

최 종
연구보고서

**생명과학기술에 의한 후발효차의 제조공정
최적화 및 그 기능성 식품 개발**

Optimal Process of Microbial Fermented Tea
and Development of Functional Food Product

연구기관
순천대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생명과학기술에 의한 후발효차의 제조공정 최적화 및 그 기능성 식품 개발”에 관한 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 10일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 박 석 규

세부연구책임자 : 조 영 숙

연 구 원 : 한 서 영

연 구 원 : 박 경 옥

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 성 낙 주

연 구 원 : 남 상 해

연 구 원 : 손 미 예

연 구 원 : 이 준

요 약 문

I. 제목

생명과학기술을 이용한 후발효차의 제조공정 최적화 및 그 기능성 식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 국민 소득 향상에 따른 물질적 풍요로움이 삶의 멋과 질을 높이게 되었고, 더불어 식탁의 서구화로 인하여 외식사업의 확대로 점차 지방과 육류의 섭취가 늘어남에 따라 유발되는 비만을 비롯한 성인병이 발생하여 체내의 지방을 제거하는 효과가 뛰어난 후발효차의 수요가 확대될 것으로 예상된다.

볶음차는 차 맛이 우월하여 수출하고 있으며 국제경쟁력이 있으나 전량 수입에 의존하는 발효차는 국제경쟁력이 없는 실정이다. 차 산업의 발전 방안으로 수입개방에 대비하여 차 품종의 개량과 우리 입맛에 맞는 새로운 제품을 개발하여 생산량을 증대하고, 원가절감 및 폭 넓은 시장성을 확보하여 국제경쟁력을 키워야 할 필요성이 있다.

우리나라에서 제조되는 차의 대부분은 불발효차인 녹차이며, 반발효차의 경우에는, 사찰을 중심으로 극히 일부 제조되고 있으며, 상품화는 녹차에 비해 극히 미미한 실정이다. 국내산 재래종 녹차는 4월 하순에서 5월 하순 사이에 수확이 끝나게 되며, 수확시기가 늦을 경우 이용률이 낮은 실정이다.

후발효차는 대엽종을 이용하므로 수확시기에 크게 영향받지 않기 때문에 5월말 이후의 차를 이용할 수 있어 이용가치를 높일 수 있어 차의 안정된 생산과 유휴 노동력을 활용하므로 인한 차 재배 농가에 대한 수익을 극대화 시킬 수 있다. 또한 녹차와 달리 적절한 보존상태를 유지하면 고급차로서 품질을 증진시킬 수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 후발효차의 발효공정 개선 및 품질특성
 - ① 후발효차의 제조용 우수균주의 선정
 - ② 제조공정에서 온도와 습도조건의 최적화
 - ③ 발효시간에 따른 후발효차의 이화학적 특성
 - ④ 후발효차 추출물의 주요성분 함량
- 2) 후발효차를 이용한 콩발효식품의 개발
 - ① 후발효차를 이용한 “전통된장”의 개발
 - ② 후발효차와 버섯균사체를 이용한 “생청국장”의 개발
 - ③ 후발효차를 이용한 “콩요구르트”의 개발
- 3) 후발효차를 이용한 음료, 차류 시제품 개발 및 품질특성
 - ① 후발효차 추출액의 용매에 따른 품질특성
 - ② 첨가물에 의한 후발효차 추출물의 맛 개선
 - ③ 추출물을 이용한 액상, 차류제품의 제조공정 및 제품개발
 - ④ 후발효차 음료, 차류 및 소프트캡슐 제품 배합성분 및 비율선정
 - ⑤ 각 제품의 품질안정성 조사
- 4) 후발효차의 항균성과 항산화 효과
 - ① 후발효차의 추출물별 항균특성 및 최소 저해농도
 - ② 후발효차의 추출물별 항산화성분 및 항산화능 특성
- 5) 후발효차 분리물질의 항암 및 면역활성 효과
 - ① 후발효차 카테킨류와 그 산화물의 분리 및 구조결정
 - ② 후발효차 분리물질의 항암효과
 - ③ 후발효차 분리물질의 면역활성 효과
 - ④ Cu와 Cd에 의해 유도된 세포독성에 대한 보호효과

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 후발효차의 발효공정 개선 및 품질특성

Aspergillus wenti KOFRI 314 균주가 후발효차 원재료 차잎을 발효시키는 적합한 발효균으로 PPO를 포함한 탄수화물과 단백질 가수분해효소의 조추출물 활성이 높은 것으로 확인되었다. 최종 발효공정은 퇴적상에서 가습 20~25%, 온도 30~40℃, 평균 집중 1%로 첨가하여, 1차 뒤집기는 내부온도 40~45℃이하, 2차 뒤집기는 35~40℃이하, 3차 뒤집기는 30~35℃이하로 각 단계별 약 7-10일간 발효기간이 적절한 것으로 판단된다.

후발효차 발효공정에서 대체로 theaflavin과 thearubigen 및 미확인물질은 약간씩 증가하는 경향이었으며, 차잎에 존재하는 카테킨류는 감소하는 경향이였다. 초기발효까지는 대체로 증가하는 유리당 함량이 많아지는 경향이었는데, 그 이후부터는 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다. 아미노산은 대체로 증가하는 하였는데, 일부 유리아미노산은 유리당과 유사하게 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다. 1차 및 2차 발효 뒤집기까지는 대체로 효소활성이 증가하는 경향이었는데, 그 이후부터는 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다.

후발효차 추출물의 이화학적 특성은 총 페놀함량은 발효차 추출물보다 녹차 추출물이 더 높게 정량되었다. 발효차 추출물은 arginine > aspartic acid > glutamic acid > glycine순이었다. 발효차 추출물은 13여종이 검출되었으며 phospho serine 함량이 다른 아미노산보다 많이 검출되었다. 무기물은 발효차 추출물이 녹차 추출물보다 많이 검출되었고, 발효차 열수추출물에는 EGCG가 검출되지 않았다.

나. 후발효차를 이용한 전통된장의 개발

1) 후발효차의 첨가농도가 CLM형 후발효차 전통된장의 성분변화

아미노태질소, 총산, 환원당 및 산가 변화는 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 18도 염수의 된장이 가장 높은 값을 나타내었으며, 18도 후발효차 염수, 21도 염수, 21도 후발효차 염수의 순으로 나타났다.

내염성 효모 변화는 발효기간이 20일 때 가장 많은 효모가 있었고, 20일을 전후하여 감소하는 경향이었으며, 18도의 염수의 효모가 가장 많고, 21도의 염수, 18도의 후발효차, 21도의 후발효차의 순으로 나타났다. 색차계 색도 및 갈변도 변화는 L값은 발효기간이 증가함에 따라 감소하였고, 초기에는 21도의 염수의 값이 가장 높았으나, 발효후기에는 21도의 후발효차 염수의 값이 더 높았다. 지용성 색소보다 수용성 색소가 높게 나타났으며, 18도의 후발효차의 값이 가장 높게 나타났고, 21도의 후발효차 염수가 다음이었다.

관능검사 변화는 18도의 염수(저염)의 경우 이취가 강하고 색깔이 나쁘게 나타난 반면, 후발효차를 첨가한 된장의 경우 이취도 적고, 색깔도 좋으며, 고미와 단맛이 적절하게 조화되어 종합적인 기호도가 가장 높게 나타났다.

2) 후발효차의 첨가농도가 CML형의 후발효차 전통된장의 성분변화

아미노태질소, 총산도, 환원당 및 산가변화는 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 18도 염수의 된장이 21도 염수의 된장보다 높은 값을 나타내었으며, 후발효차의 농도로는 저염(18도)은 6%, 일반(21도)은 4%가 가장 높은 값을 나타내었다.

내염성 효모 변화는 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 후발효차의 농도가 적은 2%까지는 18도 염수의 된장이 21도 염수의 된장보다 높은 값을 나타내었는데, 후발효차의 농도가 증가함에 따라 18도 염수의 된장의 내염성 효모의 값이 21도 염수의 된장의 값보다 낮게 나타났다. 색차계 색도 변화는 L값은 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, a 값은 감소하였으며, 21도의 된장이 18도의 된장보다 높은 값을 나타

내었으며, 후발효차의 농도가 증가할수록 감소하는 경향이였다. 갈색도 변화는 지용성 색소의 값보다 수용성 색소의 값이 더 높았으며, 발효기간이 증가할수록 증가하였다. 후발효차의 농도가 증가할수록 증가하였으며, 21도의 된장보다 18도의 된장이 높은 값을 나타내었다. 관능검사 변화는 18도의 염수(저염)의 경우 이취가 강하고 색깔이 나쁘게 나타났으며, 후발효차를 농도별로 첨가한 된장의 경우 농도가 증가할수록 이취도 적고, 색깔도 좋으며, 고미와 단맛도 고루 가추어 종합적인 기호도가 가장 높게 나타났다.

3) 캡슐메주와 후발효차 추출물의 혼합비율

아미노태질소는 전통메주와 후발효차의 추출물의 혼합비율은 1:4, 1:2.5, 1:1 로 하였으며, 후발효차 전통된장의 발효공정 최적화 방법중 CLM 발효를 사용하였다. 아미노태 질소 함량은 발효시간이 증가함에 따라 증가하였으며, 염수의 양이 적으면 적을수록 증가하였다. 환원당은 발효시간이 증가함에 따라 증가하였으며, 염수의 양이 적으면 적을수록 증가하였다. 색도는 L값(명도)는 염수를 많이 넣은 된장이 높았고, a값은 반대로 낮은 경향을 나타내었다. 발효기간이 증가할수록 L값은 증가, a 값은 감소하였으며, b값은 유의적 차이가 없었다.

다. 후발효차와 버섯균사체를 이용한 생청국의 개발

후발효차 추출물의 첨가는 동일 농도에서 녹차 추출물의 첨가보다 청국장 발효특성(아미노태 질소, 점질물 형성, 총균수 증식)이 대체로 양호하였다. 생청국 제조에서는 후발효차 추출액은 1~2% 범위가 적당할 것으로 판단된다. 대체로 40℃ ~ 45℃ 범위의 발효온도가 우수하였으며, 점질물 형성은 45℃의 높은 온도에서는 오히려 상당히 낮아지는 변화를 나타내었다. 생청국의 제조에서 스타트 발효균 첨가량의 증가에 따라 발효지표 성분이 증진되었으며, 1.0 % 전후의 농도 범위로 첨가하는 것이 좋을 것 같다.

수침시간이 경과하면서 점진적으로 총 isoflavone의 함량은 감소하였으며, aglycone의 함량은 콩 자체의 β -glucosidase활성화에 의하여 증가하는 경향을 나타내

었다. 수침온도는 총 isoflavone의 함량 변화에서 크게 영향을 미치지 못하였다. BM 발효균에 의하여 제조된 청국장이 가장 우수하였으며, BL 발효균이 제조한 청국장이 가장 낮은 함량이었다.

2단 발효대두 추출물의 수소공여능 효과는 1,000 μ L/mL농도에서 17.8~26.9%로서 단독 발효대두보다 30~40% 높았으며, 그 중에 동충하초와 SMY-212를 배양한 것이 가장 높았다. Linoleic acid에 대한 항산화 효과는 단독 발효대두는 동충하초가 가장 높았으며, 2단계 배양한 발효대두는 팽이균사체와 SMY-212가 오히려 높게 나타났다.

인체 전립선암 세포주(DU145)와 주궁암 세포주(Hela)에 대한 성장억제 효과는 단독배양에서 모두 팽이버섯 균사체를 이용한 발효대두가 가장 높았으며, 2단계 배양에서 DU145에서는 팽이버섯과 아가리쿠스 균사체 배양물에 SMY-212를 이용한 발효대두가 높았고, HeLa에서는 팽이버섯, 동충하초, 새송이버섯 균사체의 추출물 순으로 높았다. 결론적으로 삶은 콩에 버섯 균사체의 단독배양보다는 버섯균사체와 SMY-212를 2단 배양한 발효대두 추출물이 암세포주 성장억제 효과가 높게 나타났다.

라. 후발효차를 이용한 콩요구르트 개발

후발효차 콩요구르트에서 *Str. thermophilus* > *Lac. acidophilus* > *Lac. casei* 가 우수하였으며, 두유 보다는 버섯균사체로 발효시킨 발효두유가 유산균 성장이나 산도 증가에 있어서 효과적이었다. methionine, 시유 및 탈지분류는 대조구에 비하여 유산균 생육촉진과 산도증가에 효과적이었으며, 시유보다는 탈지분유가 약간 생육촉진과 산도 증가에 효과적이었다. 곡류 당화액을 첨가한 후발효차 콩요구르트에서 곡류 당화액을 2%농도로 첨가하는 콩요구르트에서 유산균 증식과 산도 증가가 높았다. 곡류 당화액이 대조구에 비하여 유산균 생육이 촉진되었고, 곡류 당화액은 밀 > 쌀 > 보리순으로 효과적이었다.

후발효차 추출물 3%가 함유된 콩요구르트에서 곡류 첨가는 대조구에 비하여 점도를 증진시켰으며, 밀과 쌀 당화액은 증가되었다. 안정제를 각 농도별로 첨가한 콩요구

르트에서 농도가 증가할수록 유청 분리량은 감소되었으며, CMC 보다는 PGA가 다소 유청분이 억제에 효과적이었다. 단일 균종에서는 Lac. casei > Str. thermophilus > Lac. acidophilus 순으로 나타났다.

2종의 혼합 유산균(Str. thermophilus, Lac. casei)보다는 3종의 유산균 혼합(Str. thermophilus, Lac. casei, Lac. acidophilus)균종이 hardness, adhesiveness 및 gumminess에서 약간 높았으며, cohesiveness에서는 약간 낮은 경향이었다. 후발효차 추출물을 농도별로 첨가한 콩요구르트에서 후발효차 추출물 농도가 증가하므로써 약간씩 유산균 생육이 억제되었으며, 그에 따른 pH 및 적정산도가 동일한 패턴으로 증감하였다.

후발효차 추출물을 농도별로 첨가한 콩요구르트에서 색차계 색도 중에 명도(L)는 76 ~ 59범위로서 농도가 증가할수록 낮아지는 경향이었으며, 적색도(a)는 -2.3 ~ -1.1를 나타내었는데 후발효차의 고유색소로 인하여 점진적으로 증가하였다, 황색도(b)는 +8.3 ~ 9.8범위로 후발효차 첨가물 농도가 증가할수록 점진적으로 증가하였다. 그러나 유산균의 혼합 균종에 따른 콩요구르트의 관능평가는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 후발효차 추출물을 농도별로 첨가한 콩요구르트에서 4% 농도가 전체적인 기호도에서 우수하였다. 그러나 유산균의 혼합 균종에 따른 콩요구르트의 관능평가는 Str. thermophilus, Lac. casei, Lac. acidophilus의 3가지 균종 혼합발효가 약간 양호하였으나 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

마. 후발효차 음료, 다류제품의 개발 및 품질특성

후발효차의 물추출 과정에서는 7시간 내외로 추출하는 것이 적합하였으며, 3차 고품분은 전체 고품분 함량에 비하여 그 함량에서 미미하여 2차로 추출만으로도 수율면에서는 적합하였다. 후발효차 물추출물의 색차계 색도는 L(명도)는 경시적으로 약간 차이가 나타났으나, a(적색도)와 b(황색도)는 추출시간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었으며, 적색도가 그 변화 폭은 약간 크게 증가하였다.

최종 음료제조에서는 이미와 이상취의 억압을 위하여 식품첨가물의 보강에 의한 조미공정이 있으므로 5~7시간의 조건에서 추출이 적합할 것으로 생각된다. 당류의 농도가 상승함에 따라 신맛, 쓴맛, 단맛이 종합적인 관능적 면에서 품질이 개선되었는데, 전체적인 기호면에서는 10% 농도가 가장 양호하게 나타났다. 과당이 정백당보다 다소 맛을 개선시킬 수 있었다. 정백당 : 과당을 비슷한 농도로 첨가하면 약간의 관능지수가 상승되는 효과가 있었다. 액상제품을 개발할 때에 스위트메이트 소재를 소량 첨가하면 품질을 향상시키는데 도움을 줄 것 같다. 향 종류에 따라 큰 차이는 나타나지 않았고, 대체로 M.S 1998-0-68, M.S, SH-1030, M.S SF-474A, M.S 1998-0-68 순으로 효과적이었다.

바. 후발효차의 향균 및 항산화 효과

대체로 녹차가 후발효차 보다 훨씬 강하게 나타났으며, 햇 차는 1년간 실온(은박 포장, 15℃)상태에서 저장하므로써 그 항균활성이 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. *Bacillus* 속 세균보다는 식중독과 관련된 세균들에 더 항균활성이 높게 나타났으며, 또한 에탄올 추출물 > 뜨거운 물추출물 > 에틸아세테이트 추출물의 순서였다.

대부분의 시험균주에 대한 최소 저해농도는 장기간 저장되지 않은 녹차와 후발효차에 대하여 각각 20~40 μ l/paper disk와 60~80 μ l/paper disk로 나타났다. 항균활성은 추출물의 농도에 의존적인 상관관계를 나타내었다.

전자공여능은 모든 추출물에서 농도가 증가할수록 비례적으로 그 활성이 증가하였는데, 특히 녹차의 ethyl acetate 추출물과 1년 저장한 후발효의 ethanol 추출물에서는 각각 93.3%, 80.9%였다. SOD 유사활성에서는 ethanol 추출물이 다른 용매 추출물보다 효과적이었다. Hydroxy radical 소거작용은 매우 높게 나타났으며, carotenoid-linoleate system에서는 L-ascorbic acid와 비슷한 경향을 보였으며, 후발효차 추출물보다 녹차추출물에서 효과적이었다. 금속화합물 형성에 대한 환원력의

효과는 L-ascorbic acid (3:1)보다 낮았으며, 지용성 항산화력을 갖는 ethyl acetate 추출물이 다른 용매 추출물보다 높은 항산화력을 나타내었다.

사. 후발효차의 항암 및 면역활성 효과

후발효차의 각 분획물의 물질구조를 조사한 결과는 lutein, FGT-1 ; (+)-Catechin (C), FGT-2 ; (-)-Epigallocatechin (EGCG), FGT-3; (-)-Epigallocatechin galate (EGCG)로 구조 동정되었다. 그리고 ethylacetate 분획은 theaflavins와 미산화 중합되지 못한 catechins 즉 (-)epicatechin gallate와 (-)epigallocatechin gallate를 일부 함유하고 있으며, n-butanol 분획은 thearubigin을 함유되어 있었다.

Hexane 분획물은 HT-29 대장암 세포에 대해서 첨가농도 200 μ g/assay에서 Fr.1.4와 Fr.1.5에서 81.1%와 58.8%의 저해 효과를 관찰하였고, HeLa 자궁암 세포에 대한 첨가농도 200 μ g/assay에서 Fr.1.4와 Fr.1.5에서 78.9%와 21.7%의 저해 효과가 나타났다. Chloroform분획물은 첨가농도 200 μ g/assay의 Fr.2.4에서 HT-29 대장암 세포에 대해서는 96.3%와 HeLa 자궁암 세포에 대해서는 73.3%의 저해 효과가 나타났다.

녹차와 후발효차에서 분리되는 catechin, EGC 그리고 EGCG는 4 종류의 암세포에 대하여 농도 의존적인 저해 효과를 나타내었으며, EGCG와 EGCG는 다른 물질에 비해서 조금 더 좋은 효과를 가지는 것으로 나타났다. 후발효차에서만 분리되는 thearubigins와 theaflavins는 50% 정도의 저해 효과를 나타내었다. 위의 결과들은 후발효차의 섭취와 암 예방과의 관계를 나타내주고 있으며, 특히 녹차에는 분리되지 않는 물질인 thearubigins와 theaflavins은 실험한 4종류의 모든 암세포에 대한 저해 효과를 나타내었으므로 녹차보다는 후발효차의 생리활성 효과는 더욱 커질 것으로 예상된다.

Cu 5와 8 mM에서 녹차, 발효차 그리고 EGCG는 아스피린과 비타민 E 보다는 높은 저해 효과를 보였으며, Cd 50과 100 uM에서는 녹차와 발효차는 500 μ g/assay 첨가군에서 다른 물질에 비하여 높게 측정되었고 EGCG는 모든 농도에서 저해 효과가 측

정되었다. 따라서 녹차, 후발효차 그리고 EGCG는 기존의 항염증 치료제와 같은 효과가 측정되었다.

무처리 대조군에 비하여 6가지 물질을 첨가한 실험군에서는 농도 의존적으로 대식세포의 일산화질소 생산을 유도하였다. 즉 발효차에서 분리한 물질들은 대식세포를 활성화시켜서 일산화질소 생산을 유도하는 것을 알 수 있었다. 발효차에서 분리한 6가지 물질들은 대식세포를 활성화 시켜 다양한 사이토카인을 분비하여 항종양 및 면역 활성을 유도하는 것을 확인하였다.

2. 활용에 대한 건의

본 과제에서 후발효차 기능성에 대한 연구는 후발효차 및 개발 대상 제품에 대한 기능성 탐색 정도에 불과하였으므로, 이 결과를 근거로 하여 후발효차에 대한 더욱 진보적인 기능성 연구가 필요할 것으로 생각된다.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Domestic and International Trends	17
Chapter 3. Research Contents and Results	19
1. Development of manufacturing process in microbial fermented tea	19
2. Development of traditional doenjang using microbial fermented tea	38
3. Development of chungkugjang using microbial fermented tea	56
4. Development of soy yoghurt using microbial fermented tea	82
5. Development of drink, capsule product using microbial fermented tea ..	92
6. Quality assessment of drink and soft capsule product	108
7. Antibacterial activities of microbial fermented tea	116
8. Antioxidant activities of microbial fermented tea	123
9. Screening of bioactive materials of microbial fermented tea	136
10. Anticancer activities of microbial fermented tea	167
11. Immunostimulatory functions of microbial fermented tea	186
Chapter 4. Degrees of Achieving the Research Goals and Contribution to the Related Fields	191
Chapter 5. Plans for the Utilization of Results	192
Chapter 6. Scientific and Technological Informations Collected during the Study	193
Chapter 7. References	194

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	19
제 1 절	후발효차의 발효공정 개선 및 품질특성	19
1.	재료 및 방법	19
2.	결과 및 고찰	22
제 2 절	후발효차를 이용한 “전통된장”의 개발	38
1.	재료 및 방법	38
2.	결과 및 고찰	40
제 3 절	후발효차와 버섯균사체를 이용한 “생청국장”의 개발	56
1.	재료 및 방법	56
2.	결과 및 고찰	60
제 4 절	후발효차를 이용한 “콩요구르트”의 개발	82
1.	재료 및 방법	82
2.	결과 및 고찰	83
제 5 절	후발효차 추출물과 발효원액을 이용한 액상, 고상제품 개발	92
1.	재료 및 방법	92
2.	결과 및 고찰	94
제 6 절	후발효차 음료, 다류 시제품의 개발 및 품질특성 조사	108
1.	재료 및 방법	108
2.	결과 및 고찰	109
제 7 절	후발효차의 항균효과	116
1.	재료 및 방법	116
2.	결과 및 고찰	117

제 8 절	후발효차의 향산화 효과	123
1.	재료 및 방법	123
2.	결과 및 고찰	125
제 9 절	후발효차로 부터 물질분리 및 동정	136
1.	재료 및 방법	136
2.	결과 및 고찰	136
제 10 절	후발효차의 항암효과	167
1.	재료 및 방법	167
2.	결과 및 고찰	167
제 11 절	후발효차의 면역활성 효과	186
1.	재료 및 방법	186
2.	결과 및 고찰	187
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	191
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	192
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	193
제 7 장	참고문헌	194

제 1 장 연구개발과제의 개요

■ 차나무의 분류 및 특징

차나무(*Camellia sinensis* L.)는 산차과(*Theaceae*), 동백속(*Camellia*)에 속하며, 열대 지방에서부터 온대지방에 이르기까지 광범위하게 분포되어 있는 다년생 상록식물이다. 주산지인 중국을 비롯한 아시아와 서남아시아, 남아메리카, 옛 소련 등 30 개국 이상에서 재배되고 있다.

차는 다당류, flavonoids, 비타민B 복합체, 비타민C, 비타민E, polyphenols, catechin, Epigallocatechin gallate(EGCg) 같은 다양한 생리활성물질을 포함하고 있다. 가장 많이 함유되어 있는 성분이 catechin으로 차잎 중에 10~18%정도 함유되어 있다. 녹차에 포함된 catechin화합물은 강력한 항산화 및 항암 효과 이외에 면역체계 강화, 항혈전 효과, 피부암 예방, 심장병 및 콜레스테롤 예방 등의 효과를 가지고 있다.

최근 차에 대한 약리적 기능성 효능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 녹차에 대한 식품학적인 성분분석은 물론 생리활성은 항암 과 항산화방지에 대한 연구, 피부 및 뇌신경 보호 효과, 항균 및 항돌연변이 효과 등이 보고되고 있지만 그 성분에 대한 연구는 아직 대단히 미흡한 상태이다.

■ 후발효차의 특징

후발효차는 차가 완전히 건조되기 전에 퇴적하여 곰팡이가 번식하도록 함으로써 곰팡이에 의해 자연히 후발효가 일어나도록 만든 차이다. 처음 마실때는 곰팡이 냄새로 인해 약간 역겨움을 느끼기도 하지만 몇 번 마시다 보면 독특한 풍미와 부드러운 차맛을 느낄 수 있다.

중국에서는 잎차류보다 차를 압착하여 덩어리로 만든 고풍차가 주로 생산되며 저장기간이 오래될수록 고급차로 간주되고 있다. 생리적 효과로는 기름기를 제거하고 장을 이롭게 씻어 내고, 술을 깨게하며, 소화를 돕고, 진액을 생기게 하며, 목의 통증을 다스린다. 또 생강탕과 같이 쓰면 간기를 치료하고 피부의 출혈을 멈추게 한다. 체내의 기름기를 제거 효과도 강하여 기름진 음식과 잘 어울린다.

최근 발효차에 대한 연구동향은 반발효차의 향기성분에 관한 연구만 있을 뿐 생물공학기술을 이용한 후발효차에 대한 연구는 아직 없는 실정이다.

■ 후발효차 개발의 필요성

최근 국민 소득 향상에 따른 물질적 풍요로움이 삶의 멋과 질을 높이게 되었고, 더불어 식탁의 서구화로 인하여 외식사업의 확대로 점차 지방과 육류의 섭취가 늘어남에 따라 유발되는 비만을 비롯한 성인병이 발생하여 체내의 지방을 제거하는 효과가 뛰어난 후발효차의 수요가 확대될 것으로 예상된다.

볶음차는 차 맛이 우월하여 수출하고 있으며 국제경쟁력이 있으나 전량 수입에 의존하는 발효차는 국제경쟁력이 없는 실정이다. 차 산업의 발전 방안으로 수입개방에 대비하여 차 품종의 개량과 우리 입맛에 맞는 새로운 제품을 개발하여 생산량을 증대하고, 원가절감 및 폭 넓은 시장성을 확보하여 국제경쟁력을 키워야 할 필요성이 있다.

우리나라에서 제조되는 차의 대부분은 불발효차인 녹차이며, 반발효차의 경우에는, 사찰을 중심으로 극히 일부 제조되고 있으며, 상품화는 녹차에 비해 극히 미미한 실정이다. 국내산 재래종 녹차는 4월 하순에서 5월 하순 사이에 수확이 끝나게 되며, 수확시기가 늦을 경우 이용률이 낮은 실정이다.

후발효차는 수확시기에 크게 영향받지 않기 때문에 5월말 이후의 차를 이용할 수 있어 이용가치를 높일 수 있어 차의 안정된 생산으로 인한 차 재배 농가에 대한 수익을 극대화 시킬 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 우리나라 기술개발 현황 및 개발수준

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

2. 외국의 기술개발 현황 및 개발수준

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

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 후발효차의 발효공정 개선 및 품질특성

1. 재료 및 방법

가. 실험재료

본 실험에 사용한 녹차와 후발효차는 본 연구의 참여기업인 <영봉다원>에서 제공을 받아서 실험재료로 사용하였다.

나. 후발효차의 표준 제조공정

후발효차의 제조공정은 생 차엽을 살청(130~150℃, 5~10분)처리하고 유념(20~30분)과정을 거친 후 1일간 일광 건조시킨 차잎을 전체 3단계로 구분되어 있는 후발효 공정 통하여 제조과정의 최적화를 모색하였다. 즉, **1단계**(건조 차잎 20~30% 수분공급시킨 차잎을 나무상자 퇴적→ 1차 뒤집기), **2단계**(1차 뒤집기→ 2차 뒤집기), **3단계**(2차 뒤집기~3차 뒤집기)로 나누어 그 발효특성을 파악하였다.

다. 실험방법

1) 후발효차의 스타트 배양을 위한 우수균주 선정

후발효 공정단계에서 녹차 잎을 발효시킬 수 있는 성장속도가 빠르고 효소생성이 강한 곰팡이를 선정하기 위하여 한국전통발효식품연구소에 보관중인 57가지 균종에 비교적 효소생성력이 우수한 11가지 균종에 대하여 PDA 배지에서 곰팡이를 배양하여 포자를 Tween 80 포자현탁액을 만들어 살균한 전처리 녹차 잎에 1% 정도로 골고루 분무 접종하여 30℃에서 배양한 후, 녹차 잎 반고체배지에서 성장속도와 효소생성이 우수한 균종을 선정하였다.

2) 카테킨 및 그 산화물 분석

시료 0.05g을 정량하여 각각 시험관에 넣고 1분간 sonication시킨 증류수를 30ml 가하여 혼합시킨 다음 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 증류수를 가하여 50ml로 만들었다. 그리고 Sep-pak C18 cartridge에 통과시켜 HPLC로 분석하였다. 분석조건은 Agilent ; column, C₁₈ (4.6 x 250 mm) ; solvent, 25% THF / 1% phosphoric acid ; flow rate, 1.0 ml/min ; detector, UV 210nm, injection volume 10 μ l 로 하였다.

3) 유리당 분석

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

4) 유리아미노산 분석

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

5) 효소활성 분석

가) 조효소액 조제

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

나) α -Amylase 활성도

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

다) Glucoamylase 활성도

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

라) Protease 활성도

기질액은 milk casein 1.8 g을 sodium phosphate buffer(pH 7.2) 300 ml에 녹여 0.6% casein용액으로 조제하였다. 효소활성 측정은 기질용액 1 ml와 증류수 1 ml를 시험관에 넣고 항온수조에서 전처리한 후, 조효소액 1 ml를 가하여 35°C, 30분간 반응시킨 다음, 0.4 M trichloro acetic acid(TCA) 3 ml를 가하고 35°C에서 30분간 방치하여 반응을 중지시켰다. 반응중지액을 원심분리하여 침전물을 제거한 다음, 상정액 2 ml에 0.5M Na₂CO₃ 5 ml와 1/3 Folin phenol 시약 1 ml를 가하여 35°C 항온수조에서

30분간 발색시킨 후 실온으로 냉각시킨 다음, UV/Vis spectrophotometer로서 660 nm에서 optical density(O.D.)를 측정하여 tyrosine($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 양으로 환산하여 protease 활성을 나타내었다. Protease의 1 unit는 조효소액 1 ml가 1분간에 1 μg 의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

마) Pectinase

기질로 1% Pectic acid의 수용액 4 ml와 조효소액 1 ml를 반응혼합액으로 하여 15분간 작용시킨 후 1M- Na_2CO_3 1 ml를 가하여 알칼리성으로 하고, 0.1N-KI 5 ml를 가하여 잘 진탕한 다음, 20분간 방치시킨 후 2N- H_2SO_4 2 ml를 넣고 N/40 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 로 적정하여 galacturonic acid로 환산하였다.

바) PPO (polyphenol oxidase)

10 mM potassium phosphate 완충액 (pH 6.0)에 L-DOPA를 10 mM 되도록 용해시킨 기질용액 20 μl 에 효소용액 100 μl 를 가하였다. 효소 1 unit는 25 $^\circ\text{C}$, 490 nm에서 1분당 0.001을 흡광도 변화를 나타내는 양을 정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 후발효차의 발효공정 개선

1) 후발효차 제조를 위한 우수 발효균의 선정

후발효차는 대엽종의 차잎을 호기성 미생물이 분비하는 효소에 의하여 발효되는 “미생물 발효차”로 알려져 있다. 따라서 맛 성분에 관련되는 가수분해효소인 탄수화물 분해효소(amylase, pectinase, protease) 및 폴리페놀 산화효소인 polyphenoloxidase 활성을 조사하여 우수 공시균주를 분리한 결과(**Table 3.1.1**), *Aspergillus wenti* KOFRI 314 균주가 후발효차 원재료 차잎을 발효시키는 적합한 발효균으로 PPO를 포함한 탄수화물과 단백질 가수분해효소의 조추출물 활성이 높은 것으로 확인되었다.

Table 3.1.1 Enzyme activity of solid culture of some fungi as starter for preparing of microbial fermented tea (U / g solid)

Molds	α -Amylase	Gluco- amylase	Protease	Pectinase	PPO
A. niger SFN 371	5.34	2.87	7.56	6.56	3.21
A. niger KOFRI 251	6.40	3.12	7.32	6.71	2.80
A. wenti KOFRI 314	5.71	2.67	10.56	8.43	4.14
A. awamori KOFRI 059	4.62	2.16	6.32	-	-
A. oryzae KOFRI 142	6.31	0.34	8.32	-	-
A. tamari KOFRI 032	7.45	2.87	5.34	-	-
R. oligosporus KOFRI 011	3.38	2.12	4.61	-	-
R. javanicus KOFRI 325	2.58	1.80	2.05	-	-
R. japonicus KOFRI 327	3.11	1.72	2.69	-	-
R. oryzae KOFRI 387	4.23	2.01	3.13	-	-
M. rouxii KOFRI 034	3.08	1.06	1.85	-	-

2) 후발효차의 발효공정중 온도 조건의 최적화

생 차엽을 살청(130~150℃, 5~10분)처리하고 유념(20~30분)과정을 거친 후 1일간 일광 건조시킨 차잎을 전체 3단계로 구분되어 있는 후발효공정 통하여 제조과정의 최적화를 모색하였다. 즉, **1단계**(건조 차잎 20~30% 수분공급시킨 차잎을 나무상자 퇴적→ 1차 뒤집기), **2단계**(1차 뒤집기→ 2차 뒤집기), **3단계**(2차 뒤집기~3차 뒤집기)로 나누어 그 발효특성을 조사한 결과는 “**다. 후발효차의 최종 발효 공정**”에 나타내었다.

3) 후발효차의 발효공정중 습도 조건의 최적화

후발효공정은 호기성 곰팡이나 호기성 세균이 증식하는 환경조건으로 대기중의 상대습도가 매우 중요하다. 특히 자연발효 형식을 따르는 전통적 발효공정은 발효 용기의 상하층의 발효 불균일로 폐기하는 불량 중간제품이 많이 발생하여 품질균일화 문제 및 곰팡이 독소에 의한 위생적 안전성 문제와 제품가격의 상승 요인이 되고 있다. 후발효차의 1 단계 발효에서 중요한 요인은 온도 다음으로 일정한 습도유지가 매우 중요하다. 특히 자연발효 형식을 따르는 후발효차의 조건을 고려하여 밀폐성 발효 / 항온항습실에서 RH 60%, RH 70%, RH 80%로 인위적으로 조절하여 후발효차의 발효특성을 조사한 결과는 “**다. 후발효차의 최종 발효공정**”에 나타내었다.

나. 발효시간에 따른 후발효차의 이화학적 특성

전통적으로 실시되어지는 후발효 표준공정에서 각 단계별 시료를 채취하여 식품학적 특성을 조사하였다. 즉, 퇴적에 의한 반고체 배양을 시작하는 시점, 1차 뒤집기 후, 2차 뒤집기 후, 3차 뒤집기 후, 건조 전 단계로 나누어서 분석하였다.

1) 공정 단계별로 후발효차의 카테킨류 및 그 산화물 조성

후발효차는 다른 녹차 혹은 홍차와 같은 이용되는 차잎의 종류나 채취시기가 다르고, 특히 차잎의 효소를 이용하지 않고 미생물성 효소를 이용하므로 발효조건이 상당히 다른 독특한 발효차이다. 따라서, 후발효차의 발효단계별로 주요 성분을 HPLC로 분석 및 확인하였다. **Table 3.1.2**는 분취용 HPLC를 이용한 후발효차 공정 단계별로 카테킨류 및 그 산화물의 함량 변화를 조한 것으로 대체로 발효공정에서 theaflavin과 thearubigen 및 미확인물질은 약간씩 증가하는 경향이었으며, 차잎에 존재하는 카테킨류는 감소하는 경향이였다.

Table 3.1.2 Changes in catechins and their oxidized catechins contents of microbial fermented tea during fermentation

Catechins and oxidized catechins	Fermentation period (day)				
	Initial step	1st Mixing	2nd Mixing	3rd Mixing	Before drying
Polyphenol(%)	20.14	15.34	13.31	12.09	10.28
Theaflavin(%)	0.23	0.45	0.67	0.79	0.89
Thearubigen(%)	2.76	6.82	8.38	11.75	13.65
(-)EGC(mg/g)	3.34	2.38	2.12	0.68	-
(-)GC (mg/g)	12.69	9.43	7.89	4.76	3.11
(-)EC+C(mg/g)	26.82	22.61	11.54	5.76	1.43
(-)EGCG(mg/g)	55.87	42.34	30.19	17.84	6.47
(-)ECG (mg/g)	31.83	26.75	21.34	13.63	7.17
Unknown	7.81	9.12	10.56	11.04	11.23

C : (+)-catechin, EC : (-)-epicatechin, EGC : (-)-epigallocatechin
 ECG : (-)-epicatechingallate, EGCG : (-)-epigallocatechingallate

2) 공정 단계별로 후발효차 물추출물의 유리당 함량 변화

후발효차는 자연발효를 통하여 쓴맛과 떫은맛이 감소하면서 동시에 단맛과 지미가 약간씩 증가하는 경향을 나타낸다. 주요 발효공정 단계별로 후발효차 물추출물의 유리당 함량 변화는 **Table 3.1.3**과 같다. 표에 나타난 바와 같이 초기발효까지는 대체로 증가하는 유리당 함량이 많아지는 경향이었는데, 그 이후부터는 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 후발효차 공정상에서 색소 생성과 기타 휘발성 성분의 생성으로 이용된 것으로 판단된다.

Table 3.1.3 Changes in free sugars contents of microbial fermented tea during fermentation (mg%)

Free sugars	Fermentation period (days)				
	Initial step	1st Mixing	2nd Mixing	3rd Mixing	Before drying
Fructose	21.41	16.47	15.42	12.78	9.42
Glucose	15.96	11.26	9.07	7.41	4.14
Sucrose	140.29	120.38	102.73	87.84	64.83
Arabinose	6.34	5.87	4.41	4.35	3.67
Xylose	8.12	5.68	4.63	3.89	3.12

2) 공정 단계별로 후발효차 물추출물의 유리아미노산 함량 변화

발효공정상에서 후발효차는 자연발효를 통하므로 인하여 자연유래의 일부세균과 황국균과 백국균 등에 의하여 맛성분과 관련되는 유리당, 유기산 및 그외 지미성분과 동시에 작용하여 쓴맛과 떫은 맛이 감소하면서 동시에 단맛과 지미가 약간씩 증가하는 경향을 나타낸다. 주요 발효공정 단계별로 후발효차 물추출물의 유리아미노산 함량 변화는 **Table 3.1.4**와 같다. 표에 나타난 바와 같이 대체로 증가하는 유리아미노산이 있었는데, 이는 차 잎에 존재하는 일부 단백질을 단백질 분해효소의 촉매에 의한 가수분해작용으로 그 함량이 많아지는 경향었는데, 일부 유리아미노산은 유리당과 유사하게 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다.

3) 공정 단계별로 후발효차 물추출물의 효소활성 변화

주요 발효공정 단계별로 후발효차 물추출물의 효소활성 변화는 **Table 3.1.5**와 같다. 표에 나타난 바와 같이 1차 및 2차 발효 뒤집기까지는 대체로 효소활성이 증가하는 경향이었는데, 그 이후부터는 지속적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 후발효차 공정상에서 맛성분과 색소 및 향미 물질의 생성으로 이용되는 효소로서 다른 녹차나 홍차와는 미생물원에 의하여 제공된다는 것이 다른 것으로 우수균주의 분리가 중요한 요소가 될 것으로 판단된다.

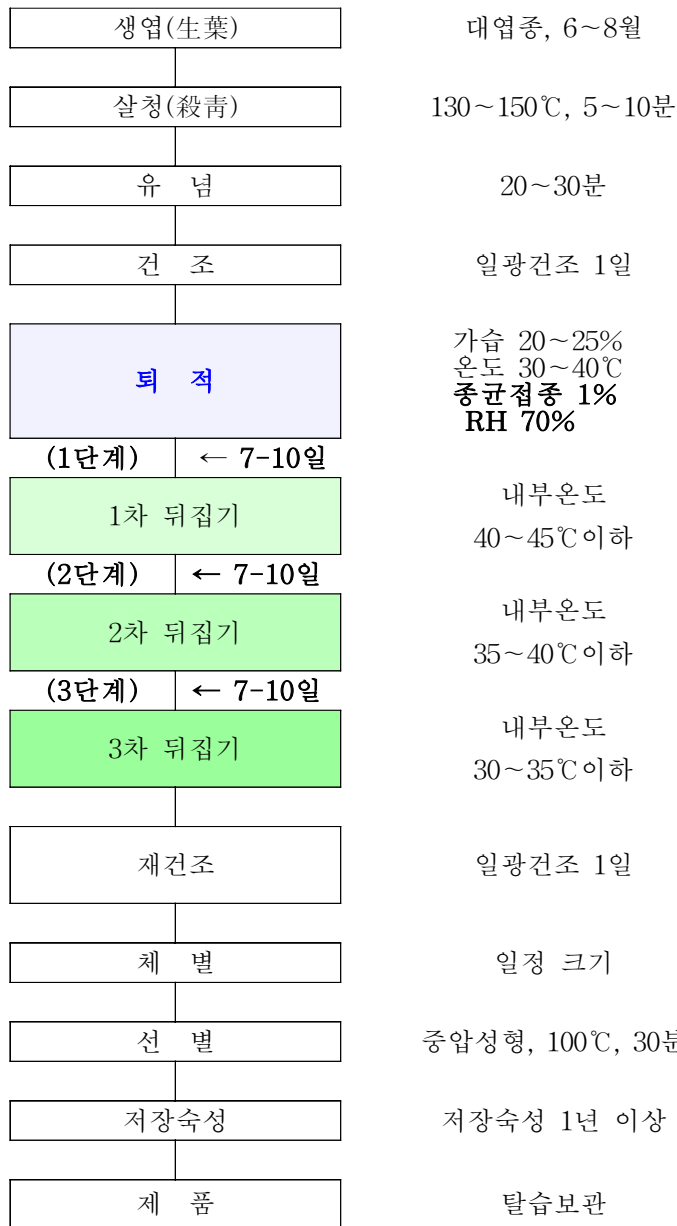
Table 3.1.4 Changes in free amino acids contents of microbial fermented tea during fermentation (mg%)

Free amino acids	Fermentation period (days)				Before drying
	Initial step	1st Mixing	2nd Mixing	3rd Mixing	
Theanine	987.5	813.5	758.3	678.4	456.7
Aspartic acid	130.8	132.6	135.2	142.1	131.4
Glutamic acid	398.6	391.2	386.5	378.9	365.7
Asparagin	52.7	53.5	56.3	57.7	59.3
Phenylalanine	24.7	27.4	28.1	28.8	29.2
Proline	29.4	30.13	27.4	27.6	25.3
Glycine	3.6	2.4	-	1.3	0.4
Alanine	34.8	35.4	37.7	40.4	42.9
Citrulline	7.6	7.8	8.2	7.8	6.4
Valine	40.9	41.3	43.5	43.8	42.4
Sarcosine	279.8	268.7	258.7	250.5	247.6
Isoleucine	20.5	21.3	22.8	23.7	24.0
Leucine	9.4	8.6	7.2	7.6	6.4
Tyrosine	28.9	24.5	21.3	18.5	16.9
Ornithine	8.2	7.8	7.5	7.4	6.7
Lysine	10.4	7.4	6.3	5.1	2.4
Histidine	7.4	7.8	8.2	8.8	9.1
Arginine	19.5	17.8	15.4	14.6	13.2

Table 3.1.5 Changes in enzyme activities of microbial fermented tea added with *Aspergillus wenti* KOFRI 0341 as starter during fermentation (U/mL)

Enzyme activity	Fermentation period (days)				
	Initial step	1st Mixing	2nd Mixing	3rd Mixing	Before drying
α -Amylase	3.56	3.78	4.23	3.12	2.87
Glucoamylase	1.32	1.45	1.22	1.10	0.93
Protease	2.31	2.46	2.51	2.32	1.53
Pectinase	3.58	4.16	4.49	3.13	2.36
PPO	5.31	7.91	8.34	7.69	6.42

다. 후발효차의 최종 발효과정



후 발효 공정

3. 후발효차 추출물의 이화학적 품질특성

가. 후발효차의 추출수율

건조상태의 녹차와 발효차를 200g씩 각각 용매에 넣어 추출한 후 rotary vacuum evaporator로 농축한 후 중량법으로 추출수율을 측정한 결과는 **Table 3.1.6**에서 보는 바와 같이 녹차의 ethanol 추출물은 46.9%, 열수추출물은 49.2%, ethyl acetate 추출물은 26.5%, 1 년간 저장한 녹차의 ethanol 추출물은 52.1%, 열수추출물은 52.0%, ethyl acetate 추출물은 34.6% 이었다. 발효차의 ethanol 추출물은 32.6%, 열수추출물은 31.9%, ethyl acetate 추출물은 17.9%, 1 년간 저장한 ethanol 추출물은 35.6%, 열수추출물은 33.9%, ethyl acetate 추출물은 15.6%이었다. Ethyl acetate 추출물보다 ethanol과 열수추출물의 수율이 훨씬 높았다.

Table 3.1.6 Yields of various solvent extracts in green and fermented tea

Tea	Solvent	Yield(g)	Extraction(%) ^a
Green tea	75% Ethanol	46.9	46.9
	Hot water	49.2	49.2
	85% Ethyl acetate	26.5	26.5
Green tea stored 1 year	75% Ethanol	52.1	52.1
	Hot water	51.9	51.9
	85% Ethyl acetate	34.6	34.6
Fermented tea	75% Ethanol	35.6	35.6
	Hot water	33.9	33.9
	85% Ethyl acetate	15.6	15.6
Fermented tea stored 1 year	75% Ethanol	32.6	32.6
	Hot water	31.9	31.9
	85% Ethyl acetate	17.9	17.9

^aDry base, each sample analyzed in triplicate.

나. 후발효차 추출물의 주요 생리활성 관련물질 분석

1) 총 플라보노이드의 함량

총 플라보노이드 함량 분석 결과는 **Table 3.1.7**과 같다. 녹차의 ethanol 추출물에서 606.4 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았고, 1년 저장한 녹차의 열수추출물은 345.1 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 낮은 함량을 보였으며, 나머지 추출물들은 400~500 $\mu\text{g/g}$ 이하의 함량을 나타내었다.

2) 총 페놀의 함량

페놀성 물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조를 갖는데, 특히 이 중 phenolic hydroxyl기가 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질이 강하여 항산화 등과 같은 생리활성 기능을 나타내게 된다. **Table 3.1.8**의 결과에서 보는 것처럼 총 페놀 함량은, 녹차의 ethyl acetate 추출물이 63.3g/100g으로 가장 높았고, 발효차의 열수추출물은 23.5g/100g으로 가장 낮았다.

Table 3.1.7 Total flavonoid contents of green and fermented tea by various solvent extracts (Dry base, $\mu\text{g/g}$)^a

Tea	Solvent	Total flavonoid
Green tea	75% Ethanol	606.4
	Hot water	413.3
	85% Ethyl acetate	542.1
Green tea stored 1 year	75% Ethanol	485.2
	Hot water	345.1
	85% Ethyl acetate	401.1
Fermented tea	75% Ethanol	481.4
	Hot water	405.7
	85% Ethyl acetate	458.7
Fermented tea stored 1 year	75% Ethanol	424.6
	Hot water	432.2
	85% Ethyl acetate	495.2

^aEach sample analyzed in triplicate.

Table 3.1.8 Total phenolic contents of green and fermented tea by various solvent extracts (Dry base, g/100g)^a

Tea	Solvent	Total phenol
Green tea	75% Ethanol	54.4
	Hot water	46.8
	85% Ethyl acetate	63.3
Green tea stored 1 year	75% Ethanol	43.0
	Hot water	35.7
	85% Ethyl acetate	39.0
Fermented tea	75% Ethanol	33.5
	Hot water	23.5
	85% Ethyl acetate	30.2
Fermented tea stored 1 year	75% Ethanol	28.3
	Hot water	23.9
	85% Ethyl acetate	39.5

^aEach sample analyzed in triplicate.

3) Catechin의 함량

녹차추출물에서는 EGC, GC, Catechin, Catechol 그리고 EGCG로 총 5종이 검출 정량되었다(Table 3.1.9, 3.1.10). EGC는 ethyl acetate 추출물(50.3mg/g) > ethanol 추출물(48.5mg/g) > 1년간 저장한 ethyl acetate 추출물(38.9mg/g) > 1년간 저장한 ethanol 추출물(32.5mg/g) > 열수추출물(29.4mg/g) > 1년간 저장한 열수추출물(22.0mg/g)의 순으로 그 함량이 높았다. 생리활성이 가장 많은 EGCG는 ethyl acetate 추출물(114.2mg/g) > 1년간 저장한 ethyl acetate 추출물(86.0mg/g) > ethanol 추출물(85.2mg/g) > 1년간 저장한 ethanol 추출물(65.4mg/g) > 열수추출물(40.4mg/g) > 1년간 저장한 열수추출물(36.7mg/g)의 순이었다. 총 함량을 보면, ethyl acetate 추출물(28.5mg/g) > 1년간 저장한 ethyl acetate 추출물(23.5mg/g) > ethanol 추출물(19.6mg/g) > 열수추출물(16.3mg/g) > 1년간 저장한 ethanol 추출물(15.7mg/g) > 1년간 저장한 열수추출물(14.2mg/g) 순으로 많았고, ethyl acetate 추출물에서는 많은 양의 catechin이 검출되었다. 그리고 저장한 녹차추출물에서는 catechin 양이 감소함을 알 수 있었다.

발효차 추출물의 catechin 분석 결과는 Table 3.1.11, 3.1.12와 같다. 녹차추출물과

같이 EGC, GC, Catechin, Catechol 그리고 EGCG가 검출 동정되었다. 녹차 추출물과 비교하면, GC와 Catechin 양이 증가하는 반면, EGC, Catechol, EGCG의 양이 감소함을 알 수 있었다. 특히 EGCG는 열수 추출물에서는 검출되지 않았다. 총 함량을 보면, 1년간 저장한 ethyl acetate 추출물(447.9mg/g) > ethanol 추출물(210.9mg/g) > 1년간 저장한 ethanol 추출물(192.9mg/g) > 열수추출물(140.6mg/g) > ethyl acetate 추출물(130.0 mg/g) > 1년간 저장한 열수추출물(127.0mg/g) 순으로 검출되었으며, 저장한 ethyl acetate 추출물의 총 함량은 다른 추출물에 비해 2배 이상 높은 함량을 보였다.

Table 3.1.9 Catechin contents of green tea by various solvent extracts (mg/g)

Catechins	Extracts		
	75% Ethanol	Hot water	85% Ethyl acetate
EGC	48.5	29.4	50.3 ^a
GC	19.8	51.0	20.7
Catechin	33.8	28.9	50.6
Catechol	84.9	13.5	49.4
EGCG	85.2	40.4	114.2
Total	262	122.8	256

^aData are presented as the mean of triplicate determinations.

Table 3.1.10 Catechin contents of green tea by various solvent extracts stored for 1 year

Catechins	Extracts		
	75% Ethanol	Hot water	85% Ethyl acetate
EGC	38.5	32.3	25.4 ^a
GC	87.4	41.0	70.1
Catechin	41.8	40.5	13.7
Catechol	30.4	26.9	20.9
EGCG	12.8	ND	ND
Total	273.1	140.7	215.1

^aData are presented as the mean of triplicate determinations.

ND : Not detected.

Table. 3.1.11 Catechin contents of fermented tea by various solvent extracts
(mg/g)

Catechins	Extracts		
	75% Ethanol	Hot water	85% Ethyl acetate
EGC	32.5	22.0	38.9 ^a
GC	11.9	45.1	57.9
Catechin	26.4	27.3	42.8
Catechol	21.1	10.4	95.7
EGCG	65.4	36.7	86.0
Total	166.9	104.8	320.3

^aData are presented as the mean of triplicate determinations.

Table. 3.1.12 Catechin contents of fermented tea by various solvent extracts
stored 1 year
(mg/g)

Catechins	Extracts		
	75% Ethanol	Hot water	85% Ethyl acetate
EGC	37.1	22.5	44.4 ^a
GC	84.4	68.5	96.3
Catechin	39.1	26.3	50.8
Catechol	24.9	9.8	19.3
EGCG	7.4	ND	13.2
Total	260.5	127.1	295.8

^aData are presented as the mean of triplicate determinations.

ND : Not detected.

다. 후발효차의 주요 식품성분의 분석

1) 무기질의 함량

녹차추출물의 무기성분 함량을 분석한 결과, Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Cr, Ni, Zn, P 및 Al등 12종이 검출되었다. K의 함량이 11,968~34,420 mg/kg으로 전체함량의

50% 이상으로 가장 높게 정량되었으며, 다음으로 P> Mg> Na> Ca> Fe 순이었다. 용매별로 볼 때는 열수추출물이 다른 용매에 비해 2배 이상 많은 양이 검출되었다. 총 함량의 변화는 1년 동안 저장한 ethanol 추출물에서 증가하였으며, 열수추출물과 ethyl acetate 추출물은 감소하는 경향을 보였다.

발효차 추출물의 무기성분 함량은 녹차추출물의 무기성분처럼 Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Cr, Ni, Zn, P 및 Al등이 검출되었으며, 녹차추출물보다 더 많은 양이 검출되었다. 그리고, 녹차와 마찬가지로 그 함량은 K> P> Mg> Na> Ca> Fe 순이었다. 또 흥미있는 결과로는 Cd와 Mo는 저장한 발효차에서만 검출되었다. 용매별로 분석한 결과에서도 녹차추출물의 결과와 같이 열수 추출물에서 더 많은 양이 검출되었다. 저장한 발효차의 총 함량은 ethanol 추출물을 제외하고는 감소하는 경향을 보였다.

2) 구성아미노산 및 유리아미노산의 함량

녹차추출물 중의 구성아미노산 함량은 aspartic acid를 비롯하여 17종의 아미노산이 다량 검출되었다. 특히 arginine의 함량이 다른 구성아미노산 보다 많이 검출되었고, 다음으로 aspartic acid> proline> serin 및 phenylalanine의 순으로 높게 검출되었다. 그리고 용매추출별로 비교하였을 때는 열수 추출물의 함량이 에탄올추출물과 ethyl acetate 추출물에 비해 월등히 높게 검출되었다. 발효차 추출물의 구성아미노산 함량은 녹차추출물과 비슷한 경향을 보여 arginine> aspartic acid> glutamic acid> glycine 순으로 정량되었다. 녹차추출물에서 높게 정량된 arginine함량은 녹차시료에 비해 낮게 검출되었으며, 발효차의 경우에는 저장 중 다소 감소하는 경향을 보였다. 녹차추출물의 유리아미노산 함량은 phospho-serine을 비롯하여 16여종의 아미노산이 검출되었으며, 특히 함량이 많은 아미노산으로는 glutamic acid는 195~554mg/100g, asparic acid는 95~179mg/100g이고 그리고, 총함량은 577.1~1,416.8mg/100g범위였다. 발효차 추출물의 유리아미노산 함량은 phospho-serine을 비롯하여 13종의 아미노산이 검출되었다. Phospho-serine의 함량이 다른 아미노산에 비해 다소 높게 검출되었으며, 녹차추출물의 함량보다는 적게 검출되었다. 총 함량은 51.8~392.3mg/100g으로 각 용매별로 차이가 있었다.

3) 유리당의 함량

HPLC로 녹차추출물의 유리당을 분석한 결과는 **Table 3.1.13, 3.1.14**와 같다. Fructose, glucose, sucrose 및 lactose가 검출되었으며, 이 중 Sucrose가 28~39 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높게 정량되었다. Glucose는 열수추출물에서만 검출되었고, 저장 중에는 약 9 $\mu\text{g/g}$ 의 감소를 보였다. Fructose는 ethanol 추출물과 ethyl acetate 추출물에서만 검출되었으나, sucrose와 lactose는 모든 시료에서 검출되었다. 후발효차 추출물의 유리당을 분석한 결과는 **Table 3.1.15, 3.1.16**과 같다. 발효차 추출물에서는 arabinose가 24~27 $\mu\text{g/g}$, glucose가 34~47 $\mu\text{g/g}$, maltose가 16~36 $\mu\text{g/g}$ 그리고, lactose가 19~26 $\mu\text{g/g}$ 의 범위였다. 그리고, 녹차추출물에서 검출되지 않았던 Arabinose와 maltose가 검출되었다. Glucose는 녹차추출물에 비해 발효차추출물에서 2~3배 이상 함유되어 있었다.

Table 3.1.13. Contents of free sugar of green tea by various solvent extracts (Dry base, g/100g)

Extracts	Free sugars				Total
	Fructose	Glucose	Sucrose	Lactose	
75% Ethanol	15.5	ND	31.1	22.5	69.1 ^a
Hot water	ND	19.8	31.7	18.3	69.8
85% Ethyl Acetate	17.9	ND	27.9	12.8	58.6

^aData are presented as the mean of triplicate determinations.

ND : Not detected.

Table 3.1.14 Contents of free sugar of green tea by various solvent extracts stored 1 year (Dry base, g/100g)

Extracts	Free sugars				Total
	Fructose	Glucose	Sucrose	Lactose	
75% Ethanol	16.4	ND	37.4	24.3	78.1 ^a
Hot water	ND	10.7	34.8	23.7	69.2
85% Ethyl Acetate	18.5	ND	38.5	21.6	78.6

^aData are presented as the mean of triplicate determinations.

ND : Not detected.

Table 3.1.15 Contents of free sugar of fermented tea by various solvent extracts
(Dry base, mg/100g)

Extracts	Free sugars				Total
	Arabinose	Glucose	Maltose	Lactose	
75% Ethanol	26.9	44.3	35.5	21.9	128.6 ^a
Hot water	24.9	38.8	27.6	26.4	117.7
85% Ethyl Acetate	25.3	47.0	32.3	ND	104.6

^aData are presented as the mean of triplicate determinations.

ND : Not detected.

Table 3.1.16 Contents of free sugar of fermented tea by various solvent extracts
stored 1 year (Dry base, mg/100g)

Extracts	Free sugars				Total
	Arabinose	Glucose	Maltose	Lactose	
75% Ethanol	24.1	34.3	22.5	ND	80.9 ^a
Hot water	23.8	33.8	16.2	18.6	92.4
85% Ethyl Acetate	24.3	36.7	16.6	20.0	97.6

^aData are presented as the mean of triplicate determinations.

ND : Not detected.

제 2 절 후발효차를 이용한 전통된장의 개발

1. 재료 및 방법

가. 실험재료

후발효차는 차색이 농갈색으로 홍차나 우롱차에 비하여 더욱 진한 느낌이 들고, 또한 차잎 중의 카테킨류가 퇴적 발효과정 중에 거의 중합(重合)되거나 분해되어 다소 카테킨류가 적기 때문에 떫은맛이 거의 없고, 향균성과 항산화성을 갖는 물질들이 많아서 「전통 콩된장」 제조를 위한 식품소재로서 효과적이라고 판단된다.

1) “후발효차 전통된장”은 후발효차의 기능성을 이용한 전통 메주된장의 품질 특성의 증진과 그 문제점을 보완하기 위한 연구의 일환으로, 전통 콩된장 제조과정에서 후발효차 농축액의 첨가시기를 다르게 하여 제조하였다. 즉, **CLM형** 후발효 전통된장은 「증자 콩→ 고품질 전통메주(C)→ 후발효차 추출물(L)→ 된장발효(M)→전통된장」으로 제조하며, **CML형** 후발효 전통된장은 「증자 콩→ 고품질 전통메주(C)→ 된장발효(M)→ 후발효차 추출물(L)→전통된장」으로 제조하였다.

2) 후발효차 전통된장의 발효조건인 캡슐메주와 후발효차 추출물의 혼합비율에 따른 주요성분을 분석하였다.

나. 실험방법

후발효차의 전통된장의 품질특성 평가를 위한 실험항목과 방법으로 “품질지표” 성분으로 유리당, 환원당, 아미노태 질소를 측정하여 평가하였고, 전통된장의 “품질열화”는 과도한 신맛을 부여하게 되는 자연환경과 메주로부터 유래되는 내염성 효모 및 유산균 증식이 그 원인으로 되고 있다.

1) 환원당 및 유리당 함량

환원당은 DNS법으로 측정하여 glucose양으로 환산하였으며, 유리당은 추출액을 증류수에 녹여 HPLC를 사용하여 측정하였다.

2) pH 및 산도

pH는 pH meter로 측정하였으며, 적정산도는 시료 10g에 CO₂를 구축한 증류수 40 mL를 가하여 교반하면서 0.1N NaOH용액으로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하여 소비된 mL수를 적정산도로 표시하였다.

3) 아미노태 질소

아미노태 질소(NH₂-N)의 측정은 된장 5 g을 증류수 100 mL로 정용한 후 20 mL를 취한 다음, 중성 포르말린용액 20 mL과 증류수 20 mL를 첨가하여 0.1 N NaOH으로 pH 8.4까지 적정하였다.

4) 산가

산가는 된장 3 g에 ethanol과 ether 용액을 1 : 2로 섞은 용매 100 mL에 용해하여, 지시약을 2~3 방울 첨가한 후, 0.1 N 에탄올성 KOH 용액으로 옅은 홍색이 될 때까지 적정하였다.

5) 색차계 색도 측정

색도의 측정은 된장 20 g을 색채색차계(Chroma Meter CR-200, MINOLTA)의 측정대에 고르게 담은 후, L(lightness), a(redness) 및 b(yellowness)값을 각각 5회 반복 측정하였으며, 이때 사용한 표준 백색판의 L, a, b값은 각각 89.2, 0.921 및 0.78이었다.

6) 갈변도 측정

지용성 색소는 된장 5 g에 n-hexane 50 mL씩을 가하여 3회 탈지시킨 후 여과하고 잔사를 chloroform - methanol(2 : 1, v/v)혼합액 50 mL로서 3회 추출한 것을 시료로 측정하였으며, 또한 수용성 색소의 측정은 추출잔사에 methanol-증류수(1 : 1, v/v)혼합액 50 mL를 가하여 20°C에서 12시간 동안 추출한 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 관능검사

관능검사는 5명의 관능검사요원을 선정하여 맛, 색, 향, 선호도 등을 5점법으로 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 후발효차의 첨가농도가 CLM형 후발효차 전통된장의 성분변화

(증자 콩→ 고품질 전통메주(C)→ 후발효차 추출물(L)→ 된장발효(M)→전통된장)

1) CLM형 후발효차 전통된장의 아미노태질소 변화

후발효차를 4% 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 그 된장으로 아미노태 질소를 측정된 결과는 **Table 3.2.1**과 같은데, 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 18도 염수의 된장이 가장 높은 값을 나타내었으며, 18도 후발효차 염수, 21도 염수, 21도 후발효차 염수의 순으로 나타났다.

Table 3.2.1 Changes in amino type nitrogen of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CLM method (%)

Salt cont.		Fermentation period (day)				
		10	20	30	40	50
21.	Control	1.13	1.34	1.50	1.54	1.76
	FT	1.02	1.30	1.35	1.39	1.42
18.	Control	1.49	1.43	1.53	1.57	1.96
	FT	1.26	1.23	1.40	1.44	1.50

FT : microbial fermented tea

2) CLM형 후발효차 전통된장의 총산 변화

후발효차를 4% 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 그 된장으로 총산을 측정된 결과는 **Table 3.2.2**와 같은데, 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 18도 염수의 된장이 가장 높은 값을 나타내었으며, 18도 후발효차

염수, 21도 염수, 21도 후발효차 염수의 순으로 나타났다.

Table 3.2.2 Changes in total acidity of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CLM method (0.1N-NaOH, ml)

Salt cont.		Fermentation period (day)				
		10	20	30	40	50
21.	Control	1.02	2.65	3.51	3.55	3.46
	FT	0.69	1.01	1.92	2.61	2.57
18.	Control	1.56	1.88	1.80	3.39	3.90
	FT	1.01	1.45	1.38	3.25	3.63

FT : microbial fermented tea

3) CLM형 후발효차 전통된장의 환원당 변화

후발효차를 4% 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후발효차 전통된장의 환원당을 측정된 결과는 **Table 3.2.3**과 같은데, 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 18도 염수의 된장이 가장 높은 값을 나타내었으며, 18도 후발효차 염수, 21도 염수, 21도 후발효차 염수의 순으로 나타났다.

Table 3.2.3 Changes in reducing sugar of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CLM method (%)

Salt cont.		Fermentation period (day)				
		10	20	30	40	50
21.	Control	0.31	0.35	0.39	0.41	0.46
	FT	0.19	0.20	0.21	0.23	0.35
18.	Control	0.50	0.54	0.62	0.65	0.78
	FT	0.33	0.39	0.43	0.43	0.48

FT : microbial fermented tea

4) CLM형 후발효차 전통된장의 내염성 효모 변화

후발효차를 4% 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 그 된장으로 내염성 효모를 측정된 결과는 **Table 3.2.4**와 같은데, 발효기간이 20일 때 가장 많은 효모가 있었고, 20일을 전후하여 감소하는 경향이었으며, 18도의 염수의 효모가 가장 많고, 21도의 염수, 18도의 후발효차, 21도의 후발효차의 순으로 나타났는데, 18도의 후발효차의 효모수가 21도의 염수의 효모수보다 작은 이유는 후발효차에 내염성 효모의 증식을 억제할 수 있는 항균성물질이 존재하는 것으로 판단된다.

Table 3.2.4 Changes in growth of salt tolerant yeast of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CLM method (CFU/g)

Salt cont.		Fermentation period (day)				
		10	20	30	40	50
21.	Control	4.44×10 ⁶	5.13×10 ⁶	4.96×10 ⁶	4.28×10 ⁶	4.16×10 ⁶
	FT	3.15×10 ⁶	3.26×10 ⁶	3.15×10 ⁶	3.02×10 ⁶	2.96×10 ⁶
18.	Control	6.01×10 ⁷	8.23×10 ⁷	7.65×10 ⁶	7.02×10 ⁶	6.89×10 ⁶
	FT	4.21×10 ⁶	4.88×10 ⁶	4.23×10 ⁶	4.11×10 ⁶	4.05×10 ⁶

FT : microbial fermented tea

5) CLM형 후발효차 전통된장의 산가 변화

후발효차를 4% 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 그 된장으로 산가를 측정된 결과는 **Table 3.2.5**와 같은데, 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 18도 염수의 된장이 가장 높은 값을 나타내었으며, 21도 염수, 18도 후발효차 염수, 21도 후발효차염수의 순으로 나타났다. 특히 후발효차의 염수가 일반 염수보다 값이 낮은 것으로 나타났는데, 이는 후발효차에 항산화 물질이 존재할 것으로 사료된다.

Table 3.2.5 Changes in acid value of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CLM method (%)

Salt cont.		Fermentation period (day)				
		10	20	30	40	50
21.	Control	12.37	17.83	23.38	28.58	41.02
	FT	9.66	13.60	16.94	29.51	32.81
18.	Control	15.36	20.07	24.00	30.82	39.63
	FT	11.33	18.37	24.37	30.19	34.58

FT : microbial fermented tea

6) CLM형 후발효차 전통된장의 색차계 색도 변화

후발효차를 4% 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 그 된장으로 환원당을 측정된 결과는 **Table 3.2.6**과 같은데, L값은 발효기간이 증가함에 따라 감소하였고, 초기에는 21도의 염수의 값이 가장 높았으나, 발효후기에는 21도의 후발효차 염수의 값이 더 높았다. 이는 후발효차 자체의 색이 된장의 색에 영향을 준 것으로 사료된다. a값은 발효기간이 증가함에 있어 증가하는 추세였고, 후발효차의 영향으로 후발효차의 염수의 값이 대조구의 염수의 값보다 높게 나타났다.

7) CLM형 후발효차 전통된장의 갈변도 변화

후발효차를 4% 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 그 된장으로 갈색도를 측정된 결과는 **Table 3.2.7**과 같은데, 발효기간이 증가함에 따라 증가하였으며, 지용성 색소보다 수용성 색소가 높게 나타났다. 그리고, 18도의 후발효차의 값이 가장 높게 나타났고, 21도의 후발효차 염수가 다음이었다.

Table 3.2.6 Changes in Hunter color index of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CLM method

Hunter color	Salt cont.		Fermentation period (day)				
			10	20	30	40	50
L	21.	Control	36.22	31.68	30.74	30.63	26.35
		FT	35.28	32.18	30.31	32.83	29.67
	18.	Control	32.15	30.9	32.92	30.13	23.92
		FT	32.73	33.35	32.66	32.39	29.1
a	21.	Control	4.38	4.95	5.74	4.60	4.85
		FT	5.88	5.40	6.69	5.15	6.32
	18.	Control	5.31	5.63	4.04	5.87	6.44
		FT	6.81	6.24	6.17	6.60	7.83
b	21.	Control	13.23	11.96	16.24	11.94	14.38
		FT	14.41	15.37	11.43	13.78	14.59
	18.	Control	8.54	15.49	15.54	10.15	15.93
		FT	12.89	10.87	10.58	10.79	17.76

FT : microbial fermented tea

Table 3.2.7 Changes in browning of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CLM method (OD/420nm)

Color	Salt cont.	Fermentation period (day)					
		10	20	30	40	50	
Lipid soluble	21 _o	Control	0.09	0.03	0.08	0.13	0.32
		FT	0.09	0.01	0.09	0.14	0.13
	18 _o	Control	0.11	0.09	0.15	0.15	0.19
		FT	1.04	0.12	0.12	0.13	0.14
Water soluble	21 _o	Control	0.14	0.12	0.23	0.14	0.16
		FT	0.22	0.25	0.29	0.19	0.16
	18 _o	Control	0.19	0.31	0.25	0.27	0.28
		FT	0.29	0.27	0.35	0.39	0.43

FT : microbial fermented tea

8) CLM형 후발효차 전통된장의 관능검사 변화

후발효차를 4% 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 저장한 후 전통된장의 관능검사를 하였는데(Fig. 3.2.1), 18도의 염수(저염)의 경우 이취가 강하고 색깔이 나쁘게 나타난 반면, 후발효차를 첨가한 된장의 경우 이취도 적고, 색깔도 좋으며, 고미와 단맛이 적절하게 조화되어 종합적인 기호도가 가장 높게 나타났다.

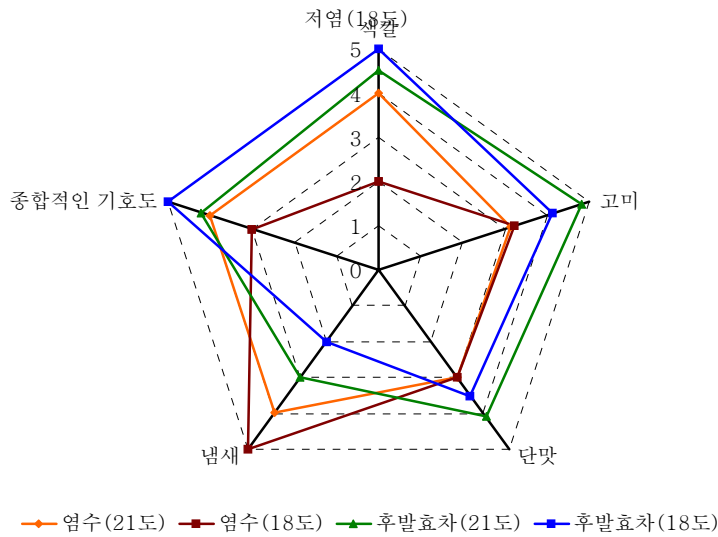


Fig. 3.2.1 Sensory evaluation of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CLM method.

나. 후발효차의 첨가농도가 CML형의 후발효차 전통된장의 성분변화

(증자 콩→고품질 전통메주(C)→된장발효(M)→후발효차 추출물(L)→전통된장)

1) CML형 후발효차 전통된장의 아미노태질소

후발효차를 농도별(2, 4, 6, 8%) 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 된장을 제조하여 아미노태 질소를 측정된 결과는 **Table 3.2.8**과 같은데, 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 18도 염수의 된장이 21도 염수의 된장보다 높은 값을 나타내었으며, 후발효차의 농도로는 저염(18도)은 6%, 일반(21도)은 4%가 가장 높은 값을 나타내었다.

2) CML형 후발효차 전통된장의 총산도 변화

후발효차를 농도별(2, 4, 6, 8%) 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 된장을 제조하여 총산을 측정된 결과는 **Table 3.2.9**와 같은데, 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 18도 염수의 된장이 21도 염수의 된장보다 높은 값을 나타내었으며, 후발효차의 농도로는 저염(18도)은 6%, 일반(21도)은 4%가 가

장 높은 값을 나타내었다.

Table 3.2.8 Changes in amino type nitrogen of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CML method (%)

Salt content	FT	Fermentation period (day)				
		10	20	30	40	50
21.	0%	1.26	1.47	1.51	1.54	1.56
	2%	1.29	1.50	1.55	1.57	1.60
	4%	1.53	1.78	1.83	1.87	1.90
	6%	1.24	1.45	1.49	1.51	1.54
18.	0%	1.30	1.50	1.55	1.58	1.60
	2%	1.38	1.61	1.65	1.68	1.71
	4%	1.39	1.61	1.66	1.69	1.72
	6%	1.41	1.64	1.69	1.72	1.75

FT : microbial fermented tea

Table 3.2.9 Changes in total acidity of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CML method (0.1N-NaOH, ml)

Salt content	FT	Fermentation period (day)				
		10	20	30	40	50
21.	0%	2.76	2.75	2.71	2.73	5.80
	2%	3.22	3.09	3.16	3.19	5.48
	4%	3.25	3.09	3.18	3.21	5.95
	6%	2.99	2.85	2.93	2.96	3.56
18.	0%	3.40	3.23	3.33	3.36	3.99
	2%	3.40	3.33	3.33	3.37	3.72
	4%	4.44	4.22	4.35	4.39	5.26
	6%	5.24	4.99	5.13	5.19	3.92

FT : microbial fermented tea

3) CML형 후발효차 전통된장의 환원당 변화

후발효차를 농도별로(2, 4, 6, 8%) 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 된장을 제조하여 환원당을 측정된 결과는 **Table 3.2.10**과 같은데, 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 18도 염수의 된장이 21도 염수의 된장보다 높은 값은 나타내었으며, 후발효차의 농도로는 저염(18도)은 6%, 일반(21도)은 4%가 가장 높은 값을 나타내었다.

Table 3.2.10 Changes in reducing sugar of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CML method (%)

Salt content	FT	Fermentation period (day)				
		10	20	30	40	50
21.	0%	0.35	0.39	0.41	0.42	0.43
	2%	0.48	0.53	0.66	0.68	0.70
	4%	0.57	0.62	0.71	0.73	0.75
	6%	0.32	0.35	0.37	0.38	0.39
18.	0%	0.20	0.22	0.23	0.24	0.24
	2%	0.27	0.29	0.32	0.33	0.34
	4%	0.37	0.40	0.42	0.43	0.45
	6%	0.49	0.53	0.56	0.58	0.59

FT : microbial fermented tea

4) CML형 후발효차 전통된장의 내염성 효모 변화

후발효차를 농도별로(2, 4, 6, 8%) 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 된장을 제조하여 내염성 효모를 측정된 결과는 **Table 3.2.11**과 같은데, 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 후발효차의 농도가 적은 2%까지는 18도 염수의 된장이 21도 염수의 된장보다 높은 값을 나타내었는데, 후발효차의 농도가 증가함에 따라 18도 염수의 된장의 내염성 효모의 값이 21도 염수의 된장의 값보다 낮게 나타났다.

Table 3.2.11 Changes in growth of salt tolerant yeast of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CML method (CFU/g)

Salt content	FT	Fermentation period (day)				
		10	20	30	40	50
21.	0%	3.16×10 ⁶	3.28×10 ⁶	3.44×10 ⁶	3.88×10 ⁶	3.96×10 ⁶
	2%	3.18×10 ⁶	3.21×10 ⁶	3.39×10 ⁶	3.48×10 ⁶	3.58×10 ⁶
	4%	3.05×10 ⁶	3.11×10 ⁶	3.21×10 ⁶	3.13×10 ⁶	3.23×10 ⁶
	6%	2.88×10 ⁶	3.03×10 ⁶	3.05×10 ⁶	2.95×10 ⁶	3.17×10 ⁶
18.	0%	5.89×10 ⁶	6.02×10 ⁶	5.01×10 ⁷	7.23×10 ⁷	6.65×10 ⁶
	2%	4.23×10 ⁶	4.84×10 ⁶	3.58×10 ⁶	5.69×10 ⁶	5.05×10 ⁶
	4%	1.96×10 ⁶	2.02×10 ⁶	2.15×10 ⁶	2.26×10 ⁶	2.15×10 ⁶
	6%	1.85×10 ⁶	1.94×10 ⁶	2.00×10 ⁶	2.17×10 ⁶	2.05×10 ⁶

FT : microbial fermented tea

5) CML형 후발효차 전통된장의 산가 변화

후발효차를 농도별(2, 4, 6, 8%) 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 된장을 제조하여 산가를 측정된 결과는 **Table 3.2.12**와 같은데, 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, 18도 염수의 된장이 21도 염수의 된장보다 높은 값을 나타내었고, 후발효차의 농도가 증가할수록 감소하는 경향이였다.

6) CML형 후발효차 전통된장의 색차계 색도 변화

후발효차를 농도별(2, 4, 6, 8%) 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 된장을 제조하여 색도를 측정된 결과는 **Table 3.2.13**과 같은데, L값은 발효기간이 증가함에 따라 증가하였고, a 값은 감소하였으며, 21도의 된장이 18도의 된장보다 높은 값을 나타내었으며, 후발효차의 농도가 증가할수록 감소하는 경향이였다.

Table 3.2.12 Changes in acid value of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CML method (%)

Salt content	FT	Fermentation period (day)				
		10	20	30	40	50
21.	0%	12.45	14.83	18.38	28.57	41.01
	2%	11.41	12.59	12.94	26.51	41.81
	4%	10.18	11.69	12.99	26.69	39.13
	6%	9.31	10.66	13.80	23.67	38.88
18.	0%	15.42	18.36	24.37	30.18	44.58
	2%	16.85	20.06	23.99	28.82	42.63
	4%	10.26	16.98	15.57	28.63	47.13
	6%	10.97	17.82	22.93	26.31	40.07

FT : microbial fermented tea

Table 3.2.13 Changes in Hunter color index of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CML method

Salt content	FT	Fermentation period (day)					
		10	20	30	40	50	
L	21 _o	0%	36.22	31.68	30.74	30.63	30.35
		2%	35.28	32.18	30.3	32.83	29.6
		4%	35.31	31.46	30.46	32.18	30.15
		6%	35.56	31.23	33.29	34.57	38.86
	18 _o	0%	32.15	30.9	32.92	30.13	29.92
		2%	33.06	30.29	30.75	32.74	34.71
		4%	32.73	33.35	32.66	32.39	29.1
		6%	31.56	33.81	32.49	31.94	29.24
a	21 _o	0%	5.31	5.63	4.04	5.87	6.44
		2%	4.81	4.24	4.17	4.60	6.83
		4%	5.07	5.77	6.03	4.58	6.64
		6%	7.67	7.33	7.44	7.60	7.44
	18 _o	0%	3.88	5.4	5.69	5.15	6.32
		2%	3.83	5.86	4.62	4.89	5.49
		4%	4.09	5.27	5.91	5.17	6.24
		6%	7.38	7.95	7.74	7.60	7.85
b	21 _o	0%	14.41	15.37	11.43	13.78	14.59
		2%	12.89	10.87	10.58	10.79	17.76
		4%	16.97	11.85	10.29	13.14	17.43
		6%	14.22	18.22	14.16	12.4	22.47
	18 _o	0%	12.54	15.49	15.54	10.15	15.93
		2%	13.23	11.96	15.27	13.94	11.38
		4%	11.17	15.48	16.65	13.31	12.64
		6%	13.11	17.00	13.4	13.98	12.01

FT : microbial fermented tea

8) CML형 후발효차 전통된장의 갈색도 변화

후발효차를 농도별(2, 4, 6, 8%) 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여 50일 동안 저장한 후 된장을 제조하여 갈색도를 측정된 결과는 **Table 3.2.14**와 같은데, 지용성 색소의 값보다 수용성 색소의 값이 더 높았으며, 발효기간이 증가할수록 증가하였다. 후발효차의 농도가 증가할수록 증가하였으며, 21도의 된장보다 18도의 된장이 높은 값을 나타내었다.

Table 3.2.14 Changes in browning of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CML method (OD/420nm)

Browning	Salt cont.	FT	Fermentation period (day)				
			10	20	30	40	50
Hydro-phobic	21.	0%	1.0402	0.1241	0.1218	0.1175	0.1447
		5%	0.1120	0.0894	0.1465	0.1479	0.1867
		10%	0.4581	0.1834	0.2340	0.3700	0.8197
		15%	0.1773	0.2966	0.3959	0.4967	0.8406
	18.	0%	0.0928	0.0282	0.0799	0.1294	0.3242
		5%	0.0925	0.0131	0.0893	0.1377	0.1265
		10%	0.1783	0.1292	0.1068	0.1452	0.1143
		15%	0.1069	0.1730	0.1787	0.1517	0.1002
Hydro-philic	21.	0%	0.2172	0.2541	0.2865	0.1828	0.2022
		5%	0.1387	0.1198	0.2260	0.2375	0.2640
		10%	0.2476	0.1584	0.2085	0.2576	0.3417
		15%	0.2262	0.1639	0.2678	0.3051	0.3637
	18.	0%	0.2218	0.2411	0.2790	0.2339	0.3305
		5%	0.1908	0.3061	0.2463	0.2691	0.3765
		10%	0.1278	0.2222	0.2459	0.2867	0.3950
		15%	0.2235	0.1796	0.2877	0.3905	0.4106

FT : microbial fermented tea

9) CML형 후발효차 전통된장의 관능검사 변화

후발효차를 농도별(2, 4, 6, 8%) 첨가한 염수 (21도, 18도)에 전통메주를 침지하여

50일 동안 저장한 후 된장을 제조하여 관능검사를 실시하였는데(Fig. 3.2.1), 18도의 염수(저염)의 경우 이취가 강하고 색깔이 나쁘게 나타났으며, 후발효차를 농도별로 첨가한 된장의 경우 농도가 증가할수록 이취도 적고, 색깔도 좋으며, 고미와 단맛도 고루 갖추어 종합적인 기호도가 가장 높게 나타났다.

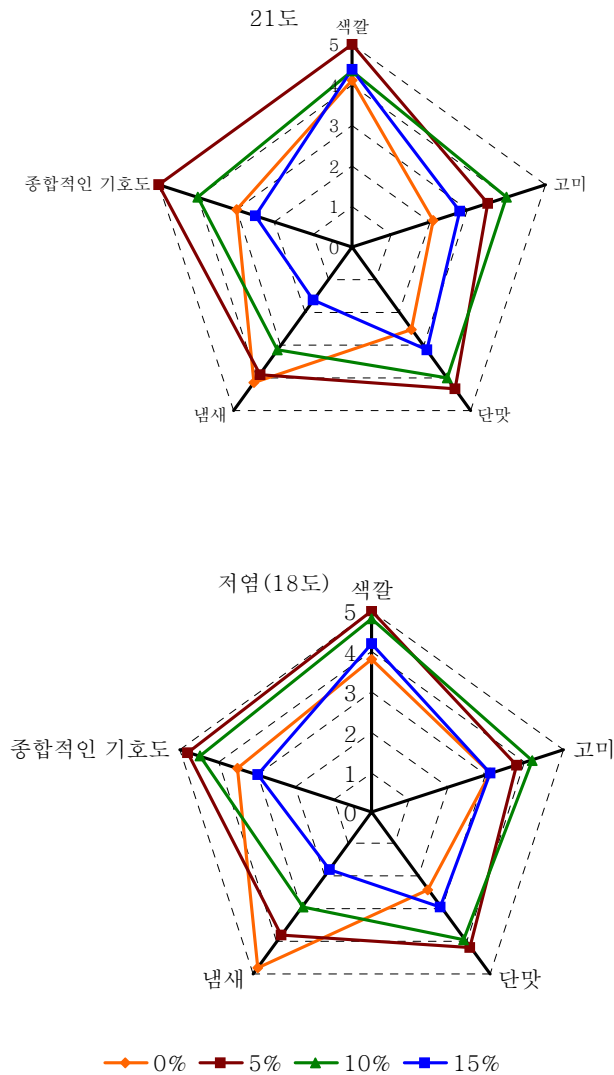


Fig. 3.1.2 Sensory evaluation of traditional doenjang added with microbial fermented tea prepared by CML method.

다. 캡슐메주와 후발효차 추출물의 혼합비율

1) 아미노태질소

전통메주와 후발효차 추출물의 혼합비율에 따른 된장의 아미노태 함량을 측정된 결과는 **Table 3.2.15**와 같다. 전통메주와 후발효차의 추출물의 혼합비율은 1:4, 1:2.5, 1:1 로 하였으며, 후발효차 전통된장의 발효공정 최적화 방법중 CLM 발효를 사용하였다. 아미노태 질소 함량은 발효시간이 증가함에 따라 증가하였으며, 염수의 양이 적으면 적을수록 증가하였다.

Table 3.2.15 Changes in amino type nitrogen of traditional doenjang prepared with different ratio of salt + fermented tea to meju (%)

Ratio (salt/meju)	Fermentation period (days)				
	10	20	30	40	50
4	1.01	1.21	1.25	1.27	1.27
2.5	1.15	1.30	1.37	1.39	1.45
1	1.33	1.48	1.53	1.57	1.65

2) 환원당

전통메주와 후발효차 추출물이 첨가된 염수비율에 따른 전통된장의 환원당을 측정된 결과는 **Table 3.2.16**과 같은데, 발효시간이 증가함에 따라 증가하였으며, 염수의 양이 적으면 적을수록 증가하였다.

3) 색도

전통메주와 후발효차 추출물의 혼합비율에 따른 전통된장의 색도를 측정된 결과는 **Table 3.2.17**과 같은데, L값(명도)는 염수를 많이 넣은 된장이 높았고, a값은 반대로 낮은 경향을 나타내었다. 발효기간이 증가할수록 L값은 증가, a 값은 감소하였으며, b 값은 유의적 차이가 없었다.

Table 3.2.16 Changes in reducing sugar of traditional doenjang prepared with different ratio of salt + fermented tea to meju (%)

Ratio (salt/meju)	Fermentation period (days)				
	10	20	30	40	50
4	0.35	0.39	0.41	0.42	0.43
2.5	0.47	0.52	0.71	0.73	0.75
1	0.58	0.63	0.66	0.68	0.70

Table 3.2.17 Changes in Hunter color index of traditional doenjang prepared with different ratio of salt + fermented tea to meju

Color	Ratio (salt/meju)	Fermentation period (days)				
		10	20	30	40	50
L	4	36.22	31.68	30.74	30.63	30.35
	2.5	35.28	32.18	30.3	32.83	29.6
	1	35.31	31.46	30.46	32.18	30.15
a	4	5.31	5.63	4.04	5.87	6.44
	2.5	4.81	4.24	4.17	4.60	6.83
	1	5.07	5.77	6.03	4.58	6.64
b	4	14.41	15.37	11.43	13.78	14.59
	2.5	12.89	10.87	10.58	10.79	17.76
	1	16.97	11.85	10.29	13.14	17.43

제 3 절 후발효차와 버섯균사체를 이용한 생청국의 개발

1. 재료 및 방법

가. 실험재료

1) 콩

청국장(*Chungkuk-jang*) 제조용의 콩 [*Glycine max* (L.) Merrill] 은 2004년에 경남 산청의 셋별농장에서 수확한 대두를 대조구로 하였다.

2) 버섯균사체 배양

식용버섯은 *Flammulina velutipes* M-034(팽이버섯)을 비롯한 *Pleurotus eryngii* M-034(새송이버섯), *Agaricus subfunereus* M-012(느타리버섯), *Cordyceps militaris* M-075(동충하초), *Agaricus blazei* Murill M-014(아가리쿠스), *Cortinellus shiitake* M-051(표고버섯)를 사용하였으며, 발효용기에 콩을 증자하여 균사체 배양 블록배지를 첨가하여 최적 배양조건에 배양하였다.

3) 청국장의 제조

가) 청국장 제조용의 종균 및 배양

공시균주는 *Bacillus megaterium* SMY-212 (KFCC 1005BP)와 각종 버섯균사체 균주를 사용하였다. 종균은 glucose 0.5%를 첨가한 NB배지(Difco, nutrient broth : beef extract 0.3%, peptone 0.5%) 250ml에 균을 각각 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후, 배양액을 무균적으로 원심분리하여 멸균수로 균체를 3회 반복 세척한 다음 균체 농도를 조절(흡광도 580nm = 2.0)하여 종균액으로 사용하였다.

나) 청국장의 제조

정선한 대두 3kg씩을 냉수에 침지한 후 물빼기를 하여 stainless steel에 담아 고압 멸균기 125℃에서 30분 동안 증자하고 50℃ 정도로 냉각하였다. 동일조건으로 발효시

킨 청국장 및 전배양한 증균액을 원료의 1%(v/w)정도 접종하여 동일조건으로 발효시킨 청국장으로 구분하여 제조하였다.

나. 실험방법

1) 총산

pH는 pH meter를 이용하여 측정하였다. 적정산도는 시료에 동량의 증류수를 넣고 균질화 한 후 0.1N NaOH 용액으로 중화적정하여 소비된 NaOH 용액의 부피를 적정산도로 환산하였다.

2) 아미노태 질소

아미노태 질소(NH₂-N)는 포르몰태질소(Formol적정법) 함량에서 암모니아태질소 함량을 뺀 것으로 나타내었다. 포르몰태 질소의 측정은 청국장 5 g을 250 ml 비이커에 넣고 증류수 100 mL를 가하여 1시간 동안 교반하여 충분히 혼합한 후 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4까지 적정하였다. 이때에 중성포르말린 용액 20 ml를 가한 다음 다시 pH가 떨어지면 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.4까지 적정하여 계산하였다.

3) 점질물

청국장의 점도는 마쇄한 청국장 10 g을 증류수 100 ml에 잘 혼합한 다음, 내경 8 cm의 원통 유리용기에 담아 20℃로 유지시킨 항온수조에 담그고, 원통형 spindle No.2 (반경 0.159 cm, 길이 3.175 cm)을 회전점도계(Brookfield Synchro-Lectric Viscometer, model LVT)에 부착한 뒤 시료표면과 spindle 표선을 일치시켰다. 10분간 방치한 후 0.6 rpm(factor = 500)에서 2분간 회전시키면서 torque값이 평형에 도달할 때 까지 측정하였다. 점도의 계산은 Dial reading × Factor(centipoise)로 하였으며, 측정수치의 평균을 구하여 mPa · s로 표시하였다.

4) 환원당

환원당은 청국장의 마쇄한 여과액 1 ml를 취하여 DNS법으로 측정하였고, glucose양

으로 나타내었다.

5) 총균수

호기성 세균의 생균수 측정은 무균적으로 마쇄한 청국장 1 g을 멸균 생리식염수로 3단계 희석법에 따라 희석한 다음, plate count agar배지(PCA : tryptone 0.5%, yeast extract 0.25%, glucose 0.1%, agar 1.5%)를 이용하여 평판 도말하고 40±1℃에서 2일간 배양한 후 나타난 colony수를 측정하였다.

6) 이소플라본

이소플라본은 액상 HPLC를 이용하여 분석하였다. 표준물질인 genistin과 daidzein, genistein을 포함한 12가지 이성체를 Sigma 사(Somerville, NJ, USA)와 Fujico(Tokyo, Japan)로 부터 구입하여 사용하였다. 시료는 80% 에탄올 용액으로 25℃에서 24시간 동안 추출한 후 syringe filter(Millex LCR 13mm NS, 0.45 μm, Millipore Co., Bedford, MA, USA) 로 여과한 후 분석하였다. 칼럼은 C18(RP C18 90A Phamaceutical, Vydac™, USA)을 이용하였고, 이동상은 Acetic acid를 0.1% 씩 첨가한 acetonitrile (용매A)과 3차 증류수 (용매B)를 이용하였다.

7) β-Glucosidase

5mM p-nitrophenyl-β-D-glucoside(PNPG)를 포함하여 50 mM sodium acetate buffer (pH 5) 1 ml와 조효소액 0.1 ml를 혼합하여, 50℃에서 10분간 반응시킨 후 미리 냉각된 1 M Na₂CO₃ 1 ml를 가하여 반응을 정지시킨 후, 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 반응조건에서 1 μmol/min의 p-nitrophenol(PNP)를 생산하는데 필요한 효소활성을 1 unit로 정의하였다.

8) 항산화활성

가) 수소공여능

청국장에 대한 수소공여능은 α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazine (DPPH)의 환원성을 이용하여 516 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer로 측정하였다. 즉 각 추출물 0.1 ml

와 대조구로 사용한 0.1% BHT 1 ml에 4×10^{-4} M DPPH 용액 3 ml를 각각 첨가한 후 5초 동안 vortex mixer로 혼합하여 증류수에 대한 흡광도를 측정하고, 대조구는 시료 대신에 에탄올 1 ml를 첨가하여 대조구에 대한 흡광도의 감소비율로 나타내었다.

나) Linoleic acid에 대한 항산화력

청국장 추출물의 항산화 효과를 linoleic acid의 과산화물값(peroxide value, POV)을 측정하여 *in vitro*로 관찰하였다. 즉, 삼각플라스크에 linoleic acid 1ml, carbonyl을 제거한 ethanol 20 ml 및 청국장 추출물 0.1 ml를 첨가한 후 0.2M phosphate buffer 25 ml를 가하여 37°C에서 일정기간(1, 3, 5, 7일) 저장한 다음 반응용액을 분액깔대기에 옮겨 chloroform 25 ml를 가하여 2-3회 반복 추출하였다. 다음에 chloroform 추출액에 acetic acid 25 ml와 포화 KI용액 1 ml를 가하여 암소에서 5분간 방치한 다음 증류수 50 ml를 가하여 soluble starch를 지시약으로 하여 1/100 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액으로 적정하였고, 과산화물가를 계산하였다.

9) 아질산염소거능

시료 추출물에 대한 아질산염소거의 효과는 1 mM NaNO_2 1 ml에 시료 추출물 0.2 ml를 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl (pH 1.2)을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2로 조정 한 후 반응용액의 부피를 10 ml로 하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그리고 반응액 1 ml에 2% 초산용액 5 ml를 첨가한 다음 Griess 시약 0.4 ml를 가하여 혼합하고 15분 방치후 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였는데, 공시험구는 NaNO_2 용액 대신에 증류수를 첨가하여 측정하였으며, 소거율을 아질산염의 백분율로 나타내었다.

11) 항암활성

가) 암세포 배양

실험에 사용한 인체 전립선암 세포(DU145)와 인체 자궁암 세포(HeLa)는 한국세포주은행에서 분양받았다. 세포는 37°C, 5% CO_2 incubator에서 RPMI 1640 배지를 사용하여 배양하였으며 세포 유지를 위해 10%의 송아지 혈청(fetal bovine serum)과 오

염방지를 위해 penicillin(10,000 units/mg)과 streptomycin(10mg/ml)의 혼합액 (Sigma,P-0781)을 첨가하였다. 세포는 플라스크에 80~90%정도 자랐을 때 완충식염수 (phosphate buffered saline)로 세척하고 0.25% trypsin-EDTA 용액을 사용하여 계대 배양하였다.

나) 암세포 성장 억제효과

세포증식 정도를 SRB assay법에 따라 측정하였다. Monolayer로 배양중인 암세포주를 0.23% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종 농도가 5×10^4 cells/ml씩 접종한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 각 well의 배지를 흡입하여 제거한 다음 서로 다른 농도로 준비한 시료를 50 µL씩 각 well에 가하여 48시간 더 반응시켰다. 배양이 종료된 후, 500µL의 차가운 12% trichloroacetic acid(TCA)를 천천히 가해주고 TCA가 바닥에 가라앉도록 잠시 기다린 후 조심스럽게 냉장고로 옮겨 1시간 동안 충분히 고정시키고 고정이 끝난 후에는 증류수로 5회 이상 세척하여 잘 건조시키고 나서 각 well에 1% 빙초산에 녹인 0.4% SRB용액 100 ml를 가하여 상온에 30분 이상 염색하였다. 염색이 끝난 후, 1% 빙초산으로 5회 이상 세척하여 잘 건조시키고, 150µL의 100mL비완충성 Tris용액으로 SRB염색액을 잘 녹여내어 96-well plate용 microplate reader로 540 nM에서 흡광도를 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 후발효차를 첨가한 생청국장의 발효공정 최적화

1) 생청국 발효특성에 미치는 후발효차의 추출물의 농도 영향

증자한 대두에 후발효차의 추출물 농도별(0.5, 1, 2, 3%)로 첨가하여 SMY-212 균주를 접종한 후, 72시간 발효시킨 후발효차 생청국장의 발효특성을 조사한 결과를 **Table 3.3.1**과 같다. 후발효차 추출물의 첨가는 동일 농도에서 녹차 추출물의 첨가보다 청국장의 발효특성(아미노태 질소, 점질물 형성, 총균수 증식)이 대체로 양호하였다. 생청국 제조에서는 후발효차 추출액은 1~2% 범위가 적당할 것으로 판단된다.

Table 3.3.1 Changes in fermentation properties of *chungkukjang* according to concentration of green and fermented tea

Tea	Items	Concentration(% , w/w)			
		0.5	1	2	4
Green	Total acidity (%)	0.41	0.42	0.43	0.47
	Amino type - N (mg%)	375.19	360.20	310.32	297.1
	Reducing sugar (%)	0.68	0.64	0.59	0.53
	Viscous material (mp.s)	98.53	94.8	85.3	83.73
	Viable cell count ($\times 10^9$ CFU/g)	8.18	7.92	7.44	6.30
Fermented	Total acidity (%)	0.40	0.43	0.42	0.44
	Amino type - N (mg%)	380.34	378.62	360.19	335.22
	Reducing sugar (%)	0.63	0.57	0.51	0.48
	Viscous material (mp.s)	103.23	96.86	91.29	87.56
	Viable cell count ($\times 10^9$ CFU/g)	8.52	8.31	7.88	7.15

2) 생청국 발효특성에 미치는 후발효차 추출물과 발효온도의 영향

증자한 대두에 후발효차의 추출물을 2% 농도로 첨가하여 SMY-212 균주를 접종한 후, 72시간 일정한 발효온도(30, 35, 40, 45°C)로 발효시킨 후발효차 생청국장의 발효 특성을 조사한 결과를 **Table 3.3.2**와 같다. 생청국 발효온도는 앞서 결과와 마찬가지로 후발효차추출물이 녹차 추출물의 첨가보다 생청국의 발효특성(아미노태 질소, 점질물 형성, 총균수 증식)이 대체로 양호하였으며, 콩단백질의 분해도를 나타내는 아미노태질소와 환원당 및 생균수에서 대체로 40°C ~ 45°C 범위의 발효온도가 우수하였으며, 점질물 형성은 45°C의 높은 온도에서는 오히려 상당히 낮아지는 변화를 나타내었다.

Table 3.3.2 Changes in fermentation properties of *chungkukjang* according to

fermentation temperature

Tea	Items	Temperature(°C)			
		30	35	40	45
Green	Total acidity (%)	0.51	0.47	0.41	0.44
	Amino type - N (mg%)	328.94	339.35	372.31	358.31
	Reducing sugar (%)	0.55	0.57	0.63	0.68
	Viscous material (mp.s)	84.25	92.84	96.81	64.40
	Viable cell count ($\times 10^9$ CFU/g)	8.03	7.76	7.94	6.87
Fermented	Total acidity (%)	0.45	0.43	0.39	0.39
	Amino type - N (mg%)	334.89	387.03	396.47	378.43
	Reducing sugar (%)	0.45	0.51	0.54	0.56
	Viscous material (mp.s)	86.32	98.50	118.35	77.99
	Viable cell count ($\times 10^9$ CFU/g)	8.23	8.65	8.95	7.23

3) 생청국 발효특성에 미치는 후발효차 추출물과 발효균주 접종량의 영향
증자한 대두에 후발효차의 추출물을 2% 농도로 첨가하여 SMY-212 균주를 접종한 후, 72시간동안 발효균주의 접종량(0.1, 0.5, 1.0, 2.5%, v/w)달리하여 발효시킨 후발효차 생청국장의 발효특성을 조사한 결과를 **Table 3.3.3**과 같다. 생청국의 제조에서 스타트 발효균 첨가량의 증가에 따라 발효지표 성분이 증진되었으며, 1.0 % 전후의 농도 범위로 첨가하는 것이 좋을 것 같으며, 또한 그 발효패턴도 후발효차 추출물이 녹차 추출물의 첨가보다 생청국의 발효특성(아미노태 질소, 점질물 형성)이 대체로 양호하였다. 즉, 콩단백질의 분해도를 나타내는 아미노태질소와 점질물형성 및 환원당의 함량에서 접종량이 비교적 낮은 0.1%에서는 상당히 낮은 발효율의 패턴을 나타내었다.

Table 3.3.3 Changes in fermentation properties of *chungkukjang* according to

inoculum volume of fermenting strain

Tea	Items	Inoculum size(%)			
		0.1	0.5	1.0	2.5
Green	Total acidity (%)	0.43	0.42	0.38	0.31
	Amino type - N (mg%)	226.73	313.59	363.2	398.72
	Reducing sugar (%)	0.60	0.57	0.53	0.48
	Viscous material (mp.s)	70.54	94.74	99.83	113.2
	Viable cell count ($\times 10^9$ CFU/g)	5.34	6.65	7.28	8.68
Fermented	Total acidity (%)	0.38	0.35	0.30	0.23
	Amino type - N (mg%)	262.14	359.04	388.95	427.38
	Reducing sugar (%)	0.52	0.50	0.48	0.36
	Viscous material (mp.s)	78.97	99.03	112.28	125.67
	Viable cell count ($\times 10^9$ CFU/g)	5.75	7.54	8.56	9.87

4) 수침조건에 따른 생청국용 대두의 Isoflavone 함량 및 조성 변화

가) 콩 종류별 Isoflavone의 함량 및 조성

실험에 사용한 소립콩은 경상대학교 유전 육종연구실에서 유전자 조작이 아닌 전통적인 유전·육종기술을 이용하여 육종된 isoflavone 함량이 높은 생청국 제조에 적합한 소립형 신품종 콩으로 국내산 대두의 isoflavone의 함량 및 조성을 조사한 결과는 **Table 3.3.4**에 나타난 바와 같이 소립형 콩의 isoflavone 함량은 1,756.92~2,969.9 $\mu\text{g/g}$ (건물) 범위였으며 평균 2,283.11 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었다. 소립형 A5 콩이 가장 높은 함량이었으며, 소립형 A1이 가장 낮은 isoflavone 함량을 나타내었다. 총 Isoflavone의 함량에서 malonyl genistin과 malonyl daidzin의 함량은 86%이상을 차지하였으며 가장 낮은 조성은 acetyl 배당체 isoflavone군이었다. Malonyl genistin의 함량은 900~1421

$\mu\text{g/g}$ (건물)이었으며 평균 1,087.36 $\mu\text{g/g}$ (건물)였고, malonyl daidzin은 871~1102 $\mu\text{g/g}$ (건물)로서 평균 917 $\mu\text{g/g}$ (건물) 정도였다.

Table 3.3.4 Content and composition of isoflavones of small seed size soybeans ($\mu\text{g/g}$, dry basis)

Isoflavones	Small seed size soybeans					Mean
	A1	A2	A3	A4	A5	
Malonyl genistin	906.62	901.91	964.25	1251.85	1412.18	1,087
Malonyl daidzin	606.18	1041.24	968.28	871.26	1102.83	917.95
Malonyl glycitin	52.52	76.35	67.83	63.18	81.97	68.37
Genistin	105.92	73.52	64.19	88.04	214.64	109.26
Daidzin	37.44	46.84	37.77	33.29	90.03	49.07
Glycitin	21.56	29.23	22.76	22.22	37.83	26.72
Genistein	6.63	4.28	3.84	5.27	10.71	6.14
Daidzein	8.79	5.66	5.58	5.07	8.69	6.75
Glycitein	2.36	2.41	1.95	2.08	2.34	2.22
Acetyl genistin	-	-	-	0.43	0.39	0.16
Acetyl daidzin	5.74	6.45	4.50	5.18	5.79	5.53
Acetyl glycitin	3.16	4.41	3.94	3.64	2.50	3.53
Total isoflavones	1,756.92	2,192.30	2144.89	2,351.51	2969.90	2283.10

나) 대두의 수침중 Isoflavone의 함량 및 조성 변화

국산 대두의 수침중 Isoflavone 함량 및 조성변화는 **Table 3.3.5**와 같다. 대두의 수침중에 isoflavone 함량의 변화는 5893.24~4944.7 $\mu\text{g/g}$ (건물) 범위였다. 총 Isoflavone의 함량에서 malonyl genistin과 malonyl daidzin의 함량은 대부분을 차지하였으며, 가장 낮은 조성은 acetyl 배당체 isoflavone군으로 약 10 $\mu\text{g/g}$ (건물) 이하의 함량을 나타내었다. Malonyl genistin의 함량은 4026.83~3328.11 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었으며, malonyl daidzin은 1388.02~1224.25 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었다. 수침시간이 경과하면서 점진적으로 총 isoflavone의 함량은 감소하였으며, aglycone의 함량은 콩 자체의 β -glucosidase활성화에 의하여 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 3.3.5 Changes in isoflavone content and composition of small seed size soybean(*Taegang*) soaked in tap water for 72 hrs at 20°C ($\mu\text{g/g}$, dry basis)

Isoflavones	Soaking time(hrs)					
	0	8	16	24	48	72
Malonyl genistin	4026.83	3505.94	3477.34	3454.40	3485.47	3328.11
Malonyl daidzin	1388.02	1289.41	1274.54	1262.66	1234.45	1224.25
Malonyl glycitin	182.28	179.60	170.87	166.82	150.24	149.15
Genistin	120.89	119.04	116.84	109.29	101.86	97.06
Daidzin	92.68	85.79	82.76	80.47	78.41	68.61
Glycitin	30.41	31.77	31.21	30.38	28.39	24.65
Genistein	10.45	13.45	16.35	25.18	28.89	24.39
Daidzein	12.19	13.62	15.21	15.94	15.26	13.07
Glycitein	5.61	5.84	6.12	6.18	6.27	6.32
Acetyl genistin	4.86	4.54	4.17	3.76	3.81	2.94
Acetyl daidzin	11.33	10.65	10.29	9.18	8.49	6.15
Acetyl glycitin	7.69	5.88	6.76	4.40	3.92	-
Total isoflavones	5,892.24	5,265.53	5,212.46	5,168.66	5,145.46	4,944.70

국산 대두를 탈피하여 수침할 경우에 수침중 Isoflavone 함량 및 조성변화는 **Table 3.3.6**과 같다. 탈피시킨 대두의 isoflavone은 899.24~4,501.37 $\mu\text{g/g}$ (건물) 범위였다. 총 Isoflavone의 함량에서 malonyl genistin과 malonyl daidzin의 함량은 대부분을 차지하였으며, 가장 낮은 조성은 acetyl 배당체 isoflavone군으로 약 11 $\mu\text{g/g}$ (건물) 이하의 함량을 나타내었다. Malonyl genistin의 함량은 4026.83~2909.03 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었으며, malonyl daidzin은 1388.02~938.06 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었다. 앞서의 대두와 마찬가지로 탈피시킨 대두의 경우에도 수침시간이 경과하면서 점진적으로 총 isoflavone의 함량은 감소하였으며, 역시 aglycone의 함량은 콩 자체의 β -glucosidase활성화에 의하여 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 3.3.6 Changes in isoflavone content and composition of dehulled large seed size soybean soaked in tap water for 72 hrs at 20°C (μg/g, dry basis)

Isoflavones	Soaking time(hrs)					
	0	8	16	24	48	72
Malonyl genistin	4026.83	3454.94	3204.98	3126.78	3085.54	2909.03
Malonyl daidzin	1388.02	1027.95	1012.06	986.39	947.89	938.06
Malonyl glycitin	182.28	135.07	126.25	133.44	133.34	124.40
Genistin	120.89	310.28	283.60	336.20	295.44	319.10
Daidzin	92.68	99.44	98.83	100.92	102.31	103.83
Glycitin	30.41	32.71	36.56	40.06	39.81	37.72
Genistein	10.45	19.10	19.64	27.41	27.50	26.48
Daidzein	12.19	25.64	25.51	26.22	24.64	25.73
Glycitein	5.61	8.54	9.35	9.84	10.12	10.33
Acetyl genistin	4.86	4.87	3.48	3.06	2.50	2.22
Acetyl daidzin	11.33	7.80	7.75	7.98	5.59	4.47
Acetyl glycitin	7.69	0.07	-	-	-	-
Total isoflavones	5,893.24	5,126.41	4,828.01	4,798.30	4,674.68	4,501.37

다) 대두의 수침온도에 따른 Isoflavone 함량 및 조성 변화

국산 대두의 수침온도에 따른 isoflavone 함량의 변화는 **Table 3.3.7**에 나타난 바와 같이 8시간 침지는 3,656.49 ~ 3,873.68 μg/g(건물) 범위였고, 16시간 침지는 3,874.44 ~ 3,183.9 μg/g(건물) 범위였다. 총 Isoflavone의 함량에서 malonyl genistin과 malonyl daidzin의 함량은 대부분을 차지하였으며, 가장 낮은 조성은 acetyl 배당체 isoflavone군으로 약 15μg/g(건물) 이하의 함량을 나타내었다. Malonyl genistin의 함량은 각각 2843~3016 μg/g(건물), 3190~2460μg/g(건물) 범위였다. malonyl daidzin은 각각 1123.36~1249.08 μg/g(건물), 1291.96~1225.12μg/g(건물) 범위였다. 1224.25 μg/g(건물)이었다. 수침온도는 총 isoflavone의 함량 변화에서 크게 영향을 미치지 못하였

다.

Table 3.3.7 Changes in isoflavone content and composition of large seed size soybean(*Taegang*) soaked in spring water at different temperature ($\mu\text{g/g}$, dry basis)

Isoflavones	Soaking temperature($^{\circ}\text{C}$)							
	5		10		20		30	
	8hr	16hr	8hr	16hr	8hr	16hr	8hr	16hr
Malonyl genistin	3016.66	3191.01	3170.40	3067.86	3089.67	2932.55	2843.31	2460.10
Malonyl daidzin	1123.36	1291.96	1210.77	1331.80	1246.40	1232.23	1249.08	1225.12
Malonyl glycitin	32.65	28.74	33.32	25.78	30.44	33.08	18.15	33.22
Genistin	324.08	166.81	290.09	308.23	287.15	269.26	261.97	289.47
Daidzin	81.12	90.56	90.35	94.11	83.31	85.76	77.77	90.32
Glycitin	29.84	64.49	28.74	38.62	30.47	29.11	26.47	31.17
Genistein	9.92	11.28	10.41	13.78	12.17	10.43	11.86	10.38
Daidzein	22.27	22.73	22.80	25.05	24.34	25.11	23.27	25.02
Glycitein	7.34	-	8.13	7.43	9.32	8.56	10.37	9.32
Acetyl genistin	2.49	0.99	2.58	2.82	3.68	6.19	3.58	3.26
Acetyl daidzin	5.14	5.34	5.31	5.17	14.46	7.80	4.80	6.52
Acetyl glycitin	1.62	0.53	0.78	0.32	0.19	-	-	-
Total isoflavones	4656.49	5874.44	5873.68	5920.97	5831.60	5640.08	5530.63	5183.90

5) 균주에 따른 발효대두의 Isoflavone의 함량 및 조성의 변화

가) 미생물에서 유래되는 β -Glucosidase의 활성

국내산 대두에 포함된 isoflavone류 배당체를 인체에 흡수되기 쉬운 형태인 alycone 형태로 변환시키는데 촉매하는 β -glucosidase의 활성을 미생물균원(*Bacillus*속 고초세균, 식용버섯)에 대하여 조사한 결과는 **Table 3.3.8**과 같다. Table에 나타난 바와 같이 고초균은 대체로 액체 배양물 단백질 mg에 대하여 0.82~2.44 units였으며, *Bacillus megaterium*이 우수하였다. 식용버섯은 액체 배양물 단백질 mg에 대하여 0.12~2.89 units였으며, *Flammulina velutipes* M-034(팽이버섯)을 비롯한 *Pleurotus*

eryngii M-034(새송이버섯), *Agaricuss subfunereus* M-012(느타리버섯), *Cordyceps militaris* M-075(동충하초), *Agaricus blazei* Murill M-014(아가리쿠스), *Cortinellus shiitake* M-051(표고버섯)가 비교적 우수하였는데, 대체로 액체배양물 단백질 mg당 2 units 효소활성을 갖고 있었다.

Table 3.3.8 Activity of β -glucosidase originated from crude enzyme of bacteria and mushrooms

Class	Strains	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> B-011	214.2	100.5	2.13
	<i>Bacillus natto</i> B-024	145.2	166.8	0.87
	<i>Bacillus megaterium</i> B-015	340.2	139.4	2.44
	<i>Bacillus licheniformis</i> B-027	117.3	143.0	0.82
Mushrooms	<i>Agaricuss subfunereus</i> M-012(느타리버섯)	331.3	124.1	2.67
	<i>Agaricus blazei</i> Murill M-014(아가리쿠스)	309.1	166.2	1.86
	<i>Cordyceps militaris</i> M-075(동충하초)	321.7	152.5	2.11
	<i>Flammulina velutipes</i> M-034(팽이버섯)	435.0	204.4	2.13
	<i>Lyophyllum ulmarium</i> M-042(만가닥버섯)	32.4	154.3	0.21
	<i>Lentinus lepidus</i> M-021(갯버섯)	42.8	118.9	0.36
	<i>Pleurotus eryngii</i> M-034(새송이버섯)	312.7	108.2	2.89
	<i>Cortinellus shiitake</i> M-051(표고버섯)	218.5	120.0	1.80
	<i>Agaricus bisporus</i> Sing M-043(양송이)	108.3	166.6	0.65
	<i>Poria cocos</i> (Fr.) Wolf M-023(복령버섯)	23.7	296.3	0.08
<i>Phellinus linteus</i> M-031(상황버섯)	28.1	234.2	0.12	

나) *Bacillus*속 균주별 청국장지의 Isoflavone 함량 및 조성

국산대두를 이용한 청국장 발효균으로 이용되는 주요 *Bacillus*속 세균을 이용한 청국장지의 Isoflavone 함량 및 조성을 분석한 결과, **Table 3.3.9**에 나타난 바와 같이 337.34~468.67 $\mu\text{g/g}$ (건물) 범위였다. 총 Isoflavone의 함량에서 genistein과 daidzein의

함량은 각각 146.80 $\mu\text{g/g}$ (건물), 135.13 $\mu\text{g/g}$ (건물)로서 전체 isoflavone의 대부분을 차지하였으며, 가장 낮은 조성은 acetyl 배당체 isoflavone 균이었다. Genistein의 함량은 73.31~180.20 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었으며, daidzein은 78.74~150.59 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었다. 원료 대두와는 다르게 발효과정을 거치게 되면서 총 isoflavone의 함량은 크게 감소하였으며, 역시 aglycone의 함량은 미생물자체에서 β -glucosidase활성화에 의하여 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 그 중에서는 BM 발효균에 의하여 제조된 청국장이 가장 우수하였으며, BL 발효균이 제조한 청국장이 가장 낮은 함량이었다.

Table 3.3.9 Content and composition of isoflavones of whole seed soybean ($\mu\text{g/g}$, dry basis)

Isoflavones	Strains					Mean
	BN	BL	BS	BM	TC	
Malonyl genistin	5.34	28.89	5.61	16.90	8.08	12.96
Malonyl daidzin	11.89	18.03	20.89	12.77	20.56	16.82
Malonyl glycitin	25.92	36.33	23.91	24.39	24.09	26.92
Genistin	31.44	36.17	31.87	39.08	19.81	31.67
Daidzin	12.77	17.11	11.90	15.31	8.33	13.08
Glycitin	9.47	9.39	7.11	10.36	6.04	8.47
Genistein	157.76	73.31	164.42	158.30	180.20	146.79
Daidzein	149.15	78.74	146.12	150.59	151.04	135.12
Glycitein	30.25	31.25	32.01	29.05	30.25	30.56
Acetyl genistin	-	-	-	-	-	0.00
Acetyl daidzin	7.15	4.75	5.82	6.98	5.59	6.05
Acetyl glycitin	4.28	3.37	3.98	4.94	5.13	4.34
Total isoflavones	445.42	337.34	453.64	468.67	459.12	432.83

BL, *Bacillus licheniformis* ; BM, *Bacillus megaterium* ; BS, *Bacillus subtilis* ; BN, *Bacillus natto* ; TC, traditional chungkugjang

다) 버섯 청국장의 Isoflavone 함량 및 조성

① 버섯 발효대두의 Isoflavone 함량 및 조성

국산대두를 버섯 균사체로 발효시킨 대두의 Isoflavone 함량 및 조성을 분석한 결과

는 **Table 3.3.10**과 같다. 총 isoflavone 함량은 396.72~1117.74 $\mu\text{g/g}$ (건물) 범위였다. 총 Isoflavone의 함량에서 genistein과 daidzein의 함량은 각각 149.90 $\mu\text{g/g}$ (건물), 111.32 $\mu\text{g/g}$ (건물)로서 전체 isoflavone의 상당한 부분을 차지하였으며, 아직 aglycone 형태로 전환되지 않은 배당체가 많이 남아 있는 상태이다. 총 isoflavone주에서 가장 낮은 조성은 acetyl 배당체 isoflavone 균이었다. Genistein의 함량은 12.99~239.03 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었으며, daidzein은 10.48~210.90 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었다. 원료 대두와는 다르게 발효과정을 거치게 되면서 총 isoflavone의 함량은 크게 감소하였으며, 역시 aglycone의 함량은 버섯 자체에서 β -glucosidase활성화에 의하여 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 그 중에서는 P 버섯 발효균에 의하여 제조된 대두 발효물이 가장 우수하였으며, S 버섯 발효균이 제조한 대두 발효물이 가장 낮은 함량이었다.

Table 3.3.10 Content and composition of isoflavone of soybean products fermented with edible mushrooms ($\mu\text{g/g}$, dry basis)

Isoflavones	Strains					Mean
	C	A	D	P	S	
Malonyl genistin	-	-	101.59	-	-	20.31
Malonyl daidzin	33.42	8.13	13.90	11.33	7.07	14.77
Malonyl glycitin	28.79	9.94	11.65	17.50	8.87	15.35
Genistin	514.02	52.60	28.46	60.39	65.46	144.18
Daidzin	394.00	22.08	6.53	25.93	24.39	94.58
Glycitin	75.33	8.31	4.60	7.89	8.40	20.90
Genistein	12.99	177.95	161.99	239.03	157.56	149.90
Daidzein	10.48	133.74	101.00	210.90	100.47	111.31
Glycitein	38.36	32.51	29.66	25.61	21.36	29.50
Acetyl genistin	1.19	0.85	-	-	-	0.40
Acetyl daidzin	5.74	2.75	2.10	3.15	3.05	3.35
Acetyl glycitin	3.42	1.55	0.62	3.50	0.09	1.83
Total isoflavones	1,117.74	450.41	462.1	605.23	396.72	606.44

② 버섯 생청국장의 Isoflavone 함량 및 조성

국산대두를 버섯 균사체로 발효시킨 대두를 청국장 발효 미생물인 *B. megaterium* SMY-212로 발효시킨 버섯 청국장의 Isoflavone 함량 및 조성을 분석한 결과는 **Table 3.3.11**과 같다.

Table 3.3.11 Content and composition of isoflavone of soybean products fermented with edible mushrooms and *Baillus megaterium* SMY-212 ($\mu\text{g/g}$, dry basis)

Isoflavones	Strains					Mean
	CB	AB	DB	PB	SB	
Malonyl genistin	-	-	-	-	-	0.00
Malonyl daidzin	25.95	9.33	8.61	10.28	9.88	12.81
Malonyl glycitin	12.70	9.59	9.51	13.52	9.93	11.05
Genistin	195.58	11.08	10.27	13.60	30.09	52.12
Daidzin	144.15	8.81	9.48	11.54	22.91	39.37
Glycitin	44.33	9.27	9.85	4.69	12.13	16.05
Genistein	16.07	129.26	148.45	181.87	69.03	108.93
Daidzein	26.52	101.39	103.82	209.19	44.91	97.16
Glycitein	33.55	36.61	32.56	30.77	35.21	33.74
Acetyl genistin	-	-	0.02	-	-	0.00
Acetyl daidzin	2.50	6.27	2.46	3.36	3.43	3.60
Acetyl glycitin	0.60	3.87	0.39	0.72	2.36	1.58
Total isoflavones	501.95	325.48	335.42	479.54	239.88	376.45

총 isoflavone 함량은 239.88~501.95 $\mu\text{g/g}$ (건물) 범위였다. 총 Isoflavone의 함량에서 genistein과 daidzein의 함량은 각각 97.17 $\mu\text{g/g}$ (건물), 108.94 $\mu\text{g/g}$ (건물)로서 전체 isoflavone의 상당한 부분을 차지하였으며, 아직 aglycone 형태로 전환되지 않은 배당체가 많이 남아 있는 상태이다. 총 isoflavone주에서 가장 낮은 조성은 acetyl 배당체 isoflavone 균이었다. Genistein의 함량은 16.07~181.87 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었으며, daidzein은 26.52~209.19 $\mu\text{g/g}$ (건물)이었다. 원료 대두와는 다르게 발효과정을 거치게 되면서 총 isoflavone의 함량은 크게 감소하였으며, 역시 aglycone의 함량은 버섯 자체에서 β -glucosidase활성화에 의하여 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 그 중에서는 P 버섯

발효균에 의하여 제조된 대두 발효물이 가장 우수하였으며, S 버섯 발효균이 제조한 대두 발효물이 가장 낮은 함량이었다.

나. 균주에 따른 생청국의 생리활성

1) 항산화 효과

가) DPPH 자유 라디칼 소거능

① 버섯 균사체 발효대두의 DPPH 자유 라디칼 소거능

식용버섯 균사체로 이용한 발효대두의 메탄올 추출물 농도별에 대한 수소공여능 효과를 조사한 결과는 Fig. 3.3.1과 같다. Fig.와 같이 식용 버섯 균사체만으로 발효시킨 대두는 일반 콩과 비교하였을 때, 차이가 없었으며, 농도별 의존도는 약간 있었다.

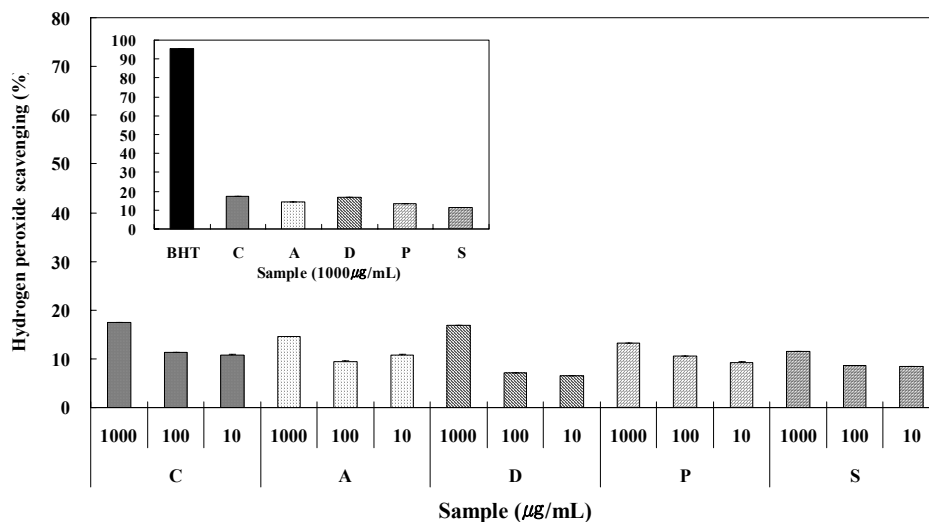


Fig. 3.3.1 Hydrogen - donating activity of methanol extracts of soybean products fermented by edible mushrooms.

C, raw seed soybean ; soybean products(A~D) fermented by mushrooms(A, *Agaricus blazei* ; D, *Cordyceps militaris* ; P, *Flammulina velutipes* ; S, *Pleurotus eryngii*).

② 버섯균사체-세균의 2단 발효 생청국의 DPPH 자유 라디칼 소거능

식용버섯 균사체 및 *Bacillus megaterium* SMY-212를 이용한 생청국의 메탄올 추출물 농도별에 대한 수소공여능 효과를 조사한 결과는 Fig. 3.3.2와 같다. Fig.에 나타난 바와 같이 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 26.923~17.83으로 식용버섯 균사체 만을 발효시킨 대두보다 30~40% 높았으며, 그 중 동충하초(*Cordyceps militaris*, DB) 균사체를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두가 가장 26.92%로 가장 높은 값을 나타내었다.

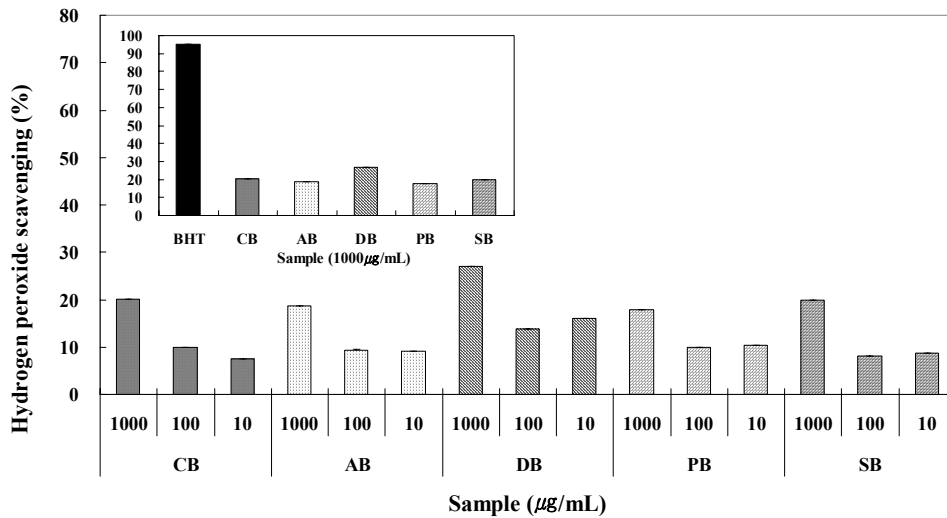


Fig. 3.3.2 Hydrogen - donating activity of methanol extracts of soybean products fermented by edible mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212.

BHT, butylated hydroxyanisole ; CB, traditional fermented soybean product ; soybean products(AB~SB) fermented by mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212(AB, *Agaricus blazei* ; DB, *Cordyceps militaris* ; PB, *Flammulina velutipes* ; SB, *Pleurotus eryngii*).

나) Linoleic acid에 대한 항산화 효과

① 버섯 균사체 발효대두의 항산화 효과

식용버섯 균사체로 이용한 발효대두의 메탄올 추출물 농도별에 대한 수소공여능 효과를 조사한 결과는 Fig. 3.3.3과 같다. Fig.에 나타난 바와 같이 BHT를 제외하고 시료들 간의 linoleic acid 의 값은 29.58~9.30의 범위로 나타났고, 가장 높은 시

료는 일반 대두발효물이었고, 동충하초 (*Cordyceps militaris*, DB)가 그 다음이었다.

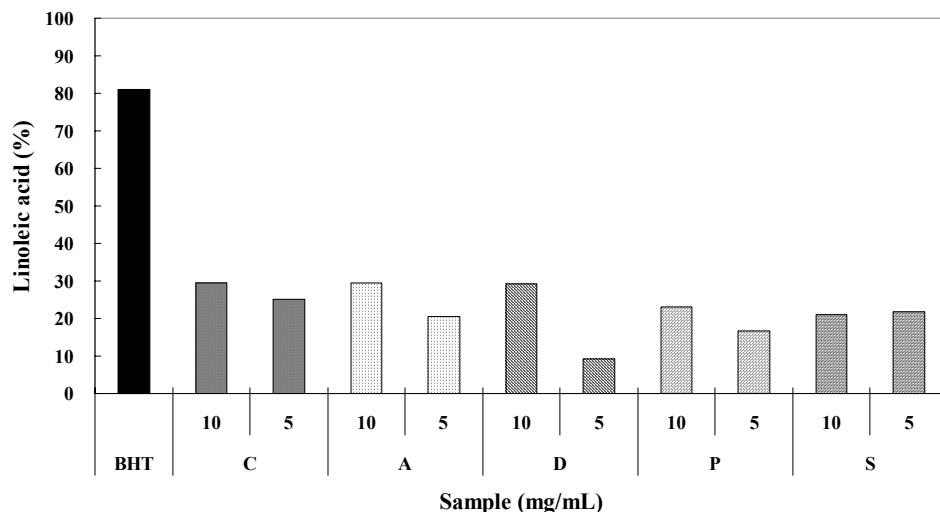


Fig. 3.3.3 Peroxide value of linoleic acid emulsion added with methanol extracts of soybean products fermented by edible mushrooms.

C, raw seed soybean ; soybean products(A~D) fermented by mushrooms(A, *Agaricus blazei* ; D, *Cordyceps militaris* ; P, *Flammulina velutipes* ; S, *Pleurotus eryngii*).

② 버섯균사체-세균의 2단 발효 생청국의 항산화 효과

식용버섯 균사체 및 *Bacillus megaterium* SMY-212를 이용한 생청국의 메탄올 추출물 농도별에 대한 수소공여능 효과를 조사한 결과는 Fig. 3.3.4와 같다. Fig. 에 나타난 바와 같이 BHT를 제외하고 시료들 간의 linoleic acid 의 값은 37.56~14.17의 범위로 나타났고, 가장 높은 시료는 팽이버섯(*Flammulina velutipes*, PB) 균사체를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두였고, 아가리쿠스 (*Agaricus blazei*, AB) 균사체를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두 순이었다.

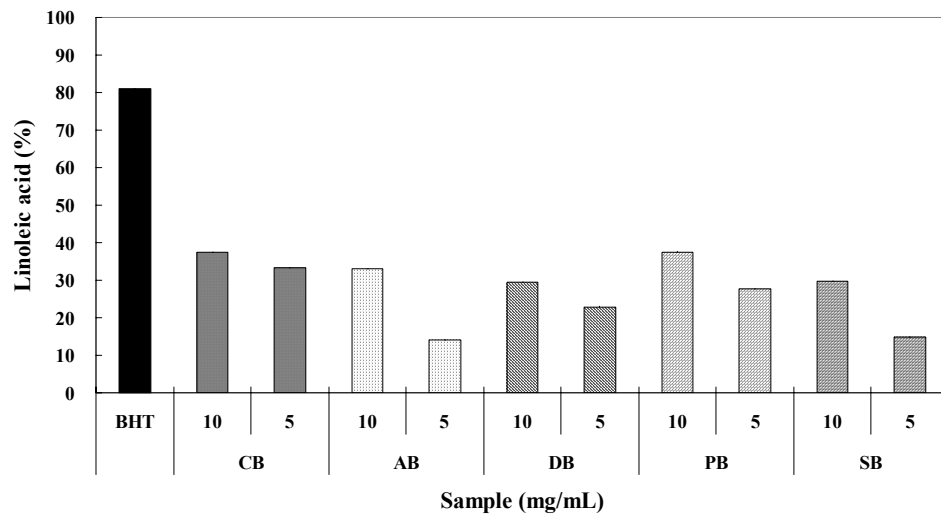


Fig. 3.3.4 Peroxide value of linoleic acid emulsion added with methanol extracts of soybean products fermented by edible mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212.

BHT, butylated hydroxyanisole ; CB, traditional fermented soybean product ; soybean products(AB~SB) fermented by mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212(AB, *Agaricus blazei* ; DB, *Cordyceps militaris* ; PB, *Flammulina velutipes* ; SB, *Pleurotus eryngii*).

3) 아질산염 소거능

버섯 균사체 발효대두와 버섯균사체 및 *Bacillus megaterium* SMY-212를 이용한 발효대두의 메탄올 추출물 농도별에 대한 아질산염소거능 효과를 조사한 결과는 Fig. 3.3.5와 같다. Fig.에 나타난 바와 같이 66.68 %로 새송이 버섯(*Pleurotus eryngii*, SB) 균사체를 배양한 발효대두가 가장 높은 값을 나타내었으며, 2단 발효한 시료 중에서는 팽이버섯(*Flammulina velutipes*, PB) 균사체를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두가 가장 높았다.

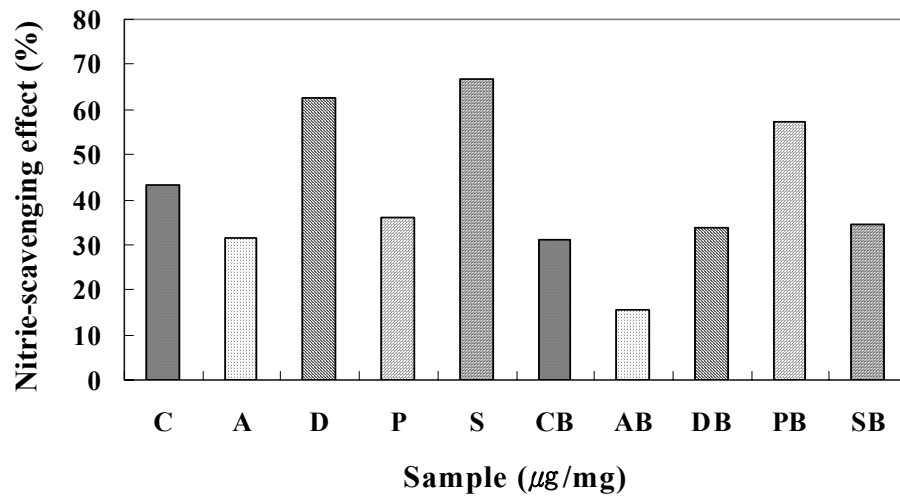


Fig. 3.3.5 Nitrite - scavenging effect of methanol extracts of soybean products fermented by edible mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212.

4) 항암활성

가) 인체 폐암 세포주

① 버섯 균사체 발효대두의 폐암세포주 성장 억제 효과

식용버섯 균사체로 이용한 발효대두의 메탄올 추출물 농도별로 인체 폐암세포주 (A549)에 대한 성장억제 효과를 조사한 결과는 **Fig. 3.3.6**과 같다. Fig.와 같이 동충하초(*Cordyceps militaris*, D)와 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*, S) 균사체를 배양한 대두가 가장 높은 값을 나타내었다.

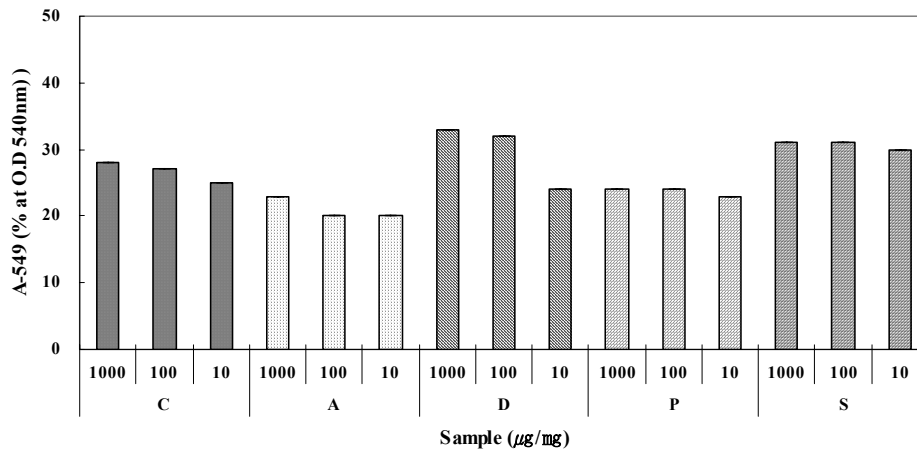


Fig. 3.3.6 Growth inhibitory effect of methanol extracts of soybean fermented with edible mushrooms in sulforhodamine B(SRB) assay using A549 human non-small lung cancer cells.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \{1 - (\text{OD}_{540} \text{ of treated cells} / \text{OD}_{540} \text{ of control cells}) \times 100$$

C, raw seed soybean ; soybean products(A~S) fermented by mushrooms(A, *Agaricus blazei* ; D, *Cordyceps militaris* ; P, *Flammulina velutipes* ; S, *Pleurotus eryngii*).

② 버섯균사체 - 세균 2단발효 생청국의 폐암세포주 성장억제 효과

식용버섯 균사체 및 *Bacillus megaterium* SMY-212를 이용한 발효대두의 메탄올 추출물 농도별로 인체 폐암 세포주(A549)에 대한 성장억제 효과를 조사한 결과는 Fig. 3.3.7과 같다. Fig.와 같이 식용버섯 균사체로 이용한 발효대두 보다 높은 값을 나타내었고, 동충하초(*Cordyceps militaris*, DB) 균사체를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두, 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*, SB) 균사체를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두, 일반 발효대두, 아가리쿠스(*Agaricus blazei*, AB)를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두, 팽이버섯(*Flammulina velutipes*, PB) 균사체를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두의 순으로 나타났다.

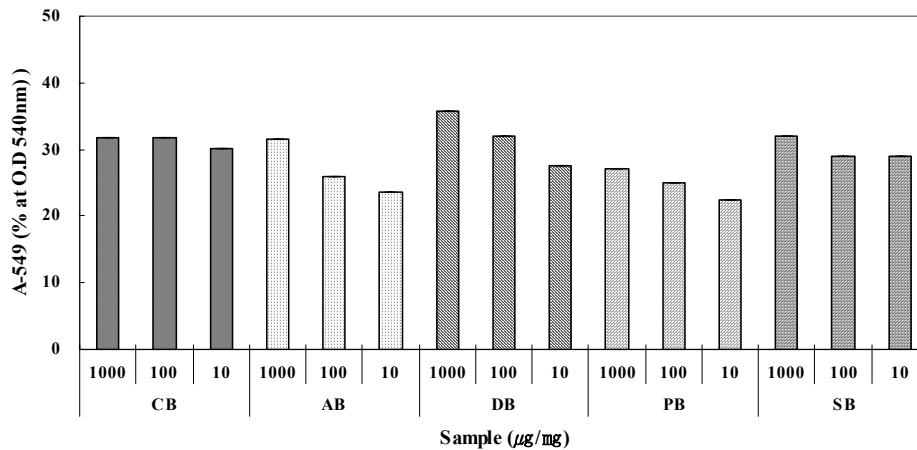


Fig. 3.3.7 Growth inhibitory effect of methanol extracts of soybean fermented with edible mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212 in sulforhodamine B(SRB) assay using A549 human non-small lung cancer cells.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \{1 - (\text{OD}_{540} \text{ of treated cells} / \text{OD}_{540} \text{ of control cells})\} \times 100$$

CB, traditional fermented soybean product ; soybean products(AB~SB) fermented by mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212(AB, *Agaricus blazei* ; DB, *Cordyceps militaris* ; PB, *Flammulina velutipes* ; SB, *Pleurotus eryngii*).

나) 인체 난소암 세포주

① 버섯 균사체 발효대두의 난소암 세포주 성장억제 효과

식용버섯 균사체로 이용한 발효대두의 메탄올 추출물 농도별로 인체 난소암 세포주(SK-OV-3)에 대한 성장억제 효과를 조사한 결과는 **Fig. 3.3.8**과 같다. Fig.와 같이 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*, S) 균사체를 배양한 발효대두가 가장 높은 값을 나타내었고, 팽이버섯(*Flammulina velutipes*, P) 균사체를 배양한 발효대두, 아가리쿠스(*Agaricus blazei*, A) 균사체를 배양한 발효대두 순으로 나타났다.

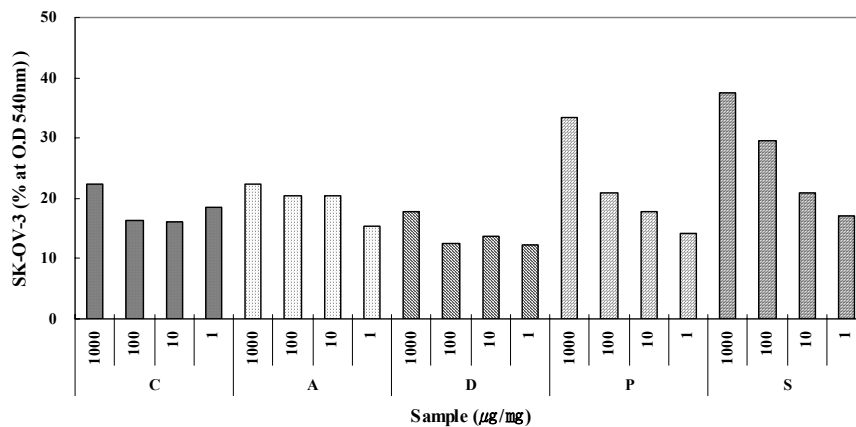


Fig. 3.3.8 Growth inhibitory effect of methanol extracts of soybean fermented with edible mushrooms in sulforhodamine B(SRB) assay using SK-OV-3 human ovarian cancer cells.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \{1 - (\text{OD}_{540} \text{ of treated cells} / \text{OD}_{540} \text{ of control cells}) \times 100$$

C, raw seed soybean ; soybean products(A~D) fermented by mushrooms(A, *Agaricus blazei* ; D, *Cordyceps militaris* ; S, *Pleurotus eryngii* ; P, *Flammulina velutipes*).

② 버섯균사체 및 세균 발효대두의 난소암 세포주 성장억제 효과

식용버섯 균사체 및 *Bacillus megaterium* SMY-212를 이용한 발효대두의 메탄올 추출물 농도별로 인체 난소암 세포주(SK-OV-3)에 대한 성장억제 효과를 조사한 결과는 Fig. 3.3.9와 같다. Fig.와 같이 식용버섯 균사체로 이용한 발효대두 보다 높은 값을 나타내었고, 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*, SB) 균사체를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두, 팽이버섯(*Flammulina velutipes*, PB) 균사체를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두, 아가리쿠스 (*Agaricus blazei*, AB)를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두, 일반 발효대두의 순으로 나타났다.

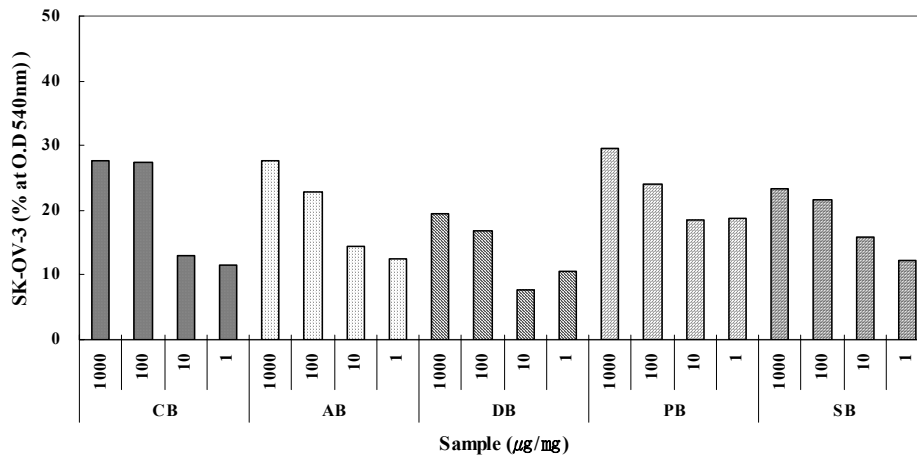


Fig. 3.3.9 Growth inhibitory effect of methanol extracts of soybean fermented with edible mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212 in sulforhodamine B(SRB) assay using SK-OV-3 human ovarian cancer cells.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \{1 - (\text{OD}_{540} \text{ of treated cells} / \text{OD}_{540} \text{ of control cells})\} \times 100$$

CB, traditional fermented soybean product ; soybean products(AB~SB) fermented by mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212(AB, *Agaricus blazei* ; DB, *Cordyceps militaris* ; PB, *Flammulina velutipes* ; SB, *Pleurotus eryngii*).

다. 후발효차를 첨가한 무취 생청국의 masking조건

최근 청국장장의 소비량이 급격히 감소하고 젊은 층에서 외면시 당하는 이유는 식생활 패턴 및 사회환경의 변화요인도 하나의 원인으로 작용하겠지만, 주된 요인은 청국장 고유의 독특한 불쾌취 때문인 것으로 생각된다. 청국장 냄새를 억제하기 위하여 녹차 및 후발효차 추출 농축물을 1%(v/w) 농도로 발효 초기부터 첨가하여 제조한 생청국의 냄새, 색깔, 점도, 쓴맛, 텃은 맛을 평가하여 **Table 3.3.12**와 **Table 3.3.13**에 나타내었다.

녹차 추출물은 색깔이 어두운 상태로 변화되었고, 원래 전통 청국장장의 냄새는 감소되었지만 chlorophyll을 많이 함유되어 풀냄새 혹은 약한 퇴비발효 냄새가 나타났다. 그러나 후발효차는 추출 농축액의 밝은 적갈색으로 생청국에서 효과적이었으며, 녹차에서 나타나는 이상취 혹은 전통 청국장장에서 발생하는 냄새는 상당히 줄었었다

으며, masking 효과가 나타났다. 그러나 대조구에 비하여 차 잎으로 나타나는 쓴맛과 떫은 맛이 녹차 추출물 첨가 생청국에는 배어 있었다.

또한 3일간 발효시킨 생청국을 2~4℃의 저온상태에서 10~14일간 숙성시키면 발효직후에 존재하는 이상취를 상당히 억제하여 관능적으로 시킬 수 있었다. 그리고 키워나 무 및 파인애플의 추출액을 적절하게 후발효차와 병용하여 첨가하면, 콩단백질의 분해율 증진과 이상취를 감소시키는 시너지 효과를 나타내었다. 국내에서의 청국장의 냄새억압은 청국장 발효 후에 대부분 그대로 10%이하의 농도로 첨가하여 유통시키지만, 발효공정의 시작에서 같이 병행발효하는 경우는 없다.

Table 3.3.12 Effect of ventilation on sensory evaluation from *chungkugjang* added with extracts of green and fermented tea

Sensory items	Control (N-Vent)	Green tea		Fermented tea	
		N-Vent	O-Vent	N-Vent	O-vent
Color	4.1±0.07	3.2±0.10	3.4±0.08	4.3±0.03	4.5±0.09
Off-odor ^a	4.8±0.03	3.7±0.04	3.5±0.06	3.1±0.08	2.8±0.07
Viscosity	4.3±0.12	3.6±0.09	3.4±0.13	3.8±0.15	4.2±0.09
Bitterness ^a	2.1±0.23	3.7±0.12	3.5±0.20	2.8±0.07	2.4±0.08
Astringent ^a	1.5±0.10	3.8±0.08	3.4±0.11	2.6±0.09	2.1±0.06

^a Intensity of sensory evaluation on 5 score test.

Table 3.3.13 Effect of low temperature aging on sensory evaluation from *chungkugjang* added with extracts of green and fermented tea

Sensory items	Control (N-Vent)	Green tea		Fermented tea	
		N-Vent	O-Vent	N-Vent	O-vent
Color	4.0±0.12	2.9±0.06	3.1±0.04	4.2±0.10	4.4±0.13
Off-odor ^a	4.2±0.07	3.3±0.02	3.2±0.05	2.4±0.02	1.9±0.06
Viscosity	4.0±0.08	3.4±0.04	3.3±0.05	3.6±0.08	4.1±0.12
Bitterness ^a	2.0±0.05	3.5±0.03	3.4±0.04	2.4±0.10	2.3±0.07
Astringent ^a	1.3±0.03	3.6±0.04	3.2±0.07	2.3±0.06	1.9±0.14

^a Intensity of sensory evaluation on 5 score test.

제 4 절 후발효차를 이용한 콩요구르트의 개발

1. 재료 및 방법

가. 사용균주

본 실험에 사용하는 균주는 한국전통발효식품연구소 종균보관실에 보존된 *Lactobacillus acidophilus* KOFRI 301, *Lactobacillus casei* KOFRI 314, *Lactobacillus bulgaricus* KOFRI 313, *Streptococcus lactis* KOFRI 212, *Streptococcus thermophilus* KOFRI 232를 제공받아 사용하였다.

나. 두유제조

두유는 단백질 함량이 높은 국산콩 태광(수분 8.2%, 조단백질 37.9%, 조지방 17.9%, 가용물질소물 30%, 회분 5.1%)을 사용하였으며, 10℃ 물에 10-12시간 수침한 다음, 95-100℃의 열수에 처리를 하고 팽윤시킨 대두를 일정량(콩:물 = 1 : 1.8)의 물과 혼합하여 마쇄한다. 다시 95℃로 10-20분간 가열하고 원심분리(3,500 rpm)하여 비지를 제거하고 남은 상정액을 두유로 사용하였다.

다. 요구르트 제조

요구르트 제조는 두유 최종 제조과정에서 고형분 함량이 7%(w/w)가 되도록 두유를 만들고, 여기에 포도당 5%(w/w)과 후발효차 추출물을 0, 2, 4, 6%농도가 되도록 첨가한 두유 100mL를 95℃에서 30분간 가열살균한 후 실온까지 냉각시켰다. 다시 MRS broth(*Lactobacillus*속)와 Elliker broth (*Streptococcus*속)에서 24시간 배양한 유산균 배양액을 2%(w/w)농도로 접종하여 40℃와 30℃ 항온기에서 24시간 배양한 후 5℃에서 12시간 응고시켜 시료로 사용하였다.

마. 유산균수의 측정

배양액을 멸균 생리식염수로 10배 희석하여 이들 희석액 1 ml를 멸균 petri dish에 주입한 다음 그 위에 45℃의 용해된 MRS배지를 가하여 균일하게 확산시켜 고정한 후, 37℃에서 20-24시간 배양한 다음 콜로니 수를 산출하였다.

바. pH, 산도 및 점도측정

요구르트의 pH는 pH meter를 측정하였으며, 산도는 0.1 N-NaOH로 적정하여 산출

하였다. 점도는 LVT viscometer(Brookfield Engineering Lab., Inc., U.S.A.)를 사용하여 Spindle No. 4의 60을 사용하였다.

사. 유청분리

발효시킨 10℃의 콩요구르트 250ml를 약 45도로 기울였을 때에 유출되어 나오는 유청분리 양을 무게를 측정하였다.

아. 콩요구르트의 관능검사

각 균주를 접종하여 14시간 배양하여 얻은 커드상의 요구르트를 1.5배 증류수로 희석하고, sucrose(15%, w/v), citric acid(0.1%, w/v)을 혼합한 다음, 충분히 교반하고 5℃ 냉장고에서 수 시간을 방치하고 관능검사를 실시하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 후발효차 추출물이 첨가된 콩요구르트의 유산균 종류별 생육특성

두유(soy milk)에서 발생하는 소화율을 증진시키고 콩 비린내(bean flavor)를 줄이면서 독특한 향미를 부여하기 위하여 유산균과 후발효차 추출물을 첨가하여 한국인의 기호에 맞는 대두요구르트(soy yoghurt)를 개발하고자 하였다. 생두유 및 버섯 균사체 발효콩으로부터 제조한 발효두유에 후발효차 추출물 농축액을 3%(v/v) 농도로 첨가한 후발효차 콩요구르트의 유산균 종류별 생육 및 적정산도를 조사한 결과는 **Table 3.4.1**과 같다. Table에 나타난 바와 같이 후발효차 콩요구르트에서 Str. thermophilus > Lac. acidophilus > Lac. casei 가 우수하였으며, 두유 보다는 버섯균사체로 발효시킨 발효두유가 유산균 성장이나 산도 증가에 있어서 효과적이었다.

나. L-methionine, 우유 및 탈지분유 첨가가 후발효차 콩요구르트의 유산균 생육과 산생성에 미치는 영향

두유는 유산균주에 따라서 약간씩 다르지만, 대체로 우유보다 생육배지로 부적절하여 포도당이나 과당과 같은 단당류나 쌀, 보리 등과 같은 곡류 등을 첨가하거나, 단백질 가수분해물과 같은 생육촉진물질을 첨가할 필요가 있다.

Table 3.4.1 Growth and acid production of some lactic acid bacteria in soy milk supplemented with water extract of fermented tea (3%, v/v)

Lactic acid bacteria	Soy milk				Fermented soy milk ¹			
	Growth		Titratable acidity		Growth		Titratable acidity	
	12hr	24hr	12hr	24hr	12hr	24hr	12hr	24hr
Lac. acidophilus	2.3x10 ⁶	3.7x10 ⁸	0.52	1.23	4.8x10 ⁶	0.9x10 ⁹	0.62	1.41
Lac. casei	1.9x10 ⁶	2.2x10 ⁸	0.43	1.14	3.9x10 ⁶	5.7x10 ⁸	0.57	1.34
Lac. bulgaricus	3.5x10 ⁴	1.3x10 ⁶	0.32	1.03	5.7x10 ⁴	6.7x10 ⁶	0.55	1.29
Str. lactis	2.1x10 ⁵	0.3x10 ⁷	0.37	1.10	4.2x10 ⁵	3.8x10 ⁷	0.51	1.37
Str. thermophilus	2.9x10 ⁶	3.1x10 ⁸	0.49	1.19	0.3x10 ⁷	7.4x10 ⁸	0.70	1.39

¹ : soy milk fermented with mycelial mushroom and B. megaterium.

즉, 두유는 우유에 비하여 유산균 증식이 어려운 조건으로 우유에 비하여 두유에 부족한 필수 아미노산인 methionine 0.1%(w/v)를 가열살균하지 않고 무균 여과하여 첨가하거나, 시유 및 탈지분유를 각각 2%(w/v)첨가하여 후발효차 3% 농도로 첨가한 콩요구르트의 유산균 생육 및 적정산도를 조사한 결과는 **Table 3.4.2**와 같다. Table에 나타낸 바와 같이 methionine, 시유 및 탈지분류는 대조구에 비하여 유산균 생육촉진과 산도증가에 효과적이었으며, 시유보다는 탈지분유가 약간 생육촉진과 산도 증가에 효과적이었다.

다. 곡류첨가가 후발효차 콩요구르트의 유산균 생육과 산생성에 미치는 영향

후발효차 3% 농도로 첨가한 발효두유에 쌀, 보리, 밀의 당화액 2%(w/w)를 첨가하여 유산균 발효시킨 콩요구르트 중 유산균수와 적정산도는 **Table 3.4.3**과 같다. Table에 나타낸 바와 같이 곡류 당화액을 첨가한 후발효차 콩요구르트에서 곡류 당화액을 2%농도로 첨가하는 콩요구르트에서 유산균 증식과 산도 증가가 높았다. 곡류 당

화액이 대조구에 비하여 유산균 생육이 촉진되었고, 곡류 당화액은 밀 > 쌀 > 보리 순으로 효과적이었다. 그리고 유산균의 혼합 균종에 따른 콩요구르트의 유산균 생육 촉진과 산도 증가는 비슷하거나 큰 차이가 없었다.

Table 3.4.2 Effect of L-methionine, milk and skim milk on growth and acid production of some lactic acid bacteria in fermented soy milk supplemented with water extract of fermented tea (3%, v/v)

Lactic acid bacteria	Control ¹		L-Methionine		Milk		Skim milk	
	Growth	Acidity	Growth	Acidity	Growth	Acidity	Growth	Acidity
Lac. acidophilus	0.9x10 ⁹	1.41	1.4x10 ⁹	1.53	1.2x10 ⁹	1.49	1.6x10 ⁹	1.59
Lac. casei	5.7x10 ⁸	1.34	6.3x10 ⁸	1.47	6.0x10 ⁸	1.36	6.8x10 ⁸	1.49
Lac. bulgaricus	6.7x10 ⁶	1.29	7.6x10 ⁶	1.34	7.3x10 ⁶	1.29	7.9x10 ⁹	1.38
Str. lactis	3.8x10 ⁷	1.37	4.1x10 ⁷	1.41	4.0x10 ⁷	1.36	4.2x10 ⁷	1.43
Str. thermophilus	7.4x10 ⁸	1.39	7.9x10 ⁸	1.47	7.5x10 ⁸	1.41	8.2x10 ⁸	1.50

¹ Fermented soy milk

라. 곡류 첨가가 후발효차 콩요구르트의 점도에 미치는 영향

후발효차 3% 농도로 첨가한 발효두유에 쌀, 보리 및 밀을 첨가하여 발효시킨 콩요구르트의 점도를 정한 결과는 **Table 3.4.5**와 같다. Table에 나타난 바와 같이 후발효차 추출물 3%가 함유된 콩요구르트에서 곡류 첨가는 대조구에 비하여 점도를 증진시켰으며, 밀과 쌀 당화액은 증가되었다. 그러나 유산균의 혼합 균종에 따른 콩요구르트의 물리적 특징에는 큰 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 3.4.3 Effect of rice, barley and wheat on growth and acid production of some lactic acid bacteria in fermented soy milk supplemented with water extract of fermented tea (3%, v/v)

Lactic acid bacteria	Control ¹		Rice		Barley		Wheat	
	Growth	Acidity	Growth	Acidity	Growth	Acidity	Growth	Acidity
Str. thermophilus	8.2x10 ⁸	1.50	8.5x10 ⁸	1.55	8.4x10 ⁸	1.49	0.8x10 ⁹	1.56
Lac. casei	6.8x10 ⁸	1.49	7.2x10 ⁸	1.52	7.5x10 ⁸	1.46	8.5x10 ⁸	1.54
Lac. acidophilus	1.6x10 ⁹	1.59	2.1x10 ⁹	1.62	1.9x10 ⁹	1.54	2.5x10 ⁹	1.69
ST + LC	1.3x10 ⁹	1.47	1.6x10 ⁹	1.42	1.5x10 ⁹	1.52	1.8x10 ⁹	1.57
ST + LC + LA	7.4x10 ⁹	1.58	7.9x10 ⁹	1.60	7.8x10 ⁹	1.48	8.5x10 ⁹	1.64

¹ Fermented soy milk + skim milk

Table 3.4.5 Effect of rice, barley and wheat on apparent viscosity of fermented soy milk supplemented with water extract of fermented tea (3%, v/v)

Lactic acid bacteria	Control	Rice	Barley	Wheat
Str. thermophilus	12.24	14.87	11.32	15.38
Lac. casei	10.28	12.59	10.73	13.24
Lac. acidophilus	12.58	13.03	11.30	14.51
ST + LC	11.87	13.42	10.43	13.89
ST + LC + LA	12.37	14.12	11.18	14.57

마. 안정제 첨가에 의한 콩요구르트의 유산균 종류별 침전도 유무시험

후발효차 3% 농도로 첨가한 콩요구르트의 유산균 종류별 침전도 유무를 CMC와 PGA 안정제 각 농도별(0.2, 0.4, 0.6%)로 조사한 결과는 **Table 3.4.6**과 같다. Table에 나타낸 바와 같이 안정제를 각 농도별로 첨가한 콩요구르트에서 농도가 증가할수록 유청 분리량은 감소되었으며, CMC 보다는 PGA가 다소 유청분리 억제에 효과적이었다. 그리고 2종의 혼합 유산균(Str. thermophilus, Lac. casei)보다는 3종의 유산균 혼합(Str. thermophilus, Lac. casei, Lac. acidophilus)균종이 유청분리 억제에서 약간 효과적이었으며, 단일 균종에서는 Lac. casei > Str. thermophilus > Lac. acidophilus 순으로 나타났다.

Table 3.4.6 Effect of CMC and PGA on syneresis of fermented soy milk supplemented with water extract of fermented tea (3%, v/v)

Lactic acid bacteria	Control	CMC(% , w/w)			PGA(% , w/w)		
		0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6
Str. thermophilus	13.2	11.3	10.4	9.3	10.8	8.7	8.2
Lac. casei	12.9	10.7	10.2	8.4	9.2	8.4	7.2
Lac. acidophilus	14.2	12.4	11.3	10.2	11.4	10.6	9.7
ST + LC	13.4	12.2	11.3	10.8	10.9	10.2	9.3
ST + LC + LA	12.6	10.9	10.2	8.7	9.4	8.3	7.9

ST : Str. thermophilus, LC : Lac. casei, LA : Lac. acidophilus

CMC : Na-carboxy methyl cellulose, PGA : propylene glycol alginate

바. 후발효차가 첨가된 콩요구르트에서 유산균 종류별 물리적 특성

후발효차 3% 농도로 첨가한 콩요구르트의 물리적 특성을 평가한 결과는 **Table 3.4.7**과 같다. Table에 나타낸 바와 같이 후발효차 추출물을 3%농도로 첨가한 콩요구르트에서 단일균종에서는 Str. thermophilus, Lac. acidophilus가 대체적인 대두유 유산

균 발효에서 양호하였다. 그리고 2종의 혼합 유산균(Str. thermophilus, Lac. casei)보다는 3종의 유산균 혼합(Str. thermophilus, Lac. casei, Lac. acidophilus)균종이 hardness, adhesiveness 및 gumminess에서 약간 높았으며, cohesiveness에서는 약간 낮은 경향이였다.

Table 3.4.7 Changes on instrumental measures of soy milk supplemented with extract of fermented tea

Lactic acid bacteria	Hardness	Adhesiveness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess
Str. thermophilus	23.426	-7.212	0.798	0.623	19.73
Lac. casei	19.276	-8.418	0.812	0.569	16.13
Lac. acidophilus	20.038	-6.668	0.805	0.672	17.09
ST + LC	21.184	-7.760	0.832	0.587	15.46
ST + LC +LA	22.483	-6.967	0.840	0.635	18.34

ST : Str. thermophilus, LC : Lac. casei, LA : Lac. acidophilus

사. 후발효차 추출물의 농도별로 첨가된 두유에서 유산균 발효특성

후발효차 0-8% 농도로 첨가한 콩요구르트의 유산균 증식도, pH 및 적정산도를 측정한 결과는 Table 3.4.8과 같다. Table에 나타낸 바와 같이 후발효차 추출물을 농도별로 첨가한 콩요구르트에서 후발효차 추출물 농도가 증가하므로써 약간씩 유산균 생육이 억제되었으며, 그에 따른 pH 및 적정산도가 동일한 패턴으로 증감하였다. 2종의 혼합 유산균(Str. thermophilus, Lac. casei)보다는 3종의 유산균 혼합(Str. thermophilus, Lac. casei, Lac. acidophilus)이 약간 산도가 높았는데, 이는 유산증식이 빠른 Lac. acidophilus 증식에 의한 것으로 판단된다.

Table 3.4.8 Effect of extract concentration of fermented tea on growth of lactic acid bacteria and acidity of soy milk

Lactic acid bacteria	Fermented tea(extract %)	Growth	pH	Titratable Acidity
ST + LC	0	2.3x10 ⁹	4.23	1.03
	2	1.2x10 ⁹	4.28	0.98
	4	4.4x10 ⁸	4.31	0.82
	6	3.8x10 ⁷	4.45	0.79
	8	7.1x10 ⁶	4.76	0.73
ST + LC +LA	0	2.7x10 ⁹	4.19	1.37
	2	1.9x10 ⁹	4.22	1.21
	4	3.2x10 ⁸	4.29	1.06
	6	2.4x10 ⁸	4.35	0.92
	8	5.1x10 ⁷	4.47	0.83

ST : Str. thermophilus, LC : Lac. casei, LA : Lac. acidophilus

아. 후발효차 추출물의 농도별 첨가된 콩요구르트에서 색도변화

후발효차 0-8% 농도로 첨가한 콩요구르트의 색차계 색도의 변화를 측정한 결과는 Table 3.4.9와 같다. Table에 나타난 바와 같이 후발효차 추출물을 농도별로 첨가한 콩요구르트에서 색차계 색도 중에 명도(L)는 76 ~ 59범위로서 농도가 증가할수록 낮아지는 경향이있으며, 적색도(a)는 -2.3 ~ -1.1를 나타내었는데 후발효차의 고유색소로 인하여 점진적으로 증가하였다, 황색도(b)는 +8.3 ~ 9.8범위로 후발효차 첨가물 농도가 증가할수록 점진적으로 증가하였다. 그러나 유산균의 혼합 균종에 따른 콩요구르트의 관능평가는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 3.4.9 Changes on Hunter color index of soy milk supplemented with extract of fermented tea

Lactic acid bacteria	Fermented tea (%w/w)	L	a	b
ST + LC	0	76.12	-2.31	8.43
	2	72.34	-2.06	8.98
	4	71.21	-1.75	9.14
	6	69.27	-1.26	9.38
	8	59.43	-1.03	9.85
ST + LC +LA	0	76.68	-2.38	8.32
	2	75.02	-1.92	8.76
	4	73.38	-1.75	8.98
	6	67.44	-1.39	9.32
	8	60.25	-1.12	9.54

ST : Str. thermophilus, LC : Lac. casei, LA : Lac. acidophilus

자. 후발효차 추출물의 농도별 첨가된 콩요구르트에서 관능평가

후발효차 0-8% 농도로 첨가한 콩요구르트의 색, 향기, 맛, 전체적인 기호도를 관능평가한 결과는 Table 3.4.10과 같다. Table에 나타낸 바와 같이 후발효차 추출물을 농도별로 첨가한 콩요구르트에서 4% 농도가 전체적인 기호도에서 우수하였다. 그러나 유산균의 혼합 균종에 따른 콩요구르트의 관능평가는 Str. thermophilus, Lac. casei, Lac. acidophilus의 3가지 균종 혼합발효가 약간 양호하였으나 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 3.4.10 Changes on sensory evaluation of soy milk supplemented with extract of fermented tea

Lactic acid bacteria	Fermented tea (extract %)	Color	Odor	Taste	After taste	Overall Acceptability
ST + LC	0	6.45	7.80	5.67	6.59	6.62
	2	6.12	8.12	6.87	7.14	7.63
	4	5.82	8.96	6.81	7.27	7.76
	6	5.43	8.79	6.23	6.72	6.42
	8	4.87	7.23	5.76	6.13	5.65
ST + LC +LA	0	6.49	7.84	5.61	7.04	6.68
	2	6.23	8.32	6.79	7.46	7.89
	4	5.98	8.98	5.48	6.89	7.93
	6	5.55	8.78	5.12	6.21	6.72
	8	5.16	8.31	4.23	5.98	5.43

ST : Str. thermophilus, LC : Lac. casei, LA : Lac. acidophilus

제 5 절 후발효차 추출물과 발효원액을 이용한 액상, 고상제품 제조공정 개발

1. 재료 및 방법

가. 추출용매별에 따른 후발효차 추출액의 품질평가

1) 열수 추출액의 조제

후발효차의 열수추출 최적 조건을 파악하기 위하여 후발효차 500g에 증류수 500mL를 넣고 100℃에서 환류 추출장치를 이용하여 획득한 추출액 중의 가용성 고형물, 색차계 색도, 투과도 및 유리당 함량을 조사하였다.

2) 에탄올 추출액의 조제

후발효차와 에탄올 농도를 1 : 1 비율로 하여 환류 추출하고 가아제로 1차 여과하고, 2차로 원심분리를 시켜서 획득한 추출액 중의 가용성 고형물, 색차계 색도, 투과도 및 유리당 함량을 조사하였다.

3) 분석항목

가) 색도 : 색차계(Chromameter, Model CR-200, CT-210, Minolta Co., Japan)로 명도(L값), 적색도(a값), 황색도(b값)를 각각 측정하였다.

나) 탁도 : 탁도는 660 nm에서 투과도로 측정하였다.

다) 당도 : 당도는 휴대용 굴절 당도계를 이용하였다

라) pH 및 산도 : pH는 시료 10 g을 취하여 직접 pH meter(Orion, model 720A)로 측정하였으며, 적정산도는 시료 10 g에 CO₂를 구축한 증류수 40 mL를 가하여 교반하면서 0.1N NaOH용액으로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하여 소비된 mL 수를 적정산도로 표시하였다

마) 관능검사 : 관능검사는 5명의 관능검사요원을 선정하여 맛, 색, 향, 선호도 등을 5점 기호도법으로 측정하였다.

나. 후발효차의 떫은맛 개선을 위한 식품소재의 선정

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

다. 후발효차의 추출법

후발효차의 추출은 정제수를 이용하여 온도 80~85℃에서 1~2차는 10배, 3~4차는 5배로 추출한 후 농축물(수분함량 31.5%)로 제조하여 사용하였다.

라. 후발효차 추출액의 사용 농도

후발효차의 extract를 일일권장량에 근거하여 1% 수용액으로 제조하여 사용하였다.

마. 관능평가

관능평가는 5점 기호도법으로 실시하였으며, 신맛, 단맛, 떫은맛, 종합적인 기호도로 구분하여 조사하였다.

바. 후발효차와 유사한 드링크 음료의 품질특성 및 마케팅조사

후발효차와 유사한 시판 드링크 제품을 구입하여 pH, 당도, 맛 등의 품질특성 및 마케팅 조사를 실시하였다.

사. 후발효차 제품개발의 방향 선정

후발효차를 이용한 액상 및 고형제품의 품질특성을 예측하고, 마케팅 조사와 음료 시장의 동향을 토대로 개발제품의 방향을 선정하였다.

아. 후발효차 액상제품의 배합성분 및 그 비율의 선정

후발효차 추출물을 이용하여 청량감과 기능성을 갖는 배합성분을 선발하였고, 그 배합비율을 달리하여 다양한 시제품을 제조하였으며, 순위시험법으로 통한 관능평가를 실시하여 양호한 1차 시제품을 선정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 후발효차 추출액의 추출용매에 따른 품질특성

1) 후발효차의 추출시간별 물추출물의 고형분 함량

후발효차의 추출온도 80~85℃에서 1, 3, 5, 7, 9, 11시간 동안 추출하여 후발효차 물추출물의 고형분 함량은 **Table 3.5.1**과 같다. 표에 나타난 바와 같이 물추출물의 1차 고형분은 추출시간이 경과할수록 높아지는데, 2.54~8.21% 함량을 나타내었으며 그 중에서 7시간 이후에서 많은 함량을 나타내었다. 한편 물추출물의 2차 고형분도 비슷한 추출 시간대로 나타났으나 1차 고형물의 10% 범위를 유지하였는데, 대체로 후발효차의 물추출 과정에서는 7시간내외로 추출하는 것이 적합하였으며, 3차 고형분은 전체 고형물 함량에 비하여 그 함량에서 미미하여 2차로 추출만으로도 수율면에서는 적합하였다.

Table 3.5.1 Solid content of water extract of microbial fermented tea by extracting time (%)

Extracting time (hr)	1st	2nd	3rd
1	2.54±0.23	0.14±0.08	-
3	3.32±0.18	0.22±0.11	Tr
5	5.22±0.30	0.44±0.09	Tr
7	7.86±0.12	0.68±0.07	0.08±0.01
9	8.09±0.22	0.84±0.10	0.09±0.02
11	8.21±0.36	0.91±0.08	0.11±0.01

2) 후발효차의 추출시간별 물추출물의 색차계 색도

후발효차의 추출온도 80~85℃에서 1, 3, 5, 7, 9, 11시간 동안 추출하여 후발효차 물추출물의 색차계 색도 **Table 3.5.2**와 같다. 표에 나타난 바와 같이 후발효차 물추출물의 색차계 색도는 L(명도)는 경시적으로 약간 차이가 나타났으나, a(적색도)와 b(황

색도)는 추출시간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었으며, 적색도가 그 변화 폭은 약간 크게 증가하였다.

Table 3.5.2 Change in Hunter color index of microbial fermented tea by extracting time

Extracting time (hr)	Hunter color index		
	L	a	b
1	43.18±0.41	3.76±0.01	2.43±0.06
3	42.19±0.26	3.79±0.08	2.39±0.11
5	42.08±0.31	3.81±0.04	2.63±0.15
7	41.58±0.18	4.23±0.06	2.75±0.09
9	40.12±0.32	4.51±0.07	2.88±0.10
11	39.33±0.09	4.77±0.02	2.92±0.08

3) 후발효차의 추출시간별 물추출물의 탁도

후발효차의 추출온도 80~85℃에서 1, 3, 5, 7, 9, 11시간 동안 추출하여 후발효차 물추출물의 탁도 **Table 3.5.3**과 같다. 표에 나타난 바와 같이 물추출물의 1차 탁도는 추출시간이 길수록 높아지면서 3시간 때부터 급속하게 높아지는 경향이었으며, 5시간 이후로는 큰 변화가 없었다. 2차 탁도는 1차 탁도의 40~50%로 감소하는 경향이었으며, 3차 추출과정에서 물추출물의 탁도는 거의 적은 수치를 나타내었다.

4) 후발효차의 추출시간별 물추출물의 총당

후발효차의 추출온도 80~85℃에서 1, 3, 5, 7, 9, 11시간 동안 추출하여 후발효차 물추출물의 총당 함량은 **Table 3.5.4**와 같다. 표에 나타난 바와 같이 후발효차 물추출물의 1차 당도는 추출시간이 시간 길수록 높아지는 경향이었으며, 추출시간에 비례적으로 증가하다가 12 시간이후부터 크게 증가하지는 않았다. 추출물 중의 2차 총당 함량은 1차 추출물의 1/6~1/7 정도 범위를 나타내었으며, 다른 유기성분에 비하여 조금 빠르게 추출되는 경향이었으며 추출물의 3차 총당은 아주 적은 양으로 나타났다.

Table 3.5.3 Change in turbidity of water extract of microbial fermented tea by extracting time (OD, 660nm)

Extracting time (hr)	1st	2nd	3rd
1	0.04±0.01	0.01±0.005	-
3	0.07±0.01	0.03±0.004	-
5	0.15±0.02	0.08±0.005	0.01±0.001
7	0.17±0.02	0.10±0.008	0.02±0.002
9	0.18±0.01	0.11±0.003	0.02±0.003
11	0.18±0.03	0.10±0.005	0.03±0.001

5) 후발효차의 추출시간별 물추출물의 관능검사

후발효차의 추출온도 80~85℃에서 1, 3, 5, 7, 9, 11시간 동안 추출하여 후발효차 물추출물의 관능검사는 **Table 3.5.5**와 같다. 표에 나타난 바와 같이 물추출물의 관능검사는 색깔, 신맛, 단맛, 쓴맛, 이상취에서는 대체로 5~7시간이 높게 나타났으나, 종합적인 맛에서는 3시간이 가장 높게 나타났다. 그러나 최종 음료제조에서는 이미와 이상취의 억압을 위하여 식품첨가물의 보강에 의한 조미공정이 있으므로 5~7시간의 조건에서 추출이 적합할 것으로 생각된다.

Table 3.5.4 Change in total sugar of water extract of microbial fermented tea by extracting time (%)

Extracting time (hr)	1st	2nd	3rd
1	1.48±0.12	0.24±0.07	-
3	2.22±0.14	0.31±0.08	0.03±0.001
5	2.56±0.09	0.42±0.05	0.09±0.002
7	3.37±0.21	0.54±0.11	0.11±0.003
9	3.43±0.19	0.58±0.08	0.13±0.002
11	3.49±0.14	0.61±0.06	0.18±0.003

Table 3.5.5 Change in sensory score of water extract of microbial fermented tea by extracting time

Sensory score	Extracting time (hr)					
	1	3	5	7	9	11
Color *	2.8±0.6	3.9±0.5	4.6±0.7	4.5±0.4	4.2±0.7	4.1±0.5
Sour**	1.7±0.2	1.9±0.1	2.1±0.1	2.3±0.3	2.6±0.2	2.4±0.4
Sweet**	2.9±0.3	2.5±0.4	2.1±0.3	1.7±0.4	1.5±0.3	1.4±0.2
Bitter*	1.8±0.3	2.4±0.4	3.4±0.5	3.4±0.6	3.5±0.3	3.8±0.4
Odor**	2.5±0.3	2.6±0.3	2.9±0.3	3.1±0.4	3.6±0.5	3.7±0.2
Overall acceptability*	3.7±0.4	4.2±0.3	3.4±0.2	2.9±0.4	2.7±0.2	2.6±0.6

*(acceptability), **(intensity)

6) 후발효차의 추출시간별 에탄올 추출물의 고형분 함량

추출온도 80~85℃의 에탄올 40, 60, 80% 농도에서 후발효차를 1, 2, 3, 4시간 동안 추출한 후발효차 에탄올 추출물의 고형분 함량은 **Table 3.5.6**과 같다. 표에 나타난 바와 같이 에탄올 추출물의 고형분 함량은 40, 60 및 80%의 에탄올 용액순서로 고형분 함량이 높게 나타났다.

Table 3.5.6 Solid content of ethanol extract of microbial fermented tea by extracting time (%)

Extracting time (hr)	Ethanol conc. (%)		
	40%	60%	80%
1	1.54±0.12	1.24±0.04	1.08±0.03
2	2.32±0.14	1.32±0.07	1.17±0.06
3	3.22±0.23	2.44±0.05	2.23±0.05
4	4.86±0.19	3.45±0.08	3.34±0.02

7) 후발효차의 추출시간별 에탄올 추출물의 색차계 색도

후발효차의 추출용매로서 80~85℃의 에탄올 40, 60, 80% 농도에서 후발효차를 1, 2, 3, 4시간 동안 추출한 후발효차 에탄올 추출물의 고형분 함량은 **Table 3.5.7**과 같다. 표에 나타난 바와 같이 후발효차 물추출물의 색차계 색도는 L(명도)는 경시적으로 약간 감소하게 나타났으나, a(적색도)와 b(황색도)는 추출시간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었으며, 2 가지 색소는 물추출물에 비하여 상대적으로 단위 시간당 색소 추출율은 많았고, 특히 적색도가 그 변화 폭은 약간 크게 증가하였다.

Table 3.5.7 Change in Hunter color index of ethanol extract of microbial fermented tea by extracting time

Extracting time (hr)	Hunter color index		
	L	a	b
1	36.15±0.21	2.41±0.08	2.78±0.11
2	35.12±0.22	3.35±0.04	3.31±0.09
3	34.23±0.24	4.67±0.07	3.38±0.14
4	33.48±0.31	5.79±0.06	3.45±0.21

8) 후발효차의 추출시간별 에탄올 추출물의 탁도

후발효차의 추출용매로서 80~85℃의 에탄올 40, 60, 80% 농도에서 후발효차를 1, 2, 3, 4시간 동안 추출한 후발효차 에탄올 추출물의 고형분 함량은 **Table 3.5.8**과 같다. 표에 나타난 바와 같이 에탄올 추출물의 1차 탁도는 추출시간이 길수록 높아지면서 3시간 때부터 높아지는 경향이었으며, 그 이후로는 큰 변화가 없었다. 물추출물에 비하여 아주 낮은 탁도를 나타내었는데, 이는 유기용매로 인한 펙틴 등의 고분자 화합물의 침전 혹은 응고로 추출액중의 청징화에 영향을 받기때문으로 판단된다. 2차 탁도는 1차 탁도에 비하여 아주 낮은 값으로 그 감소하는 경향이었으며, 3차 추출과정에서 에탄올 추출물의 탁도는 거의 전무한 수치를 나타내었다.

Table 3.5.8 Change in turbidity of ethanol extract of microbial fermented tea by extracting time (OD, 660nm)

Extracting time (hr)	1st	2nd	3rd
1	0.02±0.001	0.01±0.002	-
2	0.04±0.001	0.02±0.003	-
3	0.13±0.002	0.02±0.001	-
4	0.16±0.001	0.03±0.006	0.01±0.002

9) 후발효차의 추출시간별 에탄올 추출물의 총당

후발효차의 추출용매로서 80~85℃의 에탄올 40, 60, 80% 농도에서 후발효차를 1, 2, 3, 4시간 동안 추출한 후발효차 에탄올 추출물의 총당의 함량은 **Table 3.5.9**와 같다. 표에 나타난 바와 같이 후발효차 에탄올 추출물의 1차 당도는 물 추출물과 동일하게 추출시간이 시간 길수록 높아지는 경향이었으며, 추출시간에 비례적으로 증가하다가 3 시간이후부터 크게 증가하지는 않았다. 추출물 중의 2차 총당 함량은 1차 추출물의 10~20% 정도 범위를 낮은 함량을 나타내었으며, 물추출물에 비하여 비하여 조금 늦게 추출되는 경향이었으며, 에탄올 추출물의 3차 총당은 물추출물보다 아주 적은 양으로 나타났다.

Table 3.5.9 Change in total sugar of water extract of microbial fermented tea by extracting time (%)

Extracting time (hr)	1st	2nd	3rd
1	1.24±0.09	0.18±0.05	0.01±0.001
2	1.58±0.11	0.23±0.04	0.03±0.004
3	2.26±0.15	0.37±0.06	0.07±0.002
4	2.39±0.22	0.41±0.09	0.11±0.003

나. 첨가물에 의한 후발효차 추출물의 맛 개선

1) 당류 첨가에 의한 품질개선

후발효차 추출물을 일일권장량 기준으로 하여 제조된 1% 수용액에 정백당 및 과당을 0~20%까지 농도 별로 첨가하여 신맛, 떫은맛, 단맛, 전체적인 기호도를 조사한 결과는 **Table 3.5.10**과 같다. 당류의 농도가 상승함에 따라 신맛, 쓴맛, 단맛이 종합적인 관능적 면에서 품질이 개선되었는데, 전체적인 기호면에서는 10% 농도가 가장 양호하게 나타났다. 과당이 정백당보다 다소 맛을 개선시킬 수 있었다.

Table 3.5.10 Sensory evaluation of extract of microbial fermented tea according to addition of sugar

Conc.(%)	Refined sugar				Fructose			
	Sour	Bitter	Sweet	Overall accep.*	Sour	Bitter	Sweet	Overall accep.*
None	2.2±0.6	3.5±0.4	1.7±0.2	2.8±0.3	2.2±0.4	3.5±0.2	1.7±0.1	2.8±0.4
5	1.9±0.3	3.2±0.8	2.1±0.7	3.7±0.2	1.8±0.2	3.0±0.4	2.3±0.3	3.8±0.7
10	1.5±0.4	2.7±0.3	3.3±0.1	4.2±0.5	1.3±0.4	2.5±0.2	3.5±0.2	4.3±0.2
15	1.3±0.2	2.5±0.3	3.6±0.3	3.9±0.6	1.1±0.3	2.1±0.6	3.8±0.5	4.0±0.4
20	1.1±0.2	2.3±0.5	3.8±0.2	3.7±0.7	1.0±0.6	2.0±0.3	4.2±0.7	3.9±0.9

*(acceptability), the others(intensity)

정백당과 과당의 농도비를 일정하게 조절한 10% 당류액을 후발효차 추출액에 첨가하여 관능평가를 실시한 결과는 **Table 3.5.11**과 같다. 표에 나타난 바와 같이 정백당 : 과당을 비슷한 농도로 첨가하면 약간의 관능지수가 상승되는 효과가 있었다.

Table 3.5.11 Sensory evaluation of extract of microbial fermented tea according to ratio of refined sugar to fructose

Ratio(10%)		Sour	Bitter	Sweet	Overall* accep.
None		2.2±0.5	3.5±0.5	1.7±0.5	2.8±0.5
2**	8***	1.5±0.5	2.6±0.5	3.5±0.5	4.1±0.5
4	6	1.2±0.5	2.2±0.5	3.7±0.5	4.7±0.5
6	4	1.0±0.5	2.0±0.5	3.4±0.5	4.2±0.5
8	2	1.1±0.5	2.0±0.5	3.4±0.5	4.0±0.5

*(acceptability), the others(intensity)

** refined sugar(left) / *** fructose(right)

2) 기능성 소재 첨가에 의한 품질개선

스위트메이트 및 β-사이크로덱스트린을 0~2.0%까지 농도 별로 첨가하여 신맛, 쓴맛, 단맛 및 종합적인 기호도를 조사한 결과는 **Table 3.5.12**와 같다. 이들 기능성 소재의 농도가 증가함에 따라 신맛 및 쓴맛이 관능적으로 일부 개선되었으나, 정백당 및 과당을 포함한 단맛이 강한 당류를 첨가한 것보다는 기호적 면에서 약간 감소하는 경향이었다. 그러나 이상과 같은 2 가지의 기능성 소재는 이미, 이취 등의 맛을 개선시켜 주는 것으로 나타나서 액상제품을 개발할 때에 스위트메이트 소재를 소량 첨가하면 품질을 향상시키는데 도움을 줄 것 같다.

Table 3.5.12 Sensory evaluation of extract of microbial fermented tea according to concentration of cyclodextrin and sweetmate

Conc.(%)	Cyclodextrin				Sweetmate			
	Sour	Bitter	Sweet	Overall* accep.	Sour	Bitter	Sweet	Overall* accep.
None	2.2±0.5	3.5±0.5	1.7±0.5	2.8±0.5	2.2±0.5	3.5±0.5	1.7±0.5	2.8±0.5
0.5	2.0±0.5	3.3±0.5	1.8±0.5	2.8±0.5	1.9±0.5	3.2±0.5	2.1±0.5	2.8±0.5
1.0	1.8±0.5	3.0±0.5	2.0±0.5	2.9±0.5	1.5±0.5	2.9±0.5	2.4±0.5	2.9±0.5
1.5	1.7±0.5	2.7±0.5	2.1±0.5	3.1±0.5	1.4±0.5	2.3±0.5	2.8±0.5	3.1±0.5
2.0	1.5±0.5	2.7±0.5	2.2±0.5	3.3±0.5	1.3±0.5	2.3±0.5	3.3±0.5	3.2±0.5

3) Masking flavor 첨가에 의한 품질개선

Masking flavor 4종을 0~0.14% 농도로 조절하여 첨가한 후, 후발효차 추출액의 쓴맛을 조사한 결과는 **Table 3.5.13**과 같다. 향료의 농도가 증가함에 따라 후발효차 추출액의 쓴맛이 약간 개선되었으나, 향 종류에 따라 큰 차이는 나타나지 않았고, 대체로 M.S 1998-0-68, M.S, SH-1030, M.S SF-474A, M.S 1998-0-68 순으로 효과적이었다.

Table 3.5.13 Sensory evaluation of extract of microbial fermented tea according to concentration of masking flavor

Conc.(%)	M.S, SF-474A	M.S, SH-1030	M.S, 1998-0-68	M.S, 1998-0-69
None	3.5±0.5	3.5±0.5	3.5±0.5	3.5±0.5
0.06	3.5±0.5	3.5±0.5	3.4±0.5	3.5±0.5
0.08	3.5±0.5	3.3±0.5	3.2±0.5	3.4±0.5
0.10	3.3±0.5	3.2±0.5	3.0±0.5	3.4±0.5
0.12	3.2±0.5	2.9±0.5	2.6±0.5	3.2±0.5
0.14	2.9±0.5	2.6±0.5	2.4±0.5	3.1±0.5

Sensory score(intensity)

다. 후발효 추출물을 이용한 액상제품의 제조공정 및 제품개발

1) 국내음료의 품질특성 조사

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

2) 후발효차와 유사한 음료제품의 품질특성 및 자료 조사

후발효차와 유사한 음료제품으로서 그 경쟁이 예측되는 대표적인 녹차, 홍차, 등글레차의 3종 제품을 구입하여 품질특성을 조사하였다(Table 3.5.14). 최근 판매량이 점진적으로 신장되고 있는 제품은 녹차였으며, 다음으로는 홍차나 등글레차의 순이었다. 이들 제품들을 음용하는 연령층의 나이는 대체로 30~40대 사람이 많았고, 다음으로는 50대였으며, 20대의 비율은 가장 낮았다.

Table 3.5.14 Composition of tea drink in domestic market

Green tea drink of (A) company			Green tea drink of (B) company		
Ingredient	Content		Ingredient	Content	
Ext. of green tea	99.93%	Solid 0.15%	Ext. of green tea	99.91%	Solid 0.16%
Vitamin C	0.05%		Vitamin C	0.04%	
Sodium bicarbonate	0.02%		Sodium bicarbonate	0.03%	
			L-Ascorbic acid	0.02%	

Oolong tea drink of (C) company			Doonglae tea drink of (D) company		
Ingredient	Content		Ingredient	Content	
Oolong extract	17%	Solid 1.2%	Doonglae extract	99.965%	Solid 0.2%
Vitamin C	0.014%		Vitamin C	0.025%	
Sodium bicarbonate	0.021%		Sodium bicarbonate	0.01%	
Purified water	82.965%				

Black tea drink of (F) company				
Ingredient	Content	Ingredient	Content	
Liquefied fructose	5.4%	Vitamin C	0.01%	Solid 0.2%
Refined sugar	3%	Sodium bicarbonate	0.04%	
Pear juice	10%	Black tea aroma	0.14%	
Black tea powder	0.105%	Lemon aroma	0.02%	
Citric acid	0.18%	Purified water	82.105%	

라. 후발효차 추출물 액상제품의 개발 방향

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

마. 후발효차 추출물을 이용한 음료제품의 배합성분 및 비율 선정

후발효차의 추출물을 이용한 기능성 및 기호성이 우수한 음료를 제조하기 위하여, 감미제로서는 후발효차 고유의 약간 쓴맛을 감소시킬 수 있는 당류로서 과당 및 정백당을 선정하였고, 기능성 당으로서는 트레할로스(trehalose), 기능성 소재로서 피로회복과 뇌기능 활성화, 신진대사촉진의 기능이 있는 타우린(taurin), 지구력 증강과 긴사슬 지방산의 에너지대사 등에 효능이 있는 L-카르니틴(carnitine)을 사용하였다. 특히

한국, 일본, 중국을 포함한 동양인뿐만 아니라 서구인들에게서 건강기능성 식품소재중의 하나로 지속적으로 관심을 갖게 하는 녹차, 홍차와 같은 전통다류의 다양한 생기능적 효과에 깊은 관심을 갖고 있다. 이런 점으로부터 홍차와는 달리 제조공정에서 미생물 효소를 이용하는 후발효차의 기능성 음료화하기 위한 일환으로, 후발효 추출물과 각종 부재료를 이용하여 배합성분 및 그 배합비율을 교차적으로 달리하여 다양한 시제품을 제조한 다음, 순위시험법으로 관능평가를 실시하여 1차 시제품의 배합성분 및 그 비율을 **Table 3.5.15**와 같이 잠정적으로 결정하였으며, 앞으로 2차 연도 연구사업에서 지속적으로 진행하여서 외국인이나 신세대를 포함하는 젊은 세대 층의 사람들을 위한 “후발효차 기능성 음료”를 개발하고자 한다.

Table 3.5.15 Formulation of major components for preparing drink of microbial fermented tea

Components	Content of drink(g)	Remarks
Ext. of fermented tea	1.00	Moisture 32.8% Food additive
Maltodextrin	0.30	
Refined sugar	4.04	
Liquefied fructose	5.46	
Trehalose	0.20	
Taurine	0.10	
L-Carnitin	0.05	
Red powder	0.10	
Citric acid	0.30	
Vitamin C	0.02	
Sodium bicarbonate	0.01	
Aroma	0.05	Fermented tea
Purified water	88.37	
Total	100 mL	

사. 후발효차 추출물을 이용한 음료 액상제품의 제조공정 및 방법 설정

후발효차 추출물을 이용한 음료제품의 생산 및 상품화에 적합한 제조공정 및 방법은 다음 **Table 3.5.16**과 같이 설정하였다.

Table 3.5.16 Manufacturing process of drink of microbial fermented tea drink

Items	Process	Methods and conditions
Ext. of fermented tea	<pre> graph TD A[Micribial fermented tea] --> B[Washing] B --> C[Optimal Exctrct. condition] C --> D[Cooling] D --> E[1st Filter (Liquid)] E --> F[2nd Centrifuge (8,000rpm, 5°C, 20min)] F --> G[Supernatant] G --> H[Concentration(below 70°C)] H --> I[Condensed fermented tea] </pre>	<ul style="list-style-type: none"> - 이물질이 없는 후발효차를 정량하여 정제수로 세척한 후, 추출용기에 넣고 정제수를 1회 추출할 때에는 생약제 중량의 10배, 2, 3회에는 5배를 가하고, 80℃에서 5시간씩 3회 추출함. - 추출액을 모아서 냉각시키고, 원심 분리·여과하여 상징액을 수득하여 70℃이하에서 감압농축하여 수분함량이 32.8% 정도의 후발효차 농축액을 제조함.
Drink	<pre> graph TD A["(Con. Fermented tea) (Sugar)"] --> B[Dissolving] A --> C[Dissolving] B --> D[Mixing] C --> D D --> E["Centrifuge/Filtration (8,000rpm, 0~5°C, 20min)"] E --> F[Volume] F --> G["HTST(93°C, 15sec)"] G --> H[Filling] H --> I["Sterilization(80°C, 15min)"] I --> J[Packaging] J --> K[Inspection] K --> L[Products] </pre>	<ul style="list-style-type: none"> - 후발효 추출물, 비타민과 기능성소재 및 부형제 성분을 각각 용해하여 혼합한 후, 원심분리 및 필터 여과하여 상징액을 일정용량으로 조정함. - 추출액을 93℃에서 15초간 고온순간살균(HTST)한 다음, 100 mL 병에 담아서 capping하고, 80℃에서 15분간 후살균한 후, 포장하고 검사하여 최종제품으로 출하함.

제 6 절 후발효차 음료, 다류 시제품의 개발 및 품질특성

1. 재료 및 방법

가. 차류 및 연질캡슐 제품의 배합성분 및 비율선정

후발효차 extract의 고휘제품의 배합성분과 그 비율은 무수결정포도당, 전분, 유당 등과 같은 부형제를 농도별로 실험한 다음에 작업성과 물성 등을 고려하여 최종적으로 부형제의 성분을 선정하였고, 수분 27.8% 함유된 후발효차 extract에 연질캡슐 제품에 필요한 공기름, 팜유, 레시틴을 농도별로 첨가하여 작업성을 고려하여 주약과 기제의 배합비율을 먼저 선정하고, 젤라틴, 글리세린, 청색 1호, 황색 5호, 적색 40호의 성분을 농도별로 첨가하여 작업성과 물성 등을 충분히 검토한 후 최종배합성분 및 비율을 선정하였다

나. 차류 및 연질제품의 제조공정 및 방법설정

선정된 배합성분 및 비율, 작업적성, 관능적 특성 등을 종합하여 상품화에 적합한 제조공정 및 방법을 설정하였다.

다. 차류 및 연질제품의 특성조사

수용액상에서 용해성이 우수한 후발효차(수분 27.8%) 차류제품 제조의 원료로 선정된 배합성분 및 비율과 제조공정 및 방법에 따라 제조된 시제품에 대하여 차류제품의 특성을 조사하였으며, 소프트 캡슐의 제품으로 확정된 원료의 배합성분과 그 비율 및 제조공정에 따라 제조된 시제품으로서 Soft capsule제품의 특성을 조사하였다.

라. 각 제품의 품질안정성 조사

선정된 제품의 배합성분 및 비율과 제조공정 및 방법에 따라 제조된 시제품에 대하여 후발효차 extract의 함량, pH, 당도, 생균수, 대장균군, 붕해도, 용해도 등을 조사하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 차류제품의 배합성분 및 비율선정

후발효차 extract의 고형제품의 배합성분과 그 비율의 선정에서 후발효차 그 차류 제품 제조할 때에 이용될 수 있는 무수결정포도당, 전분, 유당 등과 같은 부형제를 농도별로 실험한 다음에 작업성과 물성 등을 고려하여 최종적으로 부형제의 성분을 선정하였다(Table 3.6.1). 또한 연질캡슐 제품의 개발할 때에 필요한 팜유, 레시친, 젤라틴 및 각종 색소 등을 종류별로 선정한 후 후발효차 extract의 일일 권장량 기준으로 배합성분을 설계하여 물성, 작업성 및 용해성 등을 고려하여 최종 배합성분 및 비율을 선정하였다. 후발효차 extract를 이용하여 차류제품 개발에 선정된 부형제로서 무수결정포도당, 전분, 유당 등을 농도별로 첨가하여 시제품을 제조한 결과 무수결정포도당이 가장 양호하였다. 유당 등은 후발효차 extract와 배합했을 때에 무수결정포도당보다 작업성 및 과립형성이 잘되지 않아 유당 등은 배제시키고, 전체 3g 중에 무수결정포도당을 농도별로 첨가했을 때에 물성, 작업성 및 관능적 면에서 2.13g이 양호하였고, stevioside 0.21 g, 구연산 0.03 g, 비타민 C 0.05g의 농도로 배합하여 시제품을 개발하였다.

Table 3.6.1 Formulation composition and contents granular tea product prepared from extract of fermented tea

Components	Contents(g)	Remarks
Extract of fermented tea	0.58	
Anhydrous glucose	2.13	Moisture content(27.8%)
Vitamin C	0.05	Food additive
Citric acid	0.03	
Stevioside	0.21	
Total	3.00	

나. 차류제품의 제조공정 및 방법설정

선정된 배합성분 및 비율, 작업적성, 관능적 특성 등을 종합하여 상품화에 적합한 제조공정 및 방법을 설정하였다. 차류제품의 대량생산 및 상품화에 적합한 제조공정

및 방법을 **Table 3.6.2**와 같이 설정하였다. 즉 무수결정포도당과 비타민 C를 먼저 칭량하여 후발효차 extract와 혼합 반죽기에 넣고 균일하게 배합한 후 역회전과립기로 Φ 1.2 mm로 사출시킨 후 건조기판에서 열풍건조기로 80℃에서 4시간 건조하였다(수분 1.5%이하). 다음으로 건조된 시료를 12~40 mesh 체를 이용하여 90%이상의 수율이 획득되고 3g을 알루미늄 봉지에 넣어 포장하여 제품으로 출하시킨다.

Table 3.6.2 Manufacturing procedure of granule tea product from extract of fermented tea

Items	Manufacturing procedure
Preparation of tea extract	The same procedure of fermented tea's drink
Mixture of tea extract & additives	<pre> graph TD TE[Tea ext.] --> W1[Weighing] AG[Anhyd. glucose] --> W2[Weighing] VC[Vit. C] --> W3[Weighing] W1 --- M1[Mixing] W2 --- M1 W3 --- M1 M1 --> GM[Granule Making] GM --> D[Drying(80℃)] D --> S[Seiving(12~40mesh)] S --> F[Filling] F --> P[Packaging(Al.)] P --> PR[Products] </pre>

다. 차류제품의 특성조사

수용액상에서 용해성이 우수한 후발효차(수분 27.8%) 차류제품 제조의 원료로

선정된 배합성분 및 비율과 제조공정 및 방법에 따라 제조된 시제품에 대하여 차류제품의 특성을 조사한 결과는 **Table 3.6.3**과 같다.

Table 3.6.3 Properties of granular tea product from extract of fermented tea

Items	Properties	Remarks
Extract of fermented tea	0.58g	Moisture 27.8%
Weight	3.0g	
Solubility	Good	
Flavor	Black tea aroma	
Type	Granular	
Color	Brighten Brown	
Viable cell count	0	
E. coli group	Negative	
Use & dose	3.0g at any time	

라. Soft capsule 제품의 배합성분 및 비율선정

수분 27.8% 함유된 후발효차 extract에 연질캡슐 제품에 필요한 콩기름, 팜유, 레시틴을 농도별로 첨가하여 작업성을 고려하여 주약과 기제의 배합비율을 먼저 선정하고, 젤라틴, 글리세린, 청색 1호, 황색 5호, 적색 40호의 성분을 농도별로 첨가하여 작업성과 물성 등을 충분히 검토한 후 최종배합성분 및 비율을 선정하였다(**Table 3.6.4**).

Table 3.6.4 Formulation of soft capsule products from extract of microbial fermented tea

Components	Contents(mg)	Remarks
Tea extract	350.52	Tea ext. moisture 27.8%
soybean oil	60.62	Food additive
Palm oil	150.48	
Lecitine(soybean)	38.37	
Total	600.12	Contents
(Coating material)		
Gelatin	163.0	
Glycerine	70.0	
Methyl paraben	0.325	
Propyl paraben	0.150	
Ethyl paraben	0.830	Food additives
Titanium dioxide	1.460	
Blue No. 1	0.045	
Yellow No. 5	0.030	
Red No. 40	0.620	
Subtotal	236.460	
Total	836.580	

마. Soft capsule 제품의 제조공정 및 방법설정

Soft capsule 제품제조사 작업성 및 물성 등을 충분히 검토하여 상품화에 적합한 제조공정 및 방법을 Fig. 3.6.1과 같이 설정하였다.

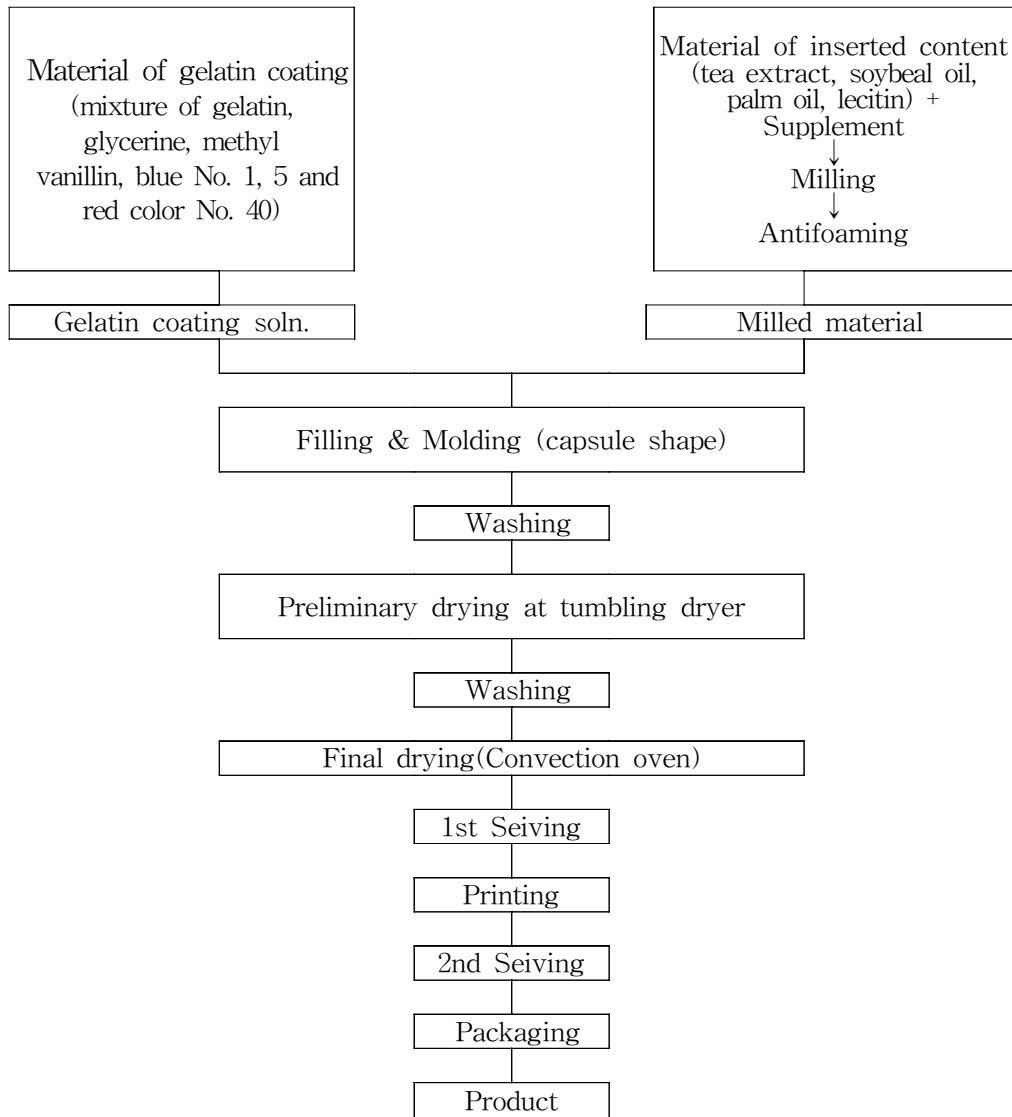


Fig. 3.6.1 Procedure of soft capsule product from extract of fermented tea.

바. Soft capsule 제품의 특성조사

최종적으로 소프트 캡슐의 제품으로 확정된 원료의 배합성분과 그 비율 및 제조공정에 따라 제조된 시제품으로서 Soft capsule제품의 특성을 조사한 결과는 **Table 3.6.5**와 같다.

Table 3.6.5 Properties of soft capsule product from extract of fermented tea

Items	Properties	Remarks
Tea extract	350.5 mg	Moisture 27.8%
Shape	Soft capsule	
Type	Oval	
Color	Chocolate	
Solubility	Below 20 minutes	
Weight	450 mg	
Use & dosage	3 cap at any time	
Viable cell counts	0	
E. coli group	Negative	

사. 각 제품의 품질안정성 조사

선정된 제품의 배합성분 및 비율과 제조공정 및 방법에 따라 제조된 시제품에 대하여 후발효차 extract의 함량, pH, 당도, 생균수, 대장균군, 붕해도, 용해도 등을 조사하였다. 후발효차 extract를 이용하여 제조된 1차년도 후발효차 음료의 드링크제품, 2차년도의 차류제품과 Soft capsule 제품에 대하여 장기저장에서 그 품질안정성 조사를 저온(5℃), 실온(15℃) 및 고온(35℃)에서 각각 6개월간 품질평가실에서 보관하면서 시제품의 색상, 향취미, 관능적 기호특성, 대장균군, 생균수, 붕해도 및 용해성 등을 조사한 결과, 모든 조사항목에서 12개월 까지 안정한 것으로 나타나고 있다.

결론적으로 후발효차의 농축 extract(수분 27.8%)를 이용하여 기호성이 있는 드링크 음료제품, 차류와 소프트 캡슐화시킨 제품의 기능성과 기호성을 동시에 부여한 건강 식품을 개발하였다. 복용의 편의성 부여한 음료제품과 휴대편의 및 고부가가치 제품

으로서는 차류와 Soft capsule 제품에 대해서 최종 배합성분 및 함량을 선정하였고, 후발효차의 향미를 가진 제품으로 상품화를 시키기 위해서 전체적인 제조공정 및 방법을 선정하였다. 각 시제품의 특성과 제품의 유통과정에서 발생될 수 있는 품질안정성을 조사하여 소비자의 욕구를 충족시키면서 우수한 효능을 가진 후발효차 추출물의 제품을 개발하였다.

제 7 절 후발효차의 항균효과

1. 재료 및 방법

가. 항균spectrum 시험용 균주 및 배지

항균시험용으로 사용된 Gram positive 균주로는 *Bacillus*속의 일반 부패균, 포도상식 중독균(화농균), 충치균, 고초균 등을 포함한 8종을 사용하였고, Gram negative 균주로는 대장균, 부패균, 녹농균, 살모넬라 식중독균 등을 포함한 5종을 사용하였다. Test plate는 0.6% agar를 함유시킨 LB배지(soft agar) 6 mL에 전배양한 시험균 1 mL를 첨가하여 잘 혼합시키고, soft agar가 응고되기전에 1.5% agar를 함유시켜 미리 준비해둔 LB배지(hard agar)에 중층·응고시킨 다음, 즉시 랩으로 싸서 냉장고에 보관하면서 2주이내에 사용하였다.

나. 항균활성은 agar diffusion법

시료의 추출액을 rotary evaporator를 사용하여 10mL로 감압농축(60℃)한 농축액을 항균활성 측정의 시료액으로 사용하였다. 멸균된 filter paper disk(Toyo Rhoishi Kaisha, Ltd., 8mm)에 시료액을 spot한 다음 80℃의 dry oven에서 용매를 완전히 휘발시키고 중층 시험용 plate의 표면에 놓아 밀착시켜 냉장고에서 1시간 동안 방치시킨 후, 인큐베이터에서 배양(30~35℃, 24시간)하여 clear zone의 크기(직경, mm)를 측정하여 항균력을 비교하였다.

다. 미생물의 최소저해 농도 측정

최소저해농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 agar diffusion법으로 측정하였다. 즉, 앞의 시험균 test plate에 시료 분획물의 농축액을 각각 40, 60, 80, 100, 120, 140 μ L씩 멸균된 filter paper disk에 spot한 다음, 항균활성 측정법에 따라 항균력을 조사하여 각 시험균에 대한 증식억제의 최소농도를 결정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 후발효차 추출물의 항균효과

녹차와 후발효차의 추출 농축액을 100 μ l(고형물 0.8 mg)를 paper disk에 적시어 40 $^{\circ}$ C에서 건조한 후, 시험 대상균주를 대상으로 항균활성을 투명환(clear zone, 직경 mm)을 조사한 결과(**Table 3.7.1**), 대체로 녹차가 후발효차 보다 훨씬 강하게 나타났으며, 햇 차는 1년간 실온(은박 포장, 15 $^{\circ}$ C)상태에서 저장하므로써 그 항균활성이 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. *Bacillus* 속 세균보다는 식중독과 관련된 세균들에 더 항균활성이 높게 나타났으며, 또한 에탄올 추출물 > 뜨거운 물추출물 > 에틸아세테이트 추출물의 순서였다.

Table 3.7.1 Antibacterial activity of ethanol extract of green and fermented tea on Gram +/- bacterial strains (Unit : clear zone, diameter mm)

Tea	Strains	Extracts		
		EN	HW	EA
Green tea	<i>Bacillus cereus</i>	11.3±0.5	10.9±0.4	8.3±0.6
	<i>Bacillus subtilis</i>	9.2±0.6	8.8±0.2	8.2±0.7
	<i>Salmonella typhimurium</i>	11.2±0.6	10.9±0.5	8.7±0.8
	<i>Escherichia coli</i>	12.8±0.4	11.9±0.7	8.9±0.4
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9.8±0.7	9.5±0.3	8.3±0.1
Green tea (stored for 1 year)	<i>Bacillus cereus</i>	10.7±0.7	10.4±0.6	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	8.8±0.9	8.6±0.4	8.1±0.5
	<i>Salmonella typhimurium</i>	10.7±0.4	10.5±0.3	8.3±0.6
	<i>Escherichia coli</i>	11.7±0.8	11.9±0.7	8.5±0.3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9.2±0.3	8.8±0.4	tr
Fermented tea	<i>Bacillus cereus</i>	9.1±0.2	8.8±0.8	8.2±0.3
	<i>Bacillus subtilis</i>	8.3±0.3	8.3±0.4	tr
	<i>Salmonella typhimurium</i>	9.5±0.5	9.1±0.2	8.4±0.7
	<i>Escherichia coli</i>	10.8±0.2	10.2±0.4	8.4±0.5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	8.9±1.2	9.0±1.2	tr
Fermented tea (stored for 1 year)	<i>Bacillus cereus</i>	8.8±0.7	8.4±0.9	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	8.2±0.1	8.2±0.3	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	8.7±0.6	8.8±0.5	tr
	<i>Escherichia coli</i>	9.7±0.3	8.7±0.4	8.2±0.3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	8.5±0.5	8.2±0.2	-

EN : 75% Ethanol, HW : Hot water, EA : 85% Ethyl Acetate

나. 후발효차 추출물의 농도별 저해활성

녹차와 후발효차 에탄올 추출물을 각 농도별(20~120 μ l)로 시험 대상균주에 대한 paper disk법으로 항균활성의 투명한(clear zone, 직경 mm)을 조사한 결과(Fig. 3.7.1), 대부분의 시험균주에 대한 최소 저해농도는 장기간 저장되지 않은 녹차와 후발효차에 대하여 각각 20~40 μ l/paper disk와 60~80 μ l/paper disk로 나타났다. 항균활성은 추출물의 농도에 의존적인 상관관계를 나타내었다.

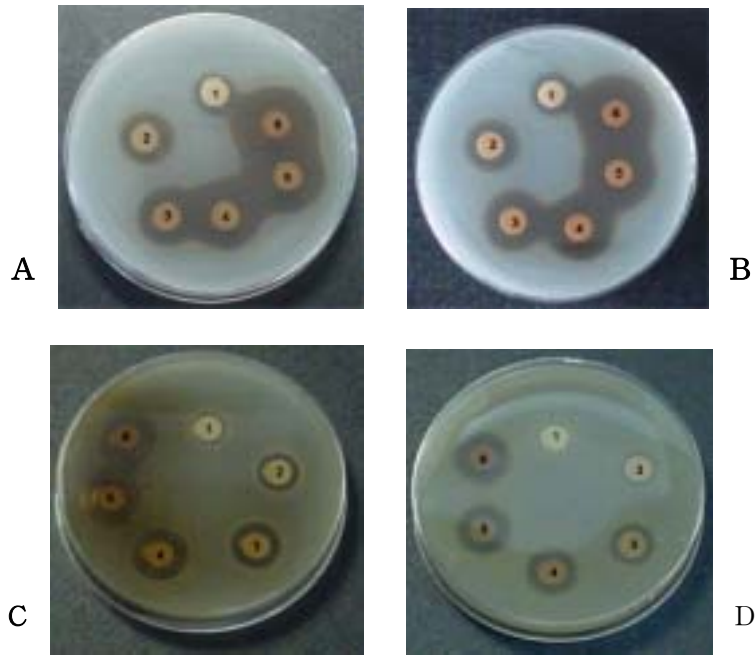


Fig. 3.7.1 Minimum inhibitory concentration(MIC) of ethanol extracts prepared from green and fermented tea against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.

Green tea (A : *Escherichia coli* B : *Salmonella typhimurium*)
 Fermented tea (A : *Escherichia coli* B : *Salmonella typhimurium*)
 No. 1~6 : 40, 60, 80, 100, 120, 140 μl /paper disk

다. 버섯 균사체 발효대두와 버섯균사체-세균 2단 발효 생청국의 항균활성

식용버섯 균사체로 이용한 발효대두와 식용버섯 균사체 및 *Bacillus megaterium* SMY-212를 이용한 발효대두의 메탄올 추출물 농도별에 대한 항균활성을 조사한 결과는 **Table 3.7.2**와 같다. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료를 100 μL 씩 spot 하였으며, 식용 버섯 균사체 만을 배양한 대두에서는 항균성이 나타나지 않았으며, *Bacillus megaterium* SMY-212를 이용한 발효대두에서 항균활성을 나타내었는데, 그 중에서도 *Staphylococcus aureus*와 *Vibrio parahaemolyticus*가 가장 강한 clear zone 을 형성하며 다른 시험균주 보다 강한 항균활성을 나타내었다. 그리고, *E. coli* O157 :H7 등에서 약간의 항균활성이 나타났으며, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Eschorichia coli, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*는 항균성이 나타나지 않았다. *Staphylococcus aureus*를 sopt한 시험구 중 동충하초 (*Cordyceps militaris*, DB)를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두를 제외한 모든 버섯균사체 및 세균 발효 생청국에서 강한 항균성을 나타냈으며, *Vibrio parahaemoliticus*를 spot한 시험구 중에서는 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*, SB) 균사체를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두가 가장 높은 항균활성을 나타내었다.

Table 3.7.2 Antibacterial activity of methanol extracts of soybean products fermented by edible mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212

Strains	Clear zone(mm)					Mean
	CB	AB	DB	PB	SB	
<i>Vibrio parahaemoliticus</i>	12	12	13	12	13	12.4
<i>Bacillus subtilis</i>	9	8	8	10	8	8.60
<i>Streptococcus mutans</i>	8	8	8	8	8	8.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	8	8	8	8	8.00
<i>Eschorichia coli</i>	8	8	8	8	8	8.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	13	11	12	12	12.2
<i>Salmonella enteritidis</i>	8	8	8	8	8	8.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	8	8	8	8	8.00
<i>Esoherichia coli</i> O157:H7	8.5	11	12	8.5	9	9.80

CB, traditional fermented soybean product ; soybean products(AB~SB) fermented by mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212(AB, *Agaricus blazei* ; DB, *Cordyceps militaris* ; PB, *Flammulina velutipes* ; SB, *Pleurotus eryngii*)

라. 버섯 균사체 발효대두와 버섯균사체 - 세균의 2단 발효 생청국의 MIC

식용버섯 균사체로 이용한 발효대두와 식용버섯 균사체 및 *Bacillus megaterium* SMY-212를 이용한 생청국의 메탄올 추출물 농도별에 대한 MIC를 조사한 결과는 **Table 3.7.3**, **Table 3.7.4**와 같다. 대체적으로 미생물의 최소 저해농도는 50~75 μ L였으며, *Vibrio parahaemoliticus*는 아가리쿠스 (*Agaricus blazei*, AB)를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두와 동충하초(*Cordyceps*

militaris, DB)를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두, *Bacillus subtilis*는 팽이버섯(*Flammulina velutipes*, PB)를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두, *Staphylococcus aureus*는 일반 발효대두, *Escherichia coli* O157:H7는 동충하초(*Cordyceps militaris*, DB)를 배양한 다음 *Bacillus megaterium* SMY-212를 배양한 발효대두가 MIC값이 가장 낮았다.

Table 3.7.3 Minimum inhibitory concentration(MIC) of methanol extract of methanol extracts of soybean products fermented by edible mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212

Strains		Growth at various concentration($\mu\text{l}/\text{disc}$)				MIC
		50	75	100	150	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CB	+	-	-	-	75
	AB	+	±	-	-	100
	DB	+	±	-	-	100
	PB	+	-	-	-	75
	SB	+	-	-	-	75
<i>Bacillus subtilis</i>	CB	+	+	-	-	100
	AB	+	+	+	-	150
	DB	+	+	+	-	150
	PB	+	-	-	-	75
	SB	+	+	+	-	150
<i>Streptococcus mutans</i>	CB	+	+	+	-	150
	AB	+	+	+	±	150
	DB	+	+	+	±	150
	PB	+	+	+	±	150
	SB	+	+	+	±	150
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CB	+	+	+	±	150
	AB	+	+	+	±	150
	DB	+	+	+	±	150
	PB	+	+	+	±	150
	SB	+	+	+	±	150

CB, traditional fermented soybean product ; soybean products(AB~SB) fermented by mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212(AB, *Agaricus blazei* ; DB, *Cordyceps militaris* ; PB, *Flammulina velutipes* ; SB, *Pleurotus eryngii*)

Table 3.7.4 Minimum inhibitory concentration(MIC) of methanol extracts of soybean products fermented by edible mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212

Strains		Growth at various concentration($\mu\ell$ /disc)				MIC
		50	75	100	150	
<i>Eschorichia coli</i>	CB	+	+	+	±	150
	AB	+	+	+	±	150
	DB	+	+	+	±	150
	PB	+	+	+	±	150
	SB	+	+	+	±	150
<i>Staphylococcus aureus</i>	CB	±	-	-	-	75
	AB	+	±	-	-	100
	DB	+	±	-	-	100
	PB	+	±	-	-	100
	SB	+	±	-	-	100
<i>Salmonella enteritidis</i>	CB	+	+	+	±	150
	AB	+	+	+	±	150
	DB	+	+	+	±	150
	PB	+	+	+	±	150
	SB	+	+	+	±	150
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CB	+	+	+	±	150
	AB	+	+	+	±	150
	DB	+	+	+	±	150
	PB	+	+	+	±	150
	SB	+	+	+	±	150
<i>Esoherichia coli</i> O157:H7	CB	+	+	+	±	150
	AB	+	+	-	-	100
	DB	+	-	-	-	75
	PB	+	+	+	±	150
	SB	+	+	+	-	150

CB, traditional fermented soybean product ; soybean products(AB~SB) fermented by mushrooms and *Bacillus megaterium* SMY-212(AB, *Agaricus blazei* ; DB, *Cordyceps militaris* ; PB, *Flammulina velutipes* ; SB, *Pleurotus eryngii*)

제 8 절 후발효차의 항산화 효과

1. 재료 및 방법

가. 실험 재료

본 실험에 사용된 후발효차는 미생물 발효차로서 경남 사천시 곤명면에 위치한 영봉다원에서 차 잎을 6월초에 채취하여 수제품으로 제조하여 실험용 시료로 사용하였다.

나. 시료제조

차 잎의 발효도가 높고 청정한 후발효차에 증류수를 가하여 60℃에서 8시간 환류 냉각하여 3회 추출한 후 여과하였으며, 이것을 회전증발기에서 농축하였다. 농축물은 다시 동결건조한 후 포장하여 -20℃에 보관하면서 시료로 사용하였다.

다. 시약 및 기기

실험에 사용한 주요 시약으로 (+)-catechin, (-)-gallic acid, (-)-gallic acid gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, catechol, quercetin, caffeic acid, L-ascorbic acid, pyrogallol, DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), butylated hydroxytoluene, potassium ferricyanide, 2-thiobarbituric acid, β -carotene 등은 Sigma사(USA)제품을 이용하였다. 용매 및 기타 시약은 특급 또는 1급을 사용하였으며, 분석기기는 UV-visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1601, Japan)와 HPLC(Waters, 2690 system, USA)를 이용하였다.

라. 실험방법

1) 총 플라보노이드 측정

후발효차 추출물 0.01 g을 증류수를 가한 후 90℃에서 30분간 추출하였으며, 여과하여 100 mL로 정용하였다. 여과액을 일정량 취하여 시험관에 옮긴 후 diethylene

glycol과 NaOH 0.75 ml를 혼합하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다(10). 이때 표준곡선은 quercetin(Sigma Co., USA)의 농도를 0~0.5 mg범위가 되도록 제조하였으며, 검량선으로부터 추출물의 플라보노이드 함량을 계산하였다.

2) 총 페놀 측정

총 페놀 함량은 Folin-Denis법에 따라 시험관에 시료 0.01 g에 Folin-Denis 시약 5 ml를 넣어 혼합한 후, 증류수로 100 ml 정용한 다음 실온에서 30분간 방치하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Catechin 분석

Catechin 분석은 Wang 등 의 방법에 준하여 HPLC로 분석하였다. 시료 0.05 g을 시험관에 넣고 1분 동안 sonication시킨 증류수를 30 ml 가하여 혼합시킨 다음 10분간 원심분리한 후 상정액을 취하여 증류수를 가하여 50 ml로 만들었다. Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시켜 HPLC로 분석하였으며, 용매는 1% phosphoric acid로 25% THF를 분당 1 ml로 용출하였고, UV detector로 210 nm에서 측정하였다.

4) DPPH free radical 소거작용

전자공여작용은 후발효차 추출물의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 전자공여효과로 후발효차 추출물의 환원력을 측정하였다(13). 즉 DPPH 16 mg을 100 ml 무수 ethanol에 용해한 후 100 ml로 만들어 여과하였다. 이 여액에 시료추출물 1 ml를 첨가하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구는 시료 대신에 에탄올 1 ml를 첨가하여 대조구에 대한 흡광도의 감소비율로 나타내었다.

5) Reducing power 측정

환원력 측정은 Oyaizu법에 따라 시험관에 다양한 농도의 시료에 sodium phosphate buffer 2.5 ml와 potassium ferricyanide 2.5 ml를 혼합하여 50℃에서 20분 동안 incubation시킨 후 trichloro acetic acid 2.5 ml를 첨가하고, 10분 동안 5,000 rpm으로 원심분리하였다. 상정액 5 ml에 0.1% ferric chloride 1 ml를 가한 후

spectrophotometer 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) β -Carotene-linoleate system을 이용한 항산화능 측정

시료의 항산화력은 β -carotene-linoleate model system으로 측정하였다. chloroform과 β -carotene용액에 linoleic acid 0.38 ml와 tween 40을 첨가한 후 40°C 회전증발기에서 chloroform을 제거하였다. 잔류 emulsion에 3차 증류수 750 ml를 첨가하여 강하게 진탕한 다음 용기에 넣어둔다. 시험관에 emulsion용액 2.5 ml에 추출물 0.3 mL에 동일한 것을 두 개 만들어 하나는 그대로 처리하고, 다른 하나는 55°C에서 105분 동안 암실에서 incubation시킨 다음, 492 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, 이때 대조구는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{\text{Sample}_{105} - \text{Blank}_{105}}{\text{Blank}_0 - \text{Blank}_{105}} \times 100$$

2. 결과 및 고찰

가. DPPH radical 소거작용

녹차의 용매별 추출물의 농도에 따른 전자공여 작용을 조사한 결과는 **Fig. 3.8.1**과 같다. 합성 항산화제인 BHT를 대조구로 사용하였으며, 추출물의 농도를 50, 100, 500 그리고 1000 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가하여 실험하였다. 모든 추출물에서 농도의 증가에 따라 래디칼의 소거 효과도 비례적으로 증가하였다. 추출물의 농도가 500 $\mu\text{g/ml}$ 일 때는 40~78%의 래디칼이 소거되었으며, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 일 때는 모든 추출물에서 84% 이상의 높은 전자공여 효과가 있음을 알 수 있었다. 특히, 농도가 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 ethyl acetate 추출물에서 래디칼 소거 효과가 높게 나타났다.

발효차 추출물의 전자공여 효과는 **Fig. 3.8.2**와 같다. 추출물의 농도가 증가할수록 전자공여 효과도 증가하였고, 추출물의 농도가 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 일 때, 발효차 추출물의 전자공여 효과는 7~19%로 대체적으로 녹차추출물보다 전자공여능이 낮았다. 저장기간별로 분석한 결과, 발효차 추출물에서는 저장을 한 발효차 추출물이 효과가 높았으며 특히, 추출물의 농도가 1000 $\mu\text{g/ml}$ 일 때는 63~81%로 높은 효과를 나타내었다.

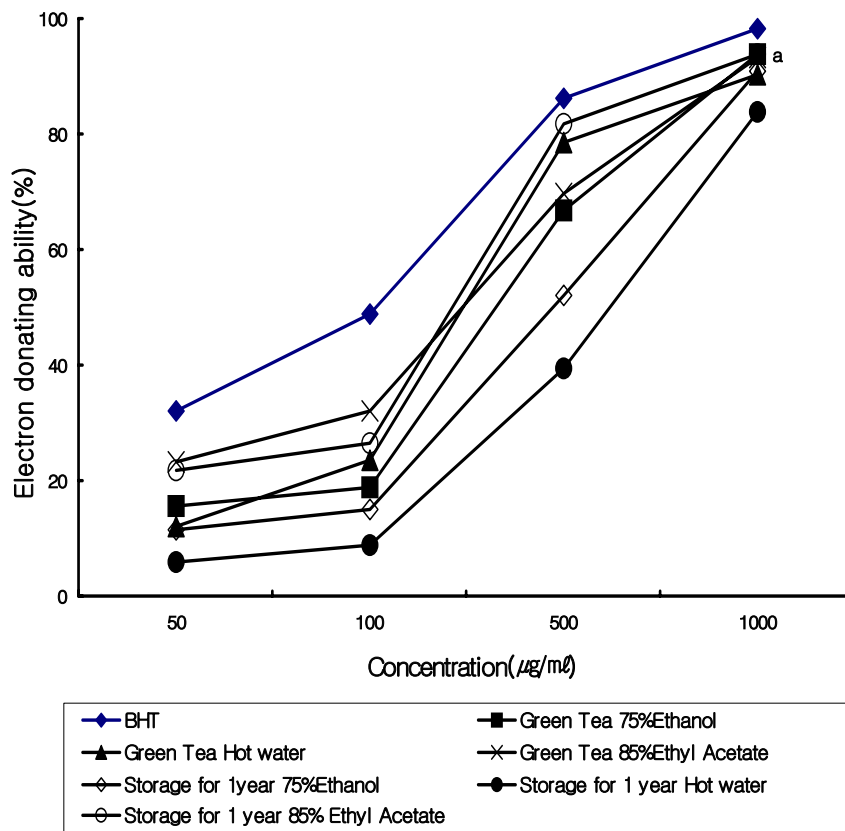


Fig. 3.8.1. Scavenging activities of various solvent extract in green tea on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical.
^aData are presented as the mean±SD, experiment was tested in triplicate on per dose per each sample.

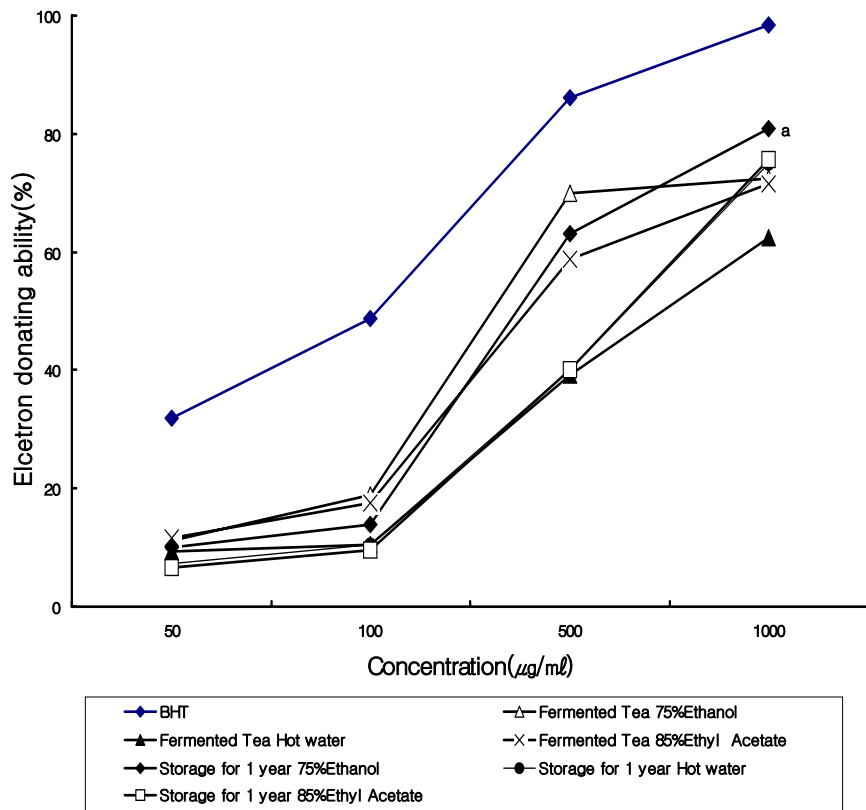


Fig. 3.8.2 Scavenging activities of various solvent extract in fermented tea on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical.

^aData are presented as the mean±SD, experiment was tested in triplicate on per dose per each sample.

나. SOD 유사 활성

SOD는 아니지만 superoxide anion의 활성을 억제시킬 수 있는 물질 즉, SOD 유사 활성능을 측정된 결과는 Fig. 3.8.3과 같다. 추출물의 농도를 높일수록 활성이 계속 증가하여, 추출물의 농도가 100µg/ml일 때는 대조구인 L-ascorbic acid와 녹차추출물의 효과가 비슷하였다. 그러나, 농도를 200µg/ml까지 높인 결과 L-ascorbic acid는 60%, 녹차추출물은 10~26%의 효과를 보여 대조구로 사용한 L-ascorbic acid와는 상당한 차이를 보였다. 그리고 ethanol 추출물이 다른 용매별 추출물보다 더 큰 활성을

보였다. Pyrogallol의 자동산화 반응을 이용하여 발효차 추출물의 SOD 유사활성을 측정된 결과는 **Fig. 3.8.4**와 같다. 추출물의 농도가 $100\mu\text{g/ml}$, $500\mu\text{g/ml}$ 일 때는 녹차추출물보다 낮은 활성을 보였지만, $200\mu\text{g/ml}$ 일때는 ethanol 추출물에서 31%의 효과를 보여 녹차추출물보다 활성이 더 높았다.

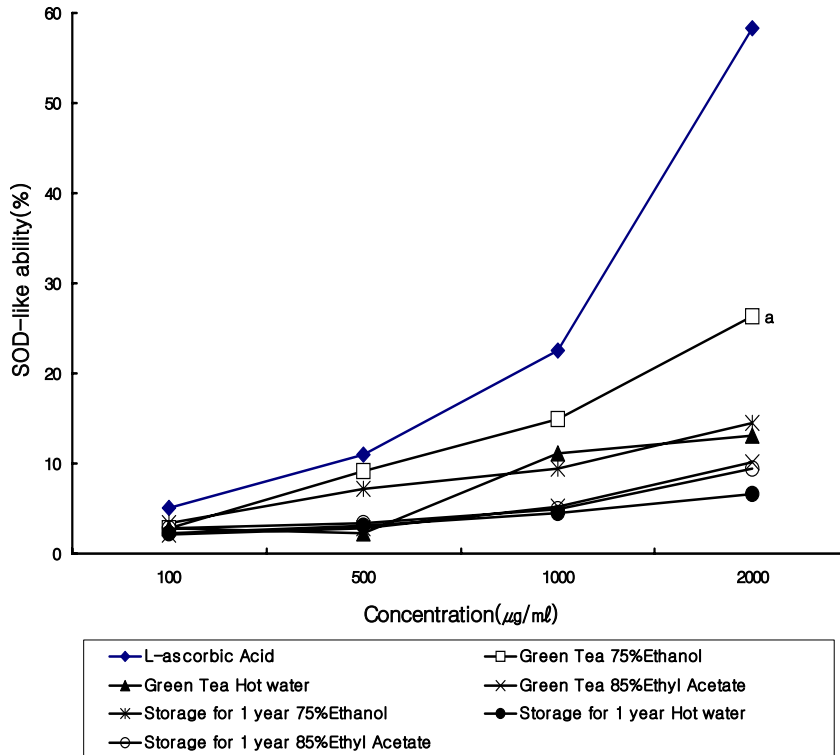


Fig. 3.8.3 Pyrogallol autoxidation activity of various solvent extract in green tea. ^aData are presented as the mean \pm SD, experiment was tested in triplicate on per dose per each sample.

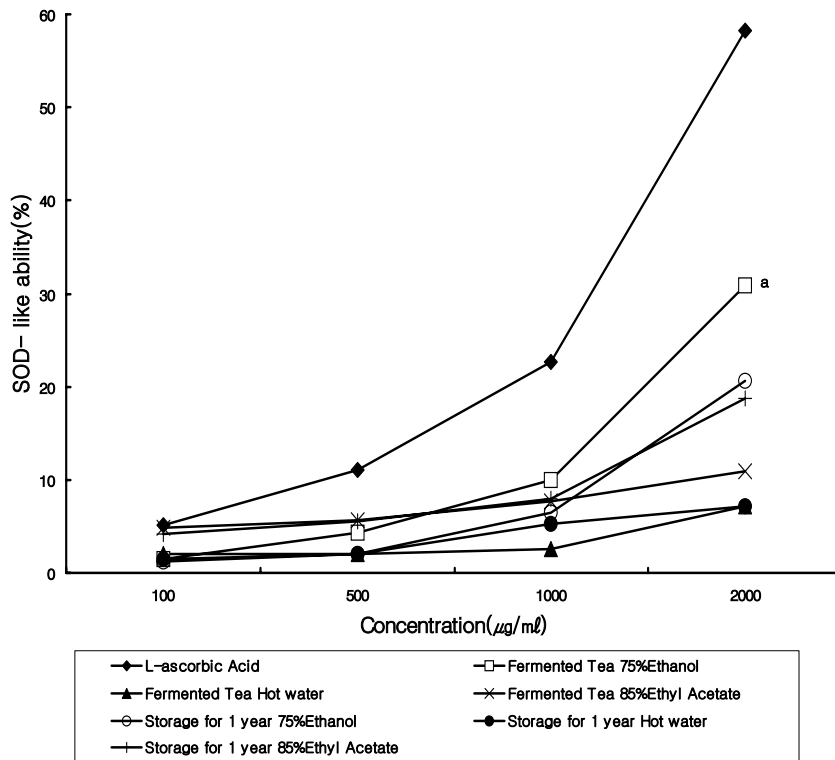


Fig. 3.8.4 Pyrogallol autoxidation activity of various solvent extract in fermented tea.

^aData are presented as the mean±SD, experiment was tested in triplicate on per dose per each sample.

다. Hydroxy radical의 소거 효과

Fig. 3.8.5은 hydroxy radical에 대한 녹차추출물들의 소거 효과를 실험한 결과이다. 용매별 녹차추출물을 500, 1000, 2000 그리고 3000µg/ml의 농도로 첨가하여, 합성 항산화제 BHA를 대조구로 사용하여 다른 용매추출물들과 비교하였다. 추출물이 3000 µg/ml 농도에서는 저장한 ethyl acetate 추출물에서 62%로 다른 용매추출물보다 높은 효과를 보였다.

발효차 추출물의 hydroxyl radical 소거 작용은 녹차추출물과 비슷한 경향을 보였다 (Fig. 3.8.6). 추출물의 농도가 3000µg/ml일 때 모든 추출물에서 50~62%의 소거효과를 보였으며, ethyl acetate 추출물이 다른 용매에 비해 효과적이었다.

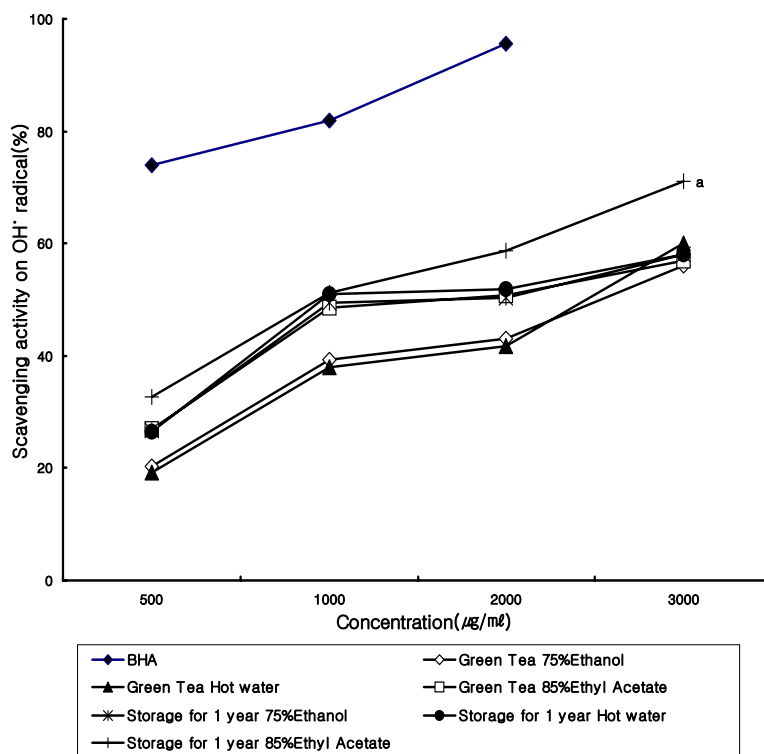


Fig. 3.8.5 The scavenging activity on hydroxyl radical of various solvent extract in green tea.

^aData are presented as the mean±SD, experiment was tested in triplicate on per dose per each sample.

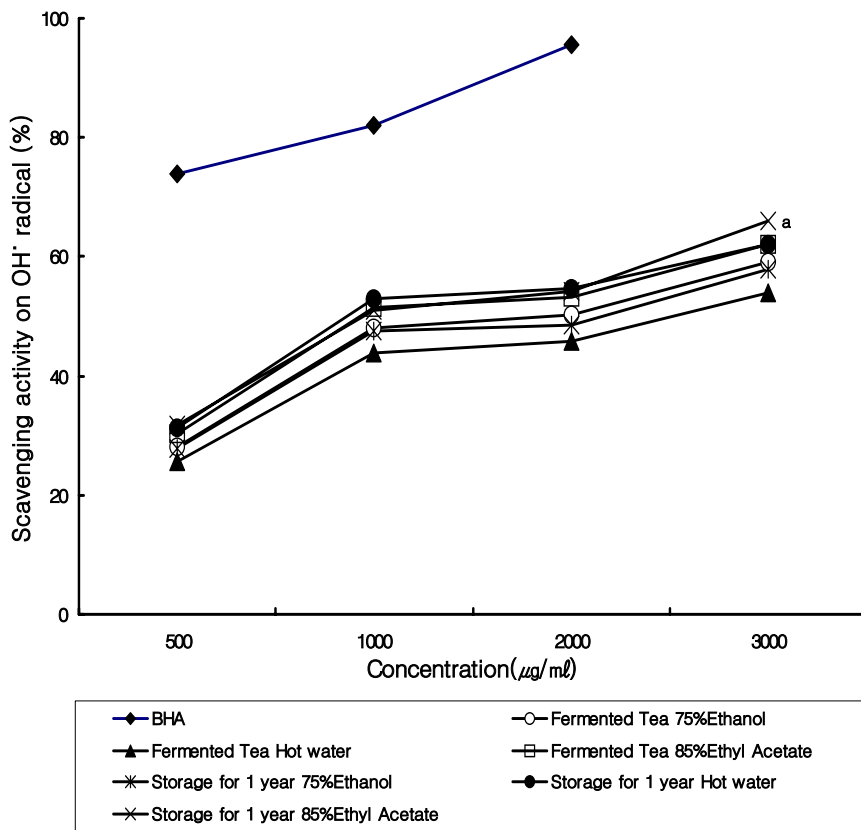


Fig. 3.8.6 The scavenging activity on hydroxyl radical of various solvent extract in fermented tea.

^aData are presented as the mean±SD, experiment was tested in triplicate on per dose per each sample.

라. β-carotene-linoleate system을 이용한 항산화 효과

녹차를 용매별로 추출하여 β-carotene-linoleate system을 이용하여 농도의 변화에 따른 항산화 효과를 측정된 결과를 Fig. 3.8.7에 나타내었다. 추출물의 농도가 1000µg/ml일 때 대조구인 L-ascorbic acid는 38%, ethanol 추출물은 28%, 열수 추출물은 27%, ethyl acetate 추출물은 29%, 저장한 시료의 ethanol 추출물은 40%, 저장한 시료의 열수추출물은 30%, 저장한 시료의 ethyl acetate 추출물은 29%로, 저장한 녹차시료에서 더 높은 항산화 효과를 보여 추출물의 농도가 3000µg/ml일 때는 65~80%의 효과를 보여 항산화 효과가 높음을 알 수 있었다.

발효차 추출물의 항산화 효과는 **Fig. 3.8.8**에 나타내었다. 녹차추출물과 비슷한 경향을 보였으며, 특히 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 ethyl acetate 추출물에서 87%로서 다른 용매 추출물보다 높은 효과를 나타내었다.

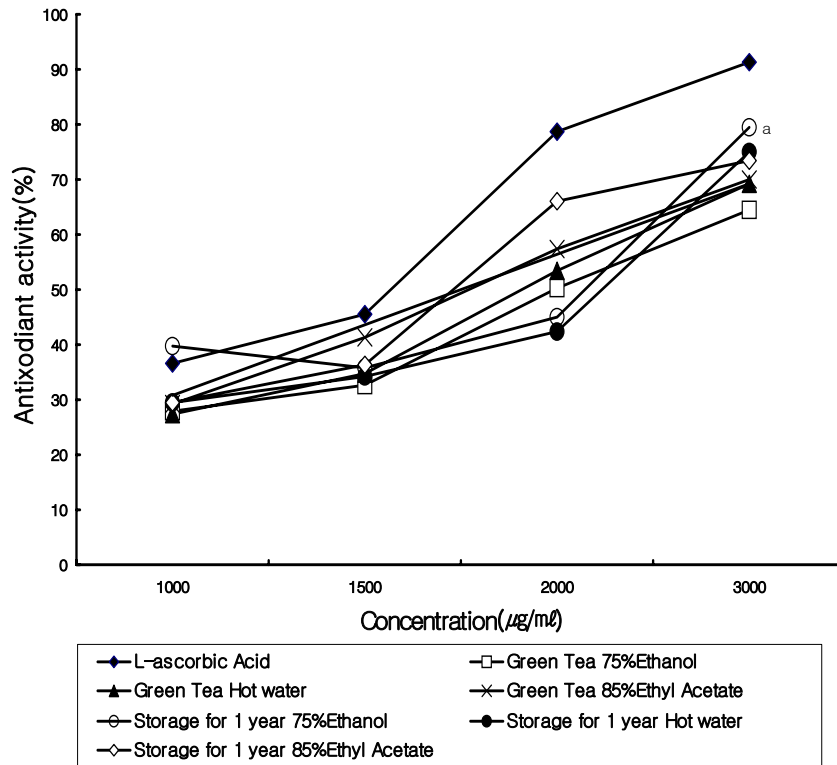


Fig. 3.8.7 Antioxidant activity of various solvent extract in green tea.
^aData are presented as the mean \pm SD, experiment was tested in triplicate on per dose per each sample.

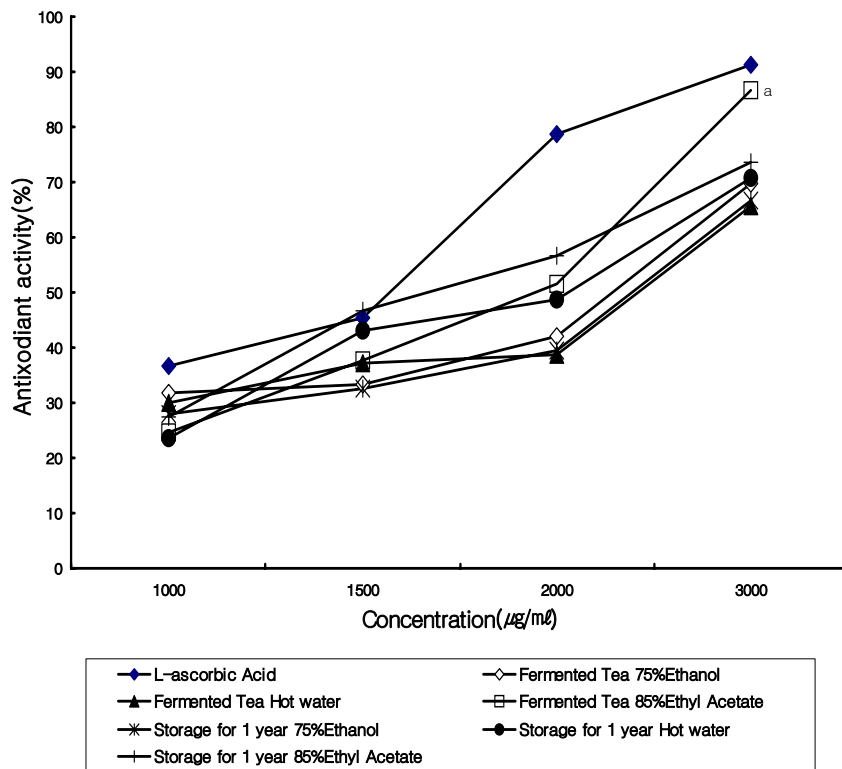


Fig. 3.8.8 Antioxidant activity of various solvent extract in fermented tea.
^aData are presented as the mean±SD, experiment was tested in triplicate on per dose per each sample.

마. Reducing power 효과

본 실험에서는 10, 50, 100 그리고 500µg/ml 농도의 추출물을 첨가하여 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정하였다. 흡광도 수치는 그 자체가 시료의 환원력을 나타내며 높은 흡광도 수치는 높은 환원력을 나타낸다. 녹차 추출물의 환원력 결과는 Fig. 3.8.9와 같다. 추출물의 농도가 500µg/ml일 때 추출물의 환원력은 ethyl acetate 추출물(1.5) > 저장한 ethyl acetate 추출물(1.3) > 저장한 ethanol 추출물(1.1) > 열수추출물(0.9) > ethanol 추출물(0.8) > 저장한 열수추출물(0.7) 순이었다.

발효차 추출물의 환원력도 녹차추출물과 비슷한 경향을 보였으며, 추출물 농도가 100µg/ml 일 때 L-ascorbic acid는 0.6일 때 다른 추출물들은 0.2~0.3였으나, 500µg/ml

일 때는 0.6~0.9로 측정되었다(Fig. 3.8.10).

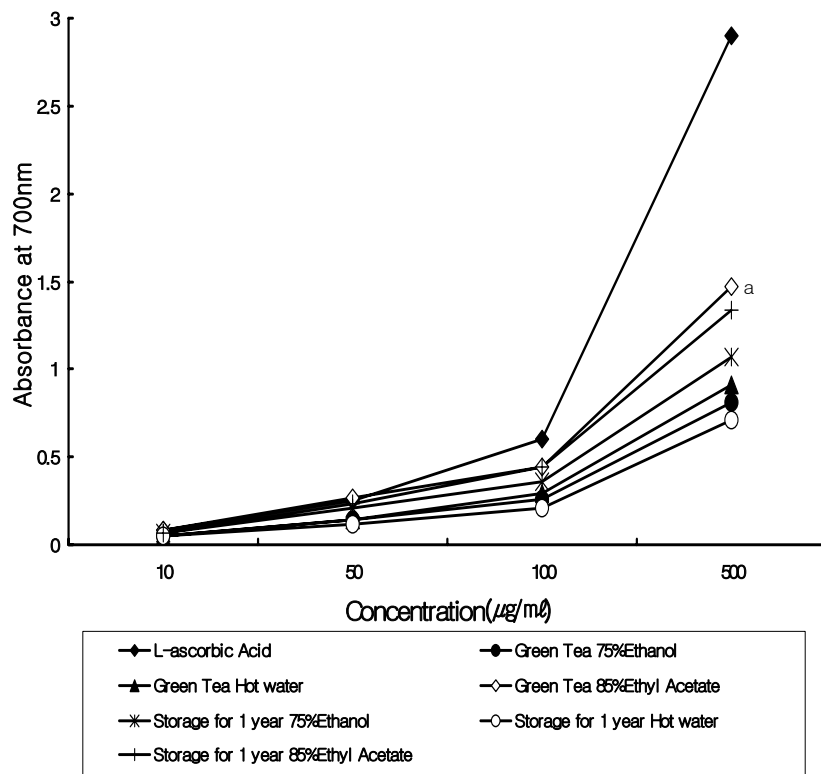


Fig. 3.8.9 Reducing power of various solvent extract in green tea.

^aData are presented as the mean±SD, experiment was tested in triplicate on per dose per each sample.

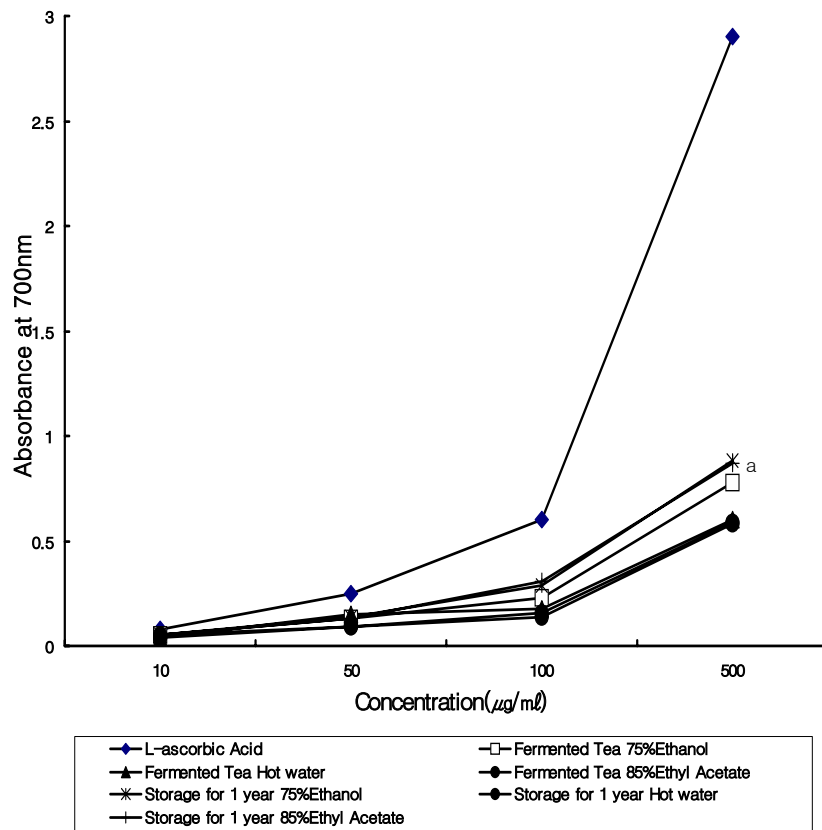


Fig. 3.8.10 Reducing power of various solvent extract in fermented tea.

^aData are presented as the mean±SD, experiment was tested in triplicate on per dose per each sample.

제 9 절 후발효차로 부터 물질분리 및 정제

1. 재료 및 방법

가. 재료

본 실험에서 사용한 후 야생녹차는 경남 사천군 소재의 「영봉다원」으로부터 현물로 지원을 받아서 순천대학교 식품영양학과 발효학연구실의 대형 발효실에서 제조한 후발효차를 사용하였다.

나. 시약 및 기기

본 실험에서 후발효차로부터 유효물질의 분리에 사용한 시약은 Analytical TLC plate(precoated silicagel 60GF254, 20×20cm, 0.25mm), Preparative TLC plate(precoated silicagel 60GF254, 20×20cm, 2mm), silicagel 60(70~230mesh ASTM), silicagel 60(230~400mesh ASTM)은 Merck사의 제품을 사용하였으며, n-Hexane, chloroform, methanol, acetic acid, ethylacetate, acetonitrile, dimethylsulfoxide(DMSO), trichloroacetic acid(TCA)등의 용매는 특급 또는 일급을 사용하였으며, 공업용인 경우에는 증류하여 사용하였다.

또한 분리된 물질의 화학적 구조 결정을 위하여 사용한 시약 및 기기는 다음과 같다. 핵자기공명 분광기는 Bruker-AW300(300MHz), 혹은 Bruker-AW500 (500Mhz) 분광기를 이용하였으며, 경상대학교 공동실험실습관과 대전의 기초과학지원센터의 도움으로 분석하였다.. Chemical shift는 tetramethylsilane(TMS)을 기준물질로 하였다. MPLC(SYkam S1021), rotary vacuum evaporator(Buchi R-114 ,Eyela N-1N)을 사용하였다.

2. 결과 및 고찰

가. Catechin류의 분리 및 구조결정

후발효차 200g을 Matsuzaki 와 Hara의 방법에 따라 100℃의 열수로 15분간 추출하

여 얻어진 열수추출물을 1000×g에서 15분간 원심 분리하여 얻어진 상정액을 chloroform으로 세척하여 caffeine을 제거하고 남은 물 추출물을 ethyl acetate로 분획하여 ethyl acetate 추출물을 얻었다. 이 ethyl acetate층을 40℃에서 진공 농축하여 용매를 제거하였으며, 이 농축물을 조catechin이라 하였다. 상세한 catechin류의 분리는 다음의 Figure 1에 나타내었다.

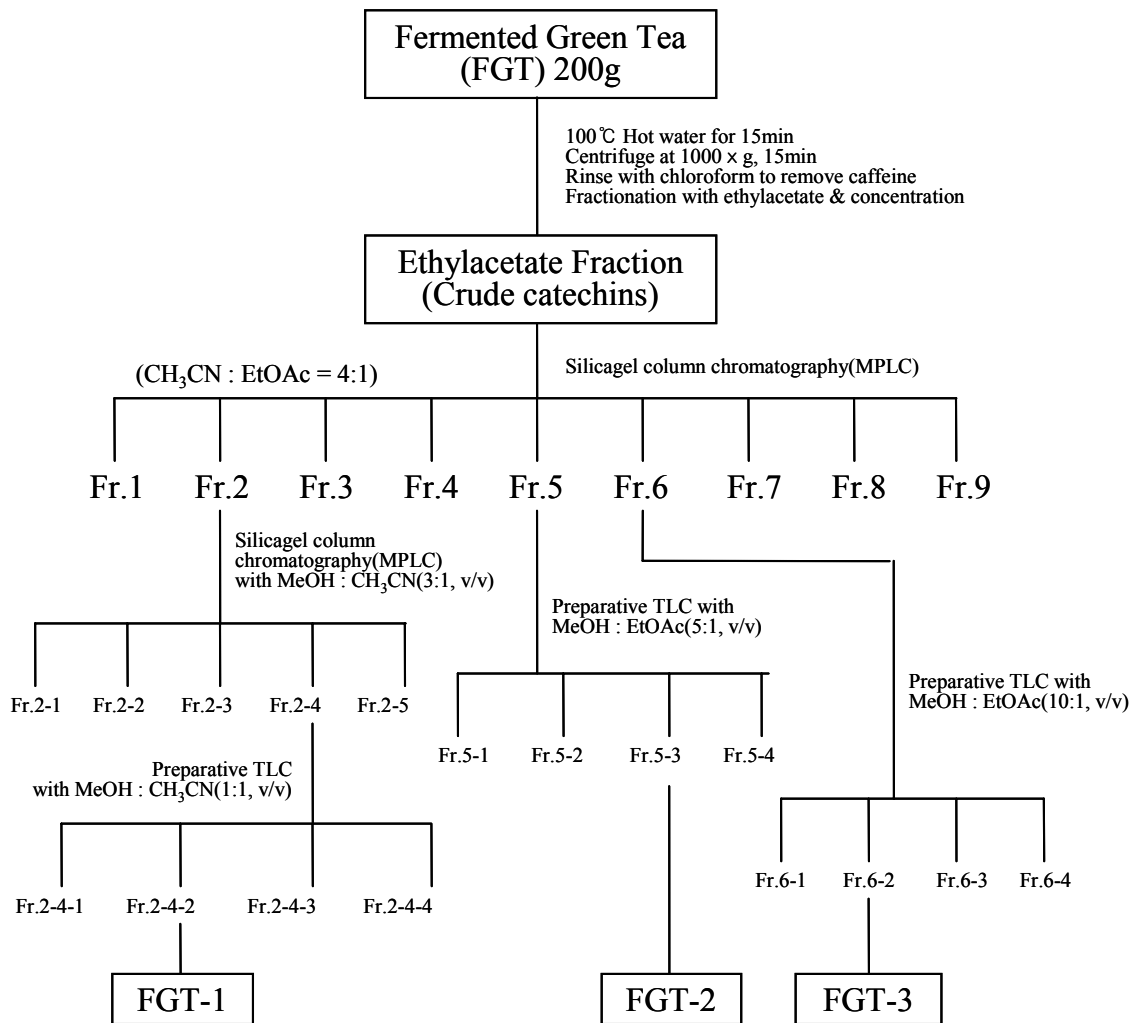
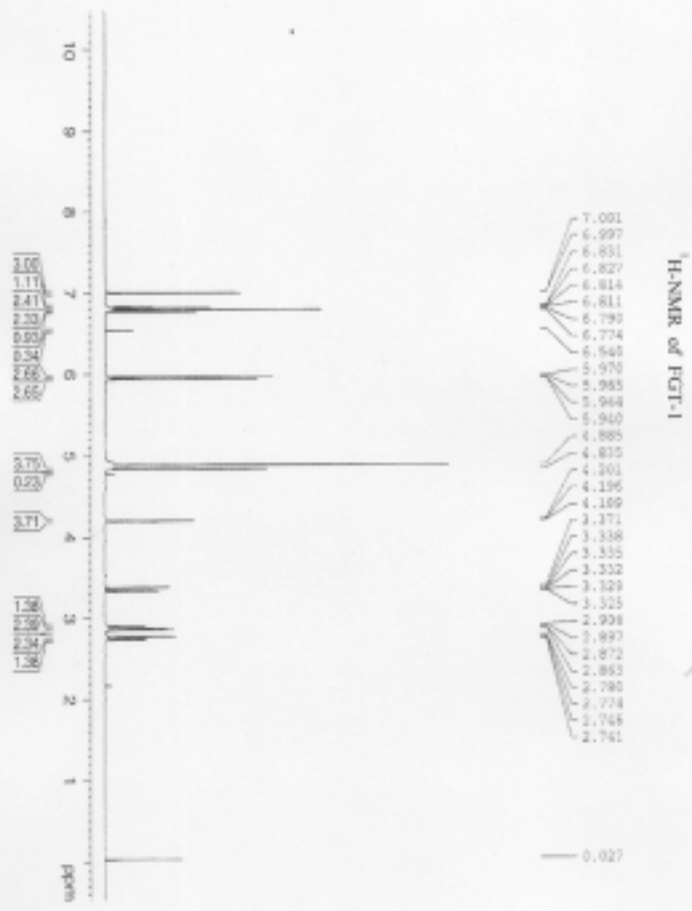


Figure 1, Isolation procedure of catechins from fermented green tea(FGT).

각 분획물의 물질구조를 조사한 결과, FGT-1 ; (+)-Catechin (C), FGT-2 ; (-)-Epigallocatechin (EGCG), FGT-3; (-)-Epigallocatechin galate (EGCG)로 구조 동정되었다.



F2 - Acquisition Parameters
 DATE_ 20081107
 TIME 11.15
 INSTRUM SENSE
 PROCPRG1 5 cm QNP2 6-D
 PULPROG zgpg30
 SFO 500.136260
 AQ 127.20
 SOLVENT H₂O
 NS 512
 DS 4
 SWH 5482.454 Hz
 FIDRES 0.167311 Hz
 AQ 2.188828 sec
 RG 327.2
 INJ 10.00
 EX 4.00
 TM 31.28 min
 TE 300.2 K
 DE 1.00000000 mm
 ACQRES 0.00000000 sec
 MONRES 0.01000000 sec
 ***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 1H
 P1 18.00
 PL1 -4.40 dB
 SFO1 500.136260 MHz
 F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 500.136260 MHz
 DS 4
 SWH 5482.454 Hz
 IN 0
 TM 31.28
 DE 1.00
 GB 0
 PC 1.00

Figure 2 . ¹H-NMR spectrum of FGT-1

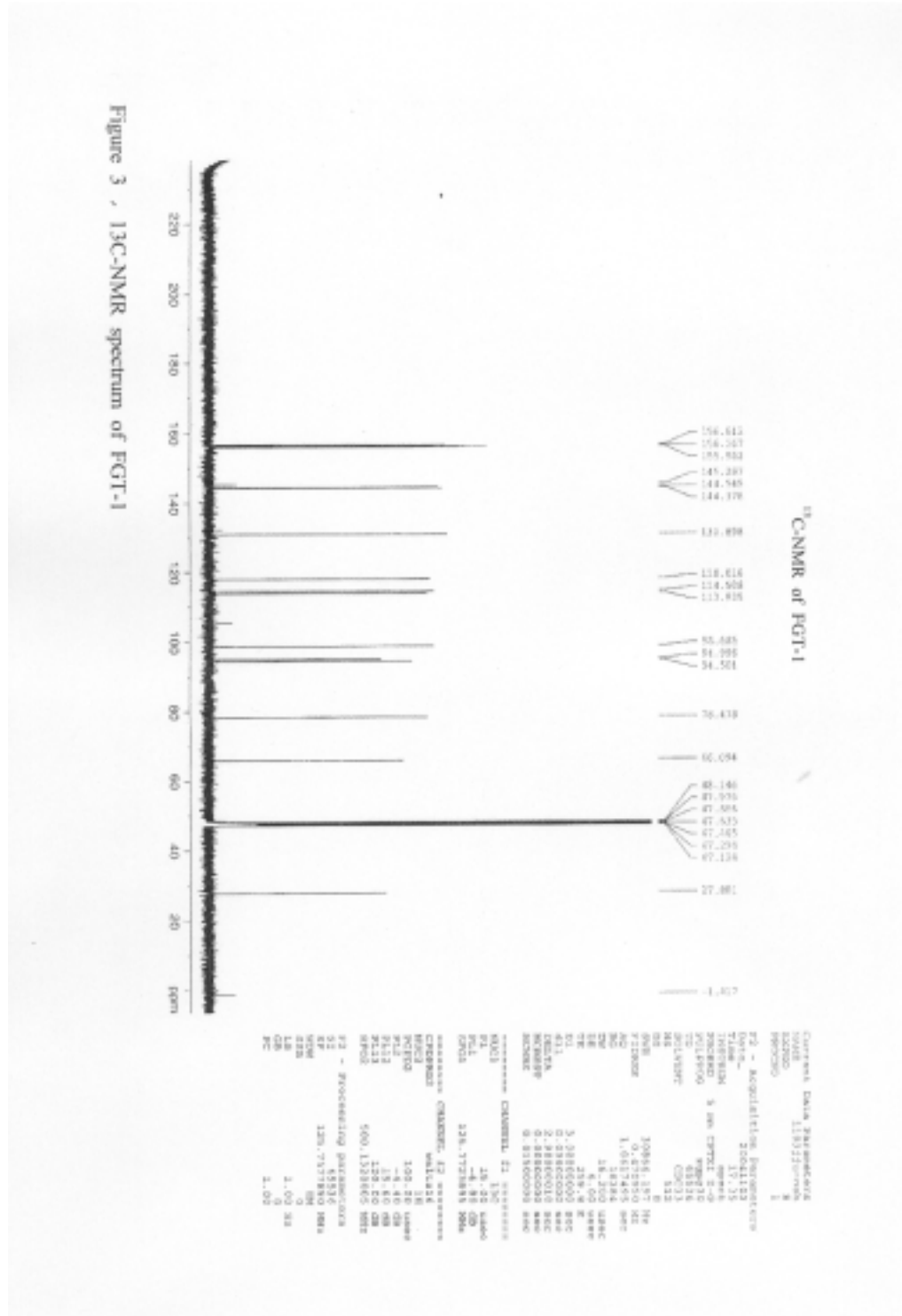


Figure 3 . ¹³C-NMR spectrum of FGT-1

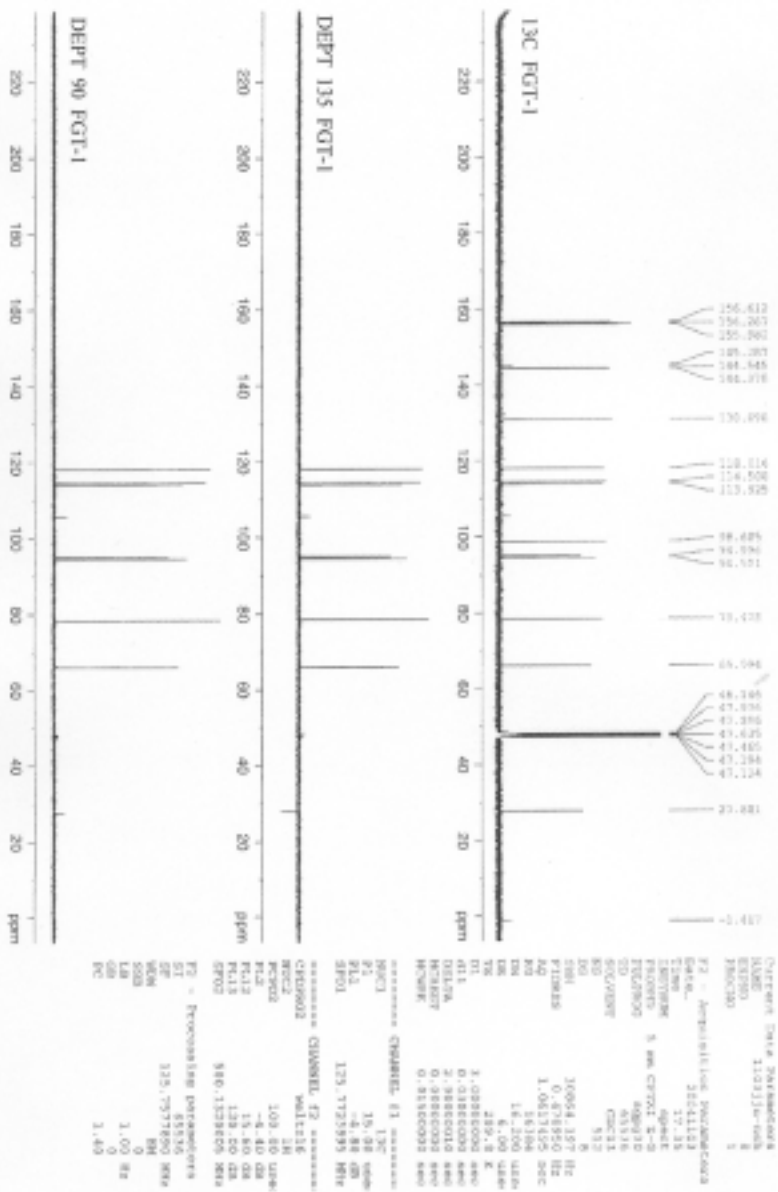


Figure 4 , DEPT spectra of FGT-1

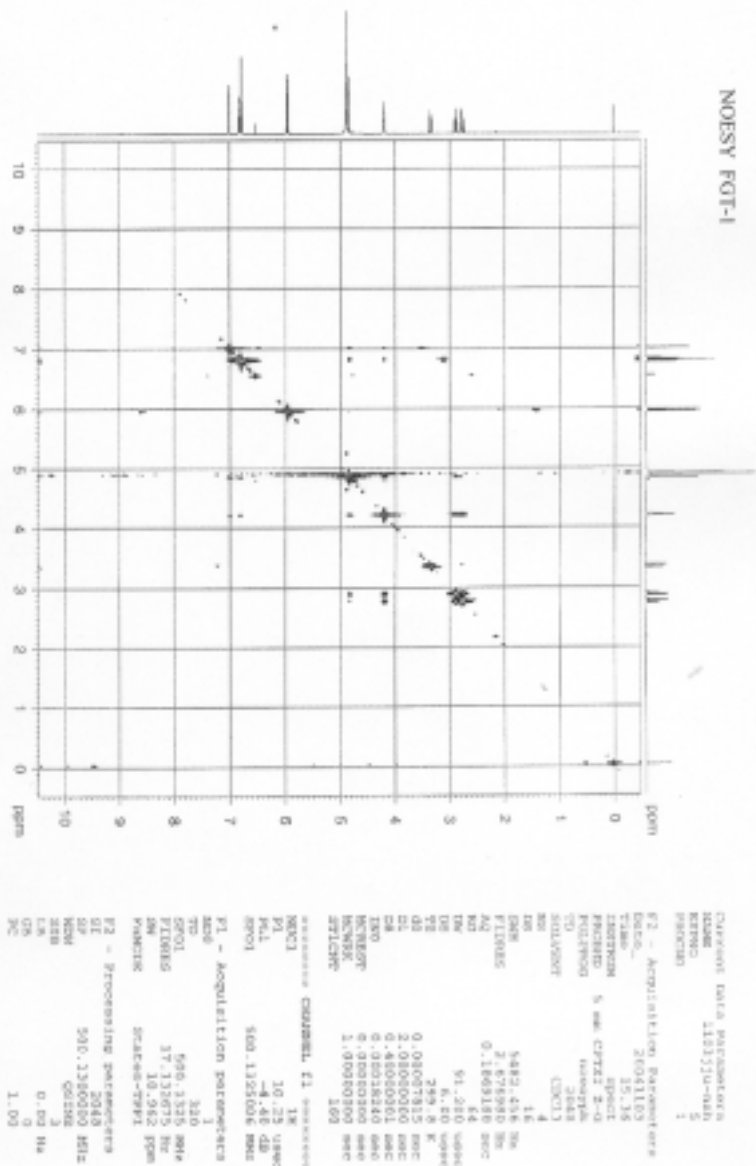


Figure 7. ^1H - ^1H NOESY spectrum of FGT-1

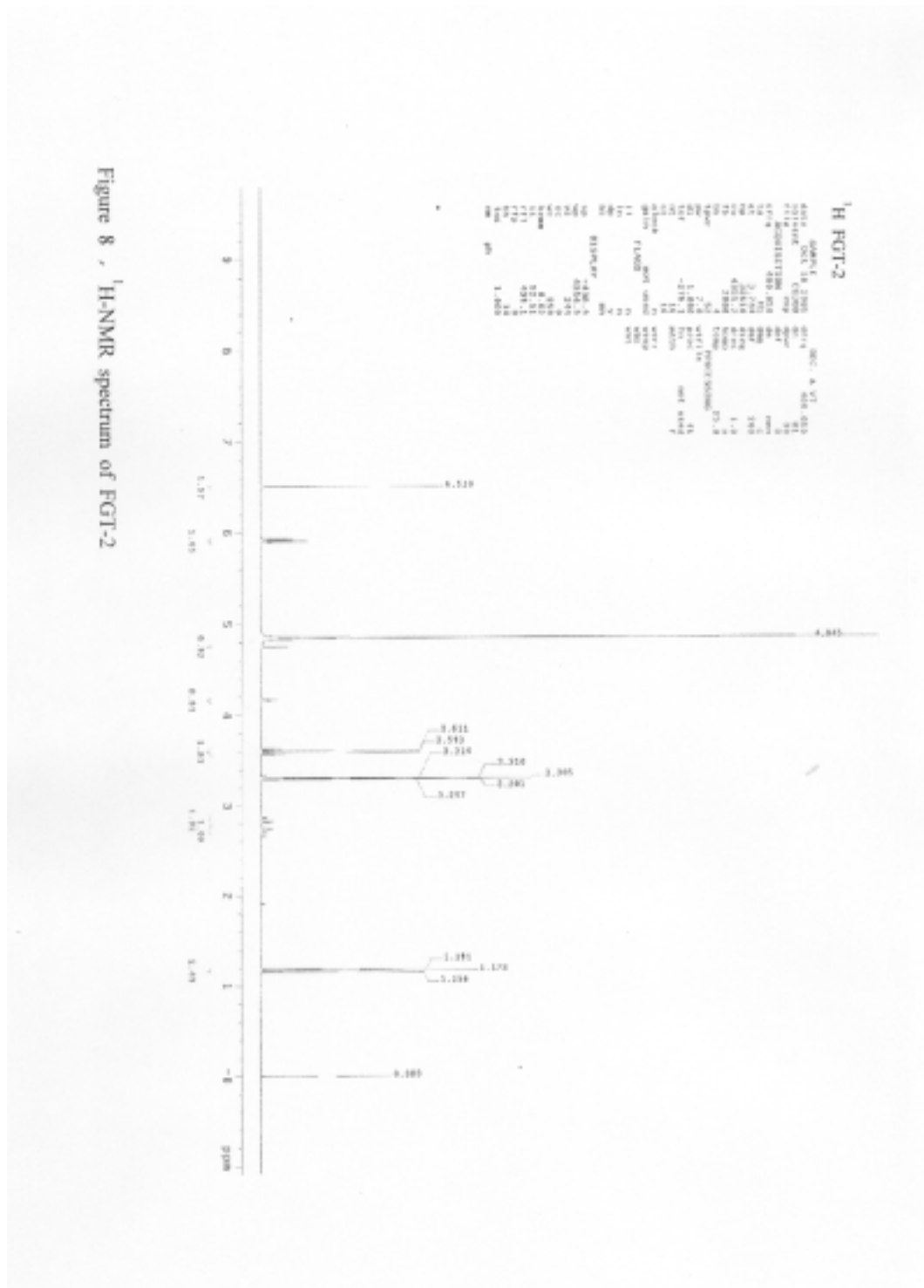


Figure 8 , ¹H-NMR spectrum of FGT-2

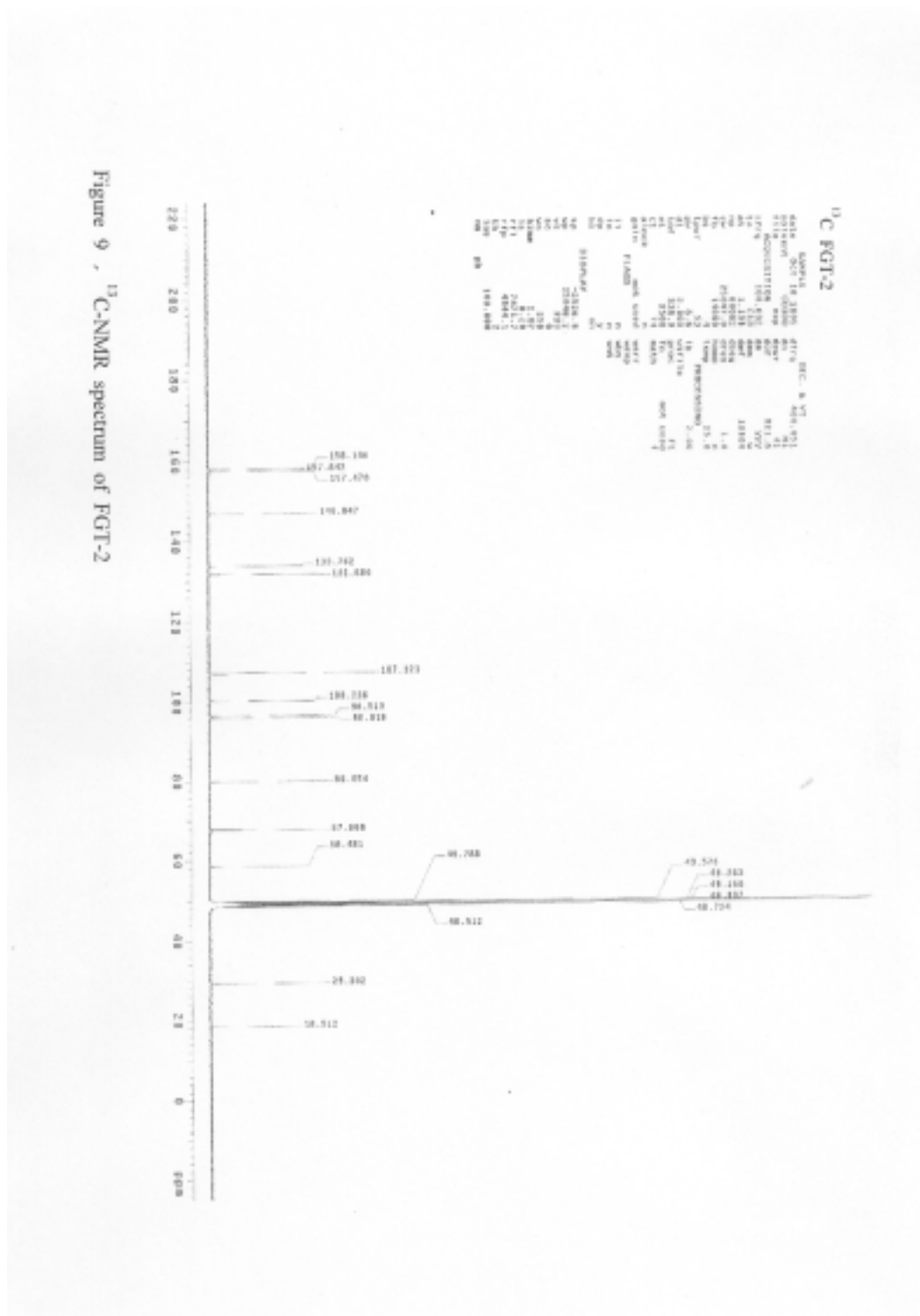
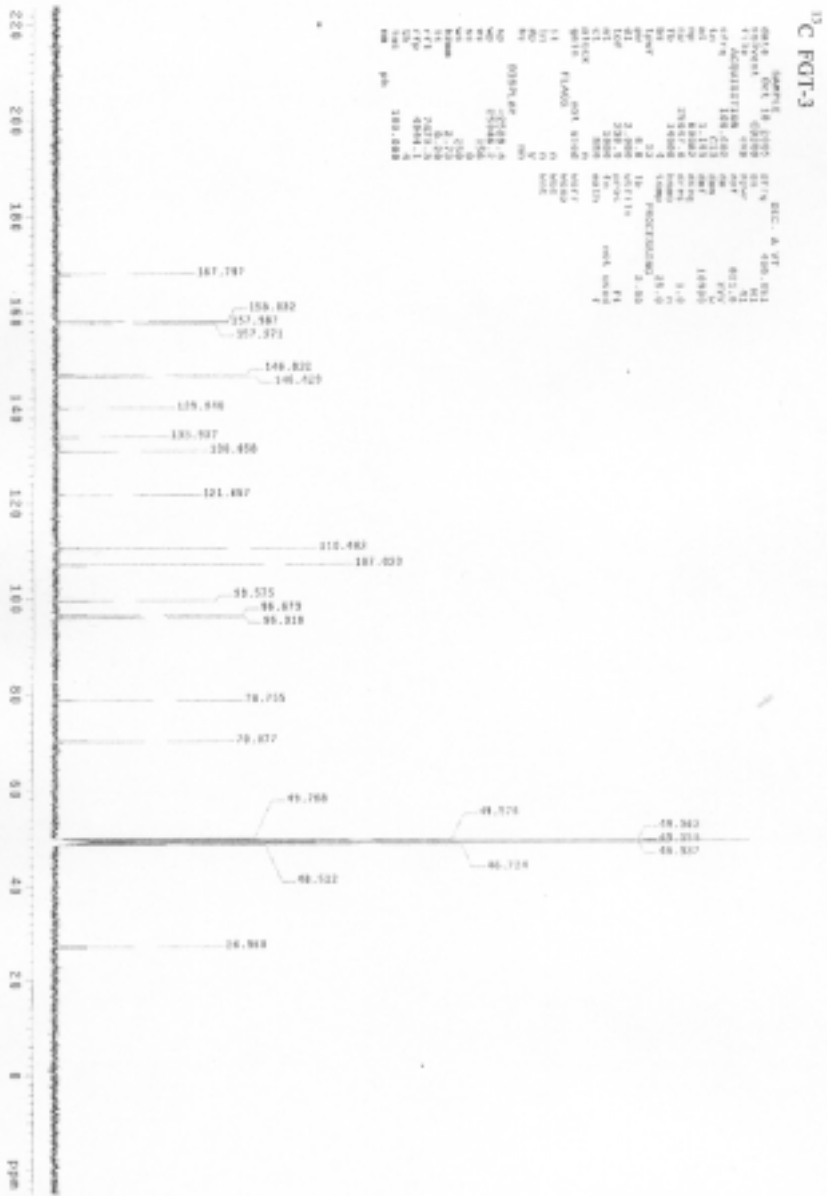


Figure 9, ¹³C-NMR spectrum of FGT-2

Figure 11, ¹³C-NMR spectrum of FGT-3

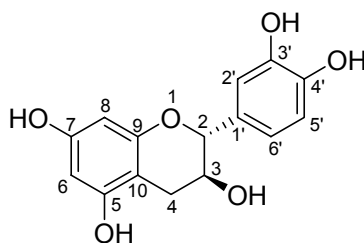


■ **FGT-1 ; (+)-Catechin (C)**

$C_{15}H_{14}O_6$,

1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): 2.78, 2.91 (2H, qd, $J = 17.0, 4.5, 3.0$ Hz, H-4), 4.20 (1H, m, H-3), 4.84 (1H, s, H-2), 5.94 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8), 5.97 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.82 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 7.00 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2')

^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): 27.9 (C-4), 66.1 (C-3), 78.5 (C-2), 94.5 (C-8), 95.0 (C-6), 98.7 (C-10), 113.9 (C-2'), 114.5 (C-5'), 118.0 (C-6'), 130.9 (C-1'), 144.38 (C-3'), 144.55 (C-4'), 155.98 (C-9), 156.27 (C-7), 156.61 (C-5).



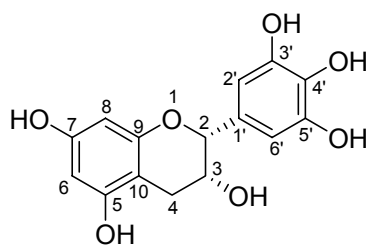
(+)-Catechin

■ **FGT-2 ; (-)-Epigallocatechin (EGC)**

$C_{15}H_{14}O_7$,

1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): 2.74, 2.86 (2H, qd, $J = 16.4, 4.4, 3.2$ Hz, H-4), 4.17 (1H, m, H-3), 4.75 (1H, br s, H-2), 5.91 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 5.93 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.51 (2H, s, H-2'/H-6')

^{13}C NMR (CD_3OD , 100MHz): 29.3 (C-4), 67.7 (C-3), 80.1 (C-2), 96.0 (C-8), 96.5 (C-6), 100.2 (C-10), 107.1 (C-2'/C-6'), 131.7 (C-1'), 133.8 (C-4'), 146.8 (C-3'/C-5'), 157.47, 157.84, 158.15 (C-5/C-7/C-9).



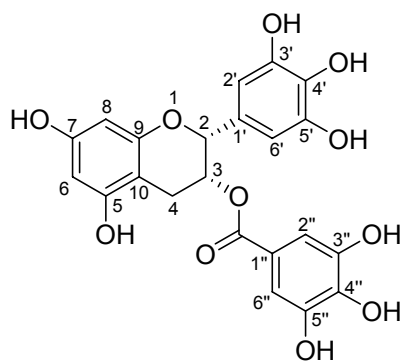
(-)-Epigallocatechin

■ **FGT-3; (-)-Epigallocatechin galate (EGCG)**

$C_{22}H_{18}O_{11}$,

1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): 2.86, 3.00 (2H, qd, $J = 17.2, 4.4, 2.0$ Hz, H-4), 4.97 (1H, br s, H-2), 5.53 (1H, m, H-3), 5.95 (2H, s, H-6/H-8), 6.50 (2H, s, H-2'/H-6'), 6.95 (2H, s, H-2''/H-6'')

^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): 27.0 (C-4), 70.1 (C-3), 78.8 (C-2), 96.0 (C-8), 96.7 (C-6), 99.6 (C-10), 107.0 (C-2'/C-6'), 110.4 (C-2''/C-6''), 121.7 (C-1''), 131.0 (C-1'), 133.9 (C-4'), 139.9 (C-4''), 146.4 (C-3''/C-5''), 146.8 (C-3'/C-5'), 157.37, 157.99, 158.03 (C-5/C-7/C-9), 167.80 (C=O).



(-)-Epigallocatechin gallate

나. Catechin 산화중합물(theaflavins & thearubigins)의 분리

Catechin 산화중합물(theaflavins & thearubigins)의 분리는 Babli 등의 방법에 따라 분리하였다. 즉 후발효차 10g을 끓는 물 250 ml에 침지하여 10분후 여과하였으며, caffeine을 제거하기 위하여 chloroform을 가하여 가용성분을 제거하였으며, 순차적으로 ethylacetate와 n-butanol로서 분획하였다. 이때 ethylacetate 분획은 theaflavins와 미처 산화 중합되지 못한 catechins 즉 (-)epicatechin gallate와 (-)epigallocatechin gallate를 일부 함유하고 있으며, n-butanol 분획은 thearubigin을 함유하고 있는 것으로 보고 되고 있다. Theaflavins 와 thearubigins를 분리하는 과정은 Figure 12에 그림으로 나타내었다.

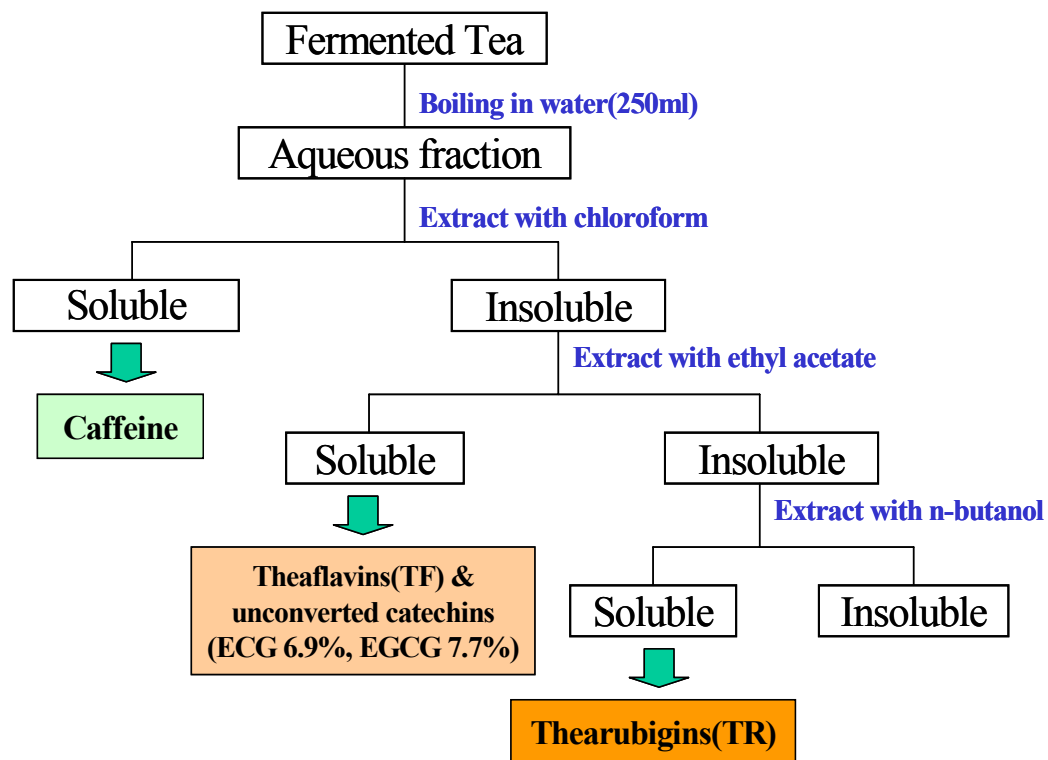


Figure 12, Isolation of theaflavins(TF) and thearubigins(TR) from fermented green tea. ²⁾

다. 기타 녹차성분의 분리

Catechin류와 그 산화중합물이외의 물질을 분리하여 생리활성 실험을 하고자 Figure 3과 같이 실시하였다. 즉 후 발효차 200g을 MeOH로서 추출한 후, hexane/acetone(9/1→1/1)으로서 gradient silica gel column chromatography를 실시하여 18개의 fraction(fr.1~18)을 얻었으며, 나머지 잔유물을 chloroform/MeOH(99/1→1/1)의 용매조건으로 gradient silica gel column chromatography를 실시하여 12개의 fraction(fr.19~30)을 얻었다. 이 중에서 fr.16~18의 분획을 합하여 다시 chloroform/acetone(19/1→1/1)의 용매조건으로 gradient silica gel column chromatography를 실시하여 9개의 fraction(fr.A~I)을 얻었으며, 이 중 fr. D와 E에서 Preparative TLC로서 chloroform/acetonitrile(5/1)의 용매조건으로 전개하여 분리된 각각의 fraction을 분리정제하여 FGT-9와 FGT-15를 얻었다.

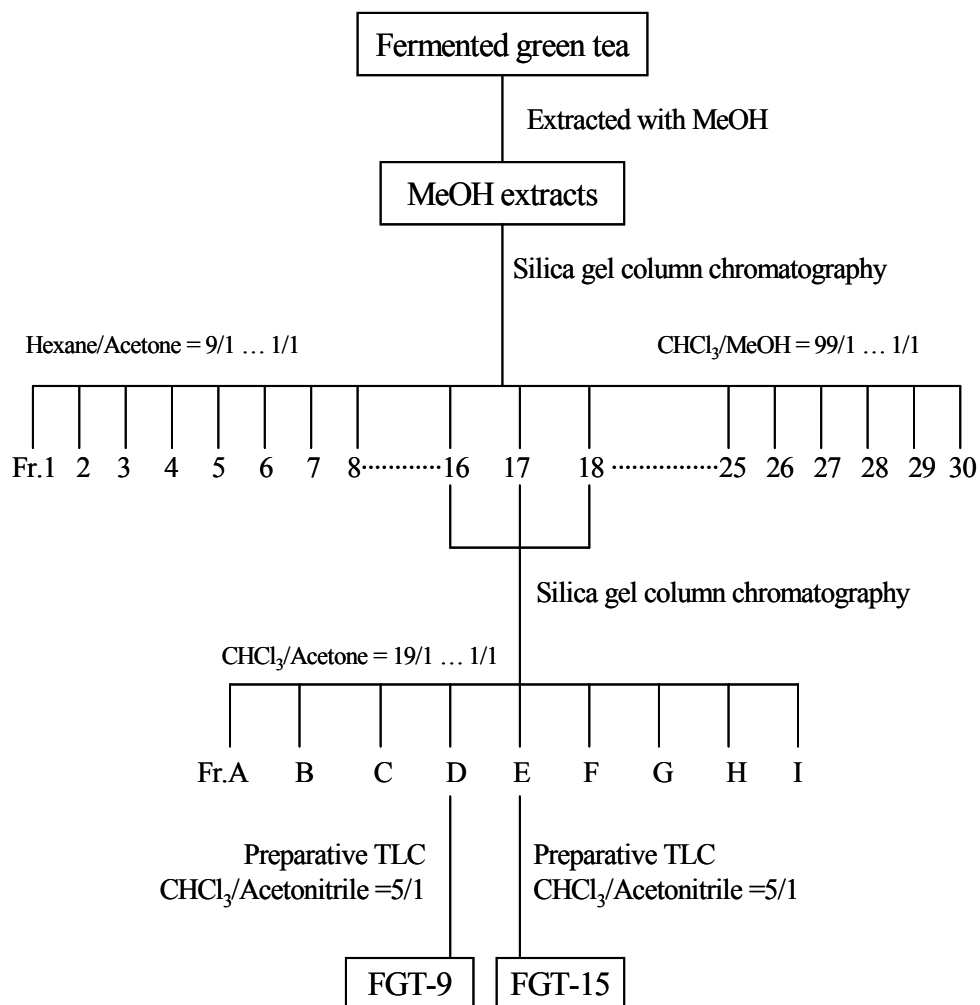
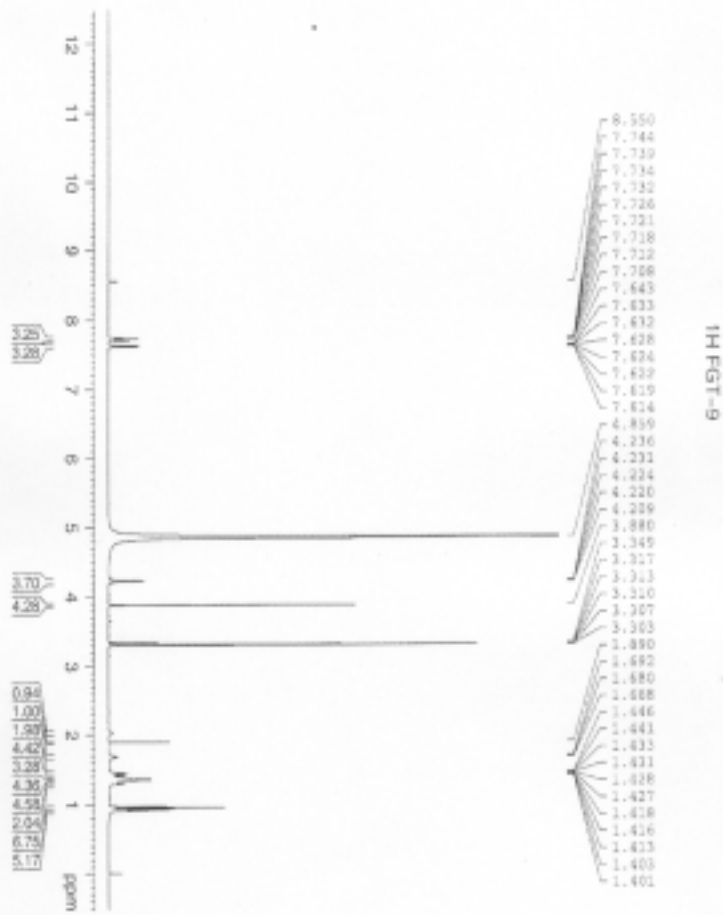


Figure 13, Isolation and purification of FGT-9 and FGT-15 from fermented green tea



***** CHANNEL F1 *****
 CHANNEL DATA PARAMETERS
 NAME: 58023001-000
 S2200 12
 PROCESSED 1

 F1 - Acquisition Parameters
 NAME: 20750003
 DATE_: 16-08
 20070808 10:48:53
 INSTRUM: spect
 PROCESSOR: 5.0M CPDPR1 8.12
 PULPROG: zgpg30
 TD: 32768
 F2: 127.48
 SOLVENT: MDECD
 NS: 356
 DS: 4
 SWH: 6510.413 Hz
 FWH: 12.88 Hz
 AQ: 0.126828 sec
 RG: 2.516759 Hz
 AC: 64
 PC: 76.803 sec
 DE: 6.400 sec
 TE: 300.2 K
 DT: 2.00000000 sec
 IC: 0.00000000 sec
 KC: 0.00000000 sec
 HYPER: 0.01550000 sec

 ***** CHANNEL F1 *****
 F1 - Processing parameters
 SI: 32768
 SF: 500.130098 MHz
 OF: 0.000000 MHz
 WDW: EM
 SSF: 0.20 Hz
 LB: 0
 GB: 0
 PC: 1.00

Figure 14 . ¹H NMR spectrum of FGT-9

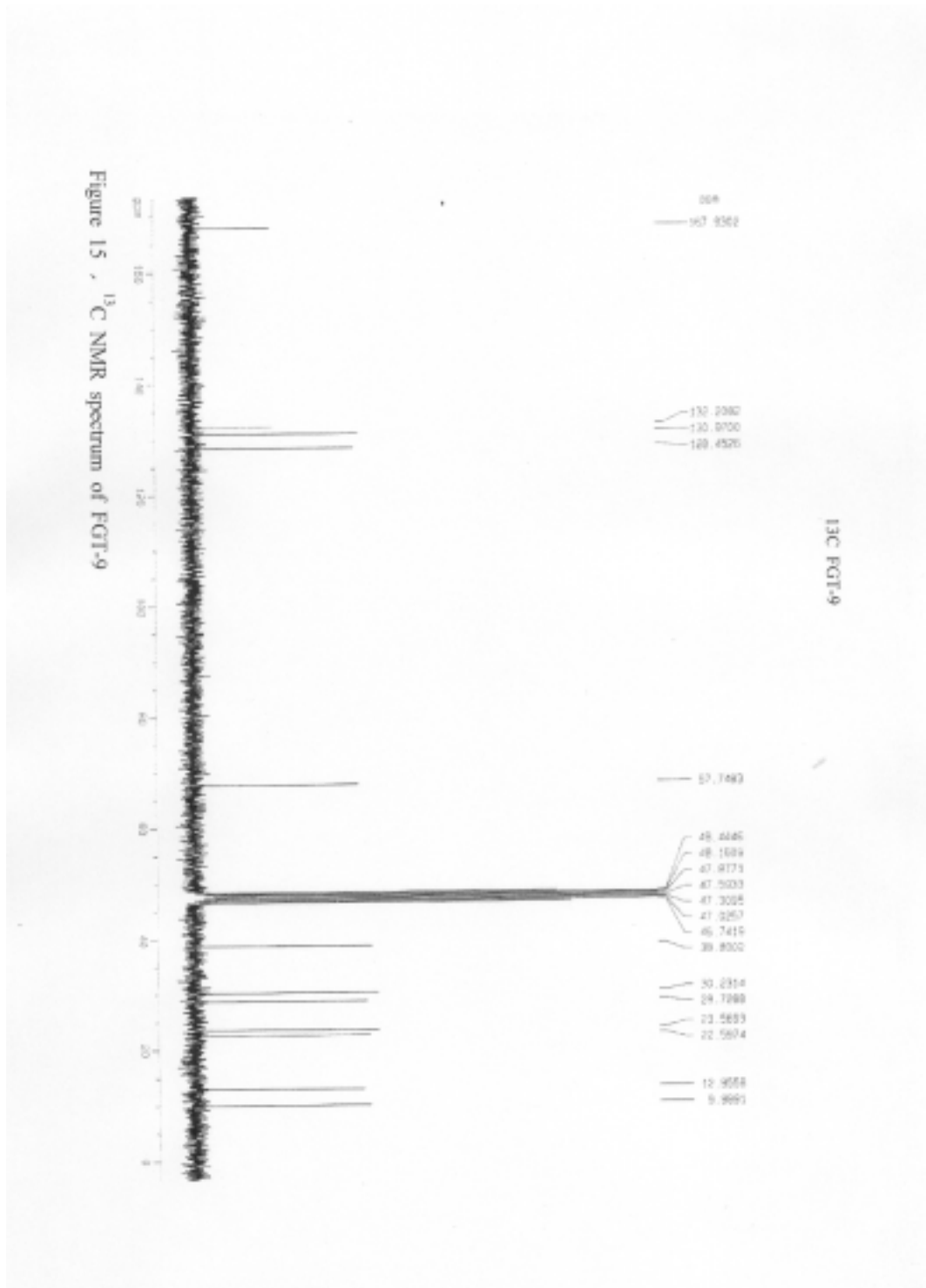


Figure 15 . ¹³C NMR spectrum of FGT-9

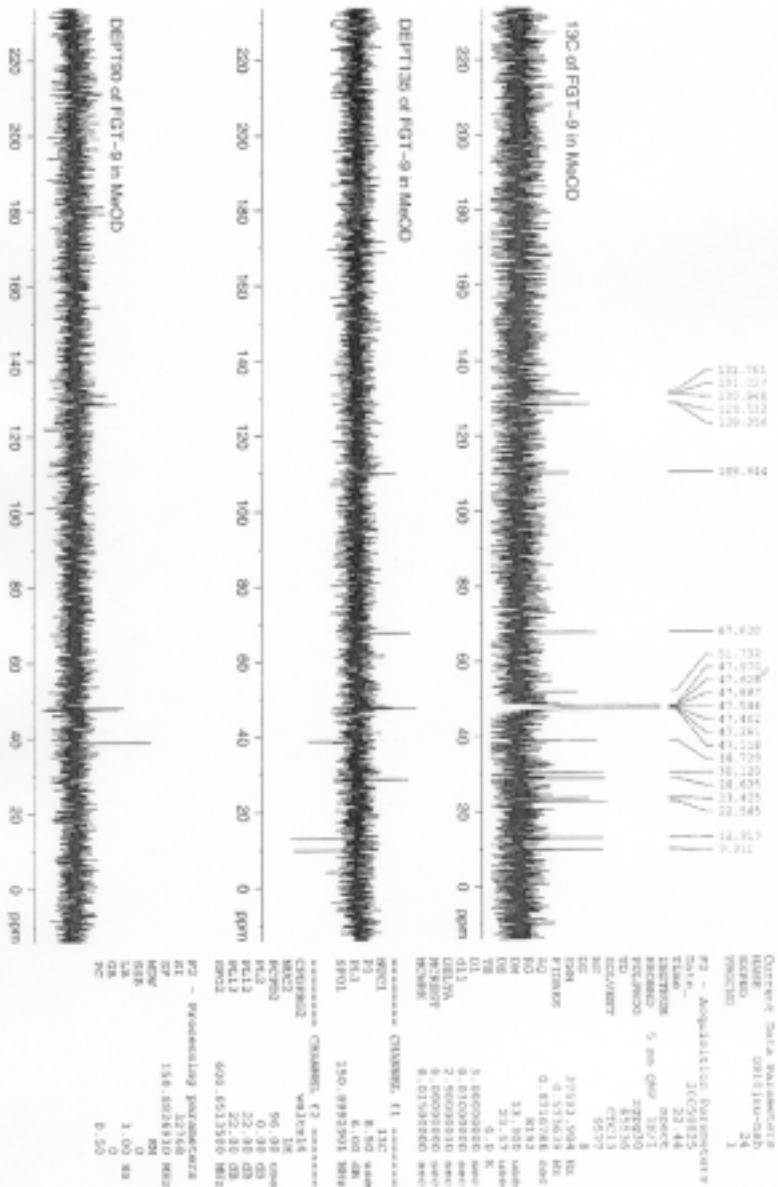


Figure 16 . DEPT NMR spectrum of FGT-9

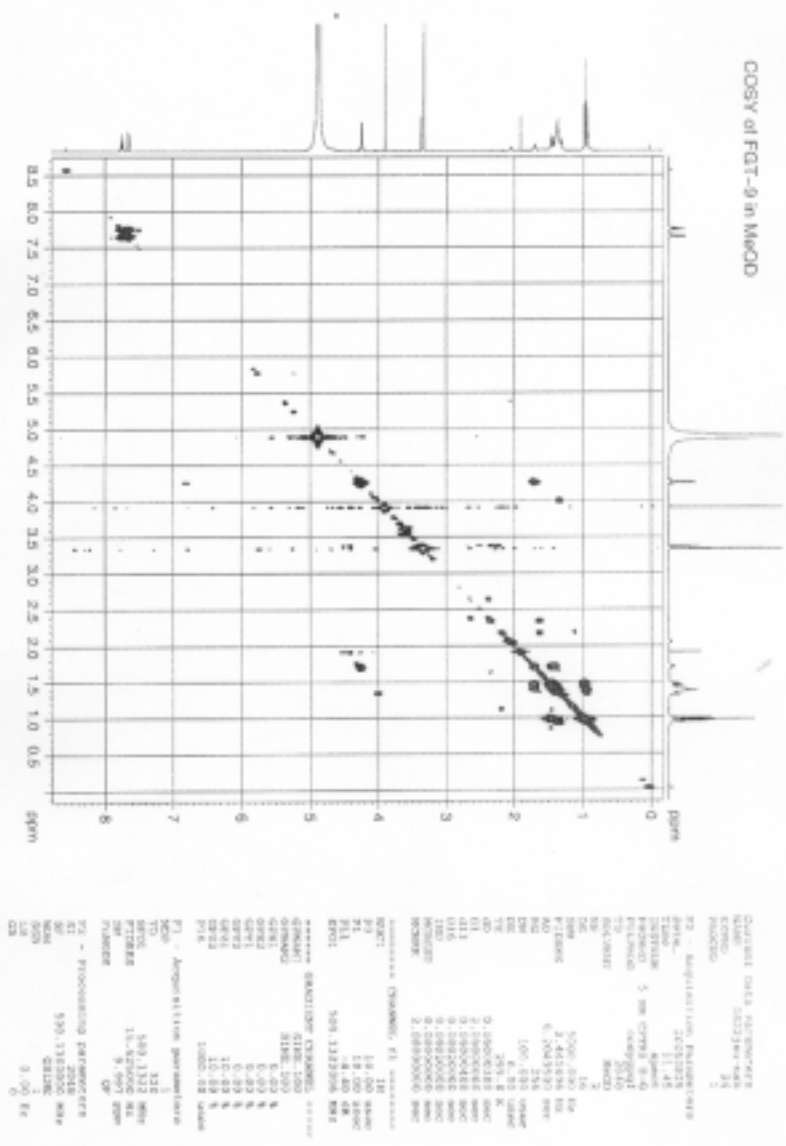
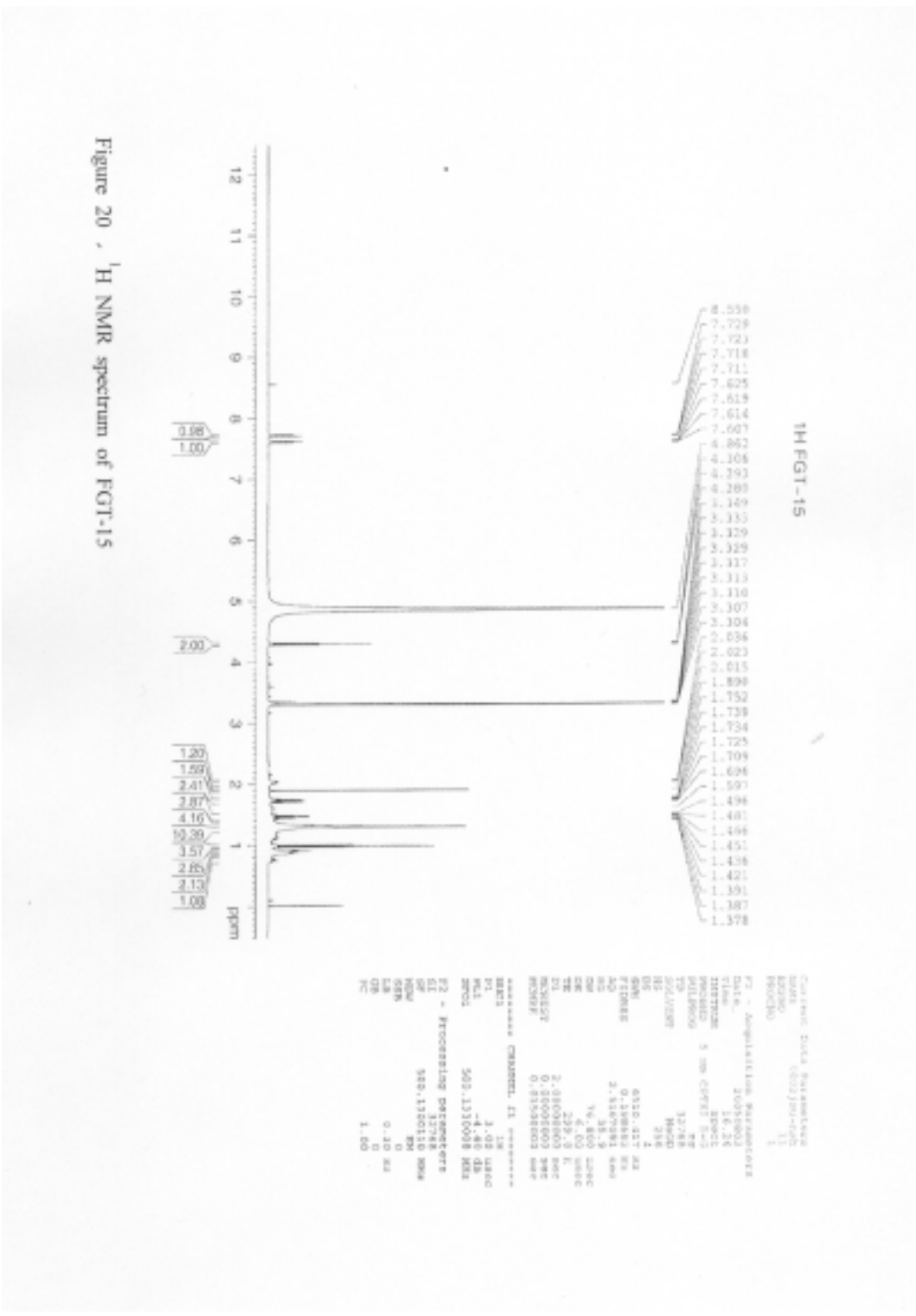


Figure 17 , ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of FGT-9



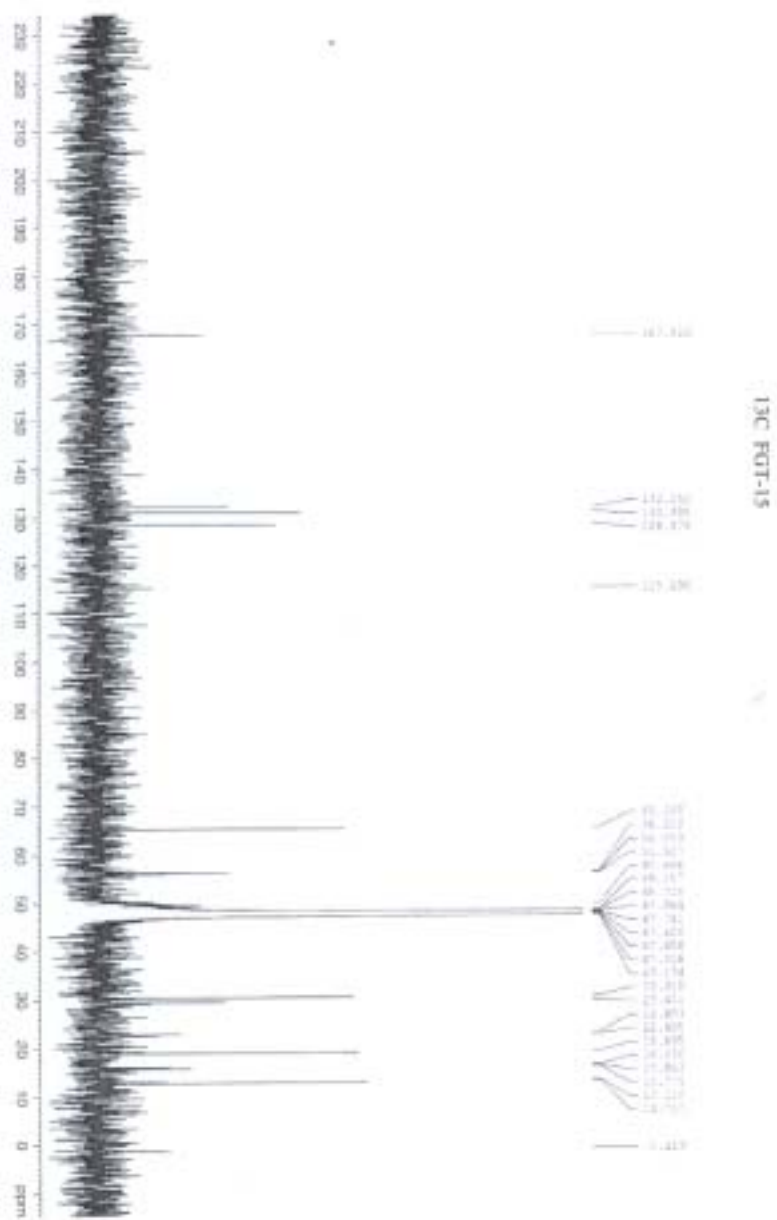


Figure 21 . ¹³C NMR spectrum of FGT-15

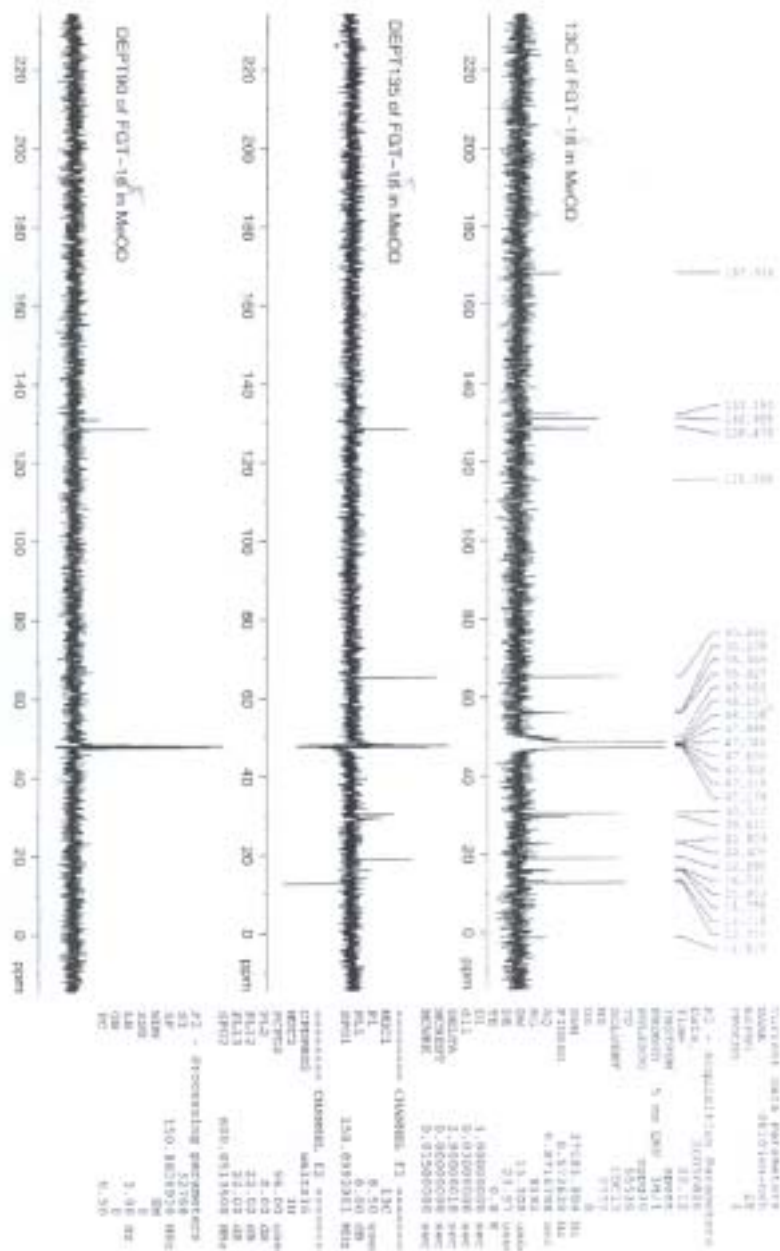


Figure 22 - DEPT NMR spectrum of FGT-15

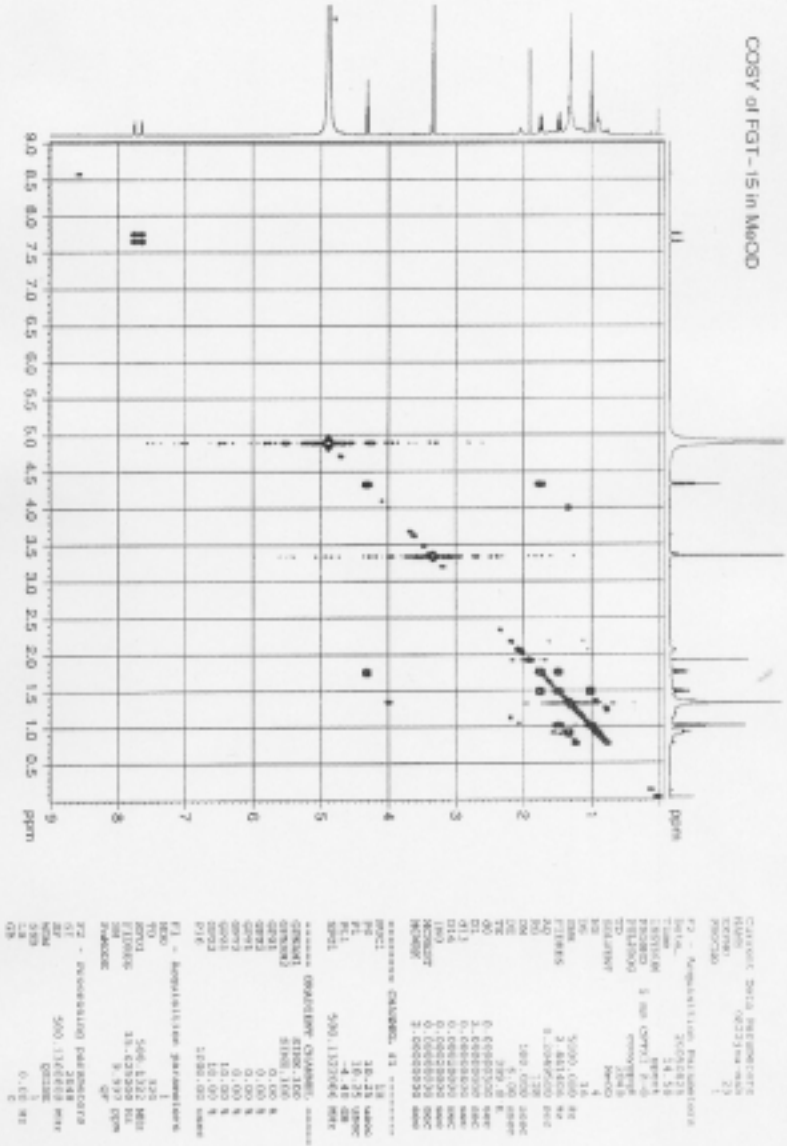


Figure 23 , ${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ COSY NMR spectrum of FGT-15

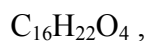
■ FGT-9



^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): 0.93 (6H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7'), 0.96 (6H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8'), 1.35-1.50 (16H, m, H-3'/H-4'/H-5'/H-6'), 1.70 (2H, m, H-2'), 4.23 (4H, dd, $J = 5.8, 1.0$ Hz, H-1'), 7.62 (2H, m, H-4), 7.75 (2H, m, H-3)

^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz): 10.0 (C-8'), 13.0 (C-7'), 22.6 (C-6'), 23.6 (C-5'), 28.7 (C-4'), 30.2 (C-3'), 38.8 (C-2'), 67.7 (C-1'), 128.5 (C-3), 131 (C-4), 132.2 (C-2), 167.9 (C-1).

■ FGT-15



^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): 0.98 (6H, t, $J = 7.5$ Hz, H-4'), 1.45 (4H, m, H-3'), 1.73 (4H, m, H-2'), 4.29 (4H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 7.62 (2H, m, H-4), 7.72 (2H, m, H-3)

^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): 12.7 (C-4'), 18.9 (C-3'), 30.3 (C-2'), 65.3 (C-1'), 128.5 (C-3), 131 (C-4), 132.2 (C-2), 167.9 (C-1).

제 10 절 후발효차의 항암효과

1. 재료 및 방법

가. 세포 주 배양법

생쥐 대식세포 계열의 세포주인 RAW264.7, cancer cell line인 HT-29, HeLa, A-549, HepG2 그리고 normal cell line인 COS-7(green monkey kidney fibroblast)은 한국 세포 주 은행(서울대학교 의과대학 암 연구소)에서 구입하였다. 세포배양을 위한 DMEM 배지에 sodium bicarbonate(NaHCO_3), 항생제(100 units/ml, penicillin, 100mg/mL streptomycin), 10% FBS(fetal bovine serum)를 첨가한 것을 이용하였으며, 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2~3번 refeeding하고 7~8일 만에 PBS(phosphate buffered saline)와 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 부착한 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75mm³ cell culture flask에 10 ml씩 일정 수 분할하여 주입하고 계속 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

나. 사용시약

DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지, FBS(fetal bovine serum)과 antibiotic- antimycotic은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)회사 제품을 사용하였으며, LPS(lipo- polysaccharide), N-1-naphthyl-ethylendiamine와 Sulfanilamide는 Sigma(St.Louis, MO, USA)회사 제품을 사용하였다. 효소 중합 연쇄 반응에 사용한 시약은 Promega회사 제품을, TNF- α , GM-CSF 와 IL-6측정에 필요한 항체는 Pharmingen회사 제품을 사용하였다.

다. Sulforhodamine B (SRB) assay

암세포를 96 well plate에 well당 3×10^4 /ml가 되도록 seeding하고 24시간 배양한 후 세포가 plate에 부착되면 시료 추출물 100 μ l를 첨가 한 후 37°C, 5% CO_2 incubator에

서 배양하였다. 배양 48시간 후에 배지를 제거한 후 0.9% NaCl로 한번 씻고, 10% TCA를 첨가하여 4℃에서 냉장 방치하였다. 1시간 후 TCA를 제거하고 증류수로 5번 씻은 후 실온에서 건조시키고 0.4% SRB 100 μ l를 첨가하여 30분 동안 염색시켰다. 그리고 1% acetic acid로 5번 씻은 후 다시 실온에서 건조시킨 후 0.01M tris base를 150 μ l를 첨가한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. Cu와 Cd에 의해 유도된 cell 독성에 대한 보호 효과 측정

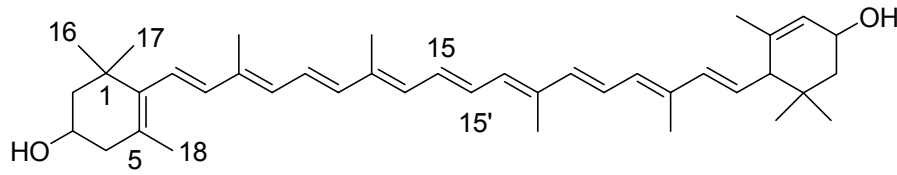
COS-7 세포를 24 well plate에 well당 5×10^4 /ml가 되도록 seeding하고 24시간 배양한 후 세포가 plate에 부착되면 시료 추출물 100 μ l를 첨가 한다. 2시간 후에 copper sulfate 또는 cadmium chloride를 첨가 하고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 배양하였다. 배양 24시간 후에 배지를 제거한 후 0.9% NaCl로 한번 씻고, 10% TCA를 첨가하여 4℃에서 냉장 방치하였다. 1시간 후 TCA를 제거하고 증류수로 5번 씻은 후 실온에서 건조시키고 0.4% SRB 100 μ l를 첨가하여 30분 동안 염색시켰다. 그리고 1%acetic acid로 5번 씻은 후 다시 실온에서 건조시킨 후 0.01M tris base를 150 μ l를 첨가한 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. Bioactive compounds 의 분리 및 정제

Compounds 1은 “Lutein”으로, ^1H NMR, ^{13}C NMR 그리고 CD data는 아래와 같으며, 문헌 data로 동정하였다(Fig 3.10.1). Compounds 2의 구조와 동정은 아직 확립 중에 있으나 지금까지의 결과로는 “Caffeine”으로 보여 지고 있다.

Lutein : ^1H -NMR(500MHz, CDCl_3) 0.85 (16'-H, s, 3H), 1.00 (17'-H, s, 3H), 1.07 (16-H and 17-H, s, 6H), 1.38 (2'-Hax, dd, $J = 5.3, 13.9\text{Hz}$, 1H), 1.48 (2-Hax, m, 1H), 1.63 (18'-H, s, 3H), 1.73 (18-H, s, 3H), 1.84 (2-Heq, m, 1H), 1.83 (2'-Heq, dd, $J = 6.2, 13.2\text{Hz}$, 1H), 1.91 (19'-H, s, 3H), 1.96 (19-H, 20-H and 20'-H, s, 9H), 2.05 (4-Hax, dd, $J = 10.5, 16.2\text{Hz}$, 1H), 2.38 (4-Heq, dd, $J = 5.0, 18.1\text{Hz}$, 1H), 2.39 (6'-H, d, $J = 9.2\text{Hz}$), 4.00 (3-H, m, 1H), 4.25 (3'-H, m, 1H), 5.43 (7'-H, dd, $J = 9.2, 15.5\text{ Hz}$, 1H), 5.54 (4'-H, s, 1H), 6.09 (7-H, d, $J = 16.2\text{ Hz}$, 1H), 6.13 (10-H, d, $J = 12\text{Hz}$, 1H), 6.14 (8-H, d, $J = 16\text{Hz}$, 1H), 6.15 (10'-H, d, $J = 11.5\text{Hz}$, 1H), 6.16 (8'-H, d, $J = 15.5\text{Hz}$, 1H), 6.25 (14-H and 14'-H, m, 2H), 6.34 (12'-H, d, $J = 14.9\text{Hz}$, 1H), 6.36 (12-H, d, $J = 14.9\text{Hz}$, 1H), 6.63 (11-H and 11'-H, m, 2H), 6.64 (15-H and 15'-H, m, 2H). ^{13}C -NMR(125MHz, CDCl_3) 12.76, 12.82, 12.82, (C-19', C-20, C-20'), 13.11 (C-19), 21.62 (C-18), 22.86 (C-18'), 24.32 (C-16'), 28.75 (C-16), 29.52 (C-17'), 30.28 (C-17), 33.48 (C-1'), 37.14 (C-1), 42.59 (C-4), 44.72 (C-2'), 48.48 (C-2), 55.02 (C-6'), 65.12 (C-3), 65.91 (C-3'), 124.51 (C-4), 124.89 (C-11), 125.01 (C-11'), 125.57 (C-7), 126.18 (C-5), 128.71 (C-7'), 124.89 (C-11), 130.09, 130.14 (C-15, C-15'), 130.78 (C-10'), 131.34 (C-10), 132.54 (C-14, C-14'), 135.13 (C-9), 135.68 (C-9'), 136.41 (C-13), 136.53 (C-13'), 137.57, 137.61 (C-12, C-12'), 137.79 (C-6), 137.85 (C-5'), 138.04 (C-8), 138.53 (C-8').



LUTEIN

$C_{40}H_{56}O_2$
 Exact Mass: 568.43
 Mol. Wt.: 568.87
 C, 84.45; H, 9.92; O, 5.62

Fig. 3.10.1 Structure of lutein purified from microbial fermented tea.

나. 후발효차 분획물 및 정제물질의 항암효과

암세포로 HT-29 인체 대장암 세포와 HeLa 자궁암 세포를 이용하여 발효차의 메탄올 추출물에 대하여 SRB assay를 행하였다. Fig 3.10.2 와 Fig. 3.10.3은 발효차의 활성물질을 얻고자 극성이 다른 용매로 분획하여 n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 그리고 water layer을 분획하여 HT-29 대장암 세포와 HeLa 자궁암 세포에 대한 SRB assay에 의한 저해 효과를 나타낸 것이다. HT-29 대장암 세포에 대해서 첨가농도 400 μ g/assay에서 발효차의 hexane 분획물(69.2%), chloroform분획물(52.9%), ethylacetate분획물(35.9%), butanol분획물(42.6%) 및 water layer분획물(34.4%)의 저해 효과를 나타내었다. 또한 HeLa 자궁암 세포에 대한 SRB assay에 대한 저해 효과는 첨가농도 400 μ g/assay에서 hexane 분획물(47.9%), chloroform분획물(60.0%), ethylacetate분획물(-2.8%), butanol분획물(-12.5%) 및 water layer분획물(-33.9%)의 저해 효과를 나타내었다. 50% 이상의 저해 효과를 나타낸 것은 hexane 분획물과 chloroform분획물에서 나타났다.

Fig. 3.10.4 및 Fig. 3.10.5, Fig 3.10.6 및 Fig. 3.10.7은 Fig 3.10.2와 Fig. 3.10.3에서 효과가 나타난 hexane 분획물(Fr.1)과 chloroform분획물(Fr.2)에 대한 column chromatography를 실시하여 각각의 column chromatography에서 5개의 분획(Fr.1.1~

Fr.1.5 / Fr.2.1~Fr.2.5)을 분리 한 후, HT-29 대장암 세포와 HeLa 자궁암 세포에 대한 SRB assay에 의한 저해 효과를 나타낸 것이다. hexane 분획물은 HT-29 대장암 세포에 대해서 첨가농도 200 μ g/assay에서 Fr.1.4와 Fr.1.5에서 81.1%와 58.8%의 저해 효과를 관찰하였고, HeLa 자궁암 세포에 대한 첨가농도 200 μ g/assay에서 Fr.1.4와 Fr.1.5에서 78.9%와 21.7%의 저해 효과가 나타났다. Chloroform분획물은 첨가농도 200 μ g/assay의 Fr.2.4에서 HT-29 대장암 세포에 대해서는 96.3%와 HeLa 자궁암 세포에 대해서는 73.3%의 저해 효과가 나타났다.

Fig. 3.10.8와 **Fig. 3.10.9**는 chloroform분획물의 Fr.4를 methanol/chloroform(2:1)의 용매 조건으로 분획하여 3개의 분획물(Fr.2.4.1~Fr.2.4.3)을 분리한 후의 SRB assay에 의한 저해 효과를 나타낸 것이다. 첨가농도 50 μ g/assay에서 HT-29 대장암 세포에 대해서 Fr.2.4.1(20.5%), Fr.2.4.2(37.1%) 그리고 Fr.2.4.3(43.5%)의 효과가 나타났다. 그리고 HeLa 자궁암 세포에 대해서 Fr.2.4.1(11.2%), Fr.2.4.2(48.9%) 그리고 Fr.2.4.3(40.8%)의 효과가 나타났다.

Fig. 3.10.10 와 **Fig. 3.10.11**은 Fig. 3.10.8 와 Fig. 3.10.9의 Fr.2를 precoated TLC에서 용매 조건 chloroform/acetone(1:1)로 3개의 분획을 분리한 후의 SRB assay에 의한 저해 효과를 나타낸 것이다. 첨가농도 20 μ g/assay에서 HT-29 대장암 세포에 대해서 Fr.1(16.7%), Fr.2(20.1%) 그리고 Fr.3(30.6%)의 효과가 나타났다. 그리고 HELA 자궁암 세포에 대해서 Fr.1(13.7%), Fr.2(10.8%) 그리고 Fr.3(-0.9%)의 효과가 나타났다.

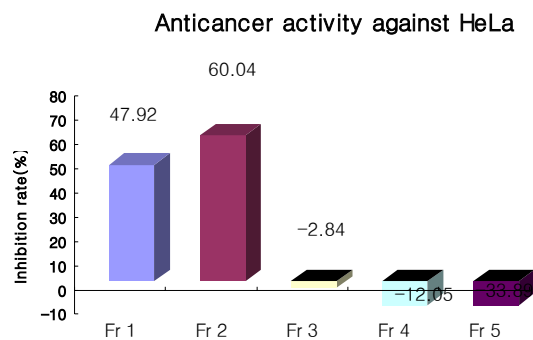


Fig. 3.10.2 Effect of fractionate Fr 1 – Fr 5 of microbial fermented tea on the viability of HeLa human uterine cancer cells by SRB assay.

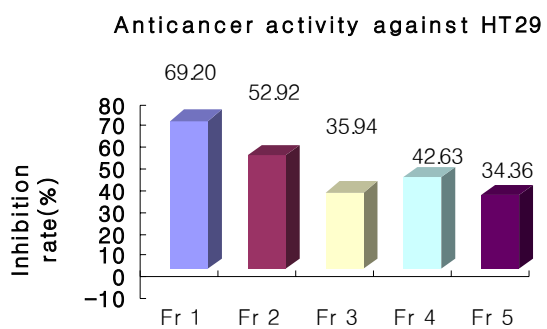


Fig. 3.10.3 Effect of fractionate Fr 1 – Fr 5 of microbial fermented tea on the viability of HT29 human colon cancer cells by SRB assay.

Anticancer activity against Hera

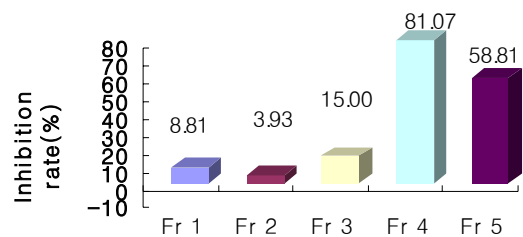


Fig. 3.10.4 Effect of fractionate Fr 1.1 - Fr 1.5 of microbial fermented tea on the viability of HeLa human uterine cancer cells by SRB assay.

Anticancer activity against HT-29

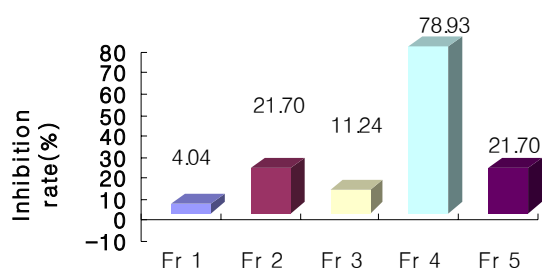


Fig. 3.10.5 Effect of fractionate Fr 1.1 - Fr 1.5 of microbial fermented tea on the viability of HT29 human colon cancer cells by SRB assay.

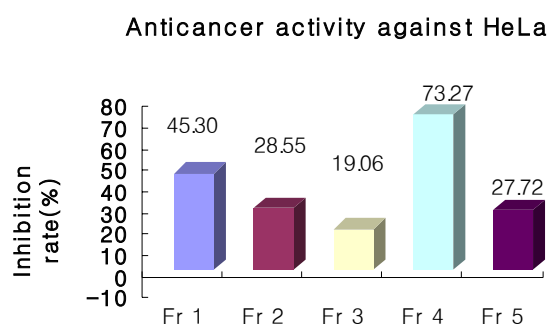


Fig. 3.10.6 Effect of fractionate Fr 2.1 - Fr 2.5 of microbial fermented tea on the viability of HeLa human uterine cancer cells by SRB assay.

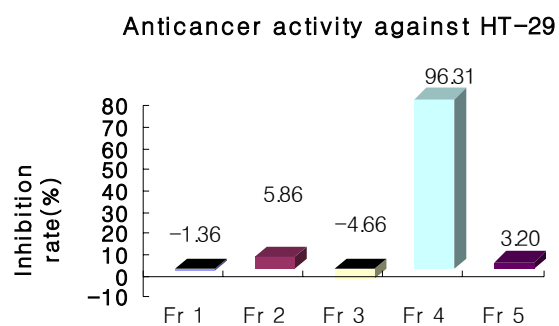


Fig. 3.10.7 Effect of fractionate Fr 2.1 - Fr 2.5 of microbial fermented tea on the viability of HT29 human colon cancer cells by SRB assay.

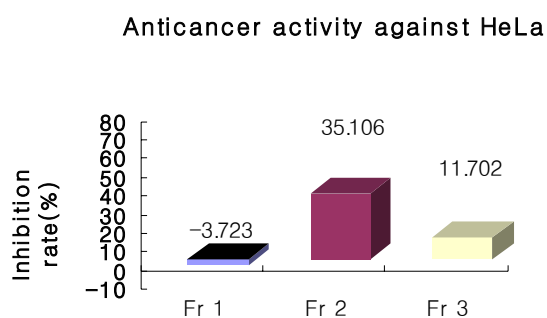


Fig. 3.10.8 Effect of fractionate Fr 2.4.1 – Fr 2.4.3 of microbial fermented tea on the viability of HeLa human uterine cancer cells by SRB assay.

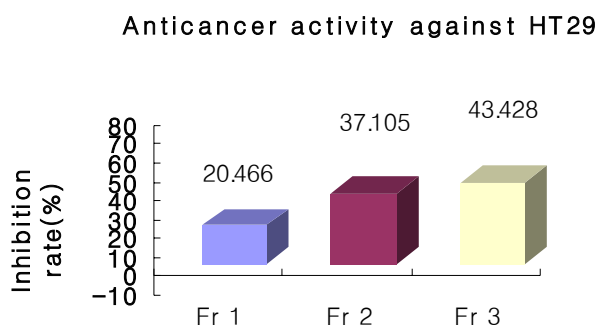


Fig. 3.10.9 Effect of fractionate Fr 2.4.1 – Fr 2.4.3 of microbial fermented tea

on the viability of HT29 human colon cancer cells by SRB assay.

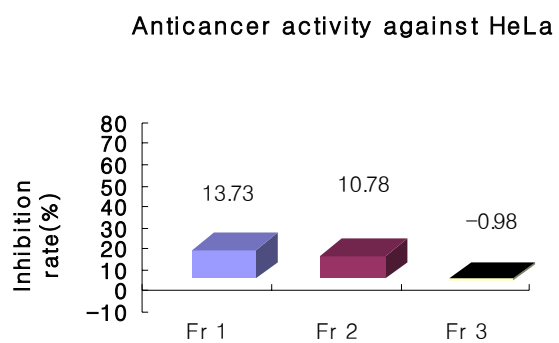


Fig. 3.10.10 (31). Effect of fractionate Fr 2.4.2.1 - Fr 2.4.2.3 of microbial fermented tea on the viability of HeLa human uterine cancer cells by SRB assay.

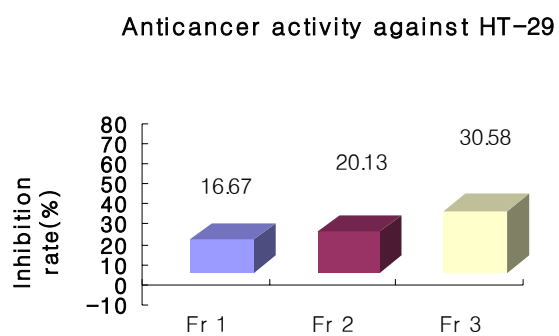


Fig. 3.10.11 Effect of fractionate Fr 2.4.2.1 - Fr 2.4.2.3 of microbial fermented tea on the viability of HT29 human colon cancer cells by SRB assay.

다, 후발효차에서 분리한 물질들의 항암 효과

Sulforhodamine B(SRB)는 두 개의 sulfonic group을 가진 밝은 핑크의 aminoxanthene염색액으로 단백질 염색에 널리 사용되어지는 bromophenol blue와 naphthol yellows와 유사하다. 약산성일 때 SRB는 trichloroacetic acid(TCA)로 고정된 세포내의 단백질 염기 아미노산 잔기와 결합하므로 세포의 밀도와 직선 관계이다. 본 연구에서는 후발효차에서 분리된 6개의 물질에 대하여 SRB assay를 행하였다. **Fig 3.10.12**는 A-549(폐암) 세포에 대한 6개 물질에 대한 저해 효과를 나타내었다. 첨가농도 80 μ g/assay에서 50% 정도의 저해 효과를 나타낸 것은 thearubigins(52%), theaflavins(48%), EGC(72%) 그리고 EGCG(66%)였으며 6개 물질들은 농도 의존적인 저해 효과를 보였다. **Fig. 3.10.13**은 HT-29(대장암) 세포에 대한 80 μ g/assay에서 thearubigins(55%), EGC(68%), tea extract(53%) 그리고 catechin(79%)의 저해 효과를 보였다. **Fig 3.10.14**는 HepG2(간암) 세포에 대한 80 μ g/assay에서 thearubigins(52%), theaflavins(55%), EGC(66%), EGCG(66%) 그리고 catechin(55%)의 저해 효과를 보였다. 그리고 **Fig 3.10.15**는 HeLa(자궁암) 세포에 대한 SRB assay로 저해 효과는 thearubigins(64%), theaflavins(68%), EGC(72%) 그리고 EGCG(62%)로 나타났다. 녹차와 후발효차에서 분리되는 catechin, EGC 그리고 EGCG는 4 종류의 암세포에 대하여 농도 의존적인 저해 효과를 나타내었으며, EGCG와 EGCG는 다른 물질에 비해서 조금 더 좋은 효과를 가지는 것으로 나타났다. 후발효차에서만 분리되는 thearubigins와 theaflavins는 50% 정도의 저해 효과를 나타내었다. 위의 결과들은 차의 섭취와 암 예방과의 관계를 나타내주고 있으며, 특히 녹차에는 분리되지 않는 물질인 thearubigins와 theaflavins은 실험한 4종류의 모든 암세포에 대한 저해 효과를 나타내었으므로 녹차보다는 후발효차의 생리활성 효과는 더욱 커질 것으로 예상된다.

라. COS-7 세포 생존율에 대한 효과

구리와 카드뮴과 같은 전이 금속에 일정하게 노출되면 대부분은 intracellular oxidative damage와 같은 병리적인 결과를 초래한다. 전이금속의 세포질 속의 축적은 내재 세포의 항상성 또는 단백질 배치를 바꾸게 하여 단백질의 기능을 저해한다. 또한 전이 금속은 미토콘드리아 막의 지질 과산화를 유도하여 막내의 cytotoxicity를 초래한다. 구리는 OH-라디칼의 형성을 촉매하는 금속이며, 카드뮴은 활성산소 형성을 촉매하여 산화적인 스트레스에 의한 손상을 초래하는 금속이다. 카드뮴은 산화적인 스트레스를 유발하여 세포내 항산화제인 glutathione을 고갈시키며, 또는 superoxide dismutase의 활성을 저해한다. 구리는 산화적인 스트레스를 유발하여 glutathione levels을 감소시킨다. 아스피린은 항염증 약이며 cyclooxygenase 활성을 저해하며 염증 전구체인 prostaglandins의 합성을 감소시킨다. 비타민 E는 지용성 비타민으로서 혈장에서 지질 산화 반응 전파를 방해함으로써 항산화제의 역할을 한다. COS-7 세포는 초록 원숭이의 normal kidney cell로 카드뮴과 구리에 의한 산화적 손상을 쉽게 받는 세포이다. 후발효차에서 분리한 물질 중의 EGCG와 여러 가지 항염증 물질들의 항산화적인 효과를 측정하였다(Fig. 3.10.16 ; Fig. 3.10.17). Cu 5와 8 mM에서 녹차, 발효차 그리고 EGCG는 아스피린과 비타민 E 보다는 높은 저해 효과를 보였으며, Cd 50과 100 uM에서는 녹차와 발효차는 500 μ g/assay 첨가군에서 다른 물질에 비하여 높게 측정되었고 EGCG는 모든 농도에서 저해 효과가 측정되었다. 따라서 녹차, 후발효차 그리고 EGCG는 기존의 항염증 치료제와 같은 효과가 측정되었다.

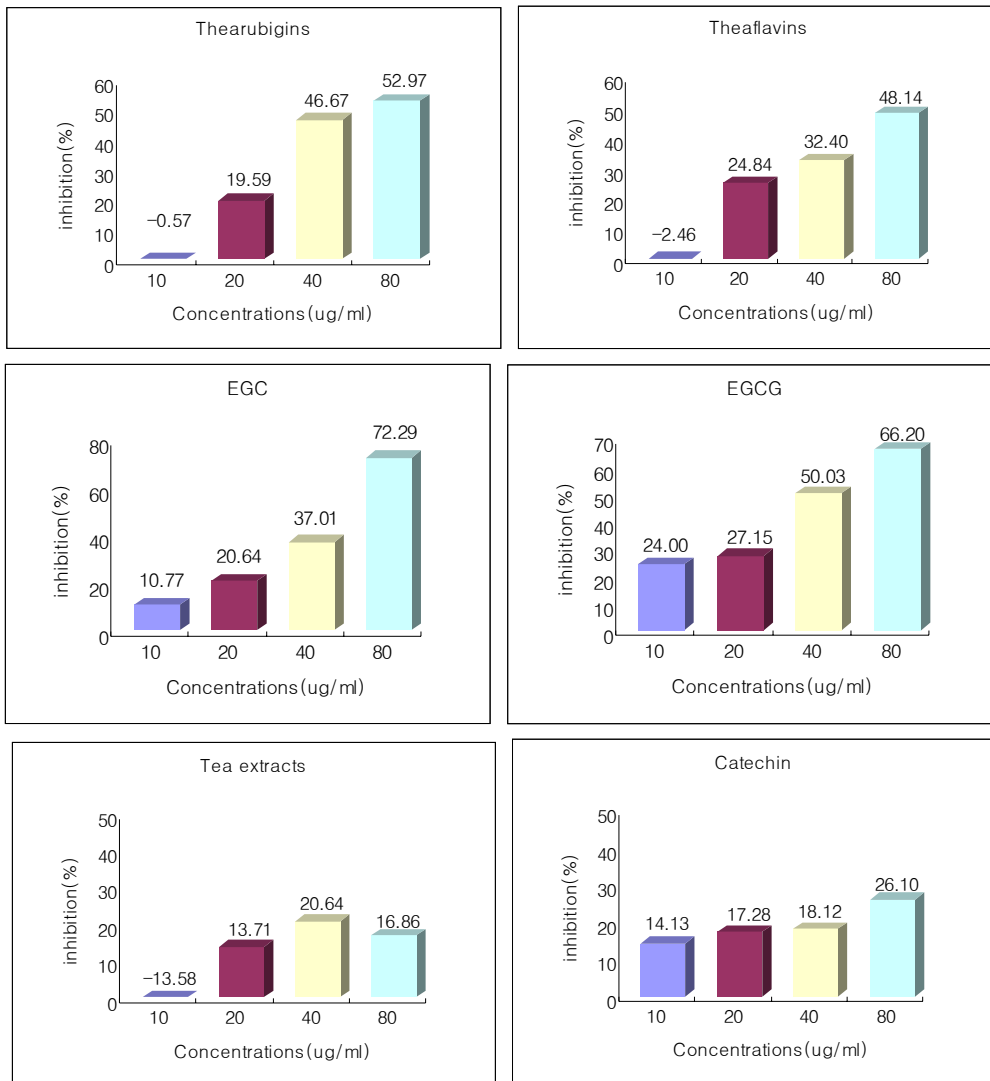


Fig. 3.10.12 In vitro inhibitory effects of isolated materials on the A-549 cell lines.

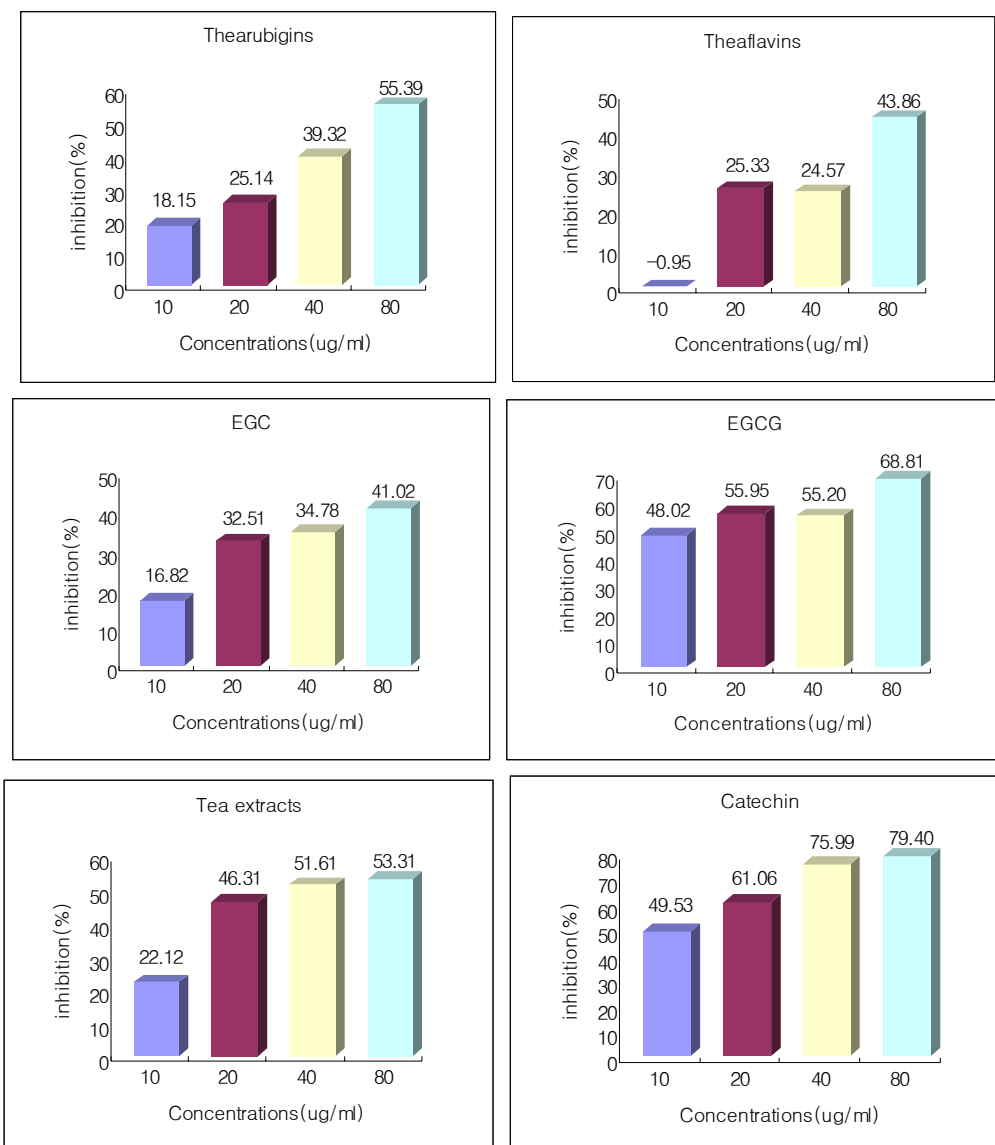


Fig. 3.10.13 In vitro inhibitory effects of isolated materials on the HT-29 cell lines.

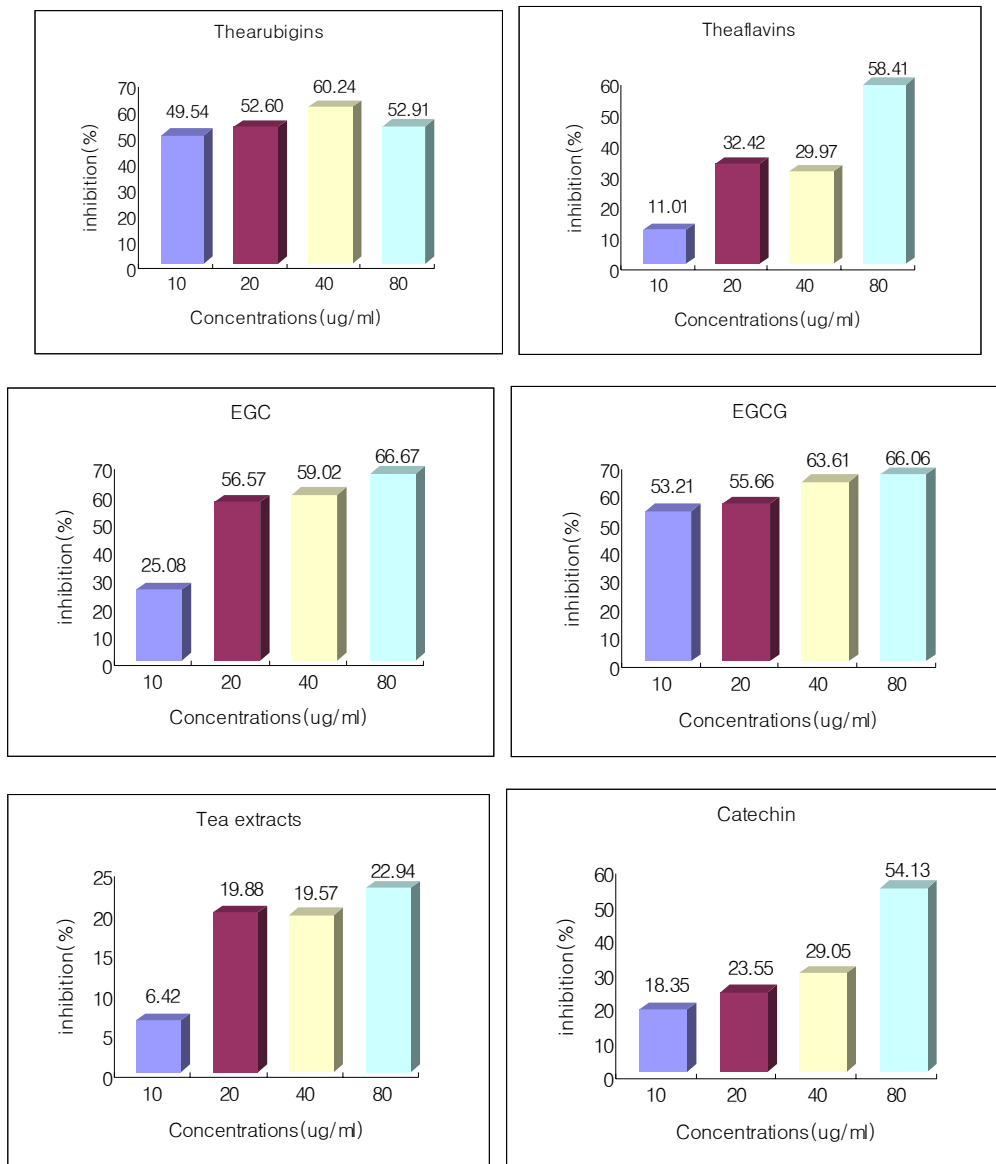


Fig. 3.10.14 In vitro inhibitory effects of isolated materials on the HepG2 cell lines.

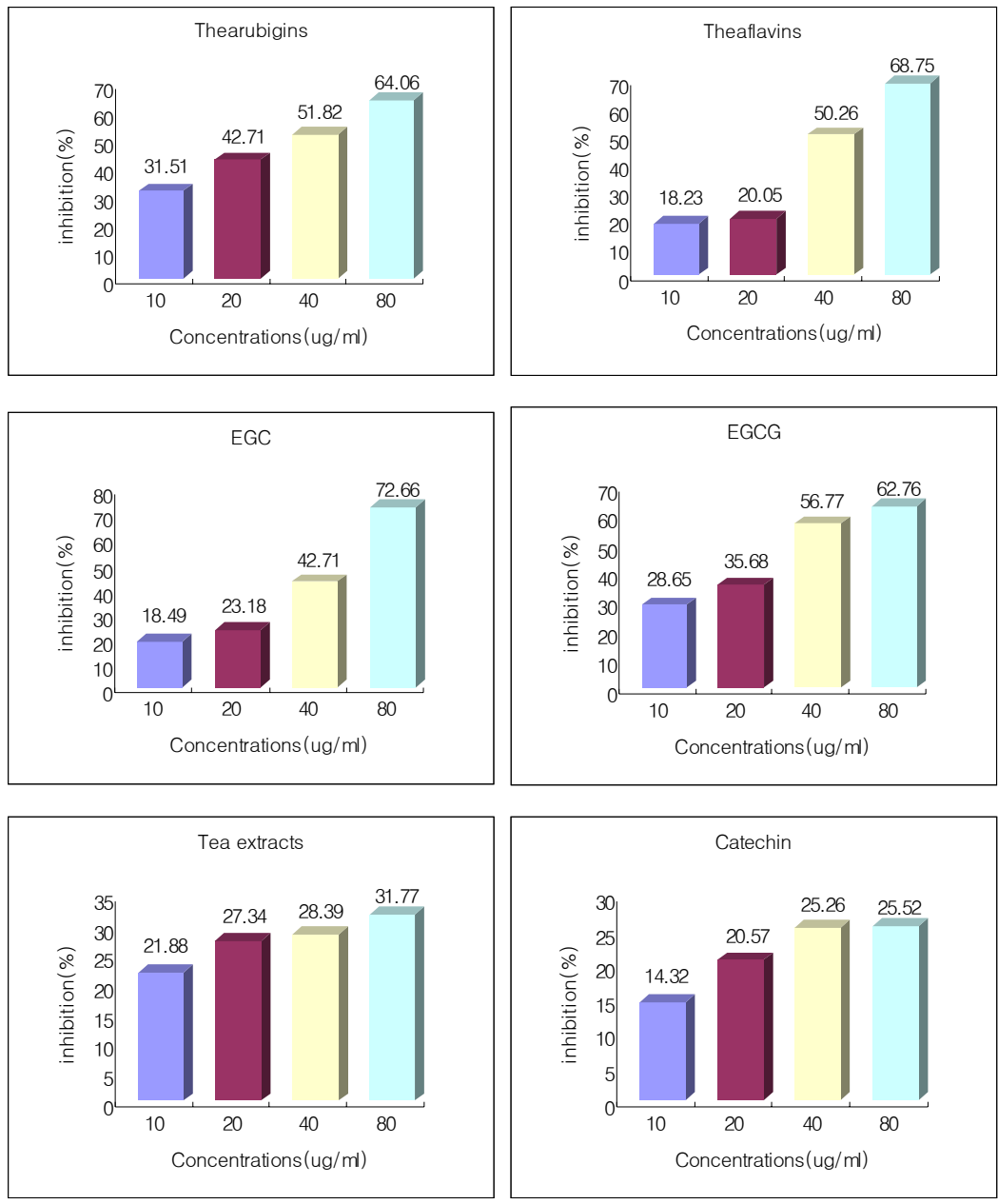
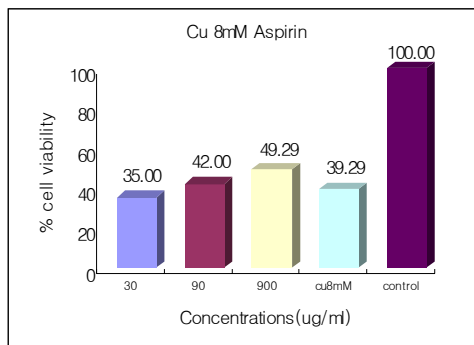
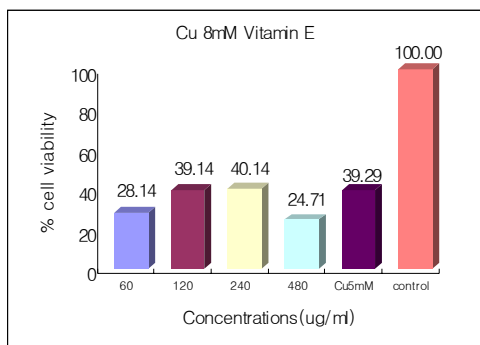
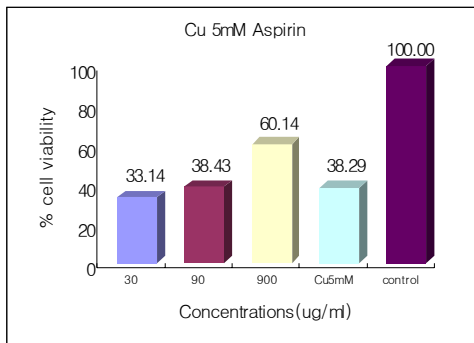
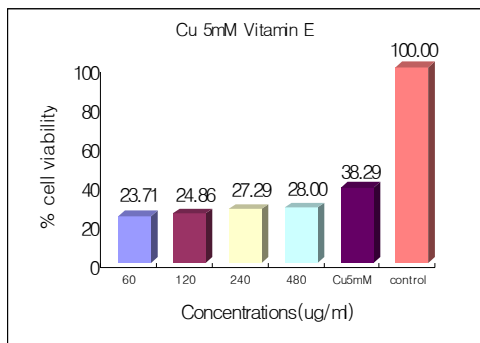
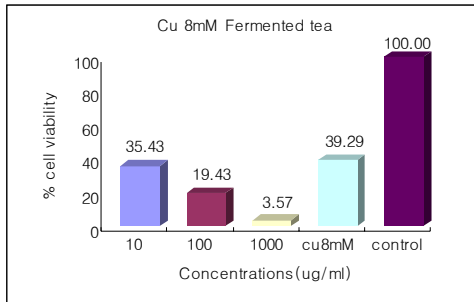
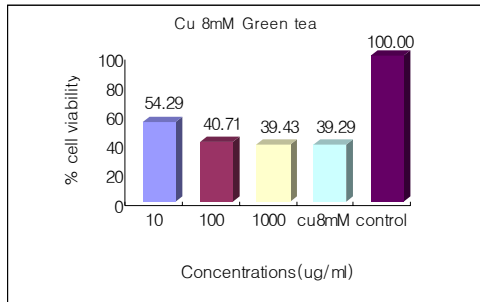
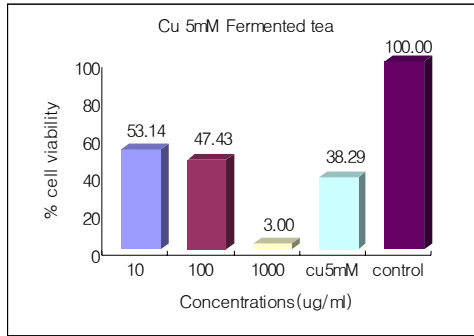
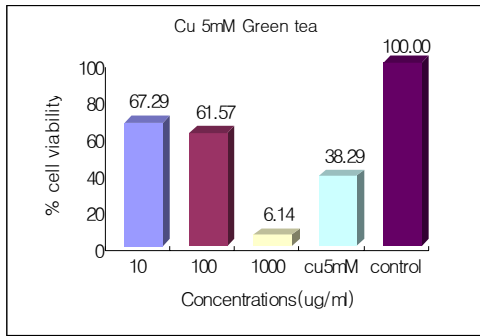


Fig. 3.10.15 In vitro inhibitory effects of isolated materials on the HeLa cell lines.



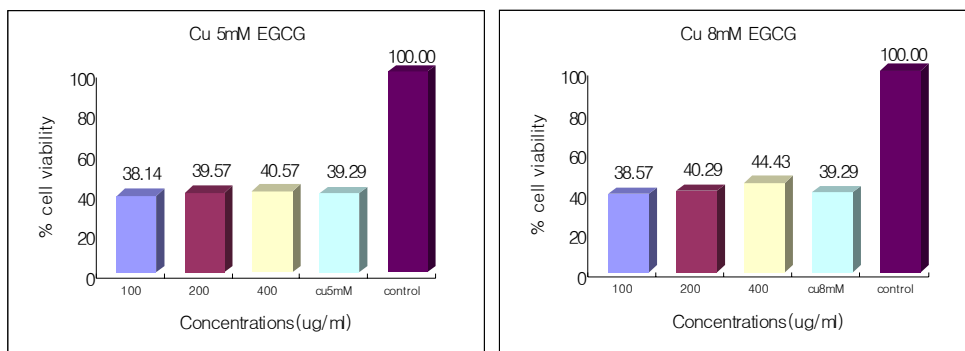
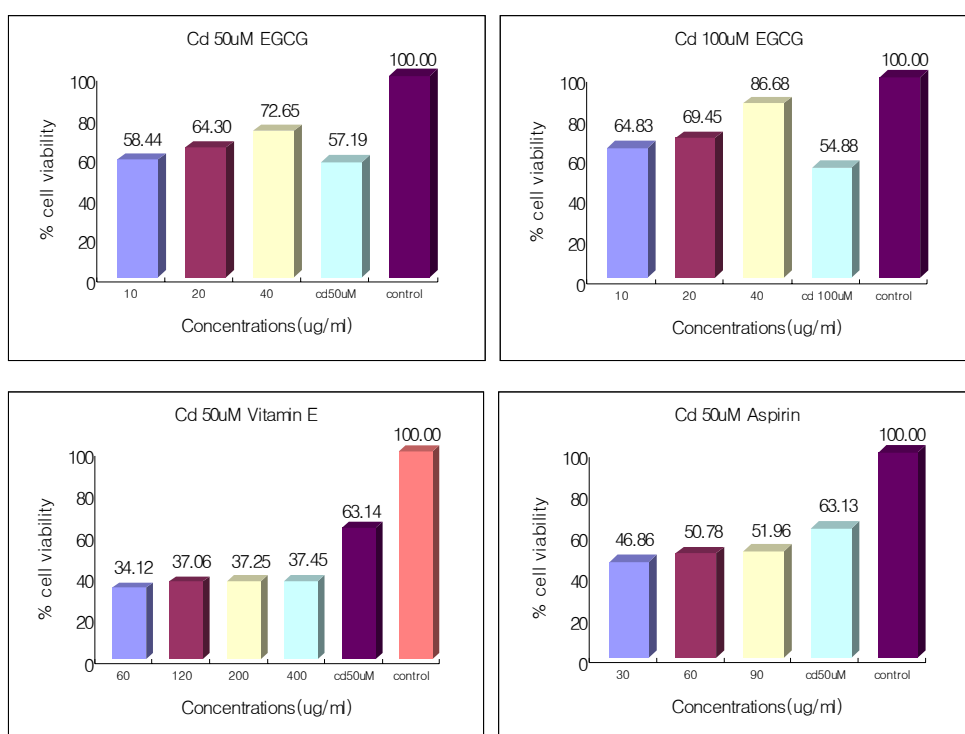


Fig. 3.10.16 Effects of aspirin, vitamine E and isolated materials on copper-induced toxicity. The effect of treating COS-7 cells with antioxidants prior to a 24-h exposure to 5 mM CuSO₄ or 8 mM CuSO₄ on cell viability was determined. The concentrations of added antioxidants are in micro-gram. Data are expressed as mean percent of untreated control.



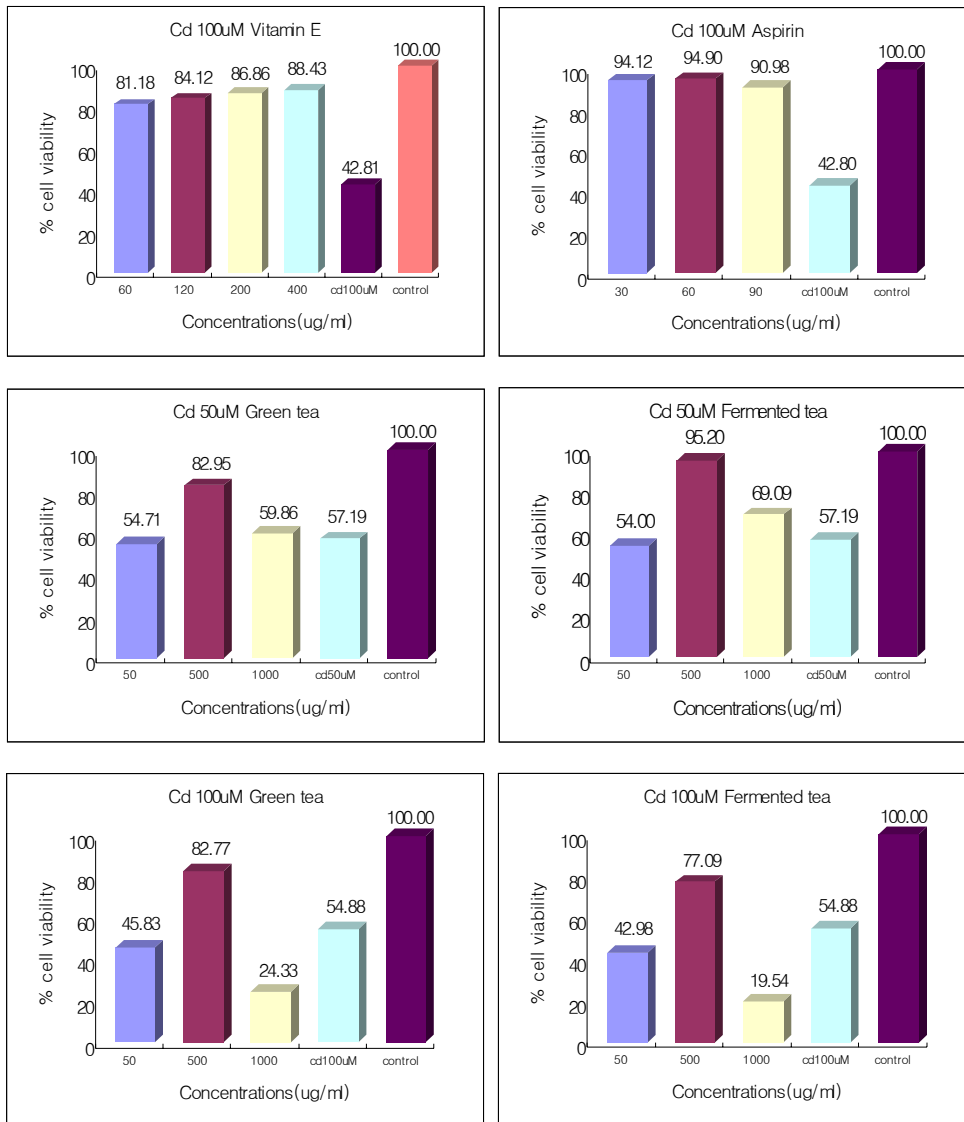


Fig. 3.10.17 Effects of aspirin, vitamine E and isolated materials on cadium-induced toxicity. The effect of treating COS-7 cells with antioxidants prior to a 24-h exposure to 5 mM CuSO₄ or 8 mM CuSO₄ on cell viability was determined. The concentrations of added antioxidants are in micro-gram. Data are expressed as mean percent of untreated control.

제 11 절 후발효차의 면역활성 효과

1. 재료 및 방법

가. NO 측정법

안정된 NO산화물인 NO_2^- (nitrite)는 Griess반응을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상층액을 flat bottom 96well plate에 $100\mu\text{l}$ 씩 넣고 여기에 Griess 시약(0.1% *N*-1-naphthyl- ethylenediamine in H_2O : 1% sulfanilamide in 5% $\text{H}_3\text{PO}_4 = 1:1$)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader(회사명)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 $32\mu\text{m}$ 에서 $0.25\mu\text{m}$ 까지 2배씩 희석하여 얻은 표준 곡선과 비교하여 계산하였다.

나. 사이토카인 측정법

후발효차에서 분리한 물질 또는 lipopolysaccharide(LPS)를 RAW264.7 세포에 첨가하여 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 IL-6, TNF- α , GM-CSF의 양을 측정하였다. 즉 일차 항체를 coating buffer(0.1M NaHCO_3)에 희석하여 plate에 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 다음 washing 용액(0.05% Tween 20/PBS)으로 세척한 다음, 소 혈청이 포함된 인산완충액10% FBS/PBS)으로 blocking한 후 배양 상층액을 적절하게 희석하여 첨가한 다음, biotin과 결합한 이차 항체를 첨가하였다. 일정한 시간 후에 avidin-peroxidase를 첨가하고, 기질(2,2'-azino-bis, 0.1 M citric acid, H_2O_2)을 넣어 발색시키는 효소 항체법(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)을 이용해 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 일산화질소(NO) 생산

대식 세포는 박테리아와 같은 항원이 침입하였을 때, 일차적으로 면역반응을 담당하는 세포로서, 우선 침입한 박테리아를 잡아먹는 식세포 작용을 한다. 잡아먹힌 박테리아는 금방 죽는 것이 아니라 대식 세포내 살균 작용에 의해 죽고 분해 된다. 박테리아를 죽이기 위해 대식세포가 분비하는 물질은 여러 가지가 알려져 있지만, 그 중에서 최근에 밝혀진 것으로 일산화질소가 있다. 따라서 조 다당체 추출물이 대식세포의 일산화질소 생산에 어떠한 영향을 미치는지를 검색하였다. 대식 세포주(RAW264.7)에 발효차에서 분리한 물질 6가지를 첨가하여 48시간 배양한 후 배양액 중 대식세포가 생산한 NO가 산화된 형태인 NO₂-농도를 측정하였다. 그 결과 무처리 대조군에 비하여 6가지 물질을 첨가한 실험군에서는 농도 의존적으로 대식세포의 일산화질소 생산을 유도하였다. 즉 발효차에서 분리한 물질들은 대식세포를 활성화시켜서 일산화질소 생산을 유도하는 것을 알 수 있었다.

나. 대식세포의 사이토카인 생산

대식세포는 항원의 자극을 받아 활성화되면 IL-6, TNF- α , GM-CSF 등을 분비하여 면역 반응을 조절한다. 특히 TNF- α 는 종양괴사인자(tumor necrosis factor)로 알려진 물질로 종양 세포를 파괴하는 사이토카인이고, IL-6는 간세포가 피브리노겐과 같은 몇 가지 혈장단백질을 합성하도록 유도하며 B세포 분화를 유도하는 B세포 성장인자로 작용한다.

그리고 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor)는 골수전구세포의 분화와 증식을 유도하여 과립구와 대식세포를 만드는 작용을 한다. 따라서 발효차에서 분리한 물질들이 대식세포가 생산하는 이들 사이토카인의 분비에 어떠한 영향을 미치는지를 검색하였다. 분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여 대식 세포주에 분리한 물질들을 첨가하여 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 사이토카인의 분비량을 측정하였다. 대식세포를 활성화시키는 LPS에 의하여 많은 양의 IL-6, TNF- α , GM-CSF 생산이 유도되는 것으로 나타났다. 그리고 분리한

물질들을 첨가하였을 때, 무처리 대조군에 비하여 IL-6, TNF- α , GM-CSF의 분비가 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 대식세포 사이토카인 생산량은 대식세포를 활성화 시키는 LPS보다 높게 나타났다. 따라서 발효차에서 분리한 6가지 물질들은 대식세포를 활성화 시켜 다양한 사이토카인을 분비하여 항종양 및 면역 활성을 유도하는 것을 확인하였다.

Table 3.11.1 Effects of isolated materials from black tea on the secretion of TNF- α , GM-CSF and IL-6(24H)

Conditions	Cytokines, pg/mL		
	TNF- α	GM-CSF	IL-6
Control	-	812.69	-
Lps(10 μ g/ml)	-	562.40	-
LPS+Thearubigins	232.54	5604.01	669.35
LPS+Theaflavins	675.11	3655.63	15471.1
LPS+EGC	675.11	3414.82	12107.91
LPS+EGCG	865.73	6523.47	14722.7
LPS+Tea extract	786.17	6260.77	13613.95
LPS+Catechin	693.34	5822.93	15508.06

The RAW264.7(2×10^4 /well) were cultured for 24hr in medium contained LPS(10 μ g/ml) in the presence or absence of extracts (80 μ g/ml).

The amount of TNF- α , GM-CSF and IL-6 secreted by RAW264.7 was measured by ELISA.

Table 3.11.2 Effects of isolated materials from black tea on the secretion of GM-CSF, GM-CSF and IL-6 (24H)

Conditions	Cytokines, pg/mL		
	TNF- α	GM-CSF	IL-6
Control	-	812.69	-
Lps(10 μ g/ml)	-	562.40	-
Thearubigins	249.11	8471.85	1399.27
Theaflavins	479.52	3195.90	13438.4
EGC	481.17	2714.28	7146.27
EGCG	757.99	4465.63	15951.56
Tea extract	623.73	3633.74	13364.49
Catechin	550.79	3436.71	10648.06

The RAW264.7(2×10^4 /well) were cultured for 24hr in medium contained LPS(10 μ g/ml) in the presence or absence of extracts (80 μ g/ml).

The amount of TNF- α , GM-CSF and IL-6 secreted by RAW264.7 was measured by ELISA.

Table 3.11.3 Effects of isolated materials from black tea on the production of nitric oxide. (uM)

Conc. (μ g/ml)	Control	LPS (10 μ g/ml)	LPS +Thearubigins	LPS +Theaflavins	LPS +EGC	LPS +EGCG	LPS +tea extract	LPS +Catechin
0	18.44	20.61	-	-	-	-	-	-
10	-	-	22.03	19.03	19.94	18.28	19.53	39.19
20	-	-	20.19	18.61	28.19	17.86	19.78	33.78
40	-	-	22.36	21.19	33.44	22.53	20.11	24.44
80	-	-	61.86	25.44	36.28	25.78	31.86	23.44

The RAW264.7(2×10^4 /well) were cultured for 24hr in medium contained LPS(10 μ g/ml) in the presence or absence of isolated materials.

Table 3.11.4 Effects of isolated materials from black tea on the production of nitric oxide.
(uM)

Conc ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Control	LPS ($10\mu\text{g}/\text{ml}$)	Thearubigins	Theaflavins	EGC	EGCG	Tea extract	Catechin
0	18.44	20.61	-	-	-	-	-	-
10	-	-	22.03	15.19	13.61	13.78	14.86	14.69
20	-	-	25.03	14.28	15.53	13.94	14.69	14.61
40	-	-	27.36	16.44	21.36	17.11	14.36	14.11
80	-	-	33.86	37.53	30.28	14.19	13.28	13.61

The RAW264.7(2×10^4 /well) were cultured for 24hr in medium contained LPS($10\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of isolated materials.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가 착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에서의 기여도 등을 기술

연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전에서의 기여도
후발효차의 발효공정 개선 및 품질특성 조사	유용스타트를 활용한 반자연발효법을 개발하고, 품질평가를 실시함	새로운 후발효차의 개발 기술을 확립하였다.
후발효차를 이용한 전통된장의 개발	전통된장의 저염화 및 기호성 개선을 부분적으로 확립함	전통된장에서 녹차이용에서 문제점을 해결하는데 기여할 것이다.
후발효차와 버섯균사체를 이용한 생청국의 개발	생청국의 기능성 증진하고자 후발효 및 균사체를 이용하여 대두 기능성분의 생물공학적 전환	녹차와 대두의 기능성분을 2단 발효를 통하여 증진시킬 수 있다.
후발효차를 이용한 콩요구르트의 개발	대두요구르트의 제조공정에서 문제점을 부분적으로 개선하였음	우유요구르트와 기호성 접근을 위한 기초기술 제공할 수가 있다.
후발효차 추출물을 이용한 음료, 과립 및 캡슐화 제조공정 개발	후발효차의 응용품 제조 기술을 확립하고, 관련 레시피를 확보함	녹차 대신의 새로운 덜 자극성 음료와 과립생산 기술에 기여될 수 있다.
후발효차의 항균성과 항산화효과	후발효차 성분의 천연항균제로 응용과 항산화제로서 가능성 제시	폴리페놀성 천연물의 활용에 대한 방향 제시
후발효차의 항암효과	녹차 카테킨류의 미생물학적 전환에 의한 관련산화물의 항암성 탐색함	녹차의 기능성에서 후발효차 생리활성에 대한 방향제시
후발효차의 면역활성 효과	녹차 카테킨류의 후발효공정에 의한 관련산화물 생성과 면역활성 탐색	후발효차의 생리활성물질 검색에 대한 필요성 제시

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술

* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

본 과제에서 후발효차의 기능성에 대한 연구는 후발효차 및 관련 개발 제품에 대한 기능성 탐색 정도에 불과하였으므로, 이 결과를 근거로 하여 후발효차를 포함한 미생물 발효차에 대한 더욱 진보적인 기능성 연구가 필요할 것으로 생각된다.

아울러 본 연구 진행과정 및 결과는 앞으로 발효차가 녹차에 비하여 그 소비인구가 증대되리라는 예측으로 숙성차 혹은 반숙성차에 그대로 응용 가능하리라 사료된다.

본 연구결과는 특허출원하고, 지리산권 전통차 (특히 야생차 고급차)의 음료 및 차의 제품생산라인을 갖춘 기업체에 기술을 이전하여 산업화하는 방안을 모색하고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

후발효차를 이용한 기능성 식품 개발에 관한 해외과학기술정보는 전무한 상태이나, 유럽의 발효차 문화가 확산되므로 인하여 녹차 카테킨류의 산화물인 “thearubigins와 theaflavins의 생리활성”에 관한 기초적인 연구 결과들이 보고 되고 있다.

제 7 장 참고문헌

1. Matsuzaki, T. and Hara, Y. : Antioxidative activity of tea leaf catechins, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 59, 129(1985)
2. Babli Halder, Swapan Pramanick, Sibabrata Mukhopadhyay and Ashok Kumar Giri : Inhibition of benzo[*a*]pyrene induced mutagenicity and genotoxicity by black tea polyphenols theaflavins and thearubigins in multiple test systems, *Food Chemical Toxicology* 43, 591~597(2005). ---- 물질분리
3. Yeo, S.A., Ahn, C.W., Lee, Y.W., Lee, T.G., Park, Y.H. and Kim, S.B. : Antioxidative effect of tea extracts from green tea , Oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24(2), 299-304(1995)
4. Kim, J.I. and Row, K.H. : Recovery of catechin compound from korean green tea by solvent extraction and partition. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 16(5), 442-445(2001)
5. Choi, S.H. : Volatile aroma components of korean semi - fermented teas. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 33(5), 529-533(2001)
5. Toit, J.D., Joubert, E. and Britz, T.J. : Idertification of microbial contaminants present during the curing of honeybush tea(*Cyclopia*). *J. Sci. Food Agric.*, 79, 2040-2044(1999)
6. Tüfekci, M. and Güner, S. : The determination of optimum fermentation time in turkish black tea manufacture. *Food Chemistry*, 60(1), 53-56(1997)
7. Nomura, M., Ma, W.Y., Huang, C., Yang, C.S., Tim bowden, G., Miyamoto, K.I. and Dong, Z. : Inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activation by theaflavins from black tea. *Molecular Carcinogenesis*, 28, 148-155(2000)
8. Ding, M., Yang, H. and Xiao, S. : Rapid, direct determination of polyphenols in by reversed-phase column liquid chrnatography. *J. Chromatography A*, 849, 637-640(1999)
9. Chao, Y.C. and Chiang, B.H. : Cream formation in a semifermented tea. *J.*

- Sci. Food Agric*, 79, 1767-1774(1999)
10. Ravichandran, R. and Parthiban, R. : Changes in enzyme activities (polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase) with type of tea leaf and during black tea manufacture and the effect of enzyme supplementation of dhool on black tea quality. *Food Chemistry*, 62(3), 277-281(1998)
 11. Tomita, M., Irwin, K.I., Xie, Z.J. and Santoro, T.J. : Tea pigments the production of type 1(T_{H1}) and type 2(T_{H2}) helper T cell cytokines in CD4⁺ T cells. *Phytother. Res.* 16, 36-42(2002)
 12. Murugesan, G.S., Angayarkanni, J. and Swaminathan, K. : Effect of tea enzymes on the quality of black tea. *Food Chemistry*,
 13. Sud, R.G. and Baru, A. : Seasonal variations in theaflavins, thearubigins, totar colour and brightness of kangra orthodox tea (*Camellia sinensis*(L) O Kuntze) in himachal pradesh. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1291-1299(2000)
 14. Wright, L.P., Mphangwe, N.I., Nyirenda, H.E. and Apostolides, Z. : Analysis of the theaflavin composition in black tea (*Camellia sinensis*) for predicting the quality of tea produced in central and Southern Africa. *J. Sci. Food Agric.*, 82, 517-525(2002)
 15. Obanda, M., Okinda Owuor, P. and Mang'oka, R. : Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation and temperature. *Food Chemistry*, 75, 395-404(2001)
 16. Wang, H. and Helliwell, K. : Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Research International*, 34, 223-227(2001)
 17. Begona Barroso, M. and Werken, G. : Determination of green and black tea composition by capillary electrophoresis. *J. High Resol. Chromatogr.*, 22, 225-230 (1999)
 18. Obanda, M. and Owuor, P.O. : Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. *J. Sci. Food Agric.*, 74, 209-215(1997)

주 의

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