

## Tea Fungus 발효홍차의 향기

최경호 · 최미애 · 김정옥\*†

대구효성가톨릭대학교 식품영양학과  
\*H&K 연구소

## Flavor of Fermented Black Tea with Tea Fungus

Kyoung Ho Choi, Mi-Ae Choi, Jeong Ok Kim\*†

Department of Food Science and Nutrition, Taegu Hyosung Catholic University, Taegu 705-716, Korea  
\*H&K Laboratories, 236-4 Gangnam-Dong Chinsu 660-250, Korea

### Abstract

The fermented black tea with tea fungus (FBTF) was prepared by culturing tea fungus biomass in black tea with 10% sucrose (BT) at 30°C for 14 days. The flavor quality of FBTF was investigated by sensory and chemical analysis, and the results were compared with BT.

The data of sensory analysis indicated that fruity, wine-like, sharp-pungent, and vinegar-like flavor notes were increased, while earthy note was reduced during fermentation. GC-MS analysis of volatile compounds collected from FBTF and BT by Tenax trap showed that linalool, linalool oxide other flavor compounds known as black tea flavor compounds were disappeared. Some major flavor compounds produced during fermentation were acetic acid, ethanol, limonene,  $\alpha$ -terpineol, and these volatiles may be attributed to the flavor of characteristic FBTF. Biosynthetic pathway for the formation of limonene and  $\alpha$ -terpineol are proposed through mevalonic acid pathway using acetic acid as precursor and/or through transformation of linalool and linalool oxide.

*Key words* : Tea fungus, fermented black tea, flavor

### 서 론

당을 첨가한 홍차 추출물에 tea fungus라 불리는 일단의 미생물을 접종하여 배양한 발효음료는 러시아 지역의 전통음료로서 러시아인의 장수에 기여하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 러시아 지역을 비롯하여 유럽 등지에서 음용되고 있는 이 음료가 우리나라에 전해 들어와 가정에서 만들어져서 암환자, 노인의 시력회복, 변비, 당뇨, 불면증, 심장병 환자들이 애용하고 있다. 이 발효음료의 생리활성효과와

미생물분포 등에 관한 연구는 러시아 지역에서 오래전 몇몇 연구자들에 의해 연구 되었으나<sup>2,3)</sup>, 최근에 다시 독일에서 새로운 연구가 활발해 지고 있다<sup>4,5)</sup>. 본 연구진이 앞서 보고한 바와 같이 배양기간 중에 일어나는 가장 두드러진 변화는 산의 생성에 의한 pH의 저하이며<sup>6)</sup>, 발효가 진행됨에 따라 원래의 홍차향은 점점 없어지고 새로운 향이 형성된다. 발효중의 향기성분 변화가 그 원인이 되겠으나, 향기성분에 관한 보고는 찾아 볼 수 없다. 미생물 분포를 조사한 결과, 우리나라에서 사용되고 있는 tea fungus에 서식하고

† Corresponding author

있는 미생물군과 러시아 및 유럽지역에서 조사 보고한 미생물 군과는 차이가 있고<sup>7)</sup>, 따라서 발효중에 일어나는 여러 가지 화학적 성분 변화에도 차이가 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 tea fungus 발효음료를 이용한 건강음료 개발에 관한 연구의 일부로써, 관능검사를 통한 발효음료의 기호도 조사와 발효과정에서 생성되는 향기성분을 조사하였다. 이들 휘발성 저분자화합물의 향의 특성과 이들이 tea fungus 발효음료의 향에 미치는 영향을 고찰하였다. 또한 이들 휘발성 향기성분의 생화학적 생성기작을 추정하고, 알려진 생리활성 효과 등에 대해 고찰하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### Tea Fungus 발효 홍차의 제조

증류수 3L을 끓인 후 홍차 (태평양화학, tea bag 제품) 8g을 넣고 끓기 시작하여 10분 뒤 배양 병에 옮겨 담았다. 여기에 백설탕을 가하여 (10%, w/v) 용해시킨 다음, 실온으로 식혀서 tea fungus (150g)를 접종하여 30°C에서 14일간 배양하였다.

#### 관능검사

단냄새(sweet), 과일향(fruit), 포도주냄새(wine-like), 특쓰는 냄새(sharp-pungent), 풋냄새(green), 곰팡이냄새(musty), 식초냄새(vinegar-like), 흙냄새(earthy), 시원한 냄새(cool)의 발효음료로부터 감지되는 특징적인 향취에 대해, 훈련된 12명의 panalist를 대상으로 설문지를 사용하여 향의 특성에 대해 7점법으로 평가하였다<sup>8)</sup>.

0	1	2	3	4	5	6	7
(weak)							(strong)
(bad)							(good)

#### 휘발성 향기성분의 분석

등근바닥 플라스크에 발효액(50ml), 4-decanol(Aldrich Chemical, Milwaukee, USA ; 11. 23µg/ml diethyl ether) 그리고 sodium chloride 수용액 250ml을 넣고 혼합하였다. 플라스크를 Tenax GC(60-80 mesh, Enka N. V. Holland) trap에 연결시킨 다음 magnetic stirrer로 혼합하면서 실온에서 질소가스로 3시간 동안 purge(300ml/min)하였

다. Tenax GC에 흡착된 휘발성 화합물을 재증류한 diethyl ether로 용출시킨 후 concentra tube (Laboratory Research Co., Los Angeles, CA, USA)를 사용하여 10µl로 농축하고 GC-MS로 분리, 동정하였다.

GC-MS는 Shimadzu gas chromatograph가 연결된 Kratos profile mass spectrometer (USA)를 사용하였으며 분석조건은 Table 1과 같다. 화합물을 분리하기 위해 사용된 column은 극성 column인 Supelcowax 10(Supelco, 25 m×0.2 mm i. d.)와 비극성 column인 HP-1(J & SCL ; 25 m X 0.2 mm i. d.)을 사용하였다. 각 화합물의 구조는 이들 두 column에서의 retention time과 mass spectrum에 의하여 잠정적으로 동정하였다.

Table 1. Operating conditions of GC-MS used for the identification of volatile compounds in the fermented black tea with tea fungus.

Instrument	Kratos profile GC-MS connected with Shimadzu Gas Chromatography
Analyzer	Quadrupole mass filter (203mm)
Ionization mode	Electron impact
Ionization potential	70eV
Columns	Supelcowax-10(Supelco ; 25m×0.2mm i. d.) HP-1 (J & SCL ; 25m×0.2mm i. d.)
Carrier gas	N <sub>2</sub> (flow rate ; 1 ml/min)
Make up gas	H <sub>2</sub>
Initial temp.	50°C
Final temp.	250°C
Rate	2°C/min
Injector temp.	270°C
Detector temp.	270°C

### 결과 및 고찰

Panalists가 발효전의 홍차용액과 발효음료로부터 감지된 특징적인 향이라고 판단된 9가지 향(단냄새, 과일향, 포도주냄새, 특쓰는 냄새, 풋냄새, 곰팡이냄새, 식초냄새, 흙냄새, 시원한 냄새)에 대해 7점법으로 관능검사를 한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 흙냄새를 제외한 나머지 8가지의 향은 발효후에 강해지는 것으로 나타났으며, 그중에서도

과일향, 포도주냄새, 특쓰는 냄새, 식초냄새가 특징적으로 강해졌다(t-test결과 95% 수준에서 유의성이 있음). 이러한 향의 생성은 발효과정에서 합성되는 향기성분에 의한 것으로 생각된다. 따라서 발효전과 발효후의 시료로부터 휘발성 향기성분을 분리 동정하였다.

Table 2. Odor qualities and their average sensory scores of the fermented black tea with tea fungus.

Attributes	fermentation	
	before <sup>1</sup>	after <sup>2</sup>
Sweet	1.37±0.47	2.14±0.83
Fruit	1.40±0.36	5.39±0.98
Wine-like	0.28±0.13	3.04±20.88
Sharp-pungent	0.53±0.29	3.14±0.85
Green (cut grass)	2.44±0.99	2.68±0.88
Musty (moldy)	1.85±0.60	2.26±0.65
Vinegar-like	0.35±0.15	2.63±0.86
Earthy	1.61±0.88	0.50±0.33
Cool	1.52±0.81	1.91±0.85
Overall in odor	0.96±0.66	3.56±0.92

<sup>1</sup>The sample tested for odor qualities was taken from the black tea with sucrose (10%, w/v) before fermentation.

<sup>2</sup>The sample tested for odor qualities was taken from the fermented black tea at 30°C for 14 days.

Tenax trap을 사용하여 향기성분을 포집한 다음, diethyl ether로 추출하여 농축한 휘발성 화합물들을 Supelcowax-10과 HP-1 capillary column을 사용하여 GC로 분리하여, 각 peak의 retention time과 mass spectrum을 표준물질의 그것과 비교하거나, Chemstation(HP 91153C/NBS-REVEL) data base와 비교하여 잠정적으로 동정한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 발효전의 홍차용액에서는 3-hexen-1-올을 비롯한 8종의 alcohols, (Z)-3-hexenal을 비롯한 3종의 aldehydes, 2, 6-bis(1, 1-dimethylethyl)-2, 5-cyclohexadiene-1, 4-dione을 비롯한 2종의 ketones, 2-ethoxy-ethanol acetate를 포함하는 2종의 esters, linalool을 포함하는 4종의 terpenes, methylbenzene을 포함하는 4종의 hydrocarbons가 분리/동정되었다. 이 중 대부분의

화합물들은 이미 보고된 홍차의 향기성분으로써<sup>9,10)</sup> 홍차의 향긋한 향에 기여하는 화합물들이다. 그러나 이들 화합물들은 tea fungus를 접종하여 발효하는 과정에서 없어지거나 감소되는 것으로 나타났으며, 반면 새로운 화합물들이 생성됨을 알 수 있었다(Table 4). 발효음료로부터 분리/동정된 화합물은 ethanol을 포함하는 7종의 alcohols, 3-hydroxy-2-butanone을 포함하는 4종의 ketones, 3-methyl-1-butanol acetate, acetic acid를 포함하는 2종의 carboxylic acids, limonene을 포함하는 2종의 terpenes, 그리고 dotriacontane이었다. 이들은 새로이 생성된 화합물들은 혼합 미생물군의 2차 대사산물 또는 분해물들인 것으로 생각된다. 발효전 홍차용액의 향기성분은 14일간의 30°C 발효온도에서 휘발되어 없어지거나, 미생물에 의해 다른 물질로 변환되었을 것으로 추정되나 이에 대한 확실한 근거는 없다. 관능검사의 결과로부터 발효후에 과일향, 과일술냄새, 특쓰는냄새, 식초냄새가 특징적으로 강해진 것으로 나타났으며 이는 limonene, 3-methyl-1-butanol acetate, terpinol과 같은 과일향을 내는 화합물의 생성과 ethanol의 생성이 어우러져 내는 것으로 생각되는 과일술냄새, 그리고 특쓰는냄새와 식초냄새의 원인이 되는 acetic acid의 생성때문인 것으로 생각된다.

Tea fungus로부터 분리/동정된 균의 종류로 미루어 보아 효모로부터 세균에 이르는 수종의 미생물에 수행되는 symbiotic과 *Gluconobacter*는 탄소원으로 공여된 sucrose를 자화할 능력이 없으나, *S. cerevisiae*가 sucrose를 monosaccharide로 분해하고 최종적으로 ethanol을 생성함으로써, *Acetobacter*와 *Gluconobacter*의 산생성에 결정적인 역할을 하는 것으로 추정된다. 아울러 *Eneilla*, *Saccharomyces* 및 *Bacillus*가 유기산으로부터 알콜에 이르는 여러 가지 향미성분을 생산하여 발효음료의 향에 기여하는 것으로 생각된다. *A. xylinum*은 불쾌취의 원인 물질을 생성하는 균주로 알려져 있으며, *acetobacter*는 생성된 acetate를 과산화하여 분해하는 성질이 있어, 이들 공생균주를 적당히 조절함으로써, 향이 우수한 음료를 생성할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 구체적인 연구는 앞으로 수행되어야 할 과제로 남아있다.

미생물에 의한 alcohol 화합물의 생성은 beer와 wine과 같은 알콜음료 제조에서 향기생성물의 효과에 가장 중요하게 언급되는 것은 fusel alcohol과 fusel oil이며, 효모 발효

Table 3. The retention times on Supelcowax 10 and HP-1 capillary columns and their aroma properties of some major flavor compounds identified by GC-MS from black tea and the fermented black tea with tea fungus.

Compounds <sup>1</sup>	Retention times(minutes)		Aroma properties
	Supelcowax 10	HP-1	
Ethanol	7.25		sweet ethereal, mild
1-Penten-3-ol	8.02		—
Limonene	8.08	10.30	lemon-like
3-Methyl-1-butanol	(19.54)	10.15	malty
(Z)-3-Hexenal	10.25		green, leafy
1-Pentanol			harsh, chemical, fusel oil
Methyl-benzene		13.07	sweet-grassy
2-Methyl-1-propanol	13.52		fruit
(3-methylbutyl)-Oxirane		14.16	meaty
(Z)-2-Penten-1-ol	15.21		—
3-methyl-1-butanol,acetate	15.28		—
1-Butanol	16.13		fusel-like
1-Hexanol		17.09	fatty green
(Z)-3-Hexanal		17.23	fatty-green, grassy
3-Hexen-1-ol	18.56		green, leafy
(E)-2-Hexen-1-ol	20.15		green, leafy
2-Ethoxy-ethanol,acetate		21.11	sweet
$\alpha,\alpha$ -5-Trimethyl-5-winyln tetrahydrofurfuryl-(2)-alcohol	22.05		soy sauce-like
Linalool oxide			—
			sweet-woody, penetrating
2,4-dimethyl-3-pentanol	24.59		—
Benzaldehyde	26.40	25.07	sweet
3-Hydroxy-2-butanone	25.32		sweet flavor, fruity
Linalool	28.57		floral-woody
4-Methyl-5-propyl-2H-furan-2-one	31.34		—
Benzene acetaldehyde	33.59	31.40	sweet fruity
1-Ethynyl-4-methyl-benzene		33.19	solvent
Acetic acid		36.33	stinging sour
2,6-Dimethyl-heptanol		38.43	green
1- $\alpha$ -Terpineol	38.51		pinely, floral, lilac
Hexedecane		39.05	petroleum-like
(E)-Geraniol	46.16		sweet, floral, rose-type
4-Decanol (I. S.)	(45.18)		
Benzenemethanol	47.27		faint aromatic
Cyclononane		47.44	floral
Benzeneethanol	50.26		floral rose
1,3-Isobenzofurandione		52.32	sweet
Tridecane		54.53	petroleum
$\alpha$ -Cubebene		60.50	spicy
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)		65.38	floral
2,5-cyclohexadiene-1,4-dione			
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-me- thyl-phenol		67.10	phenolic, medicinal
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4 -methyl-phenol,methyl carbonate		68.17	heavy sweet
Dotriacontane		72.27	petroleum-like

<sup>1</sup>Volatile compounds were collected by Tenax GC and tentatively identified on Supelcowax 10 and HP-1 capillary column by GC-MS.

Tea Fungus 발효홍차의 향기

Table 4. The concentrations of volatile compounds in the black tea and the fermented black tea with tea fungus.

Compounds	Fermentation	
	Before <sup>1</sup>	After <sup>2</sup>
- Concentrations (ng/ml) -		
<u>Alcohols</u>		
Ethanol	-	227
2-Methyl-1-propanol	-	10
Butanol	-	25
1-Penten-3-ol	72	-
1-Pentanol	40	-
2-Penten-1-ol	48	-
Hexanol	35	-
3-Hexen-1-ol	617	-
2-Hexen-1-ol	59	-
Furfuryl alcohol	27	-
2,4-Dimethyl-3-pentanol	-	5
Benzenemethanol	8	-
Benzenethanol	-	4
2,6-Dimethylheptaol	-	3
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol	-	1
<u>Aldehydes</u>		
(Z)-3-Hexanal	468	-
Benzaldehyde	89	-
Benzene acetaldehyde	80	-
<u>Ketones</u>		
3-Hydroxy-2-butanone	-	2
4-Methyl-5-propyl-2H-furan-2-one	19	-
Cyclononane	-	4
1,3-Isobenzofurandione	-	1
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	39	1
<u>Esters</u>		
3-Methyl-1-butanol acetate	-	7
2-Ethoxy-ethanol acetate	75	-
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol, methyl carbonate	43	-
<u>Acids</u>		
Acetic acid	-	92
3-Methylbutanoic acid	-	4
<u>Terpenes</u>		
Limonene	-	39
Linalool	70	-
Linalool oxide	48	-

1-a-Terpineol	-	20
(E)-Geraniol	8	-
a-Cubebene	46	-
<u>Hydrocarbones</u>		
Methylbenzene	387	-
1-Ethynyl-4-methyl benzene	39	-
Hexadecane	72	-
Tridecane	77	-
Dotriacontane	-	1

<sup>1</sup>The sample tested for odor qualities was taken from the black tea with sucrose (10%, w/v) before fermentation.

<sup>2</sup>The sample tested for odor qualities was taken from the fermented black at 30°C for 14 days.

의 주생성물인 ethanol과 함께 장미냄새와 같은 2-phenethanol과 amyl, isoamyl alcohol 이 생성되는 생화학적 경로를 거치는 것으로 추정된다<sup>11)</sup>. 효모발효에 의한 각종 alcohol의 생성은 아미노산의 transamination 또는 oxidative deamination 반응을 거쳐, decarboxylation, 그리고 reduction반응에 의한 것으로 알려져 있다. Limonene은 acetic acid, ethanol 다음으로 가장 많이 생성된 휘발성 향기 화합물이었다. Limonene은 citrus과일의 주요 향기성분이며 향 돌연변이 및 향암효과가 있는 생리활성 물질임이 보고된 바 있다. 그러나, 미생물에 의한 Terpene류의 합성은 향기 성분의 대량 합성에 유용하게 활용될 수 있어 매우 바람직한 것으로 생각된다. 식물체 내에서의 limonene과 α-terpineol 합성은 Figure 1에서 보는 바와 같이 mevalonic acid 합성을 통해 이루어 지는 것으로 알려져 있으며, mevalonic acid는 acetic acid로부터 생합성되는 것으로 추정되고 있다. 그러나 acetic acid로부터 mevalonic acid가 생합성되는 경로와 이때 관여하는 효소에 대해서는 아직 구체적으로 밝혀진 바는 없다. 한편 홍차의 향기성분으로 알려져 있는 linalool과 linalool oxide로부터 전환되는 경로도 식물체내에서 밝혀진 바 있다<sup>12)</sup>. Orange extract, ATP 그리고 mevalonic acid를 함께 배양하였을 때, mevalonate 5-pyrophosphate, isopentyl pyrophosphate 등의 중간 생성물이 합성됨을 알았으며, limonene과 같은 terpene류의 화합물이 생합성됨은 일찍이 Potty and Bruemmer에 의해 밝혀진 바 있다<sup>13)</sup>. 본 연구의 결과로 보아 limonene생합성에 관여하

는 여러 가지 효소가 tea fungus에 공생하는 미생물들에 의해 생성되는 것으로 추정된다. 이러한 현상은 미생물에 의한 limonene 등의 terpene생합성을 연구하는데 그 의의가 있을 것으로 생각된다.

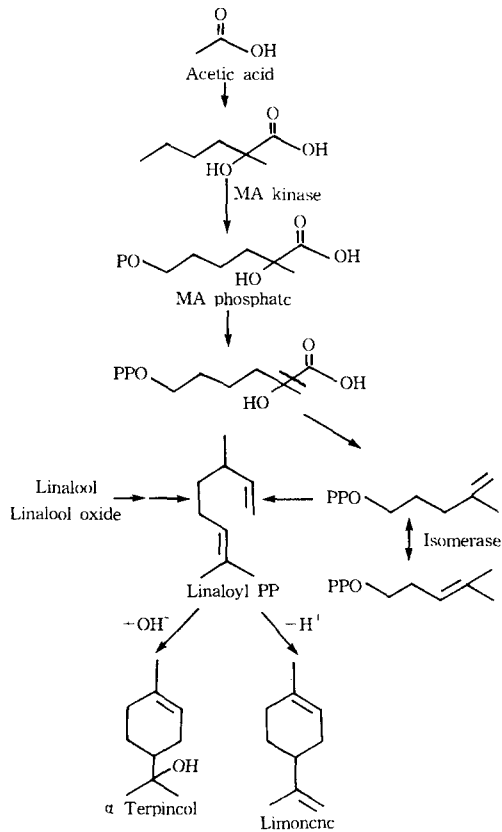


Fig. 1. A proposed biosynthetic pathway of α-terpineol and limonene in the fermented drink by tea fungus.

### 요 약

홍차에 백설탕(10%, w/v)을 용해시킨 용액에 tea fungus를 접종한 다음, 30°C에서 14일간 배양하여 tea fungus 발효홍차를 제조하였다. 음료를 발효시키기 전과 발효시킨 후의 향미를 관능검사로 비교하였으며, 이들의 휘발성 향기성분을 분석하여 비교함으로써 발효과정에서의 향의 변화와 향기성분의 감소 및 생성을 조사하였다. 관능검사의 결과 과일향, 포도주냄새, 특쓰는 냄새, 식초냄새가 특징적

으로 강해지는 반면, 흙냄새가 없어지는 경향이었다.

Tenax trap을 사용하여 포집한 향기성분을 GC-MS로 분리 동정한 결과 linalool, linalool oxide를 비롯한 대부분의 홍차 향기 성분은 발효과정에서 감소되었거나 없어졌으며, 반면 acetic acid, ethanol, limonene, α-terpineol 등이 생성되었다. 이들 휘발성 향기 화합물들은 과일향, 특쓰는 냄새, 식초냄새에 기여하는 화합물들이며, 발효후 과일술 냄새가 강해진 것은 ethanol과 과일향 화합물들이 어우러져서 나타나는 것으로 생각된다. Limonene은 acetic acid와 ethanol 다음으로 많이 생성된 향기성분이었다. Limonene은 감귤류의 주요향기성분으로 식물체내에서는 α-terpineol과 함께 acetic acid로부터 mevalonic acid생합성을 거쳐서 생성되는 것으로 알려져 있다. Linalool과 Linalool oxide로부터 생합성되는 것으로도 알려져 있는 이들 향기성분이 tea fungus에 의한 홍차 발효음료에서 생성되었다.

### 감사의 글

본 연구는 1997년도 대구효성가톨릭대학교 교비 연구지원에 의하여 수행 되었음.

### 참 고 문 헌

1. Reiss, J. : Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus, *Lebensm. Unter. und Forsch.* Springer-Verlag, 258(1994).
2. Herman, S. : *Biochem Z*, **192**, 188(1928).
3. Gasilo, Y. A., Gasilo, E. T., Strezhekurov, E. E., Duganov, G. V. : Pekavit-3, a non-alcoholic vitaminized beverage, USSR Patent SU 1 477, 365 (1989).
4. Benk, E. : *Verbraucherdenst* **33**, 213(1988).
5. Reiss, J. : *Der Teepilz und Seine Stoffwechselprodukte*, *Dtsch Lebensm Rdsch* **83**, 286(1987).
6. Choi, M. A., Ha Kim, J. O., Choi, K. H. : Effects of Saccharides and Incubation Temperature on pH Changes and total acidity of fermented black tea with tea fungus, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28** (3), 405(1996).
7. Choi, M. A., Choi K. H., Ha Kim, J. O. : Microflora Occurring in the Fermentation by tea fungus, *Korean J. Life Science*, **6**(1), 56(1996).
8. Howard, R., Moskowitz. : *Product testing and sensory Evaluation of food.* Food & Nutrition Press,

- Inc., (1983).
9. John, B. C., Res, T. E., Sidney, P., Phillip, H. : Volatile constituents of some central african black tea clones, *J. Agric. Food Chem.* 30(5), 842(1982)
  10. Gary, W. S., Harold, N. G. : On the formation of black tea aroma, *J. Agric. Food Chem.* 21(4), 576 (1973)
  11. Rose, A. H. : *Economic Microbiology*, Academic Press London, 27 (1977)
  12. Heath, H. B., Reineccius, G. : *Flavor chemistry and Technology*, 52 (1986).
  13. Potty, V. H., Bruemmer, J. H. : Oxidation of geraniol by an enzyme system from orange, *Phytochem.* 9, 1003 (1970).