

스테비아 잎 추출물을 첨가한 그리스 요거트의 항산화 활성 변화

윤지우 · 김하나 · 하태준 · 박서희 · 이세미 · 안성일 · 주진우 · *김겨유

강원대학교 동물생명과학대학 축산식품과학전공

Antioxidant Activity of Greek-style Yogurt with Stevia Leaf Extracts

Ji-Woo Yoon, Ha-Na Kim, Tae-Jun Ha, Su-Hee Park, Sae-Me Lee, Sung-Il Ahn, Jin-Woo Jhoo and *Gur-Yoo Kim

Dept. of Animal Products Food Science Program, College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

Abstract

This study was carried out to evaluate the antioxidant activity and total polyphenol content of Greek-style yogurt in 12% solid content with added stevia leaf extracts. Stevia leaf extracts used as sweetener in preparing Greek-style yogurt were prepared in hot water (100°C for 6 h 3 times, and by 70% fermented ethanol for 24 h at room temperature 3 times). The antioxidant activities were measured by assessing the radical scavenging effect through DPPH, ABTS, and FRAP assays. To identify the compounds present, total polyphenol content was evaluated using a Folin-Dennis assay. The capability to scavenge free radicals and total polyphenolic content were the highest in Greek-style yogurt containing 1% stevia extract and fermented in 70% ethanol. According to the results, antioxidant activities significantly increased when high concentration of stevia extracts were added to the yogurt ($p < 0.05$). Therefore, these results suggest that stevia leaf extracts can be used as a source of functional compounds in Greek-style yogurt. We also suggest that fermented ethanol extraction can be used to obtain stevia leaf extracts.

Keywords

stevia extract, Greek-style yogurt, antioxidant, hot water extraction, fermented ethanol extraction

서론

현대인들의 식습관과 생활습관의 서구화로 각종 성인병과 질병이 증가하고 있으며 고령화 시대가 가속화 될수록 사람들의 건강에 대한 관심도 또한 함께 증가하고 있다. 또한 사람들의 생활수준이 높아지면 서 식품은 더 이상 배고픔을 위해 먹는 것이 아니라 건강을 향상시키고 더 나은 삶을 위해 섭취하는 것으로 변화하고 있다. 따라서 유제품 시장에서도 기능성이 향상된 제품이 개발되고 있으며 요구되고 있는 실정이다.

유제품 시장에서 대부분의 유제품의 소비가 정체나 소폭 감소 형태를 보이는 것과는 대조적으로 발효유 제품의 경우에는 매출의 신장을 보이고 있고 꾸준한 소비가 이루어지고 있다(Kwang, 2007). 특히, 최근 그리스 요거트에 대한 영양학적 이점이 알려지면서 소비자들의 관심이 높아지고 있는 추세이다. 그리스 요거트는 일반 요거트에 비해 유청을 더 제거하여 고형분 함량을 높이고 더 견고한 질감을 가지고 있는

Received: December 9, 2016
Revised: December 17, 2016
Accepted: December 20, 2016

*Corresponding author :
Gur-Yoo Kim, Dept. of Animal
Products Food Science Program,
College of Animal Life Sciences,
Kangwon National University,
Chuncheon, Korea.
Tel : +82-10-9466-8647,
Fax : +82-33-259-5574,
E-mail : gykim@kangwon.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

발효유로서 일반 발효유에 비해 단백질 함량은 약 2배 이상 높고 칼슘과 식이섬유가 보다 풍부하다고 알려져 있다(Phadungath, 2015).

파라과이와 브라질의 고산지대에 자생하는 국화과 다년생 초본식물인 스테비아(*Stevia rebaudiana* Bertoni)의 줄기와 잎에서 추출되는 stevioside는 설탕의 200~300배에 달하는 감미도를 가지고 있으며(Hanson and De Oliverira, 1993), 칼로리가 낮고 열과 pH에 안정성이 높아 각종 가공식품에 감미료로 이용되고 있다. 스테비아의 추출물에는 stevioside 외에도 다양한 폴리페놀 또한 함유되어 있어 녹차의 20배 이상에 달하는 높은 항산화능을 가지고 있는 것으로 밝혀져 있다(Yamamoto *et al.*, 2001).

항산화능은 노화와 각종 질병의 원인이 되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 제거하는 능력으로 산소호흡 등에 의하여 생성된 반응성이 매우 높은 활성산소종이 체내 세포나 조직을 손상시키는 산화적 스트레스(oxidant stress)를 완화시켜준다(Fridovich, 1978; Halliwell *et al.*, 1992). 이러한 항산화 활성을 가지고 있는 천연 항산화제나 합성 항산화제가 많이 개발되어 사용되어 왔으나 보다 안전하고 항산화 활성이 높은 항산화제 원료의 개발이 끊임없이 요구되고 있어 스테비아의 항산화능에 주목할 만하다고 할 수 있다(Choe and Yang, 1982; Lee *et al.*, 2010).

본 연구에서는 영양적 가치가 우수한 그리스 스타일 요거트에 스테비아 잎 추출물을 감미료로 첨가하여 항산화 활성을 알아보고 발효유의 항산화 기능성 향상에 대하여 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 스테비아 추출물의 조제

실험에서 사용된 스테비아는 한국스테비아㈜에서 재배, 수확, 건조된 잎을 공급 받아 사용하였으며 추출은 열수 추출법(hot water extraction, HWE)과 발효주정 추출법(fermented ethanol extraction, FEE)을 사용하였다. 열수 추출은 건조된 스테비아 잎 100 g에 1차 증류수 3 L를 가하여 100°C로 6시간 추출한 후 스테비아 여과물을 3회 추출하여 총 9 L 열수 추출하였고 감압농축한 뒤 동결건조하여 분말형태로 열수추출물로 이용하였다. 발효주정 추출은 건조된 스테비아 잎 100 g에 70% 발효주정 3 L를 가하여 실온에서 24시간 추출하였다. 열수 추출과 마찬가지로 3회 추출하여 총 9 L를 추출하여 감압농축(EYELA N-1000, RIKAKIKAI Co., LTD., Tokyo, Japan)한 뒤 동결건조(EYELA FD-1000, RIKAKIKAI Co., LTD., Tokyo, Japan)하여 분말형태로 발효주정 추출물로 이용하였다.

2. 스타터(Starter)의 제조

그릭 요거트의 제조 시 사용된 스타터(starter)는 1차 증류수 88 mL에 탈지분유(서울우유) 12 g을 첨가하여 고형분 함량을 12%로 맞추어 95°C에서 15분간 멸균하였고 37°C로 식혀 동결건조되어 있는 유산균을 0.24% 접종하여 37°C incubator에서 6시간 발효하여 사용하였다. 접종한 유산균은 상업용 혼합 균주인 Yoflex Harmonic(Chr. Hansen Holdings A/S, Hersholm, Denmark)을 사용하였다.

3. 그릭 요거트(Greek-style yogurt)의 제조

그릭 요거트 제조는 시중에 판매하고 있는 시유(매일유업)에 탈지분유(서울우유)와 감미료를 전체 volume의 12%로 첨가하여 고형분 함량을 12%(w/v) 증가시켰고 stater 3%(w/v)를 접종한 뒤 incubator에서 8시간 발효하여 시료로 사용하였다. Sample의 제조 함량은 Table 1과 같다. 스테비아 추출물을 첨가한 요거트는 당을 전혀 첨가하지 않은 reference와 시중에 판매되고 있는 발효유에 당 첨가로 가장 많이 사용되고 있는 프락토올리고당을 0.5% 첨가한 control을 비교하였다.

4. DPPH 라디칼 소거능

시료의 전자 공여능은 Blois의 방법(Blois MS, 1958)을 이용하여 측정하였다. 각 시료 및 대조군의 요거트를 1 g 측정하여 메탄올 9 mL에서 추출한 후 1,000 rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 그 후 상등액 1 mL를 다시 메탄올 9 mL와 혼합하여 100배 희석(10 mg/mL)한 시료 100 μ L와 메탄올에 녹인 100 mM의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH, sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 150 μ L를 96 well-plate에 혼합하였다. 상온에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계(Macro plate reader, BioTek, USA)를 이용하여 517 nm의 영역에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 대입하여 계산되었다.

$$\text{Scavenging activity}(\%) = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{blind}}) \times 100$$

여기에서 A_{sample} 은 시료와 DPPH 용액과 혼합한 후 측정된 흡광도이며, A_{blind} 는 DPPH 용액에 시료 대신 메탄올을 100 μ L를 첨가하여 측정된 흡광도이다.

5. ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능 측정은 ABTS⁺ cationdecolourisation assay 방법을 변형하여 측정하였다. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-

Table 1. Composition of sample added stevia extracts by hot water and fermented ethanol 70%

Ingredients (%)	Treatment ¹⁾					
	Reference	Control	GHW0.5%	GHW1%	GFE0.5%	GFE1%
Milk	88	88	88	88	88	88
Skim milk powder	12	11.5	11.5	11	11.5	11
Oligosaccharide		0.5				
HWE ²⁾			0.5	1		
FEE ³⁾					0.5	1
Starter	3	3	3	3	3	3

¹⁾ Reference: Greek-style yogurt without sweetener, Control: Greek-style yogurt with oligosaccharide 0.5%, GHW0.5%: Greek-style yogurt with HWE 0.5%, GHW 1%: Greek-style yogurt with HWE 1%, GFE 0.5%: Greek-style yogurt with FEE 0.5%, GFE 1%: Greek-style yogurt with FEE 1%

²⁾ HWE=Stevia extracts prepared by hot water extraction.

³⁾ FEE=Stevia extracts prepared by 70% fermented ethanol extraction.

6-sulphonic acid)(ABTS, sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 7 mM 농도에 맞게 증류수로 조제하고 potassium persulfate(M.W=270.31)를 140 mM 농도에 맞게 증류수로 제조하였다. ABTS 용액 5 mL와 potassium persulfate 용액 88 μ L를 혼합하여 실온의 암실에서 12~16시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ stock solution을 제조하였고 반응시킨 ABTS⁺ stock solution (working ABTS⁺ solution)을 에탄올로 희석하여 734 nm에서 흡광도가 0.70 \pm 0.02가 되도록 조절한 후 시약으로 사용하였다. 시료의 제조는 DPPH 시료와 마찬가지로 시료를 1 g 칭량하여 에탄올 9 mL와 혼합 추출한 후 4 $^{\circ}$ C에서 1,000 rpm으로 15분간 원심 분리한 후 상등액 1 mL와 에탄올 9 mL를 다시 혼합하여 100배 희석(10 mg/mL)하였다. 10 μ L의 sample에 190 μ L의 ABTS solution을 96 well-plate에 첨가한 후 상온에서 30분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였고 라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 대입하여 계산되었다.

$$\text{Scavenging activity}(\%) = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{blind}}) \times 100$$

여기에서 A_{sample} 은 시료를 ABTS solution과 혼합한 후 측정된 흡광도이며, A_{blind} 는 ABTS⁺ solution에 시료 대신 에탄올 10 μ L를 첨가하여 측정된 흡광도이다.

6. 환원력(FRAP) 측정

환원력(Ferric Reducing Antioxidant Potential ability, FRAP)의 측정은 Benzi와 Strain(1996)의 방법을 이용하였다. FRAP 측정의 시약 제조는 sodium acetate(M.W=82.03)을 0.25 M로 증류수로 제조한 후 1 M의 NaOH와 1 M의 HCl을 이용하여 pH를

3.6으로 조정하여 (1) acetate buffer로 사용하였다. 0.01 M의 2,4,6-tripyridyltriazine(TPTZ, M.W=312.33)을 40 mM HCl에 혼합하여 (2) TPTZ solution을 제조하였고 ferric chloride (M.W=270.3)도 마찬가지로 40 mM HCl에 혼합하여 0.02 M 농도로 맞추어 (3) ferric chloride solution으로 제조하였다. 환원력을 측정하는데 사용된 working FRAP buffer는 위의 시약을 (1) : (2) : (3) = 10 : 1 : 1의 비율로 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 안정화시켜 사용하였다. 시료의 제조는 처리군과 대조군의 요거트를 1 g 칭량하여 증류수 9 mL와 혼합 추출한 후 원심분리기 4 $^{\circ}$ C에서 1,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 1 mL의 상등액과 증류수 9 mL를 다시 혼합하여 100배 희석(10 mg/mL)한 후 사용하였다. 96 well-plate에 시료 25 μ L와 시약 175 μ L를 혼합한 후 암실에서 30분간 반응시킨 다음 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질은 gallic acid를 이용하여 표준곡선을 제작하고 gallic acid equivalent(GAE)로 환산하여 환원력을 나타내었다. Gallic acid의 농도는 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/L로 맞추어 표준곡선을 작성하였다.

7. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Dennis법을 이용하였다. 사용된 시료는 대조군과 처리군을 1 g 칭량하여 증류수 9 mL와 혼합해 원심분리하여 상등액만을 다시 증류수 9 mL와 혼합해 100배 희석(10 mg/mL)하였다. 시료 50 μ L와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 20 μ L를 혼합하여 3분간 실온에서 반응시킨 후 sodium carbonate 포화용액 30 μ L를 첨가하고 실온에서 30분간 반응시켜 증류수 100 μ L를 더 첨가하여 총 volume을 200 μ L로 맞춘 후 750 nm에서 흡

광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 사용하였고 총 폴리페놀 함량은 gallic acid equivalent(GAE)로 나타내었다. 표준곡선을 작성할 때 사용한 gallic acid의 농도는 0.06, 0.15, 0.3, 0.6, 0.9, 1.5 mg/L로 맞추어 작성하였다.

8. 통계분석

본 실험에서 3회 반복 실험하여 얻은 결과는 SPSS statistics 20 (IBM, Korea)을 사용하여 분산 분석하였으며, 집단 간 비교를 위한 사후분석은 Turkeyb 방법으로 5% 유의수준에서 처리간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼은 생체 내에 생성되는 라디칼은 아니지만 그 자체로 홀수 전자를 가지고 있어 산화방지제로부터 전자 또는 수소를 공여받아 라디칼이 소거될 수 있으며, 보라색을 띠고 있어 517 nm에서 최대 흡광도를 나타낸다. 이러한 라디칼이 띠고 있는 색깔은 라디칼이 환원되어 소거되면서 노란색으로 변하게 되어 흡광도가 감소하게 된다. DPPH는 이러한 원리를 이용하여 흡광도를 이용하여 산화방지제의 라디칼 소거능을 측정하는 항산화능 측정 실험방법이다. 스테비아 추출물을 첨가한 그릭 요거트의 DPPH 라디칼 소거능(%)을 실험한 결과, DPPH 라디칼 소거능은 그릭 요거트에 열수 추출물 0.5%, 에탄올 추출물 0.5%, 열수 추출물 1%를 첨가한 순으로 첨가하였을 때 높아지는 경향을 보여 스테비아 추출물을 높은 비율로 첨가하였을 때 라디칼 소거능도 높아지는 것을 알 수 있

었다. 또한 저장일수가 길어질수록 라디칼 소거능이 높아지는 경향을 보였고 특히, 저장일수 15일차에 에탄올로 추출한 스테비아 추출물을 그릭 요거트에 1% 첨가하였을 때 58.21±0.37%로 가장 높았다(Table 2). 이는 추출물을 첨가한 양과 희석배수를 고려해 보았을 때 매우 높은 라디칼 소거활성으로 스테비아 잎 추출물에는 매우 강한 항산화력이 있는 것으로 사료된다. 또한 저장일수가 늘어날수록 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 경향을 보였는데, 이는 총 폴리페놀 함량이 저장일수가 지남에 따라 증가하기 때문이라고 사료된다(Table 5).

2. ABTS⁺ 라디칼 소거능

ABTS⁺ 라디칼 항산화 측정은 potassium persulfate와 반응시켜 생성된 ABTS⁺ 라디칼의 소거능을 이용해 측정하는 방법으로, ABTS⁺ 라디칼이 나타내는 특유의 청록색이 734 nm에서 시료의 항산화능이 증가할수록 흡광도가 감소하는 경향을 나타낸다. 스테비아 추출물을 첨가한 그릭 요거트의 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 실험한 결과, 대조군에 비해 스테비아 잎 추출물을 첨가하였을 때 ABTS⁺ 라디칼 소거능이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 열수 추출과 에탄올 추출 모두에서 0.5% 첨가하였을 때보다 추출물을 1% 첨가하였을 때 더 높은 라디칼 소거능을 보여 스테비아 잎 추출물에는 항산화 효과가 있는 것으로 확인되었다(Table 3). 또한, 같은 농도의 스테비아 추출물을 첨가하였을 때를 비교하면 그릭 요거트에 열수 추출물을 첨가하였을 때보다 에탄올 추출물을 첨가하였을 때 더 높은 라디칼 소거능을 보여 DPPH 실험 결과와 유사한 경향을 보였다. 하지만 DPPH와 다르게 저장일수가 지남에 따른 항산화력의 증가는 관찰되지 않았다.

Table 2. DPPH radical scavenging activity of the Greek yogurt added stevia extracts on during storage (Unit: %)

Sample ¹⁾	Storage (day)			
	0	5	10	15
Reference	4.66±0.83 ^{ABd}	4.01±0.33 ^{Be}	4.42±0.27 ^{ABe}	5.67±0.64 ^{Ae}
Control	4.46±0.31 ^{Ad}	3.06±0.22 ^{Be}	4.19±0.36 ^{Ae}	3.99±0.24 ^{Af}
GHW 0.5%	17.88±1.97 ^{Bc}	13.42±0.25 ^{Cd}	22.43±0.49 ^{Ad}	24.60±0.14 ^{Ad}
GHW 1%	28.70±0.35 ^{Cb}	21.88±0.58 ^{Dc}	38.72±0.62 ^{Bb}	40.64±0.28 ^{Ab}
GFE 0.5%	26.59±0.51 ^{Db}	28.37±0.25 ^{Cb}	32.56±0.36 ^{Bc}	34.71±0.37 ^{Ac}
GFE 1%	31.63±0.83 ^{Da}	53.03±0.88 ^{Ca}	56.19±0.14 ^{Ba}	58.21±0.37 ^{Aa}

¹⁾ Reference: Greek-style yogurt without sweetener, Control: Greek-style yogurt with oligosaccharide 0.5%, GHW 0.5%: Greek-style yogurt with HWE 0.5%, GHW 1%: Greek-style yogurt with HWE 1%, GFE 0.5%: Greek-style yogurt with FEE 0.5%, GFE 1%: Greek-style yogurt with FEE 1% Each value represents mean±S.D. (n=3)

^{A-D} Means with different storage days in the same row are different significantly at *p*<0.05.

^{a-f} Means with different treatment in the column are different significantly at *p*<0.05.

Table 3. ABTS radical scavenging activity of the Greek yogurt added stevia extracts on during storage

(Unit: %)

Sample ¹⁾	Storage (day)			
	0	5	10	15
Reference	2.51±0.31 ^{Ae}	1.29±0.41 ^{Bd}	1.02±0.51 ^{BC}	0.89±0.64 ^{Bd}
Control	2.33±0.27 ^{Ae}	1.11±0.08 ^{Bd}	0.97±0.45 ^{BC}	0.49±0.09 ^{Bd}
GHW 0.5%	4.31±0.21 ^{Ad}	2.67±0.48 ^{ABb}	3.70±1.40 ^{ABb}	2.27±0.23 ^{Bc}
GHW 1%	6.82±0.21 ^{Ab}	4.22±0.28 ^{Bc}	5.11±1.02 ^{Bab}	3.94±0.23 ^{Bb}
GFE 0.5%	5.25±0.16 ^{Ac}	4.49±0.38 ^{Bb}	3.41±0.22 ^{Cb}	3.70±0.15 ^{Cb}
GFE 1%	7.90±0.51 ^{Aa}	7.87±0.13 ^{Aa}	6.86±0.77 ^{ABa}	6.16±0.31 ^{Ba}

¹⁾ Reference: Greek-style yogurt without sweetener, Control: Greek-style yogurt with oligosaccharide 0.5%, GHW 0.5%: Greek-style yogurt with HWE 0.5%, GHW 1%: Greek-style yogurt with HWE 1%, GFE 0.5%: Greek-style yogurt with FEE 0.5%, GFE 1%: Greek-style yogurt with FEE 1% Each value represents mean±S.D. (n=3)

^{A-D} Means with different storage days in the same row are different significantly at $p<0.05$.

^{a-f} Means with different treatment in the column are different significantly at $p<0.05$.

3. 환원력(FRAP) 측정

FRAP 측정법은 DPPH나 ABTS처럼 라디칼 소거능을 측정하는 방법과는 달리 철 이온을 환원시키는 능력을 측정하는 것으로 환원력에 따른 시료의 항산화능을 측정할 수 있는 방법이다. 본 실험에서 FRAP 측정법에 의해 스테비아 잎 추출물을 첨가한 그리 요거트의 환원력을 측정한 결과, control에 비해 스테비아 잎 추출물을 첨가하였을 때 환원력이 유의적으로 높게 나타났다(Table 4). 저장기간 중 0, 10, 15일차에 비해 5일차에서 GHW 0.5%는 2.79±0.24, GHW 1%는 3.96±0.31, GFE 0.5%는 2.42±0.09, GFE 1%는 3.58±0.16(GAE mg/mL)으로 가장 높았고 각 처리구별로 환원력을 비교해보았을 때 스테비아 잎을 열수 추출법으로 추출한 추출물을 1% 첨가한 처리구가 0일차에서 3.45±0.03, 5일차에서 3.96±

0.31, 10일차에서 2.83±0.01, 15일차에서 2.97±0.05 GAE(mg/mL)로 가장 높았는데 이것은 DPPH, ABTS, 총 폴리페놀 함량의 실험결과와는 다른 경향으로 DPPH, ABTS의 경우에는 시료를 제조할 때 메탄올과 에탄올로 희석하였지만 FRAP의 경우, 증류수로 희석했기 때문에 열수 추출로 추출된 수용성 항산화 물질이 더 많이 측정된 것이라 사료된다.

4. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀은 식물에 많이 함유되어 있는 물질로 식물이나 식품이 가지고 있는 페놀성 화합물에서 라디칼 소거능과 환원력이 발생한다고 알려져 있다(Kang *et al*, 1995). 스테비아에는 1,310 mg/100 g의 다량의 폴리페놀이 함유되어 있고 특히, 잎에는 0.010 mg/

Table 4. FRAP activity of the Greek yogurt added stevia extracts on during storage

(Unit: GAE mg/mL of sample)

Sample ¹⁾	Storage (day)			
	0	5	10	15
Reference	1.85±0.06 ^{Ae}	1.14±0.03 ^{Cd}	1.79±0.02 ^{Ad}	1.38±0.00 ^{Be}
Control	1.62±0.04 ^{Af}	1.58±0.03 ^{Ac}	1.50±0.01 ^{Be}	1.39±0.01 ^{Ce}
GHW 0.5%	2.45±0.04 ^{Bc}	2.79±0.24 ^{Ab}	2.16±0.00 ^{Cc}	2.10±0.01 ^{Cc}
GHW 1%	3.45±0.03 ^{Ba}	3.96±0.31 ^{Aa}	2.83±0.01 ^{Ca}	2.97±0.05 ^{Ca}
GFE 0.5%	2.11±0.01 ^{Bd}	2.42±0.09 ^{Ab}	1.45±0.03 ^{Df}	1.92±0.04 ^{Cd}
GFE 1%	3.09±0.03 ^{Bb}	3.58±0.16 ^{Aa}	2.28±0.02 ^{Db}	2.82±0.00 ^{Cb}

¹⁾ Reference: Greek-style yogurt without sweetener, Control: Greek-style yogurt with oligosaccharide 0.5%, GHW 0.5%: Greek-style yogurt with HWE 0.5%, GHW 1%: Greek-style yogurt with HWE 1%, GFE 0.5%: Greek-style yogurt with FEE 0.5%, GFE 1%: Greek-style yogurt with FEE 1% Each value represents mean±S.D. (n=3)

^{A-D} Means with different storage days in the same row are different significantly at $p<0.05$.

^{a-f} Means with different treatment in the column are different significantly at $p<0.05$.

Table 5. Total polyphenolic contents of the Greek yogurt added stevia extracts on during storage (Unit: GAE mg/mL of sample)

Sample ¹⁾	Storage (day)			
	0	5	10	15
Reference	1.35±0.05 ^{ABe}	1.30±0.03 ^{Be}	1.45±0.03 ^{Ae}	1.40±0.05 ^{ABf}
Control	1.22±0.03 ^{Cf}	1.10±0.03 ^{Df}	1.43±0.03 ^{Bf}	1.54±0.03 ^{Ae}
GHW 0.5%	2.59±0.00 ^{Cd}	2.55±0.03 ^{Dd}	3.08±0.00 ^{Bd}	3.17±0.00 ^{Ad}
GHW 1%	4.48±0.03 ^{Db}	4.86±0.03 ^{Cb}	5.05±0.05 ^{Bb}	5.39±0.08 ^{Ab}
GFE 0.5%	3.13±0.03 ^{Dc}	3.37±0.10 ^{Cc}	3.96±0.00 ^{Bc}	4.59±0.08 ^{Ac}
GFE 1%	5.12±0.06 ^{Ca}	5.97±0.10 ^{Aa}	5.59±0.03 ^{Ba}	5.89±0.08 ^{Aa}

¹⁾ Reference: Greek-style yogurt without sweetener, Control: Greek-style yogurt with oligosaccharide 0.5%, GHW 0.5%: Greek-style yogurt with HWE 0.5%, GHW 1%: Greek-style yogurt with HWE 1%, GFE 0.5%: Greek-style yogurt with FEE 0.5%, GFE 1%: Greek-style yogurt with FEE 1%

Each value represents mean±S.D. (n=3)

^{A-D} Means with different storage days in the same row are different significantly at $p < 0.05$.

^{a-f} Means with different treatment in the column are different significantly at $p < 0.05$.

100 g의 tannin이 함유되어 있다고 보고되기도 하였다(Yamamoto, 2001; Savita *et al.*, 2004). 본 실험에서도 스테비아 잎 추출물을 그릭 요거트에 첨가하였을 때 무첨가군보다 높은 페놀 함량을 나타내었고 스테비아 추출물을 0.5% 첨가하였을 때보다 1%의 높은 농도로 첨가하였을 때 더 높은 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 보아 스테비아 잎 추출물에는 폴리페놀이 함유되어 있는 것을 알 수 있었다. 또한 이는 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능과 FRAP의 환원력을 측정하였을 때와 유사한 경향이며 이로써 스테비아를 첨가한 그릭 요거트의 항산화능은 스테비아 잎 추출물에 포함되어 있는 폴리페놀에 의한 것으로 생각된다. 특히, 열수 추출물을 첨가하였을 때보다 에탄올 추출물을 첨가하였을 때 0일차 5.12±0.06, 5일차 5.97±0.10, 10일차 5.59±0.03, 15일차 5.89±0.08 GAE(mg/mL)로 더 높은 폴리페놀 함량이 있는 것으로 나타났는데 이 또한 DPPH와 ABTS와 유사한 경향이었으며 이것은 폴리페놀은 60~70℃ 범위에서는 추출수율이 증가하지만 그 이상의 온도에서는 오히려 함량이 감소되었다는 보고와 유사하며, 본 실험에서는 100℃에서 6시간 3회 추출하였으므로 스테비아 잎의 열수 추출물의 폴리페놀 함량이 감소한 것으로 사료된다(Kim *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2008). 또한 본 실험의 총 폴리페놀 함량 측정 실험결과는 폴리페놀은 열수 추출법보다 에탄올 추출법에서 더 높은 농도로 추출된다는 연구보고와도 유사한 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Kim *et al.*, 2013). 따라서 스테비아 잎 추출물을 그릭 요거트에 첨가하였을 때의 폴리페놀에 의한 항산화 효과를 보았을 때 스테비아 잎 추출물을 추출할 때는 열수 추출법보다 에탄올 추출법이 더 항산화 기능성에 효과적이라 사료된다.

요약

본 연구는 열수 추출과 에탄올 추출법으로 추출한 스테비아 추출물을 그릭 요거트에 당으로 0.5%, 1% 비율로 첨가하여 DPPH, ABTS 라디칼 소거능과 FRAP 측정법을 통해 환원력을 측정하여 항산화능을 비교하고 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 수행되었다. 대조군에 비해 스테비아 잎 추출물을 첨가하였을 때 항산화능이 증가하였고 열수 추출물보다 에탄올 추출물을 첨가하였을 때 더 항산화능이 증가하는 경향을 보였으며, 총 폴리페놀 함량 또한 증가하는 경향을 보였다. 따라서 그릭 요거트 에스테비아 잎 추출물을 첨가하여 항산화 기능성이 함유된 발효료로서 에탄올 추출법이 효과적이라 사료된다.

감사의 말

본 연구는 한국연구재단 지역혁신창의인력양성사업(과제번호: 2015 H1C1A1035886)에 의하여 이루어졌습니다.

References

1. Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 230:70-79.
2. Blois, M. S. 1958. Antioxidant activity determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.

3. Cho, C. H., Kim, S., Yoo, G., Son, M. H., Park, K., Lim, B. L., Kim, D. C. and Chae, H. J. 2008. Resveratrol extraction from grape fruit stem and its antioxidant activity. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51:11-16.
4. Choe, S. Y. and Yang, K. H. 1982. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J. Food Sci. Technol.* 12:283-288.
5. Choi, S.-N., Kim, H.-J., Joo, M.-K. and Chung, N.-Y. 2013. Quality characteristics of castella prepared by substituting sugar with stevia leaf powder. *The Journal of Korean Society of Food & Cookery Science* 29: 153-160.
6. Desai, N. T., Shepard, L. and Drake, M. A. 2013. Sensory properties and drivers of liking for Greek yogurts. *Journal of Dairy Science* 96:7454-7466.
7. Flurkey, W. H. 1991. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J. Food Sci.* 55: 93-95.
8. Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201:875-880.
9. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. and Cross, C. E. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease. *J. Lab. Clin. Med.* 119:598-620.
10. Hanson, J. R. and De Oliverira, B. H. 1993. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. *Nat. Prod. Prp.* 10:301-309.
11. Kang, Y. H., Park, Y. K., Oh, S. R. and Moon, K. D. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27:978-984.
12. Kim, H. I. and Lee, B. M. 1996. Stevioside, a natural sweetener. *J. Food Hyg. Safety* 11:323-327.
13. Kim, J. H., Sung, N. K., Kwon, S. K., Jung, P. M., Choi, J. I., Yoon, Y. H., Son, B. S., Yoon, T. Y., Kee, H. J. and Lee, J. W. 2010. Antioxidant activity of stevia leaf extracts prepared by various extraction methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39:313-318 (in Korean).
14. Kim, J. H., Sung, N. Y., Kwon, S. K., Jung, P. M., Choi, J. I., Yoon, Y. H., Song, B. S., Yoon, T. Y., Kee, H. J. and Lee, J. W. 2010. Antioxidant activity of stevia leaf extracts prepared by various extraction methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39(2):313-316.
15. Kim, J.-H., Sung, N.-Y., Kwon, S.-K., Jung, P.-M., Choi, J.-i., Yoon, Y., Song, B.-S., Yoon, T.-Y., Kee, H.-J., Lee, J.-W. 2010. Antioxidant activity of stevia leaf extracts prepared by various extraction methods. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 39:313-318.
16. Kim, N. Y., Kim, Y. K., Bae, K. J., Choi, J. H., Moon, J. H., Park, G. H. and Oh, D. H. 2005. Free radical scavenging effect and extraction condition of ethanol extracts and fractions of wild grapeseed (*Vitis coignetiea*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34:755-758.
17. Lee, H., Jung, B., Park, J., Hwang, I., Kim, S., Choi, J., Lee, S., Chung, S. 2008. Antioxidant activity and total phenolic contents of grape juice products in the Korean market. *Korean Journal of Food Preservation* 15:445-449.
18. Lim, K. S. 2007. Current market trends and prospects of functional fermented milk products in Korea. *Food Industry and Nutrition* 12:20-28.
19. Muniandy, P., Shori, A. B. and Baba, A. S. 2016. Influence of green, white and black tea addition on the antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage. *Food Packaging and Shelf Life* 8:1-8.
20. Park, G. H. and Kim, K. M. 2003. Factors affecting plant regeneration in the culture of different explants of stevia (*Stebia rebaudiana* Bertoni). *Korean J. Plant Biotech.* 30:151-154 (in Korean).
21. Park, S. I. and Jung, D. W. 2005. Effect of green tea powder on the growth inhibition of oral bacteria in yoghurt. *Korean J. Soc. Food Sci. Anim. Res.* 4:500-506 (in Korean).
22. Park, Y. S., Kang, M. S., Kim, B. K. and Kim, M. 2013. The effect of *Eisenia bicyclis* extracts on bone tissues in ovariectomized rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 42:33-39.
23. Phadungath, C. 2015. Greek-style yogurt and its application in cheese cake. *International Journal of Food Engineering* 1(1):13-17.
24. RE, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A.,

- Yang, M. and Rice Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26:1231-1237.
25. Reiter, R. J. 1995. Oxidative process and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J.* 9: 526-533.
26. Savita, S. M., Sheela, K. and Sharan Sunanda, A. G. 2004. *Stevia rebaudiana*-A functional component for food industry. *J. Human Ecol.* 15(4):261-264.
27. Tadhani, M. B., Patel, V. H. and Subhash, R. 2007. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J. Food Compos. Anal.* 20:323-329.
28. Yamamoto, N., Mizue, S., Sano, K., Takano, N., Miyamoto, A., Ueno, Y., Kudo, K. and Mochizuki, S. 2001. Characterization of food composition and functionality of herbs cultivated in Oita. Report 36, Oita, Japan. p 144-149.
29. Yang, J. H., Kim, D. K., Yun, M. Y. and An, J. K. 2006. Antioxidative activity and therapeutic effect of the hydrogel preparation of *Scutellariae radix* and *Zingiberis rhizoma* on dermatitis. *J. Korean Pharm. Sci.* 36:253-262.
30. Yoo, S.-S. and Hong, Y.-J. 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of cookies with stevia powder. *The Journal of Korean Society of Food & Cookery Science* 28:665-673.
31. 이주은. 2008 차문화산업의 과거와 현재, 미래. 1th 세계차학술대회. 컨벤션센터, 서울, 한국. pp. 85-93.