

양파즙을 사용한 알코올 음료의 개발

김삼웅 · 오은혜 · 전흥기*

부산대학교 생명과학부 미생물학과

Received May 15, 2008 / Accepted July 21, 2008

Development of an Alcoholic Drink Using Onion Extract. Sam Woong, Kim, Eun-Hye, Oh and Hong-Ki, Jun*. *Division of Biological Science, Pusan National University, Busan 609-735, Korea* - This study was carried out to develop an alcoholic drink by fermentation of onion extract using *Saccharomyces cerevisiae*. The optimal conditions for ethanol production were obtained by standing culture at 25°C for 5 days with 5% inoculum volume. At the results by flask culture, the growth curve of used *S. cerevisiae* reached to the stationary phase at 48 hr and the death phase at 90 hr, whereas ethanol production reached maximum at 114 hr. Under the above conditions, a large scale production was carried out. A standing culture in 5 l fermenter showed the similar results to its flask culture, but progressed 24 hr rapidly more than that of the flask culture. A fed-batch culture was performed by addition of the onionic medium supplemented with 10% (v/v) sucrose after 72 hr from the fermenting start. The fed-batch culture could prevent *S. cerevisiae* from entering into the death phase and maintain constant level of alcohol production. A continuous culture was able to carry out by adding per every 24 hr the onionic medium supplemented with 10% (v/v) sucrose after 72 hr from the fermenting start. Although *S. cerevisiae* used showed a little decreased growth, alcohol production maintained roughly the constant level at the maximum yield. To enhance the quality of this alcoholic drink, 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G) was supplemented into the onion extract of the substrate for fermentation. As resulted at this study, this alcoholic drink containing AA-2G should be used as a functional fermented alcohol drink strengthened with vitamin C.

Key words : Onion, onionic drink, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, activated carbon, 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid

서 론

양파의 원산지는 이란, 파키스탄, 지중해 부근 등으로 알려져 있으나 조선(朝鮮)시대 말엽에 미국과 일본으로부터 우리나라로 도입된 것으로 추정된다. 양파 품종은 밀이 굵어지는데 필요한 일조 시간의 길이에 따라서 조만생이 결정되며, 주요 품종으로는 용인화, 천주황, 대왕황 등이 있고, 특히 천주황은 저장성이 뛰어나고 재배가 용이하다[16].

효모는 발효능을 가진 단세포로서 출아법으로 증식하고 자낭 포자를 형성하는 것으로 인식되어 왔다. 그러나 분리된 많은 효모들 중에는 발효능이 없는 것, 출아 대신 분열 혹은 출아와 분열의 혼합 방법으로 증식하는 것, 자낭 포자가 아닌 담자 포자를 형성하거나 포자 형성이 관찰되지 않은 것 등 다양한 그룹의 효모가 존재한다. 일반적으로 효모는 다른 미생물과 동일하게 성장에 있어서 탄소원과 에너지원, 무기 및 유기 질소원, 각종 미네랄 및 비타민을 필요로 한다. 효모를 배양하기 위해 사용되는 배지로는 malt extract와 beer wort가 가장 오래 전부터 사용되어 왔는데, 이는 diastatic

malt를 효소적으로 분해하여 starch와 단백질을 발효성 당 및 peptide, 아미노산으로 분해한 것이다. 효모는 3탄당까지는 쉽게 발효할 수 있으나 inulin, starch와 같은 다당류는 쉽게 발효하지 못하며 혐기적 상태나 fermentative pathway를 이용하는 경우에는 5탄당을 이용하지 못한다.

인간이나 동물의 생체 내에서 필수 영양소로 작용하는 비타민 C라 불리는 L-ascorbic acid (AA)는 영양소 외에도 의약품, 건강 보조 식품, 화장품, 식품 첨가제, 보존제 등의 다양한 용도로 널리 사용되고 있다. 현재까지 비교적 안정한 안정형 AA 유도체로 알려져서 연구가 진행된 것은 L-ascorbic acid 2-O-phosphate (AA-2P) [4,11,12], L-ascorbic acid 2-O-sulfate (AA-2S) [3], 2-O-octadecyl-ascorbic acid (CV-3611) 및 L-ascorbic acid 2-methylester (AA-2M) [9]가 있다. 그러나 이것들도 열이라든지 수용액 중에서의 안정성을 포함한 물리·화학적 성질, 생체 적용시의 안전성, 공업적 생산 단계 및 생리 활성 등에 있어서 문제점을 해결한 유도체라고는 말할 수 없다. 이러한 문제점 해결을 위해 많은 노력을 기울인 결과, 마침내 1990년 일본의 Yamamoto 등이 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G)라고 하는 신규 유도체를 발견하였다. 이 물질은 AA의 2번 위치의 수산기가 glucose 1분자로 α 치환된 것으로 열 및 산화와 같은 radical 반응을 받기 어려운 구조이어서 산화 및 수용액 중에서 안정하다[10,14,20].

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2270, Fax : +82-51-514-1778

E-mail : hkjun@pusan.ac.kr

양파는 우리나라 전역에 걸쳐 생산되고 있으며, 특히 무안 지역이 우리나라 양파 재배의 20%를 차지하고 있고, 그 다음 주산지인 창녕이며 매년 생산이 증가하는 추세에 있다[5]. 연평균 12만 톤 정도의 양파가 생산되고 있으나, 그 중 대부분이 노지(露地)에서 생 양파로 저렴한 가격으로 판매되고 실제로 가공되어 판매되고 있는 양은 미미한 편이다. 더욱이 양파는 앞에서 언급한 것과 같이 많은 장점을 가지고 있지만 수확량 증감의 폭이 크고 저장성이 낮아서 국내 수요량 이상 초과하여 대량으로 생산되면 그 처리 문제가 주기적으로 대두되어 재배 농가에 큰 타격을 주는 단점이 있다. 따라서 양파는 산지 가공에 의해 저장 효과를 증대시키고 가격을 조절하여 부가 가치를 향상시켜야 하는 필요성이 있다[16].

본 연구에서는 양파를 이용한 알코올 음료를 위한 대량 생산의 기틀을 마련함과 동시에 비타민 C 유도체인 AA-2G를 첨가하여 기능성 발효주로의 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

사용 균주

실험에 사용한 균주는 탁주 생산에 이용되는 시판 중인 효모 *S. cerevisiae*를 구입하여 양파즙 배지에 넣고 30°C에서 순화시킨 후 한 백금이 떠서 0.01 µg/ml의 chloramphenicol (Sigma Co., USA)을 함유한 YM 한천 배지에 도말하여 30°C에서 배양한 후 나타나는 단일 colony들을 1차로 분리하였다. 분리한 colony들을 YM 액체 배지에 접종하여 30°C, 200 rpm에서 배양한 후, 균 생육도와 알코올 발효도가 가장 뛰어난 균주를 2차로 선별하여 실험에 사용하였다.

배지의 조성

효모의 분리용 평판 배지의 구성 성분은 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1.0% glucose, 1.5% agar 이며 모두 일급 시약을 사용하였다. 또한 배양용 액체 배지는 분리용 평판 배지의 성분 중에서 agar를 제외한 것을 사용하였다.

양파배지의 제조

본 실험에 사용한 양파는 경상남도 창녕군에서 생산된 영산 오사리종을 원료로 하여 상부와 하부 뿌리 부분을 제거하고 사용하였다. 양파의 배지는 양파의 냄새를 제거하기 위해 양파를 파쇄한 후 과립형 활성탄(Sigma Co., USA) 10 g을 넣고 30분 동안 처리하고 17.5% sucrose를 보충하고 100°C에서 40분간 증자한 뒤 착즙하여 얻은 액을 배지로 사용하였다.

주모의 제조

알코올 발효를 위한 주모는 100 ml 플라스크에 양파즙을 50 ml을 넣고 활성탄 10 g (20%)를 첨가하여 30분간 처리한

후 sucrose를 17.5% 첨가하고 100°C에서 40분 동안 멸균하여 냉각시켰다. 냉각시킨 양파즙 배지에 30°C, 200 rpm, 24시간 동안 전배양한 효모를 5% 접종한 후 30°C, 200 rpm, 48시간 동안 배양하여 주모로 사용하였다[6,7,17].

발효 산물의 성분 분석

균 생육도는 균 배양액을 10배 희석하여 spectrophotometer (Techne Co., England)로 O.D.₆₆₀에서 흡광도 값을 측정하였다. 양파즙 및 발효액의 pH는 pH meter (Corning Co., USA)로 측정하였다.

초기 양파즙의 당도 및 발효 과정에서의 당도는 당도계 (Atago Co., Japan)를 이용하여 측정하였고 발효 과정에서 발효액의 환원당은 발효가 끝난 발효액을 7,000 rpm, 20분간 원심 분리(Bechman Co., USA)하여 얻은 상등액을 10³배 희석한 후 Somogyi-Nelson 방법[15]을 이용하여 spectrophotometer로 O.D.₅₄₀에서 흡광도 값을 측정하였다.

발효액을 7,000 rpm, 20분간 원심 분리한 후, 상등액을 membrane filter (0.45 µm, Sartorius Co., Australia)로 여과하여 여과액 1 µl를 GC [gas chromatography (Hewlett Packard Co., USA)]로 Table 1과 같은 조건 하에서 loading 하였고 standard (absolute ethanol)의 면적과 비교하여 알코올의 양을 계산하였다[13,19].

양파즙과 발효액 내의 아미노산을 분석하기 위하여 시료를 evaporator (Eyela Co., Japan)를 이용하여 농축한 다음 membrane filter로 여과하여 여과액 20 µl를 아미노산 분석기(Biochrom 20, Pharmacia Co., Sweden)로 Table 2와 같은 조건 하에 loading하여 분석하였다.

대량 생산 조건 검토

플라스크 정치 배양

100 ml 플라스크에 양파즙 배지 50 ml 첨가한 후 상기에서 결정된 최적 조건으로 발효를 시작하여 5일 동안 6시간마다 pH, 균 생육도 및 알코올의 생산량을 측정하였다.

발효조 정치 배양

상기에서 결정된 균 생육 최적 조건에서의 균 생육 특성

Table 1. Operating conditions of GC for alcohol analysis

Items	Conditions
GC Instrument	Hewlett Packard GC 5890
Column	Ino wax 30 mm Column
Carrier Gas	N ₂
Column Temperature	60°C
Detector	FID detector
Injection Temperature	120°C
Detector Temperature	280°C
Injection Volume	1 µl

Table 2. Operating conditions of amino acid analysis

Items	Conditions
Instrument	Biochrom 20 (Pharmacia Co., Sweden)
Column	High Resolution Column Bio 20 PEEK Lithium
Flow rate	Buffer: 20 ml/hr Nihydrin: 20 ml/hr
Pressure	Buffer : 75 bar Ninhydrin : 14 bar
Loading volume	20 µl
Buffer type	1: 0.20 M Lithium citrate pH 2.80 2: 0.30 M Lithium citrate pH 3.00 3: 0.50 M Lithium citrate pH 3.15 4: 0.90 M Lithium citrate pH 3.50 5: 1.65 M Lithium citrate pH 3.55 6: 0.30 M Lithium hydroxide

과 알코올 생성량 등을 검토하고 나아가 유가 배양에 필요한 기초 자료를 확립하기 위하여 5 l 용량의 발효조(Korea Fermenter Co., Korea)에 양과즙 배지 3 l을 첨가한 후 플라스크 배양과 같은 조건 하에 발효를 시작하여 5일 동안 6시간마다 pH, 균 생육도 및 알코올의 생성량을 측정하였다.

정지 유가 배양

발효조 정지 배양의 자료를 토대로 탄소원 부족에 의한 균체 생육과 알코올 생산의 저하를 막고 연속 배양으로의 가능성을 모색하기 위하여 일정한 시간, 즉 균 생육도가 대수 증식기에 있고 알코올 생성이 최고에 이를 때 10% sucrose가 첨가된 양과즙 배지 100 ml을 첨가하여 pH, 균 생육도 및 알코올 생성량을 측정하였다. 이 때 pH는 조절하지 않았다.

정지 연속 배양

72시간이 되는 때부터 24시간 간격으로 10% sucrose가 첨가된 양과즙 배지 100 ml을 첨가하고 배양액을 100 ml 회수함으로써 배양액 부피는 항상 일정하게 유지하여 균체의 재 사용성과 알코올 생성을 측정하였다[1,18].

AA-2G 반응 산물의 첨가에 의한 알코올 발효와 AA-G 확인

본 실험실에서 AA를 AA-2G로 전환하는데 필요한 효소인 CGTase (Cyclodextrin glycosyltransferase)를 생산하는 균을 분리·동정하여 *Paenibacillus* sp. JB-13이라 명명하였다[2]. 1% soluble starch, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 1% Na₂CO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O (pH 7.0)로 구성된 배양 배지 100 ml을 500 ml 플라스크에 넣고 전배양한 *Paenibacillus* sp. JB-13 배양액을 1 ml 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 36시간 배양하였다. 균 배양액을 8,000 rpm에서 10

Table 3. Operating conditions of HPLC for AA-2G analysis

Items	Conditions
Pump	Waters 515
Detector	Waters 2487 (UV 238nm)
Mobile phase	0.1M potassium phosphate phosphoric acid (pH 2.0)
Column	Capcellpak C ₁₈ (Shiseido Co., Japan)
Column temperature	Room temperature
Injection volume	20 µl
Flow rate	0.5 ml/min

분간 원심 분리한 후 상등액을 회수하고 50%의 ammonium sulfate로 침전시켰다. 이를 다시 8,000 rpm에서 40분간 원심 분리하고 침전물을 회수하여 50 mM phosphate buffer (pH 6.5)로 투석한 후 조효소액으로 사용하였다. 이 조효소액을 사용한 AA-2G의 생산의 최적 조건은 이미 Bae [2] 등의 연구에 의해 밝혀졌고 그 조건에 의하여 AA-2G를 생산하였다. 생산된 AA-2G를 양과즙 배지에 대해 10%(v/v)로 첨가하고 발효한 후 발효액의 성분을 측정하였다.

발효가 종료된 후 AA-2G와 비타민 C의 양을 알아보기 위해 발효액을 filtration하여 HPLC로 Table 3와 같은 조건 하에서 standard (AA-2G 표준품)의 면적과 비교하여 AA-2G 양을 계산하였고 비타민 C (AA)도 확인하였다.

결과 및 고찰

플라스크 정지 배양

플라스크를 이용하여 최적 조건[8] 하에서 발효를 시작하여 5일 동안 6시간마다 pH, 균 생육도 및 알코올의 생산량을 측정하였다(Fig. 1). 이 때 알코올 도수는 약 13°였다(Fig. 1). 균의 생육도는 48시간을 정점으로 하여 90시간까지 42시간 동안 일정수준으로 유지된 이후에 급격히 사멸되는 것으로 나타났다. 에탄올의 생성은 균이 대수증식기와 정지기를 보이는 시점에서는 균 생육과 유사한 정도의 에탄올 생성능의 증가를 보였다. 그러나 균이 사멸되는 시점에서는 완만한 증가의 추세를 보이는 데, 이것은 세포내에 존재하는 에탄올이 사멸과 동시에 유출된 것으로 판단된다. 배양액 중에 pH는 초기에 3.7 정도로 감소한 이후에 계속 동일 pH 영역 내에 유지되었다.

발효조 정지 배양

5 l 용량의 발효조에 양과즙 배지 3.0 l를 첨가한 후 플라스크 배양과 같은 조건하에서 발효를 시작하여 5일 동안 6시간마다 pH, 균 생육도 및 알코올의 생성량을 측정하였다. 그 결과 플라스크 배양보다 pH는 약간 빠른 하향 곡선을 나타

내었고 보다 낮은 pH 범위까지(pH 3.2) 저하되는 것으로 나타났다. 균의 생육도는 약 하루 정도 빠른 것을 알 수 있었으며 발효를 시작한 지 102시간이 되었을 때 가장 많은 양의 알코올을 생성하였다(15%; Fig. 2A). 이 수치는 플라스크 배양에 비해 2° 정도 높은 결과였다.

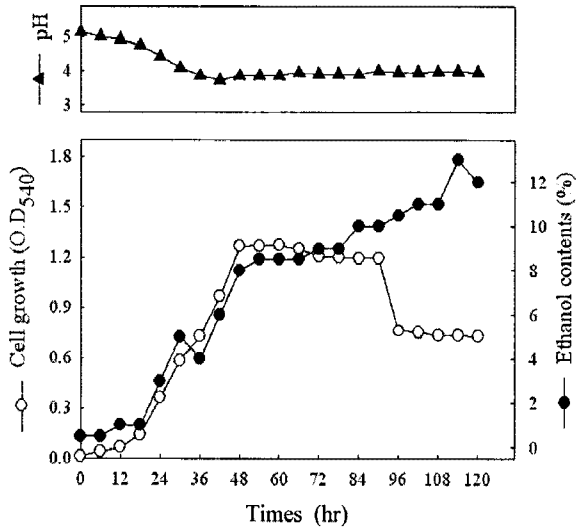


Fig. 1. Time courses of cell growth, alcohol production and pH on the flask with optimum conditions. The upper panel indicates changes of pH value during cell growth. The lower panel marks changes of cell growth and ethanol contents.

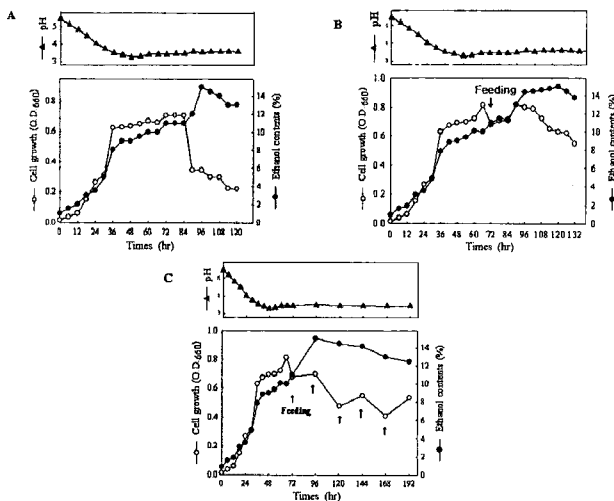


Fig. 2. Results of different fermentation methods. Time courses of cell growth, alcohol production and pH on the jar fermenter (A), time courses of cell growth, alcohol production and pH on the jar fermenter with feeding fed-batch culture (B), and time courses of cell growth, alcohol production and pH through the continuous ethanol fermentation (C). The upper panels in each Figures indicate changes of pH value during cell growth. The lower panels mark changes of cell growth and ethanol contents.

정치 유가 배양

발효조 정치 배양의 자료를 토대로 탄소원 부족에 의한 균체 생육과 알코올 생산의 저하를 막고 연속 배양으로의 가능성을 모색하기 위하여 배양 시작 후 72시간 때 10% sucrose가 첨가된 양과즙 배지 100 ml을 첨가하여 pH, 균 생육도 및 알코올 생산량을 측정하였다. 이 때 pH는 조절하지 않았다. 그 결과 sucrose를 첨가하지 않았을 때 보다 알코올 도수가 약 1° 높아졌으며 균 생육도도 잠시 감소하다 증가하는 추세를 보여서 균 재사용의 가능성을 시사하였다(Fig. 2B).

정치 연속 배양

정치 유가 배양의 자료에 의하면 균 생육도와 알코올 생성이 발효조 배양 보다 유가 배양일 때가 더 높은 것으로 나타났다. 이것은 곧 연속 배양으로의 적용 가능성을 시사한다. 따라서 72시간 때부터 24시간 간격으로 10% sucrose 첨가한 양과즙 배지 100 ml을 첨가하고 배양액을 100 ml 회수함으로써 배양액 부피는 항상 일정하게 유지하여 균체의 재사용성과 알코올 생산을 측정하였다. 그 결과 배지를 첨가한 후 24시간이 지나면서 균 생육도가 증가하였고 그 후에 다시 감소하다가 배지를 첨가할 때마다 균 생육도가 증가하는 양상을 보였다. 또한 알코올 도수는 시간이 지날수록 약간 감소하였지만 13°로 일정하게 유지됨을 알 수 있었다 (Fig. 2C). 따라서 연속 배양은 10일 이상 지속되는 발효에 의해 더 많은 양의 발효주를 얻을 수 있음과 동시에 효모의 재사용에 의한 경제성이 있는 것으로 판단되었다. 뿐만 아니라 산업적으로 응용할 경우 배양 5일 후 새로운 발효를 시작하여 발효 시간을 연장시키지 않고 바로 새로운 배지를 첨가하여 발효액으로부터 알코올을 계속해서 연속적으로 얻을 수 있으므로 경쟁력 있는 발효주가 될 수 있을 것이라 생각된다.

기능성 발효주의 생산

양과즙을 이용한 알코올 음료를 개발하기 위하여 이전의 연구에서 알코올 생성의 최적 조건을 정하였다[8]. 또한 양과의 자극적인 냄새를 제거하기 위하여 여러 가지 방법을 수행한 결과 냄새를 제거할 수 있었다[8].

양과 내에는 다양한 종류의 아미노산이 들어 있다. 특히 본 실험에 사용한 양과즙 내에는 aspartic acid, glutamic acid, ornithine, threonine, lysine 등의 아미노산이 많이 들어 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 3A).

양과즙을 발효 기질로 하여 알코올 발효를 한 후 그 발효액 내에 존재하는 아미노산을 분석하였다. 그 결과 발효 전보다 대부분의 아미노산이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3B). 이것은 효모의 성장에 아미노산이 영양 성분을 사용되었기 때문이라고 사료된다. 발효주에 비타민 C를 강화하기 위해 양과즙 배지에 AA-2G 산물을 sucrose와 함께 첨가하여 발효하였다. 양과즙 배지 50 ml에 sucrose를 17.5% 첨가하고

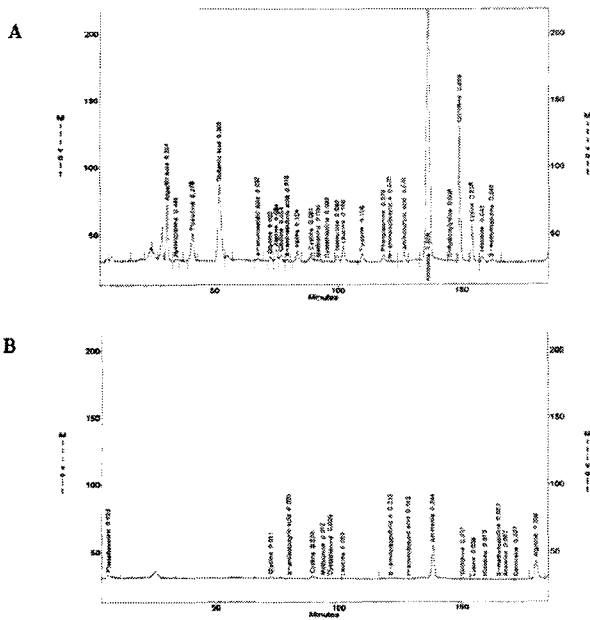


Fig. 3. Amino acid analyses by GC. Amino acid analysis of the onionic extract (A) and amino acid analysis of residues in the onionic drink after fermentation (B). X-axes indicate retention time for GC.

AA-2G 산물을 5 ml 첨가하여 발효한 후 확인한 결과 AA와 AA-2G가 손실되지 않고 남아 있었다(Fig. 4B). 양파즙 배지에 AA-2G를 첨가하여 발효한 경우는 AA-2G를 첨가하지 않고 발효한 것에 비하여 aspartic acid, glutamic acid, alanine 등의 아미노산이 상대적으로 많이 잔존하는 것으로 나타났다(Fig. 4C). AA-2G 산물을 첨가하였을 때 첨가하지 않았을 때보다 알코올 생산량이 약 1° 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

이상에서 양파즙을 이용한 알코올 음료의 개발을 위하여 여러 가지 가능성을 살펴보았다. 알코올 외에도 양파는 다양한 종류의 제품으로 개발될 수 있다. 시중에 나와 있는 양파 주스, 양파 식초가 그 대표적인 예이다. 그래서 본 실험실에서는 상기 실험을 통하여 결정한 최적 조건으로 알코올 발효를 수행하여 양파즙에 AA-2G를 첨가하여 기능성 알코올 음료를 생산하는 것이 가능하였다. 현재는 기능성 양파 식초를 개발하기 위해 알코올 발효가 끝난 발효액에 초산균을 접종하여 초산 발효를 수행하고 있다.

요 약

양파는 우리 식생활에서 자주 사용되는 식품 재료로서 그 재배 방법이 용이하여 전국 각지에서 많이 생산되고 있다. 양파 내에는 glutamic acid, arginine 등 다양한 종류의 아미노산이 들어 있어서 그 효능을 증가시킨다. 본 연구에서는 이러한 장점을 가지고 있는 양파의 수요 확대 및 국민 건강 증진을 위하여 양파즙을 기질로 하여 알코올 발효 조건을 검

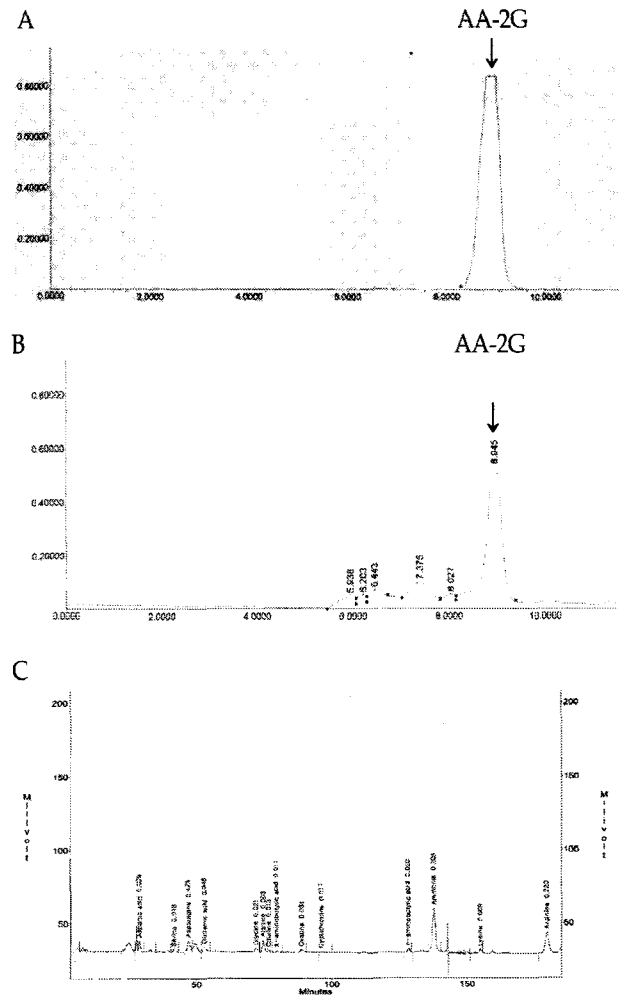


Fig. 4. Analyses of AA-2G by HPLC chromatograms and amino acids from onionic drink. A: AA-2G standard; B: onionic drink supplemented with AA-2G; C: amino acid analyses of onionic drink supplemented with AA-2G. X-axes indicates retention time for HPLC and GC.

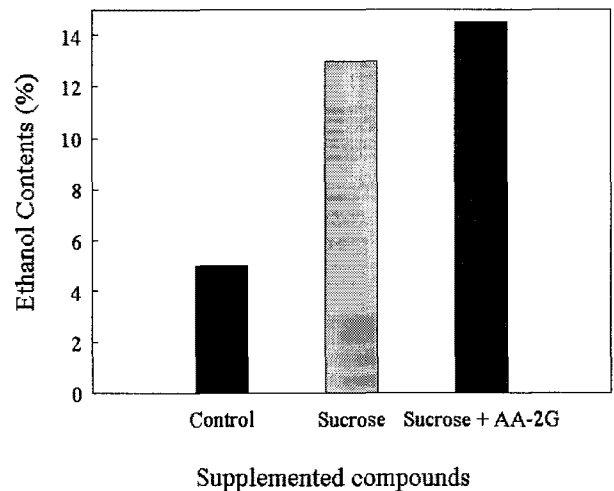


Fig. 5. Effect of AA-2 supplement on alcohol production. X-axis indicates added compounds and Y-axis marks ethanol contents.

토하고 나아가 발효주의 품질을 개선하여 산업화를 위한 발판을 마련하고자 하였다. 플라스크 배양 결과, 48시간 경에 정지기로 접어들었고, 90시간 이후에 사멸기로 나타났다. 에탄올 생성은 114시간에서 정점을 보였다. 플라스크 배양의 최적 조건을 토대로 하여 유가 배양, 연속 배양 등 발효조 배양을 행하였다. 발효조 정치배양은 플라스크 배양과 유사한 결과를 보였지만, 약 24시간 정도 빠르게 진행되었다. 유가배양은 배양 시작 후 72시간 때 10% sucrose가 첨가된 양파즙 배지를 첨가하여 실시되었고, 균의 사멸을 방지하고 알코올의 일정농도를 유지하게 했다. 연속배양은 배양 시작 후 72시간 때부터 24시간 간격으로 연속적으로 신선한 배지를 균 생육이 유지되게 하였다. 그 결과 균 생육은 다소 감소하였지만, 일정농도의 알코올 생성은 가능한 것으로 나타났다. 또한 생체 내에서 항괴혈병 작용, 면역 촉진 작용 등의 생리 활성을 나타내는 비타민 C (L-ascorbic acid)의 유도체인 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G)를 양파즙 배지에 첨가하여 알코올 발효의 특성을 분석하여 발효주의 비타민 C를 강화하고 면역 증강을 촉진시키는 기능성 발효주로의 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RT105-03-02) 지원으로 수행하였음.

References

1. Akihiko, S., N. Yoshifumi, S. Hidenao and S. Mikio. 2000. Ethanol production by repeated batch culture using yeast cells immobilized within porous cellulose carriers. *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 526-529.
2. Bae, K. M., S. K. Kim, I. S. Kong and H. K. Jun. 2001. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase synthesizing 2-O- α -glucopyranosyl L-ascorbic acid from *Paenibacillus* sp. JB-13. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 242-250.
3. Baker, E. M., D. C. Hammer, S. C. March, B. M. Tolbert and J. E. Canham. 1971. Ascorbate sulfate a urinary metabolite of ascorbic acid in man. *Science* **173**, 826-827.
4. Cinatl, J. 1995. *In vitro* inhibition of human cytomegalovirus replication in human foreskin fibroblasts and endothelial cells by ascorbic acid 2-phosphate. *Antiviral. Res.* **27**, 405-418.
5. Jeong, H. B. 1997. Eat to know onion. Donga A Entertainment.
6. Jeong, Y. J. 1996. Optimization of preparation method of Perisimon vinegar by analysis of reaction surface. Young Nam University Ph.D. thesis.
7. Kim, J. H., S. H. Lee, N. M. Kim, S. Y. Choi, J. Y. Yoo and J. S. Lee. 2000. Manufacture and physiological functionality of Korean traditional liquor by using Dandelion (*Taraxacum platycarpum*). *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 367-371.
8. Kim, S. W., E. H. Oh and H. K. Jun 2008. Analysis of optimum condition for alcoholic drink production using onion extract. *Journal of Life Science* **18**, 871-877.
9. Lu, P. W., Jr. D. W. Lillard, P. A. Seib, K. J. Kramer and Y. T. Liang. 1984. Synthesis of the 2-methylether of L-ascorbic acid : stability, vitamin activity, and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum compared to those of the 1- and 3-methyl ethers. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 21-28.
10. Mandai, T., M. Yoneyama, S. Sakai, N. Muto and I. Yamamoto. 1992. The crystal structure and physicochemical properties of L-ascorbic acid 2-glucoside. *Carbohydr. Res.* **232**, 197-205.
11. Mead, C. G. and F. J. Finamore. 1996. The occurrence of ascorbic acid sulfate in brine shrimp, *Artemia salina*, *Biochemistry* **8**, 2652-2655.
12. Mima, H., H. Nomura, Y. Imai and H. Takashima. 1970. Chemistry and application of ascorbic acid phosphate. *Vitamin* **41**, 387-398.
13. Min, K. H., H. D. Kim and B. K. Hur. 1995. Effect of initial condition on the characteristics of ethanol fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 479-484.
14. Muto, N., T. Nakamura and I. Yamamoto. 1990. Enzymatic formation of a non-reducing L-ascorbic acid α -glucoside: purification and properties of α -glucosidase catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine. *J. Biochem.* **107**, 222-227.
15. Nelson, N. 1950. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **166**, 444-452.
16. Oh, Y. J. 1998. Study about fermentation condition using onionic extract. *Journal of Donsin University* **9**, 197-205.
17. Seo, J. H., G. D. Lee and Y. J. Jeong. 2001. Optimization of the vinegar fermentation using concentrated apple juice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 460-465.
18. Shin, J. H. and E. H. Choi. 1995. Continuous ethanol fermentation by immobilized *Kluyveromyces marxianus* F043 using jerusalem artichoke powder. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 346-351.
19. Shin, K. R., B. C. Kim, J. Y. Yang and Y. D. Kim. 1999. Characterization of Yakju prepared with yeasts from fruits. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 801-804.
20. Yamamoto, I., N. Muto, K. Murakami, S. Suga and H. Yamaguchi. 1990. L-ascorbic acid α -glucoside formed by regioselective transglycosylation with rat intestinal and rice seed α -glucosidase: Its improved stability and structure determination. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 3020-3027.