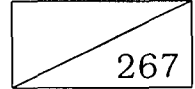


663.6  
L2937

GOVP 19916935

295200-3

최 종  
연구보고서



# 과채주스 및 발효음료의 제조와 저장성에 관한 연구

Studies on the preparation and preservation of  
fermented fruit and vegetable juices

연구기관

서울여자대학교

농 립 부



## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “과채쥬스 및 발효음료의 제조와 저장성에 관한 연구” 과제  
의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 3. 20

주관연구기관명 : 서울여자대학교

총괄연구책임자 : 정 동 선

세부연구책임자 : 최 언 호

연 구 원 : 윤 영 빈

          "      : 김 수 연

          "      : 홍 수 진

          "      : 임 경 화

          "      : 이 영 경

# 요 약 문

## I. 제 목

과채주스 및 발효음료의 제조와 저장성에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구과제의 목적은 새로운 혼합과채주스 및 발효과채음료를 개발하고자 하는 것으로서, 각종 영양성분이 풍부하고 여러 질병에 효능이 많다고 알려진 채소와 과일을 선택하여 혼합과채주스를 제조하고, 야채의 강한 맛과 향에 의한 기호 특성의 저하, 저장 중 갈변 및 영양소의 파괴, 침전물의 형성 등의 문제점을 해결하기 위한 방안으로 혼합과채주스를 젖산발효시켜 발효음료를 만들어 실용화하는데 있다. 또한 박테리옌 생성균주를 활용하여, 맛과 영양이 강화되고 유해균에 대한 항균효과와 저장성을 지닌 과채발효음료를 개발함으로써 값싸고 풍부한 우리 농산물의 가공에 따른 농가소득의 증대와 식품산업의 기반기술을 구축하는데 있다.

채소나 과일의 즙액은 다량의 유효성분을 많이 섭취하고 몸에 신속하게 소화, 흡수될 수 있는 잇점을 가지고 있으며 몇가지의 채소와 과일즙을 혼합하여 섭취할 경우 훨씬 효과가 큰 것으로 보고되고 있다. 최근 건강식품으로 신선초, 케일 등이 소비자들로부터 많은 호응을 받고 있으나 이들 녹즙은 저장기간이 매우 짧아 대량 유통이 어려운 실정이다. 지금까지는 저장기간 연장을 위하여 열처리를 이용하였

는데 과채 주스의 열처리는 영양성분과 기호성분을 변화시키고, 부유물을 생성시키므로 열처리 이외의 새로운 가공 방법이 필요하다.

녹색채소는 chlorophyll의 파괴와 변색을 방지하기 위하여 알칼리 제재나 소금물을 이용하는 방법, chlorophyll을 효소분해하여 chlorophyllide로 전환시키는 방법, 구리나 아연과 같은 금속의 첨가에 의한 “regreening” 방법 등이 사용되어 왔지만 오랜 기간동안 녹색을 유지하는데는 모두 성공하지 못하였다. 또한 주스의 품질을 결정하는 주요인자 중의 하나는 탁도로 혼탁주스의 경우 저장기간 중 주스를 고체층과 액체층으로 분리시키는 cloud loss는 바람직하지 못하며 기호의 변화를 일으킬 수 있다. 따라서 과채주스의 갈변방지를 위한 연구와 주스의 탁도 안정성에 미치는 영향을 조사하고 cloud loss를 방지하기 위한 연구가 필요하다.

젖산발효는 발효과정에서 생성되는 산미와 독특한 향, 정장작용, 부패 및 병원성 미생물의 발육 억제 등의 잇점 때문에 음료개발에 많이 이용되어 왔다. 과채류의 젖산발효는 담금재료, 원료의 전처리, 소금 및 염 농도, 발효온도, 당의 종류 및 농도, pH 완충제의 사용, 보존료의 사용, starter의 사용, 포장방법, 저해제 첨가, 저장 온도 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 발효 음료의 품질 특성에 중요한 영향을 미치는 인자들을 연구, 조사하는 것이 필요하다. 젖산 발효시 일어나는 과도한 젖산의 생성과 발효 말기의 산막효모, 호기성 미생물의 성장은 젖산발효식품의 관능을 저하시킨다. 이와같은 문제점을 해결하여 저장성을 향상시키기 위해서는 무균처리나 보존료 및 첨가물의 사용 등이 필요하다. 따라서 내산성이 우수한 젖산균을 starter로 첨가하여 저장 중 사멸되는 것을 억제하거나 젖산균이 이용하지 못하는 올리고당을 첨가하여 발효하거나 무균처리를 함으로 저장 중 발효주스의 품질이 변화되는 것을 방지하는 등의 연구가 중요하다고 본다.

각종 식품 및 음료의 저장과 발효에 널리 이용되는 젖산균은 다양한

Bacteriocin을 생성하는 것으로 알려져 있다. 천연 식품신소재로 부각되고 있는 박테리오신 중에서 특히 nisin은 미국을 비롯한 유럽 각국에서 낙농제품과 통조림 제품에 널리 활용되고 있으며, 우리 나라의 전통식품과 침채류의 가공 및 저장에 응용할 수 있을 것으로 판단되므로 bacteriocin 또는 박테리오신 생성균주의 활용을 위한 기초자료를 축적할 필요가 있다.

비타민과 각종 무기질, 섬유소 등이 풍부한 과채류를 bacteriocin 생성균주를 이용하여 발효시킨다면 맛과 영양이 강화되고 유해균에 대한 항균효과와 저장성을 지닌 건강지향적 발효음료가 될 수 있을 것이다. 따라서 본 연구의 결과는 외국의 스포츠음료와 탄산음료에 길들여지고 있는 우리 나라의 청소년층과 전통적인 맛을 원하는 성인층 모두에게 우리 입맛에 맞는 음료로 개발되어 보급된다면 수입음료의 대체효과와 농가소득 증대에 기여할 수 있을 뿐만 아니라 국내 식품산업에 박테리오신 활용을 위한 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 과채쥬스의 제조 및 젖산발효

##### 가. 혼합과채쥬스의 제조 및 저장 중의 품질 특성에 관한 연구

- (1) 재료선정 및 원료의 착즙·배합
- (2) 관능검사에 의한 배합비 결정
- (3) 혼합과채쥬스의 무균처리 및 저장방법 : 96℃에서 15초간 열처리하거나 한외여과 처리하여 5℃와 25℃에서 8주간 저장
- (4) 성분 분석 : pH, 적정산도, 유기산, 유리당, 비타민 C, 순고형분, 가용성 고형분, 색도 등

- (5) 효소활성과 미생물 검사 : peroxidase, polyphenol oxidase 활성조사, 총미생물 검사

나. Chlorophyll 함량과 색도의 변화 및 탁도 안정성

(1) Chlorophyll 함량과 색도의 변화

(가) Chlorophyll 분석 조건 설정 : SPD-M10A를 이용하여 chlorophyll과 그 유도체의 최대흡수파장을 조사, 분석

(나) 원심력과 처리방법에 따른 chlorophyll 함량과 색도의 변화 : 샐러리와 돌미나리의 착즙혼합하여 무처리, 데치기(100℃, 30sec), 데치기 후 열처리(96℃, 15sec)하여 500, 1,000, 5,000, 10,000xg에서 15분간 원심분리하고 상등액을 취하여 chlorophyll의 함량과 색도의 변화를 조사

(다) 재료배합에 따른 pH, chlorophyll 함량, 색도의 변화 : 과채주스에 사용한 재료를 착즙하여 재료배합에 따른 pH 변화를 측정하고 저장 중 chlorophyll 함량, 색도의 변화를 조사

(2) 갈변방지제 첨가에 의한 색도의 변화

(3) 저장 중 혼합과채주스의 탁도 안정성

(가) 모델시스템에서의 haze 생성 : 0.02M phosphate buffer(pH 4.8)에 단백질원으로서 gelatin, proline, polyproline을, 폴리페놀원으로서 catechin, tannic acid, chlorogenic acid를 농도별로 단독 첨가하거나 조합하여 첨가한 후 5, 25, 95℃에서 30분간 방치한 후 haze 생성정도를 측정

(나) 혼합과채주스의 haze 생성 : 혼합과채주스를 무처리구, 원심분리구(10,000xg), 한외여과구로 구분하여 제조하고 단백질과 폴리페놀을 농도별로 첨가한 후 5, 25, 95℃에서 30분간 방치하면서 haze 생성정도

측정

- (다) 원심력에 따른 탁도 안정성 : 혼합과채주스를 무처리구와 열처리 구로 제조하여 각각 2,500, 5,000, 10,000, 15,000xg에서 원심분리 하여 5℃ 와 25℃에서 60일간 저장하면서 탁도 안정성 측정
- (4) 혼합과채주스의 페놀성분 : 총 페놀물질 정량, TLC 분석
- (5) 혼합과채주스의 아미노산 분석

다. 혼합과채주스의 젖산발효 및 저장 중 품질 특성

- (1) 동치미로부터 젖산균의 분리·동정 : 발효 초기(5일), 중기 (30일), 말기(50 일)의 동치미액에서 젖산균을 분리 후 동정
- (2) 우수 젖산균의 선발 : 각 젖산균을 혼합과채주스에 접종 후 발효하여 pH, 적정산도, 총젖산균수, coliform bacteria, 향미 등을 조사하고 발효능, 산생성능, 향미생물 효과, 향기생성 등이 우수한 젖산균을 선발
- (3) 선발 젖산균의 발효조건 설정
  - (가) 선발균주의 혼합비율과 접종량이 과채발효에 미치는 영향
    - (나) 당과 식염이 과채주스의 발효에 미치는 영향 : 젖산균의 발효능 및 발효과채주스의 품질, 기호도에 가장 좋은 영향을 미치는 당의 종류, 농도, 첨가시기, 염의 농도 등을 결정
    - (다) 발효 온도가 과채주스의 젖산발효 및 품질특성에 미치는 영향 : 5, 15, 25, 35℃에서 발효하여 발효과채주스의 품질에 가장 좋은 영향을 미치는 온도 설정
    - (라) 전처리가 과채주스의 혼합발효 및 품질특성에 미치는 영향 : 발효 전 혼합과채주스를 원심분리, 가열살균, 한외여과하여 발효함으로 전처리가 혼합과채주스의 발효에 미치는 영향을 비교, 분석 후 가장 적절한 전처리를 결정



- (4) 물리적 제균처리를 달리한 과채발효주스의 저장 중 품질 특성 : 위에서 선정된 최적조건에서 혼합과채주스를 발효 후 물리적인 제균 처리 (한외여과, 열처리)를 달리하여 온도(5, 15℃)에 따른 저장 중의 품질 특성(유리당, 유기산, 향기성분, 가용성 고형분, pH, 적정 산도, 점도, 비타민 C, 미생물 분석 등)을 조사함으로써 저장성이나 영양적 가치면에서 우수한 발효과채주스의 저장조건 확립

## 2. 박테리오신 또는 박테리오신 생성균주를 이용한 발효과채음료의 제조

### 가. 원료 과채류의 미생물 조성과 자연발효 특성

- (1) 재료의 선정 및 혼합비율 결정
- (2) 과채류 혼합액의 미생물 조성과 자연발효 특성 : 과채류에 존재하는 젖산균, 대장균군, 효모 등을 계수하고, 야생균주에 의한 자연발효 가능성을 조사함.
- (3) 과채류에 존재하는 젖산균의 분리, 동정
- (4) 과채류에 존재하는 젖산균의 발효 특성 : 원료 과채류에서 분리, 동정된 젖산균을 과채혼합액에 접종하여 생육정도와 산생성능, 유기산 생성능 등의 발효특성을 조사함.

### 나. 종균 첨가에 의한 과채발효음료의 제조

- (1) 젖산균에 의한 과채류의 발효
  - (가) 최적 종균으로서의 젖산균 선발
  - (나) 과채류 발효의 최적 조건 설정 : 종균 첨가시기와 첨가량, 최적 발효온도

(2) 박테리옌 생성균주에 의한 발효능과 항균효과 조사

(가) 박테리옌 생성균주의 발효능 조사 : 박테리옌 생성균주인 *Lc. lactis* 11454를 과채혼합액에 접종하여 젖산균수의 변화, pH, 총산 등을 측정하여 발효능을 검색함.

(나) 박테리옌 생성능 : 박테리옌의 역가는 *Ped. pentosaceus* FBB-61-2를 Indicator organism으로 사용하여 Agar well diffusion method로 확인함.

(다) 박테리옌 함유 발효음료의 항균효과 조사 :

*Listeria monocytogenes* Scott A, *Staph. aureus*, *Streptococcus mutans* 등의 유해균에 대한 박테리옌 생성균주로 발효시킨 음료의 생육저해 효과를 조사함.

(라) 발효음료내에서 박테리옌의 항균역가의 안정성 조사 :

발효음료를 냉장 온도에 저장하며 박테리옌의 역가를 일정기간별로 측정하여 박테리옌의 Stability를 측정함.

(3) 과채발효음료 제조를 위한 효모의 분리, 동정 및 발효 특성

(가) 효모의 분리 및 동정 : 원료 과채류에 분포하는 효모를 분리한 후, 알콜 발효능은 없거나 미약하지만 방향성을 부여하는 특성을 지닌 효모를 선정함.

(나) 효모의 첨가조건 확립 : 효모의 접종시기, 접종 농도, 숙성온도 등의 조건을 설정함.

(다) 젖산균과 효모를 이용한 과채류의 발효특성 : 젖산균과의 혼합 발효시 동시에 접종하거나 젖산발효 후 접종했을 때의 미생물의 생육정도, 산생 성능, 풍미 등을 측정하여 발효특성을 비교함.

다. 박테리오신 생성균주와 효모를 이용한 과채발효음료의 성분분석 및 관능특성

발효음료의 중요 성분인 유기산의 종류와 함량, 유리당 함량,  
비타민 C, 무기질 함량, 휘발성 방향 성분 등을 비교 분석하고,  
음료의 색도 변화와 관능특성을 조사함.

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 과채주스의 제조 및 젖산발효

##### 가. 혼합과채주스의 제조 및 저장 중 품질특성

여러 질병의 예방과 치료에 효능이 많다고 알려진 채소와 과일을 선택하여 주스제품의 맛, 색, 향 및 전체적인 기호도에 대한 관능검사를 실시하고 순위합에 의해서 통계처리한 결과 사과, 당근, 셀러리, 돌미나리, 대추, 구기자가 최종 선정되었고 배합비는 3 : 3 : 1 : 1/2 : 1 : 1/2이 가장 적합한 것으로 결정되었다.

상기 혼합과채주스를 5℃와 25℃에서 8주 저장중 품질변화를 조사한 결과 무처리구에서 pH 저하, 환원당의 감소, lactic acid의 증가, L-ascorbic acid의 감소, 효소활성에 의한 색도 등의 변화가 더 심한 것으로 나타났고 열처리와 한외여과 처리는 대체적으로 성분에 큰 변화를 보이지 않았으며 이는 한외여과구에서 더 안정하여 한외여과 주스의 실용화가 가치있다고 판정되었다.

## 나. 혼합과채주스의 저장 중 색도와 탁도의 변화

주스에 존재하는 여러 색소 성분 중에서 가열과 낮은 pH에서 불안정한 chlorophyll의 분해와 이에 따른 색도의 변화를 원심분리와 관련하여 조사한 결과 녹색채소(샐러리, 돌미나리)를 원료로 한 경우 원심력이 증가함에 따라 chlorophyll a, b의 함량과 Hunter -a 값이 급격히 감소하였으며 특히 열처리를 하지 않은 무처리구에서 현저한 것으로 나타났다. 녹색채소의 착즙 혼합액에 사과, 당근, 대추-구기자를 각각 첨가한 후 5℃와 25℃에서 저장실험을 한 결과 25℃에서 당근첨가에 의한 chlorophyll 파괴가 가장 큰 것으로 나타났다. 따라서 chlorophyll의 불안정성에 의한 색도의 변화를 고려하여 볼 때 원심력과 재료의 배합조성을 달리하여 저장 중의 갈변화를 감소시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

모델 시스템에 단백질과 polyphenol을 첨가하여 haze 유발 실험을 수행한 결과 단백질과 polyphenol을 함께 첨가할 때 haze 생성에 대한 상승효과를 보이며 이는 아미노산인 proline이 peptide 형태로 존재할 때 현저하고 polyphenol 화합물로 tannin과 chlorogenic acid 첨가시 haze가 많이 생성되는 것으로 구명되었다. 이를 혼합과채주스에 적용하여 단백질과 polyphenol을 첨가하였을 때 무처리구에서의 haze 증가량이 가장 많았으며 한외여과구에서는 소량 증가하는 것으로 나타났다. 사과, 당근, 대추, 구기자, 샐러리, 돌미나리 등의 착즙혼합액을 열처리와 한외여과하여 저장 중 아미노산과 페놀 화합물 조성을 조사한 결과 아미노산은 전체 처리구에서 aspartate, asparagine, glutamate, glutamine, proline 등이 다량 함유되어 있는 것으로 나타났다. 페놀 화합물로는 chlorogenic acid, epicatechin, (+)catechin 등 13종이 비교, 분석되었으며 이들 단백질과 페놀 화합물은 무처리구에서 가장 많이 함유되어 있는 것

으로 나타나 이들이 haze 생성에 영향을 주는 것으로 판단되었다. 원심분리와 한외여과처리를 한 실험구에서는 무처리구에 비하여 단백질과 페놀 화합물의 양이 훨씬 적었으며 haze 증가량도 적은 것으로 나타나 원심분리 처리를 할 경우 cloud stability를 상당기간 지속시킬 수 있으리라 판단되었다.

혼합과채주스에 존재하는 여러 색소 성분 중에서 chlorophyll의 분해는 주스의 낮은 pH가 주 원인이고 이의 제거는 원심분리가 효과적이었다. 따라서 chlorophyll의 불안정성에 의한 색도의 변화를 고려하여 볼 때 원심분리처리는 유통중 야기될 수 있는 주스의 갈변화를 방지할 수 있는 한 방법이 될 수 있다. 또한 혼탁과채주스의 아미노산과 폴리페놀 성분을 분석한 결과 proline의 조성이 높은 것으로 나타났으며 polyphenol 화합물로서 tannic acid와 chlorogenic acid도 포함되어 있어 이들의 상호결합에 의하여 haze와 침전 생성이 야기된 것으로 규명되었다. 이러한 haze 생성은 원심분리와 한외여과처리에 의한 이들 아미노산과 페놀 화합물의 제거로 감소시킬 수 있었으며 원심분리에 의한 cloud stability도 상당기간 지속되는 것으로 나타나 혼탁과채주스의 저장수명을 연장시킬 수 있을 것으로 판단된다. 결론적으로 혼합과채주스의 원료배합의 조정과 원심분리 및 한외여과처리에 의하여 기호특성 및 저장성이 좋은 비열처리 혼합과채주스의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

#### 다. 혼합과채주스의 젖산 발효 및 저장 중 품질 특성

재래식으로 담금, 발효한 동치미액에서 15개 group의 젖산균을 분리, 동정 후 각 group의 젖산균을 혼합과채주스에 접종한 후 25℃에서 9일간 발효시켜 생육능, 산생성능, 향기 등을 조사하여 과채주스 발효용으로 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* M5-17, *Lc. lactis* subsp. *lactis* M30-11, *Lb. cellobiosus* Y30-1이

선발되었다.

선발된 3개의 균주를 혼합과채쥬스에 접종하여 당과 식염의 첨가조건을 달리 하여 25℃에서 9일간 배양시켜 발효 및 관능 등의 특성을 조사한 결과 starter 0.01%, fructooligosaccharide 15%, 식염 0.2%가 최적조건으로 결정되었다. 관능 검사에 근거한 최적 발효 종점은 25℃에서 3일이 가장 좋은 것으로 결정되었고, 이때의 pH는 3.62였다. 같은 조건에서 온도(5, 15, 25, 35℃)를 달리하여 27일간 배양하면서 발효특성을 조사한 결과, 저온 발효시 점질물의 형성으로 발효기간이 증가함에 따라 점도가 증가하여 쥬스로서의 가치가 저하되었고, 점질물의 형성에 의한 점도의 증가는 fructooligosaccharide 대신 isomaltooligosaccharide를 쥬스에 첨가하여 발효함으로 억제할 수 있었다.

혼합과채쥬스를 원심분리, 열처리 또는 한외여과하여 발효시 산생성속도나 당 이용능 등은 처리구간에 차이가 없었으나 한외여과의 경우 다른 처리구에 비해 젖산균의 생육과 lactic acid 생성 속도가 매우 느려 과채발효시 전처리로는 부적합하였다.

Isomaltooligosaccharide 15%, NaCl 0.2%를 첨가한 혼합과채쥬스에 3개 균주의 starter를 각각 0.01%씩 접종하여 25℃에서 3일간 또는 15℃에서 6일간 발효시킨 후 원심분리 후 가열처리 또는 한외여과를 한 후 5, 25℃에서 8주간 저장하고 성분변화를 조사한 결과 유리당으로 9종이 검출되었고, 젖산균이 살아 있는 자연 발효구와 무처리구는 혐기적 환경에 의해 비타민 C 파괴와 갈변현상은 적었지만 단당류와 이당류의 함량이 급격하게 감소되었다. 유기산으로는 5종이 검출되었고, 저장 중 무균처리를 하지 않은 구에서 malic acid가 감소하고, lactic acid가 증가되었다. 향기 성분은 총 58종이 분리, 동정되었고, 열처리의 경우 가열에 의해 가열취가 형성되었고, 한외여과에 의해 향의 일부가 손실되었다. 비타민 C는 저장 중

열처리와 한외여과로써 급격한 파괴가 있었고, 관능검사 결과 무처리구가 가장 좋은 점수를 얻었다.

순수 올리고당 또는 단당류의 함량이 낮은 복합 올리고당 15%, 식염 0.2%를 첨가한 혼합과채주스에 동치미에서 분리한 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* M5-17, *Lc. lactis* subsp. *lactis* M30-11, *Lb. cellobiosus* Y30-1 균주를 0.01%씩 접종하여 25℃에서 3일간 발효하면 가열이나 한외여과와 같은 무균처리 없이 원심분리만으로 25℃에서 8주간 저장하는 동안 성분 변화가 거의 없는 저장성이 우수하고 기호도가 높을 뿐만 아니라 젖산균에 의한 기능성을 가진 혼합과채 젖산음료의 개발이 가능하다.

## 2. 박테리오신 또는 박테리오신 생성균주를 이용한 발효과채음료의 제조

발효과채음료의 재료는 과채류의 영양학적, 기능적 특성, 그리고 재료의 수급과 경제성을 고려하여 무, 감자, 생강, 사과, 대추로 선정하였다. 원료 과채혼합액의 미생물 조성은 총균수  $9.8 \times 10^3$  cfu/mL, 젖산균수  $1.7 \times 10^2$  cfu/mL, 대장균군  $4.4 \times 10^3$  cfu/mL, 효모  $7.7 \times 10^1$  cfu/mL로 나타났다. 원료 과채류에 분포하는 젖산균의 종류는 9종이었으나, 20℃에서의 자연발효시 초기 산생성량이 높지 않아 대장균군의 증식이 억제되지 못하여 종균을 첨가하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

발효과채음료 제조를 위한 종균으로서 저온에서의 생육능과 발효특성이 우수한 *Leuconostoc mesenteroides*와 박테리오신 생성균주인 *Lactococcus lactis* 11454의 혼합접종에 의해 적정량의 산을 생성할 수 있었다. 또한 발효과채음료의

풍미 향상을 위해, 냉장온도에서 생육하며 방향생성능이 있는 효모를 활용하고자 원료 과채혼합액으로부터 분리 동정한 *Saccharomyces dairensis*를 젖산발효액에 접종하여 냉장온도에서 후숙시킴으로서 알콜류와 과일향을 내는 Ester화합물 등의 휘발성 화합물이 많이 생성되었으며, 관능특성이 개선되었다.

박테리오신 생성균주에 의한 과채류의 발효 중 박테리오신의 생성은 원료(기질)의 pH 및 성분, 고형분 농도 등에 의해 영향을 받는 것으로 나타나, 다른 젖산균과의 혼합발효시 박테리오신 생성을 위한 발효 최적조건을 확립하였다.

발효 젖산균에 대한 박테리오신의 생육저해 효과를 조사한 결과, 균주별로 억제 정도가 다르게 나타났으며, 식품의 성분도 박테리오신의 항균역가에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 박테리오신 product인 Nisin을 함유한 식품내에서 일부 젖산균의 증식이 억제되지 않았다. 그 이유가 젖산균이 박테리오신에 대한 내성을 획득한 것인지 아니면 박테리오신의 역가가 소실되었기 때문인지 분명하지 않음으로 원인 규명을 위한 지속적인 연구가 필요하다고 본다.

박테리오신 생성균주를 이용하여 발효시킨 과채음료에 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*를 0.1% 접종한 후 30C에서의 생육정도를 측정한 결과 생육이 완전히 저해됨을 확인하였으며, 발효과채음료의 항균역가는 냉장 저장 50일째까지 변화가 없었으므로 발효음료내에서의 박테리오신은 매우 안정한 것으로 보인다.

박테리오신 생성균주와 효모를 이용하여 제조한 발효과채음료에 존재하는 유기산은 lactic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, acetic acid 등이며, 유리당은 fructose, glucose, sucrose 등으로 발효 초기에 재료로부터 용출로 인해 증가



하는 경향을 보이거나, 발효가 진행됨에 따라 감소하였다. 발효과채음료의 비타민 C 함량은 발효초 급격한 저하를 보였으나 일정기간 이후에는 크게 감소하지 않았다. 그러나 전반적으로 함량이 높지 않아 제품화를 위하여 비타민 강화가 요구된다. 발효음료의 무기성분으로 Ca, K, Mg, P, Fe, Zn, Cu, Mn 등이 확인되었으며, 발효액의 pH 보정을 위해 사용한 sodium citrate로 인해 Na의 함량이 특히 높게 나타났다. 발효과채음료의 휘발성 화합물로 alcohols 13종, esters 6종, acids 3종, ketones 6종 등이 검출되었다.

본 연구에서 박테리오신 생성균주와 효모를 이용하여 제조한 발효과채음료는 각종 휘발성 화합물에 의한 독특한 향미와 각종 유기산, 무기질, 비타민, 유리당 등을 함유하고 있을 뿐만 아니라, 항균물질의 함유로 저장성이 있으며, 음료의 색상은 외관상 동치미국물과 같이 밝은 색상을 띠는 것으로서 저장 중 색상의 변화는 거의 나타나지 않아 갈증해소 음료로의 개발 가능성을 확인하였다. 그러나 발효음료를 갈증해소음료로 제품화하기 위해서는 각종 성분의 균형 특히 무기질 이온농도 균형을 체액의 농도와 비슷하게 조절해야 함으로 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

박테리오신을 생성하는 젖산균을 이용하여 발효를 행함으로써 젖산발효와 동시에 생성되는 박테리오신의 항균역가를 이용하여 발효식품의 가공 및 저장성을 향상시킬 수 있는 방법이 제시됨과 동시에 *Listeria*나 포도상구균 등에 대한 항균성이 우수한 박테리오신의 이용 가능성을 확인하였으므로, 본 연구의 결과는 국내 식품산업에 박테리오신 활용을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다. 그러나 우리 나라 전통식품 및 침채류의 가공 또는 저장에 천연 항균물질인 박테리오신을 활용하기 위해서는 보다 많은 연구가 지속되어야 할 것으로 판단된다.

## SUMMARY

### I. Title

Studies on the preparation and preservation of fermented fruit and vegetable juices

### II. Objective and Significance

This study was carried out to develop mixed fruit and vegetable juices which have good quality and longer shelf life. For this purpose, mixed fruit & vegetable juices were prepared and converted to fermented juices using lactic acid bacteria to reduce the undesirable taste and flavor of raw fruits and vegetables, and then fermented fruit & vegetable beverages with antimicrobial activity were also prepared using bacteriocin-producing culture.

Mixed fruit and vegetable juices with high preference are prepared by the combination of fruits and vegetables useful for the prevention and treatment of various diseases. The instability of juice during storage is expected to be prevented from reducing chlorophyll content and from inhibiting the formation of haze and undesirable sediments.

In recent years, food processing has undergone technological advances which include minimal processing of fruit and vegetable juices. Commercially

heat processing has been employed to preserve fruit and vegetable juices. With heat application, fruit and vegetable juices undergo color degradation, formation of undesirable sediments and decreases in contents of nutritional compounds. Therefore it is necessary to develop a decontamination method instead of heat processing.

Fermentation may increase the functionality of agricultural products. Especially, lactic acid fermentation is of worth to improve the quality of beverage foods because of its advantages such as the production of acid-taste and unique flavor, the inhibition of putrefactive bacterial growth, the control of pathogenic bacterial infection and the improvement of storage quality.

The fermentation properties of vegetables and fruits can be changed by various factors, such as the pretreatment of raw materials, addition of sugars and sodium chloride, pH and temperature, etc. Generally, most of these factors affect the lactic acid bacterial growth rate and physiochemical properties of fermented foods. Therefore it is necessary to investigate how these factors affect the fermentation of fruit and vegetable juices. Besides, necessary are the putting in of additives, aseptic treatment, or refrigeration to prevent the overproduction of lactic acid bacteria and to prevent the growth of yeast and aerobic bacteria during storage.

The lactic acid bacteria, widely used in the fermentation and preservation of foods and beverages have been to produce a number of different bacteriocins. Bacteriocin, especially nisin has been used for dairy products and canned foods in many countries as a natural bio-preservative, but not in

Korea.

If fruits and vegetables which are inexpensive and abundant products in Korea, could be processed to fermented products by bacteriocin-producing lactic acid bacteria, the products will have improved nutritional value and taste, and also retains antimicrobial effect on spoilage organisms. Fruits and vegetables contain significant amount of vitamins, mineral, and dietary fiber so that they can be processed as healthy fermented beverages.

Developing of Korean style beverages is important to replace imported sports drinks or carbonated beverages which is popular to the younger generation. The results from this study also will provide further opportunities for new and novel application of bacteriocin in processing or preservation of Korean traditional foods.

### III. The scope of this study

#### 1. Preparation and lactic acid fermentation of mixed fruit and vegetable juices

##### A. Preparation of mixed fruit and vegetable juices and storage quality

- 1) Extraction and mixing of fruit and vegetables
- 2) Determination of mixing ratio of fruit and vegetable extracts
- 3) Aseptic procedure of mixed fruit and vegetable juices and storage :  
Stored for 8 weeks at 5°C and 25°C after ultrafiltration or heat treatment for 15 sec at 96°C.
- 4) Analysis : pH, titratable acidity, organic acids, free sugars, total solids,

reducing sugars, viable cell counts, color values, enzyme activity, and L-ascorbic acid

B. Changes in chlorophyll contents and color values, and cloud stability

1) Changes in chlorophyll content and color values

- ① Chlorophyll analysis : SPD-M10A
- ② The effect of centrifugal force and thermal treatment on changes in chlorophyll content and color values : Centrifugation at 500, 1,000, 5,000 and 10,000 ×g after thermal treatment for 15sec at 96°C
- ③ The effect of mixing ratio of fruit and vegetable extracts on change in pH, chlorophyll content and color values

2) The effect of addition of browning inhibitors on change in color value

3) Changes in turbidity during storage of mixed fruit and vegetable juices

- ① Formation of haze by addition of protein (gelatine, proline and polyproline) and polyphenol (catechin, tannic acid and chlorogeni acid) in a model system(5, 25 and 95°C)
- ② Formation of haze in mixed fruit and vegetable juices by addition of protein and polyphenol sources
- ③ The effect of centrifugal force on changes in turbidity of mixed fruit and vegetable juices during storage
- ④ Analysis of phenolic compounds in mixed fruit and vegetable juices by TLC
- ⑤ Determination of amino acid contents in mixed fruit and vegetable juices by HPLC

C. The lactic acid fermentation and storage quality of mixed fruit and vegetable juices

- 1) Identification of lactic acid bacteria isolated from Dongchimi juices
- 2) Selection of lactic acid bacteria
- 3) Determination of fermentation condition of selected lactic acid bacteria
  - ① The effect of mixing ratio of selected strains and initial amount of inoculum on fermentation properties of fruit and vegetable juices
  - ② The effect of sugars and sodium chloride on fermentation properties of juices
  - ③ The effect of fermentation temperature on the lactic acid fermentation and quality of the mixed fruit and vegetable juices : 5, 15, 25 and 35 °C
  - ④ The effect of pretreatment on the coculture of lactic acid bacteria and quality of mixed fruit and vegetable juices
- 4) The storage quality of fermented fruit and vegetable juices

2. Preparation of the fermented fruit & vegetable beverage using bacteriocin or bacteriocin-producing culture

A. Selection of proper materials and characterization of natural fermentation

- Selection of fruits and vegetables for beverage preparation
- Determination of the microbial flora (lactic acid bacteria, coliforms,

yeasts) in the mixed materials

- Identification of lactic acid bacteria isolated from the mixed materials
- Characterization of the isolated lactic acid bacteria

## B. Preparation of fermented fruit & vegetable beverage

1) Selection of starter cultures to prepare fermented fruit and vegetable beverage

- Lactic acid bacteria to carry out LAB fermentation
- Bacteriocin-producing strain to provide antimicrobial activity
- Yeast strain to improve the flavor and taste of beverage fermented by lactic acid bacteria

2) Determination of the optimum conditions for fermentation and production of bacteriocin

3) Compare several characteristics of the fruit & vegetable beverages fermented by different starter cultures

4) Measuring the antimicrobial effect of bacteriocin containing beverage, which is produced by bacteriocin-producing culture during fermentation

C. Characteristics of fermented fruit & vegetable beverages using bacteriocin-producing lactic acid bacteria and yeast :

organic acids, free sugar, vitamin C, mineral content, volatile flavour components, and sensory evaluation

#### IV. Results and Suggestion for practical use

##### 1. Preparation and lactic acid fermentation of mixed fruit and vegetable juices

###### A. Preparation and Characteristics of mixed fruit and vegetable juices during storage

Mixed fruit and vegetable juices which were composed of apple, carrot, celery, watercress, jujube and lycii at the weight ratio of 3 : 3 : 1 : 1/2 : 1 : 1/2 were heated for 15sec at 96°C or filtered through a ultramembrane filter(MW cutoff value 30,000) and stored for 8 weeks at 5 and 25°C. The initial pH was 4.83-4.85 in the control and the heat-treated juices and 5.85 in the ultrafiltered juices. The ultrafiltered juices showed lower contents of soluble and total solids, reducing sugars, free sugars and organic acids than those of the control and the heat-treated juices before storage. During storage the control juices showed decreases in pH, reducing sugars and L-ascorbic acid, an increase in lactic acid and the change in color by enzyme action, more severely at 25°C, while the heat-treated juices and the ultrafiltered juices did not show remarkable changes in their composition. The storage life of juices was able to be prolonged by thermal treatment and ultrafiltration, when followed by low temperature storage.



## B. Changes in Turbidity, Chlorophyll content and color

To investigate the effect of thermal treatment and centrifugal force on changes in chlorophyll content and color, the mixture of celery and watercress at the ratio of 2 : 1 was heated and centrifuged at levels of 500, 1,000, 5,000 and 10,000xg. The content of chlorophyll a and b and hunter value of -a(greenness) decreased by thermal treatment and centrifuge treatment with an increase in g values of centrifuge. Addition of the extracts from fruits and vegetables such as apple, carrot, jujube, and lycii to the mixture of celery and watercress decreased the content of chlorophyll a and b due to reduction of pH with storage period, resulting in an increase of pheophytin a and b content levels. The trend was more remarkable with the addition of carrot. Therefore, considering change in color due to the instability of chlorophyll, it is expected to reduce browning during storage by the adjustment of the mixing ratio of raw materials and centrifugal force.

Single or combined effects of proteins and polyphenols on cloud stability were investigated with a model system of buffer. The formation of haze in buffer was remarkably induced by the addition of gelatin and peptide-type proline as proteins and tannin and chlorogenic acid as polyphenols. The formation of haze was increased synergically with combined treatment of gelatin plus tannin or chlorogenic acid and polyproline plus tannin or chlorogenic acid. Protein and polyphenols induced the formation of haze in juices which was partially prevented by centrifuge and ultrafiltration. The composition of amino acids and polyphenol compounds in mixed fruit and

vegetable juices treated with centrifuge and ultrafiltration was investigated. The major amino acids were aspartate, asparagine, glutamate, glutamine, and proline, and the major phenolic compounds were *p*-cummaric acid, vanillic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, epicatechin, (+)catechin, quercetin, and kaempferol. The content of these amino acids and phenolic compounds showed the highest in nontreated juices. It is thought that these amino acids and phenolic compounds effected the formation of haze. In conclusion, centrifugal treatment and ultrafiltration of mixed fruit and vegetable juice may be useful for beverage stabilization by inhibiting the formation of haze and undesirable sediments.

#### C. Lactic acid fermentation and Storage quality of mixed fruit and vegetable juices

Fifteen groups of lactic acid bacteria were isolated from Dongchimi juice that was fermented by a conventional method. The lactic acid bacteria from each group were separately inoculated into mixed fruit and vegetable juice which was composed of carrot, apple, celery, watercress, jujube and lycii at the weight ratio of 3 : 3 : 1 : 1/2 : 1 : 1/2. The mixed juices were fermented for 9 days at 25°C to examine growth rate, acid-producing ability and flavor. Three strains, *Leu. mesenteroides* M5-17, *Lc. lactis* M30-11 and *Lb. cellobiosus* Y30-1 were selected as starters for lactic acid fermentation of mixed fruit and vegetable juices.

The mixed fruit and vegetable juices inoculated with the mixture of three

selected strains were cultured for 9 days at 25°C in concentrations of several sugars and sodium chloride. The optimum composition was determined to be 0.01% starters, 15% fructooligosaccharide, and 0.2% sodium chloride in mixed juices. The best fermentation period, based on sensory evaluation, was 3 days, at which pH level was 3.62.

The mixed fruit and vegetable juices were cultured under the optimum composition mentioned above for 27 days at 5, 15, 25, and 35°C. At 5 and 15°C, viscosity of juices increased with fermentation time due to the formation of dextran, which devalued the quality of the juices. The formation of dextran was prevented by using isomaltooligosaccharide instead of fructooligosaccharide.

To investigate the effect of pretreatments on lactic acid fermentation, the mixed fruit and vegetable juices were either centrifuged at 10,000×g for 15min, or heated at 96°C for 15 sec or filtered through ultramembrane filter, and then cultured for 4 days at 25°C. Among the treatment samples there was no difference in acid-producing rate and sugar utilization ability. Ultrafiltration delayed the growth of lactic acid bacteria and production of lactic acid, therefore found to be an unsuitable pretreatment.

The mixed fruit and vegetable juices containing 15% isomaltooligosaccharide and 0.2% sodium chloride were fermented by the same starters as above for 3 days at 25°C or for 6 days at 15°C. The fermented fruit and vegetable juices after ultrafiltration or thermal treatment were stored for 8 weeks at 5° or 25°C. The fermented juices contained 3 species of free sugars. Ultrafiltered and heat treated juices showed an abrupt decrease in vitamin C. Their colors changed into brown during storage. But in the

naturally fermented juices and non-treatment juices, which contained live lactic acid bacteria causing an anaerobic environment, the destruction of vitamin C and browning were less. Sugar content, however, decreased abruptly, especially glucose and fructose as monosaccharides and sucrose as disaccharides.

In fermented juices 58 species of volatile compounds were detected. A specific odor was formed as a result of thermal treatment. Flavor was lost partly due to by ultrafiltration.

In conclusion, it is highly possible that fermented fruit and vegetable juices with superior preference and storage quality can be developed when the mixed fruit and vegetable juices containing 15% pure oligosaccharides or mixed oligosaccharide with low level of mono- and di-saccharide and 0.2% sodium chloride were fermented by mixture of *Leu. mesenteroides* M5-17, *Lc. lactis* M30-11 and *Lb. cellobiosus* Y30-1 for for 3 days at 25°C and followed by centrifuge without thermal treatment or ultrafiltration.

## 2. Preparation of fermented fruit & vegetable beverages using bacteriocin or bacteriocin-producing culture

Radish, potatoes, ginger, apple, and jujube were selected as materials for preparation of fermented fruit & vegetable beverages, on the basis of nutritional and functional properties, convenience of supply, and economic value. Microbial flora in the mixture of materials were as follow ; total viable counts

9.8 x 10<sup>3</sup> cfu/mL, lactic acid bacteria 1.7 x 10<sup>2</sup> cfu/mL, coliform bacteria 4.4 x 10<sup>3</sup> cfu/mL, and yeasts 7.7 x 10<sup>1</sup> cfu/mL. Nine species of lactic acid bacteria were identified in the mixture of materials, and they did not produce sufficient acids to inhibit growth of coliforms by natural fermentation of the mixture of materials at 20C.

*Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis* 11454 which is a bacteriocin-producing strain, were selected for preparation of fermented fruit & vegetable beverages as starter cultures. *Saccharomyces dairensis* which can grow at low temperature and produce flavor compounds were isolated from the mixture of materials and were inoculated for post fermentation to enhance flavor and taste of fermented fruit & vegetable beverages.

Production of bacteriocin by *Lc. lactis* 11454 during fermentation of the mixture of materials were affected by several conditions such as pH and solid content of the materials for fermentation. Optimum conditions for fermentation were established to produce bacteriocin during fermentation. The antimicrobial activity of nisin, a commercial product of bacteriocin, against lactic acid bacteria for fermentation were affected by strains and food components. Certain species of lactic acid bacteria were not inhibited in certain foods retained nisin product. It is not clear whether lactic acid bacteria became bacteriocin-resistant cells or bacteriocin lost its antimicrobial activity.

The growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* were completely inhibited in fermented fruit & vegetable

beverages prepared by bacteriocin producing culture. The antimicrobial activity of bacteriocin in fermented fruit & vegetable beverages was retained for more than 50days.

The major organic acids in fermented fruit & vegetable beverages prepared by bacteriocin producing culture and yeast were lactic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, and acetic acid. Sugars detected in fermented beverages are glucose, fructose, and sucrose, and the amount of sugars in beverages decreased rapidly during post-fermentation by *Saccharomyces dairensis*. Content of vitamin C in beverages has not significantly decreased during storage. Ca, K, Mg, P, Fe, Zn, Cu, and Mn were detected in fermented beverages as mineral components. Volatile compounds identified in fermented fruit & vegetable beverages were 13 alcohols, 6 esters, 3 acids, and 6 ketones. Post-fermentation by *S. dairensis* significantly has improved flavor, taste and total acceptability of fermented beverages.

As the outcome of this research, fermented fruit & vegetable beverages which contain various organic acids, minerals, free sugars and vitamin C, and retain unique flavor and bright color, in addition to antimicrobial activity were prepared using bacteriocin-producing lactic acid bacteria. It is expected that this beverages could be developed as a Korean style thirst-quenching beverage if mineral concentration could be balanced equivalent to that of body fluids.

The results from this study can be used as fundamental data for domestic food industry to apply bacteriocin a natural bio-food preservative. However, Much more further researches have to be followed for new and novel

application of bacteriocin in processing or preservation of Korean traditional foods.

## CONTENTS

Chapter 1.	Introduction -----	33
Section 1.	Backgrounds-----	35
Section 2.	Objective and significance-----	36
Section 3.	References-----	40
Chapter 2.	Preparation and latic acid fermentation of mixed fruit and vegetable juices -----	43
Section 1.	Introduction-----	45
Section 2.	Materials and methods-----	52
Section 3.	Results and discussions-----	70
Section 4.	References-----	196
Chapter 3.	Preparation of fermented fruit & vegetable beverages using bacteriocin or bacteriocin-producing culture-----	211
Section 1.	Introduction-----	213
Section 2.	Materials and methods-----	219
Section 3.	Results and discussion-----	226
Section 4.	References-----	274



# 여 백

## 목 차

제출문		
요약문	-----	1
SUMMARY	-----	15
CONTENTS	-----	29
목차	-----	31
제 1 장	서 론 -----	33
제 1 절	연구의 배경 -----	35
제 2 절	연구개발의 필요성 및 목표 -----	36
제 3 절	참고문헌-----	40
제 2 장	과채쥬스 제조 및 젓산발효 -----	43
제 1 절	서 설 -----	45
제 2 절	재료 및 방법 -----	52
제 3 절	결과 및 고찰 -----	70
제 4 절	참고문헌-----	196
제 3 장	박테레오신 또는 박테이로신 생선균주를 이용한 과채발효음료의 제조 -----	211
제 1 절	서설 -----	213
제 2 절	재료 및 방법 -----	219
제 3 절	결과 및 고찰 -----	226
제 4 절	참고문헌-----	274

여 백

## 제 1 장. 서 론

여 백

## 제 1 절. 연구의 배경

각종 농산물의 수입개방으로 농가의 피해가 증가하고 있다. 다행히 신선한 과채류는 저장성 문제로 수입에 어려움이 있어 신선한 원료를 이용한 가공식품개발에 우리 농산물의 이용 범위가 넓어지고 최근 관심이 높은 건강식품의 개발에도 과채류의 가공품이 많이 포함되어 있다. 이러한 내외 여건 변화에 적극 대응하려면 국내산 채소 및 과일 중 가공경쟁력이 우수한 제품의 개발이 필요하다.

최근 화학약재의 새로운 약해의 문제로 인해서 질병의 예방과 치료를 자연식품으로 실현하고자 하는 추세로 기울고 있다. 이미 병든 세포와 손상된 조직을 회생시키기 위해서는 자연에서 얻은 다량의 비타민과 미네랄 등을 공급하는 것이 효과적인 것으로 보고되고 있으며 이중 비타민, 미네랄, 섬유소, 효소 그밖의 유효성분들이 다량 함유되어 있는 채소와 과일을 이용한 요법이 많이 등장하고 있다.

우리나라의 과일 음료 소비량은 1987년 청량음료 생산량을 기준으로 보면 과채류 음료가 13.1%를 차지하였는데 1991년에는 23.7%로 성장하였으며 이러한 추세는 천연과즙에 대한 소비자들의 선호도가 증대됨에 따라 더욱 높아질 것으로 판단된다. 이들 채소나 과일의 즙액은 다량의 유효성분을 많이 섭취할 수 있고 몸에 신속하게 소화, 흡수될 수 있는 잇점을 가지고 있으며 몇가지의 채소와 과일즙을 혼합하여 섭취할 경우 훨씬 효과가 큰 것으로 보고되고 있다. 그러나 과채음료는 소비자의 요구가 많음에도 불구하고 제품의 맛이나 향이 좋지 않을 뿐 아니라 저장시 변색, 침전물 형성 등의 문제점으로 제품화되기 어렵다. 따라서 과채 원료의 가공시 물리화학적 변화와 관능 특성을 개선하여 기호성이 높은 과채음료 및 발효음료의 개발이 필요하다고 판단된다.

## 제 2 절. 연구개발의 필요성 및 목표

### 1. 연구개발의 필요성

#### 가. 경제, 사회적 측면

건강에 대한 관심이 증가되고 신선식품에 대한 소비자의 기호도가 증가하면서 건강식품 시장은 더욱 활기를 띠고 있으며 그 소재의 변화는 구체적 기능 추구, 전문화, 천연물화 방향으로 급속히 변화되고 있다.

서구에서는 사과, 감 등 감귤류 주스에 관해서는 많이 연구되고 있으나 채소주스 및 과채혼합주스에 관한 연구는 비교적 저조한 상태이고 개발 제품도 한계적이다. 국내에서는 오래전부터 사과, 오렌지 등 과일 주스가 생산되어 왔으며 채소 및 혼합과채 주스의 경우는 최근 연구가 단편적으로 진행 중이고 건강발효음료로써 우유를 원료로 한 요구르트가 대중화되었으나 과일과 채소를 원료로 한 발효음료는 거의 시판되고 있지 않다.

각종 스트레스에 시달리고 있는 현대인들은 특히 기호식품 및 건강식품에 대한 관심이 증가되면서 식욕증진, 소화촉진, 갈증해소 등을 목적으로 소비되는 음료의 소비 형태도 변화하여 1980년대에는 탄산청량음료가 주종을 이루었으나, 1990년대부터는 발효유와 과일주스나 야채주스 등의 건강음료로 바뀌어 국내 여러 식품업계에서 다양한 음료를 개발하여 시판되고 있다. 그러나 수입개방의 물결을 타고 외국의 다양한 과즙음료 또는 게토레이, 포카리스웨트 등의 수입 스포츠음료의 소비가 최근 확산되고 있으므로 우리의 입맛에 맞는 갈증해소용 음료의 제조 및 개발이 필요한 실정이다.

우리 나라는 전통적으로 동치미, 나박김치, 물김치 등의 야채발효식품을 많이 애용하여 왔으며, 특히 동치미 국물과 나박김치 등의 발효액은 갈증 해소용으로 이용되기도 하였으므로 비타민과 각종 무기질, 섬유소 등이 풍부한 과채류를 발효시켜 우리의 입맛에 맞는 건강 지향적 갈증해소음료로 개발한다면 수입 스포츠음료의 대체효과와 농가 소득증대에 기여할 수 있을 것이다. 따라서 맛과 향에 대한 기호도를 높이고, 저장성이 우수한 혼합과채 및 과채발효음료를 개발함으로써 저렴한 농산물의 가공에 따른 농가소득의 증대와 식품산업의 발전을 도모할 필요가 있다.

#### 나. 기술적 측면

채소와 과일에는 질병에 효과가 있는 성분이 다량 함유되어 있으며 채소와 과일을 착즙기로 갈아서 만들어진 즙은 섬유소가 적당히 포함되어 있기 때문에 소화와 흡수력을 높임과 동시에 배설도 순조롭게 한다. 그러나 채소와 과일을 혼합한 혼합과채주스의 여러 잇점에도 불구하고 많이 이용되고 있지 않은 이유는 채소음료의 대한 맛과 향의 거부감과 성분 상호간의 반응으로 인한 색의 변화와 저장 중 기호성분의 불안정성, 그리고 침전 형성 등의 문제로 품질유지가 어렵기 때문이다.

우리 고유의 과채발효음료를 개발하기 위한 연구로서 동치미에 대해 많은 연구가 진행되고 있으나 아직은 초기 단계로서 수입음료를 대체하기 위한 음료로 개발하기 위해서는 기호도의 개선과 기능성의 보강 등 많은 연구가 필요하다. 또한 채소주스, 과일주스, 또는 과채혼합주스가 많이 연구, 개발되고 있으나 야채의 강한 맛과 향에 의해 관능성이 저하되며 저장 중 갈변 및 영양소의 파괴, 침전물의 형성으로 많은 문제점이 야기되고 있다.

박테리오신은 미생물에 의해 생성된 peptide로서, 다른 미생물의 생육을 저



해하는 천연항균성 물질이다. 따라서 젓산균과 같은 food grade bacteria가 생성하는 박테리오신은 천연물질이기 때문에 사용이 안전하고 항균력도 높아 박테리오신 함유식품의 저장성을 향상시킬 수 있으며, 천연물을 선호하는 현대 소비자의 욕구를 충족시킬 수 있으므로 이의 활용에 대한 연구가 필요하다.

특히 여러 가지 박테리오신 중에서 *Lactococcus lactis*가 생성하는 박테리오신인 Nisin은 대부분의 그람양성균과 식중독균에 대한 저해효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다. 이 박테리오신은 이미 오래 전부터 유럽을 비롯한 여러 나라에서 각종 식품에 사용되고 있으며, FDA에서 GRAS품목으로 인정받은 물질이다. 따라서 우리나라의 전통식품과 침채류의 가공 및 저장에 응용할 수 있을 것으로 판단되므로 박테리오신 활용을 위한 기초자료를 축적할 필요가 있다.

## 2. 연구개발의 목표 및 범위

본 연구개발의 최종 목표는 채소음료의 맛과 향의 거부감을 제거하여 기호도가 향상된 채소음료를 개발하고, 가공과 저장 중에 산화, 부패에 의해 야기하는 품질변화를 억제하여 저장성이 우수한 혼합과채쥬스와 발효과채음료를 개발하고자 하는 것이다.

따라서 본 연구에서는 각종 영양성분이 풍부하고 여러 질병에 효능이 많다고 알려진 채소와 과일을 선택하여 배합비를 달리하여 혼합과채쥬스를 제조하고 저장 중 가공 및 제균처리방법이 따른 품질변화를 조사하므로 기호도가 높은 혼합과채쥬스를 개발하고자 하였다. 또한 과채음료의 색깔에 영향을 줄 수 있는 chlorophyll의 분해요인과 변화경향을 조사하고 chlorophyll을 제거함으로써 갈변과 침전생성의 요인들도 검토하여 저장 중 침전생성에 의한 품질저하를 방지하여 제품을 안정화하고자 하였다.

과채주스의 저장성 향상을 위한 또 하나의 방안으로 전통채소발효식품인 동치미에서 젖산균을 분리하고, 그 중 생육능과 산생성능, 향미 생성, 내산성이 우수한 젖산균을 선발하여 혼합과채주스에서의 젖산균의 혼합배양 조건과 식염, 당의 첨가효과를 조사하고 원심분리, 열처리, 한외여과 등이 젖산발효 음료의 품질 및 저장특성에 미치는 효과를 연구, 조사함으로써 기호도와 저장성이 우수한 젖산음료를 만들고자 하였다.

생산량이 풍부하고 값이 저렴한 농산물인 과일과 채소류를 혼합하여 항균효과를 지닌 과채발효음료를 개발하고자 하였다. 일반적으로 채소는 당도가 낮으므로 과일을 첨가하여 당도를 높이고 일반적인 젖산균 대신 박테리오신을 생성하는 젖산균을 이용하여 발효시킴으로써 과채류의 당이 젖산균에 의해 각종 유기산으로 전환되어 맛과 영양이 강화되고, 발효 중 생성된 박테리오신은 과도한 산생성을 방지하고, 지속적인 항균효과로 저장성이 있는 발효음료를 제조하고, 과채류의 젖산발효산물이 관능면에서 기호도가 낮게 나타나는 단점은 방향 생성능이 있는 효모를 이용하여 풍미를 개선하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 발효의 종균으로 일반적인 젖산균과 더불어 박테리오신 생성균주를 선택하여 발효최적조건을 확립하고, 박테리오신을 함유한 발효음료의 항균효과를 측정하였으며, 과채젖산발효액의 풍미를 개선하기 위하여 적절한 효모를 분리, 동정하여 후발효를 수행하여 제조한 음료의 품질특성을 조사하였다.

### 제3절. 참고문헌

- 이철호 : 약이 되는 식품. 어문각 (1994)
- 유풍현 : 대추 extract를 첨가한 요구르트의 제조에 관한 연구. 충남대학교 대학원 석사학위 논문 (1995)
- 박경숙, 경규향 : 무의 젖산균 증식촉진물질과 촉진작용. 한국식품과학회지, 24(6), 528 (1992)
- Leverington, R.E. : Ginger technology. Food technology in Australia, 8, 309 (1975)
- 심선택, 경규향, 유양자 : 김치에서의 젖산균의 분리 및 이 세균들의 배추액즙 발효. 한국식품과학회지, 22, 373 (1990)
- Kaneuchi, C.H., Masako, S.L., and Kazuo, K.F. : production of succinic acid from citric acid and related acids by *Lactobacillus* strains. Appl. & Environ. Microbiol., 54(12), 102 (1988)
- 함승시, 이상영, 오덕환, 김상현, 홍정기 : 산채류를 이용한 음료개발에 관한 연구. 한국식품영양과학회지, 26(1), 92 (1997)
- 김범수, 이용기 : 야채. 과일요법. 평단문화사, (1995)
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. : Bacteriocins of gram- positive bacteria, bacteriol. Rev., 40, 722 (1976)
- Reddy, G.V., Friend, B.A., Shahani, K.M. and Farmer, R.E. : Antitumor activity of yogurt components. J. Food Prot., 46, 8 (1983)
- Hosono, a., Wardojo, B. and Otani, H. : Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenic activities of volatile nitrosamines. Agric. Chem., 54, 1639(7) (1990)
- Fernandes, C.F. and Shahani, K.M. : Anticarcinogenic and immunological properties of dietary *lactobacilli*. J. Food Prot., 53, 704(8) (1990)

- 김진욱, 박장서 : 효모의 분류, 특성 및 산업적 이용, 생물산업, 10, 2 (1997)
- Daeschel, M.A., Fleming H.P. and Mcfeeters, R.F. : Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. J. Food Sci., 53(3) 862 (1988)
- Fleming H.P, R.F. McFeeters, and R.L. Thompson : Test for susceptibility of fermented vegetables to secondary fermentation. J. of Food Science 48, 982 (1983)
- 노완섭 : 한국산 침채류의 발효 속성에 관여하는 효모에 관한 연구, 동국대 박사학위논문 (1980)
- 김혜자, 양차범 : *Lactobacillus plantarum*과 *Saccharomyces cerevisiae*의 상호작용이 채소발효음료에 미치는 영향, 한국생활과학연구 제12호, 115 (1994)
- Wang, H., Cao, G. and Prior, R.L. : Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Food Chem., 44, p. 701-705 (1996)
- Faigh, J.G. : Enzyme formulations for optimizing juice yield. *Food Technol*, p. 79-83 (1995)
- Mosquera, M.I., Rojas, B.G. and Mosquera, J.M. : Mechanism and kinetics of the degradation of chlorophylls during the processing of green table olives. *J. Agric Food Chem.*, 42, p. 1089-1095 (1994)
- 이동연, 박지용, 강정일, 여익현 : 초고압처리 신선초 녹즙의 저온저장 안정성 및 관능적 특성 변화. 한국식품과학회지, 28, 105 (1996)
- Martens, B., and Knorr, D. : Developments of nonthermal processes for food preservation. *Food Technol.*, 46, 124 (1992)
- 김길환 : 식품산업에서의 분리막을 이용한 분리농축기술. 한국막학회-하계 분리막 Workshop,p.59 (1994)
- Koseoglu, S. S., Lawhon, J. T. and Lusas, E. W. : Vegetable juices produced with membrane technology. *Food Technol.*, 45, 124 (1991)

- 김수연, 최언호 : 혼합과채쥬스의 제조와 제조방법에 따른 품질특성. 한국식품과학회지, 30, 90 (1998)
- 김길환, 김동만, 진재순, 김석중 : 무열처리 청징 과채류 쥬스의 제조 방법. 공개특허 93-019148 (931018)
- 김유경 : 발효과채쥬스의 제조 및 특성에 관한 연구. 연세대학교 석사학위논문 (1995)
- Carr, J. G., Cutting, C. V., and Whiting, G. C. : Lactic acid bacteria in beverage and food, Academic Press. London, p.17 (1975)
- 강현아, 장규섭, 민용규, 최용희 : 미세여과와 한외여과를 이용한 대추술의 고품질화. 한국식품과학회지, 30, 1146 (1998)

제 2 장. 과채주스 제조 및 젓산발효  
(연구책임자 : 최 언 호)

여 백

## 제 1 절. 서 설

우리가 일상적으로 섭취하고 있는 채소, 과일 등의 식용식물은 저칼로리, 저지방 식품이면서도 비타민류, 미네랄류, 녹황색소, 폴리페놀류, 섬유 등 우리 건강을 유지하는데 중요한 물질들을 함유하고 있다<sup>(1,2)</sup>. 통조림, 냉동, 건조식품으로서 과일과 채소는 여전히 우리 식품시장에서 매우 중요한 부분을 차지하고 있으며 주스, 젤리, 잼 및 요구르트, 파이와 같은 여러가지 식품에서 다양한 형태로 가공되어 왔다<sup>(2)</sup>. 이들 채소나 과일의 즙액은 다량의 유효성분을 많이 섭취할 수 있으며 몸에 신속하게 소화, 흡수될 수 있는 잇점을 가지고 있다. 특히 한 종류의 즙액을 단독으로 섭취하는 것보다 몇가지의 채소와 과일즙을 혼합하여 섭취할 경우 훨씬 효과가 큰 것으로 보고되고 있다<sup>(3,4)</sup>. 우리나라의 과일 음료 소비량은 1987년 청량 음료 생산량을 기준으로 보면 과채류 음료가 13.1%를 차지하였는데 1991년에는 23.7%로 성장하였으며 이러한 추세는 천연과즙에 대한 소비자들의 선호도가 증대됨에 따라 더욱 높아질 것으로 판단된다<sup>(5)</sup>.

식품자체의 맛과 향을 지니는 천연식품에 대한 관심이 높아짐에 따라 가열처리로 인한 품질손상 및 영양성분 파괴를 방지하기 위한 대체방법으로 열처리를 최소화함으로써 줄이려는 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 이러한 비살균방법으로 주목받고 있는 신기술로는 막분리기술, 전기장 및 자기장의 이용, 초단파 조사, 초고압 처리 등이 있는데<sup>(6)</sup> 이 등<sup>(7)</sup>은 신선초 녹즙에 초고압 살균처리 또는 열처리를 하여 녹즙의 살균효과, 안정성조사 및 관능적 특성의 변화를 조사하였다.

식품산업에서 필요로 하는 분리공정에서 보다 저렴한 비용으로 간편하면서도 효과적으로 처리할 수 있는 막분리기술이 개발되어 주목받고 있다. 특히 열변성이 문제가 되는 분야에서의 막분리기술의 응용은 제품의 품질향상에 훨씬 효과적인 방법으로 인정되고 있다. 한외여과법이나 역삼투법을 적용하여 농축하는 방법은 기존의 증발 농축법에 비해 휘발성 성분의 손실이 적고 제품의 품질 및 영양



가의 손실을 최대한 방지할 수 있는 기술로서 주목받고 있다<sup>(8-11)</sup>.

과거에 ascorbic acid, tocopherol, tocotrienols과  $\beta$ -carotene으로 모였던 관심들이 최근 flavonoid와 phenol의 항산화 역할로 주목되고 있다. Flavonoid와 phenolic acid는 과일, 채소와 음료에 주로 많으며 사과, 배, 포도주스에서 중요한 페놀 성분은 두가지로 구분할 수 있는데 phenolic acid와 그 관련화합물 그리고 flavonoid이다. Phenolic acid는 cinnamic acid(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)와 benzoic acid(C<sub>7</sub>)를 포함하고 있으며, 특히 caffeic acid와 coumaric acid는 사과, 배, 포도주스에 널리 존재한다. Flavonoids는 diphenylpropane skeleton(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)을 지니고 있으며 사과, 배, 포도주스에는 주로 catechin, quercetin, kaempferol, myricetin, phloretin, phloridzin 등이 존재한다<sup>(12)</sup>.

식품가공 중에 일어나는 갈변반응에 대한 연구는 오랜 역사를 지니고 있으며, 식품 및 생체내에서의 갈변반응은 효소적 또는 비효소적으로 진행된다. 비효소적 갈변화는 maillard 반응, ascorbic acid 산화반응, 그리고 카라멜화 반응 등에 의하여 일어나고, 이들의 갈색화 정도는 가공식품의 성분조성에 좌우된다<sup>(13,14,15)</sup>. 과일 주스에서의 비효소적 갈변화는 당, 아미노산, ascorbic acid의 반응으로 인하여 일어나는데, 이러한 반응은 유기산, furan, furanone, ketone, cyclopentanoen, pyranoen, pyrrole 등과 같은 물질을 포함하는 다양한 물질들을 최종적으로 생성하여 주스의 이취도 야기시킨다<sup>(15)</sup>. 효소적 갈변화는 polyphenol oxidase(PPO)와 tyrosinase에 의해 polyphenol이 quinone으로 바뀌는 반응이다. PPO에 의한 갈변화를 최소화하기 위해서는 효소저해, *o*-quinone 감소, Cu<sup>2+</sup>의 chelation이나 감소, sulfite와의 안전한 *o*-quinone 화합물을 형성하는 방법들이 있다<sup>(16,17)</sup>.

주스의 품질을 결정하는 주요인자 중의 하나는 탁도로, 토마토 주스나 오렌지 주스와 같은 혼탁주스의 경우 저장기간 중 주스를 고체층과 액체층으로 분리시키는 cloud loss는 바람직하지 못하며 기호의 변화를 일으킬 수 있다. 뿐만 아니라 현탁입자와 함께 ethylbutyrate, neural, geranial 등의 향기성분이 소실될 가능성도

있다<sup>(18)</sup>. 과일로부터 제조한 주스류에 pectinesterase(PE)가 존재할 경우 주스의 펙틴분자를 가수분해하여 펙틴산과 칼슘의 복합체로 침전하게 되며 혼탁성 불투명 주스류에 이와 같은 침전이 일어나면 제품외관에 손상을 주기도 한다<sup>(19,20)</sup>. PE와 관련하여 cloud loss를 줄이기 위한 연구로 clouding agent 첨가<sup>(21)</sup>, 칼슘첨가<sup>(22)</sup>, 과육 추출물 첨가<sup>(23)</sup>, 효소 첨가<sup>(24)</sup> 등이 연구되고 있으나 이러한 방법들의 단독 처리는 한계점을 가지고 있다.

과일주스, 와인, 맥주 등의 음료는 모두 단백질과 폴리페놀 화합물을 함유하고 있는데 이들은 콜로이드 현탁액을 형성하여 빛을 산란시키고 혼탁한 상태를 유지시키지만 크기가 콜로이드 크기 이상으로 커지면 침전을 유발하기 때문에 저장 중 단백질과 폴리페놀의 함량변화와 이들의 결합방식, haze 생성에 대한 이해는 제품을 안정화시키고 저장수명을 연장하는데 중요한 역할을 한다<sup>(25)</sup>.

모든 단백질과 폴리페놀 화합물이 haze 형성에 관여하는 것은 아닌데 특히 proline과 proanthocyanidin이 산화적 메카니즘과 비산화적 메카니즘에 의해서 haze와 침전물을 형성한다는 보고가 있다<sup>(26,27)</sup>. Siebert 등<sup>(25)</sup>은 단백질-폴리페놀 결합의 주된 결합력은 수소결합이나 소수성 결합이라고 보고하였으며 Hsu 등<sup>(26)</sup>은 포도주스와 포도주의 품질안정을 유지하기 위해서는 12,600-30,000D 분획을 제거해야 한다고 하였고 Hoon 등<sup>(27)</sup>은 탄닌-단백질 화합물의 형성과 안정성에 연구하여 소수성 결합이 작용한다고 보고하였다.

녹색채소의 열처리과정에서 chlorophyll의 파괴에 의한 녹색소의 변화는 오랜 기간동안 많은 가공학자들의 관심이 되어왔다. 광선 존재하에서는 chlorophyll이 감광체로서 산화반응을 촉진시키나 광선이 차단된 상태에서는 유리 라디칼 제거제로 작용하여 지방질의 자동산화 등을 방지하며 항돌연변이성 및 항암성이 있다고 보고되고 있다<sup>(28,29)</sup>. 또한 식품산업에서는 천연색소 냄새 제거체로도 이용되고 있다<sup>(30)</sup>. Chlorophyll a와 b는 Mg 이온을 함유하고 있는 tetrapyrrole phorbins의 유도체로 열처리를 가하면 Mg<sup>++</sup>이온이 2개의 수소이온과 치환하여 갈색의 pheophytin

으로 변한다<sup>(31,32)</sup>. Chlorophyll의 분해경로는 크게 2가지로 구분되는데 첫번째가  $Mg^{++}$  이온을 잃어 pheophytin으로 바뀐후 다시 phytol chain의 분리로 pheophorbide가 형성되는 것이고 두번째는 phytol chain의 분리가 먼저 일어나 chlorophyllide로 바뀐 후에 pheophorbide가 형성되는 경로이다<sup>(33,34,35)</sup>. Chlorophyll로부터 phytol chain의 분리는 화학적인 가수분해나 chlorophyllase의 효소적 분해에 의해 일어난다<sup>(36,37)</sup>. Chlorophyll이 pheophytin과 pheophorbide로 전환되면 밝은 초록색에서 갈색으로 색이 바뀌면서 소비자들에게 품질 저하로 받아들여지기 쉽다. 가공 후에도 계속 녹색채소의 변색을 방지하기 위하여 데치기 과정에서 알칼리 제제나 소금물을 이용하여 pH를 높이는 방법을 이용하여 왔고 HTST이나 chlorophyll을 효소분해하여 chlorophyllide로 전환시키는 방법도 이용하였으나 오랜 기간동안 녹색을 유지하는데는 모두 성공하지 못하였다.  $-a$  값은 색도 측정에서 녹색도를 나타내기 위한 물리적 매개변수로 이용되어 왔다. Hayakawa 등<sup>(38)</sup>은  $-a/b$  값을 야채변색의 반응속도변수를 결정하는데 사용하였고 Gnanasekharan 등<sup>(39)</sup>은 브로콜리, 오이, 시금치, 토마토를 대상으로 저장 중 색도의 변화와 관능 검사와의 상관관계를 조사하였다.

채소와 과일을 혼합한 혼합과채주스의 문제점은 성분상호간의 반응으로 인한 색의 변화와 저장 중 기호성분의 불안정성, 그리고 침전의 형성이다. 본 연구의 목적은 각종 영양성분이 풍부하고 여러 질병에 효능이 많다고 알려진 채소와 과일을 선택하여 혼합과채주스를 만들고 저장중의 각종 성분변화와 색의 변화, 그리고 침전생성에 대한 원인을 규명하고 문제점을 보완하여 제품을 안정화하는데 있다. 재료의 배합에 의해서 기호성이 높은 과채주스를 제조하고 저장중 과채주스의 색도에 가장 큰 영향을 미치는 chlorophyll의 분해요인과 변화경향을 조사하였다. Chlorophyll은 구조의 불안정성으로 인하여 저장 중 심한 갈변을 야기하며 이를 억제하는 방법들도 단기적인 효과밖에는 기대할 수가 없다. 따라서 과채주스의 외관적 품질특성을 고려하여 chlorophyll 제거에 의한 갈변방지과 침전생성을 야기하

는 요인들에 대하여 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

일반적으로 농산물의 원료는 발효과정을 통하여 미생물의 효소활성으로 식품적 기능이 증가되는 경우가 많다. 특히 젖산발효는 발효과정에서 생성되는 산미와 독특한 향, 정장작용, 부패성 미생물의 발육 억제, 병원성 균 감염 억제, 그리고 원료의 수확기로부터 소비할 때까지 저장성 부여 등의 잇점 때문에 음료개발에 많이 이용되어 왔으며 우유를 발효시킨 발효유의 제조에도 이용되고 있다<sup>(40)</sup>.

김치, sauerkraut, pickle 등에서는 발효초기에 *Leuconostoc mesenteroides*가 번식하여 젖산 및 탄산가스를 생성함으로써 산소분압이 감소하여 혐기적 상태를 만들므로 *Achromobacter*속, *Flavobacterium*속, *Pseudomonas*속 등의 호기성 균의 성장이 저해되고, 발효 중기에는 *Streptococcus*속이 약간 증식한 후 발효가 진행되면서 젖산이 증가하며 젖산에 민감한 *Leuconostoc*속은 감소되고 내산성 젖산균인 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus brevis* 등이 주된 젖산균으로 작용하여 산패를 유도하게 된다. 그러나 발효 말기가 되면 피막형성 호기성 세균과 젖산을 기질로 하는 효모의 성장으로 pH가 상승되고 김치의 경우 균체가 분비하는 효소에 의해 조직은 급격히 연화되며 맛이 변하게 된다<sup>(41~44)</sup>.

서양의 sauerkraut의 경우 발효 단계에 따라 관여하는 미생물 종이 다름이 밝혀지고 있는데 초기 단계에는 *Leu. mesenteroides*, 발효완료단계에는 *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*이 관여하나 비정상적인 높은 온도와 염함량에서는 *Streptococcus faecalis*와 *Pediococcus cerevisiae*가 나타나며 대부분의 발효 온도 및 염 농도에서 발효초기에 *Leu. mesenteroides*가 빠르게 증식, 탄산가스, 산을 형성하고 pH 강하를 일으켜 바람직하지 못한 균의 증식 억제 및 연화 효소의 활성억제에 관여한다고 보고하였다<sup>(45)</sup>.

과채를 자연발효시켰을 때 관여하는 젖산균<sup>(46~58)</sup>은 *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Strep. faecalis*, *Strep. faecalis var. liquefaciens*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus*,

*Aerococcus* sp., *Enterococcus faecium*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. xylosus*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei*, *Lb. buchnerii* 등이 있고, 호기성 세균<sup>(46,47,49,54,58,59)</sup>으로는 *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*속이 보고되고 있고, 효모<sup>(49,50,55,60,61)</sup>로는 연부와 관련된 산막효모인 *Debaryomyces*, *Zygosaccharomyces*와 군덕내의 원인균주인 *Brettanomyces*, *Candida*, *Citromyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*속 등이 분리, 동정되었다. 김치 및 과채의 발효온도별 주요 젖산균들은, 발효초기와 중기 사이에서는 발효온도가 저온이든 중온이든 관계없이 언제나 *Leu. mesenteroides*가 최우세 미생물이나 발효 중기에서는 20~30℃의 중온 발효시 *Lb. plantarum*과 *Lb. brevis*가 우세 미생물이고, 10℃ 이하의 저온발효시는 산을 적게 생성하는 *Lactobacilli*, *Lb. sake*, *Lb. bavaricus* 등이 우세 미생물로 보고되고 있다<sup>(47,49,52,54,64-66)</sup>.

과채류 및 김치 발효는 담금재료, 원료의 전처리, 소금 및 염 농도, 발효온도, 당의 종류 및 농도, pH 완충제의 사용, 보존료의 사용, starter의 사용, 포장방법, 저해제 첨가 등에 따라 달라질 수 있다. 이들은 대부분 젖산균의 생육에 영향을 미치는 인자들이다. 과채 및 김치 발효시 첨가되는 염과 발효온도 및 저장온도를 달리했을 때 발효식품의 맛, 냄새, 색도, 염도, 조직 상태, 산도, pH, 당, 유기산, 영양 성분 등과 같은 물리화학적 품질과 관능적 품질이 달라진다고 보고되고 있다<sup>(48,66,67-71,72-87)</sup>.

김치를 저온에서 발효시키면 중온 또는 고온에서 발효시킬 때보다 숙성에 소요되는 시간은 훨씬 오래 걸리지만 휘발산, 탄산, 알콜 등 김치의 풍미에 좋은 영향을 미칠 수 있는 성분들의 양이 많아져 관능검사에서 좋은 평가를 받게된다는 연구결과들도 많다<sup>(49,88-93)</sup>. 김치 및 과채를 저온에서 발효시킨 것과 중온 또는 고온에서 발효시킨 것 간에 발효에 관여한 젖산균들의 종류와 발효양상이 다르다는

연구결과들<sup>(47,48,52-54,57,63,94-96)</sup>과 연관시켜 볼 때 저온 발효시의 좋은 풍미는 저온 발효에 관여하는 젖산균들의 생리적인 특성에 의해 야기된 것이라 볼 수 있다.

과채발효는 효소나 발효에 참여하는 각종 미생물의 분비효소에 의하여 재료에 함유된 탄수화물을 중요한 기질로 하여 아미노산, 비타민 및 무기질이 존재하는 배지에서 일어나는 일종의 발효과정으로서 재료에 함유된 당에 의해, 그리고 그 당을 이용할 수 있는 젖산균에 의해 맛, 냄새, 미생물의 성장, 유기산 생성 등이 영향을 받는다<sup>(72,97-101)</sup>.

최근 들어 발효성 당의 함량이 발효에 미치는 영향과 발효성 당의 함량을 조절하여 저장성을 향상시키는 연구가 진행되고 있고<sup>(102-105)</sup>, 또한 첨가하는 당을 설탕 대신 프럭토올리고당, 대두 올리고당, 이소말토올리고당과 같은 올리고당으로 대체하여 첨가, 발효함으로 올리고당의 기능성과 저장성을 향상시킨 발효제품이 연구되고 있다<sup>(106)</sup>.

젖산 발효시 일어나는 과도한 젖산의 생성과 발효 말기의 산막효모, 호기성 미생물의 성장은 젖산발효식품의 관능을 저하시킨다. 이와같은 문제점을 해결하여 저장성을 향상시키고자 pH 완충제의 사용<sup>(107-110)</sup>, 보존료의 사용<sup>(111-116)</sup>, yeast와의 혼합배양<sup>(97,117-123)</sup>, 포장방법, 저해제 첨가<sup>(124)</sup>, bacteriocin의 사용<sup>(82,86,125-136)</sup>, Co<sup>60</sup>의  $\gamma$ 선 조사 등의 방사선 처리<sup>(111-113)</sup>, 발효 말기에 번식하는 내산성 미생물을 열처리<sup>(137,138)</sup>, 냉장, 그리고 키토산, 산초추출물, 겨자유 등의 천연물의 첨가<sup>(139-143)</sup> 등에 관한 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 과채를 이용한 젖산발효음료의 개발 가능성을 조사하기 위하여 우리나라 전통채소발효식품인 동치미에서 젖산균을 분리하고, 그 중 생육능과 산생성능, 향미 생성이 우수한 젖산균을 선발한 후 혼합과채쥬스에서의 선발 젖산균의 혼합배양 조건과 식염, 당의 첨가효과 등이 비교, 조사되었고, 원심분리, 열처리, 한외여과 등이 젖산발효 음료의 품질 및 저장특성에 미치는 효과를 연구, 조사하였다.

## 제 2 절. 재료 및 방법

### 1. 재료

여러 질병의 예방과 치료에 효능이 많다고 알려진 채소와 과일, 한약재를 원료로 사용하여 주스를 제조하였다. 채소로서는 엽채류의 돌미나리, 양배추, 파아슬리, 샐러리, 근채류의 당근을 사용하였고 과일로서는 감미를 내는 사과와 대추, 한약재로는 당귀, 구기자를 사용하였다. 이중 당귀, 대추, 구기자는 시판 건조제품을, 그외의 원료는 슈퍼마켓에서 신선한 것을 구입하여 사용하였다.

### 2. 원료의 착즙과 착즙액의 배합

#### 1) 착즙과 전처리

각각의 원료를 수세, 정선한 후에 녹색채소의 경우 이취 발생이나 변색 방지를 위하여 착즙 전에 끓는 물에서 30초간 담근 다음, 즉시 찬물에서 냉각시켰다. 당근의 경우 끓는 0.05N acetic acid 용액을 이용하여 데치기를 하였으며 양배추 역시 유기황 냄새를 제거하기 위하여 마쇄시에 0.05N acetic acid를 첨가하였다. 당귀, 대추, 구기자는 물에 넣어 일정한 당도(20°Bx)가 될 때까지 끓인 후 여과하였으며 이와 같이 전처리한 원료를 녹즙기(엔젤 녹즙기)로 마쇄, 착즙하였다. 당근과 사과의 마쇄시에 ascorbic acid를 1,000-2,000 mg/crude extract(L)첨가하여 마쇄시에 발생할 수 있는 갈변화를 최소화하였다.

#### 2) 착즙액의 배합

배합비 결정은 Table 1에서 보는 바와 같이 사과, 당근, 대추, 구기자, 샐러리, 돌미나리를 3 : 3 : 1 : ½ : 1 : ½의 비율로 혼합한 것을 기본으로 하여(I구) 이에 당귀(1/2)를 더 첨가하거나(II구) 양배추(1/2), 파아슬리(1/5)를 더 첨가하였

다(Ⅲ구). 한편으로 사과, 당근의 비율을 1/3로 줄이고 녹색채소의 비율을 2-2.5 배 높게 하여 혼합하였다(Ⅳ구):

Table 1. Mixing ratio of fruit and vegetable extracts

Vegetable & fruit	I	II	III	IV
Apple	3	3	3	1
Carrot	3	3	3	1
Jujube	1	1	1	1
Lycii	1/2	1/2	1/2	1/2
Celery	1	1	1	2
Watercress	1/2	1/2	1/2	1
Angelicae Gigantis radix		1/2	1/2	1/2
Cabbage			1/2	1
Parsly			1/5	1/2

### 3. 혼합과채주스의 무균처리 및 저장방법

원료의 착즙배합액을 homogenizer로 균질화한 후 망사체(80 mesh)로 여과하고 그 여액을 냉동원심분리기로 원심분리(10,000xg, 15분)한 후 상등액을 취하여 96℃의 수욕에서 품온이 96℃가 될 때부터 15초간 열처리하거나 한외여과하였다. MW cut-off value 30,000 (선경 인더스트리, BUS 200)의 조건에서 한외여과하였다. 조제과정은 Fig. 1에 나타내었다. 가열 또는 한외여과 처리한 주스를 25 mL vial 병에 넣고 밀봉하여 5℃와 25℃에서 8주간 저장하였다.



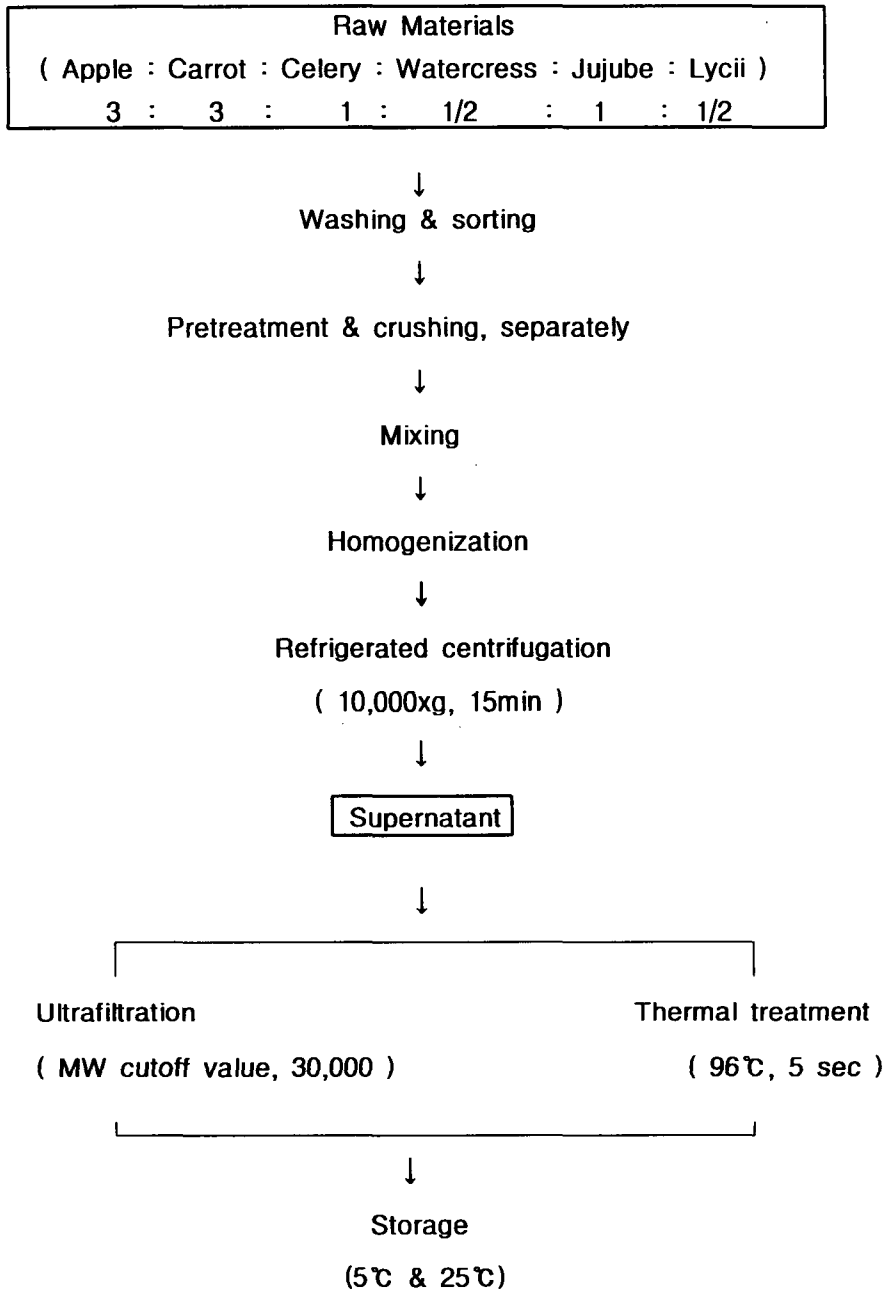


Fig. 1. Preparation of mixed fruit and vegetable juices and physical treatment for storage

#### 4. Chlorophyll 함량과 색도

##### 1) 원심분리

혼합과채주스의 재료 중 녹채로서 chlorophyll 함량이 가장 많은 셀러리와 돌미나리를 데치기(100℃, 30sec)한 후 착즙하고 착즙액을 열처리(96℃, 15sec)하여 500, 1,000, 5,000, 10,000xg에서 15분간 원심분리하고 상등액을 취하여 chlorophyll의 함량과 색도의 변화를 조사하였다.

##### 2) 재료배합

과채주스에 사용한 재료를 착즙하여 사과, 당근, 셀러리+돌미나리, 대추+ 구기자로 구분하여 각각의 pH를 측정하고 저장 중 chlorophyll 함량, 색도의 변화를 조사하였다. 이때 재료는 A구(셀러리:돌미나리=2:1)를 대조구로 하여 B구는 A : 물 = 1 : 2, C구는 A : 사과 = 1 : 2, D구는 A : 당근 = 1 : 2, E구는 A : 물 = 1 : 1, F구는 A : 대추-구기자 = 1 : 1, G구는 A : 물 = 1 : 5, H구는 셀러리-돌미나리 : 사과 : 당근 : 대추-구기자 = 1 : 2 : 2 : 1(혼합과채주스)의 비율로 배합하였으며, I구는 H구를 열처리하여 제조하였다. B구는 C, D구에 대한 대조구로, E구는 F구에 대한 대조구로, G구는 H, I구에 대한 대조구로 사용하였다.

#### 5. Haze 형성과 탁도 조사

##### 1) 원심분리

혼합과채주스를 무처리구와 열처리구로 제조하여 각각 2,500, 5,000, 10,000, 15,000xg에서 원심분리하여 5℃와 25℃에서 60일간 저장하면서 탁도 안정성을 측정하였다.

## 2) Haze 생성 모델 시스템 설정

0.02M phosphate buffer(pH 4.8)<sup>(26)</sup>에 단백질원으로서 gelatin, proline, polyproline을, 폴리페놀원으로서 catechin, tannic acid, chlorogenic acid를 농도별로 단독 첨가하거나 조합( gelatin + catechin, gelatin + tannic acid, gelatin + chlorogenic acid, proline + tannic acid, proline + catechin, proline + chlorogenic acid, polyproline + tannic acid, polyproline + catechin, polyproline + chlorogenic acid )하여 첨가한 후 5, 25, 95℃에서 30분간 방치한 후 haze 생성정도를 측정하였다.

## 3) 혼합과채주스의 haze 생성<sup>(27)</sup>

혼합과채주스를 무처리구, 원심분리구(10,000xg), 한외여과구(MW cut-off value 30,000)로 구분하여 제조하고 gelatin, proline, polyproline, catechin, tannic acid, chlorogenic acid를 농도별로 첨가한 후 5, 25, 95℃에서 30분간 방치하면서 haze를 유발한 다음 nephelometer(Monitek)를 이용하여 haze 생성정도를 측정하였다.

## 6. 젖산발효를 위한 실험 설계

재래식으로 담금, 발효한 동치미에서 젖산균을 분리, 동정 후 혼합과채주스에 접종하여 25℃에서 9일간 배양하면서 발효능, 산생성능, 향미생물 효과, 향기생성 등이 우수한 젖산균을 선발하고, 선발된 3종의 젖산균을 혼합과채주스에 혼합접종하여 당과 식염의 첨가와 배양온도 등이 혼합과채주스의 발효에 미치는 효과를 조사하여 최적발효조건을 선정하고자 하였다. 또한 전처리가 혼합과채주스의 젖산발효에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하고자 하였다. 선정된 최적조건에서 혼합과채주스를 발효 후 원심분리, 열처리, 한외여과 등의 물리적인 제균처리를 달리

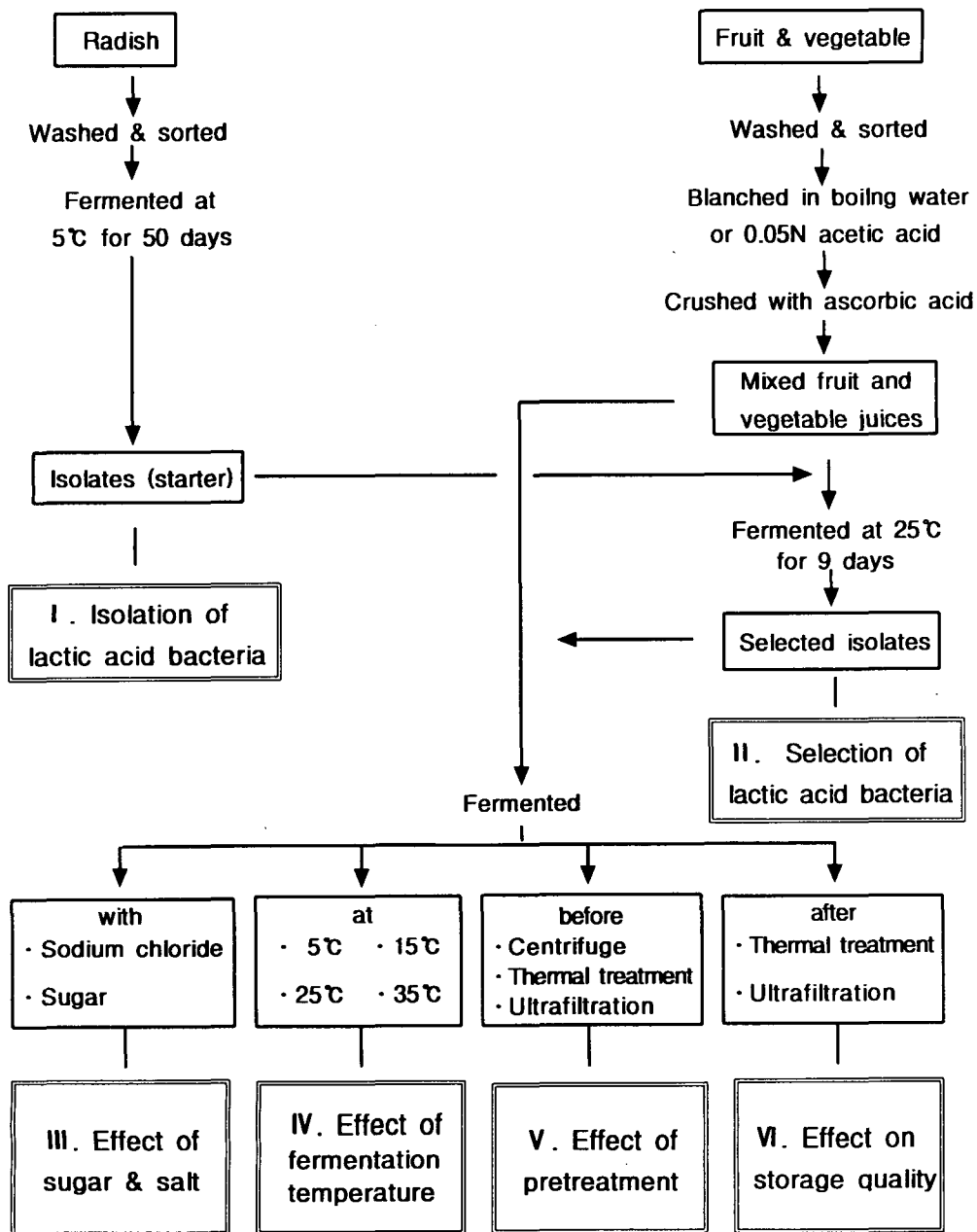


Fig. 2. Schematic diagram for fermentation of mixed fruit and vegetable juices

하여 온도에 따른 저장 중의 품질 특성을 조사함으로써 저장성이나 영양적 가치 면에서 우수한 발효과채쥬스를 제조하고자 하였다(Fig. 2).

## 7. 동치미의 제조

무(6×13cm, 6개)의 잔털과 무청을 제거하고 깨끗이 씻은 후 물기를 제거하고 소금을 묻혀 4L 유리단지 내에서 24hr 방치 후 비등 냉각수 3L를 가해 5℃에서 50일간 배양하였다.

## 8. 젖산균의 분리 및 동정

시료 0.5ml를 0.85% NaCl 4.5ml에 현탁하고 이를 10배 단위로 희석한 것을 MRS agar(Difco)와 m-Enterococcus agar(Difco) 배지에 각각 도말하여 spreader 로 분산시키고 25℃에서 48시간을 배양한 후 한 petri dish 당 5-35개의 colony를 형성하는 petri dish를 선택하여 젖산균의 colony를 분리하였다. 각 colony의 gram 염색과 catalase 반응을 확인한 다음 API 50 CH, API 50 CHL의 Api system(La Balme-Les-Grottes, France)을 사용하여 발효특성을 관찰한 후 그 결과를 API identification computer system (Bio Merieux, France)을 통해 동정하였고, 그 외 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>(144)</sup>와 光岡之足の腸内菌の世界<sup>(145)</sup>를 참조하였다.

## 9. 우수 젖산균의 선발

각 균주를 평판배지에 도말하여 25℃에서 48시간 배양 후 분리한 colony를 5 ml MRS broth에 접종하여 25℃에서 24시간 배양한 배양액을 다시 5ml MRS broth에 1% 접종하여 2차 배양하였다. 이 seed culture를 혼합과채쥬스에 0.1% 접종하여 25℃에서 9일간 발효하여, pH, 적정산도, 총젖산균수, coliform bacteria, 향미 등을 조사하였다.

## 10. 선발 젖산균의 발효조건 설정

### 1) 선발균주의 혼합비율과 접종량

과채쥬스 발효능을 비교하기 위하여 3개 균주를 선택하고 MRS 배지 5ml에 각 균주 배양액 50 $\mu$ l를 접종하여 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 전배양하였다. 전배양액을 일정 비율로 배합하여 과채즙의 0.01, 0.10, 1.00%로 접종하여 25 $^{\circ}$ C에서 9일간 발효하면서 발효 기간별로 당도, pH, 적정산도, 총젖산균수를 비교, 분석하였다.

### 2) 당의 첨가

**당의 종류** 과채즙에 glucose, fructose, sucrose, fructooligosaccharide (미원), isomaltooligosaccharide(대상)를 최종 당도가 20 $^{\circ}$ Brix가 되게 각각 첨가하고, 선발된 세 균주를 과채즙의 0.01%가 되게 접종하여 25 $^{\circ}$ C에서 9일간 발효하였다.

**당의 농도** Fructooligosaccharide의 농도를 0, 10, 15, 20, 25, 30%(w/v)로 조절하여 과채즙에 첨가하고 25 $^{\circ}$ C에서 9일간 발효시켰다.

**당 첨가시기** 선택된 당을 발효 전에 첨가하여 발효한 구와 발효가 완료된 후 첨가한 구로 나누어 관능평가를 실시하였다.

### 3) 식염(NaCl)의 첨가

Fructooligosaccharide를 15% 함유하는 과채쥬스에 식염농도를 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8%로 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 9일간 배양하면서 pH, 적정산도, 젖산균수, coliform bacteria를 측정하고 기호도 검사를 실시하였다.

### 4) 발효 종점 결정

혼합과채쥬스(fructooligosaccharide 15%, NaCl 0.2%)를 25 $^{\circ}$ C에서 4일간 배양하면서 기호도 검사를 실시하여 발효적정시기를 정하고 그때의 pH 값을 기준으로

발효중점을 결정하였다.

#### 5) 발효 온도

혼합과채주스에 starter 0.01%, fructooligosaccharide 15%, NaCl 0.2%를 첨가하여 5, 15, 25, 35℃의 4가지 온도에서 27일 동안 배양하고, 미생물, pH, 적정산도, 유기산, 유리당, 점도, 색도 등을 비교, 분석하였다.

### 11. 물리적 제균처리를 달리한 과채발효

채소와 과일의 착즙액을 배합하고 여기에 염 0.2%, fructooligosaccharide 15%를 첨가하여 다음과 같은 처리를 한 후 15℃에서 12일간, 25℃에서 4일간 배양하거나, 과채주스를 15℃에서 6일간, 25℃에서 3일간 발효 후 다음과 같은 처리를 하였다.

**원심분리** 혼합과채주스 또는 발효과채주스를 고압살균한 250ml centrifuge cell에 200ml를 넣은 후 10,000×g로 15분간 냉동원심분리하였다.

**가열살균** 혼합과채주스 또는 발효과채주스를 4℃에서 냉동원심분리 후 상등액을 비등수에서 품온이 96℃가 될 때부터 15초간 가열살균하였다.

**한외여과(ultrafiltration)** 냉동원심분리 후의 상등액을 한외여과기(신화 엔지니어링)를 이용하여 한외여과(ultrafiltration)하였다. 이때, UF membrane은 GR61pp-30,000 (Approxe cut off value MW)인 것을 사용하였다.

### 12. 저장방법

원심분리, 가열살균, 한외여과한 발효과채주스를 살균한 5~20ml bial bottle에 담아서 clamper로 밀봉한 후 5℃와 25℃에서 8주간 저장하였다. Starter를 접종하지 않고 자연발효를 한 구, starter를 첨가하여 발효한 구, 발효 후 96℃에서 15초간 열처리과정을 거친 구, 발효 후 한외여과한 구로 구분하여 저장하였다.

### 13. 혼합과채쥬스의 품질 분석

#### 가. 이화학적 검사

##### 1) 수소이온농도(pH) 및 적정산도

시료 10mL를 pH meter(Suntex, model sp-5A)로 수소이온농도(pH)를 측정한다. 다음, pH 8.3이 될 때까지 0.1N NaOH를 가하여 적하하고 시료 100mL당 0.1N NaOH 용액의 소비 mL수를 적정산도로 나타내었다.

##### 2) 순고형분

시료 10 mL를 알루미늄 용기에 담고 dry oven(100-110°C)에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 무게를 측정하여 계산하였다.

##### 3) 가용성 고형분

발효액을 굴절당도계(Hand refractometer, No. 507-I, Japan)를 사용하여 가용성 고형분을 측정하였다.

##### 4) 환원당

환원당은 시료 1 mL를 증류수로 100배 희석하여 DNS(dinitrosalicylic acid) 법으로 정량하였다. 검량곡선은 특급무수 포도당용액(0.2 - 2.0 mg/mL)을 만들어 구하였다.

##### 5) 유리당

시료 15mL를 10,000rpm에서 20분간 원심분리하고 상등액을 취하여 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 여액 0.4mL를 HPIC(Dionex)에 injection하여 Table 2



와 같은 조건으로 정량 분석하였다.

Table 2. Operating conditions of HPIC for determination of free sugars

Instrument	Dionex BioLC
Column	Carbopak PA-1 (anion exchange column)
Eluent A	150mM NaOH
B	150mM NaOH + 600mM NaOAc
Gradient	0 ~ 30% B in 30min
Detector	ED 40
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	0.4mL

#### 6) 유기산

시료 15mL를 10,000rpm에서 20분간 원심분리하고 상등액을 취하여 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과한 후 여액 25 $\mu$ L를 HPLC에 injection하여 분석하였다. 칼럼은 Aminex HPX-87H, 용매는 Sulfuric acid(0.008N)를 사용하였으며 flow rate은 0.5 mL/min, injection volume은 20  $\mu$ L로 조정하여 정량분석하였다.

#### 7) L-ascorbic acid

시료 10 mL를 취하여 15,000xg에서 10분간 원심분리하고 상등액을 취하여 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하고 HPLC로 분석하였다. 칼럼은  $\mu$ -capcell NH<sub>2</sub>, 용매는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>CN(1:3)을 사용하였으며 flow rate은 1.5 mL/min, injection volume은 20  $\mu$ L로 조정하여 정량분석하였다.

8) 색도

액체용 accessory가 부착된 색도계(colorimeter, CHROMA METER CR-200, Minolta)를 사용하여 시료의 색도를 측정하였다. Color space는 Huter 색체계인 L, a, b로 조정하여 측정하였다.

9) 점도

발효액을 일정온도(8℃)를 유지하면서 점도계(viscometer BM, SANYO)를 사용하여 spindle No.2로 100rpm에서 2분간 회전시키면서 점도를 측정하였다.

Table 3. Operating condition of HPLC for determination of chlorophylls in mixed fruit and vegetable juices

Instrument	Shimadzu LC10AD		
Column	STR ODS-II 4.6mm x 15cm, Shimadzu		
Column temperature	40℃		
Detector	SPD-M10A(Diode array detector), Shimadzu		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	20 $\mu$ L		
Integrator	Shimadzu C-R6A Chromatopac		
Mobile phase			
	Solvent A - Methanol : Water ( 75 : 25 )		
	Solvent B - Ethyl acetate ( 100 )		
Gradient table	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	100	0
	10	30	70
	14	0	100
	25	0	100

#### 10) Chlorophyll

시료 10 mL를 취하여 acetone 15 mL를 첨가하고 2분간 잘 흔들어 섞은 후 Whatman filter paper 1번과 42번으로 여과한 후 25 mL 정용 flask에 넣고 acetone으로 25 mL로 정용하고 다시 0.45 $\mu$ m nylon syringe filter로 여과하여 HPLC로 chlorophyll a와 b, pheophytin a와 b를 분석하였다(Table 3).

#### 11) 총페놀물질

시료 10 mL를 증류수로 희석하여 100 mL로 정용한 뒤 1 mL를 취하여 Folin-Ciocalteu 시약 5 mL를 첨가하고 30초간 섞은 다음 15 mL의 sodium carbonate를 첨가하여 잘 혼합한 다음 증류수로 10 mL로 정용하고 20 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치한 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서 gallic acid를 사용하였으며 총페놀물질의 양은 gallic acid equivalent( GAE mg/L (w/v))로 나타내었다.

#### 12) 페놀화합물

시료 15mL에 methanol을 가하여 80% methanol 용액으로 만들고 60 $^{\circ}$ C에서 환류추출하여 농축하였다. 이에 ethyl acetate mL을 가하여 추출, 농축하여 얻은 분획에 methanol을 가하여 TLC plate에 점적하였다. 전개용매로는 toluene/ethylacetate/formic acid(5:4:1)와 ethylacetate/formic acid/acetic acid /water(10:1.1:1.1:2.7)를 사용하였으며 발색시약으로 Folin-Ciocalteu 시약은 사용전 증류수로 1:1로 희석하여 사용하였고 FeCl<sub>3</sub>/K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>는 각각 1%, 2% 수용액을 사용전 동량씩을 혼합하여 분무하거나 FeCl<sub>3</sub>를 0.5N HCl에 녹여 사용하였다.

#### 13) 총단백질

단백질 정량은 Bradford 방법에 의하여 수행하였다. 정량표준곡선용 단백질

은 bovine serum albumin을 사용하였다. 즉 시료를 0.1 mL 취한 후 단백질 염색 시약 5 mL 첨가하여 잘 섞은 다음 상온에서 30분간 방치한 후 595 nm에서 흡광도값을 측정하였다.

#### 14) 아미노산

시료 5 mg을 취하여 6N HCl 15 mL를 가한 다음 이를 110°C 항온기에서 24 시간 가수분해시킨 뒤 방냉하여 50 mL 정용플라스크에 옮기고 탈이온수로 정용한 후 0.2 µg membrane filter로 여과하여 Pico-Tag 방법으로 유도체화시켰다. 칼럼은 Pico-Tag(3.9 x 300 mm, Waters), 검출기는 UV(254 nm), 칼럼온도는 40°C, 이동상으로는 140 mM sodium acetate(6% acetonitrile)과 60 mM acetonitrile을 사용하였으며 30분 간격으로 아미노산을 분석하였다.

#### 15) Cloud stability

시료를 15 mL falcon tube에 시료를 넣고 시료표면으로부터 조심스럽게 10 mL를 취하여 320xg에서 10분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 Whatman filter paper 41번으로 여과하고 660 nm에서 흡광도값을 측정하였다.

#### 16) Haze

시료 30 mL를 50mL falcon tube에 넣고 5, 25, 95°C 수욕에서 30분간 방치한 다음 nephelometer로 haze 생성정도를 측정하였으며 결과는 nephelos turbidity units(NTU)로 나타내었다.

#### 나. 향기성분 분석

**향기성분 포집 및 분석** 향기성분의 포집은 dynamic headspace법으로 purge and trap system인 Tekmar LSC 3000(Tekmar, U.S.A)을 사용하였다. 130°C에서

40분간 건조시켜 잔류 휘발성 성분들을 완전히 제거한 시료병(55mm O.D.×120mm)에 시료 5g을 취하여 40℃의 수욕상에서 35psi의 질소로 100ml/min의 속도로 30분간 purging하여 휘발된 향기성분은 60~80mesh의 tanex GC(polymer based on the 2,6-diphenyl-p-phenyl oxide)가 충전된 흡착관(12"×1/8" stainless steel)에 흡착시켰다. 이때 line, valve, mount의 온도는 100, 250, 40℃로 하였으며 stand-by temperature는 35℃로 하였다. 흡착 후 수분제거를 위하여 5분간 dry purging을 실시하였고, 흡착된 향기성분을 탈착시키기 위하여 흡착관을 220℃로 예비 가열하고 225℃에서 3분간 탈착하였다. 탈착 후 trap 내부에 남아 있는 비흡착 물질을 제거하기 위하여 220℃에서 30분간 conditioning시켰다. 발효과채주스의 휘발성 향기성분을 분석하기 위한 GC의 조건은 Table 4와 같다.

Table 4. Operating conditions for flavor analysis by GC

Instrument	Hewlett Packard GC 5890 II plus
Column	Supelcowax <sup>TM</sup> 10 (60m×0.32mm×0.25 μm)
Oven temp.	35(10)-1.5-220(10)
Injector temp.	230℃
Detector temp.	250℃
Detector	FID
Carrier gas	1.2ml He/min
Split ratio	1:10
Make-up gas	He, 25ml/min
Total head press.	12.5 psi

발효과채주스의 향기성분의 양적인 변화를 비교분석하기 위하여 GC 검출기로 사용된 FID의 response(area count)를 자동적분기(HP3396A, Hewlett Packard, USA)

로 측정하여 상대적인 값으로 나타내었다. 자동적분기의 조작 조건은 zero=10, attenuation=4, chart speed=0.5cm/min, area rejection=50,000, threshold=5, peak width=0.04, range=1, signal=40으로 하였다.

**향기성분의 동정** 향기성분을 동정하기 위하여 gas chromatograph mass spectrometer(GC/MS)를 사용하여 각각의 분리된 성분에 대한 질량스펙트럼을 얻어 wiley nbs 138 library의 spectrum과 비교하여 분리된 성분을 동정하였다. 이때 사용된 MS의 조건은 Table 5와 같다.

Table 5. Operating conditions for flavor analysis by GC-MS

Instrument	Hewlett Packard 5972 series mass Selective Detector
Column	Supelcowax <sup>TM</sup> 10 (60m×0.32mm×0.25 μ m)
Oven temp.	35(10)-1.5-220(10)
Injector temp.	180℃
Detector temp.	280℃
Mass range	30~300

**Olfactory evaluation** GC와 GC MSD로 분석한 후 분리된 각각의 성분에 대한 관능적인 특성을 나타내었다. GC column에 의해서 분리된 성분은 관능검출기(Olfactory detector, OD)와 불꽃이온화검출기(flame ionization detector, FID)로 분지시킨 다음 FID에 의하여 peak 1이 나오기 시작하는 순간 관능검사요원이 관능검출기에서 용출되는 성분의 냄새를 맡은 다음 즉시 냄새의 특성을 기술하도록 하였다. 패널의 감각둔화현상을 방지하기 위하여 3명의 패널이 순서대로 번갈아가며 냄새를 맡도록 하였다.

#### 다. 효소활성과 미생물 검사

**Peroxidase 활성**<sup>(3)</sup> 0.2M acetate buffer(pH 5.40) 3.00 mL, guaiacol 용액 0.05 mL, 시료 0.10 mL와 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 0.03 mL를 혼합하고 blank는 증류수를 기준으로 하여 분광광도계로 436 nm에서 흡광도의 변화를 측정하고 그 기울기를 계산하여 효소 활성을 구하였다. 효소 활성은 1분간에 흡광도 0.001 증가시킨 것을 1 unit로 하였다.

**Polyphenol oxidase 활성** 0.2M catechol 0.2 mL를 3 mL cuvette에 넣고 50 mM 인산완충용액(pH 7.5) 2.2 mL와 시료 1 mL를 가하여 420 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구로는 시료 대신 증류수를 첨가하였다. 효소활성은 실온에서 1분간에 시료 1 mL당 생성된 반응물이 흡광도를 0.01 증가시키는 것을 1 unit로 하였다.

**미생물 검사** 총균, 효모, coliform bacteria는 멸균 petri dish에 각각 plate count agar(PCA, Difco), YPD agar(Difco), Maconkey agar(Difco)를 분주하여 냉각한 후 시료 0.1ml를 각 배지에 도말하여 spreader로 분산시키고 30~37°C에서 48±3시간을 배양한 후 형성된 집락을 계수하였다. 총젖산균은 0.02% sodium azide를 첨가한 MRS agar(Difco) 배지를 사용하여 pour법으로 colony수를 측정하였다.

#### 라. 관능검사<sup>(146)</sup>

선호도 검사는 여대생 40명을 임의로 선정하여 실시하였고, 그 결과는 순위함에 의해서 통계처리하였다. 당첨가시기를 결정하기 위한 관능검사는 이점기호검사를 실시하고 그 결과는 단측검정에 의해 유의성 차이를 비교하였다.

각 특성의 강도평가는 훈련된 pannel 10명을 선정하여 선척도법(7cm)으로 실시하였다. 시료의 온도는 4~8℃로 하였다. 결과는 분산분석(ANOVA)과 Duncan의 다범위검정에 의하여 유의성 검토를 실시하였다.



## 제 3 절. 결과 및 고찰

### 1. 혼합과채쥬스의 품질특성

혼합과채쥬스의 원료로 사과, 당근, 대추, 구기자, 당귀, 셀러리, 돌미나리, 양배추, 파아슬리를 선택하여 전처리 후 착즙하고 선정된 원료의 조합과 배합비에 따른 관능검사를 실시하고 기호성을 비교하여 혼합과채쥬스를 제조(Fig. 1-1)하고 무처리구, 열처리구, 한외여과구로 구분하여 5℃와 25℃에서 8주간 저장하면서 품질 특성을 비교하였다.

#### 가. 이화학적 특성

##### 1) pH와 적정산도

무처리구와 열처리구의 초기 pH는 각각 4.83과 4.82로 비슷하였으며 한외여과구의 경우 5.85로 측정되었다. 혼합과채쥬스를 5℃에서 8주 저장하는 동안 열처리구와 한외여과구의 pH 변화는 거의 없었으나 무처리구의 경우 8주 후 pH 4.05로 떨어졌다. 25℃에서 8주 저장실험에서는 무처리구의 pH 변화가 심하여 초기 pH가 4.83에서 2주 후에 3.80으로 급격히 떨어졌으나 열처리구와 한외여과구에서는 8주 후 pH가 각각 4.73, 5.75로 큰 변화가 없었다.

적정산도는 무처리구의 경우 0일에는 30.3(0.1N NaOH mL)이었으나 25℃에서 2주가 경과함에 따라 69.56으로 크게 증가하였고 5℃에서 8주 저장후에는 46.53으로 증가한 것에 비해 열처리구에서는 30.3에서 36.03-37.07로, 한외여과구에서는 18.01에서 21.26-24.08로 크게 증가하지는 않았다. 무처리구의 경우 25℃에서의 저장에서 젖산균에 의한 발효나 잡균번식에 의한 부패로 pH가 감소하고 적정산도가 증가한 것으로 보여지나 무균처리를 한 열처리구와 한외여과구에서는 온도

Table 1-1. Changes in pH, titratable acidity, total solid content, soluble solid and reducing sugar content of mixed fruit and vegetable juices during storage

Storage time (week)	5°C			25°C		
	A	B	C	A	B	C
<b>pH</b>						
0	4.83	4.82	5.85	4.83	4.82	5.85
2	4.74	4.80	5.85	3.80	4.78	5.83
4	4.60	4.78	5.80	-	4.73	5.82
8	4.05	4.75	5.79	-	4.73	5.75
<b>Titratable acidity</b>						
0	30.30	30.30	18.01	30.30	30.30	18.01
2	33.03	31.03	20.01	69.56	32.35	20.66
4	38.02	32.53	20.51	-	36.78	22.44
8	46.53	36.03	21.26	-	37.07	24.08
<b>Total solid content (%)</b>						
0	8.49	8.15	4.15	8.49	8.15	4.15
2	8.48	8.17	4.20	8.68	8.23	4.46
4	8.37	8.29	4.25	-	8.26	4.40
8	8.30	8.25	4.21	-	8.34	4.22
<b>Soluble solid (°Bx)</b>						
0	11.20	11.00	9.00	11.20	11.00	9.00
2	11.20	11.10	9.00	11.00	10.85	9.10
4	11.00	11.05	9.05	-	10.90	9.05
8	10.75	10.90	8.95	-	10.75	8.80
<b>Reducing sugar content (%)</b>						
0	9.21	8.33	7.48	9.21	8.33	7.48
2	8.31	8.12	7.34	6.52	7.95	7.23
4	7.58	7.94	7.26	-	7.73	7.01
8	6.21	7.84	7.07	-	7.65	6.98

A : Control

B : Supernatant heated for 15sec at 96°C

C : Permeates through a ultramembrane filter

- : Not measured because of putrefaction.

와 저장기간에 따른 pH와 적정산도의 변화가 거의 없었다(Table 1-1).

## 2) 순고형분

Table 1-1에서 보는 바와 같이 무처리구와 열처리구의 경우 초기값이 8.49, 8.15%로 비슷한 값을 보이나, 한외여과구의 경우 고형분이 다량 제거되어 4.15%로 낮은 값을 보였다. 무처리구의 경우 저장기간이 경과함에 따라 부패가 심하여 측정이 힘들었으며 열처리구와 한외여과구는 저장온도와 기간에 따른 큰 변화는 없는 것으로 나타났다.

## 3) 가용성 고형분

저장 직후 무처리구와 열처리구가 11.2, 11.0°Bx로 나타났다. 한외여과구에서는 9°Bx로 무처리구와 열처리구에 비하여 가용성 고형분이 낮은 편이었고 저장기간에 따라 감소하는 경향을 보였다(Table 1-1).

## 4) 환원당

초기에 무처리구가 9.21%, 열처리구가 8.33%, 한외여과구가 7.48%로 무처리구의 환원당 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 열처리구와 한외여과구 또한 5°C 저장실험구에 비해서 환원당 함량이 낮은 것으로 나타났고 5°C 저장실험구의 경우 8주 후 환원당 함량이 무처리구가 6.21%, 열처리구가 7.84%, 한외여과구가 7.07%로 무처리구의 값이 크게 떨어진 데 비해 열처리구와 한외여과구에서는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다(Table 1-1).

## 5) 유리당

혼합과채주스의 유리당을 분석한 결과는 Table 1-2와 같다. 혼합과채주스의 유리당은 저장 직후 glucose가 3.02-5.45 %, fructose가 3.03-3.62 %로 glucose가

더 많은 것으로 나타났으며 한외여과구에서 가장 함량이 낮았다. 25℃ 저장 중 무처리구에서의 유리당 감소가 가장 큰 것으로 나타났으며 열처리구와 한외여과구에서는 저장 중 감소의 폭이 적은 것으로 나타났다.

Table 1-2. Change in free sugar content of mixed fruit and vegetable juices during storage

( unit : % )

Free sugar	Storage time (week)	5℃			25℃		
		A	B	C	A	B	C
Fructose	0	3.56	3.62	3.10	3.56	3.62	3.10
	4	3.23	3.49	3.04	2.71	3.40	2.99
	8	3.06	3.42	3.03	-	3.11	2.95
Glucose	0	5.45	5.27	4.41	5.45	5.27	4.41
	4	4.53	4.65	4.31	3.21	4.63	4.15
	8	3.02	4.20	4.09	-	4.25	4.02

A, B, C : Refer to footnote of Table 1-1.

- : Not measured because of putrefaction.

#### 6) 유기산

혼합과채즙스에 존재하는 유기산으로는 citric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid, acetic acid, propionic acid 등이 있으며 저장 기간중 함량변화를 Table 1-3에 나타내었다.

혼합과채즙스에는 malic acid가 가장 많았으며 그 다음으로 succinic acid, citric acid, acetic acid가 많은 것으로 나타났으며 lactic acid와 propionic acid는 소량 존재하는 것으로 나타났다. 저장온도와 저장기간별 변화를 보면, 무처리구의 경우 5℃와 25℃에서 모두 초기 함량이 적었던 lactic acid가 월등히 증가하는 것을 볼 수

Table 1-3. Change in organic acids of mixed fruit and vegetable juices during storage

( unit : mg % )

Organic acid	Storage time (week)	5℃			25℃		
		A	B	C	A	B	C
Citric acid	0	250.8	203.9	209.0	250.8	203.9	209.0
	4	65.2	175.9	206.9	19.5	187.5	205.6
	8	58.1	180.4	201.8	11.0	182.9	199.2
Malic acid	0	542.6	530.5	526.3	542.6	530.5	526.3
	4	380.9	503.5	505.8	276.0	485.0	510.6
	8	295.4	468.3	498.0	210.5	399.6	502.8
Succinic acid	0	360.5	300.6	265.7	360.5	300.6	265.7
	4	145.2	185.3	197.0	142.5	223.5	195.8
	8	120.6	213.5	196.2	25.4	260.5	192.5
Lactic acid	0	45.3	14.2	40.5	45.3	14.2	40.5
	4	423.0	14.0	35.0	620.5	13.0	36.5
	8	402.5	13.0	35.0	716.8	13.0	35.6
Acetic acid	0	210.2	205.0	155.6	210.2	205.0	155.6
	4	188.0	201.5	153.5	192.8	202.5	155.0
	8	162.4	200.2	154.0	168.5	200.3	154.8
Propionic acid	0	83.7	21.0	80.5	83.7	21.5	80.5
	4	65.5	22.5	80.2	48.5	20.6	79.1
	8	54.5	24.4	79.0	17.2	19.5	78.5

A, B, C : Refer to footnote of Table 1-1.

있고 25℃에서는 8주까지 계속 증가하는 경향을 보였으며 malic acid, succinic acid, citric acid, acetic acid, propionic acid 등은 저장기간이 증가함에 따라 감소하

는 것으로 나타났다. 열처리구의 경우 무처리구에 비해 초기의 유기산 함량이 조금 감소하는 것으로 나타났고 lactic acid의 경우 저장기간동안 거의 측정되지 않았으며 5℃와 25℃에서 8주 저장기간 동안 malic acid와 succinic acid의 감소외에 다른 유기산의 양에는 큰 변화가 없었다. 한외여과구 역시 저장기간 동안 유기산 함량의 변화가 조금 감소하거나 거의 없었으며 열처리구와 비교해 볼 때 lactic acid가 다소 많은 것으로 나타났다. 미생물이 검출되지 않았음에도 불구하고 열처리구와 한외여과구에서의 유기산 함량 변화는 유기산 효소의 존재나 그 밖의 다른 요일들에 의한 것으로 추측된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 무처리구의 경우 저장기간 동안 젖산발효에 의해 lactic acid가 크게 증가한 것으로 나타났으며 저장기간 동안 한외여과구에서의 유기산 변화가 적어 장기간과채주스를 저장하는데 유리할 것으로 판단되었다.

#### 나. 효소활성과 미생물검사

##### 1) 효소활성

Peroxidase와 polyphenol oxidase의 활성을 측정하여 % relative activity로 표현하였다.

$$\% \text{ Relative activity} = \frac{\text{Activity remaining during storage}}{\text{Original activity in mixed fruit and vegetable juices}}$$

Table 1-4에서 보는 바와 같이 열처리구와 한외여과구에서는 peroxidase와 polyphenol oxidase의 활성이 나타나지 않았는데 무처리구의 경우 저장초기를 100%로 보았을 때 저장기간이 경과함에 따라 peroxidase와 polyphenol oxidase 모두 점점 감소하는 경향을 보였다. 8주 후 peroxidase의 % remaining activity는 5℃와 25℃에서 각각 27%와 41%인 것으로 나타났고 polyphenol oxidase의 경우

5℃와 25℃에서 각각 33%와 54%로 나타나 저장온도가 높을수록 효소활성이 높은 것으로 나타났으며 이는 peroxidase와 polyphenol oxidase의 최적온도와 비슷하기 때문에 유추할 수 있다. Polyphenol oxidase activity와 색도와 관계에서 특히 a 값(적색도)과 높은 상관관계가 있으며 과일주스에서의 갈색소의 형성은 phenol 화합물의 양, 산소존재유무, polyphenol oxidase activity에 의해 영향을 받는다고 보고를 고려해 볼 때 이들 효소활성이 나타나지 않은 열처리구와 한외여과구에서는 무처리구에 비하여 저장 중 색도 변화가 적을 것으로 사료된다.

Table 1-4. Changes in peroxidase(POD) and polyphenol oxidase activity in mixed fruit and vegetable juices during storage(control)

(unit : % relative activity)

Storage time (week)	POD		PPO	
	5℃	25℃	5℃	25℃
0	100	100	100	100
2	72	81	77	87
4	54	68	65	76
8	27	41	33	54

## 2) 총균수

혼합과채주스의 저장온도와 저장기간에 따른 미생물수를 측정 한 결과는 Table 1-5에 나타내었다.

열처리구와 한외여과구의 경우 저장기간동안 미생물이 전혀 발견되지 않았으나 무처리구는 저장초기에  $5.6 \times 10^1$ , 2주 후에 5℃와 25℃에서  $1.2 \times 10^4$ ,  $1.6 \times 10^4$ 으로 급격히 증가하며 그 이후로도 계속 증가하는 것으로 나타나 미생물에 의한 품질저하가 우려된다.

Table 1-5. Viable cell counts of mixed fruit and vegetable juices during storage

( unit : CFU/mL )

Storage time (week)	5°C			25°C		
	A	B	C	A	B	C
0	5.6x10 <sup>1</sup>	nd	nd	5.6x10 <sup>1</sup>	nd	nd
2	1.2x10 <sup>4</sup>	nd	nd	1.8x10 <sup>4</sup>	nd	nd
4	1.5x10 <sup>4</sup>	nd	nd	1.2x10 <sup>5</sup>	nd	nd
6	2.6x10 <sup>4</sup>	nd	nd	-	nd	nd
8	2.5x10 <sup>5</sup>	nd	nd	-	nd	nd

A, B, C : Refer to footnote of Table 1-1.

nd : Not detected.

#### 다. 색도

주스에 있어서 색깔은 외관적 품질특성을 좌우하는 요인으로 중요한 역할을 한다. 처리방법을 달리한 혼합과채주스의 저장중 색도변화는 Table 1-6에 나타내었다. 육안으로 관찰한 결과 무처리구와 열처리구는 주황색으로 주스액이 불투명하였고, 한외여과구는 황색으로 투명하였다. 밝기를 나타내는 L 값의 경우 무처리구와 열처리구는 저장초기에 25.10, 25.35로 비슷한 값을 나타내었고 한외여과구는 29.47로 다른 처리구에 비해 컸으며 전체적으로 25°C 저장실험구에서 L값의 감소가 더 두드러졌다. Greenness를 나타내는 -a 값의 경우 무처리구의 -a 값이 1.38로 가장 컸으며 저장기간이 증가함에 따라 무처리구의 변화가 가장 심하였고 한외여과구에서는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.



Yellowness를 나타내는 b 값은 무처리구와 열처리구에서는 저장 중 대체로 큰 변화가 없었으나 한외여과구의 경우 증가하는 경향을 보였다.

Table 1-6. Changes in color values of mixed fruit and vegetable juices during storage

Hunter color	Storage time (week)	5°C			25°C		
		A	B	C	A	B	C
L	0	25.10	25.35	29.47	25.10	25.35	29.47
	2	23.63	24.24	29.14	26.49	23.02	27.16
	4	22.02	23.92	29.06	-	22.99	25.64
	6	21.37	23.12	28.37	-	22.15	25.02
	8	-	23.09	28.16	-	21.68	25.60
a	0	-1.38	-0.52	-0.48	-1.38	-0.52	-0.48
	2	0.22	-0.31	-0.33	3.79	0.15	-0.37
	4	0.33	-0.21	-0.37	-	0.34	-0.42
	6	1.85	1.36	-0.39	-	2.45	0.05
	8	-	2.20	-0.36	-	3.61	0.20
b	0	8.93	10.35	3.80	8.93	10.35	3.80
	2	8.88	8.60	3.80	7.82	9.17	3.91
	4	8.93	8.83	3.92	-	9.20	4.45
	6	10.19	10.45	7.40	-	9.57	5.81
	8	-	10.89	8.96	-	9.75	7.38

A, B, C : Refer to footnote of Table 1-1.

\* : Not measured because of putrefaction.

이상 열처리, 한외여과처리와 저장기간에 따른 혼합과채주스의 품질특성을 비교한 결과를 요약하면 5℃에서 8주 저장하는 동안 무처리구의 변화가 가장 심하여 pH 저하, 환원당의 감소, lactic acid의 증가, L-ascorbic acid의 감소, 효소활성에 의한 색도의 변화 등을 야기하는 결과를 초래하며 25℃ 저장구에서는 그 변화가 더 심한 것으로 나타났다. 열처리구와 한외여과구에서는 대체적으로 성분에 큰 변화가 없었으며 특히 한외여과구에서 더 안정한 것으로 나타나 한외여과 처리와 저온저장에 의하여 저장수명을 더 연장시킬 수 있을 것으로 기대된다.

## 2. 혼합과채주스의 색도 변화 및 탁도 안정성

본 연구에서 제조한 혼합과채주스는 여러가지 천연색소들을 함유하고 있다. 당근에서 비롯한 carotenoid는 황색색소 물질로 생체대사에 중요한 역할을 하며 사과, 대추, 구기자에 존재하는 antocyanin은 산성용액에서 빨간 색을 띠는 색소로 저장 중 효소적 갈변화, ascorbic acid 분해, 마이알 반응, 페놀 물질과의 중합 등으로 인하여 손실될 가능성이 있다. 샐러리, 돌미나리에 존재하는 녹색소인 chlorophyll은 산성용액에서 또는 가열에 의하여 포오피린 환에 결합하고 있는 마그네슘 이온이 2개의 수소이온으로 치환되어 갈색의 pheophytin을 형성하게 되며 빛에 노출되었을 경우 일중항 산소를 생성하여 지방산화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이러한 반응은 비가역적으로 급속하게 일어나 야채가공시 색깔변화에 큰 영향을 미치게 된다. 본 실험에서 제조한 혼합과채주스는 초기 pH가 4.8로 산성용액에서 안정하다고 알려져 있는 carotenoid나 antocyanin에 비하여 비교적 열에 예민하고 가열에 의한 색소의 파괴가 심한 chlorophyll 분해에 의한 색도의 변화가 일어나리라 추정하고 저장 중 혼합과채주스의 색깔변화에 주로 영향을 미치는 chlorophyll의 함량과 색도의 변화를 조사하였다.

## 가. 혼합과채쥬스의 색도변화

### 1) Chlorophyll 분석조건 설정

Diode array detector(Shimadzu)를 이용하여 chlorophyll a와 b, pheophytin a와 b의 흡광도가 최대치를 나타내는 파장을 구하였으며 결과는 chlorophyll a는 430 nm와 667 nm, chlorophyll b는 430 nm, pheophytin a는 410 nm, pheophytin b는 430 nm에서 최대흡광도를 나타내는 것으로 나타났다. 따라서 430 nm에서 최대흡광도를 나타내는 chlorophyll a와 b, pheophytin b를 분석하였으며 pheophytin a는 410 nm에서 분석을 수행하였다.

### 2) 원심력과 처리방법에 따른 chlorophyll 함량과 색도의 변화

재료 중 녹색채소인 샐러리와 돌미나리를 2 : 1의 비율로 혼합하여 무처리, 데치기(100℃, 30초), 데치기 후 열처리(96℃, 15초)하여 1, 500, 1,000, 5,000, 10,000xg에서 원심분리하여 HPLC로 chlorophyll a와 b의 함량을 조사하고 색도변화를 관찰하였다.

Fig. 2-2와 2-3에서 보는 바와 같이 1xg에서 chlorophyll a, b는 무처리구에 서 72.33  $\mu$  mole/L, 21.04  $\mu$  mole/L 로 약 3:1의 비율로 존재하고 있는 것으로 나타났다. 데치기를 한 경우 32.91  $\mu$  mole/L, 7.875  $\mu$  mole/L, 데치후 열처리한 경우 15.662  $\mu$  mole/L, 5.585  $\mu$  mole/L로 무처리구에서의 chlorophyll a와 b의 함량이 가장 높게 측정되었다. 원심력이 커짐에 따라 세 처리구 모두 chlorophyll a, b 값이 급속히 감소했으며 특히 무처리구의 경우 0xg에서 chlorophyll a, b값이 72.33  $\mu$  mole/L, 21.04  $\mu$  mole/L에서 500xg에서 원심분리처리 후 6.1  $\mu$  mole/L, 2.295  $\mu$  mole/L로 다른 처리구에 비해 크게 감소하였고, g 값이 증가함에 따라 데치기구

에서 chlorophyll 잔존율이 가장 높은 것으로 나타났다.

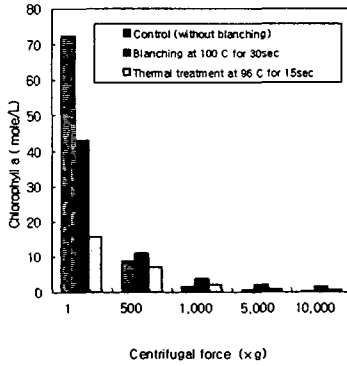


Fig. 2-2. Effect of centrifugal force on content of chlorophyll a in extracts of celery - watercress.

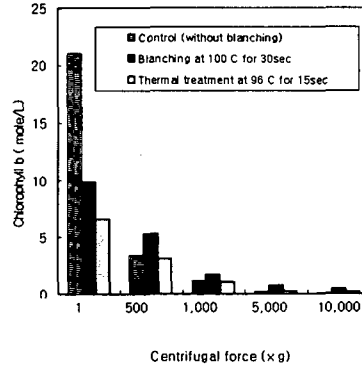


Fig. 2-3. Effect of centrifugal force on content of chlorophyll b in extracts of celery - watercress.

원심력에 따른 색도의 변화는 Table 2-1에 나타내었다. 무처리구의 경우 녹색도를 나타내는 -a 값이 1xg에서 11.04, 500xg에서 0.34, 10,000xg에서 -2.59로 급격히 감소하는 반면, 데치기구에서는 g 값이 증가함에 따라 10.12, 5.61, 3.37, 1.08, 0.54, 데치기 후 열처리구에서는 8.37, 3.14, 1.20, 0.40, 0.25로 서서히 감소하는 경향을 보여 chlorophyll a와 b함량이 많을수록 -a 값도 큰 것으로 나타났다. 여러 연구보고에서도 -a 값은 색도 측정에서 녹색도를 나타내는 parameter로서 녹색도 감소를 측정하는 지표로 사용되었다. 황색도를 나타내는 b 값(yellowness)은 전체 처리구에서 원심분리하지 않은 경우 가장 높은 값을 보였으며 데치기 후 열처리구에서는 10.86으로 다른 처리구에 비해 낮은 것으로 측정되었다. 원심력이 커짐에 따라 b 값은 감소하였으며 무처리구에서의 변화가 두드러져 10,000xg에서 3.39로 가장 낮게 나타났다. -a/b 값 또한 채소류의 변색과정에서 colorimetric parameter로

Table 2-1. Effect of centrifugal force on changes of color of extracts from celery and watercress

Hunter color	Centrifugal force (xg)	A	B	C
L	1	28.08	27.74	27.58
	500	25.74	26.61	27.16
	1000	26.88	26.06	26.58
	5000	25.80	25.47	25.39
	10000	21.51	24.09	26.17
a	1	-11.04	-10.21	-8.37
	500	-0.34	-5.62	-3.14
	1000	1.34	-3.37	-1.20
	5000	2.23	-1.08	-0.40
	10000	2.59	-0.54	-0.25
b	1	12.17	12.65	10.86
	500	6.49	10.37	8.77
	1000	5.78	8.58	8.73
	5000	4.21	7.94	7.26
	10000	3.39	6.78	6.21
-a/b	1	0.907	0.807	0.770
	500	0.052	0.541	0.358
	1000	-0.231	0.392	0.137
	5000	-0.529	0.136	0.055
	10000	-0.764	0.079	0.040

A : Control(without blanching)

B : Blanching(100°C, 30 sec)

C : Thermal treatment (96°C, 15sec after blanching)

많이 이용되어 왔는데 원심분리하지 않은 무처리구에서 0.937로 값이 가장 높았으나 -a 값과 마찬가지로 원심분리를 할 경우 가장 낮은 값을 보였으며 10,000xg에서는 -0.764로 크게 떨어졌다. 데치기구와 데치기 후 열처리구의 경우 1xg에서는 -a/b 값이 0.807, 0.770으로 나타나 열처리 온도가 높고 열처리 시간이 길수록 -a/b 값이 감소하는 것으로 나타났다. 무처리구와 마찬가지로 데치기구와 데치기 후 열처리구에서도 원심력이 증가할수록 -a/b 값은 감소하는 경향을 보였으며 -a 값과 같이 chlorophyll a와 b 함량이 감소할수록 -a/b 값도 감소하는 것으로 나타났다.

위에서 chlorophyll 함량이 가장 많은 것으로 나타난 원심분리를 하지 않은 시료를 데치기구와 데치기 후 열처리구로 구분하여 제조하고 25℃에서 96시간 동안 저장하면서 chlorophyll a와 b의 함량, pheophytin a와 b의 함량변화와 색도의 변화를 조사한 결과는 Table 2-2, 2-3, 2-4와 같다.

Table 2-2. Change in chlorophyll content of celery and watercress during storage at 25℃

Time(hr)	Chlorophyll a ( $\mu$ mole/L)			Chlorophyll b ( $\mu$ mole/L)		
	A	B	C	A	B	C
0	72.33	42.91	15.66	21.04	9.87	6.58
24	36.77	17.25	6.27	10.15	5.87	3.75
48	20.80	11.38	5.16	1.28	1.98	2.36
96	0.24	0.46	0.73	0.06	0.07	0.45

A : Control(without blanching)

B : Blanching(100℃, 30sec)

C : Thermal treatment (96℃, 15sec after blanching)

Table 2-3. Change in pheophytin content of celery and watercress during storage at 25°C

Time(hr)	Pheophytin a ( $\mu$ mole/L)			Pheophytin b ( $\mu$ mole/L)		
	A	B	C	A	B	C
0	1.54	1.92	7.03	0	0.53	1.49
24	7.17	5.57	9.66	0.32	2.18	2.62
48	16.86	5.98	11.29	4.56	4.45	3.46
96	21.71	12.60	17.67	7.07	5.37	4.51

A, B, C : Refer to footnote of Table 2-2.

무처리구의 경우 0일째 chlorophyll a와 b의 함량이 각각 72.33  $\mu$  mole/L, 21.04  $\mu$  mole/L으로 나타났으며 pheophytin a는 1.54  $\mu$  mole/L, pheophytin b는 존재하지 않는 것으로 나타난 반면 데치기 후 열처리구에서는 pheophytin a는 7.03  $\mu$  mole/L, pheophytin b는 1.49  $\mu$  mole/L로 측정되어 열처리에 의해 chlorophyll의 분해가 일어났음을 알 수 있었다. 25°C에서 96시간 동안 저장한 후 무처리구에서의 chlorophyll a의 함량은 0.24  $\mu$  mole/L로 0일째와 비교하여 볼 때 잔존율이 0.33 %로 나타났으며 데치기구에서는 1.1 %, 열처리구에서는 4.6 %로 시간의 경과에 따른 chlorophyll a의 잔존율은 열처리구에서 가장 높게 측정되었다. Chlorophyll b도 96시간 이후의 잔존율이 무처리구가 0.28 %, 데치기구가 0.7 %, 데치기 후 열처리구가 6.8 %로 열처리구에서 가장 많은 것으로 나타났다.

반면 pheophytin a와 b는 무처리구가 21.71  $\mu$  mole/L와 7.07  $\mu$  mole/L로 가장 많이 생성된 것으로 나타났고 그 다음으로 데치기구, 데치기 후 열처리구 순으로 나타났으며 이는 열처리과정 중 야채조직의 부분적인 파괴로 세포 내 존재하던 상당량의 휘발성 및 비휘발성 유기산들이 유리되어 pheophytin으로 전환되었기

때문이며 pheophytin으로 전환되지 않은 chlorophyll은 효소적 분해에 의해서 chlorophylline이나 chlorophyllide로 변화되거나 지속적인 산의 작용으로 인하여 포오피린에 존재하는 phytyl ester group이나 metyhl ester group의 가수분해로 인하여 pheophorbide로 변화된 것으로 사료된다.

색도에서는 Table 2-4에서 보는 바와 같이 전체 처리구에서 L, -a, b 값 모두 감소하는 것으로 나타났으며 -a/b 값은 무처리구가 0.907에서 -0.179로 가장 많이 감소한 것으로 나와 효소적 분해와 pH 감소에 의한 chlorophyll의 파괴가 가장 심한 것으로 나타났다.

Table 2-4. Change in color of extract from celery and watercress during storage at 25°C

Hunter color	Storage time(hr)	A	B	C
L	0	28.08	27.74	27.58
	48	25.61	26.54	22.18
	96	24.56	25.12	22.68
a	0	-11.04	-10.21	-8.37
	48	-3.16	-2.70	-1.53
	96	1.54	-0.59	-0.44
b	0	12.17	12.65	10.86
	48	7.85	7.55	7.21
	96	8.57	8.01	7.33
-a/b	0	0.907	0.807	0.770
	48	0.402	0.357	0.212
	96	0.179	0.073	0.060

A, B, C : Refer to footnote of Table 2-2.



이상의 결과로 보아 원심분리에 의한 chlorophyll의 제거효과로 chlorophyll 분해에 의한 갈변화를 많이 방지할 수 있을 것으로 사료된다.

### 3) 재료배합에 따른 pH와 색도, chlorophyll 함량의 변화

혼합과채주스 각 재료들의 pH와 이들을 배합하였을 때의 pH, chlorophyll 함량, 색도의 변화를 조사하였다. 샐러리+돌미나리의 착즙액에 물을 1 : 2의 비율로 배합한 것을 대조구로 하여 사과, 당근 첨가에 의한 영향을 보았고 샐러리+돌미나리의 착즙액에 물을 1 : 5의 비율로 배합한 것을 대조구로 하여 혼합과채주스의 무처리구와 열처리구를 제조하여 pH변화, chlorophyll 함량변화, 색도변화를 관찰하였다. 이 때의 배합비는 혼합과채주스의 배합비를 고려하여 결정하였다.

#### 가) 재료배합에 따른 pH 변화와 chlorophyll 함량의 변화

재료배합에 따른 pH와 chlorophyll a와 b의 함량을 Table 2-5에 나타내었다. 초기 pH는 4.65로 사과 첨가구가 가장 낮았고 혼합과채주스의 pH도 4.83으로 다른 시료에 비하여 낮은 편이었다. 재료배합에 따른 chlorophyll 함량의 변화를 보면 샐러리와 돌미나리를 착즙하여 2 : 1로 혼합한 시료(A구)에서 chlorophyll a가 47.56  $\mu$  mole/L, b가 14.73  $\mu$  mole/L로 가장 높았으며 이 값을 100 %로 하여 재료배합에 따른 chlorophyll 잔존율을 보면 물을 1 : 2의 비율로 혼합한 실험구(B구)에서 30.1-30.5 %, 1 : 1의 비율로 혼합한 실험구(E구)에서는 45.2-47.1 %, 1 : 5의 비율로 혼합한 G 구에서 17.6-15.4 %로 거의 희석비율과 유사한 값을 보였으며 물의 첨가에 의한 영향은 없는 것으로 나타났으며 pH도 6.08-6.10으로 변화가 없었다. 반면 사과 첨가구(C구)와 당근 첨가구(D구)의 경우 B구를 대조구로 하여 비교하여 보면 chlorophyll 잔존율이 a의 경우 절반 이

상이 감소하였으며 b의 경우 1/3 정도 감소한 것으로 나타났으며 이와 함께 pH도 감소하는 것으로 나타났다. 대추-구기자 첨가구(F구)의 경우도 대조구(E구)에 비하여 chlorophyll 잔존율이 낮았으나 사과나 당근 첨가구에 비교하여 볼 때는 더 높은 것으로 나타났다. 혼합과채쥬스의 경우도 대조구인 셀러리·돌미나리-물(1: 5)의 chlorophyll 함량이 11.66  $\mu$  mole/L인데 비하여 무처리구가 6.64  $\mu$  mole/L, 열처리구가 5.73  $\mu$  mole/L로 많이 감소하였으며 열처리구에서 더 많이 감소한 것으로 나타나 열처리로 인한 chlorophyll의 분해가 일어난 것으로 보여진다.

Table 2-5. % Changes in chlorophyll a and b of mixed fruit and vegetable juices

Sample	pH	Pigment concentration( $\mu$ mole/L)	
		chlorophyll a	chlorophyll b
A	6.05	47.56 (100)	14.73 (100)
B	6.08	14.33 (30.1)	4.49 (30.5)
C	4.65	6.89 (14.5)	3.13 (20.7)
D	5.00	7.16 (15.0)	3.06 (21.4)
E	6.10	21.52 (45.2)	6.93 (47.1)
F	5.12	15.21 (31.9)	5.68 (38.5)
G	6.09	8.38 (17.6)	2.28 (15.4)
H	4.83	5.64 (11.8)	1.56 (10.6)
I	4.82	4.73 (10.1)	1.26 (8.60)

A. Celery : Watercress = 2 : 1

B. Celery-Watercress : Water = 1 : 2

C. Celery-Watercress : Apple = 1 : 2

D. Celery-Watercress : Carrot = 1 : 2

E. Celery-Watercress : Water = 1 : 1

F. Celery-Watercress : Jujube-Lycii = 1 : 1

G. Celery-Watercress : Water = 1 : 5

H. Mixed fruit and vegetable juices

(Celery-Watercress : Apple : Carrot : Jujube-Lycii = 1 : 2 : 2 : 1 )

I. Mixed fruit and vegetable juices(Thermal treatment)

Date in a parenthesis indicate percent chlorophyll a & b on the basis of sample A.

Pheophytin의 함량도 대조구인 셀러리·돌미나리-물(1: 5)에서 비하여 혼합과채쥬스-열처리구에 더 많은 것으로 나타났다.

Table 2-6~2-11은 5°C와 25°C에서 192시간 동안 저장하면서 재료배합에 따른 pH 변화와 chlorophyll과 pheophytin의 변화에 대하여 나타내었다.

Table 2-6. Effect of addition of apple and carrot extract on change in chlorophylls during storage at 5°C

Storage time(hr)	Sample	pH	Pigment ( $\mu$ mole/L )			
			Chlorophyll a	Chlorophyll b	Pheophytin a	Pheophytin b
0	A	6.05	47.56(100)	14.73(100)	0.28	0
	B	6.08	14.33(100)	4.49(100)	0.26	0
	C	4.65	6.89(100)	3.13(100)	0.46	0
	D	5.00	7.16(100)	3.06(100)	0.32	0
96	A	5.87	20.18(42.0)	9.66(65.6)	16.76	2.48
	B	5.89	7.49(52.2)	2.82(62.8)	5.29	1.36
	C	4.56	2.20(32.0)	1.23(40.1)	4.88	1.09
	D	4.52	1.78(25.0)	1.17(37.4)	5.36	1.49
192	A	5.75	15.62(33)	6.61(44.8)	19.86	5.21
	B	5.80	4.76(33.2)	2.16(48.1)	6.52	1.54
	C	4.48	0.98(14.2)	0.88(32)	6.54	1.25
	D	4.22	0.87(12.1)	0.86(17.7)	6.21	1.54

A. Celery : Watercress = 2 : 1

B. Celery-Watercress : Water = 1 : 2

C. Celery-Watercress : Apple = 1 : 2

D. Celery-Watercress : Carrot = 1 : 2

Date in a parenthesis indicate percent chlorophyll a & b.

Table 2-7. Effect of addition of apple and carrot extract on change in chlorophylls during storage at 25°C

Storage time(hr)	Sample	pH	Pigment ( $\mu$ mole/L )			
			Chlorophyll a	Chlorophyll b	Pheophytin a	Pheophytin b
0	A	6.05	47.56(100)	14.73(100)	0.28	0
	B	6.08	14.33(100)	4.49(100)	0.36	0
	C	4.65	6.89(100)	3.13(100)	0.46	0
	D	5.00	7.16(100)	3.06(100)	0.32	0
96	A	5.34	9.81(20.6)	6.81(46.2)	31.96	6.39
	B	5.35	3.52(24.5)	1.92(42.7)	8.57	1.96
	C	4.35	1.24(17.9)	1.18(37.7)	5.78	1.65
	D	3.92	0.95(13.3)	0.68(22.2)	6.03	2.06
192	A	5.36	2.97(6.2)	3.48(23.6)	37.38	8.52
	B	5.20	0.82(5.7)	1.06(23.6)	10.61	2.39
	C	4.08	0.24(3.5)	0.72(23)	6.98	1.84
	D	3.86	0.08(1.1)	0.37(12)	7.09	2.19

A, B, C, D : Refer to footnote Table 2-6.

Date in a parenthesis indicate percent chlorophyll a & b.

사과와 당근 첨가에 의한 변화는 Table 2-6과 2-7에서 보는 바와 같다. 5°C 에서 192시간 동안 저장한 경우 사과, 당근 첨가에 대한 대조구인 B구는 pH의 변화가 거의 없는 것으로 나타났으나 사과 첨가구(C구)는 4.65에서 4.48로 다소 저하 되는 경향을 보였으며 당근 첨가구(D구)가 pH 5.00에서 4.22로 많이 저하되었다. 초기 chlorophyll a와 b의 양을 100 %로 환산하여 저장기간에 따른 chlorophyll 잔존율을 조사한 결과 5°C와 25°C에서 모두 당근 첨가구에서 chlorophyll 잔존율이 a가 12.1 %, b가 17.7 %로 가장 낮은 것으로 나타났으며

25℃에서 더 많은 감소를 보여 192시간이 경과한 이후 저장 초기와 비교하여 chlorophyll a가 1.1 %, chlorophyll b가 12 % 가량 남아있는 것으로 나타났으며 사과 첨가구에서도 대조구에 비하여 잔존율이 낮았다. 전체처리구에서 시간이 경과함에 따라 chlorophyll a와 b의 양이 감소하고 pheophytin이 증가하는 경향을 보였으며 chlorophyll b에 비하여 chlorophyll a의 파괴가 더 심한 것으로 나타났다.

Table 2-8. Effect of addition of jujube and lycii extract on change in chlorophylls during storage at 5°C

Storage time(hr)	Sample	pH	Pigment ( $\mu$ mole/L )			
			Chlorophyll a	Chlorophyll b	Pheophytin a	Pheophytin b
0	A	6.05	47.56(100)	14.73(100)	0.28	0
	E	6.10	21.52(100)	6.93(100)	0.24	0
	F	5.12	15.21(100)	5.68(100)	0.39	0
96	A	5.87	20.18(42)	9.66(65.6)	16.76	2.48
	E	5.87	9.26(43)	4.60(66.4)	6.52	1.03
	F	4.96	4.57(30)	3.34(58.8)	7.91	1.69
192	A	5.75	15.62(33)	6.61(45)	19.86	5.21
	E	5.82	6.93(32)	3.18(46)	8.99	1.67
	F	4.91	3.94(26)	2.2(38.9)	7.59	1.56

A. Celery : Watercress = 2 : 1

E. Celery-Watercress : Water = 1 : 1

F. Celery-Watercress : Jujube-Lycii = 1 : 1

Date in a parenthesis indicate percent chlorophyll a & b.

대추-구기자 혼합액의 첨가에 의한 변화는 Table 2-8과 2-9에 나타내었다. 5℃에서 저장하는 동안은 pH에 큰 변화가 없었으며 192시간 이후의

chlorophyll 잔존율은 a가 26 %, b가 38.9 %로 당근 첨가구에 비하여 2배 이상 높은 것으로 나타났으며 chlorophyll b가 더 많이 남아 있는 것으로 나타났다. 25°C 저장구에서는 pH의 변화도 심하여 초기 pH 5.12에서 4.34까지 감소하였으며 chlorophyll의 파괴도 심한 것으로 나타났다. Peophytin a와 b도 5°C와 비교하여 2배 이상 생성된 것으로 나타났다.

Table 2-9. Effect of addition of jujube and lycii extract on change in chlorophylls during storage at 25°C

Storage time(hr)	Sample	pH	Pigment ( $\mu$ mole/L )			
			Chlorophyll a	Chlorophyll b	Pheophytin a	Pheophytin b
0	A	6.05	47.56(100)	14.73(100)	0.28	0
	E	6.10	21.52(100)	6.93(100)	0.24	0
	F	5.12	15.21(100)	5.68(100)	0.39	0
96	A	5.34	9.81(20.6)	6.81(46.2)	31.96	6.39
	E	5.48	5.25(24.3)	2.47(41.6)	12.89	2.76
	F	4.59	2.28(15.0)	2.09(36.7)	12.31	1.78
192	A	5.36	2.97(6.2)	3.48(23.6)	37.38	8.52
	E	5.29	1.35(6.2)	1.62(27.3)	11.12	3.07
	F	4.34	0.75(4.9)	1.03(18.1)	12.13	3.12

A, D, E : Refer to foot note Table 2-8.

Date in a parenthesis indicate percent chlorophyll a & b.

혼합과채주스도 마찬가지로 25°C에서 pH 변화가 더 심하여 초기 pH 4.83에서 3.75까지 떨어지는 것으로 나타났으며 열처리구의 경우 pH의 변화는 없는 것으로 나타났다. 5°C에서 192시간 저장하였을 때 무처리구에서는 12.7 %의 chlorophyll a와 39 %의 chlorophyll b가 존재하는 것으로 나타났으며 열처리

구에서는 17 %의 chlorophyll a와 47.6 %의 chlorophyll b가 잔존하는 것으로 나타나 장기간 저장시 무처리에 의한 chlorophyll의 분해가 더 심한 것으로 나타났다. 이는 효소분해와 pH 감소에 의한 것으로 25℃ 저장구에서는 더욱 심하여 무처리구에서의 chlorophyll 잔존율도 가장 낮아 chlorophyll a가 1.9 % b가 5.7 %로 나타났다(Table 2-10, 2-11).

Table 2-10. Changes in chlorophylls of mixed fruit and vegetable juices during storage at 5°C

Storage time(hr)	Sample	pH	Pigment ( $\mu$ mole/L )			
			Chlorophyll a	Chlorophyll b	Pheophytin a	Pheophytin b
0	A	6.05	47.56(100)	14.73(100)	0.28	0
	G	6.09	8.38(100)	2.28(100)	0.19	0
	H	4.83	5.64(100)	1.56(100)	0.17	0
	I	4.82	4.73(100)	1.26(100)	0.26	0.62
96	A	5.87	20.18(42.4)	9.66(65.6)	16.76	2.48
	G	5.96	3.56(42.5)	1.55(67.9)	3.53	0.70
	H	4.48	1.67(29.6)	0.94(60.2)	4.26	0.60
	I	4.75	1.30(27.4)	0.83(65.8)	4.43	0.46
192	A	5.75	15.62(33)	6.61(45)	19.86	5.21
	G	5.88	2.12(26)	1.25(54)	4.14	0.66
	H	4.35	0.72(12.7)	0.61(39)	4.42	0.72
	I	4.74	0.81(17)	0.60(47.6)	4.62	0.52

A. Celery : Watercress = 2 : 1 G. Celery-Watercress : Water = 1 : 5

H. Mixed fruit and vegetable juices

( Celery-Watercress : Apple-Carrot-Jujube-Lycii = 1 : 5 )

I. Mixed fruit and vegetable juices(Thermal treatment)

Date in a parenthesis indicate percent chlorophyll a & b.

Table 2-11. Changes in chlorophylls of mixed fruit and vegetable juices during storage at 25°C

Storage time(hr)	Sample	pH	Pigment ( $\mu$ mole/L )			
			Chlorophyll a	Chlorophyll b	Pheophytin a	Pheophytin b
0	A	6.05	47.56(100)	14.73(100)	0.28	0
	G	6.09	8.38(100)	2.28(100)	0.19	0
	H	4.83	5.64(100)	1.56(100)	0.17	0
	I	4.82	4.73(100)	1.26(100)	0.26	0.62
96	A	5.34	9.81(20.6)	6.81(46.2)	31.96	6.39
	G	5.55	1.84(22)	1.05(46)	4.97	1.17
	H	3.81	0.63(11.1)	0.57(36.5)	4.67	0.81
	I	4.73	0.98(20.7)	0.58(46)	3.91	1.21
192	A	5.36	2.97(6.2)	3.48(23.6)	37.38	8.52
	G	5.44	0.49(5.8)	0.52(22.8)	4.92	1.51
	H	3.75	0.11(1.9)	0.09(5.7)	5.07	1.07
	I	4.73	0.30(6.3)	0.21(16.6)	4.26	1.13

A, G, H, I : Refer to foot note Table 2-10.

Date in a parenthesis indicate percent chlorophyll a & b.

이상의 결과 재료배합에 따른 chlorophyll의 분해정도와 저장 온도에 따른 chlorophyll과 pheophytin의 조성 변화를 볼 때 25°C에서 저장한 시료 중 특히 pH가 많이 감소한 당근 첨가구에서 chlorophyll 분해가 더 많이 일어나 pheophytin으로 전환된 것으로 나타났다. 이는 pH 감소에 의하여  $Mg^{2+}$ 가 2개의  $H^+$ 이온으로 치환되었기 때문으로 보여지며 시간이 경과함에 따라 전체 시료에서 chlorophyll a와 b의 함량은 감소하는 반면 pheophytin a와 b가 증가하는 것으로 나타났으며 chlorophyll b와 비교해 볼 때 chlorophyll a의 감소가 더



심한 것으로 나타났다. 저장 초기에는 chlorophyll이 감소한만큼 pheophytin이 증가하는 경향을 보이다가 저장기간이 길어짐에 따라 더 이상의 증가하지 않는 것으로 나타났는데 이는 chlorophyll이 pheophytin을 거쳐 pheophorbide로 바뀌었거나 효소적 분해에 의해 chlorophylline이나 chlorophyllide 등으로 전환된 것으로 추정된다.

나) 색도의 변화

Table 2-12. Effect of addition of apple and carrot extract on Hunter color values of mixture of celery and watercress extract during storage at 5°C

Hunter color	Storage time (hr)	A	B	C	D
L	0	26.40	23.10	30.42	37.20
	96	26.10	21.32	27.72	34.37
	192	26.24	20.44	27.29	35.30
a	0	-10.12	-5.62	-7.48	4.84
	96	-6.68	-3.11	-2.76	6.08
	192	-5.08	-2.27	-2.57	7.28
b	0	13.19	7.73	13.74	24.16
	96	14.76	8.56	13.59	22.09
	192	14.90	8.72	13.23	22.60

A. Celery : Watercress = 2 : 1

B. Celery-Watercress : Water = 1 : 2

C. Celery-Watercress : Apple = 1 : 2

D. Celery-Watercress : Carrot = 1 : 2

(1) 사과, 당근 첨가에 의한 색도의 변화

샐러리-돌미나리 착즙액에 사과, 당근 착즙액을 첨가하였을 경우 색의 변화는

Table 2-12, 2-13과 같다.

Table 2-13. Effect of addition of apple and carrot extract on Hunter color values of mixture of celery and watercress extract during storage at 25°C

Hunter color	Storage time (hr)	A	B	C	D
L	0	26.40	23.10	30.42	37.20
	96	24.16	20.93	25.89	36.16
	192	22.61	19.90	23.83	36.30
a	0	-10.12	-5.62	-7.48	4.84
	96	-0.91	-0.81	-1.50	9.83
	192	-0.62	-0.24	-1.05	11.38
b	0	13.19	7.73	13.74	24.16
	96	10.65	4.99	14.04	27.22
	192	9.82	4.93	15.35	28.25

A, B, C, D : Refer to foot note Table 2-12.

L 값을 보면 사과, 당근 첨가에 의하여 30.42, 37.20으로 증가하여 저장 초기에 당근 첨가구가 가장 높은 값을 보였다. 5°C에서 192시간 이후 사과첨가구의 L 값은 27.29, 당근 첨가구는 35.30으로 감소하였고 25°C에서 192시간 저장하였을 경우 사과첨가구의 L 값이 23.83, 당근 첨가구는 36.30으로 감소하는 것으로 나타나 사과 첨가에 의한 L 값의 감소가 더 심한 것으로 나타났다. -a 값은 사과 첨가구의 경우 7.48로 대조구(B)에 비하여 오히려 증가하는 경향을 보이다가 시간이 경과함에 따라 감소하였고 당근 첨가구에서는 저장 초기 -4.84로 가장 낮은 값을 나타내었으며 25°C에서 192시간저장 후 -11.38로 크게 감소하였다. b 값은 큰 변화가 없었으며 25°C 저장 중 조금씩 증가하는 경향을 보였다.

(2) 대추-구기자 첨가에 의한 색도의 변화

샬러리-돌미나리 착즙액에 대추-구기자 착즙액 첨가에 따른 색도의 변화는 Table 2-14과 같다. 대추-구기자 첨가구의 L 값은 저장 초기 19.22로 대조구(E)가 24.68인데 비하여 낮은 값을 보였다. -a 값도 0.38로 대조구에 비하여 크게 감소하는 것으로 나타났으며 25℃ 저장 중 -a 값의 변화가 더 큰 것으로 나타났다. b 값은 저장 초기 대조구에서는 9.78, 대추-구기자 첨가구에서는 5.45로 나타났으며 저장기간에 따라 조금 증가하는 경향을 보였다.

Table 2-14. Effect of addition of jujube-lycii extract on Hunter color values of mixture of celery and watercress extract during storage at 5℃ and 25℃

Hunter color	Storage time(hr)	5℃		25℃	
		E	F	E	F
L	0	24.68	19.22	24.68	19.22
	96	21.95	18.27	22.69	18.45
	192	20.88	18.52	21.09	18.07
a	0	-7.57	-0.38	-7.57	-0.38
	96	-4.24	0.38	-0.66	1.13
	192	-4.06	0.45	-0.33	2.11
b	0	9.78	5.45	9.78	5.45
	96	7.73	5.54	9.02	6.40
	192	8.30	6.03	9.11	6.83

E. Celery-Watercress : Water = 1 : 1

F. Celery-Watercress : Jujube-Lycii = 1 : 1

(3) 사과, 당근, 대추-구기자 첨가(혼합과채쥬스)에 의한 색도의 변화

샐러리-돌미나리 착즙액에 사과, 당근, 대추-구기자 착즙액 첨가(혼합과채쥬스)하였을 경우 색도의 변화를 Table 2-15에 나타내었다.

Table 2-15. Effect of addition of apple, carrot and jujube-lycii extract on Hunter color values of mixture of celery and watercress extract during storage at 5°C and 25°C

Hunter color	Storage time(hr)	5°C			25°C		
		G	H	I	G	H	I
L	0	23.08	30.31	31.47	23.08	30.31	31.47
	48	21.02	29.56	28.22	20.77	29.68	30.05
	96	21.45	28.11	28.27	19.91	28.82	29.42
	192	20.13	27.43	27.40	19.03	27.84	28.40
a	0	-3.77	2.19	2.03	-3.77	2.19	2.03
	48	-2.76	2.55	3.15	-1.94	4.90	3.50
	96	-2.40	3.23	3.08	-0.45	5.68	3.60
	192	-2.13	4.14	3.61	0.97	7.02	3.74
b	0	7.34	16.60	17.18	7.34	16.60	17.18
	48	7.52	15.63	16.85	5.52	17.62	17.52
	96	6.58	15.96	17.13	5.73	17.75	18.04
	192	7.63	17.25	15.64	5.54	18.96	18.32

G. Celery-Watercress : Water = 1 : 5

H. Mixed fruit and vegetable juices

(Celery-Watercress : Apple : Carrot : Jujube-Lycii = 1 : 2 : 2 : 1 )

I. Mixed fruit and vegetable juices(Thermal treatment)

L 값의 경우 대조구(G구)가 23.08, 혼합과채즙스가 30.31로 나타나 증가하는 경향을 보였으며 이는 사과, 당근 첨가에 따른 것으로 추측된다. 시간이 경과함에 따라 전체 처리구에서 L 값이 감소하는 것으로 나타났으며 실험구간에 큰 차이는 없었다. -a 값의 경우 혼합과채즙스가 2.19, 혼합과채즙스-열처리구가 2.03으로 대조구에 비하여 낮은 값을 보였으며 25℃ 저장기간 동안에 혼합과채즙스(H구)에서 -a 값의 변화가 가장 심하여 -7.02까지 감소하는 것으로 나타났다. b 값의 경우 혼합과채즙스가 16.60, 혼합과채즙스-열처리구가 17.18로 대조구보다 높은 값을 보였으며 저장 중 대체로 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

#### 4) 갈변방지제 첨가에 의한 색도의 변화

사과, 포도, 오렌지, 파인애플 등을 원료로 하는 과일즙스의 갈변방지에 효과적인 물질로 sodium sulfite, cysteine, ascorbic acid, sulfated polysaccharide, citric acid, resorcinol 등이 알려져 있다. Ascorbic acid의 농도가 높을수록 갈변화의 초기단계를 연장시키는 역할을 하지만 ascorbic acid가 갈변화 저해능력을 상실하는 breaking point 이후로는 농도에 관계없이 갈변화를 가속화시키고 sulfits 제제들은 천식유발의 가능성이 있다고 보고된 바 있으며 기타 산 종류들은 녹색소인 chlorophyll의 변색에 결정적인 영향을 미칠 것으로 생각되어 갈변화를 방지하거나 최소화하는 물질로 cysteine과 glutathione을 선정하여 각각 5 mM, 10 mM 씩 시료에 첨가하여 색도의 변화를 관찰하였다. 이들 cysteine과 glutathione은 환원제로 작용, 활성산소를 제거하여 색도의 변화를 방지하고 fatty acid hydroperoxide를 제거한다고 보고된 바 있다.

열처리구와 한외여과구에 갈변방지제로서 cysteine과 glutathione을 5, 10 mM 씩 첨가하여 25℃, 8주간 색도변화를 관찰한 결과는 Table 2-16과 2-17에 나타내었다.

L 값의 경우 열처리구와 한외여과구의 전체 처리구에서 모두 감소하여 실험구 간에 차이가 없는 것으로 나타났으며 -a 값도 모든 실험구에서 감소하는 경향을 보였는데 한외여과구에서는 무첨가구에 비해 cysteine, glutathione 첨가구가 오히려 더 -a 값의 감소를 보여 색도변화를 촉진하는 것으로 나타났으며 b값의 경우 열처리구에서는 전 실험구에서 감소하는 경향을 보였으나 한외여과구의 경우 반대로 증가하는 것으로 나타나 본 실험에서 제조한 혼합과채쥬스의 경우 과일쥬스나 음료 등에서 일반적으로 사용되는 갈변방지제는 큰 효과가 없는 것으로 나타났으며 이러한 결과는 -SH기에 의하여 antocyanin 색소가 환원, 탈색되고 chlorophyll의 분해와 산소의 존재가 갈변을 촉진시키기 때문으로 사료된다.

Table 2-16. Change in color values of mixed fruit and vegetable juices heat-treated for 15 sec at 96°C during storage at 25°C

Hunter color	Storage time (week)	Control	Cysteine		Glutathione	
			5mM	10mM	5mM	10mM
L	0	25.46	25.54	25.63	25.72	26.11
	4	22.16	22.75	22.71	21.09	24.05
	8	21.01	20.63	20.03	19.73	20.27
a	0	-0.67	-0.57	-0.52	-0.48	-0.32
	4	1.77	1.73	1.54	1.68	2.24
	8	3.97	3.45	3.58	3.84	3.82
b	0	10.09	10.20	10.12	10.29	10.22
	4	9.52	9.36	9.54	9.56	9.85
	8	9.59	9.08	9.07	9.33	9.41

Table 2-17. Change in color values of mixed fruit and vegetable juices treated ultramembrane during storage at 25°C

Hunter color	Storage time (week)	Control	Cysteine		Glutathione	
			5mM	10mM	5mM	10mM
L	0	28.99	28.65	29.03	28.74	28.91
	4	24.65	22.81	21.54	24.20	22.92
	8	20.59	18.36	18.07	20.52	19.97
a	0	-0.48	-0.43	-0.34	-0.41	-0.38
	4	0.02	0.17	0.24	0.09	0.27
	8	0.39	1.42	1.82	1.10	1.20
b	0	3.86	3.92	3.81	4.18	4.67
	4	5.90	5.36	5.04	5.46	7.96
	8	7.20	5.93	5.92	7.02	6.90

이상의 결과를 종합하여 보면 pH가 감소가 가장 큰 당근 첨가구에서 chlorophyll의 파괴가 심한 것으로 나타났으며 chlorophyll의 파괴가 심한 시료일수록 pheophytin이 많이 생성되는 것으로 나타났다. pH가 낮아질수록 chlorophyll의 pheophytin으로의 전환과 chlorophyllide의 pheophorbide로의 화학적 전환을 촉진하여 회색 또는 갈색으로 변하여 녹색채소의 변색을 초래하며 색도에 있어서도 chlorophyll이 많을수록 -a 값도 높은 것으로 나타나 -a 값과 chlorophyll과의 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

## 나. 저장 중 혼합과채쥬스의 탁도 안정성

쥬스의 품질을 결정하는 주요인자 중의 하나는 현탁도로 불투명 쥬스의 경우 저장기간 중 고체층과 액체층으로 분리시키는 cloud loss는 바람직하지 못하며 현탁입자와 함께 ethylbutyrate, neural, geranial 등의 향기성분이 소실될 가능성도 있다. 과일쥬스, 와인, 맥주 등의 음료는 모두 단백질과 폴리페놀성분을 함유하고 있는데 이들은 colloidal suspension을 형성하여 빛을 산란시키고 cloudy한 상태를 유지시키지만 크기가 colloidal size 이상으로 커지면 침전을 유발하기 때문에 저장 중 단백질과 폴리페놀의 함량변화와 haze 생성에 대한 이해는 제품을 안정화시키고 저장수명을 연장하는데 중요한 역할을 한다. 맥주의 경우 hordein(barley prolamins)이 haze형성에 주된 역할을 하는 단백질(haze-active protein)로 특히 proline의 조성비가 높은 것으로 알려져 있고, 과일쥬스의 경우 proanthocyanidin이 haze-active polyphenol로 알려져 있는데 이는 catechin, epicatechin, gallic acid의 dimer 또는 trimer로 이루어져 있으며 산화적 mechanism과 비산화적 mechanism에 의해서 haze와 침전을 형성한다는 보고가 있다. 본 연구에서는 haze 생성에 대한 model system을 제조하여 haze 생성에 영향을 주는 인자들을 조사하고 과채쥬스에서의 haze 생성과 이와 관련된 페놀물질과 단백질에 대한 정량, 정성 분석을 행하였다.

### 1) 모델 시스템에서의 Haze 생성

pH 4.8의 0.02M phosphate buffer를 조제하고 gelatin, proline, polyproline, catechin, tannic acid, chlorogenic acid 등을 농도별로 단독첨가하여 5, 25, 95℃에서 haze 생성 실험을 한 결과는 Table 2-18~2-25에서 보는 바와 같다. Proline을 제외한 모든 실험구에서 첨가한 시료의 농도가 증가할수록 haze도 함께 증가하



는 것으로 나타났으며 5℃와 25℃의 경우보다 95℃에서 haze가 더 많이 유발되는 것을 볼 수 있었다.

Table 2-18. Effect of addition of protein sources on haze formation in a model system

Protein source (g/L)	Haze formation (NTU)		
	5℃	25℃	95℃
<b>Gelatin</b>			
0.0	0.20	0.19	0.20
1.0	2.05	2.34	2.78
2.0	3.35	3.70	7.09
<b>Proline</b>			
0.0	0.13	0.20	0.17
1.0	0.20	0.19	0.24
2.0	0.16	0.20	0.19
<b>Polyproline</b>			
0.0	0.09	0.10	0.08
0.010	0.22	0.26	0.34
0.050	0.46	0.40	0.59

Gelatin, proline, polyproline 첨가에 의한 haze 생성정도를 비교해 보면 proline 첨가구는 농도와 온도에 따른 haze의 변화가 거의 없었으나 gelatin 첨가구의 경우 95℃에서 2.0 g/L 첨가하였을 때 6.9 NTU 만큼의 haze 증가를 관찰할 수

있었으며 polyproline 첨가구의 경우도 마찬가지로 95℃에서 50 mg/L 첨가하였을 때 haze가 가장 많이 증가하는 것으로 나타났다.

Phenol 화합물로서 catechin, tannic acid, chlorogenic acid를 각각 첨가한 경우 95℃의 tannic acid 첨가구에서 haze가 2 NTU 정도 증가하여 다른 실험구에 비해 높은 것으로 나타났다.

Table 2-19. Effect of addition of polyphenol sources on haze formation in a model system

Polyphenol (g/L)	Haze formation (NTU)		
	5℃	25℃	95℃
<b>Catechin</b>			
0.0	0.18	0.29	0.37
1.0	0.44	0.42	0.69
2.0	0.98	0.90	1.28
<b>Tannic acid</b>			
0.0	0.20	0.16	0.20
1.0	0.60	3.30	1.91
2.0	1.40	2.70	2.20
<b>Chlorogenic acid</b>			
0.0	0.19	0.49	0.54
1.0	0.81	1.08	1.04
2.0	1.62	1.67	1.70

Table 2-20. Haze formation in model system resulting from addition of gelatin and tannic acid

Temp. (°C)	Tannic acid (g/L)	Gelatin(g/L)				
		0	30	60	90	120
5	0	0.0	0.4	0.7	0.5	1.3
	120	0.3	100	128	160	145
	240	0.9	16.4	184	185	195
25	0	0.0	0.2	0.2	0.3	0.5
	120	0.4	84	192	272	356
	240	0.7	53	184	342	370
95	0	0.0	0.3	0.3	0.4	0.5
	120	0.3	149	322	262	372
	240	0.6	65	272	338	428

Gelatin + catechin, gelatin + tannic acid의 농도별 조합에 따른 haze 발생 정도는 Table 2-20, 2-21에서 보는 바와 같이 단독첨가에 비하여 훨씬 많은 haze가 생성된 것으로 나타났으며 이는 phenolic hydroxyl group에 존재하는 hydrogen donor와 protein peptide의 carbonyl function과의 hydrogen bond가 형성되었기 때문으로 보여진다. Gelatin의 경우 catechin 첨가에 의한 큰 변화는 없었으나 catechin은 gelatin 첨가농도가 증가함에 따라 NTU 값도 함께 증가하는 것으로 나타났다. Gelatin + tannic acid의 농도별 조합에 따른 haze 생성 정도를 보면 catechin 첨가구에 비하여 소량 첨가하였음에도 불구하고 NTU가 월등히 증가하였음을 볼 수 있었으며 이는 tannic acid에 더 많은 steric hindrance가 존재하여 protein과의 결합여지가 많으며 catechin에 비하여

hydroxyl group이 많기 때문에 사료된다.

온도에 따른 haze 생성능을 보면 95℃에서의 haze가 가장 많이 증가하여 gelatin 90 mg/L + tannic acid 180mg/L 조합구에서 440 NTU 만큼 증가하였다.

Table 2-21. Haze formation in model system resulting from addition of gelatin and catechin

Temp. (°C)	Catechin (g/L)	Gelatin(g/L)				
		0	30	60	90	120
5	0.0	0.20	1.10	2.05	2.89	3.35
	1.0	0.44	1.89	2.60	2.90	4.10
	2.0	0.98	1.73	2.80	3.50	4.40
25	0.0	0.19	1.06	2.34	3.19	3.70
	1.0	0.42	1.90	2.70	3.30	4.40
	2.0	0.90	2.80	3.20	4.20	5.80
95	0.0	0.37	1.25	2.78	3.99	5.09
	1.0	0.69	1.50	3.40	3.90	5.40
	2.0	1.28	2.00	3.90	4.90	6.40

Proline의 경우는 Table 2-22와 2-23에서 나타낸 바와 같이 tannic acid와 catechin 첨가에 의한 haze의 증가가 없어 유리아미노산으로서의 proline은 haze 생성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료되며 반면에 polyproline의 경우 Table 2-24, 2-25에서 보는 바와 같이 tannic acid에 첨가에 의한 haze 생성이 활발하여 polyproline과 tannic acid를 각각 50 mg/L씩 조합하였을 때 haze 값

이 19 NTU로 증가하는 것으로 나타났다.

Table 2-22. Haze formation in model system resulting from addition of proline and tannic acid

Temp. (°C)	Tannic acid (g/L)	Proline(g/L)				
		0	0.25	0.50	0.75	1.0
5	0.00	0.07	0.16	0.17	0.18	0.19
	0.50	0.87	0.69	0.54	0.66	0.49
	1.00	1.12	1.13	1.03	0.98	0.90
25	0.00	0.00	0.15	0.19	0.21	0.21
	0.50	0.63	0.51	0.67	0.50	0.50
	1.00	1.63	1.09	1.03	1.01	0.93
95	0.00	0.00	0.07	0.12	0.18	0.30
	0.50	0.80	0.72	0.71	0.52	0.66
	1.00	1.51	0.93	1.13	1.45	1.81

이상의 결과로 유추하여 볼 때 protein과 polyphenol이 함께 존재할 때 haze 생성에 대한 상승효과를 보이며 이는 두 물질간의 결합에 의한 것으로 사료된다. Siebert 등은 수소결합 acceptor인 dimethylforamide와 비극성 용매인 dioxane을 첨가하였을 경우 NTU 값이 감소한다고 보고하여 haze 생성에 수소결합이나 소수성 결합이 관여한다고 보고한 바 있다.

Table 2-23. Haze formation in model system resulting from addition of proline and catechin

Temp. (°C)	Catechin (g/L)	Proline(g/L)				
		0	0.25	0.50	0.75	1.00
5	0.00	0.05	0.09	0.16	0.17	0.18
	0.50	0.53	0.24	0.32	0.36	0.56
	1.00	0.55	0.33	0.46	0.53	0.54
25	0.00	0.00	0.01	0.07	0.12	0.19
	0.50	0.23	0.27	0.38	0.49	0.64
	1.00	0.45	0.44	0.50	0.51	0.48
95	0.00	0.07	0.04	0.09	0.11	0.19
	0.50	0.48	0.45	0.54	0.60	0.72
	1.00	0.57	0.52	0.58	0.50	0.41

Table 2-24. Haze formation in model system resulting from addition of polyproline and tannic acid

Temp. (°C)	Tannic acid (mg/L)	Polyproline(mg/L)				
		0	5	10	25	50
5	0	0.13	0.20	0.25	0.32	0.49
	25	0.17	1.63	3.30	6.40	5.80
	50	0.14	2.20	4.20	5.80	6.90
25	0	0.18	0.25	0.29	0.42	0.50
	25	0.29	1.52	2.48	6.10	6.53
	50	0.29	1.96	4.30	6.90	12.65
95	0	0.23	0.28	0.36	0.45	0.64
	25	0.33	1.80	2.90	5.80	6.90
	50	0.47	1.89	3.90	11.8	19.0

Table 2-25. Haze formation in model system resulting from addition of polyproline and catechin

Temp. (°C)	Catechin (mg/L)	Polyproline(mg/L)				
		0	5	10	25	50
5	0	0.10	0.24	0.28	0.32	0.51
	25	0.12	0.86	1.33	1.53	1.45
	50	0.25	0.92	1.30	1.49	1.53
25	0	0.12	0.22	0.28	0.31	0.47
	25	0.18	0.67	0.84	1.23	1.17
	50	0.29	0.95	1.23	1.36	1.49
95	0	0.21	0.29	0.36	0.42	0.53
	25	0.23	0.91	1.09	1.31	1.49
	50	0.34	0.99	1.39	1.41	1.65

## 2) 혼합과채쥬스에서의 Haze 생성

혼합과채쥬스를 원심분리하지 않은 시료, 10,000xg에서 15분간 원심분리한 시료, 한외여과구로 구분하여 제조한 후 gelatin, polyproline, proline을 농도별로 첨가하여 5, 25, 95°C에서 30분간 방치하면서 haze를 유발한 후 각각의 haze 생성 정도를 비교하여 그 결과를 Table 2-26에 나타내었다.

Gelatin를 첨가하지 않은 경우 무처리구가 924-992 NTU로 시료 중 가장 값이 높았고 원심분리 처리구가 394-452 NTU, 한외여과구가 2.6-2.9 NTU로 현저하게 낮은 값을 보였으며 95°C에서 haze 생성이 가장 활발한 것으로 나타났다. Gelatin 첨가량이 증가할수록 haze도 함께 증가하는 것으로 나타났는데 2.0 g/L의 gelatin을 첨가하였을 때 첨가 전과 비교하여 무처리구의 경우 218-228 NTU, 원심분리 처리구에서는 72-102 NTU, 한외여과구에서는 25-32 NTU 만큼의 haze가 생성

되었다. Polyproline을 2.0g/L 첨가할 경우 첨가 전과 비교하여 볼 때 무처리구에서 88-134 NTU 만큼 haze가 증가되어 haze 생성이 가장 활발한 것으로 나타났으며 원심분리 처리구에서는 37-62 NTU, 한외여과구에서는 4.1-4.7 NTU 만큼의 haze가 생성된 것으로 나타나 gelatin을 첨가하였을 때와 유사하였다. 유리 아미노산으로서 proline을 첨가하였을 때는 무처리구에서 16-28 NTU, 원심분리 처리구에서 6-15 NTU, 한외여과구에서 0.4-1.0 NTU 정도 증가하는 것으로 나타나 proline에 의한 haze 생성은 거의 없는 것으로 보이며 이러한 결과는 model system에서의 반응과 일치하였다.

Table 2-26. Haze formation resulting from addition of protein sources to mixed fruit and vegetable juices

(Unit : NTU)

Protein (g/L)	Control			Centrifuge at 10,000xg			Ultrafiltration(30,000MW)		
	5℃	25℃	95℃	5℃	25℃	95℃	5℃	25℃	95℃
<b>Gelatin</b>									
0.0	936	924	992	440	394	452	2.76	2.68	2.92
0.5	975	959	1096	475	424	468	7.02	6.08	7.86
1.0	1012	1072	1120	472	458	480	15.20	12.80	16.00
2.0	1164	1136	1212	512	496	520	28.40	30.40	34.80
<b>Polyproline</b>									
0.0	928	919	972	428	398	429	2.96	3.20	3.60
0.5	982	960	1080	446	420	482	3.24	3.32	6.08
1.0	1016	1060	1106	465	460	498	7.08	7.96	8.27
<b>Proline</b>									
0.0	913	920	972	436	428	442	2.90	2.78	2.96
0.5	922	929	974	440	434	448	2.96	2.94	3.07
1.0	930	936	978	442	440	457	3.18	3.62	3.93



Polyphenol 화합물로 tannic acid, chlorogenic acid, catechin을 첨가하여 5, 25, 95℃에서 30분간 방치하면서 haze를 유발한 후 각각의 haze 생성정도를 비교하여 그 결과는 Table 2-27에 나타내었다.

Table 2-27. Haze formation resulting from addition of polyphenols to mixed fruit and vegetable juices

(Unit : NTU)

Poly-phenol (g/L)	Control			Centrifuge at 10,000xg			Ultrafiltration(30,000MW)		
	5℃	25℃	95℃	5℃	25℃	95℃	5℃	25℃	95℃
Tannic acid									
0.0	982	992	1024	408	392	472	2.2	2.9	3.4
0.5	1166	1168	1056	503	524	598	4.91	4.07	5.94
1.0	1239	1232	1364	744	720	824	9.36	10.20	12.06
2.0	1324	312	1397	752	712	988	16.45	16.42	19.22
Chlorogenic acid									
0.0	924	969	1088	408	384	488	2.3	2.2	3.1
0.5	1020	1089	1096	448	416	488	3.2	3.3	3.6
1.0	1144	1016	1388	504	456	576	4.2	4.3	4.8
2.0	1226	1284	1410	544	520	685	6.1	6.3	6.9
Catechin									
0.0	903	964	1088	408	448	456	2.38	2.96	3.09
0.5	1036	1000	1184	416	475	484	3.56	3.48	4.02
1.0	1096	1016	1256	432	464	496	4.08	4.66	5.84
2.0	1160	1120	1312	440	456	488	5.98	5.95	6.27

Tannic acid 첨가에 따른 과채즙의 haze 생성을 보면 무처리구의 경우 2.0 g/L 첨가구에서 첨가 전보다 320-373 NTU정도 증가하여 원심분리 처리구와 한외여과구에 비하여 월등히 높았으며 원심분리 처리구의 경우 41-77 NTU만큼 증가하였으며 한외여과구에서도 14-16 NTU만큼 증가한 것을 볼 수 있었다.

Chlorogenic acid 첨가구에서는 무처리구에서의 haze 증가량이 302-322 NTU, 원심분리 처리구에서는 66-97 NTU, 한외여과구에서는 3.8-4.1 NTU로 tannic acid 첨가구에 비해 낮은 것으로 나타났으며 catechin 첨가구의 경우 무첨가시보다 무처리구에서 156-257 NTU, 원심분리 처리구에서 12-32 NTU, C구에서 2.9-3.6 NTU 만큼 더 생성되어 catechin첨가에 의한 haze 생성이 가장 낮은 것으로 나타났다.

모델 시스템의 단백질과 폴리페놀 상호첨가에 의한 상승효과에서 haze-active protein 함량이 많은 시료에서 polyphenol 첨가에 의한 haze 생성이 더 활발하고 haze-active polyphenol이 많은 시료에서 단백질원 첨가에 의한 haze 생성이 더 활발하다고 하는 사실과 관련하여 볼 때 전체적으로 haze 증가율이 가장 큰 것으로 나타난 무처리구가 다른 처리구에 비하여 haze-active protein과 haze-active polyphenol을 다량 함유하고 있을 것으로 유추할 수 있으며 원심분리 처리와 한외여과처리에 의해서 상당량의 haze-active protein과 haze-active polyphenol이 제거되는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Siebert 등의 연구보고와도 유사한데 이들은 시판 청징 사과즙스와 맥주에 gelatin과 tannic acid를 첨가하여 haze 생성정도를 비교, 생성된 haze 양으로 사과즙스의 haze-active protein과 haze-active polyphenol의 양을 측정할 수 있다고 밝히고 tannic acid를 첨가하였을 경우 haze-active protein을 다량 함유하고 있는 알려져 있는 맥주의 haze 증가율이 5000 NTU로 가장 높았으며 gelatin을 첨가하였을 경우 haze-active polyphenol이 많은 사과 주스에서 가장 많은 haze가 생성된다고 보고하였다.

### 3) 원심력에 따른 탁도 안정성

원심력과 온도에 따른 탁도 안정성의 변화는 무처리구를 1, 2,500, 5,000, 10,000, 15,000xg에서 원심분리하여 각각 5℃와 25℃에서 저장한 결과는 저장 초기 원심분리 처리를 하지 않은 시료의 경우 흡광도가 6.191로 원심분리를 한 다른 시료들에 비하여 현저히 높았으며 원심력이 커질수록 흡광도도 낮아져 15,000xg에서 15분간 원심분리한 시료의 경우 1.274로 가장 낮은 값을 보였다. 5℃에서 저장 32일후 원심분리처리를 하지 않은 시료의 경우 흡광도가 2.232로 낮아져 원심분리를 한 다른 시료들과 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며 침전생성도 심한 것으로 나타났다. 반면 15,000xg에서 원심분리한 시료의 경우 0일째 흡광도가 1.274였으며 32일에 1.093으로 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 25℃ 저장의 경우 미생물 번식으로 인한 응집현상을 보여 8일 이상의 보존이 불가능했으며 5℃ 저장에서와 마찬가지로 1xg에서의 변화가 가장 심하게 나타났다.

열처리구의 경우는 5℃와 25℃에서 저장한 시료 모두 64일간 미생물에 의한 부패 현상은 없었으며 저장 온도에 따른 탁도 변화를 볼 때 5℃에서 저장한 시료가 더 안정한 것으로 나타났다. 무처리구와 마찬가지로 원심분리를 하지 않은 시료(1xg)의 흡광도가 5.745로 가장 컸으나 64일 후 5℃ 저장구에서는 1.284, 25℃ 저장구에서는 1.906으로 원심분리처리를 한 다른 시료들에 비하여 변화가 가장 큰 것으로 나타났다. 반면 10,000xg와 15,000xg에서 원심분리한 시료에서는 흡광도가 거의 변화가 없어 원심분리에 의하여 저장 중 탁도변화를 방지할 수 있으리라 사료된다.

### 4) 혼합과채쥬스의 페놀 성분

총 페놀물질 정량에 대한 결과는 Table 2-28에 나타내었으며 단위는 gallic acid equivalent (mg GAE/L)로 표시하였다.

Table 2-28. Changes in total phenol content of mixed fruit and vegetable juices during storage

( unit : mg GAE/L )

Storage time (week)	5°C			25°C		
	A	B	C	A	B	C
0	757	880	730	757	880	730
2	689	831	699	-	825	680
4	716	815	685	-	812	677
8	725	795	670	-	788	668

A : Control

B : Supernatant heated for 15sec at 96°C

C : Permeates through a ultramembrane filter

저장 초기 총 페놀물질의 농도는 열처리구가 880 mg GAE/L로 가장 높았으며 이는 열처리로 인한 polyphenol oxidase의 불활성화로 페놀물질의 분해가 일어나지 않았기 때문으로 보인다. 그 다음으로 무처리구가 757 mg GAE/L였으며 한외여과구가 730 mg GAE/L 순으로 가장 낮아 일부 페놀물질이 membrane을 통과하지 못하고 pulp나 과육에 남아있는 것으로 사료된다. George 은 colorimetric assay를 이용한 배즙스와 포도즙스의 페놀물질 함량이 200-500 mg GAE/L라고 보고하였으며 Cliff 등은 사과즙스의 페놀 함량이 500-700 mg GAE/L정도라고 밝혔는데 이들과 비교하여 볼 때 본 실험에서 제조한 혼합과채즙스는 다른 과일즙스보다 페놀물질을 많이 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이러한 페놀물질들은 과일즙스에서 bitterness나 astringency와

같은 맛의 특성을 부여하며 yellow brown pigment를 형성하고 haze나 sediment를 생성하여 저장 중 품질변화를 야기한다고 알려져 있으며 또 한편으로는 항산화 물질로서 지질의 자동산화 조건에 의해서 생성된 free radical의 생성을 지연시키거나 활성을 저해하여 항산화 작용을 한다는 연구들도 활발하다. 5℃와 25℃ 저장 중 페놀물질은 다소 감소하는 경향을 보였으며 특히 무처리구에서 감소경향이 큰 것으로 나타났는데 이는 polyphenoloxidase의 작용으로 페놀 물질의 분해가 일어난 것으로 보인다. 무처리구의 경우 5℃에서 4주 이후에는 오히려 페놀 물질이 증가하는 경향을 보였으며 이는 페놀 물질의 가공이나 분해과정 중에 발생한 endiol이나 reductone 류와 같은 browning intermediate의 형성에 의한 간섭으로 사료된다.

혼합과채쥬스의 페놀성 분획을 silica gel TLC한 결과 Folin-Ciocalteu와  $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 에 검출되는 6-7개의 spot가 분리되었다. 20종의 표준물질을 전개시킨 결과 전개용매에 따라 toluene/ethyl acetate/formic acid(5:4:1)에서는 6개의 spot, ethyl acetate/formic acid/acetic acid/water(10:1.1:1.1:2.7)에서는 1개의 spot으로 분리되었다.

Spot a는 ferulic acid + *p*-cummaric acid + vanillic acid + gentisic acid + 2,3-dihydroxybenzoic acid + kaempferol, spot b는 syringic acid + quercetin, spot c는 caffeic acid, spot d는 tannic acid, spot e는 epicatechin + (+)catechin, spot f와 g는 chlorogenic acid이다.

0일째 무처리구, 열처리구에서는 a, b, c, d, e, f, g spot이 모두 정색반응을 보여 20종의 표준 물질 중 약 13종의 페놀 화합물 - ferulic acid, *p*-cummaric acid, vanillic acid, gentisic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid, kaempferol, syringic acid, quercetin, caffeic acid, tannic acid, epicatechin, (+)catechin, chlorogenic acid 등이 있는 것으로 나타났는데 catechin, kaempferol, quercetin 등은 산소 라디칼 제거제, 금속 chelator, 지질 과산화 방지제의 역할을 하여 항돌연변이성, 항암성,

항산화 효과를 보여 준다는 보고가 있었다. 한외여과구에서는 b spot과 e spot의 정색반응이 나타나지 않아 syringic acid, quercetin, epicatechin, (+)catechin 등이 거의 존재하지 않는 것으로 사료되며 그 이유는 난용성인 epicatechin, (+)catechin이 colloid나 suspension 상태로 떠 있다가 한외여과시 과육의 부유물질들과 함께 제거된 것으로 보인다. 한외여과구의 정색반응이 무처리구와 열처리구에 비해 비교적 약하게 나타난 것으로 미루어 볼 때 한외여과처리를 상 감소하며 역삼투압막을 통과한 경우는 90% 가량 감소한다고 보고한 바 있다. 이러한 페놀 화합물들은 강한 항산화 작용을 하며 특히 tannin성분은 금속이온과 착염을 형성하여 중금속해독 식품으로도 기대되는 반면 과일주스의 갈변화와 haze, 침전 생성과도 깊은 관련이 있어 품질저하의 원인이 되기도 한다. 저장 7일 이후부터는 모든 시험구에서 e spot의 정색반응이 나타나지 않아 저장기간이 길어짐에 따라 epicatechin과 (+)catechin 양도 함께 감소하는 것으로 나타났으며 특히 한외여과구에서는 f spot와 g spot도 정색반응을 보이지 않아 chlorogenic acid 양도 함께 감소하는 것으로 나타났다.

##### 5) 혼합과채주스의 아미노산 함량

혼합과채주스의 총단백질 Table 2-29에 나타내었다. 열처리구의 경우 590 mg/L로 가장 많은 것으로 나타났으며 한외여과처리구에서는 320 mg/L로 한외여과처리에 의해 다량의 단백질이 제거되는 것으로 추측된다. 저장 기간동안 전체 처리구에서 감소하는 경향을 보였으며 한외여과구에서의 변화가 가장 적은 것으로 나타났다. 혼합과채주스를 원심분리하지 않은 무처리, 10,000xg에서 원심분리 처리, 원심분리 후 열처리, 원심분리 후 한외여과 처리하여 4개의 처리구로 구분하여 제조하고 15 mL falcon tube에 넣고 5°C에서 15일간 저장하면서 처리방법에 따른 아미노산 함량을 비교 분석하였다.

Table 2-29. Changes in protein content of mixed fruit and vegetable juices during storage

( unit : mg/L )

Storage time (week)	5°C			25°C		
	A	B	C	A	B	C
0	580	590	320	580	590	320
2	531	562	310	-	550	309
4	-	540	309	-	538	304
8	-	528	302	-	507	300

A : Control

B : Supernatant heated for 15sec at 96°C

C : Permeates through a ultramembrane filter

아미노산 함량은 시료 100 mL당 mg으로 표시하였고 분석 결과는 Table 2-30과 같다. 전체 처리구에서 모두 산성 아미노산으로 알려진 aspartic acid 및 asparagine이 가장 높게 측정되었으며 그 다음으로는 glutamic acid 및 glutamine 과 proline이 많은 것으로 나타났는데 proline은 자연 단백질을 가수분해해서 얻는 아미노산 중 알콜에 녹는 유일한 아미노산으로 사과주스 침전물에 5-16%의 proline이 함유되어 있다고 보고된 바 있으며 과일주스, 맥주, 와인 등의 음료에서 haze 생성을 유발하고 침전물을 형성하여 품질저하를 야기한다고 알려져 있다. 함황 아미노산인 cysteine, cystine, methionine과 방향족 아미노산인 tryptophan과 tyrosine 등은 그 함량이 매우 낮았다.

원심분리를 하지 않은 무처리구의 경우 0일째 aspartic acid 및 asparagine이 414.9 mg/100mL로 월등하게 높은 것으로 분석되었으며 glutamic acid 및 glutamine은 372.7 mg/100mL, alanine이 68.8 mg/100mL, proline이 55.1

mg/100mL 순으로 많은 것으로 나타났다. 15일 후 무처리구의 상층을 취하여 아미노산을 분석한 결과 aspartic acid 및 asparagine이 126.3 mg/100mL, glutamic acid 및 glutamine이 124.3 mg/100mL, proline이 18.6 mg/100mL로 약 60-70 % 가량 감소하는 것으로 나타났으며 그외의 다른 아미노산도 함께 감소하는 것으로 나타났다.

Table 2-30. Amino acid content of mixed fruit and vegetable juices

Sample	Amino acid (mg/100mL)											
	Cys	Asp	Glu	Ser	Thr	Ala	Pro	Tyr	Met	Cys2	Phe	Trp
<b>0 day</b>												
Control	3.4	414.9	372.7	33.4	52.1	68.8	55.1	2.6	5.1	0.3	20.9	3.6
Centrifuge (10,000xg)	2.3	298.4	279.1	26.7	45.6	61.3	44.7	2.1	3.8	0.1	13.2	2.8
Thermal treatment*	2.4	139.2	139.3	7.9	15.2	19.2	21.4	1.4	2.9	0.09	2.9	0.4
Ultrafiltration**	1.2	34.5	29.2	1.5	3.1	4.1	8.1	0.5	0.6	0.2	0.6	0.1
<b>15 day</b>												
Control	2.2	126.3	124.3	6.9	11.3	16.9	18.6	0.04	0.9	0.09	2.2	0.2
Centrifuge (10,000xg)	2.0	113.9	116.1	6.6	11.8	15.9	17.9	0.04	0.9	N.D	1.8	0.3
Thermal treatment*	1.9	100.6	97.2	6.6	14.8	15.5	19.3	1.5	1.3	0.04	3.1	0.8
Ultrafiltration**	0.3	26.6	22.5	1.6	3.1	4.0	6.1	0.2	0.5	0.02	0.4	0.1

Asp : Aspartate+Asparagine    Glu : Glutamate+Glutamine    Cys : Cysteine    Cys2 : Cystine  
 N.D : Not detected

\* : for 15sec at 96°C after centrifuge    \*\* : MW cut-off value 30,000



10,000xg에서 원심분리한 시료의 경우 0일째 aspartic acid 및 asparagine이 298.4 mg/100mL, glutamic acid 및 glutamine이 279.1 mg/100mL, proline이 44.7 mg/100mL로 원심분리하지 않은 시료에 비해 많이 감소하는 것을 볼 수 있었으며 15일 후에는 aspartic acid 및 asparagine, glutamic acid 및 glutamine, proline이 각각 113.9, 116.1, 17.9 mg/100mL로 감소하였지만 무처리구에 비하면 그 양이 적은 것으로 나타났다.

원심분리 후 열처리한 시료의 경우 원심분리구와 큰 차이가 없는 것으로 나타나 열처리에 의한 영향은 거의 없는 것으로 나타났으며 저장기간에 따른 큰 변화도 없는 것으로 나타났다. 원심분리 후 한외여과 처리한 시료에서는 aspartic acid 및 asparagine이 34.5 mg/100mL, glutamic acid 및 glutamine이 29.2 mg/100mL, proline이 8.1 mg/100mL로 다른 아미노산에 비하여 다량 함유되어 있는 것으로 측정되었으며 원심분리하지 않은 무처리구와 비교하면 그 값이 약 90 % 이상 감소한 것으로 나타났다. 저장 15일 후에는 aspartic acid 및 asparagine이 26.6 mg/100mL, glutamic acid 및 glutamine이 22.5 mg/100mL, proline이 7.1 mg/100mL로 큰 변화가 없는 것으로 나타났으며 다른 아미노산에서도 거의 변화가 없었다.

본 연구에서는 혼탁과채즙스의 저장수명을 단축시키고 품질저하를 야기하는 haze의 생성요인 중에서 단백질과 polyphenol과의 결합과 관련하여 과채즙스에 존재하는 단백질과 polyphenol을 정성, 정량하고 원심분리와 한외여과처리가 haze 생성에 어떤 변화를 가져오는지 밝혀보고자 하였다. 본 실험에서 제조한 과채즙스에는 haze 생성에 결정적 영향을 준다고 알려져 있는 proline의 조성이 다른 아미노산에 비하여 높은 것으로 나타났으며 peptide와 수소결합 또는 소수성 결합으로 haze를 유발하는 polyphenol 화합물인 tannic acid와 chlorogenic acid도 포함되어 있어 이들의 상호결합에 의한 침전 생성이 우려되나 원심분리와 한외여과처리에 의한 이들 아미노산과 페놀 화합물의 제거로 haze 생성량을 감소시킬 수 있었으며 원심분리에 의한 cloud stability도 상당기간 지속되는 것으로 나타났다.

### 3. 발효과채주스의 제조

#### 가. 동치미로부터 젖산균의 분리 및 동정

재래식으로 담금 후 저온(5℃)에서 50일간 발효한 동치미의 발효특성은 Fig. 3-1과 같다. 초기(5일), 중기(30일), 말기(50일)의 발효액에서 각각 34, 27, 17개의 젖산균에 해당하는 colony를 분리, 동정한 결과 발효 초기에는 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* 2가 대부분을 차지하였고, 후기에는 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* 2가 줄어든 반면 *Lb. curvatus* 와 *Lc. lactis* subsp. *lactis*가 증가하였고, 말기에는 *Lc. lactis* subsp. *lactis*가 대부분이었다. 분리, 동정된 젖산균은 당발효능과 양상에 따라 15개의 group으로 나눌 수 있었다. (Table 3-1)

#### 나. 젖산균의 발효특성과 우수 젖산균주의 선발

동치미에서 분리한 15개 group의 젖산균을 1개월간 냉동 저장한 혼합과채주스(사과 : 당근 : 셀러리 : 돌미나리 : 대추 : 구기자 = 3 : 3 : 1 : 1/2 : 1 : 1/2)에 각각 접종한 후 25℃에서 9일간 발효시켜 각 균주의 과채주스에서의 발효양상 및 특성을 관찰하고 젖산균의 생육속도, 산생성능, 향미생성 등이 우수한 균주를 선발하였다.

##### 1) 젖산균의 생육속도

각 분리균주를 접종한 과채주스의 발효 기간 중 총젖산균수의 변화는 Table 3-2와 같다. 모든 균주는 발효 1일째 급격히 증가하고 3~5일까지는 서서히 증가하다가 그 이후에는 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 즉 발효 전 젖산균수는

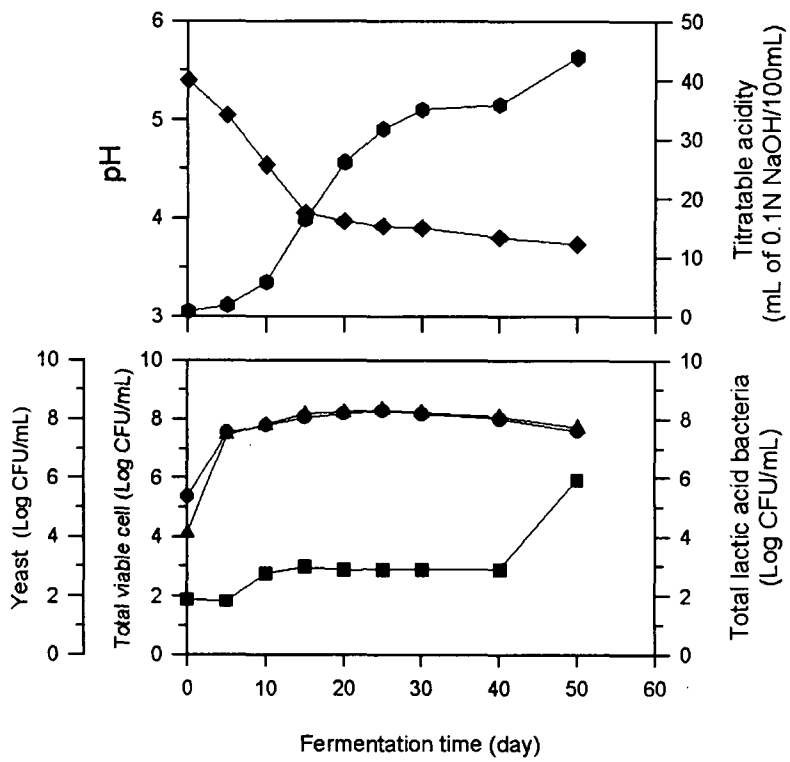


Fig. 3-2. The pH, titratable acidity, population of lactic acid bacteria, yeast and total viable cells of Donchimi juices during natural fermentation for 50 days at 5°C.

- ◆ pH
- Titratable acidity
- Total viable cells
- ▲ Yeast
- Total lactic acid bacteria

Table 3-1. Grouping of identified lactic acid bacteria isolated from Dongchimi juice fermentated naturally at 5°C

Group	Code No. of isolates	Percentage of identification (% id) *
I	M5-2~5, 7, 9~11, 14, 21, 25, E30-08	<i>Leu. mesen. mesen./dext 2</i> (99.9%), <i>Leu. mesen. mesen./dext 1</i> (0.1%)
II	M5-6, 16, 18, 22, 29, M30-6, 7, 13	<i>Leu. mesen. mesen./dext 2</i> (99.9%), <i>Lb. brevis</i> (0.1%)
III	M5-1, 17, 20, 30	<i>Leu. mesen. mesen./dext 2</i> (99.9%), <i>Leu. mesen. mesen./dext 1</i> (0.1%)
IV	M5-15, 28	<i>Leu. mesen. mesen./dext 2</i> (99.9%), <i>Leu. mesen. mesen./dext 1</i> (0.1%)
V	M5-13, 27, E5-5, 6	<i>Leu. mesen. mesen./dext 2</i> (99.9%), <i>Lb. fermentum</i> (0.1%)
VI	M5-12, 26	<i>Leu. citreum</i> (99.4%), <i>Leu. mesen. mesen./dext 1</i> (0.4%)
VII	E30-1	<i>Leu. mesen. mesen./dext 2</i> (62.0%), <i>Leu. mesen. mesen./dext 1</i> (37.8%), <i>Leu. citreum</i> (0.1%)
VIII	M30-1, 5, M50-3, 7	<i>Lb. curvatus</i> (99.9%), <i>Lb. delb. delb.</i> (0.1%)
IX	M30-3, 15, E50-2, 5, 6~8, 10, 12~14	<i>Lb. curvatus</i> (99.9%), <i>Lb. plantarum</i> (0.1%)
X	E50-1	<i>Lb. curvatus</i> (92.7%), <i>Lb. delb. delb.</i> (6.9%), <i>Lb. helveticus</i> (0.2%)
XI	M5-8, 19, 23	<i>Lb. cellobiosus</i> (99.6%), <i>Lb. fermentum</i> (0.2%)
XII	M30-2, 4, 9~12, 14, 16, 17, M50-1, 2, 4~6	<i>Lc. lactis lactis</i> (89.0%), <i>Lc. lactis lactis</i> (9.4%), <i>Leu. mesen. mesen./dext 2</i> (0.9%)
XIII	E5-2, 8	<i>Lb. acidophilus</i> (83.8%), <i>Lb. delb. delb.</i> (15.0%), <i>Lb. fermentum</i> (0.1%)
XIV	Y30-1~8	<i>Lb. cellobiosus</i> (95.9%), <i>Lb. fermentum</i> (2.9%)
XV	Y40-1~5	<i>Lb. delb. delb.</i> (90.9%), <i>Lb. acidophilus</i> (8.8%), <i>Lb. viridescens</i> (0.1%)

\* Percentage of identification (% id) : an estimate of how closely the profile corresponds to the taxon relative to all the other taxa in the data base.

$10^{6-7}$ CFU/ml이던 것이  $10^{8-9}$ CFU/ml까지 증가하였다가 다시 감소하였다. 그러나 M5-13, M5-15, M30-7, Y30-1, Y40-1 균주는 발효 9일째까지 균수가 유지되었다. 특히 M5-17의 경우 다른 균주에 비해 증식속도가 빠르고, 또한 최대 균수가  $10^9$ CFU/ml로 다른 균주보다 10배 가량 많았다. 일반적으로 *Leuconostoc*속은 산

Table 3-2. Number of total lactic acid bacteria and coliform bacteria in mixed fruit and vegetable juices\* during fermentation at 25°C by an individual starter isolated from Dongchimi juices

(unit : CFU/ml)

S <sup>a</sup> \ T <sup>b</sup>	Lactic acid bacteria				Coliform bacteria			
	0*	1	3	9	0	1	2	3
M5-8	3.90×10 <sup>6</sup>	5.80×10 <sup>8</sup>	2.30×10 <sup>6</sup>	5.90×10 <sup>6</sup>	8.0×10 <sup>2</sup>	2.0×10 <sup>1</sup>	2.0×10 <sup>1</sup>	nd
M5-9	7.60×10 <sup>6</sup>	7.00×10 <sup>7</sup>	4.62×10 <sup>7</sup>	6.10×10 <sup>6</sup>	7.0×10 <sup>2</sup>	1.0×10 <sup>2</sup>	nd	nd
M5-12	3.40×10 <sup>6</sup>	1.80×10 <sup>8</sup>	1.40×10 <sup>7</sup>	7.00×10 <sup>7</sup>	2.0×10 <sup>2</sup>	9.0×10 <sup>1</sup>	1.0×10 <sup>1</sup>	nd
M5-13	5.27×10 <sup>7</sup>	1.52×10 <sup>8</sup>	4.40×10 <sup>7</sup>	1.64×10 <sup>8</sup>	7.0×10 <sup>2</sup>	1.0×10 <sup>1</sup>	1.0×10 <sup>1</sup>	nd
M5-15	1.22×10 <sup>6</sup>	7.30×10 <sup>7</sup>	3.40×10 <sup>7</sup>	1.39×10 <sup>8</sup>	5.0×10 <sup>2</sup>	4.0×10 <sup>1</sup>	nd	nd
M5-17	1.27×10 <sup>7</sup>	1.46×10 <sup>9</sup>	1.41×10 <sup>9</sup>	9.70×10 <sup>7</sup>	7.0×10 <sup>2</sup>	nd	nd	nd
M30-3	2.00×10 <sup>6</sup>	3.40×10 <sup>8</sup>	3.50×10 <sup>8</sup>	1.72×10 <sup>6</sup>	9.0×10 <sup>2</sup>	2.0×10 <sup>2</sup>	1.0×10 <sup>1</sup>	nd
M30-7	1.10×10 <sup>7</sup>	1.04×10 <sup>8</sup>	5.00×10 <sup>6</sup>	1.66×10 <sup>8</sup>	1.2×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>2</sup>	1.0×10 <sup>1</sup>	nd
M30-11	2.03×10 <sup>6</sup>	7.20×10 <sup>8</sup>	1.52×10 <sup>8</sup>	2.28×10 <sup>6</sup>	5.0×10 <sup>2</sup>	1.0×10 <sup>2</sup>	1.0×10 <sup>1</sup>	nd
M50-1	1.90×10 <sup>6</sup>	7.10×10 <sup>8</sup>	1.56×10 <sup>8</sup>	4.14×10 <sup>7</sup>	5.4×10 <sup>3</sup>	2.0×10 <sup>1</sup>	3.0×10 <sup>1</sup>	nd
M50-7	2.70×10 <sup>6</sup>	3.90×10 <sup>8</sup>	1.54×10 <sup>8</sup>	4.90×10 <sup>6</sup>	7.0×10 <sup>2</sup>	2.6×10 <sup>2</sup>	2.0×10 <sup>1</sup>	nd
E5-8	2.70×10 <sup>7</sup>	2.24×10 <sup>8</sup>	1.40×10 <sup>7</sup>	3.40×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	2.0×10 <sup>1</sup>	nd	nd
E30-1	8.10×10 <sup>6</sup>	1.78×10 <sup>8</sup>	5.80×10 <sup>7</sup>	4.95×10 <sup>6</sup>	4.0×10 <sup>2</sup>	2.0×10 <sup>1</sup>	nd	nd
E50-1	3.35×10 <sup>6</sup>	3.20×10 <sup>8</sup>	2.17×10 <sup>8</sup>	9.00×10 <sup>6</sup>	9.0×10 <sup>2</sup>	nd	nd	nd
Y30-1	1.11×10 <sup>7</sup>	1.47×10 <sup>8</sup>	1.70×10 <sup>7</sup>	1.03×10 <sup>8</sup>	2.0×10 <sup>2</sup>	2.0×10 <sup>1</sup>	nd	nd
Y40-1	4.80×10 <sup>4</sup>	2.79×10 <sup>8</sup>	6.50×10 <sup>7</sup>	1.55×10 <sup>8</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	4.0×10 <sup>1</sup>	nd	nd

nd : not detected.

\*The data are population of lactic acid bacteria in mixed fruit and vegetable juices immediately after inoculation of starter. The mixed fruit and vegetable juices contained wild lactic acid bacteria of 1.1×10<sup>2</sup>CFU/ml before inoculation of starter.

<sup>a</sup> Starter

<sup>b</sup> Fermentation time

에 대한 내성이 약하여 pH가 높은 발효초기에 증식하다가 젖산균에 의해 생성된 젖산으로 인해 저해를 받아 감소하나 M5-17은 발효기간이 경과하여도 다른 젖산균에 비해 생육능이 좋은 것으로 보아 산에 대한 내성이 있는 *Leuconostoc*속임을 알 수 있었다.

## 2) 젖산발효가 coliform bacteria의 생육억제에 미치는 효과

각 젖산균을 접종한 과채쥬스의 coliform bacteria수는 발효 전  $10^{2-3}$  CFU/ml 이던 것이 발효가 진행됨에 따라 감소하여 발효 2일째에는  $0\sim 10^1$  CFU/ml로 나타났으며, 3일째에는 완전히 사라진 것을 관찰할 수 있었다.

이것은 젖산균에 의해 생성된 CO<sub>2</sub>, 산, 항균물질 등에 의해 coliform bacteria가 저해를 받은 것이라 볼 수 있다(Table 3-2).

## 3) 수소이온농도(pH)와 적정산도의 변화

발효 전 혼합과채쥬스의 pH와 적정산도가 5.05~5.09, 18.0~20.0이던 것이 발효가 진행되면서 pH는 감소하고, 적정산도는 증가하였다(Table 3-3).

대부분의 균주에 의한 발효액의 pH는 1일째까지 급속히 감소한 후 3일째까지는 서서히 감소하고, 3일째 이후에는 거의 변화되지 않다가 9일째 다시 약간 감소된 것을 볼 수 있다. 그러나 M5-17, M30-11, E30-1, Y30-1, Y40-1의 경우 1일째 급격히 감소하였고 그 후부터 9일째까지는 서서히 감소하였다. 특히 M5-17의 pH가 가장 많이 저하되었고(9일째 3.20), 다음으로 M30-11, E5-8, E50-1, Y30-1, Y40-1의 pH가 비교적 많이 저하되었다(9일째 3.37~3.41). 적정산도는 계속해서 증가하였고, 증가정도는 M30-11, M5-17, Y30-1, E50-1, Y40-1 순이었다. 그외의 균주에 의한 발효액의 pH는 3.53~4.09 정도까지 떨어졌고, 적정산도는 101.5~193.0 정도였다. 발효액의 pH 변화 양상을 젖산균수의 변화와 비교해 보았을 때 젖산균수의 성장속도와 pH 저하 정도가 거의 비례한 것으로 보아 젖산균의 생육

Table 3-3. Change in the pH of mixed fruit and vegetable juices during fermentation at 25°C by an individual starter isolated from Dongchimi juices

S <sup>a</sup> \ T <sup>b</sup>	pH				Titratable acidity(ml of 0.1N NaOH/100ml)			
	0	1	3	9	0	1	2	3
M5-8	5.05	4.14	3.65	3.78	1.80	50.0	70.0	148.0
M5-9	5.08	3.89	3.64	3.49	20.0	81.5	115.0	168.0
M5-12	5.09	4.49	3.81	3.62	20.2	51.5	111.0	190.0
M5-13	5.09	4.17	3.78	3.59	20.2	43.8	75.0	169.5
M5-15	5.07	4.04	3.69	3.58	19.7	62.0	108.0	177.0
M5-17	5.08	3.83	3.43	3.20	20.0	58.0	115.2	232.0
M30-3	5.07	4.03	3.68	3.72	19.7	35.0	78.0	114.0
M30-7	5.08	3.92	3.58	3.58	20.0	86.3	116.0	191.5
M30-11	5.07	4.12	3.65	3.40	19.7	44.5	82.8	273.0
M50-1	5.07	4.12	3.70	3.65	19.7	45.0	74.0	133.0
M50-7	5.09	4.15	3.69	3.65	20.2	44.5	73.5	153.5
E5-8	5.09	4.35	3.76	3.40	20.2	50.5	114.8	193.0
E30-1	5.05	3.80	3.65	3.64	18.5	92.0	113.5	161.8
E50-1	5.07	4.06	3.64	3.36	19.7	54.5	99.3	209.0
Y30-1	5.07	4.09	3.88	3.41	19.7	61.0	85.0	209.0
Y40-1	5.08	4.12	3.87	3.37	20.0	59.0	93.0	203.0

<sup>a</sup> Starter

<sup>b</sup> Fermentation time

과 함께 생성된 젖산균으로 인해 pH가 저하되었음을 알 수 있었다.

#### 4) 향미생성 효과

발효액의 향기 평가에 참여한 panel은 과채발효주스 및 과채주스에 관심이 높

Table 3-4. Aroma test of mixed fruit and vegetable juices fermented for 9 days at 25°C by an individual starter isolated from Dongchimi juices

Starter	Attributable terms expressed
M5-8	Alcoholic odor
M5-9	moldy odor
M5-12	moldy and alcoholic odor
M5-13	off-odor
M5-15	vegetable and acidic odor
M5-17	vegetable and acidic odor
M30-3	off-odor
M30-7	vegetable and acidic odor
M30-11	vegetable and acidic odor
M50-1	moldy and alcoholic odor
M50-7	off-odor
E5-8	vegetable, acidic, and sweet odor
E30-1	off-odor
E50-1	off-odor
Y30-1	vegetable and acidic odor
Y40-1	vegetable and acidic odor

고, 마셔본 경험이 많은 본 연구소의 3명의 여대학원생을 선정하였고, 이들에게 여러 표준물질을 거치게 한 후 발효 9일째에 15개 군주에 의한 발효액의 향기를 관능적으로 묘사분석하게 하였다. M5-8은 알콜취를, M5-9, M5-13, M30-3, M50-7, E5-5, E30-1, E50-1은 약간의 군덕내와 불쾌취를, M5-12는 군덕내와 알콜취를 내는 것으로 조사되었다. 반면 M5-15, M5-17, M30-7, M30-11는 신선한 야



채향과 신내를 내고, E5-8은 야채향과 신내, 단내를, Y30-1은 은은하게 야채향과 신내를, Y40-1은 강한 향을 내는 것으로 표현되었다. M5-15, M5-17, M30-7, M30-11, E5-8, Y30-1, Y40-1 균주에 의한 발효액이 모든 panel들의 좋은 관능 점수를 얻었다(Table 3-4).

라. 당과 식염이 과채즙의 젖산발효에 미치는 효과

성장속도가 빠르고 좋은 향미를 생성하는 젖산균을 혼합배양하면 발효과채즙의 생산속도와 품질이 우수할 것으로 기대하여 *Leuconostoc*속, *Lactococcus*속, *Lactobacillus*속 중에서 가장 우수하다고 선정된 M5-17 (*Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* 2), M30-11(*Lc. lactis* subsp. *lactis*), Y30-1(*Lb. cellobiosus*)의 혼합발효를 시도하였다. 발효과채즙은 산미와 감미가 중요하다. 이들 젖산음료의 산미는 젖산균의 종류와 생육속도에 크게 지배되고 젖산균의 생육과 산생성능은 당과 식염의 농도에 크게 지배된다. 따라서 젖산균의 생육과 산생성능 등에 효과적인 환경조건을 만들어주기 위하여 젖산균의 접종 농도와 혼합비율, 식염 농도, 당 종류와 농도를 결정하고자 하였다.

#### 1) 젖산균의 접종농도와 혼합비율

Starter를 첨가하여 발효시 최적의 starter양과 배합비율을 결정하기 위해 M5-17(*Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* 2), M30-11(*Lc. lactis* subsp. *lactis*), Y30-1(*Lb. cellobiosus*)을 농도와 배합비율을 달리하여 혼합과채즙에 첨가 후 발효양상을 조사하여 Table 3-5와 같은 결과를 얻었다.

3개 균주를 0.01%씩 접종한 주스(I구)의 젖산균은  $1.28 \times 10^6$ CFU/ml이고, 이보다 10배 많이 첨가한 주스(II구)에서는  $1.08 \times 10^7$ CFU/ml, 100배 많이 첨가한 주스(III구)에서는  $1.35 \times 10^8$ CFU/ml이었다. M30-11, Y30-1보다 10배 가량 생육속도

Table 3-5. Changes in the population of lactic acid bacteria, coliform bacteria, pH and titratable acidity in mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb.cellobiosus* at 25°C

T <sup>a</sup> \ S <sup>b</sup>	Lactic acid bacteria (CFU/ml)				Coliform bacteria (CFU/ml)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
0	1.28×10 <sup>6</sup>	1.08×10 <sup>7</sup>	1.35×10 <sup>8</sup>	5.21×10 <sup>6</sup>	1.00×10 <sup>2</sup>	1.00×10 <sup>2</sup>	1.20×10 <sup>2</sup>	1.40×10 <sup>2</sup>
1	6.31×10 <sup>8</sup>	8.20×10 <sup>8</sup>	1.78×10 <sup>8</sup>	4.47×10 <sup>8</sup>	1.00×10 <sup>1</sup>	1.00×10 <sup>1</sup>	2.00×10 <sup>1</sup>	1.00×10 <sup>1</sup>
2	4.45×10 <sup>8</sup>	3.51×10 <sup>8</sup>	1.23×10 <sup>8</sup>	5.80×10 <sup>8</sup>	nd	nd	nd	nd
3	2.71×10 <sup>8</sup>	4.20×10 <sup>8</sup>	1.34×10 <sup>8</sup>	4.17×10 <sup>8</sup>	nd	nd	nd	nd
6	2.60×10 <sup>8</sup>	2.57×10 <sup>8</sup>	1.70×10 <sup>8</sup>	2.55×10 <sup>8</sup>	nd	nd	nd	nd
9	2.51×10 <sup>8</sup>	1.20×10 <sup>8</sup>	1.43×10 <sup>8</sup>	2.85×10 <sup>8</sup>	nd	nd	nd	nd

T <sup>a</sup> \ S <sup>b</sup>	pH				Titratable acidity(ml of 0.1N NaOH/100ml)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
0	4.99	4.98	4.88	5.02	21.0	20.8	25.0	21.8
1	3.98	3.86	3.76	4.02	52.5	63.0	80.0	56.0
2	3.80	3.75	3.71	3.88	85.0	92.0	113.0	80.0
3	3.70	3.64	3.62	3.79	104.0	114.0	134.0	94.5
6	3.44	3.40	3.40	3.55	158.0	159.0	171.5	125.0
9	3.39	3.37	3.39	3.46	169.3	180.0	190.0	151.0

<sup>a</sup> Temperature

<sup>b</sup> Initial amount of inoculum in mixed fruit and vegetable juices

(unit : ml/juice 100ml)

Strains	I	II	III	IV
<i>Leu. mesenteroides</i>	0.01	0.10	1.00	0.01
<i>Lc. lactis</i>	0.01	0.10	1.00	0.10
<i>Lb. cellobiosus</i>	0.01	0.10	1.00	0.10

가 빠른 M5-17은 0.01%, M30-11과 Y30-1은 각각 0.1%씩 접종한 주스(IV구)에서는  $5.21 \times 10^6$  CFU/ml으로 3개 균주를 0.01%씩 접종한 시료(I구)에서보다 5배 가량 더 많이 검출되었다. 그러나 모든 시료에서 발효 1일만에  $10^8$  CFU/ml에 도달하였고 발효기간이 증가하여도 균수의 변화는 거의 없었다. Coliform bacteria 수는 발효초기  $10^2$  CFU/ml을 보이다가 발효 2일째 모든 구에서 검출되지 않았다. pH 저하정도는 III, II, I, IV구 순이었으며 큰 차이는 나타내지 않았다. 이것은 균접종량이 많을수록 발효가 빠르게 진행됨을 알 수 있다. 그러나 IV구의 경우 I구보다 5배 정도 접종량이 많음에도 불구하고 pH 저하속도가 느렸다. 마찬가지로 적정산도의 증가도 III, II, I, IV순이었다. 따라서 starter 혼합비율과 농도는 각 균주를 동일한 비율로 0.01%씩 첨가하였다.

## 2) 당의 종류와 농도

젖산균의 생육, 산생성능, 관능적으로 좋은 영향을 미칠 수 있는 당의 종류와 농도를 선정하기 위하여 여러 당을 첨가하여 발효특성을 비교, 조사하였다.

### 가) 당의 종류

당을 첨가하지 않은 혼합과채주스의 초기 당농도는  $8.4^\circ$  Brix였고, 여기에 glucose, fructose, fructooligosaccharide, isomaltoligosaccharide를  $20^\circ$  Brix가 되게 첨가한 후  $25^\circ\text{C}$ 에서 9일간 발효시킨 결과 Table 3-6과 같다.

발효 초기 총젖산균수는  $8.40 \sim 9.40 \times 10^5$  CFU/ml이던 것이 fructose를 첨가한 구에서는 발효 1일째  $1.11 \times 10^9$  CFU/ml까지 증가하여 발효 3일째  $1.64 \times 10^9$  CFU/ml까지 증가하였다가 6일째부터 점차 감소하기 시작하여 발효 9일째  $1.43 \times 10^8$  CFU/ml이 되었으나 다른 모든 구에서는 발효 1일만에  $10^8$  CFU/ml로 증가하였고, 그 후부터 발효 9일째까지 총젖산균수는 크게 변화가 없었다. Coliform bacteria

Table 3-6. Effect of sugars on the population of total lactic acid bacteria, coliform bacteria, pH and titratable acidity in mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus* at 25°C

Fermentation time (day)	Control (8.4°Brix)	Sugars (20°Brix)			
		Glucose	Fructose	Fructooligo.	Isomaltooligo.
<b>Lactic acid bacteria (CFU/ml)</b>					
0	$9.40 \times 10^5$	$8.40 \times 10^5$	$8.35 \times 10^5$	$8.50 \times 10^5$	$8.49 \times 10^5$
1	$6.20 \times 10^8$	$9.20 \times 10^8$	$1.11 \times 10^9$	$7.75 \times 10^8$	$7.50 \times 10^8$
3	$8.10 \times 10^8$	$8.50 \times 10^8$	$1.64 \times 10^9$	$8.58 \times 10^8$	$8.45 \times 10^8$
9	$3.51 \times 10^8$	$4.20 \times 10^8$	$1.43 \times 10^8$	$4.85 \times 10^8$	$4.25 \times 10^8$
<b>Coliform bacteria (CFU/ml)</b>					
0	$2.90 \times 10^2$	$2.90 \times 10^2$	$3.40 \times 10^2$	$3.10 \times 10^2$	$3.02 \times 10^2$
1	$2.00 \times 10^1$	$2.00 \times 10^1$	$1.00 \times 10^1$	$1.00 \times 10^1$	$1.00 \times 10^1$
2	nd	nd	nd	nd	nd
<b>pH</b>					
0	4.99	4.94	4.98	5.02	5.03
3	3.56	3.53	3.55	3.57	3.57
9	3.37	3.35	3.36	3.39	3.34
<b>Titratable acidity (ml of 0.1N NaOH/ml)</b>					
0	18.0	18.0	18.5	17.5	17.5
3	111.0	97.5	98.0	97.0	98.6
9	162.0	141.0	149.3	159.0	158.3
<b>Preference test</b>					
Sum of ranking order*	200 <sup>b</sup>	130 <sup>ab</sup>	123 <sup>ab</sup>	65 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>

\* The data are obtained from 40 panel members. The most preferable sample is ranked first and the least preferable sample is ranked sixth. ( $p < 0.01$ )

bacteria 수는 발효 초기  $10^2$ CFU/ml이던 것이 발효 2일째 모든 구에서 검출되지 않았다.

pH는 발효초기 4.94~5.02이던 것이 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하여 발

효 9일째 3.35~3.39로 pH 저하에는 당의 종류가 영향을 미치지 못하였다. 이는 원료로 사용된 혼합과채쥬스 내에 있는 당만으로 젖산균이 생육하기에는 충분한 것으로 여겨진다. 반면 첨가 당 종류간에 pH 변화는 차이가 없었으나 적정산도는 오히려 당을 첨가하지 않은 대조구가 당을 첨가한 구에 비해 더 높게 나왔음을 알 수 있다. pH는 거의 동일하나 적정산도가 더 높게 나온 것으로 보아 당첨가구에 비해 대조구의 경우 산도가 강한 유기산을 더 많이 생성한 것으로 추측된다.

순위법에 의해 기호도검사를 실시한 결과 전체적인 선호도는 플럭토올리고당 첨가구, 이소말토올리고당 첨가구, 포도당 첨가구, 과당 첨가구, 무첨가군 순으로 무첨가구와 올리고

당 첨가구는 1% 유의수준에서 차이가 있었다. 올리고당을 첨가한 구에서는 부드러운 맛과 발효 야채간에 조화가 있었다는 의견이 많았고, 당을 첨가하지 않은 구의 경우 신맛이 너무 강해 기호도가 낮게 나왔다.

#### 나) 당의 농도

관능특성이 좋고 장내세균, 즉 비피더스균을 증식시켜 줄 수 있으며 또한 미생물에 의해 분해되지 않아 체내에서 흡수되지 않음으로 당뇨병과 같은 성인병 예방을 고려하여 fructooligosaccharide를 선정하고 과채쥬스에 0~30%(w/v)의 당을 첨가하여 25℃에서 9일간 발효한 결과는 Table 3-7과 같다.

발효 초기 총젖산균수는  $10^5$ CFU/ml이던 것이 모든 구에서 발효 1일째에  $10^8$ CFU/ml에 도달하였고, 발효 3일째까지 약간 증가하다가 발효 9일째에는 감소하였고, coliform bacteria는 모든 구에서 발효 2일째에 사라진 것을 관찰할 수 있었다.

pH는 당의 농도와는 관계없이 모든 농도에서 1일째에 급격히 감소하여 그 후에는 서서히 감소하는 경향을 나타내었고 적정산도도 당의 농도와는 관계가 없음을 알 수 있었다. 당의 농도를 달리한 과채쥬스를 발효 3일째에 관능검사를 실시

Table 3-7. Effect of fructooligosaccharides on the population of total lactic acid bacteria, coliform bacteria, pH and titratable acidity in mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus* at 25°C

Fermentation time (day)	Fructooligosaccharides (%)					
	0	10	15	20	25	30
<b>Lactic acid bacteria (CFU/ml)</b>						
0	$8.60 \times 10^5$	$8.40 \times 10^5$	$9.98 \times 10^6$	$8.50 \times 10^5$	$9.00 \times 10^5$	$8.75 \times 10^5$
1	$5.40 \times 10^8$	$6.30 \times 10^9$	$6.22 \times 10^8$	$6.60 \times 10^8$	$8.00 \times 10^8$	$7.50 \times 10^8$
3	$9.80 \times 10^8$	$9.40 \times 10^9$	$9.10 \times 10^8$	$7.90 \times 10^8$	$7.20 \times 10^8$	$9.99 \times 10^8$
9	$4.27 \times 10^8$	$4.46 \times 10^9$	$4.52 \times 10^8$	$3.41 \times 10^8$	$2.08 \times 10^8$	$4.39 \times 10^8$
<b>Coliform bacteria (CFU/ml)</b>						
0	$3.60 \times 10^2$	$3.40 \times 10^2$	$4.98 \times 10^2$	$4.50 \times 10^2$	$4.00 \times 10^2$	$3.75 \times 10^2$
1	$7.00 \times 10^1$	$5.00 \times 10^1$	$9.90 \times 10^1$	$9.00 \times 10^1$	$9.00 \times 10^1$	$1.00 \times 10^1$
2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>pH</b>						
0	4.76	4.75	4.76	4.75	4.75	4.78
1	3.83	3.82	3.83	3.83	3.84	3.87
3	3.59	3.57	3.57	3.54	3.55	3.61
9	3.39	3.37	3.39	3.36	3.38	3.40
<b>Titratable acidity (ml of 0.1N NaOH/100ml)</b>						
0	27.0	26.5	26.0	25.0	24.5	30.0
1	74.0	75.0	70.0	61.0	66.0	82.0
3	145.0	145.0	134.0	129.7	126.5	156.5
9	170.0	185.0	189.0	190.4	185.2	201.5
<b>Preference test</b>						
Sum of ranking order*	240 <sup>b</sup>	123 <sup>ab</sup>	58 <sup>a</sup>	76 <sup>a</sup>	152 <sup>ab</sup>	191 <sup>ab</sup>

\* The data are obtained from 40 panel members. The most preferable sample is ranked first and the least preferable sample is ranked sixth. ( $p < 0.01$ )

한 결과 전체적인 선호도는 15, 20, 10, 25, 30, 0% 첨가구 순이었다. 1% 유의수준에서 15, 20% 첨가구와 0, 30% 첨가구간에 차이가 있었다. 주로 단맛을 선호하는 사람의 경우 20%의 당첨가구에 좋은 점수를 주었고, 단맛에 대한 선호도가 낮은 사람은 15%의 당첨가구에 좋은 점수를 주었으며 25, 30% 첨가구는 지나치게 단맛이 느껴졌고, 0, 10% 첨가구는 신맛이 강하다는 의견이 많았다.

#### 다) 당의 첨가시기

발효 전 혼합과채주스에 fructooligosaccharide를 15% 첨가하여 25℃에서 3일간 발효하거나, 당을 첨가하지 않은 채 혼합과채주스를 25℃에서 3일간 발효 후 fructooligosaccharide를 15% 첨가하여 관능검사를 실시하였다. 검사 결과 40명의 검사자 중 35명의 검사자들이 발효 전에 당을 첨가하여 발효 한 주스에 더 높은 선호도를 보였다( $p < 0.001$ ). 단맛의 강도나 정도는 거의 비슷하나 발효 전에 당을 넣은 시료의 경우 탁한 맛이 덜하고 상쾌한 신맛이 나지만 발효 후에 당을 넣은 시료의 경우 텁텁하고 끈적이며 점성이 높다는 의견이었다.

#### 3) 식염의 농도

혼합과채주스 발효시 식염의 농도가 발효에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보고, 또한 젖산균의 생육과 산의 생성, pH 저하 정도, 관능특성에 효과적인 식염의 농도를 결정하기 위해 각각 0.1, 0.2, 0.4, 0.8%의 식염을 혼합과채주스에 첨가하여 발효특성을 관찰한 결과는 Table 3-8과 같다.

젖산균은 식염농도 0.2%일 때 가장 생육속도가 빨랐고 coliform bacteria는 첨가되는 식염농도에 관계없이 발효 2일째에 검출되지 않았으며, pH 저하 정도와 적정산도의 증가속도는 모든 구에서 거의 동일한 것으로 보아 본 과채주스 발효에 사용된 0.2~0.5%의 식염 농도는 주스 발효에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 볼 수 있다. 관능검사를 실시한 결과 기호도는 0.2, 0.1, 0, 0.4, 0.8% 순이었고,

Table 3-8. Effect of sodium chloride on the population of total lactic acid bacteria, coliform bacteria, pH and titratable acidity in mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus* at 25°C

Fermentation time (day)	Sodium chloride (%)				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
<b>Lactic acid bacteria (CFU/ml)</b>					
0	$9.40 \times 10^5$	$1.14 \times 10^6$	$9.37 \times 10^5$	$9.55 \times 10^5$	$9.93 \times 10^5$
1	$6.63 \times 10^8$	$8.00 \times 10^8$	$8.40 \times 10^8$	$8.93 \times 10^8$	$6.97 \times 10^8$
3	$6.70 \times 10^8$	$9.40 \times 10^8$	$1.07 \times 10^9$	$9.25 \times 10^8$	$7.50 \times 10^8$
9	$1.27 \times 10^8$	$4.46 \times 10^8$	$6.52 \times 10^8$	$4.41 \times 10^8$	$2.08 \times 10^8$
<b>Coliform bacteria (CFU/ml)</b>					
0	$3.50 \times 10^2$	$2.50 \times 10^2$	$2.00 \times 10^2$	$3.10 \times 10^2$	$2.40 \times 10^2$
1	$2.00 \times 10^1$	$1.00 \times 10^1$	$1.00 \times 10^1$	$1.00 \times 10^1$	$1.00 \times 10^1$
2	nd	nd	nd	nd	nd
<b>pH</b>					
0	4.78	4.72	4.70	4.65	4.60
1	3.94	3.90	3.91	3.89	3.83
3	3.65	3.52	3.56	3.52	3.46
9	3.39	3.37	3.37	3.36	3.30
<b>Titratable acidity (ml of 0.1N NaOH/100ml)</b>					
0	27.6	28.0	27.0	27.0	28.0
1	57.0	57.2	57.0	55.0	55.0
3	150.0	114.0	116.0	115.5	117.0
9	180.0	165.0	171.0	170.4	175.2
<b>Preference test</b>					
Sum of ranking order <sup>a)</sup>	114	95*	40**	148**	190**

<sup>a)</sup> The data were obtained from 40 panel members. The most preferable sample is ranked fruit and the least preferable sample is ranked sixth. (\* P<0.05, \*\* P<0.01)



1% 유의수준에서 0.4, 0.8% 첨가구와 0.2% 첨가구간에는 유의적 차이가 있었다. 0.4% 첨가구부터는 짠맛이 느껴지고 0.8%의 식염 첨가시 느끼한 짠맛이 느껴졌다는 의견이 많았다. 이는 낮은 농도의 식염이 발효과채쥬스의 기호도에 어떠한 상승효과를 부여하는 것이라 볼 수 있다.

#### 4) 발효 종점 결정

발효 종점을 결정하기 위해 혼합과채쥬스에 fructooligosaccharide 15%, NaCl 0.2%, starter 0.01%씩을 첨가하여 25℃에서 4일간 발효하면서 날짜별로 시료를 채취하여 관능검사를 실시함으로 그때의 pH를 발효 종점으로 잡았다. 관능검사를 실시한 결과 선호도는 발효 3일, 2일, 4일, 1일 순이었고, 1% 유의수준에서 발효 1일째와 3일째 간에 차이가 있었다. 따라서 25℃에서 발효 3일째를 최적 발효 종점으로 잡았다. 이 때의 pH는 3.62였다(Table 3-9).

Table 3-9. A preference test for mixed fruit and vegetable juices fermented by a mixture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus* at the optimum concentrations of fructooligosaccharide, sodium chloride and starter at 25℃

Fermentation time (day)	Sum of ranking order <sup>a)</sup>
1	150**
2	85*
3	50**
4	115

<sup>a)</sup> The data were obtained from 40 panel members. The most preferable sample is ranked fruit and the least preferable sample is ranked sixth. (\* P<0.05, \*\* P<0.01)

이상과 같이 발효전에 fructooligosaccharide를 15%, 식염 0.2%를 혼합과채쥬스에 첨가하고 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* M5-15, *Lc. lactis* subsp. *lactis* M30-11, *Lb. cellobiosus* Y30-1을 각각 0.01%씩 접종시 혼합과채쥬스 발효 및 선호도에 가장 좋은 영향을 미친 것으로 볼 수 있다. 이와같은 최적 조건으로 25℃에서 9일간 발효시 발효과채쥬스의 발효특성은 발효 전 총젖산균과 coliform bacteria는  $9.37 \times 10^5$ ,  $2.00 \times 10^2$  CFU/ml이던 것이 발효 3일째 총젖산균은  $1.02 \times 10^9$  CFU/ml이었고, coliform bacteria는 검출되지 않았고, pH와 적정산도는 발효 전 4.70, 27.0이던 것이 발효 3일째 3.58, 116.0이었다. 25℃ 발효시 최적 pH 3.62에 도달하는 데는 대략 3일 정도의 배양기간이 필요함을 알 수 있었다.

마. 발효온도가 과채쥬스의 젖산발효 및 품질특성에 미치는 효과

과채발효시 발효 및 저장온도를 달리했을 때 발효식품은 맛, 냄새, 색도, 염도, 조직상태, 산도, pH, 당, 유기산 등의 물리화학적 품질과 관능적 품질이 달라진다. 저온에서 발효시키면 고온보다 숙성에 소요되는 시간은 훨씬 오래 걸리지만 풍미에 좋은 영향을 미칠 수 있는 성분들이 많아지고, 발효에 관여하는 미생물의 증식 양상은 특히 온도의 영향이 큰 것으로 보고되고 있다. 따라서 온도를 달리하여 발효시 발효온도가 과채쥬스의 품질에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 혼합과채쥬스에 fructooligosaccharide 15%, sodium chloride 0.2%를 첨가하고, starter로 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* M5-17, *Lc. lactis* subsp. *lactis* M30-11, *Lb. cellobiosus* Y30-1을 0.01%씩 접종하여 발효 온도(5, 15, 25, 35℃)를 달리한 조건에서 27일간 발효시켜 품질 특성을 비교, 조사하였다.

#### 1) 미생물의 분포

발효온도를 달리한 발효과채쥬스의 미생물 변화는 Fig. 3-3과 같다.

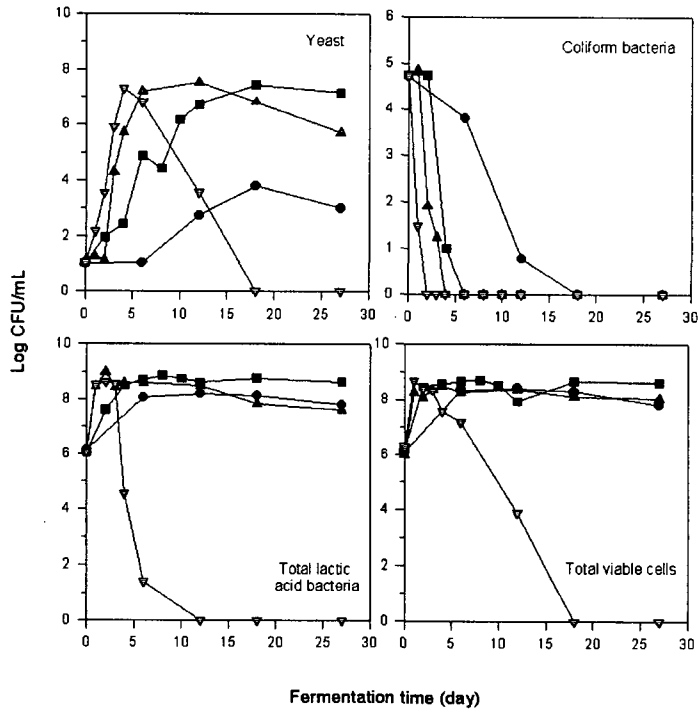


Fig. 3-3. Effect of temperature on population of coliform bacteria, lactic acid bacteria, yeast and total viable cells of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb.cellobiosus*.  
 ( ●-● : 5°C, ■-■ : 15°C, ▲-▲ : 25°C, ▼-▼ : 35°C )

Starter를 첨가하기 전 혼합과채쥬스의 미생물 분포는 lactic acid bacteria  $1.01 \times 10^4$ CFU/mL, coliform bacteria  $5.90 \times 10^4$ CFU/mL, yeast  $1.05 \times 10^1$ CFU/mL, total viable

cell count  $7.55 \times 10^5$ CFU/ml였다.

총젖산균수는 5, 15, 25, 35°C 발효시 각각 발효 6, 4, 1, 1일째에  $10^8$ CFU/ml에 도달하였고 5, 15°C 발효에서는 발효 27일까지 총젖산균수가 거의 변화가 없었으나 25°C 발효의 경우 발효 4일 이후부터 서서히 감소하여 발효 18일째  $10^7$ CFU/ml였다. 35°C 발효에서는 3일째 이후 급격히 감소하여 12일째에는 완전히 사멸되었다. 이는 관능검사시 35°C에서 발효한 구의 경우 알코올 향이 강하게 느껴진 것으로 보아 효모에 의해 생성된 알코올 성분에 의해 젖산균이 저해를 받은 것으로 추측된다.

Coliform bacteria의 경우 5°C 발효시 18일째, 15°C 발효시 6일째, 25°C 발효시 4일째, 35°C 발효시 2일째에 검출되지 않았다. 이는 발효 온도가 낮을수록 젖산균의 생육속도와 pH저하 속도가 느려 coliform bacteria에 대한 저해속도가 느린 것을 알 수 있다. 효모는 발효 온도가 높을수록 증가속도가 빨랐고, 5°C 발효의 경우 초기에  $10^2$ CFU/ml이던 것이 발효 18일이 되어서야  $10^3$ CFU/ml으로 증가된 반면 15°C에서 발효한 시료는 발효 4일째  $10^2$ CFU/ml이다가 그 이후 빠른 속도로 증가하여 발효 18일째  $10^7$ CFU/ml까지 도달하였다. 25°C 발효의 경우 발효 3일째  $10^4$ CFU/ml, 6일째  $10^7$ CFU/ml에 도달하였고, 발효 12일 이후에는 점차 감소하는 경향을 보였다. 35°C 발효에서는 젖산균과 마찬가지로 효모수도 급격히 증가하여 발효 4일째에  $10^7$ CFU/ml에 도달하였고 그 후 다시 급격히 감소하여 18일째는 효모가 검출되지 않았다.

총균수는 5, 15, 25°C 발효시 총젖산균과 거의 비슷하나 35°C 발효의 경우 젖산균의 급격한 감소와 동시에 효모는 증가하고, 젖산균이 완전 사멸 후 효모가 급격히 감소하였으므로 총균수가 발효 3일까지는 총젖산균수와 거의 비슷하나 그 후에는 효모수와 거의 비슷하게 나왔다. 이는 발효 3일까지는 발효액 내의 우점균 주로써 젖산균이 발효를 주도하는 미생물이나 그 후에는 급격히 증가한 효모가 발효를 주도하는 미생물로 작용할 것이라 생각된다.

## 2) 이화학적 특성

### 가) 수소이온농도(pH)와 적정산도

pH 저하 속도는 발효 온도가 높을수록 빠르게 진행되었다. 35℃에서 pH 저하가 가장 빠르게 진행되었으나 발효 4일째부터 다시 약간 증가되는 양상을 나타내었다. 발효 최적기인 pH 3.6에는 15℃의 경우 발효 6일째, 25℃는 발효 3일째, 35℃는 발효 2일째에 도달하였으나 5℃ 발효의 경우 발효 27일까지도 pH 3.6에 도달하지 못했다. 발효온도가 높을수록 적정산도가 더 많이 증가하였으나 35℃ 발효에서는 다른 온도에 비해 빠르게 증가하였다가 발효 4일째부터 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 효모가 젖산발효에 의해 생성된 젖산을 이용하여 감소경향을 나타낸 것으로 보인다(Fig. 3-4).

### 나) 가용성 고형분

가용성 고형분은 5℃ 발효의 경우 발효 27일까지 거의 변화가 없었고, 15℃ 발효에서는 발효 12일째까지 거의 변화가 없다가 그 후 급격하게 감소하였으며, 25℃ 발효는 3일째부터 급격하게 감소되었다. 발효 12일까지는 가용성 고형분의 저하 정도가 35, 25, 15, 5℃ 순이었으나 12일 이후 15℃가 급격히 저하되어 25℃보다 가용성 고형분이 더 많이 이용되었음을 알 수 있었다(Fig. 3-4). 발효기간에는 차이가 있지만 발효초기 가용성 고형분이 거의 변화되지 않았다.

### 다) 점도

점도는 Fig. 3-4에서 보는 바와 같이 5℃ 발효에서는 꾸준히 증가하다가 18일째 이후에는 감소하였고, 15℃ 발효에서는 4일째까지 급속히 증가하였다가 그 후에는 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 본 실험에 사용된 fructooligo-saccharide (미원)는 순수한 올리고당이 아니라 glucose, fructose, sucrose와 같은 단당류, 이당류가 함유된 복합 올리고당이므로 주스 중의 당 특히 sucrose를

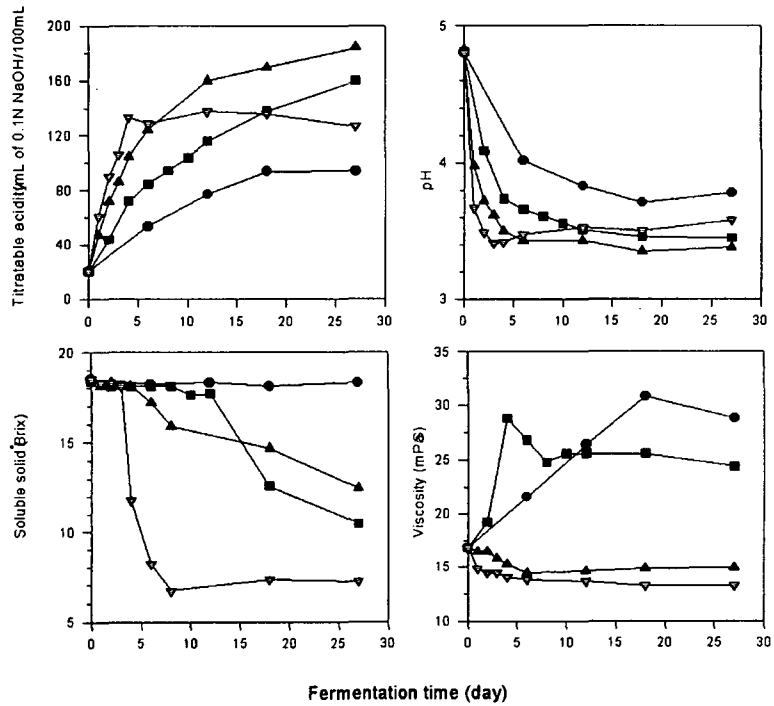


Fig. 3-4. Effect of temperature on the pH, titratable acidity, soluble solid and viscosity of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus*.  
 (●-● : 5°C, ■-■ : 15°C, ▲-▲ : 25°C, ▼-▼ : 35°C)

젖산균이 이용하여 dextran이라는 점질물을 형성함으로 점도가 증가된 것으로 생각할 수 있다. Fructooligosacchride를 sucrose가 거의 함유되어 있지 않은 isomalto-oligosaccharide로 대체함으로 쥬스의 점도상승을 억제할 수 있었다. 25, 35°C 발효

에서는 발효가 진행됨에 따라 점도가 약간씩 감소한 것으로 보아 이 발효온도에서는 점질물이 형성되지 않은 것으로 생각된다.

라) 비타민 C

발효주스를 관능검사 한 결과 pH가 3.6일 때가 가장 맛이 좋을 때라하여 5℃에서 18일, 15℃에서 6일, 25℃에서 3일, 35℃에서 2일간 발효한 발효액의 총비타민 C와 산화형 비타민 C를 측정 한 결과 Fig. 3-5와 같다. 발효온도가 높을수록

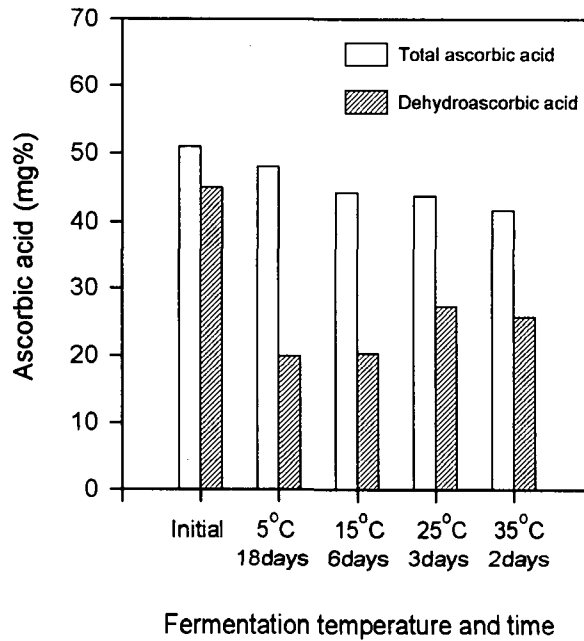


Fig. 3-5. Effect of temperature on the ascorbic acid content of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus*.

총 비타민 C는 감소하는 경향을 나타내었다. 산화형 비타민 C(dehydroascorbic acid)는 ascorbic acid의 산화된 형태로서 pH 4.0 이하에서 안정하여 더 이상 변화하지 않으나, pH 4.0 이상에서는 불활성화하는 것으로 알려져 있다. 본 발효과채

쥬스의 산화형 비타민 C는 발효 전에 가장 많이 검출되었고, 다음으로 25, 35℃, 그 다음으로 15, 5℃ 순이었다. 이는 발효 초기 pH가 4.8로 산, 비타민 C가 불안정한 상태이다가 발효에 의해 pH가 저하되어 특히, 온도가 높을수록 빠른 속도로 pH가 저하됨으로 나타난 현상이라 볼 수 있다. 산화형 비타민 C의 경우 발효 직전에는 산화형 비타민 C가 총비타민 C의 대부분을 차지하나 25, 35, 15, 5℃ 순으로 총비타민 C 중 산화형 비타민 C의 비율이 적어짐을 알 수 있다.

#### 마) 유기산

온도를 달리하여 발효한 발효과채쥬스의 유기산으로 malic acid, succinic acid, lactic acid, acetic acid를 측정된 결과 Table 3-10과 같다.

Malic acid는 발효 전 433.55mg%이던 것이 발효가 진행됨에 따라 모든 구에서 감소하는 경향을 나타내었으며, 숙성되지 않은 동치미와 김치에서는 malic acid가 검출되었으나 적기의 동치미와 김치에서는 malic acid가 검출되지 않았다는 보고와 일치하였다. 특히 15와 25℃의 경우 발효 말기에 더 많이 저하되었고, 35℃ 발효는 초기에 급격히 감소하다 3일 이후에는 큰 변화가 없었다. 5℃ 발효의 경우 15, 25℃ 발효에 비해 저하 속도가 느렸으며 발효 27일까지 서서히 감소하였다. Succinic acid는 발효전 135.45mg%이던 것이 모든 구에서 발효가 진행됨에 따라 감소하는 경향을 나타내었고, 25℃는 발효 18일째, 35℃는 발효 6일째부터 다시 증가되기 시작하였다.

Succinic acid는 *Lactobacillus*속 균주들에 의해 citric acid, malic acid, tartaric acid, fumaric acid로부터 생성되는 유기산으로 본 발효과채쥬스에서는 온도별로 차이가 없었다. 발효 초기 급격히 감소한 후 저장기간이 경과하여도 더 이상 큰 변화가 없었으나 25, 35℃의 경우 발효 후기에 증가한 것은 효모에 의해 생성된 succinic acid라 추측할 수 있다.



Table 3-10. Effect of temperature on the organic acid content of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellibiosus*

(unit : mg%)

Organic acids	F-time (day)	5°C	15°C	25°C	35°C
Malic acid	0	433.55	433.55	433.55	433.55
	3	392.56	325.92	208.36	155.31
	6	269.32	207.03	156.37	140.36
	12	201.53	181.55	162.76	121.24
	18	187.49	61.20	82.76	131.41
	27	175.54	96.30	93.34	125.34
Succinic acid	0	172.94	172.94	172.94	172.94
	3	89.42	52.97	45.41	45.61
	6	45.17	41.61	45.51	67.12
	12	39.56	39.48	45.79	83.95
	18	33.31	39.89	72.46	80.36
	27	37.54	38.73	81.83	95.97
Lactic acid	0	22.44	22.44	22.44	22.44
	3	678.21	1569.26	2431.29	3152.01
	6	1285.10	2190.67	3643.09	3956.82
	12	1305.61	3273.70	4785.82	3898.41
	18	1347.75	2745.12	4818.39	3965.98
	27	1554.09	4399.20	5366.52	3826.85
Acetic acid	0	201.84	201.84	201.84	201.84
	3	259.41	195.63	187.42	97.12
	6	325.31	187.91	176.31	114.53
	12	285.46	209.82	206.66	123.88
	18	198.66	140.07	148.42	173.72
	27	241.48	206.94	185.96	119.92

Lactic acid는 발효 전 22.44mg%이었으나 모든 구에서 발효가 진행됨에 따라 많은 양의 lactic acid가 검출되었다. 5℃ 발효는 발효 6일째까지 증가하다 그 후는 거의 변화가 없었고 15, 25℃ 발효에서는 발효 27일까지 계속해서 증가하였다. 35℃ 발효에서는 발효 3일째까지 급격히 증가하다 그 후에는 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

비휘발성 acetic acid는 발효가 진행됨에 따라 감소하였다. 따라서 발효가 진행됨에 따라 적정산도가 증가하는 것은 lactic acid의 증가에 의한 것으로 볼 수 있다.

#### 바) 유리당

혼합과채주스에 15%의 fructooligosaccharide를 첨가 후 온도를 달리하여 발효시킨 결과 Table 3-11과 같다. 혼합과채주스에 첨가한 fructooligosaccharide(미

Table 3-11. Effect of temperature on free sugars content of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellibiosus*

(unit : mg/ml)

Free sugars	F-time(day)	5°C	15°C	25°C	35°C
Glucose	0	130.6(100)	130.6(100)	130.6(100)	130.6(100)
	3	121.4 (93)	120.2 (92)	88.6 (68)	45.5 (35)
	6	110.8 (85)	117.0 (90)	85.4 (65)	14.6 (11)
	12	104.6 (80)	94.1 (72)	63.3 (49)	7.9 (6)
	18	98.1 (75)	2.5 (2)	45.7 (35)	3.8 (3)
	27	98.0 (75)	2.9 (2)	14.0 (11)	2.2 (2)
Fluctose	0	40.1(100)	40.1(100)	40.1(100)	40.1(100)
	3	37.6 (94)	39.9(100)	18.4 (46)	24.8 (62)
	6	35.8 (89)	39.7 (99)	21.2 (53)	15.6 (39)
	12	31.8 (79)	26.5 (66)	20.5 (51)	7.1 (18)
	18	26.6 (66)	6.5 (16)	27.2 (68)	3.8 (10)
	27	26.1 (65)	4.2 (11)	18.8 (47)	2.2 (6)
Sucrose	0	140.3(100)	140.3(100)	140.3(100)	140.3(100)
	3	61.8 (44)	59.1 (42)	43.0 (31)	32.1 (23)
	6	18.9 (13)	17.9 (13)	62.2 (44)	10.4 (7)
	12	7.4 (5)	6.8 (5)	44.3 (32)	7.3 (5)
	18	6.4 (5)	5.8 (4)	5.1 (4)	6.8 (5)
	27	6.2 (4)	1.1 (1)	0.1 (1)	5.2 (4)

Table 3-11. Continued.

(unit : mg/ml)

Free sugars	F-time(day)	5℃	15℃	25℃	35℃
1-Ketose	0	150.3(100)	150.3(100)	150.3(100)	150.3(100)
	3	135.6 (90)	83.5 (56)	65.4 (44)	72.5 (48)
	6	112.0 (75)	122.8 (82)	90.8 (60)	32.0 (21)
	12	98.0 (65)	56.1 (37)	55.4 (37)	11.6 (8)
	18	87.8 (58)	43.2 (29)	91.2 (61)	3.4 (2)
	27	79.3 (53)	29.9 (20)	53.2 (35)	3.9 (3)
Nystose	0	73.7(100)	73.7(100)	73.7(100)	73.7(100)
	3	64.3 (87)	42.8 (58)	29.8 (40)	25.0 (34)
	6	55.1 (75)	62.6 (85)	41.2 (56)	23.0 (31)
	12	48.3 (66)	58.6 (80)	34.8 (47)	9.7 (13)
	18	44.2 (60)	42.1 (57)	40.2 (55)	4.5 (6)
	27	44.6 (61)	30.7 (42)	28.8 (40)	8.6 (12)
1 <sup>F</sup> -Fructofuranosyl nystose	0	6.5(100)	6.5(100)	6.5(100)	6.5(100)
	3	6.1 (94)	3.8 (58)	2.8 (43)	0
	6	5.7 (88)	4.9 (75)	3.3 (51)	0
	12	4.8 (74)	4.2 (65)	3.0 (46)	0
	18	4.6 (76)	3.4 (52)	2.2 (34)	0
	27	4.5 (69)	3.0 (46)	2.1 (32)	0

원)는 glucose 27.67%, fructose 1.01%, sucrose 27.67%, 1-ketose(DP3) 32.10%, nystose(DP4) 14.49%, 1<sup>F</sup>- fructofuranosyl nystose(DP5) 1.55%로 구성되어 있다. Glucose는 5℃에서 발효시 130.6mg/ml이던 것이 발효가 진행됨에 따라 서서히 감소하였고, 15℃에서는 6일째까지 감소하다가 그 후 다시 급격하게 감소하였으며,

25℃와 35℃에서는 지속적으로 감소하였다. 전체적으로 감소하는 경향이었고, 온도가 높을수록 감소속도가 빨랐으나 27일째에 잔존해 있는 glucose는 5, 25, 15, 35℃의 순으로 25℃가 15℃와 35℃ 발효에서보다 더 많이 소비되었다. Glucose가 감소되다가 발효 도중 증가한 것은 다당류의 분해로 glucose가 생성된 것으로 볼 수 있다.

Fructose는 발효개시 전에 40.1mg/ml이었고, 발효기간이 경과함에 따라 급격히 감소하였다. 모든 구에서 발효가 진행됨에 따라 감소하는 경향이였다. 온도가 높을수록 fructose의 이용속도는 빨랐으며 15℃의 경우 발효 말기에 급격히 감소하여 27일째에 4.2mg/ml으로 25℃ 발효보다 잔존해 있는 fructose 양이 더 적었다. 동치미의 경우 발효 도중 fructose가 증가하는 것은 무 중의 fructose 등의 여러 당류가 용출되어 나타난 현상이나 본 과채주스는 과채를 착즙해서 발효하였기 때문에 발효 중 fructose가 증가하는 현상을 보이지는 않았다.

Sucrose는 발효개시 전에 140.3mg/ml이었고, 모든 구에서 급속하게 감소하였으며, 특히 glucose와 fructose와는 달리 5℃에서 급격하게 감소하여 고온보다는 저온에서 sucrose 이용속도가 더 빨랐다. 25℃에서 발효 도중 감소하다가 증가 후 다시 감소하는 경향이였다.

Glucose-fructose-fructose의 구조를 가지는 1-ketose는 발효 전 150.3mg/ml이었고, 5℃의 경우 지속적으로 감소하였으나 15, 25, 35℃는 감소하다가 약간 증가 후 다시 감소하였다. 발효온도가 높을수록 감소속도가 빨랐으나 35℃를 제외한 나머지 구는 발효 27일째까지 glucose, sucrose, fructose에 비해 미생물에 의한 당의 이용률이 낮았다. 본 과채주스 발효에서는 35℃에서 발효시 급격하게 감소하여 발효 말기(27일)에는 3%밖에 잔존하지 않았으나 5, 15, 25℃에서는 35~50% 정도 잔존하였다.

Nystose는 glucose-fructose-fructose-fructose의 구조를 가지는 올리고당으로 35℃ 발효의 경우 nystose가 급격하게 감소되었으나 5, 15, 25℃ 발효에서는 서서

히 감소하여 발효 전 73.7mg/ml이던 것이 발효 27일째 28.8~44.6mg/ml으로 단당류에 비해 상당량 잔존해 있었다.

Glucose-fructose-fructose-fructose-fructose(DP5)의 1<sup>F</sup>-fructofuranosyl nystose는 발효 초기 혼합과채주스 중에 6.5mg/ml로 소량 함유되어 있었고, 35℃에서 발효 시 미생물에 의해 이용되어 발효 3일째부터 검출되지 않았으나, 5, 15, 25℃ 발효에서는 발효기간이 경과함에 따라 서서히 감소하였고, 발효 온도가 높을수록 당의 이용속도가 빨랐음을 알 수 있었다.

이상과 같이 1-ketose, nystose, 1<sup>F</sup>-fructofuranosyl nystose는 고온(35℃)에서 발효시 안정하지 않았으나 5, 15, 25℃에서는 비교적 안정하여 이러한 당을 주스에 첨가하여 발효시 oligosaccharide의 기능성을 갖춘 발효과채주스를 기대할 수 있을 것이다. 현재 상품화된 올리고당은 glucose, fructose, sucrose가 56.4% 정도로 상당량 함유되어 있어서 발효 또는 저장 중 미생물에 의해 지속적으로 이용되거나 이들 당의 함유량이 더 적거나 순수 올리고당만 함유하는 제품을 과채주스 발효에 이용하면 더 좋은 효과를 기대할 수 있을 것이다.

#### 사) 색도

혼합과채주스를 온도를 달리하여 발효시켜 색도를 측정된 결과는 Table 3-12와 같다. 명도, 즉 밝기를 나타내는 L 값은 발효전 22.71~22.91이었고, 모든 발효 온도에서 발효 27일까지 큰 변화가 없었다. 적색도(a: red, -a : green)는 발효 전 +0.79~+0.91이던 것이 모든 구에서 발효가 진행됨에 따라 적색도가 감소하여 발효 27일째는 -값에 도달하였다. 황색도를 나타내는 b 값은 발효 전 +8.05~8.69이었고 5, 15℃ 발효의 경우 거의 변화가 없었으나 25℃ 발효에서는 약간 증가하였고, 35℃ 발효에서는 계속 증가하여 발효 27일째에 +10.40의 값을 보였다. 전체적으로 저장 기간이 길어질수록 적색도가 감소하여 황색을 띄었고, 높은 온도에서 발효할수록 황색의 값을 나타내었다.

Table 3-12. Effect of temperature on color of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellibiosus*

Fermentation time (day)		Fermentation temperature (°C)			
		5	15	25	35
L	0	22.77	22.89	22.91	22.71
	3	22.89	22.98	23.30	21.14
	6	22.93	23.09	22.00	21.08
	12	22.86	22.53	22.06	21.87
	18	22.91	23.41	22.41	21.94
	27	22.21	23.65	22.65	21.52
a	0	+0.79	+0.88	+0.85	+0.91
	3	+0.75	+0.69	+1.10	+0.92
	6	+0.72	+0.43	+0.40	+0.11
	12	+0.23	+0.36	+0.15	+0.19
	18	+0.76	-0.35	+0.19	+0.04
	27	-0.39	-0.30	-0.14	-0.11
b	0	+8.69	+8.68	+8.05	+8.51
	3	+8.15	+8.39	+8.91	+9.63
	6	+7.84	+8.26	+8.70	+9.98
	12	+7.51	+7.92	+8.93	+10.19
	18	+7.63	+7.74	+9.25	+10.16
	27	+8.44	+7.71	+9.32	+10.40

### 3) 관능 특성

발효온도가 발효과채주스의 관능 특성에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다. 먼저 관능특성을 표현하는 품질용어는 panel discussion과 문헌을 참고하여 선정하였다. 향으로는 신내, 단내, 신선한 야채향, 균덕내, 맛으로는 신맛, 단맛, 균

Table 3-13. Sensory evaluation of mixed fruit and vegetable juices fermented of a mixture of *Leu. mesenteroide*, *Lc. lactis* and *Lb. cellibiosus* at various temperatures

Attributable terms expressed	Fermentation temperature and time			
	5°C 18 days	15°C 6 days	25°C 3 days	35°C 1 days
<b>Aroma</b>				
Acidic	5.43	4.59	4.39	3.72
Sweet	4.43	4.51	4.62	5.68
Fresh vegetable	4.13	4.26	4.40	3.71
Yeasty and moldy	0.72	0.78	0.88	1.02
<b>Taste</b>				
Acidic	3.78	4.75	4.57	4.63
Sweet	5.39	5.51	5.78	5.24
Yeasty and moldy	1.36	1.31	0.90	0.98
<b>Mouthfeel</b>				
Viscous	5.84 <sup>a</sup>	4.98 <sup>a</sup>	2.85 <sup>b</sup>	2.21 <sup>b</sup>
Refreshing	4.28	4.04	5.39	5.05
<b>Color</b>				
Redness	2.85 <sup>c</sup>	5.35 <sup>ab</sup>	6.29 <sup>ab</sup>	6.70 <sup>a</sup>
<b>Preference</b>				
Ranking orders	150 <sup>b</sup>	123 <sup>b</sup>	51 <sup>a</sup>	76 <sup>a</sup>

<sup>abc</sup> Mean scores(n=3) in row with different letters are significantly different. (P<0.05)



덕맛, 입속느낌으로는 걸쭉하다와 상쾌하다로 표현하였다. 관능검사 결과는 각 검사항목별로 평균값과 함께 Table 3-13에 나타내었으며, 분산분석과 Duncan test를 거쳐 해석하였다. 각 시료는 발효중점이 pH 3.60~3.69에 해당하는 발효기간의 시료를 선정하였다. 즉 5℃에서는 12일, 15℃에서 6일, 25℃에서 3일, 35℃에서 2일간 발효한 시료를 채취하여 관능검사를 실시하였다.

신내는 5, 15, 25, 35℃ 순이었고, 단내는 35, 25, 15, 5℃ 순이었으며, 신선한 야채향은 25, 15, 5, 35℃ 순이었으나 시료간에 유의적 차이가 없었다( $P<0.05$ ). 이는 이화학적 검사 결과와 일치하였다고 볼 수 있다. 군덕맛은 모든 시료가 0.72~1.02의 값으로 거의 느껴지지 않았다는 의견이었다( $P<0.05$ ).

신맛은 15, 25, 35, 5℃ 순이었고, 단맛은 25, 5, 15, 35℃ 순이었으나 유의적 차이는 없었다. 향과 마찬가지로 이화학적 검사에서도 pH, 산도, 당도 등이 시료간에 거의 차이가 없었으므로 그 결과와 일치한다고 볼 수 있다. 군덕맛은 모든 시료에서 0.90~1.36으로 panel들에 의해 거의 감지되지 않았다. 맛에 있어서 시료간에 유의적 차이를 나타내지 않았다.

입속느낌 중 '걸쭉하다'는 5, 15, 25, 35℃ 순으로 시료간에 유의적 차이가 있었다. 5, 15℃ 발효시 점질물의 형성으로 점도가 증가하여 기호도에 좋지 않은 영향을 미쳤다. 25, 35℃ 발효에서는 panel들이 점질물의 형성을 감지하지 못하였고, 5, 15℃에 비해 낮은 값의 점수를 주었다. 색에 있어서 15, 25, 35℃ 발효구는 적색에 가까운 높은 점수로 나타내어졌고, 5℃ 발효구는 황색에 가까운 낮은 값으로 나타내어졌다. 이는 다른 구에 비해 5℃ 발효시 오랜 기간의 발효에 의해 변색이 된 것으로 추측된다.

순위법에 의해 기호도 검사를 실시한 결과 전체적인 기호도는 25, 35, 15, 5℃ 순이었고, 25, 35℃와 5, 15℃의 시료간에는 1% 유의수준에서 차이가 있었다. 이는 5, 15℃의 저온발효시 점질물의 형성과 5℃에서의 장기간 발효에 의한 변색으로 기호도가 낮게 나온 것으로 볼 수 있다.

## 바. 전처리가 과채즙스의 혼합발효 및 품질특성에 미치는 영향

혼합과채즙스의 전처리가 발효에 어떠한 영향을 미치는지를 비교, 연구하였다. 즉 전처리를 하지 않은 혼합과채착즙액을 그대로 발효한 자연발효구, 전처리를 하지 않은 착즙액에 starter(*Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* 2, *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lb. cellobiosus*)를 첨가하여 배양한 무처리접종구, 착즙액을 10,000×g에서 15분간 원심분리한 후 starter를 첨가하여 배양한 원심분리구, 착즙액을 96℃에서 15초간 가열살균한 후 starter를 첨가하여 배양한 열처리구, 착즙액을 분자량 cut-off size가 30,000의 ultramembrane filter로 여과한 후 starter를 첨가하여 배양한 한외여과구로 나누어 25℃에서 4일간 배양하고 발효 및 품질특성을 비교, 조사하였다.

### 1) 미생물 분포

전처리를 달리한 과채즙스의 발효 중 lactic acid bacteria, coliform bacteria, yeast, 총균수가 어떻게 변화되는지를 Fig. 3-6에 나타내었다.

총젖산균수는 자연발효구와 무처리접종구, 원심분리구에서 발효 초기  $10^5$ CFU/ml이었던 것이 발효 1일째  $10^8$ CFU/ml에 도달하였다. 무처리접종구에서는 발효 초기  $10^8$ CFU/ml이었고, 발효가 진행됨에 따라 총젖산균수는 거의 변화가 없었다. 그러나 한외여과구에서는 발효 초기  $10^6$ CFU/ml이던 것이 발효 1일째  $10^1$ CFU/ml까지 저하되었다가 그 후에는 서서히 증가하여 발효 4일째  $10^4$ CFU/ml이었다. 다른 구와는 달리 한외여과구는 발효 초기에 젖산균의 생육이 저해되었다. 이는 혼합과채즙스를 여과함으로써 젖산균의 생육 또는 저해에 중요한 영향을 미치는 분자량 30,000 이상의 어떤 물질이 제거되어 야기된 현상이라 추측할 수 있다.

Coliform bacteria는 자연발효구, 무처리접종구의 경우 발효 전  $10^4$ CFU/ml이었고,

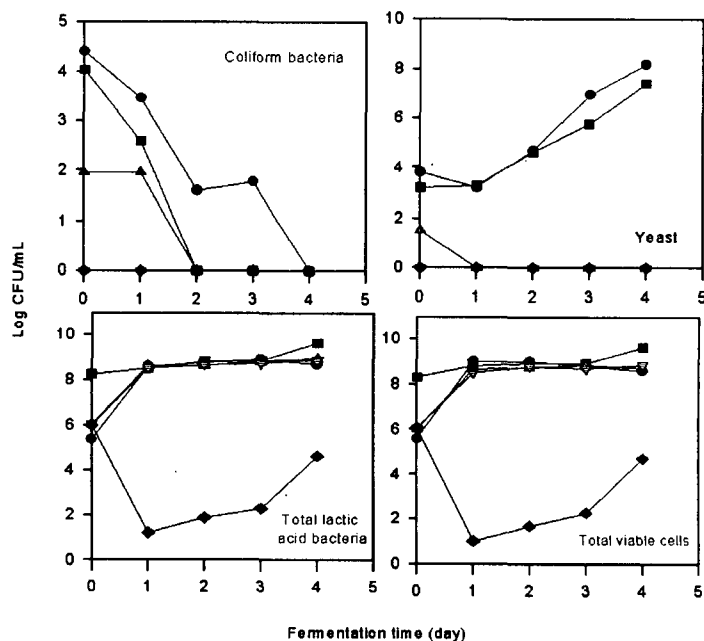


Fig. 3-6. Effect of pretreatment on the population of coliform bacteria, lactic acid bacteria, yeast and total viable cells of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus*.

- Without starter
- Coculture without pretreatment
- ▲ Coculture after centrifuge at 10,000xg for 15mi
- ▼ Coculture after thermal treatment at 96C for 15
- ◆ Coculture after ultrafiltration

원심분리구에서는  $10^2$ CFU/ml, 열처리구, 한외여과구에서는 전혀 검출되지 않았다. 발효가 진행됨에 따라 coliform bacteria수는 급격히 감소하여 무처리접종구, 원심분리구에서는 발효 2일째 전혀 검출되지 않았고, 자연발효구에서는 4일째부터 검출

되지 않았다.

효모는 전처리를 하지 않은 구의 경우 발효 전에는  $10^3$ CFU/ml이었으나 원심 분리 후  $10^1$ CFU/ml으로 감소하였다. 발효기간이 경과함에 따라 자연발효구, 무처리접종구에서는 효모수가 계속 증가하나 원심분리구에서는 발효 1일째 검출되지 않았고 발효 4일째까지도 검출되지 않았다. 무균처리한 열처리구와 한외여과구에서는 전혀 검출되지 않았다.

총균수는 총젖산균수의 경향과 거의 일치하였다. 따라서 발효액의 미생물의 대부분이 젖산균임을 알 수 있었다.

## 2) 이화학적 특성

### 가) 수소이온농도(pH)와 적정산도

전처리를 달리한 혼합과채쥬스의 발효 중 pH와 적정산도의 변화는 Fig. 3-7과 같다. 한외여과구를 제외한 모든 구에서 발효가 진행됨에 따라 pH가 급격히 감소하였다. 즉 발효 전 pH가 4.65~4.70이던 것이 발효 1일째 3.89~3.95로 급격히 저하되었고 그 후 서서히 감소하여 발효 3일째 3.6~3.7에 도달하였다. 그러나 발효 초기에 한외여과구는 젖산균의 생육이 저하되어 pH가 4.78이던 것이 발효 4일째 4.66으로 거의 변화되지 않았다. 적정산도는 한외여과구를 제외하고 발효가 진행됨에 따라 증가하였고, 자연발효구와 무처리접종구에서는 발효 전 24.2이던 것이 점차 증가하여 발효 3일째 112~123에 도달하였고, 원심분리구와 열처리구에서는 발효 3일째 84.0~88.5로 자연발효구, 무처리접종구에 비해 낮은 적정산도를 보였다. 이는 자연발효구와 무처리접종구의 경우 자연 중에 존재하는 미생물이 생성한 산에 의해 원심분리구와 열처리구보다 높은 적정산도를 보인 것으로 추측된다. 한외여과구에서는 pH와 마찬가지로 발효 4일째까지 적정산도의 변화가 거의 없었다.

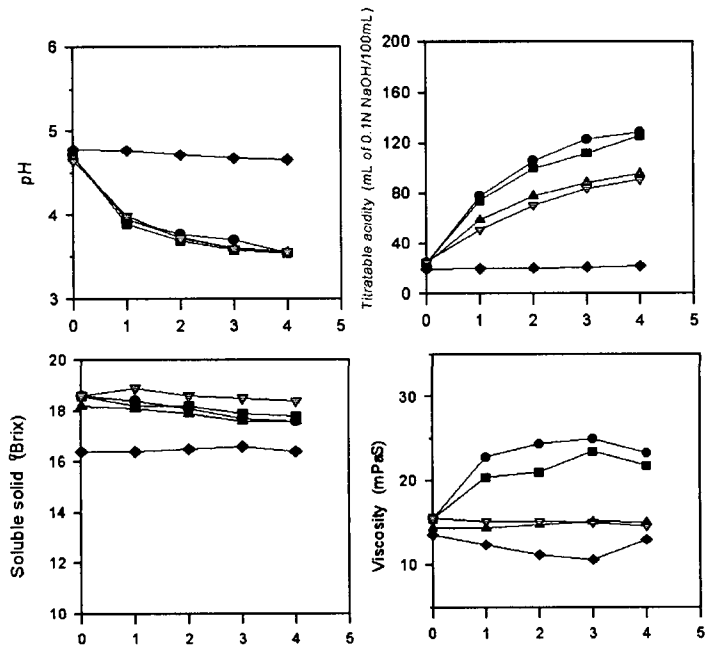


Fig. 3-7. Effect of pretreatment on the pH, titratable acidity, soluble solid and viscosity of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus*.

Legend : Refer to footnote of Fig. 3-6.

#### 나) 가용성 고형분

발효 중의 가용성 고형분의 변화양상은 Fig. 3-7과 같다. 발효 전 자연발효구, 무처리접종구, 열처리구에서는 18.6°Brix이었고, 원심분리구에서는 18.2°Brix이

었으나 한외여과구에서는 16.4°Brix로 다른 구에 비해 낮았다. 이는 한외여과에 의해 가용성 고형분이 일부 제거된 것으로 여겨진다. 25℃ 발효시 모든 구에서 가용성 고형분의 함량에 거의 변화가 없었고, 15℃ 발효에서는 원심분리구, 열처리구, 한외여과구의 가용성 고형분 함량의 변화가 거의 없었으나 자연발효구, 무처리접종구의 경우 발효 6일째부터 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

#### 다) 점도

전처리를 달리한 과채쥬스의 젖산발효 중 점도의 변화는 Fig. 3-7과 같다. 발효 전 자연발효구, 무처리접종구, 열처리구의 경우 15.6 mPa·S이었고, 고형물을 일부 제거한 원심분리구는 14.4 mPa·S, 한외여과하여 분자량 30,000이상의 물질을 제거한 한외여과구는 13.6 mPa·S로 고형물 제거정도가 클수록 점도는 낮은 값을 나타내었다. 자연발효구, 무처리접종구의 점도는 발효가 진행됨에 따라 약간 증가하였고, 원심분리구, 열처리구, 한외여과구는 거의 변화가 없었다.

#### 라) 비타민 C

전처리 방법을 달리한 혼합과채쥬스의 발효 중 비타민 C의 변화는 Fig. 3-8과 같다. 모든 구에서 전처리 직후와 25℃에서 발효 3일째의 시료를 취하여 총비타민 C와 산화형 비타민 C를 측정하였다. 전처리 직후 자연발효구, 무처리접종구, 원심분리구의 총비타민 C의 함량은 49.9~52.6mg%로 거의 비슷하였고, 한외여과구에서는 55.2mg%로 약간 높았으나 열처리구의 경우 36.4mg%로 다른 구에 비해 현저히 낮았다. 이는 가열에 의해 비타민 C가 파괴된 것으로 생각된다. 자연발효구의 경우 발효 3일째 33.9mg%로 감소하였으나 다른 구에서는 거의 변화가 없었다.

산화형 비타민 C는 자연발효구, 무처리접종구, 원심분리구의 경우 20.9~23.7mg%로 거의 비슷하였으나 열처리구에서는 6.60mg%로 현저히 낮았고, 한외여과구에서는 39.6mg%로 다른 구에 비해 높았다. 자연발효구에서는 12.7mg%로 감

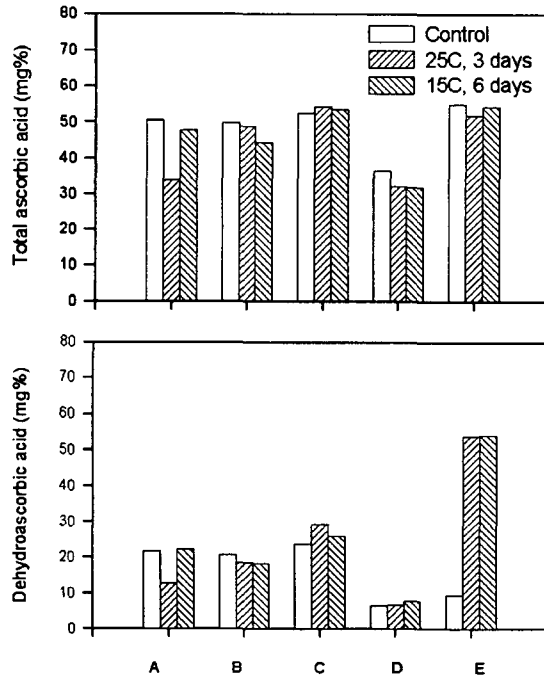


Fig. 3-8. Effect of pretreatment on the ascorbic acid content of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus*.

A : Without starter

B : Coculture without pretreatment

C : Coculture after centrifuge at 10,000xg for 15min

D : Coculture after thermal treatment at 96°C for 15sec

E : Coculture after ultrafiltration

소하였고, 무처리접종구에서는 18.0mg%로 약간 감소하였으나 원심분리구에서는 29.2mg%로 다시 증가하였다. 열처리구에서는 거의 변화가 없었고, 한외여과구에

서는 53.9mg%로 증가하였다.

Ascorbic acid는 식품 중에서 환원형(L-ascorbic acid)과 산화형(dehydroascorbic acid)으로 존재한다. 환원형은 강한 비타민 C의 작용을 나타내나 산화형은 수용액 중에서 2,3-diketogluconic acid로 변화되므로 비타민 C의 효력은 1/2 밖에 되지 않는다. 본 연구에서는 발효기간이 경과할수록 총 비타민 C는 크게 변화되지 않았으나 산화형 비타민 C가 증가된 것으로 보아 이는 환원형 비타민 C가 일부 산화형 비타민 C로 전환된 것이라 볼 수 있다. 특히 한외여과구의 산화형 비타민 C가 급속하게 증가된 것을 볼 수 있었다.

#### 마) 유기산

전처리를 달리한 과채주스의 젖산발효 중 유기산의 함량은 Table 3-14와 같다. 발효액의 유기산으로 malic acid, succinic acid, lactic acid, acetic acid의 함량을 조사하였다.

Malic acid의 경우 발효 전 321.43~395.04mg%이던 것이 발효 대부분의기간이 경과함에 따라 모든 구에서는 감소 경향을 나타내었으나 한외여과구에서는 거의 변화가 없었다. Malic acid는 포도에 다량 존재하는 산으로 포도주 품질에 좋지 않은 영향을 미치며 젖산균에 의한 malolactic fermentation에 의해 lactic acid로 전환된다. 한외여과구에서 거의 변화가 없는 것은 발효 초기 젖산균의 생육저해로 malic acid가 소비되지 않아서 나타난 현상이라 볼 수 있다.

Succinic acid의 함량은 발효 전 102.94~200.88mg%이던 것이 발효가 진행됨에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 즉 한외여과구를 제외한 모든 구에서 발효 1일째에 급격한 감소를 보였고, 그 후에는 약간씩 감소하는 경향을 나타내었으나 한외여과구는 거의 변화가 없었다.

Lactic acid는 발효 전 자연발효구에서는 검출되지 않았고, 다른 구에서는 23.55~46.83mg%의 함량을 보였다. 이는 starter 접종시 접종액에 함유된 lactic acid인 것으로 볼 수 있다. 발효가 진행됨에 따라 모든 구의 lactic acid는 계속해



Table 3-14. Effect of pretreatment on the organic acid content of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus*

(unit : mg%)

Organic acids	Ferment. time (day)	Pretreatment				
		A	B	C	D	E
Malic acid	0	321.43	360.83	385.71	377.27	395.04
	1	294.35	326.14	255.59	298.06	390.55
	2	254.46	261.99	276.47	250.52	394.19
	3	264.39	276.21	274.72	279.10	399.12
	4	157.37	286.14	275.74	345.28	396.43
Succinic acid	0	200.88	180.83	162.59	130.13	102.94
	1	56.43	55.61	52.58	62.99	120.69
	2	55.69	41.21	50.80	48.42	126.17
	3	61.63	51.86	69.66	56.02	119.22
	4	65.80	47.17	55.25	60.00	114.42
Lactic acid	0	nd	23.55	25.82	33.92	46.83
	1	1155.08	1363.26	1221.94	1383.53	46.83
	2	1593.36	1689.08	1853.30	1750.12	46.83
	3	1714.32	2302.91	2869.04	2325.58	46.83
	4	1742.02	2481.34	2659.64	2894.49	46.83
Acetic acid	0	424.74	347.65	362.67	290.15	268.23
	1	242.88	190.93	142.36	122.81	298.82
	2	343.65	207.89	127.19	150.36	297.26
	3	429.72	226.78	202.23	120.49	295.17
	4	433.48	253.99	186.11	133.78	296.74

A : Without starter

B : Coculture without pretreatment

C : Coculture after centrifuge (10,000×g, 15min)

D : Coculture after thermal treatment at 96°C for 15sec

E : Coculture after ultrafiltration

서 증가하였으나 한외여과구에서는 젖산균의 생육의 저해로 전혀 증가가 없었다.

Acetic acid는 젖산균을 접종하지 않은 주스에서는 증가하는 경향이었으나 젖산균을 첨가한 다른 구에서는 모두 감소하는 경향을 나타내었으며, 한외여과구에서는 크게 변화가 없었다. 이는 자연 중에 존재하는 젖산균이나 세균 등에 의해 acetic acid가 증가한 것으로 볼 수 있고, 무첨가구를 제외한 다른 구에서 acetic acid가 감소한 것은 첨가한 starter가 생육하면서 acetic acid를 이용한 것이라 추측할 수 있다.

#### 바) 유리당

혼합과채주스의 전처리를 달리하여 fructooligosaccharide를 15%씩 첨가하여 25℃에서 3일간 발효 후 전처리가 발효 중 당 함량에 어떤 영향을 미치는지를 조사한 결과는 Table 3-15와 같다.

혼합과채주스의 발효 전 구성 유리당은 glucose, fructose, sucrose, 1-ketose, nystose, 1<sup>F</sup>-fructofuranosyl nystose로 검출되었다. Glucose는 발효 전 128.1~128.8mg/ml이던 것이 발효 3일째 87.4~129.2mg/ml로 무처리접종구, 자연발효구, 원심분리구, 열처리구, 한외여과구 순이었다. 특히 한외여과구에서는 전혀 감소되지 않았고, 무처리접종구에서 가장 많은 양이 소비되었다. 한외여과구의 경우 발효 3일째까지 젖산균의 생육속도가 다른 구에 비해 낮은 것으로 보아 이는 접종된 starter와 과채 착즙액 자체에 존재하던 자연 젖산균에 의해 glucose가 이용된 것으로 추측할 수 있다. Fructose는 glucose와 마찬가지로 다른 구에 비해 무처리구와 자연발효구에서 다량 이용되었다. Sucrose의 이용률은 자연발효구, 무처리접종구, 원심분리구, 열처리구, 한외여과구 순이었고, 발효 후 무처리접종구가 자연발효구보다 더 많은 양의 sucrose가 잔존해 있는 것은 다당류나 1-ketose의 분해로 sucrose가 생성되어 나타난 현상이라 추측할 수 있다. 1-Ketose, nystose, 1<sup>F</sup>-fructofuranosyl nystose는 자연발효구, 열처리구, 한외여과구에서는 거의 변화가 없었으나 무처리접종구와 원심분리구에서는 발효 후 많은 양이 감소되었다.

Table 3-15. Effect of pretreatment on free sugar content of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus* at 25°C for 3 days

(unit : mg/ml)

Free sugars	Ferment. time (day)	Pretreatment *				
		A	B	C	D	E
Glucose	0	128.8	128.8	128.7	128.6	128.1
	3	99.4	87.4	100.2	123.4	129.2
Fructose	0	39.5	39.5	39.5	40.0	39.5
	3	24.7	18.1	30.4	40.9	37.7
Sucrose	0	130.3	130.3	130.3	130.3	130.5
	3	11.8	40.2	59.8	111.1	124.7
1-Ketose	0	140.3	140.3	140.2	140.1	128.2
	3	139.1	61.0	98.0	133.7	124.7
Nystose	0	72.7	72.7	72.5	72.3	65.9
	3	70.9	29.4	51.0	70.8	62.2
1 <sup>F</sup> -Fructofuranosyl nystose	0	6.1	6.1	6.1	6.1	5.6
	3	6.6	2.6	4.5	6.1	5.1

\* Refer to footnote of Table 3-15.

#### 사) 색도

전처리를 달리한 혼합과채쥬스의 발효 중 색도의 변화는 Table 3-16과 같다. 자연발효구, 무처리접종구에 비해 열처리구는 가열로 인한 약간의 갈변으로 갈색 빛을 보였고, 원심분리구에서는 고형물의 일부가 제거되어 맑은 주황색을 나타내

Table 3-16. Effect of pretreatment on color of mixed fruit and vegetable juices during coculture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus*

Ferment. time (day)	Pretreatment *				
	A	B	C	D	E
<b>L</b>					
0	21.91	21.96	23.12	22.08	19.06
1	20.94	21.96	21.24	22.07	18.83
2	21.34	21.98	21.82	22.15	18.82
3	21.43	21.93	21.96	21.60	19.36
4	22.16	21.85	22.35	21.68	19.38
<b>a</b>					
0	-0.11	-0.04	+4.82	-0.23	-0.76
1	-0.19	-0.06	+0.52	-0.09	-0.71
2	-0.21	-0.13	+0.07	-0.18	-0.83
3	-0.18	-0.09	+0.08	-0.11	-0.84
4	-0.01	-0.05	+0.23	-0.08	-0.69
<b>b</b>					
0	+7.38	+7.43	+10.98	+7.97	+5.33
1	+5.28	+6.30	+8.04	+7.39	+4.70
2	+5.90	+6.27	+7.76	+7.42	+4.53
3	+5.31	+6.05	+7.48	+7.13	+4.22
4	+5.10	+5.55	+8.02	+7.24	+4.40

\* Refer to footnote of Table 3-15.

있으며, 한외여과구는 고형물이 완전 제거되어 투명한 황색을 띄었다.

발효 전 명도(밝기)를 나타내는 L 값은 전처리를 하지 않은 자연발효구와 무처리접종구의 경우 21.91~21.96으로 거의 비슷한 값을 나타내었고, 열처리구는

22.08, 원심분리구는 23.12, 한외여과구는 29.06으로 나타났다. 발효가 진행됨에 따라 L 값은 거의 변화가 없었다.

적색도인 a 값은 원심분리한 시료를 제외한 모든 구에서 -값을 나타내었다. 전처리를 하지 않은 자연발효구, 무처리접종구는 -0.04~0.11로 거의 비슷하였고, 원심분리구는 +4.82로 다른 구에 비해 높은 적색도를 나타내었으며, 열처리구는 -0.23, 한외여과구는 -0.76으로 낮은 적색도를 나타내었다. 이는 원심분리(10,000×g, 15min)에 의해 chlorophyll이 제거되어 적색도가 높게 나왔으며 한외여과구에서는 분자량 30,000이상의 물질 제거에 의해 적색도를 띄는 carotenoid까지 제거되어 적색도가 더 낮은 값으로 나온 것이라 볼 수 있다. 모든 구가 거의 변화되지 않았으나 원심분리한 구의 경우 적색도가 감소하였다.

황색도를 나타내는 b 값의 경우 전처리를 하지 않은 자연발효구와 무처리접종구는 +7.38~7.43으로 비슷한 값을 나타내었으나, 원심분리구는 +8.98로 약간 높은 값을 보였고, 한외여과구는 +5.33으로 낮은 값을 나타내었다.

#### 사. 무균처리를 달리한 발효과채주스의 저장 특성

앞의 실험에 사용된 fructooligosaccharide는 glucose, fructose, sucrose와 같은 단당류와 이당류를 다량 포함하고 있어 5, 15℃와 같은 저온발효시 젖산균이 sucrose 등을 이용해 점질물을 형성하여 주스의 점도를 향상시킴으로 기호도를 저하시켰다. 따라서 사과, 당근, 돌미나리, 대추, 구기자를 3 : 3 : 1 : 1/2 : 1 : 1/2의 비율로 혼합한 과채주스에 fructooligosaccharide 대신 isomaltooligosacchride를 15%, NaCl 0.2%를 첨가하고, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*/*dextranicum* 2, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. cellobiosus*를 각각 0.01%씩 접종하여 25℃에서 3일간 또는 15℃에서 6일간 배양 후 10,000×g로 15분동안 원심분리하였다. 발효과채주스를 더 이상 제균처리하지 않은 무처리구, 원심분리 후 96℃에서

15초간 가열한 열처리구, molecular weight cut-off size가 30,000인 ultramembrane filter를 통과시킨 한외여과구, 그리고 starter를 첨가하지 않은 채 발효시킨 자연발효구로 구분하여 25℃와 5℃에서 8주간 저장하면서 품질 특성을 비교, 조사하였다.

#### 1) 미생물 분포

15℃에서 6일간 또는 25℃에서 3일간 발효 후 무균처리를 달리한 발효과채주스를 5, 25℃에서 8주간 저장하는 동안 총젖산균, coliform bacteria, 효모, 총균수는 Fig. 3-9~12와 같다.

##### 가) 총젖산균수

무균처리한 열처리구와 한외여과구에서는 5, 25℃에서 8주 저장하는 동안 젖산균이 전혀 검출되지 않았다. 25℃에서 발효한 자연발효구와 무처리구의 총젖산균수는 25℃에서 저장하는 동안 약간 감소하였고, 5℃ 저장에서는 무처리구의 경우 거의 변화가 없었으나 자연발효구의 경우 급속하게 감소하여 저장 전  $10^6$ CFU/ml이던 것이 2주째  $10^4$ CFU/ml, 8주째에  $10^2$ CFU/ml까지 감소하였다.

15℃에서 발효한 무처리구의 총젖산균수는 5, 25℃ 저장시 거의 변화되지 않았고, 자연발효구의 경우 저장 전  $10^6$ CFU/ml이던 것이 25℃에서 저장 8주째  $10^5$ CFU/ml으로 저장기간이 경과할수록 서서히 감소하였다. 15℃에서 발효 후 5℃에서 저장한 경우 저장 전  $10^6$ CFU/ml이던 것이 저장 2주째  $10^4$ CFU/ml로 감소하였으며, 저장 8주째는  $10^2$ CFU/ml까지 감소하였다.

이와같이 발효온도와는 무관하게 25℃에서 저장하는 동안에는 젖산균수의 변화가 거의 없었다. 5℃ 저장에서는 자연발효구의 경우 총젖산균수가 급격히 감소하나 무처리구에서 감소하지 않는 것은 과채주스 발효에 이용한 starter가 동치미에서 분리한 저온 젖산균이므로

저온 저장시 저해를 받지 않고 생육할 수 있었으나 자연 중의 젖산균은 저온

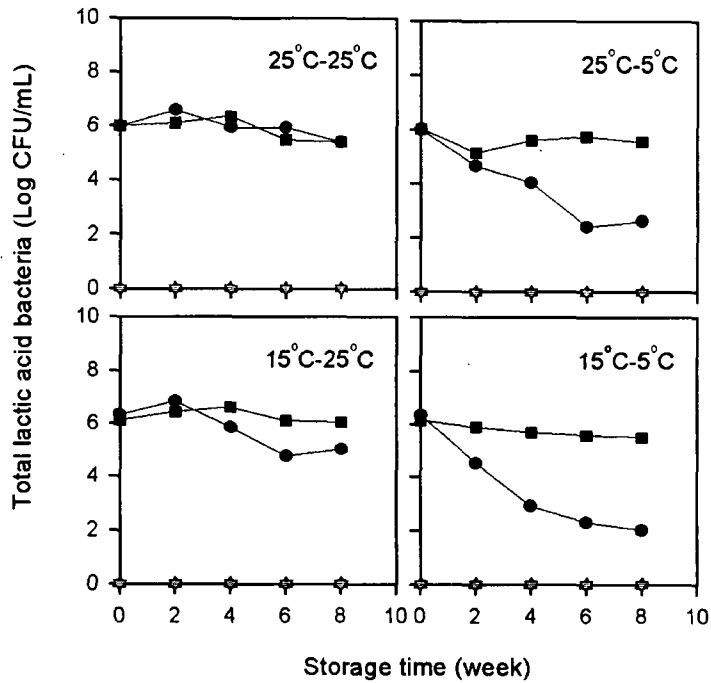


Fig. 3-9. Change in the population of total lactic acid bacteria of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 6 days at 15°C or for 3 days at 25°C.

- Natural fermentation without starter
- Fermentation after addition of starter
- ▲ Fermentation after addition of starter and ther
- ▼ Fermentation after addition of starter and ultr

저장시 저해를 받은 것으로 볼 수 있다(Fig. 3-9).

#### 나) Coliform bacteria

25°C에서 3일간 발효한 자연발효구의 coliform bacteria는 저장 전  $8.5 \times 10^1$  CFU/ml이었으며, 5, 25°C에서 8주간 저장하는 동안 저해를 받지않고 계속해서 생육하고 있었다. 그러나 starter를 접종하여 발효한 무처리구의 경우 저장 8주째

까지 전혀 검출되지 않았다.

15°C에서 6일간 발효한 자연발효구에서는 25°C 저장시 coliform bacteria수가 서서히 증가하였으나 무처리구에서는 저장 8주째까지 전혀 검출되지 않았고, 5°C저장시 자연발효구에서는 저장 6주째까지 coliform bacteria가 검출되다가 8주째에 검출되지 않았으며, 무처리구에서는 8주째까지 전혀 검출되지 않았다(Fig. 3-10). 열처리구와 한외여과구에서는 저장 8주째까지도 전혀 검출되지 않았다. 이는 발효 주스

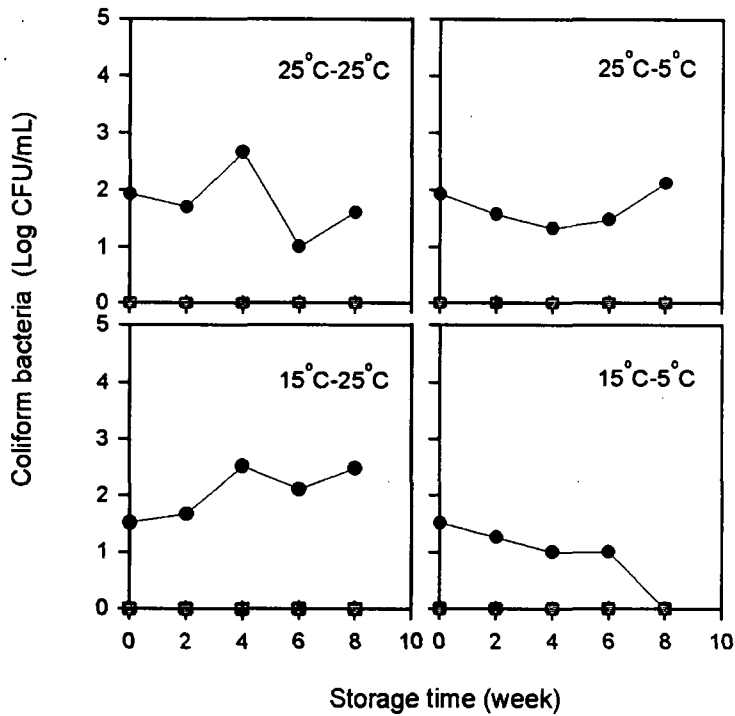


Fig. 3-10. Change in the population of coliform bacteria of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 6 days at 15°C or for 3 days at 25°C.

Legend : Refer to footnote of Fig. 3-9.



내에서 젖산균이 저장 8주째까지  $10^6$  CFU/ml 정도로 높은 생존률을 보여 coliform bacteria가 생육하지 못하고 저해를 받은 것이라 추측된다.

자연발효구에서는 저장 8주째까지 coliform bacteria가 검출되었으나 starter를 첨가하여 발효한 무처리구에서 전혀 검출되지 않은 것은 동치미에서 분리한 젖산균이 coliform bacteria에 대한 항미생물 효과가 커서 나타난 결과가 볼 수 있다.

다) 효모

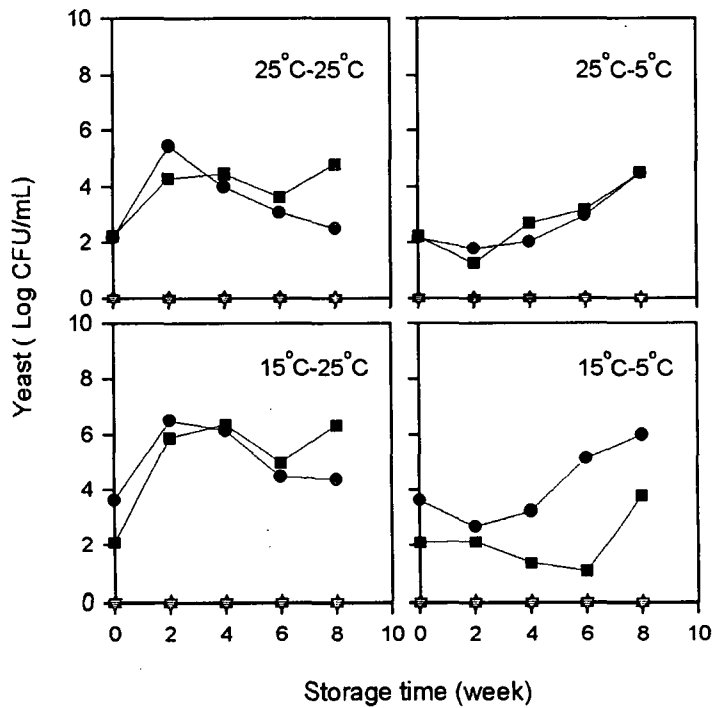


Fig. 3-11. Change in the yeast population of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 6 days at 15°C or for 3 days at 25°C.

Legend : Refer to footnote of Fig. 3-9.

25°C에서 3일간 또는 15°C에서 6일간 발효한 자연발효구와 무처리구는 저장 전  $10^2$  CFU/ml이던 것이 25°C 저장시 저장 2주째  $10^2 \sim 10^4$ 배 정도 증가하였다가 그 후 감소하는 경향을 나타내었으나, 5°C 저장시에는 저장 4주째부터 서서히 증가하는 양상을 보였다.

15°C에서 발효한 시료의 효모 증가속도는 25°C에서 발효한 시료에서의 효모 증가속도보다 더 빨랐음을 알 수 있었다(Fig. 3-11).

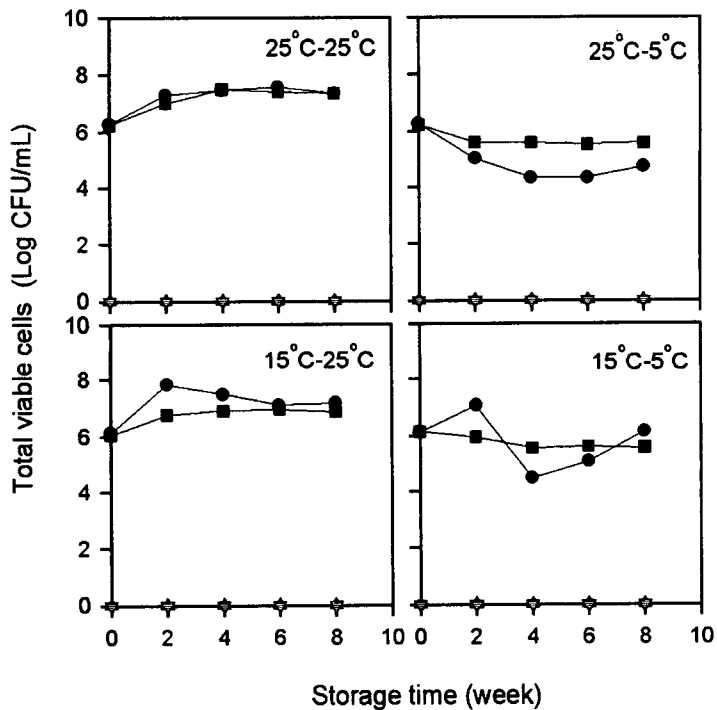


Fig. 3-12. Change in total viable cell count of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 6 days at 15°C or for 3 days at 25°C.  
Legend : Refer to footnote of Fig. 3-9.

## 라) 총균수

무균처리 후 저장 중의 총균수의 변화는 Fig. 3-12와 같다. 무균처리한 열처리구와 한외여과구의 총균수는 모든 저장기간동안 검출되지 않았다. 25℃ 발효 후 25℃에서 저장한 자연발효구와 무처리구에서는 저장 2주째 약간 증가한 후 거의 변화되지 않았으나 5℃에서 저장한 자연발효구의 경우 저장 전  $10^6$ CFU/ml이던 것이 저장기간이 길어질수록 서서히 감소하는 경향을 나타내었고, 무처리구에서는 거의 변화가 없었다.

15℃에서 3일간 발효 후 25℃에서 저장한 자연발효구의 총균수는 저장 전  $10^6$ CFU/ml이었으나 발효 1일째  $10^7$ CFU/ml으로 증가하였고, 무처리구에서는 약간의 증가가 있었지만 그 정도는 미미하였다. 5℃에서 저장한 자연발효구는 저장 4주째 급격히 감소하였다가 그 후 다시 증가하였다. 저장 기간이 경과함에 따라 젖산균의 감소로 총균수가 감소하다가 효모의 증가와 함께 총균수는 다시 증가하는 경향을 나타낸 것이다. 5℃에서 저장한 무처리구의 총균수는 저장기간동안 거의 변화가 없었다.

## 2) 이화학적 특성

### 가) 수소이온농도(pH)와 적정산도

무균처리 후 저장 중의 발효주스의 pH와 적정산도는 Fig. 3-13, 3-14와 같다. 무균처리 직후 pH는 3.62~3.70이었고, 5, 25℃에서 8주간 저장 중 모든 구의 pH는 거의 변화가 없었다. 적정산도는 발효 후 무균처리한 구는 모든 저장 온도에서 변화가 없었으나 25℃에서 발효 후 무균처리를 하지않은 자연발효구나 무처리구는 25℃ 저장 중 약간의 증가가 있었고, 15℃에서 발효한 자연발효구의 경우 급격하게 증가되는 양상을 띄었다. 자연발효구의 경우 pH는 약간 감소하나 pH에 비해 적정산도가 급속하게 증가된 것은 젖산균이 아닌 자연 중의 다른 미생물들

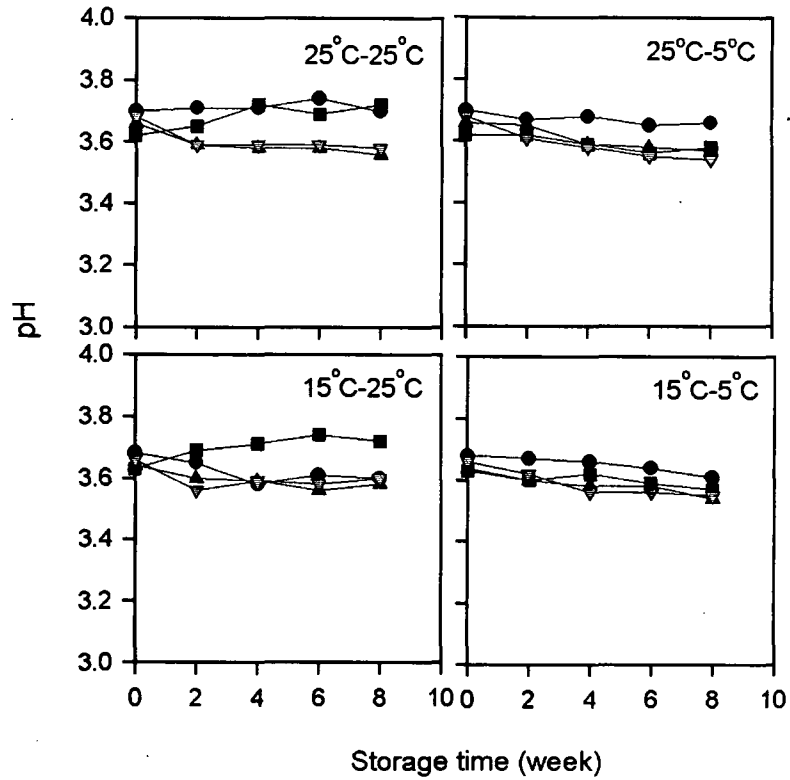


Fig. 3-13. Change in the pH of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 week at 5°C and 25°C after fermentation for 6 days at 15°C or for 3 days at 25°C.

Legend : Refer to footnote of Fig. 3-9.

에 의해 산도가 높은 산의 생성으로 나타난 결과라 추측할 수 있다.

나) 가용성 고형분

무균처리 직후 자연발효구와 무처리구, 열처리구는 18.6~18.7° Brix이나 한외

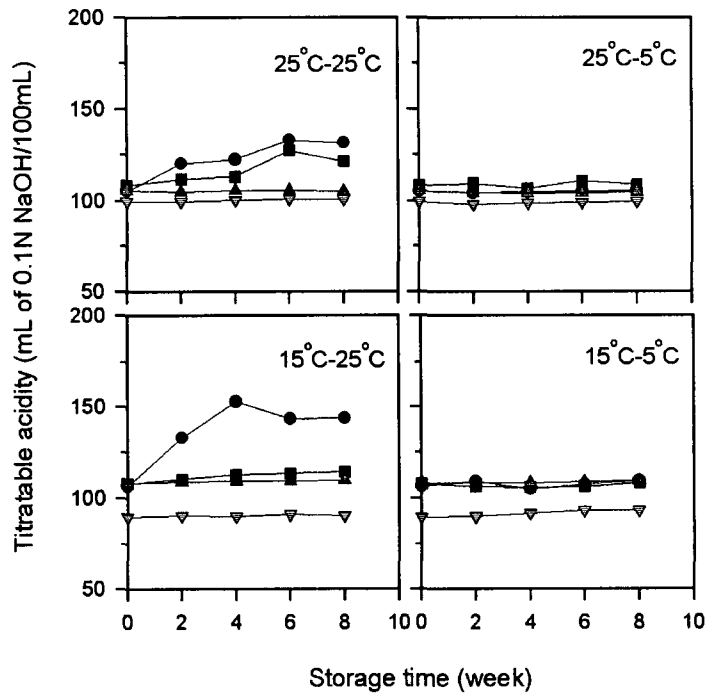


Fig. 3-14. Change in the titratable acidity of fermented fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 6 days at 15°C or for 3 days at 25°C.

Legend : Refer to footnote of Fig. 3-9.

여과구는 16.9°Brix로 다른 구에 비해 낮았다. 이는 한외여과에 의해 가용성 고형분의 일부가 제거된 것으로 여겨진다. 15°C에서 6일간 또는 25°C에서 3일간 발효 후 무균처리한 열처리구와 한외여과구는 5, 25°C 저장시 변화가 없었다. 25°C에서 발효한 과채주스를 25°C에서 저장시 자연발효구와 무처리구는 2주 저장때 15.8, 15.3°Brix로 감소 후 더 이상의 변화가 없었고, 5°C 저장에서는 모든 구가 저장동안 변화가 없었다.

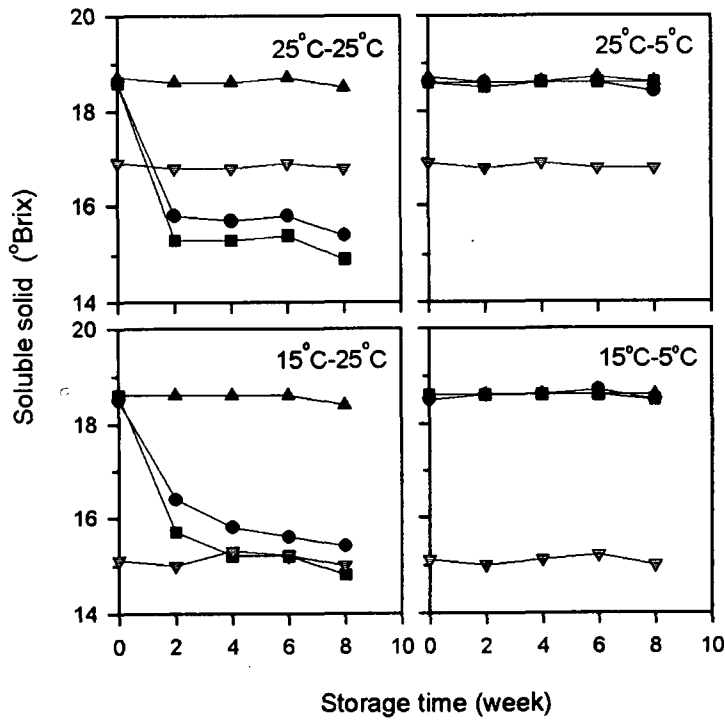


Fig. 3-15. Change in the soluble solid content of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 6 days at 15°C or for 3 days at 25°C.  
 Legend : Refer to footnote of Fig. 3-9.

15°C에서 6일간 발효한 자연발효구의 경우 25°C에서 저장시 자연발효구와 무처리구는 저장 2주째 16.4, 15.7°Brix로 급격히 감소하였으며, 그 후에는 서서히 감소하였다. 이는 발효를 중단한 후에도 젖산균이 이용할 수 있는 발효성 당이 남아있어 젖산균의 최적 온도인 25°C에서 젖산균의 활성이 증가되어 잔존해 있는 발효당을 이용함으로써 가용성 고형분이 감소한 것이라 여겨진다.

최근 저장성을 향상하기 위해서 발효당을 완전히 제거하고자 하는 연구가 진행되고 있으나 단맛이 관능특성에 중요한 영향을 미치지 못하는 김치발효에서는 발효성 당을 완전히 제거하는 방법은 유용하나 단맛이 중요한 기호도로 작용하는 주스에서는 발효성 당을 완전히 제거하는 것은 주스의 관능적인 품질에 좋지 않은 영향을 미칠 것이라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 젖산발효시 가장 안정한 당인 isomaltooligosaccharide (healthigo, 대상)를 사용하였으나 isomaltooligosaccharide 제품내에 함유되어 있는 단당류인 glucose, maltose와 혼합과채주스 내에 있는 단당류인 glucose, sucrose, fructose 등이 발효 종결 후 잔존하여 저장 중 젖산균에 의해 이용되어 가용성 고형분의 함량이 감소된 것으로 추측된다. 그러나 5℃ 저장에서는 8주간 저장동안 가용성 고형분의 변화가 거의 없었다(Fig. 3-15).

#### 다) 비타민 C

무균처리를 달리하여 저장한 발효과채주스의 총비타민 C와 산화형 비타민 C는 Fig. 3-16, 3-17과 같다. 총비타민 C는 무균처리 직후 31.8~54.0mg%로 한외여과구, 무처리구, 자연발효구, 열처리구 순이었고, 5℃ 저장시 모든 구에서 거의 변화가 없었다. 25℃에서 저장한 경우 자연발효구와 무처리구는 약간 감소하는 경향을 나타내었으나 그 정도가 미미하였던 반면 한외여과구와 열처리구의 총비타민 C는 저장 중 급격히 감소하였다.

비타민 C는 수용액 중에서 산소와 광선에 의하여 파괴된다. 따라서 젖산균이 살아있는 무처리구의 경우 젖산균에 의해 생성된 CO<sub>2</sub>로 인해 용기 내부가 혐기적인 상태이므로 비타민 C가 덜 파괴되나 열처리구나 한외여과구는 용기 내에 그리고 주스 내에 존재하는 산소에 의해 파괴가 된 것으로 추측할 수 있다.

산화형 비타민 C는 무균처리 직후 11.0~39.4mg%로 한외여과구, 무처리구, 자연발효구, 열처리구 순이었고, 특히 다른 구에 비해 한외여과구의 산화형 비타민 C의 함량이 많았다.

5℃에서 저장시 전반적으로 25℃ 저장에 비해 변화가 작았다. 저장 4주째 모든

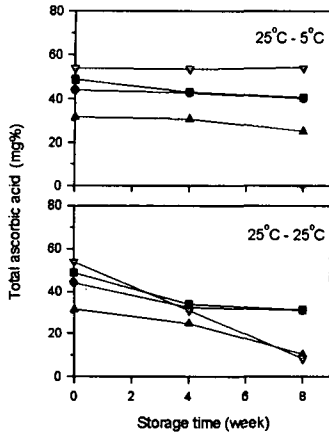


Fig. 3-16. Change in the total ascorbic acid content of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 6 days at 15°C or for 3 days at 25°C. Legend : Refer to footnote of Fig. 3-9.

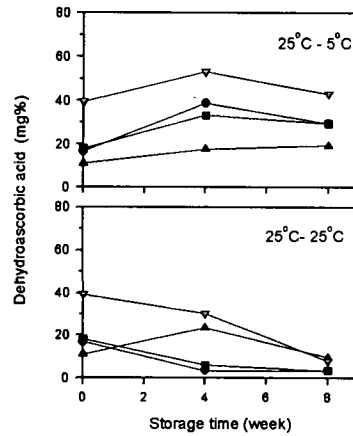


Fig. 3-17. Change in the dehydroascorbic acid content of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 6 days at 15°C or for 3 days at 25°C. Legend : Refer to footnote of Fig. 3-9.

구의 산화형 비타민 C가 약간 증가하였다가 8주째 다시 감소하는 경향을 나타내었으나, 25°C 저장에서 자연발효구와 무처리구의 산화형 비타민 C는 저장 기간이 경과함에 따라 약간 감소하였으나, 한외여과구는 저장 4주째까지 약간 감소하다가 저장 8주째 급격하게 감소하였다. 열처리구는 저장 4주째 급격히 증가하였다가 8주째 다시 급격하게 감소되었다. 이는 저장 4주째까지는 환원형 비타민 C가 산화형 비타민 C로 전환되다가 저장 8주째에는 환원형 비타민 C가 diketogluconic acid 등으로 전환된 것으로 볼 수 있다.

이와같은 무균처리 주스의 저장 중 비타민 C의 급격한 파괴는 N<sub>2</sub>나 CO<sub>2</sub> gas의 충전 포장으로 산소를 제거하여 주스를 혐기적인 환경을 만들어 줌으로써 저장 중 산화에 의한 비타민 C의 파괴를 줄일 수 있을 것이다.

#### 라) 유기산

무균처리를 달리한 발효과채주스 중의 malic acid, succinic acid, lactic acid,



Table 3-17. Change in the organic acid content of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C for 8 weeks after fermentation for 3 days at 25°C

(unit : mg%)

Storage time (weeks)	Storage temperature (°C)							
	5°C				25°C			
	A	B	C	D	A	B	C	D
Malic acid								
0	164.63	178.36	182.65	196.62	164.63	178.36	182.65	196.62
4	175.11	181.55	200.44	205.47	0	0	154.17	136.27
8	189.93	200.05	221.22	213.59	0	0	152.28	127.52
Succinic acid								
0	45.49	37.27	38.51	34.03	45.49	37.27	38.51	34.03
4	57.92	43.46	47.70	49.07	45.23	37.41	47.26	40.75
8	62.25	42.37	44.40	58.74	63.16	33.06	39.47	40.60
Lactic acid								
0	1343.28	1757.68	1687.02	1564.11	1343.28	1757.68	1687.02	1564.11
4	1340.35	1750.36	1707.89	1618.43	1604.69	1626.06	1749.61	1702.98
8	1489.09	1748.64	1742.06	1619.96	1732.45	1606.45	1738.84	1673.82
Acetic acid								
0	216.39	187.42	160.93	169.33	216.39	187.42	160.93	169.33
4	217.03	190.13	178.47	203.95	303.59	252.67	205.70	175.80
8	254.34	194.45	184.44	209.11	361.55	282.30	189.95	181.01

A : Natural fermentation without starters

B : Fermentation after addition of starters

C : Fermentation after addition of starters and thermal treatment at 96°C for 15sec

D : Fermentation after addition of starters and ultrafiltration

acetic acid는 Table 3-17과 같다. Malic acid는 저장 전 164.63~196.62mg%이었고, 모든 저장 온도와 기간동안 열처리구와 한외여과구에서는 큰 변화가 없었다. 25℃에서 저장한 자연발효구와 무처리구에서는 서서히 감소하여 저장 4주째 검출되지 않았다. 이는 malic acid가 주스 중에 존재하는 malolactic fermentation을 하는 젖산균에 의해 lactic acid로 변환된 것이라 추측된다.

Succinic acid는 저장 전 34.03~45.49mg%으로 저장기간이 경과함에 따라 큰 변화는 없었다. 발효과채주스 중의 lactic acid는 젖산균을 첨가하지 않은 자연발효구의 경우 다른 구에 비해 함량이 적었으나 25℃ 저장 중 점차 증가되었고, 5℃ 저장에서는 젖산균이 저해를 받아 저장기간이 경과하여도 큰 변화가 없었다. 그 외 다른 구에서는 저장 중 젖산의 함량에 큰 변화가 없었다.

Acetic acid는 저장 전 자연발효구, 무처리구, 한외여과구, 열처리구 순이었다. 5℃ 저장시 약간 증가되었으나 특히 자연발효구의 경우 다른 구에 비해 많이 검출되었고, 25℃ 저장에서는 무처리구와 자연발효구 모두 저장기간이 경과할수록 증가하는 양상이었고, 특히 starter를 첨가하지 않은 자연발효구에서 많은 양이 검출되었다. 이는 자연 중에 존재하는 미생물에 의해 저장 중 acetic acid가 생성된 것으로 추측된다. 일반적으로 acetic acid는 발효 주스 중에 좋지 않은 성분으로 보고되고 있으므로 자연발효구는 다른 구에 비해 품질면에서 떨어짐을 알 수 있었다. Acetic acid는 살균한 구가 가장 낮은 값을 나타내었고, malic acid는 살균이나 한외여과에 의해 전혀 손실이 되지 않았다.

#### 마) 유리당

$\alpha$ -1,6 결합이 1개 이상 존재하는 올리고당을 함유한 isomaltooligosaccharide (대상, healthligo)를 첨가하여 혼합과채주스를 25℃에서 3일간 발효 후 96℃에서 15초간 가열살균 또는 한외여과를 한 후 5, 25℃에서 저장하면서 유리당의 변화양상을 조사한 결과 Table 3-18과 같다. 첨가한 isomaltooligosaccharide(대상)의 조성은 glucose 21.95%, maltose 13.57%, isomaltose 9.30%, maltotriose 3.88%, panose 20.33%, isomaltotriose 1.90%, maltotetraose 2.40%이고, 본 실험에서도 동일한 결

과가 나왔다.

25℃에서 3일간 발효한 과채즙의 glucose(G) 함량은 66.51~69.06mg/ml이었다. 발효즙을 25℃에서 저장시 무균처리를 하지 않은 자연발효구와 무처리구에 서는 저장 4주째 1.75, 1.12mg/ml로 급격하게 감소되었다. 이는 무균처리를 하지 않았으므로 즙 중에 존재하는 젖산균과 효모에 의해 이용된 것으로 볼 수 있다. 발효 후 5℃에서 저장한 시료들은 무균처리 방법에 관계없이 저장 8주째까지 거의 변화가 없었다.

함을 알 수 있었다. 따라서 25℃에서 발효 후 5℃에서 저장하는 것이 glucose의 저장 안정성에 가장 좋은 것이라 여겨진다.

첨가한 isomaltooligosaccharide(healthligo)에는 없는 당이지만 즙 중에 존재 하는 fructose는 25℃에서 3일간 발효한 즙에서 12.65~15.87mg/ml가 검출되었다. 저장기간이 경과함에 따라 무균처리를 한 열처리구와 한외여과구의 fructose 함량은 거의 변화가 없었으나 무균처리를 하지 않은 자연발효구와 무처리구는 저장 4 일째에 급격하게 감소되었다. 이는 시료 내에 존재하는 젖산균, 효모 등에 의해 fructose가 지속적으로 이용됨을 알 수 있다. 그러나 25℃에서 발효 후 5℃에서 저장한 자연발효구와 무처리구에서도 저장 8주째까지 fructose 함량의 변화가 거의 없었다.

두 개의 glucose가  $\alpha$ -1,6 결합으로 연결된 isomaltose( $G_{\alpha 1-6}G$ )는 25℃에서 3 일간 발효한 시료의 경우 저장 전 15.79~16.20mg/ml이었다. 발효 온도, 저장 온도, 저장 기간, 무균처리 방법에 관계없이 모든 구에서 저장 8주째까지 거의 변화가 없었다. 25℃에서 3일간 발효한 과채즙의 sucrose 함량은 3.19~4.10mg/ml이었고, 무균처리를 한 열처리구와 한외여과구는 저장 중에 sucrose 함량의 변화가 거의 없었으며, 자연발효구와 무처리구는 저장 4주째 증가하였다가 저장 8주째 다시 감소하는 경향을 나타내었다.

Maltose( $G_{\alpha 1-4}G$ )는 25℃에서 3일간 발효하여 무균처리한 직후 18.72~20.48 mg/ml의 함량을 나타내었고, 25℃ 저장시 자연발효구는 약간 감소되었으며, 무처리 구는 약간 감소 후 다시 증가하였으나 5℃저장에서는 거의 변화가 없었다. 열처

Table 3-18. Change in the free sugar content of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 3 days at 25°C

(unit : mg/ml)

Storage time (weeks)	Storage temperature (°C)							
	5°C				25°C			
	A	B	C	D	A	B	C	D
<b>Glucose</b>								
0	66.51	66.68	68.90	69.06	66.51	66.68	68.90	69.06
4	65.03	71.33	70.10	68.93	1.75	1.12	67.51	62.89
8	70.22	69.44	71.86	69.81	1.51	1.88	66.23	63.24
<b>Fructose</b>								
0	12.65	14.52	15.51	15.87	12.65	14.52	15.51	15.87
4	11.49	15.65	15.93	15.71	2.98	1.27	15.13	15.42
8	12.89	15.73	16.80	15.98	2.08	1.73	14.33	14.04
<b>Isomaltose</b>								
0	15.79	15.40	15.82	16.20	15.79	15.94	15.82	16.20
4	14.52	16.73	16.32	16.13	16.42	15.03	15.63	15.70
8	16.84	15.58	16.66	16.32	16.33	15.63	15.42	16.13
<b>Sucrose</b>								
0	4.10	3.19	3.34	3.65	4.10	3.19	3.34	3.65
4	6.38	3.55	3.32	3.64	8.49	8.07	3.26	4.56
8	3.61	3.02	3.21	3.59	6.15	6.03	3.12	3.11
<b>Maltose</b>								
0	20.48	19.34	18.72	19.17	20.48	19.34	18.72	19.17
4	20.01	19.09	18.93	19.10	17.69	17.04	18.53	18.72
8	21.43	18.63	19.52	19.21	15.58	19.04	17.79	19.15

A, B, C, D : Refer to footnote of Table 3-18.

Table 3-18. Continued.

(unit : mg/ml)

Storage time (weeks)	Storage temperature (°C)							
	5°C				25°C			
	A	B	C	D	A	B	C	D
Panose								
0	38.23	39.02	37.89	35.50	38.23	39.02	37.89	35.50
4	33.83	38.40	38.37	35.49	37.81	34.39	37.63	33.92
8	38.92	37.14	39.00	35.51	35.76	35.70	36.52	35.25
Maltotriose								
0	7.08	7.33	6.20	6.00	7.08	7.33	6.20	6.00
4	6.27	6.55	6.31	6.00	6.81	6.55	6.12	6.01
8	7.11	6.53	6.65	6.01	6.72	6.53	6.03	6.01
Isomaltotriose								
0	13.23	11.02	9.34	8.78	12.23	11.02	9.34	8.78
4	9.94	10.60	9.41	8.77	10.76	10.78	9.51	8.65
8	11.43	10.51	10.15	8.78	10.61	10.32	10.03	8.71
Maltotetraose								
0	3.57	3.94	3.85	3.20	3.57	3.94	3.85	3.20
4	3.00	3.81	3.98	3.21	3.75	3.22	3.14	3.15
8	4.09	3.62	4.09	3.19	3.07	3.05	3.76	3.20

A, B, C, D : Refer to footnote of Table 3-18.

리구와 한외여과구의 maltose 함량은 저장 중에 거의 변화되지 않았다.

Panose는  $G_{\alpha 1-4}G_{\alpha 1-6}G$ 의 구조를 갖는 올리고당으로 25°C에서 발효시 무균처

리 직후 37.89~39.02mg/ml이었으며, 저장 8주째까지 거의 변화없이 안정함을 알 수 있었다.

Maltotriose( $G_{\alpha 1-4}G_{\alpha 1-4}G$ )는 25℃에서 3일간 발효 후 6.00~7.08mg/ml의 함량을 나타내었고, 저장 온도에 관계없이 저장 8주동안 거의 변화가 없었다. 이것으로 보아 maltotriose는 본 발효과채주스에서 저장 중 안정함을 알 수 있었다.

혼합과채주스를 25℃에서 발효시 isomaltotriose( $G_{\alpha 1-6}G_{\alpha 1-6}G$ )는 9.34~12.23 mg/ml의 함량을 나타내었고, 저장기간이 경과할수록 자연발효구는 감소하는 경향을 나타내었으며, 자연발효구를 제외한 나머지는 거의 변화가 없었다. 15℃에서 6일간 발효 후 isomaltotriose의 함량은 4.18~5.25mg/ml이었고, 무처리구와 자연발효구는 저장 4주째에 증가하였다가 8주째 다시 감소하는 경향을 나타내었으며, 열처리구와 한외여과구는 저장 8주째까지 거의 변화가 없었다.

Maltotetraose는 glucose가 4개 결합된 올리고당으로 25℃에서 발효한 시료의 저장 전 함량은 3.57~3.94mg/ml으로 무처리구와 자연발효구에서는 저장 기간이 경과함에 따라 약간 감소하는 경향이었으나 변화정도는 미미하였다. 15℃에서 발효한 주스의 경우 저장 전의 maltotetraose의 함량은 0.60~1.68mg/ml로 무처리구, 자연발효구, 열처리구, 한외여과구 순이었으며, 특히 한외여과구가 다른 구에 비해 0.68mg/ml로 함량이 낮았다. 이는 한외여과에 의해 maltotetraose가 일부 제거된 것으로 여겨진다. 무균처리를 한 구는 25, 5℃ 저장시 거의 변화가 없었으나 무처리구와 자연발효구는 약간 감소하는 경향이였다.

이상에서 본 바와 같이 젖산발효시 주로 glucose, sucrose, fructose, maltose 등과 같은 당이 미생물의 기질로 이용되어 산을 형성함으로써 발효 및 저장 중 급격히 감소하나 oligosaccharide의 경우 미생물의 이용이 어려워 저장 중 크게 감소하지 않음을 알 수 있다. Fructooligosaccharide의 대표적인 당인 1-ketose는 25℃에서 27일간 발효시 미생물에 의해 일부 이용되어 35~50%의 잔존율을 보였으나 isomaltooligosaccharide의 대표적인 당인 panose는 25℃에서 60일까지도 거의

변화가 없었다. 따라서 혼합과채주스에 oligosaccharide 특히 isomaltooligo-saccharide를 첨가하여 발효시 단맛을 부여하면서도 인슐린 분비에 영향을 주지 않아 당뇨병 환자에게도 좋고, 또한 충치를 예방하며, 장내미생물 균총을 변화시키는 올리고당의 우수한 기능성을 갖는 발효과채주스를 제조할 수 있을 것으로 여겨진다.

#### 바) 점도

앞의 연구에서 밝혔듯이 fructooligosaccharide의 첨가는 저온 발효시 fructooligosaccharide 중의 당 특히 sucrose가 *Leuconostoc mesenteroids* 등의 젖산균에 의해 dextran으로 전환되면서 점도를 향상시켜 기호도를 저하시켰다. 따라서 점질물 형성에 따른 점도의 상승을 억제하기 위하여 sucrose가 거의 함유되어 있지 않은 isomaltooligosaccharide를 fructooligosaccharide 대신 주스에 첨가하여 15℃에서 젖산 발효한 결과 점도의 증가가 없었다.

혼합과채주스를 25℃에서 3일간, 15℃에서 6일간 발효 후 원심분리하여 무균처리한 후 25℃와 5℃에서 8주간 저장한 결과 점도의 변화는 Fig. 40과 같다. 저장 전 자연발효구, 무처리구, 열처리구는 3.4~3.7 mPa·S로 거의 비슷하였으나 한외여과구는 고형물의 제거에 의해 3.0 mPa·S로 다른 구에 비해 낮았다. 5, 25℃ 저장시 모든 구의 점도는 저장동안 거의 변화가 없었다.

#### 사) 색도

무균처리를 달리한 발효과채주스의 색도는 Table 3-19와 같다. 무균처리 직후 자연발효구, 무처리구, 열처리구는 거의 비슷하나 한외여과구는 다른 구에 비해 높게 나타났다. 5℃에서 8주간 저장한 모든 구는 저장기간 동안 밝기(L)의 변화가 거의 없었으나 25℃에서 저장한 모든 구는 저장기간이 지남에 따라 약간 감소하였다.

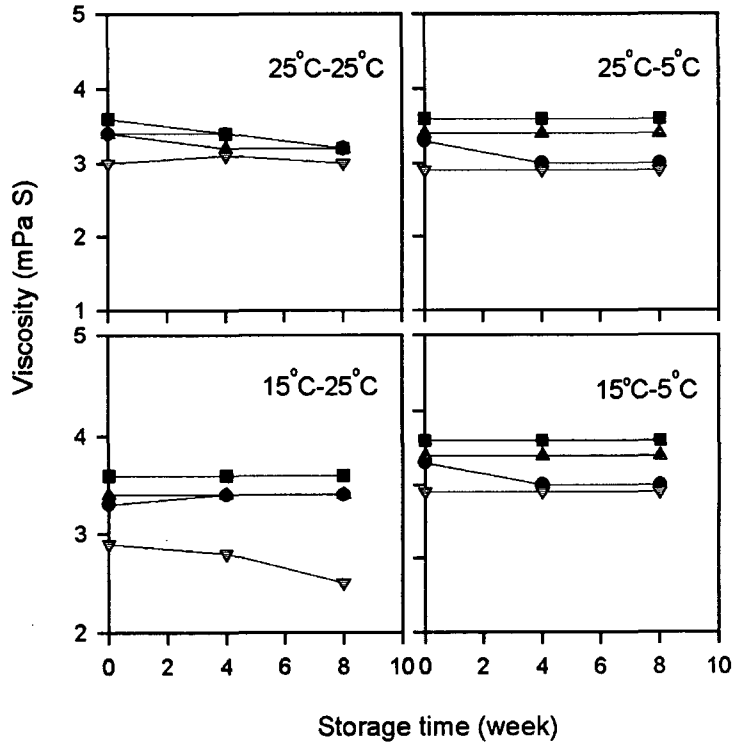


Fig. 3-19. Change in the viscosity of fermented fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 6 days at 15°C or for 3 days at 25°C.

Legend : Refer to footnote of Fig. 3-9.

적색도를 나타내는 a 값은 25°C에서 발효한 경우 무균처리 직후 -0.06 ~ -1.89를 나타내며 다른 구에 비해 한외여과구가 더 낮은 값을 나타내었다. 이는 한외여과에 의해 적색소가 제거되어 나타난 현상이라 볼 수 있다. 25°C 발효 후 5°C에서 저장한 구는 저장 중 a 값의 변화가 거의 없었으나 25°C 저장에서는 모든 구의 a 값이 증가하는 경향이었으며, 특히 열처리구가 다른 구에 비해 증가 정



Table 3-19. Effect of thermal treatment and ultrafiltration on color of mixed fruit and vegetable juices during storage for 8 weeks at 5°C and 25°C after fermentation for 3 days at 25°C

Storage time (weeks)	Storage temperature (°C)							
	5°C				25°C			
	A	B	C	D	A	B	C	D
L								
0	27.81	28.04	27.27	30.12	27.81	28.04	27.27	30.12
2	27.65	28.11	27.72	29.70	23.14	24.75	26.14	24.48
4	27.61	28.04	27.46	29.33	24.86	24.33	23.39	23.71
6	28.05	28.12	27.91	29.19	24.43	24.32	23.97	24.92
8	28.26	28.29	27.50	29.08	24.54	24.14	23.32	24.44
a								
0	-0.15	-0.23	-0.06	-1.89	-0.15	-0.23	-0.06	-1.89
2	-0.20	-0.16	+0.12	-1.74	+0.21	+0.09	+1.15	+0.57
4	-0.18	-0.34	+0.01	-1.29	+0.20	+0.15	+3.44	+1.60
6	-0.37	-0.28	-0.34	-1.02	-0.39	+0.11	+3.39	+1.35
8	-0.12	-0.06	-0.11	-1.01	-0.24	+0.39	+4.22	+1.91
b								
0	+13.44	+14.08	+13.51	+11.35	+13.44	+14.08	+13.51	+11.35
2	+13.69	+13.59	+14.87	+10.80	+10.58	+12.08	+14.83	+14.80
4	+14.07	+13.77	+13.79	+10.09	+11.54	+11.48	+13.35	+14.14
6	+13.37	+12.93	+13.41	+10.53	+12.68	+11.11	+13.64	+14.56
8	+14.57	+14.94	+14.37	+12.42	+11.78	+11.36	+13.60	+15.45

A, B, C, D : Refer to footnote of Table 3-18.

도가 컸다. 15°C에서 발효한 시료도 5°C에서 8주간 저장 중 거의 변화가 없었으나 25°C에서 저장한 열처리구는 다른 구에 비해 급격하게 증가하였고, 한외여과구

도 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 저장 중 갈변현상에 의해 a 값이 증가된 것으로 여겨진다. 즉 열처리구의 경우 저장 8주째 눈에 떨 정도로 갈변이 되었음을 볼 수 있었다.

황색도를 나타내는 b 값의 경우 무균처리 직후 다른 구에 비해 한외여과구는 낮은 값을 나타내었다. 저장 기간이 길어질수록 약간 증가되는 경향을 나타내었다. 특히 15℃에서 발효한 한외여과구는 저장 기간이 길어질수록 다른 구에 비해 b 값이 많이 증가되었다. 이는 발효주스의 저장 중 야기된 갈변현상에 의해 나타난 결과라 여겨진다.

이와같은 갈변현상을 비타민 C의 파괴와 비교해 볼 때 25℃ 저장 중 열처리구와 한외여과구의 비타민 C가 많이 파괴됨과 동시에 갈변현상이 나타났다. 따라서 25℃ 저장시 용기 중에 존재하는 O<sub>2</sub>와 비타민 C가 반응하여 비가역적으로 산화되어 여러 중간 산화생성물들을 거쳐 furfural 유도체 또는 lactone류를 형성한 후 이 물질들이 중합, 축합 반응을 일으켜 갈색으로 착색된 물질들인 browning pigments를 형성하여 갈변화가 일어난 것이라 추측된다. 따라서 무균처리한 발효과채주스의 포장시 탈기 또는 N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>를 충전하여 O<sub>2</sub>를 제거함으로써 갈변을 줄일 수 있을 것이라 예측된다.

### 3) 향기성분

무균처리를 달리한 발효과채주스와 발효하지 않은 혼합과채주스의 향기성분을 dynamic headspace법으로 시료의 향기를 포집 후 gas chromatography로 분석하였다. 향기성분의 확인은 Wiley library를 이용하여 GC-MS로 확인하였다. 과일과 야채의 신선한 향을 최대한 그대로 분석하기 위해 purge and trap 장치를 사용하여 향기를 포집하여 이들을 분석, 동정하여 Table 3-20에 peak number와 함께 area를 나타내었다.

확인된 peak는 58개의 성분이었고, acid 3종, alcohol 17종, aldehyde 1종,

alkene 9종, ester 14종, ketone 7종, 기타 7종으로 분류되었다. 발효하지 않은 과채주스에서는 이 중 51개의 peak가 분리되었다. 발효하지 않은 과채주스의 주 peak는 2-propanone, ethyl acetate, ethanol, ethyl butanoate, butyl acetate, 1-butanol, d,l-limonene, 2-methyl-1-butanol,  $\gamma$ -terpinene, 1-hexanol이었다. 이 중 2-propanone, 3-methyl-2-butanone, d,l-limonene,  $\gamma$ -terpinene이 발효과채주스에 비해 발효하지 않은 과채주스에서 많이 검출되었다. 이는 과채 중에 존재하는 이와같은 향기성분들이 발효 중 많이 휘발된 것으로 여겨진다. 그외 발효과채주스에서는 검출되지 않았던 hexyl-2-methyl-butylate, 2-heptanol, 4-methyl-6-hepten-3-one이 발효하지 않은 혼합과채주스에서 소량 검출되었다. 그러나 발효주스에서 다량검출된 3-hydroxy-2-butanone은 혼합과채주스에서 검출되지 않았고, acetic acid는 소량 검출되었다.

Starter를 첨가하지 않은 채 25°C에서 3일간 배양한 자연발효구에서는 acid 2종, alcohol 14종, aldehyde 1종, alkene 8종, ester 14종, ketone 5종, 기타 6종으로 총 50개가 검출, 확인되었다. 다른 모든 주스에서 확인된 peak 58개 중 hexyl-2-methyl-butylate, 3-pentanol, 2-penten-1-ol, 2-heptanol,  $\beta$ -phellandrene, 4-methyl-6-hepten-3-one, 2-nonanone이 검출되지 않았고, 무발효주스에서는 검출되지 않았던 1-pentanol, cyclopentanol, methyl acetate, 3-methyl-2-butanone, 2,5-dimethyl furan이 검출되었으며, 무발효 주스에 비해 acetic acid, 1-hexanol, 2-hexen-1-ol, ethyl acetate, 3-methyl-2-butanone, 3-hydroxy-2-butanone이 증가하였다. 특히 acetic acid와 3-methyl-2-butanone, 3-hydroxy-2-butanone이 급격히 증가되었다. 또한 starter를 첨가하여 발효한 과채주스에 비해 acetic acid, methyl acetate, ethyl acetate 등이 많이 검출되었다.

Starter를 첨가하여 25°C에서 3일간 발효 후 원심분리한 무처리구에서는 acid 2종, alcohol 15종, aldehyde 1종, alkene 8종, ester 14종, ketone 5종, 기타 6종으로 총 51개가 확인, 검출되었다. 주 peak는 ethyl acetate, ethanol, 3-methyl-2-butanone, ethyl butanoate, butyl acetate, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol,

Table 3-20. volatile compounds in mixed fruit and vegetable juices fermented by *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus* for 3 days at 25°C

(unit : peak area/10,000)

Peak No.	Compounds identified	Quality (%)	Peak area				
			Initial*	A	B	C	D
<b>Acids</b>							
40	Hexyl 2-methyl butylate	40	7.6	nd	nd	nd	nd
56	Acetic acid	49	80.0	3608.6	2293.2	423.4	2831.6
<b>Alcohols</b>							
9	Ethanol	86	240.5	270.8	308.7	262.4	293.5
17	2-Butanol	53	41.4	40.3	38.7	37.5	37.9
20	1-Propanol	90	11.0	15.4	10.1	nd	nd
25	2-Methyl-1-propanol	94	169.5	180.8	185.5	174.8	166.7
26	3-Pentanol	72	nd	nd	20.6	nd	nd
28	2-Methyl-1-Butanol, acetate	64	260.7	268.7	274.2	140.1	64.8
31	1-Butanol	94	1428.7	1334.5	1389.2	1415.8	1240.0
38	2-Methyl-1-butanol	91	1572.3	1518.8	1579.	1525.5	1170.6
43	1-Pentanol	78	79.2	57.0	95.6	72.5	58.0
49	Cyclopentanol	59	nd	6.5	9.7	9.1	nd
50	2-Penten-1-ol	68	16.3	nd	9.3	nd	nd
51	2-Heptanol	50	7.0	nd	nd	nd	nd
53	1-Hexanol	83	492.4	941.5	991.3	995.3	521.3
55	2-Hexen-1-ol	94	11.7	70.8	96.7	86.4	47.5
58	2-ethyl-1-Hexanol	72	18.4	10.6	10.9	11.8	9.2

Initial\* : Mixed fruit and vegetable juices before fermentation

A, B, C, D : Refer to footnote of Table 40

Table 3-20. Continued.

(unit : peak area/10,000)

Peak No.	Compounds identified	Quality (%)	Initial*	Peak area			
				A	B	C	D
<b>Aldehydes</b>							
24	Hexanal	90	828.2	18.3	5.2	15.2	56.4
<b>Alkens</b>							
1	1,4-hexadiene	87	nd	13.1	9.0	31.4	11.4
33	$\beta$ -Myrcene	95	64.8	12.0	9.0	25.1	nd
34	$\alpha$ -Terpinene	97	53.5	39.5	11.2	35.9	20.0
36	d,l-Limonene	96	1425.8	195.4	176.4	136.2	5.9
37	$\beta$ -Phellandrene	90	22.9	nd	nd	nd	nd
41	3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene	91	74.1	12.1	11.6	14.3	nd
42	$\gamma$ -Terpinene	96	468.1	91.5	71.1	67.9	12.5
46	$\alpha$ -Terpinolene	97	26.4	29.3	25.0	10.3	5.5
<b>Esters</b>							
3	Acetic acid, methyl ester	80	nd	33.8	22.2	14.1	18.6
5	Acetic acid, ethyl ester	80	138.8	691.3	191.8	101.4	331.8
7	Propanoic acid, methyl ester	25	12.7	9.9	14.8	8.6	8.7
11	Propionic acid, ethyl ester	64	9.7	8.9	9.4	7.0	nd
12	Acetic acid, propyl ester	59	62.0	64.6	82.9	72.9	52.7
15	2-Methyl-butanoic acid, methyl ester	90	73.2	18.5	21.7	nd	8.9
16	Acetic acid, 2-methylpropyl ester	47	140.1	25.4	25.3	10.1	5.6
19	Butanoic acid, ethyl ester	95	240.1	302.7	340.5	351.3	295.0
21	2-methylbutanoic acid, ethyl ester	64	10.4	9.8	9.2	7.7	nd

Initial\* : Mixed fruit and vegetable juices before fermentation

A, B, C, D : Refer to footnote of Table 40

Table 3-20. Continued.

(unit : peak area/10,000)

Peak No.	Compounds identified	Quality (%)	Peak area				
			Initial *	A	B	C	D
23	Acetic acid, butyl ester	83	176.2	205.4	209.0	112.0	41.5
30	3-Methyl-butanoic acid, butyl ester	38	5.8	5.3	5.7	nd	nd
35	Acetic acid, pentyl ester	80	15.4	5.8	29.3	37.0	10.4
39	Butanoic acid, butyl ester	90	24.9	8.0	8.3	nd	nd
47	Acetic acid, hexyl ester	83	103.4	21.6	12.7	21.5	nd
<b>Ketones</b>							
2	2-Propanone	78	1438.1	53.6	94.8	133.0	114.2
6	2-Batanone	38	36.3	12.3	18.9	24.1	13.5
13	3-Methyl-2-butanone	59	nd	569.3	89.5	1863.9	1680.1
14	4-Methyl-2-pentanone	64	24.6	6.0	9.2	nd	30.2
48	3-Hydroxy-2-butanone	78	26.2	1640.4	2616.6	2409.9	1329.9
52	4-methyl-6-Hepten-3-one	53	6.5	nd	nd	nd	nd
54	2-Nonanone	72	7.9	nd	nd	7.2	10.9
<b>Others</b>							
4	2-Methyl furan	91	52.6	25.7	29.6	58.6	117.2
10	2,5-Dimethyl furan	93	nd	18.8	19.4	35.3	11.8
18	Methyl benzen	94	86.7	69.5	74.1	35.9	25.5
22	Dimethyl sulfide	97	38.3	7.8	nd	6.8	8.9
27	Ethyl benzen	87	37.3	39.8	37.9	51.3	34.4
29	1,3-dimethyl benzen	95	16.3	nd	6.1	nd	nd
45	1-Methyl-2-(1-methylethyl) benzen	94	87.5	18.8	12.0	16.9	5.2

Initial\* : Mixed fruit and vegetable juices before fermentation

A, B, C, D : Refer to footnote of Table 40

d,l-limonene, 2-methyl-1-butanol, 3-hydroxy-2-butanone, 1-hexanol, acetic acid 등이었다. 무발효 주스에서 검출되었던 hexyl-2-methyl-butylate, 1-pentanol, 2-heptanol,  $\beta$ -phellandrene, 4-methyl-6-heptene-3-one, 2-nonanone, dimethyl sulfide가 검출되지 않았고, 무발효 주스에서 검출되지 않았던 3-pentanol, cyclopentanol, 1,4-hexadiene, methyl acetate, 3-methyl-2-butanone, 2,5-dimethyl furan이 무처리구에서 검출되었다. 또한 자연발효구에서 검출되지 않았던 2-penten-1-ol, 1,3-dimethyl benzen이 검출되었다. 그외 acetic acid가 다량 검출되었으나 자연발효구보다는 적게 검출되었다.

Starter를 첨가하여 25℃에서 3일간 발효, 원심분리 후 96℃에서 15초간 가열 처리한 열처리구에서는 acid 2종, alcohol 13종, aldehyde 1종, alkene 8종, ester 11종, ketone 5종, 기타 6종으로 총 46개가 확인, 검출되었고, 이 중 주 peak는 3-methyl-2-butanone, 1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-hydroxy-2-butanone, 1-hexanol, acetic acid 등이었다. 발효 중 다량 형성된 acetic acid는 가열처리에 의해 많이 휘발되어 다른 구에 비해 낮은 값을 나타내었고, 발효과채주스 중에 존재했던 1-propanol, 3-pentanol, 2-penten-1-ol, 2-methyl butanoate, butyl 3-methyl-butanoate, 4-methyl-2-pentanone, 1,3-dimethyl benzen은 검출되지 않았다. 무처리구와 비교해보면 대체로 향기성분의 peak 면적이 약간 줄어들었으나 1-pentanol, 1,4-hexadiene,  $\beta$ -myrcene, 2-pentanone, 3-methyl-2-butanone 등은 증가하였다. 이는 가열에 의해 생성된 것으로 여겨진다.

Starter를 첨가하여 25℃에서 3일간 발효, 원심분리 후 한외여과한 한외여과구에서는 acid 1종, alcohol 11종, aldehyde 1종, alkene 6종, ester 9종, ketone 6종, 기타 6종으로 총 34개가 분리, 검출되었으며, 무처리구에 비해 17개의 peak가 검출되지 않았다. 이는 한외여과처리에 의해 향기성분이 일부 제거되어 나타난 현상이라 추측된다. 주 peak는 ethyl acetate, 3-methyl-2-butanone, ethyl butanoate, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-hydroxy-2-

butanone, 1-hexanol, acetic acid 등이었고, 무처리구에서 검출된 1-propanol, 3-pentanol, cyclohexanol, 2-penten-1-ol,  $\beta$ -myrcene, 3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene, ethyl propionate, hexyl acetate, ethyl 2-methyl butanoate, butyl 3-methyl butanoate, butyl butanoate, 1,3-dimethyl benzen이 한외여과구에서는 검출되지 않았다. 전반적으로 peak 면적은 무처리구에 비해 작은 경향을 나타내었다. 이는 한외여과에 의해 향기성분이 일부 소실된 것으로 볼 수 있다.

Ester는 alcohol 보다 향의 강도가 강하고, 본 실험에서 제조된 발효과채주스에서 많은 ester가 분리, 검출되었으며, acetic acid, butanoic acid, propanoic acid 에 ethyl, methyl, propyl, butyl기가 붙은 것이 대부분을 차지하였다. 바나나 향의 methyl acetate와 파인애플향의 ethyl acetate는 과실 에센스, 과즙, liquor, 탄산음료, 과자 등의 향료로 널리 이용되는 과실향으로 배, 사과, 바나나에서 다량 검출되었고, 본 실험의 모든 구에서 검출되었다. Peak 면적 비율이 높아 과채주스 향기의 주성분으로 나타났다. 그외 발효과채주스에서 12종의 ester 성분이 검출되었는데 acetic acid의 propyl ester, 2-methylethyl ester, hexyl ester, butyl ester, pentyl ester와 propanoic acid의 methyl ester, ethyl ester, 그리고 butanoic acid의 methyl ester, ethyl ester, butyl ester, methylethyl ester, methylbutyl ester 등이었다. 대부분이 과실향으로 발효과채 및 무발효과채주스의 주요 향기성분이었다. 본 발효주스에서 큰 peak를 나타낸 alcohol은 일반적으로 효모발효의 대사 산물이다. 본 실험에서는 직접 접종은 하지 않았지만 자연 중에 존재하는 효모가 혼입되어 일부 발효가 일어난 것으로 볼 수 있다. Ethanol은 효모발효에 의해 당으로부터 EMP 경로에 의해 생성된다. 본 발효 주스에서는 무발효주스와 peak 면적의 차이가 거의 없었으므로 이는 발효 중 ethanol이 형성되지 않았음을 알 수 있다. 1-Hexanol은 "wine-like, slight fatty and fruity"로 발효과채주스에서 다량 검출되었다. 2-Methyl-1-propanol(isobutyl alcohol)은 "weak-isoamyl alcohol-like, wine-like"로 아미노산인 valine으로부터 생성되고, 과실주, 맥주 등 주류의



고급 알코올 성분이다. 1-Butanol은 weak fusel oil-like 냄새이고, 원류대두에서 유래되는 향기성분으로 본 발효과채쥬스에서도 다량 검출되었으나 관능검사요원들의 sniffing test 결과 무취로 나타났다. 이는 1-butanol의 threshold 값이 높은 이유일 것이라 추측된다. 2-Hexen-1-ol은 복숭아 향기성분의 주 성분으로 덜 익은 과실의 향기특성으로 혼합과채쥬스보다 과채쥬스의 발효 후 2-hexen-1-ol이 증가되었다. 그외 banana-pineapple 향의 1-propanol, "mild, fusel-oil"의 3-pentanol, "mild characterisitic, somewhat sweet, balsamic"의 1-pentanol, "mild, oily, sweet, slight rose"의 2-ethyl- 1-hexanol 등이 검출되었다.

1-Hexanal과 1-hexanol은 풀내음(green note)으로 특징지어지는 향기성분으로 세포성분인 불포화지방산 linoleic acid, linolenic acid에서 lipoxygenase pathway에 의해 생성되는 물질들이다. 이 성분들은 돌미나리나 샐러리를 녹즙기로 갈 때 linolenic acid가 효소적 산화작용과 이성화작용 즉 lipoxygenase 에 의해 13-hydroperoxide linoleic acid 또는 13-hydroperoxide linolenic acid가 생성되며 다시 hydroperoxide lyase에 의해 분해되어 생성된 화합물이다.

Ketone류인 3-hydroxy-2-butanone(acetoin)은 알코올 발효 및 젖산균 발효 중에 생성되며, 발효 중 carbon source로부터 acetaldehyde가 생성되어 3-hydroxy-2-butanone(acetoin)으로 전환되며, 무발효과채쥬스에서는 검출되지 않았으나 젖산균 발효 후 검출되었다. 2-Butanone은 발효과채쥬스에서 소량 검출되었다.

쥬스 중의 terpenoids 계통으로  $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ -terpinene,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -terpinolene, d,l-limonene 등이 검출되었다. 이 물질들은 당근에 주로 존재하는 향기성분이다.  $\gamma$ -Terpenene은 약간 쓰고 레몬향을 부여하는 물질로 향긋한 냄새를 주는 감귤류의 주요 향기물질로 무발효과채쥬스에서 다량 검출되었고, 발효 후 약간 감소하는 경향을 나타내었다.  $\beta$ -Myrcene과  $\alpha$ -terpinolene, d,l-limonene은 본 혼합과채쥬스에 다량 함유되어 있으나 발효 후 약간 감소하였고, 한외여과에 의해

다량 감소되었다.

Acetic acid는 미생물에 의한 산화생성물로 자극취가 있는 산미를 나타낸다. 혼합과채주스 발효시 다량 형성되었고, 관능검사 요원들이 sniffing test를 한 결과 향긋함과 시큼한 냄새가 혼합되어 표현하였다.

그외 풀냄새(grassy odor), benzen 향인 methylbenzen, dimethyl sulfide 등이 검출되었다.

이상의 결과로 볼 때 과채주스를 발효 후 무균처리하지 않은 무처리구에서 함량이 많은 성분들은 무균처리 후에도 큰 peak로 검출되었으나 소량 함유된 성분은 무균처리 후 특히 한외여과 중에 휘발되어 검출되지 않았고, 대부분이 과일 향인 ester 계통이 주를 이루었으며, 큰 peak를 나타내는 알코올 성분들은 threshold value가 높아 발효과채주스의 향기에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 볼 수 있다.

#### 4) Olfactory evaluation

GC column에서 분리되어 나오는 각각의 성분을 분지시켜 FID에서 나오는 응답을 보면서 동시에 코로 냄새를 맡아 직접 기술할 수 있는 장치를 사용하여 관능적인 특징을 기술, 묘사하였다. Table 3-21은 3명의 관능검사 요원이 각각의 성분에 대하여 코로 냄새를 맡은 다음 이를 기술한 것이다.

2-Propanone은 시고 상큼한 과일향으로 기술하였고, fruity한 pineapple 향인 ethyl acetate는 상큼한 과일향으로 기술하였다. 4-Methyl-2-pentanone 은 익은 사과향, 2-methyl butanoic acid methyl ester는 달콤한 배향, 2-methylpropyl acetate는 과일의 가열취, butanoic acid는 달콤한 사과와 파인애플향, ethyl 2-methyl-butanoate는 신선한 사과향으로 대부분이 과일향으로 묘사되었다. 이들 peak의 면적은 크지 않지만 threshold value가 비교적 커서 냄새가 강하게 느껴졌고 대부분 chromatograph의 앞부분에서 분리, 검출되었다. Acetone과 유사한 향

Table 3-21. Olfactory evaluation of mixed fruit and vegetable juices fermented by *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus* at for 3 days at 25°C

Peak No.	Compounds identified	Panel I	Panel II	Panel III
2	2-Propanone	신과일향	상큼한 향	산(acid)냄새
5	Acetic acid, ethyl ester	ethyl ester기가 붙은 과일향	새콤한 과일향	약간 상큼한 향
8	Ethanol	알콜취	알콜취	밥순내, 알콜취
13	3-Methyl-2-butanone	마아가린이나 버터의 순내	비린내	에탄올 섞인 약간 톡쏘는 냄새
14	4-methyl-2-pentanone	익은 사과	익은 사과향	익은사과향
15	2-Methyl butanoic acid, methyl ester	갈아만든 배	익은 배향	달콤한 향
16	Acetic acid, 2-methylpropyl ester	약한 단내	과일의 숙취	과일 가열취
19	Butanoic acid, ethyl ester	달콤한 과일향	달콤한 파인에플향	사과+파인에플취
21	2-Methyl-butanoic acid, ethyl ester	신선한 사과향	꽃사과향	신선한 사과향
23	Acetic acid, butyl ester	약한 isoamyl취, fusel oil 취	무취	꼬랑내
43	1-Pentanol	무취	방향성의 약한 단내	약간 화한 냄새
53	1-Hexanol	무취이다가 뒷부분에서 아주 약한 과자 냄새	비릿한 용매향	비린내, 역한 비누냄새
56	Acetic acid	시큼한 향	시큼한 식초향	초기에는 향긋한 식초냄새, 후기에는 시큼한 향

의 3-methyl-2-butanone은 유지류의 순내 또는 비린내로 서술되었고, 1-hexanol은 비릿한 용매향 또는 역한 비누냄새로, ethanol은 밥순내, 알콜취로 서술되었다. 이것은 발효과채주스 중의 불쾌취의 원인으로 분석된다. Acetic acid는 초기에는

향긋한 식초냄새이나 후기에는 시큼한 향으로 발효 중 효모나 세균 등에 의해 형성된 것이다. Acetic acid의 신내는 발효과채주스의 발효취로 나쁜 영향을 주는 향은 아니었다. 그외 분석된 향기성분 중 큰 peak를 형성하는 1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-hydroxy-2-butanone은 관능검사 요원 3명이 모두 무취로 기술하였다. 이 성분들은 threshold value가 크기 때문에 peak의 면적은 크지만 실제 코로는 느껴지지 않는 양이라 생각된다.

#### 5) 관능특성

혼합과채주스를 25℃에서 3일간 발효 후 열처리, 한외여과 등 무균처리를 달리 하여 관능검사를 실시한 결과는 Table 3-22와 같다.

향의 단내와 군덕내는 시료간에 유의적 차이가 없었고, 특히 군덕내는 모든 시료에서 거의 감지되지 않을 정도의 낮은 값을 나타내었다. 신내는 무처리구와 열처리구가 가장 높았고, 다음으로 자연발효구, 한외여과구 순으로 시료간에 유의적 차이를 보였다. 한외여과구의 경우 한외여과에 의해 향기물질이 일부 제거되어 다른 구에 비해 낮은 값을 나타내었다. 이는 gas chromatography에 의한 향기분석 결과와 일치하였다. 신선한 야채향은 무처리구, 한외여과구, 자연발효구, 열처리구 순으로 무처리구와 열처리구간에 유의적 차이가 있었다. 이는 가열에 의해 과채 중에 숙취가 형성되어 야채의 신선한 향이 저하된 것으로 볼 수 있다.

맛 중 신맛과 군덕맛은 시료간에 거의 차이가 없었으나 단맛은 열처리구, 무처리구, 자연발효구, 한외여과구 순으로 열처리구와 한외여과구 간에 유의적 차이가 있었다. 당도계로 가용성 고형분을 측정시 한외여과구의 경우 가용성 고형분의 일부가 제거되어 다른 구에 비해 값이 낮았다는 결과와 일치하였다.

Fructooligosaccharide를 첨가하여 저온에서 발효시 점질물이 형성되어 관능검사시 발효온도에 의한 유의적 차이를 보였으나 isomaltoligosaccharide 로 대체시 무균처리별로 점도의 유의적 차이가 없었으나 한외여과구의 경우 가장 낮은 값을 나타

Table 3-22. Sensory evaluation of mixed fruit and vegetable juices fermented by a mixture of *Leu mesenteroides*, *Lc. lactis* and *Lb. cellobiosus* for 3 days at 25°C

Attributable terms expressed	A	B	C	D
<b>Aroma</b>				
Acidic	4.00 <sup>ab</sup>	4.80 <sup>a</sup>	4.92 <sup>a</sup>	2.51 <sup>b</sup>
Sweet	4.45	5.03	4.88	3.30
Fresh vegetable	3.55 <sup>ab</sup>	4.24 <sup>a</sup>	2.22 <sup>b</sup>	3.81 <sup>ab</sup>
Yeasty and moldy	2.10	1.57	1.99	1.48
<b>Taste</b>				
Acidic	5.31	5.11	4.73	5.18
Sweet	3.24 <sup>ab</sup>	3.59 <sup>ab</sup>	3.97 <sup>a</sup>	2.58 <sup>b</sup>
Yeasty and moldy	1.71	1.13	1.37	1.41
<b>Mouthfeel</b>				
Viscous	2.16	2.05	1.91	1.25
Refreshing	3.69 <sup>b</sup>	6.71 <sup>a</sup>	4.52 <sup>ab</sup>	6.29 <sup>a</sup>
<b>Color</b>				
Redness	4.93 <sup>b</sup>	4.24 <sup>b</sup>	6.01 <sup>a</sup>	1.13 <sup>c</sup>
<b>Preference</b>				
Sum of ranking order	148 <sup>a</sup>	58 <sup>b</sup>	121 <sup>a</sup>	73 <sup>b</sup>

<sup>abc</sup> Mean scores(n=3) in row with different letters are significantly different (p<0.05)

A : Natural fermentation without starters

B : Fermentation after addition of starters

C : Fermentation after addition of starters and thermal treatment at 96°C for 15sec

D : Fermentation after addition of starters and ultrafiltration

내었다. 이는 주스 중의 당과 점질물 등이 membrane filter에 의해 일부 제거되어 점도가 낮게 평가되었다. 입속느낌 중 '상쾌하다'는 무처리구와 한외여과구에서 높은 값을 나타내었고, 자연발효구가 가장 낮은 값을 보였으며, 무처리구와 한외여과구간에 유의적 차이를 보였다. 자연발효구의 경우 starter를 첨가하지 않아 다른 구에 비해 생성된 젖산의 함량이 낮아서 나타난 것이라 예측할 수 있다.

색은 적색일수록 7에 가깝게, 황색일수록 0에 가깝게 나타내었다. 열처리구는 적색에 가깝게 높은 값을, 자연발효구와 무처리구는 중간값을, 그리고 한외여과구는 색소물질의 제거로 맑은 황색을 띄어 낮은 값을 나타내었다. 전체적인 기호도는 무처리구, 한외여과구, 열처리구, 자연발효구의 순으로 무처리구와 한외여과구간에는 유의적인 차이가 없었으나 열처리구나 자연발효구간에는 유의적 차이가 있었다. 따라서 관능검사 결과 한외여과구의 경우 향이 다른 구에 비해 약간 적었고, 유산균이 살아있는 신선한 무처리구의 관능검사 결과가 가장 우수하였다.

## 제 4 절. 참고문헌

1. 윤석권, 손헌수 : 식물 엑기스 발효식품의 현황과 전망. *식품과 산업*, p.53-56
2. Shewfelt, R.L. : Quality of fruits and vegetables. *Food Technol*, p. 99-106 (1990)
3. 김수연 : 혼합과채쥬스의 가공과 저장특성에 관한 연구. 석사학위논문, 서울여자대학교 (1994)
4. 노만 워켈 : 기적의 자연식 야채과실즙. 세종출판공사 (1987)
5. Kim, T.R., Whang, H.J. and Yoon, K.R. : Mineral contents of korean apples and apple juices(in Korea). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28(1), p. 90-98 (1996)
6. Oh, D.H., Ham, S.S., Lee, S.Y., Park, B.K., Kim, S.H., Chung, C.K. and Kang I.J. : Effect of irradiation and blanching on the quality of juices of *Spuriopinella bracycarpar* during storage(in Korea). *Korean J. Food Sci. Technol.*,30(2), p. 333-340 (1998)
7. Lee, D.U., Park, J., Kang, J. and Yeo, I.H. : Effect of high hydrostatic pressure on the shelf-life and sensory characteristics of angelica keiskei juices (in Korea). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 105 (1996)
8. Beaudry, E.G. and Lampi, K.A. : Membrane technology for direct-osmosis concentration of fruit juices. *Food Technol.*, 121 (1990)
9. Yildiz, F., Bozkuit, M. and Wiley, R.C. : Comparison of reverse osmosis and evaporation processing on the quality characteristics of tomato concentrates. *Food Control*, 4(3), p. 155-158 (1993)

10. Koseoglu, S.S., Lauhon, J.T. and Lusas, E.W. : Vegetable juices produced with membrane technology. *Food Technol.*, p. 125-129 (1991)
11. Kang, H.A. and Chang, K.S. : Concentration of persimmon juice by reverse osmosis system (in Korea). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(2), p. 279-283 (1997)
12. Spanos, G.A. and Wrolstad, R.E. : Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage-a review. *J. Agric. Food Chem.*, 40, p. 1478-1487 (1992)
13. Jo, K.S., Kim, J.H. and Shin, H.S. : Major components affecting nonenzymatic browning in ginger(*Zingiber officinale* Roscoe) paste during storage (in Korea). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28(3), p. 33-439 (1996)
14. You, B.J. : Isolation of antioxidative substances from browning reaction product obtained from L-ascorbic acid solution (in Korea). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25(3), p. 214-219 (1993)
15. Gonzalez, A.M., Canovas, G.B., McEvily, A.J. and Iyengar, R. : Inhibition of enzymatic browning in apple products by 4-hexylresorcinol. *Food Technol.*, p. 110-116 (1995)
16. Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. and Canovas, F.G. : Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and diphenolase activities of pear polyphenoloxidase. *J. Food Sci.*, 61(6), p.1177-1181 (1996)
17. Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., Castaner, M., Artes, F. and Saltveit, M.E. : Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *J. Agric. Food Chem.*, 45, p. 583-589 (1997)



18. Hou, W.N. and Marshall, M.R. : A study on separation of thermolabile and thermostable pectinesterase from valencia orange (in Korea). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(5), p. 673-679 (1995)
19. Hou, W.N. and Marshall, M.R. : Characterization of thermolabile pectinesterase and thermostable pectinesterase separated from valencia orange (in Korea). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(5), p. 666-672 (1995)
20. Kato, N., Teramoto, A.I. and Fuchigami, M. : Pectic substance degradation and texture of carrots as affected by pressurization. *J. Food Sci.*, 62(2), p. 359-362 (1997)
21. Crandall, P.G., Matthews, R.F. and Baker, R.A. : Citrus beverage clouding agents - review and status. *Food Technol.*, p. 106-109 (1983)
22. Baker, R.A., Crandall, P.G., Davis, K.C. and Wicker, L. : Calcium supplementation and processing variable effects on orange juice quality. *J. Food Sci.*, 56(5), p. 1369-1371 (1991)
23. Cameron, R.G., Baker, R.A. and Grohmann, K. : Citrus tissue extracts affect juice cloud stability. *J. Food Sci.*, 62(2), p. 242-245 (1997)
24. Schmitt, R. : Optimized enzyme system for the production of carrot juice and other vegetable juices. *Flussiges Obst.*, p. 309-311 (1988)
25. Siebert, K.J., Carrasco, A. and Lynn, P.Y. : Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 44, p. 1997-2005 (1996)
26. Siebert, K.J., Troukhanova, N.V. and Lynn, P.Y. : Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.*, 44, p. 80-85 (1996)

27. Siebert, K.J. and Lynn, P.Y. : Haze-active protein and polyphenols in apple juice assessed by turbidimetry. *J. Food Sci.*, 62(1), p. 79-84 (1997)
28. Song, E.S., Jeon, Y.S. and Cheigh, H.S. : Changes in chlorophylls and carotenoids of mustard leaf kimchi during fermentation and their antioxidative activities on the lipid oxidation (in Korea). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26(4), p. 563-568 (1997)
29. Hirata, K., Hirokado, M., Uematsu, Y., Sadamasu, Y., Yasuda, K., Kazama, M. and Suzuki, S. : Determination of chlorophyll degradation products in chlorophyll color preparations (in Japanese). *食衛誌*, 38(3), p. 155-161 (1997)
30. Dao, L. and Friedman, M. : Chlorophyll, chlorogenic acid, glycoalkaloid, and protease inhibitor content of fresh and green potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 42, p. 633-639 (1994)
31. Steet, J.A. and Tong, C.H. : Degradation kinetics of green color and chlorophylls in peas by colorimetry and HPLC. *J. Food Sci.*, 61(5), p. 924-931 (1996)
32. White, R.C., Jones, I.D. and Gibbs, E. : Determination of chlorophylls, chlorophyllides, pheophytins, and pheophorbides in plant material. *J. Food Sci.*, p. 431-436 (1963)
33. Heaton, J.W., Yada, R.Y. and Marangoni, A.G. : Discoloration of coleslaw is caused by chlorophyll degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 44(2), p. 395-398 (1996)
34. Heaton, J.W., Lencki, R.W. and Marangoni, A.G. : Kinetic model for chlorophyll degradation in green tissue. *J. Agric. Food Chem.*, 44, p.399-402 (1996)

35. Marangoni, A.G. : Kinetic model for chlorophyll degradation in green tissue. 2. pheophorbide degradation to colorless compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 44, p. 3735-3740 (1996)
36. Basset, R.A., Issa, A.A. and Adam, M.S. : Chlorophyllase activity: effects of heavy metals and calcium. *Photosynthetica*, 31(2), p. 421-425 (1995)
37. Thomas, P. and Janave, M.T. : Effect of temperature on chlorophyllase activity, chlorophyll degradation and carotenoids of cavendish bananas during ripening. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 27, p. 57-63 (1992)
38. Hayakawa, K.I. and Timbers, G.E. : Influence of heat treatment on the quality of vegetables: changes in visual green color. *J. Food Sci.*, 42(3), p. 778-781 (1977)
39. Gnanasekharan, V., Shewfelt, R.L. and Chinnan, M.S. : Detection of color changes in green vegetables. *J. Food Sci.*, 57(1), p. 149-154 (1992)
40. 이서래: 한국의 발효식품-한국문화연구원 한국문화총서, 이화여대 출판부, p.25, 26 (1997)
41. Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E. : *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th. ed., William and Wilkins Co., Baltimore, Md. (1974)
42. Pederson, C. S. : *Microbiology of food fermentation*. 2nd., Avi. Pub. Co., Int., Westport, Conn. (1979)
43. 한홍희, 임종락, 박현근, 문상식, 박영선, 주홍택 : 김치부패시 *Brettanomyces custersii*와 *Klebsiella oxytoca*의 편리공생. 인하대학교 기초과학 연구소 논문집, 11, 171 (1990)
44. Ha, S. S. : Studies on the effects of polygalacturonase and

- film-forming microbes on the soft-deterioration of the pickled vegetables. Rep. Army Res. Test. Lab. 5, 139 (1960)
45. Steinkraus, K. H. : Acid-fermented vegetables. In Handbook of indigenous fermented foods, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, p.99 (1983)
46. 김호식, 황규찬 : 김치의 미생물학적 연구(1)-혐기성 세균의 분리와 동정. 과연휘보, 4, 56 (1959)
47. 심선택, 경규향, 유양자 : 김치에서 젖산균의 분리 및 이들의 배추즙액의 발효. 한국식품과학회지, 22, 373 (1990)
48. Mheen, T. I., and Kwon, T. W. : Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. Korean *J. Food Sci. Technol.*, 16, 443 (1984)
49. 김호식, 전재근 : 김치발효 중의 세균의 동적변화에 관한 연구. 원자력연구집, 6, 112 (1966)
50. 송석훈, 조재선, 김 권 : 김치발효에 미치는 방부제의 영향에 관하여. 육군기술연구보고, 6, 5 (1966)
51. 박연희, 군정주, 조도현, 김수일 : 김치에서 분리한 젖산균의 미생물 생육저해. 한국농화학회지, 26, 35 (1983)
52. 이철우, 고창영, 하덕모 : 김치발효 중의 젖산균의 경시적 변화 및 분리, 젖산균의 동정. 한국산업미생물학회지, 20, 102 (1992)
53. 임종락, 박현근, 한홍희 : 김치에서 서식하는 Gram 양성세균의 분리 및 동정의 재평가. 한국미생물학회지, 27, 404 (1989)
54. 박현근, 임종락, 한홍희 : 각 온도에서 김치 발효 중 미생물의 천이과정. 인하대학교기초과학연구소논문집, 11, 161 (1990)
55. 하덕모 : 김치의 발효경과 및 산패 억제. 김치의 과학, 한국식품과학회, 43 (1994)

56. 박세원 : 동치미의 발효와 이에 관여하는 젖산균의 분리 및 동정. 세종대학교 가정학과 박사논문 (1996)
57. Parish, M., and Higgins, D. : Isolation and purification of lactic acid bacteria from samples of citrus molasses and unpasteurized grape juice. *J. Food Sci.*, 53, 645 (1988)
58. 황규찬, 정운수, 김호식 : 김치의 미생물학적 연구(2)-호기성 세균의 분리와 동정. *과연회보*, 5, 51 (1960)
59. 김호식, 정운수 : 김치 및 김에서 분리한 호기성 세균의 세균의 동정에 관하여. *한국농화학회지*, 3, 19 (1962)
60. 최국지 : 김치에서 분리한 효모에 관한 연구-효모의 분리 동정. *한국미생물학회지*, 16, 1 (1978)
61. 노완섭 : 한국산 침채류의 숙성과정에 관여하는 효모에 관한 연구. 동국대 박사학위논문 (1980)
62. 권숙표 : 김치의 세균학적 연구(제1보)-분리한 균에 대하여. *중앙화학연구소보고*, 4, 42 (1955)
63. Garvrilova, N. N., Gilyazova, R. F., and Novikova, A. S. : Selection of strains of lactic acid bacteria for the fermentation of beet juice. *Russian Biotechnol.*, 4, 13 (1996)
64. 소명환 : 김치에서 분리한 저온성 젖산균의 특성. 고려대학교 박사학위논문 (1994)
65. 이현중, 백지호, 양문, 한홍희, 고용덕, 김홍재 : 온도강하에 의한 김치발효의 유산균 군집의 특징. *한국미생물학회지*, 31, 346 (1993)
66. Stamer J. R., Stoyla B. O., and Dunckel B. A. : Growth rates and bacteria associated with the sauerkraut fermentation. *J. Milk Food Technol.*, 34, 521 (1971)
67. 지옥화 : 염도를 달리한 무김치(동치미, 짬지)의 숙성기간에 따른 비휘발성 유

기산의 변화. 충남대 석사학위논문 (1987)

68. 김종군 : 발효 중 오이지의 물리화학적 및 관능적 품질의 변화. 한국식품과학회지, 21, 838 (1989)

69. 강근옥 : 동치미의 발효 중 물리화학적 및 관능적 성질의 변화에 관한 연구. 세종대학교 박사학위논문 (1989)

70. 안승요 : 조미료 첨가가 김치발효에 미치는 효과. 국립공업시험원, 20, 61 (1970)

71. 이매리 : 동치미의 맛성분에 대한 연구. 서울대학교 석사학위논문(1990)

72. 여익현 : 야채발효액의 미생물 변화에 관한 연구. 연세대학교 석사학위논문 (1992)

73. 장상근 : 동치미 및 배추김치의 제조조건이 물리화학적 특성에 미치는 영향. 세종대학교 박사논문 (1995)

74. 구경형, 강근옥, 장영상, 김우정 : 염혼합물의 첨가가 김치의 물리적 및 관능적 특성에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 23, 123 (1991)

75. 강근옥, 구경형, 김우정 : 동치미의 저장성 향상을 위한 열수 담금 및 염혼합물 첨가의 병용 효과. 한국영양식량학회지, 20, 559 (1991)

76. 강근옥, 구경형, 이형재, 김우정 : 효소 및 염의 첨가와 순간 열처리가 김치발효에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 23, 183 (1991)

77. 강근옥, 김종군, 김우정 : 열처리와 염의 첨가가 동치미 발효에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 20, 565 (1991)

78. 유정원, 김종군, 김우정 : Microwave 열처리 및 혼합염의 첨가가 깍두기의 물리적 성질에 미치는 영향. 한국농화학회지, 34, 219 (1991)

79. 유정원, 김종군, 김우정 : Microwave 열처리 및 혼합염의 첨가가 깍두기의 물리적 성질에 미치는 영향. 한국농화학회지, 34, 219 (1991)

80. 유정원, 김종군, 이정근, 김우정 : 깍두기 발효 중 순간 가열과 염첨가가 pH

- 변화에 미치는 영향. 한국농화학회지, 34, 213 (1991)
81. 김종근, 윤정원, 이정근, 김우정 : 깍두기의 저장성 향상을 위한 순간 열처리 및 혼합염 첨가의 병용효과. 한국농화학회지, 34, 225 (1991)
  82. 고순남 : 김치의 저장기간 연장을 위한 염혼합물과 bacteriocin의 영향. 세종대학교 박사학위논문 (1996)
  83. 김점식, 김일석, 정동효 : 김치성분에 관한 연구(제1보) - 동치미 숙성과정에 있어서의 성분동태. 과연휘보, 4, 35 (1959)
  84. 고은정, 허상선, 박만, 최용희 : 이온음료 제조를 위한 동치미의 최적 담금 조건에 관한 연구. 한국영양식량학회지, 24, 141 (1995)
  85. 김미리 : 무 김치 숙성 중 매운맛 및 그 관련 물질의 변화에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문 (1988)
  86. 민태익 : 김치발효와 미생물. 한국조리과학회지, 4, 96 (1988)
  87. Dollinger, E. : Food and Microbiology. McGraw-Hill, Inc., p.5 (1988)
  88. 김현옥, 이혜수 : 숙성온도에 따른 김치의 휘발성 유기산에 관한 연구. 한국식품과학회지, 7, 74 (1975)
  89. 천종희, 이혜수 : 김치의 휘발성 유기산과 이산화탄소에 관한 연구. 한국식품과학회지, 8, 90 (1976)
  90. 이승교, 전승규 : 김치의 숙성에 미치는 온도의 영향. 한국영양식량학회지, 11, 63 (1982)
  91. 조영, 이혜수 : 젖산균과 온도가 김치발효에 미치는 영향(I). 한국조리과학회지, 7, 15 (1991)
  92. 조영, 이혜수 : 젖산균과 온도가 김치발효에 미치는 영향(II). 한국조리과학회지, 7, 89 (1991)
  93. 이진희, 이혜수 : 양파가 김치발효에 미치는 영향(I). 한국조리과학회지, 8, 27 (1992)
  94. 신동화 : 공장김치의 발효온도 및 포장방법별 성분과 미생물의 변화. 김치의

과학, p.82 (1994)

95. 신동화, 김문숙, 한지숙, 임대관, 박완수 : 시판 김치의 발효 온도별 성분과 미생물 변화. 한국식품과학회지, 28, 137 (1996)

96. 고용덕, 김홍재, 전성식, 성낙계 : 냉장고를 이용한 김치 발효 및 저장 제어 시스템의 개발. 한국식품과학회지, 26, 199 (1994)

97. Fleming, H. P. : Vegetable Fermentations. In Economic Microbiology, Vol.7, Academic Press Inc., London, England (1982)

98. Tilbury, R. H. : Occurrence and effect of lactic acid bacteria in the sugar industry. In Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, Academic Press, London, p.177 (1975)

99. Rainbow, C. : Beer spoilage microorganisms. In Brewing Science, Vol. 2, Academic Press, London, p.491 (1981)

100. Kandler, O., and Weiss, N. : Regular, nonsporing Gram-positive rods, In Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. p.1208 (1986)

102. 정하숙, 고영태, 임숙자 : 당류가 김치의 발효와 ascorbic acid의 안정도에 미치는 영향. 한국영양학회지, 18, 36 (1985)

102. 심동관, 김병기, 김명환 : 배추의 환원당 함량이 김치발효에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 23, 73 (1994)

103. 유형근 : 발효당의 함량이 김치의 보존성에 미치는 영향. 연세대학교 석사학위 논문 (1996)

104. Fleming, H. P., McFeeters, R. F., and Thompson, R. L. : Storage stability of vegetable fermented with pH control. *J. Food Sci.*, 48, 975 (1983)

105. Chen, K. H., Fleming, H. P., and McFeeters, R. F. : Complete heterolactic acid fermentation of green beans by *Lactobacillus*



*cellobiosus*. *J. Food Sci.*, 48, 967 (1983)

106. 윤종원, 노태욱, 강선철 : 김치발효 중 올리고당의 안정성. 한국식품과학회지, 28, 203 (1996)

107. 김순동 : 김치숙성에 미치는 pH 조정제의 영향. 한국영양식량학회지, 14, 259 (1988)

108. 김순동, 이신호 : pH 조정제 sodium malate buffer의 첨가가 김치의 숙성에 미치는 효과. 한국영양식량학회지, 17, 358 (1988)

109. 박경자, 우순자 : Na-acetate 및 Na-malate와 K-sorbate가 김치발효 중 pH, 산도 및 산미에 미치는 효과. 한국식품과학회지, 20, 40 (1988)

110. 장경숙 : 김치용 천연 pH 조정제 연구. 한국영양식량학회지, 18, 321 (1989)

111. 김창식 : Co<sub>60</sub> 방사선 조사에 의한 한국김치의 저장. 원자력 연구 논문집, 2, 139 (1962)

112. 차보숙, 김우정, 변명우, 권중호, 조한욱 : 김치의 저장성 연장을 위한 gamma 선 조사. 한국식품과학회지, 21, 109 (1989)

113. 변명우, 차보숙, 권중호, 조한욱, 김우정 : 김치의 숙성관련 주요 젖산균 살균에 대한 가열처리와 방사선 조사의 병용효과. 한국식품과학회지, 21, 185 (1989)

114. 송순홍, 조재선, 김 관 : 김치의 보존에 관한 연구(제1보)-김치 발효에 미치는 방부제의 영향에 관하여. 국방연구보고서, 5, 5, (1966)

115. 권숙표, 최건우 : 김치의 산패 방지 보존 방법. 특허공고 제152호, 27 (1967)

116. Marwon, A. G., and Nagel, C. W. : Microbial inhibitors in cranberries. *J. Food Sci.*, 51, 1009 (1986)

117. Mital, B. K., and Steinkrous, K. H. : Growth of lactic acid bacteria in soy milks. *J. Food Prot.*, 42, 895 (1979)

118. Daeschel, M. A., Fleming, H. P., and McFeeters, R. F. : Mixed culture

- fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. *J. Food Sci.*, 53, 862 (1988)
119. 김 성 : 젖산균과 효모의 혼합발효에 의한 전통안동식혜 제조. 영남대학교 박사학위논문 (1997)
120. 박선영 : 김치에서 분리한 젖산균과 효모의 혼합배양 특성. 고려대학교 석사학위논문 (1997)
121. 김혜자, 강상모, 양차범 : 효모 starter 첨가가 김치발효에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 29, 790 (1997)
122. 김혜자, 양차범, 강상모 : 김치로부터 분리한 효모가 생산하는 휘발성 화합물이 김치의 풍미에 미치는 효과. 한국산업미생물학회지, 24, 512 (1996)
123. 김미란 : 효모와 유산균 발효에 의한 야채음료의 제조, 서울여자대학교 석사학위논문 (1992)
124. Splittstoesser, D. F., and Stoyla, B. O. : Effect of various inhibitors on the growth of lactic acid bacteria in a model grape juice system. *J. Food Prot.*, 52, 240 (1989)
125. Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, W. : Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40, 722 (1976)
126. 문광덕, 변정아, 김석중, 한대석 : 김치의 선도유지를 위한 천연 보존제의 탐색. 한국식품과학회지, 27, 257 (1995)
127. Dueschel, M. A., and Klaenhammer, T. R. : Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus Pentosaccus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 1538 (1985)
128. Harris, L. J., Dueschel, M. A., Stiles, M. E., and Klaenhammer, T. R. : Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogens*. *J. Food Prot.*, 52, 384 (1989)

129. Mackay, A. M. : Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria spp.* *Lett. Appl. Microbiol.*, 11, 15 (1990)
130. Mathieu, F., Sudirman Suwandhi, I., Rekhif, N., Milliere, J. B., and Lefebvre, G. : Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides FR 52.* *J. Applied Bacteriol.*, 74, 372 (1993)
131. Kyung, K. H. and Fleming, H. P. : Antibacterial activity of cabbage juice against lactic acid bacteria. *J. Food Sci.*, 59, 125 (1994)
132. Ha, D. M., Cha, D. S., and Han, S. G. : Identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Kimchi and partial characterization of their bacteriocin. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 4, 305 (1994)
133. 전문정 : Nisin을 이용한 김치의 저장성 향상 연구. 세종대학교 석사학위논문 (1993)
134. 최신양, 이인선, 유진영, 정진섭, 구영조 : 김치발효에 대한 Nisin의 저해효과. *한국산업미생물학회지*, 18, 620 (1990)
135. Delves, B. J. : Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* (1990)
136. Wooshine M. : Antibiotics and antibiosis in agriculture. Buttreiworth, London, p. 103 (1977)
137. 이남진, 전재근 : 김치의 순간살균방법-제1보. 배추김치의 순간살균방법과 살균효과. *한국농화학회지*, 24, 213 (1981)
138. 이남진, 전재근 : 김치의 순간살균방법-제2보. 배추김치의 순간살균조건이 김치의 저장성에 미치는 영향. *한국농화학회지*, 25, 197 (1982)
139. 노홍균, 박인경, 김순동 : 소금절임시 키토산 첨가가 김치의 보존성에 미치는 효과. *한국식품과학회지*, 24, 932 (1995)
140. 홍완수, 윤 선 : 열처리 및 겨자유의 첨가가 김치 발효에 미치는 영향. 한국

식품과학회지, 21, 331 (1989)

141. 신성애 : 동치미 발효에 산수유가 미치는 영향. 건국대학교 석사학위 논문 (1997)

142. 김미정, 장명숙, 권오진 : 동치미 젖산균에 대한 대나무 및 추출물의 항균활성. 25, 741 (1996)

143. 정대균, 유리나 : 김치발효 미생물에 대한 대나무 잎 추출물의 항균력. 한국식품과학회지, 27, 1035 (1995)

144. Peter H. A. Sneath, et. al. : Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. (1986)

145. 光岡知足 : 腸内菌の世界, 朝倉書店, 東京 (1990)

146. 김광옥, 이영춘 : 식품의 관능검사. 학연사, p.241 (1998)

여 백

## 제 3 장

박테리오신 또는 박테리오신 생성균주를  
이용한 발효과채음료의 제조

(연구책임자 : 정동선)

여 백

## 제 1 절. 서 설

각종 스트레스에 시달리고 있는 현대인들은 특히 기호식품 및 건강식품에 대한 관심이 증가되면서 식욕증진, 소화촉진, 갈증해소 등을 목적으로 즐겨 찾는 음료의 소비형태도 1980년대에 주종을 이루었던 탄산음료에서 과일쥬스나 야채쥬스 등의 건강음료로 바뀌어 국내 여러 업계에서 다양한 음료를 개발하여 시판하고 있다. 그러나 수입개방의 물결을 타고 외국의 다양한 과즙음료를 비롯하여 게토레이, 포카리스웨트 등의 스포츠 음료류가 많이 수입되어 최근 소비가 확산되고 있으므로 우리의 입맛에 맞는 갈증해소용 음료의 제조 및 개발이 필요한 실정이다.

최근 서구식 식습관으로 인한 건강불균형과 정신적 스트레스에 의해 나타나고 있는 각종 성인병의 예방식으로 과일과 채소류를 이용한 새로운 젓산발효음료를 개발하려는 시도가 이루어지고 있다. 외국에서는 Kietel이 당근, 셀러리 또는 양배추를 젓산발효시킨 후 이를 신선한 원료와 섞어 착즙 후 저온살균 하여 저장성을 부여한 발효채소쥬스를 제조하여 특허를 내었고, 일본에서는 야채를 이용한 건강음료의 제조 및 기호성 증대를 위한 방법으로 자연발효를 이용하고자 하는 연구가 이루어지고 있다.

국내에서는 각종 과실 및 야채 쥬스가 개발 시판되고 있으며, 우유를 원료로 한 건강발효음료인 요구르트는 대중화되었다. 그러나 맛과 영양이 강화된 과채 발효음료의 개발에 관한 연구는, 동치미 쥬스와, 당근, 토마토, 오이, 당근잎 등의 야채를 원료로 한 발효액을 조제하여 발효 양상을 검토한 보고서 등이 있으나, 아직 연구의 초기 단계로서 제품의 개발이 이루어지지 않는 실정이다.

과채류의 젓산발효는 원료 자체의 효능, 젓산균 균체에 의한 효과, 그 외에



젖산균에 의해 생성된 발효생성물로서 각종 유기산, 알콜류, 탄산가스, 그리고 향기성분들이 생성될 수 있으므로, 과채류의 발효산물은 맛과 영양이 강화되고, 독특한 향의 부여와 관능적 특성이 향상되는 등의 효과를 기대할 수 있으며, 젖산발효시 생성되는 유기산과 각종 길항물질에 의해 유해균의 증식이 억제되는 등 발효가 진행되면서 부패균과 병원성균의 성장과 증식을 저해하므로 위생적인 식품이 되는 효과를 얻을 수 있다.

젖산발효를 수행하는 젖산균은 각종 동물의 장관 내에 서식하며 소화관내에서 점막의 보호 및 장내 이상발효의 개선, 칼슘의 체내 촉진 등 여러 가지 생리작용에 유익하게 작용하기 때문에 의약품과 사료첨가제로도 이용되고 있다. 또한 젖산균은 장내에서 유독 물질(endotoxin, amine 등)의 생성을 억제하거나 생성된 유독 물질을 분해 또는 무독화하기도 하며, 장관 내에서 외부로부터 섭취한 cholesterol을 젖산균의 체내에 축적함으로써 외인성 cholesterol에 의한 혈중 cholesterol치의 상승을 효과적으로 억제하며, 동맥경화증, 기타 심장혈관 관계질환의 증상을 완화시키거나 예방하는데 이용될 수 있다고 밝혀지고 있다. 그 외에도 젖산균이 갖는 항돌연변이 및 항종양 활성에 관한 연구가 많이 보고되고 있으며, 면역조절 효과에 대한 연구도 보고되고 있다. 따라서 이러한 장점들로 인하여 젖산균을 이용한 발효음료를 섭취함으로써 소화 흡수를 촉진시키고, 장내 유해 세균의 생육을 저지하여 정상작용과 노화방지에 도움을 주며, 숙주의 면역기능을 증대시키고, cholesterol 흡수의 억제, 심장병 및 암 예방에 효과가 있을 것으로 기대되고 있다.

박테리오신은 미생물에 의해 생성된 peptide로서, 생성균주와 관련이 있는 미생물을 저해하는 천연항균물질이다. 각종 젖산균이 박테리오신을 생성한다는 사실이 밝혀짐에 따라 food grade organisms이 생성하는 Bacteriocin을 이용한 식품저장은 새로운 저장방법으로 대두되고 있으며 천연식품 신소재인 Bacteriocin의

분리 및 활용에 대한 연구가 다방면으로 이루어지고 있다. 특히 여러 Bacteriocins 중에서 *Lactococcus lactis*가 생성한 Nisin은 가장 연구가 많이 이루어졌으며 commercial product로 개발되어 식품에 허용되고 있는 유일한 Bacteriocin이다.

*Lactococcus lactis*에 의해 생성되는 Nisin은 Bacteriocin의 일종으로 분자량이 3,500 Dalton 정도이며 34개의 아미노산으로 구성된 polypeptide로서 식품보존제로서의 활용 가능성은 1951년 Hirsch 등에 의해 swiss-type cheese에서 *Clostridium* 균에 의한 gas 형성을 방지하기 위해 최초로 시도되어 Clostridia에 대한 nisin의 저해효과가 뛰어남이 밝혀진 이래 이의 항균효과에 대한 많은 연구가 이루어졌다. Nisin은 *Clostridium botulinum*, *Bacillus subtilis*, 그리고 대부분의 젖산균을 비롯한 그람양성균과 그들 포자에 대한 저해력이 뛰어나고 또한 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*과 같은 병원성 식중독균에 대한 억제효과가 높은 것으로 알려졌으며, 이의 항균효과가 밝혀진 이래 영국, 일본, 소련 등에서 행해진 독성 실험 결과 Nisin은 non-toxic, non-allergic이며 인체내에서는  $\alpha$ -chymotrypsin에 의해 분해되어 장내 유용세균에는 영향을 끼치지 않음이 밝혀졌다. Nisin은 1969년 FAO/WHO joint committee에 의해 식품첨가제로 허용되어 (허용된 1일 섭취량은 33,000 units/kg body weight) 이미 오래전부터 유럽을 비롯한 여러나라에서 각종 식품에 사용되고 있으며 미국 FDA에서도 1988년에 nisin을 GRAS품목으로 인정하여(FDA, 1988) 현재 47개국 이상에서 식품첨가제로 사용하고 있으며 주로 낙농제품과 통조림 식품에 많이 이용되고 있다.

*Lactococcus lactis*와 같은 food grade organism이 생성하는 Bacteriocin은 천연 물질이기 때문에 사용이 안전하고 항균력도 높아 함유 식품의 저장성을 향상시킬 수 있다. 따라서 Bacteriocin 생성균주인 *Lactococcus lactis*의 젖산발효능과 발효과정 중 생성된 Bacteriocin을 이용하여 발효과채음료를 제조한다면, 예로부터 동치미 국물과 나박김치를 즐겨왔던 우리의 입맛에 맞는, 그리고 맛과 영양을 강화하고 저장성이 있는 건강음료로서, 최근 외국에서 수입되고 있는 각종 스

포츠음료(갈증해소음료)들과 탄산음료 그리고 각종 혼합과일주스 등을 대체하여 저렴한 농산물의 가공에 따른 농가소득 증대와 식품산업의 발전에 기할 수 있으리라 기대되며, 박테리오신의 활용 범위의 증대로 신제품 개발의 활성화를 기할 수 있으리라 본다. 그러나 일반적으로 야채는 당도가 낮아 발효속도도 느리고 음료로서의 기호도가 낮아 음료로 개발하기 위해서는 기호도의 개선과 기능성의 보강 등 많은 연구가 필요하다.

각종 젖산균류와 효모류는 비슷한 환경에서 공존하는 미생물로서 각종 주류 및 식품 발효에서 이들의 상호관계에 관한 많은 연구가 행해져 왔다.

국내에서의 효모의 분리 및 이용에 관한 연구 중 김치에서 분리한 젖산균과 효모의 혼합배양 특성에 대한 연구와 침채류의 발효속성에 관여하는 효모에 관한 연구 보고에 의하면, 김치 발효에 있어서 발효성 효모의 역할은 다른 양조식품의 경우와 같이 그의 증식활동이 원료취의 제거, 풍미의 생성에 작용하며, 산막효모는 김치의 외관을 손상시키고 알코올, 젖산을 산화분해해서 정미성을 악화시키는 외에 유기산에 의해 억제되었던 변패균의 증식을 유발하게 되어 저장성에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있으나, 알코올의 생성, 방향 및 풍미 등을 부여하는 특성이 있음이 보고되고 있다.

또한 대두유의 제조시 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Kluyveromyces fragilis*을 혼합하여 배양시키고, 젖산 및 alcohol 발효의 변화양상과 각각의 단독배양과 혼합배양시 생육과 발효에 미치는 영향에 관하여 연구한 결과, 단독배양보다는 혼합배양에서 산생성 능력 및 산생성 속도가 훨씬 증가하는 등 젖산균 단독 발효보다는 효모와 함께 혼합발효하는 것이 바람직한 것으로 보고되었다. 이는 효모가 함유하고 있는 단백질과 비타민등의 생산 및 젖산균 단독 발효시 바람직하지 않은 높은 산생성등을 효모와의 혼합발효로 조절함으로써 적당한 산도, 향미등을 유도할 수 있다는 것이다.

따라서 침채류의 발효시 효모는 산막의 형성 및 연부현상에 관여하여 나쁜 영향을 미치는 것으로 생각되어 왔으나, 발효과정 중 방향과 풍미를 부여하고 이취를 감소시켜 주며 알콜 등을 생성하여 관능적 특성을 향상시킬 수 있으므로 효모의 응용분야가 다양해질 것으로 기대된다.

우리 나라는 전통적으로 동치미, 나박김치, 물김치 등의 야채발효식품을 많이 애용하여 왔으며, 특히 무와 배추 등의 채소를 원료로 한 젖산발효 식품인 동치미 국물과 나박김치 등의 발효액은 독특한 향과 맛을 지녀, 갈증 해소용으로 응용되기도 하였다. 그러나 일반적으로 야채는 당도가 낮아 음료로서의 기호도가 낮고 발효속도 느리므로 과일을 첨가하여 당도를 높임으로써 발효를 촉진시키고 맛의 향상을 기할 수 있으리라 본다. 즉 과일과 채소를 혼합하여 발효시켜 음료를 만든다면, 과채류의 당이 젖산균에 의해 발효되어 lactic acid, citric acid, acetic acid 등의 각종 유기산을 비롯하여 탄산가스, 에탄올 등을 생성하여 유해균을 제거하고, 신선미를 부여할 수 있을 뿐만 아니라, 과채류는 비타민과 각종 무기질, 섬유소 등이 풍부하여 이의 가공품은 기호성이 높은 건강음료가 될 수 있을 것이다.

따라서 비타민 C의 함량이 높고 노화를 방지하는 효과가 있으며, 기침, 감장, 이뇨, 천식, 빈혈에 좋은 것으로 알려져 있는 대추와, 비타민 C도 풍부하고 여러 가지 소화효소도 들어 있어 소화불량, 만성기관지염, 천식, 구토, 기침 등에 좋을 뿐만 아니라 지혈, 소독, 해열 작용도 있으며, 젖산발효를 행하면 산미, 탄산미 뿐만 아니라 감미를 생성해 조화된 맛과 풍미를 부여하고, 젖산발효를 촉진시키는 증식촉진물질이 함유되어 있음이 알려져 있는 무, 각종 유기산과 유리당, 비타민 A, B1, B2, C 등이 풍부하여 급성 장염, 고혈압, 변비, 두통에 효과가 있고, 청량감과 산뜻한 맛을 지니고 있을 뿐만 아니라 누적된 피로를 풀어주고 식욕을 증진시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있는 사과, gingerol, shogaol, zingerone,

zingiberone 등을 비롯한 여러 방향성분이 함유되어 있어 특유의 자극성 맛을 띠며 식욕을 촉진하는 효과와 항산화 효과가 있는 것으로 보고되고 있는 생강 등의 국내 생산량이 풍부하고 값이 저렴한 농산물을 원료로 과채발효음료를 제조한다면 각종 유기산과 비타민, 무기질 등을 함유하여 건강 지향적인 새로운 형태의 음료가 될 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 값싸고 풍부한 과채류를 이용하여 저장성과 기능성이 보강된 과채발효음료를 개발하기 위하여 적절한 종균을 선택하여 최적발효조건을 확립하고, 박테리오신 생성균주를 이용한 발효능 및 박테리오신 생성능 조사와 아울러 박테리오신의 항균효과를 조사하고, 음료의 풍미 개선을 위하여 과채류의 젖산발효액에서 방향성분의 생성능을 보유한 효모를 분리·동정한 후 분리한 효모를 젖산발효액에 starter로 첨가하여 후발효시켜 제조한 과채발효음료의 품질특성을 조사하였다.

## 제2절. 재료 및 방법

### 1. 재 료

본 실험에 사용된 재료인 무, 감자, 생강, 사과, 대추는 서울시내 청과물 소매상에서 구입하였으며, 소금은 제재염(해표)을, 담금액은 정수된 물을 사용하였다.

### 2. 사용 균주

본 실험에 사용한 균주는, 과채류의 발효균주로 *Leuconostoc mesenteroides* 와 박테리오신 생성균주인 *Lactococcus lactis* ATCC 11454를 사용하였으며, 박테리오신 역가 확인용 test 균주는 *Pediococcus pentosaceus* FBB-61-2를 이용하였다. 본 실험에 사용한 효모는 원료 과채류의 자연발효액에서 분리, 동정한 *Saccharomyces dairensis*(KW0-7)를 사용하였다.

### 3. 미생물 검사

과채혼합액의 발효 숙성 중 미생물수의 변화는 시료를 1mL 취하여 0.85% 식염수에 단계 희석한 후, 젖산균수 측정은 MRS 배지(Difco co.)를, yeast는 PDA 배지(Difco co.)를 사용하여 35℃에서 48-72시간, coliform bacteria는 MakConkey 배지(Difco co.)를 사용하여 37℃에서 24시간 배양하여 형성된 집락을 Quebec colony counter를 사용하여 계수하였다.

#### 4. 효모의 분리 및 동정

과채류의 젖산발효중에 존재하는 효모를 순수분리하고자 tetracyclin을 첨가한 PDA 평판배지에 과채혼합액을 접종한 뒤 30℃에서 48시간 배양한 다음 생성된 colony중 크기와 모양, 색깔 등이 다른 균주를 선발하였다. 선발된 균주들을 Potato dextrose broth에서 24시간 배양한 뒤 신선하게 배양된 세포를 원심분리로 회수하여  $10^7$  cell/mL 농도의 현탁액을 만든 후 젖산균으로 예비발효시킨 과채발효액즙에 각각 접종한 후 젖산발효액 내에서의 효모의 생육정도와 headspace의 flavor를 관능적으로 검사하여 효모향이 강하지 않으며 fruity flavor를 생성한 것으로 평가된 균주를 선발하여 동정하였다.

효모의 동정은 PDA 배지에서 25℃ 2일간 배양한 각 균주의 영양세포, 포자형성, 위균사 형성 여부, 배지에서의 생육특성 등의 형태학적 또는 배양학적 특성을 조사하고, 당발효능, 탄소원과 질소원의 자화능 등의 생리학적 성질을 시험하여 동정하였다.

#### 5. 과채발효음료의 제조

과채발효음료의 재료로서 사과, 무, 감자는 3cm x 3cm x 0.5cm 정도의 크기로 자르고, 생강은 얇게 저민 후, 무우, 사과, 감자, 생강을 50:30:19:1(w/w)의 비율로 혼합하고 혼합고형물의 양과 동일한 양의(w/w) 끓여서 식힌 대추액(당도 2.0 °Brix)을 혼합한 후 염농도를 2%(w/v)로 조정하여 과채담금액으로 사용하였다. 과채발효음료의 제조는 과채담금액에 *Leuconostoc mesenteroides*를 1%(v/v) 접종하여 20℃에서 2일간 발효시키고, 무균적으로 액즙을 분리한 뒤 sodium citrate로 pH를 5.0으로 보정한 다음 *Lactococcus lactis* 11454를 1% 접종하여 20℃에서 1일간 추가발효시키고 *Saccharomyces dairensis* (KW0-7)를 0.1% 접종하

여 냉장온도(4℃)에서 효모에 의한 후발효를 수행하여 제조하였다.

## 6. 젖산균의 발효 특성 조사

발효음료 제조용 과채류를 상기와 같은 비율로 혼합한 후 믹서기로 분쇄하여 원심분리하고 상등액을 membrane filter로 여과하여 과채혼합액을 제조하였다. 과채혼합액에 과채류에서 분리한 젖산균을 각각 0.1%씩 접종하여 20℃에서 발효시키며 생육능과 pH, 총산, 유기산, 유리당 함량 등을 측정하여 발효특성을 파악하였다.

## 7. 박테리오신의 역가 측정

본 실험에 사용한 박테리오신 Nisin(Alpin & Barrett Co., 100.000IU/g)은 Dr. Mark A. Daeschel(오레곤주립대학교 식품공학과) 교수로부터 기증받은 것으로서, 0.02N-HCl에 녹여 냉장 보관하여 사용하였고, Nisin activity는 *Pediococcus pentosaceus* FBB-61-2를 Indicator organism으로 사용한 Agar well diffusion method로 측정하였다.

## 8. 이화학적 성분 분석

### 1) pH 및 총산, 당도

pH는 pH meter(Suntex, model sp-5A)로 측정하였으며, 총산 함량은 발효액 10mL을 1% phenolphthalein용액을 지시약으로 하여 0.1N-NaOH 용액으로 적정하고, NaOH 소비량을 젖산함량으로 환산하여 총산 함량%(w/v)으로 표시하였다. 당도는 굴절당도계(Hand Refractometer, Japan)를 사용하여 측정하였다.



### 2) 유기산

HPLC를 사용하여 Table 1와 같은 조건으로 유기산을 분석하였다. 발효액을 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액을 취하여 0.45  $\mu$ m micro filter로 여과시킨 시료 20  $\mu$ L를 injector로 column에 주입시켜 HPLC를 사용하여 분석하였다.

Table 1. Operating condition of HPLC for the analysis of organic acids

Model	Shimadzu LC10-AD HPLC
Column	Aminex HDX-87H
Mobile phase	0.008N-Sulfuric acid
Flow rate	0.6mL/min
Recorder chart speed	0.5cm/min
Detector	SPD-10A 210nm
Sample size	20 $\mu$ L
Column oven	35°C
Recorder	Chromatopac C-R6A (Shimadzu)

### 3) 유리당

발효액의 당분 함량은 HPLC로 분석하였으며 시료의 전처리는 유기산 분석한 방법과 동일하게 하였으며 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Operating condition of HPLC for the analysis of sugars

Model	Shimadzu LC10-AD HPLC	
Column	KR 100-10NH <sub>2</sub>	
Mibile phase	Acetonitril:Water=80:20	
Flow rate	2mL/min	
Recoder chart speed	0.5cm/min	
Detector	RID-6A (Shimadzu)	
Sample size	20 μL	
Temperature	35℃	
Recoder	Chromatopac C-R6A (Shimadzu)	

#### 4) Vitamin C

Vitamin C는 Akira(1986) 등의 방법에 의해 시료를 여과(Whatman No.2, 0.45um)하여 여액에 10% TCA(Trichloroacetic acid)를 넣고 반응시킨 후 8,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액 2mL에 phosphoric acid(42.5%) 0.3ml, a,a'-dipyridyl(0.8%) 1.5mL, FeCl<sub>3</sub>(3%) 0.15mL을 섞은 다음 25C에서 30분간 반응시킨 후 525nm에서의 흡광도를 측정하여 검량곡선에 의해 비타민 함량으로 환산하였다.

#### 5) 방향성분

과채발효음료의 향기성분의 분석은 GC를 이용하였으며 GC-MS로 동정하였다. 향기성분 추출은 용매추출법으로 하였으며 추출용매는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로써 siphon관의 성질을 이용한 액체 연속 추출 장치에서 추출하였다. 추출관 윗부분에는 시료 중의 휘발성 향기 성분을 응축시키기 위하여 순환장치(circulator)가 연결된 냉각관을 설치하였고 추출관과 연결된 아랫부분에는 둥근 바닥 flask를 연결하였다. 둥근 바닥 flask에는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50mL를 넣었고, 추출관에는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20mL, 증류수 20mL, 시료 20mL를 차

레로 넣어 50℃의 수욕에서 향기 성분을 추출하였다.

향기 성분이 포집된 등근 바닥 flask의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층을 분리하여 무수황산나트륨(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydrous)을 가하여 수분을 제거한 후에 Kuderna Danish concentrator (Kontes, U.S.A.)에 옮겨 향기 성분 추출 온도인 50℃에서 1.5mL까지 농축한 다음 2mL용 vial에 옮겨 N<sub>2</sub>-gas로써 0.5mL까지 농축하여 분석 시료로 하였다. GC-MS의 분석조건은 Table 3과 같다.

## 9. 관능검사

관능검사는 다시료비교법(multisample difference test)에 의하여 시행하였으며 발효음료의 냄새, 맛, 그리고 전체적인 기호도를 평가하였다. 판넬원의 구성은 서울여자대학교 식품미생물공학과와 대학원생과 학부생중 본 실험에 흥미를 갖고 있는 10명의 판넬원을 선정하였다.

발효음료의 관능적 특성은 향미묘사법(flavor profile method)에 의하여 냄새와 맛을 묘사케 한 뒤 유사한 표현을 정리하여 조사된 특성을 신내(acidic odor), 과숙향(moldy odor), 단내(sweety odor), 과일향(fruity odor)과 이와 상응하는 맛들을 9점 평가법에 의하여 평가하였다. 냄새와 맛의 경우 감지 불가능한 경우를 1, 보통 정도로 감지 할 수 있으면 5, 극도로 감지할 수 있으면 9로 점수를 지정하게 하여 1에 가까울수록 그 정도가 약하고 9에 가까울수록 그 정도가 강한 것을 나타내었으며, 전체적인 기호도(total acceptability)는 순위법으로 나타내도록 하였다.

검사 결과의 통계적 유의성 검정은 ANOVA법으로 분석하여 F-분포표를 이용하여 검정, 즉 인자 사이(행간이나 열간)의 유의도를 살펴본 후 처리간 차이의 유의도는 LSD multiple comparison으로 확인하였다.

Table 3. Analytical condition of GC-MS for volatile compounds

Instrument	HP6890GC/5973MSD
Column	DB-FFAP
	Length 30m
	I.D. 0.25mm
	Film thickness 0.25 $\mu$ m
Injector and ion source temperature ( $^{\circ}$ C)	250
Oven program	Initial temp. ( $^{\circ}$ C) 40
	Initial time (min) 2.0
	Rate ( $^{\circ}$ C/min) 8.0
	Final temp. ( $^{\circ}$ C) 230
	Final time (min) 15.0
EI ionization voltage	70eV
Carrier gas	He (1.0mL/min)
Split ratio	10 : 1
Sample size	0.6 $\mu$ L
Vacuum pump	Turbo pump

### 제3절. 결과 및 고찰

#### 1. 과채류의 미생물 조성과 자연발효 특성

##### 가. 재료의 선정

과채류의 발효를 위한 재료는 원료 과채류의 영양학적 특성과 기능적 특성 그리고 재료의 수급과 경제성을 고려하여 무, 감자, 생강, 사과, 대추로 선정하였으며 원료의 배합 비율은 Table 4와 같다.

Table 4. The composition of materials for preparation of fermented fruits and vegetable beverage

Materials	Weight ratio(%)
Radish	50
Apple	30
Potato	19
Ginger	1
Jujube extract (°Brix 2.0)	100

##### 나. 과채류 혼합액의 미생물 조성과 자연발효 특성

본 실험에 사용한 재료는 사과, 대추, 무, 감자, 생강 등으로서, 사과는 세척

후 심을 제거하고 약 3 X 3 X 0.5cm 정도 크기로 절단하고, 무와 감자도 세척, 정선 후에 사과와 같은 크기로 잘라 사용하였으며, 생강은 얇게 저미고, 대추는 끓여서 용출시킨 액을 사용하였다. 재료를 모두 혼합한 후 고형물과 동량의 대추액(2.0°Brix)을 가해 염농도를 2%로 조절한 후 발효를 수행하였다.

원료 과채류를 혼합한 담금액의 미생물 조성은 총균수  $9.8 \times 10^3$ cfu/mL, 젖산균  $1.7 \times 10^2$ cfu/mL, 대장균군  $4.4 \times 10^3$ cfu/mL, 효모  $7.7 \times 10^1$ cfu/mL 등으로서 과채혼합액의 발효온도를 4, 10, 20°C로 달리하여 자연발효를 수행한 결과는 Table 5에 나타난 바와 같다.

중균을 첨가하지 않은 상태에서의 자연발효를 4°C의 냉장온도에서 수행했을 때 7-10일 후에 총균수는  $10^7$ cfu/mL 에 도달하지만 이 기간이 경과하면 전반적으로 이취가 발생하며 효모가 증식하고, 품질의 손상이 오는 반면, 초기 산생성량이 높지 않은 편이므로 일반세균에 대한 억제효과가 낮았으며, 대장균군의 증식으로 안전성 문제가 있는 것으로 나타났다. 본 실험에 사용한 재료 중 대추와 생강은 특히 대장균군이 많고, 전체적으로 젖산균의 농도가 높지 않은 것으로 나타났다. 10°C에서 숙성시킨 것은 비교적 냄새와 맛이 우수하며 젖산균의 증식도 이루어졌으나 여전히 일반세균의 증식이 문제점으로 나타났다. 숙성온도가 20°C에서는 젖산균수가 1일 후  $7.3 \times 10^5$ cfu/mL, 3일 후에는  $2.4 \times 10^7$  cfu/mL에 도달하였으며 대장균군에 대한 저해효과도 나타났다. 그러나 발효가 지속됨에 따라 발효액의 갈변화 정도가 심하게 나타났으며, 급격한 산도 저하로 냄새와 외관이 좋지 않았다.

따라서 상큼한 맛과 독특한 향을 지닌 기호도가 높은 음료의 제조를 위해, 초기에 젖산균의 첨가로 젖산발효를 유도하여 유해균의 증식을 억제하고, 젖산균에 의한 유기산 생성을 촉진시킬 필요가 있는 것으로 나타났다.

Table 5. 과채류의 발효온도를 달리한 자연발효액의 pH와 생균수의 변화

	총균수(cfu/mL)	젖산균수(cfu/mL)	대장균수(cfu/mL)	pH
담금직후	9.8 x 10 <sup>3</sup>	1.7 X 10 <sup>2</sup>	4.4 X 10 <sup>3</sup>	5.35
숙성5일후				
4℃	2.0 X 10 <sup>b</sup>	7.3 X 10 <sup>4</sup>	5.2 X 10 <sup>b</sup>	5.25
10℃	1.6 X 10 <sup>c</sup>	1.1 X 10 <sup>6</sup>	3.3 X 10 <sup>c</sup>	4.90
20℃	1.2 X 10 <sup>d</sup>	1.4 X 10 <sup>e</sup>	1.3 X 10 <sup>d</sup>	3.51

다. 과채류 혼합액에 존재하는 젖산균의 분리, 동정

원료 과채혼합액에 분포하고 있으며 자연발효에 관여하는 젖산균을 분리 동정한 결과, 젖산균의 종류는 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbruekii subsp. delbruekii*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus dextranicus*, *Pediococcus acidilactici* 등의 9종으로 밝혀졌으며, 이들 젖산균의 특성은 Table 6과 같다.

Table 6. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from fruit and vegetable mixture

Characteristics	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextran formation	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid product from									
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+ <sup>w</sup>	+ <sup>w</sup>	+	+	+ <sup>w</sup>	+	-	+ <sup>w</sup>
Sucrose	+	-	+ <sup>w</sup>	-	+	+ <sup>w</sup>	+	+	+
Arabinose	+	+	-	-	+ <sup>w</sup>	+	+ <sup>w</sup>	-	-
Maltose	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+ <sup>w</sup>	-	-	-	+	-	-	-	-
Rhamnose	+	+ <sup>w</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Trehalose	+	+ <sup>w</sup>	-	-	+	-	+ <sup>w</sup>	+ <sup>w</sup>	+
Xylose	+	+	-	-	+ <sup>w</sup>	+ <sup>w</sup>	+ <sup>w</sup>	-	-
Mannitol	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	+	-	-	-	-

+ : positive, +<sup>w</sup> : weak positive, - : negative,

I : *Leuconostoc mesenteroides*, II : *Pediococcus acidilactici*, III : *Pediococcus dextrinicus*, IV : *Lactobacillus curvatus*, V : *Lactobacillus plantarum*, VI : *Lactobacillus brevis*, VII : *Lactobacillus fermentum*, VIII : *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, IX : *Lactobacillus acidophilus*.



라. 과채류 혼합액에 존재하는 젖산균의 발효 특성

1) 과채혼합액에서의 생육능

분리한 젖산균 9종을 무균처리한 과채혼합액에 0.1% 접종하여 20C에서 발효시키면서 각 균주의 생육능과 산생성능, 그리고 유기산 함량의 변화를 측정하였다.

발효기간별로 각 균주의 생육특성은 Fig. 1에 나타난 바와 같이, *Lactobacillus plantarum*이 가장 빨리 증식되어 1일째  $1.38 \times 10^8$  cfu/mL수준에 도달하였으며, 5일째까지 꾸준히 증가하다가 7일째에 다소 둔화되는 경향이였다. *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*은 1일째에  $1.5 \sim 4.9 \times 10^7$  cfu/mL 수준으로 *Lactobacillus plantarum*에 비해 다소 증식이 늦었으나 2일째부터  $1.85 \sim 3.5 \times 10^8$  cfu/mL에 도달하여 7일째까지 꾸준한 성장을 보여주었다. *Lactobacillus acidophilus*는 1일째에  $3.5 \times 10^6$  cfu/mL수준으로 가장 성장이 느렸지만 2일째에  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL으로 급격히 증식하여 5일째까지 비슷한 수준을 유지하다 7일째에 감소되었다. 대부분의 분리균주들이 발효 1~2일째에 급격히 성장하는데 비해 *Pediococcus dextrinicus*는 발효 5일째까지 꾸준히 증가하다 다소 둔화되는 경향을 보여주었다. *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*는 1일째  $4.5 \times 10^6$  cfu/mL, 2일째  $4.1 \times 10^7$  cfu/mL, 5일째  $8.9 \times 10^7$  cfu/mL, 7일째  $4.8 \times 10^7$  cfu/mL으로 분리된 균 중에서 가장 증식률이 낮았다.

## 2) 분리한 젖산균의 산 생성능

분리한 균주들을 과채혼합액에 접종하여 pH 및 적정산도의 변화를 관찰한 결과, 젖산균이 첨가된 과채류의 초기 pH는 5.00~5.04, 산도는 0.04~0.042%로 나타났다. *Lactobacillus plantarum*이 접종된 경우 Fig. 2에서 보듯이 가장 빨리 발효가 진행되어 1일째에 pH 4.08, 산도 0.14%를 나타내었다. 기타 첨가균들은 발효 1일째 pH 4.48~4.59이었으며, 산도 0.12% 정도로 발효가 다소 지연됨을 알 수 있었다. *Lactobacillus plantarum*의 경우 발효 2일째 pH 3.8, 5일째 pH 3.4, 7일째 pH 3.21로 지속적으로 낮아져서 이 때의 산도는 0.21, 0.4, 0.48% 이었다. 이와는 대조적으로 *Pediococcus dextrinicus*, *Lactobacillus acidophilus*는 pH가 완만하게 낮아지고 산도도 완만하게 증가되었으며 발효 7일째를 비교해보면 *Lactobacillus plantarum*의 경우 pH 3.21, 산도 0.48% 인데 반하여 *Lactobacillus acidophilus*는 pH 4.16, 산도 0.18%, *Pediococcus dextrinicus*는 pH 3.89, 산도 0.20%, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*은 pH 3.85, 산도 0.21%이었다. 증식률이 가장 낮은 *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*는 *Lactobacillus acidophilus*보다 산생성능이 높은 것으로 나타났다.

## 3) 분리한 젖산균의 유기산 생성능

과채혼합액에서 분리한 젖산균이 발효액의 유기산함량에 미치는 영향을 비교해 본 결과, 20℃에서 7일간 발효에 의해 lactic acid의 생성과 더불어 malic acid, citric acid, succinic acid 등은 전반적으로 감소하는 경향을 보였다(Table 7). 그러나 *Lactobacillus delbrueckii*를 접종한 시험구에서는 malic acid의 소모가 없었으며, lactic acid 생성량도 적었다.

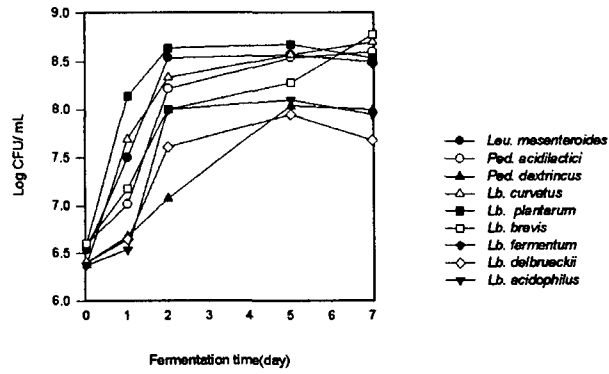


Fig. 1. Growth of the isolated lactic acid bacteria in fruit and vegetable mixture at 20°C.

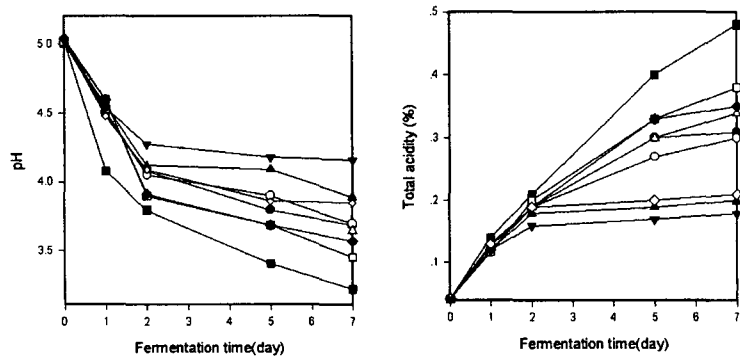


Fig. 2. Changes in pH and Total acidity of fruit and vegetable mixture fermented by the isolated lactic acid bacteria at 20°C.

또한 *Lactobacillus acidophilus*를 접종한 시험구에서는 succinic acid의 함량이 특별히 높았는데 이는 *Lactobacillus acidophilus*에 의해 succinic acid가 생성된 것으로 보인다.

Table 7. Organic acid contents in fruit and vegetable mixtures fermented by different strains of lactic acid bacteria for 7 days

[unit : mg / L ]

Lactic acid bacteria	Citric acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid
Control*	460	1650	880	0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	460	765	490	7000
<i>Pediococcus acidilactici</i>	460	776	250	6400
<i>Pediococcus dextricus</i>	220	800	330	3200
<i>Lactobacillus curvatus</i>	448	1050	229	8100
<i>Lactobacillus plantarum</i>	450	885	186	14500
<i>Lactobacillus brevis</i>	480	616	280	8500
<i>Lactobacillus fermentum</i> ,	200	640	290	8150
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	514	1500	460	3500
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	464	990	915	1900

\* control : filtrate of fruit and vegetable mixture

## 2. 종균 첨가에 의한 과채발효음료의 제조

### 가. 젖산균에 의한 과채류의 발효

과채발효음료의 제조는 자연발효에서와 같은 방법으로 재료를 혼합한 담금액에 젖산균을 0.1% 접종하고 20℃에서 2일간 젖산발효를 수행한 후 액즙을 분리하여 냉장온도에서 숙성시켰다. 종균으로 사용할 젖산균의 선택은, 과채혼합액에서의 발효특성 조사 결과에 따라 lactic acid의 생성능이 가장 뛰어난 *Lactobacillus plantarum*과 다른 유기산 함량의 감소가 비교적 적었으며 heterofermentation을 수행하는 *Leuconostoc mesenteroides*, 그리고 박테리오신 생성균주인 *Lactococcus lactis*를 종균으로 선택하여 단독 또는 혼합 접종 후 발효시킨 액즙을 냉장온도에서 숙성하며 일정 기간별로 시료를 취해 미생물 검사와 pH, 총산 함량의 변화 등의 발효특성을 비교하여 결정하였다(Fig. 3).

*Lactobacillus plantarum*을 혼합접종할 경우, 다른 균보다 활발하게 생육하여 과도한 산을 생성함으로써 일반적으로 산에 대한 내성이 적은 다른 젖산균의 생육이 저해되어 바람직하지 않은 결과를 얻었고, *Leuconostoc mesenteroides*의 단독 접종과 *Lactococcus lactis*과의 혼합접종의 결과를 비교했을 때 젖산균의 생육속도와 산생성 정도가 비슷하게 나타났기 때문에 두 균주의 혼합에 의해 heterotype의 발효로 적절한 산생성과 더불어 *Lactococcus lactis*에 의한 박테리오신 생성 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대하여 두 균주를 종균으로 선택하였다.

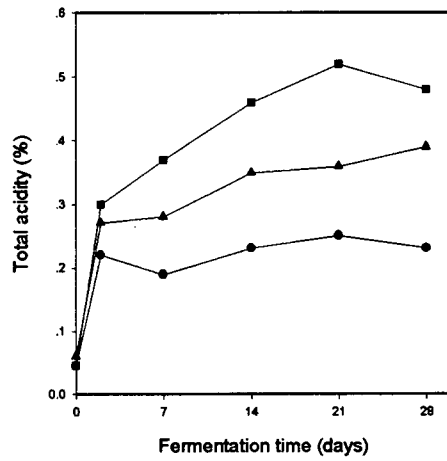


Fig. 3. Changes in total acidity of fermented fruit and vegetable beverages during fermentation

- : *Lc. lactis*
- ▲ : *Leu. mesenteroides + Lc. lactis*
- : *Leu. mesenteroides + Lb. plantarum*

## 나. 박테리오신 생성균주에 의한 박테리오신 생성 및 항균특성

박테리오신 중에서 GRAS 품목으로 인정되어 구미 유럽에서 널리 쓰이고 있는 Nisin은 젖산균의 일종인 *Lactococcus lactis*에 의해 생성되는 것으로서, 대부분의 젖산균과 각종 식중독균을 저해하는 것이 보고된 이래 미국을 비롯한 유럽 각국에서는 식품보존제로 허용하고 있으므로 우리나라의 전통식품의 가공 및 저장성 향상을 위해 활용될 수 있으리라 기대되며, 과채발효음료에의 이용 가능성을 조사하였다.

### 1) 박테리오신 생성균주의 발효능

박테리오신 생성균주인 *Lactococcus lactis* 11454의 발효능을 조사하기 위하여, 과채혼합액에 접종하여 발효를 수행한 결과, 발효2일 후 젖산균수는  $8 \times 10^8$  cfu/mL에 도달하였으며, 총산 함량도 0.27%로서 발효능이 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 그러나 박테리오신 생성균주인 *Lc. lactis*를 단독으로 접종하였을 때의 발효능은 충분하지 않았으므로 *Leu. mesenteroides*와 *Lc. lactis*를 혼합접종하여 적정량의 산 생성과 더불어 박테리오신을 생성하여 저장성 향상을 도모하고자 한다.

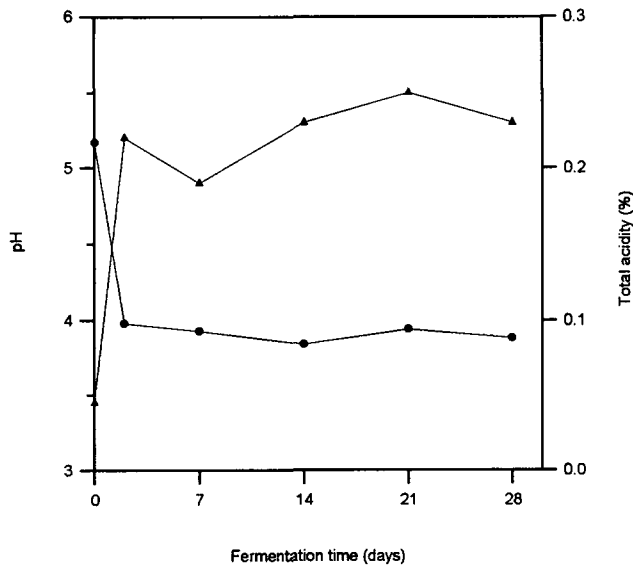


Fig. 4. Production of acid by bacteriocin producing *Lc. lactis* in fruit and vegetable mixture at 20°C

## 2) 박테리오신의 생성능

박테리오신의 항균역가는 *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2를 indicator organism으로 사용한 Agar well diffusion method로 측정하였다. 박테리오신의 항균역가는 투명환(clear zone) 크기에 비례하는 것으로서, 박테리오신 생성균주인 *Lactococcus lactis*를 종균으로 과채혼합액의 발효를 수행한 결과, Fig. 5-A에 나타난 바와 같이 발효가 진행됨에 따라 발효액내에 박테리오신이 생성되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 주발효균인 *Leu. mesenteroides*와 혼합접종시 항균역가가 나타나지 않았다(Fig.5-B ). *Leu. mesenteroides*와의 혼합발효시 초기 생육능이 활발한 *Leuconostoc*이 먼저 증식하여 산을 생성함으로써 발효액의 pH가 낮아져 박테리오신 생성균주가 증식하지 못하여 박테리오신이 생성되지 못한 것으로 판



단되므로 박테리오신 생성균주의 접종조건 확립과 더불어 발효 종균에 대한 생육 저해능을 조사하였다.

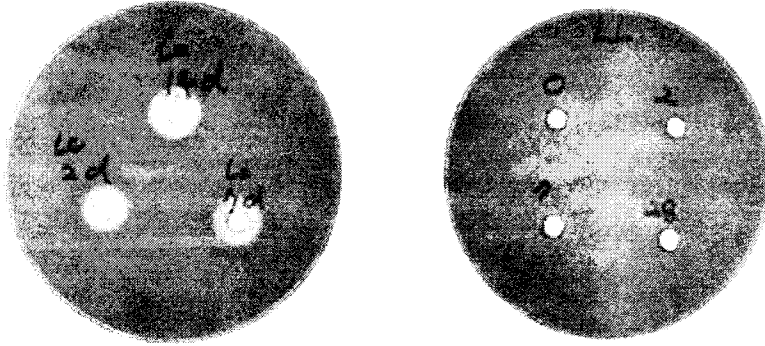


Fig. 5. Detection of bacteriocin activity in fruit & vegetable beverages fermented by different cultures (A : *Lc. lactis* single culture, B: mixed culture of *Lc. lactis* & *Leu. mesenteroides*)

### 3) 발효 종균에 대한 박테리오신의 생육 저해능 조사

발효에 관여하는 젖산균 중 *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*를 MRS broth와 멸균 처리한 발효액에 0.2% 접종한 다음 박테리오신(Nisin product)을 처리하여 이들의 생육 저해정도를 측정하였다. 실험에 사용한 젖산균은 MRS broth에서는 박테리오신을 처리했을 때 생균수가 현저히 감소하여 *Pediococcus pentosaceus*의 경우  $56 \times 10^5$ cfu/mL에서 13

X  $10^0$ cfu/mL로 감소하였고, *Leuconostoc mesenteroides*는 36 X  $10^5$ cfu/mL에서 45 X  $10^0$ cfu/mL로 감소되었다. 그러나 발효액내에서는 박테리오신의 항균효과가 균주의 종류마다 매우 달리 나타났으며, 특히 *Leuconostoc mesenteroides*는 36 X  $10^5$ cfu/mL에서 79 X  $10^3$ cfu/mL로 감소되어 박테리오신에 대한 내성이 생기는 것으로 나타났다.

이의 원인 규명을 위하여 발효액 제조에 사용된 주요 재료인 사과, 대추, 무의 즙액에 박테리오신을 첨가하여 *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*에 대한 생육저해능을 조사한 결과, *Pediococcus*는 박테리오신 첨가 후 6시간만에 생균수 감소가 현저하게 나타났으며, 24시간 이후에는 생육이 완전히 저해되었다(Table 8). *Leuconostoc*은 박테리오신을 첨가한 대추액에서는 첨가 후 생육이 저해되어 24시간 이후에는 완전히 사멸하였다. 그러나 사과와 무즙에서는 일시적인 저해가 있었으나 48시간 이후 증식이 활발해졌다(Table 9). *Lactobacillus*는 박테리오신을 첨가한 모든 시험구에서 초기에는 균수가 현저히 저하되었으나 24시간 이후 증식이 시작되어 48시간 이후에는 접종량 이상의 증가를 보였다(Table 10). 따라서 박테리오신에 대한 젖산균의 내성 정도는 균주에 따라 다를 뿐 아니라 식품의 재료에 따라 다르므로 식품보존제로 사용함에 있어 내성 형성과 식품성분과의 상호작용 등의 다양한 인자를 고려해야 할 것 같다.

Table 8. Effect of bacteriocin on the growth of *Pediococcus pentosaceus* in different media at 30°C

Materials		Number of <i>Pediococcus</i> (cfu / mL)		
		0 hrs	6 hrs	24 hrs
Apple Extract	C	$1.5 \times 10^6$	$3.8 \times 10^6$	$3.0 \times 10^7$
	N	$9.8 \times 10^5$	$1.0 \times 10^2$	0
Jujube Extract	C	$2.5 \times 10^6$	$5.1 \times 10^6$	$3.4 \times 10^6$
	N	$1.1 \times 10^5$	$2.0 \times 10^2$	0
Radish Extract	C	$2.6 \times 10^6$	$8.3 \times 10^7$	$4.5 \times 10^8$
	N	$1.8 \times 10^5$	$5.0 \times 10^1$	0

C : Control(without bacteriocin)

N : Bacteriocin containing sample

Table 9. Effect of bacteriocin on the growth of *Leuconostoc esenteroides* in different media at 30°C

Materials		Number of <i>Leuconostoc</i> (cfu/ mL)			
		0 hrs	6 hrs	24 hrs	48 hrs
Apple Extract	C	$2.3 \times 10^6$	$3.8 \times 10^6$	$3.3 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$
	N	$3.0 \times 10^3$	$2.5 \times 10^4$	$3.0 \times 10^5$	$1.1 \times 10^7$
Jujube Extract	C	$6.8 \times 10^5$	$1.4 \times 10^6$	$1.4 \times 10^7$	$6.0 \times 10^6$
	N	$1.0 \times 10^3$	0	0	0
Radish Extract	C	$2.1 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$	$9.0 \times 10^5$	$5.0 \times 10^6$
	N	$8.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^2$	$2.3 \times 10^3$	$9.0 \times 10^4$

C : Control(without bacteriocin)

N : Bacteriocin containing sample

Table 10. Effect of bacteriocin on the growth of *Lactobacillus plantarum* in different media at 30°C

Materials	Number of <i>Lactobacillus</i> (cfu/ mL)				
	0 hrs	6 hrs	24 hrs	48 hrs	
Apple Extract	C	5.7 x 10 <sup>6</sup>	2.3 x 10 <sup>7</sup>	1.3 x 10 <sup>8</sup>	
	N	2.2 x 10 <sup>5</sup>	1.0 x 10 <sup>6</sup>	5.0 x 10 <sup>7</sup>	
Jujube Extract	C	4.3 X 10 <sup>6</sup>	3.5 X 10 <sup>7</sup>	2.3 X 10 <sup>8</sup>	1.9 X 10 <sup>8</sup>
	N	7.8 x 10 <sup>4</sup>	3.0 X 10 <sup>2</sup>	-	1.2 x 10 <sup>7</sup>
Radish Extract	C	4.8 X 10 <sup>6</sup>	6.4 X 10 <sup>7</sup>	6.5 X 10 <sup>8</sup>	1.1 X 10 <sup>9</sup>
	N	1.1 x 10 <sup>5</sup>	5.0 X 10 <sup>2</sup>	2.0 x 10 <sup>4</sup>	4.3 X 10 <sup>5</sup>

C : Control(without bacteriocin)

N : Bacteriocin containing sample

#### 4) 박테리오신 생성균주의 접종조건 확립

박테리오신의 생성과 박테리오신의 항균효과는 식품내 고형분의 존재 여부와 식품의 산도 등에 의해 영향을 받기 때문에 박테리오신의 생성과 역가유지를 위한 최적조건을 조사하였다.

#### 가) 접종시기와 발효액의 전처리

과채발효음료 제조를 위한 종균으로서 박테리오신 생성균주인 *Lactococcus lactis*는 첨가시기에 따라 박테리오신의 생성율이 다른 것으로 나타났다. 즉 hetero fermentation을 수행하는 *Leu. mesenteroides*에 의해 발효를 수행한 후 또는 동시에 접종하게 되면 박테리오신이 생성되지 않았는데 이는 발효액의 pH가 낮아 박테리오신 생성균주의 생육이 이루어지지 않았기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 *Leu. mesenteroides*에 의해 1차 젖산발효를 행하여 얻은 발효액의 pH를 5.0으로 보정하여 박테리오신 생성균주를 추가 접종하여 20C에서 1일간 2차 발효를 하였을 때 박테리오신이 훨씬 많이 생성되었다.

균주를 접종하기 전 시료의 전처리에 따라 박테리오신의 생성량이 다르게 나타났으므로 1차 발효액을 원심분리 또는 membrane filtration에 의해 고형물을 제거하는 것이 박테리오신의 생성과 역가의 안정성 등에 미치는 영향을 조사하였다.

발효액을 filter로 제균하고 박테리오신 생성균주를 접종하였을 때의 박테리오신 생성량이 원심분액에서 보다 많았으며, 저장 중 역가의 변화도 적게 나타났다.

(Fig.6).

#### 나) 접종농도

박테리오신 생성균주의 접종농도를 0.1%, 1%, 2%, 5% 등으로 달리하여 발효시킨 결과, 0.1%는 생성량이 확인되지 않았으며, 농도가 높을수록 Inhibition zone size가 크게 나타났다. 그러나 1%,와 2%, 5% 접종시 나타나는 박테리오신의 역가는(Fig.7) 큰 차이가 없었으므로, 본 연구에서는 접종농도를 1%로 하여 항균 효과를 측정하였다.

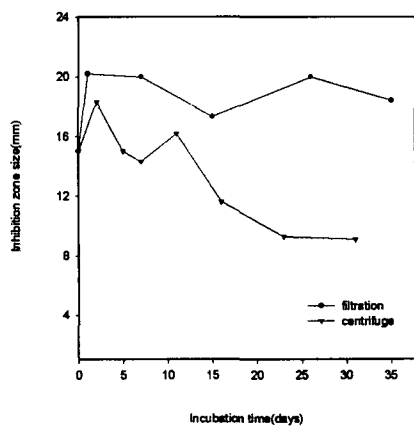


Fig. 6. Effect of pretreatment of sample on production of bacteriocin fruit and vegetable mixture

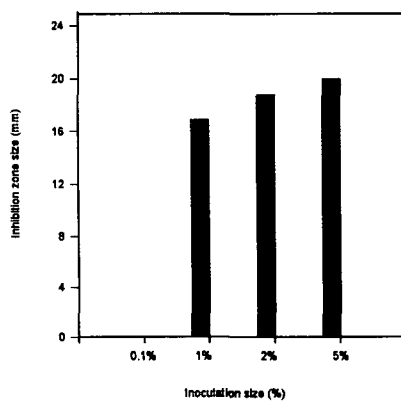


Fig. 7. Effect of inoculum size of *Lc.lactis* on production of bacteriocin in fruit and vegetable mixture

다) 발효온도

박테리오신의 생성은 발효온도에 의해서도 영향을 받는 것으로 4℃, 20℃, 25℃, 30℃에서 생성정도를 측정된 결과, 박테리오신의 생성량은 4℃에서는 생성되지 않았으며, 20℃와 25℃에서의 생성량은 비슷하였고, 30℃에서의 생성량은 훨씬 낮았다(Fig.8). 따라서 과채발효음료 제조를 위한 발효온도는 20℃로 하였다.

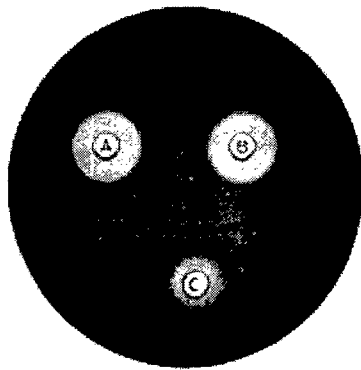


Fig. 8. Effect of fermentation temperature of *Lc. lactis* on production of bacteriocin (A : 20℃, B: 25℃, C: 30℃)



## 5) 박테리오신 생성균주에 의한 발효액의 항균효과

박테리오신 생성균주를 이용하여 발효시킨 과채발효음료의 항균 효과를 조사하기 위하여 식중독균인 *Listeria monocytogenes* ScottA와 *Staphylococcus aureus*, 충치 원인균이며 구강내 상주균으로 알려진 *Streptococcus mutans*에 대한 생육저해 효과를 조사하였다. 박테리오신 생성균주를 이용하여 발효시킨 과채음료와 대조구로서 *Leu. mesenteroides* 단독균주에 의해 발효시킨 과채음료에 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*를 0.1% 접종한 후 30℃에서의 생육 정도를 측정하여 과채음료의 항균효과를 조사하였다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 박테리오신 생성균주를 이용하여 발효시킨 음료에서는 이들 유해균의 생육이 완전히 저해되었음을 확인하였다. 특히 *Listeria monocytogenes* Scott A의 경우, 지속적으로 생육이 감소하여 7일째에는 생육이 완전히 저해되었으나 대조구에서는 생육이 저해되지 않고 지속적으로 증식하는 것으로 나타났다. *Listeria monocytogenes*는 냉장온도에서 증식이 가능하며, 자연계에 널리 분포하고 있을 뿐만 아니라, 상치, 양배추 등의 야채류에서도 검출되고, 사망률이 높은 치명적인 식중독 사고를 유발하는 균이므로, 발효액이 *Listeria monocytogenes*에 대한 저해능을 지닌 것은 매우 유익한 결과로 판단된다.

충치의 원인균으로 알려진 *Streptococcus mutans*는 박테리오신 생성균주를 이용하여 발효시킨 음료에서는 1일째에 거의 생육이 저해되었으나, 대조구에서도 서서히 생육이 저해되었다. 이는 대조구의 pH가 4.0으로서 낮은 pH에 의해 생육이 저해된 것으로 판단되며, 박테리오신의 함유시 저해효과가 훨씬 빠르게 나타남을 확인하였다.

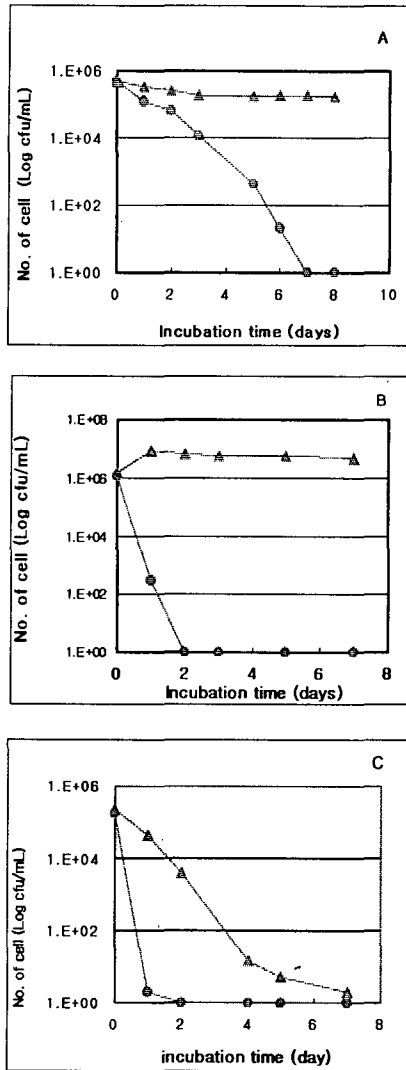


Fig. 9. Antimicrobial effect of fermented beverages contained bacteriocin against *Listeria monocytogenes*(A) *Staphylococcus aureus*(B) and *Streptococcus mutans*(C)

-▲- : control

-●- : fermented beverages (contain bacteriocin)

## 6) 박테리오신의 안정성(Stability)

과채발효음료의 저장 중 박테리오신의 역가 변화는 발효액의 상태에 따라 다르게 나타났다. 발효음료를 원심분리하여 냉장 저장 중 역가의 안정성을 살펴본 결과, 저장기간이 길어질수록 역가가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 그러나 발효음료를 membrane filter로 여과하여 고형분을 제거한 후 냉장 저장하였을 때는 저장 50일 이후에도 항균역가의 변화가 거의 없는 점으로 보아(Fig. 10), 박테리오신 생성균주를 이용하여 발효시킨 과채발효음료는 일반 젖산균으로 발효시킨 음료에 비해 저장성을 향상시킬수 있을 뿐만 아니라, 식중독균이나 기타 다른 유해균에 대한 저해효과도 보유하여 보다 위생적인 음료로서의 가치를 지닐 수 있게 되었다.

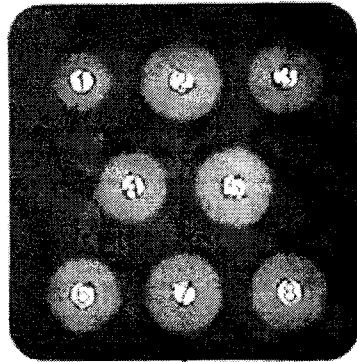


Fig.10. Stability of bacteriocin activity in fermented fruit & vegetable beverage prepared by filtration during storage at 4

(1 : fermented for 1day, 2 : fermented for 2days,

3, 4, 5, 6, 7 and 8 : stored for 5, 13, 24, 33, 40

and 50days, respectively)

#### 다. 과채발효음료의 제조를 위한 효모의 동정 및 발효 특성

침채류의 발효에서 젖산균과 효모의 혼합발효를 실시하면 젖산균에 의한 발효가 먼저 수행되어 산을 생성하고, 후에 효모가 잔류 발효성당을 소모하며 2차 발효를 수행하여 발효식품의 특성에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 효모는 산막의 형성 및 연부 현상을 초래하여 나쁜 영향을 미치는 것이 많으나, 특정 효모는 발효과정 중 방향과 풍미를 부여하고 이취를 감소시키는 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다. 따라서 본 연구에서는 과채류에서 방향성분을 생성하는 특성을 지닌 효모를 분리하여 동정한 후 과채발효음료 제조용 starter로 사용함으로써 과채젖산발효음료의 풍미 개선효과를 얻고자 하였다.

##### 1) 효모의 분리 및 동정

과채류의 젖산발효중에 존재하는 효모를 순수분리하고자 예비담금한 과채 발효음료를 균질화하여 tetracyclin 100  $\mu$ g/mL을 첨가한 PDA 평판배지에 접종한 뒤 30 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 다음 생성된 colony중 크기와 모양, 색깔등이 다른 균주 15개를 1차로 임의 선발하였다. 선발된 균주들을 Potato dextrose broth에 접종하여 산막을 형성하지 않으며 지나치게 알콜향을 생성하지 않는 5개의 균주들을 2차로 선발하여 형태학적 특성, 배양학적특성, 생리적 특성 등에 따라 동정한 결과(Table 11), 과채류의 젖산발효액에 존재하는 효모는 *Cryptococcus luteolus*, *Cryptococcus vishniacii*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccromyces dairensis*등의 5종인 것으로 판명되었다.

Table 11. Physiological characteristics of the isolated yeast strains

Strain	KW0-	KW0-	KW0-	KW0-	KW0-
	3	4	5	6	7
<b>Gas production form carbon source</b>					
D-Glucose	+	+	-	-	+
D-Galactose	+	+	-	-	+
Maltose	+	+	-	-	-
Sucrose	+	+	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	+	-	-	-	-
D-Raffinose	+	+	-	-	-
<b>Assimilation of carbon compounds</b>					
Glucose	+	+	+	+	+
D-Galactose	D	+	-	+	+
Maltose	+	+	+	+	-
Sucrose	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-
Succinate	+	-	D	+	-
Citrate	+	-	-	-	-
D-Lactate	+	-	-	D	-
D-Mannitol	+	-	-	+	-
Erythritol	+	-	-	+	-
L-Sorbose	-	-	-	D	-
D-Xylose	-	-	+	+	-
D-Ribose	-	-	-	+	-
Mannose	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	D	-	+	+	-
D-Raffinose	-	+	+	+	-
D-Meleziose	+	-	+	+	-
Salicin	+	-	+	+	-
Dextrin	+	-	+	D	-
Inulin	-	-	-	-	-
Arbutin	+	-	+	+	-
Glycerol	+	-	-	-	-
Ethanol	+	+	-	+	-
Methanol	-	-	-	-	-
<b>Assimilation of nitrogen compounds</b>					
Nitrate	+	-	+	-	-
<b>Growth</b>					
at 25°C	+	+	-	+	+
at 30°C	+	+	-	-	+
at 35°C	+	+	-	-	+
at 42°C	-	-	-	-	-

+ : positive, - : negative, D : delayed longer than 7 days

이 중 *S. dairensis*(KW0-7) 균주는 다극출아를 하는 자낭포자효모로 ethanol 생성 능이 없거나 미약하고, 저온(4℃) 및 혐기적 조건에서 활발한 생육을 하며 방향성을 부여해 주는 특성이 있어 starter균주로 선정하였다.

Table 12. Morphological and cultural Characteristics of *Sacch. dairensis* isolated from fruit & vegetable mixture.

Cell shape	oval to ellipsoidal
Cell size	3.7 × 5.9 μm
Reproduction	multilateral budding
Endospore	round (1-4)
Description	cream colonies no filaments sexual reproduction
Growth	at 4℃ + at 25℃ + at 30℃ + at 35℃ + at 40℃ -

## 2) 과채발효음료 제조를 위한 효모의 접종조건 확립

### ① 접종시기

효모를 이용한 발효액즙 제조를 위한 효모의 최적 접종시기를 알아보하고자 20℃에서 효모를 젖산균과 동시에 접종한 시험구와, 20℃에서 젖산균을 발효시킨 뒤 효모를 접종하여 4℃의 저온에서 후숙시킨 시험구로 나누어 균체의 생육정도와 발효특성을 비교한 결과를 Fig. 11에 제시하였다.

*Leu. mesenteroides*를 2일간 배양한 뒤 원심분리로 균체제거 후 *Lc. lactis*와 *S. dairensis* (KW0-7)를 20℃에서 동시에 혼합접종한 시험구와, *Leu. mesenteroides*를 2일간 배양한 뒤 원심분리후 20℃에서 *Lc. lactis*를 1일간 배양하고 4℃에서 *S. dairensis* (KW0-7)를 접종한 시험구로 나누어 실험한 결과 Fig. 11에서 보는 바와 같이 20℃에서 젖산균과 효모의 혼합접종구에서는 효모균체의 수가 발효2일차에  $1.4 \times 10^5$ cfu/mL이던 것이 20℃의 온도에서 효모의 급속한 증식으로 인하여 24시간만에  $1.9 \times 10^6$ cfu/mL로 자랐으며 이후 저장과정 중에는 완만한 증식을 하여 발효말기에  $8.0 \times 10^6$ cfu/mL을 나타내었다. 반면 4℃에서 숙성시킨 시험구에서는 저온에서도 효모가 활발한 증식을 나타내었는데 발효3일차에  $1.1 \times 10^5$ cfu/mL에서 발효말기  $6.5 \times 10^6$ cfu/mL의 균체수를 나타내었다. 따라서 20℃에서는 효모균체의 수가 빠르게 증식된 반면 효모향이 지나치게 강하여 관능면에서 다소 떨어지는 결과를 얻었으나, 4℃에서는 효모의 활발한 증식에도 불구하고 신선한 향이 느껴졌다. 결과 과채류의 발효균주인 젖산균과 효모를 동시에 접종하여 발효를 수행한 시험구에서는 효모의 증식에도 불구하고 풍미개선효과가 나타나지 않았으나 1차 젖산발효 후 원심분리에 의해 균체를 제거한 발효액에 효모를 접종하여 냉장온도에서 숙성을 유도한 결과 방향성분이 생성되어 풍미가 개선됨을 확인할 수 있었다.

따라서 효모의 최적 접종시기는 예비 젖산발효 후 제균과정을 거친 발효액에 효모를 접종하는 것으로 이것은 저온에서 발효시키면 숙성에 소요되는 시간은 다소 오래 걸리지만 휘발산, 탄산, 알콜 등 풍미에 좋은 영향을 미칠 수 있는 성분들의 양이 많아져 품질의 향상을 기할 수 있었다.

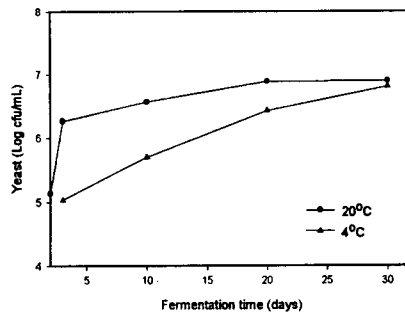


Fig. 11. The growth of *S. dairensis* in fruit and vegetable beverages fermented by mixture culture of *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis* and *S. dairensis* at 4°C and 20°C

## ② 접종량

효모의 최적 접종량을 선정하기 위하여 효모의 접종농도를 0.1%와 1%로 달리하여 발효시킨 후 균체의 생육정도를 비교하여 본 결과, 1% 첨가구에서는 발효 3일차에  $1.13 \times 10^5$  cfu/mL이던 것이 발효말기  $8.5 \times 10^6$  cfu/mL로 증식하였으며, 0.1% 첨가구에서는 발효 3일차에  $1.97 \times 10^4$  cfu/mL에서 발효 20일경까지  $2.3 \times 10^5$  cfu/mL로 완만한 생육을 보이다가 발효말기에는  $6.0 \times 10^6$  cfu/mL로 빠르게 증식하였다. 결과 균체의 생육면에서 보면 초기에 1 log cycle만큼의 차이를 보이다가 발효말기에 가서는 0.1% 접종구의 균체수가 1% 접종구 만큼 이르렀으나 1% 접종구에서는 발효초기 효모의 과도한 생육으로 효모향이 강하게 느껴져 관능면



에서 0.1% 접종구에 비하여 떨어지는 것으로 나타났다. 따라서 과채발효음료 제조를 위해 젖산균과 효모를 혼합배양할 때 효모의 접종량은 0.1%(v/v)가 적합한 것으로 나타났다.

## 라. 박테리오신 생성균주와 효모를 이용한 과채류의 발효특성

과채발효음료의 제조를 위한 종균의 종류를 달리하여 발효를 행하여 각 균주의 특성을 비교하고자 하였다. 즉 젖산발효균주로서 *Leu. mesenteroides*에 의해 1차 발효를 수행하고, 박테리오신 생성균주인 *Lc. lactis* 또는 효모인 *S. dairensis*에 의한 2차 발효를 행하거나 3가지 균주를 모두 이용했을 때의 발효특성을 비교하였다(Fig. 12, 13).

### 1) *Leu. mesenteroides*와 *Lc. lactis*의 혼합발효

*Leu. mesenteroides*를 1% 접종하여 20℃에서 2일간 발효시켜 hetero-fermentation에 의한 발효를 유도하여 유기산 생성, 적정산도 및 기타 분해산물을 유도하고 고형물과 액즙을 분리한 뒤, 원심분리를 통하여 제균작업을 거치고 sodium citrate로 pH를 5.0으로 보정하여 여기에 *Lc. lactis*를 1% 접종하여 발효특성을 조사하였다.

젖산균 혼합시험구의 pH는 발효말기 pH 4.07로 낮게 나타났으며 산도의 변화 또한 발효3일차에 0.28%이던 것이 말기에 0.36%로 높게 나타나 저장기간 중 높은 산생성도를 나타내었다. 젖산균수의 변화는 발효2일차에  $8.0 \times 10^6$ cfu/mL이던 것이 발효 20일차에  $1.66 \times 10^8$ cfu/mL를 발효말기에  $1.21 \times 10^8$ cfu/mL를 나타내는

등 발효말기로 갈수록 약간 감소하는 경향을 나타내었으나 발효 전 기간동안  $10^8$ cfu/mL의 높은 균수를 나타냈으며, 발효액은 항균효과가 있는 것으로 나타났다.

### 2) *Leu. mesenteroides*와 *S. dairensis*의 혼합발효

과채발효음료 제조시 젖산균과 효모를 각각 1%(v/v) 접종하여 pH 및 산도의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 12, 13에서와 같다.

과채액즙에 대하여 *Leu. mesenteroides*를 1% 접종하여 20℃에서 2일간 발효시키고 고형물과 액즙을 분리한 뒤, 원심분리를 통하여 제균작업을 거치고 여기에 과채류의 혼합액에서 분리·동정한 효모인 *S. dairensis*(KW0-7) 균주 1%를 접종한 시험구에서는 숙성 및 저장기간동안 pH 4.43에서 pH 4.19로 높은 pH를 나타내었으며, 산도의 변화를 보면 발효3일차에 0.26%이던 것이 0.27%로 낮은 산생성도를 나타내었다.

젖산균수의 변화는 발효2일차에  $2.04 \times 10^5$ cfu/mL이던 것이 발효말기  $1.23 \times 10^6$ cfu/mL를 유지하였으며, 효모균수의 변화는 발효2일차에  $2.1 \times 10^5$ cfu/mL이었으나 발효 10일차에  $1.29 \times 10^7$ cfu/mL로 증가함으로써 저온(4℃)에서도 활발한 생육을 나타내었으며 발효말기에는 점차 감소하여  $6.2 \times 10^6$ cfu/mL를 나타내었다.

### 3) *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis*와 *S. dairensis*의 혼합발효

*Leu. mesenteroides*를 과채액즙에 대하여 1%(v/v) 접종하여 20℃에서 2일간 발효시키고 고형물과 액즙을 분리한 뒤 *Lc. lactis*를 1% 접종하여 20℃에서 1일간 발효시키고 *S. dairensis* (KW0-7)균주를 0.1% 접종하여 냉장온도 (4℃)에서 저온숙성을 하였으며 이들 세균주의 혼합발효를 통한 숙성 및 저장과정 중의 변

화를 조사한 결과는 Fig. 12, 13에 나타낸 바와 같다.

젖산균과 효모의 혼합발효에서 pH의 변화를 보면 발효3일차에 pH 4.43에서 발효말기에 pH 4.12를 나타내었고, 산도의 경우 발효 20일차에 0.30%의 산생성도를 나타내었다.

미생물 변화는 Fig. 14에서 보는 바와 같이 *Leu. mesenteroides*와 *Lc. lactis*의 세포수가  $1.2 \times 10^8$  cfu/mL로 최대치에 도달하는 발효 10일부터 젖산균수가 감소하기 시작하여 말기에는 발효초기 균수로 감소하는데 반해 *S. dairensis* (KW0-7)는 빠르게 증식하는 경향을 보여 발효3일차에  $1.97 \times 10^4$ cfu/mL이던 것이 말기에  $8.4 \times 10^6$ cfu/mL에 이르렀다. 이러한 결과는 젖산균과 효모의 혼합배양시 효모의 성장이 젖산균이 생성하는 lactic acid로 인해 저해되었다가 저온에서 후숙시키는 과정에서 젖산균의 생육이 저지되고 효모가 활발히 증식하였기 때문으로 판단된다.

따라서 *Leu. mesenteroides*와 *Lc. lactis* 혼합발효구에서는 발효말기 산도가 0.36%로 높게 나타나 저장기간 중 높은 산생성도를 나타낸 반면, *Leu. mesenteroides*와 *S. dairensis* 혼합발효구는 0.27%로 낮은 산생성도를 나타내었고, *Leu. mesenteroides*와 *Lc. lactis* 그리고 *S. dairensis*의 젖산균과 효모 혼합발효구에서는 0.30%의 산생성도를 보임으로써 젖산균들의 혼합발효로 인한 높은 산생성이 효모와의 혼합발효로 인해 조절되어짐을 확인할 수 있었다.

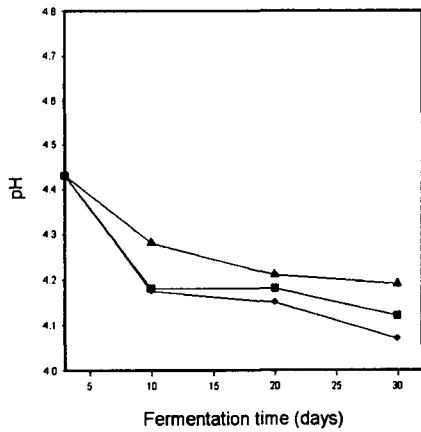


Fig. 12. Changes in pH of fermented fruit and vegetable beverages during fermentation by different cultures

- : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*
- : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*
- ▲— : *Leu. mesenteroides* + *S. dairensis*

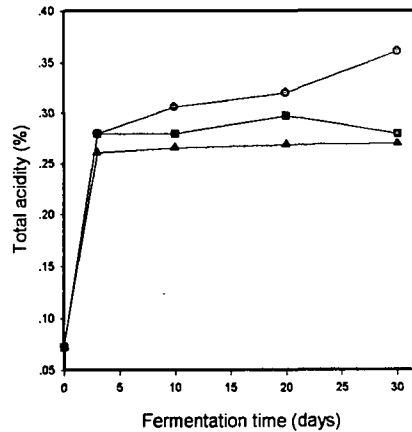


Fig. 13. Changes in total acidity of fermented fruit and vegetable beverages during fermentation by different cultures

- : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*
- : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*
- ▲— : *Leu. mesenteroides* + *S. dairensis*

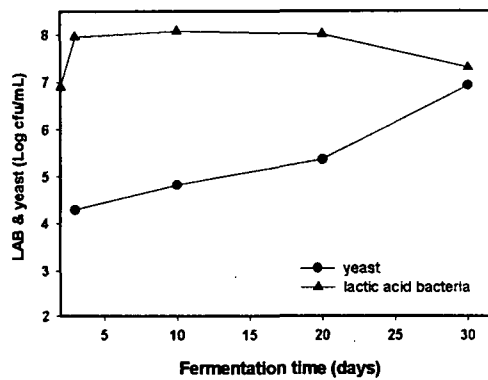


Fig. 14. Microfloral change of lactic acid bacteria & yeast in fermented fruit and vegetable beverages during fermentation at 4°C (*Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*)

### 3. 박테리오신 생성균주와 효모를 이용한 과채발효음료의 성분분석 및 관능특성

#### 가. 유기산 함량

과채발효음료의 유기산 함량은 HPLC를 사용하여 분석하였다. 발효액즙을 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액을 0.45 $\mu$ m syringe filter로 여과하여 분석시료로 사용하였다.

박테리오신 생성균주와 효모를 이용한 과채발효음료에 존재하는 유기산의 종류는 lactic acid, succinic acid, citric acid, malic acid, acetic acid, propionic acid 등으로 발효과정 중 유기산의 함량 변화는 Table 10에 나타났다. Lactic acid 함량은 숙성 중에 계속 증가하였으며 이는 산도와 숙성 정도에 매우 큰 영향을 주고 있는 것으로서, *Leu. mesenteroides*와 *Lc. lactis* 혼합구에서 담금초기에 350mg/L 이던 것이 숙성 3일 이후 급격히 증가되어 발효말기에는 13,700mg/L로 현저한 증가를 나타내었고, *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis* (KW0-7)혼합구에서는 발효초 급격한 증가 이후 저장 중에는 큰 변화를 보이지 않았다. *Leu. mesenteroides*와 *S. dairensis* (KW0-7)혼합구에서도 저장 중 증가 경향을 보였으나, 증가폭이 크지는 않았다(Fig. 15).

특정 발효 제품에서 특유의 감칠맛과 상큼한 맛을 부여하는 것으로 알려진 succinic acid 함량은 Fig. 15에서 보는 바와 같이 *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis* (KW0-7) 혼합구에서 발효말기에 340mg/L의 가장 높은 값을 나타내었고, *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*의 젖산균 혼합구에서 205mg/L를, *Leu. mesenteroides* + *S. dairensis*(KW0-7) 혼합구에서 241mg/L를 나타내 발효가 진행됨에 따른 효모를 첨가한 시험구의 succinic acid의 함량은 증가하는 경향을 보였다.

과채발효음료에 존재하는 유기산 중에서 citric, malic, acetic, propionic acid 는 모든 시험구에서 발효 전 기간동안 감소하는 경향을 나타내었다. 유기산 중 citric acid 함량이 특히 높은 이유는 pH를 보정하기 위하여 첨가하였던 sodium citrate에 의한 것으로서 발효기간 내내 높은 함량을 나타내었다.

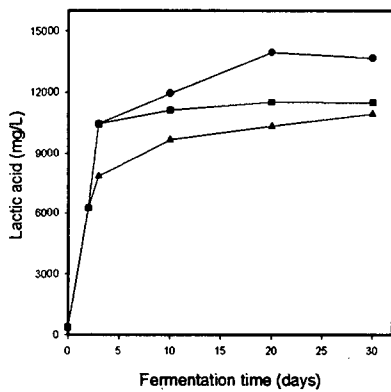


Fig. 15. Changes in lactic acid content of fermented fruit and vegetable beverages during fermentation

—●— : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*  
 —■— : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*  
 —▲— : *Leu. mesenteroides* + *S. dairensis*

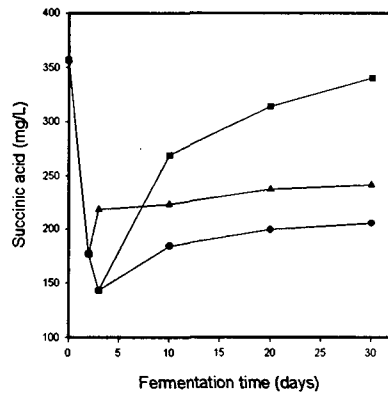


Fig. 16. Changes in succinic acid content of fermented fruit and vegetable beverages during fermentation

—●— : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*  
 —■— : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*  
 —▲— : *Leu. mesenteroides* + *S. dairensis*

Table 10. Organic acid contents in fruit and vegetable beverages during fermentation [unit : mg/L]

Organic acids		Fermentation time(days)					
		0	2	3	10	20	30
Citric	LL	732	(722.6)2170	3264	3094	2730	2386
	LLS	732	(722.6)2170	3264	2348	2212	2194
	LS	732	(722.6)2170	2458	2064	2008	1934
Malic	LL	784	1128	1064	1065	1050	941
	LLS	784	1128	1064	1038	1017	874
	LS	784	1128	758	664	584	448
Succinic	LL	357	177	143	184	199	205
	LLS	357	177	143	269	314	340
	LS	357	177	218	223	237	241
Lactic	LL	350	6246	10426	11931	13948	13666
	LLS	350	6246	10426	11102	11512	11493
	LS	350	6246	7840	9650	10939	10924
Acetic	LL	4402	7047	2369	2324	2941	2587
	LLS	4402	7047	2369	2363	2571	2580
	LS	4402	7047	2082	2841	3235	3421
Propionic	LL	577	nd	nd	nd	307	273
	LLS	577	nd	nd	nd	nd	nd
	LS	577	nd	59	333	154	nd

LL : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*

LLS : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*(KW0-7)

LS : *Leu. mesenteroides* + *S. dairensis*(KW0-7)

nd : not detected

( ) : before buffered to pH 5.0 (non-added trisodium citrate)

## 나. 유리당 함량

과채발효음료의 유리당 함량은 HPLC를 사용하여 분석하였으며, 시료의 전 처리는 유기산 분석 방법과 동일하게 하였다.

발효를 위한 과채혼합액에서 검출된 유리당은 fructose와 glucose, sucrose 등으로서, fructose 함량이 1.09%로 가장 높았다(Table 11). 발효가 진행됨에 따라 상당량의 당함량이 감소되었으며, glucose 함량 변화를 보면 *Leu. mesenteroides* + *S. dairensis*구가 발효말기 가장 많은 glucose를 소모하였으며, 다음으로 *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*구, *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* 구의 순 이었다. 효모첨가구에서 당소비량이 큰 것으로 미루어 젖산균의 단독배양시 당 이용률은 다소 낮으며 젖산균 및 효모의 혼합배양이 젖산균 단독 배양에 비해 보다 당소비가 높은 결과를 보이므로(Fig. 17) 효모와 젖산균 발효시 효모에 의해 잔류 발효성당을 완전히 제거한다면 후발효를 방지할 수 있을 것이다.

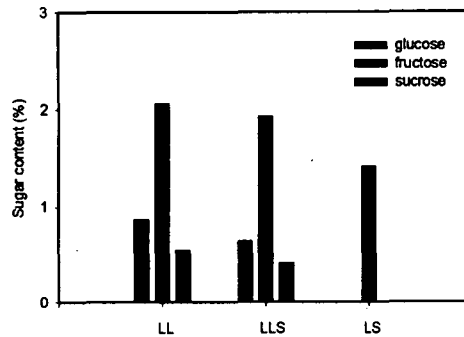


Fig. 17. Content of glucose, fructose & sucrose in fruit and fermented by different cultures for 20days at 4°C

LL : mixed culture of *Leu. mesenteroides* and *Lc. lactis*  
 LLS : mixed culture of *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* and *S. dairensis*  
 LS : mixed culture of *Leu. mesenteroides* and *S. dairensis*



Table 14. Sugar contents in fruit and vegetable beverages during fermentation  
[unit:%(w/v)]

Sugars		Frementation time(days)					
		0	2	3	10	20	30
Glucose	LL	0.60	0.89	0.77	0.84	0.87	0.55
	LLS	0.60	0.89	0.77	0.77	0.65	0.46
	LS	0.60	0.89	0.55	0.34	nd	nd
Fructose	LL	1.09	2.34	2.15	2.26	2.06	2.44
	LLS	1.09	2.34	2.15	2.14	1.93	1.54
	LS	1.09	2.34	1.98	1.58	1.42	1.14
Sucrose	LL	0.84	0.75	0.68	0.71	0.55	0.80
	LLS	0.84	0.75	0.68	0.47	0.41	0.33
	LS	0.84	0.75	0.39	nd	nd	nd

LL : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*

LLS : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*(KW0-7)

LS : *Leu. mesenteroides* + *S. dairensis*(KW0-7) , nd : not detected

#### 다. Vitamin C 함량

과채발효음료의 비타민 C 함량은  $\alpha, \alpha'$ -Dipiridyl method를 이용하여 측정하였다. 과채발효음료의 vitamin C 함량은 Fig. 18에서 보는 바와 같이 *Leu. mesenteroides* + *S. dairensis*구에서 가장 높아 담금 초기에 2.88mg%이었던 것이 발효 3일까지 9.27mg%로 급격히 증가하였으며 발효가 진행됨에 따라 감소하여 발효말기에는 6.71mg%로 감소하는 경향을 보였다. 다음으로 높은 vitamin C 함량을 보인 시험구는 *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*, *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*구의 순이었으며 효모접종구에서 무침가구에 비하여 vitamin C 함량이 높음을 알 수 있었고 효모 균체량이 가장 많았던 시험구에서 가장 높은 vitamin C 함량을 보임으로써 효모와 vitamin C 함량과는 높은 상관성이 있음을 알 수 있었다.

박테리옌 생성균주와 효모를 이용하여 제조한 과채발효음료의 비타민 함량은 발효 중 감소 경향을 보였으나 일정기간 이후에는 크게 감소하지는 않았다. 그러나 전반적으로 함량이 높지 않아 제품화를 위하여 비타민의 강화와 저장 중 비타민의 파괴를 방지하기 위한 방법을 강구할 필요가 있을 것으로 판단된다.

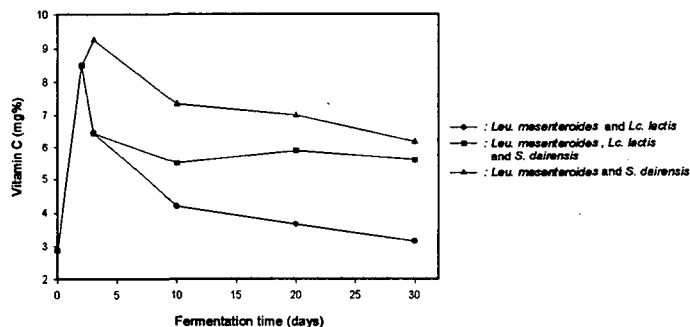


Fig. 18. Changes in vitamin C content of fruit and vegetable beverages fermented by different culture

#### 라. 무기성분 분석

과채발효음료의 무기 성분을 측정한 결과는 Table 15과 같다. Na가 1567 - 1884ppm으로 가장 많았고, P이 210 - 517ppm, K가 124 - 302ppm, Ca이 10-16ppm, Mg이 6.5 - 7.5ppm, Fe이 1.5 - 2.5ppm 그리고 Zn과 Cu, Mn이 0.1ppm - 0.3ppm 정도였다. *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces dirensis*를 이용해 발효시킨 음료와 효모인 *Sacch. dirensis*를 사용하지 않고 *Leu. mesenteroides*와 *Lc. lactis*의 젖산균만으로 발효시킨 음료의 미네랄 함량은 크게 차이가 나지 않았으나 *Leu. mesenteroides* 단독균주로 발효시킨 음료의 미네랄 함량은 전반적으로 높은 것으로 나타났다. 이는 Ca, K, Mg, Fe, P 등의 성분이 박테리오신 생성균주인 *Lc. lactis*에 의해 소모되었기 때문으로 판단된다. 과채발효음료의 무기성분 중 Na의 함량이 특히 높게 나타난 것은 과채혼합액의 젖산발효 후 박테리오신 생성을 위해 발효액의 pH를 sodium citrate로 보정하였기 때문으로서 Na 농도를 낮추기 위한 방안을 모색할 필요가 있으며, 발효음료를 갈증해소용 음료로 제조하여 산업화하기 위해서는 무기질 이온 농도 Balance를 체액의 전해질 농도와 비슷하게 조절하기 위한 후속연구가 필요할 것으로 판단된다.

#### 마. 색도 변화

과일과 채소의 조직을 파쇄하지 않고, 과일과 채소의 혼합담금액을 발효시켜 얻은 발효액균주를 달리하여 발효시킨 과채발효음료의 색상은 외관상 동치미 국물과 같이 밝은 색상을 띤 것으로서 갈변화가 저장 중 갈변화가 나타나지는 않았다. 박테리오신 생성균주 또는 효모를 이용해 발효시킨 발효음료의 저장 중 색도 변화를 Hunter colorimeter로 측정한 결과, Table 16에서 보는 바와 같이 밝기

를 나타내는 L 값의 경우 두 시험구 모두 저장 28일 까지 거의 변화가 없어 색도가 안정한 것으로 나타났으며, Yellowness를 나타내는 b 값은 저장 기간이 길어짐에 따라 약간 감소하였으나 큰 변화는 없는 것으로 나타났다.

Table 15. Mineral contents of fermented fruit and vegetable beverages

[unit ppm]

Elements	LLS	LL	Leu
Ca	10.51	10.51	16.68
K	138.50	124.30	302.60
Mg	6.83	6.49	7.30
Na	1828.20	1884.00	567.20
Fe	1.46	1.65	2.37
Zn	0.21	0.22	0.27
Cu	0.18	0.16	0.25
Mn	0.10	0.11	0.18
P	219.60	210.70	517.40

LLS : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*

LL : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*

Leu : *Leu. mesenteroides* (non-added trisodium citrate)

Table 16. Changes in color values of fruit and vegetable beverages fermented by different cultures

Hunter color	Storage time (days)	LLC	LLS
L	0	87.07	87.07
	2	84.62	84.62
	7	87.31	87.44
	14	87.93	88.65
	21	87.84	87.43
	28	84.46	85.60
	a	0	-0.98
2		-0.43	-0.43
7		-0.7	-0.53
14		-0.86	-0.76
21		-0.82	-0.67
28		-1.18	-0.95
b		0	7.73
	2	5.23	5.23
	7	4.54	3.51
	14	6.55	4.67
	21	7.05	5.89
	28	4.68	6.58

LLc : beverages fermented by mixed culture of *Leu. mesenteroides* and *Lactococcus lactis*

LLS : beverages fermented by mixed culture of *Leu. mesenteroides*, *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces dairensis*

## 바. 과채발효음료의 방향성분

중간을 달리한 과채발효음료의 휘발성 향화합물을 continuous liquid-liquid extraction method로 추출, 농축하여 GC-MS로 분석한 결과, 20일간 발효한 과채 발효음료의 휘발성 향화합물은 ester 11종과 alcohol 15종, acid 4종, ketone 9종, aldehyde 1종, 기타 4종 등 44종의 화합물이 검출되었다(Table 17). 효모를 첨가한 시험구와 효모 무첨가구에서 공통으로 검출된 성분으로는 1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-hydroxy-2-butanone, 1-hexanol, acetic acid, 2-ethyl-1-hexanol, 1,3-butanediol, butanoic acid, 1,5-hexanediol, 2-pyrrolidinone, 2-propanol, 4-(1-hydroxyethyl)- $\gamma$ -butanolactone, 1,2-benzenedicarboxylic acid bis(2-ethylhexyl) ester, chloroform 등 14종이었다.

효모 첨가구에서만 검출된 성분은 2-methyl-1-propanol, acetic acid ethyl ester, acetic acid 2-phenylethyl ester, hexanoic acid, benzene ethanol, 1,2,3-propanetriol, 1,2-benzenedicarboxylic acid dibutyl ester, hexanedioic acid dioctyl ester 등이고, butanoic acid ethyl ester, benzene methanol, heptanoic acid, 1,2-benzenedicarboxylic acid diethyl ester, 1,2-benzenedicarboxylic acid butyl 2-ethylhexyl ester 등은 효모 무첨가구에서만 각각 검출되어 담금시 효모를 첨가하는 경우 생성되는 휘발성 향화합물의 종류에 차이가 있었으며 효모 첨가구에서 alcohol류가 더 많이 검출되었다.

과실향을 부여하는 Esters류는 과채발효음료의 향미에 중요한 향화합물로서 본 실험에서 확인된 ester류는 주로 ethyl ester류로 이 중 파인애플향의 acetic acid ethyl ester는 과실 에센스, 과즙, liquor, 탄산음료, 과자 등의 향료로 널리 이용되는 과실향으로 저급지방산이 효모와 세균의 작용으로 ester화되어 생성되며 효모 첨가구에서 acetic acid ethyl ester의 면적비율이 높아 과채발효음료의 중요 ester 성분으로 추측되었고 효모 무첨가구에서는 검출되지 않았다. 또한 효모 첨가

구에서 장미향이나 벌꿀향의 acetic acid 2-phenylethyl ester가 검출되었으며, 효모 무첨가구에서는 과실향을 내는 butanoic acid ethyl ester가 검출되었다. 그 외에도 과채발효음료에서 검출된 대부분이 과실향을 나타내는 ester화합물이었다.

효모를 첨가한 발효음료에서 검출된 Alcohol류 중에는 “ethanol-like, sweet” 향을 부여하는 특징이 있는 성분인 2-methyl-1-propanol, 장미향이나 벌꿀향으로 알려진 benzene ethanol, 그리고 다가 알코올의 1,2,3-propanetriol 등이 함유되어 있었다.

과채발효음료에서 검출된 산은 acetic acid, butanoic acid, hexanoic acid, heptanoic acid의 4종류였으며 이 중 acetic acid의 함량이 가장 높았다. Acetic acid는 자극적인 향을 지니는 화합물로써 효모와 젖산균의 작용으로 생성되는 산화생성물로 효모 첨가구와 무첨가구 모두에서 높은 면적비율을 차지하였다. 과채 발효음료에서 검출된 ketone류는 9종이었으며 3-hydroxy-2-butanone은 알코올 발효 및 젖산균 발효중 미생물에 의해 생성되는 pleasant한 향으로 효모 첨가구와 무첨가구에서 가장 넓은 면적비율을 차지한 향미성분이었다.

이상의 결과와 같이 과채발효음료에는 ester, alcohol, acid, ketone, aldehyde 등 여러 종류의 휘발성 향화합물들이 존재하며 이들 성분이 조화되어 과채발효음료의 향기를 이루는 것으로 44종의 향기 성분 중 14종이 공통의 성분으로 나타났고 전반적으로 이들 대부분이 효모 첨가구에서 면적비율이 높은 것으로 나타났다. 숙성과정 중 향화합물의 수는 크게 차이가 없었으나 2-methyl-1-propanol, acetic acid ethyl ester, acetic acid 2-phenylethyl ester, benzene ethanol, 1,2,3-propanetriol, hexanedioic acid dioctyl ester등의 방향성 향화합물들이 효모 첨가구에서만 검출되는 등, 휘발성 향화합물의 종류와 주요 성분의 total area count를 비교할 때 생성된 휘발성 향화합물의 총량이 효모 첨가구에서 더 많은 양이 생성된 것으로 효모에 의해 생성된 향화합물임을 확인 할 수 있었다.

Table 17. Volatile compounds of fermented fruit and vegetable beverages

Peak No.	Volatile compounds	Peak area (%)		Odor description
		LLS <sup>1)</sup>	LL <sup>2)</sup>	
Alcohols				
4	2-Methyl-1-propanol	0.306	-	ethanol-like, sweet
5	1-Butanol	0.420	0.336	oil-like
6	2-Methyl-1-butanol	1.756	0.209	butter, straw-like, fusel oil-like
8	1-Hexanol	0.153	0.149	fruity, fatty, wine-like
9	3-Ethoxyl-1-propanol	0.262	-	
11	2-Ethyl-1-hexanol	0.105	0.094	slight rose, sweet
12	2-(Methylthio) ethanol	0.134	-	
13	1,3-Butanediol	1.187	0.410	
14	2,3-Butanediol	0.623	-	
17	Methionol	-	0.050	
22	Benzene methanol	-	0.063	faint aromatic floral, rose character,
23	Benzene ethanol	0.112	-	sweet
26	1,5-Hexanediol	0.048	0.038	
31	2-Propanol	3.706	3.143	alcoholic, ethereal
33	1,2,3-Propanetriol	0.133	-	sweet



Table 17. Continued

Peak No.	Volatile compounds	Peak area (%)		Odor description
		LLS <sup>1)</sup>	LL <sup>2)</sup>	
Esters				
3	Butanoic acid, ethyl ester	-	0.062	fruity, banana-like, sweet, ethereal
16	Acetic acid, ethyl ester	0.559	-	pineapple, fruity, ethereal
18	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0.111	-	slight rose, sweet
20	Dimethyl-alpha, alpha benzene propanoic acid, ethyl ester	-	0.158	
35	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester	-	1.616	odorless
37	3-Methyl-2-pentenoic acid, methyl ester	0.752	-	
40	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester	0.730	-	
41	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl-2-ethylhexyl ester	-	0.552	
42	Hexanedioic acid, dioctyl ester	1.089	-	
43	Di(2-ethylhexyl)adipate	-	1.036	
44	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	2.520	10.655	

Table 17. Continued

Peak No.	Volatile compounds	Peak area (%)		Odor description
		LLS <sup>1)</sup>	LL <sup>2)</sup>	
<b>Acids</b>				
10	Acetic acid	2.963	1.824	pungent, stinging-sour
15	Butanoic acid	0.218	0.192	sour, rancid, butter-like
21	Hexanoic acid	0.026	-	fatty, rancid
25	Heptanoic acid	-	0.097	sour, sweet, fatty
<b>Ketones</b>				
1	2,3-Butanedione	-	0.811	quinone
7	3-Hydroxy-2-butanone	13.094	11.532	pleasant
19	2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten	0.047	-	
24	Methyl pyrrol-2-yl ketone	0.068	-	
28	2-Pyrrolidinone	0.075	0.066	
32	3,5-Dihydroxy-2-methyl-5,6-dihydropyran-4-one	0.489	-	
34	4-(1-Hydroxy-ethyl), gamma, butanolactone	0.554	0.496	
36	Diphenylmethanone	-	0.482	geranium-like
38	Mevalonic lactone	-	0.323	
<b>Aldehydes</b>				
29	Propionaldehyde	0.388	-	suffocating
<b>Others</b>				
2	Chloroform	3.474	2.818	sweet
27	Phenol	-	0.076	sickeningly sweet, acrid
30	Glycine	-	0.267	sweet
39	2,5-Di(hydroxymethyl)-furan	-	0.673	

<sup>1)</sup>LLS : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*(KW0-7)

<sup>2)</sup>LL : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*

## 사. 과채발효음료의 관능특성

과채젖산발효액에 효모를 starter로 첨가한 후 4℃에서 숙성시키면서 각 시험구의 관능적 품질의 변화를 평가한 결과는 Table 18과 같다.

실험군간의 변화를 보면 신내의 경우 효모첨가구가 무첨가구에 비해 발효기간별로 큰 차이를 나타내어 효모 첨가구가 덜 느끼는 것으로 평가되었고 발효말기(30일)에 유의적( $p < 0.01$ )으로 높게 평가되었다. 과숙향의 경우 실험군간 약간의 차이를 보이며 발효가 진행됨에 따라 증가하였으며 단내와 과실향이 높게 평가된 효모 첨가구에서 이와 반대로 과숙향은 덜 느껴지는 것으로 평가되었다. 이는 발효말기에 생성되는 과숙향이 단내와 과일과 비슷한 향에 의해 masking된 것이라 판단되었다. 단내의 경우 시험구간 커다란 차이를 나타내었는데 효모 첨가구가 무첨가구에 비해 2배 정도의 높은 값을 나타내면서 유의적으로 평가되었다. 과실향에 유사한 새콤한 내의 경우 발효기간별로 커다란 차이를 보이며 증가하였고 특히 발효 20일차의 효모 첨가구가 무첨가구보다 유의적인 차이( $p < 0.05$ )로 높게 평가되었으며 발효말기에 이르러서는 신내와 과숙향 등과 관련하여 약간 감소하는 것으로 나타났는데 이것 또한 효모균주의 방향생성능 효과라고 생각되었다.

맛의 경우 냄새와 비슷한 것으로 판단되었으며 새콤한내의 경우 효모 첨가구에서 높은 기호성을 나타낸 반면 신맛과 과숙한 맛은 덜 느끼는 것으로 평가되었다.

전체적인 기호도는 발효기간별로 효모를 첨가한 시험구가 무첨가구보다 높게 평가되었으며 발효 20일차의 효모 첨가구의 전체적인 기호도가 가장 우수한 것으로 평가되었다.

이상에서의 결과와 같이 효모를 starter로 첨가한 시험구에서는 과채발효음료의 신내와 신맛, 과숙향과 과숙한 맛 등이 지연되는 효과를 얻었으며 이는 효모 무첨가구보다 총산 및 lactic acid 함량이 낮았던 점과 일치하는 결과를 보이며 여기에 과실에 유사한 상콤한 냄새와 맛이 부여되어 효모 첨가가 전체적인 기호도를 높

이는데 크게 기여함을 알 수 있었다. 따라서 과채류의 젖산발효음료에서의 효모의 주 역할은 과숙향 억제와 관능적 특성에 기여하는 것으로 나타났다.

Table 18. Statistical analysis of fermented fruit and vegetable beverages

Sensory	10 days		20 days		30 days		F-value	
	LL	LLS	LL	LLS	LL	LLS		
Odor	Acidic	4.9 <sup>b</sup>	3.8 <sup>b</sup>	4.8 <sup>b</sup>	2.4 <sup>a</sup>	7.7 <sup>d</sup>	6.2 <sup>c</sup>	22.315**
	Moldy	4.4 <sup>b</sup>	4.0 <sup>ab</sup>	3.0 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	5.1 <sup>bc</sup>	4.1 <sup>b</sup>	7.438**
	Sweety	3.0 <sup>a</sup>	5.3 <sup>b</sup>	3.5 <sup>a</sup>	7.4 <sup>c</sup>	3.0 <sup>a</sup>	6.1 <sup>bc</sup>	11.378**
	Fruity	2.9 <sup>a</sup>	5.8 <sup>b</sup>	2.8 <sup>a</sup>	7.5 <sup>c</sup>	2.2 <sup>a</sup>	5.8 <sup>b</sup>	53.149**
Taste	Acidic	5.6 <sup>c</sup>	4.4 <sup>b</sup>	7.1 <sup>d</sup>	3.0 <sup>a</sup>	7.4 <sup>d</sup>	4.7 <sup>b</sup>	59.056**
	Moldy	3.3 <sup>a</sup>	3.1 <sup>a</sup>	3.4 <sup>a</sup>	2.7 <sup>a</sup>	4.1 <sup>ab</sup>	4.7 <sup>b</sup>	7.616**
	Radish	3.4	3.4	2.9	3.0	3.4	3.0	0.78
	Salty	5.0	4.7	4.4	3.8	4.8	5.2	1.9
	Fruity	2.7 <sup>a</sup>	5.8 <sup>b</sup>	2.8 <sup>a</sup>	7.2 <sup>c</sup>	2.2 <sup>a</sup>	5.5 <sup>b</sup>	68.248**
Total acceptability	36 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	26 <sup>b</sup>	11 <sup>a</sup>	52 <sup>c</sup>	53 <sup>c</sup>		

LLS : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis* + *S. dairensis*(KW0-7)

LL : *Leu. mesenteroides* + *Lc. lactis*

abc : Mean scores within raw followed by the same letter are not significantly different at the 5% level using Duncans Multiple Range Test.

\*\* : p<0.01 in ANOVA test

## 제 4 절. 참고 문헌

- Carr, J.G. : "Lactic acid bacteria in beverages and foods". Academic Press. New York (1975)
- FDA. Nisin preparation : Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Food & Drug Admin., Fed. Reg. 53 : 11247 (1988)
- Tamer, J. and Fowler, G.G. Estimation of Nisin in foods. J. Sci. Food Agric. 15 : 522 (1964)
- Jung, Dong-Sun. Application, Interaction, and Enhancement of the Efficacy of Nisin in Foods and Beverages. Ph.D. Dissertation, Oregon State University (1992)
- 이철호 : 약이 되는 식품. 어문각 (1994)
- 유풍현 : 대추 extract를 첨가한 요구르트의 제조에 관한 연구. 충남대학교 대학원 석사학위 논문 (1995)
- 민용규, 이만규, 정현상 : 대추 첨가량을 달리한 대추술의 발효특성. 한국농학회지, 40(5), 433 (1997)
- 박경숙, 경규항 : 무의 젖산균 증식촉진물질과 촉진작용. 한국식품과학회지, 24(6), 528 (1992)
- Leverington, R.E. : Ginger technology. Food technology in Australia, 8, 309 (1975)
- 정태연, 이세은, 정문철, 김동철 : 생강의 저장 전처리 효과에 관한 연구. 한국식품과학회지, 28(3), 458 (1996)
- 심선택, 경규항, 유양자 : 김치에서의 젖산균의 분리 및 이 세균들의 배추액 증 발효. 한국식품과학회지, 22, 373 (1990)

- Kaneuchi, C.H., Masako, S.L., and Kazuo, K.F. : production of succinic acid from citric acid and related acids by *Lactobacillus* strains. *Appl. & Environ. Microbiol.*, 54(12), 102 (1988)
- 함승시, 이상영, 오덕환, 김상현, 홍정기 : 산채류를 이용한 음료개발에 관한 연구. *한국식품영양과학회지*, 26(1), 92 (1997)
- 김범수, 이용기 : 야채. 과일요법. 평단문화사, (1995)
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. : Bacteriocins of gram-positive bacteria, *bacteriol. Rev.*, 40, 722 (1976)
- Reddy, G.V., Friend, B.A., Shahani, K.M. and Farmer, R.E. : Antitumor activity of yogurt components. *J. Food Prot.*, 46, 8 (1983)
- Hosono, a., Wardojo, B. and Otani, H. : Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitro-samines. *Agric. Chem.*, 54, 1639(7) (1990)
- Fernandes, C.F. and Shahani, K.M. : Anticarcinogenic and immunological properties of dietary *lactobacilli*. *J. Food Prot.*, 53, 704(8) (1990)
- 김진욱, 박장서 : 효모의 분류, 특성 및 산업적 이용, *생물산업*, 10, 2 (1997)
- Daeschel, M.A., Fleming H.P. and Mcfeeters, R.F. : Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. *J. Food Sci.*, 53(3) 862 (1988)
- Fleming H.P, R.F. McFeeters, and R.L. Thompson : Test for susceptibility of fermented vegetables to secondary fermentation. *J. of Food Science* 48, 982 (1983)
- 노완섭 : 한국산 침채류의 발효 속성에 관여하는 효모에 관한 연구, 동국대 박사 학위논문 (1980)

- 유주현, 진효상, 박영지 : *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus*와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양에 의한 두유의 젖산발효, 한국식품과학회지, 19(4), 413 (1991)
- Akira murata, Hayami ishiatsu, Yoshiyuki ucin : Determination of Vitamin C by the  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl Method, Saga Uni., Laboratory of Applied Microbiology, 61, 9 (1986)
- 김혜자, 양차범 : *Lactobacillus plantarum*과 *Saccharomyces cerevisiae*의 상호작용이 채소발효음료에 미치는 영향, 한국생활과학연구 제12호, 115 (1994)
- Tressl R. : Flavor of Foods and Beverages (Charamlmbus, G., G.E. Inglett, eds.), Academic Press, New York/London, 145 (1978)
- Armstrong, D.W., S.M. Martin and H. Yamazaki : Biotechnol. Bioeng., 26, 1038 (1984)
- 熊田順一 : 醸造成分, Beer(酵母香氣成分), 日本醸造協會雜誌, 71, 819 (1976)
- 西谷尙道 : 醸造成分, 本格焼酒 (製品成分), 日本醸造協會雜誌, 72, 415 (1977)
- 坂本宏可, 下田滿哉, 箴島農 : 清酒香氣成分の ホ°ラハ°ツクカラムたよる濃縮. Nippon Nogeikagaku kaishi, 67, 685 (1993)
- 布川太郎 : 清酒成分覽(ester), 日本醸造協會雜誌, 62, 854 (1967)
- 原昌道 : 清酒成分覽(alcohol), 日本醸造協會雜誌, 62, 1196 (1967)
- 森口繁弘, 石上有造 : しょうゆ成分一覽(有機酸), 日本醸造協會雜誌, 62, 95 (1967)
- 淺尾保夫, 横塚保 : しょうゆ成分一覽(香氣成分), 日本醸造協會雜誌, 62, 1106 (1967)