

감귤 미숙과 식초의 품질 특성과 항산화 활성

이미란¹ · 황준호^{1,2} · 오유성¹ · 오현정¹ · 임상빈^{1,3*}

¹제주대학교 생명과학기술혁신센터

²제주대학교 생물학과

³제주대학교 식품생명공학과

Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Immature *Citrus unshiu* Vinegar

Mi-Ran Yi¹, Joon-Ho Hwang^{1,2}, You-Sung Oh¹, Hyun-Jeong Oh¹, and Sang-Bin Lim^{1,3*}

¹Biotechnology Regional Innovation Center, ²Dept. of Biology, and

³Dept. of Food Bioengineering, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT To develop vinegar with immature *Citrus unshiu* (IC), bacterial strains with high acetic acid-producing capabilities were isolated and identified, after which their quality characteristics, total phenolic and total flavonoid contents, and antioxidant activities were measured. Five bacterial strains were isolated from naturally fermented *C. unshiu*, and three were identified as *Acetobacter fabarum* (*A. sp.* RIC I) and *A. pomorum* (*A. sp.* RIC II, V). *A. sp.* RIC V showed the highest acetic acid-producing capability and was thus chosen as the candidate strain for further acetic fermentation using IC juice. Vinegars made with 30, 35, and 40% IC juices showed acidities of 5.38, 5.38, and 5.32% and fermentation efficiencies of 73, 72, and 70%, respectively. The fermentation periods required to reach greater than 5% acidity were 11, 9, and 9 days for vinegars containing 30, 35, and 40% IC juices, respectively. Fructose and glucose contents of the vinegars increased along with total organic acid contents including acetic acid, with increasing IC juice contents. Total phenolics were 1,546.6 and 230.9 µg GAE/mL, whereas total flavonoids were 1,004.7 and 175.1 µg QE/mL in vinegars made with IC and mature *C. unshiu* (MC) juices, respectively. DPPH free radical scavenging activities were 29% and 5%, ABTS radical scavenging activities were 62.0% and 17.9%, SOA scavenging activities were 60.9% and 41.7%, and XO scavenging activities were 32.5% and 5% in vinegars made with IC and MC juices, respectively. Therefore, vinegars made with 35% and 40% IC juices using *A. sp.* RIC V as the acetic acid fermentation strain showed potent antioxidant activities with greater total phenolic and flavonoid contents, promoting their use as functional vinegars.

Key words: immature *Citrus unshiu*, vinegar, acetic acid fermentation, quality, antioxidant activity

서 론

제주도에서는 감귤산업의 경쟁력 강화를 위한 대책의 일환으로 감귤 생과의 적정생산을 위하여 매년 약 5~10만 톤의 미숙과를 적과하여 폐기하고 있다(1,2). 감귤류는 쌍떡잎식물강 운향목 운향과(*Rutaceae*) 감귤아과에 속하는 식용식물로 유리당, 유기산, 식이섬유, 비타민, 미네랄, essential oil, carotenoids, flavonoids, limonoid 등의 다양한 물질을 함유하고 있다(1,3,4). 감귤류에는 60여 종의 flavonoids가 들어있는데 항산화, 항균작용, 콜레스테롤 저하작용, 간독성 저해작용 등을 하는 것으로 보고되고 있으며(5-7), 감귤 완숙과보다는 미숙과에 유기산, 식이섬유, poly-

phenol 그리고 flavonoids인 hesperidin, naringin, rutin 등이 많이 함유되어 있고, 특히 과피 중에 식이섬유, essential oil, carotenoids, flavonoids 등의 생리활성 성분이 많이 함유되어 있으며 과육보다 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(1,4,5,8,9).

식초는 초산을 희석하고 각종 감미료를 첨가하여 만드는 합성식초와 곡류, 사과, 감 등을 이용한 양조식초로 구분되며, 양조식초에는 초산 이외에 유기산, 유리당, 아미노산류, 에스터류 및 기능성 성분들이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다(10). 기존에 보고된 식초의 기능성으로는 ABCA-1 발현 증가와 beta-cell의 활성 증대를 통한 항당뇨 활성이 밝혀져 있으며(11), 일본에서 생산되는 감식초와 일반 식초에서 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, superoxide radicals, hydroxyl radicals 등의 항산화 실험을 통하여 항산화 활성이 우수함을 보였고(12), 사과식초에서는 superoxide dismutase 유사 활성과 총 페놀 및 총 플라보노이드

Received 18 October 2013; Accepted 4 December 2013

*Corresponding author.

E-mail: sblim@jejunu.ac.kr, Phone: +82-64-754-3617

함량을 보고하였다(13). 그러나 지금까지 유자 및 성숙한 감귤의 과즙을 이용하여 식초를 제조한 연구는 있으나(14-16) 감귤 미숙과를 이용한 식초 제조에 대한 연구는 보고된 바가 없으며 또한 감귤 미숙과 식초의 기능성에 대한 연구도 보고된 바가 없다.

미숙과 감귤 과즙은 limonene을 포함한 정유성분과 flavonoids 등 다양한 종류의 항균성 성분을 함유하고 있어 다른 과실에 비하여 초산발효가 어려운 것으로 알려져 있으므로(15), 효율적인 초산발효를 위해서는 적합한 균주 선발과 발효조건에 대한 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 폐자원인 감귤 미숙과를 이용한 식초를 개발하기 위하여 감귤슬러지를 자연 발효하여 초산 생성능이 우수한 균주를 분리하였고, 감귤 미숙과를 초산발효하여 식초를 제조한 후 품질 특성을 분석하였으며, 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과 향산화 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

재료

감귤(*Citrus unshiu* Marc.) 미숙과는 2012년 9월 제주도 내 감귤농가에서 적과한 것을 구매하여 냉동 보관하면서 사용하였다. 감귤 미숙과 과즙은 감귤 미숙과를 통째로 착즙기(Mannung Juice extractor, Green Power Co. Ltd., Suwon, Korea)로 착즙하여 제조하였다. 감귤 완숙과즙은 제주도내 J사로부터 구매하여 냉동 보관하면서 사용하였다.

평판 배지와 액체 배지의 제조

초산균 분리를 위한 평판 배지는 mannitol 2.5%, yeast extract 0.5%, peptone 0.3%, agar 1.5%, CaCO₃ 1%, ethanol 3%의 비율로 하여 ethanol을 제외한 나머지를 고압멸균기(DS-191A, Dasol Int. Co. Ltd., Gwangju, Korea)에서 121°C, 15분간 살균하여 45°C로 냉각한 다음 ethanol은 사용 직전에 무균적으로 첨가하여 제조하였고, 초산균 증조 액체 배지는 mannitol 2.5%, yeast extract 0.5%, peptone 0.3%, ethanol 3%의 비율로 제조하였다.

초산 생성균의 분리 및 동정

초산 생성이 우수한 초산균을 분리하기 위해 감귤슬러지 자연 발효물을 0.9% NaCl로 10배 희석한 후 에탄올과 calcium carbonate가 첨가된 ethanol medium 평판배지에서 배양하여 colony 주위에 투명환(clear zone)이 크게 형성된 균을 선발하였다. 선발한 균주를 3회 이상 순수 배양한 후 ㈜솔젠트(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 16S rRNA의 염기서열을 분석하였고 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)에서 얻은 다른 균종의 16S rRNA의 유전자 유사도를 검색하여 균종을 동정하였다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining method와 distance matrix data를 사용하여 확인하였다.

초산 생성 우수균주의 선발

50 mL의 액체배지에 균주를 접종한 후 30°C, 150 rpm의 shaking incubator(SI-900R, Jeio Tech., Daejeon, Korea)에서 72시간 배양한 후 생성된 산 함량을 측정 비교하여 우수한 균주를 선발하였다.

초산발효

초산발효 조건의 최적화를 위해 ethanol 5%, 증조 5%를 기본으로 하고 과즙의 비율을 30, 35, 40%로 달리하여 첨가한 후 shaking incubator(SI-900R, Jeio Tech.)를 이용하여 30°C, 150 rpm에서 배양하면서 산도 변화를 측정하였다.

식초의 제조

감귤 착즙액 35%, 발효주정 5%, 증조 5%, 증류수 55%를 혼합하고 shaking incubator(SI-900R, Jeio Tech.)를 이용하여 30°C, 150 rpm에서 11일간 배양한 후 0.22 µm nitro-cellulose membrane(Millipore Co., Billerica, MA, USA)으로 여과하여 제조하였다. 감귤과즙 첨가비율은 예비실험 결과 35%로 하였을 때 발효효율이 높고 발효기간이 짧아서 감귤 착즙액의 비율을 35%로 고정하여 식초를 제조하였다.

일반성분 및 이화학적 특성 분석

수분, 회분, 조단백, 조지방과 산도는 식품공전(17)에 따라 측정하였다. pH는 시료 5 mL를 취하여 10배 희석한 후 pH meter(S20-K, Mettler Toledo, Zurich, Switzerland)를 이용하여 측정하였으며, 당도는 당도계(N-1a, ATAGO, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 산도는 시료 5 mL에 증류수를 가하여 50 mL 되게 한 후 20 mL를 취하여 지시약으로 0.1% phenolphthalein을 가한 후 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 과즙은 구연산으로, 발효액은 초산으로 산도를 환산하였다.

유리당과 유기산 함량 분석

유리당과 유기산 함량은 시료를 3,000 rpm에서 원심분리시키고 상층액을 Sep-Pak C₁₈ cartridge(Waters Associate Inc., Milford, MA, USA)를 통과시킨 후 0.45 µm membrane filter(Woongki Science Co., Ltd., Seoul, Korea)로 여과한 것을 HPLC(Waters 2695, Waters Associate Inc.)로 분석하였다. 유리당 분석을 위한 HPLC 분석 칼럼은 Prevail™ Carbohydrate ES(4.6×250 mm, 5 µm, Grace, Deerfield, IL, USA), 검출기는 ELSD, 이동상으로는 70% acetonitrile을 분당 0.8 mL의 속도로 이동시켰다. 유리당 함량은 농도별로 제조한 표준물질인 fructose, glucose 및 sucrose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 분석하여 얻은 표준곡선으로부터 정량하였다.

유기산 분석을 위한 HPLC 조건은 Prevail™ organic acid(4.6×150 mm, 3 µm, Grace) 칼럼을 사용하여 PDA 210 nm에서 검출하였으며, 이동상으로는 pH 2.5로 조정된

25 mM KH₂PO₄ 용액을 분당 1 mL의 속도로 이동시켰다. 분리된 각 피크는 유기산 표준물질인 oxalic acid, tartaric acid, malic acid, lactic acid, acetic acid 및 citric acid (Sigma-Aldrich Co.)의 표준곡선으로부터 정량하였다.

총 페놀과 총 플라보노이드 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법으로 측정하였다(18). 시료 100 µL와 증류수 900 µL를 혼합하고, Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Co.) 100 µL를 가하여 잘 섞은 후 5분간 상온에서 반응시켰다. 이 용액에 20% Na₂CO₃ 300 µL를 넣어 혼합한 다음 증류수를 가하여 2 mL로 조정하였다. 이 용액을 25°C에서 1시간 동안 방치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였고(18), gallic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 이용한 검량선과 비교하여 µg gallic acid equivalents/mL로 총 페놀 함량을 나타내었다.

총 플라보노이드의 함량은 Chang 등(19)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료용액 200 µL를 취하고 여기에 에탄올 800 µL와 5% NaNO₂ 60 µL를 첨가하여 균질하게 혼합한 후 5분간 실온에서 반응시키고 10% AlCl₃를 60 µL 첨가하여 실온에서 다시 5분간 반응시켰다. 그 후 1 M NaOH 용액을 400 µL 첨가하여 1분간 상온에서 반응시키고 증류수 500 µL를 가하여 균질화시킨 후 200 µL를 취하여 96 well plate에 분주하여 Microplate Reader(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다(19). 표준물질로는 quercetin(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 표준곡선을 작성하였고, 시료의 총 플라보노이드 함량은 µg quercetin equivalents(QE)/mL로 나타내었다.

항산화 활성 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 자유라디칼 소거활성은 Blois 방법(20)을 약간 변형하여 측정하였다. 즉 시료 20 µL와 메탄올에 100 µM의 농도로 녹인 DPPH (Sigma-Aldrich Co.) 용액 980 µL를 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군으로는 butylated hydroxy anisole(BHA)를 사용하였고 DPPH radical 소거활성은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: Absorbance of the blank

B: Absorbance of the sample

ABTS⁺ 라디칼 소거능은 Roberta 등(21)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시험 용액의 제조는 증류수에 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 첨가하고, 상온에서 16시간 배양하여 ABTS 양이온(ABTS⁺)을 생성시킨 후 734 nm에서 흡광도의 값이 0.7 이하가 되도록 희석하여 제조하였다. 그 다음 ABTS⁺ 용액 980 µL에 시료 20 µL를 가하여 6분 후에 흡광도 값을 측정하였다. 항산화능은 증류

수를 대조군으로 다음의 식에 의하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS}^+ \text{ radical scavenging activity (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: Absorbance of the blank

B: Absorbance of the sample

Superoxide anion(SOA) 소거활성은 PMS/NADH system을 이용하여 생성된 SOA의 양을 NBT 환원법으로 517 nm에서 측정하였다(22). 즉 시료 50 µL에 125 µM NADH와 63 µM NBT의 PBS(pH 8.4) 150 µL를 첨가한 후 8 µM의 PMS 100 µL를 가하여 superoxide의 생성을 유도하였다. SOA 소거활성은 생성된 superoxide의 흡광도를 시료를 가하지 않은 대조군과 비교하여 저해활성도(%)로 나타내었다. 대조군으로는 항산화제로 알려져 있는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

Xanthine oxidase(XO) 저해활성은 Osada 등(23)의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 0.1 mM xanthine, 0.1 U/mL XO와 시료를 혼합하여 37°C에서 5분간 반응 후 1 N HCl을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이것을 시료를 혼합하지 않은 대조군과 비교하여 생성된 uric acid를 Microplate Reader(BioTek Instruments, Inc.)로 290 nm에서 흡광도를 측정하였다(23).

통계분석

본 실험에서 얻어진 결과는 통계분석용 소프트웨어 SPSS version 12.0(SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계 분석하였다. 각 결과는 일원분산분석(one-way ANOVA)에 의해 분석하였고, 유의성 검정은 Duncan의 다중범위 검정(Duncan's multiple range test)을 사용하였다. 유의수준은 *P*-value < 0.05로 하였다. 상관관계 지수는 피어슨 상관 계수(Pearson correlation coefficient)에 의해 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

감귤 미숙과 과즙의 일반성분과 이화학적 특성

감귤 미숙과 과즙의 품질 특성을 파악하기 위해 감귤 미숙과 과즙과 완숙과즙의 일반성분과 이화학적 특성을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다. 수분 함량은 약 90%로 큰 차이를 보이지 않았으나 조단백 함량은 감귤 미숙과즙이 3.50%로 완숙과즙의 0.67%보다 약 5.2배 높았고, 조지방 함량은 감귤 미숙과즙이 0.18%로 완숙과즙의 0.05%보다 약 3.4배 높았다. 조회분 함량은 감귤 미숙과즙이 0.85%로 완숙과즙의 0.36%보다 약 2.4배 높았다. Lee 등(24)에 따르면 감귤 착즙액의 수분, 조단백, 조지방, 회분 함량이 각각 87.9, 0.99, 0.14, 0.31%로 조지방 이외에는 본 실험의 분석 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

산도는 감귤 미숙과즙이 1.87%로 완숙과즙의 0.91%보

Table 1. Chemical composition of immature and mature *Citrus unshiu* juice

Chemical composition	Immature citrus juice	Mature citrus juice
Moisture (%)	90.05±0.21	89.57±0.19
Crude protein (%)	3.50±0.29	0.67±0.13
Crude lipid (%)	0.18±0.06	0.05±0.02
Crude ash (%)	0.85±0.13	0.36±0.23
Total acidity (%)	1.87±0.06	0.91±0.10
Sugar (°Brix)	7.80±0.05	11.40±0.10
pH	3.70±0.02	3.74±0.02

다 약 2배 높았고, 당도는 감귤 미숙과즙이 7.8°Brix로 완숙과즙의 11.4°Brix보다 낮았다. pH는 약 3.7로 큰 차이가 없었다. Ko 등(25)은 9월(감귤 미숙과)과 12월(감귤 완숙과)에 수확한 온주밀감의 산도가 각각 1.64와 0.70%, 당도가 각각 7.24와 11.50°Brix이었으며 pH가 각각 2.52와 3.29라고 하였는데, 당도의 경우에는 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었고 산도의 경우에는 감귤 미숙과즙과 감귤 완숙과즙 모두 본 연구보다 약 0.21~0.23% 낮은 함량을 보였으나 감귤 미숙과즙과 감귤 완숙과즙 간의 차이에 있어서는 비슷한 경향을 보였다. pH의 경우 본 연구에서는 감귤 미숙과즙과 감귤 완숙과즙이 비슷한 값을 보인 것과 달리 약 0.8의 차이를 나타내었다고 보고하였다.

초산 생성균의 분리 및 동정

감귤슬러지 자연 발효물로부터 산생성능이 우수한 5개 균주를 분리하였으며, 유전자 염기서열을 분석한 결과는 Fig. 1과 같았다. 분리군 I-oh(Fig. 1(A))는 유전자 염기서열이 99.71%가 일치하여 *Acetobacter fabarum*(*A. sp.* RIC I로 명명, GenBank accession no. KC535069)으로 동정되었고, 분리군 II-oh(Fig. 1(A))는 99.42%가 일치하여 *Acetobacter pomorum*(*A. sp.* RIC II, GenBank accession no. KC535068)으로 동정되었으며, 분리군 V-oh(Fig. 1(A))는 99.56%가 일치하여 *Acetobacter pomorum*(*A. sp.* RIC V, GenBank accession no. KC535065)으로 동정되었다. 분리군 III-oh와 분리군 IV-oh(Fig. 1(B))는 각각 99.66%와 99.86%의 유사도를 보여 *Lactobacillus pentosus*(*L. sp.* RIC III, IV, GenBank accession no. KC535067, KC535066)로 동정되었다.

L. sp. RIC III와 IV는 젖산균이기 때문에 초산발효 균주 선발 후보에서 제외하였고, *A. sp.* RIC I, II, V는 초산균이므로 초산발효 우수 균주를 선발하기 위해 액체 배양하면서 생성된 산도를 비교하였다. 산도는 72시간 배양 후 *A. sp.* RIC V와 *A. sp.* RIC II가 각각 2.00%와 1.10%이었고 *A. sp.* RIC I은 0.12%로 낮았다. 세 번의 반복 실험과 7일 이상 배양을 하여도 *A. sp.* RIC I의 액체 배양액은 산도 변화가 없었다. 따라서 *A. sp.* RIC V가 초산 생성능이 가장 우수하여 감귤 미숙과즙의 초산발효 균주로 최종 선발하였다.

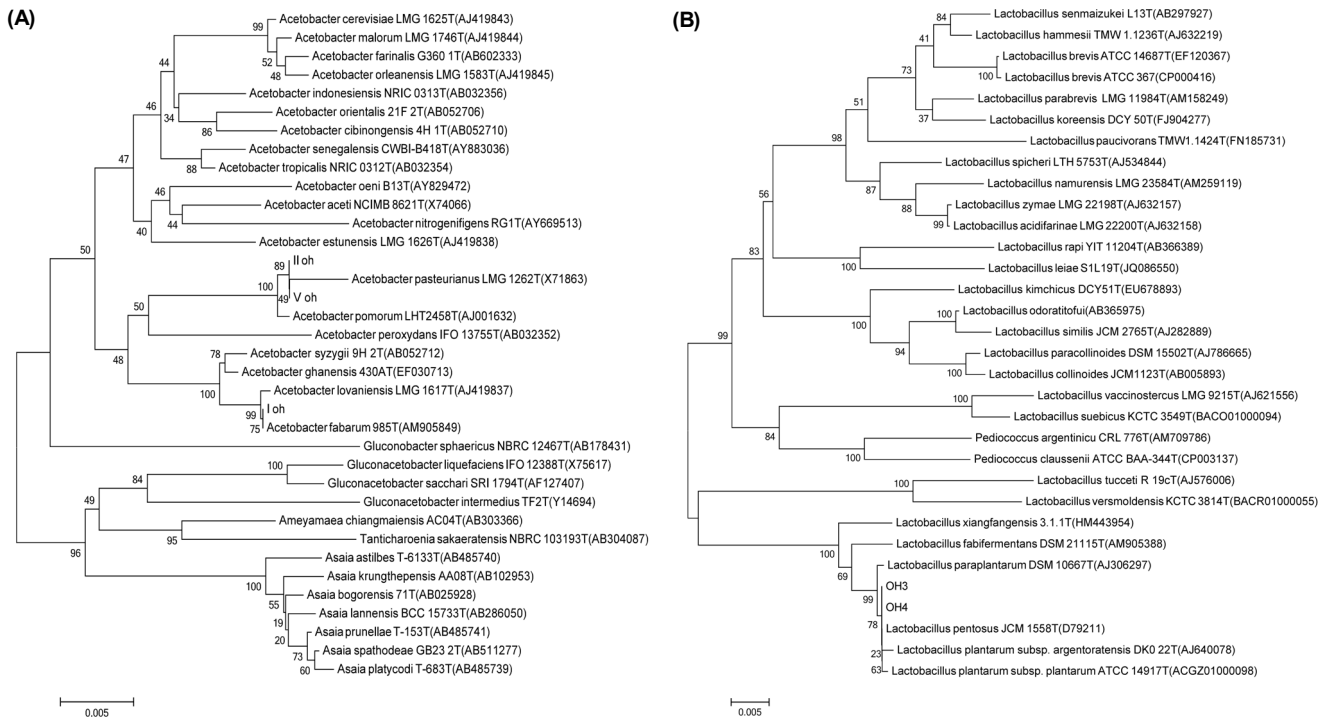


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic trees based on 16S rRNA region gene sequences of isolated bacteria. (A) I-oh, II-oh, V-oh; (B) III-oh, IV-oh.

감귤 미숙과즙 첨가비율에 따른 초산발효 특성

초산 생성능이 가장 우수한 *A. sp.* RIC V를 이용하여 감귤 미숙과즙의 초산발효 최적화를 위해 과즙의 첨가비율을 30, 35, 40%로 달리하여 13일간 발효하면서 산도 변화를 측정된 결과는 Fig. 2와 같았다. 발효 종료(13일) 후 미숙과즙 첨가비율이 각각 30, 35, 40%인 배양액의 산도는 각각 5.38, 5.38, 5.32%로 모두 5%를 넘었으며 발효 효율 또한 각각 73, 72, 70%로 높았다.

감귤 완숙과즙에 대하여 동일 균주로 발효시킨 결과(Fig. 3), 산도는 발효 종료(11일) 후 미숙과즙 첨가비율(30, 35, 40%)에 따라 각각 1.78, 4.90, 5.08%로 과즙비율 35%와 40%일 때는 산도가 4.9%를 넘었으며 발효 효율 또한 각각 69%, 71%로 높은 반면, 과즙비율 30%는 산도가 낮았으며 발효 효율 또한 21%로 낮았다.

이와 같이 감귤 미숙과즙을 이용한 초산발효는 완숙과즙을 이용한 초산발효와 달리 모든 과즙 첨가비율에서 높은 발효 효율을 보였는데, 이는 감귤 완숙과즙 자체의 산도가 0.91%인 반면 감귤 미숙과즙 자체의 산도는 1.87%로 높아(Fig. 1) 초산내성 균주인 초산균의 산 생성능을 높인 것으로 추정되었다. Lee 등(26)은 사과 해당화의 초산발효 5일 후 초기 산도가 1%인 시험군이 0.5%인 시험군보다 높은

산도를 보였으며, Mo 등(27)도 오미자를 이용한 식초 제조 시 오미자 추출액의 농도가 높을수록 초기 총산함량이 높았으며 산 생성능이 높았다고 보고하였는데, 본 연구 결과에서도 발효 후 총산 함량은 감귤 미숙과즙 첨가 시험군이 완숙과즙 첨가 시험군보다 높은 것은 초기 총산의 함량이 초산발효에 영향을 미쳤을 것으로 추정되었다. 또한 Table 1에 의하면 완숙과즙에 비해 미숙과즙의 조단백 함량이 높아서 이것이 초산균의 생육에 필요한 질소원으로 작용하여 초산균 생육에 영향을 미쳤을 것으로 추정되었다(28).

미숙과즙 첨가비율에 따라 발효 속도에서도 차이가 있었는데(Fig. 2), 과즙 첨가비율 30% 식초는 발효 11일째에, 과즙 첨가비율 35, 40% 식초는 발효 9일째에 5% 이상의 산도에 도달하여 과즙 첨가비율을 35%와 40%로 할 경우에는 발효기간을 단축시킬 수 있을 것으로 판단되었다. Kang 등(14)도 유자식초 제조 시 초기 산도를 2%로 조절하였을 때 발효 10일 후에 식초 농도가 5%에 도달하여 초기 산 농도에 따라 발효기간의 차이를 보였다고 보고하였다. 또한 본 연구에서는 감귤 미숙과즙 초산발효 시 유도기가 2~3일로 감귤 완숙과즙 초산발효 시보다 길었는데, 이는 감귤 미숙과즙에 함유되어 있는 정유성분에 의한 것으로 추정되며, Park 등(29)도 감잎의 정유성분이 김치 발효 시 산도가 알맞은 숙성기에 도달하는 기간을 연장시켰다고 보고하였다. 또한 미숙과에 다량 함유되어 있는 폴리페놀의 항균작용에 의하여 초기 균생육이 억제되어 초산생성이 늦어진 것으로 추정되었다(30).

이상의 결과로 보아 감귤 미숙과즙을 이용하여 초산발효 시 별도로 초기산도의 보정이나 외부에서 질소원과 탄소원을 첨가하지 않아도 산도가 5% 이상 도달할 수 있는 것으로 보이며 과즙 첨가비율 35%가 초산발효에 적절한 것으로 판단되었다.

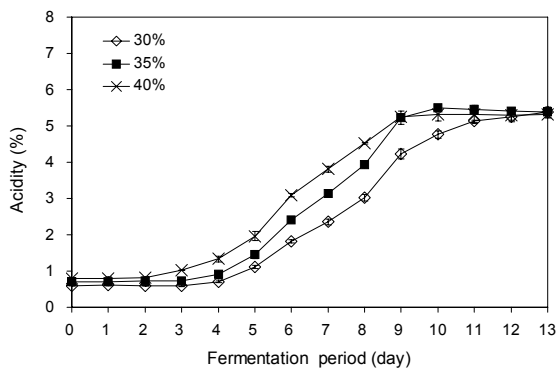


Fig. 2. Acidities of the vinegars made with different ratios of immature *Citrus unshiu* juice added during 13 days of the fermentation period at 30°C.

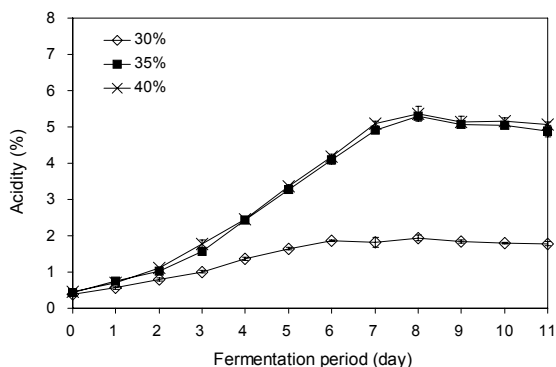


Fig. 3. Acidities of the vinegars prepared with different ratios of mature *Citrus unshiu* juice added during 11 days of the fermentation period at 30°C.

과즙 첨가비율에 따른 식초의 유리당과 유기산 함량

미숙과즙 첨가비율을 30, 35, 40%로 달리하여 *A. sp.* RIC V를 이용하여 13일간 진탕배양 하여 제조한 식초의 유리당과 유기산 함량은 Table 2 및 3과 같았다. 유리당으로는 fructose, glucose 및 sucrose가 검출되었는데, Kang 등(1)의 감귤 미숙과즙에서 fructose, glucose 및 sucrose가 검출되었다는 보고와 일치하였다. Fructose와 glucose는 과즙 첨가비율이 높을수록 높은 함량을 나타내었으나

Table 2. Contents of free sugars (mg%) in the vinegars made with different ratios of immature *Citrus unshiu* juice added

Ratio of juice (%)	Fructose	Glucose	Sucrose	Total
30	220.8±1.0 ^{a1)}	273.5±0.4 ^a	264.1±0.2 ^a	1,516.6±2.2 ^a
35	237.0±0.1 ^b	284.6±0.5 ^b	264.4±0.5 ^a	1,572.0±1.9 ^b
40	251.8±1.4 ^c	291.5±0.8 ^c	265.4±0.4 ^b	1,617.5±4.7 ^c

¹⁾Means with different superscripts in the same column are significantly different at $P<0.05$ according to Duncan's multiple range test.

Table 3. Contents of organic acids (mg%) in the vinegars made with different ratios of immature *Citrus unshiu* juice added

Ratio of juice (%)	Oxalic acid	Tartaric acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Citric acid	Total
30	5.2±0.4 ¹⁾	16.5±0.9 ^a	16.5±9.3 ^a	5,344±12 ^a	2,958±14 ^a	83±17 ^a	8,424±37 ^a
35	4.5±0.5 ^a	19.9±1.1 ^b	21.4±2.3 ^a	5,517±13 ^b	3,358±14 ^b	106±4 ^a	9,028±9 ^b
40	7.6±0.3 ^b	27.6±1.8 ^c	36.2±6.8 ^b	5,743±26 ^c	3,990±31 ^c	156±28 ^b	9,961±22 ^c

¹⁾Means with different superscripts in the same column are significantly different at $P<0.05$ according to Duncan's multiple range test.

sucrose는 과즙 첨가비율과 관계없이 모두 비슷하였다.

유기산의 경우에는 lactic acid와 acetic acid는 다량 검출되었으나 oxalic, tartaric, malic 및 citric acid는 소량 검출되었다. Citric acid, malic acid 및 oxalic acid는 감귤 과즙에서 주로 검출되는 유기산으로 발효 전에 이미 존재하였던 것으로 보인다(31). Hong(32)은 과실 식초의 유기산 분석 결과 acetic acid만이 다량 검출되었고 lactic acid는 미량 검출되었다고 보고하였는데, 초산발효 시 균주 사멸기에 영양 공급이 불충분할 경우 acetic acid가 아닌 부산물로써 lactic acid가 생성되었다는 보고가 있으며(33), 발효 초기 젖산균에 의해 생성된다는 보고도 있다(34). 따라서 lactic acid의 생성을 방지하기 위해서는 질소원의 공급, 감귤 미숙과즙의 멸균, 초기산도를 높이는 방법 등이 필요할 것으로 추정되며 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 과즙 첨가비율별로 보았을 때는 미숙과 과즙의 첨가비율이 높을수록 acetic acid를 비롯한 유기산과 총 당 함량이 높아지는 것으로 나타났다.

총 페놀 및 총 플라보노이드 함량

감귤 미숙과와 완숙과 식초의 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같았다. 총 페놀 함량은 감귤 미숙과 식초와 완숙과 식초가 각각 1,546.6과 230.9 µg GAE/mL로 감귤 미숙과 식초가 약 6.7배 더 높은 함량을 보였으며, 총 플라보노이드 함량은 감귤 미숙과 식초와 완숙과 식초가 각각 1,004.7과 175.1 µg QE/mL로 감귤

Table 4. Total phenolics and flavonoids contents in the vinegars made with immature and mature *Citrus unshiu* juices

Vinegar	Total phenolics (µg GAE/mL)	Total flavonoids (µg QE/mL)
Immature	1,546.6±0.1 ^b	1,004.7±9.7 ^b
Mature	230.9±1.5 ^a	175.1±4.2 ^a

Table 5. DPPH and ABTS radical scavenging activities in the vinegars made with immature and mature *Citrus unshiu* juice

Vinegar	DPPH		ABTS ⁺	
	Scavenging activity (%) at 2% (v/v)	IC ₅₀ (%)	Scavenging activity (%) at 2% (v/v)	IC ₅₀ (%)
Immature	29.0±1.6	—	62.0±0.1	1.36±0.1
Mature	>5	—	17.9±0.1	—
Reference	At 12.5 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)	At 12.5 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)
Ascorbic acid	59.0±0.6	9.5±0.1	28.4±0.1	12.9±0.1
BHA	70.1±7.1	6.8±1.3	96.1±0.1	5.9±0.1
Trolox	45.1±1.2	13.0±0.5	47.5±0.5	12.6±0.1

미숙과 식초가 약 5.7배 더 높은 함량을 보였다.

항산화 활성

감귤 미숙과와 완숙과 식초의 DPPH와 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 5와 같았다. 감귤 미숙과와 완숙과 식초의 DPPH 자유라디칼 소거활성은 각각 29%와 5%로 감귤 미숙과 식초가 완숙과 식초에 비해 약 5.8배 높았으며 ABTS⁺ 소거능은 각각 62.0%와 17.9%로 감귤 미숙과 식초가 완숙과 식초에 비해 약 3.4배 높았다.

DPPH와 ABTS는 같은 라디칼을 이루는 물질이지만 DPPH는 자유라디칼, ABTS는 hydroxyl, peroxy, alkoxy 및 inorganic radical과 같은 유리기들과 반응하여 안정한 ABTS⁺ 형태의 양이온 라디칼을 형성하므로(35) 이와 같은 차이로 인하여 항산화 물질에 대한 결합 능력의 차이가 발생한다(36). 따라서 ABTS⁺는 친수성 물질과 소수성 물질의 항산화력 측정이 가능하므로 일반적으로 DPPH 라디칼 소거능보다는 높은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있는데 (21), 본 연구에서도 동일한 시료 농도에서 DPPH보다는 ABTS⁺가 높은 활성을 나타내었다.

식초의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 간의 상관계수를 계산한 결과, 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거활성 간의 상관계수는 각각 0.932와 0.951이었으며 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량과 ABTS⁺ 라디칼 소거활성 간의 상관계수는 각각 0.983과 0.955로 매우 높은 것으로 보아, DPPH와 ABTS 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성은 식초 중의 총 페놀 및 총 플라보노이드의 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. Stella 등(37)도 오렌지 주스에서 총 페놀 함량이 높을수록 항산화능이 높음을 보고하였고, Kahkonen 등(38)은 과실류의 총 폴리페놀 함량은 항산화 활성과 밀접한 관련이 있음을 보고하였다.

Table 6. Superoxide anion radical and xanthine oxidase inhibitory activities in the vinegars made with immature and mature *Citrus unshiu* juices

Vinegar	Superoxide anion		Xanthine oxidase	
	Inhibitory activity (%) at 0.5% (v/v)	IC ₅₀ (%)	Inhibitory activity (%) at 2% (v/v)	IC ₅₀ (%)
Immature	60.9±3.8	0.41±0.03	32.5±2.7	—
Mature	41.7±1.4	0.65±0.01	<5	—
Reference	At 12.5 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)	At 100 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)
Ascorbic acid	1.6±8.1	—	9.0±0.4	—
BHA	—	—	29.0±0.1	—
Trolox	14.7±3.7	—	18.8±0.9	—

감귤 미숙과와 완숙과 식초의 SOA 소거활성과 XO 억제 활성은 Table 6과 같았다. SOA 소거활성은 감귤 미숙과 식초와 완숙과 식초가 각각 60.9%와 41.7%로 미숙과 식초가 높았다. XO 억제활성도 감귤 미숙과 식초가 32.5%인 반면 감귤 완숙과 식초는 5% 이하로 감귤 미숙과 식초가 높았다. 식초의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과 SOA 소거능 및 XO 억제활성 간의 상관계수를 계산한 결과, 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량과 SOA 소거능 간의 상관계수는 각각 0.845와 0.828이었으며 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량과 XO 억제활성 간의 상관계수는 각각 0.929와 0.940으로 매우 높은 것으로 보아, OA 소거능과 XO 억제활성은 식초 중의 총 페놀 및 총 플라보노이드의 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 추정되었다.

Cejudo Bastante 등(39)은 감귤에 많이 함유되어 있는 naringin 및 neohesperidin과 같은 flavonoids는 SOA 소거 활성 판의 상관계수가 0.932와 0.732로 높았으며, Russo 등(40)은 감귤 미숙과에 함유되어 있는 rutin과 naringin은 XO의 억제 활성이 뛰어나다고 보고하였다.

이상의 결과로부터 *A. sp.* RIC V를 이용하여 에탄올 5%, 증초 5%, 30°C, 150 rpm에서 감귤 미숙과즙을 35와 40% 첨가하였을 때 초산발효가 가장 우수하였으며, 감귤 미숙과 식초는 높은 총 페놀과 총 플라보노이드 함량으로 인하여 높은 항산화 활성을 나타내어 기능성 식초로 활용할 수 있을 것으로 추정되었다.

요 약

폐자원인 감귤 미숙과를 이용한 식초를 개발하기 위하여 초산 생성능이 우수한 균주를 분리 동정하였고, 감귤 미숙과를 발효하여 식초를 제조한 후 품질 특성, 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량, 항산화 활성을 측정하였다. 감귤슬러지 자연 발효물로부터 5개 균주를 분리하였으며, 그중 초산균으로 *Acetobacter fabarum*(*A. sp.* RIC I)과 *A. pomorum*(*A. sp.* RIC II, V)이 동정되었는데, *A. sp.* RIC V가 초산 생성능이 가장 우수하여 감귤 미숙과즙의 초산발효 균주로 선정하였다. *A. sp.* RIC V를 이용하여 감귤 미숙과즙의 첨가비율을 30, 35, 40%로 달리하였을 때 발효 13일 후 산도는 각각

5.38, 5.38, 5.32%, 발효 효율은 각각 73, 72, 70%이었다. 미숙과즙 초산발효 시 산도가 5%에 도달하는 기간은 과즙 첨가비율이 30%일 때는 11일, 35와 40%일 때는 9일이었다. 유리당으로 fructose와 glucose는 과즙 첨가비율이 높을수록 높은 함량을 나타내었으나 sucrose는 과즙 첨가비율과 관계없이 모두 비슷하였다. 유기산의 경우에는 미숙과 과즙의 첨가비율이 높을수록 acetic acid를 비롯한 총 유기산이 증가하였다. 감귤 미숙과 식초와 완숙과 식초의 총 페놀 함량은 각각 1,546.6과 230.9 µg GAE/mL이었고, 총 플라보노이드 함량은 각각 1,004.7과 175.1 µg QE/mL이었다. DPPH 자유라디칼 소거활성은 감귤 미숙과와 완숙과 식초가 각각 29%와 5%이었고, ABTS 소거능은 각각 62.0%와 17.9%였다. SOA 소거활성은 감귤 미숙과 식초와 완숙과 식초가 각각 60.9%와 41.7%이었고, XO 억제활성은 각각 32.5%와 5%이었다. 이상의 결과로부터 *A. sp.* RIC V를 이용하여 감귤 미숙과즙을 35와 40% 첨가하였을 때 초산발효가 가장 우수하였으며, 감귤 미숙과 식초는 높은 총 페놀과 총 플라보노이드 함량으로 인하여 높은 항산화 활성을 나타내어 기능성 식초로 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 중소기업청 산학연 공동기술개발 지역 사업(C0028212)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Kang YJ, Yang MH, Ko WJ, Park SR, Lee BG. 2005. Studies on the major components and antioxidative properties of whole fruit powder and juice prepared from premature mandarin orange. *Korean J Food Sci Technol* 37: 783-788.
2. Jun IS, Yoon JY. 2013. Analysis of the competitiveness factors of the citrus industry of Jeju. *Korean J Food Mark Econ* 30: 23-42.
3. Oh TH. 2011. A study on the cosmetic ingredients from immature citrus and *Eurya emarginata* makino. *PhD Dissertation*. Jeju National University, Jeju, Korea.
4. Park GH, Lee SH, Kim HY, Jeong HS, Kim EY, Yun YW, Nam SY, Lee BJ. 2011. Comparison in antioxidant effects of four citrus fruits. *J Fd Hyg Safety* 26: 355-360.

5. Kim YD. 2009. Study on the composition of flavonoids and biological activities from Jeju citrus fruits. *PhD Dissertation*. Jeju National University, Jeju, Korea.
6. Lee DW. 2004. Antioxidant and antimicrobial effects of Citrus flavonoids and limonoids. *MS Thesis*. Yonsei University, Seoul, Korea.
7. Son HS, Kim HS, Ju JS. 1991. Effects of rutin and hesperidin on total cholesterol concentration, transaminase and alkaline phosphatase activity in CCl₄ treated rats. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 34: 318-326.
8. Jeoung SH, Gim SB, Choi HJ, Kim DH. 2012. Study of anti-microbe activity of essential oil purified from *Citrus unshiu* S. Marcov. *Daejeon Univ Traditional Korean Med Res Instit J* 20: 67-78.
9. Choi SY, Ko HC, Ko SY, Hwang JH, Park JG, Kang SH, Kim SJ. 2007. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull* 30: 772-778.
10. Park SY, Chae KS, Son RH, Jung JH, Im YR, Kwon JW. 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of Bokbunja (black raspberry) vinegars. *Food Eng Prog* 16: 340-346.
11. Cho JH. 2012. Letter: Balsamic vinegar improves high fat-induced beta cell dysfunction via beta cell ABCA-1. *Diabetes Metab* 36: 388-389.
12. Sakanaka S, Ishihara Y. 2008. Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. *Food Chem* 107: 739-744.
13. Nakamura K, Ogasawara Y, Endou K, Fujimori S, Koyama M, Akano H. 2010. Phenolic compounds responsible for the superoxide dismutase-like activity in high-brix apple vinegar. *J Agric Food Chem* 58: 10124-10132.
14. Kang SK, Jang MJ, Kim YD. 2006. Isolation and culture conditions of *Acetobacter* sp. for the production of citron (*Citrus junos*) vinegar. *Korean J Food Preserv* 13: 357-362.
15. Kim ML, Choi KH. 2005. Sensory characteristics of citrus vinegar fermented by *Gluconacetobacter hansenii* CV1. *Korean J Food Cookery Sci* 21: 243-249.
16. Kim YT, Seo KI, Jung YJ, Lee YS, Shim KH. 1997. The production of vinegar using citron (*Citrus junos* Seib) juice. *J East Asian Dietary Life* 7: 301-307.
17. Food Code. 2010. Korea Foods Industry Association, Seoul, Korea. p 301-316.
18. Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis D, Barrow CJ. 2006. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J Appl Phycol* 18: 445-450.
19. Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10: 178-182.
20. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
22. Liu F, Ooi VEC, Chang ST. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci* 60: 763-771.
23. Osada Y, Tsuchimoto M, Fukushima H, Takahashi K, Kondo S, Hasegawa M, Komoriya K. 1993. Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents. *Eur J Pharmacol* 241: 183-188.
24. Lee SH, Park HJ, Back OH, Chun HK, Rhee SG, Lee GS. 2005. Comparison of the nutritional composition of 3 kinds of citrus produced on Jeju island, Korea. *Korean J Community Living Sci* 16: 15-20.
25. Ko JS, Yang SH, Yang YT, Jwa CS. 1998. Physicochemical properties of early cultivar of *Satsuma mandarin* sampled at different harvested dates in Cheju. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 41: 141-146.
26. Lee JC, Han WC, Lee JH, Jang KH. 2012. Quality evaluation of vinegar manufactured using rice and *Rosa rugosa* Thunb. *Korean J Food Sci Technol* 44: 202-206.
27. Mo HW, Jung YH, Jeong JS, Choi KH, Choi SW, Park CS, Choi MA, Kim ML, Kim MS. 2013. Quality characteristics of vinegar fermented using omija (*Schizandra chinensis* Baillon). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 441-449.
28. Kim YD, Kang SH, Kang SG. 1996. Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 695-700.
29. Park SK, Kang SG, Chung HJ. 1994. Effects of essential oil in astringent persimmon leaves on *Kimchi* fermentation. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 22: 217-221.
30. Choi SH, Kwak EJ. 2012. Volatile flavor compound and sensory properties of *Yakju* fermented with different contents of *Meoru* (*Vitis coignetiae*). *J East Asian Diet Life* 22: 642-648.
31. Song EY, Choi YH, Kang KH, Koh JS. 1998. Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of Cheju citrus fruits according to harvest date. *Korean J Food Sci Technol* 30: 306-312.
32. Hong SK. 2010. Study on quality properties of mulberry vinegar with different addition ratios of mulberry fruit. *MS Thesis*. Suncheon National University, Suncheon, Korea.
33. Woo CH, Park CH, Yoon HH. 2000. Production of acetic acid from cellulosic biomass. *Korean J Biotechnol Bioeng* 15: 458-463.
34. Yoon SR, Kim GR, Lee JH, Lee SW, Yeo SH, Jeong YJ, Kwon JH. 2010. Properties of organic acids and volatile components in brown rice vinegar prepared using different yeasts and fermentation methods. *Korean J Food Preserv* 17: 733-740.
35. Lee SO, Kim MJ, Kim DG, Choi HJ. 2008. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 139-147.
36. Wang MF, Shao Y, Yi JG, Zhu NQ, Rngarajan M, Lavoic EJ. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46: 4869-4873.
37. Stella SP, Ferrarezi AC, dos Santos KO, Monteiro M. 2011. Antioxidant activity of commercial ready-to-drink orange juice and nectar. *J Food Sci* 76: 392-397.
38. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 47: 3954-3962.
39. Cejudo Bastante MJ, Durán Guerrero E, Castro Mejias R, Natera Marin R, Rodriguez Doder MC, Barroso CG. 2010. Study of the polyphenolic composition and antioxidant activity of new sherry vinegar-derived products by maceration with fruits. *J Agric Food Chem* 58: 11814-11820.
40. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, Vanella A. 2000. Bioflavonoids as anti-radicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol* 16: 91-98.