



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0120117
(43) 공개일자 2018년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12G 3/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12G 3/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0048597

(22) 출원일자 2018년04월26일

심사청구일자 2018년04월26일

(30) 우선권주장

1020170053503 2017년04월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인

창원대학교 산학협력단

경상남도 창원시 의창구 창원대학로 20(퇴촌동)

(72) 발명자

주우홍

경상남도 창원시 의창구 도계로 69, 세영빌딩 1층
(도계동)

최혜정

경상남도 창원시 의창구 동읍 죽동길45번길 11
(뿔면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

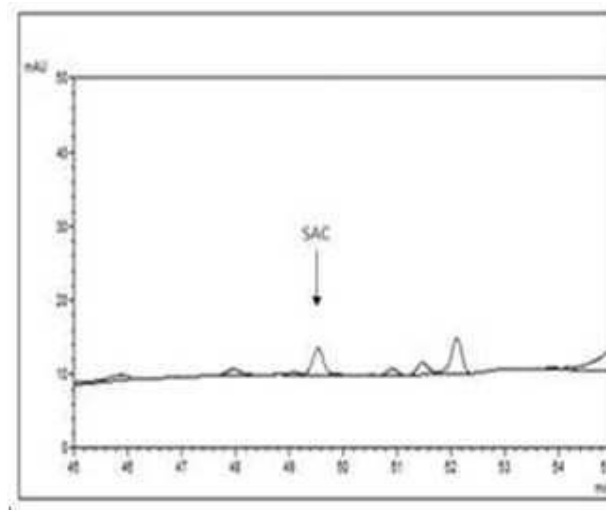
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 S-알릴시스테인 함량이 높은 기능성 흑마늘 와인의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 흑마늘 농축액을 이용한 기능성 지표물질인 S-알릴시스테인(S-allylcysteine, SAC)이 강화된 흑마늘 와인의 제조방법에 관한 것으로, 최적 발효조건에서 흑마늘 농축액을 알코올 발효시킴으로써 S-알릴시스테인의 함량을 증가시킨 기능성 흑마늘 와인을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 S-알릴시스테인 함량이 높은 기능성 흑마늘 와인의 제조방법은 흑마늘 농축액을 회석하고 보당 후 사카로마이세스 세레비지에 퍼미빈(*Saccharomyces cerevisiae* Fermivin)을 접종하여 알코올 발효시켜, 발효 전보다 기능성 지표물질인 S-알릴시스테인이 약 4배 정도 증가된 새로운 형태의 와인을 제공하는 효과가 있다. 상기 S-알릴시스테인은 콜레스테롤 감소, 항고혈당, 항산화, 항암효과가 있어 산업적으로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

신경연

경상남도 김해시 율하1로 130, 908동 701호(율하동, 율현마을 이편한세상 9단지)

류홍건

경상남도 남해군 이동면 남해대로 2450-6

이순기

경상남도 남해군 창선면 창선로86번길 19

류병호

경상남도 남해군 이동면 남해대로 2450-8

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0268799

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 산학협력기술개발

연구과제명 남해산 마늘을 이용한 기능성 명품 흑마늘 와인의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 창원대학교산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 흑마늘 농축액을 준비하는 단계;
- (b) 상기 흑마늘 농축액을 당도가 24 내지 28 brix가 되도록 보당하는 단계; 및
- (c) 상기 (b)단계에서 수득된 흑마늘 농축액에 효모를 접종하여 발효 및 숙성시키는 단계; 를 포함하는, 기능성 흑마늘 와인의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 효모는 사카로마이세스 세레비지에 퍼미빈(*Saccharomyces cerevisiae* Fermivin)인 것을 특징으로 하는, 기능성 흑마늘 와인의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 사카로마이세스 세레비지에 퍼미빈 균주는 5 내지 15%(v/v)농도로 접종하는 것을 특징으로 하는, 기능성 흑마늘 와인의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 발효는 26 내지 34℃ 에서 수행하는 것을 특징으로 하는, 기능성 흑마늘 와인의 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 제조방법에 의하여 제조된 것을 특징으로 하는 기능성 흑마늘 와인.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 기능성 흑마늘 와인은 S-알릴시스테인(S-allylcysteine) 함량이 증가된 것을 특징으로 하는, 기능성 흑마늘 와인.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 흑마늘 농축액을 이용한 기능성 지표물질인 S-알릴시스테인(S-allylcysteine, SAC)이 강화된 흑마늘 와인의 제조방법에 관한 것으로, 최적 발효조건에서 흑마늘 농축액을 알코올 발효시킴으로써 S-알릴시스테인의 함량을 증가시킨 기능성 흑마늘 와인을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 마늘(*Allium sativum*)은 백합과 식물이며 원산지는 중앙아시아, 중국, 인도, 한국 등 아시아 전역, 이집트, 러시아 및 남유럽에 광범위하게 분포하고 있다. 마늘은 생태형에 따라서 난지형, 한지형이 있으며, 난지형은 가을에

심어 뿌리와 싹이 어느정도 자라 큰 마늘로 월동하고 봄에는 한지형보다 일찍 수확하며, 한지형은 난지형 마늘과 비슷하나 알이 작고 향이 더 짙다. 한지형 품종으로는 서산, 의성, 삼척의 재래종이 있고 난지형으로는 남해백과 고흥백 등이 있다. 마늘은 탄수화물 20%, 단백질 3.3%, 지방 0.4%, 섬유질 0.92%, 회분 13.4%로 구성되어 있으며 영양학적으로 우수하고 알릴설퍼(allyl sulfur), 이황화알릴(diallyl disulfide) 및 디알릴 삼황화물(diallyl trisulfide) 등 다양한 황화합물을 포함하여 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* 등에 대한 항균활성과 항산화 활성을 보유하고 있다.

[0004] 마늘은 고온 다습한 환경에서 15일에서 30일 정도 숙성을 시키게 되면 자연적인 화학반응인 마이야르 반응(maillard reaction)에 의해 검게 변하여 흑마늘이 된다. 흑마늘은 일반 마늘에 비해 매운 맛은 없으며, 신맛과 단맛은 증가되고, 수분함량 감소로 점도가 증가하여 쫄깃한 식감을 가지고 있다. 또한 폴리페놀, 플라보노이드 그리고 함황아미노산인 시스테인과 메티오닌의 함량이 증가하고 흑마늘의 주요 지표성분인 S-알릴-L-시스테인(S-allyl-L-cysteine)과 이황화알릴(diallyl disulfide)의 함량이 일반 마늘에 비해 각각 2배와 50배 증가된다. 이 중 S-알릴시스테인(S-allylcysteine, SAC)은 마늘을 숙성시킬 때 γ -글루타미트트랜스스펙티데이스(γ -glutamyltranspeptidase)에 의해 γ -글루타밀-S-알릴-L-시스테인(γ -Glutamyl-S-allyl-L-cysteine)으로부터 생성되는 수용성 황 화합물로 콜레스테롤 감소에 효과적이며, 항고혈당, 항산화, 항암효과 등 다양한 작용을 가진다고 보고되어 있다. 이에 높은 함량의 SAC를 함유하는 흑마늘을 제조하기 위해 다양한 시도들이 행해지고 있다.

[0005] 마늘의 소비는 1970년대에는 1인당 1.5kg이었지만 1990년에 10kg까지 증가하였다가 이후부터는 조금씩 감소하여 2007년 7.7kg을 기록하였다. 이는 과거 마늘을 조미료나 양념수준에서 소비하던 것이 경제의 발전과 문화 수준의 향상으로 양념의 개념에서 벗어나 기능성 식품으로 인식되었기 때문이다. 마늘의 소비는 대부분 생마늘로 소비하며 가공율은 4%에 불과하며, 자유무역협정에 의해 저렴한 중국산 마늘이 대량 수입되어 국내 마늘의 가격경쟁력이 하락됨에 따라 마늘의 고부가 가치 상품개발이 필요하다. 국내에서 고부가가치 상품개발을 위해 과일 및 다양한 재료로 많은 연구가 진행되고 있으며 그 중에서 단감 와인, 딸보리수 와인, 블루베리 와인, 수박 와인, 참외 와인, 파인애플 와인처럼 와인에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 와인은 포도를 발효시켜 만든 알코올성 음료이며 최근에는 과즙을 발효시켜 다양한 와인을 개발하고 있다. 또한 FTA 발효 이후 와인 수입에 대한 세금이 저렴해지고 웰빙문화의 확산으로 고도수의 술보다 저도수의 술에 대한 수요가 증가하면서 와인의 수요도 증가하고 있다. 하지만 국내 와인 소비량의 약 80%는 수입산 와인이므로 품질이 우수한 과실주 개발이 필요한 실정이며, 흑마늘의 경우 주로 진액이나 환의 형태로 판매되고 있고, 아직까지 와인의 형태로는 출시되고 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 흑마늘을 이용한 와인을 개발하고자 노력한 결과, 흑마늘 농축액을 사카로마이세스 세레비지에 퍼미빈(*Saccharomyces cerevisiae* Fermivin)을 이용하여 최적 발효조건으로 알코올 발효함으로써, S-알릴시스테인(S-allylcysteine, SAC) 함량이 증가된 기능성 와인을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 기능성 지표물질인 S-알릴시스테인 함량이 높은 흑마늘 와인의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 흑마늘 농축액을 준비하는 단계; (b) 상기 흑마늘 농축액을 당도가 24 내지 28 brix가 되도록 보당하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계에서 수득된 흑마늘 농축액에 효모를 접종하여 발효 및 숙성시키는 단계; 를 포함하는, 기능성 흑마늘 와인의 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 기능성 흑마늘 와인을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 S-알릴시스테인(S-allylcysteine, SAC) 함량이 높은 기능성 흑마늘 와인의 제조방법은 흑마늘 농축액을 희석하고 보당 후 사카로마이세스 세레비지에 퍼미빈(*Saccharomyces cerevisiae* Fermivin)을 접종하여 알코올 발효시켜, 발효 전보다 기능성 지표물질인 S-알릴시스테인이 약 4배 정도 증가된 새로운 형태의 와인을 제공하는 효과가 있다. 상기 S-알릴시스테인은 콜레스테롤 감소, 항고혈당, 항산화, 항암효과가 있어 산업적으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 균주별 에탄올 생성능을 나타낸 도이다.
- 도 2는 당 함량 및 발효기간에 따른 흑마늘 와인의 발효 정도를 에탄올 함량(A) 및 당 농도(B)를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 온도 및 기간에 따른 흑마늘 와인의 발효 정도를 에탄올 함량(A) 및 당 농도(B)를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 농도에 따른 흑마늘 와인의 항산화 활성을 나타낸 도이다. 도 4의 A는 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 것이다. 도 4의 B는 ABTS 라디칼 소거활성을 나타낸 것이다. 도 4의 C는 과산화물 음이온(superoxide anion) 라디칼 소거능을 나타낸 것이다. 도 4의 D는 환원력을 나타낸 것이다.
- 도 5는 흑마늘 농축액에서 S-알릴시스테인(SAC)의 액체크로마토그래피 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 흑마늘 와인에서 S-알릴시스테인(SAC)의 액체크로마토그래피 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0017] 본 발명은 (a) 흑마늘 농축액을 준비하는 단계; (b) 상기 흑마늘 농축액을 당도가 24 내지 28 brix가 되도록 보당하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계에서 수득된 흑마늘 농축액에 효모를 접종하여 발효 및 숙성시키는 단계;를 포함하는, 기능성 흑마늘 와인의 제조방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 흑마늘 농축액은 흑마늘 추출액과 비교하여 마늘이 고농도로 함유되어 있고, 와인 제조시 첨가되는 설탕량이 적어 보당함량이 낮은 것을 특징으로 하며, 흑마늘로부터 직접 제조하거나 구입하여 사용할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 보당은 백설탕, 흑설탕 등의 당을 이용하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 보다 구체적으로, 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 보당은 설탕을 이용하여 24 내지 28 brix가 되도록 수행할 수 있으며, 바람직하게는 25 내지 27 brix가 되도록 수행할 수 있고, 가장 바람직하게는 26 brix로 수행할 수 있다. 28 brix 보다 당의 농도가 높은 경우 효모의 생육이 저해되고, 24 brix 보다 당의 농도가 낮은 경우 에탄올 함량이 낮아 쉽게 부패된다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30068, *S. cerevisiae* KACC 30008, *S. cerevisiae* EC-1118, *S. cerevisiae* K1-V1116, *S. cerevisiae* RED FRUIT, *S. cerevisiae* M22, *S. cerevisiae* BCNU M24, *S. cerevisiae* BCNU M31, *S. cerevisiae* BCNU M32 및 *S. cerevisiae* Fermivin으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나를 이용할 수 있고, 바람직하게는, *S. cerevisiae* M22, *S. cerevisiae* BCNU M24, *S. cerevisiae* BCNU M31, *S. cerevisiae* BCNU M32 및 *S. cerevisiae* Fermivin을 이용할 수 있고, 더욱 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에 퍼미빈(*S. cerevisiae* Fermivin)을 이용할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 효모는 5 내지 15%(v/v) 농도로 접종할 수 있으며, 바람직하게는 10%(v/v) 농도로 접종할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 발효는 26 내지 34℃에서 수행할 수 있고, 바람직하게는 26 내지 30℃에서 수행할 수 있고, 가장 바람직하게는 28℃에서 수행할 수 있다. 26 내지 34℃에서 발효 시 10일 쯤 발효가 완료되어 다른 온도에서 발효 시에 비해 시간 및 에너지 측면에서 효율적으로 발효를 진행할 수 있다. 25℃ 보

다 낮은 온도에서 발효를 수행하면 발효에 장시간이 소요되고, 35℃ 보다 높은 온도에서 발효를 수행하면 이상 취가 발생한다.

- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 숙성은 통상의 와인 숙성 방법에 따라 수행될 수 있으며, 20리터 기준 2개월 이상 수행하는 것이 바람직하다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 숙성은 필요에 따라서 알코올 발효액을 마이크로 필터 등을 이용하여 여과한 후, 그리고/또는 와인병에 충전한 후 숙성시킬 수 있다.
- [0026] 상기 숙성이 완료된 흑마늘 와인은, 필요에 따라서 여과기를 이용하여 여과한 후 병입할 수 있다. 병입된 와인을 코르크 마개를 한 후 최종 제품화할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의하여 제조된 기능성 흑마늘 와인을 제공한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 기능성 흑마늘 와인은 S-알릴시스테인 함량이 증가된 것을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 기능성 흑마늘 와인은 기능성 지표물질인 S-알릴시스테인의 함량이 발효 전 흑마늘 농축액의 S-알릴시스테인 함량에 비해 약 4배 정도 증가되어 콜레스테롤 감소, 항고혈당, 항산화 및 항암에 우수한 효과가 있다.

- [0031] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 실시예 1. 흑마늘 와인의 발효 균주 선정

[0034] 1.1 균주 분리 및 분리 균주의 효소 및 내성 분석

- [0035] 효모 균주 분리를 위해 시판 막걸리, 과일 및 발효 식품을 구매하여 분리원으로 사용하였으며, 각 시료를 멸균수에 희석하고 PDA 배지에 0.2 ml씩 도말하여 28℃에서 48시간 배양하였다. 배양된 효모는 집락 모양, 크기, 색깔 등 형태적 특징을 관찰하여 효모로 추정되는 균주를 순수 분리하여 사용하였으며, 분리한 균주들은 PDA 배지에 계대보관하며 실험에 이용하였다. 분리한 균주는 형태학적 특성을 통해 81개의 효모 균주로 분리하였고, 이후 각종 효소실험과 각종 내성실험을 진행하여 분리한 균주 중 아미노산 탈탄산효소(amino acid decarboxylase) 활성을 가지지 않으면서 높은 효소활성을 나타내는 균주를 선별하였다. 이 중 *Saccharomyces cerevisiae* M22, *S.cerevisiae* BCNU M24, *S.cerevisiae* BCNU M31, *S.cerevisiae* BCNU M32는 시판 효모인 *S. cerevisiae* Fermivin과 유사한 15% 에탄올 내성을 보유하는 것으로 나타나 와인이나 주류 제조에 사용이 가능할 것으로 확인되어 이하의 실험에서 사용하였다. 한편, 상기 균주들의 계통수를 염기서열 분석을 통해 확인한 결과, *S. cerevisiae* 표준균주와 99% 상동성을 나타내었고, 계통적으로도 *S. cerevisiae*의 subcluster에 속하는 균주로 확인되었다. 사카로마이세스 세레비지에 퍼미빈(*Saccharomyces cerevisiae* Fermivin)은 Wine Kit Korea Co., Ltd.에서 분양받아 와인 발효 균주로 사용하였다.

[0037] 1.2 균주별 에탄올 생성능 분석

- [0038] 에탄올 생성량은 전배양한 효모를 25%의 glucose가 함유된 YPD 액체배지 100ml에 0.1%(v/v)농도로 접종하고 28℃에서 48시간 동안 정지 배양한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 회수하여 생성된 에탄올 함량을 측정하였다. 에탄올 함량은 중크롬산염 산화법(dichromate oxidation method)에 따라 3ml의 중크롬산염 시약(dichromate reagent)(0.1M 중크롬산 칼륨, 5M 황산)을 비커에 넣고 0.3ml의 시료가 담긴 튜브를 비커에 실로 고정한 뒤 입구를 파라필름으로 봉하고 30분간 실온에서 반응시킨 뒤 590nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 그 결과를 표 1에 나타내었다.
- [0039] 표 1에 나타난 바와 같이, *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin의 에탄올 생성량이 6.2%로 가장 우수하였다.

[0041] 균주별 에탄올 생성능

균주	에탄올 생성량(%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M22	4.7
<i>S. cerevisiae</i> BCNU M24	2.7
<i>S. cerevisiae</i> BCNU M31	2.5
<i>S. cerevisiae</i> Fermivin	6.2

[0043] 1.2 균주별 에탄올 당 내성 분석

[0044] 일반적인 와인은 발효를 시작할 때 25~30 brix의 당 농도에서 시작하므로 당 내성이 필요하다. 당에 대한 내성 측정은 1, 20, 30 및 40%의 glucose가 함유된 YPD 액체배지에 전배양한 효모를 0.1%(v/v)농도로 접종하고 28℃에서 180 rpm으로 24시간 동안 진탕 배양한 후 600nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 성장을 비교하여 수행하였다. 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[0045] 표 2에 나타낸 바와 같이, 당에 대한 내성은 *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin이 40% 농도에서 OD(Optical Density)가 1.014로 가장 높은 생육을 나타냈으며, 20% 및 30% 농도에서도 *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin의 OD가 각각 2.155 및 1.617로 가장 높은 생육을 나타냄을 확인하였다.

표 2

[0047] 균주별 당 내성

당 내성 (OD600)				
균주	1%	20%	30%	40%
<i>S. cerevisiae</i> M22	2.155±0.011	1.796±0.068	1.501±0.021	0.494±0.056
<i>S. cerevisiae</i> M24	2.189±0.008	1.493±0.043	0.784±0.019	0.275±0.036
<i>S. cerevisiae</i> M31	2.147±0.026	2.141±0.011	1.602±0.029	0.701±0.126
<i>S. cerevisiae</i> M32	2.136±0.022	2.063±0.029	1.483±0.126	0.731±0.068
<i>S. cerevisiae</i> Fermivin	2.13±0.006	2.155±0.011	1.617±0.077	1.014±0.055

[0049] 상기 결과에 따라, 에탄올 생성능 및 당 내성이 가장 우수한 *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin을 본 발명의 흑마늘 와인의 발효 균주로 선정하였다.

[0051] 실시예 2. 흑마늘 와인의 발효 최적조건 탐색

[0052] 2.1 흑마늘 농축액의 준비

[0053] 흑마늘 농축액을 이용하여 흑마늘 와인을 발효하였다. 본 실험에 사용한 흑마늘 농축액(62 brix)은 남해보물섬 마늘영농조합법인에서 제조한 것으로 4℃ 냉장보관하면서 사용하였고, 15 brix로 희석하고 설탕(Samyang, Seoul, Korea)을 첨가하여 보당한 후 잡균오염과 산화방지를 위하여 아황산염($K_2S_2O_5$)을 200ppm 첨가하여 흑마늘 와인 제조용으로 이용하였다. 그 후 *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin을 사용하여 발효를 진행하였다.

[0055] 2.2 당 함량에 따른 흑마늘 와인의 발효

[0056] 선별 균주의 초기 당 함량에 따른 와인 발효에 미치는 영향을 조사하기 위하여 15 brix로 희석한 흑마늘 농축액에 설탕으로 각각 24, 26 및 28 brix로 보당하여 28℃에서 각각 발효를 진행하였다. 와인 발효에는 사카로마이세스 세레비지에 퍼미빈(*Saccharomyces cerevisiae* Fermivin)을 사용하였고, 상기 효모를 보당된 흑마늘 농축액에 10%(v/v)농도로 접종하여 알코올 발효를 수행하였다. 발효를 진행하면서 2일 간격으로 발효액을 취했으며 배

양 상등액을 이용하여 당 함량에 따른 에탄올 농도 및 당도(brix 함량)를 측정하였다. 에탄올 농도는 dichromate reagent (0.1 M potassium dichromate, 5 M sulfuric acid) 3 ml를 비커에 넣고 시료 0.3 ml가 담긴 튜브를 비커에 실로 고정한 뒤 입구를 파라필름으로 봉하고 30분간 실온에서 반응시킨 뒤 590 nm에서 흡광도를 측정하였고, 당도는 굴절당도계(RHB-55ATC, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2의 A에는 초기 당 함량에 따른 에탄올 농도를, 도 2의 B에는 초기 당 함량에 따른 당도를 나타내었다.

[0057] 도 2의 A에 나타낸 바와 같이, 초기 당 함량이 높을수록 에탄올 함량이 높은 것을 확인하였다. 구체적으로는, 발효 16일 째 기준으로 초기 당 함량 24, 26 및 28 brix에 대해 에탄올 함량이 각각 11.02, 15.20 및 18.13%으로 확인되었다. 당도의 경우, 도 2의 B에 나타낸 바와 같이, 동일하게 발효 16일 째 기준으로 각각 11, 12 및 13 brix로 관찰되었다. 와인은 에탄올 농도가 12% 이하가 되면 쉽게 부패하며, 당의 농도가 높은 경우 효모의 생육이 저해되기 때문에 초기 당 함량은 26 brix가 가장 적절한 것으로 확인하였다.

[0059] 2.3 온도에 따른 흑마늘 와인의 발효

[0060] 선별 균주의 온도에 따른 와인 발효의 영향을 조사하기 위하여 15 brix로 희석한 흑마늘 농축액을 설탕으로 26 brix로 보당하여 20, 25, 28, 30 및 35℃에서 각각 발효를 진행하면서 2일 간격으로 에탄올 농도 및 당도를 측정하여 최적 발효 조건을 탐색하였다. 와인 발효에는 사카로마이세스 세레비지에 퍼미빈(*Saccharomyces cerevisiae* Fermivin)을 사용하였고, 상기 효모를 보당된 흑마늘 농축액에 10%(v/v)농도로 접종하여 알코올 발효를 수행하였다. 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3의 A에는 온도에 따른 에탄올 농도를, 도 3의 B에는 온도에 따른 당도를 나타내었다.

[0061] 도 3의 A에 나타낸 바와 같이, 발효 16일 째 기준으로 에탄올 농도는 20, 25, 28, 30 및 35℃에 대해 각각 8.75, 16.32, 15.20, 17.37 및 15.65%로 관찰되었다. 한편, 20℃는 12일째부터, 25℃는 8일째부터 발효가 시작되었고 35℃에서는 이상취가 나타남을 확인하였다. 당도의 경우, 도 3의 B에 나타낸 바와 같이, 발효 16일째 기준으로 20, 25, 28, 30 및 35℃에 대해 각각 20, 13, 12, 12, 12 brix로 관찰되었다. 따라서, 알코올 생산량, 발효시간, 관능적인 면을 고려할 때 흑마늘 와인의 발효온도는 26 내지 34℃가 적합한 것으로 판단되었다.

[0062] 특히, 25℃에서 발효한 경우 8일째부터 발효가 시작된 것에 반해 28℃에서 발효한 경우 10일 만에 발효가 완료되어 발효에 오랜 시간 소요되는 20℃, 25℃ 등 다른 온도에 비해 우수성을 나타내었다. 즉, 28℃가 시간 및 에너지 측면에서 효율적이고, 상대적으로 대량생산에서도 유리하여 발효 온도로 가장 적합함을 확인하였다.

[0064] 실시예 3. 제조된 흑마늘 와인의 기능성 분석

[0065] 3.1 이화학 성분 분석

[0066] 상기 실시예 2를 통해 확인한 최적 발효조건, 즉 흑마늘 농축액의 초기 당 함량을 26 brix로 조절하고 사카로마이세스 세레비지에 퍼미빈을 접종한 뒤 28℃에서 발효시켜 흑마늘 와인을 제조하였다.

[0067] 제조된 흑마늘 와인의 총 폴리페놀(polyphenol), 플라보노이드(flavonoid), 탄닌(tannin), 5-하이드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF), pH 그리고 당도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 증류수 3.9 ml에 시료 0.5 ml와 1N folin-ciocalteu 용액 0.5 ml를 넣고 5분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 34% Na₂CO₃ 0.5ml를 넣고 30분 동안 실온에서 정치시킨 후 725nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 총 플라보노이드 함량은 증류수 4ml에 시료 1ml를 넣고 5분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 5% NaNO₂ 0.3ml와 10% AlCl₃ 0.3ml를 넣고 6분 동안 실온에서 정치시킨 후 1M NaOH 2ml와 증류수 2.4ml를 넣고 510nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 탄닌 함량은 시료, 95% ethanol 및 증류수를 각각 1ml씩 혼합하고 5% Na₂CO₃ 1ml와 1N folin-ciocalteu 0.5ml를 첨가하여 실온에서 60분간 반응시키고 725nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 5-하이드록시메틸푸르푸랄의 함량은 2개의 튜브에 시료 2ml와 0.6% 4-메틸아닐린 5ml를 혼합한 뒤, 0.5% 바르비투르산과 증류수를 각각 1ml 첨가한 뒤 즉시 550nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. pH는 pH 미터 (Ion meter, Orion 520A)를 이용하여 측정하였으며, 당도 및 에탄올 함량도 측정하였다. 결과를 표 3에 나타내었다.

[0068]

[0069]

흑마늘 와인의 이화학적 성분

	흑마늘 와인
Total polyphenol (mg/ml)	3.80±0.10
Total flavonoid (mg/ml)	0.51±0.05
Tannin (mg/ml)	5.74±0.05
5-HMF (mg/ml)	0.06±0.04
Brix	12±0.00
pH	4.01±0.02
Ethanol (%)	15.03±0.04

[0071]

표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 흑마늘 와인에 포함되는 총 폴리페놀은 3.80mg/ml, 총 플라보노이드는 0.51mg/ml 그리고 탄닌은 5.74mg/ml로 높은 항산화 활성을 나타내었다. 또한 5-하이드록시메틸푸르푸랄은 0.06mg/ml였으며, 당도(brix)는 12brix, pH는 4.01 그리고 에탄올 함량은 15%로 확인되었다.

[0073]

3.2 항산화 활성 측정

[0074]

흑마늘 와인의 항산화 활성을 확인하기 위하여 1,1-다이페닐-2-피크릴하이드라질(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 라디칼, 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조싸이아졸린-6-설폰산(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, ABTS) 라디칼 그리고 환원력을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 시료 0.2ml에 0.2mM DPPH 용액 0.8ml을 혼합하여 37℃에서 30분간 암소에서 반응시킨 뒤 517nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 아래와 같은 식으로 계산하여 백분율(%)로 표시하였다. ABTS 라디칼 소거활성을 확인하기 위하여 7.2 mM ABTS와 2.6mM 과황화칼륨(potassium persulfate)을 1:1로 혼합한 후 4℃에서 12시간동안 방치하여 라디칼을 형성시킨 후 734nm에서 흡광도 값이 1.10 ± 0.02 가 되도록 증류수로 희석하였다. 이후 시료 0.15ml에 ABTS 용액 2.85ml를 혼합하여 암소에서 2시간동안 반응시킨 후 흡광도 값을 측정하였다. 과산화물 음이온(Superoxide anion, O_2^-) 라디칼 소거능은 시료 0.7ml에 1 mM β -NADP 0.1ml, 1mM NBT 0.1ml, 120 μ M 페나진 메토설파이트(phenazine methosulphate) 0.1ml를 혼합한 뒤 상온에서 10분간 반응시키고 10M HCl 0.04ml을 가하여 반응을 종결시킨 후 560nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 환원력은 시료 1ml에 0.2M 인산완충액(phosphate buffer)(pH 6.6) 2.5ml와 1% 페리시안화칼륨(potassium ferricyanide) 2.5ml를 혼합하고 50℃에서 20분간 반응시키고, 반응액에 10% 트리클로로 아세트산(trichloroacetic acid) 2.5ml를 첨가하여 반응을 종료시킨 뒤, 3000 g에서 5분간 원심분리하고 동량의 상등액과 증류수에 0.1% $FeCl_3$ 0.5ml를 혼합하여 700nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 결과를 도 4에 나타내었다.

[0075]

도 4의 A 내지 D에 나타난 바와 같이, DPPH radical 소거활성 및 ABTS radical 소거활성은 100 μ l/ml 농도에서 각각 90.25% 및 94.20%로, 과산화물 음이온 라디칼 소거능은 25 μ l/ml에서 93.43%로, 그리고 환원력은 200 μ l/ml에서 2.719로 조사되어 제조된 흑마늘 와인이 높은 항산화 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

[0077]

3.3 SAC 함량 측정

[0078]

제조된 흑마늘 와인의 S-allylcysteine(SAC) 함량을 측정하였다. 우선 액체 크로마토그래피 분석에 적합하도록 시료의 유도체화를 수행하였다. 시료 0.1ml에 20mM borate buffer (pH 9.2) 0.65ml와 아세트나이트릴에 녹인 10mM 댄실 클로라이드(dansyl chloride) 0.25ml를 더해 혼합한 후 45℃에서 15분 동안 유도체화 시켰다. 유도체화 시킨 시료에 6.25% 수산화암모늄 0.1ml을 넣고 25℃에서 30분 동안 반응 시켜 여분의 댄실 클로라이드를 제거한 뒤, 원심분리 (3,000 x g, 5분, 4℃) 후 0.2 μ m 필터를 통해 여과하였다.

[0079]

이후, 제조된 흑마늘 와인의 SAC를 정량적으로 분석하기 위해 액체 크로마토그래피(LC-20AD series, Shimadzu, Japan)를 수행하였다. 컬럼은 ODS C18 (250 × 4.6 mm, 5 μ m)로 40℃로 사용하였고, 전개용매는 50mM sodium acetate buffer (pH 5.0) : 메탄올을 70:30 비율로 시작했다가 35분에 60:40 비율로, 60분에 25:75 비율로, 70분에 70:30 비율로 0.9ml/min 속도로 전개하였으며 시료는 10 μ l 주입하였다. 다이오드어레이 검출기를 이용하여 250nm에서 모니터링을 하였다. 결과를 표 4, 도 5 및 도 6에 나타내었다. 도 5에는 흑마늘 농축액, 도 6에는

흑마늘 와인의 액체 크로마토그래피 결과를 나타내었다.

표 4

흑마늘 농축액과 흑마늘 와인의 S-allylcysteine 함량 비교

시료	SAC 함량 (ppm)
흑마늘 농축액	46±1
흑마늘 와인	204±11

표 4에 나타난 바와 같이, 흑마늘 농축액의 SAC는 46ppm, 26 brix로 보당하여 28℃에서 발효한 흑마늘 와인의 SAC는 204ppm으로 관찰되어, 발효 전보다 기능성 지표물질인 SAC의 함량이 약 4배 정도 증가됨을 확인하였다.

또한, 도 5에 나타난 바와 같이, 흑마늘 농축액의 액체 크로마토그래피에서 49.6분대 SAC 피크가 관찰되었으며, 도 6에 나타난 바와 같이, 제조된 흑마늘 와인의 액체 크로마토그래피에서도 49.6분대에 SAC 피크가 확인되었다.

실시예 4. 제조된 흑마늘 와인의 향기성분 분석

4.1 향기성분 분석

제조된 흑마늘 와인의 향기성분 분석을 위해 10 ml의 흑마늘 와인을 headspace용 vial에 담아 알루미늄 캡으로 밀봉한 다음 headspace autosampler (TurboMatrix 40, PerkinElmer, USA)로 추출하였다. 추출조건은 시료를 넣은 vial을 103℃에서 평형화시켰으며, 가압시간은 0.2분, loop 온도는 113℃, transfer line 온도는 123℃, injection 시간은 0.8분이었다. 추출된 향기성분은 gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS; Clarus 600T, PerkinElmer, USA)를 이용하여 분석하였으며, 칼럼은 5ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent, USA)를 사용하였다. 오븐 온도는 40℃에서 5분간 유지한 후 분당 10℃로 250℃까지 상승시켰으며, 이 온도에서 5분간 유지하였다. 주입구의 온도는 180℃로 하였으며, 시료는 분할주입법(5:1)을 이용하여 주입하였고, 캐리어 가스는 헬륨(He)을 사용하였으며, 컬럼유속은 1 ml/min로 설정하였다. 화합물의 동정은 GC/MS로 얻은 mass spectrum을 NIST MS Search 2.0 (NIST, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 동정하였다.

4.2 성분 분석 결과

최적 조건으로 제조된 흑마늘 와인의 향기 성분 분석 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5

흑마늘 와인의 향기성분

화합물	RT (분)	Peak area (%)	향
Acid			
Pyruvic acid	2.04	3.72	acetic acid
Acetic acid	2.78	0.74	sour
Alcohol			
1-Propanol	2.09	2.57	alcohol, candy, pungent
2-Methyl-1-propanol	2.54	14.10	sweet, musty
1-Butanol	2.93	0.17	rancid, sweet
2,3-Butanediol	3.89	0.42	-
1-Pentanol	3.94	3.04	fruit
2-Methyl-1-butanol	4.03	1.20	wine, onion
3-Methyl-1-butanol	4.23	22.77	whiskey, malt, burnt
2-Hexanol	4.87	14.81	coconut

Anhydrides			
Acetic anhydride	2.41	0.16	vinegar
Ester			
Ethyl acetate	2.32	18.27	ether-like, fruity
Butyl acetate	5.17	0.25	fruity
Ethyl butyrate	5.99	0.27	pears, mild, fruity
n-Propyl acetate	8.00	0.25	banana
Isopentyl acetate	8.07	2.03	fruity, banana, sweet, fragrant, powerful
Ethyl hexanoate	10.75	0.59	fruit, green, pineapple
Octanoic acid, ethyl ester	14.10	0.18	faint, fruity-acid
Ketone			
2,6-dimethyl-4-Heptanone	10.18	0.30	peppermint, mild, sweet

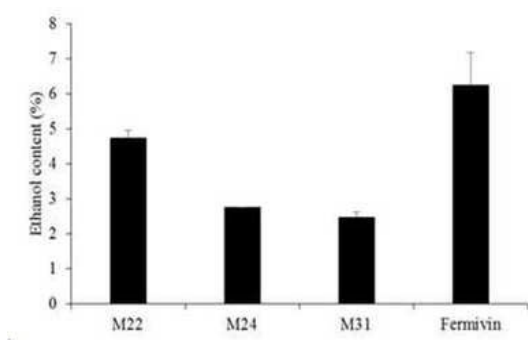
[0094] (RT: Retention time)

[0096] 표 5에 나타낸 바와 같이, 분석 결과 총 19종의 향기성분이 검출되었으며, acid계는 2종, alcohol계는 8종, anhydrides계는 1종, ester계는 7종, ketone계는 1종이 검출되었다. 흑마늘 와인의 주요 향기 성분으로는 alcohol계의 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol 및 2-hexanol이 있으며, ester계의 ethyl acetate가 검출되었다. 이 가운데 3-methyl-1-butanol의 경우 위스키, 몰트 및 탄 향(burnt odor)을 나타내며, 이는 와인의 원료인 흑마늘에서 기인한 것으로 사료된다. 또한 ethyl acetate는 과일 향을 내며 포도주의 향에 중요한 역할을 하는 휘발성 에스테르 중 하나로 알려져 있으며, 2-methyl-1-propanol은 단 향(sweet odor) 및 곰팡이 향(musty odor)을, 2-hexanol은 코코넛 향을 나타낸다. 이러한 흑마늘 와인의 향기성분을 체리 와인의 향기성분과 비교하였을 경우, alcohol계의 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, 3-methyl-1-butanol 및 2-hexanol과 ester계의 ethyl acetate, ethyl butyrate, n-propyl acetate 및 ethyl hexanoate, 이 외에 acetic acid가 공통적으로 발견되었다. 반면 쌀 와인의 향기성분과 비교하였을 경우, alcohol 성분의 1-propanol, 1-butanol 및 2,3-butanediol과 ester 성분의 ethyl acetate 및 ethyl butyrate가 공통으로 발견되는 휘발성 성분임을 확인하였다.

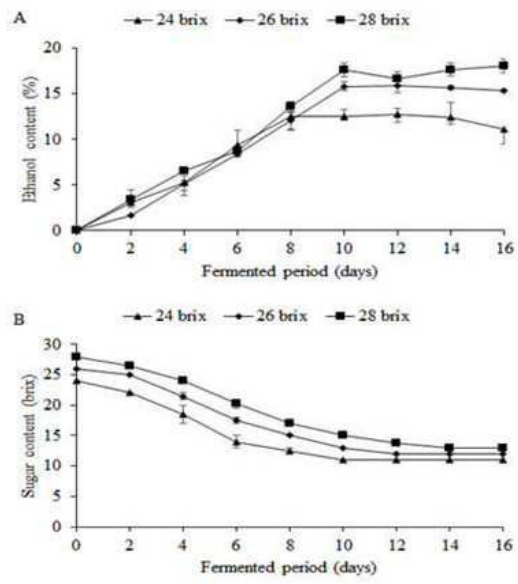
[0098] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

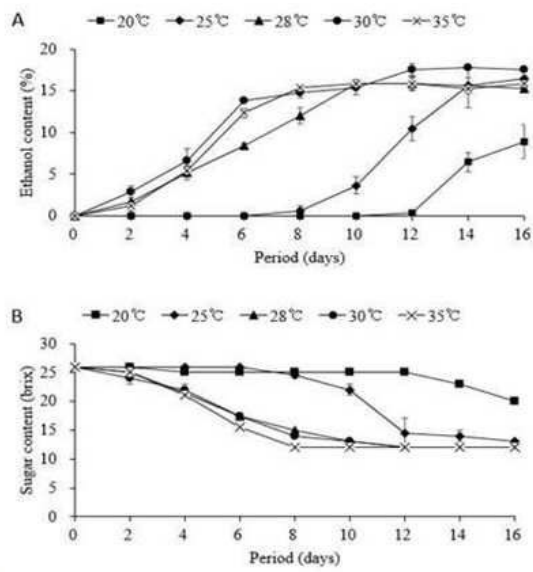
도면1



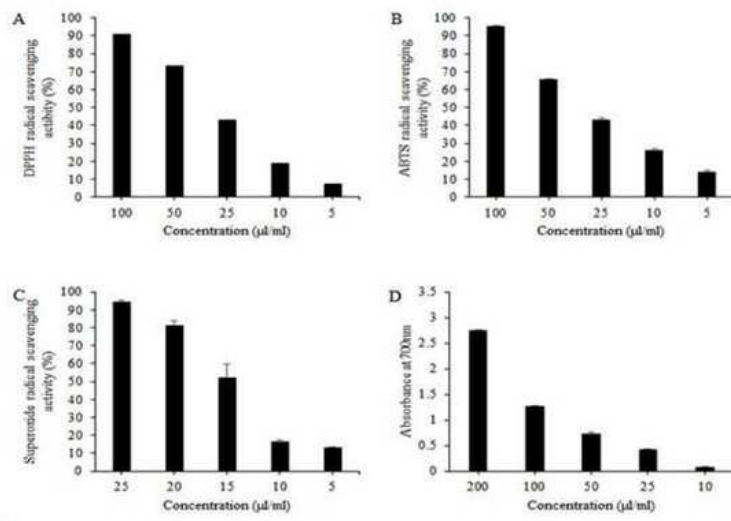
도면2



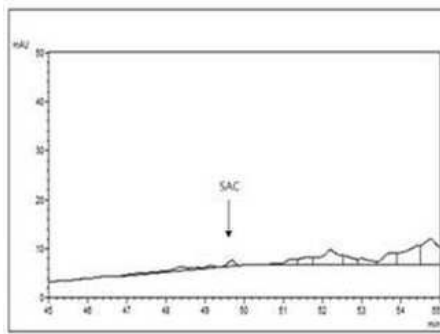
도면3



도면4



도면5



도면6

