

Fermentation of Black Garlic Wine and its Characteristics

Sung Min Ha¹, Hye Jung Choi¹, Gyeong Yeon Shin¹, Beung Ho Ryu² and Woo Hong Joo^{1*}

¹Department of Biology and Chemistry, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

²Namhaebomulsum Garlic co., Namhae 52340, Korea

Received April 21, 2016 / Revised May 12, 2016 / Accepted May 13, 2016

In the present study, we screened suitable yeasts for wine fermentation and evaluated the fermentative characteristics of *Saccharomyces* sp. BCNU 6006 and its anti-oxidant activities. Firstly, various yeasts were isolated from *Makgeolli*, fruits, and fermented foods. Then, the preliminary selections of suitable yeasts were made using an enzymatic activity assay of glucosidase, glycosidase, protease and tolerance to ethanol and SO₂. In addition, the production of biogenic amines and hydrogen sulfide was also monitored. The 9 yeast strains initially selected were determined to belong to the genera *Saccharomyces* and *Kazachantania* phylogenetically. We investigated the optimal conditions for wine fermented with black garlic juice (BGJ). The optimal conditions of alcohol fermentation using BGJ were 26 brix, 28°C, and 10 days. Finally, the fermentation products of black garlic wine (BGW) fermented with *Saccharomyces* sp. BCNU 6006 exhibited 15.03% ethanol, 12 brix of sugar, and pH 4.01. The contents of total polyphenol, total flavonoid, tannin, and 5-HMF compound of BGW were 3.85 mg/ml, 0.51mg/ml, 5.90 mg/ml, and 0.07 mg/ml respectively, lower than that of BGJ. DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, and reducing power of BGW were 90.77%, 95.20% and 1.261 respectively, lower than that of BGJ. Superoxide anion (O²⁻) radical scavenging activity was 94.42%, higher than that of BGJ. Based on the above results, the industrial potential of *Saccharomyces* sp. BCNU 6006 as a wine-making yeast was confirmed in the present study.

Key words : Antioxidant activities, black garlic, black garlic wine, total flavonoid, total polyphenol

서 론

마늘(*Allium sativum*)은 백합과 식물이며 원산지는 중앙아시아, 중국, 인도, 한국 등 아시아 전역, 이집트, 러시아 및 남유럽에 광범위하게 분포하고 있다. 마늘은 생태형에 따라서 난지형, 한지형이 있으며, 난지형은 가을에 심어 뿌리와 싹이 어느 정도 자라 큰 마늘로 월동하고 봄에는 한지형보다 일찍 수확하며, 한지형은 난지형 마늘과 비슷하나 알이 작고 향이 더 짙다. 한지형 품종으로는 서산, 의성, 삼척의 재래종이 있고 난지형으로는 남해백과 고흥백 등이 있다[11]. 마늘은 탄수화물 20%, 단백질 3.3%, 지방 0.4%, 섬유질 0.92%, 회분 13.4%로 구성되어 있으며 영양학적으로 우수하고 allyl sulfur, diallyl disulfide 및 diallyl trisulfide 등 다양한 황화합물을 포함하여 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* 등에 대한 항균활성과 항산화 활성을

보유하고 있다[5, 8].

마늘은 고온 다습한 환경에서 15일에서 30일정도 숙성을 시키게 되면 자연적인 화학반응인 maillard reaction에 의해 검게 변하여 흑마늘이 된다. 흑마늘은 일반 마늘에 비해 매운맛은 없으며, 신맛과 단맛은 증가되고, 수분함량 감소로 점도가 증가하여 쫄깃한 식감을 가지고 있다. 또한 폴리페놀, 플라보노이드 그리고 함황아미노산인 cysteine과 methionine의 함량이 증가하고 흑마늘의 주요 지표성분인 S-allyl-L-cysteine과 diallyl disulfide의 함량이 일반 마늘에 비해 각각 2배와 50배 증가된다[23]. 이런 성분 때문에 흑마늘 및 흑마늘 제품은 높은 항산화 활성을 가지며, 지질대사 및 혈당 개선, 항암효과가 있는 것으로 보고되고 있다[2, 13, 22].

마늘의 소비는 1970년대에는 1인당 1.5 kg이었지만 1990년에 10 kg까지 증가하였다가 이후부터는 조금씩 감소하여 2007년 7.7 kg을 기록하였다[10]. 이는 과거 마늘을 조미료나 양념 수준에서 소비하던 것이 경제의 발전과 문화 수준의 향상으로 양념의 개념에서 벗어나 기능성 식품으로 인식되었기 때문이다. 마늘의 소비는 대부분 생마늘로 소비하며 가공용은 4%에 불과하며[10], 자유무역협정에 의해 저렴한 중국산 마늘이 대량 수입되어 국내 마늘의 가격경쟁력이 하락됨에 따라 마늘의 고부가 가치 상품개발이 필요하다[10]. 국내에서 고부가가치 상품개발을 위해 과일 및 다양한 재료로 많은 연구가 진행되고 있으며 그 중에서 단감 와인[9], 딸보리수 와인[6], 블루베리

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

와인[23], 수박 와인[18], 참외 와인[5], 파인애플 와인[24]처럼 와인에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 와인은 포도를 발효시켜 만든 알코올성 음료이며 최근에는 과즙을 발효시켜 다양한 와인을 개발하고 있다. 또한 FTA 발효 이후 와인 수입에 대한 세금이 저렴해지고 웰빙문화의 확산으로 고도수의 술보다 저도수의 술에 대한 수요가 증가하면서 와인의 수요도 증가하고 있다. 하지만 국내 와인 소비량의 약 80%는 수입산 와인이므로 품질이 우수한 과실주 개발이 필요한 실정이다 [24].

따라서 본 연구는 흑마늘의 고부가가치 상품을 개발하기 위해 전통 발효식품, 과일 및 막걸리에서 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 분리하여 최적 발효 조건을 탐색하고 흑마늘 와인을 제조하였으며 DPPH radical, ABTS radical, super oxide radical 및 환원력 등을 분석하여 흑마늘 와인의 항산화 활성과 기능성 성분을 조사하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 흑마늘 농축액(62 brix)은 남해보물섬마을영농조합에서 제조한 것으로 4°C 냉장보관하면서 사용하였다.

균주 분리 및 배양 조건

효모 균주 분리를 위해 시판 막걸리, 과일 및 발효 식품을 구매하여 분리원으로 사용하였으며, 각각 시료를 멸균수에 희석하고 PDA 배지에 0.2 ml씩 도말하여 28°C에서 48시간 배양하였다. 배양된 효모는 집락 모양, 크기, 색깔 등 형태적 특징을 관찰하여 효모로 추정되는 균주를 순수 분리하여 사용하였으며, 분리한 균주들은 PDA 배지에 계대보관하며 실험에 이용하였다. 대조균으로 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30068, *S. cerevisiae* KACC 30008, *S. cerevisiae* EC-1118, *S. cerevisiae* K1-V1116, *S. cerevisiae* RED FRUIT, *S. cerevisiae* Fermivin을 농업유전자원정보센터(Korean Agriculture Culture Collection, KACC)와 Wine Kit Korea Co., Ltd.에서 분양받아 사용하였다.

와인 효모 효소 활성 분석

분리 효모의 β -glucosidase 활성은 Rosiet al. [19]의 방법을 따라 esculin 5 g/l(w/v)와 1% ferric ammonium citrate가 2% (v/v)가 첨가된 YPD 배지(yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l, agar 15 g/l)에 접종하고 28°C에서 48시간 배양 후 주변에 검은색 환의 생성 여부로 확인하였다. Glycosidase 활성은 Comitini [7]의 방법을 따라 측정하여, yeast nitrogen base (6.7 g/l, glucose 1 g/l, rutin 2 g/l, agar 20 g/l) 배지를 제조하여 효모를 접종하고 28°C에서 72시간 배양 후

투명환의 생성 유무를 관찰하였으며, protease 활성은 YM 배지(yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, peptone 5 g/l, glucose 10 g/l, agar 15 g/l)에 skim milk 농도가 1% (w/v)가 되도록 첨가하여 제조하고 효모를 접종하여 28°C에서 48시간 배양한 후 투명환의 생성 유무에 따라 평가하였다[1]. Amino acid decarboxylase는 YPD 고체배지에 아미노산 10 g/l (histidine, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, lysine, leucine), bromocresol purple 6 mg/l를 첨가하고 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 5.3으로 조정된 다음 효모를 접종한 후 28°C에서 120시간 배양한 뒤 보라색 환의 형성 여부를 조사함으로써 확인하였다[1].

에탄올, 아황산 내성 및 황화수소 생성능 분석

에탄올 및 아황산 내성 평가는 YPD 고체배지에 각각 농도 별로 조제한 에탄올(5, 10 및 15%) 또는 $K_2S_2O_5$ (50, 150 및 250 ppm)를 첨가한 후 효모를 접종하고 28°C에서 24시간 배양한 뒤 균주의 증식 여부에 따라 내성을 확인하였다[1]. 황화수소는 BIGGY agar 배지(bismuth ammonium citrate 5 g/l, sodium sulfite 3 g/l, glucose 10 g/l, glycine 10 g/l, yeast extract 1 g/l, agar 16 g/l)에 효모를 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 다음 균주의 색깔의 진하기에 따라 황화수소 생성능을 평가하였다[1].

효모의 동정

효모의 리보솜 DNA의 ITS영역을 솔젠트(SolGent Co., Daejeon, Korea)사에 의뢰하여 ITS1/ITS4 primer를 이용하여 증폭분석하였다. 효모의 염기서열 분석 결과는 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank의 BLAST 검색을 이용하여 기존의 등록된 효모의 리보솜 DNA ITS영역 염기서열과 상동성을 비교한 후, Bioedit, MEGA 7를 이용하여 계통학적인 위치를 확인하였다[3].

에탄올 및 당 내성 측정

에탄올 내성 측정은 0, 5, 10 및 15%의 에탄올이 함유된 YPD 액체배지 10 ml에 전 배양한 효모의 배양액을 1% 농도로 접종하고 28°C에서 3일간 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 성장을 조사하였다. 당에 대한 내성 측정은 20, 30 및 40%의 glucose가 함유된 YPD 액체배지에 전배양한 효모를 0.1% 농도로 접종하고 28°C에서 180 rpm으로 24시간 동안 진탕 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 성장을 비교하였다[1].

에탄올 발효능 분석

에탄올 생성량은 전배양한 효모를 25%의 glucose가 함유된 YPD 액체배지 100 ml에 0.1%농도로 접종하고 28°C에서 48시간 동안 정지 배양한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고

상등액을 회수하여 생성된 에탄올 함량을 측정하였다. 에탄올 함량 측정은 dichromate method [4]에 따라 3 ml의 dichromate reagent (0.1 M potassium dichromate, 5 M sulfuric acid)를 비커에 넣고 0.3 ml의 sample이 담긴 튜브를 비커에 실로 고정하고 뒤 입구를 parafilm으로 봉하고 30분간 실온에서 반응시킨 뒤 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

흑마늘 와인 제조

남해보물섬마늘영농조합법인에서 제조한 흑마늘 농축액(62 brix)을 이용하여 발효하였다. 흑마늘 농축액을 희석하고 설탕(Samyang, Seoul, Korea)을 첨가하여 당도를 조절한 후에 산화 방지와 잡균 오염을 예방하기 위해 K₂S₂O₅를 200 ppm 첨가하여 흑마늘 와인 제조용으로 이용하였다. *Saccharomyces* sp. BCNU 6006을 발효 효모로 발효하였다.

최적 발효 조건 탐색

흑마늘 와인 제조 시 초기 당 함량이 와인 발효에 미치는 영향을 조사하기 위하여 흑마늘 농축액에 24, 26, 28 brix로 보당하고 25, 30 및 35°C에서 각각 발효를 진행하면서 2일 간격으로 ethanol 농도 및 당도를 측정하여 최적 발효 조건을

탐색하였다.

이화학 성분 분석

총 polyphenol 함량 측정은 folin-ciocalteu법에 따라 3.9 ml의 증류수에 0.1 ml의 시료와 0.5 ml의 1 N folin-ciocalteu용액을 넣고 5분 동안 실온에 반응시킨 뒤 0.5 ml의 34% Na₂CO₃를 넣고 30분 동안 실온에서 정치시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다[20]. 총 flavonoid 함량은 4 ml의 증류수에 1 ml 시료를 넣고 5분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 0.3 ml의 5% NaNO₂과 0.3 ml의 10% AlCl₃를 넣고 6분 동안 실온에서 정치시킨 후 2 ml 1 M NaOH와 2.4 ml의 증류수를 넣고 510 nm에서 흡광도를 측정하였다[20]. Tannin함량은 folin-ciocalteu의 방법에 따라 동량의 시료, 95% ethanol 및 증류수를 혼합하고 1 ml의 5% Na₂CO₃와 0.5 ml의 1 N folin-ciocalteu 을 첨가하여 실온에서 60분간 반응시키고 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 5-hydroxymethylfurfural 함량은 Ningyang의 방법에 따라 2개의 튜브에 2 ml의 시료와 5 ml의 0.6% 4-methylaniline 을 혼합한 뒤, 각각 1 ml의 0.5% barbituric acid와 증류수를 첨가한 뒤 즉시 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[15]. pH는 pH meter (Ion meter, Orion 520A)를 이용하여 측정하였

Table 1. Enzyme activity, tolerance and H₂S production of yeasts isolated from *Makgeolli*, fruits and fermented foods

	BCNU 6001	BCNU 6002	BCNU 6003	BCNU 6004	BCNU 6005	BCNU 6006	BCNU 6007	BCNU 6008	BCNU 6009	<i>S.cerevisia</i> Fermivin
Enzyme activity of										
β-Glucosidase	4 ¹⁾	4.25	3	5	4	3	3	2.5	2.5	2
Protease	- ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amino acid decarboxylase										
Try ³⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolerance										
5% ethanol	+ ⁴⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% ethanol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
15% ethanol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
10mg/ml SO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20mg/ml SO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40mg/ml SO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60mg/ml SO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production of H ₂ S	+ ⁵⁾	++	++	++	-	+	++	+++	+++	+

¹⁾β-Glucosidase: fluorescence zone (mm)

²⁾+: positive,-: negative

³⁾Tyr: Tyrosine, Lys: lysine, Leu: Leucine, Phe: Phenylalanine, Trp: Tryptophan, His: Histidine

⁴⁾+: growth -: no growth

⁵⁾H₂S production: -, no color; +++: strong brown

고, 당도는 굴절당도계(RHB-55ATC, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다[15].

흑마늘 진액 및 와인의 항산화 활성 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성은 0.2 ml의 농도별로 희석한 시료에 0.8 ml의 0.2 mM DPPH 용액을 혼합하여 37°C에서 30분간 암소에서 반응시킨 뒤 517 nm에서 흡광도를 측정하였다[21]. 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 라디칼 소거활성은 7.2 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합한 후 4°C에서 12시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 1.10±0.02가 되도록 증류수로 희석하였다. 0.15 ml의 시료에 2.85 ml의 ABTS 용액을 혼합하여 암소에서 2시간 동안 반응시킨 후 흡광도 값을 측정하였다[21]. Superoxide anion (O₂⁻) 라디칼 소거능은 0.7 ml의 시료에 0.1 ml의 1 mM β-NADP, 0.1 ml의 1 mM NBT, 0.1 ml의 120 μM phenazine methosulphate를 혼합한 뒤 상온에서 10분간 반응시키고 0.04 ml의 10 M HCl을 가하여 반응을 종결시키고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다[14]. 환원력은 1 ml의 시료에 2.5 ml의 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6)와 2.5 ml의 1% potassium ferricyanide 를 혼합하고 50°C에서 20분간 반응시키고, 반응액에 2.5 ml의 10% trichloroacetic acid 첨가하여 반응을 종료시킨 뒤, 3,000 g에서 5분간 원심분리하고 동량의 상등액과 증류수에 0.5 ml의 0.1% FeCl₃를 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다[17].

결과 및 고찰

와인효모 효소 활성 분석

β-glucosidase와 glycosidase 활성은 배지에 있는 mono-glucoside나 disaccharide glycoside를 분해하여 monoterpenols을 생성하여 와인의 풍미를 향상시켜 주며[16], 바이오제닉아민은 미생물의 amino acid decarboxylation에 의해 생성되고 와인, 간장 및 발효식품에서 독소물질로 발견되며 다양한 질병을 유발시킨다[1]. 막걸리, 과일 및 발효식품에서 분리한 균주는 형태학적 특징을 통해 81개의 효모를 선별하였고, β-glucosidase 및 protease 활성을 가진 균주가 각각 51 균주와 10 균주가 확인되었고, glycosidase 활성을 보유하고 있는 효모는 없는 것으로 조사되었다.

Amino acid decarboxylase 활성을 tyrosine, lysine, phenylalanine 및 histidine 등 기질별로 조사한 결과, 활성을 모두 보유하지 않은 효모는 총 60균주로 확인되었다. 따라서, 높은 효소활성을 보유하고 amino decarboxylase 활성을 가지지 않는 9균주를 최종 선별하여 BCNU 6001-6009로 명명하였다 (Table 1).

와인은 일반적으로 SO₂을 첨가하여 발효를 시작하며, 발효가 완료된 와인은 보통 9-14%의 에탄올 함량을 가지기 때문에 SO₂와 에탄올에 대한 내성이 필요하다[1, 9]. 대부분의 분리 효모는 10% 이상의 ethanol 내성과 60 mg/ml SO₂에 대한 내성을 보유하는 것으로 나타났으며, BCNU 6006, BCNU 6007, BCNU 6008, BCNU 6009 효모는 시판 효모인 *S. cerevisiae* Fermivin와 유사한 ethanol 내성을 보유하는 것을 확인되어 와인이나 주류 제조에 사용이 가능할 것으로 사료된다

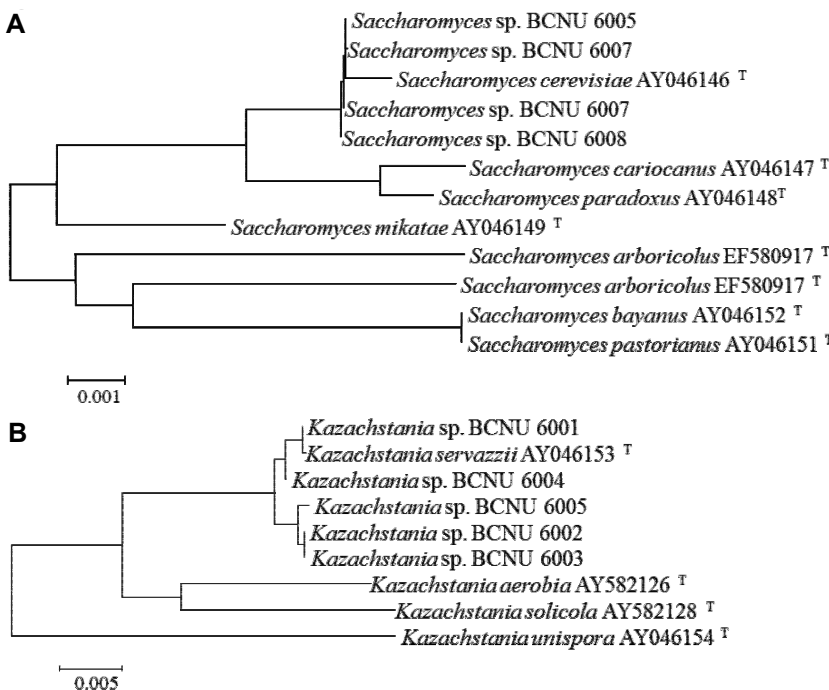


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 18S rRNA sequence of the selected 9 yeast strains isolated from Korean fermented food and *Makgulli*. Bootstrap values expressed as a percentage of 1,000 replications were given at the branching points. The scale bar represents 1% sequence dissimilarity. T exhibits type strain, A) phylogenetic tree of *Saccharomyces* sp., B) phylogenetic tree of *Kazachstania* sp.

(Table 1.).

분리 효모의 동정

선별된 효모 9균주의 ITS1/ITS4 primer를 이용하여 리보솜 DNA의 ITS영역의 염기서열을 분석한 결과, BCNU 6001, BCNU 6002, BCNU 6003, BCNU 6004, BCNU 6005는 *Kazachstania sevazzii* 표준균주와 99% 상동성을 보였으며, BCNU 6006, BCNU 6007, BCNU 6008, BCNU 6009는 *Saccharomyces cerevisiae* 표준균주와 99% 상동성을 나타냈으며, 계통적으로도 *K. sevazzii* 또는 *S. cerevisiae*의 subcluster에 속하는 균주로 확인되었다(Fig. 1).

에탄올 및 당 내성 측정

일반적인 와인의 에탄올 농도는 9-14%이며, 알코올 발효성 음료 제조에 사용되는 효모는 높은 에탄올 내성을 보유하는 것이 필요하다[9]. 선별된 9균주와 시판 효모를 이용하여 에탄올 내성을 측정된 결과, 5% 에탄올을 첨가한 액체배지에서 모두 생육이 양호했으며, 10% 에탄올을 첨가한 액체배지에서

Kazachstania sp. BCNU 6001-6005를 제외한 나머지 효모의 생육이 양호한 것으로 확인되었다. 15% 에탄올을 첨가한 액체배지에서는 모두 생육이 저조한 것으로 나타났다(Fig. 2). 이 결과는 기존에 연구된 *Saccharomyces* sp. 균주는 10% 에탄올 농도에 양호한 생육을 보이고, non-*Saccharomyces* sp. 균주는 5% 에탄올 농도에서 양호한 생육을 나타내는 것과 유사한 결과임이 확인되었다[1].

와인 제조에 사용되는 효모는 고농도의 당에서 생육하면서 발효를 진행할 수 있어야 하기 때문에 높은 당 농도에 대한 내성이 필요하다. 효모 10균주를 대상으로 glucose가 20, 30 및 40%로 첨가된 액체배지에서 생육을 비교한 결과 시판 효모인 *S. cerevisiae* Fermivin이 가장 높은 생육을 나타냈으며, BCNU 6003, BCNU 6009를 제외하고 glucose 30%가 첨가된 액체배지에서 생육이 양호한 것으로 보아 내당성이 우수하므로, 와인 제조에 사용 가능성이 충분한 것으로 판단된다(Fig. 3).

에탄올 생성능 측정

내당성 및 내알콜성이 우수한 효모 3 균주를 선별하여 에탄

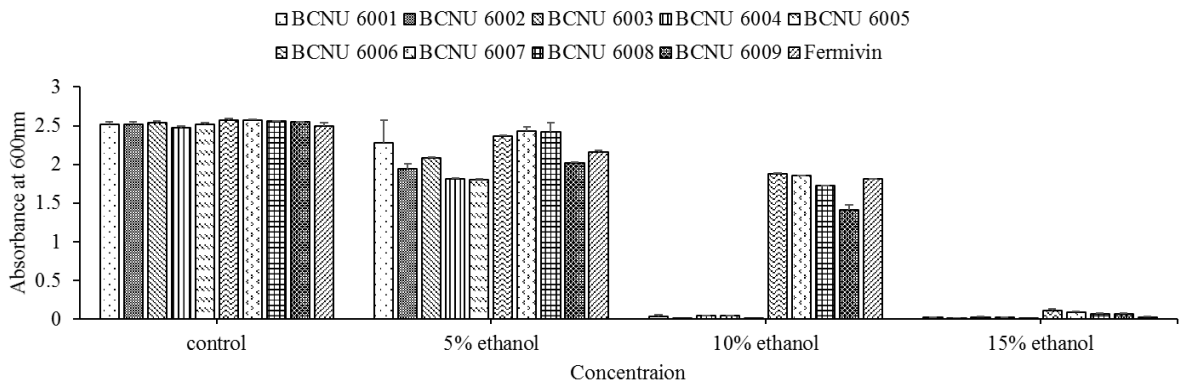


Fig. 2. The growth of selected strains at various ethanol concentrations. Selected yeast strains were pre-cultured at 28°C for 24 hr. Pre-culture were inoculated into YPD medium at various ethanol concentrations and were incubated at 28°C for 72 hr. Each growth was determined by optical density at 600 nm.

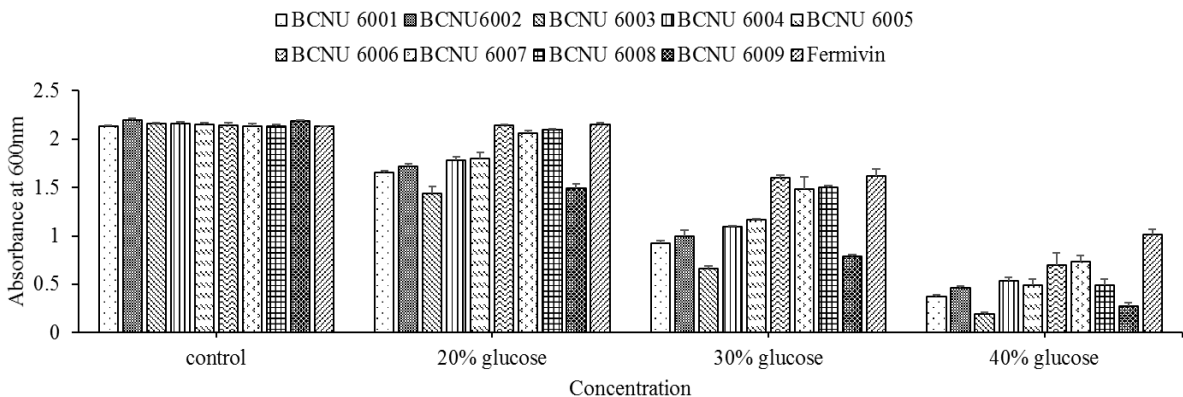


Fig. 3. The growth of selected strains at various glucose concentrations. Selected yeast strains were pre-cultured at 28°C for 24 hr. Pre-culture were inoculated YPD medium at various glucose concentrations and were incubated at 28°C for 72 hr. Each growth was determined by optical density at 600 nm.

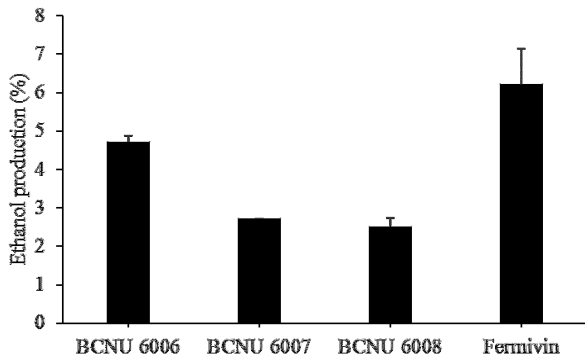


Fig. 4. Ethanol production by selected wild type yeast strains and commercial yeast. *Saccharomyces* sp. BCNU 6006-6008 and Fermivin were pre-cultured at 28°C for 24 hr. Pre-culture were inoculated into YPD medium with 25% glucose concentration and culture condition was 48 hr at 28°C. Ethanol concentration was measured using the dichromate method.

을 발효능을 확인한 결과, *Saccharomyces* sp. BCNU 6006, *Saccharomyces* sp. BCNU 6007 그리고 *Saccharomyces* sp. BCNU 6008 균주는 각각 4.7, 2.7 그리고 2.5%로 나타났으며,

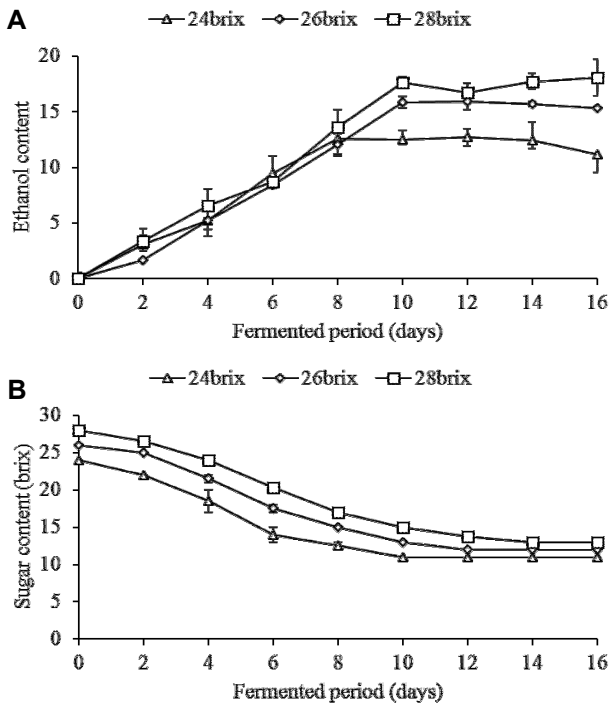


Fig. 5. Change in ethanol and sugar contents in Black garlic wine according to initial sugar contents during Alcohol fermentation. A: Ethanol contents according to the period, B: Sugar contents according to the period. *Saccharomyces* sp. BCNU 6006 was pre-culture at 28°C for 72 hr. Pre-cultured yeast was inoculated into black garlic juice at various sugar contents. Ethanol contents were measured using Dichromate method, brix was measured using a saccharimeter.

시판 효모인 *S. cerevisiae* Fermivin는 6.2%로 확인되었다. 따라서 에탄올 발효능이 가장 높은 *Saccharomyces* sp. BCNU 6006 을 와인 발효 균주로 최종 선별하였다(Fig. 4).

흑마늘 와인 발효 조건 탐색

와인은 에탄올 농도가 12% 이하가 되면 쉽게 부패하는 경향이 있으며 높은 당 농도의 경우 효모가 증식하지 못하기 때문에 적절한 당 농도가 필요하다[9]. 그래서 흑마늘 진액에 설탕으로 24, 26, 28 brix로 보당한 후 28°C에서 알코올 생성량을 살펴본 결과, 당 함량을 높일수록 에탄올 농도가 높아지는 것을 확인할 수 있었으며, 각각 11.12, 15.3 및 18.03%로 나타났다. 알코올 생산량을 고려할 때 26 brix가 적합한 것으로 판단된다(Fig. 5). 수박 와인[18], 딸보리수 와인[6], 단감 와인[9]는 24 brix에서 와인 발효가 적합하다고 보고하고 있으며, 와인 제조 시 당 농도가 26 brix 이상이면 삼투압 작용에 의해 발효가 저해 받는다고 보고하고 있으나, 본 연구에 사용된 효모는 높은 당 농도에 내성을 가지기 때문에 높은 당 농도에도 원활한 발효를 하는 것으로 판단된다[9].

발효 온도가 흑마늘 와인 발효에 미치는 영향을 살펴본 결과, 25, 30 그리고 35°C에서 각각 15.82, 17.92 및 16.64%로 나타

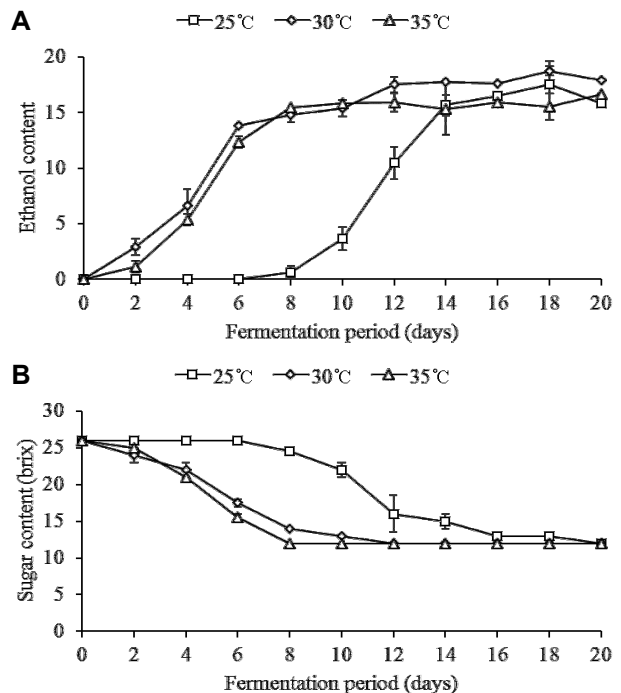


Fig. 6. Change in ethanol and sugar contents in Black garlic wine according to initial temperature during Alcohol fermentation. A: Ethanol contents according to the period, B: Sugar contents according to the period. *Saccharomyces* sp. BCNU 6006 was pre-culture at 28°C for 72 hr. Pre-cultured yeast was inoculated into black garlic juice at various temperatures. Ethanol contents was measured using Dichromate method, brix was measured using a saccharimeter.

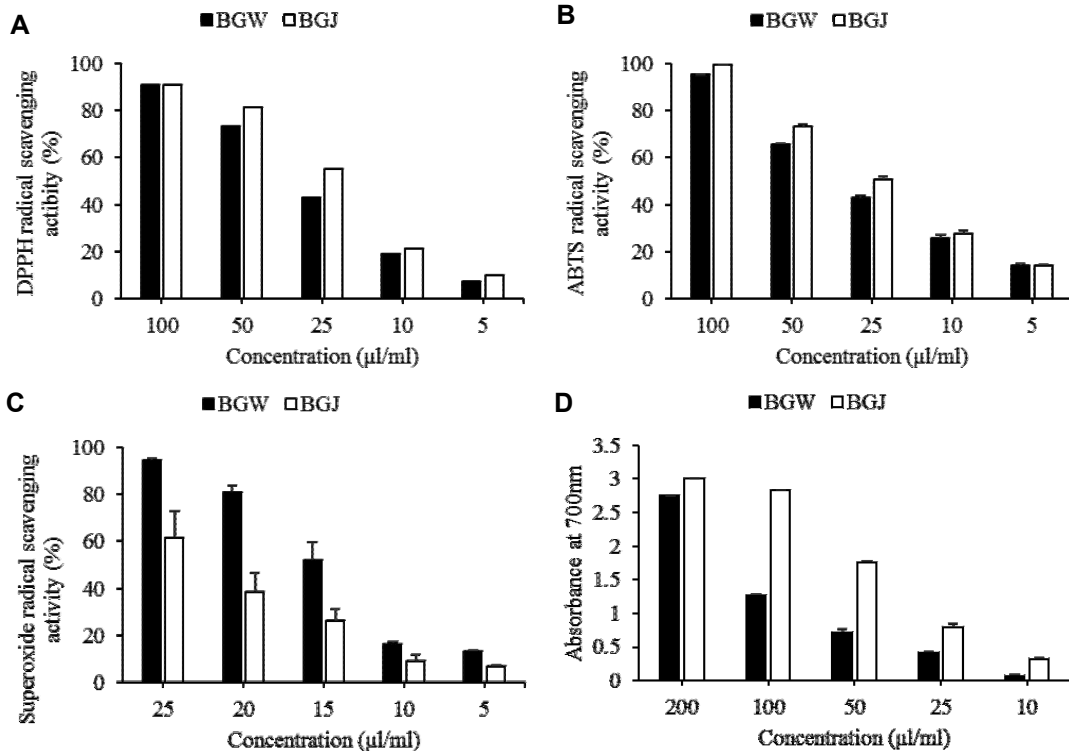


Fig 7. Comparisons of DPPH, ABTS, superoxide radical scavenging activity and reducing power of Black garlic wine and juice at different concentrations. A: DPPH radical scavenging activity, B: ABTS radical activity, C: Superoxide radical scavenging activity, D: Reducing power. BGW : Black garlic wine, BGJ : Black garlic juice. Scavenging activities of DPPH, ABTS, Superoxide radical and reducing power were evaluated in the presence of BGW and BGJ. After BGW and BGJ at various concentrations was reacted with each radical, optical density of each reaction mixture was measured at a 517, 734, 650 and 700 nm.

났으며, 25℃는 8일째부터 발효가 시작되었고 35℃에서는 이상취가 나타났다(Fig. 6). 그래서 알코올 생산량, 발효시간, 관능적인 면을 고려할 때 발효온도는 28℃가 가장 적합한 것으로 판단되었다. 단감 와인 제조 시 높은 온도에서 발효할수록 이상취가 나는 것과 유사한 결과로 나타났으나, 수박 와인[18]과 단감 와인[9]에서 에탄올 생성량, 색도 및 맛을 고려하여 26℃가 최적 조건이라는 보고와는 다소 상이하였다.

흑마늘 진액 및 와인의 이화학 성분 분석

최종적으로 흑마늘와인 제조 시 초기 당도 26 brix, 발효온도 28℃의 최적 조건에서 흑마늘 와인을 제조하였다. 최종 제조된 흑마늘와인과 흑마늘 진액의 일반성분과 기능성 성분을 분석한 결과, 흑마늘의 기능성 성분인 총 polyphenol 함량은 발효 전 3.85 mg/ml에서 발효 후 3.76 mg/ml로 나타났고 총 flavonoid 함량은 발효 전 0.52 mg/ml에서 발효 후 0.51 mg/ml 측정되어 함량에 큰 변화는 없었다. Tannin 함량은 발효 전 6.32 mg/ml에서 발효 후 5.9 mg/ml로 나타났고, 5-HMF의 함량은 발효 전 0.25 mg/ml에서 발효 후 0.07 mg/ml로 측정되어, 발효 후 성분이 다소 줄어든 것으로 확인되었다. 당도 26 brix로 시작한 발효시 12 brix가 되었고 pH는 4.0에서 4.01로, 에탄올 함량은 0에서 17.91%로 조사되었다(Table 2). 블루

베리 발효주는 발효 후 총 polyphenol 및 총 flavonoid 함량이 증가했다고 보고하고 있으며[23], 감 와인은 발효 후 총 polyphenol 함량은 증가하나 총 flavonoid 함량은 감소한다고 보고하고 있다[9]. 복분자 와인은 발효 후 총 polyphenol 및 총 flavonoid 성분이 큰 변화가 없다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다[20].

흑마늘 진액 및 와인의 항산화 활성

흑마늘 와인과 흑마늘 진액의 항산화 활성은 DPPH, ABTS,

Table 2. Quality properties of black garlic wine (BGW) and black garlic juice (BGJ)

	BGW ¹⁾	BGJ ²⁾
Total polyphenol (mg/ml)	3.85±0.12	3.76±0.12
Total flavonoid (mg/ml)	0.51±0.02	0.52±0.06
Tannin (mg/ml)	5.90±0.05	6.32±0.23
5-HMF (mg/ml)	0.07±0.03	0.25±0.003
Brix	12±0.00	26±0.00
pH	4.01±0.01	4.00±0.00
Ethanol (%)	15.03±0.05	0

¹⁾BGW: Black garlic wine

²⁾BGJ: Black garlic juice

superoxide anion (O₂) radical 소거활성 및 환원력을 한 결과, DPPH radical 소거활성은 100 µl/ml농도에서 발효 전 90.81%, 발효 후 90.77%로 유사하였으나 50 µl/ml 농도에서는 발효 전 81.29%, 발효 후 73.22%로 다소 낮아지는 것으로 나타났으며, ABTS radical 소거활성은 100 µl/ml농도에서 발효 전 99.52% 발효 후 95.20%로 발효 후 활성이 다소 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 superoxide anion radical 소거활성은 25 µl/ml에서 발효 전 61.5% 발효 후 94.42%로 높아지는 것을 확인할 수 있었다. Fe³⁺에 대한 환원력 측정결과는 농도가 높아질수록 높은 환원력을 보였으며 200 µl/ml 농도에서 발효 전 3.01 발효 후 2.747로 발효 후 환원력이 다소 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 감 와인[9]은 100 µl/ml의 농도에서 DPPH radical 소거활성은 50%이며 ABTS radical 소거활성은 42%로 가지고 있으며, 수박 와인[18]은 100 µl/ml 농도에서 DPPH radical 소거활성은 58%로 보고되고 있으므로, 본 연구에서의 흑마늘 와인이 전반적으로 더 높은 항산화 활성을 나타내고 있는 것으로 확인되었다. 발효 후 항산화 활성이 다소 감소하는 이유는 총 polyphenol 및 총 flavonoid 이외의 기능성 물질이 발효를 진행하면서 감소하기 때문이라 사료되며 딸보리수 과실주[6]에서는 발효 후 DPPH radical 소거활성 및 ABTS radical 소거활성이 감소한다는 보고와 본 결과와 유사하였다. 따라서 분리한 효모의 효소 활성 및 내성을 확인하여 와인 균주로써 가능성을 확인하였고, 최종 선발된 *Saccharomyces* sp. BCNU 6006을 이용하여 제조한 흑마늘 와인은 높은 항산화력을 가지고 있어서 본 연구 결과는 고부가가치 상품으로서 흑마늘 와인 제조에 있어서 중요한 기초연구 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 중소기업청의 기업부설연구소 설치지원사업(C0268799)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Baek, S. Y., Lee, Y. J., Kim, J. H. and Yeo, S. H. 2015. Isolation and characterization of wild yeasts for improving liquor flavor and quality. *J. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 56-61.
- Banerjee, S. K. and Maulik, S. K. 2002. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutr. J.* **1**, 1.
- Bang, J. H., Shin, H. J., Choi, H. J., Kim, D. W., Ahn, C. S., Jeong, Y. K. and Joo, W. H. 2012. Probiotic potential of lactobacillus isolates. *J. Life Sci.* **22**, 251-258.
- Bennett, C. 1971. Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol. *Am. J. Med. Technol.* **37**, 217.
- Block, E. 1985. The chemistry of garlic and onion. *Sci. Am.* **251**, 114-119.
- Cho, K. M. and Joo, O. S. Quality and antioxidant characteristics of *elaegnus multiflora* wine through the thermal processing of juice. *Kor. J. Food Preser.* **21**, 206-214.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mabbazzy, I. and Ciani, M. 2011. Selected non-*saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **28**, 873-882.
- Jung, I. C. and Sohn, H. Y. 2014. Antioxidation, antimicrobial and antithrombosis activities of aged black garlic (*Allium sativum* L.). *J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 285-292.
- Joo, O. S., Kang, S. T., Jung, C. H., Lim, J. W., Park, Y. G. and Cho, K. M. 2011. Manufacturing of the enhances antioxidative wine using a ripe daebong persimmon (*Diospyros kaki* L.). *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **54**, 126-134.
- Kim, C. H., Yoon, M, K., Kwak, J. H. and Hwang, J. M. 2013. *Garlic. a History of Korean Gardening*, pp. 33-36, Korean Society for Horticultural Science, Wanjugun, Jeolabukdo, Korea.
- Kim, J. S., Ra, J. H. and Hyun, H. H. 2015. Comparison of biochemical composition and antimicrobial activity of southern-type garlic grown in the eastern and western regions of Jeju. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **33**, 763-771.
- Kim, M. S., Kim, M. J., Bang, W. S., Kim, K. S. and Park, S. S. 2012. Determination of s-allyl-l-cystein, diallyl disulfide, and total amino acids of black garlic after spontaneous short-term fermentation. *Prev. Nutr. Food Sci.* **41**, 661-665.
- Lee, H. S., Yang, S. T. and Ryu, B. H. 2011. Effects of aged black garlic extract on lipid improvement in rats fed with high fat-cholesterol diet. *J. Life Sci.* **21**, 884-892.
- Lee, M. A., Choi, H. J., Kang, J. S., Choi, Y. W. and Joo, W. H. 2008. Antioxidant activities of the solvent extracts from tetragonia tetragonioides. *J. Life Sci.* **18**, 220-227.
- Li, N., Lu, X., Pei, H. and Qiao, X. 2015. Effect of freezing pretreatment on the processing time and quality of black garlic. *J. Food Process Eng.* **38**, 329-335.
- Mateo, J. J. and Di Stefano, R. 1997. Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiol.* **14**, 583-591.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction-antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutritio.* **44**, 307-315.
- Park, C. S. and Kim, M. L. 2010. Preparation and characterization of watermelon wine. *Kor. J. Food Preser.* **17**, 547-554.
- Rosi, I., Vinella, M. and Domizio, P. 1994. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 519-527.
- Seo, S. H., Yoo, S. A., Kang, B. S. and Son, H. S. 2014. Quality characteristics of Korean black raspberry bokbunja wines produced using different amounts of water in the fermentation process. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **46**, 33-38.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. and Byrne, D. H. 2006. Comparison of abts, dpnh, frap, and orac assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food. Compos. Anal.* **19**, 669-675.
- Wang, X., Jiao, F., Wang, Q. W., Wang, J., Yang, K., Hu, R. R., Liu, H. C., Wang, B. Y. and Wang, Y. S. 2012. Aged black garlic extract induces inhibition of gastric cancer cell

- growth *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Med. Rep.* **5**, 66-72.
23. Yoon, H. H., Chae, K. S., Son, R. H. and Jung, J. H. 2015. Antioxidant activity and fermentation characteristics of blueberry wine using traditional yeast. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 840-846.
24. Yoon, J. Y., Choi, Y. K., Park, J. S., Jung, H. H., Song, J. H., Jeon, H. H., Lee, J. C. and Kim, H. J. 2015. Effect of various sugar additives on characteristics and sensory. *Food Eng. Prog.* **19**, 255-262.

초록 : 흑마늘 와인의 발효 및 그 특성

하성민¹ · 최혜정¹ · 신경연¹ · 류병호² · 주우홍^{1*}

(¹창원대학교 생물학화학융합학부, ²남해보물섬마늘영농조합법인)

본 연구에서 와인발효의 최적 균주를 조사하였으며 최종 선발된 *Saccharomyces* sp. BCNU 6006의 발효 특성과 항산화 활성을 측정하였다. 먼저 효모는 막걸리, 과일 그리고 발효 식품에서 분리하였으며, 분리된 균주는 β -glucosidase, glycosidase와 protease 효소 활성과 에탄올 및 SO₂ 내성에 의해 선별하였고, 추가로 황화수소와 바이오제닉 아민을 생성하는 균주를 제외하여 총 9균주가 선별되었다, 한편 선별균주들은 계통적으로 *K. sevazzii*와 *S. cerevisiae*의 subcluster에 속하는 균주로 확인되었다. 최종 선발된 *Saccharomyces* sp. BCNU 6006균주의 흑마늘 와인 최적 발효조건은 26 brix, 28°C, 10일로 확인되었다. 발효가 완료된 흑마늘 와인의 성분은 에탄올 15.03%, 12 brix, pH 4.01로 측정되었고, 총 polyphenol, 총 flavonoid함량, tannin 그리고 5-HMF의 함량은 각각 3.85 mg/ml, 0.51 mg/ml, 5.90 mg/ml, 0.07 mg/ml으로 확인되었다. DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능 및 환원력은 각각 90.77%, 95.20% 그리고 1.261로 측정되었으며, 흑마늘 진액보다 낮았으나, Superoxide anion 라디칼 소거능은 94.42%로 흑마늘 진액보다 높았다. 효소활성, 발효특성 그리고 항산화 효능을 기초로 판단하면 *Saccharomyces* sp. BCNU 6006에 의해 제조된 흑마늘 와인은 산업적으로 잠재성이 높음이 확인되었다.