

어젠다코드	2-6-2		구분	완결	
기술분야코드	V3	기술유형코드	H03	작목구분코드	FC-03-0301
과제종류	농업공동연구		세부사업(약어)	지역주력	
과제명	유산균 발효를 이용한 콩잎차 개발				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	박은희		대표	(주)메타스크린	
연구기간	2017 ~ 2018		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 콩부산물 활용 콩잎 가공품 개발			(주)메타스크린	박은희	'17~'18
2) 콩잎 유효성분, 대사체 분석 및 효능 검정			농식품연구소	이하연	'17~'18
2) 생물전환 우수 유산균 선별 및 발효공정 개발			강원대학교	김명동	'17~'18
색인용어	콩잎, 발효차, 유산균, 이소플라본, 콩잎차				

ABSTRACT

Soybean leaves mostly wasted after cultivating soybean has been reported to have isoflavones which have effects on enhancing immune system and reducing climacteric symptoms. Twenty-seven soybean leaf tea samples from different conditions such as three soybean cultivars(Gangil, Cheonga, and Hoban), cultivations areas(Chunchun, Jungeup, and Yecheon) and harvesting date(1 to 3 months) were analyzed for isoflavones and aroma volatile flavor compounds. The isoflavones contents such as daidzin, genistin, glycitin, daidzein, genistein, and glycitein were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Aroma volatile compounds from soybean leaf tea were identified by headspace gas chromatography time-of-flight/mass spectrometry(HS-GC-TOF/MS). As a result, Hoban soybean cultivar exhibited high isoflavones compared to other soybean cultivars. Some isoflavone aglycone such as daidzein and genistein increased with the passing of harvesting date in Jeongeup. Six main aroma volatile compounds in soybean leaf tea were 3-octanone, 1-tridecanol, ethanone, 1-octen-3-ol and cyclopentasiloxane. Further study that monitors the correlation of sensory properties and product quality should be performed to develop high quality of soybean leaf tea.

Also, we evaluated antioxidant and nitrite scavenging activities soybean leaf tea and fermented soybean leaf tea using *Leconostoc mesenteroides* MSL129 and *Leconostoc lactics* MBE1530. The total polyphenol and flavonoid content showed no significance between soybean leaf tea and fermented soybean leaf tea. Compared to soybean leaf tea, soybean leaf tea fermented by lactic acid bacteria possessed the highest 1, 1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging capacity, 2, 2'-azobis-3-ethylbenthiiazoline-6-sulfonic acid(ABTS)

radical-scavenging capacity, superoxide dismutase(SOD)-like activities, ferric reducing antioxidant power(FRAP), and nitrite scavenging capacity. Thus fermented soybean leaf tea with lactic acid bacteria could be an excellent source of natural antioxidant.

1. 연구목표

콩잎은 콩 재배 후, 대부분 폐기되고 있으며, 공식적인 통계로 추산되고 있지 않은 실정이다. 최근 콩잎은 이러한 기능성 물질인 쿠메스트롤(coumesterol)을 이용하여 기능성 화장품이 판매되고 있지만, 아직도 가공식품은 전무한 상황이며 국내에서는 주로 장아찌와 쌈 채소로 이용되고 있다. 국내에서 콩잎에 대한 연구로는 콩잎 품종에 따른 이화학적 특성과 콩잎 분말 첨가 두부에 대한 연구(Kim 등, 2011), 콩잎 물김치의 숙성과정 중 이화학적 변화(Kim KJ Lee BH 2003), 콩잎 김치의 숙성에 미치는 소금농도의 효과(Lee SK 등, 2003), 콩잎 및 콩잎 요리의 이소플라본 함량, 항산화 성분(Ryu SH 등, 2005), 콩잎추출물의 지방간 억제 효과(Kim SR 등, 2017) 등에 대한 연구가 보고되었다. 녹차 이외의 잎으로 제조한 차에 대한 연구로는 보리순 차(Choi SH Lee SA 2014), 구절초 잎차(Kim JM Park KL 2017), 뽕잎차(Kim & Choi 2011), 감잎차(Choi, 1990), 밤잎차(Choi OB 등, 1997), 비파나무잎(Jeong CH 등, 2011) 대나무 잎(Hyun SK 등, 2012) 등이 보고된 바 있으며, 콩잎을 이용한 차 연구는 전무한 상황이다. 본 연구에서는 콩 부산물인 콩잎을 이용한 새로운 차 제품을 개발하기 위하여 기능성과 관능이 우수한 콩잎차의 제조조건을 확립하고, 유산균 발효를 통한 이소플라본의 비배당체 함량을 증가시키고자 하였다.

2. 재료 및 방법

<제2세부과제: 콩잎 유효성분, 대사체 분석 및 효능검정>

(시험 1) 콩잎 이소플라본 분석

본 연구는 강일콩, 청아콩, 호반콩을 춘천, 정읍, 예천에서 재배하여 1~3개월 동안 1개월 간격씩 콩잎을 채엽하여 HPLC 분석을 통하여 이소플라본을 분석하였다.

(시험 2) 콩잎 향기성분 분석

본 연구는 시험 1의 동일시료를 온도별로 볶은 후, HS-GC/TOF/MS를 통하여 향기성분을 분석하였다.

(시험 3) 콩잎 대사체 분석

본 연구는 시험 1의 동일시료를 GC/TOF/MS를 통하여 대사체를 분석하였다. 당류, 유기산류, 아미노산류, 지방산로 분류하여 열지도를 작성하였으며, 다변량 통계분석을 통하여 주성분분석(PCA), 부분최소자승법판별분석(PLS-DA) 분석을 수행하였다.

(시험 4) 콩잎 생리활성 평가

본 연구는 호반콩을 2개월차에 채엽하여 250℃에서 볶은 후, 액상차와 발효차를 제조하여 항산화 활성과 아질산염 소거능을 분석하였다.

(시험 5) 콩잎차 품질지표 설정

본 연구는 시험 4의 콩잎 액상차와 발효차의 품질지표의 규격을 설정하기 위하여 탄닌함량, 가용성 고형분 함량, 수분함량, 색도 등을 측정하였다.

(시험 6) 콩잎차 유통기한 설정

본 연구는 콩잎 액상차와 발효차를 가속실험을 통하여 남용온도 15℃, 35℃, 유통온도 25℃에 저장하여 산도, 색도, 일반세균수, 대장균군, 이취, 성상 등을 조사하여 식품의약품안전처 유통기한 설정프로그램을 이용하여 유통기한을 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

〈제2세부과제: 콩잎 유효성분, 대사체 분석 및 효능검정〉

(시험 1) 콩잎 이소플라본 분석

이소플라본 표준물질 6종(배당체 3종, 비배당체 3종)에 대한 HPLC 분석법의 직선성, 정확성, 정밀성에 대한 밸리데이션을 검증하였다.

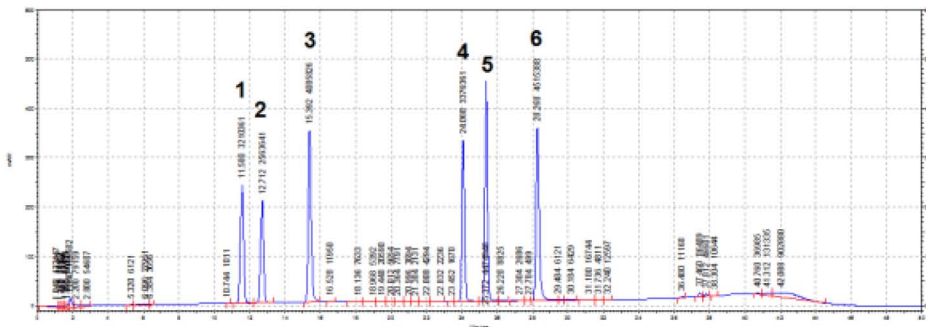


표 1. 이소플라본 분석법 검증

표준물질	회수율(%)	상대표준편차(%)	정량한계 (ug/mL)	검출한계 (ug/mL)
Daidzin	99.34	0.993	0.410	0.135
Genistin	100.24	2.089	0.069	0.023
Glycitin	99.04	2.168	0.443	0.146
Daidzein	99.33	2.424	0.211	0.070
Genistein	100.08	1.322	0.207	0.068
Glycitein	99.53	1.765	0.208	0.068

채엽시기·재배지역·품종별 콩잎 이소플라본 비교 분석한 결과, 품종별로는 ‘호반’의 총 이소플라본 함량이 대부분 높게 나타났으며, 채엽시기별과 지역에 따른 일관성이 나타나지 않았으나, 가장 높은 값은 약 10µg/mL 수준이었다.

채엽시기가 증가할수록 비배당체의 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며 특히 Daidzein의 함량이 증가하였다.

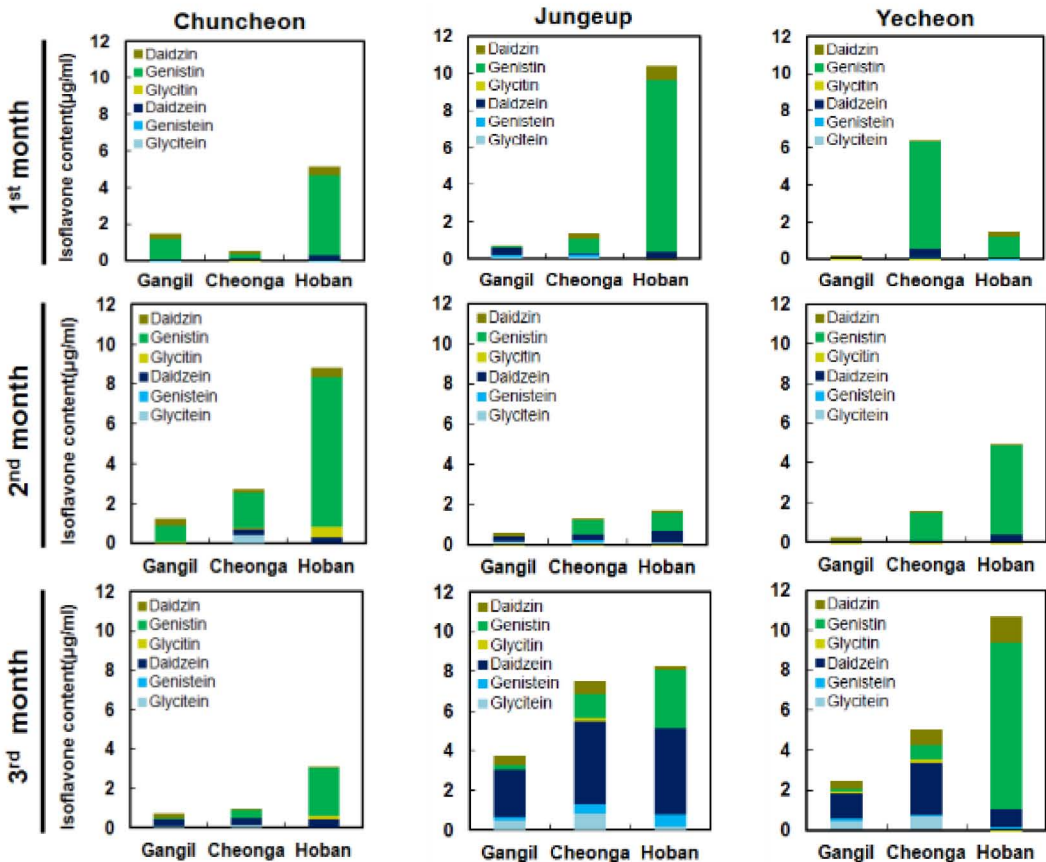


그림 2. 채엽시기·재배지역·품종별 콩잎차 이소플라본 비교 분석

볶음온도가 증가할수록 비배당체 함량이 증가하는 경향이 보였고, 240℃에서 약 2배까지 증가하였다가 다시 감소하였다. 온도가 증가할수록 이소플라본의 배당체 결합이 끊어지면서 비배당체 형태로 전환되면서 Daidzin, genistein, glycitein의 함량이 증가하였다.

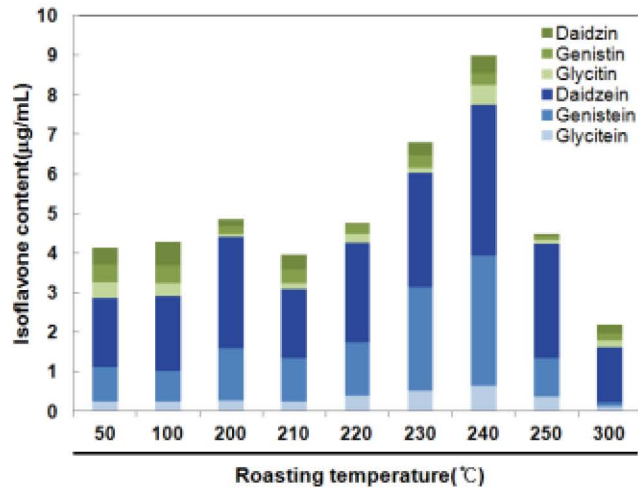


그림 3. 볶음온도별 콩잎차 이소플라본

PCA, PLS-DA와 같은 다변량 통계분석법을 시도하여 채엽시기에 따른 모델이 가장 잘 이루어짐을 확인하였고, 다변량 통계분석 주요 인자들을 비교한 결과 PCA보다 PLS-DA은 높은 모델의 적합성을 나타내었다.

표 2. 콩잎차 향기성분 다변량통계분석 결과

구분	R2	Q2	PC1	PC2
PCA	0.327	0.128	23.0%	9.7%
PLS-DA	0.811	0.077	54.7%	26.4%

두 그룹을 나뉘게 하는 기여도를 나타내는 VIP(Variable importance in the projection)가 1.0 이상인 변수들을 탐색한 결과 3가지 향기성분으로 나타내었다.

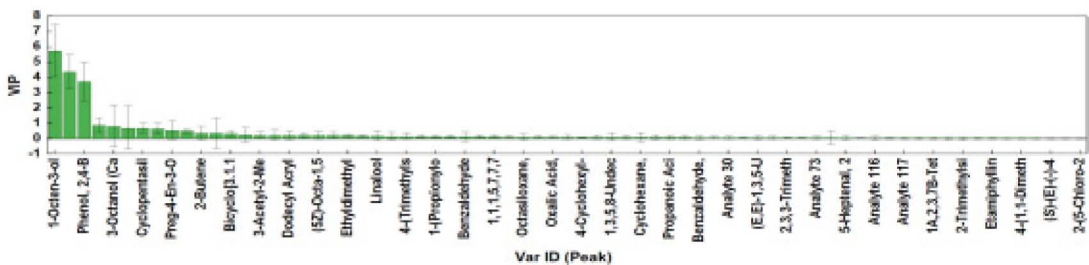


그림 5. PLS-DA VIP 그래프

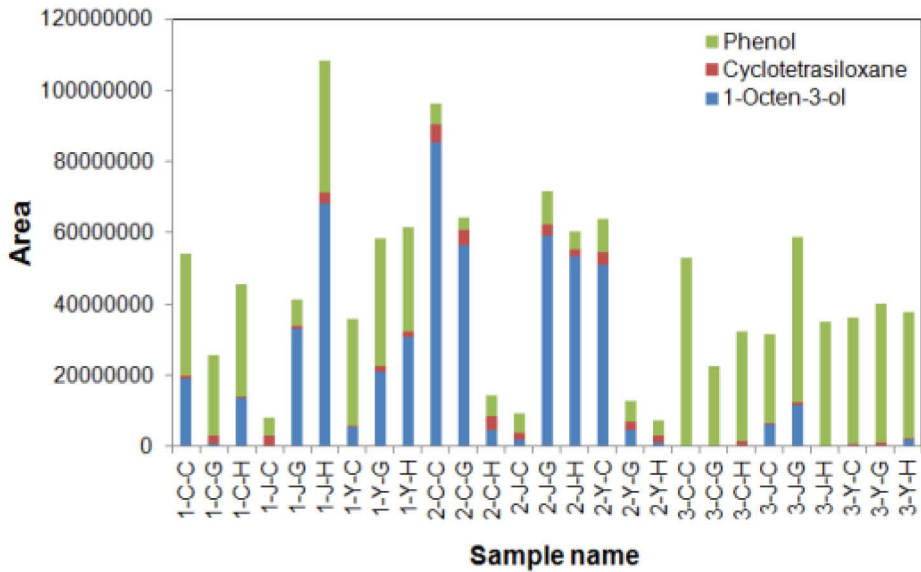


그림 6. 콩잎차 주요 향기성분 비교

채엽시기·재배지역·품종에 따른 콩잎차 주요 향기성분으로 VIP 1.0 이상의 유의적인 향기성분만 비교한 결과, 가장 많은 함량을 나타내는 1-Octen-3-ol의 함량이 2개월차에 증가하였다가 3개월차에 감소하는 경향을 보였으며, 이는 1-Octen-3-ol의 전구체인 불포화지방산 linoleic acid의 대사체 함량 변화와 일치하였다. 채엽시기에 따라 콩잎차의 향기성분의 profiling이 변화되었다.

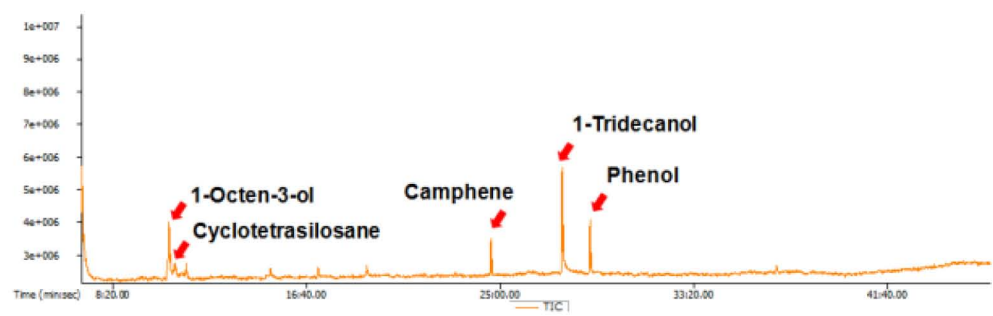


그림 7. 콩잎차 향기성분의 총이온크로마토그램(TIC)

표 3. 콩잎차 주요 향기성분

No.	Name	Rt(min:sec)	m/z
1	1-Octen-3-ol	10:46	57
2	Cyclotetrasiloxane	11:29	281
3	Camphene	24:35	93
4	1-Tridecanol	27:39	83
5	Phenol	28:51	191

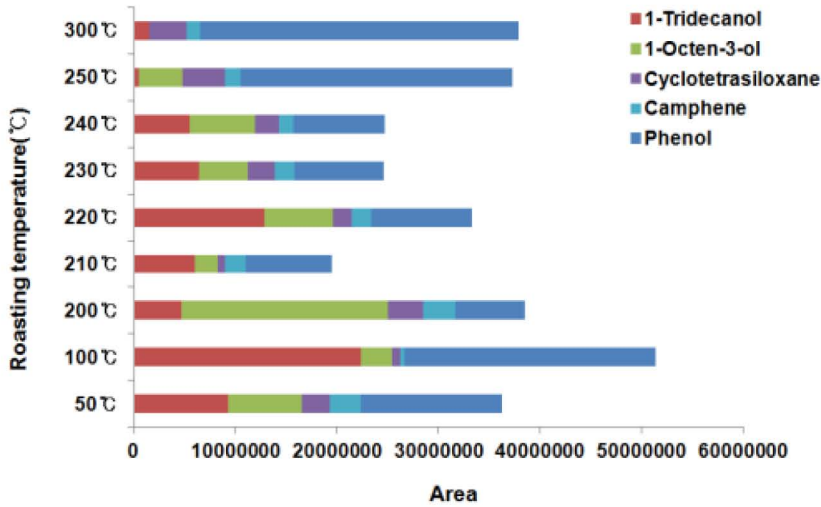


그림 8. 볶음온도별 콩잎차 주요 향기성분

HS-GC-TOF/MS를 이용하여 볶음온도별 콩잎차의 향기성분을 분석한 결과, 총 71가지의 향기 성분이 동정되었고, 그 중 5가지의 주요 향기성분을 비교하였다. 콩잎을 100°C로 볶았을 때 향기 성분이 가장 많이 검출되었고, 1-Tridecanol과 Phenol의 함량은 서로 반비례적인 경향을 보였다. 볶음온도에 따른 각 향기성분의 휘발도가 다르기 때문에 전체적으로 일관적인 경향을 나타내지 않았다.

(시험 2) 콩잎 대사체 분석

GC-TOF/MS 분석을 통하여 채엽시기·재배지역·품종별 콩잎 대사체 비교하였다. D-galactose, α-D-galactoside와 같은 갈락토오스 계열의 당류의 fisher ratio 값이 높은 것으로 나타났다.

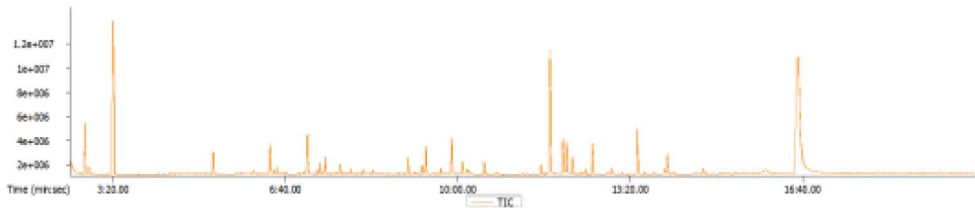


그림 9. 콩잎 대사체의 총이온크로마토그램(TIC)

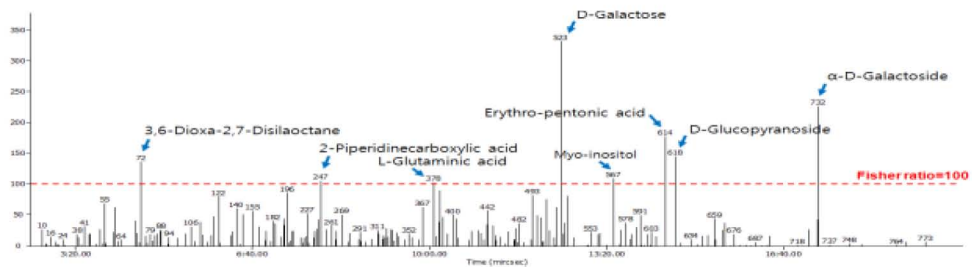
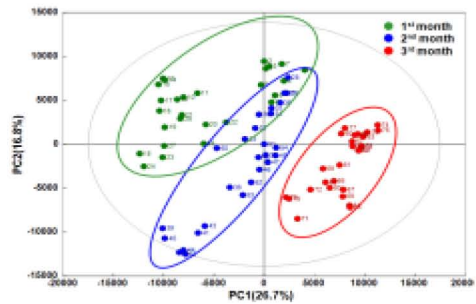
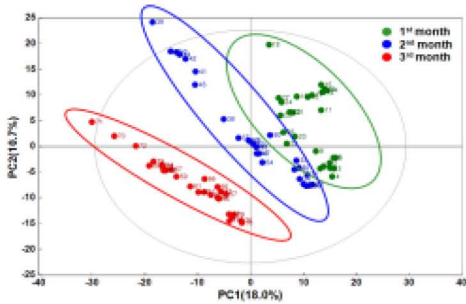


그림 10. 콩잎차 향기성분 Fisher ratio plot

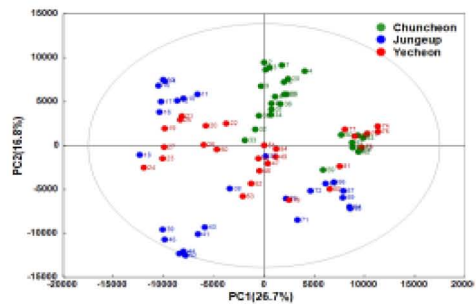
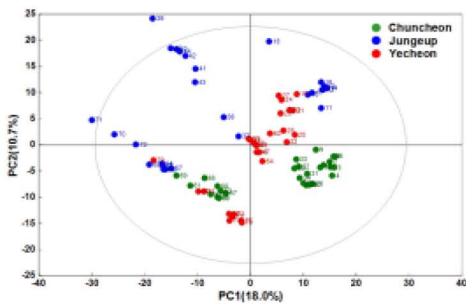
표 4. 콩잎 대사체 다변량통계분석 결과

구 분	R2	Q2	PC1	PC2
PCA	0.612	0.353	18.0%	10.7%
PLS-DA	0.435	0.030	26.7%	16.8%

1) 채엽시기



2) 재배지역



3) 품종

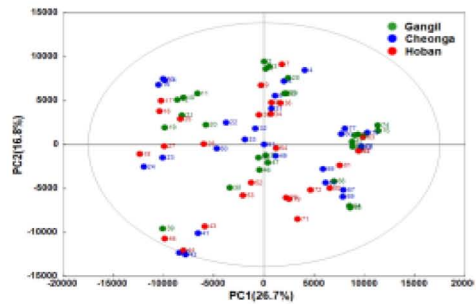
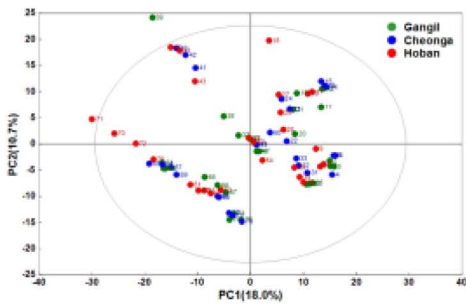


그림 11. 콩잎 대사체 다변량 분석(좌: PCA, 우: PLS-DA)

다변량 통계분석 결과, PLS-DA보다 PCA 모델이 더 적합한 것으로 나타났으며, 채엽시기에 따라 시료가 중첩되지 않았으며, 재배지역, 품종에 따른 모델링은 적합하지 않은 것으로 확인되었다.

당류 및 그 유도체(39종), 유기산류(16종), 아미노산류(15종), 지방산류(16종)에 대하여 Fisher ratio 1이상의 대사체에 대하여 열지도(Heatmap)를 작성하여 어떠한 대사체가 함량이 높고 낮은지를 확인하였다.

당류에서는 Myo-inositol, glucofuranose, fructose, xylose, glycerol, glucopyranoside의 함량이 높았고, 유기산류에서는 Hexanedioic acid, malic acid, propanedioic acid, butanedioic

acid, 아미노산류에서는 Proline, alanine, norvaline, norleucine, 지방산에서는 butyric acid, fumaric acid의 함량이 높았다. 또한 재배지역 또는 품종간 차이보다는 채엽시기에 따른 대사체의 함량이 유사한 것을 확인하였다.

(시험 3) 콩잎 생리활성 평가

콩잎 추출액의 농도는 10mg/mL이며, 이를 농도별로 희석하여 실험한 결과 농도 의존적으로 생리 활성이 유의적으로 증가하였고, 항산화 활성과 아질산염 소거능이 있는 것으로 나타났고, SOD-유사 활성과 tyrosinase 억제활성은 매우 낮은 것으로 나타났다.

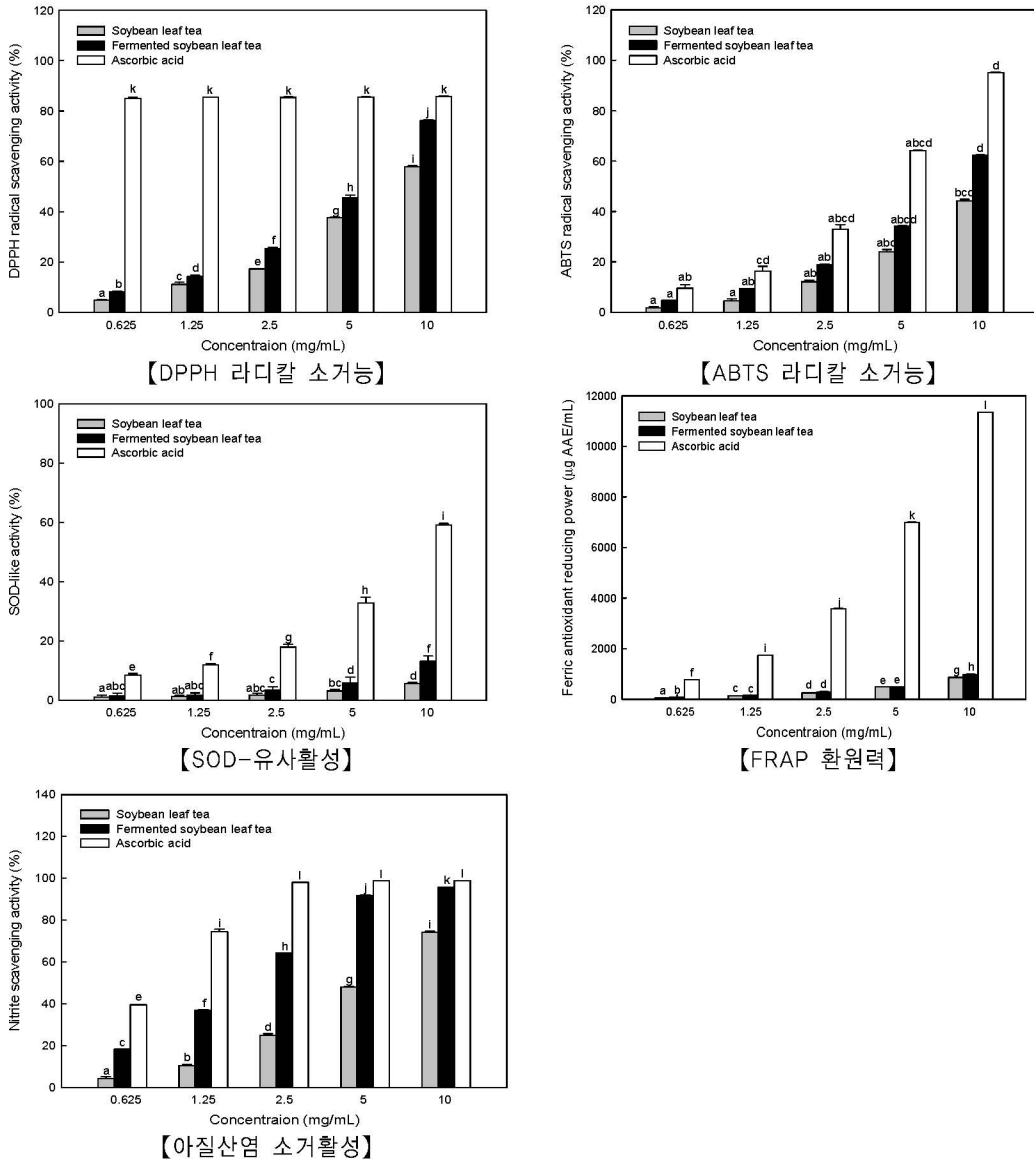


그림 12. 유산균 발효를 통한 콩잎차의 항산화 효능 평가

대조구인 ascorbic acid는 DPPH 라디칼 소거활성이 85.05~85.86%로 ascorbic acid의 농도에 따라 차이가 없는 것으로 나타났으며, 콩잎차와 발효차는 농도가 증가함에 따라 유의적으로 활성이 증가하였다.

또한 모든 농도구간에서 콩잎차에 비하여 발효차의 DPPH 라디칼 소거활성이 유의적으로 높았고, 특히 10mg/mL의 발효차는 대조구인 ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거 활성보다는 낮지만 76.26%의 활성을 나타내어 높은 항산화 활성을 나타내었고, 같은 농도에서의 액상차의 경우 57.87%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내어 발효차가 액상차에 비하여 DPPH 라디칼 소거활성이 약 1.32배 높은 값을 나타내었다.

액상차의 경우, 유산균 발효를 통하여 항산화 활성을 증진시키는 물질의 생성이 증가하여 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가된 것으로 판단되며 이는 총 페놀성 화합물 및 플라보노이드 함량의 증가와 연관된 것으로 판단된다.

액상차, 발효차, 대조구 ascorbic acid두 모두 농도가 증가할수록 ABTS 라디칼 소거 활성이 유의적으로 증가하였고, ABTS 라디칼 소거 활성 또한 DPPH 라디칼 소거 활성과 유사하게 액상차보다 발효차의 활성 효과가 더 높은 것으로 나타났다. 가장 높은 농도인 10mg/mL에서 액상차는 44.21%, 발효차는 62.30%의 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내었다.

액상차와 발효차를 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10mg/mL로 처리하였을 때 SOD 유사활성도는 액상차의 경우 1.01~5.60%, 발효차의 경우 1.52~13.10%의 활성도를 나타내어 농도가 증가할수록 SOD 유사활성이 증가하였고, 발효차가 액상차에 비하여 더 높은 SOD 유사활성을 나타내었다.

동일한 농도에서 대조구 ascorbic acid에 비하여 액상차 및 발효차의 환원력은 유의적으로 매우 낮은 것으로 나타났으며, 1.25~5mg/mL 농도에서는 액상차와 발효차 간의 유의적 차이가 없었으며, 0.625mg/mL와 10mg/mL 농도에서는 액상차 보다 발효차의 FRAP에 의한 환원력이 유의적으로 더 높은 것으로 나타나 농도 구간에 따라 액상차와 발효차의 환원력에 차이가 있는 것으로 확인되었다.

10mg/mL 농도에서 액상차의 아질산염 소거 활성은 74.27%, 발효차는 98.76%로 유산균 발효를 통하여 아질산염 소거 활성이 유의적으로 증가하였고, 98% 이상의 높은 아질산염 소거 활성을 나타내었다.

본 실험을 통하여 발효차의 아질산염 소거 활성이 우수하여 천연 유래 항염식품 소재로서 널리 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

표 5. 알콜 대사 관련 효소 억제 활성

구분	액상차	발효차
ADH	ND	ND
ALDH	ND	ND

ND: Not detected

ADH (Alcohol dehydrogenase)와 ALDH (aldehyde dehydrogenase)는 알콜 대사 관련 효소로 ADH는 에탄올을 아세트알데하이드로 전환시키고, ALDH는 아세트알데하이드를 아세테이트로 전환시켜 알콜을 분해하여 숙취 해소와 관련이 있는 효소이나 액상차와 발효차 모두 ADH와 ALDH 효소에 대한 억제활성이 없는 것으로 나타났다.

표 6. 콜레스테롤 생합성 효소 억제활성 평가

구분	Units/mgP	억제활성(%)
HMGR	1.77±0.10	-
Pravastatin	0.76±0.10	57.06
액상차	1.38±0.17	22.03
발효차	1.48±0.12	16.38

HMGR: HMG-CoA reductase

Pravastatin: HMG-CoA와 유사한 구조로 되어 있어 경쟁적으로 HMGR에 결합

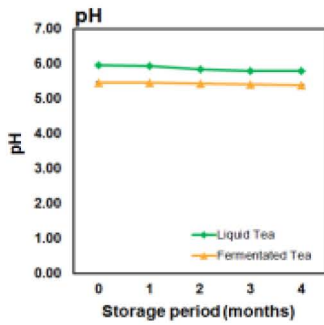
HMGR(HMG-CoA reductase)는 HMG-CoA는 acetyl-CoA로부터 생성되며 HMG-CoA는 Mavalonate와 Farnesyl pyrophosphate를 전환시켜 최종적으로 콜레스테롤 생합성에 가장 중요한 효소 중 하나로 액상차와 발효차는 각각 HMGR의 활성을 22.03%, 16.38% 억제하는 것으로 나타났으며, 특히 액상차는 발효차 보다 더 높은 억제활성을 보였으며, 양성 대조구인 Pravastatin에 비하여 낮은 수치이지만 정제물질이 아닌 조추출물임을 감안하였을 때, HMGR 억제활성이 높은 것으로 판단되며, 이는 이소플라본에 의한 항비만 효능이 있는 것으로 사료된다.

(시험 4) 콩잎차 품질지표 설정

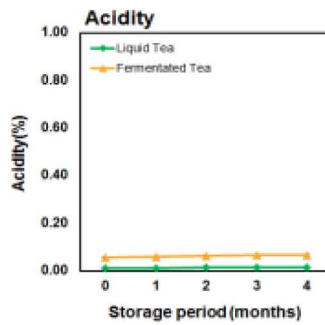
이화학적 품질지표로 pH, 산도, 탄닌, 색도(명도, 적색도, 황색도)를 설정하여 4개월간 변화량을 분석한 결과, 액상차와 발효차 모두 pH, 산도, 탄닌함량이 크게 변화가 없는 것으로 나타났으며, 특히 발효차는 색도 중 적색도가 액상차에 비하여 변화가 다소 높은 것으로 확인되었다.

표 7. 발효차 저장기간별 품질지표설정 실험결과

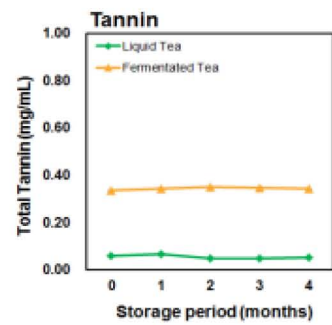
발효차	pH	산도(%)	탄닌(mg/mL)	색도(L)	색도(a)	색도(b)
0개월	5.47±0.02	0.06±0.00	0.34±0.00	63.33±0.01	12.93±0.00	55.26±0.01
1개월	5.46±0.01	0.06±0.00	0.34±0.00	62.77±0.01	14.21±0.00	56.39±0.01
2개월	5.45±0.01	0.07±0.00	0.35±0.00	62.20±0.01	15.49±0.01	57.51±0.01
3개월	5.43±0.00	0.07±0.00	0.35±0.00	60.03±0.00	16.52±0.01	58.41±0.01
4개월	5.40±0.01	0.07±0.00	0.34±0.00	57.87±0.00	17.55±0.01	59.31±0.01



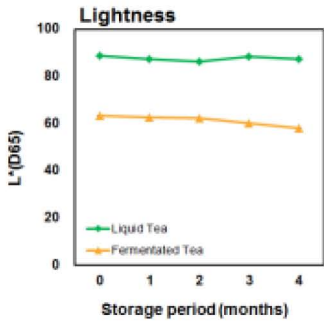
【pH】



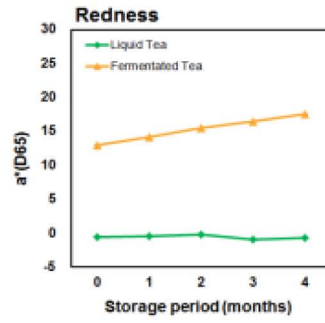
【산도】



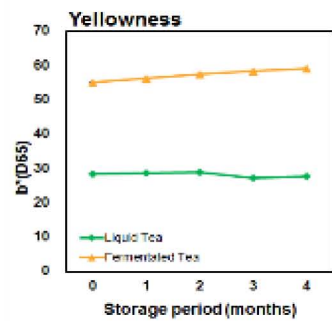
【탄닌】



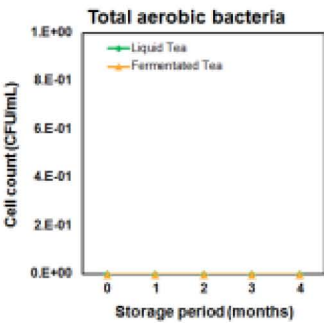
【명도】



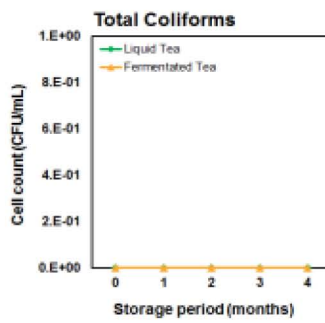
【적색도】



【황색도】



【일반세균수】

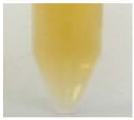

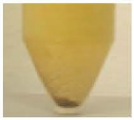


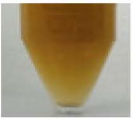














【대장균군】

그림 13. 저장기간에 따른 품질지표 분석

미생물학적 품질지표로 일반세균수와 대장균군을 모니터링한 결과 액상차와 발효차 모두 4개월 동안 불검출되어 미생물학적으로 안전할 것으로 판단된다.

표 8. 저장기간 및 온도에 따른 콩잎 액상차와 발효차의 성상 비교

온도/저장기간	액상차			발효차		
	0개월	2개월	4개월	0개월	2개월	4개월
15℃						
25℃						
35℃						

시간이 경과함에 따라 침전물이 발생하는 것을 확인할 수 있었으며, 제품 라벨에 침전물 발생에 대한 내용을 표기해야 할 것으로 판단된다.

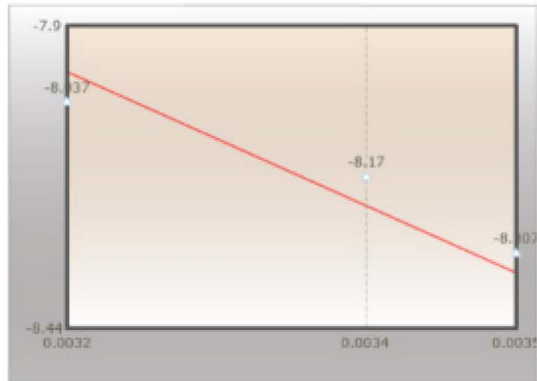
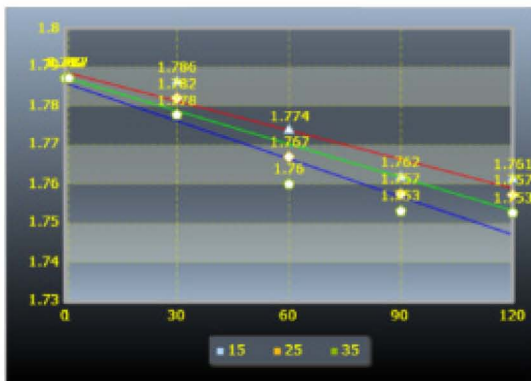
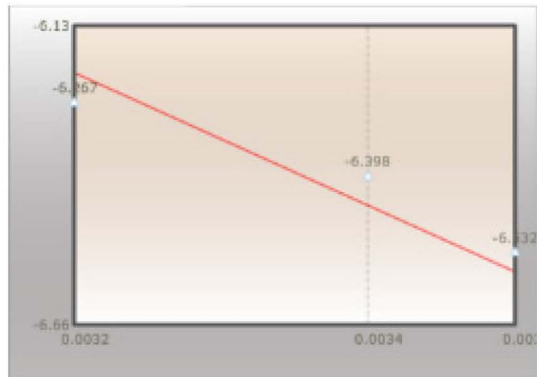
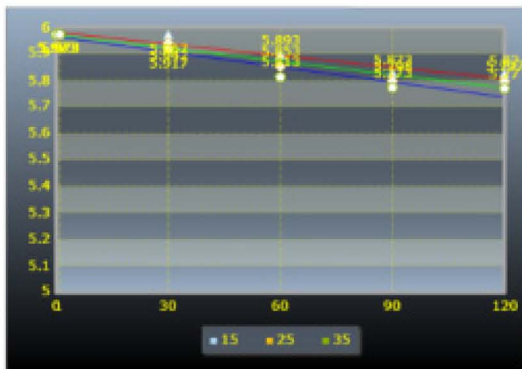
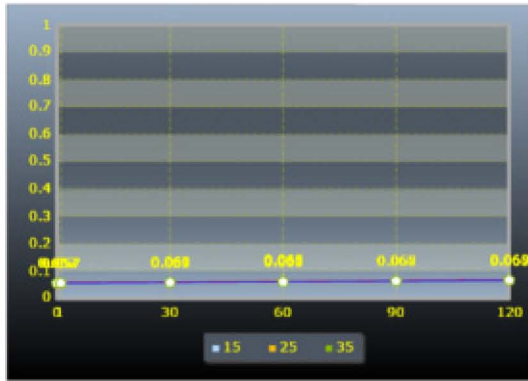
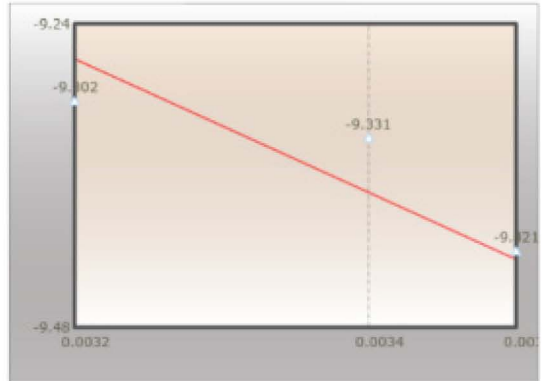


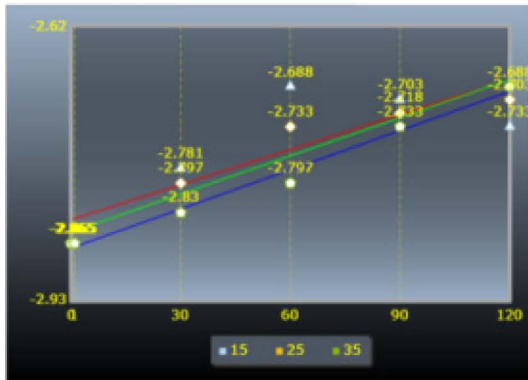
그림 14. 액상차 유통기한 예측 활성화 에너지와 반응식 차트



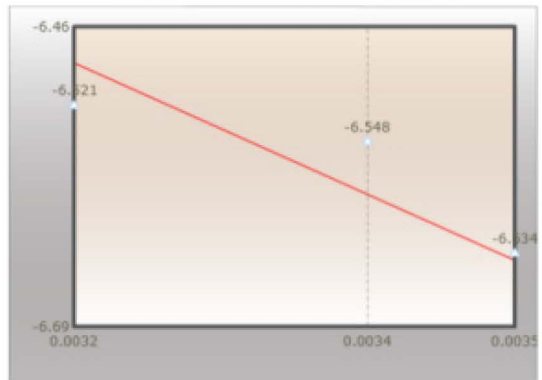
0차 반응식-Storage-Con. (%) 회귀분석



0차 반응식-1/T-ln(K) (%) 회귀분석



1차 반응식-Storage-Con. (%) 회귀분석



1차 반응식-1/T-ln(K) (%) 회귀분석

그림 15. 발효차 유통기한 예측 활성화 에너지와 반응식 차트

표 9. 콩잎차 유통기한 예측실험 결과

구 분	품질지표	0차 유통기한 (개월)	결정계수(R ²)	1차 유통기한 (개월)	결정계수(R ²)
액상차	pH	9.32	0.9999	9.57	0.9998
	산도	7.37	0.9979	6.38	0.9976
발효차	pH	18.36	0.9696	18.72	0.9698
	산도	16.25	0.9299	13.13	0.9289

표 10. 콩잎차 유통기한 예측실험 결과

구 분	예측 유통기한(개월)	안전계수	최종 유통기한(개월)
액상차	7.37	0.8	5.89
발효차	16.25	0.8	13.00

예측된 유통기한에 안전계수 0.8를 곱하여 최종적으로 액상차는 5개월, 발효차는 13개월로 산출되어 발효차가 액상차와 비교하여 약 2배 정도 유통기한이 더 연장되었고, 유통안전성이 더 높은 것으로 판단된다.