

양파를 이용한 고기능성 발효음료제조기술 개발 및 산업화
(Process Development and Industrial Application of
Bio-functional Fermented Onion Beverages)

고기능성 유산균발효 양파음료 개발
(Development of Bio-functional Onion Beverages Fermented with Lactic
Acid Bacteria)

기능성 양파식초음료 개발
(Development of Bio-functional Onion Vinegar Beverage)

기능성 양파발효음료 제조공정 개발
(Development of Manufacturing Process of Bio-functional Fermented
Onion Beverages)

기능성 양파발효음료의 산업화 연구
(Industrial Application of Bio-functional Fermented Onion Beverages)

양파발효음료의 기능성 검증
(Verification of Functionality of Fermented Onion Beverages)

경원대학교 산학협력단

농림수산식품자료실



0008935

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “양파를 이용한 고기능성 발효음료 제조기술 개발 및 산업화” 과제(세부과제 “고기능성 유산균발효 양파음료 개발”, 협동과제 “기능성 양파 식초음료 개발”, “기능성 양파발효음료 제조공정 개발”, “기능성 양파발효음료의 산업화연구”, “양파발효음료의 기능성 검증”)의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 29일

주관연구기관명 : 경원대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 박 영 서

세부연구책임자 : 박 영 서

협동연구기관명 : 청강문화산업대학 산학협력단

협동연구책임자 : 장 재 권

협동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 최 영 진

협동연구기관명 : 이화여자대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 정 명 수

협동연구기관명 : 선문대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 박 훈

요 약 문

I. 제 목

양파를 이용한 고기능성 발효음료 제조기술 개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구는 다양한 생리활성기능을 지니고 있는 양파를 이용하여 기능성이 강화되고 기호성을 높인 음료를 제조하여 산업화하기 위하여 고기능성 유산균과 초산균을 사용하여 양파 착즙액 또는 양파 육질을 발효시킨 유산발효음료와 양파식초의 제조공정을 개발하고 항암, 항산화, 항고혈압, 체중조절, 콜레스테롤억제, 운동능력향상 효과 등 양파 발효제품의 다양한 생리활성을 검증하는 것을 최종 목표로 하였다.

2. 연구개발의 필요성

식생활이 서구화되어 감에 따라 육류의 섭취는 늘고 채소나 자연식품의 섭취가 감소하면서 암, 심혈관계질환, 당뇨병 등 각종 성인병에 의한 사망률의 증가가 심각한 사회 문제로 대두되고 있다. 최근 건강유지 및 삶의 질 향상을 추구하는 소비자의 의식변화로 인해 예방 또는 치료 목적의 고기능성 건강식품의 개발에 많은 관심이 집중되고 있으며, 특히 고령화 사회와 더불어 경제적 수준의 향상으로 건강기능성식품의 시장규모는 국내 외적으로 무한하다고 볼 수 있다.

최근 양파를 많이 섭취한 사람들의 경우 암, 심혈관계질환 등 노화관련 질환의 발생률이 현저히 떨어진다는 보고가 잇따르면서 건강기능성 소재로서 양파에 대한 소비자들이 인식이 매우 높아져 있다. 현재 양파의 국내 자급률은 100%에 이르기 때문에 양파를 소재로 한 다양한 기능성식품의 개발은 국내에서 생산되는 농산물을 이용한 건강식품시장의 활성화에 밑거름이 될 것이며, 국내외적으로 우리나라 농산물의 고부가가치화를 추구하는데 크게 기여할 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제는 최종 목표를 달성하기 위하여 5개의 세부 및 협동과제를 구성하여 수행하였다.

제1세부과제에서는 고기능성 유산균 발효 양과음료를 개발하기 위하여 과채류로부터 발효능과 생리활성이 우수한 starter 유산균주를 탐색 선정하여 동정하고 균주의 발효특성을 조사하고 유산균의 종류, 접종비, 발효온도와 시간 등 발효 최적조건을 조사하였다. 또한 양과의 유산균 발효의 scale-up 조건을 확립하여 대량생산을 위한 제조공정별 제어기술을 개발하였다.

제1협동과제에서는 기능성 양과 식초음료를 개발하기 위하여 발효능과 기호도가 우수한 초산균을 탐색 선정하여 동정하고 선정 초산균의 최적 생육조건을 결정하였으며 초산균의 발효능과 생리활성을 조사하고 2단발효공정을 최적화하였으며 발효제품의 생리활성을 검증하였다. 또한 속성초산발효공정과 대량생산을 위한 각 제조공정별 제어기술을 개발하였다.

제2협동과제에서는 기능성 양과발효음료 제조공정을 개발하기 위하여 착즙 및 추출공정에 따른 유용성분 수율 분석을 통한 최적방법과 조건을 결정하였고 다양한 조합의 양과 발효기를 개발하였으며, 농축, 살균, 혼합, 탈취 공정 등 다양한 단위 공정에 대한 연구를 실시하여 발효음료 제조공정을 설계하였고, RSM을 이용하여 추출공정의 최적화 연구를 진행하였다. 또한 이러한 연구결과를 바탕으로 scale-up 연구를 통하여 산업적 제조공정을 설계하였고, 공정 자동화를 위한 제어시스템을 수학적인 모델식을 기반으로 MATLAB program을 이용하여 simulation하였다.

제3협동과제에서는 기능성 양과발효음료의 산업화 연구를 위하여 국·내외 기능성음료의 시장동향을 분석하고 기능성음료 개발과 관련한 국·내외 자료를 분석하였으며 설문조사 및 가정유치조사와 양과발효음료의 개발 가능성 및 시장성을 검토하였다. 또한 양과 유산 발효음료와 양과 초산발효음료의 제품별 formula를 개발하였고 개발된 각 제품에 대한 기호도 조사와 제품별 저장성을 조사하였으며 대량생산조건과 경제성분석을 수행하였다.

제4협동과제에서는 양과발효음료의 기능성 검증을 위하여 양과 육질과 껍질의 추출 방법 및 양과의 살균·저장에 따른 기능성 성분을 분석하였다. 또한 유산 및 초산발효에 의한 기능성 성분 변화를 분석하였으며, 양과발효 제품의 기능성을 *in vitro* 실험과 동물실험을 통하여 검증하였다.

IV. 연구개발결과

1. 고기능성 유산균 발효양과음료 개발

양과 착즙액을 이용한 고기능성 유산발효음료를 제조하기 위해서 과채류로부터 702주의 유산균을 분리한 후 발효 시 산도 증가가 우수한 61주의 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 61주 중에서 양과 착즙액의 유산 발효능이 우수한 16 균주를 2차 선별하였으며 전자공여능, 아질산염 소거능 등과 같은 항산화활성과 식중독 세균에 대한 항균활성이 우

수한 KC-007 균주를 최종 starter 균주로 선정하였다. 균주의 동정을 위해 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과 KC-007은 *Pediococcus pentosaceus*로 동정되었다(GenBank accession No. EU569832). 양과착즙액을 *P. pentosaceus* KC-007을 이용하여 발효하였을 경우 생육과 유산발효를 위한 최적조건은 배양온도 40°C, pH 4.0~6.0, 접종량 2%(v/v)로 확인되었다. 양과 착즙액에 2종류의 유산균을 혼합 접종하여 유산발효할 경우에는 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 혼합접종하여 발효하는 것이 가장 높은 산도와 우수한 유산균 생균수를 나타내고 SOD 유사활성도 비교적 높은 것으로 확인되었다. 양과 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 첨가하여 유산발효할 경우에는 팽화 홍삼 추출액의 첨가량에 관계없이 발효 24시간에서 가장 높은 생균수를 나타내었으며 발효액의 전자공여능과 아질산염 소거능은 1%(w/v) 이상의 팽화 홍삼 추출액을 첨가하였을 때 가장 높은 수치를 나타내었다. 양과취를 저감화하기 위해서는 양과를 2.0%(w/v)의 citric acid 용액으로 24시간 침지하는 것이 가장 효과적인 것으로 확인되었다. 양과 착즙액 발효를 1 L 또는 40 L로 scale-up하였을 경우 유산발효를 위한 최적조건은 양과 착즙액 원액을 pH 5.0으로 조정후 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 혼합한 starter를 2%(v/v) 접종하여 37°C에서 24시간 발효하는 것으로 확립하였다. 양과 착즙액 유산발효제품의 저장성을 5, 10, 20, 30°C에서 18일 동안 조사한 결과 5°C와 10°C에서는 산도변화가 거의 없었고 유산균 생균수는 20°C에서는 유산균수가 저장기간이 경과하여도 크게 감소하지 않았다. 효모와 곰팡이는 본 발효제품에서 검출되지 않았다. 양과 유산발효음료의 분말 제품을 제조하기 위하여 양과발효음료를 동결건조하여 제품화하였다. 이상의 결과로부터 양과 유산발효제품의 대량생산을 위한 제조공정은 다음과 같이 확립하였다. 즉, 양과를 세척한 후 8등분한 다음 양과취를 제거하기 위하여 2%(%) citric acid 용액에서 24시간 동안 침지하고 착즙한 다음 121°C에서 10분간 가열처리하고 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거한다. 양과 착즙액의 pH를 5.0으로 조정후 121°C에서 15분간 가열살균한 다음 대수증식기까지 생육한 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 혼합한 starter를 2%(v/v) 접종하여 37°C에서 24시간 동안 혐기발효시킨다. 발효가 완료되면 상온까지 냉각한 다음 양과 발효액 10%(v/v), 배 농축액 2.38%(v/v), citric acid 0.2%(v/v), 팽화홍삼 농축액 0.02%(v/v), 올리고당 5%(v/v), 고과당 10%(v/v), 아카시아벌꿀 2%(v/v), 비타민 C 0.2%(w/v), 배향 0.2%(v/v), quercetin 추출물 0.29%(w/v), 정제수 69.61%(v/v)의 비율로 배합한 후 병에 충전하여 양과 유산발효음료 제조를 완료한다. 분말제품을 생산하기 위해서는 유산발효음료를 동결건조하여 팩에 충전한다. 추출공정 및 발효공정을 제어하기 위하여 Governing equation을 이용한 에너지 수지식을 설계하여 MATLAB program의 확장도구인 simulink를 사용하였다.

2. 기능성 양과식초음료 개발

복숭아 낙과로부터 분리한 산생성능이 우수한 초산균은 분리 동정한 결과 한국미생물 보존센터에서 *Acetobacter tropicalis* KFCC 11476P로 균주번호를 부여받았다. GYP 액체배

지에서 *A. tropicalis* 11476P 균주를 이용한 식초제조의 최적 조건을 찾기 위하여 초기 에탄올농도는 GYP 배지에서 30℃에서 10일간 배양하여 균의 생육과 산생산능을 조사한 결과 4%의 에탄올 농도, 초기산도는 초산을 첨가하지 않은 0%, 초기 glucose 농도는 2.5~3% 범위의 농도가 초산균의 생육과 산도 생산이 가장 높은 조건이었다. 초산생산의 최적화를 위해 중심합성계획법에 따라 각 독립변수를 초기 ethanol 함량, 초기 acetic acid 함량, 초기 glucose 농도로 요인변수들을 -2, -1, 0, 1, 2로서 5개로 부호화하여 반응표면분석을 수행한 결과 초기 ethanol 농도 4.67%, 초기 acetic acid 농도 0.03%, 초기 glucose 농도 2.35%이었으며 이때의 산도 값은 3.77%로 나타나 실험결과에 근접함을 알 수 있었다. 식초의 관능특성으로 본 연구에서 제조한 양파식초에 대한 선호도면에서는 시판식초 보다 낮지 않아 양파자체가 갖고 있는 이취는 초산배양에 의해 거의 존재하지 않음을 알 수 있었다. 양파식초의 기능성탐색연구의 일환으로 혈전용해능 및 항혈전기능 정도를 살펴본 결과 혈전용해능은 plasmin 활성의 약 10%에 해당하는 활성을 나타내었으며 항혈전기능은 양파즙은 항혈전기능이 없는 반면 0.1 mL 양파식초 첨가군에서 APTT, TT, PT 항목이 최대치를 나타내었을 뿐만 아니라 FIB도 대단히 낮아 항혈전효과가 대단히 큼을 알 수 있었다. 산업적으로 유용한 양파식초의 속성생산과 kinetic parameter의 도출을 위하여 회분 및 유가식배양을 심도 있게 시간간격으로 분석하면서 초산균배양 실험을 수행한 결과 초기 에탄올농도 4, 5, 6% 조건에서의 양파식초의 회분배양은 통기효과에 의해 2일이 초과되지 않는 배양 30, 34, 46시간 만에 에탄올이 모두 소비되었으며 이때의 산도는 각각 3.1, 3.8, 4.9%였다. 초기 에탄올의 농도가 5%와 6%로 증가할수록 비증식속도는 0.344, 0.191, 0.114 hr⁻¹로 감소하였고, 초산생산성(P), 비초산생산성(Π)은 증가하는 것을 알 수 있었다. 유가식배양에서는 에탄올만으로는 산도의 증가가 어려웠으며, 단백질영양원인 yeast extract와 corn steep liquor가 추가로 필요함을 알 수 있었다. 유가식배양의 Feeding 방법에서 초기 에탄올농도 4%의 배양조건에서 에탄올이 고갈되는 시점인 배양 28시간에 기질로 양파즙과 에탄올을 7:3의 비율로 하여 peristaltic pump를 이용하여 시간당 8.3 mL의 속도로 15시간까지 continuous feeding 방법으로 유가식배양을 수행한 결과, 잔존 에탄올이 1.15%인 배양 45시간 만에 산도가 4.5%에 도달하였다. 배양 45시간부터 양파즙과 에탄올을 8:2의 비율로 공급한 결과 산도는 5%까지 도달하였고, 배양 72시간만에 산도가 5.72%까지 증가하여(잔존 에탄올 함량은 1.13~1.69%), step feeding 방법의 유가식 배양보다 배양기간이 단축되고 산도가 더욱 높아짐을 볼 수 있었다. 양파식초의 대량생산을 위한 필수적인 전단계로서 120 kg의 양파즙을 제조하여 300 L pilot scale 발효조에서 산소가 충분히 공급되는 조건에서 초기 에탄올 6%의 조건으로 초산균을 배양한 결과 배양 48시간에 에탄올은 고갈되었으며 이때의 산도는 4.6%로 측정되어 실험실규모(2 L)의 발효기 실험결과와 유사하였으며, 산업적인 생산가능기간인 10일의 1/5의 기간이 단축된 2일내에 산도 4%이상의 양파식초의 생산이 가능한 결과를 얻었다.

3. 기능성 양파발효음료 제조공정 개발

다양한 처리를 통한 양파껍질과 과육에서의 유용성분의 추출 수율을 확인하였고, 각

처리의 최적 조건을 조합하여 유용성분을 추출한 결과 가장 높은 추출 수율을 얻을 수 있었다. 또한 제1세부과제와 제2세부과제 연구팀과의 공동 연구로 유산균과 초산균이 가장 잘 발효시킬 수 있는 최적 발효기를 제조하였다. 각 단위 공정을 거친 양파 착즙액의 점도, 산도, pH 등의 변화를 확인하였으며, flow rate에 따른 탈취 공정으로 탈취 효과를 확인하였다. 또한 양파 발효음료 및 초산음료에 대한 전체적인 공정도를 설계하였으며, 반응표면분석법을 이용하여 용매, 마이크로웨이브 및 초음파를 이용한 추출공정의 최적화 조건을 수립하였다. 양파 발효음료 및 식초음료를 산업화하기 연구로서, 추출의 scale-up 실험 결과 초기 용매의 온도가 추출 최적온도인 59℃로 투입되고 용매와 시료가 충분히 교반되면 산업화 규모에서도 유용성분의 추출함량이 유지될 수 있음을 확인하였고, 경제성 및 효율성을 고려한 탈취 공정의 선정으로 전체적인 제조공정을 재설계하였다. 또한 추출공정 및 발효공정의 중요한 요인인 온도를 제어하기 위해 에너지 수지식과 MATLAB program을 이용하여 온도 제어의 효과를 확인하였다.

4. 기능성 양파발효음료의 산업화 연구

최근 양파를 많이 섭취한 사람들의 경우 암, 심혈관계질환 등 노화관련 질환의 발생률이 현저히 떨어진다는 보고가 잇따르면서 건강기능성 소재로서 양파에 대한 소비자들이 인식이 매우 높아져 있다. 현재 양파의 국내 자급률은 100%에 이르기 때문에 양파를 소재로 한 다양한 기능성식품의 개발은 국내에서 생산되는 농산물을 이용한 건강식품시장의 활성화에 밑거름이 될 것이며, 국내외적으로 우리나라 농산물의 고부가가치화를 추구하는데 크게 기여할 것이다. 따라서 본 연구에서는 우수한 기능성 소재로 입증된 양파를 이용하여 음료의 제조공정 개발 및 최적화시키고자 하였으며, 발효 양파 착즙액에 사과즙, 당, 산, 올리고당 등을 첨가하여 유산 발효 양파음료 시제품을 제조하여 1차, 2차 및 3차 관능평가를 실시한 결과 최종적으로 가장 우수한 배합은 유산발효음료의 경우 양파 유산발효액 10%, 고과당 10%, 올리고당 5%, 배 농축액 2.38%, 아카시아 벌꿀 2%, 배향 0.3%, quercetin 추출물 0.29%, 팽화홍삼농축액 0.02% 등이었고, 초산발효음료의 경우에는 양파식초 5%, 올리고당 14.94%, 고과당 4.7%, 레드자몽 농축액 3.3%, 복분자농축액 0.04% 등이었다. 저장시험 결과 개발된 양파발효음료는 냉장온도(4℃)에서 1개월 이상의 유통기한을 가질 수 있음을 확인하였다.

5. 양파발효음료의 기능성 검증

양파의 추출방법과 추출액의 살균·저장에 따른 기능성성분을 분석하였다. 양파 착즙액의 경우 100℃에서 열수 추출한 시료에서 기능성성분의 함량이 가장 높게 검출되었다. 양파 추출액의 살균처리는 기능성 성분의 함량에 영향을 미치지 않았으며, 저장기간 동안 총 phenol, flavonoid, quercetin 함량은 안정적으로 유지되는 것으로 확인되었다. 양파발효음료의 기능성을 검증하기 위하여 유산 및 초산 발효액에 대한 항산화, 항암, 항고혈압 활성을 조사하였다. 유산 발효액은 착즙액에 비하여 높은 전자공여능 활성을 나타내어, 유

산 발효에 의해 항산화활성이 상승되는 것으로 확인되었다. 유산 발효에 의하여 폐암세포와 대장암세포에 대한 항암 활성이 증가되었으며, 0.5% 이상의 홍삼 추출액 첨가에 의한 유산 발효는 추가적으로 항암 활성을 증가시키는 것으로 확인되었다. 초산 발효액은 폐암세포와 대장암세포에 대하여 높은 암세포 증식억제 활성을 나타내었으며, 초산발효에 의해 항고혈압 활성이 현저히 증가되는 것으로 확인되었다. 양파발효제품의 기능성을 검증하기 위하여 유산 및 초산발효양파를 투여한 흰쥐에서 혈액과 생화학적 활성변화를 조사하였다. 유산발효양파와 초산발효양파의 섭취는 흰쥐의 혈중 포도당, 중성지방, 총콜레스테롤 농도를 저하시키는 반면, HDL-콜레스테롤 농도 및 항산화 효소의 활성을 증가시키는 것으로 확인되었다. 초산발효양파를 섭취한 흰쥐에서 혈중 포도당 저하와 함께 골격근 내 글리코젠 농도가 낮게 나타나, 인슐린 감수성 증가 효과의 가능성이 제시되었다. 그러나 유산 및 초산발효양파의 섭취와 운동의 상승효과는 관찰되지 않았다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구사업을 통하여 양파 유산발효음료와 양파 유산발효분말제품, 양파식초음료와 양파식초분말 등 총 4개 제품에 대한 시제품 개발에 성공하였으며, 유산 발효기술과 초산 발효기술 및 제품화 기술, 단위공정별 제어기술, 식품원료로부터 flavonoid류 등의 추출 기술 등을 확보하였다.

본 연구사업을 통하여 개발한 4개 제품에 대하여 향후 건강기능성 음료의 시장변화를 분석하고 참여업체의 장기적인 사업 전략 및 제품화 전략을 수립하여 실용화가 가능한 시점에 제품화할 예정이다.

본 연구과제 수행 기간 중 참여연구원들을 대상으로 총 6차례 workshop을 실시하였으며 향후 본 연구사업을 통하여 개발 확보한 발효기술, 제품화 기술, 공정제어기술, 추출 기술 등을 본 연구에 참여한 각 협동과제책임자들의 지도 학생들에게 교육시켜 유용균주의 발효에 의한 건강기능식품 제조 분야의 핵심인력으로 양성할 계획이다.

또한 참여업체 소속 연구원들에게 기술 지도를 실시하여 본 연구사업을 통하여 개발한 기술을 관련업체에 확산시킴으로써 궁극적으로는 국내 식품제조 중소기업의 제품개발력 향상에 기여할 예정이다.

본 과제를 통하여 개발된 제품은 2010년 10월 20~30일 경에 이천 설봉공원에서 개최될 이천 쌀문화축제에 전시 홍보할 예정이며, 2010년 11월 초 서울 코엑스에서 개최될 서울 국제팬시푸드 페스티벌에 전시 홍보할 계획에 있다.

본 연구사업을 통하여 현재까지 3건의 특허를 출원하였고, 3건의 품종(유전자원)을 등

록하였는데 발효에 사용된 2개 균주에 대하여 한국중균협회 부설 한국미생물보존센터에 특허 기탁하였고 1개 균주에 대한 16S rRNA의 염기서열을 GenBank에 등록하였다. 또한 본 연구결과를 SCI급 논문 2편, 연구재단 등재지 5편 등 총 7편의 논문에 게재하였다.

현재 양파로부터 quercetin의 추출공정에 대한 내용으로 *Food Sci. Biotechnol.*에 투고하여 심사 중에 있으며 양파식초의 제조공정 및 제품화에 관한 결과와 개발 제품의 기능성에 관한 동물실험 결과를 각각 SCI급 학술지에 투고할 예정이다. 또한 본 연구에서 사용한 유산균과 초산균의 항균활성 등 생리활성에 관한 연구내용을 각각 국내 학술지에 투고할 계획으로, 본 연구과제를 통하여 SCI급 학술지에 5편, 국내 학술지에 7편 등 총 12편의 논문을 게재 완료 또는 게재할 계획이다.

SUMMARY

I. Title

Process Development and Industrial Application of Bio-functional Fermented Onion Beverages

II. Purpose and Necessity of Project

1. Purpose of Project

The purpose of this project is to develop the manufacturing process of the lactic acid-fermented onion beverage and onion vinegar using lactic acid bacteria and acetic acid bacteria, and thereby to produce and commercialize the onion beverages of which functionalities and organoleptic qualities are reinforced, and also to verify the biological functions of fermented onion beverage such as anti-cancer, anti-oxidant, anti-hypertension, weight control, cholesterol-lowering, and stamina effects.

2. Necessity of Project

As our dietary life pattern is westernized, for example, increase of meat intake and decrease of vegetables intake, increase in death rate by lifestyle diseases such as cancer, cardiovascular disease, and diabetes comes to the rise as serious social issue. Recently, the consumer's perception is changed to pursue maintaining health and improving the quality of life, and one's interest is focused to the development of high-functional foods of which purpose are prevention or cure of diseases. The market size of domestic and foreign functional foods is tremendous due to the improvement of one's economic level and, especially, becoming an aging society.

Recent researches reporting that the aging-related diseases rate dramatically drop in people who intake onions in large amount make consumer's perception to onions good as a functional foods. The today's domestic self-sufficiency ratio of onions reaches to 100%, and for this reason, development of various functional foods using onions will activate the functional foods market using products harvested in domestic, and will contribute in pursuing the higher value-added of domestic products.

III. Scope of Project

This project was carried out by organizing one sub-project team and four collaboration teams to accomplish the final goal.

For the sub-project team, lactic acid bacteria with high fermentation ability and biological functions were isolated from vegetables and identified for the development of high functional lactic acid fermented onion beverages. The fermentation characteristics of starter bacteria were investigated and the optimal conditions of fermentation, such as fermentation time, temperature, and inoculation ratio, was confirmed. Also, the scale-up conditions for the lactic acid fermentation of onions were set up and control system of manufacturing process for the mass production was developed.

For the 1st collaboration team, for the development of a commercial onion vinegar having functionalities of both of onions and vinegar, we isolated acetic acid bacteria having excellent acetic acid productivity and higher organoleptic properties. And we have found the optimum culture condition of onion vinegar and detected new antithrombotic activities. Also, we developed the process of the rapid acetic acid fermentation and the control technology of fermentation and manufacture processing for onion vinegar large scale production.

For the 2nd collaboration team, the optimal conditions for extraction of functional compounds from onion edible part and skin were evaluated. And optimal fermentation medium was selected from various combinations. The extraction process was optimized using response surface methodology (RSM). The processing order was decided for production of fermented onion beverages. The hardware system was selected for the overall processing line of bio-functional fermented onion beverages. The scale-up study was performed for optimal operating conditions. The software system for temperature control was developed using Simulink in MATLAB program.

For the 3rd collaboration team, the consumption trends for functional beverages were analyzed and the survey questionnaire was administered to over 100 hundred consumers as a basic study for investigating marketability. We also optimized formulations and large-scaled production conditions of commercial fermented onion beverages through preference tests, chemical analyses, preservation tests and economical analyses.

For the 4th collaboration team, the functional ingredients were determined in the edible part and skin of onions according to the extraction methods. The effects of

heat treatment and storage on functional ingredients of onion were evaluated. In order to verify the functionality of fermented onion beverages, the changes of functional ingredients by lactic or acetic acid fermentation were determined, and *in vitro* and animal tests were performed.

IV. Results of Project

1. Development of Bio-functional Onion Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria

Lactic-acid bacteria isolated from various fruits and vegetables were screened in order to select appropriate fermentation starters for manufacturing functional fermented onion juice. From the initial screening test comprising 702 isolated LAB, 61 isolates were selected based on their acid production rate. From the second screening test, 16 isolates were selected based on their abilities of lactic acid fermentation and the isolate KC-007 was finally selected as a fermentation starter due to its high antioxidant activity such as electron-donating and nitrite-scavenging activities as well as its high antimicrobial activity against food pathogens. The isolate KC-007 was identified as *Pediococcus pentosaceus* based on its morphological and physiological characteristics, carbon-utilization pattern, and molecular genetic characteristics (GenBank accession No. EU569832). The optimal temperature, pH, and starter inoculation concentration required for growth of the isolated strain were 40°C, pH 4.0~6.0, and 2%(v/v), respectively. When the onion extracts were fermented with mixed cultures of *P. pentosaceus* KC-007 and *B. bifidum* ATCC 15696 with ration of 1:2, the highest acidity, viable cell numbers of starter strains, and SOD-like activity were exhibited. When the onion extracts was supplemented with puffed red ginseng extract, viable cell number of lactic acid bacteria was the highest at 24 hr of fermentation in all examined concentrations of puffed red ginseng extract. The electron donating ability and nitrite scavenging ability were highest when red ginseng extract was added at the concentration of more than 1%(w/v). It was found that soaking the onion into 2.0%(w/v) citric acid solution for 24 hr was the best method for the reduction of off-flavor of onion, When the onion extract was fermented in large scale with 1 L or 40 L, the optimal fermentation conditions were obtained as follows; pH of the onion extract was adjusted to 5.0, and mixed cultures of *P. pentosaceus* KC-007 and *B. bifidum* ATCC 15696 with ration of 1:2 were inoculated in the concentration of 2%(v/v) and then fermented at 37°C for 24 hr. When the shelf-life of lactic acid fermented onion extract was examined at 5, 10, 20, or 30°C for 18 days, there was no

change in acidity at 5 and 10°C, and viable cell number of lactic acid bacteria was not noticeably decreased. Yeasts and fungi did not detected in the stored products. Fermented onion extract was freeze dried to manufacture the powder product. From the above results the manufacturing process for the mass production of lactic acid fermented onion extract was set up as follows; onions are washed, cut into 8 pieces, and soak into 2%(%) citric acid solution for 24 hr followed by extraction. Extracts are autoclave at 121°C for 10 min and centrifuge at 10,000×g for 30 min to remove insoluble materials. The pH of onion extract is adjusted to 5.0, autoclave at 121°C for 15 min, and mixed cultures of *P. pentosaceus* KC-007 and *B. bifidum* ATCC 15696 with ration of 1:2 are inoculated in the concentration of 2%(v/v). Fermentation is carried out at 37°C for 24 hr in anaerobic condition. Fermented broth is cooled down and formulate as follows with indicated concentrations; 10%(v/v) fermented broth, 2.38%(v/v) pear extract, 0.2%(v/v) citric acid, 0.02%(v/v) puffed red ginseng extract, 5%(v/v) oligosaccharide, 10%(v/v) high fructose syrup, 2%(v/v) acacia honey, 0.2%(w/v) vitamin C, 0.2%(w/v) pear flavor, 0.29%(w/v) quercetin extract, 69.61%(v/v) water. The formulated product is finally packed into glass bottle. The software system for the temperature control in the fermentation process was developed using Simulink in MATLAB program.

2. Development of Bio-functional Onion Vinegar Beverage

As a part of basic research for enhancing the availability of onions having short shelf-life and for the development of a commercial onion vinegar having functionalities of both of onions and vinegar, we isolated acetic acid bacteria having excellent acetic acid productivity from fallen peaches, and have found the optimum culture condition by using the properties of the response surface method (RSM) and conducted batch and fed-batch culture and compared with organoleptic properties through organic acid compositions of onion vinegar and investigated antithrombotic activity and kinetic parameter and scale-up culture of onion vinegar. In order to produce vinegar using onion, 12 acetic acid bacterium were selected and isolated from the juice of fallen peaches, among which a strain showing the highest productivity of acetic acid was identified as *Acetobacter tropicalis* 11476P. The cultural characteristics of *A. tropicalis* 11476P for maximum acetic acid production were investigated in GYP medium and onion juice. The GYP medium containing 0% initial acidity, 4% ethanol and 2.5% glucose was the most suitable acetic acid production with *A. tropicalis* 11476P, and the acidity of culture medium was 4.02% after 10 days shaking cultivation of 30°C. Also optimum conditions for acetic acid production by RSM using the fractional factorial design with 3 variables and 5 levels were involved with initial

ethanol content 4.67%, initial acidity 0.03% and initial glucose concentration 2.35% and predicted level of acetic acid production at these conditions was 3.77%. Onion vinegar with *A. tropicalis* 11476P after yeast and onion vinegar with only *A. tropicalis* 11476P have revealed higher sensory scores in overall tasted preference than the commercial vinegar in proportion to the ratio of the acetic acid to the total organic acid. The in vitro antithrombotic activities of the onion vinegar of 0.1% maximally prolonged the activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) compared with onion juice having no antithrombotic activity. On the results of fermentation properties of *A. tropicalis* 11476P varying the initial ethanol concentration to 4, 5, 6% on the fermentor with aeration (DO 80%), specific growth rate (μ) was decreased to 0.344, 0.191, 0.114 hr⁻¹, respectively according to increase of initial ethanol concentration, while the acidity was increased to 3.1, 3.8, 4.9% within the fermentation time of 2 days. Fed batch fermentation at the time of exhaustion of residual ethanol was started and the effective feeding substrate to increase of acidity was additively need to protein source such as yeast extract, corn steep liquor except ethanol. Also, fed batch culture by carrying out the continuous substrate feeding showed the increased acidity than it by step substrate feeding. A acidity of onion vinegar by a continuous fed-batch culture can be produced 5.72% at fermentation period 72 hr when the ethanol content of onion juice is reduced to a range of 1.13 to 1.69%. The pilot scale fermentation in order to the industrial onion vinegar production was performed under the conditions that initial ethanol concentration of 6%. The acidity of pilot scale (120 L) onion vinegar at fermentation period 48 hr exhausted the residual ethanol reached to about 4.6%. We come to the conclusion that a industrial brewing vinegar of total acid 4~29% can be produced within 2 days by inoculating and fermentation our identified acetic acid bacteria at onion juice having the initial 6% ethanol.

3. Development of Manufacturing Process of Bio-functional Fermented Onion Beverages

The yield of quercetin and quercetin glycosides from onion edible part and skin part was investigated under various conditions which included solvent types (methanol, ethanol, water and combination of the solvents), time (15-60 min), temperature (30-60°C), ratio of sample over solvent, grinding methods, sample amount, drying methods (freeze dry and hot air dry), microwave, ultrasound and enzyme (cellulase and viscozyme) treatments. For solvent extraction, the maximum yield of quercetin was achieved with 30 mL/g of 80% methanol at 60°C for 15 min. The methanol concentration and the extraction time showed no effect on the extraction yield. As extraction temperature increased, the extraction yield increased. Enzyme

treatment increased the extraction yield about 1.5 times more than the control. 60 sec of microwave treatment improved quercetin extraction above twice more than the control. 30 min of ultrasound treatment showed 7% of improvement on quercetin extraction. The maximum yield was 17.76 ± 1.29 mg/g from onion skin using combination of optimum conditions in various treatment. Also optimum medium for microbes was developed. Onion fermentation process was designed and optimized as measurement of viable cell count, pH, acidity, reducing sugar, nitrite scavenging ability and superoxide dismutase. Viable cell count increased to 5.3×10^8 from 3.1×10^4 , pH decreased to 3.80 ± 0.04 from 5.76 ± 0.03 , acidity increased to $2.31 \pm 0.01\%$ from $0.52 \pm 0.03\%$, reducing sugar decreased to 81.41 ± 3.97 from 101.19 ± 8.23 μmol , electron donating ability increased to 77.56% from 25.53%, nitrite scavenging ability in pH 3 increased to $76.75 \pm 4.94\%$ from $27.38 \pm 3.22\%$, that in pH 4.2 increased to 74.68 ± 1.13 from 25.47 ± 0.65 , in pH 6 increased to $73.60 \pm 3.24\%$ from 25.10 ± 0.58 and superoxide dismutase was similar to control after 48 hr fermentation. Deodorization process was designed through flow rate. 30 mL/min of flow rate was highly deodorized from sensory evaluation. The microwave assisted extraction (MAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of quercetin from onion skin were optimized and compared to conventional solvent extraction (CSE) by response surface methodology (RSM). A central composite design was employed and the response variable was yield of quercetin. The obtained models produced reasonable fittings of the experimental data on yield of quercetin ($R^2=0.937$, 0.988 and 0.809 for CSE, MAE and UAE, respectively). The optimum conditions were achieved with 55.6% ethanol at 59.3°C for 13 min for CSE; 64.5% ethanol for 148 sec of microwave treatment for MAE and 45.7% ethanol for 20.7 min of ultrasonic treatment with power of 721.8 W for UAE. Under the optimum conditions, the highest yields of quercetin were 7.13, 8.99, and 7.41 mg/g for CSE, MAE and UAE, respectively. These results implied that MAE was more efficient and faster extraction method than CSE and UAE. Based on the first and the second detail project results, overall process of fermented onion beverage and fermented onion vinegar were redesigned. Considering economics efficiency, 2%(v/v) citric acid was suitable as deodorization process compared to using activated carbon. To control temperature at 59°C and 37°C for extraction and fermentation, the heat transfer model for steam jacket was developed. Then the control system was simulated using MATLAB program. And the simulation showed a proportional control was appropriate for the control purpose. The specifications for the hardware system for the control system were determined according to the production size. The yields of quercetin and its glycosides from onion skin in lab-scale and pilot-scale under the optimal condition acquired for lab-scale (59°C , 13 min, 56% ethanol) were compared to each other. The yields were 8.35 ± 0.07 mg/g and 7.94 ± 8.68 mg/g for lab-scale and

pilot-scale, respectively. It showed that the optimum condition can be applied to industrial scale to extract the maximum quercetin contents from onion skin if there were good agitation and proper temperature control.

4. Industrial Application of Bio-functional Fermented Onion Beverages

Fermented functional onion juice was developed using lactic acid bacteria and acetic acid bacteria as fermentation starters of onion. From the preliminary studies, we selected *Pediococcus pentosaceus* and *Acetobacter tropiclis* as fermentation starters. The optimum recipe of functional lactic acid fermented onion juice based on manufacturing process and sensory evaluation were determined as 10% of fermentation liquor, 10% of fructose, 5% of oligosaccharide, 2.38% of pear concentrate, 2% of honey, 0.3% of pear flavor, 0.29% of quercetin extract, 0.02% of ginseng extract, etc. In the case of acetic acid fermented onion juice, the optimum recipe were determined as 5% of onion vinegar, 14.94% of oligosaccharide, 4.7% of fructose, 3.3% of grapefruit concentrate, 0.04% of Korean bramble concentrate, etc. Preservation tests showed that the shelf life of fermented onion juices could be greater than 1 month at 4°C of storage temperature.

5. Verification of functionality of Fermented Onion Beverages

An investigation was carried out to study the effects of extraction, heat treatment, and storage temperature on functional ingredients of onion. The highest levels of functional ingredients were observed in samples extracted using water at 100°C. Heat treatment of onion extracts did not effect on the levels of all functional ingredients tested. During the storage, the levels of total phenol, flavonoid, and quercetin were not significantly changed regardless of storage temperature. In order to evaluate the biofunctional effects of lactic acid or acetic acid fermented onions, antioxidant, anticancer, and antihypertensive activities were determined. DPPH radical scavenging activity of lactic acid fermented onion juice was greater than that of control onion juice. The fermented onion juice showed strong anti-proliferative effects against all cancer cells tested. The anticancer activity of the fermented onion juice was further increased when it was supplemented with puffed red ginseng extracts at the concentration of over 0.5%(w/v). Onion vinegar was found to have stronger growth inhibition against all cancer cells tested as well as greater ACE inhibitory activities, compared to control onion juice. In order to evaluate the physiological functionalities of the fermented onions, changes of blood components and biochemical activities were determined in Sprague Dawley rats. The fermented onion diets resulted in decreasing

the levels of glucose, triglyceride, and total cholesterol in blood, but increasing HDL-cholesterol levels and superoxide dismutase activities. Especially, lactic acid fermented onion diet reduced the serum glucose levels with significant decrease in glycogen levels in muscle, suggesting that the fermented onion may have a capacity to increase insulin sensitivity. However, the enhancement of exercise performance was not observed in rats supplemented with the fermented onions.

V. Outcome of Project and Application Plan

Four prototypes of lactic acid-fermented onion beverage, powder form of lactic acid-fermented onion beverage, onion vinegar beverage, and powder form of onion vinegar beverage were developed and lactic acid fermentation, acetic acid fermentation, extraction, and commercialization technologies were obtained.

Four products, which were developed from this project, will be commercialized in the near future through the analysis of functional foods market and building the business strategy of the involved company.

Six workshops were held to the involved researchers during the project period and the students will be educated on the fermentation, commercialization, process control, and extraction technologies, and thereby the students will be cultivated as core of professionals in the area of functional foods manufacturing.

Also the technologies, which were developed through this project, will be distributed to related companies by training the researchers in the involved company, and thereby will contribute to the improvement of product development of small and medium-sized companies.

The developed products will be exhibited at the Icheon Rice Culture Festival which will be held at Icheon on October 2010, and also will be exhibited at Seoul International Fancy Foods Festival which will be held at COEX on November 2010.

Up to now, three patents were applied and three varieties were registered and among them two fermentation strains were registered to KCCM and the nucleotide sequence of 1S rRNA from one strain was registered to GenBank. The results of this project were published, two papers on SCI-level journals and five papers on domestic journals.

Currently, a paper on the extraction of quercetin was submitted to *Food Sci. Biotechnol.* and papers on the manufacturing process of onion vinegar and *in vivo* experiments of functionality of products will be submitted to SCI-level journals. Also papers on the functional properties of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria will be submitted to domestic journals. Total five papers in SCI-level journals and seven papers in domestic journals will be published through this project.

CONTENTS

Chapter 1	Overview of Project	23
Paragraph 1	Purpose of Project	23
Paragraph 2	Necessity of Project	23
Paragraph 3	Scope of Project	35
Chapter 2	Current State of the Art in Domestic and Abroad	37
Chapter 3	Results of Project	41
Paragraph 1	Development of Bio-functional Onion Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria	41
1.	Introduction	41
2.	Methods	42
3.	Results	51
4.	Conclusion	137
Paragraph 2	Development of Bio-functional Onion Vinegar Beverage	141
1.	Introduction	141
2.	Methods	144
3.	Results	150
4.	Conclusion	196
Paragraph 3	Development of Manufacturing Process of Bio-functional Fermented Onion Beverages	200
1.	Introduction	200
2.	Methods	201
3.	Results	214
4.	Conclusion	275
Paragraph 4	Industrial Application of Bio-functional Fermented Onion Beverages	278
1.	Analysis of Fermented Onion Beverage Market Trends	278
2.	Development of Fermented Onion Beverage	376
3.	Shelf-life Study and Scale-up	401
Paragraph 5	Verification of functionality of Fermented Onion Beverages	438
1.	Introduction	438
2.	Methods	439
3.	Results	446
4.	Conclusion	493

Chapter 4	Achievement of Goal and Contribution in Related Areas	495
Paragraph 1	Achievement of Goal	495
Paragraph 2	Contribution of Technology in Related Areas	498
Chapter 5	Outcome of Project and Application Plan	499
Paragraph 1	Commercialization Plan	499
Paragraph 2	Distribution Plan of Technology Including Education, Guidance, Promotion	499
Paragraph 3	Securement of Intellectual Property Rights Including Patents, Varieties, Papers	501
Paragraph 4	Supplemental Researches, Application Plan to Other Researches	503
Chapter 6	Foreign Scientific and Technical Information Obtained During the Process of Project	504
Chapter 7	References	507

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	23
제 1 절	연구개발의 목적	23
제 2 절	연구개발의 필요성	23
제 3 절	연구개발의 범위	35
제 2 장	국내외 기술개발 현황	37
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	41
제 1 절	고기능성 유산균 발효 양파음료 개발	41
1. 서론		41
2. 연구방법		42
3. 연구결과		51
4. 결론		137
제 2 절	기능성 양파식초음료 개발	141
1. 서론		141
2. 연구방법		144
3. 연구결과		150
4. 결론		196
제 3 절	기능성 양파발효음료 제조공정 개발	200
1. 서론		200
2. 연구방법		201
3. 연구결과		214
4. 결론		275
제 4 절	기능성 양파발효음료의 산업화 연구	278
1. 발효양파음료의 시장 동향 분석 및 수요도 조사		278
2. 발효양파음료의 개발		376
3. 발효양파음료의 저장성 검토 및 Scale-up		401
제 5 절	양파발효음료의 기능성 검증	438
1. 서론		438
2. 연구방법		439
3. 연구결과		446
4. 결론		493
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	495
제 1 절	연구개발목표의 달성도	495

제 2 절	관련분야에의 기술발전에의 기여도	498
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	499
제 1 절	실용화·산업화 계획	499
제 2 절	교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등	499
제 3 절	특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등	501
제 4 절	추가연구, 타 연구에 활용 계획 등	503
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	504
제 7 장	참고문헌	507

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구는 다양한 생리활성기능을 지니고 있는 양파를 이용하여 기능성이 강화되고 기호성을 높인 음료를 제조하여 산업화하기 위하여 고기능성 유산균과 초산균을 사용하여 양파 착즙액 또는 양파 육질을 발효시킨 유산발효음료와 양파식초의 제조공정을 개발하고 항암, 항산화, 항고혈압, 체중조절, 콜레스테롤억제, 운동능력향상 효과 등 양파 발효제품의 다양한 생리활성을 검증하는 것을 최종 목표로 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

식생활이 서구화되어 감에 따라 육류의 섭취는 늘고 채소나 자연식품의 섭취가 감소하면서 암, 심혈관계질환, 당뇨병 등 각종 성인병에 의한 사망률의 증가가 심각한 사회 문제로 대두되고 있다. 최근 건강유지 및 삶의 질 향상을 추구하는 소비자의 의식변화로 인해 예방 또는 치료 목적의 고기능성 건강식품의 개발에 많은 관심이 집중되고 있으며, 특히 고령화 사회와 더불어 경제적 수준의 향상으로 건강기능성식품의 시장규모는 국내 외적으로 무한하다고 볼 수 있다.

2005년 우리나라 국민의 사망원인을 보면 암에 의한 사망이 26.7%로 1위이고, 뇌혈관 질환에 의한 사망이 12.7%, 심장질환이 7.9%를 차지해 암과 심혈관계질환이 전체 사망원인의 50%에 육박하고 있다. 한편 인구의 급속한 고령화에 따라 65세 이상의 노인인구는 1995년 5.9%에서 2005년 8.7%로 증가되었고, 2020년에는 13.2%에 이를 전망으로 앞으로 노인병과 성인병으로 인한 의료비 부담은 폭발적으로 증가하게 될 것으로 예측된다.

최근 양파를 많이 섭취한 사람들의 경우 암, 심혈관계질환 등 노화관련 질환의 발생률이 현저히 떨어진다는 보고가 잇따르면서 건강기능성 소재로서 양파에 대한 소비자들이 인식이 매우 높아져 있다. 현재 양파의 국내 자급률은 100%에 이르기 때문에 양파를 소재로 한 다양한 기능성식품의 개발은 국내에서 생산되는 농산물을 이용한 건강식품시장의 활성화에 밑거름이 될 것이며, 국내외적으로 우리나라 농산물의 고부가가치화를 추구하는데 크게 기여할 것이다.

1. 양파의 국내 수급현황

가. 생산동향

우리나라 양파의 재배면적 및 생산량은 2003년 이후 지속적인 증가추세를 나타내고

있다(Table A). 2005년 양파 수확기(5~6월) 동안 전국 744개 표본지점을 대상으로 실시한 결과 양파 생산량은 1,023천 톤으로 이는 전년 생산량 948천 톤보다 75천 톤(8.0%) 증가한 것이다. 1980년대 접어들면서 양파 재배면적의 증가와 재배기술 및 신품종 개발 등으로 인하여 양파 생산의 기초적인 증가가 이루어지고 있다.

Table A. 연도별 양파의 재배면적 및 생산량 동향

구 분	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
재배면적(ha)	14.8	16.1	16.8	19.0	15.3	12.4	15.6	16.7
생 산 량(천톤)	872	936	878	1,074	933	745	948	1,023

2005년 양파 생산량이 이처럼 증가한 것은 10 ha 당 수량이 6,114 kg으로 전년보다 24 kg(0.4%) 증가하였으며, 재배면적이 16.7천 ha로 전년도보다 7.5% 늘어났기 때문이다. 재배면적이 늘어난 이유는 평년보다 파종기 가격이 높고, 단위당 소득도 높아 재배면적이 증가했기 때문인 것으로 보인다.

- 재배면적 현황: ('04) 15.6 → ('05) 16.7천 ha (7.1% 증가, 1.1천 ha 증가)
- 파종기(9~11월) 가락시장가격(도매상품, 원/kg):
(평년) 536 → ('02) 504 → ('03) 949 → ('04) 614
- 10 a 당 농가소득(통계청 농산물생산비조사결과, 천원):
(평년) 1,016 → ('02) 1,024 → ('03) 1,766 → ('04) 1,156

10 ha 당 수량은 생육초기(3~4월)에는 강수량이 적고 기온이 낮아 작황이 좋지 않았으나, 생육후기(5~6월) 풍부한 일조량 등 기상여건의 호조로 전반적인 작황은 전년과 비슷하게 나타났다.

- 10 ha 당 수량: ('04) 6,090 kg → ('05) 6,114 kg (0.4% 증가)
- 생육초기(3~4월) 기상현황:
강수량(mm): (평년) 154.5 → ('04) 151.4 → ('05) 133.7
평균기온(°C): (평년) 8.7 → ('04) 9.5 → ('05) 8.4
- 생육후기 및 수확기(5~6월) 기상현황:
일조시간(hr): (평년) 435.6 → ('04) 389.6 → ('05) 422.8

나. 수출동향 및 전망

양파의 수출은 국내생산과 가격동향에 따라 좌우되지만 해당 수입국가의 작황동향 및 가격도 매우 중요한 요인으로 작용된다. 국가별 수출실적은 대일본 수출이 대부분이고 러시아, 중국, 대만 등에 일부가 수출되고 있다. 중국은 수출용 양파의 품질개선으로 가격

경쟁력은 물론 품질 경쟁력도 확보하고 있으며 일본 바이어가 자국의 우수한 품종을 중국으로 가져가 계약재배하고 있는데, 중국양파의 품질개선이 두드러지게 향상되고 있어 장기적으로 수출자체가 어려울 수 있을 것으로 업계는 전망하고 있다.

2. 양파의 해외시장 동향

가. 일본

일본의 양파생산은 도시근교의 주택화, 노동력 부족, 작목전환 등에 따른 재배면적 감소로 최근 몇 년간 생산량의 점진적 감소가 진행되었다. 예상 출하량은 고온과 강우량 부족으로 작황이 부진했던 전년에 비해 6~15% 증가가 전망되고 있으며, 재배 예상면적은 도시근교의 택지화와 노동력 부족 등으로 감소가 예상되었으나 관계기관의 재배장려에 의해 전년수준의 재배면적이 예상된다.

일본은 평균 20만 톤 내외의 양파를 수입하고 있는데 이중 미국, 중국, 뉴질랜드가 90% 이상을 차지하고 있으며 매년 수입이 증가하고 있다. 일본의 양파 수입은 연중 이루어지고 있는데 주 수입시기는 국내산이 품귀를 보이는 12월 후반부터 이듬해 3월까지 도입되고 있으며, 4~5월과 11~12월은 일본 자국산 출하로 수입수요 감소시기이다.

한국산은 4~6월에 수확되므로 홋카이도산 출하시기(9월) 이전인 7~8월이 수출적기인 것으로 판단되며, 일본의 양파수입은 주산지인 홋카이도산의 작황에 따라 다소 차이가 있으나 매년 17~25만 톤의 수입이 필요한 것으로 추산되고 있다.

대만산은 저장력이 약해 생산시기 이후인 6월부터는 수입의존이 불가피하며, 중국산은 가격경쟁력은 우수하나 품질면에서 아직은 뒤떨어지고 있다. 현재 한국산 양파 수출시기인 6~8월에 일본으로 수출하는 국가는 중국뿐이다.

나. 중국

중국의 양파 재배면적은 20~30만 ha, 생산규모는 500만 톤 내외로 추산되고 있다.

홍색양파(red onion)는 중국양파의 대부분을 차지하는데, 특히 남부지역의 홍색양파는 조생종으로 수출용으로 부적합하다(일부 동남아시아 국가에서 수입하고 있음). 황색양파(yellow onion)는 산동성, 하북성, 운남성, 감숙성 등의 일부지역에서 생산되어 한국과 일본으로 수출되고 있으나, 낙후된 재배기술과 품종상의 문제로 상품성이 낮은 문제점이 있다.

양파의 수확시기는 산동성, 하북성의 경우 2~3월에 파종하여 5~6월에 수확하며, 감숙성의 경우에는 5월에 파종하여 9월에 수확하고 있다.

3. 양파의 생리적 기능

양파 (*Allium cepa* L.)는 백합과에 속하며 비교적 냉한 기후에 적합한 작물로 연작이 가능한 채소이다. 양파는 재배역사가 오래되었고, 향기성분의 특성으로 인하여 고추, 마늘 등과 더불어 전 세계적으로 많이 이용되고 있는 조미 채소 중의 하나이다.

양파는 대부분 삶거나 볶아서 향신료 및 조미용으로 각종 요리에 사용되며 압출스낵, 조미액, 스프 등의 가공식으로도 이용되고 있다. 양파는 우리나라의 남부지방의 특산물로 5~7월 사이에 대부분 생산되어 저온고에 저장되었다가 수요량이 많은 시기에 출하하는데, 절임용, 건조가공용 등으로 일부 소비되고 90% 이상은 생채로 저온 저장되었다가 출하된다.

앞서 언급한 바와 같이 국내의 양파 생산량은 1990년 이후 꾸준히 증가 추세에 있으며 2005년 전국 생산량은 1,023,000톤으로 마늘 생산량의 약 2배 정도를 차지하고 있다(김웅채, 1999). 그러나 양파는 저장성이 낮아 저장 중 조직의 부패, 연화 등으로 인하여 전체 생산량의 10~20%가 상품적 가치를 상실하여 퇴비로 이용하거나 버려지고 있다. 따라서 양파 경작 농민의 안정적인 소득을 위해서는 소비대책 마련과 가공 및 저장 기술의 개발이 시급한 실정이다.

양파는 수분함량이 높아 저장성이 매우 약하며, 저장기간 중 중량감소 및 부패가 일어나기 쉬운 뿐만 아니라 맵아, 발근 및 위조에 의해 상품가치가 저하되므로 이를 예방하기 위해 저온저장(Cho et al., 1983; Lee, 1984), 방사선 처리(Park et al., 1972; Park et al., 1974), 훈증처리(Kim et al., 1986a; Kim et al., 1986b), 건조(Kim et al., 1990, Lee et al., 1995) 등에 대한 연구가 이루어지고 있다.

건조는 식품을 보존하는 수단으로 오랫동안 사용되어져 왔으며, 양파의 건조는 주로 열풍건조방법을 사용하고 있고, 유동화 기술(fluidization technique)(Swasdissevi and Soponronnarit, 1999), 얇은 막 건조법(thin layer drying)(Rapusas and Driscoll, 1995), 음향건조법(acoustic drying)(Da-Mota and Palau, 1999) 등을 이용하려는 시도도 있었다. 그러나 건조양파는 환원당 또는 아미노산 등의 함량이 높아 매우 흡습성이 커서 저장 중에 덩어리 형성, 갈변 등에 의한 품질저하가 발생될 뿐만 아니라 풍미와 영양가 감소도 일어난다(Lewicki et al, 1998; Harold, 1959). 분말양파는 식품공업에서 케찹, 수프, 소시지 및 스낵식품 등의 천연조미료로서 많이 사용되고 있으며, 사용의 편의성 때문에 일반 가정이나 음식점에서도 이용되고 있다(Farrell, 1985).

양파는 민간요법에서 스테미너 식품으로 정력을 좋게 하고 신진대사를 높여주며 각종 균을 죽일 수 있고 장에서 소화효소의 작용을 높여주고 모세혈관을 보호하여 피의 흐름을 좋게 할 뿐만 아니라 혈압이나 동맥경화증의 예방에 좋다고 하였으며 이뇨제, 거담제

로서 애용되어 왔다(Block, 1999). 양파의 특수한 냄새는 방부효과를 가지며 육류의 좋지 못한 냄새나 맛을 제거하는 데도 효과적이다(임종삼, 1993).

양파는 organosulfur를 함유하는 백합과 채소 중 가장 널리 식용되는 식물로서 양파의 성분 중에는 quercetin 4'-glucoside, quercetin 4',7-diglycoside, quercetin 3,7-diglycoside, quercetin 3,4'-diglycoside, quercetin aglycone, isorhamnetin monoglycoside, kaempferol monoglycoside 등의 flavonoid 류가 함유되어 있으며 이 중 80%가 quercetin diglycoside, monoglycoside, quercetin aglycone으로 구성되어 있다(Leighton, 1992).

양파의 껍질은 식용부위에 비하여 약 10-100배의 flavonoid를 함유하며, 특히 강력한 항산화제로서 세포의 산화적 손상과 지방의 산패를 막아주는 역할을 하는 quercetin은 다른 야채나 과일에 비하여 매우 높게 함유되어 있다. 양파에 존재하는 이러한 quercetin 관련물질과 allyl propyl disulfide, allyl sulfide, S-methylcystein-sulphoxide와 같은 화합물은 항산화작용(Lee and Park, 1996; Lee and Lee, 1990), 중금속 제거(Lee et al., 1999), 혈중 중성지방과 콜레스테롤 함량 감소(Bakhsh and Kgan, 1991; Qureshi et al, 1983), 항혈전작용(Harenberg et al., 1988; Lawson et al., 1992; Kiesewetter et al., 1993), 고혈압 및 당뇨병의 예방(Jain and Vyas, 1973; Morimitsu and Kawakishi, 1990; Jain et al., 1973), 항암작용, 항균작용, 골다공증억제, 비만억제 등 매우 광범위한 생리기능 활성화에 도움이 된다고 보고되어 있다.

또한 양파의 주성분은 glucose, fructose 및 sucrose 등의 당분으로 단맛이 아주 독특하며, 다른 음식물과 곁들여 먹으면 비타민 B1의 흡수가 촉진되어 신진대사가 높아지고 피로 회복이 빨라 스태미너가 증강된다고 알려져 있다(Cho and Yoo, 1997.).

양파는 양파세포가 파괴되었을 때 alliinase라는 효소가 비휘발성의 냄새가 없는 전구 물질에 작용하여 황을 함유한 많은 휘발성 화합물과 pyruvate, ammonia, thiosulfinate 등이 생성된다(Hanum et al., 1995; Boelens et al., 1971). 양파의 냄새는 너무 강해 식품 가공에서 선호되지 않아 유효성분인 황함유성분의 손실없이 냄새를 masking할 수 있는 물질을 찾는 연구도 활발히 진행되고 있다(Kee and Park, 1999).

양파의 생리활성기능에 관한 연구로는 Gupta(1966)의 심혈관계 질환 예방, Menon 등(1968)의 혈전증 치료에 관한 효과, Jain 등(1973)의 혈당 저하효과, 허 등(1985)의 항산화 효과 및 Sheo 등(1997)의 납 독성의 해독 효과 등이 보고되었고, Lee 등(1990)은 양파즙이 고등어의 지질산패의 진행을 억제하고 지방산 조성의 변화를 감소시키는데 효과가 있다고 보고하였다. 또한 박 등(1991)은 혈청 중의 지질함량을 낮추고 CCl₄ 독성을 완화시키는 작용이 있으며, 간지질의 과산화를 억제시키는 효과(박평심 외, 1994) 및 DNA 손상 억제 효과(박평심 외, 1992) 등을 보고하였다. 이 등(1995)은 유해균인 clostridia와 대장균

에 대한 생육억제 작용을 보고하는 등 생리활성물질들에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

최근 연구에서 향균(Sheo, 1999), 항암(Ma, 2000; Lee et al., 2000; Rho and Han, 2000), 항산화(Lee et al., 2000; Jain and Vyas, 1973) 및 중금속 제거 효과(Sheo et al., 1997) 등 양파의 다양한 생리활성기능이 밝혀져 민간요법의 효능이 재확인되고 있으며, 이들 특성은 주로 S-alkyl 또는 S-alkenyl thiosulfinate류 및 sulfide 류 등 함황화합물에 기인한다는 사실도 밝혀졌다(Block et al, 1992; Block, 1992). 이와 더불어 flavonoid의 일종인 quercetin은 심혈관 질환을 비롯하여 유방암, 대장암, 난소암, 위암, 폐암, 방광암 등의 억제에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. Babu 등(1997)은 동결건조시킨 양파가루 3%를 쥐에게 급여하였을 경우 고혈당이 감소하였으며, 혈중 콜레스테롤 함량과 특히 혈중 인지질과 중성지질이 유의적으로 감소하였음을 보고하였다.

또한 양파의 항미생물작용과 항암작용에 관한 연구 결과들이 보고되어 있으며(Didry et al., 1992), 특히 Sheo(1999)는 0.5~2.5%의 양파즙의 첨가수준에서 *Staphylococcus aureus* 와 *Vibrio parahaenolyticus*에 대한 항균력이 강하였으며, 이는 *Allium* 속 식물에 함유된 유황 화합물에 의한 것으로 추측된다고 보고한 바 있다. Bilyk 등(1984)은 양파 종류에 따라 flavonol의 농도 변화가 커서 노란 양파와 붉은 양파의 경우 육질의 flavonol 농도는 60~1,000 mg/kg의 범위를 나타낸다고 하였고, 색을 가진 마른 껍질에 특히 flavonol 함량이 높아 2.5~6.5%로 많은 양이 함유되어 있으며 이들의 함량은 산지, 품종에 따라 상당한 차이가 있다고 보고하였다.

또한 양파에 대한 항산화효과는 대부분 양파 육질이나 양파즙(Pratt and Watts, 1964; Pratt, 1964)에 대한 것으로 상당히 많은 양의 flavonoid를 함유하고 있는 국내산 양파껍질에 대한 연구는 Kang 등(1998)이 양파박에 quercetin 관련물질이 상당량 함유되어 있다고 보고되었을 뿐 상당히 미흡한 실정이다.

4. 유산균 발효

1980년대에 들어 우리나라 국민의 소득이 크게 향상되면서 식생활 문화도 고품질의 방향으로 빠르게 발전하고 있으며 이러한 식생활의 결과는 결국 고염분, 고칼로리 및 고지방의 음식물섭취를 가속화시켜 뇌졸중, 고혈압, 당뇨병 등의 성인병 발생요인이 되고 있다. 이에 따라 국민들은 몸에 좋은 음식물 섭취를 통하여 건강을 유지관리하고 질병을 예방해 보려는 의식이 급속히 확산되면서 영양적이고 의료효과가 높은 기능성 식품과 자연식품을 적극적으로 찾는 경향을 나타내고 있다. 이러한 건강 지향형의 식품으로서 관심이 높아진 것 중의 하나가 유산균에 의한 발효유제품을 들 수 있다.

일찍이 메치니코프가 유산균 발효유의 불로 장수설을 발표하고 나서부터 수 많은 연

구자들이 유산균발효 유제품의 건강발효를 연구한 결과, 유산균은 장내 균총의 개선, 장내 부패의 억제, 설사와 변비의 치료 효과, 혈중 콜레스테롤 저하 작용, 항암효과 등이 있는 것으로 보고되어 있다. 이러한 발효유, 유산 음료의 의학적 효용은 그 원료인 우유 그 자체의 효과도 있지만 이것에 추가하여, 유산균 그 자체에 의한 효과를 생각할 수 있다.

유산균은 오래전부터 우리들의 식생활과 밀접한 관계를 유지하면서 된장, 간장 및 김치 등의 전통 발효 식품 등의 제조에 중요한 역할을 담당하고 있다. 유산균은 그람 양성 세균으로, 각종의 당을 발효하여 에너지를 획득하고 소비한 포도당으로부터 50% 이상의 유산을 생성하는 세균의 총칭으로, 유산발효를 하여 식품의 부패를 방지하고 박테리오신과 같은 항균물질을 분비하여 식중독균을 억제하고 사람의 장내 pH를 낮추어 장내 부패 세균의 증식을 억제하는 등 인체에 기능성을 부여하는 미생물이다.

유산균은 농산물, 식품 및 동물의 몸에 이르기까지 자연계에 널리 분포하고 있다. 현재 유산균은 12개 속(*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Atopobium*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*)으로 분류되어 있으며, 산업적으로 중요시되고 있는 속으로는 발효유와 치즈 등의 starter로서 이용되고 있는 *Lactobacillus*와 *Lactococcus*, *Streptococcus* 등이지만 이외에도 기능적으로 볼 때 유산균과 같은 몇 가지의 균들이 더 있고, 특히 최근에 많이 연구되고 있는 *Bifidobacterium*의 이용이 활발하며, 그 밖에도 고초균 계통의 *Bacillus coagulans*와 *Sporolactobacillus inulinuse*도 있으며 앞으로 이들의 용도개발이 기대된다.

발효유란 생유, 시유 또는 동등 이상의 SNF를 함유한 젖을 유산균 또는 효모로 발효시켜 호상 또는 액상으로 한 것을 말한다. 발효유에는 유산균을 이용한 유산균 발효유와 유산균과 효모를 동시에 이용한 알코올 발효유가 있는데 유산균 발효유가 대표적으로 알려져 있다. 발효유의 제조에 이용되고 있는 유산균 중에서 간균은 산생성능이 좋으며, 구균은 풍미물질을 생산한다. 통상 yoghurt 제조에는 *Streptococcus thermophilus*와 *Lactobacillus bulgaricus*의 혼합 starter가 이용되며 *S. lactis*와 *L. bulgaricus*를 병용하거나 *L. bulgaricus*를 단독으로 사용할 때도 있다.

유산발효는 정상유산발효와 이상유산발효로 대별할 수 있는데 정상유산발효는 glucose로부터 주로 lactic acid를 85% 또는 그 이상 생성하는 발효로서 이 같은 발효를 행하는 유산균을 정상유산발효 유산균이라고 부른다.

한편 이상유산발효는 glucose로부터 유산과 그 이외 물질을 생성하는 발효로서 2가지 형태가 있는데 하나는 glucose를 발효하여 lactic acid, alcohol을 생성하는 발효형식이고, 또 하나는 glucose 1 mole에서 유산 1 mole과 초산 1.5 mole을 생성하는 발효형식을 취하는 것으로, 전자의 이상발효형식을 취하는 것이 *Leuconostoc*과 이상발효 *Lactobacillus*이고 후자의 발효형식을 취하는 것이 *Bifidobacterium*이다.

유산균이 식품가공에 이용되는 목적은 식품의 보존성향상, 풍미와 영양증진 및 건강효과를 얻기 위함이다. 유산균 발효음료의 효용에 대해서는 메치니코프의 블로장수설을 시작으로 많은 연구자에 의하여 위장장애, 간장장애, 신염, 하리, 대장염, 식욕부진, 빈혈 등에 유효하고 이것이 장 연동의 조정, 병원균의 억제, 소화흡수의 촉진, 고장의 경감, 간장기능의 촉진 등에 의한 것이라고 생각할 수 있다.

최근에는 유산균 발효유에 관한 연구가 과학적으로 진행되어 장내 유해균 억제 작용 및 정상작용, 혈중 콜레스테롤 감소 기능, 면역 증강 작용, 영양학적 가치 증진, 내인성 감염 억제 작용, 간경화 개선 작용, 항암작용, 노화억제 작용, 피부 미용 효과, 유당불내증 격감 작용, 돌연변이 억제효과 등 다양한 생리활성을 지니고 있는 것으로 나타났다.

유업계에서 사용하고 있는 유산균 starter의 기능으로서는 당의 발효(유산의 생성에 의한 풍미의 생성 및 오염균의 억제), 단백질의 분해(생육에 필요한 아미노산, peptide의 생성 및 치즈의 숙성), 향미 생성(유기산, acetaldehyde, acetoin 및 diacetyl), 조직의 부여(산에 의한 유단백질의 응고 및 세포의 다당물질), 향균물질의 생산(유산에 의한 pH 저하, 과산화수소, diacetyl, bacteriocin 등) 등이 중요하다.

유산균의 중요한 생리적 특징을 설명하면 다음과 같다.

가. Lactose 대사

우유 중에는 미량의 포도당 외에 중요한 당원으로서 유당이 우유 총 고형분의 4.1~5.0%를 차지하고 있다. 이 때문에 유당 대사능은 유업용 유산균의 생육과 유산 발효에 있어서 불가결한 유산균의 성질이다.

유당의 세포내로의 유입 경로는 lactose permease계, phosphoenolpyruvate 의존성 phosphotransferase system 및 lactose 수송 ATPase계가 보고되고 있으며, 세포내로 유입된 lactose는 β -galactosidase(β -gal)와 P- β -gal에 의해서 포도당과 galactose 및 포도당과 galactose-6-phosphate로 분해되어 결과적으로 1 mol의 lactose로부터 4 mol의 유산이 생성된다. 한편, lactose로부터 분해된 galactose는 일반적으로 Leloir 경로에 의해 대사되나 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* 및 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*에 있어서는 Leloir 경로상의 galactokinase의 결손에 따라 galactose가 대사되지 않기 때문에 세포 밖으로 배출되어 결과적으로 에너지 획득의 손실이 되고 있으나 밖으로 배출된 galactose는 고분자 물질로 전환되어 발효유제품의 조직에 좋은 영향을 부여하고 있다.

나. 단백질 분해능

Lactose 대사능에 부가하여 단백질 분해능은 유산균이 우유 중에서 생육하기 위해서

필수 불가결의 특성중의 하나이다.

즉 우유 중에는 유산균이 충분히 생육할 수 있을 만큼의 유리 아미노산은 존재하지 않기 때문에 유업용 유산균에는 유단백질을 peptide까지 분해해서 세포내로 유입한 후 peptidase에 의해서 아미노산까지 분해하는 일련의 단백질 분해 효소계가 보고되고 있다. 한편, 유단백질의 분해에 의해서 생기는 peptide 및 유리 아미노산은 세균의 생육뿐만 아니라, 유제품의 풍미와 맛에 대해 큰 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다. 특히, 치즈 제조 시에 제기되는 문제로서 쓴맛이 있는데, 이것은 유산균에 의한 숙성 과정에서 생성되는 것으로 지적되어 왔다. 이 쓴맛은 proline, leucine 및 tryptophan 등의 소수성 아미노산을 포함하는 peptide에 의하여 나타나는 것으로, 유산균의 단백질 분해계에 의해 proline등을 풍부하게 함유하고 있는 β -casein의 분해에 의한 결과로 추정되고 있다.

다. Flavor 생산성

발효유 제품이 갖는 특징적인 풍미는 diacetyl, acetoin 및 acetaldehyde 등의 carbonyl 화합물이며, diacetylactis 및 acetoin은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 와 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* 등에 의하여 생성되는 것으로 보고되고 있다. 이 균들은 citrate의 투과 및 분해계를 갖고 있어, 우유 중에 포함되어 있는 citrate를 세포내로 유입시켜 diacetyl과 acetoin으로 분해한다. 또한, 풍미물질은 lactose대사로부터 생성된다.

해당계에 의해서 생성된 pyruvate는 혐기적 조건하에서 $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$ 를 수반하여 유산으로 변환되지만, 배지 중에 용존 산소가 존재하면 NADH oxidase 를 촉매로 하는 $\text{NADH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD} + \text{H}_2\text{O}_2$ 의 반응이 진행되기 때문에 NADH 가 부족하여, pyruvate로부터 유산생성이 충분히 일어나지 않은 결과, 일부의 pyruvate로부터 diacetyl이 생성된다.

한편, 발효유의 풍미물질인 acetaldehyde의 생성에는 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* 와 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*가 관여하고 있으나, 주요한 생성경로는 단백질의 분해에서 생성되는 threonine을 glycine과 acetaldehyde로 전환하는 계이다.

라. 항균물질의 생산

유산균의 또 하나의 특성은 항균물질의 생성이다. 오래 전부터 유산균은 김치, 사일리지, 치즈, 발효유 등의 식품 보존에 널리 활용되어 왔으며 이러한 것은 오늘날에도 변함이 없다. 유산균에 의한 식품 보존의 기작은 일차적으로 당발효에 따른 유산 및 초산 등의 생성이라 할 수 있다.

그 외의 항균물질로는 hydrogen peroxide, diacetyl 및 bacteriocin 등이 있다. 이 중에

서 유산균이 생산하는 bacteriocin은 일반의 항생물질과는 구분되는 natural antibiotic으로서, 발효식품의 보존성 향상에 기여하는 항균성 peptide로서 인식되어, 다수의 bacteriocin이 유산균으로부터 분리되어 있다.

그 중에서도 산업상 중요한 위치를 차지하고 있는 bacteriocin은 *Lac. lactis* subsp. *lactis*가 생산하는 nisin으로 그람 양성균의 부패균의 생육을 억제하는 식품 첨가제로서 구미를 중심으로 사용되고 있다.

5. 식초 발효

식초는 동서양을 막론하고 오랜 옛날부터 이용되어온 전통식품으로 소량의 휘발성 및 비휘발성의 유기산, 당류, 아미노산, ester 등을 함유한 독특한 방향과 신맛을 지닌 대표적인 발효식품이다. 초산발효는 초산균의 작용으로 알코올이 산화되어 초산을 생성하는 호기적 발효이다. 발효산물인 식초의 신맛은 소화기관을 자극하여 소화액의 분비를 촉진함으로써 소화작용을 돕고 청량감을 줌으로써 식욕을 돋운다.

국내에서 양조식초는 알코올을 주원료로 사용하고 곡물이 4% 이상 함유된 곡물식초, 과즙이 30% 이상 함유된 과실식초의 형태로 시판하고 있다. 식초의 종류별 생산비율은 양조식초 50%, 사과식초 36%, 현미식초 12%, 기타 2%로 양조식초의 소비가 매년 증가하는 추세이다. 100% 순수한 과실만을 원료로 사용하여 자연발효시킨 천연양조식초인 감식초 및 포도식초는 극히 일부 생산되고 있으나, 1인당 식초 소비량은 0.38 L 정도로 1인당 2 L를 소비하는 선진국 수준에 크게 미치지 못하고 있는 실정이다.

식초는 음식을 조리할 때 신맛을 내게 하는 조미료로 쓰이는 것은 물론 짠맛, 단맛 등의 음식 맛을 부드럽게 하고 특유의 향미를 더해준다. 또한 생선의 비린내를 감소시키고, 육류를 연하게 하는 등 조리에 다양하게 이용되고 있으며, 소스, 마요네즈, 드레싱, 케찹의 원료, 향미제로도 이용되고 있다. 또한 식초는 초산을 비롯하여 TCA cycle에 관여하는 유기산을 다량 함유하고 있어서 체내에 젖산을 축적시키지 않고 TCA cycle을 순조롭게 진행시켜 과격한 운동이나 과로에 의한 피로회복에 좋으며 혈액을 약 알칼리성으로 만들어 주는 작용을 한다.

또한 식초는 다이어트에 효과가 있고 과산화지질을 분해하여 동맥경화를 예방하며, 스트레스를 관리하는 부신피질 호르몬의 분비를 촉진하고, 소화 및 식욕촉진에 효능이 있다고 알려져 있으며, 혈압 강하, 피로 회복, 갈습 흡수 촉진 등 여러 가지 생리적 기능을 지니고 있다.

식초에 대한 연구는 식초의 생산방법이나 이화학적 분석, 관능적 특성을 연구하는 것으로 구분할 수 있으며, 식초의 생산방법에 관한 연구로는 식초의 생산성을 증대시키거나

다양한 원료를 배지에 첨가하여 발효시킬 때 최적의 생산조건을 설정하는 연구로 요약할 수 있다.

대부분의 연구들이 식초의 최종 산도 관점에서 보며, 심부배양에 의한 반연속식 발효나 고정화 담체, twin bioreactor를 이용한 연속식 발효에 있어서도 식초의 최종산도는 5~7% 정도로 보고되어 있으며, 반연속식과 회분식을 조합한 초산 발효에서 여과된 초산 균체를 중간단계에서 첨가시켜 균체의 농도를 증가시켜 최종 산도를 18% 이상으로 올리거나 1 단계에서 일반적인 반연속식 초산발효를 실시하고 이 발효액을 2 단계로 이송하여 에탄올을 유가식으로 첨가하여 초산 생산성의 저하를 막는 일련의 two stage 발효로 17% 이상의 식초를 생산한 보고들이 있다. 한편 sprit vinegar 이외에 보리당화액, 매실, 배, 단감, 망고 등의 원료가 사용되었으며 사용원료에 따라 원료의 생리적이능이 부가된 식초의 생산이 가능하다.

식초의 대표적인 균주로는 *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans* 등을 들 수 있으며, 이들 균주들은 그램 음성이며 운동성의 호기성 간균 또는 구균으로 포자를 형성하지 않는다. *Gluconobacter* sp.는 알코올보다 당을 더 선호하며 초산을 재산화시킬 수 있는 능력이 없는 반면 *Acetobacter* sp.는 초산을 재산화시킬 수 있는 TCA회로를 가지고 있다.

과즙이나 곡물당화액을 이용한 식초의 제조방법으로 알코올 발효와 초산발효를 연속적으로 실시하는 경우와 주정을 희석하여 초산 발효만을 실시하는 경우로 구분할 수 있다. 알코올 발효 실시 여부에 따라 식초의 화학성분에 차이가 생길 수 있으며 원료의 종류, 사용균주, 제조방법, 발효조건 숙성조건에 따라 sprit vinegar와 과즙 및 곡물식초는 함유 성분들의 종류 및 함량에 차이를 나타내게 된다. 초산을 비롯하여 각종 유기산, 당, 아미노산 등의 영양 및 생리작용에 대한 연구가 진행되고 있으나 초산의 생산성에만 국한되어 이러한 인자들과 기호성과 관련 있는 연구는 거의 없다고 할 수 있으며, 그 중 기호성과는 생산균주의 전체 유기산에 대한 초산의 비율이 가장 중요한 요인으로 판단된다.

식초의 향기성분에 관한 연구를 살펴보면 원료, 알코올 발효 후, 초산 발효 후 broth 등에서 휘발성 성분의 차이를 나타내게 되는 데, cider vinegar 제조 시 unfermented cider stock, fermented cider에서 휘발성 성분의 차이가 발생하여 unfermented cider에서는 5개의 성분만 발견되었으며 fermented cider에는 12개의 휘발성 성분이 있음이 보고되었다.

특히 fermented cider에는 propanol이 존재하나 methyl acetate가 없었으며 cider vinegar에서는 반대의 결과를 보여주었고 3-hydroxy-2-butanone은 알코올 발효에서는 미량 생성되고 주로 초산 발효과정에서 대부분 생성되는 것으로 나타났다.

이와 같이 분석시료의 수가 극히 제한적이지만 식초의 화학성분을 휘발성 유기산, 당, 아미노산, 휘발성 성분 등으로 구분하여 연구한 적이 있음에도 기초연구에만 국한되어 상품성과 관련된 기호도와 연관된 연구는 없으며, 특히 양조식초에서 이단발효와 주정 회석초산발효와의 기호도를 비교한 연구가 없어서 기호성 측면에서 기준을 정할 필요가 있다.

양과의 유용성분과 식초의 기능성의 상승효과 측면에서 볼 때, 최종산도가 높으면 기호성 때문에 회석을 해야 하므로, 최종 산도를 높일 필요는 없다고 본다. 일반적으로 양조식초의 연구된 자료를 보면 알코올 발효기간은 24시간 정도에 종료되지만 초산발효 기간이 6일에서 8일 정도로 기존의 전통적인 병행 복발효법으로 시판되는 6, 7개월 장시간 소요를 많이 개선하였으나 보다 상업적인 측면에서 볼 때 기호도가 많이 떨어지지 않는다면 배지조성에 따른 초산균의 생육을 최적화한 속성발효에 대한 연구도 필요하다고 할 수 있다.

국내 식초 시장은 2007년 기준으로 약 600억 원의 매출을 보이고 있는데, 이 중에서 조미 식초가 전체 시장의 약 43%를 차지하고 있다. 최근 마시는 식초의 소비가 급격히 증가하여 2007년도에는 약 340억 원의 시장규모를 보이고 있다.

마시는 식초는 일반 사과식초나 현미식초 등 조미용 양조식초가 아닌 과일이나 현미, 벌꿀 등이 들어간 천연발효 식초를 말한다. 장수국가인 일본의 '마시는 식초' 시장은 4천 억원 대로 알려져 있으며 지난해 일본 30대 히트 상품 가운데 6위가 '흑초'(현미로 만든 검은 식초)일 정도이다. 일본의 경우 현재 50 여종의 식초 음료가 출시되어 있으며, 마시는 식초 시장이 조미식초 시장의 3 배에 달하고 있다. 이에 우리나라도 마시는 식초 음료 시장의 활성화가 예견되고 있다.

그러나 국내 시장에서는 자극적이고 톡 쏘는 신맛 탓에 마시는 음료로서는 인기가 없었으나 최근 붐을 주도하는 것은 자극적인 맛을 없애고 우유나 물에 타서 먹는 음료대용의 식초이다. 2006년에는 2005년 가을부터 불어 닥친 '식초 바람'을 타고 신선하고 톡 쏘는 맛을 앞세운 식초 제품들이 큰 인기를 끌었으며 특히 식초가 다이어트 음료로 부각되면서 여성들에게 큰 환영을 받고 있다. 이에 식품업체들도 앞다퉀 식초 신제품을 출시하는 등 '식초 붐'을 이뤘으며 2006년 우리나라 '마시는 식초' 시장 규모는 500억 원 가량으로 성장하면서 올해도 그 인기를 이어갈 것으로 업계에서는 보고 있다. 업계 관계자는 "마시는 식초 인기가 계속 이어지면 일본처럼 '마시는 식초' 시장규모가 향후 수년 안에 양조식초 시장을 추월할 것"이라고 한다. 식품업계 전문가들은 "회석식 식초음료가 시장을 주도하고 있는 가운데 간편함과 최적의 맛, 저렴한 가격을 내세운 음료타입 식초음료의 도전으로 향후 식초 음료시장이 더욱 치열해질 것"으로 전망하고 있다.

현재 국내에서 생산되고 있는 마시는 식초음료는 (주)대상의 감식초, 청정원의 마시는

홍초, 롯데칠성음료의 웰빙 현미흑초, 사랑초, 샘표식품의 샘표 마시는 별꿀 흑초, CJ의 미초, 신동방의 해표 마시는 감식초, 웅진식품의 그의 흑심, 그녀의 초심, 한국야쿠르트의 여인미, 사과초 등이 있으나 양파를 원료로 한 식초는 개발되어 있지 않는 실정이다.

6. 우리나라의 기능성 음료시장

국내 기능성 음료 시장의 포문을 연 제품은 음료에 웰빙의 개념이 도입되기 훨씬 이전인 1963년 출시된 '박카스'로 볼 수 있다. 다음으로는 알칼리성 이온음료로서 포카리스웨트, 게토레이, 파워에이드 등 이온음료가 등장하면서 '운동 후엔 이온음료'라는 등식이 생겨날 정도로 붐이 일었으며 미에로화이바 등 식이섬유 음료도 여성들을 중심으로 큰 인기를 끌었다. 기능성음료 시장은 2003년 대 전환점을 맞이하게 되었는데, 즉, 웰빙 열풍으로 갑작스레 시장이 팽창하게 되었다. 현재는 단백질의 기본 성분인 아미노산을 응용한 음료부터 체지방연소 기능음료, 피부미용 음료, 키토산 음료, 출산여성을 위한 음료 등 헤아릴 수 없을 정도로 종류가 많다.

다음으로는 화학 첨가제를 쓰지 않으면서 기능은 살린 음료에 관심이 쏠리고 있는데 이는 건강에 대한 관심이 높아지면서 천연성분의 음료를 마시려는 소비자들이 늘어나기 때문이다. 이와 같은 추세를 반영한 대표적인 제품이 미국업체 스무디 킹이 내놓은 '스무디'로서 16가지의 천연 과일에 비타민, 미네랄, 섬유질, 단백질 등을 혼합해 만든 음료로 운동 전후에 좋은 '워크아웃 스무디', 여성들을 겨냥한 '뷰티 앤 헬스' 등 40여종으로 세분화돼 있다. 2004년 현재 우리나라의 기능성음료 시장 규모는 3500억~4000억 원대로서 2002년 2500억 원, 2003년 3000억 원에서 꾸준히 늘고 있으며 올해에는 5000억 원을 돌파할 것으로 전망되고 있다.

본 연구과제에서 개발한 제품과 유사한 제품의 시장현황을 보면 유산균 발효유의 경우 2004년 기준으로 총 1조 1천억원의 매출시장을 보이고 있으며 이 중에서 본 과제의 개발제품에 속하는 드링크 발효유는 60%를 차지하고 있다. 식초시장은 2005년도 기준으로 총 450억 원의 시장을 형성하고 있으며 이중에서 마시는 식초는 25%를 차지하고 있다. 현재 본 과제의 개발예정 제품과 동일한 품목인 양파 유산발효음료는 출시된 바 없으며 양파식초는 1품목이 출시되어 시판되고 있다.

제 3절 연구개발의 범위

본 연구과제는 최종 목표를 달성하기 위하여 5개의 세부 및 협동과제를 구성하여 수행하였다.

즉 제1세부과제에서는 고기능성 유산균 발효 양파음료를 개발하기 위하여 과채류로부터 발효능과 생리활성이 우수한 starter 유산균주를 탐색 선정하여 동정하고 균주의 발효특성을 조사하고 유산균의 종류, 접종비, 발효온도와 시간 등 발효 최적조건을 조사하였다. 또한 양파의 유산균 발효의 scale-up 조건을 확립하여 대량생산을 위한 제조공정별 제어기술을 개발하였다.

제1협동과제에서는 기능성 양파 식초음료를 개발하기 위하여 발효능과 기호도가 우수한 초산균을 탐색 선정하여 동정하고 선정 초산균의 최적 생육조건을 결정하였으며 초산균의 발효능과 생리활성을 조사하고 2단발효공정을 최적화하였으며 발효제품의 생리활성을 검증하였다. 또한 속성초산발효공정과 대량생산을 위한 각 제조공정별 제어기술을 개발하였다.

제2협동과제에서는 기능성 양파발효음료 제조공정을 개발하기 위하여 양파 착즙 및 추출 공정별 유용성분의 수율을 분석하여 추출공정을 최적화하였고 혼합공정, 농축공정, 살균공정 등 유산발효 및 초산발효제품 제조공정을 설계하여 각 단위공정을 최적화하였다. 또한 대량생산을 위한 공정제어 하드웨어 시스템과 소프트웨어 시스템을 구축하였다.

제3협동과제에서는 기능성 양파발효음료의 산업화 연구를 위하여 국·내외 기능성음료의 시장동향을 분석하고 기능성음료 개발과 관련한 국·내외 자료를 분석하였으며 설문조사 및 가정유치조사와 양파발효음료의 개발 가능성 및 시장성을 검토하였다. 또한 양파 유산발효음료와 양파 초산발효음료의 제품별 formula를 개발하였고 개발된 각 제품에 대한 기호도 조사와 제품별 저장성을 조사하였으며 대량생산조건과 경제성분석을 수행하였다.

제4협동과제에서는 양파발효음료의 기능성 검증을 위하여 양파 육질 및 껍질의 착즙 및 추출 방법에 따른 기능성 성분을 분석하였으며 양파 착즙액 및 추출물의 농축방법에 따른 기능성 성분 분석과 발효에 의한 기능성 성분 변화 비교 분석을 수행하였다. 또한 양파 농축액 및 발효농축액 제품의 기능성을 *in vitro* 실험과 mouse를 이용한 동물실험을 통하여 검증하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재까지 양파의 생리활성기능에 관한 연구는 상당히 많이 이루어져 *in vitro* 실험 및 쥐를 이용한 동물실험을 통해 항산화작용, 중금속 제거작용과 혈중 중성지방과 콜레스테롤 함량 감소, 고혈압 및 당뇨병, 항암작용 등 성인병 예방 등에 효과가 있는 것이 확인되었다.

양파에 관한 제품 연구로는 양파스낵 제조에 관한 연구(Park, 1999), 건조 양파 착즙박과 건조 양파를 이용한 압출스낵의 물리적 특성(Kee et al., 2001), 양파 착즙박과 양파를 이용한 압출스낵의 제조(Kee and Park, 2000), 양파 중의 quercetin의 분리 기술(Kang et al, 1998a; Kang et al, 1998b), 건조 양파의 저장 안정성에 관한 연구(Lewick, 1998), 그리고 양파분말을 첨가한 식빵의 품질 특성에 관한 연구(Chun et al., 2000), 양파를 첨가한 딸기잼의 품질 특성(Kim and Chun, 2001) 등이 보고되어 있다. 또한 양파음료의 제조 및 기능성 식품화에 관한 연구(Park et al., 1999; Chung and Park, 1999)가 보고되어 있으나 소비자의 다양한 기호를 충족시키지 못하고 있는 실정이다.

한편 열처리한 후 착즙액을 이용한 식초 제조에 관한 연구 보고가 있었으나, 주정을 희석한 후 영양성분을 첨가하여 초산발효하는 방법이었다(Kim and Chun, 2001). 양파에는 flavonoid 등의 생리활성물질이 다량 함유되어 있어 그것의 기능성을 이용한 양파음료의 형태(Park, 1999)로 가공되어 응용되고 있다. 또한 양파 농축액을 이용한 항갈색화제(Son, 1996), 껍질을 이용한 xanthine oxidase의 저해제(Ra et al., 1998) 등으로 이용되고 있다.

저장성이 낮은 양파의 저장성 향상 기술과 가공기술에 관한 연구도 일부 이루어져 양파의 분말화를 위해 여러 가지의 건조공정이 적용되었으며 방사선 처리나 훈증 처리를 통해 저장성을 향상시키려는 시도도 있었으나 아직까지 만족할만한 높은 저장성을 확보하지 못하고 있는 실정이다.

특히 유산균의 생육 및 발효에 이용될 수 있는 당 함량은 양파에 약 8% 정도로, 유산균에 의한 발효가 가능할 것으로 여겨진다. 국내 양파의 가공은 현재 분말형, 압출스낵, 음료, 주류의 형태로 개발되어 일부는 상품화되어 유통되고 있으나, 유산균을 이용한 발효음료의 형태는 전혀 개발되어 있지 않다.

국외에서는 미국 Cornell 대학의 Kidd 박사 연구팀이 유산균이 존재하는 야채즙을 starter로 이용하여 양파를 발효시킨 것이 유일하다. Kidd 박사팀의 연구에 의하면 양파를 0.3 mm의 두께로 썰은 후 야채즙을 첨가한 다음 18℃에서 발효시킴으로써 pH가 3.25~3.35 수준으로 저하되고 발효액 100 mL 당 1.2~1.5 g의 유산이 생성됨을 보고하였다.

식초는 sprit vinegar 외에 사용한 원료에 따라 다양한 이름의 식초가 있다. 국외에는 과즙을 이용한 식초로 wine, cider, mango vinegar 등이 있으며 malt distilled vinegar도 공존하고 있다. 일본에는 sprit vinegar 외에 rice, 현미, 곡물, 사과, 매실식초 등이 시판되고 있으며 국내에는 초산발효를 거쳐 제조하는 양조식초와 발효과정을 거치지 않고 빙초산, 물, 향신료, 착색료 등을 혼합하여 제조하는 합성식초가 있다. 양조식초는 전분질이나 당류가 함유된 원료에 따라 다양한 식초의 제조가 가능한데, sprit vinegar 이외에 매실, 배, 단감, 보리당화액을 원료로 사용한 식초의 제조방법에 관한 연구가 보고되어 있으며, 실제로 사과, 현미, 감, 포도, 레몬식초 등이 시판되고 있다. 나라마다 다소간의 차이는 있으나 식초의 종류는 sprit vinegar 외에 과즙 및 곡물식초가 주종을 알 수 있다.

식초제조에 관한 국내 연구로는 계명대학교 정용진 교수 연구팀이 양과농축액과 보당액을 이용하여 알코올 및 초산발효를 2단계 과정으로 구분하여 성분변화를 조사한 바 있으며 현대영농조합은 양과식초 및 그 제조 방법에 관한 특허를 출원하여 2005년에 등록한 바 있다.

이외에도 지금까지 보고된 식초에 대한 연구는 감식초에 관한 연구가 많다고 볼 수 있으며 국내외 연구결과들을 살펴보면 감식초의 제조방법, 감식초를 이용한 생약제제의 제조방법, 속성감식초의 제조방법, 감식초를 함유하는 음료 조성물 제조방법, 오골계의 유효성분을 이용한 감식초의 제조방법, 분말 감식초의 제조방법 등의 특허와 몇 개의 논문들이 있다.

감식초는 발효과정과 제조과정에 대한 연구가 보고되고 있으나 감식초뿐만 아니라 거의 모든 식초에 대한 연구가 초산 생성정도에 대해서만 연구되어 있어서 응용 시 기호도를 주목적으로 하고 있는 연구는 전혀 없어서 이 부분에 대한 연구필요성은 대단히 중요하다고 할 수 있다. 이러한 기호도에 대한 연구 부족은 음료 타입으로 부담 없이 즐길 수 있는 상품화로의 연계가 힘들다고 할 수 있다.

국내에서 양조식초는 알코올을 주원료로 사용하고 곡물이 4% 이상 함유된 곡물식초, 과즙이 30% 이상 함유된 과실식초의 형태로 시판하고 있다. 식초의 종류별 생산비율은 양조식초 50%, 사과식초 36%, 현미식초 12%, 기타 2%로 양조식초의 소비가 매년 증가하는 추세이다. 100% 순수한 과실만을 원료로 사용하여 자연발효 시킨 천연양조식초인 감식초 및 포도 식초는 극히 일부 생산되고 있으나, 1인당 식초 소비량은 0.38 L 정도로 1인당 2 L를 소비하는 선진국 수준에 크게 미치지 못하고 있는 실정이다.

국내 식초 시장은 2008년 기준으로 약 698억 원대의 매출을 보이고 있는데, 이 중에서 조미 식초가 2004년도에는 전체 시장의 약 77%를 차지하다가 2008년 도에는 약 40%로 줄어들고 마시는 식초의 소비가 급격히 증가하여 2004년도의 23%에서 2008년도에는 60%로 증가된 약 416억 원의 시장규모를 형성하고 있다. 마시는 식초는 일반 사과식초나 현

미식초 등 조미용 양조식초가 아닌 과일이나 현미, 벌꿀 등이 들어간 천연발효 식초를 말한다. 장수국가인 일본의 '마시는 식초' 시장은 4천억 원 대로 알려져 있으며 지난해 일본 30대 히트 상품 가운데 6위가 '흑초'(현미로 만든 검은 식초)일 정도이다. 일본의 경우 현재 50 여종의 식초 음료가 출시되어 있으며, 마시는 식초 시장이 조미식초 시장의 3 배에 달하고 있다.

이에 우리나라도 마시는 식초 음료 시장의 활성화가 더욱 예견되고 있다. 그러나 국내 시장에서는 자극적이고 톡 쏘는 신맛 탓에 마시는 음료로서는 인기가 없었으나 최근 붐을 주도하는 것은 자극적인 맛을 없애고 우유나 물에 타서 먹는 음료대용의 식초이다. 업계 관계자는 "마시는 식초 인기가 계속 이어지면 일본처럼 '마시는 식초' 시장규모가 향후 수년 안에 양조식초 시장을 추월할 것"이라고 한다. 식품업계 전문가들은 "희석식 식초음료가 시장을 주도하고 있는 가운데 간편함과 최적의 맛, 저렴한 가격을 내세운 음료 타입 식초음료의 도진으로 향후 식초 음료시장이 더욱 치열해질 것"으로 전망하고 있다.

현재 국내에서 생산되고 있는 마시는 식초음료는 (주)대상의 감식초, 청정원의 마시는 홍초, 롯데칠성음료의 웰빙 현미흑초, 사랑초, 샘표식품의 샘표 마시는 벌꿀 흑초, CJ의 미초, 신동방의 해표 마시는 감식초, 웅진식품의 그의 흑심, 그녀의 초심, 한국야쿠르트의 여인미, 사과초 등이 있다.

본 연구결과는 양파식초로서 총산 4~29% 범위의 양조식초를 제조하는 데 있어서 기존의 타식초의 숙성발효개념의 6,7일의 식초발효기간보다도 1/3의 기간을 단축한 양조식초로, 대부분의 양조식초 제조과정에서 초기에 첨가하는 합성초산의 첨가 없이 순수한 초산균으로만 생산된 양조식초일 뿐만아니라 양파의 원료취가 남아있어도 초산발효에 의해 거부감이 전혀 없는 기호도가 높은 식초임을 연구결과에서 판명되었다. 또한 양파에는 없던 항혈전능이 양파식초에서는 대단히 뛰어난 기능성효과를 갖고 있음도 밝혀내었다. 양파식초는 현재 제품화되어 있지 않으며 자체적으로 기능성을 보유하고 있는 양파를 소재로 하여 제조한 다양한 기능성양파식초음료의 개발은 건강식품시장의 활성화에 밑거름이 될 것이며, 국내외적으로 우리나라 농산물의 고부가가치화를 추구하는데 크게 기여할 것으로 판단된다.

항산화능력, 항암작용, 혈전방지 및 고혈압예방의 기능을 가지는 flavonoid 성분이 알려짐으로써, flavonoid 성분을 추출하려는 연구가 활발히 진행되어져 왔다.

대부분의 flavonoid 성분은 식물체에 존재하기 때문에 과거에는 유기용매에 의한 추출이 활발히 시도되었으며, 최근에는 효소, 초음파, microwace, 초고압, 아임계, 초임계 등 다양한 추출법을 이용해 더 많은 flavonoid 성분을 추출하려는 연구가 계속 진행되고 있다.

최근에 양파의 과육부분 보다 껍질부분에 생리활성 물질인 quercetin이 존재한다는 연구 결과로 인해 국내에서는 양파 껍질까지 갈아서 만든 양파즙이 생산되어 판매되고 있다.

대부분의 식품공정 및 화학공정에서는 효율적이고 정확한 온도 제어를 요구하고 있기 때문에, 효율적인 온도 제어를 위한 연구 및 기술이 활발하게 진행되고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 고기능성 유산균 발효 양과음료 개발

1. 서론

양과는 수분함량이 높아 저장성이 매우 약하며, 저장기간 중 중량감소 및 부패가 일어나기 쉬울 뿐만 아니라 멍아, 발근 및 위조에 의해 상품가치가 저하되므로 이를 예방하기 위해 저온저장(Cho et al., 1983; Lee, 1984), 방사선 처리(Park et al., 1972; Park et al., 1974), 훈증처리(Kim et al., 1986a; Kim et al., 1986b), 건조(Kim & Kim, 1990; Lee et al., 1995) 등에 대한 연구가 이루어져 왔다. 국내의 양과 생산량은 1990년 이후 꾸준히 증가 추세에 있으며 2005년 전국 생산량은 1,023,000톤으로 마늘 생산량의 약 2배 정도를 차지하고 있다. 그러나 양과는 저장성이 낮아 저장 중 조직의 부패, 연화 등으로 인하여 전체 생산량의 10-20%가 상품적 가치를 상실하여 퇴비로 이용하거나 버려지고 있다. 따라서 양과 경작 농민의 안정적인 소득을 위해서는 소비대책 마련과 가공 및 저장 기술의 개발이 시급한 실정이다.

유산균은 오래전부터 우리들의 식생활과 밀접한 관계를 유지하면서 된장, 간장 및 김치 등의 전통 발효 식품 등의 제조에 중요한 역할을 담당하고 있는데, 유산균이 식품가공에 이용되는 목적은 식품의 보존성향상, 풍미와 영양증진 및 건강효과를 얻기 위함이다. 최근에는 유산균 발효제품에 관한 연구가 과학적으로 진행되어 장내 유해균 억제 작용 및 정장작용, 혈중 콜레스테롤 감소 기능, 면역 증강 작용, 영양학적 가치 증진, 내인성 감염 억제 작용, 간경화 개선 작용, 항암작용, 노화억제 작용, 피부 미용 효과, 유당불내증 격감 작용, 돌연변이 억제효과 등 다양한 생리활성을 지니고 있는 것으로 나타났다.

한편 홍삼은 수삼을 증숙한 후 건조하여 제조한 것으로 최근의 생화학, 약리학, 영양학 등의 약리작용 기전연구와 임상연구를 통해 뇌기능향상, 항암활성, 항당뇨, 간기능 향상, 면역기능 향상, 혈압조절 작용, 항산화 활성 및 노화억제 효능, 항스트레스, 피로회복 작용, 여성의 갱년기 장애개선, 방사선 장애 방어효능 등의 다양한 생리활성을 지니고 있는 것으로 보고되고 있다.

본 연구과제의 1차년도에서는 양과 착즙액을 이용한 고기능성 유산발효음료를 제조하기 위해서 과채류로부터 분리한 702주의 유산균을 대상으로 산생성능이 우수한 61주의 균주를 1차 선별한 후 유산 발효능이 우수한 16 균주를 2차 선별하였다. 2차 선별한 균주들 중에서 항산화활성과 항균활성이 우수한 6균주의 동정을 수행한 후 *P. pentosaceus* KC-007을 본 연구의 발효를 위한 starter 균주로 최종 선정하였으며 최종 선정된 starter 균주인 *P. pentosaceus* KC-007을 이용하여 양과 착즙액의 발효 특성을 분석하였다. 2차년

도에서는 양파 착즙액의 부피를 1 L로 scale-up하여 유산발효의 최적조건을 확립하였고, 제품의 기능성과 기호성을 높이기 위해 양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 첨가하여 발효함으로써 높은 생리활성을 지니는 유산발효음료를 개발하였으며 양파취 감소를 위한 물질 탐색 및 이에 대한 최적 조건을 확립하였다. 3차년도에서는 양파 착즙액의 부피를 40 L로 scale-up하여 유산발효음료의 대량생산을 위한 최적조건을 확립하였고 제품의 다양화를 위하여 발효액을 분말화시킨 제품을 개발하였으며 발효제품의 저장성을 평가하여 유통기한 설정을 위한 기초자료를 확보하였다.

1. 연구 방법

가. 실험재료 및 사용 균주

유산균 분리를 위한 과채류와 유산발효를 위한 양파는 시중 마켓에서 판매한 국내산을 구입하여 사용하였다. 항균활성의 검정균으로 사용된 *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 14458, *Bacillus cereus* KCCM 11204, *Enterobacter sakazakii* ATCC 51329, *Listeria monocytogenes* KCCM 40307은 (사)한국종균협회 부설 한국미생물보존센터에서 분양받아 사용하였다.

유산균은 Lactobacilli MRS(Difco, Detroit, MI, USA)에 1%(w/v) cystein-HCl과 0.1%(w/v) resazurin을 첨가한 배지(이하 MRS배지)를 사용하여 37°C에서 혐기적 조건에서 하룻밤 배양시켰다. 항균활성 검정균들은 Tryptic soy broth(TSB, Difco)를 사용하여 37°C에서 호기적 조건으로 하룻밤 배양시켰다. 고체배지를 제조할 경우에는 액체배지에 agar를 1.5%(w/v) 첨가하였다. 팽화홍삼 추출 농축액은 그린바이오(주)에서 생산한 것을 사용하였다.

나. 과채류로부터 유산균의 분리

과채류로부터 유산균을 분리하기 위하여 각종 과채류 시료 10 g을 잘게 절단한 후 90 mL의 Ringer's 용액을 첨가하여 homogenizer로 파쇄한 다음 10진 희석법에 의해 0.9% NaCl 용액에 희석하여 MRS agar에 도말하였다. 도말한 agar plate는 37°C에서 3일간 혐기적으로 배양하여 유산균 colony를 생성시켰다.

다. Starter의 배양과 접종

양파 착즙액의 유산발효를 위한 starter로 사용된 유산균은 MRS 배지(Difco Co., MI, USA)에 1.5%(w/v) agar를 첨가한 고체배지에서 2회 이상 계대배양한 후 고체배지 상에 생육한 colony를 MRS 배지에 접종하여 37°C에서 혐기적 조건에서 하룻밤 배양하였다. 배양액을 새로운 MRS 배지에 2.0%(v/v) 접종한 후 600 nm에서의 흡광도가 정확히 1.0

(대수증식기 말기)이 될 때까지 증식시킨 다음 양과 착즙액에 단독발효할 경우에는 접종량이 2.0%(v/v)가 되도록, 혼합발효할 경우에는 각 배양액을 일정비율이 되도록 하여 전체 접종량이 2.0%(v/v)가 되도록 하였다.

라. 양파 착즙액의 제조

양파의 껍질을 제거한 후 세척, 절단하여 녹즙기로 착즙하였다. 착즙액은 121℃에서 10분간 가열처리하여 양파취를 감소시켰고, 불용성 물질을 제거하기 위하여 4℃에서 10,000×g로 30분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 121℃에서 15분간 가열살균한 다음 4℃ 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 양파 착즙액에 팽화홍삼 추출 농축액을 첨가할 경우에는 양파 착즙액 4배량에 5 °Brix의 팽화홍삼 추출액 1배량을 첨가하였다.

마. 양파 착즙액 또는 팽화 홍삼이 첨가된 양파 착즙액의 유산 발효

제조한 양파 착즙액에 MRS 배지에서 하룻밤 배양한 유산균을 2%(v/v) 접종한 후 37℃에서 혐기적 조건으로 일정기간 발효시켰다. 또한 제조한 양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액(60°Brix, (주)그린바이오)을 일정량 첨가한 후 121℃에서 15분간 가열살균한 다음, MRS 배지에서 대수증식기 말기까지 배양한 *P. pentosacues* KC-007을 2%(v/v) 접종하여 37℃에서 혐기적 조건으로 일정기간 발효시켰다.

바. 미생물 생균수 측정

총균, 유산균, 효모와 곰팡이의 생균수는 표준한천배양법으로 측정하였으며, 시료를 0.9%(w/v) NaCl 용액을 이용하여 10⁹까지 십진 희석하여 고체배지에 1 mL씩 분주하였다. 유산균은 25 mL의 MRS agar 배지에 1 mL씩 분주한 후 37℃에서 24-72시간 배양하였다. 총균은 plate count agar(PCA, Difco, Co.) 배지를 사용하여 37℃에서 24시간 배양하였고, 효모는 yeast extract malt extract(YM) agar(Difco, Co.)를 사용하여 30℃에서 3~4일간 배양하였으며, 곰팡이는 potato dextrose agar(PDA, Difco, Co.)를 사용하여 30℃에서 4~5일간 배양하였다. 배양 후 colony 수가 100~300개인 평판을 택하여 colony 수를 측정하고 희석배수를 곱하여 단위부피 당 생균수(CFU/mL)를 산출하였다.

사. 이화학적 특성 분석

(1) 산도 측정

산도는 양파 착즙액 또는 유산균 발효액 시료 10 mL에 증류수 20 mL를 가하고 0.1%의 phenolphthalein 2~3방울을 첨가한 다음 0.1 N NaOH로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하였고, 이때 소비된 0.1 N NaOH의 부피로부터 아래의 식을 이용하여 % lactic acid로

나타내었다.

$$\text{산도(\%)} = \frac{0.1 \text{ N NaOH 소비량(mL)} \times \text{NaOH 역가} \times \text{acid factor} \times \text{희석배수}}{\text{시료의 부피 (mL)}}$$

여기서 NaOH 역가: 4

희석배수: 3

acid factor: 0.0090 (lactic acid)

(2) pH 측정

시료의 pH는 pH meter(740p, Istek Inc., Korea)를 사용하여 측정하였다.

(3) 당도 측정

시료를 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 취한 후 당도계(ATAGO, N-2E, Japan)를 사용하여 측정하였다.

(4) 환원당 함량 측정

발효액의 환원당 함량은 Somogyi-Nelson의 방법으로 측정하였다. 일정 농도로 희석된 발효액 0.5 mL에 0.4 mL의 alkaline copper reagent를 첨가한 후 100°C에서 10분간 가열한 다음 찬물로 냉각하였다. 0.4 mL의 Nelson's reagent를 첨가한 후 2.6 mL의 증류수를 첨가한 다음 520 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 0~1.0 μmol의 D-glucose로 작성한 표준곡선을 이용하여 흡광도를 μmol로 환산하여 구하였다.

(5) 유기산 함량 분석

발효액의 유기산 함량은 HPLC(ACME 9000, Young Lin Instrument, Co., Ltd.)를 이용하여 측정하였고 lactic acid, acetic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, tartaric acid를 각각 0.1% perchloric acid 용액을 사용하여 최종농도가 1%(w/v)가 되도록 조제하여 표준물질로 사용하였으며 이들 표준물질의 retention time과 peak area를 이용하여 발효액의 유기산 함량을 mg/kg 단위로 계산하였다. HPLC 조건은 Table. 1-1과 같다.

Table 1-1. Operation condition of HPLC for the analysis of organic acids

Column	Shodex RSpak KC-811 (I.D. 8.0×300 mm)
Oven temperature	40 °C
Mobile phase	0.1% perchloric acid
Flow rate	1.0 mL/min
Pressure	240 psi
Injection volume	5 µL
Detector	RI750F

아. 생리활성 측정

(1) 전자공여작용

양과 착즙액 또는 유산 발효액의 전자공여작용(electron donating ability)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 양과 착즙액 또는 유산 발효액 0.5 mL에 4×10^{-4} M DPPH(α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 용액(99.9% ethanol로 제조) 0.8 mL를 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕한 다음 10분후에 분광광도계를 사용하여 525 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 전자공여능은 시료 첨가구와 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 이용하여 다음 식에 의해 구하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \right) \times 100$$

(2) 아질산염 소거작용

아질산염 소거능(nitrite scavenging ability)은 Gray & Dugan(1975)의 방법에 의해 측정하였다. 1 mM NaNO₂ 2 mL에 시료를 1 mL 첨가하고 여기에 0.1 N HCl(pH 1.2 조정 시) 완충용액 또는 0.2 M citric acid 완충용액(pH 3.0, 4.2, 6.0 조정 시)을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0으로 조정한 후, 반응용액의 부피를 10 mL로 하였다. 이를 37°C 항온수조에서 1시간 반응시켜 얻은 반응용액을 각각 1 mL씩 취하고 여기에 2% acetic acid 5 mL와 사용 직전에 조제한 Griess 시약(30% acetic acid로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% α -naphthylamine을 1:1 비로 혼합한 것) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 분광광도계(UVmini-1240, Shimadzu)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 대조구로 NaNO₂ 용액의 흡광도는 시료

대신 증류수를 넣어 상기와 같은 방법으로 실시하였다. 아질산염 소거율은 다음 식으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{아질산염 소거율 (\%)} = \left(1 - \frac{A-C}{B} \right) \times 100$$

여기서 A : 1 mM NaNO₂ 용액과 1시간 반응한 시료의 흡광도
 B : 1 mM NaNO₂ 용액과 1시간 반응한 증류수의 흡광도
 C : 시료 자체의 흡광도

(3) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

SOD 유사활성은 SOD determination kit(Fluka, Switzerland)를 이용하여 제조사의 실험방법에 따라 수행하였고 SOD 유사활성은 % 단위로 표시하였다.

(4) Xanthine oxidase 저해활성

Xanthine oxidase 저해 작용을 측정하기 위하여 2%의 하룻밤 배양한 유산균을 접종한 양과 착즙액 1 mL에 40 mU의 xanthine oxidase 0.1 mL 및 1/15 M phosphate buffer(pH 7.5) 2.9 mL를 가한 후, 25°C에서 15분간 예비반응시켰다. 여기에 기질로서 0.15 mM xanthine 2 mL를 가하고 다시 25°C에서 30분간 반응시킨 후, 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 이들 반응 용액을 290 nm에서 흡광도를 측정하여 uric acid의 생성량을 백분율로 계산하여 xanthine oxidase 저해율을 나타내었다.

$$\text{Xanthine oxidase 저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}} \right) \times 100$$

(5) 항균활성

양과 착즙액과 이를 유산 발효시킨 발효액의 항균활성을 측정하기 위해서 *E. coli* O157:H7, *S. aureus* ATCC 14458, *B. cereus* KCCM 11204, *E. sakazakii* ATCC 51329, *L. monocytogenes* KCCM 40307을 검정균주로 사용하였다. 항균성 검정은 검정균 1백금이를 5 mL의 액체배지에 접종하여 1-2일간 배양한 후 신선한 배지 5 mL를 함유한 시험관에 양과 착즙액 발효액 0.1 mL와 상기 검정균의 배양액 0.1 mL를 함께 혼합하여 첨가하고 37°C에서 24시간 배양한 후 표준평판배양법에 의하여 생균수를 측정하였다. 시료 대신 증류수를 첨가한 검정균의 배양액을 대조액으로 하여 아래 식을 이용하여 항균효과를 확인하였다.

$$\text{항균력 (\%)} = \left(1 - \frac{\log \text{시험액의 생균수}}{\log \text{대조액의 생균수}}\right) \times 100$$

자. 균주 동정

(1) 형태학적·생리학적 분석

분리된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 기초하여 형태학적, 생리학적 특성을 조사하였다. 균주의 형태학적 특성을 분석하기 위하여 Gram 염색, KOH 시험, 운동성, 포자 염색 등을 실시하였고, 생리학적 특성을 분석하기 위해서는 glucose 자화성, catalase 시험 등을 실시하였다. 균주의 탄소원 이용도를 조사하기 위해서는 API 50CH kit(Biomériux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하였다.

(2) 분자유전학적 분석

(가) Genomic DNA의 분리

분리 균주의 16S rRNA 염기서열을 이용한 동정을 수행하기 위하여 균주로부터 genomic DNA를 Rodriguez 등의 방법을 변형하여 아래와 같이 분리하여 template DNA로 사용하였다. MRS 배지에 균체를 접종한 다음 37°C에서 혐기적 조건으로 하룻밤 정치 배양시켰다. 원심분리에 의해 균체를 수확한 후 1 mL의 TEN 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl)으로 세척한 다음 500 µL의 SET 완충용액(20% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM EDTA)에 현탁시켰다. 여기에 50 µL의 lysozyme(60 mg/mL)과 3 µL의 RNase A 용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 200 µL의 TEN 완충용액, 25 µL의 25% SDS를 넣고 조심스럽게 혼합하여 세포를 용해시켰다. 이 반응액에 25 µL의 pronase 용액을 첨가하고 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 100 µL의 5 M NaCl을 첨가하였다. 동량의 phenol: chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 처리하여 단백질을 제거한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 0°C에서 15분간 정치한 다음 13,500×g에서 원심분리를 15분간 실시하였다. 침전된 DNA는 70% ethanol로 세척한 후 건조시킨 뒤 적당량의 3차 증류수에 녹여 사용하였다.

(나) 16S rRNA 유전자 cloning

분리 유산균의 16S rRNA의 유전자를 polymerase chain reaction(PCR)에 의해 cloning하기 위하여 8F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'), 15R(5'-AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3')을 primer로 사용하였다. PCR은 AccuPower® PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR sprint(Hyaid Ltd., London, UK)로 반응시켰다. PCR 조건은 94°C에서 2분(1 cycle), 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분(35 cycle), 72°C에서 7분간 반응

시켰다. PCR 산물은 agarose gel 전기영동으로 확인하였는데 100 V에서 25-40 분간 전기영동한 후 254 nm의 자외선 조명하에서 관찰하였다. 사진촬영은 UV-filter와 orange filter가 장착된 디지털카메라(C4040Z, Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA)를 이용하였다. DNA 단편의 회수는 Bioneer사(Daejeon, Korea)의 AccuPrep® Gel Purification Kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라 수행하였다.

(다) 16S rRNA 유전자 염기서열 결정과 분석

PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 Applied Biosystems사(Foster City, CA, USA)의ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit를 사용하여 MJ Reserch사(Reno, NV, USA)의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM 3730 XL Analyzer를 이용하였다.

DNA 염기서열의 분석은 InfoMax Inc.(Bethesda, MD, USA)의 Vector NTI Suite 7.1 program을 사용하여 수행하였으며 DNA 염기서열의 homology 분석은 BLASTN online program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하였다. Phylogenetic tree는 MEGA4 program(Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)을 이용하여 작성하였다.

차. 유기산 용액을 이용한 양파 탈취

양파 특유의 향기를 제거하기 위하여 acetic acid, citric acid, lactic acid, malic acid, phytic acid, tartaric acid를 사용하여 일정 농도의 유기산 용액을 제조하였다. 양파 100 g을 8등분한 후 제조한 유기산 용액에 넣고 실온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 양파를 유기산 용액으로부터 회수한 후 수돗물로 세척한 다음 착즙하여 관능평가를 실시하여 탈취효과를 분석하였다. 이때 관능평가는 학생 20명을 관능 검사원으로 선정하여 착즙액의 향을 평가하도록 하였으며 시료 평가는 5점 척도법으로 평가하였고 수치가 클수록 양파의 향이 강한 것으로 하였다.

카. 대량생산을 위한 양파 추출액 제조 및 유산 발효제품 제조

양파발효음료의 대량생산을 위해서 양파를 껍질 채 8등분하여 2%(w/v) citric acid 용액에 24시간 침지한 후 잔존하는 citric acid를 흐르는 물로 세척하였다. 추출액 제조는 가압 열수추출 또는 착즙기를 이용한 착즙법을 사용하였다. 가압 열수추출을 할 경우에는 양파를 양파 무게의 1배량의 증류수에 담가 105℃에서 10분간 가열처리하여 추출하고 추출액은 filter press를 이용하여 회수한 다음 121℃에서 15분간 가열살균한 후 사용하였다. 착즙기를 사용할 경우에는 착즙 후 121℃에서 10분간 가열처리하고 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거하였다. 양파 추출액 또는 착즙액의 pH를 5.0으로 조정

한 후 121℃에서 15분간 가열살균한 다음 MRS배지에서 대수증식기 말기까지 배양시킨 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 각각 양파 추출액에 2%(v/v) 접종하여 37℃에서 혐기적 조건으로 20시간 발효시켜 대량 배양을 위한 중간배양액을 제조하였다. 양파추출액 40 L에 고과당을 5%(v/v) 첨가하고 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 혼합한 중간배양액을 2%(v/v) 접종하여 37℃에서 혐기적 조건으로 24시간 본 발효시켜 유산발효액을 제조하였으며 제3세부과제에서 확립한 formula에 따라 양파 발효액 10%(v/v), 배 농축액 2.38%(v/v), citric acid 0.2%(v/v), 팽화홍삼 농축액 0.02%(v/v), 올리고당 5%(v/v), 고과당 10%(v/v), 아카시아벌꿀 2%(v/v), 비타민 C 0.2%(w/v), 배향 0.2%(v/v), quercetin 추출물 0.29%(w/v), 정제수 69.61%(v/v)의 비율로 배합하여 양파 유산발효음료를 제조하였다.

타. 양파 유산발효음료의 분말화 제품 제조

제조된 양파 유산발효음료를 -80℃ deep freezer에서 예비동결시킨 후, freeze dryer를 이용하여 48시간 이상 동결건조시켜 분말화하였다.

파. 관능검사

(1) 팽화 홍삼 추출액을 첨가한 양파 유산발효음료의 관능 평가

관능 검사원으로 학생 20명을 선정하여 이들에게 실험 목적을 설명하고 각 측정치에 대하여 충분히 숙지시킨 뒤 검사에 응하도록 하였으며 발효액의 색(color), 향(flavor), 감미도(sweetness), 산미도(sour) 및 종합적인 기호도(overall acceptability) 등을 평가하였다. 시료 평가는 9점 척도법으로 평가하였고 수치가 클수록 특성이 강한 것으로 하였다.

(2) 양파 유산발효음료 분말화 제품의 관능평가

관능 검사원으로 20-30대 학생 24명을 선정하여 일정 비율로 희석한 시료들은 5℃ 냉장고에서 보관하고, 실험 전에 바로 꺼내 온도가 유지되도록 하였다. 양파의 향이 오래 남을 수 있기 때문에 각 시료를 맛 볼 때마다 물로 입안을 헹구도록 하여 입의 혼란과 감각의 둔화를 줄이고자 하였다. 평가는 예비평가와 본평가로 나누어서 수행하였고 예비평가 시에는 분말제품을 정제수를 이용하여 40, 50, 75, 100, 125, 150, 160%로 복원시킨 총 7가지 시료를 제조하여 기호도가 높고 유의적인 차이가 있는 시료 4가지를 선정하였다. 본평가는 예비평가에서 선정한 50, 75, 100, 150%로 복원시킨 시료를 사용하여 관능 검사를 실시하였다.

예비평가에는 40%로 복원시킨 시료를 기준시료로 제시하여 기준시료와 가장 맛이 가까운 것을 0점, 많이 다른 시료를 15점으로 하여 점수를 주게 한 후, 토론을 통하여 가장

맛이 있는 시료, 극단적인 맛을 갖는 시료에 대해 질의 응답을 하였다. 본평가 시에는 시료별로 가장 좋은 시료를 15점, 가장 싫은 시료를 0점으로 점수를 주도록 하였고, 시료간의 전반적인 기호도에 대한 유의적 차이를 검증하기 위하여 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 수행하였으며, 그 결과에 따라 Duncan의 중범위검정($\alpha=0.05$)을 수행하였다. 통계분석에는 Windows 용(ver. 16.0) SPSS(statistical package for the social science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)통계 package를 사용하였다.

예비평가와 본평가에 사용된 관능검사 설문지는 각각 Fig. 1-1과 Fig. 1-2에 나타내었다.

날짜 :										이름 :					
<ol style="list-style-type: none"> 1. 먼저 물로 입을 가신 후, 맨 왼쪽에 놓여진 기준 검사물(®)을 3번 맛본 후 2. 시료들을 왼쪽부터 차례대로 맛보면서 (시료사이에 입가심 O) 3. 랭킹한 후에 차이의 정도를 고려하여 점수를 주시오. 4. 다시 맛보는 것은 가능하며, 맛을 본 후 점수를 바꾸는 것 또한 가능합니다. 															
Same as R										Different as R					
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

Fig. 1-1. Preliminary questionnaire for the sensory evaluation of reconstituted dried powder of fermented onion juice.

날짜 :										이름 :					
<ol style="list-style-type: none"> 1. 먼저 물로 입을 가신 후, 맨 왼쪽에 놓여진 기준 검사물(®)을 3번 맛본 후 2. 시료들을 왼쪽부터 차례대로 맛보면서 (시료사이에 입가심 O) 3. 랭킹한 후에 차이의 정도를 고려하여 점수를 주시오. 4. 다시 맛보는 것은 가능하며, 맛을 본 후 점수를 바꾸는 것 또한 가능합니다. 															
Dislike very much										Like very much					
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

Fig. 1-2. Main questionnaire for the sensory evaluation of reconstituted dried powder of fermented onion juice.

(3) 통계분석

모든 실험은 최소 3번 반복하여 평균과 표준편차를 구하였으며, 얻은 실험값의 통계분석은 Windows 용(ver. 16.0) SPSS(statistical package for the social science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 package를 이용하였으며 Duncan의 증범위검정($\alpha=0.05$)을 실시하여 유의차를 분석하였다.

2. 연구 결과

가. 과채류로부터 발효능이 우수한 유산균의 탐색과 1차 균주 선별

양과 착즙액을 이용하여 고기능성 유산발효음료를 제조하기 위해서는 양과 착즙액을 발효시켜 유산을 다량 생성시킬 수 있는 유산균의 확보가 필수적이며 발효제품의 품질을 결정하는데 가장 중요하다. 양과 착즙액을 발효시키는 유산균주를 탐색하기 위해서 유산균 선택배지인 MRS agar 배지를 사용하여 여러 가지 종류의 과채류 등으로부터 총 702주의 유산균을 분리하였다.

분리된 702주를 MRS에서 하룻밤 배양한 다음 양과 착즙액에 2%(v/v) 접종하여 37°C에서 48시간까지 발효시켜 발효 24시간과 48시간에서의 산도와 pH를 측정하였다. 그 결과 Table 1-2에 나타낸 바와 같이 양과, 고구마, 귤, 무로부터 분리한 균주들은 산생성능이 다른 과채류로부터 분리된 균주보다 약한 경향을 나타내었으며 과, 석류 등에서 분리된 균주는 상대적으로 높은 산생성능을 나타내었다. 양과 착즙액의 초기 산도는 0.009~0.039%의 범위에 있었으며, pH는 5.49~5.89로 측정되어 산성을 지니고 있는 것으로 확인되었다.

양과 착즙액을 48시간까지 발효시켰을 경우 pH는 최대 3.2까지 감소되었으며, 산도는 최대 0.127%까지 증가하였다. 분리 균주들의 산생성능은 발효 24시간보다는 48시간에서 높은 경향을 나타내 발효시간이 증가함에 따라 pH가 감소하고 산생성이 증가하는 것으로 나타났다. 양과로부터 분리된 균주가 양과 착즙액을 우수하게 발효시킬 수 있을 것이라 예상하여 상당히 많은 균주를 양과로부터 분리하여 산 생성능을 측정하였으나 예상과 달리 양과로부터 분리된 균주는 양과 착즙액을 발효시키지 못하는 것으로 나타났다.

분리 균주 중에서 GO-007, GO-014, GO-016, GO-025, GO-29, GO-34, GO-44, SG-001, SG-002, SP-001, PE-001, BU-001, KC-009, CA-023, PG-011, CA-025, KC-014 등이 발효 48시간에서의 산도가 초기 산도보다 8배 이상 증가하였으며, 이 중에서 GO-029, GO-034는 초기 산도보다 10이상 증가한 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 과채류 등에서 분리한 702주의 균주 중에서 발효 48시간에서의 산도가 초기산도보다 8배 이상 증가한 61주의 균주를 1차 선별하여 2차 선별 실험에 사용하였다.

Table 1-2. Acidity and pH of onion juice fermented with isolates

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Onion	ON-047	0.032	0.054	0.097	5.78	5.30	4.10
	ON-048	0.032	0.000	0.000	5.78	5.30	5.20
	ON-049	0.032	0.043	0.032	5.78	5.30	5.30
	ON-050	0.032	0.089	0.076	5.78	4.00	4.00
	ON-051	0.032	0.065	0.054	5.78	4.20	4.10
	ON-052	0.032	0.028	0.032	5.78	5.40	5.30
	ON-053	0.032	0.045	0.112	5.78	5.40	3.90
	ON-054	0.032	0.032	0.056	5.78	5.50	4.80
	ON-055	0.032	0.048	0.078	5.78	5.50	5.30
	ON-056	0.032	0.037	0.099	5.78	5.40	3.50
	ON-057	0.032	0.056	0.125	5.78	4.20	3.50
	ON-058	0.032	0.058	0.076	5.78	4.30	4.10
	ON-059	0.032	0.086	0.086	5.78	4.10	3.90
	ON-060	0.032	0.080	0.091	5.78	4.10	4.00
	ON-061	0.032	0.073	0.086	5.78	4.10	4.00
	ON-062	0.032	0.078	0.082	5.78	4.30	4.10
	ON-063	0.032	0.076	0.151	5.78	4.10	3.50
	ON-064	0.032	0.086	0.084	5.78	4.00	3.90
	ON-065	0.032	0.095	0.151	5.78	4.10	3.40
	ON-066	0.032	0.000	0.076	5.78	4.40	4.40
	ON-067	0.032	0.076	0.091	5.78	4.40	4.10
	ON-068	0.032	0.065	0.115	5.78	4.40	3.50
	ON-069	0.032	0.076	0.076	5.78	4.40	4.40
	ON-070	0.032	0.058	0.071	5.78	5.20	5.20
	ON-071	0.032	0.076	0.069	5.78	4.10	4.10
	ON-072	0.032	0.060	0.097	5.78	5.60	5.40
	ON-073	0.032	0.073	0.089	5.78	5.50	4.40
	ON-074	0.032	0.039	0.086	5.78	5.50	5.30
	ON-075	0.032	0.050	0.097	5.78	5.50	5.30
	ON-076	0.032	0.039	0.035	5.78	5.50	5.00
	ON-077	0.032	0.073	0.097	5.78	4.30	4.40
	ON-078	0.032	0.065	0.082	5.78	4.40	4.10
	ON-079	0.032	0.032	0.093	5.78	5.50	4.90
ON-080	0.032	0.032	0.048	5.78	5.50	4.80	
ON-081	0.032	0.045	0.071	5.78	5.60	5.40	
ON-082	0.032	0.082	0.086	5.78	4.10	4.10	
ON-083	0.032	0.030	0.076	5.78	5.50	4.40	
ON-084	0.032	0.032	0.028	5.78	5.20	5.30	
ON-085	0.032	0.032	0.022	5.78	5.30	5.20	
ON-086	0.032	0.130	0.065	5.78	5.30	5.30	
ON-087	0.032	0.032	0.091	5.78	5.40	3.80	
ON-088	0.032	0.000	0.000	5.78	5.40	4.40	
ON-089	0.032	0.030	0.039	5.78	5.40	5.30	
ON-090	0.032	0.026	0.060	5.78	5.60	5.30	
ON-091	0.032	0.045	0.104	5.78	4.10	3.50	
ON-092	0.032	0.071	0.205	5.78	4.40	4.30	
ON-093	0.032	0.089	0.086	5.78	4.10	3.90	

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Onion	ON-001	0.032	0.060	0.065	5.78	4.95	5.00
	ON-002	0.032	0.035	0.028	5.78	4.95	4.80
	ON-003	0.032	0.045	0.037	5.78	5.10	4.80
	ON-004	0.032	0.030	0.071	5.78	5.00	4.90
	ON-005	0.032	0.032	0.032	5.78	4.80	4.80
	ON-006	0.032	0.039	0.069	5.78	5.30	3.40
	ON-007	0.032	0.032	0.067	5.78	4.40	5.00
	ON-008	0.032	0.032	0.063	5.78	5.00	4.80
	ON-009	0.032	0.041	0.028	5.78	5.30	4.80
	ON-010	0.032	0.022	0.039	5.78	5.30	5.30
	ON-011	0.032	0.037	0.067	5.78	5.30	5.30
	ON-012	0.032	0.037	0.032	5.78	3.90	3.40
	ON-013	0.032	0.035	0.032	5.78	4.10	3.40
	ON-014	0.032	0.032	0.022	5.78	5.50	4.70
	ON-015	0.032	0.030	0.043	5.78	4.40	3.40
	ON-016	0.032	0.032	0.065	5.78	5.30	4.10
	ON-017	0.032	0.045	0.076	5.78	5.30	5.10
	ON-018	0.032	0.048	0.127	5.78	5.30	5.20
	ON-019	0.032	0.045	0.076	5.78	4.10	4.00
	ON-020	0.032	0.048	0.084	5.78	5.30	4.60
	ON-021	0.032	0.048	0.048	5.78	3.70	3.80
	ON-022	0.032	0.019	0.054	5.78	5.30	4.10
	ON-023	0.032	0.045	0.050	5.78	5.40	5.10
	ON-024	0.032	0.043	0.050	5.78	5.30	5.30
	ON-025	0.032	0.060	0.119	5.78	4.00	4.00
	ON-026	0.032	0.050	0.071	5.78	4.95	5.00
	ON-027	0.032	0.050	0.080	5.78	4.95	4.80
	ON-028	0.032	0.043	0.065	5.78	5.10	4.80
	ON-029	0.032	0.058	0.067	5.78	5.00	4.90
	ON-030	0.032	0.050	0.076	5.78	4.80	4.80
	ON-031	0.032	0.056	0.123	5.78	5.30	3.40
	ON-032	0.032	0.048	0.084	5.78	4.40	5.00
	ON-033	0.032	0.043	0.076	5.78	5.00	4.80
	ON-034	0.032	0.052	0.069	5.78	5.30	4.80
	ON-035	0.032	0.048	0.065	5.78	5.30	5.30
	ON-036	0.032	0.043	0.134	5.78	5.30	5.10
	ON-037	0.032	0.080	0.108	5.78	3.90	3.40
	ON-038	0.032	0.065	0.147	5.78	4.10	3.40
	ON-039	0.032	0.000	0.069	5.78	5.10	4.70
	ON-040	0.032	0.056	0.117	5.78	4.40	3.40
	ON-041	0.032	0.045	0.095	5.78	5.30	4.10
	ON-042	0.032	0.078	0.076	5.78	5.30	4.30
	ON-043	0.032	0.043	0.069	5.78	5.30	5.20
	ON-044	0.032	0.086	0.086	5.78	4.10	4.00
	ON-045	0.032	0.050	0.086	5.78	5.30	4.60
	ON-046	0.032	0.106	0.102	5.78	3.70	3.80

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Onion	ON-094	0.032	0.028	0.035	5.78	5.30	5.30
	ON-095	0.032	0.032	0.043	5.78	5.30	5.30
	ON-096	0.032	0.032	0.080	5.78	5.30	5.30
	ON-097	0.032	0.000	0.091	5.78	4.70	4.10
	ON-098	0.032	0.069	0.106	5.78	5.10	3.40
	ON-099	0.032	0.030	0.045	5.78	5.10	5.30
	ON-100	0.032	0.076	0.097	5.78	4.10	4.00
	ON-101	0.032	0.004	0.023	5.62	5.10	4.90
	ON-102	0.032	0.011	0.022	5.62	5.70	4.00
	ON-103	0.032	0.004	0.016	5.62	5.00	4.20
	ON-104	0.032	0.008	0.018	5.62	5.80	4.20
	ON-105	0.032	0.006	0.019	5.62	5.10	4.00
	ON-106	0.032	0.005	0.009	5.62	5.10	5.00
	ON-107	0.032	0.006	0.031	5.62	5.86	4.80
	ON-108	0.032	0.004	0.019	5.62	5.10	4.90
	ON-109	0.032	0.007	0.024	5.62	5.87	5.10
	ON-110	0.032	0.006	0.025	5.62	5.88	5.10
	ON-111	0.032	0.006	0.019	5.62	5.69	4.40
	ON-112	0.032	0.007	0.029	5.62	5.87	5.00
	ON-113	0.032	0.007	0.029	5.62	5.10	5.00
	ON-114	0.032	0.000	0.023	5.62	5.30	4.90
	ON-115	0.032	0.004	0.016	5.62	5.75	5.00
	ON-116	0.032	0.007	0.026	5.62	5.73	5.00
	ON-117	0.032	0.007	0.028	5.62	5.84	4.90
	ON-118	0.032	0.004	0.025	5.62	5.00	5.00
	ON-119	0.032	0.004	0.010	5.62	5.00	5.00
	ON-120	0.032	0.007	0.009	5.62	5.80	5.10
	ON-121	0.032	0.004	0.011	5.62	5.80	4.90
	ON-122	0.032	0.011	0.011	5.62	5.73	5.00
	ON-123	0.032	0.006	0.010	5.62	5.10	4.90
	ON-124	0.032	0.005	0.009	5.62	5.72	5.00
	ON-125	0.032	0.005	0.009	5.62	5.10	4.90
	ON-126	0.032	0.003	0.009	5.62	5.10	5.00
	ON-127	0.032	0.006	0.009	5.62	5.69	4.90
	ON-128	0.032	0.004	0.008	5.62	4.80	5.00
	ON-129	0.032	0.005	0.008	5.62	5.00	5.00
	ON-130	0.032	0.005	0.011	5.62	5.10	5.00
	ON-131	0.032	0.006	0.009	5.62	5.10	5.00
	ON-132	0.032	0.003	0.009	5.62	5.10	5.10
	ON-133	0.032	0.006	0.011	5.62	5.69	5.00
	ON-134	0.032	0.003	0.009	5.62	5.00	5.00
	ON-135	0.032	0.005	0.009	5.62	5.76	5.00
	ON-136	0.032	0.007	0.030	5.62	5.10	4.85
	ON-137	0.032	0.006	0.031	5.62	5.67	5.00
	ON-138	0.032	0.006	0.032	5.62	5.78	5.00
	ON-139	0.032	0.007	0.010	5.62	5.68	4.90
	ON-140	0.032	0.003	0.009	5.62	5.10	5.00

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Onion	ON-141	0.032	0.006	0.022	5.62	5.77	3.90
	ON-142	0.032	0.004	0.020	5.62	5.10	3.90
	ON-143	0.032	0.005	0.010	5.62	5.10	5.00
	ON-144	0.032	0.007	0.012	5.62	5.00	5.00
	ON-145	0.032	0.004	0.027	5.62	5.62	5.00
	ON-146	0.032	0.008	0.031	5.62	5.67	5.00
	ON-147	0.032	0.000	0.030	5.62	5.10	3.90
	ON-148	0.032	0.006	0.012	5.62	5.00	4.90
	ON-149	0.032	0.005	0.009	5.62	5.83	5.00
	ON-150	0.032	0.000	0.011	5.62	5.00	5.10
	ON-151	0.032	0.048	0.065	5.79	4.30	4.00
	ON-152	0.032	0.052	0.054	5.79	4.30	3.90
	ON-153	0.032	0.050	0.054	5.79	4.30	4.10
	ON-154	0.032	0.054	0.073	5.79	4.40	4.20
	ON-155	0.032	0.054	0.058	5.79	4.30	4.20
	ON-156	0.032	0.054	0.076	5.79	4.40	3.90
	ON-157	0.032	0.048	0.065	5.79	4.40	4.00
	ON-158	0.032	0.052	0.058	5.79	4.40	4.00
	ON-159	0.032	0.054	0.065	5.79	4.40	4.10
	ON-160	0.032	0.054	0.071	5.79	4.30	4.10
	ON-161	0.032	0.054	0.054	5.79	4.30	3.90
	ON-162	0.032	0.056	0.080	5.79	4.40	3.90
	ON-163	0.032	0.050	0.058	5.79	4.30	4.10
	ON-164	0.032	0.048	0.063	5.79	4.40	4.00
	ON-165	0.032	0.056	0.065	5.79	4.40	4.00
	ON-166	0.032	0.052	0.065	5.79	4.40	3.90
	ON-167	0.032	0.056	0.058	5.79	4.30	4.00
	ON-168	0.032	0.052	0.060	5.79	4.40	4.00
	ON-169	0.032	0.052	0.058	5.79	4.30	3.90
	ON-170	0.032	0.058	0.060	5.79	4.30	4.00
	ON-171	0.032	0.052	0.065	5.79	4.40	3.90
	ON-172	0.032	0.050	0.056	5.79	4.30	3.90
	ON-173	0.032	0.045	0.065	5.79	4.30	4.00
	ON-174	0.032	0.052	0.054	5.79	4.30	4.00
	ON-175	0.032	0.043	0.063	5.79	4.30	4.00
	ON-176	0.032	0.043	0.060	5.79	4.20	4.10
	ON-177	0.032	0.043	0.076	5.79	4.20	4.00
ON-178	0.032	0.054	0.060	5.79	4.40	4.00	
ON-179	0.032	0.065	0.063	5.79	4.20	4.10	
ON-180	0.032	0.056	0.060	5.79	4.20	4.00	
ON-181	0.032	0.065	0.063	5.79	4.40	3.95	
ON-182	0.032	0.056	0.060	5.79	4.40	4.00	
ON-183	0.032	0.050	0.065	5.79	4.20	3.90	
ON-184	0.032	0.054	0.069	5.79	4.20	4.05	
ON-185	0.032	0.043	0.073	5.79	4.30	4.00	
ON-186	0.032	0.043	0.086	5.79	3.50	3.80	
ON-187	0.032	0.050	0.084	5.79	4.30	3.80	

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Onion	ON-188	0.032	0.052	0.067	5.79	4.10	4.00
	ON-189	0.032	0.052	0.058	5.79	4.20	4.00
	ON-190	0.032	0.065	0.073	5.79	4.20	4.10
	ON-191	0.032	0.050	0.071	5.79	4.20	4.20
	ON-192	0.032	0.089	0.119	5.79	3.30	3.20
	ON-193	0.032	0.045	0.086	5.79	4.20	3.95
	ON-194	0.032	0.050	0.069	5.79	4.20	3.90
	ON-195	0.032	0.035	0.048	5.79	4.30	4.00
	ON-196	0.032	0.076	0.089	5.79	3.90	3.40
	ON-197	0.032	0.060	0.063	5.79	4.30	4.10
	ON-198	0.032	0.063	0.060	5.79	4.30	4.10
	ON-199	0.032	0.043	0.063	5.79	4.30	4.10
	ON-200	0.032	0.058	0.069	5.79	4.40	4.00
	ON-201	0.026	0.054	0.076	5.80	4.30	3.50
	ON-202	0.026	0.039	0.060	5.80	4.30	4.20
	ON-203	0.026	0.052	0.058	5.80	4.20	4.30
	ON-204	0.026	0.054	0.073	5.80	4.40	4.20
	ON-205	0.026	0.052	0.067	5.80	4.40	4.10
	ON-206	0.026	0.050	0.058	5.80	4.30	4.20
	ON-207	0.026	0.048	0.065	5.80	4.30	4.20
	ON-208	0.026	0.050	0.065	5.80	4.30	4.10
	ON-209	0.026	0.056	0.054	5.80	4.20	4.30
	ON-210	0.026	0.056	0.065	5.80	4.20	4.00
	ON-211	0.026	0.058	0.108	5.80	4.20	4.10
	ON-212	0.026	0.056	0.065	5.80	4.40	4.20
	ON-213	0.026	0.054	0.063	5.80	4.30	4.20
	ON-214	0.026	0.052	0.067	5.80	4.30	4.10
	ON-215	0.026	0.048	0.065	5.80	4.30	4.20
	ON-216	0.026	0.045	0.054	5.80	4.40	4.10
	ON-217	0.026	0.060	0.060	5.80	4.20	4.30
	ON-218	0.026	0.048	0.063	5.80	4.30	4.20
	ON-219	0.026	0.043	0.058	5.80	4.40	3.70
	ON-220	0.026	0.052	0.052	5.80	4.40	4.20
ON-221	0.026	0.050	0.082	5.80	4.40	4.20	
ON-222	0.026	0.050	0.065	5.80	4.40	4.30	
ON-223	0.026	0.045	0.052	5.80	4.30	4.20	
ON-224	0.026	0.048	0.054	5.80	4.40	4.20	
ON-225	0.026	0.054	0.050	5.80	4.40	4.30	
ON-226	0.026	0.054	0.123	5.80	4.20	4.20	
ON-227	0.026	0.054	0.054	5.80	4.20	4.10	
ON-228	0.026	0.050	0.076	5.80	4.30	4.20	
ON-229	0.026	0.054	0.076	5.80	4.40	4.20	
ON-230	0.026	0.043	0.078	5.80	4.30	3.20	
ON-231	0.026	0.123	0.054	5.80	4.30	4.20	
ON-232	0.026	0.054	0.121	5.80	4.20	4.20	
ON-233	0.026	0.052	0.065	5.80	4.20	4.00	

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Onion	ON-234	0.026	0.063	0.060	5.80	4.20	4.20
	ON-235	0.026	0.056	0.065	5.80	4.20	4.10
	ON-236	0.026	0.052	0.054	5.80	4.30	4.20
	ON-237	0.026	0.052	0.082	5.80	4.20	4.20
	ON-238	0.026	0.052	0.054	5.80	4.40	4.10
	ON-239	0.026	0.048	0.058	5.80	4.35	4.10
	ON-240	0.026	0.050	0.060	5.80	4.20	4.30
	ON-241	0.026	0.045	0.052	5.80	4.35	4.10
	ON-242	0.026	0.058	0.043	5.80	4.30	4.20
	ON-243	0.026	0.045	0.102	5.80	4.30	4.40
	ON-244	0.026	0.054	0.054	5.80	4.20	4.00
	ON-245	0.026	0.056	0.056	5.80	4.20	4.20
	ON-246	0.026	0.089	0.093	5.80	3.30	3.30
	ON-247	0.026	0.052	0.052	5.80	4.30	4.10
	ON-248	0.026	0.050	0.050	5.80	4.10	4.00
	ON-249	0.026	0.056	0.060	5.80	4.10	4.00
	ON-250	0.026	0.054	0.043	5.80	4.10	4.30
	ON-251	0.026	0.050	0.060	5.80	4.40	3.95
	ON-252	0.026	0.048	0.054	5.80	4.40	3.95
	ON-253	0.026	0.052	0.052	5.80	4.40	4.00
	ON-254	0.026	0.050	0.043	5.80	4.30	4.00
	ON-255	0.026	0.050	0.048	5.80	4.40	4.00
	ON-256	0.026	0.054	0.058	5.80	4.40	4.00
	ON-257	0.026	0.058	0.054	5.80	4.30	3.90
	ON-258	0.026	0.054	0.052	5.80	4.40	4.00
	ON-259	0.026	0.050	0.043	5.80	4.30	4.00
	ON-260	0.026	0.052	0.054	5.80	4.40	4.00
	ON-261	0.026	0.054	0.065	5.80	4.30	3.95
	ON-262	0.026	0.045	0.063	5.80	4.40	4.00
ON-263	0.026	0.048	0.054	5.80	4.30	4.00	
ON-264	0.026	0.052	0.043	5.80	4.30	4.10	
ON-265	0.026	0.045	0.043	5.80	4.30	3.95	
ON-266	0.026	0.048	0.065	5.80	4.40	4.00	
ON-267	0.026	0.048	0.043	5.80	4.40	3.95	
ON-268	0.026	0.050	0.067	5.80	4.40	3.95	
ON-269	0.026	0.052	0.054	5.80	4.40	4.10	
ON-270	0.026	0.048	0.058	5.80	4.30	4.00	
ON-271	0.026	0.052	0.050	5.80	4.30	3.95	
ON-272	0.026	0.050	0.045	5.80	4.30	4.00	
ON-273	0.026	0.045	0.065	5.80	4.30	4.20	
ON-274	0.026	0.048	0.052	5.80	4.40	4.20	
ON-275	0.026	0.043	0.063	5.80	4.30	3.95	
ON-276	0.026	0.045	0.071	5.80	4.40	4.20	
ON-277	0.026	0.052	0.056	5.80	4.30	4.00	
ON-278	0.026	0.050	0.048	5.80	4.30	4.30	
ON-279	0.026	0.058	0.054	5.80	4.30	4.20	

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Onion	ON-280	0.026	0.048	0.054	5.80	4.30	4.10
	ON-281	0.026	0.048	0.054	5.80	4.40	4.10
	ON-282	0.026	0.043	0.076	5.80	4.40	4.10
	ON-283	0.026	0.045	0.067	5.80	4.20	4.30
	ON-284	0.026	0.054	0.052	5.80	4.30	4.30
	ON-285	0.026	0.052	0.058	5.80	4.30	4.30
	ON-286	0.026	0.052	0.056	5.80	4.40	4.10
	ON-287	0.026	0.045	0.078	5.80	4.30	4.20
	ON-288	0.026	0.043	0.060	5.80	4.40	4.10
	ON-289	0.026	0.048	0.058	5.80	4.30	4.30
	ON-290	0.026	0.048	0.052	5.80	4.30	4.30
	ON-291	0.026	0.054	0.093	5.80	4.40	4.30
	ON-292	0.026	0.054	0.058	5.80	4.40	4.00
	ON-293	0.026	0.050	0.050	5.80	4.30	4.20
	ON-294	0.026	0.054	0.050	5.80	4.40	4.20
	ON-295	0.026	0.063	0.063	5.80	4.30	4.20
	ON-296	0.026	0.043	0.056	5.80	4.40	4.30
	ON-297	0.026	0.043	0.052	5.80	4.40	4.30
	ON-298	0.026	0.054	0.190	5.80	4.40	4.20
	ON-299	0.026	0.043	0.050	5.80	4.40	4.30
	ON-300	0.026	0.045	0.056	5.80	4.40	4.20
	ON-301	0.026	0.044	0.045	5.89	4.40	4.30
	ON-302	0.026	0.043	0.043	5.89	4.40	4.40
	ON-303	0.026	0.000	0.000	5.89	4.30	4.20
	ON-304	0.026	0.000	0.000	5.89	4.30	4.10
	ON-305	0.026	0.082	0.043	5.89	4.10	4.00
	ON-306	0.026	0.043	0.052	5.89	4.20	4.30
	ON-307	0.026	0.044	0.044	5.89	4.20	4.00
	ON-308	0.026	0.030	0.048	5.89	4.20	4.20
	ON-309	0.026	0.097	0.045	5.89	4.30	3.80
	ON-310	0.026	0.056	0.054	5.89	4.20	4.00
	ON-311	0.026	0.050	0.049	5.89	4.30	4.00
	ON-312	0.026	0.050	0.050	5.89	4.30	3.90
	ON-313	0.026	0.089	0.043	5.89	4.10	3.60
	ON-314	0.026	0.054	0.050	5.89	4.10	4.20
ON-315	0.026	0.091	0.048	5.89	4.20	4.20	
ON-316	0.026	0.055	0.050	5.89	4.20	4.20	
ON-317	0.026	0.054	0.054	5.89	4.20	4.20	
ON-318	0.026	0.056	0.051	5.89	4.20	4.20	
ON-319	0.026	0.053	0.055	5.89	4.20	4.20	
ON-320	0.026	0.051	0.049	5.89	4.20	4.20	
ON-321	0.026	0.055	0.055	5.89	4.20	4.20	
ON-322	0.026	0.089	0.048	5.89	4.10	4.00	
ON-323	0.026	0.089	0.054	5.89	4.20	4.00	
ON-324	0.026	0.097	0.054	5.89	3.90	3.90	
ON-325	0.026	0.106	0.054	5.89	4.00	4.00	

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Onion	ON-326	0.026	0.054	0.060	5.89	4.10	4.10
	ON-327	0.026	0.065	0.045	5.89	4.40	3.70
	ON-328	0.026	0.050	0.055	5.89	4.80	4.00
	ON-329	0.026	0.097	0.048	5.89	4.00	3.70
	ON-330	0.026	0.093	0.043	5.89	4.10	4.00
	ON-331	0.026	0.086	0.043	5.89	4.20	3.90
	ON-332	0.026	0.102	0.048	5.89	4.00	4.00
	ON-333	0.026	0.099	0.045	5.89	4.00	4.00
	ON-334	0.026	0.052	0.048	5.89	4.00	4.00
	ON-335	0.026	0.051	0.050	5.89	4.10	4.10
	ON-336	0.026	0.076	0.052	5.89	4.20	3.90
	ON-337	0.026	0.000	0.000	5.89	4.10	4.10
	ON-338	0.026	0.095	0.043	5.89	4.00	4.00
	ON-339	0.026	0.051	0.050	5.89	4.00	4.00
	ON-340	0.026	0.048	0.043	5.89	4.20	4.20
	ON-341	0.026	0.065	0.065	5.89	4.40	3.90
	ON-342	0.026	0.112	0.076	5.89	4.00	3.50
	ON-343	0.026	0.104	0.052	5.89	4.00	3.70
	ON-344	0.026	0.048	0.043	5.89	4.00	3.50
	ON-345	0.026	0.048	0.043	5.89	4.00	3.50
	ON-346	0.026	0.102	0.056	5.89	4.10	3.80
ON-347	0.026	0.048	0.032	5.89	4.60	4.30	
ON-348	0.026	0.084	0.037	5.89	4.20	3.80	
ON-349	0.026	0.048	0.043	5.89	4.60	4.30	
ON-350	0.026	0.045	0.037	5.89	4.30	4.20	
Sweet potato	SP-001	0.026	0.080	0.086	5.80	3.50	3.40
	SP-002	0.026	0.073	0.086	5.80	3.60	3.40
	SP-003	0.026	0.056	0.084	5.80	3.50	3.40
	SP-004	0.026	0.067	0.095	5.80	3.70	3.30
	SP-005	0.026	0.076	0.076	5.80	3.40	3.40
	SP-006	0.026	0.076	0.089	5.80	3.50	3.50
	SP-007	0.026	0.065	0.086	5.80	3.70	3.30
	SP-008	0.026	0.076	0.108	5.80	3.50	3.40
	SP-009	0.026	0.065	0.086	5.80	3.70	3.30
	SP-010	0.026	0.065	0.086	5.80	3.70	3.70
	SP-011	0.026	0.071	0.095	5.80	3.50	3.40
	SP-012	0.026	0.069	0.082	5.80	3.60	3.50
	SP-013	0.026	0.084	0.089	5.80	3.60	3.40
	SP-014	0.026	0.065	0.086	5.80	3.70	3.30
	SP-015	0.026	0.073	0.089	5.80	3.60	3.50
	SP-016	0.026	0.065	0.080	5.80	3.60	3.50
	SP-017	0.026	0.076	0.093	5.80	3.40	3.30
	SP-018	0.026	0.071	0.093	5.80	3.30	3.50
	SP-019	0.026	0.065	0.082	5.80	3.80	3.40
	SP-020	0.026	0.073	0.089	5.80	3.30	3.50
	SP-021	0.026	0.076	0.071	5.80	3.50	3.40

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Sweet potato	SP-022	0.026	0.089	0.084	5.80	3.70	3.60
	SP-023	0.026	0.080	0.086	5.80	3.70	3.50
	SP-024	0.026	0.080	0.086	5.80	3.70	3.50
	SP-025	0.026	0.076	0.091	5.80	3.50	3.60
	SP-026	0.026	0.080	0.086	5.80	3.70	3.50
	SP-027	0.026	0.080	0.086	5.80	3.70	3.50
	SP-028	0.026	0.058	0.076	5.80	3.50	3.40
	SP-029	0.026	0.056	0.089	5.80	3.70	3.50
	SP-030	0.026	0.082	0.093	5.80	3.70	3.60
	SP-031	0.026	0.082	0.084	5.80	3.70	3.50
	SP-032	0.026	0.082	0.084	5.80	3.60	3.50
	SP-033	0.026	0.082	0.106	5.80	3.70	3.50
	SP-034	0.026	0.102	0.080	5.80	3.60	3.40
	SP-035	0.026	0.097	0.102	5.80	3.40	3.40
	SP-036	0.026	0.071	0.086	5.80	3.60	3.40
	SP-037	0.026	0.091	0.091	5.80	3.70	3.40
	SP-038	0.026	0.063	0.093	5.80	3.60	3.50
	SP-039	0.026	0.086	0.086	5.80	3.70	3.50
	SP-040	0.026	0.069	0.091	5.80	3.60	3.40
	SP-041	0.026	0.123	0.108	5.80	3.60	3.40
	SP-042	0.026	0.073	0.080	5.80	3.90	3.40
	SP-043	0.026	0.073	0.084	5.80	4.70	3.60
	SP-044	0.026	0.073	0.084	5.80	4.70	3.60
	SP-045	0.026	0.089	0.086	5.80	3.60	3.40
	SP-046	0.026	0.071	0.108	5.80	4.70	3.60
	SP-047	0.026	0.073	0.084	5.80	3.50	3.40
	SP-048	0.026	0.076	0.082	5.80	3.50	3.30
	SP-049	0.026	0.071	0.086	5.80	3.40	3.70
	SP-050	0.026	0.091	0.093	5.80	3.70	3.40
	Tangerine	TA-001	0.009	0.032	0.035	5.62	3.80
TA-002		0.009	0.034	0.030	5.62	3.80	3.30
TA-003		0.009	0.022	0.027	5.62	4.38	3.90
TA-004		0.009	0.020	0.000	5.62	4.24	3.80
TA-005		0.009	0.010	0.000	5.62	4.20	3.40
TA-006		0.009	0.024	0.027	5.62	4.29	3.90
TA-007		0.009	0.022	0.025	5.62	4.28	3.90
TA-008		0.009	0.020	0.025	5.62	4.37	3.90
TA-009		0.009	0.019	0.026	5.62	4.40	4.00
TA-010		0.009	0.028	0.026	5.62	4.20	3.80
TA-011		0.009	0.019	0.026	5.62	4.40	4.00
TA-012		0.009	0.021	0.025	5.62	4.31	3.90
TA-013		0.009	0.022	0.026	5.62	4.33	3.90
TA-014		0.009	0.023	0.026	5.62	4.28	3.90
TA-015		0.009	0.022	0.024	5.62	4.29	3.90
TA-016		0.009	0.018	0.026	5.62	4.32	3.90
TA-017		0.009	0.019	0.025	5.62	4.32	3.90

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Tangerine	TA-018	0.009	0.019	0.023	5.62	4.20	3.85
	TA-019	0.009	0.024	0.024	5.62	4.25	3.90
	TA-020	0.009	0.023	0.024	5.62	4.33	3.90
	TA-021	0.009	0.015	0.022	5.62	4.00	3.90
	TA-022	0.009	0.000	0.022	5.62	5.25	3.90
	TA-023	0.009	0.019	0.023	5.62	5.25	3.90
	TA-024	0.009	0.022	0.025	5.62	4.36	3.90
	TA-025	0.009	0.020	0.032	5.62	4.00	3.90
	TA-026	0.009	0.015	0.022	5.62	3.95	4.00
	TA-027	0.009	0.019	0.027	5.62	5.25	4.00
	TA-028	0.009	0.019	0.024	5.62	3.95	4.00
	TA-029	0.009	0.017	0.024	5.62	5.25	4.00
	TA-030	0.009	0.017	0.024	5.62	5.25	4.00
	TA-031	0.009	0.019	0.029	5.62	3.95	4.00
	TA-032	0.009	0.023	0.029	5.62	5.25	3.80
	TA-033	0.009	0.025	0.029	5.62	5.25	3.90
	TA-034	0.009	0.020	0.029	5.62	3.95	3.90
	TA-035	0.009	0.019	0.025	5.62	4.60	4.00
	TA-036	0.009	0.029	0.029	5.62	3.95	3.80
	TA-037	0.009	0.019	0.028	5.62	4.34	3.90
	TA-038	0.009	0.022	0.029	5.62	4.21	3.90
	TA-039	0.009	0.022	0.025	5.62	5.25	3.90
	TA-040	0.009	0.021	0.024	5.62	3.95	3.90
	TA-041	0.009	0.022	0.022	5.62	4.32	3.90
	TA-042	0.009	0.022	0.027	5.62	4.35	4.00
	TA-043	0.009	0.000	0.023	5.62	4.05	3.90
	TA-044	0.009	0.022	0.022	5.62	4.15	3.90
	TA-045	0.009	0.019	0.025	5.62	5.25	4.00
	TA-046	0.009	0.014	0.023	5.62	4.00	3.90
	TA-047	0.009	0.026	0.030	5.62	4.00	3.90
	TA-048	0.009	0.018	0.029	5.62	5.25	3.90
	TA-049	0.009	0.023	0.030	5.62	4.28	3.90
TA-050	0.009	0.022	0.028	5.62	4.38	3.90	
Radish	RA-001	0.011	0.112	0.104	5.49	4.30	3.88
	RA-002	0.011	0.108	0.106	5.49	4.00	4.00
	RA-003	0.011	0.086	0.086	5.49	4.00	4.00
	RA-004	0.011	0.104	0.099	5.49	3.90	3.40
	RA-005	0.011	0.153	0.097	5.49	3.90	3.70
	RA-006	0.011	0.095	0.076	5.49	4.00	4.00
	RA-007	0.011	0.108	0.084	5.49	4.00	4.00
	RA-008	0.011	0.102	0.073	5.49	3.90	4.00
	RA-009	0.011	0.058	0.065	5.49	4.30	4.00
	RA-010	0.011	0.095	0.078	5.49	4.00	3.70
	RA-011	0.011	0.082	0.071	5.49	4.00	4.00
	RA-012	0.011	0.065	0.076	5.49	4.10	3.80
	RA-013	0.011	0.102	0.104	5.49	3.70	3.50

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Radish	RA-014	0.011	0.082	0.080	5.49	3.70	4.00
	RA-015	0.011	0.078	0.065	5.49	4.00	4.00
	RA-016	0.011	0.069	0.076	5.49	4.00	4.00
	RA-017	0.011	0.082	0.071	5.49	3.80	4.00
	RA-018	0.011	0.086	0.076	5.49	4.00	4.00
	RA-019	0.011	0.030	0.069	5.49	5.30	3.86
	RA-020	0.011	0.076	0.069	5.49	4.00	4.00
	RA-021	0.011	0.043	0.043	5.49	4.70	4.40
	RA-022	0.011	0.080	0.071	5.49	4.00	4.00
	RA-023	0.011	0.097	0.097	5.49	3.90	3.90
	RA-024	0.011	0.076	0.082	5.49	4.00	4.00
	RA-025	0.011	0.084	0.091	5.49	3.90	4.00
	RA-026	0.011	0.069	0.067	5.49	4.00	4.00
	RA-027	0.011	0.043	0.052	5.49	4.40	4.10
	RA-028	0.011	0.093	0.106	5.49	3.80	3.90
	RA-029	0.011	0.058	0.056	5.49	4.40	4.10
	RA-030	0.011	0.043	0.058	5.49	4.10	4.00
	RA-031	0.011	0.097	0.086	5.49	3.80	3.80
	RA-032	0.011	0.065	0.076	5.49	4.00	4.00
	RA-033	0.011	0.086	0.104	5.49	3.70	3.40
	RA-034	0.011	0.086	0.086	5.49	3.90	4.00
	RA-035	0.011	0.045	0.082	5.49	4.00	4.00
	RA-036	0.011	0.000	0.058	5.49	4.50	3.70
	RA-037	0.011	0.082	0.065	5.49	4.00	4.00
	RA-038	0.011	0.063	0.069	5.49	4.20	4.40
	RA-039	0.011	0.071	0.073	5.49	4.00	4.10
	RA-040	0.011	0.069	0.065	5.49	4.10	4.10
	RA-041	0.011	0.086	0.097	5.49	4.00	4.00
	RA-042	0.011	0.102	0.114	5.49	3.70	4.00
	RA-043	0.011	0.095	0.043	5.49	4.10	4.00
	RA-044	0.011	0.071	0.086	5.49	3.80	4.00
	RA-045	0.011	0.037	0.026	5.49	5.20	4.80
RA-046	0.011	0.065	0.078	5.49	4.20	4.20	
RA-047	0.011	0.043	0.060	5.49	4.10	4.00	
RA-048	0.011	0.073	0.000	5.49	4.10	4.00	
RA-049	0.011	0.084	0.097	5.49	3.70	3.70	
RA-050	0.011	0.093	0.114	5.49	3.70	3.60	
Green onion	GO-001	0.032	0.063	0.076	5.49	4.60	3.85
	GO-002	0.032	0.043	0.060	5.49	4.10	4.00
	GO-003	0.032	0.058	0.086	5.49	4.20	4.00
	GO-004	0.032	0.050	0.063	5.49	4.70	4.20
	GO-005	0.032	0.048	0.054	5.78	4.80	4.00
	GO-006	0.032	0.086	0.048	5.89	4.00	3.70
	GO-007	0.032	0.084	0.104	5.49	3.90	3.90
	GO-008	0.032	0.069	0.041	5.89	4.30	3.70
	GO-009	0.032	0.069	0.071	5.49	4.20	3.90

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH			
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	
Green onion	GO-010	0.032	0.039	0.056	5.49	5.10	4.00	
	GO-011	0.032	0.043	0.065	5.49	4.50	4.00	
	GO-012	0.032	0.069	0.071	5.49	4.10	4.00	
	GO-013	0.032	0.065	0.065	5.78	4.00	4.00	
	GO-014	0.032	0.080	0.102	5.49	3.80	3.80	
	GO-015	0.032	0.071	0.076	5.49	4.00	4.00	
	GO-016	0.032	0.054	0.086	5.49	4.05	4.05	
	GO-017	0.032	0.060	0.056	5.49	4.25	3.85	
	GO-018	0.032	0.056	0.063	5.49	4.60	4.20	
	GO-019	0.032	0.056	0.082	5.49	4.60	3.90	
	GO-020	0.032	0.043	0.054	5.89	4.60	4.20	
	GO-021	0.032	0.052	0.048	5.49	4.30	3.85	
	GO-022	0.032	0.056	0.063	5.49	4.60	4.20	
	GO-023	0.032	0.056	0.071	5.49	4.50	4.10	
	GO-024	0.032	0.056	0.063	5.49	4.60	4.20	
	GO-025	0.032	0.054	0.095	5.49	4.60	3.90	
	GO-026	0.032	0.069	0.048	5.78	4.40	4.10	
	GO-027	0.032	0.054	0.093	5.49	4.20	4.00	
	GO-028	0.032	0.032	0.041	5.49	5.00	5.30	
	GO-029	0.032	0.095	0.108	5.49	3.30	3.30	
	GO-030	0.032	0.043	0.060	5.49	4.70	4.00	
	GO-031	0.032	0.043	0.050	5.78	4.40	4.10	
	GO-032	0.032	0.050	0.069	5.49	4.55	4.10	
	GO-033	0.032	0.043	0.060	5.49	4.60	4.20	
	GO-034	0.032	0.091	0.127	5.49	3.70	3.70	
	GO-035	0.032	0.093	0.078	5.78	3.90	3.90	
	GO-036	0.032	0.080	0.086	5.78	3.85	3.85	
	GO-037	0.032	0.065	0.082	5.78	4.00	3.90	
	GO-038	0.032	0.086	0.082	5.78	3.90	3.80	
	GO-039	0.032	0.041	0.043	5.49	5.10	4.70	
	GO-040	0.032	0.086	0.080	5.78	3.80	3.80	
	GO-041	0.032	0.086	0.080	5.78	4.10	4.10	
	GO-042	0.032	0.045	0.048	5.49	4.00	3.90	
	GO-043	0.032	0.058	0.048	5.78	4.30	4.10	
	GO-044	0.032	0.071	0.086	5.49	4.00	3.80	
	GO-045	0.032	0.093	0.091	5.78	3.70	3.70	
	GO-046	0.032	0.114	0.099	5.78	3.80	3.80	
	GO-047	0.032	0.071	0.063	5.78	4.00	4.00	
	GO-048	0.032	0.058	0.048	5.49	4.30	4.10	
	GO-049	0.032	0.065	0.000	5.78	4.00	3.50	
	GO-050	0.032	0.058	0.048	5.49	4.30	4.10	
	Shallot	SG-001	0.011	0.058	0.102	5.49	4.30	4.30
		SG-002	0.011	0.071	0.093	5.49	4.40	4.40
		SG-003	0.039	0.065	0.054	5.89	4.60	3.90
		SG-004	0.011	0.054	0.054	5.49	4.40	4.40
		SG-005	0.039	0.048	0.045	5.89	4.30	4.40

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH			
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	
Shallot	SG-006	0.032	0.039	0.056	5.78	4.50	4.50	
	SG-007	0.039	0.084	0.043	5.89	4.20	4.20	
	SG-008	0.039	0.069	0.052	5.89	4.30	4.20	
	SG-009	0.039	0.069	0.050	5.89	4.40	4.40	
	SG-010	0.032	0.065	0.065	5.78	4.30	4.40	
	SG-011	0.039	0.065	0.032	5.89	4.70	4.30	
	SG-012	0.039	0.030	0.041	5.89	4.70	4.60	
	SG-013	0.032	0.071	0.060	5.78	4.40	4.40	
	SG-014	0.039	0.065	0.067	5.89	4.30	4.20	
	SG-015	0.039	0.056	0.037	5.89	4.30	3.90	
	SG-016	0.039	0.093	0.043	5.89	4.20	3.70	
	SG-017	0.039	0.028	0.030	5.89	4.60	4.30	
	SG-018	0.039	0.082	0.045	5.89	4.10	4.00	
	SG-019	0.039	0.073	0.032	5.89	4.60	4.20	
	SG-020	0.039	0.082	0.052	5.89	4.20	3.90	
	SG-021	0.039	0.069	0.037	5.89	4.30	3.00	
	SG-022	0.039	0.097	0.045	5.89	4.10	3.80	
	SG-023	0.032	0.086	0.086	5.78	4.10	4.10	
	SG-024	0.039	0.073	0.039	5.89	4.40	4.00	
	Kimchi	KC-001	0.011	0.063	0.063	5.89	3.85	3.30
		KC-002	0.011	0.037	0.069	5.89	5.10	4.00
		KC-003	0.011	0.032	0.060	5.89	5.00	4.70
		KC-004	0.011	0.045	0.065	5.89	4.60	3.90
	Sweet pumpkin	SP-001	0.011	0.093	0.097	5.89	3.30	3.80
SP-002		0.011	0.058	0.048	5.89	4.60	4.20	
Pear	PE-001	0.011	0.071	0.089	5.89	4.05	4.00	
Bovine fecal	CA-001	0.011	0.032	0.060	5.89	4.80	4.20	
Burdock	BU-001	0.011	0.050	0.089	5.89	4.20	3.85	
Parsley	PA-001	0.011	0.080	0.082	5.89	4.60	4.30	
	PA-002	0.011	0.080	0.080	5.89	4.50	4.30	
Unknown	UN-001	0.011	0.039	0.054	5.89	4.60	4.10	
	UN-002	0.011	0.052	0.078	5.89	4.25	3.85	
	UN-003	0.011	0.048	0.063	5.89	4.60	4.20	
Dongchimi	PR-001	0.011	0.065	0.078	5.89	4.00	3.85	
	PR-002	0.011	0.043	0.086	5.89	4.90	4.10	
	PR-003	0.011	0.052	0.086	5.89	4.40	4.20	
Kimchi	KC-005	0.011	0.054	0.078	5.89	4.50	4.05	
	KC-006	0.011	0.043	0.058	5.89	4.50	4.00	
	KC-007	0.011	0.056	0.071	5.89	4.60	3.85	
	KC-008	0.011	0.043	0.065	5.89	5.40	4.30	
	KC-009	0.011	0.086	0.102	5.89	3.85	3.30	
Radish Kimchi	RK-001	0.011	0.043	0.054	5.89	5.40	5.30	
	RK-002	0.011	0.030	0.052	5.89	5.00	4.30	
Red pepper	RK-003	0.011	0.043	0.032	5.89	5.25	4.80	
	RP-001	0.011	0.067	0.052	5.49	4.10	3.30	
	RP-002	0.011	0.060	0.052	5.49	4.20	3.40	

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH			
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	
Red pepper	RP-003	0.011	0.039	0.052	5.49	4.10	4.00	
	RP-004	0.011	0.048	0.065	5.49	4.20	3.90	
	RP-005	0.011	0.048	0.065	5.49	3.80	3.50	
	RP-006	0.011	0.048	0.056	5.49	3.90	3.40	
	RP-007	0.011	0.043	0.060	5.49	4.00	3.40	
	RP-008	0.011	0.056	0.082	5.49	4.30	3.82	
	RP-009	0.011	0.048	0.056	5.49	3.90	3.60	
	RP-010	0.011	0.065	0.054	5.49	4.20	3.90	
	RP-011	0.011	0.048	0.065	5.49	4.10	3.40	
	RP-012	0.011	0.065	0.043	5.49	4.20	3.40	
	RP-013	0.011	0.073	0.050	5.49	4.20	3.50	
	RP-014	0.011	0.065	0.048	5.49	4.10	3.80	
	RP-015	0.011	0.028	0.045	5.49	4.10	3.50	
	RP-016	0.011	0.035	0.043	5.49	4.20	3.70	
	Dongchimi	PR-004	0.011	0.067	0.045	5.49	4.05	4.00
		PR-005	0.011	0.050	0.039	5.49	5.10	4.50
PR-006		0.011	0.080	0.000	5.49	4.20	3.85	
PR-007		0.011	0.037	0.043	5.49	4.70	4.20	
PR-008		0.011	0.060	0.078	5.49	4.20	3.85	
Bovine fecal	CA-002	0.011	0.043	0.069	5.49	5.30	4.50	
	CA-003	0.011	0.032	0.032	5.49	5.30	5.30	
	CA-004	0.011	0.065	0.065	5.49	4.10	4.00	
	CA-005	0.011	0.041	0.058	5.49	5.25	4.40	
	CA-006	0.011	0.035	0.045	5.49	5.30	4.50	
	CA-007	0.011	0.048	0.086	5.49	4.70	4.30	
	CA-008	0.011	0.030	0.043	5.49	5.30	4.70	
	CA-009	0.011	0.032	0.086	5.49	5.30	4.30	
	CA-010	0.011	0.058	0.071	5.49	4.20	3.80	
	CA-011	0.011	0.037	0.043	5.49	4.90	4.90	
	CA-012	0.011	0.032	0.060	5.49	5.30	4.30	
	CA-013	0.011	0.048	0.043	5.49	5.40	5.30	
	CA-014	0.011	0.048	0.060	5.49	4.20	4.00	
	CA-015	0.011	0.048	0.076	5.49	4.10	4.10	
	CA-016	0.011	0.086	0.091	5.49	3.90	3.90	
	CA-017	0.011	0.030	0.069	5.49	5.30	4.20	
	CA-018	0.011	0.030	0.080	5.49	5.25	4.30	
	CA-019	0.011	0.039	0.058	5.49	5.25	4.30	
	CA-020	0.011	0.043	0.028	5.49	5.30	5.00	
	CA-021	0.011	0.039	0.063	5.49	5.30	4.20	
	CA-022	0.011	0.035	0.065	5.49	5.00	4.00	
	CA-023	0.011	0.065	0.089	5.49	4.50	4.00	
	Kiwi	KW-001	0.039	0.065	0.056	5.89	4.30	3.40
KW-002		0.039	0.063	0.035	5.89	4.30	3.40	
KW-003		0.039	0.065	0.093	5.78	4.00	4.00	
KW-004		0.039	0.056	0.045	5.89	4.20	3.20	
KW-005		0.039	0.065	0.041	5.89	4.20	3.40	

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Kiwi	KW-006	0.039	0.108	0.102	5.78	3.50	3.40
	KW-007	0.039	0.093	0.097	5.78	3.60	3.30
	KW-008	0.039	0.086	0.097	5.78	3.70	3.30
	KW-009	0.039	0.086	0.091	5.78	3.50	3.50
Pomegranate	PG-001	0.011	0.028	0.067	5.49	5.10	3.85
	PG-002	0.011	0.035	0.035	5.49	5.30	4.60
	PG-003	0.011	0.065	0.065	5.49	4.70	4.20
	PG-004	0.011	0.048	0.060	5.49	5.30	3.85
	PG-005	0.011	0.039	0.071	5.49	4.50	4.20
	PG-006	0.011	0.063	0.065	5.49	5.10	3.90
	PG-007	0.011	0.054	0.058	5.49	4.60	4.20
	PG-008	0.011	0.043	0.054	5.49	5.40	5.30
	PG-009	0.011	0.039	0.026	5.49	4.50	4.20
	PG-010	0.011	0.039	0.052	5.49	4.70	4.20
	PG-011	0.011	0.060	0.089	5.49	4.00	3.85
	PG-012	0.011	0.043	0.050	5.49	5.40	4.30
	PG-013	0.011	0.032	0.032	5.49	5.40	4.70
Water melon	WM-001	0.011	0.071	0.063	5.80	4.10	3.10
	WM-002	0.011	0.082	0.050	5.80	4.00	3.10
	WM-003	0.011	0.078	0.065	5.80	4.10	3.40
	WM-004	0.011	0.110	0.052	5.80	4.20	4.10
	WM-005	0.011	0.102	0.080	5.80	4.20	4.20
	WM-006	0.011	0.091	0.082	5.80	3.90	3.30
	WM-007	0.011	0.063	0.063	5.49	4.50	4.20
	WM-008	0.011	0.086	0.065	5.80	4.00	4.00
	WM-009	0.011	0.063	0.065	5.49	4.50	4.20
	WM-010	0.011	0.054	0.071	5.49	4.60	4.35
	WM-011	0.011	0.071	0.065	5.49	3.90	3.40
	WM-012	0.011	0.063	0.069	5.49	4.30	4.20
Peach	PC-001	0.039	0.056	0.045	5.89	5.40	4.20
	PC-002	0.039	0.058	0.041	5.89	4.10	3.90
	PC-003	0.039	0.043	0.076	5.89	4.10	4.10
	PC-004	0.039	0.041	0.026	5.89	3.80	3.50
	PC-005	0.039	0.039	0.035	5.89	3.80	3.30
Leek	KL-001	0.032	0.058	0.060	5.78	4.60	4.50
	KL-002	0.032	0.076	0.065	5.78	4.50	4.50
	KL-003	0.032	0.054	0.060	5.78	4.45	4.50
Bovine fecal	CA-024	0.011	0.065	0.082	5.78	4.40	4.20
	CA-025	0.011	0.076	0.097	5.78	3.90	3.85
Kimchi	KC-010	0.011	0.043	0.045	5.78	5.30	4.20
	KC-011	0.011	0.035	0.035	5.78	4.50	4.20
	KC-012	0.011	0.043	0.054	5.78	5.40	3.90
	KC-013	0.011	0.039	0.058	5.78	4.40	4.30
Banana	BN-001	0.011	0.050	0.043	5.78	4.50	4.20
Lettuce	LT-001	0.011	0.067	0.050	5.78	4.10	3.40
Unknown	UN-004	0.011	0.041	0.052	5.78	4.70	4.10

Table 1-2. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			pH		
		0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Dongchimi	PR-009	0.011	0.043	0.035	5.78	5.30	5.20
Kimchi	KC-014	0.011	0.063	0.104	5.78	4.20	4.20
	KC-015	0.011	0.054	0.076	5.78	4.60	4.05
Radish Kimchi	RK-004	0.011	0.030	0.048	5.78	5.30	4.60
Green pepper	GP-001	0.039	0.037	0.056	5.78	4.90	4.00
	GP-002	0.039	0.026	0.041	5.89	4.40	4.30
	GP-003	0.039	0.065	0.071	5.78	5.30	4.60
	GP-004	0.039	0.086	0.086	5.78	3.70	3.45
	GP-005	0.039	0.039	0.043	5.89	4.20	3.40

나. 발효능이 우수한 유산균의 2차 선별

1차 선별된 61주를 대상으로 양파 착즙액과 팽화홍삼 추출액을 최종 1 °Brix가 되도록 첨가한 양파 착즙액을 이용하여 분리 유산균의 발효능을 37°C에서 96시간동안 측정하였다.

(1) 양파 착즙액을 이용한 유산 발효

양파 착즙액에 분리균주의 종배양액을 2%(v/v) 첨가한 후 37°C에서 96시간동안 발효시키면서 24시간마다 산도와 pH를 측정한 결과를 각각 Table 1-3와 1-4에 나타내었다. 양파 착즙액의 초기 산도는 0.04%였고 대부분의 균주에 있어 발효시간이 경과함에 따라 96시간까지 산도가 지속적으로 증가하여 GO-029의 경우에는 0.112%까지 증가하였다. 그러나 발효기간이 48시간을 초과하게 되면 균주에 따라 불쾌취가 발생하는 경우도 있어 발효가 장기간 지속될 경우 산패 등 관능성에 문제를 야기시키는 것을 확인하였다. 양파 착즙액의 초기 pH는 5.83으로 발효기간이 경과함에 따라 pH가 지속적으로 감소하였다.

분리균주를 이용하여 양파 착즙액을 발효시킬 경우 96시간까지 산 생성은 지속적으로 되지만 48시간 이후에는 관능성이 저하되는 등의 문제가 있기 때문에 48시간에서의 산도와 pH를 이용하여 산 생성이 우수한 10 균주를 선정하여 최종 선별에 사용하였다. 선정된 균주는 CA-024, KC-015, KC-007, GO-014, RP-011, CA-010, PE-001, PG-011, GO-023, BU-001이었다.

(2) 팽화홍삼 추출액을 첨가한 양파 착즙액을 이용한 유산 발효

양파 착즙액에 팽화홍삼 추출액을 최종 1 °Brix가 되도록 첨가한 다음 분리균주의 종배양액을 2%(v/v) 첨가한 후 37°C에서 96시간동안 발효시키면서 24시간마다 산도와 pH

를 측정된 결과는 각각 Table 1-5와 1-6에 나타내었다. 팽화홍삼 추출액을 첨가한 양파 착즙액의 초기 산도는 0.019%였고 대부분의 균주에 있어 발효시간이 경과함에 따라 96시간까지 산도가 지속적으로 증가함을 알 수 있었다. 초기 pH는 4.65로 발효시간이 경과함에 따라 pH가 지속적으로 감소하였다.

이 경우에도 48시간에서의 산도와 pH를 이용하여 산 생성이 우수한 10 균주를 선정하여 최종 선별에 사용하였으며 GO-029, KC-007, KC-009, RP-011, CA-025, CA-010, PG-011, GO-009, PA-001, GO-016 등 총 10주를 선정하여 최종 선별에 사용하였다.

Table 1-3. Acidity of onion juice fermented with isolates

Source	Strain No.	Acidity (%)				
		0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Burdock	BU-001	0.040	0.054±0.010	0.068±0.025	0.078±0.015	0.084±0.010
	CA-002	0.040	0.061±0.011	0.071±0.009	0.081±0.015	0.089±0.016
	CA-007	0.040	0.056±0.008	0.071±0.017	0.080±0.026	0.091±0.021
	CA-009	0.040	0.050±0.002	0.064±0.012	0.074±0.001	0.082±0.006
	CA-010	0.040	0.053±0.009	0.072±0.018	0.102±0.004	0.102±0.006
Bovine fecal	CA-015	0.040	0.048±0.001	0.050±0.027	0.063±0.021	0.066±0.029
	CA-016	0.040	0.045±0.011	0.053±0.013	0.066±0.019	0.073±0.017
	CA-017	0.040	0.052±0.004	0.055±0.009	0.069±0.007	0.074±0.004
	CA-018	0.040	0.060±0.014	0.073±0.015	0.070±0.018	0.085±0.020
	CA-023	0.040	0.048±0.000	0.048±0.006	0.062±0.014	0.063±0.019
	CA-024	0.040	0.059±0.013	0.066±0.010	0.075±0.008	0.078±0.003
	CA-025	0.040	0.068±0.009	0.085±0.013	0.088±0.014	0.092±0.016
	GO-001	0.040	0.050±0.007	0.053±0.015	0.067±0.015	0.068±0.014
	GO-003	0.040	0.050±0.012	0.057±0.006	0.076±0.025	0.081±0.015
	GO-007	0.040	0.066±0.024	0.057±0.047	0.076±0.021	0.089±0.013
Green onion	GO-009	0.040	0.066±0.016	0.081±0.005	0.077±0.005	0.079±0.002
	GO-011	0.040	0.045±0.006	0.047±0.007	0.067±0.009	0.080±0.002
	GO-012	0.040	0.060±0.018	0.069±0.010	0.076±0.007	0.089±0.013
	GO-014	0.040	0.057±0.019	0.066±0.017	0.077±0.019	0.096±0.020
	GO-015	0.040	0.059±0.010	0.060±0.013	0.067±0.008	0.077±0.003
	GO-016	0.040	0.060±0.017	0.083±0.031	0.092±0.018	0.107±0.008
	GO-019	0.040	0.055±0.013	0.063±0.015	0.066±0.014	0.075±0.003
	GO-023	0.040	0.052±0.008	0.059±0.016	0.068±0.016	0.082±0.015
	GO-025	0.040	0.055±0.011	0.060±0.010	0.066±0.011	0.074±0.008
	GO-027	0.040	0.050±0.006	0.048±0.003	0.063±0.013	0.076±0.004
	GO-029	0.040	0.090±0.045	0.113±0.058	0.070±0.048	0.112±0.013
	GO-032	0.040	0.057±0.010	0.050±0.013	0.062±0.018	0.074±0.018
	GO-034	0.040	0.058±0.019	0.063±0.017	0.086±0.017	0.102±0.018
GO-044	0.040	0.048±0.008	0.071±0.016	0.082±0.007	0.088±0.012	
Kimchi	KC-002	0.040	0.054±0.004	0.067±0.013	0.071±0.019	0.081±0.004
	KC-005	0.040	0.052±0.006	0.050±0.005	0.065±0.010	0.077±0.009
	KC-007	0.040	0.059±0.019	0.073±0.024	0.095±0.011	0.094±0.012
	KC-009	0.040	0.073±0.020	0.079±0.024	0.091±0.017	0.100±0.017
	KC-014	0.040	0.052±0.004	0.060±0.006	0.076±0.010	0.102±0.012
	KC-015	0.040	0.050±0.013	0.060±0.015	0.073±0.017	0.077±0.015
Onion	ON-092	0.040	0.040±0.003	0.042±0.003	0.071±0.020	0.089±0.013
	ON-298	0.040	0.061±0.016	0.068±0.019	0.084±0.025	0.094±0.018
Parsley	PA-001	0.040	0.064±0.012	0.076±0.005	0.079±0.007	0.083±0.008
	PA-002	0.040	0.058±0.022	0.062±0.015	0.064±0.010	0.077±0.001
Pear	PE-001	0.040	0.058±0.023	0.070±0.006	0.068±0.014	0.079±0.001
	PG-001	0.040	0.045±0.007	0.048±0.007	0.064±0.006	0.074±0.007
	PG-003	0.040	0.042±0.009	0.049±0.014	0.069±0.007	0.077±0.011
Pomegranate	PG-006	0.040	0.058±0.022	0.069±0.010	0.070±0.010	0.076±0.006
	PG-007	0.040	0.041±0.002	0.045±0.004	0.039±0.004	0.045±0.008
	PG-011	0.040	0.059±0.014	0.081±0.015	0.086±0.014	0.095±0.011
Dongchimi	PR-001	0.040	0.054±0.020	0.056±0.016	0.087±0.004	0.090±0.005

Table 1-3. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)				
		0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Dongchimi	PR-002	0.040	0.051±0.002	0.062±0.006	0.069±0.004	0.073±0.003
	PR-003	0.040	0.045±0.009	0.064±0.018	0.075±0.026	0.076±0.022
	PR-008	0.040	0.053±0.008	0.054±0.006	0.070±0.017	0.082±0.015
Radish	RA-019	0.040	0.058±0.013	0.066±0.018	0.074±0.013	0.088±0.012
Red pepper	RP-005	0.040	0.053±0.011	0.070±0.010	0.084±0.003	0.091±0.004
	RP-008	0.040	0.053±0.017	0.081±0.008	0.082±0.012	0.098±0.004
	RP-011	0.040	0.071±0.009	0.084±0.005	0.089±0.005	0.096±0.005
Shallot	SG-001	0.040	0.057±0.007	0.069±0.004	0.071±0.004	0.076±0.002
	SG-002	0.040	0.056±0.021	0.066±0.010	0.071±0.004	0.078±0.004
	SG-014	0.040	0.066±0.001	0.073±0.002	0.076±0.004	0.081±0.003
Sweet pumpkin	SP-001	0.040	0.060±0.022	0.072±0.020	0.077±0.009	0.095±0.006
Unknown	UN-002	0.040	0.042±0.007	0.055±0.005	0.073±0.020	0.077±0.004
Water melon	WM-009	0.040	0.048±0.017	0.060±0.014	0.066±0.009	0.091±0.005
	WM-010	0.040	0.046±0.011	0.054±0.015	0.053±0.017	0.058±0.016
	WM-012	0.040	0.037±0.003	0.048±0.015	0.040±0.008	0.045±0.006

Table 1-4. pH of onion juice fermented with isolates

Source	Strain No.	pH				
		0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Burdock	BU-001	5.83	5.58	5.37	4.70	4.43
	CA-002	5.83	5.26	5.16	4.70	4.32
	CA-007	5.83	5.49	4.85	4.40	4.19
	CA-009	5.83	5.67	5.42	5.02	4.01
	CA-010	5.83	5.36	4.75	4.01	4.01
Bovine fecal	CA-015	5.83	5.74	5.49	5.18	5.07
	CA-016	5.83	5.73	5.68	5.15	4.86
	CA-017	5.83	5.57	5.36	5.06	4.96
	CA-018	5.83	5.58	5.25	5.23	4.80
	CA-023	5.83	5.71	5.71	5.22	4.99
	CA-024	5.83	5.27	5.08	4.97	4.60
	CA-025	5.83	5.00	4.69	4.44	4.39
	GO-001	5.83	5.52	5.52	5.38	4.97
	GO-003	5.83	5.49	5.26	4.89	4.58
	GO-007	5.83	5.07	5.02	4.69	4.39
Green onion	GO-009	5.83	5.30	5.01	4.66	4.61
	GO-011	5.83	5.68	5.49	5.02	4.60
	GO-012	5.83	5.15	4.94	4.22	4.20
	GO-014	5.83	5.31	5.11	4.67	4.30
	GO-015	5.83	5.23	5.12	4.94	4.60
	GO-016	5.83	5.19	4.66	4.22	4.01
	GO-019	5.83	5.27	4.97	4.83	4.65
	GO-023	5.83	5.65	5.62	5.01	4.53
	GO-025	5.83	5.28	5.10	5.01	4.73
	GO-027	5.83	5.66	5.67	5.14	4.61
	GO-029	5.83	4.60	4.58	4.01	4.01
	GO-032	5.83	5.61	5.66	5.06	4.94
	GO-034	5.83	5.34	5.26	4.47	4.01
	GO-044	5.83	5.51	4.91	4.58	4.49
	Kimchi	KC-002	5.83	5.67	4.80	4.56
KC-005		5.83	5.72	5.67	5.01	4.60
KC-007		5.83	5.23	4.99	4.01	4.01
KC-009		5.83	4.74	4.33	4.27	4.09
KC-014		5.83	5.62	5.61	4.64	4.01
KC-015		5.83	5.39	5.02	4.47	4.42
Onion	ON-092	5.83	6.01	5.85	4.83	4.24
	ON-298	5.83	5.23	4.92	4.35	4.29
Parsley	PA-001	5.83	5.14	4.62	4.43	4.28
	PA-002	5.83	5.22	5.14	4.93	4.72
Pear	PE-001	5.83	5.05	4.97	4.70	4.55
	PG-001	5.83	5.89	5.87	4.94	4.75
Pomegranate	PG-003	5.83	5.86	5.71	4.78	4.28
	PG-006	5.83	5.29	5.09	5.02	4.67
	PG-007	5.83	5.90	5.87	5.91	5.75
	PG-011	5.83	5.45	4.47	4.22	4.01
Dongchimi	PR-001	5.83	5.26	4.97	4.01	4.01

Table 1-4. continued

Source	Strain No.	pH				
		0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Dongchimi	PR-002	5.83	5.46	5.13	4.71	4.60
	PR-003	5.83	5.77	5.30	4.91	4.74
	PR-008	5.83	5.59	5.49	4.59	4.44
Radish	RA-019	5.83	5.30	4.93	4.35	4.10
Red pepper	RP-005	5.83	5.31	4.80	4.01	4.01
	RP-008	5.83	5.22	4.35	4.29	4.08
	RP-011	5.83	4.79	4.18	4.01	4.01
Shallot	SG-001	5.83	5.24	4.78	4.73	4.61
	SG-002	5.83	5.20	4.90	4.75	4.52
	SG-014	5.83	4.87	4.69	4.46	4.38
Sweet pumpkin	SP-001	5.83	5.03	4.84	4.33	4.01
Unknown	UN-002	5.83	5.65	5.64	5.12	4.48
Water melon	WM-009	5.83	5.49	5.16	4.94	4.01
	WM-010	5.83	5.69	5.64	5.59	5.30
	WM-012	5.83	5.99	5.96	5.94	5.85

Table 1-5. Acidity of onion juice supplemented with puffed red ginseng fermented with isolates

Source	Strain No.	Acidity (%)			
		0 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Burdock	BU-001	0.019	0.057±0.015	0.068±0.005	0.058±0.013
	CA-002	0.019	0.050±0.008	0.074±0.004	0.054±0.009
	CA-007	0.019	0.057±0.014	0.057±0.003	0.063±0.008
Bovine fecal	CA-009	0.019	0.036±0.005	0.057±0.001	0.058±0.002
	CA-010	0.019	0.061±0.010	0.069±0.001	0.051±0.001
	CA-015	0.019	0.047±0.005	0.062±0.001	0.067±0.002
	CA-016	0.019	0.054±0.015	0.060±0.002	0.058±0.008
	CA-017	0.019	0.053±0.005	0.066±0.005	0.052±0.004
	CA-018	0.019	0.017±0.007	0.057±0.009	0.057±0.004
	CA-023	0.019	0.028±0.003	0.044±0.010	0.041±0.012
	CA-024	0.019	0.065±0.004	0.062±0.005	0.064±0.003
	CA-025	0.019	0.040±0.010	0.040±0.015	0.039±0.009
	GO-001	0.019	0.043±0.010	0.058±0.001	0.058±0.006
	GO-003	0.019	0.033±0.005	0.033±0.007	0.029±0.002
	GO-007	0.019	0.037±0.001	0.044±0.019	0.031±0.003
Green onion	GO-009	0.019	0.050±0.011	0.055±0.008	0.054±0.011
	GO-011	0.019	0.024±0.001	0.052±0.002	0.055±0.007
	GO-012	0.019	0.031±0.011	0.052±0.008	0.049±0.003
	GO-014	0.019	0.063±0.005	0.070±0.002	0.057±0.005
	GO-015	0.019	0.051±0.009	0.063±0.004	0.060±0.006
	GO-016	0.019	0.048±0.010	0.059±0.002	0.068±0.017
	GO-019	0.019	0.034±0.001	0.040±0.005	0.036±0.003
	GO-023	0.019	0.065±0.011	0.072±0.003	0.067±0.004
	GO-025	0.019	0.016±0.002	0.041±0.018	0.049±0.008
	GO-027	0.019	0.062±0.001	0.066±0.011	0.052±0.008
	GO-029	0.019	0.061±0.021	0.064±0.002	0.042±0.006
	GO-032	0.019	0.064±0.004	0.059±0.006	0.058±0.003
	GO-034	0.019	0.063±0.008	0.067±0.008	0.072±0.006
	GO-044	0.019	0.060±0.000	0.062±0.004	0.068±0.006
Kimchi	KC-002	0.019	0.044±0.009	0.049±0.005	0.066±0.010
	KC-005	0.019	0.030±0.004	0.043±0.001	0.037±0.001
	KC-007	0.019	0.058±0.005	0.067±0.006	0.064±0.016
	KC-009	0.019	0.056±0.005	0.054±0.001	0.057±0.015
	KC-014	0.019	0.040±0.016	0.065±0.002	0.064±0.017
Onion	ON-098	0.019	0.036±0.003	0.035±0.003	0.039±0.014
Parsley	PA-001	0.019	0.036±0.010	0.034±0.004	0.031±0.003
	PA-002	0.019	0.062±0.004	0.060±0.008	0.066±0.005
Pear	PE-001	0.019	0.061±0.009	0.071±0.003	0.059±0.003
Pomegranate	PG-001	0.019	0.032±0.006	0.035±0.011	0.029±0.002
	PG-003	0.019	0.034±0.007	0.029±0.008	0.043±0.022
	PG-006	0.019	0.044±0.016	0.044±0.001	0.053±0.021
	PG-007	0.019	0.033±0.003	0.027±0.001	0.027±0.002
	PG-011	0.019	0.065±0.010	0.078±0.008	0.061±0.003
Dongchimi	PR-001	0.019	0.036±0.001	0.058±0.008	0.066±0.008

Table 1-5. continued

Source	Strain No.	Acidity (%)			
		0 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Dongchimi	PR-002	0.019	0.041±0.004	0.057±0.005	0.040±0.003
	PR-003	0.019	0.037±0.010	0.062±0.000	0.058±0.003
	PR-008	0.019	0.063±0.002	0.053±0.016	0.058±0.010
Radish	RA-019	0.019	0.033±0.009	0.043±0.002	0.037±0.001
Red pepper	RP-005	0.019	0.057±0.003	0.064±0.008	0.055±0.001
	RP-008	0.019	0.058±0.030	0.056±0.008	0.059±0.003
	RP-011	0.019	0.051±0.005	0.059±0.007	0.058±0.008
Shallot	SG-001	0.019	0.034±0.002	0.035±0.009	0.026±0.004
	SG-002	0.019	0.044±0.010	0.036±0.002	0.047±0.007
	SG-014	0.019	0.042±0.007	0.044±0.001	0.045±0.013
Sweet pumpkin	SP-001	0.019	0.050±0.007	0.067±0.002	0.060±0.013
Unknown	UN-002	0.019	0.037±0.003	0.040±0.003	0.043±0.003
Water melon	WM-009	0.019	0.019±0.001	0.051±0.001	0.053±0.004
	WM-010	0.019	0.024±0.004	0.054±0.003	0.060±0.002

Table 1-6. pH of onion juice supplemented with puffed red ginseng fermented with isolates

Source	Strain No.	pH			
		0 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Burdock	BU-001	4.65	9.40	9.00	6.70
	CA-002	4.65	7.80	9.90	6.70
Bovine fecal	CA-007	4.65	9.20	7.60	8.00
	CA-009	4.65	5.40	8.00	8.20
	CA-010	4.65	9.50	9.50	7.00
	CA-015	4.65	7.00	8.70	9.10
	CA-016	4.65	9.00	8.20	8.80
	CA-017	4.65	7.80	8.70	6.80
	CA-018	4.65	3.00	8.80	7.60
	CA-023	4.65	4.20	5.20	4.50
	CA-024	4.65	8.60	8.10	8.60
	CA-025	4.65	6.50	7.00	6.20
	Green onion	GO-001	4.65	7.00	8.00
GO-003		4.65	5.00	5.30	3.80
GO-007		4.65	5.20	4.30	4.60
GO-009		4.65	8.00	8.50	8.60
GO-011		4.65	3.20	7.40	6.90
GO-012		4.65	5.30	6.50	6.50
GO-014		4.65	9.20	9.90	7.50
GO-015		4.65	7.90	8.30	9.00
GO-016		4.65	7.70	8.40	7.80
GO-019		4.65	4.70	5.00	4.80
GO-023		4.65	10.10	10.20	9.70
GO-025		4.65	2.40	4.00	6.00
GO-027		4.65	8.60	8.00	6.50
GO-029		4.65	10.50	8.80	5.30
Kimchi	KC-002	4.65	7.00	6.30	10.10
	KC-005	4.65	3.70	6.10	5.20
	KC-007	4.65	8.60	8.80	7.30
	KC-009	4.65	8.20	7.60	9.40
	KC-014	4.65	4.00	9.20	7.20
	KC-015	4.65	10.40	8.60	8.00
Onion	ON-098	4.65	5.20	4.60	6.80
Parsley	PA-001	4.65	4.10	4.30	4.00
	PA-002	4.65	8.20	7.50	8.60
Pear	PE-001	4.65	9.40	10.10	8.50
Pomegranate	PG-001	4.65	5.00	3.70	4.20
	PG-003	4.65	4.10	3.20	3.80
	PG-006	4.65	7.60	6.10	5.30
	PG-007	4.65	4.80	3.60	3.90
	PG-011	4.65	10.00	11.70	8.20
Dongchimi	PR-001	4.65	4.90	8.80	8.30

Table 1-6. continued

Source	Strain No.	pH			
		0 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Dongchimi	PR-002	4.65	6.10	8.40	5.80
	PR-003	4.65	6.10	8.60	8.30
	PR-008	4.65	8.60	5.80	7.10
Radish	RA-019	4.65	5.40	6.10	5.20
Red pepper	RP-005	4.65	8.20	8.20	7.70
	RP-008	4.65	11.00	8.50	7.90
	RP-011	4.65	7.60	8.80	7.30
Shallot	SG-001	4.65	4.50	3.90	3.30
	SG-002	4.65	7.10	5.20	5.80
	SG-014	4.65	6.50	6.00	5.00
Sweet pumpkin	SP-001	4.65	7.60	9.40	7.10
Unknown	UN-002	4.65	5.50	5.80	5.70
Water melon	WM-009	4.65	2.80	7.20	7.80
	WM-010	4.65	3.70	7.70	8.20

다. 선별된 유산균주의 생리활성

2차 예비실험에서 선정한 양과즙을 우수하게 발효시키는 균주 10주와 팽화홍삼을 첨가한 양과즙을 우수하게 발효시키는 균주 10주 중에서 양과즙과 팽화홍삼을 첨가한 양과즙을 모두 우수하게 발효시키는 균주는 KC-007, CA-010, PG-011, RP-011 등 4균주이므로 총 16균주(BU-001, CA-010, CA-024, CA-025, GO-009, GO-014, GO-016, GO-023, GO-029, KC-007, KC-009, KC-015, PA-001, PE-001, PG-011, RP 011)를 2차 선별실험에서 선정하였다. 이 선정균주들을 이용하여 양과 착즙액을 유산 발효시킨 후 발효액의 여러 가지 생리활성을 측정하였다.

(1) 전자공여작용

인체 내에서 특히 지방질의 산화과정에서 생성되는 free radical들은 세포의 노화를 촉진시키고 생체세포의 방어기전을 저하시키는 것을 비롯하여 세포활성을 저해하므로 이들 free radical의 생성을 근본적으로 억제하거나 이미 생성된 free radical들의 안정화를 통해 생체세포를 보호할 필요가 있는데 전자공여작용은 이러한 생물활성 free radical에 전자를 공여하여 세포 성분의 산화를 억제하게 된다. 양과 착즙액과 이를 유산발효시킨 발효액의 전자공여능을 측정한 결과 Table 1-7과 같이 양과 착즙액은 85.7%의 전자공여능을 나타내었으며 발효액의 경우에는 BU-001, CA-010, GO-009, GO-023, KC-007, PE-001, RP-011 균주의 전자공여능이 다른 균주에 비하여 상대적으로 높은 전자공여능을 나타내었다. Cha 등은 복분자를 80% methanol과 75% acetone으로 추출한 유기용매 추출물에서는 미숙과에서 92.59~92.61%, 완숙과에서 82.31~82.64%, 잎에서 84.46~88.36%의 전자공여효과를 나타내었으며 열수 추출물에서는 미숙과 91.90%, 완숙과 88.93%, 잎 85.60% 순으로 전자공여효과를 나타내 미숙과가 완숙과에 비해 효과가 높다고 보고한 바 있다.

Table 1-7. Electron donating ability of onion juice fermented with lactic acid bacteria

Strain	Electron donating ability(%)	
	24 hr	48 hr
BU-001	91.84	94.85
CA-025	90.03	91.51
CA-010	93.48	92.55
CA-024	92.61	88.83
GO-009	94.58	93.10
GO-014	90.36	89.76
GO-016	83.41	90.85
GO-023	94.96	94.47
GO-029	94.58	89.49
KC-007	95.56	90.85
KC-009	93.37	89.10
KC-015	90.85	90.36
PA-001	86.20	82.42
PE-001	93.15	91.62
PG-011	59.69	61.23
RP-011	95.29	94.20
Onion	85.71	

(2) 아질산염 소거작용

발암에 관련된 물질로 알려진 nitrite는 식품첨가물로서 뿐만 아니라 음료수, 타액 등에도 소량 존재하고 있다고 알려져 있으며, 야채류나 과실에 다량 존재하고 있는 nitrate도 타액이나 위 내 또는 식품의 저장 중에 nitrate reductase 등에 의해 nitrite로 환원되어진다고 알려져 있다. Nitrite는 그 자체가 독성을 나타내어 일정 농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중의 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성함으로써 methemoglobin증 등 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 단백질 식품이나 의약품 및 잔류 농약 등에 존재하는 amine류와 반응하여 nitrosamine을 생성하는 것으로 보고되고 있는데, 대부분의 nitrosamine은 핵산이나 단백질 또는 세포 내 성분을 alkyl화함으로써 암을 유발한다고 보고된 바 있다. 이와 같이 nitrosamine은 식품성분과의 상호반응으로 식품 자체 내에서 생성될 수 있을 뿐만 아니라, nitroso화 반응이 인체 위장 내의 pH와 유사한 범위에서 최적조건을 가지기 때문에 많은 관심이 모아지고 있다.

양파 착즙액과 이를 유산발효시킨 발효액의 아질산염 소거능을 측정한 결과 Table 1-8과 같이 양파 착즙액은 pH 1.2의 조건에서 24.89%로 가장 높은 소거율을 나타내었고 pH 3.0에서는 23.17%, pH 4.2에서는 18.50%, pH 6.0에서는 2.21%의 아질산염 소거능을 나타내어 pH가 증가할수록 소거율이 크게 감소하여 pH 의존적인 경향을 나타내었다. 이

는 복분자의 미숙과 및 완숙과 잎 추출물이 pH 1.2의 조건에서 가장 높은 아질산염 소거율을 나타내었다는 결과나 솔잎, 쪽, 결명자에서 pH가 낮을수록 아질산염 소거작용이 높았다는 결과와 일치하였다. 또한 nitrosamine 생성의 최적 pH는 2.5~3.0으로 pH 의존적이어서 강산성에서 아질산염 소거율이 높고 pH가 높아질수록 소거율이 감소한다는 보고와도 일치하였다.

양파 착즙액의 유산 발효액의 경우에도 대부분의 균주가 pH 1.2에서 가장 높은 아질산염 소거능을 나타내었으며 pH가 증가할수록 소거능이 감소하는 경향을 나타내었다. 분리 균주 중 KC-007과 CA-025의 아질산염 소거능이 pH 1.2에서 각각 68.72%, 60.05%, pH 3.0에서 각각 33.94%, 32.11%로 가장 우수하였고, 그 외에도 CA-010, PG-011, RP-011이 소거능이 우수하였다.

Table 1-8. Nitrite scavenging ability of onion juice fermented with lactic acid bacteria

Strain	Nitrite scavenging ability (%)							
	24 hr				48 hr			
	pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	pH 6.0	pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	pH 6.0
BU-001	51.37	21.75	17.00	0.52	33.79	32.11	27.50	0.53
CA-010	65.30	23.78	18.75	3.55	49.77	30.28	15.25	4.50
CA-024	49.32	13.87	18.00	3.51	26.94	27.85	32.50	5.82
CA-025	60.05	32.11	26.50	7.43	34.93	36.59	30.50	9.52
GO-009	66.89	18.29	28.50	2.42	16.21	29.67	19.50	3.21
GO-014	24.89	19.31	21.00	1.24	36.99	37.40	23.25	6.35
GO-016	30.72	26.42	17.75	1.24	37.21	25.41	20.25	1.23
GO-023	70.32	25.61	16.50	1.53	29.91	21.95	23.25	2.32
GO-029	60.05	16.06	26.00	0.35	47.95	30.28	31.50	1.85
KC-007	68.72	33.94	35.00	4.23	49.77	22.97	26.75	7.41
KC-009	56.16	16.67	19.50	0.12	42.47	34.35	20.25	0.26
KC-015	52.74	23.58	19.25	2.02	40.87	42.28	31.25	4.23
PA-001	52.97	18.50	25.25	1.23	58.22	36.38	48.00	3.70
PE-001	51.37	27.85	26.00	0.23	23.74	31.50	20.25	0.53
PG-011	65.30	31.71	22.00	2.42	30.14	27.85	17.25	3.70
RP-011	65.98	23.58	15.25	4.23	35.16	38.62	20.00	7.41
Onion	24.89	23.17	18.50	2.21				

(3) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성과 xanthine oxidase 저해 활성

노화와 관련되어 생체 대사과정 중 생성되는 superoxide radical($O_2^{\cdot -}$)은 전자 환원에 의한 반응성이 매우 크며 세포와 조직에 해로운 독성을 일으켜 질병을 유발시키는 것으로 알려져 있는데 증양을 촉진하며, 암을 유발할 수 있고 피부의 노화 등을 일으킬 수 있다. 인체 내에서는 $O_2^{\cdot -}$ 를 제거하기 위하여 superoxide dismutase(SOD)가 분비되어

superoxide radical을 과산화수소와 정상상태의 산소로 전환시켜 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemical에 속하는 것으로 보고되어 있다. 양파 착즙액과 이를 유산발효시킨 발효액의 SOD 유사활성을 측정된 결과 활성은 측정되지 않았다.

한편 xanthine oxidase는 생체 내 purine 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 urate를 형성하게 된다. Urate가 혈장 내에 증가되면 낮은 용해성으로 인하여 골절에 축적되어 통증을 일으키는 통풍을 유발할 뿐만 아니라 신장에 침착되어 신장질환을 일으키기도 한다. 통풍의 치료에 사용되는 약물로는 hypoxanthine의 유사체인 allopurinol과 alloxanthine이 있는데 allopurinol은 xanthine oxidase에 의하여 alloxanthine으로 산화된 다음, 이것이 xanthine oxidase에 그대로 단단하게 결합하여 요산의 생성 최종단계에 관여하는 xanthine oxidase의 효소활성을 저해함으로써 요산의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그 외에 효소활성을 저해할 목적으로 천연물을 대상으로 하여 많은 연구가 진행되어 왔는데 Hayashi 등은 식물계에 널리 존재하는 flavonoid류를 분리하고 xanthine oxidase 저해효과를 관찰한 결과, hydroxy기의 위치에 따라 저해효과가 다른 것을 보고한 바 있으며, Hatano 등은 galloyl기를 함유한 flavonoid 화합물이 xanthine oxidase 저해효과가 우수하였으며 경쟁적으로 저해한다는 사실을 보고하였다. 또한 Noro 등은 거담제와 이수제의 원료로 사용하고 있는 팔꽃나무의 꽃과 눈으로부터 분리된 genkwanin, luteolin 7-methylether, luteolin이 xanthine oxidase에 강한 저해효과가 있었다고 보고한 바 있다. 양파 착즙액과 이를 유산발효시킨 발효액의 xanthine oxidase 저해효과를 측정된 결과 활성이 나타나지 않았다.

(4) 항균활성

양파 착즙액과 이를 유산발효시킨 발효액의 항균활성을 측정하기 위하여 검정균으로서 여러 가지 식중독 원인균주를 사용하여 액체배지 상에서의 생육저해현상을 관찰하였다. 그 결과 Table 1-9와 같이 양파 착즙액은 *E. coli* O-157:H7에 대해서는 8.26%의 생육저해율을 나타내 사용한 검정균 중에서 가장 높은 항균력을 나타냈으며 *S. aureus*와 *B. cereus*에 대해서는 각각 3.34%, 2.81%의 생육저해효과를 나타내 유사한 항균력을 보여주었다. 발효액의 경우에는 KC-007과 PG-011이 *S. aureus*에 대해서 18.44%의 생육저해율을 나타내 가장 높은 항균력을 보였으며, *E. coli* O-157:H7에 대해서는 각각 11.71%, 8.69%의 생육저해효과를 나타내었다. 한편 *B. cereus*에 대해서는 CA-010이 11.50%의 항균활성을, *L. monocytogenes*에 대해서는 GO-023이 12.07%의 항균활성을 나타내었다.

Kim 등은 복분자 추출물이 *P. aeruginosa*와 *S. typhimurium*에 대한 항균활성을 지니고 있다고 보고하였고 Ryan 등은 *Rubus idaeus*로 제조한 복분자 주스가 *Salmonella*, *Shigella*와 *E. coli*에 대하여 생육저해효과가 있으며 곰팡이에 대해서는 효과가 없다고 보고하였으나 Cha 등은 복분자 추출물이 *B. cereus*에 대해서만 높은 항균활성을 나타내었다고 보

고한 바 있다.

이상의 결과로부터 양파 착즙액과 이를 유산발효시킨 발효액은 전자공여능, 아질산염 소거능 등과 같은 항산화활성을 지니고 있으며, 식중독 세균에 대한 항균활성도 어느 정도 지니고 있음을 확인하였다. 이 결과를 토대로 높은 발효능을 지니고 있는 16주의 분리 균주 중에서 항산화활성과 항균활성이 우수한 6균주(CA-010, CA-025, GO-029, KC-007, PG-011, RP-011)를 선정하여 동정 및 최종 starter 선정에 사용하였다.

Table 1-9. Antimicrobial activities onion juice fermented with lactic acid bacteria

Strain	Antimicrobial activity (%)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>L. monocytogenes</i>
BU-011	11.22	12.43	2.84	6.30	5.46
CA-010	8.30	11.42	11.50	2.38	12.32
CA-024	7.68	9.15	7.54	2.73	11.20
CA-025	13.22	8.22	2.93	0.41	1.33
GO-009	9.81	16.40	5.17	3.04	4.95
GO-014	10.91	15.23	2.61	0.01	0.65
GO-016	13.93	8.57	0.86	3.67	2.46
GO-023	13.02	7.94	4.63	2.02	12.07
GO-029	12.69	11.66	10.83	3.27	2.36
KC-007	11.71	18.44	5.03	0.35	7.08
KC-009	10.84	15.78	5.27	0.41	10.64
KC-015	8.38	11.90	3.53	4.16	1.80
PA-001	8.97	12.87	4.85	4.80	1.61
PE-001	12.80	2.98	4.72	9.37	11.41
PG-011	8.69	18.44	9.46	2.94	2.43
RP-011	10.17	11.78	4.80	3.45	3.94
Onion	8.26	3.34	2.81	0.69	1.04

라. Starter 균주의 동정과 최종 starter 선정

높은 유산 생성능을 지니고 있으며 우수한 생리활성을 나타내는 6균주(CA-010, CA-025, GO-029, KC-007, PG-011, RP-011)를 대상으로 동정을 실시하였다.

(1) 형태학적 생리학적 특성

선정된 6균주 중에서 KC-007, CA-010, RP-011은 광학현미경 상에서 사구균으로 관찰되었고 CA-025, GO-029, PG-011는 구균 또는 짧은 연쇄상 구균으로 관찰되었다(Fig. 1-3). 6균주 모두 운동성은 없었으며 Gram 염색과 KOH test를 통하여 Gram 양성세균으로 확인되었다. 포자염색에서는 음성반응으로 나타나 무포자균으로 확인되었으며, catalase test에서 음성 반응을 나타내어 6균주 모두 전형적인 유산균의 형태적, 생리학적 특징을 지니고 있었다. KC-007, CA-010, RP-011은 포도당으로부터 gas를 생성하지 않아

정상유산발효(homo lactic acid fermentation)를 하는 것으로 확인되었고, CA-025, GO-029, PG-011은 포도당을 이용하여 gas를 생성하였기 때문에 이상유산발효(hetero lactic fermentation)를 하는 것으로 확인되었다(Table 1-10).

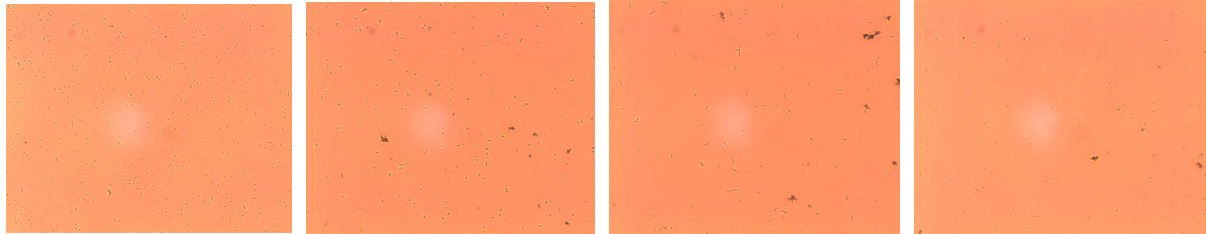


Fig. 1-3. Microscopy of isolates KC-007, CA-010, CA-025 and GO-029 from left to right panel ($\times 1,000$).

Table 1-10. Morphological and physiological characteristics of isolates.

Characteristics	KC-007	CA-010	RP-011	CA-025	GO-029	PG-011
Morphology	cocci in tetrads	cocci in tetrads	cocci in tetrads	cocci in	cocci	cocci
Gram stain	+	+	+	+	+	+
3% KOH test	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-
Catalase test	-	-	-	-	-	-
Spore stain	-	-	-	-	-	-
Gas production from glucose	-	-	-	+	+	+

한편 6 균주의 생리학적 특성을 보기 위하여 Biomériux의 API 50CHL Kit를 이용하여 탄소원 이용성을 조사하였으며 그 결과를 Table 1-11에 나타내었다. KC-007, CA-010, RP-011은 탄소원 이용성이 완벽하게 동일하였는데, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-ribose, L-arabinose, D-melibiose, D-saccharose, D-raffinose 등을 탄소원으로 이용하여 산을 생성할 수 있었으며, glycerol, xylose, L-sorbose, inositol, xylitol, fucose 등을 이용하지 못하였다. CA-025, GO-029는 D-glucose, D-fructose, D-galactose, D-mannose, D-ribose, L-arabinose, D-melibiose, D-saccharose, D-raffinose 등을 탄소원으로 이용하여 산을 생성할 수 있었으며, glycerol, L-sorbose, inositol, xylitol, fucose 등을 이용하지 못하였다. PG-011은 D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-arabinose, D-saccharose 등을 탄소원으로 이용하여 산을 생성할 수 있었으며, glycerol, D-ribose, D-melibiose, D-raffinose, L-sorbose, inositol, xylitol, fucose 등을 이용하지 못하였다. Table 1-10의 결과를 API database를 이용하여 동정을 실시한 결과 KC-007, CA-010, RP-011은

*Pediococcus pentosaceus*로 동정되었으며 identity는 모두 99.9%로 계산되었다. CA-025와 GO-029는 *Leuconostoc mesenteroides*로 동정되었고 이 두 균주 역시 identity는 모두 99.9%로 계산되었다. 한편, PG-011은 *Leuconostoc citreum*으로 동정되었으나 identity가 91.0%로 매우 낮은 수준을 보여주었다.

(2) 분자유전학적 특성

선정된 6 균주에 대한 분자유전학적 특성에 의한 동정을 위해 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정 후 분석을 수행하였다. 6 균주에 대한 16S rRNA 유전자의 염기서열은 Fig. 1-4부터 1-9에 나타내었다.

KC-007(Fig. 1-4)과 RP-011(Fig. 1-5)의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Pediococcus pentosaceus* strain MY-800, *P. pentosaceus* NRIC 0123, *P. pentosaceus* ATCC 25745의 16S rRNA 유전자 염기서열과 각각 100%의 identity를 나타내었다.

CA-010(Fig. 1-6)의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Pediococcus pentosaceus* strain MY-800, *P. pentosaceus* NRIC 0123, *P. pentosaceus* ATCC 25745의 16S rRNA 유전자 염기서열과 각각 99%의 identity를 나타내었다.

CA-025(Fig. 1-7)의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Leuconostoc mesenteroides* NRIC 1517, *L. mesenteroides* NRIC 1513, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293의 16S rRNA 유전자 염기서열과 각각 99%의 identity를 나타내었다.

GO-029(Fig. 1-8)의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *L. mesenteroides* PC13과 100%, *L. mesenteroides* 6055, *L. mesenteroides* NRIC 1517과 각각 99%의 identity를 나타내었다.

한편, PG-011(Fig. 1-9)의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Leuconostoc citreum* KM20, *L. citreum* IH22와 각각 99%의 identity를 나타내었다.

Tabel 1-11. Carbon source utilization of isolates by API 50CHL kit

Carbohydrate	KC-007	CA-010	RP-011	CA-025	GO-029	PG-011
Glycerol	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	-	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	-
D-Xylose	-	-	-	-	+	+
L-Xylose	-	-	-	+	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-
Methyl-β-D-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	-	-	-	-	+	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	+	-	-
L-Rhamnose	+	+	+	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	+	-	-
Methyl-α-D-Mannopyranoside	-	-	-	-	-	-
Methyl-α-D-Glucopyranoside	-	-	-	-	+	-
N-Acetyl Glucosamine	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	-
Arbutin	+	+	+	-	+	+
Esculin ferric citrate	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	-	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	-	+	-
D-Maltose	+	+	+	+	+	+
D-Lactose (bovine origin)	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	+	+	+	+	+	-
D-Saccharose (sucrose)	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	+	+	+	-	+	-
Amidon (starch)	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	-	+	-
D-Turanose	-	-	-	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	+	+	+	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-
Potassium Gluconate	-	-	-	-	-	+
Potassium 2-Ketogluconate	-	-	-	-	-	-
Potassium 5-Ketogluconate	-	-	-	-	-	-

TCATGCAAGTCGAACGAACTCCGTTAATTGATTATGACGTA CTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGC
GAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAA
CAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAAAGGCTACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTA
TTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATT
GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAAC
TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTT
GGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGTA
ATCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAAGAAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTTCGAAGCTACCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCCCTTCG
GGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAC
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAGACCCG
GAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGT
ACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGG

Fig 1-4. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from strain KC-007.

ATCATGCAAGTCGAACGAACTCCGTTAATTGATTATGACGTA CTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGG
CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATA
ACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAAAGGCTACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGG
TATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAA
ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAAC
CTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAG
TAATCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAAGAAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTAATTTCGAAGCTACCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCCCTTC
GGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
CGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAGACCCG
CGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGT
AACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTA

Fig 1-5. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from strain RP-011.

TCATGCAGTCGAACGAACTCCGTTAATTGATTATGACGTA CTGTACTGATTGAGATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAAC
AGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCTATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAAAGGCTACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGT
GAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTA
TTTAAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATT
GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAAC
TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCT
GGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGTA
ATCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAAGAAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTCGAAGCTACCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCCCTTCG
GGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCA
ACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAC
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCCGCGAGACCCG
GAGGTTAAGCTAATCTTTAAAACCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGT
ACACCCAAAGCCGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTA

Fig 1-6. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from strain CA-010.

TCATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTC AAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA
CGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTTAGT
GTCGCATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTT
GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGAC
TGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATG
GAGCAACGCCGCTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGA
ATAGGAAATGATTTTAGTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGT
AAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGGCGAAAGCGG
CTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAA
GTGTTCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTA
GAGATAGAAGTGTTCTTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTAGATGGGCACTCTAG
CGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGCGTATAACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAG
TACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCC
CAAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTAGGAAGGAGCCGCTAAGGCAGGACAGATGACTGGGGGAAGT

Fig 1-7. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from strain CA-025.

TGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACT
GCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTGCGATGACAAAAAGTTAAA
AGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGA
TGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTAG
GGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTG
TTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAAGGGACGGCTAAATACGT
GCCAGCAGCCCGGTAATACGTATGTCCCAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTA
AGTCTGATGTGAAAGCCCGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTG
GAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACT
GACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAG
GTGTTAGGAGGTTCCGCCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGT
CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTAGATG
GGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTC
AGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGCTTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTTAG
GAAGGAGCCGTCTAAGGCAGGACAGATGA

Fig 1-8. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from strain GO-029.

TGCAGTCGAACGCGCAGCGAGAGGTGCTTGACCTTTCAAGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTG
CCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTATCGCATGATATCAAGTTAAA
GGCGCTACGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGACGATGAT
GCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTAG
GGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTG
TTGTATGGGAAGAATGCTAAAAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAAGGGACGGCTAAATACGT
GCCAGCAGCCCGGTAATACGTATGTCCCAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATT
AAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTAACTTGAGTGTGTAGAGGTAAGT
GGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACAACAA
CTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAATACT
AGGTGTTAGGAGGTTCCGCCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTT
ACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTC
GTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTAGATT
GGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCTGCGAAGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTC
AGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGCTTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTCGG
AGGGAGCCGTCTAAGGCAGGACAGATGA

Fig 1-9. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from strain PG-011.

또한 KC-007의 16S rRNA 유전자의 염기배열순서를 BLAST의 16S rRNA 유전자 염기배열순서의 database를 이용하여 phylogenetic tree를 작성한 결과 *Pediococcus pentosaceus*와 가장 유사성이 높은 것으로 확인되었다(Fig. 1-10). 한편 분리된 6균주의 16S rRNA 유전자의 염기배열순서를 이용하여 phylogenetic tree를 작성한 결과 Fig. 1-11과 같이 CA-101, KC-007, RP-011은 같은 strain인 것으로 나타났으며 CA-025와 GO-029는 상이성이 약간 존재하는 것으로 나타났다. 16S rRNA 유전자의 염기배열순서를 조사한 결과 CA-101과 KC-007은 염기서열이 서로 100% 일치한 반면, RP-011은 CA-101 또는 KC-007과 한 개의 염기에서 차이가 나는 것을 확인하였다.

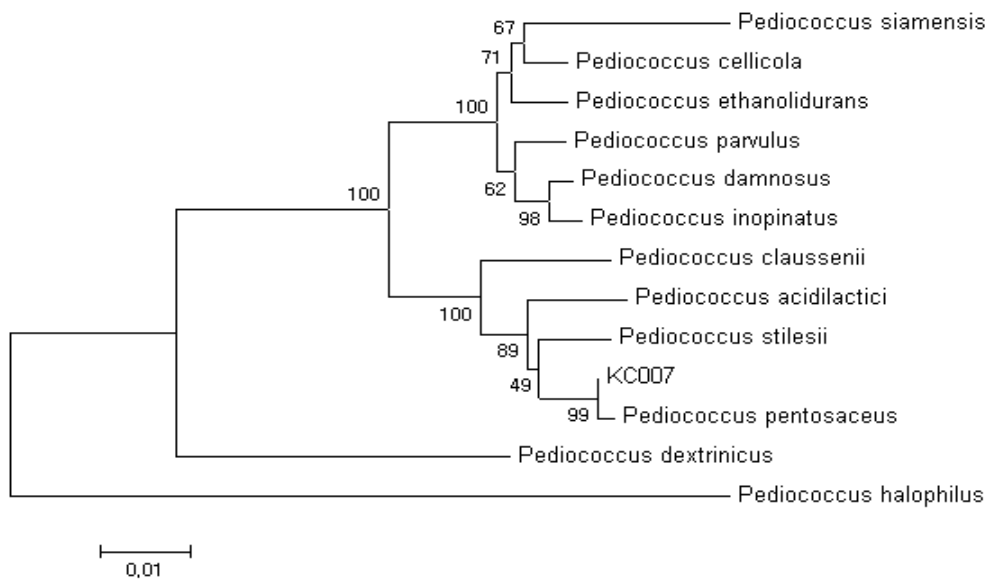


Fig. 1-10. Dendrogram of 16S rRNA gene from strain KC-007.

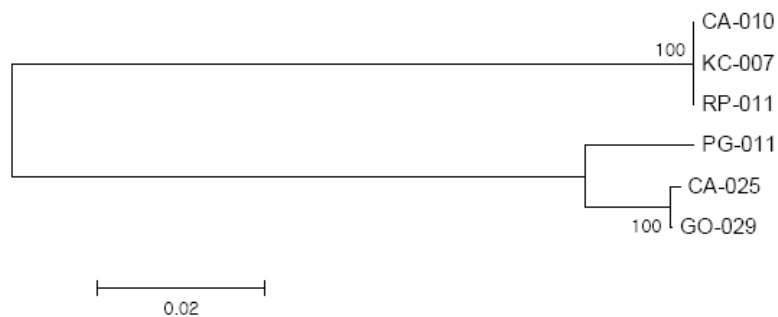


Fig. 1-11. Dendrogram of 16S rRNA gene from six strains.

이상의 형태학적, 생리학적, 분자유전학적 동정 결과로부터 KC-007, RP-011, CA-010은 *Pediococcus pentosaceus*로, CA-025, GO-029는 *Leuconostoc mesenteroides*로, PG-011은 *Leuconostoc citreum*으로 동정하였으며, 이중에서 KC-007과 RP-011는 동일한 strain인 것으로 판단되었다.

Pediococcus spp.는 식물성 유산균으로 알려져 있으며, 일반적으로 양배추를 발효시켜 Sauerkraut를 제조하는데 쓰이고 있는 유산균이다. 일부 strain은 diacetyl을 생산하여 와인이나 맥주에 버터향을 부여하기도 한다. 2007년도에는 우리나라 쉐바이오텍에서 김치로부터 AI 예방과 치료 효능이 탁월하고 *Helicobacter pylori*의 증식 억제능을 지니는 *Pediococcus pentosaceus* CBT-8을 분리한 바 있으며, 롯데우유는 위산에 대한 내성이 높은 *P. pentosaceus*를 활용한 드링크 요구르트 '식물성유산균 팬'을 판매중이다.

한편, *Leuconostoc* spp.는 일반적으로 vancomycin에 내성이고 이상 유산발효를 하며, sucrose를 이용하여 dextran을 생산한다. Sourdough starter를 제조할 때 불쾌취를 유발하기도 하며, 일부 strain은 인간에게 감염을 일으키기도 한다.

이상의 실험결과와 균주의 생리적 특성 및 식품분야에서의 산업적 이용성을 고려할 때, *Leuconostoc* spp.보다는 *Pediococcus* spp.가 보다 유용하다고 판단되어, 양파 착즙액의 유산 발효능이 우수하며, 높은 생리활성을 지니고 있는 *Pediococcus pentosaceus* KC-007을 본 연구의 발효를 위한 starter 균주로 최종선정하였다. 이에 본 균주의 16S rRNA의 유전자를 NCBI(National Center for Biotechnology Information, NIH, USA)의 GenBank database에 등록하여 accession No. EU569832를 획득하였다.

마. 선정된 starter를 이용한 양파 착즙액의 발효 특성

(1) Starter의 생육 곡선

본 연구의 starter 균주로 선정된 KC-007의 MRS 종배양액을 MRS 배지에 2%(v/v) 접종하여 배양하면서 균의 생육을 600 nm에서의 흡광도에 의한 생육곡선과 생균수 측정에 의해 경시적으로 검토하였다. 그 결과, 접종 후 4시간부터 대수증식기가 시작되어 접종 후 7시간 후에 대수증식기가 종료되었다(Fig. 1-12). 대수증식기가 종료되는 시점에서의 600 nm에서의 흡광도는 약 1.0이며 이 때의 생균수는 5.0×10^8 CFU/mL로 측정되었다(Fig. 1-13).

이 결과로부터 양파 착즙액을 발효시키기 위하여 첨가하는 starter는 대수증식기가 종료되는 시점 즉, 600 nm에서의 흡광도가 1.0인 배양액을 사용하여 양파 착즙액에 2%(v/v)가 되도록 첨가함으로써 양파 착즙액에 1×10^7 CFU/mL의 유산균수가 되도록 접종량을 결정하였다.

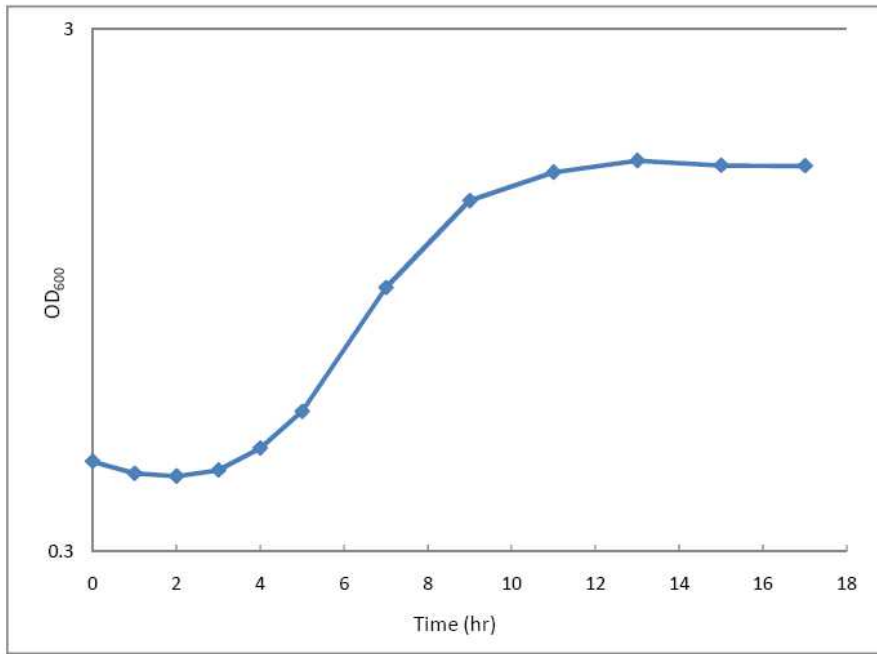


Fig. 1-12. Growth curve of *P. pentosaceus* KC-007 in MRS medium.

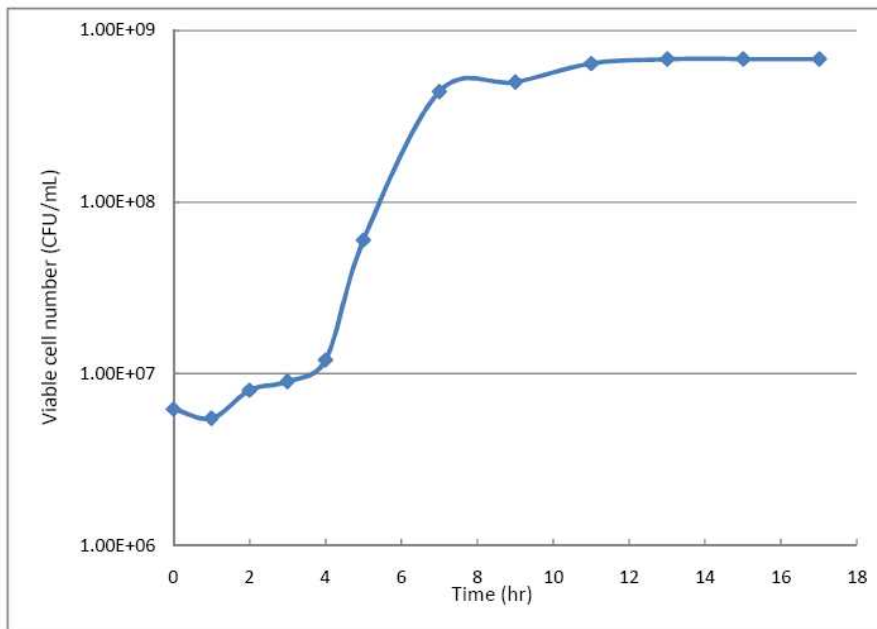


Fig. 1-13. Viable cell number of *P. pentosaceus* KC-007 in MRS medium.

(2) 유산발효에 미치는 pH의 영향

본 연구의 starter 균주인 KC-007의 MRS 종배양액을 여러 가지 pH로 조정하여 양과 착즙액에 2%(v/v) 접종한 후 54시간까지 발효시켜 양과 착즙액의 초기 pH에 따른 균주의 생육, 산도, pH의 영향을 조사하였다. 초기 pH를 달리하였을 때 균주의 생육도를 600 nm에서의 흡광도로 측정한 결과를 Fig. 1-14에 나타내었다. 초기 pH에 따라 초기 흡광도에서 큰 차이를 나타내었는데 이는 양과 착즙액의 pH를 조정할 경우 첨가되는 HCl에 의해 착즙액의 탁도에 변화가 발생되기 때문인 것으로 해석되는데, 첨가되는 HCl의 양이 증가할수록 탁도가 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 현상 때문에 낮은 pH에서는 흡광도로 균주의 생육도를 확인할 수 없었다. 그러나 pH 3은 다른 시료구보다 생육이 저조한 것으로 나타났고, 초기 pH 5-8에서는 pH에 따른 생육도가 시료간에 큰 차이를 나타내지 않았으며 발효 18시간부터는 흡광도가 더 이상 증가하지 않음을 알 수 있었다.

초기 pH에 따른 발효액의 산도 변화는 Fig. 1-15에 나타내었는데 초기 pH가 증가할수록 초기 산도는 감소하는 경향을 나타내었다. 초기 pH 4보다는 pH 5의 산도가 발효 30시간이 될 때까지 계속 높았으며, pH 7이 pH 8보다 전반적으로 높은 산도를 보여주었다. 초기 pH 6은 발효 초기에는 상당히 낮은 값을 나타내었으나 발효 12시간부터 급격히 증가하여 18시간에는 pH 4의 산도와 같은 값을 보여주었다. 발효 24시간에서의 산도는 초기 pH 3이 가장 높았으며 초기 pH가 증가할수록 낮은 값을 나타내었다. 또한 모든 시료구에서 발효 24시간 이후 산도가 더 이상 증가하지 않다가 30시간 이후 다시 증가하여 54시간까지 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 발효 후 24시간까지는 착즙액의 영양성분을 이용하여 1차 대사를 하여 산을 생성한 다음 30시간 이후부터는 2차 대사를 통해 산을 생성하는 것으로 사료되나 이러한 이유를 정확히 설명하기 위해서는 추가적인 실험을 수행해야 할 것으로 판단된다.

초기 pH에 따른 발효액의 pH 변화는 Fig. 1-16에 나타내었는데 초기 pH 6~8에서는 발효 12시간까지는 pH가 느리게 감소하다가 그 이후에는 발효 18시간까지 급격히 감소하여 24시간에는 pH 4 부근까지 감소하였다. 초기 pH 3과 4에서는 발효과정 중에 급격한 pH의 변화를 나타내지 않았다. 모든 시료구는 발효 30시간 이후부터 pH가 4 이하로 감소함을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 유산발효를 위한 최적 초기 pH는 5~6인 것으로 판단되었는데, 양과 착즙액 자체의 pH가 5.7 부근인 것을 감안할 때 발효 시 양과 착즙액의 초기 pH를 별도로 조정할 필요는 없다고 판단된다.

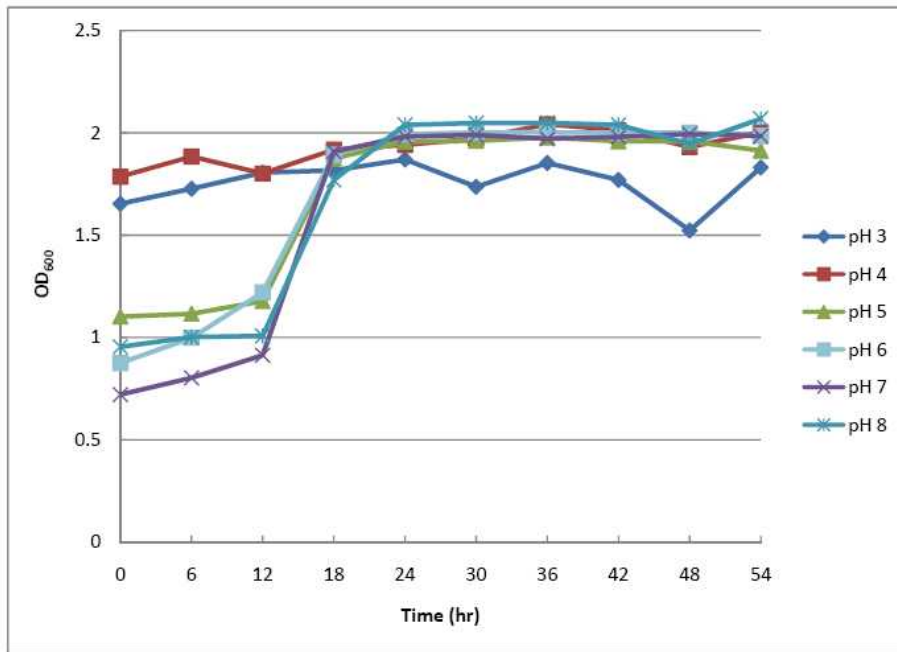


Fig. 1-14. Effect of initial pH on the on the growth of *P. pentosaceus* KC-007 in onion juice.

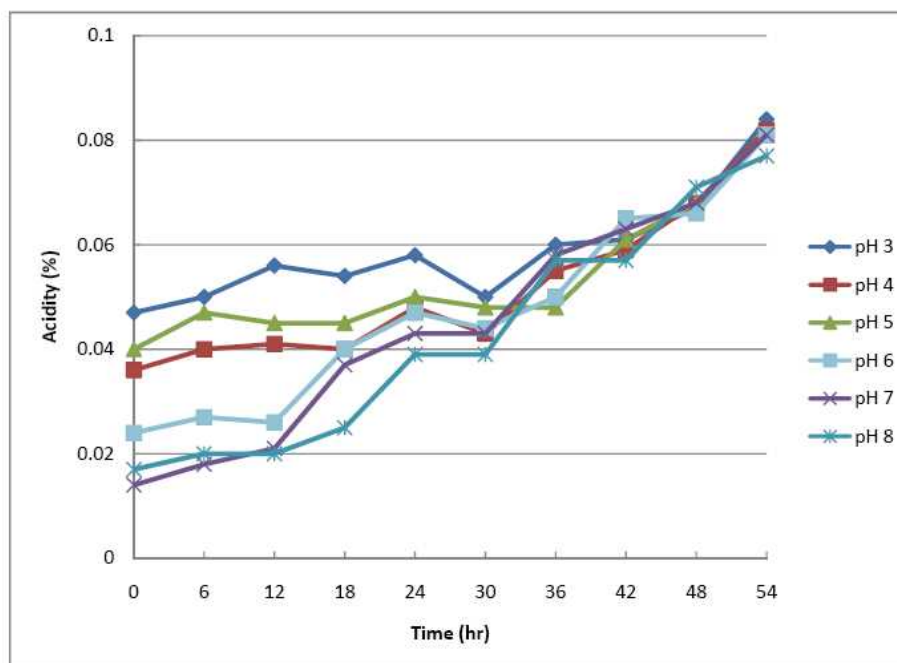


Fig. 1-15. Effect of initial pH on the acidity of onion juice fermented with *P. pentosaceus* KC-007.

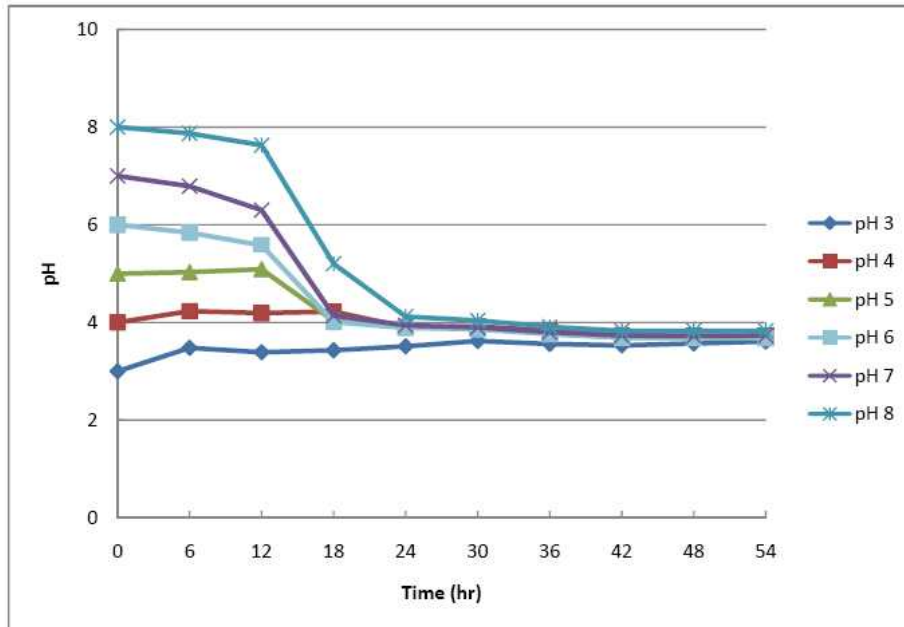


Fig. 1-16. Effect of initial pH on the pH of onion juice fermented with *P. pentosaceus* KC-007.

(3) 유산발효에 미치는 발효온도의 영향

Starter 균주인 KC-007의 MRS 종배양액을 양파 착즙액에 2%(v/v) 접종한 후 여러 가지 발효온도에서 54시간까지 발효시켜 양파 착즙액의 발효온도에 따른 균주의 생육도, 산도, pH의 영향을 조사하였다. 발효온도를 달리하였을 때 균주의 생육도를 600 nm에서의 흡광도로 측정하여 Fig. 1-17에 나타내었다. 발효온도를 35°C와 40°C로 하였을 경우 균주의 생육이 가장 좋았고 25°C에서 가장 저조하였다. 35°C와 40°C에서는 12시간까지 균의 생육이 지속적으로 증가하다가 그 이후부터는 더 이상 증가하지 않았으며 25°C와 30°C에서는 35°C와 40°C에서보다 균의 생육이 느리게 진행되어 18시간까지 증가함을 알 수 있었다. 18시간 이후에서도 40°C에서 발효시킨 시료에서 균주의 생육량이 가장 좋았다.

발효온도에 따른 발효액의 산도 변화는 Fig. 1-18에 나타내었는데 발효 6시간까지는 산도가 증가하지 않다가 25°C를 제외한 시료구는 증가하기 시작하였다. 시료구 중에서 40°C에서 발효시킨 시료의 산도가 가장 급격하게 증가하였으며 발효온도가 낮아질수록 산도의 증가도가 낮아짐을 알 수 있었다. 40°C에서 발효시킨 시료의 산도는 12시간 이후부터 더 이상 증가하지 않고 일정한 값을 나타내었으며 54시간 발효시까지 다른 시료구에 비해 높은 산도를 유지하였다.

발효온도에 따른 발효액의 pH 변화는 Fig. 1-19에 나타내었는데 35℃와 40℃에서 발효시킨 시료의 pH 변화가 동일하였는데 발효초기부터 pH가 감소하기 시작하여 발효 12시간에 pH 4 이하로 감소하였다. 발효온도가 감소할수록 pH의 감소속도가 저하되었으며 25℃에서는 발효 48시간이 지나야 pH 4 이하로 감소함을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 유산발효를 위한 최적 발효온도는 40℃인 것으로 확인하였다.

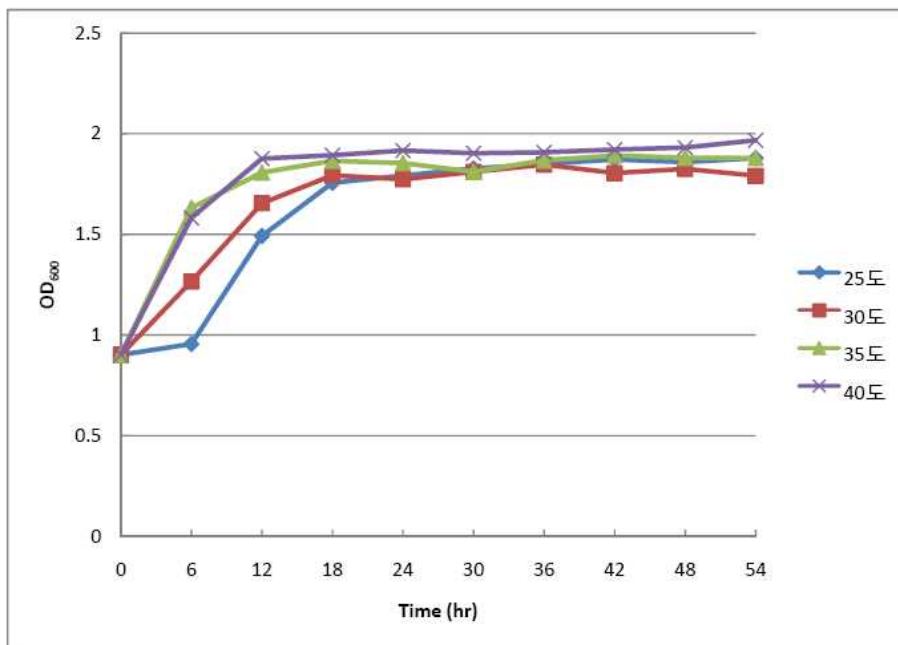


Fig. 1-17. Effect of fermentation temperature on the growth of *P. pentosaceus* KC-007 in onion juice.

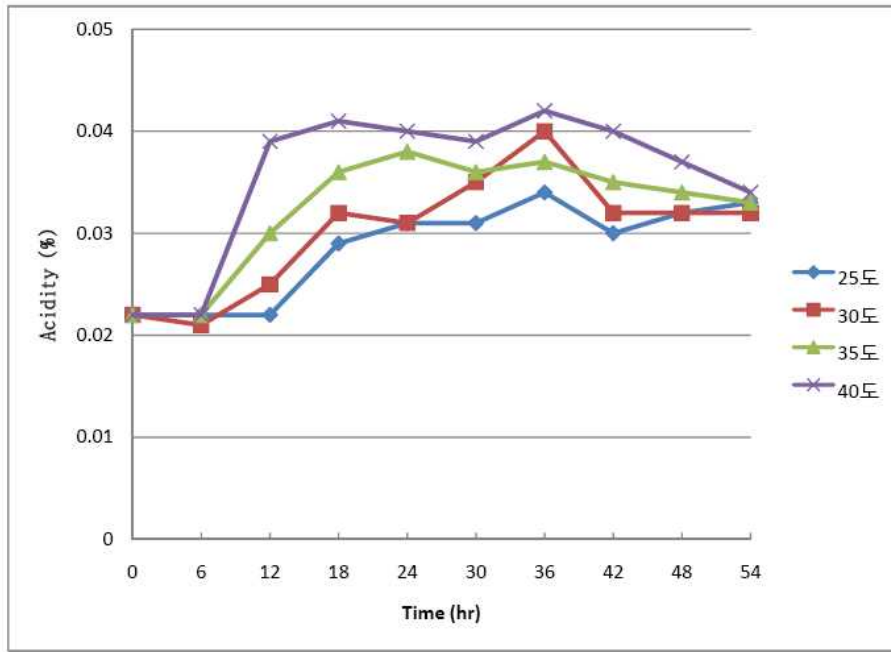


Fig. 1-18. Effect of fermentation temperature on the acidity of onion juice fermented with *P. pentosaceus* KC-007.

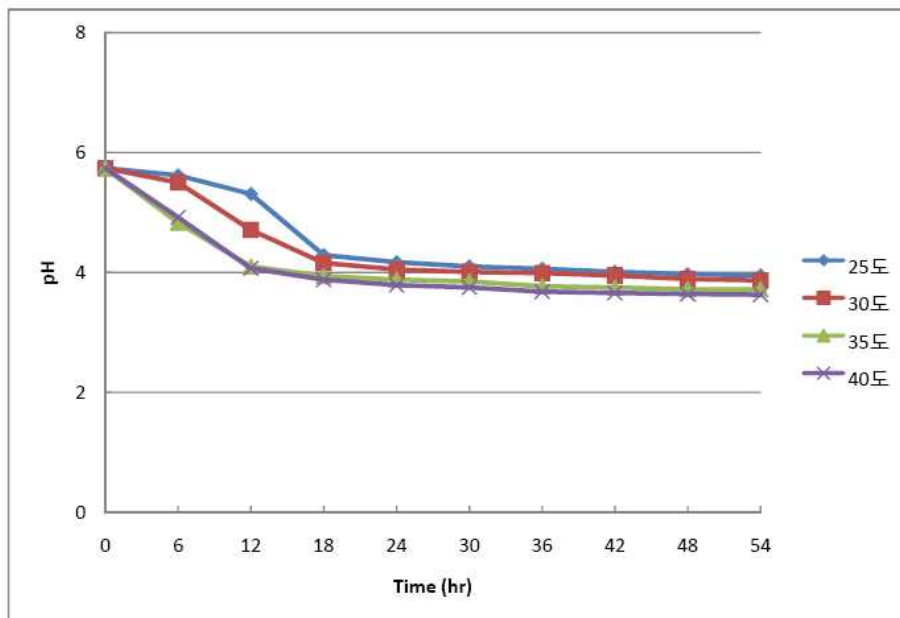


Fig. 1-19. Effect of fermentation temperature on the pH of onion juice fermented with *P. pentosaceus* KC-007.

(4) 유산발효에 미치는 접종량의 영향

Starter 균주인 KC-007의 MRS 종배양액을 양파 착즙액에 여러 가지 농도로 접종한 후 54시간까지 발효시켜 양파 착즙액의 starter 접종량에 따른 균주의 생육도, 산도, pH의 영향을 조사하였다. 접종량을 달리하였을 때 균주의 생육도를 600 nm에서의 흡광도로 측정한 결과를 Fig. 1-20에 나타내었다. 접종량을 2%(v/v)로 하였을 경우 초기 6시간까지의 생육도가 가장 좋았으며 그 다음으로 3%(v/v) 접종하였을 때 높은 생육도를 보여주었다. 발효 12시간 이후부터는 3%(v/v) 접종하였을 때 가장 높은 생육량을 나타내었다.

접종량에 따른 발효액의 산도 변화는 Fig. 1-21에 나타낸 바와 같이 발효 18시간까지는 1%(v/v)와 2%(v/v) 접종하였을 때 높은 산 생성능을 보여준 반면 3%(v/v) 접종한 시료는 가장 낮은 산 생성을 나타내었다.

접종량에 따른 발효액의 pH 변화는 Fig. 1-22에 나타내었는데 2%(v/v)와 3%(v/v) 접종하여 발효시킨 시료의 pH가 가장 급격하게 감소하여 발효 12시간 이후에 pH 4 이하로 감소하였다.

이상의 결과를 종합할 때 유산발효를 위한 최적 starter 접종농도는 2%(v/v)로 결정하였다.

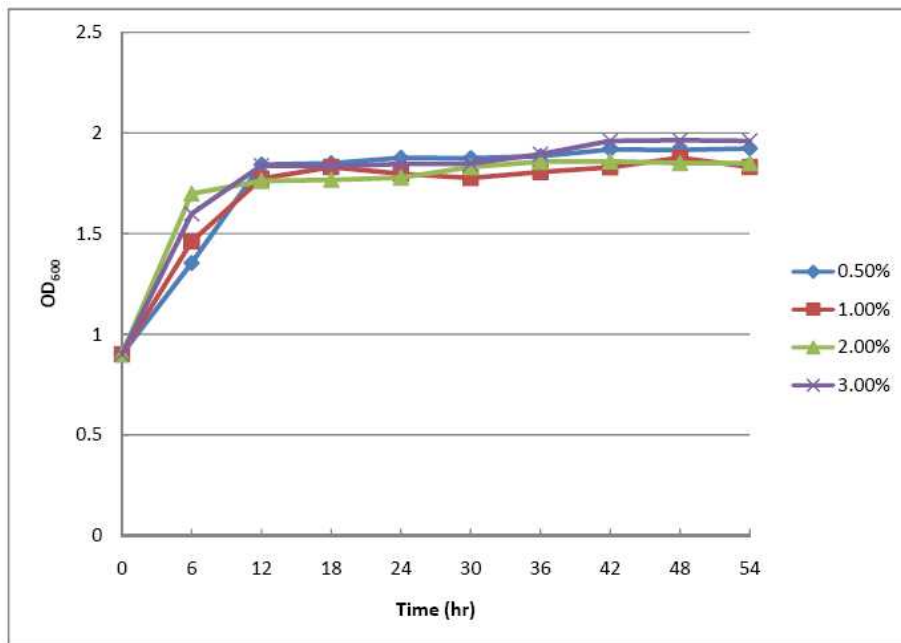


Fig. 1-20. Effect of inoculation concentration of starter on the growth of *P. pentosaceus* KC-007 in onion juice.

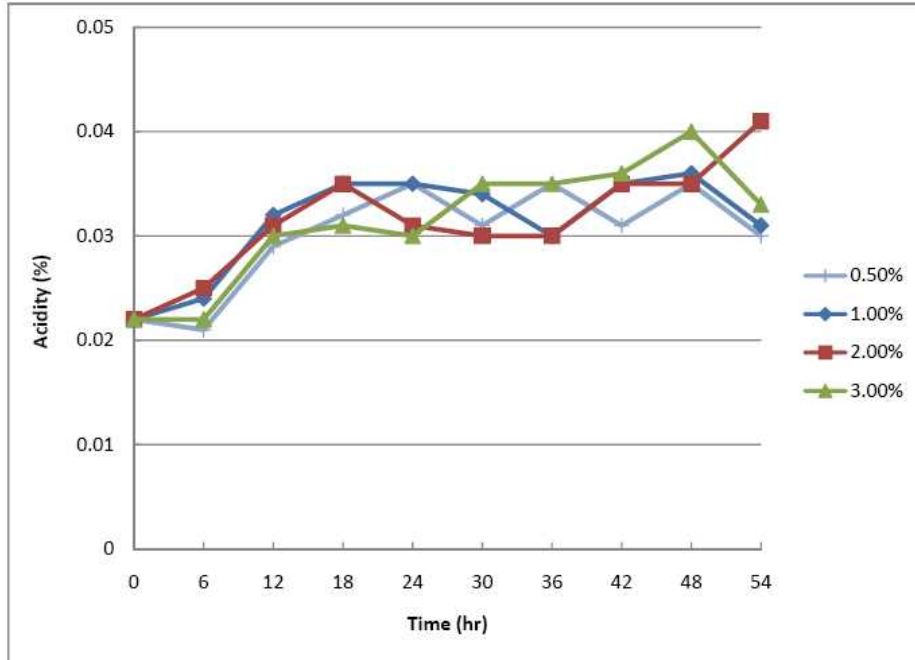


Fig. 1-21. Effect of inoculation concentration of starter on the acidity of onion juice fermented with *P. pentosaceus* KC-007.

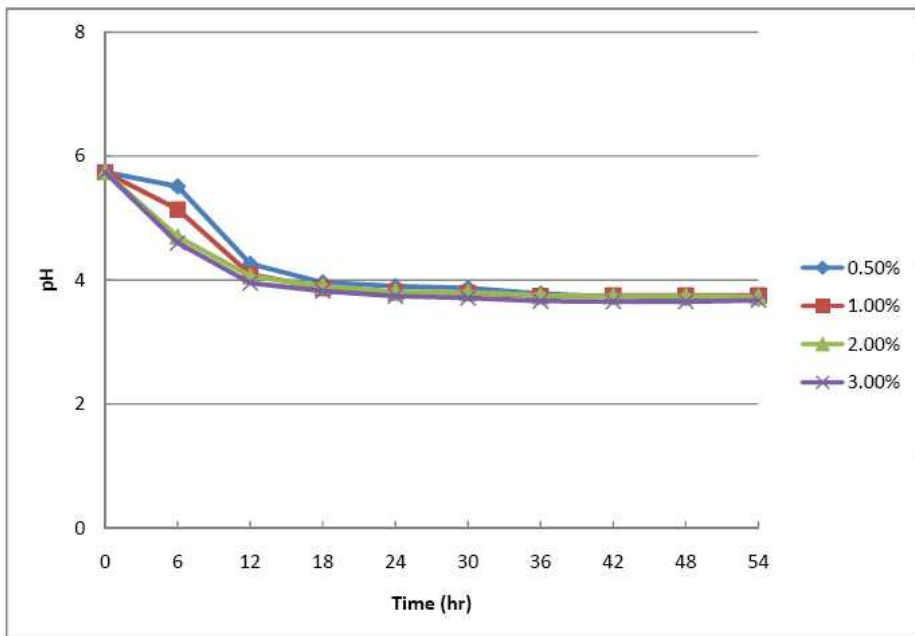


Fig. 1-22. Effect of inoculation concentration of starter on the pH of onion juice fermented with *P. pentosaceus* KC-007.

바. 양파의 유산발효 최적조건 확립

(1) 유산발효에 미치는 pH의 영향

상기 연구 결과에서 얻은 *P. pentosaceus* KC-007의 발효 특성을 기초로 하여 양파 착즙액의 부피를 1 L로 scale-up하여 *P. pentosaceus* KC-007을 이용한 유산발효의 최적조건을 확립하고자 하였다. 이를 위하여 양파 착즙액의 pH, 발효온도 및 발효시간에 따른 유산발효의 영향을 조사하였다.

P. pentosaceus KC-007의 MRS 종배양액을 여러 가지 pH로 조정하여 양파 착즙액에 2%(v/v) 접종한 후 48시간까지 발효시켜 양파 착즙액의 초기 pH에 따른 균주의 생육, 산도, pH의 영향을 조사하였다. 초기 pH를 달리하였을 때 균주의 생육도를 600 nm에서의 흡광도로 측정하여 Fig. 1-23에 나타내었다. 초기 pH에 따라 초기 흡광도에서 큰 차이를 나타내었는데 이는 양파 착즙액의 pH를 조정할 경우 첨가되는 HCl에 의해 착즙액 내의 물질들이 불용화되어 탁도에 변화가 발생되기 때문인 것으로 판단되며, 첨가되는 HCl의 양이 증가할수록 탁도가 증가하는 것으로 나타났다. pH 4에서는 다른 시료구보다 생육이 약간 저조한 것으로 나타났고, 초기 pH 5~7에서는 pH에 따른 생육도가 시료간에 큰 차이를 나타내지 않았으며 발효 18시간부터는 모든 시료구에서 흡광도가 동일한 수준으로 증가한 후 흡광도가 더 이상 증가하지 않음을 알 수 있었다.

초기 pH에 따른 발효액의 산도 변화는 Fig. 1-24에 나타내었는데 pH 5의 초기산도는 pH 4의 초기산도보다 약간 높았지만 그 외의 모든 시료구에서는 초기 pH가 증가할수록 초기 산도는 감소하는 경향을 나타내었다. 초기 pH 4와 5는 발효가 진행됨에 따라 산도가 점진적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 pH 6과 7의 시료는 발효 12시간부터 산도가 급격히 증가하였으며 18시간 이후에는 완만한 증가속도를 나타내었다.

초기 pH에 따른 발효액의 pH 변화는 Fig. 1-25에 나타내었는데 초기 pH 6과 7에서는 발효 12시간까지는 pH가 느리게 감소하다가 그 이후에는 발효 18시간까지 급격히 감소하여 24시간에는 pH 4 부근까지 감소하였다. 초기 pH 4와 5에서는 발효과정 중에 급격한 pH의 변화를 나타내지 않았다. 모든 시료구는 발효 24시간 이후부터 pH가 4 이하로 감소함을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 유산발효를 위한 최적 초기 pH는 산 생성량이 초기에 가장 높은 pH 5인 것으로 판단되었다.

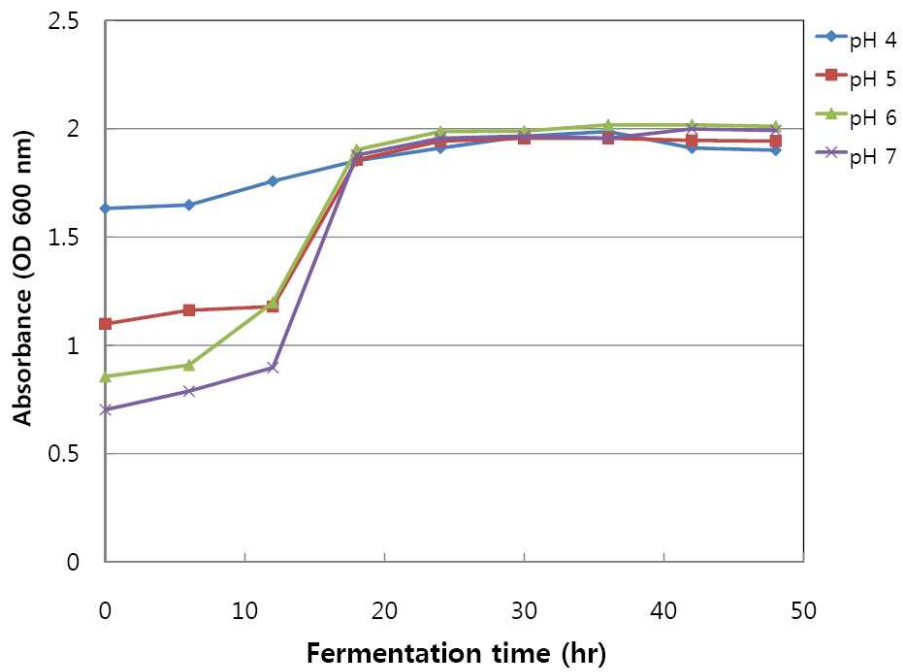


Fig. 1-23. Effect of initial pH on the on the growth of *P. pentosaceus* KC-007 in onion juice.

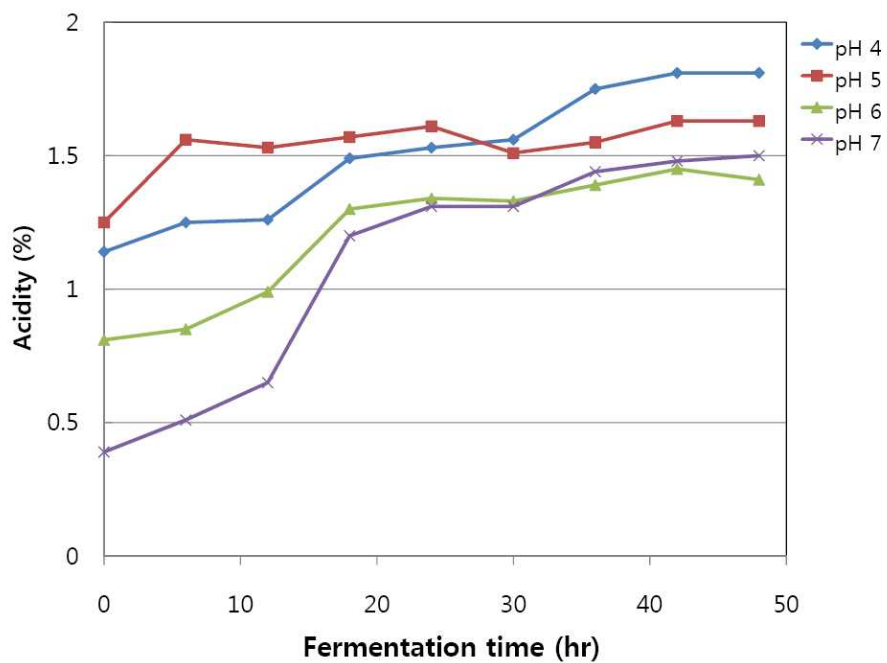


Fig. 1-24. Effect of initial pH on the acidity of onion juice fermented with *P. pentosaceus* KC-007.

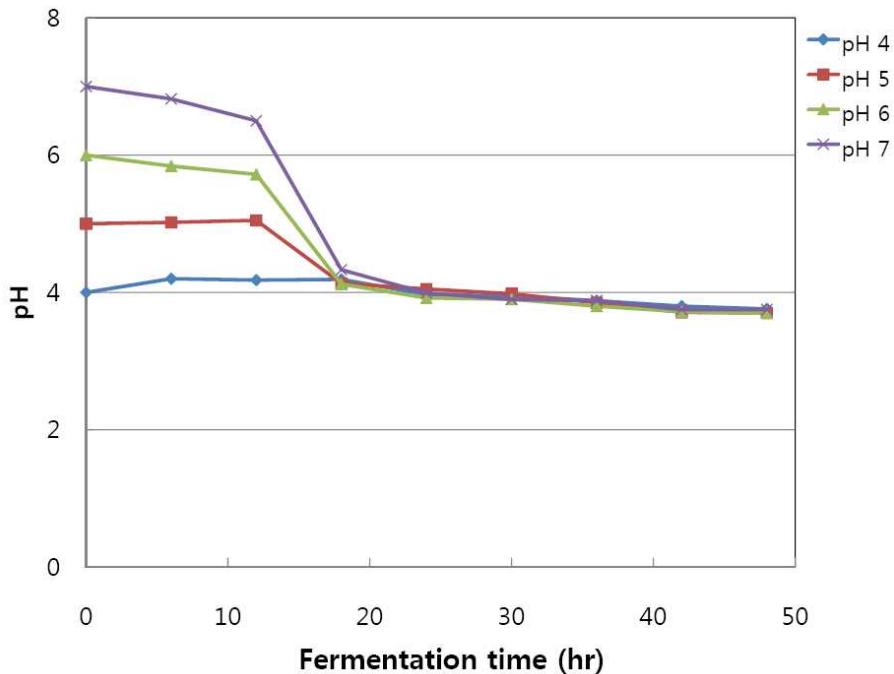


Fig. 1-25. Effect of initial pH on the pH of onion juice fermented with *P. pentosaceus* KC-007.

(2) 유산발효에 미치는 발효온도의 영향

Starter 균주인 *P. pentosaceus* KC-007의 MRS 종배양액을 양파 착즙액에 2%(v/v) 접종한 후 여러 가지 발효온도에서 48시간까지 발효시켜 양파 착즙액의 발효온도에 따른 균주의 생육도, 산도 및 pH의 영향을 조사하였다. 발효온도를 달리하였을 때 균주의 생육도를 600 nm에서의 흡광도로 측정한 결과를 Fig. 1-26에 나타내었다. 발효온도를 37°C와 40°C로 하였을 경우 균주의 생육이 가장 좋았고 30°C에서 가장 저조하였다. 37°C와 40°C에서는 12시간까지 균의 생육이 지속적으로 증가하다가 그 이후부터는 더 이상 증가하지 않았으며 30°C와 35°C에서는 37°C와 40°C에서보다 균의 생육이 느리게 진행되어 18시간까지 증가함을 알 수 있었다. 18시간 이후에서도 37°C와 40°C에서 발효시킨 시료에서 균주의 생육량이 가장 좋았다.

발효온도에 따른 발효액의 산도 변화는 Fig. 1-27에 나타내었는데 발효 6시간까지는 산도가 증가하지 않다가 30°C를 제외한 시료구는 6시간 이후부터 산도가 증가하기 시작하였다. 시료구 중에서 37°C와 40°C에서 발효시킨 시료의 산도가 가장 급격하게 증가하였으며 발효온도가 낮아질수록 산도의 증가도가 낮아짐을 알 수 있었다. 37°C와 40°C에서 발효시킨 시료의 산도는 18시간 이후부터 더 이상 증가하지 않고 일정한 값을 나타내었으며 48시간 발효 시까지 다른 시료구에 비해 높은 산도를 유지하였다.

발효온도에 따른 발효액의 pH 변화는 Fig. 1-28에 나타내었는데 35°C와 37°C 및 40°C에서 발효시킨 시료의 pH 변화가 동일하였는데 발효초기부터 pH가 감소하기 시작하여 발효 12시간에 pH 4 이하로 감소하였다. 25°C에서는 발효 30시간이 지나야 pH 4 이하로 감소함을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 유산발효를 위한 최적 발효온도는 균주의 생육이 가장 좋고 산생성속도가 가장 빠른 온도인 37~40°C인 것으로 확인하였으며 산업화 시 경제성을 고려할 때 37°C를 최적 발효온도 확정하였다.

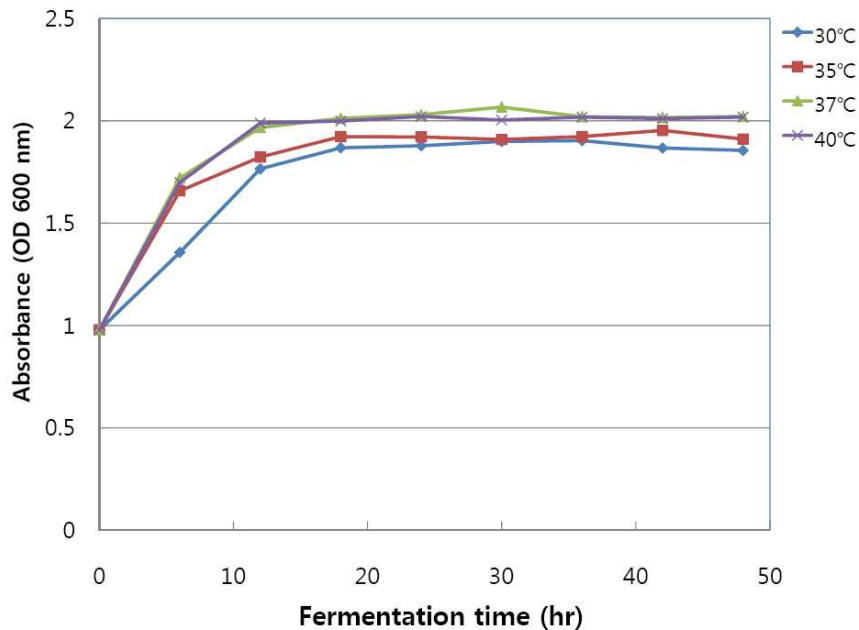


Fig. 1-26. Effect of fermentation temperature on the growth of *P. pentosaceus* KC-007 in onion juice.

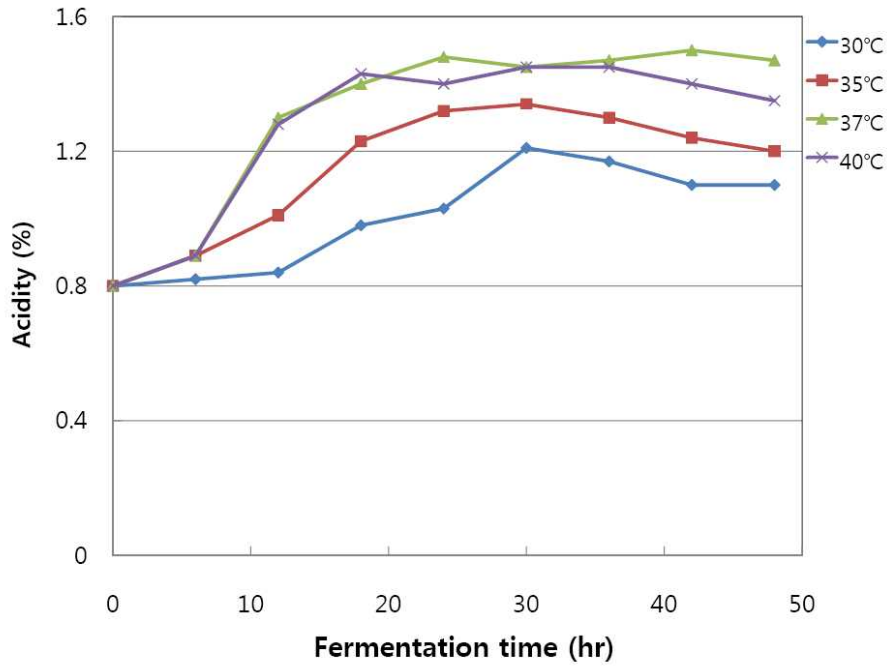


Fig. 1-27. Effect of fermentation temperature on the acidity of onion juice fermented with *P. pentosaceus* KC-007.

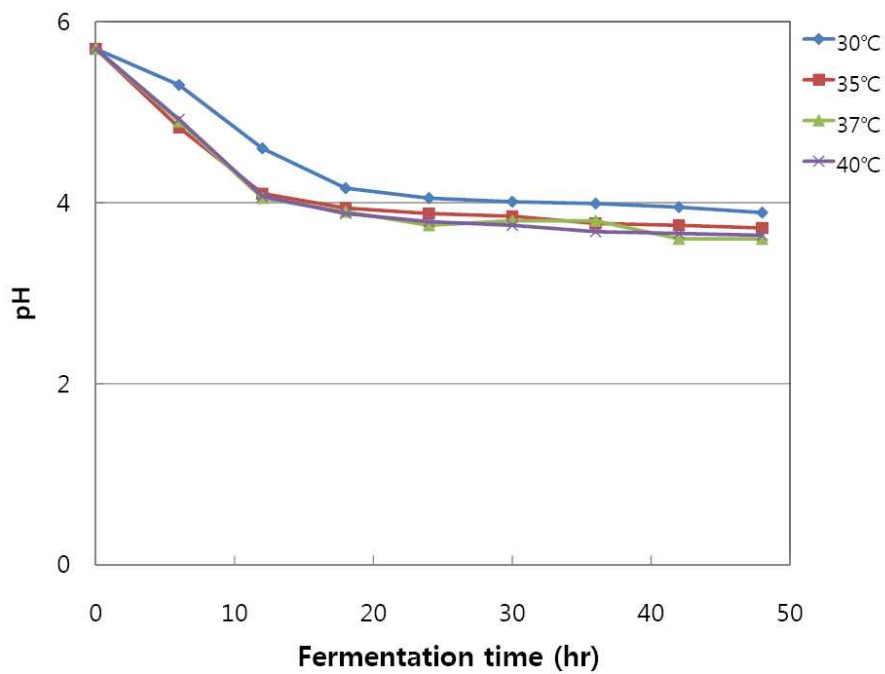


Fig. 1-28. Effect of fermentation temperature on the pH of onion juice fermented with *P. pentosaceus* KC-007.

(3) 유산발효에 미치는 최적 발효시간

양과 착즙액에 *P. pentosaceus* KC-007을 2%(v/v) 접종하여 유산발효할 경우 Fig. 1-23 부터 Fig. 1-28의 결과를 종합하여 볼 때 유산균 생균수와 산도가 발효 18시간까지 급격히 증가한 후 그 이후부터는 일정한 수준을 유지하였기 때문에 유산발효의 최적 시간은 18시간으로 확정하였다.

(4) 양과 착즙액 농도에 따른 발효능

양과 착즙액의 농도에 따른 유산발효능을 측정하기 위하여 양과 착즙원액을 증류수로 일정 농도로 희석한 후 본 연구의 유산발효 starter로 선정한 *P. pentosaceus* KC-007을 이용하여 37°C에서 18시간 발효시킨 후 발효액의 pH, 산도, 유산균수 및 유기산 함량을 측정하였다. 그 결과 Table 1-11에 나타난 바와 같이 pH는 양과 착즙액을 30% 함유하는 발효액은 pH가 발효 전 pH 4.92에서 발효 후 pH 3.42로 1.50 감소하였고 양과 착즙액을 50% 함유하는 발효액은 발효 전 pH 5.17에서 발효 후 pH 3.52로 1.65 감소하였으며, 양과 착즙액을 70% 함유하는 발효액은 발효 전 pH 5.25에서 발효 후 pH 3.54로 1.71 감소하였다. 양과 착즙액이 100% 존재하는 원액은 발효 전 pH 5.22에서 발효 후 pH 3.66으로 1.56 감소하여 양과 착즙액을 70% 함유하는 시료의 pH가 발효에 의해 가장 많이 감소함을 알 수 있었다.

산도는 양과 착즙액을 30% 함유하는 발효액의 경우 발효 전 0.21%에서 발효 후 0.86%로 0.65% 증가하였고 양과 착즙액을 50% 함유하는 발효액은 발효 전 0.29%에서 발효 후 1.48%로 1.19% 증가하였으며, 양과 착즙액을 70% 함유하는 발효액은 발효 전 0.40%에서 발효 후 1.54%로 1.14% 증가하였다. 양과 착즙액이 100% 존재하는 원액은 발효 전 0.59%에서 발효 후 2.02%로 1.43% 증가하여 양과 착즙원액을 사용한 발효액의 산도가 발효에 의해 가장 많이 증가함을 알 수 있었다. 양과 착즙액의 함량이 증가할수록 발효 전 시료의 산도가 증가하는 것은 양과 착즙액 자체가 지니고 있는 산에 의한 것으로 판단된다.

유산균 생균수의 경우에는 양과 착즙액을 30% 함유하는 발효액은 발효 전 log 7.39 CFU/mL 에서 발효 후 log 8.29 CFU/mL 로 log 0.9 CFU/mL 증가하였고 양과 착즙액을 50% 함유하는 발효액은 발효 후 log 8.84 CFU/mL로 log 1.45 CFU/mL 증가하였으며, 양과 착즙액을 70% 함유하는 발효액은 발효 후 log 8.93 CFU/mL로 log 1.54 CFU/mL 증가하였다. 양과 착즙액이 100% 존재하는 원액은 발효 후 log 8.98 CFU/mL 로 log 1.59 CFU/mL 증가하여 양과 착즙원액의 유산균 생균수가 발효에 의해 가장 많이 증가함을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 산도와 유산균 생균수가 가장 높은 양과 착즙원액이 유산발효에 가장 적합한 것으로 확인되었다.

Table 1-11. Effect of onion juice concentration on the pH, acidity, and viable cell number of lactic acid bacteria of fermentation broth

Concentration of onion juice (%)	pH		Acidity(%)		Viable cell number of lactic acid bacteria (log CFU/mL)	
	Before fermentation	After fermentation	Before fermentation	After fermentation	Before fermentation	After fermentation
30	4.92±0.31 ^{a1)}	3.42±0.02 ^a	0.21±0.06 ^a	0.86±0.08 ^a	7.39±0.09 ^a	8.29±0.22 ^a
50	5.17±0.03 ^b	3.52±0.03 ^b	0.29±0.02 ^b	1.48±0.09 ^b	7.39±0.09 ^a	8.84±0.03 ^b
70	5.25±0.01 ^c	3.54±0.06 ^b	0.40±0.04 ^c	1.54±0.05 ^b	7.39±0.09 ^a	8.93±0.09 ^b
100	5.22±0.02 ^c	3.66±0.01 ^c	0.59±0.02 ^c	2.02±0.02 ^c	7.39±0.09 ^a	8.98±0.12 ^b

¹⁾Means±SD with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 양파 착즙액의 유산발효를 위한 최적조건은 양파 착즙액 원액을 pH 5.0으로 조정 한 후 *P. pentosaceus* KC-007을 2%(v/v) 접종한 다음 37℃에서 18시간 발효하는 것으로 확립하였다.

사. 발효능과 기호성 향상을 위한 팽화홍삼 추출액을 첨가한 유산 발효제품 개발

(1) 팽화 홍삼 추출액 첨가량에 따른 유산균 생균수

이상의 연구결과와 같이 양파 착즙액을 이용하여 발효시켰을 때 산생성능이 높고 전자공여능과 아질산염 소거능 및 항균활성 등 생리활성이 높은 유산균주를 과채류로부터 탐색한 후 가장 좋은 산생성능과 생리활성을 지닌 유산균주를 선정하여 *P. pentosacues* KC-007로 동정하였고, 이 균주를 이용하여 양파 착즙액을 유산 발효시켰을 경우의 발효 특성을 조사하였으며(Choi et al., 2009) Fig. 1-23~28에 나타낸 바와 같이 최적발효조건을 확립하였다. 따라서 본 연구에서는 양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 첨가하여 유산 발효시킴으로써 발효제품의 생리활성을 더욱 높이고 관능성을 개선시킨 제품을 개발하고자 팽화 홍삼 추출액의 첨가량에 따른 발효액의 특성 변화와 생리활성을 조사하였다.

양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 각각 0.5, 1, 2, 4%(v/v) 첨가한 후 *P. pentosacues* KC-007 배양액을 2%(v/v) 접종한 다음 37℃에서 발효하면서 발효시간에 따른 유산균 생균수를 측정한 결과 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양파 착즙액은 접종 시 생균수

log 7.70 CFU/mL에서 24시간 발효 시 log 8.47 CFU/mL로 증가하여 발효 24시간에서 가장 높은 생균수를 나타내었고 그 후에는 감소하는 경향을 나타내었다(Table 1-12). 팽화 홍삼 추출액을 0.5, 2%(v/v) 첨가한 발효액에서도 24시간 발효 시 가장 높은 생균수를 나타내었다. 팽화 홍삼 추출액을 1%(v/v) 첨가한 발효액에서는 12시간부터 24시간까지 높은 생균수를 나타내었고 그 이후부터는 유의적으로 감소하는 경향을 보여주었다. 한편 팽화 홍삼 추출액을 4%(v/v) 첨가한 발효액에서는 12시간 이후부터 48시간까지 생균수가 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 따라서 발효 시 가장 높은 유산균 생균수를 나타내는 발효시간은 팽화 홍삼 추출액의 첨가량에 관계없이 24시간임을 알 수 있었다. 24시간 발효하였을 경우 팽화 홍삼 추출액 첨가량에 따른 생균수의 유의적인 차이는 나타나지 않아 팽화 홍삼 추출액의 첨가가 유산균의 생균수에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

본 연구의 궁극적인 목표는 팽화 홍삼 추출액을 첨가한 양파 착즙액을 이용한 유산균 발효에 의해 홍삼과 양파가 지니는 생리활성과 유산균의 정장작용을 모두 지니는 발효음료를 개발하는 것이며, 이를 위해서는 우선적으로 발효액 내의 유산균 생균수가 중요하다고 판단된다. 우리나라 식품 규격에 유산균 발효음료의 유산균수에 대한 기준은 설정되어 있지 않지만 식품공전 상의 발효유 규격은 유산균수 log 7 CFU/mL 이상으로 설정되어 있다(KFDA, 2008).

Table 1-12. Effect of concentration of puffed red ginseng extract on the viable cell number of lactic acid bacteria

(Unit: log CFU/mL)

Red ginseng concentration (% v/v)	Fermentation time (hr)				
	0	12	24	36	48
0.0	7.70±0.17 ^{AB1)ab2)}	8.28±0.24 ^{BCa}	8.47±0.23 ^{Ca}	7.60±0.30 ^{Aa}	8.07±0.57 ^{ABCab}
0.5	7.62±0.28 ^{Aab}	8.27±0.34 ^{BCa}	8.41±0.42 ^{Ca}	8.00±0.28 ^{ABCab}	7.73±0.23 ^{ABa}
1.0	7.30±0.00 ^{Aa}	8.62±0.17 ^{Ca}	8.46±0.13 ^{Ca}	8.03±0.37 ^{Bab}	7.56±0.24 ^{Aa}
2.0	7.87±0.24 ^{Ab}	8.43±0.41 ^{ABa}	8.74±0.16 ^{Ba}	8.36±0.43 ^{ABb}	8.05±0.41 ^{Bab}
4.0	7.60±0.30 ^{Aab}	8.41±0.44 ^{Aa}	8.39±0.72 ^{Aa}	8.38±0.33 ^{Ab}	8.42±0.10 ^{Ab}

- 1) Means±SD with different capital superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.
- 2) Means±SD with different small superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(2) 팽화 홍삼 추출액 첨가량에 따른 산도와 pH 변화

양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 각각 0.5, 1, 2, 4%(v/v) 첨가한 후 배양시간에 따른 산도 변화를 측정된 결과 Table 1-13에 나타난 바와 같이 발효시간이 경과됨에 따라 산도가 증가되어 48시간까지 지속적으로 증가함을 알 수 있었다. 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양파 착즙액의 산도는 발효 전 0.08%에서 24시간 발효 시 0.33%, 48시간 발효 후에는 0.45%로 증가하였다. 산도 증가는 팽화홍삼의 첨가량에 관계없이 모든 시료구에서 발효가 진행됨에 따라 증가하였다. 발효액의 초기 산도는 팽화 홍삼 추출액의 첨가량이 증가할수록 증가하여 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양파 추출액의 산도가 0.08%인 것에 비하여 팽화 홍삼 추출액을 4% 첨가하였을 때에는 0.17%로 2배 이상 높은 것을 알 수 있었다. 이는 팽화 홍삼 추출액 자체가 지니는 산도의 영향에 의한 것으로 판단된다.

발효액의 pH는 Table 1-14와 같이 팽화 홍삼 추출액을 0.5%(v/v) 첨가한 시료를 제외한 모든 시료구에서 발효 36시간까지 유의적으로 감소하였으며 0.5%(v/v) 첨가 시료에서는 발효 12시간 이후부터는 유의적인 변화를 보이지 않았다.

Table 1-13. Effect of concentration of puffed red ginseng extract on the acidity of fermentation product

(Unit: %)

Red ginseng concentration (%, v/v)	Fermentation time (hr)				
	0	12	24	36	48
0.0	0.08±0.02 ^{a1)}	0.27±0.01 ^b	0.33±0.03 ^c	0.41±0.02 ^d	0.45±0.02 ^e
0.5	0.09±0.02 ^a	0.27±0.01 ^b	0.34±0.03 ^c	0.43±0.04 ^d	0.48±0.03 ^d
1.0	0.10±0.02 ^a	0.29±0.01 ^b	0.37±0.02 ^c	0.45±0.03 ^d	0.51±0.02 ^e
2.0	0.12±0.02 ^a	0.34±0.01 ^b	0.40±0.04 ^c	0.49±0.05 ^d	0.54±0.03 ^d
4.0	0.17±0.03 ^a	0.38±0.01 ^b	0.47±0.04 ^c	0.55±0.04 ^d	0.62±0.03 ^e

1) Means±SD with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 1-14. Effect of concentration of puffed red ginseng extract on pH of fermentation product

Red ginseng concentration (%, v/v)	Fermentation time (hr)				
	0	12	24	36	48
0.0	4.90±0.17 ^{c1)}	3.83±0.02 ^b	3.71±0.01 ^{ab}	3.60±0.03 ^a	3.60±0.04 ^a
0.5	5.01±0.42 ^b	3.85±0.05 ^a	3.75±0.02 ^a	3.67±0.01 ^a	3.61±0.02 ^a
1.0	4.84±0.14 ^d	3.86±0.02 ^c	3.77±0.03 ^{bc}	3.64±0.06 ^{ab}	3.60±0.05 ^a
2.0	4.82±0.10 ^d	3.93±0.03 ^c	3.78±0.02 ^b	3.71±0.02 ^{ab}	3.67±0.02 ^a
4.0	4.78±0.08 ^d	3.99±0.04 ^c	3.84±0.01 ^b	3.75±0.09 ^{ab}	3.72±0.05 ^a

1) Means±SD with different superscripts in the same row are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) 팽화 홍삼 추출액 첨가량에 따른 환원당 변화

양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 각각 0.5, 1, 2, 4%(v/v) 첨가한 후 발효시간에 따른 환원당 변화를 측정한 결과는 Table 1-15에 나타내었다. 팽화 홍삼을 첨가하지 않은 양파 착즙액의 초기 환원당은 37.17 μmol 이었고 발효가 진행됨에 따라 감소하여 발효 24 시간에는 25.80 μmol 로 측정되어 약 30%의 환원당이 감소함을 알 수 있었다. 발효 24시간 이후에도 환원당량이 감소하는 경향을 나타내었지만 통계적 유의성은 보여주지 않았다. 팽화 홍삼을 첨가한 발효액에서도 동일한 경향을 나타내어 발효 24시간까지는 환원당 함량이 감소하다가 그 이후부터는 유의적인 변화를 나타내지 않음을 알 수 있었다. 이는 발효 24시간까지는 발효액에 존재하는 환원당을 이용하여 유산발효를 진행하다가 그 이후부터는 더 이상 환원당을 유산발효에 이용하지 않는다는 것을 보여주는 것이다. 팽화홍삼의 첨가량이 증가할수록 환원당 함량은 증가하여 팽화 홍삼을 4% 첨가하였을 때의 초기 환원당량은 69.91 μmol 이었고 24시간 발효 시 55.68 μmol 로 감소하여 약 20% 감소하였는데 팽화 홍삼을 첨가하지 않은 발효액과 비교하였을 때 감소폭이 크지 않았다.

팽화 홍삼 추출액을 첨가한 양파 착즙액을 유산 발효하였을 때 유산균 생균수가 발효 24시간에서 최대를 나타내었고 적정산도도 발효 24시간에서 팽화 홍삼 추출액의 첨가량에 따라 0.33-0.47%로 높은 값을 보여주었으며 환원당 함량도 발효 24시간 후에는 감소하지 않는 경향을 나타내었으므로 24시간 이상의 발효는 필요하지 않다고 판단되었다.

Table 1-15. Effect of concentration of puffed red ginseng extract on the reducing sugar content of fermentation product

(Unit: μmol)

Red ginseng concentration (%, v/v)	Fermentation time (hr)				
	0	12	24	36	48
0.0	37.17 \pm 2.57 ^{b1)}	33.67 \pm 1.63 ^b	25.80 \pm 6.96 ^a	23.67 \pm 3.03 ^a	21.80 \pm 5.11 ^a
0.5	43.13 \pm 2.20 ^b	38.95 \pm 2.12 ^{ab}	33.44 \pm 0.63 ^a	32.49 \pm 0.24 ^a	35.67 \pm 7.52 ^a
1.0	52.68 \pm 3.94 ^c	45.09 \pm 4.99 ^b	39.17 \pm 1.80 ^a	36.08 \pm 1.10 ^a	36.17 \pm 1.66 ^a
2.0	55.23 \pm 2.50 ^c	47.54 \pm 1.14 ^b	44.49 \pm 2.48 ^{ab}	43.36 \pm 1.11 ^a	42.36 \pm 2.32 ^a
4.0	69.91 \pm 1.78 ^c	66.05 \pm 2.50 ^b	55.68 \pm 0.14 ^a	55.73 \pm 1.09 ^a	55.00 \pm 2.20 ^a

1) Means \pm SD with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(4) 팽화 홍삼 추출액 첨가량에 따른 유기산 변화

양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 각각 0.5, 1, 2, 4%(v/v) 첨가한 후 발효시간에 따른 유기산 함량의 변화를 측정된 결과는 Table 1-16에 나타내었다. 팽화 홍삼 추출액을 첨가한 양파 착즙액은 acetic acid와 succinic acid를 함유하고 있지 않았으며 발효에 의해서도 생성되지 않았다. 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양파 착즙액에는 lactic acid나 citric acid도 함유하고 있지 않았으며 malic acid와 tartaric acid를 각각 9,182 mg/kg, 6,324 mg/kg의 농도로 함유하고 있었다. 발효가 진행됨에 따라 lactic acid는 발효 12시간째에 1,657 mg/kg, 24시간째에는 2,957 mg/kg으로 증가한 반면 malic acid와 tartaric acid는 발효가 진행됨에 따라 함량이 감소하여 발효 24시간에는 malic acid의 경우에는 8,792 mg/kg, tartaric acid는 5,861 mg/kg로 감소됨을 알 수 있었다.

팽화 홍삼 추출액을 양파 착즙액에 첨가할 경우 첨가량이 증가에 의해 malic acid의 함량이 유의적으로 변화하지 않은 반면에 tartaric acid의 함량은 팽화 홍삼 추출액의 첨가량이 증가함에 따라 유의적으로 증가하여 4.0%(v/v) 첨가하였을 경우 10,415 mg/kg가 함유됨을 알 수 있었다. Citric acid의 경우에는 팽화 홍삼 추출액의 첨가량이 0.5%(v/v)까지는 검출되지 않았고 1.0%(v/v) 이상 첨가하였을 경우 검출되었는데 첨가량에 따른 citric acid 함량의 유의적인 차이는 없었다.

Lactic acid의 경우 팽화 홍삼 추출액에는 존재하지 않았으나 발효가 진행됨에 따라

lactic acid의 함량이 증가하였는데, 팽화 홍삼 추출액의 첨가량이 증가할수록 lactic acid 생성량이 증가하는 현상을 나타내었다. 발효 24시간째에는 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 시료의 lactic acid 함량이 2,957 mg/kg인 반면 팽화홍삼 추출액을 4.0%(v/v) 첨가한 시료에서는 6,962 mg/kg으로 측정되었다. 이는 팽화 홍삼 추출액 내에는 당 성분이 많아 팽화 홍삼 추출액의 첨가량이 증가할수록 유산균이 이용할 수 있는 당의 함량이 증가하고 이러한 당을 이용하여 lactic acid를 대량 생산한다고 판단된다. Malic acid와 tartaric acid의 경우에는 발효시간이 경과해도 함량에 유의적인 변화를 나타내지 않아 유산균이 이용하거나 생성하지 않는 것으로 나타났다.

Table 1-16. Effect of concentration of puffed red ginseng extract on the organic acid content in fermentation product

(Unit: mg/kg)

Fermentation time (hr)	Red ginseng concentration (% v/v)	Acetic acid	Citric acid	Lactic acid	Malic acid	Succinic acid	Tartaric acid
0	0.0	ND*	ND	ND	9187±474 ^a	ND	6324±308 ^a
	0.5	ND	ND	ND	10182±717 ^a	ND	7407±380 ^{ab}
	1.0	ND	772±1075 ^{a1)}	ND	9104±1008 ^a	ND	7130±831 ^{ab}
	2.0	ND	927±803 ^a	ND	9285±924 ^a	ND	7988±845 ^b
	4.0	ND	454±413 ^a	ND	10197±1793 ^a	ND	10415±1098 ^c
12	0.0	ND	ND	1657±26 ^a	8752±545 ^a	ND	5892±405 ^a
	0.5	ND	254±221 ^a	1964±176 ^{ab}	8040±345 ^a	ND	5569±301 ^a
	1.0	ND	232±402 ^a	1839±26 ^{ab}	8682±910 ^a	ND	6331±342 ^{ab}
	2.0	ND	533±924 ^a	2260±155 ^b	9907±2415 ^a	ND	7361±1184 ^{bc}
	4.0	ND	364±321 ^a	4175±460 ^c	7830±101 ^a	ND	7548±182 ^c
24	0.0	ND	ND	2957±1198 ^a	8792±971 ^a	ND	5861±546 ^a
	0.5	ND	1079±1364 ^a	4389±2007 ^{ab}	9473±3219 ^a	ND	6713±2392 ^a
	1.0	ND	743±1008 ^a	5692±684 ^{bc}	9889±2213 ^a	ND	7160±1488 ^a
	2.0	ND	848±566 ^a	6037±759 ^{bc}	8853±1719 ^a	ND	6898±923 ^a
	4.0	ND	685±386 ^a	6962±1384 ^c	8333±1569 ^a	ND	8013±907 ^a

*ND : Not detected

¹⁾Means with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

(5) 팽화 홍삼 추출액 첨가량에 따른 전자공여능 변화

양과의 생리활성기능에 관한 연구로는 Gupta(1966)의 심혈관계 질환 예방, Menon & Kendal(1968)의 혈전증 치료에 관한 효과, Jain 등(1973)의 혈당 저하효과, Hur 등(1985)의 항산화 효과 및 Sheo & Jung(1997)의 납 독성의 해독 효과 등이 보고되었고, Lee & Lee(1990)는 양과즙이 고등어의 지질산패의 진행을 억제하고 지방산 조성의 변화를 감소시키는데 효과가 있다고 보고하였다.

팽화 홍삼 추출액이 첨가된 양과 착즙액을 24시간 동안 유산 발효시킨 발효액의 전자공여능을 측정한 결과 Table 1-17과 같이 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양과 착즙액의 발효액은 95.30%의 전자공여능을 나타내어 발효하지 않은 양과 착즙액의 전자공여능인 83.34%보다 높은 활성을 나타내었다. 이는 유산발효에 의해 양과 착즙액의 특정 성분이 전자공여능을 지니는 물질로 전환되었기 때문으로 사료된다. 양과 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 0.5%(w/v) 첨가하였을 경우에는 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 경우보다 약간 높은 전자공여능을 나타내어 팽화 홍삼의 첨가에 의하여 팽화 홍삼 자체가 지니는 전자공여능에 의해 상승효과를 나타내었다고 판단된다. 그러나 팽화 홍삼을 1%(w/v) 이상 첨가하였을 경우에는 첨가량이 증가하더라도 전자공여능이 유의적으로 증가하지 않아 팽화 홍삼 첨가에 의한 전자공여능의 상승작용은 팽화 홍삼 추출액의 첨가량에 비례하지는 않은 것으로 확인되었다.

일반적으로 flavonoid는 높은 전자공여능을 나타낸다고 알려져 있으며(임 등, 2005), Kwak 등(2000)은 양과를 메탄올로 추출하였을 경우 약70%의 전자공여능을 나타내었다고 하였다. 본 연구결과가 높은 전자공여 효과를 보여주고 있는데 이는 양과의 flavonoid 성분과 유산균의 발효에 의한 복합적인 영향이라 사료된다. Hudson & Lewis(1983)는 양과안의 플라보노이드류의 화학적 구조가 항산화효과에 영향을 준다고 하였으며 일반적으로 polyhydroxy flavonoid는 불포화지방산의 유리기 연쇄반응(free radical reaction)에서 초기단계 항산화제로 작용할 수 있다고 보고하였다. *Lactobacillus* sp. SBT 2028은 *in vivo*에서 항산화효소를 가지며 인체 내 활성산소 축적을 감소시켜 준다고 보고되는 등 유산균의 여러 가지 활성산소에 대한 제거능력도 보고되고 있다(Kaizu et al., 1993).

(6) 팽화 홍삼 추출액 첨가량에 따른 아질산염 소거능 변화

팽화 홍삼 추출액이 첨가된 양과 착즙액의 발효액이 지니는 아질산염 소거능의 경우에도 전자공여능 실험과 유사한 결과를 나타내었다(Table 1-17). 즉, 발효하지 않은 양과 착즙액의 전자공여능은 pH 1.2에서 25.49%로 측정된 반면, 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양과 착즙액의 발효액은 70.82%로 측정되어 유산 발효에 의해 아질산염 소거기능이 급격하게 증가하였음을 확인하였다. 또한 양과 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 0.5%(w/v) 첨가하여 발효하였을 경우 78.24%의 아질산염 소거능을 나타내어 팽화 홍삼 추출액 첨가에

의해 발효액의 아질산염 소거능이 상승함을 알 수 있었다. 그러나 양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 1.0%(w/v) 이상 첨가하였을 경우에는 아질산염 소거능에 유의적인 증가현상을 관찰할 수 없었다. pH 3.0, 4.2와 6.0에서도 유사한 경향을 나타내었는데, 양파 착즙액에 팽화 홍삼 착즙액을 1%(w/v) 첨가한 후 발효시킨 발효액의 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 79.93%로 가장 높은 소거율을 나타내었고, pH 3.0에서 42.85%, pH 4.2에서 41.90%, pH 6.0에서 8.96%로 측정되어 pH가 증가할수록 소거율이 크게 감소하여 pH의 존적인 경향을 나타내었다. 이는 복분자의 미숙과 및 완숙과 잎 추출물이 pH 1.2의 조건에서 가장 높은 아질산염 소거율을 나타내었다는 결과(Park & Chang, 2003)나 솔잎, 쑥, 결명자에서 pH가 낮을수록 아질산염 소거작용이 높았다는 결과와 일치하였다(Park et al., 2002).

Table 1-17. Effect of concentration of puffed red ginseng extract on the electron donating ability and nitrite scavenging ability of fermentation broth¹⁾

Red ginseng concentration (% v/v)	Electron donating ability (%)	Nitrite scavenging ability (%)			
		pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	pH 6.0
Control ²⁾	83.34±0.95 ^a	25.49±0.47 ^a	26.26±1.45 ^a	17.41±1.74 ^a	0.75±0.43 ^a
0.0	95.30±1.05 ^b	70.82±1.41 ^b	37.66±3.33 ^b	33.26±2.88 ^b	6.63±2.61 ^b
0.5	96.58±0.49 ^b	78.24±2.52 ^c	40.74±1.28 ^{bc}	38.47±1.39 ^c	8.97±1.01 ^b
1.0	98.01±0.30 ^c	79.93±0.96 ^c	42.85±1.06 ^c	41.90±1.59 ^c	8.96±0.84 ^b
2.0	98.32±0.80 ^c	79.60±0.62 ^c	42.85±2.29 ^c	41.80±1.98 ^c	8.95±1.00 ^b
4.0	98.33±0.50 ^c	78.85±2.34 ^c	40.73±2.46 ^{bc}	40.85±2.94 ^c	8.21±1.17 ^b

¹⁾Fermentation was carried out at 37°C for 24 hr using *P. pentosaceus* KC-007 and its supernatant was used for the determination of electron donating ability and nitrite scavenging ability.

²⁾The non-fermented onion juice

³⁾Means±SD with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(7) 팽화 홍삼 추출액 첨가량에 따른 항균활성

팽화 홍삼 추출액을 첨가한 양파 착즙액의 발효액이 지니고 있는 항균활성을 측정하기 위하여 검정균주로서 여러 가지 식중독 균주를 사용하여 액체배지 상에서의 생육저해 현상을 관찰하였다. 그 결과 Table 1-18와 같이 발효하지 않은 양파 착즙액은 *E. coli*

O-157:H7에 대해서는 7.87%의 생육 저해율을 나타내 사용한 검정균 중에서 가장 높은 항균력을 나타냈으며 *S. aureus*와 *B. cereus*에 대해서는 각각 3.38%, 2.90%의 생육저해효과를 나타내었다. *E. sakazakii*와 *L. monocytogenes*에 대해서는 항균력을 지니고 있지 않았다. 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양파 착즙액의 발효액의 경우에는 *S. aureus*에 대해서 19.26%의 생육 저해율을 나타내 가장 높은 항균력을 보였으며, *E. coli* O-157:H7과 *B. cereus*에 대해서는 각각 11.88%, 5.95%의 생육저해효과를 나타내어 유산균 발효에 의해 생육저해활성이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 또한 *L. monocytogenes*에 대하여 7.70%의 항균활성을 나타내어 유산발효에 의해 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성이 크게 증가함을 알 수 있었다. 그러나 팽화 홍삼 추출액을 첨가하였을 경우에는 첨가하지 않았을 경우와 비교하여 항균활성이 유의적인 차이를 나타내지 않아 팽화 홍삼 추출액이 병원성 세균의 생육억제에는 관여하지 않는 것으로 나타났다.

Cho(2006)는 *S. aureus*와 *E. coli*에 대한 양파 외피 추출물의 우수한 항균력을 보고한 바 있으며 *Allium*속 식물인 양파가 *Staphylococcus*와 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 항균력이 강한 것은 식물에 함유된 유황화합물에 의한 것이라고 보고된 자료도 있다(임 등, 2005). 또한 양파의 항미생물작용과 항암작용에 관한 연구 결과들이 보고되어 있으며(Didry et al., 1992), 특히 Sheo(1999)는 0.5-2.5%의 양파즙의 첨가수준에서 *Staphylococcus aureus*와 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 항균력이 강하였으며, 이는 *Allium* 속 식물에 함유된 유황 화합물에 의한 것으로 추측된다고 보고한 바 있다.

Table 1-18. Effect of concentration of puffed red ginseng extract on the antimicrobial activities of fermentation broth¹⁾

Red ginseng concentration (% v/v)	Antimicrobial activity (%)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Control ²⁾	7.81±0.24 ^a	3.38±0.45 ^a	2.90±0.35 ^a	0.57±0.03 ^a	0.91±0.02 ^a
0.0	11.88±0.44 ^b	19.26±0.50 ^b	5.95±0.72 ^b	0.44±0.07 ^a	7.70±0.44 ^b
0.5	11.73±1.09 ^b	18.95±0.17 ^b	6.18±0.51 ^b	0.46±0.14 ^a	7.74±0.72 ^b
1.0	12.23±1.94 ^b	18.75±0.57 ^b	5.93±0.77 ^b	0.61±0.15 ^a	8.34±0.50 ^b
2.0	11.37±0.68 ^b	19.29±0.63 ^b	5.44±0.69 ^b	0.45±0.09 ^a	8.08±0.15 ^b
4.0	11.70±0.74 ^b	19.02±0.38 ^b	6.03±0.06 ^b	0.50±0.06 ^a	7.88±0.47 ^b

¹⁾Fermentation was carried out at 37°C for 24 hr using *P. pentosaceus* KC-007 and its supernatant was used for the determination of antimicrobial activities.

²⁾The non-fermented onion juice

³⁾ Means±SD with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(8) 팽화 홍삼 추출액을 첨가한 양과 착즙액 발효산물의 관능 평가

양과 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 여러 농도로 첨가하여 유산발효시킨 후 발효액의 색, 향기, 감미도, 산미도 및 종합적 기호도를 9점 척도법으로 측정된 결과를 Table 1-19에 나타내었다. 색의 경우 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양과 착즙액은 6.2점으로 팽화 홍삼 추출액을 0.5%(w/v) 첨가하였을 때의 7.2와 비교하여 낮은 점수를 받았고 팽화 홍삼 추출액을 1%(w/v) 이상 첨가한 시료에서도 매우 낮은 점수를 받아 0.5%(w/v)의 팽화 홍삼 추출액 첨가가 가장 좋은 것으로 나타났다. 이는 홍삼 자체가 지니고 있는 붉은 색이 0.5%(w/v) 농도에서 가장 관능적으로 우수하였고, 팽화 홍삼 추출액을 1%(w/v) 이상 첨가할 경우에는 색이 너무 짙기 때문인 것으로 생각된다.

향기의 경우에도 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양과 착즙액은 4.8점으로 팽화 홍삼 추출액을 첨가하였을 때와 비교하여 매우 낮은 점수를 받았는데 이는 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않을 경우 양과 고유의 불쾌취가 나기 때문인 것으로 판단된다. 팽화 홍삼 추출액을 첨가하였을 경우에는 양과의 불쾌취를 masking 해주기 때문에 점수가 높게 나왔다고 생각되며, 팽화 홍삼 추출액의 첨가량이 증가해도 masking 효과가 더 증가하지는 않는 것으로 사료된다.

감미도 역시 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양과 착즙액은 5.3점으로 팽화 홍삼 추출액을 0.5%(w/v) 첨가하였을 때의 6.7점과 비교하여 낮은 점수를 받았는데 이는 팽화 홍삼 추출액이 지니고 있는 당도 때문인 것으로 판단되며, 팽화 홍삼 추출액의 첨가량을 증가시킬수록 감미도가 증가하는 경향이 있음을 알 수 있었으나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 산미도는 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않은 양과 착즙액은 7.1점으로 팽화 홍삼 추출액을 첨가한 팽화 홍삼 추출액을 첨가함에 따라 점수가 낮아지는 경향을 나타내었는데 이는 양과 착즙액의 유산발효에 의해 발생하는 산미가 팽화 홍삼 추출액의 첨가에 의해 어느 정도 masking되었기 때문으로 판단된다. 종합적 기호도는 팽화 홍삼 추출액을 1.0%(w/v) 첨가하였을 때 가장 높게 나왔으며 팽화 홍삼 추출액을 첨가하지 않거나 2%(w/v) 이상의 팽화 홍삼 추출액을 첨가할 경우에는 종합적 기호도가 감소하는 것으로 확인되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 전자공여능과 아질산염 소거능은 1%(w/v) 이상의 팽화 홍삼 추출액을 양과 착즙액에 첨가하여 발효하였을 때 가장 높은 수치를 나타내었고 종합적 기호도는 1%(w/v)의 팽화 홍삼 추출액을 첨가하였을 때 가장 좋았으므로 양과 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 첨가하여 발효할 경우에는 팽화 홍삼 추출액을 1%(w/v) 첨가하는 것이 생리활성이나 종합적 기호도 면에서 가장 적합한 것으로 확인되었다.

Table 1-19. Sensory evaluation of lactic acid fermented onion juice supplemented with different concentrations of puffed red ginseng extract

Red ginseng concentration (% v/v)	Color	Flavor	Sweetness	Sour	Overall acceptability
0.0	6.2±1.04 ^b	4.8±1.07 ^a	5.3±0.97 ^a	7.1±0.76 ^b	5.7±1.03 ^a
0.5	7.2±0.83 ^c	6.6±1.23 ^b	6.7±1.03 ^b	6.4±0.75 ^a	6.8±0.89 ^b
1.0	5.6±0.94 ^b	6.7±0.93 ^b	6.9±0.81 ^b	6.0±0.92 ^a	6.9±0.97 ^b
2.0	5.6±0.89 ^b	6.4±0.81 ^b	6.9±0.85 ^b	5.9±0.91 ^a	5.7±1.13 ^a
4.0	4.4±0.94 ^a	6.5±1.05 ^b	7.0±1.00 ^b	6.0±0.92 ^a	5.4±1.18 ^a

Fermentation was carried out at 37°C for 24 hr using *P. pentosaceus* KC-007 and the fermentation broth was used for the sensory evaluation.

1) Means±SD with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

아. 유산균의 혼합배양에 따른 양파 착즙액의 유산발효

일반적으로 유산균을 이용하여 유산발효식품을 제조할 경우에는 유산균을 단독으로 사용하기보다는 간균과 구균을 혼합한 starter를 사용함으로써 유산균간의 상호작용을 통해 발효식품의 산생성과 풍미를 향상시킨다. 양파 착즙액의 유산발효 시 starter로 사용되는 유산균을 단독으로 사용하는 것보다 2종류 이상의 균주를 혼합배양함으로써 발효능과 기호성을 높일 수 있을 것으로 기대하여 여러 유산균들 중에서 발효능이 우수하다고 알려진 4종류의 유산균, 즉 간균으로서 *Lactobacillus acidophilus*와 *L. casei*를, 구균으로서 *Streptococcus thermophilus*를, Bifidobacteria로서 *Bifidobacterium infantis*와 *B. bifidum*을 선정하여 본 연구에 사용한 *P. pentosaceus* KC-007과 혼합 스타터로 사용한 후 이에 따른 발효능을 조사하였다.

(1) 유산균의 생육곡선

혼합배양에 사용하기 위하여 선정한 5종류의 유산균, 즉 *L. acidophilus*, *L. casei*, *S. thermophilus*, *B. infantis*, *B. bifidum* 각각의 균주를 MRS 배지에 접종하여 배양하면서 균의 생육을 경시적으로 검토하였다. 그 결과, 사용한 유산균들 중에서 *L. acidophilus*, *L. casei*와 *S. thermophilus*는 접종 후 3 시간부터 대수증식기가 시작된 반면, *B. bifidum*은 접

종 후 5 시간부터, *B. infantis*는 접종 후 8 시간부터 대수증식기가 시작되어 12시간 후에 종료되었다(Fig. 1-29). 대수증식기가 종료되는 시점에서의 600 nm에서의 흡광도는 약 1.0이며 이 때의 생균수는 5 균주에서 $1.4\text{-}1.8 \times 10^9$ CFU/mL의 범위로 측정되었다. 배양 24시간 후에는 *L. casei*가 가장 높은 흡광도를 나타내었으나 다른 균주들과 비교하여 큰 차이를 나타내지는 않았다. 이 결과로부터 양과 착즙액을 발효시키기 위하여 첨가하는 starter는 대수증식기가 종료되는 시점 즉, 흡광도가 1.0인 배양액을 사용하여 양과 착즙액 농축액에 1%(v/v)가 되도록 첨가할 경우 양과 착즙액에 약 1.5×10^7 CFU/mL의 유산균수가 되는 것으로 계산되었다.

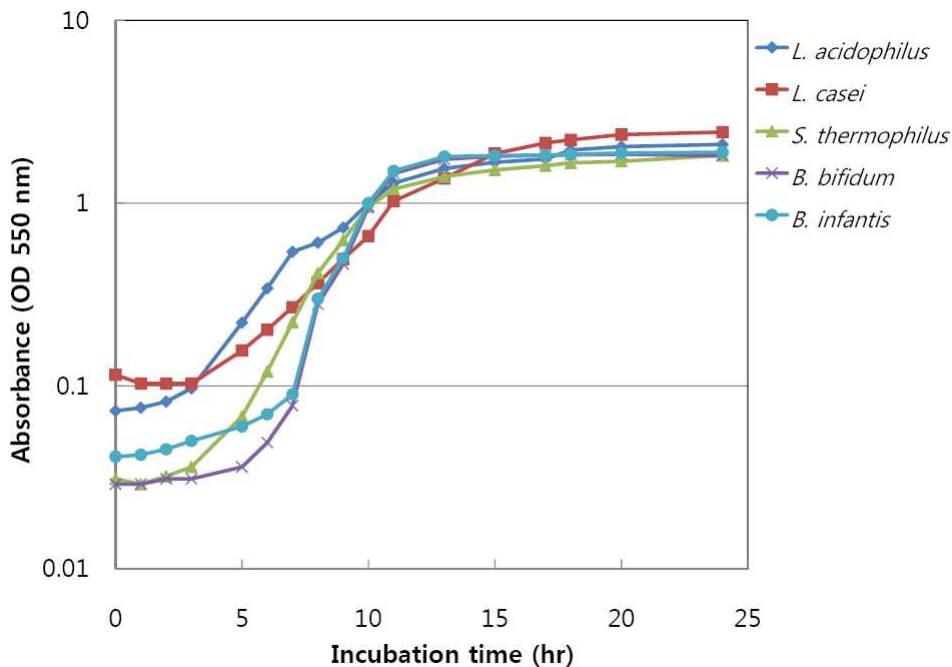


Fig. 1-29. Growth curve of lactic acid bacteria in MRS broth during the incubation at 37°C.

(2) 유산균의 혼합배양에 따른 양과 착즙액의 유산 발효능

양과 착즙액에 *P. pentosaceus* KC-007를 1%(v/v) 접종하고 *L. acidophilus*, *L. casei*, *S. thermophilus*, *B. infantis*, *B. bifidum* 균주를 각각 1%(v/v) 접종하여 *P. pentosaceus* KC-007과 유산균이 1:1로 접종된 혼합 starter로 사용하여 2균주의 혼합발효에 의한 발효능을 조사하였다. 2균주의 혼합균주를 사용하여 18시간 발효시켰을 경우 Table 1-20에서 나타낸 바와 같이 pH의 경우 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. infantis*가 1:1로 혼합된 starter가 pH 3.63으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 산도는 *P. pentosaceus* KC-007과 *S. thermophilus*의

혼합 starter를 제외한 모든 시료가 2.03%에서 2.10%의 범위에서 유의적으로 동일하였다. 유산균 생균수는 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum*의 혼합 starter가 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다. 한편 발효액의 유기산 함량을 측정한 결과 Table 1-21에서와 같이 lactic acid를 비롯한 citric acid, malic acid, tartaric acid 등의 유기산 함량은 시료간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 1-20. pH, acidity, and viable cell number of lactic acid bacteria of onion juice fermented with mixed cultures of lactic acid bacteria

Strain	pH	Acidity	Viable cell number of lactic acid bacteria (CFU/mL)
<i>P. pentosaceus</i>	3.66±0.02 ^{c1)}	2.02±0.03 ^b	8.84±0.21 ^a
<i>P. pentosaceus</i> + <i>L. acidophilus</i>	3.67±0.2 ^b	2.03±0.57 ^b	9.04±0.1 ^b
<i>P. pentosaceus</i> + <i>L. casei</i>	3.67±0.29 ^b	2.03±0.55 ^b	9.05±0.15 ^b
<i>P. pentosaceus</i> + <i>S. thermophilus</i>	3.82±0.15 ^c	1.75±0.11 ^a	9.05±0.18 ^b
<i>P. pentosaceus</i> + <i>B. bifidum</i>	3.67±0.15 ^b	2.10±0.57 ^b	9.55±0.25 ^c
<i>P. pentosaceus</i> + <i>B. infantis</i>	3.63±0.21 ^a	2.07±0.64 ^b	9.42±0.15 ^{bc}

¹⁾Means with different superscript in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Table 1-21. Organic acid content of onion juice fermented with mixed cultures of lactic acid bacteria

Strain	(mg/kg)					
	Acetic acid	Citric acid	Lactic acid	Malic acid	Succinic acid	Tartaric acid
Onion juice	ND ¹⁾	3457±326 ^{a2)}	7083±1723 ^a	32009±8372 ^a	ND	72267±9091 ^a
<i>P. pentosaceus</i>	ND	4026±314 ^a	9274±194 ^a	28322±2743 ^a	ND	29826±7345 ^a
<i>P. pentosaceus</i> + <i>L. acidophilus</i>	ND	4418±382 ^a	11272±1088 ^a	35770±8982 ^a	ND	20226±4191 ^a
<i>P. pentosaceus</i> + <i>L. casei</i>	ND	4676±408 ^a	12696±1679 ^a	36996±9359 ^a	ND	20876±6185 ^a
<i>P. pentosaceus</i> + <i>S. thermophilus</i>	ND	2312±204 ^a	8953±564 ^a	26954±3061 ^a	ND	17472±998 ^a
<i>P. pentosaceus</i> + <i>B. bifidum</i>	ND	2955±287 ^a	10605±848 ^a	30089±8983 ^a	ND	17494±3469 ^a
<i>P. pentosaceus</i> + <i>B. infantis</i>	ND	9175±678 ^a	13648±9680 ^a	43545±3269 ^a	ND	26113±1936 ^a

¹⁾ND : Not detected

²⁾Means with different superscript in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

(3) 유산균의 혼합배양에 따른 양과 유산발효액의 생리활성

양과 착즙액에 *P. pentosaceus* KC-007을 1%(v/v) 접종하고 *L. acidophilus*, *L. casei*, *S. thermophilus*, *B. infantis*, *B. bifidum* 균주를 각각 1%(v/v) 접종하여 *P. pentosaceus* KC-007과 유산균이 1:1로 접종된 혼합 starter로 사용하여 2균주의 혼합발효에 의한 발효액의 생리활성을 조사한 결과 Table 1-22와 같았다. 전자공여능은 *P. pentosaceus* KC-007 단독발효액과 *P. pentosaceus* KC-007과 *L. casei*와의 혼합발효액이 가장 높은 값을 나타내었고 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum*의 혼합발효액의 전자공여능이 가장 낮은 값을 나타내었다. 아질산염 소거능은 pH 1.2에서는 *P. pentosaceus* KC-007과 *L. casei*의 혼합발효액이 89.10%로 가장 높은 값을 보였고 pH 3.0과 pH 4.2에서는 모든 혼합발효액이 유의적으로 유사한 값을 보여주었다. pH 6.0에서는 *P. pentosaceus* KC-007과 *S. thermophilus*의 혼합발효액이 가장 높은 값을 나타내었는데 모든 혼합발효액은 *P. pentosaceus* KC-007 단독발효액보다 매우 높은 활성을 보여 주었다. SOD 유사활성은 *P. pentosaceus* KC-007과 *L. acidophilus*의 혼합배양액이 90.92%로 가장 높은 활성을 나타내었다.

Table 1-22. Effect of mixed culture of lactic acid bacteria on the electron donating ability and nitrite scavenging ability of fermentation broth

Strain	Electron donating ability (%)	Nitrite scavenging ability (%)				SOD-like activity (%)
		pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	pH 6.0	
Onion juice ¹⁾	82.74±0.92 ^a	27.36±0.78 ^a	24.32±1.98 ^a	16.54±1.51 ^a	0.91±0.63 ^a	66.83±5.06 ^a
<i>P. pentosaceus</i>	94.25±1.14 ^b	72.71±1.81 ^c	35.45±4.19 ^b	31.28±3.18 ^b	9.19±3.11 ^b	87.23±8.52 ^{ab}
<i>P. pentosaceus</i> + <i>L. acidophilus</i>	86.74±2.29 ^{ab}	77.93±4.53 ^{bc}	47.50±3.91 ^c	32.26±3.28 ^b	18.93±5.75 ^c	90.92±5.52 ^b
<i>P. pentosaceus</i> + <i>L. casei</i>	95.88±0.99 ^b	89.10±9.91 ^d	47.62±13.41 ^c	40.23±11.39 ^b	30.87±14.36 ^{cd}	65.97±11.04 ^a
<i>P. pentosaceus</i> + <i>S. thermophilus</i>	87.77±3.11 ^{ab}	75.77±2.48 ^b	43.89±1.53 ^c	32.53±3.60 ^b	39.60±17.22 ^d	79.18±2.81 ^{ab}
<i>P. pentosaceus</i> + <i>B. bifidum</i>	83.71±4.98 ^a	86.38±1.20 ^{cd}	46.51±1.91 ^c	33.57±4.80 ^b	25.07±6.69 ^{cd}	69.08±4.06 ^a
<i>P. pentosaceus</i> + <i>B. infantis</i>	88.38±6.50 ^{ab}	78.11±4.18 ^{bc}	41.31±1.72 ^c	46.42±24.42 ^b	23.84±1.61 ^{cd}	82.65±18.84 ^{ab}

¹⁾The non-fermented onion juice

²⁾Means±SD with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

이상의 결과로부터 혼합발효에 의해 발효액의 산도를 가장 높이 증가시키고 유산균 생균수가 가장 많으며 일정 수준 이상의 생리활성을 나타내는 *B. bifidum* ATCC 15696을 혼합발효의 starter로 선정하였다.

(4) 유산균의 혼합비에 따른 유산 발효능

혼합발효의 starter로 선정한 *B. bifidum* ATCC 15696과 *P. pentosaceus* KC-007의 혼합비에 따른 유산 발효능을 측정한 결과 Fig. 1-30과 같이 유산균 생균수는 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:4의 비율로 접종한 발효액이 log 9.10 CFU/mL로 가장 높았고 그 다음으로 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 접종한 발효액이 log 8.83 CFU/mL로 높았다.

산도의 경우에는 Fig. 1-31에 나타난 바와 같이 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 접종한 발효액이 2.02%로 가장 높은 값을 나타내었으며 *P.*

pentosaceus KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:1의 비율로 접종한 발효액이 1.96%로 높은 값을 나타내었다. pH는 혼합비에 따른 변화는 관찰되지 않았다.

혼합균주 발효액의 유기산 함량 역시 Table 1-23에 나타낸 바와 같이 혼합비에 따른 함량변화는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. *B. bifidum* ATCC 15696과 *P. pentosaceus* KC-007의 혼합비에 따른 발효액의 생리활성을 측정된 결과는 Table 1-24에 나타내었다. 전자공여능은 혼합비에 따른 유의적인 차이를 나타내지 않았고 아질산염 소거능도 측정된 모든 pH에서 혼합비에 따른 유의적인 차이를 나타내지 않았다. SOD 유사활성은 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:4의 비율로 접종한 발효액이 80.94%로 가장 높은 값을 나타내었고 그 다음으로 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 접종한 발효액이 높은 활성을 나타내었다.

이상의 결과로부터 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 혼합접종하여 발효하는 것이 가장 높은 산도와 우수한 유산균 생균수를 나타내고 SOD 유사활성도 비교적 높은 것으로 확인되었다.

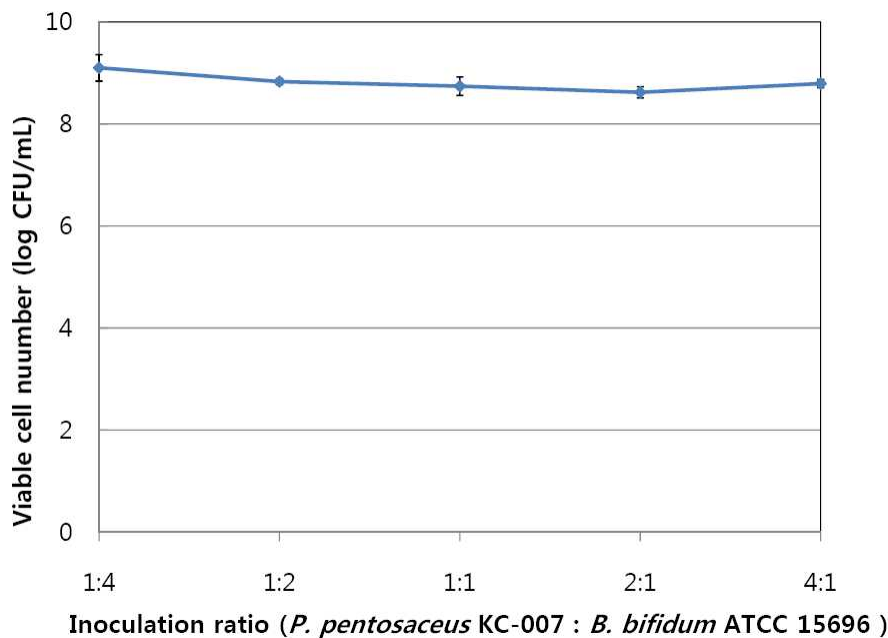


Fig. 1-30. Effect of inoculation ration of *P. pentosaceus* KC-007 and *B. bifidum* ATCC 15696 on viable cell number of lactic acid bacteria in fermented onion juice.

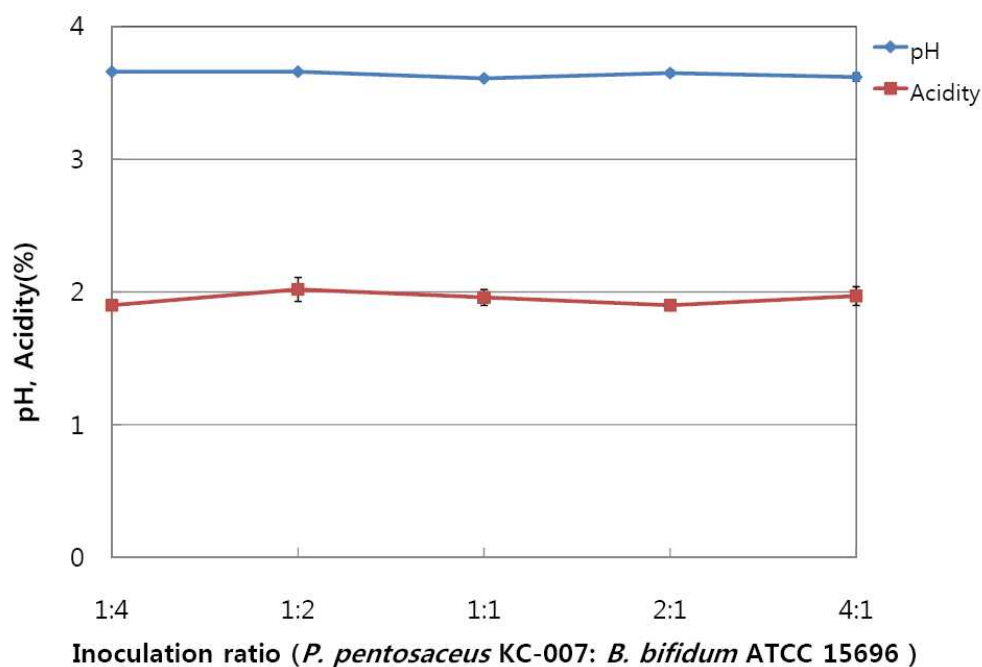


Fig. 1-31. Effect of inoculation ratio of *P. pentosaceus* KC-007 and *B. bifidum* ATCC 15696 on pH and acidity of fermented onion juice.

Table 1-23. Organic acid content of onion juice fermented with mixed cultures of lactic acid bacteria

Inoculation ratio (<i>P. pentosaceus</i> KC-007 : <i>B. bifidum</i> ATCC 15696)	(mg/kg)					
	Acetic acid	Citric acid	Lactic acid	Malic acid	Succinic acid	Tartaric acid
1:1	ND ¹⁾	4783±1695 ^{a2)}	12871±1295 ^a	37862±7555 ^a	ND	20543±3888 ^a
1:2	ND	5219±795 ^a	13160±1284 ^a	40849±4236 ^a	ND	22062±2171 ^a
1:4	ND	5643±104 ^a	12900±1454 ^a	40692±2639 ^a	ND	22063±1272 ^a
2:1	ND	6707±1657 ^a	12804±1056 ^a	42460±3716 ^a	ND	23088±2087 ^a
4:1	ND	5483±418 ^a	12544±272 ^a	40620±1040 ^a	ND	21855±579 ^a

¹⁾ND : Not detected

²⁾Means with different superscript in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Table 1-24. Effect of inoculation ratio of lactic acid bacteria on the electron donating ability and nitrite scavenging ability of fermentation broth

Inoculation ratio (<i>P. pentosaceus</i> : <i>B. bifidum</i>)	Electron donating ability (%)	Nitrite scavenging ability (%)				SOD-like activity (%)
		pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	pH 6.0	
1:1	85.14±1.79 ^{a1)}	82.70±2.83 ^a	41.51±5.10 ^a	30.85±2.77 ^a	19.81±3.33 ^a	68.05±7.74 ^{ab}
1:2	77.91±10.35 ^a	83.12±4.61 ^a	42.81±4.96 ^a	30.61±4.53 ^a	21.80±4.67 ^a	68.61±4.42 ^{ab}
1:4	81.19±1.26 ^a	80.99±1.23 ^a	40.44±1.78 ^a	39.44±0.92 ^a	18.97±1.93 ^a	70.94±3.57 ^b
2:1	77.12±3.98 ^a	84.00±10.43 ^a	48.64±9.14 ^a	30.86±8.65 ^a	29.02±19.36 _a	65.35±2.38 ^{ab}
4:1	78.64±1.00 ^a	84.27±2.70 ^a	41.51±4.86 ^a	31.97±3.67 ^a	20.57±3.68 ^a	61.30±0.80 ^a

¹⁾Means±SD with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

자. 발효제품의 저장성

(1) 양과 착즙액 유산발효제품의 저장성

(가) 저장 중 이화학적 특성 변화

양과 착즙액을 유산발효한 제품의 온도에 따른 저장특성을 조사하기 위하여 저장기간에 따른 이화학적 특성 변화를 측정하였다. 발효제품을 5, 10, 20, 30°C에서 18일 동안 저장하면서 산도 변화를 측정한 결과 Fig. 1-32와 같이 5°C와 10°C에서는 산도변화가 거의 없어 발효초기 0.7%에서 저장 18일 후에는 1.0%를 나타내었다. 20°C와 30°C에서는 저장 초기부터 산도 증가가 이루어져 저장 4일후에는 20°C에서는 1.0%로, 30°C에서는 1.25%로 유의적으로 증가하였으며 저장 18일 후에는 20°C에서는 2.2%로, 30°C에서는 2.49%로 증가하였다. 이는 20°C 이상의 높은 온도에서는 발효가 계속적으로 진행되기 때문이라고 판단된다. 발효제품의 pH의 경우에는 Fig. 33에 나타낸 바와 같이 모든 저장온도에서 유사한 경향을 나타내었는데 5°C와 10°C에서는 저장기간 동안 pH의 변화가 거의 없었다. 20°C와 30°C에서는 저장 4일까지 pH가 감소하다가 그 이후 변화가 거의 없다가 11일째부터 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 환원당은 Fig. 1-34와 같이 5°C와 30°C에서는 저장기간 동안 큰 변화를 나타내지 않았지만 10°C와 20°C에서는 저장 4일째 급격히 증가하다가 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 양과 착즙액 중에 존재하는 다당류들이 유산

균이 생산하는 당 가수분해효소에 의하여 분해되어 증가하는 것으로 판단되며 다당류로부터 분해되어 생성되는 당들이 유산균에 의해 소비되는 속도보다 생성되는 속도가 높기 때문인 것으로 사료되고, 환원당이 다시 감소하는 것은 생성된 환원당을 유산발효를 위하여 사용했기 때문인 것으로 유추된다.

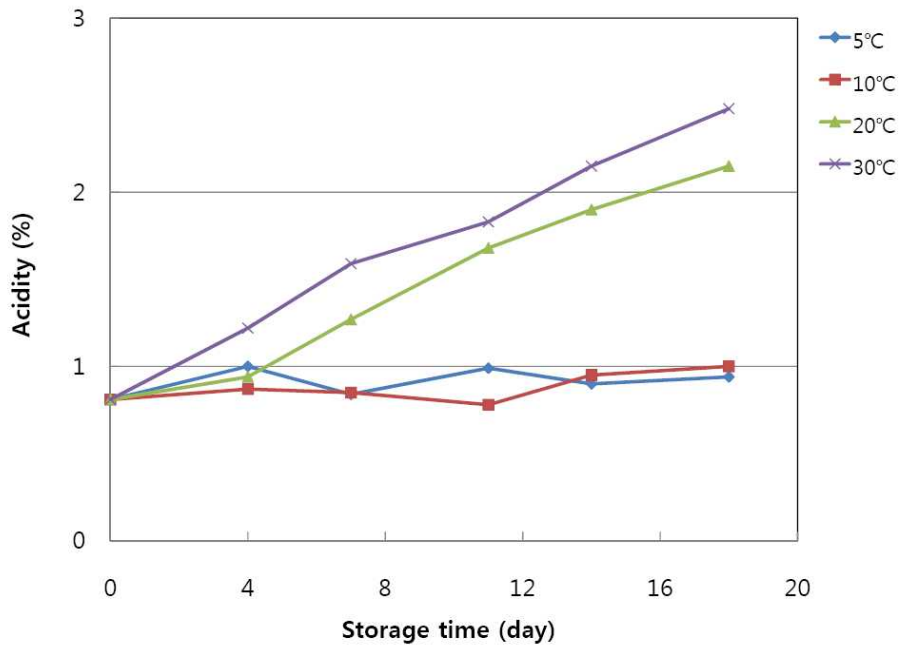


Fig. 1-32. Change in acidity of fermented onion juice during storage at different temperature.

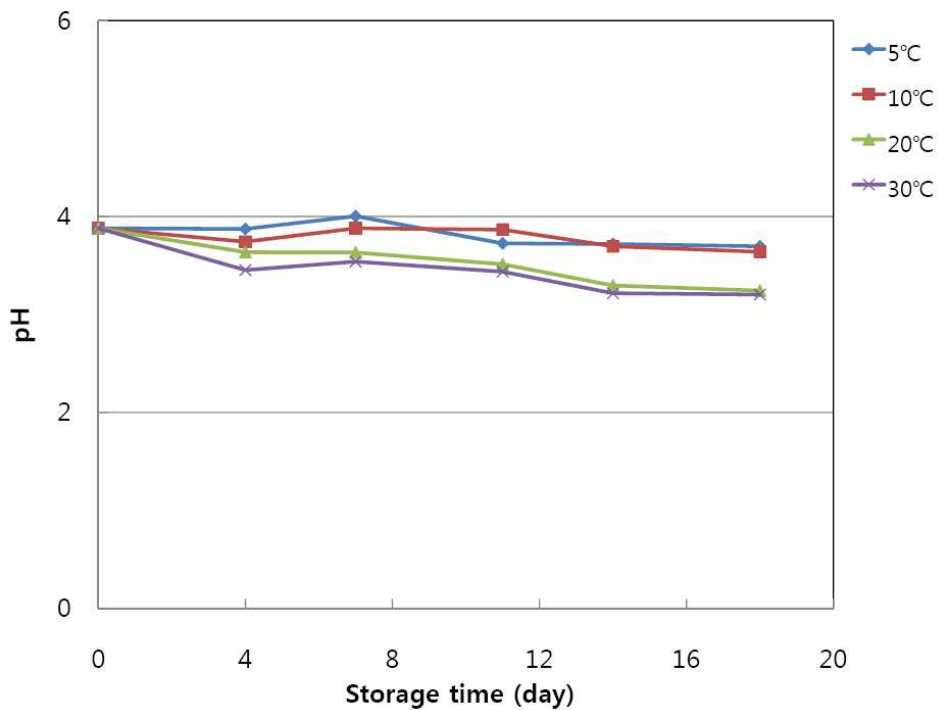


Fig. 1-33. Change in pH of fermented onion juice during storage at different temperature.

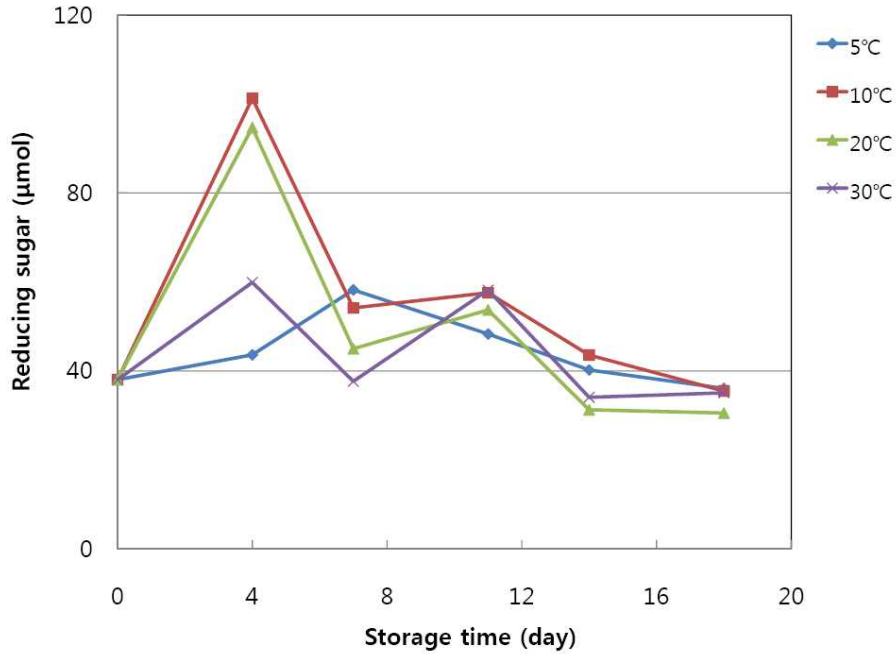


Fig. 1-34. Change in reducing sugar content of fermented onion juice during storage at different temperature.

(나) 저장 중 미생물 생균수 변화

양파 착즙액을 유산발효한 제품의 저장 시 저장온도에 따른 미생물 생균수의 변화를 측정하기 위하여 발효제품을 5, 10, 20, 30°C에서 17일 동안 저장하면서 유산균수, 총균수, 효모수 및 곰팡이수의 변화를 측정한 결과, 유산균 생균수는 Fig. 1-35와 같이 20°C에서는 유산균수가 저장기간이 경과하여도 크게 감소하지 않았고 30°C에서는 저장 4일째까지는 유산균수의 변화가 거의 없다가 그 이후 약간 감소하는 경향을 나타내어 저장 18일째에는 log 7.1 CFU/mL의 값을 나타내었다. 10°C에서는 유산균수가 저장기간이 경과함에 따라 지속적으로 감소하여 저장 18일째에는 log 7.1 CFU/mL의 값을 보여주었으며 5°C에서는 저장 4일째부터 유산균수가 감소하기 시작하여 저장 18일째에는 log 6.5 CFU/mL 까지 감소하였다.

한편 총균수는 Fig. 1-36에서 나타낸 바와 같이 유산균 생균수와 거의 동일한 경향을 나타내었는데 이는 측정된 총균이 유산균이기 때문인 것으로 판단된다. 효모와 곰팡이는 본 제품에서 검출되지 않아 본 제품의 생산공정에 유산균 이외의 잡균 오염은 없는 것으로 확인되었다.

이상의 결과로 본 발효제품의 저장성은 20°C에서 가장 좋은 것으로 나타났으나 일반적으로 발효제품의 저장성은 낮은 온도에서 우수한 특성으로 볼 때 본 제품이 5°C에서의 저장성이 낮은 이유에 대하여 추가적인 연구를 할 필요가 있다.

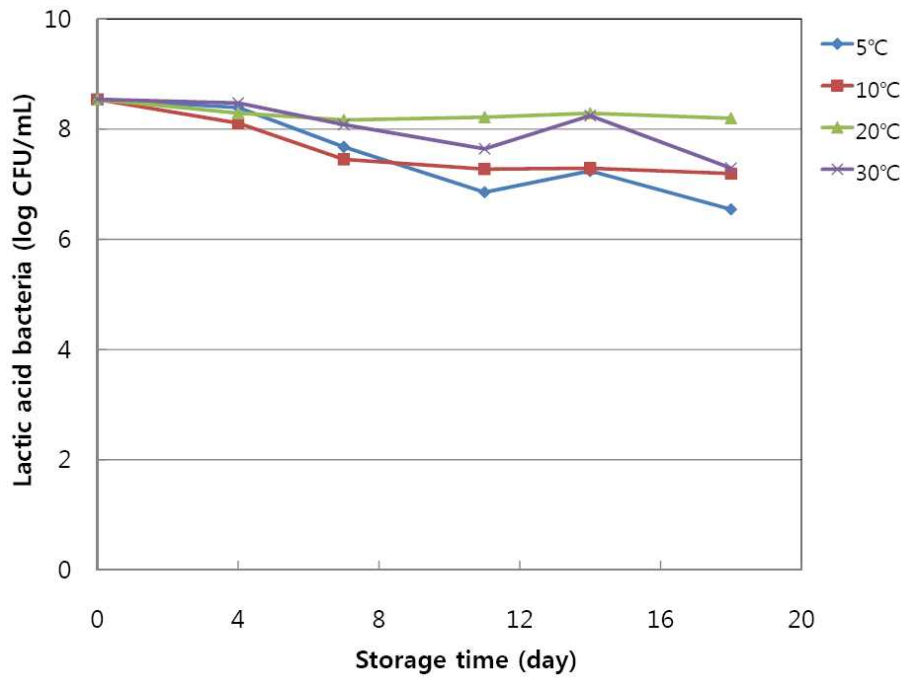


Fig. 1-35. Change in viable cell number of lactic acid bacteria of fermented onion juice during storage at different temperature.

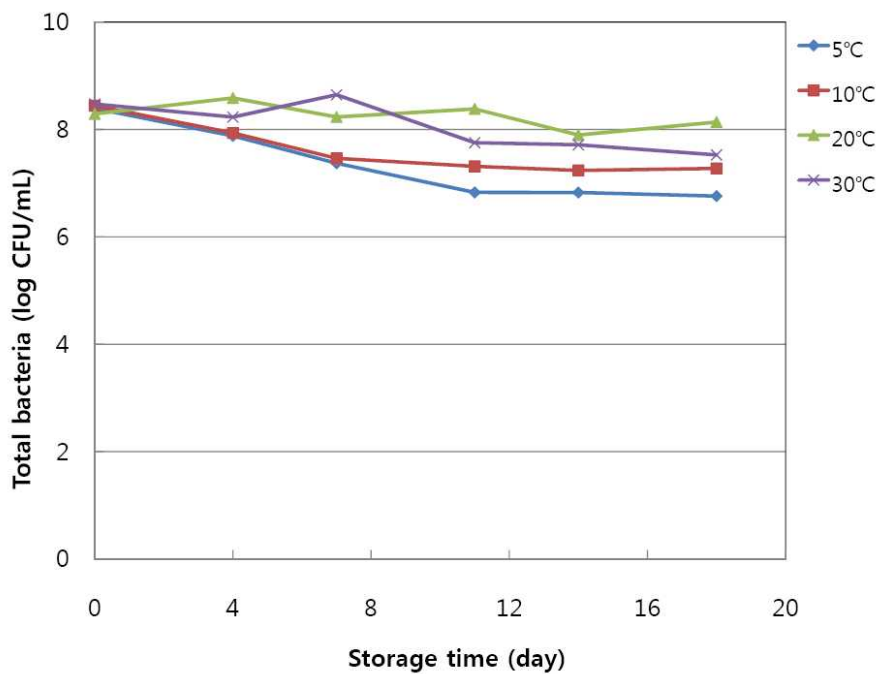


Fig. 1-36. Change in viable cell number of total bacteria of fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract during storage at different temperature.

(2) 팽화 홍삼 추출액을 첨가한 양파 착즙액 유산발효제품의 저장성

(가) 저장 중 이화학적 특성 변화

팽화 홍삼 추출액을 첨가한 양파 착즙액을 유산발효한 제품의 온도에 따른 저장특성을 조사하기 위하여 저장기간에 따른 이화학적 특성 변화를 측정하였다. 발효제품을 5, 10, 20, 30℃에서 17일 동안 저장하면서 산도 변화를 측정한 결과 Fig. 1-37과 같이 5℃에서는 산도변화가 거의 없어 발효초기 0.99%에서 저장 10일 후에는 1.07%로 최대값을 나타내다가 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 20℃와 30℃에서는 저장 초기부터 산도 증가가 이루어져 저장 3일후에는 각각 1.13%와 1.17%로 유의적으로 증가한 후 일정한 값을 유지하였다. 10℃에서도 저장 3일후에 1.13%로 유의적인 증가를 나타낸 후 감소하였다. 이는 10℃ 이상의 높은 온도에서는 저장 초기 발효가 계속적으로 진행되기 때문이라고 판단된다.

발효제품의 pH의 경우에는 Fig. 1-38에 나타낸 바와 같이 모든 저장온도에서 동일한 경향을 나타내었는데 저장 3일까지는 pH의 변화가 거의 없다가 그 이후 7일째까지 pH가 감소한 후 10일째부터 다시 증가하였다. 이는 저장 초기에 발효가 지속됨으로써 pH가 저하되었다가 균의 사멸이 시작되면서 균체의 용해로 균체 내 물질이 용출됨으로써 pH가 상승한 것으로 생각된다.

환원당은 Fig. 1-39와 같이 모든 저장온도에서 저장 10일째까지 환원당 함량이 증가하다가 그 이후에 감소하는 경향을 나타내었는데 이는 양파 착즙액 중에 존재하는 다당류들이 유산균이 생산하는 당 가수분해효소에 의하여 분해되어 증가하는 것으로 판단되며 다당류로부터 분해되어 생성되는 당들이 유산균에 의해 소비되는 속도보다 생성되는 속도가 높기 때문인 것으로 사료되나 보다 정확한 이유는 추후 실험을 통해 확인할 필요성이 있다고 본다.

한편 발효제품의 저장기간 동안 저장온도에 따른 유기산 함량의 변화를 측정한 결과를 Fig. 1-40부터 1-43에 나타내었다. Lactic acid 함량은 Fig. 1-40과 같이 저장 3일째까지 급격히 증가하는 경향을 나타내었는데 이는 저장기간의 초기에는 발효가 지속적으로 진행됨에 따라 lactic acid 함량이 증가한 것으로 판단되며 그 이후에는 유산발효가 더 이상 진행되지 않는 것으로 확인되었다. Lactic acid 이외의 citric acid, malic acid와 tartaric acid는 저장기간 중 발효온도에 관계없이 유의적인 함량 변화를 나타내지 않았다.

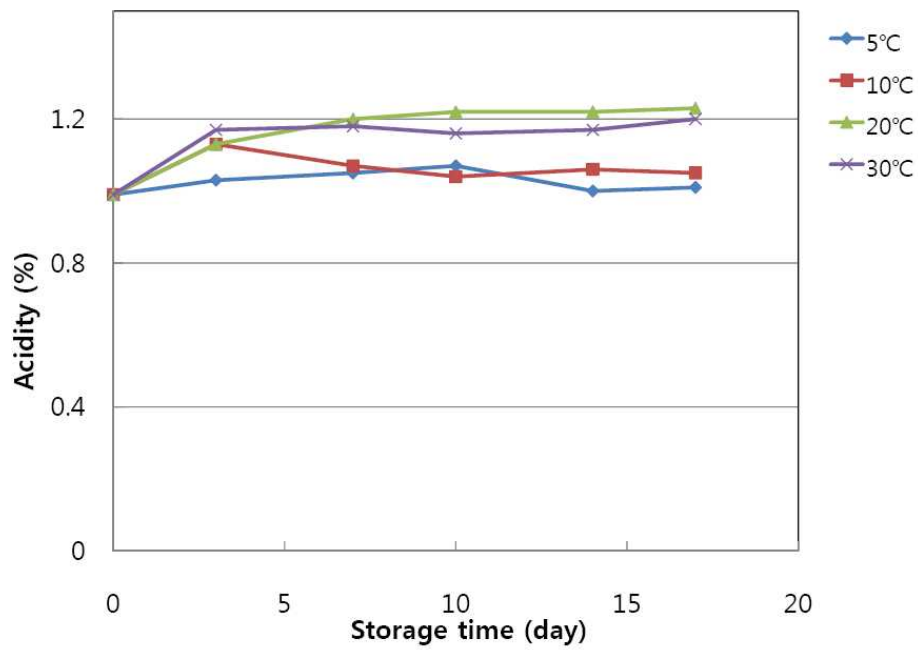


Fig. 1-37. Change in acidity of fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract during storage at different temperature.

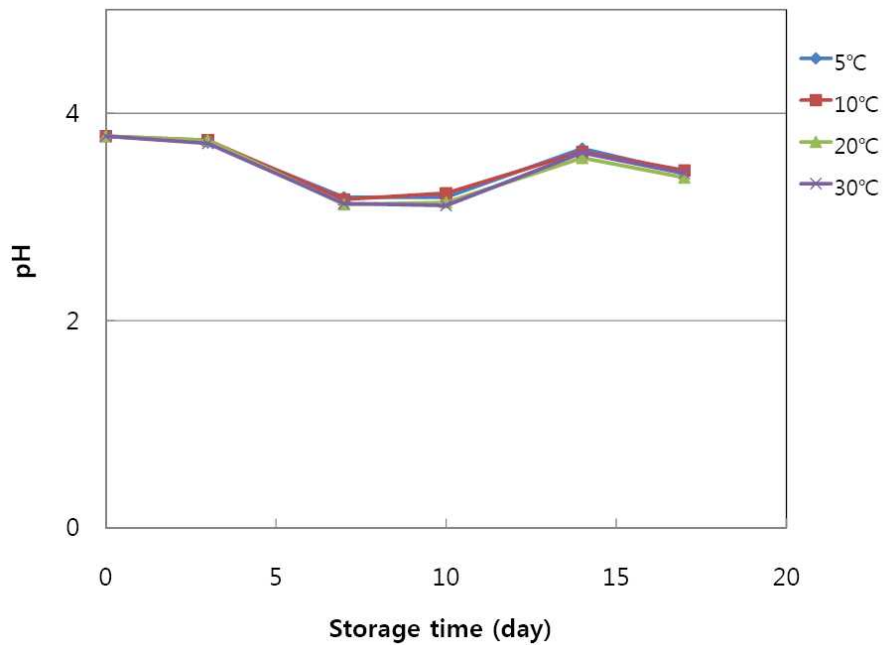


Fig. 1-38. Change in pH of fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract during storage at different temperature.

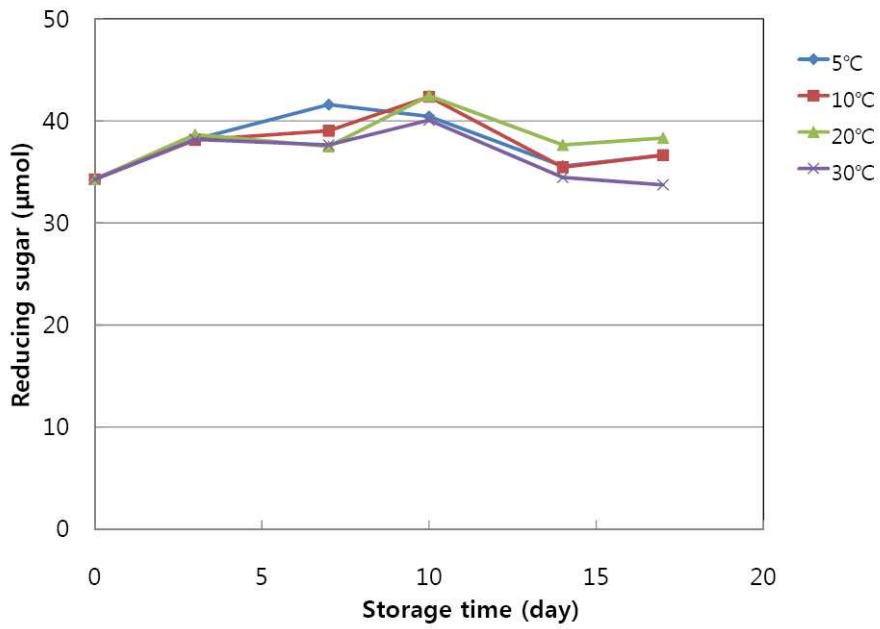


Fig. 1-39. Change in reducing sugar content of fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract during storage at different temperature.

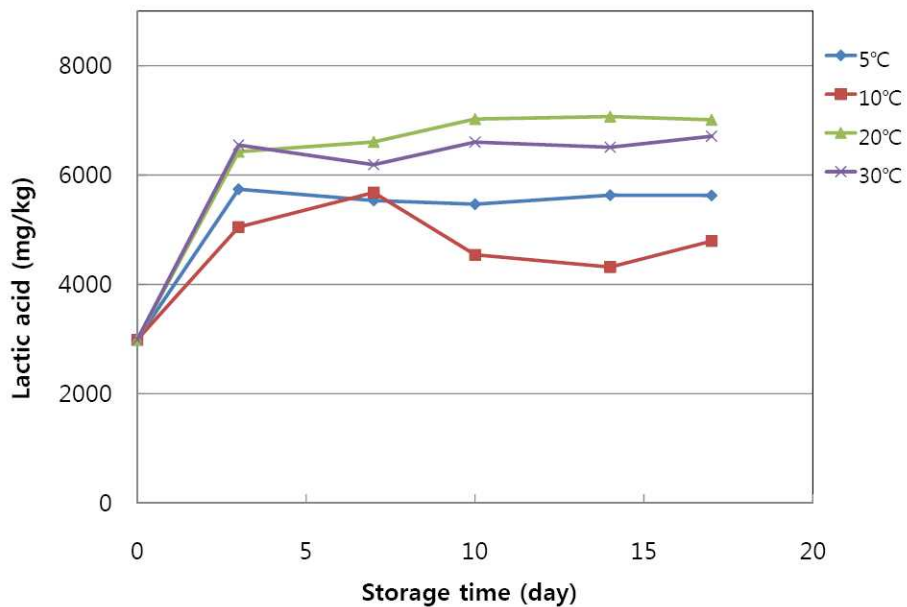


Fig. 1-40. Change in lactic acid content of fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract during storage at different temperature.

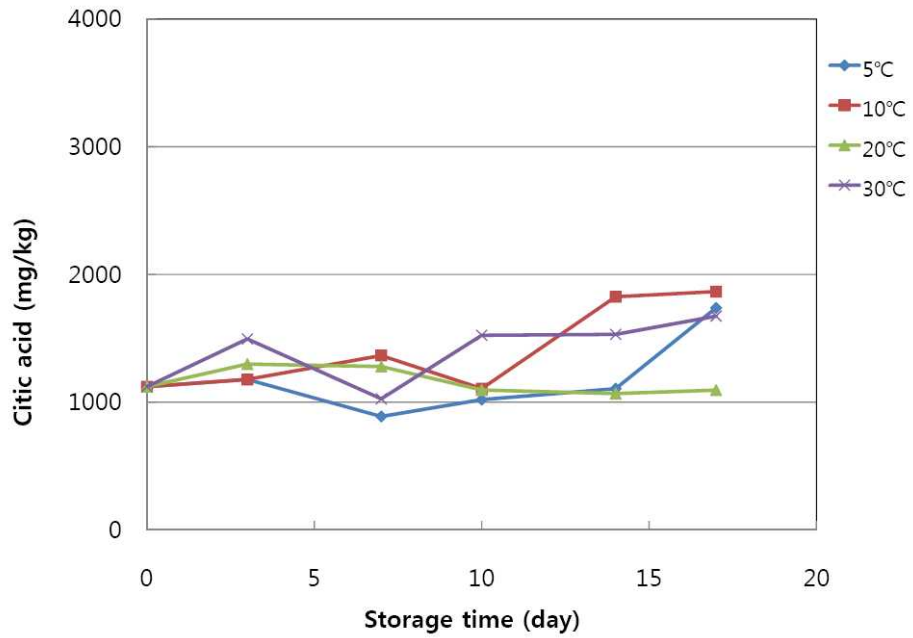


Fig. 1-41. Change in citric acid content of fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract during storage at different temperature.

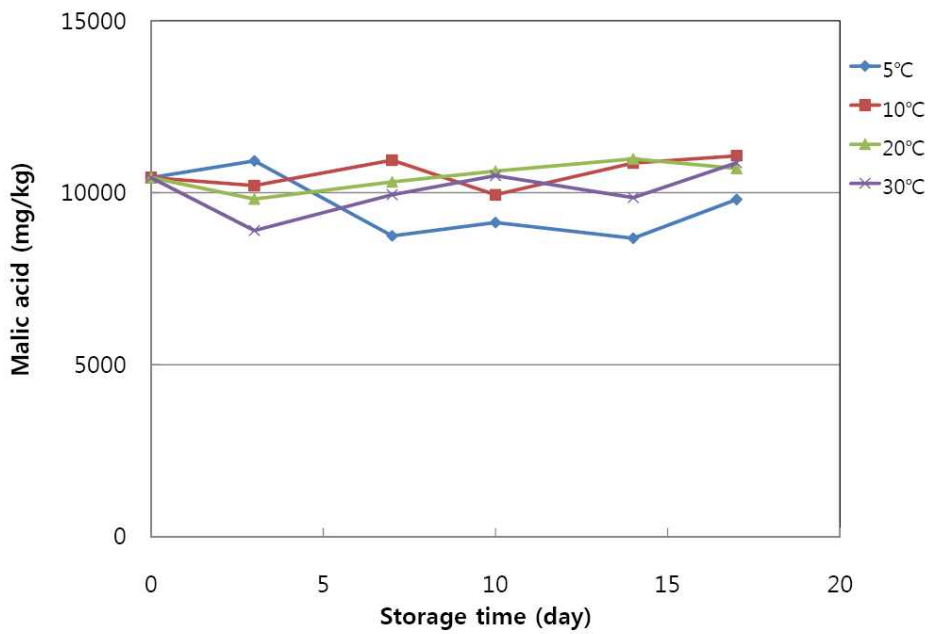


Fig. 1-42. Change in malic acid content of fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract during storage at different temperature.

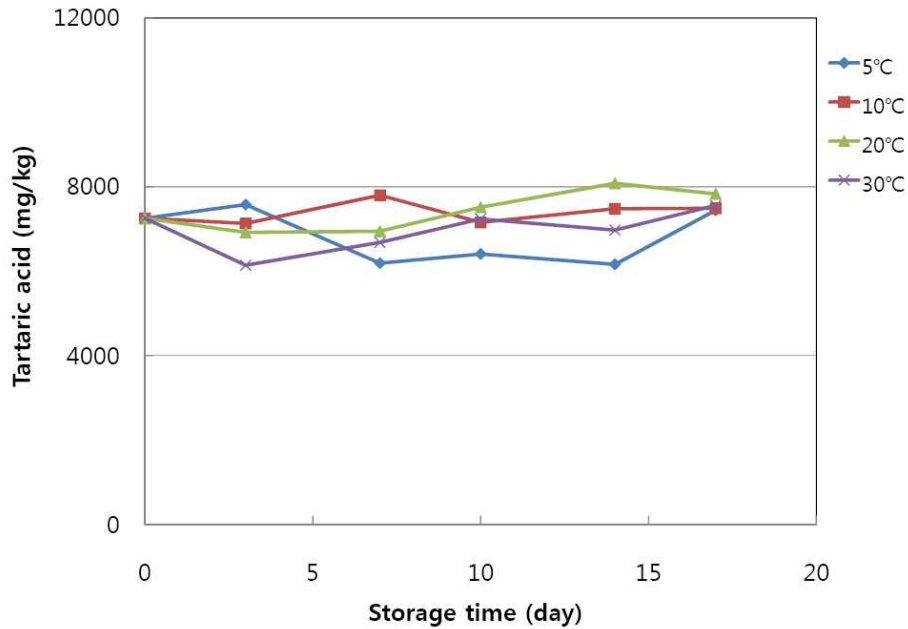


Fig. 1-43. Change in tartaric acid content of fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract during storage at different temperature.

(나) 저장 중 미생물 생균수 변화

팽화 홍삼 추출액을 첨가한 양파 착즙액을 유산발효한 제품의 저장 시 저장온도에 따른 미생물 생균수의 변화를 측정하기 위하여 발효제품을 5, 10, 20, 30°C에서 17일 동안 저장하면서 유산균수, 총균수, 효모수 및 곰팡이수의 변화를 측정한 결과, 유산균 생균수는 Fig. 1-44와 같이 모든 저장온도에서 저장기간이 경과함에 따라 생균수가 감소하였는데 예상과 달리 5°C에서 저장하였을 때 저장 3일째에 가장 급격하게 감소하였고 그 이후에는 일정한 수준을 유지하다가 저장 10일 후에 다시 감소하였다. 30°C에서 저장하였을 경우에는 저장기간 초기부터 유산균 생균수가 지속적으로 감소하였고 10°C와 20°C에서는 생균수의 감소속도가 가장 낮음을 알 수 있었다.

한편 총균수는 Fig. 1-45에서 나타낸 바와 같이 유산균 생균수와 거의 동일한 경향을 나타내었는데 이는 측정된 총균이 유산균이기 때문인 것으로 판단된다. 효모와 곰팡이는 본 제품에서 검출되지 않아 본 제품의 생산공정에 유산균 이외의 잡균 오염은 없는 것으로 확인되었다.

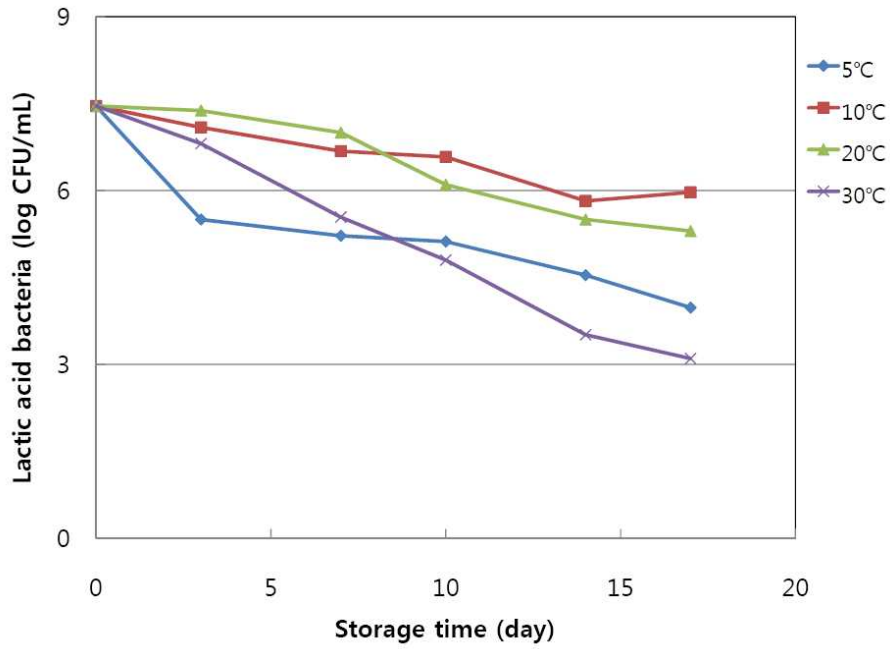


Fig. 1-44. Change in viable cell number of lactic acid bacteria of fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract during storage at different temperature.

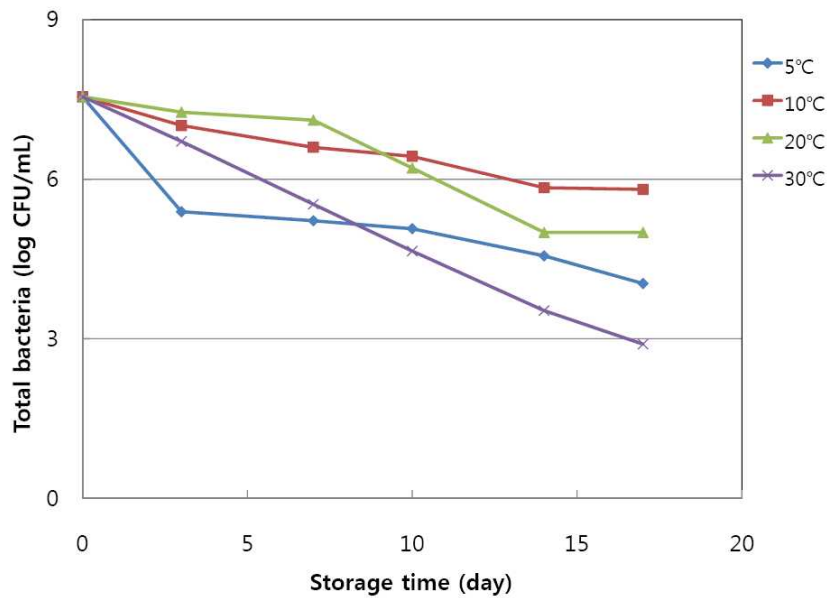


Fig. 1-45. Change in viable cell number of total bacteria of fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract during storage at different temperature.

차. 양파취 감소를 위한 masking 물질 탐색 연구

양파는 자체로 매운맛을 함유하기보다는 탈피나 절단과정 중 세포가 파괴될 때 양파에 함유된 화합물에 효소가 작용하여 매운 향미성분이 생성된다고 알려져 있다. 일반적으로 유기산은 이런 효소의 작용을 방해하고, 산도가 높으면 효소의 반응성이 낮아진다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 양파를 유기산 용액에 침지하여 유기산 종류와 농도에 따른 탈취 효과를 분석하였다. 양파 100 g을 0.5%(w/v)의 유기산 용액 200 mL에 일정 시간 동안 침지한 후 착즙하여 착즙액의 탈취효과를 관능평가를 통하여 특정한 결과는 Table 1-25와 같았다.

관능검사 결과 유기산 침지를 하지 않은 양파는 관능평가에서 가장 높은 점수를 받아 양파취가 가장 강한 것으로 나타났으며 24시간 침지하였을 때 사용한 6종의 유기산 모두 탈취효과를 나타내었다. Acetic acid는 3.50으로 유의적으로 양파 향이 많이 남아 있었으나 그 외의 유기산들은 유의적으로 동일한 탈취효과를 나타내었다. 한편 양파를 유기산 용액에 72시간 침지하였을 경우에는 malic acid 용액이 유의적으로 가장 탈취효과가 좋았고 그 외의 유기산은 24시간 침지 시보다 오히려 양파취가 증가한 것으로 나타났으나 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 침지시간에 따른 탈취효과를 보면 24시간 침지한 경우나 48시간 또는 72시간 침지한 경우 시간에 따른 탈취효과는 유의적인 차이를 나타내지 않았으므로 24시간 이상 침지할 필요는 없다고 판단되었다. 사용한 6종의 유기산 중에서 acetic acid를 제외한 5종의 유기산이 모두 유사한 탈취효과를 나타내었으므로 산업적으로 적용하기 위해서는 구매단가가 가장 낮은 유기산이 적당한 것으로 사료된다. 5종의 유기산들의 kg 당 구입단가를 보면 citric acid 12,500원, lactic acid 16,300원, malic acid 13,800원, phytic acid 400,000원, tartaric acid 17,500원으로 citric acid가 가장 저렴한 것으로 나타나 본 제품개발에 있어 양파의 탈취에 적합한 유기산으로 citric acid를 선정하였다.

양파의 탈취제로 선정된 citric acid의 농도별 탈취효과를 보면 Table 1-26과 같이 2.0%(w/v) 이상의 citric acid 용액이 가장 좋은 탈취 효과를 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았으므로 양파의 탈취를 위해서는 2.0%(w/v)의 citric acid 용액을 사용하는 것이 가장 적합한 것으로 확인되었다.

Table 1-25. Sensory evaluation of onion flavor treated with various organic acids

Organic acid (0.5%, w/v)	Soaking time (hr)		
	24	48	72
Onion ¹⁾	5.00±0.00 ^{c2)A3)}	5.00±0.00 ^{bA}	5.00±0.00 ^{dA}
Acetic acid	3.50±0.89 ^{bB}	2.60±0.75 ^{aA}	3.00±0.86 ^{bAB}
Citric acid	2.20±1.01 ^{aA}	2.15±1.14 ^{aA}	2.60±0.94 ^{bA}
Lactic acid	2.50±1.05 ^{aA}	2.30±1.03 ^{aA}	2.45±0.76 ^{bA}
Malic acid	2.00±1.03 ^{aA}	2.15±0.75 ^{aA}	1.70±0.73 ^{aA}
Phytic acid	2.30±1.03 ^{aA}	2.55±0.69 ^{aAB}	3.05±1.39 ^{bB}
Tartaric acid	3.10±0.97 ^{bA}	2.50±0.95 ^{aA}	4.05±1.05 ^{cB}

¹⁾Onion not treated with organic acid

²⁾Means±SD with different small superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

³⁾Means±SD with different capital superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 1-26. Sensory evaluation of onion flavor treated with different concentration of citric acid

Concentration (%)	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
Onion flavor	5.00±0.00 ^c	3.20±1.28 ^b	3.15±0.88 ^b	2.55±1.19 ^{ab}	2.25±1.21 ^a	2.23±1.14 ^a

¹⁾Means±SD with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

카. 양과 유산발효음료 분말화 제품 개발

일반적으로 유산균 발효유는 살균하지 아니하고 생균이 존재하는 제품으로 생산 판매함으로써 생균이 지니는 생리활성을 유지시키고 있다. 그러나 유산균을 생균형태로 유통 판매하기 위해서는 전 유통과정에 있어 냉장 보관해야 하는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해서 최근에는 유산균 배양액을 동결건조함으로써 상온에서도 유산균이 사멸되거나 제품의 변질을 야기하지 않으면서 유통시킬 수 있는 제품이 개발되고 있으며 이

러한 동결건조 제품은 분말의 형태 그대로 섭취하는 것이 많다.

본 연구과제에서도 양파 유산발효음료를 음료의 형태 이외에 분말 등의 다양한 형태로 제품을 개발한다면 소비자의 다양한 기호를 충족시킬 수 있으며 상온에서도 장기간 유통할 수 있는 장점이 있기 때문에 우선적으로 본 연구과제에서 개발된 양파 유산발효음료를 동결건조하여 분말화시키고자 하였다. 동결건조는 제3세부과제에서 확립한 formulation을 통하여 완제품을 제조하고, 제조된 완제품을 대상으로 수행하였다. 즉, 연구방법에 설명한 바와 같이 양파 착즙액의 발효액 27%(v/v), 사과즙 27%(v/v), 액상과당 3.8%(v/v), β -cyclodextrin 1.86%(w/v), 올리고당 0.9%(v/v), 사과향 0.2%(v/v), 정제수 39.25%(v/v)의 비율로 배합하여 양파 유산발효음료 완제품을 제조한 후 동결건조시켜 분말화 제품을 제조하였다.

제조된 분말화 제품은 분말 상태 그대로 섭취하는 방법도 있지만 물을 일정량 첨가하여 복원시킴으로써 발효음료 고유의 관능성을 나타내는 방법을 사용하여 복원된 제품의 기호성을 조사하였다. 분말 제품의 복원은 예비평가 시 분말제품을 정제수를 이용하여 40, 50, 75, 100, 125, 150, 160%로 복원시켜 총 7가지 시료를 제조하였으며 이 중에서 기호도가 높고 유의적인 차이가 있는 시료 4가지(50, 75, 100, 150%)를 선정하였다. 본평가는 예비평가에서 선정한 50, 75, 100, 150%로 복원시킨 시료를 사용하여 관능검사를 실시하였다. 그 결과 Table 1-27과 같이 150%로 복원시킨 1번 시료의 기호도가 가장 낮게 나왔으며, 100% 복원시킨 2번 시료와 75% 복원시킨 3번 시료는 유의적인 차이가 없었다. 기호도가 가장 높은 시료는 50% 복원시킨 시료로서 시료 중에서 양파 발효액 함량이 가장 높은 제품의 기호도가 가장 높았다. 이는 양파 발효액의 함량이 높을수록 양파의 향미가 강하게 느껴짐과 동시에 단맛과 신맛 등도 함께 강해져 소비자들의 입맛을 자극시킴으로써 높은 기호도를 받은 것이라 사료된다.

Table 1-27. Sensory evaluation of reconstituted dried powder of fermented onion juice

Sample	N	Subset		
		1	2	3
1	24	3.4583		
3	24		7.0417	
2	24		8.0417	
4	24			11.2083
Probability		1.000	.257	1.000

Sample 1: 150% dilution, sample 2: 100% dilution, sample 3 : 75% dilution, sample 4: 50% dilution

타. 양파 유산발효의 scale-up 조건 확립

양파 유산발효제품의 대량생산을 위해서는 발효공정 등을 비롯한 각 단위공정의 scale-up이 필요하며 이와 관련된 연구는 제2협동과제와 공동으로 수행하였다. 전체적인 제조공정을 보면 우선 선별과정을 거친 양파는 박피공정을 통하여 과육 부분과 껍질 부분으로 분리한 후 세척한다. 과육 부분은 세절공정과 탈취공정을 거쳐 양파취를 감소시킨 후 착즙 또는 추출공정과 불용성물질 제거를 위한 청징화 공정과 살균공정을 실시하여 발효를 위한 원료액을 제조한다. 이후 starter 균주인 유산균을 접종시켜 발효공정을 실시한다. 분리된 껍질 부분은 건조 후, 분쇄과정을 거쳐 추출공정을 통하여 껍질 부분에 풍부하게 존재하는 flavonoid 성분을 추출하여 농축시킨다. 농축 추출액은 발효가 끝난 시점에서 제품 제조 과정 중 당 및 기타 첨가물을 혼합할 때 적정량 첨가한다. 분말제품을 생산할 경우에는 동결건조 공정을 도입한 후 포장단계를 거쳐 냉장 보관한다. 양파 유산발효제품의 대량생산공정 상의 주요공정에 관한 최적조건은 양파 40 kg을 이용하여 확립하였다.

(1) 탈취공정

양파는 자체로 매운맛을 함유하기보다는 탈피나 절단과정 중 세포가 파괴될 때 양파에 함유된 화합물에 효소가 작용하여 매운 향미성분이 생성된다고 알려져 있으며, 이러한 향은 제품의 관능성에 매우 부정적인 요소로 작용하므로 가급적 제거하여야 한다. 양파 특유의 향을 제거하기 위하여 본 연구의 세부과제와 제2협동과제에서 착즙액을 활성탄 column에 통과시키거나 세절한 양파를 유기산에 침지하는 방법을 사용하였는데 활성탄 column을 사용하였을 때보다 2%(w/v) citric acid로 24시간 침지하였을 때 탈취효과가 보다 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 활성탄 column을 사용할 경우에는 일부 활성탄 가루가 착즙액에 용출되어 나오는 문제점이 있기 때문에 탈취공정은 2%(w/v) citric acid로 24시간 침지하는 방법을 채택하였다.

Table 1-28. Sensory evaluation of onion flavor treated with citric acid or active carbon column

Treatment	Sensory evaluation
Onion ¹⁾	5.00±0.00 ^{c2)}
Active carbon	3.12±1.13 ^b
Citric acid (2%, w/v)	2.31±1.05 ^a

¹⁾Onion not treated with citric acid nor active carbon

²⁾Means±SD with different small superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(2) 추출 또는 착즙공정

양파의 유산균 발효를 위해서는 양파를 열수 추출하거나 착즙하여 추출액 또는 착즙액을 제조해야 한다. 열수 추출을 위해서는 양파에 일정량의 정제수를 가한 후 일정 온도에서 추출해야 하는데 경제성을 고려할 경우 최소 부피의 정제수를 가하여야 한다. 예비 실험 결과 효율적인 추출을 위해 양파가 정제수에 완전히 잠기는 최소한의 부피는 양파 무게의 1배량에 해당하는 것으로 확인되었다. 추출온도는 추출기를 사용하여 상압에서 실시할 경우 정제수가 설정온도에 도달하는 시간이 장시간 소요되므로 autoclave를 사용하였다. Autoclave의 최저 설정온도인 105℃와 110, 121℃에서 각각 10, 20, 30분 추출한 후 추출액을 이용하여 발효하였을 경우 추출온도와 시간에 상관없이 발효특성이 유사한 것으로 나타나 최저온도와 시간인 105℃에서 10분을 추출 최적조건으로 확립하였다. 착즙기를 이용하여 착즙을 할 경우 정제수나 가열 등의 추가적인 원료나 에너지가 요구되지 않지만 본 연구에서는 대용량 착즙기를 확보하고 있지 않으므로 향후 상용화 시 추가적인 연구를 통하여 착즙공정 최적화를 수행하고 추출공정과의 경제성 비교를 할 필요가 있다. 소용량 착즙기를 이용한 공정 특성은 제2협동과제에서 조사하였다.

(3) 발효공정

발효공정은 양파 착즙액의 부피를 1 L로 scale-up하여 확립한 조건과 동일하게 하여 수행하였다. 양파 착즙액의 pH를 5.0으로 조정 후 살균공정을 거친 다음 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 혼합한 starter를 2%(v/v) 접종하여 37℃에서 발효하면서 600 nm에서의 흡광도와 pH, 산도를 조사하였다. 그 결과 Fig. 1-46에서와 같이 균주의 생육은 8시간까지 대수증식기를 유지하였으며 그 이후 18시간까지 지속적으로 증가함을 알 수 있었다. 발효액의 pH 변화는 Fig. 1-47에 나타난 바와 같이 발효초기부터 pH가 감소하기 시작하여 발효 10시간에 pH 4 이하로 감소한 후 12시간부터는 일정한 값을 유지하였다. 발효액의 산도 변화는 Fig. 1-48에 나타내었는데 발효 6시간 이후부터 18시간까지 산도가 급격하게 증가한 후 그 이후부터 더 이상 증가하지 않고 일정한 값을 나타내었다. 이상의 결과는 양파 착즙액의 부피를 1 L로 scale-up하여 발효할 때와 거의 같은 현상으로 40 L 발효에서도 1 L 발효에서 확립한 조건과 동일하게 적용할 수 있음을 보여 주는 것이다.

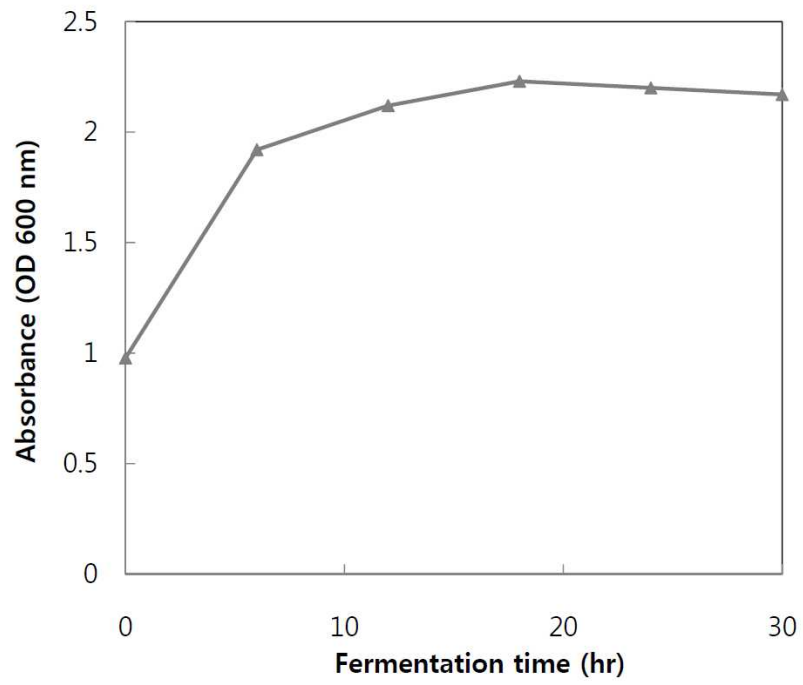


Fig. 1-46. Growth of starter in onion juice during the fermentation with volume of 40 L.

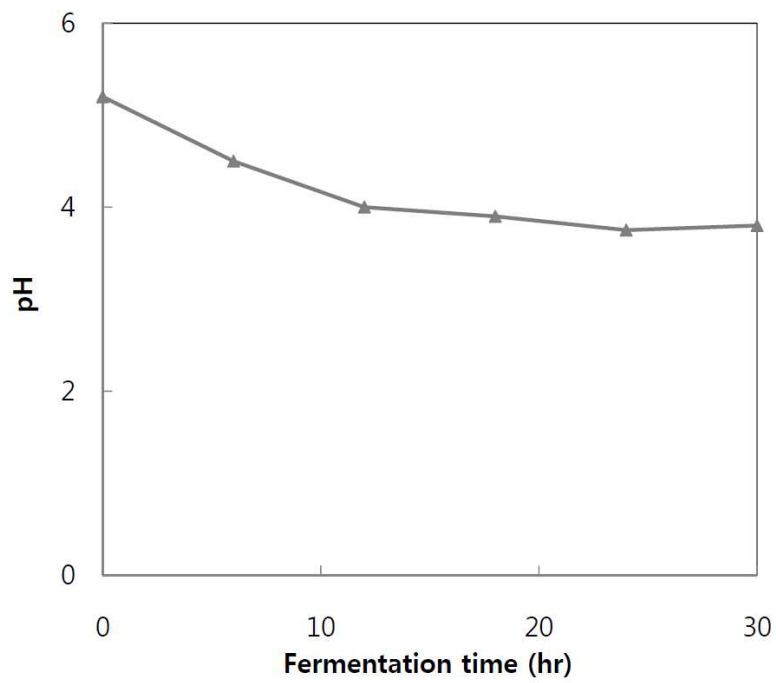


Fig. 1-47. pH of onion juice during the fermentation with volume of 40 L.

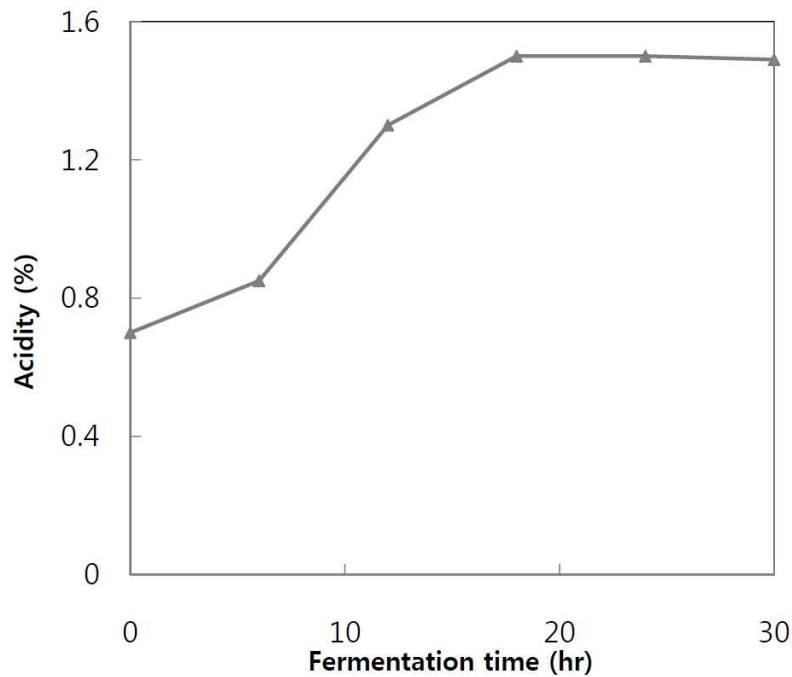


Fig. 1-48. Acidity of onion juice during the fermentation with volume of 40 L.

이상의 결과로부터 주요 공정별 scale-up 조건을 정리하면, 우선 과육부분의 탈취공정은 2% citric acid(v/v)가 담겨진 저장탱크에서 24시간의 침지한다. 이후 추출액의 pH를 5.0으로 조정 한 후 살균공정을 수행하는데 살균공정은 105℃에서 10분간 autoclave할 경우 총균, 효모, 곰팡이가 검출되지 않는 것으로 확인되었지만 저장 시 유통기한을 최대로 확보하기 위하여 121℃에서 15분간 autoclave하는 것을 최적 조건으로 확립하였다. 과피로부터 quercetin의 추출공정은 59℃의 56% ethanol을 이용하고, 발효공정은 starter 균주 전 배양액을 살균한 양파 추출액에 최종 농도가 2%(v/v) 되도록 접종하여 37℃에서 24시간동안 혐기 발효한다. 발효가 완료되면 부재료를 첨가하는 배합공정을 수행하는데 양파 발효액 10%(v/v), 배 농축액 2.38%(v/v), citric acid 0.2%(v/v), 팽화홍삼 농축액 0.02%(v/v), 올리고당 5%(v/v), 고과당 10%(v/v), 아카시아별꿀 2%(v/v), 비타민 C 0.2%(w/v), 배향 0.2%(v/v), quercetin 추출물 0.29%(w/v), 정제수 69.61%(v/v)의 비율로 배합하여 양파 유산발효음료를 제조한다. 분말제품을 생산할 경우에는 동결건조 공정을 도입하여 제품화한다. 자세한 사항은 제 3장 제 3절에서 기술하였다.

상기 제조공정을 이용하여 양파 추출액 40 L를 이용하여 양파발효음료를 제조하였으며 투명 유리병에 180 mL씩 병입하여 시제품을 제조하였다.

파. 발효제품의 대량생산을 위한 각 제조공정별 제어기술 개발 및 공정 설계

양과유산발효제품의 대량생산을 위해 각 제조공정별 제어기술개발이 요구되는데 본 연구에서는 제2협동과제와 공동으로 대량생산의 가장 핵심적인 공정인 추출공정과 발효공정의 제어기술을 개발하였다.

양과 껍질부분의 추출공정 및 양과 과육부분의 발효공정에서 가장 중요한 변수인 온도를 제어하기 위하여, Governing equation을 이용하여 에너지 수지식을 설계하여 MATLAB program의 확장도구인 Simulink를 사용하여 Laplace 전달 함수식을 블록선도에 표현하였다. 블록선도에 사용된 Laplace 전달 함수식을 AVR board에 코딩한 Micro Controller Unit을 개발하면 산업화 현장에서의 온도 제어 하드웨어로 이용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

제조공정별 제어기술 개발 및 공정 설계에 관한 자세한 내용은 제 3장 제 3절에서 기술하였다.

하. 대량생산 시 경제성을 고려한 양과취 감소방법 개발과 포장공정 도입

양과 유산발효음료 개발 시 가장 문제가 되는 양과취 감소방법은 활성탄을 이용하는 방법과 유기산 침지를 이용하는 방법이 있다. 본 연구에서 활성탄과 유기산을 이용하는 방법을 모두 시도한 결과 두 방법 모두 관능적으로 유의성 있게 양과취를 감소시켰으나 활성탄을 이용할 경우에는 제품 중에 활성탄이 유입되는 문제점이 발생하여 생산공정에 도입하기 어렵다고 판단하였으며 유기산 중에서 malic acid, lactic acid, citric acid가 모두 양과취 감소에 효과가 있었으나 citric acid가 가장 구입 단가가 낮았으므로 경제성을 고려할 때 citric acid를 2%(v/v) 사용하여 24시간 이상 침지하는 공정을 탈취공정으로 도입하였다.

포장공정은 제3세부과제와 공동으로 수행한 바 제 3장 제 4절에 관련 사항을 기술하였다.

3. 결 론

양과 착즙액을 이용한 고기능성 유산발효음료를 제조하기 위해서 과채류로부터 702주의 유산균을 분리하였다. 분리 균주들을 양과 착즙액에 2%(v/v) 접종하여 37℃에서 48시간동안 발효 시 산도가 초기산도보다 8배 이상 증가한 61주의 균주를 1차 선별하였다.

1차 선별된 61주를 대상으로 양과 착즙액과 팽화홍삼 추출액을 최종 1 °Brix가 되도록

첨가한 양과 착즙액을 이용하여 분리 유산균의 발효능을 37℃에서 96시간동안 측정하여 유산 발효능이 우수한 16 균주를 2차 선별하였다.

2차 선별한 16 균주들을 이용하여 양과 착즙액을 유산 발효시킨 후 발효액의 여러 가지 생리활성을 측정한 결과, 높은 발효능을 지니고 있는 16주의 분리 균주 중에서 전자공여능, 아질산염 소거능 등과 같은 항산화활성과 식중독 세균에 대한 항균활성이 우수한 6 균주(CA010, CA025, GO029, KC007, PG011, RP011)를 선정하여 동정 및 최종 starter 선정에 사용하였다.

균주의 동정을 위해 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과 KC-007, RP-011, CA-010(Fig. 3)은 *Pediococcus pentosaceus*로, CA-025, GO-029는 *Leuconostoc mesenteroides*로, PG-011은 *Leuconostoc citreum*으로 동정하였으며, *P. pentosaceus* KC-007을 본 연구의 발효를 위한 starter 균주로 최종 선정하였다 (GenBank accession No. EU569832).

최종 선정된 starter를 이용하여 양과 착즙액의 발효 특성을 분석한 결과, 양과 착즙액을 발효시키기 위하여 첨가하는 starter는 600 nm에서의 흡광도가 1.0인 배양액을 사용하여 양과 착즙액에 2%(v/v)가 되도록 첨가함으로써 양과 착즙액에 1×10^7 CFU/mL의 유산균수가 되도록 접종량을 결정하였다.

P. pentosaceus KC-007의 MRS 종배양액을 여러 가지 pH로 조정한 양과 착즙액에 2%(v/v) 접종한 후 54시간까지 발효시킨 결과 초기 pH 5-8에서는 pH에 따른 생육도가 시료간에 큰 차이를 나타내지 않았으며 발효 18시간부터는 흡광도가 더 이상 증가하지 않았다.

유산발효에 미치는 발효온도의 영향을 보면, 발효온도를 35℃와 40℃로 하였을 경우 균주의 생육이 가장 좋았고 25℃에서 가장 저조하였다. 산도는 40℃에서 발효시킨 시료의 산도가 가장 급격하게 증가하였고 발효온도가 낮아질수록 산도의 증가도가 낮아짐을 알 수 있었으며 이상의 결과로부터 유산발효를 위한 최적 발효온도는 40℃인 것으로 확인하였다.

양과 착즙액의 starter 접종량에 따른 균주의 생육도, 산도, pH의 영향을 조사한 결과 접종량을 2%(v/v)로 하였을 경우 초기 6시간까지의 생육도가 가장 좋았으며 발효 18시간까지는 1%(v/v)와 2%(v/v) 접종하였을 때 높은 산 생성능을 보여주었다.

양과 착즙액 발효를 1 L 또는 40 L로 scale-up하였을 경우 초기 pH는 산 생성량이 초기에 가장 높은 pH 5인 것으로 판단되었고 최적 발효온도는 균주의 생육이 가장 좋고 산생성속도가 가장 빠른 온도인 37℃로 확정하였다. 발효시간은 유산균 생균수와 산도가 발효 18시간까지 급격히 증가한 후 그 이후부터는 일정한 수준을 유지하였기 때문에 유

산발효의 최적 시간은 24시간으로 확정하였다. 양과 착즙액 농도에 따른 발효능을 조사한 결과 산도와 유산균 생균수가 가장 높은 양과 착즙원액이 유산발효에 가장 적합한 것으로 확인되었다.

이상의 결과로부터 양과 착즙액의 유산발효를 위한 최적조건은 양과 착즙액 원액을 pH 5.0으로 조정한 후 *P. pentosaceus* KC-007을 2%(v/v) 접종한 다음 37°C에서 24시간 발효하는 것으로 확립하였다.

양과 착즙액에 팽화 홍삼 추출액의 첨가량을 달리하면서 *Pediococcus pentosaceus* KC-007을 이용하여 유산발효시킨 후 발효액의 특성과 생리활성을 조사한 결과 팽화 홍삼 추출액의 첨가량에 관계없이 발효 24시간에서 가장 높은 생균수를 나타내었다. 발효액의 산도는 팽화홍삼의 첨가량에 관계없이 모든 시료구에서 발효가 진행됨에 따라 증가하였으며 발효액의 pH는 발효 36시간까지 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 발효액의 전자공여능과 아질산염 소거능은 1%(w/v) 이상의 팽화 홍삼 추출액을 양과 착즙액에 첨가하여 발효하였을 때 가장 높은 수치를 나타내었다.

간균으로서 *Lactobacillus acidophilus*와 *L. casei*를, 구균으로서 *Streptococcus thermophilus*를, Bifidobacteria로서 *Bifidobacterium infantis*와 *B. bifidum*을 선정하여 본 연구에 사용한 *P. pentosaceus* KC-007과 혼합 스타터로 사용한 후 이에 따른 발효능을 조사한 결과 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 혼합접종하여 발효하는 것이 가장 높은 산도와 우수한 유산균 생균수를 나타내고 SOD 유사활성도 비교적 높은 것으로 확인되었다.

양과 착즙액 유산발효제품의 저장성을 조사하기 위하여 발효제품을 5, 10, 20, 30°C에서 18일 동안 저장하면서 이화학적 특성과 미생물수의 변화를 측정된 결과 5°C와 10°C에서는 산도변화가 거의 없었고 환원당은 5°C와 30°C에서는 저장기간 동안 큰 변화를 나타내지 않았다. 유산균 생균수는 20°C에서는 유산균수가 저장기간이 경과하여도 크게 감소하지 않았고 30°C에서는 저장 4일째까지는 유산균수의 변화가 거의 없다가 그 이후 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 효모와 곰팡이는 본 발효제품에서 검출되지 않았다.

팽화 홍삼 추출액을 첨가한 양과 착즙액 유산발효제품의 저장성을 조사하기 위하여 발효제품을 5, 10, 20, 30°C에서 17일 동안 저장하면서 이화학적 특성과 미생물수의 변화를 측정된 결과 5°C에서는 산도변화가 거의 없었고 20°C와 30°C에서는 저장 초기부터 산도 증가가 이루어졌다. 유산균 생균수는 모든 저장온도에서 저장기간이 경과함에 따라 생균수가 감소하였다. 효모와 곰팡이는 본 발효제품에서 검출되지 않아 본 발효제품의 생산 공정에 유산균 이외의 잡균 오염은 없는 것으로 확인되었다.

양과취 감소를 위해 양과를 유기산 용액에 침지하여 유기산 종류와 농도에 따른 탈취

효과를 분석한 결과 양파의 탈취에 적합한 유기산으로 citric acid를 선정하였으며 2.0%(w/v)의 citric acid 용액으로 24시간 침지하는 것이 탈취에 가장 효과적인 것으로 확인되었다.

상온에서도 장기간 유통할 수 있는 제품을 개발하기 위하여 본 연구과제에서 개발된 양파 유산발효음료를 동결건조하여 분말화시킨 후 물을 일정량 첨가하여 복원시킨 다음 복원된 제품의 기호성을 조사한 결과 50%의 부피비로 복원시킨 제품의 기호도가 가장 높았다.

이상의 연구결과에 의해 양파의 유산발효제품의 제조공정을 확립하였다. 즉, 양파를 세척한 후 8등분한 다음 양파취를 제거하기 위하여 2%(%) citric acid 용액에서 24시간 동안 침지하고 착즙한 다음 121℃에서 10분간 가열처리하고 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거한다. 양파 착즙액의 pH를 5.0으로 조정한 후 121℃에서 15분간 가열살균한 다음 대수증식기까지 생육한 *P. pentosaceus* KC-007과 *B. bifidum* ATCC 15696을 1:2의 비율로 혼합한 starter를 2%(v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 동안 발효시킨다. 발효가 완료되면 상온까지 냉각한 다음 양파 발효액 10%(v/v), 배 농축액 2.38%(v/v), citric acid 0.2%(v/v), 팽화홍삼 농축액 0.02%(v/v), 올리고당 5%(v/v), 고과당 10%(v/v), 아카시아별꿀 2%(v/v), 비타민 C 0.2%(w/v), 배향 0.2%(v/v), quercetin 추출물 0.29%(w/v), 정제수 69.61%(v/v)의 비율로 배합한 후 병에 충전하여 양파 유산발효음료 제조를 완료한다. 양파 유산발효액의 분말제품을 제조하기 위해서는 상기 공정과 동일하게 수행한 후 formulation 공정 다음에 동결건조 공정을 추가하여 분말화한다.

추출공정 및 발효공정을 제어하기 위하여 Governing equation을 이용한 에너지 수지식을 설계하여 MATLAB program의 확장도구인 Simulink를 사용하였다.

제 2 절 기능성 양파식초음료 개발

1. 서론

양파 (*Allium cepa* L.)는 organosulfur를 함유하는 백합과 채소 중 가장 널리 식용되는 식물로서 양파의 주성분은 glucose, fructose 및 sucrose 등의 당분으로 단맛이 아주 독특하며, 다른 음식물과 곁들여 먹으면 비타민 B₁의 흡수가 촉진되어 신진대사가 높아지고 피로 회복이 빨라 스테미너가 증강된다고 알려져 있다(Cho and Yoo, 1997).

양파의 생리활성기능에 관한 연구로는 Gupta(1966)의 심혈관계 질환 예방, Menon 등(1968)의 혈당 저하효과, Hur 등(1985)의 항산화 효과 및 Sheo 등(1997)의 납 독성의 해독 효과 등이 있으며, Park 등(1991)은 혈청 중의 지질함량을 낮추고 CCl₄ 독성을 완화시키는 작용이 있으며, 간지질의 과산화를 억제시키는 효과(Park et al., 1994) 및 DNA 손상 억제 효과 등(Park and Lee, 1992)을 보고하였다. 최근 연구에서 항균(Sheo, 1999), 항암(Ma, 2000), 항산화(Lee et al., 2000, Jain and Vyas, 1973) 및 중금속 제거 효과 등(Sheo et al., 1997), 양파의 다양한 생리활성기능이 밝혀져 민간요법의 효능이 재확인되고 있으며, 이들 특성은 주로 S-alkyl 또는 S-alkenyl thiosulfinate류 및 sulfide 류 등의 함황화합물에 기인하며(Block et al., 1992a; Block et al., 1992b), 이와 더불어 flavonoid의 일종인 quercetin은 심혈관 질환을 비롯하여 유방암, 대장암, 난소암, 위암, 폐암, 방광암 등의 억제에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

그러나 대표적인 조미채소인 양파는 저장성이 낮아 저장 중 조직의 부패, 연화 등으로 인하여 전체 생산량의 10~20%가 상품적 가치를 상실하여 퇴비로 이용하거나 버려지고 있는 실정이어서 양파 경작 농민의 안정적인 소득을 위해서는 소비대책 마련과 가공 및 저장 기술의 개발이 시급하다고 할 수 있다.

한편 식초는 동서양을 막론하고 오랜 옛날부터 이용되어온 전통식품으로 소량의 휘발성 및 비휘발성의 유기산, 당류, 아미노산, ester 등을 함유한 독특한 방향과 신맛을 지닌 대표적인 발효식품이다. 초산발효는 초산균의 작용으로 알코올이 산화되어 초산을 생성하는 호기적 발효로 발효산물인 식초의 신맛은 소화기관을 자극하여 소화액의 분비를 촉진함으로써 소화작용을 돕고 청량감을 줌으로써 식욕을 돋운다. 식초는 음식을 조리할 때 신맛을 내게 하는 조미료로 쓰이는 것은 물론 생선의 비린내를 감소시키고, 육류를 연하게 하는 등 조리에 다양하게 이용되고 있으며, 소스, 마요네즈, 드레싱, 케찹의 원료, 향미제로도 이용되고 있다.

또한 식초는 초산을 비롯하여 TCA cycle에 관여하는 유기산을 다량 함유하고 있어서 체내에 젖산을 축적시키지 않고 TCA cycle을 순조롭게 진행시켜 과격한 운동이나 과로에 의한 피로회복에 좋으며 혈액을 약알칼리성으로 만들어 주는 작용을 한다. 또한 식초

는 다이어트에 효과가 있고 과산화지질을 분해하여 동맥경화를 예방하며, 스트레스를 관리하는 부신피질 호르몬의 분비를 촉진하고, 소화 및 식욕촉진에 효능이 있다고 알려져 있으며, 혈압 강하, 피로 회복, 칼슘 흡수 촉진 등 여러 가지 생리적 기능을 지니고 있다.

식초에 대한 연구는 식초의 생산방법이나 이화학적 분석, 관능적 특성을 연구하는 것으로 구분할 수 있으며, 식초의 생산방법에 관한 연구로는 식초의 생산성을 증대시키거나 다양한 원료를 배지에 첨가하여 발효시킬 때 최적의 생산조건을 설정하는 연구로 요약할 수 있다. 대부분의 연구들이 식초의 최종 산도에 초점을 맞추고 있으며, 심부배양에 의한 반연속식 발효나 고정화 담체, twin bioreactor를 이용한 연속식 발효에 있어서도 식초의 최종산도는 5~7% 정도로 알려져 있다.

한편 반연속식과 회분식을 조합한 초산 발효에서 여과된 초산 균체를 중간단계에서 첨가시켜 균체의 농도를 증가시켜 최종 산도를 18% 이상으로 올리거나 1 단계에서 일반적인 반연속식 초산발효를 실시하고 이 발효액을 2 단계로 이송하여 에탄올을 유가식으로 첨가하여 초산 생산성의 저하를 막는 일련의 two stage 발효로 17% 이상의 식초를 생산한 보고(Lee et al., 1992)도 있다. 이러한 연구결과들을 볼 때 고산도 식초의 생산도 물론 중요하지만 장시간 소요의 문제점과 과도한 희석으로 인한 원료의 성분 희석의 문제점도 발생됨에 따라 산도 4% 이상의 속성발효도 산업적으로 유용할 것으로 판단된다.

식초를 생산하는 대표적인 균주로는 *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans* 등을 들 수 있으며, 이들 균주들은 Gram 음성이며 운동성의 호기성 간균 또는 구균으로 포자를 형성하지 않는다. *Gluconobacter* sp.는 알코올보다 당을 더 선호하며 초산을 재산화시킬 수 있는 능력이 없는 반면 *Acetobacter* sp.는 초산을 재산화시킬 수 있는 TCA회로를 가지고 있다. 과즙이나 곡물당화액을 이용한 식초의 제조방법으로 알코올 발효와 초산발효를 연속적으로 실시하는 경우와 주정을 희석하여 초산 발효만을 실시하는 경우로 구분할 수 있다.

알코올 발효 실시 여부에 따라 식초의 화학성분에 차이가 생길 수 있으며 원료의 종류, 사용균주, 제조방법, 발효조건 숙성조건에 따라 sprit vinegar와 과즙 및 곡물식초는 함유 성분들의 종류 및 함량에 차이를 나타내게 된다. 초산을 비롯하여 각종 유기산, 당, 아미노산 등의 영양 및 생리작용에 대한 연구가 진행되고 있으나 초산의 생산성에만 국한되어 이러한 인자들과 기호성과 관련 있는 연구는 거의 없다고 할 수 있으며, 그 중 기호성과는 생산균주의 전체 유기산에 대한 초산의 비율이 가장 중요한 요인으로 판단된다.

식초의 향기성분에 관한 연구를 살펴보면 원료, 알코올 발효 후, 초산 발효 후 broth 등에서 휘발성 성분의 차이를 나타내게 되는 데, cider vinegar 제조 시 unfermented cider stock, fermented cider에서 휘발성 성분의 차이가 발생하여 unfermented cider에서는 5개의 성분만 발견되었으며 fermented cider에는 12개의 휘발성 성분이 있음이 보고

되었다. 특히 fermented cider에는 propanol이 존재하나 methyl acetate가 없었으며 cider vinegar에서는 반대의 결과를 보여주었고 3-hydroxy-2-butanone은 알코올 발효에서는 미량 생성되고 주로 초산 발효과정에서 대부분 생성되는 것으로 나타났다. 이와 같이 분석 시료의 수가 극히 제한적이지만 식초의 화학성분을 비휘발성 유기산, 당, 아미노산, 휘발성 성분 등으로 구분하여 연구한 적이 있음에도 기초연구에만 국한되어 상품성과 관련된 기호도와 연관된 제한된 연구만 있어서(Shin et al., 2002; Park et al., 1999), 양조식초에서 효모와 초산균의 이단발효와 주정희석 초산발효와의 기호성 비교에 대한 연구도 수행할 필요가 있다.

일반적으로 양조식초의 연구된 자료를 보면 알코올 발효기간은 24시간 정도에 종료되지만 초산발효 기간이 6일에서 8일 정도로, 기존의 전통적인 병행 복발효법으로 제조 시 6, 7개월의 장시간이 소요되는 문제점을 많이 개선하였으나 보다 상업적인 측면에서 볼 때 배지조성에 따른 초산균의 생육을 최적화한 속성발효에 대한 연구도 필요하다고 할 수 있다. 국내에서 양조식초는 알코올을 주원료로 사용하고 곡물이 4% 이상 함유된 곡물식초, 과즙이 30% 이상 함유된 과실식초의 형태로 시판하고 있다. 식초의 종류별 생산비율은 양조식초 50%, 사과식초 36%, 현미식초 12%, 기타 2%로 양조식초의 소비가 매년 증가하는 추세이다. 100% 순수한 과실만을 원료로 사용하여 자연발효시킨 천연양조식초인 감식초 및 포도 식초는 극히 일부 생산되고 있으나, 1인당 식초 소비량은 0.38 L 정도로 1인당 2 L를 소비하는 선진국 수준에 크게 미치지 못하고 있는 실정이다.

국내 식초 시장은 2008년 기준으로 약 698억 원대의 매출을 보이고 있는데, 이 중에서 조미 식초가 2004년도에는 전체 시장의 약 77%를 차지하다가 2008년 도에는 약 40%로 줄어들고 마시는 식초의 소비가 급격히 증가하여 2004년도의 23%에서 2008년도에는 60%로 증가된 약 416억 원의 시장규모를 형성하고 있다. 마시는 식초는 일반 사과식초나 현미식초 등 조미용 양조식초가 아닌 과일이나 현미, 벌꿀 등이 들어간 천연발효 식초를 말한다. 장수국가인 일본의 '마시는 식초' 시장은 4천억 원 대로 알려져 있으며 지난해 일본 30대 히트 상품 가운데 6위가 '흑초'(현미로 만든 검은 식초)일 정도이다.

일본의 경우 현재 50 여종의 식초 음료가 출시되어 있으며, 마시는 식초 시장이 조미 식초 시장의 3 배에 달하고 있다. 이에 우리나라도 마시는 식초 음료 시장의 활성화가 더욱 예견되고 있다. 그러나 국내 시장에서는 자극적이고 톡 쏘는 신맛 탓에 마시는 음료로서는 인기가 없었으나 최근 붐을 주도하는 것은 자극적인 맛을 없애고 우유나 물에 타서 먹는 음료대용의 식초이다. 업계 관계자는 "마시는 식초 인기가 계속 이어지면 일본처럼 '마시는 식초' 시장규모가 향후 수년 안에 양조식초 시장을 추월할 것"이라고 한다. 식품업계 전문가들은 "희석식 식초음료가 시장을 주도하고 있는 가운데 간편함과 최적의 맛, 저렴한 가격을 내세운 음료타입 식초음료의 도전으로 향후 식초 음료시장이 더욱 치열해질 것"으로 전망하고 있다.

현재 국내에서 생산되고 있는 마시는 식초음료는 (주)대상의 감식초, 청정원의 마시는 흥초, 롯데칠성음료의 웰빙 현미흑초, 사랑초, 샘표식품의 샘표 마시는 벌꿀 흑초, CJ의 미초, 신동방의 해표 마시는 감식초, 웅진식품의 그의 흑심, 그녀의 초심, 한국야쿠르트의 여인미, 사과초 등이 있으나 양파를 원료로 한 식초는 개발되어 있지 않는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 양파의 낮은 저장성에 대한 활용도를 높이고, 양파의 기능성과 식초의 기능성을 동시에 갖춘 양파식초를 개발하기 위하여 복숭아 낙과로부터 초산생성능이 우수한 초산균을 순수 분리하고, 이 균의 특성을 조사하였다. 또한 분리한 초산균의 양파즙에 대한 양조식초 생산에 관한 배양특성과 반응표면분석법을 활용한 최적의 배양조건을 연구하였다. 이러한 기본 자료를 토대로 양파식초를 산업화하기 위해 필수적인 발효조(fermentor)를 사용하여 효모와 초산균을 활용한 양파식초 2단계 발효특성과 주정과 초산균만의 양파식초 발효특성을 연구하였으며 기호도와 관련된 관능검사 및 유기산 분석을 수행하였으며, 기능성에 대한 연구로 양파식초의 혈전용해능과 항혈전기능 유무를 조사하였다. 식초 발효과정에서 에탄올의 초산균 생육저해문제 해결과 산도의 연속적인 증가를 위한 유가식배양(fed-batch culture)을 심도 있게 연구하였으며, 양파식초의 산업적인 대량생산의 필수적인 전단계인 pilot 규모의 발효조 배양을 수행하였다.

2. 연구 방법

가. 실험재료 및 사용균주

본 실험에 사용한 초산균은 장호원에 있는 과수원의 낙과복숭아로부터 분리하였으며 초산균을 분리하기 위한 배지조성은 Table 2-1에 나타내었다.

Table 2-1. Medium composition for isolation of acetic acid bacteria

Modified YCE medium		GYP medium	
Glucose	3 g	Glucose	1.5 g
Peptone	1 g	Peptone	0.3 g
Beef extract	1 g	Yeast extract	0.2 g
Ethanol	4 mL	Ethanol	3 mL
CaCO ₃	1 g	Acetic acid	1 g
Agar	1.5 g	Distilled water	93.97 mL
Distilled water	88.3 mL		

나. 고산도 생산균주 선별

신 냄새가 나는 낙과 복숭아를 무균적으로 마쇄한 액을 취해 modified YCE 배지 (Table 2-1)에 반복 도말, 배양하여 얻은 단일 colony를 희석도말한 다음 30°C에서 4일간 평판배양한 후 생성된 투명환(clear zone)의 크기를 확인하였다. 투명환의 크기가 큰 10균주를 선발하여 반복적으로 순수분리하여, 살균된 GYP배지에 30°C에서 7일간 150 rpm에서 진탕배양하여 초산 생성력이 가장 우수한 균주를 선별하여 실험에 사용하였다.

다. 분리균주의 동정

(1) 형태학적·생리학적 분석

분리된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 기초하여 형태학적, 생리학적 특성을 조사하였다. 균주의 형태학적 특성을 분석하기 위하여 Gram 염색, KOH 시험, 운동성, 포자 염색 등을 실시하였고, 생리학적 특성을 분석하기 위해서는 decarboxylase test, MR test, VP test, oxidase test, indole test, gelatin test 등을 실시하였다.

(2) 분자유전학적 분석

(가) Genomic DNA의 분리

분리 균주의 16S rRNA 염기서열을 이용한 동정을 수행하기 위하여 균주로부터 genomic DNA를 Rodriguez 등의 방법을 변형하여 아래와 같이 분리하여 template DNA로 사용하였다. GYP배지에 균체를 접종한 다음 37°C에서 호기적 조건으로 하룻밤 배양시켰다. 원심분리에 의해 균체를 수확한 후 1 mL의 TEN 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl)으로 세척한 다음 500 µL의 SET 완충용액(20% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM EDTA)에 현탁시켰다. 여기에 50 µL의 lysozyme(60 mg/mL)과 3 µL의 RNase A 용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 200 µL의 TEN 완충용액, 25 µL의 25% SDS를 넣고 조심스럽게 혼합하여 세포를 용해시켰다. 이 반응액에 25 µL의 pronase 용액을 첨가하고 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 100 µL의 5 M NaCl을 첨가하였다. 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 처리하여 단백질을 제거한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 0°C에서 15분간 정치한 다음 13,500×g에서 원심분리를 15분간 실시하였다. 침전된 DNA는 70% ethanol로 세척한 후 건조시킨 뒤 적당량의 3차 증류수에 녹여 사용하였다.

(나) 16S rRNA 유전자 cloning

분리 균주의 16S rRNA의 유전자를 polymerase chain reaction(PCR)에 의해 cloning하기 위하여 8F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'), 15R(5'-AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3')을 primer로 사용하였다. PCR은 AccuPower® PreMix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR sprint(Hybaid Ltd., London, UK)로 반응시켰다. PCR 조건은 94°C에서 2분(1 cycle), 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분(35 cycle), 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 agarose gel 전기영동으로 확인하였는데 100 V에서 25-40 분간 전기영동한 후 254 nm의 자외선 조명하에서 관찰하였다. 사진촬영은 UV-filter와 orange filter가 장착된 디지털카메라(C4040Z, Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA)를 이용하였다. DNA 단편의 회수는 Bioneer사(Daejeon, Korea)의 AccuPrep® Gel Purification Kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라 수행하였다.

(3) 16S rRNA 유전자 염기서열 결정과 분석

PCR 산물의 염기서열 결정은 MacroGen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 Applied Biosystems사(Foster City, CA, USA)의 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit를 사용하여 MJ Reserch사(Reno, NV, USA)의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM 3730 XL Analyzer를 이용하였다.

DNA 염기서열의 분석은 InfoMax Inc.(Bethesda, MD, USA)의 Vector NTI Suite 7.1 program을 사용하여 수행하였으며 DNA 염기서열의 homology 분석은 BLASTN online program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하였다. Phylogenetic tree는 MEGA4 program(Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)을 이용하여 작성하였다.

라. 분리 초산균주의 생육도

삼각플라스크 진탕배양시의 균증식도는 Spectrophotometer(Beckman Du®530, Life Science UV/Vis)를 사용하여 배양액의 흡광도(660 nm)를 측정하였으며 발효조에서 배양한 균의 증식도는 흡광도측정에 따른 균체의 건조무게(g/L)로 나타내었다. 효모와 초산균으로 식초를 생산하는 2단계 배양은 효모에 의한 알코올발효 후 효모로 인한 탁도로 초산균의 증식을 측정하기가 어려워 효모를 무균적으로 원심분리(18,000 rpm)하여 제거한 후 초산균을 접종하여 배양특성을 파악하였다.

마. pH 및 총산의 측정

pH는 pH meter(pH/ion/cond. F-55, Horiba Co.)를 사용하여 측정하였으며, 산도는

배양액 10 mL를 취하여 0.1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 용액으로 중화적정한 후, acetic acid로 환산하였다.

$$\text{산도} = \frac{0.006 \times \text{소비된 } 0.1N\text{NaOH의 mL 수} \times \text{수정계수}}{\text{시료의 무게}(g)} \times 100$$

바. GYP배지에서 초산균의 초기 산도 및 초기 알코올(ethanol) 농도, 초기 glucose 농도의 영향

초기 초산농도가 초산균의 생육과 초산생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ethanol이 3% 함유되어 있는 GYP배지에 초산농도를 0, 1, 2, 3, 4%로 조절하여 30°C에서 200rpm의 조건으로 진탕배양하면서 생육과 산도를 측정하였다.

초기 알코올 농도가 초산균의 생육과 초산생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 초산이 첨가되지 않은 GYP배지에 ethanol 농도를 1, 2, 3, 4, 5%로 조절하여 30°C에서 200rpm의 조건으로 진탕배양하면서 생육과 산도를 측정하였다.

초기 glucose 농도가 초산균의 생육과 초산생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 초산이 첨가되지 않고, ethanol이 4% 함유되어 있는 GYP배지에 glucose 농도를 1, 2, 3, 4, 5%로 조절하여 30°C에서 200rpm의 조건으로 진탕배양하면서 생육과 산도를 측정하였다.

사. 양파식초제조

(1) 삼각플라스크 배양

양파식초를 생산하기 위한 삼각플라스크 배양은 녹즙기로 마쇄한 양파즙을 110°C로 가열한 후 부직포로 여과한 다음 12,000 rpm으로 원심분리한 후, 전배양한 초산균이 3-5%(v/v)가 되도록 접종하여 500 mL의 Erlenmeyer flask에 150 mL와 300 mL가 working volume이 되도록 30°C에서 200 rpm의 속도로 진탕배양 하였다. 2단계 초산생산은 양파를 효모로 알코올발효 한 여액의 알코올함량을 최적의 초기 알코올농도인 4%로 조절한 후 종초 3%(v/v)를 접종하여 배양하였다.

(2) 발효조 배양

양파식초를 생산하기 위한 발효조 배양은 30°C에서 교반속도 300 rpm, 통기량 1.5 vvm으로(DO 80%) 배양하였다. 기질을 연속적으로 공급하는 유가식배양에는 24시간에 200 mL를 공급할 수 있는 peristaltic pump P-1(Pharmacia Co. Sweden)을 이용하였다.

Pilot scale 규모(한국발효기 Co. working volume 150L)의 배양은 연세대 생명공학과에서 보유하고 있는 발효기를 이용하여 실험을 수행하였다. Working volume을 120 L로 하였으며 배지로 사용된 양과즙은 양과를 세로 방향으로 16절편으로 한 후 물양을 양과무게의 50%가 되도록 하여 110°C에서 20분간 추출하고 부직포로 여과한 액을 다시 살균한 후, 전배양한 초산균 배양액을 5% 접종하고 교반속도 300 rpm, 통기량 1.5 vvm으로 (DO 80%) 배양하였다. 또한 통기조건의 발효조에서 배양 시 거품이 발생하여 실리콘수지로 거품을 제거하면서 배양하였다.

아. 환원당정량

배양액의 환원당 정량은 Somogyi-Nelson법으로 정량하였다. 즉, 반응액 0.25 mL를 취하고 여기에 Somogyi 시약 0.25 mL를 혼합하여 실온에서 15분간 방치한 후 증류수를 4 mL 씩 넣어 Spectrophotometer(Beckman Du[®]530, Life Science UV/ Vis)를 사용하여 파장 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도는 glucose 표준곡선으로부터 환원당의 함량을 구하였으며, 측정결과는 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

자. 유기산 조성

유기산의 분석은 배양 상등액을 Sep-pak C18(Waters Co.)으로 여액의 색소 및 단백질 성분을 제거한 후 0.25 µm membrane filter를 통과시켜 HPLC(Agilent 1200 series)로 분석하였다. 유기산의 분석조건은 µ Bondapak C18 column(Waters Co.)을 사용하였으며, 인산으로 pH를 2로 조정한 1% acetonitril에 NaHPO₄가 20 mM로 한 용액을 이동상(1 mL/min)으로 하여 injection volume 20 µL로 하여 UV detector(210 nm)로 검출하여 정량하였다.

차. SPME를 이용한 ethanol의 GC 분석

시료 상등액 0.5 mL와 증류수 9.4 mL를 20 mL screw cap vial에 넣고 internal standard로 butanol 0.1 mL를 첨가하였다. Vortex mixer로 잘 교반한 다음 40°C의 water bath에서 10분간 SPME fiber에 immersion법으로 흡착시킨 후 gas chromatography에 알코올이 흡착된 SPME fiber를 탈착시켜 검출하였다. 분석에 사용된 gas chromatography는 Agilent 6890 series이었으며, column은 innowax HP를 사용하였으며 FID로 검출하였다. 이때 injector와 detector의 온도는 각각 200°C와 250°C이었으며, column의 온도는 45°C에서 3분간 유지하고 20°C/min으로 180°C까지 증가시켜 3분간 유지하였다. Carrier gas로 사용한 헬륨의 유속은 50 mL/min이었고 detection을 위한 공기와 수소가스의 유속은 각각 250, 30 mL/min이었다. 표준물질로 Aldrich사의 ethanol(99.5%), butanol(99.5%)을 사용하였으며 각각의 머무름 시간(retention time)을 확인하고 butanol에 대한 ethanol의 response factor를 계산하여 시료내의 ethanol 정량에 활용하였다.

카. 발효효율

발효 초기산도에 따른 이론적인 초산생성량에 대한 순수 초산생성량을 백분율로 나타내었다.

$$\text{발효효율} = \frac{\text{최종산도}(\%, w/v) - \text{초기산도}(\%, w/v)}{\text{초기알코올농도}(\%, v/v) \times 1.304} \times 100$$

타. 실험계획

양과식초의 최적조건의 배양을 위한 기반연구로 중심합성실험계획에 따라 실험을 실시하였으며, 반응표면분석을 위해서 SAS(statistical analysis system) program을 이용하였다. 250 mL 삼각플라스크에 GYP 배지를 100 mL 씩 넣고 전 배양된 *Acetobacter tropicalis* No. 22를 2%(v/v) 접종하여, 요인변수로 설정된 초기 ethanol 농도(X1), 초기 산도(X2), 초기 glucose 농도(X3)를 각각 5수준(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하여 중심합성계획을 수립하고 16개의 설정된 조건으로 실험을 행하였다(Table 2-2). 이 때 초산배양액의 특성에 관련된 반응변수(Y1)는 산도로 하였다.

Table 2-2. Level of acetic acid culture conditions in experimental design

Xi	Culture condition	Levels				
		-2	-1	0	1	2
Xi	Initial ethanol concentration	3	4	5	6	7
X2	Initial acetic acid concentration	0	1	2	3	4
X3	Initial glucose concentration	0.5	1.5	2.5	3.5	4.5

파. 관능검사

대학생 40명을 대상으로 3점 비교법을 이용한 sequential analysis를 실시하여 60% 이상의 정답을 보인 20명을 선발하여 5점 비교법을 이용하여 산도가 동일하게 준비된 3가지 시료에 대한 식초의 관능특성은 신향강도, 발효취 강도, 기타취 강도, 기타취 기호도, 전체적인 기호도로 분류 평가하여 5점척도법((1: 매우 약하다, 매우 나쁘다 5: 매우 강하다, 매우 좋다)을 이용하여 평가하게 하였다. 시료는 투명한 유리병에 10 mL를 넣어 검사원에게 제시하였으며 백열등이 있는 booth에서 시료를 평가하게 하였다. 기타취는 식초에 있어서 신향과 발효취를 제외한 향 즉 원부재료에 기인하는 향이라고 정의하였다.

하. 통계처리

분석치의 통계처리는 SAS program을 이용하여 실시하였다. 시료간의 차이검증은 분산분석(ANOVA)을 실시하여 차이가 있는 경우 fisher의 최소유의차(least significant difference) 검정에 해당하는 pairwise 비교를 실시하였다.

거. 혈전용해활성 측정

Fibrin(혈전) 용해활성은 Yang 등(2007)의 방법을 일부 수정한 방법에 의해 측정하였다. Fibrinogen을 0.5%가 되도록 10 mM의 인산완충용액(pH 8)에 완전히 용해시키고 페트리디쉬에 10 mL를 분주하고 thrombin 20 unit를 가하여 균일한 두께의 fibrin clot을 형성시킨 후 실온에서 30분 방치하여 혈전용해활성에 사용하였다. 시료는 동일한 질량의 인산완충용액으로 희석한 후 사용하였다. 활성측정은 제조한 fibrin plate에 paper disk(8 mm, Toyo Roshi, Japan)를 놓고 시료를 50 μ L를 점적하여 35 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 반응시킨 후 생성된 투명한 부위의 직경을 조사하였다. 양성대조구는 대표적인 혈전용해제인 plasmin(2.57 U)를 사용하였고, 음성대조구는 멸균 인산완충액을 시료와 동량 사용하였다.

$$\text{혈전용해활성(\%)} = (\text{시료의 용해영역} / \text{plasmin의 용해영역}) \times 100$$

너. 항혈전 활성

혈액응고 억제활성 중 내인성 경로(intrinsic pathway)에 기인하는 활성화트롬빈 플라스틴 시간(activated partial thromboplastin time; APTT)과 외인성경로(extrinsic pathway)에 기인하는 프로트롬빈시간(prothrombin time; PT)과 fibrin 형성을 측정하는데 사용하는 간단하면서 빠른 test이며 overall tests인 PT와 APTT의 증가를 설명할 수 없을 때, 여타의 분석 시도 전에 수행해야 할 첫 번째 test인 트롬빈시간(thrombin time, TT)과 fibrinogen(FIB)의 양을 혈액응고 자동분석기(CLOT-2S, SEAC SRL., Italy)를 사용하여 측정하였다. 측정은 Rat plasma(IRT-N, Innovative research, 3.8% Na citrate)에 시료를 0.1 mL, 0.01 mL 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5~10 분간 incubation 후 응고시간을 측정하였다.

3. 연구 결과

가. 고산도 생산균주 선별

신 냄새가 나는 낙과 복숭아를 무균적으로 Modified YCE 배지에 반복 도말, 배양하여 얻은 단일 colony를 희선도말하여 배양한 후, 생성된 투명환(clear zone)의 크기가 큰 (Fig. 2-1) 10균주를 선발하여 반복적으로 순수 분리하였다.



Fig. 2-1. Clear zone in modified YCE medium for the isolation of acetic acid bacteria isolated from fruit drop peach.

나. 분리균주의 동정 및 고산도 초산균주 선별

선별된 10개의 균주를 대상으로 동정을 실시하였다.

(1) 분자유전학적 특성

선정된 10개의 균주에 대한 분자유전학적 특성에 의한 동정을 위해 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정한 후 분석을 수행하였으며 10개 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 Fig. 2-2부터 Fig. 2-11까지에 나타내었다.

No. 1, 3, 6, 7, 10, 16의 16S rRNA 유전자 염기서열은 모두 *Acetobacter tropicalis* LMG 1663, *Acetobacter tropicalis* NRIC 0312 isolate No. 39의 16S rRNA 유전자 염기서열과 각각 99%의 identity를 나타내었고, No. 22의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Acetobacter tropicalis* LMG 1663, *Acetobacter tropicalis* NRIC 0312 isolate No. 39의 16S rRNA 유전자 염기서열과 각각 98%의 identity를 나타내었다. 한편, No. 2는 *Acetobacter orientalis* 4B-S16D, *Acetobacter orientalis* B-7SC와 99%의 identity를 나타내었으며, No. 27은 *Gluconobacter cerinus* NBRC 3269과 99%의 identity를 나타내었다.

GGGGGCTGCTTACCATGCAGTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTATCC
ATGGGTGGGGGATAACTCTGGGAAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCTGTGG
AGGAGCCTGCGTTTCGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAA
CCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGGCGGGGACGATGATGACGGTA
CCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACT
GGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATAC
GTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCG
GTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCT
GGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGCAACTTAGTTGTTTCAGTGTTCGTAGCTAACGCGATAAGCAC
ACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGTATGTGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAAG
GGACCTACAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGG
CGACATCGTGTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTT
TGACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCAGCAATGGGGCGCAGCCGACCACGGTTCGGGTACGCGACTGGGGGAAGTCGTA
ACAAGAGCGAGG

Fig 2-2. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 1.

AGCGGCTGCTTACCATGCAAGTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTATC
CATGGGTGGGGGATAACTCTGGGAAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCTGTG
GAGGAGCCTGCGTTTCGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAA
ACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGT
ACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGAC
TGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATAC
GTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCG
GTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCT
GGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTAACCTAGTTATTCAGTGTGTCAGTTAACGCGTTAAGCAC
ACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGTATGGGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAAG
GGACCTACCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGC
GACATCGTGTGATCTCTAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGTAAGTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTGGAATCGCTAG
TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTT
GACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCAGCAATGGGGCGCAGCCGACCACGGTTCGGGTACGCGACTGGGGGAAGTCGTAACA
AGAGCGTGG

Fig 2-3. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 2.

TGGCTGCTTACCATGCAGTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGCTAGGAATCTATCCATG
GGTGGGGGATAA ACTCTGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGTAAGTCGCCTGTGGAGG
AGCCTGCGTTCGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCC
TGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGGCGGGGACGATGATGACGGTACCC
GCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGG
GCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTGTATACGTG
CAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTGTGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCCGGTG
GCCAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGT
AGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGCAACTTAGTTGTTTCAGTGTCTGCTAGCTAACGCGATAAGCACACC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTGTATGTGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAAGGG
ACCTACAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGCG
ACATCGTGTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTT
ACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCCGCAAGGGGCGCAGCCGACCACGGTCCGGTTCAGCGACTGGGGGAAGTCGTAACAA
GTTGCT

Fig 2-4. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 3.

TGCGCTGCTTACCTGCAGTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGCTAGGAATCTATCCATG
GGTGGGGGATAA ACTCTGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGTAAGTCGCCTGTGGAGG
AGCCTGCGTTCGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCC
TGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGGCGGGGACGATGATGACGGTACCC
GCAAAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGG
GCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTGTATACGTG
CAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTGTGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCCGGTG
GCCAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGT
AGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGCAACTTAGTTGTTTCAGTGTCTGCTAGCTAACGCGATAAGCACACC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTGTATGTGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAAGGG
ACCTACAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGCG
ACATCGTGTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTT
ACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCCAGCAATGGGGCGCAGCCGACCACGGTCCGGTTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA
CAAGAGCGAGC

Fig 2-5. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 6.

GGGCTGCTTACCTGCAGTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGAATCTATCCATGG
 GTGGGGGATAACTCTGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGG
 AGCCTGCGTTCGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCC
 TGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGGCGGGGACGATGATGACGGTACCC
 GCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGG
 GCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTGTATACGTG
 CAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTGTGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCCGGTG
 GCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGT
 AGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGCAACTTAGTTGTTTCAGTGTCTGAGCTAACGCGATAAGCACACC
 GCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
 AATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTGTATGTGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAAGGG
 ACCTACAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
 CCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATG
 ACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGCG
 ACATCGTGTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGT
 AATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTG
 ACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCCAGCAATGGGGCGCAGCCGACCACGGTCCGGTCAGCGACTGGGGGAAGTCGTAAC
 AAGTTGCCGAGT

Fig 2-6. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 7.

AGGGCTGCTTACCTGCAGTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGAATCTATCCATG
 GGTGGGGGATAACTCTGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAG
 GAGCCTGCGTTCGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATC
 AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACC
 CTGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGGCGGGGACGATGATGACGGTACC
 CGAAAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGG
 GCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTGTATACGTG
 CAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTGTGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCCGGTG
 GCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGT
 AGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGCAACTTAGTTGTTTCAGTGTCTGAGCTAACGCGATAAGCACACC
 GCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
 AATTTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTGTATGTGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAAGGG
 ACCTACAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
 CCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATG
 ACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGCG
 ACATCGTGTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGT
 AATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTG
 ACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCCAGCAATGGGGCGCAGCCGACCACGGTCCGGTCAGCGACTGGGGGAAGTCGTAAC
 AAGTTGCCGAGT

Fig 2-7. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 10.

GGGCGGCTGCTTACCATGCAGTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTATC
CATGGGTGGGGGATAAECTCTGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGTAAGTCGCCTGTG
GAGGAGCCTGCGTTCGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCA
ACCCTGATCCAGCAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGGCGGGGACGATGATGACGGT
ACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGA
CTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATA
CGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACC
GGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGCAACTTAGTTGTTCAGTGTCGTAGCTAACGCGATAAGCA
CACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGTATGTGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAA
GGGACCTACAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCCTATCTTAGTTGCCAGCATGTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATG
GCGACATCGTGTGATCTCTAAAAGCCGCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCT
AGTAATCGGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGT
TTGACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCCGCAAGGGGCGCAGCCGACCACGGTCCGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGAGCGTGG

Fig 2-8. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 16.

GGCGCTGCTTACCATGCAAGTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTATTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTATGAATCTATCCA
TGGGTGGGGGATAAECTCTGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGA
GGAGCCTGCGTTCGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAAC
CCTGATCCATCAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGGCGGGAACAATGATGACGGTAC
CCGAAAAGAAGCCCCGGCTAACTTCTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTG
GGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGT
GCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGT
GGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGG
TAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGCAACTTAGTTGTTCAGTGTCGTAGCTAACGCGATAAGCACAC
CGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGTATGTGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAAGGG
ACCTACAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CCTATCTTAGTTGCCAGCATGTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTC AAGTCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGCG
ACATCGTGTGATCTCTAAAAGCCGCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTG
ACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCCAGCAATGGGGCGCAGCCGACCACGGTCCGGTCAGCGACTGGGGGAAGTCGTAAC
AAGAGCGAGG

Fig 2-9. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 20.

AGGGCTGCTTACCTGCAGTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTATTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGAATCTATCCATG
GGTGGGGGATAACTCTGGGAAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAG
GAGCCTGCGTTCGATTATCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATC
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACC
CTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGTTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGGCGGGGACAATGATGACGGTACC
CGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACATCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTG
GGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTGATACGT
GCAGACTATAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATGTTGGGAAGAACACCGGT
GGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGACGCGGAAAGCGTGAGAAGCAAACAGGATTAGATACCTGG
TAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGCAACTTAGTTGTTCACTGTCGTAGCTAACCGGATAAGCACAC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGTATGTGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAAGG
GACCTACAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAAC
CCCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGC
GACATCGTGTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAG
TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTT
GACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCAGCAATGGGGCGCAGCCGACCACGGTCGGGTGACGACTGGGGGAAGTCGTAA
CAAGAGCGAAGG

Fig 2-10. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 22.

AGGGGCTGCTTACCATGCAAGTCGCACGGATCTTTCGGGATTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGGATCTATC
CATGGGTGGGGGACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGT
GGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCGCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGGAGAGGA
TGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG
CAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGAC
GGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAAT
GACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGTTGATGCAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTG
AGACGCATTGACTAGAGTTCGAGAGAGGGTTGTGGAATCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAAC
ACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTAACCTAGTTACTCAGTGTGCAAGCTAACCGGCTAA
GCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGCATGGGGAGGACGTAAGTACTCAGAGATGGGTATTTCTTC
GGACCTCCCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAA
CCCTGTCTTTAGTTGCCAGCACTTTCAGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTATGTGGTG
ACACAGTGTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTCG
ACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCAGCAAGGACGCGCAGCCGACCACGGACGGGTGACGACTGGGGGAAGTCGTAAACAAGA
GCGAAGG

Fig. 2-11. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 27.

한편 분리된 10균주의 16S rRNA 유전자의 염기배열순서를 이용하여 phylogenetic tree를 작성한 결과 Fig. 2-12와 같이 No. 20과 22는 근연관계가 매우 높은 것으로 확인되었고 No. 3번과 7번도 매우 유사한 균주인 것을 확인되었다. No. 27은 나머지 균주들과 근연관계가 매우 상이한 것으로 확인되었다. 이상의 형태학적, 생리학적, 분자유전학적 동정 결과로부터 No. 1, 3, 6, 7, 10, 16, 20, 22는 *Acetobacter tropicalis*로, No. 2는 *Acetobacter orientalis*로, No. 27은 *Gluconobacter cerinus*로 동정하였다.

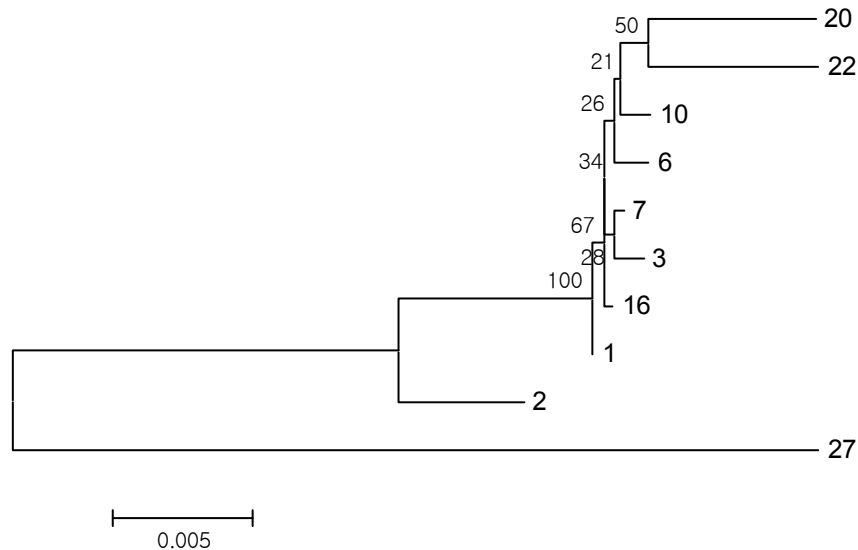


Fig 2-12. Phylogenetic tree of ten isolates based on 16S rRNA gene.

(1) 분리균주 선별

살균된 GYP배지에 30°C에서 8일간 150 rpm에서 진탕배양하여 초산 생성력과 균의 생육정도를 비교한 결과를 Table 2-3에 나타내었다. Table 2-3의 결과에서 산도와 균의 생육이 우수한 No. 22 균주를 선별하여 실험에 사용하였다.

Table 2-3. Growth, acidity and pH of acetic acid bacteria isolates.

Acetic acid bacteria strain No.	OD 660 nm	Acidity (%)	pH
<i>Acetobacter tropicalis</i> No. 1	0.334	3.73	1.8
<i>Acetobacter orientalis</i> No. 2	0.000	1.07	2.4
<i>Acetobacter tropicalis</i> No. 3	0.257	3.80	1.9
<i>Acetobacter tropicalis</i> No. 6	0.274	3.54	2.1
<i>Acetobacter tropicalis</i> No. 7	0.280	3.76	1.9
<i>Acetobacter tropicalis</i> No. 10	0.301	3.26	1.9
<i>Acetobacter tropicalis</i> No. 16	0.194	3.38	1.8
<i>Acetobacter tropicalis</i> No. 20	0	1.15	2.4
<i>Acetobacter tropicalis</i> No. 22	0.303	3.88	1.9
<i>Gluconobacter cerinus</i> No. 27	0.264	3.83	1.9

(3) 형태학적 생리학적 특성

선정된 균주 중에서 No. 22에 대한 형태학적, 생리학적 특성을 조사하였다. No. 22는 광학현미경 상에서 간균으로 관찰되었고(Fig. 2-13) Gram 염색을 통하여 Gram 음성세균으로 확인되었으며 운동성은 없는 것으로 나타났다. 포자염색에서는 음성반응으로 나타나 무포자균으로 확인되었으며, catalase test에서 양성 반응을 나타내었으며 decarboxylase test, MR test, VP test, oxidase test, indole test, gelatin test에서 모두 음성반응을 나타내어 전형적인 *Acetobacter spp.*의 특성을 지니고 있었다(Table 2-4). 이 초산균주는 한국미생물보존센터에 2009년 12월 18일자로 기탁하여, 수탁번호 KFCC 11476P를 부여받았다(*Acetobacter tropicalis* 11476P).

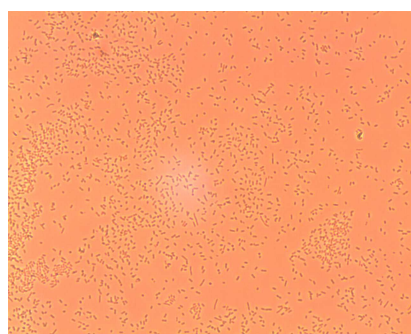


Fig 2-13. Microscopy of isolate No. 22 (×1,000).

Table 2-4. Morphological and physiological characteristics of isolate No. 22.

Characteristics	No. 22
Morphology	Rod-shaped
Gram stain	-
Catalase test	+
Decarboxylase test	-
MR test	-
VP test	-
Motility	-
Spore test	-
Oxidase test	-
Indole test	-
Gelatin test	-
H ₂ S formation	-

다. GYP배지에서의 초산균의 초기 에탄올, 초기산도, 초기 glucose 농도의 영향

진탕배양기를 사용하여 30℃, 200 rpm의 조건에서 삼각플라스크배양을 실시하였다.

(1) 초기산도의 영향

분리한 *Acetobacter tropicalis* 11476P 균주를 이용한 식초제조의 최적 조건을 찾기 위하여 3% 에탄올이 함유된 GYP 액체배지에서 초기산도를 0, 1, 2, 3, 4%로 각각 조절하여 30℃에서 10일간 배양하여 균의 생육과 총산을 조사한 결과를 Fig. 2-14에 나타내었다. 일반적으로 초산배양은 전통발효 시 잡균의 오염방지를 위하여 초기산도를 조절하여 주는 경우가 대부분으로 초산균이 생산한 초산생산량에도 포함시키는 보고가 대부분인 데, 초산균이 생산한 순수한 양만을 비교하는 것이 타당한 것으로 판단되어 초기산도를 조절하기 위해 첨가하는 초산의 양은 전체 초산생산량에서 제외하였다. 첨가한 초기 초산 양을 제외하고 초산균에 의해 순수하게 생산된 총산함량을 비교한 결과 배양 7일째까지는 초기산도가 1%일 때의 산도가 가장 높았으나, 최고 산도는 배양 8일째부터 초산을 첨가하지 않은 배양균이 산도 3.36%로 초기산도 1% 첨가균의 2.66%보다 더 높음을 볼 수 있었으며 초기 산도가 높을수록 생산되는 총산함량은 민감하게 감소하였다. 배양 10일째의 발효효율을 계산해 보면 초산을 첨가하지 않은 배양균은 86%인 반면 초산 1% 첨가 배양균은 42%이며, 3%와 4% 첨가 배양균은 -값을 나타내었다. Kang 등(2006)은 초기산도를 2%로 조절하는 것이 적당하다고 하였으며, Oh(1992)는 초기산도 0.5%와 1%에서는 산막유해

균의 오염으로 초산발효가 잘 진행되지 않아 2%가 적당하다고 하였다. 이러한 결과들은 초기 산도 조절을 위해 첨가한 초산의 양을 총산의 생산량에 포함시켜 얻은 값들로서, 초산균이 생산한 초산의 양만을 비교한 결과들은 아니라고 할 수 있다. 또한 초산균의 증식곡선(Fig. 2-14의 A)을 보면 초기에 초산의 첨가량이 증가할수록 미생물의 생육이 저해됨을 볼 수 있어서 초산을 대량생산하기 위해서는 고농도의 균체배양이 필요하므로 초산을 첨가하지 않은 조건이 균체의 생육에 더욱 바람직한 조건이라고 할 수 있다. 균체 생육곡선은 생산한 초산에 대한 균체의 생육저해에 따른 내산성의 적응기간(3-7일)을 거친 후 다시 생육하는 현상을 보였다.

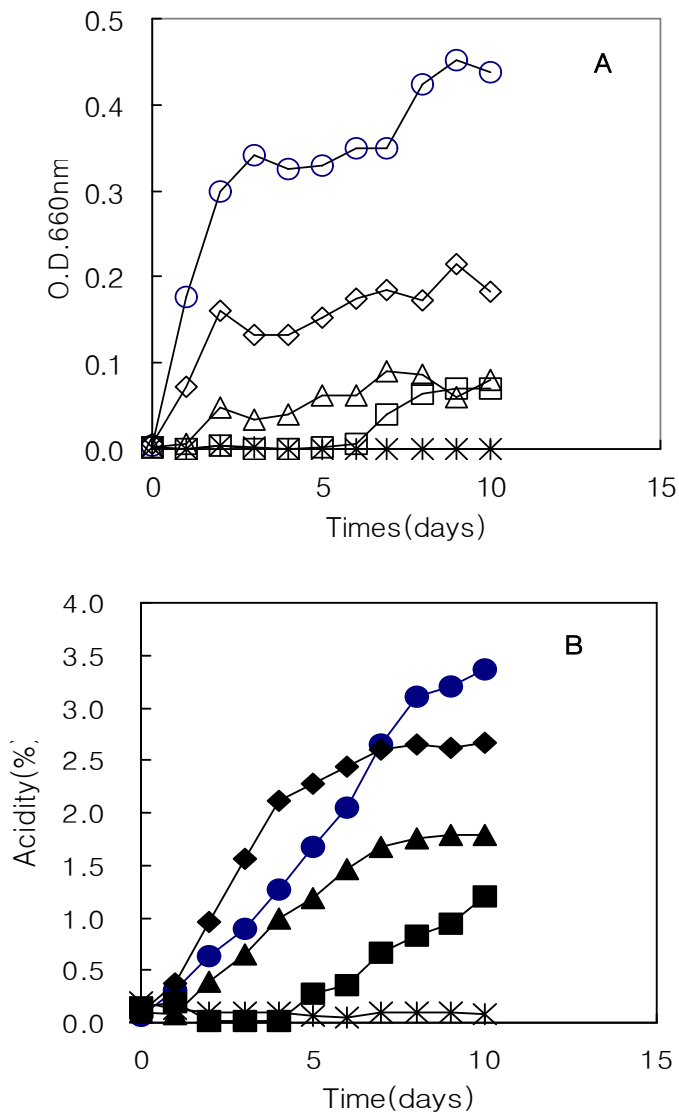


Fig. 2-14. Growth and acid production of *A. tropicalis* 11476P by initial acetic acid concentration during the incubation period at 30°C(acetic acid : 0%(●, ○), 1%(◆, ◇), 2%(▲, △), 3%(■, □), 4%(*)).

(2) 초기 에탄올 농도의 영향

초산균은 에탄올을 산화하여 초산을 생성하는 미생물로 초기 에탄올의 농도가 초산생산에 매우 중요하다고 할 수 있다. 따라서 초기 에탄올농도가 초산균의 초산생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 초기 초산농도 1%의 GYP배지에서 초기 ethanol 농도를 3, 4, 5, 6, 7%로 하여 30°C에서 10일간 배양하면서 분리균 *Acetobacter tropicalis* 11476P의 초산 생산량을 조사한 결과를 Fig. 2-15에 나타내었다.

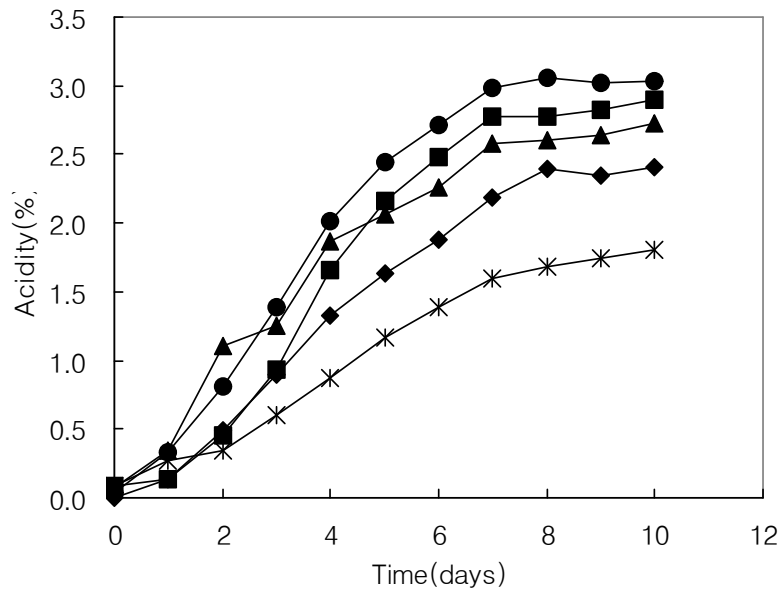


Fig. 2-15. Acid production of isolated *A. tropicalis* 11476P by initial ethanol concentration during the incubation period at 30°C (ethanol : 3%(*), 4%(●), 5%(▲), 6%(◆), 7%(■)).

Acetobacter tropicalis 11476P는 배양 8일에서 최고산도에 도달하였으며 초기 에탄올 농도 4%에서 가장 높은 산도 4.06%를 나타내었는데, 이는 Hong 등(1996)과 Son 등(2003)의 결과와 일치하였다. 한편 Lee 등(1999)과 Park 등(2005)과 Sim 등(2001)은 알로에와 감식초에서 에탄올 농도 6%에서 가장 높은 산생성능을 보였다고 보고하였으며, Kang 등(2006)은 유자식초에서 초산균은 에탄올의 초기농도가 5%일 때 가장 효율적이었다고 하였다. Hong 등(1996)은 에탄올 농도 4% 첨가구에서는 산생성능이 우수하고 관능적인 향미가 우수하지만 6% 첨가구에서는 산생성이 저해되어 강한 자극취와 관능적인 향미가 부적합하다고 하였다.

Yang 등(1979)은 에탄올의 농도가 높아지면 균의 유도기가 길어져 균의 생육이 늦고 산 생성능이 낮아진다고 하였으며 초산발효를 위한 에탄올 농도는 본 연구의 결과와 마찬가지로 약 4%가 적합하다고 보고하고 있으며, 김과 정 등은 초기 에탄올농도 8%에서

는 유도기가 길어졌으나 후기에 양호한 발효가 진행된다고 하였다. 본 연구결과에서도 초기 에탄올 농도 4%이상에서는 초산 생산의 유도기가 길어지는 현상을 볼 수 있었다.

(3) 초기 glucose 농도의 영향

Acetobacter. tropicalis 11476P 균주를 이용한 초기 glucose 농도에 따른 식초제조의 최적 조건을 찾기 위하여 산도가 가장 높았던 4% 에탄올 농도, 초기 산도가 0인 GYP 액체 배지에서 균의 생육을 증가시킬 수 있는 glucose 농도를 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 6, 8%로 각각 조절하여 30℃에서 10일간 배양하여 균의 생육과 총산을 조사한 결과를 Fig. 2-16에 나타내었다. 최대산도를 나타내는 배양기간은 10일로 보이며, 당 함량의 경우에서 Kim 등(1996)은 매실초 제조를 위한 초산생산용 매실즙배지에서 포도당 0.2% 첨가구에서는 산도값이 6.5%로 최대치를 보였으나 0.3% 이하의 첨가농도에서는 산도가 오히려 감소되어 포도당의 첨가농도가 높으면 초산생산이 저해된다고 하였다.

Hong 등(1996)은 단감을 이용한 식초제조 시 알코올 발효의 기질인 glucose를 첨가할 경우 첨가된 당의 일부만 알코올로 전환되고 나머지는 유해균의 증식과 이취발생 및 착색에 관여하여 상품성을 저하시키므로 glucose 첨가효과는 부적합하다고 보고하고 있으며, Son 등(2003)은 중심합성실험계획을 사용하여 반응표면분석에 따른 최적 당 농도는 8.42%라고 보고하였다.

본 실험결과에서는 배양 10일 까지는 초기 glucose 농도 2.5% 실험군이 균의 생육과 산도가 높게 나타났으며, 배양 10일 이후에는 초기 glucose 농도 3% 실험군이 균의 생육과 산도가 높게 나타났으며 초기 glucose 농도 6, 8%는 균의 생육과 산도가 오히려 낮게 나타났다. 따라서 초기 glucose 농도는 2.5~3% 범위의 농도가 초산균의 생육과 초산생산에 가장 좋은 조건으로 사료된다. 또한 glucose를 첨가하지 않고 ethanol만 첨가한 실험군은 초기에는 생육과 산도가 낮으나, 배양기간이 경과될수록 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

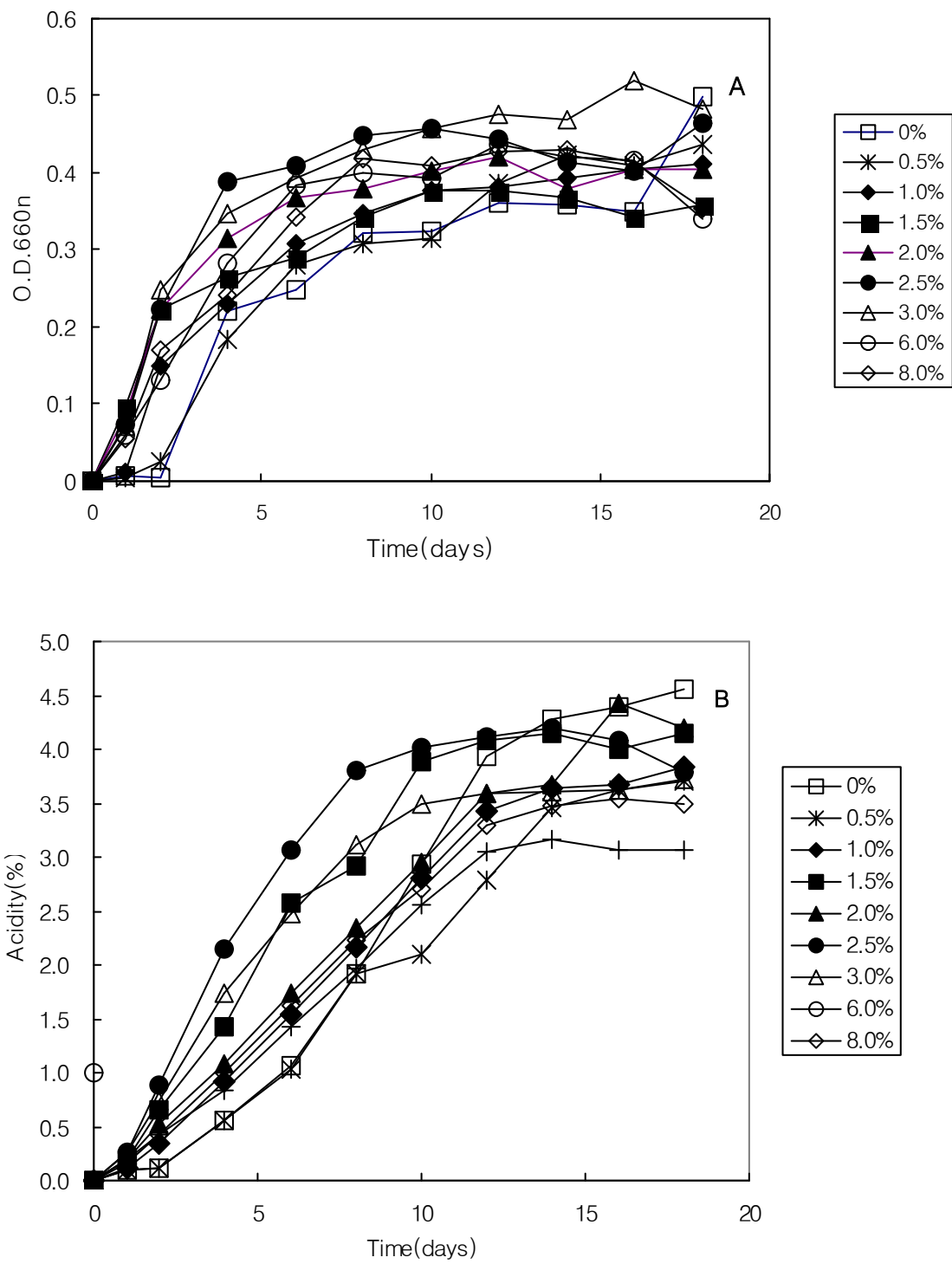


Fig. 2-16. Growth and acid production of *A. tropicalis* 11476P by initial acetic acid concentration during the incubation period at 30°C.

라. GYP배지에서의 기호도에 영향을 미치는 초산배양액의 유기산 조성

분리균 *Acetobacter tropicalis* 11476P를 4% ethanol을 함유하고 있는 GYP 배지와 양과즙에 접종하여 10일과, 18일간 각각 배양한 후, 생성된 유기산 조성을 2-17과 Table 2-5에 나타내었다. 분석에 사용한 표준 유기산 중 oxalic acid, citric acid, tartaric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid, acetic acid가 확인되었으며, 유기산 중 acetic acid 함량이 가장 높았으며 다음으로 citric acid, malic acid, succinic acid 순이었다(Table 2-5). 또한 동일한 초산균으로 실험을 하였을 때, GYP 배지와 양과즙 배양액에서 유기산의 조성은 유사하나 조성비가 차이가 있었다.

Lee 등(1999)은 감식초의 유기산을 분석한 결과, acetic acid, lactic acid, citric acid의 함량순서로 검출되었고 사과산과 옥살산은 검출되지 않았다고 보고하였다. Moon 등(1997)은 시판식초의 유기산을 분석한 결과, oxalic, citric, tartaric, malic, succinic, lactic, acetic acid가 검출되었다고 보고하고 있으며 생성유기산의 종류도 시료에 따라 다소 차이가 있었는데, oxalic acid는 시료 전반에 걸쳐 매우 소량 검출되었고 malic acid는 양조식초, 현미식초, 감식초에 0.08%이하인 것에 비해 사과식초에서는 0.08-0.29%로 두드러지게 높은 경향을 보였다고 하였다.

Shin 등(2002)은 2단계 발효한 양과식초의 유기산으로 acetic, oxalic, citric, tartaric, malic, succinic acid가 확인되었으며 acetic, succinic, malic acid 함량이 높게 나타났다고 하였는데 본 실험의 결과와 유사하였다. 또한 Moon 등(1997)은 시판식초를 관능검사한 결과 당과 아미노산 등의 함량은 미량이어서 특징적으로 나타나는 관능특성치의 상관관계는 찾을 수 없으나, 특히 유기산의 경우 1% 유의수준에서 맛 전체의 기호도와 lactic acid는 음의 상관관계를, acetic acid는 양의 상관관계를 나타내었으며, 전체 유기산에 대한 acetic acid(A/T)의 비율이 높을수록 맛 기호도가 좋게 평가된다고 하였다.

이러한 관점에서 볼 때, 본 연구결과의 초산균은 lactic acid는 미량으로 생산되었으며, GYP배지에서 10일간 배양한 시료의 A/T비율이 0.89이며, 양과즙에 18일간 배양한 것은 A/T 비율이 0.65로 더 높은 기호도를 위해서는 양과즙에서 acetic acid의 생산을 더욱 높여야 함을 알 수 있었다.

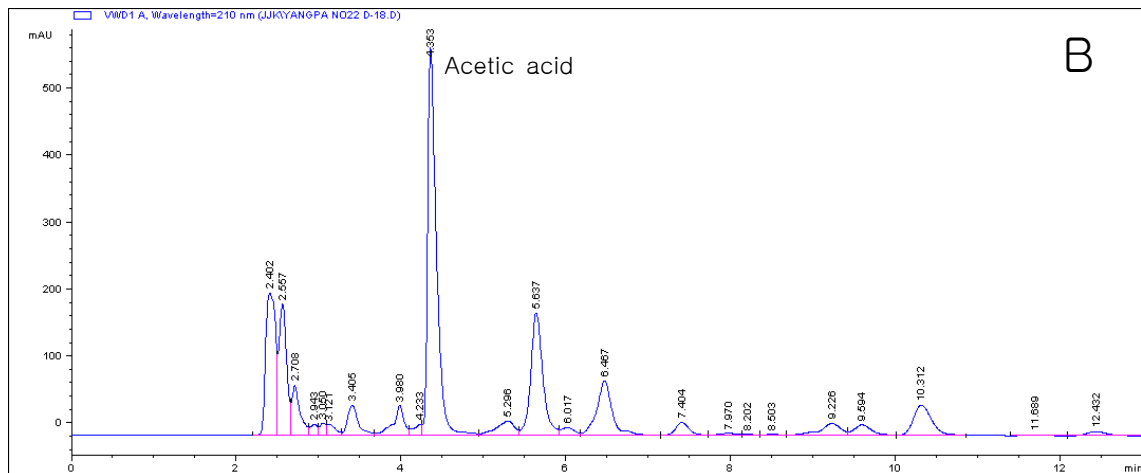
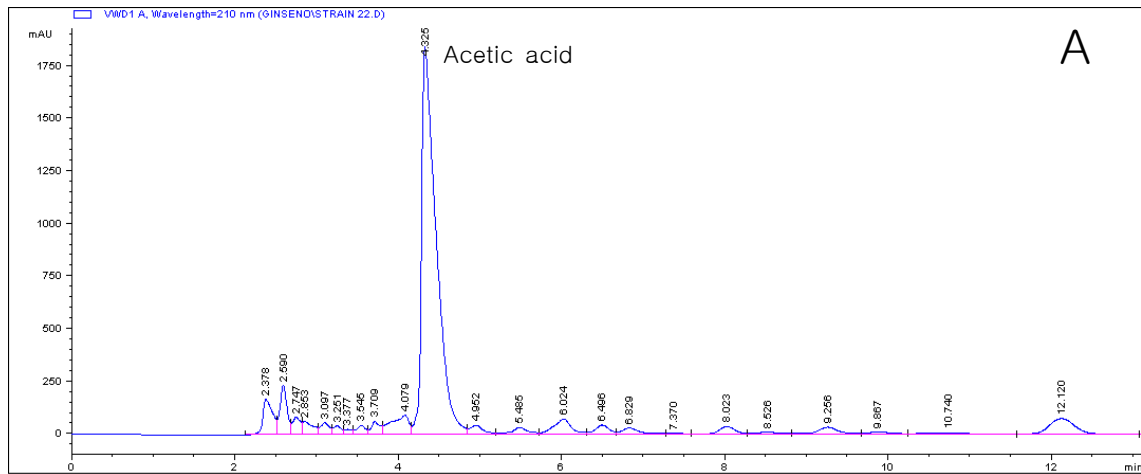


Fig. 2-17. HPLC chromatogram for acid production of *A. tropicalis* 11476P in GYP medium (A) and onions juice (B).

Table 2-5. Contents of organic acid in *A. tropicalis* 11476P culture broth

Broth	Organic acid(%)								Total	A/T ¹⁾
	Oxalic acid	Citric acid	Tartaric acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid	fumaric acid		
GYP medium broth	0.01	0.05	0.08	0.10	0.10	0.21	4.26	tr	4.81	0.89
Onion juice	0.01	0.7	0.09	0.69	0.62	tr	2.67	tr	4.08	0.65

¹⁾ Ratio of acetic acid compared to total organic acids.

마. GYP 배지에서 초산균의 초산생산에 있어서의 초기 glucose 농도와 잔존 glucose와 ethanol 농도의 영향

초기산도 0%, 초기 ethanol 농도가 4%로 동일하고, 초기 glucose 농도를 0, 2.5%로 달리한 GYP 배지와 자체적으로 환원당을 5.1% 함유하고 있는 양파즙에 *A. tropicalis* 11476P를 5%(v/v) 접종하여 18일간 배양한 결과를 Fig. 2-18에 나타내었다. 초기 ethanol 농도 4%의 조건에서 초기 glucose 농도 0%와 2.5%를 각각 함유하는 GYP 배지에서 10일간 배양한 결과를 비교하면 초기 glucose 농도를 2.5% 함유한 배양액의 산도가 배양 8일 만에 3.88%로 최고산도에 가깝게 초산을 생산하였으며, glucose가 포함되지 않은 배양액의 산도인 2.98% 보다 높아, 초산생산에 ethanol 농도뿐만 아니라 일정농도 범위의 잔존 glucose도 관련됨을 알 수 있었다.

초기 glucose 농도를 2.5% 함유한 배양액의 산도는 8일 이후부터 감소하기 시작하는데, 감소하기 전 단계의 6일과 8일의 잔존 ethanol 농도는 0.6~1.3% 범위였으며, ethanol의 소비도 효율적으로 이용함을 볼 수 있으며, 이때의 잔존 glucose 농도는 1.6~1.8%의 범위에 있었다. 환원당을 자체적으로 5.1% 함유하고 있는 양파즙 배양액의 결과를 보면 배양 8일에 산도가 1.6%로 낮으며 배양 18일까지(산도 2.94%) ethanol을 모두 소비하지 못하고 0.68%의 ethanol이 잔존하고 있는데, 이러한 이유는 잔존 당의 함량이 4.53%로 높아 효율적인 ethanol 소비가 되지 않는 것으로 보여 진다. 이것은 초기 glucose를 6% 함유하고 있는 18일간 배양한 GYP 배지(Fig. 2-16)에서도 잔존 glucose농도가 5.2% 남아있는 상태에서 ethanol이 모두 소비되지 못하고 0.76% 잔존하고 있는 것에서도 그 이유를 찾을 수 있었다.

Lee 등(1993)은 유가식배양에 의한 고산도 식초생산에서 잔존 ethanol 함량이 0.5%인 조건에서 ethanol을 유가식으로 첨가하고 발효 중의 온도를 1℃만큼 단계적으로 낮추어 발효시간이 40시간 경과하였을 때, 16%대의 고산도 식초를 생산한 결과를 보고하였다.

이와 같은 결과를 토대로, 본 연구에서는 잔존 당농도가 1.6~1.8%의 범위가 되고 잔존 ethanol의 양을 0.6~1.3% 지속적으로 첨가하는 조건을 행하면 고산도 식초를 생산할 수 있는 결론을 얻었다. 고산도 양파식초의 생산을 위해 최우선적으로 선행되어야 할 것은 양파즙의 당도감소이며, 초기에 ethanol을 첨가하지 않고 잔존 당을 일정량만큼 소비시킨 후에 ethanol을 첨가시키거나 효모로 배양하여 당도를 1.6%범위로 감소시키고 ethanol을 4%대의 범위가 되었을 때 초산균을 접종하여 배양하는 두 가지 단계의 차 후 연구로 고산도 배양이 가능하다고 할 수 있다.

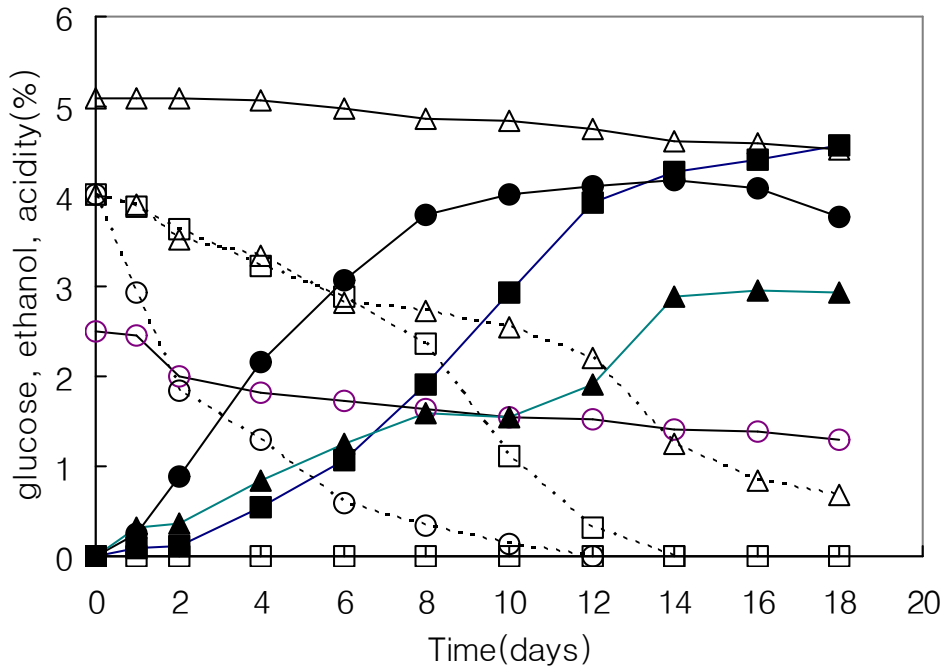


Fig. 2-18. Effect of residual glucose, ethanol concentration for growth and acid production of *A. tropicalis* No. 22 by initial acetic acid concentration during the incubation period at initial ethanol concentration of 4% (initial glucose concentration 0%: acidity (— ■), residual glucose (— □), residual ethanol concentration (··· □), initial glucose concentration 2.5%: acidity (— ●), residual glucose (— ○), residual ethanol concentration (··· ○), onion juice: acidity (— ▲), residual glucose (— △), residual ethanol concentration (··· △)).

바. GYP배지에서의 반응표면분석법에 의한 초산생산의 최적화

초산생산의 최적화를 위해 중심합성계획법에 따라 각 독립변수를 초기 ethanol 함량, 초기 acetic acid 함량, 초기 glucose 농도로 요인변수들을 -2, -1, 0, 1, 2로서 5개로 부호화하여 부족한 부분은 추가실험을 행하여 초산의 생산성을 조사한 결과를 Table 2-6과 2-7에 나타내었다.

Table 2-6. Level of acetic acid culture conditions in experimental design

Xi	Culture condition	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Initial ethanol concentration (%)	3	4	5	6	7
X ₂	Initial acetic acid concentration (%)	0	1	2	3	4
X ₃	Initial glucose concentration (%)	0.5	1.5	2.5	3.5	4.5

Table 2-7. Experimental data for acidity under different conditions of initial ethanol concentration initial glucose concentration, initial acetic acid concentration of *A. tropicalis* No. 22

Experimental No.	Culture conditions			Phiscochemical properties
	Initial ethanol concentration (%)	Initial acetic acid concentration (%)	Initial glucose concentration (%)	Acidity (%)
1	4(-1)	1(-1)	1.5(-1)	3.19
2	4(-1)	1(-1)	3.5(1)	2.72
3	4(-1)	3(1)	1.5(-1)	1.37
4	4(-1)	3(1)	3.5(1)	1.33
5	6(1)	1(-1)	1.5(-1)	2.41
6	6(1)	1(-1)	3.5(1)	2.35
7	6(1)	3(1)	1.5(-1)	1.08
8	6(1)	3(1)	3.5(1)	1.04
9	5(0)	2(0)	2.5(0)	1.27
10	5(0)	2(0)	2.5(0)	1.27
11	7(2)	2(0)	2.5(0)	1.12
12	3(-2)	2(0)	2.5(0)	1.1
13	5(0)	4(2)	2.5(0)	0
14	5(0)	0(-2)	2.5(0)	3.56
15	5(0)	2(0)	4.5(2)	1.23
16	5(0)	2(0)	0.5(-2)	0.86

반응변수인 초산생성능에 미치는 독립변수의 영향을 나타낸 결과는 Table 2-8에서 보는 바와 같이 독립변수 중 초기 acetic acid 함량이 산 생성에 가장 큰 영향을 끼치며, 초기 acetic acid 함량은 5% 수준($p < 0.05$)에서 유의성이 인정되었다.

Table 2-8. Analysis of variance showing significant effects of culture variables on acetic acid production of *A. tropicalis* No. 22

Culture variables	Degree of freedom	Sum of squares	F value	Probability > F
Initial ethanol concentration(%)	4	0.27	0.19	0.9323
Initial acetic acid concentration(%)	4	10.84	7.95	0.0141
Initial glucose concentration(%)	4	0.09	0.07	0.9882

수립된 회귀식에 대해 분산 분석한 결과를 Table 2-9에 나타내었다. 이차 회귀식에 의하여 형성된 반응표면 결과 R^2 은 0.8482의 수준이었다. 초산생성에 대한 독립변수를 초기 ethanol 농도, 초기 acetic acid 농도, 초기 glucose 농도로 하였을 때 그 변화정도를 반응표면과 contour map으로 살펴보았다. 각각 초기 ethanol 농도와 초기 acetic acid 농도와 초기 glucose 농도를 함수로 하여 등고선을 그려본 결과 반응변수에 따른 조건이 일치하지 않아 세 가지의 실험변수 중 농도별로 가장 영향이 적은 것으로 나타난 초기 ethanol 농도를 고정시키고 초기 acetic acid 농도와 초기 glucose 농도 간의 최적조건을 찾고자 하였다.

초기 ethanol 농도 값을 5%로 정한 후 초기 acetic acid 농도와 초기 glucose 농도만을 변수로 하여 분석을 행한 결과 그 변화정도를 알아보기 위하여 response surface와 contour map을 Fig. 2-19와 Fig. 2-20에 나타내었다. 이러한 결과에 대한 각 반응변수의 정상점이 안정점으로 나타나서 능선분석을 하여 초산생성능이 가장 높은 조건을 구한 결과는 Table 2-10에서 보는 바와 같이 초기 ethanol 농도 4.67%, 초기 acetic acid 농도 0.03%, 초기 glucose 농도 2.35%이었으며 이때의 산도 값은 3.77%로 나타나 실험결과에 근접함을 알 수 있었다.

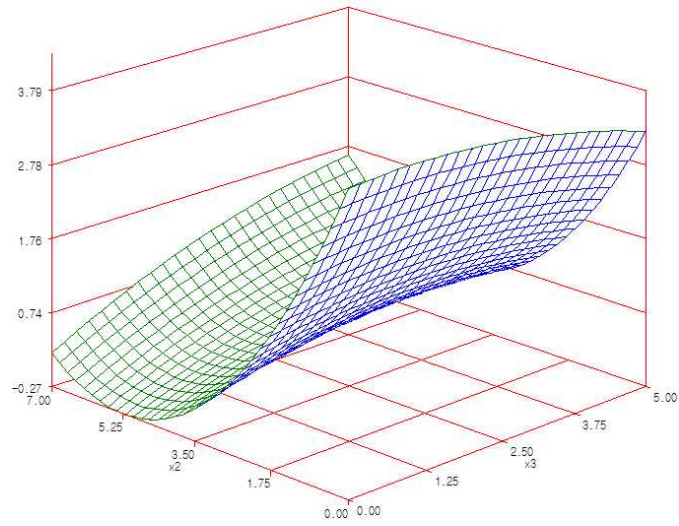
Table 2-9. Analysis of variance showing effects of treatment variables as linear or quadratic terms and interaction(cross product) effect on response variables

Source	Degree of freedom	Sum of squares	R square	Prob>F
Linear	3	10.69	0.7927	0.0085
Quadratic	3	0.66	0.0493	0.6111
Cross product	3	0.09	0.0064	0.9657
Total model	9	11.45	0.8484	0.0615

Table 2-10. Predicted levels of culture conditions for optimum responses of acetic acid production of isolated *A. tropicalis* 11476P

Culture variables	Levels for optimum responses of acetic acid production
Initial ethanol concentration (%)	4.67
Initial acetic acid concentration (%)	0.03
Initial glucose concentration (%)	2.34
Morphology	saddle point
Predicted value at stationary point (%)	3.77

Acidity (%)



Initial acetic acid (%)

Initial glucose (%)

Fig. 2-19. Response surface for acetic acid production of *A. tropicalis* 11476P.

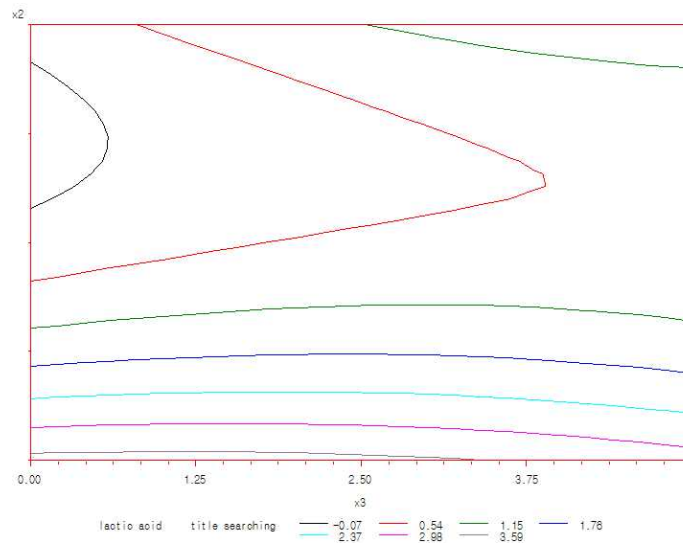


Fig. 2-20. Contour map for acetic acid production of *A. tropicalis* 11476P.

사. 양파식초

(1) 삼각플라스크 배양

(가) 500 mL Erlenmeyer 삼각 flask에서 working volume 150 mL의 양파즙 농도별 *Acetobacter tropicalis* 11476P의 생육과 산도

초기 에탄올농도 4%의 조건에서 진탕배양기를 사용하여 배양기간에 따른 150 mL 양파즙의 농도별 *A. tropicalis* 11476P의 생육과 산생산 양상을 Fig. 2-21에 나타내었다. 40%와 60%의 양파즙에서 *A. tropicalis* 11476P는 배양기간 12일 만에 3.9%로 최고의 산도(acidity)를 나타내었으며, 80%의 양파즙은 배양 16일에 3.7%, 100% 양파즙은 배양 18일에 2.9%, 20% 양파즙은 산을 거의 생산하지 못하였다. 흡광도로 측정된 초산균의 증식은 40~80%의 양파즙이 높았으며, 20%의 양파즙은 산 생산은 물론 증식도 거의 없었다. 이러한 현상은 20%의 양파즙은 초산균이 증식하고 산을 생산하는 데 있어서 영양성분이 다소 부족한 것이 원인인 것으로 판단되었다.

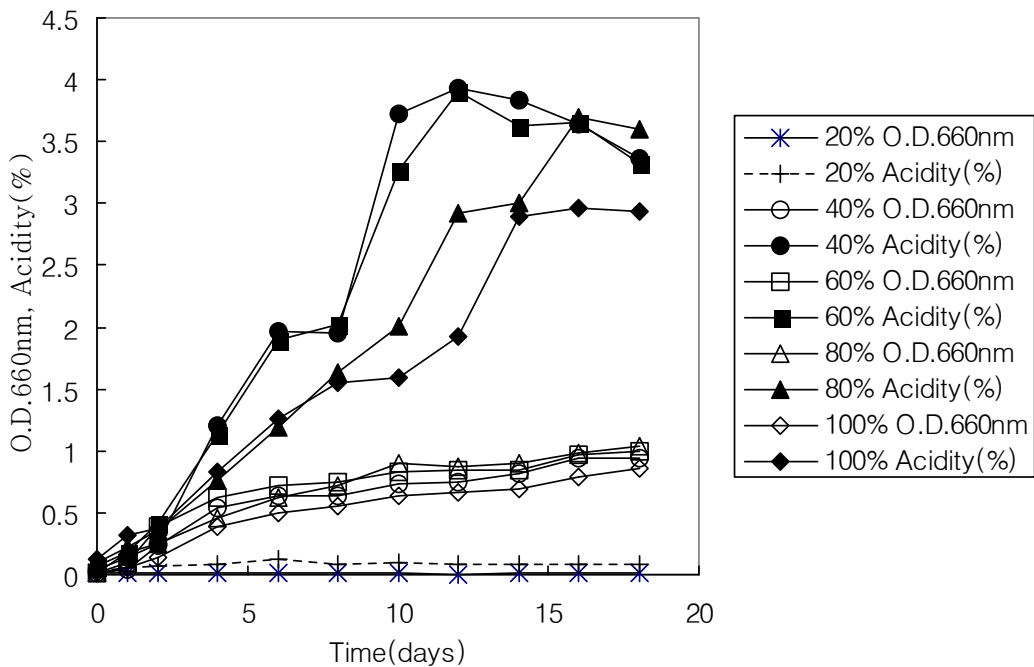


Fig. 2-21. Growth and acid production of *A. tropicalis* 11476P by onion juice concentration during the incubation period at 30°C and initial ethanol concentration of 4% in 500 mL Erenmeyer flask of working volume 150 mL.

(나) 500 mL Erlenmeyer 삼각 flask에서 100% 양파즙 300 mL를 working volume으로 하였을 때의 *Acetobacter tropicalis* 11476P의 생육과 산도

Fig.2-21의 100% 양파즙의 배양조건과 동일하고 working volume만 150 mL에서 300 mL로 하였을 때(초기 에탄올 농도를 4%), *Acetobacter tropicalis* 11476P의 단독배양특성을 Fig. 2-22에 나타내었다. Working volume을 300 mL로 배양하였을 때의 배양결과는 150 mL를 working volume으로 하였을 때의 결과(Fig. 2-21)와는 달리 배양기간 42일 까지 산도가 0.7% 밖에 생산하지 못하였으며, 잔존 환원당과 에탄올도 3.65%, 2.52% 각각 남아 있었으며, 균체의 증식도 Fig. 2-21의 배양 18일 결과의 50%도 되지 못하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 통기가 부족한 삼각플라스크 배양에서 호기성균인 초산균이 용량 증가에 의해 잔존산소농도의 부족에 따른 결과로 판단되었다.

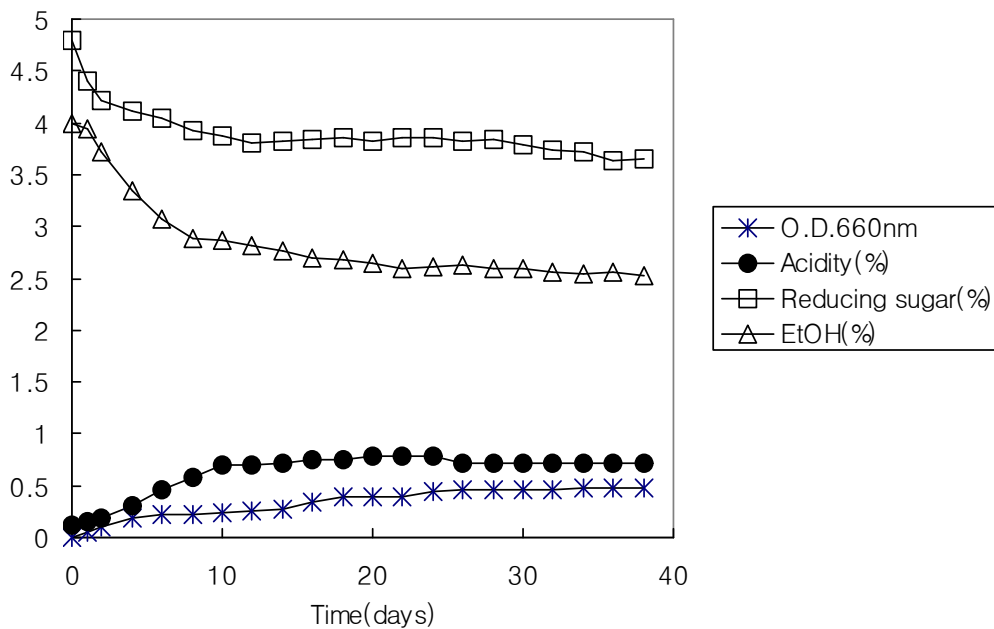


Fig. 2-22. The growth, acid production, residual glucose and ethanol concentration of *A. tropicalis* 11476P for onion vinegar during the incubation period at initial ethanol concentration of 4% in 500 mL Erlenmeyer flask of working volume 300 mL.

Working volume 300 mL의 100% 양과즙에 효모로 양과즙을 발효한 에탄올 농도가 2.5% 이어서 4%가 되도록 주정으로 조정하고, 초산균을 접종하여 2단계배양을 실시한 결과를 Fig. 2-23에 나타내었다. 이때 초산균의 증식양상을 보기 위하여 효모 알코올발효 이후 초산균을 접종하기 전에 효모균체를 무균적으로 원심분리하여 제거하였다. 효모를 배양한 이후 초산균을 접종하기 전의 양과즙(자체 환원당 4.8-5.1%)의 잔존 환원당 농도는 0.07%로 거의 없었으며 잔존 에탄올이 거의 소비된 배양기간 42일이 경과된 시점에서 최고 산도 3.8%를 나타내었다. 균의 증식 탁도도 0.98로 앞선 Fig. 2-22보다 2배정도 높은 값을 나타내었다. Fig. 2-22와 비교하였을 때 동일한 조건으로 배양하였기 때문에 양과에 자체적으로 함유되어 있는 환원당의 감소는 초산균의 산생산에 상당히 의미가 있다는 결과를 나타내었으나, 양과즙에 초산균을 working volume 150 mL로 배양한 결과(Fig. 2-21)보다는 상당히 느린 속도의 생육과 산 생산양상을 보였다.

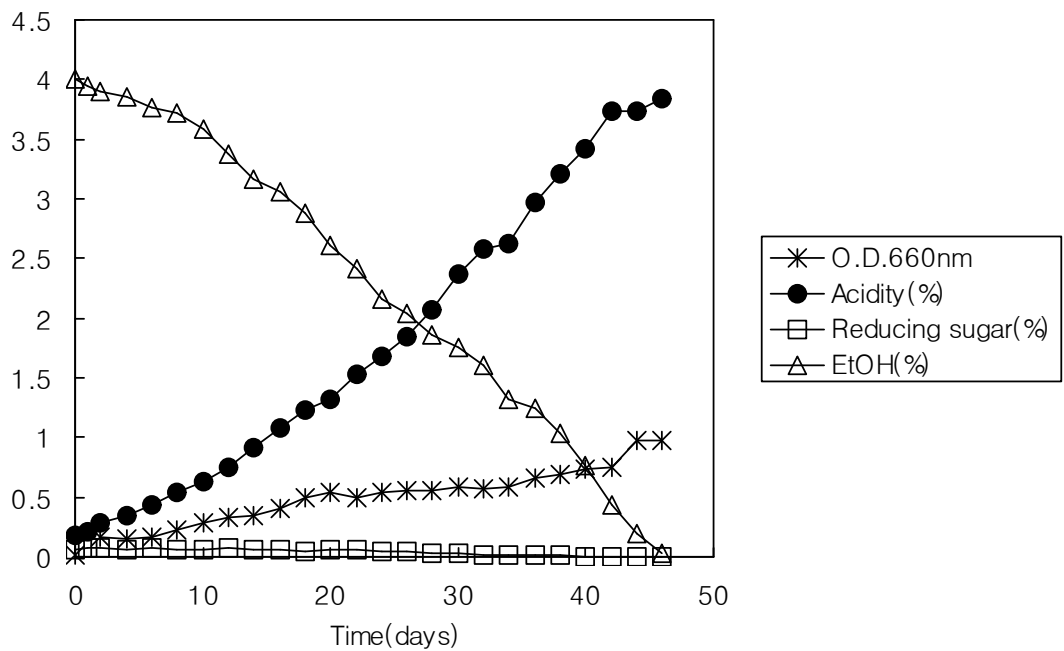


Fig. 2-23. The growth, acid production, residual glucose and ethanol concentration of *A. tropicalis* 11476P for onion vinegar during the incubation period at initial ethanol concentration of 4% after alcohol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 7913 in 500 mL Erlenmeyer flask of working volume 300 mL.

또한 Fig. 2-23과 동일한 조건이나 주정을 첨가하지 않아도 효모배양에 의한 에탄올 생산량이 4%가 되도록 포도당을 양과즙에 6%를 추가로 보당하여 환원당함량이 총 11%가 되도록 하여 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 7913를 배양한 후 초산균의 배양특성 결과를 Fig. 2-24에 나타내었다. Fig. 2-24에 볼 수 있는 바와 같이 보당을 하여 효모를 배양한 경우 Fig. 2-23의 결과와는 달리 배양기간 42일의 기간에 에탄올이 모두 소비되지 못하고 1.75% 남아있었으며 균체의 탁도도 0.58로 Fig. 2-3의 결과에 77% 정도였으며, 산

도도 2.52%의 낮은 값을 나타내었다. 이러한 현상은 양과즙에 효모를 배양하였을 때의 효모균체량보다 보당 후 양과즙에 배양한 효모의 균체량이 약 2배 정도로 증가되어 초산균의 증식에 필요한 영양분을 효모가 대부분 소비하여 초산균의 증식과 산생성이 적은 것으로 해석된다.

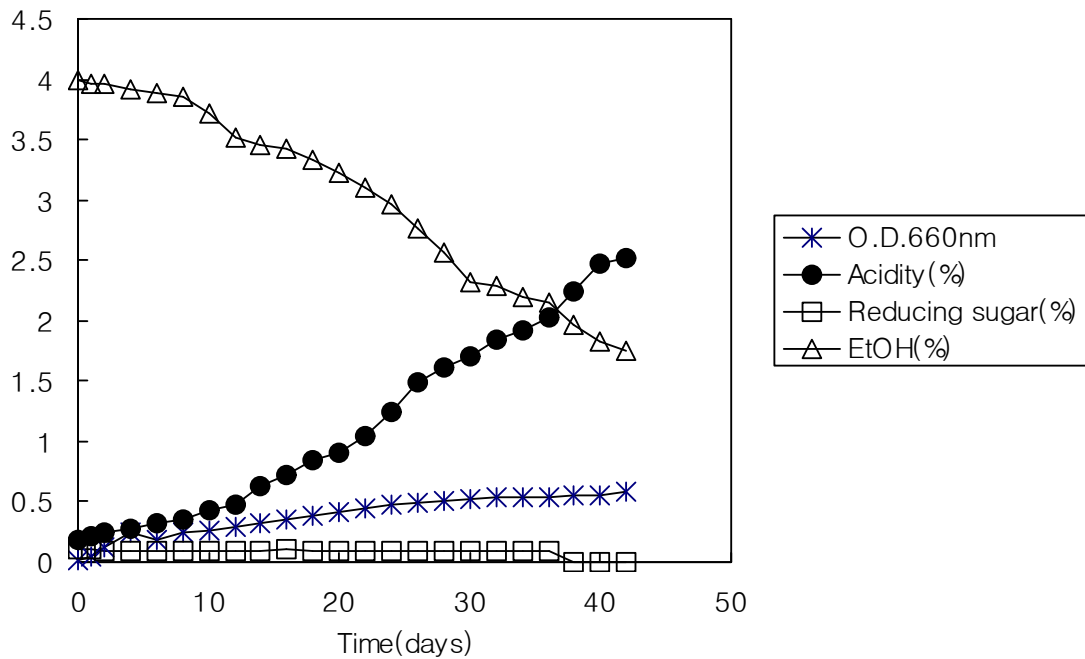


Fig. 2-24. The growth, acid production, residual glucose and ethanol concentration of *A. tropicalis* 11476P for onion vinegar during the incubation period at initial ethanol concentration of 4% after alcohol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 7913 at onion juice added sugar of 6% in 500 mL Erlenmeyer flask of working volume 300 mL.

(2) 1일 단위의 발효조 배양

(가) 양과즙에 효모발효 후 효모균체를 제거하고 초산균을 접종한 2단계 배양 및 유가식 배양(fed-batch culture)

에탄올을 최대한 생성시키기 위해 100% 양과즙 2 L를 삼각플라스크에서 효모로 진탕 배양을 행한 후(에탄올 농도 2.5%) 무균적으로 원심분리하여 효모를 제거하고 초기 에탄올 농도가 4%가 되게 조정한 후 발효조로 옮겨 초산균을 접종하여 교반속도 300 rpm, 1.5 vvm의 통기 조건으로 초산균을 배양한 결과를 Fig. 2-25에 나타내었다. 500 mL

Erlenmeyer flask에서 working volume을 300 mL로 한 42일 배양기간의 삼각플라스크 배양결과(Fig. 2-22)와는 달리 배양 4일 만에 균체의 증식이 완료되었으며, 배양 2일 만에 최대 산도가 3.4%에 도달하였고 발효효율은 65.18%였다. 삼각플라스크 배양과 발효조배양의 이러한 현격한 차이는 통기의 효과라고 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서 분리한 초산균인 *A. tropicalis* 11476P는 통기효과가 적은 삼각플라스크 배양과 비교하면 통기에 매우 민감하여 통기에 의해 균체의 증가속도와 산생산속도가 급속도로 증가하는 균주라고 할 수 있었다.

국내에서 식초의 규격인 총산함량은 4-29%(Seo et al., 2003)로 규정되어 있으며, Jeong 등(2000)은 식초의 산업화에서 식초를 생산하는 데 있어서의 단기간 배양을 약 10일로 정의하였다. 또한 대다수의 보고된 자료들이 양조식초를 제조할 때, 초기에 첨가한 초산(1% 이상)이 결과적으로 최종 산도에 포함되게 되지만 본 연구는 초기에 초산을 전혀 넣지 않고 순수하게 초산균에서 생산되는 초산의 양을 총산으로 정의하였기 때문에, 양조식초의 규격인 총산 4% 이상을 생산하기 위해서는 추가적인 식초의 산도 증가 조건을 살펴볼 필요가 있어서 초산균의 산도가 더 이상 증가하지 않는 시점인 배양 4일부터 에탄올과 당을 첨가하는 유가식 배양을 수행하였다.

배양기간 4일에 에탄올만을 4% 첨가(Fig. 2-25의 화살표 숫자 1)하였을 때 에탄올은 소비되었으나 산도는 변화가 없었으며 에탄올 4%, 포도당 1%를 첨가(Fig. 2-25의 화살표 숫자 2)한 결과도 산도의 증감 변화가 거의 없었다. 산도와 균체는 배양 2일 만에 거의 최고치에 도달하여 이후에 탄소원을 충분히 공급 하였는데도 변화가 없어서 단백질 영양원 부족이라 판단하여 단백질원으로 yeast extract를 선택하여 에탄올 2%, 당 1%, yeast extract 0.5%를 배양 7일째 첨가(Fig. 2-25의 화살표 숫자 3)하였다. 그 결과 배양 8일째에 산도가 3.67%에서 4.31%로 증가하였으며 배양 8일째 에탄올 2%, 당 1%, yeast extract 0.5%(Fig. 2-25의 화살표 숫자 4), 배양 9일째 에탄올 2%, 당 1%(Fig. 2-5의 화살표 숫자 5)를 첨가한 결과 yeast extract를 0.5%가 되게 첨가한 시점부터 산도가 급격히 증가하는 것을 볼 수 있었으며 배양 12일째에서는 6.65%의 산도를 나타내었고 에탄올 소비와 당 소비도 활발하게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 yeast extract는 유가식배양에서 식초균의 초산생산에 있어서 에탄올과 함께 초산생산을 증가시키는 영양원임을 알 수 있었으며, 에탄올 농도 4%의 높은 농도에서도 초산을 생산하는 경향을 보였다.

Yeast extract를 첨가하지 않았을 때 초기의 시간당 0.1g에 가깝게 에탄올을 소비하고 2일 만에 최고 산도에 도달한 이후에 에탄올을 첨가하면 에탄올의 소비속도가 시간당 0.05 g으로 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 이러한 yeast extract의 첨가효과는 Kim(1999)의 무화과식초에서 yeast extract와 Ca-pantothenate 첨가 시 초산 생산량이 증가하였다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 yeast extract 0.5%를 2번째 첨가하였을 때 배양 중의 양과식초에서 된장 같은 냄새가 발생하여 풍미가 저하되어 적절한 yeast extract의 농도를 선정할 필요가 있었다.

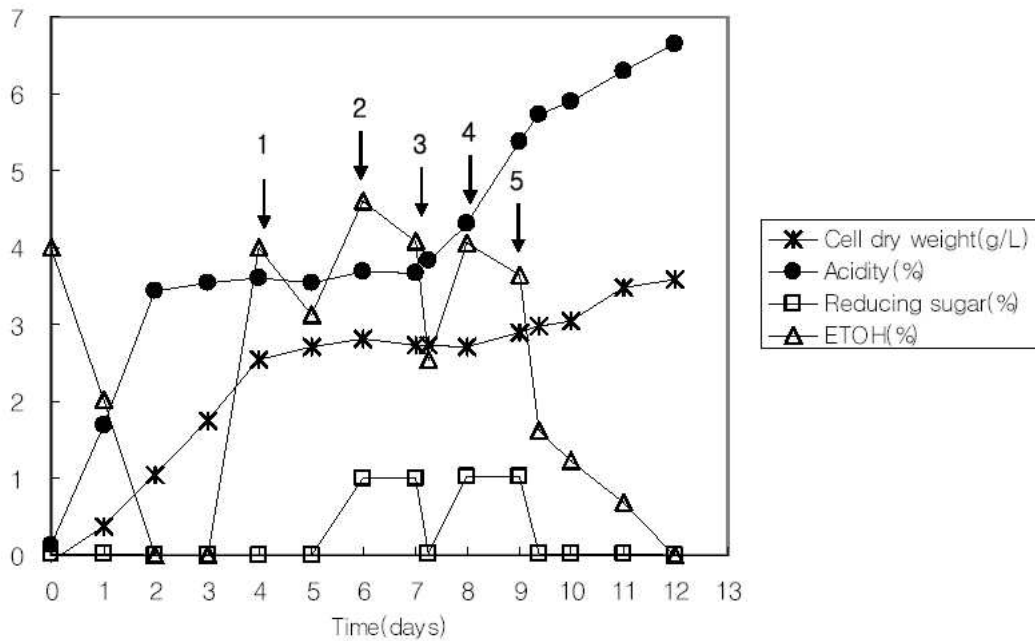


Fig. 2-25. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight during single stage fed-batch culture of *A. tropicalis* 11476P at initial 4% ethanol condition by ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 7913.

Four times step feeding, 1: 4% ethanol, 2: 2% ethanol and 1% glucose, 3: 2% ethanol and 1% glucose and 0.5% yeast extract, 4: 2% ethanol and 1% glucose and 0.5% yeast extract, 5: 2% ethanol and 0.5% yeast extract.

Arrow indicates the start of the step feeding of nutrients.

(가) 발효조(fermentor)에서 양과즙에 대한 초산균의 유가식 배양(fed-batch culture)

양과즙 2L에 초산균만을 접종하여 초기 에탄올 농도를 4%로 하여 교반속도 300 rpm, 1.5 vvm의 통기 조건으로 초산균을 배양한 결과를 Fig. 2-26에 나타내었다. 에탄올은 배양 36시간 만에 잔존당이 4.18%인 상태에서도 고갈되었으며 초산균은 산도 3.11%의 초산을 생산하였고, 발효효율은 59.62%로 효모와 초산균을 사용한 발효조 배양보다는 발효효율이 약간 낮은 값을 나타냄을 알 수 있었다.

Fig. 2-25의 된장냄새를 발생시키는 yeast extract의 농도가 1%였음을 감안하여 배양 3일째부터 에탄올을 2%, yeast extract를 0.1%가 되게 첨가(Fig. 2-26의 화살표 숫자 1)하였으며, 환원당 농도가 4.18%로 높게 측정되어 당은 첨가하지 않았다. 그 결과 배양 5일째가 되어서야 산도가 4.1%로 증가하였으며, 배양 5일, 6일 째 에탄올 1%, yeast extract 0.1%를 첨가(Fig. 2-6의 화살표 숫자 2, 3)하고 배양 7일 째에는 에탄올 1%, yeast extract

0.05%를 첨가한 결과, 산도는 계속적으로 증가하여 배양 8일째 5.6%에 도달하였다. 균체량도 초기 에탄올이 고갈된 시점인 배양 36시간에 4.06 g/L로 증가하였으며 산도도 배양 5일째부터 다시 증가하기 시작하여 배양 8일째에는 5.59 g/L로 증가하였다. 배양 8일째부터는 에탄올 1%, yeast extract 0.075%, 배양 9일째에는 에탄올 1%, yeast extract 0.15%, 배양 11일째에는 에탄올 1%, yeast extract 0.2%를 첨가하였는데,

배양 8일까지와는 달리 산도의 증가(기울기)가 완만하게 증가하는 경향을 보였다. 잔존당이 거의 없는 Fig. 2-25의 효모와 초산균의 2단계배양의 건조균체량과 잔존당이 높은 Fig. 2-26의 건조균체량을 비교해 보면 배양 2일에 각각 1.04와 4.12 g/L로 양과즙에 초산균만을 접종한 경우가 3.85배로 균체량이 많았으며, 배양 2일째 초산의 생산성(acetic acid productivity, g/L · hr)은 0.7과 0.67이었으며 균체 무게당 초산의 비생산성(specific acetic acid productivity, g/g · L · hr)은 0.67과 0.16으로 효모와 초산균으로 2단계 배양한 초산균의 초산생산성이 높았다.

이러한 결과는 잔존당의 함량이 높으면 초산생산이 저하되는데, 양과즙에 초산균을 배양한 발효조배양도 잔존당의 함량이 높아 총산의 생산이 2단계배양보다 다소 낮아진 것으로 판단된다. 그러나 삼각플라스크 배양에 비하면 통기에 의해 배양기간이 대단히 단축된 것을 알 수 있으며, 초기에 균체가 최대치에 도달한 이후 유가식에 의한 산생산 증가의 유도는 에탄올과 yeast extract가 필요함을 알 수 있었다.

Lee 등(1992)은 two stage 발효에 의한 고산도 식초생산에서 에탄올만을 첨가하여 산도 16%대의 식초를 얻었다고 한 결과와는 달리 본 연구의 초산균주는 에탄올 첨가만으로는 산 생산이 증가하지 않았다. 양과즙에 효모와 초산균을 배양하는 2단계 발효조배양은 최고산도가 6.65%, 양과즙에 초산균의 발효조배양은 5.82%로 기존의 대부분의 연구들이 초기에 acetic acid를 1% 이상 넣어 이 양이 산도에 포함된 것을 감안하면 본 연구의 발효조 결과는 배양기간과 초산생산의 관점에서 초산생산을 상당히 높인 결과를 얻었다고 할 수 있다.

발효조에서 얻은 결과들은 scale-up을 수행할 때 필요한 kinetic parameter의 토대가 되는 데, 초기 에탄올농도 4%에 대하여 배양 36시간 정도면 배양이 완료되어 배양초기의 분석을 위해 배양시간을 1-2시간으로 단축하여 초산균주의 비증식속도(μ), 에탄올 및 당 소비속도, 초산의 productivity 등과 같은 kinetic parameter를 보다 정확히 구하고 보다 짧은 배양기간에 산도를 더욱 높이기 위한 실험이 필요하다고 할 수 있다.

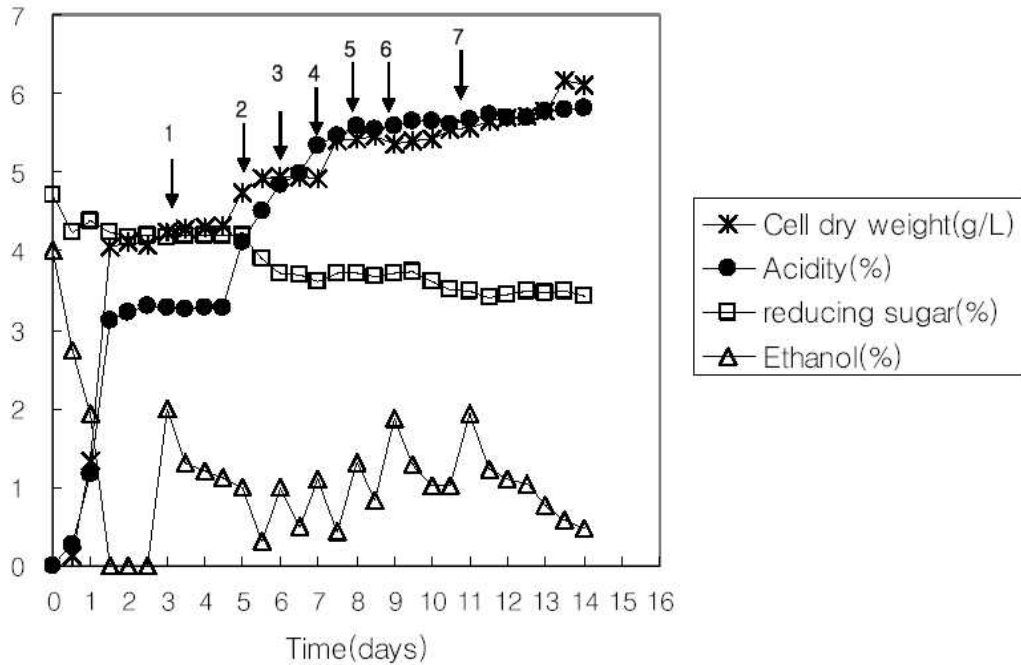


Fig. 2-26. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight during single stage fed-batch culture for onion juice of *A. tropicalis* 11476P at initial ethanol concentration 4%.

Seven times step feeding, 1: 2% ethanol and 0.1% yeast extract, 2: 1% ethanol and 0.1% yeast extract, 3: 1% ethanol and 0.1% yeast extract, 4: 1% ethanol and 0.05% yeast extract, 5: 1% ethanol and 0.075% yeast extract, 6: 1% ethanol and 0.15% yeast extract, 7: 1% ethanol and 0.2% yeast extract.

Arrow indicates the start of the step feeding of nutrients.

(다) 삼각플라스크 배양과 발효조 배양의 산도 및 균중식도 비교

500 mL Erlenmeyer 삼각플라스크에서 양과즙을 150 mL를 working volume으로 하였을 때와 발효조 배양 및 효모와 초산균의 2단계배양과 초산균만의 1단계배양시의 산도 및 균중식도(cell dry weight)를 발효조에서 유가식배양을 하기 이전인 배양 4일까지의 회분식배양과 비교하여 Fig. 2-27와 Fig. 2-28에 나타내었다. Fig. 2-27과 Fig. 2-28에서 볼 수 있는 바와 같이 통기를 해주는 발효조를 이용한 배양이 통기가 제한되는 삼각플라스크 배양보다 식초의 생산과 균의 생육이 월등함을 볼 수 있다. 본 연구의 초산균은 발효조를 사용한 초기 알코올 농도 4% 농도의 양과즙에서 통기에 의해 2일 이내에 3.3~3.6%의 최고산도에 도달하는 특성을 나타낸 결과를 얻을 수 있었다.

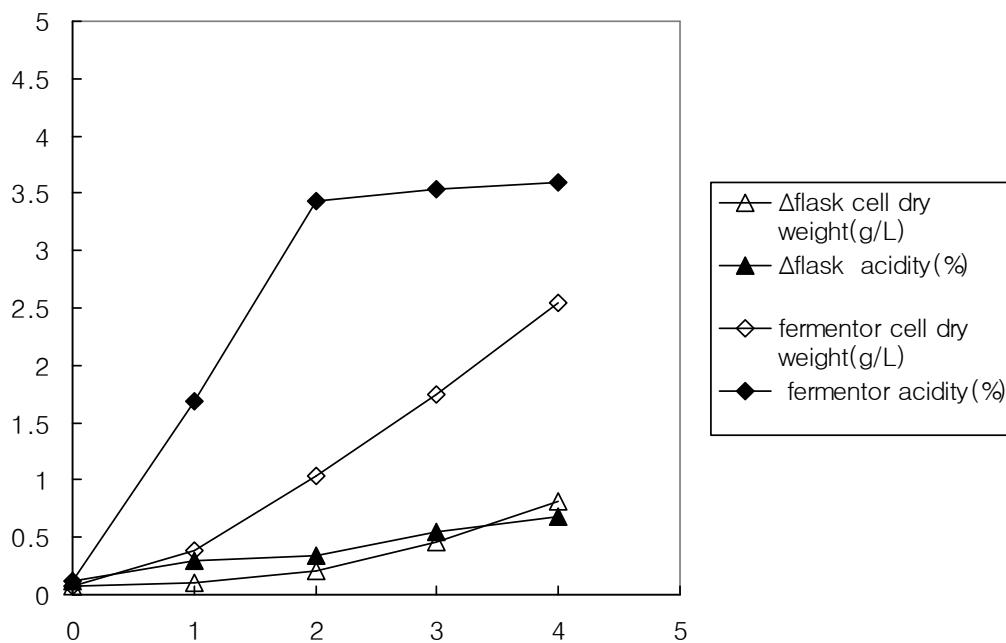


Fig. 2-27. Profiles of acidity and cell dry weight (g/L) for onion vinegar production of *A. tropicalis* 11476P using fermentor and shaking incubator with Erlenmeyer flask after alcohol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 7913.

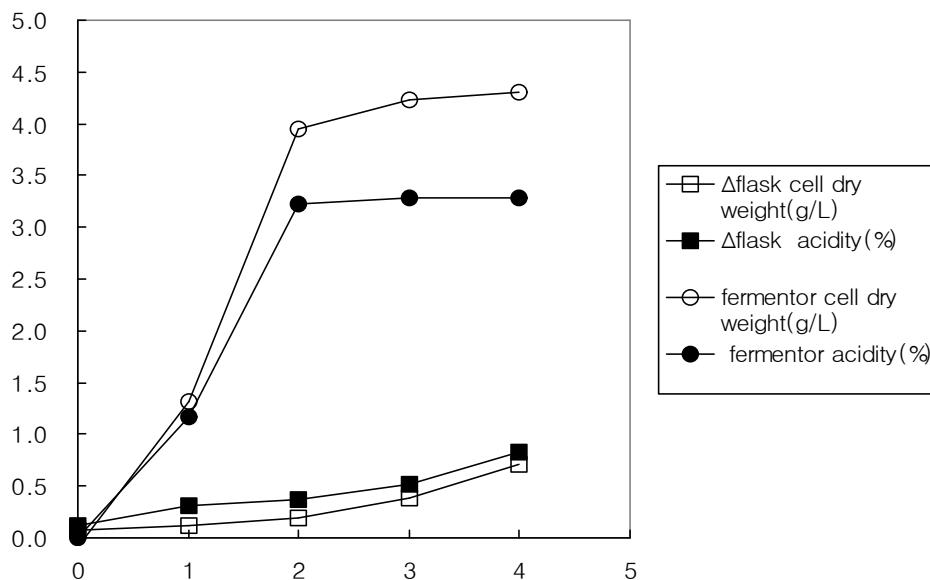


Fig. 2-28. Profiles of acidity and cell dry weight (g/L) during single stage culture for onion vinegar production of *A. tropicalis* 11476P using fermentor and shaking incubator with Erlenmeyer flask.

(라) 관능검사

식초의 관능특성으로 신맛, 발효취 강도, 원료취 강도, 원료취 기호도, 전체적인 기호도를 시판 양조식초와 효모와 초산균으로 배양한 양파식초(A), 초산균만으로 배양한 양파식초(B)를 산도를 동일하게 하여(3.6%) 관능검사한 결과를 Table 2-10에 나타내었다. 신맛의 강도는 시판 양조식초가 양파식초보다 높았으며, 발효취는 2.5점대의 시판식초와 효모와 초산균으로 배양한 양파식초가 낮았고 초산균으로 배양한 양파식초값이 2.7로 다소 높았다. 양파 원료취를 인식하였지만 양파식초의 양파원료에 대한 선호도면에서는 시판식초 보다 낮지 않은 것을 알 수 있었다. 전체적인 선호도는 효모와 초산균으로 배양한 양파식초(A)를 가장 선호하였으며(3.35), 초산균으로 배양한 양파식초(B), 시판 양조식초의 순서였다. 시판 양조식초는 단당류와 전분을 첨가하였고, 양파식초는 아무 것도 첨가하지 않은 상태에서 관능검사를 한 결과로 볼 때 양파식초는 배양 중 양파의 이취가 상당부분 제거되어 선호도 면에서 우수하게 평가된 것으로 판단되었다.

효모와 초산균으로 배양한 양파식초(A)와 초산균만으로 배양한 양파식초(B)의 유기산 분석결과를 Fig. 2-28에 나타내었다. 전체 유기산에 대한 초산의 비율(A/T)은 A의 경우 0.81, B의 경우 0.71, 시판식초 0.7로 Moon 등(1997)의 식초의 관능검사 결과 전체 유기산에 대한 acetic acid(A/T)의 비율이 높을수록 맛 기호도가 좋게 평가되었다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 또한 Fig. 2-29에서 양파식초의 유기산 성분 중 효모로 발효하고 초산균으로 배양한 A 시료는 초산균만으로 배양한 B시료와 비교 시 oxalic acid가 낮은 함량으로 나타나 효모가 oxalic acid를 탄소원으로 이용하는 것으로 판단되었다.

Table 2-10. Results of sensory evaluation score of commercial brewed vinegar and onion vinegar

Sensory Characteristics	Commercial brewed vinegar	Onion vinegar A	Onion vinegar B
Sour flavor intensity	3.45±1.15 ^b	2.95±0.89 ^{ab}	2.75±0.91 ^a
Fermented odor intensity	2.50±0.95 ^a	2.50±0.95 ^a	2.70±1.03 ^a
Background flavor intensity	2.35±0.93 ^a	3.45±0.83 ^b	2.85±1.09 ^{ab}
Background flavor preference	2.90±0.64 ^a	3.20±0.77 ^a	2.90±0.85 ^a
Overall flavor preference	2.95±0.76 ^a	3.35±0.81 ^a	3.00±0.79 ^a

¹⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05).

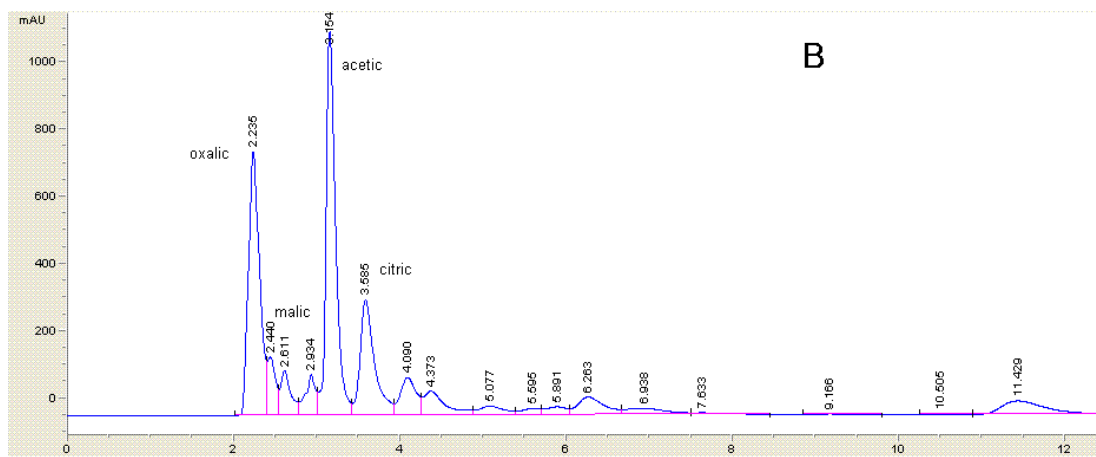
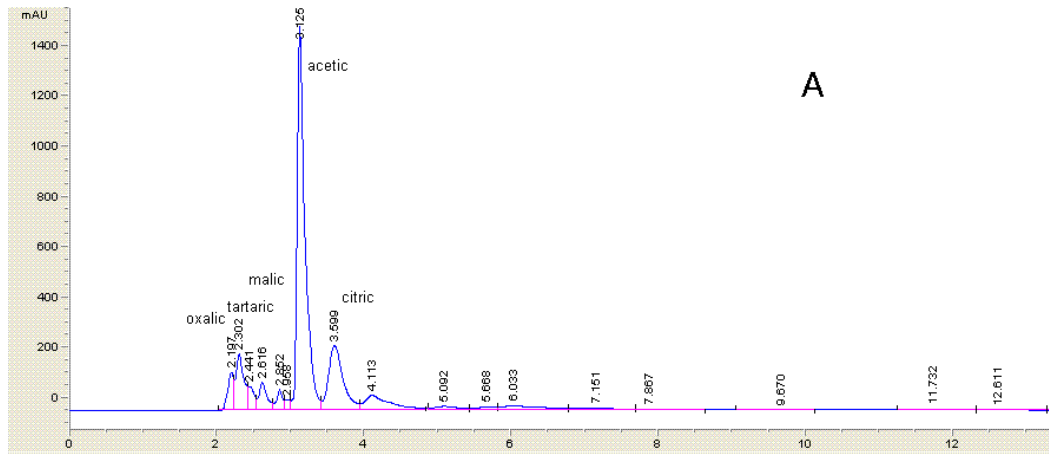


Fig. 2-29. HPLC chromatogram for acid production of *A. tropicalis* 11476P after *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 7913 fermentation (A) and *A. tropicalis* 11476P (B) at onions juice.

(마) 양파식초의 혈전용해활성 조사

양파즙에 주정과 초산균만을 접종하여 배양한 양파식초와 효모로 1단계 배양을 하여 알코올을 생성시킨 후 초산균을 접종한 2단계 배양의 양파식초 시료에서 혈전용해활성을 조사한 결과를 Fig. 2-30에 나타내었다.

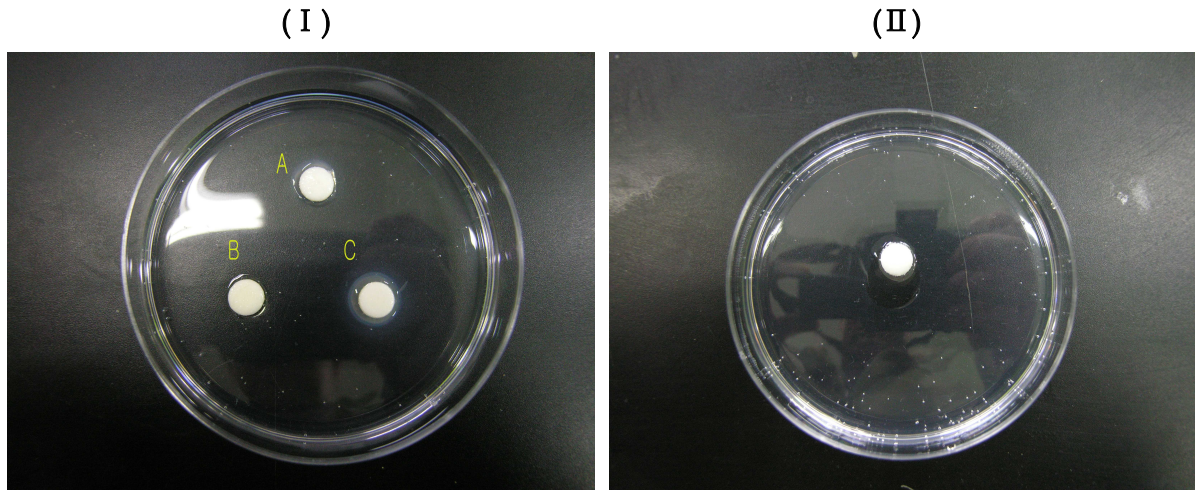


Fig. 2-30. Fibrinolytic activities of onion juice and onion vinegar with *A. tropicalis* 11476P and *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 7913, as assessed by the size of clear zones on fibrin plates.

(I) A: Onion vinegar with *A. tropicalis* No. 22, B: Onion juice, C: Onion vinegar with *A. tropicalis* No. 22 and *S. cerevisiae* KCCM 7913

(II) Plasmin (2.57U/mL)

Fig. 2-30의 결과에서 사진 상으로는 관독하기가 쉽지 않으나 효모와 초산균으로 제조한 양파식초와 초산균만의 양파식초에서 얇지만 뚜렷한 투명환을 관찰할 수 있었으며 (Fig. 2-30의 (I)의 B, C) plasmin과 투명환의 길이로 측정 비교하면 plasmin 활성의 약 10%에 해당하였다. 또한 대조군으로 실험한 식초의 산도와 동일한 3.6%로 초산을 제조하여 투명환을 관찰한 결과 투명환이 관찰되지 않아 산에 의한 혈전용해활성에 미치는 영향은 없는 것으로 판단하였다.

(마) 양파식초의 항혈액응고 활성

혈액응고계는 여러 가지 응고인자들이 연속적으로 활성화되어 최종적으로 fibrinogen을 fibrin으로 변화시킴으로서 clot을 만드는 과정이다. 여기에는 혈관벽 손상 등으로 인한 내인계 경로와 외상 등에 의해 유발되는 외인계 경로가 존재하여 clot을 형성한다. 목적하는 시료가 coagulation cascade의 내인계 또는 외인계에 영향을 주는 지를 각각 APTT와 PT를 이용하여 평가할 수 있는 데 양파식초에 의해 혈액응고가 일어나는 지 또는 어느 인자가 억제되는지를 알아보기 위하여 혈액응고 시간의 변화를 측정하여 Table 2-11에 나타내었다. APTT(activated partial thromboplastin time)와 TT(thrombin time)와 PT(prothrombin time)는 수치가 높을수록 항혈전기능이 있으며, FIB(fibrinogen)는 수치가 낮을수록 항혈전기능이 있는데, 대조군으로 한 양파즙은 Table 2-11의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이 항혈전기능이 없는 반면 초산균과 효모와 초산균을 이용한 양파식초는

0.01mL 첨가균은 APTT 연장효과를 나타내어 항혈전효능이 있었으며, 0.1 mL 첨가균에서는 APTT, TT, PT 항목이 최대치를 나타내었으며 FIB도 대단히 낮아 항혈전효과가 대단히 큼을 알 수 있었다. 즉 소량의 양파식초의 음용은 혈전을 예방하는 데 효과적이라고 할 수 있었다.

Table 2-11. Anticoagulant activity of onion juice and onion vinegar with *A. tropicalis* 11476P and *S. cerevisiae* KCCM 7913 and *A. tropicalis* 11476P

	APTT (sec) (activated partial thromboplastin time)	TT (sec) (thrombin time)	PT (sec) (prothrombin time)	FIB (mg/dL) (fibrinogen)
Rat plasma	62.4	31.5	22.6	100
Control(0.1 mL) ¹⁾	63.2	31.3	23.0	101
Onion vinegar with <i>A. tropicalis</i> No. 22 (0.1 mL)	Vmax (over 160 sec)	Vmax (over 240 sec)	Vmax (over 33 sec)	36
Onion vinegar with <i>S. cerevisiae</i> KCCM 7913 and <i>A. tropicalis</i> No. 22 (0.1 mL)	Vmax	Vmax	Vmax	34
Onion vinegar with <i>A. tropicalis</i> 11476P (0.01 mL)	71.7	30.1	23.0	104
Onion vinegar with <i>S. cerevisiae</i> KCCM 7913 and <i>A. tropicalis</i> 11476P (0.01 mL)	70.9	31.2	22.3	104

¹⁾ Onion juice

(3) 시간단위의 발효조 배양

(가) Step feeding 유가식 양파식초 발효조배양(fed-batch culture)

① 효모 및 초산균의 2단계 유가식 양파식초 발효조배양(fed-batch culture)

살균한 양파즙 2 L에 효모를 2% 되게 접종하여 에탄올을 생산한 후 무균적으로 원심 분리하여 효모를 제거한 후 발효조로 옮겨 초기 에탄올함량을 4%로 조정된 후 4일간 전 배양한 초산균을 4%(v/v) 접종하여 교반속도 300 rpm, 1.5 vvm의 통기 조건으로 초산균

을 배양한 결과를 Fig. 2-31에 나타내었다. Kinetic parameter를 구하기 위해 2시간 간격으로 수행한 실험에서는 1일 간격으로 실험한 배양결과(Fig. 2-25)에서는 알 수 없었던 균의 생육에서 lag phase가 18시간이 소요되는 것을 알 수 있었다. 이후 배양 18시간 이후부터 초산균의 생육과 산도증가가 측정되기 시작하였으며 이때의 잔존 에탄올 농도는 3.02%였다. 에탄올은 배양 28시간 만에 완전히 소비되었으며 이때의 산도는 3%, 발효효율은 57%로 계산되었으며 건조균체량은 3.48 g/L이었다. 3.02%의 초산이 생산된 배양 30시간에 에탄올 2%와 산업적으로 yeast extract 보다 활용성이 높은 corn steep liquor(CSL)를 0.5% 첨가한 결과(1차 첨가), 36시간이 경과한 배양 66시간에 산도는 3.2%이었으며 잔존 에탄올함량은 1.18%이었다. 연이어 에탄올을 2% 첨가하였을 때(2차 첨가), 48시간이 경과된 배양 114시간에 산도는 4.8%에 도달하였으며(잔존 에탄올함량 0.1%), 배양 114시간에 에탄올 2%를 3차 첨가하였을 때, 배양 160시간에는 산도가 5.4%, 에탄올을 3%, CSL을 0.3% 첨가한 결과(4차 첨가), 배양 232시간에 산도가 6.1%로 측정되었다(잔존 에탄올 함량 0%). 단백질원으로 yeast extract를 사용한 것과 비교 시 CSL 0.8%(w/v)의 첨가는 갈색이 양파식초에 영향을 주어 양을 줄여야할 필요성이 대두되었다.

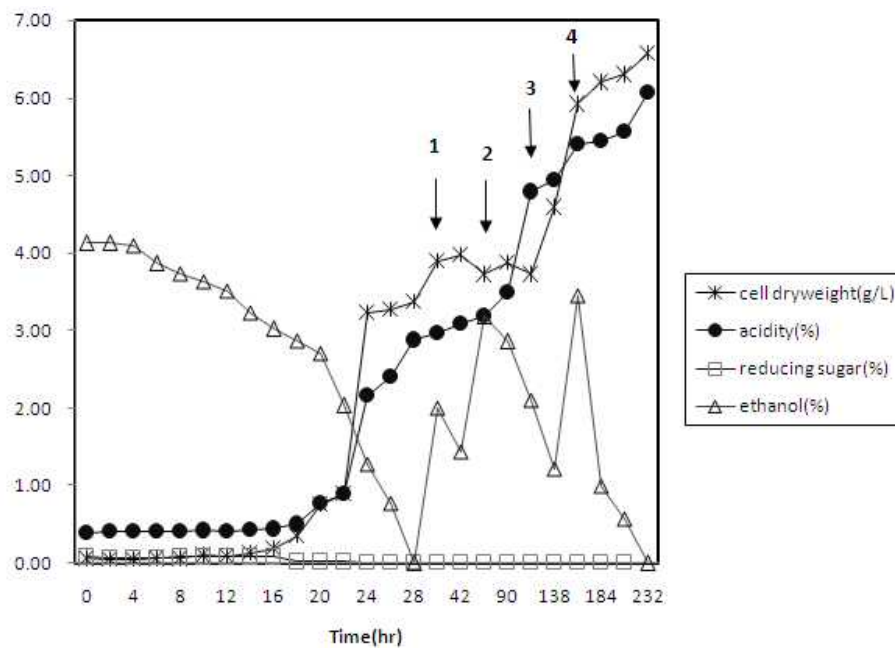


Fig. 2-31. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight during single stage fed-batch culture of *A. tropicalis* 11476P after 4% alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 7913 for onion juice.

Four times step feeding, 1: 2% ethanol and 0.5% corn steep liquor(CSL), 2: 2% ethanol, 3: 2% ethanol, 4: 3% ethanol and 0.3% CSL.

Arrow indicates the start of the step feeding of nutrients.

② 양파즙에서 초산균만의 유가식 양파식초 발효조배양(fed-batch culture)

㉞ 초기 에탄올농도 4%에서의 양파식초 유가식배양

살균한 양파즙 2L에 초기 에탄올 농도를 4%로 하고 삼각플라스크에서 4일간 배양한 초산균 전배양액을 4%(v/v)접종하여 교반속도 300 rpm, 1.5 vvm의 통기 조건으로 배양한 결과를 Fig. 2-32에 나타내었다.

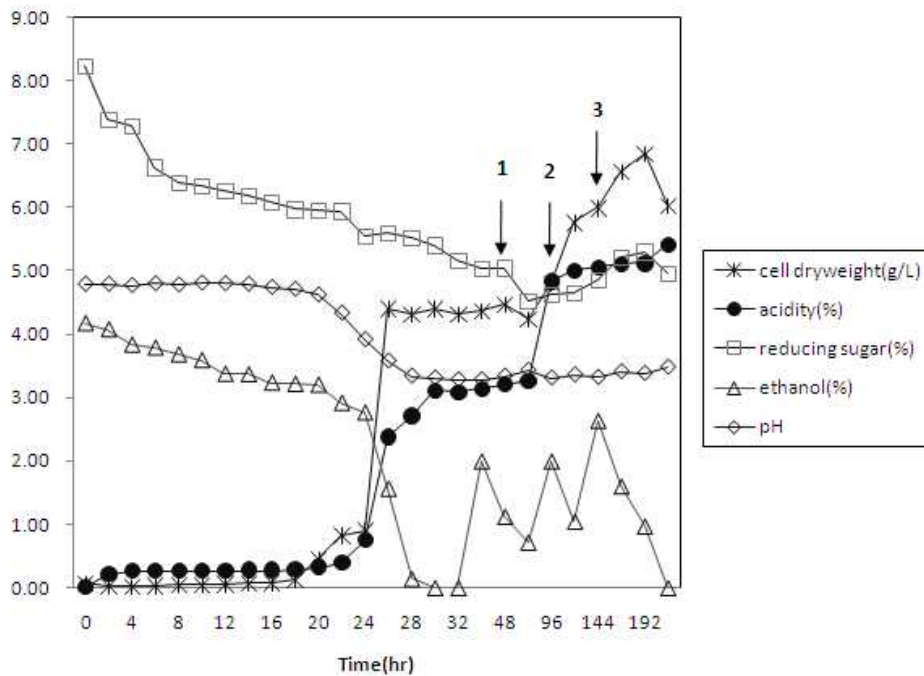


Fig. 2-32. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight during single stage fed-batch culture for onion juice of *A. tropicalis* 11476P at initial ethanol concentration 4%.

Three times step feeding, 1: 2% ethanol and 0.1% CSL, 2: 2% ethanol and 0.2% CSL, 3: 2% ethanol and 0.2% CSL.

Arrow indicates the start of the step feeding of nutrients.

양파즙에 효모와 초산균을 2단 배양한 Fig. 2-31의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이 양파즙에 초산균만을 접종한 경우에도 배양 18시간이후부터 초산균의 생육과 산도의 증가가 측정되었으며, 이때의 잔존 에탄올 농도는 3.2%였다. 에탄올은 배양 30시간만에 고갈되었으며 배양 30시간의 산도는 3.1%, 건조균체량은 4.41 g/L이었으며 이때의 발효효율은 60%로 계산되었다. 동일한 초기 에탄올농도 4%에서 효모로 알코올을 생산한 후 초산균을 배양한 Fig. 2-31의 결과와 비교하여 볼 때, 건조균체량은 0.93 g/L이 더 많게 측정되었으며, 균체량이 더 많음에도 에탄올 소비양상과 초산생산은 거의 유사한 값을 나타내

었다. 3.1%의 초산생산이 이루어진 배양 30시간에 에탄올과 CSL을 각각 2%, 0.1%씩 첨가한(1차 첨가) 유가식배양은 잔존 에탄올이 고갈된 시점인 배양 96시간에서 산도 4.8%에 도달한 결과를 얻을 수 있었다. 계속해서 배양 96시간에 에탄올을 2%, CSL을 0.2% 첨가한 결과(2차 첨가), 48시간이 경과된 배양 144시간(잔존에탄올 0.64%)에는 산도 5.1%를 나타내었으며, 배양 144시간에 에탄올을 2%, CSL을 0.2% 첨가(3회 첨가)한 결과 72시간이 경과된 배양 216시간(잔존 에탄올 0)에는 산도가 5.4%로 측정되었다.

㉔ 초기 에탄올농도 5%에서의 양파식초 유가식배양

양파즙 2 L에 초산균만을 접종하고 초기 에탄올 농도를 5%로 하여 교반속도 300 rpm, 1.5 vvm의 통기 조건으로 배양한 결과를 Fig. 2-33에 나타내었다.

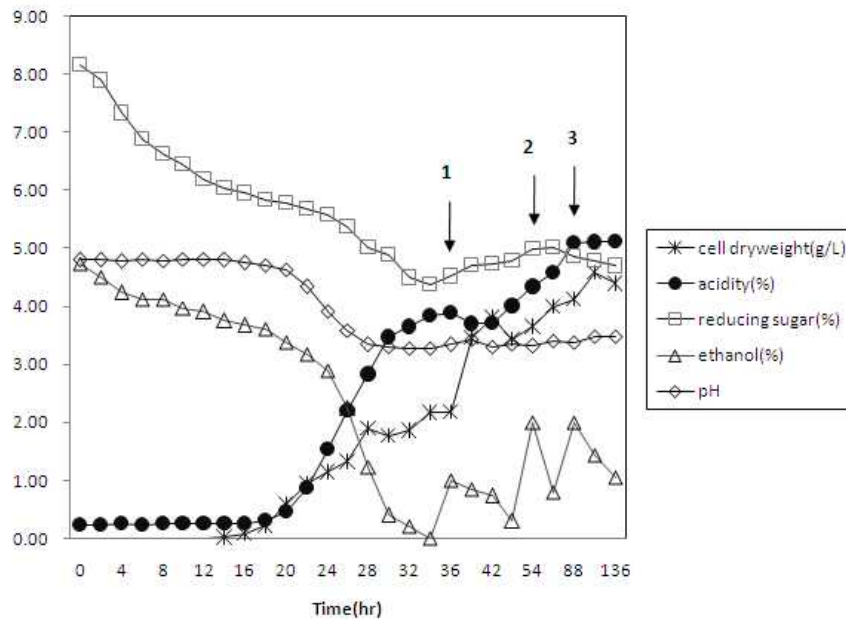


Fig. 2-33. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight during single stage fed-batch culture for onion juice of *A. tropicalis* 11476P at initial ethanol concentration 5%.

Three times steps feeding, 1: 1% ethanol and 0.2% CSL, 2: 2% ethanol and 0.2% CSL, 3: 2% ethanol and 0.2% CSL.

Arrow indicates the start of the step feeding of nutrients.

에탄올은 배양 34시간만에 고갈되었으며 배양 34시간의 산도는 3.8%, 건조균체량은 2.16 g/L이었으며 이때의 발효효율은 59%로 계산되었다. 초기 에탄올 농도 4%의 조건과 비교하면 유가식배양을 수행하기 전인 3.1%의 산도보다 0.7% 높게 측정되었으며 건조균체량은 2.2 5g/L 적게 측정되었다. 또한 초산균의 생육곡선은 초기 에탄올농도가 4%인 Fig. 2-31, Fig. 2-32의 결과와 같이 에탄올 5%에서도 초기 18시간의 lag phase가 공통적

으로 발생하였으며 초산균의 생육과 산도의 증가는 배양 18시간부터 발생하였으며, 이때의 잔존 에탄올 농도는 3.62%였다.

3.8%의 초산생산이 이루어진 배양 36시간에 에탄올과 CSL을 각각 1%, 0.2% 첨가하고(1차 첨가) 28시간이 더 경과된 배양 54시간 시점에서 산도는 4.3%에 도달하였고, 잔존 에탄올 함량은 0이었다. 계속해서 에탄올과 CSL을 각각 2%, 0.2% 첨가하고(2차 첨가) 10시간이 경과된 배양 64시간에 산도는 4.6%로 증가하였고(잔존 에탄올농도 0.8%), 에탄올이 고갈된 시점인 배양 88시간에 산도는 5.1%이었으며, 에탄올과 CSL을 각각 2%, 0.2% 계속 첨가하였을 때(3회 첨가), 48시간이 경과된 배양 136시간에서는 다소 높은 잔존산도의 영향으로 에탄올의 소비도 적어서 3차 첨가하여도 1.05%의 에탄올이 잔존하고 있었으며 산도는 5.1%를 유지하고 있는 결과를 볼 수 있었다.

㉔ 초기 에탄올농도 6%에서의 양파식초 유가식배양

양파즙 2 L에 초산균만을 접종하여 초기 에탄올 농도를 6%로 하여 교반속도 300 rpm, 1.5 vvm의 통기 조건으로 배양한 결과를 Fig. 2-34에 나타내었다. 에탄올은 배양 46시간만에 고갈되었으며 배양 46시간에서의 산도는 4.9%, 건조균체량은 3.26 g/L이었으며 이때의 발효효율은 62%로 계산되었다. 초산균의 생육곡선은 초기 에탄올농도가 4, 5%에서와 같이 초기 18시간의 lag phase가 공통적으로 발생하였으며 초산균의 산도의 증가는 초기 에탄올 4, 5%의 조건보다 약 2시간이 더 지체된 배양 20시간부터 발생하였으며, 이때의 잔존 에탄올 농도는 3.39%였다.

4.9%의 초산생산이 이루어진 배양 46시간 이후 에탄올 고갈시점인 배양 48시간에 에탄올과 CSL을 각각 2%, 0.2% 첨가한 결과(1차 첨가), 48시간이 더 경과된 배양 96시간 시점에서 산도는 4.7%이었고, 잔존 에탄올 함량은 0.86%이었다. 계속해서 배양 96시간에 에탄올과 CSL을 각각 2, 0.2% 첨가하고(2차 첨가) 48시간이 경과된 배양 144시간까지 산도는 4.8%로 산도가 유지되는 양상을 보였으며(잔존 에탄올농도 0.96%), 에탄올과 CSL을 각각 2, 0.2% 계속 첨가하여(3차 첨가), 96시간이 경과된 배양 240시간에 잔존 에탄올 함량은 0.59%로 잔존하고 있는 상태에서 산도는 5.3%로 증가된 결과를 얻을 수 있었다.

초기 에탄올 함량 6%의 경우 배양 2일이 경과된 시점에서 양조식초의 규격인 산도 4% 이상인 4.9%의 산도값을 나타내어 Shin 등(2002)이 보고한 발효조를 사용한 2단계 발효에 의한 양파식초에 대한 연구에서 초기 알코올 농도 6%에서 발효 8~10일만에 약 4.8~4.9%의 최고 산도를 나타내었다는 보고와 비교해 볼 때, 배양기간이 상당히 단축된 결과를 얻을 수 있었다. 양파즙을 이용하여 제조한 양조식초는 초기에탄올 함량 6%의 조건에서 Jeong 등(2000)이 식초의 산업화에서 식초를 생산하는 데 있어서 단기간 배양을 약 10일로 정의한 기간에서 1/5의 기간이 단축된 결과를 얻을 수 있었다.

삼각플라스크배양에서 초기 에탄올 농도가 4, 5, 6%(RSM에서는 4.77%)에서 배양 10일이 지난시점에서 최대의 산도 값인 3.03, 2.73, 2.41%와 각각 비교해 볼 때, 발효조 배양에서는 2일내에 배양이 완료되었으며 산도는 각각 3.1, 3.9, 4.9%의 값을 나타내어 배양기간의 단축및 산도의 증가를 볼 수 있었다.

Hekmat 등(1992)은 초산균의 생육율은 산소이용성에 의해 결정된다고 하였으며, Czuba(1988)는 산소 uptake rate가 biomass당 10.5 mg O₂ mg⁻¹ 이하가 되면 산소가 제한기질이 된다고 하였다. 또한 Oosterhuis 등(1985)은 산소포화농도의 10% 이하는 산소가 부족한 시스템이라고 하였다. 이러한 보고된 자료를 근거로 볼 때, 산소의 공급이 제한되는 삼각플라스크배양보다 산소의 공급을 포화농도의 80%로 공급한 실험에서 초산균의 생육과 산도는 빠른 속도로 증가되어 잔존 당농도, 잔존 에탄올함량, 단백질영양원도 중요하지만 특히 산소의 공급이 식초의 생산에 대단히 중요한 요소임을 알 수 있었다.

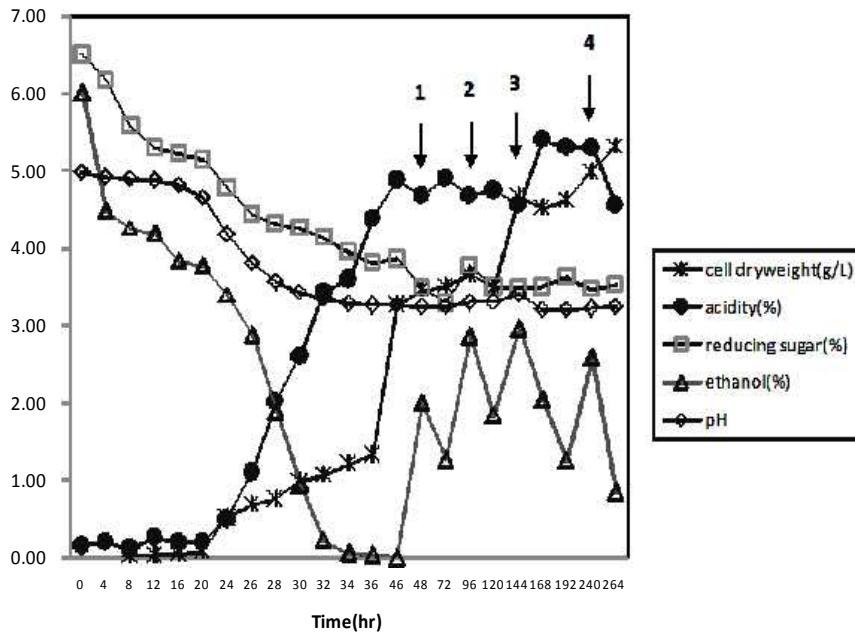


Fig. 2-34. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight during single stage fed-batch culture for onion juice of *A. tropicalis* 11476P at initial ethanol concentration 6%.

Four times step feeding, 1: 1% ethanol and 0.1% CSL, 2: 2% ethanol and 0.1% CSL, 3: 2% ethanol and 0.1% CSL, 4: 2% ethanol.

Arrow indicates the start of the step feeding of nutrients.

③ 회분식 및 유가식 양과식초 발효조배양(fed-batch culture)의 kinetic parameter

효모로 알콜을 생산하여 초산균을 배양한 양과식초와 양과즙에 초산균만을 접종하여 초기 에탄올 함량을 변화시켜 배양한 양과식초의 유가식배양 전의 회분식배양에 대한 kinetic parameter를 Table 2-12에 나타내었다.

Table 2-12. Parameters obtained from batch fermentation of under aerated condition

Parameter	Initial ethanol condition (%)			
	4%(yeast+acetic acid bacteria)	4%(acetic acid bacteria)	5%(acetic acid bacteria)	6%(acetic acid bacteria)
$\mu(\text{h}^{-1})^*$	0.341	0.344	0.191	0.114
$Y_{p/e}^{**}$	57	60	59	62
$P(\text{gh}^{-1}\text{L}^{-1})^{***}$	2.05	2.02	2.38	3.23
$\Pi(\text{h}^{-1})^{****}$	0.69	0.70	1.82	5.42

*: specific growth rate

** : fermentation efficiency = $\frac{\text{final acidity}(\%, w/v) - \text{initial acidity}(\%, w/v)}{\text{initial ethanol concentration}(\%, v/v) \times 1.304} \times 100$

***: productivity: final acidity/ fermentation time

****:specific product formation rate: $\frac{\text{final acidity}(\%, w/v) - \text{initial acidity}(\%, w/v)}{\text{final cell dryweight} - \text{initial cell dryweight}}$

Parameter 값들은 배양 중 18시간의 생육 lag phase 이후 균체의 생육과 초산의 생산이 증가되기 시작한 시점에서 최종산도에 도달한 시점까지로 하여 계산하였다. 양과즙에 효모를 배양하여 에탄올을 생산한 후 초산균을 접종한 배양과 양과즙에 동일한 에탄올 농도 4%의 주정을 첨가하여 초산균을 배양한 발효결과는 비중식속도와 발효효율, 초산생산성(P), 비초산생산성(Π)이 통기발효조에서 거의 유사한 값을 보임을 알 수 있었으며, 에탄올의 농도가 5%와 6%로 증가할수록 비중식속도는 감소하는 반면 초산의 생산성과 비초산생산성은 증가하는 것을 볼 수 있었다. 즉 초기 에탄올 농도가 4%보다 높아질수록 균체의 생산은 감소하고 초산의 생산성은 증가됨을 알 수 있었다.

초기 에탄올 농도 4, 5, 6%의 배양에서 에탄올 농도가 고갈된 시점에서 최종산도에 도달한 시점에서의 에탄올 자화는 배양시간당 0.125~0.14 g의 에탄올을 이용하는 것을 볼 수 있었는데, 최종산도 도달과 거의 동시에 유가식배양을 수행하였을 때의 에탄올 자화는 시간당 0.024~0.07 g을 이용(24시간으로 하면 0.58-1.68 g의 에탄올을 자화)하여, 산도가 높을수록 추가로 첨가하는 에탄올에 대한 초산균의 자화정도는 초기보다 낮아짐을 알 수 있었다.

④ 초산균의 양과즙에서의 생육특성

일반적으로 초산균의 생균수는 초산 4% 이상에서는 더 이상 증가하지 못하며 약 4%의 알코올 농도에서 생육저해를 받는 것으로 알려져 있으며, 알코올의 초산균 생육저해문제는 기질을 일정농도로 유지하는 유가식배양(fed-batch culture)으로 해결할 수 있다고 보고되고 있다(Park et al. 1989). 에탄올의 농도를 2~3%로 유지하도록 에탄올을 공급하고 반복적으로 유가식배양을 수행한 결과 전통적인 배양의 초산농도 5.5~6.5%보다 더 높은 초산을 생산하였다고 보고하고 있다(Park et al. 1991). 또한 Nanba 등(1984)은 낮은 에탄올 농도와 초산농도 1% 이하의 조건에서 초산균의 생육율은 증가하지만 2% 이상의 초산농도에서 생육율은 심각하게 저해되며, 5%의 초산농도에서는 잔존 에탄올의 양과 상관없이 완전하게 저해된다고도 하였다.

본 실험에서 초기 에탄올농도 4, 5, 6% 이상의 조건에서 초산균을 배양한 결과 잔존 에탄올농도 3.2~3.6%의 범위에서 초산균의 생육과 초산의 생산이 증가되기 시작한 실험 결과에 기초하여 초산균의 생육에 대한 초기 에탄올의 영향을 조사하기 위하여 양과즙에 초기 에탄올 농도를 0%로 하여 배양한 결과와 초기 에탄올 농도를 초산균의 생육과 초산생산이 증가하기 시작한 에탄올 농도범위인 3%로 하여 유가식배양을 수행한 결과를 Fig. 2-35와 2-36에 각각 나타내었다.

양과즙에 에탄올을 첨가하지 않고 초산균만을 생육시킨 Fig. 2-35의 결과에서 초산균은 에탄올이 존재하지 않는 조건에서도 초기 에탄올이 4% 이상의 조건과 유사하게 생육에 대한 다소 긴 lag phase(16시간)를 나타내고 그 이후에 급속한 증식이 있음을 알 수 있었다. 또한 잔존 에탄올 농도 3.2~3.6%의 조건에서 생육과 산도가 증가하기 시작하여 초기 에탄올 농도 3% 조건에서는(Fig. 2-36) 초산균의 증식이 배양초기부터 증가할 것이라는 예상과 달리 초기 에탄올 4%이상의 실험과 마찬가지로 18시간의 lag phase 이후에 생육과 산도가 증가하는 결과를 나타내어 양과즙에서 초산균의 초기 생육은 에탄올농도에 관계없이 16시간 정도의 lag phase를 나타냄을 알 수 있었다.

이러한 경향은 양과즙에서만 생육특성으로 생각되며, 배양 12시간에 유가식배양을 수행한 결과(Fig. 2-36) 배양 72시간에 산도 4%에 도달하였다. 배양 28시간의 산도 1.8%까지는 균체의 생육이 증가되다가 배양 48시간의 산도 3.5%에서는 생육이 저해되고 산도는 계속 증가하는 경향을 보였다. 또한 초기 에탄올 4, 5%의 배양결과(Fig. 2-31, 2-32)에서도 산도 2.1~2.4%까지 생육은 저해되지 않은 결과를 보여 Nanba 등(1984)이 보고한 초산균 생육저해 산도인 2%보다 높은 2.4%의 산도까지는 본 실험의 초산균주는 생육저해가 발생되지 않는 것으로 판단되었다.

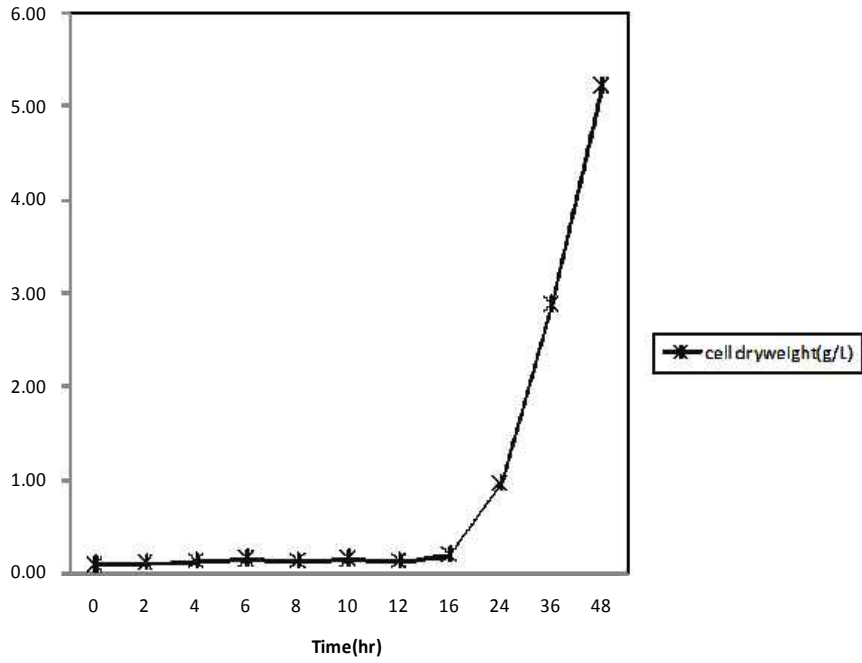


Fig. 2-35. Growth of *A. tropicalis* 11476P on onion juice only.

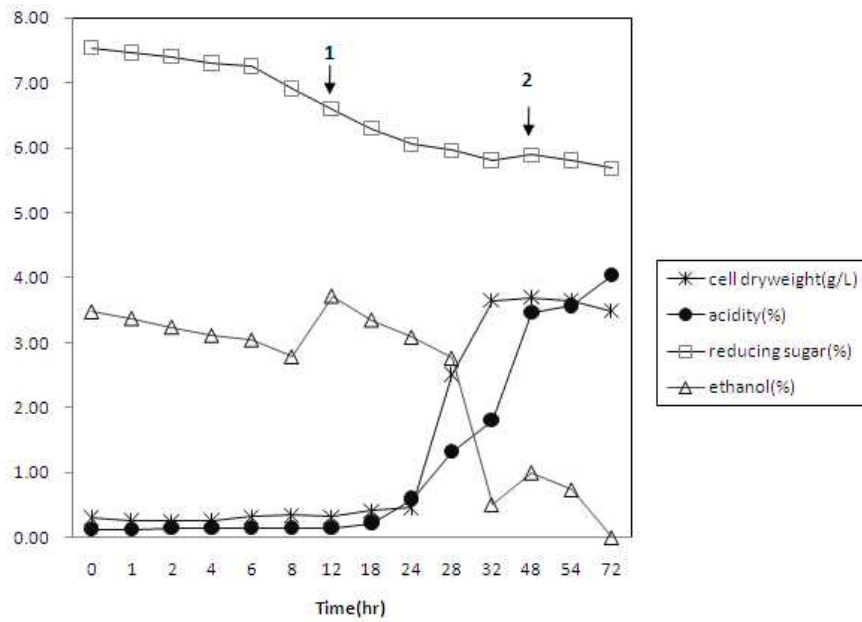


Fig. 2-36. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight during single stage fed-batch culture for onion juice of *A. tropicalis* 11476P at initial ethanol concentration 3%.

Two times step feeding, 1: 1% ethanol, 2: 1% ethanol and 0.1% CSL.

Arrow indicates the start of the step feeding of nutrients.

⑤ High cell density 유가식 양파식초 발효조배양(fed-batch culture)

Ito 등(1991)은 고산도 식초생산을 위해 2개의 발효조를 사용한 유가식 생산을 제안하였다. 첫 번째 발효조에서 생균수를 최대로 한 후 두 번째 발효조에는 소량의 기질을 공급하고 첫 번째 발효조와 두 번째 발효조 모두 낮은 에탄올농도를 공급한 결과 첫 번째 발효조에서 최대의 생균수로 키운 배양액을 두 번째 발효조로 공급하여 순환시킨 결과 8%의 초산을 얻을 수 있었다고 보고하였다. 1개의 발효조로 이와 유사한 실험효과를 보기 위하여 에탄올 첨가 없이 초산균체를 양파즙에서 2일간 증식시켜 높은 균체량(6.28 g/L)을 얻은 이후, 초기 에탄올 농도를 4%로 하여 유가식 배양을 수행한 결과를 Fig. 2-37에 나타내었다.

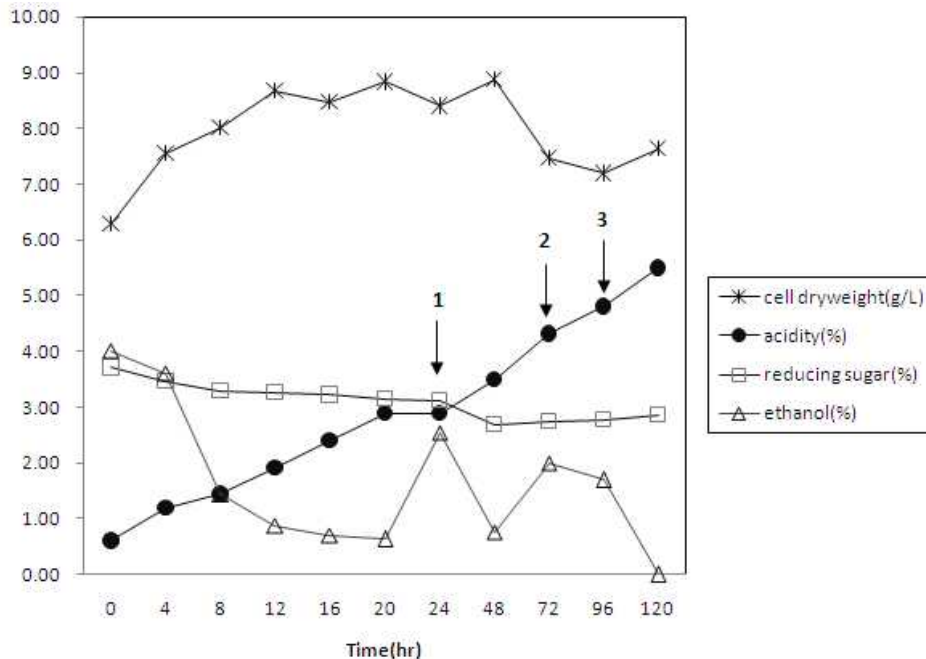


Fig. 2-37. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight during single stage fed-batch culture of *A. tropicalis* 11476P at initial ethanol concentration 4% after 2 day cell growth on onion juice.

Three times step feeding, 1: 2% ethanol and 0.2% CSL, 2: 2% ethanol and 0.2% CSL, 3: 1% ethanol and 0.1% CSL.

Arrow indicates the start of the step feeding of nutrients.

초산균체량이 높은 조건에서 초기 에탄올 4%의 배양은 균체의 증식과 초산 생산에서 배양초기의 lag 현상을 보이지 않았으며 배양 24시간까지 지속적으로 산도가 증가하는 경향을 보였다. 배양 24시간, 72시간, 96시간마다 에탄올과 CSL의 첨가에 따라 균체량은 증가하지 않으면서 지속적으로 산도가 증가하는 경향을 보였다.

(나) Continuous feeding 유가식 양과식초 발효조배양(fed-batch culture)

양과즙에 초산균만을 접종하여 초기 에탄올 농도를 4%로 한 Fig. 2-32와 동일한 조건에서 회분배양하면서 기질인 에탄올과 양과즙을 peristaltic pump로 발효조에 연속적으로 공급한 결과를 Fig. 2-38에 나타내었다.

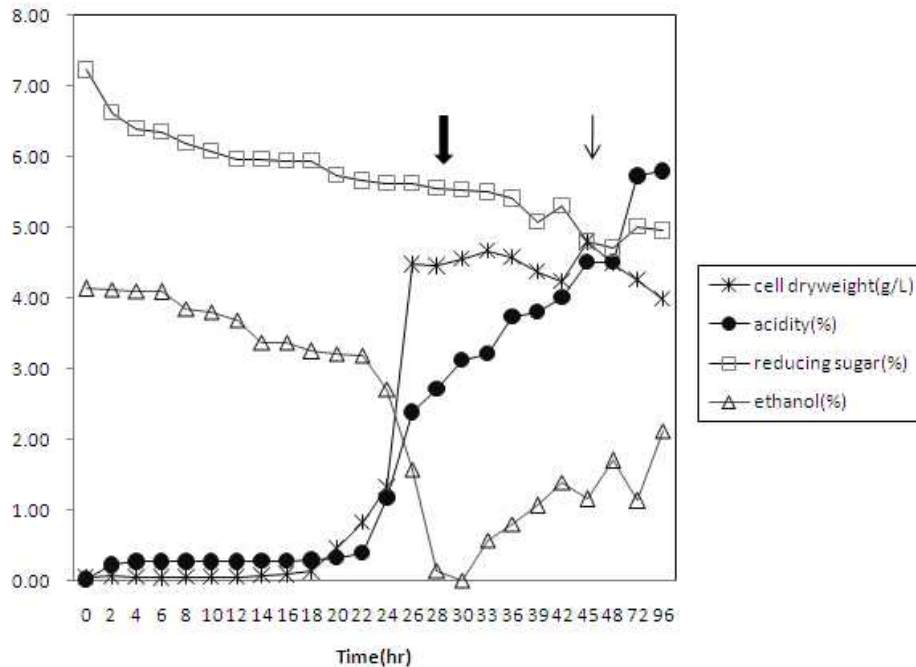


Fig. 2-38. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight during single stage fed-batch culture for onion juice of *A. tropicalis* 11476P at initial ethanol concentration 4%.

Continuous feeding(feeding rate 100 mL/h,L), ↓: 30% ethanol+70% onion juice, ↓: 20% ethanol+ 80% onion juice.

에탄올이 고갈되는 시점인 배양 28시간에 30% 에탄올과 70% 양과즙이 혼합된 기질을 만들어 working volume 2 L에 대하여 시간당 8.3 mL의 속도로 15시간까지 연속적으로 기질을 공급한 결과(시간당 0.04 g의 에탄올공급), 배양 45시간만에 산도 4.5%에 도달하였다. Step feeding한 유가식배양에서 산도 4.5%가 초과되면 에탄올의 이용성이 낮아져 배양 45시간부터 20%에탄올과 80% 양과즙이 혼합된 기질을 48시간 공급한 결과(시간당 0.027 g의 에탄올공급) 산도는 5%까지 도달하였다. 배양 96시간에 잔존 에탄올이 없는 시점에 산도 4.8%에 도달한 step feeding한 유가식 배양결과(Fig. 2-32)와는 달리 배양 30시간부터 연속적으로 소량씩 에탄올과 양과즙을 공급하는 조건에서는 건조균체량은 증가가 되지 않으면서 산도는 계속 증가하여 배양 45시간만에 산도가 4.5%에 도달하였으며, 배양 72시간에는 5.72%까지 증가하였다. 이때의 잔존 에탄올 함량은 1.13~1.69% 범위였다.

(다) 부분적인 repeated 회분식배양

실험실 발효조는 working volume을 2 L로 하였으며, 한 번에 양파식초 1.5 L의 샘플링이 가능하여 초기 에탄올농도를 5%의 조건에서 배양 30시간 마다 1.5 L를 샘플링하고 0.5 L의 식초배양액이 남은 상태에서 1.5 L의 살균한 양파즙을 보충하는 방식으로 5회 recycling 실험한 결과를 Fig. 2-38에 나타내었다.

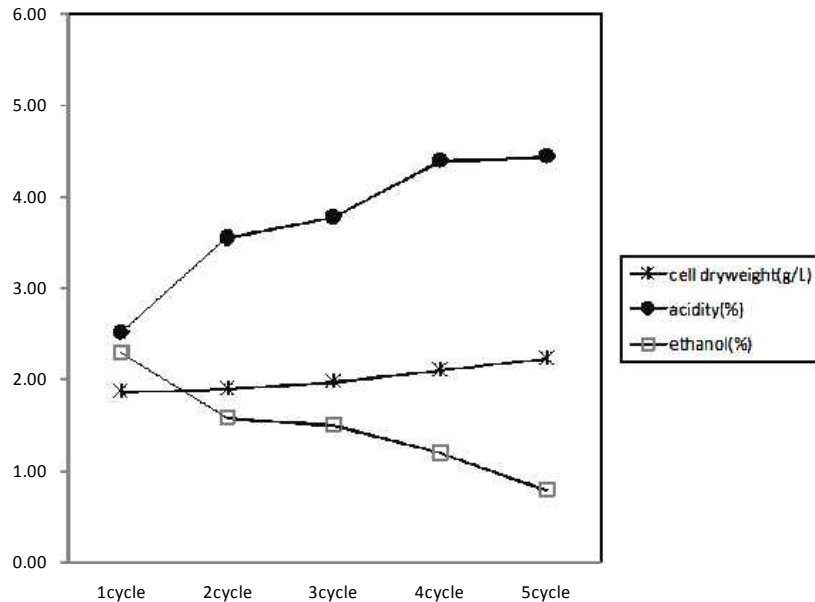


Fig. 2-38. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight during single stage fed-batch culture of *A. tropicalis* 11476P on the condition of initial ethanol concentration 5% at the fermentation cycle of 30 hr on onion juice.

0.5 L의 양파식초가 남아있는 상태에서 추가로 양파즙 1.5 L를 첨가하여 횟수를 반복할 수록 균체의 증식은 완만한 반면 산도의 증가와 잔존 에탄올의 감소현상을 보여 내산성과 에탄올의 이용성이 횟수반복에 따라 증가하는 현상을 볼 수 있었으며 산업적인 생산 조건에서도 가능한 방법 중의 하나로 여겨졌다.

(라) Pilot scale 양파식초 제조

2 L 양파즙 발효조 배양에서 배양 48시간 만에 산도가 4.9% 측정되었던 결과를 토대로 양파즙의 working volume을 120 kg으로 하여 300 L pilot scale 발효조에서 300 rpm, 1.5 vvm의 통기조건에서 초기 에탄올 6%의 조건으로 초산균을 배양한 결과를 Fig. 2-39에 나타내었다.

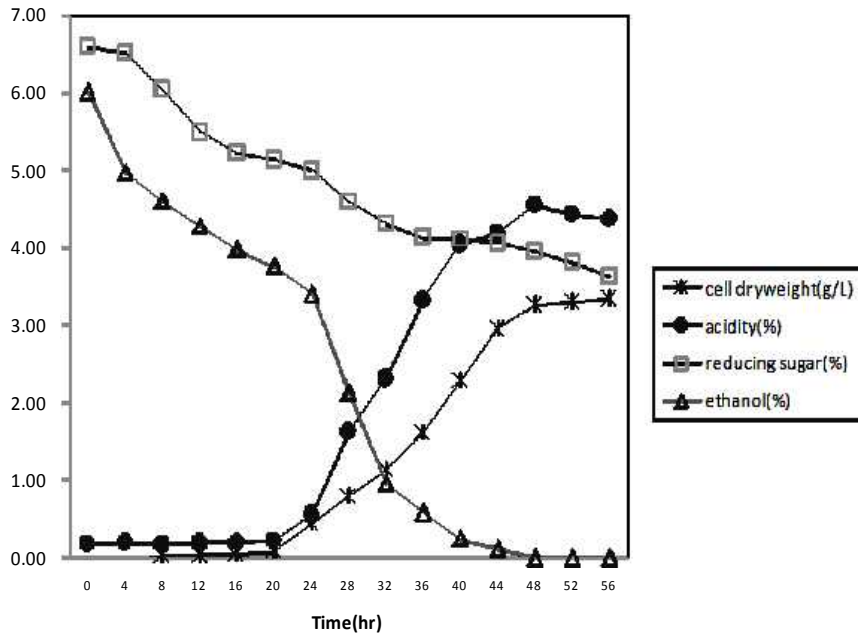


Fig. 2-39. Profiles of ethanol concentration, acidity and cell dry weight for pilot scale onion vinegar of *A. tropicalis* 11476P at initial ethanol concentration 6%.

배양 48시간에 에탄올은 고갈되었으며 이때의 산도는 4.6%로 측정되어 working volume을 2L로 한 발효조 배양결과와 유사한 값을 얻을 수 있었다. 식초의 산업화에서 양조식초(산도 4.29%)를 생산하는 데 있어서 단기간 배양을 약 10일로 정의한 Jeong 등 (2000)의 보고 자료를 기준으로 할 때 약 1/5기간이 단축된 결과로 산업적인 기능성 양파식초의 생산경제성 측면에서 우월한 결과를 얻을 수 있었다.

4. 결 론

양파의 낮은 저장성에 대한 활용도를 높이고, 양파의 기능성과 식초의 기능성을 동시에 갖춘 양파식초를 개발하기 위한 연구의 일환으로 복숭아 낙과로부터 분리한 초산생성 능이 우수한 초산균을 순수 분리하여 균의 특성을 조사하였고, 양파즙에 대한 양조식초 생산을 위하여 진탕배양기를 이용한 삼각플라스크 배양특성과 발효조를 이용한 회분 및 유가식 배양의 양파식초 발효특성을 조사하고, 관능검사비교 및 각 유기산 조성과 양파식초의 혈전용해능과 항혈전 기능성을 조사하였다. 또한 양파식초의 배양특성결과로부터 kinetic parameter의 도출 및 대량생산을 위한 pilot scale(working volume 150L)의 양파식초 제조를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

복숭아 낙과로부터 분리한 산생성능이 우수한 초산균은 분리 동정한 결과 *Acetobacter tropicalis*이었으며 한국미생물보존센터에서 *Acetobacter tropicalis* KFCC 11476P로 균주번호를 부여받았다.

GYP 액체배지에서 *A. tropicalis* 11476P 균주를 이용한 식초제조의 최적 조건을 찾기 위하여 *A. tropicalis* No. 22 균주를 이용한 식초제조의 최적 조건을 찾기 위하여 초기 에탄올농도는 GYP 배지에서 30℃에서 10일간 배양하여 균의 생육과 산생산능을 조사한 결과 4%의 에탄올 첨가균이 가장 높은 산도를 나타내었다. 초기산도는 배양 7일 쯤까지는 초기산도가 1%일 때의 산도가 가장 높았으나 최고 산도는 배양 8일 쯤부터 초산을 첨가하지 않은 배양균이 산도 3.36%로 초기산도 1% 첨가균보다 더 높음을 볼 수 있었으며 초기 산도가 높을수록 초산균이 저해를 받아 초산균이 잘 증식하지 못하기 때문에 생성되는 총산함량은 민감하게 감소하였다.

식초제조의 최적 조건을 찾기 위하여 산도가 가장 높았던 4% 에탄올 농도, 초기 산도가 0인 GYP 액체배지에서 균의 생육을 증가시킬 수 있는 glucose 농도를 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 6, 8%로 각각 조절하여 30℃에서 10일간 배양하여 균의 생육과 총산을 조사한 결과 초기 glucose 농도는 2.5-3% 범위의 농도가 초산균의 생육과 산도 생산이 가장 높았다.

잔존 ethanol과 glucose 농도가 초산생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 초기 ethanol 농도 4%의 조건에서 초기 glucose 농도 0%와 2.5%를 각각 함유하는 GYP 배지에서 10일간 배양한 결과, 초산 생산이 감소하기 전 단계의 6일과 8일의 잔존 ethanol 농도는 0.6~1.3% 범위가 초산생성이 원활한 농도라 할 수 있으며, 이때의 잔존 glucose 농도는 1.6-1.8%의 범위에 있었다.

초산생산의 최적화를 위해 중심합성계획법에 따라 각 독립변수를 초기 ethanol 함량, 초기 acetic acid 함량, 초기 glucose 농도로 요인변수들을 -2, -1, 0, 1, 2로서 5개로 부호화하여 반응표면분석을 수행한 결과 초기 ethanol 농도 4.67%, 초기 acetic acid 농도 0.03%, 초기 glucose 농도 2.35%이었으며 이때의 산도 값은 3.77%로 나타나 실험결과에 근접함을 알 수 있었다.

발효조(fermentor)에서 초기 알코올 농도 4%의 양과즙에 초산균을 발효한 경우와 효모발효 후 효모균체를 제거하고 초산균을 접종한 2단계 배양을 한 경우 2일 이내에 3.3-3.6%의 최고산도에 도달하여 삼각플라스크 배양과 비교하여 볼 때 초산균의 생육과 초산생산은 통기에 대단히 민감하게 영향을 받는 결과를 보였다. 또한 유가식 배양을 수행한 결과 초산균의 초산생산에 있어서 yeast extract와 CSL(corn steep liquor)이 에탄올에 의한 초산생산을 증가시키는 추가 영양원임을 알 수 있었으며, 초기에 초산첨가 없이 각각 5.7%와 6.65%까지 산도를 증가시킬 수 있었다.

식초의 관능특성으로 신맛, 발효취 강도, 원료취 강도, 원료취 기호도, 전체적인 기호도를 시판 양조식초와 효모와 초산균으로 배양한 양과식초, 초산균만으로 배양한 양과식초를 산도를 동일하게 하여 관능검사한 결과 신맛의 강도는 시판 양조식초가 양과식초보

다 높았으며, 발효취는 시판식초와 효모와 초산균으로 배양한 양파식초가 낮았고 초산균으로 배양한 양파식초에 대한 점수가 다소 높았다. 양파에서 기인한 원료취를 인식하였으며 양파식초에 대한 선호도면에서는 시판식초 보다 낮지 않아 양파자체가 갖고 있는 이취는 초산배양에 의해 거의 존재하지 않음을 알 수 있었다. 전체적인 선호도는 효모와 초산균으로 배양한 양파식초를 가장 선호하였으며(A/T 0.81), 초산균으로 배양한 양파식초(A/T 0.71), 시판 양조식초(A/T 0.70)의 순서였다.

양파식초의 기능성탐색연구의 일환으로 혈전용해능 및 항혈전기능 정도를 살펴본 결과 효모와 초산균으로 제조한 양파식초와 초산균만으로 제조한 양파식초에서 얇지만 뚜렷한 투명환을 관찰할 수 있었으며 plasmin 활성의 약 10%에 해당하는 혈전용해활성을 나타내었다. 항혈전기능은 대조군으로 한 양파즙은 항혈전기능이 없는 반면 초산균과 효모로 제조한 양파식초와 초산균만으로 제조한 양파식초 모두 0.1 mL 첨가군에서는 APTT, TT, PT 항목이 최대치를 나타내었을 뿐만 아니라 FIB도 대단히 낮아 항혈전효과가 대단히 큼을 알 수 있었다.

산업적으로 유용한 양파식초의 속성생산과 kinetic parameter의 도출을 위하여 회분 및 유가식배양을 심도 있게 시간간격으로 분석하면서 초산균배양 실험을 수행한 결과 초기 에탄올농도 4, 5, 6% 조건에서의 양파식초의 회분배양은 통기효과에 의해 2일이 초과되지 않는 배양 30시간, 34시간, 46시간 만에 에탄올이 모두 소비되었으며 이때의 산도는 각각 3.1, 3.8, 4.9%였다. 초기 에탄올의 농도가 5%와 6%로 증가할수록 비증식속도는 0.344, 0.191, 0.114 hr⁻¹로 감소하였고, 초산생산성(P), 비초산생산성(II)은 증가하는 것을 알 수 있었다.

회분배양(batch culture)에서의 에탄올 소비율은 배양시간당 0.125~0.14 g이었다. 에탄올 고갈 시점부터 step feeding 방법으로 에탄올과 단백질원(yeast extract, CSL)을 공급하여 유가식배양(fed batch culture)을 수행하였을 때의 에탄올 소비는 시간당 0.024-0.07g을 이용하여, 산도가 높아짐에 따라 에탄올의 소비도 낮아짐을 알 수 있었다.

유가식배양의 Feeding 방법에서 초기 에탄올농도 4%의 배양조건에서 에탄올이 고갈되는 시점인 배양 28시간에 기질로 양파즙과 에탄올을 7:3의 비율로 하여 peristaltic pump를 이용하여 시간당 8.3mL의 속도로 15시간까지 continuous feeding 방법으로 유가식배양을 수행한 결과, 잔존 에탄올이 1.15%인 배양 45시간 만에 산도가 4.5%에 도달하였다. 배양 45시간부터 양파즙과 에탄올을 8:2의 비율로 공급한 결과 산도는 5%까지 도달하였고, 배양 72시간만에 산도가 5.72%까지 증가하여(잔존 에탄올 함량은 1.13~1.69%), step feeding 방법의 유가식 배양보다 배양기간이 단축되고 산도가 더욱 높아짐을 볼 수 있었다.

양파식초의 대량생산을 위한 필수적인 전단계로서 120 kg의 양파즙을 제조하여 300 L pilot scale 발효조에서 산소가 충분히 공급되는 조건에서 초기 에탄올 6%의 조건으로 초

산균을 배양한 결과 배양 48시간에 에탄올은 고갈되었으며 이때의 산도는 4.6%로 측정되어 실험실규모(2 L)의 발효기 실험결과와 유사하였으며, 2일내에 산도 4%이상의 양파식초의 생산이 가능한 결론을 얻었다.

제 3 절 기능성 양파발효음료 제조공정 개발

1. 서론

양파는 Allium 속 채소류로서, flavonoid류가 다량 함유되어 있는 널리 재배되고 있는 채소이다(Herrmann, 1976). 양파는 식품의 향신료 및 조미료 외에 고대 이집트, 그리스, 페르시아, 인도, 중국 등에서 해열, 구충, 해독, 장염, 중풍 치료 등에 한약제로 널리 사용해 왔으며(Bordia et al., 1977), 지질대사효과(Woo et al., 2003), 항산화효과(Hertog et al., 1993), 항균작용, 혈중 콜레스테롤 감소(Jain et al., 1973), 고혈압 및 당뇨병에 대한 효과 등 중요한 생리활성을 가지는 것으로 보고되고 있으며(Leighton et al., 1992), 특히 우리 식생활에서 매우 중요한 향신료이지만, 파와 마늘에 비해 양파는 저장성이 짧고, 활용이 비교적 적은 식품이다. 우리나라에서는 남부지방, 특히 전남 무안지역의 특산물로써 전국 생산량의 약 25%를 차지하며, 재배면적도 전국의 47.2%를 차지하고 있다. 작황상황에 따라서 가격변동이 매우 큰 농산물이므로, 과잉 생산 시 이에 대한 소비대책과 저장방법이 큰 문제점(Chung et al., 1999)으로 대두되고 있다. 최근 양파를 이용한 가공제품은 스낵류, 양파음료 및 양파즙으로 특히 기존에 출시된 양파음료는 양파의 맛과 향이 강하여, 소비자에게 직접적으로 어필하지 못하였다.

따라서 소비자에게 직접적으로 다가갈 수 있는 양파를 이용한 고기능성 발효음료 제조기술 개발 및 산업화 연구를 총 3년에 걸쳐 수행하였다.

1차년도는 양파 껍질 및 과육부에 함유되어 있는 유용 성분인 quercetin 관련 물질을 추출하였다. 또한, flavonol이 강화된 기능성 양파발효음료 제조공정을 개발하기 위하여 초음파처리법, 효소처리법, 마이크로웨이브 조사법 등 다양한 착즙 및 추출방법에 따른 quercetin의 수율을 측정, 분석하였고, 추출공정에서의 추출용매, 온도, 시간, 용매량 등 양파 유용성분 추출법의 최적 조건을 수립하고자 실험을 수행하였다.

2차년도는 발효를 통해 고 기능성 양파음료 및 식초를 제조하기 위하여 양파 과육부를 이용한 공정을 설계하였다. Quercetin과 같은 유용 성분이 많이 함유되어 있는 껍질(Kim et al., 2006)로부터 추출하는 공정을 설계하여 최적화하고, 양파음료의 양파 특이취를 감소하기 위하여 별도로 양파취 감소 공정을 설계하였다.

3차년도는 각 공정에 필수적인 온도 제어를 위한 소프트웨어 및 하드웨어 구축을 위해 열전달식과 MATLAB program을 이용하여 simulation하였으며, lab-scale에서 실시된 양파껍질 추출의 최적조건을 pilot-scale에서 실시하여 비교 분석하였으며, 기존 연구를 바탕으로 고 기능성 양파발효음료 및 기능성 식초음료를 산업화하기 위한 공정을 설계하였다.

2. 연구 방법

가. 시료

본 실험에서 사용한 양파는 서울시 관악구 시중 마켓에서 판매한 국내산 양파를 무작위로 선택하여 구입하였으며, 구입한 양파는 뿌리부분을 제거하고, 과육부분과 껍질부분으로 나누어 시료로 사용하였다. 껍질 부위는 동결건조법과 열풍건조법을 이용하여 분말을 제조하였다. 동결건조를 위하여 껍질은 -75°C 의 온도에서 48시간 동안 냉동고(SW-UF-120, Samwon, Pusan, Korea)에서 냉동시킨 후 동결건조기(FD5508, Ilshin, Yangju, Korea)를 이용하여 48시간 동안 건조시켰다. 또한 열풍건조 시료는 70°C 의 온도에서 24시간 동안 Air oven dryer(VS-1202D2, Vision, Bucheon, Korea)를 이용하여 열풍건조시켰다. 건조된 각 껍질 부위는 가정용 믹서기(HMF-1000, HanIl, Seoul, Korea)를 이용하여 분쇄하여 시료로 사용하였다. 과육 부위는 가정용 녹즙기(WRD-205, 우리들 산업, Seoul, Korea)와 가정용 믹서기(BW-05G, Jeitech, Seoul, Korea)를 이용하여 착즙하여 추출에 사용하였다. 껍질 부분에서 기능성 성분을 추출한 추출액 및 농축액을 4°C 에서 저장하면서 실험에 사용하였다. 시료의 칭량에는 0~310 g의 칭량범위와 ± 0.001 g의 accuracy값을 가지는 전자저울(B303, Mettler Toledo, Küssnacht, Switzerland)과 20 g~2.5 kg의 칭량범위와 0.5 g의 accuracy값을 가지는 전자저울(AD-2.5, CAS, Seoul, Korea)을 사용하였다.

나. 양파 내 유용성분 추출

시료가 함유한 기능성 성분 중 추출 대상 유용성분으로 양파에 다량 함유되어 있고 심혈관계 질환 등에 효과를 보이는 기능성 물질인 quercetin과 quercetin glycoside를 선택하였다. 다양한 처리조건으로 준비된 양파 시료 중의 quercetin과 quercetin glycoside의 정량분석을 위하여 일정한 온도가 유지되는 항온수조(BW-05G, Jeitech, Seoul, Korea) 내에서 일정 시간동안 추출용매를 이용하거나 추출용매와 더불어 다양한 병용처리를 하여 유용성분을 추출한 후 원심분리기(KR/UNION 55R, Hanil, Seoul, Korea)를 사용하여 3,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 그 상층액을 0.2 μm PVDF membrane filter (Millipore, Billerica, MA, USA)로 filtration하여 HPLC(Genetix. UK/QPix2, Waters, Milford, MA, USA)로 분석하였다.

다. HPLC 분석

Quercetin류의 정량분석을 위하여 HPLC를 사용하였다(Crozier et al., 1997). HPLC 분석에는 Waters 600 S Centroller(600s controller, Waters)를 사용하였으며 용매는 0.1% formic acid(buffer A)와 100% methanol(buffer B)을 사용하였다. Detector는 UV-vis detector(SLC-200, Samsung, Seoul, Korea)를 이용하여 375 nm에서 분석하였다. Column

은 Nova-Pak c-18 4 μm 와 3.9 \times 150 mm를 사용하였으며, flow rate는 1.0 mL/min으로 하였다. 구체적인 분석 조건은 Table 3-1과 같다. 정량은 quercetin 표준품을 사용하여 외부 표준법으로 계산하였다. Fig. 3-1은 대표적인 quercetin standard와 양과겉질 부분의 HPLC 분석결과 chromatogram이다(Turner et al., 2006).

Table 3-1. Conditions for operating HPLC in the analysis of quercetin and quercetin glycoside.

Items	Conditions
Instrument	Genetix. UK/QPix2(Waters, us 600S)
Column	Biobasic-C18(Thermo)
Mobile phase	A: 5% Acetic acid, B: 100% Methanol Gradient : 80% \rightarrow 20% A within 40 min 20% \rightarrow 80% B within 40 min
Flow rate	1 mL/min
Detection	UV 375 nm
Injection volume	20 μL

모든 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였고 평균과 표준편차를 계산한 후 그 결과를 비교하였다. 모든 결과의 수치는 껍질 부분은 dry basis 기준으로, 과육 부분은 wet basis 를 기준으로 하였고 분산분석을 실시하여 유의적으로 차이가 나는 경우 SPSS로 분석하여 Duncan's test를 통해 유의수준 $p=0.05$ 에서 유의성을 검증하였다.

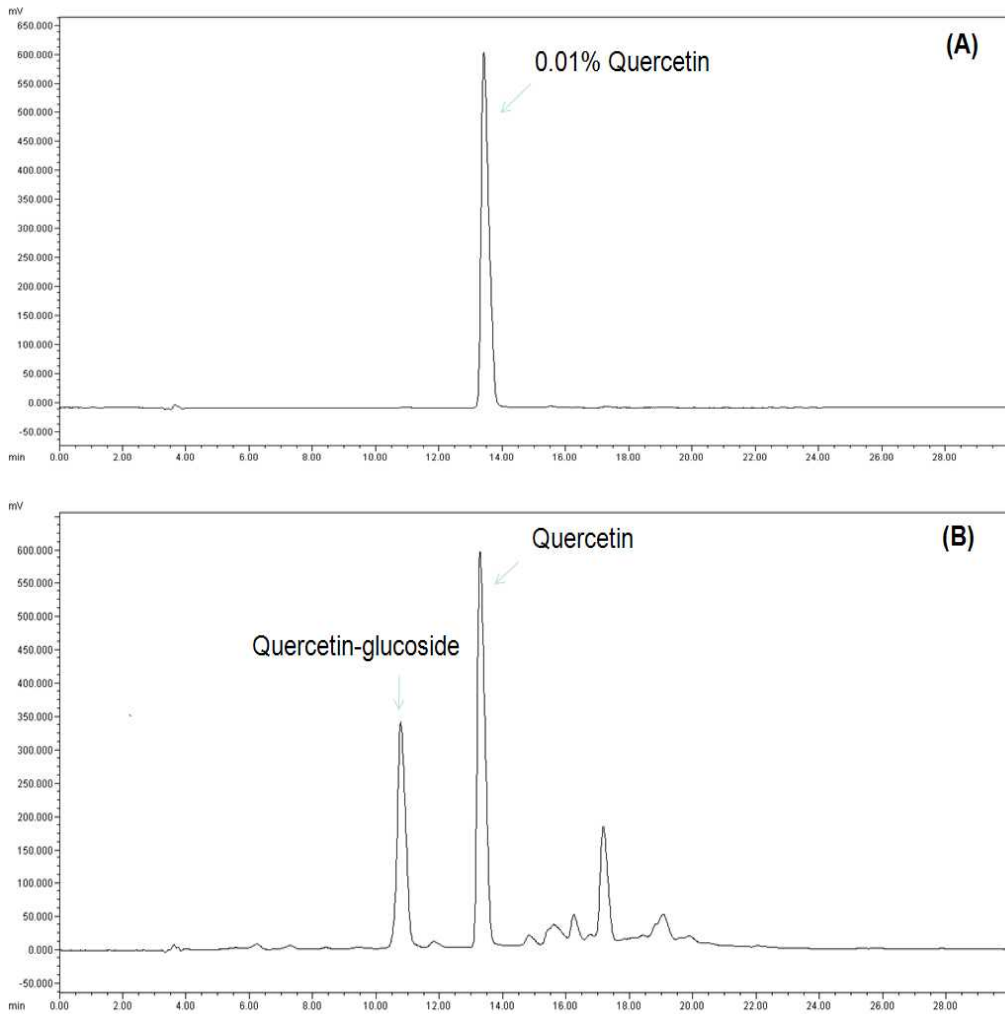


Fig. 3-1. Representative chromatograms of analytical HPLC for (A) quercetin standard and (B) flavonols extracted from the onion skin.

라. 기능성 성분 추출 효율 비교 실험

(1) 추출용매에 따른 추출효율

양파에 함유되어 있는 quercetin 관련물질의 최적 추출조건을 확립하기 위하여 다른 연구에서 quercetin 관련물질의 추출에 높은 수율을 보인 것으로 보고된 혼합용매(100% methanol:acetic acid:증류수=10:1:9)와 80% methanol, 40% ethanol 및 증류수의 4가지 용매를 사용하여 동결 건조한 양파 껍질 시료를 0.1 g씩 넣은 시험관에 각각 3 mL씩 넣고 항온수조를 사용하여 60°C에서 1시간 동안 추출하였다. 추출 후 원심분리기를 사용하여 3,000 rpm으로 30분 동안 원심 분리한 후 상층액을 분석하였다.

또한, 혼합용매를 사용하여 추출하였을 때 보다 기능성 성분의 수율이 높은 methanol 과 ethanol의 최적 추출 농도를 찾아보기 위해 methanol의 경우엔 40, 60, 70, 80, 100%의 농도에서, ethanol의 경우는 30, 40, 50, 70, 100%의 농도에서 각각 0.1 g의 시료에 3 mL씩 넣고 60°C에서 한 시간 동안 추출하였다.

양파 과육은 가정용 녹즙기를 이용하여 착즙한 액을 10 g씩 넣은 시험관에 60% methanol, 60% ethanol, 증류수를 각각 20 mL씩 넣고 항온수조를 사용하여 60°C에서 1 시간 동안 추출하였다.

(2) 추출시간에 따른 추출효율

동결 건조한 양파 껍질 시료를 0.1 g씩 넣은 시험관에 60% methanol을 3 mL씩 넣고 15분, 30분, 1시간 동안 60°C에서 추출하였다. 양파 과육은 가정용 녹즙기를 이용하여 착즙한 후 시료를 10 g씩 넣은 시험관에 60% methanol을 20 mL씩 넣고 15분, 30분, 1시간 동안 60°C에서 추출하였다.

(3) 추출온도에 따른 추출효율

동결 건조한 양파 껍질 시료를 0.1 g씩 넣은 시험관에 60% methanol을 3 mL씩 넣고 15분 동안 30, 40, 50, 60°C에서 추출하였다. 양파 과육은 가정용 녹즙기를 이용하여 착즙한 후 10 g씩 넣은 시험관에 60% methanol을 20 mL씩 넣고 15분 동안 25, 40, 50, 60°C에서 추출하였다. Methanol의 끓는점이 64.96°C이기 때문에 상압 조건에서 온도는 최대 60°C까지만 정하여 실험하였다.

(4) 추출용매와 시료의 비율에 따른 기능성성분의 추출효율

동결 건조한 양파 껍질 시료를 0.1 g씩 넣은 시험관에 60% methanol을 용매부피와 시료 무게의 비율이 10, 30, 40, 60 mL/g이 되도록 넣고 상온에서 1시간 동안 추출하였다. 양파 과육 착즙액은 시험관에 10 g씩 넣고 60% methanol을 용매부피와 시료 무게의 비율이 0.8, 1.6, 2.4 mL/g이 되도록 첨가하고 60°C에서 1시간 동안 추출하였다.

(5) 양파 껍질 시료의 분쇄 방법에 따른 추출효율

양파 껍질 시료의 분쇄 방법에 따른 추출효율을 비교하기 위하여 동결건조한 양파 껍질을 가정용 믹서를 이용하여 크게 절단한 시료, 잘게 분쇄한 시료와 막자사발을 이용하여 잘게 갈은 시료를 각각 시험관에 0.1 g씩 넣은 후 60% methanol을 3 mL씩 넣고 15분 동안 상온에서 추출하였다(Kang et al., 1998).

(6) 양과 껍질 시료 양에 따른 추출효율

시료의 양이 추출에 미치는 영향을 보고자 동결 건조한 양과 껍질을 분쇄한 시료를 각각 시험관에 0.1 g, 1 g, 5 g씩 넣은 후 60% methanol을 용매와 시료의 비율이 30 mL/g이 되도록 넣고 15분 동안 60°C에서 추출하였다(Yang et al, 2007).

(7) 양과 껍질 시료의 건조 방법에 따른 추출효율

양과 껍질을 dry oven을 사용하여 70°C의 온도에서 48시간 열풍 건조시킨 것과 동결 건조기를 이용하여 48시간동안 건조시킨 시료를 각각 시험관에 0.1 g씩 넣고 60% methanol을 3 mL씩 첨가하여 15분 동안 60°C에서 추출하였다.

(8) 양과 과육 시료의 착즙방법에 따른 추출효율

양과 과육을 가정용 녹즙기와 믹서기를 이용해 착즙하였다. 각 방법으로 착즙한 양과 착즙액을 60% methanol으로 1시간 동안 60°C에서 추출하였다(Hong et al., 2005).

(9) 초음파 처리에 따른 추출효율

동결 건조하여 분쇄한 양과 껍질 시료를 0.1 g씩 넣은 시험관에 60% methanol을 3 mL씩 넣고, 가정용 녹즙기로 착즙한 과육은 시험관에 10 g씩 넣어 60% methanol을 20 mL씩 넣고 30, 60, 90분 동안 280 W 초음파세척기(VC-05, Jeiotech, Seoul, Korea)에 넣어 초음파를 조사시키면서 추출하였다(Mason et al., 1996).

(10) Microwave 처리에 따른 추출효율

동결 건조하여 분쇄한 양과 껍질 시료를 0.1 g씩 넣은 시험관에 60% methanol을 3 mL씩 넣고, 가정용 녹즙기로 착즙한 과육 착즙액은 시험관에 10 g씩 넣어 60% methanol을 20 mL씩 넣은 후 700 W 가정용 microwave(RE-21CRN, Samsung, Seoul, Korea)를 사용하여 처리하였다(Brachet et al., 2002). 20초 이상 microwave를 조사하게 되면 용매가 끓어 넘치게 되는 이유로 연속적으로 조사하지 않고 20초 간격으로 1회, 3회(60초), 5회(100초) 조사하여 추출하였다. 또한 20초 간격으로 1회 조사 후 얼음물에 넣어 상온으로 식힌 다음 다시 조사하였다.

(11) 효소처리에 따른 추출효율

동결 건조하여 분쇄한 양과 껍질 시료를 0.1 g씩 넣은 시험관에 각각 1% cellulase-0.1M sodium acetate(pH 5.2) buffer solution과 1% viscozyme-0.1M sodium

acetate (pH 5.2) buffer solution을 시료와 비율이 20, 30, 40 (mL/g)이 되도록 2 mL, 3 mL, 4 mL만큼 넣어 45°C에서 1시간 동안 반응시켰다(Man et al., 1996). 반응이 종결된 후 원심 분리하여 상층액을 버린 pellet에 60% methanol을 3 mL씩 넣은 후 60°C에서 15분간 추출하였다. 가정용 녹즙기로 착즙한 과육은 시험관에 10 g씩 넣어 1% cellulase-0.1M sodium acetate (pH 5.2) buffer solution과 1% viscozyme-0.1M sodium acetate(pH 5.2) buffer solution을 시료와 비율이 0.5, 1, 1.5 mL/g이 되도록 5 mL, 10 mL, 15 mL만큼 넣어 45°C에서 1시간 동안 항온수조에서 반응시켰다. 반응이 종결된 후 dry oven에 넣어 buffer를 증발 시킨 후 60% methanol을 20 mL씩 넣은 후 60°C에서 15분간 추출하였다.

(12) 최적 조건의 조합에 따른 추출효율

양과 껍질 부위에서 최대 수율을 보인 viscozyme 3 mL 처리와 과육부위에서 최대 수율을 보인 viscozyme 5 mL 처리를 한 후 dry oven에서 buffer solution을 모두 증발시키고 microwave를 3회(60초)에 걸쳐 조사하였다. 그 후 초음파를 60분간 처리한 후 60% methanol 3 mL을 넣고 15분 동안 60°C에서 추출하였다.

마. 양과 유산, 초산균 발효음료 단위공정의 선정

양과를 이용한 유산균 발효음료와 초산균 발효음료의 제조공정을 설계하기 위해 기본적인 단위 공정을 선정하였다. 단위공정은 발효음료를 제조하기 위해 흔히 사용되는 기본적인 공정을 기반으로 본 개발 제품의 특성을 고려하여 변형하여 보완하였다. 최종제품은 양과의 과육부분을 이용한 발효액에 양과껍질에서 추출한 기능성 물질을 농축하여 첨가하는 것으로 설계하였다.

바. 양과 과육 발효공정의 설계와 최적화

양과 과육부분을 이용한 발효공정을 확립하기 위한 양과 발효기를 제조하고, 살균공정을 검토하였다.

(1) 양과 착즙액의 제조

양과의 과육부분은 가정용 녹즙기(WRD-205, 우리들 산업, Seoul, Korea)를 이용하여 착즙하였다. 열처리를 통해 양과 착즙액의 펙틴, 단백질 등의 불용성 물질을 제거하기 위하여 121°C에서 10분간 autoclave 한 후 filter paper(No. 41, Whatman, Inc., Clifton, NJ, USA)를 사용하여 여과하였다. 분리된 상등액을 121°C에서 15분간 autoclave하여 발효 전 양과 착즙액에 존재하는 오염균을 제거하였다.

(2) 양파 착즙액의 살균

양파 착즙액의 살균 조건을 측정하기 위해 105°C에서 5, 10, 20, 30분, 121°C에서 15분간 autoclave하였다.

(3) 양파 착즙액의 유산균 발효

Starter 균주로 선정된 *Pediococcus pentosaceus* KC-007을 사용하였다. MRS 배지에서 24시간 배양한 유산균을 살균한 양파 착즙액에 2%(v/v) 접종한 후 37°C에서 혐기적 조건으로 24시간, 48시간 발효시켰다.

(가) 생균수 측정

총균수는 Plate count agar(PCA) 배지(Difco Co., MI, USA), 곰팡이는 Potato dextrose agar(PDA) 배지(Difco Co., MI, USA), 효모는 Yeast malt extract broth(YM broth)에 1.5% Bacto agar(Difco Co., MI, USA)를 섞은 배지, 유산균은 MRS agar(Difco Co., MI, USA) 배지를 사용하였다. 0.9% NaCl 용액을 이용하여 $10^0 \sim 10^7$ 까지 희석한 시료를 각 배지에 50 μ L씩 분주한 후 평판도말하였다. PCA 배지는 37°C에서 2일, PDA 배지는 30°C에서 5일, YM agar는 30°C에서 3일, MRS agar는 37°C에서 3일간 혐기적으로 배양하여 colony 수를 측정하고 희석배수를 곱하여 단위부피당 생균수(CFU/mL)를 산출하였다.

(나) pH 및 산도 측정

pH는 pH meter(740p, Istek Inc., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 시료 10 mL을 증류수로 3 배 희석한 후 0.1 N NaOH로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하여 소비된 0.1 N NaOH의 양으로부터 산도를 측정하였다. 산도는 % lactic acid로 나타내었다.

$$\text{산도}(\%) = \frac{0.1N\text{NaOH소비량}(mL) \times \text{Acid factor}^* \times \text{희석배수}(3)}{\text{시료의 부피}(mL)} \times 100$$

Acid factor* : 0.0090(lactic acid)

(다) 환원당 측정

환원당은 Somogyi-Nelson법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 alkaline copper 용액 0.4 mL을 첨가하여 100°C에서 10분간 반응시킨 후 차가운 물에서 냉각하였다.

Arsenmolybdate 용액 0.4 mL을 가하고, 증류수 2.6 mL을 가하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(라) 아질산염 소거작용

아질산염 소거작용은 Kato 등의 방법에 의하여 측정하였다. 1 mM NaNO₂ 용액 2 mL에 시료 1 mL를 가한 후 0.1 N HCl 완충액을 이용하여 pH를 각각 3.0, 4.2, 6.0 으로 조절하여 반응용액의 부피를 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 각각 1 mL씩 취하고 여기에 2% acetic acid 5 mL과 Griess 시약(30% acetic acid로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% α-naphthylamine의 1:1 혼합액) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합시킨 다음, 실온에서 15분간 방치시킨 후 분광광도계를 사용하여 520 nm에서의 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 비교하였다. 아질산염 소거율은 다음과 같이 구하였다.

$$\text{아질산염 소거율 (\%)} = \left(1 - \frac{A - C}{B}\right) \times 100$$

여기서 A : 1 mM NaNO₂ 용액과 1시간 반응한 시료의 흡광도

B : 1 mM NaNO₂ 용액과 1시간 반응한 증류수의 흡광도

C : 시료 자체의 흡광도

(마) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

SOD 유사활성은 19160 SOD determination kit(Fluka, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

(4) 양파 착즙액의 초산균 발효

초산균 발효의 starter 균주로 *Acetobacter tropicalis* No. 22가 선정되었다. 구체적인 양파 착즙액의 초산균 발효 조건과 최적화 과정은 전년도 연구 결과를 참고하였다. 최종적인 초산균의 발효조건은 초기 ethanol 농도 4.67%, 초기 acetic acid 농도 0.03%, 초기 glucose 농도 2.35%이었으며 이때의 산도는 3.77%이었다.

사. 양파과육 탈취공정의 설계와 최적화

(1) 탈취공정의 설계

특유의 양파취가 나는 양파 착즙액의 탈취를 하기 위한 공정을 설계하기 위하여 원통형 플라스틱 column(3x23 cm)에 입상활성탄(20 mesh, 가야활성탄소공업, Seoul, Korea)

42 g을 채워 튜브연동식펌프(Masterflex, Chicago, IL, USA)의 튜브(R-3603, L/S® 17, Masterflex, Chicago, IL, USA)에 연결하여 착즙액을 통과시키면서 펌프의 flow rate에 따른 양과취의 탈취효과를 보았다.

(2) 탈취효과의 관능적 특성 검사

탈취공정을 통과하는 착즙액의 flow rate를 30, 50, 80, 120, 150 mL/min으로 하여 그에 따른 탈취효과를 관능평가를 통하여 알아보았다. 관능적 특성검사를 위하여 같은 크기의 종이컵에 담았고 각 검사물은 30 mL로 통일하였다. 검사원은 서울대학교 농생명공학부 재학생 15 명을 패널로 모집하여 수행하였다.

평가항목은 6 단계 취기강도 표시법을 사용하였다(0=무취, 1=약간 감지가 가능한 정도, 2=무슨 냄새인지를 알아차릴 수 있는 정도, 3=충분히 감지가 가능한 정도, 4=강한냄새, 5=강렬해서 고통스러운 단계). 관능적 특성 검사의 통계분석은 점수에 따라 분산분석표를 작성하였으며, 각 시료 간에 95% 유의수준에서 차이가 있는지를 보았다.

아. 양파껍질 농축공정의 설계와 최적화

(1) 양파 껍질의 건조

껍질부위는 70°C의 온도에서 24시간 동안 건조기(VS-1202, Vision Scientific, Buchon, Korea)를 이용하여 열풍건조 시켰다. 동결건조를 위하여 껍질은 -75°C의 온도에서 1시간 동안 냉동고(SW-UF-120, Samwon, Pusan, Korea)에서 냉동시킨 후 동결건조기(FD5508, Ilshin, Yangju, Korea)를 이용하여 24시간 동안 건조시켰다. 껍질 2 g을 페트리접시에 담아 건조시키지 않은 샘플의 무게를 측정하고 3, 6, 12, 24시간 건조 후 샘플의 무게를 칭량하였다. 정해진 시간의 건조가 끝난 후에는 30분간 데시케이터에서 방랭한 후 칭량하였다. 건조전과 건조 후 샘플의 무게 변화로부터 샘플의 수분함량을 계산하였다. 건조된 껍질은 가정용 믹서(HM-180, 하이벨, Hwasung, Korea)를 이용하여 분쇄하였다.

(2) 양파 껍질의 추출

분쇄한 껍질시료에 용매를 넣고 유용성분을 추출한 후 원심분리기(KR/UNION 55R, Hanil, Seoul, Korea)를 사용하여 3,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 그 상층액을 0.2 µm PVDF membrane filter(Millipore, Billerica, MA, USA)로 filtration하여 HPLC (Genetix. UK/QPix2, Waters, Milford, MA, USA)로 분석하였다.

HPLC 분석에는 Waters 600 S Centroller(600s controller, Waters)를 사용하였으며 용매는 0.1% formic acid(buffer A)와 100% methanol(buffer B)을 사용하였다. Detector는

UV-vis detector(SLC-200, Samsung, Seoul, Korea)를 이용하여 375 nm에서 분석하였다. Column은 Nova-Pak C-18(4 μ m, 3.9x150 mm)을 사용하였으며, flow rate는 1.0 mL/min으로 하였다. HPLC의 data 수집과 분석을 하기 위하여 Autochro-2000 프로그램(Young Rin, Ahnyang, Korea)을 사용하였으며, 정량은 quercetin 표준품(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 외부 표준법으로 계산하였다. 전년도 연구 결과에서 ethanol을 추출용매로 사용할 때 methanol을 사용하는 것보다 기능성 물질의 추출량이 적은 것으로 나타났다지만 식품에 쓰이는 것을 고려하여 추출 용매를 인체에 안전한 ethanol로 결정하였다.

(3) 반응표면분석(Response surface methodolgy)을 통한 최적 추출조건 탐색

양파 껍질에서 기능성 성분의 최적 조건을 탐색하기 위해 반응표면 분석을 실시하였다(Woo et al., 2009). 기능성 물질의 추출법은 마이크로웨이브를 이용한 추출법과 초음파를 이용한 추출법을 택하여 각 공정의 최적조건을 탐색하였다. 세부적인 추출 방법은 전년도의 결과를 참고하였다. 마이크로웨이브를 이용한 추출방법은 1 g의 양파껍질을 30 mL의 ethanol에 넣어 700 W microwave(RE-21CRN, Samsung, Seoul, Korea)로 마이크로웨이브를 10초 간격으로 조사하여 추출하였다. 초음파를 이용한 추출방법은 1 g의 양파껍질을 30 mL의 ethanol에 넣어 750 W 초음파 발생기(VC 5510 R-DTM, Branson, Danbury, CT, USA)를 이용하여 추출하였다.

반응표면분석은 통계 소프트웨어 SAS (9.1 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 response surface regression(RSREG)을 실시하였다. 중심합성실험계획에 따라 마이크로웨이브 추출법은 두가지 변수(X1, ethanol concentration (%); X2, extraction time (sec))를 이용하여 13 개의 조건으로 실험하였다(Table 3-2). 초음파 추출법은 세 가지 변수(X1, ethanol concentration (%); X2, 초음파 power (W); X3, extraction time (time))를 이용하여 20 개의 조건으로 실험하여 최적조건을 탐색하였다(Table 3-3). 또한 탐색된 각 변수들의 최적조건으로 검증실험을 하였다.

Table 3-2. Central composite design by RSM program for optimization of microwave assisting extraction conditions.

Experiment no.	Ethanol conc. (%), X1	Time (sec), X2	Quercetin (mg/g)
1	10 (-1)	10 (-1)	0.29
2	10 (-1)	120 (1)	1.11
3	100 (1)	10 (-1)	2.64
4	100 (1)	120 (1)	3.76
5	10 (-1)	65 (0)	0.75
6	100 (1)	65 (0)	3.72
7	55 (0)	10 (-1)	3.27
8	55 (0)	120 (1)	4.84
9	55 (0)	65 (0)	4.19
10	55 (0)	65 (0)	4.22
11	55 (0)	65 (0)	4.13
12	55 (0)	65 (0)	4.55
13	55 (0)	65 (0)	4.11

Table 3-3. Central composite design by RSM program for optimization of ultrasound assisting extraction conditions.

Exp. no.	EtOH conc. (%),	Power (W),	Time (min),	Quercetin (mg/g)
	X1	X2	X3	
1	25 (-1)	225 (-1)	9 (-1)	2.11
2	25 (-1)	225 (-1)	25 (1)	2.93
3	25 (-1)	525 (1)	9 (-1)	3.67
4	25 (-1)	525 (1)	25 (1)	4.34
5	81 (1)	225 (-1)	9 (-1)	2.33
6	81 (1)	225 (-1)	25 (1)	2.81
7	81 (1)	525 (1)	9 (-1)	3.34
8	81 (1)	525 (1)	25 (1)	3.39
9	5.9 (-1.68)	375 (0)	17 (0)	1.74
10	100 (1.68)	375 (0)	17 (0)	2.92
11	53 (0)	123 (-1.68)	17 (0)	2.52
12	53 (0)	627 (1.68)	17 (0)	3.63
13	53 (0)	375 (0)	3.5 (-1.68)	3.04
14	53 (0)	375 (0)	30.5 (1.68)	3.41
15	53 (0)	375 (0)	17 (0)	3.55
16	53 (0)	375 (0)	17 (0)	3.62
17	53 (0)	375 (0)	17 (0)	3.49
18	53 (0)	375 (0)	17 (0)	3.45
19	53 (0)	375 (0)	17 (0)	3.46
20	53 (0)	375 (0)	17 (0)	3.36

(4) 양과 껍질의 농축

양과껍질 추출액은 농축공정을 설계하기 위하여 감압농축기(EYELA Rotary vacuum evaporator N-11, Tokyo Ridadidai Co., Ltd., Japan)를 이용하여 농축하였다. 35°C의 온도에서 농축을 실시하였고 농축 시간에 따른 시료의 특성을 보기 위하여 5, 8, 13, 18, 25 분 동안 농축한 농축액의 특성을 비교하였다.

자. 각 공정중의 시료 특성 측정

(1) 전자공여능

시료의 전자공여능(electron donating ability)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 4×10^{-4} M DPPH(α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 용액(99.9% ethanol로 제조) 0.8 mL를 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕한 다음 10분 후에 분광광도계를 사용하여 525 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 전자공여능은 시료 첨가구와 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 이용하여 다음 식에 의해 구하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

(2) 점도

점도는 rheometer(HAAKE MARS, Thermo Electron, Germany)를 이용하여 측정하였으며 R=35 mm인 parallel plate를 사용하였다. 분석 동안의 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 일정하게 유지시키며 전단응력에 따른 전단속도를 측정하여 점도값을 구하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였고 평균과 표준편차를 계산한 후 그 결과를 비교하였다. 모든 결과의 수치는 껍질 부분은 건량 기준(dry basis)으로, 과육 부분은 습량 기준(wet basis)을 이용하였고 분산분석을 실시하여 유의적으로 차이가 나는 경우 SPSS로 분석하여 Duncan's test를 통해 유의수준 $p=0.05$ 에서 유의성을 검증하였다.

차. 공정제어 하드웨어 시스템 및 소프트웨어 시스템의 구축

모든 공정을 최적화된 상태로 산업화하기 위해서는 공정에 영향을 주는 변수들을 제어해야 한다. 양과발효음료 제조에 있어서 공정인자 제어가 핵심적인 공정은 발효공정과 유용성분 추출공정이며 이 때 주요 공정인자는 온도로서 공정에 필요한 온도를 설정, 유지, 관리하는 것이 매우 중요하다. 따라서, 본 연구에서는 양과 껍질부분의 추출공정 및 양과 과육부분의 발효공정에서 온도를 제어하기 위하여 열전달 모델식을 수립하여 열전달에 따른 제어 기작을 해석하고 제어가 용이한 하드웨어 시스템을 선정하였다.

열전달 모델은 시스템에서의 대류, 전도, 복사를 포함하는 열전달 해석식을 이용하여 종합적으로 유도하였고, 제어효과는 MATLAB program(MATLAB 7.0.4, The MathWorks, Natick, MA, USA)의 확장도구인 Simulink를 이용하여 simulation하였다. Simulink는 GUI(Graphic User Interface) 기능 및 블록화된 모듈들을 통해 동적인 시스템을 간편하게 모사할 수 있다. 또한 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 accuracy값을 가지는 digital PID controller를 탑재한 항온수조(WBC-3025, Jeio tech, Seoul, Korea)의 온도 제어 profile을 data acquisition system(34970A, Agilent, Santa Clara, CA, USA)과 K-type thermocouple을 이용하여 조사하였다.

카. 경제성을 고려한 양과취 감소 공정의 개발

제 1 세부과제의 2차년도 연구에서 양과취 감소를 위한 masking 물질 탐색 결과 2.0%(v/v) 이상의 citric acid 용액이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 활성탄을 이용한 양과취 감소 공정과 비교하여 경제성과 품질 측면에서 실용적인 방법을 선택하여 양과발효음료 제조공정에 반영하였다.

타. 최적조건을 이용한 양과유용성분 추출의 Scale-up

(1) 최적화 조건을 이용한 양과유용성분 추출

2차년도 본 연구에서 반응표면분석을 이용하여 용매추출의 최적화 조건을 찾은 결과는 시료와 용매의 비율은 1:40이며 56%의 ethanol로 59°C에서 13분 추출이었다. 3차년도 본 연구에서는 pilot-scale로 scale-up하기 위하여 시료 100 g과 56% ethanol 4 L를 혼합한 뒤 항온수조(BS-21, Jeio Tech, Seoul, Korea)를 이용하여 59°C, 120 rpm에서 13분 동안 유용성분을 추출을 하였다. 양과껍질 시료간의 편차들을 고려하여 대조구로 시료 1 g과 56% ethanol 400 mL을 혼합하여 앞의 조건과 동일하게 실험을 진행하였으며, 그 결과를 비교 분석하였다.

(2) 최적화 조건을 이용하여 추출한 양과유용성분의 HPLC 분석 및 항산화능 평가

원심분리기(KR/UNION 55R, Hanil, Seoul, Korea)를 사용하여 3,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여, 그 상층액을 0.2 μm PVDF membrane filter(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하여 HPLC(Genetix. UK/QPix2, Waters, Milford, MA, USA)로 분석하였다 (Miean et al., 2001). HPLC 분석에는 Waters 600 S Controller(600s controller, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 용매는 0.1% formic acid(buffer A)와 100% methanol(buffer B)를 사용하였다. Detector는 Waters™ 486 Tunable Absorbance Detector(Waters™ 486 Tunable Absorbance Detector, Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 375 nm에서 분석하였으며, Waters 717 Plus Autosampler(717 Plus Autosampler,

Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 시료를 주입하였다. Column은 Nova-Pak C-18(4 μm , 3.9 \times 150 mm)을 사용하였으며, flow rate는 1.0 mL/min으로 하였다. HPLC의 data 수집과 분석을 위하여 Clarity Lite program(Clarity Lite, Laserchrom HPLC Laboratories Ltd., Laser Quay, Rochester, Kent, UK)을 사용하였으며, 정량은 Quercetin 표준품 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 외부 표준법으로 계산하였다.

최적 추출 조건에서의 추출물의 항산화능 평가는 0.15 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 용액 0.8 mL을 이용하여, control은 ascorbic acid 0.2 mL, 대조구로는 양파껍질 추출액 0.2 mL을 각각 혼합하여 30분 후에 517 nm에서의 UV 흡광도를 측정 (Jeong et al., 2007)하여 평가하였고, 모든 실험은 3회 이상 반복하였고 SAS program (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)을 이용하여 통계적인 유의수준을 비교하였다.

파. 산업화에 필요한 발효조건 확립과 공정설계

제1세부, 2세부와 공동으로 Scale-up 결과를 토대로 고 기능성 양파발효음료를 산업적 규모로 생산하기 위한 발효 조건을 검토하고 재확립하였다. 유산 및 초산 발효에 있어 scale-up의 효과를 확인하고, 예상 생산량을 기준으로 발효 용량을 결정하고, 이에 따른 최적 조건을 확립하였다.

종합적인 연구 결과를 토대로 최종 제품의 생산을 위한 최적의 공정을 설계하였으며, 최적 조건을 고려하여 제품별 주요 단위 공정의 설계를 통해 흐름도를 작성하고, 단위공정의 용량을 결정하였다.

3. 연구 결과

가. 추출용매종류에 따른 추출효율

혼합용매(100% methanol : acetic acid : 증류수 = 10:1:9), 80% methanol, 40% ethanol 및 증류수의 4가지 용매 종류에 따른 기능성 성분의 추출 정도는 껍질 부위의 경우 Fig. 3-2에 나타내었다. 껍질의 경우 사용된 용매 중 80% methanol이 가장 많은 유용 성분을 추출하는 것으로 나타났고 추출량은 11.01 ± 0.20 mg/g onion skin으로 증류수로 추출한 경우와 비교하였을 때 약 7배 이상 더 많이 추출되었다. 그 다음으로 40% methanol이 많이 추출되었고, 증류수를 사용하였을 때가 추출정도가 가장 낮았다. 다른 연구에서 추출효율이 높다고 보고된 혼합용매의 경우엔 증류수로 추출한 경우 보다는 수율이 높았지만, methanol이나 ethanol을 단독으로 사용한 경우 보다 수율이 좋지 않았다.

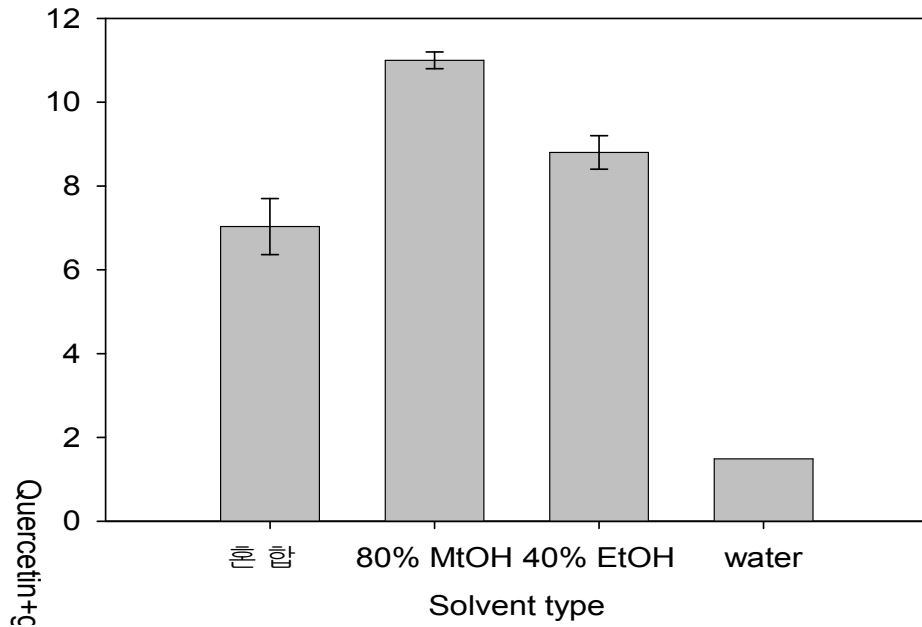


Fig. 3-2. The yield of extraction of quercetin and quercetin glycoside from onion skin using different solvents.

실험에 사용된 용매 중 비교적 높은 수율을 나타낸 methanol과 ethanol의 농도별 추출수율은 각각 Table 3-4와 Table 3-5에 나타내었다. Methanol을 사용한 경우 농도가 증가할수록 추출 수율이 높아지다가 60% 이상이면 유의적인 차이가 없이 quercetin과 quercetin glycoside가 추출되었다. Ethanol의 경우는 농도가 50%가 될 때까지는 추출 효율이 증가하고 70%까지는 유의적인 차이를 보이지 않다가 오히려 100% 농도가 되면 추출효율이 감소하는 것으로 나타났다.

Table 3-4. Contents of quercetin and quercetin glycoside in onion skin as affected by methanol concentration.

Methanol %(v/v)	Quercetin+glucoside (mg/g onion)
40%	7.39±0.15 ^a
60%	10.60±0.18 ^b
70%	10.72±0.55 ^b
80%	11.01±0.20 ^b
100%	10.92±0.32 ^b

Table 3-5. Contents of quercetin and quercetin glycoside in onion skin as affected by ethanol concentration.

Ethanol %(v/v)	Quercetin+glucoside (mg/g onion)
30%	7.48±0.06 ^b
40%	8.82±0.37 ^c
50%	9.80±0.68 ^d
70%	9.73±0.09 ^d
100%	5.46±0.28 ^a

양파 과육 부분에서의 용매 종류에 따른 유용 성분 추출 정도는 Fig. 3-3에 나타내었다. 과육 부분 또한 껍질 부분과 마찬가지로 60% methanol이나 60% ethanol를 사용하였을 경우, 추출량이 약 0.030 mg/g onion으로 증류수를 사용한 경우보다 유용성분이 약 5배 이상 더 많이 추출되었다. 이것은 기능성 성분인 quercetin과 quercetin glycoside가 증류수보다는 유기용매에 더 잘 녹아나오고, ethanol보다 methanol이 quercetin과 quercetin glycoside에 대한 친화력이 더 크기 때문에 추출 용매로서 적합하다고 할 수 있다.

유용성분인 quercetin류는 대부분 양파 껍질 부분에 존재하는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다. 60% methanol을 사용한 경우를 비교하면, 껍질 부분이 과육 부분에 비하여 약 370배 이상의 quercetin류가 존재하는 것으로 나타났다.

결과적으로 양파 부위와 관계없이 추출용매로서 60% methanol을 사용하여도 충분한 추출수율을 얻을 수 있는 것으로 판단되어 이 후 진행하는 다양한 추출조건 실험의 기본 추출용매로 사용하였다.

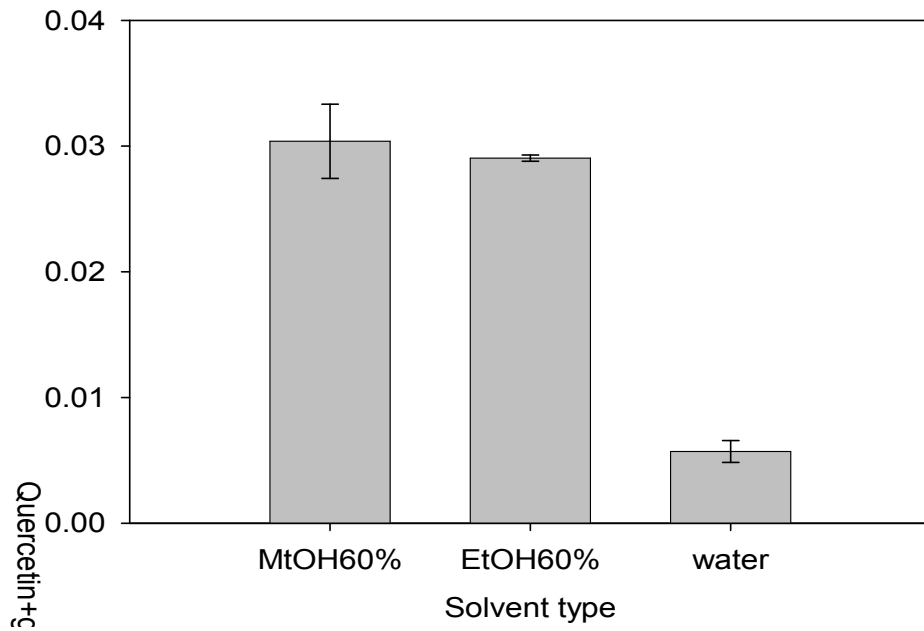


Fig. 3-3. The yield of extraction of quercetin and quercetin glycoside from onion edible part using different solvents.

나. 추출시간에 따른 추출효율

결과에서 보듯이 양파 껍질(Fig. 3-4)과 과육(Fig. 3-5) 모두 15분, 30분, 1시간 추출할 때 유의적으로 차이가 없었다. 그러므로 15분 정도만 추출하여도 충분히 유용성분을 추출할 수 있는 것으로 나타났다.

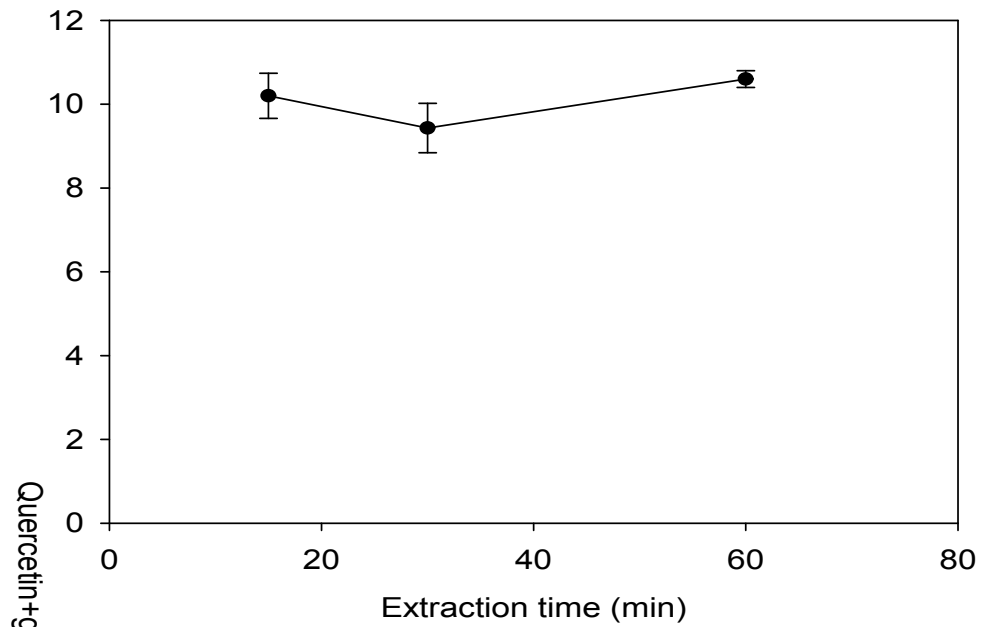


Fig. 3-4. The effect of extraction time on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion skin.

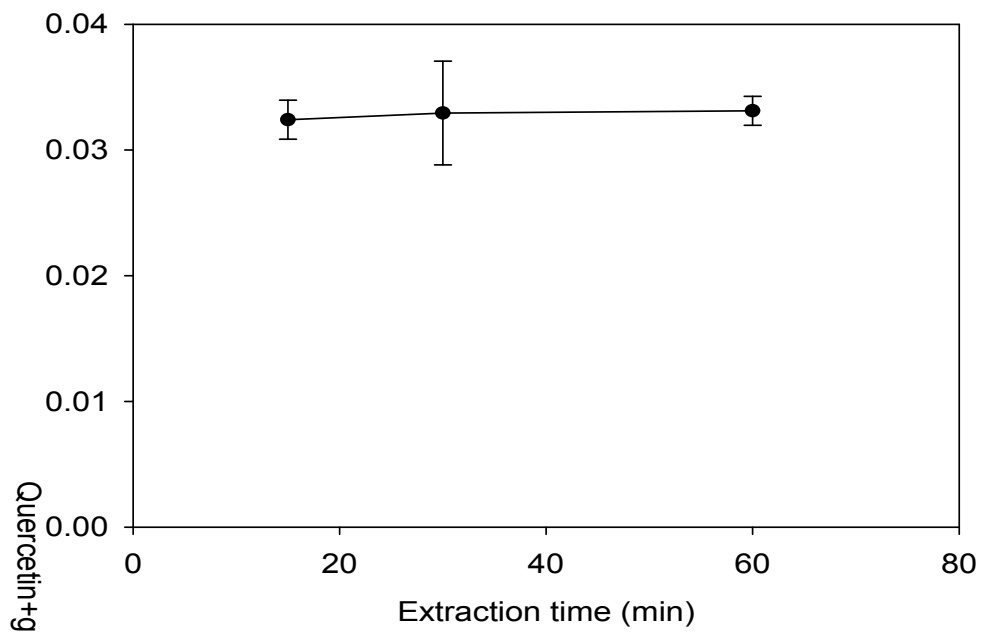


Fig. 3-5. The effect of extraction time on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion edible part.

다. 추출온도에 따른 추출효율

추출용매로 선택된 methanol의 비등점이 대기압에서 64.96°C이기 때문에 60°C 이상에서 추출하는 경우 안전성의 문제와 용매의 증발로 인한 농축현상이 발생할 수 있으므로 추출온도는 최대 60°C까지 사용하였다. 껍질과 과육 부분 모두 추출온도가 높을수록 유용성분이 더 많이 추출되었다. 껍질의 경우 60°C일 때 10.6±0.2 mg/g onion skin로 가장 높은 수율을 보였다(Fig. 3-6). 과육의 경우 50°C 이상일 때 추출량이 최대로 되는 것을 볼 수 있다(Fig. 3-7). 결과적으로 대기압에서 추출용매를 이용한 최적 추출온도는 60°C로 선택되었다.

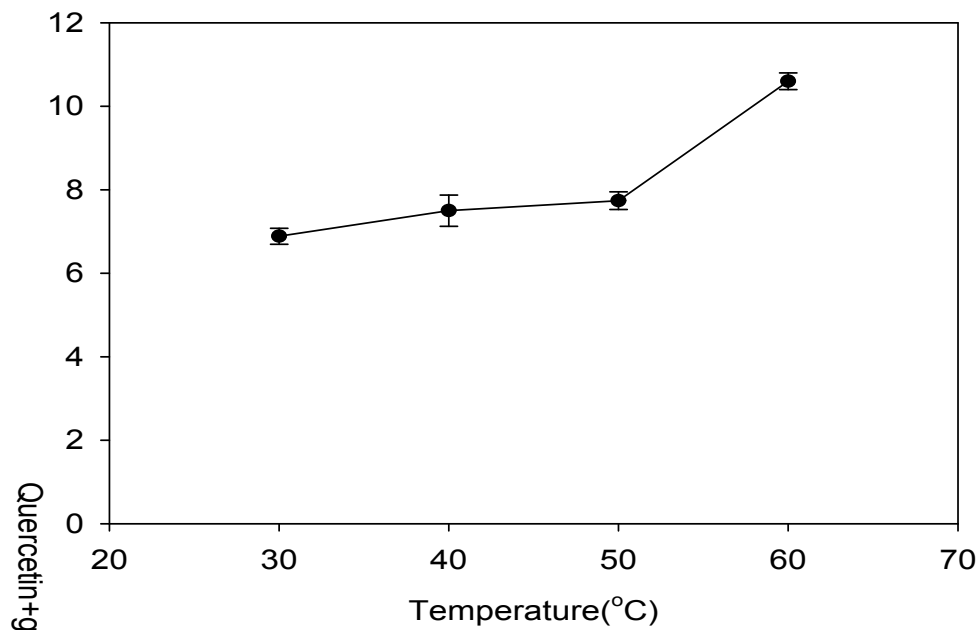


Fig. 3-6. The effect of extraction temperature on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion skin.

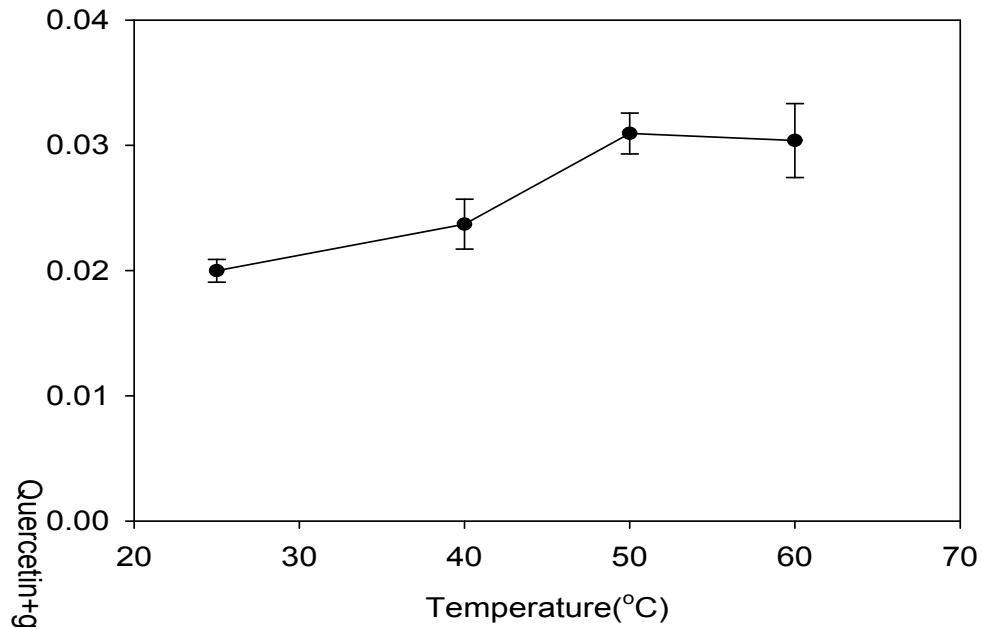


Fig. 3-7. The effect of extraction temperature on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion edible part.

라. 추출용매와 시료의 비율에 따른 추출효율

양파 시료당 적정 추출용매량을 결정하기 위하여 행한 실험에서 껍질 부분의 결과는 Fig. 3-8에, 과육 부분은 Fig. 3-9에 나타내었다. 양파 껍질의 경우 추출용매와 시료의 비율이 60일 때 8.4 ± 0.4 mg/g, 양파 과육의 경우는 0.8일 때 0.031 ± 0.001 mg/g으로 최대 추출값을 보였으나 전범위에 걸쳐 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 추출용매가 충분히 시료와 접촉하는 한 추출용매와 시료의 비율은 크게 추출에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

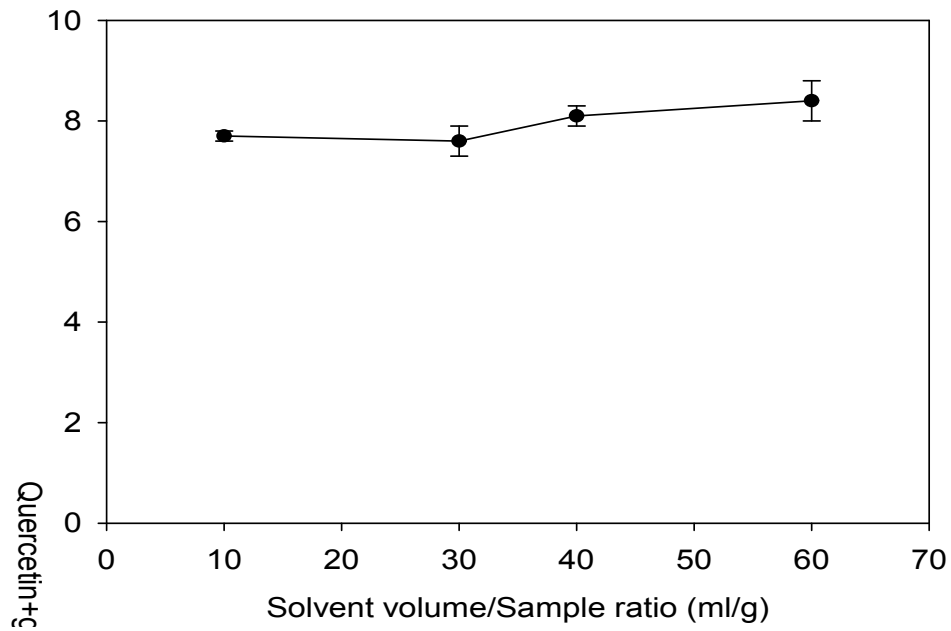


Fig. 3-8. The effect of solvent volume/sample ratio on the extraction yield of quercetin and quercetin glycoside from onion skin.

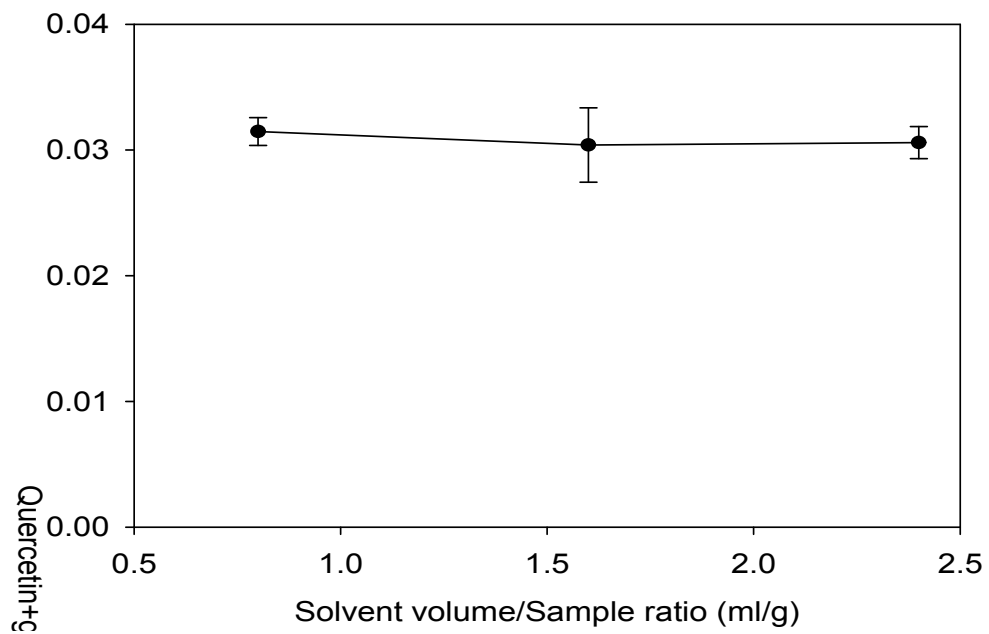


Fig. 3-9. The effect of solvent volume/sample ratio on the extraction yield of quercetin and quercetin glycoside from onion edible part.

마. 양파 껍질 시료의 분쇄 방법에 따른 추출효율

Fig. 3-10에 양파 껍질 시료를 분쇄한 방법에 따른 추출량을 나타내었다. 믹서기로 껍질을 크게 절단했을 때 추출량은 7.1 ± 0.6 mg/g이었고, 믹서기로 잘게 분쇄했을 때는 6.5 ± 1.2 mg/g이었으며, 막자사발로 곱게 갈았을 때는 7.1 ± 0.4 mg/g으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 시료를 분쇄하는 방법은 추출에 영향을 없는 것으로 나타났다.

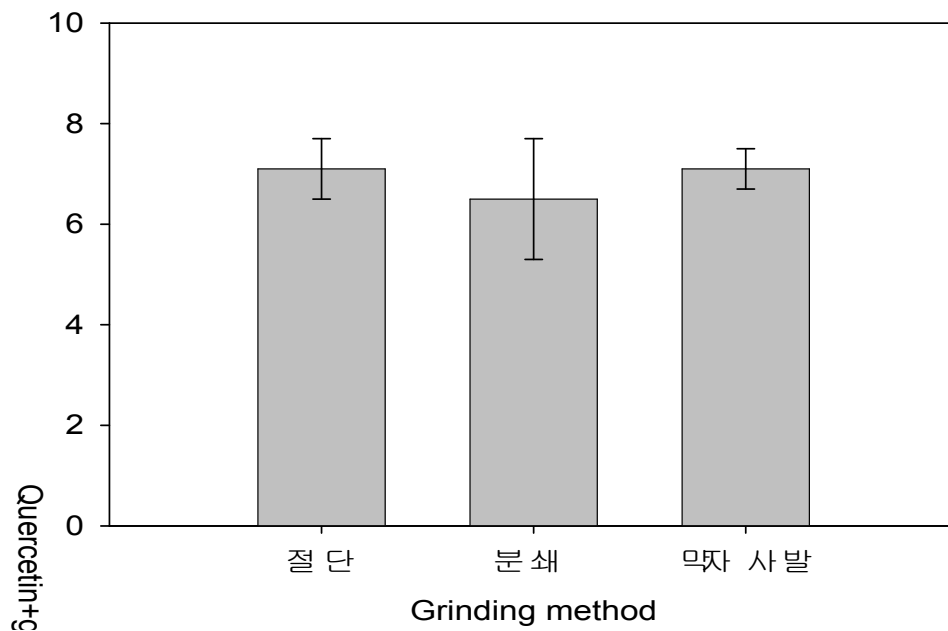


Fig. 3-10. The effect of grinding methods on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion skin.

바. 양파 껍질 시료량에 따른 추출효율

동결건조한 양파 껍질을 0.1 g 사용하였을 때 14 ± 0.5 mg/g이었고 1 g을 사용하였을 때는 13.8 ± 0.2 mg/g, 5 g을 사용했을 때는 14 ± 0.2 mg/g으로 서로 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3-11).

추출용매에 대하여 일정한 비율을 유지하는 한 양파 껍질 시료량은 추출수율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

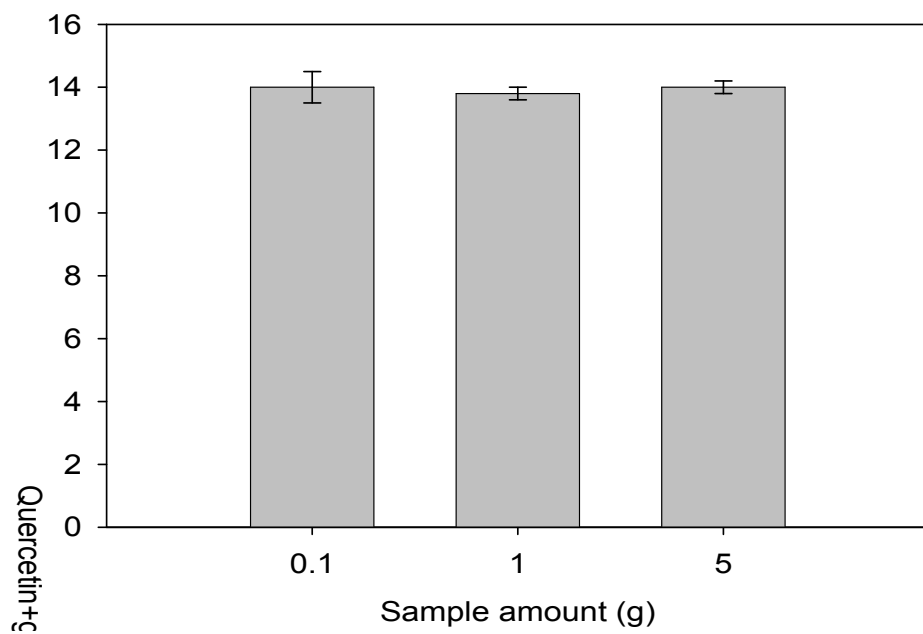


Fig. 3-11. The effect of sample amount on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion skin.

사. 양파 껍질 시료의 건조 방법에 따른 추출효율

추출을 위한 전처리로서 동결건조와 열풍건조로 준비한 양파 껍질 시료의 추출효율을 비교하였다(Fig. 3-12). 열풍건조된 시료의 경우 quercetin류가 9.72 ± 1.73 mg/g만큼 추출되었고 동결건조된 시료의 경우엔 9.08 ± 1.55 mg/g 추출되었으나 유의적인 차이를 발견할 수 없었다. 그 이유는 quercetin과 quercetin glycoside는 비교적 열에 안정한 비휘발성 물질로 알려져 있어서 열풍건조 시 크게 함량의 손실이 발생하지 않기 때문이다.

추출 전처리 과정으로서 양파 껍질 내 존재하는 수분을 제거하는 방법으로 시간과 비용이 비교적 많이 드는 동결건조법 보다는 열풍건조법을 사용하여도 무방한 것으로 판단된다.

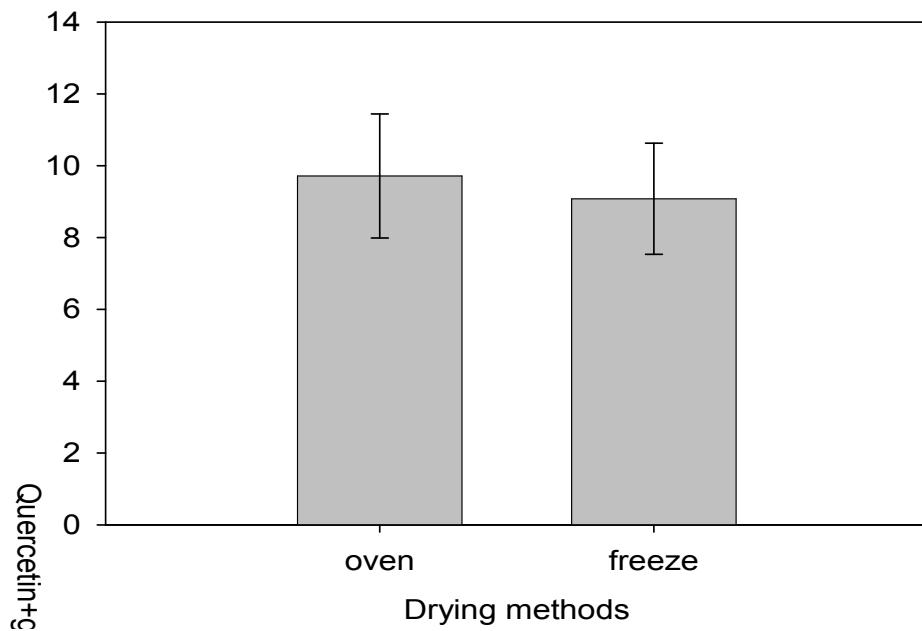


Fig. 3-12. The effect of drying methods of sample preparation on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion skin.

아. 양파 과육 시료의 착즙방법에 따른 추출효율

믹서기를 이용한 경우 유용성분이 0.013 ± 0.002 mg/g 추출되었고, 녹즙기를 이용한 경우 0.030 ± 0.003 mg/g이 추출되었다(Fig. 3-13). 녹즙기를 사용한 경우가 믹서기를 이용한 경우에 비해 2.37배 더 많이 추출되었다. 이는 믹서기의 경우 단순히 칼날의 회전력에 의한 절단이 일어나 녹즙기의 경우 두 개의 내장 스크류에 의하여 절단력 뿐 아니라 전단력, 압착력, 회전력 등의 더 다양한 힘이 작용하여 양파 과육 세포가 더 효과적으로 파괴되어 세포 내 유용성분이 원활하게 세포 밖으로 유출된 것으로 판단된다.

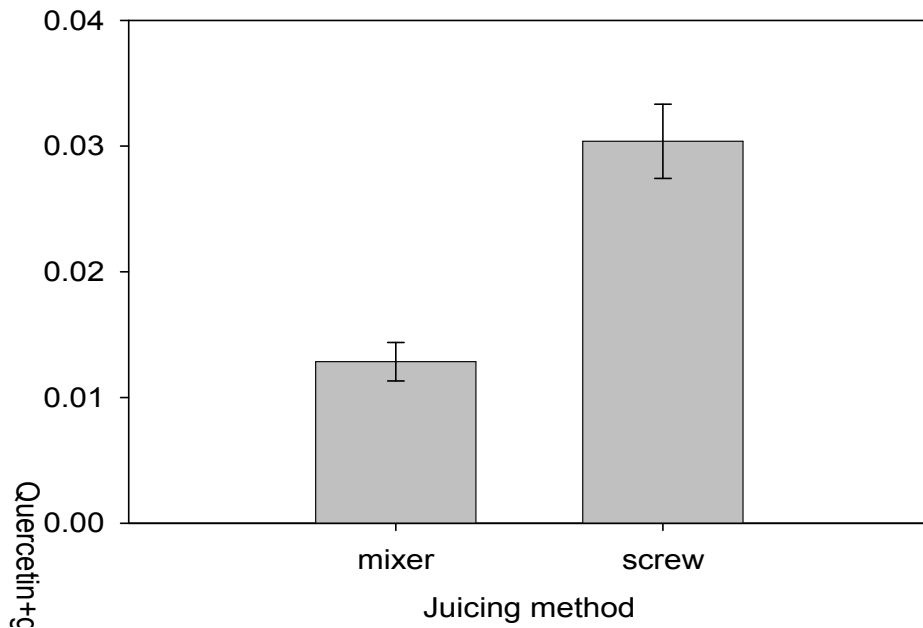


Fig. 3-13. The effect of juicing methods on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion edible part.

자. 초음파 처리에 따른 추출효율

용매 추출과 더불어 초음파로 병용 처리하였을 때 껍질과 과육 부분에서의 추출량을 각각 Fig. 3-14와 Fig. 3-15에 나타내었다. 껍질과 과육 부분 모두 60분 동안 초음파를 조사했을 때 추출수율이 가장 높았다. Fig. 3-14에서 볼 수 있듯이 껍질 부분은 30분 동안 조사했을 때 10.16 ± 0.08 mg/g onion skin이 추출되고 60분 동안 조사했을 때 10.08 ± 0.05 mg/g onion skin 추출되어 유의적인 차이를 보이지 않았으나 대조군의 5.8 ± 0.05 mg/g onion skin에 비하여 약 1.75 배 더 많이 추출되었다. 이후 90분 동안 조사 시 추출량은 오히려 감소하였다.

과육 부분은 60분까지는 조사시간이 늘어날수록 추출량도 증가하였다. 60분 조사했을 때 0.063 ± 0.002 mg/g onion이 추출되어 대조군의 0.030 ± 0.003 mg/g onion보다 2.06 배 더 많이 추출되었다. 이 후 조사시간이 60분 이상이 되면 껍질의 경우와 마찬가지로 추출량이 감소되는 경향을 보였다.

초음파가 중합체를 분해시키거나 세포를 파괴시키는 특성을 가지고 있기 때문에 적정 시간동안 조사 시 세포 내 유용성분이 세포 외로 더 원활히 유출되어 추출량이 증가하게 되나 장시간의 초음파 조사 시에는 오히려 quercetin과 quercetin glycoside가 파괴되어 오히려 추출량이 감소하는 것으로 생각된다(Fig. 3-15).

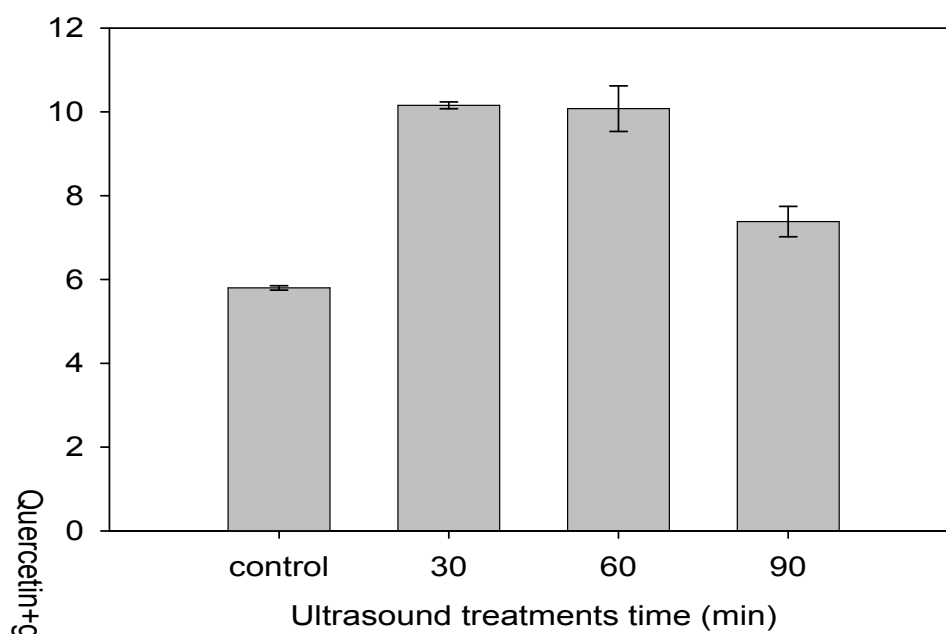


Fig. 3-14. The effect of ultrasound assisted extraction on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion skin.

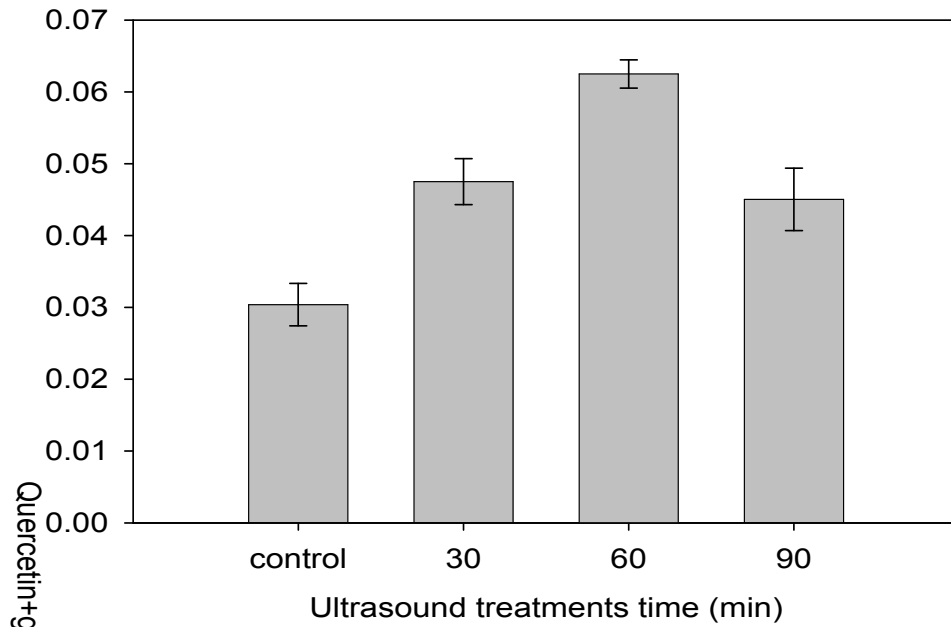


Fig. 3-15. The effect of ultrasound assisted extraction on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion edible part.

차. Microwave 처리에 따른 추출효율

용매 추출 시 microwave를 병용 처리한 껍질과 과육 부분의 결과를 각각 Fig. 3-16과 Fig. 3-17에 나타내었다. 껍질 부분의 경우 60초까지는 microwave 조사 시간이 증가할수록 추출량도 증가하였다. 60초 조사 시 유용성분이 11.70 ± 0.56 mg/g onion skin이 추출되어 대조군의 5.8 ± 0.05 mg/g onion skin 보다 2.01배 더 많이 추출되었다. 100초 동안 조사하였을 경우는 60초 조사한 경우와 유의적 차이를 보이지 않았다.

과육의 경우 조사시간에 따른 유의적 차이를 발견할 수 없었다. 20초만 조사하여도 충분히 추출되는 것으로 나타났고, 추출량은 대조군에 비하여 약 2배 이상 더 많이 추출되었다.

Microwave를 물체에 조사하면 성분의 쌍극자 모멘트를 유도하여 물체 내부로부터의 급속한 유전가열을 발생시킨다. 그러므로 추출에 대한 microwave의 조사 효과는 주로 열 에너지로서 양과 세포에 변화를 주어 세포 내 유용성분의 유출을 돕는 것으로 생각된다. 또한 microwave의 독특한 발열기작 때문에 다른 열처리 방법에 비하여 상대적으로 짧은 시간에 유용성분의 추출을 가능하게 하였다.

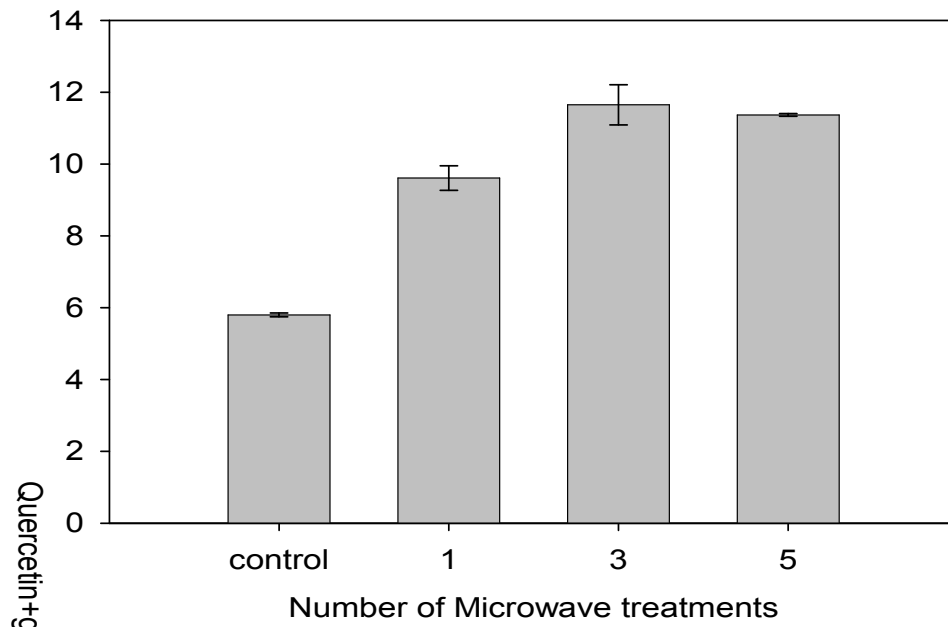


Fig. 3-16. The effect of microwave assisted extraction on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion skin.

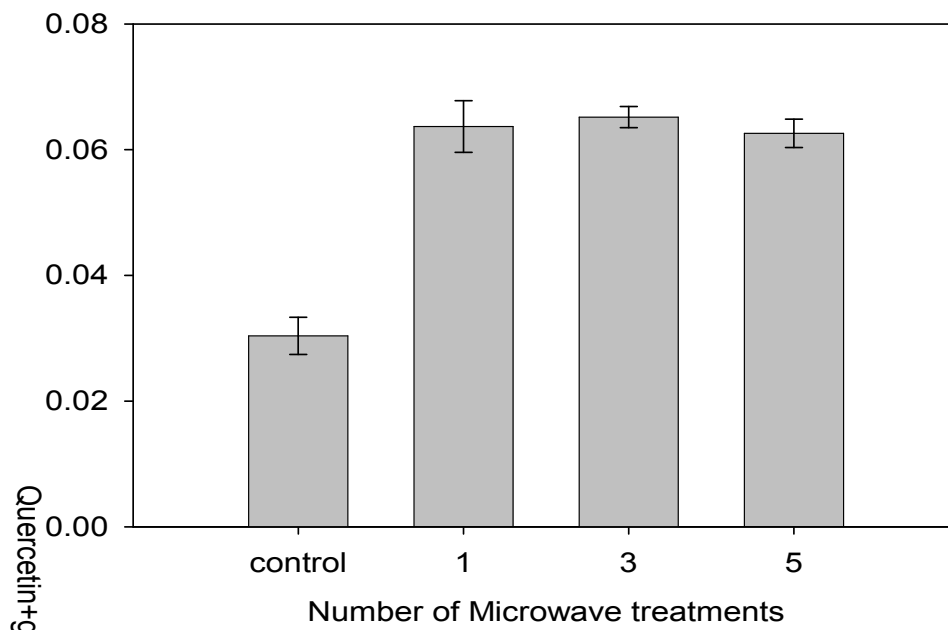


Fig. 3-17. The effect of microwave assisted extraction on the yield of quercetin and quercetin glycoside from onion edible part.

카. 효소 처리에 따른 추출효율

추출 전처리로서 양파 껍질 시료를 cellulase로 처리한 결과와 viscozyme으로 처리한 결과를 각각 Fig. 3-18과 Fig. 3-19에 나타내었다. 두 효소 모두 대조군에 비하여 추출수율이 증가하였으나 실험 범위에서 효소량에 따른 추출량의 유의적 차이는 없었다. Cellulase로 처리한 경우 최대 추출치는 3 mL을 넣었을 때 7.80 ± 1.17 mg/g으로 대조군과 비교하여 1.43배 더 많이 추출되었고 viscozyme의 경우도 3 mL을 넣었을 때 9.76 ± 0.69 mg/g으로 대조군과 비교하여 1.68배 더 많이 추출되었다.

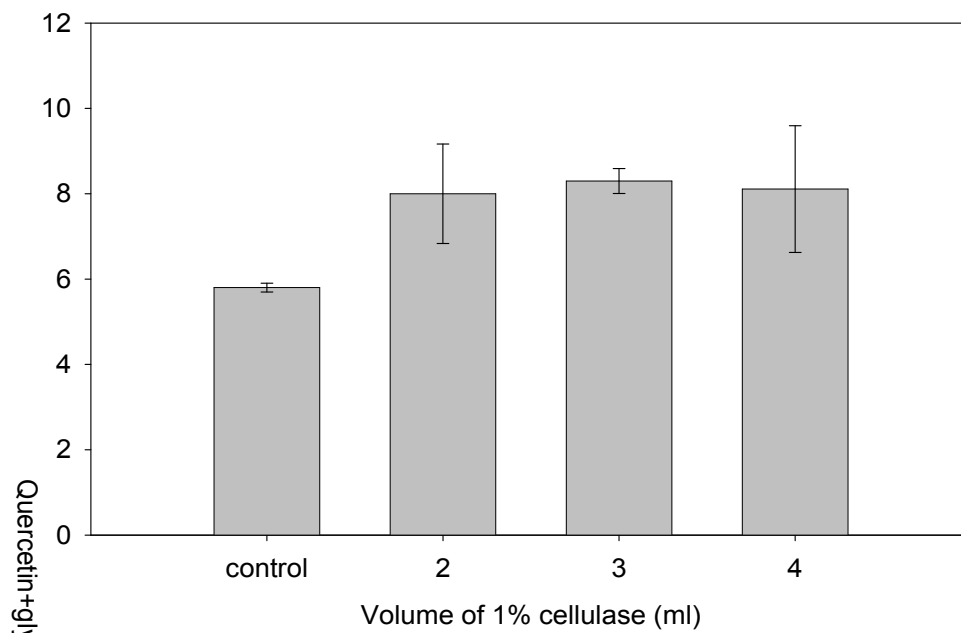


Fig. 3-18. Quercetin and quercetin glycoside contents of onion skin with cellulase treatment.

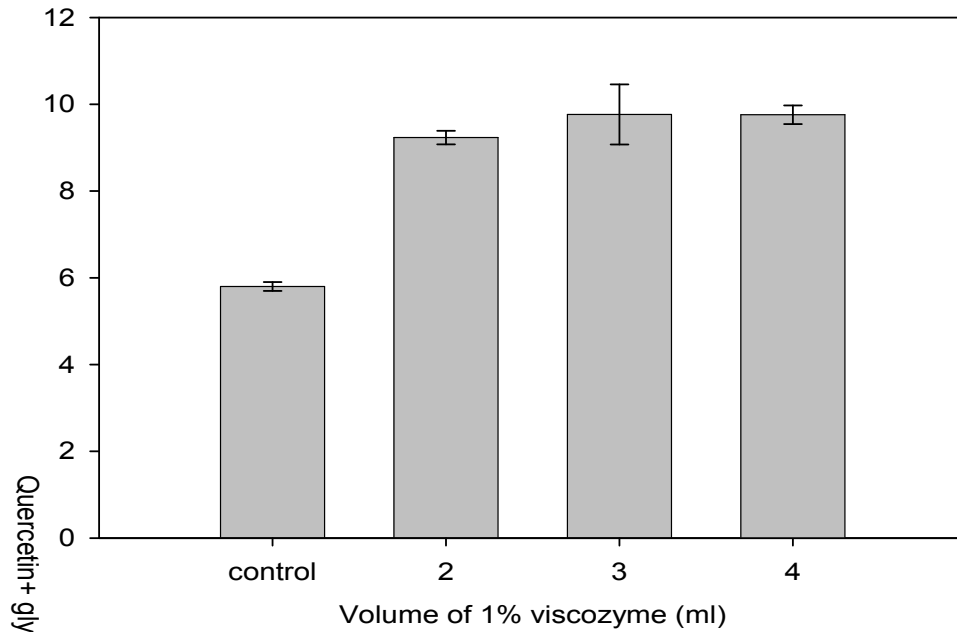


Fig. 3-19. Quercetin and quercetin glycoside contents of onion skin with viscozyme treatment.

양과 과육에 cellulase(Fig. 3-20)와 viscozyme(Fig. 3-21)을 전처리한 경우도 대조군에 비하여 추출수율이 증가하였다. 두 효소 모두 5 mL 사용하였을 때 cellulase의 경우 0.050 ± 0.004 mg/g, viscozyme의 경우 0.070 ± 0.002 mg/g으로 가장 많이 추출되었으며 5 mL 이상을 넣었을 때는 효소반응 완결 후 buffer를 증발시킬 때 발생한 과도한 열처리로 인하여 유용성분의 파괴로 추출이 감소하였다.

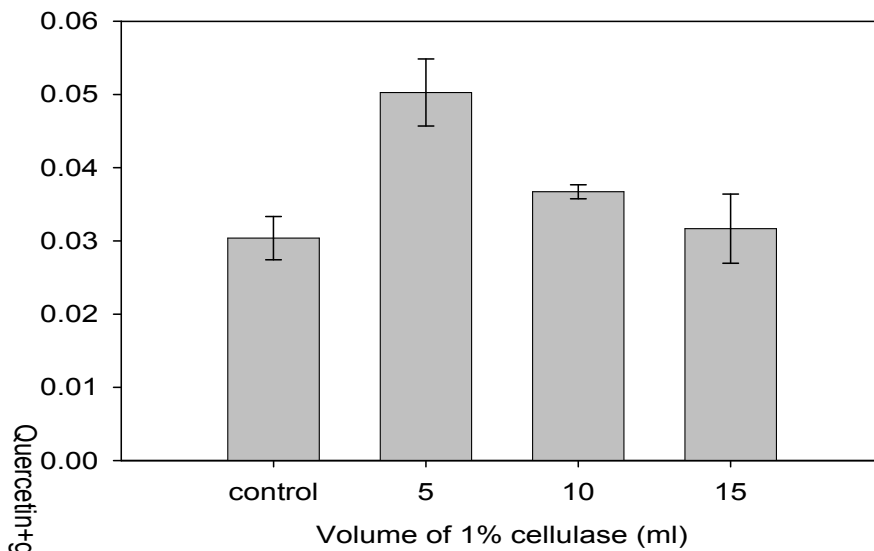


Fig. 3-20. Quercetin and quercetin glycoside contents of onion edible part with cellulase treatment.

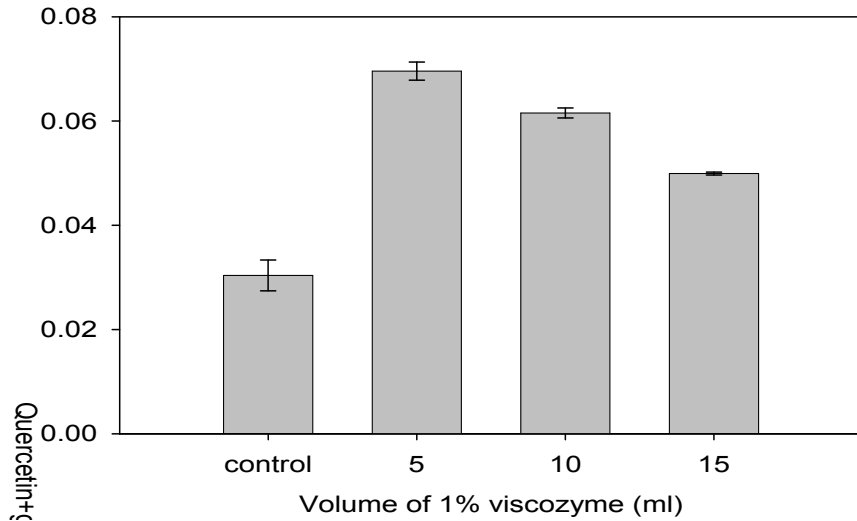


Fig. 3-21. Quercetin and quercetin glycoside contents of onion edible part with viscozyme treatment.

Cellulase로 효소처리를 한 경우 추출 효율의 증가는 세포벽을 이루는 cellulose의 분해로 기능성 성분의 용출이 용이해지고 cellulase의 quercetin glucuronide를 가수분해시키는 glucuronidase-type 활성과 rutinase 활성을 가지기 때문에 추출되지 못했던 quercetin glucuronide의 추출 수율을 증대시킨 것으로 여겨진다. 또한 viscozyme 처리를 한 양파껍질에서 더 많은 기능성 성분이 추출되었는데 이는 cellulose만 선택적으로 분해하는 cellulase와 달리 viscozyme은 arabanase, cellulase, beta-glucanase, hemicellulase, xylanase 등이 포함된 복합 효소로 세포벽을 이루는 다양한 종류의 물질을 분해하여 더 효과적인 추출을 이끌어 낸 것이라 볼 수 있다.

타. 최적 조건의 조합에 따른 추출효율

양파껍질의 경우 각각의 조건에서 찾은 최적 조건(Table 3-6)을 조합하여 처리한 것의 quercetin과 quercetin glycoside의 추출수율을 보면 17.76 ± 1.29 mg/g으로 껍질 대조군이 5.8 mg/g 추출된 것보다 3.06배 더 많이 추출되었다. 양파에 병용처리를 하여 quercetin과 quercetin glycoside를 추출한 방법 중 가장 수율이 높았던 microwave 조사 시 보다 1.52배 더 많이 추출되었다. 양파의 quercetin과 quercetin glycoside의 추출량은 양파 껍질의 수분함량이 19.44%인 것에 기인하면 최소 추출치는 껍질 대조군, 즉 상온에서 60% methanol을 용매로 하여 1시간 동안 추출한 결과로 양파껍질에서 467.25 mg/100 g(fresh weight) 만큼 quercetin과 quercetin glycoside가 추출되었고, 최대 추출치는 최적 조건들의 조합을 통하여 추출한 결과 1430.7 mg/100 g(fresh weight) 정도의 quercetin과 quercetin glycoside가 추출되었다.

Table 3-6. Amount of quercetin and quercetin glycoside in onion skin with various treatments.

Process	Quercetin + Quercetin glycoside (mg/g onion)
Control	5.8±0.1 ^a
Microwave	11.65±0.56 ^d
Ultrasound	6.64±0.51 ^c
Cellulase	8.30±0.29 ^b
Viscozyme	9.77±0.69 ^{bc}
Optimum combination	17.76±1.29 ^e

양파 과육의 경우 최적 조건을 조합한 것의 quercetin과 quercetin glycoside 추출량은 과육 대조군에서 추출된 0.030±0.00 mg/g보다 유의적으로 적은 것을 Table 3-7에서 볼 수 있다. 양파 껍질 부분에 free quercetin이 많이 존재하는 반면, 양파 과육 부분에는 free quercetin의 형태보다도 quercetin glycoside의 형태로 더 많이 존재한다. 효소처리 후 buffer solution을 증발시킬 때의 발생한 열과 microwave와 초음파의 지속적인 처리에 의하여 quercetin glycoside의 파괴가 일어났을 것이라고 생각할 수 있다. 이전 연구 (Hirota et al., 1998)에서도 양파 과육을 60분 동안 끓였을 때의 quercetin 4'-glucoside 함량은 약 80% 정도 감소했다는 보고가 있다. 실험결과에서도 대조군보다 최적 조건의 조합에 따른 시료의 quercetin과 quercetin glycoside의 추출정도는 53.33% 정도 감소하였다. 양파 과육 부분에 있어서의 최소 추출치인 대조군, 즉 상온에서 60% methanol을 용매로 하여 1시간 동안 추출한 결과로서 quercetin과 quercetin glycoside의 추출량은 3.0 mg/100 g(fresh weight)이었고, 최대 추출치는 viscozyme 처리를 한 양파 과육 부분으로 7.0 mg/100 g(fresh weight)만큼의 quercetin과 quercetin glycoside가 추출되었다. 이것은 껍질 부분에서 317.99 mg/100 g(fresh weight), 과육 부분에서 4.10 mg/100 g(fresh weight)의 quercetin과 quercetin glycoside가 추출되었다는 결과(Kang et al., 1998)와 비교해 보았을 때 microwave나 초음파 처리, 효소처리 시 quercetin과 quercetin glycoside가 더 많이 추출되었다는 것을 알 수 있다.

Table 3-7. Amount of quercetin and quercetin glycoside in onion edible part with various treatments.

Process	Quercetin + glucoside (mg/g onion)
Control	0.030±0.003 ^b
Microwave	0.065±0.002 ^{de}
Ultrasound	0.063±0.002 ^d
Cellulase	0.050±0.004 ^c
Viscozyme	0.070±0.002 ^e
Optimum combination	0.014±0.0002 ^a

파. 양파 발효음료 단위공정 설계와 최적화

전체적인 유산발효음료 공정과 초산발효음료 공정은 Fig. 3-22, 3-23에 나타내었다. 유산발효와 초산발효는 발효공정을 제외하곤 같은 공통 과정을 거치도록 설계함으로써 제품 생산의 효율성을 제고하였다. 전체 공정은 우선 선별과정을 거친 양파는 박피공정을 통하여 과육 부분과 껍질 부분으로 분리한 후, 세척하고 과육 부분은 착즙과정과 autoclave를 통하여 발효전액을 제조하고 탈취공정을 거쳐 양파취를 감소시킨 후 다시 한번 autoclave를 하여 살균된 발효기를 준비한다. 이후 선별된 유산균과 초산균을 접종시켜 발효공정을 실시한다. 분리된 껍질 부분은 건조 후, 분쇄과정을 거쳐 추출공정을 통하여 껍질 부분에 풍부하게 존재하는 flavonoid 성분을 추출하여 농축시킨다. 농축 추출액은 발효가 끝난 시점에서 제품 제조 과정에서 적정량 첨가하도록 한다. 제품 제조 단계에서는 불용성 물질을 제거하고, 당 및 기타 첨가물을 혼합하여 최종 제품을 성형한 후 포장단계를 거쳐 보관하도록 설계하였다.

(1) 발효 전 공정

(가) 박피공정

박피공정에서는 주재료인 양파에서 발효에 쓰일 과육 부분과 기능성 물질을 추출하는데 쓰일 껍질 부분을 분리하는 과정으로써 고압의 공기를 연속적으로 분사하는 방법이 대량 생산 체제에 적합한 것으로 판단된다. 시료로 사용된 양파는 개당 약 194.2 g이었고 껍질이 약 1.0 g으로 껍질과 과육부의 중량비는 1:193이었다.

(나) 착즙공정

양파 과육 부분은 유산 및 초산 발효의 발효기 제조에 사용할 수 있도록 착즙하는 과정이 필요하다. 착즙기의 형태는 착즙 수율이 좋은 screw를 이용한 기기가 착즙공정에 적합한 것으로 생각된다. 실험실 수준에서 양파를 녹즙기에 넣고 착즙한 결과 착즙액의 수율은 77.4%이었다. 착즙액은 하얀색의 점도가 높은 액상 형태로 불규칙하게 점액질의 물질이 뭉쳐있는 형태였다. 착즙액의 점성 거동을 측정된 결과, Bingham plastic fluid의 성질을 나타냈으며 항복응력은 0.3 Pa이었고 plastic viscosity는 5.3×10^{-3} Pa·s이었다 (Fig 3-24). 착즙액의 부유물을 제거하기 위하여 autoclave를 수행했다. 121°C에서 10분간 처리한 후에는 양파 착즙액이 부유물층과 액상층으로 나누어졌었다. 부유물 층을 제거하기 위해서 filtration 한 후 액상층은 여전히 Bingham plastic fluid의 거동을 보였고 항복응력은 0.144 Pa이었으며 plastic viscosity는 0.9×10^{-3} Pa·s이었다(Fig. 3-24). 최종적으로 얻어진 착즙액의 수율은 67%이었으며 처음 착즙액 형태보다 점성이 다소 낮아진 액상 형태였다.

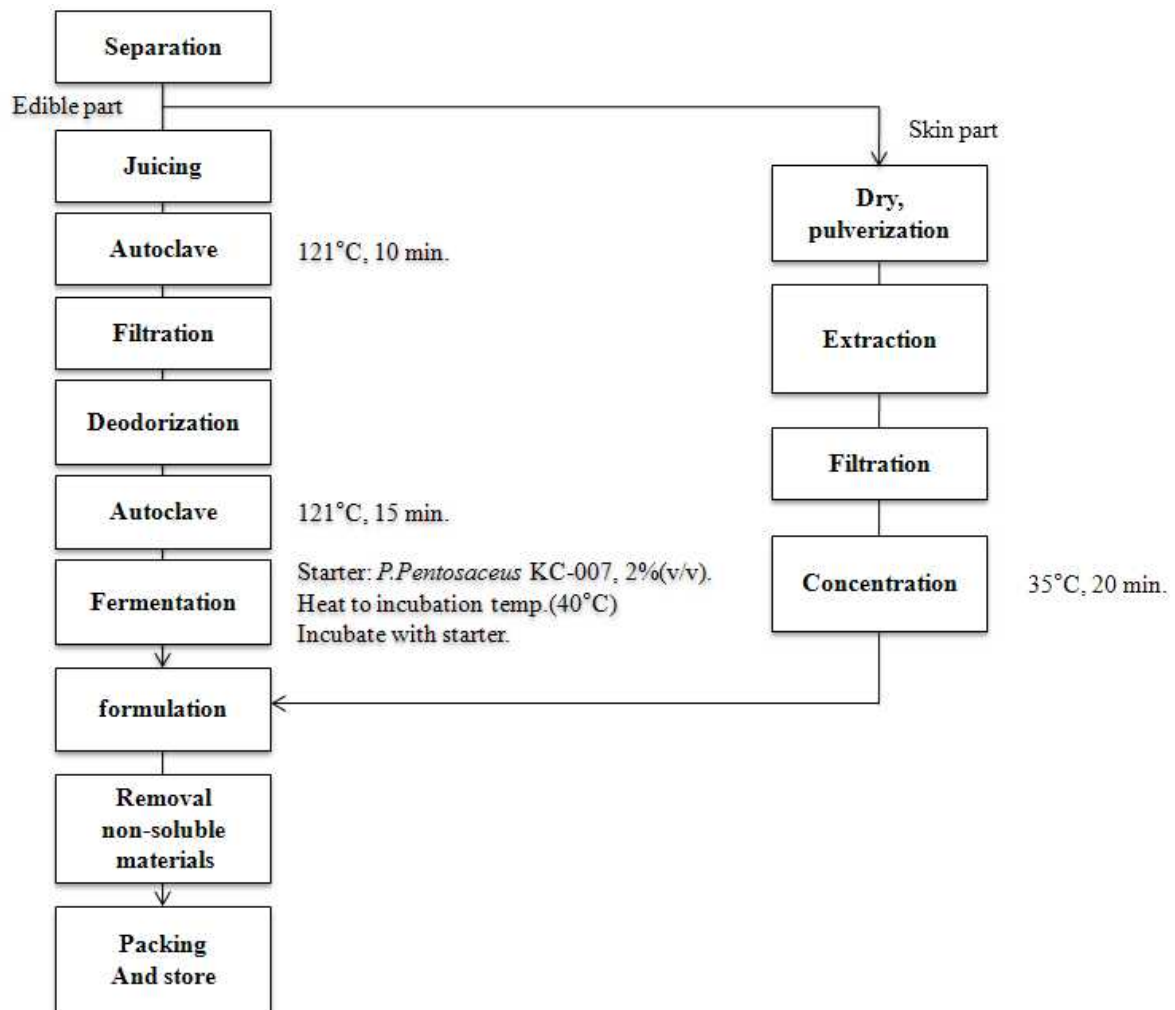


Fig. 3-22. Process of lactic acid fermented onion beverage.

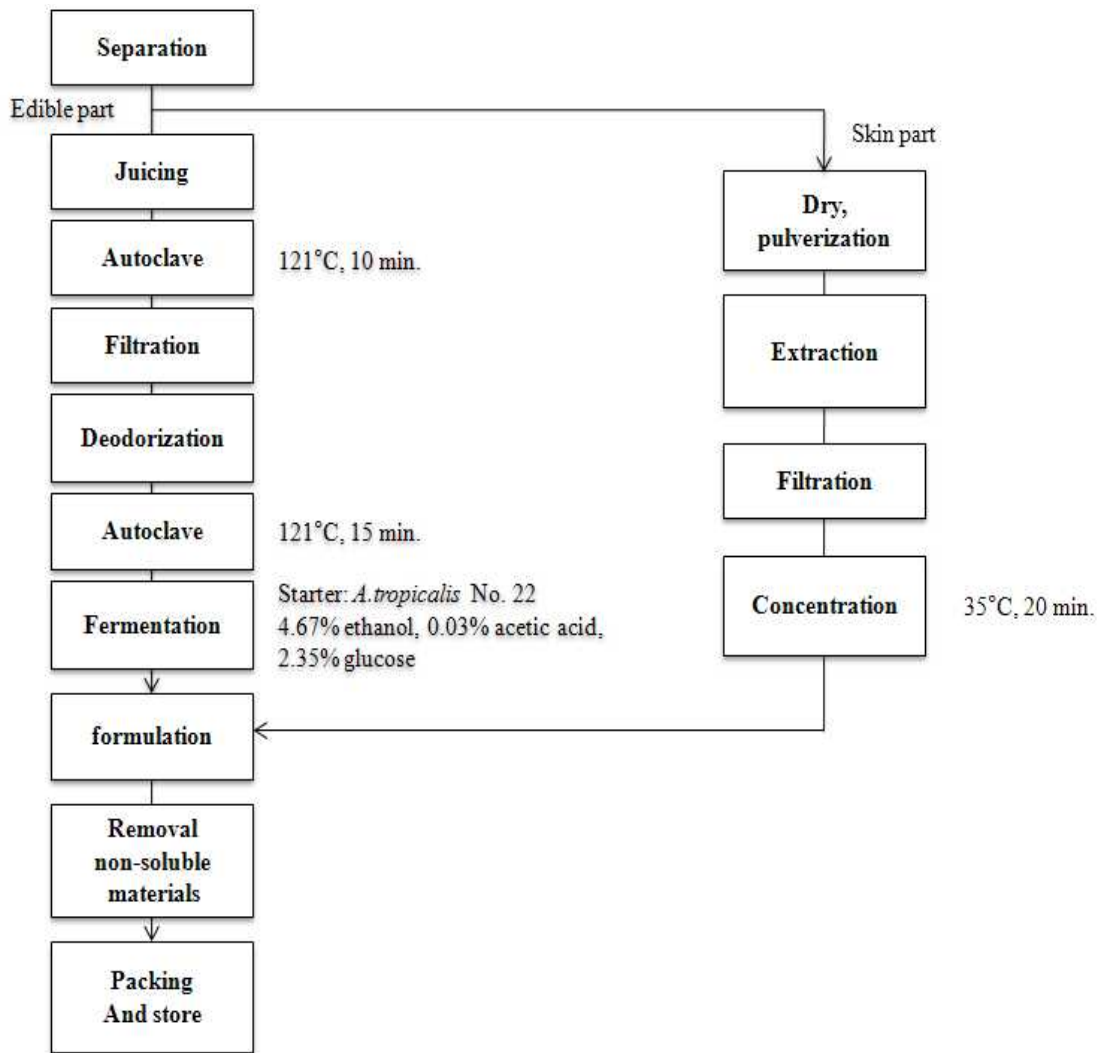


Fig. 3-23. Process of fermented onion vinegar.

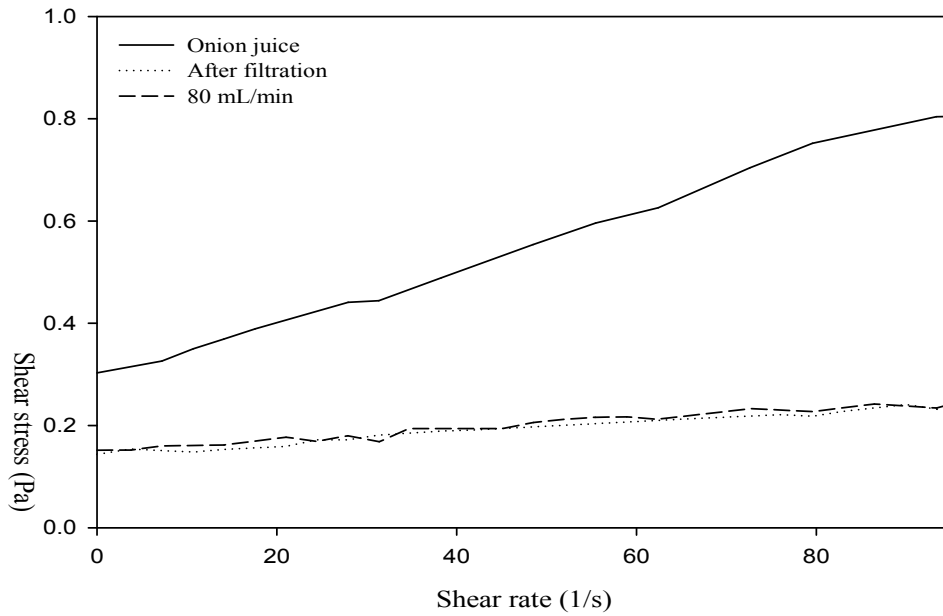


Fig. 3-24. Rheogram of onion juice.

(다) 탈취공정

양파 착즙액의 특이한 양파취를 제거하기 위해 탈취공정을 설계하였다. 설계한 탈취공정은 Fig. 3-25에 나타내었다. 착즙액이 통과하는 flow rate에 따라 향기와 점도, 기능성에 변화가 있었다.

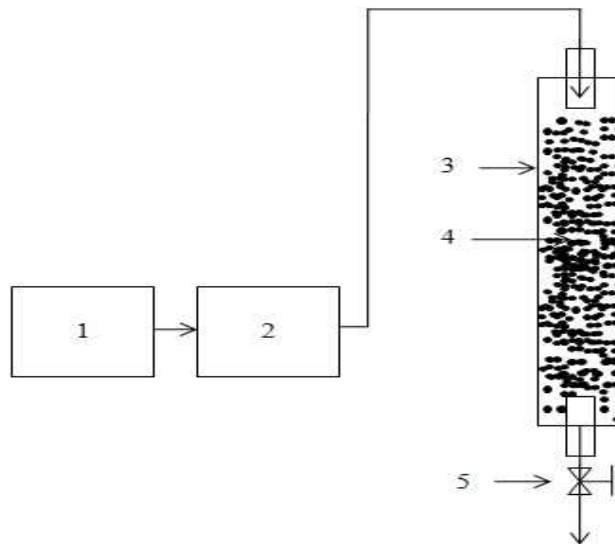


Fig. 3.25. Deodorization process of onion juice (1: onion juice; 2: pump; 3: column; 4: activated carbon; 5: valve).

Table 3-8은 탈취효과를 검증하기 위해 관능평가를 한 결과이다. 탈취공정 전의 관능검사 결과는 3.53 ± 0.74 점으로 냄새 수준이 충분히 감지가 가능한 정도와 강한냄새의 중간정도임을 알 수 있었다. 탈취공정을 거친 후의 관능검사 결과는 탈취전의 관능검사 결과와 유의적인 차이를 보였으며 공정의 flow rate에 따른 변화가 있었다.

Table 3-8. Effect of the deodorization process : sensory evaluation of onion juice.

Process	Sensory evaluation	
Flow rate of the deodorization process (mL/min)	30	1.80 ± 0.86^c
	50	2.13 ± 0.74^c
	80	2.13 ± 0.92^c
	120	2.80 ± 1.01^b
	150	2.87 ± 0.83^b
Before deodorization process	3.53 ± 0.74^a	

Flow rate가 30 mL/min일 때 1.80 ± 0.86 점으로 가장 낮은 점수가 나왔으며 냄새의 수준이 무슨 냄새인지를 알아차릴 수 있을 정도인 것으로 나타났다. Flow rate가 높아질수록 냄새는 계속 증가하여 150 mL/min일 때 2.87 ± 0.83 점으로 충분히 감지가 가능한 정도의 냄새인 것으로 나타났다. 30-80 mL/min의 flow rate로 통과시킨 착즙액의 관능적 특성은 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 120-150 mL/min의 flow rate로 통과시킨 착즙액의 관능적 특성 또한 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 80 mL/min와 120 mL/min의 flow rate로 통과시킨 시료간에는 유의적인 차이가 있었다.

탈취공정 전후의 착즙액의 전자공여능 또한 변화가 있었다(Fig. 3-26). 탈취 전 착즙액의 전자공여능은 $83.3 \pm 0.2\%$ 였다. 탈취 후 착즙액의 전자공여능은 flow rate가 느릴수록 감소하는 경향을 보였다. Flow rate가 150 mL/min일 때 $79.1 \pm 0.1\%$, 120 mL/min일 때 $79.5 \pm 1.0\%$, 80 mL/min일 때 $75.5 \pm 1.0\%$, 50 mL/min일 때 $72.8 \pm 0.3\%$ 였으며 30 mL/min으로 착즙액을 흘렸을 때 전자공여능은 $64.9 \pm 1.0\%$ 로 22% 감소하였다.

탈취공정 전후의 viscosity는 탈취 전액의 yield stress는 0.144 Pa이었으며 viscosity는 0.9×10^{-3} Pa·s이었으나 80 mL/min의 flow rate로 흘렸을 때의 탈취 후 착즙액의 yield stress 또한 0.148 Pa이었으며 viscosity는 0.9×10^{-3} Pa·s 이었다. 탈취공정 중의 viscosity는 큰 변화가 없었으며 flow rate 간에도 차이가 없었다.

관능검사와 기능성을 고려해 보았을 때 80 mL/min으로 흘린 착즙액이 기능성 성분

의 손실이 최소가 되면서 양파즙이 많이 감소되어 탈취공정에 가장 적합하다고 할 수 있겠다. 탈취공정 후 일부 활성탄 가루가 착즙액에 섞여 나오는 것을 볼 수 있었다. 음료제조공정 마지막에 불용성 물질을 제거하는 공정을 첨가하여 제거할 수 있게 하였다.

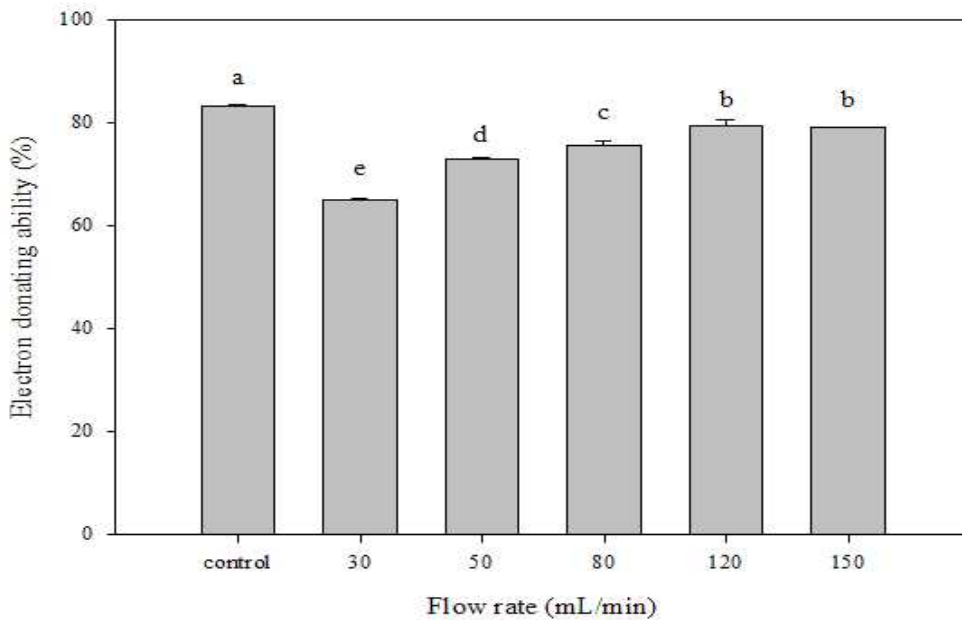


Fig. 3-26. Effect of flow rate on the electron donating ability of onion juice.

(라) 살균공정

양파 착즙액의 발효 시 유산균 starter를 접종하기 전에 착즙액 내의 오염균을 제거하여야 한다. 이를 위해 autoclave의 최저 살균 온도인 105°C에서 5, 10, 20, 30분간 열처리하며 양파 착즙액의 살균 조건을 측정하였고, 그 결과는 Table 3-9와 같다. 양파 착즙액 자체의 총균, 효모, 곰팡이 생균수를 측정된 결과 총균수는 5.9×10^5 CFU/mL, 효모는 7.7×10^5 CFU/mL, 곰팡이는 6.6×10^5 CFU/mL의 균이 존재하였다. 105°C에서 5분간 autoclave한 결과 총균과 효모는 측정되지 않았으나, 곰팡이는 2.0×10^2 CFU/mL의 균이 존재하였다. 105°C에서 10분간 autoclave한 결과 모든 균이 검출되지 않았다. 20분, 30분 열처리한 경우도 균이 검출되지 않아 양파 착즙액은 105°C에서 10분간 autoclave하면 살균이 완료됨을 알 수 있었다.

Table 3-9. Sterilization condition of onion juice at 105°C.

Autoclave (min)	Total bacterial counts (CFU/mL)	Total yeast counts (CFU/mL)	Total fungi counts (CFU/mL)
0	5.9×10^5	7.7×10^5	6.6×10^5
5	nd*	nd	2.0×10^2
10	nd	nd	nd
20	nd	nd	nd
30	nd	nd	nd

* nd : not detected

(2) 발효공정

(가) 유산균 생균수 측정

양파 발효음료 제조공정 별 생균수를 측정한 결과는 Table 3-10과 같다. 양파 착즙액 자체에 3.1×10^4 CFU/mL의 유산균이 측정되었으며, 121°C에서 10분, 15분간 autoclave 처리 과정을 거치면 기존에 존재하던 유산균은 사멸한다. 이에 KC-007 starter 접종 후 24시간 유산 발효시키면 1.1×10^9 CFU/mL의 유산균이 측정되었고, 이는 1 mL 당 10^8 마리 이상의 유산균이 함유되어야 하는 농후발효유 기준을 초과하는 충분한 양으로 열처리 공정 후에 발효가 잘 이루어지는 것을 알 수 있었다. 48시간 발효를 지속한 경우에서 5.3×10^8 CFU/mL의 유산균이 측정되어 24시간 발효한 것보다 유산균 수가 감소하였다.

Table 3-10. The viable cell count of lactic acid bacteria in process.

Process	Number of viable cells (CFU/mL)
Onion juice	3.1×10^4
Autoclaved onion juice	nd*
24hr fermented onion juice	1.1×10^9
48hr fermented onion juice	5.3×10^8

* nd : not detected

(나) pH 측정

양파 발효음료 제조과정 별 pH변화를 측정한 결과는 Fig. 3-27과 같다. 양파 착즙액은 pH 5.76 ± 0.03 , 121°C 에서 autoclave한 시료는 pH 5.49 ± 0.05 로 열처리로 인한 pH 변화는 없었다. 그러나 24시간, 48시간 발효액의 pH는 각각 3.90 ± 0.06 , 3.80 ± 0.04 로 감소하였다.

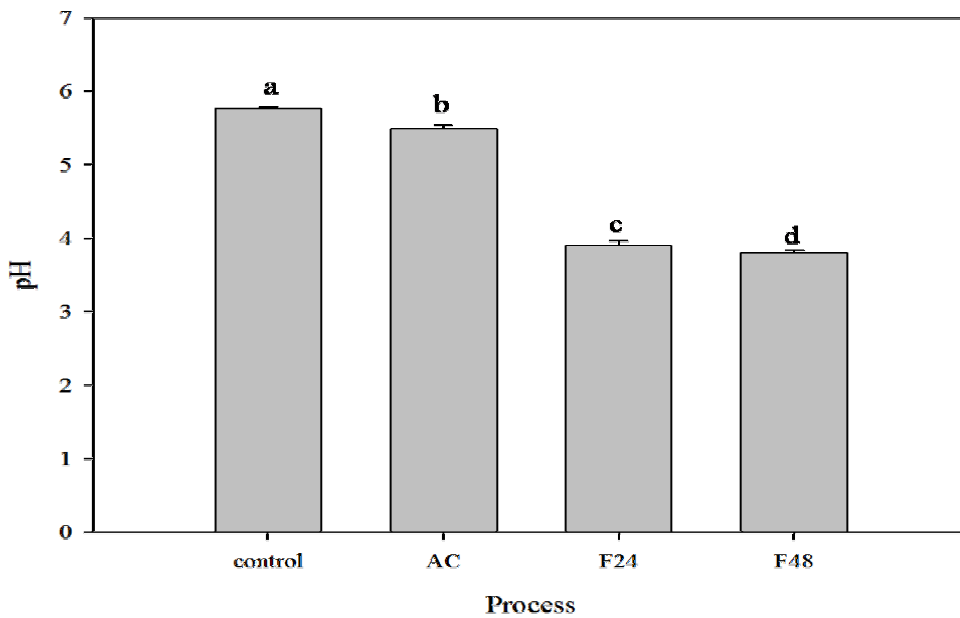


Fig. 3-27. pH of onion juice of each process unit (control: onion juice; AC: autoclave; F24: fermented 24 hr; F48: fermented 48 hr).

(다) 산도 측정

양파 발효음료 제조과정 별 산도 측정 결과는 Fig. 3-28과 같다. 양파 착즙액은 $0.52 \pm 0.03\%$, 121°C 에서 autoclave한 시료는 $0.54 \pm 0.05\%$ 로 상호 유의적인 차이가 없었으며, 24시간 발효액은 $1.97 \pm 0.02\%$ 로 발효 시 산도가 증가하는 것을 알 수 있었다. 48시간 발효액은 $2.31 \pm 0.01\%$ 로 산도가 가장 높았다. 이는 batch culture이므로 발효가 진행됨에 따라 발효 산물이 축적되기 때문인 것으로 판단되었다.

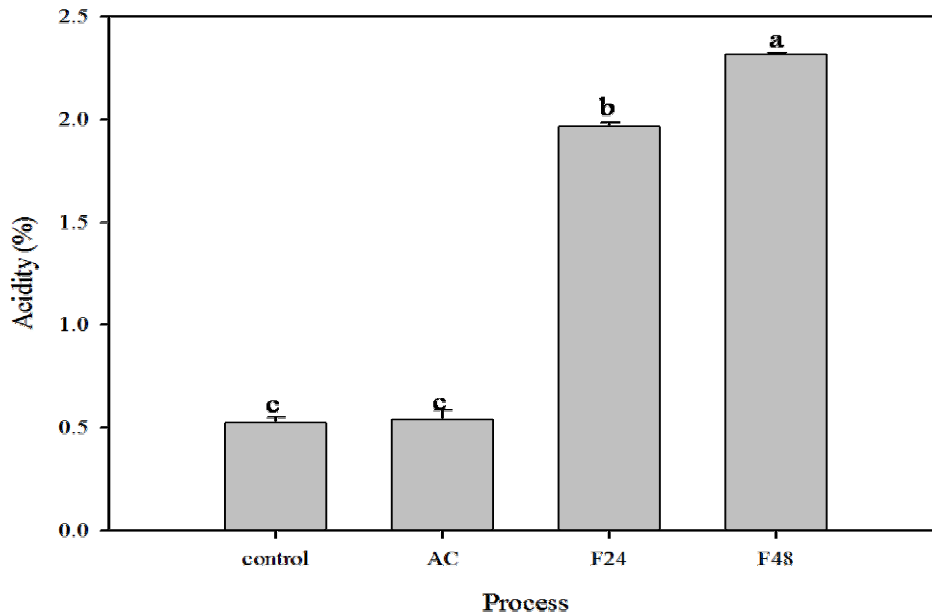


Fig. 3-28. Acidity of onion juice of each process unit(control: onion juice; AC: autoclave; F24: fermented 24 hr; F48: fermented 48 hr).

(라) 환원당

양파 발효음료 제조공정 별 환원당 측정 결과는 Table 3-11과 같다. 양파 착즙액은 $101.19 \pm 8.23 \mu\text{mol}$, 살균한 시료는 $104.80 \pm 6.70 \mu\text{mol}$ 의 환원당이 존재하며 상호 유의적인 차이가 없었다. 24시간 발효액은 $88.30 \pm 0.63 \mu\text{mol}$, 48시간 발효액은 $81.41 \pm 3.97 \mu\text{mol}$ 의 환원당이 측정되어 발효가 진행됨에 따라 환원당이 감소하는 것을 알 수 있었다.

Table 3-11. Reducing sugar contents of each unit process.

Process	Reduced sugar (μmol)
Onion juice	101.19 ± 8.23^a
Autoclaved onion juice	104.80 ± 6.70^a
24hr fermented onion juice	88.30 ± 0.63^b
48hr fermented onion juice	81.41 ± 3.97^b

(마) 전자공여능력

양파 착즙액과 이를 121°C에서 10분간 열처리 후 다시 121°C에서 15분간 살균한 시료, 24시간 유산 발효액, 48시간 유산 발효액의 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 3-29와 같이 양파 착즙액은 25.53%의 전자공여능을 나타내었으며 열처리한 경우에는 54.25%, 발효액의 경우에는 24시간 발효한 경우 76.97%, 48시간 발효한 경우 77.56%의 전자공여능을 나타내었다. 양파 착즙액은 열처리 및 발효과정을 거치면서 전자공여능이 높아짐을 알 수 있었다.

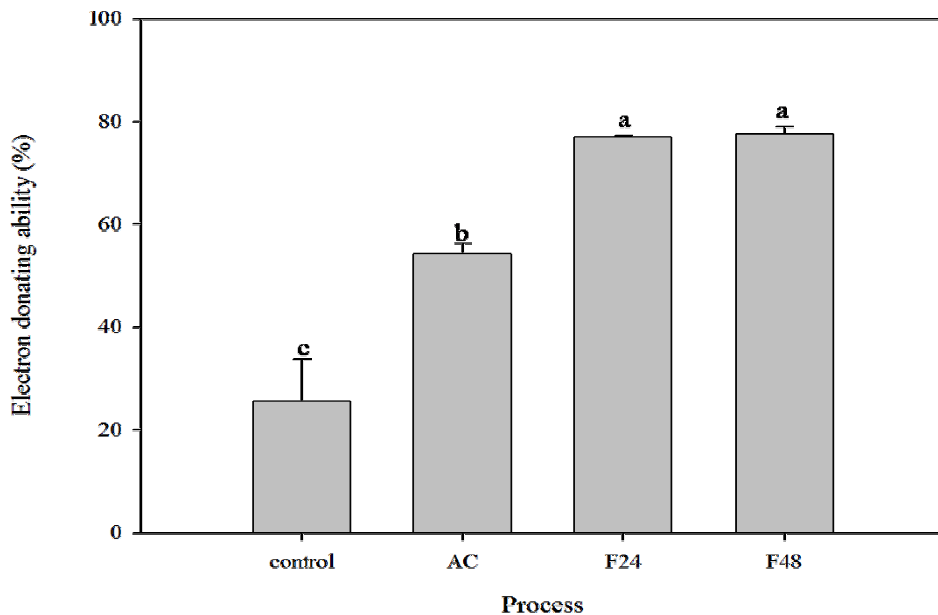


Fig. 3-29. Electron donating ability of onion juice of each unit process.

(바) 아질산염 소거작용

양파 착즙액, 열처리 및 살균, 이를 유산 발효시킨 발효액의 아질산염 소거능을 측정한 결과 Table 3-12와 같이 양파 착즙액은 pH 3의 조건에서 $27.38 \pm 3.22\%$ 로 제조 공정 중 가장 낮은 소거율을 나타내었고, 열처리 및 살균한 시료는 $79.84 \pm 3.61\%$, 24시간 발효액은 $84.21 \pm 6.26\%$ 로 가장 높은 아질산염 소거율을 나타내었다. 48시간 발효액은 $76.75 \pm 4.94\%$ 소거율을 나타내었다. pH 4.2, 6.0에서도 제조 공정 별 아질산염 소거작용은 비슷한 양상을 보였다. 살균한 시료와 발효액 상호간에 유의적인 차이는 없었지만, 양파 착즙액과 비교하였을 때 가공 과정을 거치면서 아질산염 소거율이 상승함을 알 수 있었다.

Table 3-12. Nitrite scavenging ability of onion juice of each unit process.

pH	Nitrite scavenging ability(%)			
	Onion juice	Autoclaved onion juice	24 hr fermented onion juice	48 hr fermented onion juice
3.0	27.38±3.22 ^{b*}	79.84±3.61 ^a	84.21±6.26 ^a	76.75±4.94 ^a
4.2	25.47±0.65 ^b	72.43±8.07 ^a	76.93±4.99 ^a	74.68±1.13 ^a
6.0	25.10±0.58 ^b	73.36±5.72 ^a	78.06±4.77 ^a	73.60±3.24 ^a

(사) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

양파 착즙액, 열처리 및 살균처리한 시료와 이를 유산발효시킨 발효액의 SOD 유사활성을 측정한 결과는 Fig. 3-30과 같다. 양파 착즙액은 91.21±0.61%의 SOD 유사활성을 나타내었으며, 열처리 및 살균한 시료는 86.54±4.90%, 24시간 발효액은 90±2.70%, 48시간 발효액은 91.66±1.17%의 SOD 유사활성을 나타내었다. 공정 별 SOD 유사활성은 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

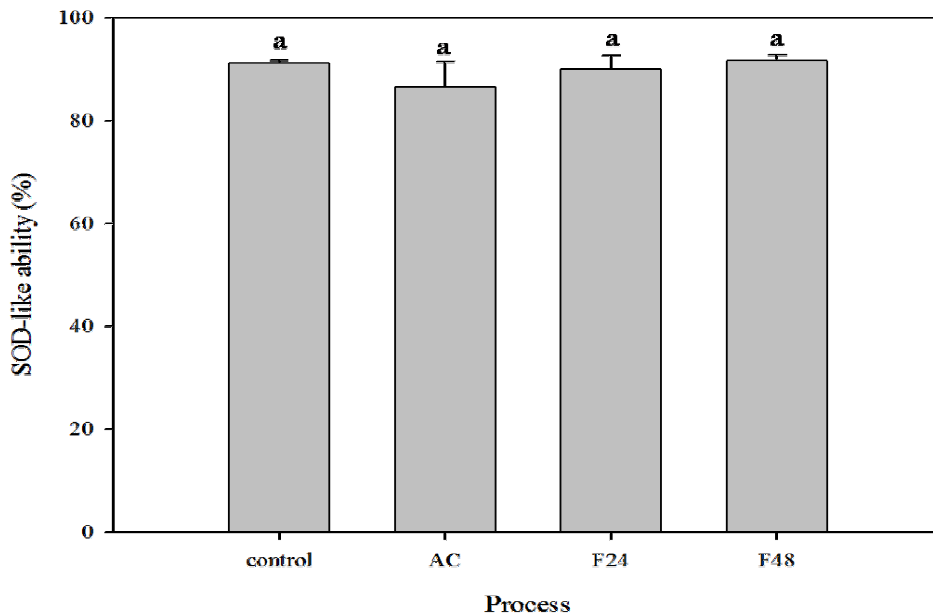


Fig. 3-30. SOD-like activities of onion juice of each unit process.

(3) 추출공정

(가) 건조공정

양파껍질을 건조한 결과 열풍건조를 한 껍질의 수분함량은 27.3%이었고 동결건조한 껍질의 수분함량은 27.7%로 유사하게 나왔다.

Fig. 3-31을 보면 알 수 있듯이 건조방법에 상관없이 수분 함량은 건조를 시작한 후 3시간 내에 급격하게 감소하여 그 이후에는 큰 변화를 보이지 않았지만 24시간이 지날 때까지 지속적으로 수분함량이 감소하는 것을 볼 수 있었다.

상대적으로 동결건조가 열풍건조방법에 비해 에너지가 많이 소비되므로 양파껍질의 건조공정은 열풍건조를 선택하였으며 그 때의 조건은 70°C에서 3시간동안 처리하는 것으로 하였다.

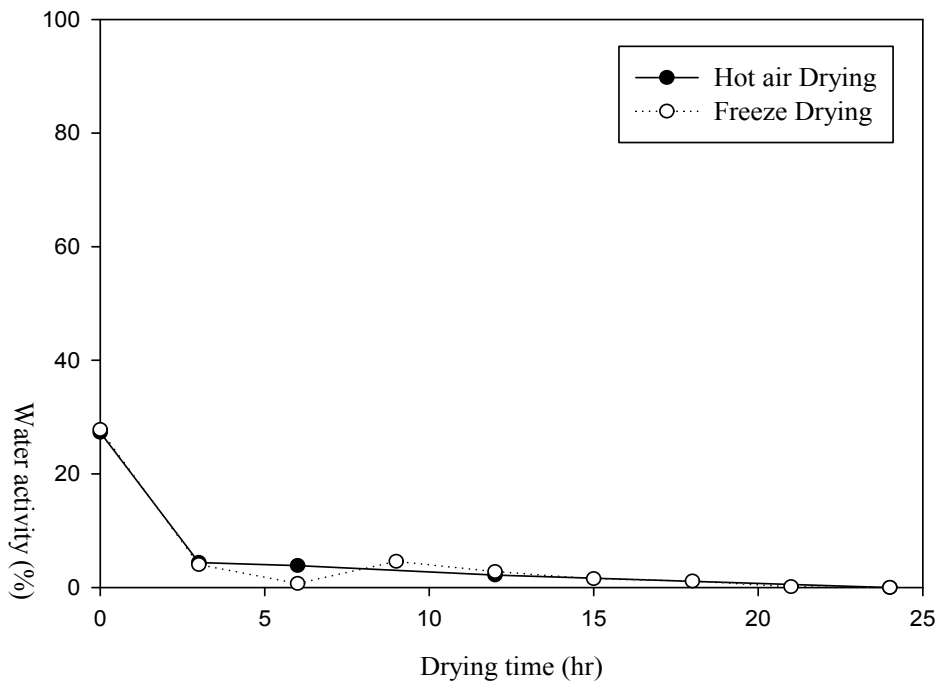


Fig. 3-31. Effect of drying times and drying methods on the water activity of onion skin.

(나) 추출공정

① 마이크로웨이브 추출공정

Table 3-2에서 볼 수 있듯이 마이크로웨이브를 처리한 양파껍질의 quercetin은 추출 조건에 따라 0.29~4.84 mg/g 정도 추출 되었다. 마이크로웨이브 추출공정의 최고 수율은 69.7%의 ethanol로 약 117초 동안 추출한 조건에서 얻어졌다. 최적 추출조건의 quercetin 추출량은 4.84 ± 0.14 mg/g으로 나타났다.

변수 중 ethanol 농도의 P-value는 <0.0001 , 조사시간의 P-value는 0.0017로 나와 ethanol 농도는 99.9% 신뢰수준에서, 조사시간은 99.0% 신뢰수준에서 마이크로웨이브 추출공정에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 표면반응 곡선을 통해 각 변수가 마이크로웨이브 추출공정에 미치는 영향을 볼 수 있었다. Fig. 3-32(A, B)를 보면 ethanol 농도에 따라 quercetin의 추출량이 변하는 것을 볼 수 있다. Ethanol 농도가 낮을 때는 추출량이 적었으나 농도가 증가함에 따라 포물선 형태로 추출량이 증가하는 것을 볼 수 있다. 하지만 어느 수준 이상으로 증가한 후에는 ethanol의 농도가 증가할수록 quercetin의 추출량이 감소하였다. 그와는 달리 마이크로웨이브 조사 시간은 시간이 증가함에 따라 quercetin의 추출량이 증가하였다.

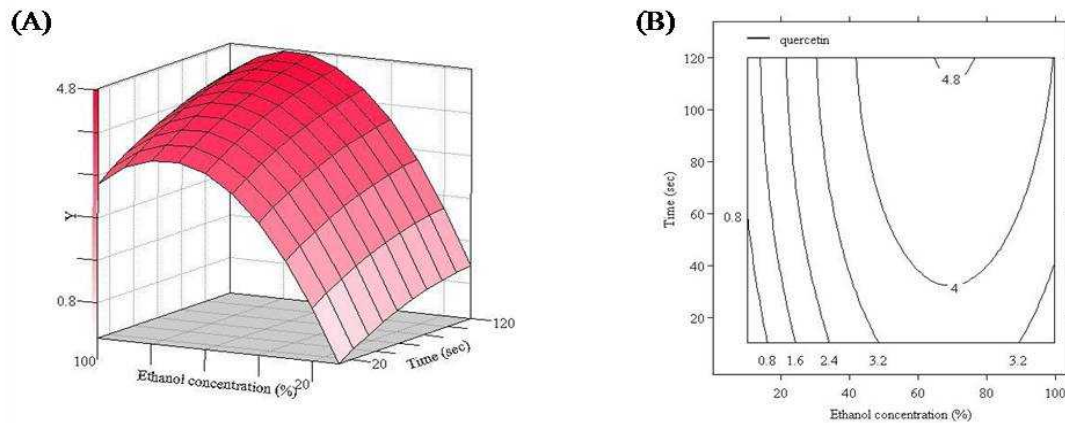


Fig. 3-32. Response surface (A) and contour (B) plots showing the effect of ethanol concentration and extraction time on yield of quercetin using microwave assisting extraction.

마이크로웨이브 추출공정의 반응표면분석 결과 quercetin의 추출양과 변수간의 상관성을 나타내는 회기 이차방정식은 다음과 같았다.

$$Y = -1.873 + 0.074*X_1 + 0.009*X_2 - 0.001*X_1*X_1 - 0.0001*X_2*X_2$$

Table 3-13을 보면 위의 회기 방정식을 나타내는 모델의 적합성을 알 수 있다. 모델의 변수간의 일차적 관계와 이차적 관계는 모두 99.9% 신뢰수준에서 유의하였고 전체모델 또한 99.9% 수준에서 유의함을 알 수 있었다.

Table 3-13. Analysis of variance for microwave assisting extraction variables of the regression model.

Source	D.F. ^a	Sum of squares
Model	9	27.64 ^{***}
(Linear)	3	12.64 ^{***}
(Quadratic)	3	14.98 ^{***}
(Cross Product)	3	0.023

a D.F., degree of freedom. * Significant at 0.05 level. ** Significant at 0.01 level

*** Significant at 0.0001 level.

② 초음파 추출공정

초음파를 처리한 양파껍질의 quercetin은 추출 조건에 따라 1.74~4.34 mg/g 정도 추출 되었다(Table 3-3). RSM 수행 결과 최고 수율은 43.8%의 ethanol로 606.4 W의 초음파 출력으로 21.7분 동안 추출한 조건에서 얻어졌다. 그 때의 quercetin 추출량은 4.09±0.29 mg/g으로 나타났다.

변수 중 ethanol 농도의 P-value는 0.035, 초음파출력의 P-value는 0.009, 처리시간의 P-value는 0.35로 나와 ethanol 농도는 95.0%신뢰수준에서, 초음파 출력은 99.0% 신뢰수준에서 초음파 추출공정에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 표면반응 곡선을 통해 각 변수가 초음파 추출공정에 미치는 영향을 볼 수 있었다. Fig. 3-33(A, B)을 보면 ethanol 농도에 따라 quercetin의 추출양이 변하는 것을 볼 수 있다. Ethanol의 농도가 낮을 때는 추출양이 적었으나 농도가 증가함에 따라 포물선 형태로 추출양이 증가하는 것을 볼 수 있다. 하지만 어느 수준 이상으로 증가한 후에는 ethanol의 농도가 증가할수록 quercetin의 추출양이 감소하였다. 그와는 달리 초음파 출력은 출력이 증가할수록 quercetin의 추출양이 증가하였다(Fig. 3-33(A, C)). 또한, 초음파 처리시간이 증가하면서 quercetin의 추출양이 증가하였다(Fig. 3-33(B, C)).

초음파 추출공정의 반응표면분석 결과 quercetin 추출량과 변수간의 상관성을 나타내는 회기 이차방정식은 다음과 같았다.

$$Y = -1.873 + 0.074 \cdot X_1 + 0.009 \cdot X_2 + 0.094 \cdot X_3 - 0.0005 \cdot X_1 \cdot X_1 - 0.0005 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0.0005 \cdot X_3 \cdot X_3$$

Table 3-14를 보면 위의 회기 방정식을 나타내는 모델의 적합성을 알 수 있다. 모델의 변수간의 일차적 관계는 99.0% 신뢰수준에서 유의하였고 변수간의 이차적 관계는 95.0% 신뢰수준에서 유의적으로 나타나 전체 모델은 95.0% 수준에서 유의함을 알 수 있다.

Table 3-14. Analysis of variance for ultrasound assisting extraction variables of the regression model.

Source	D.F. ^a	Sum of squares
Model	9	5.8*
(Linear)	3	3.58**
(Quadratic)	3	1.82*
(Cross Product)	3	0.4

a D.F., degree of freedom. * Significant at 0.05 level. ** Significant at 0.01 level.

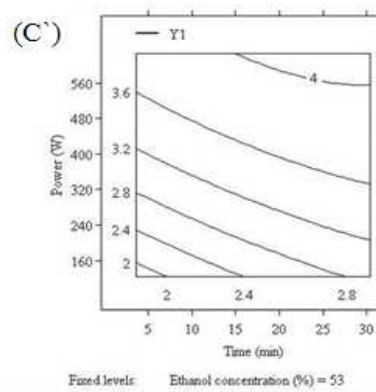
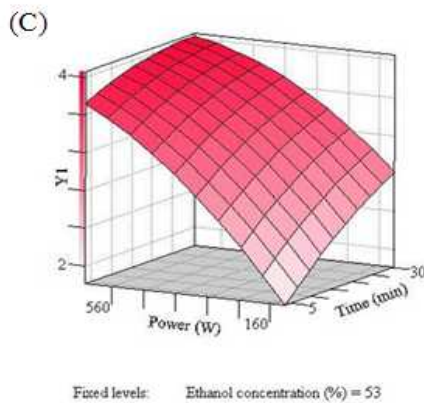
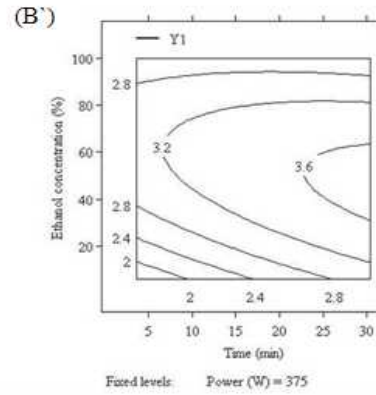
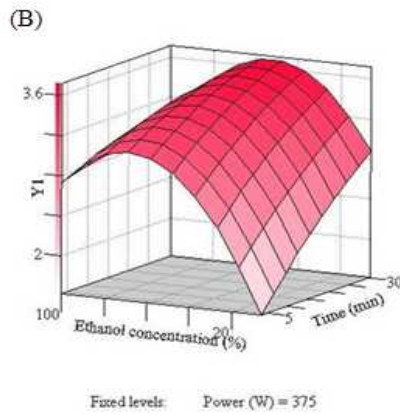
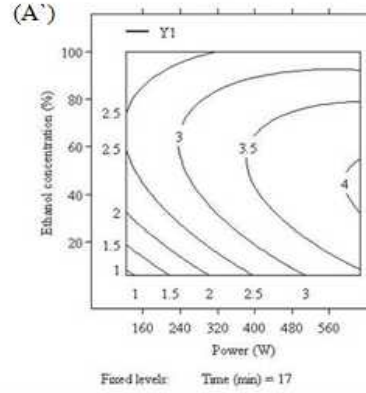
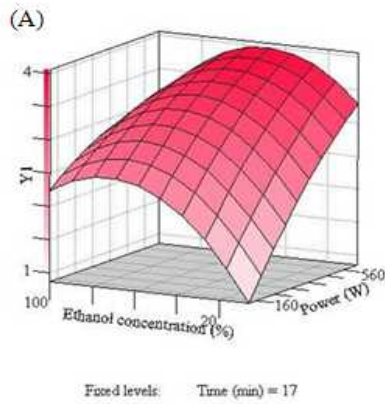


Fig. 3-33. Response surface plots showing the effect of ethanol concentration and power (A), ethanol concentration and extraction time (B), and power and extraction time (C) on yield of quercetin using ultrasound assisting extraction. ' : Contour plots of each response surface plot.

③ 반응표면분석의 검증

수행된 반응표면 분석의 결과를 검증하기 위하여 얻어진 최적 조건에서 검증 실험을 행하였다. 실험결과 마이크로웨이브 추출공정의 최적조건으로 4.75 ± 0.15 mg/g의 quercetin 양이 추출되었다. 초음파 추출공정의 최적조건으로는 3.78 ± 0.38 mg/g의 quercetin 양이 추출되어 두 추출법 모두 반응표면 분석을 한 결과와 비슷한 수준으로 추출되었다.

(4) 농축공정

양과깍질 추출액을 농축하기 위하여 농축공정을 설계하였다. 농축 방법은 널리 쓰이는 감압 농축법을 사용하였다. 농축 온도는 감압을 하였을 때 시료가 끓어 넘치게 하지 않기 위해 35°C 로 정하였다.

추출액은 Bingham plastic fluid였으며 농축 전의 yield stress는 0.15 Pa였으며, viscosity는 1.8×10^{-3} Pa·s이었다. 농축 후의 점도는 큰 변화가 없었으며, 농축시간에 따른 점도의 변화도 없었다. 일반적으로 농축 공정시 점도가 증가하는 현상을 보이는데, 본 실험에서의 농축 전 추출액의 점도가 많이 낮고, 농축 후에도 페이스트 상태가 아닌 같은 액상형태이기 때문인 것으로 판단된다.

추출액의 전자공여능은 농축이 지속될수록 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3-34). 농축 전 추출액의 전자공여능은 $85.2 \pm 0.2\%$ 이었으나 8분간 농축하였을 때 $84.5 \pm 0.1\%$ 로 95.0% 신뢰수준에서 유의적으로 낮은 결과가 나왔다. 그 후 13, 18, 25분 동안 농축하였을 때도 $82.1 \pm 0.2\%$, $72.5 \pm 0.1\%$, $58.8 \pm 0.2\%$ 로 유의적으로 전자공여능이 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 특히 25분 동안 농축하였을 때는 전자공여능이 31%정도 감소한 것을 볼 수 있었다. 또한 농축이 진행될수록 불용성 물질의 양이 증가하였다.

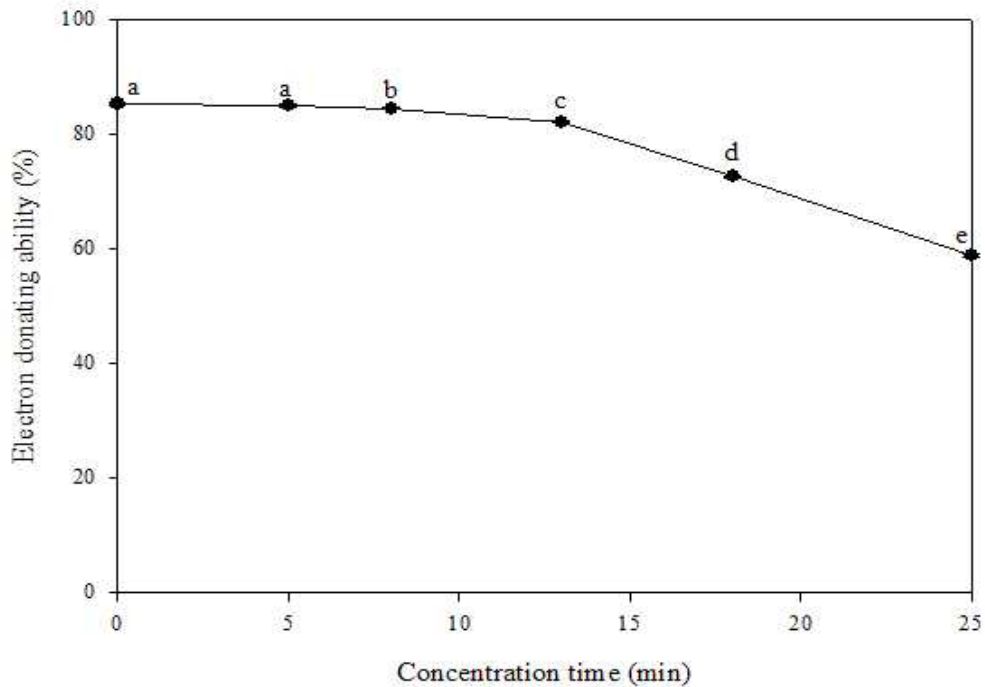


Fig. 3-34. Effect of concentration time on the electron donating ability of onion skin extract.

하. 공정제어 하드웨어시스템 및 소프트웨어시스템의 구축

(1) 공정제어 소프트웨어시스템의 구축

(가) Simulink를 이용한 온도제어 소프트웨어 시스템 구성

고기능성 양파발효 음료를 산업적으로 생산하기 위하여 연속적이고 자동화된 시스템이 요구되는데, 자동화 시스템을 위해서는 각 단위 공정에 대한 제어가 필수적이다. 기능성 양파발효 음료의 공정에서 주요 핵심공정인 추출과 발효공정에 있어서 온도 제어가 중요하다. MATLAB program의 확장도구인 Simulink를 이용하여 온도제어 소프트웨어 시스템을 구축하였다.

온도제어에 있어 다양한 신호들 사이의 상호연관성을 나타내는 블록선도를 작성하였다(Fig. 3-35).

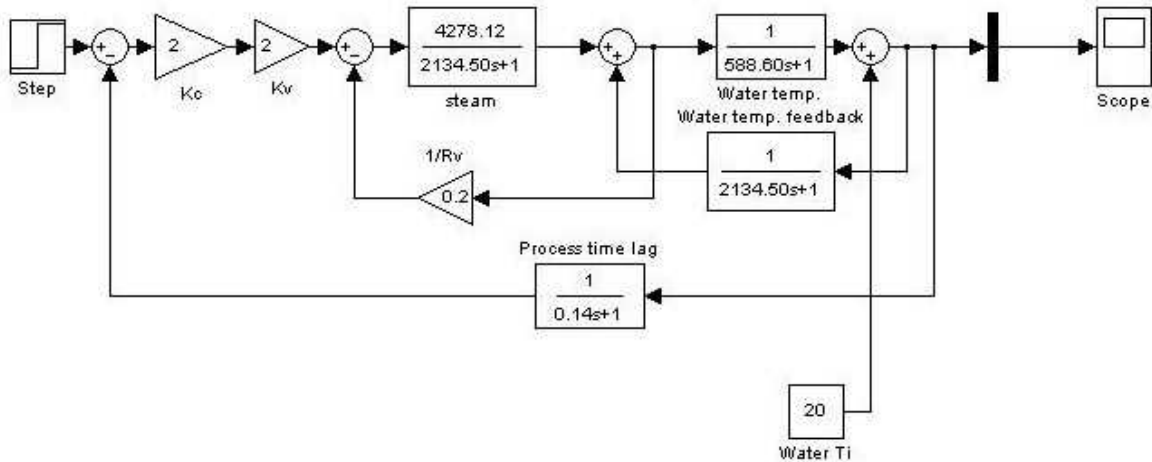


Fig. 3-35. Block diagram of temperature control of the extraction process.

온도 제어의 블록선도는 열린루프제어계와 닫힌루프제어계가 있는데, 열린루프제어계는 한 동작이 끝나면 그 결과를 가지고 다음 동작이 시작되는 순서제어로 일정 온도를 유지하려고 하는 본 연구의 제어와 맞지 않아 제어결과를 입력측으로 되돌리면서 제어결과를 소기의 목적에 일치하도록 계속적으로 조절하여 제어하는 닫힌루프제어계 방식이 있다.

산업공정에서 주로 사용되는 제어기들의 종류로는 설정값과 현재값의 차인 오차에 비례하여 제어량을 변화시키는 비례제어(proportional, P), 오차를 미분하여 제어신호를 만들어내는 미분제어를 비례제어와 병렬로 연결하여 사용하는 비례미분제어(proportional differential, PD), 비례제어를 사용하였을 때 설정값에 근접하게 도달하지만 완벽하게 도달하지 못하고 발생하는 잔류편차를 없애기 위해 잔류편차를 시간적으로 누적하여 어떤 크기로 된 곳에서 조작량을 증가하여 잔류편차를 제거하는 비례적분제어(proportional integral, PI) 및 비례적분제어로 원하는 설정값으로 완벽하게 제어할 수 있지만, 외부의 어떤 방해로 인한 외란에 대해 신속하게 반응할 수 없고, 즉시 원래의 설정값으로 돌아갈 수 없는 단점을 보완하기 위한 비례적분미분제어(proportional integral differential, PID)가 있으나, 본 발효음료 제조공정에 있어 온도조절은 상대적으로 복잡하지 않으므로 구성이 간단하고 구현하기 쉬운 비례제어를 이용한 2차계 Laplace 함수에 대한 블록선도를 작성하였다.

추출공정 및 발효공정의 온도제어에 대한 블록선도를 작성하기 위해서 기본적인 열전달 지배식과 Laplace 변환이 사용된다. 열전달 지배식을 이용한 열전달을 간단하게 표현하기 위하여 몇 가지 가정을 사용하였고, Laplace 변환은 열전달 지배식의 미분방정식을 s 함수에 대해 간단한 대수방정식으로 바꾸기 위해서 사용되었다.

(나) 추출 공정의 온도 제어시스템의 해석

추출 공정의 경우 추출을 효율적으로 하기 위해서는 추출에 사용되는 용매의 온도를 최대한 빠르게 올리고, 또한 그 온도를 지속적으로 유지하기 위해서 steam 및 steam jacket이 달린 탱크를 이용하였다. 또한 온도 제어에 대한 시스템을 간단하게 수학적 식으로 유도하기 위해서 다음의 몇 가지 가정들을 사용하였다.

대기 중으로의 열손실은 무시하며 외부와 접하고 있는 steam jacket의 바깥 벽면의 열용량은 한정되어 있고, 이 steam jacket의 외벽의 온도는 균일하며, 언제나 수증기의 온도와 같으며, steam jacket 탱크속의 용매는 충분히 교반되어 균일한 온도를 갖고, 또한 steam jacket 안의 수증기는 항상 포화되어 있다고 가정한다.

수증기로부터 steam jacket 안에 있는 용매로의 열의 흐름은 다음 식으로 표현된다.

$$q = U(T_v - T_o)$$

q = 열이 흐르는 속도, kcal/(hr · m²)

U = 총괄 열전달 계수, kcal/(hr · m² · °C)

T_v = 수증기 온도, °C

T_o = 물 온도, °C

여기서 총괄 열전달 계수 U , 용매와 금속벽의 열용량 및 용매 밀도는 일정하다.

Steam jacket이 달린 탱크의 크기는 Fig. 3-36과 같다.

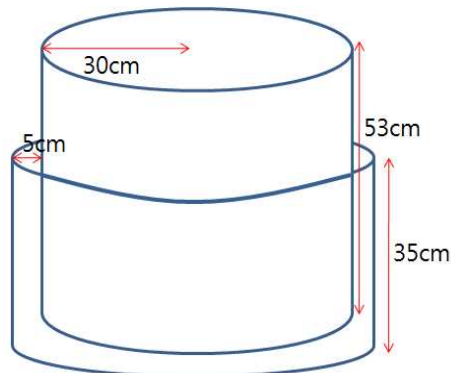


Fig. 3-36. Steam jacket tank

위의 가정들로 steam이 용매에게 주는 에너지를 시간에 대한 함수로 표현하면 다음과 같은 식으로 표현할 수 있다.

$$UA(T_v - T_o) = mc \frac{dT_o}{dt} \quad (1)$$

정상상태에서 $dT_o/dt = 0$ 이므로 위의 식은 다음과 같이 된다.

$$UA(T_{v_s} - T_{o_s}) = 0 \quad (2)$$

식 (1)에서 식 (2)를 빼고, 아래의 편차변수들을 도입한다.

$$\begin{aligned} T'_i &= T_i - T_{i_s} \\ T'_o &= T_o - T_{o_s} \\ T'_v &= T_v - T_{v_s} \end{aligned}$$

$$UA(T'_v - T'_o) = mc \frac{dT'_o}{dt} \quad (3)$$

식(3)을 s에 대한 함수로 표현하기 위하여, Laplace 변환하여, $T'_o(s)$ 에 대하여 풀면 다음과 같다.

$$T'_o(s) = \frac{1}{\tau_w s + 1} T'_v(s) \quad (4)$$

여기서 $\tau_w = \frac{mC}{UA}$

또한, Steam이 들어가서 steam의 현열과 잠열을 빼앗겨 응축수가 되어서 나올 때의 에너지는 대류에 의한 열전달과 steam jacket내 축적되고 steam jacket 외벽에 축적되고, 또한 steam jacket 외벽의 금속면의 온도는 항상 수증기의 온도와 같다는 가정을 이용하여 에너지 수지식을 세우면 다음과 같다.

$$w_v H_v - w_c H_c = UA(T_v - T_o) + \frac{Vd(\rho_v U_v)}{dt} + m_1 C_1 \frac{dT_v}{dt} \quad (5)$$

수증기에 대한 물질 수지식은 다음과 같다.

$$w_v - w_c = V \frac{d\rho_v}{dt} \quad (6)$$

식(5)와 식(6)를 결부시켜 wc를 소거하면 아래와 같이 된다.

$$w_v(H_v - H_c) = (U_v - H_c)V \frac{d\rho_v}{dt} + m_1 C_1 \frac{dT_v}{dt} + UA(T_v - T_o) + V\rho_v \frac{dU_v}{dt} \quad (7)$$

변수 ρ_v , U_v , H_v , 및 H_c 는 수증기 및 응축수 온도의 함수이고, 위의 식을 Taylor 급수전개와 선형화 기법을 적용하여, 아래와 같이 근사식으로 나타낼 수 있다. 식(4)와 식(5)를 결부시켜 wc를 소거하면 아래와 같이 된다.

$$\begin{aligned} \rho_v &= \rho_{v_s} + \alpha(T_v - T_{v_s}) \\ U_v &= U_{v_s} + \phi(T_v - T_{v_s}) \\ H_v &= H_{v_s} + \gamma(T_v - T_{v_s}) \\ H_c &= H_{c_s} + \sigma(T_c - T_{c_s}) \end{aligned} \quad (8)$$

여기서 $\alpha = \left. \frac{d\rho_v}{dT_v} \right|_s$, $\phi = \left. \frac{dU_v}{dT_v} \right|_s$, $\gamma = \left. \frac{dH_v}{dT_v} \right|_s$, $\sigma = \left. \frac{dH_c}{dT_c} \right|_s$ 이다.

Steam이 나오는 온도는 150°C, steam의 온도편차는 5°C라고 가정하고, steam table을 이용하여 α , ϕ , γ , σ 를 구한다.

식(7)에 식(8)을 대입하면,

$$\begin{aligned} [H_{v_s} - H_{c_s} + \gamma(T_v - T_{v_s}) - \sigma(T_c - T_{c_s})]w_v &= \\ [(U_{v_s} - H_{c_s}) + 2\phi(T_v - T_{v_s}) - \sigma(T_c - T_{c_s}) + \frac{m_1 C_1}{\alpha V} + \frac{\phi\rho_{v_s}}{\alpha}] \\ \alpha V \frac{dT_v}{dt} + UA(T_v - T_o) \end{aligned} \quad (9)$$

$(H_{v_s} - H_{c_s})$ 의 값은 2327.295 kJ/kg으로 $(H_{v_s} - H_{c_s})$ 와 비교하여 너무 작은 값은 무시하여 식을 간단히 표현하면 다음과 같다.

$$(H_{v_s} - H_{c_s})w_v = [(U_{v_s} - H_{c_s}) + \frac{m_1 C_1}{\alpha V}] \alpha V \frac{dT_v}{dt} + UA(T_v - T_o) \quad (10)$$

위의 식(9)를 또 다시 s에 대한 함수인 Laplace 변환을 하면 다음과 같다.

$$T'_{v_s}(s) = \frac{1}{\tau_v s + 1} T'_o(s) + \frac{K_1}{\tau_v s + 1} w'_v(s) \quad (11)$$

$$\text{여기서, } \tau_v = \frac{\alpha V(U_{v_s} - H_{c_s}) + m_1 C_1}{UA}, K_1 = \frac{H_{v_s} - H_{c_s}}{UA}$$

본 연구에서 사용되는 제어 시스템은 닫힌루프 제어계로서 제어 공정에 대한 피드백 함수식이 필요하다. 온도 측정 요소를 일차계라고 가정하면, 측정요소 전달함수는 다음과 같다.

$$\frac{T'_m(s)}{T'(s)} = \frac{1}{\tau_m s + 1} \quad (12)$$

일반적인 산업에서 온도센서로 사용되는 열전대는 6~20초의 시간상수를 가진다고 알려져 있으며, 본 연구에서는 10초라고 가정하였고, 센서의 모델은 1차로 단위계단 변화가 $T'(s) = \frac{1}{s}$ 이기 때문에, 센서의 응답은 $T'_m(s) = \frac{1}{s} \left(\frac{1}{\tau_m s + 1} \right)$ 이고, 이것을 Laplace 역변환하여 시간에 대한 상수로 표현하게 되면, $T'_m(t) = 1 - e^{-\frac{t}{\tau_m}}$ 이 된다. 응답시간은 변화가 생긴 후, 완결된 열전대 표시값의 90퍼센트까지 도달하는데 걸리는 시간이므로, $0.9 = 1 - e^{-\frac{10s}{\tau_m}}$ 이고, $\tau_m = 8.69 \text{ s} = 0.14 \text{ min}$ 이 된다. 즉, steam jacket 탱크 안에서의 실제온도 T'와 측정된 온도 T'm과의 전달함수는 아래와 같다.

$$\frac{T'_m(s)}{T'(s)} = \frac{1}{0.14s + 1} \quad (13)$$

식 (4), (11), (13)을 이용하여, 각 요소 사이의 입출력 특성을 Laplace 함수의 수식으로 표현하고, 제어의 전체 시스템을 파악하기 편리한 블록선도를 MATLAB의 확장도구인 Simulink를 이용하여 표현하였다(Fig. 3-35).

본 연구에서 사용된 용매와 steam의 에너지 수지식, 그리고 피드백 함수에 대한 값을 Laplace 전달 함수 값으로 나타내고, 오차에 대한 적절한 비례계수를 넣어준 값을 블록선도로 나타내어, 그 결과를 scope 하면, steam의 유량 및 온도를 제어하는 비례제어에 대한 profile을 얻을 수 있다(Fig. 3-37).

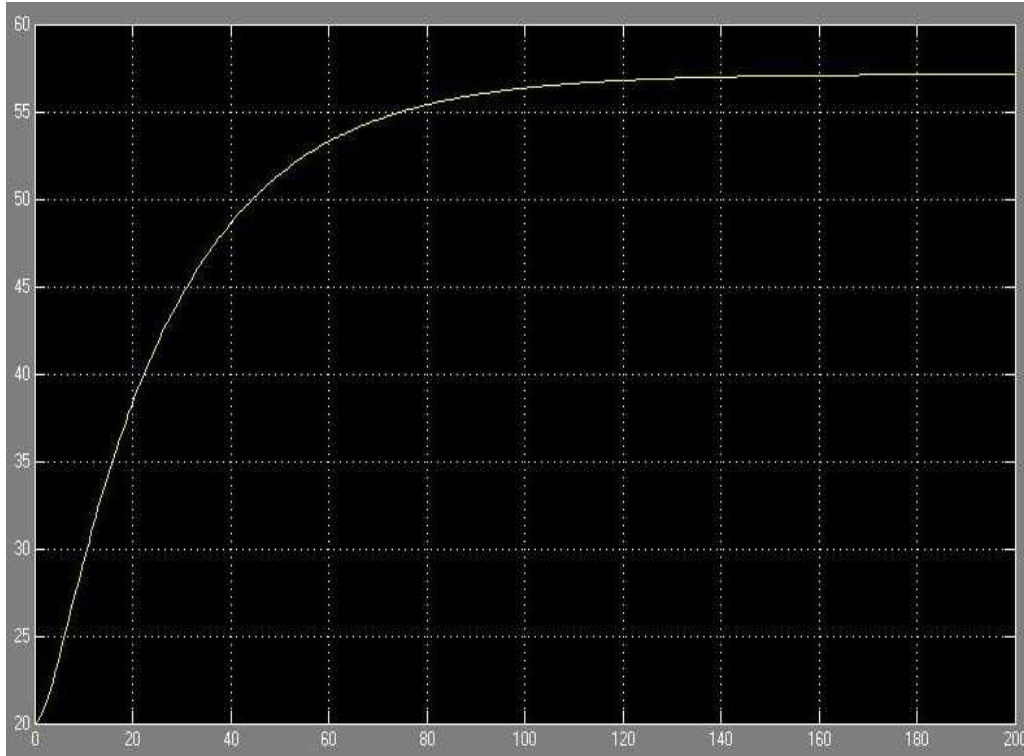


Fig. 3-37. Scope of temperature change from block diagram in extraction process.

(다) 발효 공정의 온도 제어시스템의 해석

발효 공정에 있어서도 150°C 수증기대신 80°C의 물로 온도를 제어하기 위하여 steam jacket과 같은 시스템이 부착된 발효기를 사용하였을 때의 발효 공정에서의 온도 제어 시스템을 설계하였다. 추출 공정에서 사용된 변수 중 발효기(700 D × 1180 L × 1000 H)의 크기, 발효기 내부의 양과 착즙액 무게(약 326.8 L)와 비열(약 3.8 kJ/kg · K) 그리고 열 전달매체를 뜨거운 물로 바꿔주고, 그에 따라 총괄 열전달 계수(U) 값 및 밀도에 대한 계수 α값과 최종온도를 59°C에서 37°C로만 바꿔서 대입한 값을 Laplace 전달 함수 값으로 구하였고, Laplace 전달 함수 값을 Simulink의 블록선도에 입력하여(Fig. 3-38), 블록선도의 결과를 scope하여, 발효기의 온도 제어 profile을 얻었다(Fig. 3-39).

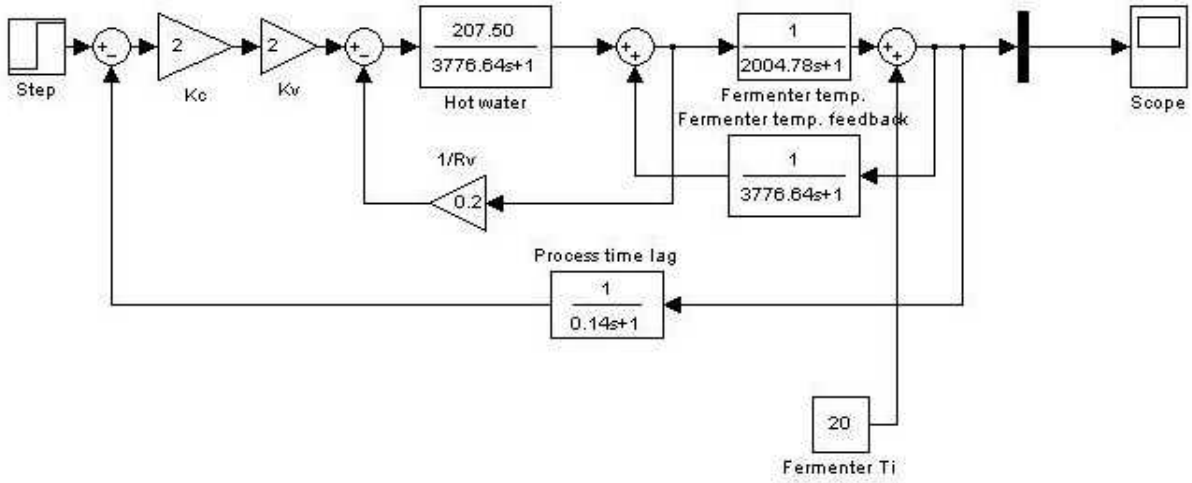


Fig. 3-38. Block diagram of control of fermentation process.

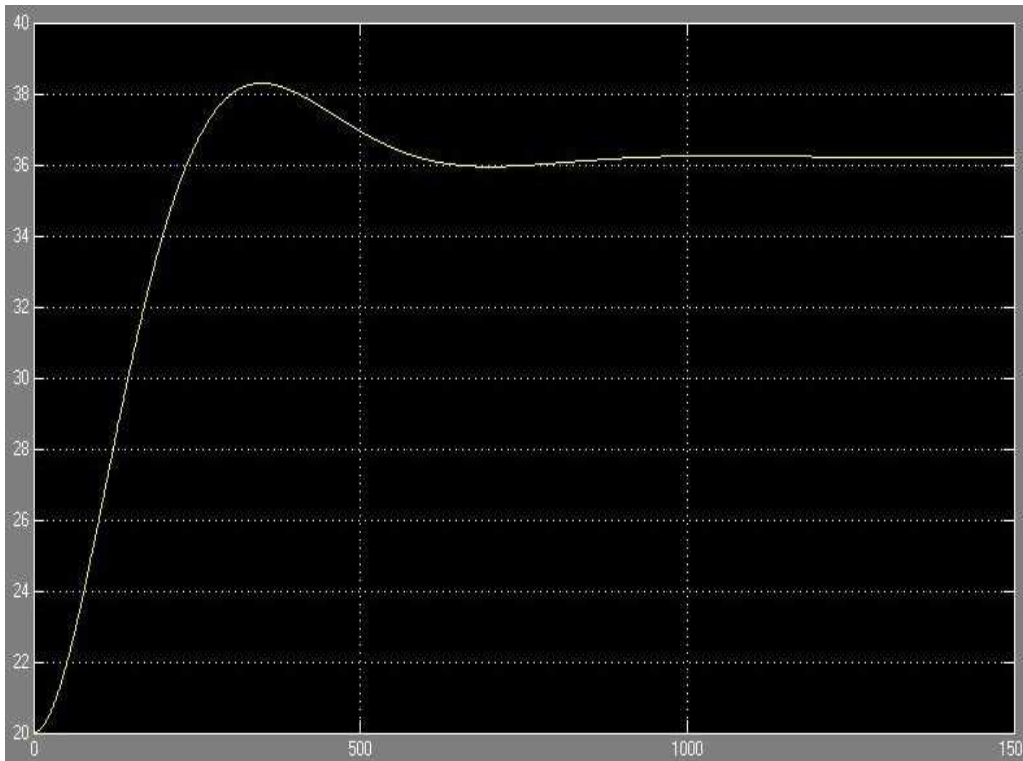


Fig. 3-39. Scope of temperature change from block diagram in fermentation process.

또한, 위의 식에서 사용된 모든 용어는 Table 3-15에 정리하였다.

Table 3-15. Nomenclature for temperature control system.

Term	Explanation
T_o	solvent temperature at set point, $^{\circ}\text{C}$
T_v	steam temperature, $^{\circ}\text{C}$
T_c	cooling water temperature, $^{\circ}\text{C}$
w_v	steam mass flow rate, kg/hr
w_c	cooling water temperature from the steam jacket, kg/hr
m	solvent mass in the steam jacket, kg
m_1	mass of the steam jacket wall, kg
V	steam volume in the steam jacket, m^3
C	용매의 열용량, $\text{kJ}/(\text{kg} \cdot ^{\circ}\text{C})$
C_1	specific heat of the steam jacket wall, $\text{kJ}/(\text{kg} \cdot ^{\circ}\text{C})$
A	cross-section area, m^2
t	time
H_v	enthalpy of steam input, kJ/kg
H_c	enthalpy of cooling water output, kJ/kg
U_v	enthalpy of steam in the steam jacket, kJ/kg
ρ_v	density of steam in the steam jacket, kg/m^3

(2) 공정 제어 하드웨어 시스템의 구축

제어를 위한 하드웨어 시스템을 구축하기 위해서는 MATLAB의 Simulink를 통하여 제어하려는 단위 공정의 블록선도를 구축해야 한다. 본 연구에서는 추출 및 발효공정에서의 온도를 제어하는 하드웨어를 구축하기 위해 추출 및 발효 공정의 블록선도에 맞는 Laplace 전달 함수를 구해야 한다. 따라서 Governing equation을 이용한 에너지 수지식을 세워 제어 효과를 simulation할 필요성이 있었다. 하드웨어 시스템으로 Micro Controller Unit(MCU)를 산업적으로 널리 사용하고 있는데, MCU는 컴퓨터의 중앙처리 장치(CPU)가 가진 기능의 대부분을 하나 또는 몇 개의 반도체 칩에 집적한 것이다. MCU 제작에 있어서 AVR(Alf Vergard Risc) board가 널리 사용된다. AVR board는 ATMEL사에서 제작된 것으로 risc구조의 MCU로 1 cycle에 1 instruction이 수행되고, ATMEL사에서 AVR board에 사용되는 컴파일러 등을 무료로 제공하고, 또한 AVR board에 입력한 코딩의 오류 발생 시 재입력할 수 있는 휘발성 board라는 장점이 있기

때문에 널리 쓰인다. 또한 ISP(In system Programming) 기능이 있어서, AVR board를 기타 장비 없이 바로 컴퓨터에 연결하여 코딩할 수 있다. 따라서 AVR board에 위에서 simulation 한 블록선도를 입력해주고, 그 외 부속품으로는 온도센서, 현재의 온도를 표시해주는 LCD 및 스팀의 양을 조절하기 위해 밸브를 조작할 수 있는 모터를 AVR board에 연결해주어 사용하면 MCU를 만들 수 있을 것이라 예상되며, 실질적인 산업화 공정에 사용할 때도 위에서 보여준 simulation과 같이 온도가 제어될 것이라고 생각된다.



Fig. 3-40. AVR board, MCU and used MCU in industrial application

(2) 경제성을 고려한 양과취 감소 공정 개발

현재 산업적으로 사용되는 탈취공정에서는 활성탄이나 규조토를 이용한 탈취공정이 많이 사용되고 있으나, 전년도 제 1 세부과제에서 양과취 감소를 위한 masking 물질 탐색 결과와 본 연구의 활성탄을 이용한 양과취 감소의 결과를 비교하였을 때, 2.0%(v/v) 이상의 citric acid 용액을 이용하는 것이 활성탄을 이용한 탈취보다 최종 제품의 관능적 평가에 있어 우월한 것으로 나타나 양과취 탈취공정은 활성탄 재사용 시 세척과정 등이 없이 간단한 citric acid를 이용하는 것으로 결정하였다.

(3) 최적조건을 이용한 양과유용성분 추출공정의 Scale-up

(가) Scale-up에 따른 용매 온도의 기준 온도 도달 시간

Scale-up에 따라 용매와 용기의 부피가 늘어남에 따라, 용매 온도가 추출 최적 온도에 도달하는 시간이 증가하였다. 최적 온도에 도달하는 데 걸리는 시간에 따른 온도변화를 아래에 나타내었다. 40 mL의 56% ethanol이 59°C에 도달하기까지 약 16분이 걸리는 반면(Fig. 3-41), 4 L 56% ethanol은 200분(Fig. 3-42)이 걸리는 것을 알 수 있었다.

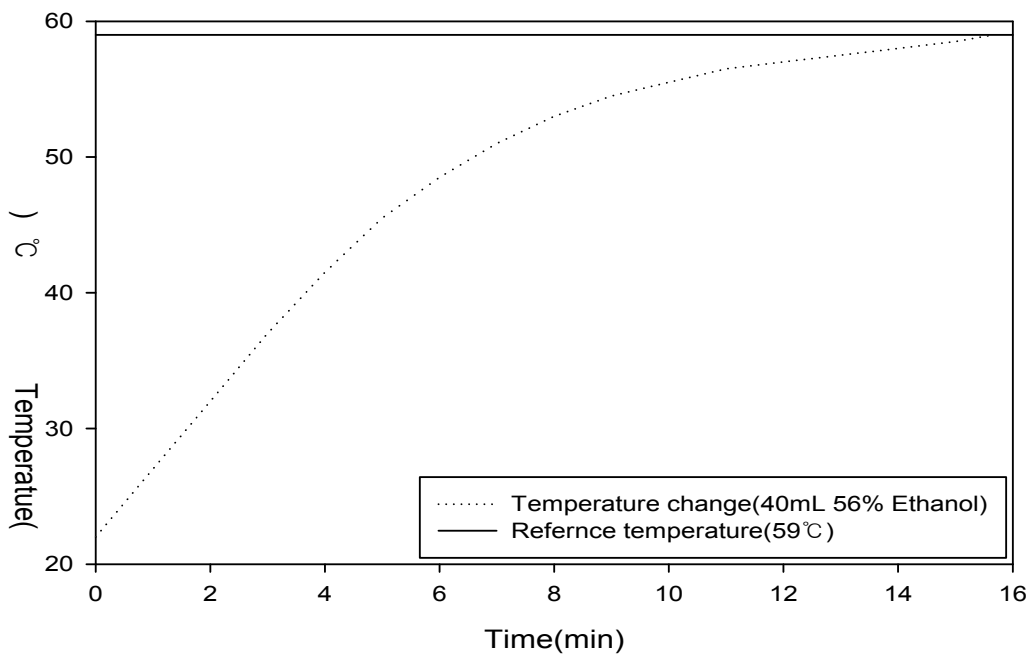


Fig. 3-41. Temperature change in solvent volume of 40 mL to reach at 59°C.

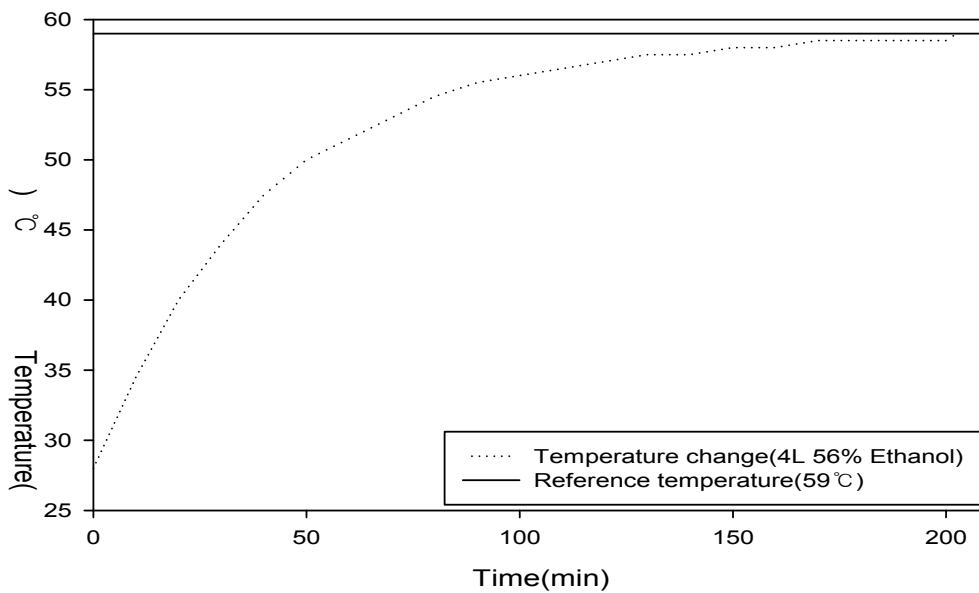


Fig. 3-42. Temperature change in solvent volume of 4 L to reach at 59°C.

(나) 최적화 조건을 이용하여 추출한 양파유용성분의 HPLC 분석 및 항산화능 평가

4 L 추출용매의 초기 온도가 최적 온도(59°C)가 아닌 상태(27°C)에서 추출을 시작하였을 때 1 g 추출액의 quercetin과 quercetin glycoside의 추출량은 6.13 ± 0.02 mg/g이고, 100 g 추출액의 quercetin과 quercetin glycoside의 추출량은 5.06 ± 0.10 mg/g으로 95.0% 수준에서 유의적으로 차이가 있음을 보였다(Fig. 3-43). 이는 시료사용량이 적은 것이 추출 최적온도까지 도달하는 시간이 짧아 상대적으로 더 많은 열에너지를 흡수하기 때문이다. 또한 1 g 추출액의 항산화능은 $90.24 \pm 2.66\%$ 였으며, 100 g 추출액의 항산화능은 $92.62 \pm 0.12\%$ 로 항산화능에 있어서도 95.0% 수준에서 유의적인 차이를 보였다(Fig. 3-44).

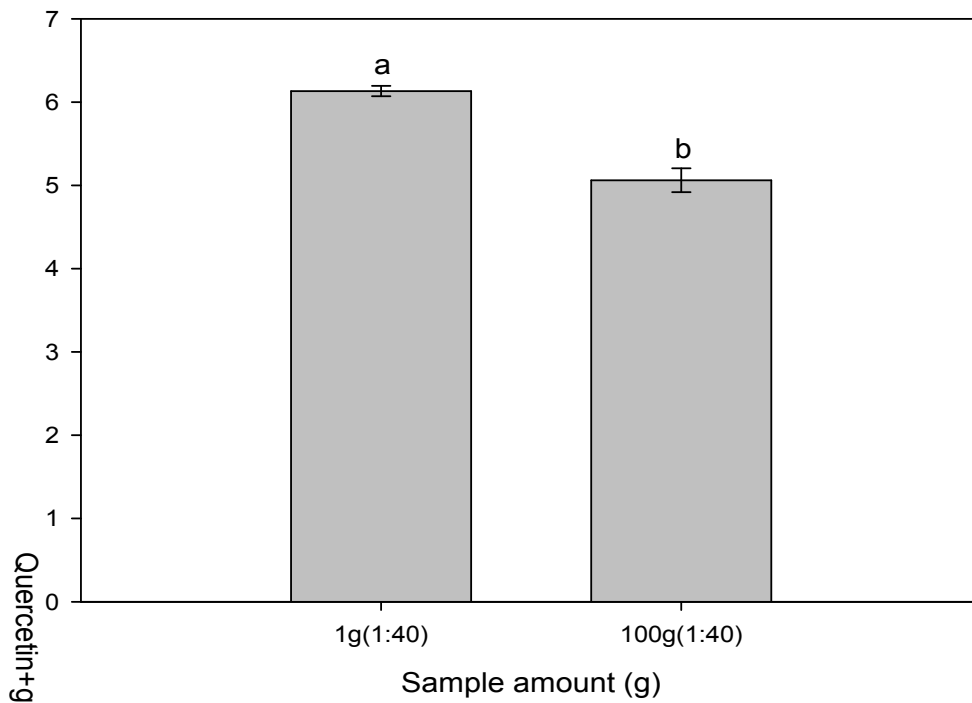


Fig. 3-43. Yield of quercetin and quercetin glycoside in onion skin extract with optimal condition not to reach initial solvent temperature at 59°C.

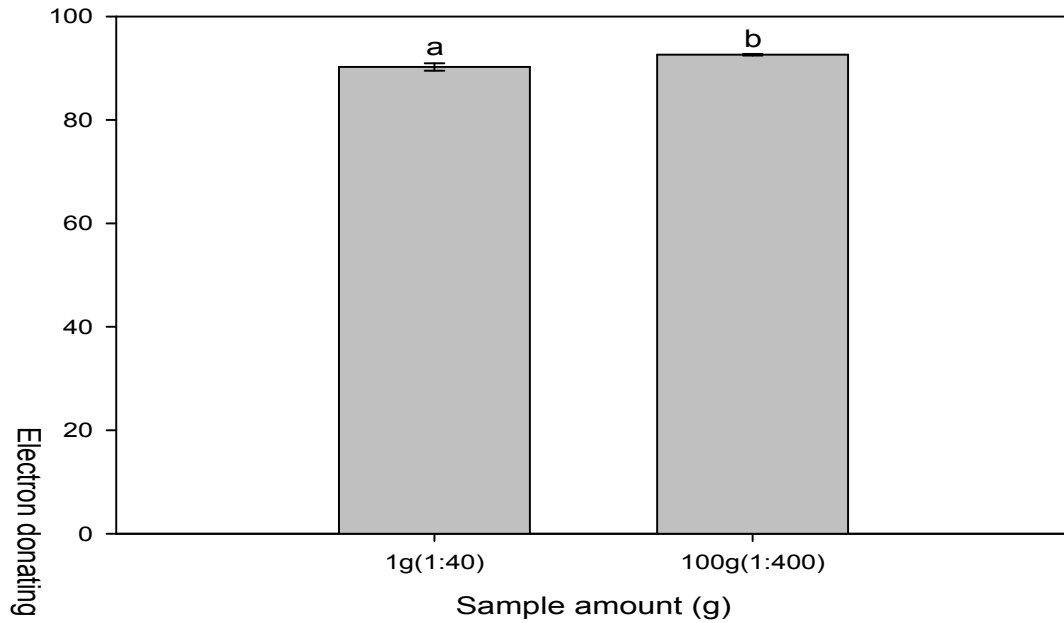


Fig. 3-44. Electron donating ability of onion skin extract with optimal condition not to reach initial solvent temperature at 59°C.

또한, 용매의 초기 온도를 59°C로 예비 가열한 후, shaking 없이 추출하였을 때 1 g 추출액의 quercetin과 quercetin glycoside의 함량은 8.44 ± 0.28 mg/g이었고, 100 g 추출액의 quercetin과 quercetin glycoside의 함량은 6.43 ± 0.01 mg/g으로 1 g과 100 g 추출액의 quercetin과 quercetin glycoside의 함량은 유의적으로 차이가 있었다(Fig. 3-45). 이는 shaking이 없어서 시료끼리 응집되어 시료와 용매사이에 불충분한 접촉으로 인해 mass transfer가 충분히 이루어지지 못했기 때문이다. 또한 1 g 추출액의 항산화능은 $90.16 \pm 0.01\%$ 였고, 100 g 추출액의 항산화능은 $92.44 \pm 0.03\%$ 로 95.0% 수준에서 유의적으로 차이가 있었다(Fig. 3-46).

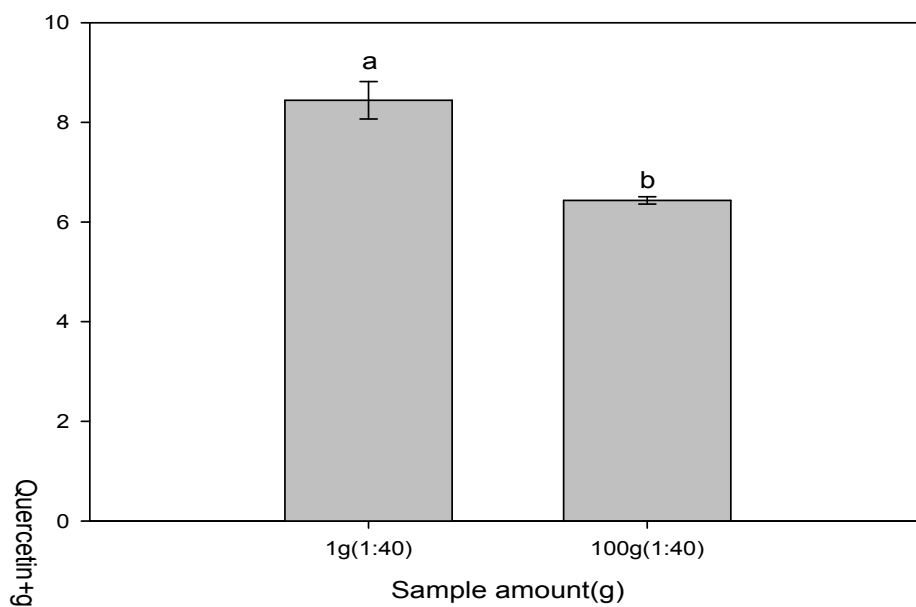


Fig. 3-45. Yield of quercetin and quercetin glycoside in onion skin extract with optimal condition without shaking.

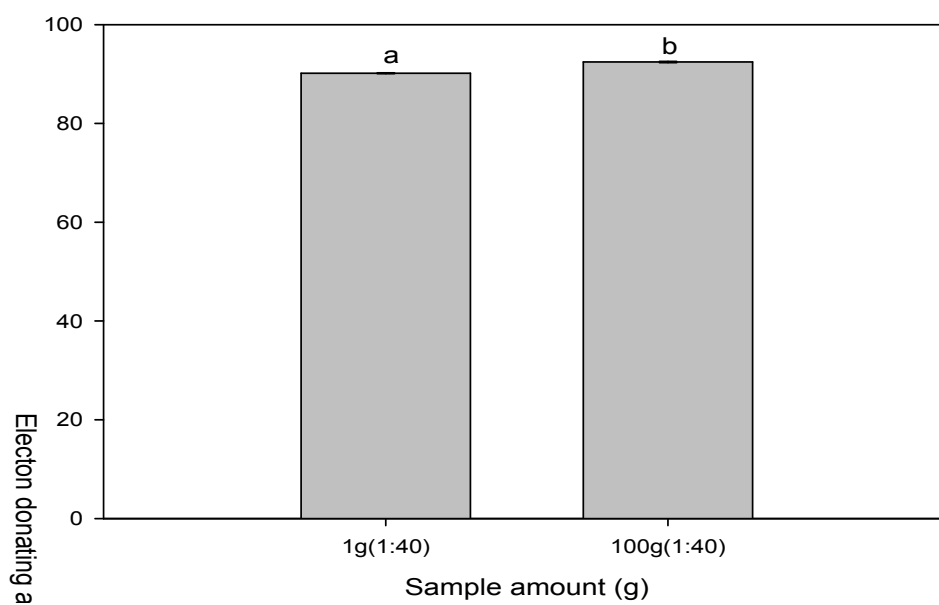


Fig. 3-46. Electron donating ability of onion skin extract with optimal condition without shaking.

따라서 항온수조(WBC-3045)를 이용하여 추출용매의 온도를 추출 최적 온도인 59°C로 예비 가열한 후, 120 rpm의 shaking과 함께 양파껍질을 추출한 결과 1 g 추출액의 quercetin과 quercetin glycoside의 함량은 8.35 ± 0.07 mg/g이었고, 100 g 추출액의 quercetin과 quercetin glycoside의 함량은 7.94 ± 8.68 mg/g으로(Fig. 3-47) 95.0% 수준에서 유의적인 차이가 없었다. 그때의 1 g 추출액의 항산화능은 $90.05 \pm 1.50\%$ 였고, 100 g 추출액의 항산화능은 $89.97 \pm 11.02\%$ 로(Fig. 3-48) 95% 수준에서 유의적인 차이가 없었다. 따라서 용매의 초기 온도를 추출 최적 온도인 59°C로 맞춰주고, 추출용매와 양파껍질 사이에 충분한 mass transfer가 일어날 수 있도록 교반을 해준다면 산업적 규모에서도 실험실 수준의 최적조건을 사용해도 quercetin과 quercetin glycoside의 추출 수율은 변함없을 것이라는 가능성을 보여주었다.

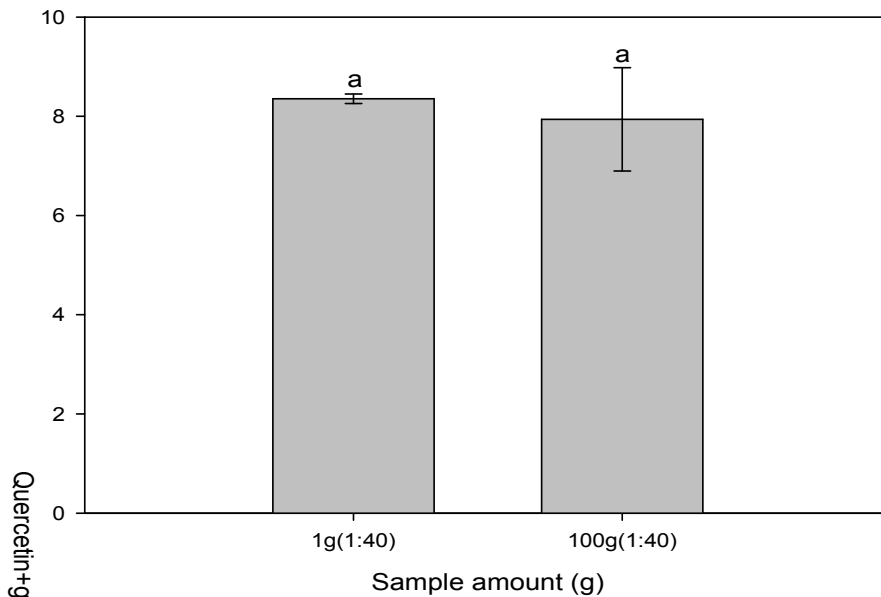


Fig. 3-47. Yield of quercetin and quercetin glycoside in onion skin extract with optimal condition.

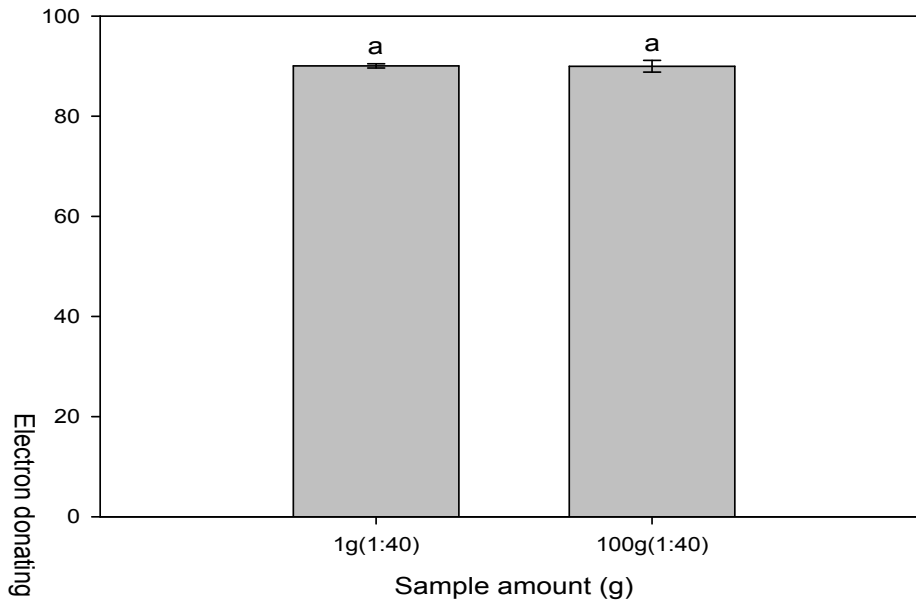


Fig. 3-48. Electron donating ability of onion skin extract with optimal condition.

(4) 산업화에 필요한 발효조건 확립과 공정설계

(가) 산업화에 필요한 발효조건 확립

제 1세부과제, 제 2세부과제 연구팀과 공동으로 연구하여, 산업화에 필요한 발효조건을 확립하였는데, 양파 발효음료를 생산하기 위한 균주는 *P. pentosaceus* KC-007 균주와 *B. bifidum* ATCC 15696 균주를 1:2의 비율로 양파 착즙액의 2%(v/v)로 접종하여 37°C에서 18 hr 발효하는 것이 양파 발효음료의 가장 높은 산도를 나타내었으며, 또한 유산균 생균수와 SOD 유사활성도 우수한 것으로 확인되었다.

또한, 양파 식초음료를 산업화하기 위한 발효조건으로는 양파 착즙액에 먼저 포도당 6%(v/v)를 보당한 뒤 *S. cerevisiae* KCCM 7913을 접종하여 1차 발효를 실시한다. 발효액의 에탄올 농도가 4%이상일 되었을 때 *A. tropicalis* No. 22를 접종하여 2차 발효를 실시하는데, 이때 *A. tropicalis* No. 22 균주의 발효에 있어서 영양 성분은 에탄올과 yeast extract이기 때문에, 유가식 배양을 하여 발효를 하는 것이 *A. tropicalis* No. 22 균주의 발효에 의한 된장냄새의 생성도 없으면서, 또한 양파취 감소까지 되고, 가장 많은 초산을 생성하는 조건으로 확인되었다.

(나) 기능성 양파발효 음료의 공정설계

기능성 양파 발효음료의 공정설계를 위한 양파 껍질부분의 추출공정과 양파 과육부분

의 발효공정에 대한 전체적인 흐름도를 작성하였다(Fig. 3-49).

2차년에 본 연구에서 설계된 양파 발효음료공정 중 몇 가지 공정들은 제1세부 연구과제의 2차년도 결과를 반영하여 수정되었다. 2차년도 본 연구에서 탈취 공정은 양파를 착즙한 후 활성탄 여과장치를 이용하려 했으나, 양파 발효음료의 자동화 시스템 및 활성탄의 세척 등을 고려하여 착즙 전 2% citric acid(v/v)에 절단된 양파를 침지시키는 탈취공정을 선정 하였고, 원심분리 공정의 경우는 본 연구에서는 formulation 된 후, non-soluble material을 제거하기 위해 formulation 공정 후에 원심분리 공정을 거치도록 설계 하였으나, 유산균의 손실을 고려하여 재설계하여 최종적인 양파 발효음료의 제조 공정을 아래에 나타내었다(Fig. 3-50)

양파 발효음료의 공정 흐름도(Fig. 3-49)는 양파의 과육과 껍질 부분을 나누는 탈피 공정을 거쳐 양파의 과육 부분은 세척과정을 거쳐 절단된 후 2% citric acid(v/v)가 담겨진 저장탱크로 이동하게 된다. 24시간의 침지 후 착즙공정을 거치고, 양파 착즙액에 2% 팽화 홍삼 추출액이 첨가되어 살균공정을 거치고 원심분리가 된다. 그리고 다시 저장탱크에서 pH를 5.0으로 맞추는 공정을 지나고, 재살균 후 *P. pentosaceus* KC-007 균주가 접종되어 18시간 발효되게 된다. 발효액은 냉각되어 진 후 59℃에서 56% ethanol로 13분간 양파껍질 추출액을 농축한 농축액과 배합탱크에서 합쳐지고 병에 주입되어 quercetin과 quercetin glycoside의 함량이 풍부한 고 기능성 양파 발효음료가 된다.

양파 1개의 중량은 평균적으로 과육부 193 g, 껍질부분 1 g이다. 전년도까지 연구된 제 1세부과제의 최적조건을 바탕으로 하루 평균 2,500개의 양파가 기능성 양파발효음료에 쓰일 때, 과육부는 482,500 g으로 착즙공정을 거치면서 수율이 약 70%인 337,750 mL이 되었다. 여기에 2%(v/v) 팽화홍삼 추출액을 첨가하여 총 용량은 344,505 mL로 증가하게 되었다. 불용성 물질 및 액상 내 존재하는 고형 물질을 제거하기 위한 원심분리 공정을 거치면서 총 용량은 320,389.65 mL로 되었는데, 이것은 양파의 평균 수분함량 93%에 의한 것이다. 마지막으로 발효기에 투입되는 총 용량은 326,797.443 mL이 되었는데, 이는 발효공정전 균 접종 시 최종 착즙액의 2%(v/v)가 되도록 접종하기 때문이다. 최종제품 140 mL에서 양파 착즙 발효액이 37.8 mL(27%)를 차지하게 되는데, 이는 최종제품을 약 8,645개를 만들 수 있는 양이다. 또한 각 공정에 사용되는 기계들의 specification과 각 공정의 최적조건을 참고하여 최종제품이 만들어지기까지는 약 50시간이 걸린다. 각 단위 공정에 사용되는 기계의 specification을 본 연구의 용량에 맞게 설정하였다(Table 3-16).

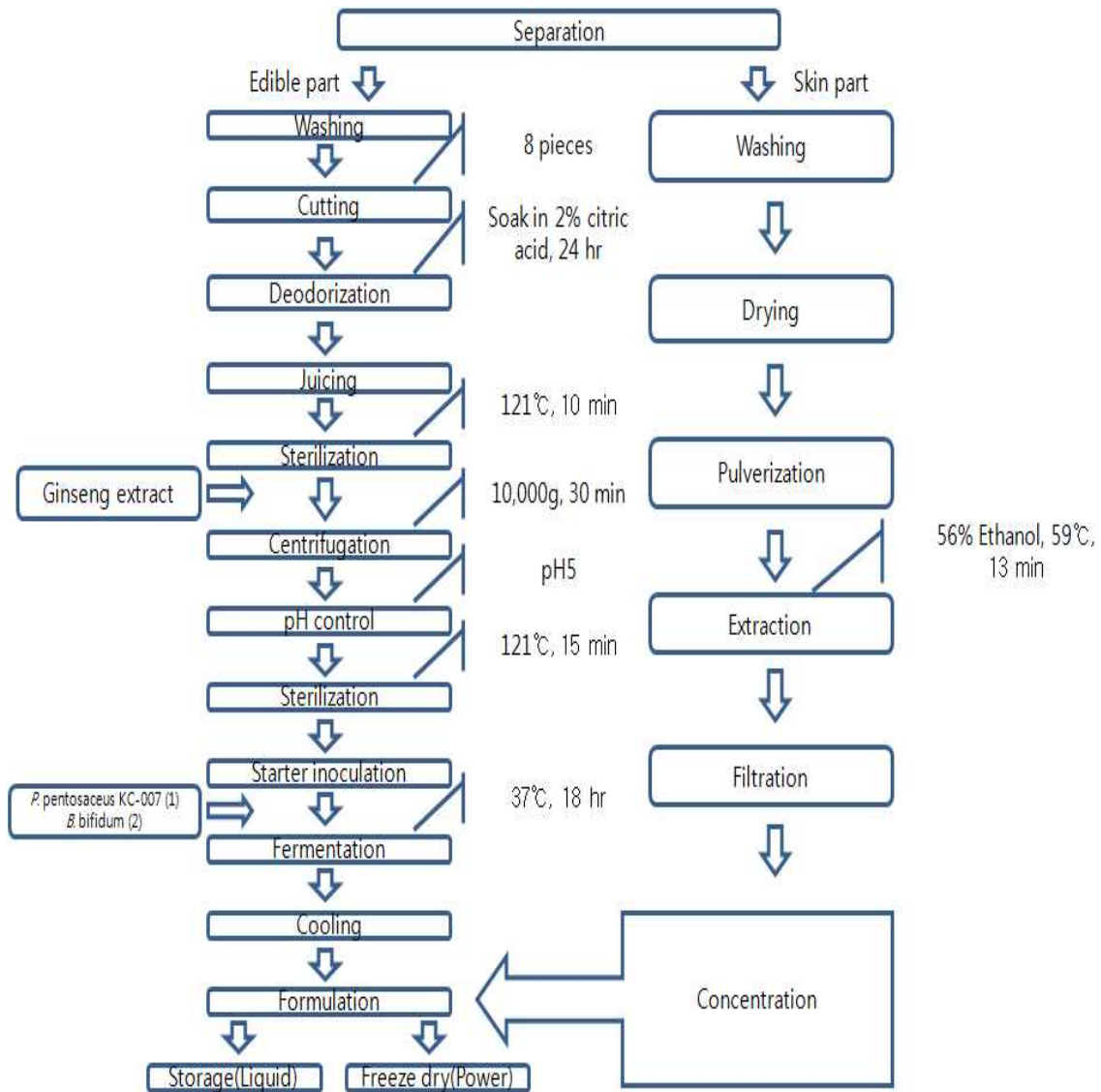


Fig. 3-49. Layout of the process of functional onion beverage.

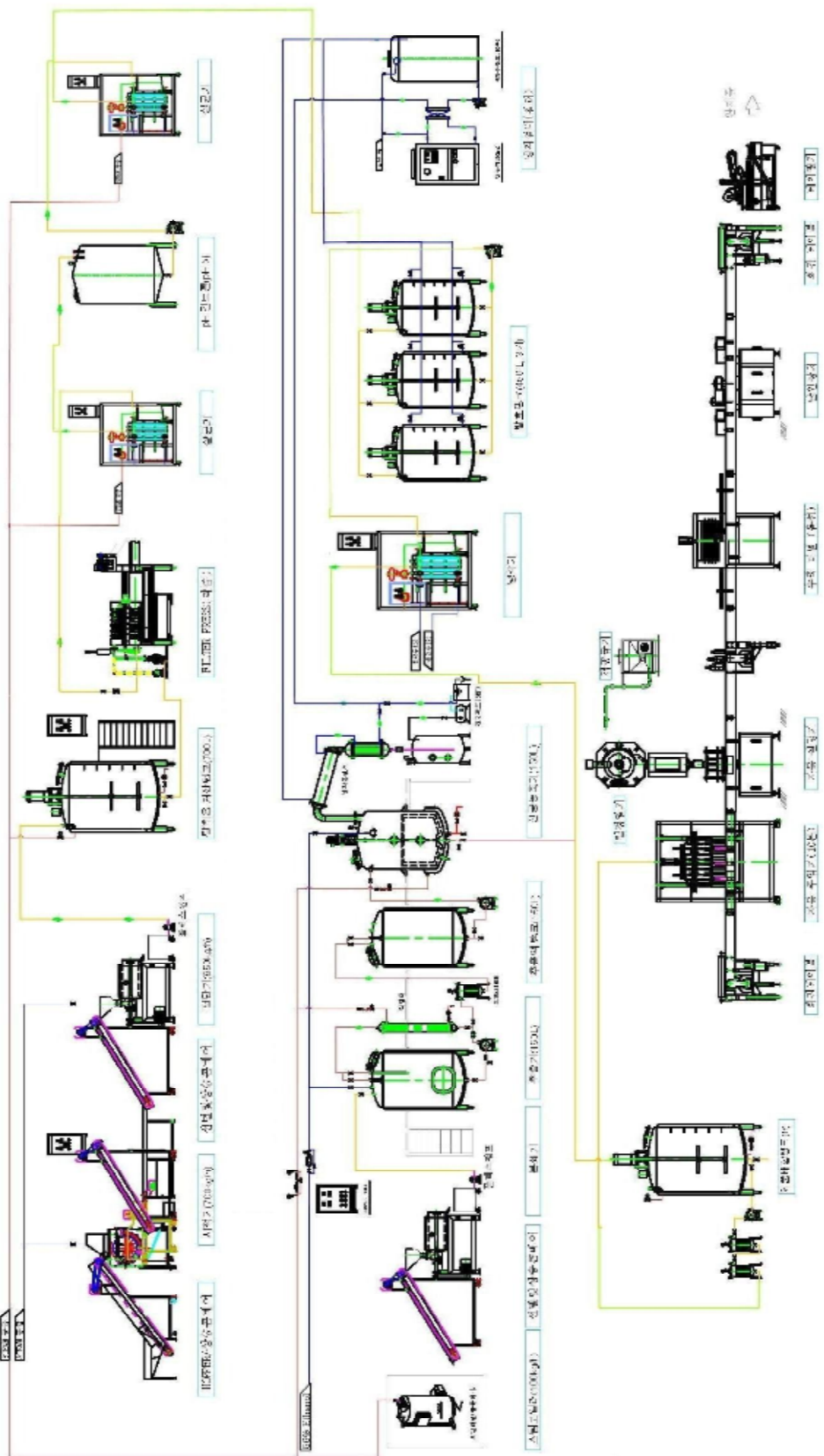


Fig. 3-50. Scheme of the process of functional onion beverage.

Table 3-16. Specification of machine used in functional onion beverage

제품명	제품	Specification
탈피기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 양파심, 꼭지 및 껍질 자동분리 ○ 탈피능력 : 1,800 개/hr
세척기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 분리된 양파심과 양파껍질 세척 ○ 세척능력 : 700 kg/hr ○ 규격 : 1400 W * 1600 L * 1750 H
절단기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 세척된 양파심 8조각으로 절단 ○ 절단능력 : 650 kg/hr ○ 규격 : 630 W * 1180 L * 1270 H
저장탱크 (탈취용)		<ul style="list-style-type: none"> ○ 2% citric acid에 세척된 양파심 침지 ○ 규격 : 700 L (800 D * 1430 L * 1220 H)
착즙기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 절단된 양파를 착즙 ○ 착즙수율 : 약 70-85% ○ 착즙능력 : 500 kg/hr ○ 규격 : 700 W * 1510 L * 1150 H
살균기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 양파 착즙액을 121°C로 10 min 살균 ○ 살균능력 : 500 kg/hr
원심분리기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 양파 착즙액 내 고형물 제거 ○ (10,000 g, 30 min) ○ 규격 : 500 L(700 D * 1300 L * 1100 H)
발효기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 양파 착즙액을 37°C로 18 hr 발효 ○ 규격 : 450 L(700 D * 1180 L * 1000 H)

제품명	제품	Specification
냉각기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효된 양파 착즙액 클링 ○ 냉각능력 : 500 kg/hr
건조기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 양파껍질을 건조 ○ (70°C, 24 hr)
분쇄기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 건조된 양파껍질을 분쇄 ○ Particle size : 0.2 mm ○ 분쇄능력 : 30 kg/hr
추출기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 양파껍질의 기능성 성분을 추출 ○ 규격 : 150 L/회 (30*30*53)
농축기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 양파껍질 추출액을 농축 ○ 규격 : 150 L/회 (30*30*53)
동결건조기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 배합된 양파 발효음료의 분말화를 위한 동결건조 ○ 성능 : 예비냉각 없이 동결건조 가능
Depalletizer		<ul style="list-style-type: none"> ○ 2개의 칼럼식 메인프레임으로 중량물에 견고 ○ 성능 : 700 BPM (24 box/min) ○ 패턴 : 6단 9열
Rinser		<ul style="list-style-type: none"> ○ 각 병의 입구 부위를 넓게 장공화하여 이물질 제거 및 병 내외부 세척

제품명	제품	Specification
충진기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 140 mL 양과발효 음료 충전 - 양과 착즙 발효액 37.8 mL (27%) - 사과즙 37.8 mL (27%) - 액상과당 5.32 mL (3.8%) - β-cyclodextrin 2.6 g (1.86%) - 올리고당 1.26 mL (0.9%) - 사과향 0.28 mL (0.2%) - 정제수 53.95 mL (38.54%) - 양과껍질 농축액 1mL (0.71%) ○ Type : line type ○ 성능 : 140 mL 기준 100 BPM ○ 충전방식 : 진공식
Capper		<ul style="list-style-type: none"> ○ 충전된 제품의 뚜껑 부착 ○ Type : rotary type ○ 헤드 : Alcoa 실링 ○ 헤드본수 : 6 units ○ 성능 : 140 mL 기준 150 BPM
라벨기		<ul style="list-style-type: none"> ○ 완성된 제품의 라벨 부착 ○ 규격 : 400 W * 800 L * 1450 H ○ 병 이송 : screw 이송
Palletizer		<ul style="list-style-type: none"> ○ 2개의 칼럼식 메인후레임으로 중량물에 견고 ○ 성능 : 700 BPM (24 box/min) ○ 패턴 : 6단 9열
Steam boiler		<ul style="list-style-type: none"> ○ 추출, 농축, 살균 및 발효의 온도유지에 사용 ○ 성능 : 100 kg/hr (150°C steam)

(다) 기능성 양과식초음료의 공정설계

전년도까지 연구된 제2세부과제의 최적조건을 바탕으로 하루 평균 2,500개의 양과가 기능성 식초음료에 쓰일 때, 과육부는 482,500 g으로 착즙공정을 거치면서 수율이 약 70%인 337,750 mL이 되었다. 이때의 양과 착즙액의 에탄올 농도는 2.5%이다. 기능성 식초음료의 최대 산 생성을 위하여 유가식 배양을 하였으며, 식초음료에 사용된 초산균인 *Acetobacter tropicalis* No.22는 초기 에탄올 농도가 4%일 때, 최대의 산을 생성하기 때문에 양과 착즙액의 에탄올 농도를 높이기 위해 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 7913을 양과착즙액에 접종한다. 또한 *S. cerevisiae* KCCM 7913 배양으로 초기 에탄올 함량이 4%가 되도록 양과 착즙액에 포도당 6%(v/v)를 같이 보당함으로써, 1차 효모 배양을 위한 발효기에 들어가는 총 용량은 358,016 mL이 되었다. 발효한 후, 발효액을 살균 및 원심분리하여 효모균체를 제거한 후, 2차 발효를 위한 *A. tropicalis* No. 22를 접종하고, 에탄올과 yeast extract를 주기적으로 feeding하는 유가식 배양을 통해 최대의 초산을 생성할 수 있도록 2차 초산균 발효를 실시하였다. 초산균 발효 공정을 거치면서 양과의 독특한 이취가 감소되었다.

기능성 식초음료를 산업적으로 생산하기 위한 전체적인 흐름도(Fig. 3-51)와 최적조건을 나타낸 기능성 식초음료의 개략도(Fig. 3-52)는 다음과 같다.

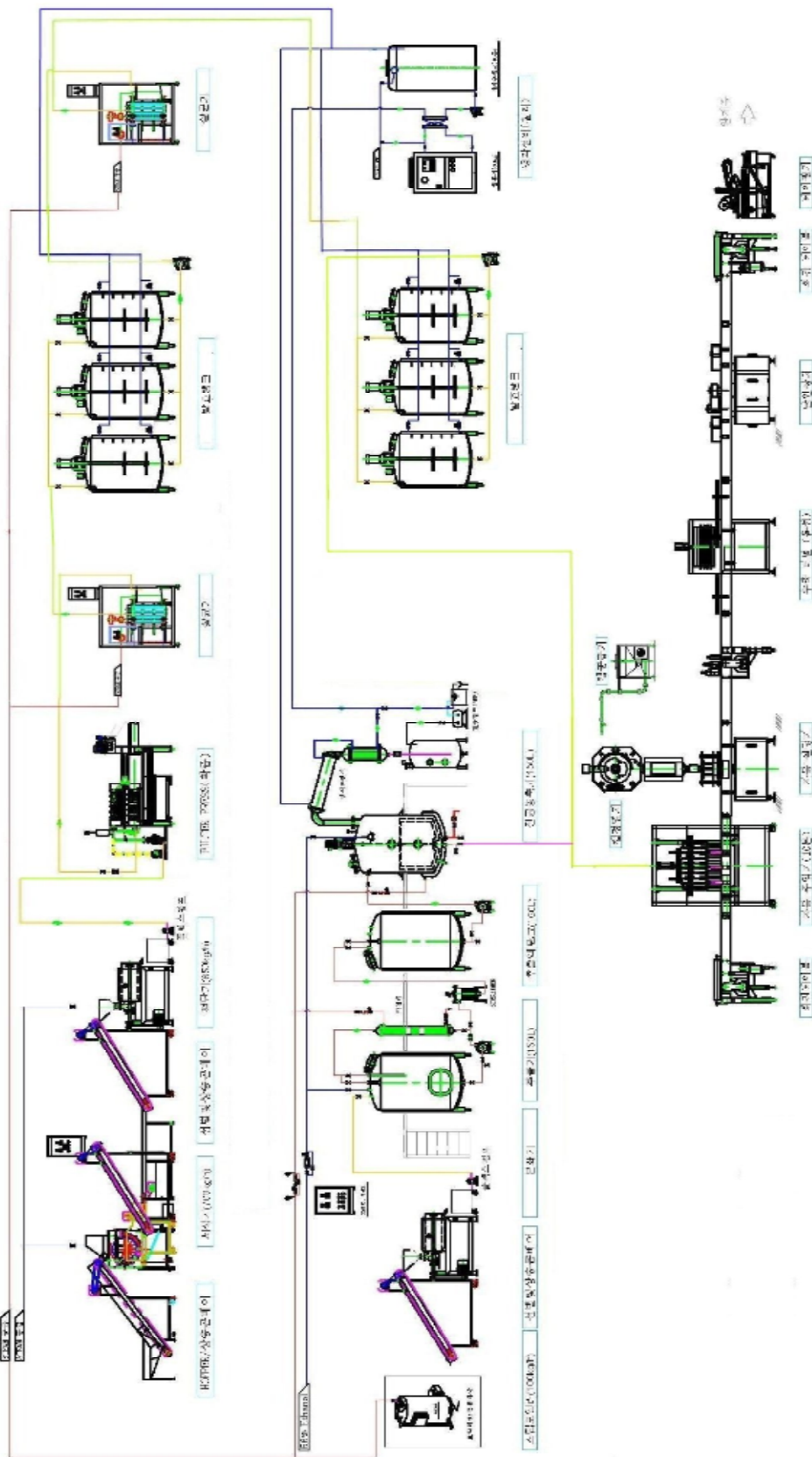


Fig. 3-51. Layout of the process of fermented onion vinegar.

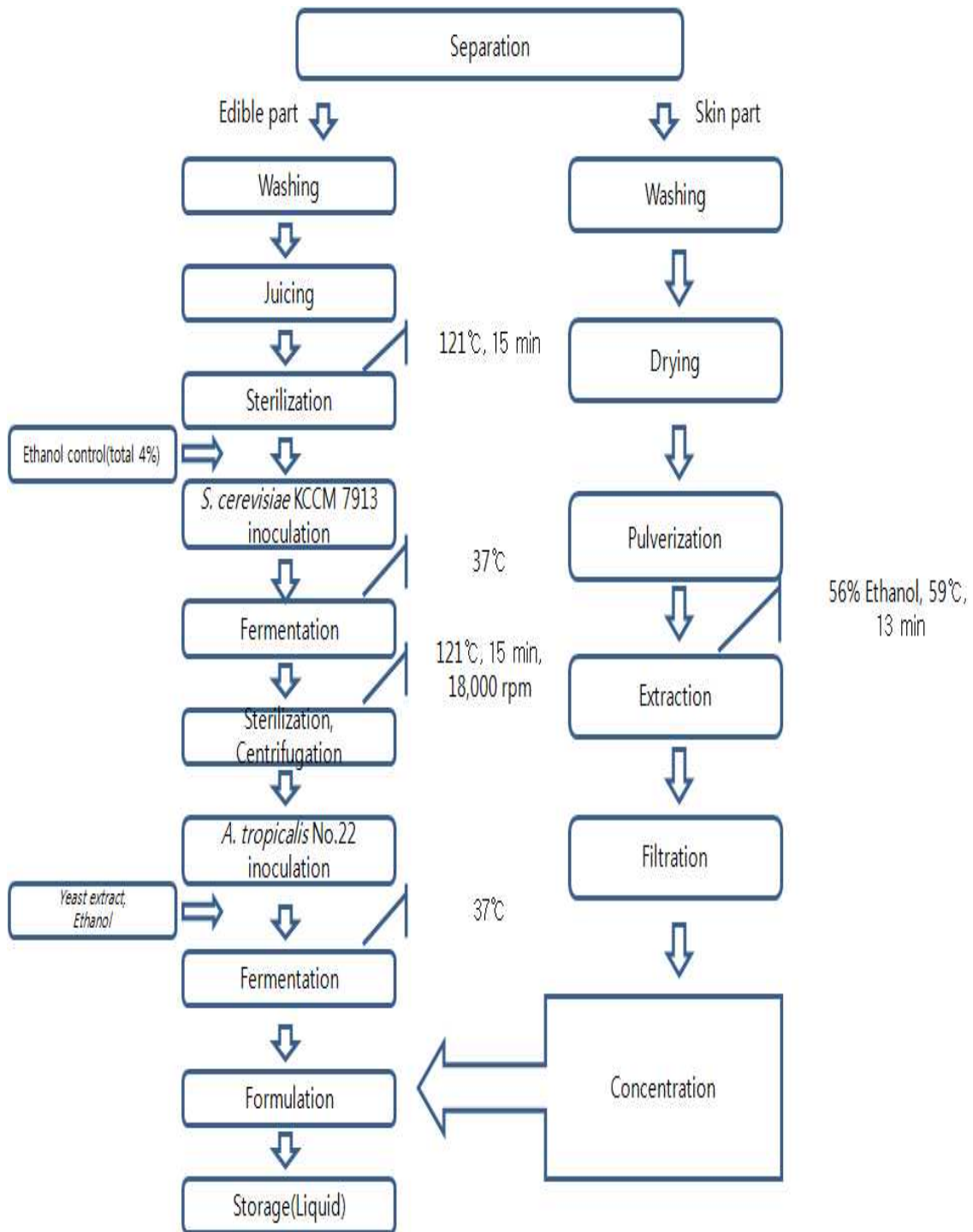


Fig. 3-52. Scheme of the process of fermented onion vinegar.

4. 결 론

양파 껍질 및 과육부에 함유되어 있는 유용 성분인 quercetin 관련 물질을 추출하였고, flavonol이 강화된 기능성 양파발효음료 제조공정을 개발하기 위한 다양한 착즙 및 추출방법에 따른 quercetin의 수율을 측정, 분석하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

양파 껍질부분과 과육부분에서의 quercetin과 quercetin glycoside의 최적 추출 조건으로는 60% methanol을 용매로 60°C에서 15분간 추출하였을 경우로 추출용매와 시료의 비율이 껍질의 경우 60 mL/g, 과육의 경우 0.8 mL/g일 때 추출수율이 가장 좋았다.

양파 껍질 시료의 전처리로서 동결건조를 사용하였을 때와 열풍건조를 사용한 경우 quercetin과 quercetin glycoside 추출수율에 유의적인 차이가 없었다.

양파껍질에 초음파를 30분 동안 처리 시 1.75배의 추출 증가 효과를 볼 수 있었고, 과육 부분에는 초음파를 60분 동안 처리 시 2.06배의 추출 증가 효과를 볼 수 있었다.

양파 껍질부분과 과육부분 모두 microwave 60초 조사 시에 quercetin과 quercetin glycoside의 최대 추출 증가효과를 나타내었다. 양파 껍질부분의 경우는 microwave를 처리하지 않은 것과 비교하였을 때, quercetin과 quercetin glycoside가 2.01배, 과육 부분의 경우에는 2.14배 더 많이 추출되었다.

Cellulase를 양파 껍질부분에 처리한 경우 1% cellulase 용액과 시료의 비율이 30 mL/g 일 때 quercetin과 quercetin glycoside의 수율이 가장 높았으며 무처리 시료에 비하여 1.43배 추출이 더 되었고, viscozyme을 처리한 경우도 1% viscozyme 용액과 시료의 비율이 30 mL/g일 때 수율이 가장 높았으며 무처리 시료에 비하여 1.68배 추출이 더 되었다. 과육부분의 경우 효소처리 시 cellulase 용액과 시료의 비율이 0.5 mL/g일 때 quercetin과 quercetin glycoside의 수율이 가장 높았으며 1.65배 더 많이 추출되었고, viscozyme과 시료의 비율이 0.5 mL/g일 때 quercetin과 quercetin glycoside의 수율이 가장 높았으며 추출증가율은 2.29배인 것으로 나왔다.

양파 껍질부분에 모든 최적조건을 조합한 방법 즉, 1% viscozyme 용액과 시료의 비율이 30 mL/g이 되게 효소반응을 시킨 후 60% methanol을 추출용매로 하여 용매와 시료의 비율이 60 mL/g이 되게 시료에 넣고 microwave를 60초 동안 조사한 다음 초음파를 30분 처리한 시료를 60°C에서 15분간 추출하였을 때 17.76 ± 1.29 mg/g onion skin로 가장 많은 quercetin과 quercetin glycoside의 수율을 볼 수 있었다. 양파 과육부분의 경우 가장 많은 quercetin과 quercetin glycoside의 추출수율을 보인 방법은 viscozyme과 시료의 비율이 0.5 mL/g일 때의 0.070 ± 0.002 mg/g onion인 것으로 나타났다.

양파를 이용하여 기능성이 강화된 발효음료와 식초를 제조하기 위한 제조공정을 선정하고, 제조공정 별 최적화 연구를 하였다. 양파 음료에서 문제가 되는 양파의 특이취를 감소하기 위하여 별도의 양파취 감소 공정을 설계하였고, 또한 껍질부분의 quercetin과 quercetin glycoside의 추출 조건을 최적화 하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

전체적인 공정은 양파 과육부분과 껍질부분으로 분리하는 분리공정을 거친 뒤 과육부분은 착즙과 autoclave를 하여 발효전액을 제조하고, 탈취공정을 거쳐 양파취를 감소시킨 후 autoclave를 하여 살균하였다. 살균 후 각 음료에 선정된 유산균과 초산균을 각각 접종시켜 발효를 하였다. 껍질부분은 건조하여 분쇄한 후 기능성 성분을 추출하여 추출액만 filtration하여 농축시켰고, 추출액과 발효액으로 제품을 만드는 formulation단계에서는 불용성 물질을 제거하고, 당 등의 첨가물을 넣은 후 제품을 포장하고 보관하는 공정을 설계하였다.

과육의 착즙공정을 위하여 불용성 물질을 제거하고 발효 배지로 사용할 수 있는 형태로 만들기 위하여 autoclave한 후 filtration하였다. 그 후 착즙액의 양파취를 감소시키기 위하여 활성탄을 이용하여 탈취한 결과 관능적으로도 우수하고 상대적으로 기능성의 감소가 적은 80 mL/min의 flow rate 조건이 가장 적당한 것으로 판단되었다. 살균공정에서는 105°C에서 10분간 autoclave 처리하였을 때 가장 적합한 것으로 판단되었다.

초산균 발효는 starter 균주로 *Acetobacter tropicalis* No. 22를 사용하여 최적조건으로 발효시기는 조건은 초기 ethanol농도 4.67%, 초기 acetic acid 농도 0.03%, 초기 glucose 농도 2.35%였으며 산도는 3.77%이었다.

유산균 발효는 *Pediococcus pentosaceus* KC-007을 사용하였으며 24시간 유산 발효시키면 농후발효유 기준을 초과하는 1.1×10^9 CFU/mL의 유산균이 측정되었고, 양파 착즙액은 열처리 및 발효과정을 거치면서 전자공여능과 아질산염 소거율이 상승하였지만 SOD 유사활성은 유의한 차이가 없었다.

껍질의 추출공정의 최적화를 위하여 반응표면분석법을 사용하여 마이크로웨이브와 초음파를 이용한 추출공정의 최적조건을 탐색한 결과 마이크로웨이브 추출공정의 quercetin과 quercetin glycoside의 최고 수율은 69.7%의 ethanol로 약 117초 동안 추출한 조건에서 얻어졌다.

마이크로웨이브추출 공정의 최적 추출조건에서의 quercetin 추출량은 4.84 ± 0.14 mg/g으로 나타났다. 초음파 추출공정의 quercetin의 최고 수율은 43.8%의 ethanol로 606.4 W의 초음파 출력으로 21.7분 동안 추출한 조건에서 얻어졌으며 그 때의 quercetin 추출량은 4.09 ± 0.29 mg/g으로 나타났다.

양과껍질 추출액은 농축시간에 따라 점도의 변화는 크게 없었으며 전자공여능은 감소하고 농축이 진행될수록 불용성 물질이 증가하였다.

양과의 낮은 저장성에 대한 활용도를 높이기 위한 연구의 일환으로, 전년도까지 연구에서의 성과인 각 주요 공정에 대한 lab-scale에서의 최적조건을 바탕으로 하여 고기능성 양과발효 음료 및 식초음료를 산업적으로 생산하기 위한 연구를 실시하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

산업적으로 양과발효 음료 및 식초음료를 생산하기 위한 양과 껍질부분의 추출공정 및 양과 과육부분의 발효공정에서 가장 중요한 변수인 온도를 제어하기 위하여, Governing equation을 이용하여 에너지 수지식을 설계하여 MATLAB program의 확장도구인 simulink를 사용하여 Laplace 전달 함수식을 블록선도에 표현하였고, 그 결과를 simulation하여 확인한 결과 추출공정에서의 설정 온도인 59°C와 발효공정에서의 설정 온도인 37°C에 근사하게 유지되는 것을 볼 수 있었고, 블록선도에 사용된 Laplace 전달 함수식을 AVR board에 코딩한 Micro Controller Unit을 개발하면 산업화 현장에서의 온도 제어 하드웨어로 이용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

제1세부과제와 본 연구의 결과를 비교한 결과 양과 발효음료의 자동화시스템 및 연속적인 공정을 위해서는 활성탄이나 규조토를 이용한 탈취공정보다 2% citric acid(v/v)에 절단한 양과를 침지 시키는 것이 더 경제적이고, 효율적인 방법으로 판단되었다.

또한, laboratory-scale에서의 양과껍질 추출의 최적 조건을 pilot-scale에서 적용시켰을 때, 용매의 초기 온도가 59°C로 투입되고, 양과껍질과 추출용매가 충분히 접촉할 수 있도록 충분히 교반된다면 lab-scale의 최적 조건을 industrial-scale에 적용해도 quercetin과 quercetin glycoside의 추출양에 변함이 없을 거라는 가능성을 보여주었다.

기능성 양과 발효음료를 산업화하기 위한 발효조건으로 *P. pentosaceus* KC-007 균주와 *B. bifidum* ATCC 15696 균주를 1:2의 비율로 2%(v/v) 양과 착즙액에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하는 것이 가장 높은 산도를 나타내었으며, 또한 유산균 생균수와 SOD 유사활성도 우수한 것으로 확인되었다. 양과 식초음료를 위한 발효조건으로는 포도당 6%(v/v) 보당과 함께 *S. cerevisiae* KCCM 7913을 접종하여 1차 발효 후, 발효액의 에탄올 농도가 4%이상일 때 유가식 배양을 통한 *A. tropicalis* No. 22를 2차 발효하는 것이 가장 많은 초산을 생성하는 조건으로 확인되었다. 최적화 조건을 바탕으로 하여 설계한 양과 발효음료 공정에 하루 평균 2,500개의 양과가 쓰일 때, 최종제품 140 mL 기준 약 8,645개를 생산된다. 각 공정에 사용되는 기계들의 specification 및 각 공정의 최적조건을 고려하였을 때 최종제품이 만들어지기까지는 약 50 시간이 걸림을 알 수 있었다.

제 4 절 기능성 양과발효제품의 산업화 연구

1. 발효양과음료의 시장 동향 분석 및 수요도 조사

가. 국내 기능성 음료의 시장동향 분석과 수요조사

(1) 전반적인 음료 시장 동향

- 탄산음료나 주스 등 음료시장의 주력제품들은 전반적인 시장침체 분위기를 주도한 반면, 건강기능적인 두유, 차 음료, 곡물 혼합 음료시장은 지속적으로 성장하고 있음 (Table 4-1).
- 지난해 6%대의 마이너스 실적을 기록하면서 약 1조 200억 원대의 시장을 형성한 탄산음료 시장은 2007년에는 전년과 비슷한 실적이 예상됨.
- 2006년 약 8,700억 원의 시장을 형성하며 5%넘게 마이너스 실적을 기록한 주스 시장은 2년 연속 마이너스 성장을 하고 있지만, 고급 주스에 대한 소비자들의 욕구가 늘어나면서 새로운 고급 주스들이 늘어날 것으로 예상됨.
- 지난해 2,400억 원이 넘는 매출을 기록하며 약 5% 신장한 실적을 기록한 두유음료 시장은 소비자들의 건강 선호경향이 지속될 것으로 보여, 업체들의 노력 여하에 따라 재도약이 기대됨.
- 차 음료 시장은 2006년 1,640억 원대의 실적으로 전년대비 70%가 넘는 신장세를 나타내었고, 차 음료의 대표주자인 녹차는 580억 원의 매출로 25%가 넘는 성장을 기록하였고, 혼합차 및 보리차의 시장은 710억 원이 넘는 실적을 기록하였음.

(2) 기능성 음료 시장 동향

- 지난해까지 큰 폭으로 성장했던 기존의 기능성 음료는 올해는 마이너스 성장을 기록하였음.
- 건강 선호 현상으로 성장을 거듭했던 비타민 음료, 콜라겐 음료, 섬유 음료 및 기타 기능성을 가미한 기능성 음료가 경기 침체의 영향을 받은 데다 비타민 음료의 벤젠 파동을 겪으면서 전년보다 약 17% 마이너스 성장한 1,020억 원대의 시장을 형성하였음.
- 기존 기능성 음료 시장은 포화상태지만, 현대인들의 생활방식과 식생활 변화, 질병 형태 다양화 등 여러 사회적 여건이 변화되고 있는데 기인하여, 현대인의 건강에 대한 관심의 증대는 음료시장의 쾌속성장과 틈새 수요를 지속적으로 창출하고 있음.
- 최근에는 체지방 분해 기능이 있는 수용성 식이섬유, 타우린 등을 첨가한 다이어트 음료, 콜라겐 성분 및 코엔자임 Q10 성분을 함유한 노화 방지 음료, 피부에 좋은 과일을 주성분으로 한 피부관리 음료 등이 2, 30대 여성 음료 시장에서 인기를 끌고 있음.
- 기존의 위, 장, 뼈 기능 개선 음료 등은 물론 혈압 강하 음료, 신장 기능 개선 음료,

당뇨병 예방 음료 등 특수 건강 음료의 출시가 늘고 있고, 기존의 음료에 건강 강화 성분을 넣은 리뉴얼 음료 출시 역시 증가해 건강 기능 음료 시장이 확대되고 있는 추세임.

Table 4-1. 최근 2년간 음료시장 현황

(단위: 억원, %)

구분		2005년	2006년		비고
		매출액	매출액	성장률	
탄산 음료	사이다	3,320	3,320		
	콜라	4,640	4,300		
	후레바	2,330	2,020		
	기타	620	570		유성탄산, 보리 등
	소계	10,910	10,210	-6.4	
주스 음료	100% 주스	3,550	3,190	-10.1	
	50% 주스	1,860	1,430	-23.1	
	저과즙+푸레	3,270	3,680	12.5	
	기타	510	390	-23.5	과립, 통조림, 젤리 등
	소계	9,190	8,690	-5.4	
기타	두유	2,280	2,440	5.3	
	스포츠	1,910	1,900	-0.5	
	니어워터	950	700	-26.3	기능성 니어워터 포함
	전통음료	620	590	-4.8	식혜, 대추, 곡류
	커피	2,870	2,800	-2.4	컵커피 실적 포함
	생수	3,230	3,360	12.4	
	차음료	960	1,640	70.8	
	기능성음료	1,230	1,020	-17.1	
	소계	14,050	14,680	4.5	
계	34,150	33,580	-1.7		

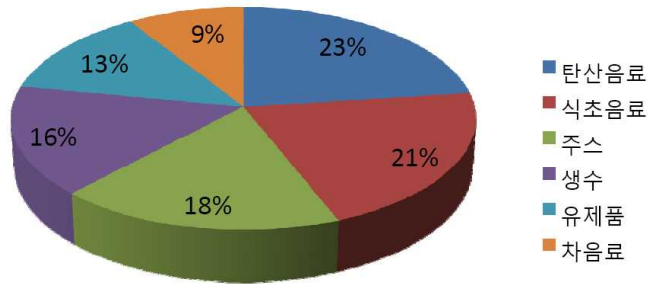
(3) 기능성 발효음료 시장 동향

(가) 마시는 식초

- 마시는 식초 시장은 2005년 6월, 대상 '청정원 마시는 홍초' 출시를 기점으로 2006년에는 롯데칠성, 웅진식품, 한국야쿠르트 등의 후발 주자들이 본격 가세, 2005년 69억 원에서 지난해 380억 원으로 급팽창했고, 올해는 600억 원 규모로 지난해보다 58% 성장할 것으로 예상됨.
- 마시는 식초의 인기가 급상승한 것은 피로 회복과 변비 예방 등 성인병 예방에 효능을 지닌 식초의 성분을 앞세워 웰빙 음료로 소비자에게 다가선 것이 주요한 덕분이라

는 분석임.

- 기존 식초 음료 음료에 여성에게 좋은 성분, 남성에게 좋은 성분 등을 첨가한 식초 음료도 시장에서 좋은 반응을 얻고 있음.
- 신제품 광고 중 식초 음료 시장의 성장에 따라 식초 음료 광고비 역시 대폭 확대되고 있음(Fig. 4-1).



신제품 광고비 총 19억원

Fig. 4-1. 음료제품에 대한 신제품 광고비

- 신제품 광고비는 탄산음료 (4억1천) > 식초음료 (4억) > 주스 (3억 4천) 순이었고, 기존 제품 광고비는 웰빙 바람을 타고 유제품(1,163,204,000원)과 식초 음료(395,982,000원) 광고비가 각각 17%, 6%로 많은 비중을 차지하고 있음.
- 마시는 식초는 마진율이 40-50%에 달하여 부가가치가 높고, 일본 시장 규모가 몇 천 억원 선인 것을 고려하면 한국에서도 1000억 원 규모로 성장할 수 있는 잠재력을 지니고 있는 것으로 평가됨(Fig. 4-2).

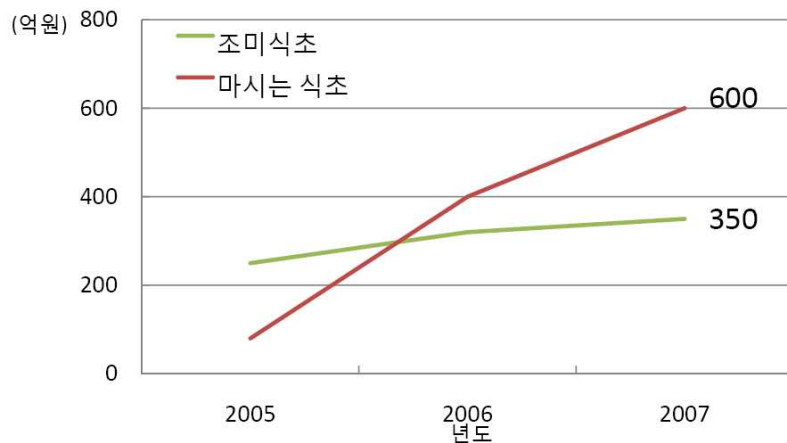


Fig. 4-2. 국내 식초 시장 규모

(나) 발효유

- 2004년 1조 원을 넘어선 발효유 시장은 지난해 1조 3000억 원 규모로 성장하였음. 이 가운데 기능성 발효유가 차지하는 비중은 40% 정도이며, 건강과 참살이에 관심을 갖는 소비자가 늘면서 시장은 갈수록 커지는 추세임.
- 아이들이 주요 고객이었던 단순한 야쿠르트에서 성인의 건강을 고려한 프리미엄급 기능성 요구르트 위주로 소비의 패턴이 바뀌고 있음.
- 기업들은 유제품과 바이오 기술이 결합된 기능성 발효유를 차세대 유망사업으로 보고 연구 인력을 강화하고 매년 새로운 제품을 개발하고 있음.
- 기능성 발효유에 관한 특허 출원 건수는 전체 발효유 관련 출원건수의 72%를 차지하고 있고, 최근 들어 이 기술 분야의 출원이 다양해지는 등 기능성 발효유에 관한 기술 개발이 활발하게 이루어지고 있음.
- 기능별 특허 출원 비율을 살펴보면, 풍미, 향, 식감 등 기호를 향상시킨 것이 18%로 가장 많았고, 칼슘, 비타민 A 등의 영양성분을 강화한 것과 정장기능을 강화한 것이 11%, 그 밖에 면역력을 증가시킨 것이 4%, 비만 억제 효과를 갖는 것이 4% 당뇨예방 효과를 갖는 것이 4%를 차지하였음(Fig. 4-3).

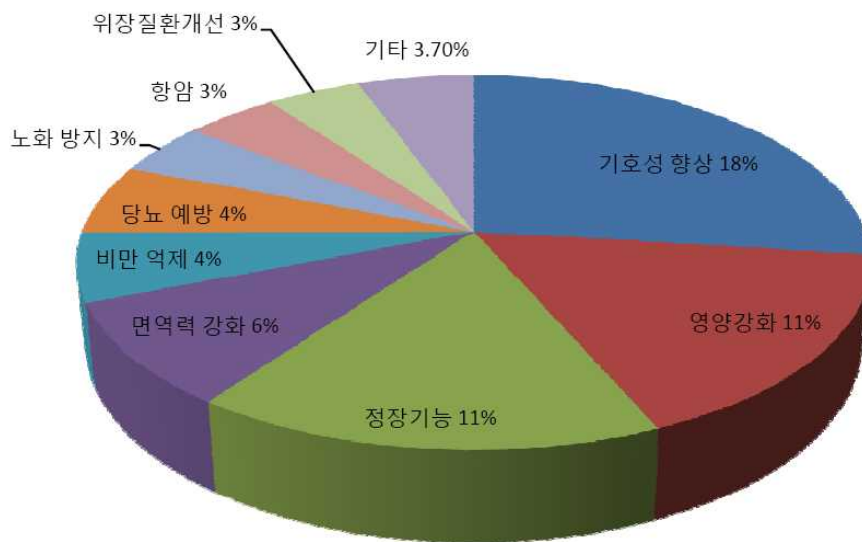


Fig. 4-3. 발효유의 기능별 특허현황

(4) 기타 음료시장

- 건강 음료 선호 추세가 지속됨에 따라 제약회사들의 음료 시장 진출이 활발해지고 있으며, 특히 자본력과 기술력에서 열세인 중소 제약사들의 진출이 두드러지고 있음.
- 2001년 비타 500을 시작으로 음료회사로의 진출이 본격화한 광동제약은 최근 옥수수

수염차, 광동 큐디액 등을 출시해 시장 굳히기에 나섰으며, 이 외에 동아제약은 최근 옥수수 수염차, 광동큐디액 등을 출시해 시장 굳히기에 나섰으며 이외에 동아제약의 숙취해소 드링크 모닝케어, CJ 뉴트라 등의 홍삼음료가 있음.

- 농심은 최근 '제주 삼다수 녹차'로 녹차 시장에 진입했으며, 이 외에도 선풍식품의 '마시는 별꿀 흑초', 오뚜기의 '현미흑초' 등이 있음.
- 저출산의 여파로 인해 우유, 분유 등의 주력 상품 판매가 줄어 고민하고 있는 유가공 업체들이 매출 확대를 위해 타 음료 시장에 뛰어드는 현상이 두드러지고 있음.
- 남양유업은 2005년 4월에 나온 '17차'는 월평균 80억 원의 판매량을 기록하며 음료업계 '웰빙' 돌풍의 주역이 됐으며, 지난해 회사 매출 8000억 원 돌파의 일등공신이 되었음.
- 2002년까지 음료 용기로는 캔의 비중이 가장 컸으나, 최근에는 PET병이나 보틀캔으로 그 비중이 점차 옮겨가고 PET병이 캔을 대신해 주력 용기가 되고 있으며, 탄산음료의 경우는 캔의 비중이 크지만, 기능성 음료의 경우는 PET과 병의 비율이 높음.
- 유제품, 건강음료, 주스 등 건강을 생각한 제품이 많이 출시된 것으로 나타나고 있으며, 탄산음료는 시장규모에 비해 신제품이 적게 출시되는 것을 알 수 있음(Fig. 4-4).

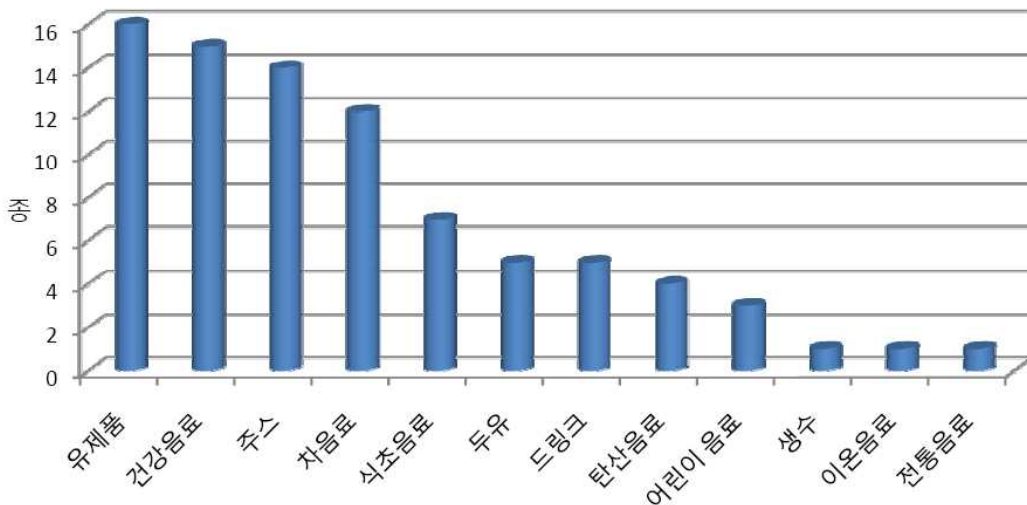


Fig. 4-4. 2006년 음료 카테고리별 신제품 출시 현황

나. 일본 기능성 음료의 시장동향 분석

(1) 전반적인 음료시장

- 2006년 총 시장규모는 전년과 비교해 0.8% 감소한 4조 9,225억 4,500만 엔으로 2년 연속 마이너스 성장을 보였으며, 시장에 견인차 역할을 했던 녹차음료 시장이 대폭 감소로 돌아선 것, 우유의 판매 감소, 따뜻한 겨울 날씨 등이 음료시장을 마이너스 성장으로 이끌었다.

로 만든 중요한 원인으로 분석됨(Table 4-2).

Table 4-2. 품목별 시장규모

분류	2006년 실적(엔)	2007년 추정(엔)	전년대비 실적(%)
기호음료	1조 9475억	1조 9756억	101.4
우유음료	1조 1432억	1조 1355억	99.3
과실, 야채음료	5626억	5578억	99.1
기능성 음료	5700억	5317억	93.3
탄산음료	5109억	4887억	95.7
미네랄워터	2398억	2593억	108.1
기타 음료	655억	655억	100.0
합계	5조 395억	5조 141억	99.5

- 탄산음료, 녹차음료가 감소한 반면, 미네랄워터, 야채음료 등의 자연지향, 건강지향성 음료들은 급성장하였음.
- 미네랄워터의 국내생산량 추이를 보면, 처음 시장을 형성한 2000년부터 2006년까지 시장규모를 2배로 성장시켰고, 자연지향·건강지향이 키워드였던 작년, 궁극의 자연 음료로 불리어지는 미네랄워터 시장은 갈증음료의 대표로서 순조롭게 확대될 것으로 예상됨.
- 2004년에 발매된 이토엔의 “1일분 야채”, 가고메 “하루 야채는 이것 1개로” 는 후생노동성이 추천하는 하루 분의 야채섭취 목표량을 명확히 표시하고 알기 쉬운 컨셉과 제품명으로 대히트하면서 야채 음료가 음료 시장의 한 부분을 차지하게 되었음.
- 불안정한 기후에 상관없이 신선한 야채를 섭취하려는 사람들의 욕구가 늘어났고, 건강지향 추세에 맞춰 대기업들이 적극적으로 상품개발·투입에 들어가 소비자의 선택사항이 늘어나 시장은 급격히 확대되었으며, 소비자가 야채의 중요성을 계속 인식하고 있으므로 향후도 건강관련 상품시장은 확대될 전망이다.

(2) 기능성 음료 시장

- 비타민C, 콜라겐, 히알루론산 등 미용성분을 함유한 미용음료시장은 여성을 타겟으로 승승장구하고 있음.
- 2005년 출시된 ‘콜라겐 10000 + 비타민C 10000’(롯데건강산업)은 드링크와 젤리타입으로 각각 출시되었으며, 지난해 113억 엔대 매출이 올해는 131억 엔으로 확대될 것으로 전망하고 있음.
- 일본 시장에서 아미노산 음료는 2002년에 최고 히트 상품으로 선정되었으며 최근 몇 년 간 일본 음료시장에서 큰 성장세를 기록하고 있음.
- 2005년에는 성장세가 약간 꺾여 전년대비 86%의 마이너스 성장을 기록했지만, 시장의 니즈가 다양화되고, 생활형태가 변화하면서 2007년에 와서 아미노산 음료의 재평가되

면서 기존 제품의 매출 증가와 신제품 발매를 통해 아미노산 시장이 다시 활성화되고 있음.

- 특히, 아미노산의 일종인 기능성 소재 GABA가 작년부터 본격적으로 음료시장을 형성하고 있으며, 혈압 상승 억제 및 스트레스완화 등의 기능성 소재로 알려진 GABA는 기존의 음료수 뿐 아니라 와인과 생수에도 배합되어 인기를 얻고 있음.

(3) 기능성 발효음료 시장

- 유산균음료는 2006년 실적 188억 엔, 2007년은 240억 엔(전년대비 127.7%)으로 예상되고 있음.
- 유산균 시장은 아이들의 발효 요구르트 중심으로 발달했기 때문에 자녀들의 수가 줄어가면서 1999년 정점 도달 후 2000년부터 지금까지 감소되는 추세였으나 2006년 발매된 [식물성 발효유 라브레(카고메社)]가 대히트하면서 대폭 확대되었음.
- [라브레]는 이제까지 어린이 중심이었던 발효유 시장에, 40세에서 50대까지의 여성을 메인 타겟으로 한 어른들을 위한 상품으로서 시장에 투입되었으며 많은 양의 TV광고로 제품의 인지도를 상승시킨 [라브레]는 07년도에도 전국적으로 붐을 일으키기 위해 계속적으로 TV광고를 하고 있고, 수요확대가 점쳐지기 때문에 유산균음료시장은 전체적으로 확대될 것으로 전망하고 있음.
- 유산균 음료의 구매형태는 집으로 배달시켜 먹는 비율(총 구매의 28.1%)이 높은 것으로 나타나 음료 배달 아줌마가 유산균 음료 판매의 중요한 채널인 것을 알 수 있음.

(4) 식초음료 시장

- 이미 일본에서는 마시는 식초 음료가 보편화된 음료 카테고리로 정착, 연간 수천억 원의 시장을 형성하고 있음.
- 피로회복과 콜레스테롤 수치 저하, 칼슘 흡수촉진 효과 등을 비롯하여, 여러 건강효과가 입증된 식초음료는 2004년에는 흑 식초 붐이 일어나 일본 30대 히트 상품 중 하나로 포함되었을 정도임.
- 식초 음료 시장을 지탱해 주고 있는 주 소비층은 40, 50대이지만(각각 총 판매액의 29.3%, 37.9%), 젊은 층에 소비 공략을 위해 과실을 양조하여 만든 과실식초를 개발하여 20~30대 여성의 소비량을 2배 이상 신장시켰음.
- 마이보이스콤의 2007년 조사결과에 따르면 식초 음료를 마셔본 경험이 있는 사람은 전년에 비해 10% 증가한 69%로 조사되었으며, 식용 경험이 있는 식초의 종류로는 흑초 72%, 사과 과실초 68%로 상위 2위 제품이 압도적인 지지를 얻고 있음. 전년과 비교해보면 흑초는 계속 증가추세지만, 사과 과실초는 약간 감소추세임.
- 건강유지를 위해 식초를 음용하고 있는 사람이 늘고 있는 지금, 간편하게 바로 먹을 수 있는 저온 냉장(chilled) 타입의 식초음료 시장이 늘고 있음.

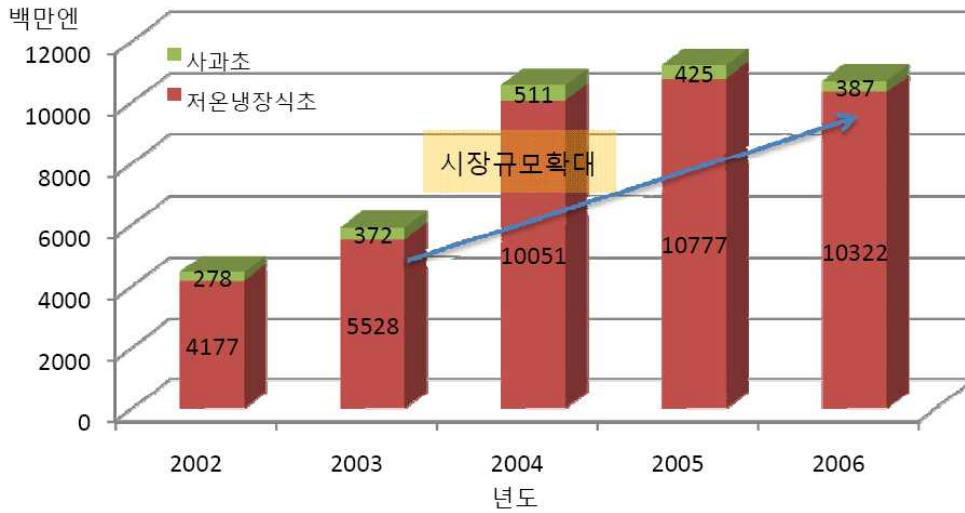


Fig. 4-5. 저온 냉장 타입의 식초 음료 시장 동향

(5) 기타 음료시장

- 운동선수용 영양보충 제품으로 개발된 젤리음료는 일본시장에서 1997년부터 볼륨을 확대하기 시작하여 연간 500~600억 엔의 판매규모를 유지해 오고 있음.
- 액체타입에 비해 간편하다는 점과 위속에 머무는 시간이 길다는 점 때문에 아침 식사 대용제품으로 젊은 층에 인기가 많으며, 다이어트 식품으로도 개발이 진행 중임.
- 일본의 리서치 회사인 마이보이스콤의 조사에 의하면 구입 포인트에서는 '맛'을 중시한다는 사람이(40.5%)로 가장 많았고 다음으로 '기능·효과(22.9%)', '가격(15.9%)'을 꼽아, 기능보다는 맛을 중시하는 경향이 강한 것으로 조사되었음.
- 다만, 중년층으로 갈수록 '맛' 보다는 '기능'을 중시하는 경향을 보이는 것으로 분석되었음.
- 음료 구입 시 가장 중점을 두는 성분은 비타민이 51%로 1위, 아미노산이 40.1%로 2위였고, 식물유지, 칼슘, 비피더스균, 미네랄 순이었으며, 성별로 보았을 때 남녀 모두 비타민과 아미노산이 1, 2위였고 남성의 3위는 비피더스균, 여성은 식물유지였음.
- 미용과 관련이 있는 콜라겐이나 코엔자임은 여성이 월등히 높았음.
- 음료 시장에서 포장 형태는 소형과 대형 PET 포장이 늘고 있고, 병 포장이 줄고 있음.
- 특히 2 L PET이 전년 대비 10.7% 증가하면서 전체 21.7%를 차지하였고, 500 mL PET 포장이 전년 대비 6.7% 증가하여 전체 시장에서 가장 많은 30.2%를 차지하고 있다. PET포장은 전체 시장의 80.2%를 차지하고 있음.

다. 기타 국가의 기능성음료의 시장동향 분석

(1) 미국

- 미국의 기능성 음료 시장은 크게 4가지 시장으로 분류됨.
 - 1) Sports drinks: 탄수화물과 전해질의 형태로 구성되었으며 순간적으로 빠르게 에너지를 공급하는 기능을 함유하고 있으며. 운동 중이나 혹은 운동 전후로 복용 시 운동 능력 향상과 피로 회복에 도움을 줌.
 - 2) Energy drinks: 카페인이나 타우린, glucuronolactone, guarana 성분으로 이뤄졌으며, 심신 각성의 기능을 함유한 음료군임.
 - 3) Enriched drinks: 섬유질이나 허브에서 비타민을 추출하여 다양한 주스의 형태로 만들어짐.
 - 4) Nutraceuticals: 특별한 용도나 특정한 치료 기능을 함유하고 있는 음료이며, 고혈압이나 소화기능을 촉진하는 음료의 형태로 많이 나타남.
-
- 미국의 기능성 음료 시장은 현재 빠른 성장세를 나타내고 있으며, 최근 연구 기관(Mintel)의 조사 결과에 따르면 2007년 현재 기능성 음료의 시장 규모는 98억 달러(9.8 billion) 규모로 2002년보다 14%가 성장한 것으로 집계되었음.
 - 특히, 18세에서 34세의 젊은 소비자층과 자녀를 둔 가정이 기능성 음료 시장의 성장을 이끌고 있어 앞으로도 그 성장이 계속될 것으로 예상됨.
 - 기능성 음료 시장 중에서도 현재 가장 빠른 성장을 보이고 있는 시장은 바로 "Energy drinks" 시장으로서, 에너지 드링크 시장은 지난 2001년에 4억 달러를 기록한 이래 2005년에는 약 30억 달러 시장규모로 급성장하였음.
 - 에너지 드링크를 마시는 주요 소비 계층은 총 소비의 65%를 차지한 35세 미만의 남성들로 나타났으며, 골드만삭스와 Mintel은 오는 2010년에는 에너지 드링크 시장이 약 100억 달러 규모에 이를 것으로 전망하면서 음료수 시장에 큰 변화가 있을 것이라 밝혔다.
 - 최근 들어 에너지 음료와 함께 빠른 성장을 보이고 있는 시장은 고급 물 시장으로 Coca-Cola Company가 주도하고 있으며 코카콜라사와 Pepsi 사, Energy brand 3사의 점유율이 90%를 육박하고 있음.
 - 현재는 물에 비타민을 첨가한 비타민 워터(vitamin water) 등이 출시돼 좋은 반응을 얻었으며 또한 미네랄 등을 첨가한 제품도 늘어나고 있는 추세임.
 - 또한, 한 병 당 40 달러에 육박하는 고급 물도 시판 되는 등 음료 시장은 더 고급스럽게, 더 다양한 기능으로 세분화되어 소비자들을 공략하고 있음.
 - MINTEL 사의 조사에 따르면 기능성 음료를 구입하는 소비자의 1/3 음료를 통해 면

역력, 소화기능 혹은 다이어트 효과를 기대하고 있는 것으로 조사됐으며, 60%의 소비자들은 건강하게 먹는 것에 주의를 기울이고 있다고 답하였음.

- 웰빙 열풍이 불고 있는 가운데 건강에 관심을 쏟는 소비자는 2002년에서 2006년 사이 3천만 명이 증가했다는 조사 결과가 나왔음(Simmons NCS, US Census Bureau population).
- 또한, 건강식품 중 휴대가 간편하며 음용하기 쉬운 이점이 있는 드링크류는 건강을 염려하는 소비자들 손쉽게 접근할 수 있는 시장으로 분석되었음.
- 실제 미국 기능성 식품시장에서 스포츠 드링크가 차지하는 비중은 19%로 매년 지속적인 시장성장을 기록하는 것으로 나타났으며 이는 현재 미국 내에서 불고 있는 '더 건강하게 살고 싶은' 트렌드가 분명 기능성 음료 시장의 확대에 영향을 끼치는 중요한 요인임에 틀림없다는 것을 보여주는 결과임.
- 시장 확대를 위하여 음료 회사들은 현재 타겟을 베이비 붐 세대인 55-64세로 확장하는데 노력을 기울이고 있는 중이며, 이 연령층은 어느 연령층보다도 구매력이 높기 때문에 이들을 위해 기억력 향상, 콜레스테롤 저하, 혈압 저하 등의 기능을 가진 음료를 개발, 시판 중임.

(2) 중국

- 중국은 "SARS"의 발병이후 건강에 대한 관심이 급속히 높아졌으며 그 전까지 중국 기업은 기능성 음료 시장에 대한 노하우가 전혀 없었기 때문에 기능성 음료 시장은 외국 기업에 의해 발전하였음.
- 중국 기능성 음료 시장은 2003년의 2%에서 2006년 10%의 성장률을, 전체 시장의 크기는 2000년 8.4억 위엔화(1,092억 원)에서 2005년 30억 위엔화(3,900억 원)로 고속 성장하고 있음.
- 특히, 2004년부터 樂百氏의 「脈動」, 娃哈哈의 「激活」, 養生堂의 「尖叫」, 統一의 「体能」 등 여러 가지 기능성음료 브랜드가 신제품을 시장에 도입하기 시작하여 시장은 급성장하였음.
- 시장규모에서 보면 아직 도입기로써, 음료시장에서 아직 리더적인 존재는 아니지만, 시장점유율은 2003년의 18%에서 2005년에는 27.1%까지 증가되는 등 급성장을 보이고 있고, 소득수준이 높아짐에 따라 소비 패턴 역시 건강을 중요시하는 방향으로 변화하고 있으며, 서구의 소비문화를 동경하는 성향을 보이고 있어 중국의 기능성 음료 시장은 향후 그 전망이 무척 밝다고 보여짐.
- 2006년 5월 베이징 까르푸의 조사 결과에 따르면 태국의 세계적 스포츠 드링크 제조사인 레드불스의 "Red Bull"이 31%로 가장 높은 점유율을 보이고 있으며, 프랑스 Danone사의 합자 회사인 Robust사의 "Mizone"이 20%, 일본 오츠카社와의 합자회사인 천진대가유한공사(天津大冢飲料有限公司) 포카리스웨트가 17%로 그 뒤를 일본대정 제약주식회사와 상해관생원유한공사의 제품 "Libaojian"이 13%, 네슬레사의 "능력e"가

9%를 점유하고 있음.




- 앞선 결과에서 볼 수 있듯이 중국 시장의 특징은 바로 다국적 브랜드들이 각축을 벌이고 있다는 것이지만, 현재 시장의 크기가 커지면서 중국 본토 음료회사인 匯源、統一、康師傅 들도 속속 새로운 제품들을 선보이고 있어, 향후 각축을 벌일 것으로 보임.

(3) 유럽

- 영국의 식·음료 분야 전문 컨설팅업체 제니스 인터내셔널社의 조사에 의하면 지난해의 경우 서유럽의 기능성 음료 생산량이 전년도 보다 8% 증가한 37억 8,000만 L에 달했으며, 이것은 전체 Nutraceutical 분야 가운데서도 단연 눈에 띄는 속도로 시장을 확대해 나가고 있는 것으로 보임.
- 특히 의학적 관점 또는 건강상으로 볼 때 특정한 효과를 나타낸다는 점을 표방한 제품들의 경우 전체 기능성 음료 시장에서 점유하는 몫은 아직 3% 수준에 불과하지만, 지난해 성장률은 39%에 달해 가장 괄목할만한 수준을 보였으며, 스포츠 드링크 분야도 지난해 시장분류가 27% 증가하는 호조를 보였음.
- 현재 서유럽의 기능성 음료 시장을 선도하고 있는 품목은 특정한 성분들의 함유량을 높인 강화음료(enriched beverages)로 지난해에 전체 기능성 음료 시장의 4분의 3 이상을 점유했던 것으로 나타났으며 뒤이어 스포츠 드링크가 13%의 시장점유율로 2위에 올랐으며, 에너지 드링크가 8%, nutraceutical 음료 3% 등의 순으로 파악되었음.
- 국가별로는 영국과 독일이 양대 산맥을 이루면서 전체 시장의 69%를 점유했으며, 이어 이탈리아·스페인·프랑스의 순으로 '톱 5'를 형성하였음.
- 전반적인 비만 인구의 확산으로 인해 관련 질병에 대한 관심이 고조됨에 따라 '건강'과 '웰빙'의 중요성이 대두되면서 기능성 음료에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 있음.
- 이에 따라 메이저 음료업체들의 경우 간판품목들의 매출확대를 도모하기 위한 전략의 일환으로 기존 보유품목들에 '기능성'이라는 특성을 앞다퉈 접목시키고 있음.
- 제니스 인터내셔널社의 조사 보고서에 따르면 2008년에 이르면 서유럽의 전체 기능성 음료 매출이 최소한 지금보다 10억 L 이상 추가로 확대될 수 있을 것이라는 전망을 내놓을 정도로 유럽에서 기능성 음료 시장은 발달 가능성을 많이 가지고 있음.


라. 제조사별, 제품형태별, 포장형태별 database

(1) 국내 기능성 음료






제조사	제품명	특징	제품	분류	포장형태
광 동 제 약	비타 500	비타민C, B2, 나이아신 등의 비타민을 함유한 제품으로 특히 현대인에게 필요한 비타민C를 쉽게 섭취할 수 있도록 개발된 제품이다.		비타 음료	100 mL 병 210 mL 병 / 250 mL치어팩
	셀파워	구연산 함량이 세계적으로 매우 높은 이탈리아산 농축 레몬과즙에, 피로 회복에 도움 되는 타우린, 비타민B2 등이 함유된 마시는 천연구연산음료 '셀파워'를 국내 최초로 출시했다.		구연산 음료	100 mL 병
	화이바스타	상큼한 맛과 향의 화이바스타는 수용성 식이섬유인 폴리덱스트로스가 들어있어 현대인에게 부족하기 쉬운 영양소인 식이섬유를 간편하게 섭취할 수 있도록 만들어진 제품이다.		식이섬유 음료	100 mL 병 210 mL 병
	옥수수 수염차	옥수수 수염차는 본초강목 등에 소개된 대로 옥수수수염이 얼굴 붓기를 빼는 민간요법에 많이 사용된 점을 착안해 만들어진 음료다. 최근 미에 대한 기준이 S라인에서 '가녀린 얼굴선'을 상징하는 'V라인'으로 바뀌면서 옥수수수염차의 판매 또한 급성장세를 보이고 있다.		茶 음료	340 mL PET

	광동 오케이	알코올 분해 작용과 간 기능 촉진 작용을 가진 사철쭉 (인진호)농축액, 헛개나무, 칩뿌리(갈근) 등의 원료를 사용해 위장보호, 해독력 강화, 노폐물 배출에 효과를 발휘한다.		숙취해소 음료	이중 오버캡 포장
	민들레 후	몸을 맑게 해준다고 알려진 민들레를 사용하여 만들어진 액상차음료이다.			
동 아 오 츠 카 제 약	멀티 비타	체내 생리활성화에 반드시 필요한 9종의 비타민 (비타민A, B2, B6, B12, C, E, 나이아신, 엽산, 판토텐산)이 함유된 음료로서 생활에 활력을 더해주는 산뜻한 웰빙 음료이다.		비타 음료	180 mL CAN
	포카리 스웨트	일반음료의 흡수력보다 2~3배 이상 빠르게 인체 내에 흡수되어 갈증을 해소시켜 주는 알칼리성 이온음료로 우리 몸의 체액에 가까운 전해질 농도로 구성되어 있어서 체내의 이온 균형을 빠르게 되찾아 준다.		이온 음료	74 g 분말 1.5 L, 620 mL 500 mL PET 340 mL CAN 245 mL CAN
	블랙빈 테라피	100% 국내산 검은콩으로 우려냄으로써, 검은콩 자체의 영양분을 그대로 살렸다. 칼로리가 없으며 다이어트는 물론 피부 미용과 몸매 관리에 관심이 많은 여성에게		미용 음료	240 mL CAN 310 mL PET

		효과적인 음료이다.			
에네르젠	과당, 구연산, 알기닌 성분의 에네르젠은 체내 에너지원인 글리코젠을 보충하고 지방을 연소시켜 에너지화 시킴으로써 지구력 향상과 라스-스퍼트를 제공하는 전문 스포츠 음료이다.		스포츠 음료	340 mL CAN	
아미노-밸류	필수 아미노산중 특히 근육에서 대사되는 BCAA(분지쇄 아미노산) 2000 mg. 즉, 발신, 로이신, 이소로이신을 1:2:1 비율로 개발된 과학적인 음료입니다. 근육의 에너지 지원, 기초대사유지 및 피로 회복에 반드시 필요한 필수아미노산 음료이다.		아미노산 음료	500 mL PET	
컨피던스	3종의 필수 아미노산과 체내 수분함량을 조절해주는 미네랄, 그리고 5가지 비타민 등으로 구성된 비탄산 비타민 음료이다.		비타 음료	250 mL CAN	
화이브미니	장의 리듬을 조절하는 식이 섬유음료로 식이섬유 4 g을 섭취할 수 있으며, 주성분이 polydextrose로 저칼로리의 다이어트 음료이다.		식이섬유 음료	210 mL 병	

	그린타임 두번째 우려낸 녹차만 담았다	첫 번째 우려낸 녹차는 녹차의 영양성분이 60%에 그쳐 맛과 향이 제대로 우려나지 않는 반면 두 번째 우려낸 녹차의 경우 녹차 본연의 맛과 향 및 영양성분을 갖추고 있는 것으로 알려졌다.		茶 음료	410 mL 스커트형 PET 180 mL CAN
해 태 음 료	비타 썬	성인음료 시장에서 인기를 끌고 있는 소재 비타민을 어린이음료 시장으로 확대하였다. 파인애플 맛의 '비타 썬 비타민C'에는 100 mL당 55 mg의 비타민 C가 들어 있어 120 mL짜리 한 병이면 어린이에게 필요한 비타민 C 하루 권장량을 섭취할 수 있다. 사과 맛의 '비타 썬 혼합비타민'은 총 6가지의 비타민을 함유하고 있다.		비타 음료	PP(Push pull) 캡 120 mL PET
	아미노 업 칼로리 제로	기존 아미노 업 제품에 함유된 아미노산 외에 추가로 일본에서 다이어트 관련 기능성 성분으로 많이 활용되고 있는 'L-카르니틴'을 추가하고 저 칼로리의 부담을 낮췄던 기존 제품보다 더 칼로리를 낮춘 '0'칼로리 아미노산 음료라는 점이 특징이다.		아미노산 음료	240 mL CAN 350 mL PET
	궁 비	발효홍삼음료로써 원광대학교 한의학 전문대학원 BK21 공동 사업단에서 궁중의 비방을 충실히 계승해 개발한 정통 한방 음료로, 국산 6년 근 발효 홍삼과 지황, 벌꿀, 지골피, 맥문동, 천문동, 복령 등의 성분이 함유되어 있다.		건강 음료	120 mL 유리병

	차은 까만콩	검은콩 중에서도 가장 우수한 것으로 알려진 '서리태'를 주원료로 만든 제품으로 다이어트와 노화방지에 좋은 것으로 알려졌다. 여기에 녹차에서 뽑은 카테킨 일종인 EGCG(EpiGalloCatechin-3-Gallate) 성분을 첨가했다. EGCG는 몸 안에 흡수되면 기초 대사량을 늘려 체지방을 낮춰주는 효과가 있다.		茶 음료	240 mL CAN 350 mL PET
	네버 스탑 액싱	네버스탑 액싱은 마시는 시점에 따라 3가지 제품으로 나뉜다. 운동 전에는 집중력과 에너지 보강 성분이 첨가된 '에너지(아미노산 함유)', 운동 중에는 수분 보충과 지구력 기능이 강조된 '스피드(아미노산과 옥타코사놀 함유)', 운동 후에는 갈증 해소와 피로 회복에 초점을 맞춘 '리커버리(비타민 함유)' 등이다.		스포츠 음료	340 mL CAN 500 mL PET
	담양 대나무 잎차	대나무잎차는 구수하고 맛과 향이 우수할 뿐만 아니라 성인병을 예방하고 이뇨작용을 원활하게 하고, 심신을 편안하게 하며, 섬유질이 풍부해 식욕을 억제하는 효과가 있어 한약재로도 사용된다. 무더위에도 쉽게 견딜 수 있게 해준다고 알려져 있다.		茶 음료	350 mL PET

롯데칠성음료	게토레이	게토레이에 포함된 6%의 탄수화물은 공복을 빠르게 없애주어 운동 시 최적의 몸 상태를 만들어 주며, 수분이 빠르게 흡수될 수 있도록 준다. 적정량의 염화나트륨이 포함되어 있어 땀으로 잃은 수분을 최적화 시켜주고, 칼륨 성분은 수분이 빠져 나가는 것을 막아준다.		스포츠 음료	240 mL CAN 500 mL PET 1.5 L PET
	MBP 뼈장군	우유에서 추출한 단백질 'MBP(milk basic protein)' 외에도 젖산칼슘 및 CPP(칼슘 흡수 촉진), 탈지분유, 구연산, 대두 등이 들어있어 성장기 청소년 및 뼈가 약해지기 쉬운 주부나 노인층에게 매우 유익한 제품이다.		건강 음료	180 mL CAN 200 mL PET 240 mL PET
	솔의 눈	솔잎 추출 농축액에는 인플루엔자, HIV 등에 대한 항바이러스, 항암, 항 박테리아, 항 기생충, 동맥경화 감소 등의 효과를 나타내면서, 체내의 면역 세포의 활성화 및 바이러스 세포 성장의 억제 등에 탁월한 효과를 보이는 것으로 밝혀졌다.		茶 음료	240 mL CAN
	하이콜라겐	상큼한 맛의 콜라겐 음료로 콜라겐 냄새가 적고, 180 mL병에는 콜라겐 성분 1,000 mg과 콜라겐 생성을 촉진하고 흡수율을 높여주는 비타민 C가 100 mg이 함유되어 있다.		미용 음료	160 mL CAN 180 mL 병
롯데	비타민 C 700 mg과 타우린 1,000 mg, 사과농축액 등이 함유된 제품으로, 젊은 층의 입맛에 맞아 학생층 및 20~30대 직장여성층의 비타민 보충과 피로 회복에 큰 도움이 된다.		비타민 음료	100 mL 소병 180 mL CAN 210 mL 병	

칠 성 음 료	홍삼 진액	우수한 품질의 6년 근 홍삼엑기스에 가시오가피, 당귀, 대추, 녹용, 구기자, 산사자, 영지, 숙지황, 천궁, 계피, 감초 등 12종의 몸에 좋은 한방성분을 첨가한 고급 홍삼음료이다.		건강 음료	100 mL NB CAN
	감초생강	우수한 품질의 국산 생강만을 엄선해 만든 생강엑기스에 감초, 계피, 대추농축액이 함유된 제품으로, 감초의 달콤한 맛과 생강의 향이 잘 어우러져 누구나 맛있게 즐길 수 있는 전통 한방음료이다. 온장 판매도 가능해 겨울철에는 따뜻하게 마실 수 있는 제품이다.		건강 음료	100 mL 소병 180 mL 소병 180 mL CAN
	아미노산 플러스 마이너스	현대인의 생활환경에서 쉽게 경험하는 스트레스, 운동 부족, 흡연, 음주, 육식 등으로 인해 신체에 부족해지기 쉬운 아미노산과 젖산칼슘, 염화마그네슘이 첨가되어 있다. 또한 식이섬유, 염화칼륨, 옥타코사놀100 등이 함유돼 신체 균형을 잡아주는 역할을 하고 있다.		아미노산 음료	240 mL CAN 500 mL PET 1.5 L PET
	오늘의 차	'오늘의 차(혼합차)'는 녹차, 홍차, 우롱차, 현미, 울무, 동굴레, 결명자, 결보리, 치커리, 검정콩 등 몸에 좋은 건강소재 추출액과 L-카르니틴이 함유된 건강차이며, 우수한 품질의 국산 보리를 정성껏 우려내 집에서 즐겨 마시던 보리차의 구수한 맛을 그대로 담아낸 제품이다.		茶 음료	175 mL CAN 190 mL CAN 370 mL NB CAN

한 국 야 쿠 르 트	천년의 식물산(蒜)	국내산 마늘을 숙성, 발효해 만든 흑 마늘 추출액이 97% 이상 들어 있으며, 배 농축액과 대추 진액을 첨가해 맛을 보강했다. 또, 단맛을 내는 폴리페놀을 늘리고 항암효과가 있는 S-아릴시스테인을 새롭게 생성해 마늘의 자극성으로 먹지 못했던 사람도 비교적 쉽게 먹을 수 있다.		건강 음료	80 mL 유리용기
	Brain Q 148	머리를 맑게 하고 기억력에 도움이 되는 음료로, ESP-102L, 가바(GABA), 팔라티노스, 페퍼민트추출액, 비타민 C 등을 성분으로 하고 있다. ESP-102L은 뇌 신경세포 사멸을 억제해 기억력 및 인지기능을 활성화하고, 아미노산분해추출물인 가바(GABA)는 신경흥분을 억제해 스트레스를 낮춰 학습능력을 높여주는 효과가 있으며, 팔라티노스는 천연당 성분으로 집중력과 주의력 향상에 도움이 된다.		건강 음료	140 mL 유리병
	비락 진홍삼	국내산 수삼을 증숙, 건조하여 만든 홍삼 농축액을 주 원료로 하고 칩즙, 대추를 혼합하였다. 홍삼은 항암 및 콜레스테롤 감소효과 등이 최근 밝혀지고 있어 건강식품으로 각광받고 있다.		건강 음료	140 mL 파우치
	아미노 센스	아스파르트산, 아르기닌, 라이신, 알라닌, 글루탐산, 이소로이신, 로이신, 발린 등 8종의 아미노산을 함유하고 있다. 그 외에 칼륨과 마그네슘도 풍부하게 들어 있어 원기회복, 신체 활성화에 유익하다.		아미노산 음료	240 mL CAN

	무하유	메밀에서 추출한 루틴, 가바, 겨우살이 추출물, 뽕잎 추출물 등이 함유된 성인을 위한 건강음료로 혈압 및 콜레스테롤 저하에 탁월한 효과가 있다.		건강 음료	140 mL CAN 340 mL PET
	350밸런스 하루야채	선진국의 1일 야채 권장량인 350 g을 충족시켜주는 유기농 야채즙으로 노화의 주범인 활성산소의 산화작용을 막아주는 항산화물질이 풍부하다는 점이 부각되고 있다. 특히 20-30대 여성들이 다이어트와 피부미용, 변비에 좋다며 주 고객층으로 등장했다.		건강 음료	200 mL Tetra Top dome 종이팩
CJ	팻 다운	식이섬유 외에도 대두 펩타이드, 가르시아 캄보지아 성분을 함유해 식이조절을 돕고 운동을 통한 체지방 감소 효율을 높인다.	 <small>http://blog.naver.com/csk875</small>	미용 음료	100 mL 병
	홍삼유 한뿌리	초미세화 인삼 분말로 만들어져 쉽게 소화 흡수돼 달이는 불편 없이 누구나 몸에 좋은 인삼과 홍삼 한 뿌리의 영양을 고스란히 섭취할 수 있다.		건강 음료	120 mL 병






	통째로 갈아넣은 마	산약, 서여 등으로 불리며, 뮤신(mucin)을 비롯한 사포닌, 알기닌 등 다양한 영양성분을 함유하고 있는 전통 식품 마를 통째로 갈아 넣은 음료이다.		건강 음료	120 mL 병
	컨디션 파워	주성분은 쌀눈 발효 추출물인 글루메이트로 위장 내에서 알코올 흡수를 지연 지키는 효과가 있고, 두통, 메스꺼움을 줄여주고, 혈중 에탄올 및 아세트 알데히드 농도 감소에 탁월한 효능을 가지고 있다.		숙취해소 음료	100 mL 병
응 진 식 품	하늘보리	청정지역 160 m 지하암반수로 만든 혼합곡물차로서, 무당, 무카페인, 무칼로리라 녹차보다 부담 없으면서 생수보다 맛있는 물을 원하던 소비자들의 호응을 끌어냈다. 또 소화를 돕고 콜레스테롤 합성을 억제하는 토코트리에놀 함유, 피부에 탄력을 주고 중금속 축적을 막아주는 보리의 효능 등 건강적인 효능이 있다.		茶 음료	180 mL CAN 500 mL PET 1.5 L PET
	내 사랑 유자C	유자의 풍부한 향미와 깔끔한 뒷맛을 느낄 수 있을 뿐만 아니라 풍부한 비타민과 칼슘이 함유되어 있다. 유자는 오렌지의 2배, 레몬의 3배, 사과의 25배나 되는 비타민C를 함유하고 있으며, 사과와 바나나의 10배에 이르는 칼슘까지 들어 있다.		비타 음료	180 mL 병 280 mL PET 340 mL PET 1.5 L PET

	가을대추	대추와 구기자로 만든 고급 대추음료로서 항암효과와 노화방지에 좋다.		건강 음료	100 mL 병 190 mL CAN 1.5 L PET
	아쿠아 비타	천연 암반수에 현존하는 과일 중 비타민 C를 가장 많이 함유한 까무까무와 아세로라의 천연 과일 비타민 C를 담아 피부에 좋은 수분과 비타민을 함께 제공하는 기능성 워터다.		비타 음료	420 mL PET
동원 F&B	우롱차	우리 몸의 지방대사 기능을 적극적으로 활성화 시키고 지방을 분해하는 효소를 활발히 움직여 주는 효과를 가지고 있으므로 기름진 음식을 먹었을 때 좋다.		茶 음료	340 mL PET
	부드러운 L녹차	녹차의 떫은 맛을 없애 맛이 부드럽고, 녹차 카테킨 중 EGCG 성분을 강화해 체지방 감소에 도움을 주는 제품이다.		茶 음료	380 mL PET
일양약품	아미노바란스	생체 활성화를 위한 L-트레오닌, L-라이신, 염산염 L-페닐알라닌 등 10종의 아미노산이 함유된 음료로서, 스트레스 등 피로에 지친 인체의 활력 증진에 좋으며 동물성 단백질과 곡류 섭취가 많은 한국인에게 꼭 필요한 아미노산이 함유돼 있어 균형 있는 생체 리듬을 도와준다.		아미노산 음료	100 mL 병 140 mL 병

	레모나-D	기미, 주근깨의 완화, 육체피로, 임신, 수유기 병중 병후의 체력 저하 시 비타민 B2, B6, C의 보급해주는 비타민 음료로써, 20년 장수 비타민제 레모나 C를 드링크화한 것이다.		비타 음료	100 mL 병
남 양 유 업	17차	대자연 속에서 키워진 17 가지의 원료 및 카르니틴, 카테킨을 사용하여 자연차로 태어났습니다. 17차는 예로부터 선조들이 귀한 약재로 쓰거나 차(茶)로 많이 애용해오던 17 가지 원료를 최적 조건으로 혼합, 추출하여 구수하고 자연스런 맛을 창출한 혼합차로 건강을 위해 무칼로리, 무설탕, 무향료, 무착색료의 까다로운 조건으로 만들어진 고급 차이다.		茶 음료	180 mL CAN 340 mL PET 500 mL PET 1.5 L PET
	비타 生	성인 1일 비타민 C 권장량의 7배가 함유되어 있으며, 무카페인 음료이다.		비타 음료	100 mL 병
	참옥수수수염차	이노작용에 좋은 천연 추출원료(옥수수수염)와 L-카르니틴, 식이섬유 등을 사용해 건강에 도움을 주는 건강차로, 20~30대 여성들에게 높은 관심을 얻고 있다.		茶 음료	180 mL CAN 1.5 L PET
	미&콜라겐	피부와 미용을 중요시하는 20대 젊은 여성층을 위한 음료로써 피부의 탄력생성 및 주름개선 기능이 있는 콜라겐과 식이섬유, 알로에 등을 첨가하고 한국인들에게 친숙한 사과 맛의 신개념 여성 음료로 주 타겟층은 20대 여성이다.		미용 음료	150 mL 병




	백년 산삼	산삼 배양근에 당귀, 숙지황, 대추, 계피 등 몸에 좋은 각종 한방 원료를 첨가해면역력 증강과 스트레스 해소에 좋다.		건강 음료	100 mL 병
	동충하초	농촌진흥청이 개발하여 특허 받은 동충하초 드링크로 항암, 항 피로 효과, 면역기능 강화, 노화방지에 효과가 있다.		건강 음료	100 mL 병
현대약품	미에로 화이바	미에로화이바는 부족한 섬유질을 보충해주고 영양의 밸런스를 유지시켜 주는 맛있는 음료입니다.		섬유 음료	100 mL 병 210 mL 병
	헬씨 올리고	콩에서 추출한 대두올리고당이 함유된 헬씨올리고는 장에 도달하여 비피더스균을 활성화 시켜주며 장을 편안하게 하고 청결하게 해주는 산뜻한 풍미의 건강음료이다.		건강 음료	100 mL 병 165 mL 병

	다슬림9	다슬림9의 가장 큰 특징은 항산화효과가 있는 카테킨이 350 mL 한 병에 일반적으로 우려낸 녹차 9잔에 해당하는 540 mg이 함유. 즉, 국내에 출시된 녹차 중 카테킨 함량이 가장 높다는 점이다. 카테킨의 함량을 대폭 높였음에도 독자적 특허 기술을 사용해 프리미엄 녹차 특유의 진하고 깊은 맛과 풍미를 그대로 살려냈다는 평가를 받고 있다.		차 음료	350 mL PET
	동충하초 동비초	동충하초 동비초는 동충하초엑기스뿐만 아니라 영지(靈芝)엑기스, 구기자엑기스, 타우린이 배합된 현대인의 음료입니다		건강 음료	100 mL 병
매일 유업	썬업 과일야채 샐러드	오렌지, 사과, 감귤, 파인애플, 바나나 등 5가지 과일과 당근, 단호박, 샐러리, 케일, 양배추 등 5가지 채소를 한 컵에 담은 제품으로 하루치 과일 섭취 목표량을 한 컵에 채웠다.		건강 음료	190 mL 컵 500 mL 우유팩
	슬림워터 썬	체내에 흡수된 지방을 분해해주는 L-카르니틴, 장 운동을 촉진시켜주는 식이섬유, 피로회복에 도움이 되는 타우린 등이 함유돼 있어 체내 밸런스 와 다이어트에 효과가 있다.		미용 음료	500 mL 치어팩




	아미노 에너비트	100 mL당 100 mg의 필수 아미노산과 비타민 500 mg 이 들어있어 운동 중 피로감을 없애고 운동 후에도 회복 능력을 높여 준다.		아미노산 음료	100 mL 병 200 mL 치어팩
한국 코카 콜라	맑은 하루 녹차	녹차 음료 브랜드 '하루 녹차'에 디톡스(독소 및 노폐물 배출) 성분을 추가하였다. 몸 속의 독소를 중화시키고 스트레스를 진정시켜주는 것으로 알려진 알로에 베라와 알코올 분해, 숙취해소에 도움을 주는 L-아스파라긴의 기능성 성분을 새롭게 첨가한 녹차 음료이다.		차음료	350 mL PET 1.5 L PET (PP 소재의 파티컵 PET)
	블라스크 파워에이드	윈터 블라스크는 수분 흡수와 탄수화물 보충을 돕고, 아쿠아 블라스크는 건강과 날씬한 몸매를 생각하는 여성들을 위한 이온 음료로 L카르니틴 성분이 포함되어 있다.		스포츠 음료	600 mL PET
한국 코카 콜라	스타일 워터	아미노산의 일종인 L-아르기닌, 비타민 B 복합체 이노시톨 등 각광받는 기능성 음료 성분을 함유하고 있다. 걷거나 쇼핑 등 가벼운 움직임만으로도 날씬한 몸매를 유지하길 원하는 여성들을 타깃으로 삼았다.		미용 음료	350 mL PET 1.5 L PET
동 아 제 약	모닝케어	알코올 분해성분인 글루메이트와 간장보호 성분인 밀크씨슬과 과라나추출분말 등 8가지 성분이 함유된 숙취해소제이다. 음주 후 구취 제거와 두통, 갈증 등을 해결할 수 있다.		숙취해소 음료	100 mL 병

	에너지	피로회복 효과와 스트레스 해소에 좋은 타우린과 과라나, 로얄 젤리, 일상생활에서 섭취하기 힘들지만 우리 몸에 꼭 필요한 비타민 B군 5종, 근육 발달에 필요한 아미노산 3종, 유럽에서 강심제로 사용하는 산사자 등을 주성분으로 한다.		아미노산 음료	250 mL CAN
농심	홍삼수	몸에 좋은 홍삼으로 만들어 물처럼 마시는 홍삼수는 깨끗한 물에 국내산 인삼으로부터 추출한 홍삼농축액과 인삼농축액 만을 넣어 깔끔하게 만든 새로운 웰빙 개념의 음료이다. 홍삼수는 첨가물이 없이 홍삼농축액과 인삼농축액만을 기술적으로 혼합하여 당이 전혀 들어가지 않은 무당음료라서 건강을 생각하시는 분들에게 좋다.		건강 음료	500 mL PET 2L PET
조아 제약	더 맨	'더맨'의 주성분인 누에번데기와 로얄젤리는 예로부터 남성의 스테미너를 강화시켜준다고 잘 알려져 있으며, 특히 누에는 혈당저하 효과가 탁월하기 때문에 당뇨병 환자나 예방하고 싶은 사람에게 좋다. 목초액, L아르기닌, 베타인 등의 주성분은 간기능 개선효과가 있어서 잦은 음주나 스트레스에 시달리는 남성들에게 도움을 주며, 항염 및 항산화 작용을 하는 목초액은 체내 유해한 활성산소를 제거해주고 노화방지에도 효과가 있다.		건강 음료	180 mL CAN



(2) 국내, 일본 양파 음료

제조사	제 품 명	특 징	제 품	포 장 형 태
샤니	닥터 어니언	양파가 가지고 있는 고지혈증·고혈압 예방 및 신경 안정 효과, 스테미너 강화 등의 효능은 유지하면서 양파 특유의 냄새와 매운 맛은 제거한 음료이다. 강장효과가 탁월하고 고혈압, 동맥경화 등을 예방하는 식품으로 잘 알려져 있다. 아울러 혈액을 정화하기 때문에 피부미용에 좋고 잔주름 예방 효과도 있어, 업무 스트레스가 많은 3,40대 직장인이나 다이어트에 관심이 많은 20대 이상 여성층 등 틈새 시장을 공략해 나갈 예정이다.		200 mL PET
전남 무안군 현대영농 조합법인	버디언	양파추출물 85%와 사과농축액, 비타민 C, 비타민 B2, L-카르니틴으로 만들어진 무설탕 음료로, 수험생과 직장인들의 피로 회복에 좋고, 혈당 저하시키는 작용이 뛰어나 당뇨병예방에도 효과가 있다. 국내 뿐 아니라 일본에서도 큰 인기를 얻고 있다.		180 mL CAN
株式會社 カントリー — 주식회사 칸토리	玉葱家族 양파가족	양파 2개분의 양파엑기스와 항산화작용 효과가 있는 양파껍질의 폴리페놀까지 합쳐 유출 배합시킨 음료이다. 이 음료는 양파 성분에 의해 지방제거효과가 있어 다이어트에 큰 효과를 볼 수 있다.		200 mL PET


(3) 국내 발효유 음료

제조사	제품명	특징	제품	포장형태
매일 유업	라씨	발효공법으로 프로바이오틱 유산균을 첨가해 만든 인도식 요구르트 음료로 걸쭉한 인도 요구르트와 과일을 섞어 독특한 맛과 향을 전해준다. 이 제품 한 컵(180 mL)에는 복합 프로바이오틱 유산균과 14종의 스위스산 허브추출물, 2700 mg의 식이섬유가 들어 있다.		180 mL PET
	GUT down	혈압강하 식이요법으로 '구트다운' 발효유를 출시했다. 여기에는 혈관수축물질을 억제하는 트리펩타이드가 들어 있고, 기존 발효유에 비해 갈슘의 함유량이 2.5배 이상 높아 혈압강하에 더욱 효과적이다. 복분자가 들어있어 달지 않으면서도 독특한 맛을 낸다.		150 mL PET
	프로바이오 GG 액티브	강력한 장운동 활성화 효능을 지닌 기능성 발효유 제품으로 장내균총의 안정화로 변비, 설사와 함께 장질환을 개선하는데 효과가 탁월하다고 알려져 있는 LGG유산균을 사용하였다. LGG유산균은 캡슐처리 없이도 위산과 담즙에 살아남는 강력한 프로바이오틱 유산균이기 때문에 장까지 살아가 유해균을 억제시킬 수 있다.		150 mL PE





해태음료	야채가득	야채를 발효시키면 유산균으로 발효되는 과정에서 독특한 향과 풍미를 지니게 된다는 점에 착안해 유산균으로 야채를 발효하여 기존의 씹쓸하고 텁텁한 맛을 없애 맛있는 야채주스를 탄생시켰다.		235 mL 팩, 950 mL 팩
롯데우유	가마솥밥요구르트	롯데우유가 국내 최초로 요구르트에 국내산 현미와 흑미를 넣어 발효시킨 건강식 퓨전 요구르트를 출시했다. 세계 특허 루테리 유산균에 의성산 현미와 진도산 현미가 들어있어 건강과 식사를 동시에 만족시켜줄 수 있는 퓨전 요구르트이다.		130 g
정식품	베지밀요거트	순식물성 콩을 발효하여 만든 유산균 발효두(豆)유이다. SB공법으로 만들어 신선한 맛과 영양을 느낄 수 있으며, 콩을 발효하여 만들었기 때문에 동물성으로 만든 요거트를 싫어하는 분들도 편안하게 마실 수 있다.		150 mL PE
남양유업	120 80	혈관수축작용의 원인이 되는 노르아드레날린의 분비를 억제하고, 콜레스테롤 및 중성지방을 저하시키고, 혈압상승의 원인이 되는 나트륨을 체외로 배출시켜 혈압을 낮추는 메카니즘을 가지고 있다. 이를 위해 [RGP-HC90], [FK-23유산균] 등의 신개발 원료를 사용했으며 현재 한국 일본 캐나다 등에 세계 특허를 출원중이다. 또 제품 1 mL당 약 20억 마리의 활성 유산균을 함유하고 있어 원활한 정장작용을 도와준다.		150 mL PE


<p>남양유업</p>	<p>위력</p>	<p>기존 발효유가 장 건강에 도움을 주는 것에 추가하여 위 건강을 겨냥한 기능성발효유로써 탁월한 항파일로리균 작용뿐만 아니라 L-글루타민이란 아미노산이 손상된 위벽 재생작용까지 하는 고기능성 발효유이다. 주재료는 L. 컨퓨서스균과 녹차추출물, 마누카꿀, 인삼추출 다당제, 인진쑥 추출 다당제, 포도폴리페놀, L-글루타민 등 위력(胃力)만의 7가지 성분이 첨가되어 있다.</p>		<p>150 mL PE</p>
<p>한국 야쿠르트</p>	<p>쿠퍼스</p>	<p>알코올성 간 질환을 억제하고 간 기능을 개선시키는 4종의 유산균과 기능성 소재 Y-Mix와 LS, 간염 유발 바이러스의 감염을 억제하는 초유 항체가 들어있다. 유산균은 소장에서의 알코올 흡수를 억제해 과도한 알코올 대사에 의한 간 기능 장애와 간 질환을 예방하며, 독성물질로부터 간을 보호하는 역할을 한다. Y-Mix와 LS는 간 기능을 활성화하고 간장을 보호하는 효과가 탁월하며, 초유항체는 A형 바이러스의 감염을 예방하는 효과가 있다.</p>		<p>15 mL PS</p>
<p>한국야쿠르트</p>	<p>윌</p>	<p>위 질환의 원인균인 헬리코박터 파일로리균을 억제하고 위벽을 보호하는 2가지 유산균과 면역난황, 차조기가 들어있다. 이 유산균은 2백여개가 넘는 유산균 가운데 헬리코박터균에 대한 억제력이 가장 뛰어나다. 차조기는 요소 분해효소의 활성을 억제하고 항균활성도 뛰어나다.</p>		<p>150 mL PS</p>

서울우유	장마스터	장마스터에 사용된 복합유산균은 애시도필러스, 불가리쿠스, 씨머필러스 및 비피더스 유산균 등 총 4종이 들어갔다. 특히 비티더스 BB-12 유산균은 장내 생존력이 높고 정상작용에 효과가 있다. 또, 장 연동 운동을 돕는 식이섬유, 유산균의 생육을 돕는 올리고당을 첨가했다.		150 mL PE
	지중해의 아침	서울우유의 1급A 원유와 유럽 정통 발효유에 사용되는 복합 균주 '씨머필러스, 불가리쿠스 복합 유산균'을 비롯, 혈액순환과 혈당조절에 용이한 올리브잎 추출물 등을 사용하였다. 특히, 비타민 B, C가 풍부하고 다량의 미네랄을 함유해 소화촉진과 변비해소에 좋은 무화과를 국내 최초로 발효유에 사용, 주목 받고 있다.		50 mL 병
파스퇴르	쾌변	복합 활성유산균을 사용한 정통 농후 발효유이며, 장내 환경을 개선시켜 주는 프로바이오틱 유산균 HOWARU Bifido를 첨가하여 제품 1병당 10억 이상의 비피더스균과 1000억 이상의 활성유산균이 들어있어 유럽정통의 요구르트 맛을 느낄 수 있다. 유산균 연구소에서 개발한 '다기능 복합 식이섬유'를 기존 발효유에 비해 2배 이상 함유하여 장운동을 촉진시켜 변비치료에 도움을 주고 있다.		150 mL PET




<p>운화 라이프에 이드</p>	<p>또별</p>	<p>세계 최초 식물세포로부터 형성층만을 유전적 변이 없이 순수하게 분리, 배양하는데 성공한 식물줄기세포를 운화과학기술원의 생명공학기술인 첨단 AFT(advanced fermentation technology) 발효공정 기술을 통해 유용물질과 영양소의 생리활성도를 높이고, 보존성과 체내흡수율을 증진시켜 체내에서 효과적으로 작용할 수 있게 하였다. 농축과정을 거치지 않는 NFC(not from concentrate) 방식으로 천연 허브와 과일을 직접 발효시켜 천연의 맛, 향, 영양 및 기능을 그대로 유지하였다.</p>		<p>120 mL 팩</p>
---------------------------	-----------	---	---	-----------------

(4) 일본 유산균 발효 음료



제조사	제품명	특징	제품	포장형태
FURUYA	글루코사민 & MSM	글루코사민과 MSM이 함유된 발효유로 관절염, 류마티스, 골다공증, 연골조직 재생에 효과를 갖고 있다.		병
CALPIS	칼피스	칼피스는 양질의 우유를 탈지해서, 독자적인 뛰어난 유산균을 발효시켜 시간을 들여 숙성을 거쳐 만들어진 것이다. 자연으로부터 만들어진 산뜻한 풍미로, 모든 사람이 안심하고 마실 수 있는 건강한 발효음료이다.		500 mL 종이용기
KAGOME	식물성 유산균 라브레	장으로 살아남는 힘이 강한 식물성 유산균 라브레균을 사용한 어른들을 위한 유산균음료이다. 식품소재를 사용하여 칼로리는 20% 줄였고, 설탕을 사용하지 않아서 매일 마셔도 개운함과 산뜻함을 느낄 수 있다.		100 mL PET
KAGOME	비피더스& 콜라겐	건조한 피부에 고민하는 여성의 미용과 건강을 서포터 해줄 드링크 요구르트. 장까지 살아서 가는 비피더스균과 L. 카제이균을 사용하였다. 여성들이 주목하고 있는 화제의 성분 콜라겐을 1500 mg 함유하였다. 설탕을 사용하지 않은 자연스러운 단맛을 느낄 수 있다.		200 mL PS

<p>KiKKoman</p>	<p>라쿠베지</p>	<p>새로운 야채음료! 식물성 유산균 발효에 의해 발효된 야채를 넣은 음료이다. 20종류의 야채와 사과 식초를 사용한 것으로 야채의 악취를 억제하고, 레몬이나 오렌지, 유자 등이 상쾌한 감귤 과실의 맛을 이끌어 냈다. 컵 한잔에 후생성이 지정한 성인 1일 야채 섭취목표의 1/3을 섭취할 수 있다.</p>		<p>930 g PET</p>
------------------------	-------------	--	---	------------------

(5) 미국의 발효 음료 제품





제조사	제품명	특징	제품
Yoplait	Yoplait Smoothie	요플레 요구르트와 과일을 혼합하여 크림리한 느낌으로 음료로 제조. 레귤러 타입과 무지방 타입으로 나뉘지며, 무지방 타입은 236 mL 당 90 kcal로 저칼로리 음료이다.	
danone	Activia®	독특한 비피도 박테리아를 첨가한 젯산 발효 요구르트. 소화 기관에 도움을 주며 약효 뿐 아니라 바닐라, 딸기, 푸룬, 배 등 6가지 다양한 맛이 있는 새로운 요구르트이다.	
LightFull Foods	LightFull Satiety Smoothie	칼로리가 적고, 섬유질 및 단백질을 강화해 쉽게 포만감이 들 수 있도록 했을 뿐 아니라 천연향을 사용하고 노화 방지제를 첨가하는 등 고급제품으로 포지셔닝함. 커피, 초콜릿, 복숭아, 딸기맛이 있음.	

(6) 중국의 발효 음료

제조사	제 품 명	특 징	제 품
광명(光明)	창우우 버터밀크요구르트 (暢优优酪乳酸牛奶)	18~45세 중에서 식생활이 불규칙하고 변비로 고생중인 여성을 타겟 장운동을 활발히 해주고 혈색을 좋게 해주는 효과. 오리지널 맛과 딸기 맛 두 가지 맛이 있다.	
중산시지력다식품 유한공사 (中山市智力多食品 有限公司)	매실식초음료 (梅子醋飲料)	특수한 공법을 사용해 매실을 발효시켜 만든 음료이다. 시원하고 상쾌한 것이며, 독특한 맛으로 소비자들의 사랑을 받고 있다. 주요 효능으로는 위를 보호하여 소화를 돕고, 심혈관 질환을 예방하며, 미용건강에 효과가 있다.	



(7) 국내 식초음료

제조사	제품명	특징	제품	포장형태
동원 F&B	토마토빈 녹차빈	녹차빈과 토마토빈은 녹차추출액을 발효해 녹차 식초를 사용한 식초 음료로, 토마토와 녹차를 기본으로 했기 때문에 식초의 신맛이 약하고 부담이 없기 때문에 신맛에 약한 중년층을 타겟으로 한 음료이다.		180 mL 병
CJ	미초	식이섬유와 벌꿀이 들어 있는 ‘미초’는 천연과일을 20일 이상 발효시킨 후 다시 초산발효를 시키는 2단계 과정을 거쳐 맛이 부드럽다. 과일 발효 식초에는 각종 아미노산, 사과산, 호박산, 주석산 등의 유기산이 풍부하게 들어있다.		180 mL 병 340 mL PET 1.45 L PET
웅진	그의 흑심 그녀의 초심	비열처리 발효공법으로 개발된 현미식초는 현미의 효소, 단백질, 아미노산, 식이섬유, 비타민 등의 영양소가 거의 파괴되지 않아 일반 현미식초보다 훨씬 몸에 좋고 무기질 함량이 높은 우수한 알칼리성 식품이다. 또한 누룩냄새가 없어 식초음료의 맛과 향을 좋게 해주는 장점을 가지고 있다. 기존의 희석식 식초음료와 달리 맛과 향의 차별화로 신개념 식초음료로 인식시킬 것이다.		180 mL 병
롯데칠성 음료	사랑초	식초의 일종인 흑초가 들어있는 웰빙 음료로 현미흑초 3%와 사과과즙 5%, 벌꿀 및 식이섬유 등이 함유되어 있으며, 과당에 비해 당지수가 낮은 결정과당을 사용해 만든 제품이다.		180 mL 소병 180 mL CAN 350 mL PET 1.5 L PET

<p>샘표</p>	<p>마시는 홍삼흑초</p>	<p>흑초는 현미를 그대로 발효하여 자연숙성을 통해 흑색을 띠게 되며 아미노산, 구연산, 미네랄성분의 알칼리성 식품이다. 발효과정에서 원료를 첨가해 숙성을 촉진 시키는 일반 식초 음료들과 달리 술을 직접 빚어 만든 전통 방식으로 영양분 함량을 높였다.</p>		<p>350 mL 병</p>
<p>청정원</p>	<p>마시는 홍초</p>	<p>석류, 오미자, 감, 자색고구마 등 웰빙형 붉은 과실초로 구성되어 출시된 식초음료제품으로 기존 식초의 효능을 유지하면서 식초의 자극적인 맛을 없애고 새콤달콤한 맛을 내기 위해 벌꿀, 올리고당, 식이섬유 등을 첨가해서 숙성시켰다.</p>		<p>500 mL 병 900 mL 병</p>
<p>한국 토종 선인장</p>	<p>후미식초 음료</p>	<p>선인장의 특성을 최대한 살리면서 발효를 통해 지방산을 강화(전체 지방산 중에 50%가 오메가3, 오메가6)해 신진대사 및 면역력 증강에 도움이 된다. 발효 형식은 효모의 알코올 발효를 이용, 산화 발효인 초산균에 의해 유기산을 발효하고, 완전 발효를 통해 유기산을 유도한다. 한국 토종 선인장이 가지고 있는 영양 그대로를 발효를 통해 완전식품으로 변형시켰다.</p>		<p>375 mL 병</p>
<p>풀무원 녹즙</p>	<p>피곤한 오후 4시 흑초와 모로미초</p>	<p>일본 오키나와 특산품인 아와모리 청주 제조에 사용된 검은 누룩균으로 자연 발효한 천연 식초이다. 프리미엄 초원료인 흑초와 모로미초가 만나 천연 구연산(800 mg), 아미노산(100 mg)이 풍부해 피로 회복에 좋다. 또한 비타민C가 파괴되는 것을 막아줘 다이어트와 피부 미용에도 도움을 주는 것으로 알려져 있다.</p>		<p>120 mL 팩</p>

(8) 일본 식초 음료

제조사	제품명	특징	제품	포장형태
미즈칸그룹	マイنز 마인즈	미즈칸의 연구결과 식초를 포함하여 초산이 혈압이 높은 사람에게 효과가 있다는 것을 밝혀냈다. 미즈칸은 초산을 한병 당 750 mL를 넣은 식초음료로 고혈압 환자에게 좋고, 저칼로리 음료로써 (사과초 14, 흑초 16 kcal)칼로리에 신경쓰는 여성들도 안심하고 마실 수 있다.		100 mL
CALPIS	먹는 사과/포도/매실 식초 & 칼피스	일본산 매실액을 발효·양조한 매실 과실산에 칼피스를 첨가한, 산뜻한 식초음료이다. 컵 한잔으로 국산매실식초를 쉽고 편하게 섭취할 수 있다. 포도맛과 사과맛 식초음료도 있다.		360 mL 병
우찌보리 비니가 (Uchibori Vinegar)	파인애플 식초	파인애플 과즙을 발효 시켜 만든 과실의 식초에 과실즙을 첨가하여 만든 식초이다. 파인애플 식초 1에 물 3배 분량을 섞어 마시면 가장 맛있게 먹을 수 있다. 식전에 마시면 식욕을 촉진시켜 주고 소화를 돕는 작용도 있다.		360 mL 병

<p>TAMANOI</p>	<p>흑초 다이어트 워터</p>	<p>국산 현미만을 원료로 한 엄선한 흑초 10 mL, 피부에 좋은 비타민 C 100 mg를 배합, 상쾌함을 주는 레몬 과즙도 더했다. 100 mL에 불과 7 kcal인 저칼로리음료로, 흑초를 확실히 섭취하고 싶은 분, 처음으로 식초음료를 시험하는 분께 권하고 싶은 음료이다.</p>		<p>350 mL PET</p>
<p>SAISON FACTORY</p>	<p>마시는 식초</p>	<p>국산현미 100%의 흑초에 꿀과 엄선된 과실을 첨가해 만든 식초음료이다. 마시는 식초 시리즈로는 블루베리, 흑초와 꿀, 오렌지, 라즈베리, 토마토, 망고 식초음료가 있다.</p>		<p>200 mL 병</p>

마. 국내외 기능성 음료 개발 관련 연구 동향 조사

(1) 논문 목록

- 매실 추출물을 함유한 기능성 음료 개발
- 앵두의 미백 기능성 성분 탐색과 그의 음료제품의 기능성
- 양과음료의 제조 및 기능성 식품화에 관한 연구
- 유산균을 이용한 해조 제품의 향미 개선
- 청피와 모려를 이용한 기능성 건강 음료 개발에 관한 연구
- 한방 기능성 음료분석 및 섭취 후 흰 쥐의 혈중 알코올 농도에 관한 연구
- 가용화처리에 의한 굴 발효음료의 개발
- 밤 속껍질에서 기능성 음료의 개발 I
- 밤 속껍질에서 기능성 음료의 개발 II
- 양과음료 제조를 위한 기능성 성분 추출
- 양과즙을 사용한 알코올 음료의 개발
- 참다래 수액을 이용한 기능성 음료 개발
- 한국산 감잎을 이용한 음료제조와 안전성
- 홍화씨 추출분말 함유 건강음료의 제조
- 대나무숯 제조과정에서 나오는 대나무액(죽력)을 이용한 기능성음료 개발
- 쌀을 이용한 젓산 발효 음료 개발
- 우유와 두유를 혼합한 이유 보충음료의 개발
- 고구마 가수분해물을 기본으로 한 아침식사용 제조 및 품질특성
- 참취의 고부가 식품이용화를 위한 품질 특성 및 기능성 건강음료 개발
- 생강 추출물을 함유하는 기능성 음료
- 스포츠 음료 개발을 위한 Tea-fungus 발효 음료의 활용
- 국내산 진피 열수추출물의 특성과 진피음료 개발에 관한 연구
- 상업 추출물을 이용한 향당노 음료의 개발
- 천연 색소 추출물을 첨가한 수박음료의 제조

(2) 특허 목록

- 갈근 추출물을 함유하는 기능성 음료 및 그 제조 방법
- 고추를 이용한 기능성 음료 제조 방법과 그 음료
- 곡류의 증류 추출에 의한 기능성 음료의 제조 방법
- 기능성 더덕 음료 및 그의 제조 방법
- 기능성 칩 음료 및 그의 제조 방법
- 기능성 호박음료 및 그의 제조 방법
- 당뇨 기능성 음료

- 볶은 홍화씨를 이용한 기능성 건강음료의 제조방법
- 양파를 조재로 한 조합음료 및 그 제조 방법
- 장미꽃잎 열수추출물 및 이를 이용한 기능성 음료 제조방법
- 치커리올리고당을 함유하는 기능성 음료 및 그 제조방법
- 한방양파음료 및 그 제조 방법
- 함초를 이용한 기능성 음료 및 제조방법

바. 설문조사 및 가정 유치 조사

(1) 조사 테마: 양파 기능성 음료

(2) 조사 대상: 서울 20대 여대생 30명

(3) 조사 기간: 3월 3일~3월 7일

(4) 설문목적

- 기능성 음료의 음용 경험 횟수를 파악하고, 기능성 음료를 먹게 된 계기를 알아봄으로써 제품의 홍보 방향을 생각해 보고자 함.
- 소비자들이 기능성 음료 구입 시 기대하는 효과를 알아보고자 함.
- 기능성 음료 구매 시 브랜드 인지도가 소비자들이 실제 구매와 어떤 상관관계가 있는 것인지 알아보고자 함.
- 양파 음료 경험의 유무를 물어보고 소비자들의 양파음료 인지도를 알아보고자 함.
- 양파 음료의 구매 의향을 물어보고 구매하는 이유와 구매하지 않는 이유를 파악해 보고자 함.
- 양파음료의 가격이 실제 소비자들에게 어떤 영향을 미칠 것인지, 그에 합당한 가격은 얼마나 될 것인지 알아보고자 함.
- 기존 출시 양파 음료 제품에 대해 향후 보완시켜야 할 점은 무엇인지 알아보고자 함.

(5) 설문내용 (기능성 음료)

본 조사결과는 통계용으로만 사용되며, 귀하의 개인 정보는 유출되지 않고 보호됨을 약속드립니다. 바쁘시더라도 잠시 시간을 내어 응답해 주시면 감사하겠습니다.

1. 기능성 음료는 한 주에 몇 번 정도 마십니까?

- ① 안 마신다. ② 1주일에 한번 ③ 1주일에 2~4 ④ 1주일에 5번 이상

2. 기능성 음료를 먹게 된 계기는 무엇입니까?

- ① TV 광고를 보고 ② 건강에 좋아 보여서 ③ 가족이나 친구의 권유로
④ 신문 광고를 보고 ⑤ 점원의 권유로 ⑥ 기타

3. 기능성 음료 구입 시 가장 중요하게 생각하는 것은 무엇입니까?

- ① 기능 ② 맛 ③ 브랜드 ④ 포장

4. 기능성 음료 구입 시 기대하는 효과는 무엇입니까?

- ① 피로회복 ② 다이어트 ③ 피부미용 ④ 콜레스테롤 저하
⑤ 변비해소 ⑥ 칼슘보충 ⑦ 기타

5. 기능성 음료를 주로 어디에서 구입하십니까?

- ① 슈퍼 (편의점) ② 백화점 ③ 자판기 ④ 배달 ⑤ 기타

6. 기능성 음료 구입하시는 가장 주된 상황은 언제입니까?

- ① 식사를 하기 전이나 후에 ② 휴식 시간 ③ 운동을 마친 후 ④ 아침에 일어났을 때

7. 기능성 음료의 용기로 귀하가 선호하는 것은?

- ① 유리병 ② 캔 ③ PET병 ④ 기타

8. 기능성 음료 구매 시 제품의 브랜드가 상관있습니까?

- ① 상관있다. ② 상관없다.

(6) 설문내용 (양과음료)

1. 양과 음료에 대해 듣거나 드셔본 적 있습니까?

- ① 먹어본 적이 있다. (1-1번으로)
- ② 먹어 본 적은 없지만 들은 적은 있다. (2번으로)
- ③ 들어 본적도 없다.

1-1. 드셔본 적이 있다면 다시 구매할 의향이 있으십니까?

- ① 구매 의향이 있다. (2번으로)
- ② 다신 구매하지 않겠다. (1-2번으로)

1-2. 구매의향이 없다면 그 이유는 무엇입니까?

()

2. 양과 음료가 있다면 구매 의향이 있으십니까?

- ① 있다. (3-1번으로)
- ② 없다. (3-2번으로)

2-1. 만약, 구매 의향이 있으시다면 그 이유는 무엇입니까?

- ① 피로 회복
- ② 항암효과
- ③ 고혈압 예방
- ④ 스테미너 강화
- ⑤ 피부 미용
- ⑥ 다이어트
- ⑦ 왠지 건강해 질 것 같아서
- ⑧ 기타

2-2. 만약, 구매 의향이 없으시다면 그 이유는 무엇입니까?

- ① 양과의 매운 맛 때문에
- ② 양과를 마신 후 입에서 냄새가 날까봐
- ③ 양과에 거부감이 있어서
- ④ 그냥 맛이 없을 것 같아서
- ⑤ 기타

3. 양과 음료의 적정가격은 어느 정도가 바람직하다고 생각하십니까?

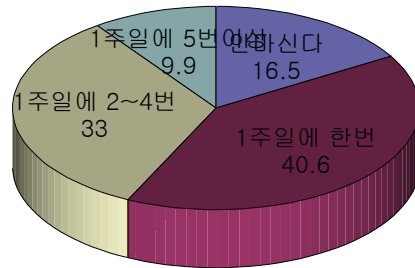
- ① 500~1000원 미만
- ② 1000~2000원 미만
- ③ 2000~3000원미만
- ④ 3000~4000원 미만
- ⑤ 4000~5000원 미만
- ⑥ 5000원 이상

4. 양과 음료가 출시된다면 어떤 용기 포장이 적합하다고 생각하십니까?

- ① 병
- ② 캔
- ③ PET병
- ④ 기타

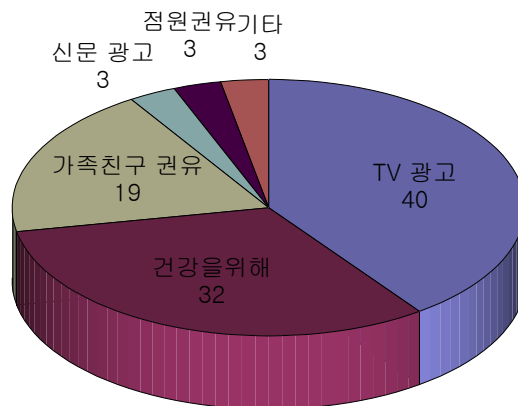
(7) 설문결과 (기능성 음료)

1. 기능성 음료는 한 주에 몇 번 정도 마십니까?



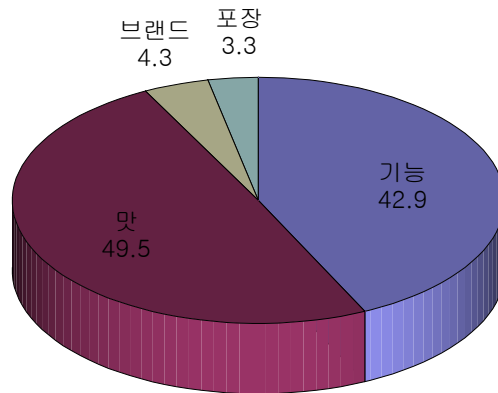
기능성 음료는 한 주에 한번 이상이 40.6%로 가장 많았고, 1주일에 2~4번이 33%로 그 뒤를 이었다. 그리고 '안마신다'의 응답자 수도 16.5%로 비교적 높게 나왔으며 1주일에 5번 이상은 9.9%로 가장 낮게 나왔다. 이를 통해 볼 때 아직까지 기능성 음료에 대한 효과 및 인지도가 약한 편으로 보인다.

2. 기능성 음료를 먹게 된 계기는 무엇입니까?



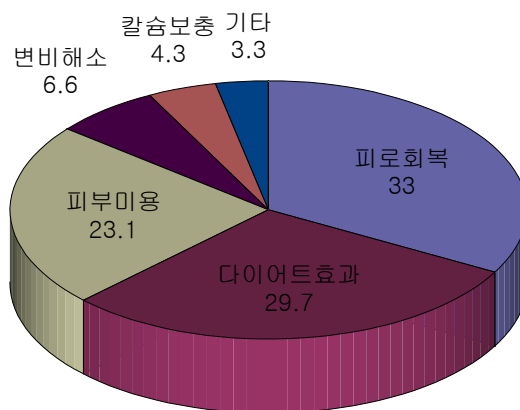
기능성 음료를 주로 먹는 계기는 TV광고가 응답자수의 40%로 가장 높게 나타났다. 이는 기능성 음료의 구매에 있어서 대중매체의 역할이 매우 크다는 것을 시사한다. 그 다음으로 건강을 위해가 32%로 그 뒤를 이었고 가족, 친구 권유가 19%, 신문광고, 점원권유, 기타가 각각 3%로 집계되었다.

3. 기능성 음료구입시 가장 중요하게 생각하는 것은 무엇입니까?



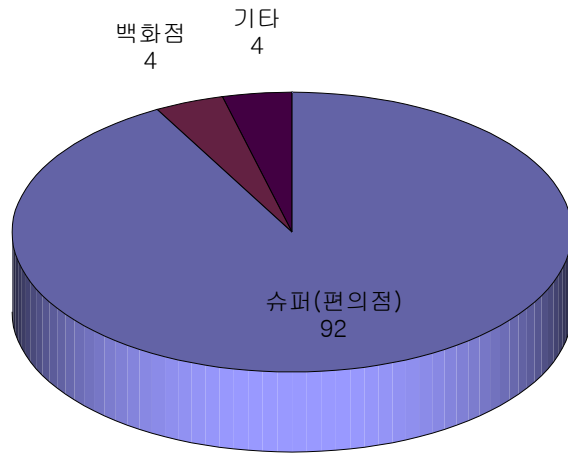
기능성 음료의 구매시 무엇을 가장 중요하게 생각하는가에 대한 질문에 응답자 수의 49.5%가 맛을 꼽았고, 그 다음으로 기능성 음료에 걸맞는 기능이 42.9%로 많았다. 그리고 브랜드가 4.3%, 포장 3.3%가 뒤를 이었다. 이로 볼 때 건강에 좋은 기능성 음료일지라도 소비자들은 음료에 있어서 맛을 중시한다는 것을 시사한다.

4. 기능성 음료 구입시 기대하는 효과는 무엇입니까?



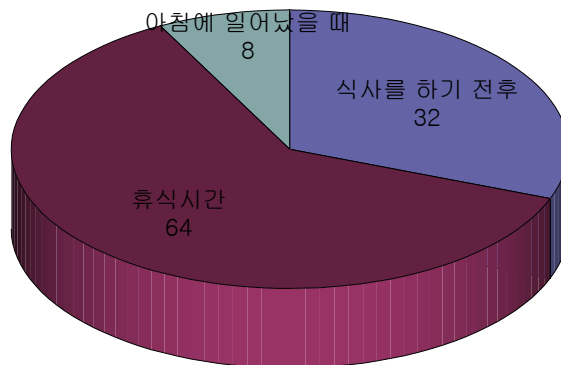
기능성 음료의 구입시 기대되는 효과에는 피로회복이 33%으로 가장 높았고, 그 뒤를 이어 다이어트 효과와 피부미용이 각각 29.7%, 23.1%로 집계되었다. 이외에 변비해소, 칼슘보충, 기타가 각각 6.6%, 4.3%, 3.3%로 나타났으며 콜레스테롤 저하에 관해서는 답을 한 응답자가 없었다.

5. 기능성 음료를 주로 어디에서 구입하십니까?



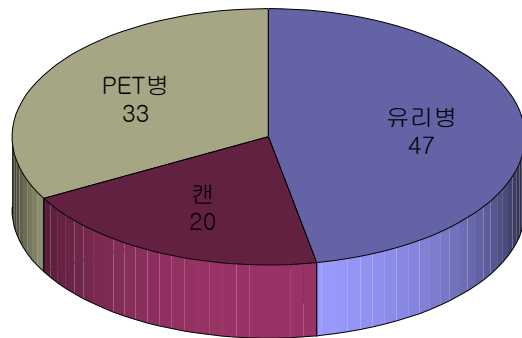
기능성 음료의 구입은 92%의 대부분 응답자가 슈퍼(편의점)에서 구입한다고 대답하였으며 백화점이 4%, 기타가 4%로 집계되었다. 자판기나 배달을 답한 응답자는 없었다.

6. 기능성 음료 구입하시는 가장 주된 상황은 언제입니까?



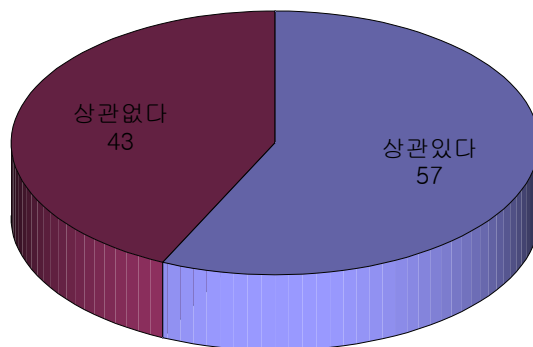
기능성 음료를 구입하게 되는 가장 주된 상황에 대해서는 휴식시간이 응답자의 64%로 가장 많았고, 식사를 하기 전, 후가 32%로 그 뒤를 이었으며, 아침에 일어났을 때가 8%, 운동을 마친 후는 응답자가 없었다.

7. 기능성 음료의 용기로 귀하가 선호하는 것은?



기능성 음료의 용기에 대한 선호도에서는 유리병이 전체 응답자수의 47%로 가장 많았고, 다음에는 PET병이 33%로 그 뒤를 이었으며 캔이 20%로 나타났다.

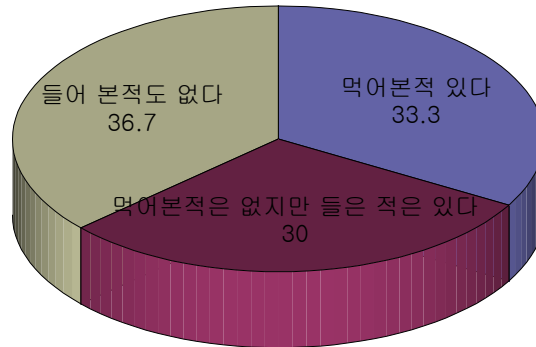
8. 기능성 음료 구매시 제품의 브랜드가 상관있습니까?



기능성 음료 구매시 제품 브랜드에 상관관계에서는 '상관있다'가 57%, '상관없다'가 43%로 집계되었다. 이로 볼때 소비자들은 기능성 음료 구매시 브랜드와 어느 정도 연관성이 있는 것으로 해석된다.

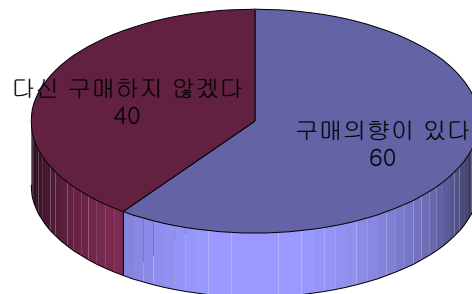
(8) 설문결과 (양과음료)

1. 양과음료에 대해 듣거나 드셔본 적 있습니까?



양과 음료를 들어본 적이 있는가에 대한 질문에 전체 응답자의 36.7%가 들어본 적이 없다고 답하였으며, 33.3%가 먹어본 적이 있다고 답하였고, 나머지 30%는 먹어본 적은 없지만 들은 적은 있다고 답하였다. 이는 아직 양과 음료에 대한 인지도가 현재까지 상당히 낮은 것으로 시사된다.

1-1. 드셔본 적이 있다면 다시 구매할 의향이 있으십니까?

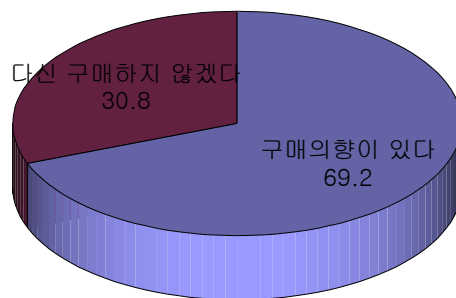


양과음료를 먹어본 응답자 중에 다시 구매할 의향이 있는가에 대한 질문에서 60%가 구매의향이 있다고 밝혔고 나머지 40%가 다신 구매하지 않겠다는 의견을 밝혔다.

1-2. 다시 구매의향이 없다면 그 이유는 무엇입니까? (주관식)

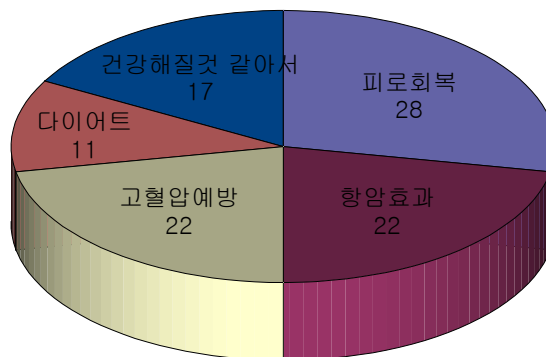
다시 구매의향이 없는 이유로는 '맛이 없어서'라는 대답이 가장 많았고 이외에 입맛에 맞지 않아서, 가격이 비싸서 라는 의견이 나왔다.

2. 양파 음료가 있다면 구매 의향이 있으십니까?



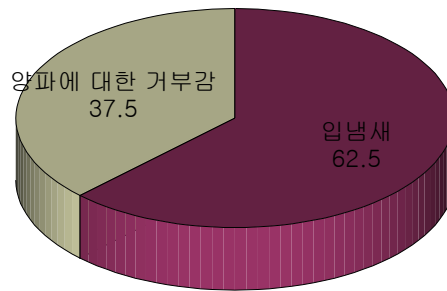
양파 음료 구매의향에 대해 전체 설문자중 69.2%가 구매의향이 있다고 답하였고 30.8%가 구매하지 않겠다고 답하였다.

2-1. 만약, 구매의향이 있으시다면 그 이유는 무엇입니까?



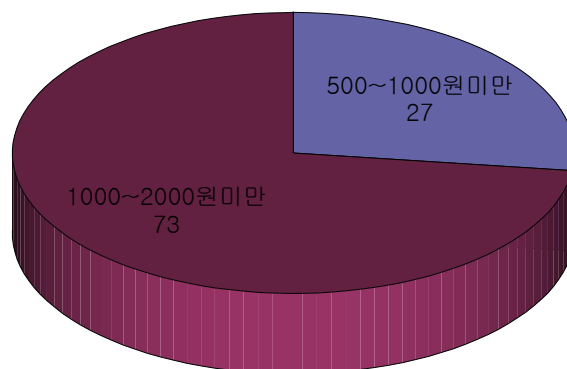
양파 구매 의향이 있는 경우, 그 이유로는 응답자의 28%가 피로회복을 꼽았고, 항암효과와 고혈압예방이 각각 22%, 건강해질 것 같아서라는 대답이 17%, 다이어트효과가 11%로 나타났다. 이외에 스테미너 강화, 피부미용, 기타를 응답한 자는 없었다.

2. 만약, 구매 의향이 없으시다면 그 이유는 무엇입니까?



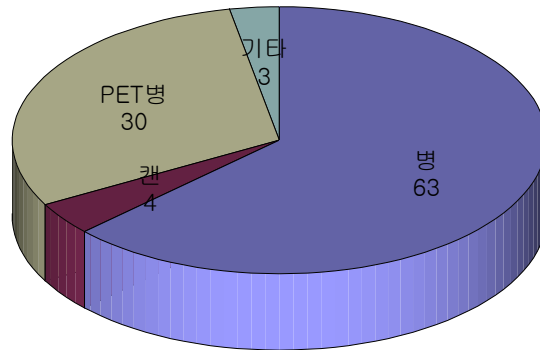
양파 구매 의향이 없는 경우, 그 이유로는 양파로 인한 입냄새가 62.5%로 가장 많았고, 양파에 대한 거부감이 37.5%로 나타났다. 현재 소비자들은 양파의 이미지에 대해 강한 인식을 가지고 있는 것으로 보인다.

3. 양파 음료의 적정가격은 어느 정도가 바람직하다고 생각하십니까?



양과 음료의 적정 가격에 대해 1000~2000원 미만이 전체 응답자의 73%로 가장 많았고, 500~1000원미만이 27%, 2000원 이상으로 대답한 응답자는 없었다.

4. 양과 음료가 출시된다면 어떤 용기 포장이 적합하다고 생각하십니까?



양과의 포장 용기로는 병이 63%로 가장 선호되었고, 그 다음으로 PET병이 30%, 캔이 4%, 기타가 3%로 나타났다.

(9) 결론

- 전체적인 설문조사 결과에 비추어 볼 때, 아직까지 소비자들은 기능성 음료의 효과와 필요성에 대한 인식이 부족으로 인해 기능성 음료를 접한 경험과 지식이 부족하다는 것을 알 수 있었음.
- 그리고 건강에 좋은 기능성 음료라고 하더라도 맛이 떨어질 경우 소비자들은 제품을 구입하지 않는 통계결과를 볼 때 기능성과 맛 모두 충족해야 음료로서의 가치가 높아진다는 것을 알 수 있었음.
- 양과 음료의 경우 들어보지 못한 소비자들이 많은 것으로 볼 때 양과음료에 대한 인지도가 매우 낮은 것으로 나타났으며 양과 음료를 접하게 될 경우 구매하지 않겠다고 응답한 소비자들이 많은 것으로 보아 양과의 특유한 향과 맛으로 인한 거부감이 음료를 기피하게 되는 요인으로 작용하는 것으로 보임.
- 양과 음료를 먹어본 소비자의 경우 구매하지 않는 이유로 맛이 없어서라고 답한 경우를 볼 때 맛의 중요성을 다시 시사해 준 결과로 볼 수 있음.

- 성공적인 양파 음료의 출시를 위해서는 양파음료에 대한 기능성을 최대한 부각시키고, 양파에 대한 강한 편견 이미지를 완화시키며 무엇보다 소비자의 입맛을 최대한 맞출 수 있는 음료 출시가 이루어져야 할 것으로 사료됨.

사. 양파의 종류별, 부위별 성분 조사

(1) 양파의 종류별 (red onion, yellow onion 등) 일반화학 성분 조사

(가) 일반성분 함량

- 황색과 자색 양파의 일반성분 함량은 Table 4-3과 같음
- Ahn과 Lee는 한국산 창녕대고, 프랑스 shallot, 인도 shallot 3종의 양파를 구입하여 일반성분을 분석한 결과 수분 89.97-90.75%, 가용성 무질소물 6.67-7.23% 및 조단백 1.03-1.10% 순으로 나타났다고 보고하였음.

Table 4-3. 양파의 종류별 일반성분 함량

(Unit: %)						
Cultivars	Moisture	Crude protein	Crude fat	Nitrogen free extract	Crude fiber	Ash
Yellow	92.80±0.75	1.09±0.14	0.15±0.01	5.13±0.46	0.47±0.09	0.36±0.02
Red	92.47±0.89	1.03±0.20	0.14±0.02	5.59±0.37	0.45±0.05	0.32±0.04

(나) 무기성분 함량

- 양파의 무기성분 함량을 ICP로 분석한 결과는 Table 4-4와 같음.

Table 4-4. 양파의 종류별 무기성분 함량

(Unit: mg%)

Minerals	Cultivars	
	Yellow	Red
Na	34.09±11.14	33.57±4.89
Mg	6.13± 0.41	7.44±0.50
Ca	18.77± 2.41	27.59±3.74
K	123.64± 5.96	114.41±2.11
Mn	-	-
Fe	1.50± 0.36	1.94±0.38
Zn	1.05± 0.07	0.93±0.11
P	27.04± 0.45	20.56±0.53

(다) 유리당 함량

- 양파의 유리당 함량을 HPLC로 분석한 결과는 Table 4-5와 같음.

Table 4-5. 양파의 종류별 유리당 함량

(Unit: mg%)

Cultivars	Sucrose	Glucose	Fructose	Maltose	Rhamnose
Yellow	335.4±11.03	744.2±26.46	705.9±11.27	trace	-
Red	692.8±19.47	515.0±29.01	517.3±6.02	64.5±1.93	-

(라) 총아미노산 함량

- 양파의 총아미노산 함량을 아미노산 자동분석기로 분석한 결과는 Table 4-6과 같음.

Table 4-6. 양파의 종류별 총아미노산 함량

(Unit: mg%)

Total amino acids	Cultivars	
	Yellow	Red
Aspartic acid	50.47±2.38	50.49±1.25
Threonine	17.86±0.46	17.15±0.15
Serine	20.73±0.31	15.76±0.48
Glutamic acid	157.34±2.48	157.68±3.27
Proline	29.78±0.28	21.56±0.62
Glycine	16.65±0.75	15.78±0.57
Alanine	17.93±0.36	13.16±0.79
Cystine	19.31±0.21	13.15±0.44
Vlanine	20.98±0.27	17.79±0.63
Methionine	10.86±0.12	9.28±0.32
Isoleucine	1.71±0.04	13.15±0.25
Leucine	29.72±0.39	28.37±0.84
Tyrosine	24.88±0.63	23.05±0.40
Phenylalanine	75.58±0.92	82.14±3.29
Histidine	14.07±0.15	16.51±1.38
Lysine	39.60±0.68	30.58±0.87
Arginine	49.52±1.02	26.89±1.38
Total AA	596.99±13.28	552.49±20.17

(마) 유리아미노산 함량

- 양파의 유리 아미노산을 분석한 결과는 Table 4-7과 같음.

Table 4-7. 양파의 종류별 유리 아미노산 함량

(Unit: mg%)

Free amino acids	Cultivars	
	Yellow	Red
O-Phospho-L-serine	0.44±0.02	0.41±0.02
O-Phosphoethanolamine	1.67±0.16	0.74±0.05
Hydroxy-L-proline	46.38±1.92	7.92±1.27
L-Serine	27.34±0.84	10.93±0.43
L-Asparagine	-	10.26±0.35
L-Glutamic acid	12.45±0.75	16.35±1.28
L- α -aminoiso-n-butyrate	1.30±0.06	0.50±0.03
L-Proline	1.45±0.04	-
Glycine	1.02±0.16	0.44±0.02
L-Alanine	2.58±0.27	1.35±0.18
L- α -Aminoiso-n-butyrate	0.90±0.05	0.34±0.03
L-Valine	6.50±1.29	2.82±0.27
L-Cystine	1.64±0.18	-
L-Methionine	0.88±0.03	-
Cystathionine	0.63±0.07	0.69±0.07
L-Isoleucine	3.24±0.35	-
L-Leucine	6.01±0.27	-
L-Tyrosine	4.55±0.94	0.72±0.03
β -Alanine	0.82±0.05	-
L-Phenylalanine	9.43±1.27	-
L-Homocystine	-	1.74±0.17
γ -Amino-n-butyric acid	1.74±0.07	1.27±0.08
Ethanolamine	1.00±0.04	0.56±0.02
Ammonium chloride	8.27±1.26	15.22±1.29
L-Lysine	8.63±1.75	2.65±0.27
L-Histidine	3.96±0.41	1.73±0.02
L-Arginine	26.25±3.29	5.49±0.77
Total AA	179.08±12.39	82.13±9.36

(바) 비타민 C 및 quercetin 함량

- 양파의 비타민 C 및 quercetin의 함량은 Fig. 4-6과 같음.

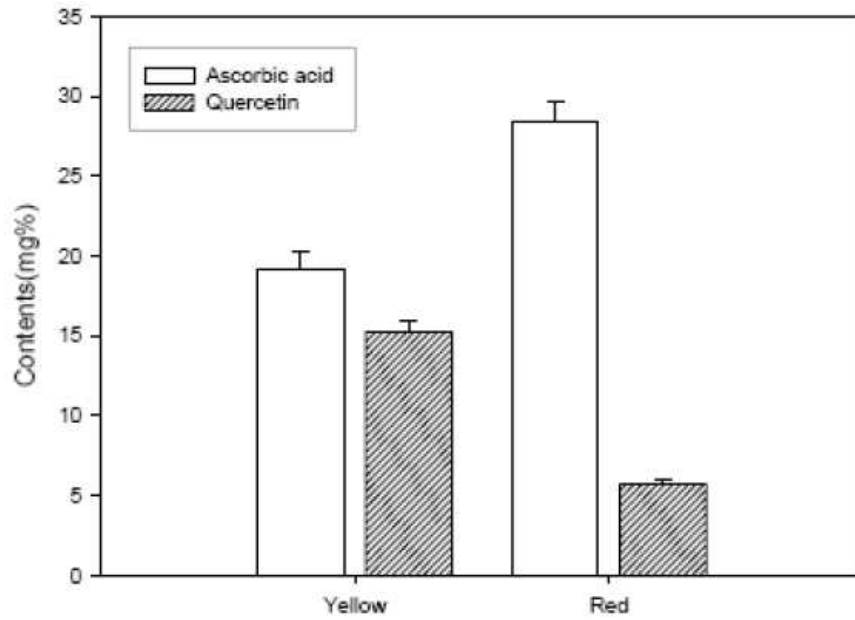


Fig. 4-6. 양파의 종류별 비타민 C 및 quercetin 함량

(사) 총 Polyphenol 함량

- 양파의 60% 에탄올 추출물의 총 polyphenol 함량을 분석한 결과는 Fig. 4-7과 같음.

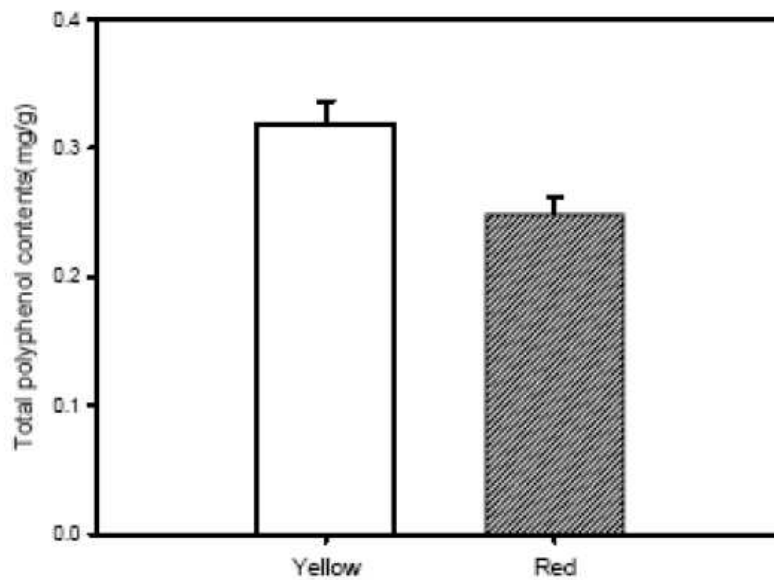


Fig. 4-7. 양파의 종류별 총 polyphenol 함량

(2) 양파의 부위별 (가식부, 껍질 등) 화학성분

- 양파껍질과 양파육질의 일반성분을 비교한 결과는 Table 4-8과 같음.
- 양파껍질에 함유된 섬유질과 무기질은 양파육질 뿐만 아니라 식품성분표 상의 다른 식품들과 비교할 때 월등히 많은 편으로 성인의 1일 섬유질 권장량 (20~30 g/day)에 비추어 양파껍질 100 g을 섭취할 경우 충족된다고 볼 수 있겠으나 식이를 통해 섭취하는 것은 그 양과 질감에 있어 어려운 문제가 많을 것으로 생각되므로 기능성 식품으로의 활용이 바람직하다고 생각됨.

Table 4-8. 양파껍질과 양파육질의 일반성분

Composition	Onion peel	Onion flesh
Moisture	13.9	91.2
Crude protein	ND*	0.9
Crude fat	1.5	0.5
Nonfibrous	50.4	6.6
Crude fiber	29.2	0.5
Crude ash	50	0.4

*ND: Not determined.

(3) 껍질 부위 등 폐기물의 사용 가능성 검토

- 우리의 식생활에서 애용되는 양파는 *Allium*속 채소류로서 지질에 대한 항산화 효과를 가진 것으로 알려져 있으며, 항균작용, 혈압을 낮추고, 모세혈관 강화에 영향을 주며 이 작용은 주로 주성분으로 구성되어 있는 flavonoid계, phenol계 및 방향족 amine계 물질 등과 관련되어 있음.
- 특히 양파에 많이 함유되어 있는 quercetin은 발암성 물질의 활성을 감소시키고, 혈압을 낮추고, 모세혈관 강화에 영향을 주는 것으로도 보고되어 있음.
- 이와 같은 quercetin 관련 물질은 일반적으로 우리가 섭취하는 양파의 가식부위에 비해 비가식 껍질 부위에 77배 이상으로 훨씬 높게 함유되어 있으나 이는 대부분 폐기되고 있는 실정이므로 그 활용방안이 모색되어지고 있음.
- 현재 보고되어 있는 양파껍질에 대한 연구로는 양파껍질에 함유된 플라보노이드의 생체 내 퓨린 대사에 관여하는 xanthine oxidase에 대한 저해 효과를 보고하였고, 양파 껍질에서 분리된 용매 추출물에서 항산화 효과에 대한 결과를 보고하였으며, 항균효

과에 대한 연구도 보고되고 있음.

- Leighton 등은 양파 중의 주요한 flavonol 화합물로 quercetin aglycone, quercetin 4'-glycoside, isorhamnetin monoglycoside, kaempferol monoglycoside를 분리, 동정하였음.
- 또한 Hermann은 flavonol의 농도가 양파의 안쪽 조직보다 껍질이나 잎 부분으로 갈수록 더 높아져서 quercetin을 포함한 flavonol 농도는 양파육질 및 양파즙 중에는 100 mg/kg, 양파껍질에는 순무계의 6.5%에 이른다고 보고하고 있어 이들을 이용한 항산화제의 개발 가능성을 시사하고 있음.
- 양파색소인 quercetin은 세포의 산화를 방지하는 효과가 있다고 알려지고 있고 양파 껍질을 이용한 견직물 염색에서 일광 견뢰가 우수한 것으로 보고되고 있어 감염염색에서와 같이 취약한 견뢰도의 문제를 지니고 있는 천연염색의 혼합염색의 염재로서도 사용할 가치가 높음.

아. 양파발효음료의 개발 가능성 및 시장성 검토

(1) 기존의 시판 양파음료제품의 formula분석 (주원료, 첨가물)

번호	회사	상품명	식품유형	원재료명	함량(%)
1	Daigozakura	타마네기노 치카라	음료 베이스	양파	
				사과	
				과당	
				포도당	
				구연산	
				비타민C	
2	Del monte	타마네기 슈깁	혼합음료	당근즙	
				토마토주스	
				사과과즙	
				양파puree	
				레몬과즙	
3	식품개발연구원	헬스라인	음료 베이스	양파추출액	84.3
				배과즙	10
				텍스트린	
				구연산	
				액상과당	

(2) 기존 마시는 식초음료제품의 formula 분석 (주원료, 첨가물)

번호	회사	상품명	식품유형	원재료명	합량(%)
1	CJ	물에 타서 마시는 미초 석류	음료베이스	액상과당	
				석류식초	18
				이소말토올리고당	
				석류농축액	6
				폴리텍스트로스	
				에리스리톨	
				별꽃	2
				젖산칼슘	
				합성착향료 (석류향, 당밀향)	
				DL-사과산	
				L-아스코르빈산나트륨	
				구연산	
				베리추출색소 (블랙커런트추출물, 엘더베리추출물, 구연산, 당근추출물)	
수크랄로스 (합성감미료)					
2	CJ	물에 타서 마시는 미초 배	음료베이스	액상과당	
				배발효식초	16
				이소말토올리고당	
				배농축액	5.6
				폴리텍스트로스	
				에리스티톨	
				별꽃	2
				젖산칼슘	
				합성착향료 (배향, 당밀향)	
				DL-사과산	
				구연산	
				L-아스코르빈산나트륨	

				수크랄로스 (합성감미료)	
3	CJ	물에 타서 마시는 미초 블루베리	음료베이스	블루베리식초 (블루베리과즙/ 사과과즙)	16 (50/50)
				이소말토올리고당	
				폴리텍스트로스	
				사과농축액	
				에리스리톨	
				벌꿀	2
				젖산칼슘	
				블루베리농축액	12
				합성착향료 (블루베리향, 당밀향)	
				DL-사과산	
				구연산	
				엘더베리색소 (엘더베리색소, 텍스트 린, 산도조절제, 비타민 C, L-아스코르빈산나트륨)	
				수크랄로스 (합성감미료)	
4	CJ	물에 타서 마시는 미초 사과	음료베이스	액상과당	
				사과발효식초	16.5
				이소말토올리고당	
				사과농축액	6
				정백당	
				폴리텍스트로스	
				벌꿀	
				젖산칼슘	
				DL-사과산	
				구연산	
				합성착향료 (사과향, 당밀향)	
				L-아스코르빈산나트륨	

				수크랄로스 (합성감미료)	
				안나토색소	
5	오뚜기	마시는 석류 흑초	음료베이스	석류식초	21.9
				흑초	4.9
				석류농축과즙 (고형분)	3.05 (65)
				액상과당	
				올리고당	12
				벌꿀	5
				과당믹스	
				화이버슐2 (식이섬유)	1 (85)
				구연산	
				비타민C	
				자몽종자추출물	
				6	오뚜기
흑초	4.9				
복분자즙 (고형분)	3.23 (7)				
액상과당					
올리고당	12				
벌꿀	5				
화이버슐2 (식이섬유)	1 (85)				
구연산					
사과농축과즙					
액상과당믹스					
비타민C					
자몽종자추출물					
7	오뚜기	마시는 오곡흑초	음료베이스	오곡식초 (오곡추출액: 고형분- 보 리/쌀/검은콩/조/수수)	19.74 (20: 50- 48/ 25/ 25/ 1/

					1)
				주정	
				흑초	4.9
				오곡추출액 (고형분-보리/쌀/검은콩 /조/수수)	1.65 (50- 48/ 25/ 25/ 1/ 1)
				액상과당	
				올리고당	12
				별꿀	5
				맥아엑기스	
				과당믹스	
				화이버슐2 (식이섬유)	1 (85)
				구연산	
				비타민C	
				자몽종자추출물	
8	청정원	마시는 홍초 검은콩	음료베이스	검은콩식초 (검정콩농축액/사과농축 액, 주요, 현미, 주정)	24 (4)
				액상과당	
				현미흑초	11
				올리고당	9
				별꿀	1
				폴리텍스트로스	1
9	청정원	마시는 홍초 백년초	음료베이스	백년초식초 (백년초농축액)	33.51 (9.76)
				사과농축액	
				주요	
				별꿀	2.98
				폴리텍스트로스	2.98
				액상 과당	
				올리고당	9
				저감미당	

10	청정원	감식초	총산	감원액	100
11	청정원	마시는 홍초 석류	음료베이스	석류식초 (석류농축액/벌꿀/폴리 텍스트로스, 사과농축액, 주요)	48.9 (20.7/ 2.05/ 2.05)
				액상과당	
				저감미당	
				올리고당	5
12	청정원	마시는 홍초 오미자감	음료베이스	감식초	34.1
				오미자농축액혼합액 (오미자농축액/사과농축 액, 구연산, DL-사과산, 스테비오사이드)	26.9 (1.12)
				액상과당	
				올리고당	9
				저감미당	
				벌꿀	1
				폴리텍스트로스	1
13	청정원	마시는 홍초 복분자	음료베이스	복분자식초 (복분자농축액/벌꿀/ 폴리텍스트로스, 사과농축액, 주요)	36.2 (3.62/ 2.76/ 2.76)
				액상과당	
				저감미당	
				올리고당	4
14	청정원	마시는 홍초 홍삼	기타 홍삼식품 음료베이스	5년근홍삼농축액 (고형분/홍삼)	0.24 (60 Brix/ 70 mg/g)
				홍삼식초	40.98
				사과농축액	
				주요	
				벌꿀	2.44
				폴리텍스트로스	2.44
				액상과당	
				올리고당	11
				저감미당	
더덕혼합액기스					
15	샘표	마시는	음료베이스	벌꿀홍초	35

				(현미/별꽃, 종초, 맥아엑기스, 올리고당)	(17.1/14.3)
				올리고당	
				말티톨시럽	
				액상과당	
				사과농축액	
				과실류채소류가공품	
				함수결정포도당	
				말토덱스트린	
				합성감미료 (수트랄로스, 아세설팜칼륨)	
				소포제	
		별꽃흑초			
16	샘표	마시는 화이버흑초	음료베이스	매실농축액 (매실과즙)	(43.2)
				현미흑초 (현미,종초,맥아엑기스, 흑설탕)	20 (20)
				폴리덱스트로스	4.5
				올리고당	
				사과농축액	
				과실류채소류가공품	
				구연산	
				합성감미료 (수크랄로스, 아세설팜칼륨)	
				규소수지 (소포제)	
				홍삼농축액	0.22
				현미흑초 (현미, 종초, 맥아엑기스, 흑설탕)	27 (20)
				올리고당	
				액상과당	
				사과농축액	
				함수결정포도당	
				과실류채소류가공품	
				별꽃	
17	샘표	마시는 홍삼흑초	홍삼음료		

				텍스트린	
				합성감미료 (수크랄로스)	
				규소수지 (소포제)	
18	해표	마시는 24초 감	음료베이스	감식초	35
				고과당	
				올리고당	
				황백당	
				사과농축액	
				벌꿀구연산	1
				비타민C	
19	참그루	오미자 감식초 골드	음료베이스	감식초	35
				오미자추출액 (고형분)	15 (5)
				올리고당	10
				액상과당	
				정백당	
				구연산	
				카라멜	
				텍스트린	
				스테비오사이드	
				자몽종자추출물	
				차추출물	
				글리세린	
20	미즈칸	버몬트 하치미츠링고스	음료베이스	사과식초	6.06
				젓산칼슘	
				증류식초	
				벌꿀	
				구연산	
				사과향	0.61
				비타민C	
				현미식초	
				합성감미료 (수트랄로스)	
				비타민D2	
				비타민B2	
21	미즈칸	블루베리쿠로스	음료베이스	현미식초	

				블루베리주스	11.24
				과당포도당액당	
				포도주스	
				과당	
				구연산	
				블루베리향	0.4
				DL-사과산	
				합성감미료 (수크랄로스)	
22	미즈칸	사라토 토마토식초 스트레이트	혼합음료	토마토주스	11.93
				토마토식초	3.86
				구연산	
				토마토향	0.13
				트레할로스	
				DL-사과산	
				합성감미료 (수크랄로스)	
23	미즈칸	사라토 쿠로즈 스트레이트	혼합음료	형미식초	
				사과주스	
				젖산칼슘	0.49
				구연산	
				사과향	
				액상설탕	
				젖산칼슘	
				DL-사과산	
				비타민C	0.08
				트레할로스	
				수크랄로스 (합성감미료)	
				글루콘산칼륨	
24	미즈칸	사라토 사과식초 스트레이트	혼합음료	사과식초	1.71
				젖산칼슘	0.48
				별꽃	
				구연산	
				사과향	0.14
				비타민C	0.1

				DL-사과산	
				합성감미료 (수크랄로스)	
				비타민B2	
				인산에스테르나트륨	
25	미즈칸	사라토 포도식초 스트레이트	혼합음료	포도주스	3.24
				포도식초	3.05
				DL-사과산	
				L-주석산	
				포도향	0.08
				합성감미료 (수크랄로스)	
				구연산	
26	大地	마시는 흑초	청량음료수	흑산	
				순미식초	
				올리고당	
				트레할로스	
				별꽃	
27	大地	마시는 매실 식초	청량음료수	순미식초	
				사과식초	
				매실식초	
				올리고당	
				트레할로스	
				별꽃	
				매실향료	
28	Del monte	타마네기 슈깁	혼합음료	당근즙	
				토마토주스	
				사과과즙	
				양파puree	
				레몬과즙	
29	키레이 데깅끼	양파 흑초	총산	양파농축액	100%

(3) 시판제품 분석 (pH, 수분활성도, 점도)

(가) 시료

- 각각 다른 회사의 석류 맛 마시는 식초 3가지와 홍삼 첨가 음료 3가지, 일본 양파시판 음료 3가지를 시료로 사용하였음(Table 4-9).
- 청정원의 홍초와 일본 키레이데깅끼의 양파홍초음료는 희석해서 먹는 것이기 때문에 희석 했을 때와 안 했을 때 2가지를 측정하였음.

Table 4-9. 시판제품 측정시료

제조사	제품명
CJ	미초 석류
오뚜기	마시는 석류홍초
청정원	홍초
	4배 희석한 홍초
농심	홍삼수
정관장	맑게 우려낸 홍삼수
웅진	꿀 홍삼
Daigozakura	ONION POWER
Del monte	양파습관
키레이데깅끼	양파홍초
	10배 희석한 양파홍초

(나) 실험방법

① pH

- 마시는 식초음료, 홍삼첨가 음료, 시판 양파 음료 각각 3가지, 희석한 것 2가지 총 11가지의 시료의 pH를 Istek사의 pH meter를 이용하여 측정하였음.
- 측정 방법은 50 mL 비커에 시료 5 mL를 넣은 후 pH meter 전극을 비커에 담아 수치가 안정될 때 까지 기다린 후 수치가 안정되면 pH 수치를 읽음.

② 수분활성도(Aw)

- 마시는 식초음료, 홍삼첨가 음료, 시판 양파 음료 각각 3가지, 희석한 것 2가지 총 11가지의 시료의 수분활성도를 water activity meter를 이용하여 측정하였음.
- 측정 방법은 Aw meter 측정용기에 측정 용기에 측정 시료를 담고 시료의 양은 용기의 절반 이하가 될 수 있도록 한 후, 측정 용기를 Aw meter에 넣고, 수분 활성도를 측정함.

③ 점도

- 마시는 식초음료, 홍삼첨가 음료, 시판 양파 음료 각각 3가지, 희석한 것 2가지 총 11가지의 시료의 점도를 Brookfield Viscometer (USA)를 이용하여 측정하였음.
- 측정 방법은 600 mL 비커에 시료를 500 mL를 넣은 후 점도계에 61번 spindle을 장착하고, RPM을 150에 맞춘 후 수치가 안정될 때 까지 기다린 후 수치가 안정되면 점도 수치를 읽음.

(다) 실험 결과

Table 4-10. 시판제품 분석결과

제품명 (제조사)	pH	Aw	mPa · s
미초 석류 (CJ)	3.62	0.968	5.68
마시는 석류흑초 (오뚜기)	2.58	0.977	4.84
홍초 (청정원)	2.74	0.929	4.76
희석한 홍초 (청정원)	2.86	0.913	11.5
홍삼수 (농심)	4.64	0.903	3.96
맑게 우려낸 홍삼수 (정관장)	5.40	0.919	3.72
꿀 홍삼 (웅진)	3.15	0.905	5.20
ONION POWER (Daigozakura)	3.28	0.962	4.84
양파습관 (Del monte)	4.29	0.994	26.7
양파흑초 (키레이데깁끼)	3.60	0.929	5.72
희석한 양파흑초 (키레이데깁끼)	3.56	0.932	4.08

자. 발효양파음료와 홍삼음료와의 혼합음료 개발가능성의 검토

(1) 기존의 마시는 홍삼음료제품의 formula 분석 (주원료, 첨가물)

번호	회사	상품명	식품유형	원재료명	함량(%)
1	웅진	꿀홍삼	기타홍삼식품 혼합음료	홍삼농축액 (고형분)	0.075 (0.6)
				홍삼사포닌	70 mg/g이상
				정제수	
				액상과장	
				벌꿀	3
				덱스트린	
				사과농축액	
				시클로 덱스트린시럽	
				합성착향료 (허니향, 홍삼향)	
				구연산	
				카라기난	
카라멜색소					
2	한미	홍삼전두유	기타홍삼식품 조제두유 (멸균제품)	홍삼농축액 (고형분/홍삼성분)	0.05 (60/ 70 mg/g)
				전두유액 (대두고형분)	50 (18)
				정백당	
				옥배유	
				대추농축액	
				벌꿀	
				글리세린지방산에 스테르	
				식염	
				코코넛크림분말	
				합성착향료 (두유향, 홍삼향)	
				포스칼슘P-24 (제삼인산칼슘,	

				아라비아검)	
				산도조절제	
				카라기난	
				티제이2000 (식물성유지, 글리세린지방산에스테르, 레시틴, 탄산마그네슘)	
3	청정원	마시는 홍초 홍삼	기타홍삼식품 음료베이스	5년근홍삼농축액 (고형분 / 홍삼)	0.24 (60 Brix / 70 mg/g)
				홍삼식초	40.98
				사과농축액	
				주요	
				벌꿀	2.44
				폴리텍스트로스	2.44
				액상과당	
				올리고당	11
				저감미당	
				더덕혼합엑기스	
4	정관장	맑게 우려낸 홍삼수	기타홍삼식품 (혼합음료)	홍삼농축액 (고형분 / 홍삼성분)	0.1 (60 Brix / 70 mg/g)
				혼합차추출액 (볶은보리, 볶은옥수수, 볶은결명자추출액)	
				비타민 C	
				홍삼향)	
				L-카르니틴	
				복합황금추출물 (황금, 감초, 대추, 황기농축액, 덱스트린, 젖산)	
				시클로덱스트린	

5	샘표	마시는 홍삼흑초	홍삼음료	시럽	
				홍삼농축액	0.22
				현미흑초 (현미, 종초, 맥아엑기스, 흑설탕)	27 (20)
				올리고당	
				액상과당	
				사과농축액	
				함수결정포도당	
				과실류채소류 가공품	
				벌꿀	
				텍스트린	
				합성감미료 (수크랄로스)	
규소수지 (소포제)					
6	농심	홍삼수	기타홍삼식품 (혼합음료)	홍삼농축액 (고형분 / 사포닌)	0.223% (60%이상/70 mg/g 이상)
				인삼농축액 (고형분 / 사포닌)	0.027 (60%이상 /80mg/g 이상)
7	CJ	홍삼식스플러 스	기타홍삼식품 (혼합음료)	6년근 홍삼농축액 (고형분 /홍삼사포닌)	3 (60% 이상 /70mg/g)
				대보추출물 (백출, 복령, 당귀, 천궁, 작약, 황기)	
				솔비톨	
				프락토올리고당	
				시클로덱스트린	
				백출, 복령, 당귀, 천궁, 작약, 황기	

(2) 조사를 위한 설문지 개발

(가) 조사테마: 발효양과음료와 홍삼음료와의 혼합음료에 대한 인식조사

(나) 조사대상: 서울 20대 여성 30명

(나) 조사기간: 2007년 10월 10일 ~ 10월 30일

(라) 설문목적

- 홍삼음료나 홍삼 원액의 음용 경험 횟수를 파악하고, 홍삼음료나 홍삼 원액을 마시는 이유를 알아봄으로써 홍삼의 인지도와 음용 시 기대하는 효과에 대해 알아보고자 함.
- 양과음료 음용경험의 유무를 물어보고 소비자들의 양과음료 인지도를 알아보고자 함.
- 발효양과음료와 홍삼음료를 혼합한 음료가 출시되었을 때 제품의 구매 의향을 물어보고 구매하는 이유와 구매하지 않는 이유를 파악하고자 함.
- 발효양과음료와 홍삼음료를 혼합한 음료의 성공적인 출시를 위해 가장 중요한 요소가 무엇인지, 어떤 점을 보완시켜야 할지 알아보고자 함.

(마) 설문내용

본 조사는 양과 음료에 관한 의견 조사입니다.

본 조사결과는 통계용도로만 사용되며, 귀하의 개인 정보는 유출되지 않고 보호됨을 약속드립니다. 바쁘시더라도 잠시 시간을 내어 응답해 주시면 감사하겠습니다.

1. 귀하는 평소에 홍삼이 첨가된 음료나 홍삼 원액을 즐겨먹는 편입니까?

- ① 안 마신다.
- ② 한달에 1~2번
- ③ 1주에 1~2번
- ④ 1주에 3번 이상

2. 홍삼음료나 홍삼 원액을 마시는 이유가 무엇입니까? (복수응답 가능)

- ① 맛있어서
- ② 건강을 위해
- ③ 홍삼 향이 좋아서
- ④ 기본적으로 안 마신다.

3. 발효양과 음료와 홍삼 음료를 혼합한 음료가 출시되면 구매하시겠습니까?

- ① 구매한다. (3-1로)
- ② 구매하지 않겠다. (3-2로)

3-1. 구매한다면 그 이유가 무엇입니까? (복수응답 가능)

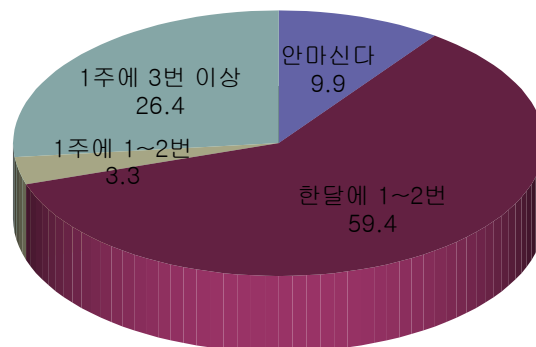
- ① 맛있을 것 같아서
- ② 다이어트에 효과가 있을 것 같아서
- ③ 양과와 홍삼의 기능성 때문에 (피부미용, 피로회복, 항암효과)
- ④ 기타 ()

3-2. 구매하지 않겠다면 이유가 무엇입니까? (복수응답 가능)

- ① 맛 없을 것 같아서
- ② 건강에 별 도움이 안 될것 같아서
- ③ 가격이 비쌀 것 같아서
- ④ 기타 ()

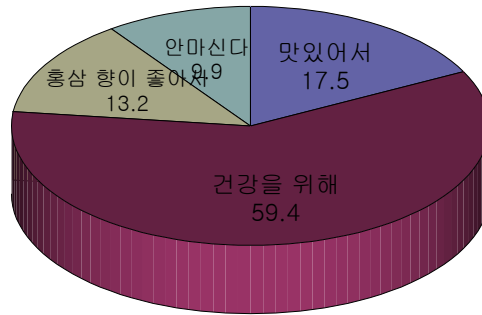
(바) 설문 결과

1. 귀하는 평소에 홍삼이 첨가된 음료나 홍삼 원액을 즐겨먹는 편입니까?



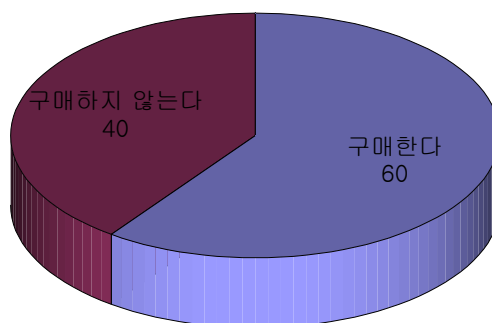
홍삼음료를 즐겨먹는가에 대한 질문에 전체 응답자의 59.4%가 한달에 1~2번 먹는다고 답하였고 1주에 3번 이상이 26.4%, 안마신다가 9.9%, 1주에 1~2번이 3.3%로 나타났다.

2. 홍삼음료나 홍삼 원액을 마시는 이유가 무엇입니까?



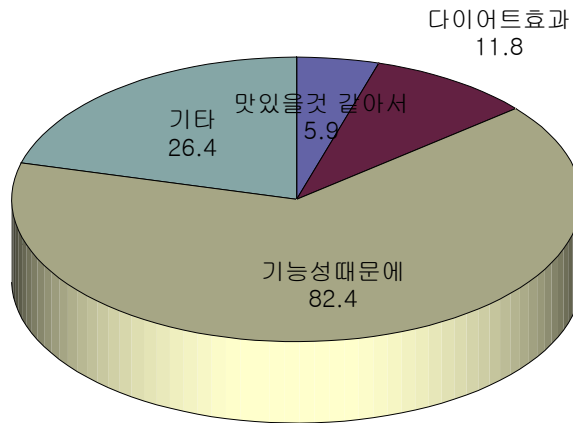
홍삼음료를 마시는 이유에 대해 전체 응답자의 59.4%가 건강을 위해 마신다고 답하였고 17.5%가 맛있어서, 그리고 13%가 홍삼 향이 좋아서라고 답하였으며 9.9%가 안 마신다고 답하였다.

3. 발효양파음료와 홍삼음료를 혼합한 음료가 출시되면 구매하시겠습니까?



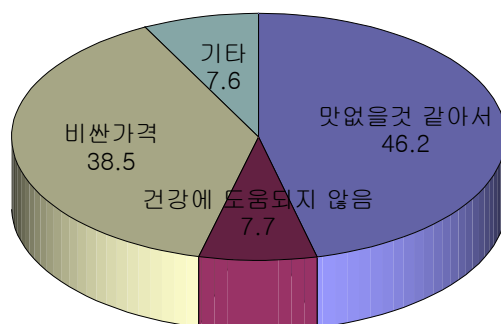
발효양파음료와 홍삼음료를 혼합한 음료가 출시될 경우 구매의사에 대한 질문에서 60%가 구매한다고 답하였고 40%가 구매하지 않겠다고 답하였다.

3-1. 구매한다면 그 이유가 무엇입니까?



구매한다면 그 이유에 대해 전체 응답자의 82.4%가 기능성 때문에 라고 답하였고 기타가 26.4%, 다이어트 효과가 11.8%, 맛있을 것 같아서가 5.9%로 집계되었다.

3-2. 구매하지 않겠다면 이유가 무엇입니까?



구매하지 않겠다면 그 이유에 대해 맛없을 것 같아서가 46.2%로 가장 많았고, 비싼가격이 38.5%, 건강에 도움되지 않아서가 7.7%, 기타가 7.6%로 나타났다.

(사) 결론

- 전체적인 설문조사 결과에 비추어 볼 때 아직까지 소비자들은 기능성 음료의 효과와 필요성에 대한 인식이 부족으로 인해 기능성 음료를 접한 경험과 지식이 부족하다는 것을 알 수 있었음.
- 그리고 건강에 좋은 기능성 음료라고 하더라도 맛이 떨어질 경우 소비자들은 제품을 구입하지 않는 통계결과를 볼 때 기능성과 맛 모두 충족해야 음료로서의 가치가 높아진다는 것을 알 수 있었음.
- 양파 음료의 경우 들어보지 못한 소비자들이 많은 것으로 볼 때 양파음료에 대한 인지도가 매우 낮은 것으로 나타났으며 양파 음료를 접하게 될 경우 구매하지 않겠다고 응답한 소비자들이 많은 것으로 보아 양파의 특유한 향과 맛으로 인한 거부감이 음료를 기피하게 되는 요인으로 작용하는 것으로 보임.
- 하지만 발효양파음료와 홍삼음료를 혼합한 음료에 대한 인식은 그다지 나쁘지 않은 것으로 나타나 향후 제품개발 concept로 활용하고자 함.
- 성공적인 양파음료의 출시를 위해서는 양파음료에 대한 기능성을 최대한 부각시키고, 양파에 대한 강한 편견 이미지를 완화시키고자 하며, 무엇보다 홍삼음료 등과의 혼합을 통해 소비자의 기호를 최대한 고려한 제품 concept를 개발하고자 함.

차. 기존 시판제품 관능검사 결과

(1) 양파음료

(가) 시료 및 방법

① 시료

- 본 실험에 사용된 양파 음료는 일본에 유통되고 있는 제조사가 다른 3가지 제품을 시료로 사용하였고 시료는 2007년 12월 24일 일본 동경에서 구입하였음.
- 양파가 함유된 음료로 ONION POWER ((주)Daigozakura), 양파 습관 ((주)Del monte), 양파 흑초 ((주)키레이데깡끼)를 대상으로 하였음.

② 시료준비

- 검사물은 같은 종류, 같은 크기의 종이컵에 담았고, 각 검사물의 정량은 30 mL를 제시하였음.
- 키레이데깡끼의 양파 흑초의 경우는 설명서대로 생수에 10배 희석한 흑초를 준비하였고, 나머지 두 시료는 희석하지 않은 상태로 준비하였음.

③ 소비자 기호도 검사 방법

- 본 검사의 시료는 검사 전까지 4℃ 냉장고에서 보관하고 검사 전에 바로 꺼내 차가운 상태로 제시하였음.
- 시료 제시 방법은 3개의 검사물을 균형 있게 배치 방법을 사용하여, ABC, ACB, BCA, BAC, CBA, CAB의 6개의 조합을 30명의 패널 요원의 수를 고려하여 동일한 수로 배치되도록 하였음.
- 시료의 번호는 난수표에서 임의로 3자리를 선택하여 사용하였고 각 시료는 다시 맛 볼 수 있으며 각 시료를 맛 볼 때마다 물로 입안을 헹구도록 하여 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄였음.
- 검사원은 이화여대 식품공학과, 식품 영양학과 재학생 30명을 패널로 모집하여 수행하였음.
- 음료 시장의 주요 타겟층인 20대 여대생 중에서 패널을 정하였고, 정확한 검사를 위해 관능평가 유경험자로 한정하여 패널을 모집하였음.
- 평가항목은 전반적인 기호도를 알기 위하여 순위 기호 검사(1=가장 좋아하는 것, 3=가장 싫어하는 것)를 사용하였음.

④ 관능적 특성 검사 방법

- 본 검사의 시료는 검사 전까지 4℃ 냉장고에서 보관하고 검사 전에 바로 꺼내 차가운 상태로 제시하였음.
- 특성을 뽑아내는 과정을 거친 후, 시료 제시 방법은 3개의 검사물을 균형 있게 배치 방법을 사용하여, ABC, ACB, BCA, BAC, CBA, CAB의 6개의 조합을 30명의 패널 요원의 수를 고려하여 동일한 수로 배치되도록 하였음.
- 시료의 번호는 난수표에서 임의로 3자리를 선택하여 사용하였고 검사원은 식품공학과, 식품 영양학과 재학생 30명을 패널로 모집하여 수행하였음.
- 음료 시장의 주요 타겟층인 20대 여대생 중에서 패널을 정하였고, 정확한 검사를 위해 관능평가 유경험자로 한정하여 패널을 모집하였다. 각 시료는 다시 맛 볼 수 있으며 각 시료를 맛 볼 때마다 물로 입안을 헹구도록 하여 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄였음.
- 패널요원은 소비자기호도 검사와 동일한 30명이 3가지의 시료에 대해 관능적 특성 강도를 평가하고 묘사분석을 하였음.
- 평가 척도는 9점 항목척도로 1점에서 9점으로 갈수록 강도가 강해지는 것을 표시하였고 관능적 특성 검사에서 뽑아낸 특성 중 3가지를 평가 항목(Table 4-11)을 정하여 혼련하였음.
- 외관 평가특성인 색깔과 향미 평가 특성인 단맛, 신맛의 정도를 특성으로 사용하였음.

Table 4-11. Definitions of Sensory attributes for the descriptive analysis

Sensory attributes	Definitions
노란 정도	시료 외관의 노란 정도
단맛	혀에서 느껴지는 단맛과 관련된 물질의 맛
신맛	혀에서 느껴지는 신맛과 관련된 물질의 맛

⑤ 통계분석

- 관능적 특성검사를 위한 묘사분석은 각 항목들의 통계분석은 난괴법(완전 블록법)을 사용하고 30명의 패널요원에게 9점 평점법을 사용하여 평가하도록 하였음.
- 각 항목의 점수에 따라 분산 분석표를 작성하며 이를 이용하여, 각 시료간의 특성 차이를 5%의 수준에서 유의적인지 여부를 확인하였음.
- 소비자 기호도 순위는 시료별 점수의 총 합산을 구하여 순위법 유의성 검정표를 이용하여 5%의 수준에서 유의적인지 여부를 확인하였음.

(나) 결과 및 고찰

① 소비자 기호도 검사

- 소비자 기호도 검사 결과(Table 4-12) 순위법을 이용한 기호도는 유의적 차이가 있었음.
- 분석 결과 ONION POWER((주)Daigozakura)가 기호도가 가장 높고 양파 습관 ((주)Del monte)이 제일 낮은 것으로 나왔음.

Table 4-12. 소비자 기호도 순위 검사 결과 (N = 30)

1	2	3
43 (*)	59	78 (*)

1: ONION POWER 2: 양파 흑초 3: 양파습관

- 따라서 양파음료에 있어서 ONION POWER와 양파 흑초는 5%수준에서 유의적 차이가 있고, ONION POWER와 양파 습관은 1%수준에서 유의적 차이가 있다고 할 수 있음.

② 관능적 특성 검사

- 관능적 특성 묘사분석 검사 결과(Table 4-13~4-16) 노란 정도는 시료 2가 가장 강했고 시료 3이 가장 약했음.
- 세 시료가 서로 다른 알파벳을 나타내므로 유의적인 차이가 있는 것으로 보임.
- 신맛은 시료 1이 가장 강했고 시료 3이 가장 약했으며 역시 세 시료가 서로 다른 알파벳을 나타내므로 서로 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났음.
- 단맛은 시료 3이 가장 약하고 시료 1이 가장 강했다. 세 시료가 서로 다른 알파벳을 나타내므로 서로 유의적인 차이가 있는 것으로 보임.
- 양파 음료에서 가장 기호도가 높은 시료 3의 경우 가장 노란색을 띄었으며 신맛이 가장 낮은 반면 단맛은 가장 높은 결과를 나타내었음.

Table 4-13. 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	노란정도	신맛	단맛
1	4.27 b	7.3 c	2.43a
2	3.00a	6.47b	5.03b
3	7.37c	5.13 a	6.4c

시료1: 양파 흑초 시료2: 양파 습관 시료3: ONION POWER

Table 4-14. 색의 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	N	유의수준 = 0.05에 대한 부집단		
		1	2	3
3.00	30	3.00		
1.00	30		4.27	
2.00	30			7.37
유의확률		1.000	1.000	1.000

Table 4-15. 신맛의 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	N	유의수준 = 0.05에 대한 부집단		
		1	2	3
3.00	30	5.13		
2.00	30		6.47	
1.00	30			7.3
유의확률		1.000	1.000	1.000

Table 4-16. 단맛의 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	N	유의수준 = 0.05에 대한 부집단		
		1	2	3
1.00	30	2.43		
2.00	30		5.03	
3.00	30			6.40
유의확률		1.000	1.000	1.000

(2) 식초음료

(가) 시료 및 방법

① 시료

- 본 실험에 사용된 식초 음료는 시중에 유통되고 있는 제조사가 다른 3가지 제품을 시료로 사용하였음.
- 시료는 2008년 3월 2일 서울역에 있는 롯데마트에서 구입하였으며, 시료 선정 시 가장 기본 조건은 마실 수 있는 식초 음료 중 석류 맛인 것으로 하여 최종적으로 미초 석류((주)CJ), 마시는 석류 흑초((주)오뚜기), 홍초 석류((주)청정원)을 선정하였음.

② 시료준비

- 검사물은 같은 종류, 같은 크기의 종이컵에 담았고, 각 검사물의 정량은 30 mL를 제시하였음.
- 청정원 홍초의 경우는 설명서대로 생수에 4배 희석한 홍초를 준비하였고, 나머지 두 시료는 희석하지 않은 상태로 준비하였음.

③ 소비자 기호도 검사 방법

- 본 검사의 시료는 검사 전까지 4℃ 냉장고에서 보관하고 검사 전에 바로 꺼내 차가운 상태로 제시하였음.
- 시료 제시 방법은 3개의 검사물을 균형 있게 배치 방법을 사용하여, ABC, ACB, BCA, BAC, CBA, CAB의 6개의 조합을 30명의 패널 요원의 수를 고려하여 동일한 수로 배치되도록 하였음.
- 시료의 번호는 난수표에서 임의로 3자리를 선택하여 사용하였으며 각 시료는 다시 맛 볼 수 있으며 각 시료를 맛 볼 때마다 물로 입안을 헹구도록 하여 전 시료와의 혼란

과 감각의 둔화를 줄였음.

- 검사원은 식품공학과, 식품 영양학과 재학생 30명을 패널로 모집하여 수행하였음. 음료 시장의 주요 타겟층인 20대 여대생 중에서 패널을 정하였고, 정확한 검사를 위해 관능평가 유경험자로 한정하여 패널을 모집하였음.
- 평가항목은 전반적인 기호도를 알기 위하여 순위 기호 검사(1=가장 좋아하는 것, 3=가장 싫어하는 것)를 사용하였음.

④ 관능적 특성 검사 방법

- 본 검사의 시료는 검사 전까지 4℃ 냉장고에서 보관하고 검사 전에 바로 꺼내 차가운 상태로 제시하였음.
- 특성을 뽑아내는 과정을 거친 후, 시료 제시 방법은 3개의 검사물을 균형 있게 배치 방법을 사용하여, ABC, ACB, BCA, BAC, CBA, CAB의 6개의 조합을 30명의 패널 요원의 수를 고려하여 동일한 수로 배치되도록 하였음.
- 시료의 번호는 난수표에서 임의로 3자리를 선택하여 사용하였으며. 검사원은 식품공학과, 식품 영양학과 재학생 30명을 패널로 모집하여 수행하였음.
- 음료 시장의 주요 타겟층인 20대 여대생 중에서 패널을 정하였고, 정확한 검사를 위해 관능평가 유경험자로 한정하여 패널을 모집하였음.
- 각 시료는 다시 맛 볼 수 있으며 각 시료를 맛 볼 때마다 물로 입안을 헹구도록 하여 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄였음.
- 패널요원은 소비자기호도 검사와 동일한 30명이 3가지의 시료에 대해 관능적 특성 강도를 평가하고 묘사분석을 하였음.
- 평가 척도는 9점 항목척도로 1점에서 9점으로 갈수록 강도가 강해지는 것을 표시하였음.
- 관능적 특성 검사에서 뽑아낸 특성 중 3가지를 평가 항목(Table 4-17)을 정하여 훈련하였고 외관 평가특성인 색깔과 향미 평가 특성인 단맛, 신맛의 정도를 특성으로 사용하였음.

Table 4-17. Definitions of Sensory attributes for the descriptive analysis

Sensory attributes	Definitions
노란정도	시료 진한 정도
단맛	혀에서 느껴지는 단맛과 관련된 물질의 맛
신맛	혀에서 느껴지는 신맛과 관련된 물질의 맛

⑤ 통계분석

- 관능적 특성검사를 위한 묘사분석은 각 항목들의 통계분석은 난괴법 (완전 블록법)을 사용하고 30명의 패널요원에게 9점 평점법을 사용하여 평가하도록 하였음.
- 각 항목의 점수에 따라 분산 분석표를 작성하며 이를 이용하여, 각 시료간의 특성 차이를 5%의 수준에서 유의적인지 여부를 확인하였음.
- 소비자 기호도 순위는 시료별 점수의 총 합산을 구하여 순위법 유의성 검정표를 이용하여 5%의 수준에서 유의적인지 여부를 확인하였음.

(나) 결과 및 고찰

① 소비자 기호도 검사

- 소비자 기호도 검사 결과(Table 4-18) 순위법을 이용한 기호도는 유의적 차이가 있었음.
- 분석 결과 미초 석류((주) CJ)가 기호도가 가장 높고 홍초 석류((주) 청정원)가 제일 낮은 것으로 나타났음.

Table 4-18. 소비자 기호도 순위 검사 결과 (N = 30)

1	2	3
40 (*)	59	81 (*)

1: 미초 석류 2: 마시는 석류 흑초 3: 홍초 석류

- 따라서 식초음료에 있어서 미초 석류와 마시는 석류 흑초는 5%수준의 유의적 차이가 있고, 미초 석류와 홍초 석류는 1%수준에서 유의적 차이가 있다고 할 수 있음.

② 관능적 특성 검사 결과

- 관능적 특성 묘사분석 검사 결과(Table 4-19~4-22) 노란정도는 시료 1이 가장 강하고 시료 2가 가장 약했음.
- 서로 다른 알파벳을 사용하므로 가장 확연한 유의적 차이가 있었으며 신맛은 시료 3이 가장 강하고 시료 2가 가장 약했음.
- 시료1과 시료3은 같은 알파벳을 사용하므로 유의적이지 않았고 시료 1과 시료 2, 시료 2와 시료 3은 다른 알파벳을 사용하므로 유의적이었음.
- 단맛의 경우 시료 2가 가장 높았고 시료 1이 가장 낮았으며. 시료 2와 시료 3은 같은 알파벳을 사용하므로 유의적이지 않았고 시료 1과 시료 2, 시료 2와 시료3은 다른 알파벳을 사용하므로 유의성이 있었음.

- 식초음료에서 기호도가 가장 높은 것은 시료 2였으며 신맛은 가장 강하고 단맛은 또한 가장 강한 것으로 나타났음.

Table 4-19. 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	노란정도	신맛	단맛
1	7.03 c	6.3b	4.40a
2	3.27 a	5.07a	5.27b
3	4.03 b	6.73b	5.47b

시료1: 홍초 석류 시료2: 미초 석류 시료3: 마시는 석류 흑초

Table 4-20. 색의 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	N	유의수준 = 0.05에 대한 부집단		
		1	2	3
2.00	30	3.27		
3.00	30		4.03	
1.00	30			7.03
유의확률		1.000	1.000	1.000

Table 4-21. 신맛의 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	N	유의수준 = 0.05에 대한 부집단	
		1	2
2.00	30	5.07	
1.00	30		6.30
3.00	30		6.73
유의확률		1.000	.257

Table 4-22. 단맛의 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	N	유의수준 = 0.05에 대한 부집단	
		1	2
1.00	30	4.40	
3.00	30		5.47
2.00	30		5.27
유의확률		1.000	.640

(3) 홍삼음료

(가) 시료 및 방법

① 시료

- 본 실험에 사용된 홍삼 음료는 시중에 유통되고 있는 제조사가 다른 3가지 제품을 시료로 사용하였음.
- 시료는 2008년 3월 2일 서울역에 있는 롯데마트에서 구입하였고, 시료 선정 시 가장 기본 조건은 홍삼이 첨가된 음료로 건강식품코너가 아닌 음료 코너의 제품으로서 최종적으로 홍삼수 ((주)농심), 맑게 우려낸 홍삼수 ((주)정관장), 꿀 홍삼 ((주)웅진)을 시료로 선정하였음.

② 재료준비

- 검사물은 같은 종류, 같은 크기의 종이컵에 담았고, 각 검사물의 정량은 30 mL를 제시하였음.

③ 소비자 기호도 검사 방법

- 본 검사의 시료는 검사 전까지 4℃ 냉장고에서 보관하고 검사 전에 바로 꺼내 차가운 상태로 제시하였음.
- 시료 제시 방법은 3개의 검사물을 균형 있게 배치 방법을 사용하여, ABC, ACB, BCA, BAC, CBA, CAB의 6개의 조합을 30명의 패널 요원의 수를 고려하여 동일한 수로 배치되도록 하였음.
- 시료의 번호는 난수표에서 임의로 3자리를 선택하여 사용하였으며 각 시료는 다시 맛 볼 수 있으며 각 시료를 맛 볼 때마다 물로 입안을 헹구도록 하여 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄였음.
- 검사원은 이화여대 식품공학과, 식품 영양학과 재학생 30명을 패널로 모집하여 수행하였음.
- 음료 시장의 주요 타겟층인 20대 여대생 중에서 패널을 정하였고, 정확한 검사를 위해 관능평가 유경험자로 한정하여 패널을 모집하였음.
- 평가항목은 전반적인 기호도를 알기 위하여 순위 기호 검사(1=가장 좋아하는 것, 3=가장 싫어하는 것)를 사용하였음.

④ 관능적 특성 검사 방법

- 본 검사의 시료는 검사 전까지 4℃ 냉장고에서 보관하고 검사 전에 바로 꺼내 차가운

상태로 제시하였음.

- 특성을 뽑아내는 과정을 거친 후, 시료 제시 방법은 3개의 검사물을 균형 있게 배치 방법을 사용하여, ABC, ACB, BCA, BAC, CBA, CAB의 6개의 조합을 30명의 패널 요원의 수를 고려하여 동일한 수로 배치되도록 하였음.
- 시료의 번호는 난수표에서 임의로 3자리를 선택하여 사용하였으며 검사원은 식품공학과, 식품 영양학과 재학생 30명을 패널로 모집하여 수행하였음.
- 음료 시장의 주요 타겟층인 20대 여대생 중에서 패널을 정하였고, 정확한 검사를 위해 관능평가 유경험자로 한정하여 패널을 모집하였으며 각 시료는 다시 맛 볼 수 있으며 각 시료를 맛 볼 때마다 물로 입안을 헹구도록 하여 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄였음.
- 패널요원은 소비자기도 검사와 동일한 30명이 3가지의 시료에 대해 관능적 특성 강도를 평가하고 묘사분석을 하였음.
- 평가 척도는 9점 항목척도로 1점에서 9점으로 갈수록 강도가 강해지는 것을 표시하였으며 관능적 특성 검사에서 뽑아낸 특성 중 3가지를 평가 항목(Table 4-23)을 정하여 훈련하였음.
- 외관 평가특성인 색깔과 향미 평가 특성인 단맛, 신맛의 정도를 특성으로 사용하였음.

Table 4-23. Definitions of Sensory attributes for the descriptive analysis

Sensory attributes	Definitions
붉은 정도	시료 외관의 붉은 정도
단맛	혀에서 느껴지는 단맛과 관련된 물질의 맛
쓴맛	혀에서 느껴지는 쓴맛과 관련된 물질의 맛

⑤ 통계분석

- 관능적 특성검사를 위한 묘사분석은 각 항목들의 통계분석은 난괴법(완전 블록법)을 사용하고 30명의 패널요원에게 9점 평점법을 사용하여 평가하도록 하였음.
- 각 항목의 점수에 따라 분산 분석표를 작성하며 이를 이용하여, 각 시료간의 특성 차이를 5%의 수준에서 유의적인지 여부를 확인하였음.
- 소비자 기호도 순위는 시료별 점수의 총 합산을 구하여 순위법 유의성 검정표를 이용하여 5%의 수준에서 유의적인지 여부를 확인하였음.

(나) 결과 및 고찰

① 소비자 기호도 검사

- 소비자 기호도 검사 결과(Table 4-24) 순위법을 이용한 기호도는 유의적 차이가 있었

음.

- 분석 결과 꿀 홍삼((주) 웅진)이 기호도가 가장 높고 맑게 우려낸 홍삼수((주) 정관장)가 제일 낮은 것으로 나왔음.

Table 4-24. 소비자 기호도 순위 검사 결과 (N = 30)

1	2	3
43 (*)	62	75 (*)

1: 꿀 홍삼 2: 홍삼수 3: 맑게 우려낸 홍삼수

- 따라서 홍삼음료에 있어서 꿀 홍삼과 홍삼수는 5%수준의 유의적 차이가 있고, 꿀 홍삼과 맑게 우려낸 홍삼은 1%수준에서 유의적 차이가 있다고 할 수 있음.

② 관능적 특성 검사 결과

- 관능적 특성 묘사분석 검사 결과(Table 4-25~4-28) 붉은 정도는 시료 1이 가장 강하고 시료 2가 가장 강한 약한 것으로 나타났음.
- 따라서 붉은 정도에 있어서 시료2와 시료 3은 같은 알파벳을 함유하고 있으므로 시료간 차이가 유의적이 않았음.
- 쓴맛은 시료 3이 가장 강하고 시료 2가 가장 낮은 것으로 나타났고 시료 1과 시료 3은 같은 알파벳이므로 유의적이지 않았고 시료 1과 시료 2, 시료 2와 시료 3은 유의적인 것으로 보임.
- 단맛의 경우 시료 2가 가장 강했고 시료 3이 가장 약했으며 시료 1과 시료 3은 같은 알파벳이므로 유의적이지 않은 반면 시료 1과 시료 2, 시료 2와 시료 3은 다른 알파벳을 가지므로 단맛의 차이가 유의적인 차이가 있었음.
- 기호도 검사에서 가장 기호도가 높은 시료 3의 경우 쓴맛은 가장 강했지만 단맛은 제일 약한 것으로 보임.

Table 4-25. 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	붉은정도	쓴맛	단맛
1	6.17 b	4.7 a	3.01a
2	3.07 a	3.33 b	7.71b
3	3.43 a	5.3 a	2.87a

시료 1: 홍삼수 시료 2: 맑게 우려낸 홍삼수 시료 3: 꿀 홍삼

Table 4-26. 색의 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	N	유의수준 = 0.05에 대한 부집단	
		1	2
2.00	30	3.07	
3.00	30	3.43	
1.00	30		6.17
유의확률		0.229	1.000

Table 4-27. 쓴맛의 묘사분석 결과 (유의수준 = 0.05) N = 30

시료	N	유의수준 = 0.05에 대한 부집단	
		1	2
2.00	30	3.33	
1.00	30		4.7
3.00	30		5.3
유의확률		1.000	0.064

Table 4-28. 단맛의 묘사분석 결과 (유의수준=0.05) N = 30

시료	N	유의수준 = 0.05에 대한 부집단	
		1	2
3.00	30	2.87	
1.00	30	3.01	
2.00	30		7.71
유의확률		0.656	1.000

차. 첨가물의 법적조항 검토

1. 총칙

[총칙]

- (1) 식품첨가물(이하 "첨가물"이라 한다)로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한, 총칙 및 일반시험법에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- (2) 물질명에 []를 붙인 것은 각 항목에서 규정한 품목으로서 첨가물임을 표시한다.
- (3) 이 공전 제4.품목별 규격 및 기준 가. 화학적합성품 중 424.합성착향료에 수재된 품목 이외에도 codex, FEMA(Flavor and Extract Manufacturer's Associations), IOFI (International Organization of the Flavour Industry) 등 국제적으로 식품향료로서 통용되는 것은 사용할 수 있으나, 안전성에 문제가 있을 때는 예외로 할 수 있다.
- (4) 이 공전에 수재된 품목 중 제조장치로부터 제조되는 식품첨가물의 경우 이들 품목의 제조장치는 전기용품 안전관리법, 산업표준화법 등 관련법령에 적합한 기계장치 또는 부품을 사용하여 제조·조립·구성되어야 하고, 생성된 최종 식품첨가물이 직접 접촉하는 부품의 재질은 식품공전 기구 및 용기, 포장의 기준·규격에 적합한 것이어야 한다.

[중량 용적 및 온도]

- (5) 도량형은 미터법에 따라 다음의 약호를 쓴다.

길이: m, dm, cm, mm, μm , nm

용량: L, mL, μL

중량: kg, g, mg, μg , ng

넓이: cm^2

1 L는 1,000 cc, 1 mL는 1 cc로 하여 시험할 수 있다.

- (6) 중량백분율을 표시할 때에는 %의 기호를 쓴다. 다만, 용액 100 ml 중의 물질 함량 (g)을 표시할 때에는 w/v%, 용액 100 mL중의 물질함량 (mL)을 표시할 때에는 v/v%의 기호를 쓴다. 중량 백만분율을 표시할 때는 ppm의 약호를 쓴다.

- (7) 온도의 표시는 셀시우스법을 쓰며 아라비아 숫자의 오른쪽 위에 °를 붙여 표시한다.
- (8) 표준온도는 20°, 상온은 15~25°, 실온은 1~35°, 미온은 30~40°로 한다. 온탕은 60~70°, 열탕은 약 100°의 물로 한다. "수욕상 또는 수욕중에서 가열한다"라 함은 따로 규정이 없는 한 그 가열온도는 약 100°로 하되, 그 대신 약 100°의 증기욕을 쓸 수 있다.
- (9) "찬 곳"이라 함은 따로 규정이 없는 한 0~15°의 장소를 말한다.

[시 험]

- (10) 초산($C_2H_4O_2$) 등과 같이 분자식을 표시한 것은 순물질을 의미한다.
- (11) 시험에 쓰는 물은 따로 규정이 없는 한, 증류수 또는 정제수로 한다.
- (12) "용액"이라 기재하고 특히 그 용제를 표시하지 아니한 것은 수용액을 말한다.
- (13) 감압은 따로 규정이 없는 한, 15 mmHg 이하로 한다.
- (14) 산성, 알칼리성 또는 중성을 볼 때에는 따로 규정이 없는 한, 청색 또는 적색 리트머스지를 쓴다. 또 "미산성", "약산성", "강산성", "미알칼리성", "약알칼리성", "강알칼리성" 등으로 기재한 것은 산성 또는 알칼리성의 정도의 개략을 표시한 것으로서 그 pH의 범위는 다음과 같다.
- | | |
|----------------|-----------------|
| 미산성: 약 5~약 6.5 | 미알칼리성 약 7.5~약 9 |
| 약산성: 약 3~약 5 | 약알칼리성 약 9~약 11 |
| 강산성: 약 3 이하 | 강알칼리성 약 11 이상 |
- (15) 용액의 농도를 "(1→5)", "(1→10)", "(1→100)" 등 1 mL를 용제에 녹여 전량을 각각 5 mL, 10 mL, 100 mL 등으로 하는 것을 표시하는 것으로서 모두 개수를 표시한다. 예를 들면, 수산화나트륨(1→5)은 수산화나트륨 1 g을 물에 녹여 5 mL로 한 것이며 희석한 염산(2→5)은 염산 2 mL에 물을 가하여 5 mL로 한 것이다.
- (16) 방울수를 측정할 때에는 20°에서 증류수 20방울을 적하할 때, 그 무게가 0.9~1.1 g 이 되는 기구를 쓴다.

- (17) 네슬러관은 안지름 20 mm, 바깥지름 24 mm, 밑에서부터 마개의 하면까지의 거리 20 cm의 무색 유리로 만든 공전평저시험관으로서 50 mL의 것을 쓴다. 각 관의 눈금 높이의 차이는 2 mm 이하로 한다.
- (18) 시험에 있어서 규정된 값 (이하 규격치라 한다)과 시험에 의해 얻은 값 (이하 실험치라 한다)을 비교하여 적부의 판정을 하는 경우에는 실험치는 규격치보다 한 자리수까지 더 구하여 더 구한 한자리수를 반올림해서 규격치와 비교판정한다. 또한, 규격치가 a~b라고 기재된 것은 a 이상 b 이하임을 뜻한다.
- (19) 원자량은 국제원자량표에 의한다 (부록). 분자량은 이 표에 의하여 계산한 다음 소수점 이하 2자리까지 정리한다.
- (20) "정밀히 단다"라 함은 규정한 양의 검체를 취하여 화학천칭으로 칭량함을 말한다. 예를 들면 "약 5 g을 정밀히 단다"라는 것은 약 5 g의 검체를 취하여 그 무게를 화학천칭으로 칭량하는 것을 말한다.
- (21) 시험은 따로 규정이 없는 한 상온에서 행하고 조작 후 30초 이내에 관찰한다. 다만, 특히 온도의 영향이 있는 것에 대하여는 표준온도에서 행한다.
- (22) 첨가물의 역가를 표시할 때에는 첨가물 해당품목에 관하여 규정된 단위를 쓴다.
- (23) 확인시험은 첨가물을 확인하는데 필요한 시험으로서 이온의 반응, 관능기의 반응, 물리정수 등에 대하여 시험한다.
- (24) 순도시험은 첨가물중의 불순물에 대한 시험으로서 보통 혼유가 예상되는 물질의 종류 및 그 양의 한도에 대하여 시험한다.
- (25) 정량시험은 첨가물의 성분함량 또는 역가를 측정하는 시험이며 첨가물 해당 품목에 관하여 규정된 성분함량 또는 역가의 한도는 정량시험에서 얻은 값의 한도를 표시하는 것으로서 특히 그 한도를 표시하지 아니한 경우에는 100.5%를 한도로 한다.
- (26) "백색"이라 기재한 것은 백색 또는 거의 백색, "무색"이라 기재한 것은 무색 또는 거의 무색임을 표시한다. 따로 규정이 없는 한 검체가 고체일 때에는 그 색상의 시험은 1~3 g을 시계접시에 취하여 백색바탕 위에서 관찰하며 검체가 액체일 때에는 그 색상 또는 징명도의 시험은 검체를 을 시계약 1.5 cm의 시험관에 취하여 액층을

약 3 cm로 하고 백색을 배경으로 하여 위 및 옆에서 관찰한다. "탁하여서는 아니 된다"라고 기재한 것은 탁도가 혼탁 이하임을 말한다.

- (27) "징명", "거의 징명", "약간 미탁", "미탁" 또는 "혼탁"이라 기재한 것은 다음의 기준에 의한다.

탁도표준원액: 0.1 N 염산 14.1 mL에 물을 가하여 50 mL로 한다. 이 액 1 mL는 Cl 1 mg을 함유한다.

탁도표준용액: 탁도표준원액 10 mL에 물을 가하여 1,000 mL로 한다. 이 액 1 mL는 Cl 0.01 mg을 함유한다.

(가) 징명

탁도표준용액 0.2 mL에 물을 가하여 20 mL로 하고, 이에 희석한 질산 (1→3) 1 mL, 2 w/v% 덱스트린용액 0.2 mL 및 2 w/v% 질산은용액 1 mL를 가하여 15분간 방치한 때의 탁도 이하로 한다. 다만, 부유물 등의 이물의 혼입이 거의 없어야 한다.

(나) 거의 징명

탁도표준용액 0.5 mL에 물을 가하여 20 mL로 하고, 이에 희석한 질산 (1→3) 1 mL, 2w/v% 덱스트린용액 0.2 mL 및 2w/v% 질산은용액 1 mL를 가하여 15분간 방치한 때의 탁도로 한다. 다만, 부유물 등의 혼입이 거의 없어야 한다.

(다) 약간 미탁

탁도표준용액 1.2 mL에 물을 가하여 20 mL로 하고, 이에 희석한 질산 (1→3) 1 mL, 2 w/v% 덱스트린용액 0.2 mL 및 2 w/v% 질산은용액 1 mL를 가하여 15분간 방치한 때의 탁도로 한다.

(라) 미탁

탁도표준용액 6 mL에 물을 가하여 20 mL로 하고, 이에 희석한 질산 (1→3) 1 mL, 2 w/v% 덱스트린용액 0.2 mL 및 2 w/v% 질산은용액 1 mL를 가하여 15분간 방치한 때의 탁도로 한다.

(마) 혼탁

탁도표준원액 0.3 mL에 물을 가하여 20 mL로 하고, 이에 희석한 질산 (1→3) 1 mL, 2 w/v% 덱스트린용액 0.2 mL 및 2 w/v% 질산은용액 1 mL를 가하여 15분간 방치한 때의 탁도로 한다.

- (28) "냄새가 없다"라고 기재한 것은 냄새가 없거나 또는 거의 없는 것을 표시하는 것이다. 냄새의 시험은 따로 규정이 없는 한, 검체 약 1 g을 증발접시에 취하여야 한다.

- (29) 확인시험은 따로 규정이 없는 한, 그 액 2~5 mL를 취하여 안지름 1~1.5 cm의 시험관에서 한다.
- (30) 용상을 볼 때에는 따로 규정이 없는 한, 검체를 용제에 넣고 30초~5분간 흔들어서 섞은 다음에 관찰한다.
- (31) 강열 또는 건조할 때 "항량이 될 때까지"라고 기재한 것은 계속 1시간 강열 또는 건조한 때에 전후의 칭량차가 화학천칭을 쓸 때에는 0.5 mg 이하, 마이크로화학천칭을 쓸 때에는 0.01 mg 이하가 될 때까지 강열 또는 건조를 계속함을 말한다. 다만, 전량이 1 g을 넘을 때에는 전후의 칭량차가 0.1% 이하이면 된다.
- (32) 정량시험에 쓰는 검체의 채취량에 "약"을 붙인 것은 기재량의 90~110%를 채취함을 말한다.
- (33) 이 규격 및 기준에 규정된 시험방법 이외의 방법으로서 그 시험방법이 보다 더 정밀할 때에는 그 방법을 사용할 수 있다. 다만, 그 결과가 의심스럽거나 판정에 영향을 미칠 수 있다고 인정할 때에는 규정한 방법에 의하여 시험하고 판정하여야 한다.

[용 기]

- (34) "밀봉용기"라 함은 취급 또는 저장하는 동안에 공기 또는 다른 가스가 침입하지 아니하도록 내용물을 보호하는 용기를 말한다.
- (35) "차광용기"라 함은 광선을 투과시키지 아니하는 용기거나 취급 또는 저장하는 동안에 내용물의 품질이 광선에 의하여 변화되지 아니하도록 보호하는 용기를 말한다. 차광하지 아니한 용기는 이에 적당한 포장을 하여 차광용기로 할 수 있다.

2. 제조 기준

- 1) 첨가물일반: 첨가물을 제조 또는 가공할 때에는, 그 제조 또는 가공에 필요불가결한 경우 이외에는 산성백토, 백도토, 벤토나이트, 탈크, 모래, 규조토, 탄산마그네슘 또는 이와 유사한 불용성의 광물성물질을 사용하여서는 아니된다.
- 2) 면류첨가알칼리제: 면류첨가알칼리제(화학적합성품에 한한다)를 제조 또는 가공할 때에는, 각각 그 성분규격에 적합한 탄산 나트륨, 탄산칼륨, 탄산수소나트륨, 인산염의 나

트립염 또는 칼륨염을 원료로 하여 이 중의 1종 또는 2종 이상을 혼합한 것 또는 이들의 수용액 또는 소맥분으로 희석한 것이어야 한다.

3) 혼합제제

(1) 혼합제제의 제조에 사용하는 첨가물은 식품첨가물 공전에 수재된 품목으로서 개별규격에 적합한 것이어야 한다. 다만, 화학적 합성품 이외의 첨가물로서 한시적 기준규격을 필한 품목은 혼합제제의 성분이 될 수 있다.

(2) 혼합제제를 제조할 때는 그 사용목적이 타당하여야 하며, 원래의 성분에 변화를 주는 제조방법이어서는 아니 된다.

(3) 혼합희석 또는 희석혼합제제에 사용하는 희석제는 전분 (가공되어 첨가물로 분류되는 것은 제외), 소맥분, 포도당, 설탕과 그 밖에 일반적으로 식품성분으로 인정되는 것이어야 한다.

(4) 혼합제제 제조시 품질안정, 형태형성을 위하여 필요불가결한 경우 산화방지제, 보존료, 유화제, 안정제, 용제 등의 첨가물을 사용할 수 있으며, 그 양은 기술적 효과를 달성하는데 필요한 최소량으로 하여야 한다.

4) 젤라틴: 젤라틴의 제조에 사용되는 우내피 등의 원료는 크롬처리 등 경화공정을 거친 것을 사용하여서는 아니된다.

5) 제조장치를 통해 제조되는 식품첨가물

(1) 제조장치를 통해 제조되는 식품첨가물은 품목별 기준 및 규격에 적합하여야 한다.

(2) 오존수 제조장치에서 배출되는 배오존의 농도는 다중이용시설 등의 실내공기질관리법 등 관련법령에서 정한 기준에 적합하여야 한다.

6) 천연첨가물의 추출용매: 천연첨가물 제조에 사용되는 추출용매는 식품첨가물공전에 수재된 것으로서 개별 규격에 적합한 것이거나 메틸알콜, 아세톤, 삼염화에틸렌, 염화메틸렌으로서 다음의 개별규격에 적합한 것이어야 한다.

3. 첨가물의 일반 사용 기준

1) 영·유아용 곡류제조식, 기타 영·유아식에는 강화제(구연산삼나트륨, 구연산철, 구연산철 암모늄, 구연산칼륨, 구연산칼슘, 글루콘산나트륨, 글루콘산철, 글루콘산칼륨, 글루콘산칼슘, 글리세로인산칼, 글리세로인산칼슘, 니코틴산, 니코틴산아미드, L-로이신, L-메티오닌, L-발린, 분말비타민A, 비오틴, 비타민B12, 비타민B1염산염, 비타민B1질산염, 비타민B2, 비타민B2인산에스테르나트륨, 비타민B6염산염, 비타민C, 비타민D2, 비타민D3, 비타민E, 비타민E초산에스테르, 비타민K1, 산화마그네슘, 산화 아연, 산화칼슘, 수산화마그네슘, L-시스틴, L-아르기닌, L-아스코르빈산나트륨, 아스코르빈산칼슘, L-아스코르빌파르미테이트, 염화마그네슘, 염화칼륨, 염화칼슘, 염화콜린, 엽산, 요오드칼륨, 유성비타민A지방산에스테르, 이노시톨, L-이소로이신, 인산, 인산철, 전해철, 젖산나트륨, 젖산철, 젖산칼슘, 제삼인산나트륨, 제삼인산마그네슘, 제삼인산칼슘, 제이인산나트륨, 제이인산마그네슘, 제이인산칼륨, 제이인산칼슘, 제일인산나트륨, 제일인산칼륨, 제일인산칼슘, L-주석산나트륨, 주석산수소콜린, β -카로틴, L-카르니틴, 타우린, 탄산나트륨, 탄산마그네슘, 탄산수소나트륨, 탄산수소칼륨, 탄산칼슘, L-티로신, L-트레오닌, L-트립토판, 판토텐산칼슘, L-페닐알라닌, 푸마르산제일철, 피로인산제일철, 피로인산철나트륨, 황산나트륨, 황산동, 황산마그네슘, 황산망간, 황산아연, 황산제일철, 황산칼슘, L-히스티딘, 염화망간, 구연산망간), 카제인, 카제인나트륨, 염화마그네슘, 구아검, 로커스트콩검, 카라기난, 락토페린농축물, 레시틴, 글리세린지방산에스테르, 탄산수소나트륨, 탄산나트륨, 구연산삼나트륨, 구연산, 젖산, L-아스코르빌파르미테이트, 뮤신, 바닐라추출물, 에틸바닐린, 바닐린, 전분질 분해효소, 단백질분해효소(식물성), 제이인산칼륨, 아라비아검, 젤라틴, 헴철, 변성전분, d-토코페롤 (혼합형) 이외의 첨가물을 사용하여서는 아니 된다.

2) 조제유류, 영아용 조제식, 성장기용 조제식에는 강화제(상기 영·유아용 곡류제조식, 기타 영·유아식에서 규정된 품목 및 5'-구아닐산이나트륨, 글루콘산동, 글루콘산망간, 글루콘산아연, 5'-리보뉴클레오티드이나트륨, 5'-리보뉴클레오티드칼슘, 5'-시티딜산이나트륨, 5'-우리딜산이나트륨, 5'-이노신산이나트륨, 이노시톨, 5'-아데닐산, 5'-시티딜산), 구아검, 바닐린, 구연산, 구연산삼나트륨, 구연산칼륨, 글리세린 지방산에스테르, 레시틴, 로커스트콩검, 변성전분(인산이전분, 아세틸인산이전분, 인산화인 산이전분, 히드록시프로필전분, 아세틸아디핀산이전분, 옥테닐호박산나트륨전분), 락토페린 농축물, 리소짐, 뮤신, L-아스코르빈산나트륨, 아스코르빈산칼슘, L-아스코르빌 파르미테이트, 비타민C, 비타민E, 수산화칼슘, 에틸바닐린, 젖산, 카라기난, 탄산나트륨, 탄산수소나트륨, 탄산수소칼륨, 탄산칼륨(무수), d-토코페롤(혼합형), 펙틴 이외의 첨가물을 사용하여서는 아니 된다.

3) 첨가물은 식품제조 가공과정 중 결함 있는 원재료나 비위생적인 제조방법을 은폐하기 위하여 사용되어서는 아니 된다.

- 4) 식품 중에 첨가되는 첨가물의 양은 물리적, 영양적, 기타 기술적 효과를 달성하는데 필요한 최소량으로 제한 사용하여야 한다.
- 5) 대외무역관리규정에 의한 외화획득용 원료 및 제품(주식회사 한국관광용품센터에서 수입하는 식품), 관세법 143조의 규정에 의하여 세관장의 허가를 받아 외국으로 왕래하는 선박 또는 항공기안에서 소비 되는 식품 및 선천성대사 이상질환자용 식품을 제조·가공·수입함에 있어 사용되는 첨가물은 식품위생법 제6조 및 이 규격기준의 적용을 받지 아니할 수 있다.
- 6) 별도의 규정이 없는 한 혼합제제의 용도 및 사용량은 개별성분에서 정해진 사용기준에 적합하게 사용하여야 한다.

카. 결론

- 기존 기능성음료시장은 포화상태지만, 현대인들의 생활방식과 식생활 변화, 질병 형태 다양화 등 여러 사회적 여건이 변화되고 있는데 기인하여, 현대인의 건강에 대한 관심의 증대는 음료시장의 쾌속성장과 틈새 수요를 지속적으로 창출하고 있음.
- 최근에는 체지방 분해 기능이 있는 수용성 식이섬유, 타우린 등을 첨가한 다이어트 음료, 콜라겐 성분 및 코엔자임 Q10 성분을 함유한 노화 방지 음료, 피부에 좋은 과일을 주성분으로 한 피부 관리 음료 등이 2, 30대 여성 음료 시장에서 인기를 끌고 있음.
- 기존의 위, 장, 뼈 기능 개선 음료 등은 물론 혈압 강하 음료, 신장 기능 개선 음료, 당뇨병 예방 음료 등 특수 건강 음료의 출시가 늘고 있고, 기존의 음료에 건강 강화 성분을 넣은 리뉴얼 음료 출시 역시 증가해 건강 기능 음료 시장이 확대되고 있는 추세임.
- 최근 신선한 야채를 섭취하려는 사람들의 욕구가 늘어났고, 건강지향 추세에 맞춰 대기업들이 적극적으로 상품개발 · 투입에 들어가 소비자의 선택사항이 늘어나 시장은 급격히 확대되었으며, 소비자가 야채의 중요성을 계속 인식하고 있으므로 향후도 건강관련 상품시장은 확대될 전망이다.
- Quercetin 관련 물질은 일반적으로 우리가 섭취하는 양과의 가식부위에 비해 비가식 껍질 부위에 77배 이상으로 훨씬 높게 함유되어 있으나 이는 대부분 폐기되고 있는 실정이므로 그 활용방안을 모색하고자 함.
- Flavonol의 농도가 양과의 안쪽 조직보다 껍질이나 잎 부분으로 갈수록 더 높아져서 quercetin을 포함한 flavonol의 농도는 양과육질 및 양과즙 중에는 100 mg/kg, 양과껍질에는 순무게의 6.5%에 이르므로 이들을 이용한 발효음료개발은 경제적으로나 사회적으로 매우 의미 있는 연구가 될 것으로 사료됨.

- 조사결과 양파음료에 대한 인지도가 매우 낮은 것으로 나타났고 양파음료를 접하게 될 경우 구매하지 않겠다고 응답한 소비자들이 많은 것으로 보아 양파의 특유한 향과 맛으로 인한 거부감이 음료를 기피하게 되는 요인으로 작용하는 것으로 보임.
- 하지만 발효양파음료와 홍삼음료를 혼합한 음료에 대한 인식은 그다지 나쁘지 않은 것으로 나타나 향후 제품개발 concept로 활용하고자 함.
- 성공적인 양파음료의 출시를 위해서는 양파음료에 대한 기능성을 최대한 부각시키고, 양파에 대한 강한 편견 이미지를 완화시키고자 하며, 무엇보다 홍삼음료 등과의 혼합을 통해 소비자의 기호성을 최대한 고려한 제품 concept를 개발하고자 함.

2. 발효양파음료의 개발

가. 양파발효음료 제조

(1) 실험재료 및 사용 균주

유산균은 Lactobacilli MRS(Difco, Detroit, MI, USA)에 1%(w/v) cysteine-HCl과 0.1%(w/v) resazurin을 첨가한 배지(이하 MRS배지)를 사용하여 37℃에서 혐기적 조건으로 하룻밤 배양시켜 액체 배지에 옮겨 사용하였다. 유산균의 배양에는 MRS 배지(Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였다. 본 연구에 사용된 유산발효양파음료는 1차년도 연구결과에 의해 최종 선정된 유산균(*Pediococcus pentosaceus* KC-007)으로 발효한 양파액(무안산 양파), 사과즙(CJ Food Inc., Incheon, Korea), 올리고당(CJ Food Inc., Incheon, Korea), β -cyclodextrin(BK Bio Co., Ltd., Seongnam, Korea), 액상 과당(CJ Food Inc., Incheon, Korea), 사과향(JEY'S F.I. Inc., Seongnam, Korea)을 사용하여 제조하였다.

양파식초를 생산하기 위한 삼각플라스크 배양은 살균한 양파즙에 전배양한 초산균이 3%(v/v)가 되도록 접종하여 500 mL의 Erlenmeyer flask에 working volume이 150 mL와 300 mL가 되도록 30℃에서 150 rpm의 속도로 진탕배양하였다. 2단계 초산배양은 양파를 효모로 알코올발효한 여액의 알코올함량을 최적의 초기 알코올농도인 4%(v/v)로 조절 한 후 종초 3%(v/v)를 접종하여 배양하였다. 초산발효양파음료는 1차년도 연구결과에 의해 최종 선정된 초산균(*Acetobacter tropicalis* No. 22)으로 발효한 양파액을 예비실험을 통하여 정제수 4배로 희석하고 사과향을 첨가하여 1차 배합비를 선정하였다. 또한 발효양파·홍삼 혼합음료의 개발을 위해 예비실험을 통하여 0.7%(v/v)의 홍삼엑기스를 앞서 언급한 유산발효액에 첨가한 후 음료를 제조함으로써 1차 배합비를 선정하였다.

(2) 발효양파음료 제조 공정

유산발효양파음료의 전체적인 제조공정은 Fig. 4-8과 같다. 먼저 무안산 양파를 구입하

여 껍질을 벗긴 후 세척, 절단한 후 녹즙기로 양파를 착즙하여 통과된 착즙액을 121℃에서 10분 가열처리시킨 다음 불용성 물질을 제거하기 위하여 30분간 원심분리(10,000×g, 4℃)를 하였다. 원심분리 후 용액 중 상등액만을 취하여 121℃에서 15분간 살균한 후, 4℃ 냉장고에 보관하였다. *P. pentosaceus* KC-007을 MRS 액체배지에서 1 백금이를 접종시켜 37℃ 인큐베이터에서 24시간 배양시키고, 24시간 배양시킨 KC-007 배양액을 다른 MRS배지에 2%(v/v)가 되도록 옮겨 7시간 배양시켰다. 미리 만들어 놓은 양파즙에 2%(v/v)가 되도록 접종시켜 18시간 동안 37℃ 인큐베이터에서 배양시켰다. 18시간 후 더 이상 발효가 일어나지 않도록 4℃ 냉장고에서 보관하였다. 일정 비율의 양파액을 만들기 위해 100% 발효 양파액을 물로 희석시킨 후 이취 제거를 위해 β-cyclodextrin을 용해시켰고 β-cyclodextrin을 다 녹인 뒤 일정 비율의 사과즙을 넣고 마그네틱 바로 잘 섞은 후, 액상과당, 올리고당, 구연산을 넣었다. 잘 안 녹을 경우 온도를 올려 녹인 후 다시 냉장고에 넣어 차가운 상태로 만들었다. 잘 섞인 용액에 마지막으로 사과향을 첨가하여 4℃ 냉장고에서 하룻밤 숙성시켰다.

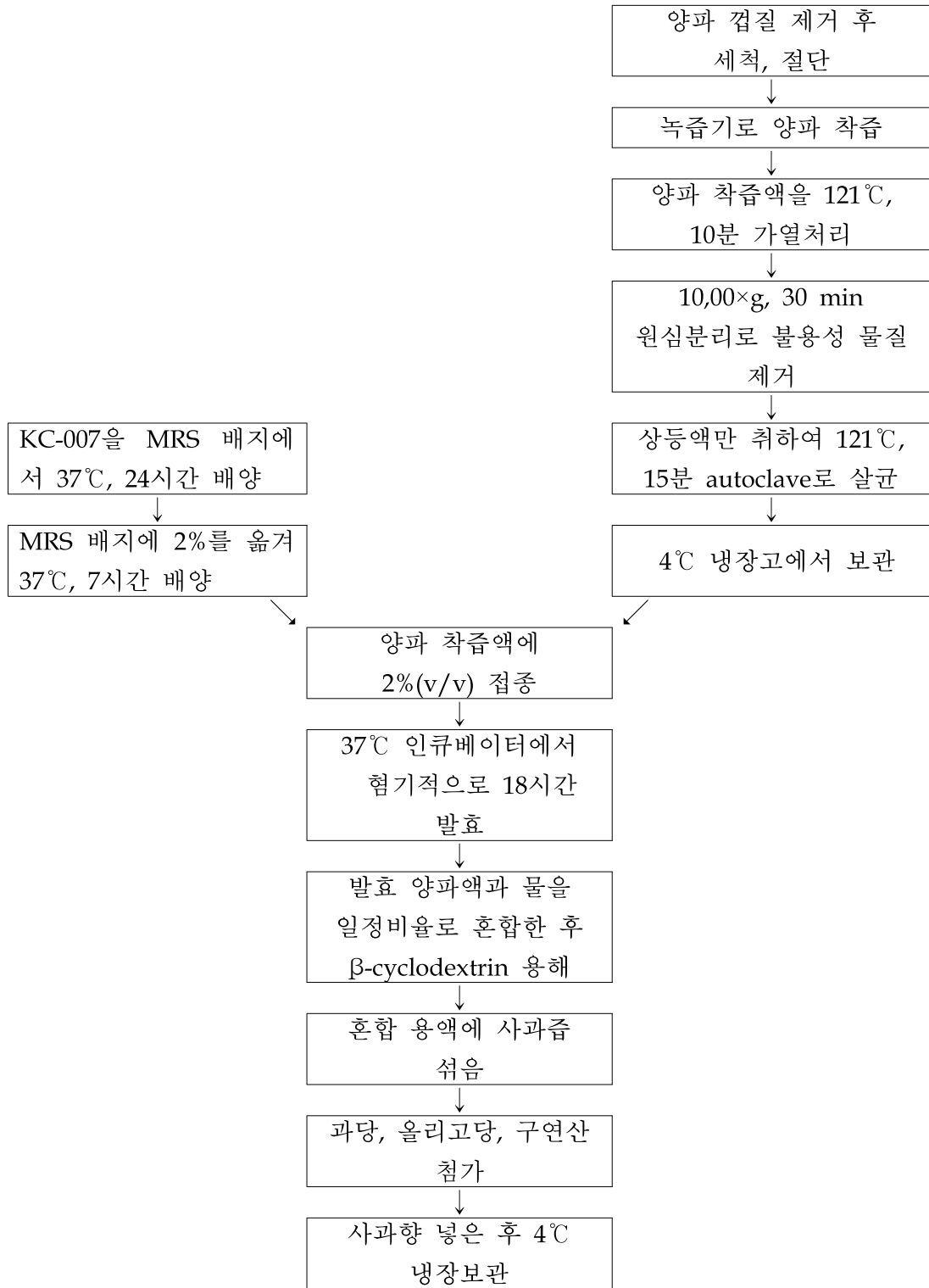


Fig. 4-8. Manufacturing process for lactic acid fermented onion juice.

나. 최적 배합비 확립

(1) 소비자 검사 목적

양과의 경우는 다른 야채와 달리 특유의 향과 맛으로 인한 거부감이 음료를 기피하게 만드는 요인으로 작용하기 때문에 향과 맛을 억제하면서 기호도를 가지도록 만드는 것이 중요하다. 본 연구에서는 소비자 기호도가 높은 양과발효음료의 제조를 위해 배합비 전개 시험(양과발효액의 함량 결정, 음료 base의 종류 및 함량 결정, 향의 종류 및 함량 결정, 감미료, 점증제 등 기타 첨가물의 함량 결정)과 기호도 조사를 병행하면서 수행되었다.

(2) 1차 소비자 기호도 검사 및 강도 평가

패널 대상은 이화여자대학교 20~30대 대학원생·대학생 50명으로 하였다. 소비자 검사의 패널은 이화여자대학교 신공학관에 있는 대학원생과 식품공학과 학부생들에게 전화를 걸어 모집하였으며, 실험에 참여한 사람들에게는 소정의 보상을 하여 소비자 검사의 참여를 유도하였다. 발효양과음료에서 발효 양과액과 사과즙의 양을 정하기 위하여 액상과당 2%, β -cyclodextrin 1.40%, 올리고당 0.9%, 사과향 0.15%를 사용하여 발효 양과액과 사과즙의 양만을 다른 비율로 첨가한 5가지 시료를 준비하였다.

실험 전날 시료를 제조하여 4°C 냉장고에서 보관하였고, 실험 5분전 냉장고에서 꺼내 검사 직전에 일회용 플라스틱 용기(직경 4.5 cm, 높이 5.5 cm)에 약 30 mL씩 담아 평가 시 온도가 $5.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 되도록 하였다. 각 시료의 용기에는 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였고, 제시 순서는 Microsoft Office Excel 2007(Microsoft Inc., USA)을 이용하여 무작위적으로 제시하였다. 시료와 시료 사이에 입을 행굴 수 있도록 정수된 물($20 \pm 2^\circ\text{C}$)과 빨는 컵을 함께 제공하여 시료를 평가하기 전에 시료의 강한 특성에 따른 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄이기 위해, 2~3번 정도 충분한 입 행굴을 하도록 하였다.

평가는 소비자 패널과 1:1 면접 방식으로 실시하였으며, 전반적인 기호도, 단맛의 정도, 사과 향미의 정도, 양과 향미의 정도 순으로 평가하게 하였다. 전반적인 기호도는 15점 척도의 rank-rating scale를 사용하여 1점은 '매우 좋지 않다', 15점은 '매우 좋다'로 평가하였다. 단맛의 정도와 사과 향미의 정도, 양과 향미의 정도는 11점 척도의 just about right scale을 사용하였으며 각 항목의 특성강도가 적당한 것은 척도 중간의 just about right로 특성 강도가 약한 것을 much too weak로, 특성 강도가 강한 것을 much too strong으로 평가하였다(Fig. 4-9). 먼저 전반적인 기호도 평가에서는 입행굴을 하면서 세 가지 시료를 다 맛본 후, 전반적인 기호도가 높은 순으로 점수를 매겨 해당하는 칸에 시료의 번호를 적도록 하였으며, 한 칸에 하나의 시료 번호만을 쓰도록 하였다. 전반적인 기호도를 평가한 후 5분 정도 휴식 시간을 갖고 다음의 3가지 항목에 대해 평가하도록

하였는데, 제시되는 시료를 왼쪽의 시료부터 평가하도록 하였으며, 한 시료에 대한 단맛의 정도, 사과 향미의 정도, 양파 향미의 정도를 한 번에 평가하는 Monadic 평가 절차를 사용하였다.

날짜 : _____													이름 : _____	
1. 먼저 물로 입을 가신 후, 시료들을 왼쪽부터 차례대로 맛보면서 (시료사이에 입가심 O) 2. 전반적인 기호도를 Rank-rating 하시오. 3. 랭킹한 후에 기호도를 고려하여 점수를 주시오. 4. 다시 맛보는 것은 가능하며, 맛을 본 후 점수를 바꾸는 것 또한 가능합니다.														
Dislike very much													Like very much	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

날짜 : _____										이름 : _____				
※ 시료를 <u>왼쪽부터</u> 차례대로 맛보면서 다음 질문을 평가하십시오.														
시료번호 : <input style="width: 100px; height: 20px;" type="text"/>														
1. 먼저 입을 가신 후, <u>단맛의 정도</u> 를 평가하십시오.														
Much Too Weak			Just About Right						Much too strong					
2. 먼저 입을 가신 후, <u>사과 향미의 정도</u> 를 평가하십시오.														
Much Too Weak			Just About Right						Much too strong					
3. 먼저 입을 가신 후, <u>양파 향미의 정도</u> 를 평가하십시오.														
Much Too Weak			Just About Right						Much too strong					

Fig 4-9. Consumer acceptance test sheet.

(3) 2차 소비자 기호도 검사

패널 대상은 이화여자대학교 20~30대 대학원생·대학생 50명으로 하였다. 소비자 검사의 패널은 이화여자대학교 생활환경관 내에 지나가는 사람들과의 접촉을 통하여 모집하였으며, 마찬가지로 실험에 참여한 사람들에게는 소정의 보상을 하여 소비자 검사의 참여를 유도하였다. 이 단계에서는 발효 양과액과 구연산의 함유량을 결정하기 위하여 사과즙 27%, 액상과당 2.8%, β -cyclodextrin 1.86%, 올리고당 0.9%, 사과향 0.20%로 고정된 뒤, 발효 양과액의 첨가 비율을 다르게 하여 각각 4가지의 시료를 준비하였다.

실험 전날 시료를 제조하여, 4°C 냉장고에서 보관하였고, 실험 1시간 전 냉장고에서 꺼내 얼음을 담은 아이스박스에 보관하면서, 검사 직전에 일회용 플라스틱 용기(직경 4.5 cm, 높이 5.5 cm)에 약 30 mL씩 담아 평가 시 온도가 $5.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 되도록 하였다. 각 시료의 용기에는 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였고, 제시 순서는 Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Inc., USA) 이용하여 무작위적으로 제시하였다. 시료와 시료 사이에 입을 헹굴 수 있도록 정수된 물($20 \pm 2^\circ\text{C}$)과 빨는 컵을 함께 제공하여 시료를 평가하기 전에 시료의 강한 특성에 따른 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄이기 위해, 2~3번 정도 충분한 입 헹굼을 하도록 하였다. 입 헹굼을 하면서 네 가지 시료를 다 맛본 후, 전반적인 기호도가 높은 순으로 점수를 매겨 해당하는 칸에 시료의 번호를 적도록 하였으며, 한 칸에 하나의 시료 번호만을 쓰도록 하였다. 평가는 소비자 패널과 1:1 면접 방식으로 실시하였으며, 전반적인 기호도를 평가하게 하였다. 전반적인 기호도는 15점 척도의 Rank-rating scale를 사용하여 1점은 '매우 좋지 않다', 15점은 '매우 좋다'로 평가하였다.

(4) 3차 소비자 기호도 검사

패널 대상은 이화여자대학교 20~30대 대학원생과 대학생 50명으로 하였다. 소비자 검사의 패널은 이화여자대학교 ECC 내에 지나가는 사람들과의 접촉을 통하여 모집하였으며, 마찬가지로 실험에 참여한 사람들에게는 소정의 보상을 하여 소비자 검사의 참여를 유도하였다. 발효 양과 음료 중에서 액상과당의 함유량을 결정하기 위하여 발효 양과액 27%, 사과즙 27%, β -cyclodextrin 1.86%, 올리고당 0.9%, 사과향 0.20%, 구연산 0.09%로 고정된 뒤, 액상과당 첨가 비율을 다르게 하여 각각 3가지의 시료를 준비하였다. 평가 절차는 2차 소비자 기호도 검사와 동일하다.

(5) 통계 분석

시료간의 전반적인 기호도에 대한 유의적 차이를 검증하기 위하여 분산 분석(analysis of variance, ANOVA)을 수행하였으며, 그 결과에 따라 Duncan's multiple range test($\alpha = 0.05$)를 수행하였다. 단맛의 정도, 사과 향미의 정도, 양과 향미의 정도는 just about

right는 0점으로, much too weak는 -5점, much too strong은 +5점으로 환산하여 시료간의 평균값을 계산하였다. 통계 분석에는 SPSS for Windows 14.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

(6) 소비자 검사결과

(가) 1차 소비자 검사 및 강도 평가 결과

발효 양과원액의 매운맛과 양과 특유의 숙성된 양과향을 제거하고 음료의 맛을 부드럽게 하기 위해서 β -cyclodextrin을 발효 양과 원액에 녹였다. β -Cyclodextrin은 포집 화합물을 형성함으로써 탈취, 냄새 은폐, 이미 제거, 용해도 개선, 향미의 안정화 등의 작용을 한다고 알려져 있으며, 여러 논문에서는 β -cyclodextrin에는 양과 냄새 제거에 탁월한 효과가 있다고 나타내었다. 단맛의 경우 설탕 대신 액상과당을 사용한 것은 좀 더 풍부하고 부드러운 감미를 주기 위해서이며, 액상과당은 특히 미생물에 대한 우수한 안정성을 가지고 있어 각종 음료 및 주류제품에 다량 사용되고 있기 때문이다.

예비 실험을 통해 소비자들이 거부감 없이 받아들일 수 있는 발효 양과액의 첨가량이 27% 이하인 것을 알 수 있었다. β -Cyclodextrin의 양과에 대한 이취제거 효과를 알아보기 위해 예비 실험을 하였다. β -Cyclodextrin을 0.0~2.0%까지 0.2% 간격으로 발효 양과액에 넣어 측정해 본 결과, 1.40% 이상이 되었을 때부터 소비자들은 발효 양과액의 냄새가 감소되었다는 것을 감지할 수 있었다. 양과 착즙액을 27%이하로 하고, 사과즙의 비율을 다르게 하여 예비실험을 실행하였고, 예비실험에서 기호도가 높았던 시료 5가지를 선정하여 소비자에게 제공하였다(Table 4-29).

단맛의 정도, 사과향미의 정도, 양과 향미의 정도는 11점 척도의 Just about right scale로 평가하였고, 종합적 기호도는 15점 척도를 사용하여 평가하게 하였으며 그 결과를 분산 분석으로 처리하여 유의성을 검증하였다. Table 4-2와 같이 종합적인 기호도는 $\alpha=0.05$ 수준에서 유의적으로 차이가 나타났으며, 종합적 기호도는 T-2, T-5, T-4, T-1, T-3 순이었다. 사과즙의 양이 27%로 동일한 T-2, T-4, T-5는 유의적 차이가 없었지만, 사과즙의 양이 18%인 T-1, T-3 와는 유의적인 차이를 보였다. 발효 양과액이 14%인 것과 27%인 것이 유의적 차이가 없는 것으로 보아 발효 양과액의 양은 기호도에는 큰 영향을 미치지 않고, 사과즙의 양에 따라 소비자의 선호도 차이가 있음을 알 수 있었다.

강도 평가에서는 전체적으로 단맛의 정도와 사과향미의 정도가 약한 것으로 나타났다(Table 4-30). 전체 기호도가 낮았던 T-1과 T-3을 살펴보면, 사과 향미와 단맛 둘 다 낮은 것으로 나왔다. 양과향미의 경우는 강한 쪽이 약한 쪽보다 기호도가 높았기 때문에 발효 양과액의 비율은 20%이상인 것이 적당하다고 생각한다. 조사결과 소비자들은 발효 양과 착즙액이 20% 이상인 것, 사과즙은 27%를 적당하다고 생각하는 것을 알 수 있었다. 또,

기타의견을 통해 양파의 맛은 약하게 느껴지지만 냄새가 너무 강하게 느껴진다는 것을 알 수 있었다. 첫 번째 조사결과 2번째 소비자 기호도 검사에서는 사과 향미와 단맛을 늘리고, 양파의 경우 양은 줄이지 않고 냄새만 약하게 하는 방향으로 보완하도록 하였다.

Table 4-29. Recipe of fermented onion juice

Number	Onion (%)	Apple (%)	HFCS (%)	β-Cyclodextrin (%)	Oligosaccharide (%)	Apple flavor (%)	Water (%)
T-1	14	18	2	1.40	0.9	0.15	63.55
T-2	14	27	2	1.40	0.9	0.15	54.55
T-3	20	18	2	1.40	0.9	0.15	57.55
T-4	20	27	2	1.40	0.9	0.15	48.55
T-5	27	27	2	1.40	0.9	0.15	42.55

Table 4-30. Overall liking scores and JAR scale ratings for fermented onion juice

Samples	Attributes	Overall liking	Sweetness	Apple flavor	Onion flavor
T-1		5.63 ^b	-2.13	-1.65	-1.15
T-2		8.09 ^a	-1.06	-0.41	-0.43
T-3		5.09 ^b	-1.57	-1.54	0.46
T-4		6.98 ^a	-1.02	-0.8	-0.26
T-5		7.31 ^a	-0.96	-0.93	0.80

Mean scores of 50 consumers. Values within a row not sharing a superscript letter are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

(나) 2차 소비자 검사 결과

1차 소비자 검사의 결점들을 보완하여 2차 소비자 검사를 진행하였다. 2차 검사에서는 양파 특유의 냄새를 억제시키기 위해 β-cyclodextrin의 함량을 늘리고, 사과향미와 단맛을 높이기 위해 사과향과 HFCS(high fructose corn syrup)의 함량도 늘렸다. 또, 음료의 맛

맛함을 없애고 상큼함을 부여하기 위해 구연산을 첨가하였다. 구연산은 식품의 맛과 향 유지에 효과가 있으며, 음료에 들어가면 청량감과 상큼함을 부여해 음료수나 과일 관련 가공식품을 만드는데 많이 이용되고 있다. 특히, 피로회복과 피부미용에 효과가 있다고 알려지면서 여성을 타겟으로 한 미용음료에 많이 사용되고 있다.

구연산의 함량은 예비 실험을 통해 소비자들의 기호도가 높으면서 차이를 느낀 0.05%와 0.09%로 정하였다. 양과 착즙액은 각각 20%, 27%로 하고, 나머지 재료들의 함량은 사과즙 27%, 액상과당 2.8%, β -cyclodextrin 1.86%, 올리고당 0.9%, 사과향 0.2%로 고정하여 Table 4-31과 같이 4가지 시료를 소비자에게 제공하였다. 2차 발효 양과음료 기호도 검사 결과 소비자의 전체적인 기호도 평균값은 올라갔다(Table 4-32). 기호도의 평균값이 가장 높았던 시료는 S-4였지만, S-1, S-2 및 S-3 시료와는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 이 실험을 통해 소비자들이 양과즙의 함량에 따른 기호도의 차이는 없다는 것을 알 수 있었다. 그래서 기능성을 높이기 위해 발효 양과액 함량이 높은 쪽을 선택하기로 하였으며, 발효 양과액 함량이 27%일 때, 구연산이 0.09%인 것이 적합하다고 생각되어 이 값으로 고정하기로 하였다. 기타 의견을 통해 단맛이 아직 약한 것으로 판단되어 단맛을 조금 더 올려 3차 실험을 수행하였다.

Table 4-31. The second recipe of fermented onion juice

Number	Onion (%)	Apple (%)	HFCS (%)	β -Cyclodextrin (%)	Oligosaccharide (%)	Apple flavor (%)	Citric acid (%)	Water (%)
S-1	20	27	2.8	1.86	0.9	0.2	0.05	47.19
S-2	20	27	2.8	1.86	0.9	0.2	0.09	47.15
S-3	27	27	2.8	1.86	0.9	0.2	0.05	40.19
S-4	27	27	2.8	1.86	0.9	0.2	0.09	40.15

Table 4-32. The second overall liking scores for fermented onion juice

Sample	S-1	S-2	S-3	S-4
Score	8.72 ^a	7.98 ^a	8.58 ^a	9.02 ^a

Mean scores of 50 consumers. Values within a row not sharing a superscript letter are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

(다) 3차 소비자 검사 결과

Table 4-33과 같이 다른 재료의 비율은 동일하게 하고 액상과당의 비율만 각각 2.8%, 3.7%, 4.6%로 다르게 하여 액상과당의 차이에 따른 발효 양과 음료의 기호도를 알아보도록 하였다. 3차 발효 양과음료 소비자 검사 결과 기호도 평균값은 액상과당을 3.7%넣은 T-2시료가 다른 시료들에 비해 높았으며, 3가지 시료 모두 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 4-34). 시료간의 뚜렷이 유의적인 차이가 나는 이유는 액상 과당의 함량을 적은 경우 상대적으로 구연산이 강하게 느껴져 음료가 전체적으로 신맛이 강해지고, 액상과당의 함량이 많은 경우는 상대적으로 구연산 맛이 약하게 느껴져 음료가 단맛만 강하게 느껴졌기 때문에 기호도 점수에서 차이가 나는 것으로 생각된다. 1~3차 소비자 검사 결과를 살펴보면 소비자 기호도는 단맛이 강해질수록 기호도가 올라가는 것으로 보였지만, 단맛이 어느 정도 이상이 되면 소비자들의 기호도가 낮아지는 것을 알 수 있었다. 전체적인 기호도가 가장 높았던 시료는 P-2였으며, 배합비는 발효 양과액 27%, 사과즙 27%, HFCS 3.7%, β -cyclodextrin 1.86%, 올리고당 0.9%, 사과향 0.2%, 구연산 0.09%였다.

식품 공전상의 발효음료의 규격이 유산균수 또는 효모수 1 mL당 1,000,000 이상이다. 예비 실험에서 양과 착즙액을 20%로 희석시켜 발효시켰을 때 유산균수가 10^7 이었으며, β -cyclodextrin을 첨가하여 발효 시켰을 경우 유산균수가 10^9 까지 증가하였다. 예비 실험의 결과를 비추어볼 때, 양과 착즙액을 27%로 희석시키고, β -cyclodextrin을 첨가한다면 상업적으로 적합한 유산균수인 10^8 이상 존재하는 발효 양과 음료 제조가 가능할 것으로 생각된다.

Table 4-33. The third recipe of fermented onion juice

Number	Onion (%)	Apple (%)	HFCS (%)	β -Cyclodextrin (%)	Oligosaccharide (%)	Apple flavor (%)	Citric acid (%)	Water (%)
P-1	27	27	2.8	1.86	0.9	0.2	0.09	40.15
P-2	27	27	3.7	1.86	0.9	0.2	0.09	39.25
P-3	27	27	4.6	1.86	0.9	0.2	0.09	38.35

Table 4-34. The third overall liking scores for fermented onion juice

Sample	P-1	P-2	P-3
Score	8.04 ^c	11.14 ^b	5.38 ^a

Mean scores of 50 consumers. Values within a row not sharing a superscript letter are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

다. 최종 선정된 발효양과음료의 일반성분 및 제품특성

(1) 분석 및 측정 방법

(가) 탄수화물(환원당)

환원당을 측정하는 방법에는 DNS법, Somogyi법 등 여러 가지 방법이 있으나 이 실험에서는 Somogyi법을 변형한 방법을 사용하였다. 원심분리하여 얻은 양과음료 500 μ L에 alkaline copper 0.4 mL를 첨가하여 100°C에서 10분간 끓인 후, 잘 식혀준 후 0.4 mL Nelson 용액과 증류수 2.6 mL를 첨가하여 520 nm spectrophotometer로 측정하였다.

(나) 수분함량

IR moisture meter 를 이용하여 수분함량을 측정하였다. 물의 끓는점보다 높은 105°C에서 건조시켜 증발된 수분의 함량을 구하였다.

(다) 조단백질 함량

가장 일반적으로 많이 사용되는 Kjeldahl법을 이용하여 측정하였다. 먼저 시료 2 mL와 촉매제를 넣고 진한 황산 15 mL를 넣어주었다. 420°C에서 2시간 정도 가열하고 냉각시킨 다음 증류수를 60 mL 넣고 혼합지시약을 첨가한 플라스크에 증류액을 모은 후 0.1 N HCl로 적정하여 소비된 HCl의 함량을 다음 식에 의해 조단백질 함량을 구하였다.

$$\text{Nitrogen}(\%) = \frac{(T - B) \times 14.007 \times F \times 100}{\text{sample weight}}$$

T: 시료분석에 사용된 적정액의 용량(mL)

B: 공시험에 사용된 적정액의 용량(mL)

N: 적정액의 노르말 농도

F: 0.1N HCl 표준용액의 역가

$$\% \text{Protein} = N \times 6.25$$

N: 단백질의 질소환산계수

(라) 조지방 함량

Soxhlet 추출법을 이용하여 조지방의 함량을 구하였다. 먼저 발효양과음료를 건조시킨 다음 1 g을 원통여과지에 넣고 마개를 탈지면으로 막아주었다. Ether를 165 mL 넣어 주고, 기계를 작동시켰다. 3시간 추출한 후, ether를 잘 증발 시킨 후, 무게를 측정하여 다음 식에 의해 조지방 함량을 구하였다.

$$\text{조지방 (\%)} = \frac{w_1 - w_0}{\text{시료의 채취량}} \times 100$$

W1 : 지방 추출 후 건조한 수기의 중량

W0 : 수증기의 중량

(마) 점도 및 pH의 측정

회전식 점도계(Brookfield, LVDV-II+Pro) 및 pH meter(ISTEK, pH-200L)를 이용하여 양과발효음료 제품의 점도 및 pH를 측정하였다.

(2) 분석 및 측정 결과

(가) 탄수화물(환원당)

유산발효양과음료 100 μL 를 200배 희석한 후 500 μL 를 취한 다음 520 nm의 파장에서 측정한 흡광도 값은 0.607이 나왔고, 그에 따른 glucose 함량은 미리 준비된 표준곡선 (Fig. 4-10)을 이용하여 79.6 μmol (2.60%에 해당)로 측정되었다. 사과즙, 올리고당, 액상과당 등 발효양과음료 제조시 당 성분 함량이 높은 재료들이 사용되었기 때문에 기타 일반 성분에 비해서 함량이 높게 나타난 것으로 보여진다.

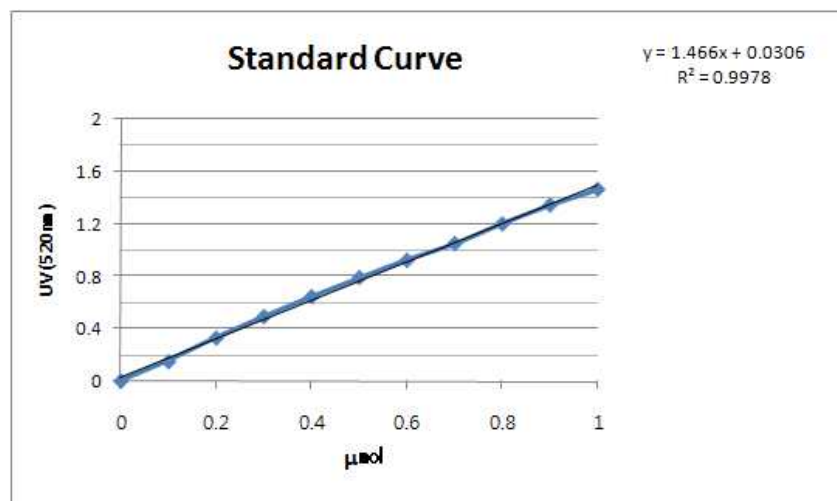


Fig 4-10. Standard curve for determining content of carbohydrate.

(나) 수분 함량

IR moisture meter로 측정 시 수분함량이 높아 1시간 이상 측정할 경우 오류가 생길 수 있어 적은 양의 시료로 수분함량을 측정하였다. 그 결과 발효양파음료의 수분함량은 88.9%로 측정되었다.

(다) 조단백질 함량

일반적으로 단백질을 구성하는 질소의 비율은 약 16% 정도이다. 이 비율은 식품 단백질의 종류에 따라 약간씩 다르지만 거의 비슷하다. 그러므로 식품중의 단백질을 정량할 때에는 이와 같은 단백질의 특징을 이용, 식품중의 질소 양을 측정하고, 그 값에 질소계수 6.25(=100/16)를 곱하여 단백질 양을 산출한다. 그러나 식품에 존재하는 질소가 모두 단백질을 구성하는 것이 아니고, 단백질이 아닌 질소화합물(amide 화합물, 암모니아 화합물, purine 염기, creatine 등)도 구성하기 때문에 식품에 존재하는 전체 질소를 정량하고, 여기에 질소계수를 곱하여 얻은 단백질 양은 조단백질(crude protein) 양이라고 한다.

질소 정량법으로는 여러 가지 방법이 있지만 Kjeldahl 법이 가장 널리 이용되고 있어 이 방법으로 조단백질의 함량을 측정하였다. Blank시료로는 증류수를 사용하였고, Blank와 발효양파음료의 HCl 적정량은 0.5 mL로 동일하였다. 따라서 발효양파음료의 조단백질 함유량은 0%로 측정되었다.

(라) 조지방 함량

지방질은 물에 녹지 않고 에테르(ether), 클로로포름(chloroform), 아세톤(acetone), 벤젠(benzene), 헥산(hexane), 알코올(alcohol)등의 유기용매에 녹는 화합물이다. 식품 중의 지방질의 함량은 일반적으로 에테르(ether) 추출로 정량한다. 그러나 실제로 에테르(ether)에 녹아 추출되는 것은 순수한 지방만이 아니고 유기산, 알코올, wax, 색소(Chlorophyll, Carotenoid, flavonoid), 지용성 비타민(A, D, E, K) 등이 포함된다. 그러나 phospholipid 및 lipoprotein 등은 추출되지 않는다. 실제로 추출된 지방 외 추출물의 양은 경미하다. 따라서 이 방법으로 정량된 지방질을 조지방(crude fat) 또는 에테르 추출물(ether extract)이라고 한다. Soxhlet법을 이용하여 유산발효양파음료의 조지방 함량을 측정할 결과 다음과 같이 2.04%로 계산되었다.

$$\text{조지방(\%)} = \frac{101.4213 - 101.4009}{1} \times 100 = 2.04(\%)$$

(마) 점도 및 pH

Brookfield 점도계를 이용하여 최종 선정된 제품에 대한 유체특성과 점도를 측정해 본 결과 Newtonian 유체의 특성을 가지면서 점도는 0.03 Pa·s로 측정되었고, pH는 6.5로 측정되었다.

Table 4-35. 발효양과음료의 일반성분 및 제품특성

일반성분					제품특성	
수분	탄수화물	단백질	지방	기타	점도	pH
88.9%	2.60%	0%	2.04%	6.46%	0.03 Pa·s	6.5

라. 포장재 검토와 마케팅 및 PR 전략 수립

(1) 포장의 정의

인류 초기부터 일상생활에서 간단한 저장이나 운반하기 위한 도구로 포장은 사용되어져왔으나 오늘날 포장의 개념은 여러 형태로 확대되어지고 있다. 즉, 포장의 의미가 ‘상품을 싸는 것’ 또는 ‘집을 꾸리는 것’으로부터 판매촉진에 기여할 수 있는 방향으로 바뀌었으며, 생산의 대량화, 유통구조의 복잡화, 판매경쟁의 심화에 따른 포장의 중요성은 날로 증대되고 있다.

국제포장협회(The Packaging Institute International)에서는 포장을 파우치, 백, 박스, 컵, 트레이, 캔, 튜브, 병이나 기타 용기에 담는 기능, 보호성과 보존성 부여, 소비자에게로의 의사전달, 사용의 기능성 중 한 가지 이상을 수행하기 위해서 물품을 담은 용기나 도구로 정의하고 있다. 또한 한국공업규격(KS A 1006)에서는 포장을 ‘물품의 유통과정에 있어서 그 물품의 가치 및 상태를 보호하기 위하여 적합한 재료 또는 용기 등을 시공한 기술 및 시행한 상태를 말하며, 이것을 날포장, 속포장 및 겉포장의 3종으로 분류한다.’라고 규정하고 있다.

(2) 음료 포장용기의 시장동향

(가) 세계시장

2005년 기준 세계 음료 포장용기 시장 규모는 약 3,700억 달러로 2009년까지의 연평균 성장률은 4.8%로 예상하고 있다(Table 4-36). 음료 포장용기 종류별로 보면 ‘플라스틱’이 전체시장의 39%로 가장 많은 비중을 차지하고 있으며, 그 다음으로 ‘종이’ 29%, ‘금속’

19%의 순으로 나타나고 있다. 그러나 시장 성장률은 '플라스틱'과 '종이'가 5% 이상으로 예측되고 있으며, '금속'의 경우 전체 평균을 밑도는 3.1%로 예상되고 있다(Fig. 4-11).

2004년 기준으로 세계 포장용기 시장 중 '아시아', '북미', '유럽'의 포장용기 시장규모는 비슷하며, 이들 대륙이 전체의 85%를 차지하고 있다. 세계 청량음료용 3대 포장용기별 판매 비중을 보면 PET병은 상승국면에 있으며, 알루미늄캔과 유리병은 하강국면에 진입하고 있다. 이는 새롭게 출시되는 주스와 과즙음료 등에 사용하는 음료 포장 용기 대부분이 PET병 등을 사용하기 때문으로 보인다.

Table 4-36. 2008~2009년 예상 평균 성장률

구분	예상성장률(%)
전체	4.8%
플라스틱	5.9%
종이	5.3%
금속	3.1%
유리	2.0%
기타	3.6%



출처: Raxam, 'consumer packaging report', 2005

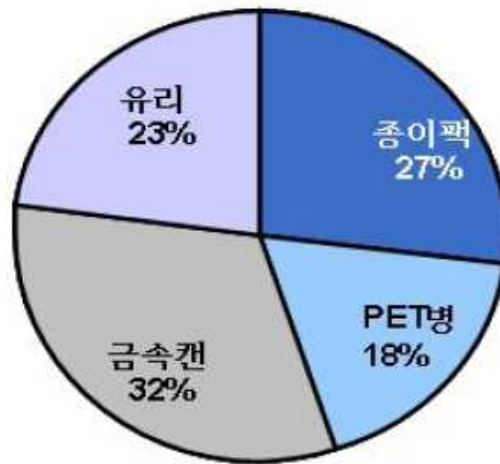
Fig. 4-11. 세계 포장용기 시장

(나) 국내시장

2005년을 기준으로 국내 포장용기 시장에서는 '금속캔'이 전체시장의 32%로 가장 많은 비중을 차지하고 있으며, 그 다음이 '종이팩', 'PET'등의 순으로 나타났음(Fig. 4-12).

금속캔의 경우 2005년 기준 전체 용기의 62.3%로 가장 큰 점유율을 보이고 있으나, 2002년~2005년까지 지속적인 감소추세로 나타났음(Table 4-37).

2005년 기준 전반적인 음료시장은 감소추세이나 금속캔의 감소율이 5%로 다른 용기에 비해 감소율이 상대적으로 큰 것으로 나타났음.



출처: 월간포장계, 2005.3

Fig. 4-12. 우리나라 포장용기 구성비

Table 4-37. 연도별 포장용기 현황

구분	2002년	2003년	2004년	2005년	전년대비 신장률(%)
전체	7,708	7,449	7,320	7,019	-4%
캔	4,856	4,686	4,593	4,372	-5%
PET병	1,253	1,192	1,252	1,229	-2%
유리병	856	860	743	701	-6%
종이팩	706	684	705	690	-2%
기타	27	27	27	27	-

* 출처 : (사)한국금속캔자원협회

(3) 음료 포장용기와 소비자 인식 등에 관한 기존 연구사례

(가) 소비자의 제품 선택에 영향을 미치는 속성군과 시장구조에 대한 분석 연구(이여훈, 2002)

- 소비자들은 음료 포장용기 중 PET병을 가장 선호하는 것으로 나타났으며, 다음은 캔, 유리병 등의 순이었음.
- 휴대와 음용이 간편한 소용량의 PET병이 가장 선호되고 있음을 알 수 있음.
- 또한 최근 캔의 경우 기존 용기보다 쉽게 음용할 수 있고, 안정된 외관을 가진 넥인캔(Neck in can)이 도입되는 등 새로운 용기들이 개발되는 추세임.

(나) 음료 포장용기의 형태별 구매행동을 연구(포항산업과학연구원, 2002)

- 주로 구입하는 음료 포장용기는 금속캔과 PET병이었음.
- 고급 포장용기 차별화에 의한 제품 차별화는 수용도가 있는 편임.
- 음료제품 구입시 용기 형태에 대한 영향율도 평균 39.14%로 큰 비중을 차지하는 것으로 나타났음.

(다) 음료의 포장디자인이 소비자 브랜드 선호에 미치는 영향에 관한 연구(신해용, 2005)

- 음료의 포장용기에서 내용물이 보이지 않을 경우, 소비자가 음료를 선택하는 과정에서 내용물에 영향을 받아 과즙 함유량을 높게 생각하는 것으로 나타남.

(라) 시판 기능성 음료에 대한 소비자 인식 연구(이명화, 2006)

- 기능성 음료 포장용기로 연구대상자의 48.4%가 유리병을, 다음으로 PET 29.6%, 금속캔이 15.6%의 순으로 나타났음.
- 특히 사무직, 전문기술직, 가정주부, 학생을 유리병을 가장 선호하였음.

(마) 음료 및 음료 포장용기에 대한 소비자 인식과 구매행동에 관한 연구(김영희, 2008)

- 음료하면 가장 먼저 떠오르는 포장용기가 무엇인지에 대한 설문조사 결과 43.6%가 PET를, 42.3%가 일반캔을, 8.6%가 유리병을 떠올린다고 하였음(Fig. 4-13).
- NB(New Bottle Can)이란 금속재질로 만든 소형 PET모양의 음료 포장용기로 대표적인 제품으로는 롯데칠성의 “오늘의 차”, 동원 F&B의 “차앤인”이 있음.

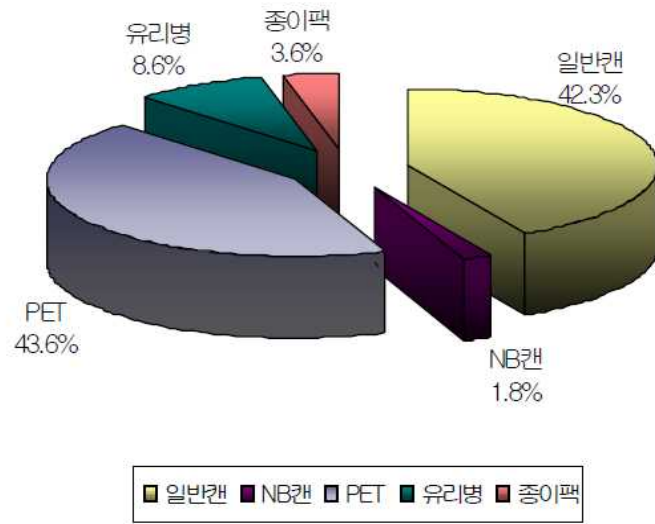


Fig. 4-13. 음료 포장용기에 대한 소비자 인식

- 또한 음료 포장용기에 대한 소비자의 선호도 PET가 가장 높았고, 그 다음은 일반캔 (39.5%), 유리병(8.6%), 종이팩과 NB 캔이 그 뒤를 이었음(Fig 4-14).

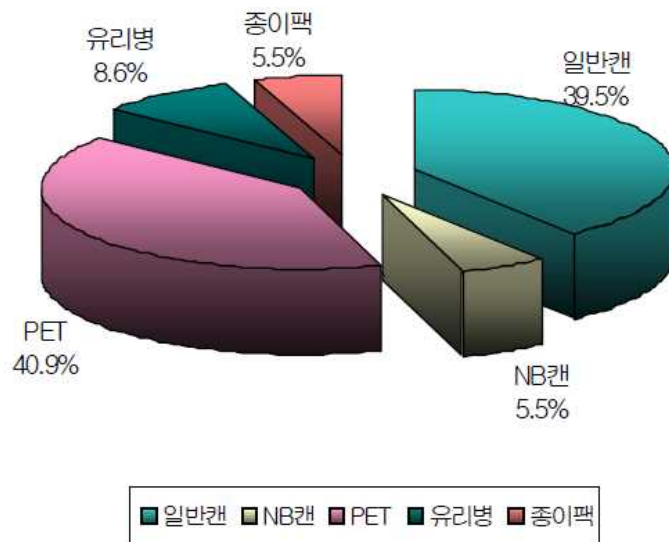


Fig. 4-14. 음료포장용기에 대한 선호도

- 과거 음료시장의 대부분을 차지하던 탄산음료의 수요가 크게 감소함에 따라 탄산음료의 주요 포장용기인 일반캔의 선호도가 크게 감소하였으며, 웰빙, 로하스 등 건강을 고려한 차음료나 주스음료 등의 포장용기인 PET의 선호도가 크게 증가한 것으로 보임.
- 음료 제품군별로는 탄산음료, 커피음료, 스포츠 음료, 전통음료는 일반캔을 가장 선호

하였고, 미과즙음료, 차음료, 곡류음료, 생수는 PET를 가장 선호하였음.

- 주스음료, 기능성음료는 유리병을 가장 선호하고, 두유음료, 곡류음료, 우유는 종이팩을 가장 선호하는 것으로 나타났음.

(바) 기존연구 요약

소비자들은 음료 포장용기에 대해 과거의 1차적인 기능을 넘어 설득적 의사소통을 수행하는 브랜드 이미지로 평가하고 있으며, 주로 구입하는 용기로는 PET와 일반캔을 꼽았다. 또한 시판 기능성음료에 대한 연구를 보면 연구대상의 48.45%가 유리병을 가장 선호하는 것으로 나타났는데 이는 현재 식이섬유음료, 비타민음료 등 기능성음료의 주요 포장용기가 유리병으로 되어있기 때문에 소비자가 선호하는 것도 유리병일 것으로 판단된다 (Table 4-38).

Table 4-38. 음료 제품군별 포장용기의 선호도

구분	N(%)					계
	캔	PET	유리병	종이팩	NB캔	
탄산음료	116 (52.7)	78 (35.5)	16 (7.3)	3 (1.4)	7 (3.2)	220 100.0
주스음료	14 (6.4)	76 (34.5)	106 (48.2)	18 (8.2)	6 (2.7)	220 100.0
커피음료	124 (56.4)	40 (18.2)	23 (10.5)	19 (8.6)	14 (6.4)	220 100.0
스포츠음료	53 (24.1)	126 (57.3)	15 (6.8)	12 (5.5)	14 (6.4)	220 100.0
미과즙음료	40 (8.2)	114 (51.8)	40 (18.2)	12 (5.5)	14 (6.4)	220 100.0
차음료	35 (5.9)	82 (37.3)	26 (11.8)	12 (5.5)	65 (29.5)	220 100.0
두유음료	9 (4.1)	30 (13.6)	37 (16.8)	132 (60.0)	12 (5.5)	220 100.0
곡류음료	24 (10.9)	68 (30.9)	37 (16.8)	71 (32.3)	20 (9.1)	220 100.0
전통음료	63 (28.6)	57 (25.9)	41 (18.6)	36 (16.4)	23 (10.5)	220 100.0
기능성음료	20 (9.1)	67 (30.5)	83 (37.7)	13 (5.9)	37 (16.8)	220 100.0
생수	6 (2.7)	185 (84.1)	11 (5.0)	8 (3.6)	10 (4.5)	220 100.0
우유	4 (1.8)	16 (7.3)	20 (9.1)	172 (78.2)	8 (3.6)	220 100.0

(4) 포장재의 특성 조사 및 검토

(가) 금속 포장재

금속포장용기로는 대표적으로 캔(can)을 말하며 통조림 식품의 포장에 사용되는 스틸 캔(steel can)은 강판(steel plate)에 주석을 도금한 주석판을 원료로 만들어졌다.

① 특징

- 산소 등의 기체, 수분 및 빛을 완벽히 차단한다. 완벽한 차단성으로 인해 식품에 대해서 우수한 보호성을 제공하는 반면 내용물을 외부에서 볼 수 없다.
- 독성이 없으며 위생적으로 비교적 안전하다.
- 내열성이 우수하고 열전도성 및 전기전도성이 좋다. 따라서 내용물을 충전하고 밀봉한 후 고온에서 가열살균하고 상온에서 보존하는 용도로 적당하다.
- 높은 기계적 강도를 가져서 부서지기 쉬운 식품의 파손방지와 맥주나 탄산음료의 포장과 같이 내압이 요구되는 용기에 적당하다.
- 상온에서 고속의 고정밀 기계가공을 할 수 있어 대량생산과 규격화에 있어서 생산효율이 우수하다. 그리고 가공에 열에너지를 그다지 필요로 하지 않는다.
- 고분자 재료와의 복합화가 용이하여 표면을 라카로 코팅함으로써 내용물에 의한 금속과의 반응을 방지할 수 있다. 그러나 종이나 플라스틱 용기에 비하여 무겁다.

② 용기 취급상 주의사항

- 통조림 제품의 유통에서 외면에 녹이 스는 것이 문제가 되는 수가 있으므로 수분에 노출되거나 표면에 응결수가 생기지 않도록 주의하여야 한다.
- 이를 방지하기 위해서는 제품저장 중에 급격한 온도변화를 피하고 염분 등과 같은 녹 발생 촉진물질에의 노출을 피해야 한다.

(나) 유리

유리용기는 무겁고 부서지기 쉬운 특성으로 인하여 편의성면에서 플라스틱이나 캔 포장에 비하여 경쟁력이 다소 떨어져서 시장을 이들 포장재에 의하여 잠식되어 왔다. 그러나 유리포장은 재활용이나 재사용면에서 우수한 환경친화적인 포장일 뿐 아니라 가격면에서도 우수한 포장으로서 앞으로 그 지위가 주목된다. 그리고 전통적인 유리의 포장의 이미지를 필요로 하고 있는 주스, 마요네즈와 같은 품목의 포장에서는 아직도 그 위치를 지키고 있다. 앞으로 유리포장용기의 성장가능성은 플라스틱 성형용기와의 경쟁관계에 의해 결정될 것으로 전망된다.

- 용기의 제조에 사용되는 유리의 구성성분은 액체나 고체의 모든 식품에 화학적으로 안정하다. 특히 물이나 산에 강하며 상온에서 유리와 반응하는 유일한 액체는 불화수소(HF)뿐이다. 수용액이 유리와 반응하나 상온에서는 아주 낮은 속도로 일어난다.
- 유리포장은 소비자가 상품을 사기 전에 볼 수 있는 장점을 가지고 있다. 식품 품질보존 등의 목적으로 빛에 대한 보호가 필요하다면 유리의 착색이 가능하다. 유리는 결정성이 없으므로 광학적으로 등방성(isotropic)이며 빛의 투과성은 착색제의 첨가에 의하여 조절이 가능하다.
- 유리포장은 견고성이 있고 이로 인해 충전과정에서 다루기가 쉽고 전체적인 판매과정에서 그 형태를 유지하는 데 도움을 준다. 이러한 점과 함께 유리포장용기는 딱딱하므로 분말이나 페이스트 등과 같이 소비할 때 짜는 것이 편리한 제품의 포장에는 적합하지 않다. 강도면에서 유리는 잘 부서지는 취약성을 가지고 있지만 하중에는 잘 견디므로 여러 단으로 적재할 때 부서지지 않고 용기의 형태를 그대로 유지한다. 그래서 외포장이 덜 견고해도 상당한 응력하에서도 부피를 변화시키지 않고 모양을 유지한다.
- 유리는 하나의 특정한 용점을 갖지 않는 열가소성의 재료이다. 다시 말해 유리는 고온에서 녹은 액체를 생각하여 점도를 감소시켜서 고화성형시킨 무정형상태의 과냉각상태의 액체이며 원하는 모양으로 자유롭게 성형이 가능하다. 유리병의 이러한 점은 유리포장제품의 이미지를 소비자에게 심는 데 사용될 수 있다. 예를 들어서 우리는 맥주, 포도주를 이야기하면 그 맛이나 품질보다는 응선 제품이 포장된 병의 모양을 먼저 머리에 떠오르게 된다.
- 유리는 약 500℃까지의 온도에서 견디므로 어느 식품포장에서도 내열성으로서는 충분하다. 온도내성이 필요한 식품공정으로는 고온충전(hot filling), 저온살균(pasteurization) 및 고온살균(sterilization), 증기나 건열에 의한 공병의 살균 등이 있다. 유리포장용기는 살균이나 가열공정에서 내열성을 가지고 있으나 갑작스럽게 온도를 높이거나 온도를 낮추면 열충격을 견디지 못하여 병이 깨지므로 공정설계에서 이 점을 주의하여야 한다.
- 유리는 근본적으로 수증기나 모든 가스에 대해서 투과성이 없어서 식품의 품질 보존면에서 우수하다. 다만 뚜껑이나 밀봉부위를 통한 투과성문제는 타전이나 밀봉 등의 공정에서 관리되어야 한다.
- 포장용기로 사용된 모든 유리재료는 사용 후 회수되어 파유리로서 유리용기제조의 원료가 되며 따라서 근본적으로 재순환된다. 이는 환경보호의 관점에서 유리용기포장의 큰 장점으로 부각되고 있다. 또한 맥주병과 같은 용기는 병채로 회수하여 세척 후 다시 식품의 포장에 사용될 수 있으므로 자원 이용면과 포장비 절감의 측면에서 이점이 있다.
- 종이나 플라스틱용기, 금속포장용기에 비해서 유리는 무게가 무겁다. 이는 유리포장이 갖는 큰 결점의 하나이다. 하지만 기술의 발전으로 계속 병은 경량화되고 이로 인해서 사용재료가 절감되고 경제성이 제고될 것으로 전망된다. 어떤 면에서는 이런 무거운 무게가 소비자에게 고급성의 이미지를 주고 고속의 포장라인에서 취급을 쉽게 하는

장점이 되기도 한다.

(다) 플라스틱

① 폴리에틸렌(polyethylene, PE)

- PE의 종류별 특성은 Table 4-39와 같음.

Table 4-39. 폴리에틸렌(polyethylene, PE)의 종류별 특성

종류 (밀도)	수증기투과도 (g mil/ 100 in ² d)	가스투과도 (cc mil/100 in ² d atm)		인장강도 (MPa)	연화점 (°C)	탄소 1,000개당 CH ₃ 기의 수
		O ₂	CO ₂			
LDPE (920 kg/m ³)	1.0	498	2,500	9~15	120~180	20~33
MDPE (940 kg/m ³)	0.7	250	1,000	21	120~180	5~7
HDPE (960 kg/m ³)	0.3	185	580	28	135~180	<1.5

*수증기 투과도는 37.8°C, 습도 90%에서의 값.

*가스 투과도는 23-25°C, 습도 75%에서의 값. 1 mil = 1/1000

- 폴리에틸렌은 수분 차단성이 좋으며 내화학적 및 가격이 저렴한 장점이 있는 반면 기계투과성이 큰 특징이 있음.
- 저·중·고밀도의 투명 내지 반투명 폴리에틸렌 필름은 여러 가지 포장 분야에 사용되고 있으며 저밀도 폴리에틸렌의 경우 내한성이 커서 냉동식품 포장과 열융착성이 좋아 다른 포장재와 라미네이션 시 열접착성 포장재로 많이 사용되고 있음.
- 고밀도 폴리에틸렌 필름의 경우 쇼핑백과 같은 백용에 많이 사용됨.

② 에틸렌 비닐 알코올(ethylene-vinyl alcohol, EvOH)

- 에틸렌 비닐 알코올은 에틸렌 비닐 아세테이트(ethylene-vinyl acetate)를 가수분해시켜 생산함. 에틸렌 비닐 알코올은 에틸렌이 27~48% 함유된 결정성 물질로 에틸렌이 증가할수록 산소 투과도가 증가하는 한편 수분 투과도는 저하함.
- 바비큐 소스나 케첩, 마요네즈 등과 같이 고온충전용 병으로 사용됨.

③ 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET)

- 높은 기계적 강도와 치수 안정성, 내수성, 내화학적, 투명성, 질김성, 강성도, 차단성이

우수한 포장재며 사용 온도 범위가 높음.

- 특히 용융점이 높아 보일-인-백(boil-in-bag)이나 레토르트 파우치, 이중오븐용(dual ovenalbe)트레이 뚜껑(lid)에 사용됨.
- 용기로는 사출 블로우 성형이나 사출 스트레치 블로우 성형용기로 탄산음료나 액체 식품에 사용됨. 특히 탄산음료수 병은 기존의 유리병에 비해 무게가 가벼워 수송비용이 절감되며 질기고 깨지지 않아 고압 상태에 탄산가스가 들어있는 기존의 유리병과는 달리 깨졌을 때 폭발 위험성이 없어 유리병 대용으로 대체 사용되고 있음.

④ 폴리카보네이트(polycarbonates, PC)

- 필름이나 시트, 용기 등으로 사용되며 우수한 치수 안정성으로 물속에서 하루 동안 흡수율이 0.15%로 치수 안정성이 좋으며 150℃에서 10분간 가열하여도 수축률이 2% 이내로 고온에서의 치수 안정성이 좋음.
- 투명성도 깨끗한 유리가 92%의 빛을 투과하는 것과 비슷한 89~91%의 빛 투과도를 갖고 있음.
- 수분 및 가스 투과성은 모두 높아 차단성이 요구 될 시 차단성 코팅이 필요함.
- 폴리카보네이트의 식품 포장 용도로는 용기체 가열한 후 먹을 수 있는 트레이 식품이나 생수용 물통, 필름으로는 보일-인-백(boil-in-bag)식품 등에 사용됨.

(라) 액체용 종이용기

- 내면이나 양면에 폴리에틸렌이나 왁스로 코팅을 하여 내수성을 갖게 하고 여러 구조로 적층을 한 복합종이를 피라밋이나 육면체의 장방형, 각형 등으로 모양을 만든 액체 종이포장용기가 우유나 과일주스 등의 포장에 이용됨.
- 무균포장에 사용되는 Tetra Brik 용기에는 차단성 제공을 위해 PE/종이/PE/Al/PE의 적층으로 구성된 복합지가 사용됨. 외면 PE층은 수분이나 마찰 등의 환경조건으로부터 포장재를 보호하고, 내층의 종이는 내용물의 지지를 위해 충분히 견고하면서도 성형이 가능하게 유연하여야 함.

(5) 식품유형에 따른 포장방법

(가) 생수

- 생수의 품질보존에서 가장 중요한 것은 미생물의 성장문제임. 미생물 오염도를 줄이기 위하여 염소나 오존에 의한 살균처리를 하는 경우도 있지만 이것이 생수의 향미를 나쁘게 하므로 사용에 어려움이 따름.
- 포장이 적절치 못하면 플라스틱 용기로부터 용출된 플라스틱 향미가 생수의 맛을 좋지 않게 함.

- 생수의 병 포장에 사용되는 포장지로는 유리, HDPE, PP, PVC, PET 등이 있는데, 플라스틱 포장 재료의 경우 용기의 성형 시 항산화제 등의 첨가로 인하여 이들이 생수로 이행되어 이상한 맛이나 냄새를 주지 않아야 함.
- 생수의 포장으로서는 유럽에서는 PVC가 많이 사용되고 미국에서는 HDPE가 가장 많이 사용되거나 우리나라에서는 PET가 많이 사용됨.

(나) 과일주스

- 과일주스의 품질은 당산비, 향기성분의 종류와 양, 페놀 화합물, ascorbic acid의 함량에 따라 결정됨.
- 주스에서의 변질을 일으킬 수 있는 요인은 미생물적 변패, 비효소적 갈변, 향미성분 및 영양성분의 산화반응 등이다. 주스는 대부분이 산성식품이므로 미생물적인 변패를 억제하기 위하여 저온살균을 행함.
- 과일주스의 포장에 가장 오래 일반적으로 사용된 방법은 탈기시킨 주스를 90-95℃ 정도로 튜브형 열교환기나 판형 열교환기로 가열한 후 금속 캔에 고온 충전한 후 이중권체로 밀봉하고 캔을 거꾸로 하여 10-20분 동안 방치한 다음 냉각시키는 것이었음.
- 이중권체가 완벽하고 내면 lacquer가 산에 견디고 주스의 탈기가 충분하면 적어도 1-2년 동안의 유통기한이 가능하나 캔 내면에 코팅이 불완전하거나 긁힌 곳이 있으면 부식이 빠르고 금속이 주스로 녹아 나오며 수소 가스가 발생되어 용기가 팽창되게 함.
- 유리병도 과일 주스의 포장에 광범위하게 사용되어 왔으며 용기의 파손을 막기 위하여 고온충전이나 냉각 시 급격한 온도변화를 피하도록 해야 함.
- 특히 유리병은 화학적 안정성으로 인하여 고급 주스의 우수한 포장임.
- 최근에는 많은 양의 주스가 플라스틱 필름/알루미늄 호일/종이로 된 적층포장재에 무균포장되고 있고, 이런 포장제품의 저장성은 카톤 포장의 차단성, 포장과 주스의 상호작용, 저장환경에 따라 영향을 받음.

(다) 탄산음료

- 청량음료의 포장에 가장 많이 사용되어온 포장이 재사용 유리병임.
- 최근에는 비회수 유리병이 탄산음료의 포장에 많이 사용됨. 이들 병은 파손에 대한 안전성을 고려하여 발포 플라스틱이나 수축 플라스틱 필름으로 싸서 완충성을 부여하였고, 비회수 유리병은 왕관 대신에 알루미늄 roll-on closure로 대체하여 사용하고 있음.
- 플라스틱 포장도 탄산음료포장에 사용되어짐. PET 재활용에 대한 요구가 증가함에 따라서 PET만의 단일재질로 만들어서 바닥이 4~5개의 돌출부에 의해서 세울 수 있는 병이 현재는 주로 이용되고 있음.
- 대용량에 대한 요구와 경향이 진행되어 현재 1~2 L 용량의 용기가 주로 이용됨.

(라) 우유

- 저온살균 우유는 유리병, 종이 카톤, 플라스틱 용기에 포장되는 것이 일반적임.
- 투명 유리병은 빛에 대한 차단성은 좋지 못하지만 많이 사용되고 있음.
- 빛에 대한 차단성이 가장 좋은 포장재는 종이 카톤 이므로 오늘날 우유의 포장에 가장 광범위하게 사용되고 있음.
- 착색하지 않은 PE 병은 350-800nm의 파장범위에서 빛의 58-79%를 투과시키므로 이를 막기 위하여 이산화티타늄을 첨가하여 착색처리하여 빛의 투과를 억제시키기도 함.
- UHT 우유는 보통 PE를 내층으로 하고 알루미늄 호일과 적층된 종이 카톤에 포장함.

(마) 요구르트

- 우유를 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus* 등의 유산균에 의하여 발효시킨 요구르트 제품은 페이스트상과 액상으로 크게 나눌 수 있고, 요구르트의 포장에서도 빛과 산소에 대한 차단성이 저장성에 영향을 줌.

마. 포장재 선정

(1) 발효음료

포장재 조사 결과 소비자는 새로운 기능성 음료 포장재로 유리병을 원하는 것으로 나타났다. 기존 고급 기능성 음료의 포장은 100~200 mL 용량의 유리병이 많이 차지하고 있다. 또한 유리병은 액체의 충전이 용이하고, 모든 가스에 대한 투과성이 없어 식품의 품질보존에 우수하며 내열성이 있어서 살균에도 용이하며 환경보호의 관점과 포장비 절감의 측면에서 이점이 있다. 산도가 높은 양과초산·유산발효음료의 특성상 산에 강하고 화학적으로 안정한 유리병이 적합하다고 생각되어 본 발효음료의 포장재로 180 mL의 유리병을 선정하였다.

라벨접착 시 용이하도록 단순한 형태의 유리병을 선택하였다. 마개는 판두께는 0.16 mm, 외경은 33.65 mm, 내경 26.45 mm, 높이 9.40~10 mm 규격의 Regular Twist Button cap을 사용하였다.

(2) 분말

Al foil은 산소투과도가 낮고 비틀림에 견고하다는 장점 때문에 과자, 인스턴트 식품, 커피, 차, 버터, 치즈 등의 포장재로 이용된다. 분말제품은 수분에 대한 차단성이 중요하므로 수분차단성과 내화학성 및 가격이 저렴한 장점이 있고, 열접착성이 없어서 밀봉이 어려운 Al foil의 단점을 보완할 수 있는 PE를 포장재의 안쪽에 적층 시켜준다. 바깥 면

은 기계적 강도와 질김성, 차단성이 좋은 PET를 라미네이팅 시킨 파우치(PE-Al-PET)를 이용하여 분말제품을 포장하였다.

3. 발효양파음료의 저장성 검토 및 Scale-up

본 연구에서는 양파의 기능성과 발효의 기능성을 동시에 갖춘 총 4종류의 양파 발효 제품(유산발효음료, 초산발효음료, 유산발효분말, 초산발효분말)을 개발하였다. 새롭게 개발한 식품의 경우 시판에 앞서 저장수명을 정확히 예측하여 적절한 유통기한을 설정하는 것이 중요하다. 실제 저장조건에서 저장시험을 통한 저장수명을 설정하는 것은 경제적, 시간적 손실이 크기 때문에 가속저장시험이 널리 이용되고 있다. 식품의 품질변화에 가장 중요한 영향을 미치는 요인인 온도이므로 여러 온도구간에서 저장기간에 따른 변화를 분석하여 평가하는 가속시험방법이 널리 이용되고 있다. 일반적으로 가속시험의 온도는 우유나 유제품은 20~37℃, 가공식품은 30~40℃가 많이 사용되므로, 본 연구에서는 개발된 발효제품을 각기 4, 25, 37℃의 저장온도에 저장하여 저장온도에 따른 미생물학적·이화학적 변화를 측정하여 저장수명을 검토하였다.

가. 연구방법

(1) 양파발효음료의 제조

본 연구에 사용된 양파유산발효음료는 1차년도 연구결과에 의해 최종 선정된 유산균 (*Pediococcus pentosaceus*, KC-007)으로 발효한 양파액, 2차년도 실험에 의해 양파의 불쾌취 masking 효과가 있는 것으로 확인된 팽화홍삼농축액(그린바이오), 양파취의 감소효과와 기호도가 좋았던 배농축액(MSC Co.,LTE, °Bx), 올리고당, 고과당(코맥스 인터내셔널), 아카시아 벌꿀(오뚜기), 배향(서울향료), L-ascorbic acid, 결정구연산, quercetin 추출물(양파 껍질로부터 아임계 추출함), 정제수를 사용하여 소비자 검사 수행 후, 최적배합비(Table 4-40)를 선정하였다.

초산발효음료는 농축되어 희석시켜 마시는 타입의 음료가 대부분이나 번거로움 때문에 우리나라 사람들은 많이 선호하지 않으므로, 바로 마실 수 있는 음료타입으로 개발하였다. 양파초산발효음료는 *Acetobacter tropicalis* No.22에 의해 발효된 양파식초, 산뜻한 이미지를 위하여 레드자몽농축액(Comax international, #4344, 64°Bx), 고과당, 올리고당, 색상을 위하여 소량의 복분자농축액(MSC CO, LTD)를 첨가하였고, xylitol, malto-dextrin, sucralose, 정제수를 사용하여 소비자 검사 결과에 따라 최적의 배합비(Table 4-41)를 선정하였다.

Table 4-40. 양과유산발효음료 배합비

원료명	배합비율(%)
양과유산발효액	10.0
팽화홍삼농축액	0.02
고과당	10.0
올리고당	50
아카시아 벌꿀	2.0
L-ascorbic acid	0.2
citric acid	0.2
배 농축액	2.38
배 향	0.3
Quercetin 추출물	0.29
정제수	69.61
합계	100

Table 4-41. 양과초산발효음료 배합비

원료명	배합비율(%)
양과식초	50
레드자몽 농축액	3.3
고과당	4.7
올리고당	14.94
복분자 농축액	0.04
xylitol	0.04
Sucralose	0.002
malto dextrin	0.038
정제수	65.940
합계	100

기호도가 가장 좋게 나온 배합비에 따라 배합한 부재료를 살균하여 37℃의 온도가 될 때까지 냉각하여 양파발효액을 넣고 가열살균된 180 mL의 유리병에 충전·밀봉하였고, 충전 시 무균상태로 하여 오염이 최소화되도록 하여 양파 유산·초산발효음료를 제조 (Fig. 4-15)하였다.

(2) 양파발효분말의 제조

양파발효분말은 음료와 같은 부재료를 사용하였고, anti-caking agent인 malto-dextrin 을 첨가하여 살균한 후 냉각시킨 후 양파발효액을 첨가하여 freeze dryer를 이용하여 동결 건조시켜 분쇄하였다. 생산된 분말 제품은 PE-Al-PET로 이루어진 파우치에 5 g의 일정 중량으로 충전한 후, 열접착기로 밀봉하였다.

(3) 제품의 포장

일반적으로 액체식품의 포장은 포장용기와 제품을 따로 살균한 후, 무균조건하에서 포장하는 무균포장방식이 이용된다. 대량생산 시, 살균된 부재료와 발효액은 관을 통하여 이동되므로 오염에 노출되지 않으나 충전 할 때 처음으로 환경에 노출되게 된다. 따라서 재오염이 되지 않도록 하기 위하여 충전·밀봉 시에는 무균상태로 유지되도록 하였다. 각 포장재에 포장된 제품은 물리적인 충격으로부터 보호하기 위해 박스를 이용하여 2차 포장을 하였다.

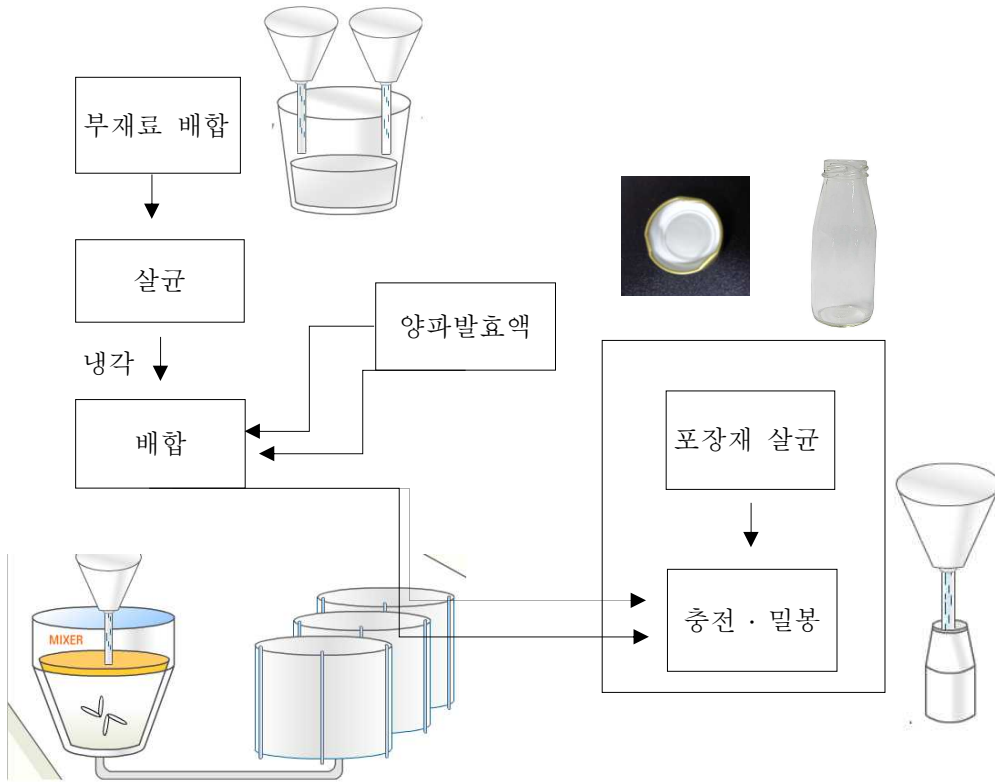


Fig. 4-15. processing of fermented onion juice.




Lactic acid fermented onion juice	Acetic acid fermented onion juice	Fermented onion powder
		

Fig. 4-16. Fermented onion product

(4) 양과발효제품의 pH와 산도 측정

pH는 pH meter(Orion model 310, Orion Research Inc, USA)를 사용하여 실온에서 측정하였다. 적정산도는 시료 10 mL에 증류수 20 mL를 가하고 0.1% phenolphthalein 2~3방울을 가하고 0.1 N NaOH로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하고, 이 때 소비된 0.1 N NaOH의 부피로부터 아래의 식을 이용하여 산도를 계산하였다.

$$\text{산도 (\%)} = \frac{(\text{NaOH 소비량 (ml)} \times \text{NaOH 역가} \times \text{acid factor} \times \text{시료 희석배수})}{\text{시료 부피 (ml)}} \times 100$$

(5) 환원당 함량 측정

환원당 함량은 Somogyi-Nelson 방법을 이용하여 측정하였다. 일정 농도로 희석한 시료 0.5 mL에 0.4 mL alkaline copper reagent를 첨가한 후, 100°C에서 10분간 가열한 다음 찬물로 냉각하였다. 0.4 mL Nelson's reagent를 첨가한 후 2.6 mL의 증류수를 첨가한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 0~1.0 μmol의 D-glucose로 작성한 standard curve를 이용하여 측정된 흡광도 값을 μmol단위로 환산하여 구하였다.

(6) 색도

색도는 분광색차계(ColorQuest XE, Hunter Associates Lab, USA)를 이용하여 L, a, b 값을 측정하였다. 증류수를 이용하여 calibration시킨 colorimeter에 시료를 액체 측정용 cell에 2/3를 넣고 색도를 측정하였다. 이때 증류수의 L, a, b값은 각각 100, 0, -0.01이었으며, 색도 측정 시 시료를 잘 흔들어서 전체적으로 잘 섞이게 한 후에 측정하였다.

(7) 탁도

유산발효음료와 초산발효음료의 탁도를 측정하였다. 탁도는 원심분리한 시료의 상등액을 blank로 하였고, 측정 전 시료를 잘 흔들어서 전체적으로 잘 섞이게 한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(8) 점도

음료의 점도는 viscometer (Brookfield Viscometer LVDV-II+Pro, Brookfield Engineering Labs., Inc., USA)를 사용하여 측정하였다. 시료를 600 mL 비이커에 spindle이 잠길 정도로 부은 후에 점도를 측정하였으며 점도는 온도에 민감하므로 측정 전 항온수조에 담아 온도가 23±2°C로 일정하게 유지되도록 하였다.

(9) 수분활성도와 수분함량

분말제품은 온도뿐만 아니라 수분 또한 중요한 품질열화요인이므로 저장온도와 저장기간에 따른 수분활성도와 수분함량의 변화를 관찰하였다. 수분활성도는 Water Activity Meter(Aqualab lite, Decagon Devices, Inc, USA)로 측정하였고, 수분함량은 IR Moisture meter(Kett Electric Lab, Japan) 로 물의 끓는점보다 높은 105℃에서 건조시켜 증발된 수분의 함량(%)을 측정하였다.

(10) 차이식별검사

이화여대 식품공학과 대학원생들을 대상으로 새로 생산한 각 시료를 대조구로 하여 각 저장온도에 저장한 시료와의 차이여부를 검사하였다. 이 때 모든 시료의 온도는 일정하게 유지되도록 하였다.

(11) 통계분석

모든 실험은 최소 3번 반복하여 평균과 표준편차를 구하였으며, 얻은 실험값의 통계분석은 Windows용 (ver. 16) SPSS(statistical package for the social science, SPSS Inc., Chicago. IL. USA)를 사용하여 수행하였다. 실험자료 분석은 Duncan의 중범위검정($\alpha=0.05$)을 실시하여 유의적인 차이를 검정하였다.

나. 연구결과

(1) 양과유산발효음료의 저장 중 물리화학적 및 미생물학적 특성변화

양과유산발효음료의 저장수명을 예측하기 위하여 온도와 저장기간에 따른 물리화학적 특성 변화와 미생물 변화를 측정하였다. 제품을 4, 25, 37℃에서 25일 동안 저장하면서 3~4일 간격으로 측정하였다. pH와 산도변화를 측정한 결과 28일 동안 4, 25, 37℃ 모든 온도에서 pH는 2.7(Fig. 4-17), 산도는 1.5%(Fig. 4-18)의 값을 나타내었는데, 일반적인 발효제품의 pH가 3.7~4.0인 것에 비해 낮은 pH를 나타냈다. 이는 구연산과 비타민 C와 같은 산성을 띄는 부재료가 첨가되었기 때문인 것으로 사료된다. 일반적으로 발효제품은 젖산균과 같은 미생물의 작용으로 생성된 각종 유기산에 의해 산의 함량이 증가하지만 본 연구에서 개발된 양과유산발효음료는 미생물이 저장기간에 따라 유산균의 생균수가 감소하여 미생물에 의한 산의 변화는 나타나지 않은 것으로 보인다. 또한 모든 저장온도에서 일정한 값을 나타내었으므로 저장온도가 시료의 pH와 산도에 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

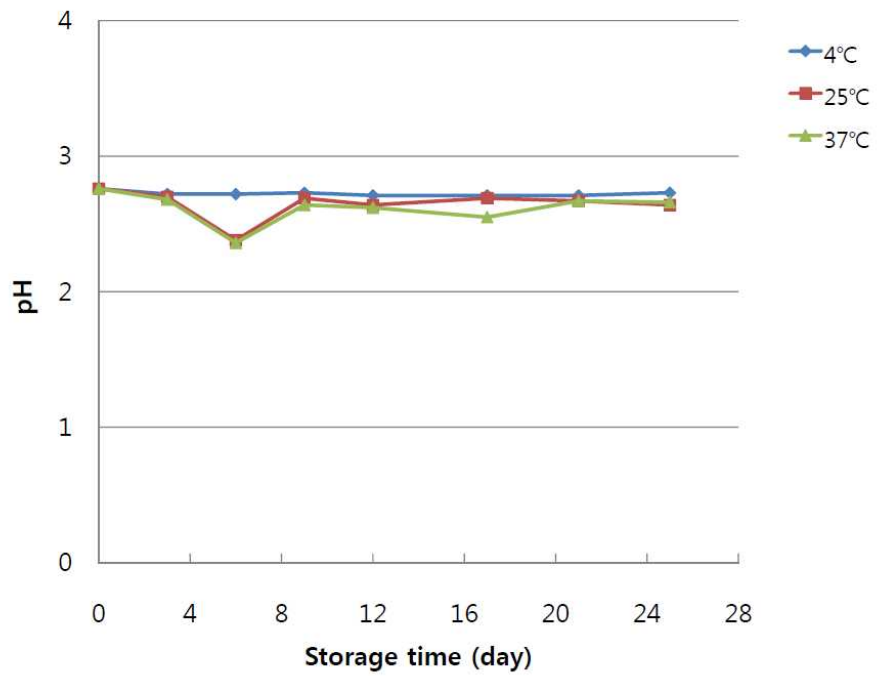


Fig. 4-17. Change in pH of lactic acid fermented onion juice during storage at different temperatures.

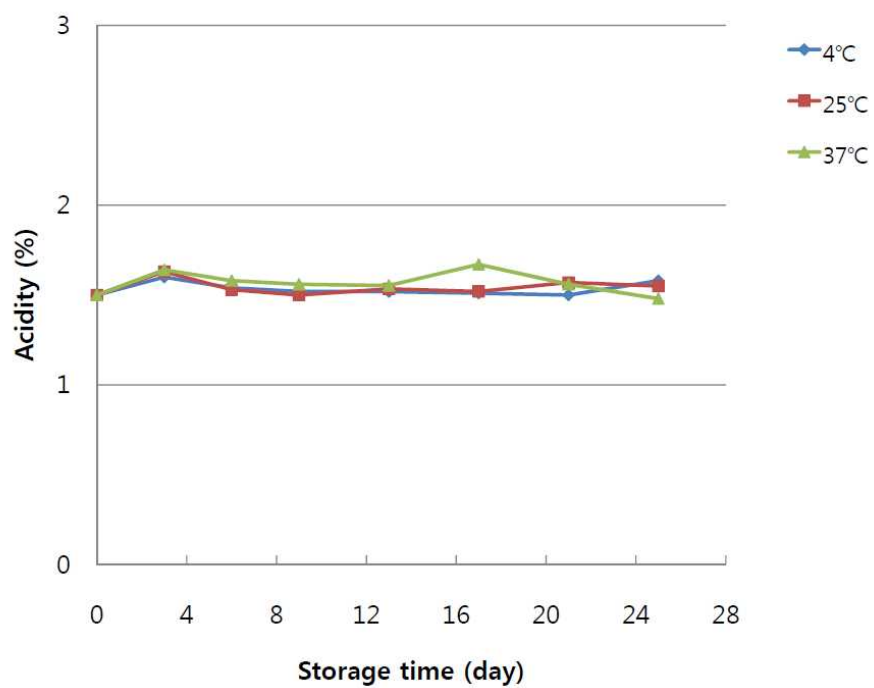


Fig. 4-18. Change in acidity of lactic acid fermented onion juice during storage at different temperatures.

유산균은 포도당을 분해하여 젖산을 생성하는데, 4°C에 저장한 시료의 환원당은 Fig. 4-19와 같이 유산균의 생육속도와 비슷한 속도로 감소하는 것으로 보아 유산균의 생균수가 감소함에 따라 유산균에 의해 소비되는 환원당의 함량도 감소한 것으로 본다. 25, 37°C에서는 저장 후 급격히 하락하다 6일 이후에 증가하였고 9일 이후 다시 감소하는 경향을 나타내었는데, 저장 6일 이후 유산균이 사멸함에 따라 유산균에 의해 생성되는 당 가수분해 효소에 의한 환원당으로의 전환이 감소하였고, 유산균에 의한 환원당의 소비가 감소함에 따라 6일 이후 환원당의 함량이 일시적으로 증가한 것으로 보인다. 25, 37°C 저장온도의 시료는 600 nm에서 흡광도를 측정할 때 모든 온도에서 뚜렷한 변화를 나타내지는 않았으나 4°C에서는 13일 이후, 37°C에서는 17일 이후부터 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 4-20).

저장온도에 따른 색도를 특정한 결과 Fig. 4-21과 같이 L값은 모든 저장온도에서 거의 변화를 나타내지 않았다. a값은 4°C에서는 일정하게 유지되었고, 25°C에서는 저장초기에 -1.66에서 점차 감소하여 저장 25일째에는 -2.090로 저장기간에 따라 감소하는 경향을 보였다. 37°C에서는 저장 초기 -1.633의 값에서 저장 13일째 -2.163까지 일정하게 감소하였으나 13일 이후부터는 변화가 없었다. yellowness를 나타내는 b값은 4, 25°C에서는 일정한 값을 보였고, 37°C에서는 저장 초기 20.05에서 저장 9일까지 24로 소폭 증가하였으나 저장 13일 후 32.380로 급격히 증가하는 경향을 나타내었는데, 이는 높은 온도에 따른 환원당의 갈변현상에 의한 것으로 생각된다. 저장기간 동안의 총 색도의 차이를 보여주는 ΔE 값 역시 37°C에서 저장기간에 따라 증가하였는데, 변화의 폭이 가장 크게 나타났다. 점도는 저장 초기, 13, 28일째 총 세 번 150 rpm에서 측정하였는데, 약 9.11 mPa·s의 낮은 점도 값을 갖으며 저장온도에 따른 유의적인 차이는 없었다(Fig. 4-22).

제품 내 존재하는 미생물 생균수를 측정한 결과 유산균은 Fig. 4-23에 나타난 바와 같이 초기에 7.55 log CFU/mL로 존재하였는데 4°C에서 저장하였을 경우 저장기간이 지남에 따라 지속적으로 감소하여 저장 22일 후에는 4.1 log CFU/mL까지 감소하였다. 25°C에서 저장하였을 경우에는 유산균의 감소속도가 더욱 빨라 저장 14일째에는 대부분 사멸하는 것으로 나타났으며 37°C에서는 저장 4일만에 대부분 사멸하였다. 총균수도 유산균수와 유사한 패턴을 나타내었는데 이는 plate count agar에서 생육한 대부분의 균이 유산균이기 때문인 것으로 판단된다(Fig. 4-24). 효모와 곰팡이는 저장기간 동안 관찰되지 않았다.

차이식별검사 결과 4°C에서 저장된 시료는 차이를 느끼지 못하였으나, 25°C에서 저장된 시료는 저장 12일이 지난 이후부터, 37°C에서 저장된 시료는 저장 8일 이후부터 좋지 않은 향미로 인하여 거부감을 불러일으켰다. 따라서 본 연구에서 개발한 양과유산발효음료는 유산균의 생육과 이화화학적 변화와 미생물의 변화에 안정한 4°C에서 약 20일간의 유통기한을 갖는 것으로 사료된다.

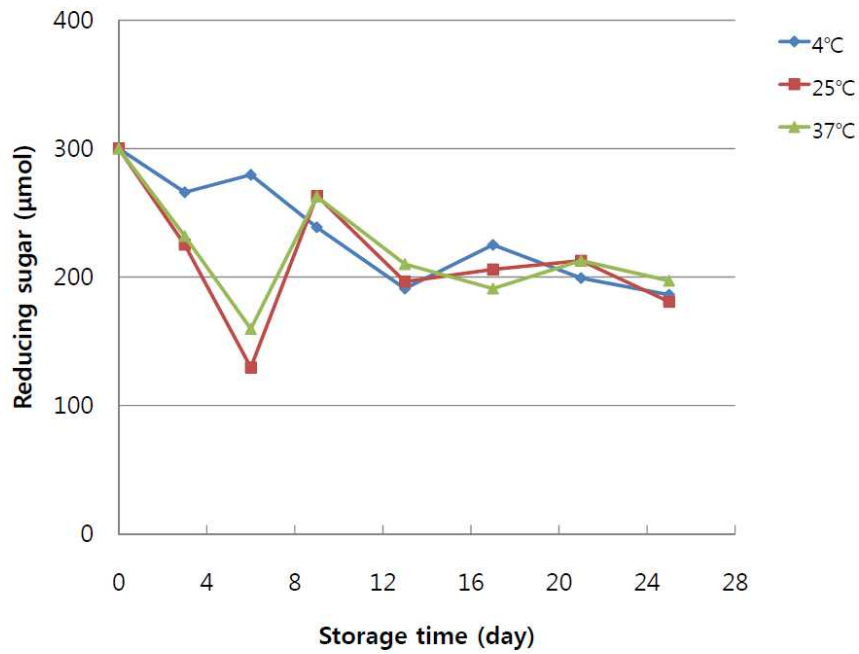


Fig. 4-19. Change in reducing sugar content of lactic acid fermented onion juice during storage time at different temperatures.

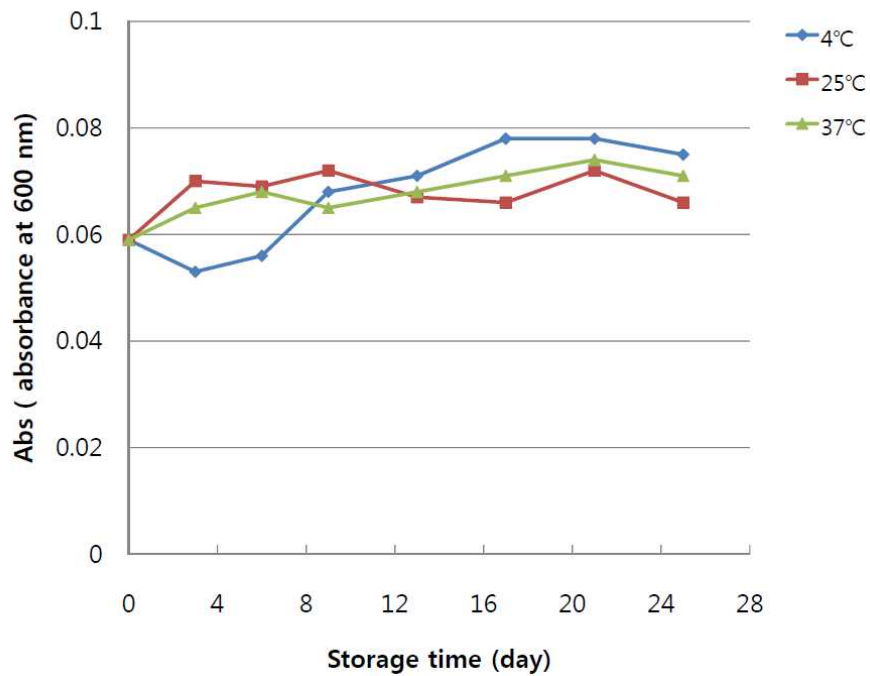


Fig. 4-20. Change in turbidity of lactic acid fermented onion juice during storage time at different temperatures.

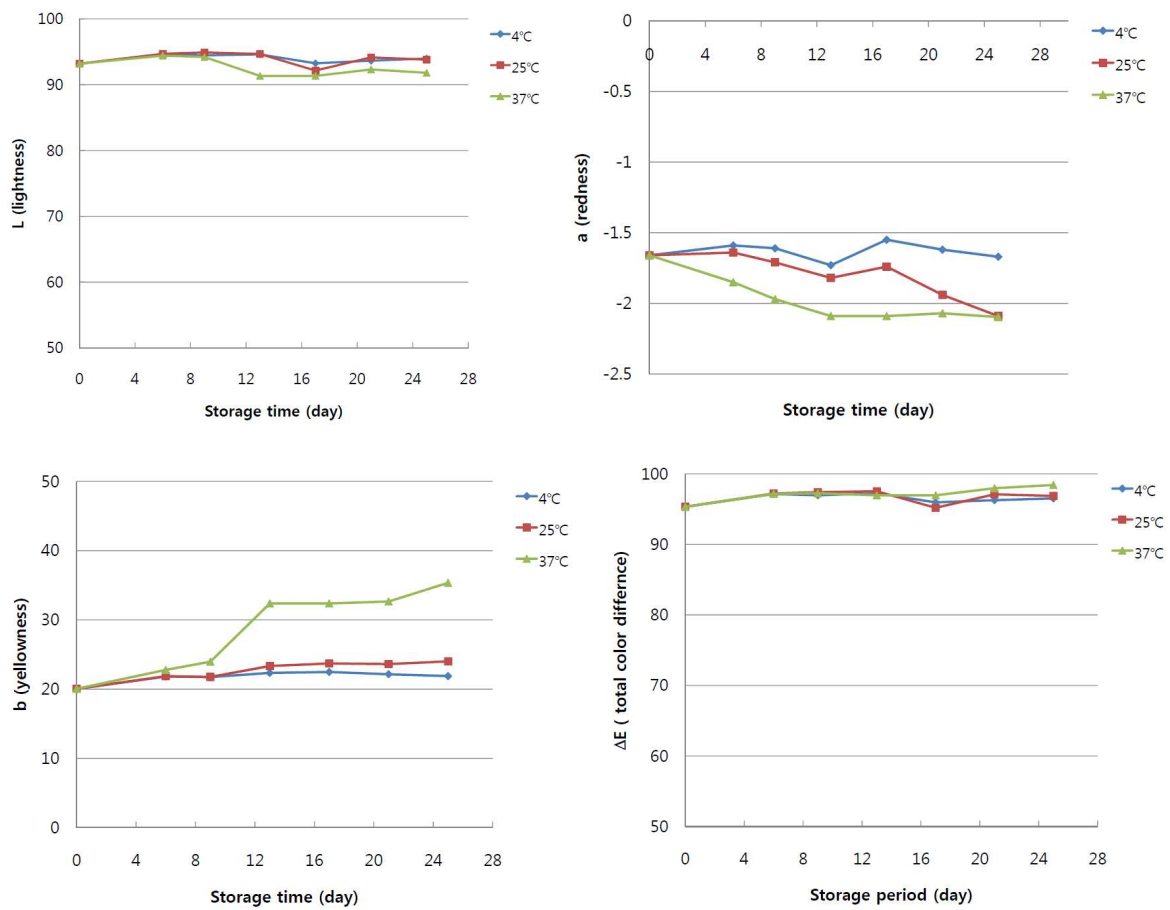


Fig. 4-21. Change in Hunter's color value of lactic acid fermented onion juice during storage time at different temperatures.

L(Lightness), a(redness), b(yellowness), ΔE (total color difference)

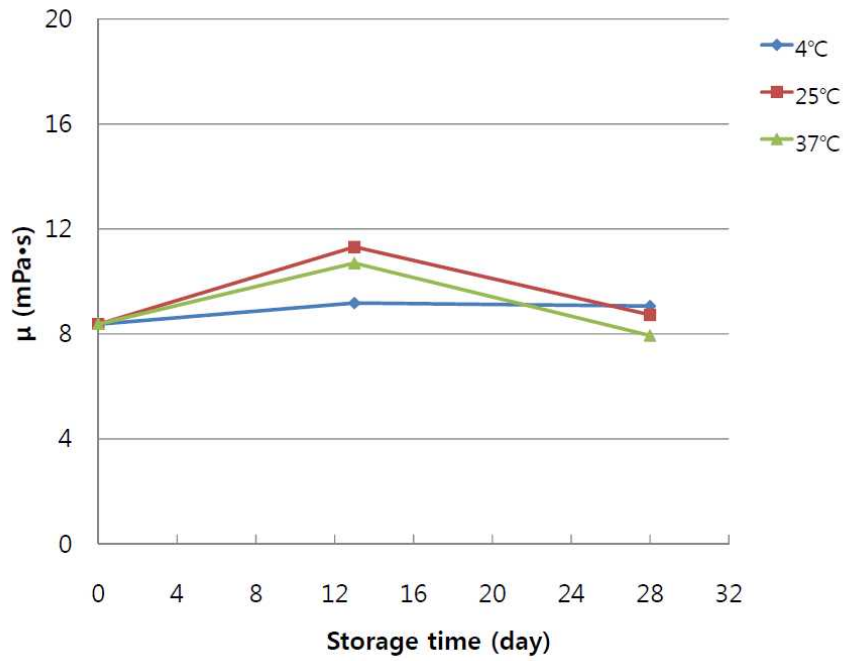


Fig. 4-22. Change in viscosity of lactic acid fermented onion juice during storage at different temperatures.

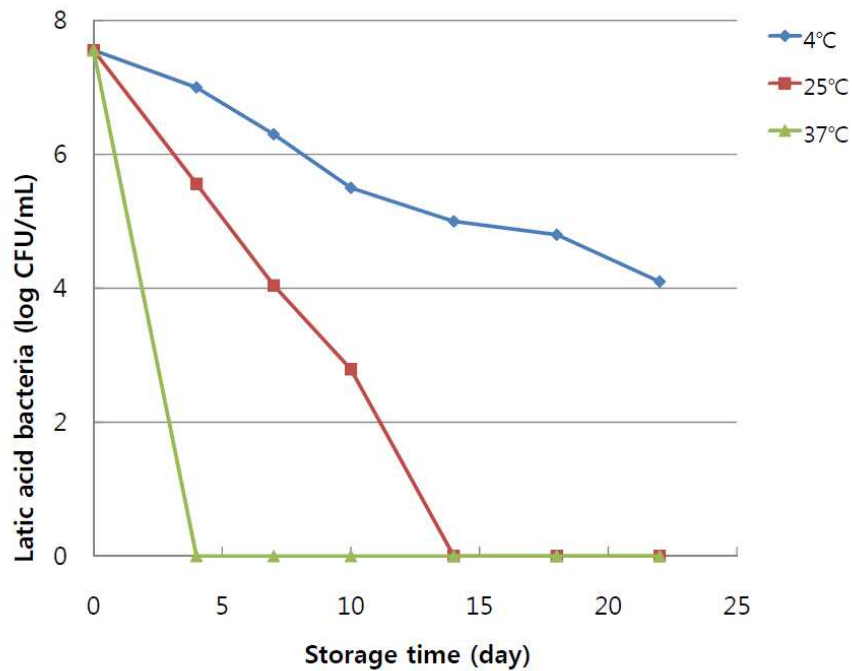


Fig. 4-23. Change in viable cell number of lactic acid bacteria of lactic acid fermented onion juice during storage at different temperatures.

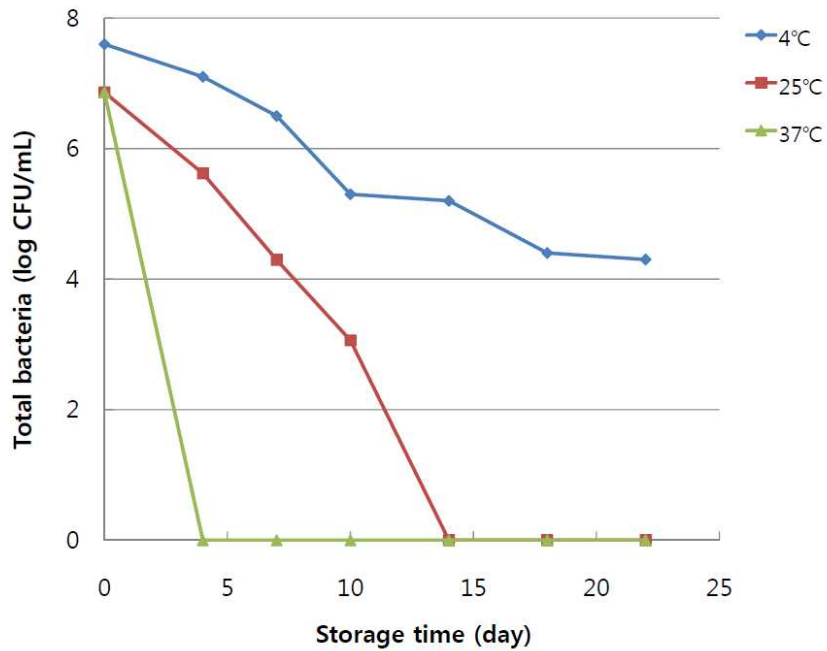


Fig. 4-24. Change in viable cell number of total bacteria of lactic acid fermented onion juice during storage at different temperatures.

(2) 양파초산발효음료의 저장 중 물리화학적 및 미생물학적 변화

개발된 양파초산발효음료를 4, 25, 37°C에서 5주간 저장하면서 일주일 간격으로 물리화학적인 변화와 미생물 생균수의 변화를 측정하였다. 저장 초기의 pH와 저장 중 최고치는 3.29, 최저치는 3.13으로 저장기간 동안 비교적 일정한 pH를 유지하였다(Fig. 4-25). 이와 같은 결과는 저장온도가 시료의 pH의 변화에 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. 산도의 변화 또한 Fig. 4-26과 같이 1.4% 정도로 저장 중 저장온도에 따른 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

600 nm에서 흡광도를 측정한 탁도 값은 저장초기 0.007에서 저장 후 5주가 지난 후, 0.11의 값을 갖으며 저장온도에 따른 변화를 나타내지 않았다(Fig. 4-27). 환원당이란 반응성이 있는 알데히드기와 케톤기를 갖고 금속염 알칼리 용액을 환원시키는 단당류와 이당류를 총칭하는 것으로 설탕을 제외한 포도당, 과당 등에 포함된다. 4°C에서 저장된 시료의 환원당은 Fig. 4-28에 나타난 바와 같이 저장 3주 후부터 급격히 증가하였고, 25°C에서는 저장 4주 후에 유의적으로 증가하였고 37°C에서 저장한 시료의 환원당 값의 변화는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이는 4, 25°C에서 생육하는 미생물에 의한 당 가수분해효소에 의해 생성되는 환원당의 함량이 발효에 의해 소비되는 당분의 소비에 비해 많기 때문에 증가하는 경향을 보인 것이라 생각된다. 반면 37°C에서는 미생물이 사멸하여

환원당이 생성되지 않아 생산 초기의 환원당 함량을 유지한 것으로 보아 환원당의 함량은 미생물의 생육과 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다.

색도의 L값은 모든 저장온도에서 일정한 값을 나타냈으나 redness를 나타내는 값은 4℃를 제외한 25, 37℃에서는 저장기간에 따라 감소하였다. 특히 37℃에서 저장한 음료는 저장 후 2주까지는 급속하게 감소하였으나 3주후부터는 소폭 감소하였다. yellowness를 나타내는 b값 또한 4℃를 제외하고, 25, 37℃에서 저장기간에 따라 증가하였는데 37℃에서 저장한 시료의 b값은 저장기간에 따른 뚜렷한 유의적인 차이를 나타냈다(Fig. 4-29). 2주 간격으로 150 rpm에서 측정된 초산발효음료의 점도는 Fig. 4-30과 같이 온도에 따른 변화는 나타나지 않았다.

제품 내 존재하는 미생물 생균수를 측정한 결과를 Fig. 4-31에 나타내었는데 총균수는 초기에 3.50 log CFU/mL로 존재하였고 4℃에서 저장하였을 경우 저장기간이 지남에 따라 약간 증가하는 경향을 나타내어 저장 35일 후에는 3.58 log CFU/mL의 수치를 나타내었으며 25℃에서 저장하였을 경우에도 약간 증가하여 4.80 log CFU/mL의 생균수를 나타내었다. 37℃에서 저장하였을 경우에는 4℃나 25℃에서와는 달리 총균수가 급격히 감소하여 저장 7일째 대부분 사멸하는 것으로 나타났다. 효모와 곰팡이는 저장기간 동안 관찰되지 않았다.

차이 식별검사 결과 4℃와 25℃에서 저장한 시료는 차이를 나타내지 않았고, 37℃에 저장된 시료는 저장기간에 따라 불쾌취를 생성하였고 붉은 빛을 거의 나타내지 않아 시각, 미각적으로 차이를 나타내었다. 따라서 양과초산발효음료는 4, 25℃에서 한 달 이상의 저장기간을 갖는 것을 알 수 있다.

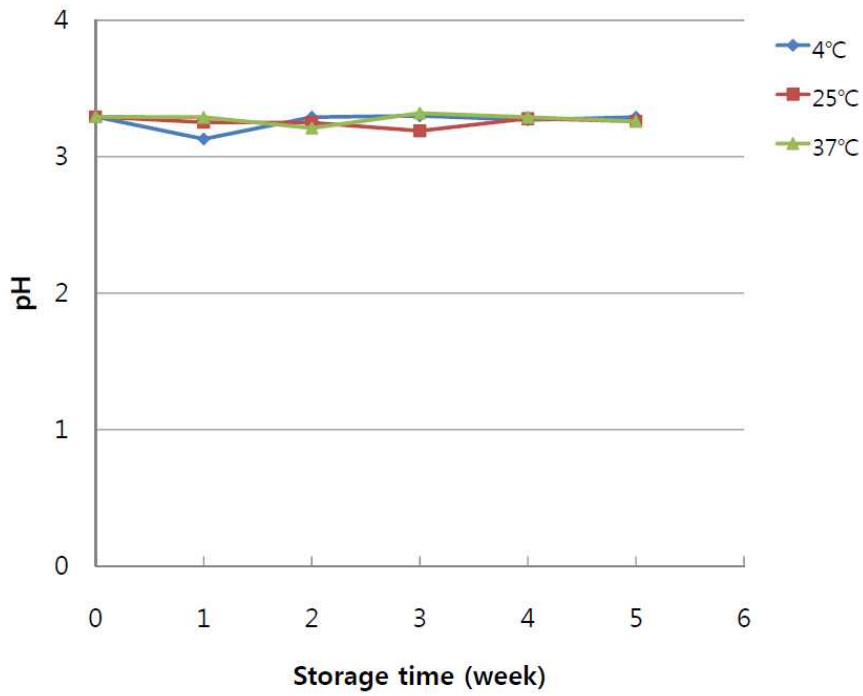


Fig. 4-25. Change in pH of onion vinegar beverage during storage at different temperatures.

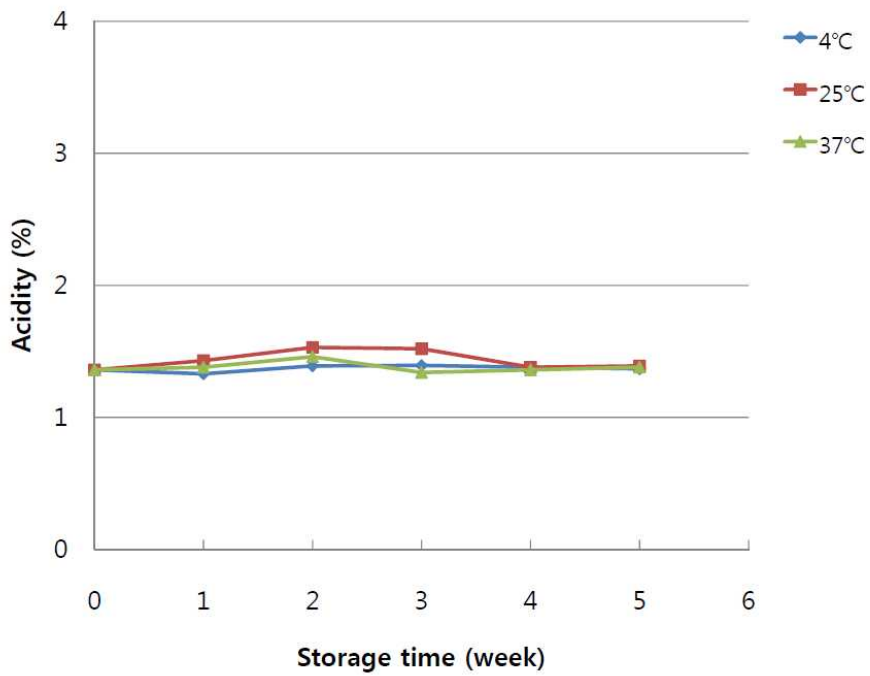


Fig. 4-26. Change in acidity of onion vinegar beverage during storage at different temperatures.

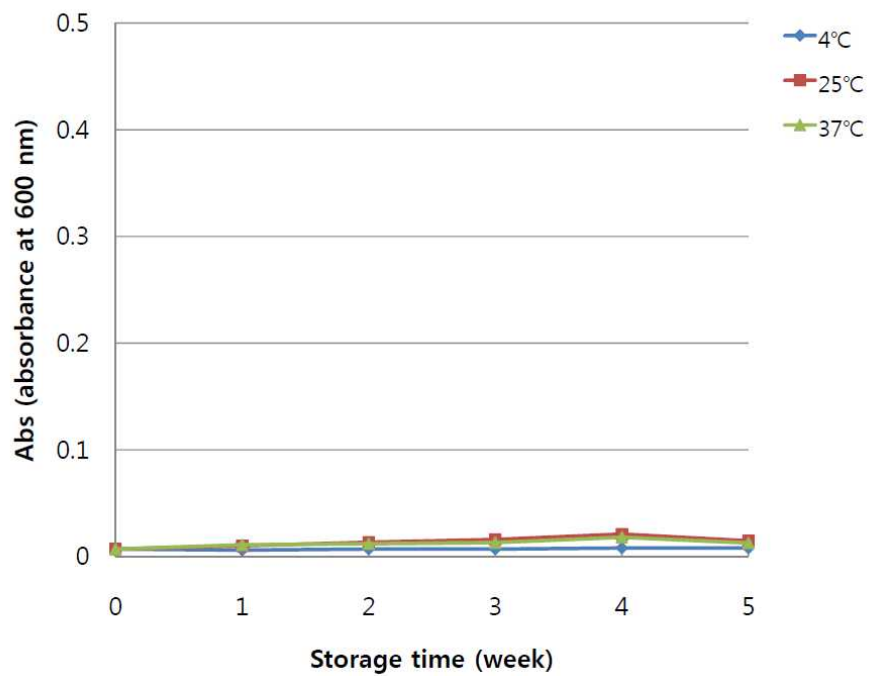


Fig. 4-27. Change in turbidity of onion vinegar beverage during storage at different temperatures.

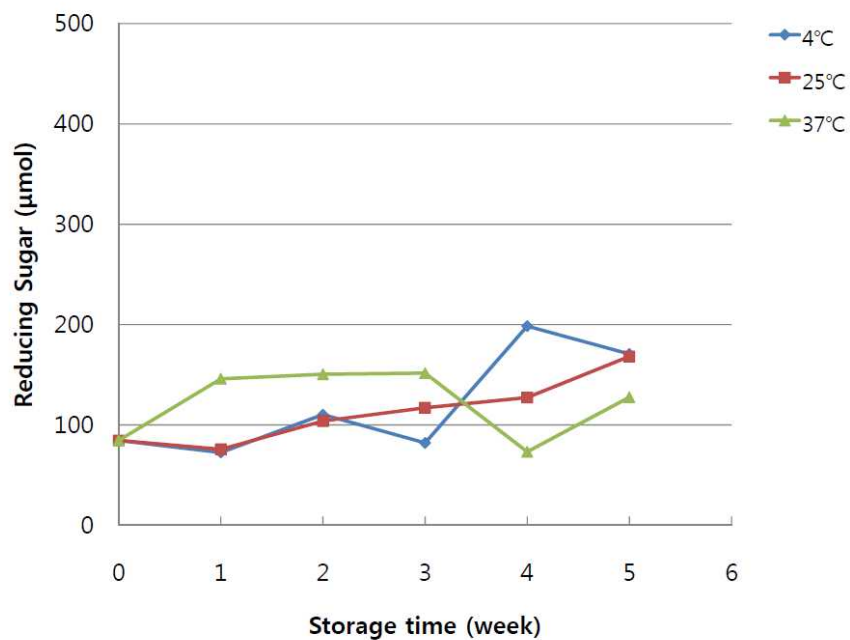


Fig. 4-28. Change in reducing sugar content of onion vinegar beverage during storage at different temperatures.

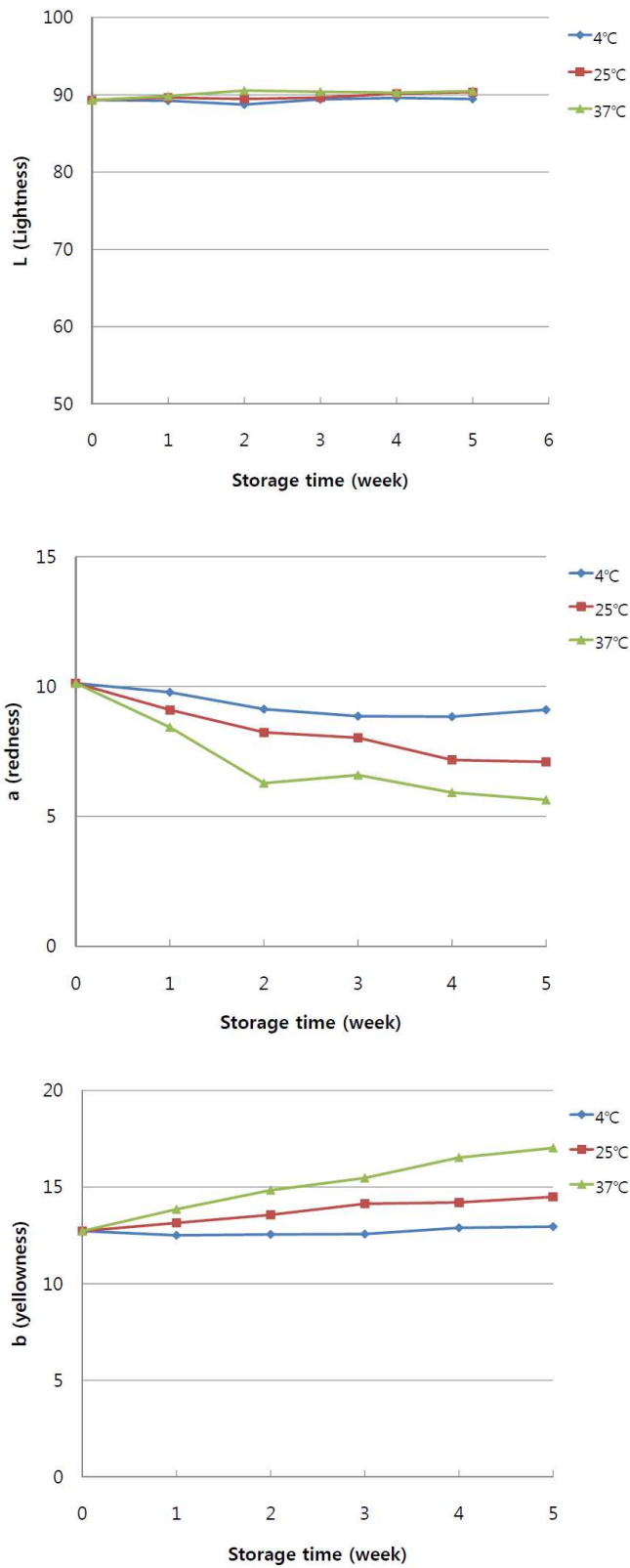


Fig. 4-29. Change in Hunter 's color value of acetic acid fermented onion juice during storage at different temperature.

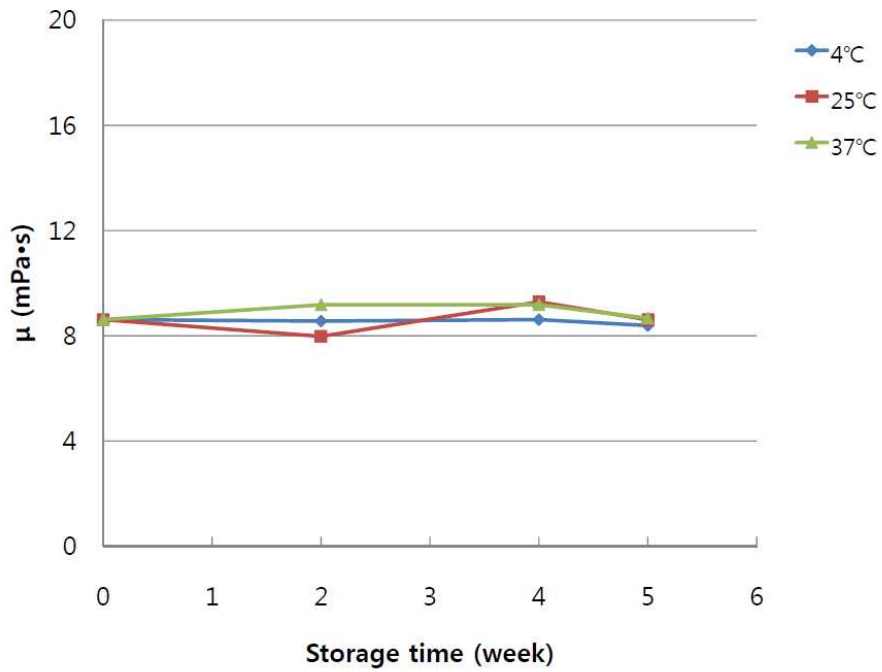


Fig. 4-30. Change in viscosity of onion vinegar beverage during storage at different temperatures.

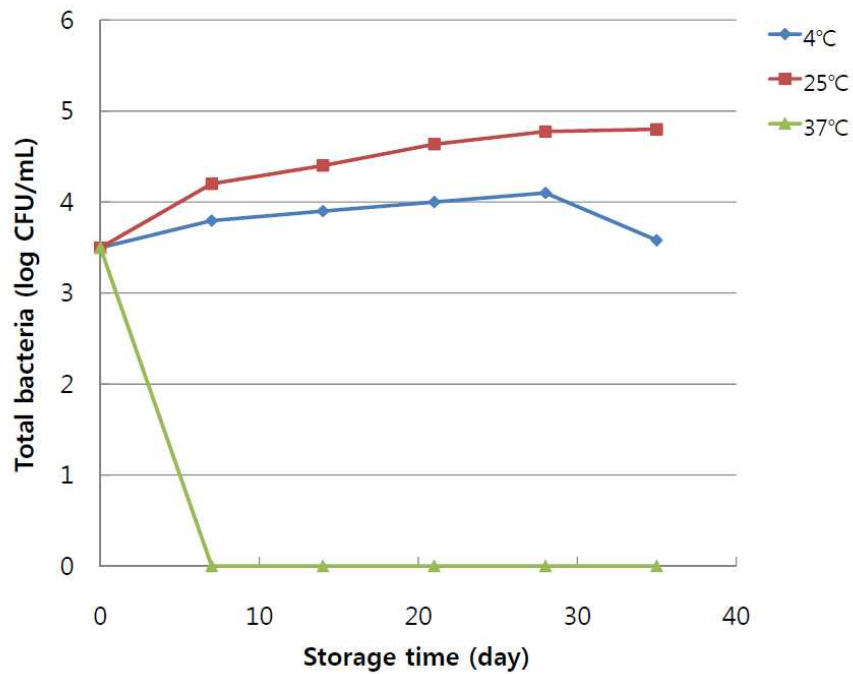


Fig. 4-31. Change in viable cell number of total bacteria of onion vinegar beverage during storage at different temperatures.

(3) 양과유산분말제품의 저장 중 물리화학적 및 미생물학적 변화

양과분말제품은 25, 37, 45°C에서 약 한달 간 저장하면서 5~7일 간격으로 수분활성도, 수분함량, 환원당, 색도, pH, 산도를 측정하였으며 저장기간과 온도에 따른 변화를 관찰하였다. 저장온도에 따른 수분활성도의 값은 저장초기 0.3, 최대값은 0.46, 최소값은 0.25로 저장온도에 따른 유의적인 차이는 없었다(Fig. 4-32). 고형분에 함유되어 있는 수분을 105°C에서 건조시켜 측정한 양과유산분말의 수분함량도 0.5 % 미만의 값을 갖으며 저장온도에 따른 변화를 나타내지 않았다(Fig. 4-33).

pH는 25, 37, 45°C 모든 온도에서 저장기간 동안 2.6의 일정한 값을 유지하였고(Fig 4-34), 산도는 저장초기의 4.7 %의 값에서 25, 37, 45°C의 모든 저장온도에서 4.37, 4.45, 4.1로 감소하였다(Fig 4-35). 통계분석결과 25°C에서는 22일 이후부터 37°C와 45°C에서는 10일 이후부터 유의적인 차이를 보였다.

환원당은 모든 저장온도에서 저장초기 값에 비해 감소하였는데, 저장온도 37, 45°C에서 저장된 시료는 저장 후 5일 쯤 측정치가 613 μmol 에서 560 μmol 로 급속하게 감소한 반면, 25°C에서 저장된 시료는 765 μmol 로 급속히 증가하였다(Fig 4-36).

색도는 Fig 4-37에 나타낸 바와 같이 25°C에서는 L, a, b값 모두 일정한 값을 유지하였고 저장온도 37, 45°C에서의 L값은 유의적인 차이를 보이며 감소하였고 저장온도가 높아질수록 저장기간에 따른 a, b값이 증가하는 경향을 타나냈는데, 특히 45°C에서 저장한 시료에서 확연하게 나타내었다. 이러한 색도의 변화는 차이식별검사결과 차이점을 나타내지 않았다. 따라서 유산발효분말은 총 실험기간 동안 모든 저장온도에서 안정한 상태를 유지하였다.

분말제품 내 존재하는 미생물 생균수를 측정한 결과 유산균은 Fig. 4-38과 같이 초기에 4.01 log CFU/mL로 존재하였는데 25°C에서 저장하였을 경우 저장기간이 지나고 큰 변화가 없이 저장 28일 후에 3.27 log CFU/mL의 생균수를 나타내었다. 반면에 37°C에서 저장하였을 경우에는 유산균의 감소속도가 매우 빨라 저장 14일째에는 대부분 사멸하는 것으로 나타났으며 45°C에서는 저장 4일만에 대부분 사멸하였다. 총균수도 Fig. 4-39와 같이 유산균수와 유사한 패턴을 나타내었으며 효모와 곰팡이는 저장기간 동안 관찰되지 않았다.

분말제품의 Q10-value인 5를 본 시료에 적용하였을 때, 상온에서 약 6개월의 유통기한을 가질 것으로 예측하고 계속 실험을 진행하여 유통기한을 설정할 것이다.

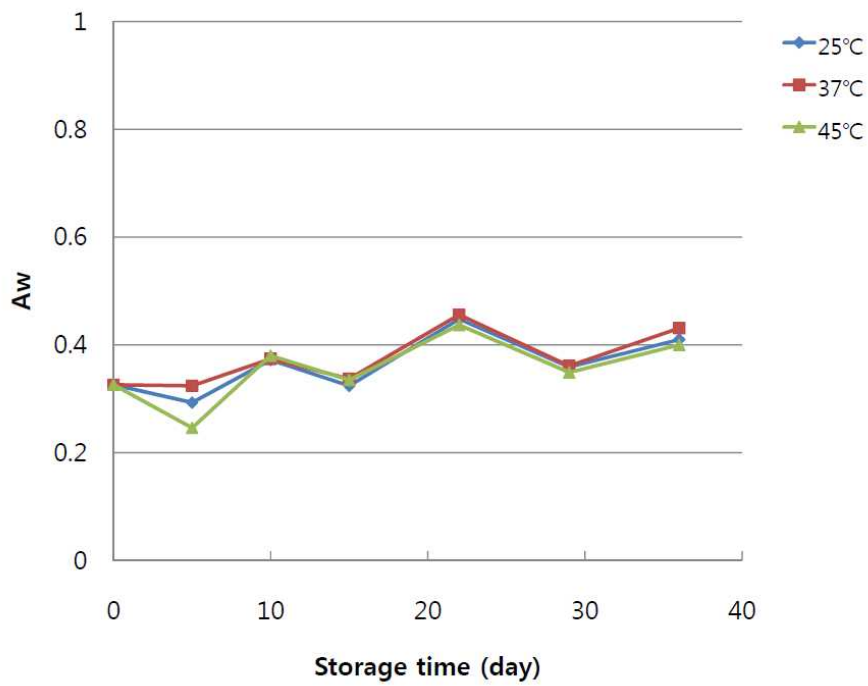


Fig. 4-32. Change in water activity of lactic acid fermented onion powder during storage at different temperatures.

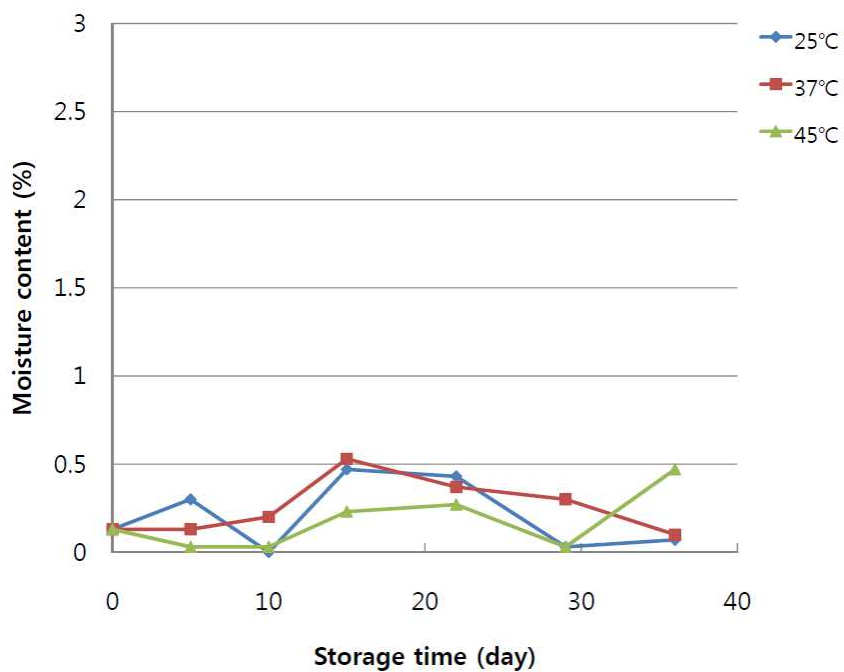


Fig. 4-33. Change in Moisture Content of lactic acid fermented onion powder during storage at different temperatures.

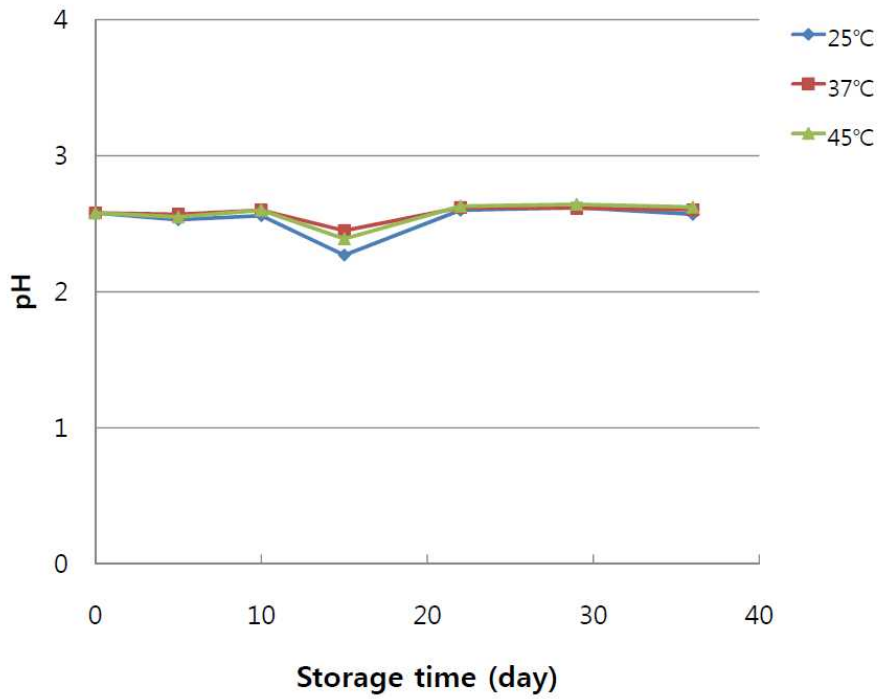


Fig 4-34. Change in pH of lactic acid fermented onion powder during storage at different temperatures.

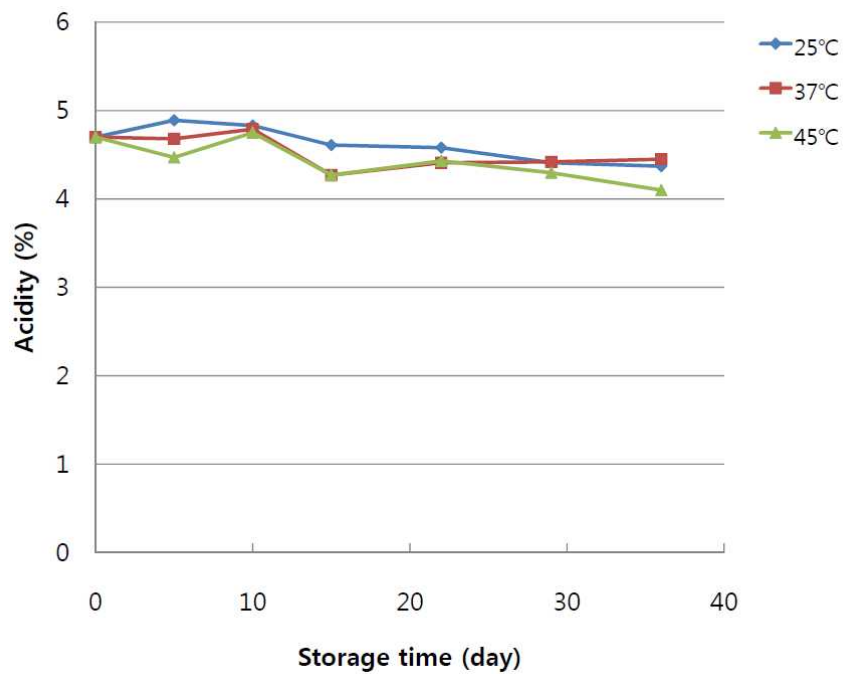


Fig 4-35. Change in acidity of lactic acid fermented onion powder during storage at different temperatures.

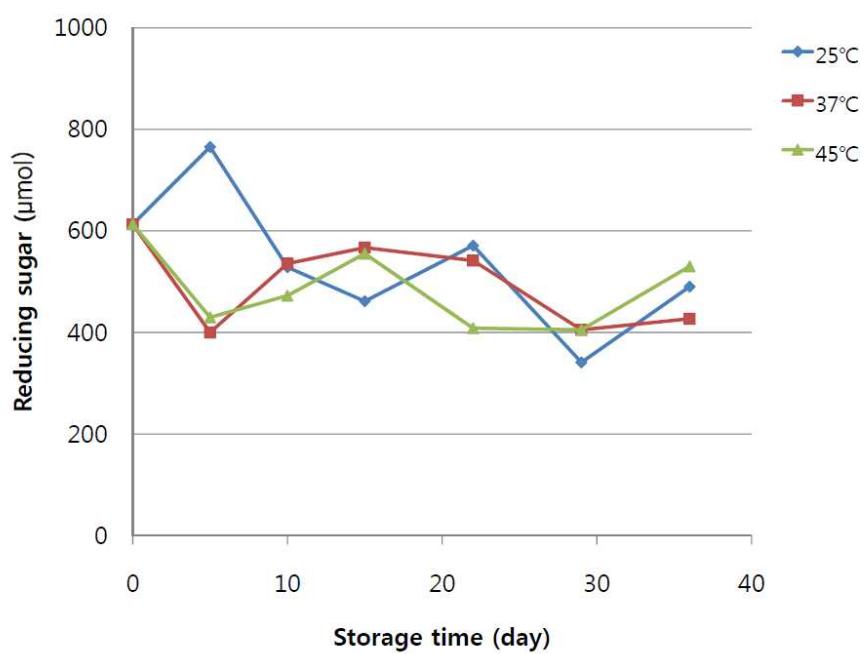


Fig 4-36. Change in reducing sugar of lactic acid fermented onion powder during storage at different temperatures.

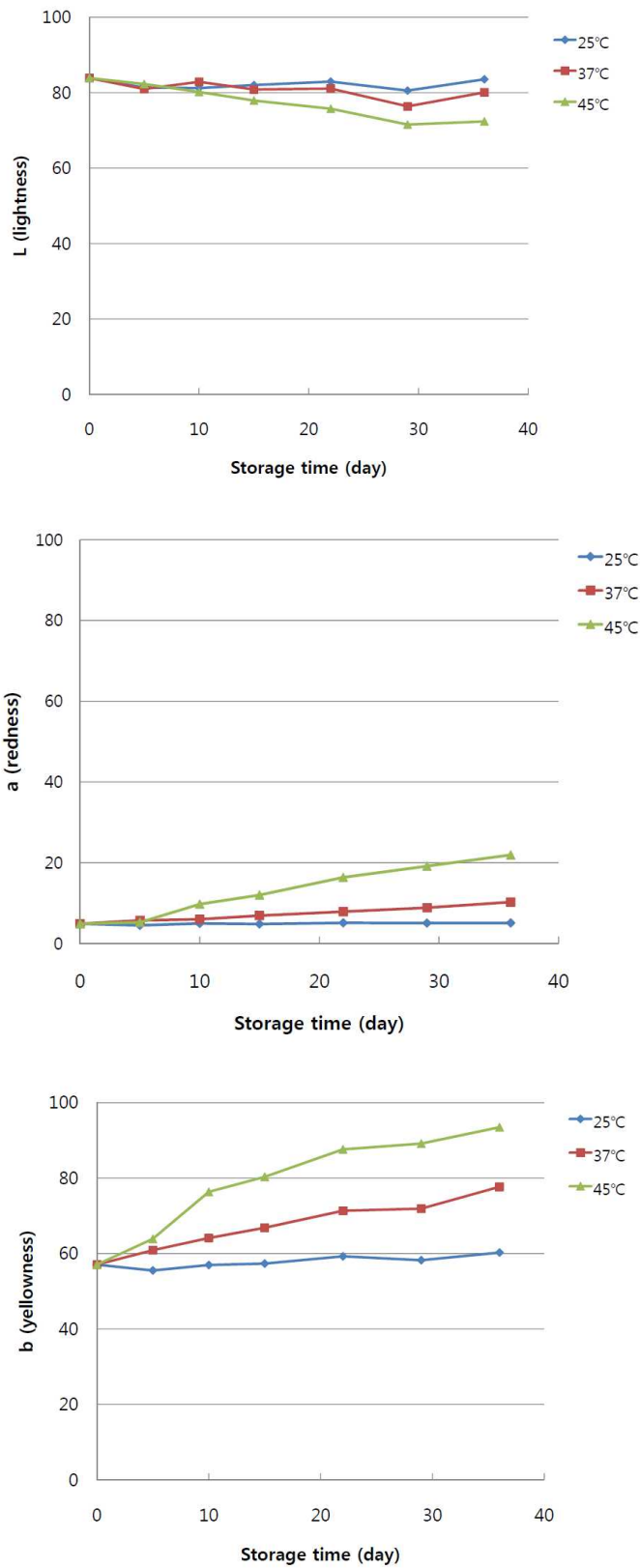


Fig 4-37. Change in Hunter's color value of lactic acid fermented onion powder during storage at different temperatures.

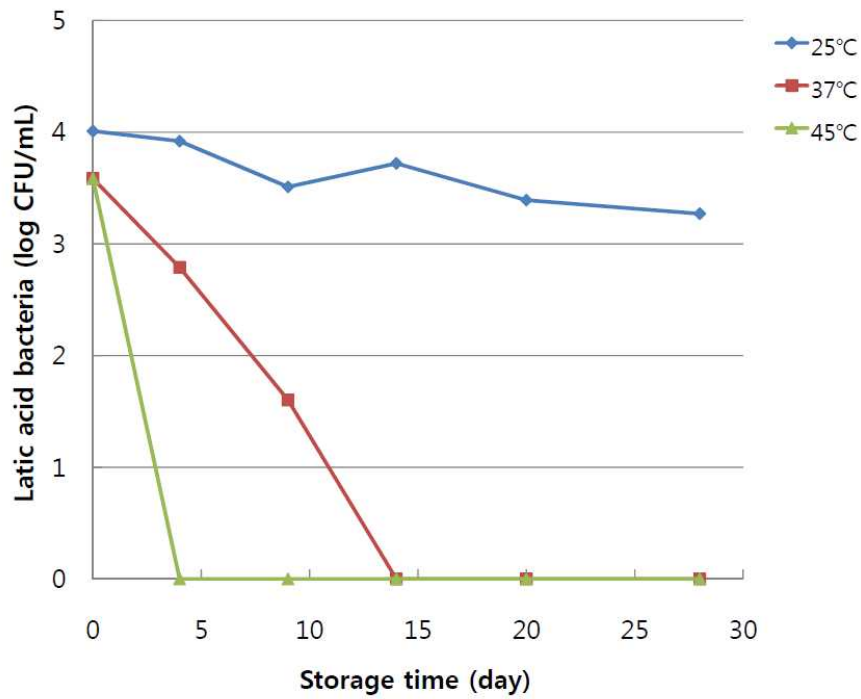


Fig. 4-38. Change in viable cell number of lactic acid bacteria of lactic acid fermented onion powder during storage at different temperatures.

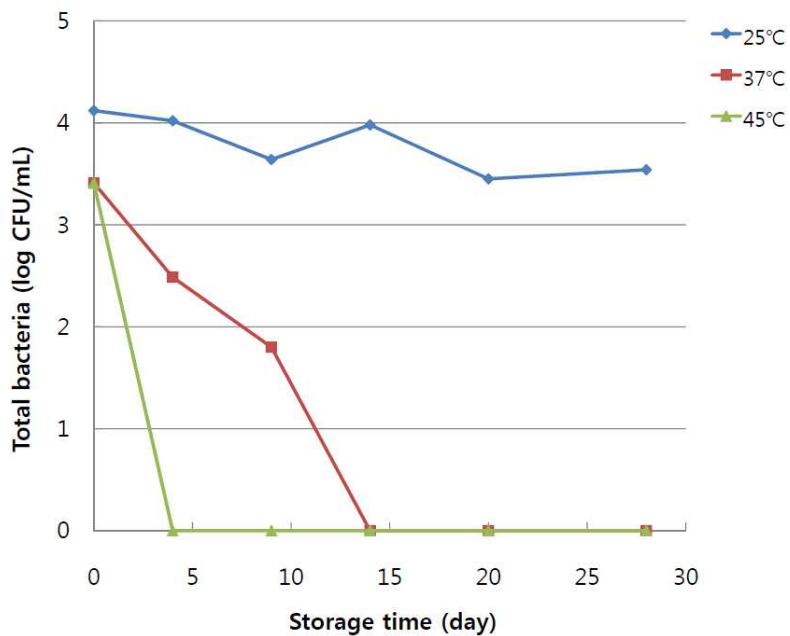


Fig. 4-39. Change in viable cell number of total bacteria of lactic acid fermented onion powder during storage at different temperatures.

(4) 양파초산발효분말 제품의 물리화학적 및 미생물학적 특성 변화

생산된 양파초산발효분말제품을 25, 37, 45℃로 설정된 incubator에 저장하여 저장온도에 따른 물리화학적 특성의 변화를 살펴보았다. 25℃에서 저장한 시료의 수분활성도는 변화가 없었으나 37, 45℃에서 저장한 분말 제품은 저장 9일부터 증가하였다(Fig. 4-40). 각 저장온도에서 저장한 시료의 수분함량(Fig. 4-41)과 pH(Fig. 4-42)는 변화가 없이 일정한 값을 유지하였다. 산도는 Fig. 4-43과 같이 모든 저장온도에서 같은 변화를 보여주었는데 저장 초기 3.39%의 값에서 저장 3일 후 3.1%로 값이 감소하였고 3일 이후부터 일정한 pH값을 나타내었다. 환원당 값은 저장 1주 후 모든 저장온도에서 증가하였다가 2주째 부터는 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 4-44).

저장기간 중 색도의 변화는 Fig. 4-45에 나타내었다. 모든 저장온도에서 저장기간에 따른 색도의 L, a, b, ΔE 값의 유의적인 차이 없이 저장기간 동안 일정한 값을 나타낸 것으로 보아 초산발효분말제품의 색도는 저장온도의 영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다. 양파초산발효분말도 모든 저장온도에서 차이식별검사를 한 결과 기준 시료와의 패넬들은 시료간의 차이를 인식하지 못하였다.

초산 분말제품 내 존재하는 미생물 생균수를 측정한 결과 Fig. 4-46과 같이 저장온도에 관계없이 총균수가 3 log CFU/mL 수준으로 일정하게 유지됨을 알 수 있었으며 효모와 곰팡이는 저장기간동안 관찰되지 않았다.

분말 제품은 유통기한이 길어 유통기한을 설정하는데 어려움이 있다. 따라서 일반적인 분말제품의 Q10-value 5를 적용하여 유통기한을 예측해 보면 25℃에서 6개월 정도의 저장기간을 갖는 것으로 보인다. 앞으로 실험을 계속하여 양파유산분말제품과 함께 본 제품의 정확한 Q10-value를 구하고, 정확한 유통기한을 예측해 볼 예정이다.

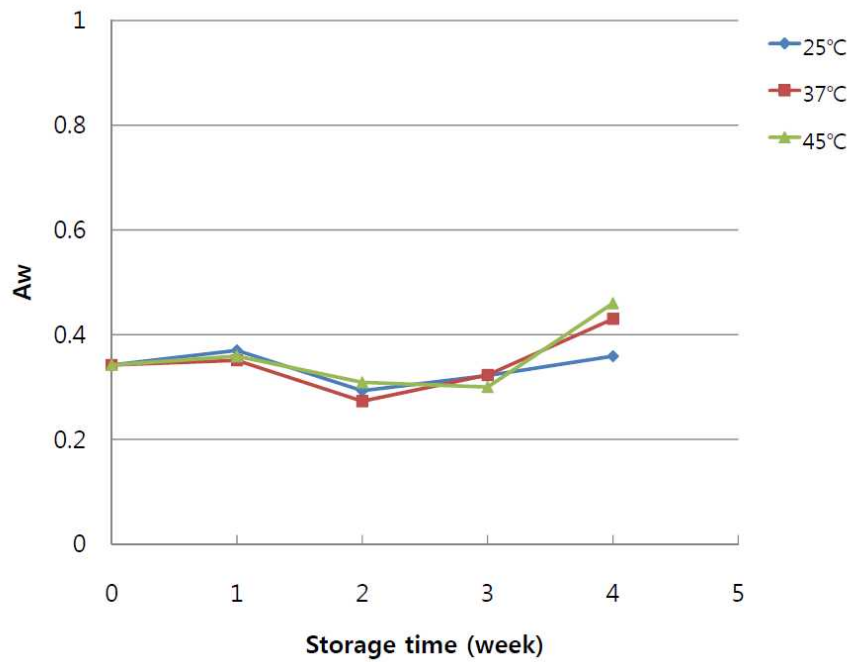


Fig. 4-40. Change in A_w of onion vinegar powder during storage at different temperatures.

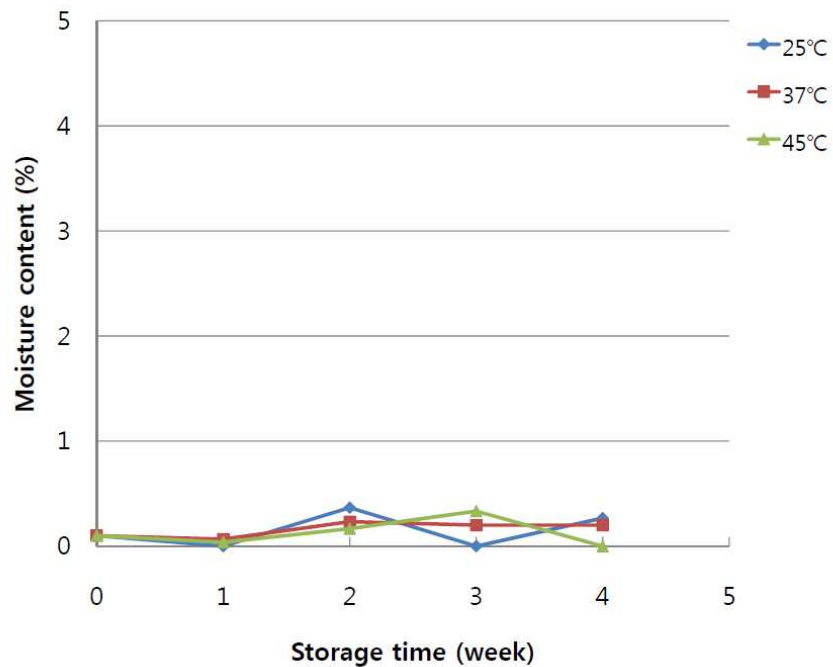


Fig. 4-41. Change in moisture content of onion vinegar powder during storage at different temperatures.

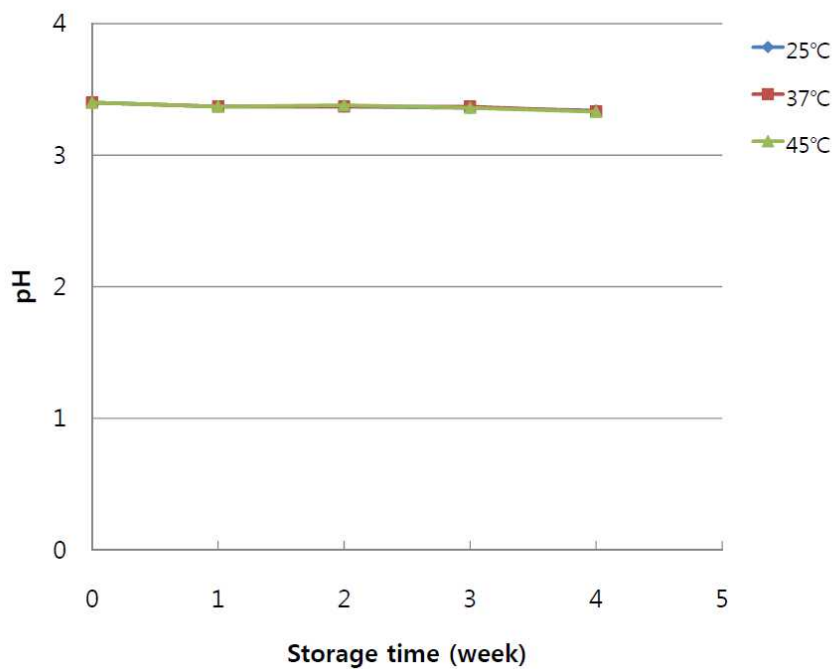


Fig. 4-42. Change in pH of onion vinegar powder during storage at different temperatures.

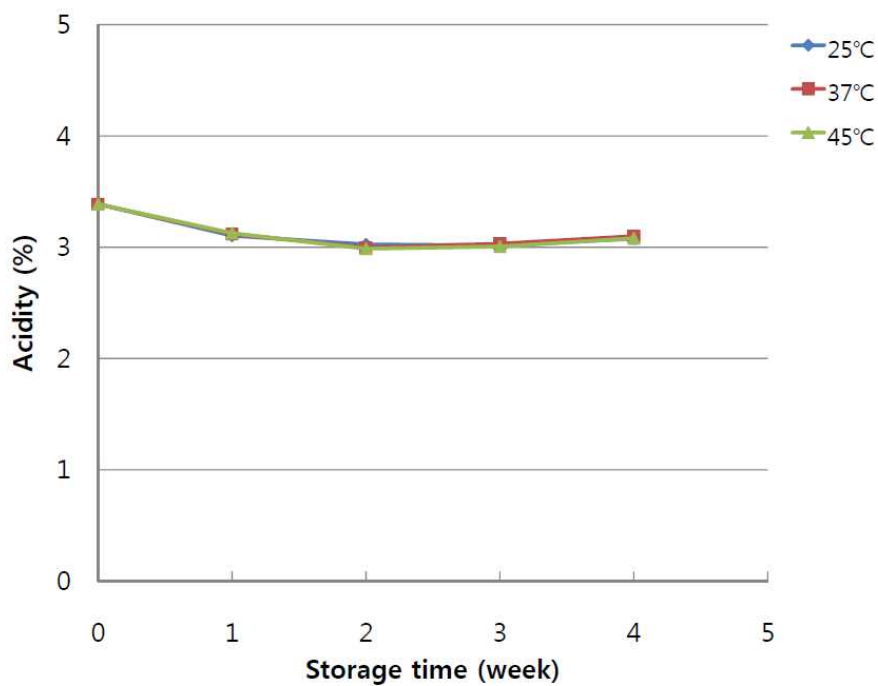


Fig. 4-43. Change in acidity of onion vinegar powder during storage at different temperatures.

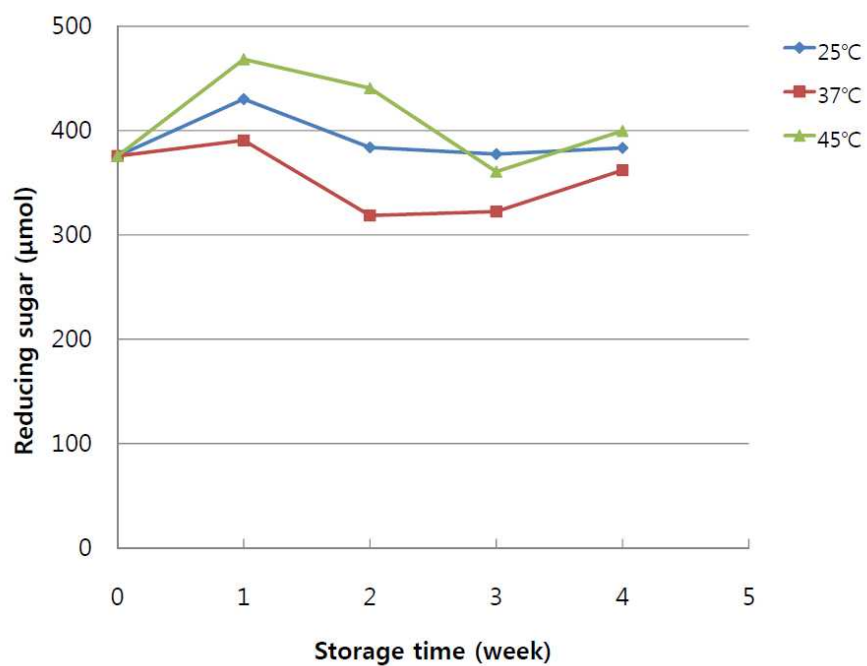


Fig. 4-44. Change in reducing sugar content of onion vinegar powder during storage at different temperatures.

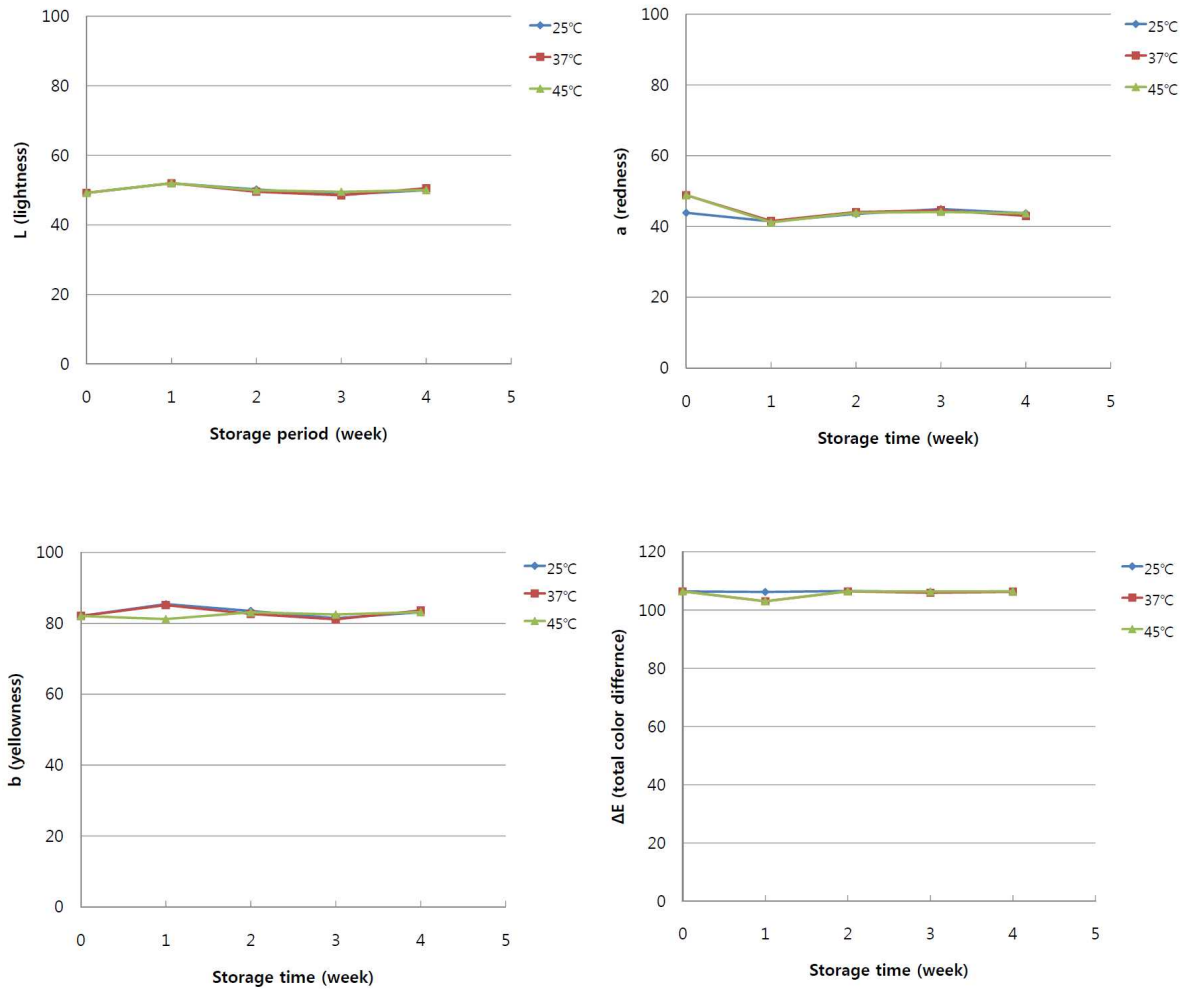


Fig. 4-45. Change in Hunter 's color value of onion vinegar powder during storage at different temperatures.

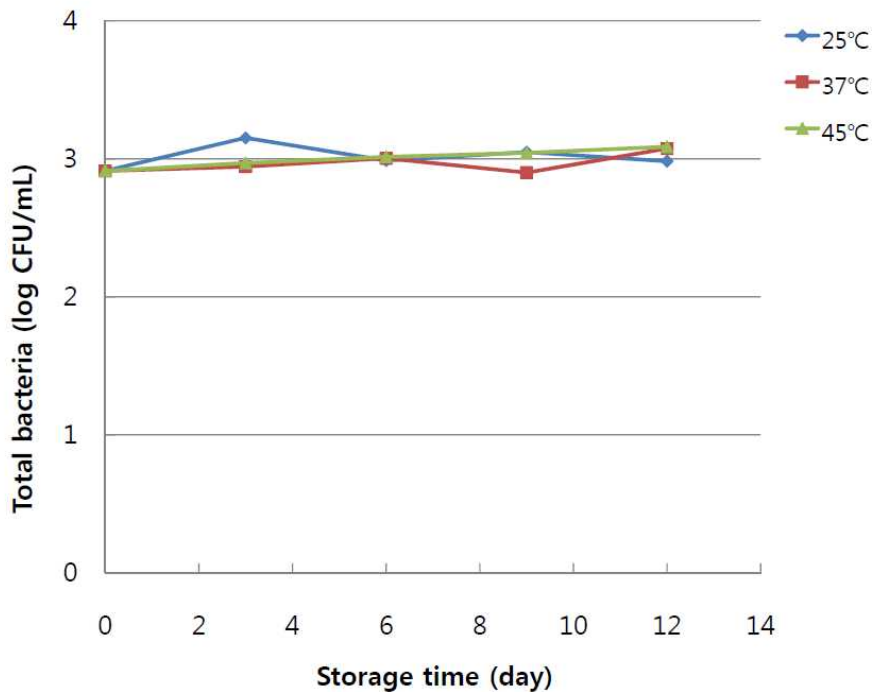


Fig. 4-46. Change in viable cell number of total bacteria of onion vinegar powder during storage at different temperatures.

다. 제품의 경제성 분석

개발된 신제품을 생산하기 위해서는 신규 설비투자를 하게 되는데, 이 때 투자비에 따른 이윤과 투자한 금액을 회수하는 데 필요한 기간 등을 예측한 후, 이에 따른 투자여부를 결정하게 된다. 따라서 본 연구에서 개발한 양과유산발효음료와 양과유산발효분말제품의 생산을 위한 투자자본 회수율(ROI)을 계산해 보고 사업의 수익성을 검토하여 보았다.

(1) 양과유산발효음료

일반적으로 회사에서 1시간당 3,000개의 제품을 생산하고, 기계의 과부하를 방지하기 위해 기계가동을 월 25일로 하고 1일 8시간 생산한다고 할 때 연간생산량은 72,000,000개이다. 2008년 기준 발효유 시장은 1조 2000억 원이었고, 액상발효유에서 고가고기능의 드링크발효유로의 소비전환으로 고기능성발효유는 전체 발효유의 매출의 36.2%를 차지한다. 본 연구에서 개발한 발효제품이 신제품이란 점을 감안하였을 때 양과유산발효음료의 판매량은 전체 발효유시장의 1%를 차지한다고 가정하여 판매량은 43억 4천4백만 원/year으로 예상하였고, 소비자 가격을 고기능성 발효유의 평균가인 1300원으로 정하였다. 따라서 본제품의 연간 생산량은 333,900개/year이고, 생산량은 생산 첫 해를 기준으로 매

해 30%씩 매출이 신장한다고 가정하였다. 180 mL 생산시 , 재료원가는 275원이고, 포장재 가격이 Table 4-43과 같으므로, 총 생산원가는 39원/개가 된다.

Table 4-42. 양과유산발효음료의 배합비와 kg당 원료의 원가

원료명	배합비(%)	원료원가(원/kg)
양과	10	3,320 (시세 적용)
배농축액	2.38	5,053
올리고당	5	958
고과당	10	800
아카시아 벌꿀	2	22,500
구연산	0.2	14,000
비타민 C	0.2	200,000
팽화홍삼농축액	0.02	350,000

Table 4-43. 포장재 원가

포장재	가격
유리병	90원/개
Cap	25/개
박스 (out box)	12원/24개

초기 고정투자비는 10억 원이고 고정투자비에 대한 내용연수는 10년으로 가정하였다. 판관비는 당해 연도 판매비의 35%, 생산원료비를 제외한 제조경비는 그 해 판매비의 30%로 예측하고 생산된 제품이 100% 판매된다고 할 때의 투자자본회수율의 회수율(ROI)을 구하였다.

초기 총 투자비 10억 원과 내용연수 10년에 따른 투자자본회수율(ROI)은 19.5%이고, 각 한 병당 54 원의 이윤을 남길 수 있다. 그러나 시장은 한정되어 있고, 예상과 달리 생산된 제품이 100% 판매되지 않을 때에 따른 부담감이 있기 때문에 많은 기업에서 OEM 방식의 생산을 많이 하고 있다. 따라서 본 연구에서 개발한 양과발효음료 생산을 위해 초기 10억 원을 투자하여 새로운 설계를 확립하는 것과 OEM 생산 시의 BTE(Before Tax Earing)을 비교해 보고, 어느 사업이 더 투자가치가 있는지 비교해 보았다.

OEM 생산 시, 감가상각비를 모두 포함한 생산비로 OEM 생산 공장에 50원/병을 지급하므로 한 병당 제조경비는 441원/병이 된다. 각각의 첫 해년도의 BTE를 비교해보았을 때, OEM 생산 시의 BTE값이 10억 원을 투자했을 때보다 1,136,123,077원의 이득을 보므로 시장이 한정되어 있는 유산양과발효음료는 새로운 시설을 설비하는 것보다는 초기투자비가 없는 OEM 생산을 하는 것이 훨씬 사업성이 있다고 사료된다.

Table 4-44. 10억 원 초기 투자 시 양과유산발효 음료 제품판매에 따른 자금흐름

(단위 : 원)

Year	1	2	3	4	5
연간생산량(병/year)	3,341,538	3,675,692	4,043,262	4,447,588	4,892,346
판매금액(원/year)	4,344,000,000	4,778,400,000	5,256,240,000	5,781,864,000	6,360,050,400
생산원료비(원/year)	1,306,541,538	1,437,195,692	1,580,915,262	1,739,006,788	1,912,907,466
판관비(원/year)	1,520,400,000	1,672,440,000	1,839,684,000	2,023,652,400	2,226,017,640
원료를 제외한 제조경비	4,130,141,538	4,543,155,692	4,997,471,262	5,497,218,388	6,046,940,226
Total cost	3,912,941,538	4,304,235,692	4,734,659,262	5,208,125,188	5,728,937,706
BTE	213,858,462	235,244,308	258,768,738	284,645,612	313,110,174
감가상각비	100,000,000	100,000,000	100,000,000	100,000,000	100,000,000
TI	113,858,462	135,244,308	158,768,738	184,645,612	213,110,174
T	34,157,538	40,573,292	47,630,622	55,393,684	63,933,052
CF	179,700,923	194,671,015	211,138,117	229,251,929	249,177,121

Year	6	7	8	9	10
연간생산량(병/year)	5,381,581	5,919,739	6,511,713	7,162,884	7,879,173
판매금액(원/year)	6,996,055,440	7,695,660,984	8,465,227,082	9,311,749,791	10,242,924,770
생산원료비(원/year)	2,104,198,213	2,314,618,034	2,546,079,838	2,800,687,822	3,080,756,604
관관비(원/year)	2,448,619,404	2,693,481,344	2,962,829,479	3,259,112,427	3,585,023,669
원료를 제외한 제조경비	2,098,816,632	2,308,698,295	2,539,568,125	2,793,524,937	3,072,877,431
Total cost	6,651,634,249	7,316,797,674	8,048,477,441	8,853,325,186	9,738,657,704
BTE	344,421,191	378,863,310	416,749,641	458,424,605	504,267,066
감가상각비	100,000,000	100,000,000	100,000,000	100,000,000	100,000,000
TI	244,421,191	278,863,310	316,749,641	358,424,605	404,267,066
T	73,326,357	83,658,993	95,024,892	107,527,382	121,280,120
CF	271,094,834	295,204,317	321,724,749	350,897,224	382,986,946

i=18	1	2	3	4	5
PVF	0.8475	0.7182	0.6086	0.5158	0.4371
DCF	152,296,532	139,812,723	128,498,658	118,248,145	108,915,320
CDCF	152,296,532	292,109,256	420,607,914	538,856,058	647,771,378
	6	7	8	9	10
PVF	0.3704	0.3139	0.2660	0.2255	0.1661
DCF	100,413,526	92,664,635	85,578,783	79,127,324	63,617,962
CDCF	748,184,904	840,849,540	926,428,323	1,005,555,647	1,069,173,608
i=20	1	2	3	4	5
PVF	0.8333	0.6944	0.5787	0.4823	0.4019
DCF	149,744,779	135,179,553	122,185,628	110,568,205	100,144,285
CDCF	149,744,779	284,924,332	407,109,960	517,678,166	617,822,451
	6	7	8	9	10
PVF	0.3349	0.2791	0.2326	0.1938	0.1615
DCF	90,789,660	82,391,525	74,833,177	68,003,882	61,852,392
CDCF	708,612,110	791,003,635	865,836,812	933,840,694	995,693,086

Table 4-45. OEM 생산 시 자금흐름

(단위 : 원)

year	1	2	3	4	5
연간생산량(병/year)	3,341,538	3,675,692	4,043,262	4,447,588	4,892,346
판매금액(원/year)	4,344,000,000	4,778,400,000	5,256,240,000	5,781,864,000	6,360,050,400
판관비(원/year)	1,520,400,000	1,672,440,000	1,839,684,000	2,023,652,400	2,226,017,640
생산비	1,473,618,462	1,620,980,308	1,783,078,338	1,961,386,172	2,157,524,790
Total cost	2,994,018,462	3,293,420,308	3,622,762,338	3,985,038,572	4,383,542,430
BTE	1,349,981,538	1,484,979,692	1,633,477,662	1,796,825,428	1,976,507,970
year	6	7	8	9	10
연간생산량(병/year)	5,381,581	5,919,739	6,511,713	7,162,884	7,879,173
판매금액(원/year)	6,996,055,440	7,695,660,984	8,465,227,082	9,311,749,791	10,242,924,770
판관비(원/year)	2,448,619,404	2,693,481,344	2,962,829,479	3,259,112,427	3,585,023,669
생산비	2,373,277,268	2,610,604,995	2,871,665,495	3,158,832,044	3,474,715,249
Total cost	4,821,896,672	5,304,086,340	5,834,494,974	6,417,944,471	7,059,738,918
BTE	2,174,158,768	2,391,574,644	2,630,732,109	2,893,805,320	3,183,185,852

② 양과유산발효분말

Table 4-46. 양과유산발효음료의 배합비와 kg 당 원료의 원가

원료명	배합비(%)	원료원가(원/kg)
양과	10	3,320 (시세 적용)
배농축액	2.38	5,053
올리고당	5	958
고과당	5	800
아카시아 벌꿀	2	22,500
구연산	0.2	14,000
비타민 C	0.2	200,000
팽화홍삼농축액	0.02	350,000
Malto dextrin	5	1,250

건강기능식품 중 유산균을 함유한 제품의 판매량은 약 연간 123억 원이므로 이 중 분말제품이 20% 정도 판매된다고 가정하고, 소비자가격은 1포 당 1000원으로 하여 20포 단위를 소포장으로 하였고(알루미늄 파우치 35원/1포, 박스 내·외 포장 30원), 1포 당 중량은 2 g이고, 연간 판매량은 2,400,000,000원, 소비자가격은 일반 유산발효분말제품의 평균가로 1포 당 1,000원으로 하였다. 따라서 연간생산량은 2,400,000포/year 이고 제조 원가를 포함한 제조경비와 판매비는 총 판매량의 40%씩 지출되고, 세율은 50%로 적용하였다. 판매량은 시장이 형성됨에 따라 0.5%씩 매해 증가하고, 감가상각은 초기투자비에 대해 10년간 발생한다고 가정하고, 정액법으로 계산하였다.

1포 당 원가는 99원, 판매가는 1,000원으로 유산발효음료에 비해 margin은 훨씬 크지만 투자자금회수율(ROI)은 32% 이상으로 높은 회수율을 보였고, 한 포 당 170원의 높은 이윤을 갖는다. 이와 같이 높은 회수율을 갖는 데에는 음료에 비해 낮은 원가와 건강기능식품의 높은 소비자가격 때문이라 생각된다. 분말제품은 음료에 비해 ROI값과 margin이 좋고, 유통기한이 길고 유통이 용이하다는 장점이 있기에 음료에 비하여 좋은 사업성을 갖고 있다고 보인다.

Table 4-47. 10억 원 초기 투자 시 양과유산발효 분말 제품판매에 따른 자금흐름

(단위 : 원)

Year	1	2	3	4	5
생산량(포/year)	2,400,000	2,520,000	2,772,000	3,049,200	3,354,120
판매금액(원/year)	2,400,000,000	2,520,000,000	2,772,000,000	3,049,200,000	3,354,120,000
제조경비(원/year)	720,000,000	756,000,000	831,600,000	914,760,000	1,006,236,000
관관비(원/year)	960,000,000	1,008,000,000	1,108,800,000	1,219,680,000	1,341,648,000
Total cost(원/year)	1,680,000,000	1,764,000,000	1,940,400,000	2,134,440,000	2,347,884,000
BTE	720,000,000	756,000,000	831,600,000	914,760,000	1,006,236,000
D	100,000,000	100,000,000	100,000,000	100,000,000	100,000,000
TI	620,000,000	656,000,000	731,600,000	814,760,000	906,236,000
T	310,000,000	328,000,000	365,800,000	407,380,000	453,118,000
CF	410,000,000	428,000,000	465,800,000	507,380,000	553,118,000

Year	6	7	8	9	10
생산량(포/year)	3,689,532	4,058,485	4,464,334	4,910,767	5,401,844
판매금액(원/year)	3,689,532,000	4,058,485,200	4,464,333,720	4,910,767,092	5,401,843,801
제조경비(원/year)	1,106,859,600	1,217,545,560	1,339,300,116	1,473,230,128	1,620,553,140
관관비(원/year)	1,475,812,800	1,623,394,080	1,785,733,488	1,964,306,837	2,160,737,520
Total cost(원/year)	2,582,672,400	2,840,939,640	3,125,033,604	3,437,536,964	3,781,290,661
BTE	1,106,859,600	1,217,545,560	1,339,300,116	1,473,230,128	1,620,553,140
D	100,000,000	100,000,000	100,000,000	100,000,000	100,000,000
TI	1,006,859,600	1,117,545,560	1,239,300,116	1,373,230,128	1,520,553,140
T	503,429,800	558,772,780	619,650,058	686,615,064	760,276,570
CF	603,429,800	658,772,780	719,650,058	786,615,064	860,276,570

제 5 절 양파 발효음료의 기능성 검증

1. 서론

양파(*Allium cepa* L.)는 백합과에 속하는 다년생 식물로, 재배역사가 오래되었고 특유의 맛과 향기를 지니고 있어 고추, 마늘 등과 더불어 전 세계적으로 많이 이용되고 있는 조미 채소 중의 하나이다(Kim & Chun, 2001). 또한 고대부터 동양에서는 마늘과 함께 한약재로 애용되어 해열, 구충, 해독, 장염, 중풍치료 등에 널리 사용되었다(Park et al., 1991; Sheo et al., 1993). 최근의 연구에 의하면 양파에는 기능성 성분으로 항산화 작용을 나타내는 flavonoid계 물질과 다양한 생리활성을 갖는 황화합물이 함유되어 있는 것으로 밝혀져 성인병 예방을 위한 기능성 식품으로서의 관심이 증가되고 있다(Griffiths et al., 2002; Jakubowski, 2003).

양파의 flavonoid 성분 중에는 quercetin, kaempferol, rutin과 같은 flavonoid계 물질이 함유되어 있으며, 특히 강력한 항산화제로서 세포의 산화적 손상과 지방의 산패를 막아주는 역할을 하는 quercetin은 전체 flavonoid의 80% 이상으로 다른 야채나 과일에 비하여 매우 높게 함유되어 있다(Hertog et al., 1993; Lanzotti, 2006). 양파에 존재하는 이러한 quercetin 관련물질과 allyl disulfide, diallyl sulfide, S-methylcystein-sulphoxide와 같은 황화합물은 항산화, 항고혈압, 항동맥경화, 항균작용, 콜레스테롤 저하, 알레르기 반응 억제, 혈액순환 증가 등에 효과가 우수한 것으로 보고되고 있다(Park et al., 1991; Sheo et al., 1993; Babu & Srinivasan, 1999; Chen et al., 2000; Griffiths et al., 2002; Benkebia, 2004; de Pascual-Teresa et al., 2004; El-Demerdash et al., 2005; Kim et al., 2006)

국내의 양파 생산량은 1990년대 이후 꾸준히 증가 추세에 있으며 2005년 전국 생산량은 1,023,000톤으로 마늘 생산량의 약 2배 정도를 차지하고 있다. 그러나 양파는 수분이 약 90%로 저장기간 중 중량감소 및 부패가 많이 일어나는 등 저장성이 매우 떨어지며, 발근 및 위조에 의해 상품가치를 상실하는 경우가 많이 발생한다(Chung, 1982; Lee et al., 1984; Kim et al., 1986). 또한 재배 면적과 작황상황에 따라서 가격 변동이 매우 크므로 과잉으로 생산 및 출하될시 가격폭락을 방지하기 위하여 저장방법 및 소비대책이 큰 문제점으로 대두되고 있다. 양파의 저장성을 향상시키기 위한 방법으로 건조, 열처리, 저온저장, 방사선처리, 용매 추출액의 제조, 건조 및 분말화 등의 방법이 연구되었으나, 마늘과 비교하여 연구보고가 미흡한 실정이며 현재까지 생양파가 갖는 품질을 유지할 정도의 만족할만한 저장성은 확보하지 못하고 있다.

양파는 우리나라 남부지방의 특산물로 5~7월 사이에 대부분 생산되어 저온고에 저장되었다가 수요량이 많은 시기에 출하하는데, 일부만이 가공용으로 소비되고 90% 이상은 가공처리 없이 생체로 소비되고 있다. 따라서 양파를 이용한 다양한 가공식품의 개발은

양파의 과잉생산으로 인한 가격폭락을 방지하고, 국내외적으로 우리나라 농산물의 고부가가치화를 추구하는데 크게 기여할 것이다.

따라서 다양한 생리활성기능을 지니고 있는 양파를 이용하여 기능성이 강화되고 기호성을 높인 음료를 제조하여 산업화하기 위한 목적으로 다음과 같은 연구를 수행하였다. 제 1차년도에는 양파 육질과 껍질의 추출 방법 및 양파의 살균·저장에 따른 기능성 성분을 분석하였다. 제 2차년도에는 높은 생리활성을 갖는 양파 발효음료를 개발하기 위하여 양파 착즙액을 이용하여 유산 및 초산 발효액을 제조한 후 이에 대한 항산화, 항암, 항고혈압 활성을 조사하였다. 제 3차년도에는 양파발효음료의 생리활성을 검증하기 위하여 유산 발효액과 초산발효액을 동결건조한 분말시료를 흰쥐에 급여한 후 혈액과 생화학적 활성 변화를 조사하였으며, 이와 함께 운동수행능력에 미치는 영향을 평가하였다.

2. 연구 방법

가. 공시 재료 및 양파 시료의 제조

실험에 사용된 양파는 전라남도 함평산 양파로 농협 하나로마트에서 구입하여 -20°C 의 저장고에 저장하면서 사용하였다. 양파의 껍질을 제거한 후 양파를 잘게 절단하고 착즙기로 5분간 마쇄하여 착즙액을 제조하였다. 분말시료의 경우 마쇄된 양파를 동결건조기(일신랩, 대한민국)의 shell에 넣고 응축온도 -50°C , 압력 10 mTorr의 조건으로 48시간 동결 건조하여 제조하였다. 양파껍질은 수세, 정선 및 탈수과정을 거쳐 열풍건조한 후 분쇄기로 분쇄하여 35~100 mesh에 속하는 분말을 시료로 사용하였다.

나. 추출, 살균 및 저장 조건

각 시료 당 10배수의 50, 80, 100°C 열수 및 60%의 ethanol 또는 methanol 용매를 가하여 12시간 추출하였으며, 원심분리에 의해 추출액으로부터 불용성 물질을 제거한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)로 감압농축하였다. 추출한 시료의 살균은 60°C 와 80°C 에서 30분, 105°C 와 121°C 에서 15분 동안 수행하였다. 살균 처리한 추출액은 100 mL의 멸균된 screw-capped glass bottle에 80 mL씩 분주한 후 밀봉하여 4°C 와 25°C 에 저장하였다.

다. 기능성 성분 분석

(1) 총 phenol 함량 측정

총 phenol 함량은 Folin-Denis 법에 따라 비색 정량하였다(Gutfinger, 1981). 즉, 일정하게 희석한 추출액 1 mL에 Folin-Ciocalteu 시약(Sigma, USA)과 10% Na_2CO_3 용액을

각 1 mL씩 차례로 가하고 충분히 교반한 다음 실온에서 1시간 정치한 후 spectrophotometer(Biochrom, England)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 농도별로 조제하여 얻는 표준검량곡선으로부터 시료 추출물의 총 phenol 함량을 산출하였다.

(2) 총 flavonoid 함량 측정

각 추출물의 총 flavonoid 함량은 aluminum chloride 법에 따라 비색 정량하였다 (Moreno et al., 2000). 즉, 일정하게 희석한 추출액 0.5 mL에 95% 에탄올 1.5 mL, 10%(w/v) aluminum chloride hexahydrate(AlCl_3) 0.1 mL, 1 M potassium acetate (CH_3COOK) 0.1 mL 및 증류수 2.8 mL를 차례로 가하여 충분히 교반한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 415 nm에서 spectrophotometer(Biochrom, England)로 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 하여 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 얻어진 표준검량곡선으로부터 시료 추출물의 총 flavonoid 함량을 산출하였다.

(3) 총 thiosulfinate 함량 측정

총 thiosulfinate 함량은 Han et al.(1995)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉, 2 mM cysteine이 함유된 50 mM *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N*-(2-ethane sulfonic acid)(HEPES, pH 7.5, Sigma, USA) 용액 0.5 mL에 추출액 0.1 mL를 가하고, 4.4 mL의 50 mM HEPES 용액으로 총 반응용액의 부피를 5 mL로 조절한 후 27°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 용액의 1 mL를 취하여 50 mM HEPES buffer로 조제한 0.4 mM DTNB 1 mL를 가하여 잘 혼합한 후 27°C에서 10분간 반응시킨 다음 412 nm에서 spectrophotometer(Biochrom, England)로 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 cysteine을 농도별로 조제하여 얻는 표준검량곡선으로부터 시료 추출물의 총 thiosulfinate 함량을 산출하였다.

(4) HPLC에 의한 quercetin 정량

Wach 등(2007)의 방법에 따라 시료 200 μl 를 2.8 M HCl-methanol(60:40, v/v)에 가하고 20분 동안 열탕처리한 후 dessicator를 이용하여 건조하였다. 건조된 시료는 water/methanol (60:40, v/v)에 녹인 다음, membrane filter(millipore 0.20 μm)로 여과한 후 Table 5-1과 같은 조건으로 분석하였다.

Table 5-1. Analytical conditions for quercetin by HPLC

	Conditions
Instrument	Waters associates HPLC system
Column	Nova-Pak C ₁₈ column
Detector	UV-Vis detector
Wave length	375 nm
Mobile phase	A: 0.1% formic acid B: 100% methanol
Gradient	linear gradient of 0~100% of methanol over 30 min
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 μ L

라. 양파 착즙액의 유산 발효

살균된 양파 착즙액에 *Pediococcus pentosacues* KC-007을 2%(v/v) 접종한 다음 37°C에서 혐기적 조건으로 일정기간 발효시켜 유산 발효액을 얻었으며, 팽화 홍삼이 첨가된 발효액은 양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액(60°Brix, (주)그린바이오)을 일정량 첨가한 후 동일한 조건에서 발효하여 얻어졌다.

마. 양파 착즙액의 초산 발효

양파식초 발효는 2단계 초산 배양에 의해 수행되었다. 즉, 살균된 양파 착즙액을 효모로 알코올 발효시켜 여액의 알코올 함량을 최적의 초기 알코올 농도인 4%로 조절한 후 *Acetobacter tropicalis*를 3%(v/v) 접종한 다음 일정기간 발효시켜 1~3%의 초산 발효액을 얻었다.

바. ABTS cation decolorizing assay에 의한 총 항산화력 측정

총 항산화력은 ABTS cation decolorizing assay 방법에 의해 측정하였다(Re et al., 1999). 즉, 7.4 mM의 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma Aldrich)와 2.6 mM의 potassium persulphate를 암소에서 하루 동안 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 다음 이 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 물의 흡광계수를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 시료 30 μ L를 가하여 흡광도의 변화를 정확히 30분 후에 측정하였으며, 표준물질로서 동량의 Trolox[®]를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 시료의 항산화 능력(TEAC)을 측정하였다.

사. DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)에 의한 전자공여능 측정

전자공여능(electron donating ability, EDA)은 Blois의 방법(1958)을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 99.9% ethanol로 조제한 4×10^{-4} M α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH, Sigma) 용액 0.8 mL를 가한 후 vortex mixer를 사용하여 10초간 혼합하였다. 10분 후 분광광도계(UVmini-1240, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식을 이용하여 계산하였다. 전자공여능은 시료 첨가구와 비첨가구(대조군)의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{EDA (\%)} = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

A₁: 시료 첨가구의 흡광도

A₀: 시료 대조군의 흡광도

아. Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성 측정

ACE 저해활성은 Cushman과 Cheung의 방법(1971)을 응용하여 ACE 조효소액을 제조하여 수행하였다. 즉, 0.3 M NaCl을 함유한 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)에 rabbit lung acetone powder(Sigma Aldrich)를 1 g/10 mL(w/v)의 농도로 4°C에서 24시간 동안 추출한 후, 4°C, 4,000 rpm에서 40분간 원심 분리하여 ACE 조효소액을 얻었다. ACE 저해활성은 시료 50 μ L에 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 100 μ L와 ACE 조효소액 50 μ L를 가한 다음 37°C에서 5분간 예비반응 시킨 후, 0.3 M NaCl이 함유된 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 5 mL에 HHL(hippuryl-histidyl-leucine) 25 mg을 첨가하여 만든 기질 50 μ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이에 1 N HCl 250 μ L를 가하여 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL을 가해 15초간 교반한 후 원심분리(3,000 rpm/5 min, 4°C)하여 상등액 1 mL을 얻었다. 이 상등액을 감압 건조시켜 증류수 3 mL을 넣은 후에 228nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 측정하였다. 대조구로서는 추출물 대신 추출용매 50 μ L를 가해 실험하였으며, ACE 저해활성효과는 다음 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ACE inhibition (\%)} = 1 - ((S-SB)/(C-CB)) \times 100$$

S: sample absorbance

SB: absorbance of sample blank

C: control absorbance

CB: absorbance of control blank

자. 종양세포의 배양

종양세포주는 A-549(human lung carcinoma), SK-MES-1(human lung carcinoma),

DLD-1 (human colon adenocarcinoma), Caco-2(human colon adenocarcinoma)를 사용하였으며, 세포의 배양은 Gibco사(Life Technologies, INC., USA)의 RPMI1640 배지와 DMEM, MEM 배지에 10% fetal bovine serum(FBS, heat inactivated)과 1% penicillin-streptomycin을 각각 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 수행하였다 (Monjazeba, et al, 2005).

차. MTT assay

항종양활성을 알아보기 위하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 실행하였다. 즉 각각의 종양세포주를 2×10⁵ cells/mL 농도로 조절한 후에 96 well plate에 100 µL씩 접종하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후, 각각의 시료를 100 µL 접종하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 MTT solution(0.5 mg/mL)을 각 well당 50 µL씩 첨가한 후 4시간 추가 배양하여 formazan 형성을 유도시켰고, 이것을 용해시키기 위하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 각 well당 100 µL 첨가한 후 plate shaker에서 20분간 교반하여 Multi-well scanning spectrophotometer(microlate autoreader, Bio-Tek instrument, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항종양활성은 세포성장 저해율로 평가하였으며, 저해율이 50% 이상인 경우 항종양활성이 있는 것으로 판정하였다(Yoon et al., 2005).

$$\text{Growth inhibition rate(\%)} = \left[1 - \frac{\text{OD of treated cells}}{\text{OD of control cell}} \right] \times 100$$

카. 동물실험

(1) 실험동물의 사육 및 유산발효양과식이군의 분류

본 연구는 6주령의 수컷 SD계(Sprague Dawley) 32마리를 4주간 고지방식이 대조군(HS: high-fat diet sedentary group, n=8), 고지방식이 운동군(HE: high-fat diet exercised group, n=8), 유산발효양과식이 대조군(OS: Onion[fermented with lactic acid bacteria] supplemented diet sedentary group, n=8), 유산발효양과식이 운동군(OE: Onion [fermented with lactic acid bacteria] supplemented diet exercised group, n=8)으로 분류하여 사육하였다. 1주간 환경적응을 위하여 본 실험 전에 1주일간 고품 배합사료로 예비 사육을 실시하였으며, cage 당 2마리씩 사육하였다. 사육실 실내온도는 23±1°C, 습도는 50±5%를 유지하고 사육기간 동안 명기는 20:00~08:00로 설정하였다. 사육기간 동안 식이와 물은 자유섭취가 가능하도록 하였다.

(2) 실험동물의 사육 및 초산발효양과 식이군의 분류

6주령의 수컷 SD계(Sprague Dawley) 32마리를 4주간 고지방식이 대조군(HS: high-fat diet sedentary group, n=8), 고지방식이 운동군(HE: high-fat diet exercised group, n=8), 초산발효양과식이 대조군(AS: Onion[fermented with acetic acid bacteria] supplemented diet sedentary group, n=8), 초산발효양과식이 운동군(AE: Onion[fermented with acetic acid bacteria] supplemented diet exercised group, n=8)으로 분류하여 사육하였다. 실험동물의 사육은 위에서 언급한 것과 동일한 방법에 의해 수행되었다.

(3) 실험동물의 운동훈련

운동군은 수영 운동을 35±1℃의 온수로 채워진 실험동물용 수조(반지름: 25 cm, 수심: 50 cm)에서 사육 4주째에 5일간 하루에 10~30분씩 1주간 적응 운동을 실시하고, 사육 종료 후 체중의 3% 중량을 부하하여 2시간동안 수영운동을 실시하였다.

(4) 유산발효양과군의 식이 조성

고지방식은 AIN-76을 기준으로 지방은 corn oil 대신 lard로 치환하여 지방함량을 35%로 증가시켰으며, 유산발효양과식은 Azuma 등(2007)의 연구에 사용한 식이조성을 modification하여 전체 식이조성의 6%를 양과 유산발효액을 동결건조한 분말시료로 치환하여 제조하였다.

Table 5-2. Composition of experimental diets. (g/kg diet)

Group	Control diet	Onion-supplemented diet
Casein	200	185
Starch	200	171
Sucrose	150	144
Lard	350	348
Vitamin mix	10	9
Mineral mix	35	33
Cellulose	50	45
D.L-Methionine	3	3
Choline barbiturate	2	2
D.L-Alpha-tocopherol	1.2	1.2
Lactic acid fermented onion	•	60

(5) 초산발효양과군의 식이 조성

고지방식은 AIN-76을 기준으로 지방을 corn oil 대신 lard로 치환하여 지방함량을 35%로 증가시켰으며, 초산발효식은 Azuma 등(2007)의 연구에 사용한 식이조성을 modification하여 전체 식이조성의 3%를 양과 초산발효액을 동결건조한 분말시료로 치환하여 제조하였다. 초산발효식의 경우 초산의 강한 향으로 인한 식이 거부감에 영향을 주지 않는 3%의 농도를 선정하였다.

Table 5-3. Composition of experimental diets. (g/kg diet)

Group	Control diet	Onion vinegar-supplemented diet
Casein	200	192.5
Starch	200	185.5
Sucrose	150	147
Lard	350	349
Vitamin mix	10	9.5
Mineral mix	35	34
Cellulose	50	47.5
D.L-Methionine	3	3
Choline barbiturate	2	2
D.L-Alpha-tocopherol	1.2	1.2
Acetic acid fermented onion	•	30

(6) 혈액 및 생화학적 분석

사육기간 중의 식이섭취량은 1일 1회, 체중은 1주일에 1회씩 지정된 시간에 측정하였다. 식이효율(feed efficiency ratio: FER)은 실험기간동안의 체중 증가량에서 총식이섭취량을 나눈 수치를 계산하여 나타내었다. 4주간의 사육 후 12시간의 공복상태 후에 에테르를 이용하여 마취한 다음 좌심실을 통하여 혈액을 분리하고 고환부 지방과 복부지방, 간장 및 하지의 골격근을 적출하였다. 혈액성분을 분석하기 위하여 혈액을 700×g에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 다음에 모든 샘플은 분석 시까지 -70℃의 초저온냉동고에 보관하였다. 혈액의 glucose, TG, total-cholesterol, HDL-cholesterol의 농도는 분광광도계(UV-MINI 1240, Shimadzu, Japan)를 이용하여 효소법에 의하여 분석하였다. 글리코겐 농도는 근육샘플에 hexokinase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 첨가하여 fluorescence를 이용하여 excitation 365 nm와 emission 455 nm에서 NADPH의 반응을 통하여 측정하였으며, MDA 활성은 Buege & Aust법(1978)을 이용하여 535 nm에서 흡광

도를 측정하였다.

Superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GPx) 활성은 다음과 같이 분석하였다. 즉, pH 7.4의 phosphate buffered saline(PBS)를 이용하여 조직을 씻은 후, SOD 측정용 조직은 HEPES buffer 1 mL(20 mM HEPES buffer, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, pH 7.2)에, GPx 측정용 조직은 Tris-HC buffer 1 mL(50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT pH 7.5)에 각각 첨가하여 균질화 작업을 실시하였다. 균질화 작업이 끝난 후 SOD activity 측정용은 1,500×g, 5 min, 4°C에서 GPx 측정용은 10,000×g, 15 min, 4°C의 조건에서 조직 샘플을 각각 원심분리한 후 상층액을 BCA protein assay kit(Bio-Rad, USA)을 이용하여 단백질을 정량한 다음 Superoxide Dismutase Assay Kit(Cayman, USA)과 Glutathione Peroxidase Assay Kit(Cayman, U.S.A)을 이용하여 분석하였다.

(7) 통계처리

모든 실험 결과는 Mean±SEM으로 나타내었다. 각 군간의 유의성 검증을 위하여 이원변량분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 유의한 차이가 나타난 항목에 대해서는 Scheffe 사후검증을 실시하였다. 통계적 유의한 차이는 $\alpha=0.05$ 로 설정하였다.

3. 연구 결과

가. 양과의 추출방법과 추출액의 살균·저장에 따른 기능성성분 분석

(1) 양과 착즙액과 동결건조분말의 추출방법에 따른 기능성 성분 분석

양과의 육질로부터 얻어진 착즙액과 동결건조된 양과분말을 대상으로 추출방법에 따른 기능성 성분을 비교 분석하였다(Table 5-4 & 5-5). 양과 착즙액을 50°C에서 열수 추출한 경우 thiosulfinate를 제외한 모든 기능성 성분의 함량이 가장 낮았으며, 추출 온도가 높아질수록 기능성 성분의 함량이 증가되는 것으로 나타났다. 양과 착즙액의 경우 100°C에서 열수 추출한 시료에서 총 phenol, flavonoid, quercetin의 함량이 가장 높게 검출되었으며, 에탄올을 사용하여 추출한 시료에서도 100°C에서 추출한 시료와 거의 유사한 양의 기능성 성분이 검출되었다. 추출방법에 따른 thiosulfinate 함량은 모든 추출조건에서 유사한 농도로 검출되어 50°C의 온화한 열수조건 하에서도 황화합물인 thiosulfinate가 쉽게 추출이 되는 것으로 나타났다.

양파에서 quercetin은 quercetin-3,4'-O-diglucoside, quercetin-4'-O-glucoside, quercetin aglycone의 형태로 존재하며(Leighton et al., 1992; Price & Rhodes, 1997), 이 중 대부분이 quercetin-3,4'-O-diglucoside, quercetin-4'-O-glucoside로 구성되어 있으며 총 quercetin 함량은 총 flavonoid의 약 90%를 차지한다고 보고되었다(Lombard et al., 2005). 본 연구에서는 HCl 처리에 의한 glucoside의 가수분해에 의해 유리된 quercetin 양을 정량하였으며, 양파 추출액의 quercetin 함량은 총 flavonoid의 약 80~90%로 quercetin이 flavonoid의 대부분을 구성하는 것으로 확인되었다.

동결건조 처리에 의해 제조된 양파분말의 경우도 착즙액과 유사한 결과를 나타내 열수 추출 온도가 높아질수록 총 phenol, flavonoid, quercetin과 같은 기능성 성분의 추출량이 증가하였으며, 100°C에서 열수 추출한 경우 가장 높은 함량을 나타냈다. 양파분말의 경우 착즙액과 비교하여 추출된 phenol의 함량이 낮았지만 flavonoid와 quercetin 함량은 약간 높은 농도로 검출되었다. 하지만 thiosulfinate는 착즙액에 비해 약 40% 낮은 농도를 나타내 동결건조 과정이 휘발성 성분인 황화합물의 손실을 초래하는 것으로 나타났다. 양파분말은 동결건조 시 주요한 기능성 성분인 thiosulfinate의 손실이 높고 동결건조과정에 따른 시간과 설비비용이 많이 들기 때문에 직접 착즙액으로부터 추출액을 얻는 것이 양파음료의 제조를 위한 효율적인 방법으로 판단된다.

따라서 착즙액에 대한 최적의 추출 조건으로 100°C 열수추출법과 ethanol 추출법을 선정하여 양파 육질과 껍질의 기능성성분을 분석하였다.

Table 5-4. Contents of functional ingredients extracted from onion paste using different solutions

Extraction	Total phenol (mg GAE ¹ /100 g)	Total flavonoid (mg QE ² /100 g)	Quercetin (mg/100 g)	Thiosulfinate (mmole/100 g)
50°C water	93±11	3.1±0.1	2.5±0.3	5.3±0.2
80°C water	107±7	6.9±1.1	5.6±0.9	5.7±0.5
100°C water	129±9	11.0±0.9	9.7±0.6	5.5±0.4
Ethanol	126±13	10.3±0.8	9.4±0.2	6.0±0.1
Methanol	113±9	9.8±0.7	8.6±0.7	5.9±0.3

Each value is represented as means±standard deviation. Data are the means of three determinations. The unit of content is mg or mmole per 100g of fresh edible part.

¹GAE indicates gallic acid equivalents.

²QE indicates quercetin equivalents.

Table 5-5. Contents of functional ingredients extracted from onion powder using different solutions

Extraction	Total phenol (mg GAE ¹ /100 g)	Total flavonoid (mg QE ² /100 g)	Quercetin (mg/100 g)	Thiosulfinate (mmole/100 g)
50°C water	89±4	2.3±0.1	1.9±0.1	3.5±0.1
80°C water	90±9	6.5±0.6	5.7±0.7	3.6±0.0
100°C water	112±3	12.6±1.8	10.4±1.3	3.7±0.2
Ethanol	111±7	14.8±0.7	12.5±0.8	3.4±0.5
Methanol	108±9	14.0±0.7	11.7±0.4	3.6±0.3

Each value is represented as means±standard deviation. Data are the means of three determinations. The unit of content is mg or mmole per 100 g of fresh edible part.

¹GAE indicates gallic acid equivalents.

²QE indicates quercetin equivalents.

Table 5-6. Comparison of functional ingredients according to different sections in onion

Samples	Total phenol (mg GAE ¹ /100 g)	Total flavonoid (mg QE ² /100 g)	Quercetin (mg/100 g)	Thiosulfinate (mmole/100 g)
Edible part (100°C water)	131±8	11.5±1.0	9.3±0.7	5.9±0.4
Skin (100°C water)	3,152±56	725±15	585±21	-
Skin(ethanol)	3,024±73	733±32	592±18	-

Each value is represented as means±standard deviation. Data are the means of three determinations. The unit of content is mg or mmole per 100 g of fresh edible part or skin.

¹GAE indicates gallic acid equivalents.

²QE indicates quercetin equivalents.

100°C 열수추출법과 ethanol 추출법을 이용하여 양파 껍질과 양파의 육질로부터 얻어진 착즙액의 기능성 성분 함량을 분석하였다(Table 5-6). 양파 껍질을 100°C에서 열수 추출한 경우 총 phenol 함량은 3,152 mg/100 g으로 양파 육질에 비하여 약 24배 높았으며, 총 flavonoid와 quercetin은 각각 725 mg/100 g과 585 mg/100 g으로 양파 육질에 비하

여 약 60배 이상 높은 함량을 나타냈다. 그러나 thiosulfinate는 양파의 껍질로부터 검출되지 않아 휘발성향기 성분은 양파의 육질에만 존재하는 것으로 나타났다. 양파 껍질을 에탄올로 추출한 시료에서도 100℃에서 열수 추출한 시료와 유사한 농도의 기능성 성분이 검출되었다.

Flavonoid와 quercetin 함량은 양파의 산지와 품종 및 부위에 따라 상당한 차이를 나타내며(Leighton et al., 1992; Patil et al., 1995), 양파의 껍질은 식용부위에 비하여 약 10~100배의 flavonoid를 함유하고 있는 것으로 보고되었다(Lanzotti, 2006). 양파껍질에 주로 함유되어 있는 quercetin 관련물질은 비가식 부위인 껍질에 주로 함유되어 있어 조리 가공할 경우 대부분 버리게 되므로 앞으로 이에 대한 활용방안이 모색되어야 할 필요성이 있다.

(2) 양파의 살균온도에 따른 기능성 성분 분석

양파추출액의 살균방법이 기능성 성분의 함량에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 착즙액을 100℃에서 열수 추출한 시료와 ethanol 추출에 의해 얻어진 시료를 다양한 온도에서 살균한 후 기능성 성분의 함량을 측정하였다(Table 5-7 & 5-8). 100℃ 열수추출액과 ethanol 추출액 모두 60, 80, 105, 121℃로 열처리한 후 대조군과 비교하여 모든 기능성 성분의 함량에 있어서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 하지만 ethanol로 추출한 시료의 경우 80℃ 이상에서 가열 처리한 후 24시간 이내에 침전물이 형성되었다. 양파발효음료의 제조 시 종균의 접종 전에 착즙액의 살균처리과정을 거쳐야하므로 ethanol 추출액은 양파발효음료의 제조에 부적합한 것으로 사료된다.

Table 5-7. Effect of sterilization temperature on onion paste extracted by hot water at 100℃

Temperature, time	Total phenol (mg GAE ¹ /100 g)	Total flavonoid (mg QE ² /100 g)	Quercetin (mg/100 g)	Thiosulfinate (mmole/100 g)
Control	138±4	11.3±0.5	9.2±0.9	5.6±0.4
60℃, 30 min	140±2	11.8±0.4	9.8±0.6	5.7±0.2
80℃, 30 min	140±3	11.6±1.1	10.1±1.2	5.7±0.5
105℃, 15 min	142±3	12.2±0.6	9.4±0.8	5.8±0.4
121℃, 15 min	141±7	12.0±0.9	10.7±0.5	5.5±0.2

Each value is represented as means±standard deviation. Data are the means of three determinations. The unit of content is mg or mmole per 100 g of fresh edible

¹GAE indicates gallic acid equivalents.

²QE indicates quercetin equivalents.

Table 5-8. Effect of sterilization temperature on onion paste extracted by 60% ethanol

Temperature, time	Total phenol (mg GAE ¹ /100 g)	Total flavonoid (mg QE ² /100 g)	Quercetin (mg/100 g)	Thiosulfinate (mmole/100 g)
Control	135±4	10.9±1.1	9.5±0.6	5.2±0.1
60°C, 30 min	129±9	10.0±0.4	9.3±0.7	5.1±0.5
80°C, 30 min	134±3	11.7±1.0	10.0±0.8	5.0±0.3
105°C, 15 min	138±2	10.0±1.3	9.6±1.1	4.9±0.8
121°C, 15 min	130±5	11.1±0.9	10.2±0.9	5.4±0.3

Each value is represented as means ± standard deviation. Data are the means of three determinations. The unit of content is mg or mmole per 100 g of fresh edible.

¹GAE indicates gallic acid equivalents.

²QE indicates quercetin equivalents.

(3) 양파 추출액의 저장기간에 따른 기능성 성분 분석

양파 추출액의 저장 중 기능성 성분의 변화를 조사하기 위하여 착즙액을 100°C에서 열수추출한 후 감압농축한 시료를 105°C에서 15분간 살균처리한 다음 4°C와 25°C에서 4주간 저장하면서 기능성 성분의 변화를 측정하였다(Fig. 5-1 & 5-2). 총 phenol, flavonoid, quercetin 함량은 4°C와 25°C에서 저장하는 동안 유의적인 차이 없이 안정적으로 유지되는 것으로 나타났다. 하지만 thiosulfinate의 경우 저장 기간이 길어질수록 감소하였고 25°C에서 저장한 경우 4°C에서 보다 급격히 감소하는 경향을 나타냈다. 즉, 4°C 저장의 경우 저장 전과 비교하여 14일과 28일 후 각각 8%와 31%가 감소하였으며, 25°C에서는 각각 31%와 46%가 감소하였다. 따라서 착즙액을 냉장 온도 이하에서 보관하고 2주 이내에 사용하는 것이 주요 기능성 성분인 thiosulfinate의 손실을 최소화할 수 있을 것으로 사료된다.

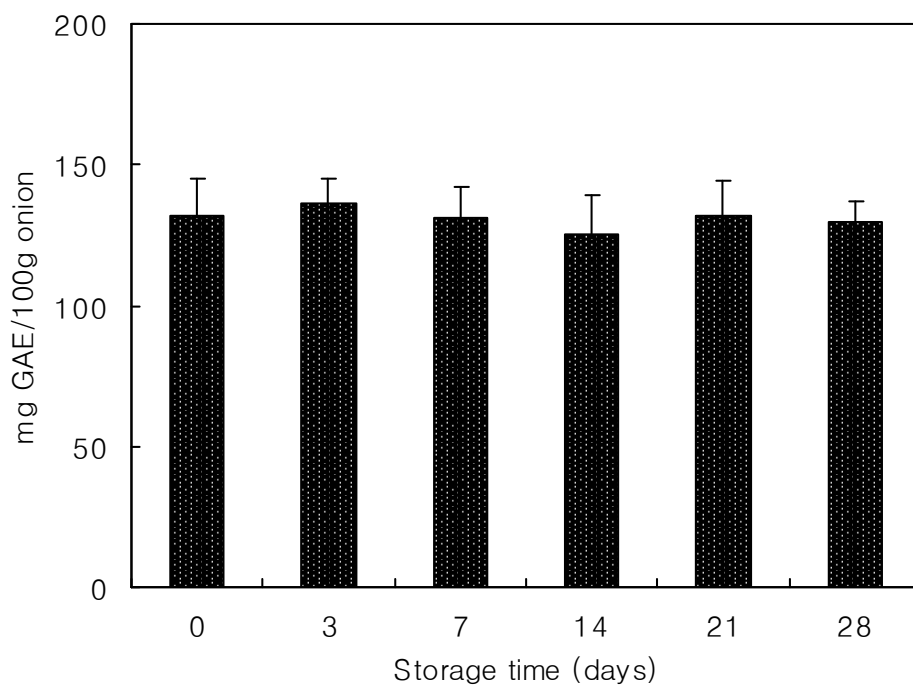


Fig. 5-1a. Contents of total phenol of onion extracts during storage at 4°C.

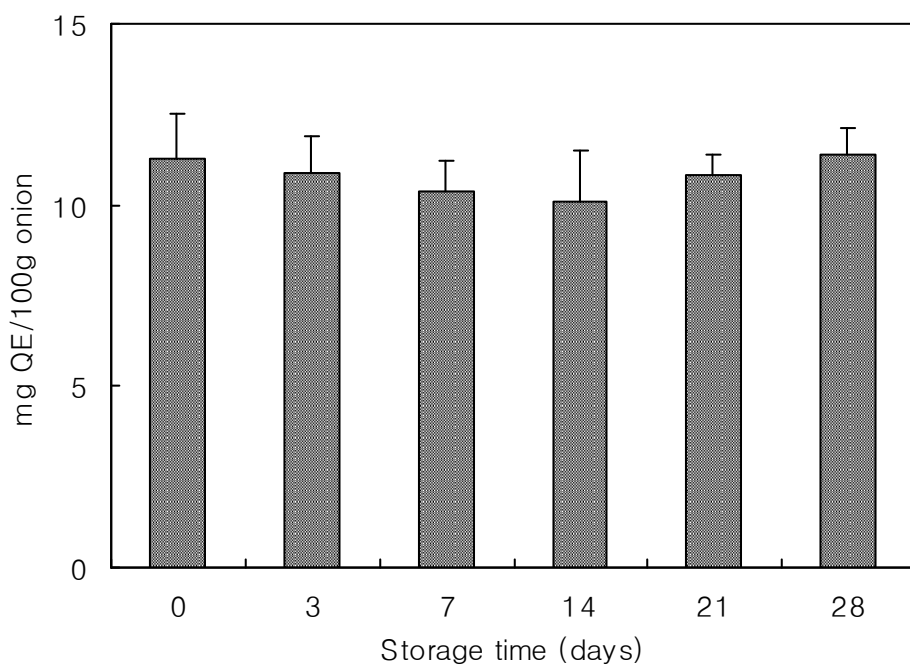


Fig. 5-1b. Contents of total flavonoid of onion extracts during storage at 4°C.

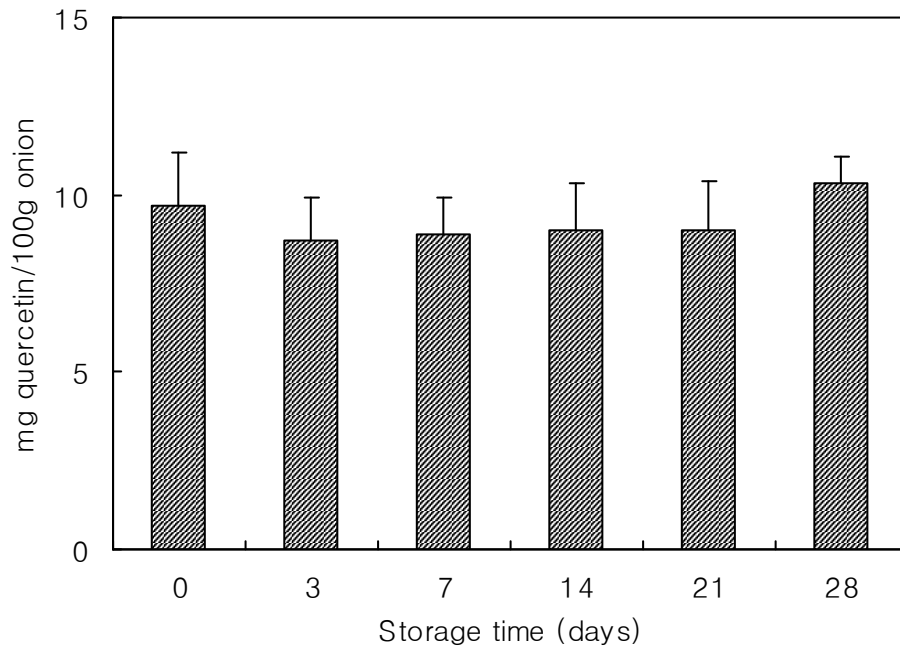


Fig. 5-1c. Contents of quercetin of onion extracts during storage at 4°C.

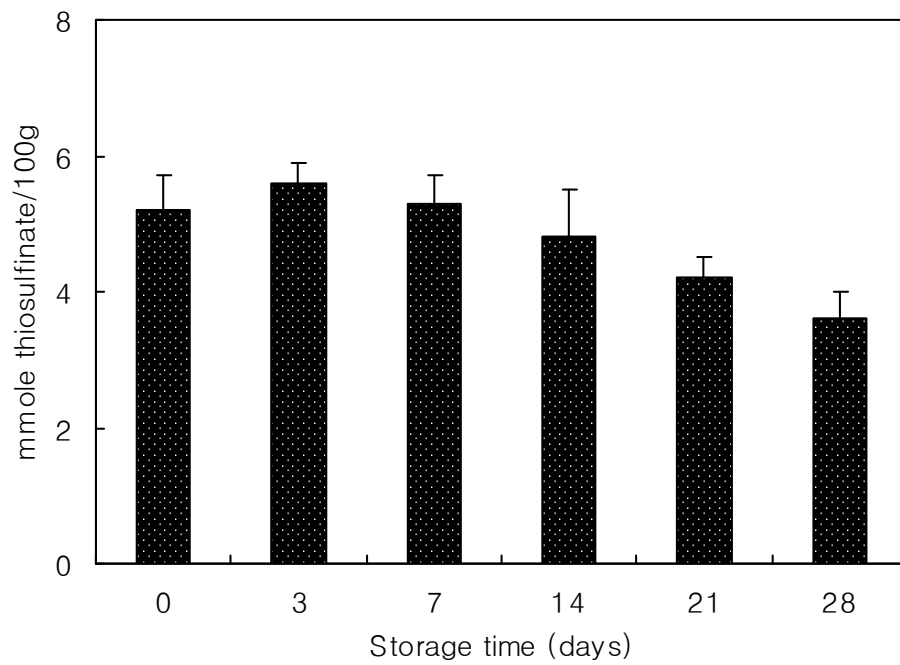


Fig. 5-1d. Contents of total thiosulfinate of onion extracts during storage at 4°C.

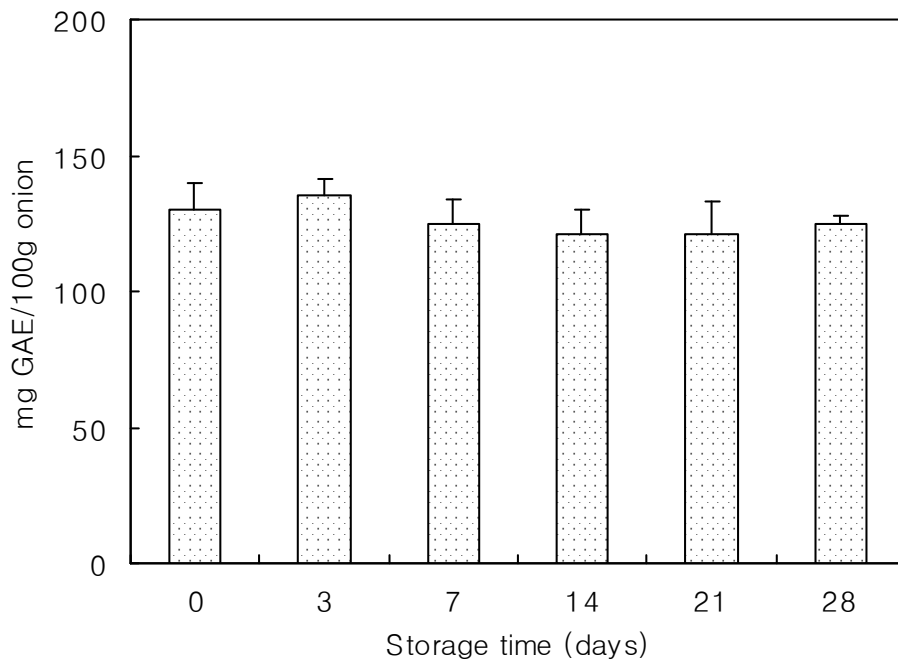


Fig. 5-2a. Contents of total phenol of onion extracts during storage at 25°C.

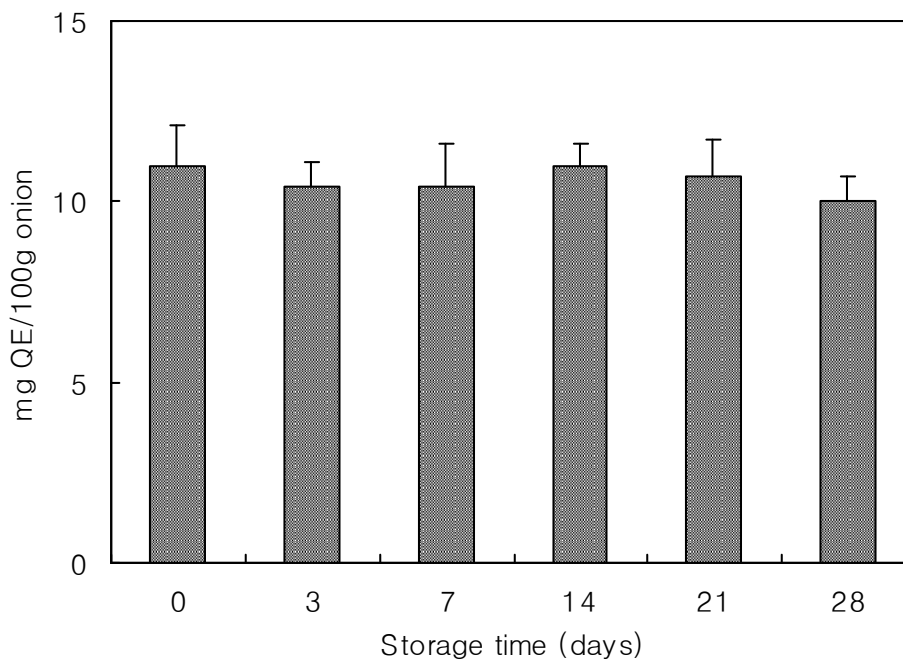


Fig. 5-2b. Contents of total flavonoid of onion extracts during storage at 25°C.

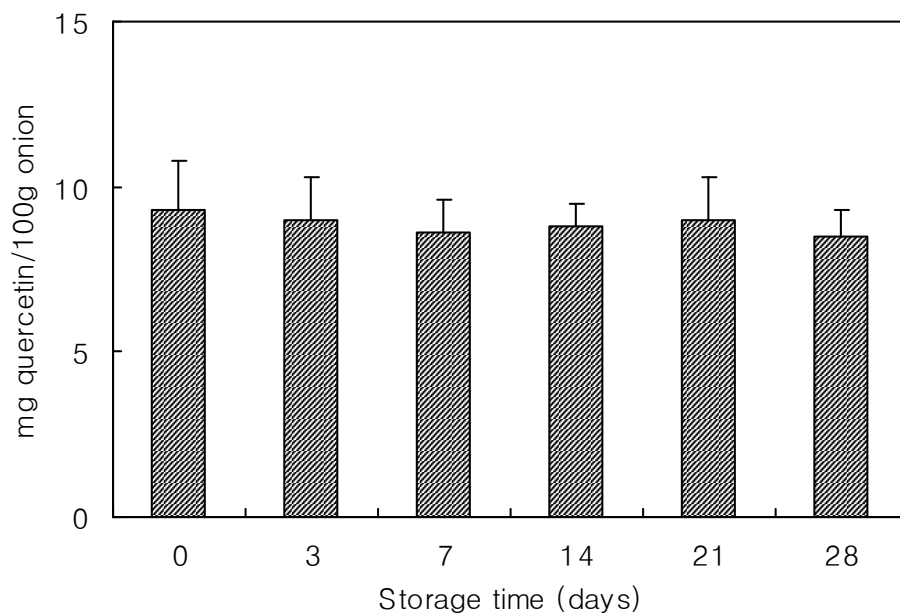


Fig. 5-2c. Contents of quercetin of onion extracts during storage at 25°C.

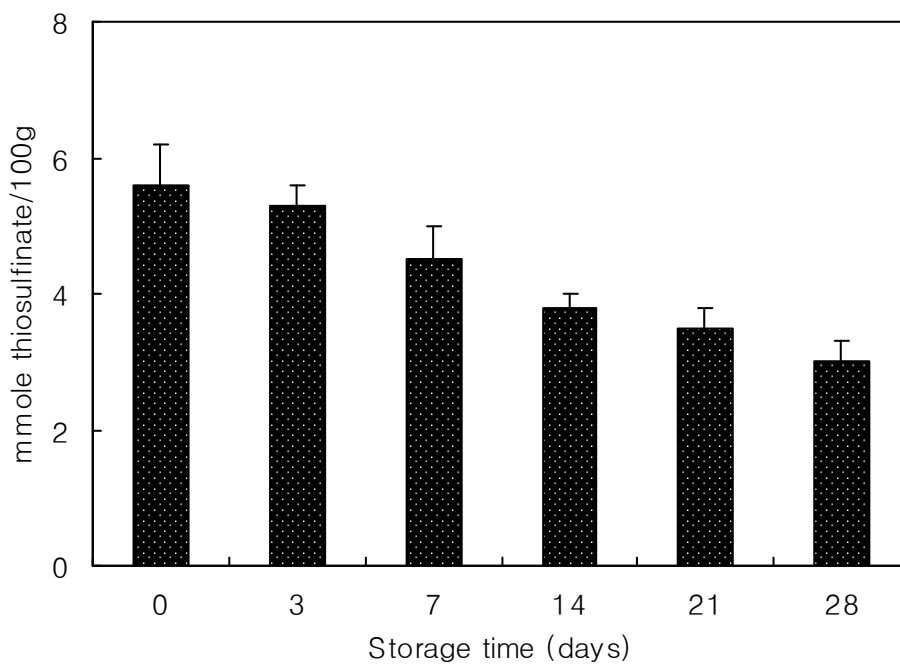


Fig. 5-2d. Contents of total thiosulfinate of onion extracts during storage at 25°C.

(4) 양파의 품종별 기능성 성분 분석

일반양파 2종(함평산 천지양파, 농협 브랜드 프라네 양파)과 빨간 양파 1종(무안산)을 선정하여 기능성 성분을 분석하였다. 천지양파(Onion I) 육질의 총 phenol, flavonoid, quercetin 함량은 각각 137 mg/100 g, 11.6 g/100 g, 10.5 g/100 g으로 프라네 양파(Onion II)에 비해 높은 함량을 나타냈으나 thiosulfinate는 두 종 모두 유사한 함량을 나타냈다. 빨간양파(red onion) 육질의 경우 총 phenol 함량은 천지양파에 비해 14%가 낮았으나 총 flavonoid 함량과 quercetin 함량은 25.9 mg/100 g, 21.5 mg/100 g으로 일반양파 품종에 비해 약 2배 이상 높은 함량을 나타냈다.

양파껍질의 기능성 성분을 분석한 결과 천지와 프라네양파의 껍질은 육질과 비교할 때 phenol은 19~24배, flavonoid와 quercetin은 약 50배 이상 높은 함량을 나타냈다. 빨간양파의 경우 총 phenol 함량은 약 2754 mg/100 g, flavonoid 함량은 612 mg/100 g, quercetin 함량은 502 mg/100 g으로 육질에 비하여 모두 약 20배 이상 높은 함량을 나타냈으며, thiosulfinate는 껍질에서 검출되지 않았다.

Table 5-9. Contents of functional ingredients in 2 onion cultivars

Temperature, time	Total phenol (mg GAE ¹ /100 g)	Total flavonoid (mg QE ² /100 g)	Quercetin (mg/100 g)	Thiosulfinate (mmole/100 g)
Onion I (paste)	137±12	11.6±1.4	10.5±1.7	5.3±0.6
Onion I (skin)	3,278±78	683±10	560±29	-
Onion II (paste)	116±15	9.6±0.9	8.4±0.6	4.8±0.2
Onion II (skin)	2,161±52	527±22	448±16	-
Red onion (paste)	123±8	25.9±1.8	21.5±2.2	6.3±0.3
Red onion (skin)	2,754±42	612±24	502±28	-

나. 양파 발효제품의 기능성 검증(*in vitro*)

(1) 유산 및 초산 발효액의 기능성 성분 변화

양파 착즙액과 착즙액을 유산 발효시킨 발효액으로부터 total phenol과 flavonoid 함량을 측정된 결과는 Table 5-10과 같다. 발효 전의 양파 착즙액은 565 mg/L의 total phenol과 7.6 mg/L의 total flavonoid를 함유하였으나, 유산균 발효에 의해 두 성분이 모

두 감소하여 발효액은 total phenol과 flavonoid를 각각 233 mg/L와 1.6 mg/L 함유하는 것으로 나타났다.

양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 각각 0.5, 1, 2, 4%(v/v) 첨가한 후 유산 발효시킨 발효액의 total phenol과 flavonoid 함량을 측정한 결과 홍삼 추출액의 첨가량이 증가할수록 발효액의 phenol과 flavonoid 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 홍삼 추출액을 0.5, 1, 2, 4%의 농도로 첨가한 경우 total phenol은 각각 306, 391, 511, 779 mg/L을 나타내었으며, total flavonoid는 각각 5.6, 8.4, 16.2, 35.2 mg/L를 나타내었다. 특히 홍삼 추출액의 첨가량이 증가될수록 flavonoid 함량이 급격히 증가되는 것을 보여주고 있는데, 이는 홍삼에 함유되어 있는 고농도의 flavonoid 함량에 기인되는 것으로 사료된다.

양파 착즙액과 착즙액을 초산 발효시켜 얻은 발효액의 total phenol과 flavonoid 함량은 Table 5-11에 나타내었다. 발효 전의 양파 착즙액은 528 mg/L의 total phenol과 16 mg/L의 total flavonoid 함량을 나타내었으나, 초산 함량이 1, 2, 3%를 함유하는 발효액 으로부터 각각 375, 295, 281 mg/L의 phenol과 각각 11.6, 8.7, 8.4 mg/L의 flavonoid가 검출되어 초산 발효에 의해 두 성분이 모두 감소되는 것으로 나타났다. 양파 착즙액을 유산 또는 초산 발효한 후 total phenol과 flavonoid가 모두 감소되었으나, 특히 유산 발효에 의해 상대적으로 더 많은 양이 감소되는 것으로 나타났다.

Table 5-10. Total phenolic and flavonoid contents in lactic acid fermented onion juice

Red ginseng concentration (%, v/v)	Total phenol content (mg GAE ¹ /L)	Total flavonoid content (mg QE ² /L)
Control ³)	565±48	7.6±1.0
0.0	233±11	2.6±0.2
0.5	306±10	5.6±1.1
1.0	391±29	8.4±0.4
2.0	511±17	16.2±0.9
4.0	779±20	35.2±1.4

Each value is represented as means±standard deviation. Data are the means of four determinations.

¹)GAE indicates gallic acid equivalents.

²)QE indicates quercetin equivalents.

³)The non-fermented onion juice

Table 5-11. Total phenolic and flavonoid contents in acetic acid fermented onion juice

Acetic acid concentration (%, v/v)	Total phenol content (mg GAE ¹ /L)	Total flavonoid content (mg QE ² /L)
Control ³)	528±20	16.0±1.1
1.0	375±21	11.6±0.9
2.0	295±15	8.7±0.4
3.0	281±29	8.4±0.4

Each value is represented as means±standard deviation. Data are the means of four determinations.

¹)GAE indicates gallic acid equivalents.

²)QE indicates quercetin equivalents.

³)The non-fermented onion juice

(2) 유산 발효제품의 기능성 검증

(가) 팽화홍삼 추출액 첨가에 의한 유산 발효제품의 기능성 검증

양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 각각 0.5, 1, 2, 4%(v/v) 첨가한 후 유산 발효시킨 발효액의 항산화 활성을 측정하였다. 발효액의 상대적인 항산화 활성 측정은 ABTS cation decolorizing assay에 의한 총 항산화력과 DPPH에 의한 전자공여능 측정방법을 이용하였다.

Fig. 5-3에서 보는 바와 같이 발효하지 않은 양파 착즙액은 1 mM의 TEAC 값을 나타내어 유산 발효액의 0.63 mM에 비하여 높은 총 항산화력을 나타내었다. 이는 유산 발효에 의해 항산화력이 높은 phenol과 flavonoid 성분들의 감소에 기인되는 것으로 사료된다. 팽화 홍삼 추출액을 첨가하여 발효한 경우 총 항산화력은 첨가량이 높아질수록 증가하였으며, 4%(w/v)의 홍삼 추출액을 첨가한 시료는 양파착즙액과 유사한 항산화력을 나타내어, 팽화 홍삼 추출액의 첨가가 유산 발효액의 총 항산화력을 증가시키는 것으로 나타났다.

양파 착즙액과 유산 발효액의 전자공여능을 측정한 결과는 Fig. 5-4와 같다. 발효하지 않은 양파 착즙액이 83%의 전자공여능을 나타내는데 비하여, 양파 착즙액의 유산 발효액은 95%의 높은 전자공여능을 나타내어, 유산 발효에 의해 전자공여능 활성이 향상되는 것으로 나타났다. Table 5-10과 Fig. 5-3에서 보여지는 것처럼 유산 발효에 의한 phenol과

flavonoid 성분의 감소가 총 항산화력의 감소로 나타났지만, 유산 발효에 의해 전자공여능은 크게 향상되는 것으로 확인되었다. 이는 유산발효에 의해 양과 착즙액의 특정 성분이 전자공여능을 지니는 물질로 전환되었기 때문으로 사료된다. 홍삼 추출액을 0.5%와 1% 첨가하여 유산 발효한 발효액의 전자공여능은 각각 96%와 98%로 홍삼 첨가가 전자공여능을 향상시키는 것으로 나타났으나, 2% 이상 첨가하였을 경우 추가적으로 증가되지는 않았다.

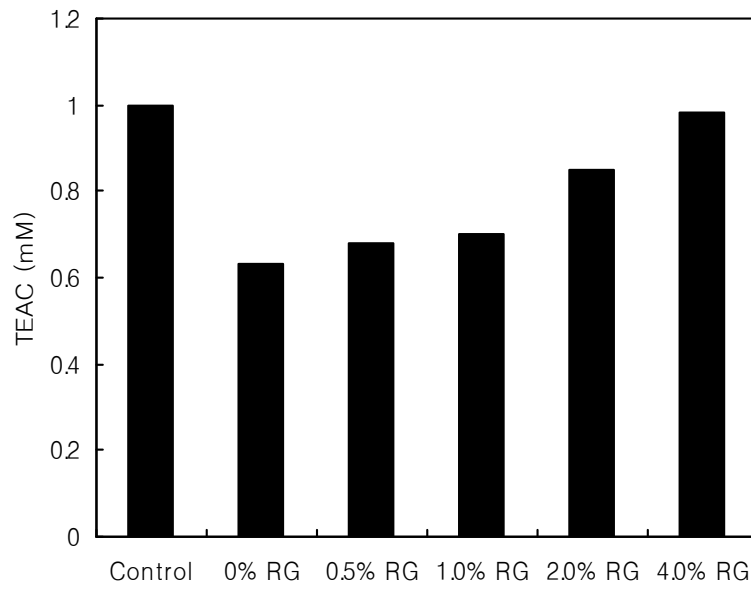


Fig. 5-3. Effect of lactic acid fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract on ABTS activity.

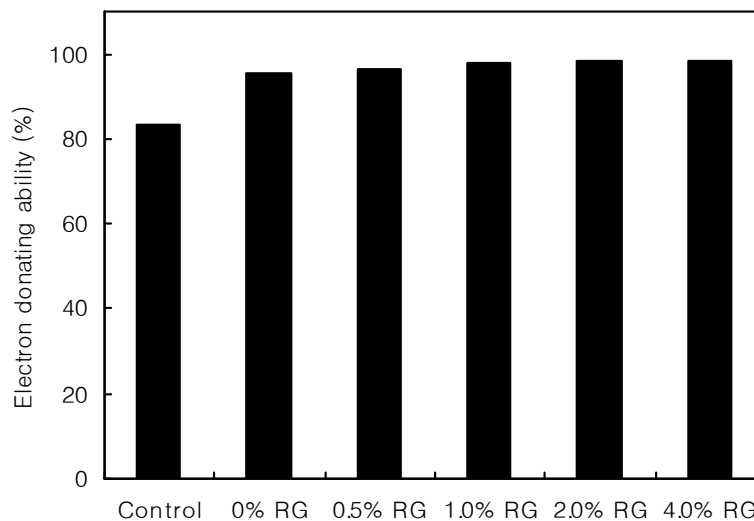


Fig. 5-4. Effect of lactic acid fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract on the electron donating ability.

양파 착즙액 및 유산균 발효액의 인체 암세포에 대한 증식 억제활성(Growth inhibition rate (%))을 조사하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 폐암세포인 A549와 SK-MES-1에 대한 증식억제 활성을 측정한 결과는 Fig. 5-5(A), 5-5(B)와 같다. 유산 발효 전의 양파 착즙액은 A549 세포에 대하여 83%의 증식억제 효과를 보였다. 양파 착즙액을 유산 발효하였을 때 증식억제 효과는 발효 전보다 증가하여 96%의 높은 억제효과를 보였으며, 0.5% 이상의 홍삼을 첨가한 경우도 발효액과 동일한 활성의 증식 억제 효과를 나타내었다. SK-MES-1 세포에 대한 양파 착즙액의 증식억제 활성은 53%로 나타났으며, 양파 착즙액을 유산 발효한 경우 65%의 활성을 나타내어 발효에 의해 증식억제 효과가 상승되는 것으로 나타났다. 양파 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 0.5% 이상 첨가하여 발효한 경우 91% 이상의 높은 증식억제 활성을 나타내어 팽화 홍삼이 폐암 세포주인 SK-MES-1에 대한 증식억제 활성을 향상시키는 것으로 나타났다.

대장암세포인 DLD-1과 Caco-2에 대한 증식억제 활성을 측정한 결과는 Fig. 5-5(C), 5-5(D)에 나타내었다. DLD-1 세포에 대하여 양파 착즙액을 비롯한 모든 발효액 시료는 94% 이상의 높은 증식 억제 효과를 보였다. Caco-2 세포에 대한 양파 착즙액과 유산균 발효액의 증식억제 활성은 각각 71%와 80%를 나타내어, 유산 발효에 의해 증식억제 효과가 상승되는 것으로 나타났다. 홍삼 추출액을 0.5% 이상 첨가하여 발효한 경우 Caco-2 세포에 대하여 93% 이상의 높은 증식 억제 활성을 나타내어, 홍삼추출액이 유산 발효액의 항암 효과를 증가시키는 것으로 확인되었다.

Rho 등(2000)은 양파 및 마늘 유기 용매 추출물이 폐암 세포주에 대해 세포독성을 나타낸다고 보고하였으며, Netherland와 Southern India에서 case-control 연구를 통해 양파 소비가 폐암 발생에 유의적 보호 효과를 보여준다고 보고한 바 있다(Dorant et al., 1994; Sankaranayanan, 1995). 이전의 연구와 본 실험결과를 종합하여 볼 때 양파 발효액의 암세포주 성장억제 효과는 양파에 함유되어 있는 flavonoid 성분과 allicin을 비롯한 황화합물, 그리고 유산 발효에 의해 생성되는 여러 가지 성분들에 의해 시너지 효과가 발생하여 높은 암세포 성장 억제 효과가 나타났다고 판단된다. 또한 홍삼에 함유되어 있는 사포닌 성분인 여러 종류의 ginsenoside가 홍삼 첨가에 의한 발효액의 항산화 및 항암 활성을 추가적으로 증가시킨 것으로 생각된다.

양파 유산 발효액이 고혈압의 작용기전에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ACE 저해 활성을 측정하였다. 고혈압이 발생하는 기작에서 angiotensin I converting enzyme(ACE)은 angiotensin I에서 angiotensin II를 합성하는 단계에 관여하는 효소로 혈압과 전해질 균형 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다(William 1998). Angiotensin II는 수용체와 결합하여 동맥과 소동맥을 수축시키고 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 유리를 촉진시켜 혈압의 증가를 가져온다. 따라서 ACE 저해물질은 ACE의 활성을 억제함으로써 고혈압을 직접적으로 억제할 수 있다(Ma, 2000). Fig. 5-6에서 보는 바와 같이 발효하지 않은 양파 착즙액은 50%의 ACE 저해활성을 보였으며, 유산 발효액도 이와 유사한 47%의 저해활성

을 보였다. 팽화 홍삼을 첨가하여 발효한 경우 첨가 양이 증가될수록 ACE 저해활성이 감소되는 것으로 나타났으며, 이는 팽화 홍삼의 특정 성분이 ACE 저해활성을 억제시키는데 기인하는 것으로 사료된다.

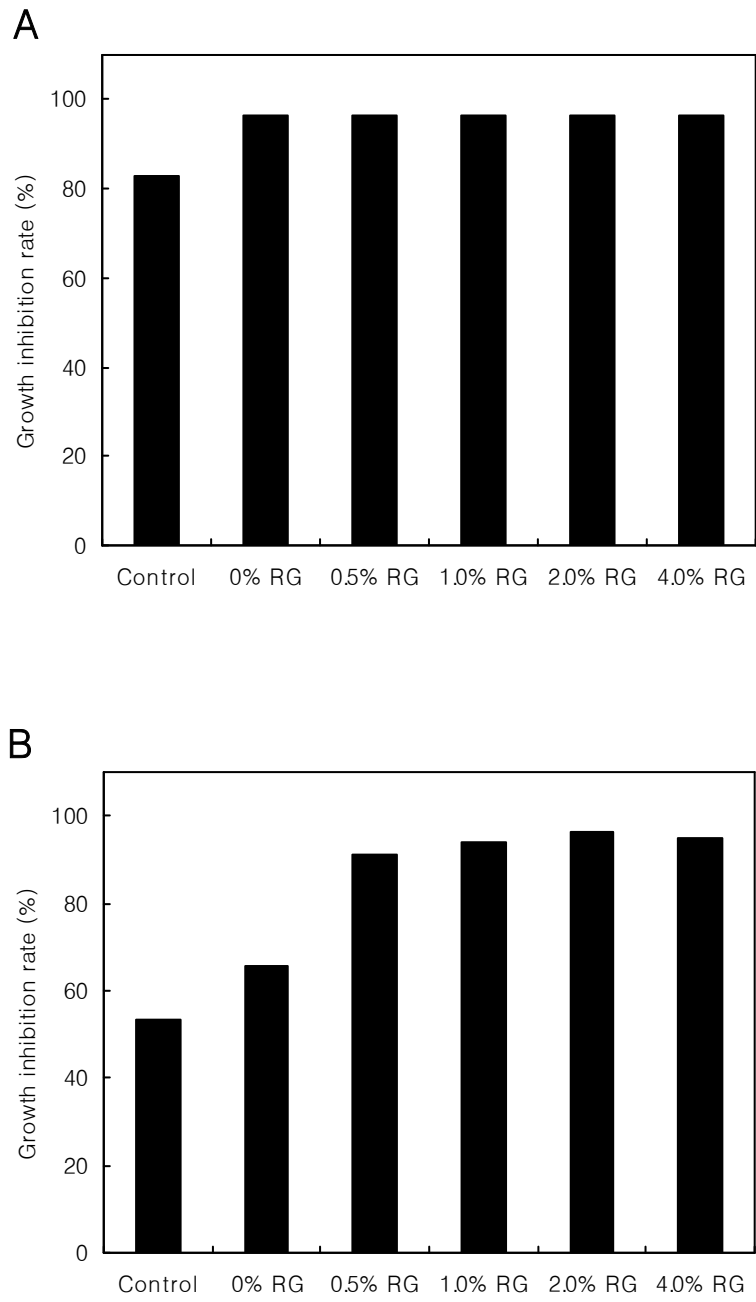


Fig. 5-5. Inhibitory effect of lactic acid fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract on the growth of human cancer cells. Lung cancer A549: A, lung cancer SK-MES-1: B, colon cancer DLD-1: C, colon cancer Caco-2: D.

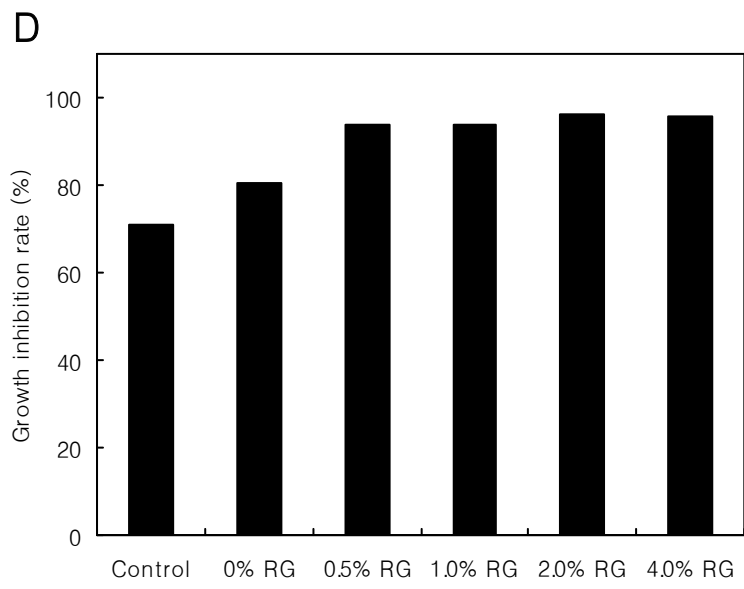
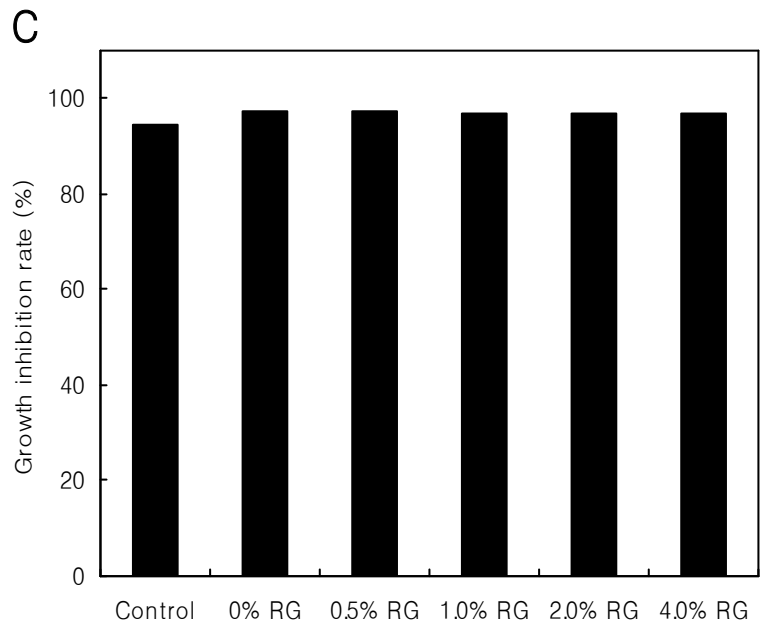


Fig. 5-5. Continued.

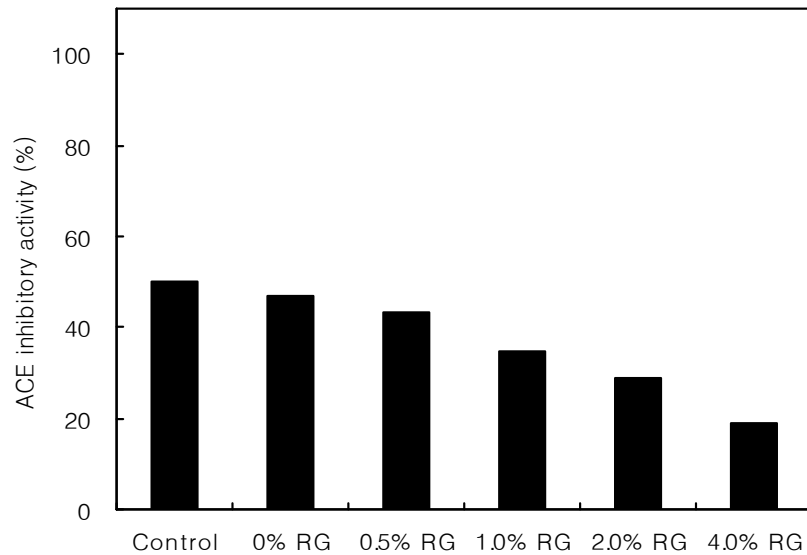


Fig. 5-6. Effect of lactic acid fermented onion juice supplemented with puffed red ginseng extract on ACE inhibitory activity.

(나) 양파껍질 추출액 첨가에 의한 유산 발효제품의 기능성 검증

양파 발효액에 농축된 양파껍질 추출액을 각각 1, 5, 10, 20%(v/v) 첨가한 후 발효액의 생리활성을 조사하였다. 농축된 양파껍질 추출액은 231 mg/L의 quercetin을 함유하고 있으며, 발효액에 첨가한 양파 동일한 농도를 갖도록 희석하여 껍질 추출액이 첨가된 발효액의 생리활성과 비교하였다.

양파 착즙액을 24시간 동안 유산 발효시킨 발효액에 양파껍질 추출액을 첨가하여 총 항산화력을 측정한 결과는 Fig. 5-7과 같다. 유산 발효액은 0.63 mM의 총 항산화력을 나타내었으며, 1%, 5%, 10%, 20%의 껍질 추출물 첨가한 경우 각각 0.7, 0.84, 0.95, 1.14 mM의 총 항산화력을 보여주어, 양파껍질 추출액 첨가에 의해 항산화력이 증가하는 것으로 나타났다. 첨가량인 1, 5, 10, 20%에 해당하는 양파껍질 추출액의 총 항산화력은 각각 0.64, 0.81, 0.98, 1.15 mM로 발효액과 유사한 활성을 나타내어, 껍질 추출액에 다량 함유되어 있는 favonoid 성분인 quercetin이 총 항산화력을 높이는데 기여한 것으로 사료된다.

껍질 추출액이 첨가된 유산균 발효액의 전자공여능을 측정한 결과는 Fig. 5-8과 같다. 껍질 추출액을 1% 첨가한 발효액은 94%의 전자공여능을 나타내어, 껍질을 첨가하지 않은 발효액의 전자공여능인 88%보다 높은 활성을 나타내었다. 껍질 추출액을 5% 이상 첨가하였을 경우에는 95%의 전자공여능을 보여주었으나 첨가량이 10% 이상 증가하더라도

전자공여능이 추가적으로 증가되지는 않았다. 양파껍질 추출물은 1%의 낮은 농도(2.3 mg/L의 quercetin)에서도 76%의 높은 전자공여능을 나타냈으며 5%와 10%의 농도에서는 전자공여능이 각각 88%와 92%를 나타내었다. 하지만 20%의 농도에서 전자공여능은 추가적으로 증가되지 않았다.

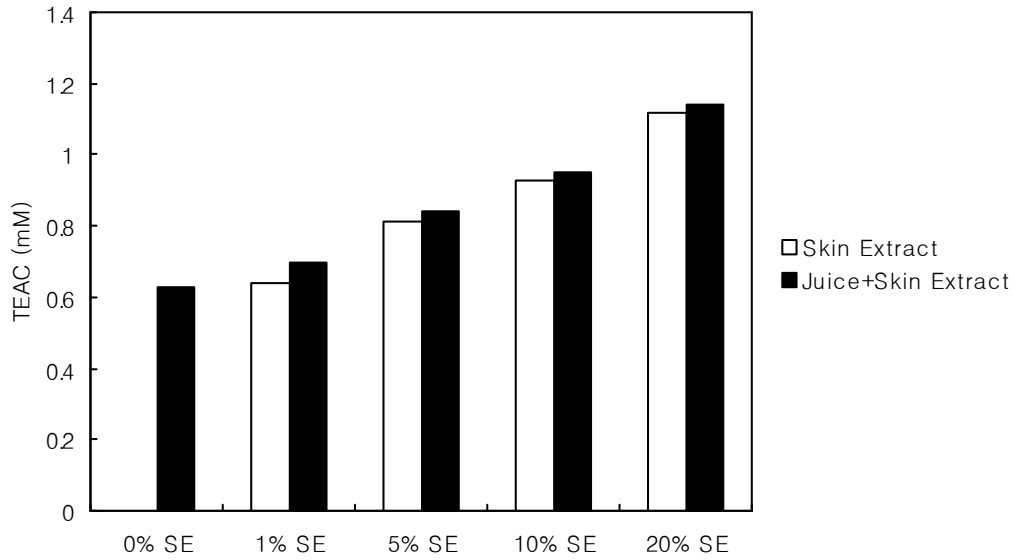


Fig. 5-7. Effect of lactic acid fermented onion juice supplemented with onion skin extract on ABTS activity.

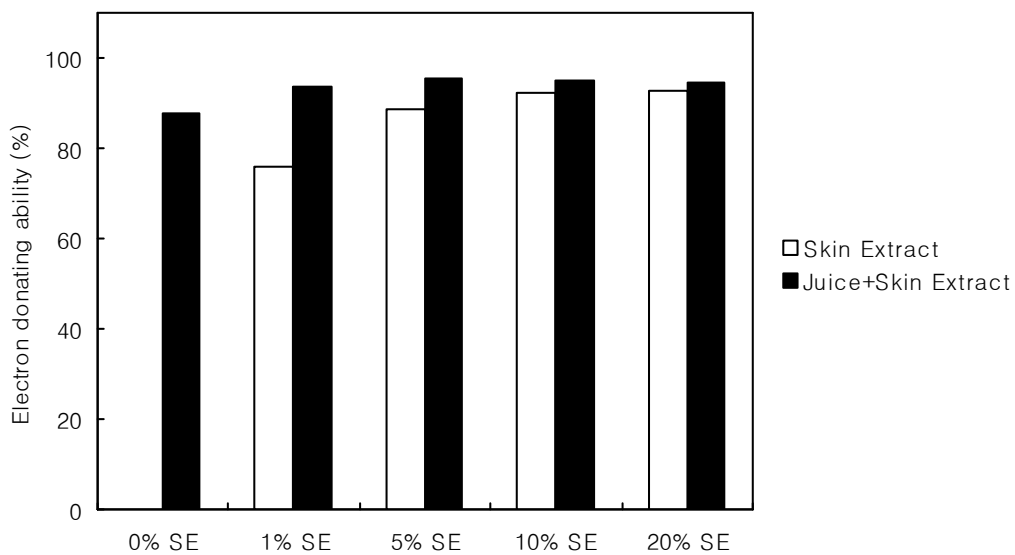


Fig. 5-8. Effect of lactic acid fermented onion juice supplemented with onion skin extract on the electron donating ability.

유산균 발효액과 양파껍질 추출액이 첨가된 발효액의 인체 암세포에 대한 증식 억제 활성(Growth inhibition rate (%))을 조사하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 폐암세포인 A549와 SK-MES-1, 대장암세포인 DLD-1과 Caco-2에 대한 증식억제 활성을 측정한 결과는 Fig. 5-9와 같다. 유산균 발효액은 폐암세포인 A549와 Sk-MES-1에 대하여 각각 96%와 66%, 대장암세포인 DLD-1과 Caco-2에 대하여 각각 97%와 80%의 증식 억제 효과를 나타내었다. 그러나 양파 껍질을 첨가한 발효액의 경우 모든 암세포에서 추가적으로 증식 억제 효과가 상승되지 않는 것으로 나타났다.

발효액에 첨가하기 전의 순수한 양파껍질 추출액의 암세포 증식 억제효과는 추출액의 농도에 비례하여 증가하였다. 하지만 20%의 양파껍질 추출액은 폐암세포인 A549와 Sk-MES-1에 대하여 각각 79%와 53%, 대장암세포인 DLD-1과 Caco-2에 대하여 각각 84%와 66%의 증식 억제 효과를 나타내어, 껍질을 첨가하지 않은 유산 발효액보다 동일한 암세포에 대하여 낮은 항암 활성을 나타내었다. 따라서 껍질 추출액 첨가에 의해 유산 발효액의 항암 활성이 추가적으로 증가되지 않은 원인은 유산 발효액보다 낮은 껍질의 항암 활성에 기인하는 것으로 판단된다.

껍질 추출액 첨가에 따른 양파 발효액의 ACE 저해활성은 Fig. 5-10과 같다. 양파 발효액의 ACE 저해활성은 47%를 나타내었지만, 1%와 5%의 껍질 추출액 첨가에 의해 활성이 각각 40%와 26%로 감소되었으며, 양파 껍질 추출액을 10% 이상을 첨가한 경우 ACE 저해활성은 검출되지 않았다. 순수한 양파껍질 추출물에서는 ACE 저해활성이 전혀 검출되지 않아 껍질에 함유되어 있는 flavonoid 성분이 ACE 저해활성을 억제시키는 작용을 하는 것으로 나타났다.

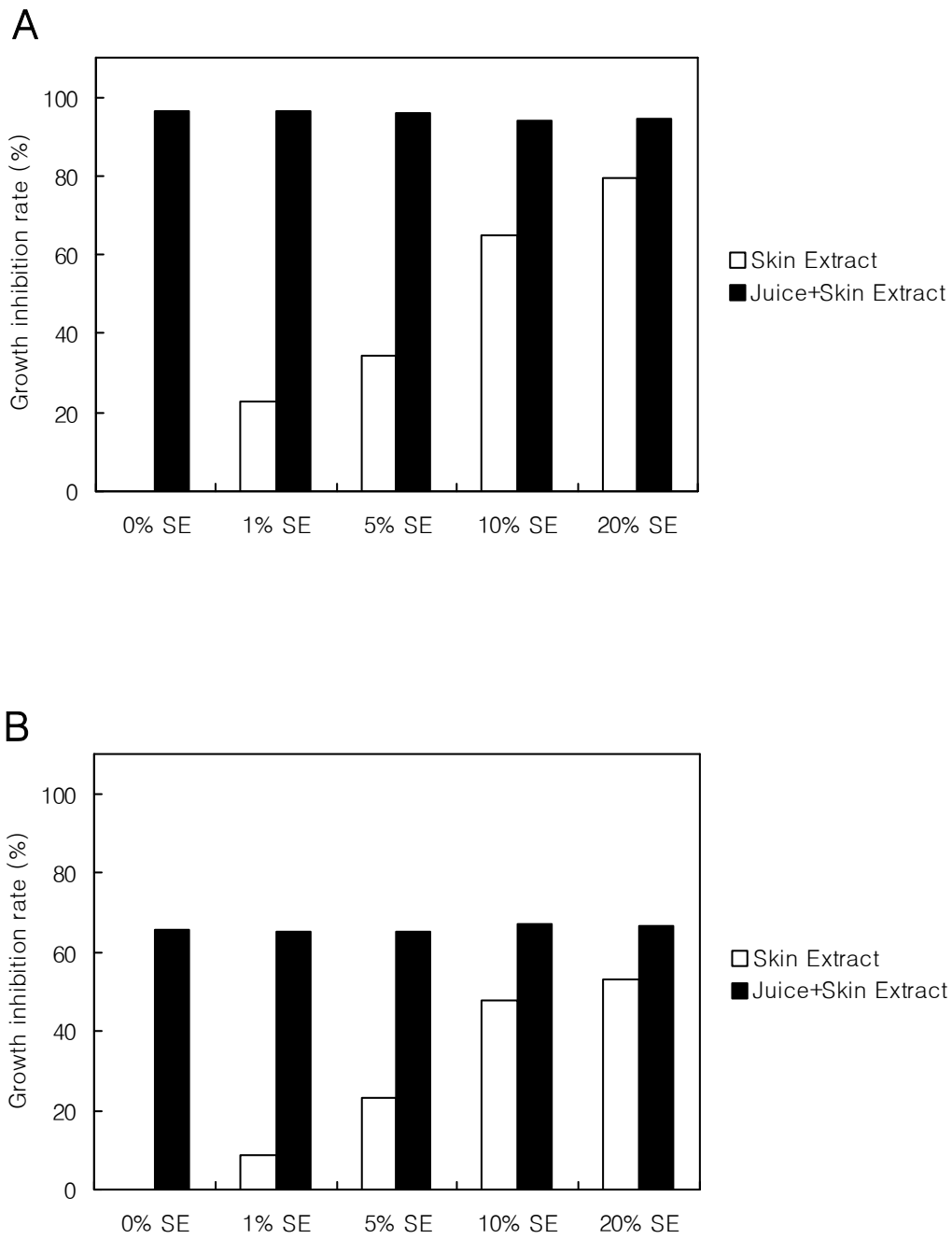


Fig. 5-9. Inhibitory effect of lactic acid fermented onion juice supplemented with onion skin extract on the growth of human cancer cells.

Lung cancer A549: A, lung cancer SK-MES-1: B, colon cancer DLD-1: C, colon cancer Caco-2: D.

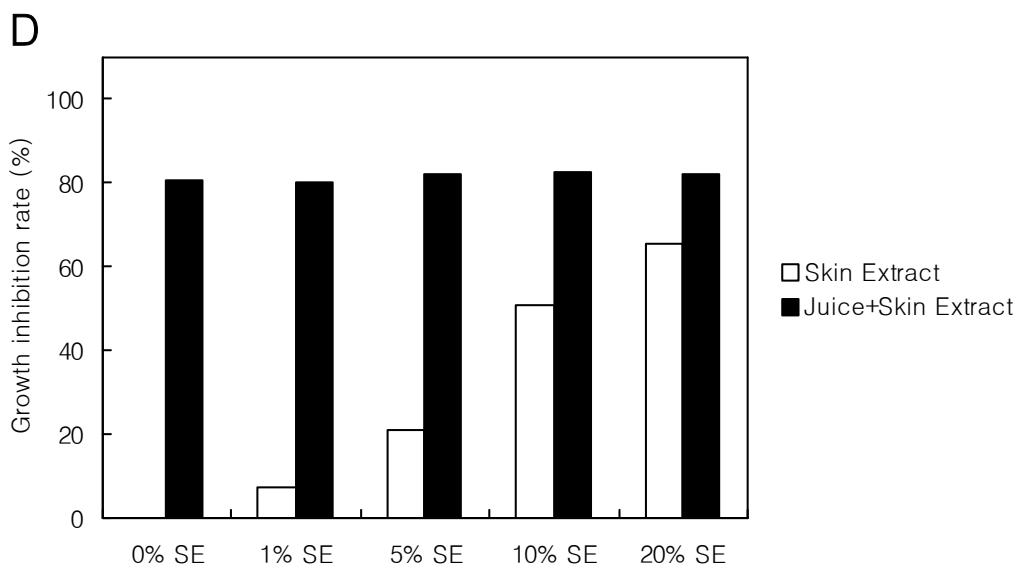
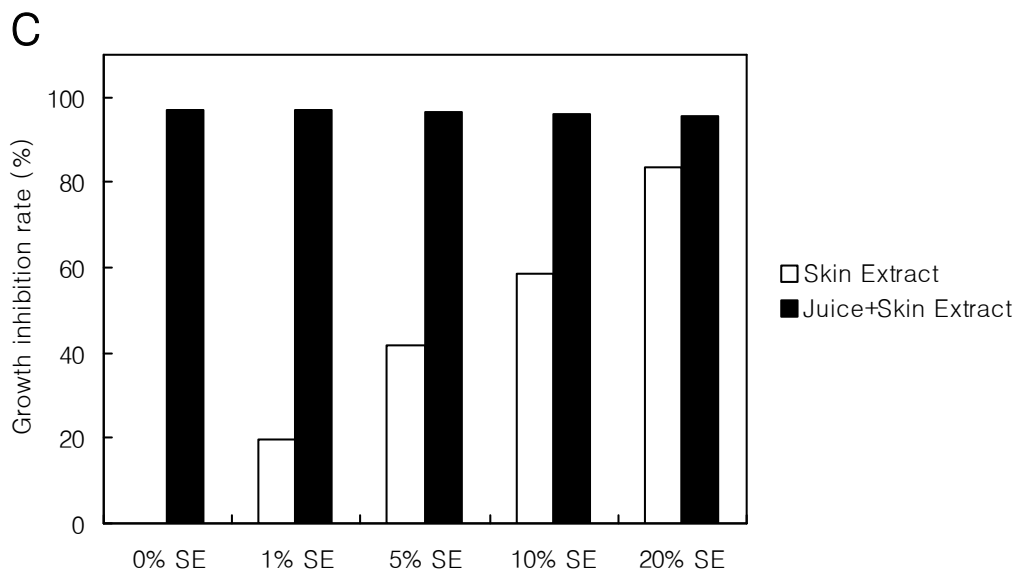


Fig. 5-9. Continued.

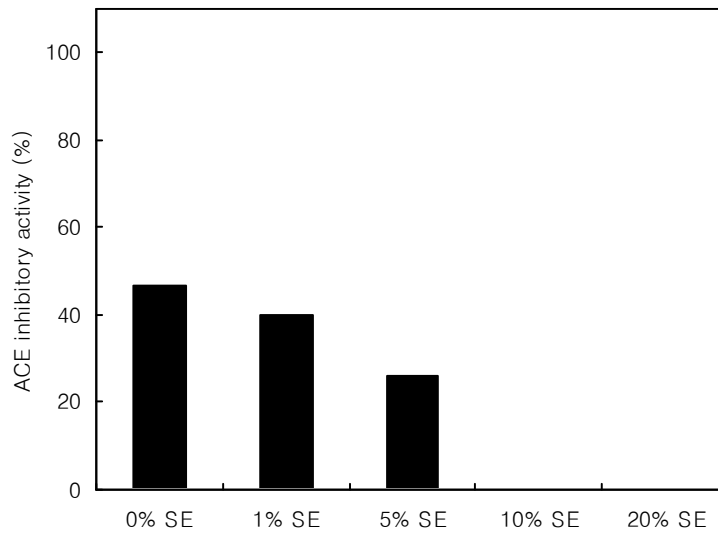


Fig. 5-10. Effect of lactic acid fermented onion juice supplemented with onion skin extract on ACE inhibitory activity.

(다) 유산 발효 시제품의 기능성 검증

유산 발효 시제품에 농축된 양파껍질 추출액을 각각 1, 5, 10, 20%(v/v) 첨가한 후 생리활성을 조사한 결과 시제품의 총 항산화력과 전자공여능은 formulation 전의 발효액 시료와 유사한 활성을 나타내었다. 유산 발효 시제품의 총항산화력을 측정한 결과는 Fig. 5-11과 같다. 유산 발효액은 0.86 mM의 총 항산화력을 나타내었으며, 1%, 5%, 10%, 20%의 껍질 추출액을 첨가한 경우 각각 0.92, 1.00, 1.14, 1.24 mM의 총항산화력을 나타내어, 껍질 첨가에 의해 총 항산화력이 증가되는 것으로 나타났다. 유산 발효제품의 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 5-12와 같이 유산 발효 시제품은 89%의 전자공여능을 나타내었으며, 껍질 추출액을 1%와 5%를 첨가하였을 경우 각각 92%와 96%로 전자공여능 활성이 상승되었다.

유산 발효 시제품과 양파껍질 추출액이 첨가된 시제품의 인체 암세포에 대한 증식 억제활성(Growth inhibition rate (%))은 Fig. 5-13과 같다. 유산 발효액 시제품은 폐암세포 A549와 Sk-MES-1에 대하여 모두 96%의 억제효과를 나타내었으며, 대장암세포인 DLD-1과 Caco-2에 대하여 각각 97%와 96%의 증식 억제 효과를 나타내어, 시제품의 항암활성이 매우 높은 것으로 나타났다. 특히 폐암세포인 Sk-MES-1과 대장암 세포인 Caco-2에 대하여 formulation 전의 발효액에 비하여 상승된 암세포 증식억제 활성을 나타내었는데, 이는 시제품의 formulation시 첨가된 성분들 중 사과즙이 활성을 증가시키는데 유의한 효과를 나타내었을 가능성이 있다. 유산 발효 시제품의 ACE 저해활성을 측정한 결과 53%의 활성을 나타내었으며, 껍질 추출액 첨가에 의해 활성이 감소되는 경향을 나타내었다(data not shown).

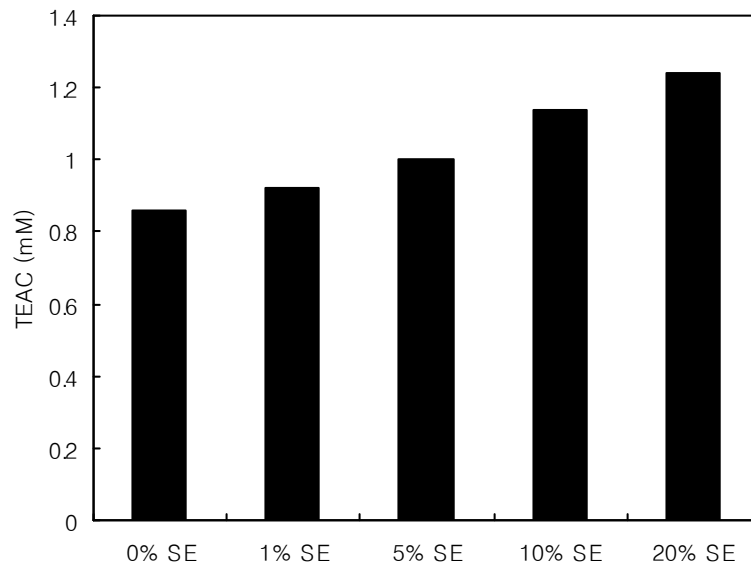


Fig. 5-11. Effect of lactic acid fermented onion beverage supplemented with onion skin extract on ABTS activity.

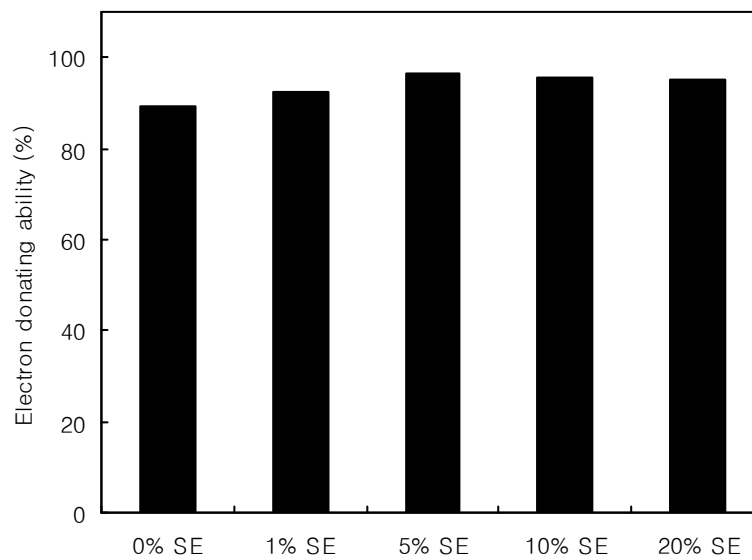


Fig. 5-12. Effect of lactic acid fermented onion beverage supplemented with onion skin extract on the electron donating ability.

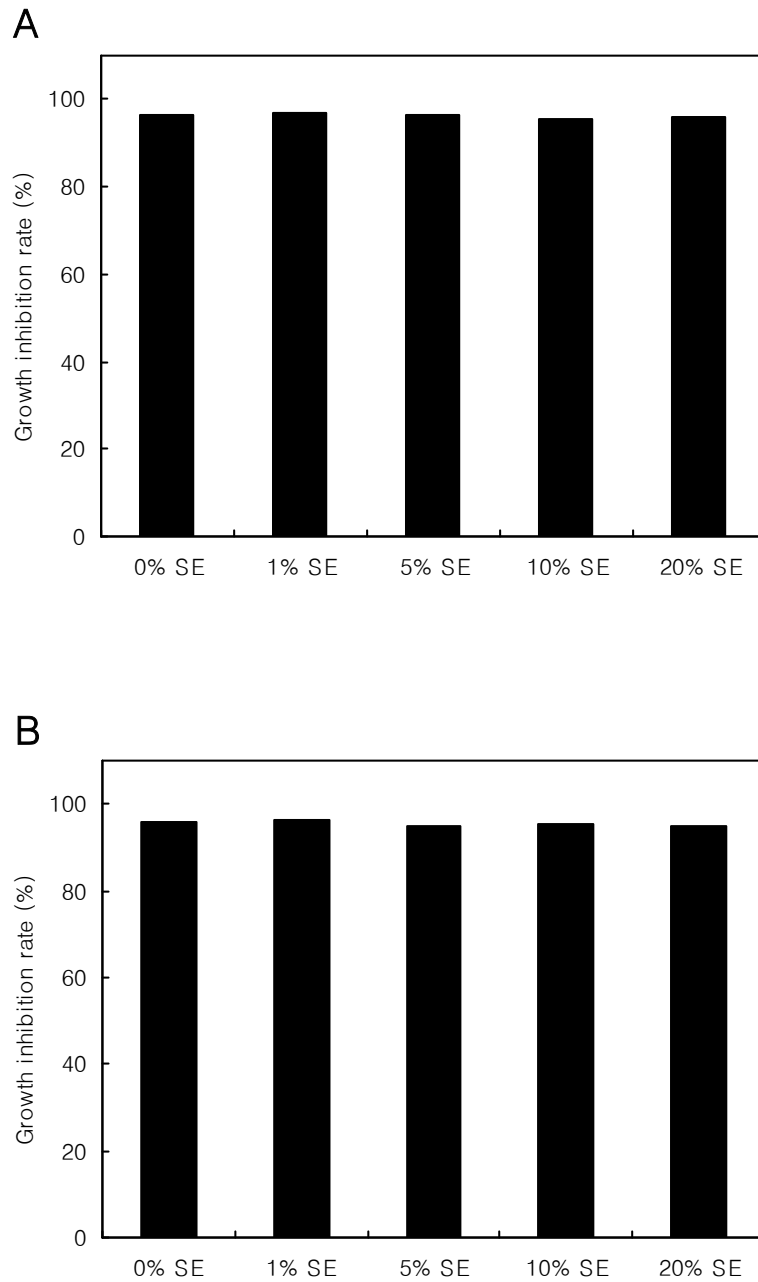
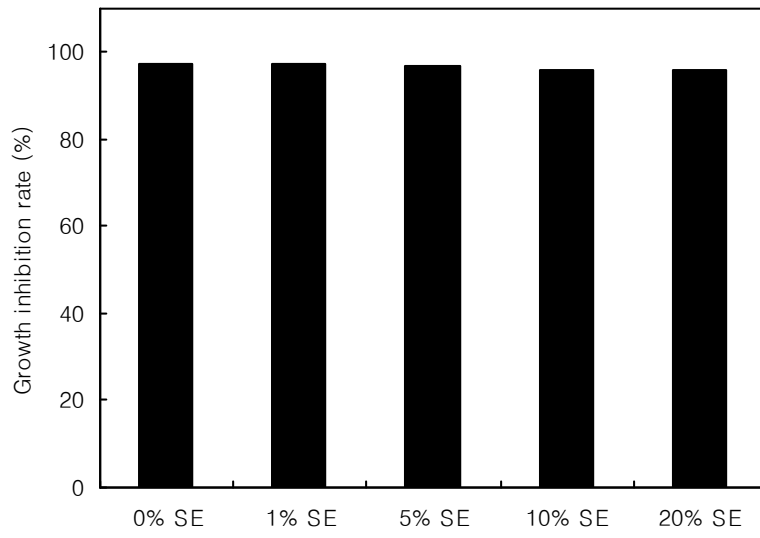


Fig. 5-13. Inhibitory effect of lactic acid fermented onion beverage supplemented with onion skin extract on the growth of human cancer cells.

Lung cancer A549: A, lung cancer SK-MES-1: B, colon cancer DLD-1: C, colon cancer Caco-2: D.

C



D

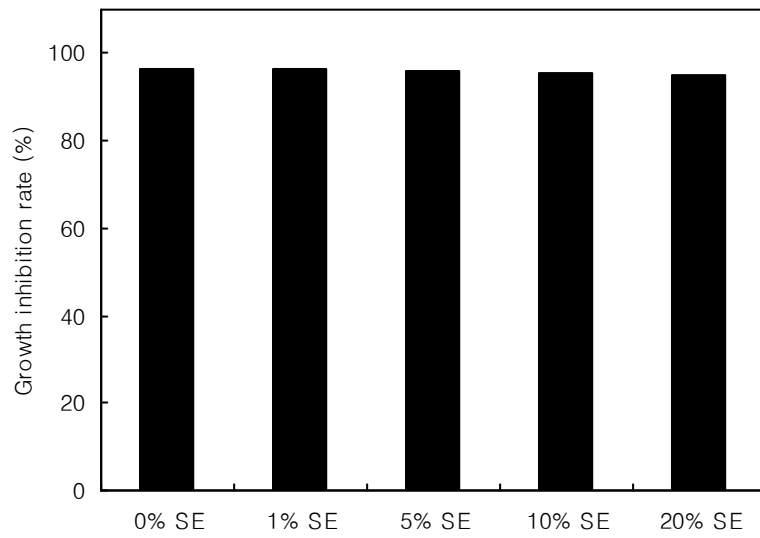


Fig. 5-13. Continued.

(3) 초산 발효제품의 기능성 검증

양파식초 발효는 2단계 초산 배양에 의해 수행되었다. 즉, 살균된 양파 착즙액을 효모로 알코올 발효시켜 알코올 농도를 4%로 조절한 후 *Acetobacter tropicalis*에 의한 초산 발효에 의해 최종 산도가 각각 1%, 2%, 3%(v/v)인 발효액을 얻었다.

초산 발효액의 총 항산화력을 측정한 결과는 Fig. 5-14에 나타내었다. 발효하지 않은 양파 착즙액은 1 mM의 TEAC 값을 나타내어, 1%의 산도를 갖는 초산 발효액의 0.64 mM의 TEAC 값에 비하여 높은 항산화력을 나타내었다. 발효액의 산도가 증가될수록 총 항산화력은 추가적으로 상승하여 2%와 3%의 산도를 갖는 발효액의 경우 각각 0.68 mM과 0.76 mM의 총 항산화력을 나타내었다.

양파 착즙액과 초산발효액의 전자공여능을 측정한 결과는 Fig. 5-15에 나타내었다. 산도가 1%와 2%인 발효액의 전자공여능은 각각 67%와 78%를 나타내어, 발효하지 않은 양파 착즙액의 전자공여능인 88%에 비해 낮은 활성을 나타내었다. 하지만 3%의 산도를 갖는 발효액의 경우 84%의 활성을 나타내어, 발효 전의 양파 착즙액과 유사한 수준의 전자공여능 활성을 갖는 것으로 나타났다.

초산 발효액의 인체 암세포에 대한 증식 억제활성(Growth inhibition rate (%))을 조사하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 폐암세포인 A549와 SK-MES-1에 대한 증식억제 활성을 측정한 결과는 Fig. 5-16(A)와 5-16(B)와 같다. 초산 발효 전의 양파 착즙액은 A549 세포에 대하여 79%의 증식억제 효과를 보였다. 산도가 1%인 발효액은 양파 착즙액과 비교하여 매우 높은 96%의 억제 효과를 보였으며, 2%와 3%의 산도를 갖는 발효액의 경우도 동일한 활성의 높은 억제 효과를 보였다. SK-MES-1 세포에 대한 양파 착즙액의 증식억제 활성은 60%를 나타내었으나, 양파 착즙액을 초산 발효한 경우 모든 발효액에서 증식억제 효과가 현저히 상승되어 95%이상의 높은 활성을 나타내었다.

대장암세포인 DLD-1과 Caco-2에 대한 증식억제 활성을 측정한 결과는 Fig. 5-16(C)와 5-16(D)와 같다. 발효 전의 양파 착즙액은 DLD-1과 Caco-2 세포에 대하여 각각 76%와 66%의 증식억제 효과를 나타내었으나, 1% 이상의 산도를 갖는 모든 발효액의 경우 두 대장암세포에 대하여 95% 이상의 높은 항암 활성을 나타내었다.

양파 초산 발효액이 고혈압의 작용기전에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ACE 저해 활성을 측정한 결과 항고혈압 효과는 초산발효에 의해 현저하게 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 5-17). 1%의 산도를 갖는 초산 발효액의 경우 63%의 ACE 저해활성을 나타내어, 발효하지 않은 양파 착즙액의 46%에 비하여 높은 활성을 나타내었으며, 산도가 2%와 3%로 증가된 발효액에서 ACE 저해활성은 추가적으로 상승되어 각각 83%와 89%의 활성을 나타내었다.

ACE를 억제할 수 있는 물질은 angiotensin II의 생성을 억제하기 때문에 혈관이완제로 작용하며, ACE의 억제는 혈압상승원을 제거할 뿐 아니라 혈관확장제인 bradykinin을 증가시키고 신장혈관을 확장시켜 Na 배설을 촉진함으로써 혈압을 강하시킨다고 보고되고 있다 (Alwxabder, 1995). Choi 등(2008)은 양파 분말이 고혈압군 쥐의 ACE 활성을 억제하고 혈압을 감소시키는 효과가 있다고 보고하였으며, Yamamoto 등(2005)은 녹색의 Welch 중 양파가 ACE 활성을 억제하였으며 혈압의 상승을 억제한다고 보고한바 있다. ACE 저해활성이 20% 이상인 경우 항고혈압 활성이 있다는 것으로 판정한다. 본 연구에서 양파 착즙액은 46%의 ACE 저해활성을 나타내어, 발효전의 양파 착즙액이 일정 수준의 항고혈압 활성을 갖고 있는 것으로 확인되었다. ACE 저해활성은 항암활성과 더불어 양파 착즙액의 초산 발효에 의해 현저히 증가되었으며, 이는 초산 발효에 의해 생성되는 성분들에 의한 시너지 효과가 발생하여 나타난 것으로 사료된다.

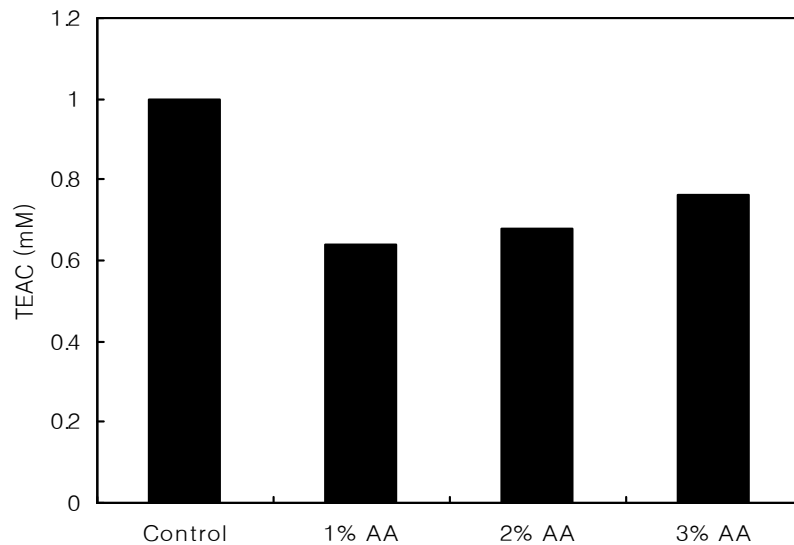


Fig. 5-14. Effect of acetic acid fermented onion juice on ABTS activity.

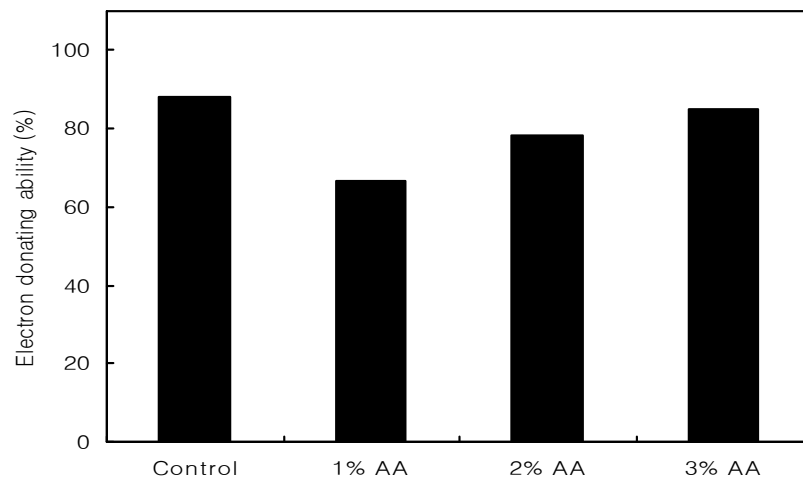


Fig. 5-15. Effect of acetic acid fermented onion juice on the electron donating ability.

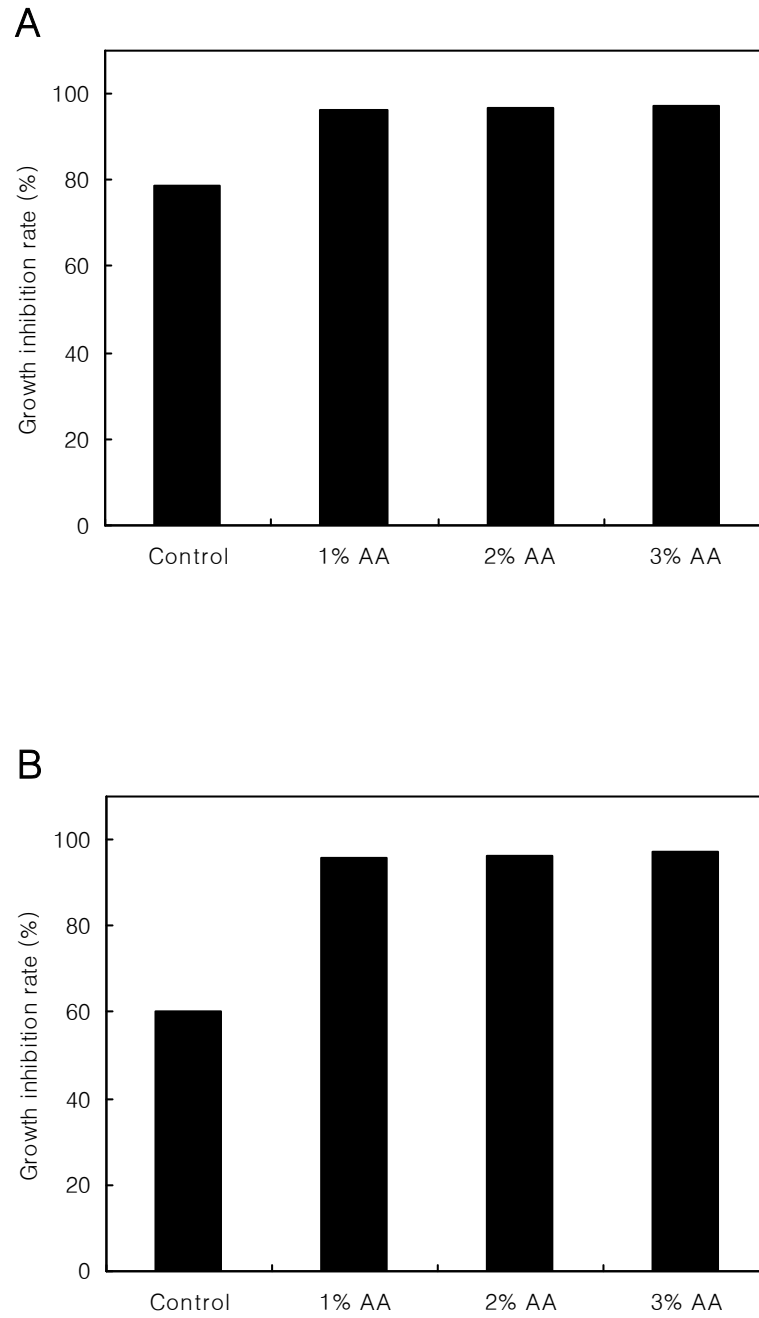
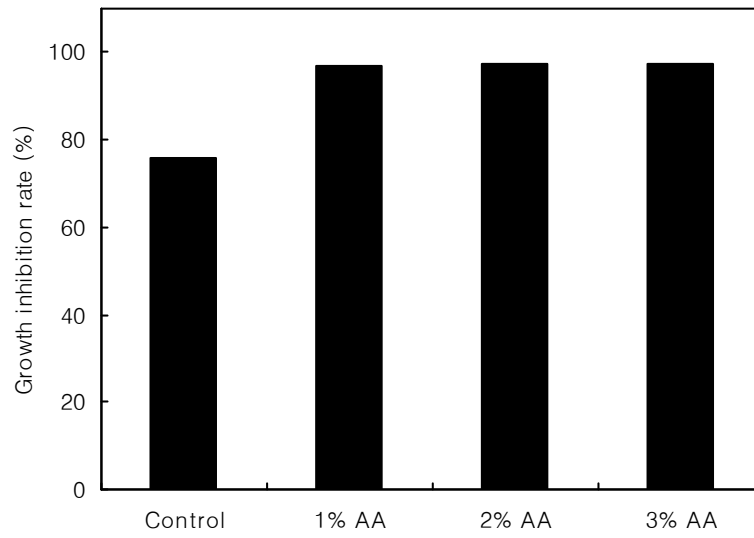


Fig. 5-16. Inhibitory effect of acetic acid fermented onion juice on the growth of human cancer cells.

Lung cancer A549: A, lung cancer SK-MES-1: B, colon cancer DLD-1: C, colon cancer Caco-2: D.

C



D

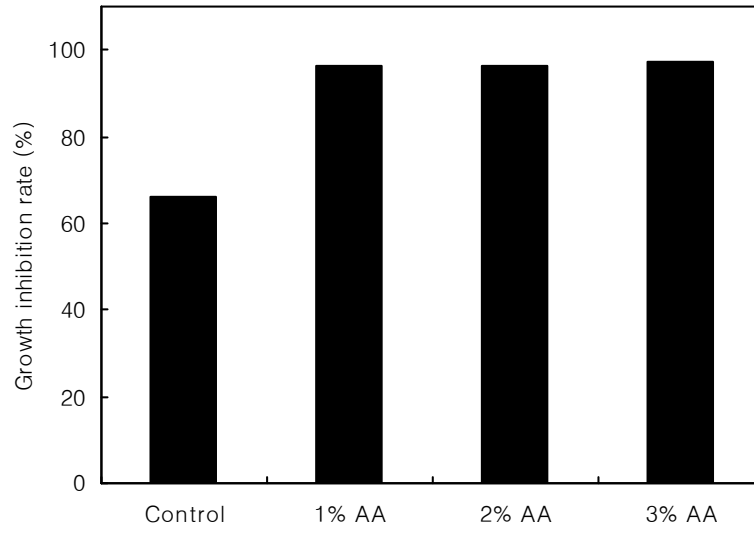


Fig. 5-16. Continued.

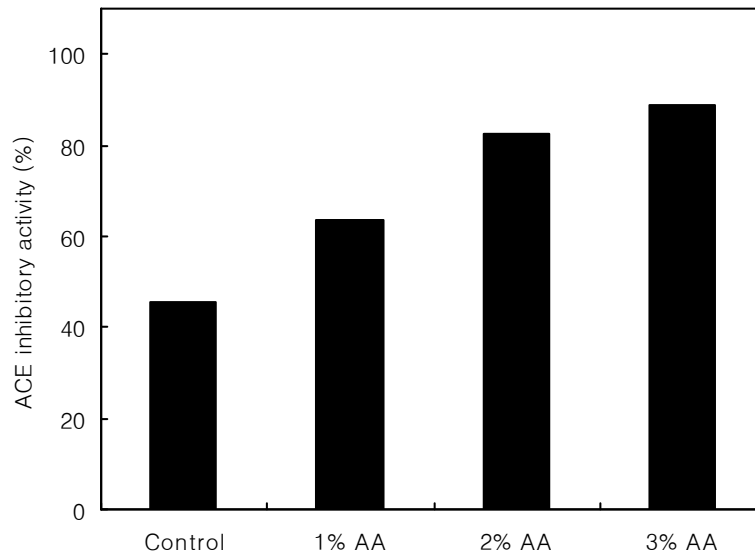


Fig. 5-17. Effect of acetic acid fermented onion juice on ACE inhibitory activity.

다. 양파 발효제품의 기능성 검증(*in vivo*)

(1) 유산발효양파와 섭취군의 생리학적 활성

(가) 체중 및 형태의 변화

4주간의 유산발효양파식이의 부하와 1회성 수영운동 후 체중 및 형태의 변화를 알아보기 위하여 체중, 고환부 지방, 복부지방, 식이효율을 분석하였다. 4주간의 사육 후 체중의 변화는 전체적으로 110g 전후로 증가하였으나 유산발효식이의 섭취에 따른 차이는 나타나지 않았다. 그러나 유산발효양파식이 운동군(OE군)은 유산발효양파식이 대조군(OS군)에 비해 체중이 유의하게 감소하였다. 하지만, 고환부 지방과 복부지방 모두 그룹 간 유의한 차이가 나타나지 않았다. 식이효율은 실험기간 중 증가한 체중을 총 섭취한 식이량으로 나눈 것으로, OE군이 OS군에 비해 유의하게 감소하였다.

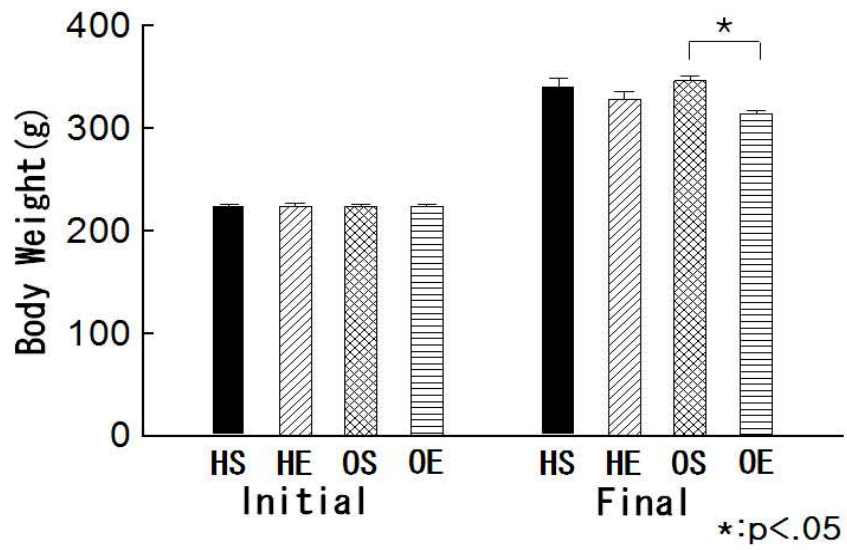


Fig. 5-18. Changes of body weight.

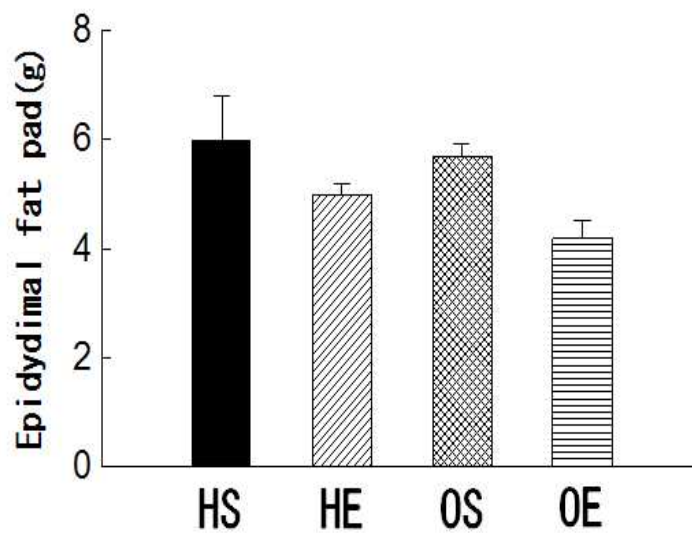


Fig. 5-19. Changes of epididymal fat pad weight.

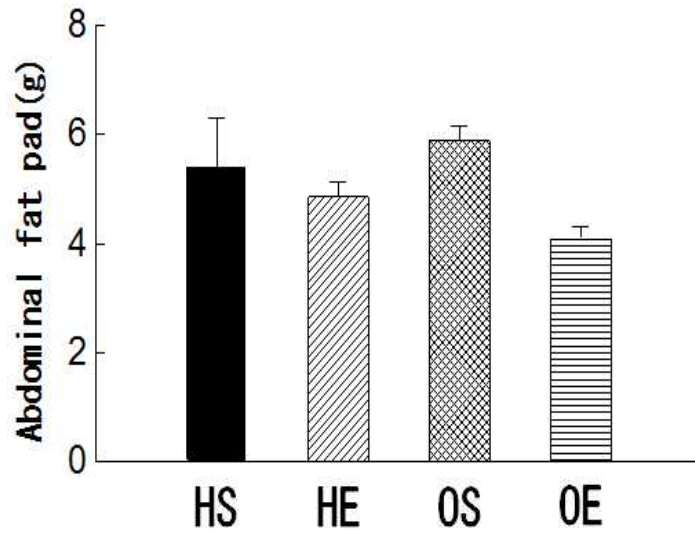


Fig. 5-20. Changes of perirenal fat pad weight.

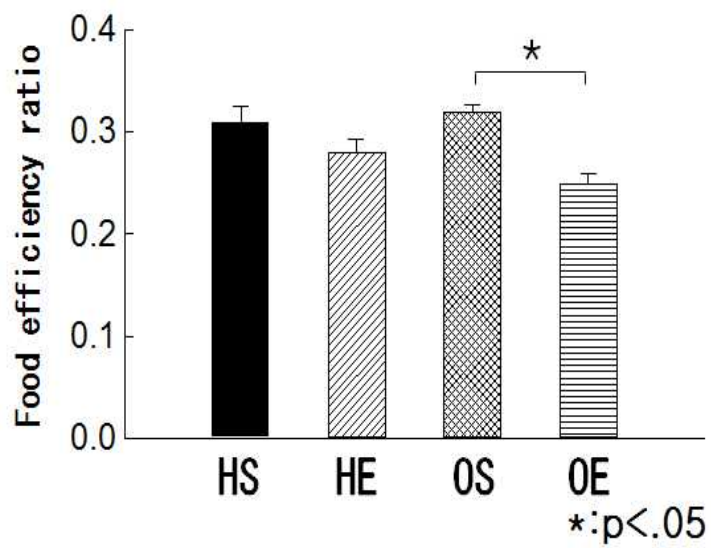


Fig. 5-21. Changes of food efficiency ratio

(나) 혈액 성분의 변화

유산발효양과식이의 부하와 1회성 수영운동 후 혈액 및 생화학적 변화를 측정한 결과 혈당치는 OE군이 HE군에 비해 유의하게 낮게 나타났으며($p < 0.01$) 또한 OS군에 비해서도 유의하게 낮게 나타났다($p < 0.01$). 혈중 중성지방 농도는 OE군이 HE군에 비해 유의하게 높게 나타났으며($p < 0.05$), OS군에 비해서도 유의하게 높게 나타났다($p < 0.01$). 총콜레스테롤은 OE군이 HE군에 비해 유의하게 낮게 나타났다($p < 0.05$). HDL-콜레스테롤은 각 그룹간 유의한 차이가 나타나지 않았지만, OS군은 HS군에 비해 높은 경향을 보였다. 젖산 농도는 각각의 운동군이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$), 이는 운동효과에 기인되는 것으로 사료된다. OS군에서 중성지방과 총콜레스테롤이 낮은 경향을 보인 이유는 양과 섭취에 의해 장내에서 생성된 단쇄지방산에 의해 간장과 소장에서 콜레스테롤 합성을 억제시킨 결과라고 할 수 있다(Hara et al, 1999). 또한 OE군의 혈당이 낮고 중성지방이 높게 나타난 이유는 운동 중의 에너지 기질로서 당질 보다 상대적으로 지질에 대한 의존성이 강하게 나타난 결과라고 추측된다.

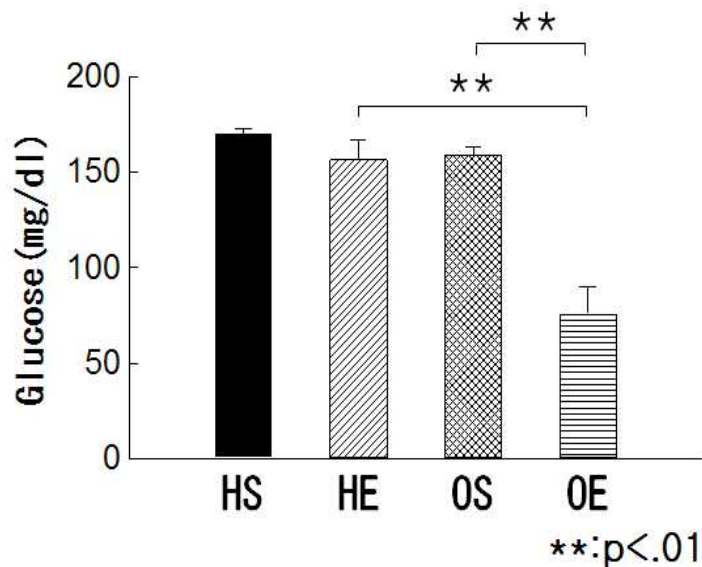


Fig. 5-22. Changes of serum glucose levels.

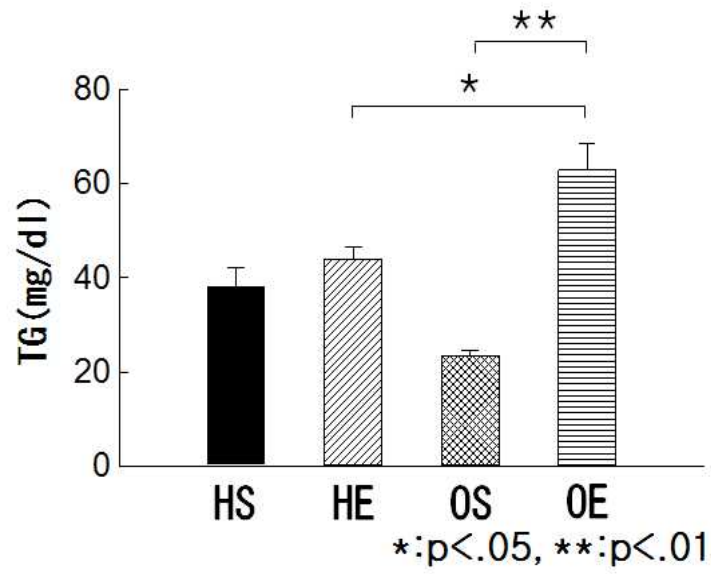


Fig. 5-23. Changes of serum triglyceride levels.

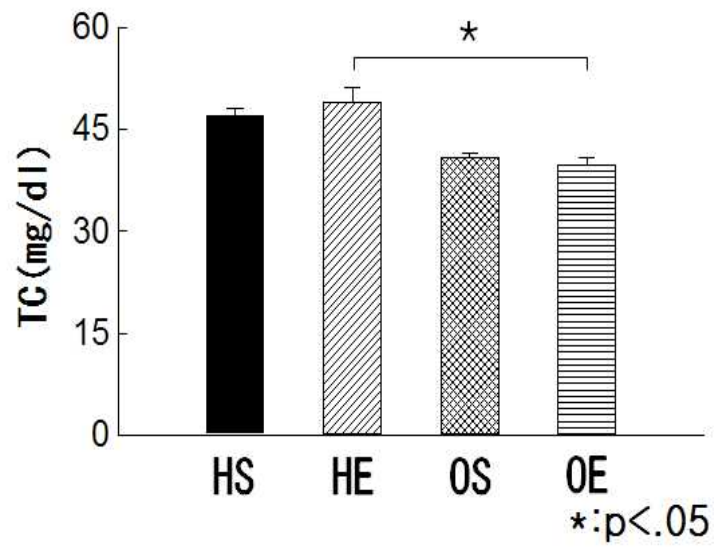


Fig. 5-24. Changes of serum total cholesterol levels.

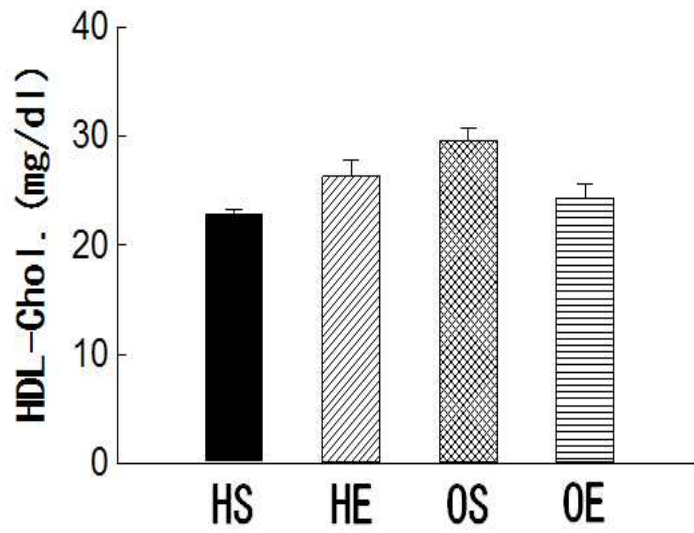


Fig. 5-25. Changes of serum HDL-cholesterol levels.

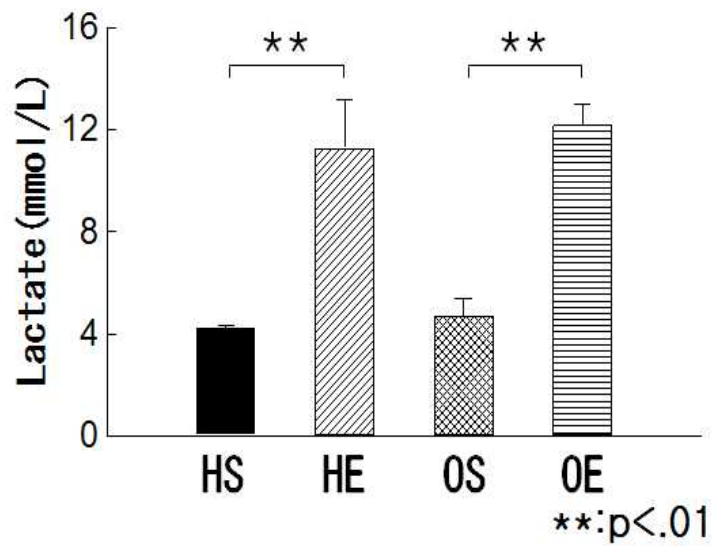


Fig. 5-26. Changes of serum lactate levels.

(다) 근육 및 간장의 글리코겐 농도

가자미근에서 분석한 글리코겐 농도는 OE군이 OS군에 비해 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.05$) 장시신근에서는 HE군이 HS군에 비해 유의하게 감소하였으나 ($p < 0.05$), 유산발효 양파식이 섭취에 의한 차이는 나타나지 않았다. 한편 간장에서 측정된 글리코겐 농도는 각각의 운동군이 대조군에 비해 유의하게 낮게 나타났다 ($p < 0.01$). 간장과 근육의 글리코겐 함량의 경우 식이에 의한 차이는 나타나지 않았으나, 운동 후의 글리코겐 감소량은 근육보다 간장의 감소율이 큰 것으로 나타났다. 이는 두 시간의 수영운동에 의한 당질에너지는 주로 간장의 글리코겐에 의해 공급된다는 것을 보여준다.

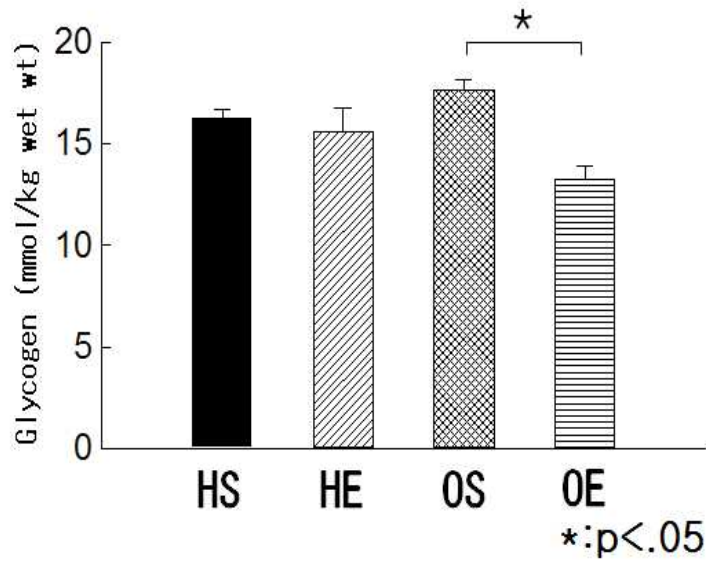


Fig. 5-27. Changes of glycogen contents in soleus muscle.

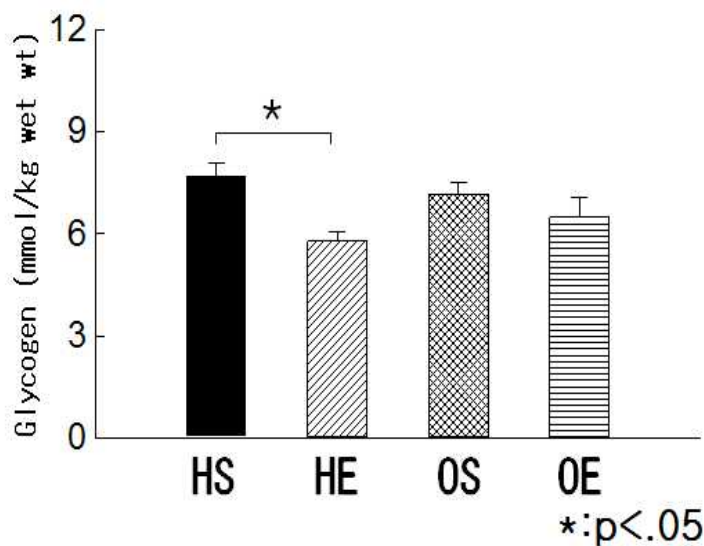


Fig. 5-28. Changes of glycogen contents in extensor digitorum longus muscle.

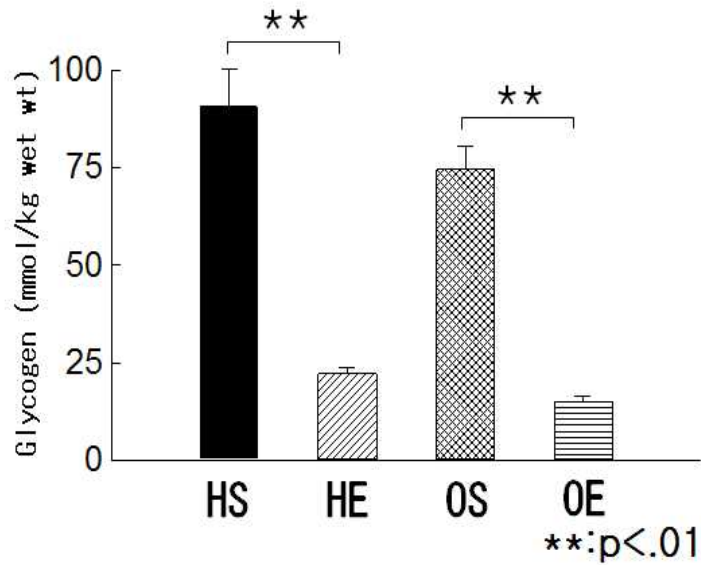


Fig. 5-29. Changes of glycogen contents in liver.

(라) 근육 내 MDA 농도 및 항산화효소 활성

골격근에서 측정된 MDA 농도의 경우 OS군이 HS군에 비해 상대적으로 낮은 수치를 나타내었으며 OE군은 HE군에 비해 낮은 경향을 나타내었다. SOD 활성도 유의한 차이는 아니지만 OS군이 HS군에 비해 상대적으로 높은 수치를 나타내었으며, GPx는 군간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 양파를 섭취한 군의 MDA 농도가 낮고 SOD 활성이 증가한 이유는 양파 내에 고도로 함유되어 있는 flavonoid류(Ikigai et al, 1993; Huang et al, 1998; Yang and Wang, 1993)의 일종인 quercetin(Hertog et al, 1993; Kang et al, 1998)과 같은 항산화 물질이 항산화효소의 활성을 증가시키는데 기인되는 것으로 생각된다.

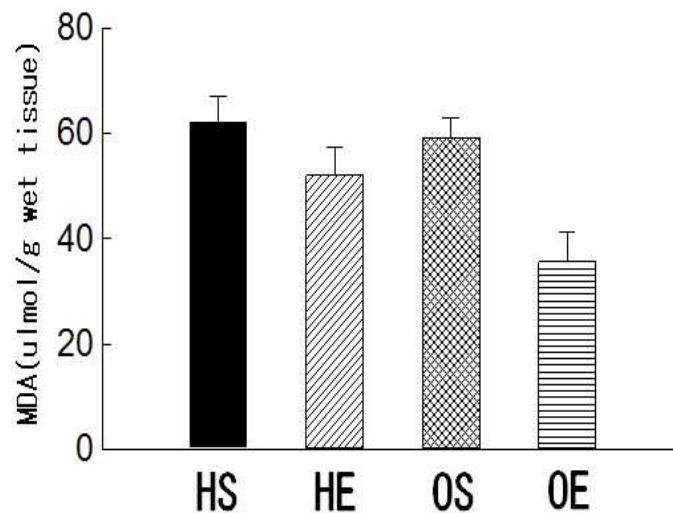


Fig. 5-30. Changes of muscle MDA concentration.

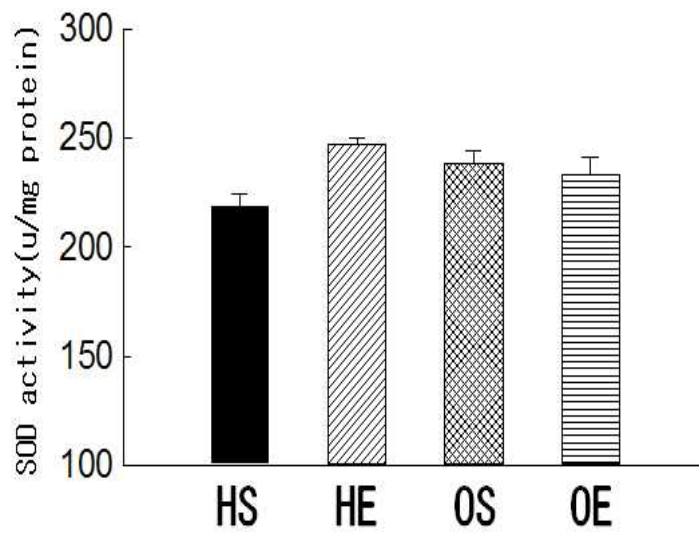


Fig. 5-31. Changes of SOD activity in muscle.

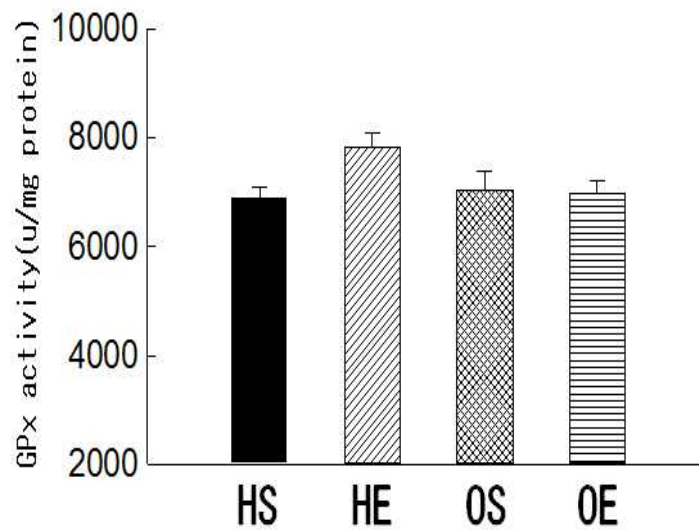


Fig. 5-32. Changes of GPx activity in muscle.

(2) 초산발효양과 섭취군의 생리학적 활성

(가) 체중 및 형태의 변화

4주간의 초산발효양과식이의 섭취와 1회성 수영운동 후의 체중 및 형태의 변화를 알아보기 위하여 체중, 고환부 지방, 복부지방, 식이효율을 분석하였다. 4주간의 사육 후 체중의 변화를 측정한 결과 초산발효양과식이 대조군(AS군)은 고지방식이 대조군(HS군)에 비해 유의하게 높게 나타났으며($p < 0.05$), 또한 초산발효양과식이 운동군(AE군)도 고지방식이 운동군(HE군)에 비해 유의하게 높게 나타났다($p < 0.01$). 그러나 고환부 지방과 복부 지방은 그룹 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 식이효율은 AS군이 HS군에 비해 유의하게 높게 나타났으며($p < 0.05$), AE군도 HE군에 비해 유의하게 높게 나타났다($p < 0.05$). 이러한 결과는 양과 내에 존재하는 천연의 식이섬유가 장내에서 발효에 의하여 단쇄지방산의 생산량을 증가시킨 것이 하나의 원인이라고 생각된다(Fodje et al, 2006).

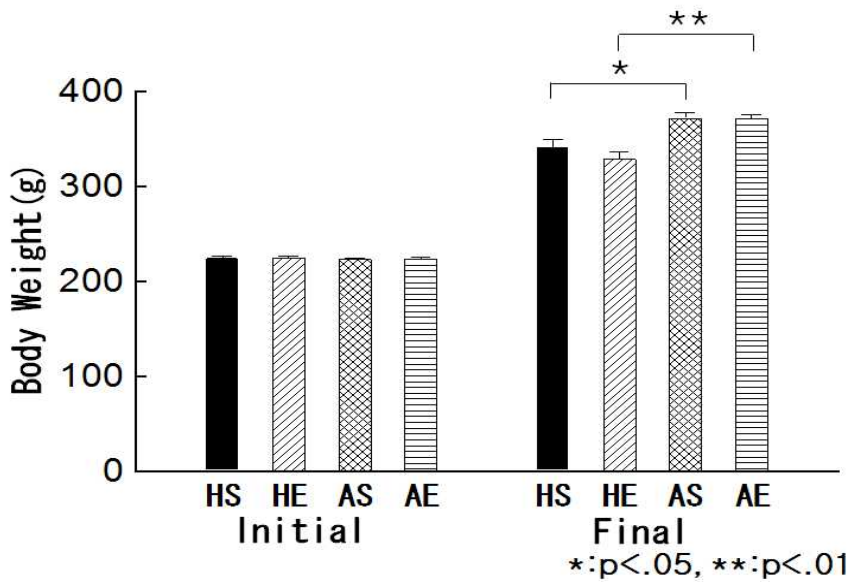


Fig. 5-33. Changes of body weight.

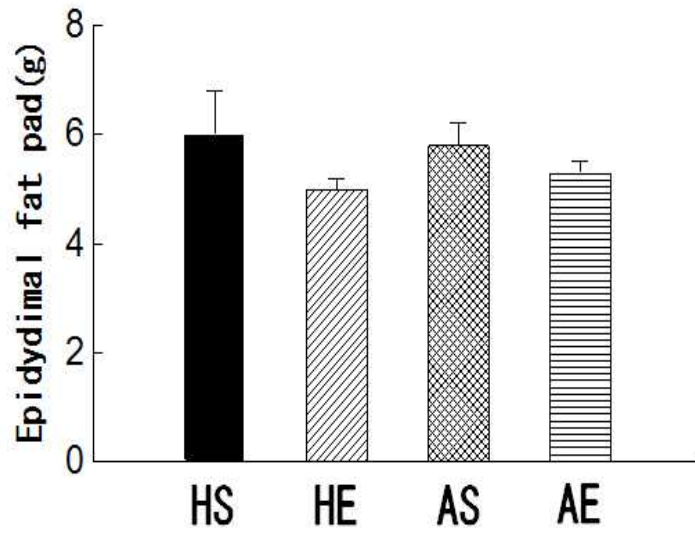


Fig. 5-34. Changes of epididymal fat pad weight.

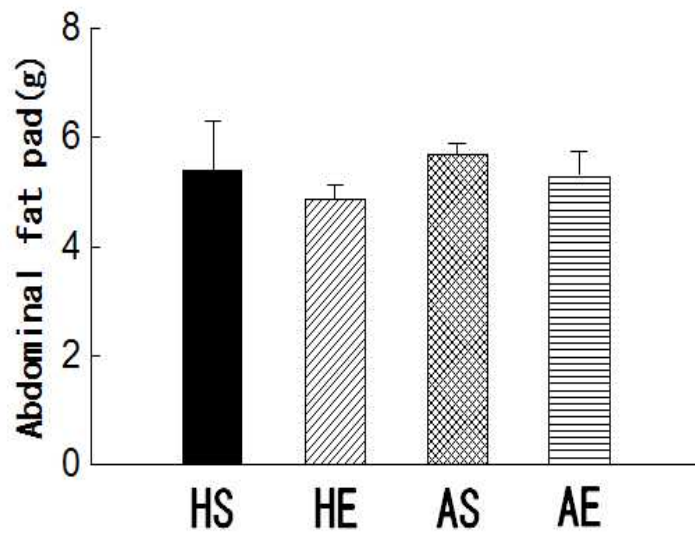


Fig. 5-35. Changes of perirenal fat pad weight.

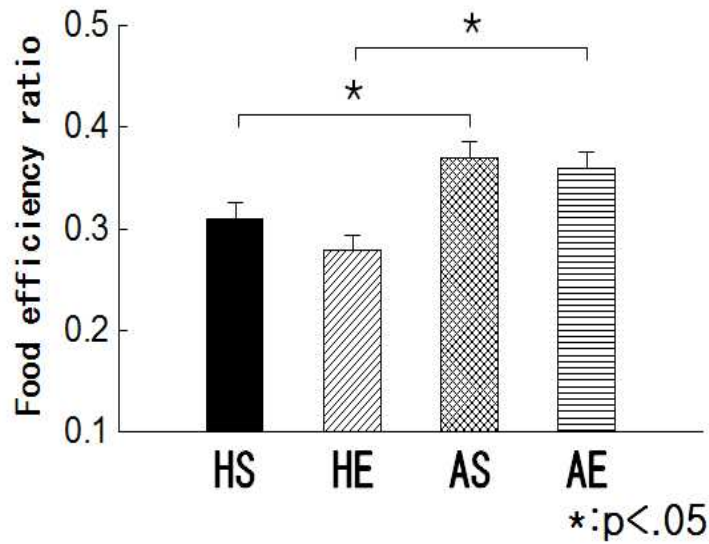


Fig. 5-36. Changes of food efficiency ratio.

(나) 혈액 성분의 변화

4주간의 수영운동과 초산발효양과식이의 부하 후 생화학적 변화를 측정된 결과 혈당치와 총콜레스테롤은 그룹간 유의한 차이가 나타나지 않았다. 혈중 중성지방 농도는 AE군이 AS군에 비해 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 항동맥경화 작용과 관련이 있는 HDL-콜레스테롤은 AS군이 HS군에 비해 유의하게 높게 나타났으며($p < 0.01$), AE군 또한 HE군에 비해 유의하게 높게 나타났다($p < 0.01$). 특히, AE군은 AS군과의 비교에서도 유의하게 높게 나타났다($p < 0.01$). 젖산농도는 HE군이 HS군에 비해 유의하게 높게 나타났으며($p < 0.01$), AE군은 HE군에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 초산발효식이 섭취군도 유산발효식이 섭취군과 마찬가지로 혈중의 중성지방, 총콜레스테롤 수치가 낮은 경향을 보였으며, HDL-콜레스테롤은 높은 수치를 나타내었다. 이는 양과 내에 포함된 식이섬유에 의한 장내 단쇄지방산의 증가(Fodje et al, 2006)와 더불어 양과에 함유되어 있는 S-methyl cysteine sulfoxide가 HMG CoA reductase의 활성을 억제시킨 결과로 사료된다 (Kumari & Augusti, 2007).

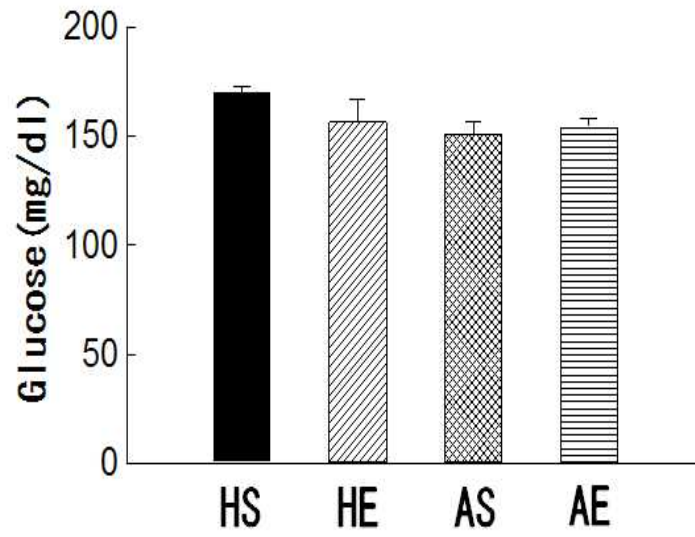


Fig. 5-37. Changes of serum glucose levels.

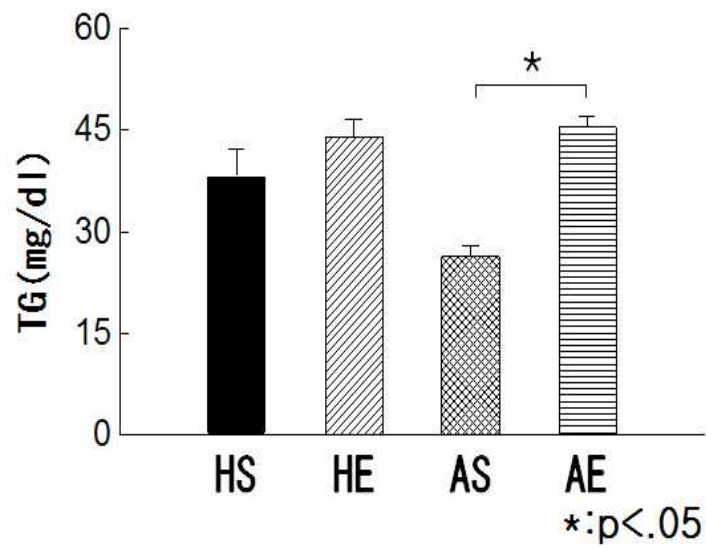


Fig. 5-38. Changes of serum triglyceride levels.

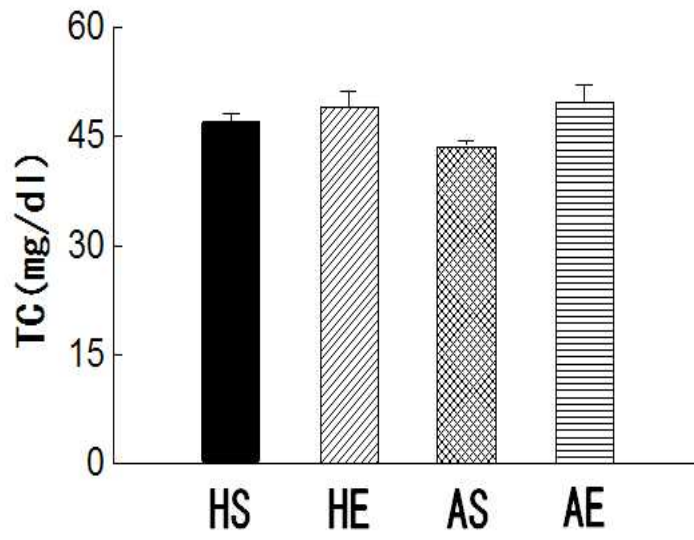


Fig. 5-39. Changes of serum total cholesterol levels.

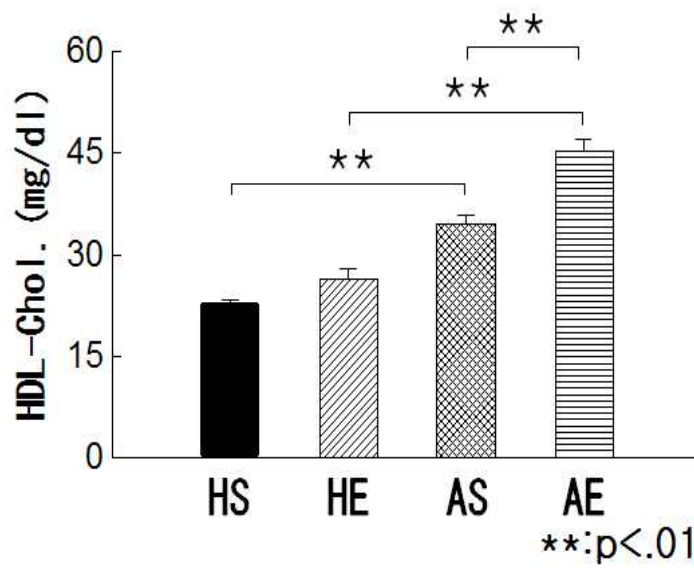


Fig. 5-40. Changes of serum HDL-cholesterol levels.

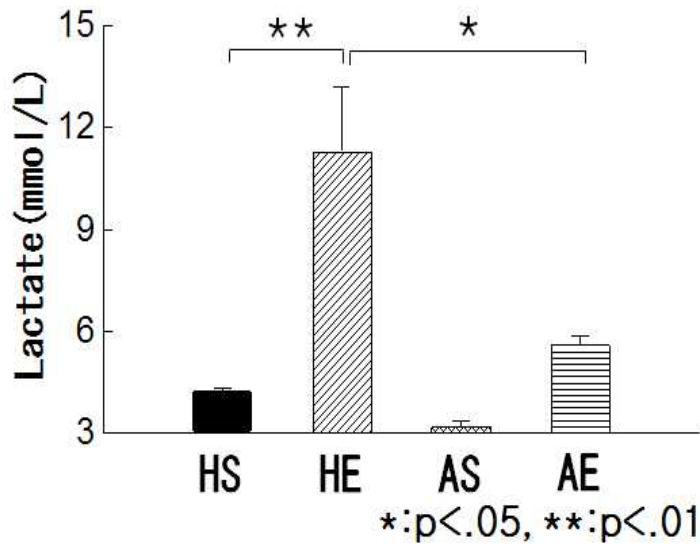


Fig. 5-41. Changes of serum lactate levels.

(다) 근육 및 간장의 글리코겐 농도

가자미근의 글리코겐 농도는 모든 그룹간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 장지신근의 글리코겐 농도는 AS군이 HS군 보다 유의하게 낮았으며($p < 0.01$), 또한 AE군은 HE군 보다 유의하게 낮은 것으로 나타났다($p < 0.05$). 한편, 간장에서의 글리코겐 농도는 식이에 의한 차이는 없었으나 HE군은 HA군 보다, AE군은 AS군 보다 각각 유의하게 낮은 것으로 나타났다($p < 0.01$). 골격근의 증가된 글리코겐 농도는 인슐린 자극 유무에 관계없이 glycogen synthase의 활성을 감소시키는 것으로 알려져 있으며(Danforth, 1965), glycogen synthase의 기능부전은 제2형 당뇨병을 유발시키는 것으로 알려져 있다(Schalin-Jantti et al, 1992). 성인형 당뇨병은 인슐린에 대한 감수성이 떨어져 혈당을 효과적으로 이용하지 못하기 때문에 발생한다. 본 연구결과 초산발효양파를 섭취한 흰쥐의 근육 내 글리코겐 농도가 낮게 나타났으며, 이는 양과발효음료의 섭취가 인슐린에 대한 감수성을 증가시켜 혈당 조절을 용이하게 함으로서 당뇨병을 예방할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

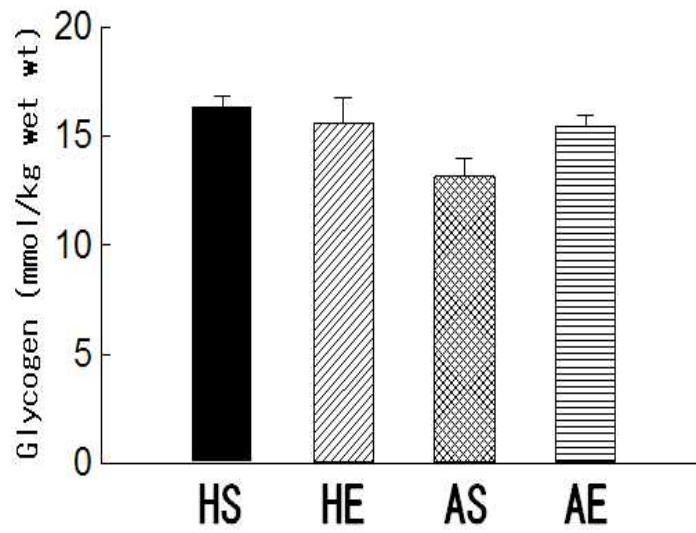


Fig. 5-42. Changes of glycogen contents in soleus muscle.

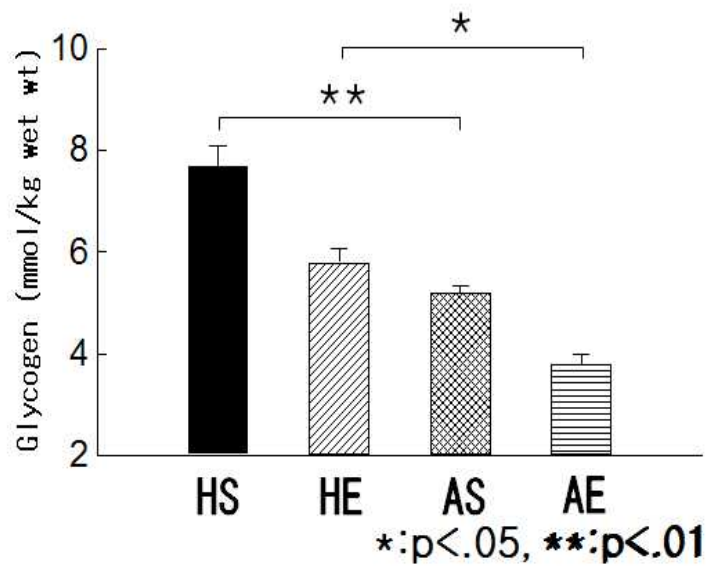


Fig. 5-43. Changes of glycogen contents in extensor digitorum longus muscle.

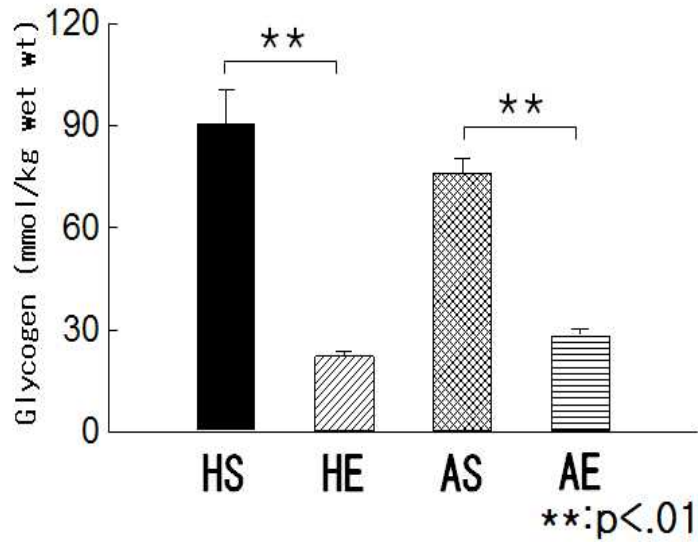


Fig. 5-44. Changes of glycogen contents in liver.

(라) 근육 내 MDA 농도 및 항산화효소 활성

근육 내에서의 MDA 농도는 AS군이 HS군에 비해 유의한 차이는 아니지만 낮은 경향을 보였으며 HE군과 AE군 사이에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 근육의 SOD 활성은 AS군이 HS군 보다 높았으며 AE군이 HE군 보다 높았으나 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다. 또한 각각의 운동군은 유의한 차이는 아니지만 각각의 대조군에 비하여 높은 활성을 나타내었다. 한편, 근육 내의 GPx 활성 또한 각각의 운동군은 유의한 차이는 아니지만 각각의 대조군에 비하여 높은 활성을 나타내었으며 식이에 의한 차이는 없는 것으로 나타났다. 위에서 언급한 것처럼 양과를 섭취한 군의 MDA 농도가 낮고 SOD 활성이 증가한 경향이 나타난 이유로서는 양과 내에 고동도로 함유되어 있는 flavonoid 류(Ikigai et al, 1993; Huang et al, 1998; Yang and Wang, 1993)의 일종인 quercetin(Hertog et al, 1993; Kang et al, 1998)과 같은 항산화 물질이 항산화효소의 활성을 증가시키는데 기인되는 것으로 생각된다.

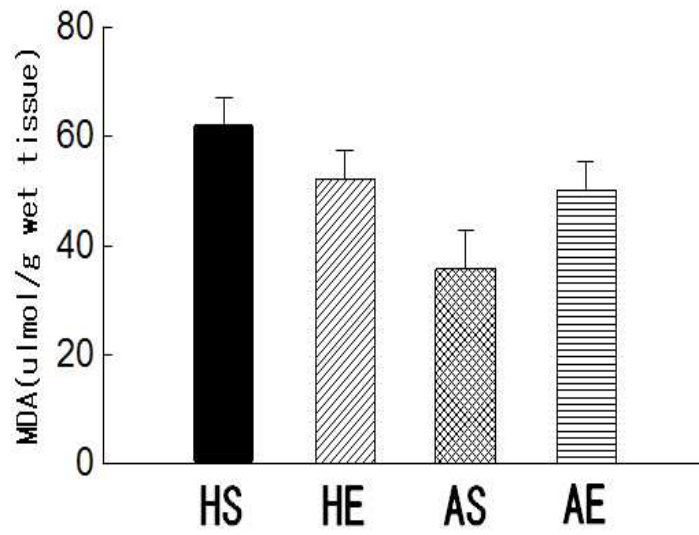


Fig. 5-45. Changes of muscle MDA levels.

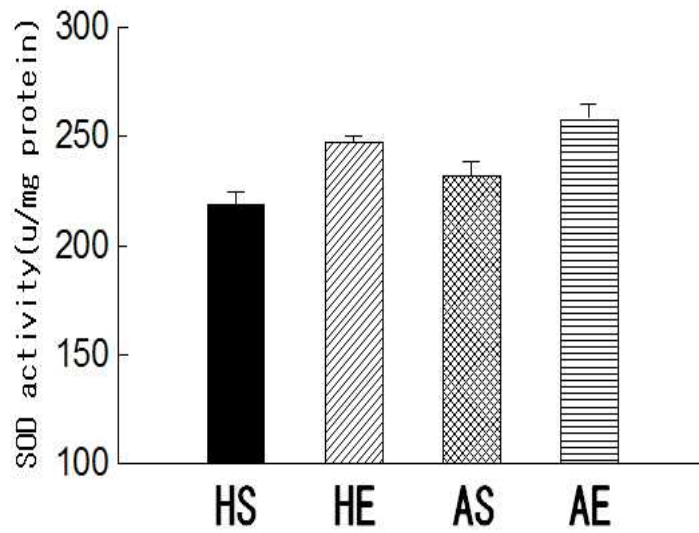


Fig. 5-46. Changes of muscle SOD activities.

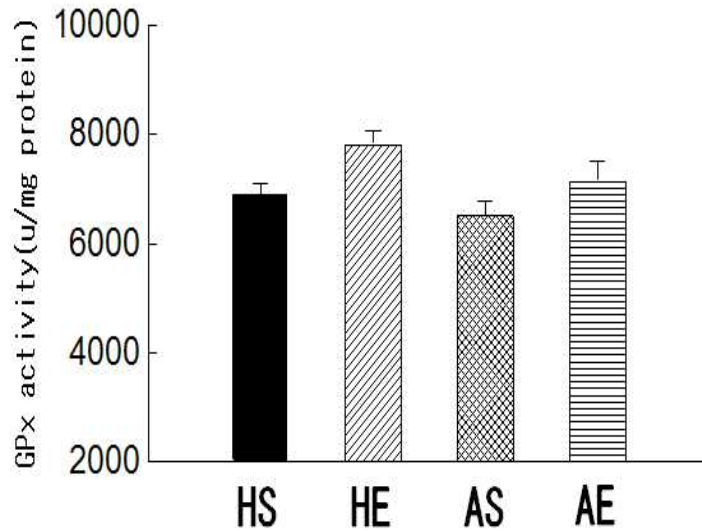


Fig. 5-47. Changes of muscle GPx activities.

4. 결 론

추출방법에 따른 기능성 성분을 분석한 결과 양파 착즙액의 경우 100℃에서 열수 추출한 시료에서 총 phenol, flavonoid, quercetin의 함량이 가장 높게 검출되었으며, 에탄올 추출 시 100℃에서 추출한 시료와 거의 유사한 농도의 기능성 성분이 검출되었다.

양파 추출액의 quercetin 함량은 총 flavonoid의 80~90%로 quercetin이 flavonoid의 대부분을 구성하는 것으로 확인되었다. 양파분말의 경우 착즙액과 비교하여 추출된 flavonoid와 quercetin 함량이 약간 높았지만, thiosulfinate는 약 40% 낮은 농도를 나타내 동결건조 과정이 황화합물의 손실을 초래하는 것으로 나타났다.

양파 껍질은 육질에 비하여 60배 이상 높은 quercetin을 함유하고 있는 것으로 나타났으나, thiosulfinate는 껍질에서 검출되지 않았다. 양파 추출액의 살균조건에 따른 기능성 성분을 분석한 결과 60, 80, 105, 121℃의 열처리는 살균 전과 비교하여 기능성 성분의 함량에 영향을 미치지 않았다.

양파 추출액의 저장동안 총 phenol, flavonoid, quercetin 함량은 저장기간과 온도에 상관없이 안정적으로 유지되었으나, thiosulfinate는 저장 기간이 길어질수록 감소하였고 25℃에 저장한 경우 4℃에서 보다 급격히 감소하는 경향을 나타냈다.

양과발효음료의 기능성을 검증하기 위하여 유산 및 초산 발효액을 제조한 후 이에 대한 항산화, 항암, 항고혈압 활성을 조사하였다. 양과 착즙액에 팽화 홍삼 추출액을 첨가한 후 유산 발효시킨 발효액의 경우 홍삼 추출액의 첨가량이 증가할수록 발효액의 total phenol과 flavonoid 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

양과 착즙액의 유산 발효액은 95%의 높은 전자공여능 활성을 나타내어, 유산 발효에 의해 전자공여능 활성이 상승되는 것으로 나타났다. 유산 발효에 의하여 폐암세포와 대장암세포에 대한 항암 활성이 증가되었으며, 0.5% 이상의 홍삼 추출액 첨가에 의한 유산 발효는 추가적으로 항암 활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

한편, 발효액에 양과껍질 추출액을 첨가한 경우 전자공여능 활성이 향상되었지만, 암세포 증식억제 활성은 추가적으로 상승되지 않았다.

양과 발효액의 ACE 저해활성을 측정한 결과 47%의 활성을 나타내었지만, 고농도의 홍삼 및 껍질 첨가는 활성을 감소시키는 경향을 나타내었다. 산도가 1%와 2%인 초산 발효액의 전자공여능은 발효하지 않은 양과 착즙액에 비하여 낮은 활성을 나타내었지만, 산도가 3%인 발효액의 경우 착즙액과 유사한 수준의 활성을 갖는 것으로 나타났다.

초산 발효액은 착즙액에 비하여 높은 항암활성을 갖는 것으로 확인되었으며, 폐암세포와 대장암세포에 대하여 산도 1, 2, 3%를 갖는 초산 발효액 모두 95% 이상의 높은 암세포 증식억제 활성을 나타내었다. ACE 저해활성을 측정한 결과 초산 발효에 의해 항고혈압 활성이 현저히 증가되는 것으로 확인되었다.

양과발효제품의 기능성을 검증하기 위하여 유산발효양과와 초산발효양과를 투여한 흰쥐에서 혈액과 생화학적 활성변화를 조사하였으며, 이와 함께 운동수행능력에 미치는 영향을 평가하였다. 본 연구결과 4주간의 유산발효양과와 초산발효양과의 섭취는 흰쥐의 혈중 포도당, 중성지방, 총콜레스테롤 농도를 저하시키는 반면, HDL-콜레스테롤 농도는 증가시키는 결과를 보였다.

또한 양과발효식이 투여군에서 골격근의 MDA 농도가 감소되고, SOD 활성이 증가되는 것으로 나타나, 발효양과의 섭취가 항산화 활성을 향상시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히, 초산발효양과를 섭취한 흰쥐에서 혈중 포도당 저하와 함께 골격근 내 글리코젠 농도가 낮게 나타나, 초산발효양과에서 인슐린 감수성 증가 효과의 가능성이 제시되었다. 그러나 유산 및 초산발효양과의 섭취와 운동의 상승효과는 관찰되지 않았다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
1차 연도	2007	발효능과 생리활성이 우수한 starter 유산균의 선정	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ○ 과채류로부터 발효능이 우수한 유산균 분리 ○ 분리 유산균의 생리활성 측정과 동정 ○ 고기능성 유산균의 선정과 발효 특성분석 	100
		발효능과 기호도에 적합한 초산균 선정 및 최적 생육조건 결정	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수한 발효능을 지닌 초산균 분리 및 산 생성 배양조건 연구 ○ 반응표면분석법을 이용한 최적 생육 에탄올 농도, 배지 당도 등 결정 	100
		양과발효를 위한 양과 발효기의 가공 및 제조	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ○ 추출방법에 따른 유용성분의 추출수율 분석 ○ 유용성분의 추출 최적화 확립 	100
		발효양과음료의 시장 동향 분석 및 수요도 조사	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 음료 시장 동향 분석에 따른 시장진입 가능성 검토 ○ 기존의 발효음료 및 식초 음료의 분석을 통한 상품 concept 선정 ○ 설문조사를 통한 양과음료에 대한 소비자의 수요도 조사 	100
		양과 추출물과 농축액의 기능성 성분 분석을 통한 유효처리구 선정	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양과 착즙액과 착즙액을 농축한 동결건조분말 시료의 추출방법에 따른 기능성성분 분석 ○ 양과 추출액의 살균 및 저장 기간에 따른 기능성 성분 분석 ○ 품종별 양과 추출액의 기능성 성분 분석 	100

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
2차 연도	2008	양파 유산균발효의 최적화	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유산발효특성 분석과 최적 발효 조건 확립 ○ 발효제품의 기호성과 기능성 향상을 위한 발효공정 개선 ○ 발효제품의 저장성 평가 	100
		양파 초산균발효의 최적화	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기호성이 높은 발효 최적화 연구 ○ 알코올 발효와 초산 발효의 2단 발효 연구 	100
		발효음료 제조공정의 개발	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유산발효음료 제조공정의 설계 ○ 초산발효음료 제조공정의 설계 	100
		발효양과음료의 개발	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선정된 유산 발효균 및 초산 발효균을 이용한 발효음료의 formula 개발 ○ 첨가물의 종류 및 배합량 결정 ○ 개발된 제품에 대한 기호도 조사 ○ 조리 및 배합조건 최적화 	100
		유산 및 초산발효에 의한 기능성 성분변화 확인 및 양파 농축액 및 제품의 기능성 검증	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유산발효와 초산발효 제품의 기능성 성분 분석 ○ 발효에 의한 기능성 성분 변화 비교 분석 ○ 유산발효와 초산발효 제품의 기능성 검증(<i>in vitro</i>) 	100

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
3차 연도	2009	양파 유산균 발효음료의 제품화와 대량생산	20 %	○ 대량생산을 위한 scale-up 조건 확립 ○ 시제품 생산 및 제품화	100
		양파 초산균 발효음료의 제품화연구	20 %	○ 배지 최적화 및 속성 초산발효 연구 ○ 시제품 제조 및 제품화	100
		발효음료 제조공정의 제어시스템 구축	20 %	○ 발효음료 제조 공정 하드웨어 시스템 구축 발효음료 제조 공정 소프트웨어 시스템 구축	100
		발효양파음료의 저장성 검토 및 scale-up	20 %	○ 제품의 저장성(미생물학적, 화학적, 물리적) 검토 및 유통기한 설정 ○ 제품별 포장방법 및 포장재 결정 ○ 최종제품의 형태 결정	100
		동물실험에 의한 제품의 생리활성 검증	20 %	○ 발효제품의 기능성 검증실험 ○ (동물실험): 체중조절 및 콜레스테롤 억제효과, 운동능력 향상효과	100
최종 평가		고기능성 유산균발효 양파 음료 개발	20 %	○ 고기능성 유산발효 양파음료의 시제품 생산 및 제품화	100
		기능성 양파 식초음료 개발	20 %	○ 기능성 양파식초 시제품 생산 및 제품화	100
		기능성 양파발효음료 제조 공정 개발	20 %	○ 유산 및 초산 발효음료 제조 공정 확립	100
		기능성 양파발효음료의 산업화연구	20 %	○ 제품의 저장성, 포장방법, 형태 결정	100
		양파발효음료의 기능성 검증	20 %	○ 발효제품의 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 실험을 통한 기능성 검증	100

제 2 절 관련분야에의 기술발전예의 기여도

본 연구과제를 통하여 과채류에 존재하는 유산균의 다양성과 분포도를 확인함으로써 자연계에 존재하는 유산균의 생태학적 연구의 기초자료를 제시하였다. 또한 유산균을 이용하여 양파 등 생리활성이 우수한 과채류의 유산발효기술을 확립함으로써 식물자원을 이용하여 다양한 종류의 기능성 음료를 개발할 수 있는 기반을 마련하였다.

또한 효모와 초산균 양파식초 및 주정과 초산균 양파식초의 유기산 조성에 따른 기호도 변화특성을 규명하였으며 양파식초의 신규 항혈전능이 우수함을 입증하였다.

초산발효를 위한 유가식 배양 시 산도의 증가는 에탄올만의 첨가로는 불가능하고 추가로 단백질원이 필수적으로 필요하다는 사실을 확인하였으며 양조식초의 숙성발효에는 통기가 절대적으로 필수요소임을 입증하였다.

주정의 농도가 일정농도까지 높아짐에 따라 산도는 증가하는 반면 균체량은 감소하며, 유가식 배양 시 기질공급방법(step, continuous feeding)에 따라 산도 증가 양상이 차이가 나는 것을 규명하였다. 또한 발효기 1대로 repeated 발효(내산성)의 가능성을 증명하였으며 scale-up 실험 시 2일 내에 양조식초를 제조할 수 있는 기술을 개발하였다.

최근 각광받고 있는 기능성 물질은 polyphenol 계열의 flavonoid로서 항산화효과, 항암효과, 심장병 및 동맥경화 예방 등의 효과가 있는 flavonoid 성분의 추출에 있어서, 추출의 최적조건을 확립하는데 기본적인 도구가 될 수 있으며, 또한 산업적으로 이와 같은 유용성분을 추출하는데 있어서 도움이 될 수 있을 것이라 예상된다.

또한, Governing equation을 이용한 에너지 수지식과 Laplace 함수를 수학적 모델로 이용하여 온도 제어에 대한 simulation 결과를 확인하였으며, 이와 유사하게 물질 수지식과 Laplace 함수를 이용하여 유량 및 유속의 제어를 통해 화학공정 및 다른 식품공정에 활용되어질 수 있을 것이라고 예상된다.

본 연구를 통하여 항산화, 항암, 항고혈압, 항당뇨, 콜레스테롤 억제 등 양파발효제품의 다양한 생리활성 효과가 검증되었다. 따라서 기능성 양파발효제품의 개발은 국민의 건강 증진과 보건 향상에 기여할 수 있을 것이다. 또한 양파발효제품의 개발에 의해 양파의 소비가 촉진될 수 있으며, 향후 양파를 이용한 기능성 가공식품의 개발이 활성화 될 수 있을 것이다. 또한 현재 양파의 생리활성 연구는 마늘에 비해 매우 부족한 실정으로, 양파에 함유되어 있는 flavonoid와 황화합물 성분들에 의한 생리활성 기작을 규명하기 위한 연구가 활발히 진행될 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화·산업화 계획

본 연구사업을 통하여 양과 유산발효음료와 양과 유산발효분말제품, 양과식초음료와 양과식초분말 등 총 4개 제품에 대한 시제품 개발에 성공하였으며 제품개발과정에서 과채류의 유산 발효기술과 초산 발효기술 및 발효음료 formula 개발 등 제품화 기술, 제품 생산의 각 단위공정별 제어기술, 식품원료로부터 flavonoid류 등의 추출기술 등을 확보하였다.

본 연구사업을 통하여 개발한 4개 제품에 대하여 향후 건강기능성 음료의 시장변화를 분석하고 참여업체의 장기적인 사업 전략 및 제품화 전략을 수립한 후 제품의 산업화가 가능하다고 판단될 경우 실용화가 가능한 시점에 산업화할 예정이다. 단기적으로 산업화가 가능하다고 판단될 경우에는 회분식 발효기 2톤 규모의 OEM업체를 선정하여 OEM을 통한 제품생산 계획을 고려하고 있다.

제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

1. 교육 및 지도

본 연구과제 수행 기간 중 참여연구원들을 대상으로 유산균 및 기능성 소재 등 본 과제에 관련된 주제에 대하여 총 6차례 workshop을 실시하였으며 구체적인 내용은 아래와 같다.

제 1차 workshop

일시: 2008년 7월 22-23일

장소: 용인 한화리조트

주제: 연구 과제관련 전반적 실험방법 및 결과 분석 및 균주 동정법 특강

제 2차 workshop

일시: 2009년 7월 24일

장소: 경원대학교

주제: 식물유래 기능성 소재의 탐색과 활용 및 연구결과 토의

제 3차 workshop

일시: 2009년 10월 8일

장소: 경원대학교

주제: Development of pharmaceuticals using lactic acid bacteria 및 연구결과 토의

제 4차 workshop

일시: 2010년 1월 26일

장소: 경원대학교

주제: 저산성 밀봉식품의 안전관리체계 및 연구결과 토의

제 5차 workshop

일시: 2010년 4월 19일

장소: 경원대학교

주제: 국내 생명공학의 현황과 식품산업의 VISION 및 연구결과 토의

제 6차 workshop

일시: 2010년 5월 4일

장소: 경원대학교

주제: 기능성소재시장 동향 및 연구결과 토의

향후 본 연구사업을 통하여 개발 확보한 과채류의 유산 발효기술과 초산 발효기술, 발효음료 제품화 기술, 제품 생산의 공정 제어기술, 식품원료로부터 flavonoid류 등의 추출 기술 등을 본 연구에 참여한 각 협동과제책임자들의 지도 학생들에게 교육시켜 유용균주의 발효에 의한 건강기능식품 제조 분야의 핵심인력으로 양성할 계획이다.

또한 참여업체 소속 연구원들에게 기술 지도를 실시하여 본 연구사업을 통하여 개발한 기술을 관련업체에 확산시킴으로써 궁극적으로는 국내 식품제조 중소기업의 제품개발력 향상에 기여할 예정이다.

2. 홍보

참여업체가 본 연구사업을 통하여 개발한 제품을 산업화할 경우 제품 소개 등 언론에 본 연구사업의 결과물을 홍보할 예정이다.

단기적으로는 2010년 10월 20~30일 경에 이천 설봉공원에서 개최될 이천 쌀문화축제에 부스를 마련하여 본 과제를 통하여 개발된 제품을 전시하여 홍보할 예정이며, 2010년 11월 초 서울 코엑스에서 개최될 서울 국제팬시푸드 페스티벌에 부스를 설치하여 개발제품을 전시 홍보할 계획에 있다.

제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

본 연구사업을 통하여 현재까지 3건의 특허를 출원하였고, 3건의 품종(유전자원)을 등록하였는데 발효에 사용된 2개 균주에 대하여 한국중균협회 부설 한국미생물보존센터에 특허기탁하였고 1개 균주에 대한 16S rRNA의 염기서열을 GenBank에 등록하였다. 또한 본 연구결과를 SCI급 논문 2편, 연구재단 등재지 5편 등 총 7편의 논문을 학술지에 게재하였다.

본 연구사업을 통하여 현재까지 확보된 지식재산권 목록은 아래와 같다.

특허출원

출원번호: 10-2009-0024870

출원일자: 2009.03.24

발명의 명칭: 신규한 유산균 및 이를 이용한 양과 발효 음료의 제조방법

출원인: 경원대학교 산학협력단, 청강문화산업대학 산학협력단, 서울대학교 산학협력단, 이화여자대학교 산학협력단, 선문대학교 산학협력단, (주)그린바이오

발명자: 박영서, 장재권, 최영진, 정명수, 박훈, 심건섭

출원번호: 10-2010-0017370

출원일자: 2010.02.25

발명의 명칭: 신규한 초산균

출원인: 경원대학교 산학협력단, 청강문화산업대학 산학협력단, 서울대학교 산학협력단, 이화여자대학교 산학협력단, 선문대학교 산학협력단, (주)그린바이오

발명자: 장재권, 박영서, 최영진, 정명수, 박훈, 심건섭

출원번호: 10-2010-0018241

출원일자: 2010.02.26

발명의 명칭: 양과 발효 음료의 제조방법

출원인: 경원대학교 산학협력단, 청강문화산업대학 산학협력단, 서울대학교 산학협력단, 이화여자대학교 산학협력단, 선문대학교 산학협력단, (주)그린바이오

발명자: 장재권, 박영서, 최영진, 정명수, 박훈, 심건섭

품종(유전자원)

Pediococcus pentosaceus KC-007 16S-rRNA gene: GenBank database accession No. EU569832

Pediococcus pentosaceus KC-007: 한국중균협회 부설 한국미생물보존센터 기탁번호 KFCC11439P

Acetobacter tropicalis No. 22: 한국중균협회 부설 한국미생물보존센터 기탁번호 KFCC11476P

논문

(SCI 급)

Jae Kweon Jang, Young Jin Choi, Myong-Soo Chung, Hoon Park, Kun-Sub Shim, and Young-Seo Park. 2009. Isolation and Cultural Properties of Acetic Acid Bacteria for Production of Onion Vinegar. *Food Sci. Biotechnol.* 18(4) 939-947.

You-Jung Choi, Chan-Ick Cheigh, Su-Woo Kim, Jae Kweon Jang, Young Jin Choi, Young-Seo Park, Hoon Park, Kun-Sub Shim, and Myong-Soo Chung. 2009. Selection of Starter Cultures and Optimum Conditions for Lactic Acid Fermentation of Onion. *Food Sci. Biotechnol.* 18(5) 1100-1108.

(연구재단 등재지)

Young-Seo Park, Jae Kweon Jang, Young Jin Choi, Myong-Soo Chung, Hoon Park, and Kun-Sub Shim. 2009. Lactic Acid Fermentation of Onion Juice Supplemented with Puffed Red Ginseng Extract. *Food Engineering Progress* 13(1) 16-23.

Young-Seo Park, Jae Kweon Jang, Young Jin Choi, Myong-Soo Chung, Hoon Park, and Kun-Sub Shim. 2009. Distribution and Biodiversity of Lactic Acid Bacteria Having Bacteriocin-like Activity from Fresh Fruits and Vegetables. *Food Engineering Progress* 13(1) 64-69.

You-Jung Choi, Su-Woo Kim, Jae-Kweon Jang, Young-Jin Choi, Young-Seo Park, Hoon Park, Kun-Sub Shim, Hye-Seong Lee, and Myong-Soo Chung. 2009. Development of Fermented Functional Onion Juice Using Lactic Acid Bacteria. *Food Engineering Progress* 13(1) 1-7.

Hoon Park, Ganbud Oyunzul, Sung-Who Suh, Young-Seo Park, Jae-Kweon Jang, Myong-Soo Chung, Young Jin Choi, and Kun-Sub Shim. 2009. Investigation of Functional Ingredients from Onion According to the Extraction Methods, Heat Treatment, and Storage Period. *Food Engineering Progress* 13(2) 92-98.

Eun Young Jin, Young-Seo Park, Jae Kweon Jang, Myong-Soo Chung, Hoon Park, Kun-Sub Shim, and Young Jin Choi. 2009. Extraction of Quercetin and Its Glucosides from Onion Edible Part Using Solvent Extraction and Various Extraction Assisting

Methods. *Food Engineering Progress* 13(2) 147-153.

향후 출원된 특허에 대해서는 등록 결정이 될 경우 특허 등록을 유지하여 본 사업에서 개발한 기술과 제품에 대한 권리를 보유할 예정이다.

한편 본 연구결과의 논문게재와 관련하여 현재 양파로부터 quercetin의 추출공정에 대한 내용으로 *Food Sci. Biotechnol.*에 투고하여 심사 중에 있으며 양파식초의 제조공정 및 제품화에 관한 결과와 개발 제품의 기능성에 관한 동물실험 결과를 각각 SCI급 학술지에 투고할 예정이다. 또한 본 연구에서 사용한 유산균과 초산균의 항균활성 등 생리활성에 관한 연구내용을 각각 국내 학술지에 투고할 계획이다.

상기와 같이 본 연구과제를 통하여 SCI급 학술지에 총 5편, 국내 학술지에 총 7편의 논문을 게재할 계획이다.

제 4 절 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등

1. 추가연구

본 연구사업을 통하여 개발한 초산발효기술을 이용하여 산도 15%대의 고산도 양파식초 발효기술을 개발할 예정이다.

또한 본 연구사업 통하여 양파발효음료가 다양한 생리활성효과를 갖는 것으로 확인되었다. 특히, 발효양파의 섭취가 인슐린에 대한 감수성을 증가시켜 당뇨를 예방할 수 있다는 가능성이 제시되었는데, 향후 양파발효에 의한 항당뇨 작용기작을 과학적으로 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한 임상실험을 통하여 건강기능식품으로서 양파발효음료의 인체 내 효능을 검증하기 위한 노력이 진행되어야 할 것이다.

2. 타 연구에 활용계획

최근 양파의 각종 생리활성 효과가 과학적으로 입증되어 주목을 받고 있지만, 양파 가공식품의 생리활성 연구는 거의 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구과제에서 검증된 양파 발효제품의 다양한 생리활성효과는 양파 가공식품의 기능성을 홍보하기 위한 자료로 적극 활용될 수 있을 것이다. 또한 양파발효제품의 개발은 기능성 발효식품 분야의 연구를 활성화시킬 것으로 기대되며, 본 연구개발과정에 적용된 실험방법들은 생리활성을 지니는 다양한 작물을 이용한 기능성 발효식품의 개발에 활용될 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

식초산업에서 고산도 식초의 생산은 저장 용량과 여과 용량을 감소할 수 있는 잇점이 있다. 이러한 고산도 식초생산은 초산균의 생육이 알코올과 초산농도에 영향을 받기 때문에 알코올과 초산농도의 조절을 필요로 한다.

현재까지 회분식배양(batch culture)이 식초산업에 널리 사용되고 있는 데, 이러한 변수들의 영향을 고려하지 못하고 있다. 일반적으로 초산균의 생균수는 초산 4% 이상에서는 더 이상 증가하지 못하며 약 4%의 알코올 농도에서 생육저해를 받는 것으로 알려져 있다(Park et al, 1989). 알코올의 초산균 생육저해문제는 기질을 일정농도로 유지하는 유가식배양(fed-batch culture)으로 해결할 수 있다. Ito 등(1991)은 고산도 식초생산을 위해 2개의 발효조를 사용한 유가식 생산을 제안하였다. 첫 번째 발효조에서 생균수를 최대한 후 두 번째 발효조에는 소량의 기질을 공급하고 첫 번째 발효조와 두 번째 발효조 모두 낮은 에탄올 농도를 공급한 결과 첫 번째 발효조에서 최대의 생균수로 키운 배양액을 두 번째 발효조로 공급하여 순환시킴으로써 8%의 초산을 얻을 수 있었다고 보고하였다.

Park 등(1991)은 에탄올의 농도를 2~3%로 유지하도록 에탄올을 공급하고 반복적으로 유가식배양을 수행한 결과 전통적인 배양의 초산농도 5.5~6.5%보다 더 높은 초산을 생산하였다고 보고하고 있다. Berraud(2000)는 초산 7%, 에탄올 4%와 당, 무기질, 염과 효모 엑기스 0.235%를 이용하여 회분배양을 수행하면서 초산 3%와 에탄올 6.2%를 유가식 배양하였을 때, 70시간의 회분식 배양에서 초산농도가 7.5%가 되었고 이후 에탄올을 2.5%로 일정하게 공급하는 유가식배양을 하여 220시간에 초산농도가 17%에 달하는 고산도 식초를 얻었다. 이때 초산균의 생균수는 130시간에서 최대에 도달한 후 산도증가에 기인하여 세포사멸과 자가분해가 되어 0에 가까워졌으며 0에 가까워져도 에탄올을 산화하여 초산을 계속 생산하는 양상을 보였다.

초산균의 생육율은 산소이용성에 의해 결정된다. Czuba(1988)는 산소 섭취율이 biomass당 $10.5 \text{ mg O}_2 \text{ mg}^{-1}$ 이하가 되면 산소가 제한기질이 된다고 하였으며 Odsterhuis 등(1985)은 산소포화농도의 10% 이하는 산소가 부족한 시스템이라고 하였다. 초산 생산율은 산도에 의해 초산균이 자가분해되는 넓은 범위에 걸쳐서도 영향을 받지 않는 결과는 Hekmat 등(1992)의 결과에서도 볼 수 있는데, 초산균이 자가분해되어도 초산생산에 기여하는 초산균의 세포막에 결합된 효소복합체가 계속 작용을 하기 때문으로 보고되고 있다.

양파의 건조는 주로 열풍건조방법을 사용하고 있고, 유동화 기술(fluidization technique) (Swasdisevi and Saponronnarit, 1999), 얇은 막 건조법(thin layer drying)(Rapusas and Driscoll, 1995), 음향건조법(acoustic drying)(Da-Mota and Palau,

1999) 등을 이용하려는 시도도 있었다. 그러나 건조양파는 환원당 또는 아미노산 등의 함량이 높아 매우 흡습성이 커서 저장 중에 덩어리 형성, 갈변 등에 의한 품질저하가 발생될 뿐만 아니라 풍미와 영양가 감소도 일어난다고 하였다(Lewicki et al, 1998).

마늘에 비해 양파의 생리활성에 관한 연구가 부족한 실정이지만, 양파의 기능성 성분 및 생리활성을 규명하기 위한 연구가 국내에 비해 비교적 활발히 진행되고 있다. 양파는 quercetin, kaempferol, rutin과 같은 flavonoid계 물질이 다량 함유되어 있으며, 특히 강력한 항산화제 역할을 하는 quercetin은 전체 flavonoid의 80% 이상으로 다른 야채나 과일에 비하여 매우 높게 함유되어 있는 것으로 알려졌다(Hertog et al., 1993; Lanzotti, 2006). 양파에서 quercetin은 quercetin-3,4'-O-diglucoside, quercetin-4'-O-glucoside, quercetin aglycone의 형태로 존재하며(Leighton et al., 1992; Price & Rhodes, 1997), 이 중 대부분이 quercetin-3,4'-O-diglucoside, quercetin-4'-O-glucoside로 구성되어 있는 것으로 보고되었다(Lombard et al., 2005). Flavonoid와 quercetin 함량은 양파의 산지와 품종 및 부위에 따라 상당한 차이를 나타내며(Leighton et al., 1992; Patil et al., 1995), 양파의 껍질은 식용부위에 비하여 약 10~100배의 flavonoid를 함유하고 있으며(Lanzotti, 2006), red onion은 yellow onion에 비해 약 2배 이상 높은 quercetin 함량을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다(Nuutila et al, 2003). Bilyk 등(1984)은 양파 종류에 따라 flavonol의 농도 변화가 커서 노란 양파와 붉은 양파의 경우 육질의 flavonol 농도는 60~1,000 mg/kg의 범위를 나타낸다고 하였고, 색을 가진 마른 껍질에 특히 flavonol 함량이 높아 2.5~6.5%로 많은 양이 함유되어 있으며 이들의 함량은 산지, 품종에 따라 상당한 차이가 있다고 보고하였다.

Nuutila 등(2003)은 red onion은 yellow onion에 비해, 양파는 마늘에 비해 높은 전자공여능 활성을 갖고 있으며, 특히 양파껍질에서 가장 높은 활성이 검출되어, 전자공여능 활성은 flavonoid 농도에 비례한다는 것을 확인하였다. 양파에 고농도로 함유되어 있는 quercetin은 혈청 콜레스테롤을 저하시켜 심혈관계질환 예방에 효과가 있는 것으로 보고되었다(Gässer et al., 2002). 또한 Yamamoto 등(2005)은 녹색의 Welch 종 양파가 ACE 활성을 저해시킴으로써 혈압의 상승을 억제한다고 보고하였으며, Dorsch 등(1991)은 양파의 천식 예방 효과, Hughes 등(1991)은 양파 황화합물에 의한 항균성을 보고하였다.

최근 들어 양파의 다양한 생리활성 효능 중 항암 효과에 대한 관심이 집중되고 있다. Flavonoid에 의한 항암작용은 전자공여능 활성 이외에 돌연변이 유발 외래물질의 해독작용(Uda et al., 1997; Birt et al., 2001), cyclin-dependent kinase(Casagrande et al., 2001)와 protein kinase(Davies et al., 2000)의 억제작용에 기인된다고 보고되고 있다. Hung(2007)은 동물실험을 통하여 quercetin이 폐암세포의 증식억제에 효과가 있다고 보고하였으며, Brusselman 등(2005)은 flavonoid 물질이 지방산합성 효소의 활성을 저해시켜 암세포의 세포자살을 유도한다고 보고하였다. 양파에 함유된 organosulfur 성분들에 의한 항암기작은 현재까지 거의 보고되고 있지 않지만, 양파와 비슷한 구조의 *Allium*속

식물인 마늘의 organosulfur 성분들에 대한 항암작용은 비교적 활발히 연구되었다. Xiao 등(2005)은 마늘에 함유된 organosulfur 화합물이 결장암 세포의 성장을 억제하고, 유사분열 정지 및 세포사멸을 유도함으로써 항암작용을 한다는 것을 확인하였다. Babu 등(1997)은 동결건조시킨 양파가루 3%를 쥐에게 급여하였을 경우 고혈당이 감소하였으며, 혈중 콜레스테롤 함량과 특히 혈중 인지질과 중성지질이 유의적으로 감소하였음을 보고하였다.

최근 여러 나라에서 case-control 실험을 통하여 *Allium*속 식물 섭취에 의한 항암효과를 검증하기 위한 연구가 진행되었다. Netherland와 Southern India에서 실시한 case-control 연구에서 양파 소비가 폐암 발생에 유의적 보호 효과를 나타냈으며(Dorant et al., 1994; Sankaranayanan, 1995), 최근 Northern Italy에서 수행된 case-control 연구는 양파의 섭취가 결장암, 후두암, 난소암의 발생을 감소시키는 것으로 확인되었다(Galeone et al., 2006).

제 7 장 참고문헌

- Alexander RW. 1995. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. *Hypertens.* 25: 155-161.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Azuma K, Minami Y, Ippoushi K, Terao J. 2007. Lowering effects of onion intake on oxidative stress biomarkers in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 40: 131-40.
- Babu PS, Stinivasan K. 1997. Influence of dietary capsaicin and onion on the metabolic abnormalities associated with streptozotocin induced diabetes mellitus. 1997. *Mol. Cell Biochem.* 175: 49-57.
- Babu PS, Srinivasan K. 1999. Renal lesions in streptozotocin-induced diabetic rats maintained on onion and capsaicin containing diets. *J. Nutr. Biochem.* 10: 477-483.
- Bakhsh R, Kgan S. 1991. Influence of onion (*Allium cepa*) and chaunga (*Caraluma tubercula*) on serum cholesterol, triglycerides, total lipids in human subject. *Sarhas J. Agri.* 6: 425-431.
- Benkebia N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm.-Wiss. Technol.* 37: 263-268.
- Bilyk A, Cooper PL, Sapers GM. 1984. Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa* L.) tissue. *J. Agric. Food Chem.* 32: 274-280.
- Birt DF, Hendrich S, Wang W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* 90: 157-77.
- Block E. 1986. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic. *J. Am. Soc.* 108: 1045-1049.
- Block E. 1992. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* - Implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1135-1178.
- Blocke E, Ahmad S, Catalfamo JL, Jain MK, Apitz R. 1986. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: structural, mechanistic, and synthetic studies. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 7045-7055.
- Block E, Putman D, Zhao SH. 1992. *Allium* chemistry: GC-MS analysis of thiosulfinates and related compounds from onion, leek, scallion, shallot, chive and Chinese chive. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2431-2438.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199.
- Boelens M, de Valois PJ, Wobben HJ, Van der Gen A. 1971. Volatile flavor compounds from onion. *J. Agric. Food Chem.* 19: 984-991.

- Bordia A, Verma SK. 1977. Effect of essential oil of onion and garlic on experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 26: 379.
- Brachet A, Christen P, Veuthey JL. 2002. Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem. Anal.* 13: 162-169.
- Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV. 2005. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J. Biol. Chem.* 280: 5636-5645.
- Buege JA, Aust SD. 1978. *Methods in enzymology* (Fleischer S & Packer L eds.) 52, Academic Press, New York. pp. 302-310.
- Casagrande F, Darbon JM. 2001. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1205-1215.
- Che Man YB, Suhardiyono, Asbi AB, Azudin MN, Wei LS. 1996. Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. *JAOCs* 73: 683-686.
- Chen JH, Chen H, Tsai SJ, Jen CJ. 2000. Chronic consumption of raw but not boiled welsh onion juice inhibits rat platelet function. *J. Nutr.* 130: 34-37.
- Cho HO, Kwon JH, Byun MW, Yang HS. 1983. Batch scale storage of sprouting foods by irradiation combined with natural low temperature - III. Storage of onions (3). *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 26: 82-89.
- Cho JH. 2006. Anti-microbial activities of onion outer skin extract for cosmetics. MS thesis, Chung-Ang University.
- Cho WD, Yoo KW. 1997. Preparation of onion hydrolysate for usage of sauce. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 1147-1151.
- Choi PS, Kwon JY, Han MR, Kim MH, Kim SH, Chang MJ. 2008. Effect of raw versus flavor, browning and caking reduced onion (*Allium cepa* L.) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J. Korean Soc. Dietary Cul.* 23: 55-61.
- Choi YJ, Park YS, Jang JK, Choi YJ, Park H, Chung MS. 2009. Selection of starter cultures and optimum conditions for the lactic acid fermentation of onion. *Food Sci. Biotechnol.* submitted.
- Chun SS, Park JR, Cho YS, Kim MY, Kim RY, Kim KO. 2000. Effect of onion powder addition on the quality of white bread. *Korean J. Food Nutr.* 14: 346-354.
- Chung DO, Park YK. 1999. The study of soft drinks production and functional food in onions. *Korean. J. Soc. Food Sci. Nutr.* 15: 158-162.
- Chung HD. 1982. Control of onion bulb rot during storage at low temperature by postharvest treatment of fungicides. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 23: 17-22.
- Crozier A, Lean MEJ, Morag S, McDonald MS, Black C. 1997. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J. Agric. Food Chem.* 45: 590-595.

- Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20: 1637-1648.
- Czuba J. 1988. Increase of *Acetobacter* biomass and acidification rate in submerged fermentation. *Acta Aliment. Pol.* 14: 183-192.
- Da-Mota VM, Palau E. 1999. Acoustic drying of onion. *Drying Technol.* 17: 855-867.
- Danforth WH. 1965. Glycogen synthase activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 240: 588-593.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351: 95-105.
- De Pascual-Teresa S, Johnston KL, DuPont MS, O'Leary KA, Needs PW, Morgan LM, Clifford MN, Bao Y, Williamson G. 2004. Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes *ex vivo* but not *in vivo*. *J. Nutr.* 134: 552-557.
- Didry N, Dubreuf L, Pinkas M. 1992. Antimicrobial activity of naphthoquinones and *Allium* extract combined with antibiotics. *Pharm. Acta. Helv.* 67: 148-151.
- Dorant E, Brandt PA, Goldbohm RA. 1994. A perspective cohort study on *Allium* vegetable consumption. *Netherlands cancer Res.* 54: 6148-6153.
- Dorsch W, Wagner H. 1991. New antiasthmatic drugs of plant origin. *Immunol.* 14: 55-62.
- El-Demerdash FM, Yousef MI, El-Naga NI. 2005. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* 43: 57-63.
- Farrell KT. 1985. Onions. In: *Spices, condiments, and seasonings*. AVI, New York, p. 159.
- Galeone C, Pelucchi C, Levi F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Giacosa A, La Vecchia C. 2006. Onion and garlic use and human cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 84: 1027-1032.
- Glässer G, Graefe EU, Struck F, Viet M, Gebhardt R. 2002. Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites. *Phytomedicine* 9: 33-40.
- Gray JJ, Dugan Jr. LR. 1975. Inhibition of *N*-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* 40: 981-984.
- Griffiths G, Trueman L, Growther T, Thomas B, Smith B. 2002. Onion - a global benefit to health. *Phytother. Res.* 16: 603-615.
- Guan X, Yao H. 2008. Optimization of viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chem.* 106: 345-351.
- Kwon YJ, Kwon JH, Kim HK. 1999. Oleoresin content and functional properties of fresh onion by microwave-assisted extraction. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28:

876-881.

- Gupta NN. 1966. Effect of onion on serum cholesterol, blood coagulation factors and fibrinolytic activity in alimentary lipaemia. *Ind. J. Med. Res.* 54: 48-54.
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *JAOCS* 58: 966-967.
- Hanum T, Sinha NK, Guyer DE, Cash JN. 1995. Pyruvate and flavor development in macerated onion (*Allium cepa* L.) by gamma-glutamyl transpeptidase and exogenous C-S lyase. *Food Chem.* 54: 183-188.
- Hara H, Haga S, Aoyama Y, Kirijima S. 1999. Short-chain fatty acid suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *J. Nutr.* 129: 942-948.
- Harenberg J, Giese C, Zimmerman R. 1988. Effect of dried garlic on blood coagulation, fibrinolysis, platelet aggregation and serum cholesterol levels in patients with hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 74: 247-249.
- Harold S. 1959. Defining minimum moisture contents for dehydrated foods. *J. Food Technol.* 13: 594-595.
- Hekmat D, Vortmeyer D. 1992. Measurement, control, and modeling of submerged acetic acid fermentation. *J. Ferm. Bioeng.* 73: 26-30.
- Herrmann K. 1976. Flavonols and flavones in food plants. *J. Food Technol.* 11: 433-448.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 1007-1011.
- Hertog MSL, Feskens EJM, Hollman PCH, Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 1007-1011.
- Hirota S, Shimoda T, Takahama U. 1998. Tissue and spatial distribution of flavonol and peroxidase in onion bulbs and stability of flavonol glucosides during boiling of the scales. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3497-3502.
- Hong JH, Lee GM, Hur SH. 1996. Production of vinegar using deteriorated deastringent persimmons during low temperature storage. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 25: 123-128.
- Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. 1998. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 63: 257-283.
- Hudson BJB, Lewis JJ. 1983. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids as synergists. *Food Chem.* 10: 111 - 120.
- Hughes BG, Lawson. 1991. Antimicrobial effects of *Allium sativum* L., *Allium ampeloprasum* L., and *Allium cepa* L. *Phytother. Res.* 5: 154-158.
- Huh K, Lee SI, Park JM. 1985. Effect of garlic on the hepatic xanthine oxidase activity in rats. *Korean Biochem. J.* 18: 209-214

- Hung H. 2007. Dietary quercetin inhibits proliferation of lung carcinoma cells. In: Nutrigenomics-opportunities in Asia. Tai ES, Gillies PJ (eds). Forum Nutr. Basel, Karger, 60: 146-157.
- Hur K, Lee SI, Park JM. 1985. Effect of garlic on the hepatic xanthine oxidase activity in rats. Kor. J. Biochem. 18: 209-215.
- Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochim. Biophys. Acta. 1147: 132-136.
- Ito T, Honda H, Shimizu K, Kobayashi T. 1991. Efficient acetic acid production by repeated fed-batch fermentation using two fermenters. Appl. Microbiol. Biotech. 36: 295-299.
- Jain RC, Vyas CR, Mahatma OP. 1973. Hypoglycemic action of onion and garlic. Lancet 29: 1491-1495.
- Jakubowski H. 2003. On the health benefit of *Allium* sp. Nutr. 19: 167-168.
- Jeong JA, Kwon SH, Kim YJ, Shin CS, Lee CH. 2007. Investigation of antioxidative and tyrosinase inhibitory activities of the Seed Extracts. Korean. J. Plant Res. 20: 177-184.
- Jeong YJ. 2000. Production of beverages and fruits vinegar using Kyungpook special products (persimmon, apple and grape). Food Ind. Nutr. 5: 53-59.
- Kaizu H, Sasaki M, Nakajima H, Suzuli Y. 1993. Effect of antioxidative lactic and bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. J. Dairy Sci. 76: 2493-7499.
- Kang SK, Jang MJ, Kim YD. 2006. Isolation and culture condition of *Acetobacter* sp. for the production of citron (*Citrus junos*) vinegar. Korean J. Food Preserv. 13: 357-362.
- Kang SK, Kim YD, Hyun KH, Kim YW, Song BH, Shin SC, Park YK. 1998a. Development of separating techniques on quercetin-related substances in onion (*Allium cepa* L.)-1. Contents and stability of quercetic-related substances in onion. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 682-686.
- Kang SK, Kim YD, Hyun KH, Kim YW, Sung BH, Shin SC, Park YK. 1998b. Development of separating techniques on quercetin-related substances in onion (in Korean) contents and stability of quercetin-related substances in onion. 2. optimal extracting condition of quercetin-related substances in onion. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 687-692.
- Kee HJ, Park YK. 2000. Preparation and quality properties of extruded snack using onion pomace and onion. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 578-583.
- Kee HJ, Ryu GH, Park YK. 2001. Physical properties of extruded snack made of dried onion and onion pomace. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 64-69.
- Kee JJ, YK Park. 1999. Effect of seaweeds and adsorbents on volatile flavor compounds of onion juice. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1477-1483.
- KFDA. 2008. Food Code. Korea Food and Drug Administration.

- Kiesewetter H, Hung F, Jung EM, Wenzel E. 1993. Effect of garlic on platelet aggregation in patients with increased risk of juvenile ischaemic attack. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 45: 333-336.
- Kim DH. 1999. Studies on the production of vinegar from fig. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 53-60.
- Kim HK, Kim BY. 1990. Effect of mild heat treatments prior to air dehydration of dried onions quality. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22: 539-542.
- Kim HK, Lee HC, Park MH, Shin DH. 1986a. Effects of fumigation treatment on the physiological changes of onion bulbs. *Korean J. Food Sci. Technol.* 18: 6-10.
- Kim HK, Lee HC, Park MH, Shin DH. 1986b. Microflora of decayed onion bulbs and their suppression by fumigation treatment. *Korean J. Food Sci. Technol.* 18: 1-5.
- Kim MY, Chun SS. 2001. Effects on onions on the quality characteristics of strawberry jam. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 17: 316-322.
- Kim SJ, Kim GH. 2006. Quantification of quercetin in different parts of onion and its DPPH radical scavenging and antibacterial activity. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 39-43.
- Kim YD, Kang SH, Kang SK. 1996. Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 695-700.
- Kumari K, Augusti KT. 2007. Lipid lowering effect of S-methyl cysteine sulfoxide from *Allium cepa* L. in high cholesterol diet fed rats. *J. Ethnopharmacol.* 109: 367-371.
- Kurozawa LE, Park KJ, Hubinger MD. 2008. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. *Journal of food science.* 73: 405-412.
- Kwak HJ, Kwon YJ, Jeong PH, Kwon JH, Kim HK. 2000. Physiological activity and antioxidative effect of methanol extract from onion (*Allium cepa* L.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 349-355.
- Lang SK, Lim YD, Hyun KH, Kim YW, Song BH, Shin SC, Park YK. 1998. Development of separating techniques on quercetin-related substances in onion. *J. Korean Food Sci. Nutr.* 27: 682-686.
- Lanzotti V. 2006. The analysis of onion and garlic. *J. Chromatogr.* 1112: 3-22.
- Lawson LD, Ransom K, Hughes BG. 1992. Inhibition of whole blood platelet aggregation by compounds in garlic extract and commercial products. *Throm. Res.* 65: 141-156.
- Lee BY, Yuk JS. 1999. Change of physicochemical characteristics of persimmon vinegar by vacuum concentration. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 31: 1132-1136.
- Lee CJ, Kim HD, Choung EH, Suh JK, Park CW, Ha YL. 2000. Reduction effect of carcinogen-induced mouse epidermal and forestomach carcinogenesis by the extract of onion wastes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 525-530
- Lee DS, Ryu IH, Lee GS, Shin YS, Chun SH. 1999. Optimization in the preparation of

- Aloe vinegar by *Acetobacter* sp. and inhibitory effect against lipase activity. J. Korean Soc. Agric. Chem Biotechnol. 42: 105-110.
- Lee HC, Kim HK, Park MH, Shin DH. 1984. Confirmation of saprophytes of onions in Korea and effects of temperature, humidity and fumigation on Boxyrtis-rot. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 12: 299-304.
- Lee JY, Kang HA, Chang KS, Kim SS. 1995. Drying of onion and ginger using drying system controlled by microcomputer. Agric. Chem. Biotechnol. 38: 78-82.
- Lee MK, Chung YH, Nam HK. 1999. Studies on the heavy metals elimination and antioxidation of the onion ethanolic extract. J. Korean Oil Chem. Soc. 16: 143-146.
- Lee WS. 1984. Studies on improvement of storability of onion bulbs. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 25: 227-232.
- Lee YC, Lee GY, Kim HC, Park KB, Yoo YJ, Ahn PU, Son SH. 1992. Production of high acetic acid vinegar using two stage fermentation. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 663-667.
- Lee YC, Park MS, Kim HC, Park KB, Yoo YJ, Ahn IK, Son SH. 1993. Production of high acetic acid vinegar by single stage fed-batch culture. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 511-512.
- Lee YK, Lee HS. 1990. Effects of onion and ginger on the lipid peroxidation and fatty acid composition of mackerel during frozen storage. J. Korean Food Sci. Nutr. 19: 321-329.
- Lee YK, Park YK. 1996. Identificatin of isorhamnetic- 4'-glucoside in onions. J. Agric. Food. Chem. 44: 34-36.
- Leighton T, Ginther C, Fluss L, Harter WK, Cansado J, Notario V. 1992. Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in *Allium* vegetables: Their effects on malignant cell transformation. In: Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II Antioxidants and Cancer Prevention, Huang MT, Ho CT, Lee CY (Eds). ACS Symposium Series. 507: 220-238.
- Leighton T, Ginther C, Fluss L, Harter WK, Park JY, Lee CY. 1996. Identification of isorhamnetin 4'-glucoside in onions. J. Agric. Food Chem. 44: 34-36.
- Lewick PP, Pomaranska-Lazuka W, wittrowa-Rajchert D, Nowak D. 1998a. Storage stability of dried onion. J. Food Quality 21: 505-516.
- Lewicki PP, Witrowa-Rajchert D, Nowak D. 1998b. Effect of pretreatment on kinetics of convection drying of onion. Drying Technol. 16: 83-100.
- Lim SJ, Choi SS, Han HK. 2005. Biological functions in *Allium sativum* and *Allium victorialis*. Ann. Plant Resour. Res. 4: 113-137.
- Lombard KA, Peffley E, Geoffriau E, Thonpson L. 2005. Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. J. Food Compos. Anal. 18: 571-581.

- Ma SJ. 2000. Inhibitory effect of onion seasoning on angiotensin converting enzyme. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 395-400.
- Mason TJ, Paniwnyk L, Lorimer JP. 1996. The uses of ultrasound in food technology. Ultrasonics Sonochem. 3: 253-260.
- Menon IS, Kendal RY. 1968. Effect of onion on blood fibrinolytic activity. Brit. Med. J. 21: 351-360.
- Miean KH, Mohamed S. 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. J. Agric. Food. Chem. 49: 3106-3112.
- Monjazeba AM, High KP, Koumenisa C, Chilton FH. 2005. Inhibitors of arachidonic acid metabolism act synergistically to signal apoptosis in neoplastic cells. Prostag. Leukotr. Essen. Fatty Acids 73: 463 - 474.
- Moon SY, Chung HC, Yoon HN. 1997. Comparative analysis of commercial vinegars in physicochemical properties, Minor components and organoleptic tastes. Korean J. Food. Sci. Technol. 29: 663-670.
- Moreno MIN, Isla MIN, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of Argentina. J. Entropharmacol. 71: 109-114.
- Morimitsu Y, Kawakishi S. 1990. Inhibitors of platelet aggregation from onion. Phytochem. 29: 3435-3440.
- Nanba A, Tamura A, Nagai S. 1984. Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. J. Ferment. Technol. 62: 501-505.
- Nuutila AM, Puupponen-Pimiä R, Aarni M, Oksman-caldentey KM. 2003. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. Food Chem. 81: 485-493.
- Oh YJ. 1992. A study on cultural conditions for acetic acid production employing pear juice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 1062-1067
- Ossterhuis NMG, Groesbeek NM, Kossen NWF, Schenk ES. 1985. Influence of dissolved oxygen concentration on the oxygen kinetics of *Gluconobacter oxidans*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 42-49.
- Park AS. 1999. Preparation and functional properties of onion juice. M.S. Thesis, Mokpo National University, Korea.
- Park CS, Kwon CJ, Choi MA, Park KS, Choi KH. 2002. Antioxidative and nitrite scavenging activities of mugwort and pine needle extracts. Korean J. Food Preserv. 9: 248-252.
- Park MH, Lee JO, Lee JY, Yu SJ, Ko YJ, Kim HH, Ryu CH. 2005. Isolation and characteristics of acetic acid bacteria for persimmon vinegar fermentation. J. Korean Soc. Food Nutr. 34: 1251-1257.
- Park NP, Choi EH, Byun KE. 1972. Studies on the storage on onions by radiation (1).

- Korean J. Food Sci. Technol. 4: 84-89.
- Park NP, Choi EH, Kim SK, Kim YJ. 1974. Studies on the storage on onions by radiation (2). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 15: 163-167.
- Park PS, Lee BR, Lee MY. 1991. Effect of onion diet on carbon tetrachloride toxicity of rats. J. Korean Soc. Food Nutr. 20: 121-125.
- Park PS, Lee BR, Lee MY. 1994. Effect of onion juice on ethanol induced hepatic lipid peroxidation in rats. J. Korean Soc. Food Nutr. 23: 750-755
- Park PS, Lee MY. 1992. The effect of onion and garlic on cooper-phenanthroline complex induced DNA degradation. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 367-371
- Park YK, Jung ST, Kang SG, Park IB, Cheun KS, Kang SK. 1999. Production of a vinegar from onion. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2: 75-79.
- Park YS, Chang HG. 2003. Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. J. Agric. Food Chem. 46: 367-375.
- Park YS, Ohtake S, Toda K, Fukaya M, Okumura H, Kawamura Y. 1989. Acetic acid production using a fermenter equipped with a hollow fibre filter module. Biotech. Bioeng. 33: 918-923.
- Park YS, Toda K, Fukaya M, Okumura H, Kawamura Y. 1991. Production of a high concentration acetic acid by *Acetobacter aceti* using a repeted fed-batch culture with cell recycling. Appl. Microbiol. Biotech. 35: 149-153.
- Patil BS, Pike LM, Yoo KS. 1995. Variation in the quercetin content in different colored onions (*Allium cepa* L.). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 909 - 913.
- Perry RH. 2007. Perry's Chemical Engineers' Handbook 8th ed. Process control 8: 1-96, Heat-transfer Equipment 11: 1-76.
- Pratt DE. 1964. Lipid antioxidants in plant tissue. J. Food Sci. 30: 737-742.
- Pratt DE, Watts BM. 1964. The antioxidant activity of vegetable extracts. I. Flavone aglycones. J. Food Sci. 29: 27-33.
- Price KR, Rhodes MJC. 1997. Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. J. Sci. Food Agric. 74: 331-339.
- Qureshi AA, Din ZZ, Elson CE, Burger WC. 1983. Inhibition of cholesterol and fatty acid biosynthesis in liver enzymes and chicken hepatocyte by polar fraction of garlic. Lipids 18: 343-348.
- Ra KS, Bae SH, Son HS, Chung SH, Suh HJ. 1998. Inhibition of xanthine oxidase by flavonols from onion skin. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 693-697.
- Rapusas RS, Driscoll RH. 1995. The thin layer characteristics of white onion slices. Drying Technol. 13: 1905-1931.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorizing assay.

- Free Radic. Biol. Med. 26: 1231-1237.
- Rho SR, Han JH. 2000. Cytotoxicity of garlic and onion methanol extract on human lung cancer cell lines. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 870-874.
- Sankaranarayanan R, Varghese C, Duffy SW, Padmakumary G, Day NE. 1995. A case-control study of diet and lung cancer in Keraka, South India. Int. J. Cancer. 75: 1766-1777.
- Schalin-Jantti C, Harkonen M, Groop LC. 1992. Impaired activation of glycogen synthase in people at increased risk for developing NIDDM. Diabetes 41: 598-604.
- Seo JH, Kim YJ, Lee KS. 2003. Comparison of physicochemical characteristics of fruit vinegars produced from two-stage fermentation. Food Ind. Nutr. 8: 40-44.
- Sheo HJ. 1999. The antibacterial action of garlic, onion, ginger and red pepper juice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 94-99.
- Sheo HJ, Jung DL. 1997. The effects of onion juice on serum lipid levels in rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26: 1164-1172.
- Sheo HJ, Lim HJ, Jung DL. 1997. Effects of onion juice on toxicity of lead in rat. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 22: 138-143.
- Shin JS, Lee OS, Jeong YJ. 2002. Changes in the components of onion vinegars by two stages fermentation. Korean J. Food. Sci. Technol. 34: 1079-1084.
- Sim KC, Lee KS, Kim DH, Ryu IH, Lee JS. 2001. Studies on the acid tolerance of *Acetobacter* sp. isolated from persimmon vinegar. Korean J. Food. Sci. Technol. 33: 574-581.
- Son JY, Son HS, Cho WD. 1996. Effects of some antibrowning agent on onion juice concentrate. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25: 529-534.
- Son SS, Ji WD, Chung HC. 2003. Optimum condition for acetic acid fermentation using mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) fruits. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 544-548.
- Swasdisevi T, Soponronnarit S. 1999. Drying of chopped spring onion using fluidization technique. Drying Technol. 17: 1191-1199.
- Turner C, Turner P, Jacobson G, Almgren K, Waldebäck M, Sjöberg P, Karlsson EN, Markides KE. 2006. Subcritical water extraction and β -glucosidase-catalyzed hydrolysis of quercetin glycosides in onion waste. Green Chem. 8: 949-959.
- Uda Y, Price KR, Williamson G, Rhodes MJ. 1997. Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids. Cancer Lett. 210: 213-216.
- Woo HS, Aan BJ, Bae JH, Kim S, Choi HJ, Han HS, Choi C. 2003. Effect of biologically active fractions from onion on physiological activity and lipid metabolism. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 119-123.
- Woo KS, Lee SH, Noh JW, Hwang IG, Lee YR, Park HJ, Lee J, Kang TS, Jeong HS.

2009. Optimization of extraction conditions for dried jujube by response surface methodology. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 244-251.
- Xiao D, Pinto JT, Gundersen GG, Weinstein IB. 2005. Effects of a series of organosulfur compounds on mitotic arrest and induction of apoptosis in colon cancer cells. Mol. Cancer Ther. 4: 1388-1398.
- Yamamoto Y, Aoyama S, Hamaguchi N, Rhi GS. 2005. Antioxidative and antihypertensive effects of Welsh onion on rats fed with a high-fat high -sucrose diet. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 1311-1317.
- Yang CS, Wang ZY. 1993. Tea abd cancer. J. Natl Cancer Inst. 85: 1038-1146.
- Yang HC, Choi DS. 1979. Physiological characteristics of acetic acid bacteria isolated from clover flower vinegar. J. Kor. Agric. Chem. Soc. 22:150-159.
- Yang SA, Im NK, Lee IS. 2007. Effect of methanolic extract from *Salvia miltiorrhiza* bunge on *in vitro* antithrombotic and antioxidative activities. Korean J. Food. Sci. Technol. 39: 83-87.
- Yi Y, Zhang F. 2007. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (thunb.) Sieb. Ultrasonics Sonochem. 15: 308-313.
- Yoon WH, Choi JH, Lee KH, Kim CH. 2005. Antimicrobial and antitumor activities of speed extracts of *Camellia sinensis* L. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 108-112.
- 김응채. 1999. 작물생산동향분석. 농림부 국립농산물품질관리원. 서울. pp. 57-71.
- 박평심, 이명렬. 1992. Cooper-phenanthroline 복합체에 의해 유도되는 DNA 손상에 대한 양파와 마늘의 억제효과. 한국영양식량학회지 21: 367-371.
- 박평심, 이병래, 이명렬. 1991. 양파식이가 흰쥐에서 사염화탄소 독성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 20: 121-127.
- 박평심, 이병래, 이명렬. 1994. 양파즙이 에탄올에 의한 백서의 지질과 산화물 생성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 23: 750-755.
- 이선화, 우순자, 구영조, 신현경. 1995. 썩, 양파 및 원지가 흰쥐의 장내환경에 미치는 영향. 한국식품과학회지 27: 598-602.
- 임종삼. 1993. 양파와 건강. 국제문화출판공사.
- 허근, 이상일, 박종민. 1985. 흰쥐에 hepatic xanthine oxidase activity에 대한 garlic의 효과. 한국생화학회지 18: 209-215.