



Research Article

Influence of cell-wall degrading enzyme treatment and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation on the antioxidant and antibacterial activities of green tea leaf

세포벽 분해 효소 처리 및 *Saccharomyces cerevisiae* 발효가 녹차 잎의 항산화 및 항균 활성에 미치는 영향

Dong-Wook Lim¹, Ga-Yang Lee², Min-Jeong Jung², Byoung-Mok Kim², Joon-Young Jun^{2*}
 임동욱¹ · 이가양² · 정민정² · 김병목² · 전준영^{2*}

¹Food Functionality Research Division, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea

²Food Convergence Research Division, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea

¹한국식품연구원 식품기능연구본부, ²한국식품연구원 식품융합연구본부

Abstract This study was conducted to suggest an extraction method for preparing the extract from green tea leaves that possess enhanced antioxidant and antibacterial activities. Different ethanol concentrations were tested to recover phenolics and flavonoids, and 50% ethanol was the best under heat treatment (121°C, 15 min). The ethanol extract exhibited excellent DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity and growth inhibition against *B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. aureus* subsp. *aureus*, and *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*. To enhance the antioxidant and antibacterial activities, cell-wall degrading enzymes (2.5% cellulose + 2.5% pectinase, v/w dry sample) treatment and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation were applied singly or in combination. The enzymatic treatment of green tea leaves notably increased extraction yield. However, the antioxidant and antibacterial activities of the extract were lower than those of the control (heat-treated 50% ethanol extract). In contrast, the yeast fermentation alone did not affect the yield, but enhanced antioxidant and antibacterial activities, contributing to the increase in the extract's total phenolic and flavonoid contents.

Keywords green tea leaf, antioxidant, antibacterial agent, enzymatic treatment, yeast fermentation



Citation: Lim DW, Lee GY, Jung MJ, Kim BM, Jun JY. Influence of cell-wall degrading enzyme treatment and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation on the antioxidant and antibacterial activities of green tea leaf. Korean J Food Preserv, 30(6), 1043-1055 (2023)

Received: November 28, 2023
Revised: December 11, 2023
Accepted: December 12, 2023

***Corresponding author**
 Joon-Young Jun
 Tel: +82-33-643-8043
 E-mail: jjjun@kfri.re.kr

Copyright © 2023 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

고수분 식품에서의 부패와 변질은 주로 화학적, 물리적 변화보다는 미생물에 의해 발생되고, 이를 방지하기 위해 다양한 합성보존료를 사용하고 있다. 그러나 이에 따른 인체의 부작용 발생 가능성이 지속적으로 제기되고 있어 기존 합성보존료를 대체할 수 있는 천연보존료 개발을 위한 연구가 다양하게 수행되고 있다(Han 등, 2020; Kang 등, 2022). 국내의 천연보존료 산업화 기술은 미진한 실정이며, 자몽종자 추출물 외에는 국내에서 산업적으로 활용 가능한

제품이 거의 없어 새로운 천연보존료 기술 개발이 매우 필요한 실정이다(Kim 등, 2019). 녹차는 발효시키지 않은 차나무(*Camellia sinensis*)의 잎을 사용해서 만든 차로써 동아시아 지역이 주 생산지로 전 세계 생산량 중 82%를 차지하고 있으며, 아시아 지역 내 녹차의 주 생산국은 중국, 일본, 대만, 한국이다. 녹차에는 카테킨, 카페인, 아미노산, 무기질 등 인체 내 다양한 생리활성을 나타내는 성분들이 다량 함유되어 있고(Vishnoi 등, 2018), 오래전부터 항산화, 항염증, 항균, 항암, 항노화, 항알레르기 활성 등 다양한 효능이 있는 것으로 밝혀져 있다(Namita 등, 2012). 이러한 연유로 녹차는 건강식품, 식품 보존료, 향균제 등 다양한 기능성 소재로 개발되었을 뿐 아니라, 높은 산업적 잠재 가치를 가지고 있다(Chung과 Yoon, 2008).

식물 유래 phytochemical 물질들은 비타민, 미네랄 등과 같은 필수 영양소는 아니지만 phenolic, alkaloid, flavonoid, terpenoid 등으로 존재하고, 이들은 항산화, 항균, 항염증, 항암 등 다양한 인체 생리 활성을 나타낸다(Joung 등, 2007). 녹차 잎에는 catechin과 flavonol이 풍부하게 함유되어 있고, 이러한 polyphenol 물질은 구성성분의 약 36% 이상 차지한다(Al Hroob 등, 2019; Prasanth 등, 2019). 식물 잎 세포 mesophyll 영역에는 1차 대사를 위한 엽록소를 포함하여 생체방어기작을 담당하는 2차 대사산물인 phytochemical 물질이 축적되어 있고(Isah, 2019), 세포 내에서 합성 또는 전환되어 세포 외로 배출된다(Liu 등, 2018). 식물 잎 세포벽은 대부분 cellulose, hemicellulose, pectin 및 lignin 등으로 구성되어 있어(Schädel 등, 2010) 세포벽 파괴를 거치지 않고 phytochemical 물질을 회수하는 것은 효율적이지 않을 수 있다. 세포벽 물질은 grinding을 포함하여 초음파 처리, 산 가수분해 또는 효소 분해로 파괴가 가능하며, phytochemical 물질은 비교적 극성도가 있는 유기용매에 잘 추출되어 회수 용매로 알코올류가 자주 사용된다(Altemimi 등, 2017).

한편, *Trichoderma reesei*로부터 생산된 cellulase는 cellulose를 glucose, cellobiose 및 glucose 중합체 등으로 분해하며, *Aspergillus aculeatus*로부터 생산된 pectinase에는 pectintranseliminase, polygalacturonase, pectinesterase, hemicellulase 및 cellulase가 포함되어 있어(Sigam-Aldrich, 2023a; Sigam-Aldrich, 2023b),

이 두 효소를 사용하면 식물 잎 세포벽 분해가 가능하다. 효모는 다양한 식품산업에서 활용되고 있으며, 와인 발효에 대표적으로 *Saccharomyces cerevisiae*가 사용되고 있다. 이 효모는 혐기적인 당 발효를 통해 알코올, CO₂ 이외 향기 성분 등과 같은 2차 대사산물을 생성하며, 재료로부터 polyphenol류의 회수를 용이하게 하고 향을 부여하여 최종 제품의 품질을 높여주는 역할을 한다(Li 등, 2017; Oh와 Jin, 2020; Yoon 등, 2015).

이와 관련하여 본 연구에서는 항산화와 항균 활성 등이 우수한 녹차 잎으로부터 phytochemical 물질 회수에 적합한 에탄올의 농도 설정과 세포벽 분해 효소 및 효모 발효가 phytochemical 물질과 위 두 활성을 높이는 데 도움을 줄 수 있는지 살펴보았다. 녹차 잎 에탄올 추출물을 포함하여 녹차 잎을 cellulase와 pectinase 혼합 효소로 처리하거나 *S. cerevisiae*로 발효한 추출물 또는 효소 처리와 효모 발효를 병행한 추출물의 수율, 총페놀화합물 및 플라보노이드 함량을 조사하였고, 처리 방법에 따른 항산화 및 항균 활성 비교를 통해 활성이 증진된 녹차 잎 추출물의 제조방법을 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 공시 균주

재료로 사용된 녹차 잎(leaf of *Camellia sinensis*)은 건조 분말 형태로 가공 포장된 것을 화개약양농협(Hadong, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 항균 활성 평가에는 다음과 같이 식품위해균 7종이 사용되었다. *Bacillus cereus* KCTC 3062, *B. licheniformis* KCTC 1918, *Listeria monocytogenes* KCTC 13064, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCTC 3881, *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* KCTC 2358과 *Escherichia coli* KCTC 2441은 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures; Jeongeup, Korea)로부터 분양 받았다. *Salmonella* Typhimurium NCCP 12219는 국가병원체 자원은행(National Culture Collection for Pathogens; Cheongju, Korea)으로부터 분양받았다. 시험 균주는 모두 brain heart infusion(Difco; Becton Dickison and Co., Sparks, MD, USA)에서 활성화시킨 다음, tryptic

soy agar(Difco)에 보관하면서 사용하였다. 효모 발효에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* KFRI 122는 전통주로부터 분리된 stock 균주로 yeast mold agar(Difco)에 보관하면서 사용하였다.

2.2. 일반성분 분석

녹차 잎 분말의 일반성분은 AOAC 방법(2005)에 따라 분석하였다. 수분 함량은 상압가열건조법(method 950.46), 회분 함량은 직접회화법(method 923.03), 조단백질 함량은 자동화 장치를 이용한 semi-Kjeldahl 법(method 976.05), 조지질 함량은 diethyl ether를 사용한 용매침지 추출법(method 991.36)으로 각각 분석하였다. 탄수화물 함량은, 탄수화물(%) = 100 - (수분 함량 + 조단백질 함량 + 조지질 함량 + 회분함량) 계산식을 활용하여 산출하였다.

2.3. 구성당 분석

녹차 잎 분말의 구성당은 HPAEC-PAD(high-performance anion-exchange chromatography combined with pulsed amperometric detector; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)로 분석하였다(Jun 등, 2018). 시료 10 mg에 72% sulfuric acid 100 μ L를 가한 뒤 121°C에서 1시간 동안 가수분해를 진행하였고, 2.8 mL 탈이온수(deionized water, DW)에 희석한 다음 0.20 μ m PTFE Syringe filter(Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)에 여과 후 분석용 시액으로 사용하였다. 컬럼은 Dionex™ CarboPac™ PA-1(10 μ m, 4×250 mm; Thermo Fisher Scientific Inc.)을 사용하였고, 시액 20 μ L를 주입한 뒤 18 mM sodium hydroxide를 1 mL/min 유속으로 흘리면서 분석하였다. 단당류 동정 및 정량을 위해 8종의 단당류 표준시약(fucose, rhamnose, arabinose, galactose, glucose, mannose, xylose, fructose; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)을 사용하였고, 산성당 동정 및 정량을 위해 3종의 산성당 표준시약(glucuronic acid, galacturonic acid, mannuronic acid; Sigma-Aldrich Inc.)을 사용하였다. 혼합한 표준시약을 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 머무른 시간과 비교하여 동정하였고, 3-point 농도의 외부 표준용액 분석 방법으로 정량하였다.

2.4. 녹차 잎 분말의 입도 분포 분석

녹차 잎 분말의 형태학적 관찰 및 입도 분포 분석을 위해, 별다른 처리 없이 녹차 분말을 백금도금 후 주사전자현미경(Nanoeye, SNE-3000M; SEC Co., Ltd., Suwon, Korea)으로 관찰하였고, Image J 프로그램을 사용하여 녹차 잎 분말의 입자 크기 분포도를 측정하였다.

2.5. 용매 추출물의 제조

녹차 잎 분말로부터 phytochemical 물질 추출에 적합한 에탄올의 농도 설정을 위해 다음과 같이 에탄올 농도별 추출물을 제조하였다. 녹차 잎 분말에 25 배수 DW 또는 25, 50, 75% 에탄올을 각각 가하고 균질(10,000 rpm, 5 min)하였고, 원심분리(8,000 \times g, 4°C, 30 min)하여 얻은 상등액을 용매 추출물로 하였다. 가열 처리에 의한 용매 추출물의 항산화 및 항균 활성 변화를 살펴보기 위해, 앞서 기술한 바와 동일하게 균질 처리를 진행하였고, 121°C에서 15분간 가열 처리하였다. 이 후 실온에서 냉각한 뒤 원심분리(8,000 \times g, 4°C, 30 min)하여 상등액을 얻어 가열 처리 용매 추출물로 하였다.

2.6. 세포벽 분해 효소 처리 및 효모 발효 추출물의 제조

세포벽 분해 효소 처리 또는 효모 발효를 진행하여 얻은 추출물의 제조방법은 Fig. 1과 같다. 세포벽 분해 효소 처리 및 *S. cerevisiae* 발효가 녹차의 항산화 및 항균 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 다음과 같이 실험 그룹을 설정하였다. 가열 처리한 녹차 잎 50% 에탄올 추출물을 대조구(50% EOH-H)로, 효소 처리 단독(Ecp25), 효모 발효 단독(SC), 효소 처리 후 효모 발효(Ecp25+SC), 효모 발효 후 효소 처리(SC+Ecp25)로 각각 설정하여 진행하였고, 이들의 항산화 및 항균 활성을 평가하여 비교하였다. 효소 처리를 위해, 녹차 분말에 12배수에 해당하는 DW를 가하고 균질(10,000 rpm, 5 min)하였고, cellulase(from *Trichoderma reesei*, \geq 700 unit/g; Sigma-Aldrich Inc.)와 pectinase(from *Aspergillus aculeatus*, \geq 3,800 unit/mL; Sigma-Aldrich Inc.)를 녹차 분말의 각 2.5%(v/w dry sample)가 되도록 첨가한 뒤 50°C에서 12시간 반응시켰다. 이후 121°C에서 1분간 열처리하여 효소를 불활성화시켰고, 에탄올을 최종 농도 50%가 되도록 가한 다음 원심분리(8,000 \times g,

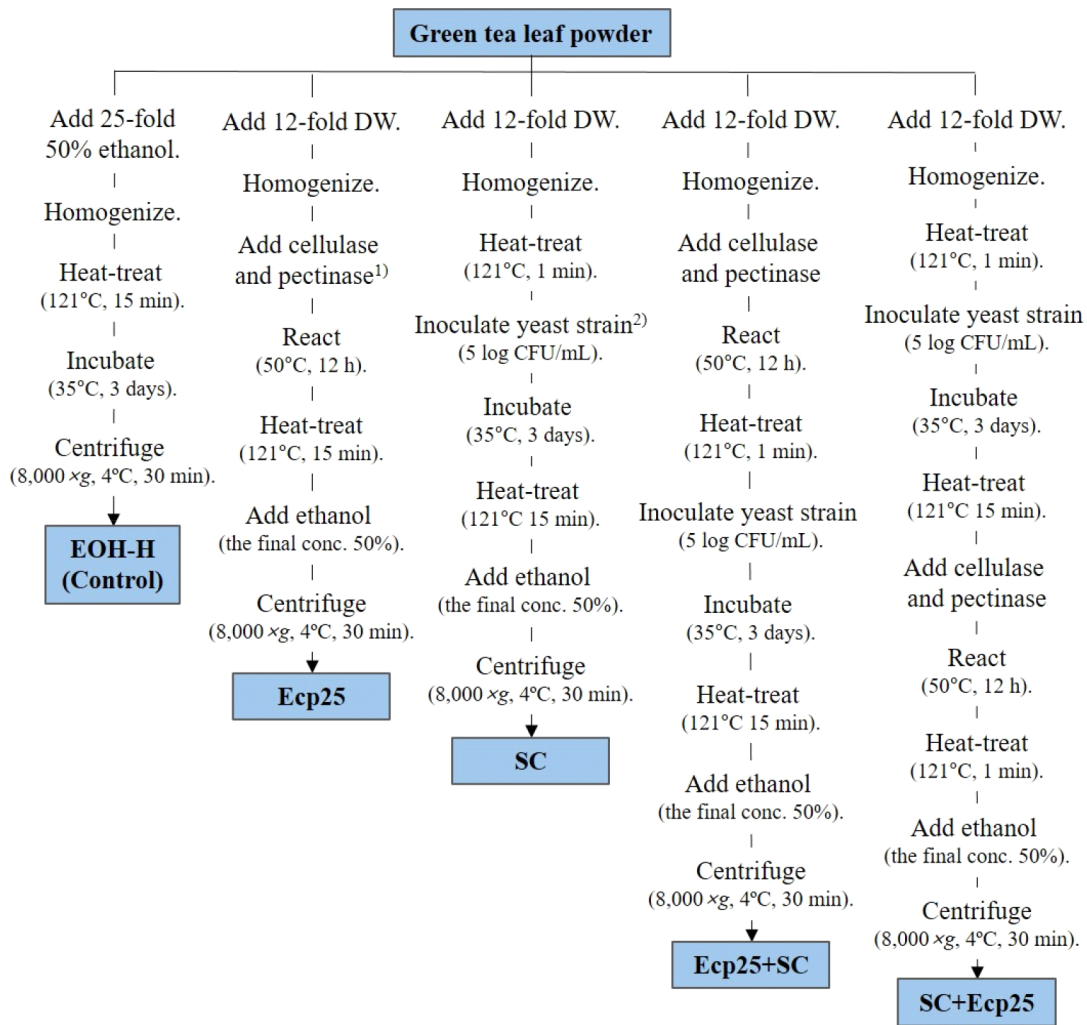


Fig. 1. The schema of solvent extraction, enzymatic treatment and yeast fermentation. ¹The 2.5% cellulase and 2.5% pectinase (v/v dry sample) were used in combination. ²The yeast strain was *Saccharomyces cerevisiae*, which isolated from Korean traditional wine.

4°C, 30 min)하여 상등액을 얻었고, 이를 효소 처리 추출물 (Ecp25)로 하였다. 효모 발효의 경우 녹차 잎 분말에 12 배수에 해당하는 DW를 가하여 균질하였고, 121°C에서 1분 간 순간 살균한 다음 yeast mold broth(Difco)에서 전배양 (35°C, 20 h) 한 *S. cerevisiae* KFRI 122를 최종 효모수 약 5 log CFU/mL가 되도록 접종하였다. 이후 35°C에서 3일간 흔들면서 배양하였고, 121°C에서 15분 멸균처리를 진행하였다. 여기에 에탄올을 최종 농도 50%가 되도록 가한 다음 원심분리(8,000 ×g, 4°C, 30 min)하여 상등액을 얻었고, 이를 효모 발효 추출물(SC)로 하였다. 순서와 관계 없이 효소 처리 및 효모 발효를 병행 진행한 것은 에탄올

첨가 전까지 동일하게 효소 처리 또는 효모 발효를 진행한 뒤 최종 추출물 회수 시 에탄올을 최종 농도 50%가 되도록 가한 다음 원심분리(8,000 ×g, 4°C, 30 min)하여 상등액을 얻었다.

2.7. 수율 측정

사용된 녹차 잎 분말로부터 용매 추출, 세포벽 분해 효소 처리 및 효모 발효를 통해 얻은 추출물의 수율을 구하기 위해, 얻은 액상 추출물의 총 부피와 추출물 내 고형분 함량을 측정하였다. 추출물의 총 부피는 50 mL 메스실린더 (tolerance 0.5 mL)를 사용하여 측정하였고, 항량된 도가

니에 액상 추출물 10 mL를 취하고 60°C에서 약 3시간 예비 가열한 다음 105°C에서 약 6시간 가열건조하여 고형분 함량을 측정하였으며, 아래 계산식에 대입하여 수율(%)로 나타내었다.

$$\text{수율(\%)} = \frac{\text{고형분의 함량(g/mL)} \times \text{추출물의 총 부피(mL)}}{\text{사용된 원료의 무게(g)}} \times 100$$

2.8. 항산화 활성 평가

녹차 잎 용매 추출물을 포함한 세포벽 분해 효소 처리 및 효모 발효 추출물의 항산화 활성은 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich Inc.) 라디칼 소거 활성 측정 방법(Sharma와 Bhat, 2009)을 약간 변형하여 평가하였다. 0.25 mM DPPH-ethanol 반응액을 517 nm에서 흡광도 약 1.2가 되도록 조제하였고, 시료액마다 50% ethanol을 사용하여 2배씩 희석한 7단계 희석액을 각각 준비하였다. 각 시료의 희석액 200 μ L에 DPPH-ethanol 반응액 600 μ L를 가한 뒤 vortex하였고, 상온에서 30분간 반응시켰다. 각 반응액은 5,000 \times g(4°C)에서 5분간 원심분리하였고, 상등액 200 μ L를 96-well plate에 옮긴 뒤 517 nm에서 흡광도를 측정하여 아래 계산식에 대입해 DPPH 라디칼 소거 활성(%)으로 나타내었다. EC₅₀ 값을 구하기 위해, 각 시료 희석단계 별 농도를 x 축, 활성을 y 축으로 하여 1차 함수식을 구하였고, y값에 소거활성 50% 일 때를 가정한 50을 대입하여 얻은 x 값을 EC₅₀ 값으로 정의하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도 값(OD517)}}{\text{blank의 흡광도 값(OD517)}}\right) \times 100$$

2.9. 항균 활성 평가

녹차 잎 추출물의 항균 활성은 agar-well diffusion 방법으로 평가하였다(Jun 등, 2015). 평가전 *L. monocytogenes* KCTC 13064는 tryptic soy broth(Difco), 나머지 시험 균주 6종은 mueller hinton broth(Difco)를 사용하여 30°C에서 약 15시간 전배양하였고, 전배양과 동일한 배지조성의 agar에 시험 균주의 최종 농도가 약 5 log CFU/mL가 되도록

접종한 뒤 plate에 부어 굳혔다. 각 균주가 접종된 agar plate에 가열 살균한 직경 5 mm의 실린더를 사용하여 well을 제작하였고, 시험 물질 50 μ L를 주입한 뒤 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 버니어캘리퍼스를 사용하여 균의 증식이 저해된 저해존(diameter of inhibition zone, DIZ)의 직경을 측정하였고, well의 직경을 감하여 저해존의 크기를 나타내었다. 각 시험 물질의 평가 농도는 10 mg/mL이었고, 용매 대조구(solvent control)로 DW, 50% 또는 75% ethanol을 사용하여 시험 물질과 동일하게 평가하였다.

2.10. 총페놀화합물 및 플라보노이드 함량 측정

총페놀화합물 함량은 Folin-Denis 방법(Dewanto 등, 2002)에 따라 측정하였다. 시료 125 μ L에 Folin & Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Inc.) 125 μ L, 75% ethanol 0.5 mL를 순차적으로 가하고 혼합한 다음 5분 동안 정치하였다. 여기에 4% sodium carbonate 2.25 mL를 가하고 90분 동안 실온에서 정치한 후 740 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma-Aldrich Inc.)를 표준물질로 0-600 μ g/mL의 농도로 조제하여 시료와 동일하게 측정하였다. 결과로부터 1차 함수식을 얻었고, 시료의 흡광도 값을 대입하여 총페놀화합물 함량을 계산하였다.

총플라보노이드 함량은 Chang 등(2002)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 500 μ L에 80% ethanol 1.5 mL를 가하고 혼합하였다. 여기에 10% aluminum chloride와 1M potassium acetate 각 100 μ L와 DW 2.8 mL를 순차적으로 가하고 혼합한 다음 30분간 정치하였다. 이것을 3,000 \times g(4°C)에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 rutin trihydrate(Sigma-Aldrich Inc.)를 사용하였고, 0-600 μ g/mL 농도로 조제하여 시료와 동일한 방법으로 측정하였다. 결과로부터 1차 함수식을 얻었고, 시료의 흡광도 값을 대입하여 총플라보노이드 함량을 계산하였다.

2.11. 통계처리

모든 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었고, 평균 값들 사이 유의적 차이는 IBM SPSS Statistics 20(IBM,

NewYork, USA)을 사용하여 one-way ANOVA를 실시한 후 사후검정으로 유의수준 5%에서 Tukey test($p < 0.05$)로 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 녹차 잎 분말의 화학적 조성 및 입자 분포도

재료로 사용된 녹차 잎 분말의 화학적 조성을 파악하고자 일반성분 및 구성당 분석을 진행하였고, 그 결과를 Table 1로 나타내었다. 녹차 잎 분말은 탄수화물 69.94%, 조단백질 16.86%, 회분 5.79%, 조지질 3.05%로 구성되어 있었다. 재배 지역, 시기, 수확 후 처리 및 보관 방법에 따라 달라질 수 있지만, 녹차 잎은 polyphenols 36%, 탄수화물 25%, 단백질 15%, lignin 6.5%, 회분 5%, 아미노산 4%, methyl xanthines 3.5%, 지질 2%, 유기산 1.5%, chlorophyll 0.5% 등으로 구성되어 있다 보고된 바 있다(Al Hroob 등, 2019). 녹차 잎 분말의 구성당 분석 결과 7종의 중성당과 1종의 산성당이 검출되었다. 이를 높은 비율 순으로 나열하

Table 1. Proximate and monosaccharide compositions of green tea (*Camelia sinensis*) leaf powder

Proximate composition	Content (%)	
Moisture	4.35±0.07	
Crude protein	16.86±0.95	
Crude lipid	3.05±0.10	
Ash	5.79±0.07	
Carbohydrate	69.94±0.94	
Composite monosaccharide	Content (g/100 g)	Ratio ¹⁾ (%)
Fucose	0.50±0.01	1.58
Rhamnose	1.11±0.01	3.48
Arabinose	2.29±0.03	7.17
Galactose	3.70±0.03	11.57
Glucose	17.39±0.13	54.34
Mannose	1.03±0.01	3.21
Xylose	1.54±0.04	4.83
Galacturonic acid	4.43±0.04	13.83

¹⁾Percent ratio in the total composite monosaccharides. All values are mean±SD (n=3).

면, glucose, galacturonic acid, galactose, arabinose, xylose, rhamnose, mannose 및 fucose 순으로 나타났고, glucose 비율이 검출된 구성당의 54.34%를 차지하는 것으로 나타났다. 식물 잎의 hemicellulose는 대부분 xyloglucan 형태로 glucose와 xylose가 주요 구성당이며 (Zhang 등, 2020), 녹차 잎 분말 내 pectin의 주요 구성당인 galacturonic acid의 비율은 검출된 총구성당의 14.83%를 차지하는 것으로 나타났다. 쌍떡잎 식물의 세포벽은 15-30% cellulose, 30-40% pectin, 20-30% hemicellulose 및 소량의 lignin 등으로 구성되어 있는 것으로 보고되고 있다(Avci, 2022). 형태학적 관찰에서 녹차 잎의 외형은 불규칙적이지만 타원형으로 나타났고, 대부분 2-10 μm 범위에서의 입자 크기 분포도를 보였다(Fig. 2).

3.2. 에탄올 농도 및 가열 처리에 따른 녹차 잎 추출물의 수율 및 항산화 활성 변화

식물 유래 phytochemical 물질들은 유기용매 가운데 알코올과 같은 비교적 극성도가 있는 용매에 잘 추출된다 (Altemimi 등, 2017). 녹차 잎 분말로부터 항산화 및 항균 활성이 높은 물질을 회수하기 위해, DW를 포함한 다양한 농도의 에탄올을 조제하여 추출 용매로 사용하였다. 또한, 살균, 가열 등의 목적으로 열처리가 필요한 식품 제조공정에 보존료로 사용하기 위해서는 추출물 내 활성 물질의 열에 대한 안정성이 요구되므로, 가열 처리에 따른 항산화 및 항균 활성 변화를 함께 살펴보았다(Table 2와 3).

녹차 추출물 제조 시 25% 에탄올을 추출 용매로 사용하고 가열 처리(121°C, 15 min)를 할 경우 가장 높은 수율을 나타내었고, 물을 사용하여 상온에서 추출할 때 유의적으로 가장 낮은 수율을 보였다($p < 0.05$). 이 두 경우를 제외하고 75% 이내 에탄올 농도 및 가열 처리에 따른 추출물간 수율 변화는 거의 없었고, 평균적으로 약 26% 수율을 보였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 추출 용매인 에탄올 농도에 따라 차이를 보였으며, 가열 처리 유·무와 관계없이 50% 에탄올 사용 시 가장 낮은 EC_{50} 값을 나타내었다. 즉, 이 농도에서 항산화 잠재력이 가장 우수한 추출물을 제조할 수 있는 것으로 판단되었다. 가열 처리 유·무에 따라 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 큰 차이를 보이지 않아 121°C, 15분간

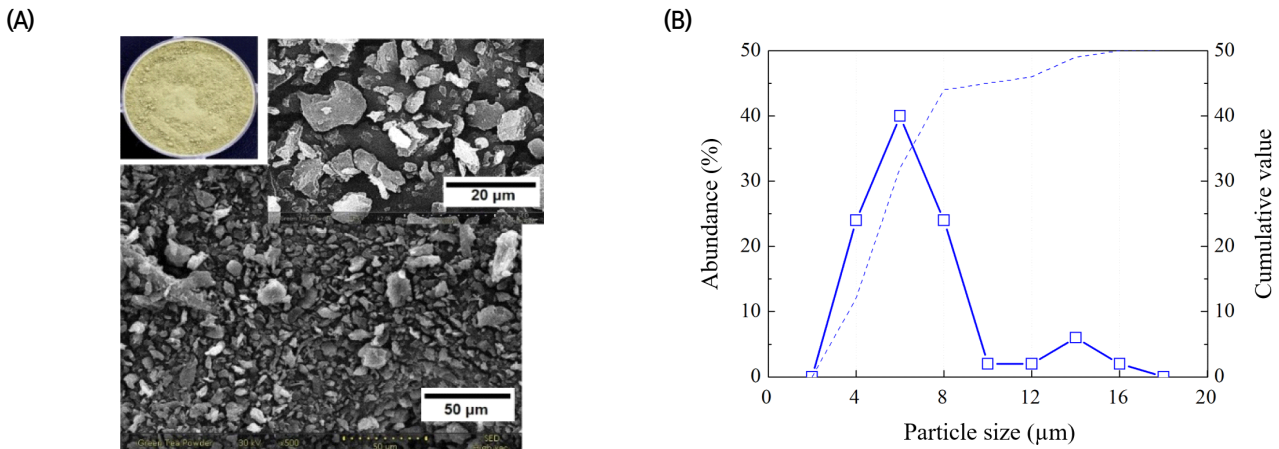


Fig. 2. Micro-structure (A) and particle size distribution (B) of green tea (*Camelia sinensis*) leaf powder. SEM images were obtained at ×500 and ×2,000 magnifications.

Table 2. Yields and DPPH radical scavenging activities of the solvent extracts from green tea (*Camelia sinensis*) leaf according to ethanol concentrations and heat treatment

Group	Yield (g/100 g, dry)	EC ₅₀ value ²⁾ (μg/mL)
Con-DW	21.4±0.4 ^{c3)}	75.4±0.2 ^b
25% EOH	27.4±0.2 ^b	49.0±0.3 ^c
50% EOH	27.1±0.1 ^b	34.9±2.2 ^e
75% EOH	26.4±0.8 ^b	41.4±0.5 ^d
CON-DW-H ¹⁾	27.1±0.5 ^b	86.6±1.1 ^a
25% EOH-H	31.4±2.1 ^a	50.5±2.0 ^c
50% EOH-H	27.2±0.8 ^b	37.4±1.4 ^e
75% EOH-H	25.6±0.4 ^b	42.6±0.3 ^d

¹⁾Heat treatment was conducted at 121°C for 15 min.
²⁾Effective concentration possessing 50% scavenging activity for DPPH radical.
³⁾All values are mean±SD (n=3) and different superscripts within each column are significantly different (p<0.05) by Tukey test.

가열 처리에 항산화 활성 물질은 비교적 안정한 것으로 예상되었다.

3.3. 에탄올 농도 및 가열 처리에 따른 녹차 잎 추출물의 항균 활성 변화

식품 보존료로서 녹차 잎 추출물의 활용 가능성 평가를 위해, 대상균으로 식품 위해균 7종을 선택하였고, 추출물의 항균 활성은 agar-well diffusion 방법으로 측정하였다. 녹차 잎 용매 추출물에 의해 균의 증식이 억제된 저해존(DIZ)은 *B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. aureus* subsp.

aureus 및 *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*에서 관찰되었고, 물 추출물은 모든 대상균에 대해 항균 활성을 나타내지 않았다(Table 3). 추출 용매로 25% 에탄올 사용 시 *B. licheniformis*에 대해 항균 활성을 보이지 않았던 반면, 에탄올 50% 농도부터 앞서 나열한 균종 모두에 대해 항균 활성을 나타내었다. 가열 처리에 의한 항균 활성 변화는 없었다. 다만, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*의 경우 에탄올 농도의존적으로 감수성이 증가하는 것으로 나타났다. 이 세균은 수인성으로 담수어 양식장에서 주로 발견되며, 이와 관련된 생물 원료 또는 일부 가공식품 등에서 발견된다(Stratev와 Odeyemi, 2016).

녹차 잎 또는 녹차 추출물은 여러 연구에서 넓은 항균 스펙트럼을 가지며 catechins이 주요 유효 물질로 알려져 있다. 이 가운데에서도 (-)-epigallocatechin gallate와 (-)-epicatechin gallate는 methicillin 내성 *S. aureus*를 포함하여, *Helicobacter pylori*, 충치 원인균인 Streptococci 등에 대해 증식 저해 활성을 가지며, 항생제와의 상승효과를 보여 다양한 약제 내성균들의 제어를 위해 평가되고 있다(Taylor 등, 2005). Liu 등(2022)은 녹차 잎을 에탄올로 추출한 다음 ethyl acetate로 분획하여 catechins이 풍부한 추출물을 제조할 경우 최소억제농도 10-35 mg/mL 수준에서 *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*와 *Sal. Typhimurium*에 항균 효과를 나타낸다 하였다.

본 연구에서 평가한 녹차 잎 용매 추출물은 *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*를 제외하고 추출 용매로 50% 에탄올

Table 3. Antibacterial activities of the solvent extracts from green tea (*Camelia sinensis*) leaf against food-born pathogenic bacteria according to ethanol concentrations and heat treatment (unit: mm, diameter of inhibition zone)

Bacterium	Solvent control		Extract							
	DW	75% ethanol	Non-heat treatment				Heat treatment ¹⁾			
			Con-DW	25% EOH	50% EOH	75% EOH	Con-DW-H	25% EOH-H	50% EOH-H	75% EOH-H
Gram positive										
<i>B. cereus</i>	NI ²⁾	NI	NI	1.0±0.1 ³⁾	2.2±0.2	2.7±0.2	NI	1.0±0.1	2.1±0.1	3.0±0.2
<i>B. licheniformis</i>	NI	NI	NI	NI	1.9±0.4	2.2±0.3	NI	NI	1.6±0.2	2.0±0.3
<i>L. monocytogenes</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	NI	NI	NI	3.3±0.3	3.6±0.3	3.5±0.2	NI	3.0±0.2	3.3±0.1	3.4±0.2
Gram negative										
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	NI	NI	NI	2.4±0.4	4.3±0.5	6.1±0.4	NI	3.4±0.3	4.6±0.3	5.5±0.4
<i>E. coli</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Sal. Typhimurium</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

¹⁾Heat treatment was conducted at 121°C for 15 min.

²⁾No inhibition.

³⁾All values are mean±SD (n=3). The test cell density of all the bacteria was approximately 5 log CFU/mL and the test concentration of the sample was 10 mg/mL.

사용 시 75% 에탄올과 유사한 수준의 항균 활성을 나타내었는데, 에탄올 사용량을 줄여 경제적인 수 있다는 점에서 추출 용매로 50% 에탄올을 사용하는 것이 효율적이다 판단되었다.

3.4. 세포벽 분해 효소 처리 및 효모 발효에 따른 추출물의 수율 및 항산화 활성 변화

섹션 3.1.에서 기술한 바와 같이 녹차 잎 분말에는 세포벽 구성성분으로 알려진 cellulose, hemicellulose 및 pectin이 존재하는 것으로 예상되었다. 2차 대사산물인 phytochemical 물질들은 식물 세포 내에서 합성 또는 전환되어 세포 외로 배출된다(Isah, 2019; Liu 등, 2018). 녹차 잎의 세포벽 분해는 이들 물질의 추출 효율을 높일 수 있을 것으로 예상되었고, 분해율을 높이고자 cellulase와 pectinase를 혼합하여 처리하였다.

효소 제조사의 기술 설명에 따르면, 본 실험에 사용된 cellulase의 최적 활성 pH는 6, 온도는 약 52°C이다(Sigma-Aldrich, 2023a). Pectinase는 pH 5.0-6.5, 반응 온도 30-50°C에서 높은 활성을 기대할 수 있는 것으로 나타난다(Omeje 등, 2023). 녹차 분말에 약 12배수 DW를 가하여

균질한 것의 pH는 약 6.5로 나타나 별도의 pH 조절은 하지 않았고, 두 효소의 높은 활성을 기대하기 위해 반응 온도는 50°C로 설정하였다.

일반적인 *Saccharomyces* sp.는 cellulase를 생산하지 않는 것으로 보고되고 있지만, 양조 및 제빵 산업에서 혐기적인 당 발효를 통해 알코올, CO₂ 및 향기 성분 생성 목적으로 널리 사용되고 있다(Oh와 Jin, 2020). 본 연구에서의 효모의 사용은 알코올 생성 목적보다는 효모 발효과정 중 일어나는 녹차 잎 phytochemical 물질의 변환과 휘발성 화합물 생성에 주목하였다. 일부 선행 연구에서 *Saccharomyces* sp. 효모 발효를 통해 생성된 휘발성 물질 등은 다양한 생리활성 효과를 나타낸다고 보고된 바 있고(Park, 2012), Yoon 등 (2015)은 블루베리의 차즙액과 효모 발효물의 총페놀화합물과 플라보노이드 함량 및 항산화 효과를 비교한 결과, 효모 발효 후 모두 증가하는 것으로 나타난 바 있다.

녹차 잎을 세포벽 분해 효소로 처리, 효모 발효 또는 효소 처리와 효모 발효를 병행하여 얻은 추출물의 수율과 항산화 활성은 Table 4와 같다. 수율에서는 효소 처리를 단독으로 진행한 Ecp25구가 약 41.2%로 가장 높았고, 대조구인 50% 에탄올 용매 추출(50% EOH-H)구와 효모 발효 단독

Table 4. Effects of enzyme treatment or yeast fermentation on the yield and antioxidant activity of the extracts from green tea (*Camelia sinensis*) leaf

Group ¹⁾	Yield (g/100 g, dry)	EC ₅₀ value ³⁾ (μg/mL)
GSE	NT ²⁾	455.1±2.8 ^a
Con-50% EOH	26.3±0.6 ^{cd4)}	41.8±0.3 ^c
Ecp25	41.2±1.0 ^b	57.2±1.6 ^b
Ecp25+SC	32.5±0.1 ^c	40.9±0.4 ^c
SC	28.1±1.6 ^d	30.5±0.5 ^d
SC+Ecp25	36.4±0.1 ^b	38.9±0.8 ^c

¹⁾GSE, grapefruit seed extract; Con-50% EOH, the extract with 50% ethanol; Ecp25, 2.5% cellulose and 2.5% pectinase combination treatment; Ecp25+SC, yeast fermentation after Ecp25 treatment; SC, yeast fermentation; SC+Ecp25, Ecp25 treatment after yeast fermentation.

²⁾Not tested.

³⁾Effective concentration possessing 50% scavenging activity for DPPH radical.

⁴⁾All values are mean±SD (n=3) and different superscripts within each column are significantly different (p<0.05) by Tukey test.

(SC)구는 각각 26.3%와 28.1%로 나타나 다른 그룹에 비해 유의적으로 낮았다(p<0.05). 반면, 진행 순서와 관계없이 효소 처리와 효모 발효를 병행한 두 그룹의 수율은 앞선 두 그룹에 비해 약 5.3-9.2%가량 높았다. 다르게 말하면, 효소 처리 시 추출물의 수율은 증가되었고, 효모 발효는 수율 변화에 영향을 주지 않았다. 자몽종자추출물(GSE)은 비교물질로 사용되었다. 결과에는 나타나지 않았지만, 효모 발효를 진행한 모든 그룹에서 효모 접종 후 24시간 이내 초기 접종 효모 수 약 5.0 log CFU/mL에서 최대 약 7.2 log CFU/mL로 증가되어, 녹차 잎 분말 이외 다른 영양성분 첨가 없이 균이 잘 증식되는 것을 알 수 있었다(data not shown).

그룹들 사이 최대 DPPH 라디칼 소거활성은 약 85.9-87.7% 범위로 유사한 수준으로 나타났다. 그러나 EC₅₀ 값 비교에서 SC구가 가장 낮아 항산화 활성이 가장 우수한 것으로 나타났고, GSE가 가장 높아 항산화 활성이 가장 낮았다. 처리 방법에 따라 효소 처리만 진행할 경우 용매 추출인 대조구에 비해 항산화 활성이 감소하였고, 효모 발효가 병행될 경우 그 활성은 증가되었다.

3.5. 세포벽 분해 효소 처리 및 효모 발효에 따른 녹차 잎 추출물의 항균 활성 변화

식품일반의 기준 및 규격에 따르면(MFDS, 2023), 위생

지표균으로 세균수와 대장균군에 대한 기준이 있고, 식품 특성에 따라 *Salmonella* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, 장출혈성 *E. coli*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolitica*, *B. cereus*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus* 등 식중독 균에 대한 세부 규격이 있다. 녹차 잎 추출물은 *B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. aureus* subsp. *aureus* 및 *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*에 대해 항균 활성을 나타내었다. 식품 보존료로서의 사용 가능성 평가를 위해 녹차 잎 추출물이 항균 활성을 보인 균종 가운데 식품일반의 기준 및 규격에 고시된 식중독 균인 *B. cereus*와 *S. aureus* subsp. *aureus*를 항균 활성 평가 대상균으로 선택하였다.

녹차 잎을 세포벽 분해 효소로 처리, 효모 발효 또는 효소 처리와 효모 발효를 병행하여 얻은 추출물의 항균 활성 결과는 Fig. 3과 같다. Solvent control로 사용된 50% 에탄올의 두 세균에 대한 저해 활성은 없었다. 녹차 잎 추출물은 시판 자몽종자추출물(GSE)에 비해 평가된 두 세균 모두에서 다소 낮은 항균 활성을 나타내었다. *S. aureus* subsp. *aureus*가 *B. cereus*에 비해 감수성이 높은 것으로 나타났고, 추출물의 활성은 균종에 따라 조금 다른 양상을 보였다. *B. cereus*에서는 효모 발효 단독으로 진행한 SC구만 용매 추출 대조구에 비해 활성이 높았고, *S. aureus* subsp. *aureus*에서는 효소 처리 단독구(Ecp25)를 제외한 다른 그룹 모두에서 그 활성이 증가하였다. 다르게 말하면, 효모 발효 단독으로 진행 시 대조구에 비해 항균 활성이 증가하였으나, 효소 처리를 병행할 경우 처리 순서와 관계없이 효모 발효 단독보다 항균 활성이 감소하였다. 녹차 잎에 존재하는 phytochemical 물질은 catechin, epicatechin, gallic acid, galloylated catechin, epigallocatechin gallate, galloylated epigallocatechin gallate, myricetin, caempferol, quercetin, chlorogenic acid, coumaric acid 및 theogallin 등이 있으며, 이 가운데 catechin 유도체들이 주요 항균 물질인 것으로 알려져 있다(Prasanth 등, 2019; Taylor 등, 2005).

3.6. 세포벽 분해 효소 처리 및 효모 발효에 따른 녹차 잎 추출물 내 총페놀화합물 및 플라보노이드 함량

녹차 잎 추출물 내 phytochemical 물질의 양을 예상하

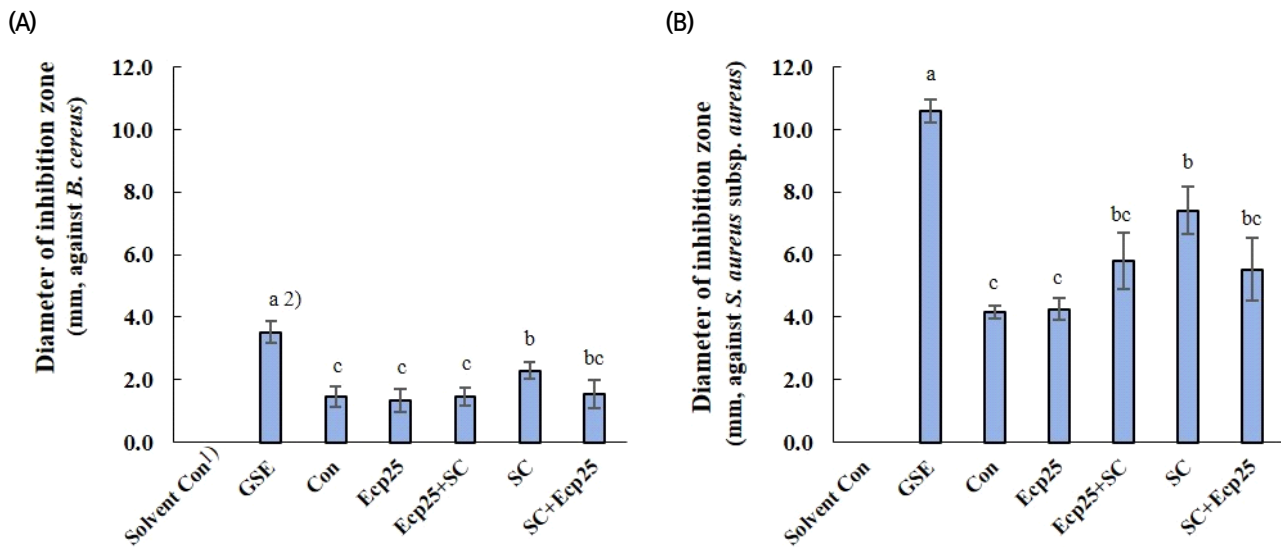


Fig. 3. Effects of enzyme treatment and yeast fermentation on the antibacterial activities of the extracts from green tea (*Camelia sinensis*) leaf against *B. cereus* (A) and *S. aureus subsp. aureus* (B). ¹⁾Solvent con, 50% ethanol; GSE, grapefruit seed extract; Con, the 50% ethanol extract with heat treatment; Ecp25, 2.5% cellulose and 2.5% pectinase combination treatment; Ecp25+SC, yeast fermentation after Ecp25 treatment; SC, yeast fermentation; SC+Ecp25, Ecp25 treatment after yeast fermentation. ²⁾All values are mean±SD (n=3) and different superscripts within each column are significantly different (p<0.05) by Tukey test. The test cell density of the two bacteria was approximately 5 log CFU/mL, and the test concentration of the sample was 10 mg/mL.

기 위해 총페놀화합물과 플라보노이드 함량을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 이들은 항산화 및 항균 활성과 연관성이 높다고 알려져 있다(Joung 등, 2007). 총페놀화합물 함

량에서 녹차 잎 추출물 모두는 GSE보다 유의적으로 높게 나타났고(p<0.05), 이러한 결과는 앞선 항산화 활성 결과 (Table 4)와 잘 일치하였다. 플라보노이드 함량에서는 GSE가

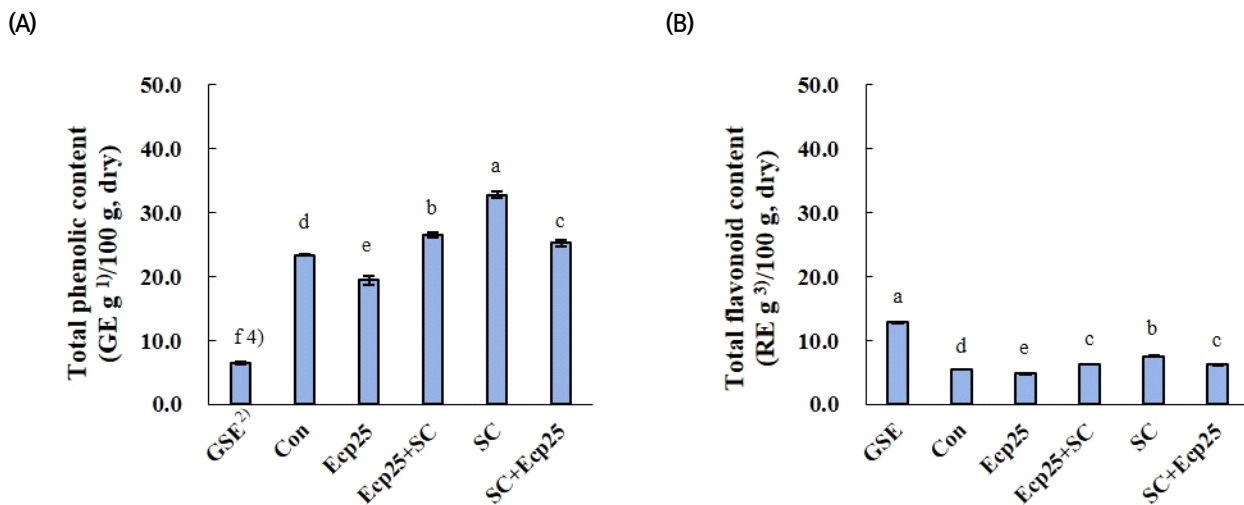


Fig. 4. Effects of enzyme treatment and yeast fermentation on the total phenolic (A) and flavonoid (B) contents in the extracts from green tea (*Camelia sinensis*) leaf. ¹⁾Gallic acid equivalent gram. ²⁾GSE, grapefruit seed extract; Con, the 50% ethanol extract with heat treatment; Ecp25, 2.5% cellulose and 2.5% pectinase combination treatment; Ecp25+SC, yeast fermentation after Ecp25 treatment; SC, yeast fermentation; SC+Ecp25, Ecp25 treatment after yeast fermentation. ³⁾Rutin equivalent gram. ⁴⁾All values are mean±SD (n=3) and different superscripts within each column are significantly different (p<0.05) by Tukey test.

가장 높게 나타났고, 세포벽 분해 효소 처리만 진행(Ecp25)할 경우 용매 추출 대조구보다 유의적으로 낮아졌다($p<0.05$). 이것은 세포벽 분해 효소 처리로 인해 페놀화합물과 플라보노이드가 감소되었다고 해석하는 것보다, 효소 처리 후 추출물의 수율이 증가된 것에 비추어 볼 때 추출물 내 페놀화합물과 플라보노이드 이외 다른 물질이 늘어난 것에 의한 결과로 예상된다. 효소 처리에 효모 발효를 병행하거나 효모 발효만 진행할 경우 용매 추출 대조구에 비해 총페놀화합물 및 플라보노이드 함량 모두 유의적으로 높아지는 것으로 나타났다($p<0.05$). 소재는 다르지만, Ngadze 등(2018)의 보고에 따르면, *Strychnos cocculoides* juice 착즙 전 열과 pectinase의 처리는 juice의 수율과 페놀화합물 함량을 증가시켜 항산화 활성을 높인다고 보고한 반면, orange 가공부산물로부터 페놀화합물 회수 목적으로 pectinase를 처리할 경우 그 함량이 감소된다는 보고가 있어(Shaharam 등, 2019), 세포벽 분해 효소 처리에 의한 페놀화합물 변화는 재료에 따른 차이가 있었다. 처리 방법에 따른 결과를 요약하면, 세포벽 분해 효소 처리는 녹차 잎 추출물의 수율을 증가시키나 추출물 내 페놀화합물과 플라보노이드의 순도를 낮출 수 있고, 효모 발효는 추출물 내 총페놀화합물 및 플라보노이드 함량을 높이는데 긍정적으로 작용할 수 있는 것으로 나타났다.

4. 요약

본 연구에서는 항산화와 항균 활성 등이 우수한 녹차 잎을 대상으로 관련 물질 회수에 적합한 추출 용매의 농도 설정과 세포벽 분해 효소 처리 및 효모 발효가 활성을 높이는 데 도움을 줄 수 있는지 살펴보았다. 입도 약 4-10 μm 의 녹차 분말을 사용하여 추출물을 제조할 때, 다양한 에탄올 농도 가운데 50% 에탄올을 추출 용매로 하고 가열 처리(121°C, 15 min)를 진행할 경우 높은 수율과 DPPH 라디칼 소거능 및 항균 활성을 나타내었다. 이 추출물은 *B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. aureus* subsp. *aureus* 및 *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*에서 항균 활성을 나타내었다. 녹차 잎 분말에 효소 처리 및 효모 발효 진행 시 최종 녹차 잎 추출물의 항산화와 항균 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해, 효소 처리에는 cellulase와 pectinase

를 혼합(2.5%+2.5%)하여 사용하였고, 효모 발효에는 *S. cerevisiae*가 사용되었다. 녹차 잎을 효소 처리할 경우 추출물의 수율은 증가되었으나, 50% 에탄올 추출물(대조구)에 비해 항산화와 항균 활성은 유의적으로 감소되었다($p<0.05$). 그에 반해 효모 발효를 단독으로 진행할 경우 최종 추출물의 수율 증가는 없었지만, 총페놀화합물과 플라보노이드 함량을 높여 항산화와 항균 활성을 높이는데 긍정적으로 작용하였다.

Acknowledgements

이 논문은 2023년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구(20220131, 수산식품산업 맞춤형 기술개발)로 이에 감사드립니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Kim BM, Jun JY. Methodology: Lim DW, Lee GY. Analysis: Lee GY, Jung MJ. Writing - original draft: Lim DW. Writing - review & editing: Jun JY.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Dong-Wook Lim (First author)

<https://orcid.org/0000-0002-2386-8414>

Ga-Yang Lee

<https://orcid.org/0009-0007-1964-0445>

Min-Jeong Jung

<https://orcid.org/0000-0002-6887-9459>

Byoung-Mok Kim

<https://orcid.org/0000-0001-6928-9576>

Joon-Young Jun (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0002-9559-7270>

References

- Al Hroob AM, Abukhalil MH, Hussein OE, Mahmoud AM. Pathophysiological mechanisms of diabetic cardiomyopathy and the therapeutic potential of epigallocatechin-3-gallate. *Biomed Pharmacother* 109, 2155-2172 (2019)
- Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6, 42 (2017)
- AOAC. Official Methods of Analysis. 17th ed, Official Method 950.46, 923.03, 976.05 and 991.36, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA (2005)
- Avcı U. Trafficking of xylan to plant cell walls. *Biomass*, 2, 188-194 (2022)
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *J Food Drug Anal*, 10, 178-182 (2002)
- Chung SH, Yoon KH. Antimicrobial activity of extracts and fractions of green tea used for coarse tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37, 1382-1388 (2008)
- Dewanto V, Wu X, Liu RH. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50, 4959-4964 (2002)
- Han JH, Seo HS, Chung JD. Development of a natural preservative with antioxidant activity from by-products of food processing. *J Korea Soc Waste Manag*, 37, 411-418 (2020)
- Isah T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biol Res*, 52, 39 (2019)
- Joung YM, Park SJ, Lee KY, Lee JY, Suk JK, Hwang SY, Park KE, Kang MH. Antioxidative and antimicrobial activities of *Lilium* species extracts prepared from different aerial parts. *Korean J Food Sci Technol* 39, 452-457 (2007)
- Jun JY, Jung MJ, Jeong IH, Yamazaki K, Kawai Y, Kim BM. Antimicrobial and antibiofilm activities of sulfated polysaccharides from marine algae against dental plaque bacteria. *Mar Drugs*, 16, 301 (2018)
- Jun JY, Nakajima S, Yamazaki K, Kawai Y, Yasui H, Konishi Y. Isolation of antimicrobial agent from the marine algae *Cystoseira hakodatensis*. *Int J Food Sci Technol*, 50, 871-877 (2015)
- Kang JH, Ra CH, Kim SH, Shon HW, Chung HY. Effects of Bactocease treatment on microbial growth and quality of fried fish paste during storage. *Food Eng Prog*, 26, 19-26 (2022)
- Kim BK, Kang JH, Oh GH, Hwang JY, Jang SO, Kim M. Antibacterial and antioxidant activity of *Chamaecyparis obtusa* extracts. *J Life Sci*, 29, 785-791 (2019)
- Li X, Xing Y, Cao L, Xu Q, Li S, Wang R, Jiang Z, Lin H. Effects of six commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains on phenolic attributes, antioxidant activity, and aroma of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv.) wine. *BioMed Res Int*, 2934743 (2017)
- Liu Q, Luo L, Zheng L. Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants. *Int J Mol Sci*, 19, 335 (2018)
- Liu S, Zhang Q, Li H, Qiu Z, Yu Y. Comparative assessment of the antibacterial efficacies and mechanisms of different tea extracts. *Foods*, 11, 620 (2022)
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). 3. Standards and specification for general foods: 4) Hygiene indicator bacteria and foodborne pathogens. Available from: <https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/ext/Document/FC?searchNm=%EB%AF%B8%EC%83%9D%EB%AC%BC%20%EA%B8%B0%EC%A4%80&itemCode=FC0A003001002A017>. Accessed Nov. 8, 2023.
- Namita P, Mukesh R, Vijay KJ. *Camellia sinensis* (green tea): A Review. *Glob J Pharmacol*, 6, 52-59 (2012)
- Ngadze RT, Verkerk R, Nyanga LK, Fogliano V, Ferracane R, Troise AD, Linnemann AR. Effect of heat and pectinase maceration on phenolic compounds and physicochemical quality of *Strychnos cocculoides* juice. *PLoS ONE*, 13,

e0202415 (2018)

- Oh EJ, Jin YS. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. FEMS Yeast Res, 20, foz089 (2020)
- Omeje KO, Nnolim NE, Ezema BO, Ozioko JN, Ossai EC, Eze SOO. Valorization of agro-industrial residues for pectinase production by *Aspergillus aculeatus*: Application in cashew fruit juice clarification. Clean Circ Bioecon, 4, 100038 (2023)
- Park KY. Increased health functionality of fermented foods. Food Sci Nutr, 17, 1-8 (2012)
- Prasanth MI, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C, Tencomnao T. A review of the role of green tea (*Camellia sinensis*) in antiphotaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy. Nutrients, 11, 474 (2019)
- Schadel C, Blochl A, Richter A, Hoch G. Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. Plant Physiol Biochem, 48, 1-8 (2010)
- Shaharam H, Dinani ST, Amouheydari M. Effects of pectinase concentration, ultrasonic time, and pH of an ultrasonic-assisted enzymatic process on extraction of phenolic compounds from orange processing waste. J Food Meas Charact, 13, 487-498 (2019)
- Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chem, 113, 1202-1205 (2009)
- Sigma-Aldrich. Application data sheet of cellulase from *Trichoderma reesei* C2730. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/KR/ko/product/sigma/c2730>. Accessed Nov. 10, 2023a.
- Sigma-Aldrich. Application data sheet of pectinase from *Aspergillus aculeatus* P2611. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/KR/ko/product/sigma/p2611>. Accessed Nov. 10, 2023b.
- Stratev D, Odeyemi OA. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. J Infect Public Health, 9, 535-544 (2016)
- Taylor PW, Hamilton-Miller JMT, Stapleton PD. Antimicrobial properties of green tea catechins. Food Sci Technol Bull, 2, 71-81 (2005)
- Vishnoi H, Bodla RB, Kant R, Bodla RB. Green tea (*Camellia sinensis*) and its antioxidant property: A review. Int J Pharm Sci Res, 9, 1723-1736 (2018)
- Yoon HH, Chae KS, Son RH, Jung JH. Antioxidant activity and fermentation characteristics of blueberry wine using traditional yeast. J Korean Soc Food Sci Nutr, 44, 840-846 (2015)
- Zhang C, Zhu X, Zhang F, Yang X, Ni L, Zhang W, Liu Z, Zhang Y. Improving viscosity and gelling properties of leaf pectin by comparing five pectin extraction methods using green tea leaf as a model material. Food Hydrocoll, 98, 105246 (2020)