

11-15430
00-00219
7-01

대사증후군 개선효과를 나타내는 과채 발효음료 개발 최종보고서

2017

농림축산식품부

고부가가치 식품기술개발사업 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-002197-01

대사증후군 개선효과를
나타내는 과채 발효음료 개발
최종보고서

2018. 02. 14.

주관연구기관 / (주)휴롬
협동연구기관 / 경상대학교 산학협력단
인제대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “대사증후군 개선효과를 나타내는 과채 발효음료 개발”(개발기간 : 2016. 07. 01 ~ 2017. 12. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 02. 14

주관연구기관명 : (주)휴롬 (대표자) 김재원 (인)
협동연구기관명 : 경상대학교 산학협력단 (대표자) 정종일 (인)
인제대학교 산학협력단 (대표자) 최용선 (인)

주관연구책임자 : 강민정

협동연구책임자 : 경상대학교 류충호
인제대학교 김정인

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	2016-154호	총 단계 연구 기간	2016.07.01.~ 2017.12.31	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치 식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	대사증후군 개선효과를 나타내는 과채 발효음료 개발			
연구책임자	강 민 정	해당단계 참 여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구 개발 비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 15명 내부: 15명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:220,000천원 민간:147,000천원 계:367,000천원
연구기관명 및 소속부서명	주관기관 : (주)휴롬 참여기관 : 경상대학교, 인제대학교			참여기업명: (주) 휴롬	
위탁연구	연구기관명			연구책임자	
요약				보고서 면수 : 87	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 채소·과일을 활용한 알코올 발효 및 발효식초 제조 공정을 확립하였음. ○ 발효식초를 함유한 과채 발효음료의 이화학적 특성, 관능적 특성 및 생리활성 결과를 바탕으로 최종 발효음료 레시피를 확립하였음. ○ 개발 음료의 대사증후군 개선효과를 <i>in vitro</i> 실험 및 임상 시험을 통해 규명하였음. ○ 개발된 발효음료를 초고압 살균처리함으로써 제품의 품질 및 관능적 특성 변화를 최소화하고 미생물적 안전성을 확보할 수 있는 방안 및 사업화의 기반을 마련하였음. 					

〈 요약 문 〉

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용		<ul style="list-style-type: none"> ○ 신선한 채소·과일 원료를 첨가물 없이 천연당을 활용하고 미생물 발효법으로 제조한 식초를 함유한 고부가가치 과채 발효음료 제품을 개발하고 대사증후군 개선효과를 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 과채 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 규명 - 과채 알코올 발효산물 제조 및 표준 공정 확립 - 발효 과채 소재 및 알코올 발효산물의 <i>in vitro</i> 대사증후군 개선효과 규명 - 과채 발효음료 제품 개발 및 이화학적 특성 규명 - 과채 발효식초 제조 및 제조 공정 확립 - 과채 발효음료 제품의 대사증후군 개선효과 및 작용기작 규명 	
연구개발성과		<ul style="list-style-type: none"> ○ 과채 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 발효소재별 이화학적 특성 및 항산화능을 측정한 결과 블랙베리 주스는 총 폴리페놀 함량이 가장 높았고, 당도가 높아 보당을 최소화할 수 있어 발효소재로 선정하였음. 또한 총 폴리페놀 함량이 높은 케일주스와 당도가 높은 당근주스를 발효소재로 선정하였음. - 알코올 발효산물의 유리당 함량은 발효 8일 이후 큰 변화를 나타내지 않아 알코올 발효기간을 8일로 결정하였음. 케일/당근주스와 블랙베리주스 혼합액의 당도 및 항산화능 결과를 바탕으로 케일/당근주스와 블랙베리 주스를 1:9 및 2:8의 비율로 결정하였음. - 과채 알코올 발효산물 중 pH, 당도, 산도 및 β-카로틴, 플라보노이드, 안토시아닌 및 총 폴리페놀 함량 분석 결과를 바탕으로 AF-2, AF-6을 최종 알코올 발효산물로 결정하였음. ○ 과채 알코올 발효산물 제조 및 표준 공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 발효원료에 적합한 유용 균주를 선발하고 이미, 이취가 나지 않는 발효 공정을 표준화하였음. 알코올 발효를 위해 필수적으로 사용되는 합성첨가물 및 당분을 첨가하지 않고 알코올 발효를 할 수 있는 표준 공정을 구축하기 위하여 케일, 당근, 블랙베리를 주원료로, 농축배즙을 보당원료로 선정하여 3가지 공정으로 알코올 발효를 실시하였음. ○ 발효 과채 소재 및 알코올 발효산물의 <i>in vitro</i> 대사증후군 개선효과 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 블랙베리주스, 당근주스, 케일주스의 항산화능, α-glucosidase, pancreatic lipase 저해활성이 높게 나타났음. - 혼합 과채 주스 알코올 발효산물 중 AF-2의 <i>in vitro</i> 항산화능 및 α-glucosidase 저해활성, pancreatic lipase 저해활성이 높게 나타났음. ○ 과채 발효식초 제조 및 제조공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 발효원료에 적합한 초산균을 선정하고 정지 발효법으로 식초를 제조하였음. 초산발효용 종초를 제조하고 발효시간 및 온도에 따른 성분변화 측정, 이취 생성 및 불량 초산균의 오염여부를 확인, 최종 초산발효 종료 시기를 결정하여 초산발효산물을 완성하였음. 	

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 과채 발효음료 제품 개발 및 이화학적 특성 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 발효식초와 혼합하기 위한 과채주스의 소재로 케일 및 사과를 선정하였고 케일사과주스의 배합비율별 품질 특성, 항산화 효과 및 관능적 특성 등을 고려하여 케일주스와 사과주스의 배합비율은 45:55로 결정하였음. 발효식초를 농도별로 첨가한 과채 발효음료를 제조한 후 이화학적 특성, 항산화능, 관능적 검사, 미생물적 안전성 등의 결과를 바탕으로 발효식초를 5% 첨가한 과채 발효음료 최종 배합비율을 결정하였음. - 저장 기간 동안 이화학적 특성을 유지하기 위해 과채 발효음료를 비가열초고압(HPP) 살균처리하였음. HPP 처리는 과채 발효음료의 이화학적 특성, 항산화능에 영향을 주지 않았음. ○ 과채 발효음료의 대사증후군 개선효과 및 작용기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 과채 발효음료의 DPPH 라디칼 소거능, α-glucosidase 저해활성, 췌장 lipase 저해활성은 각 활성의 표준품 대비 39.9%, 75.2%, 53.4%로 나타났음. - 대사증후군 환자에게 10주 동안 과채 발효음료를 1회에 250 mL씩, 1일 2회 제공하였을 때, 혈장 중성지방 농도 및 동맥경화지수가 감소되고, 인슐린 저항성지표인 HOMA-IR이 감소되었음. 과채 발효음료의 섭취는 혈장 지질과 산화물, TNF-α, hs-CRP 농도를 감소시켜, 항산화 및 항염증효과를 나타내었음. 				
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 과채 발효음료 제조를 위한 정치배양용 우량균주를 확보함. ○ 저장성이 낮은 소재를 활용한 발효제품 개발로 장기 저장형 가공품 제조 방법을 확립하였음 ○ 본 연구결과를 바탕으로 채소·과일을 활용한 발효 사업 분야의 기초데이터로 사용될 것임. ○ 본 연구를 통해 발효기술 노하우를 습득하여 채소·과일을 활용한 발효 제품 개발에 기여할 수 있을 것임. ○ 무첨가제 과채 발효식초와 과채주스의 혼합 레시피 개발로 우수한 맛과 품질의 발효음료 제품을 개발하여 사업화함. ○ 본 연구를 통해 발효산물 제조를 위해 최종 선정된 발효 미생물 효모 및 초산균을 주관기관 및 타기관에 2년간 무상으로 제공하여 발효 제품 개발의 사업 활성화에 기여하고자 함. ○ 신문, 잡지, 인터넷 등 대중매체를 활용하고 주관기관에서 운영하는 주스매장과 인재개발원의 체험 프로그램과 연계하여 개발 제품에 대한 홍보를 실시하고 판매를 촉진시키고자 함. ○ 블랙베리, 케일, 당근 등을 재배하는 농가 소득 증대에 기여할 것임. ○ 부작용 없이 지속적으로 섭취할 수 있는 대사증후군 개선용 제품 개발로 의료비 절감에 기여하고 삶의 질 향상에 기여할 것임. 				
<p style="text-align: center;">중심어 (5개 이내)</p>	알코올 발효	발효식초	과채 발효음료	과채주스	대사증후군

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of high value-added fermented beverage products containing vinegar produced by microbial fermentation method using natural sugar of fresh vegetables and fruits and identifying the improvement effect of metabolic syndrome. - Elucidation of quality characteristic and bioactive compounds of alcohol fermentation products - Development of alcohol fermentation products from mixed fruits and vegetables and selection of useful strains suitable for fermentation - Elucidation of physiological functions of alcohol fermentation products from mixed fruits and vegetables <i>in vitro</i>. - Development of value-added fermented beverage from mixed fruits and vegetables and elucidation of its quality characteristic - Development of fermentation vinegar produced by political fermentation - Elucidation of chronic consumption of fermented beverage on metabolic syndrome and the underlying mechanisms by clinical trial 		
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Elucidation of quality characteristic and bioactive compounds of alcohol fermentation products from mixed fruits and vegetables <ul style="list-style-type: none"> - The AF-2 and AF-6 were determined as final alcohol fermentation based on the analysis of pH, sugar content, acidity, β-carotene, flavonoid, anthocyanin and total polyphenol contents. ○ Development of alcohol fermentation products from mixed fruits and vegetables <ul style="list-style-type: none"> - Kale, carrots and blackberries were used as the main ingredients and the fermentation of alcohol was carried out in three stages using the extract of the pear. ○ Elucidation of physiological functions of alcohol fermentation products from mixed fruits and vegetables <i>in vitro</i> <ul style="list-style-type: none"> - Blackberry juice, carrot juice, and kale juice showed strong antioxidant activity, and inhibitory activities against α-glucosidase and pancreatic lipase <i>in vitro</i>. - AF-2 among alcohol fermentation products of mixed fruits and vegetables showed the strongest antioxidant activity, and inhibitory activities against α-glucosidase and pancreatic lipase <i>in vitro</i>. ○ Development of value-added fermented beverage (from mixed fruits and vegetables) and elucidation of its quality characteristic <ul style="list-style-type: none"> - The mixture ratio of kale juice and apple juice was determined at 45:55, and fermented vinegar was determined at 5% of the total fermented beverage amount. 		

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of fermentation vinegar, acetic acid fermentation product, produced by political fermentation <ul style="list-style-type: none"> - Acetic acid bacteria for fermentation were selected and vinegar was produced by political fermentation. ○ Elucidation of beneficial effects of fermented beverage (from mixed fruits and vegetables) on metabolic syndrome and the underlying mechanisms <ul style="list-style-type: none"> - Fermented beverage showed DPPH radical scavenging activity, α-glucosidase inhibition, and pancreatic lipase inhibition equivalent to 39.9%, 75.2%, 53.4% of that of each positive standard, respectively. - Consumption of fermented beverage (500 mL/day) for 10 weeks significantly reduced plasma triglyceride, TBARS, TNF-α, and hs-CRP levels, HOMA-IR and atherogenic index in the patients with metabolic syndrome. Fermented beverage improved insulin resistance via α-glucosidase inhibition and antioxidant and anti-inflammatory activities. 				
<p>Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ To contributes to the development of the fermentation product by providing the final selected fermented microorganism yeast and acetic acid bacteria to the main institution and other institutions for 2 years free of charge for the production of fermented product ○ To establish scientific background to develop value-added fermented beverage to improve metabolic syndrome ○ To contribute to increase exports by developing fermented beverage products using traditional vinegar. 				
<p>Keywords</p>	<p>alcohol fermentation</p>	<p>fermented vinegar</p>	<p>fermented beverage</p>	<p>fruit and vegetable juice</p>	<p>metabolic syndrome</p>

< CONTENTS >

Chapter 1. Outline and objective of the research	1
Chapter 2. Current status of domestic and foreign technical development	5
Chapter 3. Research substance and result	9
Chapter 4. Degree of goal achievement and contribution to the related areas	78
Chapter 5. Result of the research and application plan of the result	81
Chapter 6. Information and technology obtained from abroad during performance of the study	81
Chapter 7. Security grade of R&D	82
Chapter 8. Current condition research facility and equipment registered in NTIS ·	82
Chapter 9. Safety guideline of laboratory during performing Research	83
Chapter 10. Representative achievements of the Research	86
Chapter 11. The others	87
Chapter 12. References	87

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	5
3. 연구수행 내용 및 결과	9
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	78
5. 연구결과의 활용계획 등	81
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	81
7. 연구개발성과의 보안등급	82
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	82
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	83
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	86
11. 기타사항	87
12. 참고문헌	87

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

가. 연구개발 목적

- 신선한 채소·과일 원료를 첨가물 없이 천연당을 활용하고 미생물 발효법으로 제조한 식초를 주원료로 고부가가치 과채 발효음료 제품을 개발하고 대사증후군 개선효과를 규명함.
 - 과채 발효음료 제조를 위한 알코올 및 초산 발효 공정 확립 및 발효산물을 제조함.
 - 과채 발효음료 제품을 개발하고 이화학적 특성과 생리활성 물질 분석 및 세포실험을 통한 항비만 효과를 규명함
 - 과채 발효음료 제품의 대사증후군 개선효과 및 작용기전을 임상시험으로 규명함.

나. 연구개발의 필요성

- 발효
 - 발효란 효모를 포함한 미생물이 유기화합물을 분해하여 알코올류, 유기산류, 이산화탄소 등을 만드는 작용을 말함. 전통적인 발효로는 알코올 발효, 젖산 발효, 초산 발효, 단백질 분해 및 당질 분해 등이 있음.
 - 전통적으로 발효는 맛을 향상시키고 저장성을 증가시킬 수 있어 다양한 발효식품이 전해지고 있음. 우리나라의 주요 발효식품은 간장, 된장, 고추장, 청국장, 김치, 젓갈, 기타 절임류 및 과실주, 약탁주, 식초 등이 있음. 발효는 재료의 맛과 향미를 증진시키고 유산, 초산과 같은 여러 유기산을 생성하여 병원성균의 증식을 억제하여 식품의 저장성을 증진시켜 안전성 유지에 도움을 줄 수 있음.
 - 또한 발효 과정에서 미생물의 분해작용으로 유기산, 분해산물 및 활성성분의 생성되어 생리활성이 증가하여 기능성이 증가된다는 연구결과가 다수 발표되면서 최근 다양한 재료를 활용한 발효에 대한 관심이 증가하고 있음.
 - 채소, 과일, 약용식물 등에 고농도의 당을 첨가하여 삼투압에 의해 원료의 유용성분을 당액으로 침출시키거나 적당한 당과 미생물에 의해 발효가 진행되어 유용성분 뿐만 아니라 발효에 의한 생성물을 포함한 액을 식물발효액이라고 함. 일반적으로 발효액을 효소액, 발효추출액, 발효음료, 효소음료 등으로 불리어짐.
 - 발효가 원활하게 진행되기 위해서는 고농도의 당이 필요함. 최근 가정에서 제조되거나 판매되고 있는 식물발효액은 당 함량이 높아 섭취가 제한적이고 건강 증진 기대효과에 미치지 못함.
 - 또한 현재 판매되고 있는 발효제품은 전통적으로 내려오는 방법으로 가정에서 이루어지거나 소규모로 생산되는 경우가 많음.
 - 따라서 인위적으로 첨가하는 당을 대체한 새로운 소재를 활용한 발효 방법의 확립이 필요함. 또한 발효 공정의 표준화와 제조기술의 과학화, 안전성 등이 확보되어야 할 것임.

○ 착즙 주스 시장

- 최근 과채주스 시장이 정체기를 나타내고 있으나 채소·과일 섭취를 권장하는 트렌드와 건강에 대한 소비자들의 관심이 증가하면서 착즙주스 시장 경쟁은 더욱 치열해지고 있음. 착즙주스 판매 회사는 100% 천연 주스와 건강함을 강조하며 타사 제품과 차별성을 강조하고 있으나 제품 우수성에 대한 근거자료가 부족하고 소비자들에게 제대로 어필하지 못하여 소비자들은 대중매체를 통한 광고, 구매방법의 접근성 등과 같은 기타 요인에 의해 제품을 선택하는 경우가 대부분임.
- 소비자들의 새로운 제품에 대한 요구가 증가하면서 기능성을 강조한 다양한 제품이 개발·판매되고 있음. 2014년 과채음료 시장은 오렌지(24.8%), 포도(13.8%), 기타야채(13.1%) 순으로 시장점유율을 보였음. 과채음료 시장이 전반적으로 판매가 감소하고 있으나 블루베리, 자몽 등 새로운 소재에 대한 영양적 우수성이 보고되면서 블루베리주스, 자몽주스 등 새로운 제품이 꾸준히 개발·판매되고 있음. 이는 소비자들이 건강에 도움이 되고 새로운 소재를 활용한 제품에 대한 요구가 증가하기 때문인 것으로 사료됨. 따라서 기존 제품과 차별화된 착즙주스 제품을 개발하고 판매한다면 착즙주스 시장에 있어서 유리한 위치를 선점할 수 있을 것임.
- 저속 압착 착즙 방식을 도입한 주스기((주)휴롬)는 2008년에 개발되어 판매량이 지속적으로 증가되어 2014년 매출액이 약 1,500억원 규모로 우수한 제품으로 인정받고 있음. 그러나 착즙주스의 건강기능성을 입증할 수 있는 자료는 충분하지 않아 연구의 필요성이 절실한 실정임. 따라서 휴롬주스기로 착즙한 기능성 과채주스의 우수성을 과학적으로 입증하여, 주스기의 우수성을 홍보하고 마케팅에 활용할 필요성이 절실함.

○ 대사증후군

- 식생활과 생활양식의 서구화로 비만 유병율은 급속히 증가하고 있으며, 비만은 심혈관질환, 제2형 당뇨병 등의 위험요인이 되고 있음.
- 대사증후군(metabolic syndrome)은 복부비만, 내당능장애, 고인슐린혈증, 이상지질혈증 및 고혈압이 균집을 이루어 나타나는 증후군임. 국내 성인의 비만 유병율은 30.7%, 당뇨병 유병율은 9.7%, 고콜레스테롤혈증 및 고중성지방혈증 유병율은 각각 10.9%, 17.3%로 나타났다. 국내 성인의 대사증후군 유병율을 조사한 결과 대사증후군 유병율은 26.1%로 나타났다.
- 대사증후군의 적절한 관리가 이루어지지 않을 경우 제2형 당뇨병과 심혈관질환으로 이환될 위험이 매우 높음. 따라서 대사증후군 환자를 조기에 발견하여 치료하는 것은 제2형 당뇨병 및 심혈관질환 유병율을 감소시키는데 있어서 매우 중요함.
- 비만은 활성산소 생성을 증가시키고 항산화 시스템을 저하시켜, 산화적 스트레스를 증가시킴. 산화적 스트레스는 인슐린 저항성을 가속화시키고, 인슐린 저항성은 심혈관질환, 제2형 당뇨병의 원인이 되므로, 항산화능의 증진은 대사증후군의 예방과 치료에 있어서 매우 중요함.
- α -glucosidase 저해제는 식사로 섭취한 탄수화물의 소화를 저해하여 식후혈당을 조절하는 제2형 당뇨병 치료제로 인슐린저항성 개선효과 및 공복 혈당 조절효과를 나타냄. 그러나 구토, 복부 팽만감 등의 부작용을 나타내어, 식품을 포함한 천연물로부터 α

-glucosidase 저해 활성이 높은 소재에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있음.

- Pancreatic lipase 저해제는 식사로 섭취한 지방의 흡수를 저해하여 비만 개선 및 예방 효과를 나타내고 고지혈증을 개선하는 약물임. 비만을 치료하는 것은 인슐린저항성을 개선하고 고혈압을 완화시키는데 매우 중요함. 그러나 Pancreatic lipase 저해제의 복용은 지방변, 신장 손상 등의 부작용을 나타내어, 식품을 포함한 천연물로부터 pancreatic lipase 저해제를 탐색하는 연구가 활발히 이루어지고 있음.

○ 발효 소재

- 케일(*Brassica oleracea* var. *Acephala*)은 십자화과 채소로써 비타민 C, 클로로필, β -carotene, sulforaphane 등이 풍부함. 케일은 암 예방 및 돌연변이 유발 억제효과를 나타내는 것으로 보고되고 있음. 케일은 독특한 향과 맛을 나타내어 식사로 섭취하기 보다는 녹즙으로 주로 섭취함.
- 당근(*Daucus carota* L.)은 미나리과에 속하는 뿌리로 provitamin A인 β -carotene과 α -carotene과 같은 carotenoid 성분을 다량 함유하며, 항암 작용 및 항산화 효과가 우수한 것으로 알려져 있음. 당근은 주스 원료로 많이 활용되고 있으나 당도가 낮고 맛이 좋지 않아 소비자들의 선호도가 높지 않음.
- 블랙베리(*Rubus fruticosus* L.)는 anthocyanin이 풍부하고 폴리페놀, 탄닌 등이 함유되어 있어 항산화, 항암, 항염증, 심혈관계질환 예방 효과가 우수한 것으로 보고되고 있음. 블랙베리는 수확한 후 잘 익은 생과로 장기간 저장 및 유통이 어려운 실태이며 생과로의 섭취가 어렵기 때문에 대부분 착즙시켜 가공한 단순한 음료의 형태로 유통되거나 여러 종류의 식품에 가미되는 첨가물로써 이용되고 있음.
- 과채류의 종류에 따라 색상과 구성성분 등이 다르고 특히 착즙 및 혼합 후엔 풍미나 청징성 등의 1차적인 변화는 물론 원료에 부착된 상태로 기다리던 미생물이 주스 속에서 생육하며 거품 및 이취 발생의 우려와 풍미 저하 등의 2차적인 변화도 예상됨. 따라서 발효 공정을 3가지로 구분하여 예비 알코올 발효산물을 제조하여 공동 연구진의 분석 결과를 바탕으로 표준화된 최적 발효공정의 구축이 필요함.

다. 연구개발 범위

- 제 1세부과제 : 과채 발효음료 제품을 개발하고 이화학적 특성과 생리활성 물질을 분석하고 세포실험을 통한 비만 개선효과를 규명함
 - 과채 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 규명
 - 과채 발효음료 제품 개발 및 이화학적 특성 규명
- 제 2세부과제 : 과채 발효음료 제조를 위한 알코올 및 초산 발효 공정 확립 및 발효산물을 제조함
 - 과채 알코올 발효산물 제조 및 표준 공정 확립
 - 과채 발효식초 제조 및 발효음료 소재화

- 제 3세부과제 : 과채 발효음료 제품의 대사증후군 개선효과 및 작용기전을 임상시험으로 규명함
 - 과채 알코올 발효산물의 *in vitro* 생리활성 규명
 - 과채 발효음료 제품의 대사증후군 개선효과 및 작용기전 규명

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발의 범위
1차년도 (2016)	과채 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 채소·과일주스 및 알코올 발효산물의 이화학적 특성 확인 ○ 채소·과일주스 및 알코올 발효산물의 유기산, 유리당 측정 ○ 채소·과일주스 및 알코올 발효산물의 생리활성 물질 분석
	과채 알코올 발효산물 제조 및 표준 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 과채류 혼합 알코올 발효산물의 제조 ○ 과채 주스를 이용한 알코올 발효 공정 확립 ○ 발효식초 제조를 위한 내성 초산균 선정
	과채 알코올 발효산물의 <i>in vitro</i> 생리활성 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효 과채 소재의 <i>in vitro</i> 대사증후군 개선효과 규명 ○ 과채 알코올 발효산물의 <i>in vitro</i> 대사증후군 개선효과 규명
2차년도 (2017)	과채 발효음료 제품 개발 및 품질 특성규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효식초 및 과채 발효음료의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 분석 ○ 최종 과채 발효음료 배합비율 결정 및 제품화
	과채 발효식초 제조	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효원료에 적합한 초산균을 선정하고 정치 발효법으로 과채 발효식초 제조
	과채 발효음료 제품의 대사증후군 개선효과 및 작용기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>In vitro</i>에서 발효식초 및 과채 발효음료의 대사증후군 개선효과 측정 ○ 대사증후군 환자에 있어서 과채 발효음료의 대사증후군 개선효과 규명

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

가. 국내 기술개발 및 시장 현황

1) 기술현황

- 소득수준 향상과 건강에 대한 관심이 증가하고 발효식품의 우수성이 과학적으로 규명됨에 따라 발효 소재 및 제품 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 발효에 관한 연구는 알코올발효, 유산균발효(젖산발효), 초산발효 등으로 집중되어 있음.
- 알코올발효 관련 연구는 와인과 맥걸리 연구가 대표적으로, 발효 원료의 전처리 방법에 따른 이화학적 특성, 발효조건 및 다양한 효모 사용에 따른 발효산물의 특성에 대한 연구가 대부분임. 최근 와인의 대표 재료인 포도뿐만 아니라 베리류 및 각 지자체의 특성화된 작물을 원료로 개발된 와인의 전처리기술 및 제조기술, 품질 및 기호성에 대한 연구가 보고되고 있음. 또한 맥걸리 열풍으로 이취와 숙취 개선 효과가 있는 맥걸리 연구 개발도 보고된 바 있으며, 최근에는 다양한 소재를 첨가한 맥걸리 개발 및 재료 특성을 활용한 기능성 맥걸리 연구도 활발히 진행되고 있음.
- 된장, 간장 및 김치 등 전통발효식품에 대한 연구가 많이 진행되었으며, 최근에는 김치의 유산균을 추출한 유산균 식품 즉, 프로바이오틱스에 대한 연구와 제품 개발이 활발히 진행되고 있음.
- 현재까지 국내 식초에 대한 제조방법 연구는 주로 발효균주 및 숙성 제조방법 등에 국한되어 있으므로 전통적인 정치배양 식초의 품질향상 및 기능성 강화제품 개발은 미흡한 실정임. 최근 소비자 트렌드에 맞게 주정을 사용하지 않은 천연재료를 이용한 효모발효 및 초산발효를 시킨 2단계 발효에 의한 식초 개발에 대한 연구결과가 보고되고 있음. 식초의 품질 특성 및 향산화, 향당뇨, 지질대사 개선 등과 같은 기능성에 대한 연구도 활발히 진행되고 있음. 감귤식초의 향산화 활성, 미나리 발효식초의 지방세포 분화억제 및 항염증 효과, 야콘 식초의 향당뇨 및 혈액 지질 감소 효과에 대한 연구결과가 보고되었음.
- 최근 국내에서 시판되고 있는 발효음료는 풀무원의 발효 녹즙과 청정원의 식초음료가 대표적임. 발효녹즙은 녹즙 소재를 유산균 발효시킨 후 다양한 과일착즙액과 혼합한 제품임. 발효 조건으로 당 성분이 첨가되어야 하므로 유산균 발효시 올리고당과 같은 당을 첨가하여 발효를 함. 식초음료는 석류, 복분자 등의 소재를 바탕으로 개발되어 기능성을 강조하고 있음. 시판되고 있는 발효음료는 당과 첨가물을 첨가한 제품으로, 발효원료의 차별화로 원료 고유의 생리활성을 증진시키고 원료가 함유한 천연당을 활용한 발효제품은 현재 시판되고 있지 않음.
- 무설탕 첨가 국산 과채 발효 식초를 정치배양법으로 제조하고 발효음료 소재로 사용한 연구는 없었음.

2) 시장현황

○ 발효음료 시장

- 효소액 및 식초음료 등의 발효음료 시장은 증가 추세로서 전체시장에서 61.8%를 차지하고 있음. 식초음료, 효소음료 등의 음료베이스는 2011년 매출액은 2010년 대비 129.1% 증가했으며 음료시장에서 큰 비중을 차지했던 탄산음료에 대한 소비는 점차 감소하는 추세임.
- 식초는 강한 신맛으로 그동안 직접 음용하지 않고, 조미용으로 사용되던 양조식초 및 과일식초가 대부분을 차지하였음. 기존에는 대기업 위주의 공장식 대량 제품개발로 생산이 이뤄졌으나, 최근 지자체 특산물을 이용한 소규모 천연발효식초 생산으로 시장이 확대되고 있으며, 소득증대와 웰빙 트렌드에 따라 건강에 대한 관심이 증가하면서 기능성 발효식품에 대한 수요가 꾸준히 증가하고 있음.
- 조미용 식초 중심의 식초 산업에 다양한 음료용 식초가 가세하면서 식초시장이 다변화되고, 기능성 높은 천연식초 제품이 생산되면서 시장규모가 확대되고 있고 합성식초 위주의 조미용 식초가 발효 식초로 많이 대체되면서 기능성 제품이 증가하고 있는 추세임. 2005년부터 형성되기 시작한 식초음료시장은 매년 50% 이상의 성장률로서 급성장하고 있으며, 2012년 기준으로 국내 식초음료 시장(닐슨코리아 기준)은 약 910억원대로, 대상, 샘표, CJ제일제당 등 대기업 위주로 제품이 개발·판매되고 있음.

○ 착즙주스 시장

- 2016년 국민건강·영양조사 결과에 의하면 우리나라 국민의 음료 소비량은 1998년 45.3 g에서 2016년 185.35 g으로 4배 정도 증가한 것으로 나타났음. 전체 음료 소비 중 탄산음료 및 주스가 차지하는 비율이 가장 높았으나 최근 열량, 당류 과잉섭취와 같은 영양적 문제점이 제시되면서 감소하는 추세에 있음. 반면 비타민, 홍삼 음료와 같은 기능성을 강조한 음료 및 착즙주스의 소비는 꾸준히 증가하고 있음.
- 국내 과채주스 시장규모는 2013년 1조 400억원에서 2014년 9,600억원으로 약 7% 감소하여 정체되고 있음. 그러나 착즙주스 시장은 2014년 339억원으로 2013년 308억원에 비해 약 10% 증가하며 꾸준히 성장하고 있으며, 건강을 강조하는 분위기가 형성되면서 착즙주스 시장은 더욱 확대될 것으로 예상하고 있음.
- 최근 착즙주스 시장에서 대기업들의 경쟁이 치열해지면서 다양한 착즙주스 제품들이 판매되고 있으나 대부분 채소·과일만 착즙한 주스임. 본 연구팀에서 개발하고자 하는 과채 발효식초를 첨가한 과채주스 제품은 아직 판매되고 있지 않음.

3) 경쟁기관현황

- 대상 홍초, 샘표 백년동안, CJ 미초, 해표 마시는 식초, 풀무원 발효 녹즙, 대상 웰라이프 클로렐라 발효 녹즙, 참 선진식품 식물성 유산균 등은 다양한 과채류 음료 및 마시는 식초 음료를 시중에 판매하고 있고, 녹즙 전문 회사에서는 기존 녹즙을 발효시켜 제품을 판매하고 있음.

- 풀무원에서 식물성유산균으로 발효시킨 채소 발효산물을 함유한 발효녹즙 제품을 개발하여 시판중임.
- 청정원은 발효식초 음료를 판매 중에 있음. 현재 시판되고 있는 발효식초 음료는 발효식초와 복분자 또는 석류 등의 과일 농축액과 정제수, 비타민 복합물, 올리고당 등의 첨가물을 혼합한 제품임.
- 본 연구팀에서는 채소와 과일을 발효한 후 첨가물을 첨가하지 않고 과채녹즙을 혼합하여 맛을 낸 음료를 개발하고자 함.

4) 지식재산권현황

- 특허청의 특허정보검색서비스(<http://www.kipris.or.kr>)를 통해 검색어를 “발효”로 하여 최근 5년간(2015년 기준)의 특허를 살펴본 결과 약 1만7천건이 검색되었으며, 이 중 결과 내 재검색으로 “기능”은 12,317건, “미생물”은 6,700건, “음료”는 1,770건, “발효액”은 306건으로 나타났음. 식물발효액에 대한 특허가 많은 것으로 조사되었음. 또한 “발효음료”를 검색해보면 약 4천개의 특허가 검색되어지며 이 중 약 60%는 기능성 발효음료로 분류됨. 또한 “발효녹즙”으로 검색하였을 때는 77개의 특허가 확인되어 관련 연구가 미비한 것으로 조사되었음.
- 식초를 활용한 식초음료의 제조방법, 오디 발효 식초음료와 그 제조방법, 유자 식초를 이용한 유자 음료 제조 방법, 복분자 식초음료 조성물 및 이의 제조방법 등이 있는 것으로 파악되었으나, 최근 자료에 따르면 국내외 식초 관련 특허 출원은 감소하는 추세로서 식초음료 인기에 비해 연구는 미비한 실정임. 식초 제조에 있어 직접적인 연구보다는 발효에 쓰이는 원료와 제조 공정에 대한 활용연구가 이루어지는 것으로 확인되었음. 특히 국내 식초음료의 기능성에 대한 관심은 증가하고 있으나 기능성에 대한 연구는 부족한 실정으로 지속적 연구가 필요함.
- 풀무원의 녹즙을 젖산 발효시킨 음료(출원번호 : 1020080121978), 블랙베리를 발효시킨 발효주(출원번호 : 1020050063047), 마시는 식초(출원번호: 1020110105353)은 있으나 블랙베리 식초와 녹즙을 혼합한 발효음료의 지식재산권은 전무함.

5) 표준화현황

- 풀무원에서 녹즙용 생채소의 가식부 전체를 습식 분쇄 후 식물 발효에 더욱 적합한 식물성 유산균을 접종하여 30-37℃에서 24-48시간 동안 발효시키고 녹즙을 추가한 제품을 표준화 완료함.

나. 국외 기술개발 및 시장 현황

1) 기술현황

- 중국은 발효를 통한 주류, 일본은 식초에 관한 연구가 대부분임.
- 미국의 대표 식초인 사과 식초는 산뜻한 풍미를 강점으로 드레싱뿐만 아니라 드링크의 용도로 이용되고 있음.
- 세계적으로 과일과 베리 종류를 이용하여 다양한 마시는 과실음용 식초를 개발하고자 하는 추세임.

2) 시장현황

- 세계 식초 시장규모는 2007년 현재 약 1조원대로 단일 상품으로서는 큰 시장규모를 보임. 현재 약 2조원대 이상의 시장 규모를 나타낼 것으로 예상함.
- 일본의 식초 시장 규모는 약 526억 엔(약 5,000억 원)이며, 일본의 국민 1인당 연간 식초 소비량은 평균 4L임. 특히 일본사람들은 식초음료를 음료수처럼 음용하는데 익숙함.
- 중국의 식초 생산량은 2013년 기준 300만 톤으로 전년 대비 약 13% 성장함.

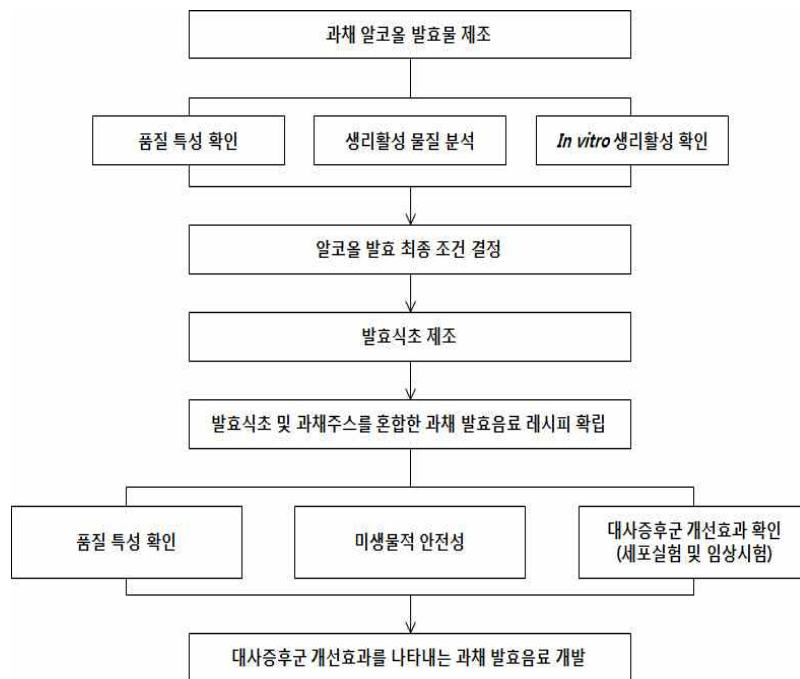
3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

가. 연구개발 추진전략 및 추진체계

1) 연구개발 추진전략·방법

- 본 연구팀은 주관기관((주)휴롬)과 참여기관1(경상대학교), 참여기관2(인제대학교)로 구성되어 ‘대사증후군 개선효과를 나타내는 과채 발효음료 개발’ 연구를 수행하였음. 경상대학교 연구팀은 발효식초 제조와 제조 공정 확립 연구를, (주)휴롬 바이오식품연구소에서는 과채발효 식초를 활용한 발효음료 제품의 레시피를 확립하고 품질 특성, 미생물적 안전성 결과를 바탕으로 제품화를 위한 연구를, 인제대학교 연구팀에서는 *in vitro* 및 임상시험을 통해 개발 제품의 대사증후군 개선효과 규명 연구를 수행하였음.



2) 연구개발 추진체계

- 1차년도에는 경상대학교 연구팀에서 과채 알코올 발효산물을 개발한 후 (주)휴롬과 인제대학교에서 이화학적 특성, 생리활성을 분석한 후 과채 발효식초 제조에 가장 적합한 알코올 발효산물을 선별하였음.
- 2차년도에는 경상대학교 연구팀에서 과채 발효식초를 개발한 후 (주)휴롬에서 발효식초를 함유한 과채 발효음료 레시피를 확립하였음. 인제대학교에서는 과채 발효음료의 대사증후군 개선효과를 임상시험을 통해 규명하였음.

나. 연구범위 및 연구수행 방법

구분	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1차년도 (2016)	과채 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 규명	발효 소재별 과채주스의 이화학적 특성 확인 및 발효기간별 알코올 발효산물의 이화학적 특성과 생리활성 물질 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 발효소재(신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리)와 보당 소재(사과, 배, 오렌지)를 각각 저속압착방식의 착즙기를 이용하여 주스를 제조한 후 pH, 당도, 산도 및 총 폴리페놀 함량을 측정하였음 - 과채주스의 발효기간별(4, 8, 12, 16일) 알코올 발효산물을 경상대로부터 제공받은 후 pH, 산도 및 유리당, β-카로틴, 플라보노이드, 총 폴리페놀 함량을 분석하였음
		알코올 발효소재의 효율적 배합비율 결정 및 이화학적 특성과 생리활성 물질 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 당근주스, 케일주스, 블랙베리주스를 비율별로 배합한 후 pH, 당도, 산도 및 총 폴리페놀 함량을 측정하여 발효조건에 가장 적합한 적정 배합비율을 결정하였음
	과채 알코올 발효산물 제조 및 표준 공정 확립	과채 주스를 이용한 알코올 발효 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 과채 주스를 천연당인 배농축액(59 °Brix)을 이용해 24 °Brix로 조절한 후 선발된 과채 내성 효모를 약 6 log CFU/mL 첨가하여 27±1℃에서 알코올 발효시켰음 - 알코올 발효산물의 pH, 당도, 산도, 효모수 및 알코올 함량을 측정하여 알코올 발효 정도를 확인하고 최종 제조방법을 확립하였음
		과채 발효식초 제조를 위한 내성 초산균 선발	<ul style="list-style-type: none"> - 경상대학교 생물공학연구실에서 분리, 보관 중인 초산균(2종 이상)을 GYP 한천배지에 증식시켜 정상 초산균을 확인하고 알코올 발효산물에 예비 배양하여 과채류 성분에 내성을 가진 초산균을 선발하였음
	과채 알코올 발효산물의 <i>in vitro</i> 생리활성 규명	발효 과채 소재의 <i>in vitro</i> 대사증후군 개선효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 발효 소재(신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리 주스)의 DPPH radical 소거능, α-glucosidase 저해활성, pancreatic lipase 저해활성을 측정하였음
		과채 알코올 발효산물의 <i>in vitro</i> 대사증후군 개선효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 6종의 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 DPPH radical 소거능, α-glucosidase 저해활성, pancreatic lipase 저해활성, SOD 유사 활성, ABTS radical 소거능, FRAP value를 측정하였음

2차년도 (2017)	과채 발효음료 제품 개발 및 이화학적 특성 규명	발효식초의 생리활성 물질 분석	- 정상대에서 제공받은 발효식초의 β -카로틴, 플라보노이드, 안토시아닌 및 총 폴리페놀 함량을 측정하였음
		과채 발효음료의 품질 특성, 생리활성 물질, 관능적 특성 및 미생물적 안전성을 분석한 결과를 바탕으로 최종 음료 배합비율 결정	- 배합비율별 과채 발효음료의 pH, 당도, 산도, 유리당 및 유기산 함량, β -카로틴, 플라보노이드, 안토시아닌 및 총 폴리페놀 함량을 측정하였고 미생물 검사 및 관능 평가를 통해 최종 과채 발효음료 배합비율을 결정하였음 - 최종 과채 발효음료의 당류, 탄수화물, 단백질, 지방, 나트륨 등의 영양성분을 분석하였고, 지방전구세포에서 지방분해 효과를 조사하였음
		비가열초고압(HPP) 살균 처리한 과채 발효음료 분석 및 소비자 기호도 평가	- 저장기간 동안 과채 발효음료의 관능적 특성 유지를 위하여 비가열초고압(HPP) 살균 처리를 실시하였음. HPP 처리 과채 발효음료의 이화학적 특성, 항산화능, 관능적 특성을 조사하였고 소비자 기호도 조사를 실시하였음.
	과채 발효식초 제조 및 공정 확립	1차 년도에 표준화한 알코올 발효산물에 선발 초산균 접종 후, 정지 발효법으로 발효식초 제조	- 1차년도에 선발한 과채류 성분에 내성을 가진 초산균을 알코올 함량 6%로 조절된 알코올 발효산물에 접종하고 26±1°C에서 진탕 배양하여 발효용 종초 제조 - 1차년도에 선발된 최적 배합비율의 알코올 발효산물은 알코올 함량 6%로 조절 후 산도 3~6% 되게 종초를 첨가하여 26±1°C에서 산도 6% 이상 되도록 정지 발효시킴 - 최종적으로 pH, 산도 및 색도를 측정하여 최적 과채 발효식초를 선발
	과채 발효음료 제품의 대사증후군 개선효과 및 작용기작 규명	<i>In vitro</i> 에서 발효식초 및 과채 발효음료의 대사증후군 개선효과 측정	- 발효식초 및 과채 발효음료의 DPPH 라디칼 소거활성, α -glucosidase 저해활성 및 pancreatic lipase 저해활성을 측정하였음
		과채 발효음료의 대사증후군 개선효과 규명	- 대사증후군 환자를 대상으로 과채 발효음료를 10주간 제공한 후 허리둘레, 혈압, 혈당 및 내당능 개선효과, 혈장 지질 profile을 분석하여 대사증후군 개선효과를 규명하고 혈액 항산화능 및 adiponectin, TNF- α , hs-CRP를 분석하여 작용기전을 규명하였음

1) 과채 발효음료 제품 개발과 품질 특성 규명 : 제 1세부과제

가) 과채 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 규명

(1) 연구 방법

(가) 발효 소재 및 발효기간별 알코올 발효산물의 품질 특성 확인 및 생리활성 물질 분석

○ 발효 소재별 과채주스의 이화학적 특성 조사

- 알코올 발효 소재로 신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리를, 발효시 보당을 위해 사과, 배, 오렌지를 선정하여 저속주스기(HWS-SBF18, (주)휴롬)로 각각 착즙하여 주스를 제조하였음.
- 산도는 0.1N NaOH 용액을 이용하여 pH 8.3이 될 때까지 적정하였으며, 적정에 사용된 0.1N NaOH 소비량으로부터 %로 나타내었음.
- 각 주스의 pH는 pH meter를 이용하여, 당도는 굴절당도계를 이용하여 측정하였고, °Brix로 나타내었음.
- 각 주스의 총 폴리페놀 함량은 Folin-ciocalteu법을 응용하여 측정하였으며, tannic acid을 표준품으로 사용하여 작성된 검량선으로부터 tannic acid 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)로 환산하여 나타내었음.

○ 발효기간별 과채 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 분석

- 신선초주스, 셀러리주스, 비트주스 및 당근주스의 발효기간별(4일, 8일, 2일, 16일) 알코올 발효산물을 정상대에서 제공받았음.
- 과채 알코올 발효산물의 pH, 산도를 측정하였음.
- 과채 알코올 발효산물의 유리당 함량은 HPLC-RID(Shimadzu, Japan)을 이용하여 측정하였음. Column은 Asahipak NH2P-50 4E(4.6×250mm, 5 μm), mobile phase는 DW:ACN(25:75), flow rate는 0.8mL/min, 온도는 40°C, injection volume은 20 μL 으로 분석조건을 설정하여 측정하였음.
- 과채 알코올 발효산물의 β -카로틴 함량은 HPLC-PDA(Shimadzu, Japan)을 이용하여 측정하였음. Column은 C18 ODS(4.6×250mm, 5 μm), mobile phase는 A:B(70:30, A=ACN:MeOH(85:15), B=100% Dichloromethane), flow rate는 1.0mL/min, 온도는 40°C, injection volume은 10 μL 으로 분석조건을 설정하여 측정하였음.
- 과채 알코올 발효산물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였고, 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법을 이용하여 측정하였으며, catechin을 표준품으로 사용하여 작성된 검량선으로부터 catechin 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)로 환산하여 나타내었음.

(나) 알코올 발효 소재의 효율적 배합비율 조사

- 당근주스, 케일주스, 블랙베리주스의 배합비율별 이화학적 특성 측정
 - 당근주스와 케일주스는 1:1, 1:2, 1:2.5, 1:3, 2:1, 2.5:1, 3:1의 비율로 혼합한 후 산도, pH, 당도 및 총 폴리페놀 함량을 측정하였음.
 - 산도와 당도 분석 결과를 바탕으로 당근주스와 케일주스의 최종 배합비율을 결정한 후 당근주스와 케일주스를 혼합한 주스(당근/케일주스)를 제조하였음.

(다) 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 품질 특성 및 생리활성 물질 분석

- 알코올 발효산물의 이화학적 특성 확인
 - 정상대에서 제공받은 6종의 알코올 발효산물(AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6)의 pH, 산도 및 유리당 함량을 측정하였음.
- 알코올 발효산물의 생리활성 물질 분석
 - 알코올 발효산물(AF-1 ~ AF-6)의 β -카로틴, 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량을 측정하였음.
 - 안토시아닌 함량은 AOAC에 명시된 방법을 응용하여 측정하였으며, cyanidin-3-glucoside 농도($\mu\text{g/mL}$)로 환산하여 나타내었음.

(2) 연구 결과

(가) 발효 소재 및 발효기간별 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 물질

- 발효 소재별 과채주스의 이화학적 특성
 - 신선초주스, 셀러리주스, 비트주스, 케일주스, 당근주스, 블랙베리주스 등의 알코올 발효 소재 및 사과주스, 배주스, 오렌지주스 등의 보당 소재들의 pH, 당도, 산도를 측정한 결과는 Table 1-1에 나타내었음. 발효 소재를 착즙한 각 주스의 pH는 3.30-6.20, 당도는 3.9-14.7 °Brix, 산도는 0.10-1.03%의 범위를 나타내었음. 보당 원료의 pH를 측정한 결과 배주스 > 사과주스 > 오렌지주스 순으로, 당도는 사과주스 > 배주스 > 오렌지주스 순으로, 산도는 오렌지주스 > 사과주스 > 배주스 순으로 나타났음.

Table 1-1. 과채주스의 pH, 당도, 산도

	pH	당도(°Brix)	산도(%)
신선초주스	6.02	5.3	0.33
셀러리주스	5.85	3.9	0.26
비트주스	5.94	4.4	0.21
케일주스	5.89	5.8	0.16
당근주스	6.20	8.5	0.10
블랙베리주스	3.30	14.7	1.03
사과주스	3.95	15.5	0.52
배주스	5.08	11.4	0.26
오렌지주스	3.87	10.7	0.96

- 신선초주스, 셀러리주스, 비트주스, 케일주스, 당근주스, 블랙베리주스의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과는 Fig. 1-1에 나타내었음. 블랙베리주스의 총 폴리페놀 함량이 가장 높았고, 케일주스, 신선초주스 순으로 폴리페놀 함량이 높은 것으로 나타났음. 블랙베리주스는 총 폴리페놀 함량이 가장 높아 항산화 효과가 우수할 것으로 기대되며 당도가 높아 보당을 최소화할 수 있음. 또한 블랙베리 발효산물은 색과 향이 강하지 않아 다른 소재와의 혼합시 영향을 최소화할 수 있어 발효소재로 적합한 것으로 나타났음. 또한 소재의 착즙율, 구입단가, 소재 확보의 용이성 등을 고려하고 총 폴리페놀 함량이 높아 생리활성이 우수할 것으로 기대되는 케일, 당근을 최종 소재로 선정하였음.

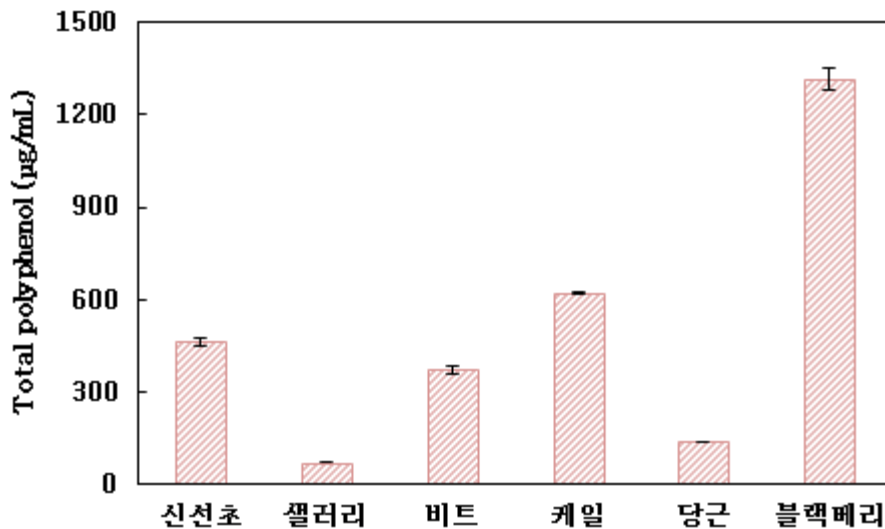


Fig. 1-1. 과채주스의 총 폴리페놀 함량

○ 발효기간별 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 물질

- 알코올 발효기간을 결정하기 위하여 발효기간별 알코올 발효산물의 pH와 산도를 측정한 결과는 Table 1-2와 Table 1-3에 나타내었음. pH는 발효가 진행됨에 따라 발효 소재별로 증가 또는 감소를 보였으나 큰 수치 변화는 보이지 않았음. 산도는 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 나타내었음.

Table 1-2. 과채주스의 발효기간별 pH

	4일	8일	12일	16일
신선초발효산물	4.64	4.68	4.68	4.66
셀러리발효산물	4.00	4.07	4.07	4.07
비트발효산물	3.93	3.95	3.97	4.09
케일발효산물	4.57	4.60	4.60	4.63
당근발효산물	4.19	4.29	4.19	4.31
블랙베리발효산물	3.33	3.40	3.38	3.42

Table 1-3. 발효 소재들의 발효기간별 산도

	4일	8일	12일	16일
신선초발효산물	0.51	0.41	0.80	0.60
셀러리발효산물	0.56	0.52	0.82	0.68
비트발효산물	0.68	0.65	1.08	1.09
케일발효산물	0.21	0.20	0.42	0.49
당근발효산물	0.55	0.52	0.92	1.04
블랙베리발효산물	3.21	3.19	3.81	3.70

- 발효기간별 알코올 발효산물의 유리당 함량은 과당, 포도당, 자당별로 각각 Table 1-4, 1-5, 1-6에 나타내었음. 알코올 발효시 효모가 알코올을 생성하기 위하여 당을 이용하므로 발효가 진행될수록 당도는 감소하게 됨. 당도가 감소하면서 과당, 포도당, 자당 등의 유리당 함량 또한 감소하였음. 특히 발효가 4일 경과된 후 과당, 포도당, 자당 함량은 크게 감소하였고 자당의 경우 8일 이후 큰 변화를 나타내지 않아, 알코올 발효는 8일 동안 활발히 진행되는 것으로 사료됨.

Table 1-4. 과채 알코올 발효산물의 발효기간별 과당 함량

	(µg/mL)			
	4일	8일	12일	16일
신선초발효산물	7.63±0.01	0.92±0.01	0.86±0.01	0.72±0.01
셀러리발효산물	12.41±0.01	0.11±0.01	0.03±0.01	ND
비트발효산물	0.31±0.01	ND	ND	ND
당근발효산물	ND	ND	ND	ND

ND : Not Detected

Table 1-5. 과채 알코올 발효산물의 발효기간별 포도당 함량

	(µg/mL)			
	4일	8일	12일	16일
신선초발효산물	0.64±0.01	0.18±0.01	ND	ND
셀러리발효산물	0.66±0.01	ND	ND	ND
비트발효산물	0.25±0.01	ND	ND	ND
당근발효산물	0.10±0.01	ND	ND	ND

ND : Not Detected

Table 1-6. 과채 알코올 발효산물의 발효기간별 자당 함량

	(µg/mL)			
	4일	8일	12일	16일
신선초발효산물	ND	ND	ND	ND
셀러리발효산물	0.35±0.01	0.18±0.01	0.13±0.01	0.10±0.01
비트발효산물	1.88±0.02	1.21±0.01	0.91±0.01	0.71±0.01
당근발효산물	0.58±0.01	0.36±0.01	0.31±0.01	0.29±0.01

ND : Not Detected

- 알코올 발효산물의 β-카로틴과 플라보노이드 함량은 발효가 진행될수록 감소하였으나 (Table 1-7, 1-8) 총 폴리페놀 함량은 발효기간에 따라 증가하였음(Fig. 1-2). 따라서 발효는 항산화능을 증가시키는 데 도움을 주는 것으로 나타났음.

Table 1-7. 과채 알코올 발효산물의 발효기간별 β-카로틴 함량

	(µg/mL)			
	4일	8일	12일	16일
신선초발효산물	152.4±0.6	34.6±0.1	31.1±0.3	28.1±0.2
셀러리발효산물	33.7±1.8	21.8±0.2	19.9±0.2	19.5±0.2
비트발효산물	ND	ND	ND	ND
당근발효산물	125.2±0.5	62.8±0.7	52.9±0.3	29.5±0.2

ND : Not Detected

Table 1-8. 과채 알코올 발효산물의 발효기간별 총 플라보노이드 함량

	(µg/mL)			
	4일	8일	12일	16일
신선초발효산물	2551.0±20.6	1672.4±4.1	1624.8±29.7	1689.1±36.7
셀러리발효산물	91.6±2.0	84.5±4.1	70.7±2.2	34.5±4.1
비트발효산물	ND	ND	ND	ND
당근발효산물	91.6±2.2	67.2±2.2	64.5±3.3	63.5±3.0

ND : Not Detected

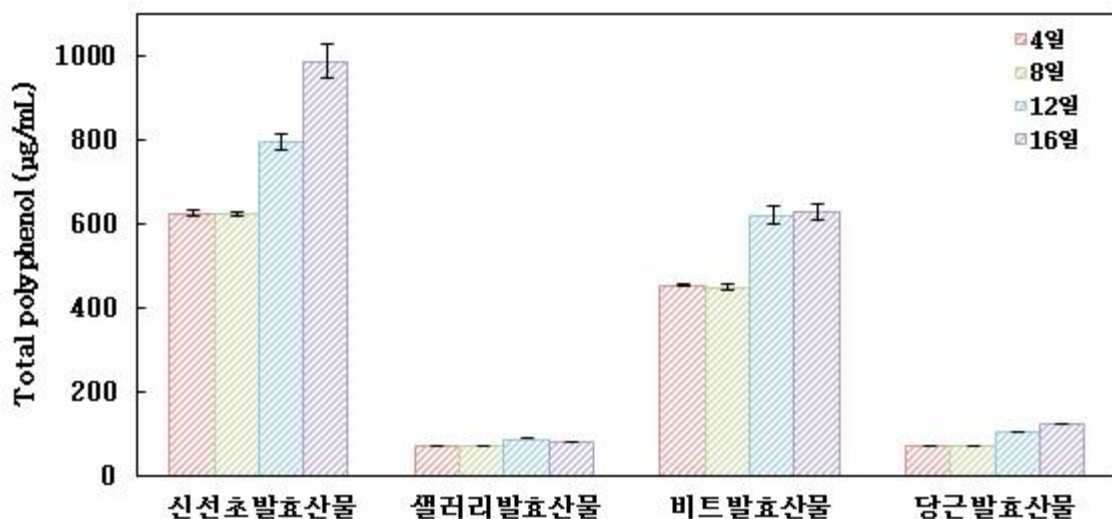


Fig. 1-2. 과채 알코올 발효산물의 발효기간별 총 폴리페놀 함량

본 연구 결과를 경상대학교 연구팀에게 알코올 발효 소재 및 보당 소재 선정을 위한 기초자료로 제공하였음.

(나) 알코올 발효 소재의 효율적 배합비율

- 발효소재의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 분석 결과를 바탕으로 당근주스, 케일주스, 블랙베리주스를 발효소재로 최종 선정한 후 각각의 적정 혼합비율을 결정하였음. 특히 항산화 활성이 우수한 블랙베리주스는 다른 재료에 비해 당도가 높아 알코올 발효시 보당 원료의 첨가를 줄일 수 있어 알코올 발효 소재로 가장 적합한 것으로 나타났음. 따라서 블랙베리주스의 배합비율을 당근주스와 케일주스에 비해 높게 결정하였음.
- 케일주스와 당근주스를 다양한 비율로 배합한 후 pH, 당도, 산도를 측정된 결과를 Table 1-9에 나타내었음. 당근주스의 배합비율이 증가할수록 pH와 당도는 증가하였음. 케일주스와 당근주스를 1:2.5와 1:3의 비율로 혼합한 경우 pH, 당도, 산도에 있어서 큰 차이를 나타내지 않았음. 당도가 높은 배합비율을 적용시킬 경우 보당 원료의 첨가를 줄일 수 있을 것임. 따라서 항산화능이 우수한 케일의 배합비율을 높이기 위하여 케일주스와 당근주스를 1:2.5의 비율로 최종 결정하였음.

Table 1-9. 케일주스와 당근주스 배합비율에 따른 pH, 당도 및 산도

케일주스 : 당근주스	pH	당도(°Brix)	산도(%)
3 : 1	6.07	6.0	0.30
2.5 : 1	6.07	6.2	0.40
2 : 1	6.09	6.2	0.40
1 : 1	6.11	6.7	0.44
1 : 2	6.13	7.2	0.30
1 : 2.5	6.15	7.5	0.25
1 : 3	6.15	7.5	0.26

- 케일/당근주스와 블랙베리주스 혼합액의 pH, 당도, 산도를 측정된 결과는 Table 1-10, 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과는 Fig. 1-3에 나타내었음. 블랙베리주스 비율이 감소함에 따라 pH는 증가하고, 당도 및 산도는 감소하였고 총 폴리페놀 함량 또한 감소하였음. 따라서 혼합액의 당도 및 항산화능 결과를 바탕으로 케일/당근주스와 블랙베리주스를 1:9 및 2:8의 비율로 결정하여 경상대학교에 분석결과를 제공하였음.

Table 1-10. 케일/당근주스와 블랙베리주스 배합비율에 따른 pH, 당도 및 산도

케일/당근주스 : 블랙베리주스	pH	당도(°Brix)	산도(%)
1 : 9	3.36	22.2	3.40
2 : 8	3.29	20.4	3.14
3 : 7	3.44	18.7	2.79
4 : 6	3.47	16.9	2.41

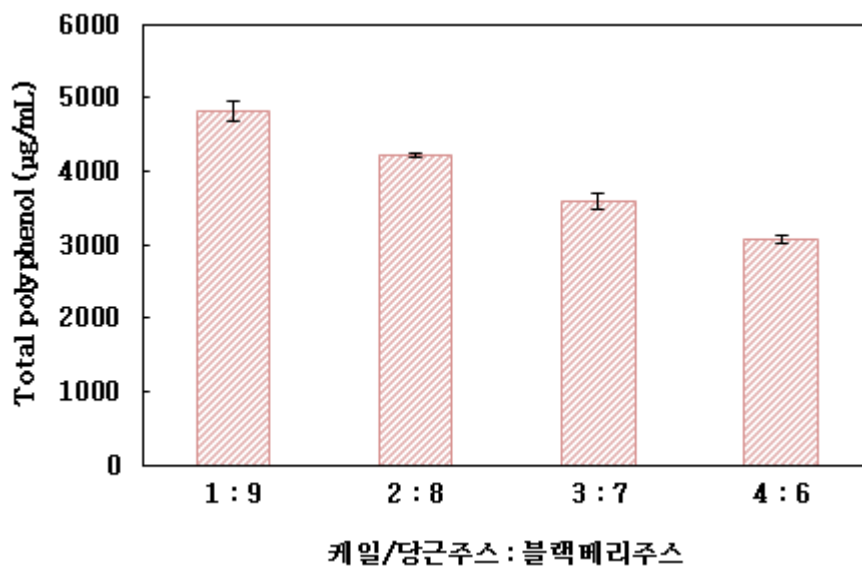


Fig. 1-3. 케일/당근주스와 블랙베리주스 배합비율에 따른 총 폴리페놀 함량

(다) 혼합 과채 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 물질

○ 혼합 과채주스 알코올 발효산물의 이화학적 특성

- 케일주스, 당근주스 및 블랙베리주스의 배합비율을 바탕으로 발효방법을 달리하여 제조된 과채주스 알코올 발효산물 6종(AF-1 ~ AF-6)의 pH, 당도, 산도를 측정된 결과는 Table 1-11에 나타내었음. AF-1 ~ AF-6의 pH는 3.44-3.70, 당도는 12.5-13.6 °Brix, 산도는 3.10-3.32%의 범위를 나타내어 발효산물 간의 차이는 크지 않았음.

Table 1-11. 혼합 과채주스 알코올 발효산물의 pH, 당도 및 산도

	pH	당도(°Brix)	산도(%)
AF-1	3.57	13.6	3.32
AF-2	3.52	13.3	3.10
AF-3	3.52	13.6	3.27
AF-4	3.70	13.3	3.14
AF-5	3.52	12.6	3.32
AF-6	3.44	12.5	3.15

- AF-1 ~ AF-6의 유리당 함량을 측정한 결과는 Fig. 1-4에 나타내었음. 알코올 발효시 각각의 과채주스를 혼합하여 알코올 발효를 시킨 AF-1, AF-2는 각각 과채주스 알코올 발효산물을 제조한 후 배합비율로 혼합한 AF-3, AF-4보다 유리당 잔존량이 다소 높은 것으로 나타났음. 반면 블랙베리 알코올 발효산물에 케일주스와 당근주스를 혼합한 AF-5와 AF6의 경우 과당, 포도당, 자당 등의 함량이 높은 것으로 나타났음.

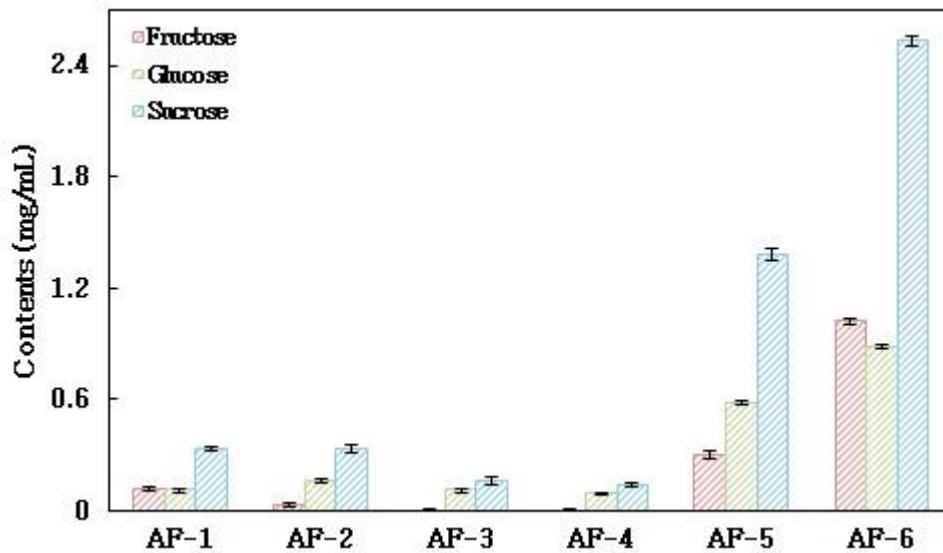


Fig. 1-4. 혼합 과채주스 알코올 발효산물의 과당, 포도당, 자당 함량

○ 알코올 발효산물의 생리활성 물질 함량

- AF-1 ~ AF-6의 베타카로틴 함량을 측정한 결과는 Fig. 1-5에 나타내었음. AF-2 및 AF-6의 베타카로틴 함량은 각각 $19.1 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$, $22.8 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ 로 높게 나타났음. 또한 AF-2 및 AF-6의 베타카로틴 함량은 AF-1 ($13.1 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$) 및 AF-5 ($13.3 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$)에 비해 높은 것으로 나타나 발효원료 중 케일주스와 당근주스의 비율이 높을수록 알코올 발효산물의 베타카로틴 함량이 높은 것으로 나타났음.

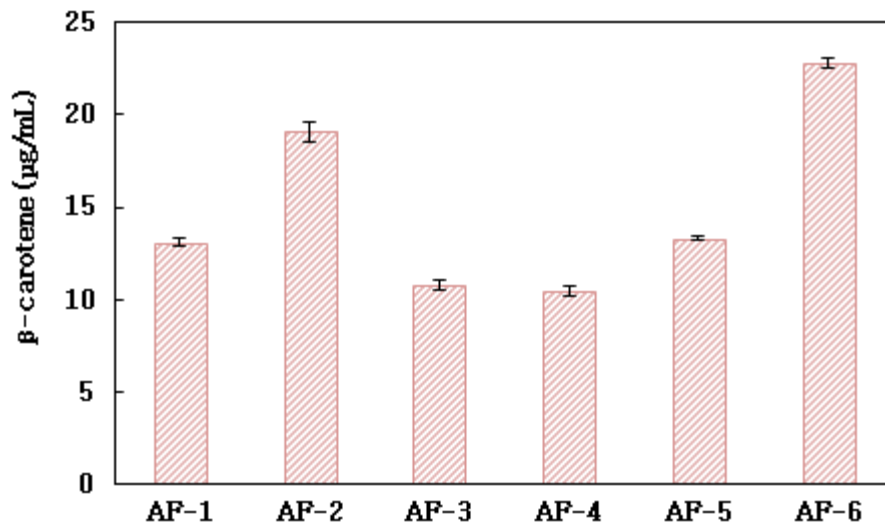


Fig. 1-5. 혼합 과채주스 알코올 발효산물의 베타카로틴 함량

- AF-1 ~ AF-6의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Fig. 1-6에 나타내었음. 블랙베리주스 함량이 높은 AF-1, AF-3, AF-5의 총 플라보노이드 함량은 AF-2, AF-4, AF-6에 비해 다소 높은 것으로 나타났음.

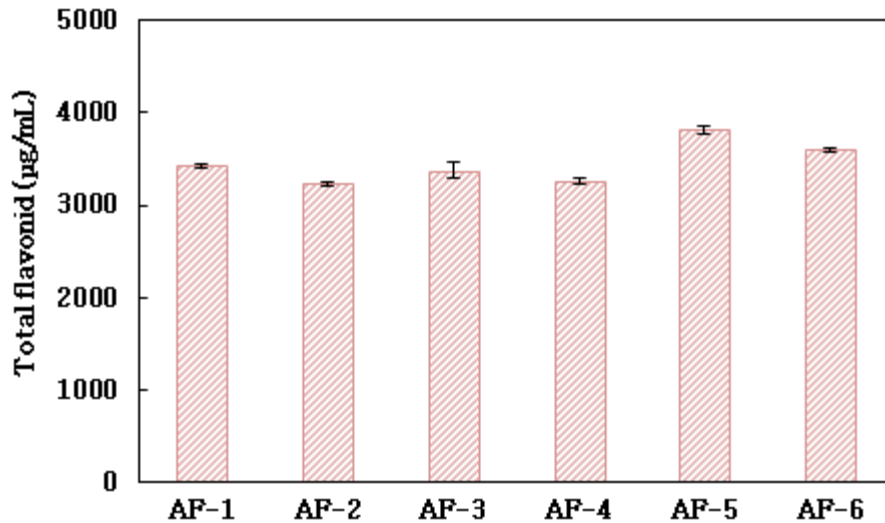


Fig. 1-6. 혼합 과채주스 알코올 발효산물의 플라보노이드 함량

- AF-1 ~ AF-6의 안토시아닌 함량을 측정한 결과는 Fig. 1-7에 나타내었음. 알코올 발효 소재 배합비율에 따른 안토시아닌 함량은 큰 차이를 나타내지 않았음.

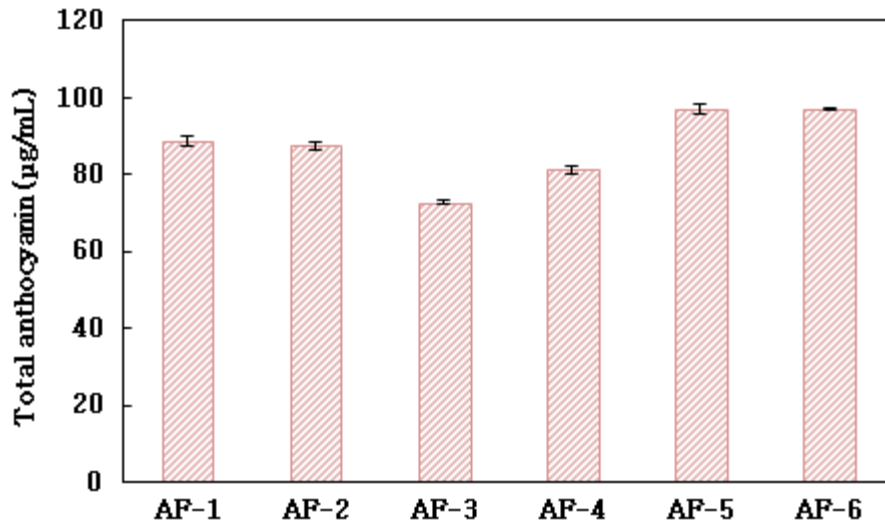


Fig. 1-7. 혼합 과채주스 알코올 발효산물의 안토시아닌 함량

- AF-1 ~ AF-6의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Fig. 1-8에 나타내었음. AF-1과 AF-2의 총 폴리페놀 함량은 각각 64.6 ± 4.0 , 62.9 ± 0.5 µg/mL로 나타나 발효 소재 배합비율에 큰 영향을 받지 않았음. 반면 AF-5와 AF-6의 총 폴리페놀 함량은 각각 94.4 ± 1.9 , 112.3 ± 1.4 µg/mL로 나타나 AF-6의 총 폴리페놀 함량이 더 높은 것으로 나타났음.

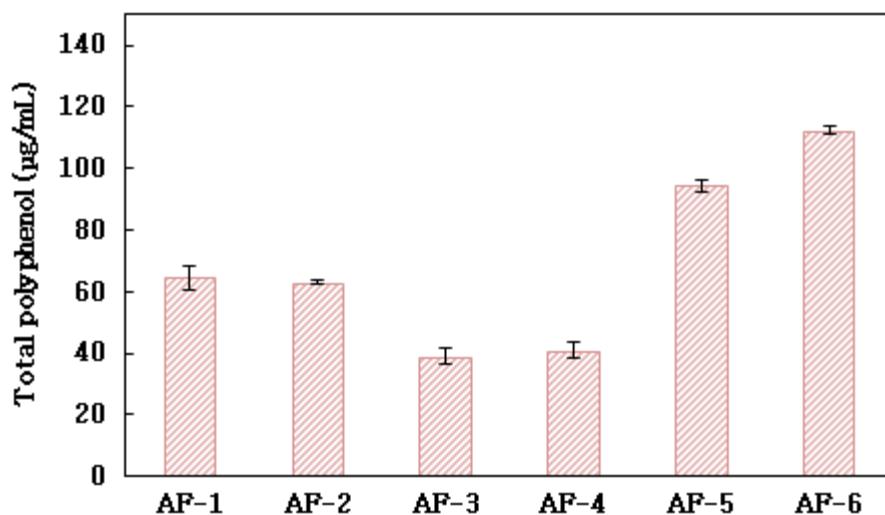


Fig. 1-8. 혼합 과채주스 알코올 발효산물의 총 폴리페놀 함량

- 혼합 과채주스 알코올 발효산물(AF-1 ~ AF-6)의 이화학적 특성과 생리활성 물질 분석 결과를 2차년도 과채 발효식초 제조를 위해 경상대학교 연구팀에게 제공하였음.

나) 과채 발효음료 제품 개발 및 이화학적 특성 규명

(1) 연구 방법

(가) 발효식초의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 분석

○ 발효식초의 이화학적 특성 확인

- 발효식초의 유리당 및 유기산 함량은 HPLC-RID(Shimadzu, Japan)을 이용하여 측정하였음. Column은 Asahipak NH2P-50 4E(4.6×250mm, 5 μ m), flow rate는 0.8mL/min, 온도는 40 $^{\circ}$ C, injection volume은 20 μ L으로 분석조건을 설정하여 측정하였음. 유리당 측정시 mobile phase는 DW:ACN(25:75), 유기산의 mobile phase는 Table 2-1에 나타내었음.

Table 2-1. 유리산 HPLC mobile phase

시간(분)	0.01M KH ₂ PO ₄ (%)	Acetonitrile(%)
0.00	100	0
15.00	100	0
15.01	85	15
17.00	85	15
17.01	100	0
25.00	100	0
30.00	100	0

○ 발효식초의 생리활성 물질 분석

- 발효식초의 β -카로틴, 플라보노이드, 안토시아닌 및 총 폴리페놀 함량을 측정하였음.
- 발효식초의 β -카로틴 함량은 HPLC-PDA(Shimadzu, Japan)을 이용하여 측정하였음. Column은 C18 ODS(4.6×250mm, 5 μ m), mobile phase는 A:B(70:30, A=ACN:MeOH(85:15), B=100% Dichloromethane), flow rate는 1.0mL/min, 온도는 40 $^{\circ}$ C, injection volume은 10 μ L으로 분석조건을 설정하여 측정하였음.
- 발효식초의 총 폴리페놀 함량은 Folin-ciocalteu법을 응용하여 측정하였으며, tannic acid를 표준품으로 사용하여 작성된 검량선으로부터 tannic acid 농도(μ g/mL)로 환산하여 나타내었고, 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법을 이용하여 catechin을 표준품으로 사용하여 작성된 검량선으로부터 catechin 농도(μ g/mL)로 환산하여 나타내었음.
- 발효식초의 안토시아닌 함량은 AOAC에 명시된 방법을 응용하여 측정하였으며, cyanidin-3-glucoside 농도(μ g/mL)로 환산하여 나타내었음.

(나) 과채 발효음료 배합비율 결정

① 과채주스의 효율적 배합비율 조사

○ 발효식초와 혼합하기 위한 과채주스 소재 선정

- 발효식초의 원료인 케일 또는 당근을 베이스로 하고 착즙률 및 맛을 향상시키기 위한 소재로 사과를 선정한 후 케일 또는 당근과 사과의 배합비율에 따른 관능검사를 실시하였음. 케일, 당근, 사과를 각각 저속착즙기로 착즙한 후 케일주스 또는 당근주스와 사과주스의 비율이 4:6, 5:5가 되도록 혼합한 후 색, 맛, 향, 목 넘김, 전체적인 기호도 등 관능검사를 9점 척도법(1=매우 나쁘다, 10=매우 좋다)으로 실시하였음.
- 관능검사 결과 전체 항목, 특히 맛과 전체적인 기호도에서 점수가 높았던 케일사과주스(KAJ)를 발효식초와 혼합하기 위한 과채주스로 결정하였음.

○ 케일사과주스 배합비율 결정

- 케일주스와 사과주스의 배합비율을 최종 결정하기 위하여 케일주스와 사과주스를 각각 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50의 비율로 혼합한 후 산도, pH, 당도, 총 폴리페놀 함량 및 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였음.
- 산도는 phenolphthalein 지시약을 가하여 0.1N NaOH 용액을 적정하여 초산의 상당량으로 계산하고, pH는 pH meter를, 당도는 굴절당도계를 이용하여 측정하였음.
- 각 배합비율별 케일사과주스의 색, 맛, 향, 목 넘김, 전체적인 기호도 등 관능적 특성을 조사하였음.
- 배합비율별 케일사과주스의 이화학적 특성, 항산화 활성 및 관능적 특성 결과로부터 최종 배합비율을 결정하였음.

Table 2-2. 케일사과주스(KAJ) 배합비율

	케일주스(%)	사과주스(%)
KAJ-1	30	70
KAJ-2	35	65
KAJ-3	40	60
KAJ-4	45	55
KAJ-5	50	50

② 과채 발효음료의 최종 배합비율 결정

○ 배합비율을 달리한 과채 발효음료 제조

- 케일사과주스(KAJ-4)와 발효식초를 0, 2.5, 5, 7.5, 10% 수준으로 혼합한 과채 발효음료(VJ) 5종을 제조하였음.

Table 2-3. 과채 발효음료(VJ) 배합비율

	케일사과주스 (%)	발효식초 (%)
VJ-0	100.0	0.0
VJ-2.5	97.5	2.5
VJ-5	95.0	5.0
VJ-7.5	92.5	7.5
VJ-10	90.0	10.0

- 과채 발효음료의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 측정
 - 5종의 과채 발효음료(VJ-0, VJ-2.5, VJ-5, VJ-7.5, VJ-10)의 pH, 당도, 산도 및 유리당, 유기산 함량을 측정하였음.
 - 과채 발효음료(VJ-0 ~ VJ-10)의 β -카로틴, 플라보노이드, 안토시아닌 및 총 폴리페놀 함량을 측정하였음.
- 과채 발효음료의 관능적 특성 확인
 - 발효식초 함량에 따른 관능적 특성을 비교하기 위하여 과채 발효음료(VJ-0 ~ VJ-10)의 색, 맛, 향, 목 넘김, 전체적인 기호도 등 관능적 특성을 조사하였음.
- 과채 발효음료의 저장 온도 및 저장기간별 일반세균수 측정
 - 과채 발효음료(VJ-0 ~ VJ-10)의 보관온도 및 보관기간에 따른 미생물적 안전성을 확인하기 위하여 과채 발효음료 제조 즉시, 4℃ 및 10℃에서 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28일 동안 보관한 후 음료의 일반세균수를 측정하였음.
- 5종의 과채 발효음료의 이화학적 특성 및 생리활성 함량, 관능적 특성 및 미생물적 안전성에 대한 결과를 종합적으로 분석한 후 과채 발효음료 최종 배합비율을 결정하였음.
- 과채 발효음료의 영양성분 분석
 - 최종 배합비율에 따라 제조된 과채 발효음료(VJ-5)의 탄수화물, 당, 단백질, 지질, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤 및 나트륨 등의 영양성분을 분석하였음.
- 저장기간별 과채 발효음료의 관능적 특성 변화 조사
 - 최종 배합비율에 따라 제조된 과채 발효음료(VJ-5)를 0, 1, 3, 5, 7, 14일 동안 저장한 후 맛, 향, 색, 목 넘김, 전체적인 기호도 등을 평가하여 저장기간이 관능적 특성 변화에 미치는 영향을 조사하였음.

- 지방전구세포에 있어서 지방분해 효과 규명
 - 지방전구세포(3T3-L1 세포)에 있어서 발효식초 및 과채 발효음료의 세포독성을 확인하기 위하여 cell viability를 측정하였음. 3T3-L1 세포에 발효식초 및 과채 발효음료를 투여하고 2일간 배양한 후 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 용액을 가한 후 흡광도를 측정하여 cell viability를 측정하였음.
 - 3T3-L1 세포를 배양한 후 IBMX-DEX cocktail과 insulin을 첨가하고 발효식초 및 과채 발효음료를 가한 후 8일 동안 배양시킴. 세포를 고정시킨 후 세포내 lipid droplet를 염색시킨 후 세포를 해리시켜 중성지방 함량을 측정하였음.

(다) 저장기간 연장을 위한 비가열초고압(HPP) 살균처리 방법 적용

- 비가열초고압 살균처리
 - 저장 기간 동안 과채 발효음료(VJ-5)의 관능적 특성 변화를 최소화하기 위해 비가열초고압(HPP) 살균처리 방법을 적용하기로 결정하였음. 과채 발효음료를 제조하여 용기에 담은 후 5,500 bar에서 60초 동안 HPP 처리하였음.
- HPP 처리 과채 발효음료의 이화학적 특성 및 관능적 특성 변화 확인
 - HPP 처리 과채 발효음료의 이화학적 특성 및 안전성을 확인하기 위하여 HPP 처리 전과 후 과채 발효음료의 pH, 당도, 산도를 측정하여 품질 특성 변화를, DPPH 라디칼 소거활성 및 총 폴리페놀 함량을 측정하여 항산화 효과를, 일반세균수를 측정하여 미생물적 안전성을 확인하였음.
 - 저장기간 동안 관능적 특성 변화를 확인하기 위해 HPP 처리 즉시, 저장 1, 3, 5, 7, 14일 후 맛, 색, 향, 목 넘김, 전체적인 기호도 등을 평가하였음.
- HPP 처리 과채 발효음료의 관능적 특성에 대한 소비자 기호도 조사
 - 휴롬주스 매장 방문 고객을 대상으로 HPP 처리 과채 발효음료의 색, 맛, 향, 전체적인 기호도 등에 대한 관능적 특성을 조사하였음. HPP 처리한 과채 발효음료를 총 117명(남자 59명, 여자 58명, 연령 20-60세)의 소비자 패널에게 제공한 후 맛, 향, 전체적인 기호도 및 구입 의향 등을 평가하였음. 기호도 평가는 5점 척도법(1=매우 나쁘다, 5=매우 좋다)으로 평가하였음.

(라) 통계처리

- 실험 분석결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었고 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였음. 각 군의 평균치의 유의성 검정은 분산분석(ANOVA)를 사용하여 실시하였고, Tukey's test를 follow up test로 사용하였음. HPP 처리 전과 후 사이의 유의성은 Student's t-test를 사용하였음.

(2) 연구결과

(가) 발효식초의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 함량

○ 발효식초의 이화학적 특성

- 발효식초의 유리당 함량을 분석한 결과는 Table 2-4에 나타내었음. 발효식초의 과당, 포도당, 자당 함량은 각각 0.19 ± 0.01 , 0.09 ± 0.01 , 0.05 ± 0.01 mg/mL로 나타났음. 케일, 당근, 블랙베리 등의 식초 원료에 함유되어 있는 당은 발효 과정 중 초산균의 작용으로 대부분 산으로 전환되어 당은 미량 존재함. 미량 잔존해 있는 당은 식초의 감미와 산미에 영향을 주는 것으로 알려져 있음.

Table 2-4. 발효식초의 유리당 함량

	(mg/mL)		
	Fructose	Glucose	Sucrose
발효식초	0.19 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01

ND : Not detected

- 발효식초의 유기산 함량을 측정된 결과는 Table 2-5에 나타내었음. 발효식초의 유기산 함량은 acetic acid($46,619.74\pm 45.44$ µg/mL)가 가장 높았고 citric acid, malic acid, formic acid, ascorbic acid 순으로 나타났고, fumaric acid 및 succinic acid는 검출되지 않았음.

Table 2-5. 발효식초의 유기산 함량

	(mg/mL)
	발효식초
Acetic acid	$46,619.74\pm 45.44$
Ascorbic acid	42.45 ± 0.40
Citric acid	329.36 ± 3.12
Formic acid	88.02 ± 2.01
Fumaric acid	ND
Malic acid	314.48 ± 5.51
Succinic acid	ND

ND : Not detected

○ 발효식초의 생리활성 물질 함량

- 발효식초의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Table 2-6에 나타내었음. 발효식초의 총 폴리페놀은 250.00±3.39 µg/mL, 총 플라보노이드 함량은 81.74± 2.35 µg/mL로 나타났음.

Table 2-6. 발효식초의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

	Total polyphenol contents (µg/mL)	Total flavonoid contents (µg/mL)
발효식초	250.00±3.39	81.74±2.35

- 발효식초의 β-카로틴 및 안토시아닌 함량은 Table 2-7에 나타내었음. 발효식초의 안토시아닌 함량은 0.75±0.03 µg/mL로 나타났고, 베타카로틴은 검출되지 않았음.

Table 2-7. 발효식초의 β-카로틴 및 안토시아닌 함량

	β-carotene contents (µg/mL)	Anthocyanin contents (µg/mL)
발효식초	ND	0.75±0.03

ND : Not detected

(나) 과채 발효음료 배합비율 확립

① 과채주스의 배합비율 결정

○ 발효식초와 혼합하기 위한 과채주스 소재 결정

- 발효식초와 혼합하기 위한 과채주스 레시피를 결정하기 위해 케일사과주스(KAJ)와 당근사과주스(CAJ)의 배합비율별 관능검사 결과를 Fig. 2-1에 나타내었음. 주스의 맛과 전체적인 기호도는 KAJ-4:6 > KAJ-5:5 > CAJ-4:6 > CAJ-5:5 순으로 나타났음. 그러나 색, 향, 목 넘김, 맛, 전체적인 기호도는 각 주스간 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 관능검사 결과를 바탕으로 케일사과주스(KAJ-4:6)를 발효식초와 혼합하기 위한 과채주스로 결정하였음.

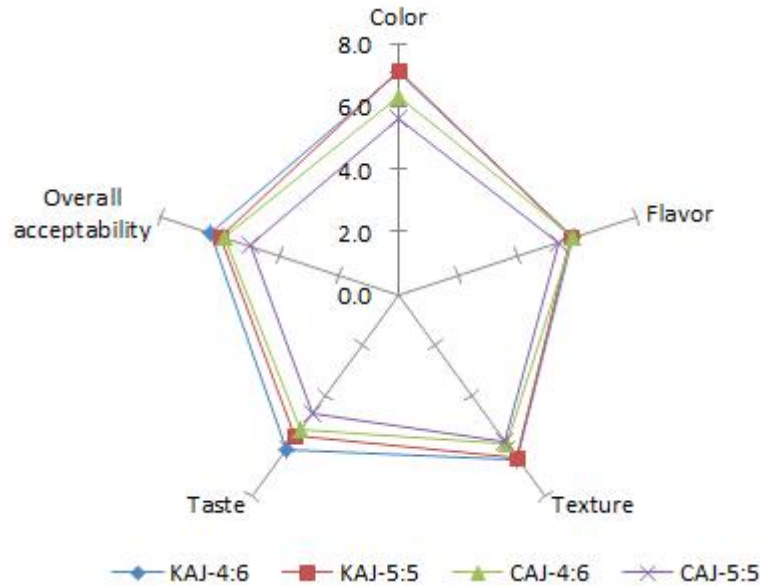


Fig. 2-1. 케일사과주스(KAJ)와 당근사과주스(CAJ)의 관능적 특성

○ 케일사과주스 배합비율 결정

- 케일사과주스(KAJ-1 ~ KAJ-5)의 pH, 당도, 산도를 측정한 결과는 Table 2-8에 나타내었음. KAJ-1에서 KAJ-5로 갈수록 당도 및 산도는 감소하고 pH는 증가하는 경향을 보였음. 이는 케일사과주스에서 케일주스보다 상대적으로 당도와 산도가 높고 pH가 낮은 사과주스의 배합비율이 감소하면서 케일사과주스의 이화학적 특성에 영향을 주는 것으로 사료됨.

Table 2-8. 배합비율별 케일사과주스의 pH, 당도, 산도

	pH	당도(°Brix)	산도(%)
KAJ-1	3.99±0.01 ^c	10.37±0.06 ^a	0.81±0.01 ^a
KAJ-2	4.00±0.01 ^c	9.90±0.01 ^b	0.68±0.01 ^b
KAJ-3	4.03±0.01 ^b	9.53±0.06 ^c	0.45±0.01 ^c
KAJ-4	4.10±0.01 ^a	9.20±0.01 ^d	0.50±0.01 ^d
KAJ-5	4.12±0.01 ^a	8.63±0.06 ^e	0.50±0.01 ^d

- 배합비율별 케일사과주스(KAJ-1 ~ KAJ-5)의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Fig. 2-2에 나타내었음. KAJ-4와 KAJ-5의 총 폴리페놀 함량은 각각 328.28±1.01, 331.33±1.32 µg/mL로 KAJ-1(317.97±3.95 µg/mL)과 KAJ-2(316.20±2.91 µg/mL)에 비해 유의적으로 높았음. KAJ-3(322.16±2.75 µg/mL)의 총 폴리페놀 함량은 KAJ-1, KAJ-2, KAJ-4, KAJ-5와 유의적인 차이가 없었음. 케일주스의 배합비율이 높을수록 총 폴리페놀 함량이 증가하는 것으로 나타났음.

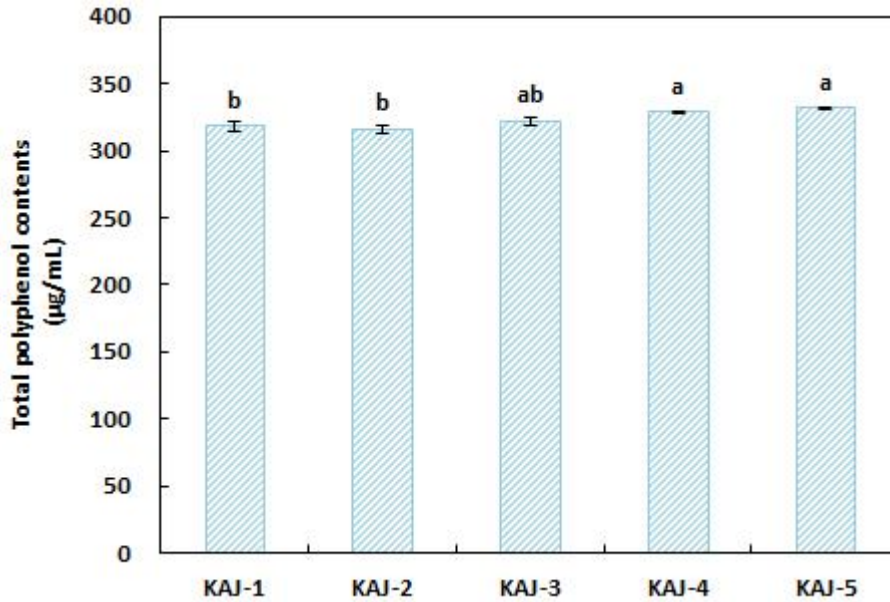


Fig. 2-2. 발효식초의 총 폴리페놀 함량

- 배합비율별 케일사과주스(KAJ-1 ~ KAJ-5)의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 2-3에 나타내었음. KAJ-4와 KAJ-5의 DPPH 라디칼 소거활성은 각각 195.36 ± 3.20 , 195.48 ± 4.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 KAJ-1(178.72 ± 3.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 KAJ-2(184.73 ± 4.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 비해 유의적으로 높았고 KAJ-3(192.05 ± 4.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과는 유의적인 차이가 없었음. KAJ-3의 DPPH 라디칼 소거활성은 KAJ-1에 비해 유의적으로 높았고, KAJ-2와는 유의적인 차이가 없었음. 케일주스의 배합비율이 높을수록 DPPH 라디칼 소거활성이 높은 것으로 나타났다. 따라서 케일주스의 배합비율이 높을수록 항산화능이 우수할 것으로 사료됨.

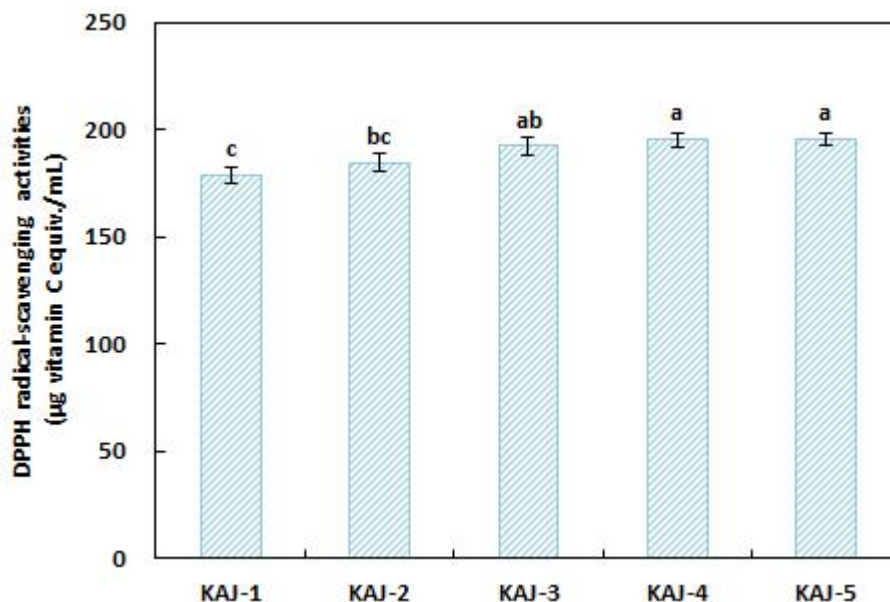


Fig. 2-3. 배합비율별 케일사과주스의 DPPH 라디칼 소거능

- 케일사과주스(KAJ-1 ~ KAJ-5)의 배합비율별 관능검사 결과를 Fig. 2-4에 나타내었음. 각 주스간 색 및 향에 대한 선호도는 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 사과주스 배합비율이 가장 높은 KAJ-1의 목 넘김에 대한 선호도는 KAJ-4, KAJ-5보다 유의적으로 높았고 KAJ-2, KAJ-3과는 유의적인 차이를 나타내지 않았음. KAJ-1의 맛에 대한 선호도는 KAJ-4, KAJ-5보다 유의적으로 높았고 KAJ-2, KAJ-3과는 유의적인 차이를 나타내지 않았음. KAJ-2의 맛에 대한 선호도는 KAJ-5보다 유의적으로 높았고, KAJ-3, KAJ-4와는 유의적인 차이가 없었음. KAJ-3과 KAJ-4의 경우 KAJ-5와 유의적인 차이가 없었음. KAJ-1, KAJ-2, KAJ-3, KAJ-4의 전체적인 기호도는 KAJ-5에 비해 유의적으로 높았고 KAJ-1 ~ KAJ-4 사이에는 유의적인 차이가 없었음. 케일주스의 배합비율은 목넘김, 맛, 전체적인 기호도에 영향을 주는 것으로 나타났음.

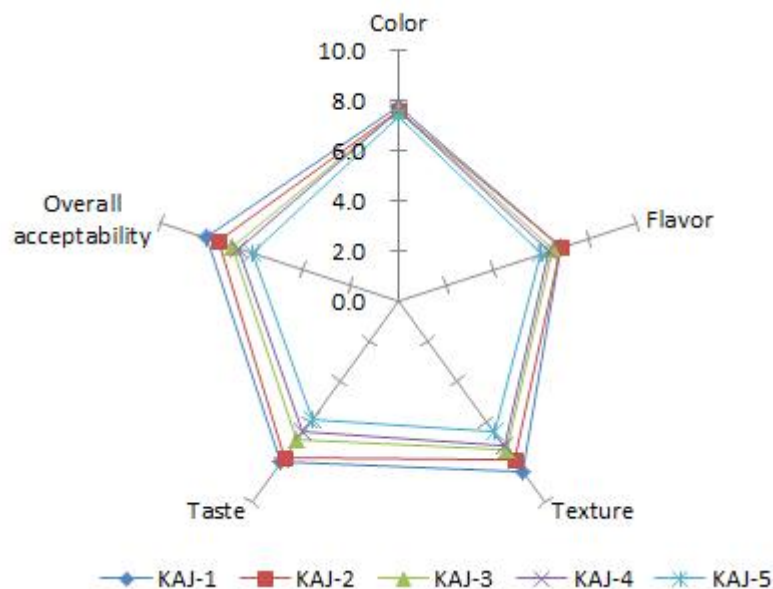


Fig. 2-4. 배합비율별 케일사과주스의 관능적 특성

- 케일주스의 함량이 높을수록 관능적 특성은 사과주스 함량이 높은 케일사과주스보다 낮으나 총 폴리페놀 함량 및 DPPH 라디칼 소거활성은 증가하는 것으로 나타났음. 따라서 항산화능이 높으면서 맛과 전체적인 기호도에 있어서 다른 배합비율의 케일사과주스와 차이를 나타내지 않는 KAJ-4를 최종 과채주스 배합비율로 결정하였음.

② 과채 발효음료의 최종 배합비율 결정

○ 과채 발효음료의 이화학적 특성 및 생리활성 물질

- 과채 발효음료(VJ-0 ~ VJ-10)의 pH, 당도, 산도를 측정한 결과는 Table 2-9에 나타내었음. 발효식초의 함량이 높을수록 pH와 당도는 감소하였고, 산도는 증가하였음. 이는 당도와 pH가 낮고 산도가 높은 발효식초의 혼합비율에 영향을 받는 것으로 사료됨.

Table 2-9. 과채 발효음료의 pH, 당도, 산도

	pH	당도(°Brix)	산도(%)
VJ-0	4.60±0.01 ^a	9.67±0.12 ^a	0.20±0.01 ^e
VJ-2.5	4.27±0.01 ^b	9.50±0.01 ^b	0.34±0.01 ^d
VJ-5	4.10±0.01 ^c	9.30±0.01 ^c	0.45±0.02 ^c
VJ-7.5	3.98±0.01 ^d	9.10±0.01 ^d	0.60±0.02 ^b
VJ-10	3.89±0.01 ^e	8.90±0.01 ^e	0.74±0.02 ^a

- 과채 발효음료의 유리당 함량을 측정한 결과는 Table 2-10에 나타내었음. 발효식초를 혼합하지 않은 케일사과주스(VJ-0)의 과당, 포도당, 자당 함량은 각각 50.07±0.04, 17.96±0.09, 0.62±0.01 mg/mL로 나타났고 발효식초의 혼합비율이 증가할수록(VJ-2.5 ~ VJ-10) 과당, 포도당, 자당의 함량은 감소하였음.

Table 2-10. 과채 발효음료의 유리당 함량

	(mg/mL)		
	Fructose	Glucose	Sucrose
VJ-0	50.07±0.04 ^a	17.96±0.09 ^a	0.62±0.01 ^a
VJ-2.5	48.00±0.08 ^b	17.10±0.07 ^b	0.58±0.01 ^b
VJ-5	47.22±0.03 ^c	16.85±0.03 ^c	0.50±0.01 ^c
VJ-7.5	45.89±0.09 ^d	16.23±0.05 ^d	0.46±0.03 ^d
VJ-10	43.87±0.10 ^e	15.65±0.05 ^e	0.36±0.01 ^e

- 과채 발효음료의 유기산을 측정한 결과는 Table 2-11에 나타내었음. 발효식초를 혼합하지 않은 케일사과주스(VJ-0)의 유기산 함량은 citric acid > succinic acid > malic acid > formic acid > ascorbic acid > fumaric acid 순으로 나타났고, acetic acid는 검출되지 않았음. VJ-0에 혼합되는 발효식초의 농도가 증가할수록 VJ-0에 비해 발효식초의 주요 유기산인 acetic acid는 증가하였고, ascorbic acid, citric acid, formic acid, fumaric acid, malic acid, succinic acid는 감소하였음.

Table 2-11. 과채 발효음료의 유기산 함량

	(µg/mL)				
	VJ-0	VJ-2.5	VJ-5	VJ-7.5	VJ-10
Acetic acid	ND	1,114.48±0.85 ^d	2,355.49±2.43 ^c	3,629.56±2.47 ^b	4,904.62±2.89 ^a
Ascorbic acid	34.93±0.28 ^a	34.83±0.17 ^{ab}	34.61±0.15 ^{ab}	34.33±0.07 ^{bc}	34.07±0.21 ^c
Citric acid	2,666.07±51.27 ^a	2,607.37±85.34 ^a	2,571.80±67.53 ^{ab}	2,515.93±73.71 ^{ab}	2,473.66±64.80 ^b
Formic acid	137.12±0.31 ^a	135.30±1.09 ^{ab}	132.15±1.21 ^{bc}	130.08±2.36 ^c	128.03±2.01 ^c
Fumaric acid	24.06±0.08 ^a	23.37±0.05 ^b	22.95±0.04 ^c	22.37±0.01 ^d	21.87±0.05 ^e
Malic acid	851.24±43.93 ^a	780.08±6.79 ^b	743.02±8.37 ^b	731.44±6.64 ^b	730.24±6.48 ^b
Succinic acid	1042.71±12.21 ^a	969.11±9.13 ^b	951.34±9.86 ^{bc}	927.09±8.37 ^{cd}	910.06±12.19 ^d

ND : Not detected

- 과채 발효음료(VJ-0 ~ VJ-10)의 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량은 Table 2-12에 나타내었음. VJ-2.5, VJ-5의 총 폴리페놀 함량은 각각 436.65±1.96, 432.13±4.52 µg/mL로 나타나 발효식초를 첨가하지 않은 VJ-0(440.42±2.85 µg/mL)과 유의적인 차이가 없었음. VJ-7.5의 경우 VJ-0, VJ-2.5에 비해 유의적으로 감소하였고 VJ-5, VJ-10과는 유의적인 차이가 없었음. 발효식초를 10% 첨가한 VJ-10의 경우 VJ-0, VJ-2.5, VJ-5에 비해 유의적으로 감소하였고, VJ-7.5와는 유의적인 차이가 없었음. VJ-2.5, VJ-5, VJ-7.5, VJ-10의 플라보노이드 함량은 각각 215.07±1.50, 245.10±1.88, 307.78±3.55, 308.65±1.80 µg/mL로 나타나 발효식초를 첨가한 과채 발효음료는 발효식초를 첨가하지 않은 VJ-0(197.36±1.31 µg/mL)에 비해 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 증가하였음.

Table 2-12. 과채 발효음료의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

	Total polyphenol contents (µg/mL)	Total flavonoid contents (µg/mL)
VJ-0	440.42±2.85 ^a	197.36±1.31 ^d
VJ-2.5	436.65±1.96 ^a	215.07±1.50 ^c
VJ-5	432.13±4.52 ^{ab}	245.10±1.88 ^b
VJ-7.5	427.60±4.08 ^{bc}	307.78±3.55 ^a
VJ-10	420.06±1.31 ^c	308.65±1.80 ^a

- 과채 발효음료(VJ-0 ~ VJ-10)의 β-카로틴 함량은 Table 2-13에 나타내었음. VJ-2.5, VJ-5, VJ-7.5, VJ-10의 베타카로틴 함량은 각각 41.83±0.11, 41.31±0.03, 40.84±0.16, 40.57±0.21 µg/mL로 나타나 발효식초를 첨가한 과채 발효음료는 발효식초를 첨가하지 않

은 VJ-0($42.40 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$)에 비해 베타카로틴 함량이 유의적으로 낮았음. VJ-2.5의 베타카로틴 함량은 VJ-5와 유의적인 차이가 없었고, VJ-7.5 및 VJ-10에 비해 유의적으로 높았음. VJ-5의 베타카로틴 함량은 VJ-7.5와 유의적인 차이가 없었고, VJ-10보다는 유의적으로 높았음. VJ-7.5의 베타카로틴 함량은 VJ-10과 유의적인 차이가 없었음. 발효식초를 첨가하지 않은 VJ-0은 안토시아닌이 검출되지 않았으나 발효식초를 첨가한 경우 안토시아닌 함량이 유의적으로 증가하였음. 발효식초의 배합비율이 증가할수록 총 폴리페놀 및 베타카로틴 함량은 감소하였고, 총 플라보노이드 및 안토시아닌 함량은 증가하였음.

Table 2-13. 과채 발효음료의 β -카로틴 및 안토시아닌 함량

	β -carotene contents ($\mu\text{g/mL}$)	Anthocyanin contents ($\mu\text{g/mL}$)
VJ-0	42.40 ± 0.36^a	ND
VJ-2.5	41.83 ± 0.11^b	0.07 ± 0.03^c
VJ-5	41.31 ± 0.03^{bc}	0.20 ± 0.07^b
VJ-7.5	40.84 ± 0.16^{cd}	0.33 ± 0.05^a
VJ-10	40.57 ± 0.21^d	0.39 ± 0.04^a

ND : Not detected

○ 과채 발효음료의 관능적 특성

- 과채 발효음료(VJ-0 ~ VJ-10)의 관능검사 결과를 Fig. 2-5에 나타내었음.

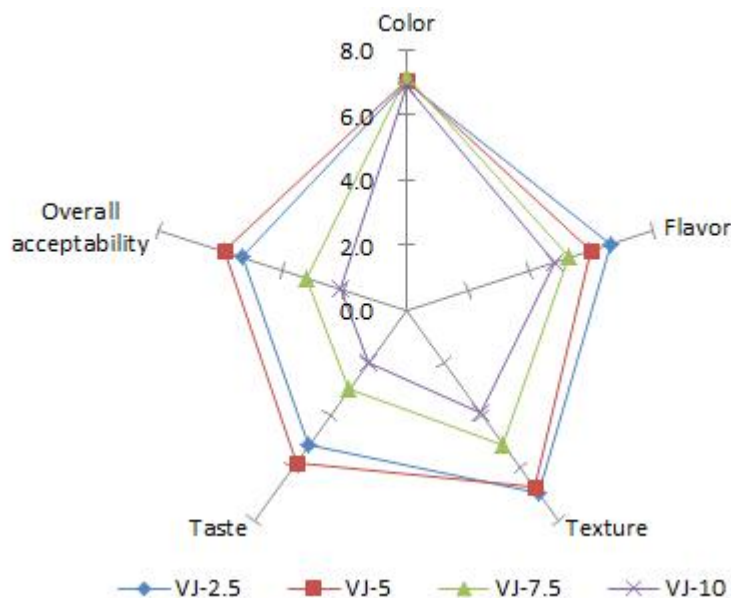


Fig. 2-5. 과채 발효음료의 관능적 특성

○ 과채 발효음료의 저장온도 및 저장기간별 일반세균수

- 과채 발효음료를 4°C에서 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28일 동안 보관하면서 일반세균수를 측정
한 결과 발효식초를 첨가한 VJ-2.5, VJ-5, VJ-7.5, VJ-10은 1일 후 0일에 비해 급격히
감소하였고 이 후 비슷한 수준을 유지하였음. 발효식초를 첨가하지 않은 VJ-0의 일반세
균수도 저장기간에 따라 영향을 받지 않았음. 과채 발효음료를 10°C에서 보관하면서 저
장기간별 일반세균수를 측정한 결과 VJ-0은 1일 후부터 증가하기 시작하였고 VJ-2.5는
14일 후, VJ-5는 21일 후부터 증가하기 시작하였고, VJ-7.5 및 VJ-10은 저장기간 동안
꾸준히 감소하였음. 따라서 과채 발효음료를 4°C에서 저장할 경우 일반세균수 성장을 억
제하여 주스의 안전성을 유지하는 데 도움이 되는 것으로 사료됨.

Table 2-14. 과채 발효음료의 저장기간에 따른 일반세균수

								(A) 4°C
	0일	1일	3일	5일	7일	14일	21일	28일
VJ-0	5.54±0.04 ^a	5.25±0.05 ^{ab}	5.25±0.05 ^{ab}	5.23±0.05 ^{ab}	5.19±0.15 ^b	5.00±0.11 ^b	5.13±0.24 ^b	5.00±0.14 ^b
VJ-2.5	5.16±0.02 ^a	3.61±0.26 ^b	3.69±0.22 ^b	4.10±0.07 ^c	4.11±0.16 ^c	3.82±0.07 ^{bcd}	3.86±0.05 ^{bcd}	3.67±0.03 ^{bd}
VJ-5	4.84±0.03 ^a	3.88±0.21 ^{bc}	3.96±0.15 ^b	3.89±0.03 ^{bc}	3.92±0.14 ^{bc}	3.75±0.05 ^{bc}	3.75±0.04 ^{bc}	3.61±0.11 ^c
VJ-7.5	4.47±0.06 ^a	3.74±0.09 ^{bc}	3.77±0.07 ^b	3.77±0.01 ^b	3.80±0.02 ^b	3.60±0.02 ^c	3.70±0.01 ^{bc}	3.66±0.10 ^{bc}
VJ-10	4.39±0.09 ^a	3.63±0.23 ^b	3.74±0.10 ^b	3.68±0.01 ^b	3.73±0.03 ^b	3.70±0.02 ^b	3.68±0.09 ^b	3.65±0.03 ^b

								(B) 10°C
	0일	1일	3일	5일	7일	14일	21일	28일
VJ-0	5.54±0.04 ^a	5.75±0.05 ^a	6.29±0.11 ^a	7.21±0.03 ^b	8.76±0.02 ^c	11.97±0.14 ^d	13.99±0.31 ^e	15.42±0.66 ^f
VJ-2.5	5.16±0.02 ^a	3.81±0.10 ^b	3.81±0.09 ^b	4.29±0.01 ^c	4.29±0.19 ^c	5.10±0.12 ^a	5.92±0.13 ^d	6.33±0.06 ^e
VJ-5	4.84±0.03 ^a	3.98±0.08 ^b	4.08±0.09 ^{bc}	4.00±0.07 ^{bc}	3.99±0.15 ^{bc}	3.93±0.11 ^{bc}	3.95±0.15 ^{bc}	3.79±0.08 ^c
VJ-7.5	4.47±0.06 ^a	3.84±0.06 ^b	3.83±0.05 ^b	3.85±0.01 ^b	3.87±0.11 ^b	3.83±0.11 ^b	3.80±0.11 ^b	3.77±0.05 ^b
VJ-10	4.39±0.09 ^a	3.73±0.06 ^b	3.75±0.06 ^b	3.76±0.06 ^b	3.75±0.04 ^b	3.80±0.08 ^b	3.74±0.14 ^b	3.68±0.03 ^b

○ 과채 발효음료의 영양성분

- 최종 선정된 과채 발효음료 VJ-5의 영양성분 분석을 의뢰한 결과를 Table 2-15에 나타
내었음. 과채 발효음료의 열량은 주스 100 mL 당 33.8 kcal, 당류는 5.8 g/100 mL로 이
를 1회 제공량 250 mL로 환산할 경우 열량 및 당류는 각각 84.5 kcal, 14.5 g으로 나타났
음. 과채 발효음료의 열량 및 당 함량은 기존 시판 주스에 비해 낮은 것으로 나타나 본
연구팀에서 개발한 음료는 체중 조절 및 대사증후군 개선에 도움을 줄 것으로 사료됨.

Table 2-15. 과채 발효음료의 영양성분

	과채 발효음료	1일 영양성분 기준치(%)
열량 (kcal/100mL)	33.8	-
탄수화물 (g/100mL)	7.0	2
당류 (g/100mL)	5.8	6
조단백질 (g/100mL)	1.0	2
조지방 (g/100mL)	0.2	0
포화지방 (g/100mL)	0	0
트랜스지방 (g/100mL)	0	-
콜레스테롤 (mg/100mL)	0	0
나트륨 (g/100mL)	37.1	1

시 험 성 적 서

발급번호 : G170012945

접수번호	1709-0589	검사목적	참고용
제품명	휴롬주스	제조사	
제품유형		유통기한	..
업소명	(주)휴롬	의뢰인	김재민
소재지	경상남도 김해시 주촌면 굴드루트로 80-60		
접수년월일	2017.09.06	검사완료일	2017.09.13

시 험 결 과

시험항목	기준규격	결과	1일영양성분기준치(%)
열량(kcal/100mL)		33.8	-
탄수화물(g/100mL)		7.0	2
당류(g/100mL)		5.8	6
조단백질(g/100mL)		1.0	2
조지방(g/100mL)		0.2	0
포화지방(g/100mL)		0	0
트랜스지방(g/100mL)		0	0
콜레스테롤(mg/100mL)		0	0
나트륨(mg/100mL)		37.1	2

* 비교 : 생산일자:2017.09.05
2018년 1월 1일 시행(식약처 고시 제2016-149호)에 따른 1일 영양성분 기준치에 따라 계산된 값입니다.
위 결과는 작성상 세밀한 검독을 필요로 하며, 불량 및 위산치거 변동이오니 포장 전 보내드린 성적서와 영양표시 관련정보 사이트(<http://www.mfds.go.kr/nutrition/index.do>)를 참고하시어 재확인 후 사용하시기 바랍니다.

2017년 09월 13일

(주) 한국분석기술연구

이 성적은 제출된 견본에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 및 상업용에 사용할 수 없음.
주소 : 부산시 동구 초량1동 1213-17 해광빌딩 3층, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3295.
발식번호(KATRI-P-24-01) 계정번호(0) 개봉일자(2006.12.15)

○ 저장기간별 과채 발효음료의 관능적 특성 변화

- 최종 선정된 과채 발효음료(VJ-5)를 28일 동안 저장한 결과 미생물적으로 안전함을 확인 하였음. 본 연구에서는 미생물적으로 안전함이 입증된 저장기간 동안 주스의 관능적 특성 변화를 조사한 결과를 Fig. 2-6에 나타내었음. 저장 기간이 증가할수록 색, 향, 목 넘김, 맛, 전체적인 기호도 등에 대한 선호도가 감소하는 것으로 나타났음. 특히 저장기간 7일째부터 급격히 선호도가 낮아지는 것을 확인할 수 있었음. 따라서 과채 발효음료의 관능적 특성 변화를 최소화하기 위해 비가열초고압(HPP) 살균처리를 적용하기로 결정하였음.

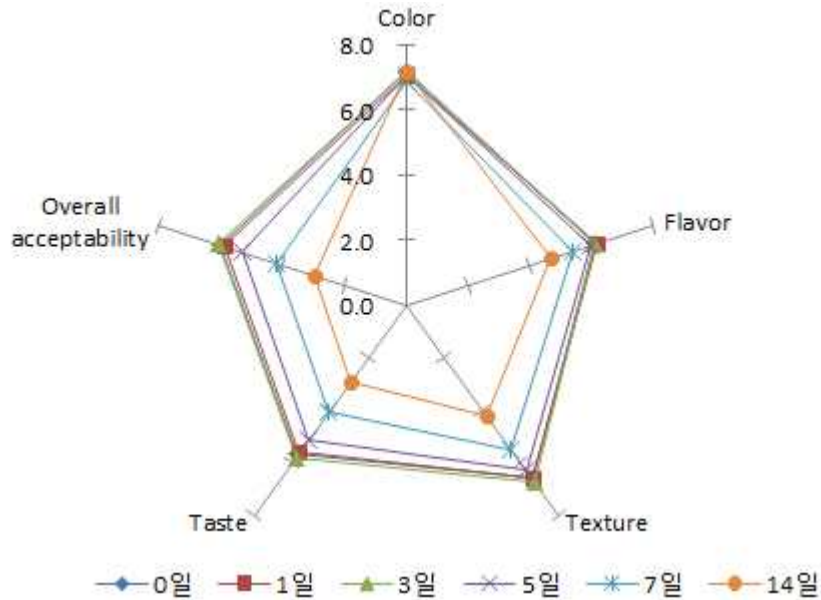


Fig. 2-6. 저장기간별 과채 발효음료의 관능검사

○ 지방전구세포에 있어서 지방분화 억제효과

- 지방전구세포에 있어서 발효식초 및 과채 발효음료의 처리는 대조구에 비해 지방 분화를 억제시켜 지방 축적을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났음. 발효식초는 과채 발효음료보다 유의적으로 지방 축적을 억제하는 것으로 나타났음. 따라서 발효식초 및 과채 발효음료는 지방 축적을 억제하여 비만 개선 가능성을 제시하였음.

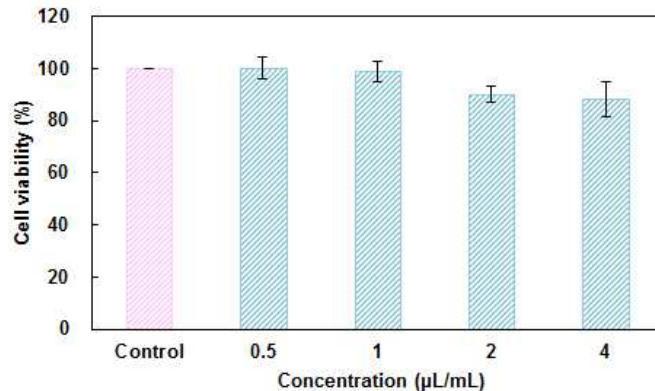


Fig. 2-7. 발효식초의 cell viability

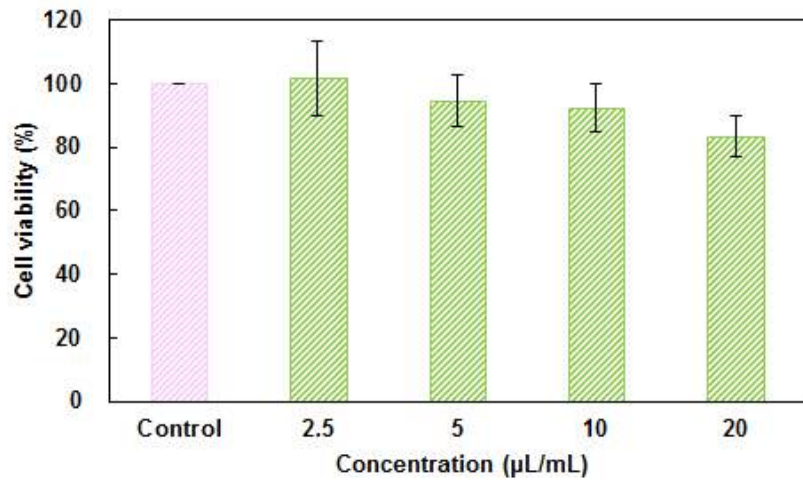


Fig. 2-8. 과채 발효음료의 cell viability

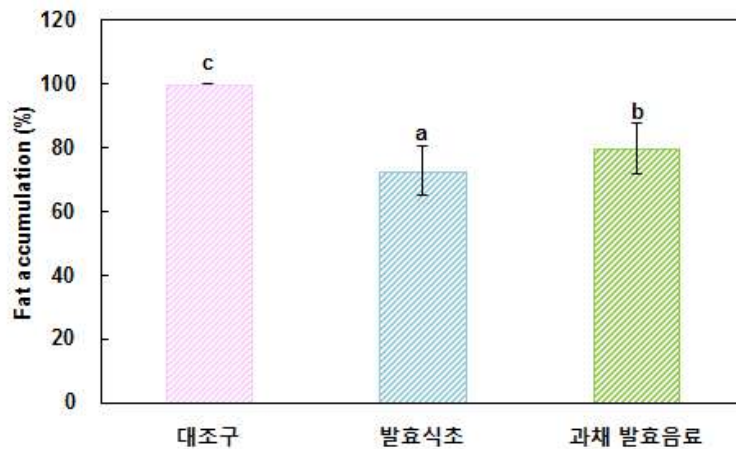


Fig. 2-9. 발효식초 및 과채 발효음료의 지방 축적 억제 효과

(다) 저장기간 연장을 위해 비가열초고압(HPP) 살균처리한 과채 발효음료의 특성

○ HPP 처리한 과채 발효음료의 이화학적 특성 및 항산화 효과

- HPP 처리한 과채 발효음료의 pH는 4.34 ± 0.01 , 당도는 9.10 ± 0.01 °Brix, 산도는 0.51 ± 0.02 %로 나타났음. 이는 HPP 처리를 하지 않은 과채 발효음료의 pH(4.10 ± 0.01), 당도 (9.30 ± 0.01 °Brix), 산도(0.45 ± 0.02 %)와 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 따라서 HPP 처리는 음료의 이화학적 특성에 영향을 주지 않는 것으로 사료됨.

Table 2-16. HPP 처리 과채 발효음료의 pH, 당도, 산도

	pH	당도(°Brix)	산도(%)
무처리 과채 발효음료	4.30±0.04	9.11±0.01	0.55±0.02
HPP 처리 과채 발효음료	4.34±0.01	9.10±0.01	0.51±0.02

- 과채 발효음료의 총 폴리페놀 함량은 HPP 처리 전, 후 각각 326.34±6.56, 319.60±3.57 μg/mL로 나타나 유의적인 차이가 없었음. HPP 처리한 과채 발효음료의 DPPH 라디칼 소거활성은 94.73±3.00 μg/mL로 처리 전(98.62±1.67 μg/mL)와 유의적인 차이가 없었음. 따라서 HPP 처리는 총 폴리페놀 함량 및 DPPH 라디칼 소거활성 등 항산화능에는 영향을 주지 않는 것으로 사료됨.

Table 2-17. HPP 처리 과채 발효음료의 항산화능

	Total polyphenol contents (μg/mL)	DPPH radical-scavenging activities (μg vitamin C equiv./mL)
무처리 과채 발효음료	326.34±6.56	98.62±1.67
HPP 처리 과채 발효음료	319.60±3.57	94.73±3.00

○ HPP 처리 과채 발효음료의 관능적 특성

- 과채 발효음료의 HPP 처리 전, 처리 즉시, 저장 7일, 14일, 21일 후 관능적 특성은 저장 기간에 따라 유의적인 차이가 없었음. 따라서 HPP 처리는 과채 발효음료의 품질을 유지하는데 효과적인 것으로 사료됨.

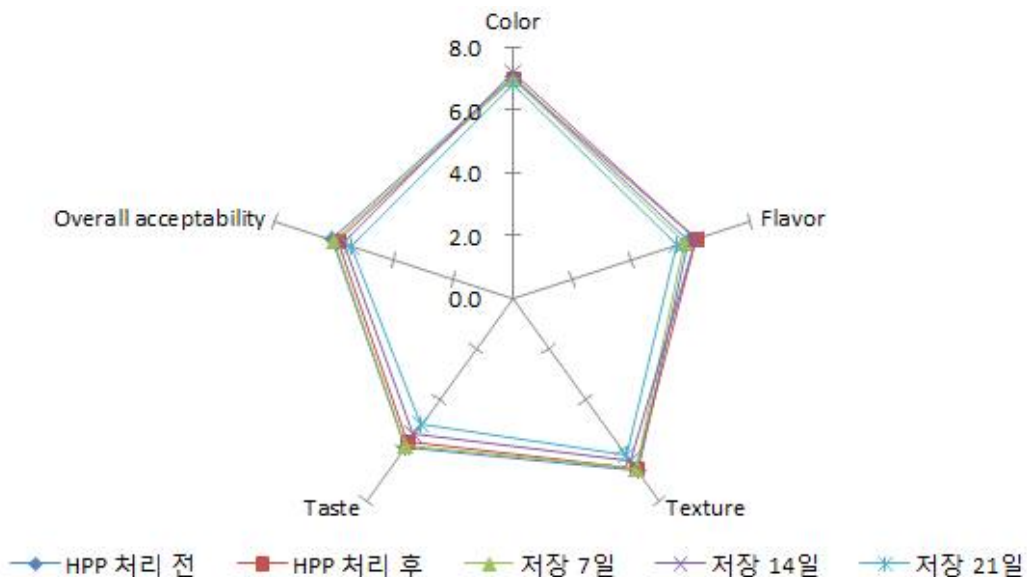


Fig. 2-10. HPP 처리 과채 발효음료의 관능적 특성

○ HPP 처리 과채 발효음료의 일반세균수

- HPP 처리 과채 발효음료의 일반세균수는 460±121 CFU/mL로 처리 전(65,333±7,572 CFU/mL)에 비해 유의적으로 감소하였음. HPP 처리방식은 품질 및 관능적 특성, 생리활성의 변화를 최소화하면서 일반세균수를 사멸시켜 미생물적 안전성을 확보할 수 있는 방법으로 최근 과채주스의 저장기간 연장을 위해 많이 적용되는 기술임. 본 연구에서는 식초를 첨가한 과채 발효음료를 4℃, 10℃에서 4주간의 저장 기간 동안 일반세균수를 측정 한 결과 3~4 log CFU/mL로 나타나 식품의약품안전처에서 제시한 비가열 과채주스의 미생물 규격인 5 log CFU/mL(1.00×10^5 CFU/mL)보다 낮아 저장 기간에 따른 안전성을 확인하였음. 그러나 저장 기간이 증가할수록 관능적 특성이 변하여 품질 저하의 요인이 되는 것으로 나타났음. 따라서 미생물 제어를 통하여 보다 안전한 유통과 품질 및 관능적 특성을 유지하기 위하여 HPP를 실시하였고 그 결과 과채발효음료의 일반세균수가 약 2 log 감소하여 2.65 log CFU/mL(460 CFU/mL)로 나타났음. 따라서 냉장유통 제품의 유통기한으로 설정된 2주의 유통기한을 확보하는데 무리가 없으며 관능적 특성을 유지하며 품질 변화를 최소화하는데 적합한 처리방법인 것으로 사료됨.

Table 2-18. HPP 처리 과채 발효음료의 일반세균수

	CFU/mL	Log CFU/mL
무처리 과채 발효음료	65,333±7,572	4.81±0.05
HPP 처리 과채 발효음료	460±121	2.65±0.11

○ 과채 발효음료의 관능적 특성에 대한 기호도

- 휴롬주스 매장 방문 고객을 대상으로 과채 발효음료의 색, 맛, 향, 전체적인 기호도 등 관능적 특성에 대한 조사를 실시한 결과 40대와 50대에 있어서 과채 발효음료에 대한 관능적 특성에 대한 선호도가 높은 것으로 나타났음. 향후 과채 발효음료 구입 의향에 대한 항목에서 40대와 50대는 각각 61.5%, 62.5%가 구입할 것이라고 응답하였음. 소비자가 주스를 선택할 때 고려하는 사항을 조사한 결과 40대와 50대의 경우 맛 보다는 기능성을 더 중요시한다는 응답비율이 20대와 30대에 비해 더 높게 나타났음. 따라서 향후 대사증후군 개선에 도움을 주는 것으로 입증된 과채 발효음료를 40대 이상, 건강에 대한 관심이 많은 소비자를 대상으로 마케팅할 경우 제품 판매를 촉진시킬 수 있을 것으로 사료됨.

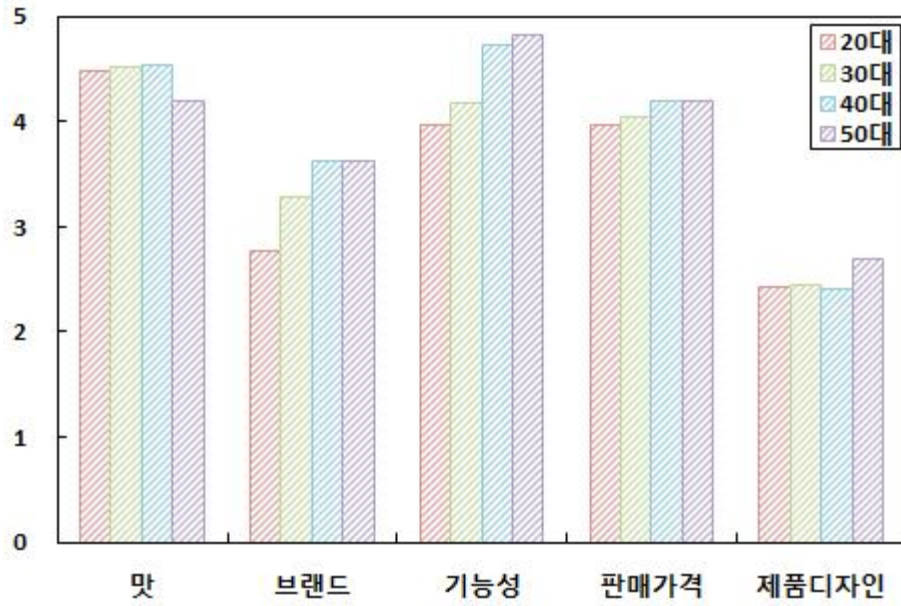


Fig. 2-11. 주스 구입시 고려사항

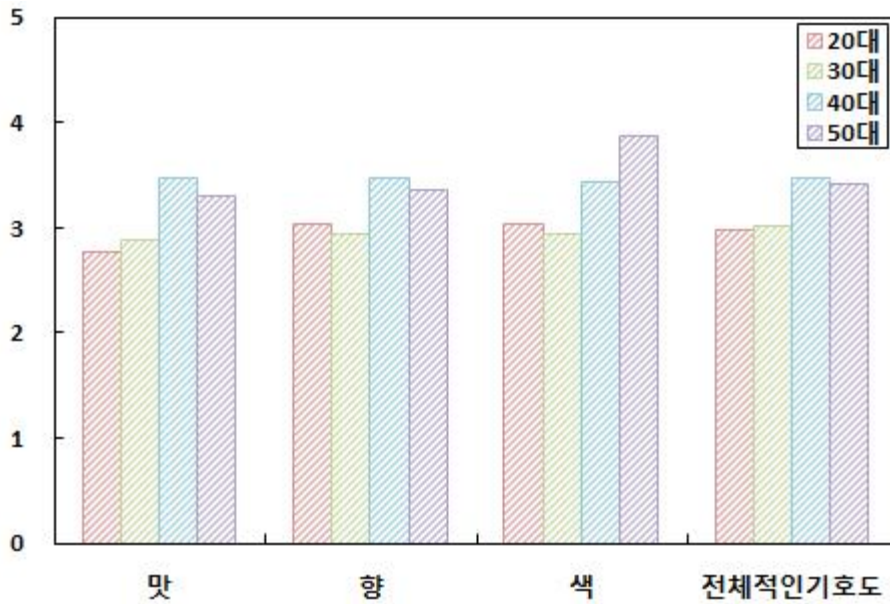


Fig. 2-12. 과채 발효음료에 대한 소비자의 관능적 특성에 대한 선호도

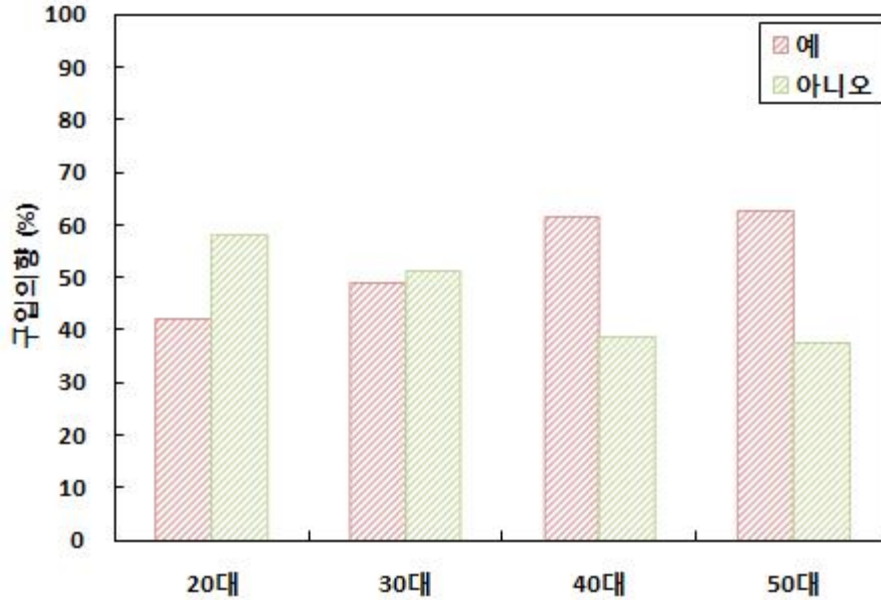


Fig. 2-13. 과채 발효음료 구입의향

2) 과채 발효음료 제조를 위한 알코올 및 초산 발효 공정 확립 및 발효산물 제조 : 제 2 세부과제

가) 과채 알코올 발효산물 제조 및 표준 공정 확립

(1) 연구 방법

(가) 과채주스 단일 알코올 발효산물 제조

- 알코올 발효 소재 : 국산 신선 과채류인 신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리를 진주시 A 백화점에서 구입하였음.
- 보당 소재 : 배, 사과, 오렌지 중 국산 과일로 제조한 농축액 이어야 하고 맛, 향이나 색을 손상시키지 않는 농축배즙을 보당소재로 사용하였음.

○ 과채류 전처리

- 구입한 신선한 상태의 과채류를 흐르는 수돗물로 충분히 세척하고 과잉의 물기를 제거한 후 착즙기(HWS-SBF18, (주)휴롬)를 이용하여 착즙한 액상 주스(블랙베리는 32 °Brix로 순수 농축된 농축액(완주베리, 전북)을 사용)로 제조하였음. 원 재료에 부착된 상태로 주스에 오염된 미생물에 의한 부패 현상 방지를 위해 일반적으로 사용되는 화학합성첨가제(피로아황산칼륨)를 사용하지 않고 80°C에서 30분간 열처리하여 발효에 지장을 초래할 수 있는 원료 및 물 유래의 미생물을 살균하였음.

○ 보당

- 과채류 주스에는 정상적인 알코올 발효를 위한 당분함량이 부족하므로 24 °Brix 되도록 3배로 농축된 블랙베리주스(21.5 °Brix), 농축배즙과 물을 첨가하여 24 °Brix로 조절하였음.
- 국산 배즙을 탈수시켜 65 °Brix로 농축한 배즙은 경남 하동에서 구입하여 사용하였음.

○ 과채류 내성 효모의 선발 및 전배양

- 과실주용 효모(*Saccharomyces cerevisiae*; Fermivin, Denmark)를 YM(Yeast Malt, Difco, France) 배지에 30°C, 24~72시간 동안 180 rpm에서 진탕배양하여 활성화시킨 후 각 과채류 주스를 농축배즙으로 24 °Brix로 조절한 의 보당액에 3%(v/v) 첨가하여 을 반복 실시 후 YM 한천배지에 도말하여 순수 콜로니를 확인하며 각 과채류 원료 성분에 적응시켰음.
- 각 원료 성분에 익숙하도록 적응시킨 효모를 당도 24.0 °Brix로 조절한 각 과채 주스 보당액에 접종하여 28°C, 24시간 진탕배양 하여 주모로 사용하였음.

○ 본 발효

- 신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근 및 블랙베리 착즙주스를 살균하고 보당한 후 대수증식기의 활성화된 효모를 3%(v/v) 첨가하여 28±1°C에서 정지 배양하여 1단 발효 즉 알코올 발효를 실시하였음.
- 발효 기간 중 4, 8, 12, 16일에 각각 시료를 채취하여 당도 및 알코올 등 정량분석을 실시하였음.
- 알코올 발효산물의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 분석을 위해 (주)휴롬과 인제대학교에 샘플을 제공하였음.
- 당도는 200 uL을 취하여 hand refractometer(Krüssl, Germany)를 이용하여 °Brix로 측정하였고, 알코올 함량은 AOAC법에 따라 시료액 100 mL을 증류한 액 70 mL을 증류수로 100 mL되게 정용한 후 alcohol meter(Snap 50, Austria)를 이용하여 측정하였음.

(나) 과채 배합비율 선정 및 알코올 발효산물 제조

○ 과채 배합비율별 알코올 발효 조건 설정

- (주)휴롬에서 제공받은 3종의 발효소재(케일주스, 당근주스, 블랙베리주스) 중 채소액의 혼합비율은 케일주스와 당근주스(1:2.5, v/v), 채소액과 블랙베리주스의 혼합비율 1:9 & 2:8)의 알코올 발효를 진행하였음.
- 케일주스, 당근주스, 블랙베리주스를 전처리 후 보당하여 각 원료에 적용된 내성 효모를 전배양하여 첨가 후 알코올 발효를 진행하였음.
- 복합 과채류 배합비율 선정을 위한 시험구는 다음의 6가지로 선정하였음.

AF-1 : 케일/당근주스(1:2.5)과 블랙베리주스를 1:9 비율로 혼합하여 알코올 발효한 것

AF-2 : 케일/당근주스(1:2.5)과 블랙베리주스를 2:8 비율로 혼합하여 알코올 발효한 것

AF-3 : 케일주스, 당근주스, 블랙베리주스를 각각 알코올 발효한 후, 케일/당근(1:2.5) 발효액과 블랙베리 발효액을 1:9 비율로 혼합한 것

AF-4 : 케일주스, 당근주스, 블랙베리주스를 각각 알코올 발효한 후, 케일/당근(1:2.5) 발효액과 블랙베리 발효액을 2:8 비율로 혼합한 것

AF-5 : 케일/당근주스(1:2.5)와 블랙베리 알코올 발효액을 1:9로 혼합한 것

AF-6 : 케일/당근주스(1:2.5)와 블랙베리 알코올 발효액을 2:8로 혼합한 것.

- AF-1 ~ AF-6 실험구의 알코올 발효 과정 중 경시적으로 시료를 채취하여 pH, 당도, 알코올 함량, 효모수, 색도를 측정하였으며, 추가적인 이화학적 특성 및 생리활성 물질 분석을 위해 (주)휴롬, 인제대학교에 시료를 제공하였음.

- pH 측정 : 20 mL을 취하여 pH meter(Orion 420A, USA)로 실온에서 측정하였음.

- 효모수 : 무균적으로 희석한 시료를 Haemocytometer(Marientfeld, Germany)를 이용하여 카운팅하였음.

- 색도 : 10 mm 셀에 각 시료 10 mL을 채운 후 Color meter(Minolta CM-3500d, USA)로 측정하였음.

(다) 과채 발효식초 제조를 위한 초산균 선발

○ 최적 배합된 과채 알코올 발효산물에 내성을 가진 초산균 선발

- 감식초, 산딸기식초 제조 중 담금물에서 순수 분리하여 경상대학교 생물공학연구실에서 -80℃에서 보관 중인 초산균 *Acetobacter* sp.를 GYP(Glucos, Yeast extract, Peptone) 배지에 접종하여 27℃에서 72시간 동안 진탕 배양하여 증식시킨 후 GYP 한천배지에 도말하여 셀룰로오스 생성능이 없고 작은 정상 초산균 콜로니를 확인하였음.

- 초산균을 각 과채 주스의 알코올 발효산물에 접종 후 진탕배양(27℃, 180 rpm, 72시간)하여 GYP 한천배지에 반복적으로 배양하며 발효소재(케일, 당근, 블랙베리) 성분에 내성을 지닌 초산균을 선발하였음.

(2) 연구 결과

(가) 과채 알코올 발효산물 제조 공정 확립

○ 알코올 발효 소재의 전처리

- 선택된 과채류 착즙 주스의 수율 및 당도를 조사한 결과는 Table 3-1과 같음.

- 착즙 수율은 당근이 50%로 가장 낮고 비트와 케일 60%, 신선초 65% 이었으며 셀러리가 67%로 가장 높았음.

- 당도는 케일, 셀러리, 신선초, 당근, 비트 순으로 3.2~8.2 °Brix 였고 농축 과즙 제품인 블랙베리는 국산을 구입하여 착즙수율 측정은 불가능하였으나 대략 3배 농축시킨 액상 제품으로 당도는 21°Brix 이상이었음.

Table 3-1. 알코올발효 소재의 주스 수율 및 당도

	수율(%)	당도(°Brix)
신선초주스	65	5.2
샐러리주스	67	4.0
비트주스	60	8.2
케일주스	60	3.2
당근주스	50	6.8
블랙베리주스	측정 불가(농축액 상태)	>21.5

○ 알코올 발효를 위한 보당

- 사과와 오렌지는 특유의 산미로 인해 주스용 과채류 특유의 향미를 손상시킬 우려가 있어 보당 소재로 배 농축액을 사용함.

○ 과채류 발효에 적합한 효모의 선발

- 각 과채류 주스 보당액에 3회 이상 예비 배양하여 적응시킨 효모는 생육 장애를 받지 않고 증식하였으며 배양된 효모(그림 3-1) 중의 생균수는 약 8.0 log CFU/mL 이었음.

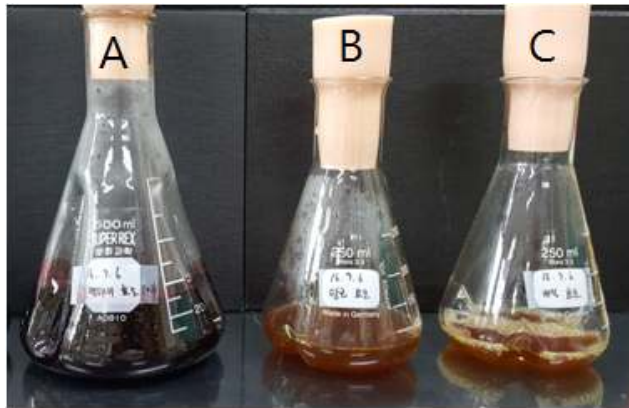


Fig. 3-1. 각 과채류 주스 내성 주모

A, 블랙베리주스 내성 주모; B, 당근주스 내성 주모; C, 케일주스 내성 주모.

○ 본 발효

- 각 과채류 주스 보당액에 전배양한 효모를 첨가하고 알코올발효 중 경시적으로 채취한 시료의 당도를 측정한 결과는 Table 3-2와 같음.
- 발효 20일 후 비트, 당근, 블랙베리, 신선초, 샐러리, 케일 순으로 각각 10.8, 9.6, 8.3, 8.1, 7.9, 7.6 °Brix로 잔당 함량이 낮았으며 발효 4일 까지 급격히 당함량이 감소하고 이후 8일까지 대부분의 당이 소비되는 것으로 미루어 효모의 당 소비는 8일까지 집중적으로 일어남을 알 수 있음.

Table 3-2. 과채 알코올 발효산물의 발효기간별 당도 변화

(°Brix)

	0일	4일	8일	12일	16일	20일
신선초발효산물	24.0	12.6	8.5	8.2	8.1	8.1
셀러리발효산물	24.0	12.5	8.2	8.4	8.0	7.9
비트발효산물	24.0	16.7	11.0	11.2	11.2	10.8
케일발효산물	24.0	12.4	7.8	7.8	7.4	7.6
당근발효산물	24.0	13.2	9.6	10.1	9.8	9.6
블랙베리발효산물	24.0	12.3	8.3	8.5	8.4	8.3

- 각 과채류 주스에 보당 후 알코올 발효를 진행 중 발효 0, 4, 8, 12, 16 및 20일 채취한 담금물 속의 알코올 함량을 측정한 결과는 Table 3-3과 같음.
- 모든 소재에서 발효 4일에 알코올 함량이 급격히 증가하고 그 후 8일 까지 약 3% 정도 증가하지만 8일 이후엔 거의 증가하지 않았음.
- 과채류 주스 보당액의 발효 후 알코올함량은 11~13%였고 8일 이후에 큰 변화는 없었음.

Table 3-3. 과채 알코올 발효산물의 발효기간별 알코올 함량 변화

(%)

	0일	4일	8일	12일	16일	20일
신선초발효산물	0	10.5	12.1	11.9	12.1	12.7
셀러리발효산물	0	10.3	12.1	11.8	12.4	12.6
비트발효산물	0	7.9	10.3	10.2	10.2	10.9
케일발효산물	0	9.8	12.3	11.9	12.6	12.8
당근발효산물	0	8.8	11.0	11.2	10.8	11.5
블랙베리발효산물	0	9.2	12.1	12.6	12.0	12.5

(나) 과채류 주스의 최적 배합비율 선정 및 알코올 발효산물 제조

- 각 발효소재 혼합액을 알코올 발효 시켜 시험구의 설정에 따라 혼합하여 제조.
- 시험구는 다음과 같이 설정
 AF-1 : 케일/당근주스(1:2.5)과 블랙베리주스를 1:9 비율로 혼합하여 알코올 발효한 것
 AF-2 : 케일/당근주스(1:2.5)과 블랙베리주스를 2:8 비율로 혼합하여 알코올 발효한 것
 AF-3 : 케일주스, 당근주스, 블랙베리주스를 각각 알코올 발효한 후, 케일/당근(1:2.5) 발효액과 블랙베리 발효액을 1:9 비율로 혼합한 것

AF-4 : 케일주스, 당근주스, 블랙베리주스를 각각 알코올 발효한 후, 케일/당근(1:2.5) 발효액과 블랙베리 발효액을 2:8 비율로 혼합한 것

AF-5 : 케일/당근주스(1:2.5)와 블랙베리 알코올 발효액을 1:9로 혼합한 것

AF-6 : 케일/당근주스(1:2.5)와 블랙베리 알코올 발효액을 2:8로 혼합한 것.



Fig. 3-2. 최적 배합 과채류 음료 제조를 위한 알코올 발효산물

A, 케일 알코올 발효산물; B, 당근 알코올 발효산물; C, 케일/당근주스(1:2.5)과 블랙베리주스를 1:9 비율로 혼합한 알코올 발효산물; D, 케일/당근주스(1:2.5)과 블랙베리주스를 2:8 비율로 혼합한 알코올 발효산물; E, 블랙베리 알코올 발효산물

- 알코올 발효산물의 pH, 당도, 알코올 함량, 효모수를 분석한 결과를 Table 3-4에 나타냄.
- 알코올발효가 끝난 케일발효산물, 당근발효산물, 블랙베리발효산물의 pH는 주스보다 각각 1.25, 0.42, 0.12 씩 감소되었으며 이상의 3종 과채류를 혼합하여 제조한 시험구 AF-1 ~AF-6 중에서 AF-1, AF-3, AF-5번 즉 90% 블랙베리를 첨가한 시험구에서 약간 낮았고 AF-2, AF-4, AF-6번 즉 80%만 블랙베리를 첨가한 것은 모두 pH 3.5~3.6으로 약간 높은 것으로 미루어 블랙베리 주스의 양이 최종발효산물의 pH에 영향을 미치는 것으로 생각됨.
- 효모 분해 후 남은 당분은 8.3~8.4 °Brix, 발효 8일 후의 알코올 함량은 10.9~11.9%로 거의 차이가 없어 향미의 보존을 위해 냉장 숙성을 실시함.
- 저온에서 자연 침전시킨 상징액 중의 효모수는 4.0 log CFU/mL 미만이었음.
- 과채류 혼합 알코올 발효액은 투명도가 높아 여과하지 않고 하층의 찌꺼기 부분을 제외한 상징액만 분리하여 초산발효에 사용함.
- 대형 발효조를 이용한 알코올 생산 시스템으로 주류를 생산한다면 공장의 규모에 맞는 여과 공정을 검토할 필요가 있음.

Table 3-4. 과채류 주스 및 혼합 알코올 발효산물의 분석

	pH	당도 (°Brix)	알코올 함량 (%)	효모수 (log CFU/mL)
케일 주스	5.86	3.2	측정 불가	측정 불가
당근 주스	5.24	6.8	측정 불가	측정 불가
블랙베리 주스	3.63	32.0	측정 불가	측정 불가
케일 발효산물	4.61	7.6	12.8	
당근 발효산물	4.82	9.6	11.5	
블랙베리 발효산물	3.51	8.3	12.5	
AF-1	3.53	8.4	11.8	
AF-2	3.56	8.4	11.9	< 4.0
AF-3	3.52	8.3	11.7	
AF-4	3.60	8.4	11.8	
AF-5	3.51	8.4	10.9	
AF-6	3.59	8.4	11.2	

- 각 과채류 주스와 과채류 혼합액의 알코올 발효산물의 색도를 측정한 결과를 Table 3-5에 나타냄.
- 케일 주스는 알코올 발효 후 적색도(a)가 3.60에서 13.99, 황색도(b)가 21.24에서 49.84로 증가하였고 명도(L)는 66.40에서 38.00으로 감소함.
- 당근 주스는 알코올 발효 후 적색도(a)가 22.11에서 31.85, 황색도(b)가 48.97에서 54.32로 증가하였고 명도(L)는 35.72에서 35.09로 감소함.
- 블랙베리 주스는 알코올 발효 후 명도(L), 적색도(a), 황색도(b) 모두 감소하였으며 이는 블랙베리 알코올 발효산물을 첨가한 혼합 알코올 발효산물의 색도에 영향을 주어 명도(L), 적색도(a) 그리고 황색도(b)가 큰 차이를 나타내지 않음.
- 혼합 알코올 발효산물 중 명도(L)는 AF-5번이 가장 높고 AF-4번이 가장 낮았으며, 적색도(a)는 AF-6번이 가장 높고 AF-3번이 가장 낮게 측정되었고, 황색도(b)는 AF-6번이 가장 높고 AF-5번이 가장 낮게 측정됨.

Table 3-5. 과채류 주스 및 혼합 알코올 발효산물의 색도

	Color value		
	L	a	b
케일 주스	66.40	3.60	21.24
당근 주스	35.72	22.11	48.97
블랙베리 주스	5.86	3.16	0.60
케일 발효산물	38.00	13.99	49.84
당근 발효산물	35.09	31.85	54.32
블랙베리 발효산물	2.47	1.80	0.14
AF-1	2.71	2.17	0.27
AF-2	2.66	2.28	0.29
AF-3	2.56	1.97	0.14
AF-4	2.51	2.08	0.16
AF-5	3.10	2.33	0.12
AF-6	2.75	2.56	0.35

L, lightness; a, redness; b, yellowness.

(다) 과채류 발효식초 제조를 위한 초산균 선발

○ 과채 발효 음료의 식초발효에 적합한 초산균 선발

- 알코올 발효산물을 통한 진탕배양과 GYP 한천배지에 획선도말을 수차례 거친 후 발효소재(케일, 당근, 블랙베리) 성분은 물론 알코올과 초산에 내성이 강하고 정지배양에 적합한 초산균으로 *Acetobacter aceti* 를 선발하였음(Fig. 3-3). 선발된 균주는 콜로니 크기가 아주 작고, 셀룰로오스막이나 이취를 생성하지 않으며 최종 농도 7% 이상의 초산을 생성하였음.



Fig. 3-3. 케일, 당근, 블랙베리 내성 초산균의 콜로니

나) 과채 발효식초 제조 및 발효음료 소재화

(1) 연구 방법

(가) 과채류 원료에 적합한 초산균을 선정하고 정치 발효법으로 과채 발효식초 제조

○ 최적 배합된 과채 알코올 발효산물에 내성을 가진 초산균 선발

- 자연균에 의존한 감식초 제조 현장의 담금물에서 순수 분리하여 경상대학교 생물공학연구실에 보관 중인 정치발효용 초산균 *Acetobacter aceti*을 사용하였음. GYP(Glucose, Yeast extract, Peptone) 배지에 접종하여 27°C에서 72시간 동안 진탕 배양 후 GYP 한천 배지에 도말하여 셀룰로오스 생성능이 없고 크기가 작은 정상 초산균 콜로니를 확인하였음.
- 초산균을 각 과채 주스의 알코올 발효산물에 접종 후 진탕배양(27°C, 180 rpm, 72시간)하여 GYP 한천배지에 반복적으로 배양하며 발효소재(케일, 당근, 블랙베리) 성분내 내성을 가진 초산균을 선발하였음.

○ 발효식초의 이화학적 특성

- 산도측정: 시료 1ml을 증류수로 10배로 희석하고 phenolphthalein 지시약을 1~2 방울 가하여 0.1N NaOH 용액으로 중화 적정한 후 소비된 용액의 양을 acetic acid로 환산하여 중량 %로 표시하였음.
- pH, 당도 : pH는 20 mL을 취하여 pH meter(Orion 420A, Waltham, MA, USA)를 이용하여 실온에서 측정하였고, 당도는 200 μ L을 취하여 hand refractometer(AK.HRN32, Krüss, Hamburg, Germany)를 이용하여 °Brix로 측정하였음.
- 발효식초의 항산화능을 조사하기 위하여 총 페놀성 화합물 함량, DPPH radical 소거능, ABTS⁺ radical 소거능을 측정하였음.

(나) 초산 발효산물과 과채주스 혼합에 의한 과채발효음료 개발을 통한 소재화

○ 과채류를 각 농도별로 혼합하여 발효, 각각 혼합 후 발효구로 나누어 제조한 초산발효물을 냉장실에서 2주일 이상 숙성시킨 후 고온 살균이나 여과 조작 없이 찌꺼기가 자연 침강된 후의 상정액을 과채 식초화로 사용 함.

- 산도 7% 이상의 과채 2단 발효 식초를 (주)휴롬에서 소재로 사용하여 복합물을 제조하고 기능성 시험 및 제품화를 실시하여 혼합 비율을 결정함.
- 소재화 작업은 주관 연구기관인 (주)휴롬에 과채류 발효식초를 제고함으로써 완수됨.

(2) 연구 결과

(가) 과채 발효식초의 제조

○과채 발효 식초용 종균

- 알코올을 산화시키는 초산균의 배양방법은 진탕법과 정치법 두 가지로 구분됨.
- 진탕배양법은 고압공기를 이용하여 산소를 공급하고 대량생산에 적합하지만 유입된 공기가 발효조 밖으로 빠지며 향기도 동시 유출되는 단점이 있고
- 정치배양법은 담금물 상부 공기와의 경계면에 얇은 초산균 균막 형성되어 발효가 일어나고 발효물의 향기가 우수한 반면
- 2~3배씩 발효액의 양을 늘리는 과정 반복 중 오염 확률이 높고 대량 생산에 시간이 많이 소요되는 단점이 있음.
- 정치배양법을 채택하고 본 연구실에서 분리하여 보관 중인 초산균을 수차례 계대배양을 거친 후 발효소재(케일, 당근, 블랙베리) 성분 에 적응시킨 콜로니는 GYP배지상에 아주 작은 형태였음(Fig. 3-3).

○과채 발효 식초용 종초 제조

- 알코올 분석한 결과를 바탕으로 증류수를 첨가하여 알코올 함량 6%로 조절하여 초산발효용 피딩용액으로 사용함.
- 발효실의 온도는 26℃, 초파리 오염 발생 방지하며 피딩하여 발효조에 충격이 가지 않도록 정치 배양하며 초산발효 시킴.
- 오염균이 없는 초산균 콜로니를 최종 에탄올 농도 3%의 피딩용액, 초산농도 3%되도록 시판 식초를 첨가한 후 진탕 배양하여 종초용 초산균을 활성화시킴.

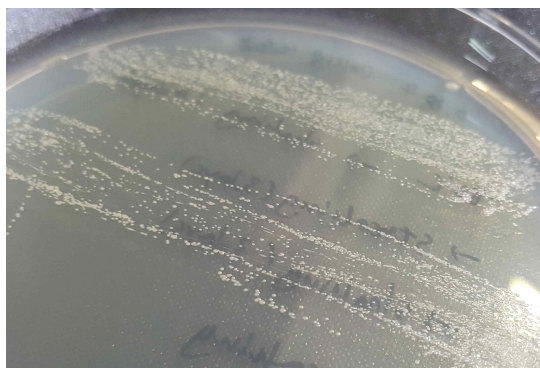


Fig. 3-3. 과채류 혼합 식초 발효균 콜로니



Fig. 3-4. 정치 배양한 종초의 균막

○ 대량 과채 발효식초 제조

- 농축배즙(65 °Brix), 블랙베리농축액(21.5 °Brix 이상), 과채주스와 물을 혼합하여 총 100 L의 과채류 혼합 알코올발효물을 제조 후 정치배양식 2단 초산발효로 식초를 제조하였음.
- 총산도 4% 이상의 초산균 배양액에 피딩용액을 동량 첨가하여 최종 산도가 약 3% 유지 되도록 정치배양하며 양을 늘려 종초를 제조함(Fig. 3-4).
- 액표면에 형성된 얇은 균막의 밀도나 두께를 관찰함과 동시에 초산농도를 측정하여 피딩 시기를 결정함.
- 피딩용액 첨가 시 배양액과 1:1(v/v) 혼합을 원칙으로 하되 초산발효 종료 단계엔 물 사용량을 줄인 알코올 농도 9%의 피딩 용액을 별도로 가하였음.
- 최종 초산 농도는 약 6% 이상의 식초 제조하여 휴룸에 제공함.
- 제조된 식초는 자극적인 산미가 강하여 식감이 부드러워 지도록 15일 이상 저온에서 숙성 후 소재로 사용하였음. 블랙베리농축액을 희석하지 않고 사용하면 색상이나 당도가 높아 보당 과정을 생략 가능한 편리한 방법으로 판단하여 희석과정 없이 발효조 높이의 70%만으로 채우고 알코올 발효를 실시하였음.
- 착즙한 블랙베리주스를 농축하는 과정에 거품 형성 물질의 함량도 증가된 탓에 발효 중의 발생된 거품이 폭발적으로 솟아오르며 심하게 넘치는 현상이 일어났음(Fig. 3-5).

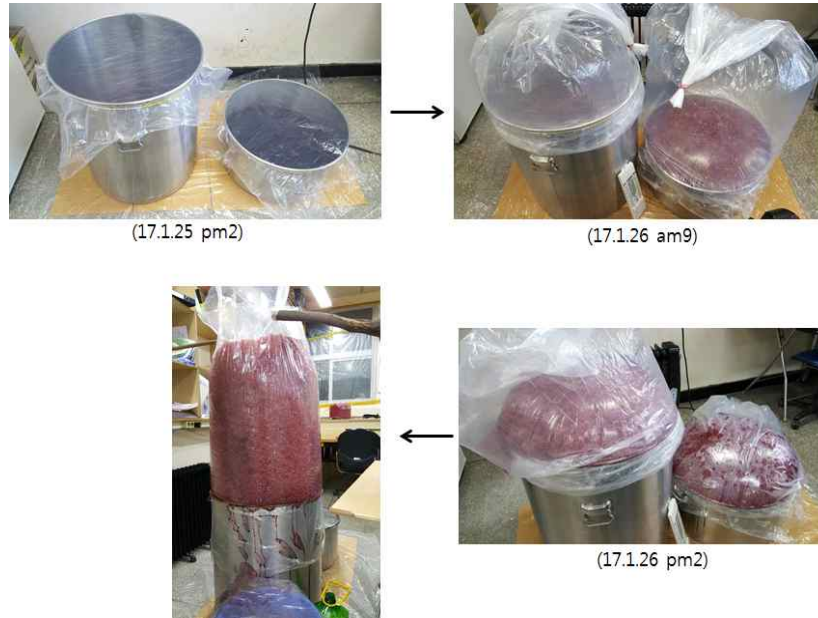


Fig. 3-5. 블랙베리농축액의 알코올 발효

- 거품에 의한 잡균 오염은 발효물 관리 상 잦은 실패의 원인이 되므로 블랙베리 농축액을 3배로 희석하고 농축배즙과 과채주스, 물로 24 °Brix를 조정하여 알코올 발효에 이어서 초산 발효하는 2단 발효기술을 실시하였음.

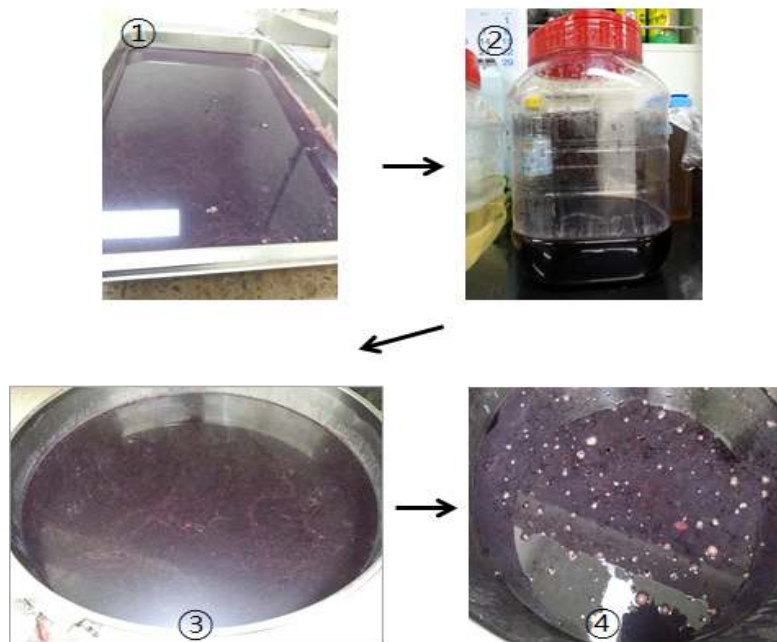


Fig. 3-6. 초산 발효 과정별 균막 형태 변화

- ①표면적이 넓은 스텐레스 용기에 넣고 정치배양한 종초를 ②, ③순으로 6% 알코올발효 산물을 2배씩 피딩하며 확대배양하여 초산발효액량을 늘리고 ④의 균이 되면 대량 배양을 종료(Fig. 3-6)함 .

(나) 선발된 발효원료에 적합한 초산균으로 과채 발효식초의 이화학적 특성

○ 과채 발효식초의 pH, 당도, 산도 및 색도

- 1차년도 선발 알코올 발효산물 AF-1과 AF-2를 알코올 농도 6%로 조절하여 앞서 제조한 종초를 30~50%(v/v) 첨가한 후 26±1℃에서 정치발효한 결과 AF-1은 AAF-1, AF-2는 AAF-2로 표시하였음.
- pH, 산도, 당도 그리고 색도를 분석한 결과는 Table 4-1에 나타내었음.
- pH는 AAF-1 2.80, AAF-2 2.92로 측정되었으며, 산도는 7.14%로 AAF-1이 7.00%의 AAF-2보다 다소 높게 측정되었음.
- 이는 과실 양조식초의 품질기준인 산도 4% 이상과 비교해 다소 높은 수준으로 종초에 함유된 초산균의 acetic acid 생성능이 우수한 것을 짐작할 수 있음.
- 당도는 AAF-2가 5.4°Brix로 4.6°Brix의 AAF-1보다 높게 나타났음.
- 색도를 분석한 결과 AAF-2가 명도(L) 50.08로 49.36인 AAF-1보다 높게 측정되어 매우 짙은 블랙베리 농축액에 배합 채소류의 혼합 비율을 높일 때 나타나는 희석률에 의한 차이로 판단되어짐.
- 이러한 결과는 알코올 및 초산발효가 연속해서 진행된 경우의 색이 더 진해지는 것을 확인한 선행 연구 결과를 바탕으로 유사한 경향을 확인할 수 있었음.

Table 4-1. 과채 발효식초의 pH, 산도, 당도 및 색도

	pH	산도(%)	당도(°Brix)	색도 ²⁾		
				L-value	a-value	b-value
AAF-1 ¹⁾	2.80±0.02	7.14±0.11	4.60±0.01	49.39±0.21	34.76±0.46	33.21±0.32
AAF-2	2.92±0.02	7.00±0.14	5.40±0.01	50.08±0.31	32.14±0.55	30.98±0.33

1) AAF-1, 알코올 발효산물 AF-1을 이용한 과채 발효식초; AAF-2, 알코올 발효산물 AF-2을 이용한 과채 발효식초.

2) Color value: L, brightness; a, red; b, yellow.

○ 과채 발효식초의 항산화능 분석

- 과채 발효식초의 항산화능을 측정하기 위해 총페놀성화합물, DPPH radical 소거능 그리고 ABTS^{•+} radical 소거능을 측정하여 Table 4-2에 나타내었음.
- 식물계의 2차 대사산물로서 항산화와 같은 다양한 생리활성 기능을 가지는 페놀성화합물을 측정된 결과 AAF-1이 14.95 mg/100 mL, AAF-2가 15.49 mg/100 mL로 측정되어 AAF-2가 약 1.5 mg/100 mL 높게 측정되었음. 이는 배합 채소류인 케일과 당근이 각 60.0 mg/100 g과 75.3 mg/100 g으로 총페놀성화합물을 높게 함유한다는 선행 연구를 통해 채소류 혼합율이 높은 AAF-2에서 더 높은 함량으로 측정되었음을 짐작할 수 있었음.

- 과채 발효식초의 DPPH radical 소거능은 AAF-2가 53.97%로 AAF-1의 40.48% 보다 높게 측정되었음. 5종의 녹즙재료를 이용한 선행 연구 결과에 따르면 카로티노이드의 대표적인 물질인 β -carotene 함량이 당근과 케일 순으로 가장 높았는데, 이 β -carotene 은 DPPH radical 소거능에 있어서 우수한 활성을 나타낸다고 보고되어있음.
- ABTS⁺ radical 소거능은 AAF-2가 65.02%로 측정되어 55.53%의 AAF-1보다 높게 나타나 유의적인 결과를 확인 할 수 있었음.
- 이러한 결과는 총페놀성화합물 함량이 높아질수록 수소공여능이 높아지므로 항산화 물질이 free radical 수용체로 작용하면서 활성을 나타낸다는 보고와 일치하며 총페놀성화합물 함량이 높은 AAF-2가 DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거능에서 모두 높게 측정되었음.

Table 4-2. 과채 발효식초의 항산화능

	Total phenolic content(mg/100 mL)	DPPH radical scavenging activity(%)	ABTS ⁺ radical scavenging activity(%)
AAF-1	14.95±0.26	40.48±1.03	55.53±0.87
AAF-2	15.49±0.43	53.97±1.05	65.02±0.63

(나) 과채 발효식초의 분석 및 대량 제조

- 산도 7.00% 이상의 과채 발효식초 2종(AAF-1, AAF-2) 중 명도(L)가 높고 총페놀성화합물 및 항산화 활성이 높은 AAF-2를 최종 과채 발효식초로 선발함.
- 2종의 발효 식초 제품의 기능성 분석 결과 당근과 케일 주스 20%와 블랙베리를 80%를 혼합 후 24°Brix되도록 배즙을 첨가하여 2단 발효 식초를 Fig. 4-4 순으로 대량 생산함.
- 발효조의 액량이 적을 경우에는 실온에서 3일 후 발효가 종료되지만 액량이 증가하면 피딩 시기가 7일 이상 소요되었음.
- 정치배양 중인 균막을 깨지 않고 2배씩 증량한 전반부와는 달리 15일 쯤 피딩 시 균막이 훼손되자 안정적인 초산균막의 형성 및 산도 증가(결과 생략)에 오랜 시간이 소요됨.
- 산도 증가 폭도 감소되어 마지막엔 피딩용액의 알코올 도수를 서서히 증가 시키며 총산 함량 7%의 식초를 제조함.
- (주)휴롬과 인제대에 시료로 제공하였음

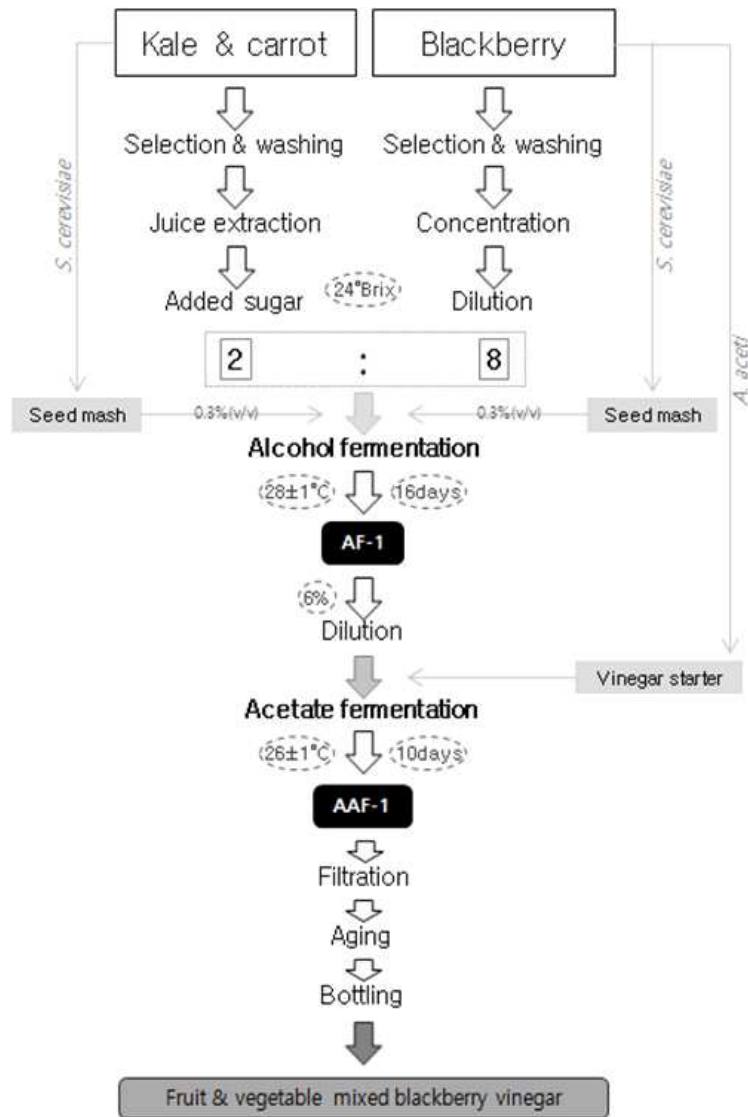


Fig. 4-4. 최종 과채 발효식초의 제조 공정도



Fig. 4-5. 정치법으로 초산 발효 중 산도 변화

3) 과채 발효음료 제품의 대사증후군 개선효과 및 작용기전을 임상시험으로 규명 : 제 3 세부과제

가) 과채 알코올 발효산물의 *in vitro* 생리활성 규명

(1) 연구 방법

(가) 발효 과채주스 소재의 *in vitro* 대사증후군 개선효과 규명

○ 발효 소재의 DPPH 라디칼 소거능 측정

- 발효 소재(신선초주스, 셀러리주스, 비트주스, 케일주스, 당근주스, 블랙베리주스)의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성을 Blois 등의 방법으로 측정하여 항산화 활성을 조사하였음. 각 발효 과채 소재를 원심분리(4000 rpm, 10분)한 후, 상층액을 취하여 사용하였음. 상층액을 메탄올로 5배 희석한 후, 시료 300 uL에 0.2 mM DPPH 반응용액 2700 uL를 가한 후 혼합하고 517 nm에서 흡광도를 측정함. 대조구로 증류수를, 양성대조구는 L-ascorbic acid(10 mg/mL)를 사용하였음.

○ 발효 소재의 α -glucosidase 저해활성 측정

- 발효 소재(신선초주스, 셀러리주스, 비트주스, 케일주스, 당근주스, 블랙베리주스)의 *in vitro* 혈당 조절효과를 측정하기 위하여 yeast α -glucosidase 저해활성을 Watanabe법으로 측정하였음. 각 발효 과채 소재를 원심분리(4000 rpm, 10분)한 후, 상층액을 취하여 사용하였음. yeast α -glucosidase를 효소원으로, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 기질로 사용하였음. 시료 10 uL에 효소용액 50 uL를 넣은 후 405 nm에서 흡광도 측정하였음. 5분간 incubation한 후 기질용액 50 uL를 넣고 추가로 5분간 incubation한 후, 동일한 파장에서 흡광도를 측정하였음. 대조구로 증류수를, acarbose(10 mg/mL)을 양성대조구로 사용하였음.

○ 발효 소재의 pancreatic lipase 저해활성 측정

- 알코올 발효산물의 *in vitro* 항비만 활성을 측정하기 위하여 pancreatic lipase 저해활성을 측정하였음. Pancreatic lipase 저해활성은 Arai 등의 방법으로 측정하였음. 각 발효 과채 소재를 원심분리(4000 rpm, 10분)한 후, 상층액을 취하여 사용하였음. 효소원으로 돼지의 췌장 lipase를 사용하고 기질로 4-methylumbelliferyl oleate를 이용하였음. 대조구로 증류수를, xenical(10 mg/mL)을 양성대조구로 사용하였음.

(나) 과채 알코올 발효산물의 *in vitro* 대사증후군 개선효과 규명

○ 과채 알코올 발효산물의 DPPH 라디칼 소거능 측정

- 신선초주스, 셀러리주스, 비트주스, 케일주스, 당근주스, 블랙베리주스의 *in vitro* 대사증후

균 개선효과를 측정된 결과, 활성이 우수한 것으로 나타난 블랙베리, 케일, 당근을 원료로 선정하여 경상대학교에서 제조한 6종의 과채주스 알코올 발효산물(AF-1 ~ AF-6)을 제공받아 DPPH 라디칼 소거활성을 Blois 등의 방법으로 측정하였음. 각 과채 알코올 발효산물을 원심분리(4000 rpm, 10분)한 후, 상층액을 메탄올로 5배 희석하여 사용함. 대조구로 증류수를, 양성대조구는 L-ascorbic acid(10 mg/mL)를 사용하였음.

○ 과채 알코올 발효산물의 α -glucosidase 저해활성 측정

- 6종의 과채 알코올 발효산물(AF-1 ~ AF-6)을 원심분리(4000 rpm, 10분)한 후, 상층액을 취하여, yeast α -glucosidase 저해활성을 Watanabe법으로 측정하였음. p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 기질로, 증류수를 대조구로, acarbose(10 mg/mL)을 양성대조구로 사용하였음.

○ 과채 알코올 발효산물의 pancreatic lipase 저해활성 측정

- 알코올 발효산물(AF-1 ~ AF-6) 상층액을 취해 Arai 등의 방법으로 pancreatic lipase 저해활성을 측정하였음. Pancreatic lipase 저해활성은 Arai 등의 방법으로 측정하였음. 시료는 microcentrifuge(4000 rpm, 10분)로 원심 분리한 후 상층액을 취하여 사용함. 효소원으로 돼지의 췌장 lipase를 사용하고, 4-methylumbelliferyl oleate를 기질로, 증류수를 대조구로, xenical(10 mg/mL)을 양성대조구로 사용하였음.

○ 과채 알코올 발효산물의 superoxide dismutase(SOD) 유사 활성 측정

- 알코올 발효산물(AF-1 ~ AF-6) 상층액을 취해 SOD 유사 활성을 Marklaud와 Marklaud 방법을 사용하여 superoxide에 의한 pyrogallol의 자동산화를 억제하는 활성으로 측정하였음. 대조구로 증류수를, 양성대조구로 L-ascorbic acid(10 mg/mL)을 사용하였음.

○ 과채 알코올 발효산물의 ABTS 라디칼 소거능 측정

- 알코올 발효산물(AF-1 ~ AF-6)의 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 라디칼 소거활성을 Roberta 등의 방법으로 측정하였음. 알코올 발효산물을 에탄올과 1:1로 혼합하여 암실에서 1시간 방치 후, 원심분리(10,000 rpm, 10분)한 후, 상층액을 사용하였음. ABTS working solution은 potassium persulfate(2.45 mM)와 ABTS solution (7 mM)을 1:1로 혼합하여 25°C에서 16시간 방치 후 ethanol과 88:1의 비율로 혼합하여 734 nm에서 흡광도가 0.70 ± 0.02 가 되도록 조절하여 사용하였음. 시료 20 μ L에 ABTS working solution 200 μ L를 혼합하여 4분간 암소에서 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였음. 대조구로 증류수를 사용하였음. Trolox 표준용액을 사용하여 검량선을 작성하였으며, ABTS 라디칼 소거능은 Trolox equivalent antioxidant capacity로 표시하였음.

○ FRAP(Ferric reducing antioxidant power) 측정

- 알코올 발효산물(AF-1 ~ AF-6) 상층액을 취해 FRAP을 Benzie와 Strainin의 방법으로

측정하였음. 시료는 microcentrifuge(4000 rpm, 10분)로 원심 분리한 상층액을 2% 농도로 만들어 사용함. Trolox 표준용액을 사용하여 검량선을 작성하였으며, FRAP은 Trolox equivalent antioxidant capacity로 표시하였음. 대조구로 증류수를, 양성대조구로 L-ascorbic acid(1 mg/mL)을 사용하였음.

(2) 연구 결과

(가) 발효 과채 소재의 *in vitro* 대사중후군 개선효과

- 발효 소재(신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리 주스)의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 Fig. 5-1에 나타내었음.
- 신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리 주스의 DPPH radical 소거능은 각각 40.2, 5.1, 4.8, 48.1, 49.2, 51.6%로 나타났고, 표준품인 L-ascorbic acid(10 mg/mL)은 95.0%로 나타났음. 따라서 신선초, 케일, 당근, 블랙베리주스의 DPPH radical 소거능이 40% 이상으로 나타났음.

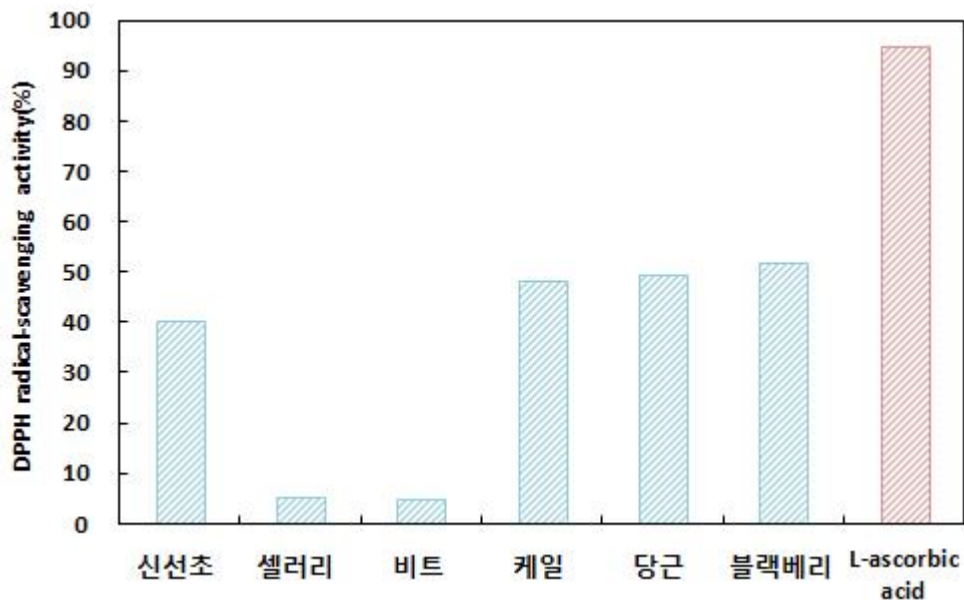


Fig. 5-1. 과채주스의 DPPH radical 소거능

- 과채주스(신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리 주스)의 yeast α -glucosidase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 5-2에 나타내었음.
- 신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리 주스의 yeast α -glucosidase 저해활성은 각각 19.7, 17.3, 15.0, 9.6, 23.2, 41.2%로 나타났고, 표준품인 Acarbose(10 mg/mL)의 저해활성은 47.4%로 나타났음. 따라서 α -glucosidase 저해활성은 블랙베리주스가 가장 우수하게 나타났고, 당근, 신선초, 셀러리, 비트, 케일 주스 순으로 감소하였음.

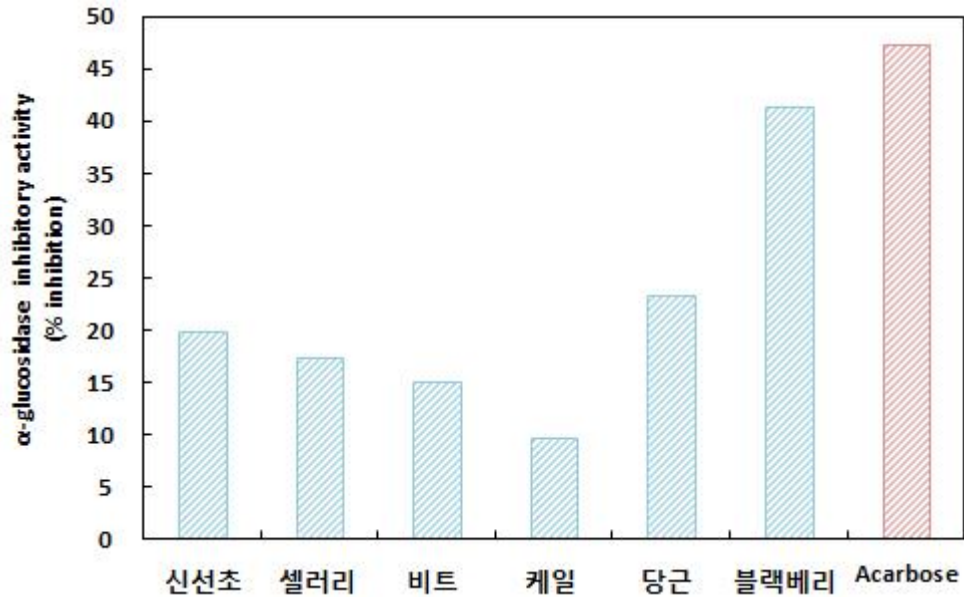


Fig. 5-2. 과채주스의 α-glucosidase 저해활성

- 과채주스(신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리 주스)의 Pancreatic lipase 저해활성을 측정된 결과는 Fig. 5-3에 나타내었음.
- 신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리 주스 pancreatic lipase 저해활성은 각각 49.2, 38.3, 34.5, 47.7, 33.2, 41.2%로 나타났고, 표준품인 Xenical(10 mg/mL)은 94.5%로 나타났음. pancreatic lipase 저해활성은 신선초, 케일, 블랙베리, 셀러리, 비트, 당근 주스 순으로 감소하였음. 발효 소재(신선초, 셀러리, 비트, 케일, 당근, 블랙베리 주스)의 DPPH radical 소거능, α-glucosidase 저해활성, pancreatic lipase 저해활성을 조사한 결과, 블랙베리, 당근, 케일, 신선초 주스의 *in vitro* 대사증후군 개선효과가 우수한 것으로 사료됨.

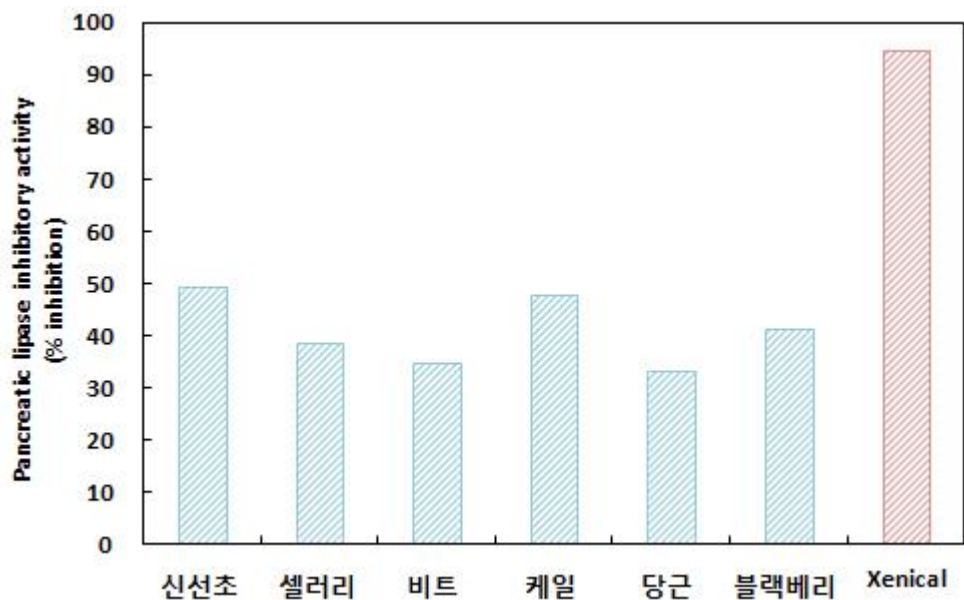


Fig. 5-3. 과채주스의 pancreatic lipase 저해활성

(2) 과채 주스 알코올 발효산물의 대사중후군 개선효과 규명

- 혼합 과채 주스 알코올 발효산물(AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6)의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 Fig. 5-4에 나타내었음.
- AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6의 DPPH radical 소거능은 각각 76.4, 89.5, 74.1, 82.6, 87.2, 90.3%로 나타났고, 표준품인 L-ascorbic acid(10 mg/mL)는 96.3%로 나타났음. 따라서 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 DPPH radical 소거능은 AF-6, AF-2, AF-5, AF-4, AF-1, AF-3 순으로 감소하였음.

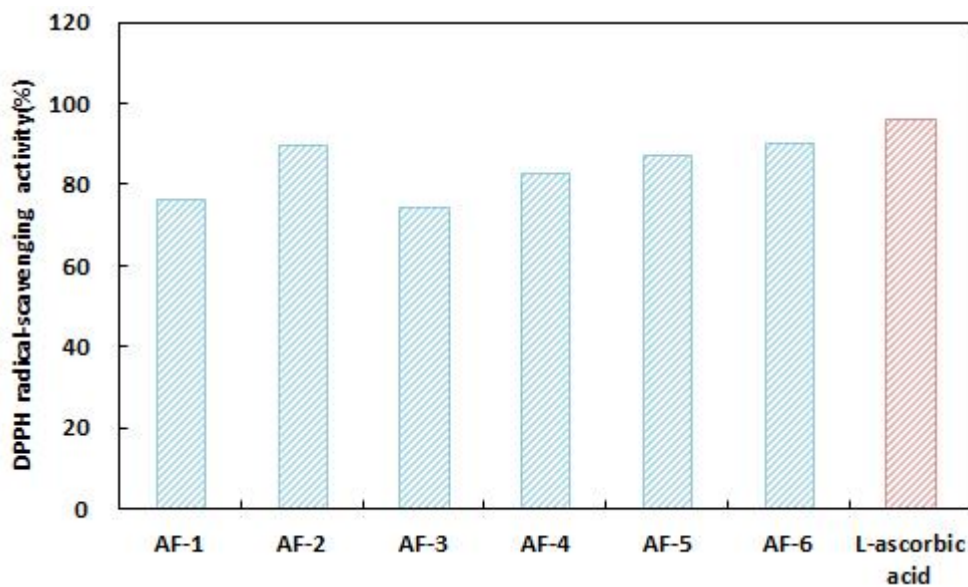


Fig. 5-4. 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 DPPH radical 소거능

- 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 yeast α -glucosidase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 5-5에 나타내었음.
- AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6의 α -glucosidase 저해활성은 각각 92.2, 93.8, 86.5, 88.3, 64.2, 67.9%로 나타났고, 표준품인 Acarbose(10 mg/mL)는 46.7%로 나타났음. 따라서 AF-1, AF-2, AF-3, AF-4의 α -glucosidase 저해활성이 70% 이상으로 높게 나타났고, AF-2의 α -glucosidase 저해활성이 가장 우수하였음.

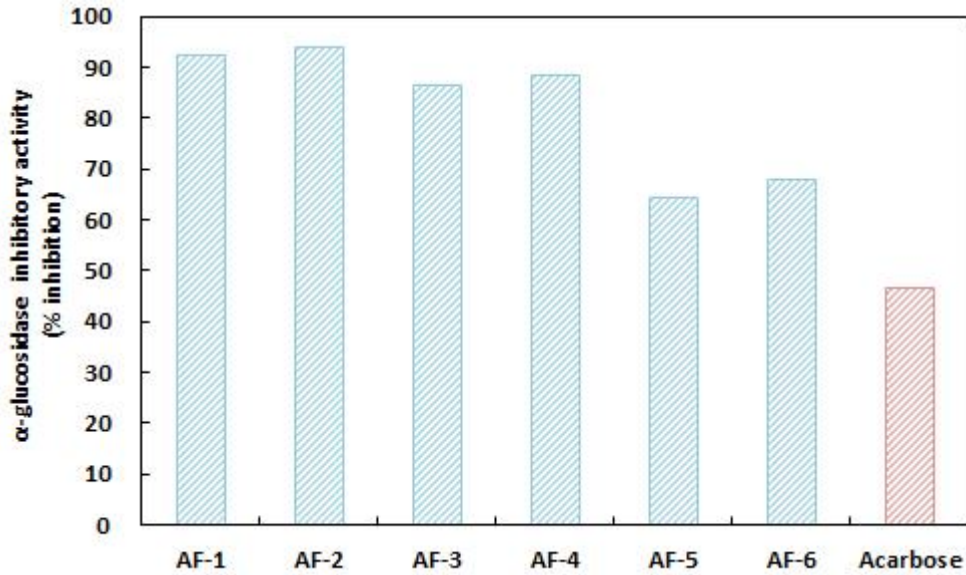


Fig. 5-5. 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 α-glucosidase 저해활성

- 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 pancreatic lipase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 5-6에 나타내었음.
- AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6의 pancreatic lipase 저해활성은 각각 90.8, 92.2, 83.3, 86.5, 80.0, 75.9%로 나타났고, 표준품인 Xenical(10 mg/mL)는 96.6%로 나타났음. 따라서 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 pancreatic lipase 저해활성은 모두 70% 이상으로 높게 나타났고, AF-2, AF-1, AF-4, AF-3, AF-5, AF-6 순으로 감소하였음.

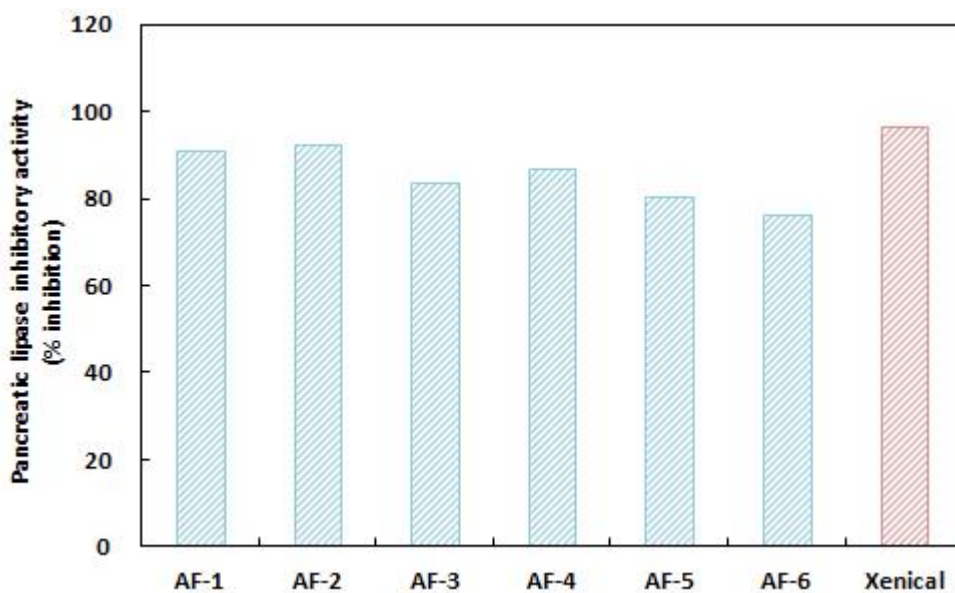


Fig. 5-6. 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 pancreatic lipase 저해활성

- 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 superoxide dismutase(SOD) 유사 활성 측정을 측정한 결과는 Fig. 5-7에 나타내었음.
- AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6의 SOD 유사 활성은 각각 76.1, 83.1, 66.6, 73.6, 44.6, 50.7%로 나타났고, 표준품인 L-ascorbic acid(10 mg/mL)은 93.7%로 나타났음. 따라서 AF-1, AF-2, AF-3, AF-4의 SOD 유사 활성이 60% 이상으로 높게 나타났고, AF-2의 SOD 유사 활성이 가장 우수하였음.

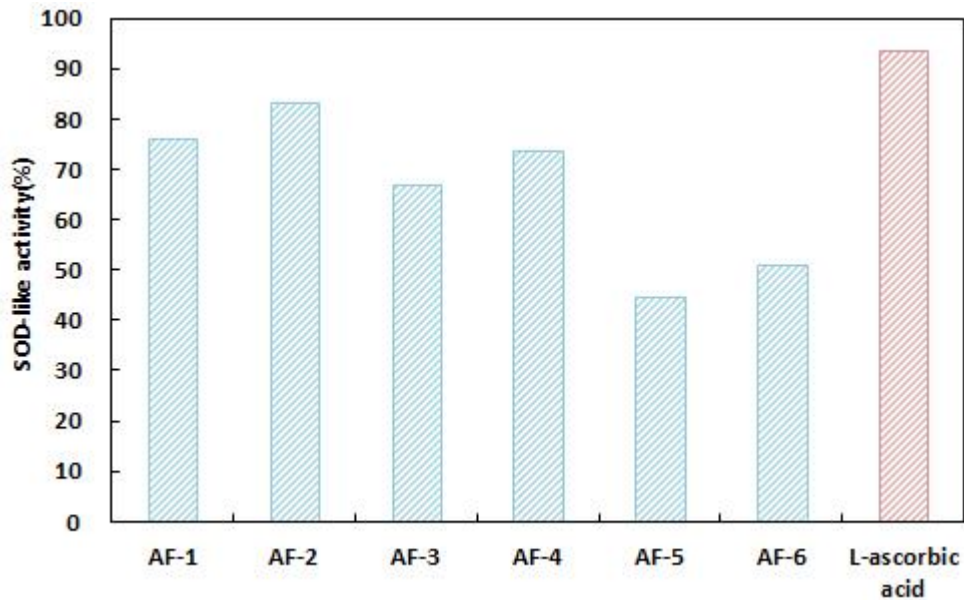


Fig. 5-7. 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 SOD 유사 활성

- 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 ABTS radical 소거능 측정을 측정한 결과는 Fig. 5-8에 나타내었음.
- AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6의 ABTS radical 소거능은 각각 56.2, 55.1, 50.0, 54.7, 53.9, 54.5 $\mu\text{g trolox/mL}$ 로 나타났음. 따라서 모든 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 ABTS radical 소거능은 50 $\mu\text{g trolox/mL}$ 이상으로 나타났음.

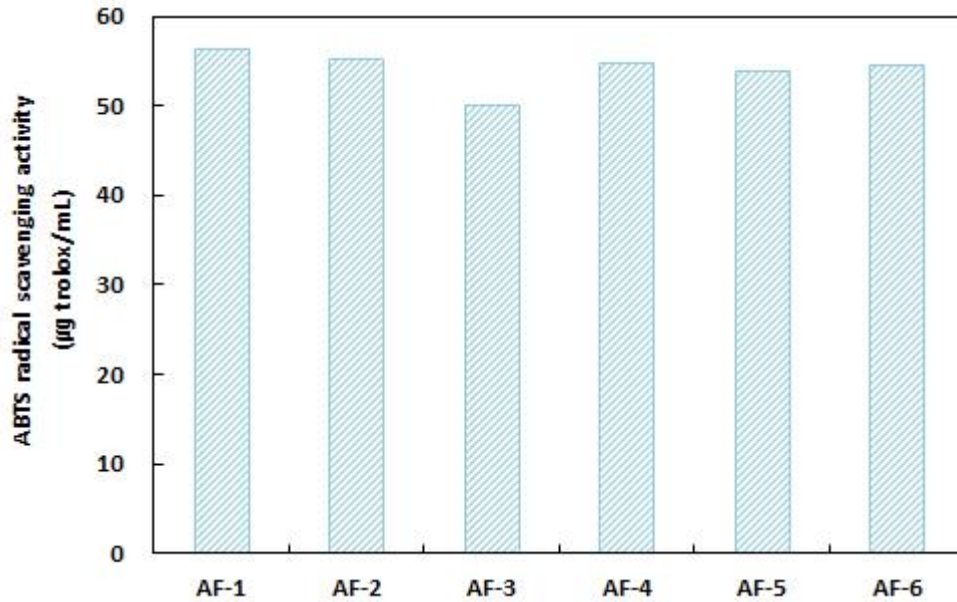


Fig. 5-8. 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 ABTS radical 소거능

- 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 FRAP value를 측정한 결과는 Fig. 5-9에 나타내었음.
- AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6의 FRAP value는 각각 19.2, 18.5, 17.9, 16.3, 20.1, 17.7 µg trolox/mL로 나타났고, 표준품인 L-ascorbic acid(1 mg/mL)는 36.1 µg trolox/mL로 나타났음. 따라서 모든 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 FRAP value는 15 µg trolox/mL 이상으로 나타났으며, AF-5의 FRAP value가 가장 우수하였음. 따라서 6종의 혼합 과채 주스 알코올 발효산물 중 AF-2의 *in vitro* 항산화 활성, 혈당조절 효과, 항비만 활성이 우수한 것으로 사료됨.

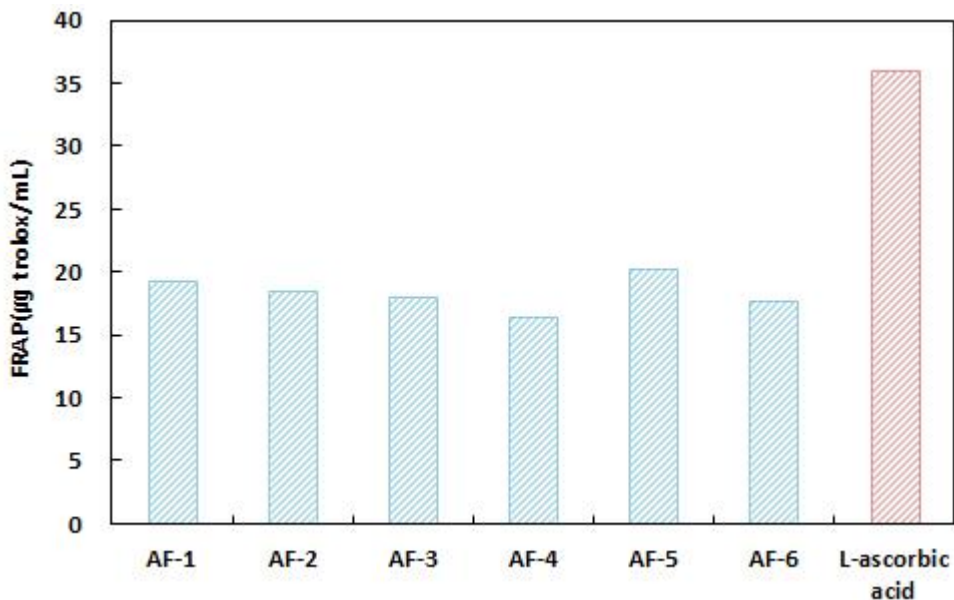


Fig. 5-9. 혼합 과채 주스 알코올 발효산물의 FRAP value

나) 과채 발효음료 제품의 대사증후군 개선효과 및 작용기전 규명

(1) 연구 방법

(가) 발효식초 및 과채 발효음료의 *in vitro* 대사증후군 개선효과 규명

- 발효식초 및 과채 발효음료의 DPPH 라디칼 소거능 측정
 - 발효식초 및 과채 발효음료의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성을 Blois 등의 방법으로 측정하여 항산화 활성을 조사하였음. 시료를 메탄올로 10배 희석한 후, 원심분리(4000 rpm, 10분)하고, 상층액을 취하여 라디칼 소거능을 측정하였음. 증류수를 대조구로, L-ascorbic acid(10 mg/mL)를 양성대조구로 사용하였음.
- 발효식초 및 과채 발효음료 과채 알코올 발효산물의 α-glucosidase 저해활성 측정
 - 발효식초 및 과채 발효음료를 원심분리(4000 rpm, 10분)한 후, 상층액을 취하여, *in vitro* 향당노 활성을 측정하기 위하여 yeast α-glucosidase 저해활성을 Watanabe법으로 측정하였음. p-nitrophenyl-D-glucopyranoside를 기질로, 증류수를 대조구로, acarbose(10 mg/mL)를 양성대조구로 사용하였음.
- 발효식초 및 과채 발효음료 과채 알코올 발효산물의 pancreatic lipase 저해활성 측정
 - 발효식초 및 과채 발효음료의 *in vitro* 향비만 활성을 측정하기 위하여 pancreatic lipase 저해활성을 Arai 등의 방법으로 측정하였음. 발효식초 및 과채 발효음료를 원심분리(4000 rpm, 10분)한 후, 상층액을 취하여 사용하였음. 효소원으로 돼지의 췌장 lipase를 사용하고 기질로 4-methylumbelliferyl oleate를 이용하였음. 증류수를 대조구로, xenical(10 mg/mL)을 양성대조구로 사용하였음.

(나) 과채 발효음료의 대사성증후군 개선효과 규명

- 과채 발효음료의 제조
 - 케일과 사과를 1% 베이킹소다와 1% 구연산으로 단계적 병용 세척한 후 저속착즙기로 착즙하여 케일 및 사과주스를 제조한 후, 각각 중량비 4.5:5.5의 비율로 혼합하여 케일사과주스를 제조한 후 발효식초를 5% 수준으로 혼합하여 과채 발효음료를 제조하였음.
- 대상자 선정 및 시험 디자인
 - 본 연구는 보건복지부 지정 공용기관생명윤리위원회의 승인을 받아 수행되었음. 비만(체질량지수 > 25 또는 허리둘레(남 > 90 cm, 여 > 85 cm), 공복혈당장애(공복 혈당 > 100 mg/dL), 고중성지방혈증(공복 중성지방 > 150 mg/dL), 저HDL-콜레스테롤혈증(공복 HDL-콜레스테롤 < 40 mg/dL(남), 50 mg/dL(여), 고혈압(혈압 > 130/85 mmHg)의 5가지 기준 중 2가지 이상을 만족시키는 대사증후군 환자 24명(20-64세)을 모집하였음. 심근경색, 뇌졸중, 위장장애, 당뇨병, 간질환, 암, 선천성질환 등 전문가가 연구에서 제외시켜

야 한다고 인정하는 자, 임신부, 수유부, 체중조절을 실시하고 있는 자는 대상자에서 제외하였음. 혈액지질 개선, 혈압조절, 혈당 강하, 간기능 개선 또는 항산화 효과가 기대되는 약물 또는 건강보조식품을 섭취하는 자는 대상자에서 제외하였음. 대상자들을 단순 무작위배정법으로 시험군(발효음료군, n=12)과 대조군(n=12)으로 나누고 시험기간(10주) 동안 발효음료군에게는 과채 발효음료를 1회에 250 mL씩, 1일 2회, 제공하였고, 대조군에게는 과채 발효음료 대신 fructose(47.22 mg/mL), glucose(16.85 mg/mL), sucrose(0.50 mg/mL)를 생수에 혼합하여 제공하여, 시험군과 대조군이 제공받은 음료로부터 섭취한 당의 종류와 양이 동하도록 하였음. 시험기간 동안 시험대상자들은 일상적인 식생활과 생활습관을 유지하도록 하였음.

○ 설문조사 및 신체계측, 체지방과 혈압 측정

- 시험기간 전, 후에 설문조사를 실시하여 음주량, 흡연여부 및 흡연량, 운동량을 조사하였음. 24시간 회상법을 통해 식이섭취량을 조사하여, CAN Pro를 사용하여 영양소 섭취량을 조사하였음.
- 시험기간 전, 후에 키와 체중을 측정하여 체질량지수(body mass index, BMI)를 다음의 계산식에 의해 구하여, 비만 개선효과를 조사하였음.

$$\text{BMI} = \text{체중(kg)} / \text{키}^2(\text{m}^2)$$
- 시험기간 전, 후에 줄자로 허리둘레를 측정하여 복부비만 개선효과를 조사하였음.
- 시험기간 전, 후에 체지방계(TBF-105, Tanica, Japan)를 사용하여 체지방 함량을 측정하여, 비만 개선효과를 조사하였음.
- 시험기간 전, 후에 혈압을 측정하여 고혈압 개선효과를 조사하였음.

○ 혈당 및 내당능 개선 효과 측정

- 시험기간 전, 후에 12시간 공복상태에서 정맥 혈액을 채취한 후, 혈장을 분리하였음. 혈당을 효소법으로, 혈장 인슐린 농도를 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법으로 측정하였고, 공복 혈당과 인슐린 농도로부터 Homeostasis model assessment of insulin resistance(HOMA-IR)을 계산하여 인슐린 저항성 개선도를 조사하였음.

$$\text{HOMA-IR} = \text{공복 혈당(mmol/L)} \times \text{공복 인슐린}(\mu\text{U/mL}) / 22.5$$
- 시험기간 전, 후에 oral glucose tolerance test(OGTT)를 실시하여 내당능 개선도를 측정하였음. 12시간 공복상태의 대상자의 손끝(모세혈관)에서 채혈하여 간이혈당계를 사용하여 혈당을 측정하였음. 대상자에게 75 g의 포도당을 섭취시킨 후, 30, 60, 120 및 180분에 손끝에서 채혈하여 혈당을 측정하였고, 모세혈관 혈당치 변화곡선의 면적(area under the curve, AUC)을 계산하였음. 포도당을 섭취한 120분 후에 정맥에서 혈액을 채취한 후, 혈장을 분리하고 혈당을 효소법으로, 인슐린 농도를 ELISA법으로 측정하였음..

○ 혈장 지질 profile 분석

- 혈장의 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤을 효소법으로 측정하여 이상지질혈증 개선효과를 조사하였음. 중성지방 및 HDL-콜레스테롤 농도로부터 동맥경화지수(atherogenic index, AI)를 다음의 계산식에 의해 계산하였음.

$$\text{동맥경화지수(AI)} = (\text{Triglyceride}) / (\text{HDL-cholesterol})$$

○ 간 기능에 미치는 영향 조사

- 혈장 alanine aminotransaminase(ALT) 및 aspartate aminotransferase(AST) 활성을 측정하고, 알부민 및 총 빌리루빈 농도를 측정하여, 과채발효음료의 장기간 섭취가 간 기능에 미치는 영향을 조사하였음.

○ 작용기전 구명

- 혈장의 지질과산화물 농도를 조사하기 위해 Ohkawa 등의 방법에 따라 Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)를 측정하여, 항산화효과를 조사하였음. Thiobarbituric acid (TBA)와 반응하는 malondialdehyde (MDA)의 농도를 측정하였고, 표준용액으로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP)를 사용하였음.
- 혈장의 글루타치온(glutathione) 농도를 Ellman의 방법에 따라 측정하였음.
- 혈장의 superoxide dismutase(SOD) 활성은 Marklund & Marklund의 방법을 이용하여 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색반응을 억제하는 정도를 측정하였음. Catalase 활성은 Aebi법에 따라 H₂O₂를 기질로 사용하여 측정하였음. glutathione peroxidase(GSH-Px)의 활성은 Lawrence & Burk의 방법으로 측정하여 항산화계 효소 활성 변화정도를 측정하였음.
- 인슐린 저항성을 개선하는 cytokine인 adiponectin의 혈장농도를 ELISA법으로 측정하였음.
- 염증성 cytokine인 종양괴사인자 TNF(tumor necrosis factor)-α 농도를 ELISA법으로 측정하였음. 염증지표인 hs-CRP(high-sensitivity c-reactive protein)를 면역비탁법으로 측정하여, 항염증효과를 조사하였음.

○ 통계처리

- 모든 측정치는 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였음.
- 대조군과 발효음료군 별로 중재기간 전 및 10주간의 중재기간 종료 후의 측정치의 차이(difference)를 구하고, difference간의 유의성 검증은 Student's t-test를 사용하여 실시하였음(p<0.05).

(2) 연구 결과

(가) 과채발효음료의 *in vitro* 대사중후군 개선효과

○ 발효식초 및 과채 발효음료의 DPPH radical 소거능

- 발효식초와 과채 발효음료의 DPPH radical 소거능은 각각 59.2±2.9%, 38.7±2.2%로 나타났으며, 표준품인 L-ascorbic acid(10 mg/mL)은 96.8±1.3%로 나타났음. 발효식초와 과채 발효음료의 DPPH radical 소거능은 각각 표준품 대비 61.2%, 39.9%로 나타나, *in vitro* 항산화 활성이 우수하게 나타났음.

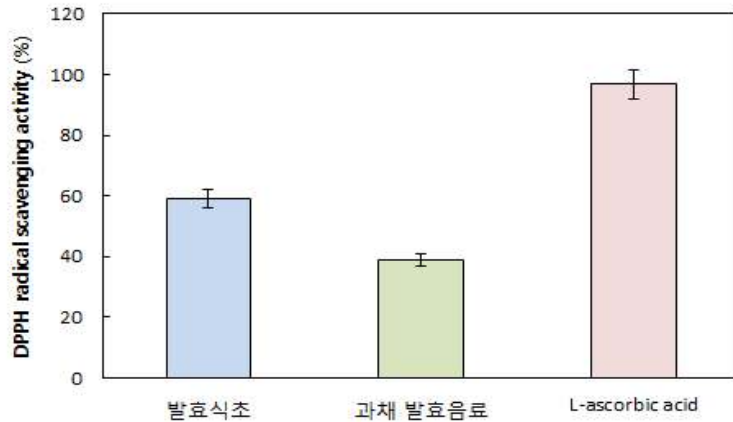


Fig. 6-1. 발효식초 및 과채 발효음료의 DPPH radical 소거능

○ 발효식초 및 과채 발효음료의 α -glucosidase 저해활성

- 발효식초와 과채 발효음료의 yeast α -glucosidase 저해활성은 각각 $66.6 \pm 2.6\%$, $35.2 \pm 2.3\%$ 로 나타났고, 표준품인 Acarbose(10 mg/mL)의 저해활성은 $46.7 \pm 1.7\%$ 로 나타났음. 발효식초와 과채 발효음료의 α -glucosidase 저해활성은 각각 표준품 대비 142.6%, 75.2%로 나타나, *in vitro* 항당뇨 활성이 우수하게 나타났음.

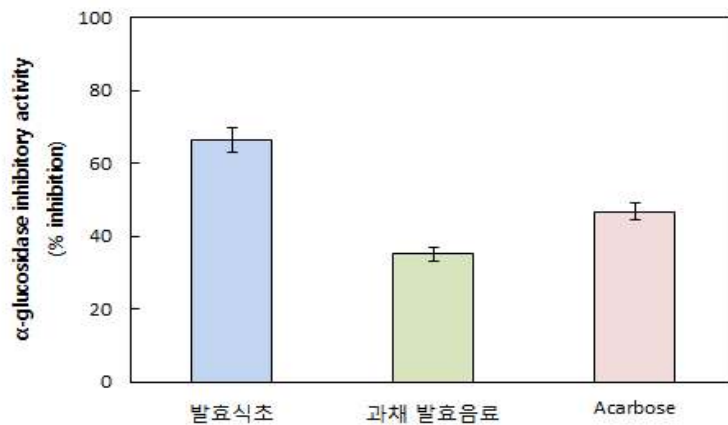


Fig. 6-2. 발효식초 및 과채 발효음료의 yeast α -glucosidase 저해활성

○ 발효식초 및 과채발효음료의 Pancreatic lipase 저해활성

- 발효식초와 과채 발효음료의 pancreatic lipase 저해활성은 각각 $74.7 \pm 2.5\%$, $51.4 \pm 2.9\%$ 로 나타났고, 표준품인 Xenical(10 mg/mL)의 저해활성은 $96.3 \pm 1.2\%$ 로 나타났음. 발효식초와 과채 발효음료의 pancreatic lipase 저해활성은 각각 표준품 대비 77.6%, 53.4%로 나타나, *in vitro* 항비만 활성이 우수하게 나타났음.

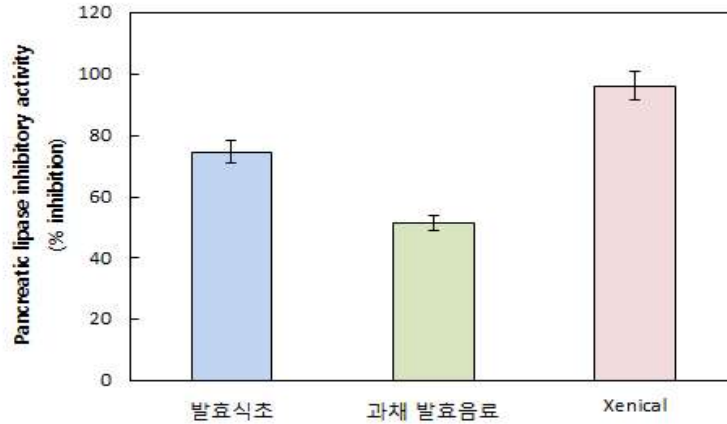


Fig. 6-3. 발효식초 및 과채 발효음료의 Pancreatic lipase 저해활성

(나) 과채 발효음료의 대사성증후군 개선효과 규명

○ 신체계측 및 설문조사, 식이섭취조사

- 대조군은 12명(남 12), 발효음료군은 12명(남 9, 여 3)으로 구성되었음. 전체 시험대상자의 평균연령은 41.4±9.0세, 신장은 172.9±6.5 cm이었음. 대조군 12명 및 발효음료군 12명 모두 시험 종료 시점까지 시험에 참가하였고, 시험대상자 중 부작용을 보고한 자는 없었음.
- 대조군과 발효음료군의 시험 전 에너지 섭취량은 각각 2,478±423, 2,564±381 kcal/day, 음주량은 12.8±10.1, 14.3±13.6 g alcohol/day로 나타났음. 시험기간 전에 대조군과 발효음료군의 흡연자 수는 각각 6명, 8명이었음. 대조군과 발효음료군의 시험 전 흡연량은 6.2±6.6, 7.5±6.0, 개피/일로 나타났음. 대조군과 발효음료군 모두 에너지 섭취량, 음주량, 흡연자 수, 흡연량이 중재 기간 전, 후에 유의적으로 변화하지 않았음.
- 대조군의 경우 시험기간 전, 후의 체중이 각각 81.8±25.6, 82.8±24.8 kg으로 나타났으며, 발효음료군의 경우 각각 79.4±8.8, 80.2±8.6 kg으로 나타났음. 대조군의 경우 시험기간 전, 후의 체질량지수(BMI)는 각각 27.6±7.5, 27.9±7.2 kg/m²이었으며, 발효음료군의 경우 26.1±2.3, 26.4±2.3 kg/m²로 나타났음. 대조군의 경우 시험기간 전, 후의 체지방은 28.2±6.4, 28.5±5.9%이었으며, 발효음료군의 경우 각각 24.9±2.7, 25.8±3.2%로 나타났음. 대조군의 시험기간 전, 후의 허리둘레는 각각 95.1±18.2, 95.3±17.3 cm이었으며, 발효음료군의 경우 시험기간 전, 후의 허리둘레는 각각 92.8±5.6, 93.2±6.2 cm로 나타났음. 대조군과 발효음료군 모두 체중, BMI, 체지방, 허리둘레가 중재기간 전, 후에 유의적으로 변화하지 않았음.
- 대조군의 최고혈압은 시험기간 전, 후에 각각 142.1±23.4, 141.0±19.7 mmHg로 나타났으며, 발효음료군의 경우 135.5±12.6, 135.9±9.8 mmHg로 나타났음. 대조군의 최저혈압은 시험기간 전, 후에 각각 89.3±15.6, 90.1±10.7 mmHg로 나타났으며, 발효음료군의 경우 5.8±9.8, 87.0±10.4 mmHg로 나타났음. 대조군과 발효음료군 모두 최고혈압과 최저혈압이 중재기간 전, 후에 유의적으로 변화하지 않았음.

Table 6-1. 시험기간 전, 후의 신체계측치 및 혈압

Parameters	Control group			Fermented beverage group		
	Pre ¹⁾	Post ²⁾	Difference ³⁾	Pre	Post	Difference
Age(yrs)			41.4±9.0			
Height(cm)			172.9±6.5			
Body weight (kg)	81.8±25.6	82.8±24.8	1.0±2.0	79.4±8.8	80.2±8.6	0.7±1.6
BMI(kg/m ²)	27.6±7.5	27.9±7.2	0.4±0.7	26.1±2.3	26.4±2.3	0.3±0.5
Body fat(%)	28.2±6.4	28.5±5.9	0.3±1.7	24.9±2.7	25.8±3.2	0.8±1.8
Waist circumference (cm)	95.1±18.2	95.3±17.3	0.2±4.2	92.8±5.6	93.2±6.2	0.5±2.4
Blood pressure						
SBP(mmHg)	142.1±23.4	141.0±19.7	-1.1±13.1	135.5±12.6	135.9±9.8	0.4±7.1
DBP(mmHg)	89.3±15.6	90.1±10.7	0.8±9.7	85.8±9.8	87.0±10.4	1.3±7.5

1) Pre : 시험 전

2) Post : 시험 후

3) Difference = Post - Pre

○ 혈당, 인슐린 저항성지표 및 내당능 개선 효과

- 대조군의 공복 모세혈관 혈당은 시험기간 전, 후에 각각 101.8±21.1, 107.9±13.3 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 공복 모세혈관 혈당은 시험기간 전, 후에 105.5±16.8, 99.4±17.3 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 포도당 섭취 후 30분의 대조군의 모세혈관 혈당은 시험기간 전, 후에 각각 188.6±37.9, 180.3±34.4 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 30분 모세혈관 혈당은 시험기간 전, 후에 각각 195.3±27.9, 170.8±35.5 mg/dL로 나타나, 시험기간 후에 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 없었음.
- 대조군의 혈당 변화곡선의 면적(area under the curve, AUC)은 시험기간 전, 후에 각각 8,323±1,945, 7,978±1874 mg·min/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 혈당 변화곡선의 면적은 시험기간 전, 후에 각각 7,961±1450, 7,013±1862 mg·min/dL로 나타나, 시험기간 후에 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 없었음.

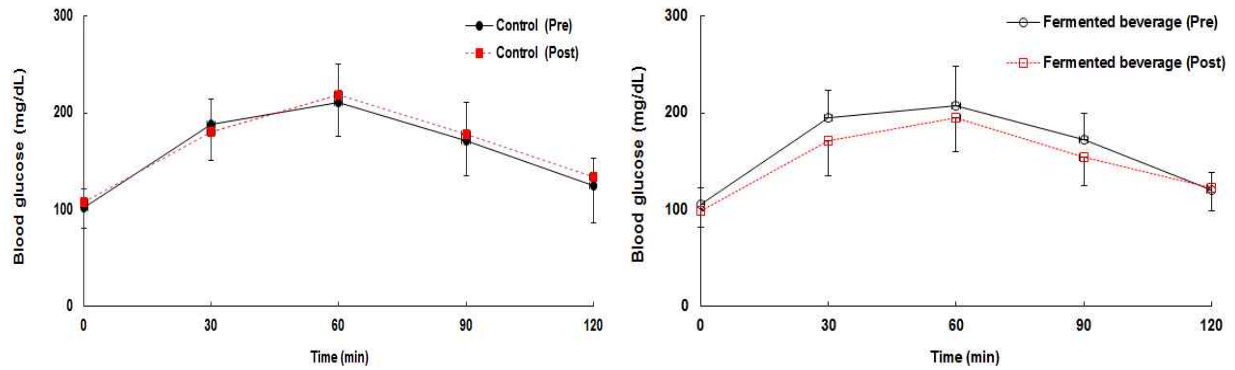


Fig. 6-4. 당부하검사(OGTT)시 모세혈관 혈당 변화

Table 6-2. 당부하 검사(OGTT) 후 모세혈관 혈당 변화곡선의 면적(AUC)

Parameters	Control group			Fermented beverage group		
	Pre	Post	Difference ¹	Pre	Post	Difference
AUC (mg·min/dL)	8,323±1945	7,978±1874	-345±1971	7,961±1450	7,013±1862	-948±2660

- 대조군의 공복 정맥 혈당은 시험기간 전, 후에 각각 92.2±17.3, 95.1±16.0 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 공복 혈당은 시험기간 전, 후에 95.2±20.1, 91.7±14.0 mg/dL로 나타나, 시험기간 후에 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 없었음. 대조군의 120분 정맥 혈장 혈당은 시험기간 전, 후에 각각 100.0±15.6, 99.0±20.2 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 120분 정맥 혈장 혈당은 시험기간 전, 후에 각각 100.9±16.9, 98.2±13.0 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음.
- 대조군의 공복 혈장 인슐린 농도는 시험기간 전, 후에 각각 8.56±4.34, 9.02±4.25 uU/mL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 공복 혈장 인슐린 농도는 시험기간 전, 후에 8.85±2.55, 7.78±3.53 uU/mL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 대조군의 120분 혈장 인슐린 농도는 시험기간 전, 후에 각각 19.0±7.8, 19.0±10.0 uU/mL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 120분 혈장 인슐린 농도는 시험기간 전, 후에 각각 22.2±10.1, 21.6±10.7 uU/mL로 나타나, 시험기간 후에 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 없었음.
- 대조군의 HOMA-IR은 시험기간 전, 후에 각각 1.90±0.90, 2.06±0.83로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 HOMA-IR은 시험 전에 2.05±0.62 이었으며, 시험 종료 후에 유의적으로 감소하여 1.73±0.74로 나타났음(p<0.05). 따라서, 대사증후군 환자에 있어서 과채 발효음료의 장기간 섭취는 인슐린 저항성을 개선하였음.

Table 6-3. 당부하 검사(OGGT) 0분 및 120분의 정맥 혈장혈당, 인슐린 및 HOMA-IR

Parameters	Control group			Fermented beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
Glucose, 0 min (mg/dL)	92.2±17.3	95.1±16.0	2.9±6.6	95.2±20.1	91.7±14.0	-3.5±9.9
Glucose, 120 min (mg/dL)	100.0±15.6	99.0±20.2	-1.0±11.9	100.9±16.9	98.2±13.0	-2.8±13.1
Insulin, 0 min (μU/mL)	8.56±4.34	9.02±4.25	0.46±1.94	8.85±2.55	7.78±3.53	-1.07±2.03
Insulin, 120 min (μU/mL)	19.0±7.8	19.0±10.0	0.0±5.3	22.2±10.1	21.6±10.7	-0.6±6.5
HOMA-IR ¹⁾	1.90±0.90	2.06±0.83	0.15±0.53	2.05±0.62	1.73±0.74	-0.32±0.47*

¹⁾HOMA-IR = 공복 혈당(mmol/L) x 공복 인슐린(μU/mL) / 22.5

○ 혈장 지질 Profile

- 대조군의 혈장 중성지질의 농도는 시험기간 전, 후에 각각 184.7±83.7, 189.4±73.5 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 혈장 중성지질 농도는 시험 전에 202.6±88.1 mg/dL이었으며, 시험 종료 후에 유의적으로 감소하여(p<0.05) 193.0±90.7 mg/dL로 나타나, 시험기간 전, 후의 차이는 -9.6±14.2 mg/dL로 나타났음. 따라서, 대사증후군 환자에 있어서 과채 발효음료의 장기간 섭취는 대사증후군의 factor 중 하나인 고중성지방혈증을 완화시킨 것으로 나타났음.
- 대조군의 혈장 총 콜레스테롤 농도는 시험기간 전, 후에 각각 193.2±33.0, 187.6±40.7 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 혈장 총 콜레스테롤 농도는 시험기간 전, 후에 각각 198.0±35.7, 196.2±37.1 mg/dL로 나타나 유의적인 차이가 없었음.
- 대조군의 혈장 HDL-콜레스테롤 농도는 시험 전, 후에 각각 38.8±6.9, 37.0±7.8 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 HDL-콜레스테롤 농도는 시험기간 전, 후에 각각 33.5±9.0, 35.0±6.4 mg/dL로 나타나 유의적인 차이가 없었음.
- 대조군의 혈장 LDL-콜레스테롤 농도는 시험 전, 후에 각각 111.7±33.6, 110.6±32.9 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 LDL-콜레스테롤 농도는 시험기간 전, 후에 각각 120.6±38.4, 118.4±31.3 mg/dL로 나타나 유의적인 차이가 없었음.
- 대조군의 동맥경화지수는 시험기간 전, 후에 각각 4.8±2.0, 5.2±1.8로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 동맥경화지수는 시험 전에 6.7±4.1이었으며, 시험 종료 후에 유의적으로 감소하여(p<0.05) 6.0±4.1로 나타나, 시험기간 전, 후의 차이는 -0.7±1.0로 나타났음. 따라서, 과채발효 음료는 대사증후군 환자에 있어서 동맥경화지수를 감소시켜, 심혈관계질환의 발병을 억제하는데 기여할 것으로 사료됨.

Table 6-4. 시험기간 전, 후의 혈장 지질 성분 및 동맥경화지수

Parameters	Control group			Fermented beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
Triglyceride (mg/dL)	184.7±83.7	189.4±73.5	4.6±17.5	202.6±88.1	193.0±90.7	-9.6±14.2*
Cholesterol (mg/dL)	193.2±33.0	187.6±40.7	-5.6±14.1	198.0±35.7	196.2±37.1	-1.9±17.5
HDL-cholesterol (mg/dL)	38.8±6.9	37.0±7.8	-1.8±4.2	33.5±9.0	35.0±6.4	1.5±4.9
LDL-cholesterol (mg/dL)	111.7±33.6	110.6±32.9	-1.1±8.4	120.6±38.4	118.4±31.3	-2.3±11.8
동맥경화지수 (atherogenic index, AI) ¹⁾	4.8±2.0	5.2±1.8	0.4±1.0	6.7±4.1	6.0±4.1	-0.7±1.0*

¹⁾동맥경화지수(AI) = (Triglyceride)/(HDL-cholesterol)

○ 간 기능에 미치는 영향

- 대조군의 혈장 ALT 활성은 시험 전, 후에 각각 27.8±18.8, 26.2±16.0 U/L로 나타나, 유의적인 차이가 없었으며, 발효음료군의 ALT 활성은 시험 전, 후에 각각 26.7±9.1, 28.5±13.33 U/L로 나타나, 유의적인 차이가 없었음.
- 대조군의 혈장 AST 활성은 시험 전, 후에 각각 27.7±16.5, 26.3±14.7 U/L로 나타나, 유의적인 차이가 없었으며, 발효음료군의 AST 활성은 시험 전, 후에 각각 27.8±6.0, 30.5±6.8 U/L로 나타나, 유의적인 차이가 없었음.
- 대조군의 혈장 총 빌리루빈 농도는 시험 전, 후에 각각 0.5±0.1, 0.6±0.2 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었으며, 발효음료군의 경우 시험 전, 후에 각각 0.5±0.2, 0.6±0.3 mg/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음.
- 대조군의 혈장 알부민 농도는 시험 전, 후에 각각 4.1±0.8, 4.5±0.2 g/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었으며, 발효음료군의 경우 시험기간 전, 후에 각각 4.4±0.7, 4.7±0.1 g/dL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 따라서 과채발효음료의 장기간 섭취는 간 기능 지표에 영향을 미치지 않았으며, 간 기능에 대한 부작용이 없을 것으로 사료됨.

Table 6-5. 혈장 AST, ALT 활성 및 총 빌리루빈, 알부민 농도

Parameters	Control group			Fermented beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
ALT (U/L)	27.8±18.8	26.2±16.0	-1.7±5.3	26.7±9.1	28.5±13.3	1.8±6.9
AST (U/L)	27.7±16.5	26.3±14.7	-1.3±6.3	27.8±6.0	30.5±6.8	2.7±9.2
Total bilirubin (mg/dL)	0.5±0.1	0.6±0.2	0.1±0.2	0.5±0.2	0.6±0.3	0.2±0.3
Albumin (g/dL)	4.1±0.8	4.5±0.2	0.4±0.9	4.4±0.7	4.7±0.1	0.3±0.7

○ 항산화 효과

- 대조군의 혈장 TBARS 농도는 시험 전, 후에 각각 1.91±0.67, 2.06±0.84 nmol/mL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 혈장 TBARS 농도는 시험 전에 1.73±0.45 nmol/mL이었으나, 시험 종료 후에 유의적으로 감소하여 1.45±0.73 nmol/mL로 나타났음 (p<0.05). 따라서, 과채 발효음료는 *in vivo*에서 항산화 효과가 우수한 것으로 나타났으며, 이는 인슐린 저항성을 개선하는데 기여할 것으로 사료됨.
- 대조군의 혈장 glutathione 농도는 시험 전, 후에 각각 2.31±0.39, 2.50±0.35 μmol/L로 나타났음. 발효음료군의 glutathione 농도는 시험 전, 후에 각각 2.52±0.53, 2.69±0.45 μmol/L로 나타났음. 대조군과 발효음료군 모두 glutathione 농도는 시험기간 전, 후에 유의적인 차이가 없었음.
- 대조군의 혈장 SOD 활성은 시험기간 전, 후에 각각 1.19±0.39, 1.07±0.34 U/g protein으로 나타났으며, 발효음료군의 경우 각각 1.02±0.22, 1.13±0.28 U/g protein으로 나타났음.
- 시험 전, 후의 혈장 catalase 활성은 대조군의 경우 각각 193±29, 201±31 U/mg protein으로 나타났으며, 발효음료군의 경우 각각 197±26, 209±28 U/mg protein으로 나타났음. 시험기간 전, 후의 혈장 GSH-Px 활성은 대조군의 경우 각각 33.9±4.8, 31.8±5.7 U/mg protein으로 나타났으며, 발효음료군의 경우 각각 31.3±4.3, 29.4±8.1 U/mg protein으로 나타났음. 대조군과 발효음료군 모두 혈장 SOD, catalase, GSH-Px 활성이 시험기간 전, 후에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나, 과채 발효음료의 섭취는 항산화 효소계 활성에는 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료됨.

Table 6-6. 혈장 TBARS와 glutathione 농도 및 항산화 효소계 활성

Parameters	Control group			Fermented beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
TBARS (nmol/mL)	1.91±0.67	2.06±0.84	0.16±0.45	1.73±0.45	1.45±0.73	-0.28±0.51*
GSH (μmol/L)	2.31±0.39	2.50±0.35	0.19±0.59	2.52±0.53	2.69±0.45	0.17±0.33
SOD (U/g protein)	1.19±0.39	1.07±0.34	-0.12±0.45	1.02±0.22	1.13±0.28	0.11±0.36
CAT (U/mg protein)	193±29	201±31	8±26	197±26	209±28	12±19
GSH-Px (U/mg protein)	33.9±4.8	31.8±5.7	-2.1±7.6	31.3±4.3	29.4±8.1	-1.9±9.9

○ 항염증 효과

- 대조군의 혈장 Adiponectin 농도는 시험 전, 후에 각각 9.4±2.9, 9.9±2.6 ng/mL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 혈장 Adiponectin 농도는 시험 전에 8.6±2.7 ng/mL, 시험 종료 후에 9.2±4.0 ng/mL로 증가하는 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 없었음.
- 대조군의 TNF-α 농도는 시험 전, 후에 각각 12.5±2.9, 13.3±3.6 pg/mL로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 혈장 TNF-α 농도는 시험 전에 13.3±3.2 pg/mL로 나타났으며, 시험 종료 후에 유의적으로 감소하여 11.2±2.0 pg/mL로 나타났음(p<0.05).
- 대조군의 혈장 hs-CRP 농도는 시험 전, 후에 각각 2.7±2.6, 3.1±2.4 mg/L로 나타나, 유의적인 차이가 없었음. 발효음료군의 hs-CRP 농도는 시험 전에 2.2±2.6 mg/L, 시험 종료 후에 유의적으로 감소하여 1.4±2.1 mg/L로 나타났음(p<0.05). 따라서, 대사증후군 환자에 있어서 과체 발효음료의 장기간 섭취는 항염증 효과를 나타내어, 인슐린 저항성을 개선시키는데 기여할 것으로 사료됨.

Table 6-7. 혈장 Adiponectin, TNF-α 및 hs-CRP 농도

Parameters	Control group			Fermented beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
Adiponectin (μg/mL)	9.4±2.9	9.9±2.6	0.5±2.9	8.6±2.7	9.2±4.0	0.6±4.4
TNF-α (pg/mL)	12.5±2.9	13.3±3.6	0.8±2.4	13.3±3.2	11.2±2.0	-2.2±2.8*
hs-CRP (mg/L)	2.7±2.6	3.1±2.4	0.3±1.3	2.2±2.6	1.4±2.1	-0.8±1.1*

다. 연구개발 성과

1) 논문

- 과채류를 혼합한 블랙베리(*Rubus fruticosus* L.) 식초의 발효 특성. 경상대학교 농업생명과학회지 2018년 (심사 중)
- 당근식초의 항산화활성 및 췌장리파아제 저해활성. 한국생명공학회지 (투고 중)
- Effect of fermented beverage on metabolic syndrome in patients with metabolic syndromd (Biotechnology and Bioprocess Engineering (투고 예정)

2) 학술대회 발표

- Inhibitory activities of fermentation products of blackberry juice against pancreatic lipase and α -glucosidase *in vitro*. 한국영양학회 국제학술대회 2016.
- Inhibitory activities of alcoholic fermentation product of fruit and vegetable juices against α -glucosidase and pancreatic lipase *in vitro*. 한국식품영양과학회 국제학술대회 2016.
- Development of fruit and vegetable mixed fermented liquor without additives. 한국식품영양과학회 국제학술대회 2016.
- Antioxidative effects of alcoholic fermentation product using fruit and vegetable juices. 한국식품과학회 국제학술대회 2017.
- Antioxidant activity of alcoholic fermentation product of fruit and vegetable juices *in vitro*. 한국식품과학회 국제학술대회 2017.
- Inhibitory activity of kale vinegar against pancreatic lipase *in vitro*. 한국식품조리과학회 학술대회 2017.
- Physicochemical quality and antioxidant compounds of fruit and vegetable juice with vinegar. 한국영양학회 국제학술대회 2017.
- Inhibitory effects of juice containing vinegar on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. 한국식품영양과학회 국제학술대회 2017.

3) 특허

- “케일식초와 그 제조방법 및 항비만 효과를 나타내는 케일식초를 포함하는 조성물(출원번호: 10-2017-0179860, 대한민국). 2017
- “당근 발효 식초 제조방법 및 이를 포함하는 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물” 특허출원(출원번호: 10-2017-0182542, 대한민국). 2017

4) 제품화

- 대사증후군 개선 효과 및 관능적 특성이 우수한 식초를 함유한 발효 과채음료를 개발하였음.
- 현재 시판되고 있는 바나나식초, 파인애플식초 등은 바나나, 파인애플 등을 발효식초 제품이 아닌 바나나, 파인애플 등과 설탕, 식초를 섞어 절인 제품이 대부분임. 물에 타먹는 식초 제품들 또한 식초 외 액상과당, 정제수, 합성착향료 등과 같은 첨가물로 구성됨. 시판중인 발효음료도 발효즙은 3~7% 함유하고 있으나, 베이스가 되는 과채주스가 순수 착즙액이 아닌 농축액에 정제수를 첨가한 농축환원주스임. 본 연구팀에서 개발된 과채 발효음료는 설탕이나 액상과당이 아닌 과일의 천연당을 이용하여 발효하여 시중 제품들보다 당 함량이 적으며, 정제수를 포함한 어떠한 첨가물도 첨가하지 않았음. 또한 농축환원주스가 아닌 순수 착즙주스로서 공정을 최소화하여 영양소 보존률을 높였음.
- 휴롬팜은 음료 및 식품 제조업을 하는 휴롬의 자회사였으나 매출의 저조로 인해 휴롬이 인수 작업 중임. 따라서 현재 음료의 판매원을 휴롬팜에서 휴롬으로 변경할 예정이며, 정상적인 영업이 진행된다면 기 개발된 발효 과채음료를 판매할 계획임.
- 휴롬은 온라인 및 배달을 통해 주스 및 음료를 판매할 계획으로 발효 과채 음료는 스페셜주스(건강 기능 주스 카테고리)로서 일반 주스보다 고가인 7,800원에 판매할 예정임.
- 본 연구에서 확립된 레시피 및 발효식초 제조 공정을 적용하여 과채 발효음료는 전문업체에 OEM 방식으로, 과채 발효음료에 혼합되는 발효식초는 식초 제조업체와 co-work를 통해 생산하고자 함. 시제품 생산을 통해 착즙률을 고려한 재료투입량, 이화학적 특성 및 품질 특성 등을 유지할 수 있는 조건을 최종 점검한 후 대량 생산 공정을 확립하고 제품을 생산할 계획임.

5) 홍보 전시

- 과채 발효음료는 휴롬팜 매장에서 배너와 포스터를 제작하여 매장 내 비치하였음.
- 휴롬주스 매장 문현점, 화명점, 창원점에서 2017년 10월 20일~11월 20일 동안 매장 내 방문하는 고객을 대상으로 개발된 발효 과채 발효음료의 시음 행사와 설문조사를 시행하였음.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

가. 목표달성도

○ 최종 성과

- 신선한 채소과일 원료를 첨가물 없이 천연당을 활용하고 미생물 발효법으로 제조한 식초를 주원료로 고부가가치 과채 발효음료 제품을 개발하고 대사증후군 개선효과를 규명하였음.

평가목표	비중(%)	달성도(%)	실적
알코올 발효산물 제조 및 표준 공정 확립	10	100	케일, 당근, 블랙베리 등 채소·과일을 활용하고 천연당으로 보당한 과채 알코올 발효산물을 제조하였고 표준 공정을 확립하였음
과채 발효식초 제조 공정 확립	15	100	발효원료에 적합한 초산균을 선정하고 정치 발효법으로 발효식초를 제조하였고 제조 공정을 확립하였음
발효 음료 레시피 확립	15	100	발효식초를 혼합한 과채 발효음료 레시피 1건을 확립하였음.
대사증후군 개선효과 규명	15	100	과채 발효음료의 대사증후군 개선효과를 <i>in vitro</i> 실험 및 임상시험에서 규명하였음
최종 제품 개발	20	100	과채 발효음료의 이화학적 특성, 관능적 특성, 안전성 등을 고려하여 최종 과채 발효음료 제품을 개발하였음.
학술대회 논문 발표 6건	5	100	국내 및 국제 학술대회 초록 건을 발표하였음.
논문 투고 SCI급 2건, 비SCI 2건	10		국내 논문 1건은 경상대학교 농업생명과학회지에 투고하여 심사 중이며, 1건은 한국생명공학회지에 투고 중임. SCI급 논문 1건은 Biotechnol. Bioprocess Eng.에 투고 예정임.
특허 출원 및 등록 2건	10	100	- 국내 특허 2건을 출원(출원번호: 10-2017-0179860, 10-2017-0182542)하였고 현재 등록 준비 중임.

○ 세부 성과 목표

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	평가의 착안점	비중 (%)	달성도 (%)
1차년도 (2016)	과채 알코올 발효산물의 품질 특성 및 생리활성 물질 규명	알코올 발효산물의 이화학적 특성 확인	품질 특성 분석 여부	5	100
		알코올 발효산물의 생리활성 물질 분석	생리활성 물질 분석 여부	5	100
	과채 알코올 발효산물 제조 및 표준 공정 확립	과채 주스를 이용한 알코올 발효 공정 확립	발효공정 확립 여부	10	100
		발효식초 제조를 위한 초산균 선정	초산균 선정 여부	5	100
	과채 알코올 발효산물의 <i>in vitro</i> 생리활성 규명	발효 과채 소재의 <i>in vitro</i> 대사증후군 개선효과 규명	대사증후군 효능 평가 여부	5	100
		알코올 발효산물의 <i>in vitro</i> 대사증후군 개선효과 규명	대사증후군 효능 평가 여부	5	100
2차년도 (2017)	과채 발효음료 제품 개발 및 품질 특성규명	발효식초 및 과채 발효음료의 이화학적 특성 및 생리활성 물질 분석	이화학적 특성 및 생리활성 물질 분석 여부	5	100
		최종 과채 발효음료 배합비율 결정 및 제품화	배합비율 확립 여부	20	100
	과채 발효식초 제조 및 공정 확립	과채 발효식초 제조	발효식초 제조 여부	10	100
		과채 발효식초 제조공정 확립	발효식초 제조공정 확립 여부	5	100
	과채 발효음료 제품의 대사증후군 개선효과 및 작용기전 규명	<i>In vitro</i> 에서 발효식초 및 과채 발효음료의 대사증후군 개선효과 측정	개선효과 측정 여부	5	100
		과채 발효음료의 대사증후군 개선효과 규명	개선효과 규명 여부	20	100
합 계				100	100

나. 관련분야 기여도

- 본 연구에서 발효식초 및 과채 발효음료 제조 기술 노하우를 습득함으로써 다양한 소재를 활용한 발효 제품 개발 가능성을 제시하였음.
- 과채 발효음료의 우수성을 입증함으로써 과채 발효음료의 소재로써 활용가치가 높은 국내 채소·과일을 지속적으로 발굴하여 농가 소득 증대에 기여하고자 함.
- 본 연구에서 과채 발효음료의 인슐린저항성 및 항산화 개선효과를 규명하였고 이는 후속 연구에 필요한 기초자료로 활용될 수 있을 것임.
- 대사증후군 환자가 부담없이 마실 수 있는 음료의 개발로 의료비 절감에 기여하고 삶의 질 향상에 기여할 것임.
- 과채 발효음료의 우수성에 대한 과학적 근거 자료를 제공함으로써 제품 마케팅에 적극적으로 활용하여 주스 판매 촉진에 기여할 수 있을 것임.
- 발효식초를 함유한 과채 발효음료의 특성 및 안전성과 관련된 자료를 제공함으로써 이를 바탕으로 발효 제품 개발의 사업 활성화에 기여할 수 있을 것임.
- 기존 착즙주스에 발효식초를 첨가한 차별화된 제품의 개발로 착즙주스 시장 활성화에 기여할 것으로 기대됨
- 아직 생소한 국내 신선 과채류 음료 시장의 활성화를 위해서는 소화기관이 약한 소비자를 위한 안전성 확보 기술이 필요한데 본 연구의 결과가 미래 건강 지향적 간편 채소 및 과일 혼합 음료 시장의 확장에 기여할 것으로 예상됨.

5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<p>○ 추가연구 및 타연구에의 활용 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구에서 개발된 과채 발효음료는 40대 이상의 소비자에 있어서 선호도가 높은 것으로 나타났음. 따라서 생리활성이 우수하면서 다양한 연령대에서 섭취할 수 있는 과채 발효음료 개발이 필요함. 본 연구 결과를 바탕으로 발효식초와 혼합시 거부감 없이 섭취할 수 있는 과채주스의 소재를 발굴하고 레시피를 개발하기 위한 연구가 필요한 것으로 사료됨. - 과채 주스의 저장기간 연장 및 관능적 특성 유지를 위해 비가열초고압(HPP) 살균처리 방법이 우수함을 확인하였음. 그러나 소재에 따라 HPP 처리는 맛, 색 등을 변화시켜 기호도를 낮출 수 있음. 따라서 소재별 HPP 처리에 의한 품질 특성 및 관능적 특성, 생리활성 변화 등에 대한 연구를 수행하여 HPP 처리 조건을 확립하고 이를 제품 개발에 적용시키기 위한 연구가 필요한 것으로 사료됨. <p>○ 기업화 추진 방안</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구에서 개발한 과채 발효음료의 소비자 만족도를 지속적으로 모니터링하고 개선사항을 적극 반영하여 소비자들이 니즈를 충족시키는 제품으로 확립하고자 함. - 휴롬은 온라인 및 배달을 통해 주스 및 음료를 판매할 계획으로 발효 과채 음료는 스페셜주스(건강 기능 주스 카테고리)로서 일반 주스보다 고가인 7,800원에 판매할 예정임. 		

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<p>○ BALB/c mice에 있어서 코코넛, 파인애플 등 과일주스 식초의 급성 및 아만성 독성시험을 실시한 결과 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났음. 식초에 함유된 페놀산은 항산화 효과 및 면역력을 개선시킨다고 보고하였음(Mohamad NE, Yeap SK, Beh BK, Romli MF, Yusof HM, Kristeen-Teo YM, Sharifuddin SA, Long K, Alitheen NB. Comparison of in vivo toxicity, antioxidant and immunomodulatory activities of coconut, niphah and pineapple juice vinegars. <i>J Sci Food Agric</i> 98: 534-540, 2017)</p> <p>○ 식초와 초산이 케양성 대장염에 미치는 예방 효과를 연구하였음. 식초(5% v/v) 및 초산(0.3% w/v) 처리는 질병 활성 지수 및 조직 병리학적 점수를 유의적으로 감소시켰으며, 체중 감소를 약화시키고 결장 길이를 단축시켰음. 또한, 식초 섭취시 대변에서 유산균 및 초산균의 수가 증가하고 대장균 수가 감소하였음(F. Shen, J. Feng, X. Wang, Z. Qi, X. Shi, Y. An, Q. Zhang, C. Wang, M. Liu, B. Liu and L. Yu. Vinegar Treatment Prevents the Development of Murine Experimental Colitis via Inhibition of Inflammation and Apoptosis. <i>J Agric Food Chem</i> 64: 1111-1121, 2016).</p>		

- 고지방/콜레스테롤 식이를 섭취하는 햄스터에게 black vinegar을 저농도(0.13 g/kg BW), 고농도(0.26 g/kg BW) 수준으로 9주간 섭취시킨 결과 분변 지질 농도는 증가, 간조직 및 혈액 지질 농도는 감소시켰고, 항산화능을 개선시키는 것으로 나타났음(Chou CH, Liu CW, Yang DJ, Wu YS, Chen YC. Amino acid, mineral, and polyphenolic profiles of black vinegar, and its lipid lowering and antioxidant effects *in vivo*. *Food Chem* 168: 63-69, 2015.)
- 만성 알코올성으로 인한 간 손상에 헛개나무 주스와 발효식초가 미치는 영향을 연구하였음. 에탄올(50%, v/v, 10 mL kg⁻¹)을 6주 동안 마우스에 투여하여 간 손상을 유도한 후 헛개나무 주스와 발효식초를 처리한 결과 마우스는 항산화제 시스템이 상대적으로 높게 관찰되었음. 이는 헛개나무 주스와 발효식초 섭취 시 알코올성 부작용을 줄이는데 유의한 효과를 미치는 것으로 확인됨(Xiang j. et al.. Effect of juice and fermented vinegar from *Hovenia dulcis* peduncle on chronically alcohol-induced liver damage in mice. *Food Funct* 3: 628-634, 2012).
- 제 2형 당뇨병 환자들에게 식초섭취가 식후 혈당 향상을 억제하는지 연구하였음. (CON) 그룹은 75g의 포도당 음료를 마셨고 (VIN) 그룹은 25g 백색 식초(4% 초산)가 든 75g의 포도당 음료를 마셨음. 식후 혈장 인슐린 및 포도당 증가 곡선에서 (CON)과 (VIN) 사이에 유의적인 차이는 관찰되지 않았음. 식초 동시 섭취는 제 2형 당뇨병 환자에게 식후 혈장 포도당 및 인슐린 농도의 상승을 억제하지 않는다고 생각됨(J. W. van Dijk, K. Tummers, H. M. Hamer and L. J. van Loon. Vinegar co-ingestion does not improve oral glucose tolerance in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 26: 460-461, 2012).

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

- 해당사항 없음

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
<p>가. ㈜휴름</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 산업안전보건법 제20조 안전보건관리규정을 작성, 안전보건관리규정에 의거하여 안전 교육 및 시설물을 정기적으로 점검함으로써 연구 활동 종사자와 연구실의 안전을 확보하고 연구자원을 효율적으로 관리하고 있음. ○ 연구활동 종사자의 안전교육 <ul style="list-style-type: none"> - 안전관리 책임자 : 연구실의 일상점검과 정기점검 계획 수립 및 시행, 안전점검 결과 이상시 정밀안전진단 또는 이용제한/폐쇄 등의 안전 조치함. - 연구활동 종사자 : 연구실 안전 유지 및 사고 예방을 위하여 안전관리 규정을 준수하고 안전보건교육을 정기적으로 받고 있음(월 1회). 연구 활동 전 안전점검 실시 및 적절한 개인보호구를 착용함. ○ 시약 및 연구실 폐기물의 관리 <ul style="list-style-type: none"> - 안전표시 부착 : 유해위험성 물질 등에 대한 안전 표식, 안전수칙 등을 부착함. - 구급용품의 비치 : 응급처치를 위한 구급함 비치 - 시약 등의 관리 : 물질보건안전자료(Material Safety Data Sheet, MSDS)를 작성한 후 연구실에 비치함. - 연구실 폐기물 처리 : 유해화학 폐기물은 별도로 수집, 실험 고형 폐기물은 종류별로 분류 배출, 감염성 폐기물은 별도 처리 요청함. - 안전시설 : 화재와 폭발을 대비한 소화설비 설치함. ○ 건강검진 <ul style="list-style-type: none"> - 연구활동 종사자에 대한 일반건강검진 및 특수건강검진을 연 1회 실시함. <p>나. 인제대학교</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 과학기술정보통신부 ‘연구실 안전 환경 조성에 관한 법률’에 의거하여 시행된 교내 연구실 안전교육을 이수하였음. ○ 연구활동 종사자의 안전교육 <ul style="list-style-type: none"> - 안전관리 책임자 : 연구실의 일상점검과 정기점검 계획 수립 및 시행, 안전점검 결과 이상시 정밀안전진단 또는 이용제한/폐쇄 등의 안전 조치함. - 연구활동 종사자 : 연구실 안전 유지 및 사고 예방을 위하여 안전관리 규정을 준수하고 안전교육을 정기적으로 받고 있음(연 2회). 연구 활동 전 안전 점검 실시 및 적절한 보호장비를 착용함. 	

- 연구실 안전 환경관리 (인제대학교 방재연구센터에서 제시한 연구실 안전환경관리 방법에 따라 연구실 안전관리를 이행하였음).
 - 일일점검 및 일상점검: 일일점검은 일일점검표를 매일 연구 활동 전에 작성하여 연구실 책임자의 서명을 받은 후 실험실별로 보관하였고, 일상점검은 주 1회 실시하였음.
 - 정기점검: 방재연구센터에서 외부 기관과 위탁하여 점검하였음(연 1회)
- 시약 및 연구실 폐기물의 관리
 - 안전표시 부착 : 유해위험성 물질 등에 대한 안전 표식, 안전수칙 등을 부착함.
 - 구급용품의 비치 : 응급처치를 위한 구급함 비치
 - 시약 등의 관리 : 물질보건안전자료(Material Safety Data Sheet, MSDS)를 작성한 후 연구실에 비치함.
 - 안전시설 : 화재와 폭발을 대비한 소화설비 구비되어 있음.
 - 인제대학교(김해캠퍼스) 2017년도 연구실 지정폐기물 처리절차에 따라 폐기물을 관리하였음.

※ 인제대학교(김해캠퍼스) 2017년도 연구실 지정폐기물 처리절차

- ① 혈액 및 혈액생성물(혈청, 혈장, 혈액제제)은 조직물류 폐기물(액상)으로 구분된다.
- ② 조직물류 폐기물(액상)은 조직물류액상폐기물이 표시된 용기에 폐기하여 반드시 의료폐기물 보관창고의 폐기물 냉장고 안에 보관한다.
- ③ 지정용기는 매주 화요일 오후 2시부터 2시 30분, 인제대학교(김해캠퍼스) B동 001호 앞에서 배포한다.

다. 경상대학교

- 연구실안전지원센터의 연구실 안전수칙에 따름
 - 실험실에서는 연구책임자의 지도하에 실험을 수행하여야 한다.
 - 실험을 하기 전에 실험절차를 정확히 인지하고, 성실한 자세로 실험을 해야 한다.
 - 실험안내서의 절차나 연구책임자의 지시에 따라 실험기구를 사용하도록 한다.
 - 어떠한 사소한 사고나 실험기구의 파손이라도 연구책임자에게 즉시 알리고 뒷처리가 완료된 후 실험해야 한다.
 - 가열, 가압, 화합물질 취급 등 위험성이 있는 실험을 할 때는 실험복, 보호안경 등 적절한 보호구를 착용한다.
 - 취급주의를 요하는 실험기구, 전기기기, 시약 등에 대하여는 눈에 띄도록 반드시 '취급주의 안전표지'를 부착하여야 한다.
 - 젖은 손이나 물기가 있는 실험기구는 전기기기에 접촉시키지 말아야 한다.
 - 화학약품에 대한 맛보기, 냄새맡기, 만지기를 함부로 해서는 안되며 젖은 손이나 물기가

있는 실험기구는 전기기기에 접촉시키지 말아야 한다.

- 유독한 기체가 발생할 때에는 반드시 환기가 잘 되는 후드에서 실험해야 한다.
- 유독성 액체 시약은 피펫이나 스포이드 등을 이용하여 취급하여야 하며, 피펫을 사용할 때에는 입으로 직접 빨아올려서는 안 된다.
- 가연성 물질(알코올, 가스 등)을 사용하는 실험은 화재와 폭발에 유의해야 한다.
- 섬광, 용접불꽃 등을 직접 육안으로 가까이에서 관찰해서는 안 된다.
- 유리관, 온도계를 고무마개에 꽂을 때 무리한 힘을 가하지 않도록 하며, 물이나 글리세린을 묻혀 수건이나 장갑을 끼고 꽂는다.
- 시약은 반드시 라벨을 확인하고 사용하되, 남은 시약은 다시 시약병에 넣지 말아야 하며, 지정된 폐액용기에 분리하여 배출하여야 한다.
- 유해물질(벤젠, 수은 등)은 반드시 연구책임자의 승인을 득한 후 사용해야 한다.
- 화상이나 상처를 입었을 때에는 신속히 응급처치하고 전문의의 치료를 받아야 한다.
- 발화점이 낮은 물질(인, 황 등)은 직사광선을 피하고, 특정한 장소에 보관하여야 한다.
- 강산이나 염기성 용액은 반드시 연구책임자의 철저한 지도하에 다루어야 한다.
- 실험실은 통풍이 잘 되어야 하고, 항상 소화기를 비치해야 한다.
- 실험이 끝나면 모든 기구나 실험 장치는 본래 상태로 정돈하고, 항상 얼굴·손 등을 깨끗이 씻는다.

○ 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「산업안전보건법」 등 관련 법령에 따른 연구실 등의 안전조치(직원 교육, 안전장치 설치, 장비 검사 등) 계획을 적시

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	D-12	
								사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	특허	케일식초와 그 제조방법 및 항비만 효과를 나타내는 케일식초를 포함하는 조성물	(주)휴롬		대한민국		2017.12.26 (출원일)		
2	특허	당근 발효 식초 제조방법 및 이를 포함하는 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물	인제대학교 바이오식품 과학부		대한민국		2017.12.28. (출원일)		
3	논문	채소류를 혼합한 블랙베리(<i>Rubus fruticosus L.</i>) 식초의 발효 특성	경상대학교	교신 저자	경상대학교 농업생명 과학연구지		2017	단독사사	심사 중
4	논문	당근식초의 항산화활성 및 취장리파아제 저해활성	인제대학교 바이오식품 과학부	교신 저자	한국 생물공학회			단독사사	투고 중
5	기타/ 학술 대회 발표	Inhibitory activities of fermentation products of blackberry juice against pancreatic lipase and α -glucosidase <i>in vitro</i>	(주)휴롬		한국 영양학회		2016.10.21. (발표일)		
6	기타/ 학술 대회 발표	Inhibitory activities of alcoholic fermentation product of fruit and vegetable juices against α -glucosidase and pancreatic lipase <i>in vitro</i>	인제대학교 바이오식품 과학부		한국식품 영양과학회		2016.11.02. (발표일)		
7	기타/ 학술 대회 발표	Development of fruit and vegetable mixed fermented liquor without additives	경상대		한국식품 영양과학회		2016.11.02. (발표일)		
8	기타/ 학술 대회 발표	Antioxidative effects of alcoholic fermentation product using fruit and vegetable juices	(주)휴롬		한국 식품과학회		2017.06.21. (발표일)		

9	기타/학술대회 발표	Antioxidant activity of alcoholic fermentation product of fruit and vegetable juices <i>in vitro</i>	인제대학교 바이오식품 과학부		한국 식품과학회		2017.06.23. (발표일)		
10	기타/학술대회 발표	Inhibitory activity of kale vinegar against pancreatic lipase <i>in vitro</i>	인제대학교 바이오식품 과학부		한국식품 조리과학회		2017.10.13. (발표일)		
11	기타/학술대회 발표	Physicochemical quality and antioxidant compounds of fruit and vegetable juice with vinegar	(주)휴롬		한국 영양학회		2017.11.03. (발표일)		
12	기타/학술대회 발표	Inhibitory effects of juice containing vinegar on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells	(주)휴롬		한국식품 영양과학회		2017.11.08. (발표일)		

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
○ Blois MS. Antioxidant activity determination by the use of a stable free radical. <i>Nature</i> . 181: 1199-1200 (1958)		
○ Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha. <i>Biosci Biotech Biochem</i> . 61: 177-178 (1997)		
○ Arai I, Amagaya S, Komatsu Y, Okada M, Hayashi T, Kasai M, Arisawa M & Momose Y. Improving effects of the extracts from <i>Eugenia uniflora</i> on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. <i>J Ethnopharmacol</i> . 68: 307-314 (1999)		
○ Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. <i>Anal Biochem</i> . 95: 351-358 (1979)		
○ Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. <i>Arch Biochem Biophys</i> . 82: 70-77 (1959)		
○ Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the		

- oxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 47: 469-474 (1974)
- Aebi H. Catalase in vitro in *Method in Enzymology*. Academic Press, Glando, Florida. 105: 121-126 (1984)
 - Lawrence RA, Burk F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biophys Res Conmm.* 425: 503-509 (2012)
 - Kang J, Li Z, Wu T, Jenen GS, Schauss AG and Wu X. 2010. Antioxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp(*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chem.* 122: 610-617
 - Ismail A, Marjan ZM and Foong CW. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem.* 87: 581-586
 - Park HJ, Jeong SH, Kim HR and Song JY. 2015. Quality characteristics and functional components analysis of berries juice. *Korean Herb, Med. Inf.* 3: 43-54
 - Choi HS, Kim MK, Park HS and Shin DH. 2005. Changes in physicochemical characteristics of bokbunja(*Rubus coreanus* Muq.) wine during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 573-578
 - Kim YS, Jeong DY and Shin DH. 2008. Optimum fermentation conditions and fermentation characteristics of mulberry(*Morus alba*) wine. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 63-69
 - Jeong SY. 2004. Quality characteristics of blackberry wine. M.S. Thesis, Chonbuk national university, Jeonbuk
 - Oh HH, Jang SW, Jun HI and Jeong DY. 2017. Production of concentrated blueberry vinegar using blueberry juice and its antioxidant and antimicrobial activities. *J. Korean soc. Food Sci. Nutr.* 46: 695-702
 - Kim KO, Kim SM, Kim SM, Kim DY, Jo DJ, Yeo SH, Jeong YJ and Kwon JH. 2013. Physicochemical properties of commercial fruit vinegars with different fermentation methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 736-742
 - Lee JH and Oh MM. 2015. Short-term low temperature increases phenolic antioxidant levels in kale. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 56: 588-596
 - Elyana CM, Miriam RA, Silke H and Peter W. 2011. Anthocyanin composition of black carrot(*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) cultivars antonina, beta sweet, deep purple, and purple haze. *J. Agric. Food Chem.* 59: 3385-3390
 - Liu DH, Shi J, Ibarra AC, Kakuda Y and Xue SJ. 2008. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT-Food Sci. Technol.* 41: 1344-1349
 - Ra KS, Suh HJ, Chung SH and Son JY. 1997. Antioxidant activity of solvent extract from onion skin. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29: 595-600

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품 기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.