토종발효미생물을 이용한 오디 발효주의 항산화 활성 및 향기성분 분석

채규서 · 정지혜 · 윤해훈 · 손락호

(재)고창복분자연구소

Antioxidant Activity and Main Volatile Flavor Components of Mulberry Wine Fermented with *Saccharomyces cerevisiae* B-8

Kyu Seo Chae, Ji Hye Jung, Hae Hoon Yoon, and Rak Ho Son

Gochang Black Raspberry Research Institute

ABSTRACT This study was carried out to develop mulberry wines fermented with traditional microorganisms (*Saccharomyces cerevisiae* B-8). *S. cerevisiae* B-8 is a traditional fermentation microorganism isolated from domestically grown *Rubus occidentalis*. Each *S. cerevisiae* B-8 and Fermivin was inoculated into mulberry up to 1×10^9 CFU/kg, followed by incubation at 25°C for 10 days. Mulberry fermented with *S. cerevisiae* B-8 (MBB) had a high alcohol content (16.47%), and the fermentation rate of MBB was faster than that of mulberry fermented with Fermivin (MBF). The total polyphenol and flavonoid contents of MBB were higher than those of MBF. DPPH radical scavenging activity of MBB was as high as that of MBF. ABTS radical scavenging activity of MBF was higher than those of MBB and mulberry juice (MBJ). In addition, reducing power of MBB was much higher than other samples. Flavor constituents of the two fermented wines were analyzed by gas chromatography and mass spectrometry. Twenty-three compounds from the sample were separated and identified as fifteen esters, six alcohols, an aldehyde, and an acetate. Particularly, tetradecanoic acid, ethyl ester of orris and violet flavor were ten times more abundant in MBB than in MBF. Several ester components were two times more abundant in MBB than in MBF. In conclusion, current findings indicate that MBB might have better antioxidant activities with flavor, which contributes to improved wine production with high quality and function.

Key words: mulberry, antioxidant activity, flavor component, traditional microorganism, fermentation

서 론

최근 수많은 식품소재들의 건강증진 효능 및 질병예방 효과가 밝혀지면서 소비자들은 과거 식품이 갖는 영양소 공급을 위한 1차적 기능을 넘어 식품의 생리활성 측면에 대한 관심이 증대되고 있다(1). 그중에서 과실에는 강력한 항산화 효과를 가지는 여러 가지 생리활성 성분, 즉 비타민, 카로티노이드 및 플라보노이드와 같은 페놀성 화합물이 많이 존재하는 것으로 알려지고 있는데, 이러한 성분들은 산화적 스트레스에 의해 발생하는 항산화, 항염, 위장관의 위액 분비 조절과 설사예방, 당뇨예방, 암, 심장병 및 퇴행성 질병들의 예방과 감소에 크게 기여한다고 보고되고 있다(2-4). 산화적 스트레스를 유발하는 free radical은 수많은 화합물의 화학적 반응 및 여러 가지 산화, 환원 반응 등 내적 요인과 흡연, 음주, 스트레스, 대기오염 등 외적 요인에 의해 생성되며, 생체 내에서 free radical 반응에 의해 생성되는 활성산

소종(reactive oxygen species, ROS)은 DNA 분절과 단백질의 불활성화 및 과산화 반응을 일으켜 생체기능을 저하시킴으로써 여러 질환을 유발하는 원인이 된다(5-7). 대표적인 항산화 음식으로 알려져 있는 와인은 생활수준의 향상과 여성의 사회진출, 저가의 와인 공급 등으로 대중화를 불러왔으며(8), 와인의 다양한 생리활성이 검증되면서 단감(9), 오디(10,11), 머루(12), 살구(13) 등 다양한 원료를 이용한 와인과 관련된 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

오디(*Morus alba*, mulberry)는 뽕나무과(Moraceae) 뽕나무속(*Morus*)에 속하는 낙엽 활엽교목의 성숙한 열매로 검은색 또는 자홍색을 띠고, 5월에서 6월에 채취하여 식용으로 이용하거나 한약재로 사용하기도 한다(14). 오디는 '상심자'로 불리며 백발을 검게 하고 소갈(당뇨)을 덜어주며 오장을 이롭게 하는 자양강장제뿐만 아니라 빈혈, 고혈압, 관절통 및 대머리 치료제로써 사용되고 있으며(15), 다량의 안토시아닌계 및 naphthoquinone계 색소를 함유하고 있다. 현재까지 오디에 대한 기능성 연구로는 오디의 항당뇨 효과(16), 뽕나무 오디추출물의 항염증 항산화 작용에 대한 생리활성에 관한 연구(17), 꾸지뽕나무의 폴리페놀 함량과 항산화 효과(18), 뽕나무와 꾸지뽕나무의 수용성 추출물에 의한

Received 28 February 2014; Accepted 12 May 2014

Corresponding author: Rak Ho Son, Gochang Black Raspberry Research Institute, Gochang, Jeonbuk 585-943, Korea
E-mail: sonnaco@hanmail.net, Phone: +82-63-560-5191

항산화 활성 연구(19), 품종이 다른 오디추출물의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균 활성 및 항산화 효과(20), 오디 추출물의 신경세포 보호 활성 및 항균 활성(21), 오디 추출물의 알코올 분해능 및 항산화 효과(22) 등의 오디 및 그 추출물에 대한 기능성 연구가 많이 보고되었다.

과실 발효주는 원료의 특성이 품질에 가장 큰 영향을 미치지만 발효에 사용되는 효모에 따라서는 품질의 차이가 나타난다. 따라서 오디 발효주에 적합한 효모의 선택은 오디 발효주의 맛과 품질 특성을 결정하는 중요한 요소이다. 대표적인 과실주인 포도주 생산 시 사용되는 효모 대부분은 *Saccharomyces cerevisiae*이며 다른 효모에 비하여 가장 많은 알코올을 생산하는 효모라고 보고된 바 있다(23,24).

본 연구에서는 다양한 생리활성이 알려지면서 관심과 활용 가치가 높아진 오디를 이용하여 국내 복분자로부터 분리된 토종발효미생물인 *S. cerevisiae* B-8(KCCM11415)과 대조군으로 현재 상업적인 주류 제조에 많이 사용되는 *S. cerevisiae* Fermivin을 이용하여 발효주를 제조한 후, 이에 대한 품질 특성 확인 및 항산화 활성을 비교하고 향기성분을 분석하여 토종발효미생물(*S. cerevisiae* B-8)을 이용한 오디 발효주의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 오디(과상2호)는 전라북도 고창군에서 2012년에 수확한 것을 구입하여 -40°C에서 냉동 보관하여 사용하였다. 보당에 사용된 설탕은 (주)삼양사(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 발효에 사용된 효모는 시판건조효모 *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin(DSM Food Specialties, B.V., Heerlen, Netherlands)과 순창군발효미생물관리센터(Sunchang Research Center for Fermentation Microbes, Sunchang, Korea)가 국내 복분자로부터 분리한 토종발효미생물인 *Saccharomyces cerevisiae* B-8(기탁번호 KCCM11415)을 분양받아 사용하였다.

발효주 제조

오디의 발효에 사용한 효모 *S. cerevisiae* B-8은 YPD (1% bacto yeast extract, 2% bacto peptone, 2% dextrose) 배지(Difco, Sparks, MD, USA)를 사용하여 25°C에서 48시간 동안 진탕 배양한 후 10,000×g에서 10분간 원심 분리 하여 얻은 균체를 사용하였다. 또한 시판건조효모 Fermivin은 계량하여 15% 설탕용액에 20°C에서 10~15분간 배양한 후 활성화시켜 발효에 사용하였다.

오디 발효주 제조 과정은 오디 10 kg을 으갠 뒤 설탕을 2.0 kg(과실 무게의 20%)을 넣어 보당 한 후 Fermivin 및 *S. cerevisiae* B-8을 오디 1 kg당 약 1×10^9 CFU가 되도록 접종하여 교반해준 다음 25°C에서 8~11일 동안 발효시켰으며, 발효가 완료된 오디 발효주는 유압압착기(Stainless

70L, Tomotech Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 1차 여과하였고 그 다음 -5°C에서 2일 동안 냉동 보관하여 pore size 1.2 µm membrane filter를 사용하여 여과하였다.

발효 특성

알코올 함량은 알코올 분석기 세트(Alcoholizer wine, Anton Paar, Graz, Austria)를 이용하여 측정하였으며, 당도는 상온에서 굴절계(PAL-1 Pocket Refractometer, ATAGO, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. pH는 pH meter(S20, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)로 측정하였으며, 총 산도는 AOAC 방법(25)에 의해 오디 발효주 10 mL를 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.3까지 중화시키는데 소비된 0.1 N NaOH의 소비량으로 정의하였고 citric acid(% w/w)로 표시하였다. 환원당은 dinitro-salicylic acid method에 따라 UV/VIS spectrophotometer(UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하고 표준물질 glucose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 농도별로 제조하여 정량하였다(26).

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

식물체에 존재하는 페놀화합물은 2차 대사산물로서 분자 내에 하나 이상의 hydroxyl기를 가지고 있어서 단백질 및 거대분자들과 결합하는 성질이 있고 2가 금속이온과의 결합력이 우수하며 수소 공여 작용을 통해 free radical을 제거함으로써 항산화 작용과 항암 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(27,28). 총 폴리페놀 함량은 페놀성 물질인 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법(29)을 이용하여 측정하였다. 시료액 1 mL에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 1 mL를 가하고 3분간 반응시킨 다음 10% Na₂CO₃ 1 mL를 넣고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer(UV-2450, Shimadzu Co.)를 사용하여 700 nm에서 비색정량 하였다. 이때 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 사용하여 검량곡선을 작성하고 이로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량은 Davis 방법(30)을 이용하여 측정하였다. 시료액 1 mL에 diethylene glycol 2 mL, 1 N-NaOH 0.02 mL를 가한 다음 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer(UV-2450, Shimadzu Co.)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 함량은 rutin(Sigma-Aldrich Co.)을 표준물질로 사용하여 검량곡선을 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거 활성 측정

DPPH는 아스코르빈산 및 토코페롤, polyhydroxy 방향

족 화합물, 방향족 아민류에 의해 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되어짐에 따라 짙은 자색이 탈색되어지는 원리를 이용하여 다양한 천연소재로부터 항산화 물질 탐색에 이용되고 있다(31). DPPH radical 소거 활성은 Choi 등(32)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉 농도별로 조제한 시료액 0.1 mL에 ethanol 0.2 mL를 가하고 2×10^{-4} M DPPH 용액 0.3 mL를 5초간 vortex mixer로 혼합하여 실온에서 30분간 반응시키고 ELISA (Synergy HT, BioTek, Washington, DC, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신에 ethanol을 첨가하여 실험하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: absorbance of sample, B: absorbance of blank

ABTS radical 소거 활성 측정

ABTS radical을 이용한 항산화 활성의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS radical이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 DPPH 방법과 함께 항산화 활성을 탐색하는데 자주 이용되고 있다(33). ABTS assay는 Arts 등(34)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 농도별로 조제한 시료액 5 μ L에 ABTS radical 용액 195 μ L를 첨가하여 7분간 반응시킨 후 ELISA(Synergy HT, BioTek)를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구는 시료 대신에 ethanol을 첨가하여 실험하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: absorbance of sample, B: absorbance of blank

환원력

환원력은 Oyaizu(35)의 방법을 변형하여 측정하였다. 농도별로 조제한 시료액 1 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6, 2.5 mL)와 1% $K_2Fe(CN)_6$ 2.5 mL를 첨가하고 water bath(50°C, 20 min)에서 반응시켰다. 반응액에 10% trichloroacetic acid 2.5 mL를 첨가하여 원심분리(3,000 $\times$ g, 5 min) 한 후 상등액 2.5 mL를 취한 후 증류수 2.5 mL와 0.1% $FeCl_3$ 0.5 mL를 첨가하여 700 nm(UV-2450, Shi-

madzu Co.)에서 측정하였다.

향기성분 분석

각각의 시료액은 gas chromatography(GC-2010, Shimadzu Co.)에 mass selective detector(240-MS, Shimadzu Co.)를 부착한 GC/MS를 사용하여 각각의 향기성분을 분석하였다. GC에 의하여 분리된 각각의 휘발성 향기성분은 Kovats gas chromatographic pattern을 authentic chemical의 pattern과 비교하였다. 휘발성 향기성분의 GC 분석조건으로 analytical column은 ZB-5MS(0.25 μ m ID $\times$ 60 m, 0.25 μ m film thickness, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA)를 사용하였고, injector 온도는 250°C, oven 온도는 50°C에서 분당 3°C로 250°C까지 올린 후 20 분간 유지하도록 하였다. Carrier gas는 He를 사용하였고 평균 flow rate는 1 mL/min로 고정하였다. 한편 휘발성 향기성분의 동정을 위한 MS의 분석 조건으로 MS ionization voltage는 70 eV, source 온도는 200°C, inter face temperature는 250°C, mass spectrum scan range는 50~500 m/z로 하였다.

통계처리

본 연구의 실험 결과에서 평균과 표준편차는 SPSS program 12.0(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 계산하였고, 최소 유의차 검정(LSD)에 의해 평균 간의 유의차를 95% 유의수준($P < 0.05$)에서 Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

오디 발효주의 발효 특성

토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8과 수입 시판건조효모 Fermivin을 이용한 오디의 발효 특성을 확인하기 위하여 발효 기간에 따른 이화학적 특성을 측정하였다(Table 1, Fig. 1).

본 연구에 사용된 오디의 당도는 12.3°Brix, 환원당 14.77%였으며 과실 무게에 대한 20% 보당 후 당도는 30.4°Brix, 환원당 37.45%였다(Table 1). *S. cerevisiae* B-8의

Table 1. Physicochemical characteristics of mulberry and mulberry wines with fermented using two yeast

Samples		Alcohol content (%, v/v)	Soluble solid (°Brix)	Reducing sugar (%, w/v)	pH	Total acidity (% as citric acid)
Mulberry		0	12.3 $\pm$ 0.03	14.77 $\pm$ 0.06	5.17 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.03
Before primary fermentation		0	30.4 $\pm$ 0.28	37.45 $\pm$ 0.02	5.17 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.01
After primary fermentation ¹⁾	MBF	15.44 $\pm$ 0.10 ^{b2)3)}	11.2 $\pm$ 0.05 ^a	1.79 $\pm$ 0.12 ^a	4.30 $\pm$ 0.17 ^b	0.75 $\pm$ 0.02 ^a
	MBB	16.47 $\pm$ 0.11 ^a	10.5 $\pm$ 0.22 ^b	1.68 $\pm$ 0.05 ^a	4.51 $\pm$ 0.15 ^a	0.45 $\pm$ 0.01 ^b

¹⁾MBF, mulberry fermented with Fermivin; MBB, mulberry fermented with *Saccharomyces cerevisiae* B-8.

²⁾Values are the mean $\pm$ SD (n=3).

³⁾Values within a column (different microorganism) followed by different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

Fig. 1. Changes in quality characteristics (alcohol content, soluble solid, pH, and total acidity) of mulberry wines fermented using two yeast (Fermivin, *S. cerevisiae* B-8) during fermentation time. A: alcohol content, soluble solid of MBF and MBB, B: pH and total acidity of MBF and MBB.

발효 양상은 발효 2일째부터 알코올 생성량이 급격하게 증가하여 5일째에 알코올 생성량 및 당도의 변화가 정지하여 발효 완료 후 최종 알코올 16.47%, 당도 10.5°Brix, 환원당 1.68%로 나타났다. 대조군으로 사용된 Fermivin은 10일째에 발효가 완료되어 이와 비교하였을 때 Fig. 1과 같이 *S. cerevisiae* B-8의 발효 속도가 약 2배 빠르며 최종 알코올 생성량이 약 1% 정도 높은 것으로 확인되었다.

Kim 등(36)에 따르면 오디를 30°Brix로 보당 하여 *S. cerevisiae* KCCM12224를 이용하여 발효하였을 때 14.4%의 알코올을 생성한다고 보고하였으며, 본 실험 결과와 비교 시 *S. cerevisiae* B-8이 약 1~2% 높은 알코올 생성량을 나타내었다. 이는 군주에 따라서 각각 다른 알코올 생성량을 나타내는 것으로 사료된다.

발효기간 동안의 pH 및 산도의 변화는 Fig. 1과 같이 초기 pH 5.17에서 조금씩 감소하였으며 산도는 0.24%에서 발효가 진행됨에 따라 Fermivin은 0.75%, *S. cerevisiae* B-8은 0.45%로 증가하였다. *S. cerevisiae* B-8은 일반적인 과실주의 총산 함량이 0.4~0.6% 정도라는 보고(37)와 일치하는 결과를 보였으나 Fermivin은 이를 벗어나 조금 높은 결과를 보여 B-8이 과실주에 적합한 안정된 산도 값을 보임을 알 수 있었다.

본 연구 결과 빠른 발효 속도 및 우수한 알코올 생성능을 보인 *S. cerevisiae* B-8은 현재 양조 산업에 주로 이용되고

Table 2. The total polyphenol and total flavonoid contents of mulberry juice and mulberry wines

Samples ¹⁾	Total polyphenol content (GAE ²⁾ mg/mL)	Total flavonoid content (RU ³⁾ mg/mL)
MBJ	2.01±0.02 ^{a4)5)}	0.77±0.05 ^a
MBF	1.90±0.02 ^b	0.60±0.02 ^b
MBB	1.97±0.01 ^a	0.57±0.01 ^b

¹⁾MBJ, mulberry juice; MBF, mulberry wine fermented with Fermivin; MBB, mulberry wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* B-8.

²⁾Total polyphenol contents was expressed as mg gallic acid (GAE) per 100 gram.

³⁾Total flavonoid contents was expressed as mg rutin (RU) per 100 gram.

⁴⁾Values are the mean±SD (n=3).

⁵⁾Values within a column (different microorganism) followed by different superscripts are significantly different at $P<0.05$.

있는 시판효모인 Fermivin을 대신하여 오디 발효주 제조에 산업적으로 사용 가능함을 확인하였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

오디의 착즙액(MBJ)과 시판건조효모 Fermivin으로 발효한 발효주(MBF) 및 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8로 발효한 발효주(MBB)에 대한 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 비교한 결과는 Table 2와 같다. MBJ의 총 폴리페놀 함량은 2.01±0.02 GAE mg/mL의 함량을 나타내었고, MBF가 1.90±0.02 GAE mg/mL, MBB는 1.97±0.01 GAE mg/mL로 Lee 등(38)의 효모 종류를 달리하여 제조한 black raspberry 발효주의 품질 특성 연구에서 군주별로 발효하였을 때 총 폴리페놀 함량이 감소한다는 연구보고와 같은 경향을 보이지만 MBB는 유의적인 차이를 보이지 않을 만큼 높은 함량을 보였으며, MBF는 유의적으로 함량이 감소하여 MBF에 비해 MBB가 상대적으로 높은 함량을 가진다.

지질과산화에 대한 항산화제(39)로 알려져 있는 총 플라보노이드의 함량을 비교한 결과도 오디생과를 착즙한 MBJ가 0.77±0.05 RU mg/mL로 가장 높은 함량을 보였고, MBF가 0.60±0.02 RU mg/mL, MBB는 0.57±0.01 RU mg/mL로 두 종류의 발효주 모두 발효하였을 때 총 플라보노이드 함량이 총 폴리페놀과 같이 감소하는 경향을 보였으며, 두 종의 발효주 간의 함량에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

DPPH radical 소거 활성 측정

오디의 착즙액과 시판건조효모 Fermivin 및 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8을 이용하여 발효한 발효주의 DPPH radical 소거 활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. MBJ의 IC₅₀ 값은 114.60±3.19 µL/mL의 활성을 나타냈으며, MBF가 70.86±0.79 µL/mL, MBB는 73.62±0.37 µL/mL로 활성이 1.5배 이상 증가하여 발효 후에 오디 착즙액보다 우수한 활성을 보였다. 이러한 결과는 Joo 등(40)의 연구에서

Table 3. Comparison of IC₅₀ values of DPPH and ABTS radical scavenging activity of mulberry juice and mulberry wines

Samples ¹⁾	DPPH radical scavenging activity	ABTS radical scavenging activity
	(IC ₅₀ μ L/mL) ²⁾	
MBJ	114.60 $\pm$ 3.19 ^{a3)4)}	20.72 $\pm$ 0.30 ^a
MBF	70.86 $\pm$ 0.79 ^b	19.90 $\pm$ 0.19 ^b
MBB	73.62 $\pm$ 0.37 ^b	19.16 $\pm$ 0.25 ^c

¹⁾Samples are the same as in Table 2.²⁾Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determinations, obtained by interpolation of concentration inhibition curve.³⁾Values are the mean $\pm$ SD (n=3).⁴⁾Values within a column (different microorganism) followed by different superscripts are significantly different at $P<0.05$.

과즙보다 와인에서 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다는 보고와 같은 경향을 보였으며, Kwon(41)의 오디 발효 추출물의 항산화 효과 연구에서 추출물보다 발효물에서 활성이 증가하였다는 결과와도 일치하였다. 이는 발효를 통해 생성된 대사산물이나 성분변성이 유효성분으로 작용하여 활성이 증가한 것으로 생각된다. 또한 MBF의 DPPH 소거 활성이 MBB보다 높은 활성을 보였으나 유의적인 차이는 없어, 시판건조효모인 Fermivin으로 제조한 발효주와 비교해도 토종발효미생물로 제조한 발효주의 우수한 활성을 확인하였다.

ABTS radical 소거 활성 측정

오디 착즙액과 시판건조효모 Fermivin 및 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8을 이용하여 발효한 발효주의 ABTS radical 소거 활성을 측정한 결과는 Table 3과 같이 발효 후 활성이 증가하는 것을 확인하였다. MBF의 IC₅₀ 값은 19.90 $\pm$ 0.19 μ L/mL로 발효 후 활성이 증가하였으며, MBB가 19.16 $\pm$ 0.25 μ L/mL로 유의적으로 가장 높은 활성을 보였다. 결론적으로 MBB는 양이온 radical인 ABTS에 잘 반응하는 항산화 물질이 많을 것으로 생각되었으며(42), 오디를 토종발효미생물인 *S. cerevisiae* B-8로 발효한 오디 발효주가 시판건조효모로 발효한 발효주보다 더 높은 활성을 보여 토종발효미생물인 *S. cerevisiae* B-8의 활용 가능성을 확인하였다.

환원력

과산화의 전구물질과 반응하여 과산화 형성을 억제하는

(43) 환원력을 확인하였다. 오디 착즙액과 시판건조효모 Fermivin 및 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8을 이용하여 발효한 발효주의 10, 25, 50, 75, 100 μ L/mL 농도에서 환원력을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 모든 시료에서 농도 의존적으로 활성이 증가하였는데, 이는 Jeong 등(44)의 꾸지뽕나무 열매 추출물의 환원력을 측정한 연구에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 환원력이 농도 의존적으로 증가한다는 보고와 본 실험의 결과가 같은 경향을 보였으며, MBB가 비교 와인인 MBF보다 농도 의존적으로 높은 환원력을 보였다(Table 4).

위의 DPPH radical 소거 활성, ABTS radical 소거 활성, 환원력 등 항산화 활성에 대한 실험 결과, 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8을 이용하여 만든 오디 발효주가 시판건조효모 Fermivin을 이용하여 만든 발효주에 비해 ABTS 소거 활성, 환원력에 대해 더 높은 항산화 활성을 보였고, DPPH radical 소거 활성도 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 높은 활성(73.62 $\pm$ 0.37 μ L/mL)을 보이는 등의 결과로 보아, 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8을 이용하여 발효주를 제조하면 항산화 활성이 우수한 와인으로서의 이용 가치가 높을 것으로 판단된다.

향기성분 분석

위 항산화 실험 결과와 같이 토종발효미생물인 *S. cerevisiae* B-8을 이용한 오디 발효주의 높은 항산화 활성과 함께 향미와 식향에 도움을 줄 수 있는지 확인하기 위해 Fermivin으로 발효한 오디 발효주(MBF)와의 향기성분을 분석·비교하였다. 두 종의 효모를 이용하여 발효한 발효주의 향기성분을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 오디 발효주에서 분석된 23개의 휘발성분은 술의 향기성분에 크게 관여하는 과일향이나 와인향의 풍미를 지닌 ester류 15종과 바나나, 배향의 acetate류 1종, aldehyde류 1종과 술의 주성분인 ethyl alcohol을 제외한 alcohol 6종이 분석되었다. MBF와 MBB의 주요 향미 성분인 15종의 ester류 화합물은 포도주향을 지니는 ethyl caprylate와 달콤하면서 견과류향(45)을 나타내는 decanoic acid, ethyl ester가 MBF보다 MBB에서 2배 이상 높은 함량을 보였으며, 특히 부드럽고 orris, violet과 같은 oil 특성(46)을 나타내는 tetradecanoic acid, ethyl ester는 MBF보다 MBB가 약 10배 많은 함량을 보였다. 그 밖에 파인애플향의 butanoic acid, ethyl ester와 사과향을 지닌 hexanoic acid, ethyl ester 그리고

Table 4. Reducing power of mulberry juice and mulberry wines

Samples ¹⁾	10 μ L/mL	25 μ L/mL	50 μ L/mL	75 μ L/mL	100 μ L/mL
MBJ	0.257 $\pm$ 0.019 ^{b2)3)}	0.675 $\pm$ 0.023 ^a	1.310 $\pm$ 0.029 ^a	1.945 $\pm$ 0.034 ^a	2.564 $\pm$ 0.035 ^a
MBF	0.251 $\pm$ 0.008 ^b	0.583 $\pm$ 0.005 ^c	1.110 $\pm$ 0.008 ^c	1.639 $\pm$ 0.011 ^c	2.184 $\pm$ 0.024 ^c
MBB	0.290 $\pm$ 0.017 ^a	0.626 $\pm$ 0.009 ^b	1.180 $\pm$ 0.011 ^b	1.724 $\pm$ 0.009 ^b	2.248 $\pm$ 0.030 ^b

¹⁾Samples are the same as in Table 2.²⁾Values are the mean $\pm$ SD (n=3).³⁾Values within a column (different microorganism) followed by different superscripts are significantly different at $P<0.05$.

Table 5. Comparison of volatile components of mulberry wine fermented with traditional microorganism and Fermivin

Compound name	MBF		MBB	
	R.T. ¹⁾	Area	R.T.	Area
Isoamyl alcohol	9.08	10,731,901	9.05	35,205,118
Butanoic acid, ethyl ester	10.36	1,200,583	10.35	1,512,074
N-Amyl alcohol	10.57	854,431	—	—
1-Hexanol	13.96	517,128	13.97	798,718
Isoamyl acetate	14.24	456,286	—	—
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	19.13	5,530,418	17.50	8,086,915
Benzaldehyde	18.83	645,203	18.83	2,513,630
Hexanoic acid, ethyl ester	20.61	1,058,130	20.62	1,260,305
Ethyl 2-hydroxy-4-methylvalerate	23.73	245,828	—	—
Ethyl enanthate	25.83	88,527	25.85	116,364
Benzoic acid, ethyl ester	29.75	73,589	—	—
Diethyl butanedioate	29.98	1,649,692	29.99	1,807,881
1-Isopropyl-4-methyl-3-cyclohexen-1-ol	30.38	220,427	—	—
Terpinenol-4	—	—	30.39	121,273
Ethyl caprylate	30.88	831,610	30.89	1,845,341
Nonanoic acid, ethyl ester	35.67	115,902	—	—
Decanoic acid, ethyl ester	40.18	308,192	40.18	650,672
Propanedioic acid, methyl-, bis(1-methylpropyl) ester	43.69	110,534	43.69	121,258
Butanedioic acid, methyl-, bis(1-methylpropyl) ester	—	—	47.79	263,911
Dodecanoic acid, ethyl ester	48.48	289,728	48.48	350,292
Trimethylsilyl 2,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]benzoate	—	—	49.70	309,380
Tetradecanoic acid, ethyl ester	55.93	154,328	55.93	1,510,064
Hexadecanoic acid, ethyl ester	62.69	305,109	62.69	777,387

Samples are the same as in Table 1.

¹⁾Retention time.

와인 향기를 지닌 ethyl enanthate, 부드러운 waxy 향의 hexadecanoic acid, ethyl ester 등 대부분 술의 향미에 크게 관여하는 ester류 화합물이 MBF보다 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8로 발효한 발효주인 MBB에서 더 높은 함량을 보였다. 이와 같은 오디 발효주의 향기성분 분석 결과 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8은 시판효모인 Fermivin으로 발효한 발효주보다 풍미나 식향을 향상시킬 수 있는 대부분의 ester류의 함량이 약 2배에서 많게는 약 10배 정도 훨씬 높은 함량을 보여 *S. cerevisiae* B-8로 발효하여 제조한 와인은 식향이나 풍미 향상에 도움을 줄 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8을 이용한 오디 발효주(MBB)와 시판건조효모 Fermivin을 이용한 오디 발효주(MBF)의 발효 품질 특성을 비교하였고, 항산화능을 확인하기 위하여 두 종의 제조된 발효주와 오디생과 착즙액의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 및 DPPH radical 소거 활성, ABTS radical 소거 활성, 환원력을 측정하였다. 또한 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8로 발효한 발효주의 향기성분을 Fermivin 발효주의 향기성분과 비교하여 풍미나 식향에 대한 영향을 분석하였다. *S. cerevisiae* B-8은 국내 복분자로부터 분리된 토종발효미생물이며, 이

와 Fermivin을 각각 오디에 1×10^9 CFU/kg으로 접종하여 25°C에서 10일 동안 발효를 진행하였다. 그 결과 MBF의 최종 품질은 알코올 15.44%, 당도 11.2°Bx, 산도 0.75%로 발효 속도는 MBB보다 약 2배 정도 빠르며 최종 알코올 생성량이 약 1% 정도 높아 우수한 알코올 생성능을 보였다. 총 폴리페놀 함량은 MBF가 1.90 ± 0.02 GAE mg/mL, MBB는 1.97 ± 0.01 GAE mg/mL로 Fermivin보다 토종발효미생물인 *S. cerevisiae* B-8로 발효한 MBB가 가장 높은 함량을 보였고, MBB의 총 플라보노이드 함량(0.57 ± 0.01 RU mg/mL)은 MBF와 비슷한 함량을 보였으며, MBB보다는 감소하는 경향을 보였다. 항산화 활성 검증을 위한 DPPH radical 소거 활성의 IC₅₀ 값을 비교한 결과 오디 착즙액보다 두 종의 발효주의 활성이 증가하였고, MBB(73.62 ± 0.37 µL/mL)와 MBF(70.86 ± 0.79 µL/mL) 간에 유의적인 차이는 없었다. ABTS radical 소거 활성 결과 IC₅₀ 값은 MBB(19.16 ± 0.25 µL/mL), MBF(19.90 ± 0.19 µL/mL), 착즙액 순으로 높은 활성을 보였고, 환원력도 MBB가 MBF보다 농도 의존적으로 높은 활성을 보여 항산화 활성 실험 결과 MBB가 MBF보다 우수한 활성을 보였다. 두 종의 오디 발효주에서 분석된 23개의 휘발성분(Table 4) 중 술의 향기성분에 크게 관여하는 과일향이나 와인향의 풍미를 지닌 ester류 15종과 과일향의 acetate류 1종, aldehyde류 1종과 술의 주성분인 ethyl alcohol을 제외한 alcohol 6종이 분석되었다. Ethyl caprylate와 달콤하면서 견과류 향을 나타내는 decanoic acid,

ethyl ester가 MBF보다 2배 이상 높은 함량을 보였으며, 부드럽고 orris, violet과 같은 oil 특성을 나타내는 tetra-decanoic acid, ethyl ester는 MBF보다 MBB가 약 10배 많은 함량을 보였다. 그 외 술의 향미에 크게 관여하는 ester 류 화합물이 MBB보다 MBF에서 대체적으로 더 높은 함량을 보였다. 결과적으로 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8을 이용한 발효주는 시판되는 Fermivin을 이용한 발효주보다 우수한 향산화 활성을 보였으며, 향기성분 분석 결과 상대적으로 풍부한 ester 화합물을 지니 향미나 식향에도 도움을 줄 것으로 판단되어 토종발효미생물 *S. cerevisiae* B-8의 산업적 활용가치가 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 ‘산업통상자원부’, ‘한국산업기술진흥원’, ‘호남지역사업평가원’의 ‘광역경제권 선도산업 육성사업’으로 수행된 연구 결과의 일부로서 연구비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Han JH, Song YJ, Park SH. 2004. Development of drink from composition with medicinal plants and evaluation of its physiological function in aorta relaxation. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 18: 1078-1082.
- Azuma K, Kakayama M, Koshioka M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Yamauchi Y, Ito H, Higashio H. 1999. Phenolic antioxidant from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J Agric Food Chem* 47: 3963-3966.
- Ham SS, Oh DH, Hong JK, Lee JH. 1997. Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs. *J Food Sci Nutr* 2: 155-161.
- Cho YJ, Ju IS, Kim BC, Lee WS, Kim MJ, Lee BG, An BJ, Kim JH, Kwon OJ. 2007. Biological activity of *Omiya* (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 198-203.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16: 33-50.
- Morrissey PA, O'brien NM. 1998. Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J* 8: 463-472.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
- Jeon HM. 2009. A study on wine selection attributes and behavioral intention by segmentation based on purchase and drinking motive - focused on wine retail shop customers in seoul-. *J Foodservice Management Soc Korea* 12: 29-50.
- Bae SM, Park KJ, Kim JM, Shin DJ, Hwang YI, Lee SC. 2002. Preparation and characterization of sweet persimmon wine. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 45: 66-70.
- Jung GT, Ju IO, Choi DG. 2005. Quality characteristics and manufacture of mulberry wine. *Korean J Food Preserv* 12: 90-94.
- Kim YS, Jeong DY, Shin DH. 2008. Optimum fermentation conditions and fermentation characteristics of mulberry (*Morus alba*) wine. *Korean J Food Sci Technol* 40: 63-69.
- Kang BT, Yoon OH, Lee JW, Kim SH. 2009. Qualitative properties of wild grape wine having different aging periods. *Korean J Food & Nutr* 22: 548-553.
- Jung GT, Ju IO, Ryu J, Choi JS, Choi YG. 2003. Studies on manufacture of wine using apricot. *Korean J Food Preserv* 10: 493-497.
- Park SW, Jung YS, Ko GC. 1997. Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. *J Kor Soc Hort Sci* 38: 722-724.
- Kim SK. 1991. Beneficial medicine, mulberry fruit. In *Bonchohak*. Younglimsa, Seoul, Korea. p 598-605.
- Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS, Moon JY. 1996. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruit. *Korean J Seric Sci* 38: 100-107.
- Kim SY, Park KY, Lee WC. 1998. Antiinflammatory and antioxidative effects of *Morus* spp. fruit extract. *Korean J Medicinal Crop Sci* 6: 204-209.
- Cha JY, Kim HJ, Chung CH, Cho YS. 1999. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 1310-1315.
- Kim HJ, Cha JY, Choi ML, Cho YS. 2000. Antioxidative activities by water-soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43: 148-152.
- Cho YJ, Chun SS, Lee KH, Kim JH, Kwon HJ, An BJ, Kim MU. 2006. Screening of the antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* and antioxidant by extracts from mulberry fruits (*Morus alba* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 15-20.
- Kim HB, Kim SY, Lee HY, Kim SL, Kang SW. 2005. Protective effect against neuronal cell and inhibitory activity against bacteria of mulberry fruit extracts. *Korean J Crop Sci* 50: 220-223.
- Lee EJ, Bae JH. 2011. Study on the alleviation of an alcohol induced hangover and the antioxidant activity by mulberry fruit. *Korean J Food & Nutr* 24: 204-209.
- Kim DS. 1998. *Food fermentation microbiology*. Yu Han Pub. Co., Seoul, Korea. p 250.
- Choi HS, Kim MK, Park HS, Kim YS, Shin DH. 2006. Alcoholic fermentation of *Bokbunja* (*Rubus coreanus* Miq.) wine. *Korean J Food Sci Technol* 38: 543-547.
- AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 32-35.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Lee SY, Shin YJ, Park JH, Kim SM, Park CS. 2008. An analysis of the *Gyungokgo*'s ingredients and a comparison study on anti-oxidation effects according to the kinds of extract. *Kor J Herbology* 23: 123-136.
- Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH, Heo HJ. 2010. Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J Agric Life Sci* 44: 57-66.
- Amerine MA, Ough CS. 1980. *Methods for analysis of musts and wine*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA. p 176-180.
- Chang CC, Yang MH, Chen JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10: 178-182.
- Jeong HS, Han JG, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY, Lee HY. 2009. Antioxidant activities and skin-whitening effects of nano-encapsulated water extract from *Rubus coreanus* Miquel. *Korean J Medicinal*

- Crop Sci* 17: 83-89.
32. Choi JS, Lee JH, Park HJ, Kim HG, Young HS, Mun SI. 1993. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus davidiana*. *Kor J Pharmacogn* 24: 299-303.
 33. Yook HS, Kim KH, Jang SA. 2010. Quality characteristics of grape pomace with different drying methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1353-1358.
 34. Arts MJ, Haenen GR, Voss HP, Bast A. 2004. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food Chem Toxicol* 42: 45-49.
 35. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction-antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
 36. Kim YS, Jeong DY, Shin DH. 2008. Optimum fermentation conditions and fermentation characteristics of mulberry (*Morus alba*) wine. *Korean J Food Sci Technol* 40: 63-69.
 37. Kim YJ, Song GC, Lee YH, Jang GH, Jeong ST, Jeong C. 2012. *Fruit Wine: Science and Application*. Soohaksa, Seoul, Korea. p 384-400.
 38. Lee Y, Kim JC, Hwang KT, Kim DH, Jung CM. 2013. Quality characteristics of black raspberry wine fermented with different yeasts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 784-791.
 39. Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 115-120.
 40. Joo OS, Kang ST, Jeong CH, Lim JW, Park YG, Cho KM. 2011. Manufacturing of the enhances antioxidative wine using a ripe Daebong persimmon (*Dispyros kaki* L). *J Appl Biol Chem* 54: 126-134.
 41. Kwon HN. 2013. The effect of the antioxidant activities of fermented mulberry extracts as cosmetic materials. *J Investigative Cosmetology* 9: 221-227.
 42. Wang M, Shao Y, Li J, Zhu N, Rangarajan M, LaVoie EJ, Ho CT. 1999. Antioxidative phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). *J Nat Prod* 62: 454-456.
 43. Hassas-Roudsari M, Chang PR, Pegg RB, Tyler RT. 2009. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chem* 114: 717-726.
 44. Jeong CH, Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Heo HJ, Shim KH, Cho BR, Bae YI, Choi JS. 2009. *In vitro* antioxidative activities and phenolic composition of hot water extract from different parts of *Cudrania tricuspidata*. *J Food Sci Nutr* 14: 283-289.
 45. Arctander S. 1969. *Perfume and flavor chemicals (aroma chemicals)*. Allured Publishing Co., Carol Stream, IL, USA. Vol I.
 46. Arctander S. 1969. *Perfume and flavor chemicals (aroma chemicals)*. Allured Publishing Co., Carol Stream, IL, USA. Vol II.