

혐기처리공법을 이용한 Phytochemical 축적  
기술 개발 및 이를 이용한 건강보조식품의  
산업화

Development of anaerobic process for accumulation of  
phytochemicals and its application on functional food  
development

2004. 10.

연 구 기 관  
한국식품개발연구원

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “협기처리공법을 이용한 Phytochemical 축적 기술 개발 및 이를 이용한 건강보조식품의 산업화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 10월 14일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 박 용 곤

연 구 원 : 최 인 옥

연 구 원 : 류 미 라

연 구 원 : 최 희 돈

연 구 원 : 석 호 문

연 구 원 : 박 미 원

연 구 원 : 김 윤 숙

연 구 원 : 장 윤 정

연 구 원 : 성 규 병

협동연구기관명 : 경 희 대 학 교

협동연구책임자 : 김 선 녀

연 구 원 : 하 상 근

연 구 원 : 이 군 호

# 요 약 문

## I. 제목

협기처리공법을 이용한 Phytochemical 축적 기술 개발 및 이를 이용한 건강보조식품의 산업화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

식물체의 협기적 처리에 따른 고농도의 GABA 축적은 원료 종류, 전처리 방법 및 협기처리전 원료내 글루타민산의 함량, 처리 온도와 시간 등 반응조건에 따라 각기 달라 GABA함량이 높은 원료의 선발과 고농도 GABA축적을 위한 최적 반응조건 설정을 위한 과학적이고 체계적인 연구가 필요하다. 식물 원료 중 GABA의 함량이 높은 녹차와 비교할 때 약 10배 높은 GABA를 함유하는 것으로 알려진 뽕잎을 원료로 선발하여 협기적 처리공법에 의해 고농도 GABA 축적 기술을 개발함과 동시에 GABA축적 원료의 혈압강하 및 신경성장 촉진인자에 미치는 효과를 검증하여 GABA축적 원료를 활용한 고혈압 및 퇴행성 신경질환 예방용 건강보조식품을 개발, 산업화하고자 한다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

### 1. 뽕잎의 협기처리 공법 개발

- 가스종류, 반응온도, 시간별 뽕잎의 GABA 함량 분석
- 글루타민산 농도, 반응온도, 시간 및 반응액 pH별 뽕잎 페이스트의 GABA 함량 분석
- GABA 축적 뽕잎의 phytochemical 함량 분석, 비교

### 2. GABA 축적 뽕잎의 혈압강하 효능 검증

- 고농도 GABA함유 용매추출물의 제조
- 추출물의 ACE 저해효과 검색

- 추출물의 혈관이완 효과 검색
- 실험동물을 이용한 혈압강하 효능 검증

### 3. GABA측적 뿌잎의 퇴행성 신경질환보호 효과 검증

- 세포주를 이용한 신경축색돌기 outgrowth에 미치는 효과
- 신경독성물질에 의해 유도되는 신경세포사의 억제 효과
- Oxygen-glucose deprivation 조건하에서의 신경세포보호 효과
- 뇌교세포주에서의 nitric oxide 생성 억제 효과
- 뇌허혈 동물모델에서의 신장보호 효과
- Scopolamine 유발 뇌손상에 대한 인지기능 개선 효과

### 4. GABA 측적 뿌잎을 이용한 대중성 있는 제품 개발

- 분산성, 용해성이 우수한 수용성분말 제조
- 청량음료 개발
- 향미개선 차류 제품
- 선식 제품
- 엑기스(농축물)형 제품

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 뿌잎의 혐기처리 공법 개발

신속하고 정확한 뿌잎의 GABA측정법을 개발하기 위하여 기존의 비색법을 수정한 방법과 HPLC에 의한 GABA 측정법과 비교한 결과, 비색법에 의하여 뿌잎의 GABA를 측정하였을 때, 재현성과 회수율이 HPLC방법과 거의 유사하고 오히려 HPLC법에 비해 경제적이며 신속하여 향후 GABA측정을 위하여 비색법을 전 실험에 적용하기로 하였다. 뿌잎의 GABA 측적을 위한 혐기처리 공정은 신선뿌잎을 적당한 크기로 세절하고 초퍼를 이용하여 초핑한 다음 중량대비 2배의 1% glutamic acid 용액과 함께 콜로이드밀을 이용하여 페이스트화시켰다. 20% 구연산 용액을 이용하여 뿌잎 페이스트의 pH를 5.5로 조정하고 적당한 용기 또는 비닐에 넣고 CO<sub>2</sub>를 충전, 밀봉하여 30℃에서 흔들며 주면서 3시간 반응을 시켰다. 반응이 완료된 것을 85℃정도로 열처리

하고 동결 또는 열풍건조한 다음 분쇄하여 GABA 축적 분말을 제조하였다.

## 2. GABA 축적 뿌잎의 혈압강하 효능 검증

GABA 축적뿌잎의 농도를 달리한 실험식으로 자연발증고혈압쥐(SHR)를 6주간 사육하면서 혈압강하효능을 비교한 결과 뿌잎첨가식을 급여한 사료는 SHR의 혈압상승을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났으나 뿌잎의 GABA축적유무와 뿌잎의 첨가 농도에 따른 혈압상승억제효과는 처리구간 차이가 없는 것으로 나타났다. 뿌잎추출물은 내피가 보존된 혈관에 대해 평활근의존적 이완작용이 나타났으며 메탄올추출물이 가장 큰 것으로 나타났다. 뿌잎 용매추출물 중 열수추출물에서는 내피세포 의존적 순간이완작용이 동시에 나타났으며, 이 작용은 험기처리한 시료가 대조구보다 큰 경향이었다. 뿌잎 열수추출물의 순간혈관이완작용은 L-NNA, methylene blue, atropin 전처리로 대부분 소멸되는 것으로 나타나 이 작용이 혈관내피에서 분비되는 NO에 의한 것임을 확인하였다. 특히, 험기처리한 뿌잎 물추출물의 경우 농도 1.0, 0.3, 0.1 mg/mL에서 각각 높은 활성(100, 86.3±1.5, 72.3±1%)을 나타냈으나 생 뿌잎 물추출물은 농도 1.0 mg/mL에서만 그 활성을 나타내었다.

## 3. GABA축적 뿌잎의 퇴행성 신경질환보호 효과 검증

GABA 축적 뿌잎의 신경보호 효능을 비교하기 위하여 실험동물을 이용한 퇴행성 신경질환 보호 효과에 미치는 효과를 검색하였다. 그 결과 oxygen-glucose deprivation(OGD)에 의하여 유발된 뇌허혈모델에서의 GABA 축적 뿌잎추출물은 일반 뿌잎에 비하여 우수한 세포생존율을 증가시켰고 고농도 처리시에는 거의 정상 대조군 수준으로 세포손상을 회복시켰다. 또한 중대동맥봉합(MCAO) 뇌허혈 모델에서도 역시 같은 경향을 나타내었다. 그러나 scopolamine독성에 의한 인지기능 개선 효과는 GABA 축적 뿌잎과 일반 뿌잎간의 큰 차이가 없었고 그 효과도 거의 나타나지 않았다.

## 4. GABA 축적 뿌잎을 이용한 대중성 있는 제품 개발

1% Glutamic acid를 이용하여 험기처리 후 열풍건조한 뿌잎분말을 이용하여 고농도의 GABA를 함유하며 냉수에서의 분산성, 용해성이 우수하고 최종제품의 물성에는 영향을 미치지 않는 식품가공용 중간소재로 활용할 수 있는 냉수가용성 분말을 제조하였다. 수용성 분말의 경우 GABA 함량이 시료에 비해 2.7배 상승하였고 무기질 중

마그네슘은 2배, 칼륨은 3배 증가하는 것으로 나타났으며 특히 나트륨은 55배 상승하였다. 냉수가용성 분말은 물에서 95%의 용해도를 보였고 분말에 함유된 GABA는 100℃, 2시간의 열처리와 pH 2~10의 범위에서는 안정한 것으로 나타났다.

GABA를 축적시킨 뽕잎분말을 이용한 청량음료는 분말을 160℃에서 5분간 볶음처리하고 중량대비 200배의 정제수를 가하여 60℃에서 1시간 추출, 여과하여 얻은 추출액을 음료용 추출액으로 사용하였다. 설탕 2.9%, 고과당 6.0%, 구연산 0.025%, 비타민 C 0.02%에 뽕잎 추출액을 가하여 혼합, 용해시킨 다음 향료(No. 3307) 0.2%, 씩향 0.01%를 첨가, 혼합, 여과한 것을 살균, 냉각하여 제조하였다.

뽕잎 침출차는 분말을 160℃에서 5분간 볶음처리한 다음 1.0%의 분말형 국화향을 첨가, 혼합한 것을 tea bag 당 0.8g씩 포장하여 제조하였다. 뽕잎/현미 혼합침출차는 볶음처리한 분말에 국화향과 셀러리향을 각각 2, 1%씩 첨가, 혼합시킨 것에 볶음처리한 분쇄현미를 4:6으로 혼합한 다음 tea bag 당 0.8 g씩 포장하였다.

선식제품은 ball mill을 이용, 미분말화시킨 GABA 축적 분말 16%에 동결건조한 양배추, 무청, 미나리, 신선초분말 4, 4, 4, 5.6%와 다시마가루 2.4%, 포도당 12%, 식물성 프림 22.4%, 소금 1.6%, 찹옥수수알파전분 8%, 혼합과일분말 20%를 혼합한 것을 과립화하였다.

액기스형 당절임물은 생 뽕잎 상태로 헹기처리한 원료와 신선 채소혼합물(신선초, 브로콜리, 양배추, 당귀잎, 파슬리, 셀러리, 케일 및 썩가루, 다시마가루) 및 76 brix 당액(설탕 : 팔라티노스 : 물 = 60 : 20 : 20, v/v)을 사용하였다. 뽕잎, 채소혼합물, 당액을 16.7, 16.7, 66.7%의 비율로 혼합한 다음 포장하여 10℃에서 5주정도 숙성시킨 다음 압착하여 당절임물을 제조하였다. 당절임물은 흐름성 개선을 위해 고속균질기로 처리한 다음 용기에 충전하고 85℃에서 20분간 저온살균하였다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of Anaerobic Process for Inducing Phytochemical Accumulation in Mulberry Leaves and Its Application on Nutraceutical Food Development

## II. Objectives and Significance

Degree of accumulation of GABA, which was occurred in plants by anaerobic treatments, varies not only by treatment conditions but also other factors such as differences in plant resources, types of pre-treatment and concentrations of innate glutamine in plants. There should be systematic and scientific research needed in developing an optimum GABA accumulating technology when those various factors are considered. Mulberry leaves are known to contain more than 10 times as much GABA as in green tea leaves. Therefore, this project focused on developing an effective GABA accumulating technology applied to mulberry leaves and investigating antihypertensive and neuroprotective activities of GABA accumulated mulberry leaves. The objective of this project was further extended to develop GABA accumulated mulberry leaves as a half-processed material for processing various nutraceutical foods.

## III. Scope

### 1. Developing the most effective anaerobic treatment for accumulation of GABA in mulberry leaves

- Types of gas, reaction temperature and time, and GABA contents in mulberry leaves
- Concentrations of glutamine and GABA in pastes of mulberry leaves that were treated at different pHs
- Concentrations of phytochemicals in GABA accumulated mulberry leaves

## **2. Antihypertensive activity of GABA accumulated mulberry leaves**

- Production of solvent extracts of high GABA contents
- ACE inhibiting activities of the extracts
- Vasorelaxant activities of the extracts
- Antihypertensive activities of the extracts(animal experiment)

## **3. Neuroprotective effects of GABA accumulated mulberry leaves on anaplastic disease**

- Effect on neurite outgrowth of neuronal cells
- Inhibitory effect on a neurotoxin induced neuronal cell death
- Neuroprotective activity against oxygen-glucose deprivation injury
- Inhibitory effect on nitric oxide production of microglia cells.
- Neuroprotective effect in an ischemic animal model.
- Protective effect against scopolamine induced neuronal damage

## **4. Development of commercially available food products from GABA accumulated mulberry leaves**

- Highly water soluble and dispersible powder product
- Soft drinks
- Tea products
- Sunsik products
- Extracts(Concentrates)

## **IV. Major Results and Conclusion**

### **1. Developing the optimal anaerobic process for accumulating GABA in mulberry leaves**

It was prerequisite in this project to develop a precise and rapid GABA determining method. When colorimetric method for GABA determination was modified and compared with GABA analysis on HPLC, both recovery and repeatability were considered to meet minimum requirements. Therefore, colorimetric method was applied to determination of GABA in mulberry leaves



through the whole study. To develop an effective anaerobic treatment for accumulating GABA in mulberry leaves, fresh mulberry leaves were sliced into an adequate size, chopped and, with an help of a colloid mill, pasted after adding two volumes of 1% glutamic acid. The pH of the paste was adjusted to 5.5 by adding 20% citric acid, and it was packed in a vinyl pack, filled up with CO<sub>2</sub> and sealed. The packed product was incubated at 30°C for 3 hr in a shaking incubator. As soon as the incubation was completed, it was heated at 85°C and freeze dried for producing a GABA accumulated mulberry leaf powder.

## **2. Investigating antihypertensive activities of GABA accumulated mulberry leaves**

Mulberry leaf extracts showed vasorelaxation activities in endothelium-intact rat thoracic aorta and, among the extracts, methanol extract had the strongest relaxant activity. The water-reflux extract of mulberry leaves exhibited endothelium-dependent phasic-relaxation and long-term relaxation at the same time. Generally, anaerobically treated mulberry leaves showed higher in these activities than untreated ones. The relaxant effect was significantly inhibited when it was treated with nitric oxide(NO) synthase inhibitor, L<sup>G</sup>-nitro-arginine(L-NNA), soluble guanylate cyclase inhibitor, methylene blue and muscarinic receptor antagonist, atropin. These findings indicated that water-reflux extract of mulberry leaves effectively stimulate the formation of NO in the endothelial cells, which accounts for the endothelium-dependent relaxation and production of cGMP in the rat aorta. Especially, water-reflux extract of mulberry leaves that were anaerobically treated exhibited higher relaxation activities than the water-reflux extract of fresh mulberry leaves showing 100, 86.3±1.5, and 72.3±1% reduction at 1.0, 0.3, and 0.1 mg/ml, respectively. In the case of the water-reflux extract of fresh mulberry leaves, however, relaxation activities were observed at only above 1.0 mg/ml(40±10%). When antihypertensive activities of GABA accumulated leaves were determined through animal experiment by feeding different amounts of GABA accumulated leaves to SHR for 6wks, there were significant antihypertensive effects on SHR of GABA accumulated mulberry leaves fed groups

even though no significant difference between fresh and GABA accumulated mulberry leaves fed groups.

### **3. Neuroprotective effects of GABA accumulated mulberry leaves on anaplastic disease**

To the measurement of neuroprotective effects of GABA accumulated mulberry leaves, *in vivo* studies were used. As the results, GABA accumulated mulberry leaves showed higher cytoprotective activity than normal mulberry leaves in oxygen-glucose deprivation induced neuronal injury. As the sample was treated with higher concentration, the protective effect was getting reached at almost 100%. Moreover, GABA accumulated mulberry leaves also exhibited potent neuroprotection in MCAo ischemic animal model. However, improvement of recognition was not significantly different between GABA accumulated mulberry leaves treated group and normal mulberry leaves treated group

### **4. Development of nutraceutical food from GABA accumulated mulberry leaves**

A powder of GABA accumulated mulberry leaves, as a half-processed food material, was prepared by soaking fresh mulberry leaves with glutamic acids followed by anaerobic treatment and air-drying process. The produced powder was highly soluble and dispersive in a cold water. This water-soluble powder contained GABA 2.7 times higher than fresh mulberry leaves. It was abundant in minerals having twice, three and even fifty five times as much magnesium, potassium and sodium than fresh mulberry leaves, respectively. GABA in this powder was stable at heating at 100°C for 2 hr and under an extreme pH shift from 2 to 10.

The GABA fortified beverage was processed after roasting GABA accumulated powder at 160. C for 5min followed by addition of distilled water with 200 times the volumes of the powder, extraction at 60°C for 1hr and filtration. To this extract, 2.9% of sugar, 6.0% of fructose syrup, 0.025% citrate and 0.002% of vitamin C were added and mixed thoroughly. Other ingredients such as 0.2%

seasoning(No. 3307) and 0.01% mugwort flavor were finally added to the mixture, and pasteurized, filtered and cooled.

Mulberry leaf tea was produced by roasting mulberry powder at 160°C for 5min, adding powdered chrys anthmum flavor and packaging 0.8g each in a tea bag. For processing of mulberry leaf & brown rice extract, chrys anthmum flavor, cereley flavor and roasted brown rice powder were added to roasted mulberry leaf powder, and packaged 0.8g each into a tea bag.

Sunsik product was produced by milling and granulating the mixture that was previously prepared by mixing 16% of GABA accumulated fine powder, 4% of freeze dried cabbage, 4% of radish leaf, 4% of dropwort and 5.6% of sinsuncho powder, 2.4% of sea tangle powder, 12% of glucose, 22.4% of non-dairy cream, 1.6% of salt, 8% of alpha-corn starch and 20% of fruit mix powder.

The product of sugar-brined mulberry leaf was processed by mixing anaerobically treated mulberry leaf with fresh vegetable mix and sugar brine soln.(76. Brix, sugar: palatinose: water = 60: 20: 20, v/v) with 16.7: 16.7: 66.7 (w/w/w) ratio. This mixture was, then, packed, fermented for 5wks at 10°C and pressed to produce a sugar-brined product. Sugar-brined product was homogenized to improve texture of the product, packaged and sterilized at 85°C for 20min.

# Contents

Chapter 1. Summary.....	
I. Objectives and Significance	
II. Contents and Scope	
Chapter 2. Current Status of Domestic and Foreign Technologies	
I. Related Research Performed by Other Research Groups.....	
II. Issues of Difficulty in Available Technology	
Chapter III. Experimental Methods and Results.....	
I. Development of Anaerobic Process for Accumulation of GABA in Mulberry Leaf .....	
1. Materials .....	
2. Methods .....	
A. Anaerobic treatment on fresh mulberry leaves....	
(1) Effect of packaging.....	
(2) Effect of shapes.....	
(3) Effect of withering.....	
(4) Effect of repeated anaerobic and aerobic treatments	
B. Anaerobic treatment on mulberry leaves with glutamic acid addition.....	
(1) Anaerobic treatment on sliced mulberry leaves.....	
(2) Anaerobic treatment on pasted mulberry leaves.....	
C. Physicochemical properties of anaerobically treated mulberry leaves.....	
(1) Comparison on methods of GABA determination....	
(2) Polyphenol compounds.....	
(3) Total flavonoids.....	

- (4) Phytoestrogen.....
- (5) Proximate components.....
- (6) Minerals .....
- 3. Results and discussion.....
  - A. Comparison on methods of GABA determination.....
    - (1) Effect of activated carbon treatment.....
    - (2) Comparison between colorimetric analysis and HPLC analysis on GABA determination.....
  - B. Application of anaerobic treatment for GABA accumulation .....
  - (1) Effect of packaging .....
  - (2) Effect of shapes of mulberry leaves.....
  - (3) Effect of withering.....
  - (4) Effect of repeated aerobic and anaerobic treatments.
  - C. Anaerobic treatment on mulberry leaves with glutamic acid addition.....
    - (1) Anaerobic treatment on sliced mulberry leaves.....
    - (2) Anaerobic treatment on pasted mulberry leaves.....
  - D. Layout and procedural properties of anaerobic process of GABA accumulated mulberry leaves.....
  - E. Component analysis on GABA accumulated mulberry leaves.

## **II. Antihypertensive Effect of GABA Accumulated Mulberry Leaves.....**

- 1. Materials.....
- 2. Methods .....
- A. Preparing extracts.....
- B. ACE inhibiting activities.....
- C. Vasorelaxant effect.....

D Effect of crude extracts on blood pressure of SHR.....

- 1) Animals and Diet ....
- 2) Diet intake, Body weight gain, and Feeding efficiency ratio(FER).....
- 3) Measurement of blood pressure.....
- 4) Statistics.....

3. Results and discussion.....

- A. Yield and contents of extracts.....
- B. ACE inhibiting activities of extracts.....
- C. Vasorelaxant activities of extracts.....
  - 1) Vasorelaxant activities of extracts.....
  - 2) Endothelium-dependent relaxation and mechanism of extracts.....
  - 3) Endothelium-dependent vasorelaxation mechanism of water-reflux extract.....
- D. Animal experiments for antihypertensive activities of GABA accumulated mulberry leaves.....

**III. Neuroprotective Effects of GABA Accumulated Mulberry Leaves.....**

1. Materials and methods .....
  - A. Preparing extracts
  - B. Effect on neurite outgrowth in PC12 cells.....
  - C. Cytoprotective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced neuronal cell death.....
  - D. Neuroprotective effect on oxygen-glucose deprivation damage.....
  - E. Inhibitory effect on nitric oxide production in BV-2 cells.....
  - F. Neuroprotective effect in MCAo ischemic animal model..
    - 1) Animal.....
    - 2) Method of surgery
    - 3) Sample injection
    - 4) Staining of brain slice

- G. Behavior test for measurement of neuroprotective effect against scopolamine induced neuronal damage.....

#### IV. Development of Nutraceutical Foods of GABA Accumulated Mulberry Leaves.....

- 1. Materials and Methods.....
  - A. Production of cold water-soluble powder
    - 1) Preparing extracts.....
    - 2) Properties of water-soluble powder.....
      - a. Recovery.....
      - b. Proximate composition.....
      - c. Contents of GABA.....
      - d. Minerals.....
      - e. Total flavonoids .....
      - f. Polyphenols.....
    - 3) Properties of water extract.....
      - a. Color.....
      - b. Transparency.....
      - c. Solubility.....
    - 4) Stability of water-soluble powder.....
      - a. Heat stability .....
      - b. pH stability.....
  - B. Development of soft drinks
    - 1) Investigating properties of commercial tea products.....
    - 2) Preparing extracts for drinks and establishing roasting process of mulberry leaves.....
    - 3) Production of drinks and improvement in their palatability
      - a. Production of drinks
      - b. Improving palatability of drinks
    - 4) Quality changes during storage of drinks.....
    - 5) Physicochemical properties of extracts and drinks.
      - a. Soluble solid
      - b. Total carbohydrate.....
      - c. Reducing sugars.....
      - d. pH.....

- e. Transparency
  - f. Color.....
  - g. Sensory analysis.....
- C Tea-bag type products.....
  - 1) Tea-bag type products of GABA accumulated mulberry leaves.....
  - 2) Blended tea products of GABA accumulated mulberry leaves and brown rice.....
  - 3) Qualitative changes during storage.....
- D. Powdered sunsik products.....
  - 1) Materials.....
  - 2) Sunsik products.....
  - 3) Qualitative changes during storage.....
- E. Sugar-brined products.....
  - 1) Materials.....
  - 2) Preparing brine solution and sugar-brined products.....
  - 3) Improving rheological properties.....
  - 4) Qualitative changes during storage.....
- F. Physicochemical properties of sugar-brined products
  - 1) Yields.....
  - 2) Brix.....
  - 3) pH.....
  - 4) Color
  - 5) Microbial properties.....
  - 6) Sensoric quality.....
- 2. Results and discussion
  - A. Cold water-soluble powdered products.....
  - B. Soft drinks.....
    - 1) Investigating properties of commercial tea products.....
    - 2) Preparing extracts



3) Preparing roasted mulberry leaves and investigating their physicochemical properties .....	
4) Processing soft drinks .....	
5) Qualitative changes during storage .....	
C. Tea-bag type products	
1) Tea-bag type products of GABA accumulated mulberry leaves .....	
2) Blended tea products of GABA accumulated mulberry leaves and brown rice .....	
3) Qualitative changes during storage .....	
D. Powdered sunsik products .....	
1) Preparing powdered sunsik products .....	
2) Granulating powdered sunsik products .....	
3) Qualitative changes during storage .....	
E. Sugar-brined products .....	
1) Preparing brine solution .....	
2) Processing sugar-brined products .....	
3) Qualitative properties of aged sugar-brined products .....	
4) Improving rheological properties and sterilization .....	
5) Qualitative changes during storage	
<b>Chapter 4. Achievements and Contributions to Related Technologies .....</b>	
A. Achievements .....	
B. Contribution .....	
<b>Chapter 5. Application of the Results</b>	
<b>Chapter 6. Scientific Information on Current Technology .....</b>	
<b>Chapter 7. References</b>	

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	
제 1 절 연구의 필요성	
제 2 절 연구의 내용 및 범위	
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	
제 1 절 국내외 타연구기관이 수행한 연구 내용.....	
제 2 절 현 기술상태의 문제점 .....	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	
제 1 절 빵잎의 GABA 축적 혐기처리공법 개발 .....	
1. 재료 .....	
2. 실험방법 및 내용 .....	
가. 빵잎의 혐기처리 .....	
1) 포장방법별 효과 .....	
2) 잎 형태별 효과 .....	
3) 위조처리별 효과 .....	
4) 혐기, 호기 반복처리 효과 .....	
나. Glutamic acid 처리 빵잎의 혐기처리 .....	
1) 세절 빵잎의 혐기처리 .....	
2) 페이스트 빵잎의 혐기처리 .....	
다. 혐기처리 빵잎의 이화학적 특성 분석 .....	
1) GABA 측정방법 비교 .....	
2) 폴리페놀화합물 .....	
3) 총 플라보노이드 .....	
4) Phytoestrogen .....	

5) 일반성분 .....	
6) 무기질 .....	
3. 결과 및 고찰 .....	
가. GABA 함량 측정방법 비교 .....	
1) 활성탄처리 영향 .....	
2) 비색법과 아미노산 자동분석기의 비교 .....	
나. 빵잎의 혐기처리 .....	
1) 포장방법별 효과 비교 .....	
2) 빵잎 형태별 효과 .....	
3) 위조처리별 효과 .....	
4) 혐기, 호기 반복처리 효과 .....	
다. Glutamic acid 처리 빵잎의 혐기처리 .....	
1) 세절 빵잎의 혐기처리 .....	
2) 페이스트 빵잎의 혐기처리 .....	
라. 빵잎의 GABA 축적을 위한 혐기처리 공정도 및 공정별 특징 .....	
마. GABA 축적 빵잎의 성분분석 .....	
<b>제 2 절 GABA 축적 빵잎의 혈압강하 효능 검증 .....</b>	
1. 재료 .....	
2. 실험방법 및 내용 .....	
가. 추출물의 제조 .....	
나. ACE 저해작용 .....	
다. 혈관이완작용 .....	
라. 실험동물을 이용한 혈압강하 효능 검증 .....	
1) 실험동물 및 식이 .....	

- 2) 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율 .....
- 3) 혈압측정 .....
- 4) 통계처리 .....
- 3. 결과 및 고찰 .....
- 가. 빵잎 용매 추출물의 수율 및 GABA함량 .....
- 나. 빵잎 용매 추출물의 ACE 저해작용 .....
- 다. 빵잎 용매추출물의 혈관이완효과 검색 .....
- 1) 추출물의 혈관이완작용 .....
- 2) 추출물의 내피세포 의존적 혈관이완작용 및 작용기전
- 3) 추출물의 내피세포 의존적 혈관이완작용의 기전 검색
- 라. 실험동물을 이용한 GABA축적 빵잎의 혈압강하 효능 검증 .....

**제 3 절 GABA 축적 빵잎의 퇴행성 신경질환 보호 효능 검증**

- 1. 실험방법 및 내용 .....
- 가. 추출물의 제조 .....
- 나. PC 12 cells의 신경축색돌기 outgrowth에 미치는 효과
- 다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리에 의해 유도되는 신경세포사에 대한 억제 효과
- 라. Oxygen-glucose deprivation(OGD)조건하에서의 신경세포 보호 효과 .....
- 마. BV-2 cell에서의 nitric oxide 생성 억제 효과 .....
- 바. 중뇌대동맥 폐쇄(MCAO)에 의하여 유발된 뇌허혈 동물 모델에서의 신경보호효과 .....
- 1) 실험동물 .....
- 2) 수술방법 .....
- 3) 약물투여 .....
- 4) 뇌조직의 염색 .....

사. 스코폴라민 유발 수동회피 반응 시험 .....	
1) 실험장치 .....	
2) 실험방법 .....	
2. 결과 및 고찰 .....	
가. PC 12 cells의 신경축색돌기 outgrowth에 미치는 효과	
나. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 처리에 의해 유도되는 신경세포사에 대한 억제	
효과	
다. Oxygen-glucose deprivation(OGD)조건하에서의	
신경세포 보호 효과 .....	
라. BV-2 cell에서의 nitric oxide 생성 억제 효과 .....	
마. 중뇌대동맥 폐쇄(MCAO)에 의하여 유발된 뇌허혈 동물	
모델에서의 신경보호효과 .....	
바. Scopolamine 유발 수동회피 반응 시험 .....	
<b>제 4 절 GABA 축적 뿔잎을 이용한 가공제품 개발 .....</b>	
1. 실험방법 및 내용 .....	
가. 냉수가용성 분말소재 제조 .....	
1) 추출물의 제조 .....	
2) 수용성 추출분말의 특성 .....	
가) 수율 .....	
나) 일반성분 .....	
다) GABA 함량 .....	
라) 무기질 .....	
마) 총플라보노이드 .....	
바) 폴리페놀 .....	
3) 수용액의 특성	
가) 색도 .....	
나) 투광도 .....	
다) 용해도 .....	
4) 수용성 분말의 안정성 검토 .....	
가) 열안정성	

나) pH 안정성 .....	
나. 청량음료 개발 .....	
1) 국내외 차류 음료의 특성 .....	
2) 음료용 추출액의 제조 및 빙잎의 볶음처리 .....	
3) 음료제조 및 기호도 개선 .....	
가) 음료의 제조 .....	
나) 음료의 기호도 개선 .....	
4) 음료의 저장 중 품질 특성 변화 .....	
5) 추출액과 음료의 이화학적 특성 .....	
가) 가용성 고형분 .....	
나) 총당 .....	
다) 환원당 .....	
라) pH .....	
마) 투광도 .....	
바) 색도 .....	
사) 관능검사 .....	
다. 티백형 차 .....	
1) GABA 축적 빙잎을 이용한 티백형 침출차 제조 .....	
2) GABA 축적 빙잎을 이용한 빙잎/현미 혼합 침출차 제조 .....	
3) 저장중 품질 특성 변화 .....	
라. 분말상 선식제품 .....	
1) 재료 .....	
2) 선식제품의 제조 .....	
3) 저장 중 품질 특성 변화 .....	
마. 엑기스형 당절임물 제품 .....	
1) 재료 .....	
2) 당액 및 당절임물의 제조 .....	
3) 당절임 액의 물성 개선 .....	

4) 당질임물 제품의 저장중 품질 특성 변화 .....	
5) 당질임물의 이화학적 특성 .....	
가) 수율 .....	
나) 당도 .....	
다) pH .....	
라) 색도 .....	
마) 미생물학적 특징 .....	
바) 관능검사 .....	
2. 결과 및 고찰 .....	
가. 냉수가용성 분말소재 .....	
나. 청량음료 .....	
1) 국내외 차류 음료의 특성조사 .....	
2) 추출액의 제조 및 특성 .....	
3) 볶음처리 빵잎분말의 제조 및 추출액의 이화학적 특성 .....	
4) 음료제조 및 품질개선 .....	
5) 음료의 저장중 품질 특성 .....	
다. 티백형 차제품 .....	
1) GABA 축적 빵잎분말을 이용한 티백형 침출차 .....	
2) GABA 축적 빵잎을 이용한 빵잎/현미 혼합 침출차 ..	
3) 혼합 침출차의 저장 중 품질 특성 변화 .....	
라. 선식제품(유형 : 엽록소 함유식품/맥류약엽 가공식품)	
1) 분말선식의 제조 .....	
2) 분말선식의 과립화 .....	
3) 저장중 품질 특성 변화 .....	
마. 엑기스형 당질임물 .....	
1) 당액의 제조 .....	
2) 당질임물의 제조 .....	
3) 숙성 중 당질임물의 특성 .....	

4) 당질임물의 물성 개선 및 살균 .....	
5) 당질임물의 저장중 품질 특성 변화 .....	
<b>제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	
1. 목표 달성도 .....	
2. 기여도 .....	
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....</b>	
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보 .....</b>	
<b>제 7 장 참고 문헌 .....</b>	



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구의 필요성

### 1. 기술적 측면

우리 나라 국민의 연령별 주 사망원인을 보면 20~30대는 교통사고, 40대는 간질환, 50대 이후에는 혈관질환, 즉 고혈압과 중풍 등으로 조사, 보고되고 있다. 특히 평균수명이 길어지면서 고혈압과 당뇨, 중풍 등의 성인병으로 고생하는 사람의 수가 증가하고 있으며 발생연령도 점차 낮아져 30대, 40대부터 성인병으로 고생하는 사람이 많아지고 있다는 사실이다.

$\gamma$ -Aminobutylic acid(GABA)는 동식물 등 자연계에 널리 분포하는 비단백태 아미노산의 일종으로 L-glutamic acid의  $\alpha$ -탄소에 결합되어 있는 일종의  $-COOH$ 가 glutamic acid decarboxylase(GAD)의 촉매작용에 의해 탈탄산되어 생성된다. GABA의 기능성은 혈압상승억제작용, 뇌의 혈류개선작용, 정신안정작용, 간, 신장기능 개선작용, 대장암억제작용 등이 알려져 있다.

GABA는 포유동물의 뇌, 척수에 존재하는 억제계의 신경전달물질로서 의약품으로서 뇌의 혈류를 개선하고 산소공급량을 증가시켜 뇌대사를 향진시키는 운동을 가지며 뇌졸중, 두부외상후 증상, 뇌동맥후 증상에 의한 두통, 귀울림, 의욕저하 등의 치료에 응용되고 있다. GABA는 지금까지 연구 결과 노인성치매, 정신증상을 가진 파킨슨병에서 수액중 농도가 감소함이 밝혀졌고, 중적발작을 가진 간질환자의 수액에 있어서도 GABA 농도가 저하되는 것에서 GABA가 신경흥분 작용을 가지고 있음이 보고되었다. 또한 기분장애, 알콜성질환 환자의 수액 중 GABA농도가 감소하고 우울증 치료약인 desipramine, aminotriptyline이 그 작용기서로서 GABA전달계를 개입시켜 GABA의 유리를 촉진하고 우울증 개선에 기여하고 있는 것을 추측하여 정신장애, 불안장애의 발증메카니즘에 GABA계가 크게 관여함이 밝혀졌다.

최근에는 GABA가 학습능력을 유의적으로 증강시키고 장기 기억 촉진에 기여할 뿐 아니라 혈압상승을 억제하며 식용과 포만감을 조절하는 요소로 작용한다고 발표되어 전세계적으로 주목을 받고 있는 물질의 하나로서 경구적 처방약으로서는 5, 10 mg의 환제가 시판되고 있으나 의약품의 합성 GABA제제의 경우 식욕부진, 변비, 설사 등의 소화기계의 부작용이 있다고 한다.

GABA는 식물 중에도 함유되어 있는 물질로서 차, 쌀배아, 홍국, 황기 등의 식물에 존재한다. 식물에 있어서 GABA의 생리적 역할로서 쌀의 발아율과 GABA생성효소인 GAD의 양과는 높은 상관관계가 있고, 또 혐기상태에서는 식물체의 기관에 있어서도 GABA가 축적되는 것으로 알려져 녹차의 경우 잎을 혐기적 조건하에 방치할 경우 최고 10배의 GABA가 축적되며 이러한 가공공정에 의해 제조한 차를 일본에서는 “GABARON TEA”라 하여 판매하고 있다. 일본에서 GABA가 크게 주목받게 된 가장 큰 요인은 많은 회사에서 제조된 발아현미가 히트하였기 때문이다. 현미를 물에 침지시키고 0.5~1.0 mm정도 발아시킨 발아현미는 품종에 따라 차이는 있으나 원료 쌀대비 약 4~5배의 GABA가 증가하는 것으로 알려져 있으나 실제 GABA함량은 10 mg%정도에 지나지 않고 있다.

고혈압 일상의 식생활에서 예방할 수 있다는 관점에서 GABA를 함유한 차, 현미, 고형상소재 등이 개발되어 있으나 어느 것도 GABA농도가 낮고 형상적으로도 응용 범위가 제한되어 있다. 또한 GABA의 인지도가 상승하고 시장에서 보다 고농도의 GABA를 함유한 상품의 등장이 기대되고 있어 새로운 소재 선정과 이들을 이용한 신제품 개발이 요구된다. 따라서 광범위한 가공용 식품에 사용 가능한 고농도 GABA 소재의 선정은 대단히 중요한 과제이며 또한 자연섭취로는 양적 제한을 가진 GABA를 생리활성이 기대되는 양까지 높여 섭취할 수 있도록 식물체내 GABA 축적 기술의 개발, 보급은 중요한 과제 중의 하나이다.

뽕잎은 매우 다양한 성분을 함유하고 있으며 50여종의 무기성분이 분석되었으며 특히 칼슘, 칼륨, 철의 함량이 매우 높으며 아미노산은 메치오닌 등 21종이 함유되어 있다. 구와논(kuwanon)등 유기성분이 59종 이상 함유되어 있음이 분석되었다. 이들 유기성분은 뽕잎과 상백피에서 처음으로 확인된 것이 상당수에 이르고 그 때문에 이름은 있어도 아직 기능성은 밝혀지지 않은 성분이 많다. 기능성이 밝혀진 성분 중 루틴

은 모세혈관강화에, GABA, 모라세닌, 상계논은 혈압을 떨어뜨려 주고, 모라신, 디모라신, 활코모라신 등은 항균작용에, 움벨리페론은 염증을 없애주고, 모루신은 항종양, 테옥시노지리마이신(DNJ), 페고민, 이미노아라비니톨(DAB)) 등은 당뇨병에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 이밖에 항알레르기, 탈모억제, 동맥경화, 비만억제 등에 효과는 확인되었지만 어떤 성분에 의해서인지 아직 밝혀져 있지 않다. 뽕잎의 생리활성에 대한 여러 연구 중에서 특히,  $\alpha$ -glycosidase 활성억제에 의한 혈당강하 효과와 혈중 중성지방과 콜레스테롤 저하작용, 동맥경화증 및 고지혈증 효과 등이 연구되고 있다.

식물체의 혐기적 처리에 따른 고농도의 GABA 축적은 원료 종류, 전처리 방법 및 혐기처리전 원료내 글루타민산의 함량과 처리 온도, 시간 등 반응조건에 따라 각기 달라 GABA함량이 높은 원료의 선발과 고농도 GABA축적을 위한 최적 반응조건 설정을 위한 과학적이고 체계적인 연구가 필요하다. 식물 원료 중 GABA의 함량이 높은 것으로 알려진 녹차와 비교할 때 약 10배 높은 GABA를 함유하는 것으로 알려진 뽕잎을 원료로 선발하여 혐기적 처리공법에 의해 고농도 GABA 축적 기술을 개발함과 동시에 이들 GABA축적의 혈압상승 억제 효과 및 퇴행성신경질환 효능을 확인하고 이들을 활용한 대중성 있는 건강보조식품을 개발, 산업화한다면 파급효과는 클 것으로 예상된다.

## 2. 경제·산업적 측면

기능성식품은 일본에서 저 알레르겐 쌀 “Fine rice”를 시작으로 일반 건강보조식품과 구별된 ‘특정보건용식품’으로 허가된 이래 급격히 증가하여 현재 수십 종이 시판되고 있으며, 최근 북미나 유럽에서는 질병치료 및 예방에 보다 적극적 개념의 nutraceuticals에 대한 연구 및 그 성과의 활용이 급증하고 있다. 이러한 경향은 선진국을 중심으로 더욱 확대될 것으로 예상되므로 해외에서 개발된 기술이나 제품의 수입보다는 자체기술의 개발이 시급한 실정이다.

또한 국가적으로도 삶의 질을 향상시키기 위한 건강사회 구현 및 복지국가 건설이 국가 중요 목표가 되고 있어 각종 성인병 예방으로 건강을 유지하고 의료비를 경감하기 위해서도 한의약, 천연물과학, 생물공학 등의 기술을 통한 건강 기능성 식품 개발 및 신소재 개발 등 BT 산업의 발전을 이루기 위한 노력이 요구되는 실정이다.

기능성식품의 세계시장규모가 2000년도에는 1,280억불로 성장하였고, 미국과 유럽의 과학기술예측조사에 따르면 21세기 건강기능식품의 시장은 자동차 산업과 대등한 규모로 성장할 것이라 보고하였다. 그러나 우리 나라의 경우 전세계 시장의 1.2%정도로 미약한 반면 미국과 일본이 전체 시장의 50%이상을 차지하고 있어 이 분야에 대한 보다 적극적인 연구지원이 필요한 실정이다.

국내 기능성 식품은 2000년도에 1,733억원 정도가 수입되었으며 수입건수는 4,654건(수량 10,251톤)으로 집계되어 전년도 수입총액의 60.9%가 증가한 실적으로 향후에도 시장을 위축시킬만한 변수가 없는 한 수입은 지속적으로 늘어날 것으로 추정된다.

따라서 빵잎 등 값싼 천연자원에 기능성이 우수한 생리활성물질을 고농도로 축적할 수 있는 기법의 개발을 통한 이들 소재의 고부가가치화 및 이를 활용한 건강보조식품의 개발, 산업화는 고령화 사회에서 점차 늘어가는 고혈압, 퇴행성신경질환 환자에 소요되는 막대한 사회적 비용의 경감과 해외로의 수출 및 수입대체에 의한 외화획득에 크게 기여할 것이며 또한 수입식품과의 차별화를 통해 수출상품화를 유도할 수 있을 것으로 예상되며 국내 관련 분야의 소득증대에 크게 기여할 것이다.

### 3. 사회·문화적 측면

최근 생활수준이 급속하게 향상됨에 따라 평균수명이 증가되어 노인인구가 급증하고 개인 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라 식품의 3차 기능인 생리활성 조절기능에 대한 관심이 고조되고 있다. 우리나라는 전통적으로 일상 섭취하는 식품을 통하여 건강을 유지할 수 있다는 생각이 보편화되어 있고 전통의약품도 식품의 형태를 가진 것이 많아 기능성식품은 오래 전부터 우리 생활에 깊은 관련성을 가지고 있다.

도시화, 산업화, 핵가족화 됨에 따라 가공식품의 섭취가 증대되고 고혈압, 당뇨, 암 등 성인병의 발병율이 증가되어 국민의 의료진료비가 지난 5년간 약 두 배로 증가하고 있어 식품의 기능성 및 유효성이 소비자들의 가장 중요한 관심사항의 하나가 되고 있다.

특히 고혈압은 대표적인 성인병의 하나로 우리나라 뿐 아니라 세계적으로 그 관리

방안이 필요시 되고 있으며 식이요법이 중요한 관리방안의 하나로 활용될 수 있어 혈압강하 기능성식품 소재의 개발을 통한 경증환자의 치료 또는 발병가능성이 있는 사람의 예방을 미리 유도할 필요가 있다.

## 제 2 절 연구의 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>o GABA 축적 험기처리공법 개발 및 가공제품 개발</li> <li>o GABA축적 시료의 혈압강하 효능 검증</li> <li>o GABA 축적 시료의 퇴행성신경질환 보호 효과 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o 빵잎의 험기처리 공법 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>-글루타민산 농도, 반응시간, 반응액의 pH별 세절 빵잎의 GABA 함량 분석</li> <li>-가스, 온도, 시간별 세절 빵잎의 GABA 함량 분석</li> <li>-글루타민산 농도, 반응시간, 반응액 pH별 빵잎 착즙액의 GABA 함량 분석</li> <li>-GABA 축적 세절 빵잎, 착즙액의 폴리페놀, 플라보노이드, 무기질 등 phytochemical 함량 분석, 비교</li> <li>-분산성, 용해성이 우수한 식품가공용 미세분말 개발</li> <li>-청량음료 개발</li> </ul> </li> <li>o GABA 축적 빵잎의 혈압강하 효능 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>-고농도 GABA함유 추출물 제조</li> <li>-ACE 저해효과 검색</li> <li>-혈관이완 효과 검색</li> </ul> </li> <li>o GABA축적 빵잎의 퇴행성 신경질환보호 효과 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>-세포주를 이용한 신경축색돌기 outgrowth에 미치는 효과</li> <li>-Oxygen-glucose deprivation 조건하에서의 신경세포보호 효과</li> <li>-뇌교세포주에서의 nitric oxide 생성억제 효과</li> <li>-신경독성 물질에 의해 유도된 신경세포사의 억제효과</li> </ul> </li> </ul>
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>o GABA 축적 시료를 이용한 대중성 있는 제품 개발</li> <li>o 실험동물을 이용한 혈압 강하효능 검증</li> <li>o 생체 실험동물을 이용한 퇴행성 신경질환 보호 효과 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o GABA 축적 빵잎 및 이를 이용한 대중성 있는 제품 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>-향미개선 차류 제품</li> <li>-Soft beverage의 품질 개선</li> <li>-액기스(농축물)형 제품</li> <li>-미분말 소재, 과실 등을 이용한 선식제품</li> </ul> </li> <li>o 실험동물을 이용한 혈압강하 효능 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>-GABA축적 빵잎 함량별 실험식이 제조</li> <li>-SHR 5주령부터 7주간 실험 식이투여</li> <li>-수축기, 이완기, 심장박동수 측정</li> </ul> </li> <li>o 생체실험동물을 이용한 퇴행성 신경질환 보호 효과 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>-MCAO류의 신경질환동물모델의 인지기능 개선효과 검색</li> <li>-뇌허혈동물모델을 이용한 뇌신경보호효과검색</li> </ul> </li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 타연구기관이 수행한 연구 내용

식물체내에서 생리활성물질을 증강시키기 위하여 무잎을 혐기처리함으로써 무즙의 GABA와 alanine 등이 축적되며 대맥의 발아시, 토마토 어린싹에 있어서도 혐기적 조건하에서 GABA의 함량 변화가 보고되어 있다.

식품에 있어서의 GABA축적을 위한 연구와 이들에 대한 기능성 연구는 최근에 들어 주로 일본에서 활발하게 이루어져 GABA가 사람의 혈압을 낮춰주는 혈압강하제로 작용한다는 사실이 입증되자 차잎의 혐기적 처리에 의해 GABA 함량을 높인 녹차가 개발되었으며 차에 함유된 카테킨, 플라보노이드 등의 성분도 동시에 혈압저하작용에 관여한다고 보고하고 있다.

현미의 글루타민산 탈탄산효소가 가수조건하에서 글루타민산을 빠르게 GABA로 전환시키는 것을 이용, GABA가 고농도로 축적된 발아현미가 일본에서 개발, 크게 히트하였고 쌀의 GABA함량 증진을 위한 연구를 보면 고압처리 조건, 침지시 함량 변화 및 쌀배아를 대상으로 침지조건별 GABA를 축적하고자 한 시도와 이산화질소와 같은 기체로 대두를 혐기처리하였을 때 GABA의 함량을 조사한 연구도 있다. 이 외에도 곡류, 토마토, 밤호박, 크로렐라 등 많은 천연물에서 GABA의 함량을 높이는 연구가 진행되었거나 현재에도 진행 중이다.

일본에서는 GABA를 축적한 쌀배아를 경구투여하여 갱년기 장애 및 노인들의 정신장애에 미치는 영향을 조사한 결과 하루 26.5 mg의 GABA를 섭취하였을 때 두통, 우울증 같은 정신적 질환이나 여러 증상의 갱년기 장애가 75% 치유됨을 확인하고 노령화시대에 대비하기 위한 silver foods의 하나로 GABA가 주목 받을 것이라 하였다.

국내의 경우 식물을 재배하면서 키토산 처리 등에 따른 GABA 함량의 증가 등 재

배에 관한 연구와 녹차, 뽕잎을 단순 헹기처리하여 GABA함량의 변화를 조사한 단편적인 연구는 있으나 식품가공용 원료로 활용하고자 뽕잎으로부터 고농도의 GABA 축적을 위한 체계적인 연구 및 이들 축적된 GABA의 생리활성을 이용한 건강기능성식품의 개발 연구는 미흡한 실정이다.

## 제 2 절 현기술상태의 문제점

식물체의 헹기적 처리에 따른 고농도의 GABA 축적은 원료의 종류와 전처리 방법 및 원료내 초기 글루타민산의 함량과 처리 온도, 시간 등 반응조건에 따라 큰 차이를 나타내고 있어 선정 원료에 적합한 최적의 반응조건 설정은 반드시 연구되어야 한다. 뿐만 아니라 GABA함량이 높은 원료의 선발 및 이들 실험실적 규모에서 설정된 처리기술의 산업적 적용을 위한 공정 개발은 GABA 축적 원료의 산업화에 앞서 반드시 검토되어야 한다.

천연물의 생리활성작용은 어느 한가지 특정 물질에 의해서 라기보다 원료내의 고유 성분이 복합적으로 작용할 경우 더욱 효과를 발휘하므로 원료 유래의 단백질, 비타민, 무기질, 아미노산 등의 성분을 종래 제품과 동일하게 유지시키면서 GABA의 함량만을 고농도로 증가시키는 기술이 확립되어 있지 못하다. 또한 GABA 축적 원료의 특정 생리활성 효능 검증과 이들을 이용한 대중성 있는 가공제품의 제조방법에 대한 과학적이고 체계적인 연구가 수행되어야 한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 빵잎의 GABA 축적 혐기처리공법 개발

#### 1. 재료

본 실험에 사용한 빵잎은 농촌진흥청 잠사곤충연구부에서 재배한 청일빵을 가을('02년 11월경)과 봄('03년 5, 6, 7월경)에 각각 채취하고 예냉처리한 다음 4℃에 저장하면서 이용하였다. 채취시기별 분석용 원료 빵잎은 채취 즉시 액체질소로 처리한 후 동결건조하였다.

#### 2. 실험방법 및 내용

##### 가. 빵잎의 혐기처리

##### 1) 포장방법별 효과

빵잎을 23x17x5 cm<sup>3</sup>의 플라스틱용기에 일정량씩 담고 가스믹스기를 이용, 일정농도의 질소가스와 이산화탄소를 조정한 다음 가스충전포장기(Dacuum packing machine, 테크노백)로 용기의 상단부를 충전, 포장하였다. 이들 시료의 혐기처리 조건을 검토하기 위하여 미리 온도를 조정한 반응기에 시료가 든 용기를 넣고 온도와 시간 변화에 따라 혐기처리하였다. 혐기처리가 완료된 시료는 즉시 용기에서 꺼내어 효소 불활성화를 위해 바로 전자레인지에서 1분간 열처리한 다음 열풍 또는 동결건조하였다. 한편 포장방법에 따른 차이를 검토하고자 앞서 사용한 플라스틱용기와 동일한 크기의 산소차단 비닐봉지에 시료를 담은 다음 각각 비닐 및 진공포장한 후 동일하게 혐기처리하였다.

##### 2) 잎 형태별 효과

빵잎을 그대로, 세절 및 초핑처리한 것을 각각 플라스틱용기에 담고 앞서 언급한 것과 동일한 방법으로 가스를 주입한 다음 충전, 포장한 것을 혐기처리하였다.



### 3) 위조처리별 효과

빵잎을 일정한 크기로 세절한 다음 상온에서 건조시키면서 건조정도별로 시료를 채취하여 각각 플라스틱용기에 담고 앞서 언급한 것과 동일한 방법으로 가스를 주입한 다음 충전, 포장한 것을 혐기처리하였다.

### 4) 혐기, 호기 반복처리 효과

혐기처리의 반복횟수에 다른 효과를 비교하고자 플라스틱용기에 생빵잎 시료를 넣고 질소가스를 충전한 다음 3시간 1차 혐기처리 후 포장지를 개봉하여 1~3시간 방치하여 1차 혐기처리 후 다시 질소가스를 충전하여 3시간 혐기처리하고 다시 포장지를 개봉하여 1~3시간 방치하여 2차 혐기처리하였다.

## 나. Glutamic acid 처리 빵잎의 혐기처리

### 1) 세절 빵잎의 혐기처리

일정크기로 세절한 빵잎 15 g에 농도를 달리한 glutamic acid(pH 5.9) 200 mL를 첨가하고 질소가스를 충전한 다음 37°C shaking incubator에서 혐기처리하였다. 반응이 종료된 시료는 물로 표면을 수세하고 바로 전자레인지에서 효소를 불활성화시킨 후 건조하였다. 동결건조 빵잎분말에 1% glutamic acid를 첨가하고 반응물의 pH를 조정한 것을 37°C shaking incubator에서 혐기처리하였다.

### 2) 페이스트 빵잎의 혐기처리

신선 빵잎을 1차 초핑처리한 후 중량대비 3배의 glutamic acid를 첨가하여 콜로이드밀로 페이스트화시켰다. 빵잎 페이스트의 pH를 조정한 다음 용기에 반응물을 담고 여기에 질소가스를 충전한 30분간 sonication 처리한 후 37°C shaking incubator에서 혐기처리하였다. 이때 최적 반응조건을 검토하고자 glutamic acid의 농도와 pH를 달리한 반응물의 반응온도, 시간을 달리하여 혐기처리하였다. 반응이 종료된 시료는 전자레인지에서 1분간 열처리하고 열풍건조하였다. 또한 앞서 제조한 빵잎 페이스트를 착즙한 착즙액을 동일한 방법으로 혐기처리하여 비교하였다.

## 다. 혐기처리 빵잎의 이화학적 특성 분석

### 1) GABA 측정 방법 비교

헛기처리한 뽕잎분말의 GABA 함량은 Zhang 등의 방법을 이용하여 비색법으로 측정하였다. 즉, eppendorf tube에 시료 0.1 g을 취한 후 MeOH 400  $\mu$ l를 가하고 70~80°C water bath에서 완전히 건고시켰다. 여기에 70 mM LaCl<sub>3</sub> 1 mL를 가하여 10분간 shaking한 후 13,600 g에서 15분간 원심분리하여 상등액 700  $\mu$ l를 0.1M KOH 160  $\mu$ l를 미리 넣어둔 eppendorf tube에 가한 후 3~5분간 shaking하고 5분간 원심분리 후 상등액 550  $\mu$ l를 활성탄을 통과시켜 시료의 polyphenol pigment에 의한 영향을 최소화하고자 색소를 제거하여 cuvette에 넣고 아래의 ①~④를 각각 혼합한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하고 여기에 ⑤의 20 mM  $\alpha$ -KG 용액을 첨가 하여 실온에서 1시간 방치 후 340 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 구하고 측정된 흡광도에서 GABA 함량을 구하였다. 이때 뽕잎시료에서 추출되는 색소에 의한 영향을 최소화하고자 activated carbone을 이용, 색소물질을 제거하는 단계를 추가하였으며 이러한 공정이 GABA 함량에 미치는 영향을 GABA 표준물질을 이용하여 비교하였다.

즉, activated carbone을 일정량씩 충전시킨 카트리지를 이용하여 GABA 측정법에 의해 추출된 용액을 일정농도로 희석 후 50, 100  $\mu$ mol GABA 표준물질을 각각 첨가하여 카트리지를 통과시켰을 때의 흡광도를 측정하여 첨가된 표준품 GABA의 회수율을 측정하여 활성탄의 영향을 비교하였다.

표 1. Determination method on the quantitative of GABA

	GABA표준품( $\mu$ mol)						Sample
	0	5	10	20	50	100	
① 1mM GABA	0	5	10	20	50	100	550
② 0.5M K <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	750	745	740	730	700	650	200
③ 4mM NADP	150	150	150	150	150	150	150
④ 2.0units Gabase/mL	50	50	50	50	50	50	50
⑤ 20mM $\alpha$ -KG	50	50	50	50	50	50	50

한편 GABA 측정법에 의한 함량을 비교하고자 분말시료 일정량에 6N HCl 용액을 가하고 질소가스를 충전한 후 110°C에서 22시간 가수분해하고 감압농축시켜 염산을 제거하였다. 이를 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하고 여액중 일부를 취해 건조 튜브에 넣고 유도제 시약(methanol : triethylamine : water : phenyl isothiocyanate = 7 : 1 : 1 : 1, v/v)을 첨가하여 유도제화시킨 다음 이를 감압건고하였다. 건고물을 용해시

킨 다음 pico-tag 방법에 따라 HPLC로 아미노산의 함량을 분석하였다. 이때 분석조건은 instrument: Jasco HPLC System, column: pico-tag, column temp.: 40°C, eluent: pico-tag eluent A & B, flow rate: 1.0 mL/min, chart speed: 1.0 cm/min, detector: UV 254 nm, injection volume: 10  $\mu$ l이었다.

## 2) 폴리페놀화합물

Folin-Denis법을 이용하여 총폴리페놀 함량을 측정하였다. 즉, 시료 10 g에 75% 아세톤 50 mL을 가하여 마쇄한 후 55°C에서 30분간 환류추출하여 여과하였다. 여과액 5 mL과 Folin-Denis 시약 5 mL을 혼합하여 진탕한 후 실온에서 3분간 방치하고 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 5 mL을 가하여 혼합한 다음 실온에서 다시 1시간 정치시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 검량곡선은 tannic acid를 표준물질로 사용하여 작성하였다.

## 3) 총플라보노이드

분말 10 g에 50% methanol 60 mL을 가하여 마쇄한 후 80°C에서 1시간 환류추출하고 냉각한 후 50% methanol로 100 mL 정용하여 여과하여 시료용액으로 하였다. 시료용액 1 mL과 diethylene glycol 10 mL을 혼합한 후 1N NaOH 1mL를 가하여 잘 혼합하여 37°C에서 1시간 방치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 naringin의 농도가 0~0.5 mg% 범위가 되도록 제조한 표준용액을 이용하여 검량선을 작성하여 플라보노이드 측정에 사용하였다.

## 4) Phytoestrogen

건조분말에 85% 메탄올을 첨가하여 80°C에서 1시간 환류추출하고 여과한 여액을 45°C 진공농축기에서 농축하여 증류수로 일정량으로 정용하고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 GABA 축적 시료의 용매별 추출물을 제조하였다.

메탄올 추출 건조물을 25 mg 취한 후 0.2M acetate buffer(pH 5.2) 1 mL과 함께 phytoestrogen류의 산화를 방지하기 위하여 ascorbic acid 용액(10 mg/mL) 100  $\mu$ l를 가하고  $\beta$ -glucuronidase/aryl sulfatase(*Helix pomatia*로부터 얻은 추출물,  $\beta$ -glucuronidase 활성-39°C에서 5.5 U/mL, aryl sulfatase 활성-38°C에서 2.6 U/mL) 100  $\mu$ l를 가한 후 55°C에서 30분간 가수분해시켰다. 반응시간이 지난 후 시료를 상온

에서 냉각 후 diethyl ether 5 mL를 가하고 10분간 교반하여 가수분해된 isoflavonoid 류를 추출하였다. 교반 후 2,500 rpm에서 원심분리하여 유기용매층을 분취하고 회전 진공증발기(rotary vacuum evaporator)에서 증발건고시켰다.

유기용매층을 분리하고 남은 완충액에는 다시 6M HCl 50  $\mu$ l를 가한 후 100 $^{\circ}$ C에서 2.5 시간 동안 방치하였다. 이를 식힌 후 diethyl ether 5 mL를 넣고 위와 동일한 방법으로 추출한 후 증발건고시켰다.

효소가수분해와 산 가수분해를 거친 시료에 대하여 Oasis-HLB<sup>TM</sup> 카트리지(60 mg: Waters Co. Milford, Mass, USA)를 작은 진공펌프와 수조가 연결된 장치에 고정시킨 후 메탄올 1 mL와 물 1 mL를 연속적으로 흘려주어 전처리하였다. 여기에 효소가수분해와 산가수분해한 잔사를 메탄올 0.5 mL에 녹여 로딩시켰다. 이 카트리지를 물 1mL로 세척한 후 메탄올 5 mL로 유출시켰다. 유출된 메탄올은 증발건고시킨 후 MSTFA/NH<sub>4</sub>I/dithioerythritol의 1,000 : 4 : 5(v/w/w)의 혼합용액을 50  $\mu$ l를 가하고 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 가스크로마토그래피-질량분석기(GC-MS)를 이용하여 농도를 정량하였다. 분리관은 Ultra-2 (길이 25 m, 내경 0.2 mm I.D., film thickness 0.33  $\mu$ m)를 사용하였으며, 분리관의 온도는 160 $^{\circ}$ C에서 270 $^{\circ}$ C까지 10  $^{\circ}$ C/min으로 올리고, 10분간 머무른 후 다시 5  $^{\circ}$ C/min 으로 315 $^{\circ}$ C까지 상승시켜 2분간 유지시켰다. 주입기 온도는 280  $^{\circ}$ C, 검출 온도는 300  $^{\circ}$ C로 설정하였으며, 주입방법은 Column head pressure은 9psi로, Split mode(ratio 1:5)로 설정하였다. 이온화에 사용한 전자 에너지는 70eV이었고, 전처리된 시료들을 분석하기 위해 질량 스펙트럼상의 특성이온만을 선택하여 검출하는 selected ion monitoring(SIM)방법을 이용하였다.

## 5) 일반성분

GABA 측정 분말 시료의 수분, 지질, 단백질, 회분, 탄수화물의 함량은 AOAC 방법에 따라 정량하였다. 즉, 수분은 105 $^{\circ}$ C 상압가열건조법, 단백질은 Kjeldahl법에 의하여 kjeltec auto sampler system 1035 analyzer를 이용하여 측정하였다. 조지방은 Soxhlet 추출법에 따라 구하였다.

## 6) 무기질

빵잎의 무기질 분석은 AOAC법에 따라 미리 항량을 구한 도가니에 시료를 취하고 예비탄화시킨 후 560 $^{\circ}$ C의 회화로에서 백색이나 회백색이 될 때까지 회화시켰다. 회화

된 회분을 소량의 이온교환수로 재가 흡어지지 않도록 적신 후 염산용액(염산 : 이온교환수 = 1 : 1) 5 mL를 가하여 hot plate에서 증발, 건조시킨 다음 다시 5 mL의 염산용액(염산:이온교환수 = 1:3)을 가하여 5분간 가열, 용해한 후 여과하여 100 mL로 정용하였다. 이 액 중 5 mL를 25 mL메스플라스크에 취한 후 공존이온의 영향을 제거하기 위해 5% La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>용액 5 mL를 가한 다음 0.1N HCl로 정용하여 ICP(Inductively Coupled Plasma, Jobin Yvon Co., France)로 정량 분석하였다. 이때의 측정조건은 표 2와 같다.

표 2. 무기질의 ICP 분석조건

Instrument	Jasco PU-980 Pump/Jasco 851-AS sampler Jasco 807-IT Integrator(Japan) Sedex 55 Light Scattering Detector(France)
Detector	Waters Associates, UV/visible(210 nm)
Column	Aminex HPX-87H Column(7.8×300 mm, USA)
Chart speed	5 mm/min
Flow rate	0.6 mL/min
Mobile phase	0.04M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. GABA 함량 측정 방법 비교

##### 1) 활성탄처리 영향

뿌잎의 GABA 함량을 신속하고 정확하게 측정하기 위하여 기존의 비색법을 본 실험 재료에 맞게 변형하였다. 즉, 뿌잎으로부터 GABA 추출시 함께 추출된 색소에 의한 영향을 방지하기 위해 activated carbone으로 시료의 색소물질을 제거시키는 단계를 추가하였다. 본 실험을 위하여 변형된 비색법의 실효성을 측정하기 위하여 GABA 표준품을 이용하여 그림 와 같은 표준곡선을 얻었으며 흡광도와 GABA 농도와의 상관관계는  $R^2=0.9996$ 으로 매우 유의적이었다. 한편, 활성탄처리로 인한 GABA의 회수율을 측정하고자 뿌잎 GABA 측정법에 의해 추출된 용액을 일정농도로 희석 후 50, 100 umol GABA 표준물질을 각각 첨가하여 활성탄을 통과시켰을 때의 각각의 흡광도를 측정하여 활성탄처리가 실제적으로 뿌잎의 GABA 측정에 미치는 영향여부를 살펴보았다. 표 3의 결과에서 볼 수 있듯이, 활성탄처리로 말미암아 뿌잎의 색소는 흡착하여 제거되고 GABA는 흡착되지 않고 99% 이상이 회수되는 것으로 나타났다.

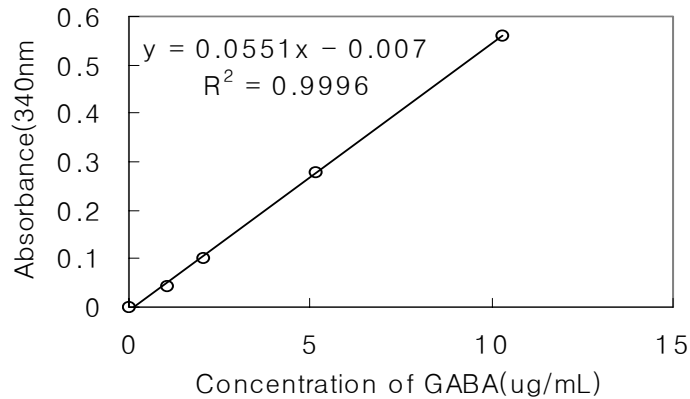


그림 1. 비색법에 의하여 측정된 흡광도와 GABA 함량간 표준곡선

표 3. 뽕잎의 GABA 측정을 위한 활성탄의 회수율  
(mg%)

GABA(umol)	표준품	생뽕잎
0	0	0.1940 (100)
5	0.2787	0.1931 (99.5)
10	0.5620	0.1922 (99.1)

## 2) 비색법과 아미노산 자동분석기의 비교

비색법에 대한 결과를 HPLC를 이용한 GABA 측정법과 비교하기 위해 생뽕잎, 시들계한 뽕잎, 진공처리, 질소충진 후 37°C에서 6시간 처리한 뽕잎의 GABA 함량을 측정하였다(그림 2). 비색법에 의한 생뽕잎은 67mg%, 시든뽕잎은 180mg%, 진공 및 질소처리하는 각각 299mg%, 271mg%를 나타냈으며, HPLC에 의한 결과인 생뽕잎 85mg%, 시든뽕잎 155mg%, 진공처리 274mg%, 질소처리 259mg%들과 유사한 측정결과를 나타내었다(표 4). 비색법에 의한 GABA 측정법은 HPLC에 의한 방법보다 월등히 경제적이며 신속하나 정밀성에 대한 의문이 있어 본 연구를 통하여 살펴본 결과, 앞서 결과에서 관찰한 바와 같이 비색법에 의한 GABA 측정은 신속하며 또한 정확한 결과를 도출할 수 있어 향후 GABA 함량은 비색법에 의한 방법으로 측정하기로 하였다.

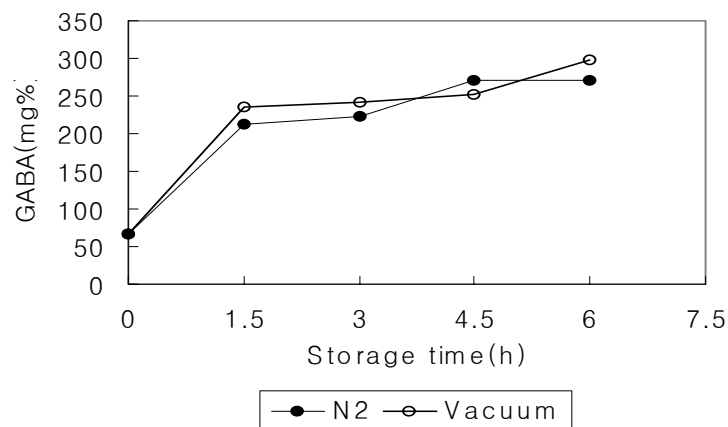


그림 2. 비색법에 의한 뽕잎시료별 GABA 함량 변화 측정

표 4. HPLC를 이용한 뽕잎시료별 유리 아미노산 함량 변화

아미노산	mg%, 건물량			
	생뽕잎	시든뽕잎	진공처리	질소처리
Cya	17.0	18.2	0	0
Asp	12.8	21.7	20.2	16.7
Glu	67.0	53.5	47.6	72.3
Asn	40.4	191.8	165.1	120.7
Ser	13.9	26.1	29.8	32.4
Gln	10.6	57.0	22.5	29.4
Gly	16.6	10.1	20.2	20.1
His	0	19.1	25.1	26.7
Arg	21.4	22.1	29.7	34.1
Thr	11.1	18.3	23.2	26.8
Ala	48.0	45.7	87.6	132.1
GABA	85.2	154.6	273.5	259.1
Pro	45.2	136.3	125.5	84.8
Tyr	11.2	10.1	47.7	46.8
Val	32.6	35.8	50.5	63.4
Met	19.6	19.7	23.3	26.2
Cys2	10.2	6.2	6.3	7.2
Ileu	20.2	20.9	28.7	33.1
Leu	22.4	9.5	22.4	29.9
Phe	39.3	36.2	13.2	14.4
Trp	6.1	7.4	11.5	13.9
Lys	5.5	5.6	3.0	4.4
Total	5,6.7	925.9	1,076.3	1,094.7

한편 처리별 뽕잎의 유리아미노산 조성 분석 결과를 보면 뽕잎을 시들게 하거나 진공 또는 질소가스로 처리했을 때 글루탐산의 함량은 감소한 반면, GABA 함량은 증가하는 경향을 보였다. 이는 시들게 하거나 진공처리 및 질소처리가 뽕잎에 가해지는 스트레스로 작용하여 총 생뽕잎에 비해 유리아미노산의 양은 증가되나 유리된 글루탐산의 함량 및 구성비는 감소하여 글루탐산의 GAD에 의한 GABA로의 전환인 것으로 보여진다.



## 나. 빵잎의 혐기처리

### 1) 포장방법별 효과 비교

생빵잎을 비닐, 진공포장 및 질소가스로 충전한 후 실온에서 시간 변화에 따른 GABA 함량의 변화를 측정된 결과 그림 3과 같다. 초기인 3시간 경과 후 무처리구의 14.01 mg%에 비해 비닐, 진공포장구, 질소가스처리시 각각 2.9배, 5.7배 및 8.2배 증가하였으며 질소가스의 경우 114 mg%를 보여 비닐 및 진공포장처리의 41.60 mg%, 79.64 mg%에 비해 2.8배 및 1.4배 증가한 함량을 나타내었다. 혐기시간의 증가에 따른 GABA 함량은 모든 처리구에서 약간씩 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 빵잎의 GABA 함량을 단시간에 증가시키는 인자로 질소가스 충전에 의한 혐기처리가 우수한 것으로 보여진다.

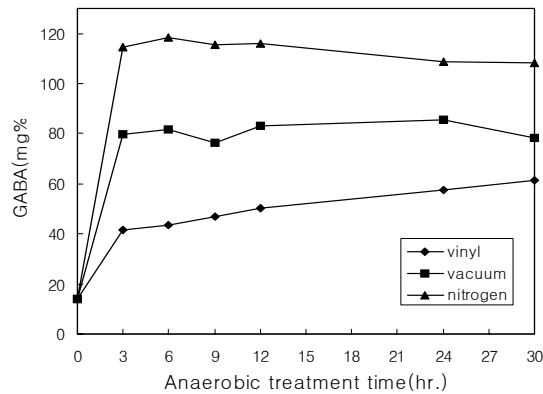


그림 3. 포장 및 질소가스처리에 따른 GABA 함량 변화

질소가스를 충전한 생빵잎의 혐기처리 온도에 따른 GABA 함량 변화는 그림 4와 같다. 혐기처리 3, 6시간 경과 후 40℃에서 119.25, 122.62 mg%를 나타내어 초기값인 24.44 mg%에 비해 4.87배를 나타내어 다른 온도처리구에 비해 높은 함량을 나타내었으며, 혐기처리 12시간 경과 후에는 40℃를 제외한 모든 온도 처리구의 GABA 함량이 83.58~93.54 mg%로 유사한 것으로 나타났다.

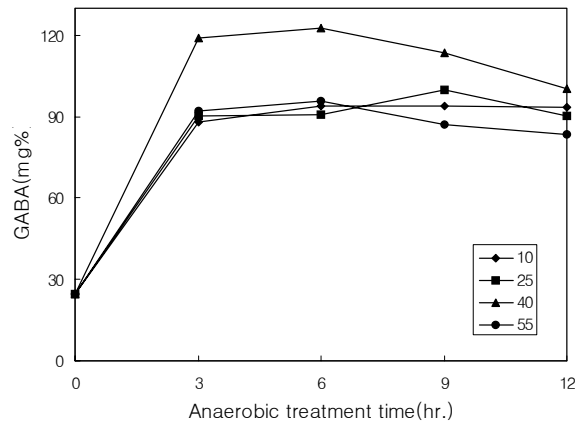


그림 4. 혐기처리 온도별 GABA 함량 변화

## 2) 빵잎 형태별 효과

빵잎을 그대로, 세절 및 초핑처리한 것을 각각 플라스틱용기에 담고, 포장방법, 혐기처리 온도 및 시간변화에 따른 GABA 함량 측정에서 가장 높은 함량을 나타낸 질소가스처리, 40°C에서 시료를 3, 6, 9시간 혐기처리하면서 GABA함량 변화를 측정한 결과는 그림 5와 같다. 빵잎의 형태가 적을수록, 혐기시간이 길수록 GABA함량이 높아져 초핑 빵잎의 경우 초기의 14.01mg%에서 혐기 9시간 경과 후 137.26mg%를 보여 9.8배 증가하였다. 그러나 통빵잎은 3시간의 106.22mg%에서 9시간의 121.47mg%로 초기 GABA함량의 약 8.7배 증가, 세절빵잎은 중간정도인 9.0배 증가하는 것으로 나타났다.

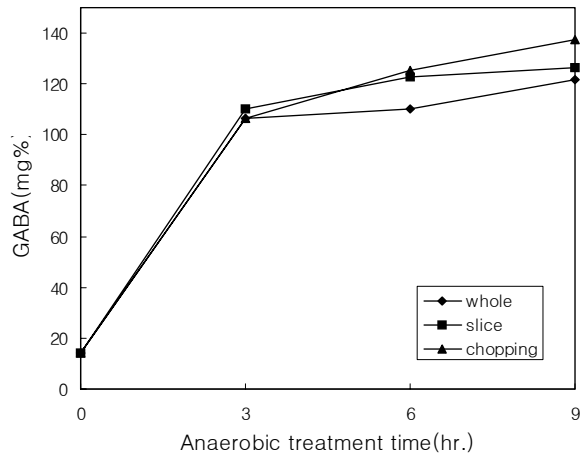


그림 5. 원료의 잎 형태별 GABA 함량 변화

### 3) 위조처리별 효과

빵잎을 일정한 크기로 세절한 다음 상온에서 건조시키면서 건조정도를 3단계로 차등화한 후 시료를 채취하여 각각 플라스틱용기에 담고 앞서 언급한 것과 동일한 방법으로 가스를 주입한 다음 충전, 포장한 것을 40℃에서 시간별 GABA함량의 변화를 측정하였다(표 5).

혐기처리에 앞서 세절한 빵잎의 시든 정도를 3단계로 차등화한 다음 질소가스를 충전하여 40℃에서 시간별 GABA함량의 변화를 측정하였다. 혐기처리에 앞서 시든 정도가 심할수록 혐기처리 초기인 1시간경의 GABA 함량은 차이를 보여 시든 정도가 가장 약한 단계 1의 경우 1시간 경과 후 79.28mg%를 나타내어 초기의 14.01mg% 대비 5.6배 증가한 반면 시든 단계 3은 96.88mg%로 7배의 증가를 보였으나 그 이후에는 처리구사이에 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 5. 초기 원료의 위조 상태에 따른 혐기시간별 GABA 함량 변화

(mg%)

위조상태	혐기처리(시간)				
	0	1	3	6	9
위조단계(하)	14.01	79.28	96.43	96	96.40
위조단계(중)		91.79	97.24	99.64	105.59
위조단계(상)		96.88	98.79	103.00	106.13

생빵잎에 질소가스와 이산화탄소를 각각 충전한 후 40℃에서 혐기처리하면서 GABA 함량을 측정된 결과는 표 6과 같다. 질소가스처리의 경우 혐기 3시간 경과시 100.16mg%으로 초기 함량인 27.13mg%에 비해 3.7배 증가를 보인 이후 혐기시간이 길어질수록 더욱 증가하여 혐기 24시간에는 136.41mg%로 초기의 5.0배를 나타내었다. 이산화탄소 처리구는 GABA 함량이 질소가스처리구보다 더욱 증가하여 혐기 24시간에는 초기값의 5.8배 이상의 상승효과를 보였다. 따라서 빵잎의 경우 이산화탄소를 이용한 혐기처리가 질소가스에 비해 GABA 축적 효과가 우수한 것으로 나타났다.

표 6. 가스종류에 따른 혐기처리 빵잎의 GABA 함량 변화

(mg%)

가스종류	혐기처리(시간)				
	0	3	7	11	24
질소	27.13	100.16	126.72	123.72	136.41
이산화탄소		115.91	136.60	148.41	156.19

앞서 질소가스와 이산화탄소 처리 중 GABA 축적 효과가 우수한 것으로 나타난 이산화탄소를 이용한 혐기처리시 온도 변화에 따른 GABA 함량을 측정된 결과는 그림 6과 같다. 25℃의 경우 혐기처리 3시간에 96.24mg%로 초기의 27.13mg%에 비해 3.5배 증가하여 혐기처리 24시간에는 131.64mg%로 4.85배를 보였다. 이산화탄소처리에 의한 혐기처리시 온도별 GABA 축적 정도를 비교하면 40℃처리구가 각 시간별 GABA 축

적 정도가 높고 특히 40℃, 24시간 혐기처리시 159mg%로 25℃와 비교하여 1.2배 높은 것으로 나타나 혐기처리시 GABA 축적의 중요한 요인의 하나가 온도임을 알 수 있었다.

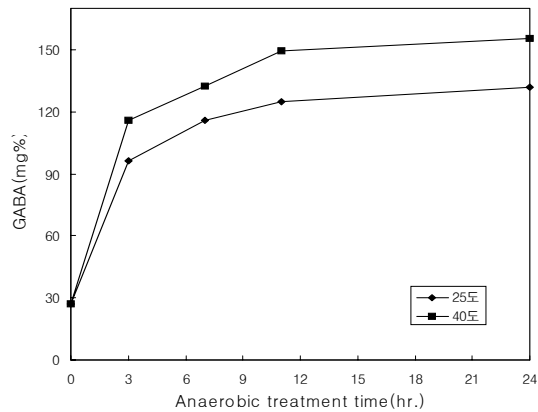


그림 6. 혐기처리 온도별 GABA 함량 변화

#### 4) 혐기, 호기 반복처리 효과

이산화탄소를 충전, 혐기처리의 횟수 변화에 따른 GABA의 축적 변화를 조사하였다. 즉, 1차 3시간 혐기처리 후 포장지를 개봉하고 1~3시간 호기처리한 다음 다시 이산화탄소를 충전하여 2차로 3시간 혐기처리를 반복하였다(그림 7). 1차 혐기처리 후 포장지를 개봉한 상태에서 호기처리 시간을 달리한 결과 1시간 호기처리한 병잎이 119.04mg%로 초기의 12.07mg%에 비해 10배 증가하였으나 호기처리 시간간의 증가폭은 매우 적은 것으로 나타났다. 또한 혐기, 호기 및 2차 혐기처리를 반복한 경우 축적된 GABA 함량은 1회 처리시와 큰 차이가 없어 향후 보다 면밀한 검토가 필요한 것으로 판단되었다.

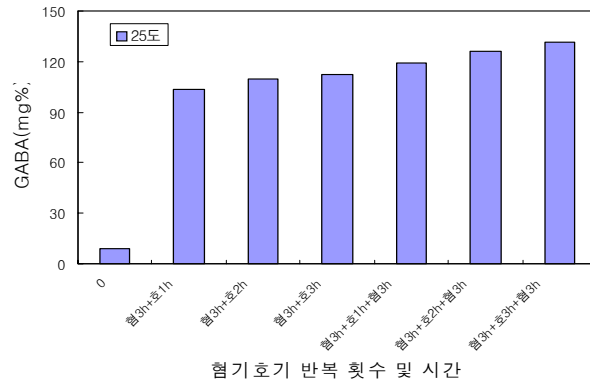


그림 7. 혐기처리 반복횟수에 따른 GABA 함량 변화

#### 다. Glutamic acid 처리 빵잎의 혐기처리

##### 1) 세절 빵잎의 혐기처리

GABA 축적 방안의 하나로 전구물질인 glutamic acid를 빵잎 조직내에 보충하여 반응 중 GABA 의 축적 정도를 조사하고자 세절한 신선 빵잎에 농도를 달리한 글루타민산 용액을 첨가, 반응 후 GABA 함량을 조사하였다. 글루타민산 농도 1.0%, 반응 시간 3시간일 때 150.2 mg%를 나타내어 반응초기의 30.56 mg%에 비해 5배 증가하는 것으로 나타났다.

표 7. 글루타민산 농도에 따른 GABA 함량 변화

(wet basis, mg%)

Glutamate 농도 (%)	반응시간		
	0	3	6
0	30.56	53.8	64.4
0.1	30.56	103.2	116.7
0.5	30.56	130.6	140.7
1.0	30.56	150.2	170.4

한편 1% glutamate 용액에 동결건조 빵잎분말을 최종농도가 10%가 되도록 첨가한 후 초음파처리하여 조효소를 추출 후 원심분리한 액을 37°C에서 반응시킨 결과 첨가된 glutamate에 의한 GABA 축적 효과가 크지 않았다.

반응물의 pH 변화에 따른 GABA 함량 변화를 조사하고자 동결건조한 빵잎에 1% glutamate 10 mL를 첨가하고 반응물의 pH를 조정하여 37°C에서 30분 반응 후 고형물의 GABA 함량을 측정하였다. pH 5.0에서 91.8 mg%로 가장 높은 GABA 축적을 보였다.

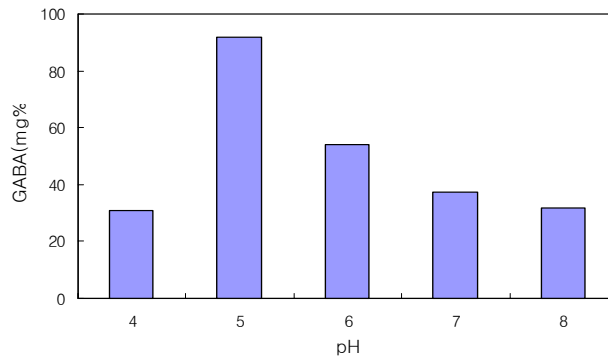


그림 8. 반응물의 pH 변화에 따른 GABA 함량 변화

초핑한 시료에 1% glutamate 용액을 10배 첨가하고 3분간 초음파처리 후 37°C에서 혐기처리한 시료의 GABA 함량을 측정하였다. Glutamate 단독처리구는 초기값인 8.82 mg%에서 1시간 반응시 115.91mg%로 13배 상승되었으며 반응시간이 경과할수록 증가 폭은 매우 적은 반면 sonication 병행처리구의 경우 그들의 증가가 높아져 초기의 12~14배정도 상승하였다.

표 8. 초음파처리에 따른 GABA 함량 변화

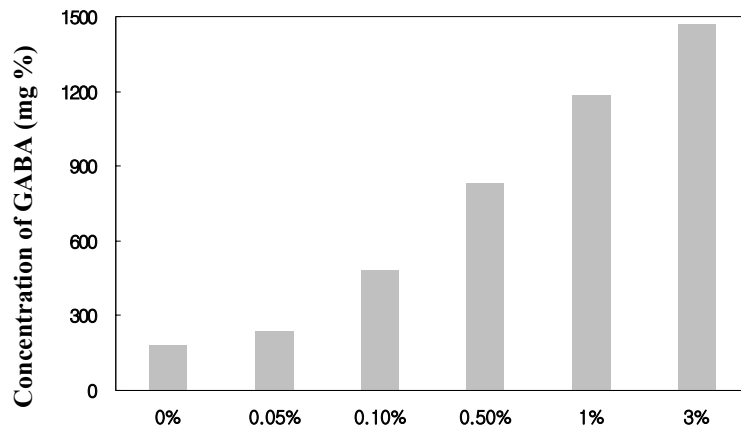
(mg%)

처리구	반응시간				
	0	1	3	6	24
Glutamate(GA)	8.82	115.91	111.81	113.23	115.35
GA+sonication		115.87	118.43	122.99	135.32

## 2) 페이스트 빵잎의 혐기처리

### 가) Glutamic acid 농도

GABA 축적의 최적 반응조건을 검토하고자 농도를 달리하여 제조한 glutamic acid 용액을 신선빵잎 중량의 3배씩 첨가한 뒤 분쇄기를 이용하여 페이스트화 시켰다. 빵잎 페이스트에 20% 구연산 용액을 이용하여 pH 5.2로 조정된 다음 비닐팩에 반응물을 담고 이산화탄소를 충전하여 밀봉한 뒤 40℃ shaking incubator에서 4시간동안 반응시켰다. 반응이 종료된 시료를 전자레인지에서 1분간 열처리하고 40℃에서 열풍건조하여 분말의 GABA 함량 측정에 사용하였다. 그림 1에서 볼 수 있는 바와 같이 물을 첨가하여 반응시킨 대조구도 178.25 mg%로 신선 원료 빵잎에 비해 GABA 함량이 상승하였으나 glutamic acid를 첨가한 처리구는 반응물에 첨가되는 glutamic acid의 농도가 증가함에 따라 혐기처리 후 GABA 함량이 큰 폭으로 상승하여 0.5% 첨가시 833.57mg%, 1% 첨가시 1,187mg%로 대조구에 비해 각각 4.7, 6.7배 상승하였다.



글루타민산 농도

그림 9. 글루타민산 농도에 따른 빵잎페이스트의 GABA 함량 변화

### 나) pH

GABA 축적에 있어서 반응물의 최적의 pH 조건을 검토하고자 선행의 glutamic acid 첨가량별 조건실험에서 결정된 1% glutamic acid 용액을 신선빵잎 중량의 3배로 첨가하고 분쇄기를 이용하여 페이스트화 시켰다. 빵잎 페이스트에 20% 구연산 용액과 sodium carbonate 용액을 이용하여 pH를 4, 5, 6, 7, 8로 조정된 뒤 비닐팩에 담고 이



산화탄소를 충전하여 40℃ shaking incubator에서 4시간동안 반응시켰다. 반응이 종료된 시료를 전자레인지에서 1분간 열처리하고 40℃에서 열풍건조하여 GABA 함량 측정에 사용하였다. pH 5 반응물이 1,367.1mg%로 GABA의 함량이 가장 높았고 pH 4, 8의 반응물이 각각 245.8, 343.7 mg%로 낮게 나타났다.

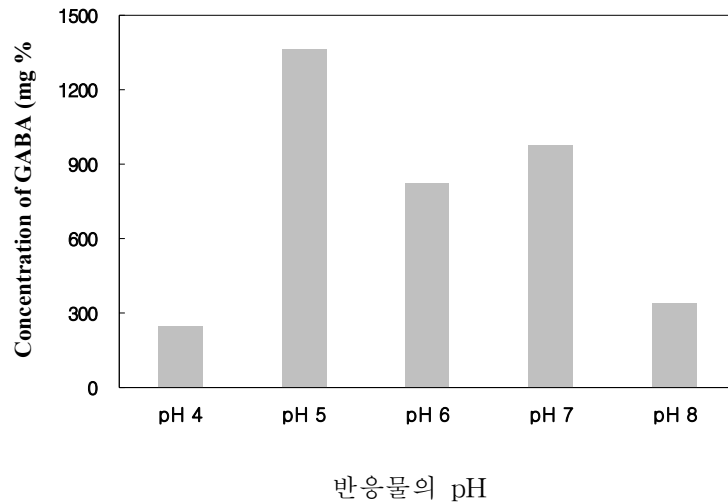
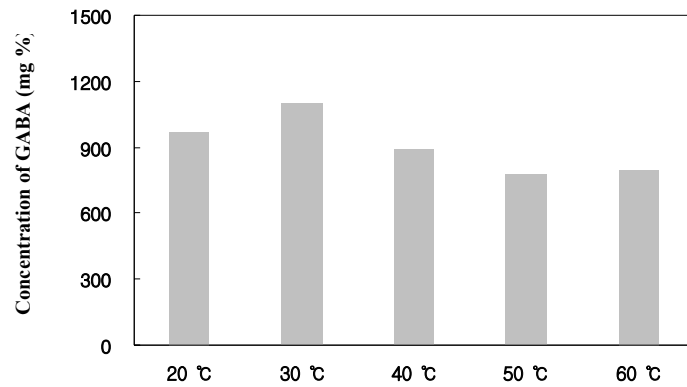


그림 10. pH에 따른 빵잎페이스트의 GABA 함량 변화

#### 다) 반응온도

GABA 측정에 있어서 최적의 반응온도를 검토하고자, 1% glutamic acid 용액을 신선빵잎 중량의 3배로 첨가, 페이스트화시키고 pH 5로 조정된 뒤 비닐팩에 담아 이산화탄소를 충전하여 밀봉한 뒤 각각 20~60℃에서 4시간동안 반응시켰다. 반응이 종료된 시료를 앞에서와 같은 방법으로 처리하고 건조하여 실험에 사용하였다. 그림 1에서 볼 수 있는 바와 같이 반응온도 30℃가 1,097.7 mg%로 GABA 함량이 가장 높았고 20℃ 반응물이 968.7 mg%로 40℃ 이상의 반응물보다 측정된 GABA 함량이 많은 것으로 나타났다.

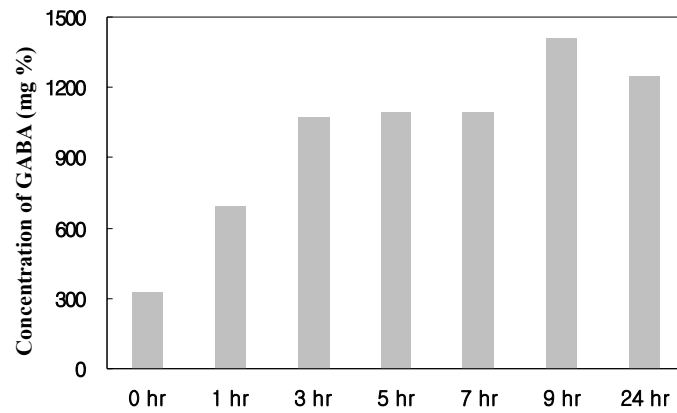


반응온도

그림 11. 반응온도에 따른 뽕잎페이스트의 GABA 함량 변화

#### 라) 반응시간

최적의 반응시간을 검토해 보고자 앞에서와 같은 방법으로 1% glutamic acid를 이용, 페이스트 뽕잎을 제조하고 pH를 조정한 후 이산화탄소를 충전하여 30°C shaking incubator에서 각각 0~24시간동안 반응시켰다. 반응이 종료된 시료를 앞에서와 같은 방법으로 처리하고 건조하여 실험에 사용하였다. 반응시간이 경과함에 따라 반응물내에 축적되는 GABA 함량은 증가하여 3시간 반응시 1,075.4 mg%까지 증가한 다음 평행을 유지하다 반응 9시간에는 1,409.2 mg%까지 상승하였으나 반응 24시간 경에는 다시 1,250.6 mg%로 감소하였다.

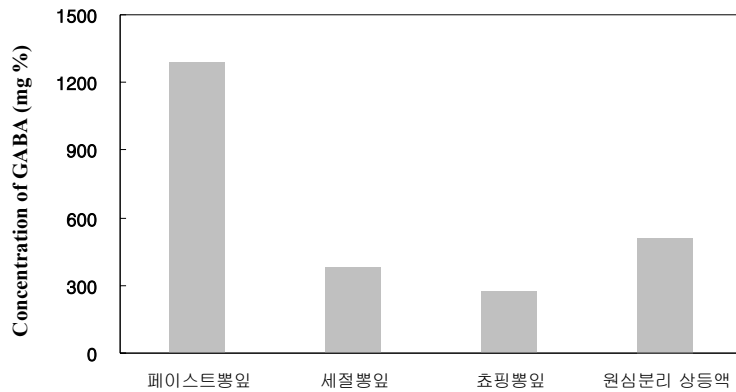


반응시간

그림 12. 반응시간에 따른 빵잎페이스트의 GABA 함량 변화

마) 빵잎 형태

반응전 빵잎의 형태별 차이를 검토하였다. 즉, 빵잎을 0.5cm x 0.5cm로 세절한 것, 이들 세절 빵잎을 초핑을 이용하여 초핑한 것, 기존의 빵잎페이스트를 사용하였다. 세절, 초핑한 시료에는 미리 pH 5로 조정된 1% glutamic acid 용액을 원료 중량의 3배 만큼 가하고 이산화탄소를 충전하여 밀봉한 뒤 30℃ shaking incubator에서 3시간동안 반응시켰다. 그리고 기존의 페이스트 빵잎을 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액에 이산화탄소를 충전하여 밀봉한 뒤 위와 같은 방법으로 반응시킨 후 건조시켜 GABA 함량 측정에 사용하여 비교하였다. 세절, 초핑처리 빵잎이 각각 379.4, 274.6 mg%로 페이스트 형태의 반응물 1,290.4에 비해 반응물내에 축적되는 GABA의 함량이 월등히 낮은 것으로 나타났다. 페이스트를 원심분리하여 얻은 상등액 반응물의 경우 세절, 초핑 빵잎보다 높은 513.4 mg%의 함량을 보였다.



#### 병잎 형태

그림 13. 잎형태에 따른 병잎페이스트의 GABA 함량 변화

#### 바) Gas

반응가스에 따른 조건을 검토하기 위하여 신선병잎에 3배 중량의 1% glutamic acid 용액을 첨가하여 페이스트화 시킨 후 pH5 로 조정하여 비닐팩에 담고 각각 N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> 가스를 충전하여 밀봉한 뒤 30℃ shaking incubator에서 4시간동안 반응시켰다. 반응이 종료된 시료를 전자레인지에서 1분간 열처리하고 40℃에서 열풍건조하여 가스 종류별 GABA 함량을 비교하였다. 병잎페이스트의 혐기처리시 이산화탄소를 사용한 처리구가 923.9 mg%로 질소가스처리구에 비해 약 1.5배 GABA의 축적이 많았다.

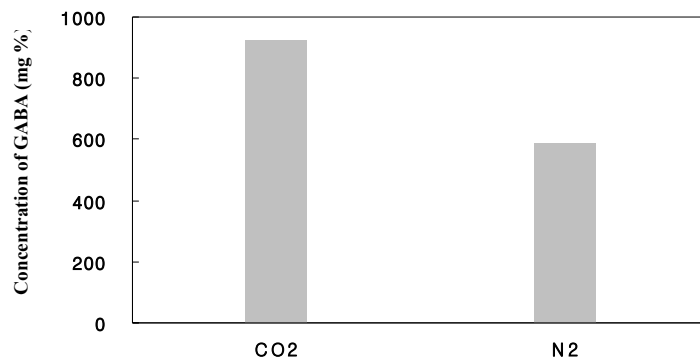


그림 14. 가스종류에 따른 병잎페이스트의 GABA 함량 변화

라. 빵잎의 GABA 축적을 위한 혐기처리 공정도 및 공정별 특징

빵잎의 GABA 축적을 위한 혐기처리 공정도를 요약하면 그림 15와 같다. 빵잎을 적당한 크기로 세절하고 초퍼를 이용하여 초핑하였다. 원료 중량대비 2배의 1% glutamic acid 용액과 함께 콜로이드밀을 이용하여 페이스트화 시켰다. 20% 구연산 용액을 이용하여 빵잎 페이스트의 pH를 5.5로 조정한 다음 적당한 용기 또는 비닐에 넣고 CO<sub>2</sub>를 충전, 밀봉하였다. 30℃에서 30분 간격으로 흔들며 주면서 3시간 반응을 시켰다. 반응이 완료된 것을 85℃정도로 열처리하고 동결 또는 열풍건조한 다음 분쇄하였다.

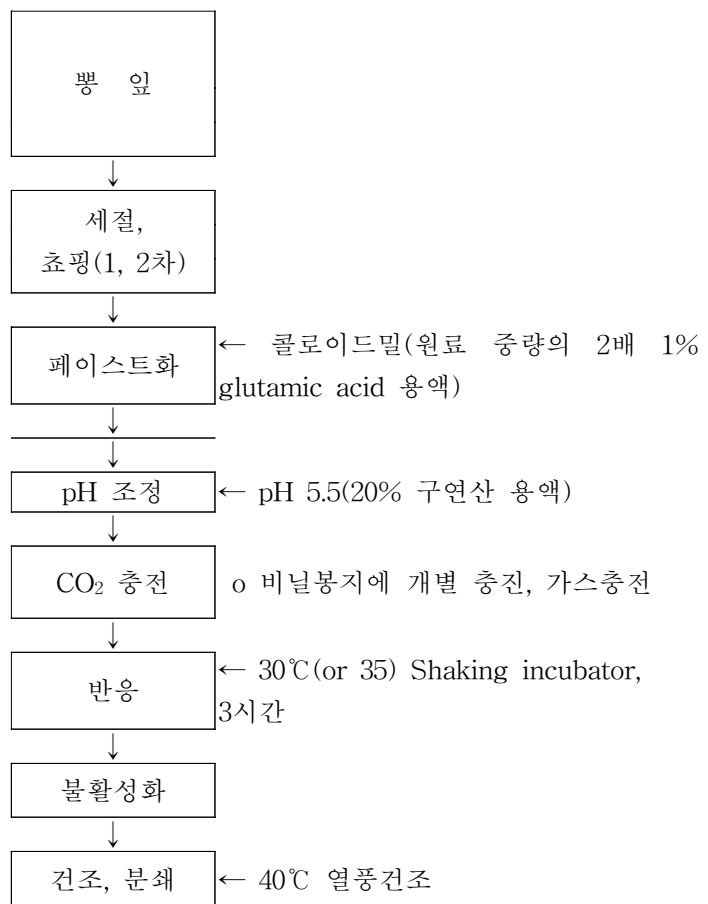


그림 15. 빵잎의 GABA 축적 공정도

마. GABA 축적 빵잎의 성분 분석

GABA를 축적시킨 빵잎의 성분 변화를 조사한 결과는 표 9, 10, 11과 같다. GABA 축적 빵잎 분말의 일반성분을 살펴보면 단백질과 회분 함량이 각각 27.4, 14.1%로 원료 빵잎보다 높은 것으로 나타났는데 이는 반응시 첨가된 glutamic acid에 의한 것으로 판단된다. GABA 함량은 1,000 mg%로 원료 빵잎 대비 50배가 증가하였고 총폴리페놀과 플라보노이드 함량은 큰 차이가 없었다. 무기질의 경우 마그네슘, 철, 칼슘은 원료 빵잎과 차이가 없었으나 나트륨의 함량은 84.2 mg%로 상승하였다.

이들 GABA 축적 빵잎의 에스트로젠 유사물질의 함량을 측정된 결과 genistein, kaempferol, apigenin, quercetin이 동정되었고 4개 성분 중 quercetin의 함량이 가장 높았으며 헹기처리에 의해 genistein은 증가한 반면 quercetin이 원료 빵잎의 33.4 mg/g에서 19.1 mg%로 감소하였다.

표 9. GABA 축적 빵잎의 일반성분

(%)

시료	수분	지질	단백질	회분	탄수화물
대조구	5.61	2.14	21.18	9.02	62.20
처리구	5.07	2.00	27.44	14.13	51.36

표 10. GABA 축적 빵잎의 GABA, 총폴리페놀, 플라보노이드 및 무기질 함량

(mg%, 건물량)

시료	GABA	총폴리페놀	플라보노이드	무기질				
				Mg	Fe	K	Ca	Na
대조구	20.25	6.36	8.27	304.0	11.1	2,454.1	1,680.5	29.2
처리구	1,003	4.48	7.93	300.6	10.4	2,341.6	1,677.0	84.2

표 11. GABA 축적 콩잎의 phytoestrogen 함량

(mg/g)

Phytoestrogen	생 콩잎	헤파처리 콩잎
Genistein	0.841	3.381
Kaempferol	4.906	2.938
Apigenin	3.808	1.314
Quercetin	33.454	19.090

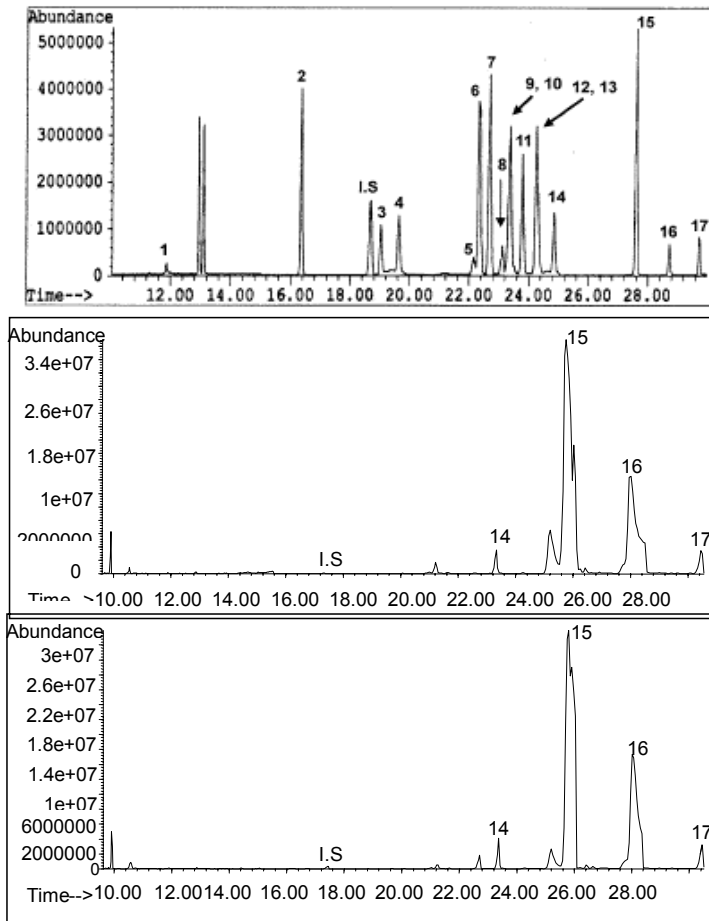


그림 16. GABA 축적 빵잎의 phytoestrogen 물질의 크로마토그램

1. Flavone; 2. Equol; 3. Enterodiol; 4. Chrysin; 5. Enterolactone; 6. a-Zearalenol;
7. b-Zearalenol; 8. Zearalanone; 9. Biochanin-A; 10. Catechin; 11. a-Zearalenol;
12. Daidzein; 13. b-Zearalanol; 14. Genistein; 15. Kaempferol; 16. Apigenin;
17. Quercetin; IS; 17β-estradiol-d<sub>4</sub>



## 제 2 절 GABA 축적 뿌잎의 혈압강하 효능 검증

### 1. 재료

혈압강하 효능 검증을 위한 뿌잎 시료는 앞의 GABA 축적 시료 중 생 뿌잎을 플라스틱용기에 담아 질소가스를 충전, 밀봉 후 40℃에서 4시간 혐기처리 후 동결건조한 분말과 뿌잎을 1% glutamic acid 용액과 함께 콜로이드밀로 페이스트화시킨 후 혐기처리하고 열풍건조한 분말을 각각 사용하였다.

### 2. 실험방법 및 내용

#### 가. 추출물의 제조

생 뿌잎을 혐기처리 후 동결건조한 분말에 증류수, 75% 메탄올, 75% 아세톤을 각각 첨가하여 98, 80℃에서 1시간 환류추출하고 여과한 여액을 45℃ 진공농축기에서 농축하여 증류수로 일정량으로 정용하고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 GABA 축적 시료의 용매별 추출물을 제조하였다. 추출물의 수율은 분말 시료의 중량에 대한 동결건조 후 고형물의 중량 백분비로 산출하였다. 한편 뿌잎을 1% glutamic acid 용액과 함께 콜로이드밀로 페이스트화시킨 후 혐기처리하고 열풍건조한 분말에 40배의 물을 가하여 현탁시킨 다음 1시간 98℃에서 추출, 여과하여 얻은 액은 동결건조하여 사용하였다.

#### 나. ACE 저해작용

ACE(Angiotensin Converting Enzyme)에 대한 GABA 축적 뿌잎 용매추출물의 저해율은 동결건조 분말을 증류수에 용해시킨 다음 시료 50  $\mu$ l에 ACE 조효소액 50  $\mu$ l, 10 mM sodium borate buffer(pH 8.3) 100  $\mu$ l를 가한 후 37℃ shaking incubator에서 5분간 반응시켰다. 이 반응액에 기질인 hippuryl-histidyl-leucine 용액(HHL, 27 mg/2.5 mL in sodium borate buffer) 50  $\mu$ l를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 250  $\mu$ l를 가하여 반응을 종료시켰다. 여기에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 vortex mixer로 15초간 진탕 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액 1 mL를 취하였다. 이 상등액을 Temp-Block heater로 건조시킨 후 증류수 3 mL를 가하여 용해시킨 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE저해율을 산출하였다. 대조구 시험은

시료용액 대신에 증류수 50  $\mu$ l를 가하였다.

$$\text{ACE 저해율(\%)} = \left( 1 - \frac{A}{B} \right) \times 100$$

A : 시료 첨가구의 흡광도

B : 시료 무첨가구의 흡광도

#### 다. 혈관이완작용

각 추출물의 음성 SD rats에서 적출한 하행흉부대동맥에 대한 혈관이완작용을 측정하였다. 즉, 적출한 혈관을 길이 약 2~3 mm의 ring 형태로 잘라 4 mL의 physiological salt solution(PSS 조성 : NaCl 115, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2.1, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, glucose 11, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM) organ bath에 현수시킨 후 1 g 장력으로 60분간 평형화시키고 70 mM KCl 용액에 반응이 안정될 때까지 반복적으로 노출시켰다. Norepinephrine(NE)으로 혈관의 수축을 유도하고 최대 수축상태에서 시료를 투여하였다. Organ bath용액은 37°C, pH 7.5, 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> mixture 통기상태로 유지시켰다. 혈관의 장력은 force-displacement transducer가 연결된 polygraph system과 computer analyser로 측정하였다. Endothelium dependent relaxasing factot(EDRF) inhibitor인 N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine(L-NNA), methylene blue, indomethacin 및 atropin으로 inhibition한 실험에서는 혈관의 수축을 유도하기 전에 각 inhibitor를 organ bath에 첨가하여 약 20분 preincubation 시킨 후 NE로 혈관수축을 유도하고 최대수축이 일어난 상태에서 시료를 투여하였다. 일부 실험에서는 혈관내피 의존적 이완효과를 검색하기 위해 PSS에 담근 솜을 사용하여 혈관의 내부를 부드럽게 분질러서 내피를 제거한 후 사용하였다.

#### 라. 실험동물을 이용한 혈압강하 효능 검증

##### 1) 실험동물 및 식이

실험동물은 5주령의 본태성 고혈압쥐(Spontaneously hypertensive rat: SHR, Japan SLC, Inc.)를 분양받아 10주령까지 적응기와 안정기를 거친 다음 실험식이를 공급하였다. 실험군은 고혈압쥐에 표준식이를 공급한 대조군(Control), 팽잎을 1% 혼합한 식

이를 공급한 1% 빵잎균, 빵잎을 5% 혼합한 식이를 공급한 5% 빵잎균, GABA 축적 빵잎을 1% 혼합한 식이를 공급한 GABA 축적 1% 빵잎균 및 GABA 축적 빵잎을 5% 혼합한 식이를 공급한 5% GABA 축적 빵잎균의 5가지 처리군으로 나누어 6주간 사육하였다. 이때 물과 식이는 자유로이 섭취하도록 공급하였고 식이는 4℃에서 보관하며 사용하였으며, 실험동물들은 환경조절된 사육실(조명 6:00 pm~6:00 am, 온도 22 ±2℃)에서 분리사육하였고 각 실험군당 5마리로 하였다.

실험식이의 조성은 표 12와 같으며, 대조군은 표준식이(AIN-93)로 공급하였고, 1, 5% 빵잎균과 1, 5% GABA 축적 빵잎균 등은 이들 원료의 열량과 식이섬유량을 고려하여 식이배합을 조정하였다.

표 12. 빵잎첨가 실험용 식이조성

(%)

조성물	정상군	빵잎		혐기처리 빵잎	
		1% 첨가군	5% 첨가군	1% 첨가군	5% 첨가군
Starch	55	54	50	54	50
Casein	20	20	20	20	20
Sucrose	10	10	10	10	10
Cellulose	5	5	5	5	5
Corn oil	5	5	5	5	5
Mineral mix <sup>1)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix <sup>2)</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
생 빵잎	-	1	5	-	-
GABA 축적 빵잎	-	-	-	1	5

1) AIN mineral mixture(g/kg mixture) : calcium phosphate, dibasic 500, sodium chloride 74, potassium citrate, monohydrate 220, potassium sulfate 52, magnesium oxide 24, manganous carbonate 2.5, ferric citrate 6, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose, finely powdered, to make 1000gram.

2) AIN vitamin mixture(g/kg mixture) : thiamine HCl 600, riboflavin 600, pyridoxine HCl 700, nicotinic acid 3000, D-calcium pantothenate 1600, folic acid 200, D-biotin 20, cyanocobalamin 1, retinyl palmitate 120,000 retinol equivalents, dl- $\alpha$ -tocophenyl acetate 5,000IU vitamin E activity, cholecalciferol 2.5, menadione 5.0, sucrose finely powdered, to make 1,000gram.

## 2) 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율

사육기간 중 실험동물의 체중은 주 1회 측정하였으며, 식이섭취량은 주 2회 일정시간에 식이급여량과 잔량을 측정하여 산출하였다. 식이효율(feeding efficiency ratio(FER))은 6주간의 총 식이섭취량에 대한 체중증가량의 비 ( $FER = \text{body weight gain(g)}/\text{food intake(g)}$ )로 계산하였다.

## 3) 혈압측정

혈압은 고혈압쥐를 혈압측정용 용기에 고정시킨 다음 30℃로 조정된 항온기에 넣어 10~15분간 안정화시킨 다음 꼬리동맥으로부터 미동맥혈압측정장치(Muromachi Kikai MK-1000, Japan)를 사용하여 수축기혈압(systolic blood pressure)을 측정하였으며 한 동물에서 3회 반복 측정한 평균값을 측정치로 하였다.

## 4) 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 SAS(Statistical Analysis System)를 사용하여 분산분석을 행한 후 Duncan's Multiple Range Test로 각 시료간의 유의성을 검증하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 뽕잎 용매 추출물의 수율 및 GABA 함량

생 뽕잎을 그대로 헹기처리한 분말을 열수, 80% 메탄올, 75% 아세톤으로 추출하여 동결건조한 분말의 GABA 함량을 측정된 결과 열수 추출물은 헹기처리구가 63.10 mg%로 생 뽕잎의 그것에 비해 6배 높은 것으로 나타났으며, 80% 메탄올 추출물에서 6.9배, 75% 아세톤 추출물에서 6.6배로 이어져 추출용매에 관계없이 헹기처리 뽕잎 추출물은 GABA 함량이 6배 이상 증가됨을 알 수 있었다. 한편 헹기처리 뽕잎 중 75% 아세톤 추출물에서 95.93 mg%를 보여 물 추출물에 비해 1.52배 증가한 GABA 함량을 나타내었으며, 생 뽕잎의 경우 모든 추출용매에서 10~14 mg%에 지나지 않아 매우 낮은 수치를 보였다. 따라서 헹기처리 뽕잎의 GABA 함량은 추출용매에 관계없이 75% 아세톤>80% 메탄올>열수 추출물의 순으로 생 뽕잎에 비해 높았고, 생 뽕잎은 추출용매에 의한 차이가 거의 없음을 알 수 있었다.

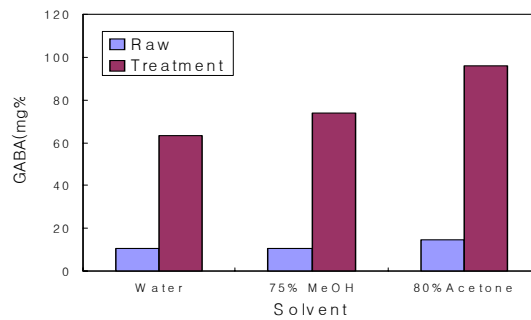


그림 17. GABA 축적 시료의 용매 추출물의 GABA 함량

#### 나. 뽕잎 용매추출물의 ACE 저해작용

이들 용매별 추출물의 ACE 저해작용을 측정된 결과는 그림 18과 같다. 추출용매에 관계없이 생뽕잎이 헹기처리 뽕잎보다 ACE 저해효과가 높은 것으로 나타났으며, 추출용매별 ACE 저해 작용은 열수 추출물의 경우 생뽕잎 및 헹기처리뽕잎이 각각 56.18%와 48.47%를 보여 가장 높았고 70% 아세톤 추출물이 생, 헹기처리뽕잎에서 35.20% 및 28.05%로 열수 추출물에 비해 0.62배와 0.47배를 나타내었다. 이는 열수 추출물의 1/2정도의 ACE 저해작용에 미치지 못하는 결과이며 80% 메탄올 추출물의 경

우 다른 용매의 중간정도를 나타내었다. 한편 1% glutamic acid를 이용하여 페이스트 상태로 헹기처리하여 GABA를 축적시킨 뽕잎분말 열수추출물의 경우 49.56%로 앞서 신선 상태의 뽕잎을 그대로 헹기처리한 것과 유사하였다.

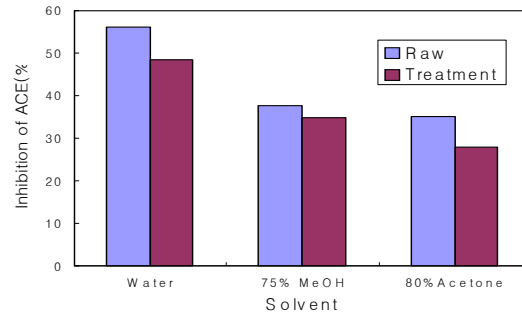


그림 18. GABA 축적 시료 용매추출물의 ACE 저해작용

## 다. 뽕잎 용매추출물의 혈관이완 효과 검색

### 1) 추출물의 혈관이완작용

생 뽕잎을 그대로 헹기처리한 시료의 methanol, acetone 및 열수추출물의 각 동결 건조 시료에 대해 혈관이완작용을 측정하였다. 내피가 온전히 보존된 혈관에 대해 모든 시료에서 평활근이완에 의해 나타나는 평활근의존적 이완작용이 나타났으며 그 작용은 추출 용매에 따라 차이를 나타내었다. 즉, NE로 최대 수축을 유도한 혈관을 현수시킨 organ bath에 시료를 첨가한 후 수축된 혈관을 50% 이완시키는데 걸리는 시간이 methanol 추출물이 약 1.0~1.8분으로 가장 빨랐고 (그림 19), 열수추출물이 약 3.4~10분 (그림 20), acetone 추출물은 약 29~52분 (그림 21)으로 가장 많은 시간이 필요한 것으로 나타나 methanol 추출물의 혈관이완작용이 가장 큰 것으로 나타났다. 그러나 뽕잎 시료의 헹기처리에 따른 혈관이완작용의 유의적인 증가는 나타나지 않았다.

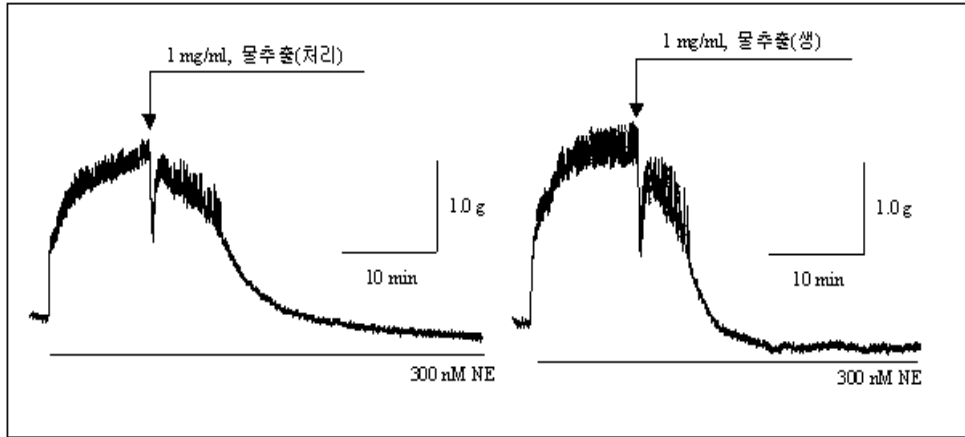


그림 19. 생 뽕잎과 혐기처리 물추출물의(1 mg/mL)에 의한 쥐의 하행흉부대동맥의 이완효과. NE(300 nM)로 최대 수축 후 시료 첨가.

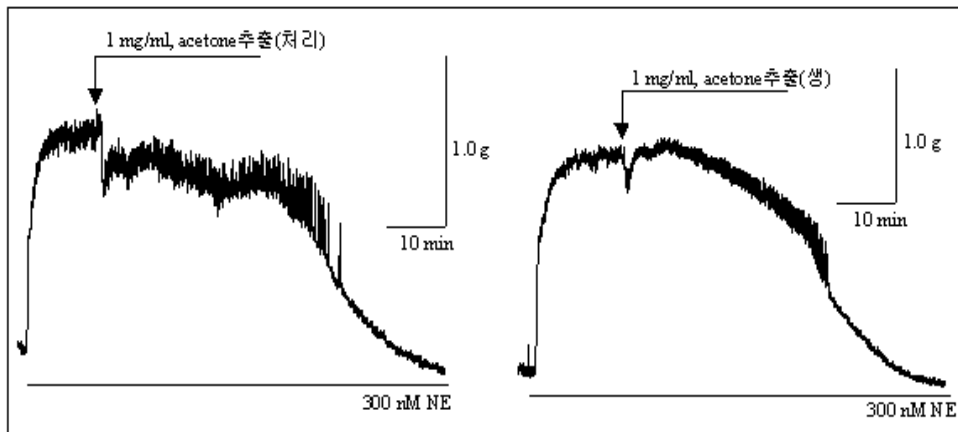


그림 20. 생 뽕잎과 혐기처리 acetone추출물의(1 mg/mL)에 의한 쥐의 하행흉부대동맥의 이완효과. NE(300 nM)로 최대 수축 후 시료 첨가.

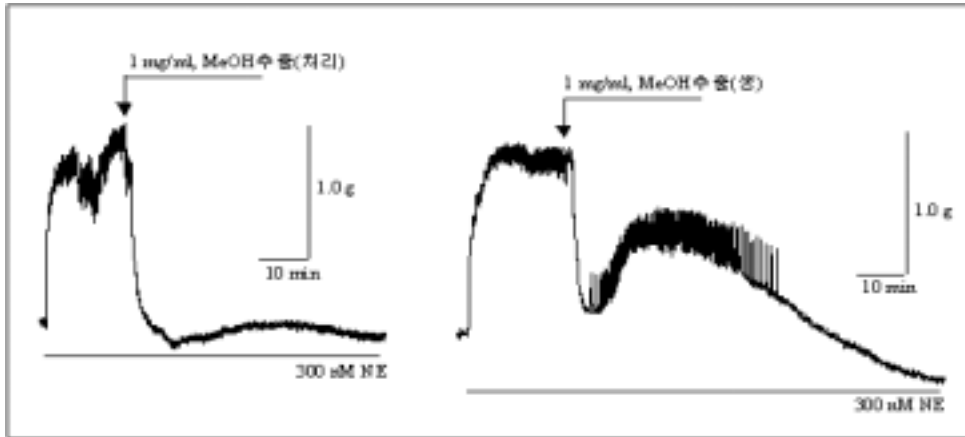


그림 21. 생 뽕잎과 혐기처리 MeOH추출물의(1 mg/mL)에 의한 쥐의 하행흉부대동맥의 이완효과. NE(300 nM)로 최대 수축 후 시료 첨가.

한편 1% glutamic acid를 이용하여 페이스트상태로 혐기처리하여 GABA를 축적시킨 뽕잎분말의 물추출물의 효능을 검토하였다. 혐기처리한 뽕잎 물추출물 및 혐기처리하지 않은 생 뽕잎 물추출물의 각 동결건조 시료에 대해 혈관이완작용을 측정하였다.

내피가 온전히 보존된 혈관에 대해 혐기처리한 뽕잎 물추출물과 생 뽕잎 물추출물을 투여한 결과 혈관이완활성의 차이가 유의적으로 나타났으며, 그 활성이 농도 의존적이었다(그림 22). 혐기처리한 뽕잎 물추출물의 경우 농도 1.0, 0.3, 0.1 mg/mL에서 각각 높은 활성(100,  $86.3 \pm 1.5$ ,  $72.3 \pm 1$ %)을 나타냈으나(그림 23), 생 뽕잎 물추출물은 농도 1.0 mg/mL에서만 그 활성( $40 \pm 10$ %)을 나타냈으며, 그 이하의 농도에서는 그 활성을 나타내지 않았다(그림 24).



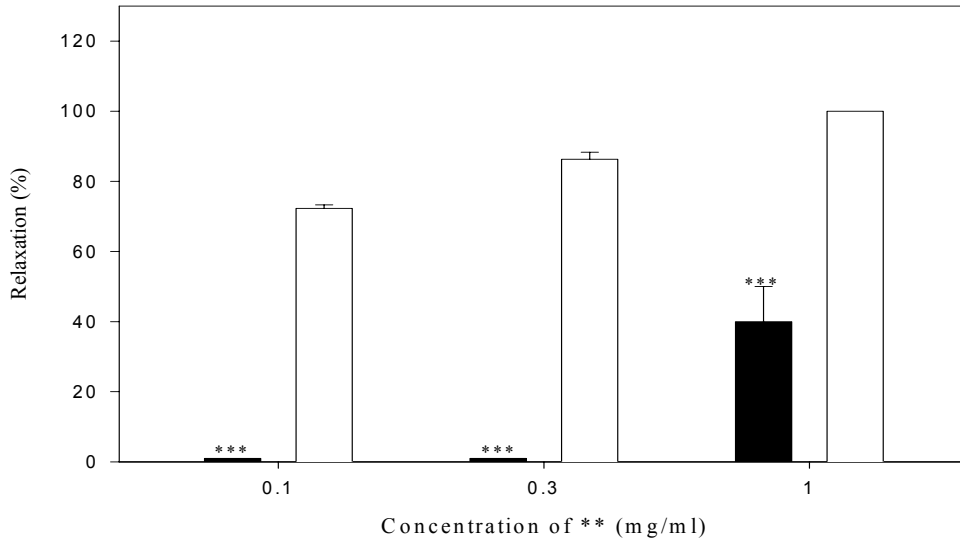


그림 22. 생 뿌잎(■, n=3~4, 0.1~1.0 mg/mL)과 험기처리 뿌잎 물추출물(□, n=4, 0.1~1.0 mg/mL)의 혈관이완효과의 비교. \*\*\* = P < 0.001.

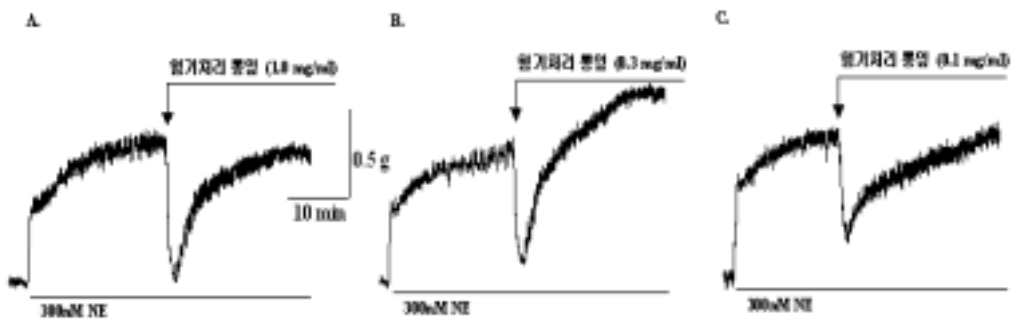


그림 23. 험기처리 뿌잎 물추출물(A, n=4, 1.0 mg/mL, B, n=4, 0.3 mg/mL, and C, n=4, 0.1 mg/mL)에 의한 쥐의 하행흉부대동맥의 이완효과. NE (300nM)로 최대수축 후 시료 첨가.

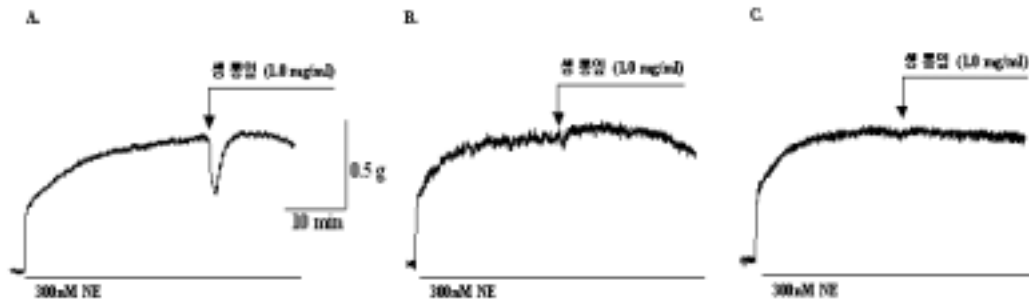


그림 24. 생 뽕잎 물추출물(A, n=4, 1.0 mg/mL, B, n=4, 0.3 mg/mL, and C, n=4, 0.1 mg/mL)에 의한 쥐의 하행흉부대동맥의 이완효과. NE (300nM)로 최대수축 후 시료 첨가.

## 2) 추출물의 내피세포 의존적 혈관이완작용 및 작용기전

일반적으로 acetylcholine, bradkinin, histamin 등의 혈관활성 물질들은 혈관내피세포를 자극하므로써 endothelium derived relaxing factor인 nitric oxide(NO)를 유리시키고 이 유리된 NO는 혈관이완 시그널을 혈관내피세포로부터 인접한 혈관평활근세포에 전달하여 혈관확장을 일으킨다. 이 때 NO는 혈관내피세포에 의존하는 혈관확장의 중요한 인자가 된다. NO에 의한 순간 이완작용은 nitric oxide synthase inhibitor인 N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine(L-NNA)에 의해 억제되는 것으로 보고되고 있다.

뽕잎 용매별 추출물 중 특히 열수 추출물에서는 평활근 의존적 이완작용 뿐 아니라 시료 투여 즉시 나타나는 내피세포 의존적 순간이완작용이 동시에 나타났으며 이 작용은 험기처리한 뽕잎시료가 처리하지 않은 대조구 보다 큰 경향을 나타내었다. 뽕잎 열수 추출물에서 나타나는 순간혈관이완작용이 내피세포로부터 분비되는 NO에 의한 것인지 그 작용기전을 확인하기 위하여 L-NNA에 의한 저해효과를 확인하였다. 그림 6B에 나타난 것 같이 험기처리한 뽕잎 시료 및 처리하지 않은 시료의 물 추출물에 의한 순간 혈관이완작용은 L-NNA의 전처리로 대부분 소멸되는 것으로 나타나 이 작용이 혈관내피에서 분비되는 NO에 의한 것으로 추정되었다.

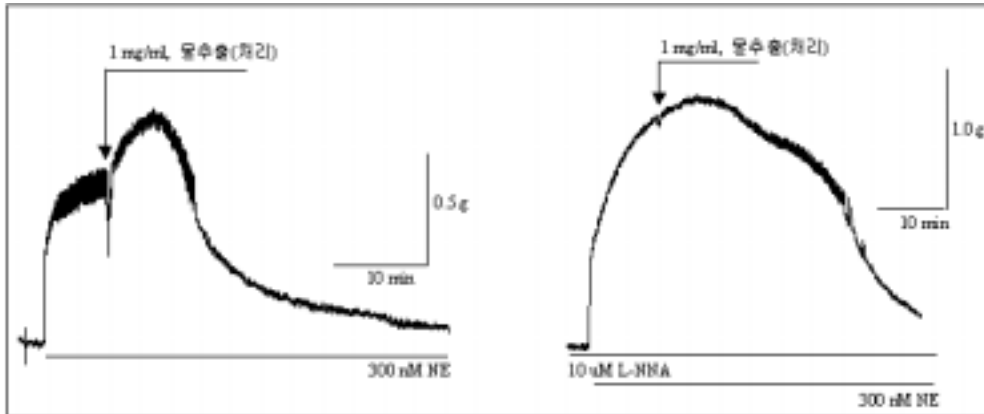


그림 25. L-NNA에 의한 물추출물의 내피의존성이완작용의 저해효과. Aortas were contracted with NE in the absence (A) or presence (B) of 10  $\mu$ M L-NNA(treated for 20 min) and then extract(1 mg/mL) was added to the muscle. Representative tracings.

한편 1% glutamic acid를 이용하여 페이스트상태로 험기처리하여 GABA를 축적시킨 뽕잎분말과 대조구의 물추출물을 대상으로 내피가 온전히 보존된 혈관 및 내피를 제거한 혈관에 대해 두 추출물의 농도에 따른 그 활성을 검색하였다. 즉, 300 nM NE로 최대 수축을 유도한 혈관에 각 추출물의 농도가 1.0 mg/mL이 되도록 각각 첨가하였다. 험기처리 뽕잎 추출물을 그림 26과 같이 내피가 존재하는 혈관에서는 추출물을 투여한 순간 혈관확장작용이 나타났으나, 내피를 제거한 혈관에서는 이러한 작용이 관찰되지 않았으며, 생 뽕잎 추출물 역시 그림 27과 같이 내피 존재시 그 활성이 나타났으나 내피를 제거한 혈관에서는 그 활성이 나타나지 않아 두 추출물의 혈관확장작용은 내피세포 의존적임을 확인 할 수 있었다. 두 추출물의 농도 변화(0.1~1.0 mg/mL)에 따른 내피가 보존된 혈관과 제거한 혈관에서의 활성의 차이 역시 유의적인 차이를 나타내었다(그림 28(A),(B)).

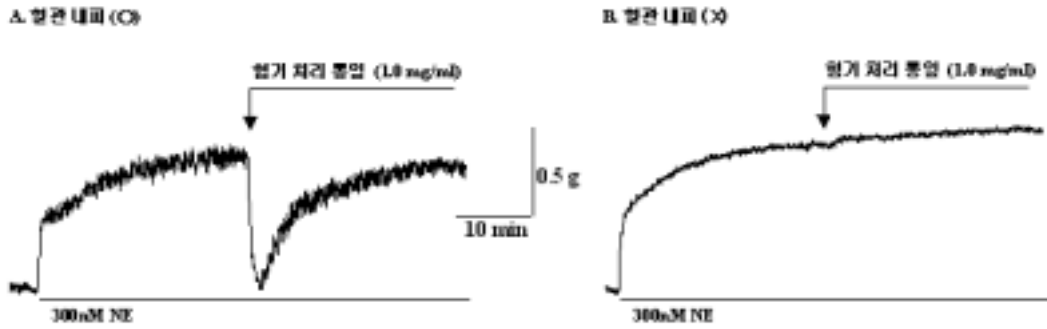


그림 26. 혈관내피가 보존되어 있는 혈관(A, n=4, 1.0 mg/mL)과 제거된 혈관(B, n=4, 1.0 mg/mL)에서의 헤파린 처리 용액 물추출물의 이완효과 비교. NE로 최대수축 후 시료 첨가.

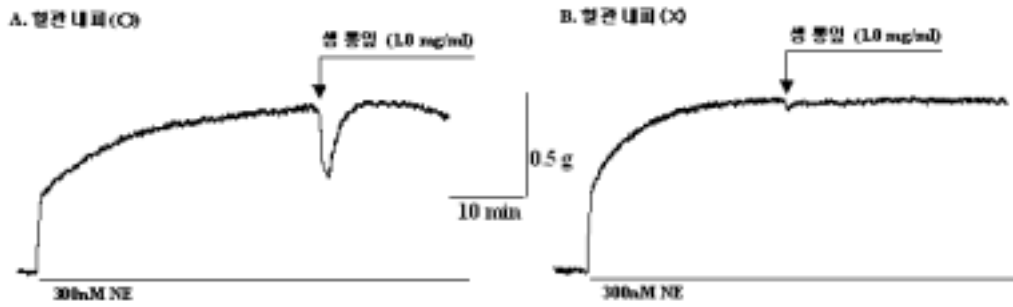


그림 27. 혈관내피가 보존되어 있는 혈관(A, n=4, 1.0 mg/mL)과 제거된 혈관(B, n=4, 1.0 mg/mL)에서의 생 용액 물추출물의 이완효과 비교. NE로 최대수축 후 시료 첨가.

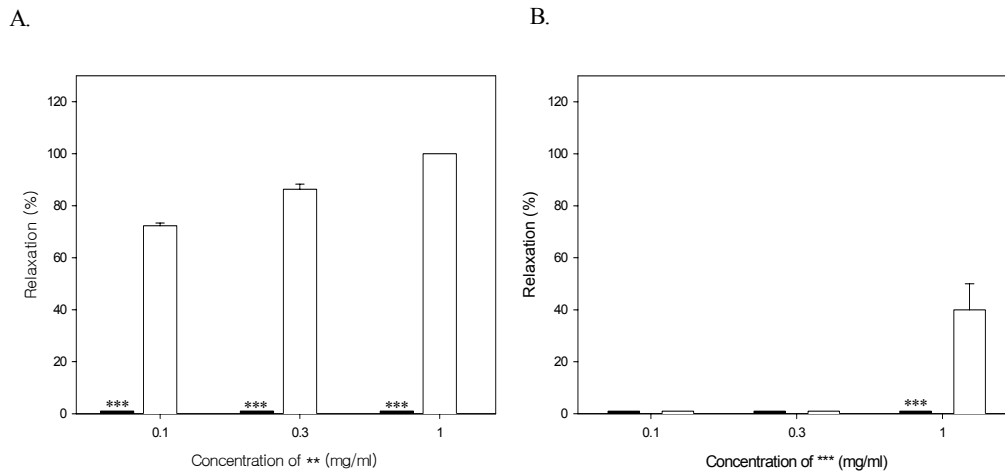


그림 28. 생 뽕잎과 험기처리 뽕잎 물추출물의 농도변화에 따른 내피가 보존된 혈관 (A)과 제거된 혈관(B)에서의 혈관이완효과의 비교. \*\*\* =  $P < 0.001$ .

### 3) 추출물물의 내피세포 의존적 혈관이완작용의 기전 검색

일반적으로 acetylcholine 등의 혈관활성 물질들은 muscarinic receptor 등을 통해 혈관내피세포를 자극하므로써 endothelium derived relaxing factor(EDRF)인 nitric oxide(NO) 및 prostacyclin을 유리시키고 이 유리된 EDRF는 혈관이완 시그널을 혈관 내피세포로부터 인접한 혈관평활근세포에 전달하여 혈관확장을 일으킨다. NO에 의한 혈관이완작용은 크게 nitric oxide synthase inhibitor인  $N^G$ -nitro-L-arginine (L-NNA)와 cyclic GMP inhibitor인 methylene blue에 의해 억제되는 것으로 보고되고 있으며, prostacyclin에 의한 이완작용은 cyclooxygenase inhibitor인 indomethacin에 의해 억제되는 것으로 보고되고 있다.

내피세포 의존적인 험기 처리 뽕잎 추출물과 생 뽕잎 추출물의 혈관이완작용의 기전을 확인하기 위하여 L-NNA, methylene blue 및 indomethacin과 muscarinic receptor inhibitor인 atropin에 의한 저해효과를 확인하였다. 그림 29와 같이 L-NNA ( $10 \pm 3\%$ ), methylene blue( $33 \pm 4\%$ ), atropin( $0\%$ )을 처리한 후 시료 첨가 시 blank( $86 \pm 2\%$ )와 비교하여 혈관이완활성이 저해되는 것으로 확인되었다. 그러나 cyclooxygenase inhibitor인 indomethacin( $80 \pm 3\%$ )에 의해서는 그 활성이 저해되지 않음을 확인하였으며, indomethacin을 제외한 inhibitor들에 의한 혈관이완활성의 저해도는 유의적으로 차이가 나타났다(그림 30). 또한 생 뽕잎 추출물 역시 그림 31과 같이

L-NNA(0%), methylene blue(17±5%), atropin(0%)에 의해 그 활성이 저해되는 것으로 확인되었으며, indomethacin(42±5%)에 의해서는 그 활성이 저해되지 않음을 확인하였다. Indomethacin을 제외한 각 inhibitor들의 저해도는 유의적으로 차이가 나타났다(그림 32).

이러한 결과를 토대로 혐기 처리 뿔잎과 생 뿔잎의 혈관이완활성이 혈관 내피세포에서 muscarinic receptor에 생성된 NO에 의한 혈관이완효과를 유발함을 확인할 수 있었다.

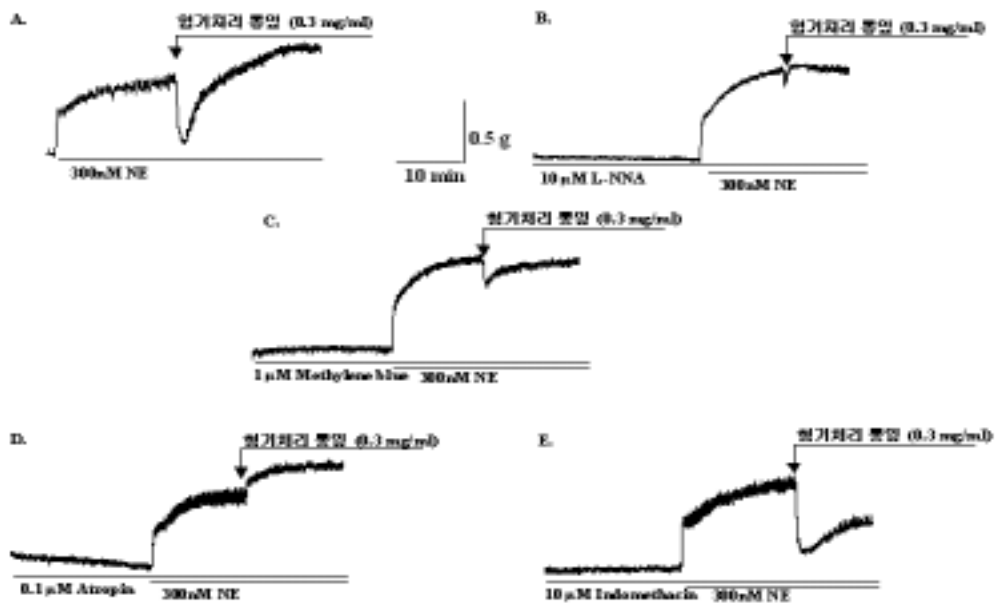


그림 29. Blank(A, n=4)와 L-NNA(B, n=4), methylene blue(C, n=3), atropin(D,n=3), 그리고 indomethacin(E, n=3)을 20분 동안 처리한 후 NE로 최대 수축 후 혐기처리 뿔잎(0.3 mg/mL)에 의한 이완효과와의 비교.

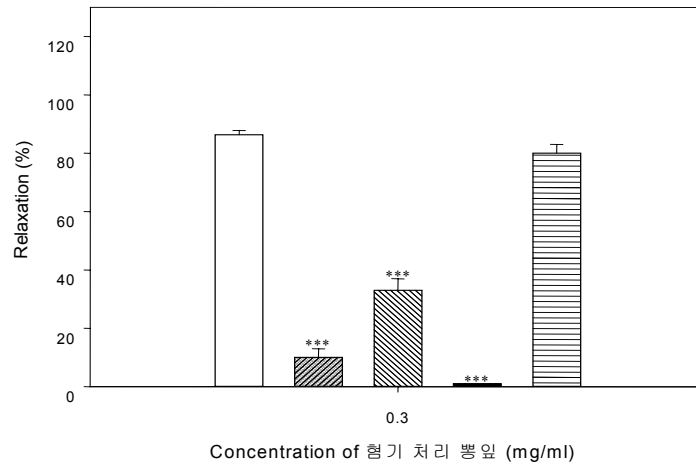


그림 30. Blank(□, n=4)와 L-NNA(⊠, n=4), methylene blue(▨, n=3), atropin(■, n=3), 그리고 indomethacin(▤, n=3) 처리 후의 헝기처리 뽕잎 물추출물의 혈관이완 효과의 비교. \*\*\* = P < 0.001.

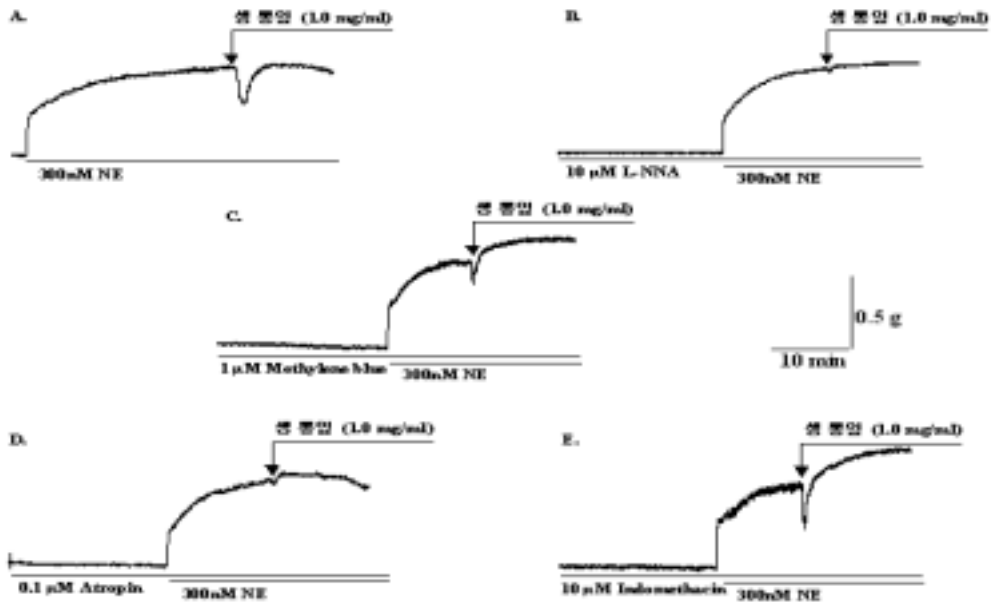


그림 31. Blank(A, n=4)와 L-NNA(B, n=4), methylene blue(C, n=3), atropin(D, n=3), 그리고 indomethacin(E, n=3)을 20분 동안 처리한 후 NE로 최대 수축 후 뽕잎 물추출물(1.0 mg/mL)에 의한 이완효과와의 비교.

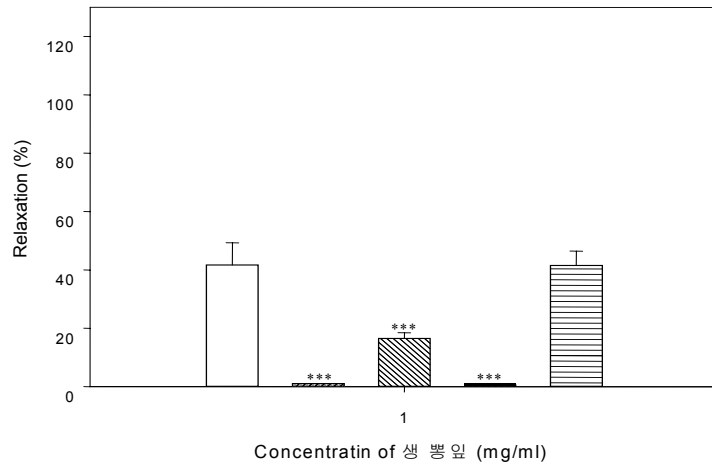


그림 32. Blank(□, n=4)와 L-NNA(▨, n=4), methylene blue(▤, n=3), atropin(■, n=3), 그리고 indomethacin(▥, n=3) 처리 후의 생 뽕잎 추출물의 혈관이완효과의 비교. \*\*\* = P < 0. 001.

#### 라. 실험동물을 이용한 GABA 축적 뽕잎의 혈압강하 효능 검증

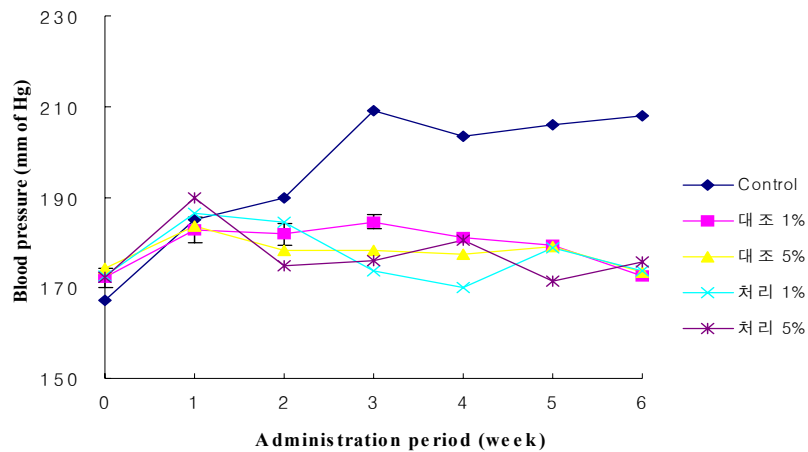
표 13은 각 실험식이로 6주간 사육한 실험동물의 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율을 측정한 결과이다. 주당 체중증가량과 사료섭취량은 기본식을 급여한 대조군이 각각 18.57, 135.4 g/week으로 가장 높았고 1% 생 뽕잎 첨가군이 각각 15.96, 120.3 g/week으로 처리군 중 가장 낮았다. 그러나 식이효율은 12.81~13.75%로 처리구간에 차이가 거의 없는 것으로 나타났다.

표 13. 실험동물의 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율

분석항목	정상군	1% 뽕잎 첨가군	5% 뽕잎 첨가군	1% 험기처리 뽕잎첨가군	5% 험기처리 뽕잎첨가군
체중증가량 (g/week)	18.57	15.96	17.71	17.98	16.69
식이섭취량 (g/week)	135.4	120.3	131.8	130.8	130.3
식이효율 (%)	13.71	13.27	13.43	13.75	12.81



GABA 축적 빵잎의 농도를 달리한 실험식으로 자연발증고혈압쥐(SHR)를 6주간 사육하면서 처리구간의 혈압강하 효능을 비교하였다. 실험개시 시점에서의 혈압은 기본식이군의  $167.5 \pm 11.1$  mmHg에서 GABA 축적 식이군의  $172.5 \pm 11.1$  mmHg로 혈압의 차이가 거의 없었다. 6주간 사육하는 동안의 혈압변화를 살펴보면 1주일까지는 처리구에 관계없이 모든 식이군의 혈압이 182.8 mmHg에서 189.9 mmHg로 상승하여 차이가 없었으나 그 이후에부터 기본식이군은 2주경에 190 mmHg로 증가하여 사육 6주에는 208 mmHg로 상승한 반면 빵잎 첨가 식이군은 처리구에 관계없이 174.9~184.4 mmHg에서 172.6~175.8 mmHg로 사육 1주일경보다 도리어 최고혈압이 약간씩 감소하는 것으로 나타나 빵잎첨가 식이를 급여한 사료는 자연발증고혈압쥐(SHR)의 혈압 상승을 유의적으로 억제함을 알 수 있었다. 그러나 빵잎의 GABA 축적 유무와 빵잎의 첨가농도에 따른 혈압상승억제 효과는 처리구간 차이가 없는 것으로 나타났다.



8주 9주 10주 11주 12주 13주 14주

그림 33. SHR에 있어서 혈압강하효능에 대한 GABA 축적 빵잎식이의 영향

## 제 3 절 GABA 축적 뽕잎의 퇴행성 신경질환 보호 효능 검정

### 1. 실험방법 및 내용

#### 가. 추출물의 제조

신선하게 채취된 뽕잎을 헹기처리하여 GABA 함량을 증가시키고 증강된 시료의 퇴행성 신경질환보호 효능을 검정하고자 뽕잎분말에 85% MeOH을 첨가하여 80℃에서 1시간 환류추출하고 여과한 여액을 45℃ 진공농축기에서 농축한 후 동결건조하여 추출물을 제조하였다. 추출물의 수율은 분말 시료의 중량에 대한 동결건조 후 고형물의 중량 백분비로 산출하였다.

#### 나. PC 12 cells의 신경축색돌기 outgrowth에 미치는 효과

$3 \times 10^5$  cells/well로 희석된 PC 12 cell은 5% FBS와 10% HS 및 1% PS를 함유한 DMEM 배지하에서 배양하고 24시간이 지난 후 시료를 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 각 well에 처리하였다. 2일에 한번씩 신선한 배지와 시료를 재처리하고 6일동안 배양하면서 1, 2, 4 및 6일에 세포의 형태를 사진 촬영한 후 3명의 관찰자로 하여금 neurite outgrowth 된 길이를 측정하게 하였다.

#### 다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리에 의해 유도되는 신경세포사에 대한 억제 효과

PC 12 cells에서 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의해 유도되는 세포상해에 대한 GABA 축적 뽕잎추출물의 효능 비교를 하기 위하여 각 시료를 1, 10 및 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하고 90분 후에 150  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 독성을 유도한 다음 24시간 후에 세포생존을 측정을 위한 MTT assay와 LDH assay를 수행하였다.

#### 라. Oxygen-glucose deprivation(OGD)조건하에서의 신경세포보호 효과

PC12 세포를  $2.5 \times 10^4$  cells의 농도로 96 well에 접종한 후 10% FBS와 5% HS, 1% PS 가 첨가된 RPMI(complemented media)에서 24시간 배양하였다. 배양 후 normal 군은 complemented media로 교체하고 washing control군과 시료처리군은 산소를 제거한 glucose free RPMI media로 3회 washing한 후 glucose free RPMI로 교체하였

다. 시료처리군과 control군을 hypoxia chamber에 넣어 120분간 배양하였다. Oxygen glucose 재관류를 위하여 시료처리군과 control군을 complemented RPMI media로 교체하고 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 24시간 배양하였다. Normal과 washing control군 또한 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 24시간 배양하였다. 모든 시료들은 24시간 배양 후 상층액을 제거하고 MTT(5 mg/mL)을 100mL 첨가한 후 2시간 배양하고 DMSO를 넣어 생성된 formazan 결정을 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포사멸율을 확인하였다.

#### 마. BV-2 cell에서의 nitric oxide 생성 억제 효과

뇌교세포주인 BV-2 cell은 10% FBS와 1% penicillin streptomycin이 첨가된 DMEM배지하에서 배양하였다.  $4 \times 10^4$  cells/well을 각 시료가 포함된 배지하에서 lipopolysaccharide를 처리하고 24시간 배양한 후 배양액을 50  $\mu$ L 취하여 50 $\mu$ L의 Griess reagent와 96 well plate에 섞고 상온에서 10분간 방치한 후 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 바. 중뇌대동맥 폐쇄(MCAO)에 의하여 유발된 뇌허혈 동물모델에서의 신경보호 효과

##### 1) 실험동물

24~32g 무게의 수컷 ICR(Institute of Cancer Research) 생쥐를 사용하였다. 물과 사료를 충분히 공급하면서 7일간 적응시킨 후 실험전날 물만 공급하여 실험에 사용하였다.

##### 2) 수술방법

생쥐를 70% N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub>가 섞인 혼합가스에 2.5%의 isoflourane으로 전마취를 한 후, 수술하는 동안 1.5%로 유지하였다. 중뇌대동맥 폐쇄 실험방법은 Kilic의 방법을 응용한 intraluminal filament method를 사용하였다. 생쥐의 목 전방 부위 중앙을 피부절개하고 오른쪽 경동맥과 외경동맥을 주위조직과 신경들로부터 조심스럽게 분리하고 실로 묶었다. 5.0 나일론 봉합사(Ethlion, Johnson and Johnson Intl., Belgium)의 끝 부분을 둥글게 실리콘(Xantopren, Byer Dental, Germany)으로 코팅하여 제작한 probe를 사용하였다. 외경동맥을 자르고 probe를 외경동 TDI Scope Eye 3.0맥에서 내경동맥으로 천천히 삽입하되 총경동맥분지에서 약 10 mm정도 삽입한 후 실로 고정

하였다. 피부절개부위를 다시 봉합한 후 마취에서 자연 회복시켰다. 수술 90분 후 같은 방법으로 재마취하여 probe를 후퇴시켜 재관류시켰다. 모든 수술과정은 isoflourane을 1.5%로 유지하면서 시행하였으며, 체온이  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  이하로 떨어지지 않도록 체온 유지장치(Biomed S. L., Spain)를 이용하였다. 수술과정 동안 심장박동수, 동맥 중 헤모글로빈 산소분압 및 ECG를 모니터(SurgiVet, USA)하였다.

### 3) 약물투여

음성대조군은 10% Tween 80 생리식염수용액을 1 mL/kg 경구투여 하였고, 양성대조군은 10% Tween 80 생리식염수용액에 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolium-5-one (MCI-186, Sigma Co. USA)을 5 mg/kg 용량으로 정맥주사하였다. 각 샘플군은 각각 10% Tween 80 생리식염수용액에 뽕잎추출물 200 mg/kg, 험기처리 뽕잎추출물 200 mg/kg 용량으로 경구투여하였다. 약물의 투여시간은 중뇌대동맥 뇌허혈 유발 후 30분에 맞추었다.

### 4) 뇌조직의 염색

뇌조직의 손상 부위는 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 염색으로 확인하였다. TTC 염색법은 미토콘드리아의 기능을 평가할 수 있는 지표로서 뇌허혈 유발 후 3일까지 뇌손상 부위를 나타내는 신뢰할 수 있는 지표로 알려져 있다. 재관류 후 22.5시간 뒤에 경추 탈골시켜 2분 이내에 뇌를 적출하여 brain dissection guide(World Precision Instruments, Inc., USA)를 이용하여 정수리점(bregma)으로부터 +1 mm의 부위로부터 2 mm 두께로 잘라서 절편으로 나누었다. 이 절편들을 2% TTC가 들어 있는 16 well plate에 조직을 충분히 담그고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 60분동안 반응시킨 후 10% neutral-buffered formalin으로 고정시켰다. 고정된 조직을 디지털 카메라로 하나씩 촬영한 후 컴퓨터에 옮겼고, 이미지 분석프로그램(TDI Scope Eye 3.0)을 이용하여 허혈 부위의 부피를 계산하였다. 뇌허혈의 부피는 허혈이 유발되지 않은 좌반구의 전체부피에서 우반구의 손상되지 않은 부위를 뺀 실제 조직손상부위를 좌반구 전체에서 퍼센트로 계산하였다.

## 사. 스코폴라민 유발 수동회피 반응 시험

### 1) 실험장치

실험동물은 24~32g 크기의 수컷 ICR 생쥐를 사용하였다. 실험기구로는 셔틀박스 (shuttle box, 50x15x40 cm, Gemini Avoidance System GEM337)를 사용하였는데 이 기구는 칸막이를 이용하여 두 구획으로 구분된 상자로써 작은 입구를 통해 한쪽에서 건너편 구획으로 들어가면 자동적으로 입구가 닫히게 되며 바닥에는 전기충격을 줄 수 있도록 되어있다. 상자의 두 구획 중 한 구획에는 조명장치를 하여 밝은 구획으로, 나머지는 어두운 구획으로 나누어 주었다.

### 2) 실험방법

실험순서는 첫째 날 생쥐에게 vehicle만을 투여한 후 박스에 넣어 조명이 들어오면 어두운 방으로 이동하게 훈련시켰다. 둘째 날 생쥐에게 샘플을 일정량 경구투여하고 30분 후 스코폴라민을 1 mg/kg 복강주사하였다. 30분 경과 후 박스에 넣고 30초간 적응시킨 후 조명이 들어오고 어두운 방으로 들어가게 되면 전기충격(0.5 mA)이 2초간 가해진 후 생쥐를 꺼냈다. 셋째 날 약물 투여 후 24시간에 맞추어 생쥐를 박스에 넣고 30초간 적응시킨 후 조명을 켜서 어두운 방으로 이동하는 시간을 측정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. PC 12 cells의 신경축색돌기 outgrowth에 미치는 효과

무처리뿔잎과 GABA 축적 혐기처리 뿔잎의 시료를 대상으로 85% MeOH을 가하여 초음파 추출 후 동결건조하여 얻은 분말의 수율은 무처리뿔잎 28%, 혐기처리 뿔잎 22%였다. PC 12 cells을 이용한 신경축색돌기 outgrowth에 미치는 뿔잎추출물의 효능을 비교한 결과는 표 14와 같다. 뿔잎추출물은 정상대조군과 비교시 차이가 없는 것으로 판단할 때 neurite outgrowth시키는 효능을 나타내지 않았고 무처리뿔잎과 혐기처리에 의한 GABA 축적 뿔잎간의 neurite outgrowth차이 또한 없었다.

표 14. PC 12 cell을 이용한 신경축색돌기 성장에 미치는 GABA 축적 뿔잎추출물의 영향

처리구	1일	2일	4일	6일
Control	-	+	+	+
NGF	+	++	+++	+++
무처리 뿔잎	-	+	+	+
혐기처리 뿔잎	-	+	+	+

+ : 지름길이 1배, ++ : 지름 2배, +++ : 지름 3배

### 나. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리에 의해 유도되는 신경세포사에 대한 억제 효과

PC 12 cells에서 신경독성물질인 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의해 유도되는 세포상해에 대한 GABA 축적 뿔잎추출물의 효능을 비교한 결과 무처리뿔잎의 경우 농도의존형으로 세포상해를 방지하였고 GABA 축적 혐기처리뿔잎의 경우 농도의존성을 나타내지는 않았으나 일반뿔잎에 비하여 항산화 효능이 저농도에서 통계적으로 우수한 효능을 나타냄을 확인할 수 있었다. MTT assay의 경우는 무처리뿔잎과 혐기처리 뿔잎의 경우 큰 차이는 없었으나 1 µg/mL 저농도에서 40%이상 세포생존율을 증가 시킴으로써 모두 유의적으로 hydrogen peroxide에 의한 세포독성 유도에 대한 방어 효능을 가짐을 확인할 수 있었다.

표 15. LDH assay에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 유도되는 신경세포사에 대한 GABA 축적 뽕잎 추출물의 억제 효능

(세포생존율, %)

Normal	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	무처리 뽕잎 (1μg/mL)	험기처리 뽕잎 (1μg/mL)	무처리 뽕잎 (10μg/mL)	험기처리 뽕잎 (10μg/mL)	무처리 뽕잎 (50μg/mL)	험기처리 뽕잎 (50μg/mL)
100±2.1	46.3±0.2	48.5±1.3	68.1±0.5	60.4±3.5	72.7±2.6	62.4±3.2	69.5±4.2

Cytoprotective effects of material extract of PC 12 cells injured by hydrogen peroxide. After pretreatment of PC 12 cells with materials (1, 10, 50μg/ml) for 90 min, cell were exposed to hydrogen peroxide (150μM) for 24 hr, then cytotoxicity were measured by LDH assay. Viability of hydrogen peroxide untreated cells was set to 100%. Values are mean±SD of percentage of normal group (n=6).

표 16. MTT assay에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 유도되는 신경세포사에 대한 GABA 축적 뽕잎 추출물의 억제 효능

(세포생존율, %)

Normal	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	무처리 뽕잎 (1μg/mL)	험기처리 뽕잎 (1μg/mL)	무처리 뽕잎 (10μg/mL)	험기처리 뽕잎 (10μg/mL)	무처리 뽕잎 (50μg/mL)	험기처리 뽕잎 (50μg/mL)
100±0.2	65±0.2	86±0.1	85±0.5	91±0.3	87±0.2	92±0.3	91±0.4

Cytoprotective effects of material extract of PC 12 cells injured by hydrogen peroxide. After pretreatment of PC 12 cells with materials (1, 10, 50μg/ml) for 90 min, cell were exposed to hydrogen peroxide (150μM) for 24 hr, then cytotoxicity were measured by MTT assay. Viability of hydrogen peroxide untreated cells was set to 100%. Values are mean±SD of percentage of normal group (n=6).

#### 다. Oxygen-glucose deprivation(OGD) 조건에서의 신경세포보호 효과

Oxygen-glucose deprivation(OGD)에 의하여 유발된 뇌허혈모델에서의 GABA 축적 뽕잎추출물의 신경세포보호 효과를 비교한 결과는 그림 34와 같다. 무처리 뽕잎의 경우 1 μg/mL의 농도와 같은 저농도에서 56%이상 세포생존율을 증가시켰고 이 후 고

농도에서도 농도의존형으로 세포생존율을 증가시켰다. 또한 혐기처리 뽕잎의 경우 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 경우 58%이상 세포생존율을 증가시켰고 이후 고농도에서는 정상군과 같은 수준으로 세포생존을 증가시킴으로써 oxygen-glucose 고갈에 의해 유도되는 뇌허혈을 혐기처리에 의해 GABA 축적 뽕잎추출물은 고농도에서 거의 완벽하게 차단함을 확인 할 수 있었다.

(세포생존율, %)

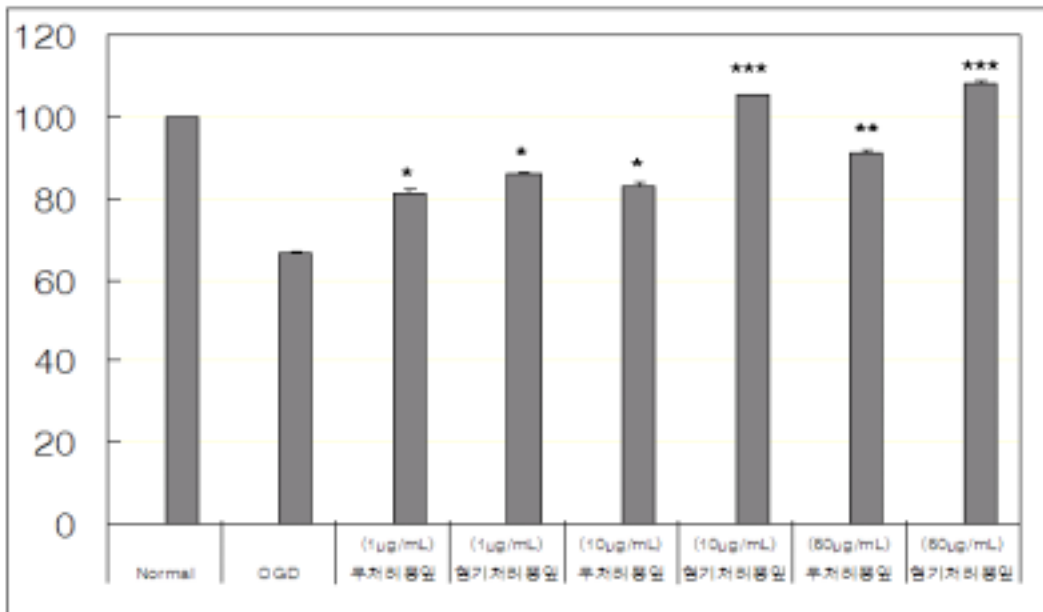


그림 34. Oxygen-glucose deprivation(OGD)에 의하여 유발된 뇌허혈모델에서의 GABA 축적 뽕잎추출물의 신경세포보호 효과

Protective effects of material on OGD/reoxygenation induced neuronal injury on the PC 12 cells. Cultures were exposed to OGD for 2 hr following by 24 hr reoxygenation. Materials was added to the culture during the OGD exposure at the concentration of 1, 10 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Neuronal death was measured by MTT assay after 24 hr reoxygenation. The data are mean $\pm$ SD(n=3) of three different cultures (\* $<0.05$ , \*\* $<0.01$  and \*\*\* $<0.001$ ).

#### 라. BV-2 cell에서의 nitric oxide생성 억제 효과

뇌교세포주인 BV-2 cell에서의 GABA 축적 뽕잎추출물의 nitric oxide(NO)생성 억



제효능을 비교한 결과 혐기처리 뿔잎과 무처리 뿔잎간의 NO억제 효능차이는 없었으며 농도에 따른 의존성도 나타내지 않았다.

표 17. LPS로 유도된 BV-2세포에서의 GABA 축적 뿔잎추출물의 NO 생성 억제 효과

(NO 생성율, %)

Normal	Control (LPS유도군)	무처리 뿔잎 (1µg/mL)	혐기처리 뿔잎 (1µg/mL)	무처리 뿔잎 (10µg/mL)	혐기처리 뿔잎 (10µg/mL)	무처리 뿔잎 (50µg/mL)	혐기처리 뿔잎 (50µg/mL)
30.2±1.2	100.±2.0	86.8±2.3	83.9±0.9	83.2±3.2	87.6±2.5	79.2±1.3	76.3±4.2

Inhibitory effect on microglial NO production. Treatment of BV mouse microglia cells with LPS (100 µg/ml) for 24 hr. NO accumulated in culture supernatant was measured by Gries reaction.

**마. 중뇌대동맥 폐쇄(MCAO)에 의하여 유발된 뇌허혈 동물모델에서의 신경보호 효과**

중뇌대동맥 폐쇄(MCAO)된 실험동물의 뇌조직의 손상 부위를 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 염색하여 세포손상 부위를 확인한 결과(그림 35), 혐기처리 뿔잎추출물은 무처리 뿔잎보다 우수한 신경보호 효과를 가지고 있으며, 특히 대표적인 신경보호 작용 양성 대조군인 MCI-186과 거의 비슷한 효과를 나타냈고 음성대조군과 비교하여 유의적인 뇌신경 보호효과를 나타냈다.

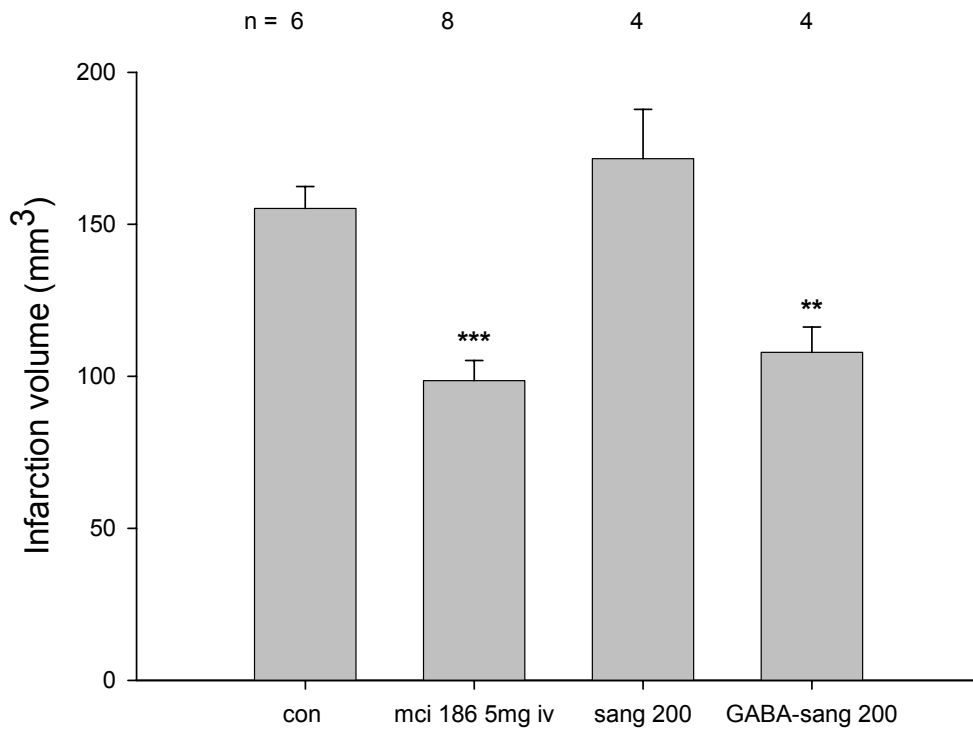


그림 35. MCAO 뇌허혈 모델에서의 GABA 축적 뿌잎추출물의 신경세포 보호 효과  
 Protective effects of the samples against MCAO in mouse. MCAO were proceeded for 90 min. and reperfusion for 22.5 h . Samples was injected at 30min before MCAO by p.o at the concentration of 200 mg/kg repectively. Infarct volume were measured by TTC staining method after 22.5 hr reperfusion. The data are mean±SD(n=4 - 8) ( \*<0.05, \*\*<0.01 and \*\*\*<0.001).

#### 바. Scopolamine 유발 수동회피 반응 시험

Scopolamine을 처리한 마우스의 경우 신경독성을 입음으로써 인지기능이 저하되어 passive avoidance 실험결과 전기충격을 주고 어두운 곳으로 찾아오는 시간이 증가되었다. 그러나 일반 뿌잎과 GABA 축적 뿌잎을 200 mg/kg으로 처리한 경우 대조군보다는 시간이 저하되었으나 인지기능 개선 효과는 통계적으로 유의한 수준은 없는 것으로 나타났다.

표 18. 스코폴라민에 의한 뇌손상에 대한 인지기능 개선 효과

(초)

대조군	scopolamine 처리군	뿔잎 (200 mg/kg)	GABA축적 뿔잎 (200 mg/kg)
109.9±8.74	48.2±12.7	91.5.8±7.2	89.5±5.6

## 제 4 절 GABA 축적 빵잎을 이용한 가공제품 개발

### 1. 실험방법 및 내용

#### 가. 냉수가용성 분말소재 제조

##### 1) 추출물의 제조

다양한 가공제품의 소재로 활용할 수 있고 특히, 물에서의 분산성, 용해성이 우수한 식품가공용 중간소재의 제조는 GABA 축적 빵잎분말 시료에 40배의 물을 가하여 현탁시킨 다음 1시간 초음파로 실온에서 추출하였다. 다른 처리구는 증류수와 75% 에탄올을 각각 40배씩 첨가하여 98, 70℃에서 동일시간 추출하였다. 여과하여 얻은 액은 동결건조하였다.

##### 2) 수용성 추출분말의 특성

###### 가) 수율

수용성 추출분말의 수율은 추출에 사용한 GABA 축적 분말시료의 중량에 대한 추출 후 얻어진 고형물의 중량백분비로 산출하였다.

###### 나) 일반성분

GABA 축적 분말과 이를 추출한 분말 시료의 수분, 지질, 단백질, 회분, 탄수화물의 함량은 AOAC 방법에 따라 정량하였다. 즉, 수분은 105℃ 상압가열건조법, 단백질은 semi micro kjedahl법, 조지방은 soxhlet 추출법, 조회분은 550℃ 회화법, 탄수화물은 100에서 수분, 조지방, 조단백, 조회분을 뺀 값으로 하였다.

###### 다) GABA 함량

GABA 축적 분말과 이를 열수추출한 분말 시료의 GABA 함량은 Zhang 등의 방법을 이용하여 비색법으로 측정하였다.

###### 라) 무기질

GABA 축적 분말과 수용성 추출분말의 무기질 함량은 유도결합플라즈마원자방출분광법(ICP-AES, Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer,

Jobin Yvon JY138 Ultrace, France)로 마그네슘, 철분, 칼륨, 칼슘 및 나트륨 함량을 측정하였다.

#### 마) 총플라보노이드

수용성 추출분말 10 g을 이용, 앞서 GABA 측정 분말과 동일한 방법으로 측정하였다.

#### 바) 폴리페놀

Folin-Denis법을 이용하여 앞서 언급한 것과 동일한 방법으로 폴리페놀 함량을 측정하였다.

### 3) 수용액의 특성

#### 가) 색도

수용성 추출분말 0.2 g을 25 mL의 증류수에 용해시킨 용액의 색도는 Color and color difference meter(ColorQUEST II, Hunter Lab, U.S.A.)를 이용하여 L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)를 측정하여 원심분리(=== rpm, == 분) 전후의 색도를 비교하였으며, 이때 표준 백색판은 L=92.68, a=-0.81, b=0.86 의 값을 가진 것을 사용하였다.

#### 나) 투광도

GABA 측정 분말과 이를 추출한 분말 시료의 용액(0.2 g/25 mL)을 분광광도계를 이용하여 590 nm에서의 %T를 측정하여 원심분리전후의 투광도를 비교하였다.

#### 다) 용해도

수용성 추출분말 0.2 g을 25 mL의 증류수에 용해시킨 용액을 미리 무게를 측정한 원심분리 셀에 취하여 원심분리(7,000 rpm, 5분)후 침전물을 50℃에서 건조 후 중량을 측정하여 분말의 용해도를 산출하였다.

### 4) 수용성 분말의 안정성 검토

#### 가) 열안정성

열수추출 분말을 1% 수용액으로 제조하여 100℃에서 0, 10, 30, 60, 120분 동안 각각 가열 후 GABA 함량을 측정하여 가열전 함량을 기준으로 잔존율로 나타내었다.

#### 나) pH 안정성

열수추출 분말의 1% 수용액을 제조하여 각각 pH 2, 4, 5, 6, 8로 조정하고 GABA 함량을 측정하여 pH 5에서의 함량을 기준으로 잔존율로 나타내었다.

### 나. 청량음료 개발

#### 1) 국내의 차류 음료의 특성 조사

빵잎 음료의 개발을 위한 기초자료로 활용하기 위하여 시판 국내외 차류음료 제품(국내 8종, 외국 4종)을 수집하여 음료의 당/산비, 원부재료 및 기호도 등을 조사하였다.

#### 2) 음료용 추출액의 제조 및 빵잎의 볶음처리

Glutamic acid로 혐기처리한 GABA 축적 빵잎분말을 이용한 청량음료 제조를 위한 추출액은 다음과 같이 제조하였다. 먼저 분말의 중량대비 50~200배의 정제수를 첨가하여 98℃에서 1시간 환류추출한 것을 여과하여 추출액으로 하였다. 음료용 추출액의 기호도 개선의 일환으로 GABA 축적 빵잎분말을 호일에 일정 두께로 깔고 미리 온도를 조정된 160℃ 건조기에서 볶음시간(3, 5, 7, 10분)을 달리하여 볶음처리하였다. 볶음처리한 빵잎을 이용한 추출액은 중량대비 200배의 정제수를 가하여 앞과 동일한 방법으로 추출, 여과하여 음료용 추출액으로 사용하였다.

#### 3) 음료제조 및 기호도 개선

##### 가) 음료의 제조

GABA 축적 빵잎분말 추출액을 이용한 음료 제조는 고과당, 설탕, 구연산, Vit C, 향료의 첨가비율을 변화시키면서 음료를 제조, 여과 후 180 mL 병에 충전, 밀봉한 다음 내부온도가 85℃가 될 때까지 살균, 냉각한 다음 기호도 조사를 통해 최적의 당/산비 설정을 위한 배합비를 결정하였으며 복숭아, 사과 등 과실 농축액의 적용에 따른 기호도 변화를 관능검사를 통해 조사하였다.

## 나) 음료의 기호도 개선

볶음처리한 뽕잎분말을 98℃에서 1시간 추출한 추출액을 이용하여 제조한 음료(당도 7.2~8.2, Brix, pH 3.6~3.9)의 경우 음용 후 후미가 깔끔하지 못한 것으로 나타났다. 음료의 기호도 개선을 위해 뽕잎 추출액 제조시의 온도를 25, 60, 98℃로 달리하여 추출액을 제조한 다음 이들 추출액의 이화학적, 관능적 특성을 조사하여 음료용 최적 추출온도를 설정하였다. 또한 이들 추출액을 이용한 음료의 기호도를 더욱 상승시키고자 당류로 설탕과 고과당을 혼합, 사용하였고 과실 농축액 및 감, 쪽 등의 향료를 적용, 최적 향료를 선정하였다.

## 4) 음료의 저장 중 품질 특성 변화

GABA 축적 뽕잎분말을 이용한 음료의 저장 중 품질 변화는 시료에 200배의 정제수를 가하여 60℃에서 1시간 추출 후 여과하여 얻은 여과액에 설탕, 고과당, 비타민 C, 향료를 첨가, 용해시킨 다음 여과한 것을 180 mL 투명 유리병에 충전, 밀봉한 다음 내부온도가 85℃가 될 때까지 살균, 냉각하였다. 살균한 음료는 4℃, 25, 37℃에 각각 저장하면서 경시별로 음료를 채취하여 당도, 산도, pH, 투광도, 색도, 관능적 특성 등의 품질변화를 측정하였다.

## 5) 추출액과 음료의 이화학적 특성

### 가) 가용성 고형분

분말시료에 200배 부피의 물을 가수하여 제조한 음료제조용 추출액의 당도는 Hand Brixmeter(ATAGO, N-1E, Japan)를 사용하여 측정하였다.

### 나) 총당

Phenol-황산법으로 총당 함량을 측정하였다. 즉, 위의 추출액 1 mL에 5% phenol 용액 1 mL을 가하고 진한황산 5 mL을 가하여 혼합하고 20분간 실온에서 방치 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 검량곡선은 glucose를 표준물질로 하여 작성하였다.

### 다) 환원당

환원당은 DNS방법으로 정량하였다. 즉 추출액 1 mL에 DNS 시약 3 mL을 가하고

5분간 끓인 다음 냉각한 후 증류수를 이용하여 25 mL로 정용하여 500 nm파장에서 흡광도를 측정하였으며 이때 검량곡선은 glucose를 표준물질로 하여 작성하였다.

#### 라) pH

가수량별 음료제조용 추출액의 pH는 pH메타(Orion 729A, Japan)를 이용하여 측정하였다.

#### 마) 투광도

음료 제조용 추출액의 투광도 변화는 분광광도계를 이용하여 590 nm에서의 %T를 측정하였다.

#### 바) 색도

색도는 Color and color difference meter(ColorQUEST II, Hunter Lab, U.S.A.)를 이용하여 L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)를 측정하였으며, 이때 표준 백색판은 L=92.68, a=-0.81, b=0.86 의 값을 가진 것을 사용하였다.

#### 사) 관능검사

관능평가는 10명의 전문패널을 구성하여, 색상, 향, 맛, 종합적 기호도의 평가항목에 대해 9점 기호척도로 평가하였고 결과는 SAS 통계프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하고 Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$ 에서 시료간의 유의차를 검증하였다.

### 다. 티백형 차

#### 1) GABA 축적 빵잎을 이용한 티백형 침출차 제조

GABA 축적을 위해 1% glutamic acid를 첨가하여 제조한 페이스트를 혐기처리한 것을 열풍건조한 분말 및 100% 빵잎 침출차의 기호도 개선을 위해 분말을 110°C, 1시간 또는 160°C에서 5분간 볶음처리한 분말을 사용하였다. 100% 빵잎분말을 이용한 티백형 침출차 제품의 기호도 개선을 위해 볶음처리한 빵잎분말에 분말상의 포도, 레몬, 딸기, 복숭아/사과, 국화향료를 각각 0.3%씩 첨가하여 비닐소재 지퍼백에 담고 충분히 흔들어 혼합한 후 20mesh sieve에 통과시키고 다시 지퍼백에 넣고 흔들어 혼합한 뒤



일정량씩 칭량하여 전기실러로 밀봉하여 1회용 티백차를 제조하였다.

제조한 침출차는 80℃ 온수 100 mL에 티백을 5회씩 담겼다 빼낸 후 침출되어진 액을 색상, 향, 맛, 종합적 기호도의 평가항목에 대해 9점 기호척도로 관능평가를 실시하였다. 결과의 유의성 검증은 분산분석 및 Duncan's multiple range test를 통하여  $p < 0.05$ 에서 유의적인 차이를 검증하였다. 앞서 기호도가 우수한 향료의 적정 첨가농도를 설정하고자 향료를 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0%로 첨가율을 증가시켜 같은 방법으로 관능평가를 실시하여 향료 첨가량을 결정하였다.

## 2) GABA 축적 빵잎을 이용한 빵잎/현미 혼합 침출차 제조

빵잎/현미 혼합 침출차 제품의 제조를 위해 볶음처리된 현미의 입자크기가 침출차의 향미에 미치는 영향을 조사하고자 한 처리구는 통현미를 popping 후 분쇄하였고 다른 처리구는 현미를 roll mill을 이용하여 분쇄한 다음 popping 하였다. 볶음처리한 빵잎분말과 현미의 혼합비율을 4:6의 비율로 혼합한 것을 포장 단위별 적정 양을 설정하고자 티백에 1.5, 1.0, 0.8 g씩 포장하였다.

앞서 빵잎 침출차의 기호도 개선을 위해 사용한 분말형의 국화향료를 2% 첨가한 빵잎에 볶음처리한 현미를 4:6의 비율로 혼합한 것을 티백당 0.8 g씩 포장하였고 혼합 침출차의 기호도 개선을 위해 앞서 기호도가 개선된 국화향을 처리한 시료에 다시 셀러리 분말향을 1% 첨가하였다. 제조한 혼합침출차는 80℃ 온수 100 mL에 티백을 5회씩 담겼다 빼낸 후 침출되어진 액을 색상, 향, 맛, 종합적 기호도의 평가항목에 대해 9점 기호척도로 관능평가를 실시하였다.

## 3) 저장 중 품질 특성 변화

빵잎/현미 혼합 티백차 제품의 저장 중 품질 특성 변화를 조사하고자 볶음처리한 빵잎분말과 현미를 4:6의 비율로 혼합하고 여기에 향료를 첨가하여 내용물을 완전히 혼합한 것을 1회용 티백용기에 0.8 g씩 포장하였다. 티백용 제품을 종이로 각각 재 포장하고 종이박스에 넣어 4, 25, 37℃에 저장하면서 경시별로 시료를 채취하였다.

## 라. 분말상 선식제품

### 1) 재료

냉수, 우유, 과즙 등에서 분산성이 우수하고 현대인의 기호에 적합한 빵잎 선식제품

제조를 위해 앞서 GABA를 축적, 건조한 분말을 ball mill을 이용하여 미세분말화하여 사용하였다. 빵잎점질물 분말은 신선 빵잎을 세절, 초핑한 다음 빵잎에 중량대비 1.5 배의 물을 첨가하여 10℃에 2일 방치한 다음 탈수기를 이용하여 점질성의 액을 회수한 다음 동결건조하였으며 이때 점질성분말의 수율은 13.1%, 수분 13.4%, 회분 17.9%, 조지방 1.09%, 조단백 36.97%, 탄수화물 30.64%이었다.

양배추, 무청, 미나리, 신선초는 (주)고제에서 동결건조한 분말, 당귀분말(국제식품), 솔잎가루(그린논농원), 다시마가루(국제식품)는 대형 슈퍼에서 구입하였다. 선식의 물성 및 기호도 개선을 위한 찹옥수수알과전분은 (주)대상, 과실분말은 KH 후드사 제품을 사용하였으며 기타 부재료는 식품첨가물용을 구입, 사용하였다.

## 2) 선식제품의 제조

Ball mill로 미분쇄시킨 빵잎분말(33~16%)에 동결건조한 양배추, 무청, 미나리, 신선초분말과 잔탄검, 솔스타, 포도당, 식물성프림, 소금, 솔잎가루, 다시마가루, 찹옥수수알과전분 등의 배합비를 달리하여 칭량한 다음 믹서기를 이용하여 전체 내용물을 고르게 혼합하여 GABA 축적 빵잎가미 선식제품을 제조하였다. 제조한 선식제품 분말의 색상은 색차계를 이용하여 측정하였으며 배합비 설정을 위해 분말 3 g에 정제수 90 mL을 첨가하여 완전히 용해시킨 것의 색상, 향, 맛 종합적 기호도를 9점 기호척도로 관능평가를 실시하였다.

선식제품의 외관, 유동성을 개선하고 포장 등의 연속성과 자동화를 용이하게 하고자 앞서 사용한 원부재료를 혼합한 분말 100 g에 85% 알콜용액을 40 mL 첨가하여 다시 혼합, 반죽한 것을 20 mesh를 통과시켜 과립화시킨 다음 40℃ 열풍건조기에서 건조, 과립화하였다. 주사전자현미경을 이용하여 과립제품의 표면구조를 비교하였다.

## 3) 저장 중 품질 특성 변화

앞서 제조한 선식제품을 3 g씩 일회용 알루미늄은박지(1.7x11.5 cm)에 포장한 다음 밀봉하고 4, 25, 37℃에 각각 저장하였다. 저장 중 선식제품을 경시별로 채취하여 포장지를 개봉하고 분말의 외형적 정상, 이취, 색상을 관찰하였고 이들 분말을 일정량의 정제수에 완전히 용해시킨 다음 색상과 관능적 특성을 평가하였다.

## 마. 액기스형 당질임플 제품

### 1) 재료

헝기처리한 생 빵잎을 세절, 초핑 후 당절입물 제조에 사용하였으며 신선초, 브로콜리, 양배추, 부추, 파슬리, 셀러리, 미나리, 청경채, 케일, 당귀잎 및 사과, 배는 신선 원료를 대형식품매장에서 구입하여 수세 후 적당한 크기로 세절하여 사용하였다.

### 2) 당액 및 당절입물의 제조

먼저 당절입용 당류로는 설탕과 기능성 당류인 팔라티노스, 락티톨, 올리고당을 단독 또는 혼합, 첨가하고 정제수를 가하여 완전히 용해시켜 당액으로 사용하였다. 빵잎을 이용한 당절입물의 제조는 세절한 빵잎, 채소(10종), 과일(2종)의 혼합비율을 달리한 것에 당액의 첨가비율을 각기 달리한 다음 비닐용기에 일정량씩 개별 포장하였다. 즉, 10종의 채소류의 혼합비율을 동일하게 한 것(배합비 A), 부추, 당귀, 파슬리의 첨가량을 감소시킨 것(배합비 B), 배합비 B에서 채소 첨가량을 감소시키고 사과, 배를 첨가한 것(배합비 C), 부추를 제외하고 썩, 다시마를 첨가한 것(배합비 D), 배합비 D에서 채소류 첨가량을 감소시키고 과실을 첨가한 것으로 구분하였다. 10℃에서 이들 당절입물을 일정기간 방치, 숙성시킨 다음 착즙하여 얻은 액의 관능적 특성을 비교하여 최적 배합비를 설정하였다.

한편 앞서 당절입물의 배합비 실험에서 선정한 채소, 과일의 기본적인 혼합비는 고정하고 설탕, 팔라티노스, 정제수를 60, 20, 20%의 비율로 혼합하여 가열, 용해하여 제조한 당액을 이용하였다. 즉, 배합비 1~3은 빵잎, 당액 혼합비, 배합비 4~6은 빵잎, 채소, 당액의 혼합비, 배합비 7~9는 빵잎, 채소, 과일, 당액의 혼합비를 각각 달리하여 당절입물을 제조하였다. 당절입물을 10℃에 방치하면서 숙성기간별 당절입물을 처리구별로 채취하여 부지포에 담고 착즙하여 당절입 착즙액을 제조한 다음 수율, 당도, pH, 색도, 관능적 특성을 조사하였다.

### 3) 당절입 액의 물성 개선 및 살균

빵잎, 채소, 과일 및 당액을 혼합, 숙성한 다음 착즙하여 제조한 당절입물은 기존의 액상형 차제품과 같이 물에 희석하여 음용하게 된다. 그러나 본 연구에서 제조한 빵잎 가미 당절입물은 기존의 액상형 차 제품과는 달리 저장 용기에서 내용물을 취할 때 일정량씩 취하기가 어렵고 내용물 전체가 한꺼번에 흘러내리는 흐름성의 문제점을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 빵잎 가미 당절입물의 물성을 기존의 액상차와 유사하게 개선하고자 고속균질기(ULTRA-TURRAX T25, Germany)로 처리하였다.

당절임물의 저장, 유통 중 액에 존재하는 미생물에 의한 변질과 발효를 방지하고자 일반 액상차에서 적용하는 살균조건을 적용하였다. 즉, 물리적으로 처리한 당절임물을 85℃의 온수에서 20분간 저온살균하고 살균전후 당절임물의 색상 및 관능적 특성 변화를 조사하였다.

#### 4) 당절임물 제품의 저장 중 품질 특성 변화

액기스형 당절임물의 저장 중 품질 특성 변화를 조사하고자 고속균질기로 물리적으로 처리한 당절임물을 유리병에 일정량씩 넣고 밀봉한 다음 미리 85℃로 온도를 조정된 항온수조에서 20분간 저온살균하였다. 살균한 당절임물 제품은 4℃, 25, 37℃에 각각 저장하면서 경시별 품질 변화를 조사하였다.

#### 5) 당절임물의 이화학적 특성

##### 가) 수율

당절임물의 수율은 당절임물 제조시 시료의 중량에 대한 착즙 후 얻어진 액의 중량 백분비로 산출하였다.

##### 나) 당도

당절임액의 당도는 Hand Brixmeter(ATAGO, N-1E, Japan)를 사용하여 측정하였다.

##### 다) pH

당절임액의 pH는 pH메타(Orion 729A, Japan)를 이용하여 측정하였다.

##### 라) 색도

색도는 Color and color difference meter(C0-olorQUEST II, Hunter Lab, U.S.A.)를 이용하여 L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)를 측정하였으며, 이때 표준 백색판은 L=92.68, a=-0.81, b=0.86 의 값을 가진 것을 사용하였다.

##### 마) 미생물학적 특성

총균은 nutrient broth(Difco Co.)와 agar powder(Samchun Chemical Co.)를 혼합하

여 만든 배지, 효모는 potato dextrose agar(Difco Co.)배지를 사용하였다. 당절임물 1 mL를 취하여 멸균수로 단계적으로 희석하여 준비한 고체배지에 평판 주가법으로 0.1 mL씩을 접종한 후 30℃ 배양기에서 48시간 배양 후 나타난 colony를 계수하였다.

#### **바) 관능검사**

당절임물에 대한 관능적 특성은 이들 제품에 흥미를 갖고 있고 품질 차이를 식별할 수 있는 한국식품개발연구원의 경험이 있는 패널요원을 선발하여 수행하였다. 당절임물에 관한 평가 항목으로는 색상, 향, 맛, 종합적기호도에 대하여 9점 척도법을 사용하여 평가하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 냉수가용성 분말소재

빵잎에 1% glutamic acid를 첨가하여 콜로이드밀로 페이스트화시키고 37℃에서 일정시간 GABA 축적을 위해 혐기처리 후 열풍건조한 분말을 이용하여 고농도의 GABA를 함유하며 냉수에서의 용해성이 우수하고 최종제품의 물성에는 아무런 영향을 미치지 않는 다양한 식품가공용 중간소재로 활용할 수 있는 냉수가용성 빵잎 분말을 제조하였다.

먼저 GABA를 축적시킨 시료 분말에 15배의 물을 가하여 98℃에서 1시간 열수추출하고 여과한 다음 잔사에 다시 15배의 물을 가하여 추출, 여과하여 얻은 여과액을 농축(20. Brix)하였다. 본 결과에서는 나타내지 않았으나 농축액의 물성은 가용성 고형물의 함량이 20. Brix 정도임에도 불구하고 가용성고형물의 농도가 65~70. Brix인 일반 생약류 농축액과 거의 유사한 물성을 보였다. 이들 농축액을 이용하여 분무건조 분말을 제조하고자 13. Brix의 농축액에 70. Brix의 액상텍스트린을 85:15의 비율로 혼합한 후 분무건조하였다. 이때 분무건조기의 inlet temp.는 160℃, outlet temp.는 96~100℃이었다. 분무건조 결과 빵잎 추출물은 일반 생약류 시료와는 달리 분말 입자를 형성시키지 못하는 것으로 나타났다.

GABA 축적 빵잎으로부터 손쉬운 공정에 의해 고농도의 GABA를 함유하는 냉수가용성 분말의 제조를 위한 방안의 하나로 시료 분말에 40배의 물을 가하여 실온에서 초음파처리하여 수용성물질을 추출한 액을 일정농도로 농축 후 동결건조하여 수용성 분말을 제조하였다. 이때 열수추출과 75% 에탄올을 이용하여 추출한 것을 동일하게 처리하여 비교용 동결건조 분말을 제조하였다.

표 19는 이들 수용성 동결건조분말의 수율을 조사한 결과이다. 실온에서 초음파로 추출한 처리구가 38%로 98℃에서 열수추출한 것의 45%에 비해 수율이 낮았으며 75% 에탄올로 추출한 것이 53%로 가장 높았다. 본 결과에는 나타내지 않았으나 이들 분말의 성상에 있어서 물로 추출한 것은 담황색을 띄었으나 75% 에탄올 추출구의 분말은 검녹색을 띄었으며 물 추출 분말에 비해 흡습성이 큰 것으로 나타났다.

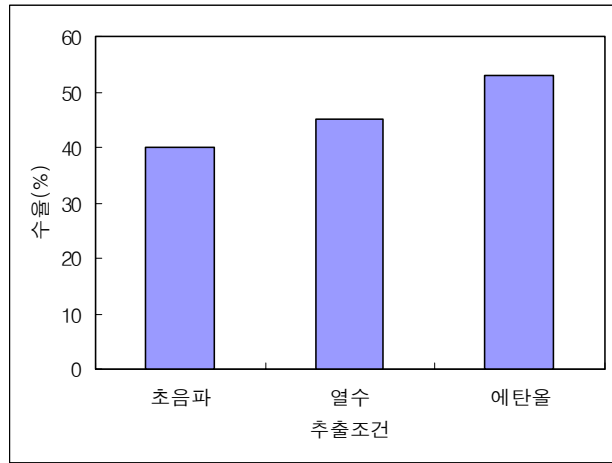


그림 36. 수용성 분말의 추출 수율

표 19는 열수추출 후 동결건조한 수용성 분말과 GABA 축적 분말의 성분을 비교한 결과이다. 수용성 분말의 경우 GABA 함량이 2,702 mg%로 추출전 시료에 비해 약 2.7배 농도가 상승하였다. 일반성분 분석결과 수분은 동결건조한 수용성 분말이 약간 높았으며 지질과 탄수화물은 수용성분말이 각각 0.2%, 38.46%로 낮았는 반면 회분의 경우 GABA 축적 분말에 비해 약 1.6배 높은 22.96%를 보였다. 이들 분말의 무기질 함량을 비교해 보면 수용성 분말의 경우 마그네슘, 칼륨은 증가하는 것으로 나타났으며 특히 나트륨은 15배 상승하였다. 총폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 측정한 결과에 있어서는 시료 사이에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 19. GABA 축적 빵잎과 열수추출 수용성분말의 성분 분석

분석항목	GABA축적 분말	수용성 분말	1일 권장량
GABA (mg/100g)	1,001	2,702.7	6~20 mg
수분(%)	5.07	8.50	
지질(%)	2.00	0.20	50~60 g
단백질(%)	27.44	29.88	60~70 g
회분(%)	14.13	22.96	
탄수화물(%)	51.36	38.46	
마그네슘(mg%)	300.6	411.1	300 mg
철(mg%)	10.4	12.3	10~12 mg
칼륨(mg%)	2,341.6	3,946.5	
칼슘(mg%)	1,587.5	1,892.4	
나트륨(mg%)	84.2	1,200.5	
폴리페놀 (mg%)	4.48	6.66	
플라보노이드 (mg%)	7.93	3.16	

GABA 축적 빵잎에서 제조한 수용성 분말을 1%의 수용액으로 제조할 경우의 분말의 용해도와 이들 수용액의 색도와 분광광도계에 있어서의 탁도를 각각 측정된 결과는 표 20과 같다. 실온 초음파추출과 열수추출한 분말은 물에 용해시 거의 완전하게 용해가 되는 것으로 나타나 각각 95%의 용해도를 보인 반면 75% 에탄올 추출분말은 지용성 물질로 인해 용해 후 잔사 덩어리가 남고 약 65.3%의 용해도를 보였다. 수용액의 투광도를 측정된 결과 75% 에탄올 추출분말은 0.63으로 매우 낮은 반면 물 추출물은 63.5~70.2정도로 높았다. 이들 수용액을 7,000rpm에서 원심분리한 다음의 용액의 투광도를 측정된 결과 물추출물은 원심분리전후 투광도 값의 변화가 크지 않은 반면 에탄올 추출물은 91.59로 급격히 상승하여 추출물의 대부분이 용해되지 않고 현탁 상태로 유지됨을 알 수 있었다. 동결건조 분말 수용액의 색도를 측정된 결과 색의 밝기를 나타내는 백색도 값은 열수추출물이 44.98로 가장 높고 75% 에탄올 추출물이 18.03으로 가장 낮았으며 적색도 값은 초음파추출물이 13.91로 높고 75% 에탄올 추출



물이 4.37로 낮았다. 황색도 값은 물로 추출한 분말 수용액이 75% 에탄올 추출물에 비해 약 2배 높은 것으로 나타났다. 이들 수용액을 7,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 용액의 색도를 측정된 결과 75% 에탄올 추출물은 백색도 값이 35.99로 가장 높았고 적색도는 -7.46으로 녹색도 값을 보였으며 황색도 값은 다른 추출물과 달리 그 값이 상승하였다.

표 20. 냉수가용성 분말 수용액(1%)의 색도, 용해도 및 탁도

항목	GABA축적 분말	동결건조 분말			
		초음파	열수	75% 에탄올	
용해상태	입자상태로 분산	용해	완전용해	용해 후 잔류물 발생	
색도	L	16.3(40.18)	39.68(33.56)	44.98(22.96)	18.03(35.99)
	a	3.86(-2.60)	13.91(2.71)	10.15(0.67)	4.37(-7.46)
	b	10.28(14.92)	24.88(18.98)	26.40(11.98)	11.21(13.10)
	△E	84.43(84.43)	66.74(69.15)	61.88(77.96)	82.86(65.76)
탁도 (590nm, %T)	0.18 (83.02)	13.95 (68.64)	13.28 (77.10)	0.63 (91.59)	
용해도(%)	-	94.9	95.3	63.53	

( ) : 7,000rpm, 5분 원심분리 후 액의 값



(GABA 축적 분말) (수용성 분말)

그림 37. 냉수가용성 분말의 정상 및 용해 상태

그림 38은 GABA 축적 뿌잎에서 추출한 수용성 분말을 1% 수용액으로 제조한 후 이들의 열안정성을 검토한 결과이다. 즉, 100℃에서 10분에서 2시간까지 수용성 용액을 가열시킨 후 용액에 잔존하는 GABA의 함량을 비교하였으며 잔존율은 가열전 수용액의 초기 GABA 함량을 기준으로 하였다. Glutamic acid를 첨가, 혐기처리에 의해 축적된 뿌잎 수용성분말내의 GABA는 100℃정도의 온도에서는 가열 2시간까지 안정적인 것으로 나타났다.

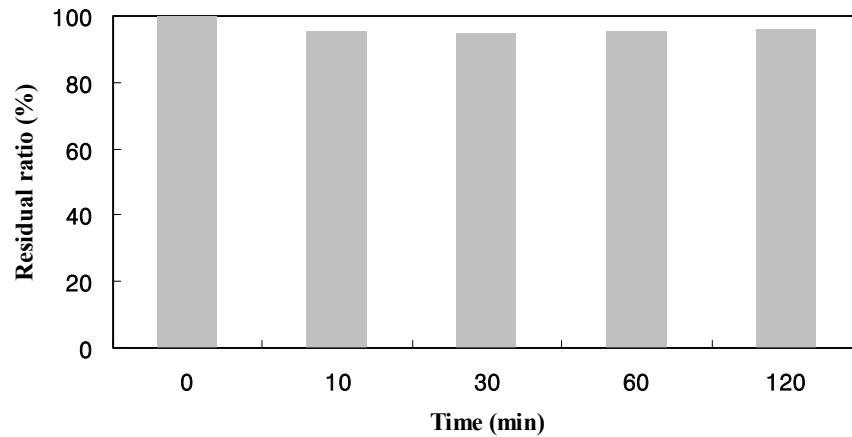


그림 38. 수용성분말의 열안정성

수용성 분말의 pH 안정성을 조사한 결과는 그림 39와 같다. 이 때 1% 수용액의 pH 5.5의 GABA 함량을 기준으로 하여 산출하였다. 뿌잎 수용성분말의 GABA 물질은 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 pH변화에 관계없이 pH 2~10의 범위에서는 거의 95%이상의 잔존율을 보여 넓은 pH범위에서 안정적임을 알 수 있었다.

GABA 축적 뿌잎에서 제조한 수용성의 분말은 기능성 드링크와 같은 음료, 스프, 건면 등의 건조식품, 장류와 같은 발효식품 및 기타 다양한 건강보조식품의 소재로 활용 가능할 것으로 판단된다.

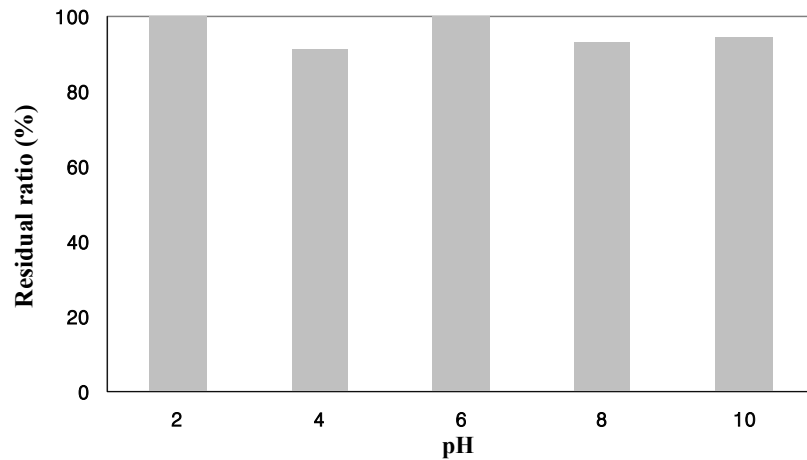


그림 39. 수용성분말의 pH 안정성

## 나. 청량음료

### 1) 국내외 차류 음료의 특성

표 21은 GABA를 축적시킨 빙잎을 이용한 기호성 음료의 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 시판 국내외 차류 관련 음료의 몇가지 특성을 조사한 결과이다. 음료의 당도는 6.6~11.2. Brix정도가 되게 설탕, 고과당, 벌꿀 등을 가미한 것과 순수 차 추출액만을 사용하여 0.3. Brix정도로 낮은 것으로 구분되었다. 산도는 0.01~0.13%까지 다양하였고 산미료 중 구연산을 첨가하였으며 pH는 실론티, 보성녹차가 3.2로 가장 낮았고 달콤녹차가 7.6으로 가장 높았다. 음료의 투광도(%T)는 보성녹차가 96.24로 가장 높았고 식물성 유지분말, 칼슘 등이 첨가된 밀크녹차와 달콤녹차가 낮은 값을 보였다. 색의 밝기를 나타내는 백색도 값은 이모민 녹차가 45.74로 높고 적색도 값은 오후의 홍차, 황색도 값은 영천양잠의 빙잎차가 각각 4.73, 14.54로 높은 값을 보였다.

표 21. 시판 녹차 관련 음료의 품질 특성

상품명 (회사)	원재료명	당도 (. Bx)	산도 (%)	pH	투광도 (590nm, %T)	색상			
						L	a	b	ΔE
차우린 녹차 (롯데)	녹차추출액30%(고형분 0.8, 국산18, 중국산12%), 녹차향, L-아스코르빈산 나트륨, 비타 민C, 탄산수소나트륨	0.3	0.012	6.4	85.15	36.53	-4.88	6.72	64.02
차우린 우롱차 (롯데)	우롱차 추출액18.6%, 탄산수 소나트륨, 비타민C	0.2	0.010	5.8	66.22	10.36	2.74	5.41	89.85
오후의 홍차	홍차추출액 0.5% (고형분 0.07%), 설탕, 우유(1.2%), 전 지분유, 탈지분유, 레몬향	7.7	0.016	6.8	0.04	2.48	4.73	1.64	97.66
실론티 (롯데)	홍차추출액, 액상과당, 설탕, 구연산, 향료	7.9	0.083	3.2	72.07	13.71	1.73	7.56	86.65
이모민 자스민차	녹차추출액(고형분 20%) 0.663%, 자스민꽃추출액(고형 분 4%) 0.297%, 비타민C	0.2	0.006	6.3	86.72	29.19	-2.00	2.74	70.90
이모민 녹차	녹차추출액(고형분 20%) 100%, 비타민C	0.3	0.007	6.5	87.68	45.74	-4.79	11.91	55.76
유기농 녹차	유기농 녹차추출액(0.3%) 100%	0.2	0.013	5.0	88.25	13.76	-0.27	2.68	86.30
보성녹차	녹차추출액10%, 비타민C, 구 연산, 백설탕, 레몬향, 녹차향, 탄산수소나트륨, 벌꿀향	8.0	0.128	3.2	96.24	14.56	-1.00	0.42	85.46
뽕잎차 (영천양잠)	뽕잎추출액91%, 벌꿀5%, 감 초추출액, 구연산, 비타민C	6.6	0.075	4.0	58.87	25.56	3.92	14.54	75.95
우롱차	우롱차, 비타민C	0.3	0.020	4.9	56.05	17.13	3.21	8.65	83.40
밀크녹차 (녹차원)	가루녹차6.5%, 식물성유지분 말5%, 유청분말10%, 텍스트 린, 세립당, 식염	11.2	0.017	6.6	0.17	6.06	0.71	3.98	94.03
달콤녹차 (녹차원)	식이첨유35.46%(일본-51%), 가루녹차 9.15%텍스트린, 자 일리톨4.6%, 헤조, 나노칼슘 2.3%	6.6	0.057	7.6	0.55	14.91	0.73	9.41	85.62

## 2) 추출액의 제조 및 특성

1% Glutamic acid 용액과 함께 콜로이드밀로 페이스트화시킨 뽕잎을 헝기처리 후 건조한 분말을 이용하여 대중적 기호성이 있는 음료 제조에 앞서 먼저 GABA 축적 분말에 각기 다른 농도의 물을 첨가하여 열수추출한 추출액의 특성을 조사하였다(표 22).

추출액의 가용성 고형분, 총당 및 환원당 함량은 가수량이 증가함에 따라 감소하여 50배의 정제수를 첨가한 경우 각각 1.1, Brix, 3.88, 1.04 mg/mL이던 것이 250배 정제수를 첨가한 경우 각각 0.1, Brix, 0.70, 0.08mg/mL이었다. 추출액의 pH는 6.6에서 6.29로 약간 감소하였고 분광광도계에서의 투광도 값(%T)은 79.41에서 250배 정제수 첨가시 64.54로 상승하였다. 추출액의 색도에 있어서 백색도 값은 50배 정제수 첨가시 26.56에서 150배 정제수 첨가시까지는 약간 상승하였으나 그 이후부터는 감소하여 250배 첨가시에는 21.03을 나타내었다. 적색도 값은 50배 정제수 첨가구의 경우 7.63이었으나 150배 정제수 첨가구부터는 녹색도 값인 -0.80으로 보였고 정제수의 첨가량이 상승함에 따라 녹색도 값은 상승하였다. 황색도 값은 50배 첨가시 16.21로 처리구 중 가장 높은 값을 보였고 정제수의 첨가량이 상승함에 따라 감소하였다.

표 22. 가수량별 뽕잎추출액의 특성

처리구	가용성 고형분 (。Bx)	총당 (mg/mL)	환원당 (mg/mL)	pH	투광도 (%T, 590nm)	색도			
						L	a	b	△E
1 : 50	1.1	3.88	1.04	6.60	79.41	26.56	7.63	16.21	75.60
1 : 100	0.6	2.10	0.54	6.56	87.23	29.68	1.30	15.20	71.96
1 : 150	0.4	1.44	0.36	6.51	90.48	29.08	-0.80	12.55	72.03
1 : 200	0.3	1.07	0.27	6.58	92.37	28.85	-1.74	10.31	71.92
1 : 250	0.1	0.70	0.08	6.29	94.54	21.03	-1.59	6.15	79.23

앞서 음료용 추출액 제조시 물량을 각기 다른 농도로 첨가한 추출액의 관능적 특성을 비교한 결과 가수량에 적을수록 추출액을 음용할 경우 목과 혀가 까칠함을 느끼게 하고 음용하기에 다소 역겨웠으며 향이 강하여 초기 거부감이 생기고 음용시 뽕 향미가 강하게 느껴지고 미원맛이 나중에 느껴졌다. 가수량이 많을수록 뽕 특유의 향이 희석되어 음용전 느끼는 향은 그런대로 좋아졌으나 추출액을 음용하면 즉시 다소 느끼한 미원맛이 느껴졌으나 1:200처리구는 그런대로 음용 가능한 범위로 추정되었다.

### 3) 볶음처리 뽕잎분말의 제조 및 추출액의 이화학적 특성

앞서 glutamic acid를 이용하여 GABA를 축적시킨 열풍건조 뽕잎 분말을 그대로 열수추출한 추출액의 관능적 특성에서 나타난 문제점을 해결하고자 GABA 축적 뽕잎

분말을 볶음처리하였다. 즉, GABA 축적 시료를 호일에 일정 두께로 깔고 미리 온도를 조정된 건조기에서 시간별로 볶음처리하였다(그림 40).



0            3분  
5분        7분        10분

그림 40. 볶음처리한 빵잎의 외형적 성상

시간을 달리하여 볶음처리한 분말의 색도를 조사한 결과는 표 23과 같다. 색의 밝기를 백색도와 황색도 값은 3분 볶음처리시 각각 39.12, 7.85로 미처리구의 37.85, 6.52보다 약간씩 상승하였으나 볶음시간이 상승함에 따라 다시 감소하는 것으로 나타났다. 적색도 값은 분말의 볶음시간이 상승함에 따라 3분 처리구의 0.02에서 10분 처리구의 1.91로 상승하였다.

표 23. 볶음시간별 뽕잎분말의 색도 변화

볶음시간 (분)	L	a	b	△E
0	37.85	-0.23	6.52	55.48
3	39.12	0.02	7.85	54.38
5	37.20	0.95	7.07	56.22
7	36.53	1.80	6.69	56.87
10	35.96	1.91	6.42	57.42

볶음시간을 달리한 뽕잎분말에 중량대비 200배의 정제수를 첨가하여 98℃에서 1시간 열수추출한 추출액의 특성을 조사한 결과는 표 24와 같다. 추출액의 가용성고형분은 볶음시간에 따른 차이가 없는 것으로 나타났으나 추출액의 총당과 환원당 함량은 볶음처리구가 미처리구에 비해 함량이 낮았으며 볶음시간이 상승함에 따라 약간씩 더 감소하였다. 이러한 현상은 뽕잎분말을 160℃에서 볶음처리함으로써 뽕잎의 환원당이 열에 의해 갈색색소로 변화된 것이 원인인 것으로 판단된다. 추출액의 pH는 볶음처리구가 미처리구의 6.58에 비해 낮았고 5분 볶음처리구부터는 차이가 없었다. 추출액의 투광도는 3분 볶음처리시 97.65로 미처리구에 비해 상승하였으나 볶음시간이 상승함에 따라 다시 감소하여 10분 볶음처리시 87.26이었다. 색도 중 백색도 값은 볶음처리에 의해 감소한 반면 적색도 값은 미처리구의 -1.74에서 10분 볶음처리시 4.06으로 상승하였다.

표 24. 볶음시간별 뽕잎추출액(1:200)의 이화학적 특성

볶음시간 (분)	가용성 고형분 (。Bx)	총당 (mg/ mL)	환원당 (mg/ mL)	pH	투광도 (%T, 590nm)	색도			
						L	a	b	△E
0	0.3	1.07	0.27	6.58	92.37	28.85	-1.74	10.31	71.92
3	0.3	0.80	0.05	6.01	97.65	19.54	-0.74	7.99	80.87
5	0.3	0.72	0.02	5.77	93.15	14.53	2.53	8.21	85.91
7	0.3	0.67	0.01	5.71	89.53	11.60	3.49	7.00	88.76
10	0.2	0.64	0.02	5.70	87.26	10.46	4.06	6.49	89.88

볶음시간을 달리한 뽕잎 추출액의 관능적 특성을 비교해 보면 3분 처리구는 풀냄새와 비린냄새가 감지되나 5분 처리구부터는 거의 감지하기 어려웠고 7분 처리구는 탄향미가 감지되었다. 추출액을 음용한 후 후미의 미원맛이 3분처리구는 약하게 감지되나 5분 처리구부터는 거의 느껴지지 않았고 볶음시간이 긴 처리구는 추출액을 음용한 후 후미에 까칠까칠한 느낌이 아주 약하였다.

이들 볶음시간을 달리한 뽕잎 추출액의 색상, 향, 맛, 종합적 기호도에 대한 관능검사 결과는 표 25와 같다. 추출액의 색상은 5분 볶음처리구까지는 미처리구에 비해 좋은 것으로 나타났으나 그 이상의 볶음처리구는 점수가 낮았다. 향, 맛, 종합적 기호도에 있어서는 표에서 볼 수 있는 바와 같이 볶음처리한 것이 미처리구에 비해 전반적으로 관능적 평가 점수가 높았고 특히 5분 볶음처리한 것이 각각 6.0, 5.9, 6.2으로 가장 우수하였다.

표 25. 볶음시간별 뽕잎추출물의 관능검사 결과

볶음시간 (분)	색상	향	맛	종합적기호도
0	5.3±0.3 <sup>ab</sup>	4.0±0.5 <sup>b</sup>	2.7±0.4 <sup>c</sup>	3.2±0.3 <sup>c</sup>
3	6.3±0.4 <sup>a</sup>	5.3±0.5 <sup>ab</sup>	4.3±0.6 <sup>b</sup>	4.7±0.6 <sup>b</sup>
5	6.3±0.4 <sup>a</sup>	6.0±0.4 <sup>a</sup>	5.9±0.4 <sup>a</sup>	6.2±0.5 <sup>a</sup>
7	4.7±0.4 <sup>bc</sup>	5.3±0.3 <sup>ab</sup>	5.2±0.4 <sup>ab</sup>	5.3±0.4 <sup>ab</sup>
10	3.9±0.3 <sup>c</sup>	4.8±0.5 <sup>ab</sup>	4.7±0.3 <sup>ab</sup>	4.7±0.5 <sup>b</sup>

1 : 아주 나쁘다, 9 : 아주 좋다

#### 4) 음료 제조 및 품질 개선

음료용 뽕잎 추출액의 기호도 개선을 위해 160℃, 5분간 볶음처리한 뽕잎분말에 200배의 정제수를 첨가하여 98℃에서 1시간 추출한 추출액을 이용하여 기호성 음료를 제조하였다. 표 26의 배합비로 음료의 최종 당도는 설탕을 이용하여 7.2~8.2 brix, pH는 구연산 또는 피틴산을 이용하여 3.6~3.9의 범위로 조정하였고 티, 오디, 복숭아, 사과, 파인애플 향을 단독 또는 혼합, 첨가하여 음료를 제조한 후 살균, 냉각하였다. 추출액을 그대로 음용할 경우에 비해 GABA 축적 뽕잎 분말의 문제점인 미원 맛이



월등히 약하게 느껴졌으나 배합비 1, 2는 후미에 약한 미원맛이 여전히 남아 있었으며 피틴산을 첨가한 것보다 구연산 첨가구가 좋았고 티향((No.01600930)을 첨가한 것이 다소 기호적으로 좋았으나 음료의 산뜻한 맛이 부족하였다.

표 26. 빵잎 청량음료의 제조 배합비

원·부재료	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
추출액	93.16	93.16	92.555	92.555	92.555	92.215	92.355	92.355	92.355	
구연산	0.02	-	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
피틴산	-	0.02	-	-	-	0.04	-	-	-	
비타민 C	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
설탕	6.8	6.8	7.2	7.2	7.2	7.5	7.4	7.4	7.4	
향료 1(Tea) (No.01600930)	-	-	0.2	-	0.15	0.2	0.15	0.15	0.15	
향료 2(Mul)	-	-	-	0.2	0.05	-	-	-	-	
향료 3(복숭아)	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-	
향료 4(사과)	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	
향료 5(파인애플)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	
음료	당도 (. Bx)	7.6	7.2	7.8	7.8	7.8	8.0	8.2	8.2	8.2
	pH	3.9	3.9	3.8	3.8	3.8	3.6	3.8	3.8	3.8

표 27은 음료의 기호도를 개선하고자 설탕과 고과당을 혼합, 첨가하여 음료의 최종 당도를 7.8. Brix로 조정하고 앞서 기호도가 괜찮은 것으로 나타난 차 향료(No.01600930)의 다소 아린 뒷맛과 깔끔한 향미를 보강시킨 개선 차 향료(No.3307)를 이용하여 음료를 제조하였다. 이 때 사과, 복숭아 향료 또는 사과, 복숭아 농축액을 단독 또는 혼합 첨가하여 음료를 제조하였다.

설탕에 고과당을 혼합조미함으로써 음료의 단맛이 길게 늘어지지 않고 짧게 끝어지는 효과가 있었다. 배합비 1은 단맛과 신맛의 조화가 그런대로 좋았으나 배합비 2는 음용 후 후미가 좋치 못하고 화장품 냄새가 났으며 배합비 3은 후미에 떼은 맛이 감

지되었다. 이들 3가지 음료의 관능평가 결과(표 28) 개선된 차 향료에 사과향과 사과 농축액을 첨가한 배합비 1이 음료의 맛과 종합적 기호도에서 약간 우수한 것으로 나타났다.

또한 개선 차 향료의 농도를 상승시키거나 보조향으로 사과 향의 첨가량을 조정하고 사과 농축액의 첨가농도를 조정한 음료를 제조, 관능평가한 결과(표 29) 배합비 4는 음료의 전체적인 맛이 부드러웠고, 배합비 5는 배합비 4에 비해 음료의 신맛이 다소 강하나 기호도는 좋았으며 전반적으로 배합비 4, 5가 배합비 1, 2, 3에 비해 기호도가 약간씩 우수하였다. 특히, 배합비 4는 많은 양을 한번에 음용할 경우 전반적인 향미가 부드러운 반면 배합비 5는 중간 중간 신맛이 약간씩 튀어 오르는 것으로 나타났으나 관능적 차이는 거의 없는 것으로 판명되었다.

표 27. 빵잎 청량음료의 제조 배합비

원·부재료	1	2	3	4	5	6
빵잎추출액 (1:200)	90.855	90.855	90.855	90.855	90.855	90.785
설탕	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9
고과당	2.0	2.0	2.0	6.0	2.0	4.0
구연산	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
비타민 C	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
향료 (No.3307)	0.1	-	0.1	0.2	0.15	0.25
향료 (No.01600930)	-	0.1	-	-	-	-
사과향료 (No.3410-Z)	0.1	0.1	-	-	0.02	0.02
복숭아향료 (No.0235)	-	-	0.1	-	-	-
사과농축액 (6825-C)	4	4	-	-	4	2
복숭아농축액 (727+6)	-	-	4	-	-	-
음료 당도/pH/산도	7.8/3.7/0.11	7.8/3.7/0.10	7.8/3.7/0.16	7.7/4.4/0.04	7.7/3.6/0.11	7.7/3.7/0.10

표 28. 음료의 관능검사 결과

배합비	색상	향	맛	종합적기호도
1	5.9±0.4	5.5±0.4	5.1±0.5	5.8±0.4
2	5.9±0.4	5.1±0.7	4.5±0.7	4.7±0.7
3	5.3±0.3	5.5±0.6	4.4±0.6	4.5±0.4

1 : 아주 나쁘다, 9 : 아주 좋다

표 29. 음료의 관능검사 결과

배합비	색상	향	맛	종합적기호도
4	6.5±0.4	5.3±0.5	5.9±0.4	5.5±0.4
5	6.2±0.4	5.6±0.3	5.6±0.5	5.4±0.4
6	5.9±0.4	6.0±0.4	5.5±0.5	5.6±0.5

1 : 아주 나쁘다, 9 : 아주 좋다

GABA 축적 빵잎을 160℃에서 5분간 볶음처리한 것을 98℃에서 1시간 열수추출한 액으로 제조한 음료의 경우 생빵잎의 그것에 비해 기호도가 개선되었으나 음료를 음용한 후 후미가 깔끔하지 못한 것으로 판단되었다. 본 실험에서는 이러한 결점 보완을 위해 음료용 빵잎 추출액 제조 적용한 온도를 변화시켜 추출액을 제조하였다.

표 30은 볶음처리한 빵잎분말에 200배의 물을 가하여 25, 60, 98℃에서 각각 1시간 추출한 음료용 추출액의 특성을 비교한 결과이다. 추출액의 가용성고형분과 pH는 추출온도에 따라 차이가 없었으나 총당과 환원당은 추출온도가 상승함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 추출액의 투광도(%T)와 색도 중 백색도와 황색도는 추출온도가 상승함에 따라 감소하여 백색도, 황색도 값은 25℃ 추출액이 각각 24.03, 13.57으로 가장 높았고 98℃ 열수추출액이 각각 15.46, 9.03으로 가장 낮았다.

표 30. 추출온도별 뽕잎추출액(1:200)의 이화학적 특성

추출온도 (°C)	가용성 고형분 (° Bx)	총당 (mg/ mL)	환원당 (mg/ mL)	pH	투광도 (%T, 590nm)	색도			
						L	a	b	△E
실온	0.6	0.46	3.46	5.8	89.7	24.03	4.01	13.57	77.26
60	0.6	0.39	4.06	5.7	88.6	19.28	4.27	11.16	81.59
98	0.6	0.64	4.09	5.7	86.2	15.46	3.81	9.03	85.10

이들 추출온도를 달리한 추출액의 관능적 특성을 비교한 결과 본 결과에서는 나타 내지 않았으나 추출온도가 높을수록 액의 색상이 다소 어두운 검은 색을 띄었고 맛이 강해졌으며 음용 후 까칠한 느낌을 주는 것으로 나타났다. 또한 25, 60°C 추출액은 부드러운 볶음향이 주로 감지되는 반면 98°C 추출액은 볶음향의 강도가 다른 것에 비 해 약해지면서 다소 무거운 느낌의 향이 감지되었다. 표 31은 이들 추출액의 색상, 향, 맛 등에 대한 관능평가를 실시한 결과이다. 추출액의 색상은 60°C, 향, 맛은 25°C 추출액이 가장 우수하였고 98°C 추출액이 종합적 기호도에 있어서도 다른 2가지 추출 액보다 떨어지는 것으로 나타났다.

표 31. 추출온도별 뽕잎추출액의 관능검사 결과

추출온도 (°C)	색상	향	맛	종합적기호도
실온	3.4±0.5 <sup>a</sup>	5.3±0.5	5.0±0.5 <sup>a</sup>	5.0±0.5
60	5.3±0.3 <sup>ab</sup>	4.8±0.4 <sup>ab</sup>	3.8±0.3 <sup>b</sup>	4.8±0.4
98	4.4±0.6 <sup>b</sup>	4.3±0.4	3.4±0.4 <sup>ab</sup>	3.9±0.3

앞서 표 27의 음료제조용 배합비에서 기호도가 우수한 것으로 나타난 배합비 4를 기준으로 하여 추출온도를 달리하여 제조한 추출액을 사용하여 음료를 제조한 다음 관능평가를 실시한 결과는 표 32와 같다. 음료의 색상은 앞서 추출온도 자체를 관능 평가한 결과에서와 같이 25°C 추출액을 이용한 것이 6.4로 가장 좋았으나 음료의 향, 맛, 종합적기호도에 있어서는 60°C 추출액을 사용하여 제조한 음료가 가장 좋은 것으로 나타났다. 98°C 추출액을 이용한 음료는 짙은맛이 발현되면서 목안을 막히게 하는 듯한 다소 독한 향미가 발현된 반면 25, 60°C 추출액을 이용한 음료는 기호도는 훨씬

부드러우나 음용 즉시 신맛과 단맛이 약간 강한 듯 느낌을 주었다.

표 32. 추출온도를 달리한 뽕잎추출액으로 제조한 음료의 관능검사 결과

추출온도 (°C)	색상	향	맛	종합적기호도
실온	6.4±0.3	5.5±0.2	5.1±0.5	5.1±0.4
60	5.3±0.3	5.7±0.3	6.2±0.6	5.6±0.4
열수	5.1±0.5	4.5±0.5	5.9±0.6	5.1±0.6

앞서 뽕잎 음료의 기호도 개선을 위해 추출온도를 달리한 추출액을 이용하여 제조한 음료의 청량감 부여를 위해 표 27의 배합비 4를 기준으로 감향과 쑥향을 단독 또는 혼합 첨가하여 음료를 제조하였다(배합비 1). 제조한 음료의 관능적 특성을 살펴보면 0.1%의 감향과 0.05%의 쑥향을 첨가한 음료는 쑥향의 강도가 강하고 음용시 떼은 맛이 강하여 도리어 대조구 음료에 비해 기호도가 떨어지는 것으로 나타났고 쑥 향료만 0.01% 첨가한 음료는 음료의 향이 은은하고 쑥향과 차향이 어우러지며 상큼한 맛이 가미되어 연령대가 높은 층에서 선호도가 좋았다. 그러나 감 향료만 0.05% 첨가한 음료는 인공적인 향미가 강하여 거부감이 생겼고 0.005%의 감향과 0.01%의 쑥 향료를 첨가한 음료는 다른 처리구에 비해 뽕 고유의 향이 적당히 강하고 전반적으로 은은한 향미를 부여하는 것으로 나타났다. 전반적으로 기존 음료의 배합비에 적당량의 쑥향 첨가는 차 향의 강도를 상승시키고 음료의 기호도를 증진시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

표 34는 예비평가에서 기호도가 우수한 것으로 나타난 2가지 음료를 대상으로 관능평가를 실시한 결과이다. 2가지 음료 모두 보통이다 이상의 관능점수를 받았으나 음료의 향, 맛, 종합적기호도에 있어서 쑥 향만을 0.01% 첨가한 것이 기호도가 약간 우수한 것으로 나타났다.

이상의 glutamic acid를 이용, 혐기처리에 의해 GABA를 축적시킨 뽕잎분말을 이용한 청량음료 제조 실험 결과를 요약하면 뽕잎분말을 160°C에서 5분간 볶음처리하고 중량대비 200배의 정제수를 가하여 60°C에서 1시간 추출, 여과하여 얻은 추출액을 음료용 추출액으로 사용하였다. 설탕 2.9%, 고과당 6.0%, 구연산 0.025%, 비타민 C 0.02%를 칭량하고 여기에 앞서 제조한 뽕잎 추출액을 가하여 혼합, 용해시킨 다음 향

료(No. 3307) 0.2%, 숙향 0.01%를 첨가하여 다시 혼합 후 뽕잎 추출액으로 전체 물량을 조정하고 여과하여 청량음료를 제조하였다.



그림 41. 청량음료

표 33. 뽕잎 청량음료의 제조 배합비

원·부재료	7	8	9	10	11	12
뽕잎추출액 (1:200)	90.855	90.705	90.815	90.845	90.805	90.840
설탕	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9
고과당	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
구연산	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
비타민 C	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
향료 (No.3307)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
감향	-	0.1	0.03	-	0.05	0.005
숙향	-	0.05	0.01	0.01	-	0.01

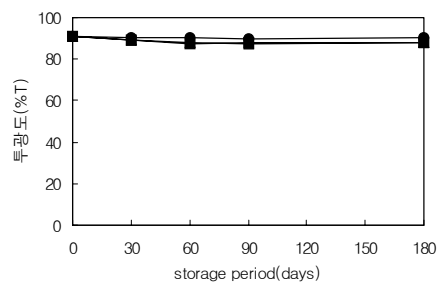
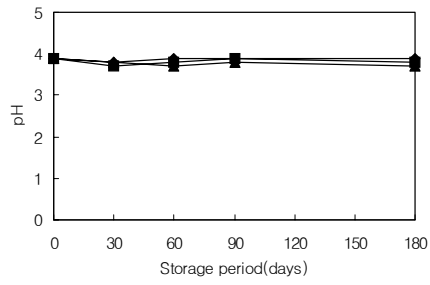
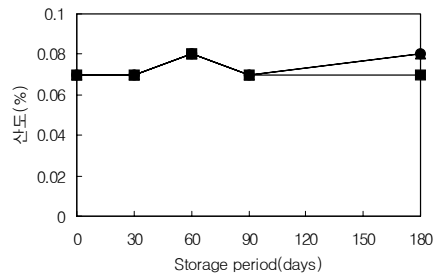
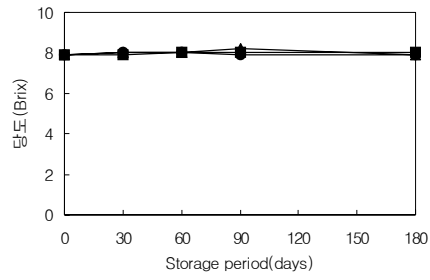
표 34. 썩향, 감향의 혼합비율에 따른 음료의 관능검사 결과

음료번호	색상	향	맛	종합적기호도
10	6.00±0.24	6.89±0.39	6.56±0.38	6.56±0.38
12	6.00±0.26	6.22±0.28	6.11±0.39	6.33±0.29

### 5) 음료의 저장 중 품질 특성

GABA 축적 빵잎분말을 이용하여 제조한 청량음료의 저장 중 품질 변화를 조사하고자 시료에 200배의 정제수를 가하여 60℃에서 1시간 추출 후 여과하여 얻은 추출액에 설탕 2.9%, 고과당 6.0%, 구연산 0.025%, 비타민 C 0.02%를 가하여 혼합, 용해시킨 다음 향료(No. 3307) 0.2%, 썩향 0.01%를 첨가하여 다시 혼합 후 빵잎 추출액으로 전체 물량을 조정하고 여과하였다. 여과한 음료를 180 mL 투명 유리병에 충전, 밀봉하고 음료의 내부온도가 85℃가 될 때까지 살균, 냉각하였다.

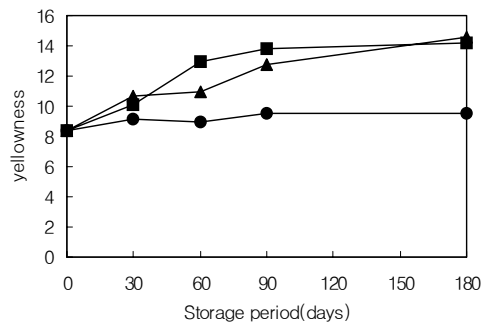
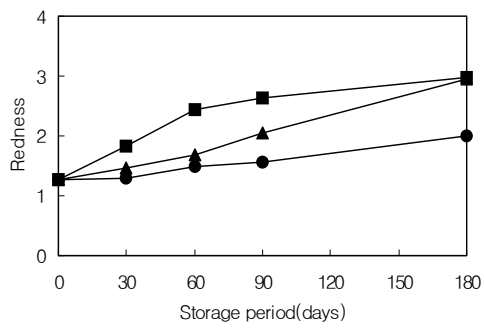
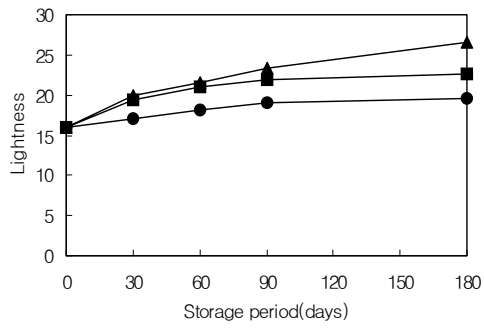
그림 41, 42은 저장온도(4, 25, 37℃)별 음료의 경시적 품질변화를 측정된 결과이다. 본 결과에서는 나타내지 않았으나 미생물의 경우 대장균, 총균 모두 저장 180일까지 저장온도에 관계없이 검출되지 않아 음료의 안전성에는 문제가 없는 것으로 평가되었다. 음료의 당도, 산도, pH도 저장 180일까지 각각 7.9. Brix, 0.07%, 3.9 정도에서 큰 변화 없이 초기의 값을 유지하는 것으로 나타났다. 음료의 투광도(%T)를 살펴보면 4℃에 저장 한 음료는 저장 중 변화가 없었으나 25℃, 37℃ 저장 음료는 저장기간이 경과함에 따라 약간씩 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 볶음처리한 빵잎 추출액의 성분이 저장 중 용해도가 변하게 되면서 용기 밑부분에 약간의 침점물을 생성함에 따라 음료의 탁도에 영향을 미친 것이 원인으로 판단된다. 음료의 백색도, 적색도, 황색도 값은 저장기간이 경과함에 따라 약간씩 상승하여 25℃ 저장구는 저장 60일경부터는 변화가 없었으나 37℃ 저장구는 저장 180일까지 지속적으로 약간씩 상승하였으나 육안으로 큰 차이는 관찰할 수 없었다. 음료의 저장 중 관능평가 결과 25℃ 저장 음료는 저장에 따른 관능적 차이를 보이지 않았으나 37℃ 음료는 저장 90일경에 향미에 약간의 변화를 보이는 것으로 나타났다.



●—● 4°C    ■—■ 25°C    ▲—▲ 37°C

그림 41. 빙얌음료의 저장 중 품질 특성 변화





●—● 4°C    ■—■ 25°C    ▲—▲ 37°C

그림 42. 빵잎음료의 저장 중 품질 특성 변화

#### 다. 티백형 차제품

침출차란 기호성 식물의 어린 싹이나 잎, 꽃, 줄기, 뿌리, 열매 또는 곡류 등의 원료를 단독 또는 이들을 2종 이상 혼합하거나 이에 다른 식품을 가하여 가공한 것으로서 온수에 침출하여 그 여액을 음용하는 기호성 식품을 말한다.

##### 1) GABA 축적 빵잎분말을 이용한 티백형 침출차

1% Glutamic acid가 첨가된 빵잎페이스트를 험기처리한 다음 열풍건조한 분말을 이용하여 티백형의 침출차를 제조하였다. 건조분말을 1 g씩 tea bag 포장한 다음 80℃ 온수 100 mL에 넣고 3분간 우려낸 침출액을 관능검사한 결과 색상이 진하고 음용시 glutamic acid로 인한 느끼한 미원맛이 강하게 감지되어 GABA 축적 분말을 그대로 침출차 원료로 사용하는 것은 기호적으로 문제가 있었다.

GABA 축적 빵잎분말을 tea bag용 침출차로 사용하기 위해 분말을 110℃에서 1시간 열처리한 다음 앞과 동일하게 1회용 tea bag에 포장, 침출액의 관능적 특성을 살펴보았다. 추출액의 색상, 맛이 진하고 볶음 향이 발현되어 기호적으로는 약간 개선되는 것 같으나 후미에 감지되는 미원맛이 비볶음처리구보다는 약해졌으나 기호적으로 좋치 못하였다.

앞서 청량음료 제조시 적용한 볶음처리방법 중 160℃에서 5분간 분말을 볶음처리한 다음 tea bag에 1 g씩 포장하고 200 mL 온수로 침출한 액의 관능적 특성을 조사한 결과는 표 35와 같다. 표에서 볼 수 있는 바와 같이 침출액의 색상, 향, 맛, 종합적 기호도가 대조구에 비해 월등히 좋아지는 것으로 나타났다. 특히 160℃에서 5분 볶음차리함에 따라 침출액의 후미에서 느껴지는 느끼한 미원 맛이 크게 약해지는 것으로 나타났다.

표 35. 처리구별 분말(1 g/200 mL)의 관능검사

처리구	색상	향	맛	종합적기호도
대조구	5.3±0.3 <sup>ab</sup>	4.0±0.5 <sup>b</sup>	2.7±0.4 <sup>c</sup>	3.2±0.3 <sup>c</sup>
볶음구	6.3±0.4 <sup>a</sup>	6.0±0.4 <sup>a</sup>	5.9±0.4 <sup>a</sup>	6.2±0.5 <sup>a</sup>

1 : 아주 나쁘다, 9 : 아주 좋다

표 36은 앞서 관능적 기호도가 우수한 볶음처리 빵잎 분말을 각기 다른 농도(0.6~1.2 g)로 1회용 tea bag에 포장한 다음 100 mL의 온수에서 침출한 액의 관능적 특성을 조사한 결과이다. 표에서 볼 수 있는 바와 같이 tea bag당 빵잎분말의 농도 차이에 따른 침출액의 색상, 향, 맛, 종합적기호도에서 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났으나 0.8 g/tea bag 포장구가 약간 우수하였다.

표 36. 적정량 빵분말 농도 설정 관능검사 결과

포장량 (g/티백)	색상	향	맛	종합적 기호도
0.6	5.40±0.38	5.56±0.24	5.44±0.34	5.44±0.18
0.8	5.89±0.42	5.78±0.22	5.56±0.34	5.67±0.33
1.0	5.44±0.29	5.56±0.24	5.56±0.44	5.44±0.47
1.2	5.78±0.57	5.11±0.35	5.33±0.50	5.11±0.48

1 : 아주 나쁘다, 9 : 아주 좋다

GABA 축적 빵잎을 이용한 기호성이 우수한 침출차 제조를 위해 160°C에서 5분간 볶음처리한 분말의 기호도 개선을 위해 분말상의 포도, 레몬, 딸기, 복숭아/사과, 국화 향료를 적용하였다. 즉, 볶음처리한 빵잎분말에 분말향료를 각각 0.3%씩 첨가하여 비닐봉지에서 1차 혼합 후 20mesh를 통과시킨 다음 다시 비닐봉지에서 혼합하였다. 이들을 tea bag 당 0.8 g씩 포장하여 100 mL 온수에 각각의 향료를 첨가한 것을 일정 시간 침출한 액을 관능검사한 결과는 표 37과 같다. 침출액의 색상은 레몬 향을 첨가한 것이 5.86로 가장 좋았으나 향, 맛, 종합적 기호도에 있어서는 국화향료를 첨가한 것이 가장 우수한 것으로 나타났고 그 다음으로는 레몬 향료를 혼합한 것이 우수하였다. 포도, 복숭아/사과 향 첨가구는 대조구에 비해 기호도가 떨어지는 것으로 나타났다.

표 37. 분말향료 종류별 빙잎차의 관능검사 결과

향료	색상	향	맛	종합적 기호도
무처리	5.22±0.52 <sup>ab</sup>	4.89±0.35 <sup>ab</sup>	4.67±0.17 <sup>b</sup>	5.22±0.28 <sup>ab</sup>
포도	5.11±0.26 <sup>ab</sup>	4.56±0.18 <sup>b</sup>	4.22±0.22 <sup>b</sup>	4.33±0.17 <sup>ab</sup>
레몬	5.89±0.26 <sup>a</sup>	5.33±0.29 <sup>ab</sup>	5.67±0.24 <sup>a</sup>	5.89±0.31 <sup>a</sup>
복숭아/사과	4.67±0.33 <sup>b</sup>	4.67±0.44 <sup>b</sup>	4.00±0.33 <sup>b</sup>	4.22±0.32 <sup>c</sup>
딸기	5.67±0.24 <sup>ab</sup>	5.33±0.47 <sup>ab</sup>	4.56±0.50 <sup>b</sup>	4.89±0.39 <sup>bc</sup>
국화	4.89±0.26 <sup>ab</sup>	6.00±0.44 <sup>a</sup>	5.67±0.33 <sup>a</sup>	6.11±0.39 <sup>a</sup>

1 : 아주 나쁘다, 9 : 아주 좋다

GABA 축적 빙잎 침출차의 기호도 개선을 위해 적용한 분말향료 중 1차 관능평가에서 기호도가 우수한 것으로 나타난 국화향료의 적정 첨가량을 설정하고자 각기 다른 농도(0.3~3%)의 국화향 분말을 첨가하여 제조한 tea bag형 침출차의 관능적 특성을 조사한 결과는 표 38과 같다. 분말형의 국화향료를 1.0%까지 첨가한 침출차 침출액은 색상, 향, 맛 등 관능적 특성에서 기호도를 상승시키는 것으로 나타났으나 그 이상의 첨가농도에서는 도리어 침출액의 기호도를 저하시키는 것으로 보였다.

표 38. 국화향 첨가량별 빙잎차의 관능검사 결과

향료농도 (%)	색상	향	맛	종합적 기호도
0.3	4.83±0.31 <sup>a</sup>	5.33±0.33 <sup>ab</sup>	4.17±0.65 <sup>a</sup>	4.33±0.42 <sup>b</sup>
1.0	5.33±0.21 <sup>a</sup>	6.00±0.26 <sup>a</sup>	5.67±0.33 <sup>a</sup>	6.00±0.26 <sup>a</sup>
2.0	5.00±0.26 <sup>a</sup>	5.33±0.42 <sup>ab</sup>	4.83±0.48 <sup>a</sup>	4.67±0.50 <sup>b</sup>
3.0	5.00±0.26 <sup>a</sup>	4.50±0.56 <sup>b</sup>	4.50±0.43 <sup>a</sup>	4.17±0.31 <sup>b</sup>

1 : 아주 나쁘다, 9 : 아주 좋다

이상의 glutamic acid를 첨가하여 GABA를 축적시킨 빙잎 분말을 이용한 침출차 제조에 대한 연구결과를 종합하면 빙잎분말을 160℃에서 5분간 볶음처리한 다음 여기에 1.0%의 분말형 국화향료를 첨가하여 혼합한 것을 tea bag 당 0.8g씩 포장함으로써 침출차를 완성하였다.

## 2) GABA 축적 빵잎을 이용한 빵잎/현미 혼합침출차

GABA 축적 빵잎분말을 이용한 침출차의 다변화 방안의 하나로 볶음처리 현미를 이용하여 혼합침출차를 제조하였다. 먼저 볶음처리된 현미의 입자크기가 혼합침출차의 향미에 미치는 영향을 조사하고자 한 처리구는 통현미를 popping 후 분쇄하였고 다른 처리구는 현미를 roll mill을 이용하여 분쇄한 다음 popping 하여 사용하였다.

앞서 침출차 제조시 볶음처리한 빵잎분말에 전처리한 현미를 5:5(v/v)의 비율로 혼합한 다음 tea bag 당 1.5 g씩 포장하였다. 혼합침출차를 100 mL 온수로 일정시간 침출한 액의 관능적 특성을 평가하였다(표 39). 침출액의 경우 먼저 현미 향이 발현되나 바로 빵잎 특유의 향이 발현되었고 현미녹차 대비 색상이 붉었다. 전반적으로 빵잎 맛이 강하고 현미 향이 약한 것으로 나타나 빵잎 향을 약하게 할 필요가 있었다. 현미의 전처리 방법에 따라서는 분쇄 현미를 볶음처리한 것은 통 현미를 볶음처리하여 분쇄한 것보다 볶음처리에 의해 발현되는 현미 고유의 향미가 약한 것으로 나타나 침출액의 향, 맛, 종합적기호도에서 통 현미를 볶음처리 후 분쇄하여 빵잎과 혼합한 처리구가 기호도가 우수하였다.

표 39. 전처리 방법을 달리한 현미 첨가 티백차의 관능검사 결과

시료	색상	향	맛	종합적기호도
볶음, 분쇄현미	7.0±0.3 <sup>a</sup>	6.8±0.20 <sup>a</sup>	6.0±3.16 <sup>a</sup>	6.6±0.24 <sup>a</sup>
분쇄, 볶음현미	7.2±0.37 <sup>a</sup>	6.0±0.32 <sup>a</sup>	4.8±0.37 <sup>b</sup>	5.4±0.24 <sup>b</sup>

표 40은 빵잎과 현미의 혼합비율(5:5, 4:6, v/v)을 달리하여 제조한 혼합침출차를 tea bag당 1.5 g씩 포장 후 침출한 액의 관능검사 결과이다. 현미의 혼합비율이 상승함에 따라 전반적으로 빵잎 향미는 약해지면서 현미의 볶음 향미가 다소 강하게 발현되어 침출액의 향, 맛 등 종합적기호도가 좋아지는 것으로 나타났다.

표 40. 빙잎/현미 혼합비율별 티백차의 관능검사 결과

혼합비율(v/v)	색상	향	맛	종합적기호도
5:5	6.2±0.37 <sup>a</sup>	6.4±0.50 <sup>a</sup>	5.2±0.37 <sup>b</sup>	5.4±0.40 <sup>a</sup>
4:6	6.6±0.24 <sup>a</sup>	7.2±0.37 <sup>a</sup>	6.6±0.40 <sup>a</sup>	6.6±0.40 <sup>a</sup>

혼합침출차의 tea bag당 적정 첨가량을 설정하고자 볶음처리한 빙잎과 현미를 4:6의 비율로 혼합한 것을 tea bag에 0.8~1.5 g씩 포장한 다음 이들을 온수에서 일정시간 침출시켜 얻은 액의 관능적 특성을 조사한 결과는 표 41과 같다. 표에서 볼 수 있는 바와 같이 tea bag 당 0.8g씩 포장하여 침출한 액이 관능적 특성에서 우수한 것으로 나타났다.

표 41. 빙잎/현미 혼합침출차의 1회용 티백당 첨가량별 관능검사 결과

포장량(g/티백)	색상	향	맛	종합적기호도
1.5	5.6±0.40 <sup>a</sup>	5.8±0.37 <sup>a</sup>	4.8±0.37 <sup>a</sup>	5.0±0.32 <sup>a</sup>
0.8	6.8±0.37 <sup>a</sup>	6.6±0.24 <sup>a</sup>	5.6±0.40 <sup>a</sup>	6.2±0.37 <sup>a</sup>

빙잎/현미 혼합침출차의 기호도 개선을 위해 앞서 100% 빙잎 침출차의 기호도 개선 실험에서 선정된 분말형 국화향료를 2% 첨가한 빙잎에 현미(4:6, v/v)를 혼합하여 tea bag 당 0.8 g씩 포장하여 침출액의 관능적 특성을 평가하였다(표 42). 국화향 2% 처리 빙잎을 사용한 것이 대조구에 비해 관능검사 결과 빙잎 향이 다소 약해지면서 은은한 국화향이 약간 감지되어 기호도가 개선되는 것으로 나타났다.

표 42. 향처리 빙잎/현미 혼합 침출차의 관능검사 결과

시료	색상	향	맛	종합적기호도
대조구	5.2±0.37 <sup>b</sup>	5.6±0.60 <sup>a</sup>	4.8±0.58 <sup>b</sup>	5.2±0.37 <sup>b</sup>
향 처리구(I)	7.2±0.37 <sup>a</sup>	6.8±0.37 <sup>a</sup>	7.4±0.24 <sup>a</sup>	7.4±0.40 <sup>a</sup>

표 43은 혼합침출차의 기호도 개선을 더욱 개선하고자 앞서 기호도가 개선된 국화향을 처리한 찹쌀분말에 다시 분말형의 셀러리 향을 1% 첨가하였다. 즉, 찹쌀분말에 국화, 셀러리 분말향을 각각 2, 1%씩 첨가하여 완전히 혼합한 것에 볶음처리한 현미를 4:6의 비율로 혼합하고 티백당 0.8 g씩 포장하여 혼합침출차를 제조, 침출액의 관능적 특성을 평가하였다(표 1). 침출액을 음용하는 즉시 느껴지는 초기 향이 개선되었고, 음용시 찹쌀 특유의 맛도 훨씬 약해졌으며 현미 특유의 향도 약간 강해진 듯하여 대조구에 비해 기호도가 훨씬 개선되었다.

표 43. 향처리 찹쌀/현미 혼합침출차의 관능검사 결과

시료	색상	향	맛	종합적기호도
대조구	5.8±0.37 <sup>a</sup>	6.4±0.24 <sup>a</sup>	5.4±0.40 <sup>a</sup>	6.0±0.31 <sup>a</sup>
향 처리구(II)	6.4±0.24 <sup>a</sup>	7.6±0.24 <sup>a</sup>	7.0±0.32 <sup>a</sup>	7.4±0.24 <sup>a</sup>

이상의 찹쌀/현미 혼합침출차의 실험 결과를 요약하면 GABA를 축적시킨 찹쌀분말은 160℃에서 5분간 볶음처리하고 현미는 통 현미를 popping 후 분쇄하였으며 볶음처리 찹쌀에 분말형의 국화향과 셀러리향을 각각 2, 1%씩 첨가, 전체 내용물을 완전히 혼합시켜 찹쌀과 현미를 4:6의 비율로 혼합한 다음 이들을 tea bag 당 0.8 g씩 포장하여 혼합침출차를 제조하였다.



그림 43. 찹쌀/현미 혼합침출차 및 침출액의 성상

### 3) 혼합침출차의 저장 중 품질 특성 변화

녹차와 같은 차류는 일종의 기호식품으로 저장 중에 맛이나 향이 변할 경우에는 가치가 없어지게 되므로 차 본래의 맛과 향을 유지하는 것이 매우 중요하다. 차의 변질에 관여하는 중요성분으로는 클로로필, 카테킨, 지질 및 카로티노이드, 비타민 C 등으로 이들 성분들의 자동산화에 의해 다협의 표면색, 침출액의 색, 향기, 맛 등의 변화가 일어나 품질이 저하된다.

혼합침출차 제품의 저장 중 품질 특성 변화를 조사하고자 glutamic acid 용액을 이용, 혐기처리하여 GABA 축적시킨 다음 열풍건조하고 볶음처리한 빙잎분말과 현미를 4:6의 비율로 혼합하고 여기에 국화와 셀러리 분말향료를 첨가하여 내용물을 완전히 혼합한 것을 1회용 티백용기에 0.8 g씩 포장하였다. 티백 제품을 종이로 각각 채 포장하고 종이박스에 담아 4, 25, 37℃에 각각 저장하면서 경시별로 시료를 채취하여 혼합침출차의 외형적 성상과 이취를 조사하였다.

혼합침출차의 외형적 성상은 저장기간, 온도에 따라 차이가 없었으나 25℃ 저장구는 저장 90일경에 품질개선을 위해 첨가된 향료의 강도가 많이 약해졌고 대신 볶음처리한 현미 향이 저장초기에 비해 강하게 발현되었다. 37℃ 저장구 또한 유사한 경향을 보여 본 실험에서 혼합침출차의 품질개선을 위해 첨가된 분말형의 국화, 셀러리향은 저장 중 향 강도의 안정성을 다소 보완할 필요가 있는 것으로 나타났다. 저장기간별 혼합침출차 침출액의 색도를 측정된 결과는 표 44와 같다. 백색도와 황색도 값은 저장기간, 저장온도에 따른 차이가 거의 없었으나 적색도 값은 저장온도에 따라 약간씩의 감소하는 경향을 나타내었다. 특히, 37℃ 저장구가 가장 낮은 값을 보였으나 25℃ 저장구는 초기 값과 비교할 때 약간의 차이가 있었다.



표 44. 빵잎/현미 혼합 티백차의 저장 중 침출액의 색도 변화

저장온도	저장기간	L	a	b
대조구	-	33.51	-1.13	14.03
4℃	30일	34.12	-1.19	14.31
	60일	34.52	-1.04	14.18
	90일	35.12	-1.23	14.25
	180일	34.10	-1.02	13.98
25℃	30일	33.43	-1.63	14.90
	60일	33.86	-0.98	13.19
	90일	33.98	-0.82	13.79
	180일	32.65	-0.81	14.00
37℃	1주	32.38	-0.85	14.48
	2주	32.43	-0.82	13.56
	3주	32.58	-0.63	14.57
	6주	31.57	-0.46	14.11

**라. 선식제품(유형:엽록소함유식품/맥류약엽 가공식품)**

선식제품은 일반대중들이 일상적으로 섭취하는 음식과는 달리 육류가 들어 있지 않은 순수 식물성 원료를 소재로 한 음식이며 특히 마늘, 양파, 파, 부추와 같은 자극성이 강한 채소는 함유되어 있지 않고 기타 양념류가 가미되지 않아 원료가 가지고 있는 자연 그대로의 맛을 나타내는 식품의 하나로 생각된다. 뿐 만 아니라 여러 가지 종류의 곡류, 두류 등을 함께 잘 혼합하여 조제된 것이므로 각종 비타민, 무기질 등이 풍부하고 특히, 육류가 들어있지 않으므로 식육제품의 과다섭취로 인한 비만, 고혈압 등의 성인병을 유발시킬 우려가 없어 성인용 식품으로서는 바람직한 조성을 하고 있는 것으로 생각된다. 현재 선식이란 이름으로 상품화된 제품들의 사용 원료로서는 찹쌀, 보리, 현미, 율무, 콩, 깨 등 7가지 재료를 같은 비율로 혼합하는 것을 기본으로 하

여 적절히 그 양을 가감하기도 하며 그밖에 건조 채소류를 혼합하기도 하여 다양한 이름으로 시판되고 있다.

### 1) 분말선식의 제조

본 연구에서는 GABA 축적 빵잎분말을 이용하여 냉수, 우유 등에서의 분산성이 우수하고 현대인의 기호에도 적합한 빵잎 선식제품을 제조하였다. 표 45와 같은 배합비로 ball mill로 미세분말화시킨 빵잎분말(30~33%)에 동결건조한 양배추, 무청, 미나리, 신선초와 같은 채소류분말, 점성부여를 위해 잔탄검, 솔스타 및 기호도 증진을 위해 포도당, 식물성프립, 소금 등을 혼합하고 믹서기를 이용하여 전체 내용물을 균일하게 혼합하였다.

표 45. GABA 빵잎을 이용한 선식제품의 배합비

(%)

원·부재료	1	2	3	4
당귀분말	1.0	1.0	1.0	1.0
양배추	6.3	6.1	6.2	6.7
무청	6.3	6.1	6.2	6.7
미나리	6.3	6.1	6.2	6.7
신선초	6.3	6.1	6.2	6.7
솔잎가루	-	-	1.2	0.6
참쌀현미가루	-	-	1.8	-
다시마가루	-	-	-	1.3
빵잎분말	31.6	31.0	30.6	33.1
빵잎점진물분말	0.9	0.9	0.9	0.9
포도당	32.1	32.0	30.6	33.1
잔탄검	0.9	1.0	0.9	1.0
소금(정제)	1.8	1.8	1.8	2.0
비타민 C	0.2	0.2	0.2	0.2
식물성프립	6.3	6.1	6.2	-
솔스타	-	1.6	-	-

앞서 제조한 선식 분말의 색도를 색차계를 이용하여 측정한 결과는 표 46과 같다. 백색도 값은 44.84~46.09, 녹색도 값은 -0.72~-1.85, 황색도 값은 11.79~13.12로 배합비에 따라 약간씩의 차이가 있었다. 현재 시중에서 건강보조식품 중 엽록소함유식품/맥류약엽가공식품으로 판매중인 청즙분말 제품(L: 51.14, a: -4.02, b: 13.39)과 비교해보면 빵잎을 이용한 제품은 백색도와 녹색도 값이 약간씩 낮은 것으로 나타났다.

표 46. GABA 축적 빵잎을 이용한 선식분말의 색도

배합비	L	a	b	△E
1	46.09	-1.85	12.34	47.60
2	44.84	-0.93	12.09	48.74
3	44.20	-0.72	11.79	49.30
4	45.43	-1.00	13.12	48.41

\* 시판청즙 - L: 51.14, a: -4.02, b: 13.39, △E: 43.11

앞서 제조한 배합비별 GABA 축적 빵잎 가미 선식분말 1.5 g을 정제수 45 mL에 용해시킨 것의 색도를 색차계를 이용하여 측정한 결과는 표 47과 같다. 이 때 청즙제품을 동일하게 처리하여 비교하였다. 백색도와 황색도 값은 배합비 1이 각각 1.18, 0.79로 가장 높았고 적색도는 0.56으로 가장 낮았다. 배합비 2, 3, 4는 선식분말 자체의 색도는 청즙과 다소 차이가 있었으나 이들 분말을 물에 용해한 경우 청즙(L: 0.66, a: 0.92, b: 0.44)의 그것과 거의 비슷한 수치를 보였다.

표 47. 배합비를 달리한 선식분말의 용해 후 색도

배합비	L	a	b	△E
1	1.18	0.56	0.79	98.84
2	0.69	0.91	0.46	99.33
3	0.70	0.82	0.47	99.32
4	0.67	0.93	0.44	99.36

\* 시판청즙 - L: 0.66, a: 0.92, b: 0.44, △E: 99.36

\* 빵잎분말 - L: 0.57, a: 1.11, b: 0.39, △E: 99.45

앞서 GABA 축적 빵잎을 첨가하여 제조한 선식분말을 용해시켜 색상, 향, 맛, 종합적기호도에 대해 청즙과 같이 9점 기호척도법으로 관능검사한 결과는 표 48과 같다. 표에서 볼 수 있는 바와 같이 전반적으로 관능적 기호도가 낮았으나 시판 청즙의 경우에 있어서도 낮은 점수를 보였다. 색상은 전반적으로 청즙보다 우수한 것으로 나타났고 배합비 4가 처리구 중 가장 높은 점수를 보였으며 청즙보다 관능적 평가가 낮은 배합비는 없었다.

이들 분말의 용해시 관능적 특성을 살펴보면 먼저 GABA 축적을 위해 사용된 glutamic acid에 의한 맛의 영향은 크지 않은 것으로 나타났으며 배합비 1은 물에 녹였을 경우 점질성이 별로 없었고, 배합비 3은 찹쌀현미가루의 첨가로 인해 후미에 쓴 맛이 감지되어 기호도가 떨어진 반면 배합비 4는 솔잎과 다시마 가루의 첨가로 독특한 향미가 발현되었다. 그러나 본 실험에서 선식제품에 점질성을 부여하고자 생 빵잎에서 추출, 건조한 빵잎점진물 분말의 첨가에 따른 효과는 선식제품의 용해시 관찰할 수 없었다.

표 48. GABA 축적 빵잎을 이용한 선식분말의 용해 후 관능검사 결과

배합비	색상	향	맛	종합적 기호도
청즙	3.83±0.31 <sup>b</sup>	3.83±0.31	2.83±0.40 <sup>c</sup>	3.50±0.22 <sup>c</sup>
1	5.67±0.42	4.00±0.45	2.67±0.33 <sup>b</sup>	4.00±0.26 <sup>bc</sup>
2	5.83±0.31	4.33±0.33	2.7±0.31 <sup>b</sup>	4.17±1.67 <sup>b</sup>
3	4.83±0.40	3.50±0.34	3.00±0.37 <sup>b</sup>	3.50±0.22 <sup>c</sup>
4	5.83±0.40	4.67±0.42	4.67±0.33 <sup>a</sup>	4.83±0.17 <sup>a</sup>

1 : 아주 나쁘다, 9 : 아주 좋다

앞서 표 45의 배합비에 의해 제조한 GABA 축적 빵잎분말 첨가 선식제품의 용해 후 물성 및 기호도 개선을 위해 찹쌀가루, 빵잎점진물분말, 솔스타, 잔탄검을 제외시키고 대신 식물성프림의 첨가량을 상승시키고 GABA 축적 빵잎과 채소류 분말 및 포도당의 첨가농도를 감소시키고 찰옥수수 알파전분을 적용하여 물성을 조정하였다. 또한 최종제품의 맛과 기능성 강화를 목적으로 과일분말(사과분말 : 바나나분말 : 파인애플농축액 : 오렌지분말 : 미분 = 15 : 15 : 15 : 15 : 40, KH Food Co.)을 첨가하여 선식분말을 제조하였다(표 49).

표 49. 빵인첨가 선식제품의 배합비

(%)

원·부재료	5	6	7	8	9
양배추	3	2	5	5	4
무청	3	2	5	5	4
미나리	3	5	5	5	4
신선초	5	7	7	6	5.6
솔잎가루	-	1	-	-	-
다시마가루	1	2	3	2	2.4
빵인분말	25	20	20	17	16
포도당	18	15	15	10	12
소금(정제)	1.5	1	2	2	1.6
식물성프림	30	30	28	23	22.4
찰옥수수전분	10	15	10	10	8
과일분말*	-	-	-	15	20

표 50은 배합비를 조정한 선식분말의 색도를 측정된 결과이다. 백색도 값은 51.72~56.94, 녹색도 값은 -1.1~-5.34, 황색도 값은 6.12~15.18로 시판 청죽(L: 51.14, a: -4.02, b: 13.39)과 비슷한 수치를 보였다.

표 50. 빵인첨가 선식분말의 색도

배합비	L	a	b	△E
5	53.88	-1.75	11.28	39.79
6	55.97	-4.70	15.11	39.18
7	51.72	-1.10	6.12	56.79
8	56.94	-5.37	15.18	38.39
9	53.25	-3.98	14.12	38.54

\* 시판청죽 - L: 51.14, a: -4.02, b: 13.39, △E: 43.11

선식제품의 물성과 기호도 개선을 위해 배합비를 조정한 분말제품 1.5 g을 정제수 45 mL에 용해시킨 다음 청즙과 함께 관능적 특성을 비교한 결과는 표 51과 같다. 모든 배합비가 청즙보다 높은 관능적 점수를 보였으며 특히, 배합비 9의 경우 색상이 5.83, 맛이 5.33, 종합적기호도가 5.5로 처리구 중 가장 우수한 점수를 보였다. 이들 선식제품은 빵잎과 각종의 채소류 분말을 사용한 관계로 냉수에 용해시 분산성, 용해성이 우수할 뿐 아니라 곡류를 주 베이스로 하는 미숫가루보다 훨씬 걸쭉한 물성을 부여할 수 있었다. 이상의 선식제조 실험 결과를 요약하면 ball mill을 이용, 미분말화시킨 GABA 축적 분말 16%에 동결건조한 양배추, 무청, 미나리, 신선초분말을 각각 9, 4, 4, 4, 5.6%와 다시마가루 2.4%, 포도당 12%, 식물성프림 22.4%, 소금 1.6%, 찹옥수수알과전분 8%, 혼합과일분말 20%를 혼합하고 전체 내용물이 균일하게 섞여 완성하였다.

표 51. 빵잎첨가 선식분말의 관능평가

배합비	색상	향	맛	종합적 기호도
청즙	3.83±0.31 <sup>b</sup>	3.83±0.31	2.83±0.40 <sup>c</sup>	3.50±0.22 <sup>c</sup>
5	4.00±0.3 <sup>b</sup>	3.83±0.31	3.67±0.33 <sup>bc</sup>	3.83±0.31 <sup>bc</sup>
6	4.00±0.37 <sup>b</sup>	4.00±0.52	4.00±0.52 <sup>abc</sup>	4.00±0.26 <sup>bc</sup>
7	4.00±0.37 <sup>b</sup>	4.17±0.31	3.67±0.42 <sup>bc</sup>	4.17±0.17 <sup>bc</sup>
8	3.83±0.31 <sup>b</sup>	4.00±0.37	5.00±0.58 <sup>ab</sup>	4.33±0.33 <sup>b</sup>
9	5.83±0.31 <sup>a</sup>	4.50±0.43	5.33±0.33 <sup>a</sup>	5.50±0.22 <sup>a</sup>

## 2) 분말선식의 과립화

일반적으로 시중에서 판매되고 있는 과립차의 제조공정은 원료에 적당량의 추출용매를 가하여 추출 후 여과하여 가용성고형분 함량이 60~70. Brix 정도가 되도록 감압농축한다. 이 농축액에 포도당 등의 부형제를 85% 정도 가하고 잘 혼합한 다음 과립기에서 과립화한다. 이 때의 수분함량은 매우 중요하며 수분조건이 맞지 않으면 과립형성이 어렵고 수분함량이 과도할 경우에는 서로 달라붙어 제품의 질을 떨어뜨린다. 조립이란 입자간에 수분을 첨가하여 가교수분을 부착시키고 그 후 건조시키게 되면 수분이 감소하는데 따라 표면장력에 의한 부착력이 커지기 때문에 입자는 서로 밀어 붙여져서 접촉면적을 증가시키고 따라서 입자간의 거리가 접근되게 되어 분자간의

힘이 충분히 서로 작용할 만한 상태로까지 이끌어 가게 된다. 이와 같이 되면 완전히 건조되어 수분이 없어지게 된 상태에서도 입자상호간에 강한 응집체를 형성하게 되어 허물어지거나 하지 않는다. 식품공업에서 행하여지는 조립의 목적로서는 정량을 할 수 없는 것을 계수화할 수 있고 입도, 밀도 등의 차에 의한 분리현상을 막게 되며 성분의 균일성을 유지할 수 있으며 기벽에 부착되거나 덩어리의 생성을 막게 되며 외관이 개선되고 미분말 상태에 비하여 조립제품들은 용해되기 쉽고 발진의 방지, 외관의 개선 및 유동성이 양호하여 수송, 포장, 공급 등의 자동화, 연속화, 정량화가 용이한 점 등을 열거할 수 있다.

한편 앞서 제조한 GABA 축적 빵잎을 가미한 선식제품은 채소류 분말, 포도당 등의 혼합으로 일반 미숫가루제품과 비교할 때 냉수에서의 분산성과 용해성이 개선되었지만 최종제품의 외관, 유동성을 개선하고 포장 등의 연속성과 자동화를 용이하게 하고자 과립화하였다. 즉, 표 49의 배합비 중 9번 배합비로 빵잎분말에 양배추, 무청 등 채소류와 과일분말, 다시마가루, 포도당, 찹옥수수 알파전분 등 재료를 혼합하였다. 분말 100 g에 85% 알콜용액을 40 mL를 첨가하여 혼합, 반죽한 것을 20 mesh를 통과시켜 과립화시킨 다음 40℃ 열풍건조기에서 건조시킨 다음 다시 20mesh를 통과시켰다. 표 52는 색도 변화를 조사한 결과로서 색의 밝기를 나타내는 백색도 값은 분말이 57.50으로 과립화시킨 것의 42.76보다 높았다. 적색도와 황색도 값은 분말이 각각 -5.09, 14.39로 과립의 -3.83, 10.36보다 높은 값을 나타내었다.

표 52. GABA 축적 빵잎 첨가 선식분말의 과립화전후 색도 변화

처리구	L	a	b	△E
선식분말	57.50	-5.09	14.39	21.38
선식과립	42.76	-3.83	10.36	31.93

과립의 외형적 성상을 살펴보면(그림 44) 분말에 비해 색상에서는 푸른 녹색이 더욱 선명하게 나타났고 부피가 줄어들었으며 포장시 제품의 유동성이 크게 개선되었다. 일정량의 물을 첨가한 결과 분말은 약간의 덩어리가 있으나 수저로 휘저을 경우 분산되어 전체가 고른 현탁액을 나타내었고 과립화시킨 것은 물에 첨가할 경우 덩어리 형성은 없고 입자가 용기 밑바닥에 가라앉아 수저로 휘저을 경우 바로 분산되어 전체가 균일한 현탁액을 형성하였다.

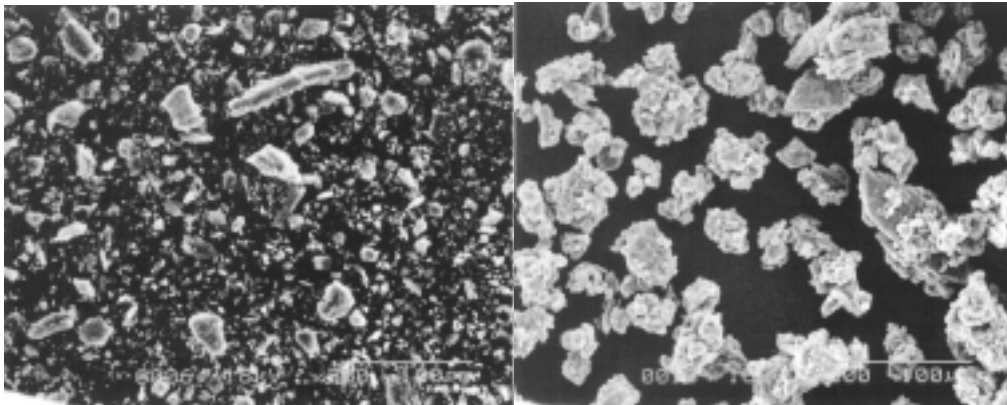


(분말)

(과립)

그림 44. 과립전후 선식제품의 성상

그림 45는 이들 과립화시킨 선식의 외형적 형상을 주사전자현미경으로 관찰한 결과이다. 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 분말선식은 사이즈가 다양한 개개의 입자가 구성된 반면 과립화시킨 것은 여러 개의 입자가 뭉쳐져 하나의 덩어리를 형성함을 관찰할 수 있었다.



분말

과립

그림 45. 분말, 과립의 표면구조

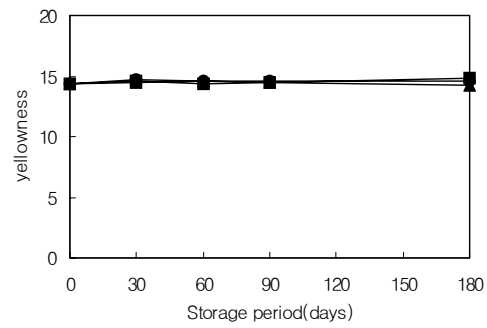
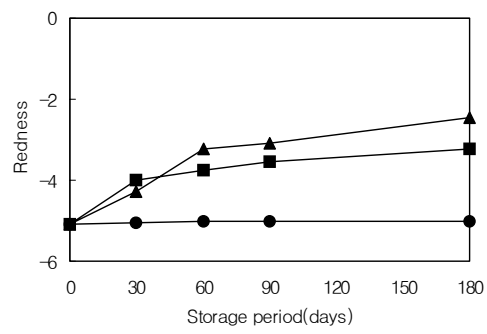
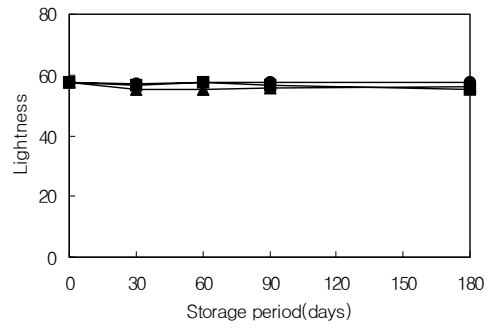


### 3) 저장 중 품질 특성 변화

GABA 축적 빵잎분말과 각종의 동결건조 채소류분말 등을 이용하여 제조한 전식분말 제품의 저장 중 품질 변화를 조사하였다. 전식분말 0.8 g씩을 일회용 알루미늄 은박지에 포장한 다음 밀봉하고 4, 25, 37℃에 각각 저장하면서 경시별로 시료를 채취하여 포장지를 개봉, 분말의 외형적 성상, 이취, 색상을 비교하였고 이들 분말을 일정량의 정제수에 용해시킨 다음 색상과 관능적 특성을 평가하였다.

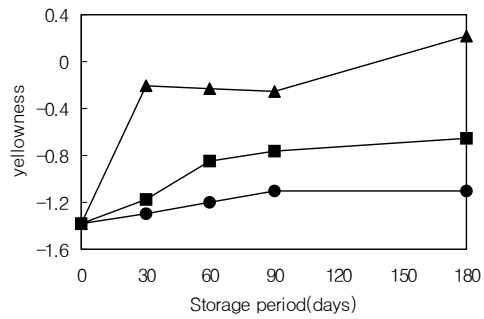
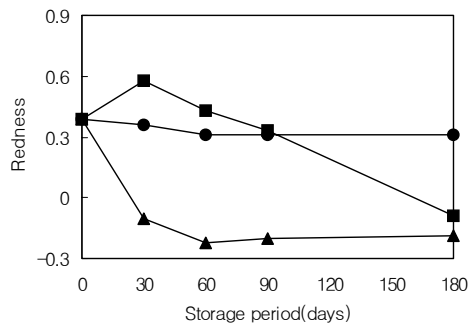
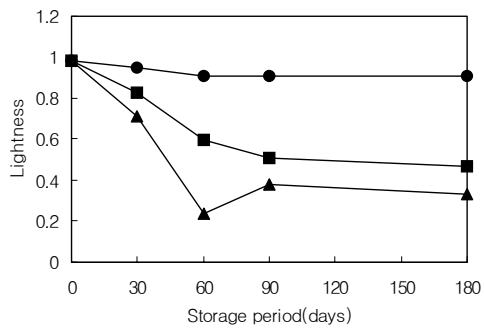
제품의 색상은 맛, 향, 영양성분과 함께 식품의 품질과 가치를 나타내는 중요한 특성 중의 하나로서 분말전식의 저장 중 표면색도는 관능적인 평가치에 영향을 줄 것으로 생각되며 각 저장온도별로 전식제품을 저장하면서 저장기간의 경과에 따른 표면색도의 변화를 측정된 결과는 그림 46, 47과 같다. 본 결과에는 나타내지 않았으나 먼저 4, 25℃에 저장한 제품의 경우 저장 180일까지 분말의 외형적 색상과 향미는 저장초기와 차이가 거의 없었으나 37℃ 저장구는 저장 3주까지는 초기와 차이가 없었으나 저장 6주경에는 분말의 외관상 녹색색상이 초기에 비해 열어졌고 향도 약해진 것으로 나타났다. 분말의 색도 변화를 측정된 결과 25℃ 저장 시료는 저장기간이 경과함에 따라 백색도, 황색도 값은 큰 차이가 없으나 적색도 값은 저장초기의 -5.09에서 약간씩 감소하여 저장 180일에는 -3.23을 나타내었다. 37℃ 저장 시료는 적색도의 변화가 25℃ 시료에 비해 더 큰 것으로 나타났다.

한편 저장기간별 분말을 일정량의 물에 현탁한 액의 경우 25℃ 저장구의 백색도 값은 초기 0.98에서 서서히 감소하여 저장 120일에 0.51, 적색도는 0.39에서 0.33, 황색도는 -1.38에서 -0.76으로 감소하였고 37℃ 저장구는 이러한 감소 변화가 더욱 빠르게 발생하였고 특히 적색도 값은 저장 1주일에 -0.10으로 변화하였다.



●—● 4°C    ■—■ 25°C    ▲—▲ 37°C

그림 46. 저장기간별 빵잎 선식분말의 색도 변화



●—● 4°C    ■—■ 25°C    ▲—▲ 37°C

그림 47. 저장기간별 빵잎 선식분말 현탁액의 색도 변화

마. 엑기스형 당절입물

1) 당액의 제조

기능성 당류가 첨가되는 엑기스형 빵잎 당절입물 제조를 위해 당액의 조성비와 혼합 비율을 설정하고자 먼저 설탕, 팔라티니트, 올리고당의 혼합비율 및 물 첨가량별을 달리하여 당절입용 당액을 제조하였다(표 53). 생 빵잎을 그대로 헹기처리한 다음 세절, 초핑한 것에 당액을 표 53의 비율로 혼합하여 10℃에서 1개월 숙성시켰다. 이들 당절입물의 착즙상태와 관능적 특성을 비교한 결과 빵잎과 설탕을 1:1의 비율로 혼합, 숙성시킨 것(배합비 ①)은 1개월 경과 후에도 설탕이 완전히 용해되지 않았고 착즙이 처리구 중 가장 어려워 당절입액의 수율이 극히 낮았다. 설탕25%에 팔라티니트와 정제수를 각각 25, 50%의 비율로 혼합한 처리구(배합비 ⑤)는 착즙은 가장 용이하였으나 당절입액의 최종당도가 44. Brix로 다른 것에 비해 낮았다. 설탕, 팔라티니트, 올리고당, 정제수의 비율을 각각 25%씩으로 동일하게 혼합한 것(배합비 ④)은 착즙상태가 양호하고 당절입액의 당도도 68. Brix로 높았으나 단맛이 강한 것으로 느껴졌다. 설탕 : 팔라티니트 : 정제수의 비율을 동일하게(33.3%) 첨가한 처리구(배합비 ③)는 착즙 후 당절입액의 색상이 다른 것에 비해 다소 희뿌연 색상을 띄었다. 팔라티니트를 첨가한 경우 다른 종류의 당 첨가구에 비해 당절입액의 감미가 덜 달게 느껴지면서 당절입액의 당도는 높게 유지되는 것을 알 수 있었다.

표 53. 당절입용 당액 조성비 및 이들을 이용한 당절입물의 배합비

조성물		①	②	③	④	⑤
당액 조성물 (%)	설탕	100	50	33.3	25	25
	팔라티니트	-	-	33.3	25	25
	올리고당	-	-	-	25	-
	정제수	-	50	33.3	25	50
당절입물 조성(%)						
빵잎		50	40	40	33.3	33.3
당액		50	60	60	66.7	66.7
당도(。Brix)		69	51	51	68	44

## 2) 당절임물의 제조

뿌잎만을 이용한 당절임물의 기능성, 기호도 증진을 위해 각종의 채소류, 과일 등의 배합비를 달리한 혼합조성물을 제조하였다(표 54). 즉, 신선초, 브로콜리, 양배추, 부추, 당귀잎, 파슬리, 셀러리, 미나리, 청경채, 케일의 비율을 10%로 동일하게 한 혼합물(배합비 A), 부추, 당귀잎, 파슬리의 첨가량을 각각 2, 0.7, 0.7%로 감소시키고 나머지 채소류를 13.6%로 혼합한 것(배합비 B), 부추, 당귀잎, 파슬리의 첨가량을 각각 1.2, 0.84, 0.84%로 하고 나머지 채소류를 8.16%로 조정하면서 사과와 배를 20%씩 첨가한 혼합물(배합비 C), 부추, 청경채를 완전히 제외시키고 나머지 채소류를 12%씩 혼합한 것에 썩, 다시마가루를 각각 2%씩 혼합한 것(배합비 D), 배합비 D에서 채소류의 첨가량을 각각 7.3%씩으로 감소시키고 0.8%의 썩, 다시마가루와 20%씩의 사과와 배를 혼합한 것으로 구분하였다.

표 54. 뿌잎 당절임용 채소, 과일의 배합비

원부재료	A	B	C	D	E
신선초	10	13.6	8.16	12	7.3
브로콜리	10	13.6	8.16	12	7.3
양배추	10	13.6	8.16	12	7.3
부추	10	2	1.2	-	-
당귀잎	10	0.7	0.84	12	7.3
파슬리	10	0.7	0.84	12	7.3
셀러리	10	13.6	8.16	12	7.3
미나리	10	13.6	8.16	12	7.3
청경채	10	13.6	8.16	-	-
케일	10	13.6	8.16	12	7.3
썩가루	-	-	-	2	0.8
다시마	-	-	-	2	0.8
사과	-	-	20	-	20
배	-	-	20	-	20

표 54의 채소류, 과일혼합물 배합비를 기준으로 하고 여기에 앞서 선정된 3번의 당액(설탕 : 팔라티니트 : 정제수 = 33.3 : 33.3 : 33.4%)을 이용, 빵잎, 채소, 과일의 혼합을 각기 달리하여 당절임물을 제조하였으며 그 중 몇가지의 배합비를 표 55에 나타내었다.

표 55. 빵잎, 채소, 과일 및 당액의 혼합비율과 당절임물의 당도 변화

혼합비(%)	A	B	C	D	E
협기처리빵잎	33.3	33.3	33.3	25	25
채소혼합물	33.3	33.3	20	25	15
과일혼합물	-	-	13.3	-	10
당액	33.4	33.4	33.4	50	50
당절임물의 당도(。 Bx)	33	31	35	48	47

앞서 제조한 당절임물을 10℃에서 1개월 숙성시킨 다음 착즙한 액의 관능적 특성을 비교한 결과 배합비 A-C은 시큼한 냄새와 함께 김치 익은 향이 강하였고 부추의 첨가농도가 높은 처리구가 이러한 현상이 심하였다. 배합비 C의 경우 다른 것에 비해 김치 익은 향이 약하였다. 배합비 D, E는 부추를 제거함에 따라 숙성 후 김치 익은 향은 감지되지 않았고 당귀향과 썩향이 발현되며 맛도 좋았으나 과일혼합물을 첨가구한 것이 향미가 약간 약하였다.

표 56. 빵잎, 채소, 과일 및 당액의 혼합비율을 달리한 당절임물의 관능평가

시료	색상	향	맛	종합적 기호도
A	5.0	3.2	3.8	3.6
B	5.8	4.0	4.1	4.0
C	5.5	5.1	4.5	4.6
D	6.0	5.9	5.8	5.8
E	6.1	5.6	5.3	5.3

### 3) 숙성 중 당절임물의 특성

당액과 채소, 과실 혼합비 실험 결과를 토대로 뽕잎 당절임물의 숙성 중 특성 변화를 조사하였다. 즉, 최종 당액의 당도를 감안하여 설탕, 팔라티노스, 정제수를 60:20:20(v/v)의 비율로 혼합한 것을 가열하여 완전히 용해시켜 당액(76. Brix)을 제조하였다. 채소, 과실 혼합비율은 앞의 채서, 과실 혼합 배합비 중 D, E배합비를 기준으로 하여 당절임물을 제조, 10℃에 숙성시키며 경시별 당절임물의 특성을 조사하였다(표 57). 이 때 배합비 1~3은 뽕잎과 당액, 배합비 4~6은 뽕잎, 채소 및 당액, 그리고 배합비 7~9는 뽕잎, 채소, 과실 및 당액의 혼합비를 각각 달리하였다.

표 57. 뽕잎 당절임물용 원부재료의 배합비

원부재료	1	2	3	4	5	6	7	8	9
뽕잎	50	40	33.3	25	22.2	16.7	25	22.2	16.6
채소혼합물	-	-	-	25	22.2	16.7	15	13.3	10
과실혼합물	-	-	-	-	-	-	10	8.9	6.7
당액	50	60	66.7	50	55.6	66.7	50	55.6	66.7

숙성기간별 당절임물의 착즙상태와 관능적 특성을 살펴본 결과 먼저 배합비 1~3은 착즙이 어려웠고 배합비 5, 6, 8, 9는 착즙이 용이하였다. 배합비 1~3의 당절임물은 전반적으로 꿈꿈한 냄새와 함께 뽕잎 냄새가 강하고 후미에 쓴맛이 발현되었으며 1번이 가장 강하였다. 채소가 혼합된 배합비 4~6의 경우 4번이 색상이 가장 검었고 뽕잎, 채소 첨가량이 가장 적은 6이 향이 가장 약하였다. 배합비 7~9의 경우 7번이 색상이 덜 검었고 8이 향이 가장 좋았으며 1~6번 처리구에 비하여 전반적으로 당절임물의 색상이 덜 검으며 뽕잎에 채소류만 첨가한 것에 비하여 향이 부드러운 것으로 나타났다.

그림 48, 49, 50은 숙성기간별 당절임액의 품질 특성을 비교한 결과이다. 착즙 수율의 경우 뽕잎에 당액(76. Brix)만을 첨가, 숙성시킨 것은 모두 40% 이하의 수율을 보였고 배합비 4~6번에서는 뽕잎, 채소, 당액을 16.7:16.7:66.7%의 비율로 혼합한 것이 130%의 수율을 보였고 과실이 첨가된 배합비가 동일한 양의 당액을 첨가한 다른 처리구에 비해 착즙 수율이 높았고 배합비 9는 약 150%의 수율을 나타내었다. 당절임액의 당도를 측정된 결과 전반적으로 첨가되는 당액의 양이 많을수록 당도가 높아 50%

당액 첨가시 48. Brix에서 66.7% 당액 첨가시 64. Brix로 상승하였으나 채소, 과실 혼합 유무에 따른 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 당절임액의 pH는 빵잎에 당액만을 첨가한 배합비 1~3은 숙성 20주까지 초기와 거의 유사한 7.8 정도를 유지한 반면 빵잎에 채소, 과실을 첨가한 처리구 중 당액을 66.7% 첨가한 배합비 6, 9번은 숙성 20주까지 초기와 비슷한 pH를 유지하였으나 50%의 당액을 첨가한 배합비 4, 7은 숙성 10주까지 당절임물의 pH가 지속적으로 감소한 후 평행을 유지하는 것으로 나타났으며 특히, 빵잎에 채소를 첨가한 배합비 4가 가장 낮은 pH를 보였다.

당절임물의 색도를 조사한 결과 밝기를 나타내는 백색도 값은 당액 첨가량이 높은 처리구가 높았고 빵잎, 채소, 과실을 혼합 첨가한 배합비 중 배합비 9번이 가장 높았다. 빵잎만을 첨가한 처리구(1-3)는 배합비에 따른 차이를 거의 보이지 않은 반면 빵잎과 채소류를 혼합한 처리구(4-6)는 당액 첨가량이 상승함에 따라 백색도 값이 높았으며 숙성 5주 이후부터는 백색도 값이 약간씩 상승하는 경향이였다. 그러나 빵잎, 채소, 과실을 혼합한 처리구(7-9)는 숙성 3주까지는 백색도 값이 약간 감소한 다음 숙성 20주까지 유사한 수치를 유지하였다. 적색도의 경우 빵잎, 채소, 과실에 당액을 66.7% 혼합한 배합비 9가 초기 숙성 1주에는 가장 높은 값을 보였고 숙성 3주일에는 약간 감소 후 다시 상승하였다. 그러나 빵잎에 채소를 혼합하고 동일한 양의 당액을 첨가한 배합비 6은 숙성 5주까지는 지속적으로 적색도 값이 상승하여 9개의 처리구 중 가장 높은 값을 보였다. 황색도에 있어서 배합비 9는 처리구 중 초기 값이 가장 높고 숙성 20주까지 비슷한 수치였으나 배합비 6은 숙성 5주까지 상승 후 다시 감소하여 숙성 20주에는 초기와 유사한 값을 보였다.



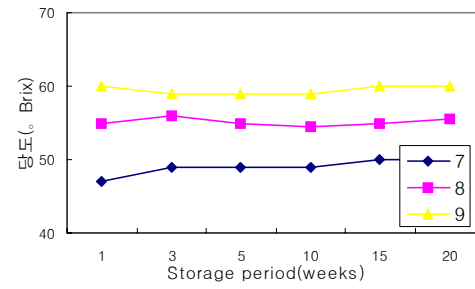
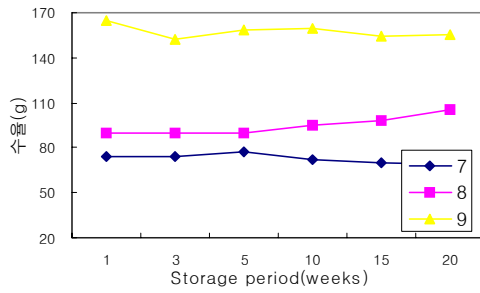
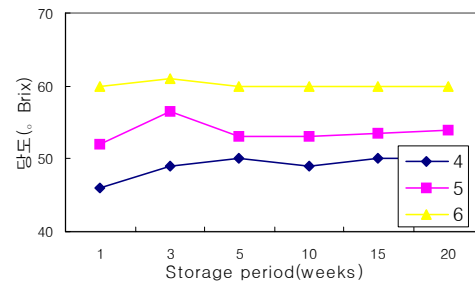
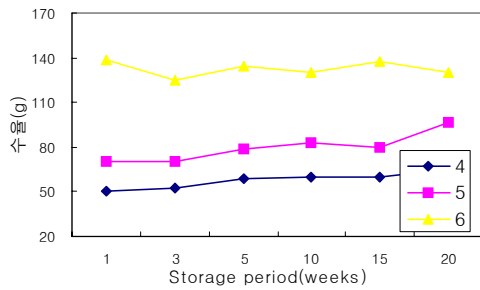
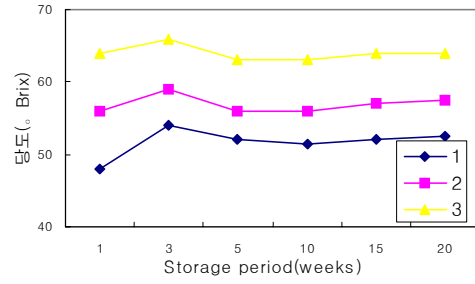
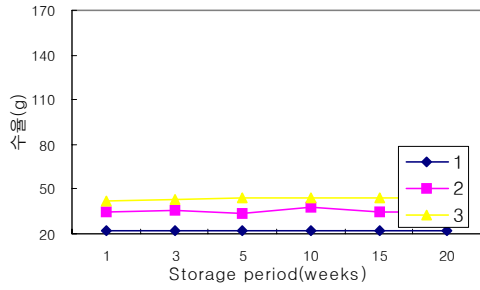


그림 48. 빵잎당절임물의 숙성 중 특성 변화

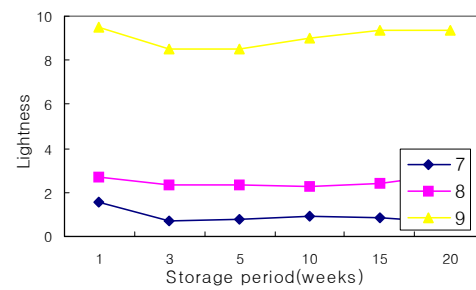
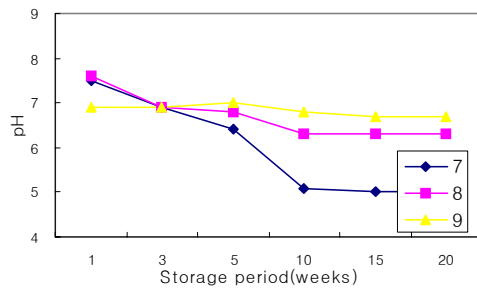
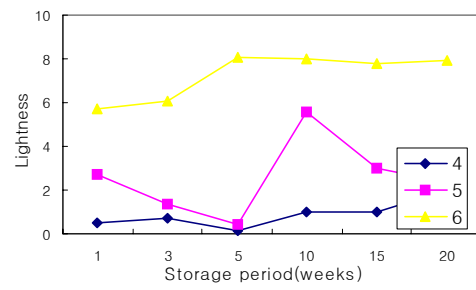
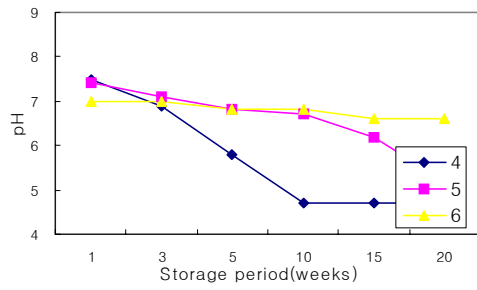
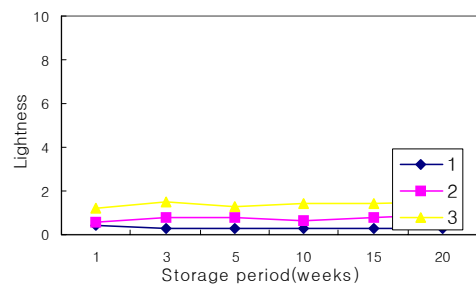
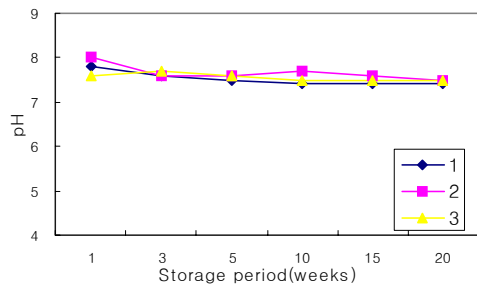


그림 49. 빵인당절임물의 숙성 중 특성 변화

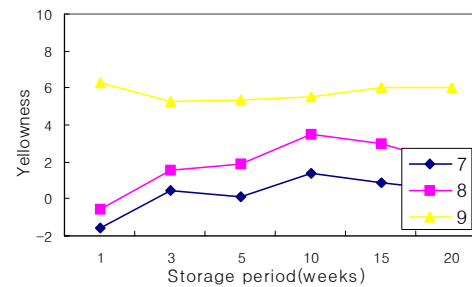
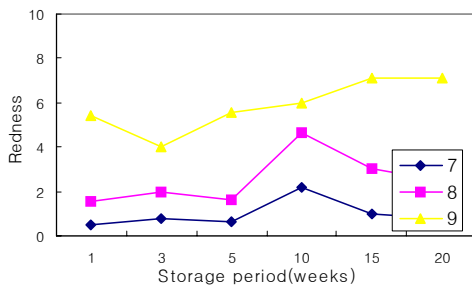
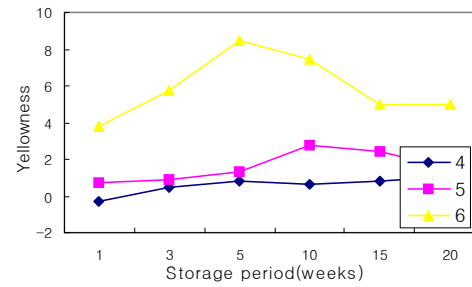
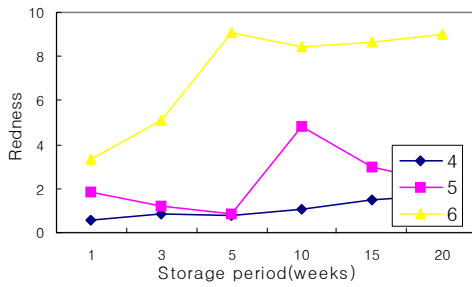
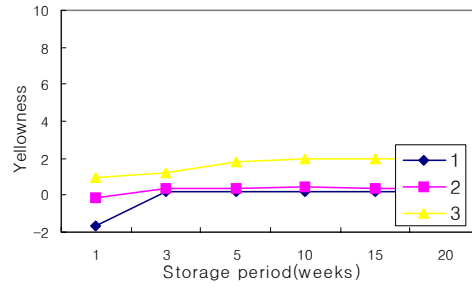
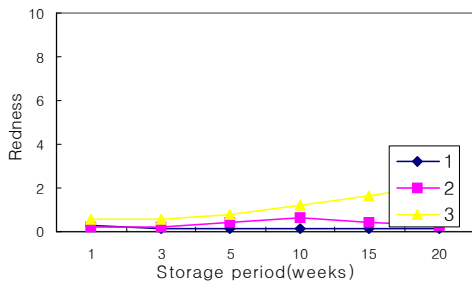


그림 50. 빵잎당질임물의 숙성 중 특성 변화

이들 처리구별 당절임액(10 g)을 정제수(50 mL)에 희석하여 예비 관능평가한 결과 배합비 5, 6, 8, 9번이 1차 우수한 것으로 선정되었다. 표 58은 이들 4가지 당절임물 바로 음용하기에 적합한 농도로 희석시킨 액의 색상, 향, 맛 등에 대한 관능적 특성을 평가한 결과이다. 뽕잎(16.7%)에 채소류(16.7%)를 혼합하고 66.7%의 당액을 첨가, 숙성시킨 배합비 6의 당절임물이 다른 처리구에 비해 기호적으로 가장 우수한 것으로 나타났다. 또한 뽕잎, 채소, 과실을 혼합한 당절임물은 과실에 의해 전반적인 향미가 다소 약하여 배합비 9가 향, 맛, 종합적 기호도에 있어서 보통이하의 낮은 점수를 보였다.

표 58. 1차 선정 당절임 희석액의 관능검사 결과

배합비	색상	향	맛	종합적기호도
5	6.6±0.51 <sup>a</sup>	5.8±0.20 <sup>b</sup>	6.2±0.37 <sup>a</sup>	6.2±0.20 <sup>b</sup>
6	7.0±0.32 <sup>a</sup>	7.2±0.20 <sup>a</sup>	7.0±0.32 <sup>a</sup>	7.4±0.24 <sup>a</sup>
8	6.0±0.32 <sup>a</sup>	6.0±0.32 <sup>b</sup>	5.2±0.37 <sup>b</sup>	5.4±0.24 <sup>c</sup>
9	6.2±0.37 <sup>a</sup>	4.8±0.37 <sup>c</sup>	3.6±0.25 <sup>c</sup>	4.4±0.24 <sup>d</sup>

이들 4가지 당절임물을 바로 음용하기에 적합한 농도로 희석시킨 액의 색도를 측정 한 결과는 표 59와 같다. 희석액의 경우에 있어서도 첨가된 당액의 비율이 많을수록 백색도 값이 높아 배합비 6이 33.41로 가장 높고 그 다음이 배합비 9가 27.59로 높았다. 적색도 값은 반대로 배합비 6이 5.68로 가장 낮았고 다른 처리구는 비슷하였으며 황색도 값은 백색도와 같은 경향이였다.

표 59. 당절임 희석액(10g/50mL)의 색도 변화

배합비	L	a	b	△E
5	16.83	6.84	10.12	85.05
6	33.41	5.68	20.53	69.92
8	19.49	6.93	12.47	81.77
9	27.59	6.23	17.38	74.73

이상의 혐기처리 뽕잎을 이용한 액기스형 당절임물의 제조 실험 결과를 요약하면 뽕잎은 생 원료 상태로 혐기처리 후 세절, 초핑한 것, 신선 채소혼합물은 신선초, 브로콜리, 양배추, 당귀잎, 파슬리, 셀러리, 케일을 각각 12%씩 그리고 썬가루, 다시마가루를 각각 2%의 농도로 혼합한 것, 당액(76. Brix)은 설탕, 팔라티노스, 정제수를 60, 20, 20%의 비율로 혼합 후 가열, 용해한 것을 사용하였다. 당절임을 위한 뽕잎, 채소혼합물, 당액을 16.7, 16.7, 66.7%(v/v)의 비율로 혼합한 다음 일정량씩 비닐포장하여 10℃에서 5주정도 숙성시킨 다음 압착하여 당절임물을 제조하였다.

#### 4) 당절임물의 물성 개선 및 살균

앞서 뽕잎, 채소 및 당액을 혼합, 숙성한 다음 착즙하여 제조한 당절임물은 기존의 액상형 차제품과 같이 일반적으로 당액을 물에 희석하여 음용하게 된다. 그러나 본 연구에서 제조한 뽕잎 가미 당절임물은 기존의 액상형 차 제품과는 달리 뽕잎에서 추출된 점질물로 인해 손가락 등으로 내용물을 취할 경우 끊어지지 않고 하나의 덩어리 형태로 떨어져나와 일정량씩 취하기가 어렵고 저장용기에서도 용기를 기울이게 되면 내용물이 끊기지 않고 전체가 한꺼번에 흘러내려 당절임물을 희석, 음용하고자 할 때 시료 채취가 어려운 문제점이 있었다. 따라서 뽕잎 가미 당절임물의 흐름성을 기존의 당액을 이용한 액상차와 유사하게 개선하고자 고속균질기로 물리적 처리하였다. 처리에 의해 뽕잎 당절임물의 흐름성은 개선되어 이란 액상차 제품과 같이 손가락 등으로 쉽게 시료를 채취할 수 있었고 용기에서의 흐름성도 개선되는 것으로 나타났다.

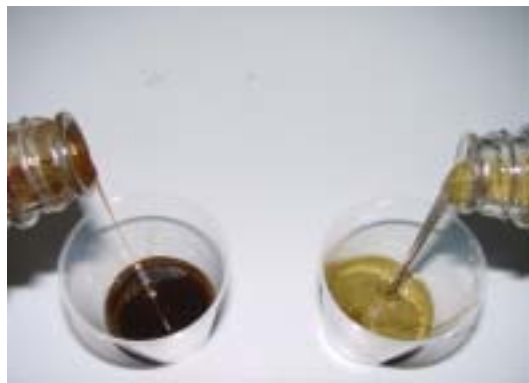


그림 51. 당절임물의 물성 개선 효과

한편 당절임물의 경우 최종당도가 60. Brix 정도의 당액이므로 이들을 실온에 그대

로 방치, 유통할 경우 액 내에 존재하는 미생물에 의해 변질 또는 발효가 발생하게 될 것이다. 따라서 이들 당절임물이 상품성을 지닌 제품으로 유통되기 위해서는 살균 공정이 필수적으로 추가되어야 하며 본 연구에서는 일반 액상차에서 적용하는 살균조건을 적용하였다. 즉, 앞서 물성 개선을 위해 물리적으로 처리한 당절임물을 85℃의 온수에서 20분간 저온살균하고 살균에 따른 당절임물의 색상 및 관능적 특성 변화를 비교하였다. 살균직후 당절임물의 색도 중 백색도, 적색도 값은 약간씩 상승한 반면 황색도 값은 2.11에서 0.93으로 감소하였다. 그러나 이들 살균처리한 당절임물을 희석하여 관능적 특성을 살펴본 결과 살균에 따른 향미에 있어서의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

표 60. 살균처리한 당절임물의 색도 변화

시료	L	a	b	△E
대조구	3.75	3.34	2.11	96.32
살균 처리	4.75	5.09	0.93	95.42

#### 5) 당절임물의 저장 중 품질 특성 변화

표 57의 배합비 6으로 제조한 당절임물을 고속균질기로 처리한 다음 일정량씩 갈색 병에 담아 밀봉한 다음 85℃에서 20분간 저온살균한 다음 4, 25, 37℃에 각각 저장하였다. 표 61은 이들 당절임물의 저장조건별 품질 변화를 조사한 결과이다.

당절임물의 당도, pH는 저장온도, 저장기간에 따른 차이가 없었으나 색도의 경우 저장기간이 경과함에 따라 약간씩 상승하였고 저장 온도가 높을수록 이러한 현상은 빨리 발생하였다. 당절임물의 저장 중 효모, 총균수의 변화를 측정하였다. 살균전 당절임물의 효모수는  $1.9 \times 10^6$  CFU/mL이었지만 이들을 병에 포장하고 밀봉하여 85℃에서 20분간 저온살균한 후에는  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL으로 효모수가 감소하였다. 이들 살균 당절임물을 각기 다른 온도에서 저장 한 결과 4, 25℃ 저장 시료는 저장기간의 경과와 함께 효모가 검출되지 않았으며 37℃ 저장 당절임물은 저장 1주에  $2.0 \times 10$  CFU/mL로 감소하였고 6주 후에는 검출되지 않았다. 총균수의 경우 살균전 당절임물은  $6.1 \times 10^5$  CFU/mL이었지만 85℃ 20분 저온살균 후에는  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL으로 감소하였다. 저장기간이 경과함에 따라 총균은  $8.3 \sim 5.1 \times 10^2$  CFU/mL의 범위로 감소하였으나 저장온도에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 당절임물의 경우 곰팡이는

검출되지 않았으며 저장기간별 당질입물을 물에 희석하여 음용한 결과 25℃ 저장구는 큰 차이가 없었으나 37℃ 저장구는 초기의 신선한 향미가 약간씩 약해지는 것으로 나타났다.

표 61. 빵잎 당질입물의 저장기간에 따른 특성 변화

저장온도 (℃)	저장기간 (일)	pH	당도 (° Bx)	효모 (cfu/mL)	곰팡이 (cfu/mL)	총균 (cfu/mL)
	살균 전	5.7	55.5	1.9x10 <sup>6</sup>	-	6.1x10 <sup>5</sup>
	살균 후	5.7	55.5	1.0x10 <sup>2</sup>	-	1.0x10 <sup>3</sup>
4	30	5.8	55.5	1.0x10	-	3.5x10 <sup>2</sup>
	60	5.7	55.8	-	-	6.0x10 <sup>2</sup>
	120	5.7	55.7	-	-	5.9x10 <sup>2</sup>
	180	5.8	56.0	-	-	5.0x10 <sup>2</sup>
25	30	5.6	56.5	1.0x10	-	8.3x10 <sup>2</sup>
	60	5.7	56.0	-	-	6.9x10 <sup>2</sup>
	120	5.7	56.0	-	-	6.9x10 <sup>2</sup>
	180	5.7	56.0	-	-	6.5x10 <sup>2</sup>
37	1주	5.7	55.5	2.0x10	-	6.1x10 <sup>2</sup>
	2주	5.5	56.5	1.0x10	-	6.3x10 <sup>2</sup>
	3주	5.4	56.0	-	-	5.1x10 <sup>2</sup>
	6주	5.6	56.0	-	-	6.0x10 <sup>2</sup>

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 목표 달성도

구분	목표 달성도	
	목표	달성도
최종평가	o 고농도 GABA 축적을 위한 효율적인 혐기처리공법의 개발	30
	o 고농도 GABA 축적 시료의 혈압강하효능 검증	20
	o 고농도 GABA 축적 시료의 퇴행성 신경질환보호효능 검증	20
	o 고농도 GABA 축적 시료를 활용한 대중성 있는 가공제품 개발	30

### 2. 기여도

#### o 해외학술지 논문 게재

- Lee P., Son D., Lee J., Kim Y.S., Kim H and Kim S.Y.(2003) Excessive production of nitric oxide induces the neuronal cell death in lipopolysaccharide-treated rat hippocampal slice culture. Neuroscience letters Sep. 25:349(1)33-6

#### o 석사학위 논문

- 손동욱 : Neuroprotective effect of Angelica dahurica on oxygen and glucose deprivation exposed rat organotypic hippocampal slice culture. 경희대(2003)



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 고농도 GABA 축적 기술 및 이를 활용한 제품의 제조방법은 특허출원 계획이다.
2. GABA 축적 뿌잎을 활용하여 본 연구에서 개발한 다양한 가공제품은 본 과제의 참여기업인 대양영농조합법인에 기술이전할 것이며 개발 제품이 상업화될 수 있도록 연구진이 직접 현장을 방문 기술지도할 계획이다.
3. 본 연구를 통하여 얻어진 연구결과를 국내외 전문 학술지에 발표, 투고할 계획이다. 발표, 투고할 학술지와 논문명은 다음과 같다.
  - o 학술지명 : 혐기처리공법에 의한 뿌잎의 고농도GABA 축적  
: 혐기처리 뿌잎의 혈관이완 작용  
: Neuroprotection of GABA-enriched mulberry leaves against cerebral ischemia
  - o 논문명 : 한국식품영양과학회지  
: J. Agricultural Food Chemistry
  - o 투고예정일 : 2004. 12

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 日本特開 2003-310171 桑の葉の機能成分を含有するチューイン・ガム及び製造方法
2. 日本特開 2002-330744 桑の葉の加工方法
3. 日本特開 2001-136953 桑茶エキス配合ビール及びその製造方法
4. 日本特開 2001-136939 桑の葉入りヤーコン茶の製法
5. 日本特開 2001-281583 桑の葉を含有する健康補助製劑及び健康補助飲食品
6. 日本特開平 09-206019 乾燥桑葉および桑葉粉末の製造方法
7. 日本特開平 08-298952 桑葉粉末を主成分とする
8. 日本特開平 05-153941 醱酵桑葉及びその製造方法
9. 日本特開平 05-076304 桑の葉加功食品の製造方法

## 제 7 장 참고문헌

1. Blindermann JM, Maitre M, Ossola L, Mandel P. 1978. Purification and some properties of L-glutamate decarboxylase from human brain. Eur J Biochem 86: 143~152.
2. Kono I, Himeno K. 2000. Change in  $\gamma$ -aminobutyric acid content during beni-koji making. Biosci Biotechnol Biochem 64: 617~619.
3. Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R. and Takahashi, T. 2000. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 47(8): 596~603.
4. Omor, M., Yano, T., Okamoto, J., Tsushida, T., Murai, T. and Higuchi, M. 1987. Effect of anaerobically treated tea(gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 61: 1449~1451.
5. Robert, E. and Frankel, S. 1951. Glutamic acid decarboxylase in brain. J. Bio. Chem. 188: 789~795.
6. Saikura, T., Okada, T., Murai, H., Ohmori, M., Mori, Y., Horio, T., Ito, M. and Onoda, A. 2001. The effect of defatting with organic solvent on accumulation of 4-aminobutyric acid(GABA) in the rice germ. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi. 48: 196~201.
7. Schales, O., Mims, V. and Schales, S. S. 1946. Glutamic acid decarboxylase of higher plants. Arch. Biochem. 10: 455~465.
8. Stanton, H.C. 1963. Mode of action of gamma aminobutyric acid on the cardiovascular system. Arch. Int. Phamacodyn. 143: 195~200.
9. 茅原. 2002. GABAの能明と新素材開発の可能性. Japan Food Science. 41(1): 39-43.
10. Rhyu M.R., Kim D.K., Kim H.Y. and Kim B.K. 2000. Nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta induced by aqueous extract of red rice fermented with *Monascus ruber*. J. Ethnopharm. 70(1):

29-34.

11. 류미라, 김은영. 2002. 홍국의 혈압강하효과와  $\gamma$ -aminobutyric acid, 균체량 및 색도의 영향. 한국식품과학회지. 34(4): 737-740.
12. 이완주, 김애정, 김선여. 2003. 뽕잎의 기능성물질 탐색 및 효과 구명. 한국식품과학회, 식품산업과 과학. 36(3): 2-14.
13. Streeter J.G. and Thompson, J.F. 1972. Anaerobic accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves. Plant Physiol. 49: 572-578
14. Yun S.J. and Lee W.C. 1995.  $\gamma$ -Aminobutyric acid in leaves and effects of an anaerobic condition on its content. RDA. J. Agri. Sci. 37: 207-213.
15. 유수경, 이순재. 2002. YK-209 뽕잎이 Streptozotocin 유발 당뇨쥐 간조직의 항산화계에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 31(6): 1065-1070.
16. 유수경, 김미지, 김진원, 이순재. 2002. YK-209 뽕잎이 Streptozotocin 유발 당뇨쥐 소장의 이당류분해효소 활성과 혈당강하에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 31(6): 1071-1077.
17. Naitoh K. 1968. Studies on the micro constituent in mulberry leaves. Part 2. Isolation of rutin and quercetin from mulberry leaves. Nippon Nogei Kagaku Kaishi. 42: 422-425.
18. Kim J.S., Kang S.S. and Lee M.W. 1995. Isolation of flavonoids from the leaves of *Aralia continentails*. Kor. J. Phamacogn. 26: 239-243.
19. Tsushida, T., Murai, T., Omori, M. and Okamoto, J. 1987. Production of a new type tea containing a high level of  $\gamma$ -aminobutylic acid. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 61: 817-822.
20. Horie, H., Sayai, Y. and Kohata, K. 1999. Flow injection analysis of  $\gamma$ -aminobutylic acid in GABA-enriched tea. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi. 46: 494-496.
21. Nakamura, T., Matsubayashi, T., Kamachi, K., Hasegawa, T. and Omori, M. 2000.  $\gamma$ -aminobutylic acid (GABA)-riched chlorella depresses the elevation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats(SHR). Nippon Nogeikagaku Kaishi. 74: 907-909.
22. Kinefuchi, M., Sekiya, M., Yamazaki, A. and Yamamoto, K. 1999. Accumulation of GABA in brown rice by high pressure treatment. Nippon Shokuhin Kagaku

- Kaishi. 46: 323-328.
23. 장지신, 이병순, 김영걸. 1992. 혐기처리 녹차의 처리조건에 따른  $\gamma$ -aminobutylic acid(GABA) 및 주요 성분의 변화. 한국식품과학회지. 24: 315-319.
  24. Yusuke, S., Kenichi, K., Yasuyoshi, O. and Atsuko, T. 1999. Repeating treatment of anaerobic and aerobic incubation increase the amount of  $\gamma$ -aminobutylic acid in tea shoots. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi. 46: 462-466.
  25. Mitsuaki, K. and Sumio, S. 1987.  $\gamma$ -Aminobutylic acid accumulation in bean sprouts treated with carbon dioxide. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi. 36: 916-919.
  26. Tojiro, T. and Toshinobu, M. 1987. Conversion of glutamic acid to  $\gamma$ -aminobutylic acid in tea leaves under anaerobic conditions. Agric. Biol. Chem. 51: 2865-2871.
  27. 오석홍, 서경원, 최동성, 한광수, 최원규. 2000. 배추의 생장 및 배추 중의  $\gamma$ -aminobutylic acid 함량에 미치는 키토산 비료의 시비 효과. J. Korean Soc. Chem. Biotechnol. 43: 34-38.
  28. 김선여, 류강선, 이완주, 구현옥, 이회선, 이강노. 1999. 혐기처리한 빵잎의 혈당강하 효과. 생약학회지. 30: 123-129.
  29. Omori, M., Kato, M., Tamura, T., Obanda, M. 1998. Production of CTC Gabaron black tea by modifying withering conditions. Tea. 19: 92-96.
  30. 최희돈, 박용곤, 석호문, 김성란, 김홍만. 2001. 특수처리방법을 이용한 현미의 기호성 및 기능성 증진. 한국식품개발연구원 보고서 E1107-0112.
  31. 박용곤, 김홍만, 강윤한, 박무현. 1995. 버섯 및 빵의 종합적 이용 가공제품 개발. 한국식품개발연구원 보고서 G1072-0548.
  32. 박용곤, 김홍만, 차환수, 강윤한. 1997. 빵잎을 이용한 차, 음료, 국수 개발. 한국식품개발연구원 보고서 I1261-0790.
  33. 김성훈, 김금수, 이진하, 정을권, 박영식, 박유정, 이현용. 1997. 강원도산 상업과누에의 혈당강하 활성물질의 특성. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 391-395.
  34. 김선여, 이완주, 김현복, 김애정, 정순경. 1998. 빵잎추출물이 콜레스테롤 투여 흰쥐의 혈청지질에 미치는 영향. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 1217-1222.
  35. Kilic E., Bähr M. and Hermann D.M. 2001. Effects of recombinants tissue

plasminogen activator after intraluminal thread occlusion in mice. *Stroke*. 32: 2641-2647.

36. Bederson J.B., Pitts L.H., Germano S.M., Nishimura M.C., Davis R.L. and Bartowski H.M. 1986. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke*. 17: 1304-1308.
37. Lin T.N., He Y.Y., Wu G., Khan M. and Hsu C.Y. 1993. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke*. 24: 117-112.