

최 중
연구보고서

국산 야생차를 이용한 미생물 발효차의
개발 및 상품화

Development of Microbial Fermented Tea
Using Korean Wild Type Green Tea

연구기관
순천대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국산 야생차를 이용한 미생물 발효차의 개발 및 상품화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 04 월 24 일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 조영숙

세부연구책임자 : 박석규

연 구 원 : 이광수

연 구 원 : 김재용

연 구 원 : 왕수빈

협동연구기관명 : 진주산업대학교

협동연구책임자 : 남상혜

연 구 원 : 손미예

요 약 문

I. 제 목

국산 야생차를 이용한 미생물 발효차의 개발 및 상품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구에서는 녹차의 이용분야를 확대하는 방안으로 버섯균사체와 유산균을 이용한 국산 야생차로부터 미생물 발효차의 제조공정을 최적화하고, 이들 미생물 발효차 소재들을 다소비 식품으로 그 영역을 확대해 가고 있는 김밥류와 양갱, 소스 및 음료 등과 같은 일반 간편식품류에 적용하여 품질개선과 야생차 및 그 미생물 발효차의 분리성분에 대한 항균활성을 기본으로 가지면서 항염증, 항암 및 항돌연변이, 항치매 및 간기능 보호의 기능성 효과를 가지는 고품질 미생물발효차 및 그 응용의 간편식품류들을 아래와 같이 연구 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 국산 야생차를 이용한 「미생물 발효차」의 개발 및 최적화 제조조건 확립

가. 야생차를 발효기질로 한 “버섯균사체 발효차”의 최적화 제조조건 확립

- 야생차(생엽, 분말, 덩음)를 발효기질로 한 우수 버섯균사체의 선정
- 야생차 시료(생엽, 분말, 덩음)에 따른 버섯균사체의 발효특성
- 배양조건(온도, 습도, 발효기간)에 따른 버섯균사체의 발효특성
- 보조영양원(식물성 천연소재) 첨가에 따른 버섯균사체 발효특성
- 최종 제품의 품질특성(기호성, 주요 성분) 평가

나. 야생차를 발효기질로 한 “산(酸) 발효차”의 최적화 제조조건 확립

- 야생차(생엽, 분말, 덩음, 추출액)를 발효기질로 한 우수 산(酸)발효 균주의 선정
- 야생차 시료(생엽, 분말, 덩음, 추출액)에 따른 산생성균의 발효특성
- 배양조건(온도, 습도, 발효기간)에 따른 산생성균의 발효특성
- 보조영양원(식물성 천연소재) 첨가에 따른 산생성균의 발효특성
- 최종 제품의 품질특성(기호성, 주요 성분) 평가

다. 미생물 발효차의 품질평가와 저장성 및 제품화공정 확립

- 미생물 발효차의 저장 및 유통 중 품질유지
- 미생물 발효차의 편의성 포장법 검토
- 시제품의 실험실 Scale 제작
- 시제품의 품질특성(기호성, 주요 기능성 성분) 평가
- 대규모 산업화 생산을 위한 발효 및 제품화 공정 확립

2. 국산 야생차와 미생물 발효차를 이용한 「기능성 간편식품」의 상품화

가. 야생차를 이용한 “김밥과 면류” 간편식품의 개발

- 야생차의 채엽시기별로 첨가된 김밥 및 면류 제품의 품질특성 평가
- 야생차의 분말 입도별과 농축물 첨가량에 따른 품질특성 평가
- 채엽시기와 형태별로 첨가된 김밥 및 면류 제품의 저장성 평가
- 최종 제품의 품질특성(기호성, 상품성) 평가

나. 버섯균사체 발효차를 이용한 “양갱과 죽류” 간편식품의 개발

- 버섯균사체 발효차를 이용한 양갱류의 최적화 배합비율 선정
- 버섯균사체 발효차를 이용한 죽류의 최적화 배합비율 선정
- 최종 제품의 품질특성(기호성, 저장성, 상품성) 평가

다. 산(酸)발효차를 이용한 “소스와 음료류” 간편식품의 개발

- 산 발효차를 이용한 소스와 음료류의 최적화 배합비율 선정
- 산 발효차를 이용한 소스와 음료류의 최적화 배합비율 선정
- 최종 제품의 품질특성(기호성, 저장성, 상품성) 평가

3. 국산 야생차로부터 「기능성 물질」의 분리 및 생리활성 검색

가. 야생차 및 미생물 발효차의 생화학적 주요성분 분석

나. 기능성 신물질의 분리 및 화합물의 구조 동정

다. 야생차로부터 분리물질의 “항균 및 항염증” 활성 검색

라. 야생차로부터 분리물질의 “항암 및 항돌연변이” 활성 검색

마. 야생차로부터 분리물질의 “항치매 및 간기능 보호” 활성 검색

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 국산 야생차를 이용한 미생물발효차의 개발 및 최적화 제조조건

1) 국산 야생차를 이용한 버섯균사체 발효차의 최적화 제조조건

- 곡물을 이용한 버섯균사체 발효 「당화물」의 품질특성

환원당 생성량과 기호적 단맛은 *Aspergillus oryzae* MF-27이 가장 우수하였으나, 색의 밝기인 명도나 향기에서는 다소 불리하였다. 그러나 효소생성량이 강하여 전처리 당화공정에서 곡류 배지에서는 유리할 것으로 판단된다. 시험 버섯균사체 중에서는 환원당 생성량과 기호적 단맛은 *Flammulina velutipes* M-034가 가장 우수하였고, 명도나 향기에서도 양호하였다.

- 야생차를 발효기질로 한 우수 버섯균사체의 선정

5가지 버섯 균사체에서 팽이버섯이 가장 우수하였다. 다음으로는 동충하초와 느타리버섯 균사체가 비교적 우수하였다. 팽이버섯 균사체 *Flammulina velutipes* M-034로 PPO를 포함한 기타 가수분해효소의 조추출물 활성이 높은 것으로 확인되었다.

- 녹차 추출물의 식물성 배지액 제조조건

각 농도별로 버섯 균사체는 pellet를 형성하면서 잘 성장하였으나, 8% 이상 기질농도에서는 거의 비슷한 건조균체 무게를 나타내었다. 그 중에서 4-6%의 기질농도에서 건조균체 무게가 약간 높게 나타났다. 녹차분말 첨가배지로 사용한 밀 배지에서 공시균주 모든 버섯균사체의 생육은 가능하였으며, 팽이버섯 균사체는 액체배양에서와 유사하게 성장속도도 비교적 빠르고, 효소생성력도 우수하였다.

- 야생차 시료에 따른 버섯균사체의 발효특성

총 카테킨 함량은 생엽에서 높은 함량을 나타내었으며, 생엽 크기가 클수록 상대적으로 많은 함량을 나타내었으며, 그 산화물은 덩어리나 생엽을 전처리를 한 것이 높게 나타났으나 분말형태는 오히려 상당히 낮게 나타났다. 차잎 크기가 큰 것을 처리를 할수록 산화적 산화물을 대체로 높게 생성되는 것으로 나타났다.

- 발효조건에 따른 버섯균사체의 발효특성

발효온도에 따른 총 카테킨 함량은 발효온도가 낮을수록 상대적으로 많은 함량을 나타내었으며, 그 산화물은 최적 발효온도에서 대체로 높게 나타났다. 온도가 높은 30℃로 상승되면 효소적 산화물 생성보다는 다른 산화적 산화물을 생성되는 것으로 판단된다.

발효습도에 따른 총 카테킨 함량은 발효온도가 낮을수록 상대적으로 많은 함량을 나타내었으며, 그 산화물은 최적 발효온도에서 대체로 높게 나타났다. 총 카테킨 함량은 발효습도가 90%전후로 유지되는 것이 상대적으로 낮은 함량을 나타내었으며, 특히 발효습도가 낮으면 카테킨 함량이 높은 상태로 유지되었다.

발효시간에 따른 theaflavin과 thearubigen은 약간씩 증가하는 경향이었으며, 차잎에 존재하는 카테킨류는 감소하는 경향이였다. 팽이 버섯균사체 (*Flammulina velutipes* M-034)의 미생물 발효차는 쓴맛과 떫은 맛이 감소하면서 동시에 단맛과 지미가 약간씩 증가하는 경향을 나타낸다. 초기발효까지는 대체로 유리당 함량이 많아지는 경향이었는데, 그 이후부터는 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다. 유리아미노산은 glutamic acid와 theanine, sarcosine 등이 많이 포함되어 있었으며, 일부 증가하는 유리아미노산은 차 잎에 존재하는 일부 단백질을 단백질 분해효소의 촉매에 의한 가수분해작용으로 그 함량이 많아지는 경향이였다. 팽이 버섯균사체(*Flammulina velutipes* M-034)의 발효차 물추출물의 효소활성 변화는 1차 및 2차 발효 뒤집기까지는 대체로 효소활성이 증가하는 경향이었는데, 그 이후부터는 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다.

- 보조영양원 첨가에 따른 버섯균사체 발효특성

팽이버섯 균사체 배양은 다른 세균이나 곰팡이류와 달리 균사체 증식속도가 상대적으로 상당히 느리고 포자가 아닌 균사체를 이용하기 때문에 접종 혹은 배양 중에 오염문제나 효소활성이 대체로 곰팡이류보다 낮기 때문에 보조영양원의 첨가를 필요로 예측을 하였지만, 곡류 혹은 감자로부터 제조되는 소량 당화액으로 가능하였다.

2) 야생차를 발효기질로 한 “산(酸) 발효차”의 최적화 제조공정 확립

- 야생차의 전처리를 발효기질로 한 최종 산(酸)발효 균주의 선정

산 발효균에 따른 증식도는 *Lactobacillus bulgaricus* KOFRI 139 균종은 대

조구 1.3×10^6 CFU/mL에 비하여 4.6×10^6 CFU/mL로서 약 1.48배 정도 촉진되었다. 또한 *Streptococcus thermophilus* KOFRI 309 균종은 대조구 1.3×10^6 CFU/mL에 비하여 4.6×10^6 CFU/mL로서 약 1.48배 정도 촉진되었다.

- 전처리 형태에 따른 시험균주의 야생차 전처리 추출물들이 첨가된 단독배양에서는 모든 실험군에서 ST 균종이 LB 균종에 비하여 성장도가 양호하였으며, 버섯균사체 발효차 > 녹차 > 생엽 순으로 성장속도가 높았다. 단독배양보다는 혼합배양이 다소 효과적이었으며, 그 가운데는 LB + ST(1 : 2)가 효과적이었다.

- 추출물의 농도에 따른 녹차 열수 추출물보다는 팽이버섯 자실체 발효차의 추출물이 효과적이었는데, 녹차 추출물의 경우는 2% 농도 이상의 첨가에서 균 증식이 약간씩 감소하는 패턴을 나타내었으나, 팽이버섯 균사체 발효차 추출물은 6% 농도에까지 점진적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 유산균 <단독 발효형> 보다는 LB : ST의 비율 1 : 2 (균수 기준)의 <혼합 발효형>으로 산 발효를 실시하는 것이 녹차 및 버섯자실체 발효차의 대부분 추출물 농도에서 균 증식도에 효과적이었다.

- 식물성 배지액에 녹차 열수 추출물을 2.5% 농도로 첨가한 산 발효에서 황국균 *Aspergillus oryzae*의 당화액이 가장 산 발효에 적합하였으며, 다음으로는 팽이버섯 자실체 *Flammulina velutipes*의 당화액이 효과적이었다. 녹차 열수 추출물과 유사하게 황국균 *Aspergillus oryzae*와 팽이버섯 자실체 *Flammulina velutipes*의 당화액이 효과적이었으며, 백국균 *Rhizopus oryzae*의 당화액은 탄수화물 기질로서 비교적 낮은 산 발효액으로 평가되었다.

- 팽이버섯균사체(*Flammulina velutipes* M-034)배양한 그 분말/추출물의 혼합 유산균의 산 발효물의 유리당 함량 변화는 glucose와 maltose가 많았으며, sucrose와 fructose는 상대적으로 낮은 함량을 나타내었다. 혼합 유산균의 산 발효물의 유기산 함량은 발효에 따른 lactic acid 함량이 45~50%전후를 차지하였으며, 다음으로는 malic acid와 citric acid가 많았다.

- 배양조건에 따른 총 카테킨 함량은 발효온도가 낮을수록 상대적으로 많은 함량이 잔존되어 있었으며, 녹차 열수 추출물의 경우가 1차 발효를 거친 버섯균사체 발효차에 비하여 대체로 높게 나타났다. 또한 온도가 높은 20°C로 상승되면 유산균 증식 촉진에 의하여 카테킨류의 산화적 생성물인 theaflavin과 thearubigin

등이 많이 생성되었다. 발효 접종 종균량에 따른 산 발효의 특성에서 총 카테킨 함량은 종균량이 많을수록 비례적으로 그 함량이 낮아지는 경향이였다.

- 보조영양원 첨가에 따른 산(酸)생성균의 발효특성

당근 > 배추 > 양파 > 마늘 등의 순으로 공시균주의 성장촉진에 효과가 크게 나타났으며, 토마토, 상추 등은 약간 낮은 경향을 나타내었다. 또한 *Streptococcus thermophilus* 균주가 *Lactobacillus bulgaricus* 균주보다는 각 추출물에서 성장촉진에 효과적이었으며, 두 균주를 혼합한 LB + ST (1 : 2) 실험군이 단독배양보다 성장촉진에 효과적이었다.

- 최종 제품의 품질특성 평가

시험 미생물 발효차는 차의 색깔(color)과 신 냄새(sour)는 큰 차이가 없었으며, 맛(taste)은 팽이 버섯자실체 발효차의 산 발효물이 우수하였다. 다음으로 쓴맛(bitter)은 그 강도를 나타내는데, 버섯 자실체의 발효차 분말/추출물편이 녹차 분말/추출물 편보다 그 강도가 유의적으로 약한 경향을 나타내었다. 종합적으로 보면, 발효차 분말/추출물을 산 발효물로 이용하는 것이 다른 시험구에 비하여 종합적 기호성에서 좋은 결과를 나타내었다.

3) 미생물 발효차의 품질평가와 제품화공정 확립

- 미생물 발효차의 저장 및 유통중 품질유지

버섯균사체 발효차와 산 발효차를 실온(20℃)에서 보관하여 기호성과 색도를 조사한 결과, 팽이버섯 균사체 발효차가 색차계 색도나 색깔, 맛, 이상취 저감화 등의 관능적인 평가에서 좋은 것으로 나타났다.

- 미생물 발효차의 편의성 포장법 검토

미생물 발효차의 포장용기의 선택은 원료가 녹차이므로 일반적인 대중차 혹은 추출차와는 유사하게 ‘티백 형태’가 편리할 것으로 판단된다. 또한 미생물 발효차는 액상 발효차 형태보다는 반고체 배양에 의한 분말화 형태가 제조공법이나 상품화 단계에서 유통 및 관리측면을 고려한다면 농가보급형으로 적절한 것으로 판단된다. 발효차 음료화로는 경제성과 위생성 및 편의성을 고려한다면 폴리스티렌 용기가 바람직할 것으로 판단된다. 그 외에 미생물 발효차가 일부 소량으로 이용되는 죽류나 양갱류는 일반적인 종이, 펄프몰드, PSP 용기 등으로 이용하는 것이 바람직 할 것으로 판단된다.

- 시제품의 품질특성 평가

버섯균사체 발효차가 산 발효차보다 색깔이나 맛에서 우수하고 이상취도 높지 않아서 종합적인 기호도에서 산발효차 보다 좋은 것으로 평가되었다. 주요 유기산은 succinic acid, citric acid, malic acid가 검출되었는데, 이 중 succinic acid가 가장 높게 정량되었다. 산 발효차는 버섯균사체 발효차보다 총 유기산 함량이 높은 특징은 산 발효과정 중에서 유산 발효에서 유래되는 유산균 산생성 과정에서 생성되는 젖산이 주요 유기산이었다.

총 유리당은 발효차 맛의 감미 성분들이 포함되는 맛 성분으로 하나로 버섯균사체 발효차(건물기준, $4.94 \pm 0.04\%$)가 산발효차($2.04 \pm 0.04\%$)보다 높았으며, 그 주요 유리당은 fructose, glucose, sucrose가 검출되었는데, 이 중에 sucrose와 fructose가 높게 정량되었다. 유리아미노산은 총 14 여종의 아미노산이 검출되었으며, 특히 그 함량이 많은 유리 아미노산으로는 맛난 맛을 부여하는 glutamic acid가 가장 높았는데, 버섯균사체 발효차는 건물당 $973.8 \pm 6.7 \text{ mg}\%$ 였으며, 산 발효차는 $632.1 \pm 5.9 \text{ mg}\%$ 였다. 그 다음으로는 arginine, aspartic acid, arginine 등이 많았다.

카테킨 및 그 산화물의 함량은 버섯균사체 발효차는 GC가 가장 높은 함량으로 $63.4 \pm 6.3 \text{ mg/g}$ 이었으며, 산 발효차는 EGCG로서 $98.2 \pm 5.8 \text{ mg/g}$ 이었다. 한편 발효과정을 통하여 이들 카테킨류로 부터 전환되는 고분자 중합 산화물인 theaflavin(TF)과 thearubigin(TR)은 버섯균사체 발효차가 각각 $426.5 \pm 10.8 \text{ mg/g}$, $74.6 \pm 2.7 \text{ mg/g}$ 였으며, 산발효차는 각각 $47.6 \pm 9.8 \text{ mg/g}$, $19.8 \pm 3.6 \text{ mg/g}$ 로서 평균적으로 7~8배 이상 높게 나타났으며, 그리고 1차 산화물인 TF가 2차 산화물 TR보다는 각각 5.7배, 2.4배가 높은 함량을 나타내었다.

나. 국산 야생차와 미생물 발효차를 이용한 「기능성 간편식품」의 상품화

1) 야생차를 이용한 “김밥과 면류” 간편식품 개발

- 녹차물 백미밥을 이용한 「녹차물 김밥」의 제조

밥알의 끈기를 위하여 모든 쌀 4C+ 찰쌀 1C의 비율, 즉 4:1의 비율로 하여 밥을 지었을 때가 김밥 및 성형밥으로서 적합하였다. 녹차물 백미밥은 녹차물밥(쌀 4C + 녹차물(대작 10g을 5분 우린물) 400 ml를 넣음) 105g + 우영 10g + 생선가루 10g + 계란 10g + 녹차나물을 10g으로 하였을 때가 영양학적으로 우수하였다.

- 녹차 추출물을 이용한 「녹차 백미 성형밥」의 제조

기본적인 레시피는 우영 10g + 생선 10g + 녹차가루 10g + 버섯무침 10g + 깨 10g을 섞어 녹차밥 (210g)에 뿌려 섞어서 성형밥을 만들거나, 우영 10g + 생선 10g + 녹차잎 무침 5g + 녹차가루 5g + 버섯무침 10g + 깨 10g + 쇠고기 10g + 당근 10g 을 섞어 녹차밥 (210g)에 섞어 성형하였을 때가 적합하였다.

- 녹차분말 첨가에 따른 「칼국수」와 「수제비」의 기호도 평가

칼국수와 수제비의 반죽은 우리밀 270g(3인분) + 녹차가루 13.5g(5%) + 소금 2.7g(1%)으로 하여, 수제비 재료로는 가루 반죽(밀가루 90g), 새우 20g, 조갯살 20g, 양파 20g, 감자 20g, 당근 10g, 호박 20g, 버섯 10g, 마늘 5g, 소금 1g, 녹차잎 무침 5g, 지단 5g으로 결정하였다.

- 녹차분말 첨가에 따른 「녹차밥」과 「녹차김밥」의 기호도, 색차도 평가

녹차를 첨가한 밥과 김밥의 관능검사에서 녹차를 첨가한 밥의 경우 학생 그룹에서는 녹차의 첨가율이 증가할수록 전반적인 색, 맛, 질감, 향 같은 기호도가 낮아졌다. 그러나 30-40대 성인 그룹의 경우는 대조군에 비해 색과 향미는 1.5% 첨가군이 그리고 전체적인 맛에 있어서는 분말녹차를 1%, 1.5% 첨가한 군에서 색, 맛, 질감, 향, 종합적인 맛 등 전반적으로 기호도가 높아졌으며 유의적인 차이를 보였다. 쌀밥과 김밥의 기능성을 강화할 목적으로 분말 녹차를 0%, 1%, 1.5%, 2% 혼합하여 밥을 지어 분말 녹차밥과 김밥의 품질특성에서 분말녹차를 첨가한 밥의 색깔은 암녹색을 나타냈으며 분말녹차 첨가량이 증가할수록 어두워졌다.

- 우동의 경우 3% 녹차가루를 첨가 반죽하여 만든 우동이 색이나 맛, 질감, 향, 종합적인 맛 등 가장 맛있는 우동으로 평가되었으며 자장면의 경우도 3% 녹차가루를 첨가한 면으로 만든 것이 모든 검사 결과 좋게 나타났으나 6%의 경우도 우동 6% 보다는 좋은 결과여서 자장면의 부재료와 어우러짐이 좋은 것으로 사료됨.

- 녹차 추출물의 항균력은 대장균 고체배양에서는 최소저해농도 MIC는 10 mg/paper disk였으며, 무색소 추출액은 40 mg/paper disk였다. 한편 액체배양에서 녹차 추출물의 최소저해농도 MIC는 20 mg/mL 농도의 범위였다. 분말 녹차 첨가량이 증가할수록 미생물의 생육이 억제되었으며, 특히 분말녹차 2% 첨가군이 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 분말 녹차밥과 김밥을 지을 때 분말녹차 1%, 1.5% 첨가가 영양학적으로 우수하고 종합적인 관능 면에서 적절하다고 생각되며

위생성 및 보존성 개선에 기여할 것으로 생각된다.

2) 버섯균사체 발효차를 이용한 “양갱과 죽류” 간편식품 개발

- 버섯균사체(팽이버섯) 발효차를 첨가한 흰죽의 경우 색상에 있어 관능검사 및 육안 모두 뚜렷한 차이가 나타났으며 향, 종합적인 맛 등 전반적으로 기호도가 높게 나타났다. 녹두죽의 경우 대조군에 비하여 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 맛, 아욱죽 모두 비슷한 결과를 나타내었다. 그러나 버섯균사체(팽이버섯) 발효차를 첨가한 홍합죽의 경우 2% 첨가군이 색, 맛, 질감, 향, 종합적인 맛 등 전반적인 기호도가 높게 나타났다.

- 양갱의 품질 변화

버섯균사체(팽이) 발효차를 첨가함으로써 호박양갱은 18.4 °Brix, 녹두양갱은 17.6 °Brix로 대조군에 비하여 약 2 °Brix 낮은 수치를 나타내었다. 색도를 측정 한 L, a 및 b 값에서 버섯균사체(팽이) 발효차의 첨가량이 증가함에 따라 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 대조군의 L(lightness)값이 각 34.16, 46.13으로 가장 높게 나타났으며, 버섯균사체(팽이) 발효차 첨가 2% 군에서 28.82, 33.96으로 가장 낮은 값을 나타내어 버섯균사체(팽이) 발효차의 첨가량이 증가할수록 L 값은 감소하여 어두운 색을 나타내었다.

- 양갱의 조직감에서 견고성(hardness)은 두 가지 양갱 모두 버섯균사체(팽이) 발효차의 첨가량이 증가할수록 각각 감소하였으며, 탄력성(springiness)은 버섯균사체(팽이) 발효차를 첨가한 녹두양갱 실험군은 탄력성이 증가하였으나 호박양갱은 감소하는 경향을 보였다. 씹힘성(chewiness) 또한 녹두양갱 실험군에서는 값이 증가하였으나 호박양갱은 분말 버섯균사체(팽이) 발효차를 첨가한 실험군의 값이 감소하였다.

- 버섯균사체 발효차를 첨가한 호박과 녹두양갱의 관능검사에서 버섯균사체 발효차를 첨가한 호박양갱의 경우 그룹간의 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 전반적으로 2% 버섯균사체 발효차 첨가군에 비하여 1% 버섯균사체 발효차 첨가군의 기호도가 높았다.

3) 산 발효차를 이용한 “소스와 음료류” 간편식품 개발

- 녹차 및 산발효를 이용한 마요네즈 야채소스의 최적 배합비율은 마요네즈 야채소스 기본재료로서 마요네즈 10g, 사과즙 10ml, 배즙 10ml, 마쇄시킨 바나나 10g, 양파가루 5g가 적합하였으며, 최종 배합비율은 기본재료 22.5 g + 10% 녹차 추출액 10ml + 녹차가루 2% (0.5 g) 혹은 기본재료 22.5 g + 10% 녹차 추출액 10ml + 녹차가루 4% (1g)로 양호하였다.

- 마늘-야채 발효차 소스는 마늘-야채소스 재료로 마늘즙 10ml, 양파즙 20ml, 맛장 10ml, 식초(wine) 30ml, 설탕 1g을 기본으로 하였으며, 기본재료 30 ml + 유산균 발효차 5ml (17%) 혹은 기본재료 30ml + 유산균 발효차 10ml (34%)의 레시피가 적합하였다. 즉 유산균 발효차 5ml를 첨가하였을 때는 색과 맛은 양호하였으나, 신맛이 약간 적은 상태였는데, 10ml를 첨가하였을 때는 가장 적절한 배합비율이었다.

- 육류용 발효차 소스는 본 육류소스 재료로 맛장 15 ml, 마늘즙 5 ml, 양파즙 10ml, 올리고당 5ml, 표고버섯가루 2g, 소금 1g, 후추 약간으로 하였고, 기본육류소스 30ml + 10% 녹차추출액 10ml + 녹차가루 2% (0.6g) 혹은 기본육류소스 30ml + 10% 녹차추출액 10ml + 녹차가루 4% (1.2g)가 적합하였다.

- 발효차 음료류 제조를 위한 첨가물 사용에서 당류의 농도가 상승함에 따라 신맛, 쓴맛, 단맛이 종합적인 관능적 면에서 품질이 개선되었는데, 전체적인 기호면에서는 6% 농도가 가장 양호하게 나타났다. 과당이나 정백당이 큰 차이가 없이 맛을 개선시키는 효과를 나타내었지만, 정백당보다는 과당을 이용하는 편이 단맛을 주는 의미에서 유리할 것으로 판단된다.

- 정백당과 과당의 농도비를 일정하게 조절한 6% 당류액을 미생물 발효차 추출액에 첨가하여 관능평가를 실시한 결과는 정백당(3) : 과당(3)을 비슷한 농도 (w/w)로 첨가하면 어느 정도의 종합적인 기호도가 상승되는 효과가 있었다.

- 스위트메이트 및 β -사이크로덱스트린을 0~1.6%까지 농도 별로 첨가하여 신맛, 쓴맛, 단맛 및 종합적인 기호도를 조사한 결과, 이들 기능성 소재의 농도가 증가함에 따라 신맛 및 쓴맛이 관능적으로 일부 개선되었으나, 정백당 및 과당을 포함한 단맛이 강한 당류를 첨가한 것보다는 기호적 면에서 약간 감소하는 경향

이었다.

- 향미 개선제 4종을 0~0.10% 농도로 조절하여 첨가한 결과, 향료의 농도가 증가함에 따라 미생물 발효차 추출액의 맛이 약간 개선되었으나, 향 종류에 따라 큰 차이는 나타나지 않았다.

- 음료 액상 제품을 제조를 위하여 미생물 발효차의 추출단계(I)에서는 미생물 발효차를 정량하여 정제수로 세척한 후, 추출용기에 넣고 정제수를 1회 추출할 때에는 발효차 중량의 10배를 가하고, 80℃에서 5시간씩 2회 추출한다. 그리고 추출액을 모아서 냉각시키고, 원심분리·여과하여 상징액을 수득하여 70℃이하에서 감압농축하여 수분함량이 34.3%정도의 미생물 발효차 농축액을 제조한다. 음료화 공정단계((II))에서는 미생물 발효차 추출물, 비타민과 기능성소재 및 부형제 성분을 각각 용해하여 혼합한 후, 원심분리 및 필터 여과하여 상징액을 일정용량으로 조정한다. 그리고 추출액을 93℃에서 15초간 고온순간살균(HTST)한 다음, 100ml병에 담아서 capping하고, 80℃에서 15분간 후살균한 후, 포장하고 검사하여 최종제품으로 출하한다.

다. 국산 야생차로부터 「기능성 물질」의 분리 및 생리활성 검색

야생차의 주요 생화학적 물질의 변화와 버섯발효차 및 산발효차의 생리활성을 실험하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1) 야생차 잎의 채취시기별 주요성분의 변화

야생차 잎에 함유된 polyphenol의 함량은 5월 초순에 채취한 중작에서 37.032%, 카페인은 4월말에 수확한 세작에서 3.080%, 플라보노이드는 가장 늦게 수확한 대작에서 0.347%, theanine과 총 유리아미노산의 함량은 곡우 전에 가장 먼저 채취한 우전에서 각각 14.11, 27.97mg/g으로 가장 많이 함유되어 있었다.

2) 야생차 추출물의 분획 및 기능성 물질의 분리

야생차, 버섯발효차 및 산발효차로부터 생리활성효과의 시험을 위하여 용매의 극성별로 분획물을 만들었으며, 야생차로부터는 chromatography법을 이용하여 26종의 화합물을 분리하였으며, 이 중에서 9종의 물질에 대해서는 항염증효과 실험을 하였으며, 4종은 6종류의 미생물에 대하여 항균실험을 하였다. 또한 분리한

물질의 구조동정은 정제된 량이 비교적 충분한 5종에 대하여 실시하였다.

3) 야생차의 생리활성

야생차 분획물의 항균활성은 미약하였으나, 분리된 화합물인 CS-08과 CS-15는 E. coli에, CS-25는 S. typhimurium에 다소 강한 항균력을 나타내었다. 항염증활성은 Cyclooxygenase-1과 2에 대하여 활성은 나타났으나 선택성이 없었다.

4) 버섯발효차의 생리활성

- 유방암 세포(MCF-7), 자궁경부암 세포(HeLa), 간암세포(HepG2) 및 대장암세포(HT-29)에 대한 버섯발효차 용매분획물의 생육저해 효과는 대체로 0.2mg/ml 처리하였을 때, 10.84 ~ 39.70%의 저해효과를 나타내었다.

- 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline(IQ 0.2 μ g/plate)에 의하여 유발된 S. typhimurium TA98에 대한 버섯발효차의 항돌연변이 효과는 분획추출물을 0.6mg/plate 처리하였을 때 44.0 ~ 68.45%, catechin, luteolin 및 theanine을 0.2mg/plate 처리하였을 때 각각 55.85, 44.41 및 38.67%의 저해효과가 나타났다. 한편 S. typhimurium TA100에 대한 효과는 용매분획물에서 68.98~87.91%로 비교적 높게 나타났으나, catechin, luteolin 및 theanine은 32.13, 59.59 및 47.76% 억제율을 나타내었다.

- N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG 0.4 μ g/plate)에 의하여 유발된 S. typhimurium TA98에 대한 버섯발효차의 항돌연변이 효과는 분획추출물을 0.6mg/plate 처리하였을 때 75.83 ~ 86.66%, catechin, luteolin 및 theanine을 0.2mg/plate 처리하였을 때 각각 90.75, 64.50 및 90.75%의 저해효과가 나타났다. 한편 S. typhimurium TA100에 대한 효과는 용매분획물에서 57.25~83.75%, catechin, luteolin 및 theanine은 73.08, 70.25 및 77.91% 로 비교적 높은 억제율을 나타내었다.

5) 산 발효차의 생리활성

- 산 발효차의 항 치매활성은 실험동물의 뇌 조직에 생성된 superoxide radical과 과산화지질의 생성량을 측정하였다. 산 발효차 추출물의 섭취량이 많을수록 모두 생성량이 줄어드는 경향을 나타내었다. 또한 acetylcholine(ACh)의 함량은 50 μ g/ml 처리하였을 때 가장 많았으며, acetylcholinesterase(AChE)의 활성

은 처리농도가 높을수록, choline acetyltransferase(ChAT)의 활성은 20 μ g/ml일 때가 가장 높았다. 한편 monoamine oxidase-B(MAO-B)의 활성은 농도별도 대조군에 비하여 95.50~84.29%까지 낮아졌다.

- 산 발효차의 간 기능 보호활성 효과는 bromobenzene에 의하여 간독성이 유도된 간세포의 protein 합성능력은 butanol과 water 분획에서 각각 88.70 및 94.96%, lactic acid dehydrogenase (LDH)의 활성도 butanol과 water 분획에서 각각 122.38 및 104.77% 까지 회복되었다. 한편 사염화탄소(CCl₄)에 의하여 간독성이 유발된 쥐의 혈액 내 GOT 및 GPT 활성과 D-galactosamine/LPS에 의하여 유발된 쥐의 혈액 내 GOT, GPT 및 γ -GT활성은 비교적 극성이 큰 물질을 포함하고 있는 butanol과 water 분획에서 다소 회복되었다.

2. 활용에 대한 건의

본 과제에서 미생물발효차의 제조공정 최적화와 그 간편식품의 응용 및 기능성에 대한 연구는 미생물 발효차의 제조공정 최적화 도출 및 그 개발 제품에 대한 기능성 탐색 정도에 불과하였으므로, 이 결과를 근거로 하여 미생물 발효차에 대한 더욱 진보적인 품질특성 개선 및 기능성에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 아울러 본 연구의 결과는 다른 대용차 등에 그대로 적용 가능하리라 사료된다. 본 연구결과는 특허출원하고, 차와 음료 및 간편식품의 제품 생산라인을 갖춘 기업체에 기술을 이전하여 산업화가 가능하리라 생각된다.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	18
Chapter 2. Domestic and International Trends	20
Chapter 3. Research Contents and Results	21
1. Development of manufacturing process of 'mush' tea	21
2. Development of manufacturing process of 'sour' tea	36
3. Quality assessment of microbial fermented tea	49
4. Development of Kimbab and noodles using microbial fermented tea ...	56
5. Development of Yangang and Jook using microbial fermented tea	78
6. Development of sauce and drink using microbial fermented tea	94
7. Analysis of major chemical components from wild green tea	106
8. Isolation and identification of functional components from wild green tea	116
9. Physiological activities of wild green tea and microbial fermented tea	126
Chapter 4. Degrees of Achieving the Research Goals and Contribution to the Related Fields	168
Chapter 5. Plans for the Utilization of Results	169
Chapter 6. Scientific and Technological Informations Collected during the Study	170
Chapter 7. References	170

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	18
제 2 장	국내외 기술개발 현황	20
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	21
제 1 절	국산 야생차를 이용한 버섯균사체 발효차의 최적화 제조공정	21
1.	재료 및 방법	21
2.	결과 및 고찰	24
제 2 절	야생차를 발효기질로 한 “산(酸) 발효차”의 최적화 제조공정 확립	36
1.	재료 및 방법	36
2.	결과 및 고찰	36
제 3 절	미생물 발효차의 품질평가와 제품화공정 확립	49
1.	재료 및 방법	49
2.	결과 및 고찰	49
제 4 절	야생차를 이용한 “김밥과 면류” 간편식품의 개발	56
1.	재료 및 방법	56
2.	결과 및 고찰	56
제 5 절	버섯균사체 발효차를 이용한 “양갱과 죽류” 간편식품의 개발	78
1.	재료 및 방법	78
2.	결과 및 고찰	78
제 6 절	산 발효차를 이용한 “소스와 음료류” 간편식품의 개발	94
1.	재료 및 방법	94
2.	결과 및 고찰	94
제 7 절	야생차로부터 주요 화학성분 분석	106
1.	재료 및 방법	106
2.	결과 및 고찰	109

제 8 절	야생차로부터 기능성 성분의 분리	116
1.	재료 및 방법	116
2.	결과 및 고찰	116
제 9 절	야생차 및 발효차의 생리활성 검색	126
1.	재료 및 방법	126
2.	결과 및 고찰	135
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	168
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	169
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	170
제 7 장	참고문헌	170

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

본 연구에서는 녹차의 이용분야를 확대하는 방안으로 버섯균사체와 유산균을 이용한 국산 야생차로부터 미생물 발효차의 제조공정을 최적화하고, 이들 미생물 발효차 소재들을 다소비 식품으로 그 영역을 확대해 가고 있는 김밥류와 양갱, 소스 및 음료 등과 같은 일반 간편식품류에 적용하여 품질개선과 야생차 및 그 미생물 발효차의 분리성분에 대한 항균활성을 기본으로 가지면서 항당뇨, 항암 및 면역증진 등의 기능성 효과를 가지는 고품질 기능성 발효두부를 아래와 같이 연구 개발하고자 하였다.

제 2 절 연구개발 필요성

1. 기술적 측면

- 5월 이후의 값싼 차잎을 이용한 고부가가치 상품 개발
- 미생물 발효차의 제조 및 대량생산을 위한 최적화공정 확립 필요
- 미생물 발효차를 이용한 고기능성 간편식품(즉석)의 개발 필요

2. 경제·산업적 측면

- 국가 차원에서 경쟁력있는 유용작물로서 지역의 차류 명품 브랜드로 활용
- 중국, 인도차의 국내 개방에 따른 불안정한 국내산 차류 경쟁력 향상 기여
- 음료, 패스트푸드 등과 연계하므로 야생차 재배농가와 관련 제다산업의 소득 향상에 기여

3. 사회·문화적 측면

- 자극적인 녹차를 기피하는 소비자를 위한 건강기능식품으로 개발 가능
- 미생물 발효차의 우수성에 대한 입증으로 소비자의 수요 증진 기여
- 쉽게 먹을 수 있는 간편식품과 연계하므로 차문화 대중화에 기여

제 3 절 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2005)	야생차를 발효기질로 한 “버섯균사체 발효차”의 최적화 제조공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 야생차(생엽, 분말, 덩음)를 발효기질로 한 우수 버섯균사체의 선정 - 야생차 시료(생엽, 분말, 덩음)에 따른 버섯균사체의 발효특성 - 배양조건(온도, 습도, 발효기간)에 따른 버섯균사체의 발효특성 - 보조영양원(식물성 천연소재) 첨가에 따른 버섯균사체 발효특성
	야생차를 이용한 “김밥과 면류” 간편식품의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 야생차의 채염시기별로 첨가된 김밥 및 면류 제품의 품질특성 평가 - 야생차의 분말 입도별과 농축물 첨가량에 따른 품질특성 평가 - 채염시기와 형태별로 첨가된 김밥 및 면류 제품의 저장성 평가 - 최종 제품의 품질특성(기호성, 상품성) 평가
	야생차로부터 분리물질의 “항균 및 항염증” 활성 검색	<ul style="list-style-type: none"> - 야생차로부터 기능성 물질의 분리 및 구조결정 - 분리물질의 항균 스펙트럼 조사 평가 - 분리물질의 항염증 활성 조사 평가
2차 년도 (2006)	야생차를 발효기질로 한 “산(酸) 발효차”의 최적화 제조공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 야생차(생엽, 분말, 덩음, 추출액)를 발효기질로 한 우수 산(酸) 발효 균주의 선정 - 야생차 시료(생엽, 분말, 덩음, 추출액)에 따른 산생성균의 발효 특성 - 배양조건(온도, 습도, 발효기간)에 따른 산생성균의 발효특성 - 보조영양원(식물성 천연소재) 첨가에 따른 산생성균의 발효특성
	버섯균사체 발효차를 이용한 “양갱과 죽류” 간편식품의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 버섯균사체 발효차를 이용한 양갱류의 최적화 배합비율 선정 - 버섯균사체 발효차를 이용한 죽류의 최적화 배합비율 선정 - 최종 제품의 품질특성(기호성, 저장성, 상품성) 평가
	야생차로부터 분리물질의 “항암 및 항돌연변이” 활성 검색	<ul style="list-style-type: none"> - 야생차로부터 기능성 물질의 분리 및 구조결정 - 분리물질의 항암 활성 조사 평가 - 분리물질의 항돌연변이 활성 조사 평가
3차 년도 (2007)	미생물 발효차의 품질 평가와 저장성 및 제품화공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 미생물 발효차의 편의성 포장법 검토 - 시제품의 품질특성(기호성, 주요 기능성 성분) 평가 - 대규모 산업화 생산을 위한 발효 및 제품화 공정 확립
	산(酸)발효차를 이용한 “소스와 음료류” 간편식품의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 산 발효차를 이용한 소스와 음료류의 최적화 배합비율 선정 - 산 발효차를 이용한 소스와 음료류의 최적화 배합비율 선정 - 최종 제품의 품질특성(기호성, 저장성, 상품성) 평가
	야생차로부터 분리물질의 “항치매 및 간기능 보호” 활성 검색	<ul style="list-style-type: none"> - 야생차로부터 기능성 물질의 분리 및 구조결정 - 분리물질의 항치매 활성 조사 평가 - 분리물질의 간기능 보호 활성 조사 평가

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

1. 국내의 기술 개발 현황

- 녹차의 화학성분과 영양성분에 대한 보고가 주류임
- 녹차의 항암 및 항산화 효과를 비롯한 생리활성에 대한 보고가 대부분
- 우리나라에서는 불 발효차인 녹차가 대부분 제조되어 상품화되고 있으나, 발효차는 사찰을 중심으로 극히 일부만 제조되고 상품화는 전무한 실정
- 미생물 발효차의 생리활성에 관한 연구가 전무
- 차의 여러 가지 약리적인 효능이 매스컴에 의해 알려짐에 따라 차의 소비와 더불어 차의 생산도 크게 증가하고 있으나, 기후적인 요인에 의한 생산지역의 제한과 재배상의 기술부족 등으로 농가의 재배가 어려운 상황

2. 국외의 기술 개발 현황

- 차 생산국 중 한국, 일본을 제외한 유럽, 터키, 중국은 발효차가 주종
- 차의 응용뿐만 아니라 식품첨가제 및 사료첨가제로써 제품이 다양함
- 차 가격의 고가화로서 품질이 뛰어난 차 제품의 선호도가 높아지고 있고, 차에 대한 건강음료로서의 인식이 증가되고 있으며, 각종 과자, 면, 아이스크림 등의 여러 가지 식품에 첨가하여 마시는 차로서 기능 이외에 먹는 차로서의 소비증가
- 세계 여러 국가에서 생리활성기능을 갖는 성분을 추출하여 식품에 첨가하거나, 먹기 쉽고 체내에서 흡수가 잘 되도록 가공한 제품이 상당수 시판됨

제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과

제 1 절 국산 야생차를 이용한 버섯균사체 발효차의 최적화 제조공정

1. 재료 및 방법

가. 실험재료

본 실험에 사용한 야생 녹차와 미생물 발효차는 참여기업과 순천대학교 식품영양학과 발효학연구실의 대형 발효실에서 제조하여 실험재료로 사용하였다.

나. 미생물 발효차의 표준 제조공정

버섯균사체 미생물 발효차의 제조공정은 생 차잎을 살청(130~150°C, 5~10분) 처리하고 유념(20~30분)과정을 거친 후 1일간 일광 건조시킨 차잎을 전체 3단계로 구분되어 있는 발효공정 통하여 제조과정의 최적화를 모색하였다. 즉, 1단계(건조 차잎 20~30% 수분 공급시킨 차잎을 나무상자 퇴적→ 1차 뒤집기), 2단계(1차 뒤집기→ 2차 뒤집기), 3단계(2차 뒤집기~3차 뒤집기)로 나누어 그 발효특성을 파악하였다. 버섯균사체 배양은 곡류나 감자를 이용하여 사상균의 당화액을 만든 다음에 버섯균사체를 배양한 후에 부분적으로 살균시킨 유념처리 차잎에 그 배양액을 접종시켜 본 발효를 실시하였다.

다. 실험방법

1) 미생물 발효차의 스타트 배양을 위한 우수균주 선정

발효 공정단계에서 녹차 잎을 발효시킬 수 있는 성장속도가 빠르고 효소생성이 강한 버섯균사체와 유산균을 선정하기 위하여 한국전통발효식품연구소에 보관중인 57가지 균종에 비교적 효소생성력이 우수한 11가지 균종에 대하여 PDA 배지에서 균사체 배양하여 액체 천연배양액 균사체를 만들어 살균한 전처리 녹차 잎에 골고루 접종하여 20°C에서 배양한 후, 녹차 잎 반고체배지에서 성장속도와 효소생성이 우수한 균종을 선정하였다.

2) 카테킨 및 그 산화물 분석

시료 0.05g을 정량하여 각각 시험관에 넣고 1분간 sonication시킨 증류수를 30 mL 가하여 혼합시킨 다음 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 증류수를 가하여 50 mL로 만들었다. 그리고 Sep-pak C18 cartridge에 통과시켜 HPLC로 분석하였다.

분석조건은 Agilent ; column, C₁₈ (4.6 x 250 mm) ; solvent, 25% THF / 1% phosphoric acid ; flow rate, 1.0 mL/min ; detector, UV 210 nm, injection volume 10 μ l 로 하였다.

3) 유리당 분석

시료 100 mg을 정확히 취하여 시험관에 넣고 99% ethanol 3 mL와 80% ethanol 3 mL를 가하여 혼합시킨 후 20분간 방치한 후 20 $^{\circ}$ C의 항온상태에서 80% ethanol을 4 mL 더 가하여 정용한 다음, 원심분리(10,000rpm, 10 min)하여 상정액을 C₁₈ Sep-pak cartridge와 0.2 μ m membrane filter로서 색소 등의 이물질 제거한 여과액을 분석용 시료로 사용하였다. 유리당은 column, C₁₈ Reverse phase ; mobile phase, acetonitrile : water = 75 : 25 ; flow rate, 1 mL/min ; reflective index detector ; column temp., 30 $^{\circ}$ C 조건에서 HPLC로 분석(Shimadzu LC10A)을 실시하였다.

4) 유리아미노산 분석

시료 5g에 증류수 약 100 ml를 가하고 마쇄하여 500 ml로 정용한 후 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 추출하였다. 이 추출액을 0.2 μ m membrane filter와 Sep-pak C₁₈ cartridge로 여과한 후 아미노산분석기로 분석하였으며, 분석조건은 LKB 4150, alpha autoanalyzer, pH 3.2 to 4.25 : between alanine and cystine, pH 4.25 to 10.0 : after phenylalanine ; buffer flow, 40 mL/hr ; Ninhydrin flow rate, 25 mL/hr ; Column temp., 50~80 $^{\circ}$ C ; Injection volume, 40 μ l로 하였다.

5) 효소활성 분석

가) 조효소액 조제

조효소액은 homogenizer로 마쇄한 시료 10g과 증류수 100ml를 혼합하여 실온에서 2시간 동안 진탕추출하고 원심분리하여 조제하였다.

나) α -Amylase 활성도

Amylase 활성 측정은 조효소액 1ml에 1% 수용성 전분을 함유한 0.1 M acetate buffer(pH 4.8) 10ml를 가하고 30 $^{\circ}$ C에서 반응시킨다. 10분후에 반응액 1ml를 취하고 여기에 0.1N-HCl 10ml를 가하여 반응을 정지시킨다. 그 액 0.5ml에 0.005% iodine과 0.05% potassium iodine을 함유한 발색액 10ml를 가한 후 660 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. α -Amylase의 1 unit는 amylose-iodine complex의 blue color가

10% 감소되는 효소량으로 하였다.

다) Glucoamylase 활성도

Glucoamylase 활성 측정은 1%의 생전분을 함유한 0.05 M acetate buffer(pH 4.8) 5 ml에 동일한 완충액 2 ml를 가하고, 30°C에서 수분간 보온하였다. 여기에 조효소액 1ml를 가하고 30분간 반응시킨 후, 그 액 1 ml를 취하여 DNS법에 따라 반응 전후 액중의 환원당량을 측정하고, 양자의 차이로부터 효소반응에서 생산된 환원당을 산출하였다. Glucoamylase의 1 unit는 1시간에 1 μ mole의 glucose를 생산하는 효소량으로 하였다.

라) Protease 활성도

기질액은 milk casein 1.8 g을 sodium phosphate buffer(pH 7.2) 300 ml에 녹여 0.6% casein용액으로 조제하였다. 효소활성 측정은 기질용액 1 ml와 증류수 1 ml를 시험관에 넣고 항온수조에서 전처리한 후, 조효소액 1 ml를 가하여 35°C, 30분간 반응시킨 다음, 0.4 M trichloro acetic acid(TCA) 3 ml를 가하고 35°C에서 30분간 방치하여 반응을 중지시켰다. 반응중지액을 원심분리하여 침전물을 제거한 다음, 상정액 2 ml에 0.5M Na₂CO₃ 5 ml와 1/3 Folin phenol 시약 1 ml를 가하여 35°C 항온수조에서 30분간 발색시킨 후 실온으로 냉각시킨 다음, UV/Vis spectrophotometer로서 660 nm에서 optical density(O.D.)를 측정하여 tyrosine(μ g/ml)의 양으로 환산하여 protease활성을 나타내었다. Protease의 1 unit는 조효소액 1 ml가 1분간에 1 μ g의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

마) Pectinase

기질로 1% Pectic acid의 수용액 4 ml와 조효소액 1 ml를 반응혼합액으로 하여 15분간 작용시킨 후 1M-Na₂CO₃ 1 ml를 가하여 알칼리성으로 하고, 0.1N-KI 5 ml를 가하여 잘 진탕한 다음, 20분간 방치시킨 후 2N-H₂SO₄ 2 ml를 넣고 N/40 Na₂S₂O₃로 적정하여 galacturonic acid로 환산하였다.

바) PPO (polyphenol oxidase)

10 mM potassium phosphate 완충액 (pH 6.0)에 L-DOPA를 10 mM 되도록 용해시킨 기질용액 20 μ l에 효소용액 100 μ l를 가하였다. 효소 1 unit는 25°C, 490 nm에서 1분당 0.001을 흡광도 변화를 나타내는 양을 정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 버섯균사체 발효차의 제조공정도

버섯균사체 발효차의 제조공정에서, 먼저 버섯균사체 배양을 위한 식물성 액체 배지의 당화물을 만든 후, 적합한 종균을 접종하여 종균배양액을 조제하였다. 다음으로 그 배양액을 생엽분말이 포함된 액상배지에 접종하여서 발효시켜 아주 미량으로 적절한 방향제를 보충하여서 「버섯균사체 액상발효차」를 제조하였다. 한편으로 그 종균 배양액을 일반 녹차 제조와 유사한 살청과 유념과정을 거친 녹차 전처리 고품물에 접종하여서 뒤집기를 통한 최적 발효조건으로 자연발효하여 고품발효 잎차로서 「버섯균사체 발효차」를 제조하였다.

각 단계에서 주요한 당화물과 종균배양액, 고체/퇴적 발효물의 각 단계 뒤집기 공정에서 시기별로 발효특성을 분석하고, 최종적인 액상발효차와 고품발효차의 품질특성을 분석하였다.

나. 곡물을 이용한 버섯균사체 발효 「당화물」의 품질특성

1) 곰팡이 배양의 당화물

식품미생물로서 많이 이용되는 5가지 유용곰팡이를 스타트 종균으로서 이용하여 최종 액상발효차 및 고상발효차의 풍미나 발효도를 상승시키고자 증자시킨 곡물(밀)과 대두(노랑)를 분쇄하여 혼합한 배양액 상태로 당화시킨 결과(Table 3.1.1), 환원당 생성량과 기호적 단맛은 *Aspergillus oryzae* MF-27이 가장 우수하였으나, 색의 밝기인 명도나 향기에서는 다소 불리하였다. 그러나 효소생성량이 강하여 전처리 당화공정에서 혼합 곡류/두류 배지에서는 유리할 것으로 판단된다. 대체로 하등 곰팡이 보다는 고등 곰팡이류가 유리하지만 최종적인 차의 향미 측면에서는 거미줄이나 털곰팡이가 유리할 것으로 생각하지만, 성장속도나 발효율을 고려하면 황국균이 유익한 것으로 나타났다.

Table 3.1.1 Quality characteristics of hydrolyzing broth of soybean or wheat grain from molds for production of mycelial mushroom medium

Molds	Reducing sugar(%)	Hunter Color Index			Aroma ¹	Sweet taste ¹
		L	a	b		
<i>Rhizopus oryzae</i> MF-21	4.37	45.71	-0.26	4.67	3.2±0.4	2.9±0.2
<i>Rhizopus oligosporus</i> MF-45	4.21	44.53	-0.09	4.28	3.6±0.2	2.5±0.3
<i>Aspergillus oryzae</i> MF-27	8.92	41.29	-1.27	6.51	3.1±0.3	4.2±0.3
<i>Aspergillus niger</i> MF-23	7.65	32.76	-1.46	4.32	2.7±0.2	3.9±0.2
<i>Aspergillus wenti</i> MF-16	5.92	35.63	-1.24	3.86	2.9±0.4	3.4±0.4

¹Sensory evaluation by 5 score test(mean±sd)

2) 버섯균사체 배양의 당화물

발효성 당을 확보하기 위한 곡류/두류의 효소 당화물 공정과 종균배양액 공정 제조에서 동일한 버섯균사체 균종으로 처리할 목적으로 증자시킨 천연배지에 균사체

Table 3.1.2 Quality characteristics of hydrolyzing broth of soybean or wheat grain from for production of mycelial mushroom medium

Mycelial mushrooms	Reducing sugar	Hunter Color Index			Off-odor	Sweet taste
		L	a	b		
<i>Agaricus subfunereus</i> M-012	2.63	49.422	-1.52	4.85	3.5±0.2	2.5±0.3
<i>Pleurotus eryngii</i> M-034	2.97	45.26	-1.87	6.43	3.7±0.4	2.7±0.2
<i>Agaricus blazai</i> Murill M-014	1.82	41.08	-2.03	4.62	3.1±0.3	2.0±0.2
<i>Cordyceps militaris</i> M-075	2.15	44.34	-1.65	9.31	3.2±0.3	2.4±0.4
<i>Flammulina velutipes</i> M-034	3.20	47.62	-1.36	5.37	3.8±0.1	3.1±0.2

¹Sensory evaluation by 5 score test(mean±sd)

증식 속도가 빠른 느타리버섯, 새송이버섯, 아가리쿠스버섯, 동충하초, 팽이버섯 균사체를 접종하여 액체배양을 시킨 결과(Table 3.1.2), 시험 버섯균사체 중에서는 환원당 생성량과 기호적 단맛은 *Flammulina velutipes* M-034가 가장 우수하였고 명도나 향

기에서도 양호하였다. 그러나 식품 당화용 곰팡이에 비하여 일반 가수분해효소의 활성이 낮고 균사체 성장속도가 느려서 산업화를 위한 발효공정상에서 오염문제 해결과 당화를 주목적으로 하는 데는 다소 응용하는데 불리하였지만, 녹차 카테킨류를 산화시켜 미생물 발효차를 제조하는데 필수적인 산화효소(PPO)의 활성은 팽이버섯 균사체 *F. velutipes* M-034에서는 높아서 발효공정에서는 혼합 곡류/두류 배지에서는 유리할 것으로 판단되었다.

다. 야생차를 발효기질로 한 우수 버섯균사체의 선정

야생차의 전처리 공정(생엽, 분말, 볶음 정도)을 따른 버섯균사체의 증식도와 탄수화물 분해효소의 생성능을 분석한 결과(Table 3.1.3), 5가지 버섯 균사체중에서 팽이버섯이 가장 우수하였다. 다음으로는 동충하초와 느타리버섯 균사체가 비교적 우수하였다.

버섯균사체 발효차는 대엽종의 차잎을 버섯균사체가 분비하는 효소에 의하여 발효되는 “생물공학적 발효차”로 분류할 수가 있다. 따라서 맛 성분에 관련되는 가수분해효소인 탄수화물 분해효소(amylase, pectinase, protease) 및 폴리페놀 산화효소인 polyphenol oxidase(PPO) 활성을 조사하여 우수 공시균주를 선정한 결과로 팽이버섯 균사체 *Flammulina velutipes* M-034로 PPO를 포함한 기타 가수분해효소의 조추출물 활성이 높은 것으로 확인되었으며, <제 1 세부과제>는 경상남도농업기술원, 한국전통발효식품연구소 및 (주)머쉬토피아의 자문을 통하여 버섯균사체 우수 균종의 선정하였다.

본 실험 이후는 당화액 조제는 대두와 탄수화물(밀)을 6 : 4(w/w)로 혼합한 자연배지에 *Aspergillus oryzae* MF-27을 이용하여 당화액을 제조하며, 버섯균사체는 팽이버섯 균사체 *Flammulina velutipes* M-034를 사용하였다.

라. 녹차 추출물의 식물성 배지액 제조조건

1) 버섯 액체배양의 최적기질농도

버섯균사체를 액체배양 할 때 첨가하는 녹차추출물 농도를 검토하기 위하여 500 mL의 삼각플라스크에 PDB(감자 추출물) 배지 100 mL의 증류수를 넣고 각 농도별 2%, 4%, 6% 및 8% 농도로 첨가하고 버섯균사체를 배양한 결과는 Table 3.1.4와 같다. 각 농도별로 버섯 균사체는 pellet를 형성하면서 잘 성장하였으나, 8% 이상 기질농도에서는 거의

비슷한 건조균체 무게를 나타내었다. 그 중에서 4-6%의 기질농도에서 건조균체 무게가 약간 높게 나타났다.

Table 3.1.3. Mycelial growth of mycelial mushroom on PDB medium added with water extract of raw, powder and roasting green tea

Mycelial mushroom	Mycelial growth			Enzyme (U/mL) ¹		
	Raw	Powder	Roasting	Raw	Powder	Roasting
<i>Agaricus subfunereus</i> M-002	++	+++	+++	0.57	2.37	2.13
<i>Pleurotus eryngii</i> M-003	+	+	++	-	0.19	0.12
<i>Agaricus blazai</i> Murill M-011	+	++	++	-	0.26	0.48
<i>Cordyceps militaris</i> M-025	++	+++	+++	0.32	1.14	1.79
<i>Flammulina velutipes</i> M-034	++	+++	+++	0.28	2.98	3.14

¹Carbohydrate - hydrolyzing enzyme(amylase) activity analyzed by Lee method on liquid culture added with raw, powder and roasting green tea.

2) 녹차분말이 첨가된 곡류 배지를 이용한 버섯균사체의 고체배양

녹차분말을 첨가한 밀 배지를 사용하여 느타리, 동충하초, 아가리쿠스 및 팽이 버섯균사체를 배양하였을 때의 생육정도를 관찰하여 Table 3.1.5에 나타내었다. 녹차분말 첨가배지로 사용한 밀 배지에서 공시균주 모든 버섯균사체의 생육은 가능하였으며, 버섯 균사체의 성장속도는 사용한 주요 배지의 종류보다 버섯균사체의 균종 성장속도의 특성에 따라 큰 차이를 나타내었는데, 팽이버섯 균사체도 액체배양에서와 유사하게 성장속도도 비교적 빠르고, 효소생성력도 우수하였다.

Table 3.1.4. Growth of mycelial mushroom on PDB medium added with water extract of green tea

Mycelial mushroom	Conc. (%)	Dry cell weight (g/L)
<i>Agaricus subfunereus</i> M-002	2	2.86 ± 0.21
	4	2.80 ± 0.12
	6	2.58 ± 0.08
	8	2.02 ± 0.24
<i>Pleurotus eryngii</i> M-003	2	1.85 ± 0.26
	4	1.73 ± 0.22
	6	1.62 ± 0.07
	8	1.56 ± 0.04
<i>Agaricus blazai</i> Murill M-011	2	2.96 ± 0.11
	4	3.12 ± 0.08
	6	2.70 ± 0.18
	8	2.17 ± 0.03
<i>Cordyceps militaris</i> M-025	2	3.42 ± 0.12
	4	3.37 ± 0.09
	6	3.19 ± 0.07
	8	2.86 ± 0.10
Flammulina velutipes M-034	2	3.28 ± 0.07
	4	3.24 ± 0.02
	6	2.97 ± 0.15
	8	2.26 ± 0.19

Table 3.1.5. Growth of mycelial mushrooms on soybean or wheat semi-solid medium added with powdered green tea

Media	Mycelial mushrooms				
	<i>Agaricus subfunereus</i> M-012	<i>Pleurotus eryngii</i> M-034	<i>Agaricus blazai</i> Murill M-014	<i>Cordyceps militaris</i> M-075	<i>Flammulina velutipes</i> M-034
Soybean	++	+	++	+	++
Wheat	+++	+	+++	+	+++

Mycelial growth = + , slow ; ++, mederate ; +++, fast

즉, 대두 혹은 밀 배지 사이에는 버섯균사체 생육정도의 차이가 약간 나타났지만, 동일 배지에서 느타리 및 팽이버섯 균사체의 생육이 아가리쿠스 버섯 균사체의 생육보다 빠르게 나타났다.

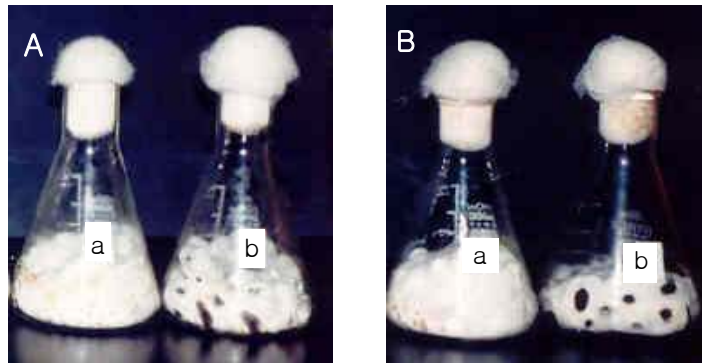


Fig. 3.1.1. Growth of mycelial mushroom on soybean or wheat grain solid medium added with powdered green tea

A: *Agaricus subfunereus* M-012, B: *Flammulina velutipes* M-034
a: soybean ; b: wheat

3) 버섯균사체의 성장에 미치는 녹차 추출물-밀 배지의 초기 pH영향

밀 배지의 추출물(고형물 3%)에 녹차 추출물을 4% 농도로 첨가한 천연배지에 초기 pH를 달리하여 25°C에서 팽이버섯 균사체 배양을 시킨 결과, 균 생육도는 Table 3.1.6과 같다. 최종 pH는 배양 후에 약간 감소하였으며, 배양 후로 증류수로 세척한 후의 건조 균체량은 초기 pH 5.5 부근에서 약간 양호하였으나 큰 차이는 나타나지 않았다.

Table 3.1.6. Changes in mycelial growth of *Flammulina velutipes* M-034 at different initial pH on soybean liquid medium added with green tea

Initial pH	Final pH	Dry cell weight (g/L)
4.5	4.2	2.85 ± 0.10
5.0	4.4	3.13 ± 0.08
5.5	5.1	3.35 ± 0.03
6.0	5.3	3.12 ± 0.11
6.5	5.6	3.01 ± 0.07

마. 야생차 시료에 따른 버섯균사체의 발효특성

차잎의 전처리 조건별로 팽이버섯 균사체 *Flammulina velutipes* M-034의 발효에서 카테킨류 및 그 발효산물인 theaflavin과 thearubigin의 함량 변화를 조사한 결과

Table 3.1.7. Changes in total catechin and their oxidized compounds of fermented tea prepared with *Flammulina velutipes* M-034 mycelial mushroom at different samples (mg%)

Catechin oxidized comp.	Samples				
	Raw 1	Raw 2	Raw 3	Powder	Roasting
Total catechin(mg/g)	178.43	189.31	230.68	170.42	150.42
Theaflavin(%)	0.27	0.43	0.56	0.39	0.65
Thearubigen(%)	2.34	4.37	5.68	4.54	7.46

Raw 1~3 (leaf size)

(Table 3.1.7), 총 카테킨 함량은 생엽에서 높은 함량을 나타내었으며, 생엽 크기가 클 수록 상대적으로 많은 함량을 나타내었으며, 그 산화물은 더움이나 생엽을 전처리를 한 것이 높게 나타났으나 분말형태는 오히려 상당히 낮게 나타났다. 차잎 크기가 큰 것을 처리를 할 수록 산화적 산화물을 대체로 높게 생성되는 것으로 나타났다.

바. 발효조건에 따른 버섯균사체의 발효특성

1) 발효온도에 따른 버섯균사체의 발효특성

차잎의 발효 온도별로 팽이버섯 균사체 *Flammulina velutipes* M-034의 발효에서 카테킨류 및 그 발효산물인 theflavin과 thearubigin의 함량 변화를 조사한 결과 (Table 3.1.8), 총 카테킨 함량은 발효온도가 낮을수록 상대적으로 많은 함량을 나타내었으며, 그 산화물은 최적 발효온도에서 대체로 높게 나타났다. 온도가 높은 30℃로 상승되면 효소적 산화물 생성보다는 다른 산화적 산화물을 생성되는 것으로 판단된다.

Table 3.1.8. Changes in total catechin and their oxidized compounds of fermented tea prepared with *Flammulina velutipes* M-034 mycelial mushroom at different samples (mg%)

Catechin oxidized comp.	Fermentation temp.(℃)				
	18	20	24	27	30
Total catechin(mg/g)	148.63	145.22	132.41	127.32	120.65
Theaflavin(%)	0.39	0.56	0.61	0.52	0.43
Thearubigen(%)	2.21	4.68	6.83	6.03	4.21

2) 발효습도에 따른 버섯균사체의 발효특성

차잎의 발효 습도별로 팽이버섯 균사체 차잎의 발효 온도별로 팽이버섯 균사체 *Flammulina velutipes* M-034의 발효에서 카테킨류 및 그 발효산물인 theflavin과 thearubigin의 함량 변화를 조사한 결과(Table 3.1.8), 총 카테킨 함량은 발효온도가 낮을수록 상대적으로 많은 함량을 나타내었으며, 그 산화물은 최적 발효온도에서 대체로 높게 나타났다. 온도가 높은 30℃로 상승되면 효소적 산화물 생성보다는 다른 산화적 산화물을 생성되는 것으로 판단된다.

의 발효에서 카테킨류 및 그 발효산물인 theflavin과 thearubigin의 함량 변화를 조사한 결과(Table 3.1.9), 총 카테킨 함량은 발효온습도가 90%전후로 유지되는 것이 상대적으로 낮은 함량을 나타내었으며, 특히 발효습도가 낮으면 카테킨 함량이 높은 상태로 유지되었다. 또한 그 산화물인 theflavin과 thearubigin의 함량은 최적 발효습도에서 대체로 높게 나타났다.

Table 3.1.9. Changes in total catechin and their oxidized compounds of fermented tea prepared with *Flammulina velutipes* M-034 mycelial mushroom at different RH humidity (mg%)

Catechin oxidized comp.	Fermentation humidity(RH)				
	75%	80%	85%	90%	95%
Total catechin(mg/g)	160.24	152.73	140.21	137.38	140.13
Theaflavin(%)	0.13	0.37	0.52	0.62	0.56
Thearubigen(%)	2.56	4.39	6.31	7.36	5.47

3) 발효시간에 따른 버섯균사체의 발효특성

전통적으로 퇴적발효를 통하여 실시되어지는 미생물 발효차로서 팽이버섯 버섯균사체 *Flammulina velutipes* M-034의 발효공정에서 각 단계별 시료를 채취하여 발효도의 지표성분 중의 몇 가지에 대한 식품학적 특성을 조사하였다. 즉, 퇴적에 의한 반고체 배양을 시작하는 시점, 1차 뒤집기 후, 2차 뒤집기 후, 3차 뒤집기 후, 건조 전 단계로 나누어서 분석을 실시하였다.

가) 공정 단계별로 균사체 발효차의 카테킨류 및 그 산화물 조성

팽이버섯 버섯균사체(*Flammulina velutipes* M-034)의 미생물 발효차는 다른 녹차 혹은 홍차와 같은 이용되는 차잎의 종류나 채취시기와는 약간씩 다르고, 특히 차잎의 효소를 이용하지 않고 버섯균사체 생성 효소를 이용하므로 발효조건이 상당히 다른 독특한 발효차이다. 따라서, 미생물 발효차인 버섯균사체 발효차의 주요 카테킨류와 그 산화물을 HPLC로 분석 및 확인한 결과(Table 1.10), 버섯균사체 발효차 공정 단계별로 카테킨류 및 그 산화물의 함량 변화를 조한 것으로 대체로 발효공정에서 theaflavin과 thearubigen 및 미확인물질(미제시)은 약간씩 증가하는 경향이었으며, 차잎에 존재하는 카테킨류는 감소하는 경향이였다.

Table 3.1.10. Changes in catechin and their oxidized compounds of fermented tea prepared with *Flammulina velutipes* M-034 mycelial mushroom at different steps (mg%)

Catechin oxidized comp.	Fermentation period (Step)				
	Initial	1st	2nd	3rd	Final product
Total catechin(mg/g)	168.35	154.21	100.35	78.35	53.22
Theaflavin(%)	0.19	0.32	0.42	0.69	0.73
Thearubigen(%)	1.56	4.39	5.60	6.57	6.93

나) 공정 단계별로 버섯균사체 발효차 물추출물의 유리당 함량 변화

팽이 버섯균사체(*Flammulina velutipes* M-034)의 미생물 발효차는 자연발효를 통하여 쓴맛과 떫은 맛이 감소하면서 동시에 단맛과 지미가 약간씩

Table 3.1.11. Changes in free sugars of fermented tea prepared with *Flammulina velutipes* M-034 mycelial mushroom at different steps (mg%)

Free sugars	Fermentation period (Step)				
	Initial	1st	2nd	3rd	Final product
Fructose	56.61	40.32	30.47	28.43	20.79
Glucose	20.08	16.05	15.94	11.13	6.87
Sucrose	80.58	73.64	62.53	56.80	48.92
Arabinose	2.41	2.07	2.23	1.98	2.32
Xylose	5.65	5.28	4.63	4.20	3.86

증가하는 경향을 나타낸다. 주요 발효공정 단계별로 버섯균사체 발효차 물 추출물의 유리당 함량 변화는 Table 3.1.11과 같다. 표에 나타난 바와 같이 초기발효까지는 대체로 증가하는 유리당 함량이 많아지는 경향이었는데, 그 이후부터는 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다. 주요 유리당은 sucrose와 fructose였으며, 그 외에 glucose, xylose와 arabinose가 분석되었으며, 이들 단당류 중에 일부는 이는 버섯균사체 발효차 공정상에서 색소 생성과 기타 휘발성 성분의 생성으로 이용된 것으로 판단된다.

다) 공정 단계별로 버섯균사체 발효차의 유리아미노산 함량 변화

발효공정상에서 미생물 발효차는 자연발효를 통하므로 인하여 자연유래의 일부세균과 황국균과 백국균 등에 의하여 맛성분과 관련되는 유리당, 유기산 및 그 외 지미성분과 동시에 작용하여 쓴맛과 떼은 맛이 감소하면서 동시에 단맛과 지미가 약간씩 증가하는 경향을 나타낸다. 주요 발효 단계별로 팽이 버섯균사체(*Flammulina velutipes* M-034)의 발효차 물 추출물의 유리아미노산 함량 변화는 Table 3.1.12와 같다.

Table 3.1.12. Changes in free amino acids of fermented tea prepared with *Flammulina velutipes* M-034mycelial mushroom at different steps (mg%)

Free amino acid	Fermentation (Step)				
	Initial	1st	2nd	3rd	Final product
Theanine	647.2	760.8	658.5	586.7	338.3
Aspartic acid	97.4	110.3	109.2	98.4	86.3
Glutamic acid	294.0	312.3	274.1	265.8	243.4
Asparagin	34.2	41.9	48.6	47.07	49.4
Phenylalanine	19.3	20.5	22.7	23.5	24.9
Proline	21.4	23.4	22.5	25.2	25.8
Glycine	0.9	—	—	—	—
Alanine	28.3	30.5	33.3	36.5	39.7
Citrulline	3.4	3.8	3.5	3.1	2.8
Valine	28.7	32.7	30.6	31.3	33.7
Sarcosine	221.6	207.8	194.3	185.7	174.3
Isoleucine	15.7	17.2	19.5	20.6	21.4
Leucine	2.3	2.9	2.4	2.7	2.5
Tyrosine	23.1	22.6	19.3	15.4	13.2
Ornithine	4.0	3.6	3.1	2.8	2.4
Lysine	8.7	5.8	5.1	4.3	2.0
Histidine	5.3	5.9	6.3	7.6	8.4
Arginine	17.6	15.3	13.5	11.2	9.3

표에 나타난 바와 같이 glutamic acid와 theanine, sarcosine 등이 많이 포함되어 있었으며, 일부 증가하는 유리아미노산은 차 잎에 존재하는 일부 단백질을 단백질 분해효소의 촉매에 의한 가수분해작용으로 그 함량이 많아지는 경향이었는데, 일부 유리아미노산은 유리당과 유사하게 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다.

라) 공정 단계별로 버섯균사체 발효차 물추출물의 효소활성 변화

주요 발효공정 단계별로 팽이 버섯균사체(*Flammulina velutipes* M-034)의 발효차 물추출물의 효소활성 변화는 Table 3.1.13과 같다. 표에 나타난 바와 같이 1차 및 2차 발효 뒤집기까지는 대체로 효소활성이 증가하는 경향이었는데, 그 이후부터는 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 버섯균사체 발효차 공정상에서 맛 성분과 색소 및 향미 물질의 생성으로 이용되는 효소로서 다른 녹차나 홍차와는 미생물원에 의하여 제공된다는 것이 다른 것으로 우수균주의 분리가 중요한 요소가 될 것으로 판단된다.

Table 3.1.13. Changes in enzyme activities of fermented tea prepared with *Flammulina velutipes* M-034 mycelial mushroom at different steps (U/mL)

Enzyme activities	Fermentation period (Step)				
	Initial	1st	2nd	3rd	Before final step
α -Amylase	2.31	2.34	2.41	2.05	1.89
Glucoamylase	1.13	1.32	1.29	1.23	1.08
Protease	1.87	1.98	1.67	1.54	1.24
PPO	2.31	3.36	5.30	4.68	3.27

사. 보조영양원 첨가에 따른 버섯균사체 발효특성

팽이버섯 균사체 배양은 다른 세균이나 곰팡이류와 달리 균사체 증식속도가 상대적으로 상당히 느리고 포자가 아닌 균사체를 이용하기 때문에 접종 혹은 배양 중에 오염문제나 효소활성이 대체로 곰팡이류보다 낮기 때문에 보조영양원의 첨가를 필요로 예측을 하였지만, 곡류 혹은 감자로부터 제조되는 소량 당화액으로 가능하였다.

제 2 절 야생차를 발효기질로 한 “산(酸) 발효차”의 최적화 제조공정 확립

1. 재료 및 방법

가. 유산균주의 배양

산 발효차의 조제에서 사용되는 유산균주의 배양은 일반적인 유산균 배양의 방법을 통하여 실시하였다. 즉 야생차를 이용한 녹차분말(중작, 40 mesh)을 MRS broth(Difco)에 1%(w/v)농도로 첨가하여 김치, 요구르트 및 각종 침채류에 많이 분포하는 유산균주 11 균종을 접종(1%, v/v)하여 24시간 배양하였다.

나. 식물성 배지액 조제

분쇄한 보리쌀과 대두분말을 8 : 2(w/w)로 혼합하여 분말 5%의 농도가 되도록 배지를 조제한 후, 250 ml의 삼각플라스크에 100 ml씩을 넣고 멸균한 다음, 흑국균과 황국균 및 팽이버섯 균사체를 일정량씩 접종하여 25~30℃에서 3~7일간 120 rpm으로 진탕배양한 후, 그 여과액의 발효성당이 2%와 4%농도가 되도록 조절하여 식물성 배지액으로 사용하였다.

다. 산 발효차의 맛 성분 분석

유산균 미생물 발효차의 맛 성분인 유리당, 유리아미노산, 유기산의 함량 분석은 제3장 3.1.1의 실험분석법을 통하여 평가하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 야생차의 전처리를 발효기질로 한 최종 산(酸)발효 균주의 선정

1) 녹차분말에서 산 발효균 종류에 따른 증식도 비교

야생차를 이용한 녹차분말(중작, 40 mesh)을 MRS broth(Difco)에 1%(w/v)농도로 첨가하여 김치, 요구르트 및 각종 침채류에 많이 분포하는 유산균주 11 균종

Table 3.1.14 Cell growth of lactic acid bacteria on natural medium added with raw material powder, green tea powder, green tea and mycelial mushroom water extract

Acid – producing bacteria	Cell growth (CFU/mL)	
	Control	Green tea powder (1%, w/v)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KOFRI 158	3.1×10^6	5.6×10^6
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> KOFRI 139	2.9×10^6	9.8×10^6
<i>Lactobacillus plantarum</i> KOFRI 104	2.9×10^6	1.2×10^6
<i>Lactobacillus casei</i> KOFRI 162	2.7×10^6	2.3×10^6
<i>Lactobacillus fermentum</i> KOFRI 173	3.3×10^6	1.9×10^6
<i>Lactobacillus brevis</i> KOFRI 129	1.5×10^6	3.7×10^6
<i>Lactobacillus reuteri</i> KOFRI 172	2.1×10^6	1.4×10^6
<i>Streptococcus thermophilus</i> KOFRI 309	3.8×10^6	4.8×10^7
<i>Streptococcus faecalis</i> KOFRI 328	2.7×10^6	3.5×10^6
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KOFRI 012	1.3×10^6	6.2×10^5
<i>Lactococcus lactis</i> KOFRI 441	2.5×10^6	4.3×10^5
<i>Pediococcus cerevisiae</i> KOFRI 537	2.3×10^6	1.6×10^6

을 접종(1%, v/v)하여 24시간 배양한 다음, 녹차분말 무첨가의 대조구와 비교하여 균 증식도를 조사한 결과는 Table 3.1.14와 같다. 대체로 시험 대상균주의 균 증식은 대조구에 비하여 비슷하거나 약간 억제되는 패턴이었다. 그러나 *Lactobacillus bulgaricus* KOFRI 139 균종은 대조구 1.3×10^6 CFU/mL에 비하여 4.6×10^6 CFU/mL로서 약 1.48배 정도 촉진되었다. 또한 *Streptococcus thermophilus* KOFRI 309 균종은 대조구 1.3×10^6 CFU/mL에 비하여 4.6×10^6 CFU/mL로서 약 1.48배 정도 촉진되었다. 이상의 두 균주는 녹차분말 1% 첨가농도에서 균 생육이 억제되지 않아, 녹차 분말에 함유된 카테킨이나 카페인, 각종 유기산 등에 의하여 생육 영향을 크게 받지 않았다.

2) 야생차 가공/발효처리 형태에 따른 산 발효균의 증식도 변화

야생차의 전처리 형태별(생체분말, 녹차분말/열수 추출액, 자실체 팽이버섯 발효차 분말/열수 추출액)을 MRS broth(Difco)에 2.5%(w/v) 농도로 첨가하여 *Lactobacillus bulgaricus* (이하 LB로 표시)와 *Streptococcus thermophilus* (ST) 균종

을 단독 혹은 각각 혼합액의 비율(2:1, 1:2, 1:1)을 달리하여 접종(1%, v/v)하여 24시간 배양한 다음, 녹차분말 무첨가의 대조구와 비교하여 균증식도를 조사한 결과는 Table

Table 3.1.15. Cell growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* on natural medium added with raw material, green tea and mycelial mushroom tea

Acid – producing bacteria	Cell growth (CFU/mL)				
	Raw powder	Green tea powder	Green tea extract	Mush tea powder	Mush tea extract
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	3.1×10^6	5.6×10^6	7.3×10^6	8.9×10^6	2.8×10^7
<i>Streptococcus thermophilus</i>	4.5×10^6	6.8×10^6	9.6×10^6	0.6×10^7	2.3×10^8
LB + ST (2 : 1)	5.1×10^6	6.5×10^6	7.8×10^6	9.2×10^6	2.1×10^7
LB + ST (1 : 2)	5.9×10^6	7.4×10^6	9.3×10^6	2.1×10^7	3.5×10^8
LB + ST (1 : 1)	5.6×10^6	6.9×10^6	8.9×10^6	1.3×10^7	2.9×10^7

Mush tea extract was the hot water extract of microbial fermented tea cultured by mycelial *Flammulin velutipes* M-034.

3.1.15와 같다. 그 결과 시험균주의 야생차의 전처리 추출물들이 첨가된 단독배양에서는 모든 실험군에서 ST 균종이 LB 균종에 비하여 성장도가 양호하였으며, 버섯균사체 발효차 > 녹차 > 생엽 순으로 성장속도가 높았다. 특히 각각 분말형태의 산 발효보다는 열수 추출물의 산 발효가 다소 효과적이었다.

1차 년도의 <제1 세부과제>에서 버섯균사체 발효차에서 우수한 품질특성을 나타낸 팽이버섯 자실체의 발효차 추출물을 산 발효균으로 사용한 “ST 균종”에서는 그 증식도가 1.3×10^8 CFU/mL였으며, 분말형태로서 이용한 산 발효물에서는 0.6×10^7 CFU/mL였다. 또한 산 발효균으로 사용한 “LB 균종”에서는 그 증식도가 2.8×10^7 CFU/mL였으며, 분말형태로서는 8.9×10^6 CFU/mL를 나타내었다. 단독배양보다는 혼합배양이 다소 효과적이었다. 그 가운데는 LB + ST(1 : 2)가 효과적이었다.

3) 야생 발효차 추출물의 농도에 따른 산 발효균의 증식도 변화

야생차를 이용하여 제조한 녹차 및 팽이버섯 균사체 발효차의 추출물농축액(고형물 6.3% 수준)을 농도별(2, 4, 6%, v/v)로 MRS broth(Difco)배지에 첨가하여 유산

균 *Lactobacillus bulgaricus* (이하 LB로 표시)와 *Streptococcus thermophilus* (ST)

Table 3.1.16. Cell growth of mixed lactic acid bacteria on natural medium added with some different concentration of green tea and mycelial mushroom hot water extracts

Acid – producing bacteria	Cell growth (CFU/mL)					
	Green tea extract			Mush tea extract		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	6.7×10^6	3.1×10^6	5.4×10^5	2.2×10^7	5.1×10^7	8.4×10^7
<i>Streptococcus thermophilus</i>	7.3×10^6	4.5×10^6	6.2×10^5	0.7×10^8	6.7×10^8	1.3×10^9
LB + ST (2 : 1)	7.1×10^6	3.9×10^6	5.9×10^5	2.6×10^7	5.8×10^7	7.5×10^7
LB + ST (1 : 2)	8.2×10^6	5.6×10^6	7.3×10^5	3.2×10^8	4.9×10^8	3.6×10^9
LB + ST (1 : 1)	7.3×10^6	4.4×10^6	6.1×10^5	2.3×10^7	3.2×10^7	2.1×10^8

Mush tea extract was the hot water extract of microbial fermented tea cultured by mycelial *Flammulin velutipes* M-034.

균종을 단독 혹은 각각 혼합액의 비율(2 : 1, 1 : 2, 1 : 1)을 달리하여 접종(1%, v/v)하여 24시간 배양한 다음, 각 농도별로 비교하여 균증식도를 조사한 결과는 Table 3.1.16과 같다. 그 결과 녹차 열수 추출물보다는 팽이버섯 자실체 발효차의 추출물이 효과적이었는데, 녹차 추출물의 경우는 2% 농도 이상의 첨가에서 균 증식이 약간씩 감소하는 패턴을 나타내었으나, 팽이버섯 균사체 발효차 추출물은 6% 농도에까지 점진적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

그리고 유산균 <단독 발효형>보다는 LB : ST의 비율 1 : 2 (균수 기준)의 <혼합 발효형>으로 산 발효를 실시하는 것이 녹차 및 버섯자실체 발효차의 대부분 추출물 농도에서 균 증식도에 효과적이었다. 이는 녹차 열수 추출물보다는 팽이버섯 균사체 발효차의 추출물은 카테킨류 보다는 이들 산화물인 theaflavin 및 thearubigin이나 차엽에 포함된 각종 폴리머 등의 버섯 자실체에 생산된 효소 가수분해물들이 산 발효에 효과적인 저분자화되어 있기 때문인 것으로 추론된다.

나. 식물성 배지액 제조조건

분쇄한 보리쌀과 대두분말을 8 : 2(w/w)로 혼합하여 분말 5%의 농도가 되도록 배지를 조제한 후, 250 mL의 삼각플라스크에 100 mL씩을 넣고 멸균한 다음, 흑국균과 황국균 및 팽이버섯 균사체를 일정량씩 접종하여 25~30°C에서 3~7일간 120 rpm으로 진탕배양한 후, 그 여과액의 발효성당이 2%와 4%농도가 되도록 조절하여 식물성 배지액으로 사용하였다. 식물성 배지액에 녹차 열수 추출물을 2.5% 농도로 첨가하여 산 발효를 실시한 결과는 Table 3.1.17과 같다.

Table 3.1.17. Cell growth of lactic acid bacteria on mold and mycelial mushroom – saccharifying barley liquid medium containing 2.5% hot water extract of green tea

Acid – producing bacteria	Cell growth (CFU/mL)					
	<i>Rhizopus oryzae</i> MF-21		<i>Aspergillus oryzae</i> MF-27		<i>Flammulina velutipes</i> M-34	
	2%	4%	2%	4%	2%	4%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1.6×10^3	8.1×10^4	4.3×10^5	1.4×10^6	2.0×10^5	1.6×10^6
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2.9×10^3	9.7×10^4	5.1×10^5	2.9×10^6	3.4×10^5	2.8×10^6
LB + ST (1 : 2)	4.8×10^3	0.8×10^5	5.9×10^5	3.2×10^6	3.9×10^5	3.1×10^6

황국균 *Aspergillus oryzae*의 당화액이 가장 산 발효에 적합하였으며, 다음으로는 팽이버섯 자실체 *Flammulina velutipes*의 당화액이 효과적이었다. 가장 하등 사상균인 백국균 *Rhizopus oryzae*의 당화액은 아주 낮은 산 발효액으로 평가되었다. 그리고 전체 당화액은 4% 농도까지는 산 발효의 발효성 당농도로 적합하였다. 그리고 쌀, 밀, 수수, 조 등을 포함한 각종 곡류 중에서 보리 당화액은 MRS broth 배지에 비하여 대체로 균 생육도가 낮지만, 다른 응용면에서 가격이나 안전성 등으로 산 발효의 적절한 식물성 기초배지(영양원)인 것으로 판단된다.

식물성 배지액에 팽이버섯 균사체를 이용하여 제조한 발효차의 열수 추출물을 2.5% 농도로 첨가하여 산 발효를 실시한 결과는 Table 3.1.18과 같다. 표에 나타난 바와 같이 녹차 열수 추출물과 유사하게 황국균 *Aspergillus oryzae*와 팽이버섯 자실체

*Flammulina velutipes*의 당화액이 효과적이었으며, 하등 사상균인 백국균 *Rhizopus oryzae*의 당화액은 탄수화물 기질로서 비교적 낮은 산 발효액으로 평가되었다. 그리고 녹차분말의 열수 추출액과 마찬가지로 팽이버섯 균사체 보리 당화액은 전체적으로 당화액 4% 농도까지는 산 발효의 발효성 당농도로 적합하였으며, 또한 팽이버섯 자실체의 보리 당화액이 황국균이나 백국균의 당화액보다는 그 향기나 당화액의 색도 면에서 최종산물의 산 발효조건에서 오히려 유리하였다.

Table 3.1.18. Cell growth of lactic acid bacteria on mold and mycelial mushroom – saccharifying barley liquid medium containing 2.5% hot water extract of mycelial mushroom fermented tea

Acid – producing bacteria	Cell growth (CFU/mL)					
	<i>Rhizopus oryzae</i> MF-21		<i>Aspergillus oryzae</i> MF-27		<i>Flammulina velutipes</i> M-34	
	2%	4%	2%	4%	2%	4%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	5.4×10^4	3.2×10^5	6.8×10^6	4.9×10^7	4.8×10^6	0.2×10^7
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1.8×10^5	1.3×10^6	8.2×10^6	9.3×10^7	7.5×10^6	3.4×10^7
LB + ST (1 : 2)	1.6×10^6	0.9×10^7	4.4×10^7	3.7×10^8	6.6×10^7	3.1×10^8

다. 야생차 가공/발효처리에 따른 산(酸)생성균의 발효특성

1) 유리당 함량의 변화

야생차를 이용한 원료분말, 녹차 분말/추출물, 팽이 버섯균사체(*Flammulina velutipes* M-034)분말/추출물의 혼합 유산균의 산 발효물의 유리당 함량 변화는 Table 3.1.19와 같다. 표에 나타난 바와 같이 glucose와 maltose가 많았으며, sucrose와 fructose는 상대적으로 낮은 함량을 나타내었다. 그리고 녹차 및 발효차의 추출물 형태가 분말 형태에 비하여 산 발효과정에서 유리당 생성량이 양호하였다. 또한 팽이 버섯균사체 발효차가 녹차 분말/추출물에 비하여 대체로 증가하는 유리당 함량이 많아지는 경향이였다. 특히 팽이 버섯균사체 발효차를 산 발효의 소재로 활용하면 유산균 증식도에서도 효과적인 결과를 나타내었으며, 4가지의 발효성당의 함량이 높아 신

맛이나 차 류의 쓴맛 혹은 떫은맛을 저감화시키는 효과도 동시에 얻을 수가 있을 것으로 생각된다.

Table 3.1.19. Changes in free sugars of “sour black tea” prepared with green or mycelial mushroom fermented tea and mixed lactic acid bacteria (mg%)

Free sugars	Green & mush tea				
	Raw powder	Green tea extract	Green tea powder	Mush tea extract	Mush tea powder
Fructose	48.43	64.59	52.64	88.38	70.84
Glucose	63.37	177.81	118.25	311.37	247.25
Sucrose	21.75	83.42	64.77	43.02	37.08
Maltose	76.68	122.20	97.23	351.49	292.31

2) 유기산 함량의 변화

야생차를 이용한 원료분말, 녹차 분말/추출물, 팽이 버섯균사체(*Flammulina velutipes* M-034)분말/추출물의 혼합 유산균의 산 발효물의 유기산 함량 변화는 Table 3.1.20과 같다. 표에 나타난 바와 같이 유산균 발효에 따른 lactic acid 함량이 45~50%전후를 차지하였으며, 다음으로는 malic acid와 citric acid가 많았다. 그리고 유리당과 유사한 경향으로 녹차 및 발효차의 추출물 형태가 분말 형태에 비하여 산 발효과정에서 유산균 증식 촉진으로 인한 유기산 생성량이 양호하였으며, 팽이 버섯균사체 발효차가 녹차 분말/추출물에 비하여 대체로 약간 높은 경향이였다. 차 잎으로부터 유래되는 “차” 유기산과 발효과정에서 나타나는 “발효” 유기산으로 보면, 팽이 버섯자실체 발효차의 경우는 2단 발효형식을 실시하게 되므로 인하여 “차” 유기산 함량이 아주 낮은 것이 특징이였다.

3) 유리아미노산 함량의 변화

야생차를 이용한 원료분말, 녹차 분말/추출물, 팽이 버섯균사체(*Flammulina velutipes* M-034)분말/추출물의 혼합 유산균의 산 발효물의 유리아미노산의 함량 변화는 Table 3.1.21과 같다. 유리아미노산은 맛성분과 관련되는 유리당, 유기산 및 그 외 지미성분과 동시에 작용하여 쓴맛과 떫은맛이 감소하면서 동시에 단맛과 지미가 약간씩 증가시킬 수 있는 주요한 맛 성분이다.

Table 3.1.20. Changes in organic acids of “sour black tea” prepared with green or mycelial mushroom fermented tea and mixed lactic acid bacteria (mg%)

Organic acids	Green & mush tea				
	Raw powder	Green tea extract	Green tea powder	Mush tea extract	Mush tea powder
Citric acid	53.73	62.06	55.38	33.27	22.36
Lactic acid	232.42	316.14	251.74	423.01	330.63
Malic acid	61.38	87.69	68.06	43.54	33.84
Succinic acid	25.39	34.47	27.41	5.86	5.60
Acetic acid	—	2.5	—	—	—

산 발효차의 발효물 중에서 생엽 분말이나 녹차분말/추출액은 주요한 정미성분인 theanine 함량이 아주 많았으나, 버섯균사체 발효차의 경우에는 아주 낮은 함량을 나타내었다. 그리고 주요한 유리아미노산으로는 glutamic acid와 aspartic acid가 많이 포함되어 있었으며, 그 외는 앞의 유기산과 유리당 함량과 유사하게 추출액의 산 발효가 분말형 산 발효보다는 대체로 유리아미노산 함량이 많았다. 버섯균사체 발효차의 유리아미노산은 녹차보다 비슷하거나 약간 낮은 함량을 나타내었다. 이는 2단 발효과정에서 갈색화 반응과 유산균 증식에 많이 이용된 것으로 판단된다.

라. 배양조건에 따른 산(酸)생성균의 발효특성

1) 발효온도에 따른 산 발효의 특성

녹차 및 팽이버섯 자실체 발효차의 열수 추출물을 이용한 산 발효의 온도별 각각 10℃와 20℃에서 실시하여 총 카테킨류 및 그 발효산물인 theflavin과 thearubigin의 함량 변화를 조사한 결과는 Table 3.1.22와 같다. 총 카테킨 함량은 발효온도가 낮을수록 상대적으로 많은 함량이 잔존되어 있었으며, 녹차 열수 추출물의 경우가 1차 발효를 거친 버섯균사체 발효차에 비하여 대체로 높게 나타났다. 또한 온도가 높은 20℃로 상승되면 유산균 증식 촉진에 의하여 카테킨류의 산화적 생성물인 theaflavin과 thearubigin 등이 많이 생성되었다.

Table 3.1.21. Changes in free amino acids of “sour black tea” prepared with green or mycelial mushroom fermented tea and mixed lactic acid bacteria (mg%)

Free amino acid	Green & mush tea				
	Raw powder	Green tea extract	Green tea powder	Mush tea extract	Mush tea powder
Theanine	412.1	334.7	221.5	38.4	25.3
Aspartic acid	82.4	71.5	65.2	83.1	64.0
Glutamic acid	250.6	215.9	189.4	194.6	168.9
Asparagin	21.5	13.2	–	12.6	8.7
Phenylalanine	7.8	6.2	2.8	10.2	7.3
Proline	13.7	12.8	10.3	18.3	14.3
Glycine	0.4	–	–	–	–
Alanine	17.7	24.1	18.0	21.1	18.5
Valine	21.0	13.9	10.7	25.8	24.6
Isoleucine	5.2	6.3	3.8	5.2	3.9
Leucine	2.1	1.7	0.8	4.2	–
Tyrosine	12.6	17.1	10.8	10.2	9.7
Lysine	0.5	0.8	–	–	–
Histidine	1.9	0.7	0.2	2.1	2.6
Arginine	10.2	13.8	11.6	14.4	6.7

Table 3.1.22. Changes in total catechin and their oxidized compounds of “sour black tea” prepared with green or mycelial mushroom fermented tea and lactic acid bacteria at 10 and 20°C of fermentation (mg%)

Catechin oxidized comp.	Fermentation temp.(°C)			
	10°C		20°C	
	Green tea ext.	Mush tea ext.	Green tea ext.	Mush tea ext.
Total catechin(mg/g)	376.82	45.46	203.13	23.58
Theaflavin(%)	0.14	0.58	0.21	0.68
Thearubigen(%)	0.37	5.72	0.73	7.05

2) 발효 접종 농도에 따른 산 발효의 특성

녹차 및 팽이버섯 자실체 발효차의 열수 추출물을 이용한 산 발효의 발효 접종 농도에 따라 실시하여 총 카테킨류 및 그 발효산물인 theflavin과 thearubigen의 함량 변화를 조사한 결과는 Table 3.1.23과 같다. 총 카테킨 함량은 농도가 높을

Table 3.1.23. Changes in total catechin and their oxidized compounds of “sour black tea” prepared with green or mycelial mushroom fermented tea and lactic acid bacteria according to inoculating cell amount (mg%)

Catechin oxidized comp.	Inoculating amount			
	10 ⁶ (Cells/mL)		10 ¹⁰ (Cells/mL)	
	Green tea ext.	Mush tea ext.	Green tea ext.	Mush tea ext.
Total catechin(mg/g)	224.18	67.90	267.17	38.29
Theaflavin(%)	0.15	0.67	0.43	0.84
Thearubigen(%)	0.25	4.09	0.32	5.47

수록 비례적으로 그 함량이 낮아지는 경향이었으며, 녹차 열수 추출물은 아직 미 발효 카테킨의 함량이 2단계의 1차 발효를 거친 버섯자실체 발효차에 비하여 대체로 높게 나타났다. 각 시료 군에서는 2차 산화물 thearubigen이 1차 산화물 theaflavin의 함

량보다 높게 나타났다. 유산균도 다른 사상균을 스타트로 사용하는 전통 발효식품의 발효공정에서 보다는 비례적인 점진적 상관관계를 나타내었다.

3) 발효시간에 따른 산 발효의 특성

녹차 및 팽이버섯 자실체 발효차의 열수 추출물을 이용한 산 발효의 기간을 각각 5일과 10일 장기간으로 액체배양하여 총 카테킨류 및 그 발효산물인 theflavin과 thearubigin의 함량 변화를 조사한 결과는 Table 3.1.24와 같다. 산 발효의 배양시간에 따른 총 카테킨 함량은 발효기간이 길수록 상대적으로 적은 함량이 잔존되어 있었으며, 아직 천연의 카테킨 상태로 많이 함유되어 있는 녹차 열수 추출물의 경우에는 1차 발효를 거친 버섯자실체 발효차에 비하여 대체로 높게 나타났다. 식물성 소재를 기본 영양원으로 한 배지에서는 MRS broth 배지에 비하여 산 발효의 기간을 아주 길게 해야 하는 단점이 있지만, 상품화를 위한 최적 천연영양배지로서 조건을 충족하기 위하여 보리 당화액을 사용하는 것이 그 대안으로 판단된다.

Table 3.1.24. Changes in total catechin and their oxidized compounds of “sour black tea” prepared with green or mycelial mushroom fermented tea and lactic acid bacteria during fermentation time (mg%)

Catechin oxidized comp.	Fermentation time (days)			
	5		10	
	Green tea ext.	Mush tea ext.	Green tea ext.	Mush tea ext.
Total catechin(mg/g)	456.82	230.79	280.62	83.26
Theaflavin(%)	0.21	1.32	0.54	2.68
Thearubigen(%)	1.48	5.74	3.43	7.12

마. 보조영양원 첨가에 따른 산(酸)생성균의 발효특성

유산균 배양은 천연 식물성 배지에서는 다른 MRS broth와 같은 합성배지와 달리 균사체 증식속도가 상대적으로 상당히 느리기 때문에 접종 혹은 배양 중에 오염 문제나 효소활성이 대체로 다른 세균류나 사상균보다 비교적 낮기 때문에 보조영양원의 첨가를 요구하며 그에 따른 최적의 첨가량과 그 조성 비율을 모색해야 한다. 특히

<제 2 세부과제>의 ‘소스와 음료’개발에서 품질개선을 위한 기호성과 기능성 증진이 라는 두 측면에서 고려할 필요가 있다. 이런 점으로부터 식물성 천연 발효소재의 종류와 각각 농도별 발효특성은 조사한 결과는 Table 3.1.25와 같다. 유산균의 성장속진은 대체로 과채류와 같은 식물성 재료가 효과적인데, 이는 재료 속에 함유된 각종 천연 유기산, 유리당 및 미네랄 등을 이용할 수 있기 때문으로 판단된다. 본 실험에서도 당근 > 배추 > 양파 > 마늘 등의 순으로 공시균주의 성장속진에 효과가 크게 나타났으며, 토마토, 상추 등은 약간 낮은 경향을 나타내었다. 또한 *Streptococcus thermophilus* 균주가 *Lactobacillus bulgaricus* 균주보다는 각 추출물에서 성장속진에 효과적이었으며, 두 균주를 혼합한 LB + ST (1 : 2) 실험군이 단독배양보다 성장속진에 효과적이었다.

Table 3.1.25. Cell growth of mixed lactic acid bacteria on natural medium added with some different concentration of green tea and mycelial mushroom hot water extracts

Food stuffs	Cell growth (CFU/mL)		
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	LB + ST (1 : 2)
Cabbage	7.6×10^6	8.5×10^7	2.3×10^8
Garlic	3.8×10^6	1.4×10^7	6.3×10^7
Radish	0.5×10^6	5.8×10^6	2.5×10^7
Onion(red)	4.3×10^6	0.8×10^7	6.8×10^7
Carrot	1.7×10^7	3.2×10^8	7.5×10^8
Pumpkin	5.6×10^5	6.3×10^5	7.3×10^5
Sweet pumpkin	2.7×10^6	4.8×10^6	8.7×10^6
Spinach	2.5×10^5	2.1×10^5	3.6×10^5
Tomato	1.0×10^5	4.2×10^5	7.4×10^5

바. 최종 제품의 품질특성 평가

야생차를 이용한 원료분말, 녹차 분말/추출물, 팽이 버섯균사체 (*Flammulina velutipes* M-034) 분말/추출물의 혼합 유산균의 산 발효물의 1차 발효물 관능검사의 변화는 Table 3.1.26과 같다. 표에 나타난 바와 같이 색깔(color)과 신 냄새(sour)는 큰 차이가 없었으며, 맛(taste)은 팽이 버섯자실체 발효차의 산 발효물이 우수하였다. 다음으로 쓴맛(bitter)은 그 강도를 나타내는데, 버섯 자실체의 발효차 분말/추출물편이 녹차 분말/추출물 편보다 그 강도가 유의적으로 약한 경향을 나타내었다. 종합적으로 보면, 발효차 분말/추출물을 산 발효물로 이용하는 것이 다른 시험구에 비하여 종합적 기호성에서 좋은 결과를 나타내었다. 최종 제품에 대한 반복적인 관능평가를 실시할 필요가 있으며, 이후의 실험에서 <제 3 차년도> "소스와 음료"의 2가지 측면에서 혼합유산균/식물성 탄수화물 당화물/과채류/발효조건 등의 조합을 재 선택하여서 최종 제품의 최적화 공정에 대한 결론을 도출하였다.

Table 3.1.26. Changes in sensory evaluation score of “sour black tea” prepared with green or mycelial mushroom fermented tea and mixed lactic acid bacteria at 20°C of fermentation

Green & mush teas	Sensory evaluation score				
	Color	Taste	Bitter	Sour	Overall - eating
Raw powder	3.9 ± 0.6	2.2 ± 0.5	4.8 ± 0.3	3.0 ± 0.2	2.9 ± 0.5
Green tea powder	4.3 ± 0.4	3.1 ± 0.3	4.5 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.7 ± 0.2
Green tea ext.	4.6 ± 0.3	3.5 ± 0.2	4.2 ± 0.3	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.3
Mush tea powder	4.3 ± 0.1	4.6 ± 0.3	3.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.7 ± 0.5
Mush tea ext.	4.2 ± 0.5	4.2 ± 0.4	2.9 ± 0.4	3.6 ± 0.4	4.1 ± 0.2

제 3 절 미생물 발효차의 품질평가와 제품화공정 확립

1. 재료 및 방법

가. 미생물 발효차의 저장성 평가

미생물 발효차의 저장중 품질특성 평가의 기본적인 항목인 색차계 색도와 관능 평가(색, 맛, 이상취)를 평가하였다.

나. 미생물 발효차의 맛 성분 분석

버섯균사체 및 유산균 미생물 발효차의 맛성분인 유리당, 유리아미노산, 유기산을 평가하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 미생물 발효차의 저장 및 유통중 품질유지

버섯균사체 발효차와 산발효차를 실온(20℃)에서 4개월 동안 보관하여 기호성과 색도를 조사한 결과는 Table 3.1.27과 같다. 버섯균사체 발효차는 산 발효차에 비하여 명도(L)는 약간 높았고, 저장 중에 명도의 감소는 산 발효차가 높게 나타났다. 적색도(a)는 산 발효차가 버섯균사체 발효차보다 비교적 낮았으며, 황색도(b)는 오히려 높은 경향을 나타내었고, 4개월 후에는 비슷한 값을 나타내었다. 그리고 음료로서 기호도 평가에서 2가지 발효차의 색깔, 맛, 이상취는 버섯균사체 발효차가 우수한 것으로 나타났지만, 활용하는 간편식품에 따라서는 오히려 산 발효차가 유리한 경우도 있을 수 있을 것 같다.

Table 3.1.27. Changes in color and sensory evaluation of 'mush tea' and 'sour tea' stored at 20°C for 4 months

Tea	Days	Color value			Sensory evaluation		
		L	a	b	Color	Taste	Odor
Mush tea	30	29.32±2.13	0.69±0.13	9.07±0.98	3.5±0.4	4.2±0.6	1.7±0.3
	60	27.28±1.72	0.80±0.09	8.34±0.32	3.4±0.2	3.8±0.2	1.8±0.2
	90	25.20±1.65	0.85±0.13	8.21±0.41	3.1±0.5	3.7±0.3	2.3±0.4
	120	22.60±1.20	0.96±0.05	7.38±0.36	2.9±0.4	3.3±0.5	3.9±0.3
Sour tea	30	26.79±1.44	0.43±0.07	11.54±0.87	2.6±0.2	3.1±0.2	1.3±0.1
	60	25.12±1.87	0.49±0.08	10.38±0.46	2.5±0.4	2.5±0.3	1.5±0.3
	90	21.34±1.32	0.58±0.03	9.60±0.24	2.2±0.1	2.3±0.1	2.1±0.2
	120	16.45±0.91	0.62±0.04	8.79±0.19	2.0±0.3	2.0±0.4	2.5±0.2

나. 미생물 발효차의 편의성 포장법 검토

미생물 발효차의 포장용기의 선택은 원료가 녹차이므로 일반적인 대중차 혹은 추출차와는 유사하게 '티백 형태'가 편리할 것으로 판단된다. 또한 미생물 발효차는 액상 발효차 형태보다는 반고체 배양에 의한 분말화 형태가 제조공법이나 상품화 단계에서 유통 및 관리 측면을 고려한다면 농가보급형으로 적절한 것으로 판단된다. 발효차 음료화로는 일반 대중음료에서 마찬가지로 알루미늄캔 혹은 스틸캔 등이 좋지만 생산가격 부담 등으로 농가보급형으로 곤란할 것 같다. 특히 투명 유리병의 경우에는 원료의 특징과 제품의 고유한 이미지 전달에서 시각적인 면에서 유리한 점이 있지만 유통-판매 관리상으로 부적절한 면이 많이 있다. 경제성과 위생성 및 편의성을 고려한다면 폴리스티렌 용기가 바람직할 것으로 판단된다. 그 외에 미생물 발효차가 일부 소량으로 이용되는 죽류나 양갱류는 일반적인 종이, 펄프폴드, PSP 용기 등으로 이용하는 것이 바람직 할 것으로 판단된다.

다. 시제품의 품질특성 평가

가) 기호성

버섯균사체 및 산발효의 발효 미생물 발효차에 대한 관능검사를 실시한 결과는 Table 3.1.28과 같다. 버섯균사체 발효차가 산발효차보다 색깔이나 맛에서 우수하

고 이상취도 높지 않아서 종합적인 기호도에서 산발효차 보다 좋은 것으로 평가되었다.

Table 3.1.28. Sensory evaluation of fermented mush tea and sour tea

Score	Mush tea	Sour tea
Color	3.6±0.4	2.8±0.3
Taste	3.5±0.6	3.1±0.4
Odor	2.1±0.7	1.4±0.9
Over all eating	3.3±0.8	2.9±0.6

나) 유기산 함량

버섯균사체 발효차 및 산 발효차 물 추출물의 유기산을 분석한 결과는 Table 3.1.29와 같다. 총 유기산은 전체적인 미생물 발효차의 신맛이나 상쾌한 맛과 향을 생성하는 데 기여하는 맛성분으로서 버섯균사체 발효차(1.46±0.06%)가 산 발효차(3.91±0.05%)보다 그 함량이 낮았으며, 그 주요 유기산은 succinic acid, citric acid, malic acid가 검출되었는데, 이 중 succinic acid가 가장 높게 정량되었다. 산 발효차는 버섯균사체 발효차보다 총 유기산 함량이 높은 특징은 산 발효과정 중에서 유산 발효에서 유래되는 유산균 산생성 대사에서 생성되는 젖산이 주요 유기산이었으며, 기타 미 동정 유기산도 포함되어 있었다.

Table 3.1.29. Contents of organic acids of water extracts from mush tea and sour tea (Dry weight base, %)

Organic acids	Mush tea	Sour tea
Succinic acid	0.64±0.09	0.98±0.10
Citric acid	0.48±0.03	0.74±0.04
Malic acid	0.25±0.04	0.30±0.03
Lactic acid	0.09±0.05	1.89±0.09
Total	1.46±0.06	3.91±0.05

Each sample analyzed in triplicate.

ND : Not detected.

다) 당질

버섯균사체 발효차 및 산 발효차 물 추출물의 유리당을 분석한 결과는 Table 3.1.30과 같다. 총 유리당은 발효차 맛의 감미 성분들이 포함되는 맛 성분으로 하나로 버섯균사체 발효차(건물기준, $4.94 \pm 0.04\%$)가 산발효차($2.04 \pm 0.04\%$)보다 높았으며, 그 주요 유리당은 fructose, glucose, sucrose가 검출되었는데, 이 중에 sucrose와 fructose가 높게 정량되었다. 특히 산 발효차는 glucose가 검출되지 않은 시료도 있었으며, 그 함량이 다소 낮은 것은 산발효차의 균종과 발효방법 등의 처리조건에 상이하므로 인하여 그 함량에서 차이가 있는 것으로 추측된다.

Table 3.1.30. Contents of free sugar of water extracts from mush tea and sour tea (Dry weight base, %)

Free sugars	Mush tea	Sour tea
Fructose	1.70 ± 0.03	0.92 ± 0.02
Glucose	0.37 ± 0.01	ND
Sucrose	2.87 ± 0.06	1.12 ± 0.04
Total	4.94 ± 0.04	2.04 ± 0.03

Each sample analyzed in triplicate.

ND : Not detected.

라) 유리아미노산

미생물 발효차 추출물의 유리아미노산 함량은 Table 3.1.31과 같다. 미생물 발효차에서 유리당, 유기산과 더불어 차의 맛에 결정적인 역할을 하는 유리아미노산은 총 14 여종의 아미노산이 검출되었으며, 특히 그 함량이 많은 유리 아미노산으로는 맛난 맛을 부여하는 glutamic acid가 가장 높았는데, 버섯균사체 발효차는 건물당

973.8±6.7 mg%였으며, 산 발효차는 632.1±5.9 mg%였다. 그 다음으로는 arginine, aspartic acid, arginine 등이 많았다. 이는 차엽의 특성에도 있지만 산생성균에 비하여 대체로 반고체 배양에서 발효도가 비교적 강한 버섯균사체 발효특성에 의한 유리아미노산 생성량이 많은 것으로 생각된다.

Table 3.1.31. Contents of free amino acids of water extracts from mush tea and sour tea (Dry weight base, mg%)

Amino acids	Mush tea	Sour tea
L-Aspartic acid	135.2±5.9	66.9±3.7
L-Threonine	23.5±6.1	30.3±1.4
L-Serine	69.3±5.8	43.8±3.5
L-Asparagine	76.2±3.2	53.9±5.0
L-Glutamic acid	328.0±12.6	196.2±9.4
L-Proline	24.6±2.6	11.8±0.9
L-Alanine	39.4±4.2	17.6±0.6
L-Leucine	36.1±5.3	16.3±0.3
L-Tyrosine	18.4±2.8	23.8±0.7
L-Isoleucine	19.2±2.1	13.4±0.3
L-Phenylalanine	22.8±1.6	15.2±0.7
L-Lysine	19.3±1.3	13.7±0.2
L-Arginine	148.6±4.7	113.5±3.6
L-Histidine	13.2±2.9	15.7±0.9
Total	973.8±6.7	632.1±5.9

Each sample analyzed in triplicate.

마) 카테킨류 및 그 유도체 성분

버섯 균사체 발효차 및 산 발효차 추출물의 catechin 및 그 산화물의 분석 결과는 Table 3.1.32와 같다. 각 미생물 발효차의 추출물에서 EGCG, EGC, GC, Catechin 및 Catechol이 분석되었으며, 버섯균사체 발효차는 GC가 가장 높은 함량으로 63.4 ± 6.3 mg/g이었으며, 산 발효차는 EGCG로서 98.2 ± 5.8 mg/g이었다. 한편 발효

Table 3.1.32. Contents of catechins, theaflavin and thearubigin of water extracts from mush tea and sour tea (Dry weight bases, mg/g)

Catechins	Mush tea	Sour tea
EGC	28.3 ± 1.8	56.2 ± 1.4
GC	63.4 ± 6.3	36.9 ± 0.8
Catechin	18.1 ± 1.4	53.1 ± 0.5
Catechol	14.8 ± 1.7	18.5 ± 0.2
EGCG	9.9 ± 0.5	98.2 ± 5.8
Subtotal(1)	134.5 ± 3.1	262.9 ± 2.9
Theaflavin	426.5 ± 10.8	47.6 ± 9.8
Thearubigin	74.6 ± 2.7	19.8 ± 3.6
Subtotal(2)	501.1 ± 9.6	67.4 ± 19.7
Total	635.6 ± 8.7	330.3 ± 20.3

Each sample analyzed in triplicate.

과정을 통하여 이들 카테킨류로부터 전환되는 고분자 중합 산화물인 theaflavin(TF)과 thearubigin(TR)은 버섯균사체 발효차가 각각 426.5 ± 10.8 mg/g, 74.6 ± 2.7 mg/g였으며, 산발효차는 각각 47.6 ± 9.8 mg/g, 19.8 ± 3.6 mg/g로서 평균적으로 7~8배 이상 높게 나타났으며, 그리고 1차 산화물인 TF가 2차 산화물 TR보다는 각각 5.7배, 2.4배가 높은 함량을 나타내었다.

라. 대규모 산업화 생산을 위한 발효 및 제품화 공정

미생물 발효차(버섯균사체) 제조를 위한 전처리(당화공정), 발효(버섯균사체 배양) 및 제품화 공정의 개략도는 다음과 같다. 전체 공정을 크게 나누어 보면, 팥이 버섯 균사체 배양액의 조제공정(I), 차잎을 살청하거나 유념하는 차잎 전처리 공정(II), 버섯균사체 배양액을 전처리 차잎에 접종하여 1, 2차로 발효시키는 발효공정(III) 및 체별이나 선별과정을 통하여 이루어지는 상품화 공정(IV)으로 구분된다. 산 발효차 제조공정은 발효균주의 영양보조원으로 과일, 채소류 추출물을 활용하여 버섯균사체 발효차 제조공정에서 반고체 발효 대신에 침지발효를 실시하면서 이하 상품화공정은 동일하게 처리한다.

Grain, Potato → Soaking → Steaming

↓ (Fresh water / Grinding / Sterilization)

↓ (Saccharification) ← **Koji culture**

Saccharified Product

↓

Mycelial mushroom → PDA medium → Mycelial culture broth

(*Flammulina velutipes*)

↓

↓

Green tea leaf → Fixation → Rolling → **Fermentation** → Re-mixing

(1st, 2nd)

↓

Drying

↓

Mycelial fermented tea ← Aging ← Sorting ← Sieving

(**'Mush' tea**)

제 4 절 야생차를 이용한 “김밥과 면류” 간편식품 개발

1. 녹차물 백미밥을 이용한 「녹차물 김밥」의 제조

가. 주재료 및 부재료

* 녹차밥 : 쌀 4C + 우전 10g을 물 150cc에 2분 우려낸 물 넣고 밥 지음
김밥 control 및 녹차물밥 김밥을 말아 보관상태 실험함

1) 우영졸임 : 껍질을 벗기고 청정수에 삶아 낸 것 270g + 맛장 400cc + 조림간장 100cc를 넣고 졸인 것

2) 명태가루 : 명태살을 살짝 찌서 손바닥 선인장 열매의 과육으로 빨갱게 물들임

3) 생녹차잎 나물 : 생잎을 약 2분간 삶아내어 맛장, 깨소금, 마늘, 참기름 등으로 나물로 무쳐서 사용

4) 우전녹차잎 나물 : 우전을 물에 불려서 맛장, 깨소금, 마늘, 참기름 등으로 나물로 무침.

5) 맛장 담그기

표고버섯 180g, 다시마 100g, 가죽잎 40g, 산초 10g, 검정콩 350g, 양파 380g, 무 850g에 청정수 6L를 가하여 강한 불에서 2시간 가열시켜 2.4 L까지 추출과 농축시킨 후, 여과하고, 다시 양조간장(탈지대두 15.15%, 소맥(밀) 12.4% 식염, 주정, 고과당, 감초엑기스) 2.4 L와 올리고당 물엿(프락토올리고당 40% 이상) 2.4 L를 혼합시킨다. 다시 약불에서 1시간 가열한 후에 2.1 L로 재농축하여 제조하였다.

나. 주재료와 부재료의 칼로리 및 영양

김밥 한줄 (굵게 말은)로서 한끼 식사 대응으로 가능하다.

Table 3.2.1 녹차물 김밥 재료의 칼로리 및 영양가

김밥 재료	중량 (g)	칼로리 (Kcal)	단백질 (g)	지질 (g)	당질 (g)	칼슘 (mg)	인 (mg)	철 (mg)	나트륨 (mg)	칼륨 (mg)
밥	210	300	7.4	0.4	81.2	21.0	243	3.4	11	288
김	2	10	40.9	2.0	41.7	300	703	10.6	258	3117
계란말이	20	40	11.7	13.9	1.1	56.4	174	2.0	313	126
우엉	10	20	1.8	0.1	15.3	60	62	1.1	6.0	338
명태가루	10	40	82.7	2.4	1.1	300	595	4.9	482	870
녹차잎(생)	10	30	28.3	4.8	53.6	253	53	1	8	191
녹차잎(우전)	10	30	28	4.5	52.5	253	50	1	8	190
합계(생)	262	440	172.8	23.6	194	990.4	1830	23	1078	4930
합계(우전)	272	470	200.8	28.1	246.5	1243.4	1,880	24	1,086	5,120

다. 밥 실험

1차 실험결과에서 살펴보면 밥이 끈기가 없는 점이 문제였다. 김밥 및 성형밥으로 사용될수 있는 쌀이 지역마다 맛이 다르고 끈기도 달라서 김밥 및 성형밥으로 만들었을 때 입에 씹힘도 달랐으며 따라서 경기미, 아끼바리, 홍천쌀, 김포쌀, 고흥쌀, 별량쌀 등 각 지역에서 생산된 쌀로 흰밥을 지어 실험한 결과 모든 쌀 4C+ 찰쌀 1C의 비율, 즉 4:1의 비율로 하여 밥을 지었을 때가 김밥 및 성형밥으로서 적합하였다. 따라서 앞으로 본 실험에 사용하는 밥은 쌀 : 찰쌀의 비율을 4:1로 하여 하기로 하였다.

1) 녹차물밥 : 쌀 5C + 10g의 녹차 대작 5분간 우려낸 물 500 ml를 넣는다.

2) 재료준비

우엉 : 1차 삶아 뚫은 맛 우려내고 우엉 310g + 맛장 400 ml + 조림간장 50 ml로 조립하였다.

생선가루 : 명태 살을 찌서 손바닥 선인장열매 과육으로 곱게 물들여 약간 말린 것으로 사용하였다.

3) 녹차나물 준비

A. 생엽 26g을 물에서 10분간 삶아 내어 잘게 다져, 참기름 5 ml, 깨소금 1g, 맛소금을 약간 넣고 무쳐 나물화하여 42g 정도로 제조하였다.

B. 대작 10g + 물 500 ml - 15분 우려낸 잎을 잘게 다져 참기름 5 ml, 깨소금 1g, 맛 소금 약간 넣고 무쳐서 나물화하였다(주암호 주변 송광면에서 7월 11일 채취하여 뒤음차로 빻었음).

C. 마른 녹차 잎을 물에 삶아(8분) 위의 것과 같은 과정으로 나물화하였다.

(: 조계산에서 따서 말림-협력업체 제공)



4) 녹차물 백미밥을 이용한 녹차김밥

김밥재료 : 우엉줄임, 계란말이, 생선가루, 녹차나물

녹차물밥(쌀 4C + 녹차물(대작 10g을 5분 우린물) 400 ml를 넣음)

김은 구워서 사용하였다.

가) 밥 105g + 우엉 10g + 생선가루 10g + 계란 10g + 녹차생엽나물 (A)

나) 밥 105g + 우엉 10g + 생선가루 10g + 계란 10g + 녹차대엽나물 (B)

다) 밥 105g + 우엉 10g + 생선가루 10g + 계란 10g + 녹차마른잎나물 (C)

각각 2개 말아 1개당 9등분으로 하여 1인분의 김밥으로 함)- 밥 105g은 반공기의 밥에 해당함.

라) 밥 210g + 우엉 10g + 생선가루 10g + 계란 10g + 표고버섯나물 10g + 녹차나물 10g(A)

마) 밥 210g + 우엉 10g + 생선가루 10g + 계란 10g + 표고버섯나물 10g + 녹차나물 10g(B)

바) 밥 210g + 우엉 10g + 생선가루 10g + 계란 10g + 표고버섯나물 10g + 녹차나물 10g(C)

Table 3.2.2. 녹차물 백미밥을 이용한 녹차김밥 재료의 칼로리 및 영양가

김밥 재료	중량 (g)	칼로리 (Kcal)	단백질 (g)	지질 (g)	당질 (g)	칼슘 (mg)	인 (mg)	철 (mg)	나트륨 (mg)	칼륨 (mg)
밥	105	150	3.7	0.2	40.6	10.5	121.5	1.7	5.5	144
김	2	10	40.9	2.0	41.7	150	351.5	5.3	129	1558.5
계란말이	10	20	5.8	6.8	0.5	28.2	87	1	156.5	63
우영졸임	10	20	1.8	0.1	15.3	30	31	0.5	3	169
명태가루	10	40	82.7	2.4	1.1	150	497.5	2.4	241	435
녹차나물	10	30	28.3	4.8	53.6	121.5	26.5	0.5	4	85.5
합계	147	270	163.2	16.3	152.8	490.2	1,115	11.4	539	2,455

김밥 재료	아연 (mg)	비타민A (R.E.)	β-카로틴	비타민 B1	비타민 B2	비타민 B6	나이아신	비타민 C	엽산	수분 (%)
밥	0.75	0.0	0.0	0.15	0.6	0.05	2.5	0.0	1.8	4.8
김	2.5	1215.5	0.0	0.4	1.81	0.04	5.6	78.5	682	3.1
계란말이	0.69	-	-	0.03	0.14	0.7	0.0	0.0	19	35.9
우영졸임	0.13	0.0	0.0	0.03	0.02	0.12	0.1	-	11.4	40.3
명태가루	1.33	-	0.0	0.6	0.62	0.12	2.7	0.0	6.5	5.6
녹차나물	0.015	54	173	0.6	0.12	0.7	0.5	12.5	8.0	3.8
합계	5.415	1,269.5	173	1.81	3.31	1.73	11.4	91	728.7	93.5

위의 실험결과 밥 1공기(1인분)보다 반공기의 밥으로 김밥을 말았을 때가 보다 더 부재료의 섭취가 배나 높아 영양학적으로 우수한 배합임을 볼 수 있었으며, 따라서 김밥의 기본 recipe로 하고자 함.

A : 김밥 1인분
(밥 105g(1/2공기)으로 말이한 김밥 2줄)



B : 김밥 1인분
(밥 210g(1 공기)으로 말이한 김밥)



C : 녹차생엽나물



D : 녹차대엽나물



E : 녹차마른잎나물



F : 녹차생엽, 대엽, 마른잎나물



2. 녹차 추출물을 이용한 「녹차 백미 성형밥」의 제조

가. 녹차물밥 (성형밥)

5.5C 의 쌀을 2시간 불려 여기에 녹차가루 10g을 400 ml의 물을 넣고 혼합하여 부어 밥을 지었다.



나. 부재료

(1) 우영 10g + 생선 10g + 녹차가루 10g + 버섯무침 10g + 깨 10g을 섞어 녹차밥 (210g)에 뿌려 섞어서 성형밥을 만들었다.

(2) 우영 10g + 생선 10g + 녹차잎 무침 5g + 녹차가루 5g + 버섯무침 10g + 깨 10g + 쇠고기 10g + 당근 10g을 섞어 녹차밥 (210g)에 섞어 성형하였다.

※ 녹차가루: 주암호 주변(송광면) 야생녹차잎을 1분간 찌서 원적외선 건조기 (FDI-150, DUKSON, Korea)를 사용하여 50℃에서 수분함량 4%(dry basis)까지 건조 시킴.

A : 녹차백미 성형밥



B : 녹차백미 성형밥



3. 녹차분말 첨가에 따른 「칼국수」와 「수제비」의 기호도 평가

가. 주재료 및 부재료

반죽 : 우리밀 270g(3인분) + 녹차가루 13.5g(5%) + 소금 2.7g(1%)

부재료 : 멸치국물(멸치 15g + 물 6C을 넣고 10분 정도 달여서 기본다시국물로 함) 새우살, 표고버섯, 감자, 당근, 호박, 양파, 녹차잎 무침(마른 녹차잎 불려 채진것) 계란지단 등

수제비 재료 : 밀가루 반죽(밀가루 90g), 새우 20g, 조갯살 20g, 양파 20g, 감자 20g, 당근 10g, 호박 20g, 버섯 10g, 마늘 5g, 소금 1g, 녹차잎 무침 5g, 지단 5g (* 야채는 알파셀기로 사용함)

칼국수 재료 : 재료와 양은 같고 다만 모든 부재료 중 야채류는 채쳐서 사용함.

▶ Green tea Soojaebi



▶ Green tea Kalguksoo



▶ Green tea Soojaebi & Green tea Kalguksoo (right)



4. 녹차분말 첨가에 따른 「녹차밥」 과 「녹차김밥」 의 기호도 및 색차도 평가

가. 주재료 및 부재료

- 1) 밥 짓기 : 쌀과 찰쌀을 4:1의 비율로 섞어 놓은 쌀을 1200g(8C)씩 달아 씻어 놓는다.
A : + 12g의 녹차가루 - 1% 녹차밥
B : + 18g의 녹차가루 - 1.5% 녹차밥
C : + 24g의 녹차가루 - 2% 녹차밥
- 2) 우영줄임 : 1차 삶아 뚫은 맛 우려내고 우영 800g+맛장 800cc+조림간장 100cc 줄임
- 3) 생선가루 : 동태살 찌서 손바닥 선인장 껍질 씨제거한 과육으로 곱게 물들인다. 선풍기로 말리면서 물들면서 부스러뜨리고 채로 내린다.
- 4) 계란말이, 녹차잎 나물 준비

- 5) A, B, C, 밥 105g에 우영 10g, 계란 10g, 동태가루 5g, 녹차나물(대작을 따뜻한 물에 불려 나물로 무침) 10g을 넣어 김밥을 말아 9등분하여 실험에 사용함.

나. 관능검사

녹차를 첨가한 밥과 김밥의 관능검사는 20대 학생층 그룹과 30-40대 성인층 그룹으로 나누어 실시하였으며 5점 척도법으로 실시한 결과는 Table 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6과 같다. 녹차를 첨가한 밥의 경우 학생 그룹에서는 녹차의 첨가율이 증가할수록 전반적인 색, 맛, 질감, 향 같은 기호도가 낮아졌다. 그러나 30-40대 성인 그룹의 경우는 대조군에 비해 색과 향미는 1.5%첨가군이 그리고 전체적인 맛에 있어서는 분말녹차를 1%, 1.5% 첨가한 군에서 색, 맛, 질감, 향, 종합적인 맛 등 전반적으로 기호도가 높아졌으며 유의적인 차이를 보였다.

녹차를 첨가한 김밥 또한 녹차의 첨가율이 증가할수록 학생 그룹의 경우는 기호도가 낮아졌으나 성인 그룹은 전반적으로 1%, 1.5%의 분말녹차를 첨가한 김밥말이의 기호도가 높았고 특히, 1% 첨가가 종합적인 관능 면에서 가장 좋은 결과를 나타냈었다. Shin 등의 관능검사결과에서는 색에 있어 2%의 분말녹차를 첨가한 밥이 대조군에 비해 유의하게 좋은 평가를 받았다고 했으나 본 실험의 결과에서는 학생군이나 성인군 모두 control Group에 비해 유의하게 낮아 반대 현상임을 볼 수 있었다.

종합적인 맛 등에 대해서는 역시 1%첨가군이 제일 좋았고 그다음 2%군이었다고 하여 본 실험의 결과와 비슷한 경향임을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 20대와 30~40대에서 색, 맛, 질감, 향, 종합적인 맛에 있어 느낌의 차이가 많이 남을 알 수 있었다.

Table 3.2.4. Sensory evaluation of cooked rice with green tea powder(students)

Green tea content(%w/w)	Color	Taste	Texture	Flavor	Overall acceptability
Control	4.2±0.6 ^a	3.9±0.7 ^a	3.9±0.7 ^a	3.5±0.6 ^a	3.7±0.7 ^a
1	3.4±0.6 ^b	3.3±0.7 ^b	3.2±0.7 ^b	3.0±0.6 ^b	3.0±0.6 ^b
1.5	3.1±0.8 ^b	2.9±0.7 ^{bc}	2.6±0.7 ^c	2.8±0.6 ^b	2.8±0.7 ^b
2	1.8±0.9 ^c	2.5±1.0 ^c	2.5±0.9 ^c	2.1±0.7 ^c	1.9±0.8 ^c

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different (p<0.05).

Table 3.2.5. Sensory evaluation of Kimbab with green tea powder(students)

Green tea content(% _{w/w})	Color	Taste	Texture	Flavor	Overall acceptability
Control	4.0±0.8 ^a	4.0±0.6 ^a	3.8±0.6 ^a	3.7±0.8 ^a	4.1±0.5 ^a
1	3.3±0.8 ^b	3.2±0.8 ^b	2.9±0.7 ^b	3.1±0.8 ^b	3.1±0.8 ^b
1.5	3.3±1.0 ^b	2.9±0.8 ^b	2.6±0.9 ^{bc}	2.9±0.6 ^b	2.8±0.9 ^b
2	2.2±1.0 ^c	2.1±0.6 ^c	2.2±0.9 ^c	2.4±0.9 ^c	2.1±0.9 ^c

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different (p<0.05).

Table 3.2.6. Sensory evaluation of cooked rice with green tea powder(Adults)

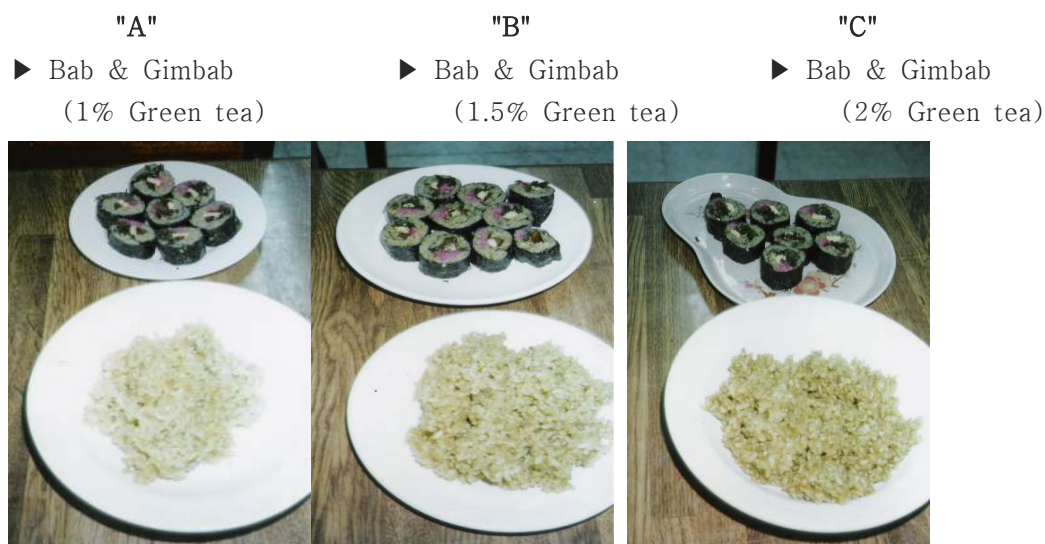
Green tea content(% _{w/w})	Color	Taste	Texture	Flavor	Overall acceptability
Control	3.3±0.7 ^a	3.9±0.8 ^a	4.2±0.8 ^a	3.0±1.0 ^a	3.3±0.8 ^a
1	4.1±0.9 ^b	4.3±0.6 ^b	4.2±0.7 ^a	3.9±0.7 ^b	4.6±0.6 ^b
1.5	4.2±1.0 ^b	3.4±0.6 ^b	3.2±0.8 ^b	4.2±0.8 ^b	3.8±0.8 ^a
2	2.5±0.8 ^c	2.5±0.8 ^c	2.4±0.8 ^c	3.2±1.0 ^a	2.3±0.6 ^c

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different (p<0.05).

Table 3.2.7. Sensory evaluation of Kimbab with green tea powder(Adults)

Green tea content(%w/w)	Color	Taste	Texture	Flavor	Overall acceptability
Control	3.7±0.8 ^a	3.3±0.8 ^a	3.4±0.8 ^a	3.2±0.9 ^a	3.4±0.6 ^a
1	3.9±0.7 ^a	4.3±0.8 ^b	4.1±0.7 ^b	4.2±0.9 ^b	4.3±0.6 ^b
1.5	3.5±0.8 ^a	3.8±0.7 ^{ab}	3.7±0.7 ^{ab}	3.7±0.7 ^b	3.6±0.5 ^a
2	2.5±0.9 ^b	2.8±0.8 ^c	2.8±0.8 ^c	2.4±0.8 ^c	2.3±0.6 ^c

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different (p<0.05).



녹차 밥에 있어 1% 녹차를 넣어서 지은 밥이 색, 맛, 질감, 향 등 종합적인 맛에 있어서도 모두 좋다고 하였으며, 녹차김밥의 경우는 색은 1.5%의 녹차 밥으로 말은 김밥이 제일 좋다고 하였으나 맛이나 질감, 향, 종합적인 맛 등은 1% 녹차가루를 섞어 지은 밥으로 김밥을 말은 것이 가장 좋다고 하여 1%의 녹차가루를 넣어 지은 녹차밥과 녹차나물 10g을 김밥재료로 하였을 때가 가장 알맞아 1인분의 밥에 약 20g 정도의 녹차를 넣은 밥으로 냉장온도에서 3일은 보관할 수 있어 젊은이 층의 선호하는 건강식으로 개발함이 매우 바람직함을 볼 수 있었다.

다. 색도 측정

분말녹차를 첨가하여 취반한 쌀밥의 색도를 측정한 L, a 및 b 값은 Table 3.2.8에서와 같이 L, a, b 값은 녹차의 첨가량이 증가함에 따라 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 대조군의 L(lightness)값이 50.3으로 가장 높게 나타났으며, 녹차 첨가 2%군에서 34.8로 가장 낮은 값을 나타내어 녹차의 첨가량이 증가할수록 L 값은 감소하여 어두운 색을 나타내었다. 이는 녹차의 취반에 의한 갈변현상 때문인 것으로 생각된다. 적색도를 나타내는 a 값은 마이너스 값으로 녹색방향을 나타내며 녹차 첨가량이 많을수록 진한 녹색색을 높게 나타남을 육안으로도 확인할 수 있었으며 황색도를 나타내는 b(yellowness) 값은 녹차 첨가량이 증가할수록 높은 값을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Shin 등의 색도 측정결과와 일치하는 현상이었다.

Table 3.2.8. Effect of green tea powder on the color of cooked rice

Concentration(% w/w)	L	a	b
Control	50.3±0.6 ^a	-1.6±0.1 ^a	4.5±0.2 ^a
1	41.1±0.1 ^b	-2.8±0.0 ^b	13.5±0.1 ^b
1.5	37.6±0.0 ^c	-2.0±0.0 ^c	13.5±0.0 ^b
2	34.8±0.0 ^d	-2.3±0.1 ^d	15.8±0.4 ^c

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

L: measures lightness and varied from 100 for perfect white to zero for black.

a: measures redness when plus, gray when zero, and greenness when minus.

b: measures yellowness when plus, gray when zero, and blueness when minus.

라. 녹차 추출물의 항균활성

1) 추출법에 따른 항균성 변화

녹차 추출물을 agar diffusion - paper disk법으로 대장균과 포도상구균에 대한 항균활성을 조사한 결과는 Fig. 3.2.1에 나타내었다. 야생 녹차 분말을 80% 에탄올 환류 추출 및 실온 열수 진탕추출을 2단계로 실시하여 농축한 경우(투명환 직경 : 대장균 26.3 mm, 포도상구균 32.6 mm)가 물 정치추출만으로 실시하여 농축한 경우(투명환 직경 : 대장균 18.5 mm, 포도상구균 25.8 mm)보다 항균활성이 높게 나타났다. 이는 에탄올-열수 추출은 녹차분말에 함

유되어 있는 항균성 카테킨류나 유기산 및 각종 색소류 등이 물 추출만의 경우보다 효과적인 추출법인 것으로 나타났다. 특히 항균 스펙트럼에서는 대장균보다는 포도상 구균이 녹차 추출물에 의한 항균활성이 높게 나타났다. 녹차물 추출물의 식품유해균 항균효과에서 대장균이나 포도상 구균에 효과적이었다고 보고하였으나, 본 실험에서 결과보다는 약간 낮은 항균활성을 나타내었다.

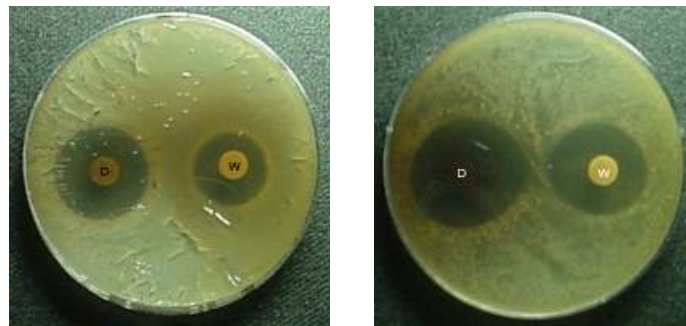


Fig. 3.2.1. Antibacterial activity of tea extract against *Escherichia coli* (left) and *Staphylococcus aureus* (right) on NBA medium.

D : 80% Ethanol + water ext. W : Water ext.

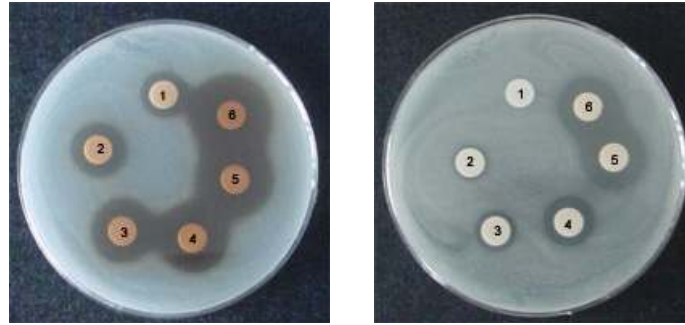
2) 추출물 농도에 따른 항균성 변화

녹차 추출물을 agar diffusion - paper disk법으로 대장균과 포도상 구균에 대한 추출물의 원액과 그 추출물의 색소를 제거한 여과액을 각 농도별 최소저해농도(MIC)를 조사한 결과는 Fig. 3.2.2에 나타내었다. 녹차 추출물의 원액은 20 mg/paper disk에서 60 mg/paper disk까지는 항균활성이 농도에 비례하여 증가하였으나, 그 이후의 농도에서는 증가되는 정도가 완만한 경향을 나타내었다. 그리고 최소저해농도 MIC는 10 mg/paper disk로 나타났다(결과 미제시).

한편 녹차 추출액의 색소를 부분적으로 제거한 녹차 추출물은 그 원액과는 달리 항균활성이 상대적으로 낮게 나타났으며, 최소저해농도 MIC는 40 mg/paper disk로 나타났다. 특히 색소를 일부 제거하므로 녹차 추출액의 항균활성이 낮은 이유로는 일부 녹차의 카테킨 산화물인 테아플라빈 및 테아루이나 녹차 제조공정 및 저장중에 생성된 각종 색소류 등이 그 함량에서 감소되

기 때문으로 판단된다.

녹차 추출물 및 분획물의 대장균 O157 : H7에 대한 항균활성을 조사한 결과, 에틸아세테이트의 분획물 500 µg/disk 농도에서 최소저해농도를 나타내었다고 보고하였다.



Whole ext.

Non pigment ext.

Fig. 3.2.2. Antibacterial activity of green tea extract against *Escherichia coli* on PCA medium.

1: 20 mg, 2: 40 mg, 3: 60 mg, 4: 80 mg,
5: 100 mg, 6: 120 mg

3) 액체배양에 따른 녹차추출물의 항균성 변화

녹차 추출물을 NB 액체배지에 대장균 *Escherichia coli* 배양액을 0.1%(v/v) 첨가하여 37°C에서 24시간 진탕배양하여 광학현미경으로 관찰한 결과, 녹차 추출물 무첨가의 대조구에 비하여 30 mg/mL 첨가구에서는 대장균 성장이 상당히 억제되는 현상을 나타내었다.

4) 최소저해농도

대장균의 액체배양에서 최소저해농도 MIC를 조사하고자, 녹차 추출물을 각 농도별(0, 2.5, 5, 10, 20, 40 mg/mL)로 첨가하여 3일 동안 배양한 결과는 Fig. 3.2.3과 같다. 녹차 추출물 2.5 mg/mL와 5 mg/mL 농도의 경우, 배양 20~24시간까지는 대조구와 비슷한 생육을 하였지만 그 이후는 대수증식기까지는 성장억제를 나타내었다. 그러나 10 mg/mL 농도에서는 24시간까지 생육억제가 되면서 유도기 연장형의 형태를 나타내면서 그 이후는 2일까지 점진적 성장을 나타내었다. 특히 20 mg/mL이상에서는 거의 생육이 이루어지지 않음

므로 인하여, 대장균의 액체배양에서 녹차 추출물의 대장균 최소저해농도 MIC는 20 mg/mL 농도 범위로 판단된다.

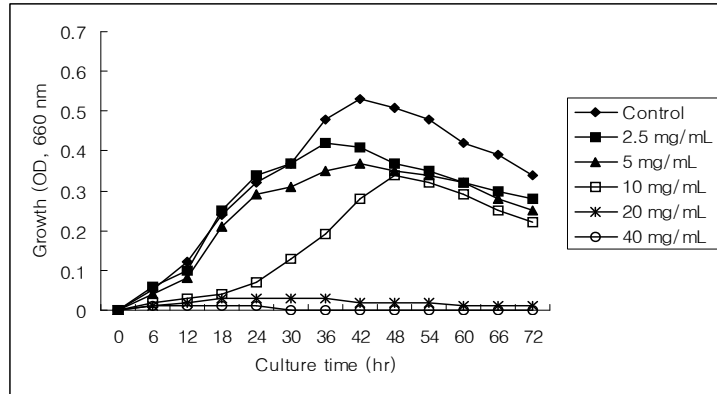


Fig. 3.2.3. Growth inhibition of green tea extract against *Escherichia coli* on NB liquid medium.

5) 일반세균수의 측정

분말녹차를 농도별로 첨가시킨 쌀밥을 25°C에서 저장시키면서 일반세균의 증식도를 조사한 결과는 Table 3.2.9 및 3.2.10과 같다. 대체로 발효차는 녹차로부터 그 발효도에 따라서 항균활성에서 감소한다. 즉 차잎의 각종 카테킨류가 테아플라빈이나 테아루비긴과 같은 1차 산화와 1차 산화물로 전환되므로 일반세균을 포함한 식품부패균 및 식중독 유발 세균에 대한 항균스펙트럼에서 변동이 발생되며, 그 활성도도 감소하는 경향을 나타낸다. 분말녹차를 첨가한 쌀밥의 경우, 일반 세균은 녹차의 첨가율이 증가할수록 전반적으로 감소하는 경향이였다. 저장 6시간에서는 큰 변화가 없었으며, 대조군은 저장 18시간 이후에서 급속한 증가를 나타내었고, 24시간이 되면 냄새가 심하게 발생되었다. 김밥의 경우는 쌀밥보다 일반세균 증식요소가 높아서 쌀밥보다는 2~3배 높은 증식도를 나타내었다.

Table 3.2.9. Changes in general bacteria of cooked rice with different green tea powder. (CFU / 1 g)

Green tea powder (%, w/w)	Storage time (hr)			
	6	12	18	24
Control	1.3×10^3	4.1×10^5	2.6×10^6	0.8×10^8
1	1.1×10^3	1.7×10^4	1.8×10^6	2.5×10^6
1.5	1.0×10^3	6.9×10^3	6.1×10^4	0.2×10^5
2	0.6×10^3	2.4×10^3	0.6×10^4	1.8×10^4

Table 3.2.10. Changes in general bacteria of *Kimbab* with different green tea powder (CFU / 1 g)

Green tea powder (%, w/w)	Storage time (hr)			
	6	12	18	24
Control	2.8×10^3	6.4×10^5	4.8×10^6	2.0×10^8
1.0	1.8×10^3	2.9×10^4	3.2×10^6	4.1×10^6
1.5	1.6×10^3	9.7×10^3	8.6×10^4	1.2×10^5
2.0	1.2×10^3	5.2×10^3	2.4×10^4	3.7×10^4

6) 대장균수 측정

분말녹차를 농도별로 첨가시킨 쌀밥을 25°C에서 저장시키면서 대장균의 증식도를 조사한 결과는 Table 3.2.11 및 3.2.12와 같다. 대장균(*Escherichia coli*)은 사람을 포함한 척추동물의 장내에 상재하는 그람 음성균으로 일반 식품류의 오염지표세균으로서 알려져 있는데, 병원성 대장균 *Escherichia coli* O157:H7의 몇 종류를 제외하고는 질병을 유발하지 않는 장내세균이다. 대체로 발효차는 녹차로부터 그 발효도에 따라서 항균활성에서 감소한다. 즉 차잎의 각종 카테킨류가 1차 산화와 1차 산화물로 전환되므로 일반세균이나 식품부패균 및 식중독 유발 세균 등과 마찬가지로 활성도도 감소하는 경향을 나타낸다. 분말녹차를 첨가한 쌀밥의 경우, 대장균은 녹차의 첨가율이 증가할수록 전반적으로 감소하는 경향이였다. 저장 6시간에서는 초기균수와 비교하여서 약간의 균수증식 변화가 있었으며, 대조군은 저장 12시간 이후에서 급속한 증가를 나타내었고, 24시간이 되면 일반세균보다 더욱 냄새가 심하게 발생되였다. 김밥의 경우도 일반세균의 경향과 유사한 경향을 나타내었다.

Table 3.2.11. Changes in *Escherichia coli* of cooked rice with different green tea powder. (CFU/1g)

Green tea powder (%, w/w)	Storage time (hr)			
	6	12	18	24
Control	0.8×10^2	2.9×10^4	1.8×10^5	3.5×10^6
1.0	0.7×10^2	1.3×10^3	0.7×10^5	1.6×10^5
1.5	0.5×10^2	4.7×10^2	3.2×10^3	4.8×10^4
2.0	0.3×10^2	1.9×10^2	1.1×10^3	7.2×10^3

Table 3.2.12. Changes in *Escherichia coli* of *Kimbab* with different green tea powder (CFU / 1 g)

Green tea powder (%, w/w)	Storage time (hr)			
	6	12	18	24
Control	2.8×10^2	4.9×10^4	4.9×10^5	0.8×10^7
1.0	1.6×10^2	5.1×10^3	2.1×10^5	0.5×10^6
1.5	1.5×10^2	7.4×10^2	4.7×10^3	6.3×10^4
2.0	0.9×10^2	3.8×10^2	1.3×10^3	8.9×10^3

5. 녹차분말 첨가에 따른 「성형밥」의 기호도 평가

가. 주재료 및 부재료

기본재료 : 다랑어 2g, 표고버섯 가루 2g, 볶은 깨 2g, 우엉 2g, 녹차나물 2g, 매실 1g, 맛소금 1g, 다시마 0.5g

① 기본재료 + 연어가루 5g, 새우가루 3g, 파래김 0.5g

② 기본재료 + 명태가루 5g, 문어가루 3g, 파래김 0.5g

③ 기본재료 + 연어가루 5g, 문어가루 3g, 파래김 0.5g

④ 기본재료 + 명태가루 5g, 새우가루 3g, 파래김 0.5g

⇒ 1% 녹차밥, 1.5% 녹차밥으로 각각 만들

⑤ 기본재료 + 명태가루 5g, 새우가루 3g, 다시마 1g, 제비꽃 0.5g

⑥ 기본재료 + 연어가루 5g, 문어가루 3g, 다시마 1g, 진달래 0.5g

⇒ 2% 녹차밥으로 만들

나. 관능검사

관능검사에 참여한 요원은 관능검사에 경험이 있는 식품영양학과 대학원생 10여 명으로 검사는 식전 공복상태에서 검사하였으며 냉수로 입안을 씻어낸 후 맛을 볼 때는 시료를 입에 휘둘러서 씹고 전 표면이 젖도록 하여 검사를 실시하였다. 평가 특성은 색(색의 조화), 구수한 맛(맛있는 맛), 질감(씹히는 정도), 이취, 향, 종합적인 맛이었으며 평가척도로 5점 항목 척도를 사용하였다.

Table 3.2.13. Sensory evaluation of pressed bab added with powdered green tea

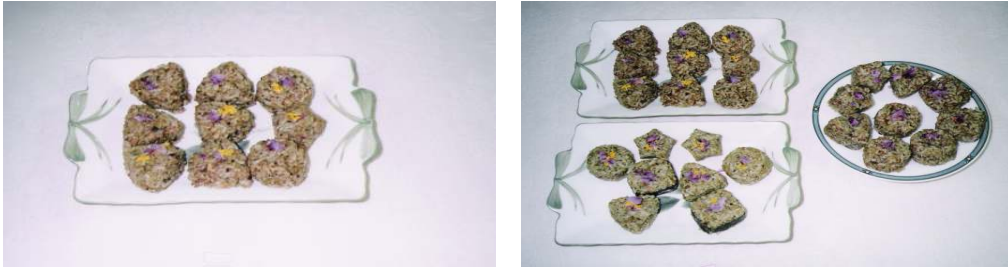
	Color	Taste	Texture	Off-odor	Aroma	Over all eating
① - 1%	3.9±0.2	3.9±0.3	4.1±0.2	2.6±0.2	4.0±0.2	3.9±0.2
② - 1%	3.5±0.4	3.5±0.2	3.7±0.1	2.9±0.2	3.8±0.1	3.7±0.3
③ - 1.5%	3.3±0.1	3.5±0.5	3.3±0.4	2.5±0.1	3.4±0.4	3.6±0.4
④ - 1.5%	3.2±0.2	3.3±0.4	3.0±0.3	3.1±0.4	3.0±0.3	3.3±0.1

	Color	Taste	Texture	Off-odor	Aroma	Over all eating
⑤ - 2%	3.4±0.1	4.1±0.3	3.8±0.2	3.0±0.1	3.3±0.3	3.5±0.1
⑥ - 2%	3.3±0.2	3.3±0.2	3.3±0.3	3.0±0.2	2.9±0.2	3.3±0.4
⑤ - 1%	3.4±0.5	3.4±0.2	3.7±0.4	2.2±0.1	3.5±0.4	2.9±0.2
⑥ - 1.5%	3.5±0.3	3.0±0.1	3.4±0.1	3.0±0.4	3.5±0.2	3.2±0.3

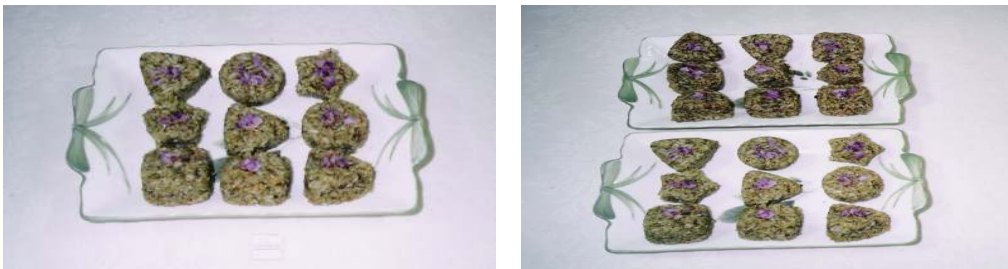
▶ Pressed bab added with 1% powdered green tea



▶ Pressed bab added with 1.5% powdered green tea



▶ Pressed bab added with 2% powdered green tea



성형밥의 관능검사 결과 색이나 맛, 질감, 향, 종합적인 맛 등 1% 녹차밥을 주재료로 했을 때가 가장 좋게 점수가 나타났으며, 부재료에 따른 성형밥은 모두 좋게 나타났고, 그 중에서 1%의 연어와 새우가루를 뿌려서 만든 밥이 제일 좋아하는 밥으로 나타났다.

6. 녹차분말 첨가에 따른 「우동」 및 「짜장면」의 기호도 평가

가. 주재료 및 부재료

1) 부재료 - 우동재료 : 멸치가루 10g, 조갯살 120g, 생새우 120g, 양파 120g, 감자 120g, 호박 120g, 표고버섯 120g, 당근 60g, 마늘 30g

짜장면 재료 : 돼지고기 120g, 감자 120g, 호박 120g, 양파 120g, 표고버섯 120g, 당근 60g, 밀가루 3T, olive oil 3T

2) 주재료의 면류로 사용된 밀가루는 우리밀과 참밀가루로 50:50의 비율로 섞어서 사용하였으며,

① 녹차가루 3% 면 : 우리밀 밀가루 270g + 참밀가루 270g + 소금 3g + 녹차가루 16g

② 녹차가루 6% 면 : 우리밀 밀가루 270g + 참밀가루 270g + 소금 3g
+ 녹차가루 32g

나. 부재료와 영양가

각각 3인분씩의 재료임. 따라서 우동 및 자장면 한 그릇(1 인분)에 들어가는 부재료와 그 영양가는 Table 3.2.14와 같다.

Table 3.2.14. 우리밀과 참밀가루의 칼로리 및 영양가

재료	중량 (g)	칼로리 (Kcal)	단백질 (g)	지질 (g)	당질 (g)	무기질 (mg)	비타민 (mg)	수분 (%)
우리밀	100	340	13	1	75	4	6.5	15
참밀가루	100	350	9	1.5	75	4.4	6.3	14.5

Table 3.2.15. 우동 한그릇의 칼로리 및 영양가

재료	중량 (g)	칼로리 (Kcal)	단백질 (g)	지질 (g)	당질 (g)	칼슘 (mg)	인 (mg)	철 (mg)	나트륨 (mg)	칼륨 (mg)
멸치가루	10	23.8	22	2.5	0.0	450	480	3.5	1625	570
조갯살	120	56	9.7	1.0	1.3	166.0	123.0	5.50	303.0	151.0
생새우	120	83.0	16.2	1.2	0.8	23.0	122.0	2.50	134.0	201.0
양파	120	35	1.0	0.2	7.9	15	34	0.3	5.0	141
감자	120	55	2.5	0.1	11.6	6	51	0.8	3.0	396
호박	120	38	1.1	0.2	9.4	19	36	0.3	2.0	285
표고버섯	120	26	2.4	0.2	5.3	7.0	45	0.6	5.0	143
당근	60	34	1.0	0.2	7.8	38	37	0.7	29	362
마늘	30	13	1.2	0.15	3.8	16	23	0.3	3	110
합계	820	363.8	57.1	5.75	47.9	740	951	14.5	2,109	2,359

재료	아연 (mg)	비타민A (R.E.)	β -카로 틴	비타민 B1	비타민 B2	비타민 B6	나이아 신	비타민 C	엽산	수분 (%)
멸치가루	0.65	0.0	0.0	0.7	0.6	0.34	3.4	0.0	16	3.5
조갯살	2.10	21.0	68.0	0.020	0.160	0.06	1.5	1.0	16.0	85.20
생새우	1.56	0.0	0.0	0.230	0.270	0.17	2.8	0.0	1.8	77.60
양파	0.0	0.0	0.04	0.01	0.21	0.2	8.0	15.1	90	90
감자	0.41	0.0	0.0	0.08	0.03	0.27	1.3	21	13.3	84
호박	0.14	27	163	0.07	0.04	0.11	0.5	35	9.3	88.2
표고버섯	0.28	0.0	0.0	0.08	0.21	0.12	3.0	0.0	47	90.5
당근	0.15	1257	7540	0.06	0.04	0.25	0.8	6.0	8.0	89.6
마늘	0.38	94	360	0.4	0.4	0.32	0.26	27	3.1	86.2
합계	5.67	1,399	8,131.04	1.65	1.96	1.84	21.56	105.1	204.5	694.8

Table 3.2.16. 자장 한 그릇의 칼로리 및 영양가

재료	중량 (g)	칼로리 (Kcal)	단백질 (g)	지질 (g)	당질 (g)	칼슘 (mg)	인 (mg)	철 (mg)	나트륨 (mg)	칼륨 (mg)
돼지고기	120	235	18.5	16.5	0.3	1.0	179	1.7	59	300
감자	120	55	2.5	0.1	11.6	6	51	0.8	3.0	396
호박	120	38	1.1	0.2	9.4	19	36	0.3	2.0	285
양파	120	35	1.0	0.2	7.9	15	34	0.3	5.0	141
표고버섯	120	26	2.4	0.2	5.3	7.0	45	0.6	5.0	143
당근	60	34	1.0	0.2	7.8	38	37	0.7	29	362
밀가루	3T	330	10	1.4	74.7	19	84	0.8	3.0	112
올리브오일	3T	859	0.0	96.4	0.0	0.0	1.0	0.36	0.0	0.0
합계	666	1,612	36.5	115.2	117	105	467	5.56	106	1,739

재료	아연 (mg)	비타민A (R.E.)	β-카로 틴	비타민 B1	비타민 B2	비타민 B6	나이아 신	비타민 C	엽산	수분 (%)
돼지고기	1.87	2.0	0.0	0.92	0.18	0.4	1.9	0.0	6.8	63.6
감자	0.41	0.0	0.0	0.08	0.03	0.27	1.3	21	13.3	84
호박	0.14	27	163	0.07	0.04	0.11	0.5	35	9.3	88.2
양파	0.0	0.0	0.04	0.01	0.21	0.2	8.0	15.1	90	90
표고버섯	0.28	0.0	0.0	0.08	0.21	0.12	3.0	0.0	47	90.5
당근	0.15	1257	7540	0.06	0.04	0.25	0.8	6.0	8.0	89.6
밀가루	0.69	0.0	0.0	0.23	0.04	0.04	1.1	0.0	25.7	13.3
올리브오일	0.06	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
합계	3.6	1,286	7,703.04	1.45	0.75	1.39	16.6	77.1	200.1	519.2

Table 3.2.17. 맛 감도 조사표

점수항목	시료	5 (가장 좋다)	4 (좋다)	3 (보통이다)	2 (좋지않다)	1 (아주 좋지않다)
색깔 (색의 조화)	A					
	B					
	C					
구수한 맛 (맛있는 맛)	A					
	B					
	C					
질 감 (씹히는 정도)	A					
	B					
	C					
이 취	A					
	B					
	C					
향	A					
	B					
	C					
종합적인 맛	A					
	B					
	C					

다. 관능검사

관능검사에 참여한 요원은 관능검사에 경험이 있는 식품영양학과 대학원생 10 여명으로 검사는 식전 공복상태에서 검사하였으며 냉수로 입안을 씻어낸 후 맛을 볼 때는 시료를 입에 휘둘러서 씹고 전 표면이 젖도록 하여 검사를 실시하였다. 평가 특성은 색(색의 조화), 구수한 맛(맛있는 맛), 질감(씹히는 정도), 이취, 향, 종합적인 맛이었으며, 평가척도로 5점 항목 척도를 사용하였다.

Table 3.2.18. Sensory evaluation of Woodong and Zzajangmyeon added with powdered green tea

	Color	Taste	Texture	Off-odor	Aroma	Over all-eating
Woodong 3%	3.7±0.3	4.0±0.5	4.0±0.3	1.4±0.3	3.6±0.2	3.9±0.4
Woodong 6%	2.5±0.4	2.2±0.3	2.6±0.2	2.2±0.4	2.7±0.4	2.4±0.3
Zzajangmyeon 3%	3.5±0.2	3.5±0.2	3.3±0.4	1.5±0.2	3.7±0.2	3.8±0.3
Zzajangmyeon 6%	3.0±0.3	3.0±0.4	3.1±0.1	2.0±0.3	3.3±0.3	3.2±0.2

우동의 경우 3% 녹차가루를 첨가 반죽하여 만든 우동이 색이나 맛, 질감, 향, 종합적인 맛 등 가장 맛있는 우동으로 평가되었으며 자장면의 경우도 3% 녹차가루를 첨가한 면으로 만든 것이 모든 검사 결과 좋게 나타났으나 6%의 경우도 우동 6% 보다는 좋은 결과여서 자장면의 부재료와 어우러짐이 좋은 것으로 사료됨.

▶ Woodong(3% powdered green tea)



▶ Woodong(6% powdered green tea)



▶ Zzajangmyeon(3% powdered green tea)



▶ Zzajangmyeon(6% powdered green tea)



▶Tea Noodle (3% powdered green tea) ▶Tea Noodle(6% powdered green tea)



제 5 절 버섯균사체 발효차를 이용한 “양갱과 죽류” 간편식품의 개발

1. 버섯균사체 발효차를 첨가한 죽류의 제조

죽의 역사는 1 만년 전 농경의 시작과 더불어 갈돌, 연석, 토기 등의 사용으로 곡물을 인간이 먹기 시작한 맨 처음의 음식 형태이다. 오늘날은 이와 같은 곡물에 여러 가지 부재료를 배합하여 보양식, 별미식, 이유식, 환자식 등으로 사용된다. 따라서 그 종류를 크게 분류하면 재료의 형태에 따라 된죽(범벅), 과죽(粥, 미음)으로 분류하며 사용하는 재료에 따라서는 흰죽, 두테죽, 장국죽, 어패류죽, 비단죽 등으로 분류한다. 쌀알의 모양에 따라 흰죽은 용근죽, 원미죽, 무리죽 등이 있는데 예부터 주로 사용되는 형태는 용근죽이다. 즉, 쌀을 씻어서 이남박에서 손바닥으로 약간 으깨어 물을 붓고 끓인다.

- 녹두죽은 두테죽의 하나로 장을 이롭게 하고 소갈증을 없애며 향미가 좋으므로 많은 사람들에게 널리 애용되고 있다.
- 홍합죽은 taurine 풍부하고 입맛을 돋우므로 예부터 마른 홍합을 1년 내내 구입할 수 있는 점이 장점이므로 이른 봄 허약한 어린이나 노약자, 환자 등의 보양식으로 이용되어 왔다.
- 아욱죽은 장국죽으로 옛 문헌에 의하면 아욱 한바리를 싣고 장에 가면 모든 곡식과 적절히 바꿨다고 하는, 물물교환의 척도로 사용될 정도로 매우 귀하게 이용되었는데 아욱의 점질물은 장을 이롭게, 소화를 좋게 하는 장점이 있다.
- 갯죽은 그 재료가 모든 음식에 고명으로 사용할 정도로 그 갯나무 향은 옛 조상들이 매우 좋아하는 풍미 성분이며 보양 영양죽으로 이용되어왔다.

가. 실험재료 및 방법

실험에 사용한 버섯균사체(팽이) 발효차는 1차년도 <제1세부과제>로부터 시료를 제공받았으며, 쌀은 순천에서 생산되는 (팔마미인) 친환경 쌀로 구입하였고, 녹두, 홍합, 아욱, 잣 등은 마트에서 구입하여 사용하였다.

나. 각종 죽의 제조 및 비율에 따른 녹차죽의 제조

1) 흰죽

대체적으로 밥은 쌀과 물의 비율이 중량으로 1 : 2.5배이나 죽은 1 : 6배이다. 따라서 밥 1공기 (210g, 쌀로는 90g, 3교환단위)는 죽으로는 2공기가 되는 셈으로 4그릇의 죽을 끓이려면 쌀 180g + 물 1200mL + NaCl 4g에서 죽, 쌀 180g을 씻어서 이남박에서 약 5분간 손바닥으로 으깨어 솥에 넣고 물 1200 mL를 부어 약 30~40분정도 끓여서 다 익으면 소금 4g을 넣어 간을 맞추어 4등분한다. 따라서 한 그릇 (1인분)의 죽은 쌀45g + 물 300c mL + NaCl 1g 이다.

죽 300g (1/4죽)에 0g 분말 버섯균사체 발효차를 넣어 약 5분간 끓인 죽- control G			
" 0.9g	"	"	- 2% 발효차 죽
" 1.8g	"	"	- 4% 발효차 죽
" 2.7g	"	"	- 6% 발효차 죽

2) 녹두죽

녹두 60g (2교환 단위)을 씻어 물 1600 mL를 넣고 약 20분 가열한 다음 씻어놓은 쌀 180g을 넣고 약 30분 정도 끓여 소금 5g을 넣어 간을 맞추는 다음 4등분 한다.

죽 350g (1/4죽)에 0g의 분말 버섯균사체 발효차를 넣어 약 5분간 끓인 죽			
" 0.9g	"	"	- 2% 발효차 죽
" 1.8g	"	"	- 4% 발효차 죽
" 2.7g	"	"	- 6% 발효차 죽

따라서 1인분은 쌀 45g + 녹두 15g + 물 400c mL + 소금 1g

3) 아욱죽

아욱 100g을 씻어 놓는다. (2교환 단위) 씻어 놓은 쌀 180g에 물 1200 mL를 넣고 20분 정도 끓이다가 씻어 놓은 아욱 100g을 잘게 찢어 넣고 된장 240g을 넣어

20분 정도 끓여낸다. 이를 4등분 한다.

아욱죽 300g + 0g의 분말 버섯균사체 발효차 첨가	- control group
" + 0.9g "	- 2% 발효차 아욱죽
" + 1.8g "	- 4% 발효차 아욱죽
" + 2.7g "	- 6% 발효차 아욱죽

4) 홍합죽

마른 홍합 30g (2교환 단위)을 분쇄기에 약간 분쇄하여 (쌀알 크기 정도) 둔다. 씻어 놓은 쌀 180g에 물 1200 mL를 넣고 10분간 끓이다 분쇄하여 놓은 홍합을 넣고 약 30분간 끓여 소금 2g을 넣어 간을 맞춘다. 이를 4등분 하여 사용한다.

홍합죽 300g + 0g의 분말 버섯균사체 발효차 첨가	- control group
" + 0.9g "	- 2% 발효차 홍합죽
" + 1.8g "	- 4% 발효차 홍합죽
" + 2.7g "	- 6% 발효차 홍합죽

5) 잣죽

잣은 32g(4교환 단위)을 믹서에 갈아 놓는다. 씻어 놓은 쌀 180g에 물 1200 mL를 넣고 30분간 끓이다 갈아 놓은 잣 32g을 넣고 10분간 더 끓이다가 소금 2g으로 간을 맞추어 4등분 한다.

잣죽 300g + 0g의 분말 버섯균사체 발효차 첨가	- control group
" + 0.9g "	- 2% 발효차 잣죽
" + 1.8g "	- 4% 발효차 잣죽
" + 2.7g "	- 6% 발효차 잣죽

* 된장 - 청정원 유기농 된장

소금 - 백설 펜솔트 (Na 함량 40% 이하)

다. 실험결과

1) 관능검사

1차 년도, 제1세부과제에서 개발한 것으로 가장 품질특성이 우수한 버섯균사

체(팽이버섯) 발효차를 첨가한 죽의 관능검사는 순천대학교 식품영양학과 학생 중에서 30명의 패널을 선발하여 실시하였으며, 5점 척도법으로 실시한 결과는 Table 3.2.19 ~3.2.23과 같다. 버섯균사체(팽이버섯) 발효차를 첨가한 흰죽의 경우 색상에 있

Table 3.2.19. Sensory evaluation of general Jook (white color)

Amount (%, tea)	Color	Taste	Texture	Bitter	Arome	Overall- eating
0	3.4±0.9 ^{ab}	3.9±0.7 ^a	3.9±0.8 ^a	4.3±0.9 ^a	3.6±0.6 ^{ab}	3.7±0.7 ^a
2	4.0±0.8 ^a	3.9±0.7 ^a	3.9±0.5 ^a	3.5±0.7 ^b	4.0±0.7 ^a	3.9±0.7 ^a
4	3.2±1.0 ^b	2.7±0.8 ^b	3.3±0.4 ^b	2.5±0.7 ^c	3.1±0.6 ^b	2.6±0.7 ^b
6	2.1±0.8 ^c	1.9±0.2 ^c	2.8±0.6 ^b	1.7±1.0 ^d	2.6±0.5 ^c	1.7±0.5 ^c

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different (p<0.05).

어 관능검사 및 육안 모두 뚜렷한 차이가 나타났으며 향, 종합적인 맛 등 전반적으로 기호도가 높게 나타났다. 녹두죽의 경우 대조군에 비하여 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 찹죽, 아욱죽 모두 비슷한 결과를 나타내었다. 그러나 버섯균사체(팽이버섯) 발효차를 첨가한 홍합죽의 경우 2% 첨가군이 색, 맛, 질감, 향, 종합적인 맛 등 전반적인 기호도가 높게 나타났다.

Table 3.2.20. Sensory evaluation of Nockdoo Jook

Amount (%, tea)	Color	Taste	Texture	Bitter	Aroma	Overall eating
0	4.0±0.5 ^a	4.1±0.6 ^a	3.7±0.8 ^a	3.9±0.8 ^a	3.5±0.8 ^a	4.0±0.7 ^a
2	4.0±0.7 ^{ab}	3.8±0.8 ^a	3.9±0.7 ^a	3.9±0.7 ^a	3.8±0.6 ^a	4.1±0.7 ^a
4	3.4±0.9 ^b	2.8±1.0 ^b	3.5±0.7 ^a	2.7±0.8 ^b	3.5±0.8 ^a	3.1±0.7 ^b
6	2.5±0.9 ^c	1.9±0.7 ^c	2.7±0.7 ^b	1.8±1.0 ^c	2.8±1.2 ^b	1.9±0.5 ^c

Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different (p<0.05).

Table 3.2.21. Sensory evaluation of Jact Jook

Amount (%, tea)	Color	Taste	Texture	Bitter	Aroma	Overall eating
0	4.0±0.7 ^a	4.2±1.0 ^a	3.7±0.8 ^a	4.1±0.9 ^a	3.7±1.2 ^a	4.1±0.9 ^a
2	4.0±1.0 ^a	3.7±0.7 ^a	3.8±0.8 ^a	3.7±0.7 ^a	3.7±0.5 ^a	3.8±1.0 ^a
4	3.7±0.7 ^a	2.8±0.9 ^b	3.3±0.7 ^{ab}	2.9±0.7 ^b	3.1±0.8 ^{ab}	2.9±0.5 ^b
6	2.7±0.8 ^b	2.2±0.5 ^b	3.1±0.8 ^b	2.1±1.0 ^c	2.9±1.2 ^b	2.1±0.6 ^c

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different ($p<0.05$).

Table 3.2.22. Sensory evaluation of Awook Jook

Amount (%, tea)	Color	Taste	Texture	Bitter	Aroma	Overall eating
0	3.9±0.9 ^a	3.9±0.7 ^a	3.5±0.5 ^a	4.1±1.0 ^a	3.5±1.1 ^a	3.8±0.8 ^a
2	3.9±0.6 ^a	4.1±0.9 ^a	4.0±0.7 ^{ab}	3.6±0.8 ^a	3.7±0.8 ^a	3.9±0.8 ^a
4	3.5±0.8 ^a	2.9±0.7 ^b	3.4±0.5 ^b	2.6±0.8 ^b	3.3±0.8 ^{ab}	3.1±0.9 ^b
6	1.9±0.5 ^b	2.0±0.6 ^c	2.6±0.8 ^c	2.0±1.1 ^b	2.7±1.3 ^b	1.9±0.5 ^c

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different ($p<0.05$).

3.2.23. Sensory evaluation of Honghap Jook

Amount (%, tea)	Color	Taste	Texture	Bitter	Aroma	Overall eating
0	3.2±0.7 ^a	2.5±0.9 ^a	2.5±0.7 ^a	3.5±0.9 ^a	2.2±1.0 ^a	2.4±1.0 ^a
2	3.5±0.6 ^a	2.8±0.6 ^a	3.1±0.5 ^a	3.2±0.5 ^{ab}	2.8±0.7 ^a	3.0±0.9 ^{ab}
4	3.3±1.0 ^a	2.7±1.0 ^a	2.9±0.8 ^a	2.7±0.7 ^{bc}	2.5±0.8 ^a	2.3±1.1 ^{ab}
6	2.4±1.2 ^b	2.5±0.9 ^a	2.9±1.0 ^a	2.4±0.9 ^c	2.8±1.2 ^a	1.9±0.8 ^b

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different ($p<0.05$).

2) 각종 죽의 영양가

가) 각종 죽의 1인분의 량

흰 죽 쌀 45g+물 300mL+NaCl 0.5g+0,2,4,6% 분말 (버섯균사체) 발효차

녹두죽 쌀 45g+녹두 15g+물 400mL+NaCl 0.5g+0,2,4,6% 분말 발효차

아욱죽 쌀 45g+아욱 25g+물 300mL+된장 6g+0,2,4,6% 분말 발효차

홍합죽 쌀 45g+물 300mL+홍합가루 7g+NaCl 0.5g+0,2,4,6% 분말 발효차

잣 죽 쌀 45g+물 300mL+잣가루 7g+NaCl 0.5g+0,2,4,6% 분말 발효차

나) 각종 죽의 1인분에 대한 영양가

5 가지 죽의 1인분에 대한 영양가 평가는 다음과 같다.

Table 3.2.24. Caloric contents of general Jook (white color)

General Jook	Mois- ture	Calorie	Protein	Lipid	Sugar	Fiber	Ca	Fe	Na	K	Zn	Vit. A
0%	29.25	65.70	1.22	0.09	14.27	0.05	0.90	0.09	1.35	11.25	0.21	0.00
2%	29.35	71.34	1.88	0.21	15.12	0.21	2.70	0.23	1.41	40.35	0.28	70.00
4%	29.44	76.98	2.54	0.32	15.97	0.37	4.50	0.37	1.47	69.45	0.35	140.00
6%	29.54	82.62	3.20	0.44	16.83	0.53	6.30	0.50	1.53	98.55	0.42	210.00

Retinol	β-Carotene	Vit. B1	Vit. B2	Vit. B6	Niacin	Vit. C	Folic acid	Vit. E
0.00	0.00	0.02	0.01	0.03	0.27	0.00	0.99	0.09
0.00	420.00	0.05	0.04	0.03	0.36	2.70	3.18	1.41
0.00	840.00	0.08	0.08	0.03	0.46	5.40	5.37	2.73
0.00	1260.00	0.11	0.11	0.03	0.55	8.10	7.56	4.05

Table 3.2.25. Caloric contents of Nockdoo Jook

Nockdu Jook	Mois- ture	Calorie	Protein	Lipid	Sugar	Fiber	Ca	Fe	Na	K	Zn	Vit. A
0%	1.64	50.25	3.35	0.23	8.61	0.69	15.00	0.83	0.30	198.45	0.37	1.80
2%	1.73	55.89	4.01	0.34	9.46	0.85	16.80	0.96	0.36	227.55	0.44	71.80
4%	1.83	61.53	4.67	0.46	10.32	1.01	18.60	1.10	0.42	256.65	0.51	141.80
6%	1.92	67.17	5.33	0.57	11.17	1.18	20.40	1.24	0.48	285.75	0.58	211.80

Retinol	β -Carotene	Vit. B1	Vit. B2	Vit. B6	Niacin	Vit. C	Folic acid	Vit. E
0.00	10.80	0.06	0.02	0.03	0.30	0.00	59.40	0.21
0.00	430.80	0.09	0.05	0.03	0.39	2.70	61.59	1.53
0.00	850.80	0.12	0.09	0.03	0.49	5.40	63.78	2.85
0.00	1270.80	0.15	0.12	0.03	0.58	8.10	65.97	4.17

Table 3.2.26. Caloric contents of Jact Jook

Jact Jook	Mois- ture	Calorie	Protein	Lipid	Sugar	Fiber	Ca	Fe	Na	K	Zn	Vit. A
0%	7.46	2.40	0.06	0.07	0.40	0.00	0.96	0.04	10.08	1.76	0.03	0.00
2%	7.55	8.04	0.72	0.19	1.25	0.16	2.76	0.18	10.14	30.86	0.09	70.00
4%	7.65	13.68	1.38	0.30	2.11	0.32	4.56	0.32	10.20	59.96	0.16	140.00
6%	7.74	19.32	2.04	0.42	2.96	0.49	6.36	0.45	10.26	89.06	0.23	210.00

Retinol	β -Carotene	Vit. B1	Vit. B2	Vit. B6	Niacin	Vit. C	Folic acid	Vit. E
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.34	0.08
0.00	420.00	0.03	0.03	0.00	0.13	2.70	2.53	1.40
0.00	840.00	0.06	0.07	0.00	0.22	5.40	4.72	2.72
0.00	1260.00	0.09	0.10	0.01	0.31	8.10	6.91	4.04

Table 3.2.27. Caloric contents of Awook Jook

Awook Jook	Mois- ture	Calorie	Protein	Lipid	Sugar	Fiber	Ca	Fe	Na	K	Zn	Vit. A
0%	22.90	5.00	0.90	0.15	0.43	0.23	23.50	0.50	8.75	136.50	0.14	285.75
2%	23.00	10.64	1.56	0.27	1.28	0.39	25.30	0.64	8.81	165.60	0.21	355.75
4%	23.09	16.28	2.22	0.38	2.13	0.55	27.10	0.78	8.87	194.70	0.28	425.75
6%	23.19	21.92	2.88	0.50	2.99	0.71	28.90	0.91	8.93	223.80	0.34	495.75

Retinol	β -Carotene	Vit. B1	Vit. B2	Vit. B6	Niacin	Vit. C	Folic acid	Vit. E
0.00	1714.75	0.03	0.05	0.04	0.23	12.00	27.25	0.35
0.00	2134.75	0.06	0.08	0.04	0.32	14.70	29.44	1.67
0.00	2554.75	0.09	0.11	0.04	0.41	17.40	31.63	2.99
0.00	2974.75	0.12	0.15	0.04	0.51	20.10	33.82	4.31

Table 3.2.28. Caloric contents of Honghap Jook

Honghap Jook	Mois- ture	Calorie	Protein	Lipid	Sugar	Fiber	Ca	Fe	Na	K	Zn	Vit. A
0%	0.90	27.37	3.93	0.71	0.99	0.00	15.75	1.21	34.93	17.50	0.50	6.02
2%	1.00	33.01	4.59	0.83	1.84	0.16	17.55	1.35	34.99	46.60	0.56	76.02
4%	1.10	38.65	5.25	0.95	2.70	0.32	19.35	1.49	35.05	75.70	0.63	146.02
6%	1.19	44.29	5.91	1.06	3.55	0.49	21.15	1.63	35.11	104.80	0.70	216.02

Retinol	β -Carotene	Vit. B1	Vit. B2	Vit. B6	Niacin	Vit. C	Folic acid	Vit. E
4.55	8.75	0.01	0.04	0.02	0.39	0.56	5.67	0.84
4.55	428.75	0.04	0.07	0.02	0.48	3.26	7.86	2.16
4.55	848.75	0.07	0.10	0.03	0.57	5.96	10.05	3.48
4.55	1268.75	0.10	0.14	0.03	0.67	8.66	12.24	4.80

2. 버섯균사체 발효차를 첨가한 양갱의 제조

가. 양갱의 제조

1) 늙은 호박과 녹두를 이용한 양갱의 제조

호박(Cucurbita spp.)은 박과에 속하는 1년생 초본의 덩굴 식물로 우리나라에 전해진 것은 임진왜란 이후로 과육의 성숙에 따라 애호박과 늙은 호박으로 나누는데 호박 생산량의 80%를 차지하는 애호박은 반찬용으로 사용되고 20% 정도는 늙은 호박으로서 독특한 향미와 호박 특유의 조직감 등으로 저장성이 좋아서 음식용·약용 등으로 널리 애용되고 있다.

늙은 호박의 황색 색소는 주로 carotenoid 류로서 다량 함유되어 있고 식이 섬유소가 많으므로 충변을 이롭게 하여 항산화 항암작용, 점막의 저항력을 길러주며 냉증치료, 이뇨작용, 혈중 CHOL의 저하 지방의 축적 등을 막아주므로 다이어트식으로 건강에 매우 유익한 식품이다. 녹두(green gram mung bean)는 두류 중에서 향미가 좋고 소화가 잘되며 당질이 46%이고 단백질은 25%이며 조섬유가 5%, 조회분이 4% 정도로 당질이 높아서 gel 형성의 성질 등으로 음식의 비린내 등 잡냄새와 결합-제거함으로써 어죽 등에 이용된다. 또한 한방에서는 소갈증과 설사에 이용되며 인도에서는 신경계층의 약용으로 사용된다. 따라서 값싸고 손쉽게 구할 수 있는 늙은 호박과 녹두를 이용한 양갱은 어린이와 노약자의 간식용으로 성인병 예방의 다이어트식으로 매우 바람직하다.

2) 늙은 호박과 녹두를 이용한 paste 만들기

A. 호박 paste 제조

껍질과 씨를 제거한 늙은 호박 2 kg을 중탕냄비에서 약 30분정도 찌서 믹서에 갈아 채에 곱게 내린다. 변색과 굳는 것을 방지하기 위해 여기에 설탕 200g + oligo당 300g + NaCl 1g을 넣고 약 10분간 끓인다.

B. 녹두 paste 만들기

껍질 벗기고 물에 불린 녹두 1.5kg을 찌서 물 1L와 함께 믹서에 갈아 으깨어 채에 곱게 내린다. 변색과 굳는 것을 방지하기 위해 여기에 설탕 200g + oligo당 300g + NaCl 1g을 넣어 약 10분간 끓여 paste를 만든다.

3) 양갱의 제조

A. 호박 양갱의 제조 및 분말 녹차 첨가에 따른 양갱

물 200 mL에 분말 한천 20 g을 넣고 약 10분정도 끓여 한천이 완전히 풀리면 미리 만들어 놓은 늙은 호박 paste를 500 g 넣고 10분간 끓이다가 준비된 양갱의 틀에 부어 식혀서 냉장고에 20시간 정도 굳힌다. 이를 control G로 한다. * 여기에 Vitamin C의 강화와 flavor를 좋게 하기 위하여 chewable Vitamin C (orange flavor)를 각각 5 tablet (1 tablet 에 vitamin C 500 mg 함유) 씩을 넣음. * 버섯균사체(팽이) 발효차는 <제 1 세부과제>로부터 제공받았으며, 각각의 양갱은 틀에 부어 식혀 냉장고에서 20시간 정도 굳혀서 완성시킨다.

- ① 늙은 호박 paste 500 g + 한천액 200 ml + 0% 분말 버섯균사체 발효차
- ② " " + 1% (5g) 분말 버섯균사체 발효차 + 5 tablet
- ③ " " + 2% (10g) 분말 버섯균사체 발효차 + 5 tablet

B. 녹두 양갱의 제조 및 분말 녹차 첨가 양갱

물 200mL에 20g의 한천을 넣어 약 10분간 끓이다 미리 만들어 놓은 녹두 paste를 넣고 약 10분간 끓이다가 미리 준비된 양갱의 틀에 넣어 식혀 20시간 정도 굳힌다. 이를 control G로 한다.

- ① paste 500g + 한천액 200 mL + 0% 분말 버섯균사체 발효차 - Control G
- ② " + " + 1% (5g) 분말 버섯균사체 발효차 + 5 tablet (Vit. C 500mg)
- ③ " + " + 2%(10g) 분말 버섯균사체 발효차 + " 각각의 양갱은 틀에 부어 20시간 정도 냉장고에서 굳혀서 완성시킨다.

나. 양갱의 품질 특성 실험

1) 당도측정 : 당도계 refractometer (Model Pal-1, ATAGO, Japan)를 이용하여 당도를 측정하였다.

2) Texture 측정 : texture meter (texture analyzer Model TXXT 2i, Stable Micro Systems, England)를 이용하여 견고성(hardness), 응집성(cohesiveness), 탄성(springiness), 검성(gumminess), 씹힘성(chewiness), 부서짐성(fractureness), 부착성(adhesiveness), 탄력성(elasticity) 같은 TPA (texture profile analysis) parameter 를 측정하였다.

3) 색도측정 : 버섯균사체(팽이) 발효차를 첨가하여 제조한 양갱의 색도를 측정하기 위해 시료를 직경 2 cm, 높이 1 cm cell에 넣어 색차계 (Chroma Meter, CR-200b, Minolta, Japan)를 사용하여 whiteness의 색계인 밝은 정도를 나타내는 L값(lightness), 붉은색의 정도를 나타내는 a값(redness), 그리고 노란색의 정도를 나타내는 b값(yellowness)으로 각 시료당 총 5회 반복 실험하여 평균값으로 나타내었다. 이때 사용된 표준색판으로 백색판(L=96.88, a=-0.16, b=-0.29)을 사용하였다.

L은 명도(L-value, lightness → white +100 ↔ 0 black), a는 적색도(a-value, redness → red +60 ↔ -60 green), b는 황색도(b-value, yellowness → yellow +60 ↔ -60 blue)를 나타낸다.

4) 관능검사 : 관능 검사는 순천대학교 식품영양학과 학생 중에서 30명의 패널을 선발하여 평가하였다. 평가방법은 색(color), 맛 (taste), 향기 (aroma), 조직감(texture), 종합적인 맛(overall eating acceptability)등에 대하여 5점 기호 척도법으로 하여 아주 좋다 5점, 좋다 4점, 보통이다 3점, 나쁘다 2점, 아주 나쁘다 1점으로 하였다.

다. 양갱의 품질특성 변화

1) 양갱의 당도 변화

버섯균사체(팽이) 발효차를 첨가하여 제조한 양갱의 당도를 측정한 결과는 Table 3.2.21에서와 같이 버섯균사체(팽이) 발효차를 첨가함으로써 호박양갱은 18.4 °Brix, 녹두양갱은 17.6 °Brix로 대조군에 비하여 약 2 °Brix 낮은 수치를 나타내었다.

2) 양갱의 색차계 색도 변화

버섯균사체(팽이) 발효차를 첨가하여 제조한 양갱의 색도를 측정한 L, a 및 b 값은 아래 Table 3.2.30, Table 3.2.31에서와 같이 버섯균사체(팽이) 발효차의 첨가량이 증가함에 따라 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 대조군의 L(lightness)값이 각 34.16, 46.13으로 가장 높게 나타났으며, 버섯균사체(팽이) 발효차 첨가 2% 군에서 28.82, 33.96으로 가장 낮은 값을 나타내어 버섯균사체(팽이) 발효차의 첨가량이 증가할수록 L 값은 감소하여 어두운 색을 나타내었다.

Table 3.2.29. Formulation of Yang Gaeng added with pumpkin and mung bean

Yang Gaeng	Sugar content (°Brix)
Pumpkin	20.3
1% fermented tea + pumpkin	18.4
mung bean	19.0
1% fermented tea + mung bean	17.6

Table 3.2.30. Hunter color index of Yang Gaeng of pumpkin and fermented tea powder prepared with mycelial *Flammulina velutipes* M-034

Concentration(% w/w)	L	a	b
Control	34.16±0.6 ^a	0.14±0.1 ^a	8.42±0.2 ^a
1	30.16±0.1 ^b	-0.12±0.0 ^b	4.65±0.1 ^b
2	28.82±0.0 ^c	-0.13±0.1 ^b	3.86±0.4 ^c

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

L: measures lightness and varied from 100 for perfect white to zero for black.

a: measures redness when plus, gray when zero, and greenness when minus.

b: measures yellowness when plus, gray when zero, and blueness when minus.

Table 3.2.31. Hunter color index of Yang Gaeng of mung bean and fermented tea powder prepared with mycelial *Flammulina velutipes* M-034

Concentration(% w/w)	L	a	b
Control	46.13±0.6 ^a	-1.25±0.1 ^a	8.55±0.2 ^a
1	38.82±0.1 ^b	-0.87±0.0 ^b	7.57±0.1 ^b
2	33.96±0.0 ^c	-0.76±0.1 ^b	10.42±0.4 ^c

Means±S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

L: measures lightness and varied from 100 for perfect white to zero for black.

a: measures redness when plus, gray when zero, and greenness when minus.

b: measures yellowness when plus, gray when zero, and blueness when minus.

이는 버섯균사체(팽이) 발효차의 첨가에 따른 현상 때문인 것으로 생각된다. 적색도를 나타내는 a 값은 마이너스 값으로 나타내며 버섯균사체(팽이) 발효차 첨가량이 많을수록 진한 갈색을 높게 나타남을 육안으로도 확인할 수 있었으며 황색도를 나타내는 b(yellowness) 값은 버섯균사체(팽이) 발효차 첨가량이 증가할수록 낮은 값을 나타내었다.

3) 양갱의 Texture 변화

버섯균사체(팽이) 발효차를 첨가하여 제조한 양갱을 texture를 측정된 결과는 Table 3.2.32와 같다. 견고성(hardness)은 두 가지 양갱 모두 버섯균사체(팽이) 발효차의 첨가량이 증가할수록 각각 감소하였으며, 탄력성(springiness)은 버섯균사체(팽이) 발효차를 첨가한 녹두양갱 실험군은 탄력성이 증가하였으나 호박양갱은 감소하는 경향을 보였다. 씹힘성(chewiness) 또한 녹두양갱 실험군에서는 값이 증가하였으나 호박양갱은 분말 버섯균사체(팽이) 발효차를 첨가한 실험군의 값이 감소하였다. 결과적으로 분말 버섯균사체(팽이) 발효차 첨가시 양갱의 견고성 및 강도는 전체적으로 약해졌으나 녹두양갱의 경우 점, 탄성 및 응집성이 증가하고 반면, 호박양갱은 점, 탄성이 약해져 잘 부스러지게 된다.

Table 3.2.32. Texture characteristics of Yang Gaeng of pumpkin and mung bean with fermented tea powder prepared with mycelial *Flammulina velutipes* M-034

	Mung bean grain ¹⁾	Mung bean + fermented tea ²⁾	Pumpkin ³⁾	Pumpkin + fermented tea ⁴⁾
Hardness	3878.68±338.56 ^b	3696.56±290.99 ^b	3248.85133.19 ^a	3164.02±166.38 ^a
Adhesiveness	-1.52±104.05 ^{NS}	0.80±2.39	-41.11±17.09	-88.56±185.60
Springiness	1.13±0.42 ^{NS}	1.37±0.90	1.78±1.63	1.03±0.48
Cohesiveness	0.57±0.61 ^b	0.65±0.05 ^c	0.42±0.27 ^a	0.43±0.04 ^a
Gumminess	2210.74±189.26 ^b	2402.30±178.99 ^c	1358.96±104.40 ^a	1371.50±138.20 ^a
Chewiness	2504.96±954.47 ^{NS}	3381.77±2512.38	2403.68±2192.16	1417.34±653.76
Resilience	0.54±0.11 ^a	0.49±0.05 ^a	0.63±0.05 ^b	0.62±0.11 ^b

¹⁾Means±S.D.(n=8) ; ²⁾Means±S.D.(n=12) ; ³⁾⁴⁾Means±S.D.(n=11) ; ^{NS} : Non-significantly. Means in a row sharing a common superscript letter(s) are not significantly different(p<0.05).

4) 양갱의 관능검사 변화

버섯균사체 발효차를 첨가한 호박과 녹두양갱의 관능검사는 순천대학교 식품영양학과 학생 30명을 대상으로 5점 척도법으로 실시한 결과는 Table 3.2.33, <Table 3.2.34와 같다. 버섯균사체 발효차를 첨가한 호박양갱의 경우 그룹간의 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 전반적으로 2% 버섯균사체 발효차 첨가군에 비하여 1% 버섯균사체 발효차 첨가군의 기호도가 높았다.

Table 3.2.33. Sensory evaluation of Yang Gaeng of pumpkin and mung bean with fermented tea powder prepared with mycelial *Flammulina velutipes* M-034

Yang Gang	Color	Taste	Hardness	Adhesive-ness	Chewiness	Overall eating
A	3.6±1.0 ^a	3.6±1.0 ^a	3.6±0.8 ^a	3.6±0.9 ^a	3.6±0.9 ^a	3.7±0.9 ^a
B	3.5±0.7 ^a	3.1±0.7 ^{ab}	3.4±0.6 ^a	3.3±0.7 ^a	3.5±0.7 ^a	3.4±0.7 ^a
C	3.1±0.6 ^a	2.8±0.7 ^b	3.6±0.5 ^a	3.1±0.5 ^a	3.3±0.4 ^a	3.1±0.5 ^a

Means ± S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

또한 녹두 양갱의 경우 1% 버섯균사체 발효차를 첨가한 실험군이 경도 및 씹힘성에 있어서 기호도가 높았으며, 호박양갱의 결과와 동일하게 2% 버섯균사체 발효차 첨가군에 비하여 1% 버섯균사체 발효차 첨가군이 전반적으로 기호도가 높았다.

Table 3.2.34. Sensory evaluation of Yang Gaeng added with mycelial mushroom fermented tea and mung bean

Yang Gang	Color	Taste	Hardness	Adhesive-ness	Chewiness	Overall eating
A	3.5±0.8 ^a	3.6±0.8 ^a	3.4±0.7 ^a	3.5±0.8 ^a	3.8±0.9 ^a	3.5±0.6 ^a
B	3.6±0.8 ^a	3.6±0.9 ^a	3.9±0.8 ^a	3.7±0.8 ^a	4.0±0.7 ^a	3.4±0.9 ^a
C	3.4±0.8 ^a	3.3±0.6 ^a	3.6±0.6 ^a	3.4±0.8 ^a	3.6±0.9 ^a	3.4±0.7 ^a

Means ± S.D. Means in a column sharing a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

A)



B)



C)



D)



E)



F)



Fig. 3.2.4. Some Jook and Yang Gaeng of "Sour Black Tea" prepared with mycelial mushroom fermented tea.

제 6 절 산 발효차를 이용한 “소스와 음료류” 간편식품의 개발

1. 녹차 및 산발효차를 이용한 ‘소스’의 최적화 배합비율 선정

가. 녹차 및 산발효차를 이용한 “마요네즈 야채소스”

녹차 및 산발효를 이용한 마요네즈 야채소스의 최적 배합비율은 각 단계별 다양한 농도에서 예비실험 기본적인 결과를 토대로 다음과 같이 요약된다.

1) 마즈-야채 녹차소스 (A-1)

마요네즈 야채소스의 기본재료 : 마요네즈 10g, 사과 10g, 배 10g
바나나 10g, 양파가루 5g

사과, 배, 바나나 등을 껍질을 벗기고, 각각의 무게를 달아서 mixer에 넣고, 갈아서 여기에 마요네즈, 양파가루 등을 넣어 잘 섞어서 기본 마요네즈 야채소스로 하였음.

① 기본재료 25g + 5% 녹차 추출액 10 mL + 녹차가루 5% (1.75g)

② 기본재료 25g + 10% 녹차 추출액 10 mL + 녹차가루 10% (3.5g)

사용한 녹차는 덩음차로 빛은 우전을 사용하였으며, 녹차 추출액은 2분간 우려서 사용함.

2) 마즈-야채 녹차소스 (A-2)

마요네즈 야채소스의 기본재료 (90g) : 마요네즈 20g, 사과20g, 배20g
바나나 20g, 양파가루 10g

제조방법은 1차 실험과 동일함

① 기본재료 22.5 g + 5% 녹차추출액 10 ml + 가루녹차 2% (0.5 g)

② 기본재료 22.5 g + 5% 녹차추출액 10 ml + 가루녹차 4% (1 g)

③ 기본재료 22.5 g + 10% 녹차추출액 10 ml + 녹차가루 2% (0.5 g)

④ 기본재료 22.5 g + 10% 녹차추출액 10 ml + 녹차가루 4% (1g)

2차 실험결과 맛, 질감, 색, 냄새 등은 적합하였으나, 녹차 추출액 5%, 10%의 차이는 볼 수 없었으므로 10% 추출액을 사용함.

3) 마즈-야채 녹차소스 (A-3)

마요네즈 야채소스 기본재료 : 마요네즈 10 g, 사과즙 10 ml, 배즙 10 ml

마쇄시킨 바나나 10 g , 양파가루 5 g

#마요네즈 만들기 : 계란 노른자 2개 (33 g), olive oil 60 ml, 2배식초 15 ml 등의 재료를 hand mixer를 사용하여 계란 노른자와 olive oil를 mixing하는데 2배 식초를 떨어뜨려 고르게 넣으면서 마요네즈를 잘 만들고, 마지막에 레몬즙을 몇 방울을 떨어뜨려 맛과 향을 양호하게 하였음.

① 기본재료 22.5 g + 10% 녹차 추출액 10 ml + 녹차가루 2% (0.5 g)

② 기본재료 22.5 g + 10% 녹차 추출액 10 ml + 녹차가루 4% (1 g)

4) 마즈-야채 발효차소스 (A-4)

마요네즈 야채소스 기본재료를 상기와 동일하게 만들어서

① 기본재료 22.5 g + 유산균 발효차 5 ml (20%)

② 기본재료 22.5 g + 유산균 발효차 10 ml (40%)

그 결과 색, 맛, 질감 등이 양호하였으나, 상큼한 맛이 20% 농도는 나타나서 양호하였으나 40% 농도는 약간 신맛이 강하였다.

나. 녹차 및 산발효차를 이용한 “마늘 야채소스”

녹차 및 산발효를 이용한 마늘 야채소스의 최적 배합비율은 각 단계별 다양한 농도에서 예비실험 기본적 결과를 토대로 다음과 같이 요약된다.

1) 녹차 마늘 야채소스

■ 마늘-야채 녹차소스 (G-1)

마늘소스의 기본재료 : 마쇄 마늘 10g, 마쇄 양파 20g, 맛장 10 ml

식초(wine식초) 20 ml

맛장 만들기

표고버섯 180g, 다시마 100g, 가죽잎 40g, 산초 10g, 김정콩 350g, 양파 380g, 무 850g을 물 2L에 첨가하고 증자솥에서 1시간 가량 충분히 달인

후, 물 1L에 올리고당 1L, 시판 진간장 1L를 넣고 증자-농축시켜 2.4 L를
부피로 제조한 맛장임.

- ① 기본재료 25g + 10% 녹차 추출액 10 mL + 녹차가루 2% (0.5g)
- ② 기본재료 25g + 10% 녹차 추출액 10 mL + 녹차가루 4% (1g)

<위의 실험결과 맛은 양호하였으나 신맛이 부족하였음>.

■ 마늘-야채 녹차소스 (G-2)

마늘소스의 기본재료 : 마늘즙 10 ml, 양파즙 20 ml, 맛장 10 ml
식초(wine식초) 30 ml, 설탕 1g

제조방법은 1차 실험과 동일함

- ① 기본재료 35 g + 10% 녹차추출액 10 ml + 가루녹차 2% (0.7 g)
- ② 기본재료 22.5 g + 10% 녹차추출액 10 ml + 가루녹차 4% (1.4 g)

<2차 실험결과 맛, 색, 냄새 등은 적합하였음>.

2) 산발효차 마늘 야채소스

■ 마늘-야채 발효차소스 (G-3)

마늘 야채소스 기본재료 : 마늘즙 10 ml, 양파즙 20 ml, 맛장 10 ml
식초(wine) 30 ml, 설탕 1 g

- ① 기본재료 35 ml + 유산균 발효차 0.2 ml (5%)
- ② 기본재료 35 ml + 유산균 발효차 0.4 ml (10%)

<실험결과 기본재료의 맛과 별로 차이가 없었음>.

■ 마늘-야채 발효차소스 (G-4)

마늘 야채소스 기본재료 : 마늘즙 10 ml, 양파즙 20 ml, 맛장 10 ml
식초(wine) 30 ml, 설탕 1 g

- ① 기본재료 35 ml + 유산균 발효차 5 ml (15%)
- ② 기본재료 35 ml + 유산균 발효차 10 ml (30%)

<기본재료의 맛과 색깔은 양호하였으나 유산균 발효차 자체가 신맛이 나므로 더욱 신맛이 나타났음>.

■ 마늘-야채 발효차소스 (G-5)

마늘 야채소스 기본재료 : 마늘즙 10 ml, 양파즙 20 ml, 맛장 10 ml
식초(wine) 30 ml, 설탕 1 g

① 기본재료 30 ml + 유산균 발효차 5 ml (17%)

② 기본재료 30 ml + 유산균 발효차 10 ml (34%)

<유산균 발효차 5 ml를 첨가하였을 때는 색과 맛은 양호하였으나 신맛이 약간 적은 상태였으나 10 ml를 첨가하였을 때는 가장 적절한 배합비율이었다>.

다. 녹차 및 산 발효차를 이용한 '육류소스' 및 '불고기 양념' 최적화 배합비율 선정

녹차 및 산발효를 이용한 '육류소스' 및 '불고기 양념'의 최적 배합비율은 각 단계별 다양한 농도에서 예비실험 기본적 결과를 토대로 다음과 같이 요약된다.

1) 육류소스

■ 육류용 녹차소스 (M-1)

기본 육류소스 재료 : 맛장 15ml, 마늘즙 5ml, 양파즙 10ml
올리고당 5ml, 표고버섯가루 2 %, 후추 약간

① 기본육류소스 30ml + 10% 녹차추출액 10ml + 녹차가루 2% (0.6g)

② 기본육류소스 30ml + 10% 녹차추출액 10ml + 녹차가루 4% (1.2g)

<질감은 양호하였으나 약간 묽은 상태(싱거운)의 맛으로 평가>.

■ 육류용 녹차소스 (M-2)

기본 육류소스 재료 : 맛장 15ml, 마늘즙 5ml, 양파즙 10ml
올리고당 5ml, 표고버섯가루 2g, 소금 1g,

후추 약간

- ① 기본육류소스 30ml + 10% 녹차추출액 10ml + 녹차가루 2% (0.6g)
- ② 기본육류소스 30ml + 10% 녹차추출액 10ml + 녹차가루 4% (1.2g)

<간이 적절하고. 약간 녹차 냄새와 더불어 맛이 있었음>.

■ 육류용 발효차소스 (M-3)

기본육류소스 30ml + 유산균 발효차 10ml를 첨가한 결과, 색과 맛은 양호하였으나 약간 신맛이 강하였음.

■ 육류용 발효차소스 (M-4)

기본육류소스 30ml + 유산균 발효차 5ml를 첨가한 결과, 색과 맛, 냄새 등에서 적절하였음.

2) 불고기 양념소스

옛날부터 불고기 양념은 간장과 마늘로 간을 맞추는데 불과했으나 오늘날은 여러 가지 양념을 넣고 숙성시켜서 맛과 영양을 더욱 부여한다.

■ 불고기용 녹차소스 (B-1)

쇠고기(등심으로 4 mm두께로 잘라서 사용함) 양에 따라서 양념은 마늘 4%, 양파 10%, 표고버섯가루 2%, 갈은 배 10%, 맛장 20%, 올리고당 4%, 후추 약간을 사용한다.

- ① 기본양념 25g + 10% 녹차추출액 10ml + 녹차가루 2% (0.5g)
- ② 기본양념 25g + 10% 녹차추출액 10ml + 녹차가루 4% (1g)

따라서 쇠고기(등심) 1kg에 양념으로 마늘 40g, 양파 100g, 맛장 200ml, 표고버섯가루 20g, 갈은 배 100g, 올리고당 40g, 후추 약간, 참기름 10 ml를 넣어 양념하여 숙성시킨다. 냉장온도에서 1일 숙성시킨 결과, 배즙과 양파즙 등으로 단백질 숙성과 분해 등으로 연육되어 맛이 좋았고, 녹차의 첨가로 냄새가 양호하였음.

■ 불고기용 발효차소스 (B-2)

기본 양념 25g + 유산균 발효차 10ml를 넣어 제조한 불고기 양념은 신맛이

나타났다. 그러나 쇠고기 1kg에 양념으로 유산균 발효차를 첨가하였을 때 오히려 육류의 이상취를 줄이는 효과를 나타내었다.

2. 산 발효차를 이용한 음료류의 최적화 배합비율 선정

가. 재료 및 방법

1) 미생물 발효차의 열수 추출액 조제

미생물 발효차(버섯균사체)의 추출은 정제수를 이용하여 온도 80℃에서 1~2차는 10배, 3~4차는 5배로 추출한 후 농축물(수분함량 34.3%)로 제조하여 사용하였다.

2) 미생물 발효차의 짙은맛 개선을 위한 식품소재의 선정

미생물 발효차(버섯균사체)의 추출물의 품질개선을 위하여 당류(정백당, 과당) 첨가, 이미와 이상취를 masking할 수 있는 텍스트린(β -싸이클론텍스트린) 첨가, 기능성 소재(스위트 메이트) 첨가 및 masking flavor(5종) 첨가군으로 나누어서 검토하였다.

3) 미생물 발효차 추출액의 사용 농도

미생물 발효차(버섯균사체)의 extract를 일일 권장량에 근거하여 1% 수용액으로 제조하여 사용하였다.

4) 관능평가

미생물 발효차 추출물 혹은 시제품의 관능검사는 5명의 관능검사요원을 통하여, 5점 기호도법으로 실시하였으며, 신맛, 단맛, 짙은맛, 종합적인 기호도로 구분하여 조사하였다.

5) 미생물 발효차 액상제품의 배합성분 및 그 비율의 선정

미생물 발효차(버섯균사체) 추출물을 이용하여 청량감과 기능성을 갖는 배합성분을 선발하였고, 그 배합비율을 달리하여 다양한 시제품을 제조하였으며, 순위시험법으로 통한 관능평가를 실시하여 양호한 1차 시제품을 선정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 첨가물에 의한 미생물 발효차 추출물의 맛 개선

가) 당류 첨가에 의한 품질개선

미생물 발효차(버섯균사체) 추출물을 1일동안 섭취 권장량 기준으로 하여 제조된 1% 수용액에 정백당 및 과당을 무게비로서 0~12%까지 농도 별로 첨가하여 신맛, 떫은맛, 단맛, 전체적인 기호도를 조사한 결과는 Table 3.1.38과 같다. 전체적으로 감미성분이 있는 당류의 농도가 상승함에 따라 신맛, 쓴맛, 단맛의 종합적인 관능적 면에서 품질이 개선되었으며, 대체로 음료로서의 기호성에서는 무게비로 6% 농도가 가장 바람직할 것으로 생각되었다. 그러나 2가지의 과당과 정백당에서 크게 차이가 없었지만, 부분적으로 음료로서 맛을 개선시키는 효과를 나타내었는데, 대체로 정백당 보다는 대사에서 유리한 점이 있는 과당을 이용하는 편이 단맛을 주는 의미에서 유리할 것으로 판단된다.

Table 3.1.38. Sensory evaluation of extract of 'mush tea' according to addition of sugar

Conc.(%)	Refined sugar				Fructose			
	Sour	Bitter	Sweet	Overall accep.*	Sour	Bitter	Sweet	Overall accep.*
None	2.4±0.4	2.4±0.2	1.3±0.3	2.3±0.4	2.3±0.3	2.4±0.1	1.6±0.2	2.4±0.2
3	1.8±0.2	2.3±0.3	1.7±0.4	3.5±0.1	1.6±0.1	2.1±0.3	2.2±0.4	3.6±0.3
6	1.6±0.3	1.5±0.5	2.8±0.3	3.9±0.3	1.4±0.2	1.6±0.3	3.3±0.1	4.2±0.1
9	1.1±0.1	1.5±0.4	3.2±0.2	3.4±0.4	1.0±0.4	1.3±0.2	3.9±0.3	3.6±0.4
12	1.0±0.5	1.4±0.1	3.4±0.2	3.2±0.2	0.9±0.3	1.2±0.4	4.1±0.6	3.4±0.5

*(acceptability), the others(intensity)

2가지의 당류의 혼합 농도비를 조사하기 위하여 정백당과 과당의 농도비를 일정하게 조절한 6% 당류액을 버섯균사체 발효차 추출액에 첨가하여 관능평가를 실시한 결과는 Table 3.1.35와 같다. 표에 나타난 바와 같이 정백당(3) : 과당(3)을 비슷한 농도 2:3 - 3:3(w/w) 범위로 첨가하면 종합적인 관능점수가 증진되는 효과가 있었다.

Table 3.1.39. Sensory evaluation of extract of "mush tea" according to ratio of refined sugar to fructose

Ratio(10%)		Sour	Bitter	Sweet	Overall* accep.
None		2.3±0.3	2.3±0.3	1.3±0.2	2.6±0.2
1**	5***	1.6±0.2	1.9±0.2	2.8±0.4	3.1±0.3
2	4	1.4±0.2	1.5±0.4	3.2±0.2	3.4±0.2
3	3	0.9±0.1	1.3±0.5	3.3±0.1	3.6±0.4
4	2	0.8±0.4	1.2±0.3	3.2±0.3	3.3±0.6

*(acceptability), the others(intensity)

refined sugar(left) / *fructose(right)

나) 기능성 소재 첨가에 의한 품질개선

기능성 소재로서 음료화에 이용되는 스위트메이트 및 β-사이클로덱스트린을 0~1.6%까지 농도 별로 첨가하여 신맛, 쓴맛, 단맛 및 종합적인 기호도를 조사한 결과는 Table 3.1.40과 같다. 이들 2 가지의 기능성 소재는 그 농도가 증가함에 따라 신맛 및 쓴맛이 관능적으로 일부 개선되었으나, 정백당 및 과당을 포함한 단맛이 강한 당류를 첨가한 것보다는 기호적 면에서 약간 감소하는 경향이였다. 그러나 이상과 같은 2 가지의 기능성 소재 중에 스위트메이트가 덱스트린 소재보다는 버섯 균사체 발효차를 포함한 미생물 발효차의 음료제조에서 이미, 이상취 등을 고려한 종합적인 관능지표에서 조금 더 효과적으로 맛을 개선시켜 주는 것으로 나타나서 버섯균사체 음료의 액상제품을 개발할 때에 소량 첨가하면 품질을 향상시키는데 도움을 줄 것 판단된다.

Table 3.1.40. Sensory evaluation of extract of 'mush tea' according to concentration of cyclodextrin and sweetmate

Conc.(%)	Cyclodextrin				Sweetmate			
	Sour	Bitter	Sweet	Overall* accep.	Sour	Bitter	Sweet	Overall* accep.
None	2.3±0.3	2.9±0.3	1.2±0.4	2.4±0.3	1.9±0.1	2.4±0.3	1.3±0.4	2.5±0.3
0.4	1.9±0.2	2.6±0.4	1.5±0.3	2.4±0.6	1.5±0.3	1.8±0.2	1.8±0.4	2.6±0.2
0.8	1.6±0.4	1.9±0.2	1.9±0.4	2.6±0.4	1.3±0.4	1.6±0.4	2.0±0.3	2.8±0.2
1.2	1.4±0.2	1.3±0.1	2.4±0.2	2.9±0.2	1.2±0.2	1.1±0.3	2.3±0.1	2.9±0.4
1.6	1.2±0.1	1.2±0.2	2.4±0.4	3.1±0.3	0.8±0.2	0.8±0.1	2.8±0.2	3.3±0.3

다) 향미개선제 첨가에 의한 품질개선

향미개선제 4종을 0~0.10% 농도로 조절하여 첨가한 후, 미생물 발효차 추출액의 맛을 조사한 결과는 Table 3.1.41과 같다. 향료의 농도가 증가함에 따라 미생물 발효차 추출액의 맛이 약간 개선되었으나, 향 종류에 따라 큰 차이는 나타나지 않았고, 대체로 M.S, SH-1030, M.S SF-474A, M.S 1998-0-68, M.S 1998-0-69 순으로 효과적이었다.

Table 3.1.41. Sensory evaluation of extract of 'mush tea' according to concentration of masking flavor

Conc.(%)	SF-474A	SH-1030	MS 1998-0-68	MS 1998-0-69
None	3.5±0.4	3.5±0.4	3.5±0.4	3.5±0.4
0.02	3.4±0.3	3.5±0.1	3.3±0.2	3.3±0.3
0.04	3.5±0.2	3.4±0.3	3.3±0.3	3.2±0.1
0.06	3.2±0.1	3.2±0.2	2.8±0.4	3.0±0.2
0.08	2.9±0.4	3.0±0.3	2.4±0.1	2.7±0.4
0.10	2.6±0.3	2.7±0.2	2.2±0.3	2.4±0.6

Sensory score(intensity)

2) 미생물 발효차 추출물을 이용한 액상제품의 제조공정 및 제품개발

가) 국내음료의 품질특성 조사

국내외 지역에 유통·판매되고 있는 기호성 음료식품 중에 비교적 판매량이 많은 식품음료 제품의 pH와 당 함량을 조사한 결과, 생약재의 추출물을 함유한 “생약재 음료”는 생약재 자체의 단맛과 쓴맛이 강하기 때문에 최종 제품에서도 이들 맛이 기본적으로 포함되어 있었으며, pH는 3.51~4.0 범위였고, 당도는 대체로 10~15% 범위의 제품이 가장 많았다. “기능성 음료”도 역시 신맛과 단맛이 많았으며 pH는 3.0~3.5 범위였으며, 당도는 10.0~15.0% 범위가 많았는데, 전체적으로는 pH가 3.0~3.5, 당도는 10~15% 사이의 제품이 대부분을 차지하였다.

나) 미생물 발효차와 유사한 음료제품의 품질특성 및 자료 조사

미생물 발효차와 유사한 음료제품으로서 그 경쟁이 예측되는 대표적인 녹차, 홍차, 등글레차의 3종 제품을 구입하여 품질특성을 조사하였다. 최근 판매량이 점진적

으로 신장되고 있는 제품은 녹차였으며, 다음으로는 홍차나 둥글레차의 순이었다. 이들 제품들을 음용하는 연령층의 나이는 대체로 30~40대 사람이 많았고, 다음으로는 50대였으며, 20대의 비율은 가장 낮았다.

3) 미생물 발효차 추출물 액상제품의 개발 방향

시중에 유통되고 있는 음료제품의 품질특성과 관련자료 등을 참고로 하여 후발효차 제품의 개발 방향으로는 pH와 당도를 낮추어 신선 청량감을 증가시키고, 쓴맛과 신맛을 감소시키며, 30대~ 40대 중, 장, 노년층을 대상으로 하면서, 기호성 및 기능성이 잘 조화된 당류, 비타민 등을 첨가하여 건강 기능성식품에 적합한 방향으로 개발 목표를 설정하였다.

4) 미생물 발효차 추출물을 이용한 음료제품의 배합성분 및 비율 선정

버섯균사체 발효차의 추출물을 이용한 기호성이 우수한 음료를 제조하기 위하여, 감미제로서는 미생물 발효차 고유의 약간 쓴맛을 감소시킬 수 있는 당류로서 과당 및 정백당을 선정하였고, 기능성 당으로서는 트레할로스(trehalose), 기능성 소재로서 피로회복과 뇌기능 활성화, 신진대사촉진의 기능이 있는 타우린(taurin), 지구력

Table 3.1.42. Formulation of major components for preparing drink of 'mush tea'

Components	Content of drink(g)	Remarks
Ext. of 'mush tea'	1.00	
Sweetmate	0.28	Moisture 34.3%
Refined sugar	5.13	
Fructose	4.28	
Trehalose	0.14	
Taurine	0.15	
L-Carnitin	0.06	
Red powder	0.05	
Citric acid	0.25	
Vitamin C	0.04	
Sodium bicarbonate	0.02	
Aroma	0.04	'Mush tea'
Purified water	88.56	
Total	100 mL	

증강과 긴사슬 지방산의 에너지대사 등에 효능이 있는 L-카르니틴(carnitine)을 사용하였다. 특히 한국, 일본, 중국을 포함한 동양인뿐만 아니라 서구인들에게서 건강기능성 식품소재중의 하나로 지속적으로 관심을 갖게 하는 녹차, 홍차와 같은 전통다류의 다양한 생기능적 효과에 깊은 관심을 갖고 있다. 이런 점으로부터 홍차와는 달리 제조공정에서 버섯균사체의 균체의 효소를 이용하는 미생물 발효차의 기능성 음료화하기 위한 일환으로, 버섯균사체 발효차 추출물과 각종 부재료를 이용하여 배합성분 및 그 배합비율을 교차적으로 달리하여 다양한 시제품을 제조한 다음, 순위시험법으로 관능평가를 실시하여 시제품의 배합성분 및 그 비율을 Table 3.1.42와 같이 결정하였다.

5) 미생물 발효차 추출물을 이용한 음료 액상제품의 제조공정 및 방법 설정

버섯균사체 발효차 추출물을 이용한 음료제품의 생산 및 상품화에 적합한 제조공정 및 방법은 다음 Table 3.1.43과 같이 설정하였다. 음료 액상 제품을 제조를 위하여 미생물 발효차의 추출단계(I)에서는 이물질이 없는 미생물 발효차를 정량하여 정제수로 세척한 후, 추출용기에 넣고 정제수를 1회 추출할 때에는 생약제 중량의 10배, 80℃에서 5시간씩 2회 추출한다. 그리고 추출액을 모아서 냉각시키고, 원심분리·여과하여 상징액을 수득하여 70℃이하에서 감압농축하여 수분함량이 34.3%정도의 버섯균사체 발효차 농축액을 제조한다. 음료화 공정단계((II))에서는 미생물 발효차 추출물, 비타민과 기능성소재 및 부형제 성분을 각각 용해하여 혼합한 후, 원심분리 및 필터 여과하여 상징액을 일정용량으로 조정한다. 그리고 추출액을 93℃에서 15초간 고온순간살균(HTST)한 다음, 100 mL병에 담아서 capping하고, 80℃에서 15분간 후살균한 후, 포장하고 검사하여 최종제품으로 출하한다.

Table 3.1.43. Manufacturing process of drink of 'mush tea'

Items	Process
Ext. of 'mush tea' (I)	<p style="text-align: center;">Fermented 'mush tea'</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Washing</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Optimal extrct. conditions</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Cooling</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">1st Filter (Liquid)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">2nd Centrifuge (8,000rpm, 5°C, 20min)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Supernatant</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Concentration(below 70°C)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Condensed fermented tea</p>
Drink (II)	<p style="text-align: center;">(Con. mush tea) (Sugar)</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓</p> <p style="text-align: center;">Dissolving Dissolving</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Mixing</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Centrifuge/Filtration (8,000rpm, 0~5°C, 20min)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Volume</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">HTST(93°C, 15sec)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Filling</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Sterilization(80°C, 15min)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Packaging</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Inspection</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Products</p>

제 7 절 야생차의 주요 성분의 분석

가. 재료 및 방법

우리나라에서 자라는 재래종 야생차나무는 중국 소엽종으로 알려져 있으며, 일본계 품종인 개량종(야부키타)과는 달리 지리산 지역에서 많이 자생한다. 개량종과는 달리 야생종은 4월 초순부터 5월 하순까지 10~15일 간격으로 네 번 차 잎을 수확한다. 재래종은 개량종에 비해 수확 간격이 비교적 짧고 잎이 매우 작은 것이 특징이다. 본 연구에서는 채취시기별로 야생차 잎을 구하여 생화학적 주요성분을 분석하였다. 시기별 야생차의 잎은 재래종의 경우 우전(곡우 전에 따는 잎), 세작(4월 중하순에 따는 잎), 중작(5월 초순에 따는 잎), 대작(5월 중순에 따는 잎)으로 구분하여 각각의 생화학적 주요성분을 분석하였다.

1) 채취시기별 polyphenol 분석

차의 쓴맛과 떫은맛에 70~75% 정도 관여하는 것으로 알려진 polyphenol이라는 물질은 주로 catechin이라고도 하며, 그 함유량이 건조한 차 잎 중에 15~30% 정도 함유되어 있다(Quansheng 등, 2008). 본 연구에서는 HPLC 분석을 위하여 다음과 같이 시료를 조제하였다. 즉 녹차 분말 1g에 90℃ 정도의 boiling water 15ml를 가하고, 90℃에서 2분에 1회씩 vortex mixing을 하면서 30분 동안 두었다. 그리고 상등액 1ml을 취해서 원심분리(12000rpm, 10min)한 후 0.2 μ m의 membrane filter로서 여과한 후에 HPLC 분석용 시료로 사용할 때까지 냉장고에 보관하였다. Polyphenol을 분석에 이용한 HPLC는 Shimadzu LC-10AD이며, analytical column은 C18 ODS(4.6mm × 25cm), mobile phase solvent는 25% THF를 함유한 0.1% phosphoric acid를 사용하였고, flow rate는 1ml/min, detector는 UV 280nm, 시료의 injection volume는 10 μ l이었다(이정희 등, 1992, 이순재, 2003).

2) 채취시기별 caffeine 분석

Caffeine은 피로를 회복하고 기분을 전환시키며 이뇨를 촉진하는 작용이 있으나, 지나치게 많이 섭취하면 정서불안이나 초조감이 생기지만, 녹차의 caffeine은 catechin류와 결합한 형태로 존재하고, 차 특유의 아미노산인 theanine이 caffeine의 활성을 저해하는 작용을 하기 때문에 부작용이 거의 없다고 한다(Xiaogang, 2008). Caffeine은 대체로 건조 녹차의 2.5~5.5%정도 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구에서는 녹차를 음용할 때에 섭취 가능한 caffeine의 함량을 측정하기 위하여 녹차를 8

0°C 정도의 뜨거운 물에 2분간 침출하여 측정하였다. Caffeine 함량의 측정은 HPLC로서 측정하였는데, 이때의 시료조제 및 HPLC 분석조건은 다음과 같이 하였다. Caffeine의 분석도 차 잎의 채취시기별로 나누어 실험하였으며, 차 잎 5g에 80°C 정도의 뜨거운 물 50ml를 가하여 2분간 침출하여 침출액을 3회 반복하여 모은 후, Sep-pak C18 cartridge를 통과시킨 여액 5ml에 HPLC 분석용 mobile phase 15ml를 가하고 0.2 μ m membrane filter로서 여과하여 HPLC 분석용 시료로 하였다. Caffeine의 분석에 이용한 HPLC는 Shimadzu LC-10AD이며, analytical column은 μ -Bondapak C18(3.96mm \times 30cm), mobile phase solvent는 MeOH/Acetic acid/Water=20/1/79를 사용하였고, flow rate는 1ml/min, detector는 UV 280nm, 시료의 injection volume는 10 μ l이었다.

3) 채취시기별 flavonoids 분석

차의 flavonoids는 catechin류 이외에 catechin과 유사한 구조를 가지는 quercetin, kaempferol, myricetin 등의 flavonol류와 apigenin, luteolin 등의 flavone류 등이 있다. 차 잎에 들어 있는 이들은 당과 결합한 배당체의 형태로 존재하며, 함량은 매우 적지만 차 잎의 채취시기가 늦어질수록 조금씩 증가하는 경향을 보이고 있다. 차의 flavonoids는 기름등의 산화를 촉진하는 금속을 봉쇄하고, 산화를 진행시키는 free radical을 소거하는 작용을 한다. 또한 저밀도 cholesterol의 산화를 막고 산화효소의 활성을 저해하는 작용도 하는 것으로 알려져 있다(Gerry 등, 2007, Kamilla 등, 2007).

본 연구에서는 flavonoids의 분석을 차 잎의 채취시기별로 실험하였으며, 차 잎 5g을 methanol 30ml로 추출하고 원심분리(12,000rpm, 10min)하여 상등액을 0.2 μ m membrane filter로서 여과하여 HPLC 분석용 시료로 하였다. Flavonoids의 분석에 이용한 HPLC는 Shimadzu LC-10AD이며, analytical column은 octadecylsilane(4.6mm \times 25cm), mobile phase로는 solvent A는 MeOH/Water/Acetic acid=5/93/2, solvent B는 60% MeOH를 사용하였으며 solvent A에서 B로 linear gradient로 55분간 용출한 후, 15분간 isocratic으로 solvent B로서 용출하였다. Flow rate는 1ml/min, detector는 UV 370nm, 시료의 injection volume는 10 μ l이었다(Lihu 등, 2006).

4) 채취시기별 theanine 분석

Theanine은 녹차의 대표적인 amino acid로서 녹차의 감칠맛을 내는 성분으로 햇차에 많이 들어있는 물질이다. theanine은 caffeine의 활성을 저해하여 차에 들어 있는 caffeine의 부작용을 줄여주는 것으로 알려져 있다. 차 잎의 채취시기가 늦어질수록 theanine은 polyphenol류의 성분으로 변화하게 되므로 차 잎의 채취시기가 늦어질수록 theanine의 함량은 줄어들게 되며, 맛도 구수한 감칠맛이 줄어들게 되어 품질이 저하

되는 것으로 알려져 있다(Crystal 등, 2008). Theanine의 분석은 free amino acids의 분석방법과 동일하며, amino acid analyzer(Biochrom20)을 사용하여 분석하였다.

5) 야생차 잎의 채취시기별 free amino acids 분석

Theanine을 비롯하여 녹차의 free amino acids는 녹차의 맛을 결정하는 중요한 물질로서 대표적으로 aspartic acid와 asparagine, glutamic acid, glutamine, serine, proline, arginine등이 많이 함유되어 있다(고영수 등, 1985). 본 연구에서는 차 잎의 채취시기별로 free amino acids의 함량을 분석하였으며, 시료의 조제는 채취시기가 다른 녹차의 분말 100mg을 test tube에 넣고 5ml의 물을 가하여 60°C의 heating block에서 1시간을 두었다. 이어서 각각의 test tube에 100mg의 5-sulfosalicylic acid dihydrate를 가하여 잘 녹이고 4°C의 냉장고에 넣어 2시간을 기다린 후에 원심분리(15,000rpm, 4°C, 15min)하여 상등액을 evaporating flask에 옮기고 rotary vacuum evaporator로서 완전히 농축시켰다. 그리고 나서 각각의 evaporating flask에 2ml씩의 Li-citrate(pH2.2) buffer를 가하여 완전히 녹이고 0.2 μ m membrane filter로서 여과하여 free amino acids 분석을 위한 시료로 하였다.

Free amino acids의 분석을 위한 기기는 Biochrom20(Pharmacia co.)을 이용하였으며, 표준물질로는 physiological fluid standard(A6407, A1585, Sigma co.)를 희석하여 각각의 standard free amino acid의 농도를 10nmol로 조정(단, cystine은 5nmol)하여 사용하였다.

분석에 사용되는 column은 free amino acid 분석전용기기로서 anion exchange column(4.6mm \times 200mm)을, elution solvent는 0.2M Li-citrate(pH 2.8)과 0.3M Li-citrate (pH 3.0), 0.5M Li-citrate(pH 3.15), 0.9M Li-citrate(pH 3.50), 1.65M Li-citrate(pH 3.55)를 차례로 흘려보내 차츰 anion의 강도를 높여가면서 분리하였고, 최종적으로 LiOH를 흘려 반응을 종료시켜 regeneration하는 과정을 거치게 하였다. 이때 elution buffer의 flow rate는 25ml/hr, column의 온도는 35°C에서 80°C까지 점진적으로 상승시켰다. 또한 분리된 free amino acids의 reaction은 ultrasolve에 녹인 ninhydrin과 hydrindantin을 사용하였으며, flow rate는 20ml/hr, reaction coil의 온도는 135°C로 하였다. Detector는 440nm에서 imino acids(secondary amino acids)를 570nm에서 amino acids(primary amino acids)를 검출하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 채취시기별 polyphenol 함량

차 잎의 채취시기별로 polyphenol의 함량을 HPLC로 분석한 결과는 Table 3.3.1에 나타내었으며, 결과는 표준물질과의 면적비로서 계산하였다. 전체 polyphenols의 함유량은 차 잎의 채취시기가 가장 이른 우전이 19.423%로 가장 적었으며, 세작이 25.444%, 중작이 37.032%로 증가하다가 차 잎의 채취시기가 가장 늦은 대작에서는 오히려 23.170%로 적게 함유하고 있었다(Fig. 3.3.1). 각 polyphenols의 성분별로도 (-)-EGC 와 (-)-EGCG, (-)-GCG, (-)-CG의 함량이 중작에서, (+)-catechin 과 catechol은 세작에서 가장 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 이는 theanine이 채취시기가 늦어질수록 polyphenols로 변화되는 이치와 일치하였으며, 차 잎의 채취시기가 가장 늦은 대작에 이르러서는 polyphenols이 flavonol glycosides 또는 다른 종류의 물질로 변화되어 감을 짐작할 수 있었다(Table 3.3.1).

Table 3.3.1. Changes of polyphenols in green tea leaf on different picking time

Polyphenols	Contents of polyphenols(%)			
	WJ ¹⁾	SJ ²⁾	JJ ³⁾	DJ ⁴⁾
(-)-Epigallocatechin(EGC)	4.263	3.572	7.007	4.361
(-)-Gallocatechin(GC)	-	-	-	-
(+)-Catechin	3.962	7.902	6.688	6.088
Catechol	1.640	2.786	2.701	2.646
(-)-Epigallocatechingallate(EGCG)	5.533	6.343	11.079	5.937
(-)-Gallocatechingallate(GCG)	3.406	4.063	6.472	3.528
(-)-Catechingallate(CG)	0.619	0.778	3.085	0.610
Total polyphenols	19.423	25.444	37.032	23.17

¹⁾;woojeon, ²⁾;sejak, ³⁾;jungjak, ⁴⁾;daejak

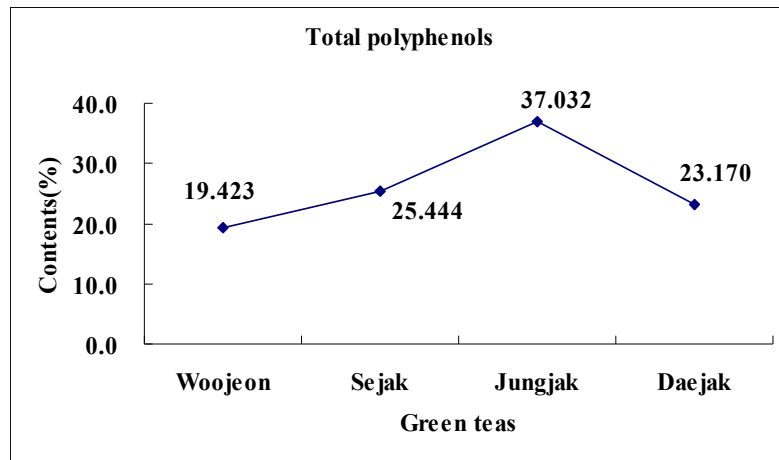


Fig. 3.3.1. Changes of polyphenols in green tea leaf on different picking time.

2) 채취시기별 caffeine 함량

차 잎의 채취시기별로 caffeine의 함량을 HPLC로 분석한 결과는 Table 3.3.2와 Fig. 3.3.2에 나타내었으며, 결과는 표준물질과의 면적비로서 계산하였다. Caffeine의 함량은 세작에서 3.08%로 가장 많았으며, 차 잎의 채취시기가 가장 늦은 대작에서 1.91%로 가장 적게 함유되어 있었다.

Table 3.3.2. Changes of caffeine in green tea leaf on different picking time

Tested samples	Contents of caffeine(%)
WJ ¹⁾	2.32
SJ ²⁾	3.08
JJ ³⁾	2.57
DJ ⁴⁾	1.91

¹⁾;woojeon, ²⁾;sejak, ³⁾;jungjak, ⁴⁾;daejak

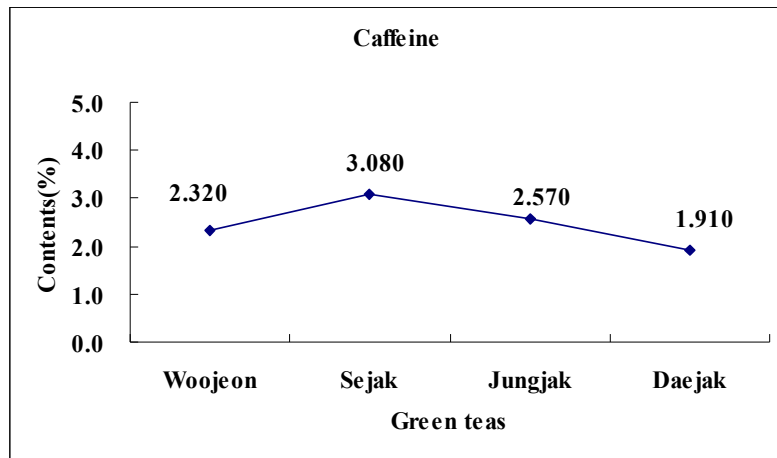


Fig. 3.3.2. Changes of caffeine in green tea leaf on different picking time.

3) 채취시기별 flavonoids 함량

차 잎의 채취시기별로 flavonoids의 함량을 HPLC로 분석한 결과는 Table 3.3.3과 Fig. 3.3.3에 나타내었으며, 결과는 표준물질과의 면적비로서 계산하였다. Flavonoids의 함량은 우전에서 0.22%로 가장 적게 함유되어 있었으며, 차 잎의 채취시기가 가장 늦은 대작에서 0.347%로 가장 많이 함유되어 있었다. Quercetin과 kaempherol, luteolin은 차 잎의 채취시기가 늦어질수록 그 함량이 많아지는 추세였지만, myricetin은 우전에서만 0.004%로 매우 적게 함유되어 있을 뿐, 세작과 중작, 대작에서는 존재하지 않았고, apigenine은 우전에서 0.060% 로서 가장 많이 함유되어 있었다.

Table 3.3.3. Changes of flavonoids in green tea leaf on different picking time

Flavonoids	Contents of flavonoids(%)				
	WJ ¹⁾	SJ ²⁾	JJ ³⁾	DJ ⁴⁾	
Flavonol glycosides	Myricetin	0.004	—	—	—
	Quercetin	0.120	0.164	0.161	0.183
	Kaempherol	0.019	0.022	0.025	0.050
Flavone glycosides	Luteolin	0.017	0.035	0.038	0.051
	Apigenine	0.060	0.034	0.045	0.063
Total flavonoids	0.220	0.255	0.269	0.347	

¹⁾;woojeon, ²⁾;sejak, ³⁾;jungjak, ⁴⁾;daejak

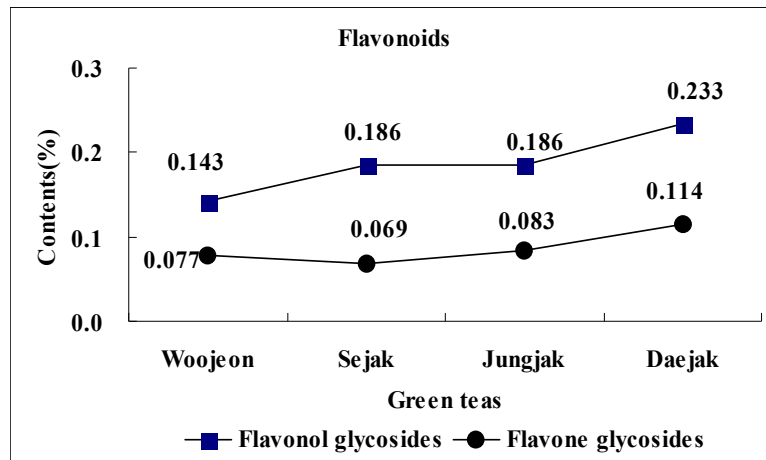


Fig. 3.3.3. Changes of flavonoids in green tea leaf on different picking time.

4) 채취시기별 theanine 함량

Table 3.3.4 및 Fig. 3.3.4에서 나타낸 바와 같이 theanine의 함량은 차 잎의 채취시기가 가장 이른 우전에서 14.11mg/g 으로 가장 많았으며, 세작과 중작, 대작에서는 각각 10.36, 9.72, 1.81mg/g 이었다. 자세히 보면 4월 중순~5월 초순까지 채취한 우전과 세작 중작에서는 theanine의 함량변화가 비교적 완만하게 감소하였으나, 5월 중순에 채취한 대작의 경우에는 급격히 theanine의 함량이 줄어든 것으로 보아서 야생차의 경우 5월 중순이후에 채취한 대작의 경우는 음용을 위한 녹차로서는 부적당한 것으로 여겨졌다.

Table 3.3.4. Changes of theanine in green tea leaf on different picking time

Tested samples	Contents of theanine(mg/g)
WJ ¹⁾	14.11
SJ ²⁾	10.36
JJ ³⁾	9.72
DJ ⁴⁾	1.81

¹⁾;woojeon, ²⁾;sejak, ³⁾;jungjak, ⁴⁾;daejak

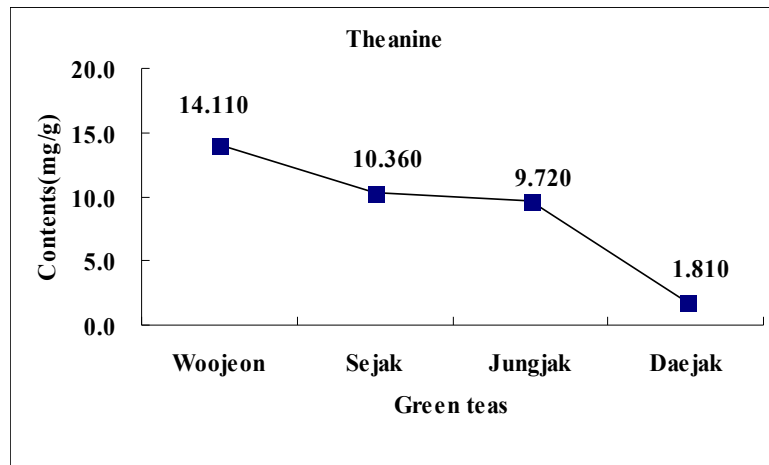


Fig. 3.3.4. Changes of theanine in green tea leaf on different picking time.

5) 야생차 잎의 채취시기별 free amino acids 함량

차 잎의 채취시기별로 분석한 free amino acids의 함량변화를 Table 3.3.5에 나타내었다. 유리아미노산의 전체적인 함량은 차 잎의 채취시기가 가장 이른 우전에서 27.97mg/g 으로서, 채취시기가 다소 늦은 세작과 중작에 비해서 2배 정도, 가장 늦은 대작에 비해서 5배 이상이 함유되어 있었다(Fig. 3.3.5). 각각의 free amino acid 함량에서도 aspartic acid를 비롯한 23종의 아미노산 함량이 우전에서 가장 높았고, 세작에서 2종, 중작에서 4종, 대작에서 3종의 아미노산 함량이 가장 높았으나, 세작과 중작, 대작에서 많이 함유된 free amino acids는 매우 미량 존재하는 것들이어서 큰 의미는 없는 것으로 여겨졌다.

따라서 녹차의 맛을 좌우하는 유리아미노산의 함량이 가장 많은 우전이 최고급 녹차임을 증명하게 되었고, 대작은 우려먹는 녹차로서는 부적당 할 것으로 보이며, 가공용 녹차의 분말로 만들어 이용하는 것이 좋을 것으로 보였다. 또한 동물 및 사람의 혈압을 저하시켜 심혈관계질환을 예방 또는 치료하고 신경과민과 경련을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려진 γ -Amino butyric acid(GABA)는 우전에서 0.29mg/g이 함유되어 있어서 세작의 0.07, 중작의 0.06, 대작의 0.03mg/g에 비하여 4.14~9.67배 이상이 함유되어 있음이 밝혀졌다(Table 3.3.5).

Table 3.3.5. The changes of free amino acids in green tea leaf on different picking time

Free amino acids	Contents of free amino acids(mg/g)			
	WJ ¹⁾	SJ ²⁾	JJ ³⁾	DJ ⁴⁾
Phosphoserine	0.32	0.18	0.17	0.08
Phosphoethanolamine	0.35	0.20	0.53	0.21
Aspartic acid	4.93	2.98	3.41	0.61
Threonine	0.56	0.29	0.31	0.14
Serine	1.37	0.78	0.90	0.34
Asparagine	1.02	0.43	0.39	0.13
Glutamic acid	6.41	3.39	4.03	1.51
Glutamine	1.51	0.35	0.34	0.11
Proline	5.40	2.73	1.85	0.59
Glycine	0.09	0.05	0.06	0.07
Alanine	0.76	0.31	0.31	0.18
Citrulline	0.05	0.01	—	0.01
Valine	0.79	0.33	0.40	0.21
Cystine	—	0.04	0.03	—
Methionine	0.02	0.01	0.02	0.03
Isoleucine	0.20	0.07	0.11	0.09
Leucine	0.42	0.11	0.18	0.15
Tyrosine	0.48	0.10	0.21	0.13
β -Alanine	0.23	0.26	0.28	—
Phenylalanine	0.45	0.15	0.24	0.13
β -Aminoisobutyric acid	—	—	0.05	—
γ -Aminobutyric acid	0.29	0.07	0.06	0.03
Ethanolamine	0.01	—	—	—
Ornithine	0.01	0.01	0.01	0.03
Lysine	0.15	0.05	0.07	0.05
1-Methylhistidine	0.06	—	0.01	—
Histidine	0.10	0.02	0.04	0.02
Anserine	0.50	0.22	0.28	—
Arginine	1.49	0.44	0.29	0.09
Total free amino acids	27.97	13.58	14.58	4.94

¹⁾;woojeon, ²⁾;sejak, ³⁾;jungjak, ⁴⁾;daejak

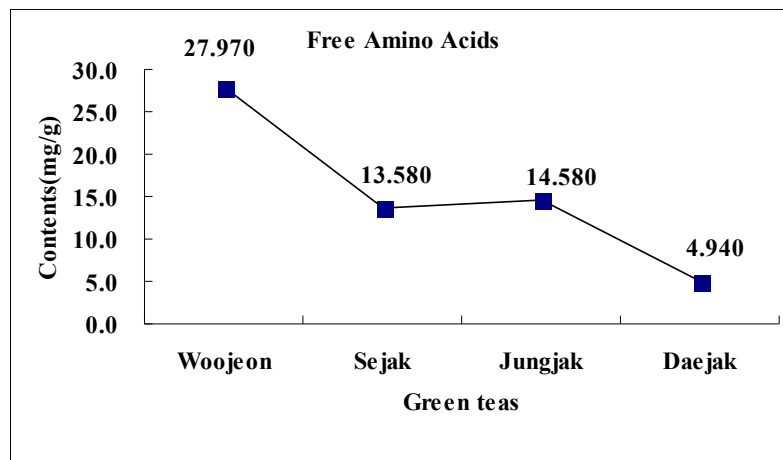


Fig. 3.3.5. The changes of free amino acids in green tea leaf on different picking time.

제 8 절 야생차로부터 기능성 물질분리

가. 기능성 물질의 분리

야생차(우전)로부터 기능성 생리활성물질을 분리하기 위하여 Figure 3.3.6, 3.3.7과 같이 분리과정을 진행하였으며, MPLC(medium pressure liquid chromatography), NPCC(normal phase column chromatography), RPLC(reverse phase column chromatography), TLC(thin layer chromatography), preparative-TLC 등의 방법으로 26종의 물질을 분리하였으나 정제된 시료의 양이 미량이어서 이 중에서 9종의 물질에 대하여 항염증효과 실험을 하였으며, 4종에 대하여는 항균실험을 하였다. 또한 분리한 물질의 구조동정은 정제된 양이 충분한 5종에 대하여 실시하였다.

나. 분리된 물질의 구조동정

NMR을 이용하여 ^1H (300, 400, 500Mhz) 및 ^{13}C NMR(75, 100, 125Mhz) 스펙트럼을 얻었으며, 각각의 화합물에 대한 chemical shift data는 다음과 같다.

CS-2, Bis (2-methylheptyl) phthalate ; $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 0.93 (6H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7'), 0.96 (6H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8'), 1.35-1.50 (16H, m, H-3'/H-4'/H-5'/H-6'), 1.70 (2H, m, H-2'), 4.23 (4H, dd, $J = 5.8, 1.0$ Hz, H-1'), 7.62 (2H, m, H-4), 7.75 (2H, m, H-3) ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz): δ 10.0 (C-8'), 13.0 (C-7'), 22.6 (C-6'), 23.6 (C-5'), 28.7 (C-4'), 30.2 (C-3'), 38.8 (C-2'), 67.7 (C-1'), 128.5 (C-3), 131 (C-4), 132.2 (C-2), 167.9 (C-1).

CS-3, Dibutyl phthalate ; $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ 0.98 (6H, t, $J = 7.5$ Hz, H-4'), 1.45 (4H, m, H-3'), 1.73 (4H, m, H-2'), 4.29 (4H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 7.62 (2H, m, H-4), 7.72 (2H, m, H-3) ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ 12.7 (C-4'), 18.9 (C-3'), 30.3 (C-2'), 65.3 (C-1'), 128.5 (C-3), 131 (C-4), 132.2 (C-2), 167.9 (C-1).

CS-7, (+)-Catechin (C) ; $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ 2.78, 2.91 (2H, qd, $J = 17.0, 4.5, 3.0$ Hz, H-4), 4.20 (1H, m, H-3), 4.84 (1H, s, H-2), 5.94 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8), 5.97 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.82 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 7.00 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2') ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ 27.9 (C-4), 66.1 (C-3), 78.5 (C-2), 94.5 (C-8),

95.0 (C-6), 98.7 (C-10), 113.9 (C-2'), 114.5 (C-5'), 118.0 (C-6'), 130.9 (C-1'), 144.38 (C-3'), 144.55 (C-4'), 155.98 (C-9), 156.27 (C-7), 156.61 (C-5).

CS-8, (-)-Epigallocatechin (EGC) ; C₁₅H₁₄O₇ ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 2.74, 2.86 (2H, qd, *J* = 16.4, 4.4, 3.2 Hz, H-4), 4.17 (1H, m, H-3), 4.75 (1H, br s, H-2), 5.91 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6), 5.93 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.51 (2H, s, H-2'/H-6') ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 29.3 (C-4), 67.7 (C-3), 80.1 (C-2), 96.0 (C-8), 96.5 (C-6), 100.2 (C-10), 107.1 (C-2'/C-6'), 131.7 (C-1'), 133.8 (C-4'), 146.8 (C-3'/C-5'), 157.47, 157.84, 158.15 (C-5/C-7/C-9).

CS-9, (-)-Epigallocatechin galate (EGCG) ; C₂₂H₁₈O₁₁ ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 2.86, 3.00 (2H, qd, *J* = 17.2, 4.4, 2.0 Hz, H-4), 4.97 (1H, br s, H-2), 5.53 (1H, m, H-3), 5.95 (2H, s, H-6/H-8), 6.50 (2H, s, H-2'/H-6'), 6.95 (2H, s, H-2"/H-6") ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 27.0 (C-4), 70.1 (C-3), 78.8 (C-2), 96.0 (C-8), 96.7 (C-6), 99.6 (C-10), 107.0 (C-2'/C-6'), 110.4 (C-2"/C-6"), 121.7 (C-1"), 131.0 (C-1'), 133.9 (C-4'), 139.9 (C-4"), 146.4 (C-3"/C-5"), 146.8 (C-3'/C-5'), 157.37, 157.99, 158.03 (C-5/C-7/C-9), 167.80 (C=O).

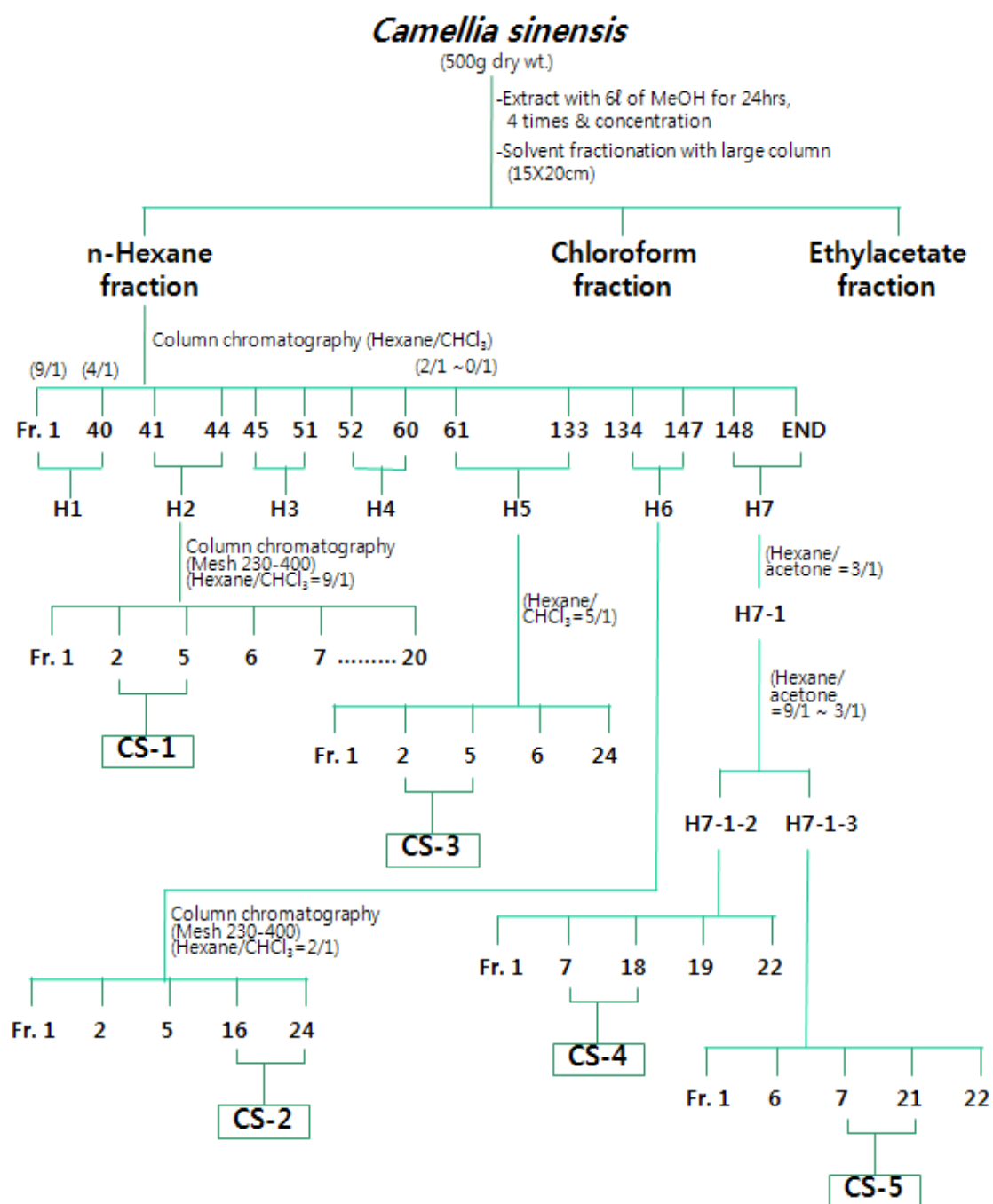


Fig. 3.3.6. Procedure of isolation & purification from *Camellia sinensis*.

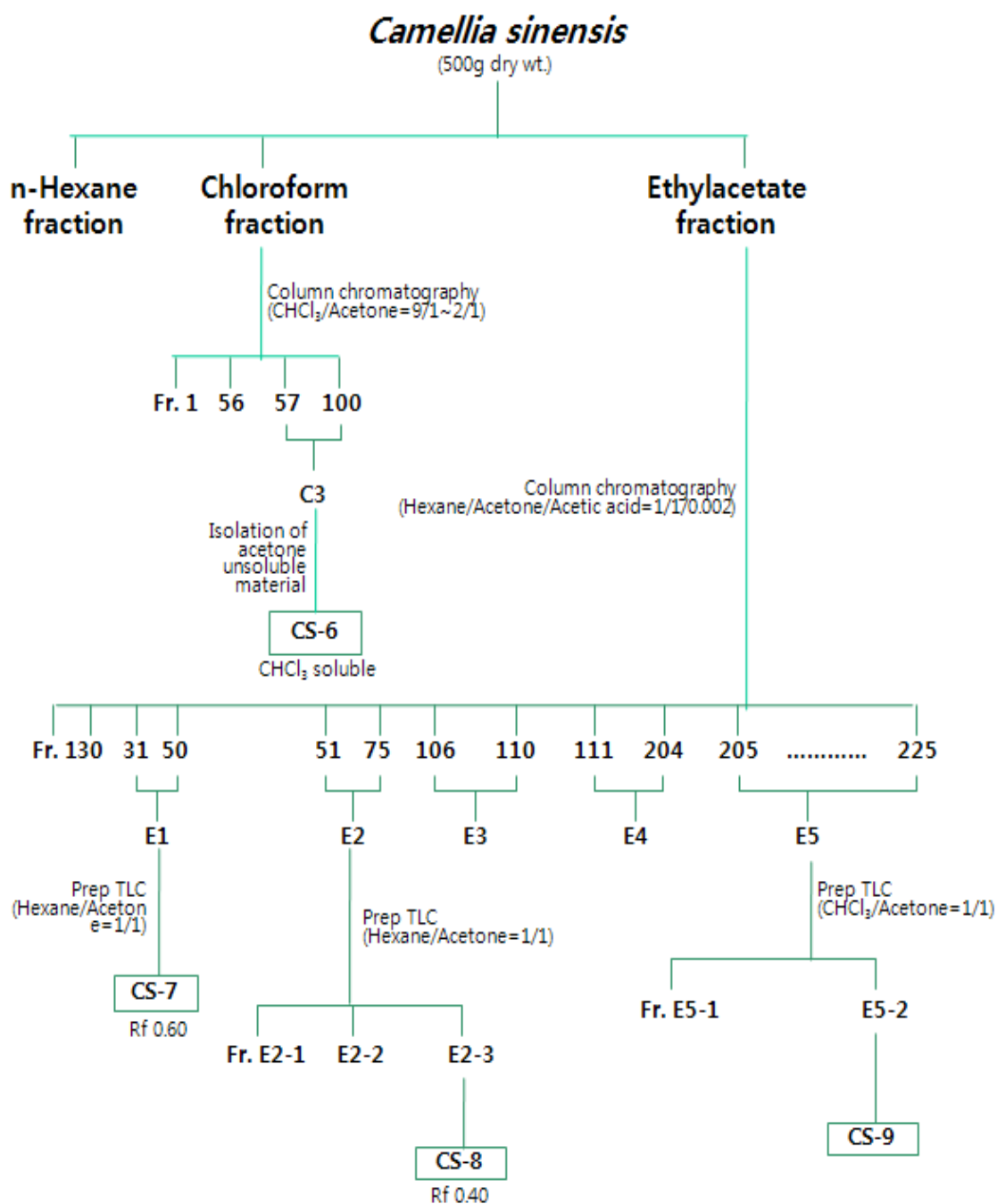


Fig. 3.3.7. Procedure II of isolation & purification from *Camellia sinensis*.

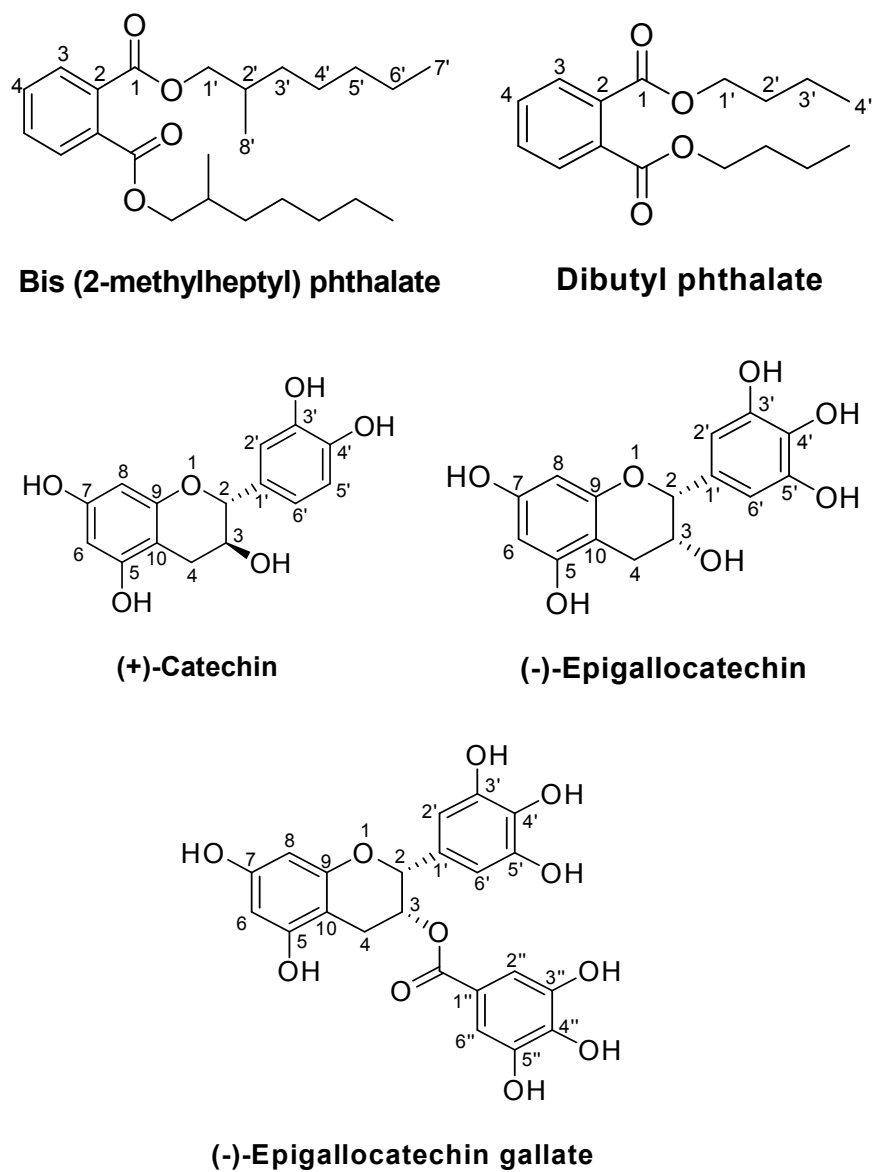


Fig. 3.3.8. Structural identifications of compounds isolated from *Camellia sinensis*.

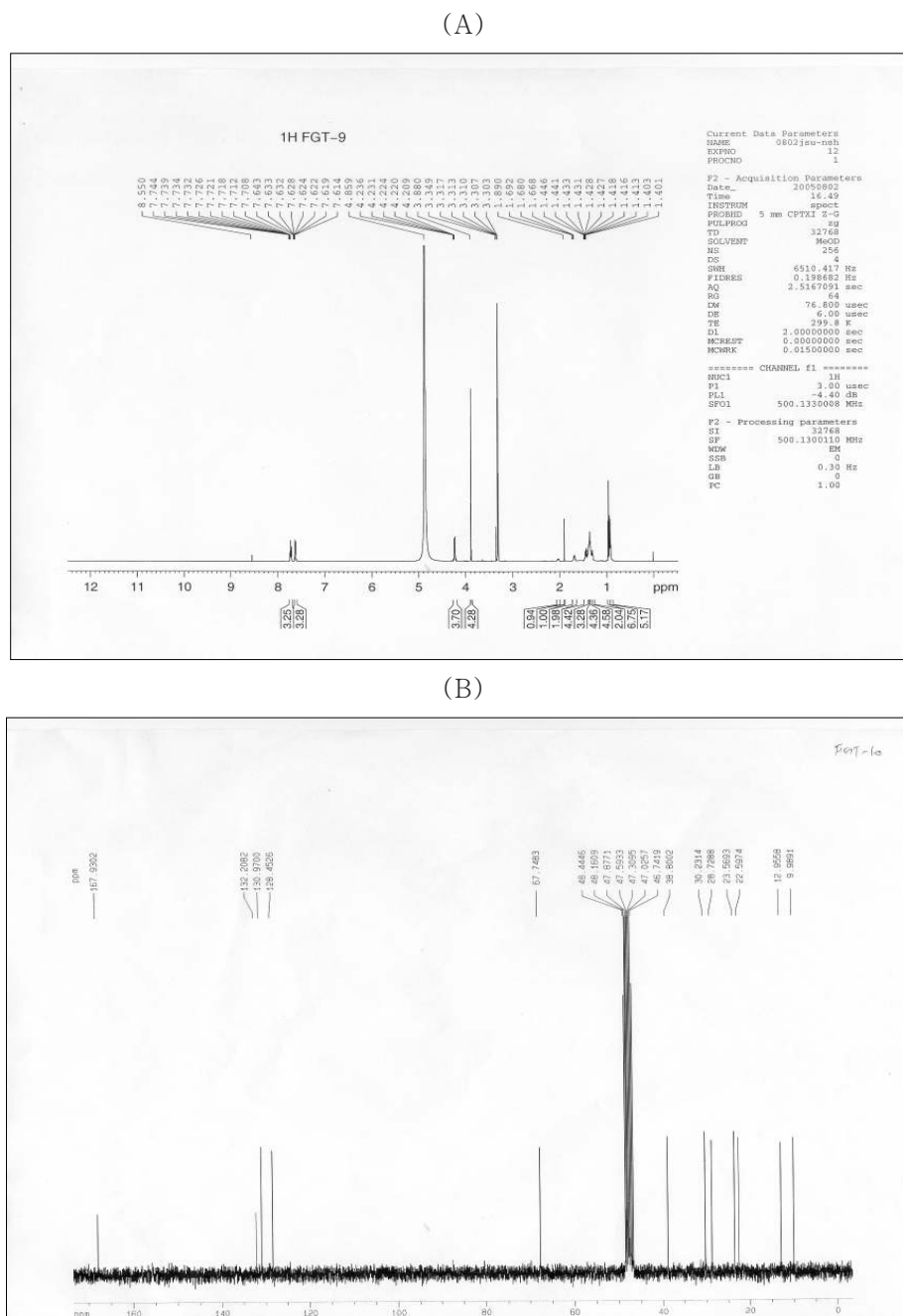


Fig. 3.3.9. ^1H (A) and ^{13}C NMR(B) spectrums of CS-2 isolated from *Camellia sinensis*.

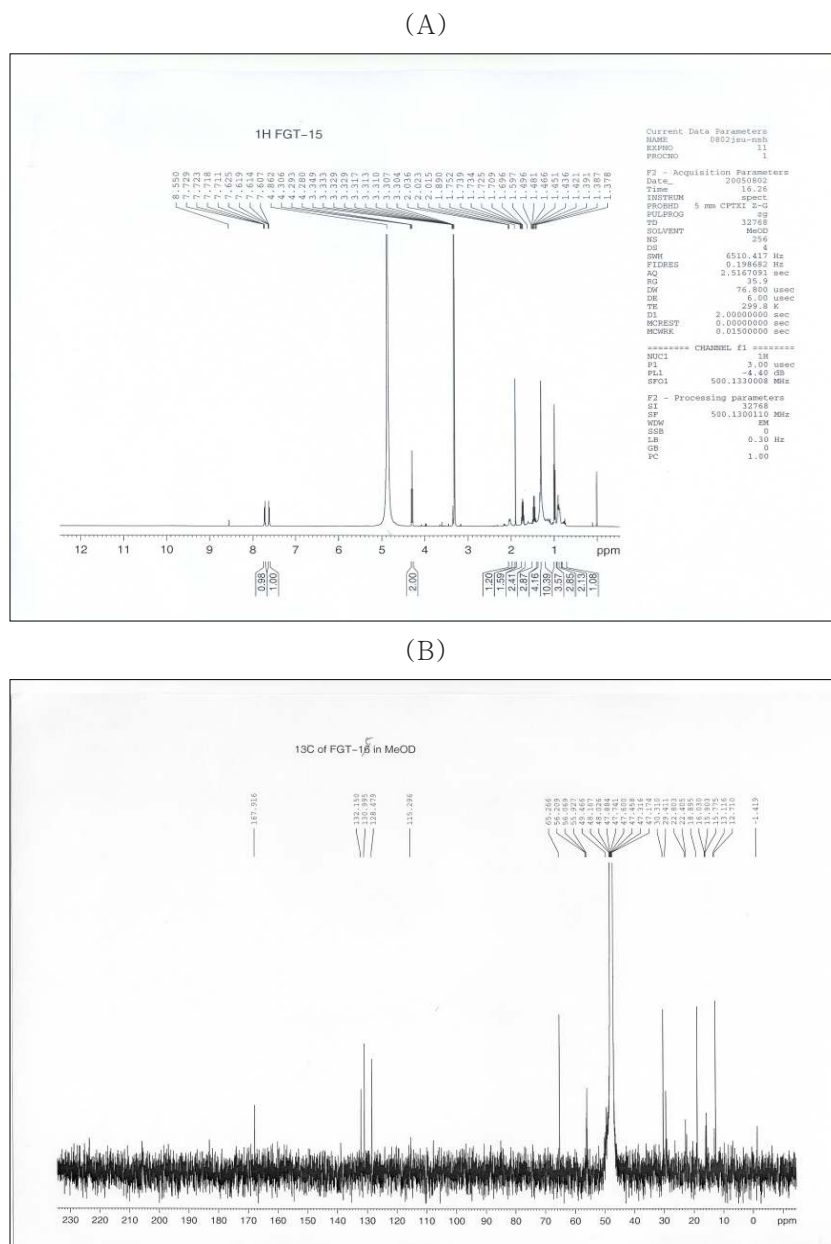


Fig. 3.3.9-1. ^1H and ^{13}C NMR spectrums of CS-3 isolated from *Camellia sinensis*.

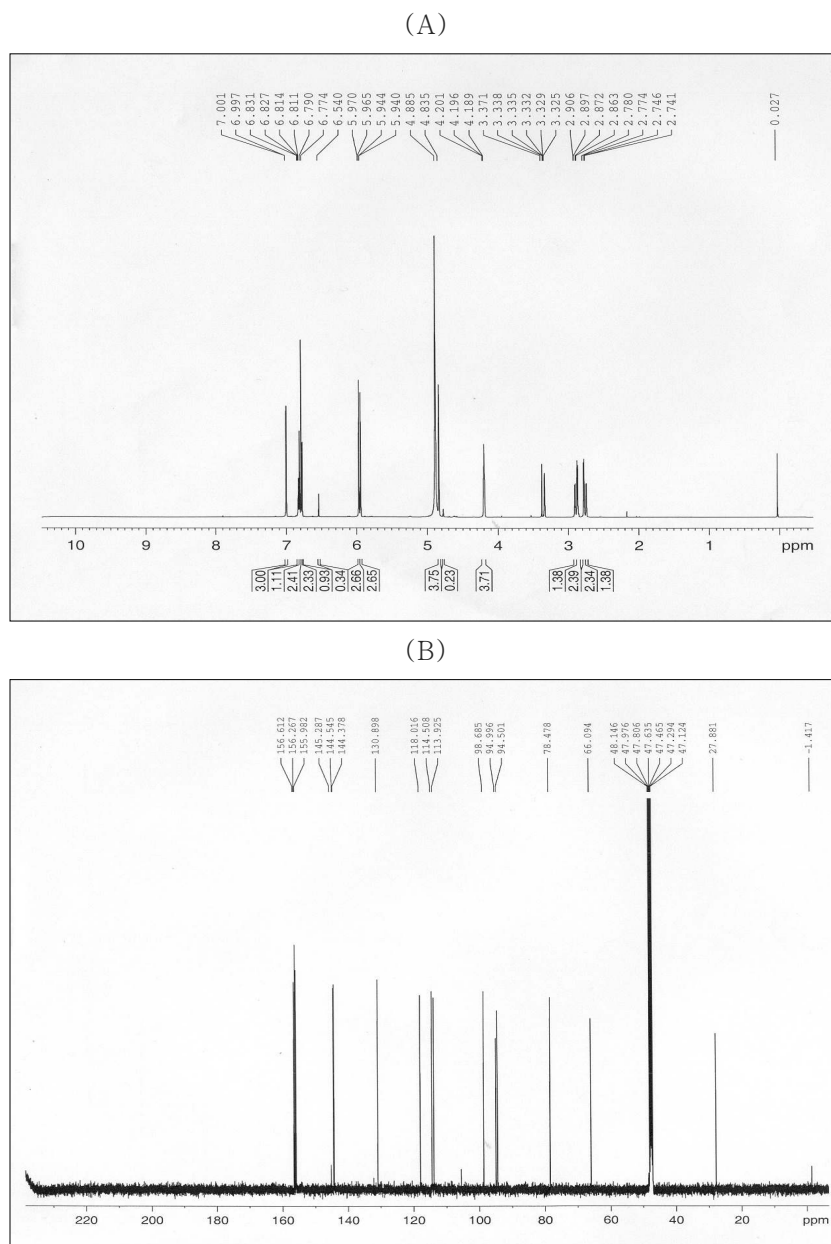
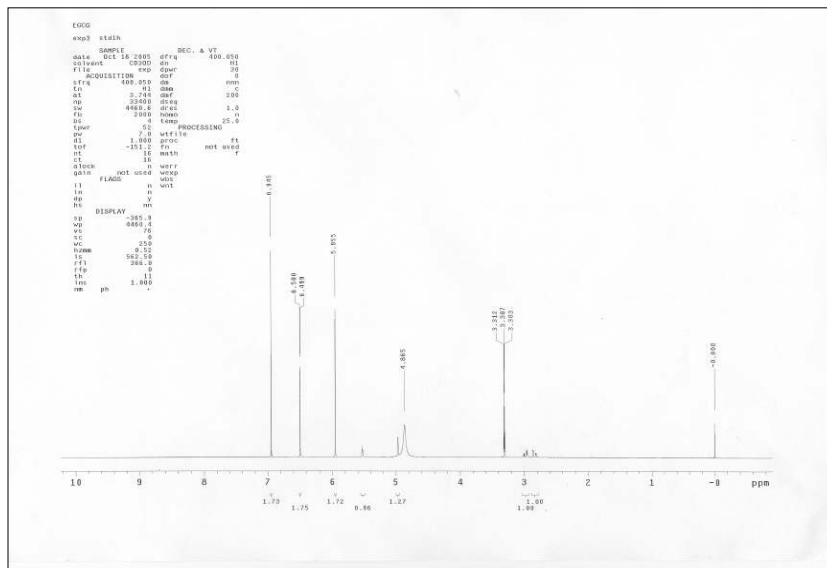


Fig. 3.3.9-2. ^1H and ^{13}C NMR spectrums of CS-7 isolated from *Camellia sinensis*.

(A)



(B)

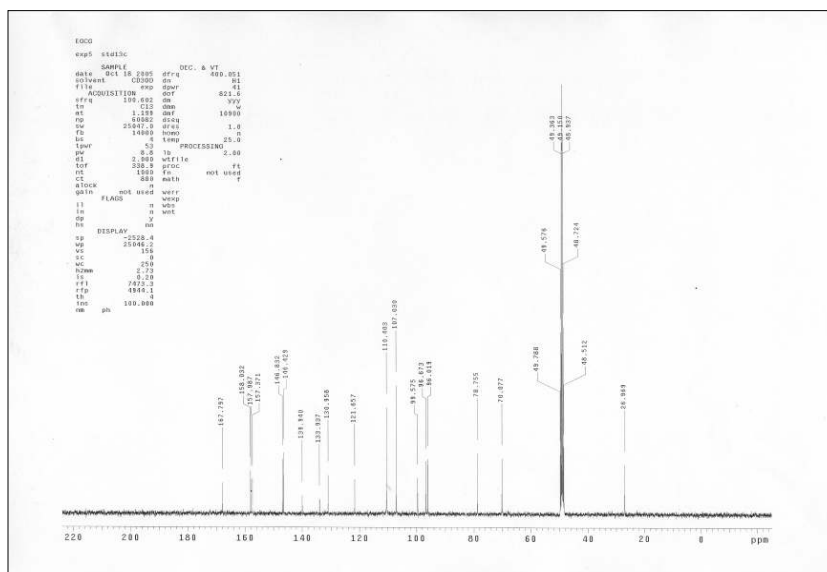


Fig. 3.3.9-4. ^1H and ^{13}C NMR spectrums of CS-9 isolated from *Camellia sinensis*.

제 9 절 생리활성 검색

가. 재료 및 방법

1) 항균활성 시험

① 미생물의 균주 및 배양

야생차 추출물의 항균활성에 사용한 미생물은 생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받았으며, 사용균주는 모두 6종으로서 그 종류는 다음과 같다. 즉 *Bacillus subtilis*(KCTC 1023), *Escherichia coli*(ATCC 25922), *Staphylococcus aureus*(KCTC 1916), *Salmonella typhimurium*(KCTC 2208), *Escherichia coli* O157:H17 그리고 *Streptococcus mutans*(KCTC 3065)이었다. 미생물의 배양을 위하여 *Streptococcus mutans*에만 Brain heart infusion broth(Difco 0037-17)를, 이 외의 모든 균주의 배양은 LB Broth, Miller(Difco 0446-17)를 사용하였으며 37°C의 incubator에서 배양하였다.

② 시료 및 시료조제

항균활성 시험에 사용한 시료는 4종의 야생차 추출물의 용매분획물과 이들로부터 분리한 4종의 화합물(CS-3, CS-4, CS-6, CS-8)로서, 모두 10mg/ml의 농도로 10%-dimethylsulfoxide에 녹여서 사용하였으며, disc당 각각 1000, 800, 600, 400, 200, 0 μ g의 농도로 흡수시킨 후 사용하였다.

③ 항균활성 시험 방법

항균활성 시험법은 일반적으로 주로 사용하는 paper disc method를 사용하였다(Lee 등, 2003, Anna 등, 2003, Senji 등, 2000).

2) 항염증활성 시험

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid를 prostagrandins, procyclin 및 thromboxane을 포함한 prostanoids로 전환시키는 일을 촉진시키는 효소이다(Fig. 3.3.10, 3.3.11).

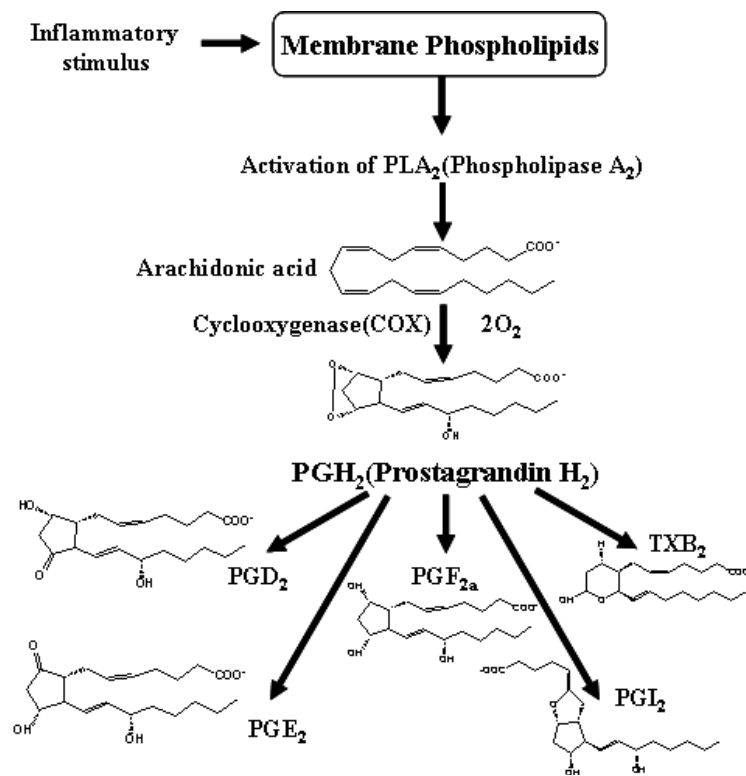


Fig. 3.3.10. Biosynthesis of prostaglandin.

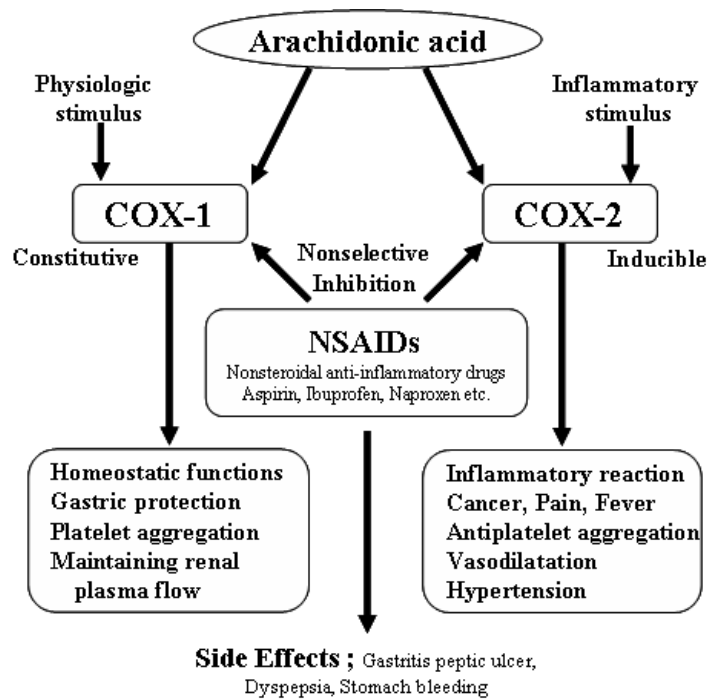


Fig. 3.3.11. Actions of COX-1 and COX-2 in the system.

COX는 2종의 isoform(COX-1, COX-2)으로 밝혀져 있으며, COX-1은 세포내에서 위점막 보호, 상피중세포 기능의 조절, 신장기능의 유지, 혈소판 응집의 촉진 등의 어떠한 생리적 기능을 유지시키는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, COX-2는 pro-inflammatory cytokines(IL-1 β , TNF- α , IFN- γ), growth factors, mitogens, bacterial lipopolysaccharides(LPS) 및 tumor promoter 등의 염증성 자극에 의하여 대응하여 염증성 조직에 광범위하게 발견되는 inducible enzyme으로서 최근에는 대장암, 알츠하이머, 고혈압 등의 질병의 발생에 중요한 역할을 할지도 모른다고 제안된 바가 있어서 더욱 흥미가 커지고 있는 있다. 때문에 최근 들어 Cyclooxygenase-2(COX-2)는 소염제, 해열제, 항암제 및 항고혈압제의 개발에 중요한 molecular target으로 대두되고 있다. 본 연구에서는 야생차로부터 분리한 몇 종의 화합물에 대하여 COX-1, 2 assay를 통하여 항염증활성을 검색하였다(Joshua 등, 2005, Kenneth 등, 2008).

① 시약 및 standard의 조제

이 실험에 사용된 시약은 다음과 같다. Tris-base, Tris-HCl, Phenol, Hemoglobin

(Hb), Arachidonic acid(AA), Aspirin, Ibuprofen, Naproxen, Cyclooxygenase-1(COX-1) 및 Cyclooxygenase-2(COX-2)이다. 이 들 중에서 COX-1(CN60100), COX-2(CN60120)는 Cayman chemical Co.에서 구입하였고, 각각의 activity는 32,500units/ml, 16,927units/ml이며, 나머지는 Sigma chemical Co.의 시약을 구입하여 사용하였다.

- Tris-Buffer(pH8.0) ; 0.1M Tris-1mM phenol buffer : Tris-base 7.40g, Tris-HCl 6.14g, phenol 0.0942g을 1L의 millipore water에 녹인다.
- Tris-Buffer(pH7.0) ; 0.1M Tris-1mM phenol buffer : Tris-base 1.60g, Tris-HCl 13.70g, phenol 0.0942g을 1L의 millipore water에 녹인다.
- Hemoglobin(Hb) ; hemoglobin 3.4mg을 Tris-buffer(pH7.0) 1mL에 녹인다.
- Arachidonic acid(AA) ; Arachidonic acid 0.25mg을 Tris-buffer(pH7.0) 0.5mL에 녹인다.
- Buffer-Hemoglobin mixture(assay buffer) ; 37°C의 Tris-Buffer(pH7.0) 12mL와 Hb soln. 100 μ l를 vial속에서 결합시킨다.
- Standards : Aspirin(1000 μ M), Ibuprofen(10 μ M), Naproxen(10 μ M)로 조제한다.

② 시료조제

항염증활성 시험에 사용한 시료는 야생차에서 분리한 26종의 화합물 중에서 9종을 선별하여 실시하였다. 시료의 조제는 crude extracts의 경우에는 15mg을 DMSO 1ml에 녹여 조제하였으며, compound의 경우에는 3mg을 1ml의 DMSO에 녹여서 조제하였다. 이렇게 조제된 시료는 10 μ l를 주입하였으며 0.6ml의 reaction chamber 내에서의 최종 농도는 각각 250ppm과 50ppm이 되도록 조제하였다.

3) 항암활성 시험

생리활성실험에 사용한 시료는 다음과 같다. 즉 전향의 물질분리과정에서 만들어진 MeOH 추출물을 비롯하여 5종의 용매분획물(hexane, chloroform, ethylacetate, BuOH, water layer)의 농축물과 녹차와 발효차에서 흔히 존재하는 기존의 알려진 물질들에 대하여 항암 및 항돌연변이 실험을 실시하였다. 즉 catechin을 비롯하여 이와 유사한 구조를 가지는 quercetin, kaempferol 등의 flavonol류와 luteolin 등의 flavone류 등이다. 차 잎에 들어 있는 이들은 당과 결합한 배당체의 형태로 존재하며, 함량은 매우 적지만 유지 등의 산화를 촉진하는

금속을 봉쇄하고, 산화를 진행시키는 free radical을 소거하는 작용을 한다. 또한 저밀도 cholesterol의 산화를 막고 산화효소의 활성을 저해하는 작용도 하는 것으로 알려져 있다. 게다가 녹차에 유일하게 존재하는 아미노산의 일종인 L-theanine은 녹차의 감칠맛을 내는 성분으로 핫차에 많이 들어있는 물질이다. L-Theanine은 caffeine의 활성을 저해하여 차에 들어 있는 caffeine의 부작용을 줄여주는 것으로 알려져 있다.

① 암세포 증식 억제능 측정

인체 자궁경부암세포인 HeLa, 유방암 세포인 MCF-7, 대장암 세포인 HT-29 그리고 간암 세포인 HepG2을 분양받아 각각 5% fetal bovine serum (FBS)와 항생제가 포함된 DMEM 배양액과 RPMI-1640배양액에서 배양하였다. 버섯균사체로 발효시킨 자생차 추출물의 암세포 증식 억제능은 MTT assay(Denzot F, Lang R 1966)로 실험하였다. 암세포를 1×10^4 cells/well 농도로 96 well plate에 분주 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 버섯균사체로 발효시킨 자생차 추출물을 20 μ l를 첨가하여 다시 48시간 배양하였다. 배양완료 후 배지를 제거하고 5mg/ml의 농도로 제조한 MTT 용액 20 μ l를 분주한 후 동일한 배양조건에서 4시간을 배양 후 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, 각 well에 DMSO 150 μ l를 가한 후 ELISA reader를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하여 억제율(%)을 구하였다.

4) 항돌연변이활성 시험

시험균주는 *Salmonella typhimurium* TA98 과 TA100으로 histidine 요구성 변이주이며, 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 구입하였다. 실험 전에 균들은 정기적으로 histidine requirement, deep rough character, UV sensitivity 및 R factor 존재 등의 geno-types를 확인한 후 시험균주로 사용하였다. 균주에 대한 시료의 독성유무를 살펴보기 위해서 실험에 사용하기 전에 독성실험을 행하여 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 시료의 농도를 결정하였다.

먼저 멸균된 cap tube에 top agar 2ml를 분주한 후 균주 100ul와 시료를 첨가하고 가볍게 vortex한 후 nutrient agar plate에 분주, 고화시켜서 37°C에서 24시간 배양시킨 다음 독성 유무를 판정하였다. Mutagenicity test와 Antimutagenicity test를 위한 S9mixture, 배지, 필요한 시약의 조제는 송 등의 방법(송현순, 1999)에 따라 행하였다. 즉 각 cap tube를 ice bath에 보관하면서 S9

mix 0.5ml, 하룻밤 배양된 균주 0.1ml, mutagen 50ul와 시료용액 50ul를 시험관에 첨가한 후 가볍게 vortex하고 37°C에서 20분간 예비 배양하였다. 45°C에 보관 중이던 top agar 2ml 씩을 위의 각 시험관에 붓고 3초간 vortex한 후 minimal glucose agar plate에 도말한 다음 37°C에서 48시간 배양하고 revertant 숫자를 계수하였다.

5) 항 치매활성 시험

① 시료의 조제

유기산을 주로 생성하는 유산균 등을 이용하여 발효시킨 산 발효차 5kg을 제1세부과제로부터 인도받아 잘 건조한 후에 산 발효차 kg당 10L의 증류수를 가하여 90±5°C로 가온하여 3회 반복 추출하였으며, 이를 여과하여 농축하고 동결건조하여 분말 892g을 얻었으며, 이를 동물실험용 시료로 사용하였다.

② 실험동물 및 사육조건

SD계 Rat(male, 150±10g)를 구입하여, 동물사육 실험실에서 약 1주일 정도 적응시킨 후에 한 개의 실험군에 6마리의 rats로 구성하여 총 5그룹으로 나누었다. 즉 대조군과 산 발효차 추출물의 동결건조물을 1% 첨가군(AFGT-1), 2% 첨가한 실험군(AFGT-2), 5% 첨가한 실험군(AFGT-5), 10% 첨가한 실험군(AFGT-10)으로 하여 4주간 사육하였다. 동물사육실의 온도는 23±1°C, 습도 60±5%로 조절하였고, 명/암은 14/10hr으로서 자동으로 조절되는 타이머를 부착하여 사용하였다.

③ 실험방법

- 뇌조직의 분획 : 미리 차게 해 둔 완충용액(10mM phosphate buffer에 녹인 1.15% KCl 용액과 5mM EDTA, pH7.4)을 절취한 뇌조직의 10배(w/v)를 가하고 homogenizer를 이용하여 3000rpm에서 균질화한 다음, 2,000rpm에서 원심분리하여 실험에 사용하였으며, 뇌 조직 균질물은 실험 전까지 deep freezer(-85°C)에 보관하였다(Choi 등 1989). 한편 모든 실험결과는 통계처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test로 실시하였다.
- Superoxide radical의 생성량 측정 : 활성 산소종(ROS)의 생성량은 superoxide radical의 생성량으로서 측정하였다. McCord 등(1969)과 Chan 등(1974)의 방법에 따라 superoxide dismutase를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원속도를 측정하였다. 즉 0.1mM EDTA를 함유한

phosphate buffer(pH 7.8) 420 μ l에 cyanide의 농도가 50 μ M이 되도록 20mM cyanide 용액을 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 가온하였다. 이 용액에 뇌 조직 균질물을 300 μ l와 0.1mM cytochrome C 50 μ l를 넣어 550nm에서 흡광도를 시간에 따라 측정하였다. 이 때 cytochrome C의량은 분자흡광계수 19,500 $^{-1}$ cm $^{-1}$ 로 계산하였다.

- 과산화지질함량 측정 : 과산화지질의 함량은 Choi and Yu(1990)가 사용한 방법에 따라 TBA법으로 malondialdehyde(MDA) 함량을 측정하였다. 뇌 조직 균질물 20 μ l에 증류수 180 μ l을 혼합한 것을 각 시험관에 취하고 8.1% SDS(sodium dodecyl sulfate)용액 200 μ l를 가하여 약 5초간 혼합한 후 초산 1.5ml를 넣어 다시 5초간 혼합하고, 1.2% TBA(thiobarbituric acid) 시약 1.0 ml 첨가하여 마개를 한 뒤 30분간 수조에서 가열한다. 이 반응액을 원심분리(1500rpm, 10min)하여 상층액을 532nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 따라 과산화지질의 함량(nmol/mg protein)을 정량하였다.
- Acetylcholine(ACh)의 함량 측정 : Acetylcholine(ACh)의 측정은 alkaline hydroxylamine을 가진 o-acyl 유도물의 반응을 기초로 측정하였다(Galgani 등, 1992). 모든 hydroxamic acid는 산 용액에서 ferric ion과 결합하여 붉은 자주색을 나타낸다. 농도별 산발효차 추출물에 뇌조직 균질물을 50 μ l를 취하여 1% hydroxylamine 50 μ l를 첨가, 혼합하여 HCl로서 pH를 1.2 \pm 0.2로 조절하였다. FeCl₃(10% in 0.1N HCl)을 500 μ l 첨가 후 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 incubation 시키면서 매 15분마다 530nm에서 acetylcholine(ng/mg protein)의 함량을 측정하였다.
- Acetylcholinesterase(AChE)의 활성 측정 : Galgani 등(1992)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉 micro well plate에 0.1M Tris buffer, pH8.0을 300 μ l, 0.01M dithionitrobenzoic acid(DTNB) 20 μ l, 뇌조직 균질물 10 μ l, 농도별로 산발효차 추출물을 연속적으로 첨가하고, 흡광도를 측정하기 직전에 기질시약인 0.1M acetylcholine chloride 10 μ l을 첨가한다. microplate reader를 이용하여 405nm에서 흡광도의 변화를 5분 동안 관찰하여 AChE의 활성(unit/min/mg protein)을 측정하였다.
- Choline acetyltransferase(ChAT)의 활성 측정 : 뇌 조직 중의 ACh의 합성효소로서 choline acetyltransferase(ChAT)의 활성은 뇌세포 분획물 50 μ l에 0.2mM acetyl-CoA, 10mM choline chloride, 0.2M KCl, 10mM potassium phosphate with 1mM EDTA를 각각 0.2ml씩 첨가 혼합하여 총 0.8ml의 부피로 만든 다음 choline acetyltransferase를 1 μ l, cytosol 100 μ l, 1.0M Tris buffer 190 μ l, DTB를 5 μ l, 20% TCA(trichloroacetic acid) 250 μ l의 양으로

각각 첨가 혼합하여 분광광도계를 이용해 파장 412nm에서 2분 간격으로 ChAT의 활성을 측정하였다.

- Monoamine oxidase-B(MAO-B)의 활성 측정 : Catecholamine(CA)계 신경전달물질을 파괴하는 효소로 알려진 MAO-B의 활성측정은 Kalaria 등(1987)의 방법에 따라 H₂O₂의 생성능을 기초로 측정하였다. 각 시험관에 100mM Na-Pi buffer(pH7.4) 용액 460 μ l, 30mM sodium azide 용액 70 μ l, 뇌조직 균질물 100 μ l를 넣은 후 기질시약인 10mM benzylamine을 70 μ l을 넣으면서 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 30분간 가온시킨다. 그리고 항온수조에서 시험관을 꺼내면서 1.8mM 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid) 500 μ l을 넣는다. 5초 후 저온상태로 보관되어 있는 5 units horseradish peroxidase 50 μ l을 넣는 동시에 5초간 잘 혼합시킨다. 10초가 지난 후 5% SDS를 함유한 0.75M hydrochloric acid 250 μ l을 각 시험관에 넣으면서 다시 5초간 잘 혼합시킨다. 기질시약인 10mM benzylamine을 넣지 않은 blank를 대조구로 하여 414nm에서 흡광도를 측정하여 MAO-B의 활성을 측정하였다.

6) 간 기능 보호활성 시험

① 실험동물

동물은 BALB/c 마우스와 Spraque Dawley 랫드를 사용하여 사료와 물을 자유롭게 먹게 하였으며, 동물생육실의 온도는 23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 습도는 50~60%를 유지하였다. 또한 12시간마다 낮과 밤이 반복되도록 사육장내 빛을 조절하였다.

② 간세포 배양

마우스로부터 간세포의 분리는 collagenase perfusion 방법을 사용하였다. Perfusion 용액으로서 HBSS(Hank's balanced salt solution)을 사용하였다. 분리한 간세포는 hormonal AB medium에 현탁시켜 tryphan blue로서 염색하여 생존율을 조사하고 생존율이 90%이상인 것만 사용하였다. 세포수를 1 \times 10⁶/ml로 희석하고 이 세포 희석액 3ml을 collagen(Vitrogen 100)이 전 처리된 60 \times 15mm petri dish에 plating하여 CO₂ incubator(5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C)에서 배양하였다. 배양 시작 4시간 후 배양액을 갈아줄 때 부착되지 않은 세포를 제거하고 20시간을 더 배양하여 세포가 완전히 mono layer를 형성하면 사용하였다.

③ *In vitro* 간독성 시험

Collagenase liver perfusion technique에 의한 단층배양기술로서 얻은 다량의 균일한 간세포에 증류수를 대조군으로 하여 산 발효차 추출물(MeOH, n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 water extracts)을 처리하고, 한 시간 뒤에 간 손상물질로 알려진 bromobenzene을 배양액에 직접 첨가하였다. 그리고 5시간 후에 protein 합성 능력을 측정하여 추출물의 분획들에 대한 간독성 해소능력을 평가하였다.

- 간세포 내에서 protein 합성량 측정 : 간세포 내의 protein 합성량의 측정은 세포 배양액에 ^3H -leucine($5\mu\text{Ci}/\text{plate}$, 0.38mM)을 첨가하여 2시간 동안 labelling 한 후, 세포를 채취하여 동일량의 20% TCA를 가하여 $2000\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리 후 침전물을 10% TCA로 2회 세척하고 1N NaOH로 digestion시켜 radioactivity를 측정하였다.
- Bromobenzene에 의하여 유발된 간세포의 간독성 효과 : Bromobenzene은 간 손상의 정도를 측정하는 가장 널리 사용되는 방법으로, 손상된 세포에서 세포 밖으로 배출되는 lactic acid dehydrogenase(LDH)의 활성도를 측정하여 세포손상 정도의 지표로 사용하였다. 즉 간 세포배양에서 배양액으로 유출되는 LDH의 활성도를 생화학자동분석기(FUJI DRI-CHEM 3000, Japan)를 이용하여 측정함으로써 간 손상의 여부를 판단하였다.

④ *In vivo* 간독성 시험

사염화탄소(CCl_4)는 간에 독성을 주는 대표적인 물질로서 간 독성 연구에 많이 이용되고 있다. 사염화탄소는 간에서 대사되어 CCl_3 와 Cl free radical로 되는데 이 free radical이 간세포의 불포화지방산에 작용하여 lipid peroxidation을 일으키기 때문이라고 알려져 있다. 또한 D-galactosamine은 박테리아의 lipopolysaccharide (LPS)와 함께 투여하였을 경우, 인간의 간염과 유사한 간 손상을 유발하는 것으로 알려져 있으므로 간염의 실험적 연구에 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 SD 랫드를 8그룹(각 3마리)으로 나누고, 아무런 처치를 하지 않은 대조군과 사염화탄소 또는 D-galactosamine/ LPS를 복강 내 주사한 양성대조군 및 각각의 산 발효차 분획물(MeOH, n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 water)을 처리한 그룹으로 구분하여 실험하였으며, 각각의 ethyl alcohol에 녹인 분획물을 $10\text{mg}/\text{kg}$ 씩을 경구 투여하였으며, 24시간 뒤에 심장에서 채혈하여 간 기능을 측정하였다.

- 혈액 내 glutamate-oxaloacetate transaminase(GOT) 및 glutamate- pyruvate transaminase(GPT) 활성도 측정 : *In vivo* 실험의 경우 랫드에 사염화탄소를 0.5ml/kg, body weight의 용량으로 복강 주사하며, 산 발효차 시료는 사염화탄소 처리 전후에 경구 투여하였다. 24시간 후에 사염화탄소의 투여로 인한 간 손상 시 혈액으로부터 유리되어 나오는 GOT 및 GPT의 활성도를 측정하기 위하여 심장채혈하여 30분간 4℃에서 방치한 후, 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 serum을 얻었으며, 측정은 생화학자동분석기(FUJIDRI-CHEM 3000, Japan)를 이용하여 측정함으로써 간 손상의 여부를 판단하였다.
- D-galactosamine/LPS에 의하여 유발된 간독성에 대한 효과 : 랫드에 D-galactosamine(300 μ g/kg)과 LPS(30 μ g/kg)을 복강 주사하였으며 추출시료는 경구 투여하였다. D-galactosamine에 의한 간손상 기작은 galactosamine이 세포내에서 UDP와 결합하여 UDP-hexosamine을 형성함으로써 RNA와 단백질 합성의 저해 및 탄수화물대사에 이상을 초래하여 결국 세포의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 랫드에 D-galactosamine+LPS 처리 4시간 후에 혈액을 채취하여 GPT, GOT 및 γ -GT(glutamyltransferase) 활성도를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 항균활성 효과

야생차의 용매분획물 4종의 항균효과는 Table 3.3.6에 나타내었다. 6종류의 미생물에 대한 효과는 전반적으로 크다고는 할 수 없겠으나, *S. typhimurium* 과 *E. coli* O157:H17등의 식중독 및 장출혈을 유발하는 병원성 미생물에 대하여도 모든 야생차 용매분획물에서 항균성이 나타났다는 것에 의미를 두고 싶다. 그러나 용매분획물은 매우 많은 종류의 화합물이 섞여있는 상태이므로 이들을 분리 정제하여 순도를 높이면 틀림없이 상당히 강력한 항균성을 가진 물질을 찾아낼 수 있을 것으로 생각되었다. 각각의 용매분획별로 보면 n-hexane 분획에서는 충치균(*S. mutans*) 및 *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H17 등의 세균에서 비교적 고르게 항균력을 나타내었고, chloroform 및 ethylacetate 분획에서는 비교적 항균력이 약하기는 하지만, 충치균을 제외한 모든 세균에서 항균력을 보였다. 단계별 분획의 최종분획물인 methanol 분획은 비교적 극성이 큰 물질들로 구성되어 있을 것으로 여겨지는 분획으로서 녹차의 주성분인 polyphenol류를 비롯한 amino acids, flavonoids, caffeine 등이 다량 함유되어 있을 것으로 예상되므로 비교적 큰 항균력을 나타낼 것으로 기대하

였으나 예상과는 달리 항균력이 그리 크지는 않았다. 그러나 모든 종류의 세균에 고
 른 항균력을 나타내었다. 그러나 이를 더욱 분리 정제하게 되면 항균력이 뛰어난 녹
 차의 성분을 발견할 수 있을 것으로 기대하고 있다.

Table 3.3.6. Antibacterial effects of 4 solvent fractions from *Camellia sinensis*

Extracts	Conc. ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Diameters of clear zone(mm)					
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i> O157:H17
n-Hexane extracts	1000	11	13	14	12	12	12
	800	11	13	14	11	12	12
	600	—	13	14	10	11	12
	400	—	—	13	—	10	12
	200	—	—	13	—	9	—
	0	—	—	—	—	—	—
CHCl ₃ extracts	1000	10	—	12	12	11	10
	800	10	—	11	12	11	10
	600	9	—	10	11	9	10
	400	—	—	—	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—
	0	—	—	—	—	—	—
EtOAc extracts	1000	12	12	13	13	13	12
	800	11	—	13	12	12	11
	600	10	—	11	12	12	10
	400	9	—	10	—	11	—
	200	—	—	9	—	—	—
	0	—	—	—	—	—	—
MeOH extracts	1000	10	10	11	11	12	12
	800	9	9	11	10	12	12
	600	9	—	10	—	11	11
	400	—	—	—	—	10	10
	200	—	—	—	—	—	—
	0	—	—	—	—	—	—

야생차로부터 분리한 4종의 화합물에 대한 항균력 실험결과는 Table 3.3.7에 나타내
 었다. 6종류의 세균에 대하여 전반적으로 고른 항균력을 나타내었지만 그렇게 강력하

지는 않았다. 화합물의 종류별로 보면 CS-3 및 CS-4의 경우에는 *E. coli*에 대하여 비교적 낮은 농도에서도 강한 항균력을 나타내었다. 특히 항균력 시험에 사용한 4종의 화합물중에서는 CS-4만이 *E. coli* O157:H17에 항균력을 나타내었을 뿐이었다. CS-6은 전반적으로 미약한 항균력을 나타내었고, CS-8는 *S. aureus* 및 *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *E. coli*에 대하여 항균력을 나타내었으나 농도가 낮아질수록 항균효과는 약해지는 것으로 나타났다.

Table 3.3.7. Antibacterial effects of 4 isolated compounds from *Camellia sinensis*

Purified samples	Conc. ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Diameters of clear zone(mm)					
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i> O157:H17
CS-3	1000	11	12	16	12	12	-
	800	10	11	16	12	12	-
	600	9	10	16	-	12	-
	400	-	-	14	-	11	-
	200	-	-	14	-	11	-
	0	-	-	-	-	-	-
CS-4	1000	12	10	13	14	12	12
	800	10	-	13	12	11	10
	600	-	-	13	11	11	-
	400	-	-	13	-	10	-
	200	-	-	10	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-
CS-6	1000	9	9	11	10	10	-
	800	9	-	10	9	10	-
	600	-	-	9	-	9	-
	400	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-
CS-8	1000	12	10	10	13	13	-
	800	11	-	10	12	12	-
	600	11	-	9	10	11	-
	400	9	-	-	-	10	-
	200	-	-	-	-	9	-
	0	-	-	-	-	-	-

2) 항염증활성 효과

야생차에서 분리한 9종의 compound에 대하여 COX-1에 대한 활성억제 실험에서는 CS-8과 9에서 90.48과 89.99%의 억제활성을 보였다. 이는 aspirin, ibuprofen 및 naproxen 등의 51.46~58.41%정도의 억제활성보다 월등히 높은 것으로 나타났다(Fig. 3.3.12).

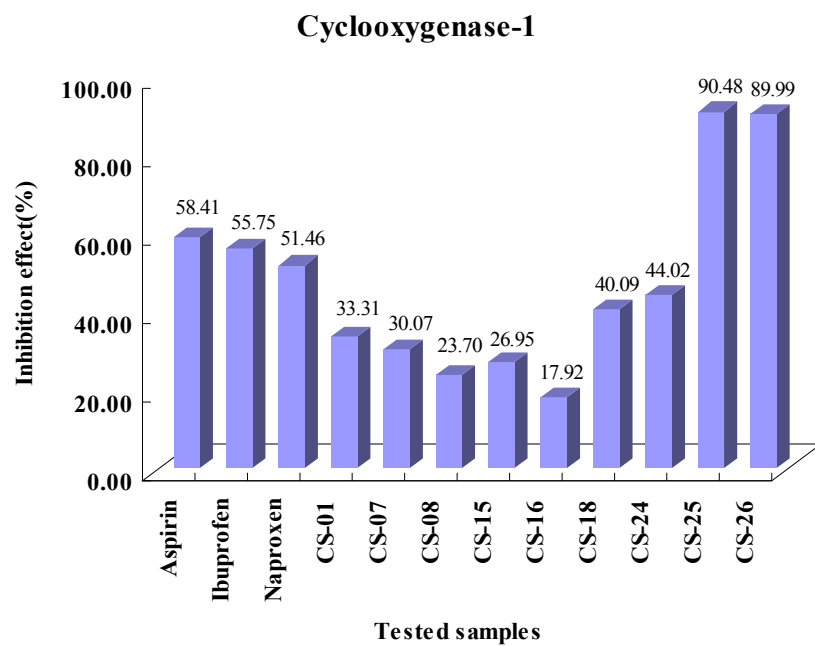


Fig. 3.3.12. Cyclooxygenase-1 inhibition effects of compounds isolated from *Camellia sinensis*.

COX-2에 대한 활성은 CS-8과 CS-9에서 47.24%와 80.86%로 비교적 높게 나왔다. 이것은 COX-1의 경우와 마찬가지로 선택적인 저해효과는 없다고 할 수 있으나, 이들의 생리적인 또 다른 작용까지 설명하기는 현재로서는 난해하다고 할 수 있겠다. 따라서 야생차로부터 분리한 화합물들의 생리활성을 다각적인 면에서 검토해야 할 것으로 보였다.

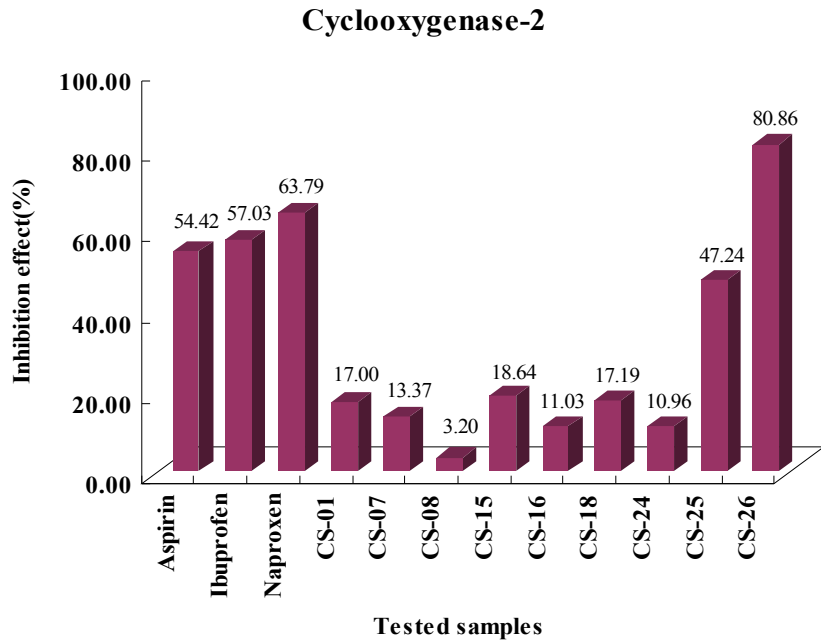


Fig. 3.3.13. Cyclooxygenase-2 inhibition effects of compounds isolated from *Camellia sinensis*.

3) 항암활성 효과

인체 유방암세포인 MCF-7에 버섯균사체로 발효시킨 자생차 분획별 추출물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식억제 정도를 알아본 결과는 Table 3.3.8, 3.3.9와 같다. 유방암 세포인 MCF-7 세포의 경우 chloroform 과 butanol 분획물에서 각각 36.44%와 35.80% (0.2mg/ml)의 세포 증식억제효과가 있었고, 일반적인 차에 많이 존재하는 catechin의 유방암 암세포 증식억제 정도는 43.69% (0.04mg/ml), flavonoids인 luteolin의 증식억제효과는 34.54% (0.04mg/ml), 그리고 양과에 대량 존재하는 quercetin의 증식억제효과는 33.60% (0.04mg/ml)으로 측정되었다.

Table 3.3.8. Inhibitory effect of fractional extracts from fermented tea by mushroom on cell proliferation in MCF-7

Conc. (mg/ml)	Inhibition rate (%)		
	0.2	0.1	0.05
Methanol layer	20.66±1.12 ^{bcd}	12.78±0.67 ^{a*}	11.67±2.68 ^a
Hexane layer	30.95±0 ^{ef}	31.7±4.24 ^{ef}	26.34±1.12 ^{de*}
Chloroform layer	36.44±2.90 ^f	33.44±2.23 ^f	31.07±0.22 ^{ef*}
Ethylacetate layer	19.24±1.34 ^b	14.83±1.78 ^{ab}	9.62±0.67 ^{a*}
Butanol layer	35.80±2.90 ^f	33.44±4.91 ^f	19.87±3.12 ^{bc}
Water layer	25.55±4.91 ^{cde}	20.82±2.68 ^{bcd}	9.94±2.90 ^a

1. Values are means±SD, n=3

2. Values followed by different letters are significantly different at p<0.05

Table 3.3.9. Inhibitory effect of some extracts from fermented tea by mushroom on cell proliferation in MCF-7

Conc. (mg/ml)	Inhibition rate (%)		
	0.04	0.02	0.005
Luteolin	34.54±0.67 ^{ghi}	32.49±0.89 ^{efgh}	24.61±1.78 ^{abcd}
L-Theanine	29.81±0.67 ^{cdefg}	24.76±4.68 ^{abcde}	26.66±1.12 ^{bcdef}
Catechin	43.69±4.24 ^j	41.33±2.68 ^{ij}	24.61±3.13 ^{abcd}
Tea extract	30.44±1.56 ^{cdefgh}	29.81±1.11 ^{cdefg}	26.18±0.45 ^{abcdef}
Kaemperol	38.01±6.02 ^{hij}	31.86±4.46 ^{defgh}	18.61±0 ^a
Quercetin	33.60±3.35 ^{fgh}	23.03±7.14 ^{abc}	19.56±1.78 ^{ab}

1. Values are means±SD, n=3

2. Values followed by different letters are significantly different at p<0.05

인체 자궁경부암세포인 HeLa에 버섯균사체로 발효시킨 자생차 분획별 추출물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식억제 정도를 알아본 결과는 Table 3.3.10, 3.3.11과 같다. 자궁경부암세포인 HeLa 세포의 경우hexane 분획물에서 35.96% (0.2mg/ml)의 세포 증식억제효과가 있었고, 0.2mg/ml일 때, ethylacetate 분획물 (25.07%), buthanol 분획물 (22.75%), water 분획물 (24.73%)의 증식억제효과가 있었고, 지용성 비타민인 kaemperol은 63.12% (0.04mg/ml)으로 측정되었다.

Table 3.3.10. Inhibitory effect of fractional extracts from fermented tea by mushroom on cell proliferation in HeLa

Conc. (mg/mL)	Inhibition rate (%)		
	0.2	0.1	0.05
Methanol layer	17.28±2.67 ^{abc}	16.12±1.44 ^{abc}	13.36±2.74 ^{ab}
Hexane layer	35.96±1.71 ^f	32.72±1.51 ^{ef}	29.24±0.27 ^{*def}
Chloroform layer	15.10±0.68 ^{*ab}	14.08±0.62 ^{*ab}	13.75±0.55 ^{*ab}
Ethylacetate layer	25.07±3.42 ^{bcd}	21.20±2.05 ^{abcd}	14.38±1.85 ^{ab}
Butanol layer	22.75±12.05 ^{cde}	19.89±5.00 ^{a^{bc}d}	12.97±4.79 ^a
Water layer	24.73±1.03 ^{cde}	17.38±1.103 ^{abc}	12.38±6.98 ^a

1. Values are means±SD, n=3

2. Values followed by different letters are significantly different at p<0.05

Table 3.3.11. Inhibitory effect of flavonoids from fermented tea by mushroom on cell proliferation in HeLa

Conc. (mg/mL)	Inhibition rate (%)		
	0.04	0.02	0.005
Kaemperol	63.12±1.10 ^{*e}	58.37±1.92 ^{*e}	45.55±11.98 ^d
Quercetin	24.35±4.45 ^{ab}	22.07±0.00 ^{*ab}	19.26±1.37 ^{*a}
Luteolin	35.29±3.22 ^c	31.32±1.71 ^{bc}	26.67±0.48 ^{abc}

1.Values are means±SD, n=3.

2.Values followed by different letters are significantly different at p<0.05.

인체 간암세포인 HepG2에 버섯균사체로 발효시킨 자생차 분획별 추출물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식억제 정도를 알아본 결과는 Table 3.3.12, 3.3.13과 같다. 간암세포인 HepG2의 경우 0.2mg/ml일 때, hexane 분획물 (39.18%), chloroform 분획물 (39.70%), methanol 분획물 (35.16%), butanol 분획물 (33.18%), ethylacetate 분획물(30.56%) 그리고 water 분획물 (26.80%)의 증식억제효과가 측정되었다. 0.04mg/ml의 농도일 때, catechin, tea extract, kaemperol, quercetin, luteolin 그리고 L-theanine의 증식억제효과는 각각 46.03%, 43.31%, 40.96%, 38.82%, 33.70% 그리고 30.72%로 측정되었다.

Table 3.3.12. Inhibitory effect of fractional extracts from fermented tea on cell proliferation in HepG2

Conc. (mg/ml)	Inhibition rate (%)		
	0.2	0.1	0.05
Methanol layer	35.16±2.44 ^{ij}	29.10±1.26 ^{efgh}	20.92±0.07 ^{*b}
Hexane layer	39.18±2.66 ^j	31.45±.77 ^{ghi}	25.39±1.48 ^{cdef}
Chloroform layer	39.70±1.18 ^{*j}	29.36±5.17 ^{efgh}	25.39±5.76 ^{cdef}
Ethylacetate layer	30.56±0.07 ^{*fghi}	28.16±0.66 ^{*efgh}	24.82±3.77 ^{cdef}
Butanol layer	33.18±2.73 ^{hi}	23.98±0.66 ^{cde}	20.06±2.51 ^c
Water layer	26.80±0.52 ^{*defg}	22.15±1.33 ^{*cd}	3.81±0.07 ^{*a}

1. Values are means±SD, n=3

2. Values followed by different letters are significantly different at p<0.05

Table 3.3.13. Inhibitory effect of some extracts from fermented tea by mushroom on cell proliferation in HepG2

Conc. (mg/ml)	Inhibition rate (%)		
	0.04	0.02	0.005
Kaemperol	40.96±5.76 ^{ghi}	30.20±1.92 ^{ef}	16.46±1.11 ^{*bc}
Quercetin	38.82±5.10 ^{ghi}	24.35±5.62 ^{de}	8.20±.99 ^{*a}
Luteolin	33.70±0.07 ^{*fg}	21.00±1.77 ^{cd}	10.34±2.36 ^{ab}
L-Theanine	30.72±3.10 ^{ef}	23.25±2.29 ^{cde}	11.49±4.88 ^{ab}
Catechin	46.03±0.22 ^{*i}	38.66±1.33 ^{*ghi}	34.90±1.03 ^{*fg}
Tea extract	43.31±6.42 ^{hi}	36.89±0.30 ^{*fgh}	10.97±3.40 ^{ab}

1. Values are means±SD, n=3

2. Values followed by different letters are significantly different at p<0.05

인체 대장암세포인 HT-29에 버섯균사체로 발효시킨 자생차 분획별 추출물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식억제 정도를 알아본 결과는 Table 3.3.14, 3.3.15와 같다. 대장암세포인 HT-29의 경우 0.2mg/ml일 때, hexane 분획물 (10.84%), chloroform 분획물 (25.84%), methanol 분획물 (38.91%), butanol 분획물 (24.41%), ethylacetate 분획물(24.46%) 그리고 water 분획물 (30.35%)의 증식억제효과가 측정되었다. 0.04mg/ml의 농도일 때, kaemperol, quercetin 그리고 luteolin 의 증식억제효과는 각각 38.42%, 91.63% 그리고 50.84%로 측정되었다.

Table 3.3.14. Inhibitory effect of fractional extracts from fermented tea by mushroom on cell proliferation in HT-29

Conc. (mg/ml)	Inhibition rate (%)		
	0.2	0.1	0.05
Methanol layer	38.91±7.28 ^h	18.17±0.49 ^{*d}	8.66±2.31 ^b
Hexane layer	10.84±0.49 ^{*bc}	6.68±0.49 ^{*ab}	4.06±0.70 ^{*a}
Chloroform layer	25.84±0.14 ^{*f}	24.50±0.35 ^{*ef}	23.27±0.42 ^{*ef}
Ethylacetate layer	24.46±0.56 ^{*ef}	22.82±0.49 ^{*ef}	20.84±0.77 ^{*de}
Butanol layer	24.41±0.63 ^{*ef}	21.19±0.70 ^{de}	18.07±0.49 ^d
Water layer	30.35±1.19 ^{*g}	21.49±1.68 ^{def}	13.71±0.07 ^{*c}

1. Values are means±SD, n=3

2. Values followed by different letters are significantly different at p<0.05

Table 3.3.15. Inhibitory effect of flavonoids from fermented tea by mushroom on cell proliferation in HT-29

Conc. (mg/ml)	Inhibition rate (%)		
	0.04	0.02	0.005
Kaemperol	38.42±2.94 ^b	37.51±1.28 ^{*b}	22.42±6.41 ^a
Quercetin	91.63±0.21 ^{*e}	65.54±5.46 ^d	23.96±2.10 ^{*a}
Luteolin	50.84±0.21 ^{*c}	50.64±0.21 ^{*c}	31.68±1.40 ^{*b}

1. Values are means±SD, n=3

2. Values followed by different letters are significantly different at p<0.05

4) 항돌연변이활성 효과

Fig. 3.3.14는 Ames test법에 의한 항 돌연변이활성을 시험한 사진이다. Ames test로 버섯균사체로 발효시킨 자생차 분획별 추출물의 간접작용 돌연변이능에 대한 저해 효과는 Table 3.3.16, 3.3.17에서 *Salmonella typhimurium* TA98에 대한 각 분획물의 농도가 0.6mg/plate일 때 돌연변이 저해율은 hexane 분획물 (60.56%), chloroform 분획물 (64.58%), ethylacetate 분획물 (68.45%)의 억제 효과가 측정되었다. 0.1mg/plate일 때, catechin, tea extract, luteolin 그리고 L-theanine의 억제 효과는 63.17%, 23.58%, 56.76% 그리고 39.23%로 측정되었다.

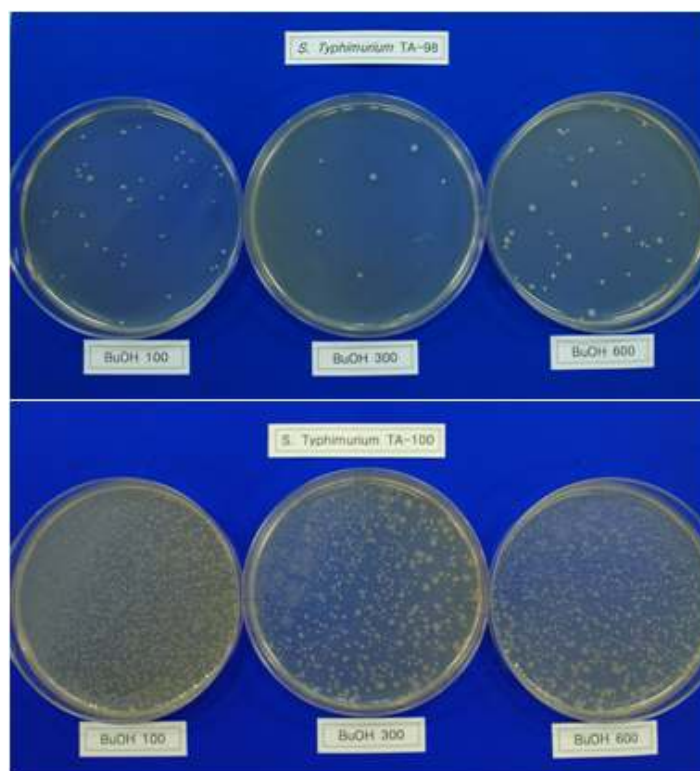


Fig. 3.3.14. The pictures of AMES test against *Samonella typhimurium* TA-98 & TA-100.

Table 3.3.16. Antimutagenic effect of fractional extracts from fermented tea by mushroom on mutagenicity induced by 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline IQ;0.2 μ g/plate) for *Salmonella typhimurium* TA98 2053(IQ)

	Concentration (mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous		35.5 \pm 4.95 ^{kl*}	
Control		652 \pm 25.46 ^{*a}	
MeOH layer	0.1	561.5 \pm 7.78 ^{ij}	11.43 \pm 1.23 ^{bc}
	0.3	394.5 \pm 16.27 ^{efgh}	37.77 \pm 2.57 ^{efgh}
	0.6	259 \pm 26.87 ^{cd*}	59.14 \pm 4.24 ^{ijkl}
Hexane layer	0.1	413.5 \pm 4.95 ^{gh}	34.78 \pm 0.78 ^{efg*}
	0.3	307.5 \pm 36.06 ^{cde}	51.49 \pm 5.69 ^{ijk}
	0.6	250 \pm 70.71 ^{bc*}	60.56 \pm 11.15 ^{kl}
CHCl ₃ layer	0.1	537.5 \pm 34.65 ^{i*}	15.22 \pm 5.47 ^{cd}
	0.3	462 \pm 1.41 ^{b*}	27.12 \pm 0.22 ^{de}
	0.6	224.5 \pm 26.16 ^h	64.58 \pm 4.13 ^l
EtOAc layer	0.1	359.5 \pm 51.62 ^b	43.29 \pm 8.14 ^{fghi}
	0.3	324.5 \pm 38.89 ^{def}	48.81 \pm 6.13 ^{hijk}
	0.6	200 \pm 18.38 ^{efg*}	68.45 \pm 2.90 ^{*kl}
BuOH layer	0.1	624.5 \pm 13.44 ^{jk}	1.49 \pm 2.12 ^b
	0.3	438 \pm 16.97 ^{hl}	30.91 \pm 2.68 ^{ef}
	0.6	338.5 \pm 51.61 ^{ef}	46.60 \pm 8.14 ^{ghij}
Water layer	0.1	709.5 \pm 67.17 ^l	11.90 \pm 10.59 ^a
	0.3	451.5 \pm 24.74 ^h	28.78 \pm 3.90 ^e
	0.6	355 \pm 35.35 ^{efg}	44.00 \pm 5.58 ^{fghi}

Values are means \pm SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05; different letters are significantly different at p<0.05

Table 3.3.17. Antimutagenic effect of some extracts from fermented tea by mushroom on mutagenicity induced by 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f] uinoline(IQ;0.2 μ g/plate) for *Salmonella typhimurium* TA98

	Concentration (mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous		35.5 \pm 4.95 ^{a*}	
Control		1728 \pm 39.60 ^{h*}	
Catechin	0.2	529.5 \pm 71.42 ^b	68.85 \pm 4.20 ^d
	0.1	626 \pm 5.66 ^{c*}	63.17 \pm 0.33 ^{d*}
	0.05	750.5 \pm 72.83 ^d	55.85 \pm 4.28 ^c
Tea extract	0.2	785 \pm 21.21 ^{d*}	53.82 \pm 1.25 ^c
	0.1	1299 \pm 1.41 ^{g*}	23.58 \pm 0.08 ^{a*}
	0.05	1368 \pm 45.25 ^g	19.52 \pm 2.66 ^a
Luteolin	0.2	547 \pm 4.24 ^{bc*}	67.82 \pm 0.24 ^{d*}
	0.1	735 \pm 21.21 ^{d*}	56.76 \pm 1.25 ^c
	0.05	945 \pm 7.07 ^{e*}	44.41 \pm 0.42 ^{b*}
Theanine	0.2	980.5 \pm 14.85 ^{ef*}	42.32 \pm 0.87 ^{b*}
	0.1	1033 \pm 117.38 ^{ef}	39.23 \pm 6.90 ^b
	0.05	1042.5 \pm 7.78 ^{f*}	38.67 \pm 0.46 ^{b*}

Values are means \pm SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05; different letters are significantly different at p<0.05

Table 3.3.18, 3.3.19에서 *Salmonella typhimurium* TA100에 대한 각 분획물의 농도가 0.6mg/plate일 때 돌연변이 저해율은 hexane 분획물 (87.91%), chloroform 분획물 (75.03%), ethylacetate 분획물 (86.26%)의 억제 효과가 측정되었다. 0.1mg/plate일 때, catechin, tea extract, luteolin 그리고 L-theanine의 억제효과는 21.35%, 35.61%, 36.46% 그리고 53.15%로 측정되었다.

Table 3.3.18. Antimutagenic effect of fractional extract from fermented tea by mushroom on mutagenicity induced by 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline(IQ;0.2 μ g/plate) for *Salmonella typhimurium* TA100 2054(IQ)

	Concentration (mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous		119.5 \pm 0.71 ^{a*}	
Control		763 \pm 2.83 ^{c*}	
MeOH layer	0.1	282 \pm 94.75 ^{ab}	72.99 \pm 1.76 ^{ab}
	0.3	212 \pm 1.41 ^{ab}	62.94 \pm 12.45 ^{ab}
	0.6	205.5 \pm 13.44 ^{ab}	72.14 \pm 0.18 ^{ab*}
Hexane layer	0.1	312.5 \pm 294.86 ^{ab}	58.93 \pm 38.75 ^{ab}
	0.3	108 \pm 26.87 ^a	85.80 \pm 3.53 ^{ab}
	0.6	92 \pm 4.24 ^a	87.91 \pm 0.56 ^{b*}
CHCl ₃ layer	0.1	279.52 \pm 3.97 ^{ab}	66.42 \pm 26.85 ^{ab}
	0.3	255.5 \pm 20.44 ^{ab}	63.27 \pm 31.49 ^{ab}
	0.6	190 \pm 73.54 ^{ab}	75.03 \pm 9.66 ^{ab}
EtOAc layer	0.1	374 \pm 5.66 ^b	50.85 \pm 0.74 ^{a*}
	0.3	149 \pm 83.44 ^{ab}	80.42 \pm 10.96 ^{ab}
	0.6	104.5 \pm 14.85 ^a	86.26 \pm 1.95 ^{ab}
BuOH layer	0.1	325.5 \pm 30.41 ^{ab}	57.22 \pm 3.99 ^{ab}
	0.3	292.5 \pm 67.18 ^{ab}	61.56 \pm 8.82 ^{ab}
	0.6	236 \pm 2.83 ^{ab}	68.98 \pm 0.37 ^{ab*}
Water layer	0.1	213 \pm 73.54 ^{ab}	75.49 \pm 6.78 ^{ab}
	0.3	197 \pm 76.37 ^{ab}	72.01 \pm 9.66 ^{ab}
	0.6	186.5 \pm 51.62 ^{ab}	74.11 \pm 10.04 ^{ab}

Values are means \pm SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05; different letters are significantly different at p<0.05

Table 3.3.19. Antimutagenic effect of some extracts from fermented tea by mushroom on mutagenicity induced by 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline(IQ;0.2 μ g/plate) for *Salmonella typhimurium* TA100

	Concentration (mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous		119.5 \pm 0.71 ^{a*}	
Control		763 \pm 2.83 ^{g*}	
Catechin	0.2	516.5 \pm 17.68 ^{ef*}	32.13 \pm 2.32 ^{bcd*}
	0.1	598.5 \pm 67.17 ^f	21.35 \pm 8.83 ^b
	0.05	707.5 \pm 0.71 ^{g*}	7.03 \pm 0.09 ^{a*}
Theanine	0.2	397.5 \pm 16.26 ^c	47.76 \pm 2.14 ^{efg}
	0.1	490 \pm 106.06 ^{de}	35.61 \pm 13.94 ^{bcd^e}
	0.05	563 \pm 73.54 ^{ef*}	26.01 \pm 9.66 ^{bc}
Tea extract	0.2	280 \pm 14.14 ^{b*}	63.20 \pm 1.86 ^{h*}
	0.1	483.5 \pm 9.19 ^{de*}	36.46 \pm 1.21 ^{cde*}
	0.05	540 \pm 45.25 ^{ef*}	29.04 \pm 5.95 ^{bc}
Luteolin	0.2	307.5 \pm 6.36 ^{b*}	59.59 \pm 0.84 ^{gh*}
	0.1	356.5 \pm 14.84 ^{bc}	53.15 \pm 1.95 ^{fgh}
	0.05	422 \pm 46.66 ^{cd}	44.54 \pm 6.13 ^{def}

Values are means \pm SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05; different letters are significantly different at p<0.05

버섯균사체로 발효시킨 자생차 분획별 추출물의 직접 작용 돌연변이능에 대한 저해 효과는 Table 3.3.20, 3.3.21에서 *Salmonella typhimurium* TA100에 대한 각 분획물의 농도가 0.6mg/plate일 때 돌연변이 저해율은 hexane 분획물 (73.83%), chloroform 분획물 (75.08%), ethylacetate 분획물 (76.5%) 및 butanol 분획물 (83.75%)의 억제 효과가 측정되었다. 0.1mg/plate일 때, catechin, tea extract, luteolin 그리고 L-theanine의 억제효과는 65.16%, 21.0%, 54.41% 그리고 51.66%로 측정되었다.

Table 3.3.20. Antimutagenic effect of fractional extracts from fermented tea by mushroom on mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG; 0.4µg/plate) for *Salmonella typhimurium* TA100

	Concentration (mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous		68.5±2.12 ^{a*}	
Control		583.5±23.33 ^{j*}	
MeOH layer	0.1	138.5±21.92 ⁱ	15.16±9.66 ^a
	0.3	187±29.70 ^{cd*}	68.83±4.95 ^{gh*}
	0.6	509±57.98 ^{bc*}	76.91±3.65 ^{hi}
Hexane layer	0.1	294±25.46 ^{ef}	51±4.24 ^{de}
	0.3	261.5±13.44 ^e	56.41±2.24 ^{ef}
	0.6	157±26.87 ^{bc*}	73.83±4.48 ^{hi}
CHCl ₃ layer	0.1	149.5±0.71 ^{bcd}	67±12.26 ^{fgh}
	0.3	167.5±30.41 ^{c*}	72.08±5.06 ^{hi}
	0.6	198±73.54 ^{bc*}	75.08±0.12 ^{hi}
EtOAc layer	0.1	141±1.41 ^{gh}	37.5±3.77 ^{bc}
	0.3	247±14.14 ^{cde*}	58.83±2.36 ^{efg}
	0.6	375±22.63 ^{bc*}	76.5±0.24 ^{hi}
BuOH layer	0.1	97.5±13.44 ^{gh*}	38.16±5.89 ^{bc}
	0.3	186.5±4.95 ^{cd*}	68.91±0.82 ^{gh*}
	0.6	371±35.36 ^{ab*}	83.75±2.24 ^{i*}
Water layer	0.1	421±14.14 ^h	29.83±2.36 ^{b*}
	0.3	330±35.36 ^{fg}	45±5.89 ^{cd}
	0.6	256.5±4.95 ^{de*}	57.25±0.82 ^{ef*}

Values are means±SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05; different letters are significantly different at p<0.05

Table 3.3.21. Antimutagenic effect of some extracts from fermented tea by mushroom on mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG; 0.4µg/plate)for *Salmonella typhimurium* TA100

	Concentration (mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous		68.5±2.12 ^{a*}	
Control		583.5±23.33 ^{i*}	
Catechin	0.2	161.5±0.71 ^{bc*}	73.08±0.12 ^{hi*}
	0.1	209±1.41 ^{de*}	65.16±0.24 ^{gh*}
	0.05	276±7.07 ^{f*}	54±1.18 ^{ef*}
Tea extract	0.2	229±26.87 ^{e*}	61.83±4.47 ^{fg}
	0.1	474±5.66 ^{h*}	21±0.94 ^{b*}
	0.05	552±43.84 ⁱ	8.00±7.31 ^a
Luteolin	0.2	178.5±13.43 ^{cd*}	70.25±2.24 ^{hi*}
	0.1	273.5±19.09 ^{f*}	54.41±3.18 ^{ef}
	0.05	332.5±27.58 ^g	44.58±4.59 ^{cd}
Theanine	0.2	132.5±27.58 ^{b*}	77.91±4.59 ⁱ
	0.1	290±19.80 ^{f*}	51.66±3.29 ^{de}
	0.05	338.5±13.43 ^g	43.58±2.24 ^{c*}

Values are means±SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05; different letters are significantly different at p<0.05

Table 3.3.22, 3.3.23에서 *Salmonella typhimurium* TA98에 대한 각 분획물의 농도가 0.6mg/plate일 때 돌연변이 저해율은 hexane 분획물 (79.33%), chloroform 분획물 (75.83%), ethylacetate 분획물 (80.83%)의 억제 효과가 측정되었다. 0.1mg/plate일 때, catechin, tea extract, luteolin 그리고 l-theanine의 억제효과는 78.91%, 44.25%, 39.83% 그리고 61.41%로 측정되었다.

Table 3.3.22. Antimutagenic effect of fractional extracts from fermented tea by mushroom on mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG;0.4µg/plate) for *Salmonella typhimurium* TA98

		Concentration(mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
Spontaneous			19.5±2.12 ^{a*}	
Control			505.5±7.78 ^{g*}	
MeOH layer	0.1		225±7.07 ^{d*}	62.5±1.17 ^{d*}
	0.3		125±7.07 ^{bc*}	79.16±1.17 ^{e*}
	0.6		110±0.00 ^{bc*}	81.6±0.00 ^{e*}
Hexane layer	0.1		425±91.92 ^f	29.16±15.32 ^a
	0.3		300±56.56 ^e	50±9.42 ^{bc}
	0.6		115±35.35 ^{bc}	79.33±3.77 ^e
CHCl ₃ layer	0.1		325±35.35 ^e	45.83±5.89 ^b
	0.3		220±42.42 ^d	63.33±7.07 ^d
	0.6		145±21.21 ^c	75.83±3.53 ^e
EtOAc layer	0.1		240±14.14 ^{d*}	60±2.35 ^{cd}
	0.3		150±14.14 ^{c*}	75±2.35 ^e
	0.6		115±7.07 ^{bc*}	80.83±1.17 ^{e*}
BuOH layer	0.1		355±7.07 ^{e*}	40.83±1.17 ^{b*}
	0.3		215±7.07 ^{d*}	64.16±1.17 ^{d*}
	0.6		125±21.21 ^{bc}	79.16±3.53 ^e
Water layer	0.1		220±0.00 ^{d*}	63.33±0.00 ^d
	0.3		115±7.07 ^{bc*}	80.83±1.17 ^{e*}
	0.6		80±0.00 ^{ab*}	86.66±0.00 ^{e*}

Values are means±SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05; different letters are significantly different at p<0.05

Table 3.3.23. Antimutagenic effect of some extracts from fermented tea by mushroom extract on mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG; 0.4 μ g/plate) for *Salmonella typhimurium* TA98

	Concentration (mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous		19.5 \pm 2.12 ^{a*}	
Control		505.5 \pm 7.78 ^{i*}	
Catechin	0.2	55.5 \pm 30.40 ^a	90.75 \pm 5.06 ^h
	0.1	126.5 \pm 10.60 ^{b*}	78.91 \pm 1.77 ^{g*}
	0.05	266.5 \pm 12.02 ^{e*}	55.58 \pm 2.00 ^{d*}
Theanine	0.2	179.0 \pm 8.48 ^{c*}	70.16 \pm 1.41 ^{f*}
	0.1	334.5 \pm 38.89 ^{fg}	44.25 \pm 6.48 ^c
	0.05	408.0 \pm 7.07 ^{h*}	32 \pm 1.17 ^{ab*}
Tea extract	0.2	253.5 \pm 2.12 ^{e*}	57.75 \pm 0.35 ^{de*}
	0.1	361.0 \pm 50.91 ^g	39.83 \pm 8.48 ^{bc}
	0.05	445.5 \pm 4.95 ^{h*}	25.75 \pm 0.82 ^{a*}
Luteolin	0.2	213.0 \pm 4.24 ^{cd*}	64.5 \pm 0.71 ^{ef}
	0.1	231.5 \pm 2.12 ^{de*}	61.41 \pm 0.35 ^{de*}
	0.05	314.5 \pm 14.84 ^f	47.58 \pm 2.47 ^{c*}

Values are means \pm SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05; different letters are significantly different at p<0.05

Salmonella typhimurium TA98과 100에서의 직접, 간접 돌연변이원에 대한 버섯균사체로 발효시킨 자생차 분획별 추출물의 항돌연변이능에서는 상대적으로 hexane 분획물, chloroform 분획물 그리고 ethylacetate 분획물의 효과가 우수하였고 농도 의존적으로 저해율이 증가되었다. 또한 catechin과 luteolin의 효과가 tea extract와 L-theanine의 저해율보다 높게 측정되었다.

5) 항 치매활성 효과

SD계 Rat(male, 150±10g)을 5실험군으로 나누어 각 실험군별로 대조군과 산발효차 추출물의 동결건조물을 1, 2, 5 및 10%씩 첨가한 사료로서 4주간 사육하였다. 사육 후 뇌 조직을 분리하여 균질물을 만들었으며 이 균질물속의 superoxide radical 생성량, 과산화지질 함량, acetylcholine(ACh) 함량, acetylcholinesterase(AChE) 활성, Choline acetyltransferase(ChAT) 활성 및 monoamine oxidase-B (MAO-B)의 활성 등을 측정함으로써 항 치매 활성효과를 평가하였다.

① Superoxide radical의 생성량

노화(aging)는 시간이 지남에 따라 개체의 기능이 감소하게 되며 질병에 대한 감수성이 증가하는 현상으로 정의할 수 있을 것이다. 노화의 원인에 관한 많은 이론들이 있지만 Harman(1956)에 의해 제안된 노화의 「Free Radical Theory」에 따라 활발히 연구되고 있다. 최근에는 나쁜 산소로서 프리라디칼(free radical)이라는 활성산소가 세포막의 지질이나 단백질 및 핵산을 공격하여 생성되는 과산화지질(lipid peroxide ; LPO), 산화단백질(Oxidized protein ; OP) 및 핵산의 산화에 의한 변이(mutation) 같은 산화적 스트레스가 원인이라고 하는 Yu 등(1996)이 제안한 「Oxidative Stress Theory」가 매우 중요한 가설로서 각광을 받고 있다.

노화는 정상적인 대사과정이나 환경호르몬, 과음, 과식, 스트레스, 자외선 및 방사선 등의 외부로부터의 어떤 유발인자들에 의해 발생하는 활성산소(oxygen radicals, free radicals) 또는 활성산소종(reactive oxygen species ; ROS)으로 알려진 유해산소의 영향으로 생긴 불가역적인 변화에 의해 일어난다(Choi and Yu, 1991).

활성산소란 분자 또는 원자의 최외각 전자궤도에 부대전자(unpaired electron)를 가진 불안정한 산소화합물로서 좁은 의미에서는 hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$), superoxide radical($\text{O}_2\cdot$), hydrogen peroxide(H_2O_2) 및 nitric oxide(NO) 등이 있다. 넓은 의미로는 지방산과 반응할 수 있는 peroxy radical($\text{LOO}\cdot$)이나 alkoxy radical($\text{RO}\cdot$) 등도 포함된다. Superoxide radical의 생성은 삼중항산소(triplet oxygen)가 일중항산소($^1\text{O}_2$)로 변화하거나, 아니면 전자를 직접 받아들여 superoxide radical이 생성되는데, 이것이 다시 전자를 받아들이면 hydrogen peroxide로 되고, Fe^{+2} 가 산화될 때 생성되는 전자를 받아들여 hydroxyl radical을 생성하기 때문에 free radical damage 중의 초기 단계에서 가장 강력한 활성산소로서 superoxide radical이 보고되어 있으므로 본 연구에서는 superoxide radical

의 생성량을 조사하여 평가하고자 하였다. Table 3.3.24, Fig. 3.3.15에는 SD 랫드의 뇌 조직에 4주 동안에 생성된 superoxide radical의 량에 대한 산 발효차 추출물의 영향을 조사한 것이다. 즉 산발효차 추출물 5% 함유한 사료를 먹고 자란 실험군에서 가장 적은 108 ± 3.780 nmol/mg protein으로서 대조군에 비하여 30.3% 적게 생성되었으며, 10% 함유사료를 먹인 실험군에서는 랫드의 사료섭취량이 현저히 줄어들어 대조군보다 25.8% 적게 생성되었다.

Table 3.3.24. Effects of AFGT extracts on superoxide radical formation in brain of SD rats for 4 weeks

Test groups	Superoxide radical formation (nmol/mg protein)	Decreasing rate(%)
Control	155 ± 4.543^a	—
AFGT-1	134 ± 3.985	86.45 ^b
AFGT-2	126 ± 4.109	81.29
AFGT-5	108 ± 3.780	69.68
AFGT-10	115 ± 5.339	74.19

^a, Mean \pm SD with 6 SD rats, ^b, Content of sample/content of control

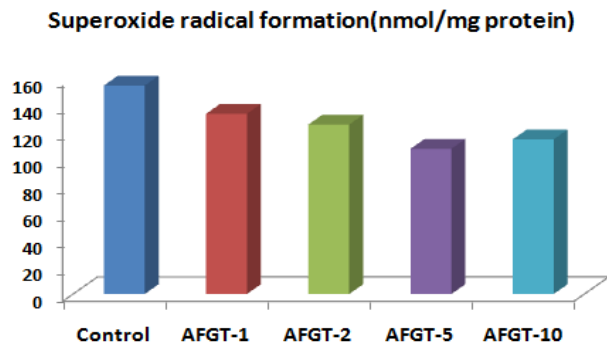


Fig. 3.3.15. Effects of AFGT extracts on superoxide radical formation in brain of SD rats for 4 weeks.

② 과산화지질 생성량

산화적 스트레스에 대한 평가로서 노화의 과정을 설명하기 위한 가설에는 활성 산소와 관련한 학설(Harman, 1956)이 최근 많이 주목을 받고 있다. Free radical은 주로 세포막, 지질, 단백질의 sulfurhydryl(-SH)기 및 DNA의 nucleotide에 작용하여 지질과산화(lipid peroxidation), 단백질 및 DNA 손상 등을 일으켜 세포의 손상을 초래하게 된다. 특히 지질은 손상되기 쉬운 세포성분으로 보고되고 있다 (Yu 등 1996, Yu 1966).

본 연구에서는 산 발효차 추출물의 과산화지질의 생성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 산발효차 추출물을 첨가하여 만든 사료로 사육한 랫드의 뇌 조직에 생성되어 축적된 과산화지질의 함량을 측정하였다. 그 결과를 Table 3.3.25와 Fig. 3.3.16에 나타내었다.

Table 3.3.25. Effects of AFGT extracts on lipid peroxide content in brain of CD rats for 4weeks

Test groups	lipid peroxide content (nmol/mg protein)	Rate(%)
Control	1.98±0.453 ^a	—
AFGT-1	1.65±0.447	83.33 ^b
AFGT-2	1.39±0.379	70.20
AFGT-5	1.37±0.562	69.19
AFGT-10	1.35±0.475	68.18

^a, Mean±SD with 6 SD rats, ^b, Content of sample/content of control.

즉 산 발효차를 첨가한 사료를 먹인 랫드의 뇌 조직에 형성된 과산화지질의량은 1.65±0.447 ~ 1.35±0.475 nmol/mg protein 으로서 첨가량이 많을수록 줄어드는 경향이었으며, 대조군에 비하여 68.18 ~ 83.33 % 수준이었다. 따라서 산 발효차의 추출물은 농도 의존적으로 과산화지질의 생성량을 감소시키는 것으로 나타나 항치매 효과가 있을 것으로 판단되었다.

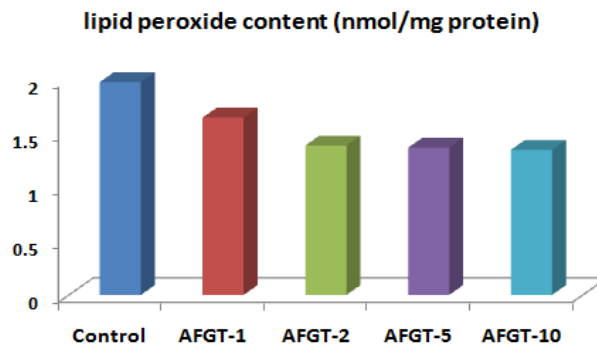


Fig. 3.3.16. Effects of AFGT extracts on lipid peroxide content in brain of CD rats for 4weeks.

③ Acetylcholine(ACh)의 함량

체내의 신경전달물질은 무수히 많지만, 그중에서 대표적인 신경전달물질이 바로 아세틸콜린(acetylcholine ; ACh)이다. 아세틸콜린은 거의 모든 뇌의 신경조직에서 발견되며 시냅스(synapse)와 시냅스 사이의 신경전달에 관여하는 가장 중요한 신경전달물질로 알려져 있다. Alzheimer's 노인성 치매의 가장 일반적인 요인으로 흔히 중년기에 발병하여 점진적인 정신의 황폐화를 초래한다. 그 원인에 대해서는 확실치 않으나 해마부위와 대뇌피질에 연결된 콜린성 뉴우런(신경전달물질로 ACh를 분비)의 상실에 의한다고 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 산발효차 추출물의 치매예방 및 치료효능 검증을 위하여 균질화 된 뇌조직에 첨가 후 incubation 시간에 따른 ACh 함량을 조사하여 Table 3.3.26과 Fig. 3.3.17에 나타내었다.

Table 3.3.26. Time scanning effects of AFGT extracts on acetylcholine(ACh) contents in brain homogenate

Samples	Treatments ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Acetylcholine content (ng/mg protein)			
		15min	30min	45min	60min
Control	—	42.92 \pm 1.45 ^a	43.11 \pm 2.01	42.98 \pm 1.99	40.78 \pm 2.46
AFGT-10	10	43.01 \pm 2.00	45.45 \pm 2.87	46.34 \pm 2.90	46.76 \pm 2.27
AFGT-20	20	44.32 \pm 1.07	47.26 \pm 2.21	48.54 \pm 2.91	49.26 \pm 3.11
AFGT-50	50	45.41 \pm 3.21	48.32 \pm 2.01	50.12 \pm 0.97	50.07 \pm 3.02
AFGT-100	100	43.27 \pm 0.87	46.26 \pm 3.31	44.05 \pm 3.05	42.24 \pm 3.26

^a, Mean \pm SD with 6 SD rats

그 결과 산발효차 100 μ g/ml를 처리하였을 때를 제외하고 대체로 시간이 경과함에 따라 45분까지는 ACh 함량이 증가하였으나, 60분에는 그 함량이 감소하였다. 특히 산 발효차 추출물을 50 μ g/ml 처리하였을 때, 시간별 생성량이 45.41 \pm 3.21 ~ 50.12 \pm 0.97 ng/mg protein으로서 최대에 달하여 가장 효과가 우수한 것으로 나타났다.

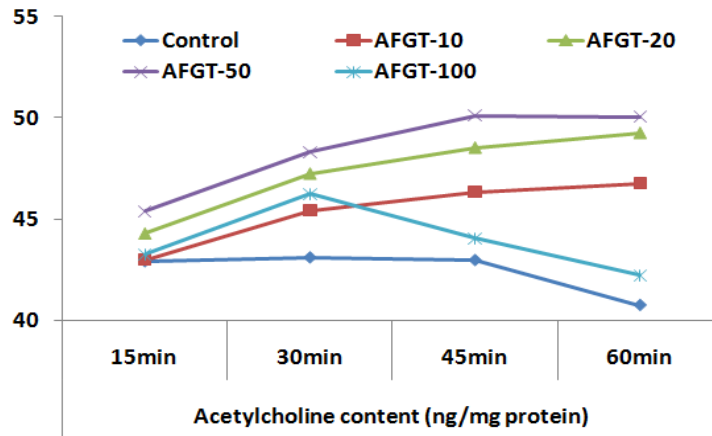


Fig. 3.3.17. Time scanning effects of AFGT extracts on acetylcholine(ACh) contents in brain homogenate.

④ Acetylcholinesterase(AChE)의 활성화

신경전달물질로서 ACh도 중요하지만 AChE 효소의 활성화도 매우 중요하다. ACh이 pre-synapse ending에서 분비되면 그것이 post-synapse ending에서 수용체와 결합하여 신경세포사이의 자극을 전달한다. 그러나 제2의 자극이 시냅스를 통해 전달하기 전에 제1의 자극 시에 분비된 ACh은 AChE에 의하여 가수분해되어야만 한다. 그러나 AChE의 분비가 억제되면 ACh이 파괴되지 못하고 수용체와 지속적으로 결합하여 시냅스 후 세포를 자극하여 강직성 마비를 초래하기도 한다. 따라서 AChE 효소의 활성화도 매우 중요하다. 그렇지만 ChAT 및 AChE의 활성이 다 같이 증가한다면 ACh의 합성과 분해가 다 같이 활발해지기 때문에 좋은 치료제가 될 수 있을 것이다(Fig. 3.3.18).

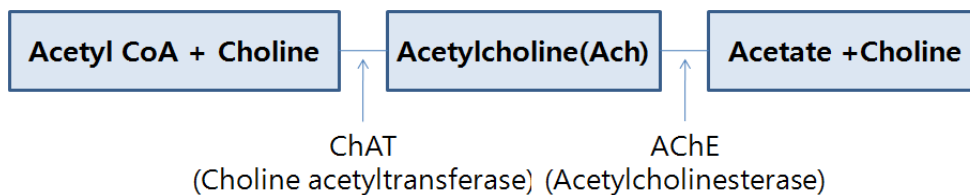


Figure 3.3.18. Changes in acetylcholine(ACh)-related enzymes(Vender et al., 1998)

따라서 신경전달물질인 ACh의 분해를 촉진하는 AChE의 활성을 평가하기 위하여 산발효차의 추출물을 농도별로 처리하여 AChE의 활성을 측정한 결과를 Table 3.3.27과 Fig. 3.3.19에 나타내었다. 산발효차의 처리농도가 많을수록 AChE의 활성이 높아지는 경향을 보였다. 따라서 산발효차 추출물이 아세틸콜린을 가수분해하는 능력에도 효과를 나타내는 것으로 보아서 향치매 활성이 있을 것으로 나타났다. 그러나 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때에 비하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리하였을 때에는 AChE의 활성의 상승폭이 미약하였다.

Table 3.3.27. Effects of AFGT extracts on acetylcholinesterase(AChE) activities in brain homogenate

Samples	Treatments ($\mu\text{g/ml}$)	AChE activity (unit/mg protein/min)	Decreasing rate(%)
Control	—	178.75 \pm 10.45 ^a	—
AFGT-10	10	185.09 \pm 12.21	103.94 ^b
AFGT-20	20	198.21 \pm 9.98	110.89
AFGT-50	50	202.13 \pm 13.02	113.08
AFGT-100	100	205.24 \pm 10.28	114.82

^a, Mean \pm SD with 6 SD rats, ^b, AChE activity of sample/AChE activity of control

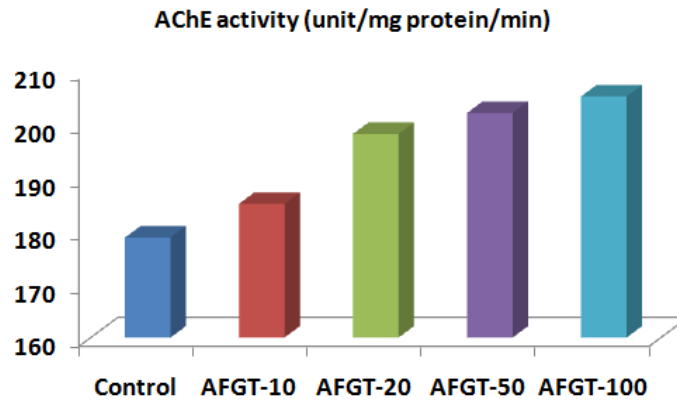


Fig. 3.3.19. Effects of AFGT extracts on acetylcholinesterase(AChE) activities in brain homogenate.

⑤ Choline acetyltransferase(ChAT)의 활성화

Acetyl CoA와 choline를 합성하여 acetylcholine(ACh)로 만들어 주는 효소가 ChAT이다. 따라서 신경전달 물질인 ACh가 많이 생성될 수 있어야 뇌의 신경의 활동이 원활해져서 치매에 걸릴 위험이 줄어든다고 할 수 있을 것이다. Table 3.3.28과 Fig. 3.3.20은 산 발효차의 뇌세포 분획물에서 ChAT 활성을 나타낸 것이다.

Table 3.3.28. Time scanning effects of AFGT extracts on choline acetyltransferase(ChAT) activities in brain homogenate

Samples	Treatments ($\mu\text{g/ml}$)	ChAT activity (unit/mg protein/min)			
		2min	4min	6min	8min
Control	—	5.34 \pm 1.45 ^a	5.48 \pm 0.99	5.27 \pm 1.03	4.89 \pm 0.87
AFGT-10	10	5.69 \pm 1.24	6.35 \pm 0.96	6.28 \pm 1.28	5.39 \pm 1.29
AFGT-20	20	5.98 \pm 0.69	6.75 \pm 0.88	6.83 \pm 1.26	6.27 \pm 1.86
AFGT-50	50	5.76 \pm 1.43	6.48 \pm 1.38	6.77 \pm 2.07	5.99 \pm 1.82
AFGT-100	100	5.55 \pm 1.59	6.03 \pm 1.85	6.36 \pm 2.31	5.53 \pm 1.50

^a, Mean \pm SD with 6 SD rats

산 발효차의 처리농도가 20 $\mu\text{g/ml}$ 이었을 때 가장 높게 나타났으며, 6분이 경과

할 때까지는 활성이 증가하였으나 그 이후에는 약간씩 줄어들었다. 그러나 대체로 대조군의 ChAT 활성에 비하여 11.98 ~ 29.60% 증가하는 경향이였다. 처리농도별 ChAT 활성은 20 $\mu\text{g/ml}$ 처리했을 때까지는 증가하였으나, 그 이상의 농도로 처리하였을 때에는 오히려 활성의 증가폭이 감소하였다.

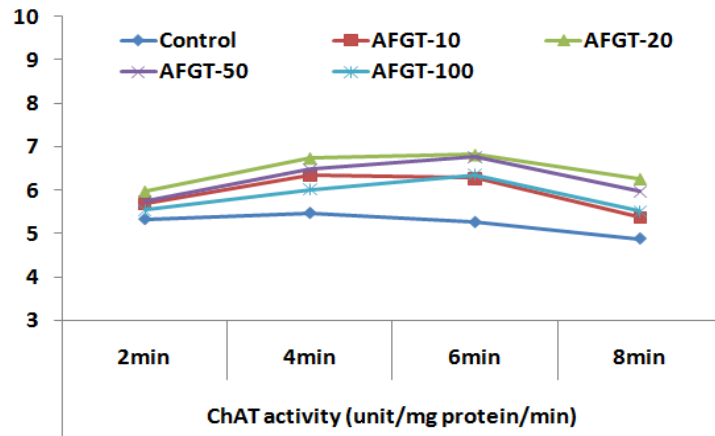


Fig. 3.3.20. Time scanning effects of AFGT extracts on choline acetyltransferase(ChAT) activities in brain homogenate.

⑥ MAO-B(monoamine oxidase-B)의 활성

Monoamine oxidase는 동물에 널리 분포되어 있으면서 사람이나 흰쥐의 뇌나 혈청에서 연령에 따라 증가한다는 사실이 밝혀져 있다(Grote 등, 1974, Noda 등 1982). 이 효소는 도파민(DA)이나 세로토닌(5-HT) 및 그 대사산물로서 노르에피네프린(NA) 등의 catecholamine을 산화하여 파괴하는 효소로 알려져 있다. 특히 monoamine oxidase-B(MAO-B)는 뇌조직 내에서 신경전달물질로서 작용하는 catechol amine계 신경전달물질을 파괴하기 때문에 MAO-B의 활성 증가는 상당히 문제가 되는 것으로 알려져 있다.

Table 3.3.29. Time scanning effects of AFGT extracts on monoamine oxidase-B(MAO-B) activities in brain homogenate

Samples	Treatments ($\mu\text{g/ml}$)	MAO-B activity (unit/mg protein/min)	Decreasing rate(%)
Control	—	3.12 ± 1.25^a	—
AFGT-10	10	2.98 ± 0.88	95.50 ^b
AFGT-20	20	2.76 ± 0.54	88.46
AFGT-50	50	2.77 ± 0.83	88.78
AFGT-100	100	2.63 ± 0.94	84.29

^a, Mean \pm SD with 6 SD rats, ^b, MAO-B activity of sample/MAO-B activity of control

또한 뇌 조직에서 MAO-B에 관한 연구로는 상심자의 모노아민산화효소 저해 활성(Hwang 등, 2003) 등의 연구를 기초로 하여 산 발효차 추출물이 MAO-B 효소의 활성변화에 미치는 영향을 분석하였으며 농도별 MAO-B 효소 활성변화를 Table 3.3.29와 Fig. 3.3.21에 나타내었다. 즉 산 발효차 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 MAO-B의 활성이 낮아졌으며, 농도별로 대조군에 비하여 95.50 ~ 84.29 % 수준까지 낮아졌다. 따라서 산 발효차의 추출물이 카테콜아민계의 신경 전달물질을 파괴하는 MAO-B의 활성을 저해하므로 치매예방에 효과가 있을 것으로 보였다.

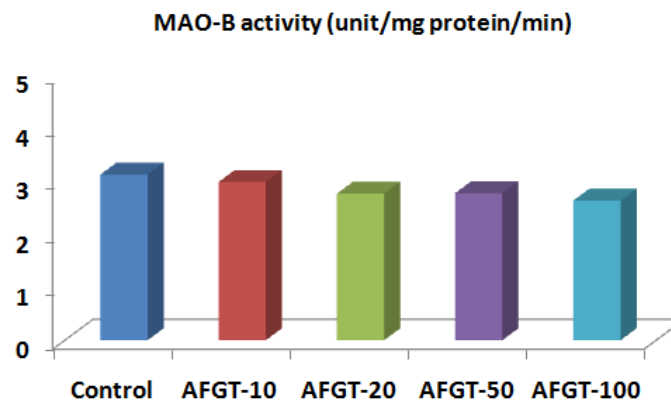


Fig. 3.3.21. Time scanning effects of AFGT extracts on monoamine oxidase-B(MAO-B) activities in brain homogenate.

6) 간 기능 보호활성 효과

산 발효차 추출물의 분획물들에 대한 마우스로부터 분리한 간세포를 이용하여 *in vitro* 간 기능의 보호효과를 시험하였으며, 사염화탄소 또는 D-galactosamine/LPS에 의하여 간독성이 유발된 SD계 rat의 혈액내의 GOT(glutamate-oxaloacetate transaminase) 및 GPT(glutamate-pyruvate transaminase) 활성도 및 γ -GT(glutamyltransferase)를 측정하였다.

① 간세포 내에서의 protein 합성능력

Bromobenzene에 의하여 유도된 간세포의 손상에 대한 산 발효차 추출물의 간 보호 효과를 Table 3.3.30에 나타내었다. 즉 bromobenzene을 처리하여 간세포의 독성을 유발하였을 경우에는 간세포의 단백질 합성능력이 대조군의 44.33% 정도에 불과할 정도로 저하되었으나, 산 발효차 분획물들의 처리 농도가 높을수록 다소 회복되는 것을 알 수 있었다. 한편 대체로 비극성화합물을 많이 함유하고

Table 3.3.30. Effects of AFGT extracts on protein synthetic activities at bromobenzene-damaged liver cells

Groups	Sample treatment (μ g/dish)	$\times 10^2$ DPM/mg protein	Rate(%)
Control	-	45.41	-
Bromobenzene	100	20.13	44.33 ^a
MeOH ext.	100	36.55	80.49
	200	36.35	80.05
Hexane Fr.	100	28.17	62.03
	200	26.43	58.20
Chloroform Fr.	100	24.39	53.71
	200	25.11	55.30
Ethylacetate Fr.	100	34.60	76.19
	200	36.24	79.81
Butanol Fr.	100	38.02	83.73
	200	40.28	88.70
Water Fr.	100	41.23	90.79
	200	43.12	94.96

^a, Sample value/control value

있는 hexane 및 chloroform 분획에서는 회복력이 대조군에 비하여 53.71 ~62.03%로 비교적 낮았으나, water 및 butanol 분획 등과 같이 극성화합물을 많이 함유하는 분획에서는 회복력이 83.73 ~ 94.96%까지 높았다. 따라서 산 발효차의 간 보호 작용을 가진 물질은 대체로 극성이 높은 물질일 것으로 여겨졌다.

② Bromobenzene에 의하여 손상된 간세포의 lactic acid dehydrogenase(LDH) 활성 비교

Bromobenzene에 의하여 유도된 간세포의 손상에 대한 산 발효차 추출물의 간 보호 효과를 Table 3.3.31에 나타내었다. 즉 bromobenzene을 처리하여 간세포의 독성을 유발하였을 경우에는 간세포 유리되어 나오는 lactic acid dehydrogenase(LDH)의 활성은 대조군의 240.9%에 해당하여 간세포 내에 심한 손상을 일으킨 것을 짐작할 수 있었다. 한편 산 발효차의 hexane과 chloroform 분획물을 처리하였을 때는 간 기능의 회복효과가 거의 없었으며, 처리농도를 높여도 효능을 기대할 수 없었다. 그러나 butanol 및 water 분획을 200 µg/dish

Table 3.3.31. Effects of AFGT extracts on LDH release activities at bromobenzene-damaged liver cells

Groups	Sample treatment (µg/dish)	Activities of LDH (unit/L)	Rate(%)
Control	-	105.303	-
Bromobenzene	100	253.673	240.90 ^a
MeOH ext.	100	188.754	179.25
	200	165.110	156.80
Hexane Fr.	100	237.438	225.48
	200	254.210	232.86
Chloroform Fr.	100	230.672	219.06
	200	235.386	223.53
Ethylacetate Fr.	100	201.902	191.73
	200	198.008	188.04
Butanol Fr.	100	136.209	129.35
	200	128.870	122.38
Water Fr.	100	108.003	102.56
	200	110.326	104.77

^a, Sample value/control value

처리하였을 때는 각각 122.38 및 104.77 %까지 회복되었으며 처리농도에 대한

의존성도 나타났다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 간세포의 단백질 합성능력과 마찬가지로 산 발효차의 극성화합물이 간 보호 기능을 할 것으로 추정되었다.

③ 사염화탄소에 의하여 유발된 랫드의 혈액 내 GOT 및 GPT 활성도 측정

본 연구에서는 SD 랫드를 아무런 처치를 하지 않은 대조군과 사염화탄소를 복강 내 주사한 양성대조군 및 각각의 산 발효차 분획물(MeOH, n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 water)을 처리한 그룹으로 구분하여 실험하였으며, 각각의 ethyl alcohol에 녹인 분획물을 10mg/kg 씩을 경구 투여하였으며, 24시간 뒤에 심장에서 채혈하여 GOT 및 GPT를 측정하여 간 기능을 평가하였다(Table 3.3.32).

Table 3.3.32. Effects of AFGT extracts on GOT and GPT in serum of CCl₄-induced hepatitides SD rats

Samples	Sample treatment	Activities(units/L)			
		GOT	Rate(%)	GPT	Rate(%)
Control	-	44.32	-	38.25	-
CCl ₄	0.5 ml/kg	268.43	605.66 ^a	216.14	565.07
MeOH extracts	10 mg/kg	143.09	322.86	165.55	432.81
n-Hexane Fr.		278.38	628.11	280.45	733.20
Chloroform Fr.		290.28	654.96	301.66	788.65
Ethylacetate Fr.		186.47	420.74	143.01	373.88
n-Butanol Fr.		120.96	272.92	92.25	241.18
Water Fr.		90.42	204.02	88.26	230.75

^a, Sample value/control value

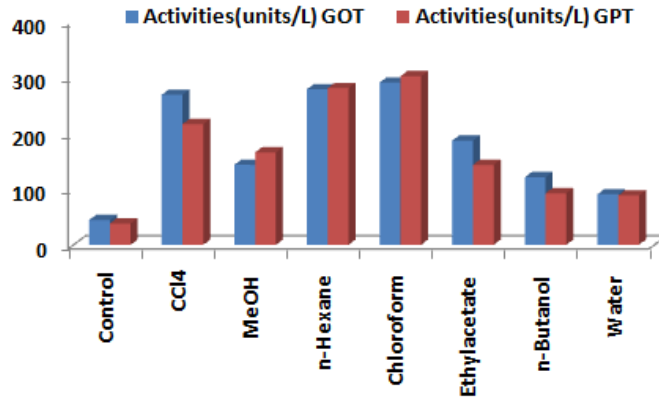


Fig. 3.3.22. Effects of AFGT extracts on GOT and GPT in serum of CCl₄-induced hepatitis SD rats.

Fig. 3.3.22에 나타난 바와 같이 GOT와 GPT는 사염화탄소를 처리하였을 때 각각 대조군의 605.66 및 565.07 %까지 상승하여 매우 심한 간독성을 일으킨 것을 알 수 있었다. 한편 산발효차 분획물중에서 n-hexane과 chloroform 분획은 오히려 GOT 및 GPT의 활성을 증가시켜 간독성을 악화시키는 것으로 나타났으나, 극성이 큰 물질들을 함유하고 있는 water 분획에서는 대조군의 GOT는 204.02 %, GPT는 230.75 %로 회복되어 감을 알 수 있었다.

④ D-galactosamine/LPS에 의하여 간독성이 유발된 랫드의 혈액 내 GOT, GPT 및 γ -GT 활성도 측정

본 연구에서는 SD 랫드를 아무런 처치를 하지 않은 대조군과 D-galactosamine/ LPS를 복강 내 주사한 양성대조군 및 각각의 산 발효차 분획물(MeOH, n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 water)을 처리한 그룹으로 구분하여 실험하였으며, 각각의 ethyl alcohol에 녹인 분획물을 10mg/kg 씩을 경구 투여하였으며, 24시간 뒤에 심장에서 채혈하여 GOT, GPT 및 γ -GT 를 측정하여 간 기능을 평가하였다(Table 3.3.33).

Table 3.3.33. Effects of AFGT extracts on GOT, GPT and γ -GT in serum of D-galactosamine /LPS-induced hepatitides SD rats

Samples	Treat	Activities(units/L)					
		GOT	Rate(%)	GPT	Rate	γ -GT	Rate
Control	–	44.32	–	38.25	–	52.30	–
D-galactosamine /LPS ^a	0.5 ml/kg	298.20	672.83 ^b	265.02	692.86	218.63	418.03
MeOH extracts		182.23	411.17	152.20	397.91	142.04	271.59
n-Hexane Fr.		287.45	648.58	285.50	746.41	188.72	360.84
Chloroform Fr.	10 mg/k	297.88	672.11	241.19	630.56	183.40	350.67
Ethylacetate Fr.	g	221.03	498.71	187.27	489.59	120.06	229.56
n-Butanol Fr.		164.30	370.71	90.06	235.45	92.15	176.20
Water Fr.		67.39	152.05	74.83	195.63	88.44	169.10

^a; lipopolysaccharide, ^b, Sample value/control value

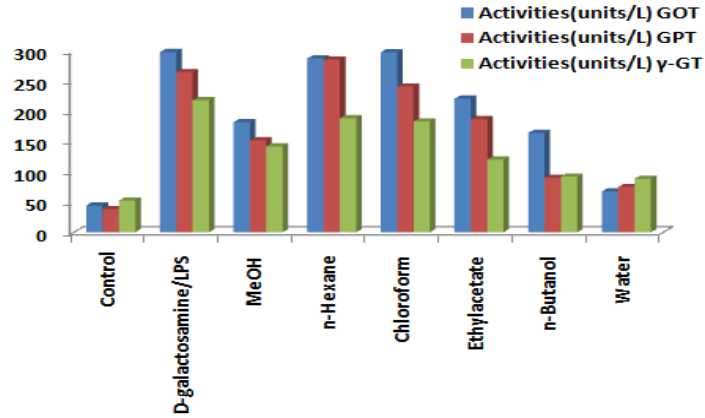


Fig. 3.3.23. Effects of AFGT extracts on GOT, GPT and γ -GT in serum of D-galactosamine /LPS-induced hepatitis SD rats.

Fig. 3.3.23에 나타난 바와 같이 GOT, GPT 및 γ -GT는 D-galactosamine/LPS를 처리하였을 때 각각 대조군의 672.83, 692.86 및 418.03 %까지 상승하여 매우 심한 간독성을 일으킨 것을 알 수 있었다. 한편 산 발효차 분획물중에서 n-hexane과 chloroform 분획은 오히려 GOT, GPT 및 γ -GT의 활성을 증가시켜 간독성을 악화시키는 것으로 나타났으나, 극성이 큰 물질들을 함유하고 있는 water 분획에서는 대조군의 GOT는 152.02 %, GPT는 195.63 %, γ -GT는 169.10 %로 회복되어 감을 알 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전예의 기여도
야생차를 이용한 「미생물 발효차」의 최적화 공정 확립	<p>-야생차를 발효기질로 한 “버섯균사체 발효차”와 “산(酸) 발효차”의 최적화 발효조건 확립하였음.</p> <p>- 발효 미생물차의 품질평가와 저장성 및 제품화에 대한 농가 적합형 기본공정을 확립함.</p>	<p>국내 소규모 제다공장의 녹차 및 그 관련제품 생산 중심에서 발효차와 연관이 되는 미생물 발효차의 상품화를 위한 제반 발효조건을 활용할 수 있도록 기술개발함.</p>
야생차와 그 미생물 발효차를 이용한 「기능성 간편식품」의 상품화	<p>-야생차를 이용한 “녹차 김밥과 면류” 간편식품의 개발하였음.</p> <p>-버섯균사체 및 산발효차를 이용한 “양갱과 죽류”, “마요네즈야채 발효차 소스 / 마늘야채 녹차소스와 음료류” 간편식품의 개발하였음.</p>	<p>국내 음료소비의 중심에 있는 녹차와 그 관련 숙성차로부터 미생물 발효차를 이용한 다소비 간편식품류 개발에 대한 제조기술에 기여함.</p>
야생차와 미생물발효차의 「기능성 신물질」 분리 및 생리활성 검색	<p>-야생차로부터 카테킨 및 그 관련 분리물질들의 “항균 및 항염증” 활성을 조사하였고,</p> <p>-야생차와 버섯균사체 발효차로부터 분리물질의 “항암, 항돌연변이”활성을 조사하였음.</p> <p>-야생차와 산(酸) 발효차로부터 분리물질의 “항치매 및 간기능 보호” 활성을 검색함.</p>	<p>야생차와 버섯균사체와 산발효차의 미생물 발효차에 대한 주요 생리활성의 분석 및 평가결과를 토대로 이들 발효차 주요 성분소재들의 활용도를 증진시키는 데 기여함.</p>

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발 효과

1. 기술적 측면

- 자연발효의 문제점을 해소할 수 있는 미생물 발효차의 제조 및 대량생산을 위한 최적화 공정 확립
- 발효차의 식품학적 분석 및 다양한 생리활성의 입증 효과
- 5월 이후 값싼 차잎을 이용한 고부가가치 상품개발로 기반기술 확보
- 기능성 발효 다류식품 및 다류음료 개발에 활용가능
- 장기간 섭취에 의한 만성질환의 예방 효과 및 간편식품으로 활용가능

2. 경제·산업적 측면

- 소규모로 운영되는 영세 유기농 야생차 생산자들의 농가소득증대
- 다류산업에서 건강기능식품 벤처로 창업을 하여 고부가가치 상품생산
- 각 개발제품에 대한 제조기술의 국내 및 국제특허를 출원할 수 있음
- 패스트푸드 및 음료기업과 연계하여 외식산업에서 웰빙이미지 제고
- 5월 이후에 값싼 차잎을 이용한 고부가가치 녹차 상품의 개발 가능

제 2 절 연구개발 활용계획

1. 농가 보급형으로 과잉 출하되는 녹차를 이용한 미생물 발효차 제조공정을 기술을 지리산 권역 제다공장(신광수 명인차, 영봉다원 등 5곳) 및 웰빙 토종식품(효자식품, 유진식품 등 4곳) 제조업체에 기술이전.
2. 최근 웰빙문화의 급속한 확산으로 녹차류를 활용한 간편식품에 응용할 수 있음. 청소년이나 신세대 젊은 층을 대상으로 녹차 기호에 거부감이 있는 소비자들에게 필요한 다류제품 개발에 유용함.
3. 녹차관련 기술 전문인들의 학문발전과 친환경 전문인력 양성에 활용.
4. 다른 미이용 자원이나 유기농 유용자원을 활용한 고품질 발효차를 개발하는데 기본기술로 활용가능.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- ① 녹차를 활용한 야생 효모와 유산균 등으로 발효시킨 콤부차(Kombucha)에 대한 다수의 문헌을 입수하여 본 연구수행에 참고가 되었음.
- ② 녹차류 및 발효차의 자연발효 우점종 균주에 대한 문헌정보를 수집하여 차후 농가 보급활용에서 참고할 니용들이 있었음.

제 7 장 참고문헌

Anthony, M. S., Burke, G. L., C. L. Jr and Clarkson, T. B. 1995, Does soy improve coronary heart disease risk. *Circulation*. 91, 925-934.

Chan, P.C. and Bielski, B.H.J., 1974, Enzyme catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotide. *J. Biol. Chem.* 249(4):1317~1319.

Cho Hong-Suk, Seung Kim, Sook-Young Lee, Jeong Ae Park, Sung-Jun Kim, Hong Sung Chun, 2008, Protective effect of the green tea component, L-theanine on environmental toxins-induced neuronal cell death, *Neuro Toxicology*, In Press

Choi, J.H. and Yu, B.P., 1989, The effect of food restriction on kidney membrane structures of aging rats. *AGE* 12:133~136.

Choi, J.H. and Yu, B.P., 1990, Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *AGE* 13:61~64.

Choi, J.H. and Yu, B.P., 1991, The role of prostaglandins in the aging process.

Korean J. Gerontol. 1(1): 28~34, 1991.

Crystal F. Haskell, David O. Kennedy, Anthea L. Milne, Keith A. Wesnes, Andrew B. Scholey, 2008, The effects of l-theanine, caffeine and their combination on cognition and mood, *Biological Psychology*, 77(2): 113–122

David Sadava, Elizabeth Whitlock, Susan E. Kane, 2007, The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate inhibits telomerase and induces apoptosis in drug-resistant lung cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(1): 233–237

Galgani, F., Bocquene, G. and Cadiou, Y., 1992, Evidence of variation of cholinesterase activity in fishes along a pollution gradient in the north sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 19:1~6.

Gerry P. Schamberger, Theodore P. Labuza, 2007, Effect of green tea flavonoids on Maillard browning in UHT milk LWT, *Food Science and Technology*, 40(8): 1410–1417

Grote, S.S., Moses, S.G., Robins, E., Hudgens, R.W. and Croniger, A.B., 1974, A study of selected catecholamine metabolizing enzymes; A comparison of depressive suicides and alcoholic suicides with controls. *J. Neurochem.*, 23:791~802.

Harman, D. 1956, Aging : A theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.* 11:298~300.

Hsieh Ming-Mu, Sheng-Min Chen, 2007, Determination of amino acids in tea leaves and beverages using capillary electrophoresis with light-emitting

diode-induced fluorescence detection, *Talanta*, 73(2): 326–331

Hwang, K.H. and Song, I. 2003, The inhibitory activity on monoamine oxidase of the fruit of *Morus alba*, *Korean J. Pharmacogn.* 34(2):185~189.

Joshua D. Lambert, Joseph E. Rice, Jungil Hong, Zhe Hou, Chung S. Yang, 2005 Synthesis and biological activity of the tea catechin metabolites, M4 and M6 and their methoxy-derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(4): 873–876

Jun Xu, Jue Wang, Fei Deng, Zhihong Hu, Hualin Wang, 2008, Green tea extract and its major component epigallocatechin gallate inhibits hepatitis B virus *in vitro*, *Antiviral Research*, 78(3): 242–249

Kalaria, R.N., Mitchell, M.J. and Harik, S.I. 1987, Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:3521~3525.

Kamilla Kelemen, Claudia Kiesecker, Edgar Zitron, Alexander Bauer, Eberhard Scholz, Ramona Bloehs, Dierk Thomas, Johannes Greten, Andrew Remppis, Wolfgang Schoels, Hugo A. Katus, Christoph A. Karle, 2007, Green tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits cardiac hERG potassium channels *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364(3): 429–435

Kenneth I. Strauss, 2008, Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain, *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(3): 285–298

Lee Yee-Lean, Thomas Cesario, Yang Wang, Edward Shanbrom, Lauri Thrupp,

2003, Antibacterial activity of vegetables and juices, *Nutrition*, 19(11–12) : 994–996

Lihu Yao, Xu Liu, Yueming Jiang, Nola Caffin, Bruce D'Arcy, Riantong Singanusong, Nivedita Datta, Ying Xu, 2006, Compositional analysis of teas from Australian supermarkets, *Food Chemistry*, 94(1) : 115–122

McCord, J.M. and Fridovch, I. 1969, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte(hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244(22):6049~6055.

Noda, Y., McGeer, P.L., and McGeer, E. G. 1982, Lipid peroxides in brain during aging and vitamin E deficiency: Possible relations to change in neurotransmitter indices. *Neurobiol. Aging*, 3:173~178.

Pilar Almajano M., Rosa Carbó, J. Angel López Jiménez, Michael H. Gordon, 2008, Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions, *Food Chemistry*, 108(1): 55–63

Quansheng Chen, Jiewen Zhao, Muhua Liu, Jianrong Cai, Jianhua Liu, 2008, Determination of total polyphenols content in green tea using FT–NIR spectroscopy and different PLS algorithms, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(3): 568–573

Rajesh L. Thangapazham, Anoop K. Singh, Anuj Sharma, James Warren, Jaya P. Gaddipati, Radha K. Maheshwari, 2007, Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo, *Cancer Letters*, 245(1–2): 232–241

- Senji Sakanaka, Lekh Raj Juneja, Makoto Taniguchi, 2000, Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(1): 81-85
- Huh Seung Won, Su Mi Bae, Yong-Wan Kim, Joon Mo Lee, Sung Eun Namkoong, Insu P. Lee, Sang Hee Kim, Chong Kook Kim, Woong Shick Ahn, 2004, Anticancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on ovarian carcinoma cell lines, *Gynecologic Oncology*, 94(3): 760-768
- Shaoping Nie, Mingyong Xie, Zhihong Fu, Yiqun Wan, Aiping Yan, 2008, Study on the purification and chemical compositions of tea glycoprotein, *Carbohydrate Polymers*, 71(4): 626-633
- Susana Coimbra, Elisabeth Castro, Petronila Rocha-Pereira, Irene Rebelo, Susana Rocha, Alice Santos-Silva, 2006, The effect of green tea in oxidative stress, *Clinical Nutrition*, 25(5): 790-796
- Xiaogang Wang, Xiaochun Wan, Shuxia Hu, Caiyuan Pan, 2008, Study on the increase mechanism of the caffeine content during the fermentation of tea with microorganisms, *Food Chemistry*, 107(3): 1086-1091
- Yu, B.P, and Yang, R. 1996, Critical evaluation of free radical theory of aging: A proposal of oxidative stress hypothesis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 768: 1~11.
- Yu, B.P. 1996, Aging and oxidative stress : Modulation by dietary restriction, *Free Rad. Biol. Med.* 21:651~668.
- 고영수, 이인숙, 1985, HPLC에 의한 증제와 볶음 녹차 중의 유리 아미노산과 유리당

- 의 정량, 한국영양식량학회지, 14(3): 301 ~ 304.
- 김용관, 1995, 국내외산 녹차 추출액의 항균 작용, 한국환경위생학회지, 21(1):권 39 ~ 46
- 박홍주, 김대익, 이성현, 이영민, 정현진, 조수목, 전해경, Hyun S. Lillehoj., 2005, 채취 시기 및 부위가 다른 표고버섯의 급여가 당뇨 마우스 뇌조직의 신경전달물질 및 지질과산화물 수준에 미치는 영향, 한국식품영양과학회지, 34(8): 1182 ~ 1187
- 송현순, 이현걸, 강명희, 1999, Salmonella typhimurium Strain TA98, 100에서 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물의 돌연변이 억제효과, 한국식품영양과학회지, 28(3): 599 ~ 606
- 오중학, 김은희, 김정례, 문영인, 강영희, 강정숙., 2004, DPPH 방법을 통한 녹차의 산화 활성화에 대한 연구, 한국식품영양과학회지, 33(7): 1079 ~ 1084
- 윤여표 · 박종범 · 허문영, 2001, 녹차카테킨과 에피갈로카테킨갈레이트의 산화적 스트레스에 대한 억제효과, 약학회지, 45(1): 101 ~ 107
- 이성현, 김대익, 조소영, 정현진, 조수목, 박홍주, Hyun S. Lillehoj, 2005, 도토리 급여가 치매모델 마우스 뇌조직의 아세틸콜린 및 관련효소 활성화에 미치는 영향, 한국식품영양과학회지, 34(5): 738 ~ 742
- 이정희, 이용문, 문동철, 1992, 녹차 중 카테킨류의 신속 분리 및 동정법, 분석과학, 5(3): 333 ~ 338.
- 이지현 외 5명, 2002, 녹차 (-)Epigallocatechin-gallate에 의한 전립선암 세포주 DU145 세포고사 기전, Journal of Toxicology and Public Health, 18(2): 183 ~ 190

정희정 · 유영상, 1996, 녹차가 흰쥐의 혈청 및 간의 지질성분과 항산화계 효소 활성도에 미치는 영향, 동아시아식생활학회지, 6(1): 41 ~ 49

홍기형, 김병용, 김혜경, 2004, 아위버섯(*Pleurotus ferulea*) 추출물의 생리활성 탐색, 한국식품영양과학회지, 33(5): 791 ~ 796

홍은정, 김우경,, 2007, Epigallocatechin Gallate가 인체 유방암 세포인 MDA-MB-231의 세포증식억제에 미치는 영향, 한국식품영양과학회지, 36(8): 983 ~ 988

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.