

감귤과즙을 이용한 산형음료 발효 및 발효음료의 항균효과

정지숙¹ · 김성호² · 김미림³ · 최경호^{1*}

¹대구가톨릭대학교 식품영양학과

²경북과학대학 바이오식품과

³대구한의대학교 한방식품조리영양학부

Acidic Beverage Fermentation Using Citrus Juice and Antimicrobial Activity of the Fermented Beverage

Ji-Suk Jeong¹, Seong-Ho Kim², Mi-Lim Kim³, and Kyoung-Ho Choi^{1*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

²Dept. of Bio-Food Science, Kyongbuk College of Science, Gyeongbuk 718-851, Korea

³Faculty of Herbal Food Cuisine & Nutrition, Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Korea

Abstract

In this experiment, citrus juice was fermented by *Gluconacetobacter hansenii* TF-2, an isolate from tea fungus to develop a new type of acidic beverage. The juice broth is made by fermenting of 11~17% (v/v) juice and sweetened with sucrose (initial sucrose 10°Brix). The fermentation by *G. hansenii* TF-2 was initiated by adding 5% (w/v) of seed gel (pellicle, tea fungus) which was previously cultured in the same medium (fresh juice broth) and the fermentation was carried out in a dark incubator at 28~30°C for about 15 days. During the fermentation a pellicle grew on the surface of the fermenting fluid and acids were produced. Fermented fluid (beverage) was centrifuged at 7,000 rpm for 15 min for further analyses. The highest amount of the other metabolites including organic acids were observed in 5 to 10 days. Major acids were acetic acid (fermented citrus beverage, CB). After 15 days of fermentation, organic acid content such as acetic acid in fermented beverage was measured to be 183.5~186.6 ppm. Free sugars content in CB were 56.8%, 35.1%, 40.7% and 63.2% of unfermented sucrose, glucose, fructose and sorbitol, respectively. When the growth rate of inhibitory effect of the fermented beverage was measured by using several species of food-related bacteria, the beverage fermented with CB exhibited the strongest inhibition against gram-negative (*E. coli* and *Sal. Typhimurium*). Its inhibition rate was between 71.9~94.0% at CB. Fermented beverage has shown effectiveness for antimicrobial activity against some species of food-related bacteria.

Key words: *Gluconacetobacter hansenii*, tea fungus, acidic beverage, fermented beverage, citrus juice

서 론

펠리클, 중국, 독일, 러시아 등의 나라에서 많이 애용되고 있는 전통음료 중 하나인 콤투차(kombucha)는 대표적인 산형발효에 속한다(1,2). 콤투차는 당을 첨가한 홍차 추출물을 발효한 전통 건강식품의 하나(3)로, 장수, 항암, 변비, 당뇨 등에 효과가 있는 것으로 알려져 민간에서 많이 음용하고 있다(4). *Acetobacter*를 위시한 다양한 세균과 효모 등의 공생배양으로 식초산(acetate) 외에도 다양한 유기산 생성으로 발포성의 사과주처럼 청량음료 맛이 나며(3-5), 배양액 표면에 curd 상의 겔(gel)을 형성하는 것을 tea fungus라 지칭하기도 한다. 최근, 콜라 등의 탄산음료의 수요가 큰 비중을 차지하고 있지만, 식혜, 수정과 등의 전통음료에 기초한 제품들도 지속적인 소비자들의 호응으로(6) 음료 선택 시

갈증해소 뿐만 아니라 건강에 유익한 점도 중요시 되고 있다(7,8). 이는 오랜 기간을 통하여 안전성이 보장된 전통음료를 현대인의 기호에 맞는 새로운 음료로써 개발이 요구된다. Tea fungus 발효 연구로는 tea의 종류와 tea fungus의 배양 균 종류에 따른 발효특성을 비교한 연구(9), 발효음료의 항균효과(10,11)에 대한 연구가 다수 있으나 모두가 홍차 또는 녹차 등의 다류를 이용한 연구뿐 과즙을 이용한 발효 및 안전성과 기능성에 관한 연구가 미비하다.

본 실험에 사용한 시료 감귤(citrus)은 유기산 함량이 높고 vitamin C, 카로티노이드류(β -carotene) 및 식이성섬유소를 다량 함유하고 있을 뿐 아니라 항산화 및 항노화성 플라보노이드 화합물(hesperidin, rutin, naringin 등)과 같은 기능성 물질을 다량 함유하고 있다. 영양 및 기능성 물질을 다량 함유하고 있어, 생과 또는 감귤주스(12,13), 감귤주

*Corresponding author. E-mail: herojisuk@hanmail.net
Phone: 82-53-850-3521, Fax: 82-53-850-3504

(14,15), 감귤식초(16), 감귤청과음료와 젤리(12) 및 기타 빵(17) 및 어묵(18) 등에 이용되고 있다. 또, 감귤 잼, 감귤초콜릿, 만감류를 이용한 차 등의 제품에 이용되어 지역 특산품으로 출시되고 있으나 논문으로 보고된 바는 없다.

따라서 본 연구는 기능성 산형음료로서의 가능성을 확인하기 위해 tea fungus에서 분리한 *Gluconacetobacter hansenii* TF-2로 감귤과즙을 발효시킨 후, 발효액의 유기산과 유리당의 종류 및 함량을 조사하였으며, 음용 시 안전성을 확인하기 위해서 식품에 관련된 세균을 사용하여 항균효과를 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 재료는 제주도 서귀포산 온주밀감을 구입하여 박피하고 압착한 착즙액(이하 감귤과즙으로 약함)을 부직포와 여과지(Whatman No. 2, USA)로 여과하여 -20°C에서 저장하면서 실험 직전에 clean bench 내에서 해동하여 사용하였다.

발효균

Tea fungus는 다양한 효모와 세균 등이 복합적으로 발효에 관여하므로 균의 분리가 필요하였다. 발효균은 tea fungus로부터 분리한 *Gluconacetobacter hansenii* TF-2를 Park(19)으로부터 분양받아 사용하였다. *G. hansenii* TF-2는 감귤과즙에서 배양하여 활성화시킨 후 사용하였으며, 전 배양과정에서 사용된 종균으로는 과즙 표면에 형성된 두께 10 mm 이상의 겔(이하 seed gel로 약함)을 사용하였다.

발효용 배지 및 음료발효

감귤과즙을 멸균증류수로 6배(과즙 17% 함유), 9배(과즙 11% 함유) 희석하고 시판 백설탕(제일제당, 한국)을 사용하여 초기당도 10°Brix로 조정된 과즙배지를 발효병에 80 mL씩 분주하였다. 과즙배지에 seed gel을 5%(w/v) 접종하여 29±1°C에서 정치배양하면서 경과일수에 따른 발효변화를 보았다. 이때 발효용기로는 시중 유리제품의 음료병을 살균하여 사용하였으며, 발효병 입구는 살균 여과지(Whatman No. 2, USA) 2겹으로 봉하였다.

이화학적 조사

pH 및 산도 변화: pH는 pH meter(Mettmer toledo 340, Swiss)를 이용하여 발효액 20 mL를 취하여 측정하였다. 발효액의 총 산 함량은 AOAC법(20)에 따라 삼각 flask에 배양액 10 mL를 취한 다음 bromothymol blue 2방울을 적하한 후 0.1 또는 0.01 N NaOH로 중화 적정하여 초산(acetic acid)의 함량으로 환산하여 %로 표시하였다. 이때, 발효액은 원심분리(7,000 rpm×15 min)하여 균체를 제거하고 측정에 사용하였다.

겔 두께 변화: 겔 두께는 눈금자를 이용하여 측정하였으며 mm로 나타내었다.

발효액의 유기산 및 유리당 분석

유기산 함량 변화: 감귤과즙 배지를 15일간 배양하면서 5일 간격으로 발효액을 수거하여 분석 시료로 사용하였다. 발효액 1 mL를 뚜껑 달린 시험관에 취한 다음 인산완충용액(0.05 M, pH 2.0)을 가하여 희석하고 membrane filter(pore size: 0.45 µm)로 2회 반복 여과한 후 다시 SepPak으로 여과하여 여액 중 유기산의 종류별 함량을 HPLC(Shimadzu LC-10AT)로 분리 정량하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

유리당 함량 변화: 시료는 유기산 분석에 사용된 동일한 발효액을 사용하였으며, 발효액은 acetonitrile/water(80/20, v/v%)로 2배 희석하고 membrane filter(pore size: 0.45 µm)로 2회 반복 여과한 다음 다시 SepPak으로 여과하였다. 여액 중 당의 종류별 함량을 HPLC(Shimadzu LC-10AT)로 분리 정량하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

발효음료의 항균효과

시료: 9배 희석 감귤과즙의 발효 전(0일째)과 발효 후(15일째)의 액을 비교하였으며, 여과지(Whatman No. 2, USA)로 여과하고 clean bench 내에서 membrane filter(pore size: 0.45 µm)로 여과하여 제공한 다음 사용하였다.

시험균주 및 배양조건: 실험에 사용한 균주는 모두 한국 균주보존협회로부터 분양받아 사용하였다. 그람 양성균으로 *Salmonella* Typhimurium(KCTC 1925), *Bacillus subtilis*(KCTC 1021)와 그람 음성균으로 *Escherichia coli* (ATCC 11105), *Staphylococcus aureus*(KCTC 1916)를 사용하였으며, 배양 조건은 Table 2와 같다. 배지의 pH는 0.1

Table 1. Operating conditions of HPLC for quantitative analysis of organic acids and free sugars

Item	Condition	
	Organic acid	Free sugar
System	Shimadzu LC-10AT	Shimadzu LC-10AT
Detector	UV detector 210 nm	Refractive index
Flow rate	0.5 mL/min	1.0 mL/min
Solvent	0.1% H ₃ PO ₄	Acetonitrile/water (80/20, v/v)
Column	µ-Bondapak C ₁₈ (4.6×250 mm, Waters Co.)	Spherisorb S ₁₀ NH ₂ (4.6×250 mm, Waters Co., USA)
Column temp.	30°C	30°C
Injection volume	20 µL	20 µL

Table 2. Bacterial strains and cultural conditions of the organisms used for determination of antimicrobial activity of fermented beverage

Bacterial strains		Cultural conditions	
		Medium	Temperature (°C)
Gram+ rod & coccus	<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	Nutriunt ¹⁾ (NT)	30
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	Micrococcus medium ²⁾	37
Gram- rod	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11105	NT	37
	<i>Salmonella</i> Typhimurium KCTC 1925	NT	37

The medium was adjusted to pH 6.8 and sterilizer at 0.75 kg/cm for 15 minutes. Fill up to distilled water 1.0 liter.

¹⁾Nutrient broth: peptone 5 g, beef extract 3 g.

²⁾Micrococcus medium: peptone 5 g, beef extract 1.5 g, glucose 1 g, yeast extract 3 g.

N HCl과 0.1 N NaOH를 사용하여 pH 6.8로 조정 한 후 0.75 kg/cm²에서 15분간 가압살균 한 후 사용하였다.

생육저해율 시험: 생육저해율 시험은 paper disc법으로, 생육저해율 시험은 탁도 측정법으로 실험하였다. 생육저해율에 의한 생육저해율 시험은 멸균된 petri dish에 배지를 분주하여 24시간 clean bench 안에서 응고시켜 배지 표면의 수분을 제거시키고 균액(10⁴~10⁵ cells/mL)을 균일하게 도말하여 5~8시간 후 멸균된 6 mm filter paper disc (Whatman No. 2, USA)를 균이 접종된 plate 표면위에 disc를 밀착시키고 각 추출물을 200 ppm 흡수시켜 30°C 또는 37°C incubator에서 48시간 배양하여 disc 주위의 clear zone의 직경(mm)을 측정하여 항균력을 비교하였다. 탁도에 의한 생육저해율 시험은 3회 계대배양 후 활성화시킨 균액 14 mL를 L자형 시험관에 분주하고, 0, 20, 50, 100% 농도로 조정된 발효액을 동일하게 1 mL씩 투여한 후 30°C 또는 37°C에서 진탕배양(160 rpm, HB-201SF)하면서 광전비색계(東京光電, 7A)로 660 nm에서 배양액의 탁도를 측정하였다.

통계처리

모든 데이터는 특별한 경우를 제외하고는 3회 반복 측정 한 후 평균치±표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

발효특성

감귤과즙 첨가에 따라 발효액의 경시적 외관 변화가 나타났다. Seed gel의 접종 직후에는 중균 덩어리가 액 표면에 떠 있었으나 1일 경과 후에는 바닥으로 가라앉았으며, 배양 이틀째 배양액 상부 가장자리에 기포가 생기기 시작하였다. 또한 배양액의 탁도에 영향을 준 부유물이 발효병 바닥으로 가라앉아 멍쳐짐을 볼 수 있었다(Fig. 1). 발효 경과일에 따른 배양액의 pH, 산도, 겔 두께 변화를 측정 한 결과는 Fig. 2와 같으며, 전반적인 pH 변화는 배양 4일째까지 급격히 감소한 후 서서히 낮아지는 경향을 보였다. 6배 희석 발효액(이하 CB17로 약함)은 초기 3.97에서 배양 14일째 3.14로, 9배 희석 발효액(이하 CB11로 약함)은 3.98에서 2.81로 낮아졌다. 산도 변화는 배양 1일째 소폭 증가하였다가 배양 4~5일

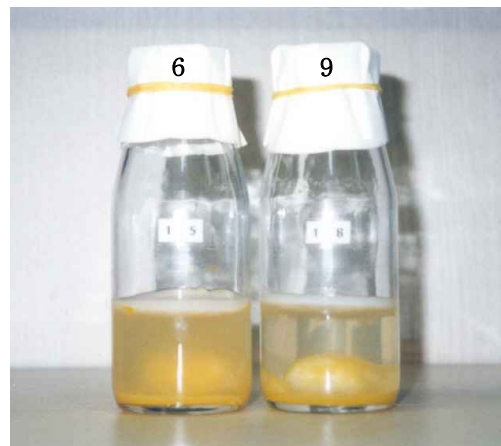


Fig. 1. Changes in image of fermentation bottle after acidic fermentation by *Gluconacetobacter hansenii* TF-2.

Gels were produced by static culture of citrus juice for 15 days at 30°C with inoculation of seed gel. Numbers at the top of bottles in the plate indicate dilution time of the citrus juice.

째는 가장 높은 산 함량을 보였으며 이후에 다시 감소하였다. CB17은 배양 4일째 0.438%(acetic acid)로 급격히 증가했다가 5일째 0.109%로 다시 급격히 감소한 이후에도 소폭의 증가 및 감소를 반복하였다. CB11은 배양 4일째 0.384%로 급격히 증가하여 5일째 0.482%로 가장 높게 증가한 이후 전반적으로 감소하는 경향이었으나 총산 함량에는 큰 차이가 없었다. 겔의 두께 변화는 감귤과즙 발효의 경우 배양 3일째부터는 배양액 표면에 겔이 생성되기 시작하여 배양 15일째 5.8~7.0 mm로 가장 두껍게 겔이 생성되었다.

초기 산(acid) 함량이 증가할수록 겔의 형성시기가 빨리 시작되었으며, 겔의 두께가 증가하는 시기에는 산의 함량이 갑자기 낮아지는 경향이 나타나 총산의 함량이 겔 두께 생성에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Lee와 Zhao(21)의 0.5% citric acid 첨가와 Lee 등(22)의 *G. persimmonus*를 이용한 발효 시 0.5% acetic acid 첨가에 의해 겔 수율 향상에 효과적인 것과 비슷한 경향을 보였다. 홍차와 녹차 추출물로 tea fungus 배양 시 Dragoljub 등(23), Jayabalan 등(24) 및 Keshk과 Sameshima(25)의 보고에 따르면 발효 후 pH는 3.0~3.5 사이였으며, Jeong(26)의 동충하초 분말 추출물 배양에서는 2.45~2.58로 pH가 2.5 부근이었으나 썩, 솔잎 추출물

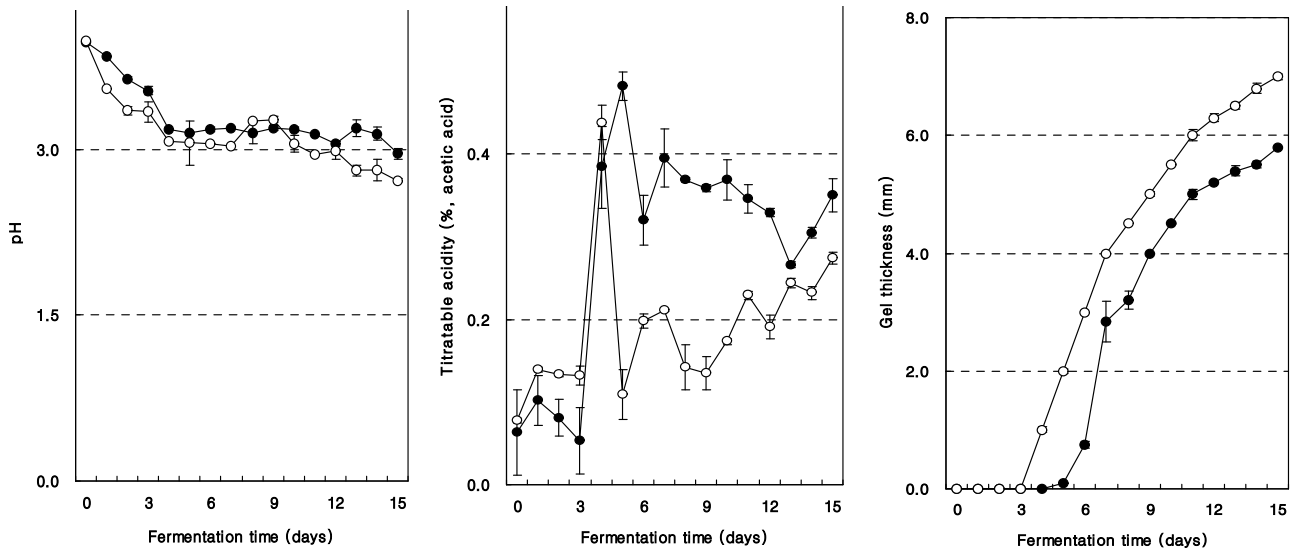


Fig. 2. Change in pH, total acidity and gel thickness of fermenting beverage during fermentation by tea fungus at 30°C incubator for 15th day.
 Symbols represent dilution times of the juice: ●, CB11 (fermentation beverage of the citrus juice 9 dilution times); ○, CB17 (fermentation beverage of the citrus juice 6 dilution times). Values are mean of tree replication.

배양 시에는 pH가 거의 변화가 없어 시료에 따라 차이가 있음을 알았다. 과즙을 이용한 tea fungus 발효 연구로는 Choi 등(27)의 감귤 농축과즙 배양이 있으며, 발효 후에는 pH가 2.0~3.0 부근으로 본 실험의 감귤과즙 발효 시의 pH 2.8~3.1로 초기 유기산 함량과 부재료에 따라 발효액의 pH에 상당한 차이를 보이는 것은 tea fungus의 종류와 균주의 개량에 의한 것으로 판단된다.

발효음료의 유기산 변화

유기산 분석에 사용된 시료는 발효특성 조사에 사용된 동일한 시료로 측정하였다. 발효액의 유기산 함량 변화는 Table 3과 같으며, 총 유기산 함량이 발효 5일째 가장 높아졌다가 이후 감소하는 경향을 보였다.

CB11은 배양 5일째 급격히 증가하여 배양 10일째까지 높은 수치를 보였으며, 이후에는 감소하였다. CB17은 CB11보

다 총 함량은 적으나 발효 5일째 큰 폭으로 증가하였다가 이후에는 서서히 감소하여 발효 15일째는 CB11과 거의 비슷한 수치를 보였다. CB11과 CB17에서 가장 많이 검출된 유기산은 acetic acid였으며, 0일째는 acetic acid가 검출되지 않았으나 발효가 진행되면서 다량의 acetic acid가 생성되어 발효전반에 걸쳐 가장 많은 양을 차지하였다. 다음으로 citric acid가 검출되었으며 배양 5일째 감소한 이후 거의 비슷한 수준으로 검출되었다. Fumaric acid는 배양 전반에 걸쳐 검출되었으나 검출량에는 거의 변화가 없었다. 산도 측정 결과에서도 발효경과 2~6일 사이에 가장 큰 폭으로 증가하였다가 감소한 이후에 다시 서서히 증가하여 HPLC를 이용한 유기산 측정 결과와 비슷하였다.

Jayabalan 등(24)은 녹차와 홍차를 이용한 kombucha 발효 연구에서 acetic acid가 주된 유기산으로 발효기간 동안 지속적으로 증가하여 배양 15일째 가장 높은 함량을 나타내

Table 3. Amount of organic acids fermenting beverage before and after fermentation

Juice content (%)	Fermented time (days)	Organic acids (ppm, ×50 dilutions)					Total
		Malic	Acetic	Citric	Succinic	Fumaric	
Citrus	0	21.9498	ND ³⁾	24.0896	ND	0.3444	46.3837
	5	ND	283.0784	11.4483	21.7058	0.3448	345.1005
	10	ND	304.2873	13.9810	ND	0.3545	318.6228
	15	ND	183.5013	11.8324	ND	0.3584	195.6921
	0	21.8193	ND	33.6955	ND	0.3478	55.8620
	5	ND	201.5262	14.7169	ND	0.3510	216.5941
Citrus	10	ND	213.1659	11.8987	ND	0.3472	225.4118
	15	ND	186.6345	13.7955	ND	0.3409	200.7790

Organic acid content in citrus juice were analysed by using a HPLC as described in the methods.

¹⁾CB11: fermentation beverage of the citrus juice 9 dilution times.

²⁾CB17: fermentation beverage of the citrus juice 6 dilution times.

³⁾ND: Not detected.

Table 4. Amount of free sugars fermenting beverage before and after fermentation

Juice content (%)	Fermented time (days)	Free sugars (mg/mL, ×50 dilutions)						
		Fructose	Glucose	Sorbitol	Sucrose	Maltose	Lactose	Total
11% (CB11 ¹⁾)	0	ND ³⁾	ND	ND	1956.3453	ND	ND	1956.3453
	5	397.3782	438.8867	403.2000	ND	ND	ND	1239.4469
	10	456.5810	303.8211	ND	ND	ND	ND	760.4021
	15	407.2454	350.9621	ND	568.3096	ND	ND	1326.5170
Citrus 17% (CB17 ²⁾)	0	ND	ND	ND	1798.3230	ND	ND	1798.3230
	5	382.8051	357.2091	ND	548.0258	ND	ND	1288.0399
	10	507.8016	ND	ND	ND	ND	ND	507.8016
	15	ND	ND	631.7000	ND	ND	ND	631.7288

Sugar content in citrus juice were analysed by using a HPLC as described in the methods.

¹⁾CB11: fermentation beverage of the citrus juice 9 dilution times.

²⁾CB17: fermentation beverage of the citrus juice 6 dilution times.

³⁾ND: Not detected.

다가 이후 다시 감소하며, acetic acid 다음으로는 glucuronic acid가 발효전반에 검출되었다고 보고하였다. Lee 등(22)의 *Gluconacetobacter persimmonis*를 이용한 농축 사과배지 발효 연구에서는 succinic acid와 acetic acid가 크게 증가하는 것으로 보고하였다. 그러나 본 실험의 감귤과즙 발효액 (CB)에서는 acetic acid와 citric acid가 우위를 차지하는 것으로 나타나 부재료에 따라 생성되는 유기산에 상당한 차이를 보였다. 식초에 존재하는 유기산은 원료로부터 전이되었거나 미생물에 의해 생성된 것으로 식초산의 자극적인 맛을 부드럽게 조화시켜 주며, 구연산(citric acid)과 사과산(malic acid)은 온화하고 상쾌한 신맛, 주석산(tartaric acid)은 약간 톡은맛 있는 신맛, 초산(acetic acid)은 자극적인 냄새가 있는 신맛 등으로 이들 유기산은 식품의 풍미를 결정하는 귀중한 요소(28)로서 된장, 간장, 김치뿐만 아니라 산형음료에 있어서도 귀중한 맛을 결정하는 요소가 될 것으로 판단된다.

발효음료의 유리당 변화

발효액의 유리당 함량 분석 결과는 Table 4와 같으며, 발효특성 조사에 사용된 시료와 동일한 시료로 측정하였다. 당의 종류로는 fructose, glucose, sorbitol, sucrose, maltose, lactose가 확인되었으며, 발효 전 과정에서 maltose와 lactose는 검출되지 않았다.

CB는 0일째 sucrose 검출량이 가장 높았으나 이후 감소하는 결과로 발효 시 탄소원으로 이용된 것으로 보이며, 초기에 검출되지 않았던 fructose, glucose, sorbitol이 발효가 진행되면서 검출되었다. 초기 sucrose 검출량이 높은 것은 발효액의 보당 시 첨가한 백설탕에 의한 것으로 보인다.

발효음료의 항균활성

항균활성 검정 시료는 CB11로 pH 및 산도를 Table 5에 나타내었다. 생육저해율에 약간의 차이는 있었으나 검정균 모두에서 증식이 현저히 저해되어 paper disc 주위에 생육저지환을 뚜렷하게 생성하였다(Table 6). CB11는 *Sal. Typhimurium*, *E. coli*의 그람 음성균에서 저지환이 더욱 뚜렷하였다. 또한, 증식저해도 결과에서도 Fig. 3, 4 및 Table

Table 5. pH and acidity of fermented beverage using anti-microbial activity of citrus beverage

Beverage	Chemical	Fermented time (days)	
		0	15
CB11 ¹⁾	pH	3.97±0.00	2.96±0.12
	Titrateable acidity (%)	0.06±0.05	0.35±0.05

Fermentation beverage was fermentation at 29±1°C for 15th day. ¹⁾CB11: fermentation beverage of the citrus juice 9 dilution times.

Table 6. Diameter of inhibitory zone of food-related bacteria formed by fermented beverage without neutralization (unit: mm)

Bacterial strains		CB11 ¹⁾
Gram +	<i>B. subtilis</i>	6.1±0.1
	<i>S. aureus</i>	7.0±0.1
Gram -	<i>E. coli</i>	8.0±0.2
	<i>Sal. Typhimurium</i>	8.5±0.1

Fermentation beverage was fermentation at 29±1°C for 15th day. Clear zone formation by fermented beverage. Food-related bacteria were inoculated by dipping the paper disc in liquid culture. Inoculated disc was incubated for 48 hour at 30°C and 37°C. ¹⁾CB11: fermentation beverage of the citrus juice 9 dilution times.

7에서 보는 바와 같이 발효액의 함량에는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, 그람 양성균과 그람 음성균 모두에서 저해능력을 보였으나 그람 양성균보다 그람 음성균에 더 효과적인 것으로 확인되었다. Park(29)은 솔잎과 눈꽃동충하초를 첨가한 tea fungus 발효음료의 항균활성 측정에서는 *E. coli*와 *S. aureus*에 대하여 우수한 항균활성을 나타내었으나 감잎차를 첨가한 음료는 항균활성을 나타내지 않은 것으로 보고하였다. Greenwalt 등(10)은 음용 수준에서의 발효시키지 않은 홍차와 녹차는 대부분 항균활성을 나타내지 않았으나, 발효된 콤포차에서는 주로 초산에 의한 결과이지만 병원성 박테리아의 범위에 대한 항균활성을 나타내어 건강에 좋은 음료일지도 모른다고 보고하였다. 따라서 식품에 존재하는 미생물은 발효를 통해 복잡한 화합물을 분해할 뿐

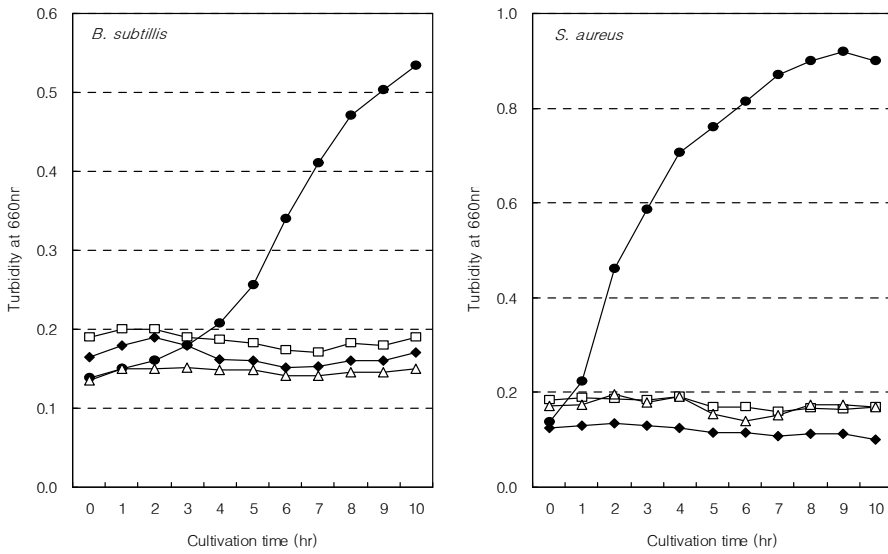


Fig. 3. Comparison of inhibitory effects of fermented beverage on the survival of *B. subtilis* and *S. aureus* of gram positive.
 Symbols are ●: control, □: CB¹⁾ 20%, ◆: CB 50%, △: CB 100%. ¹⁾CB: fermentation beverage of the citrus juice 9 dilution times.

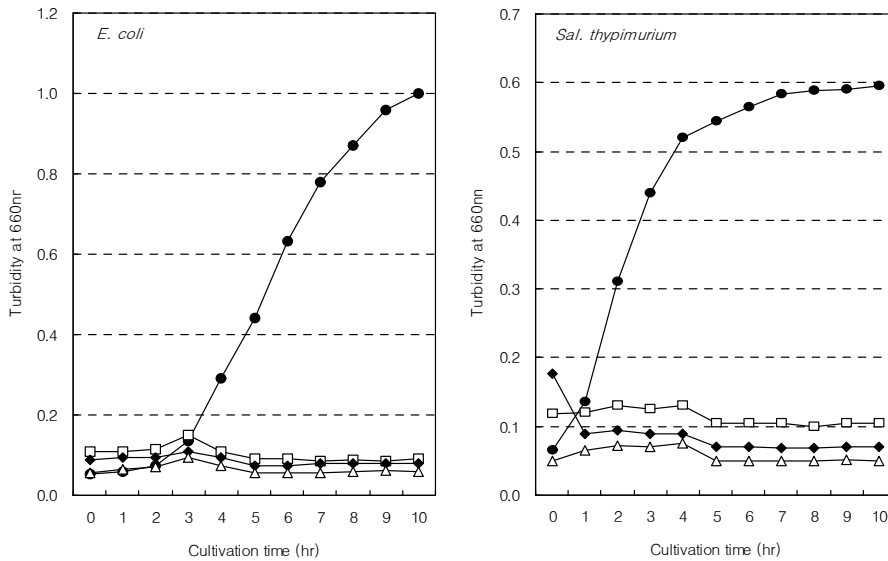


Fig. 4. Comparison of inhibitory effects of fermented beverage on the survival of *E. coli* and *Sal. typhimurium* of gram negative.
 Symbols are ●: control, ■: CB¹⁾ 20%, ◆: CB 50%, ▲: CB 100%. ¹⁾CB: fermentation beverage of the citrus juice 9 dilution times.

Table 7. Changes in inhibition rate of food-related bacteria formed by the addition of fermented beverage

Bacterial strains	Fermented beverage content (%)	Growth inhibition (%)	
		CB11 ¹⁾	
Gram +	<i>B. subtilis</i> (KCTC 1021)	20	64.42
		50	81.60
		100	71.91
<i>S. aureus</i> (KCTC 1916)	20	81.11	
	50	88.89	
	100	81.11	
Gram -	<i>E. coli</i> (ATCC 11105)	20	91.00
		50	92.00
		100	94.00
<i>Sal. Typhimurium</i> (KCTC 1925)	20	82.35	
	50	88.24	
	100	91.60	

Fermentation beverage was fermented at 30°C for 15th day.
¹⁾CB11: fermented beverage of the citrus juice 9 dilution times.

아니라 여러 가지 영양소를 합성하기도 하며 식품의 저장 및 품질개선은 물론 생성된 알코올과 유기산이 병원균의 증식을 억제한다(28,30). 그러나 몇몇의 연구(31,32)에서는 콤부차 음용이 유해하다는 기록도 있으므로 임상학적인 분야에서 좀 더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

감귤과즙으로 새로운 산형음료 개발을 위해 tea fungus로부터 분리한 *G. hansenii* TF-2 균을 이용하였다. 과즙배지는 11~17%(v/v)의 과즙에 초기 당도를 10°Brix로 하였다. *G. hansenii* TF-2에 의한 발효는 과즙배지에 활성화시킨 seed gel을 5%(w/v) 첨가하여 29±1°C에서 15일 배양하면서 5일 간격으로 측정하였다. 발효 동안 발효액 표면에는 막을 생성하고 액에는 다양한 유기산을 생성하였다. 분석에

사용한 발효액은 7,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 사용하였다. 5~10일 사이에 유기산 등의 기타 대사산물의 함량이 가장 높았다. 발효가 진행되면서 malic acid, acetic acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid 등의 다양한 유기산이 생성되었으며, 특히 발효 전반에 acetic acid가 관여하였다. 주요 산으로는 acetic acid이었다. 발효 15일째 측정에 의하면, acetic acid 함량은 183.5~186.6 ppm이 검출되었다. 배양 동안 CB11의 유리당은 sucrose, glucose, fructose 그리고 sorbitol이 확인되었으며 각각 56.8%, 35.1%, 40.7%, 63.2%가 검출되었다. 음용 시 식품에 관련된 세균에 대해 CB11가 71.9~94.0%의 저해율을 나타내었으며 그람 양성균보다는 그람 음성균에서 더 효과적이었다.

문 헌

1. Bartholomew A, Bartholomew M. 1998. *Kombucha tea for your health and healing*. Access Publishers Network, MI. p 13.
2. Sievers M, Lanini C, Wever A, Schuler-Schmid U, Teuber M. 1995. Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *System Appl Microbiol* 18: 590-594.
3. Dufresne C, Farnworth E. 2000. Tea, kombucha, and health: A review. *Food Res Int* 33: 409-421.
4. Reiss J. 1987. The tea fungus and its metabolic products. *Dusch Lebensm Rdsch* 83: 286-290.
5. Reiss J. 1994. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z Lebensm Onters Forsch* 198: 228-261.
6. 통계청. 2007. 음료 품목별 생산·출하량 통계자료.
7. Cho HS, Kim YO. 1999. The study on Korean youth's status of beverage consumption and preference of beverage in Chunnam area. *Korean J Food & Nutr* 12: 536-542.
8. Han ES, Rho SN. 2004. An analysis of consumption and preferences of the Korean traditional drinks by women in different age groups *J East Asian Soc Dietary Life* 14: 397-406.
9. Lee SP, Kim CS. 2000. Characterization of kombucha beverage fermented with various teas and tea fungus. *J Food Sci Nutr* 5: 165-169.
10. Greenwalt CJ, Steinkraus KH, Ledford RA. 2000. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *J Food Prot* 63: 976-981.
11. Sreeraulu G, Zhu Y, Knol W. 2000. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J Agric Food Chem* 48: 2589-2594.
12. Chung SK, Kim SH, Choi YH, Song EY, Kim SH. 2000. Status of citrus fruit production and view of utilization in Cheju. *Food Industry and Nutrition* 5: 42-52.
13. Koh JS. 1995. Quality improvement of citrus juice by supercritical carbon dioxide. R41-1995-000-00254-0.
14. Koh JS, Koh NK, Kang SS. 1989. Citrus wine-making from mandarin orange produced in Cheju island. *J Korean Agric Chem Soc* 32: 416-423.
15. Kang KH. 2004. Studies on the production of citrus wine and brandy using Jeju citrus. *PhD Dissertation*. Dong-A University.
16. Kim ML, Choi KH. 2005. Sensory characteristics of citrus vinegar fermented by *Gluconacetobacter hansenii* CV1. *Korean J Food Cookery Sci* 21: 263-269.
17. Kyun SK, Lee YK, Kim SD. 2002. Quality characteristics of bread with citrus peel water homogenate. *J East Asian Soc Dietary Life* 12: 397-406.
18. Yang MO, Cho EJ. 2007. Quality properties of surimi with added citrus fruits. *J East Asian Soc Dietary Life* 17: 58-63.
19. Park EJ. 2002. Isolation of pellicle producing bacterium in fermentation system by tea fungus and establishment of the optimum composition for gel production. *MS Thesis*. Catholic University of Daegu.
20. AOAC. 1980. *Official Methods of Analysis*. 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. p 180.
21. Lee HC, Zhao X. 1996. The optimal medium composition for the production of microbial cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 11: 550-556.
22. Lee OS, Jang SY, Jeong YJ. 2003. Effect of ethanol on the production of cellulose and acetic acid by *Gluconacetobacter persimmonis* KJ145. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 181-184.
23. Dragoljub C, Sinisa M, Mirjana D, Dragisa S, Aleksandra V. 2008. Specific interfacial area as a key variable in scaling-up kombucha fermentation. *J Food Eng* 85: 387-392.
24. Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. 2007. Changes in content of organic acid and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem* 102: 392-398.
25. Keshk S, Sameshima K. 2006. Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. *Enzyme Microb Technol* 40: 4-8.
26. Jeong JS. 2001. Acidic beverage fermentation by tea fungus and anti-microbial activity of the fermented beverage. graduate school. *MS Thesis*. Catholic University of Daegu.
27. Choi KH, Jeong JS, Moon CH, Kim ML. 2004. Effect of carbon source supplement on the gel production from citrus juice by *Gluconacetobacter hansenii* TL-2C. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 170-175.
28. 장희진. 1992. 식품가공과 조미기술. 세진사, 서울. p 69.
29. Park CS. 2003. Functional properties of tea-fungus beverage. *Korean J Food Preserv* 10: 241-245.
30. 김영만, 임무현. 1997. 최신 발효공학. 유림문화사, 서울. p 325.
31. Choi MA, Choi KH, Kim JO. 1996. Microflora occurring in the fermentation by tea fungus. *Korean J Life Science* 6: 56-65.
32. Choi MA, Kim JO, Choi KH. 1996. Effects of saccharides and incubation temperature on pH and total acidity of fermented black tea with tea fungus. *Korean J Food Sci Technol* 28: 405-410.

(2008년 7월 1일 접수; 2008년 8월 7일 채택)