대한 항체면역 실험에서 아로니아 추출물이 항체가를 다소 낮추는 경향이 관찰 되었으므로, 알러젠인 OVA항원에 의한 알러지 모델에서 항알러지 효과를 측정함.

- OVA를 alum과 함께 2주 간격으로 복강주사하여 알러지 반응을 유발하는 모델에서 아로니아 추출물을 OVA면역 5시간 전과 동시에 투여하고 OVA에 대한 IgE항체 유도에 미치는 영향을 조사함.



<그림> 항알러지 실험 프로토콜

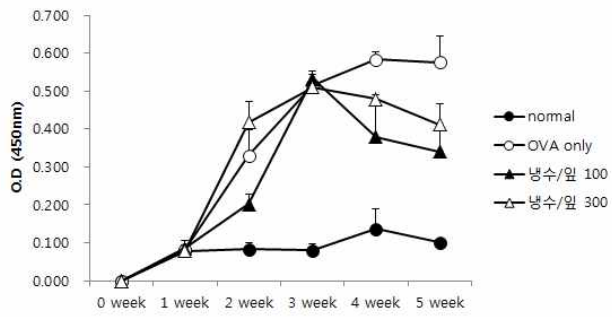
- 그 결과, 열매와 잎 추출물 모두에서 약간의 알러지 억제활성이 관찰되었다. 특히 아로니아 잎의 열수 추출물이 가장 효과가 높은 것으로 나타남.

- 한편 동일한 혈청을 이용하여 OVA항원에 대한 IgGAM 항체가를 측정한 실험에서는, 어떤 추출물도 OVA 특이적인 IgGAM항체 분비에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 아로니아 추출물은 OVA와 같은 알러젠에 대하여, IgE 특이항체 반응을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료됨.

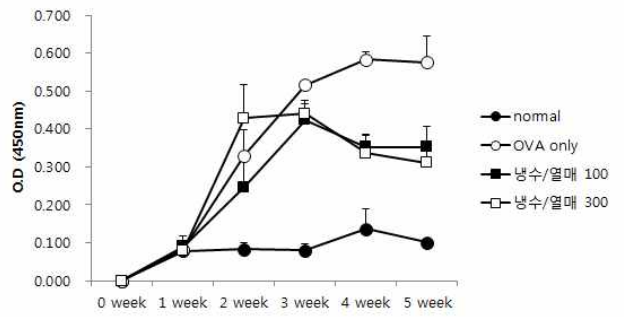
- 또한 혈청 중의 항원에 대해 특이성을 갖지 않는 total IgE를 측정한 실험결과, 아로니아 열수 추출물에서는 대체로 억제효과가 보였으며, 냉수 추출물 중에서도 잎 추출물이 약한 활성을 보였지만, 농도 의존성이 없어 데이터의 신뢰도가 약함.

- 항알러지 실험결과를 종합해 보면, 아로니아 추출물은 KLH와 같은 일반적인 단백질 항원에 대해서는 항체유도를 억제하며, OVA와 같은 알러젠에 대해서는 IgE의 분비를 억제하는 항알러지 효과를 지니는 것으로 사료됨.

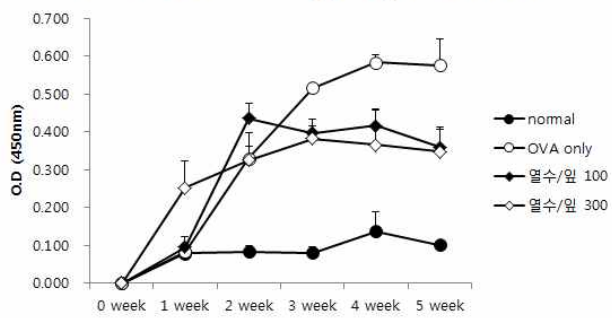
OVA-induced Allergy - IgE (냉수/잎)



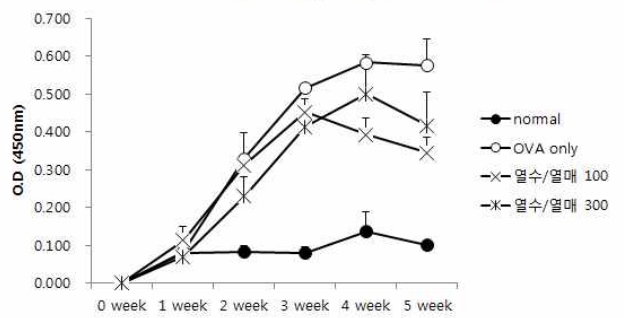
OVA-induced Allergy - IgE (냉수/열매)



OVA-induced Allergy - IgE (열수/잎)

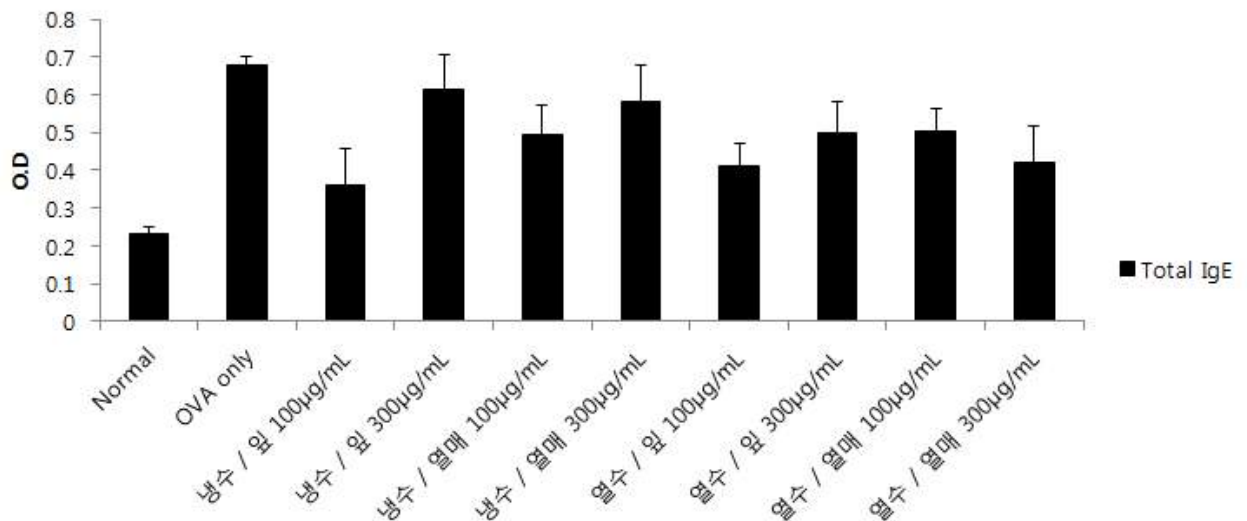


OVA-induced Allergy - IgE (열수/열매)

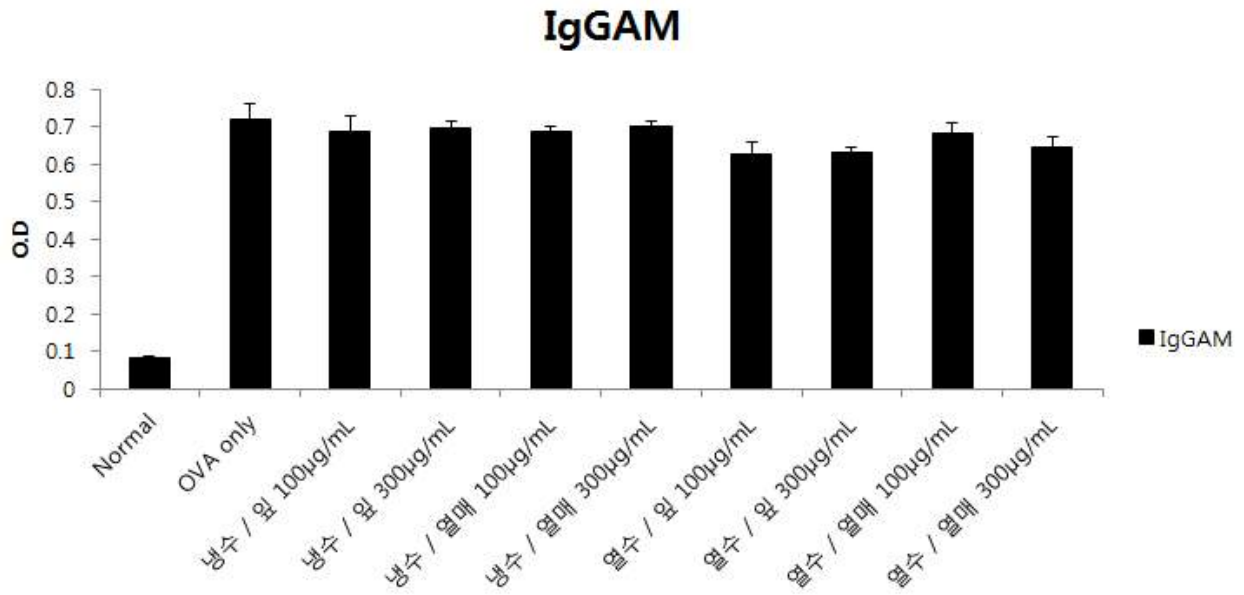


<그림> 아로니아 OVA에 대한 IgE분비 억제활성

Total IgE

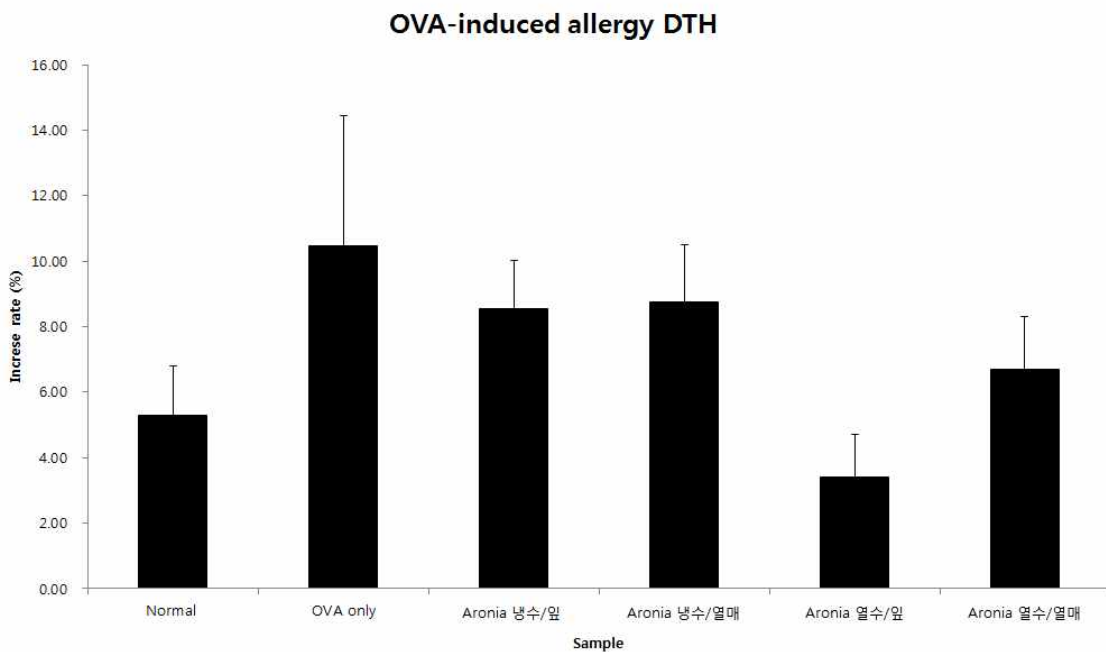


<그림> Total IgE 유도에 대한 아로니아 추출물의 영향



<그림> OVA 특이적인 IgGAM 반응에 대한 아로니아 추출물의 영향

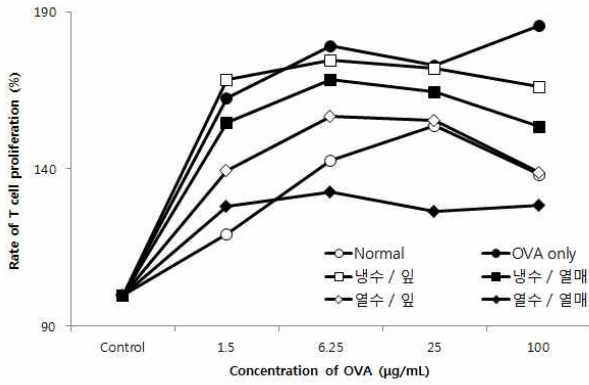
- OVA 알러젠에 대한 세포성 면역에 미치는 영향을 조사하기 위하여, OVA 특이적인 DTH와 T세포 증식반응에 대한 아로니아 추출물의 영향을 측정함. 그 결과 잎 열수 추출물이 DTH 반응에 대한 가장 높은 억제활성을 나타내었음.



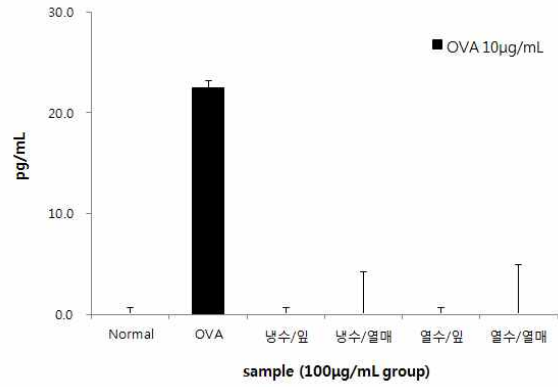
<그림> OVA특이적인 DTH반응에 대한 아로니아 추출물의 억제활성

- 한편 *in vitro*에서의 T세포 증식반응에 있어서도 일부 추출물에서 억제활성이 관찰되었고, 특히 열매 열수, 잎의 열수 및 냉수 추출물에서 높은 억제활성이 인정됨. 이들 추출물은 세포배양 상청액 중의 IL-4 분비에 있어서도 현저한 억제효과가 관찰됨.

A) T세포 증식반응



B) IL-4

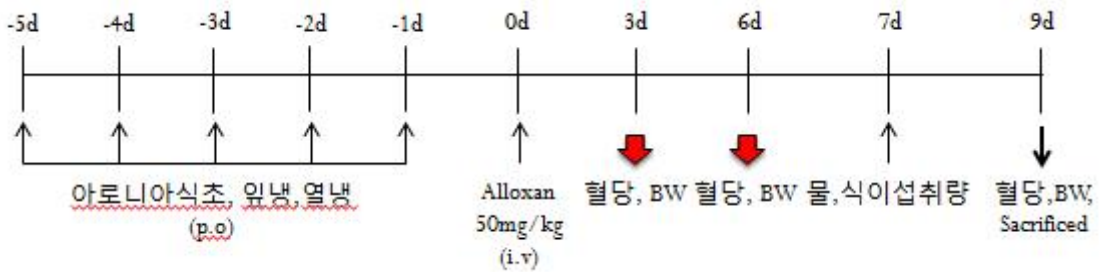


<그림> OVA에 대한 T세포 증식반응 및 IL-4 분비 억제활성

6. 아로니아 열매 추출물 및 아로니아 식초의 항당뇨 활성

가. 실험 방법

- (1) 아로니아 추출물에 의한 혈당조절 활성은 ICR 마우스에 alloxan을 50 mg/kg의 양으로 정맥주사하는 모델을 이용함. 아로니아 및 아로니아 식초의 항당뇨 활성은 alloxan 투여 5일 전부터 1일 1회 총 5회에 걸쳐 경구투여한 후, 혈중 포도당의 농도와 혈중지질의 농도를 정량함으로써 측정함.



<그림> 항당뇨 활성 실험 프로토콜

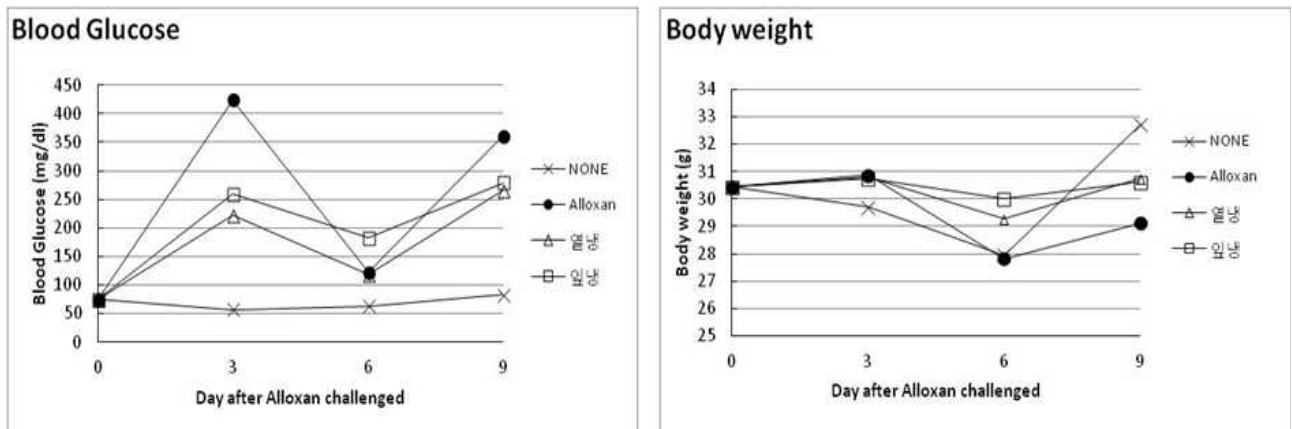
(2) 각 시료의 투여량은 아로니아 추출물(잎 혹은 열매 냉수 추출물)은 3 mg/mouse/day로 경구투여하였으며, 아로니아 식초는 1:1 혹은 1:3으로 증류수로 희석한 아로니아 식초를 500 ul/mouse/day로 경우투여하였음.

(3) 혈중 지질은 total cholesterol, LDL, triglyceride 등을 측정하였으며, 시료의 투여 종료 후 각 장기의 중량을 계측하여 간이독성 테스트를 수행함.

나. 실험 결과

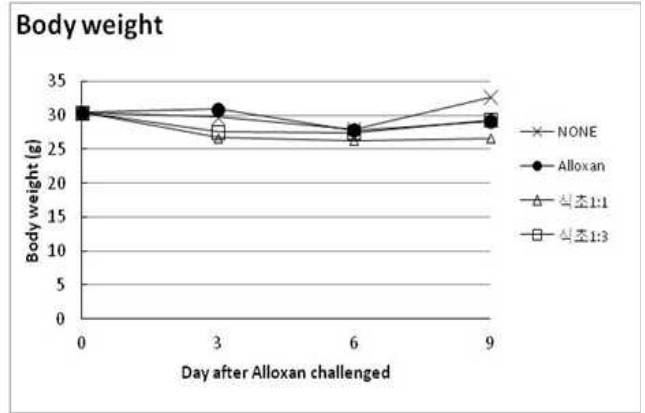
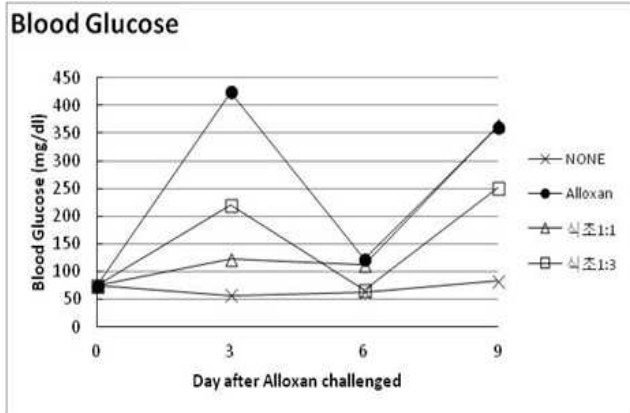
1) 아로니아 잎 및 열매 냉수 추출물 아로니아 식초의 항당뇨 활성

- 아로니아 잎과 열매의 냉수 추출물 투여에 의한 항당뇨 활성을 측정한 결과, 이들 모두 alloxan 투여 3일째에 혈당의 억제가 관찰되었으며, 점차 억제효과가 약해지기는 하지만 9일째까지 약하게 유지되는 것으로 나타남. 이 때 당뇨에 의한 체중감소를 회복시키는 효과도 관찰됨.



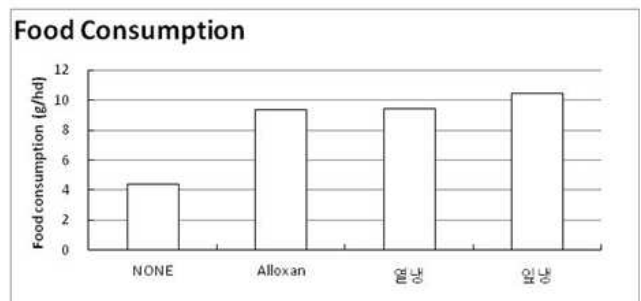
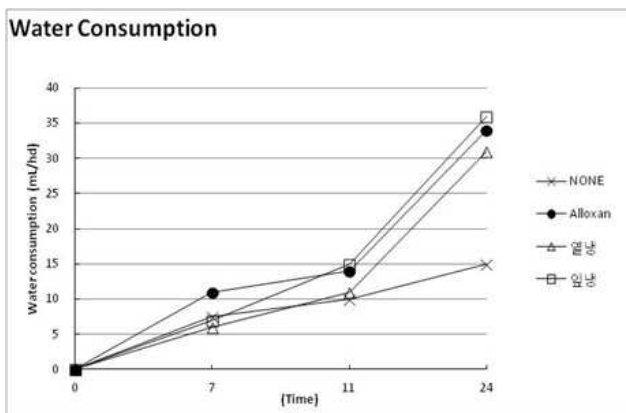
<그림> 아로니아 잎 및 열매 냉수 추출물의 혈당억제 및 체중유지 효과

- 한편 아로니아 식초를 투여한 마우스에서도 alloxan 투여 3일째에는 안정된 혈당조절 효과가 나타남. 특히 1:3으로 희석한 아로니아 식초가 더 효과적인 것으로 관찰됨. 체중에 있어서는 특별한 영향을 주지 않는 것으로 확인됨.

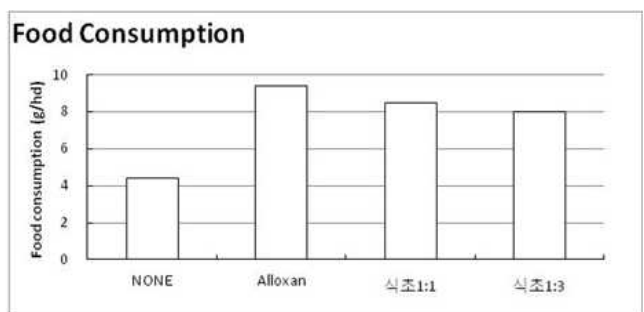
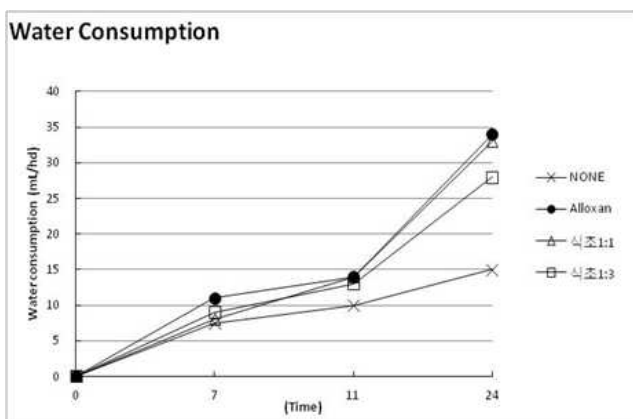


<그림> 아로니아 식초의 항당뇨 활성

- 한편 물과 사료의 섭취량에 미치는 이들 시료의 효과를 측정된 결과, 특별한 영향은 없으므로 확인되었음. 이러한 결과는 아로니아 식초에서도 동일하게 관찰됨.



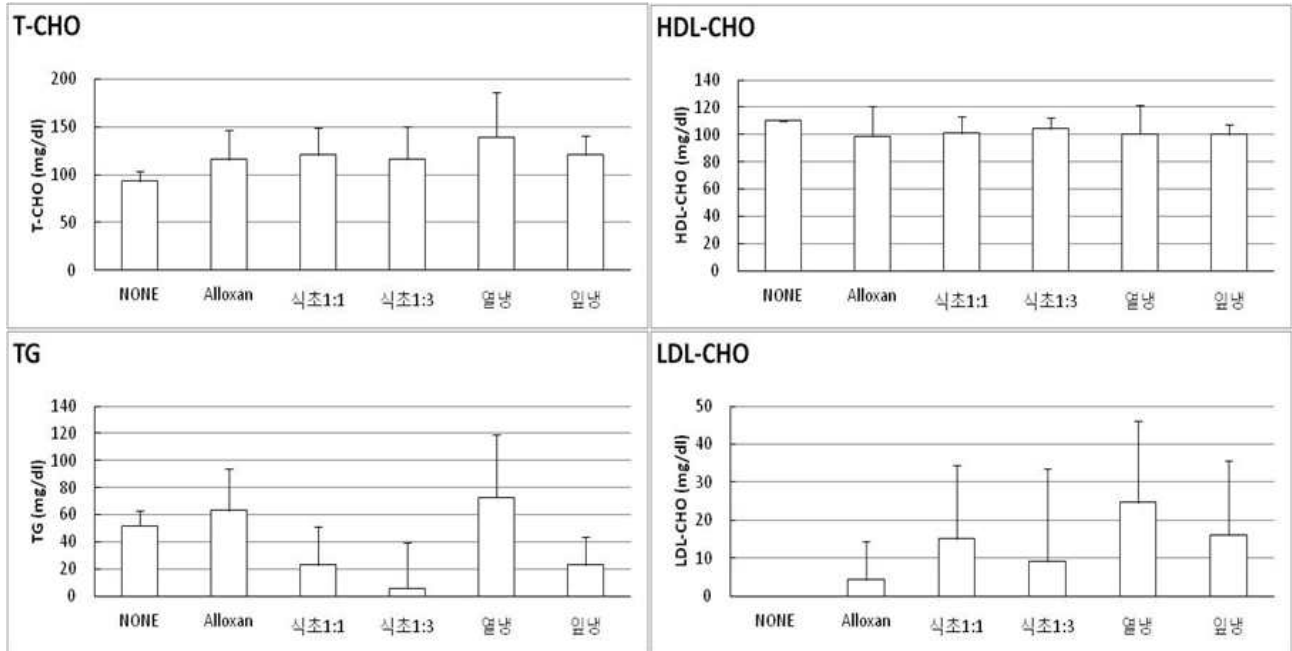
<그림> 당뇨 마우스에서 아로니아 잎 및 열매 냉수 추출물이 음수 및 사료섭취에 미치는 영향



<그림> 당뇨 마우스에서 아로니아 식초가 음수 및 사료섭취에 미치는 영향

2) 당뇨 마우스에서 혈중지질에 미치는 영향

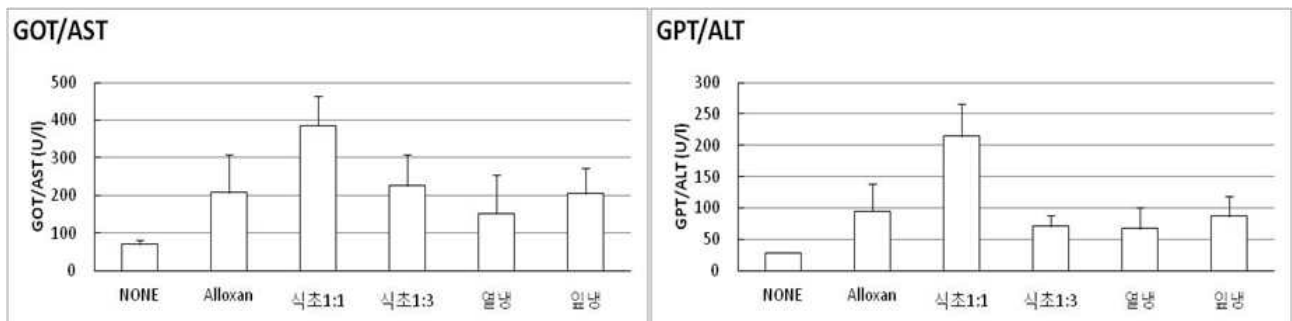
- 혈중 지질성분에 대한 검사를 실시한 결과, total cholesterol과 HDL-cholesterol에는 어떤 시료도 별다른 영향을 미치지 않았으나, TG는 아로니아 식초 투여에 의해 현저하게 감소하였으며, 아로니아 잎의 냉수 추출물도 높은 효과를 보였다. 하지만 LDL-cholesterol에 있어서는 이들 시료 투여에 의해 다소 증가하는 의외의 결과가 관찰됨.



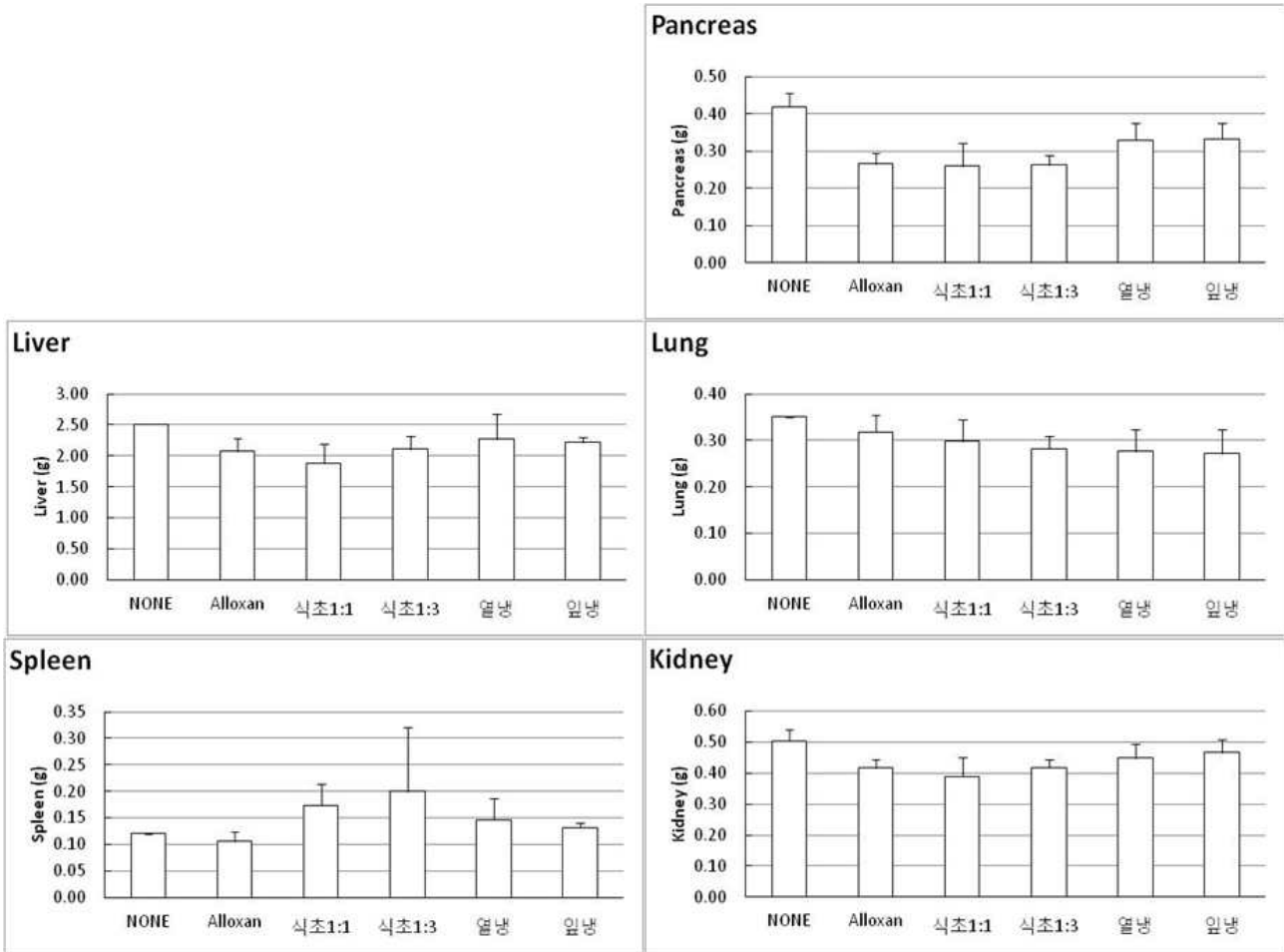
<그림> 당뇨 마우스에서 혈중 지질성분의 정량

3) 항당뇨 실험에서 시료의 간이독성시험

- 당뇨 마우스에서 아로니아 잎 및 열매의 냉수 추출물과 아로니아 식초 투여에 의한 side-effect를 조사하기 위하여, 각 장기의 중량과 간기능을 측정하였다. 그 결과, 폐, 간장, 신장, 비장, 췌장 등 장기의 중량에 있어서는 별다른 변화가 관찰되지 않았음. 하지만 간수치를 나타내는 GOT/AST와 GPT/ALT의 혈중 농도에 있어서는, 당뇨 마우스에 이들 시료를 경구 투여함으로써 간수치가 약간 상승하는 경향이 관찰됨. 추후 보다 구체적인 검토를 계획중임.



<그림> 당뇨 마우스에서 아로니아 추출물 및 식초의 간기능에 미치는 영향



<그림> 당뇨 마우스에서 아로니아 시료 투여가 장기 중량에 미치는 영향

7. 아로니아 막걸리 부산물의 면역조절작용

가. 실험 방법

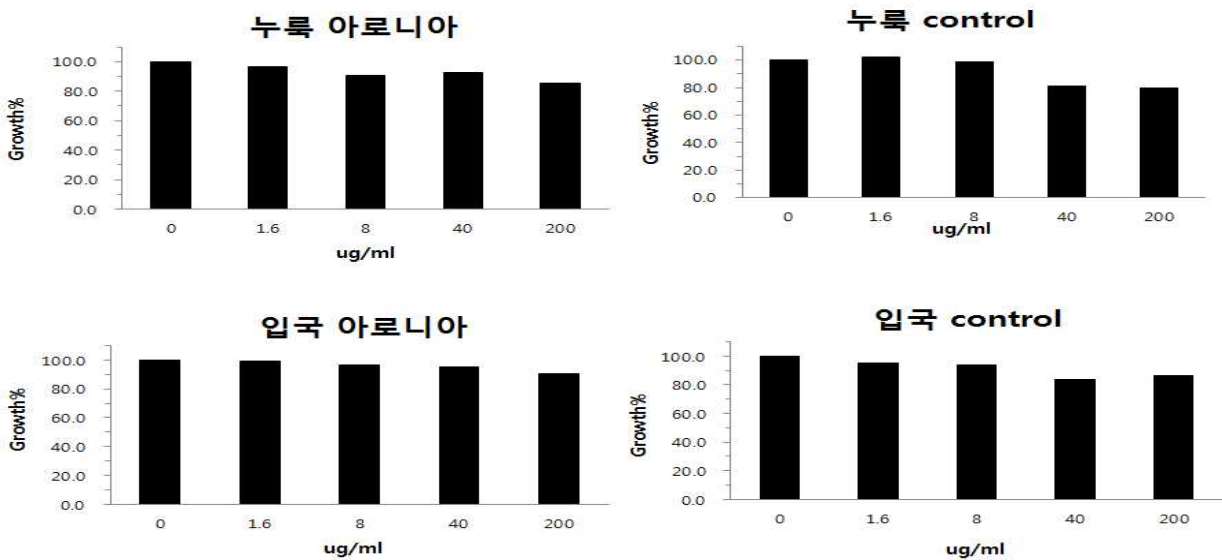
- (1) 누룩과 입국을 이용하여 아로니아를 첨가한 막걸리 제조를 위해 발효시킨 후의 발효부산물의 면역조절활성을 BMDM에 대한 활성화 및 IL-1b 분비유도 관점에서 검토함.
- (2) 아로니아 막걸리 부산물에 의한 항염증 활성화는 LPS로 RAW 264.7세포를 자극하는 염증 모델을 이용하여, 이들 시료를 전처리함으로써 염증매개인자의 분비억제작용을 측정함.

나. 실험 결과

1) 면역증강 활성 조사

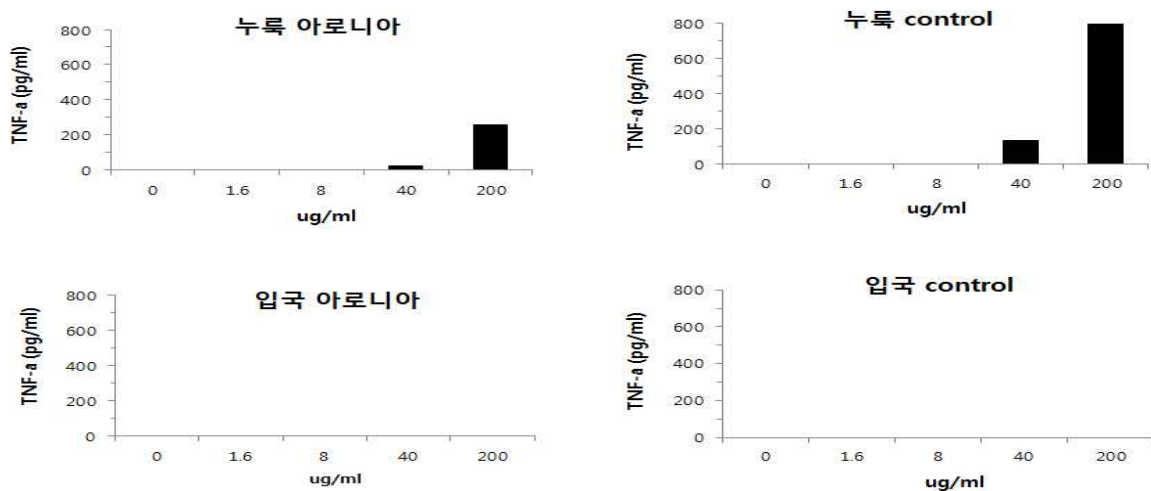
- 누룩 혹은 입국을 이용하여 막걸리를 제조방법에 아로니아를 첨가하는 아로니아 함유 막걸리 제조법에서, 발효 후의 부산물을 산업적으로 이용할 수 있는 지 조사하기 위하여, 이들 부산물의 면역조절활성을 조사함.

- 면역증강활성은 골수에서 유도된 대식세포(BMDM)에 대한 비특이적인 활성화를 측정함. 그 결과 누룩 및 입국으로 제조된 막걸리 부산물 모두 약 40 ug/ml의 농도까지는 안전한 것으로 나타남.

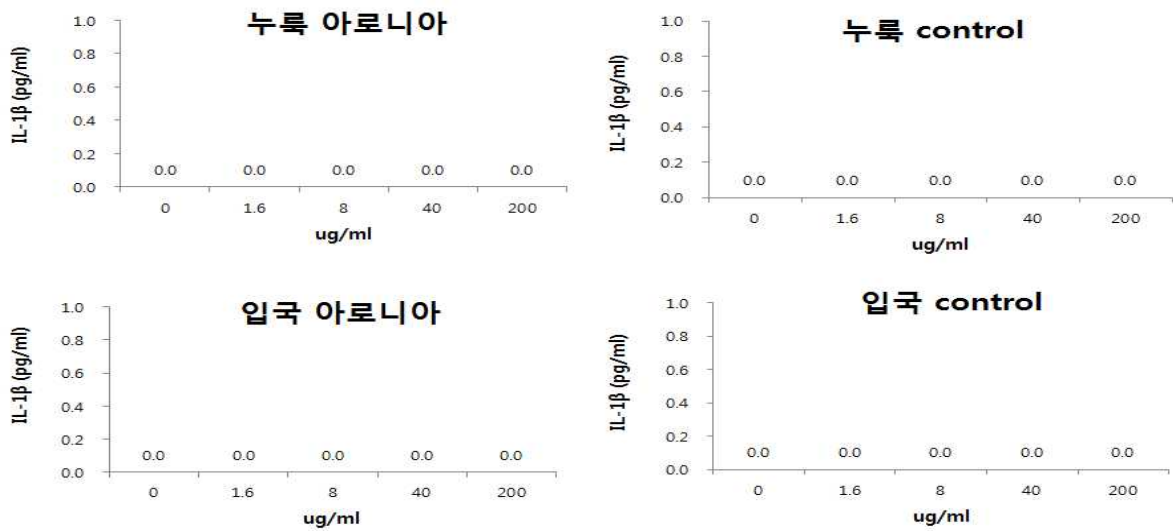


<그림> 아로니아 함유 막걸리 부산물의 BMDM에 대한 세포독성

- 한편 활성화 대식세포로부터 분비되는 사이토카인 TNF-a와 IL-1b를 측정 한 결과, 어떤 치료도 활성을 나타내지 않는 것으로 확인됨.



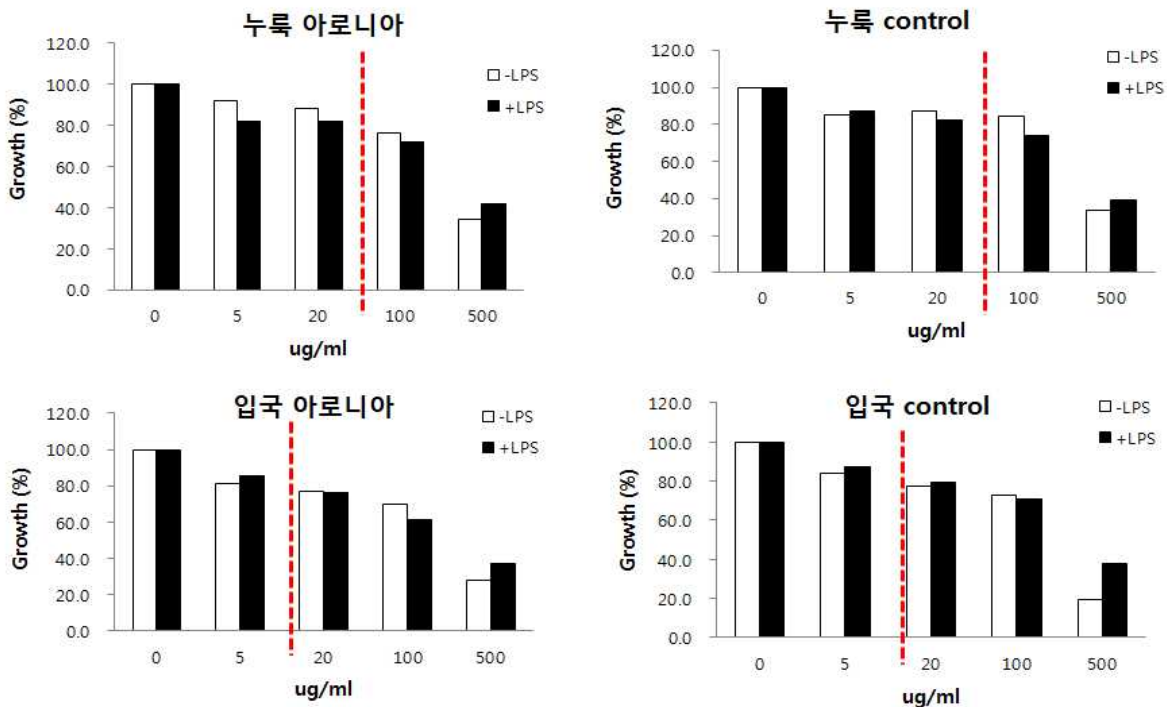
<그림> BMDM에서 아로니아 함유 막걸리 부산물에 의한 TNF-a 분비



<그림> BMDM에서 아로니아 함유 막걸리 부산물에 의한 IL-1b 분비

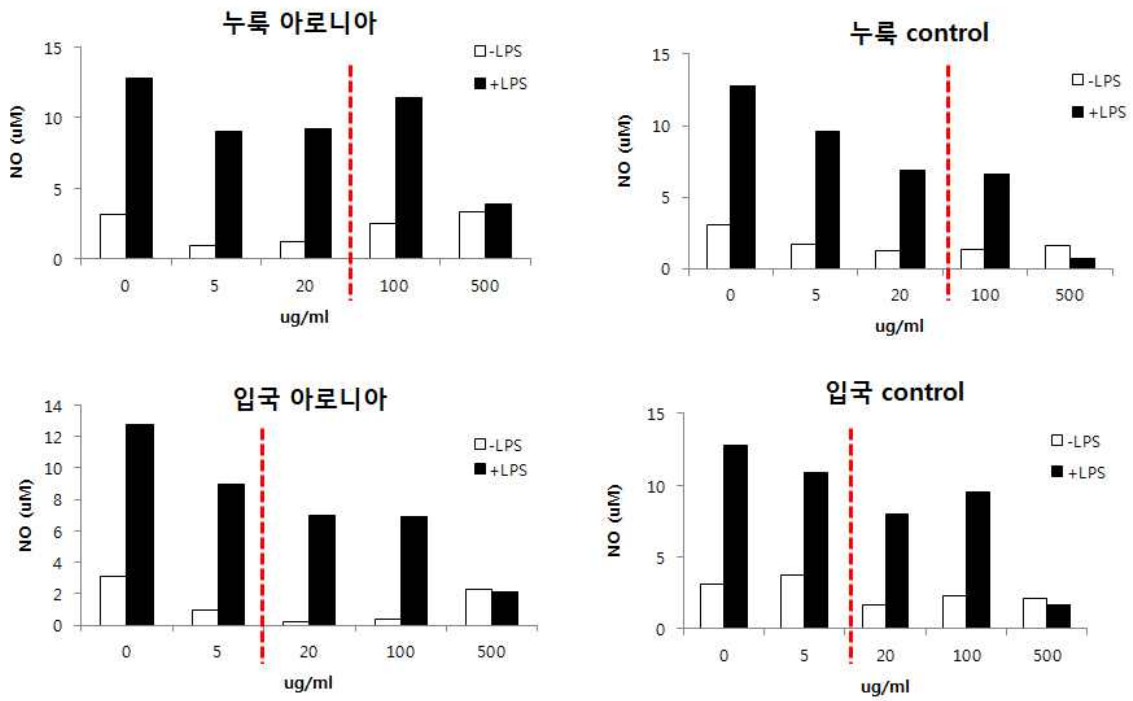
2) 아로니아 함유 막걸리 부산물의 항염증 효과

- 항염증 활성은 RAW264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발하는 실험법을 이용하여 측정함. 먼저 세포독성을 측정한 결과, 모든 시료가 약 20 ug/ml의 농도까지 안전한 것으로 밝혀짐. 이 안전한 농도에서 아로니아 함유 막걸리 부산물의 항염증 활성을 측정한 결과, 모든 시료가 약한 활성을 나타내었다.



<그림> RAW 264.7세포에 대한 아로니아 함유 막걸리 부산물의 세포독성

- 또한 아로니아 함유 막걸이 부산물은 세포독성이 없는 농도에서도 그다지 유의할 만한 항염증 활성은 나타나지 않았음.



<그림> RAW 264.7세포에서 아로니아 함유 막걸이 부산물의 NO 분비억제 효과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	세부연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도 및 기여도
1차 년도 (2012)	아로니아 생산지에 따른 품질특성 및 유효성분 평가	생산지에 따른 아로니아 유효성분 제시	100
	저장온도와 저장기간에 따른 품질특성 및 유효성분 평가	기능성 성분이 극대화 되는 저장조건 제시	100
	건조조건에 따른 분말의 품질특성 및 가공적성 분석	기능성 성분이 극대화되는 건조조건 제시	100
	아로니아 함유 양갱 개발	아로니아 전처리 조건 및 최적의 배합조건 확립	100
	아로니아의 대식세포 조절 기능	신천면역세포에 대한 아로니아 추출물의 기능조절 유무	100
	아로니아 추출물에 의한 T림프구 기능조절 효과	T림프구에 대한 비특이적 기능조절 효과	100
	아로니아의 항염증 활성 측정	염증반응에 대한 억제활성 측정	100
아로니아의 항암작용	아로니아의 항암활성 유무	100	
2차 년도 (2013)	아로니아 열매의 건조 방법에 따른 생리활성물질 함량 측정	생리활성 성분, 색소물질, 페놀화합물 등의 패턴 분석 및 항산화 활성 제시	100
	아로니아 잎의 수확시기에 따른 생리활성물질 함량 측정	생리활성 성분, 색소물질, 페놀화합물 등의 패턴 분석 및 항산화 활성 제시	100
	아로니아 잎의 수확시기에 따른 항산화 및 항암 활성 측정	잎 추출물의 <i>in vitro</i> 항산화 활성 탐색 및 암세포의 침윤, 이동, 전이 억제능 제시	100
	아로니아 함유 기능성 막걸리 제조	아로니아 전처리 조건 확립, 발효 패턴 연구, 색 안정성 증진 조건 확립 및 대량생산조건 도출	100
	항염증 활성 관련 기능성 분자의 발현 억제 및 세포내 신호전달 억제 규명	염증매개인자 유도 관련분자 발현 억제 해석	100
	항염증 활성관련 세포 내 신호전달 억제 규명	신호전달체계의 억제 규명	100
	항원특이적인 면역반응에 대한 아로니아의 효과	항원에 대한 특이면역반응에 미치는 영향 규명	100
항알러지 활성 유무 판정	알러지 억제효과 분석	100	

구분	세부연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도 및 기여도
3차 년도 (2014)	아로니아 함유 발효음료 개발	아로니아 전처리 조건 및 식초음료 제조를 위한 최적조건 확립	100
	아로니아 함유 설기떡 제조	설기떡 제조를 위한 최적조건 확립	100
	아로니아 함유 기능성 잼 제조	기능성 잼 제조를 위한 최적화 조건 확립	100
	개발된 제품의 기능성 평가	개발된 제품의 이화학적 특성, 관능적 특성 및 항산화 활성 제시	100
	아로니아의 항체면역 및 세포면역에 대한 영향 평가	항체면역과 세포면역 제어 여부	100
	알러젠에 대한 알러지 반응 아로니아의 억제기전 해석	항알러지 활성의 작용기전 해석	100
	아로니아의 항당뇨 활성	혈당조절 효과의 유무 규명	100
	아로니아 막걸리 부산물의 생리활성	아로니아 막걸리 부산물의 면역조절 및 항염증 활성 입증	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 : 연구개발 성과

○ 특허 : 특허등록 1건, 특허출원 1건, 특허준비 0건 등

1) 특허 등록

황은선, 뉴안도티. 이예진. 아로니아 양갱의 제조방법 및 이에 의해 제조된 아로니아 양갱. 제 10-1448501호. 2014.9.15

2) 특허 출원

① 황은선, 린뉴웬, 뉴안도티. 아로니아 식초의 제조방법 및 이에 따라 제조된 아로니아 식초. 제10-2015-0088387호. 2015.6.22.

○ 논문 : 11편 게재완료, 1편 출판 중, 2편 투고 중, 3편 투고 준비 중

※ SCI 급

1. J.H. Kwak, Y. He, B. Yoon, S. Koo, Z. Yang, E.J. Kang, B.H. Lee, S.Y. Han, Y.C. Yoo, K.B. Lee, J.S.D. Kim. Synthesis of rhodamine-labelled dieckol: Its unique intracellular localization and potent anti-inflammatory activity. Chem. Commun. 50: 13405-13408 (2014)
2. Nhuan Do Thi, Eun-Sun Hwang. Effects of drying methods on contents of bioactive compounds and antioxidant Activities of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). Food Science and Technology. 2015. (*in press*)

※ 비 SCI급

1. 황은선, 기경남. 아로니아 유래 안토시아닌 색소의 안정성. 한국식품과학회지. 45(4): 416-421. (2013)
2. 황은선, 이예진. 아로니아즙을 첨가하여 제조한 양갱의 품질특성 및 항산화활성. 한국식품영양과학회지. 42(8): 1220-1226. (2013)
3. 뉴안도티, 황은선. 아로니아 분말을 첨가한 청포묵의 품질특성 및 항산화활성. 한국식품조리과학회지. 30(2): 161-169 (2014)
4. 황은선, 뉴안도티. 건조방법에 따른 아로니아 열수 추출물의 항산화 성분 함량 및 항산화 활성. 한국식품과학회지. 46(3): 303-308 (2014)
5. Nhuan Do Thi, Eun-Sun Hwang. Bioactive compound contents and antioxidant activity in aronia (*aronia melanocarpa*) leaves collected at different growth stages. Prev. Nutr. Food Sci.

19(3): 204-212. (2014)

6. 이슬애, 황은선, 문준관, 김계원, 심재용. 아로니아 막걸리의 안토시아닌 안정성. 한국산업식품 공학회지. 18(4): 374-381 (2014)
7. 황은선, 뉴안도티. 설탕 대체 당류를 첨가하여 제조한 아로니아잼의 품질특성 및 항산화 활성. 한국식품영양학회지. 27(5): 888-896. (2014)
8. 황영란, 황은선. 아로니아 분말을 첨가하여 제조한 설기떡의 품질 특성 및 산화방지 활성. 한국식품과학회지. 47(4): 452-459. (2015)
9. 양혜, 오광훈, 유영춘. LPS 자극 RAW 264.7 대식세포에 있어서 아로니아 열매 열수 추출물의 항염증 효과. 한국식품영양과학회지. 44(1): 7-13 (2015)
10. 박우용, 성낙윤, 변의홍, 오광훈, 변명우, 유영춘. 주박에서 분리된 다당류의 대식세포 면역 조절 활성. 44(7): 1079-1083 (2015)

○ 학회발표 : 국내외 학술대회에 참석하여 9편의 연구결과 발표

1. Nhuan Do Thi, Eun-Sun Hwang. Effects of different drying methods on the bioactive compound contents of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). 한국식품과학회 국제심포지움. 천안 예술의전당. 2013. 8. 30.
2. Kyung-Nam Ki, Eun-Sun Hwang. Stability of the anthocyanin pigment extracted from black chokeberry. 한국식품영양과학회 국제심포지움. 광주 김대중 컨벤션센터. 2013. 11. 14.
3. Nhuan Do Thi, Eun-Sun Hwang. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity in *Aronia melanocarpa* leaves collected from the different growing stages. Institute of Food Technologists annual meeting. Chicago, USA. 2013. 7. 14.
4. Nhuan Do Thi, Eun-Sun Hwang. Effects of different drying methods on bioactive compound content and antioxidant activity of *Aronia melanocarpa* fruit. Institute of Food Technologists annual meeting. Chicago, USA. 2013. 7. 14.
5. Nhuan Do Thi, Eun-Sun Hwang. Effects of different drying methods on the bioactive compound contents and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). 한국식품과학회 국제심포지움. 광주 김대중 컨벤션센터. 2014. 8. 26.
6. Nhuan Do Thi, Eun-Sun Hwang. Effects of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extracts on adhesion, invasion, and migration in SK-Hep1 human hepatoma cancer cells. Experimental Biology. Boston Convention Center, USA. 2015. 4. 1.
7. Eun Ju Kang, Junglim Lee, Seok-Rae Park, Yung Choon Yoo. Inhibitory effect of the extract of aronia fruits (AF-WE) on LPS-induced inflammation in Raw 264.7 macrophages. 한국실험동물학회. 2014. 2. 20.

8. Eun Ju Kang, Junglim Lee, Seok-Rae Park, Yung Choon Yoo. Effect of the extract of aronia leaves (AL-WE) on inflammation induced by LPS stimulation in Raw 264.7 macrophages. 한국실험동물학회. 2014. 2. 20.
9. Eun Ju Kang, Junglim Lee, Seok-Rae Park, Yung Choon Yoo. The Extract of Aronia Fruits Inhibits LPS-Induced Inflammation via Inhibition of MAPK and NF-κB Activation in Raw 264.7 Macrophages. 대한면역학회. 2014. 4. 18.

○ 기술이전 :

1. 참여기업에 기술이전 (2014. 4) : 아로니아 추출물을 함유하는 병행복발효 기술
2. 참여기업에 기술이전 (2015. 6) : 아로니아 추출액을 함유한 양갱의 제조 기술

언론 홍보 실적

❖ MBC 생방송 좋은아침(2013. 7.11)



❖ MBN뉴스(2013. 11.2)



제2절. 성과활용 계획

- 본 연구를 통해 얻어진 결과를 국내외 학술논문, 학술대회, 심포지움 등에서 발표함으로써 아로니아의 기능성과 제품화 가능성을 과학적으로 입증함
- 국내에 유통되고 있는 아로니아의 선천면역세포 활성증강, 염증작용 및 알러지 개선 기능성 식품소재의 개발을 통해 식품생명공학 관련 학문발전에 기여하고 국내의 연구기술을 해외에 널리 홍보함
- 아로니아의 기능성 성분을 증가시킬 수 있는 저장 및 가공기술을 개발 보급함으로써 가정에서 쉽게 응용할 수 있고, 건강기능성 식품의 원료로 개발할 수 있는 기초자료를 제공하고 활용하도록 함
- 기능성 식품 신소재 및 기능성 식품 시장의 확대에 의한 관련 산업의 고용 창출 효과가 기대되며 국내소비 뿐만 아니라 해외 시장 개척을 통해 수출 상품화가 가능할 것으로 예측됨
- 아로니아의 가공제품 개발로 아로니아 생산농가의 안정적인 생과(fresh fruit) 납품처 확보 및 매출 안정화와 가공제품 생산기업의 경제적 이윤을 확대하고 아로니아 및 아로니아 가공제품 홍보로 소비자 신뢰도 향상 및 지속적인 마케팅으로 매출액 확대에 기여할 수 있을 것으로 예상됨
- 본 과제를 통해 아로니아 가공품 개발하여 이에 대한 노하우를 참여기업에 기술이전 함으로써 개발된 다양한 가공제품을 산업화할 수 있는 기초 토대를 마련함
- 대학원생들이 연구에 참여하여 학위논문과의 연계를 통해 제품개발, 생리활성 평가기술 등 다양한 실험경험을 갖춘 우수한 연구 인력의 배출하는 계기 마련

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 현재 아로니아를 산업적으로 가장 활발하게 응용하고 있는 나라는 일본으로 1976년부터 러시아와의 농업기술교류사업을 통해 아로니아를 자국에 도입하였음. 도입 초기에는 북해도에서 제한적으로 러시아산 아로니아를 재배하여 일본 전역에 여러 형태로 제품화 하여 판매하였으나 점차로 일본 내 다른 지역에서도 아로니아의 재배가 증가하고 있음
- 일본에서는 항산화 활성을 지닌 기능성 식품 혹은 화장품 소재가 인기를 끌고 있으며, 아로니아도 안토시아닌을 많이 함유하고 있는 이유로 생산량과 관련제품의 매출이 크게 신장되고 있는 상황임.
- 일본에서의 아로니아 관련제품 판매는 통신판매와 인터넷 판매가 주류를 이루고 있으며, 와인, 빵 및 과자류(롤케익, 센베과자, 젼, 캔디 등), 음료(드링크, 주스, 시럽 등), 기능성 식품(눈 보호용 식품, 아토피 환자용 아로니아 동충화초, 다이어트 서프리트, 건조 아로니아 열매 등), 기능성 화장품 및 향장품(비누, 샴푸, 먹는 화장품 등), 기타 제품(우동, 아이스크림, 국밥용 분말 등) 등 여러 제품에 적용되고 있음

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

1. 연구활동종사자 보험가입

- 매년 정기적으로 보험가입 및 갱신처리를 지속적으로 이행함
- 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제14조 제1항 및 시행령 제15조 제1항에 의거 의 목적 가입
- 가입기관 : 교육시설재난공제회
- 보상한도 : 사망시 100,000,000원 / 상해시 10,000,000원
- 가입대상 : 학부생, 대학원생, 연구원(보조연구원 포함)

□ 안전점검 및 정밀안전진단

- 안전점검 및 안전진단체계

구분	일상점검	상시점검	정기점검	정밀안전진단
횟수	매일 1회	월 1회 이상	연간 1회	2년 1회
점검자	연구활동종사자	연구실안전환경관리 자	외부점검의뢰 및 연구실안전환경관리 자	외부점검의뢰

2. 연구실 안전교육

- 교육개요
 - 연구실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 연구실의 안전교육이 의무화됨에 따라 과학기술분야 대학생·대학원생 및 연구원 전원은 연구실 안전교육을 의무적으로 수강

○ 교육구분

가. 정기교육

- 1) 교육방법 : 온라인교육
- 2) 교육시기 : 1학기 : 3월~6월 / 2학기 : 9월~12월
- 3) 교육강사 : 외부 전문 업체 이용
- 4) 교육내용 : 연안법, 전기/소방, 화학/생물, 기계/가스 및 기타 실험실 안전관련 사항

나. 신규교육

- 1) 교육방법 : 오프라인 교육 또는 개별교육
- 2) 교육시기 : 오프라인 교육(2월, 8월)
- 3) 교육강사 : 외부 전문가 활용

4) 교육내용 : 연안법 및 연구실 안전에 관한 사항

다. 수시교육

- 해당연구실의 연구과제 및 특별히 안전조치가 필요할 때 연구책임자가 시행
- 해당 교과목 수업진행 시 안전조치에 관한사항을 교과목 담당 교수가 시행

제 9 장 참고문헌

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 15 th ed. Method 77, 780, 788. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA (1990)

AOAC. Official methods of analysis. 16th ed., Association of official analytical chemists. Washington, DC. Ch. 3, pp 1-26 (1995)

Benvenuti S, Pellati F, Melegari M, Bertelli D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. J Food Sci. 69: 164-169 (2004)

Borchani C, Besbes S, Masmoudi M, Blecker C, Paquot M, Attia H. Effect of drying methods on physico-chemical and antioxidant properties of date fibre concentrates. Food Chem. 125: 194-1201 (2011)

Bridle P, Timberlake CF. Anthocyanins as natural food colors-selected aspects. *Food Chem* 58: 103-109 (1997)

Chae SK, Gang GZS, Rue ID, Ma SJ, Bang GY, Oh MH, Oh SH. Standard food analysis. Ji-Gu Publishing Co. Paju, Gyeonggi-do, Korea, pp. 403-404 (2008)

Chan EWC, Lim YY, Wong SK, Lim KK, Tan SP, Lianto FS, Yong MY. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. Food Chem. 113: 166-172 (2009)

Cheung LM, Cheung PC, Ooi VE. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. Food Chem. 81: 249-255 (2003)

Choi YS, Kim HW, Hwang KE, Kim CJ, Lee HM, Kim OK, Choi KS. Effects of replacing sugar with xylitol and sorbitol on the textural properties and sensory characteristics of injeolmi. Korean J Food Cookery Sci 29: 825-831 (2013)

Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). Biosci. Biotech. Biochem. 61: 118-123 (1997)

D'Alessandro LG, Dimitrov K, Vauchel P, Nikov I. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chem. Eng. Res. Des.* 92: 1818-1826 (2014)

Gironés-Vilaplana A, Valentão P, Andrade PB, Ferreres F, Moreno DA, García-Viguera C. Phytochemical profile of a blend of black chokeberry and lemon juice with cholinesterase inhibitory effect and antioxidant potential. *Food Chem* 134: 2090-2096 (2012)

Giusti MM, Wrolstad RE. *Handbook of Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, New Jersey, USA. pp. 19-31 (2001)

Handeland M, Grude N, Torp T, Slimestad R. Black chokeberry juice (*Aronia melanocarpa*) reduces incidences of urinary tract infection among nursing home residents in the long term – a pilot study. *Nutr. Res.* 34: 518-525 (2014)

Hellström JK, Shikov AN, Makarova MN, Pihlanto AM, Pozharitskaya ON, Ryhänen E, Kivijärvi P, Makarov VG. Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii*, var. *Viking*). *J. Func. Foods.* 2: 163-169 (2010)

Hsu C-L, Chen W, Weng Y-M, Tseng C-Y. Chemical composition, physical properties and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chem.* 83: 85-92 (2003)

Jakobek L, Drenjančević M, Jukić V, Šeruga M. Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galicianka” and wild chokeberries. *Scientia Hort.* 147: 56-63 (2012)

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962 (1999)

Kedzierska M, Olas B, Wachowicz B, Glowacki R, Bald E, Czernek U, Szydłowska-Pazera K, Potemsk P. Effect of the commercial extract of aronia on oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients after the surgery and various phases of the chemotherapy. *Fitoterapia* 83: 310-317 (2012)

KFAC. Korean Food Additives Code. Ministry of Food and Drug Safety. Korea (2013)

Kim JH, Auger C, Kurita I, Anselm E, Rivoarilala LO, Lee HJ, Lee KW, Schini-Kerth VB. *Aronia melanocarpa* juice, a rich source of polyphenols, induces endothelium-dependent relaxations in porcine coronary arteries via the redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase. Nitric Oxide 35: 54-64 (2013)

Kim MH, Kim MH, Yun S, Lee BY, Lee C, Kim BA, Jang KH, Lee JC, Surh J. Preparation and quality characterization of apple jam with *Rosa rugosa* Thunb. fruit. Korean J Food Cookery Sci 26:367-380 (2012)

Kim H, Kim J, Seok Y, Seo S, Kim S, Sung G. The effect of citric acid and enzyme inactivation treatment on C3G stability and antioxidant capacity of mulberry fruit jam. J Seric Entomol Sci 50: 82-86 (2012)

Kulling SE, Rawel HM. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. Planta Medica 74: 1625-1634 (2008)

Na YM, Lee YJ, Chun SS. Quality characteristics of tomato jam added with fructo-oligosaccharide. J Korean Soc Food Sci Nutr 41:227-232 (2012)

Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jap. J. Nutr. Diet 44: 307-315 (1986)

Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA, Diamantidis Gr. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, black berries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. Food Chem. 102: 777-783 (2007)

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26:1231-1237 (1999)

Sainova I, Pavlova V, Alexieva B, Vavrek I, Nikolova E, Valcheva-Kuzmanova S, Markova T, Krachanova M, Denev P. 2012. Chemoprotective, antioxidant and immunomodulatory *in*

in vitro effects of *Aronia melanocarpa* total extract on laboratory-cultivated normal and malignant cells. J Biosci Biotech SE/ONLINE:35-43 (2012)

Singleton VLR, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Method Enzymol. 299: 152-178 (1999)

Slimestad R, Torskangerpoll K, Nateland HS, Johannessen T, Giske NH. flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. J Food Composit Anal 18: 61-68 (2005)

Valcheva-Kuzmanova S, Marazova K, Krasnaliev I, Galunska B, Borisova P, Belcheva A. Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats. Exp. Toxicol. Pathol. 56: 385-392 (2005)

Wang J, Yuan X, Jin Z, Tian Y, Song H. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. Food Chem. 104: 242-250 (2007)

Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J. Apicul. Res. 37: 99-105 (1998)

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

특허, 논문, 시장분석 보고서

신청과제명	아로니아 함유 가공식품 개발을 위한 가공적합성 및 건강기능성 규명		
주관연구책임자	황 은 선	주관기관	한경대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
아로니아 가공적성, 가공품(조리법)개발	폴란드, 일본	10	80	100	
아로니아 기능성	폴란드	10	80	100	

2. 특허분석

기술명	아로니아 추출 가공품	아로니아 건강기능성
Keyword	(아로니아 or aronia) and (추출 or extraction) and (가공품 or processed food)	(아로니아 or aronia) and (건강기능성 or health functionality)
검색건수	40	21
유효특허건수	5	4
핵심특허 및 관련성	특허명	안토시아닌 함량을 높이는 추출, 정제법 및 분말화 체중감소를 촉진시키는 방법 -아로니아 성분 및 함량
	보유국	대한민국 미국
	특허번호	KR공개20110063081 US공개20100222422
	관련성(%)	50% 20%
	유사점	안토시아닌 함량을 높이는 추출, 정제법 및 분말화 아로니아를 활용한 기능성 소재개발
차이점	안토시아닌 이외의 다른 기능성 물질에 대한 탐색 및 아로니아의 면역활성 증진에 중점을 두고 기전 및 활용가능성 연구	

핵심특허 및 관련성	특허명	트리테르펜 함유추출물, 플라보노이드 함유 추출물 제조방법(아로니아 세포배양)	항산화용 또는 항노화용 화장품 조성물
	보유국	일본	대한민국
	특허번호	JP공개2011026265	KR공개2011005754
	관련성(%)	30%	40%
	유사점	아로니아를 활용한 추출물 배양 기술 개발	아로니아의 기능성을 활용한 소재 개발
	차이점	아로니아 세포배양이 아닌 생과 및 잎을 활용한 제품제조 기술 개발	아로니아의 면역활성 증진에 중점을 두고 기전 및 활용가능성 연구
핵심특허 및 관련성	특허명	아로니아 허브 주스 제조방법	초크베리 생물활성분획물 C3G 복합체를 유효성분으로 함유하는 동맥경화 및 고혈압 예방 및 치료용 약학적 조성물
	보유국	일본	대한민국
	특허번호	JP공개2011041544	출원 1020100053609
	관련성(%)	20%	30%
	유사점	아로니아를 활용한 제품 개발	아로니아에 함유된 C3G를 유효성분으로 한 의약소재 개발
	차이점	음료 이외의 제품 개발	아로니아의 C3G를 포함한 전반적 생리활성 물질에 대한 면역활성 연구
핵심특허 및 관련성	특허명	아로니아 블랙 초크베리 티백차 조성물 및 이의 제조방법	
	보유국	대한민국	
	특허번호	KR공개20111060083	
	관련성(%)	30%	
	유사점	아로니아 잎을 활용한 제품 개발	
	차이점	아로니아 잎을 활용한 티백차 이외의 다른 제품(조리법) 개발	

3. 논문분석

개발기술명		아로니아 건강기능성	아로니아 추출 가공품
Keyword		아로니아,	
검색건수		30	
유효논문건수		7	1
핵심논문 및 관련성	논문명	아로니아로부터 유래한 추출물의 항산화 및 항알레르기 효능	Aronia-enriched lemon juice: a new highly antioxidant beverage.
	학술지명	한국식품영양과학회지	J Agric Food Chem.
	저자	정종문	González-Molina E, Moreno DA, García-Viguera C.
	게재년도	2008	2008
	관련성(%)	50%	40%
	유사점	아로니아 추출물의 항산화 활성, 5-LO와 COX 억제능 측정	아로니아의 높은 항산화 활성을 활용하여 레몬주스에 첨가
	차이점	아로니아 주정추출분말이 아닌 실제 열매의 항산화 활성 평가 예정	아로니아의 항산화활성을 주스 이외의 다른 가공품(막걸리, 양갱 등)에 적용 예정
핵심논문 및 관련성	논문명	An Extract from berries of <i>Aronia melanocarpa</i> modulates the generation of superoxide anion radicals in blood platelets from cancer patients	
	학술지명	Planta Med	
	저자	M. Kedzierska, B Olas, B Wachowicz et al.	
	게재년도	2009	
	관련성(%)	30%	
	유사점	암환자의 혈소판을 대상으로 아로니아 추출물의 항산화 활성 탐색	
	차이점	아로니아의 면역활성 및 작용기전 탐색 예정	
핵심논문 및 관련성	논문명	The nitrative and oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients: The protectory action of <i>aronia melanocarpa</i> extract	
	학술지명	Platelets	
	저자	M. Kedzierska, B. Olas, B. Wachowicz et al.	

	게재년도	2010	
	관련성(%)	30%	
	유사점	유방암환자의 혈소판에서 아로니아 추출물의 항산화 효과 측정	
	차이점	아로니아의 면역활성 및 작용기전 탐색 예정	
핵심논문 및 관련성	논문명	Effects of the commercial extract of aronia on oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients after the surgery and various phase of the chemotherapy	
	학술지명	Fitoterapia	
	저자	M. Kedzierska, B. Olas, B. Wachowicz et al.	
	게재년도	2012	
	관련성(%)	30%	
	유사점	수술 후와 다양한 단계의 항암치료를 거친 유방암환자의 혈소판에서 아로니아 추출물의 항산화 효과 측정	
	차이점	아로니아의 면역활성 및 작용기전 탐색 예정	
핵심논문 및 관련성	논문명	Up-regulation of tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of polyphenol-rich chokeberry juice	
	학술지명	J. Nutritional Biochemistry	
	저자	M. Bermudex-Soto, M. Larrosa, J. Carcia-Cantalejo et al.	
	게재년도	2007	
	관련성(%)	40%	
	유사점	인체 대장암세포에서 아로니아 주스의 항암효능 평가	
	차이점	생과에서 얻은 아로니아 추출물의 암전이 효능 측정	
핵심논문 및 관련성	논문명	Inhibitory effects of various beverages on the sulfoconjugation of 17 β -estradiol in human colon carcinoma Caco-2 cells	
	학술지명	Biol. Pharm Bull.	
	저자	A. Saruwatari, M. Isshiki, H. Tamura	

	게재년도	2008	
	관련성(%)	30%	
	유사점	인체 대장암세포에서 아로니아 음료의 항암효능 측정	
	차이점	생과에서 얻은 아로니아 추출물의 암전이 효능 측정	
핵심논문 및 관련성	논문명	Studies on antioxidant properties of polyphenol-rich extract from berries of <i>Aronia melanocarpa</i> in blood platetlets	
	학술지명	J. Physiology and Pharmacology	
	저자	B. Olas, B. Wachowicz, P. Nowak et al.	
	게재년도	2008	
	관련성(%)	30%	
	유사점	혈소판에서 아로니아 추출물의 항산화 효능 평가	
	차이점	아로니아의 면역활성 및 작용기전 탐색 예정	

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내에는 아로니아 재배가 활성화되지 않아 아직까지 지속적으로 생산되는 제품은 없음

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 현재 아로니아를 산업적으로 가장 활발하게 응용하고 있는 나라는 일본으로 1976년부터 러시아와의 농업기술교류사업을 통해 아로니아를 자국에 도입하였음. 도입 초기에는 북해도에서 제한적으로 러시아산 아로니아를 재배하여 일본 전역에 여러 형태로 제품화 하여 판매하였으나 점차로 일본 내 다른 지역에서도 아로니아의 재배가 증가하고 있음.
- 일본에서는 항산화 활성을 지닌 기능성 식품 혹은 화장품 소재가 인기를 끌고 있으며, 아로니아도 안토시아닌을 많이 함유하고 있는 이유로 생산량과 관련제품의 매출이 크게 신장되고 있는 상황임.

○ 일본에서의 아로니아 관련제품 판매는 통신판매와 인터넷 판매가 주류를 이루고 있으며, 와인, 빵 및 과자류(롤케익, 샌드위치, 잼, 캔디 등), 음료(드링크, 주스, 시럽 등), 기능성 식품(눈 보호용 식품, 아토피 환자용 아로니아 동충화초, 다이어트 서프리트먼트, 건조 아로니아 열매 등), 기능성 화장품 및 향장품(비누, 샴푸, 먹는 화장품 등), 기타 제품(우동, 아이스크림, 국밥용 분말 등) 등 여러 제품에 적용되고 있음



다이어트식

먹는 화장품



건조 아로니아



국밥용 분말

아로니아 잼 및 주스



와인



아로니아를 소재로 한 과자류

그림. 일본 내에서 만들어진 아로니아를 활용 제품들

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 본 연구에서는 아로니아 생과, 잎, 추출물 및 건조 아로니아를 이용한 건강기능성 식품(소재)을 개발하고 이를 기술이전하여 기업차원에서 경쟁력 있고 시장성이 있는 건강기능성 식품 제품개발

- 아로니아 추출물과 잎을 이용하여 다양한 가공제품 개발(막걸리, 양갱류, 쿠키, 나물, 샐러드 등)
- 아로니아의 건조, 냉동, 냉장 조건을 확립하여 제과제빵을 포함한 가공식품 소재로 활용하도록 함
- 그 밖의 가능성이 규명된 부분(항산화, 항암, 항간암 등)에 대한 다양한 고부가가치 가공품 개발

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	50	100	2,000	5,000	10,000	17,150
경제적 파급효과	100	300	5,000	10,000	20,000	35,400
부가가치 창출액	100	300	5,000	10,000	20,000	35,000
합 계	250	700	12,000	25,000	50,000	87,950

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

- 기존의 아로니아 제품에 대한 특허는 식초음료 및 허브음료 형태에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 아로니아 특유의 시고 뚝은 맛이 제거된 뒷맛이 깔끔한 막걸리를 개발하여 국내에 출원할 계획임. 또한 아로니아 저장 및 유통기술에 대한 특허가 없어 이 기술에 대한 특허를 출원할 계획임

2) 논문분석 측면

- 기존 논문은 아로니아에 함유된 안토시아닌 성분의 항산화 효능에 대해 보고하고 있으므로, 본 연구과제에서는 구체적인 항산화 물질을 분리하고, 항산화 성분이 가장 많이 함유

된 아로니아 저장 및 가공(조리)법을 제시하며, 가공·저장 과정에서 항산화 물질의 변화 양상을 분석하여 국내외 학술지에 발표할 계획임

- 기존 논문은 아로니아 추출물의 성분분석에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 아로니아 생과, 재배부산물인 잎 및 아로니아를 가공하였을 때, 생리활성 물질의 변화 및 항암 효능에 관한 구체적인 메카니즘을 분석하여 국제 학술지에 게재할 계획임
- 기존의 아로니아 제품에 대한 논문은 추출액 개발에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 아로니아를 활용한 쿠키, 양갱, 막걸리 개발 방향으로 연구를 추진하여 이화학적 특성 분석, 영양성분 분석 및 관능평가 결과 등을 국내 학술지에 게재할 계획임

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 아로니아 추출물, 아로니아 잎차 제조 등이 보고되고 있으나, 막걸리, 양갱, 과자류, 샐러드 등의 제품개발은 거의 되어 있지 않음. 따라서 본 연구를 통해 과학적 근거에 기반을 둔 건강기능성 소재를 개발하고, 아로니아 추출액 및 폐기물로 버려지는 아로니아 잎의 효용가치를 증진시켜 아로니아의 가공시장 확대와 함께 소득제고의 활로를 모색하기 위한 방법으로 연구를 진행하여 아로니아의 산업화 기반을 마련하고자 함

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.