

회 중
연구보고서

녹차씨를 이용한 항염증 및 발암예방
건강기능성 제품의 개발

Development of functional foods from green
tea seeds for the prevention of inflammation
and cancer

연구기관
인제대학교

농림자료실



0013419

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “녹차씨를 이용한 항염증 및 발암예방 건강기능성 제품의 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 05 월 24 일

주관연구기관명 : 인제대학교

총괄연구책임자 : 송 영 선

세부연구책임자 : 송 영 선

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 김 정 상

협동연구기관명 : 국민대학교

협동연구책임자 : 김 영 균

요 약 문

I. 제 목

녹차씨를 이용한 항염증 및 발암예방 건강기능성 제품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

심혈관질환의 위험인자들은 50여년전에 시작된 Framingham Heart Study를 통해 제시되었으며 “traditional” 위험인자에는 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤의 상승, 낮은 HDL-콜레스테롤, 혈압상승, 흡연 등의 요인이 있으며 최근의 여러 연구들은 심혈관질환 발생에 산화적 스트레스와 염증반응이 관여한다고 보고되고 있다. 즉, 동맥경화의 시작은 각종 위험인자들의 반복되는 물리적, 화학적 자극에 의한 혈관 내피세포의 손상에 의한 것이며 내피세포의 손상을 초래하는 중심물질로 산화적 스트레스(oxi-LDL 혹은 reactive oxygen species:ROS)에 의해 활성화되는 Nuclear factor- κ B (NF κ B)가 지목되고 있다(Bowie, and O'Neill, 2000; Collins and Cybulsky, 2001). 본 연구팀의 연구에서도 고콜레스테롤혈증쥐에 flavonoids-rich 식물추출물의 투여 시 superoxide anion 생성과 NF κ B 활성이 저하함을 확인하였다 (Lee et al, 2003). 동맥경화는 염증을 수반하며 interleukin-6, tumor necrosis factor- α 와 같은 염증성 cytokine을 생성하거나 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 유전자의 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있으며(Bennett, 1986, Dubois 등, 1994, Molina-Holgado 등, 2000), 따라서 이러한 염증반응을 억제할 수 있는 천연자원에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

국내에서 암 예방 관련 연구는 최근 빠르게 활성화되고 있으며, 그 탐색 범위도 동물, 식물 등 전 범위에 걸쳐 진행되었으며, 1970년도부터 1995년 말까지 약 176종의 식품과 500여종의 한약재에 대하여 항암, 항돌연변이, 항산화효과 등이 검색되었다. 상당한 규모의 연구임에도 불구하고 몇 가지 중요한 개선해야 할 문제점이 제기되었는데 첫째, 검색방법이 통일되어 있지 못하고, 상당수의 연구가 validity가 확보

되지 않은 검색시스템을 사용하고 있는 점. 둘째, 대부분 검색단계에 머물고 있으며, 활성성분을 분리하여 물질 특허로 까지 이어진 경우가 적은 점.(박 1996) 셋째, 관련 소재들을 이용한 건강기능성 식품 등 제품화가 거의 이뤄지지 못한 점이다. 항암효과를 주장하는 많은 종류의 식품소재들이 난립하고 있지만, 이들에 대한 체계적인 비교 평가가 이뤄져 있지 않아 국민들의 건강에 해를 줄 염려가 있어 타당성이 입증된 assay방법을 이용하여 우리나라에서 주로 소비되는 식품들에 대한 발암예방효능의 평가가 필요하다고 사료된다.

녹차나무(*Camellia sinensis* L.)는 다년생 상록 관목수로 북위 35° 이하 지방에서 주로 재배되어 차잎을 수확한 후 생산되는 종자이다. 국내 녹차 재배면적은 2002년에 1,830ha로서 생산량은 1,395 M/T이며 최근 건강식품에 대한 인식이 높아지면서 재배지역이 증가하고 있으며 녹차씨는 속씨를 감싸고 있는 겉껍질상태로 열리는데 이 속에는 2~4개씩의 속씨가 들어 있으며 녹차씨는 녹차 수확이 끝난 후 거의 폐기되고 있는 실정이며 그 양은 평균 평당 5kg 정도일 것으로 추정된다. 녹차씨앗에는 지방이 풍부하고 사포닌 등 각종 천연화학성분들이 풍부하게 함유되어 있어 그 이용가치가 충분할 것으로 사료된다. 유지의 상당량을 수입에 의존하고 있는 국내실정에 비추어 대체 유지자원의 개발이 꼭 필요하며 차종실유의 식용유지화 개발이 가능할 것으로 판단된다. 특히 우리나라에서 자급율이 가장 낮은 식품류는 유지류(3.6%)이며, 참기름, 미강유, 들기름, 어유, 유채유가 소량 생산되어 국내 생산 식용유지 자원으로 이용되고 있다(한국농촌경제연구원 1998). 유지의 상당량을 수입에 의존하고 있는 국내실정에 비추어 대체 유지자원의 개발이 꼭 필요하며 차종실유의 식용유지화 개발이 가능할 것으로 판단된다. 특히 녹차씨유는 올리브유가 갖는 혈장 콜레스테롤 저하효과 및 LDL 산화억제 효과를 가질 것으로 사료되며 녹차씨유에 함유되어 있는 활성물질의 생리적 효능에 관한 과학적 규명이 이루어지면 녹차씨유의 산업화에 기폭제가 될 것으로 사료된다.

녹차씨에서 기름을 제거한 녹차씨(defatted meal)은 쓴 맛을 지녀 식용으로 이용하기는 어려우나 이에 함유된 phytochemicals은 분리, 정제하여 건강기능성 식품 소재로 활용할 수 있다. 녹차씨를 산업적으로 활용하기 위해서는 녹차씨의 생리적 효능에 대한 연구 결과가 뒷받침되어야 할 필요가 있다.

따라서 본 연구는 녹차씨를 활용하여 새로운 유지자원으로 활용하고자 녹차씨유의 추출조건에 따른 항산화능을 측정하여 저장안정성을 규명하여 녹차씨유의 이용 가능성을 검토하고자 하였다. 그리고 녹차씨의 항염증·항동맥경화 및 항암 효과를 확인하고자 녹차씨가 항염증·항동맥경화 기전인 염증반응과 산화적 스트레스에 미치는 기작 규명을 위해 *in vivo*와 *in vitro* 및 임상시험을 통해 염증반응 생성 인자와 항산화효소계 활성화, 유전자 발현 및 혈소판 응집력 등을 통한 평가와 암 발생 기전 중의 하나인 해독 효소계의 유도활성과 apoptosis에 관련된 cell arrest를 살펴보았다. 녹차씨의 항염증과 항동맥경화 및 항암효능을 가진 생리활성 물질을 분리 확인하고 건강기능성 소재 혹은 제품으로 개발하여 임상시험과 소비자의 기호도 조사 등을 통해 제품의 산업화 가능성을 확인하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 녹차씨의 유용한 생리활성기능을 확인하여 건강기능성 제품으로 활용하고자 실시하였다. 녹차씨에 다량으로 함유되어 있는 지방을 추출하여 녹차씨유를 조제하여 식용으로서의 가능성을 확인하고자 녹차씨유를 추출하여 물리화학적 특성, 항산화효과 및 저장 안정성 등을 평가하였다. 녹차씨유 추출조건 확립을 위해 녹차씨유 분리를 위한 가열 조건을 확립하고 추출조건에 따른 지방 함량 및 지방산 조성 조사하였다. 녹차씨유의 식용기름으로서의 특성 규명을 위해 물리화학적 특성으로 비중, 굴절률, 총 지방함량, 색도, 비비누화물가, 요오드가, 산가, 과산화물가, TBA가, free fatty acid 함량을 측정하였으며 지방산 조성은 gas chromatography를 이용하여 분석하였다. 녹차씨유의 산화안정성을 평가하기 위하여 항산화물질인 총 phenol 함량을 측정하였으며 녹차씨유의 저장안정성 규명을 위해 저장기간 동안의 산가, 과산화물가, TBA가 및 색도를 측정하여 확인하였다.

녹차씨의 유용성분을 추출하여 녹차씨의 항염증·항동맥경화 효과를 RAW 264.7 Macrophage cell line과 C57BL/6 mice에서 탐색하였다. Macrophage cell에서는 산화적 스트레스 유발 상황에서 세포 독성여부, 염증생성과 관련된 인자들 NO와 TNF- α 생성의 억제효과 및 iNOS의 유전자 발현정도를 확인하였으며, 항산화 효소계 활성을 측정하였다.

녹차씨 활성성분의 *in vivo*에서의 항산화·항염증효과 및 기작 연구를위해 동맥경화식이에 녹차씨유를 섭취시킨 mouse의 혈중지질 농도, 간의 TBARS 함량, 혈장 및 복강 대식세포에서의 염증반응물질인 TNF- α , prostaglandin와 interleukine B_4 및 NO 생성정도를 확인하였다. 그리고 동맥경화식이에 녹차씨 추출물 (주정추출물과 열수추출물을 6주간 급여)을 제공한 mouse에서의 복강대식세포의 superoxide dismutase 활성과 GSH 농도, 산화적 스트레스 억제효과, 염증반응 물질의 생성 억제효과 및 염증반응의 유전자 발현정도를 평가하였다.

녹차씨 유용성분을 첨가한 개방제품의 임상적 효능 평가를 위해 흡연자를 대상으로 한 개방제품의 torlox equivalent를 사용한 총 항산화능, TBARS 농도, 염증유발인자인 TNF- α 활성 등 산화적 스트레스 억제효과를 혈장에서 확인하였고, 혈중지질 강하효과, 체내 독성에 미치는 영향으로 GOT와 GPT 활성 및 적혈구의 항산화효소계 활성으로 SOD, catalase, GSH-px, GSH-red, Cu,Zn-SOD 수준을 측정하였고 혈소판 응집력 억제효과를 비교 분석하였다.

녹차씨의 암예방을 효능을 확인하기 위해 세포 모델계를 이용한 녹차씨 추출물의 암세포 생육억제 활성을 평가하였으며, 녹차씨 추출물의 발암물질 해독효소계 (1상 및 2상) 유도/저해 활성을 조사하였다. 식품소재로서의 활용가능성을 평가하기 위하여 catechin함량을 HPLC로 분석하고 해독효소계 및 암세포 생육억제 활성을 확인하였다. 녹차씨의 건강기능성 식품 소재화 연구를 위해 녹차씨의 가공방법(roasting, boiling, steaming, frying)에 따른 활성성분의 변화와 녹차씨 가공방법별 발암예방활성의 변화 (*In vitro* 및 *In vivo* 평가)를 확인하였다. 녹차씨 추출물의 안전성 평가를 위해 급성 독성평가 및 유전독성 평가를 실시하였다.

생리활성물질의 분리·정제 및 구조 분석을 위해 생리활성분획에서 chromatography를 이용하여 물질을 분리하여 활성물질을 추적하여 활성분획을 각종 chromatography를 이용하여 순수한 활성물질을 단리하여 정제하여 분광학적방법 즉, NMR, LC-MS등의 기기분석 방법을 통한 활성물질의 구조 확인 및 동정을 하여 물질 구조를 확인하였다.

녹차씨를 이용한 건강 기능성 소재 및 제품으로는 녹차씨로 부터 추출한 항염증

· 항동맥경화 · 발암예방 활성성분을 녹차씨유에 첨가하여 “nutraceutical” 식용유지 제품과 크래커 및 드링크를 개발하여 소비자들을 대상으로 관능검사를 실시하였으며 녹차씨유와 녹차씨 추출물을 이용한 항염증용 화장비누를 개발하고 임상시험을 실시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

본 연구에서는 녹차씨의 항염증 및 항동맥경화 효능을 평가하고 기능성 소재를 개발하여 녹차씨의 활용 가능성을 평가하기 위하여 녹차씨유를 추출하여 녹차씨유의 물리화학적 특성 및 저장안정성을 확인하였다. 녹차씨 추출물을 조제하여 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264. 7 macrophage cell에서의 항염증 및 항동맥경화 효능을 평가하였다. 그리고 C57BL/mice를 사용하여 전임상실험을 하였고 건강한 성인 흡연자를 대상으로 단기 · 장기 임상시험을 실시하였다.

녹차씨유의 추출조건은 볶음 처리를 한 압착유가 가장 바람직한 방법으로 생각되며 회수율을 높이기 위한 방안이 필요한 것으로 사료된다. RAW 264. 7 cell line에서 산화적 스트레스 유발 상황에서 녹차씨 추출물은 iNOS protein 발현을 유의적으로 저해하는 것으로 나타났다. 동맥경화 식이에 녹차씨유를 섭취시킨 4주령의 C57BL/6 mice에서 녹차씨유의 일정기간섭취는 콜레스테롤식이 섭취에 따른 혈장의 콜레스테롤 농도 억제하는 효과가 있으며 옥수수유 섭취군에 비해 효과적으로 thiobarbituric reactive substances (TBARS)생성을 낮추므로 녹차씨유가 콜레스테롤식이 섭취에 따른 산화적 스트레스를 방어하는 효과가 있고 녹차씨유가 혈장과 대식세포에서의 염증반응에 미치는 영향은 옥수수유나 올리브유와 크게 다르지 않는 것으로 생각되었다. 녹차씨 추출물을 보충한 식이를 6주간 제공받은 C57BL/6 mice의 복강 대식세포에서 superoxide dismutase(SOD) 활성과 간의 항산화 효소계 활성에서 현저하게 높은 수준을 보였다. 동맥조직에서 VCAM-1의 발현을 억제하고 eNOS 유전자 발현의 활성 증진을 보였다.

단기 임상시험에서 녹차씨 추출물이 고지방식이를 섭취한 후 혈 중의 TBARS와

TNF- α 생성을 억제함으로써 항산화 및 항염증 효과가 있는 것으로 확인되었다. 장기임상시험에서 흡연자들에게 있어 4주간의 녹차씨 추출물의 보충이 항산화 효소계를 활성화 시켜 체내 산화적 스트레스를 경감시키고 혈소판 응집력을 낮추어 주는 것으로 나타났다. 이와 같이 녹차씨 추출물은 TG와 총 콜레스테롤의 농도를 감소시키며, 항동맥경화 지수와 총 항산화능 및 항산화 효소계 활성을 증가시켰고 체내 염증생성인자인 TNF- α 의 생성과 VCAM-1의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다.

녹차씨의 암예방 활성을 평가하고, 식품소재로서의 활용가능성을 평가하기 위하여 catechin함량을 HPLC로 분석하고 해독효소계 및 암세포 생육억제 활성을 조사하였다. 녹차잎과 비교하여 catechins의 함량은 낮은 수준이었으나, 해독효소계인 phase 1과 2상 효소계 유도 활성은 잎 추출물보다 높은 것으로 나타났다. 또한 phase 2 해독효소계의 유도에는 ARE 및 Nrf2가 관여하는 것으로 나타났다. 즉, 녹차씨 추출물에 의하여 Nrf2가 Keap1과 분리되며 핵내로 들어와 phase 2 효소계 유전자의 promoter 부위의 ARE에 결합하여 transcriptional activation을 유도하는 것으로 추정된다. 그리고 녹차씨 추출물의 농도 의존적 세포독성이 관찰되어 이를 바탕으로 cell cycle에 미치는 영향을 분석한 결과, 녹차씨 추출물이 subG1 phase의 축적을 유도하는 것을 확인하였으며 이는 apoptosis를 일으킨다는 것을 암시한다. 이와 같이 녹차씨 추출물은 해독효소계의 활성을 유도하고 cell cycle을 조절하는 성분을 함유한 소재로서 향후 암예방 물질로서 연구할 가치가 있다고 판단이 된다. 아직까지 녹차씨 추출물의 어떠한 화합물들이 이러한 항암효과를 발휘하는지에 대해서는 연구가 더 필요하다.

녹차씨 메타놀 추출물의 회수율은 녹차씨 껍질을 제거한 GTA의 조추출물의 양은 8.5g으로 회수율 17.0%를 보였으며 껍질을 제거하지 않은 GTB의 조추출물의 양은 7.0g으로 14.0%였다. GTA가 GTB에 비해 상대적으로 높은 수확율을 보였다. TLC의 분석결과 GTA의 성분에 대한 TLC 패턴이 분명하게 나타남으로 판단하여 GTA 메타놀 추출물을 농축하여 LC로 분석한 결과는 3개의 분획물(GT-1과 GT-2 및 GT-3)을 얻었다. TLC로 분석하여 획득한 GTA의 세포 독성과 염증생성과 관련된 인자인 NO의 생성능을 RAW 264.7 macrophages cell line에서 비교한 결과 GTA 1은 농도가 높을수록 세포 생존율이 증가하는 반면 GTA 2와 3은 농도가 높을수록 감소하는 경향을 보였으며 NO 생성량은 모든 군에서 농도가 높을수

록 유의적으로 감소되는 경향을 보였으며 염증생성에 있어 효과적인 것으로 나타났다. 순수 물질 분리 및 구조 분석은 oil 성분이 제거된 fraction(YK-CSS2)을 가지고 Partition을 실시하여 4개의 sub-fractions을 획득하였으며 (YK-CSS21, YK-CSS22, YK-CSS23, YK-CSS24). 이 중 YK-CSS22를 가지고 column chromatography를 시행하여 다시 3개의 sub-fractions을 획득하였고 이 중 두 번째 fraction(YK-CSS222)에서 순수한 성분의 물질을 획득하였다(YK-CSS_com1). 분석결과 해당 물질은 $C_{18}H_{32}O_2$ 의 linoleic acid로 밝혀졌다.

활성물질을 이용한 기능성 제품으로 드링크, 초코렛, 화장용 비누, 로션, 마요네즈 등을 제조하였고 그 결과 녹차씨유를 주 원료로하여 천연비누를 제조하였을 때 최종 제품은 녹차씨유를 함유하지 않고 제조된 기존의 제품과 비교해볼 때, 상품성을 저하시키는 어떠한 문제점도 발견되지 않았다. 녹차씨 추출물을 함유한 화장비누의 임상시험대상자들에게서 염증에 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 녹차씨유로 제조한 마요네즈는 대두유로 제조한 마요네즈에 비해 저장안정성이 높았으며 기호도 조사에서도 전체적인 기호도가 높게 나타났다.

2. 활용에 대한 건의

녹차씨유 및 녹차씨에 존재하는 phytochemicals의 생리기능성 규명은 녹차씨유 및 그 부산물을 다양한 건강보조 식품소재 및 건강 기능성 제품으로 개발 가능하도록 한다. 항염증, 항동맥경화, 항암 활성을 근거로 한 건강식품 소재화 및 성인병 예방을 위한 건강기능성 제품 개발 및 염증반응을 수반하는 다양 질병, 즉 위염, 피부염, 관절염 등의 질환에도 적용될 수 있는 기초자료가 된다. 알코올 섭취는 간 손상 등 부작용을 수반하는데, 최근 이러한 부작용이 체내 존재하는 CYP2 E1 효소에 의해서 알코올이 분해 될 때 발생하는 free radical에 의한 것임이 밝혀졌으며 (Kessova 2003), 녹차의 polyphenol 성분이 이 효소활성을 조절하는 능력이 있는 것으로 보고되어 녹차씨 활성성분의 섭취가 알코올섭취에 의하여 유도되는 간손상을 예방할 가능성이 있음. 이와 관련된 녹차의 효능이 증명될 경우, 간보호 기능성 식품소재로의 개발 성공가능성이 높다. 녹차씨 추출물성분의 생리활성 탐색 방법, 기전의 규명방법의 정립으로 향후 다양한 농산자원에 대한 항동맥경화와 항염증

및 암 예방 활성 평가 시스템 구축한다. 녹차씨에서 분리되는 항염증·암예방물질의 특허출원 및 항염증·암예방(해독능력 증강) 건강기능성 식품 제품화 기술의 특허 출원하였으며 앞으로 녹차씨로 부터 신기능 식품소재의 물질의 특허를 받도록 한다.

녹차씨유 및 녹차씨를 이용한 제품을 산업화하는데 기초자료로 활용한다. 연구결과와 기술이전으로 유지 산업계의 새로운 제품개발(예: 기능성을 증진시킨 녹차씨유 제품)에 이용하도록 하며 녹차씨유 및 녹차씨에 함유된 활성성분의 기능적 특성을 홍보함으로써 해당제품의 소비촉진 및 가공을 통한 새로운 수요 창출한다. 그리고 규명된 녹차씨유의 기능성을 바탕으로 학술지와 언론 기고를 통해 녹차씨의 유용성과 경제성을 알리고 입업시험장, 농림기술센터의 협조를 받아 녹차씨의 채취를 권장한다. 녹차씨의 유용한 성분을 활용한 건강기능성 제품으로는 녹차씨유, 마요네즈, 미용비누의 산업화는 참여기업인 화개제다와의 협력으로 추진할 것이다.

SUMMARY

I. Title

Development of functional foods from green tea seeds for the prevention of inflammation and cancer

II. Objective and Significance

This study was performed to develop functional foods using green tea seed oil and its defatted byproduct. The oil and defatted cake were subjected to evaluation of bioactive functions including anti-inflammatory, anti-carcinogenic, anti-oxidative, and anti-atherogenic effects.

III. Contents and Scope

1. Physicochemical properties, antioxidative activity, and stability of green tea seed oil.
2. Anti-inflammatory, anti-atherogenic activities of green tea seed extract and green tea seed oil.
3. Anti-inflammatory, anti-atherogenic and anti-oxidative activities of green tea seed extract and oil using *in vivo* and *vitro* model systems
4. Anti-carcinogenic effect of green tea seed extract
 - Antiproliferative activity of green tea seed extract in mouse hepatoma cells
 - Effect of green tea seed extract on expression of phase 1 and 2 enzymes
 - Mechanism of anti-carcinogenic enzyme induction of green tea seed extract
5. Change of anti-carcinogenic enzyme induction activity during processing of green tea seed
6. Safety evaluation of green tea seed powder
 - Acute toxicity evaluation

7. Separation, purification and structure determination of green tea seed bioactive substance
8. Development of healthy functional food and products (cosmetic soap, mayonnaise, green tea seed oil, drink, cracker, etc) containing green tea seed

IV. Major results and Recommendation

1. Green tea seed oil yield in different extraction methods were higher pressed oil (roasting and steaming) than in solvent extraction oil. Fatty acid composition of green tea seed oils detected by GC method was highest oleic acid content(41.0-42.2%). Total phenol contents were higher chlorogenic acid (13.7mg%) and caffeic acid (17.0mg%) of pressed oil than in solvent extraction oil
2. In LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line, treatment with green tea seed methanol extract (GTSME) and defatted green tea seed methanol extract (DGTSME) suppressed nitric oxide (NO) production, in dose-dependently manners with an IC_{50} of 28.7 and 39.7 $\mu\text{g/ml}$, respectively. GTSME and DGTSME groups were significantly ($p < 0.05$) enhanced superoxide dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GSH-px), and GSH-recuctase activities. DGTSME ameliorates iNOS expression, which may be mediated by attenuated oxidative stress in RAW 264.7 macrophages.
3. Effects of the intake of green tea seed oil on the plasma cholesterol, the thiobarbituric reactive substances (TBARS) formation of liver and inflammatory markers of plasma and macrophage in cholesterol fed mice were investigated, comparing to the intakes of corn oil and olive oil. C57BL/6 mice were divided three groups and fed the experimental diets supplemented corn oil, green tea seed oil and olive oil to cholesterol diet,

respectively, at the level of 10% for 9 weeks. The increased levels of serum cholesterol of green tea seed oil group were significantly ($p < 0.05$) lower than that of corn oil group until 6 weeks. The TBARS formation in liver of the groups of green tea seed oil and olive oil were significantly ($p < 0.05$) reduced than those of corn oil group. The contents of inflammatory markers (LTB_4 , $\text{TNF-}\alpha$, PGE_2 , NO) in plasma and macrophage did not showed significant difference among the experimental groups. These results showed that green tea seed oil could exert the activity of decreasing serum cholesterol and the antioxidative activity in cholesterol fed mice liver. Therefore, we suggest that green tea seed oil might be developed to the edible oil having high quality

4. C57BL/6 mice were fed on the atherogenic diets containing green tea seed extract (GTSE), green tea seed hot water (HWE) and green tea seed alcohol extract (AE) I and II groups, respectively, for 6 weeks. Plasma total cholesterol (TC) levels were lower after 6 week in GTSE supplementation groups than in control group. SOD activities on peritoneal macrophage increased in HWE II group than in GTSE groups. Hepatic glutathione levels and antioxidant enzyme activities including glutathione-reductase, glutathione-px, catalase, Cu,Zn-SOD and Mn-SOD were significantly ($p < 0.05$) higher in the GTSE supplementation groups.

VCAM-1 mRNA expression in aorta tissue was significantly ($p < 0.05$) decreased in GTSE supplemented groups compared to that of control group. The eNOS mRNA expression levels in aorta tissue of HWE supplemented groups were significantly ($p < 0.05$) higher than AE groups.

5. In short term, the subjects were 10 healthy male adult smokers and received the fatty breakfast (37.2% fat / total kcal) with one capsule of 250mg rice powder (PG), green tea seed hot water extract (GTSWE) and alcohol extract group (GTSAE) with one week wash-out period. Postprandial triglyceride (TG) and TC levels in plasma were significantly ($p < 0.05$) decreased at 4 hours after breakfast in green tea seed extract

(GTSE) supplemented groups compared to that of PG. But TG and TC levels were lower in GTSWE group compared to that of GTSAE group. Total antioxidant capacity showed significant difference ($p < 0.05$) at 6 hours after breakfast among the groups and increased in GTSE supplemented groups. Thiobarbituric acid–relative substances (TBARS) concentrations were significantly ($p < 0.05$) lowered after 6 hours in GTSE supplemented groups. Tumor necrosis factor–alpha (TNF– α) levels were significantly ($p < 0.05$) increased at 4 hours after breakfast in PG. No significant differences in plasma lipid profile, TNF– α and TBARS levels between GTSE groups were observed, though TNF– α and TBARS levels were slightly lower in GTSAE group than in GTSWE group.

6. In long term, the subjects (10 healthy male adult smokers) were divided into 2 groups and supplemented the capsule for 4 weeks; PG and GTSE group were given 250 mg rice powder and GTSE daily, respectively. These results showed that the blood pressure, plasma TG and TC levels of GTSE supplemented group were significantly ($p < 0.05$) lower than PG. Anti–atherogenic index was increased in GTSE supplemented group. TNF– α level, inflammatory marker, in plasma was significantly ($p < 0.05$) decreased in GTSE supplemented group. The collagen–induced platelet aggregation between the GTSE and the PG showed significant difference ($p < 0.05$) the GTSE supplement inhibited collagen–induced platelet aggregation more effectively. Anti–oxidative enzyme activities of erythrocyte were significantly ($p < 0.05$) elevated in GTSE supplemented group.
7. The contents of catechins, gallate, and caffeine of green tea seed were compared with those of leaf. The seed contained 130 ug EGCG, 167 ug EGC, 753 ug ECG, and 68 g EC, 61 ug gallate, 125 ug caffeine per gram dry powder, which are significantly lower than those of green tea leaf.
8. Quinone reductase (QR), one of the well–known anticarcinogenic enzymes, was significantly induced by EGC and seed extract at the concentration of 100 ul per mg dry weight in both mouse hepatoma hepalc1c7 and BPRc1 cell lines.

9. Green tea seed extract appeared to induce QR through interaction with antioxidant response element in the gene as a reporter assay showed its potential to induce luciferase activity in HepG2-C8 cells transfected with plasmid containing ARE-luciferase sequence.
10. The methanolic extract of green tea seed also promoted the transport of Nrf2 into nucleus and thereby activated the expression of phase 2 detoxifying or antioxidant enzymes
11. Green tea seed extract showed a strong anti-proliferative activity against several cancer cells such as human hepatoma and mammary tumor cells. Cell cycle analysis showed that green tea seed extract caused subG1 arrest of human hepatoma cells, suggesting its proapoptotic activity.
12. Roasting of green tea seed reduced anti-proliferative and QR-inducing activities of the methanolic extract of green tea seed.
13. Acute toxicity test showed that green tea seed extract did not cause any toxic effect in the range of 1 to 5 g per kg body weight in Sprague-Dawley rats.
14. The extraction yields of green tea seed methanolic extract removed inner coat (GTA) and green tea seed methanolic extract contained inner coat (GTB) were 17.0% and 14.0%, respectively.
15. Three fractions separated (GT-1, GT-2, and GT-3) from the GTA methanolic extract by TLC and LC contributed the anti-inflammatory effect. The anti-atherogenic and anti-inflammatory substance in methanolic extracts was successively purified with TLC.
16. GTA of cell toxicity by obtained TLC analysis in RAW 264.7 macrophages cell line was not detected. Treatment of RAW 264.7 cells with GTA by obtained TLC analysis reduced LPS-stimulated NO production in a dose-dependent manner ($p < 0.05$).
17. The purified active substance (YK-CSS222) was isolated by TLC, HPLC, and gel filtration and identified as green tea seed extract by ^1H ^{13}C -NMR, DEPT, and LC/MS analysis. The purified substance (YK-CSS-com 1) determined $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$, linoleic acid by ^1H , ^{13}C -NMR, DEPT, and LC/MS.

18. The application of cosmetic soap, cosmetic (lotion), mayonnaise, green tea seed oil, drink, and cracker through examination for biological activity of green tea seed extracts will provide useful information for development of green tea seed-containing functional products.

CONTENTS

Chapter 1	Introduction-----	26
Chapter 2	Status of technology development-----	32
Chapter 3	Results and contents of the study-----	34
I.	Materials and methods(1st subproject)-----	34
1.	Physio-chemical characteristics and storage stability of green tea seed oil-----	34
a.	Conditions of green tea seed oil extraction method-----	34
b.	Green tea seed oil of physio-chemical characteristics and storage stability with different extraction methods-----	35
c.	Anti-oxidant effect with oil extraction methods-----	38
2.	Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects and it's mechanisms-----	38
a.	Anti-oxidative and anti-inflammatory effects on green tea seed fraction in RAW 264.7 murine macrophage cell line (<i>In vitro</i>)-----	38
b.	Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of green tea seed oil in C57BL/6 mice (<i>In vivo</i>)-----	43
c.	Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of green tea seed extract in C57BL/6 mice (<i>In vivo</i>)-----	46
II.	Result and Discussion-----	51
1.	Estimation of extraction condition for green tea seed oil-----	51
2.	Physio-chemical characteristics and storage stability of green tea seed oil-----	52
a.	Fatty acid composition-----	52
b.	Physio-chemical characteristics-----	54
c.	Sensory evaluation-----	57
d.	Anti-oxidative activities during storage-----	58
3.	Anti-oxidative and anti-inflammatory effects on green tea seed fraction in	

RAW 264.7 murine macrophage cell line-----	64
a. Cell viability-----	64
b. NO productions-----	65
c. Lipid peroxidation levels-----	66
d. Glutathione levels-----	67
e. Anti-oxidant enzyme system activities-----	68
f. mRNA gene expression of iNOS-----	70
4. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of green tea seed oil in C57BL/6 mice (<i>In vivo</i>)-----	71
a. Food efficiency ratio-----	71
b. Lipid profiles and TBARS levels on plasma-----	71
c. Inflammatory responses factors on plasma-----	74
d. Inflammatory responses on peritoneal macrophages-----	76
5. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of green tea seed extract in C57BL/6 mice-----	77
a. Food efficiency ratio-----	77
b. Lipid profiles and TBARS levels on plasma-----	77
c. SOD activity of peritoneal macrophage-----	82
d. Hepatic lipid levels and anti-oxidant enzyme activities-----	83
e. mRAN gene expression of eNOS and VCAM-1 in aortas-----	87
 III. Effects of green tea seed extract supplementation in Korean male adult smokers-----	89
1. Materials and methods-----	89
a. Long term study-----	89
b. Short term study-----	90
2. Results and discussion-----	92
a. Green tea seed extract supplementation attenuates plasma lipid profiles and oxidative in Korean male adult smokers during postprandial lipemia-----	92
b. Anti-atherogenic and anti-oxidative effects of green tea seed extract	

supplementation in Korean male adult smokers-----	97
IV. Green tea seed containing products-----	105
1. Mayonnaise-----	105
a. Recipe and preparation procedure-----	105
b. Product characteristics evaluation-----	107
2. Cosmetics-----	112
a. Composition and preparation procedure-----	112
b. Physical characteristics containing hot water extract lotions-----	114
c. Physical characteristics containing alcohol extract lotions-----	116
3. Cosmetic soaps-----	119
a. Composition and physical characteristics-----	119
V. Conclusions-----	128
VI. Material and method (1st cooperative project)-----	131
1. <i>In vitro</i> -----	131
a. Materials-----	131
b. Methods-----	132
c. Anti-proliferative activities-----	134
2. <i>In vivo</i> -----	135
a. Materials-----	135
b. Methods-----	136
VII. Results and discussion-----	136
1. Content of catechins-----	136
2. Bio-active functions-----	140
3. Anti-proliferative activities and effect to cell cycle-----	145
VIII. Effect of roasted green tea seed to anti-cancer activities-----	149
1. Change of anti-proliferative activities-----	149

2. Change of anti-cancer enzyme systems induction activities-----	149
IX. Stability evaluation of green tea seed-----	153
1. Acute toxicity-----	153
2. Effect of green tea seed supplementation on body and organ weights----	153
3. Effect of green tea seed powder supplementation for GOT and GPT activities-----	157
X. Genotoxicity evaluation of green tea seed and leaf extracts-----	158
XI. Development of products-----	162
XII. Conclusions-----	164
XIII. Material and method (2nd cooperative project)-----	166
1. Separations of bio-active function substances from green tea seed-----	166
a. Preparation of green tea seed extracts-----	166
b. Analysis of Low Pressure Liquid Chromatography-----	166
c. Analysis of High Pressure Liquid Chromatography-----	167
2. Anti-inflammatory and anti-oxidative activities of green tea seed extracts-----	168
a. Preparation of green tea seed extracts and cell culture-----	168
b. NO concentrations and cell viability-----	168
3. Isolation, purification, and structure determination of bio-active function substances-----	168
a. Isolation of bio-active functions substances from green tea seed -----	168
b. Preparative Low Pressure Liquid Chromatography analysis-----	168
c. Purification and structure determination-----	168
XIV. Results-----	169

1. Yield of green tea extracts-----	169
2. Low pressure liquid chromatography-----	169
3. Isolation of bio-active functions substances by Chromatography methods-----	170
a. TLC-----	170
b. Low Pressure Liquid Chromatography-----	171
c. High Pressure Liquid Chromatography-----	172
4. Anti-inflammatory and anti-oxidative activities-----	173
a. NO products and cell viability-----	173
5. Purification and structure determination-----	176
 X V. Functional products development-----	181
1. Cosmetic soap contained green tea seed oil-----	181
2. Green tea seed oil cosmetic soap contained green tea seed alcohol extract-----	181
3. Evaluation for newly-developed cosmetic soap-----	182
 X VI. Conclusions-----	184
 Chapter 4. Research achievement and contribution of related field-----	185
 Chapter 5. Proposal for future application-----	187
I. Proposal for future application-----	187
II. The results from this study-----	188
 Chapter 6. Abroad science technical information collected from research development process-----	190
 Chapter 7. Reference-----	191

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요-----	26
제 2 장	국내외 기술개발 현황-----	32
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과-----	34
제 1 절	실험의 재료 및 방법 (제1세부과제)-----	34
1.	녹차씨유의 물리화학적 특성 및 저장안정성 규명-----	34
가.	녹차씨유 추출 조건 확립-----	34
나.	추출조건에 따른 녹차씨유의 물리화학적 특성 및 저장안정성 규명----	35
다.	추출조건에 따른 녹차씨의 항산화능-----	38
2.	녹차씨의 항염증 · 항동맥경화 효과 및 기작 연구-----	38
가.	녹차씨 분획물이 RAW 264.7 murine macrophage cell line에서 항산화 · 항염증 효과 및 기작 규명(<i>In vitro</i>)-----	38
나.	녹차씨기름이 C57BL/6 mice에서 항산화 · 항염증 효과(<i>In vivo</i>)-----	43
다.	녹차씨 추출물의 C57BL/6 mice에서 항산화 · 항염증 효과(<i>In vivo</i>)----	46
제 2 절	실험결과 및 고찰-----	51
1.	녹차씨유 추출조건 확립-----	51
2.	추출조건에 따른 녹차씨유의 물리화학적 특성 및 저장안정성 규명-----	52
가.	녹차씨유의 지방산 조성-----	52
나.	녹차씨유의 물리적 · 이화학적 특성-----	54
다.	관능평가-----	57
라.	녹차씨유의 저장기간에 따른 항산화능-----	58
3.	녹차씨 분획물의 RAW 264. 7 cell line에서의 항산화 · 항염증 효과-----	64
가.	세포 생존률-----	64
나.	NO 생성량-----	65
다.	지질 과산화 정도-----	66

라. Glutathione(GSH) 함량-----	67
마. 항산화 효소 활성-----	68
바. iNOS의 발현-----	70
4. 녹차씨기름이 C57BL/6 mice에서 항산화·항염증 효과-----	71
가. 식이효율-----	71
나. 혈장의 지질농도 및 TBARS 수준-----	71
다. 혈장의 염증반응인자에 미치는 영향-----	74
라. 대식세포의 염증반응인자에 미치는 영향-----	76
5. 녹차씨 추출물의 C57BL/6 mice에서의 항산화·항염증 효과-----	77
가. 식이효율-----	77
나. 혈장의 지질농도 및 TBARS 수준-----	77
다. 복강 대식세포의 SOD 활성-----	82
라. 간의 지질농도 및 항산화 효소계 활성-----	83
마. 동맥조직에서 eNOS와 VCAM-1의 mRNA gene expression-----	87
제 3 절 성인 흡연 남성에게 녹차씨 추출물의 보충 효과-----	89
1. 재료 및 방법-----	89
가. 단기시험-----	89
나. 장기시험-----	90
2. 임상시험의 결과 및 고찰-----	92
가. 성인 남자 흡연자의 고지방식을 섭취 후 녹차씨 추출물을 보충시 혈 중 lipid profile과 산화적 스트레스에 미치는 효과-----	92
나. 성인 남자 흡연자들에게 있어 항동맥경화와 항산화적 스트레스에 미치는 녹차씨 추출물의 효과-----	97
제 4 절 제품개발-----	105
1. 마요네즈-----	105
가. recipe 및 preparation procedure-----	105
나. 품질특성 평가-----	107
2. 화장품-----	112
가. 화장품 조성 및 제조과정-----	112

나. 열수추출물 첨가 로션의 물리적 특성-----	114
다. 주정추출물 첨가 로션의 물리적 특성-----	116
3. 비누조제-----	119
가. 비누 조성 및 물리적 특성-----	119
제 5 절 결론-----	128
제 6 절 재료 및 방법(제1협동과제)-----	131
1. <i>In vitro</i> 실험-----	131
가. 실험 재료-----	131
나. 실험방법-----	132
다. Antiproliferation 활성평가-----	134
2. <i>In vivo</i> 실험-----	135
가. 실험 재료-----	135
나. 실험방법-----	136
제 7 절 실험결과 및 고찰-----	136
1. Catechins 함량-----	136
2. 생리활성 평가-----	140
3. Anti-proliferation 활성 및 세포주기에 미치는 영향-----	145
제 8 절 녹차씨의 볶음처리가 항암활성에 미치는 영향-----	149
1. 볶음처리에 의한 암세포증식억제활성 변화-----	149
2. 볶음처리에 의한 항암효소계 유도활성의 변화-----	149
제 9 절 녹차씨의 안전성평가-----	153
1. 급성 독성 평가-----	153
2. 녹차씨 섭취가 체중 및 장기별 무게에 미치는 영향-----	153
3. 녹차씨 분말 섭취가 혈액의 GOT와 GPT활성에 미치는 영향-----	157
제 10 절 녹차씨 및 잎 추출물의 유전독성평가-----	158

제 11 절 녹차씨 함유 제품 개발-----	162
제 12 절 결론-----	164
제 13 절 재료 및 방법 (제2협동과제)-----	166
1. 녹차씨로 부터 생리활성물질의 분리-----	166
가. 녹차씨 추출물 조제-----	166
나. Low Pressure Liquid chromatography의 분석-----	166
다. High pressure liquid chromatography의 분석-----	167
2. 녹차씨 추출물의 항염증 및 항산화활성-----	168
가. 시료 제조 및 세포 배양-----	168
나. NO 농도와 세포 생존율-----	168
3. 녹차씨의 생리활성 물질의 분리 정제 및 구조분석-----	168
가. 녹차씨로 부터 생리활성물질의 분리-----	168
나. Preparative Low Pressure Liquid Chromatography 분석-----	168
다. 정제 및 구조분석-----	168
제 14 절 실험결과-----	169
1. 녹차씨 추출물의 회수율-----	169
2. Low Pressure Liquid Chromatography-----	169
3. 크로마토그래피를 이용한 생리활성물질의 분리-----	170
가. TLC의 분석-----	170
나. Low Pressure Liquid Chromatography의 분석-----	171
다. High pressure liquid Chromatography의 분석-----	172
4. 분리한 물질의 항염증 및 항산화활성-----	173
가. NO 농도와 세포 생존율-----	173
5. 순수 물질 분리 및 구조 분석-----	176
제 15 절 활성물질을 이용한 기능성 제품 제조-----	181
1. 녹차씨유를 이용한 비누 제조-----	181
2. 주정추출물을 함유한 녹차씨유 비누 제조-----	181
3. 시제품 제품평가-----	182

제 16 절 결론-----	184
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	185
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	187
제 1 절 활용에 대한 건의-----	187
제 2 절 본 연구로부터 발생한 업적-----	188
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	190
제 7 장 참고문헌-----	191

제 1 장 연구개발과제의 개요

심혈관질환의 위험인자들은 50여년전에 시작된 Framingham Heart Study를 통해 제시되었으며 “traditional” 위험인자에는 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤의 상승, 낮은 HDL-콜레스테롤, 혈압상승, 흡연 등의 요인이 있으며 최근의 여러 연구들은 심혈관질환 발생에 산화적 스트레스와 염증반응이 관여한다고 보고되고 있다. 즉, 동맥경화의 시작은 각종 위험인자들의 반복되는 물리적, 화학적 자극에 의한 혈관 내피세포의 손상에 의한 것이며 내피세포의 손상을 초래하는 중심물질로 산화적 스트레스(oxi-LDL 혹은 reactive oxygen species:ROS)에 의해 활성화되는 Nuclear factor- κ B (NF κ B)가 지목되고 있다(Bowie, and O'Neill, 2000; Collins and Cybulsky, 2001). 본 연구팀의 연구에서도 고콜레스테롤혈증쥐에 flavonoids-rich 식물추출물의 투여 시 superoxide anion 생성과 NF κ B 활성이 저하함을 확인하였다 (Lee et al, 2003). 동맥경화는 염증을 수반하며 interleukin-6, tumor necrosis factor- α 와 같은 염증성 cytokine을 생성하거나 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 유전자의 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있으며(Bennett, 1986, Dubois 등, 1994, Molina-Holgado 등, 2000), 따라서 이러한 염증반응을 억제할 수 있는 천연자원에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

국내에서 암 예방 관련 연구는 최근 빠르게 활성화되고 있으며, 그 탐색 범위도 동물, 식물 등 전 범위에 걸쳐 진행되었으며, 1970년도부터 1995년 말까지 약 176종의 식품과 500여종의 한약재에 대하여 항암, 항돌연변이, 항산화효과 등이 검색되었다. 상당한 규모의 연구임에도 불구하고 몇 가지 중요한 개선해야 할 문제점이 제기되었는데 첫째, 검색방법이 통일되어 있지 못하고, 상당수의 연구가 validity가 확보되지 않은 검색시스템을 사용하고 있는 점. 둘째, 대부분 검색단계에 머물고 있으며, 활성성분을 분리하여 물질 특허로 까지 이어진 경우가 적은 점.(박 1996) 셋째, 관련 소재들을 이용한 건강기능성 식품 등 제품화가 거의 이뤄지지 못한 점이다. 항암효과를 주장하는 많은 종류의 식품소재들이 난립하고 있지만, 이들에 대한 체계적인 비교 평가가 이뤄져 있지 않아 국민들의 건강에 해를 줄 염려가 있어 타당성이 입증된 assay방법을 이용하여 우리나라에서 주로 소비되는 식품들에 대한 발암예방효능의 평가가 필요하다고 사료된다.

차(茶, tea, *Camellia sinensis*)는 전 세계적으로 물(water) 다음으로 섭취량이 많은 음료로 알려져 있으며, 각종 암, 심혈관계질환, 백내장 등 만성질환을 예방하는 효과가 보고되어 있으며 (Lambert 2003), 제조방법에 따라 생리활성성분의 함량이 크게 변화하는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 녹차에는 건물기준으로 catechin 함량이 30-42% 함유되어 있음. 주요 catechins 성분으로 (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등이 보고 되었으며, 이 가운데 EGCG가 주요 구성성분으로서 항산화·항동맥경화 및 암예방 활성이 높은 것으로 알려져 있다.(Adhami 2003).

녹차나무(*Camellia sinensis* L.)는 다년생 상록 관목수로 북위 35° 이하 지방에서 주로 재배되어 차잎을 수확한 후 생산되는 종자이다. 국내 녹차 재배면적은 2002년에 1,830ha로서 생산량은 1,395 M/T이며 최근 건강식품에 대한 인식이 높아지면서 재배지역이 증가하고 있으며 녹차씨는 속씨를 감싸고 있는 겉껍질상태로 열리는데 이 속에는 2~4개씩의 속씨가 들어 있으며 녹차씨는 녹차 수확이 끝난 후 거의 폐기되고 있는 실정이며 그 양은 평균 평당 5kg 정도일 것으로 추정된다. 녹차씨의 구성성분은 단백질이 18.4 %이고 탄수화물 함량이 37.2 %이며 조지방의 함량은 34.6 %로 구성되어 있다. 이들에는 사포닌의 함량이 다른 종자에 비해 많이 함유되어 있는데 콩(*Glycine max* L. Merrill)보다 3배나 많은 122 mg/g을 가지고 있다. 녹차씨의 종자유의 지방산 조성을 보면 oleic acid가 52.7 %로 가장 많은 비율로 존재하며, linoleic acid가 27.8 %, palmitic acid가 16.1 %, linoleic acid와 stearic acid가 각각 1.9, 1.5 % 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 녹차씨앗에는 지방이 풍부하고 사포닌 등 각종 천연화학성분들이 풍부하게 함유되어 있어 그 이용가치가 충분할 것으로 사료된다. 유지의 상당량을 수입에 의존하고 있는 국내실정에 비추어 대체 유지자원의 개발이 꼭 필요하며 차종실유의 식용유지화 개발이 가능할 것으로 판단된다. 또한 녹차씨에는 항산화제로 잘 알려져 있는 tocopherol 22 μ g/g 함유되어 있는 것으로 보고되었다 (Na HH et al, 1992).

우리나라에서 자급율이 가장 낮은 식품류는 유지류(3.6%)이며, 참기름, 미강유, 들기름, 어유, 유채유가 소량 생산되어 국내 생산 식용유지 자원으로 이용되고 있으며(한국농촌경제연구원 1998), 녹차씨유는 올리브유가 갖는 혈장 콜레스테롤 저

하효과 및 LDL 산화억제 효과를 가질 것으로 사료되며 녹차씨유에 함유되어 있는 활성물질의 생리적 효능에 관한 과학적 규명이 이루어지면 녹차씨유의 산업화에 기폭제가 될 것으로 사료된다. 녹차씨유는 대두유나 옥수수유에 비해 고도불포화 지방산의 함량이 적으며 올레인산이 54%나 들어있는 녹차씨유는 산화안정성이 높아 유지의 함량이 높은 가공식품에 첨가 시 유통기간을 연장시킬 수 있는 장점이 있다. 식물종자에 함유되어 있는 기름을 추출하는 방법(김동훈 1994, 한진숙 등: 1993, Kand et al: 2002, Szentmihalyi K et al: 2002.)으로는 열처리 후에 압착으로 추출하는 방법과 용매를 이용하여 추출하는 방법이 있으며 기름의 추출 수율도 중요하지만 고유성분의 변화없이 추출하는 것이 가장 중요하다(Gomez AM et al: 1996, Ajiwe VIE et al: 1995, Besbes S et al: 2004, Lee YC et al: 2004, Song J 등: 2003) 녹차씨앗에는 지방이 풍부하고 사포닌 등 각종 천연화학성분들이 풍부하게 함유되어 있어 그 이용가치가 충분할 것으로 사료된다. 유지의 상당량을 수입에 의존하고 있는 국내실정에 비추어 대체 유지자원의 개발이 꼭 필요하며 차종실유의 식용유지화 개발이 가능할 것으로 판단된다.

녹차씨에서 기름을 제거한 녹차씨(defatted meal)은 쓴 맛을 지녀 식용으로 이용하기는 어려우나 이에 함유된 phytochemicals은 분리, 정제하여 건강기능성 식품 소재로 활용할 수 있다. 우리나라는 현재 식생활의 서구화 등으로 식용유지의 소비가 증가하고 있으나 96.4% 수준의 식용유지 자원을 수입(년간 7-8억달러)에 의존하고 있으며 녹차씨유의 생산 및 상업화는 국내의 고급 식용유지 자급율을 향상시키고 값비싼 올리브유 수입대체 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

녹차씨를 산업적으로 활용하기 위해서는 녹차씨의 생리적 효능에 대한 연구 결과가 뒷받침되어야 하며 녹차는 여러 연구에서 항동맥경화효과·항산화효과 및 항암 또는 발암억제활성이 높은 것으로 나타나, 녹차씨에서도 그와 유사한 효능이 관찰될 것으로 추정되나, 이와 관련된 연구는 거의 없다. 우리나라 사망률 1, 2위를 다투는 순환계질환과 암의 발생(<http://www.nso.go.kr/report/data/svca9800.htm>)을 감소시키는 식이 인자에 대한 연구가 필요하며 올리브와 유사한 지방산과 phytochemical 조성을 갖는 녹차씨유와 녹차씨에서 이러한 성인병 예방 효능이 있는지 확인할 필요가 있다. 암의 치료율은 50% 이하로 아직은 낮은 수준이고, 암의 진행이 상당기간(10~30년) 소요되는 특성을 갖고 있기 때문에 일상적인 생활패턴을

조절함으로서 암 발생을 예방하는 것이 국민보건향상 및 의료비 절감 측면에서 필요하며 genome project의 완결로 유전적으로 암에 걸리기 쉬운 취약집단이 밝혀지게 될 것이고, 이들을 대상으로 한 compliance가 높은 암예방 식품소재의 수요가 증가할 것으로 예상되며 건강기능성 식품법의 시행으로 기능성 식품의 수요 및 시장이 확대될 것으로 전망되며, 이에 따른 다양한 기능성 식품소재의 발굴이 요구된다고 할 수 있다.

녹차시장은 성장가능성이 큰 것으로 전망되고 있으나 마시는 녹차제품만으로는 수요 창출이 한정되어 있으므로 기능성식품 및 건강보조식품의 개발로 틈새시장을 공략할 필요가 있으며 녹차씨의 기능성을 이용하여 심혈관질환, 암, 위염, 관절염, 피부염, 해독, 숙취해소, 간기능 개선 등을 target으로 하는 건강기능성식품의 개발이 가능할 것으로 기대된다. 녹차 제조과정에서 발생하는 부산물인 녹차씨를 가공하여 고부가가치 상품으로 개발할 경우, 녹차 재배농가와 녹차 가공업체의 부가가치 증대에 기여할 것으로 기대되며 앞으로 예상되는 건강식품시장의 확대에 대비하여 다양한 식품소재의 발굴이 요청되며 녹차씨로부터 새로운 기능성성분의 존재가 확인된다면 이를 이용한 건강식품 산업의 국제 경쟁력을 높일 수 있어 WTO의 출범에 따른 교역자유화에서 살아남기 위해서는 자국 내에 존재하는 부존자원 중 가장 토속적이고 향토적인 것을 발굴하여 세계적인 상품으로 개발 육성하는 것이 이 연구의 목적이다.

천연물을 이용한 항염증 · 항동맥경화와 암예방 물질 및 항암제 개발에서 녹차에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 녹차의 항염증 · 항동맥경화와 항암효과에는 녹차에 함유되어 있는 polyphenol 중 특히 EGCG에 대해 많은 연구자들이 관심을 가지고 있으며 이외 EGC나 ECG등의 화합물에 대해서도 연구가 되고 있다. 또한 콩을 비롯한 포도씨나 자몽(grapefruit)씨 등의 항암효과 및 생리활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 포도씨유의 경우 미 콜로라도대 보건과학센터 연구팀이 생쥐들에서 추출물을 먹인 결과 대장 종양 크기가 44%나 줄어들었음을 확인했다고 보고하였으며 이외 포도씨유의 항암 및 항산화에 대한 연구보고가 발표되고 있고 이를 이용한 건강기능성 식품이 판매되고 있는 실정이다(Kang et al; 1998, Del Bas et al; 2005, Katiyar, S. K; 2006, Balu et al, 2006). 또한 자몽씨는 이미 항균성을 인정받고 현재 우리의 생활속에서 활용되고 있다(Ko G.H. et al.,

1995). 이러한 다양한 종자들에 관한 연구가 활발히 되어가고 있는 가운데 아직까지 녹차씨의 종자의 생리활성에 관한 연구 부족하다.

따라서 본 연구는 폐기되는 녹차씨의 유용한 생리활성기능을 확인하여 건강기능성 제품으로 활용하고자 실시하였다. 녹차씨에 다량으로 함유되어 있는 지방을 추출하여 녹차씨유를 조제하여 식용으로서의 가능성을 확인하고자 녹차씨유를 추출하여 물리화학적 특성, 항산화효과 및 저장 안정성 등을 평가하였다. 녹차씨유 추출조건 확립을 위해 녹차씨유 추출을 위한 가열 조건을 확립하고 추출조건에 따른 지방 함량 및 지방산 조성 조사하였다. 녹차씨유의 식용기름으로서의 특성 규명을 위해 물리화학적 특성으로 비중, 굴절률, 총 지방함량, 색도, 비비누화물가, 요오드가, 산가, 과산화물가, TBA가, free fatty acid 함량을 측정하였으며 지방산 조성은 gas chromatography를 이용하여 분석하였다. 녹차씨유의 산화안정성을 평가하기 위하여 항산화물질인 총 phenol 함량을 측정하였으며 녹차씨유의 저장안정성 규명을 위해 저장기간 동안의 산가, 과산화물가, TBA가 및 색도를 측정하여 확인하였다.

녹차씨의 유용성분을 추출하여 녹차씨의 항염증·항동맥경화 효과를 RAW 264.7 Macrophage cell line과 C57BL/6 mice에서 탐색하였다. Macrophage cell에서는 산화적 스트레스 유발 상황에서 세포 독성여부, 염증생성과 관련된 인자들 NO와 TNF- α 생성의 억제효과 및 iNOS의 유전자 발현정도를 확인하였으며, 항산화 효소계 활성을 측정하였다.

녹차씨 활성성분의 *in vivo*에서의 항산화·항염증효과 및 기작 연구를 위해 동맥경화식이에 녹차씨유를 섭취시킨 mouse의 혈중지질 농도, 간의 TBARS 함량, 혈장 및 복강 대식세포에서의 염증반응물질인 TNF- α , prostaglandin와 interleukine β_4 및 NO 생성정도를 확인하였다. 그리고 동맥경화식이에 녹차씨 추출물 (주정추출물과 열수추출물을 6주간 급여)을 제공한 mouse에서의 복강대식세포의 superoxide dismutase 활성과 GSH 농도, 산화적 스트레스 억제효과, 염증성 cytokine 생성 억제효과 및 염증반응의 유전자 발현정도를 평가하였다.

녹차씨 유용성분을 첨가한 개방제품의 임상적 효능 평가를 위해 흡연자를 대상으로 한 개발제품의 trolox equivalent를 사용한 총 항산화능, TBARS 농도, 염증

유발인자인 TNF- α 활성 등 산화적 스트레스 억제효과를 혈장에서 확인하였고, 혈중지질 강하효과, 체내 독성에 미치는 영향으로 GOT와 GPT 활성 및 적혈구의 항산화효소계 활성으로 SOD, catalase, GSH-px, GSH-red, Cu,Zn-SOD 수준을 측정하였고 혈소판 응집력 억제효과를 비교 분석하였다.

녹차씨의 암예방을 효능을 확인하기 위해 세포 모델계를 이용한 녹차씨 추출물의 암세포 생육억제 활성을 평가하였으며, 녹차씨 추출물의 발암물질 해독효소계 (1상 및 2상) 유도/저해 활성조사하였다. 식품소재로서의 활용가능성을 평가하기 위하여 catechin함량을 HPLC로 분석하고 해독효소계 및 암세포 생육억제 활성을 확인하였다. 녹차씨의 건강기능성 식품 소재화 연구를 위해 녹차씨의 가공방법 (roasting, boiling, steaming, frying)에 따른 활성성분의 변화와 녹차씨 가공방법별 발암예방활성의 변화 (*in vitro* 및 *in vivo* 평가)를 확인하였다. 녹차씨 추출물의 안전성 평가를 위해 급성 독성평가를 실시하였다.

생리활성물질의 분리·정제 및 구조 분석을 위해 생리활성분획에서 chromatography를 이용하여 물질을 분리하여 활성물질을 추적하여 활성분획을 각종 chromatography를 이용하여 순수한 활성물질을 단리하여 정제하여 분광학적방법 즉, NMR, LC-MS등의 기기분석 방법을 통한 활성물질의 구조 확인 및 동정을 하여 물질 구조를 확인하였다.

녹차씨를 이용한 건강 기능성 소재 및 제품으로는 녹차씨로 부터 추출한 항염증·항동맥경화·발암예방 활성성분을 녹차씨유에 첨가하여 “nutraceutical” 식용유지 제품(녹차씨유, 마요네즈), 드링크 및 크래커를 개발하여 소비자들을 대상으로 관능검사를 실시하였으며 녹차씨유와 녹차씨 추출물을 이용한 항염증용 화장비누를 개발하고 임상시험을 실시하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내

최근 들어 천연물의 생리활성을 탐구하는데 있어서 많은 연구가 되고 있는 물질중의 하나가 녹차 잎이다. 하지만 녹차 잎의 다양한 연구보고와 달리 아직 녹차씨에 대한 연구는 국내외 모두 미미한 실정이다. 민간요법에서는 녹차씨가 천식이나 뇌명(腦鳴)에 효과가 있다고 알려져 있으며 또한 기름이 풍부하게 있어서 중국 등의 일부지역에서는 이를 식용으로 이용한다고(Chunhua X et al, 1986)보고되고 있다. Na등(1992)이 보고한 바에 따르면 녹차씨에는 일반적으로 사포닌의 함량이 많은데 이러한 구성성분의 특성은 계면활성제나 항종양제로서 연구자원으로의 가치가 높다고 평가하였다(Seshadri R. et al, 1986). 국내에서 녹차와 관련된 연구는 매우 폭 넓게 이뤄졌는데, 지난 10여 년 간 200여 편의 녹차관련 논문이 보고되었으며, 그 가운데 약 10~20편 정도가 암 예방과 관련된 것이다. 특히, 동물 모델계에서 녹차의 대장암 예방효과, *in vitro* 암세포주의 세포사멸효과 등이 보고되어 있다(박지선 2002; 박현서 2000). 그러나 녹차 종자에 대한 생리활성 연구는 전무한 실정이며, 단지 종자의 일반성분과 지방산조성에 대한 보고가 있을 정도이다 (나요환 1992). 올리브유와 조성이 비슷한 녹차씨유는 현재 상용화되지 않고 있으며 녹차씨유와 녹차씨박에서 생리활성 물질을 탐색하는 연구 또한 전혀 이루어져 있지 않으므로 이에 대한 연구의 수행이 필요하다.

2. 국외

세계적으로 식용유로서의 녹차씨유에 관한 연구가 거의 이루어져 있지 않으며 단단한 껍질에 싸여 있는 녹차종실의 착유 전처리 과정에 관한 연구가 전혀 이루어져 있지 않았다. 녹차씨유 및 그 부산물의 생리활성 기능에 관한 체계적인 연구가 전혀 이루어져 있지 않았다.

녹차의 암 예방효과와 관련된 연구는 지난 10여년간 세포와 동물모델계를 이용하여 폭넓게 이루어졌으며, 많은 연구에서 긍정적인 결과가 보고되었다 (Lambert 2003, Adhami 2003). 녹차잎의 성분인 폴리페놀, 카테킨, 차색소 등을 이용한 다양한 제품이

개발되고 있으며, 중국에서는 차색소를 이용한 신약 판매량이 연간 6억 달러를 넘고 있으며 일본에서는 녹차 카테킨을 이용한 약취제거, 부식 및 산화방지 효능을 가진 각종 생활용품과 보건의식품이 개발되었다.

녹차씨에는 kaempferol-3-*O*-[2-*O*-beta-D-galactopyranosyl-6-*O*-alpha-L-rhamnopyranosyl]-beta-D-glucopyranoside와 kaempferol-3-*O*-[2-*O*-beta-D-xylopyranosyl-6-*O*-alpha-L-rhamnopyranosyl]-beta-D-glucopyranoside 등의 flavonol배당체가 존재하는 것이 보고되었으나 이들의 생리활성은 알려져 있지 않고 있다(Sekine 1991). 최근 녹차씨로부터 사포닌의 일종인 assamsaponins F, G, H, and I이 분리되었으며, 이들은 음식물의 장관통과 속도를 증가시키는 효과가 있으며, 감기바이러스의 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Murakami 2000; Hayashi 2000). 중국 남부의 호남성과 광둥성, 대만에서는 녹차씨유를 고부가가치의 식용유 자원으로 이용하고 있으며 녹차씨유를 이용한 미용비누 등이 개발되어 비싼 값에 팔리고 있으며 녹차가 중국, 인도 등의 아시아권에서 주로 생산되고 있어 서구에서는 녹차씨의 생리활성물질이나 이의 효능 등에 관한 연구를 수행한 적은 거의 없는 실정이다.

2005년도 녹차 전체 시장 규모는 787억원으로 전년도 매출액인 723억원보다 8.85% 증가한 것으로 나타났으며, 수량 또한 3천136만개 (1개당-티백 : 25개, 잎차 : 1통(100g))를 판매하여 전년 동기대비 4.81% 성장한 것으로 나타났으며, 이와 같이 녹차 시장이 증가하는 것은 건강기능성에 대한 홍보와 대중의 건강식품에 대한 인식변화에 기인하는 것으로 판단되며, 따라서 본 과제가 성공적으로 수행될 경우, 건강기능성 식품시장의 확대에 기여할 것으로 기대된다.

(http://www.ifoodworld.co.kr/pdf/m200211_2.pdf).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

세부과제 연구기관	인제대학교
세부 과제명	녹차씨의 항염증·항동맥경화 효능 평가 및 기능성 소재 개발
연구책임자	송 영 선

제 1 절 실험의 재료 및 방법

1. 녹차씨유의 물리화학적 특성 및 저장안정성 규명

가. 녹차씨유 추출 조건 확립

녹차씨유 추출의 위한 최적조건을 확립하기 위하여 압착유와 용매 추출유의 두 방법으로 실험을 계획하였다. 압착유는 2가지 조건 {분쇄와 볶음(grinding and roasting), 분쇄와 볶음 및 증숙(grinding, roasting and steaming)} 단계로 나누어 추출하였으며 용매 추출유는 n-hexane을 사용하여 실온에서 24h 침지하여 추출하였다.

1) 재료

경남하동 소재 화개제다(花開製茶)로부터 유기농 녹차씨를 2004년 11월에 공급받아 외피를 제거하여 정선하여 세척한 후 60±5℃의 열풍건조기에서 건조하여 사용하였다.

2) 압착 추출의 조건

녹차씨유의 압착추출은 Kang 등의 방법을 변형하여 녹차씨 13 kg을 볶음(roasting), 분쇄(grinding), 증숙(steamming)을 실시하였으며 추출조건을 확립하기 위하여 처리과정을 2가지 방법으로 처리하였다. 분쇄와 증숙과정을 거친 녹차씨(grinding and steaming), 분쇄와 볶음 및 증숙(grinding, roasting and steaming)

과정을 거친 녹차씨를 압착하여 녹차씨유를 추출하였다. 압착추출을 위한 볶음과 분쇄 및 증숙 조건은 Fig. 1과 같다. 볶음은 예비실험을 통해 녹차씨가 Maillard 반응으로 갈변을 일으키지 않는 시간을 확인하여 roaster로 100~110℃에서 15분 간 볶아 실온에서 식힌 후 롤러 분쇄기로 약 40~50 mesh의 입자 크기로 분쇄하였다. 증숙 조건은 steam boiler로 2 kg · f/cm²의 압력에서 20~30분 간 증숙하였으며, 이렇게 처리한 시료는 열교환 장치가 부착된 밀폐식 압착기로 200~400 kg/cm²의 압력에서 기류의 흔적이 없어질 때까지 압착하여 기름을 추출하였다.

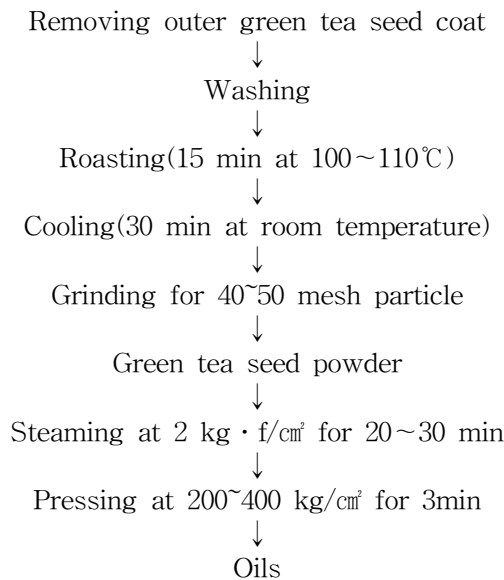


Fig. 1. Schematic diagram for green tea seed oil extraction by pressing

3) 용매 추출 조건

녹차씨 용매 추출유를 얻기 위하여 녹차씨 2,900 g을 약 40~50 mesh의 입자 크기로 분쇄하여 10배의 n-hexane으로 24hr 침지하여 감압 농축하여 녹차씨 용매 추출유를 수확하였다.

나. 추출조건에 따른 녹차씨유의 물리화학적 특성 및 저장안정성 규명

1) 녹차씨유의 지방산 조성

녹차씨유 100mg을 알콜성 수산화나트륨으로 검화시켜 지방산을 분리한 후 Chin 등의 방법에 따라 4% HCl-메타놀을 사용하여 60℃에서 20분 간 메틸화한 후 GC로 분석하였다. GC는 QP-5050 (Shimadzu, Japan)를 사용하였으며 분석조건은 column은 DB-Waxter (30m×0.25mm×0.2μm)로 initial temperature는 60℃이었으며 분당 10℃ 상승시켜 180℃에서 2분간 머무른 후 분당 3℃ 상승시켜 255℃에서 6분간 유지하였다. 운반체는 헥산으로 유속은 30.8ml/min로 하였으며 Injector 온도는 230℃로 하였다.

2) 녹차씨유의 물리적·이화학적 특성 조사

추출조건에 따른 물리적·이화학적 특성을 확인하기 위하여 지방함량, 비중, 굴절률, IV, 비비누화물, AV와 POV, TBA가, free fatty acid 함량과 총 phenol 함량 및 색도를 측정하였으며 모든 실험은 3회 반복 실시하여 분석하였다.

가) 지방함량은 Soxhlet법으로 지방을 추출하여 분석하였다.

나) 비중은 용량 100ml의 병으로 온도계를 붙이는 갈아 맞춘 마개와 눈금 및 갈아 맞춘 뚜껑을 가진 측관이 있는 비중병을 사용하여 측정하였다.

다) 굴절률은 abbe굴절계를 사용하여 측정하였다.

라) 요오드가는 측정할 지질 100g에 흡수되는 할로겐의 양을 요오드의 g수로 표시한 값으로 Wijs 법으로 측정하였다. 즉, 녹차씨유 0.2g을 500mL 유리마개가 달린 삼각플라스크에 정확히 취하고 4염화탄소 10mL을 가하여 유지를 완전히 용해한다. Wijs 액 25mL을 가하여 20~30℃의 암소에서 30~60분 간 때때로 흔들어 주면서 방치한 후 10% KI 용액 20mL과 증류수 100mL을 가하여 0.1N-Na₂S₂O₃ 용액으로 엷은 황색이 될 때까지 적정하고 가용성 전분용액을 몇 방울 떨어뜨려 무색이 되는 점을 종말점으로 하여 분석하였다.

$$IV = \frac{(A-B) \times F \times 1.269}{S}$$

A ; 바탕시험의 0.1N-Na₂S₂O₃ 용액 소비량(mL)

B ; 본시험의 0.1N-Na₂S₂O₃ 용액 소비량(mL)

F : 0.1N-Na₂S₂O₃ 용액의 농도계수

S : 시료 채취량(g)

마) 비비누화물 함량은 녹차씨유 5g을 정확히 달라 1N-KOH·에타놀 용액 50mL을

가하여 환류냉각기를 연결하여 때때로 흔들여 주면서 물중탕 속에서 1시간 동안 가열한 후 끓는 물 80mL을 가하여 씻은 후 냉각시킨다. 여기에 ether 100mL을 가하여 잘 혼합하여 물층을 50mL의 ether로 3회씩 추출하여 ether층을 모두 받아 ether를 제거한 후 아세톤 3mL을 가해 완전 증발시킨 후 건조하여 함량을 구하여 %값으로 계산하였다.

바) AV는 표준유지분석시험법(JOCS)으로 분석하였다,

사) POV는 AOAC법으로, TBA가는 Sidwell법으로 분석하였다. 녹차씨유 3.0g을 정확히 취하여 benzene 10mL을 가해 완전히 용해시켜 TBA 시약 10mL을 가해 때때로 흔들여 주면서 실온에서 4분간 방치하여 아래층 부분을 취한다. 끓는 물속에서 30분 간 가열한 후 흐르는 물에 냉각시켜 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 같은 시료에 대해 3~4회 반복 측정하여 평균값을 취하였다.

$$\text{TBA가} = \frac{(A-B) \times 3 \times 100}{S}$$

아) Free fatty acid 함량은 oleic acid 함량을 기준으로 하여 환산하였다.

자) 총 phenol 함량은 chlorogenic acid와 caffeic acid를 표준물질로 하여 Folin-Denis법으로 측정하였다. 아세톤에 용해시킨 녹차씨유를 20uL 취하여 2% Na₂CO₃ 용액 2mL을 가하여 완전히 용해시켜 2분간 정치시켜 Folin-Ciocalteus 시약 0.1mL을 가하여 실온에서 30분간 방치한 후 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 chlorogenic acid와 caffeic acid를 사용하여 총 phenol 함량을 계산하였다

차) 색도는 Hunter system에 따르는 색차계(Minolta CT-310, Japan)을 사용하여 명도(L값), 적색도(a값), 황색도(b값)를 측정하였다.

3) 관능평가

식품영양학 전공자 10명을 대상으로 녹차씨 압착유 2종과 용매 추출유 1종의 관능평가를 실시하였다. 평가항목은 구수한 냄새((아주 강함 7점, 아주 약함 1점), 풀냄새(아주 강함 7점, 아주 약함 1점), 쓴맛(아주 강함 7점, 아주 약함 1점), 밝기(아주 밝음 7점, 아주 어두움 1점), 전체적인 기호도 등을 7구간 척도법으로 평가하였다. 외관용으로는 동일한 용기에 시료 50g을 담아 뚜껑을 덮어서 따로 제시하였으며 각 시료 용기는 난수표에서 선택한 세 자리 숫자로 표기하였다. 평가 사이에 입을 헹굴 수 있는 물과 껌을 제공하였다.

다. 추출조건에 따른 항산화능

녹차씨의 저장기간에 따른 항산화능은 Oven 법으로 분석하였다. 즉, 각 시료를 100mL 비커에 마개없이 60mL씩 넣어 60±2℃ 항온기에 18일 간 저장하면서 AV, POV, TBA가와 free fatty acid 함량 및 색도를 측정하여 분석하였다.

2. 녹차씨의 항염증·항동맥경화 효과 및 기작 연구

가. 녹차씨 분획물이 RAW 264.7 murine macrophage cell line에서 항산화·항염증 효과 및 기작 규명(*In vitro*)

1) 세포 배양 및 처리

RAW 264.7 murine macrophage cell line은 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였으며, 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 10% FBS(Fetal bovine serum)와 2mM L-glutamine이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)에 배양하였다. 세포를 10mm dish나 24-well plate에 주입하고 부착시켰다. 녹차씨는 걸쭉질을 제거하고 60℃에서 건조시킨 뒤 분쇄하였으며 메타놀 추출물은 분쇄시료 1kg에 10배 분량의 메타놀을 넣고 24시간 동안 추출하여 여과(Whatman no. 42)한 후 rotary evaporator로 60℃에서 감압 농축하여 메타놀 추출물을 얻었다. 탈지 녹차씨 메타놀 추출물(DGTSME)은 분쇄한 녹차씨를 탈지하여 녹차씨 메타놀 추출물(GTSME)과 같은 방법으로 추출물을 얻었다. 이들 추출물을 각각 10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml이 되도록 첨가하고 2시간 배양한 후 산화적 손상을 유발하기 위해 LPS(1µg/ml)를 첨가하고 20시간 배양하였다.

2) 세포 생존률은 살아있는 세포가 neutral red에 염색되는 특성을 이용하여 측정하였다. 24-well의 배지를 제거하고, 1.14mmol/L의 neutral red가 포함된 배지를 0.5ml 씩 넣고 3시간 동안 배양한 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 세척하였다. 세포에 acetic acid(1%, v/v) 와 ethanol(50%, v/v)을 함유하는 1ml의 cell lysis buffer를 넣어 15분간 배양시켜 세포로부터 neutral red를 방출시킨 후 염색된 정도를 측정하기 위해서 세포 용해 산물을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 취해 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

- 3) Nitric oxide(NO) 생성량은 NO 생성의 지표인 배지에 생성된 nitrite 양을 측정하여 결정하였다. 배지 상등액에 1% sulphanilamide 와 0.1% naphthylenediamine dihydrochloride을 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다.
- 4) 지질 과산화 정도는 thiobarbituric reactive substances(TBARS) 함량으로 측정하였다. 배지 상등액에 TBARS 용액을 가한 후 95℃ 수조에서 30분간 반응시킨 다음 4,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취해 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선으로는 1,1,3,3-TMP (tetramethoxypropane)를 사용하였으며, 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 malondialdehyde (MDA)의 양으로 환산하였다.
- 5) Glutathione(GSH) 함량은 GSH는 효소적 순환 절차를 이용하여 Tietze의 방법으로 분석하였다. 배지를 제거한 후 PBS(pH 7.4)로 2번 세척하고 1ml의 PBS를 첨가하여 세포를 모았다. 각 시료당 세포수를 세어 세포수를 동일하게 맞춰준 다음, 얼음 상태에서 5초씩 3회 sonication하고, 4℃, 4,500rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액 취해 5% SSA(5-Sulfosalicylic acid) 와 혼합한 후, 4℃, 4,500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 의 reaction mixture와 반응시켜 2분간 405nm에서 흡광도 변화를 관찰하였다.
- 6) 항산화 효소 활성
- 가) Catalase 활성은 Aebi 법을 다소 수정하여 측정하였다. 즉, 세포 추출 상등액에 50mM phosphate buffer(pH 7.0)를 가하였다. 여기에 30mM H₂O₂ 용액을 가하여 240nm에서 10초 간격으로 2분간 흡광도 변화를 측정하였다. 효소의 활성은 1분 동안 1μmole의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1unit로 하였다.
- 나) Superoxide dismutase(SOD) 활성은 pyrogallol의 자동산화로 측정하였다. 96 well plate에 세포 추출물과 1.1mM DTPA (diethylene triamine pentacetic acid)를 가하였다. 여기에 50μl of 6mM pyrogallol을 첨가하여 405nm에서 2분간 10초 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. SOD 활성 1unit은 pyrogallol의 산화를 50%까지 저해하는 효소의 양으로 나타내었다.
- 다) GSH-peroxidase(GSH-px) 활성은 Lawrence과 Burk의 방법을 다소 수정하여 측

정하였다. 세포 상등액에 reaction mixture를 가한다. 2.5mM H₂O₂를 가한 즉시 340nm에서 2분 동안 10초 간격으로 흡광도 변화를 측정한다. GSH-px 활성 1unit은 1분당 1nmole의 NADPH가 산화되는 효소의 양으로 나타내었다.

라) GSH-reductase 활성은 Inger와 Bengt의 방법으로 측정하였다. 96-well plate에 세포 추출 상등액을 넣고 reaction mixture 를 가한 즉시 340nm에서 2분간 10초 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. Glutathione reductase 1unit은 1분동안 1nmole의 NADPH 환원을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였다.

마) 단백질 농도는 Bradford 방법으로 측정하였다.

7) inducible NO synthase, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein 발현

가) Total protein 분리

세포로부터 protein을 분리하는 과정은 10mm dish(5×10^6 cells/dish)에 세포를 주입하여 부착시키고, 녹차씨 추출물을 농도별로 처리하여 2시간 배양한 후, LPS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 20시간 배양하였다. Cell culture plate로부터 배양액을 제거하고 미리 준비해 둔 10ml ice-cold PBS로 2회 세척한다. Plate를 얼음 위에 올려 놓은 채 0.5ml lysis buffer(50mM Tris-HCL pH 8.0, 150mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM PMSF)을 넣어주고 cell scraper로 긁어주어 세포를 수집한다. 이를 얼음 상태에서 5초간 sonication한 후, 4°C, 120,000rpm에서 20분간 원심분리하고 상층액만을 모아 새 튜브로 옮긴다. 단백질 정량을 위해 -20°C에 보관하였다. 단백질 정량은 Bradford 방법으로 측정하였다.

나) 전기영동

세포 추출 상등액을 Bradford assay로 단백질 농도를 결정하였다. Protein sample $60 \mu\text{g}$ 을 10% SDS-polyacrylamide gel에 주입하고 nitrocellulose membrane에 electrotransfer하고 membrane은 1 h 동안 실온에서 5% nonfat dry milk in TBST[10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 0.05% Tween 20]로 block하였다. inducible NO synthase (iNOS) protein 발현을 결정하기 위해 1:10,000으로 희석한 rabbit anti-mouse iNOS antibody를 사용하였으며 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein 발현을 위해서는 1:1,000으로 희석한 rabbit anti-mouse GAPDH antibody를 사용하였다. Membrane을 TBST로 헹군 후, alkaline phosphatase로 결합된 goat anti-mouse

immunoglobulin G(IgG) secondary antibody를 1:10,000으로 희석하여 1 hr 동안 실온에서 incubate하였다. Blot은 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP) /nitroblue tetrazolium (NBT) color developing solution을 사용하여 현상하였다. 결과는 Gel Doc EQ System을 사용하여 나타내었다.

8) iNOS, GAPDH의 mRNA 발현

가) RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

총 RNA는 Tri-reagent(Molecular Research Center, Inc.)로 추출하고 2 μ g의 total RNA를 M-MLV를 이용하여 first strand cDNA를 만든다. 1/10 diluted first strand cDNA 2 μ l, 10 \times Buffer II 5 μ l, 각각 2.5 mM의 dNTPs mixture 4 μ l, 각각 10 mM의 primer set 1 μ l에 Taq DNA polymerase 0.4 μ l (2 U)을 넣은 후 최종 부피가 50 μ l 되도록 맞추는 다음 thermocycler(Eppendorf Gradient PCR System)로 PCR을 수행한다. Amplification profile은 94 $^{\circ}$ C에서 2분 30초 동안 initial step을 수행 후 95 $^{\circ}$ C에서 40 초간 denaturation, 각각의 annealing temperature에서 1분 20초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2 분간 polymerization의 30 cycle을 수행하고 최종 cycle에서는 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간 더 연장하였다. PCR 결과는 2%metaphor agarose (Biowhittaker Molecular applications) gel에 PCR product 5 μ l과 loading dye 1 μ l을 잘 섞은 후 loading 하고 50V에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하고 polaroid camera로 촬영하여 목표 유전자의 발현을 확인하였다. mRNA 수준은 GAPDH와의 ratio로서 표시하였다. 본 실험에 사용한 iNOS, GAPDH의 primer sequence와 annealing temperature는 Table 1에 제시하였다.

Table 1. List of primer sequence and product size

Name	Product size (bp)	Sequence (5' -3')	Annealing temperature (°C)
iNOS	920	F 5' -GCC TTC AAC ACC AAG GTT GTC TGC A-3' R 5' -TCA TTG TAC TCT GAG GGC TGA CAC A-3'	59
GAPDH	375	F 5' -ACC TGC CAA GTA TGA TGA CAT-3' R 5' -CCT GTT ATT ATG GGG GTC TG-3'	49

나. 녹차씨기름이 C57BL/6 mice에서 항산화·항염증 효과(*In vivo*)

1) 실험동물의 사육

실험동물은 체중 $20.01 \pm 0.24\text{g}$ 의 5주령 C57BL/6 mice, 수컷을 효창 사이언스로부터 구입하여 처음 1주간 stock diet로 예비 사육한 후 체중과 콜레스테롤 수치에 따라 난괴법 (completely randomized design)으로 3마리씩 plastic cage에 넣고 각 군당 12마리씩 3그룹 (옥수수유군, 녹차씨유군, 올리브유군)으로 나누어 9주간 사육하였다. 해당 식이와 물은 자유급식법 (ad libitum feeding method)으로 사육하였으며, 사육실의 온도는 $22 \sim 25^\circ\text{C}$ 로 실온을 유지하였고 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등을 하였다. 식이 섭취량은 주 2회, 체중은 주 1회 간격으로 측정하였다.

2) 식물성기름의 지방산조성

실험 식이에 첨가한 옥수수유, 녹차씨유, 올리브유의 지방산 조성은 국가공인 시험 분석기관 (식품의약품안전청 인증 20호)인 유니푸드테크(주)에 의뢰하여 분석하였으며 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

Table 2. Fatty acid composition of the oils used(%)

Fatty acid	Corn oil	Green tea seed oil	Olive oil
C16:0	5.7	16.8	10.1
C16:1, <i>cis</i> -9	- ¹⁾	-	0.6
C18:0	1.7	1.4	3.2
C18:1, <i>cis</i> -9	23.0	53.9	78.7
C18:1, <i>trans</i> -9	0.8	-	6.4
C18:2, <i>cis</i> -9,12	61.4	26.9	-
C18:2, <i>trans</i> -9,12	0.4	-	-
C18:3, <i>cis</i> -9,12,15	6.0	-	0.5
C20:0	0.4	1.0	0.5
C21:0	0.06	-	-
C22:0	-	-	-

¹⁾ Not detected.

3) 식이 조성

본 실험에서 사용한 식이는 고콜레스테롤 함유 식이를 이용하였으며, 옥수수유, 녹차씨유, 올리브유를 각각 첨가하여 에너지 수준이 동일하게 식이 (semipurified diet)를 조성하였다. 사료 100 g에 대하여 옥수수유, 녹차씨유, 올리브유 각 10%를 함유시킨 후, 옥수수유 5%와 1.25% 콜레스테롤을 각각의 식이에 혼합하고 냉동보관하면서 실험동물에게 급여하였으며 식이의 조성은 Table 3에 나타내었다. 사료에 사용한 mineral mixture, vitamin mixture, DL-methionine, choline bitartrate, sodium cholate는 ICN Biochemicals (ICN Aurora, ohio, USA) 제품을 이용하였고, 옥수수유는 시판 오뚜기 식용유를, 올리브유는 시판 미국산 extra verzin을 일반슈퍼에서 구입하여 사용하였으며 녹차씨유는 하동 화개제다(花開製茶)로부터 제공받은 녹차씨를 hexane처리하여 추출물을 정제한 후 농축하여 사용하였다. 녹차씨가루 1 kg에서 순수 녹차씨유 301.3 g이 추출되었다(약 30.13%).

Table 3. Composition of the experimental diets (%)

	Corn oil diet	Green tea seed oil diet	Olive oil diet
Casein	20	20	20
Sucrose	25	25	25
Corn starch	28.5	28.5	28.5
Fat			
corn oil	15	5	5
green tea seed oil	-	10	-
olive oil	-	-	10
Cholesterol	1.25	1.25	1.25
DL-methionine	0.3	0.3	0.3
Vitamin	1	1	1
Mineral	3.5	3.5	3.5
Cellulose	5	5	5
Sodium cholate	0.5	0.5	0.5
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
Total kcal	428	428	428

4) 시료채취

실험동물을 희생하기 2일전 대식세포의 활성화를 위해 복강에 4%의 thioglycollate를 주입하여 48시간 경과 후 4시간가량 절식시켰다. 그 후 ether를 이용한 호흡기 마취법으로 마취 후 안구로부터 헤파린이 처리된 모세관을 이용하여 혈액을 취하였다. phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4, filtered)를 이용하여 복강으로부터 대식세포를 수확하고 개복하였다. 간장은 적출하여 PBS로 씻은 다음 여과지로 물기를 제거하고 무게를 측정하여 액체 질소에 담근 후 -70°C 에서 보관하면서 실험에 이용하였다. 대식세포는 수확 즉시 4°C 에서 원심분리 ($500 \times g$, 5분) 후 cell count를 행하여 실험에 사용하였다.

5) 혈장 콜레스테롤 농도

3주 간격으로 안구에서 혈액을 취해 효소법에 의한 정량용 kit시약 (영동제약)으로 총 콜레스테롤 함량을 측정하였다. 각 시료 $5 \mu\text{l}$ 에 조제한 효소용액과 혼합한 반응시약 0.75 ml 을 첨가하여 혼합한 후 37°C water bath에서 5분간 반응시켜 발색시켰다. 시료대신 증류수로 대치한 blank를 대조로 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 콜레스테롤 표준용액 ($300 \text{ mg} / \text{dl}$)을 농도별로 희석하여 사용하였다.

6) 간조직의 항산화능

간의 항산화능은 Ohkawa 등의 방법을 다소 수정하여 TBARS 함량으로 측정하였다. 간 0.1 g 을 125 mM KCl이 함유된 50 mM HEPES buffer 1 ml 로 균질화시킨 후 시료 $150 \mu\text{l}$ 와 $50 \mu\text{l}$ H_2O 혼합용액을 37°C 에서 60분간 incubation 시키고 0.4% TBA, 15% TCA, 그리고 2.5% HCl을 혼합한 TBARS 용액을 $400 \mu\text{l}$ 가한 후 95°C 수조에서 60분간 반응시켰다. 찬물에서 완전히 식혀서 $4,000 \text{ rpm}$ 에서 10분간 원심분리하였고, 분리된 상층액을 취하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준으로는 1,1,3,3-TMP를 사용하였으며 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 MDA의 양으로 환산하였다.

7) Prostaglandin E_2 , Leukotriene B_4 , TNF- α 농도

분리된 혈장과 대식세포의 prostaglandin E_2 (PRN222, Amersham Biosciences, UK), leukotriene B_4 (PRN223, Amersham Biosciences, UK), TNF- α , MTA00, R&D, USA)의 생성정도는 enzymeimmunoassay법에 의한 kit를 이용하여 측정하

였다.

8) Nitric Oxide 생성량

Nitric oxide (NO) 생성 정도는 Green 등(21)의 방법으로 혈장과 24 well plate에 부착시킨 대식세포 (8×10^5 cells/well) 배양액에 생성된 nitrite 양을 측정하여 결정하였다. $100 \mu\text{l}$ 의 혈장과 대식세포 배양액의 상등액 각각에 $50 \mu\text{l}$ 의 1% sulphanilamide (in 5% phosphoric acid)와 $50 \mu\text{l}$ 의 0.1% naphthylenediamine dihydrochloride을 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 NaNO_2 를 농도별 (0.5~100 M)로 조제하여 사용하였다.

다. 녹차씨 추출물의 C57BL/6 mice에서 항산화·항염증 효과

1) 녹차씨 추출물의 조제

경남하동 소재 화개제다(花開製茶)로부터 유기농 녹차씨를 2004년 11월에 공급받아 외피를 제거하여 정선하여 세척한 후 $60 \pm 5^\circ\text{C}$ 의 열풍건조기에서 건조하여 주정 및 열수의 2가지 추출물을 조제하였다. 추출물 제조는 약 40~50 mesh의 입자 크기로 분쇄하여 사용하였으며 주정 추출물은 고려식료로부터 제공받은 주정을 시료 1kg에 10배를 가해 $80 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서, 열수 추출물은 시료 1kg에 10배의 증류수를 가해 $100 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 환류냉각관을 부착하여 4시간 동안 추출하여 여과지(Whatman 42)를 사용하여 감압여과한 후 동결 건조하였다. 녹차씨 추출물의 회수율은 주정 추출물이 12.8%, 열수 추출물이 22.8%였다.

2) 실험동물관리, 식이조성 및 식이효율

6주령의 C57BL/6 mice중 수컷 50수를 2주간의 적응기를 거쳐, 평균 체중 22.3g인 실험동물을 완전임의배치로 한 군당 10수씩 5군으로 나누어 plastic cage에서 사육하였다. 사육실의 온도는 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며 명암은 12시간 간격으로 짐등 및 소등하였다. 실험 식이는 atherogenic diet(control)에 녹차씨 주정 추출물과 물 추출물의 회수율(주정 추출물이 12.8%, 열수 추출물이 22.8%)로 녹차씨 5%와 10%에 해당하는 주정 녹차씨 추출물을 0.64%와 1.28%를, 물 추출물을 1.14%와 2.28%를 첨가한 실험 식이를 6주간 급여하면서 사육하였다. 식이조성은 Table 4와 같은 조성으로 혼합한 후 pellet화하여 급여하였으며 식이 제조에 사용한 vitamin

mixture와 mineral mixture(AIN-76A), α -cellulose, vitamin free casein, cholesterol, DL-methionine, choline bitartrate와 sodium cholate 등은 ICN Biochemicals (ICN Aurora, ohio, USA), cocoa butter (선인) 제품을 사용하였다. 옥수수 전분(두산), 옥수수유(제일제당) 제품을 사용하였다. 실험 식이와 물은 자유 섭취방법(ad libitum)으로 급여하였으며 실험동물의 식이섭취량과 체중은 각각 1주일에 2회와 1회씩 정기적으로 측정하였다. 모든 실험결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며 일원배치분산분석으로 비교하여 Duncan 다중범위 분석에 의해 각 실험군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 에서 검정하였다.

Table 4. Composition of the experimental diets (g/kg)

	Group ⁴⁾				
	Control	AE I	AE II	HWE I	HWE II
Casein ¹⁾	200	200	200	200	200
Sucrose	400	400	400	400	400
Corn starch	120	113.6	107.2	108.6	97.2
Cocoa butter	80	80	80	80	80
Corn oil	80	80	80	80	80
Cholesterol	12	12	12	12	12
Sodium cholate	5	5	5	5	5
α -Cellulose	50	50	50	50	50
Vitamin mixture ²⁾	10	10	10	10	10
Mineral mixture ³⁾	35	35	35	35	35
DL-methionine	6	6	6	6	6
Choline bitartrate	2	2	2	2	2
AE of Green tea seed	-	6.4	12.8	-	-
HWE of Green tea seed	-	-	-	11.4	22.8

¹⁾ Casein(vitamin free); ICN ²⁾ Vitamin mixture; AIN-76A ³⁾ Mineral mixture; ICN ⁴⁾Control; fed atherogenic diet AE I; fed atherogenic diet and 0.64% alcohol extract AE II; fed atherogenic diet and 1.28% alcohol extract HWE I; fed atherogenic diet and 1.14% hot water extract HWE II; fed atherogenic diet and 2.28% hot water extract

3) 혈청의 지질농도 및 지질과산화 정도

실험 종료 전 실험동물을 하룻밤 절식시킨 후 dry ice로 마취시킨 후 희생하였다. 혈액은 실험동물을 6주간 사육하면서 3주 간격으로 채혈 6시간 전에 금식시켜 물만 급여한 후 mouse의 안와정맥으로부터 혈액을 취하였다. 채취된 혈액은 3,000rpm에서 20분 간 원심분리하여 분리된 혈청을 -20°C 에서 냉동 보관하면서 6주간의 총 콜레스테롤 농도, HDL-과 TG 농도 변화를 효소법에 의한 정량용 kit (영동제약) 사용하여 표준곡선에 대입하여 각각의 농도를 분석하였으며 LDL-콜레스테롤 농도는 Freidch의 공식에 대입하여 환산하였다. TBARS 농도를 분석하여 지질과산화 정도를 확인하였다. TBARS 함량은 Buege와 Aust에 의한 방법을 다소 수정하여 측정하였다. 즉, 0.4% TBA, 15% TCA, 그리고 2.5% HCl을 혼합한 TBARS 용액을 만든 후, 혈장 $20\mu\text{l}$ 에 $180\mu\text{l}$ 의 증류수를 혼합하여 전체 부피를 $200\mu\text{l}$ 로 조정하여 37°C 에서 1시간 예온하였다. 여기에 TBARS 용액을 $400\mu\text{l}$ 를 가하여 혼합하여 90°C 에서 20분간 가열하여 식힌 후 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준으로는 1,1,3,3-TMP를 사용하였으며 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 MDA의 양으로 환산하였다.

4) 복강 대식세포의 SOD 활성

복강의 대식세포 분리하는 희생 48시간 전에 4% thioglycollate를 주입하여 Hank's solution(pH 7.4)을 사용하여 혈액 채취 후 즉시 복강의 macrophage 수확한 후 SOD 활성을 측정하였다.

5) 간의 지질농도 및 항산화 효소계 활성

간장과 동맥을 적출하였다. 간장은 부착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 후 생리식염수(0.9% NaCl)로 세척하여 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 제거하고 -70°C 에서 보관하며 간의 지질농도와 항산화 효소계 활성을 측정에 사용하였다.

가) 간의 총 지방 함량 및 지질농도

간의 지방은 Folch 등의 방법을 다소 수정하여 추출하여 chloroform으로 10ml이 되도록 정용하여 실험에 사용하였다. 총 지방 함량은 간의 지방 추출액 5ml을 항량 접시에 넣어 hot plate에서 휘발시킨 후 dry oven에서 20분 건조 후 무게를 측

정하였다. 총 콜레스테롤 함량은 효소법에 의한 정량용 kit 시약(영동제약)으로 측정하였다. 간 지질 추출액 0.1ml씩 취하여 비등수 중에서 용매를 모두 휘발시킨 후 에탄올 0.2ml에 용해하였다. 반응액과의 혼탁을 방지하기 위하여 triton X-100을 0.5ml 첨가한 콜레스테롤 완충액에 효소시약을 용해시킨 반응시약을 3ml 넣고 혼합한 후 37°C 수조에서 5분 간 반응시킨 후 발색시켰다. 이 반응액 중 시료용액을 증류수로 대치한 blank를 대조로 하고, 각 시료에 반응시약을 넣지 않은 대조군도 함께 500nm에서 흡광도를 측정하여 시약과 시료의 혼탁에 의한 흡광도를 배제하였다. 콜레스테롤 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 흡광도를 측정한 후 시료의 흡광도 값을 대입하여 총 콜레스테롤 함량을 측정하였다. TG 함량과 HDL-콜레스테롤 함량도 영동제약 kit를 사용하여 동일한 방법으로 분석하였다.

나) 항산화효소계 활성

- (1) Cu,Zn-SOD와 Mn-SOD 활성은 Marklund와 Marklunds의 방법으로 측정하였다.
- (2) Catalase 활성은 Aebi 법을 다소 수정하여 측정하였다. 즉, 혈장에 50mM phosphate buffer(pH 7.0)를 가하였다. 여기에 30mM H₂O₂ 용액을 가하여 240nm에서 10초 간격으로 2분간 흡광도 변화를 측정하였다. 효소의 활성은 1분 동안 1μmole의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1unit로 하였다.
- (3) SOD 활성은 pyrogallol의 자동산화로 측정하였다. 96 well plate에 혈장과 1.1mM DTPA (diethylene triamine pentacetic acid)를 가하였다. 여기에 50μl of 6mM pyrogallol을 첨가하여 405nm에서 2분간 10초 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. SOD 활성 1unit은 pyrogallol의 산화를 50%까지 저해하는 효소의 양으로 나타내었다.
- (4) GSH-px 활성은 Lawrence과 Burk의 방법을 다소 수정하여 측정하였다. 혈장에 reaction mixture를 가한다. 2.5mM H₂O₂를 가한 즉시 340nm에서 2분 동안 10초 간격으로 흡광도 변화를 측정한다. GSH-px 활성 1unit은 1분당 1nmole의 NADPH가 산화되는 효소의 양으로 나타내었다.
- (5) GSH-reductase 활성은 Inger와 Bengt의 방법으로 측정하였다. 96-well plate에 혈장을 넣고 reaction mixture 를 가한 즉시 340nm에서 2분간 10초 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. Glutathione reductase 1unit은 1분 동안

1nmole의 NADPH 환원을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였다.

다) 단백질 농도는 Bradford 방법으로 측정하였다.

6) 동맥조직에서 VCAM-1과 eNOS의 mRNA gene expression

동맥조직은 부착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 후 생리식염수(0.9% NaCl)로 세척하여 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 제거하여 동맥조직에서의 세포부착물질의 발현 정도를 RT-PCR로 확인하였다. 총 RNA는 Tri-reagent (Molecular Research Center, Inc.)로 추출하고 2 μ g의 total RNA를 M-MLV를 이용하여 first strand cDNA를 만든다. 1/10 diluted first strand cDNA 2 μ l, 10 \times Buffer II 5 μ l, 각각 2.5 mM의 dNTPs mixture 4 μ l, 각각 10 mM의 primer set 1 μ l에 Taq DNA polymerase 0.4 μ l (2 U)을 넣은 후 최종 부피가 50 μ l 되도록 맞추는 다음 thermocycler(Eppendorf Gradient PCR System)로 PCR을 수행한다. eNOS와 VCAM-1, GAPDH의 primer sequence는 다음과 같다. eNOS의 primer는 5'-AGC GGT GGA AAT TAA GTT TGT GC-3'(sense)와 5'-GTT GTA CCG GCC GAG TGA CAT ATT-3'(anti-sense)이며 VCAM-1의 primer는 5'-ACA GAC AGT CCC CTC AAT GC-3'(sense)와 5'-AGC TGT CTG CTC CAC AGG AT-3'(anti-sense)이며 GAPDH의 primer는 5'-ACC TGC CAA GTA TGA TGA CAT-3'(sense)와 5'-CCT GTT ATT ATG GGG GTC TG-3'(anti-sense)를 사용하였으며 PCR products의 기대되는 크기는 100bp (eNOS, VCAM-1, GAPDH)였다. Amplification profile은 eNOS와 VCAM-1 및 GAPDH는 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 initial step을 수행 후 94 $^{\circ}$ C에서 60 초간 denaturation을 하였다. 각각의 annealing 온도는 eNOS와 VCAM-1은 52 $^{\circ}$ C에서 1분, GAPDH는 45 $^{\circ}$ C에서 1분 간 annealing, eNOS와 VCAM-1은 35 cycle을, GAPDH는 30 cycle을 수행하고 최종 cycle에서는 eNOS와 VCAM-1 및 GAPDH는 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간 더 연장한 후 soaking step으로 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. PCR 결과는 1.5% metaphor agarose (Biowhittaker Molecular applications) gel에 PCR product 5 μ l과 loading dye 1 μ l을 잘 섞은 후 loading 하고 50V에서 60분간 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하고 polaroid camera로 촬영하여 목표 유전자의 발현을 확인하였다. mRNA 수준은 GAPDH와의 ratio로서 표시하였다.

제 2 절 실험결과 및 고찰

1. 녹차씨유 추출조건 확립

압착한 녹차씨유와 n-hexane으로 추출하여 얻은 용매추출유의 형상은 Fig. 2에서 보는 바와 같으며 각각의 방법에서 얻어진 기름의 회수율은 Table 3과 같다. 볶음 처리 하지 않고 증숙하여 추출한 압착유(GS)는 약 9.5%의 회수율을 보였으며 볶음과 증숙을 실시한 압착유(GRS)는 약 15.0%의 회수율을 보여 볶음 처리를 한 압착 방법에서의 회수율이 높음을 알 수 있었다. 녹차씨 2,900g을 n-hexane으로 24h 추출한 용매 추출유는 828.9g의 녹차씨유를 얻어 회수율은 총 무게의 28.6%였다. 용매 추출유에 비해 상대적으로 압착유의 회수율이 낮은 것은 압착과정에서 손실되는 유지의 양이 많기 때문으로 사료된다.

Table 5. Yield of green tea seed oils extracted with different methods

Treatment ¹⁾	Yield(%)
Pressing extraction oil	
GS	9.5
GRS	15.0
Solvent extraction oil	
n-Hexane	28.6

¹⁾GS: Grinding and steaming GRS: Grinding, roasting and steaming

Solvent extraction oil: Oil extracted with n-hexane for 24 hour at room temperature



Fig. 2. Appearance of green tea seed oils extracted with different methods
Refer to Table 5

2. 추출조건에 따른 녹차씨유의 물리화학적 특성 및 저장안정성 규명

가. 녹차씨유의 지방산 조성

지방산 조성은 Table 6과 같다. C18:1이 GS (41.01%), GRS (41.06%), n-hexane 추출유가 42.17%의 수준으로 다른 지방산에 비해 높은 수준을 보였다. C18:3은 GRS에서 2.78%로 현저하게 높은 반면 GS는 0.52% 수준이었다. 처리방법에 따라 지방산 조성에서 조금 차이를 보였으며 불포화지방산의 함량은 GRS가 67.7% GS가 66.8%, 용매추출유가 64.4%로 GRS가 가장 높은 수준이었으며 P/M/S 비를 보면 GS(0.73/1.28/1), GRS(0.78/1.31/1), 용매추출유(0.60/1.21/1)로 GRS가 다가 및 단일불포화지방산 비가 다른 처리유에 비해 조금 높게 나타났다. 이러한 결과는 지방의 추출을 위한 처리방법과 지방산 조성에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 본 연구에서는 C18:1이 41.0~42.2%로 가장 높은 수준이었고 C16:0이 25.5~30.0%, C18:2이 19.5~23.7% 범위로 나타났으며 대량의 녹차씨유 추출을 위해 녹차씨앗의 내피 제거를 하지 않고 추출하였기 때문에 나타난 결과로 사료된다.

Table 6. Fatty acid composition of green tea seed oils extracted with different methods by GC (% methylation)

Fatty acid	Treatment ²⁾		
	GS	GRS	n-Hexane
C14:0	0.19	0.13	0.15
C15:0	0.05	0.07	-
C16:0	25.69	25.52	30.00
C16:1	- ¹⁾	0.12	-
C17:0	0.31	0.25	0.18
C17:1	0.08	-	-
C18:0	6.53	6.04	4.97
C18:1	41.01	41.06	42.17
C18:2	23.72	22.28	19.52
C18:3	0.52	2.78	1.60
C20:0	0.22	0.18	0.20
C20:1	1.29	0.96	0.89
C22:0	0.14	0.08	0.13
C22:1	-	0.09	-
C22:2	-	0.26	-
C24:0	0.11	0.09	-
C24:1	0.13	0.10	-
C22:2	-	-	0.21
SFA ³⁾	33.2	32.3	35.6
UFA	66.8	67.7	64.4
P/M/S	0.73/1.28/1	0.78/1.31/1	0.60/1.21/1

¹⁾Not detected ²⁾GS: Grinding and steaming GRS: Grinding, roasting and steaming n-Hexane: Oil extracted with n-hexane for 24 hour at room temperature ³⁾SFA: Saturated fatty acid, UFA: Unsaturated fatty acid, P/M/S: Polyunsaturated fatty acid/ monounsaturated fatty acid/ saturated fatty acid

나. 녹차씨유의 물리적·이화학적 특성

1) 추출조건에 따른 물리적 특성

추출조건에 따른 녹차씨유의 물리적 특성은 Table 7과 같다. 녹차씨유의 비중은 GS가 0.91로 가장 낮은 수준을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 굴절률은 GS가 1.468, GRS가 1.469, 용매추출유가 1.458이었다. 추출조건에 따른 녹차씨유의 색도는 명도(L값)이 용매 추출유가 가장 밝았으며 GS처리를 한 압착유보다 GRS처리를 한 압착유의 밝기가 조금 더 어두운 것으로 나타났다. 적색도를 나타내는 a값은 GRS처리를 압착유가 가장 높게 나타났으며 황색의 정도를 나타내는 b값은 GS 처리군이 가장 높았다.

Table 7. Physical characteristics of green tea seed oils extracted with different methods

Treatment ³⁾	Fat content(%)	Specific gravity	Refractive index	Color Value		
				L*	a*	b*
GS	99.92±0.00	0.91±0.00 ^{1)NS}	1.468	87.0±0.30 ^{b2)}	-5.30±0.01 ^b	138.02±0.04 ^c
GRS	99.97±0.00	0.92±0.00	1.469	84.0±0.29 ^a	-2.52±0.01 ^c	134.22±0.01 ^a
n-Hexane	98.30±0.04	0.93±0.01	1.458	90.7±0.05 ^c	-7.96±0.04 ^a	145.19±0.08 ^b

¹⁾Mean±S.E ²⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05 ³⁾Refer to Table 5

2) 녹차씨유의 이화학적인 특성

이화학적인 특성은 Table 8에서 보듯이 요오드가(IV)는 GS가 60.3, GRS가 60.4 이었고, 용매추출유가 55.0으로 불건성유로 나타났다. 비비누화물의 함량은 GS가 2.11%로 가장 높은 수준이었고 GRS와 용매추출유가 둘 다 1.54% 수준이었다. 산가는 GRS가 3.62 mgKOH/g으로 가장 높게 나타났으며 용매추출유가 가장 낮은 수준을 보였다. 추출과정에서 볶음처리 과정이 산가에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 추출유 중 유리지방산 함량은 올레산으로 보고 계산한 값은 GRS 압착유가 1.81%, GS 압착유가 1.57%, 용매 추출유가 0.7%의 수준이었다. POV는 GS에서 13.08 mEq/kg 수준으로 가장 낮았으나 GRS가 20.64 mEq/kg 수준으로 3종의 추출유 중에서 가장 높은 수준을 보였다.

Table 8. Chemical characteristics of green tea seed oils extracted with different methods

Treatment ³⁾	IV ⁴⁾	Unsaponifiable matter(%)	AV (mgKOH/g)	POV (mEq/kg)	TBA (O.D.530nm)	FFA (%)
GS	60.3±0.001 ^{b2)}	2.11	3.15±0.13 ^b	13.08±0.25 ^{NS}	0.30±0.03 ^{NS}	1.57±0.06 ^b
GRS	60.4±0.19 ^b	1.54	3.62±0.04 ^c	20.64±2.89	0.29±0.00	1.81±0.00 ^c
n-Hexane	55.0±0.00 ^a	1.54	1.41±0.00 ^a	19.47±0.36	0.28±0.02	0.70±0.01 ^a

^{1),2),3)}Refer to Table 1 ⁴⁾IV: Iodine value AV: Acid value POV: Peroxide value

TBA: Thiobarbituric acid value FFA: Free fatty acid as oleic acid NS: Not significant

3) 총 phenol 함량

항산화능과 관련이 있는 총 phenol 함량은 지방 100g 당 GRS가 3종의 추출 녹차씨유 중 chlorogenic acid (13.7mg)와 caffeic acid(17.0mg)이 가장 높은 수준이었다(Table 9).

Table 9. Content of total phenolics of green tea seed oils extracted with different methods

Treatment ²⁾	Chlorogenic acid (mg/g)	Caffeic acid (mg/g)
GS	13.3±0.30 ^{1)NS}	16.6±0.34 ^{NS}
GRS	13.7±0.05	17.0±0.05
n-Hexane	12.3±0.16	15.5±0.18

^{1),2)}Refer to Table 5 NS: Not significant

다. 관능평가

녹차씨 추출유 3종의 관능평가를 실시한 결과는 Table 10에서 보는 바와 같다. 구수한 냄새는 GRS 압착유가 3종의 녹차씨유 중 가장 현저하게 높은 평가를 받았으나 용매 추출유는 아주 나쁨에 가까운 평가를 받았다. 풀냄새와 쓴맛 역시 GS와 GRS 압착유가 상대적으로 낮은 점수를 받은 반면 용매 추출유는 쓴맛이 특히 강한 것으로 나타났다. 밝은 정도는 용매추출유가 가장 높았으며 GRS와 GS가 다소 낮은 점수를 받았으나 유의성은 없었다. 구수한 냄새, 풀냄새, 쓴맛, 밝기 등으로 3종의 녹차씨유를 비교한 전체적인 수용도는 GRS 압착유가 가장 좋은 것으로 나타났고 그 다음이 GS 압착유로 용매추출유가 가장 낮은 점수를 나타내었다. 관능평가에서 GRS 압착유가 가장 바람직한 것으로 평가되었다.

Table 10. Sensory characteristics of green tea seed oils extracted with different methods

Treatment ¹⁾	Savor	Grassiness	Bitterness	Lightness	Overall acceptance
GS	4.20±0.49 ^{2)b3)}	4.20±0.36 ^{NS}	3.67±0.41 ^{NS}	3.80±0.39 ^a	4.40±0.34 ^b
GRS	6.10±0.41 ^c	3.60±0.40	3.56±0.41	3.50±0.37 ^a	5.60±0.31 ^c
n-Hexane	1.50±0.17 ^a	4.60±0.72	5.11±0.70	5.90±0.38 ^b	2.40±0.27 ^a

^{1),2),3)}Refer to Table 5 NS: Not significant

라. 녹차씨유의 저장기간에 따른 향산화능

저장기간에 따른 녹차씨유의 AV는 Fig. 3에서 보듯이 용매추출유가 저장기간에 따른 증가가 가장 낮은 수준이었으며 GS의 경우 저장기간 4일 동안은 GRS보다 낮은 수준을 보였으나 저장기간 8일부터는 GRS보다 높은 수준이었다.

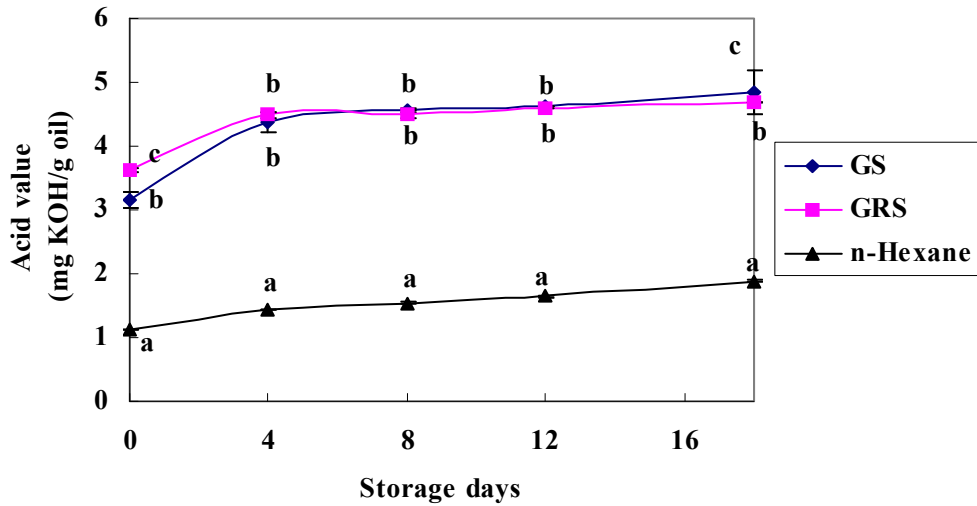


Fig. 3. Changes of acid value of green tea seed oils extracted with different methods during storage at 60°C.

Data represent the means±SE, each values being the mean of triplicate assays. Values sharing same superscript are not significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range at $p < 0.05$. Refer to Table 5.

유지의 과산화물의 생성 속도(Fig. 4)는 유지의 이중결합 정도와 산화방지 물질에 따라 차이가 나며 GRS의 18일 저장기간 동안 증가가 다른 추출유에 비해 현저하게 저하되었으나 용매 추출유는 12일 이후에는 급격하게 증가하는 경향을 보였다.

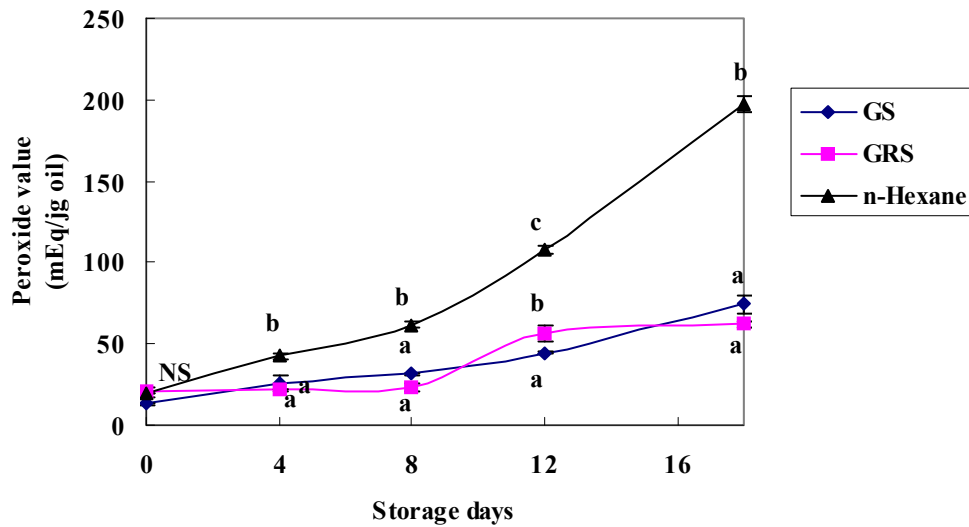


Fig. 4. Changes of peroxide value of green tea seed oils extracted with different methods during storage at 60°C. NS ; Not significant Refer to Fig. 3

TBA가 GS가 저장 4일부터 다른 추출유에 비해 상대적으로 높은 증가를 보였으며 8일부터는 현저하게 높은 수준이었다(Fig. 5). 올레산을 기준으로 하여 측정한 free fatty acids 함량 (%)은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 용매 추출유가 가장 낮은 수준을 보였다.

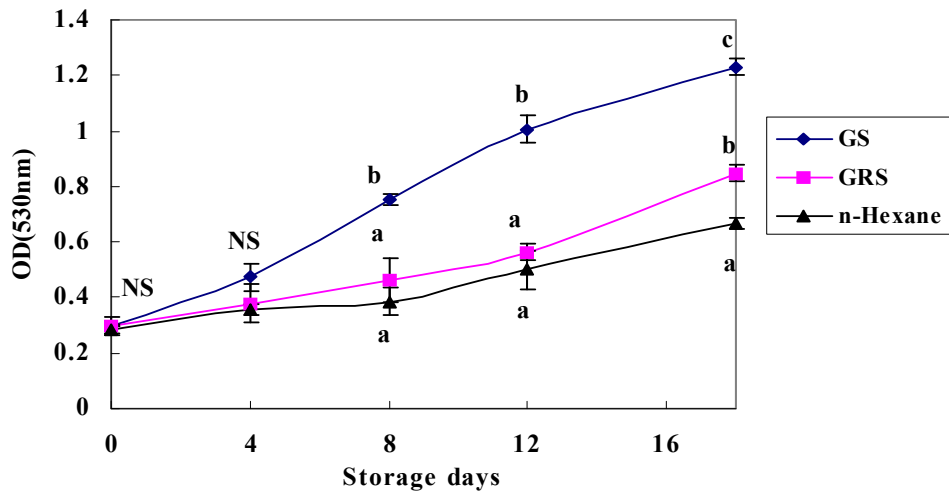


Fig. 5. Changes of thiobarbituric acid of green tea seed oils extracted with different methods during storage at 60°C. NS ; Not significant Refer to Fig. 3.

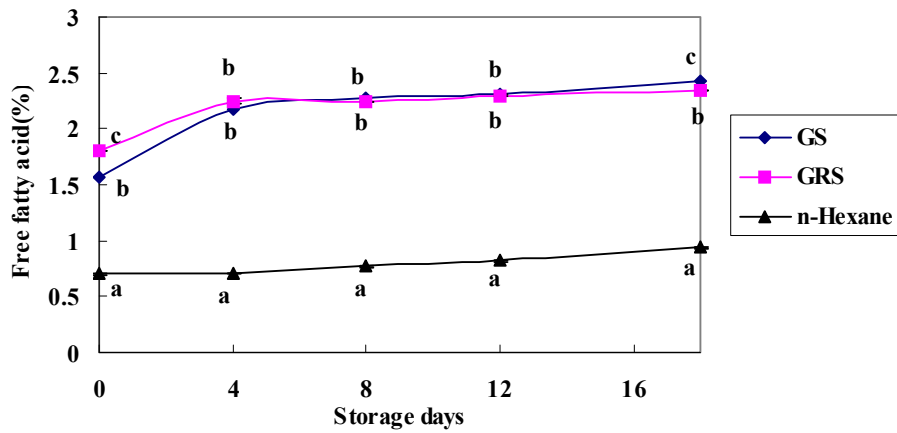


Fig. 6. Changes of free fatty acid of green tea seed oils extracted with different methods during storage at 60°C. Refer to Fig. 3

18일 저장 기간 동안 추출조건에 따른 녹차씨유의 색도 변화는 Fig. 7와 8에서 보는 바와 같다. 색차($\Delta E^* ab$)의 값이 6.0이상이면 극히 현저한 차이가 있는 것으로 판단하며 12이상이면 다른 계통의 색으로 결정한다. 색차의 변화는 GRS에서 가장 낮았으나 8일 이후에는 급격하게 차이를 보이는 것으로 나타났다.

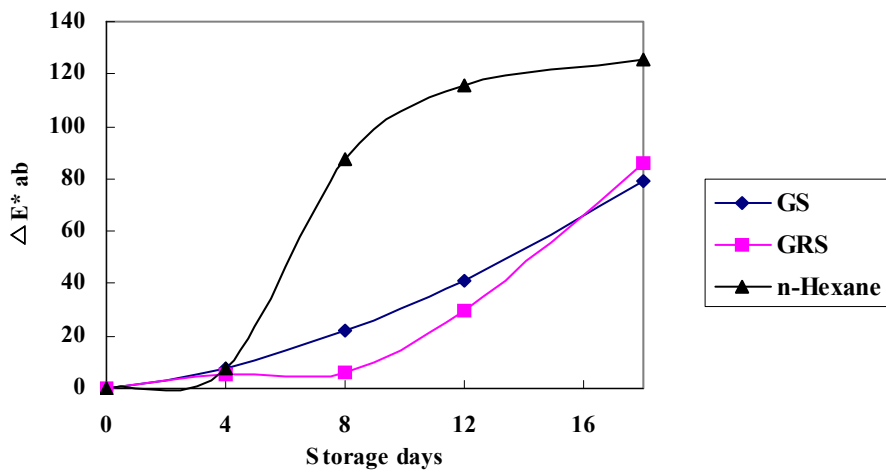


Fig. 7. Changes of Hunter color value of green tea seed oils extracted with different methods during storage at 60°C.

$$\Delta E^* ab = \{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\}^{0.5} \quad \text{Refer to Fig. 3}$$

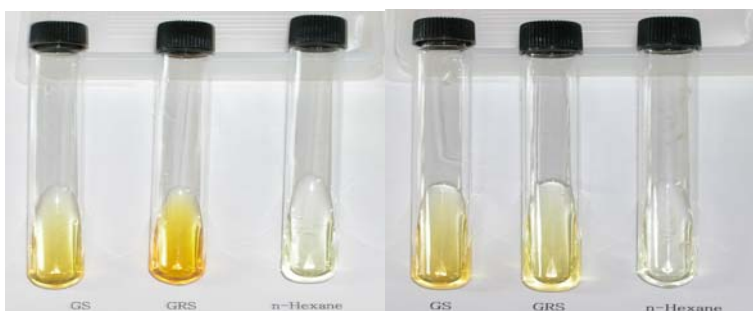


0 day



4 days

8 days



12 days

18 days

Fig. 8. Changes of color of green tea seed oils extracted with different methods during storage at 60°C. Refer to Table 5

3. 녹차씨 분획물의 RAW 264. 7 cell line에서의 항산화 · 항염증 효과

가. 세포 생존률

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264. 7 cell에 녹차씨 메타놀 추출물과 탈지 녹차씨 메타놀 추출물을 농도별로 처리하였을 때 세포 생존률을 Fig. 9에 나타내었다. 그 결과 녹차씨 메타놀 추출물과 탈지 녹차씨 메타놀 추출물 모두에서 DMSO와 LPS를 처리한 positive control군의 세포 생존률과 비교하여 negative control군, 녹차씨 추출물군 모두 세포 생존률에 유의적인 차이가 없었으며, 이는 녹차씨 추출물이 세포 독성을 야기시키지 않음을 나타낸다.

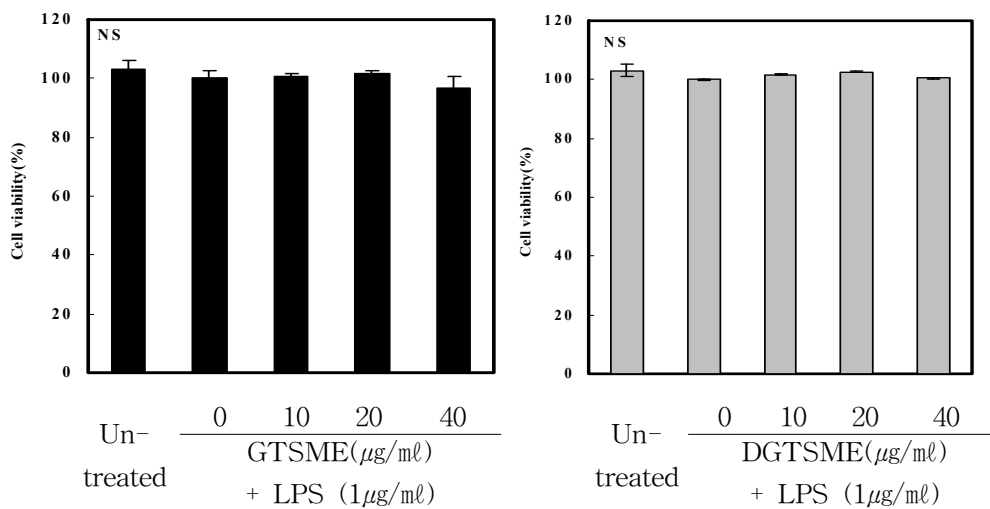


Fig. 9. Effects of green tea seed methanol extract (GTSME, left) and defatted green tea seed methanol extract (DGTSME, right) on cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Untreated is negative control without LPS treatment, while control is positive control treated with LPS. Data represent the mean±S.D. of triplicate experiments. One-way ANOVA and Duncan's multiple range test was used to examine the difference between groups ($p<0.05$).

나. NO 생성량

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 cell에서 녹차씨 메타놀 추출물과 탈지 녹차씨 메타놀 추출물이 NO 생성에 미치는 영향을 확인한 결과 산화적 스트레스 유발 상황에서 녹차씨 메타놀 추출물과 탈지 녹차씨 메타놀 추출물은 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하였고, 이때 IC₅₀ 값은 각각 28.7, 39.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다(Fig. 10).

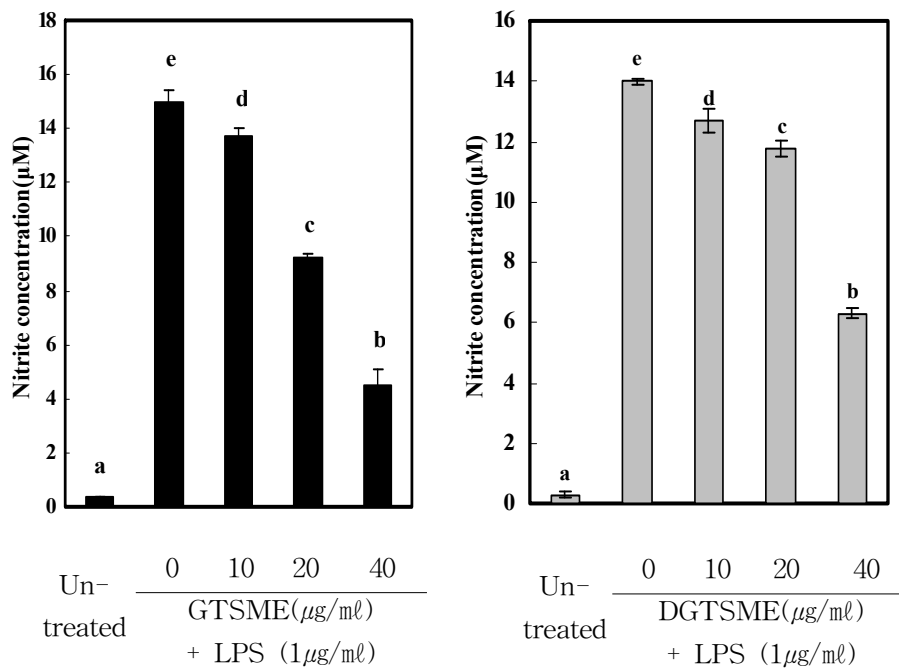


Fig. 10. Effects of GTSME and DGTSME on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Refer to Fig. 9.

다. 지질 과산화 정도

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 cell에서 녹차씨 메타놀 추출물과 탈지 녹차씨 메타놀 추출물이 지질 과산화 정도에 미치는 영향을 TBARS 농도로 분석하였으며 그 결과 녹차씨 메타놀 추출물과 탈지 녹차씨 메타놀 추출물을 처리한 군에서 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도 의존적으로 TBARS 생성이 감소하였고(Fig. 11), 이는 녹차씨 추출물 처리가 지질 과산화를 억제하는 것으로 보여진다.

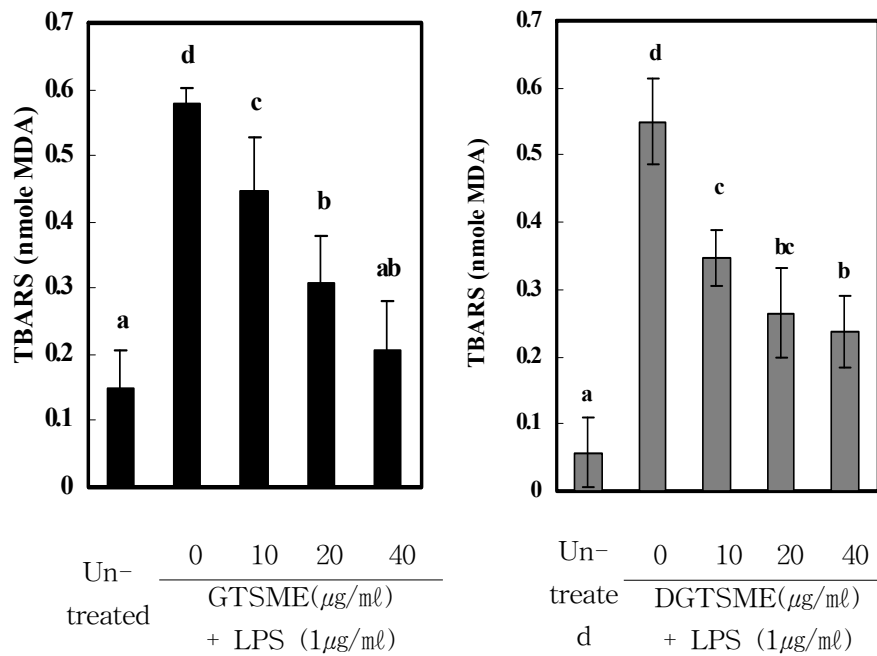


Fig. 11. Effects of GTSME and DGTSME on TBARS generation in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Refer to Fig. 9.

라. Glutathione(GSH) 함량

LPS로 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264.7 cell에서 녹차씨 메타놀 추출물과 탈지 녹차씨 메타놀 추출물이 GSH 함량에 미치는 영향은 녹차씨 메타놀 추출물을 처리한 군에서 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 유의적으로 GSH 함량이 증가하였고, 탈지 녹차씨 메타놀 추출물을 처리한 군에서는 control군에 비해 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 유사한 증가율을 보였으며 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의적으로 증가하였다(Fig. 12).

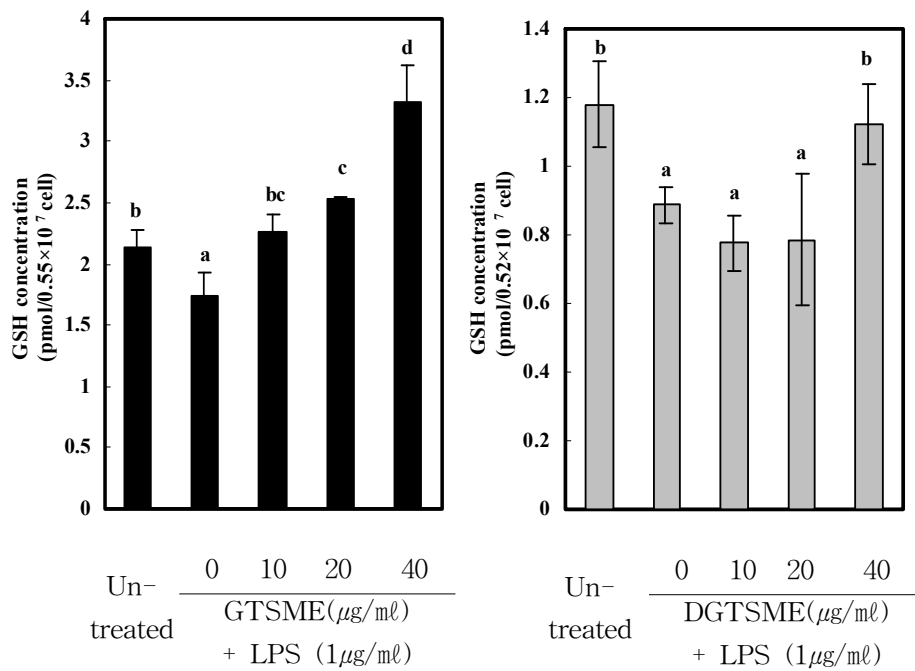


Fig. 12. Effects of GTSME and DGTSME on GSH concentration in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Refer to Fig. 9.

마. 항산화 효소 활성

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 cell에서 녹차씨 메타놀 추출물과 탈지 녹차씨 메타놀 추출물이 항산화 효소 활성에 미치는 영향은 녹차씨 메타놀 추출물을 처리한 군에서 SOD, GSH-px, GSH-reductase는 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도는 유사한 증가율을 보였으며 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의적으로 증가하였으며 탈지 녹차씨 메타놀 추출물을 처리한 군에서도 Catalase, SOD, GSH-px, GSH-reductase 함량이 대조군에 비해 증가하였고 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의적으로 증가하였다(Table 11).

Table 11. Effects of GTSME and DGTSM E on antioxidative enzyme activities in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages

	Untreated	GTSME, DGTSM E ($\mu\text{g}/\text{ml}$)+LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)				
		0	10	20	40	
Catalase ($\mu\text{mole}/\text{mg}$ protein min)	GTSME	1.62 \pm 0.18 ^{1)bz2)}	1.12 \pm 0.05 ^a	1.63 \pm 0.22 ^b	1.83 \pm 0.06 ^b	2.16 \pm 0.05 ^c
	DGTSM E	1.74 \pm 0.11 ^{bc}	1.5 \pm 0.06 ^a	1.67 \pm 0.06 ^{ab}	1.84 \pm 0.06 ^c	2.29 \pm 0.15 ^d
SOD ³⁾ (unit/mg protein)	GTSME	18.52 \pm 2.01 ^a	27.75 \pm 2.73 ^b	40.2 \pm 1.86 ^c	38.18 \pm 1.72 ^c	46.36 \pm 1.94 ^d
	DGTSM E	25.62 \pm 1.56 ^a	36.54 \pm 1.95 ^b	40.48 \pm 3.94 ^{cd}	37.67 ^{bc}	41.69 \pm 1.12 ^d
GSH-pX ⁴⁾ (unit/mg protein)	GTSME	4.02 \pm 0.18 ^a	4.96 \pm 0.31 ^b	5.99 \pm 0.18 ^c	5.98 \pm 0.47 ^c	6.46 \pm 0.19 ^d
	DGTSM E	3.95 \pm 0.33 ^a	5.56 \pm 0.19 ^b	5.94 \pm 0.34 ^b	6.35 \pm 0.18 ^c	6.67 \pm 0.21 ^c
GSH-reductase ⁵⁾ (unit/mg protein)	GTSME	16.24 \pm 0.67 ^c	13.6 \pm 1.21 ^a	14.73 \pm 0.56 ^b	17.64 \pm 0.5 ^d	19.16 \pm 0.86 ^e
	DGTSM E	15.38 \pm 0.51 ^c	12.83 \pm 0.15 ^a	13.81 \pm 0.51 ^b	13.38 \pm 0.76 ^{ab}	16.86 \pm 0.69 ^d

1)2) Refer to Table 5 ³⁾ Superoxide dismutase ⁴⁾ Glutathione peroxidase ⁵⁾ Glutathione reductase

바. iNOS의 발현

녹차씨 탈지 메타놀 추출물을 처리했을 때 $10\mu\text{g/ml}$ 에서 LPS에 의해 증가된 iNOS protein 발현을 저해하였고, 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 13)

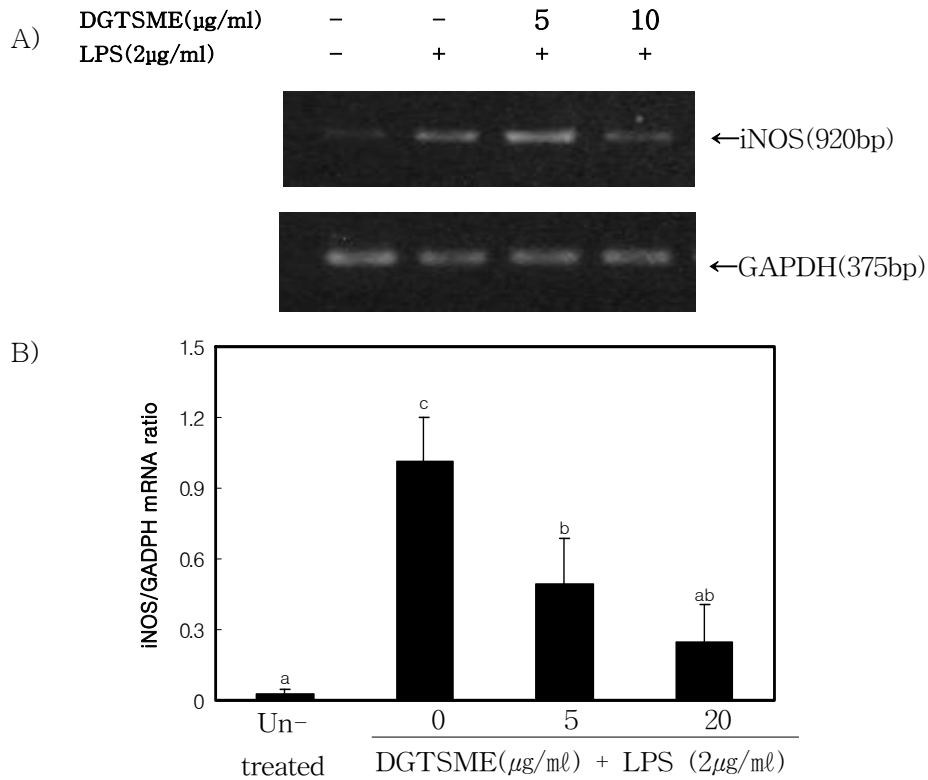


Fig. 13. Effects of DGTSME on iNOS mRNA in LPS-Stimulated RAW 264.7 cells. A) Levels of iNOS protein were measured by Western blot analysis using a monoclonal antibody for murine iNOS. The blot was rehybridized with antibody against GAPDH to verify equal loading of protein in each lane. GAPDH was used as an internal control. B) All signals were normalized to protein levels of the house keeping gene, GAPDH and expressed as a ratio. Refer to Fig. 9.

4. 녹차씨기름이 C57BL/6 mice에서 항산화·항염증 효과

가. 식이효율

콜레스테롤식이에 옥수수유, 녹차씨유, 올리브유를 각각 10%씩 첨가한 식이를 9주간 섭취시킨 C57BL/6 mice의 체중 증가량, 식이섭취량, 식이효율, 간 무게를 측정된 결과는 Table 12에서 보듯이 각 실험군 간의 체중의 변화는 올리브유군에서 가장 높았으며 옥수수유와 녹차씨유 간에는 차이가 없었으므로 녹차씨유의 섭취는 올리브유의 경우보다 체중증가를 감소시키기를 알 수 있었다. 식이 섭취량은 녹차씨유군에서 유의적으로 낮았으나 ($p < 0.05$) 군 간의 식이효율에는 유의적 차이가 없었다. 녹차씨유군에서의 체중감소는 다른 군에 비해 식이섭취량이 다소 낮은 수준에 기인한 것으로 사료된다.

나. 혈장 콜레스테롤 및 간 조직에서의 TBARS 농도

녹차씨유를 비롯한 식물유 첨가사료를 섭취시킨 쥐의 안구 혈액으로부터 3주마다 콜레스테롤 변화는 Fig. 14에 나타내었듯이 혈청의 콜레스테롤농도는 식이 섭취 6주까지는 모든 군에서 증가하였으나 6주에서의 증가 수준은 녹차씨유군이 옥수수유군에 비해 유의적으로 낮았으므로($p < 0.05$) 다른 식물성 유지보다 녹차씨유가 콜레스테롤 식이로 인한 혈청의 콜레스테롤 증가를 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 그런데 식이섭취 9주째에는 옥수수유군, 녹차씨유군, 올리브유군 간에 유의적 차이를 보이지 않았다.

간조직의 TBARS는 Fig. 15에서 볼 수 있듯이 옥수수유군에 비해 녹차씨유군과 올리브유군에서 유의적인 차이를 나타내며($p < 0.05$) 각각 68%, 77% 감소하는 것으로 나타났다. 녹차씨의 경우도 이상의 결과로 미루어 볼 때 현재 식용유로서 보편적으로 쓰이고 있는 옥수수유보다 혈청 콜레스테롤이나 간의 과산화물을 감소시키며 다른 식품에 사용되었을 때 지방의 산화를 지연시켜 식품의 질을 개선할 수도 있을 것으로 예측되었다.

Table 12. Effect of green tea seed oil supplementation on the weight gain, food intake, food efficiency and liver weight in C57BL/6 mice fed high cholesterol diet for 9 weeks

	Corn oil	Green tea seed oil	Olive oil
Body weight gain (g/week)	0.38±0.01 ^{1)a2)}	0.38±0.01 ^a	0.40±0.01 ^b
Food intake (g/week)	3.83±0.18 ^b	2.84±0.16 ^a	3.25±0.04 ^{ab}
Food efficiency (%) ⁴⁾	9.80±0.97 ^{NS3)}	13.21±0.97	12.15±0.83
Liver weight (g/g BW)	0.08±0.00 ^b	0.08±0.00 ^b	0.07±0.00 ^a

¹⁾Each value is the mean±SEM of 12 mice. ²⁾Means with different letters within a row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. ³⁾NS: not significant. ⁴⁾{Weight gain (g)/food intake (g)}×100.

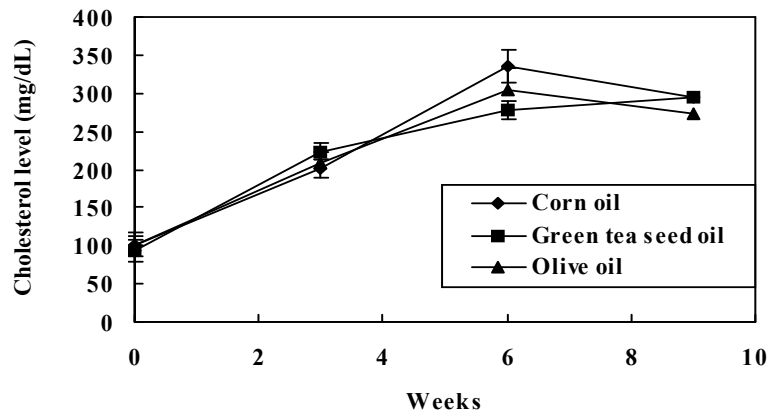


Fig. 14. Effect of green tea seed oil supplementation on plasma cholesterol level of C57BL/6 mice fed high cholesterol diets for 9 weeks. Refer to Table 12. Values within the same column with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Bar represent standard error of mean value.

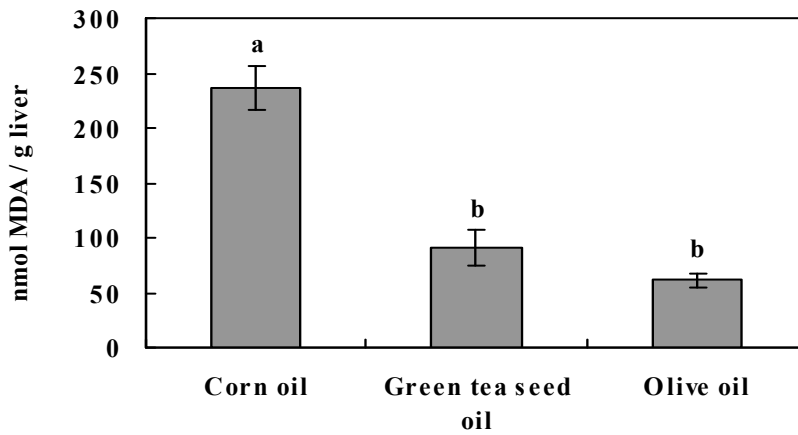


Fig. 15. Effect of green tea seed oil supplementation on hepatic TBARS of C57BL/6 mice fed high cholesterol diets for 9 weeks. Refer to Fig. 14.

다. 혈장의 염증반응인자에 미치는 영향

병원체나 내독소에 대응하는 염증반응은 생물체에 유익할 수 있으나 염증관련물질이나 cytokine들의 과도한 생성은 심각한 질환을 일으킬 수 있다. 또한 동맥경화는 최근 insulin내성과 상관되는 TNF- α 와 같은 cytokine과 관련하여 염증성의 질환으로 여겨지고 있다. 녹차씨유의 섭취가 혈장에서 이들 염증반응 시 주로 arachidonic acid로부터 생성되는 leukotriene B₄ (LTB₄)와 prostaglandin (PGE₂), 그리고 NO와 cytokine인 TNF- α 의 생성정도를 Table 13에 나타내었다. LTB₄, TNF- α , NO의 생성능은 녹차씨유에서 가장 낮은 경향을 보였는데 군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않아 녹차씨유는 옥수수수유나 다른 식물유와 비교하였을 때 이들 염증관련인자들에 대해 별 차이가 없음을 알 수 있었다.

Table 13. Effect of green tea seed oil supplementation on the inflammatory responses of C57BL/6 mice fed high cholesterol diet for 9 weeks

Dietary groups	Concentration			
	LTB ₄ (pg/well)	TNF- α (pg/mL)	PGE ₂ (pg/well)	NO (μ M)
Corn oil	3.50 \pm 0.06 ^{1)NS2)}	47.48 \pm 7.86 ^{NS}	6.59 \pm 0.06 ^{NS}	1.25 \pm 0.31 ^{NS}
Green tea seed oil	3.37 \pm 0.08	38.52 \pm 4.54	6.69 \pm 0.10	0.70 \pm 0.16
Olive oil	3.29 \pm 0.11	46.67 \pm 3.04	6.66 \pm 0.08	0.87 \pm 0.15

LTB₄, leukotriene B₄; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; PGE₂, prostaglandin E₂; NO, nitric oxide.

¹⁾Each value is the mean \pm SEM of 12 mice.

²⁾NS: not significant.

라. 대식세포의 염증반응인자에 미치는 영향

일반적으로 대식세포에서 LPS나 내독소(endotoxin)는 염증성의 cytokine인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 protein의 생성을 촉진시키나 역시 이들 cytokine들의 과다한 발현은 심각한 질환을 일으킬 수 있으므로 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성 억제에 염증반응에 의한 질환의 치료에 도움이 된다. 대식세포에서의 염증반응에서 생성되는 LTB₄와 PGE₂, TNF α 의 생성에 미치는 식물유섭취의 영향을 Table 14에 나타내었다. 녹차씨유를 섭취시킨 군에서 옥수수유를 섭취시킨 경우보다 이들 염증반응인자의 생성 정도가 다소 낮은 경향을 보였으나 실험군들 간에 유의적인 차이는 없어 혈장에서와 같이 대식세포에서도 염증반응인자에 대한 영향은 녹차씨유가 다른 식물성기름과 다르지 않는 경향을 나타내었다. 이와 같은 효과를 가지는 녹차의 종자유를 실험한 본 연구에서 나타난 혈장의 콜레스테롤 농도와 간조직의 TBARS값의 감소 효과는 녹차씨유의 체내에서 항동맥경화 효과의 가능성을 시사한다. 따라서 혈장과 대식세포의 염증반응인자에 대해서도 다른 식물성유와 다르지 않은 경향을 나타냈음을 볼 때 녹차씨유가 현재의 식생활에서 흔히 사용되고 있는 옥수수유나 올리브유와 같이 개발되어도 전혀 손색이 없을 것으로 생각되어진다.

Table 14. Effect of green tea seed oil supplementation on macrophage of C57BL/6 mice fed high cholesterol diet for 9 weeks

Dietary groups	Concentration		
	LTB ₄ (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	PGE ₂ (pg/mL)
Corn oil	0.34±0.07 ^{1)NS2)}	27.1±10.2 ^{NS}	4.98±0.22 ^{NS}
Green tea seed oil	0.32±0.03	25.7±10.6	4.96±0.33
Olive oil	0.35±0.01	22.9±4.0	4.99±0.10

LTB₄; leukotriene B₄ TNF- α ; tumor necrosis factor- α , PGE₂; prostaglandin E₂,

¹⁾Each value is the mean±SEM of 12 mice. ²⁾NS: not significant.

5. 녹차씨 추출물의 C57BL/6 mice에서의 항산화·항염증 효과

가. 식이효율

체중 증가량과 식이효율은 Table 15에서 보는 바와 같이 각 실험군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 15. Body weight, body weight gain, and food efficiency ratio in the experimental groups

Group ³⁾	Initial BW(g)	Final BW(g)	Weight gain (g/week)	Food intake (g/week)	FER ²⁾
Control	22.3±0.21 ^{1)NS}	25.3±0.35 ^{NS}	2.94±0.29 ^{NS}	14.5±0.43 ^{NS}	0.03±0.00 ^{NS}
AE I	22.4±0.16	24.8±0.16	2.45±0.14	14.0±0.62	0.03±0.00
AE II	22.3±0.30	25.0±0.33	2.93±0.47	15.9±0.68	0.03±0.00
HWE I	22.1±0.30	24.5±0.33	2.29±0.22	14.6±0.26	0.03±0.00
HWE II	22.3±0.22	24.9±0.50	2.56±0.33	14.2±0.70	0.03±0.00

¹⁾ Mean±SE
NS; not significant

²⁾ FER; Food efficiency ratio

³⁾ Refer to Table 4

나. 혈장의 지질농도 및 TBARS 수준

1) 중성지방 농도

6주간의 혈장의 중성지방농도 변화는 Fig. 16에서 보는 바와 같다. 시간이 지남에 따라 혈 중 중성지방의 농도가 현저하게 감소되는 경향을 보였으나 각 군 간의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

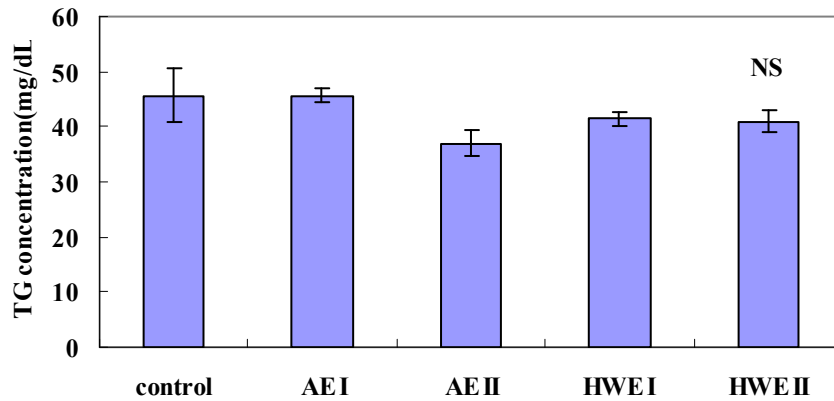


Fig. 16. Effect of green tea seed extracts on plasma triglyceride concentrations in C57BL/6 mice fed atherogenic diets for 6 weeks. Data represent the means \pm SE of ten animals, each values being the mean of triplicate assays.

2) Cholesterol 농도

6주간의 혈청의 cholesterol 농도는 Fig. 17에서 보는 바와 같이 각 군 간의 유의적인 차이는 없었으나 AE I과 HWE II에서 현저한 감소를 보였다. HDL-cholesterol의 농도 변화는 HWE II가 현저한 증가를 보였다(Fig. 18). Fig. 19에서 보는 바와 같이 LDL-cholesterol의 농도는 보면 AE I이 현저하게 감소하는 경향을 보였다. AE 군에서는 AE I이 AE II 보다 LDL-cholesterol의 감소가 현저했으며, HWE II가 HWE I 보다 감소량이 많았다.

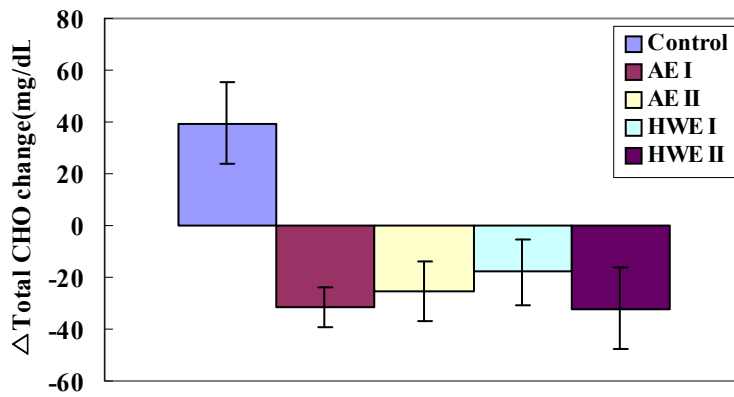
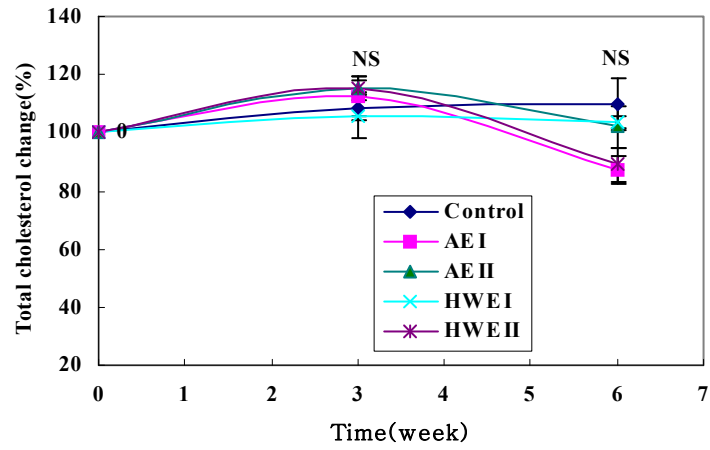


Fig. 17. Effect of green tea seed extracts on plasma total cholesterol concentrations in C57BL/6 mice fed atherogenic diets for 6 weeks Δ change=final concentration-initial concentration
Refer to Fig. 16.

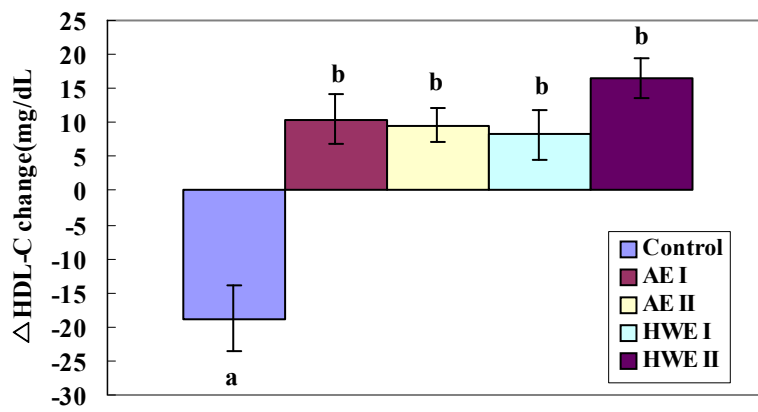
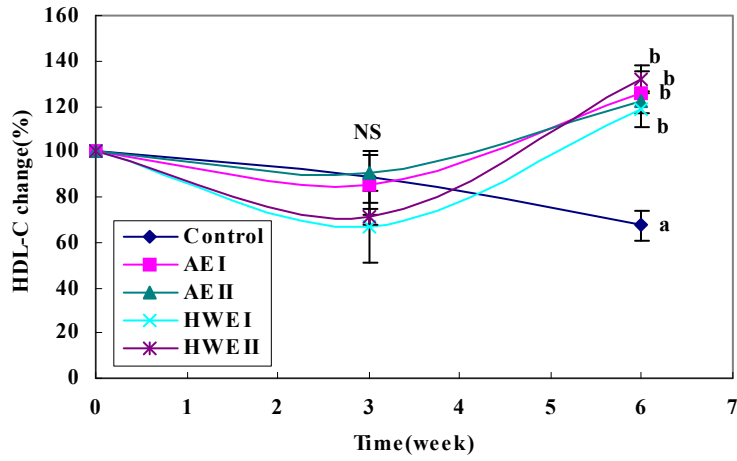


Fig. 18. Effect of green tea seed extracts on plasma HDL-cholesterol concentrations in C57BL/6 mice fed atherogenic diets for 6 weeks. Refer to Fig. 16

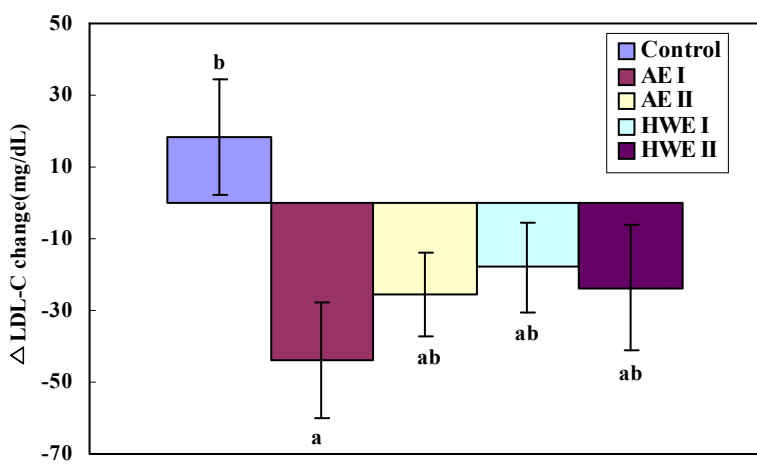
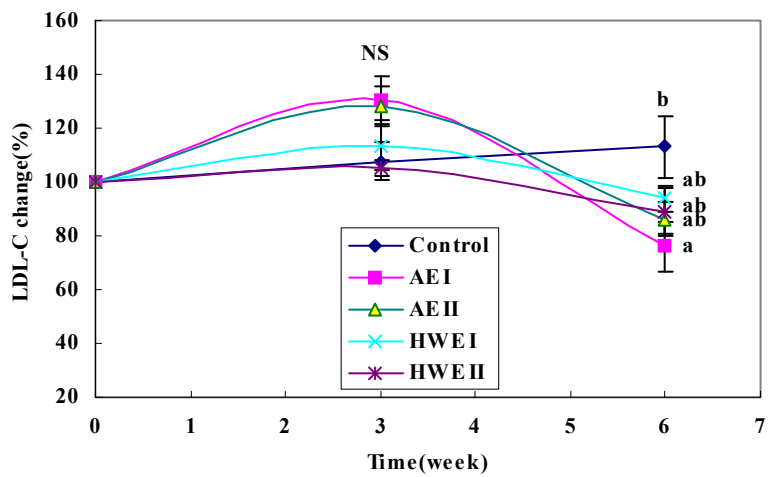


Fig. 19. Effect of green tea seed extracts on plasma LDL-cholesterol concentrations in C57BL/6 mice fed atherogenic diets for 6 weeks Refer to Fig. 16.

3) 혈장의 지질과산화

녹차씨 추출물을 6주간 급여한 mouse의 지질과산화 정도를 TBARS의 생성량으로 분석한 결과 각 군 간의 유의적인 차이가 없었으나 주정추출물을 섭취한 군에 비해 열수추출물을 섭취한 군에서 TBARS의 생성이 낮게 나타나 지질과산화가 낮은 것으로 나타났다(Fig. 20).

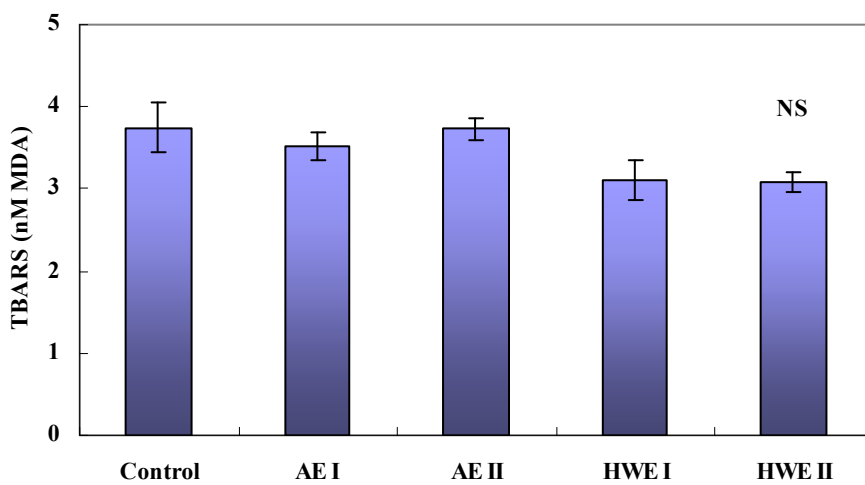


Fig. 20. Effect of green tea seed extracts on plasma TBARS generations concentrations in C57BL/6 mice fed atherogenic diets for 6 weeks Refer to Fig. 16.

다. 복강 대식세포의 SOD 활성

Fig. 21에서 보는 바와 같이 SOD 활성은 각 군 간의 유의적인 차이를 보였으며 HWE군이 AE군에 비해 SOD 활성이 현저하게 높게 나타났으며 HWE II가 가장 높은 것으로 나타났다.

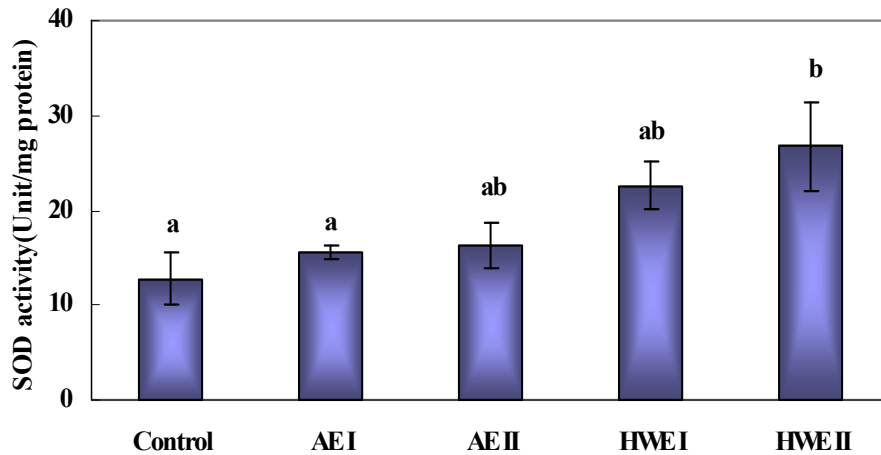


Fig. 21. Superoxide dismutase activity of peritoneal macrophage in C57BL/6 mice fed atherogenic diets contained green tea seed extract for 6 weeks Refer to Fig. 16.

라. 간의 지질농도 및 항산화 효소계 활성화

1) 간장의 무게 및 지질 농도

녹차씨 추출물을 섭취한 실험동물의 간장 무게 및 총 지방함량은 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나 총 지방 함량은 HWE I이 가장 높은 수준을 보였고 AE II군이 가장 낮은 수준을 보였다(Table 16). Fig. 22에서 보듯이 TG의 농도는 대조군에 비해 실험군에서 현저히 낮았다. 총 cholesterol 농도는 각 군 간의 유의적인 차이를 보였으며 HWE 군의 증가가 다른 군에 비해 상대적으로 나타났다. TBARS의 생성량은 각 군 간의 유의적인 차이를 보였으며 HWE II가 상대적으로 가장 낮은 수준을 보였다. 주정 추출물과 열수 추출물 둘 다 농도가 높을수록 지질과산화 정도가 낮은 것으로 나타났다(Fig. 23).

Table 16. Effect of green tea seed extracts on liver weight and total lipid content in C57BL/6 mice fed atherogenic diets for 6 weeks

Group ²⁾	Liver weight (g)/100g BW	Total lipid(%)
Control	5.90±0.26 ^{1)NS}	21.63±1.38 ^{NS}
AE I	5.89±0.34	21.92±0.33
AE II	6.42±0.17	20.78±1.59
HWE I	6.27±0.29	23.38±0.42
HWE II	6.23±0.36	21.33±0.83

^{1),2)}Refer to Table 4 NS; Not significant

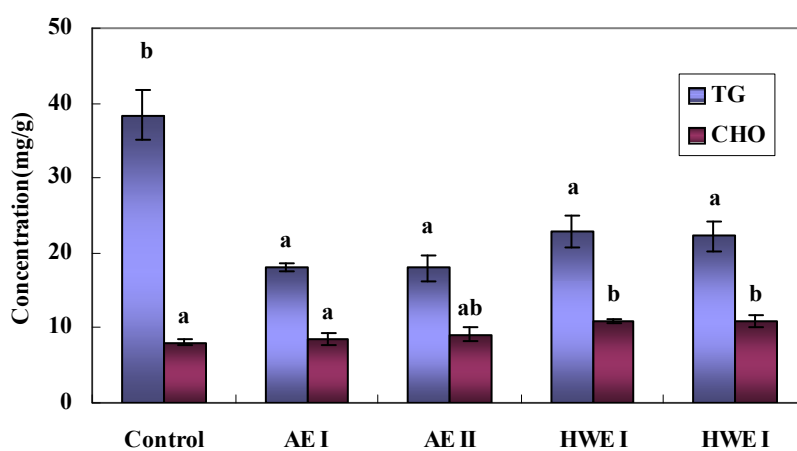


Fig. 22. Effect of green tea seed extracts on liver triglyceride and cholesterol concentrations in C57BL/6 mice fed atherogenic diets for 6 weeks Refer to Fig. 16.

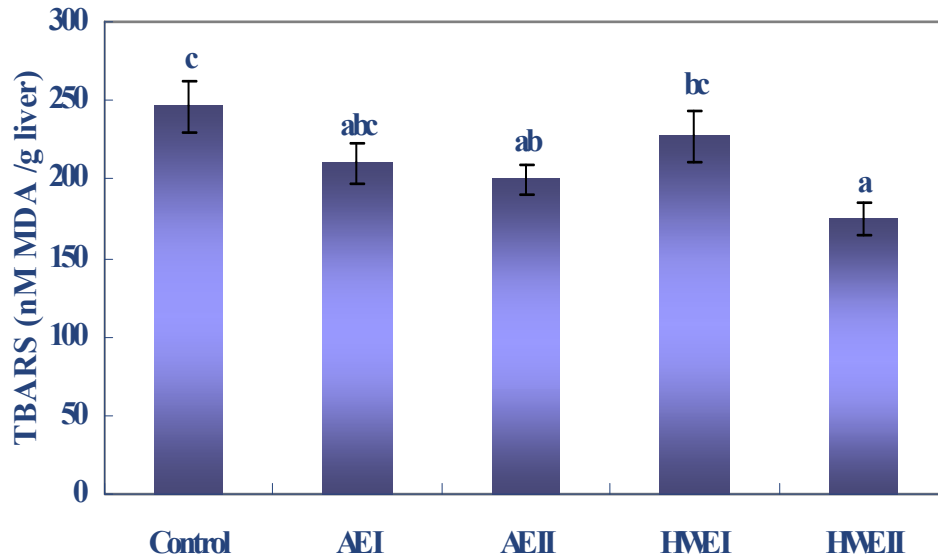


Fig. 23. Effect of green tea seed extracts on liver TBARS generations in C57BL/6 mice fed atherogenic diets for 6 weeks Refer to Fig. 16.

2) 간의 항산화 효소계 활성화

Table 17에서 보듯이 glutathione 함량, Cu,Zn-SOD와 Mn-SOD, catalase, glutathione peroxidase와 glutathione reductase 활성화는 각 군 간의 유의적인 차이를 보였으며 대조군에 비해 녹차씨 추출물을 급여한 군에서 높은 활성을 보였고, 특히 HWE II가 항산화 효소계 활성화에서 현저하게 높은 수준을 보였다.

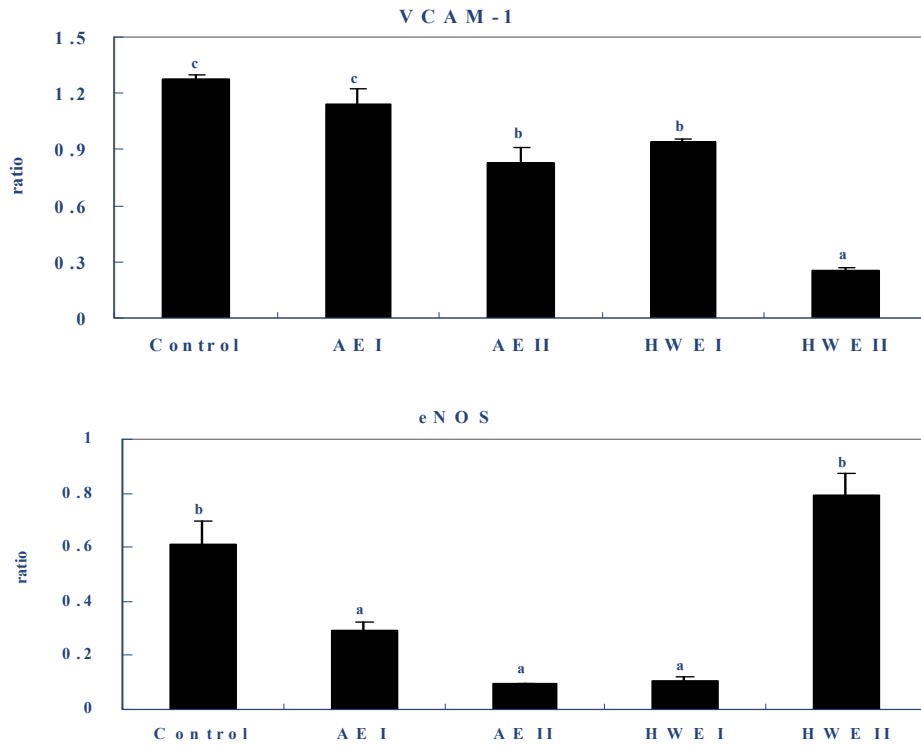
Table 17. Effect of green tea seed extracts on liver antioxidative enzyme activities in C57BL/6 mice fed atherogenic diets for 6 weeks

	Control ³⁾	AE I	AE II	HWE I	HWE II
Catalase (μ mole/mg protein)	0.68 \pm 0.04 ^{1)a2)}	1.02 \pm 0.11 ^b	1.18 \pm 0.11 ^b	1.15 \pm 0.10 ^b	1.27 \pm 0.13 ^b
GSH-reductase (Units/mg protein)	17.02 \pm 4.68 ^a	17.86 \pm 2.61 ^a	32.92 \pm 4.88 ^{ab}	28.96 \pm 7.07 ^{ab}	40.31 \pm 5.88 ^b
GSH-peroxidase (Units/mg protein)	79.0 \pm 5.74 ^a	101.1 \pm 5.96 ^{ab}	132.4 \pm 8.98 ^{bc}	128.5 \pm 12.37 ^{bc}	135.9 \pm 11.44 ^c
Cu,Zn-SOD (Nitrate Units/mg protein)	44.97 \pm 10.23 ^a	91.88 \pm 3.41 ^b	66.98 \pm 4.76 ^{ab}	92.99 \pm 11.06 ^b	83.02 \pm 9.48 ^b
Mn-SOD (Nitrate Units/mg protein)	2.74 \pm 0.22 ^a	4.22 \pm 0.23 ^b	3.67 \pm 0.17 ^{ab}	3.82 \pm 0.51 ^b	4.34 \pm 0.37 ^b

¹⁾²⁾³⁾Refer to Table. 4. A unit of GSH-reductase was defined as amount of enzyme that catalyze reduction of 1 nmole of NADPH per minute. A unit of GSH-peroxidase was defined as amount of enzyme that oxidase 1 nmole of NADPH per minute. A nitrate unit of SOD was defined as amount of sample for 50% inhibition

마. 동맥조직에서 eNOS와 VCAM-1의 mRNA gene expression

동맥조직에서의 세포부착물질의 발현 정도를 RT-PCR로 확인한 결과는 Fig. 24에서 보는 바와 같다. 최근 몇 년 동안 soluble adhesion molecule은 순환계질환의 biomarker로써 잠재적인 가치가 있는지에 대해 주목을 받아왔으며 soluble form이 증가하면 유전자의 transcription을 증가시키며 mRNA의 안정성과 translation을 변화시킨다고 알려져 있다. 그러나 세포의 발현과 soluble form의 기능은 명백히 밝혀지지 않고 있다. cell adhesion molecules (CAMs)의 생성에 미치는 영향을 동맥경화의 제1 초기현상을 나타내는 soluble VCAM-1의 측정을 통하여 녹차씨 추출물의 항동맥경화 효과를 확인한 결과 control군에 비해 현저하게 유의적으로 감소시키는 것으로 보아 CAMs의 생성을 효과적으로 감소시켜 동맥경화를 예방할 수 있을 것으로 사료된다. 혈관이완과 혈소판 응집, 심혈관 항상성의 기작 조절과 관련 있는 NO 생성 효소인 eNOS의 mRNA gene expression을 RT-PCR을 통해 확인하였다. eNOS에 의해 생성된 NO는 관상동맥을 포함하는 모든 종류의 혈관을 넓히며 혈소판의 응고나 백혈구의 부착, 평활근의 증식, 동맥경화를 막는 효과를 가진다. 위의 결과로 미루어 볼 때 HWE II의 eNOS활성 증진 기능은 혈관확장에 기여하며 혈압을 낮추는 효과가 있음을 보여준다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때 녹차씨 추출물의 항염증 및 항동맥경화 효과는 HWE II가 가장 효과적인 것으로 사료된다.



	Control	AE I	AE II	HWE I	HWE II
VCAM-1 (601bp)					
eNOS (599bp)					
GAPDH (375bp)					

Fig. 24. Effect of green tea seed extracts on arterial VCAM-1, eNOS and GAPDH mRNA gene expression in C57BL/6 mice fed atherogenic diets for 6 weeks. Refer to Fig. 15.

제 3 절 성인 흡연 남성에게 녹차씨 추출물의 보충 효과

1. 재료 및 방법

가. 단기시험

1) Capsule 조제

경남하동 소재 화개제다(花開製茶)로부터 유기농 녹차씨를 2004년 11월에 공급받아 외피를 제거한 다음 정선하여 세척한 후 $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ 의 열풍건조기에서 건조하였다. 건조한 녹차씨를 40 mesh로 분쇄하였다. 녹차씨 주정 추출물은 시료양의 10배의 주정(무학소주)을 가하여 $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 가열 추출하여 건고하여 주정추출물을 조제하였다. 녹차씨 열수추출물은 시료양의 10배의 증류수를 가하여 $100\pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 가열 추출하여 동결건조하여 열수추출물을 조제하였다. Capsule 조제는 주정 및 열수 추출물을 1 capsule 당 250mg을 함유하도록 조정하여 조제하였다.

2) 대상자 선정

대상자는 20~25세의 젊고 건강한 흡연 남자 대학생 10명을 선정하여 동일한 대상자를 대상으로 단기 임상실험을 3회에 걸쳐 시행하였으며 다음 실험까지 1주일의 휴식기간을 두었다. 시험 대상자들에게 공복시 조제한 capsule을 1개씩 섭취시킨 후 고지방식 {유러피언 프리코 치즈버거 set(롯데리아), 열량 858.7kcal, 단백질 34.6g, 지방 35.5g(kcal 37.2%), 탄수화물 109.8g}을 섭취시켰으며 placebo군은 capsule을 섭취하지 않고 고지방식사만을 섭취시켰다.

3) 시료 분석

식사 전과 식사 후 2h, 4h, 6h에 대상자의 혈액을 채취하여 혈 중 지질 농도와 항산화능 및 염증인자 생성 정도를 확인하였으며 신체계측도 병행 실시하였다.

가) 신체계측은 시험 시작 전에 Inbody 3.0을 이용하여 BMI, 혈압 등을 측정하였다.

나) 혈중 지질농도는 영동제약 kit를 사용하여 분석하였다.

다) 총 항산화능은 trolox equivalent로 측정하였다.

라) 지질과산화 정도는 TBARS 농도로 측정하였다. 일정량의 혈장에 TBARS 용액을 가한 후 95°C 수조에서 30분간 반응시킨 다음 4,000rpm에서 10분간 원심분리하고

상층액을 취해 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선으로는 1,1,3,3-TMP를 사용하였으며, 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 MDA의 양으로 환산하였다.

마) 항염증 수준은 TNF- α 수준은 ELISA kit (R&D)으로 분석하였다.

바) 녹차씨 추출물의 체내 독성여부는 GOT와 GTP 활성 수준으로 확인하였으며 GOT와 GTP 활성 측정은 Reitman-Frankel법으로 아산제약 kit를 사용하여 측정하였다.

나. 장기시험

1) 대상자 선정 및 capsule 조제

흡연자(1갑 이상/day)로 젊고 건강한 20~29세 성인 남자 12명을 대상자로 선정하였으며 실험군은 녹차씨 추출물(이하 GTSE)군과 placebo군으로 분류하였고 각 군 당 시험 대상자는 각각 6명이었다. Capsule 은 위의 단기임상시험과 동일한 방법으로 조제하였다. GTSE capsule은 녹차씨 주정추출물 250 mg/capsule로, placebo군은 건조시킨 쌀가루 250 mg/capsule로 조제하였으며(Fig. 25), 각각의 capsule을 하루에 1개씩 4주간 매일 아침 공복시에 섭취하도록 하였으며, 대상자들의 식이는 제한은 하지 않았다.



Placebo capsule

GTSE capsule

Fig. 25. Appearance of capsules containing green tea seed alcohol extract and rice powder

2) 시료채취 및 분석

실험시작 0주와 4주에 시험 대상자의 신체계측 및 혈액을 공복시에 취하여 분석하였다.

- 가) 신체계측은 Inbody 3.0을 이용하여 대상자의 비만도와 혈압 등을 비교하였다.
- 나) 혈장의 lipid profile (TG, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 수준)은 영동제약 kit를 사용하여 분석하였으며 LDL-콜레스테롤 수준은 Friedwald 공식[$LDL-C = TC - HDL - (TG/5)$]을 사용하여 계산하였다.
- 다) 체내의 독성에 미치는 영향은 GOT와 GPT 활성으로 확인하였으며 분석은 영동제약 kit를 사용하였다.
- 라) 항산화능은 총 항산화능을 측정하였으며 trolox equivalent로 계산하였다.
- 마) 지질 과산화 정도는 TBARS 함량으로 측정하였다. 일정량의 혈장에 TBARS 용액을 가한 후 95°C 수조에서 30분간 반응시킨 다음 4,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취해 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선으로는 1, 1, 3, 3 - TMP를 사용하였으며, 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 MDA의 양으로 환산하였다.
- 바) 항염증효과는 TNF- α 생성정도로 확인하였으며 ELISA kit(R&D)로 분석하였다.
- 사) 적혈구의 항산화 효소계 활성은 SOD, catalase, GSH-px, GSH-red, Cu,Zn-SOD 수준을 측정하였다.
 - (1) SOD 활성은 pyrogallol의 자동산화로 측정하였다. 96 well plate에 적혈구 세포 추출 상등액과 1.1mM DTPA를 가하였다. 여기에 50 μ l of 6mM pyrogallol을 첨가하여 405nm에서 2분간 10초 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. SOD 활성 1unit은 pyrogallol의 산화를 50%까지 저해하는 효소의 양으로 나타내었다.
 - (2) GSH-px 활성은 적혈구 세포 추출 상등액에 reaction mixture를 가한다. 2.5mM H₂O₂를 가한 즉시 340nm에서 2분 동안 10초 간격으로 흡광도 변화를 측정한다. GSH-px 활성 1unit은 1분당 1nmole의 NADPH가 산화되는 효소의 양으로 나타내었다.
 - (3) GSH-red 활성은 96-well plate에 적혈구 세포 추출 상등액을 넣고 reaction mixture를 가한 즉시 340nm에서 2분간 10초 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. Glutathione reductase 1unit은 1분동안 1nmole의 NADPH 환원을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였다.

아) 녹차씨 추출물 보충이 혈소판 응집능에 미치는 영향

(1) Washed Platelet 조제

채혈된 임상대상자의 혈액 응고를 막기 위해 sodium citrate를 처리(최종 0.38%) 하였다. 혈액을 770 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층을 취해 platelet rich plasma (PRP)를 얻은 뒤 이를 다시 2000 rpm에서 20분간 원심분리하여 pellet을 취하였다. Washing buffer (modified Tyrode's buffer: 134mM NaCl, 3mM KCl, 0.3mM NaH₂PO₄, 2mM MgCl₂, 5mM glucose, 12mM NaHCO₃, 1mM EDTA, 3.5mg/ml bovine serum albumin at pH 7.4)로 pellet을 재 현탁시킨 후 다시 2번 반복하여 원심분리를 실시하였다. 최종 pellet을 EDTA가 들어있지 않은 suspension buffer로 현탁시킨 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 측정하여 5×10⁸ cells/ml의 농도로 platelet poor plasma (PPP)를 조제하였다.

(2) Platelet aggregation 측정

PRP(5×10⁸ cells/ml)를 3min at 37°C에서 예온하여 agonist로 선택한 collagen을 10μl/ml을 가하였다. 5×10⁸ cells/ml로 조제된 각 군의 혈소판 현탁액을 100μl/well로 가하였고 마지막 줄에 가하자마자 timer를 작동시켰다. 15초간 platelet aggregometer (Chrono-Log, Corp., Havertown, PA, U.S.A.)에서 교반한 후 30초마다 micro plate reader(Molecular Devices)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 계속 교반하면서 최대 응집반응을 나타내는 시점의 흡광도를 측정하였다. 각 응집율은 light transmission의 %로서 계산하였다. PPP는 reference (transmission 0%)로 하였다.

3) 조사대상자들의 평상시 섭취하는 영양소 섭취 평가를 위해 식이섭취조사를 병행 조사하였고 시험대상자의 평소 3일간의 식사기록법을 실시하였으며 영양소 섭취량 분석은 Can-Pro 4.0을 이용하여 환산하였다.

2. 임상시험의 결과 및 고찰

가. 성인 남자 흡연자의 고지방식을 섭취 후 녹차씨 추출물을 보충시 혈 중 lipid profile과 산화적 스트레스에 미치는 효과

1) 조사대상자들의 일반적인 특성

조사대상자들의 일반적인 특성은 나이는 평균 23세, BMI는 평균 22.3으로 체질량지수가 정상을 유지하고 있었다. 임상실험 대상자들의 최고 혈압은 평균 133.8mmHg로 정상혈압보다 다소 높은 값을 보였으나 최저혈압은 77.8mmHg로 정상으로 나타났다. 조사 대상자들이 담배를 피운 기간은 5~6년 정도였으며 하루에 피우는 담배의 수량은 5~9 개피가 1명, 10~14 개피가 4명, 15~19 개피가 3명, 1갑 이상이 2명이었다.

2) 녹차씨 추출물을 섭취한 대상자들의 혈 중 지질농도

가) TG와 총 콜레스테롤 농도의 변화

고지방식이를 섭취한 후 혈 중 TG와 총 콜레스테롤 변화는 Fig. 26에서 보는 바와 같이 TG의 수준은 GTSE를 섭취한 군에서 placebo 군에 비해 시간이 경과함에 따라 유의적으로 감소하는 결과를 보였으나 섭취 후 6시간 경과시에는 군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 총 콜레스테롤 함량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나 placebo군에 비해 GTSE를 섭취한 군에서 다소 감소하는 경향을 보였다.

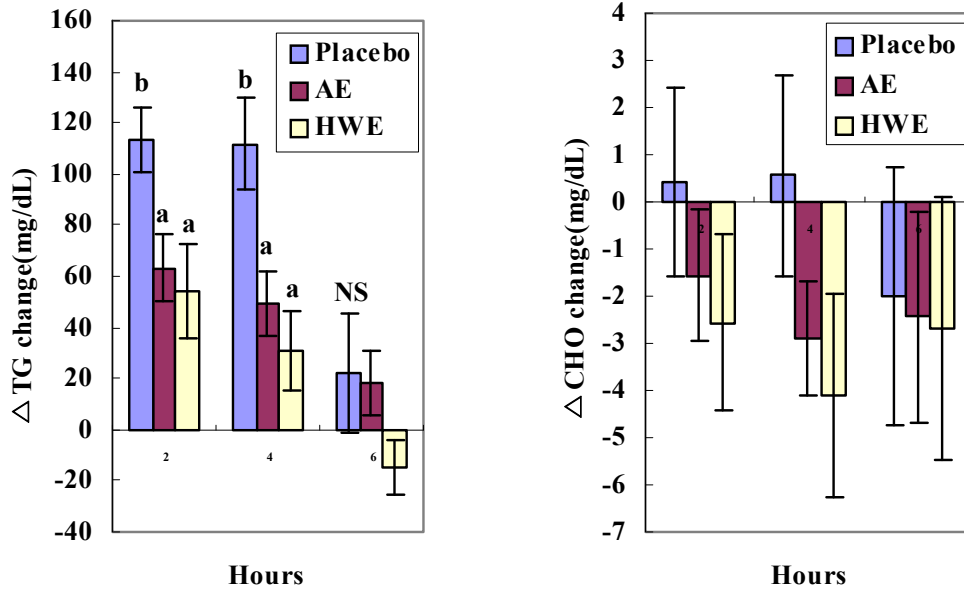


Fig. 26. Changes of TG and total cholesterol levels on plasma of the subjects before and after GTSE supplementation. Values with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Bar represent standard error of mean value. AE; alcohol extracts HWE; hot water extracts

나) 항산화능

항산화능은 녹차씨 추출물을 섭취한 군에서 placebo군에 비해 2시간 경과 후 유의적으로 높은 수준이었으나 6시간 경과 후 열수추출물을 섭취한 군에서 유의적으로 높은 수준을 보였다. 따라서 녹차씨 추출물이 고지방식을 섭취한 후 대상자들의 혈중 총항산화능에 영향을 미쳐 항산화 수준을 증가시키는 것으로 보인다 (Fig. 27.).

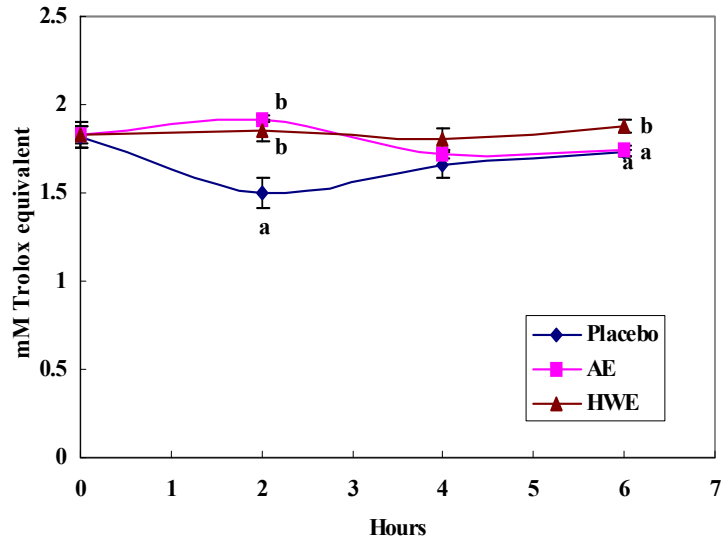


Fig. 27. Changes of total antioxidant capacities on plasma of the subjects before and after GTSE supplementation.

Refer to Fig. 26

다) 지질과산화 정도 및 TNF- α 수준

지질과산화정도는 TBARS 생성 정도로 확인하였으며 Fig. 28에서 보는 바와 같다. 녹차씨 추출물을 섭취한 군에서 시간이 경과함에 따라 TBARS 생성정도가 placebo군에 비해 감소하는 것으로 나타났다. 염증생성 정도는 TNF- α 의 생성 정도로 확인하였으며 녹차씨 추출물을 섭취한 군에서 4시간 경과 후에 유의적으로 TNF- α 생성이 placebo군에 비해 현저하게 감소하는 것으로 나타났다.

녹차씨 추출물이 고지방식을 섭취한 후 혈 중의 TBARS와 TNF- α 생성을 억제함으로써 항산화 및 항염증 효과가 있는 것으로 사료된다.

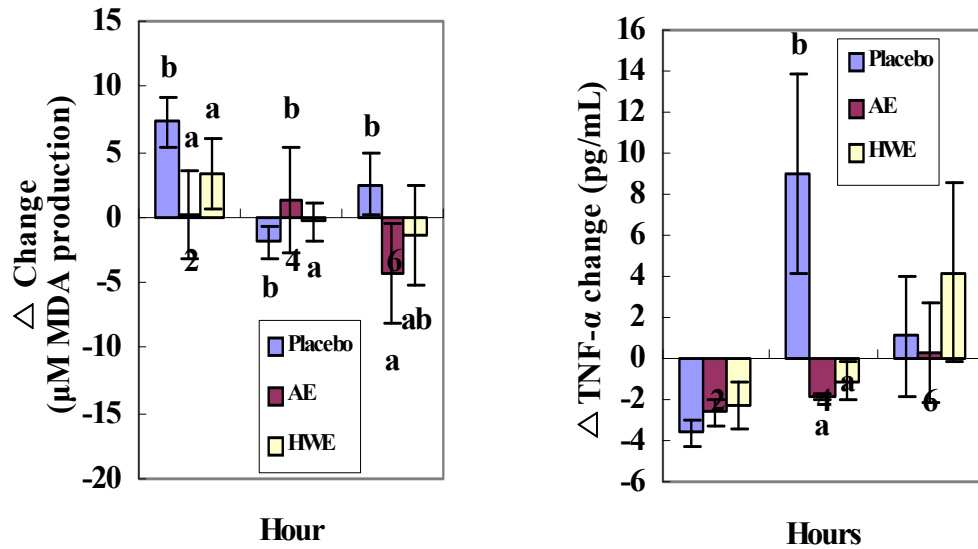


Fig. 28. Changes of TBARS and TNF- α levels on plasma of the subjects before and after GTSE supplementation. Refer to Fig. 26

라) GOT와 GPT 수준

녹차씨 추출물의 체내 독성 여부를 확인하기 위해 GOT와 GPT 활성을 측정한 결과(Fig. 29) 체내 독성을 나타내지 않는 수준임을 확인할 수 있었다.

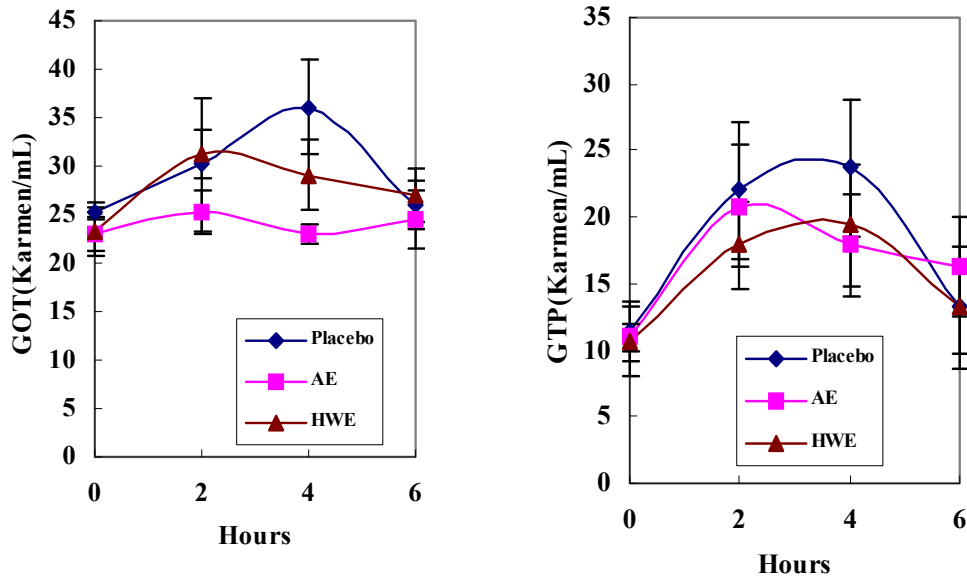


Fig. 29. Changes of GOT and GTP activities on plasma of the subjects before and after GTSE supplementation.
 AE; alcohol extracts HWE; hot water extracts

나. 성인 남자 흡연자들에게 있어 항동맥경화와 항산화적 스트레스에 미치는 녹차씨 추출물의 효과

1) 대상자의 일반적인 특성

대상자의 일반적인 특성은 평균 연령 만 23.8 ± 0.8 세(만 20세~30세)로 1일 담배 1갑 이상 피우는 건강한 성인남자로 담배를 처음 피우기 시작한 연령은 평균 18.7 ± 0.7 세, 담배를 피운 기간은 평균 6.08 ± 1.0 년이였다.

2) 실험 전 후의 조사대상자들의 비만도 및 혈압변화

4주간의 실험기간 중 실험 전후의 조사대상자들의 신체계측은 Table 17에서 보

는 바와 같다. 비만도 및 혈압변화를 보면 복부비만 정도를 확인할 수 있는 WHR이 GTSE군에 비해 placebo군에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며, 수축기 혈압은 GTSE군에서 유의적으로 감소하는 결과를 보여 녹차씨 추출물이 혈압에 유리하게 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Table 17. Anthropometric characteristics of the subjects before and after GTSE supplementation.

	Placebo group (n=5)		GTSE group (n=6)	
	0 week	4 weeks	0 week	4 weeks
Height (cm)	174.8±1.5	174.8±1.5	175.0±3.0	174.7±3.3
Weight (kg)	72.1±3.4	72.4±3.6	68.5±5.1	69.4±5.1
BMI(kg/m ²)	23.7±1.4	23.8±1.5	22.1±1.3	22.7±1.3
Obesity(%)	107.8±6.9	108.2±7.2	100.2±5.8	103.0±5.6
Lean body mass (kg)	54.1±1.2	53.3±1.2*	54.5±3.7	54.3±3.4
Total body fat (kg)	15.0±2.5	16.1±2.7**	10.5±1.6	12.1±1.8*
Body fat percentage (%)	20.3±2.5	21.8±2.6***	15.1±1.2	17.0±1.54*
WHR	0.84±0.02	0.85±0.02***	0.81±0.02	0.82±0.02
Blood pressure (mmHg)				
Systolic blood pressure	137.6±4.9	137.6±5.7	143.3±5.7	135.2±3.5*
Diastolic blood pressure	88.4±4.4	89.8±3.8	87.3±2.9	84.7±3.8

*; Significantly different after the 4weeks supplementation within groups p<0.05 by paired t-test.

** ; Significantly different after the 4weeks supplementation within groups p<0.01 by paired t-test.

BMI; body mass index WHR; waist / hip ratio

GTSE; green tea seed alcohol extract

3) 1일 영양소 섭취 수준

임상대상자들의 1일 영양소 섭취수준은 Table 18에서 보는 바와 같다. β -carotene의 섭취수준이 placebo군에서 GTSE군에 비해 유의적으로 높은 수준을 보였다.

Table 18. Daily nutrient intakes of the subjects before and after GTSE supplementation.

	Placebo group (n=5)	GTSE group (n=6)
Calorie(kcal)	2034.9±152.7	2191.9±114.7
Protein (g)	80.3±4.1	94.8±10.8
Lipid (g)	66.2±7.3	72.5±6.9
Carbohydrate (g)	286.4±25.3	303.4±9.7
Dietary fiber (g)	20.4±0.7	21.5±2.1
Ca (mg)	551.9±94.3	579.9±81.8
P (mg)	1086.1±98.7	1213.5±168.5
Fe (mg)	15.1±1.03	15.6±1.70
Na (mg)	5330.9±409.8	6114.2±713.2
K (mg)	2616.5±113.1	3064.4±270.1
Zn (mg)	9.20±0.29	10.1±0.82
Vitamin A (μ gRE)	862.5±104.7	675.1±158.9
β -Carotene (μ g)	3900±362	3050±175**
Retinol (μ g)	112±21	138±37
Vitamin B ₁ (mg)	1.36±0.03	1.62±0.07**
Vitamin B ₂ (mg)	1.25±0.17	1.43±0.22
Vitamin B ₆ (mg)	2.16±0.04	2.35±0.29
Niacin (mg)	17.6±0.91	21.9±3.12
Vitamin C (mg)	104.8±15.4	155.0±23.8
Folic acid (μ g)	249.1±27.3	249.5±19.2
Vitamin E (mg α -TE)	19.3±2.13	17.2±1.89

**; Significantly different after the 4weeks supplementation within groups
p<0.01 by t-test. Refer to Table 17

4) 혈 중 지질 농도, 항동맥경화 지수, 혈당, TBARS 농도 및 총항산화능

Table 19에서 보는 바와 같이 임상대상자의 혈 중 지질 중 TG 농도는 두 군에서 다소 증가하는 경향을 보였으나 증가량은 GTSE군에서 낮은 수준으로 나타났다. 총 콜레스테롤 수준은 GTSE군에서 4주 후 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며 HDL-콜레스테롤 수준은 두 군에서 증가하는 경향을 보였으나 GTSE군에서 placebo군에 비해 다소 증가하는 추세였다. LDL-콜레스테롤 수준은 placebo군은 다소 증가하는 경향을 보였으나 GTSE군에서 4주후 유의적으로 감소하였으며 placebo군에 비해 현저하게 감소되는 결과를 보였다. 따라서, 동맥경화 지표로 사용되는 항동맥경화지수는 GTSE군에서 유의적으로 증가되는 결과를 확인하였으나 placebo군에서는 오히려 감소되는 결과를 보였다. 혈 중 지질농도의 수준으로 보았을 때 GTSE군이 placebo군에 비해 TG, LDL-콜레스테롤 농도를 감소시키며 HDL-콜레스테롤 농도를 증가시켜 항동맥경화지수를 상승시켜 녹차씨 추출물이 성인 흡연 남자들에게 있어 동맥경화를 예방시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

4주간의 혈당 수준의 변화를 보면 GTSE군에서는 유의적으로 감소하는 반면 placebo군에서는 유의적인 차이는 없었지만 다소 감소하는 경향을 보였다. 혈 중 지질과산화 정도는 TBARS 농도로 확인하였으며 두 군 모두 변화량의 유의적인 차이는 보이지 않았지만 GTSE군은 다소 감소하는 경향을 보인 반면 placebo군에서는 다소 증가하는 경향을 보였다. Trolox equivalent로 측정된 총 항산화능은 두 군 간의 변화량에는 유의적인 차이가 없었으며 유사한 수준을 보였다. 그러나 영양소 섭취수준에서 항산화능이 있는 β -caretene의 섭취량이 GTSE군에 비해 placebo군에서 유의적으로 현저하게 높은 수준임을 감안하면 녹차씨 추출물의 항산화능이 있음을 확인할 수 있다.

Table 19. Changes of lipid profile, antiatherogenic index, blood glucose, TBARS levels and total antioxidant capacities on plasma of the subjects before and after GTSE supplementation.

	Placebo group (n=5)		GTSE group (n=6)	
	0 week	4 weeks	0 week	4 weeks
TG ³⁾ (mg/dL)	34.4±1.5 ¹⁾ (30.9±9.0) ²⁾	65.2±10.8	30.4±1.9 (11.3±4.7)	41.6±4.0*
TC ⁴⁾ (mg/dL)	133.6±17.3 (10.8±5.4)	148.54±15.9	142.1±9.1 (-17.1±5.8)**	125.3±9.9
HDL-C ⁵⁾ (mg/dL)	62.5±4.5 (1.23±1.76)	63.58±41.5	59.61±4.3 (2.42±3.33)	64.6±9.7
LDL-C ⁶⁾ (mg/dL)	67.9±11.4 (3.38±3.81)	71.32±10.0	79.4±5.9 (-21.7±8.82)*	57.7±7.6*
AI ⁷⁾	0.47±0.03 (-0.03±0.02)	0.43±0.03	0.42±0.01 (0.07±0.04)*	0.50±0.03
BG ⁸⁾ (mg/dL)	93.2±1.6 (-4.83±1.86)	88.4±1.4	107.2±2.7 (-6.29±9.84)	92.2±4.8*
TBARS ⁹⁾ (MDA μM)	1.45±0.08 (0.29±0.10)	1.74±0.07*	1.59±0.05 (-0.13±0.35)	1.58±0.15
TAOC ¹⁰⁾ (Trolox equivalent nM)	0.31±0.02 (0.39±0.03)	0.71±0.03**	0.29±0.01 (0.42±0.04)	0.72±0.04**

¹⁾ means±SE ²⁾ change = 4 weeks-0 week ³⁾TG; triglyceride ⁴⁾TC; total cholesterol
⁵⁾HDL-C; high density lipoprotein cholesterol ⁶⁾LDL-C; low density lipoprotein cholesterol
⁷⁾AI; Antiatherogenic index ⁸⁾BG; blood glucose
⁹⁾TBARS; thiobarbituric acid reactive substances ¹⁰⁾TAOC; total antioxidant capacity
Refer to Table 17.

5) 항염증 효과

항염증효과를 확인하기 위하여 TNF- α 생성의 변화를 확인한 결과 (Fig. 30) placebo군에 비해 GTSE군이 유의적으로 감소하였다. 녹차씨 추출물이 염증생성인자인 TNF- α 의 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

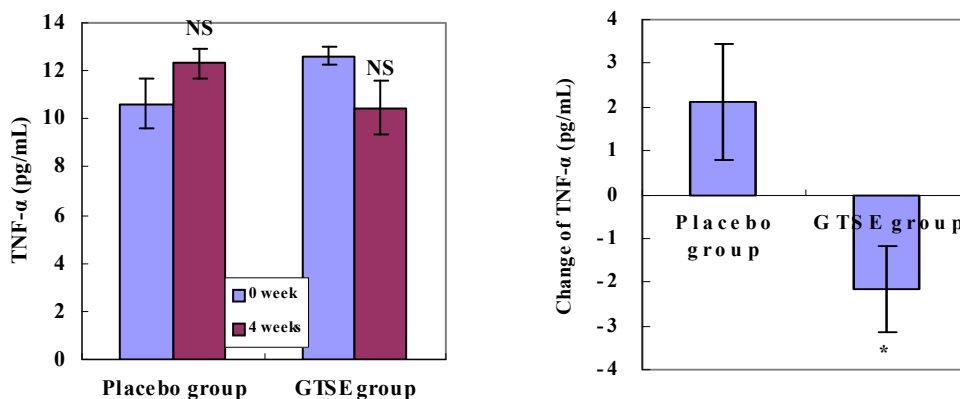


Fig. 30. Changes of TNF- α levels on plasma of the subjects before and after GTSE supplementation. Bar represent standard error of mean value. Refer to Table 17

6) 체내 독성 유무

본 실험에 사용한 녹차씨 추출물의 4주간 섭취 시 체내 독성 유무를 확인하기 위해 혈 중 GOT와 GTP 활성을 측정된 결과 4주 후에도 정상인 것으로 나타나 체내 독성을 가지지 않는 것으로 확인하였다(Fig. 31).

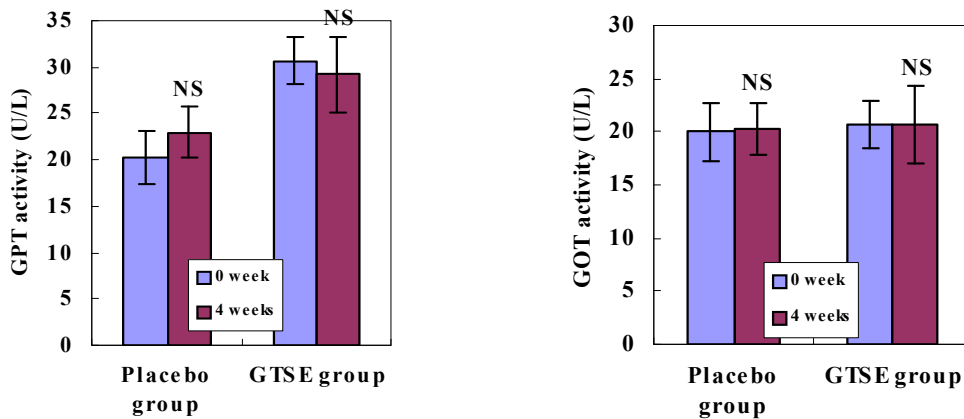


Fig. 31. Changes of GOT and GTP activities on plasma of the subjects before and after GTSE supplementation.
Refer to Fig. 30.

7) 산화적 스트레스에 미치는 효과

녹차씨 추출물이 산화적 스트레스에 미치는 효과를 확인하기 위해 적혈구의 항산화 효소계 활성을 측정하였다. Table 20에서 보는 바와 같이 SOD, catalase, GSH-px, GSH-red과 Cu,Zn-SOD 활성이 모두 GTSE군에서 placebo군에 비해 유의적으로 증가하는 것으로 나타나 녹차씨 추출물의 보충이 항산화 효소계를 활성화 시켜 체내 산화적 스트레스를 경감시키는 것으로 나타났다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때 녹차씨 추출물의 보충이 단기와 장기임상실험에서 혈 중의 TG, LDL-콜레스테롤의 농도를 감소시키며, 항동맥경화 지수를 증가시키는 것으로 나타났다. 그리고 총 항산화능과 항산화 효소계 활성을 증가시켰고 체내 염증생성인자인 TNF- α 의 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 따라서 녹차씨 추출물의 보충은 성인 남자 흡연자에게 있어 항산화, 항동맥경화 및 항염증효과가 있는 것으로 사료된다.

Table 20. Changes of antioxidant enzyme activities on erythrocyte of the subjects before and after GTSE supplementation.

	Placebo group (n=5)		GTSE group (n=6)	
	0 week	4 weeks	0 week	4 weeks
SOD ³⁾ (U/mg protein)	70.7±27.3 ¹⁾	77.8±10.3	35.5±11.5	117.8±10.2**
		(11.2±30.0) ²⁾		(82.3±12.3)*
Catalase (U/mg protein)	293±6	192±16*	162±17	234±14*
		(-100±15)		(72±20)
GSH-reductase ⁴⁾ (U/mg protein)	1343±301	1343±171	1236±170	1808±186*
		(-0.45±316)		(572±275)
GSH-peroxidase ⁵⁾ (U/mg protein)	40.1±16.3	18.0±2.8	40.8±7.1	53.4±18.8
		(-22.1±18.1)		(12.7±18.2)
Cu,Zn-SOD (NU · g red blood cell/mg protein)	600±112	667±84	755±451	1113±202
		(67±212)		(358±244)

¹⁾ means±SE ²⁾ change = 4 weeks-0 week ³⁾SOD; superoxide dismutase

⁴⁾GSH-reductase; glutathione-reductase ⁵⁾GSH-peroxidase; glutathione-peroxidase

Refer to Table 17

8) 혈소판 응집능에 미치는 영향

녹차씨 추출물을 보충한 군의 혈소판 응집력의 변화는 Fig. 32에서 보는 바와 같이 placebo군에 비해 유의적 ($P < 0.01$)으로 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 녹차씨 추출물을 보충한 군에서 placebo군에 비해 심장병의 발생을 낮추어 주는 것으로 사료된다.

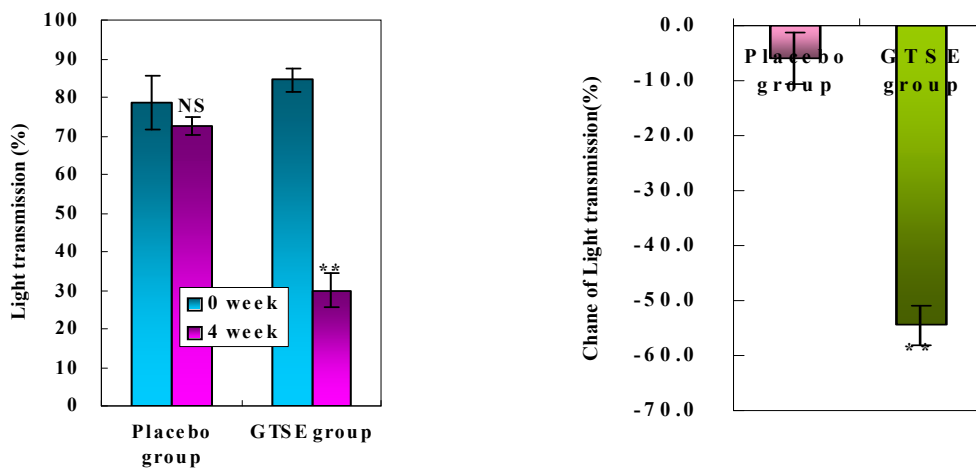


Fig. 32. Changes of collagen-induced platelet aggregation on blood of the subjects before and after GTSE supplementation. The platelets were stimulated with collagen ($10 \mu\text{g/ml}$) for 5 min. platelet aggregation (%) was recorded as an increase in light transmission. Refer to Fig. 30.

제 4 절 제품개발

1. 마요네즈

가. recipe 및 preparation procedure

마요네즈 조제를 위한 recipe는 Table 21에서 보는 바와 같다. 마요네즈 조제에 사용한 soybean oil(백설표), olive oil (압착올리브유, 백설표), 녹차씨유(AZI) 제품을 사용하였으며 식초는 사과식초(오뚜기, 산도 6~7%), 소금은 꽃소금(샘표), 설탕은 삼양사제품으로 시중에서 구입하여 사용하였다. 제조 과정은 도깨비 방망이를 사용하였으며 제조과정은 Fig. 33과 같으며 본 연구에서 제조한 마요네즈의 외형은 Fig. 34와 같다.

Table 21. The composition of mayonnaise

Ingredients	Content		
	SOM	OOM	GTSOM
Egg yolk (g)	85	85	85
Oil (ml)			
Soybean oil	475	-	-
Olive oil	-	475	475
Green tea seed oil	-	-	-
Vinegar (ml)	23	23	23
Salt (g)	7	7	7
Sugar (g)	10	10	10

SOM; mayonnaise contained soybean oil OOM; mayonnaise contained olive oil
GTSOM; mayonnaise contained green tea seed oil

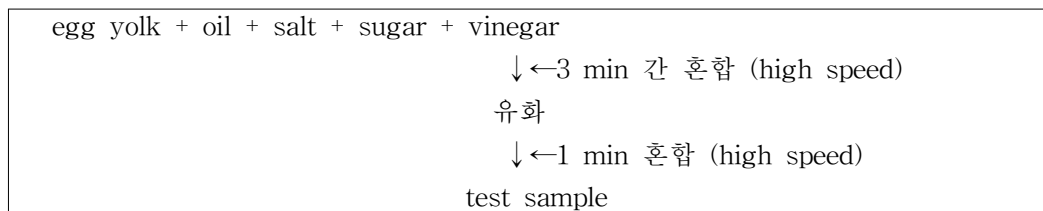


Fig. 33. Procedure of mayonnaise preparation



SOM

OOM

GTSOM

Fig. 34. Appearance of mayonnaise containing different oils

SOM; mayonnaise contained soybean oil

OOM; mayonnaise contained olive oil

GTSOM; mayonnaise contained green tea seed oil

나. 품질특성 평가

마요네즈 제조 후 0~7일 간 0℃에서 저장하면서 탁도 및 유화안정성을 평가하면서 층의 분리 유무를 확인하였다. -10℃에서 냉동저장하면서 1일, 3일, 5일 저장 후의 유화안정성 측정하였으며 -10℃에서 1일 저장 후 아래의 그림과 같이 올리브유와 녹차씨유로 제조한 마요네즈는 층의 분리가 확실하게 나타났다.

1) 탁도

마요네즈를 0℃에서 0~7일간 저장하면서 시료 0.02~0.05g을 100ml 삼각플라스크에 취하여 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액으로 1:1000 비율로 희석한 후 3분간 균질화하여 2시간 방치 후 500nm에서 흡광도 측정하였다. 0℃에서 7일 저장 후의 탁도는 Table 18에서 보는 바와 같으며 대두유로 제조한 마요네즈에 비해 올리브유와 녹차씨유로 제조한 마요네즈의 탁도가 유의적으로 낮은 것으로 나타났다. 올리브유로 만든 마요네즈의 탁도가 1.33으로 가장 낮은 수준을 보였다.

Table 22. Changes in turbidity of mayonnaise contained different oils during storage at 0°C

	SOM	OOM	GTSOM
0일	1.40±0.02 ¹⁾	1.41±0.03	1.37±0.01
1일	1.43±0.03	1.48±0.01	1.44±0.00
7일	1.45±0.01 ^{a2)}	1.33±0.01 ^c	1.39±0.01 ^b

¹⁾means±SE ²⁾Values within the same with different superscripts differ significantly($p<0.05$) by Duncan's multiple range test
Refer to Table 21.

2) 기름분리도

마요네즈의 유화안정성은 기름의 분리도로 측정하였다. 마요네즈를 0°C에서 0~7일간 저장하면서 시료 10g을 80°C 항온조에서 30분 간 가열시킨 후 흐르는 물에서 15분간 냉각시키고 2개의 원심분리관에 나누어 2500rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 분리량을 주사기로 취하여 측정하였다. 기름분리도는 0°C에서 저장 기간이 증가할수록 기름의 분리도가 적은 것으로 나타나 유화안정성을 가지는 것으로 나타났다으며 대두유로 만든 마요네즈에 비해 녹차씨유로 만든 마요네즈가 다소 분리도가 높은 것으로 나타났다(Table 23).

Table 23. Changes in oil separation of mayonnaise contained different oils during storage at 0°C.

unit(%)			
Days	SOM	OOM	GTSOM
0	1.5±0.01 ¹⁾	0.2±0.00	1.4±0.05
1	1.4±0.03	0.2±0.00	1.1±0.05
7	0.01±0.00 ^{a2)}	0.04±0.00 ^b	0.03±0.00 ^b

^{1),2)} Refer to Table 22.

다) 산화 안정성 및 유화안정성

40±5°C에서 50 일간 제조한 마요네즈를 저장하면서 산화안정성을 확인하기 위해 과산화물가 (POV), 유화안정성을 측정하여 평가하였다. Fig. 35에서 보듯이 POV를 보면 일반적으로 60-100meq/kg 일 때 산패발생시기로 알려져 있으며 4 0°C에서 저장기간이 30일경에는 올리브유로 제조한 마요네즈가 산패가 발생하는 것으로 보이며 40일경에는 대두유로 제조한 마요네즈가 산패가 발생한 것으로 나타났다. 3종류의 마요네즈 중에서 녹차씨유로 조제한 마요네즈가 가장 산패에 안정적인 것으로 나타났으며 50일 후에는 유의적으로 POV가 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 녹차씨유가 항산화능이 있음을 지적하는 것으로 사료된다.

유화안정성은 저장일 수가 증가할수록 감소되는 것을 확인할 수 있었으며 녹차씨유로 제조한 마요네즈의 유화안정성이 저장일 수가 증가할수록 가장 많이 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 36).

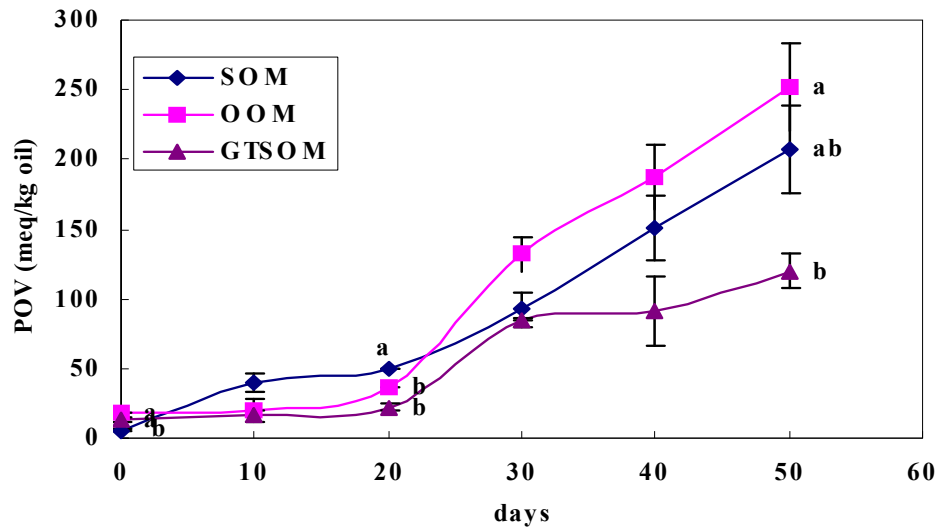


Fig. 35. Changes of peroxide value of mayonnaise contained different oils during storage at 40°C. Values within the same with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Bar represent standard error of mean value. Refer to Table 23.

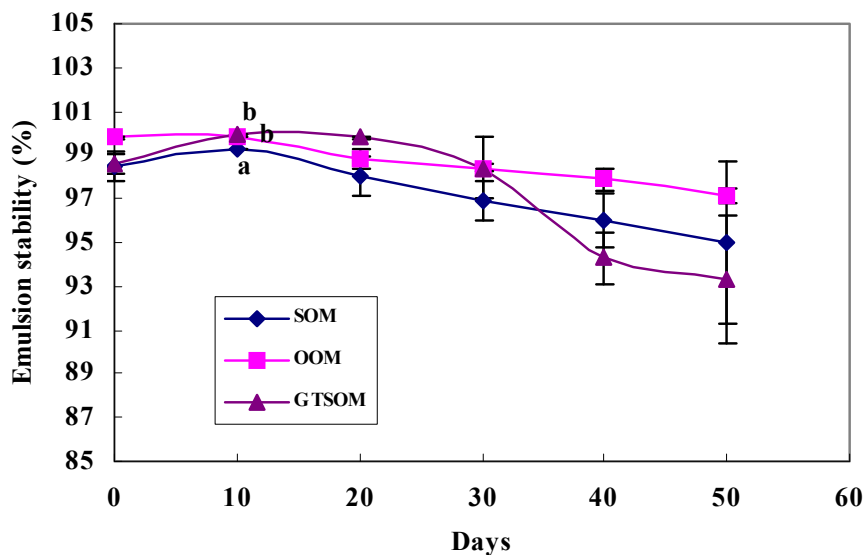


Fig. 36. Changes in emulsion stability of mayonnaise contained different oils during storage at 40°C. Refer to Fig. 34.

3) 관능검사

제조한 마요네즈의 고소한 맛, 색, 매끄러운 정도, 향, 윤기, 부착정도, 전반적인 바람직성을 식품영양학 전공자 20명을 대상으로 관능평가를 실시하였다. 마요네즈 20g을 백색 사기그릇에 담아 5점 척도법으로 평가하였으며 점수가 높을수록 강도 증가하는 것으로 표시하였다. 또한 spreadability는 식빵에 5g의 마요네즈를 올려놓은 다음 knife로 몸 안쪽에서 바깥쪽으로 마요네즈를 식빵에 발라 보아서 쉽게 발라질수록 낮은 점수를 주도록 하였다.

3종의 마요네즈 중 녹차씨유로 제조한 마요네즈가 Table 24에서 보듯이 냄새의 조화, 색깔 등이 유의적으로 높게 나타났으며 윤기, 먹고 난 후의 고소한 느낌 및 빵에 발랐을 때 잘 퍼지는 것으로 나타났다. 따라서 녹차씨유로 조제한 마요네즈의 전체적인 기호도가 3.57로 가장 높은 점수를 얻었다. 시중에 판매되고 있는 대두유를 사용한 마요네즈에 비해 전체적인 선호도와 먹고 난 후의 고소함, 빵에 발

랐을 때 잘 퍼짐은 유사한 수준이었다.

따라서, 이상의 결과들로 미루어 볼 때 녹차씨유로 조제한 마요네즈는 시중에 판매되는 마요네즈와 비교시 유화안정성이 떨어지나 산화안정성은 녹차씨유로 만든 마요네즈가 더 안정한 것으로 나타났으며 관능적인 평가에서도 떨어지지 않는 것으로 나타났다.

Table 24. Sensory evaluation of mayonnaise contained different oils

	SOM	OOM	GTSOM
기름냄새	2.50±0.50 ¹⁾	1.67±0.21	2.00±0.26
달걀냄새	1.86±0.34	2.14±0.46	2.43±0.48
식초냄새	3.57±0.43 ^a	2.00±0.44 ^{b2)}	2.00±0.31 ^b
냄새조화	2.33±0.42 ^b	3.00±0.31 ^{ab}	3.71±0.18 ^a
색깔	3.86±0.26 ^a	2.86±0.34 ^b	4.00±0.22 ^a
윤기	3.29±0.42	3.43±0.20	4.00±0.22
먹고 난 후 고소한 느낌	3.57±0.48	2.43±0.37	3.57±0.43
잘 퍼짐	3.00±0.31	3.43±0.20	3.57±0.48
전체적인 기호도	3.29±0.29 ^a	2.29±0.36 ^b	3.57±0.30 ^a

^{1),2)} Refer to Table 22.

2. 화장품

가. 화장품 조성 및 제조과정

녹차씨 주정추출물 및 열수추출물은 각각 0%, 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1.0%의 농도 별로 첨가하여 수상에 미리 중탕으로 녹여 분산시켜두었다가 첨가하였다. Lotion 제조의 조성은 Table 25와 같으며 제조 과정을 Fig. 37과 같다.

Table 25. The composition of lotion

		Wt(%)
유상	홍화씨유	4g
	녹차씨유	4g
	유화제(천연유화제)	1g
	폴리솔베이트	0.5g
수상	글리세린	8g
	녹차씨 주정추출물	0-1.0%
	녹차씨 열수추출물	0-1.0%
	꿀	2g
	천연방부제(메틸파라핀)	0.3g
	점도제	1.4g
	물	to 100g

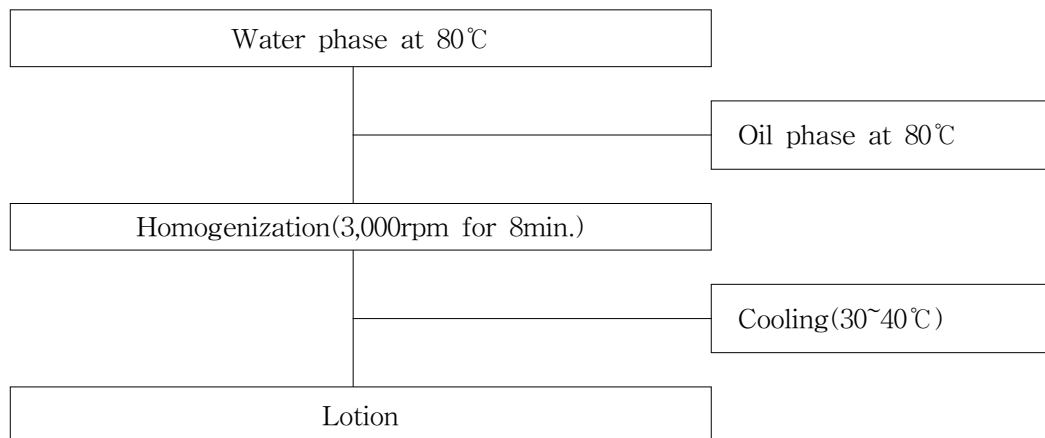


Fig. 37. Schematic diagram of cream preparation

나. 열수추출물 첨가 로션의 물리적 특성

1) pH 및 색도 측정

녹차씨 추출물이 첨가된 화장품 2g을 정제수 30ml에 용해시킨 후 pH meter로 측정하였다. 색도는 색차계(Minolta, Japan)를 사용하여 측정하였다. 본 연구에서 조제한 녹차씨 열수 추출물 첨가 로션의 외형은 Fig. 38에서 보는 바와 같으며, pH와 색도는 Table 26에서 보는 바와 같다.

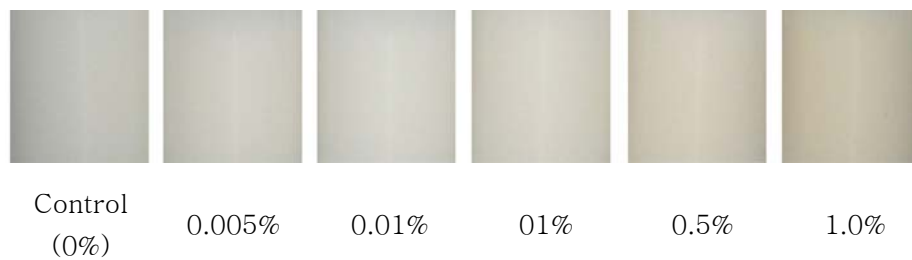


Fig. 38. Appearance of lotion containing green tea seed hot water extract with different concentrations

Table 26. Color value and pH of lotion containing green tea seed hot water extract with different concentrations

Green tea seed hot water extract(%)	Color value			pH
	L	a	b	
control (0%)	97.5	-0.09	1.66	6.14
0.005%	105.8	-0.06	2.89	6.11
0.01%	105.8	-0.06	4.00	6.11
0.1%	108.7	-0.09	4.46	6.09
0.5%	113.9	-0.12	8.24	6.08
1.0%	108.8	-0.21	9.61	5.98

2) 저장기간과 저장온도에 따른 pH 변화

0°C, 20°C, 40°C에서 28일 간 방치하여 pH 변화를 측정하였다. pH의 저하는 세균의 번식을 억제하는 역할을 하므로 녹차씨 열수 추출물의 첨가는 화장품 제조에 유리한 작용을 하는 것으로 보인다(Fig. 39).

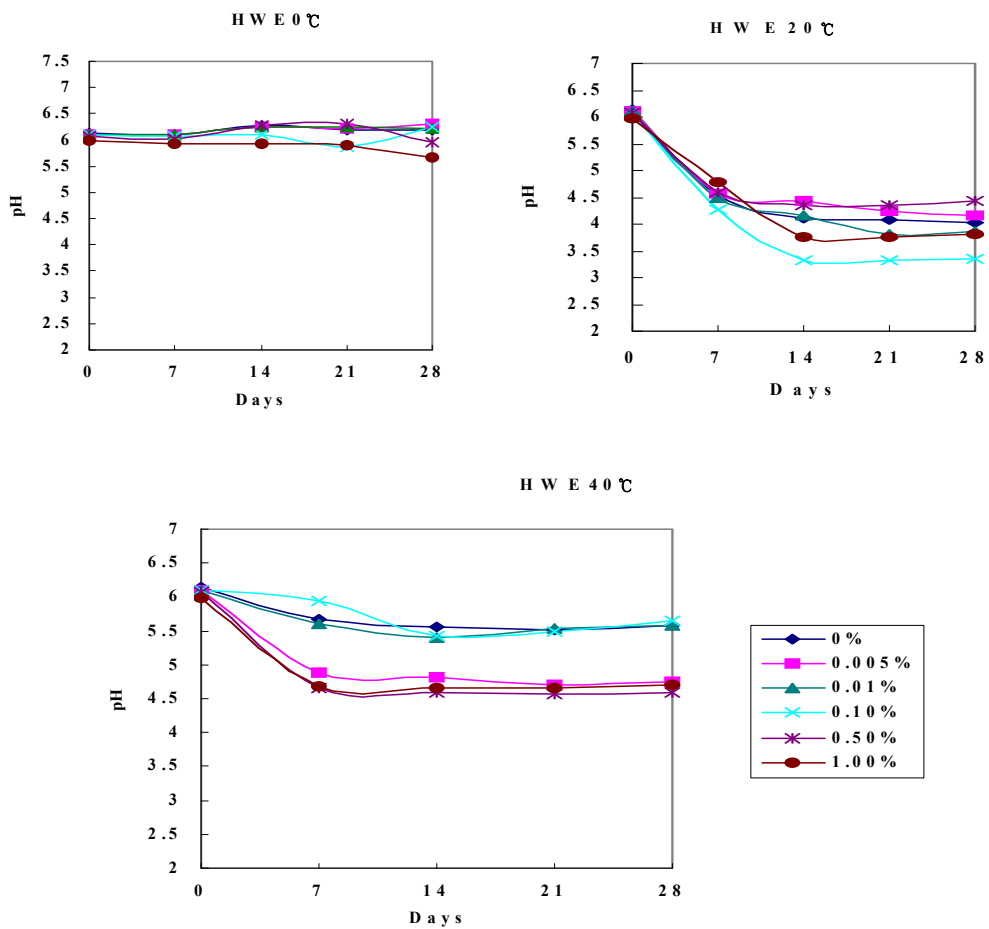


Fig. 39. Changes of pH of lotion contained green tea seed hot water extract with different concentrations during storage at 0°C, 10°C and 40°C.

3) 내온성 평가

저장기간에 따른 성상의 변화는 내온성으로 평가하였다. 즉, 0℃, 20℃, 40℃에서 28일 간 방치하고 실온보관 제품을 표준품으로 하여 실험품의 상태 변화를 육안으로 관찰하여 상 분리 유무를 측정하였으며 표준품으로는 Calendula sage moisture lotion (THEFACESHOP, Korea)을 사용하였다. 열수 추출물 0.1%, 0.5%, 1.0%를 첨가한 로션의 경우 40℃에서 저장 20일 경에 층 분리가 생겼다.

4) Freezing-thawing cycling 평가

동결과 해동을 1일씩 교대, 반복하는 과정을 고체상에서 액체상으로, 액체상에서 고체상으로 물성을 교대로 변화시켜 보는 평가법으로 7일간 -10℃, 25℃를 교대, 반복 실시하는 과정에서 육안으로 상분리가 일어났는지 여부로 안정성 평가한 결과 모든 농도에서 안정하였다.

마) 안정성 실험

10℃, 0℃, 실온, 37℃에서 각각 한 달 간 방치하여 주로 실온보관 제품을 표준품으로 하여 육안적 관찰(상분리 유무 측정) 변화를 측정하였으며 안정성 평가에서 모든 농도에서 상분리가 발생하지 않았으므로 안정한 것으로 사료된다.

따라서 이상의 결과들로 미루어 볼 때 열수 추출물을 첨가하는 로션의 녹차씨 열수 추출물 농도는 0.01% 농도가 적당한 것으로 사료된다.

다. 주정추출물 첨가 로션의 물리적 특성

1) pH 및 색도 측정

녹차씨 추출물이 첨가된 화장품 2g을 정제수 30ml에 용해시킨 후 pH meter로 측정하였으며 색도는 색차계(Minolta, Japan)를 사용하여 측정하였다. 본 연구에서 조제한 녹차씨 주정추출물을 첨가한 로션의 외형은 Fig. 40과 같으며 pH와 색도는 Table 27에서 보는 바와 같다.

2) 저장기간과 저장 온도에 따른 pH 변화

0℃, 20℃, 40℃에서 28일 간 방치하여 pH 변화를 측정하였다(Fig. 41). pH의 저하는 세균의 번식을 억제하는 역할을 하므로 녹차씨 열수 추출물의 첨가는 화장품 제조에 유리한 작용을 하는 것으로 보인다.

3) 내온성 평가

0℃, 20℃, 40℃에서 28일 간 방치하고 실온보관 제품을 표준품으로 하여 실험품의 상태 변화를 육안으로 관찰하여 상 분리 유무를 측정하였으며 표준품으로는 Calendula sage moisture lotion (THEFACESHOP, Korea)을 사용하였다. 저장기간에 따른 주정 추출물을 첨가한 로션의 경우 28일 간 저장 중 상(狀) 분리가 발생하지 않았다.

4) Freezing-thawing cycling 평가

동결과 해동을 1일씩 교대, 반복하는 과정을 고체상에서 액체상으로, 액체상에서 고체상으로 물성을 교대로 변화시켜 보는 평가법으로 7일간 -10℃, 25℃를 교대, 반복 실시하는 과정에서 육안으로 상분리가 일어났는지 여부로 안정성을 평가한 결과 모든 농도에서 안정하였다.

5) 안정성 실험

10℃, 0℃, 실온, 37℃에서 각각 한 달 간 방치하여 주로 실온보관 제품을 표준품으로 하여 육안적 관찰(상분리 유무 측정) 변화를 측정하였으며 모든 농도에서 상분리가 발생하지 않았으므로 안정한 것으로 사료된다.

따라서 이상의 결과들로 미루어 볼 때 녹차씨 주정추출물의 로션 제조 시 첨가량은 0.01과 0.10%가 가장 바람직한 것으로 사료된다.

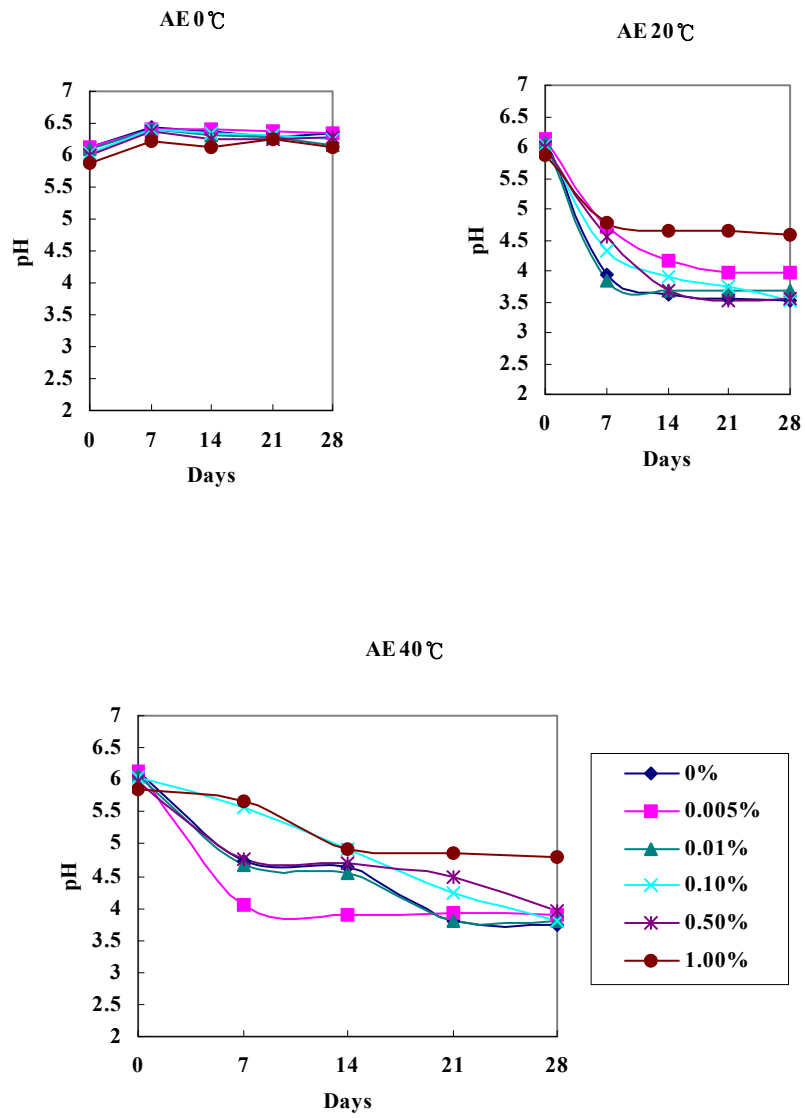


Fig. 41. Changes of pH of lotion contained green tea seed alcohol extract with different concentrations during storage at 0°C, 10°C and 40°C.

3. 비누조제

가. 비누 조성 및 물리적 특성

1) 가성소다를 첨가한 비누

가성소다를 첨가한 비누의 기본 조성은 Table 28과 같으며 비누 제조 과정은 Fig. 42와 같다.

Table 28. The composition of cosmetic soap

		Wt(%)
Lipid phase	Sweet almond	14g
	Green tea seed oil	18g
	coconut	50g
	Palm oil	50g
Water phase	NaOH	
	H ₂ O	

<수상은 <http://www.miyin.com>에서 가성소다 계산기 이용>

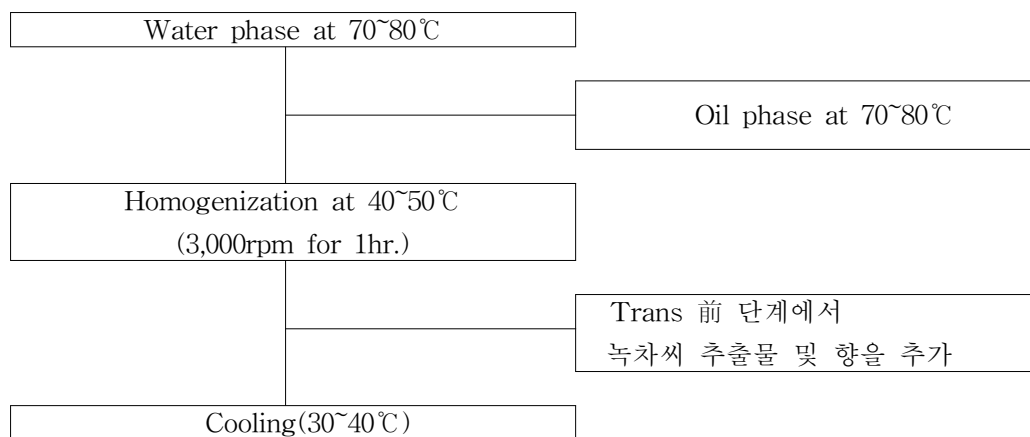


Fig. 42. Schematic diagram of cosmetic soap preparation

가) 열수추출물 첨가 비누

열수추출물 첨가 비누의 물리적 특성을 12명을 대상으로 비누를 사용하고 난 후에 설문지를 통해 6구간 척도법으로 평가하였다. 점수가 높을수록 바람직한 것으로 평가하였다. Table 29에서 보는 바와 같이 거품성과 자극이 없는 것에 가장 높은 점수를 얻은 것은 열수추출물 0.5%를 첨가한 비누였다. 그러나 촉촉함은 열수추출물 1.0% 첨가한 비누에서 가장 높은 점수를 얻었다. Fig. 43은 열수추출물을 첨가한 비누의 색깔의 비교한 것이다.

Table 29. Physical characteristics of cosmetic soap contained green tea seed hot water extract with different concentrations.

GTSWE (%)	Color	Foaming	Rinsing	Moisture	Not irritancy
control (0%)	3.23±0.44 ^{1)b2)}	2.00±0.46 ^a	2.45±0.55	2.56±0.63	2.50±0.67
0.005%	3.92±0.40 ^{bc}	4.00±0.56 ^b	4.18±0.52	3.11±0.45	3.50±0.76
0.01%	4.77±0.36 ^c	3.33±0.38 ^{ab}	3.36±0.31	3.56±0.58	3.17±0.83
0.1%	4.00±0.34 ^{bc}	3.25±0.45 ^{ab}	3.82±0.38	3.67±0.50	3.67±0.76
0.5%	3.15±0.49 ^b	4.25±0.39 ^b	3.64±0.54	3.89±0.48	4.17±0.60
1.0%	1.92±0.47 ^a	4.17±0.49 ^b	3.55±0.69	4.22±0.74	4.00±0.68

¹⁾means±SE ²⁾Values within the same with different superscripts differ significantly($p<0.05$) by Duncan's multiple range test

GTSWE; green tea seed hot water extract

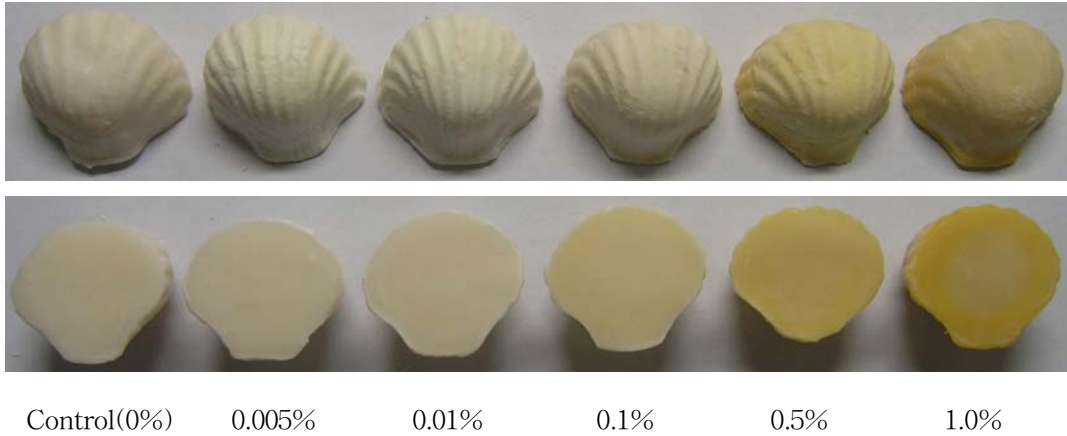


Fig. 43. Appearance of cosmetic soap containing green tea seed hot water extract with different concentrations

나) 주정추출물 첨가 비누

위와 동일한 방법으로 평가한 녹차씨 주정추출물 첨가 비누의 평가는 Table 30에서 보는 바와 같이 거품성과 자극이 없는 것에 가장 높은 점수를 얻은 것은 주정추출물 1.0%를 첨가한 비누였다. 그러나 촉촉함은 주정추출물 1.0% 첨가한 비누에서 가장 높은 점수를 얻었다. Fig. 44는 열수추출물을 첨가한 비누의 색깔의 비교한 것이다.

Table 30. Physical characteristics of cosmetic soap contained green tea seed alcohol extract with different concentrations.

GTSAE(%)	Color	Foaming	Rinsing	Moisture	Not irritancy
control (0%)	3.62±0.47 ¹⁾	2.31±0.55 ^{a2)}	3.42±0.65	1.50±0.27 ^a	1.57±0.30 ^a
0.005%	4.15±0.425	3.23±0.46 ^{ab}	4.08±0.48	3.30±0.56 ^{bc}	3.29±0.71 ^{bc}
0.01%	3.38±0.45	3.08±0.33 ^{ab}	4.17±0.41	3.20±0.51 ^b	2.14±0.40 ^{ab}
0.1%	3.77±0.34	3.54±0.31 ^{abc}	3.58±0.26	3.60±0.27 ^{bcd}	4.00±0.38 ^{cd}
0.5%	3.38±0.55	4.62±0.46 ^c	3.17±0.53	4.60±0.50 ^{cd}	5.14±0.26 ^d
1.0%	2.69±0.58	4.23±0.50 ^{bc}	2.58±0.51	4.80±0.44 ^d	4.86±0.46 ^d

^{1),2)} Refer to Table 29 GTSAE; green tea seed alcohol extract



Fig. 44. Appearance of cosmetic soap containing green tea seed alcohol extract with different concentrations

2) 비누베이스를 사용한 비누

비누베이스를 사용한 녹차씨 추출물을 첨가한 비누 조제는 Table 31과 같다. 녹차씨 주정추출물 및 열수추출물은 각각 0%, 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1.0%의 농도별로 글리세린에 녹여 첨가하였다.

Table 31. The composition of cosmetic soap used soap base containing green tea seed alcohol extract with different concentrations

	Wt(g)
base	990g
Glycerin	10g
Green tea seed extract	0~10g

가) 관능평가 및 세정력 확인

관능평가와 세정력 확인은 설문지를 사용하여 평가하였으며 설문지는 각 문항별 6구간 척도법으로 평가하였다.

(1) 열수추출물 첨가 투명비누

열수추출물 첨가 투명비누의 물리적 특성은 Table 32에서 보듯이 열수추출물 1.0% 첨가한 비누의 색, 거품성, 촉촉함 및 자극성이 없는 점 등이 가장 높은 점수를 얻었다. 비누의 외형은 Fig. 45에서 보는 바와 같다.

Table 32. Physical characteristics of cosmetic soap used soap base containing green tea seed hot water extract with different concentrations

GTSWE(%)	Color	Foaming	Rinsing	Moisture	Not irritancy
control (0%)	2.88±0.69 ^{1)a2)}	3.50±0.82	3.75±0.84	4.25±0.70	4.25±0.67
0.005%	2.50±0.42 ^a	3.00±0.53	3.25±0.65	3.88±0.69	4.29±0.64
0.01%	2.88±0.40 ^a	3.88±0.40	4.75±0.37	4.50±0.60	4.13±0.74
0.1%	3.63±0.60 ^{ab}	3.13±0.44	4.00±0.46	4.25±0.59	4.25±0.56
0.5%	4.88±0.55 ^b	3.63±0.56	3.50±0.57	4.75±0.45	4.75±0.31
1.0%	4.88±0.48 ^b	4.13±0.77	3.88±0.88	4.88±0.67	4.88±0.24

^{1),2)}Refer to Table 29.

GTSWE; green tea seed water extract

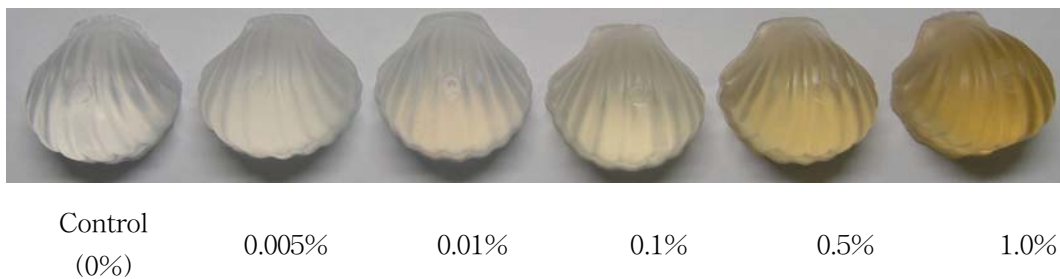


Fig. 45. Appearance of cosmetic soap used soap base containing green tea seed hot water extract with different concentrations

(2) 주정추출물 첨가 투명비누

주정추출물 첨가 투명비누의 물리적 특성은 Table 33에서 보듯이 주정추출물 0.5% 첨가한 비누의 색, 촉촉함 및 자극성이 없는 점 등이 가장 높은 점수를 얻었다. 비누의 외형은 Fig. 46에서 보는 바와 같다.

Table 33. Physical characteristics of cosmetic soap used soap base containing green tea seed alcohol extract with different concentrations

GTSAE(%)	Color	Foaming	Rinsing	Moisture	Not irritancy
control (0%)	1.87±0.55 ^{1)a2)}	3.57±0.95	2.71±0.89	2.83±0.40 ^a	3.29±0.78
0.005%	2.88±0.40 ^a	4.00±0.50	2.88±0.48	3.00±0.22 ^a	3.63±0.46
0.01%	2.88±0.30 ^a	3.50±0.53	3.63±0.42	2.86±0.34 ^a	3.50±0.42
0.1%	3.25±0.67 ^a	3.00±0.38	3.50±0.38	3.71±0.18 ^a	3.38±0.42
0.5%	4.88±0.55 ^b	3.75±0.59	3.88±0.52	4.86±0.34 ^b	4.75±0.41
1.0%	4.75±0.45 ^b	3.50±0.78	4.00±0.80	4.57±0.57 ^b	4.50±0.68

^{1),2)}Refer to Table 25. GTSAE; green tea seed alcohol extract

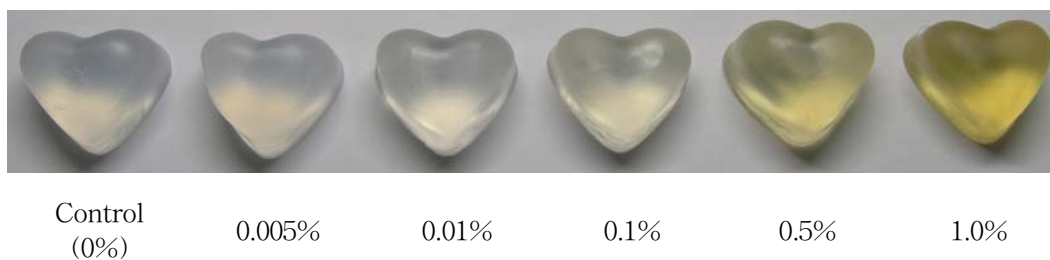


Fig. 46. Appearance of cosmetic soap used soap base containing green tea seed alcohol extract with different concentrations

(3) 열수추출물과 주정추출물 첨가 투명비누의 평가

평가자 10명을 대상으로 1차 평가 결과 0.5% 녹차씨 주정추출물과 1.0% 녹차씨 열수추출물을 첨가한 투명비누를 선정하여 2차 평가를 5구간 척도법으로 실시한 결과는 Table 30과 같은 결과를 얻었다.

Table 34. Comparisons of physical characteristics of cosmetic soap used soap base containing 1.0% green tea seed hot water extract and 0.5% green tea seed alcohol extract

Cosmetic soap		Color	Foaming	Rinsing	Moisture	Not irritancy
Contained	AE 0.5%	4.4	3.7	3.9	3.6	4.8
Contained	HWE 1.0%	3.6	3.7	3.8	3.6	4.8

(4) 녹차씨 추출물을 첨가한 비누의 임상시험 결과

녹차씨 주정 추출물 0.5% 첨가 투명비누를 여드름이 발생한 3명을 대상으로 임상시험을 실시하였다. 2006년 11월 22일부터 5주 동안 실시하였으며 그 결과는 사진으로 확인하였다(Fig. 47). 대상자들의 경우 모두 증세가 호전된 것으로 나타났다.

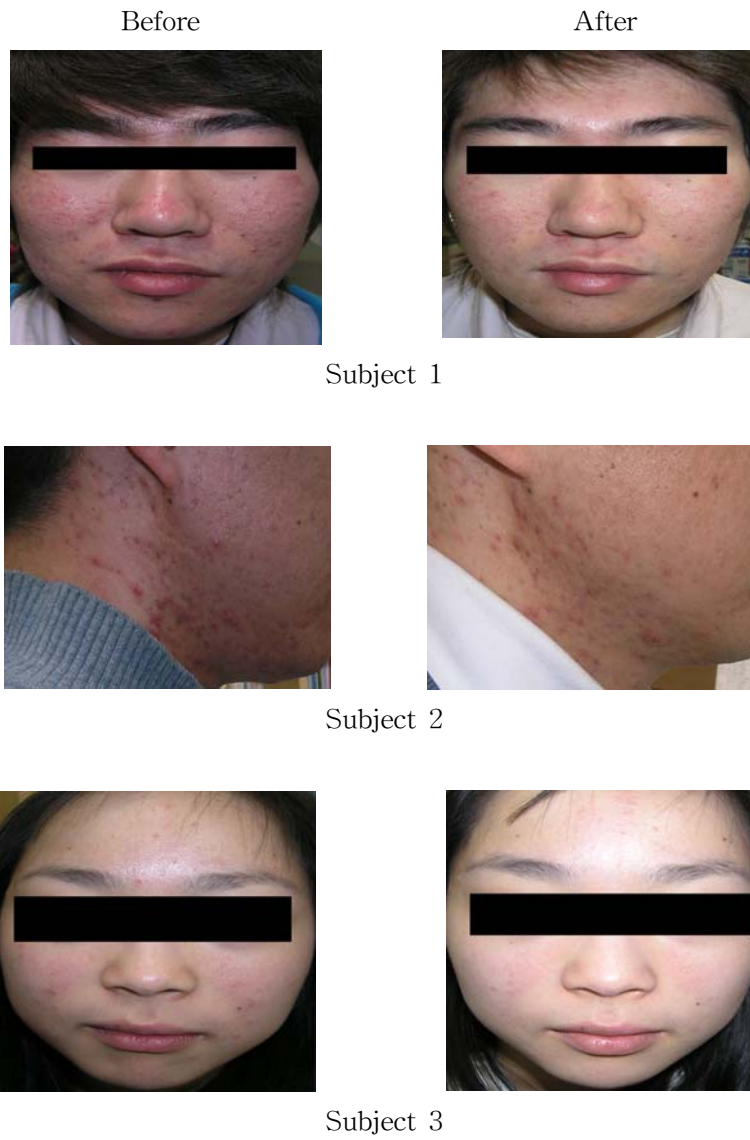


Fig. 47. Changes of the subjects used cosmetic soap before and after containing 0.5% green tea seed alcohol extract

제 5 절 결론

본 연구에서는 녹차씨의 항염증 및 항동맥경화 효능을 평가하고 기능성 소재를 개발하여 녹차씨의 활용 가능성을 평가하기 위하여 녹차씨유를 추출하여 녹차씨유의 물리화학적 특성 및 저장안정성을 확인하였다. 녹차씨 추출물을 조제하여 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264.7 macrophage cell에서의 항염증 및 항동맥경화 효능을 평가하였다. 그리고 C57BL/mice를 사용하여 전임상실험을 하였고 건강한 성인 흡연자를 대상으로 단기·장기 임상시험을 실시하였다. 녹차씨유의 추출조건은 볶음 처리를 한 압착유가 가장 바람직한 방법으로 생각되며 회수율을 높이기 위한 방안이 필요한 것으로 사료된다. RAW 264.7 cell line에서 산화적 스트레스 유발 상황에서 녹차씨 추출물은 iNOS protein 발현을 유의적으로 저해하는 것으로 나타났다.

녹차씨유의 장기간 섭취가 혈장 콜레스테롤과 간 조직에서의 항산화능 및 염증반응인자에 미치는 영향을 동맥경화 유발이 용이한 콜레스테롤식이를 섭취시킨 4주령의 C57BL/6 mice에서 녹차씨유의 일정기간섭취는 콜레스테롤식이 섭취에 따른 혈장의 콜레스테롤 농도 억제하는 효과가 있으며 옥수수유 섭취군에 비해 효과적으로 TBARS생성을 낮추므로 녹차씨유가 콜레스테롤식이 섭취에 따른 산화적 스트레스를 방어하는 효과가 있고 녹차씨유가 혈장과 대식세포에서의 염증반응에 미치는 영향은 옥수수유나 올리브유와 크게 다르지 않는 것으로 생각되었다. 녹차씨 추출물을 보충한 식이를 6주간 제공받은 C57BL/6 mice의 복강 대식세포에서 SOD 활성과 간의 항산화 효소계 활성화에서 현저하게 높은 수준을 보였다. 동맥조직에서 VCAM-1의 발현을 억제하고 eNOS 유전자 발현의 활성화 증진을 보였다. 단기 임상시험에서 녹차씨 추출물이 고지방식이를 섭취한 후 혈 중의 TBARS와 TNF- α 생성을 억제함으로써 항산화 및 항염증 효과가 있는 것으로 확인되었다. 장기임상시험에서 흡연자들에게 있어 4주간의 녹차씨 추출물의 보충이 항산화 효소계를 활성화 시켜 체내 산화적 스트레스를 경감시키고 혈소판 응집력을 낮추어 주는 것으로 나타났다. 이와 같이 녹차씨 추출물은 TG와 총 콜레스테롤의 농도를 감소시키며, 항동맥경화 지수와 총 항산화능 및 항산화 효소계 활성을 증가시켰고 체내 염증생성인자인 TNF- α 의 생성과 VCAM-1의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다.

따라서, 녹차씨의 항염증 및 항동맥경화 효능을 가진 소재 물질로서 향후 동맥경화를 예방물질로서 연구할 가치가 있다고 판단이 된다.

1. 추출조건에 따른 녹차씨유의 회수율은 볶음 처리를 한 압착 방법 (GRS)에서의 수율이 가장 높았으며 GC로 분석한 녹차씨유의 지방산 조성은 C18:1이 41.0~42.2%로 가장 높은 수준이었다. 총 phenol 함량은 지방 100g 당 GRS가 녹차씨유 중 chlorogenic acid (13.7mg)와 caffeic acid (17.0mg)이 가장 높은 수준이었다.
2. RAW 264. 7 macrophage cell line에서 산화적 스트레스 유발 상황에서 녹차씨 메타놀 추출물 (GSTME)과 탈지 녹차씨 메타놀 추출물 (DGSTME)은 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하였고, 이때 IC₅₀ 값은 각각 28.7, 39.7 μ g/ml로 나타났다. 녹차씨 추출물 (GTSE)을 처리한 군에서 superoxide dismutase (SOD), glutathione-peroxidaase (GSH-px), glutathione-reductase (GSH-reductase)는 40 μ g/ml에서 유의적으로 증가하였다. GTSE를 처리했을 때 LPS에 의해 증가된 iNOS protein 발현을 유의적으로 저해하는 것으로 나타났다.
3. 녹차씨유의 일정기간섭취는 콜레스테롤식이 섭취에 따른 혈장의 콜레스테롤 농도 억제하는 효과가 있으며 옥수수유 섭취군에 비해 효과적으로 TBARS생성을 낮추므로 녹차씨유가 콜레스테롤식이 섭취에 따른 산화적 스트레스를 방어하는 효과가 있고 녹차씨유가 혈장과 대식세포에서의 염증반응에 미치는 영향은 옥수수유나 올리브유와 유사한 것으로 생각되었다.
4. 동맥경화 식이에 GTSE (열수추출물 I과 II, 주정추출물 I과 II)을 첨가한 식이를 6주간 제공받은 C57BL/6 mice의 혈청 cholesterol (TC)는 각 군 간의 유의적인 차이는 없었으나 GTSE를 섭취한 군에서 현저한 감소를 보였다. 복강 대식세포의 SOD 활성은 각 군 간의 유의적인 차이(p<0.05)를 보였으며 GTSE군에서 열수 추출물(HWE) II 군이 가장 높은 것으로 나타났다. 간의 glutathione 함량, Cu,Zn-SOD와 Mn-SOD, catalase, GSH-px와 GSH-reductase 활성은 GTSE를 급여한 군에서 높은 활성을 보였다. GTSE의 동맥조직에서 혈관이완과 혈소판 응집, 심혈관 항상성의 기작 조절과 관련 있는 nitric oxide 생성 효소인 eNOS과 항동맥경화 효과를 확인하기 위해 VCAM-1의 mRNA gene expression을 확인한 결과 GTSE를 섭취한 군에서 eNOS활성 증진과 VCAM-1를 감소시키는 것으로 보아 CAMs의 생성을 효과적으로 감소시켜 동맥경화를 예방할 수 있을 것으로 사료된다. 주정추출물(AE)이 HWE에 비해 LDL-콜레스테롤을 현저하게 감소시켰으나

HWE이 AE에 비해 복강대식세포의 SOD 활성과 동맥조직의 eNOS 발현을 증가시키고 VCAM-1의 발현은 감소시키는 것으로 나타났다.

5. 단기임상시험으로 건강한 성인 남자 흡연자(10명)에게 녹차씨 열수 추출물(GTSWE)과 녹차씨 주정 추출물(GTSAE)를 250mg/capsule로 조제하여 1개씩을 섭취시킨 후 고지방식(37.2% fat / total kcal)을 섭취시켰다. Placebo 군 (PG)은 쌀가루를 동일한 양으로 조제하여 제공하였으며 동일한 대상자를 대상으로 다음 시험까지 1주일의 휴식기를 두었다. 를 혈 중 TG의 수준은 녹차씨 추출물(GTSE)을 보충한 군 에서 시간이 경과함에 따라 유의적으로 감소하는 결과를 보였으나 섭취 후 6시간 경과시에는 군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 총 항산화능은 GTSE군에서 PG에 비해 2시간 경과 후 유의적으로 높은 수준이었다. GTSE군이 고지방식을 섭취한 후 혈 중의 TBARS와 TNF- α 생성을 억제함으로써 항산화 및 항염증 효과가 있는 것으로 사료된다. 그러나, TNF- α 와 TBARS의 수준이 GTSAE군이 GTSWE군보다 다소 낮았으나 두 군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다.
6. 장기임상시험에서 건강한 성인 남자 흡연자들(11명, 1갑 이상/일)에게 있어 4주간의 GTSE의 보충이 혈압과 염증생성인자인 TNF- α 생성을 PG에 비해 유의적으로 감소시켰다($p < 0.05$). 혈 중 지질농도의 수준은 GTSE군이 PG에 비해 TG, LDL-콜레스테롤 농도를 감소시키며 HDL-콜레스테롤 농도를 증가시켜 항동맥경화지수를 상승시켰다. 녹차씨 추출물을 보충한 군의 혈소판 응집력 유의적 $p < 0.01$)으로 감소하는 것으로 나타났다. 적혈구의 SOD, catalase, GSH-px, GSH-red과 Cu,Zn-SOD 활성이 모두 GTSE군에서 PG에 비해 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가하는 것으로 나타나 GTSE의 보충이 항산화 효소계를 활성화시켜 체내 산화적 스트레스를 경감시키는 것으로 나타났다.
7. 녹차씨 추출물을 함유한 화장품비누의 임상시험대상자들에게서 염증이 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 녹차씨유로 제조한 마요네즈는 대두유로 제조한 마요네즈에 비해 저장안정성이 높았으며 기호도 조사에서도 전체적인 기호도가 높게 나타났다.

제 1 협동과제 연구기관	경북대학교
연구 과제명	녹차씨의 발암예방활성 평가 및 제품 개발
연구 책임자	김 정 상

제 6 절 재료 및 방법

1. *In vitro* 실험

가. 실험 재료

1) 시료

경남하동 소재 화개제다(花開製茶)로부터 유기농 녹차씨를 2004년 11월에 공급 받아 외피를 제거한 다음 정선하여 세척한 후 60±5℃의 열풍건조기에서 건조하였다. 건조한 녹차씨를 60 mesh이하로 분쇄하였다.

2) 시약

HPLC분석 및 녹차씨 및 녹차잎 추출을 위해 methanol (HPLC grade)은 Merck사에서, 세포 배양을 위해서 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), alpha-modified minimum essential medium (α-MEM)은 Gibco BRL (NY, USA)의 제품을 그리고 fetal bovine serum은 JRH Biosciences (Lenexa, KS, USA)의 제품을 사용하였다. Western blotting을 위한 시약은 BioRad (Hercules, CA, USA)에서 Primary antibody와 horse radish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 기타 본 연구에 사용한 시약들은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였다.

3) 세포주

실험에 사용된 세포주 BPRc1 (mouse hepatoma, ATCC, CRL-2217)은 American Type Culture Collection (ATCC)사로부터, Hep1c1c7 (mouse hepatoma, KCLB-22026), HepG2 (human hepatocellular carcinoma, KCLB-88065)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받았다. 그리고 HepG2-C8은 김복량(원광대 의과대학, 생화학과)교수로부터 제공받았다.

나. 실험방법

1) 녹차씨에 함유된 catechins류 함량 분석

탈지된 녹차씨 2.5 g을 80 % methanol 20 ml에 3 시간 추출하여 2000 rpm에서 5 분간 원심분리를 하였다. 2회 methanol 추출 후 남아 있는 pellet에 80 % methanol(0.15 % HCl 함유) 로 2회에 걸쳐 추가로 추출한 다음, 각 단계별 추출액을 모아 syringe filter (0.45 μ m, nylon membrane, Corning, USA)로 여과하여 이것을 HPLC용 시료로 이용하였다. HPLC의 분석조건은 Table 1과 같다.

2) 세포배양

HepG2세포는 DMEM (10 % FBS)배지에 hepa1c1c7, BPRc1은 α -MEM (10 % FBS), HepG2-C8은 F-12(10% FBS, 1% essential amino acid, 0.1% insulin)에 각각 배양하였다. 세포배양은 CO₂ incubator (MCO-15AC, SANYO, Japan)에서 37°C, 5 % CO₂의 조건하에서 수행 하였다.

3) 녹차씨의 해독효소계 활성화능 평가

가) NAD(P)H : quinone reductase (QR) activity

QR활성은 Benson (Benson et al., 1980)의 방법에 따라 수행하였다. 1×10^6 개의 Hepa1c1c7, BPRc1세포를 culture dish (ϕ 100 mm)에 분주하여 CO₂ incubator (MCO-15AC, SANYO, Japan)에 37°C, 5% CO₂에 48시간 preincubation하였다. 48 시간 후 α -MEM (10 % FBS)을 제거하고 새로운 배지에 녹차씨 메탄올 추출물, 녹차잎 메탄올 추출물, EGCG, EGC, ECG, EC, gallate, caffeine등의 시료를 첨가하여 24시간 배양한다. 배지를 제거한 다음 차가운 PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄)로 2회 수세하고 0.25 M sucrose로 수집하

였다. 수집한 세포를 ultrasonic cell disrupter (50W, Kontes, Vineland, NJ, USA)로 균질화한 다음, microcentrifuge (VS-15000CFN11, Vision, Seoul, Korea)로 10,500 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 세포 상등액 200 μ l에 250 mM tris-HCl (pH 7.4), 70 mg bovine serum albumin, 0.1 % Tween 20, 500 uM FAD, 2 mM NADH를 첨가한 다음, 기질인 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP)가 단백질 mg당 1분 동안 산화되는 정도를 600 nm에서 측정하였다. 단백질 정량은 Lowry (Peterson et al., 1977) 방법으로 하였다.

나) Western blot analysis

다양한 농도로 처리한 HepG2를 수집한 다음, protein assay kit (BioRad, CA, USA)의 방법에 따라 단백질 정량을 하였다. 30 μ g의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 다음 PVDF membrane(polyvinylidene fluoride; pore size 0.45 μ m, Millipore)로 transfer하였다. Transfer가 완료된 PVDF membrane을 5% non-fat dry milk를 함유한 TBS/T(Tris buffered saline-Tween; 200 mM Tris, 1.37 M NaCl, pH 7.6, 0.1 % Tween 20)으로 비특이적 단백질을 차단하기 위하여 하룻밤 반응시켰다. 계속하여 CYP1A1, CYP1A2, Nrf2에 대한 항체와 3시간 정도 반응시킨 후, 각 항체에 대한 이차항체인 anti-rabbit IgG 또는 anti-goat IgG에 2시간 반응시켰다. 각 반응사이 TBS/T로 10분씩 3회 washing 하였다. 마지막 washing이 끝나면 각 항체에 대한 대응 단백질 band는 Supersignal west pico chemiluminescent substrate(Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 발현시켰다.

다) Luciferase assay

HepG를 culture plate (ϕ 60mm)당 1×10^5 cell/60 mm dish로 분주하여, 48시간 preincubation한 다음, 최종 농도가 각각 GTS 10, 50, 100 μ g/ml, 20 uM t-BHQ 되도록 투여하여 24시간 배양한 후 세포를 수집하여 luciferase 활성을 Promega E4030방법에 따라 측정하였다. 즉, 수집한 시료를 luminometer (Perkin Elmer Victor2 1420)를 통하여 분석하였다. 분석한 시료의 효소 활성은 Protein assay (BioRad, CA, USA)를 이용, 단백질 분석 정량하여 specific activity 값으로 보정하였다.

Table 1. HPLC conditions for analysis of catechins

Items	Conditions
Instrument	HPLC (JASCO 1580)
Column	Shiseido capcell Pak C18 (5 μ m, 4.6 \times 2250 mm, Phenomenex)
Detector	UV 280/210nm
Mobile phase	Solvent A : Solvent B (9 : 1 \rightarrow 4 : 6)
Flow rate	0.5 ml/min
Sample injection	20 μ l

※ Solvent A - 0.5 % H₃PO₄, Solvent B - 50 % CH₃CN in 0.5 % H₃PO₄

라) 핵 내 Nrf2 축적 평가

PBS로 세포를 수집한 다음 500 \times g에서 5 분간 원심분리를 한 다음, 하층에 Nodiet P-40 lysis buffer (50 μ M Tris-HCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 % Nonidet P-40, pH 8.0) 300 μ l 첨가하여 4 $^{\circ}$ C, 10분간 반응시켰다. 500 \times g에서 5 분간 원심분리를 한 후, 상등액은 cytosolic extract로 사용하고 남아있는 하층에 high salt buffer(20 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) 30 μ l를 첨가한 다음, vortexing하였다. 15000 \times g에서 30 분간 원심분리한 후 상등액을 취해 nuclear extract로 사용하였다. 추출한 cytosolic extract와 nuclear extract를 시료로 하여 Nrf2에 대한 western blot을 수행하였다.

다. Antiproliferation 활성평가

1) MTT assay

HepG2, Hepal1c7, BPRc1세포를 96-well plate에 5 \times 10³ cell/well (200 μ l)로 분주한 다음, 4 시간 동안 preincubation하고 GTS 또는 catechins를 (0~100 μ g/ μ l) 농도별로 투여하였다. CO₂ incubator (MCO-15AC, SANYO, Japan)에 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂의 조건에서 72시간 배양한 다음, 1 mg/ml의 농도가 되도록 MTT(3-

[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 첨가한 후, 4 시간 동안 배양하였다. 4시간 후 살아있는 세포에서 mitochondria dehydrogenases에 의해 MTT가 formazan dye결정으로 전환됐다. 여기에 DMSO 150 μ l를 첨가하여 세포에서 formazan dye를 용해시켜낸 다음 microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 DMSO에 대한 흡광도값을 나누어 백분율로 나타내었다.

2) Cell cycle에 미치는 영향

Cell cycle은 propidium iodide (PI)염색법을 이용하였다. 즉, 수집한 세포에 PBS 100 μ l와 ethanol 200 μ l를 첨가한 다음, 4 $^{\circ}$ C, 1시간동안 세포를 고정시켰다. PBS로 2회 washing한 다음 50 μ g/ml RNaseA (1.12 % sodium citrate buffer) 250 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨다. 반응 후, 50 μ g/ml PI (1.12 % sodium citrate buffer) 250 μ l를 첨가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 어두운 곳에서 반응시킨 다음, flow cytometer (Becton Dickinson, FACS Calibur, NJ, USA)로 세포주기별 비율을 분석하였다.

2. *In vivo* 실험

가. 실험 재료

1) 식이재료

동물 실험에 사용된 녹차씨 메탄올 추출물은 80% methanol (v/v)을 시료 100 g에 10배 첨가해 37 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 12시간 추출하였다. 추출물을 여과지(Whatman #2, ADVANTEC, Japan)를 이용하여 감압여과한 다음, rotary evaporator (N-1000, EYELA, Japan)로 methanol을 제거하고 freezer dryer (Ilsin lab, Korea)를 이용하여 완전히 건조시킨 후, 0.9% NaCl에 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 실험동물

체중이 35~42 g인 ICR계 수컷 흰쥐를 대한바이오링크(Daejeon, Korea)에서 분양 받았으며 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험을 시작하였고 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

나. 실험방법

1) 급성 독성 실험

실험 전날 동물을 하루 밤 동안 절식을 시킨 후 녹차씨 메탄올 추출물(GTS)을 5군으로 나누어 1군당 6~7마리가 되도록 하였다. 다음으로는 1군에서부터 5군의 흰쥐에게 시료를 흰쥐 체중 1 kg당 각각 0, 0.5, 1, 2, 5 g의 녹차씨 추출물을 gastric tube를 이용투여하고, 14일간 사육하였다.

2) 생존율 평가

시료를 투여한 이후 매일 흰쥐를 관찰하여 죽거나 행동의 변화가 나타나는가를 살펴보았다.

3) 채혈 및 장기분리

실험동물을 하루 밤 절식 시킨 후 에테르로 마취시키고 개복하여 복부 대동맥에서 채혈을 하였다. 혈액은 2000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈장을 분리하였으며, 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에 보관하였다.

4) 혈장내 GOT, GPT활성 측정

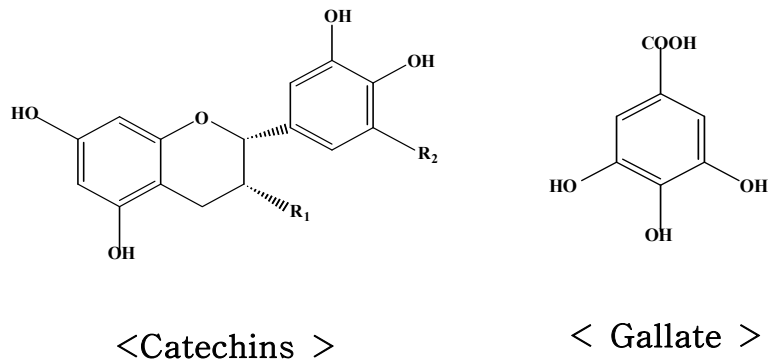
혈장의 GOT, GPT 활성은 Reitman-Frankel 법에 의한 GOT, GPT 측정 kit(아산제약, Korea)를 사용하여 측정하였으며 Karmen U로 나타내었다.

제 7 절 실험결과 및 고찰

1. Catechins 함량

녹차잎에는 polyphenol류에 속하는 flavone-3-ol을 기본으로 하는 catechins으로서 (+)-catechin, (-)-epigallocatechingallate (EGCG), (-) -epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechingallate (ECG), (-)-epicatechin (EC)가 있다. (Fig. 1) 이들은 다양한 생리활성(항산화, 항암, 항비만, 노화억제 작용)이 보고되어 있다.

HPLC를 이용한 녹차씨의 catechin류 함량을 분석한 결과는 Fig. 2, Table 1과 같으며 녹차씨에는 ECG 753 $\mu\text{g/g}$, EGCG가 130 $\mu\text{g/g}$, caffeine 125 $\mu\text{g/g}$, EGC 167 $\mu\text{g/g}$, EC 68 $\mu\text{g/g}$, gallate 61 $\mu\text{g/g}$ 순으로 함유된 것으로 나타났다. 이는 동량의 녹차잎에 비해 catechin류의 함량이 낮은 것으로 나타났으나 catechins의 존재로 오히려 녹차잎과 유사한 생리활성을 나타낼 것으로 예상된다.



Catechin	R ₁	R ₂
(-) Epicatechin (EC)	H	H
(-) Epigallocatechin (EGC)	H	OH
(-) Epicatechin gallate (ECG)	G	H
(-) Epigallocatechin gallate (EGCG)	G	OH

Fig. 1. Chemical structures of catechins present in green tea.

Table 2. Contents of catechins, gallate, caffeine of green tea seed and leaf (ug/g)

	EGCG	EGC	ECG	EC	Gallate	Caffeine
Seed	130	167	753	68	61	125
Leaves	9,435	11,127	3,316	1,303	95	2,508

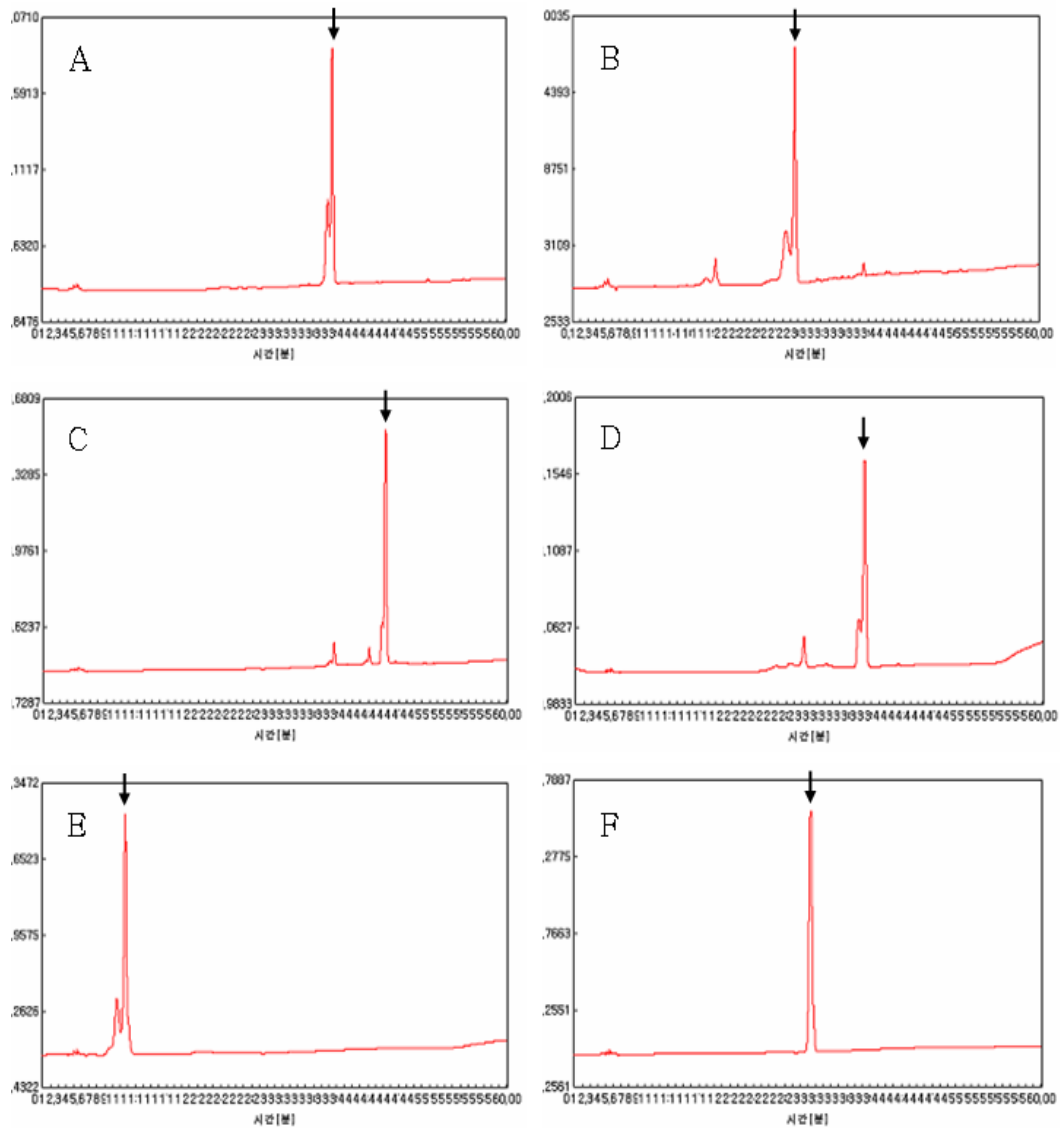


Fig. 2. HPLC Chromatograms of catechins.

A; (-)-epigallocatechingallate (EGCG), B; (-)-epigallocatechin (EGC),
 C; (-)-epicatechingallate (ECG), D; (-)-epicatechin (EC), E; Gallate, E; Caffeine

2. 생리활성 평가

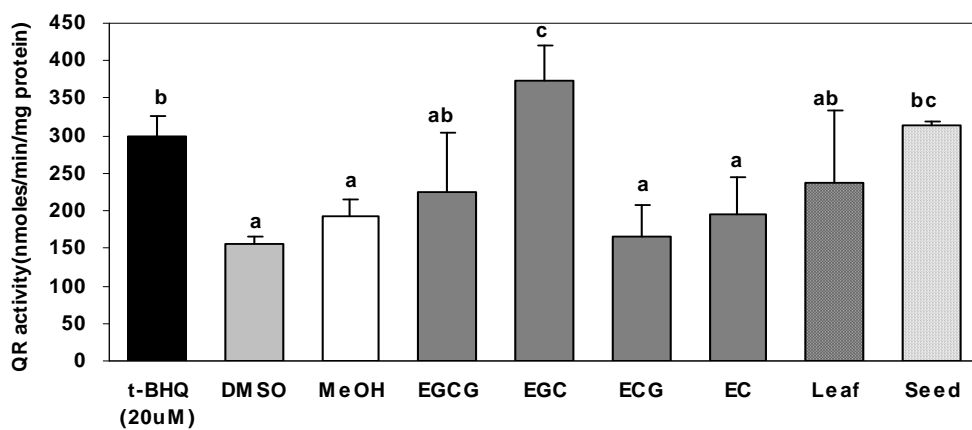
암예방 물질은 다양한 기전을 통하여 활성을 나타내는데, 그 가운데 주요한 두 가지 기전은 해독효소계 활성유도를 통한 암예방과 apoptosis의 유도이다. 해독효소계에는 대표적으로 NAD(P)H : quinone reductase (QR)와 glutathione S-transferase(GST), glucuronyl transferase, sulfotransferase, 그리고 cytochrom P450 등이 있다 이러한 효소들은 정상세포의 DNA나 기타 손상을 입었을때 초기에 유도되어 암화를 방지한다. 또한 apoptosis는 세포예정사라고도 하는데 이는 내외적인 요인에 의하여 손상된 세포가 더 이상 분열되지 않고 세포 스스로가 사멸되는 과정이다.

가. 녹차씨의 해독효소계 활성능 평가

1) NAD(P)H : quinone reductase (QR) 효소활성에 미치는 영향

녹차잎, 녹차씨, 그리고 catechin류가 간세포의 해독효소계의 지표효소인 quinone reductase (QR)을 유도하는지를 비교 조사하고자 실험을 수행한 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 phase 1, 2 해독 효소계를 모두 가진 hapal1c7에서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 EGC>녹차씨>녹차잎 순으로 QR유도 활성이 높았고, Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator(ARNT)가 결여된 BPRc1에서도 역시 EGC> 녹차씨>녹차잎 순으로 QR유도활성이 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 녹차씨 메탄올 추출물은 QR유도활성 또는 해독능력이 높은 소재로 추정된다.

A.



B.

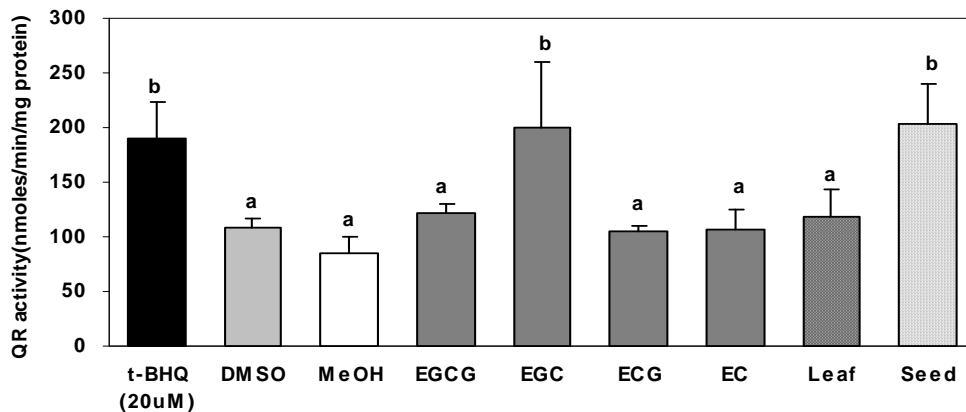


Fig. 3. Quinone reductase-inducing activities of methanolic extracts of green tea seed and leaf.

A; Hepal1c7, B; BPRc1

1) Bars, Mean \pm SD of triplicate data points.

2) Values with different superscript are significantly different at $\alpha=0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

2) pARE-T1-Luciferase의 발현에 미치는 영향

녹차씨 추출물의 QR 효소활성 유도가 antioxidant response element (ARE)의 활성으로 인하여 일어나는 것인지를 reporter assay (luciferase 활성)를 이용하여 평가하여 나타난 결과는 Fig. 4와 같다. 녹차씨 메탄올 추출의 농도 의존적으로 ARE-luciferase의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 QR활성과도 일치하는 결과로 녹차씨의 QR활성 증가는 ARE와 연관이 있는 것으로 추정할 수 있다.

3) Nrf2의 발현에 미치는 영향

Nrf2는 ARE가 활성화되는데 transcriptional activator로 작용한다. 일반적으로, Nrf2는 cytosol 구획에서는 Keap1과 결합하고 있으나, inducer에 의해 Nrf2가 Keap1과 분리되면 Nrf2가 핵내로 유입되고 이러한 Nrf2는 ARE promotor와 결합하여 QR이나 기타 항산화효소의 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있다.

녹차씨 추출물이 Nrf2의 핵내로의 유입을 유도하는지를 조사한 결과, Fig. 5와 같이 시료를 농도 의존적으로 Nrf2의 핵내로의 유입을 증가시켰으며, 세포질에는 농도 의존적으로 Nrf2의 함량이 감소되었다.

4) Cytochrom P450 중 CYP1A1, 1A2의 발현에 미치는 영향

간 해독효소계 지표 중 하나인 cytochrom P450은 다양한 family로 구성되어 있는데, 이중 CYP 1A1, 1A2는 지용성 독성물질을 대사하는 대표적인 효소로 알려져 있다. 그러나 일부 화합물에 대해서는 돌연변이원성을 증가시키기도 하는데, 특히 CYP1B1는 오히려 DNA 손상을 유발하도록 하여 유전적 암화를 일으키는 것으로 보고되고 있다.

녹차씨 메탄올 추출물의 CYP1A1, 1A2의 발현에 미치는 영향은 Fig. 6과 같다. 녹차씨 메탄올 추출물은 CYP1A1, 1A2의 발현을 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 이와 같이 녹차씨 추출물은 간 2상효소계만 아니라 1상효소계인 CYPs에도 영향을 미치는 것으로 나타났다.

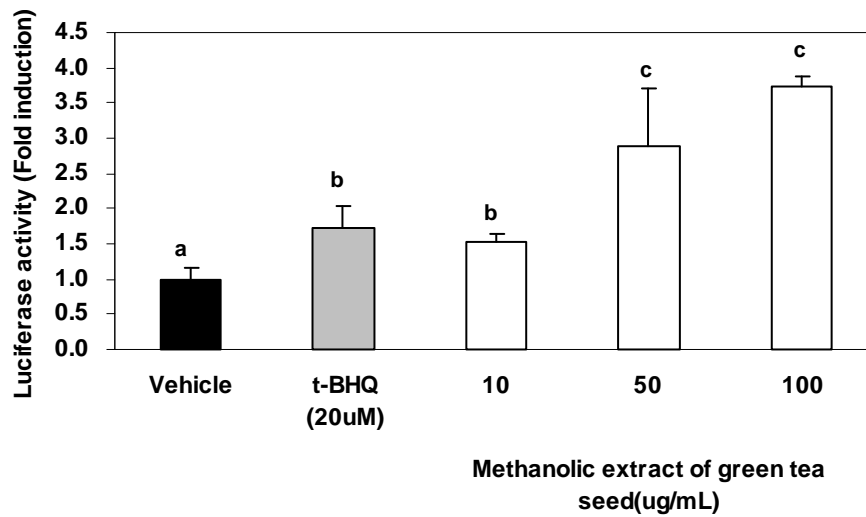


Fig. 4. Induction of lucifertase activity in HepG2-C8 cells transfected with ARE-luciferase construct by methanolic extract of green tea seed. HepG2-C8 were treated with different doses of methanolic extract of green tea seed for 24 hr, and the activity of luciferase was measured. Control cells were treated with 0.1% DMSO. The activity of luciferase was assayed and converted into fold induction of control. 1) Bars, mean \pm SD of triplicate data points. 2) Values with different superscript are significantly different at $\alpha=0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

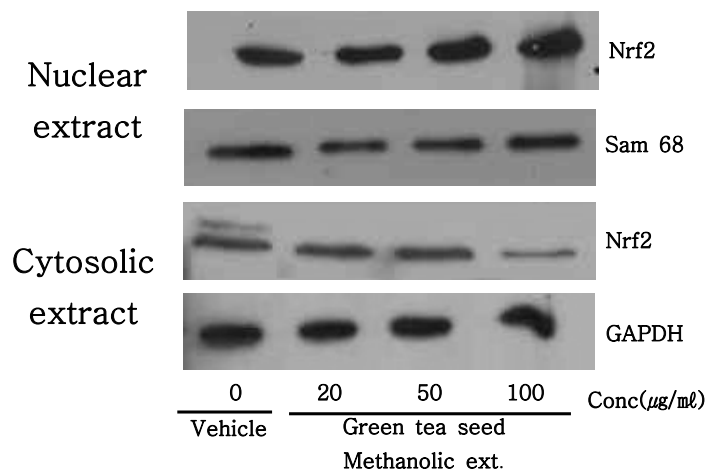


Fig. 5. Effect of methanolic extract of green tea seed on nuclear translocation in HepG2 cells. Nuclear translocation of Nrf2 by methanolic extract of green tea seed was determined by western blot of nuclear and cytosolic lysates.

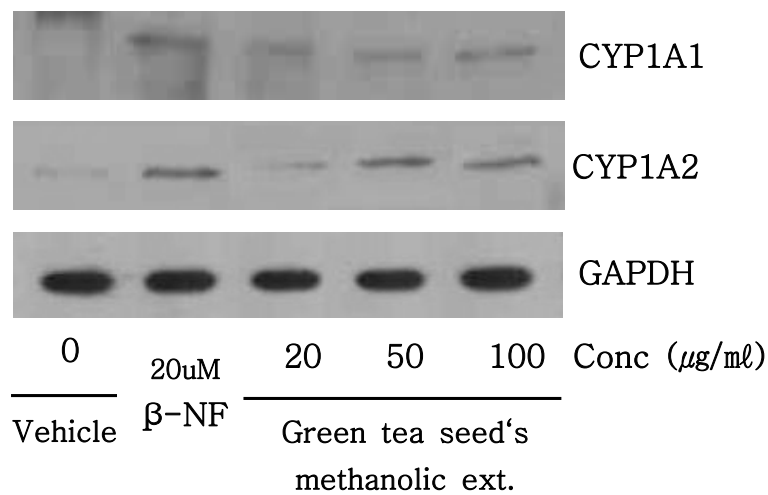


Fig.6. Effect of methanolic extract of green tea seed on expression of CYP1A1 and 1A2 expression as analysed by western blot. β -naphthoflavone was used as positive control.

3. Anti-proliferation 활성 및 세포주기에 미치는 영향

가. Anti-proliferation 활성

녹차씨의 암예방 활성을 알아보기 위해 먼저 다양한 암세포주에 대한 녹차씨 메탄을 추출물이 가지는 생육저해 활성을 MTT 방법으로 평가하였으며 결과는 Fig. 7과 같다. 암세포 증식억제 활성을 평가한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 녹차씨 메탄을 추출물이 마우스의 간암세포(Hepa1c1c7, BPRc1)와 사람의 간암세포(HepG2) 그리고 유방암세포(MDA-MB231)에서 모두 70%이상 세포생육을 저해하였다.

녹차씨 추출물은 녹차잎 추출물과 비교하여 암세포 생육억제 활성이 높은 것으로 나타났다.

나. 세포주기에 미치는 효과

세포주기 가운데 G1 phase는 주로 DNA 복제 timing을 결정하는 시기로 이후 G2기에서 세포분열을 준비하고 분열시작의 timing을 결정하고 세포주기 내 G1 특히 sub G1은 세포가 생존하는데 결정적인 역할을 한다고 할 수 있다. 녹차씨에 의한 세포주기를 살펴본 결과는 Fig. 7과 같다.

녹차씨 추출물은 세포주기 중 subG1의 arrest를 유도하여 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 subG1 phase에 있는 세포의 비율이 21.96 %, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 26.13 %, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 54.44 %로 나타나는 것으로 관찰되어졌다. 특히 녹차씨 메탄을 추출물은 apoptosis를 유도하는 대표적인 물질로 알려진 staurospoin(1 μM)보다 더욱 높은 활성을 나타내는 것으로 나타났다.

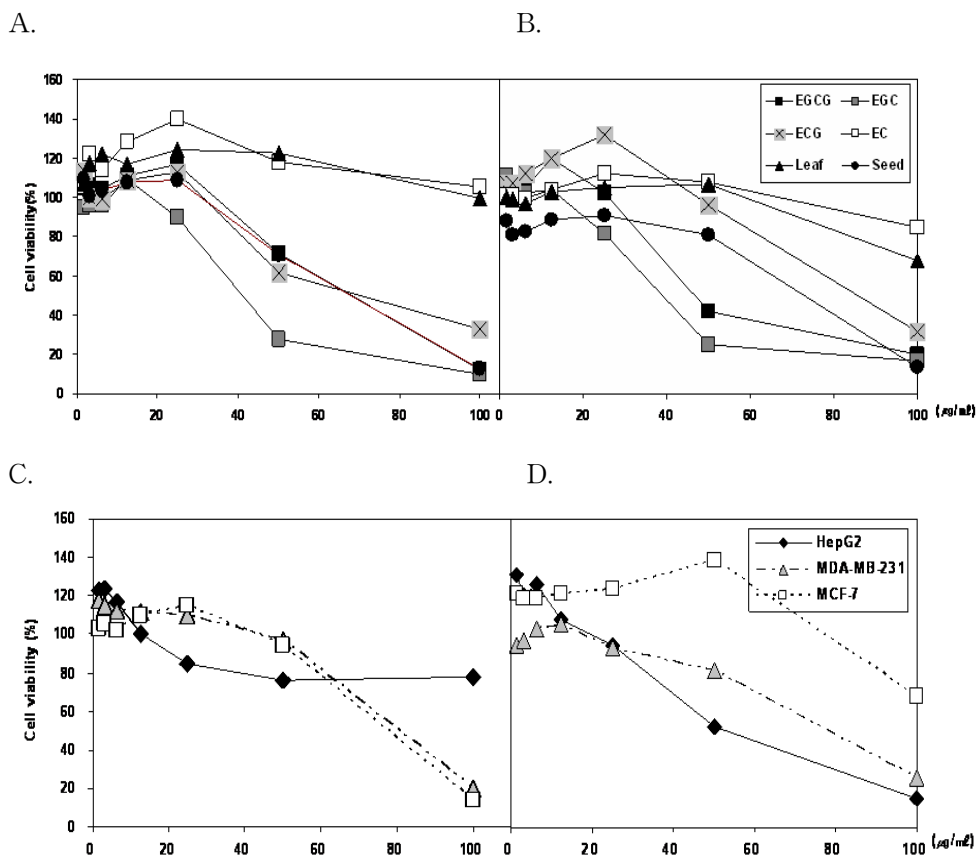


Fig. 7. Antiproliferative activity of catechins, green tea seed and leaf extracts for hep1c7 and HepG2 cells.

A; Hep1c7, B; BPRc1, C; green tea leaf extract, D; green tea seed extract
Methanolic extracts of green tea seed and leaves or catechins were added to cells pre-cultured for 4 hours, and incubated another 72 hours, followed by cell survival evaluation by MTT assay.

1) Data are mean \pm SD of triplicate data measurements.

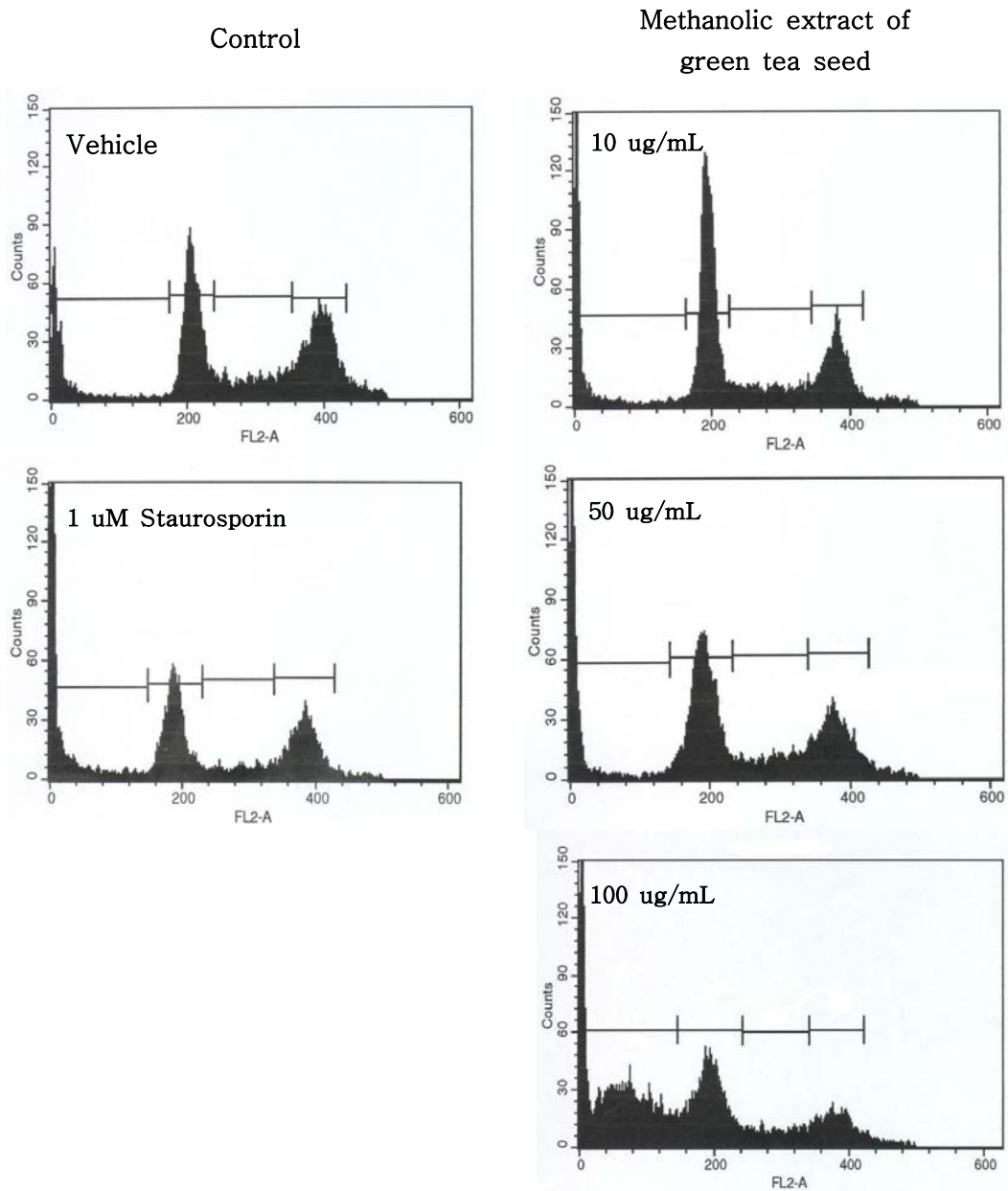


Fig. 7. Effect of green tea seed extract on cell cycle of HepG2 cells.

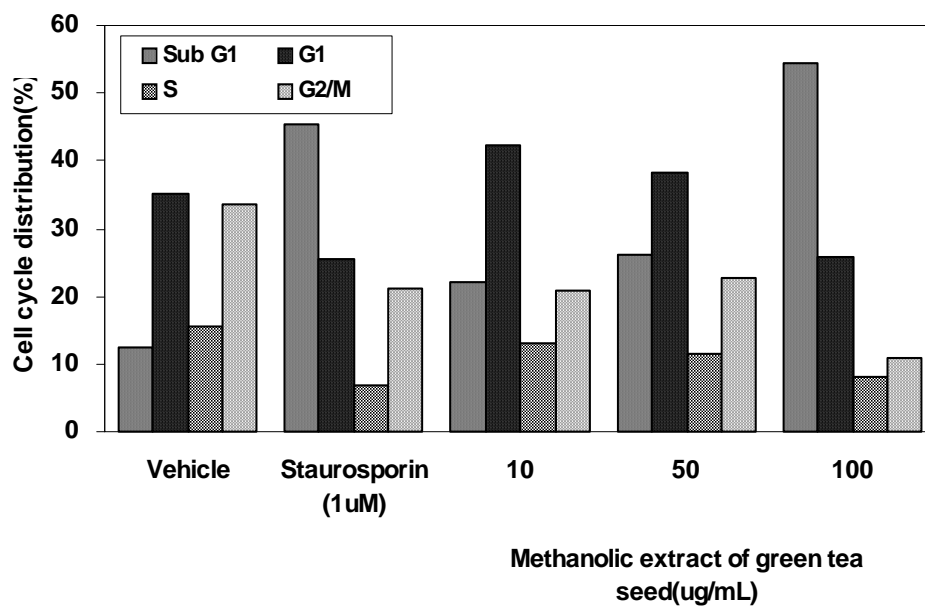


Fig. 8. Cell cycle distribution of HepG2 cells exposed to different levels of green tea seed extract.

Cells were treated with 0, 20, 50, 100 uM of green tea seed extract and 1 uM staurosporin (positive control) for 24 hours. Cells were trypsinized and washed twice with PBS. Cell cycle distribution was determined by propidium iodide staining.

제 8 절 녹차씨의 볶음처리가 항암활성에 미치는 영향

일반적으로 생리활성성분은 열이나 화학적 처리에 의하여 그 활성이 변할 수 있으므로, 녹차씨의 기능성식품소재로서의 가공적성을 평가하기 위한 일환으로, 녹차씨의 열처리에 따른 암 예방활성의 변화여부를 평가하였다. 녹차씨의 열처리는 Table 2와 같은 조건으로 처리하였으며, 20 mesh 이하로 분쇄하여 실험에 사용하였다.

1. 볶음처리에 의한 암세포증식억제활성 변화

온도별, 시간별로 볶음처리 (roasting)하고, 분쇄하여 메탄올 추출물을 제조하고, 이를 mouse의 간암세포 (hepa1c1c7, BPRc1)에 농도별로 투여하여, 암세포증식억제활성을 MTT assay 방법(Mosmann,1983)으로 조사하였다. 온도별 볶음처리에 따른 녹차씨의 암세포증식억제활성 분석 결과, 160℃ 이상의 온도에서 볶음 처리한 녹차씨의 메탄올 추출물들은 100 μ g/ml의 농도에서 hepa1c1c7, BPRc1세포 각각 50%, 70%이상의 암세포증식억제활성을 나타내었다. 그러나 전체적으로 볶음처리에 의하여 암세포증식억제활성이 감소하는 경향을 보였다.

2. 볶음처리에 의한 항암효소계 유도활성의 변화

볶음처리 조건 (온도 및 시간)에 따른 녹차씨 메탄올 추출물의 해독효소계 유도활성 변화는 Fig. 10과 같다. 즉, 본 연구에서 사용한 볶음처리조건하에서는 녹차씨 추출물의 QR유도활성이 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다.

Table 3. Roasting condition of green tea seed

Temperature (°C)	Time (min)
137	10
	20
	30
148	10
	20
	30
160	10
	20
	30
168	8
	10
	12
176	8
	10
	12

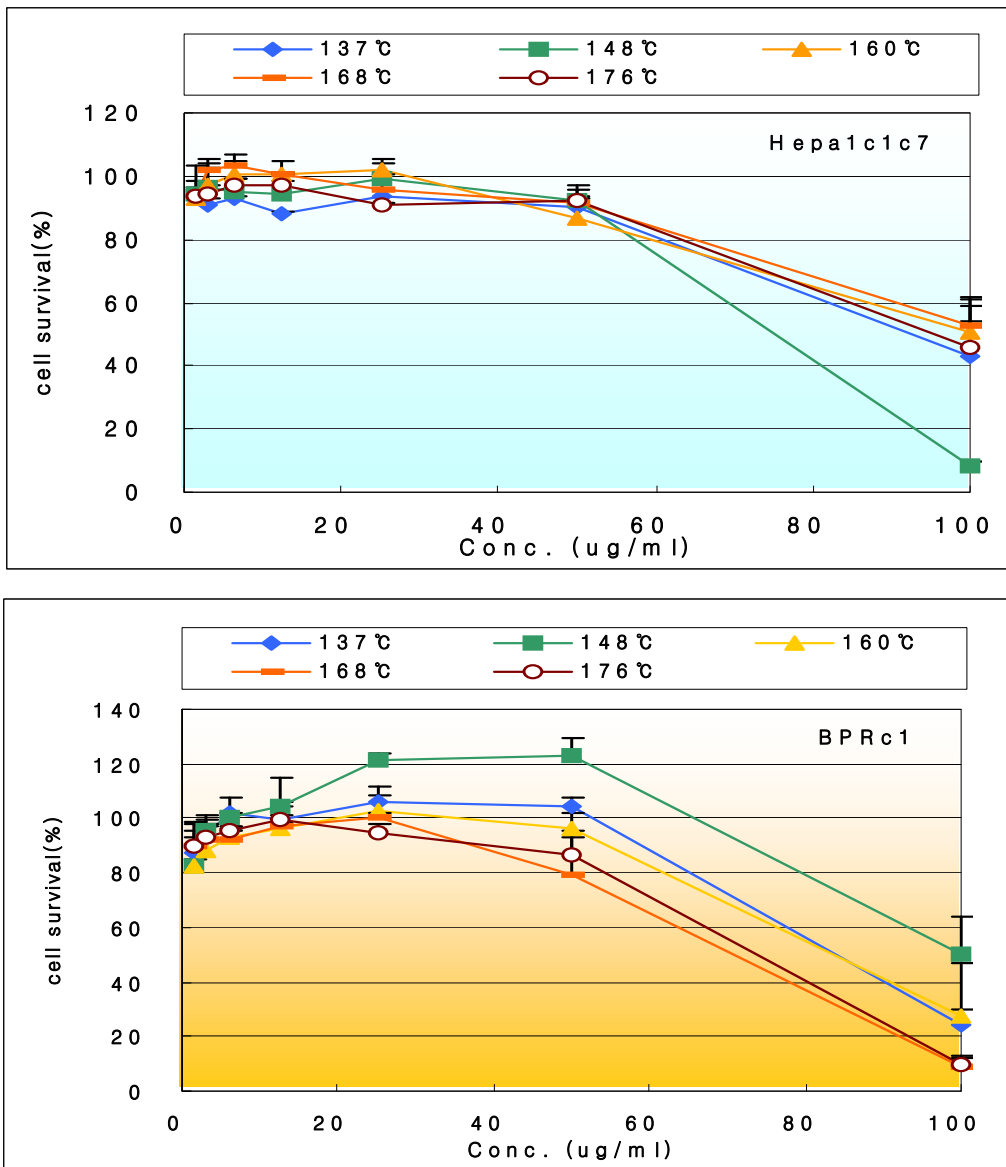


Fig. 9. Antiproliferative activity of methanolic extracts of roasted green tea seed for hepalc17 and BPRc1 cells.

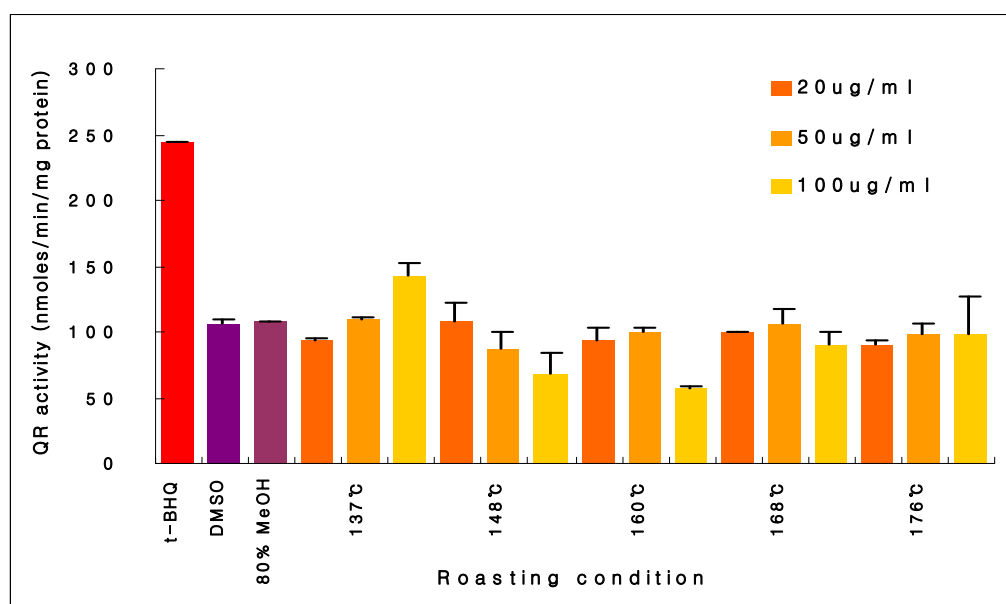
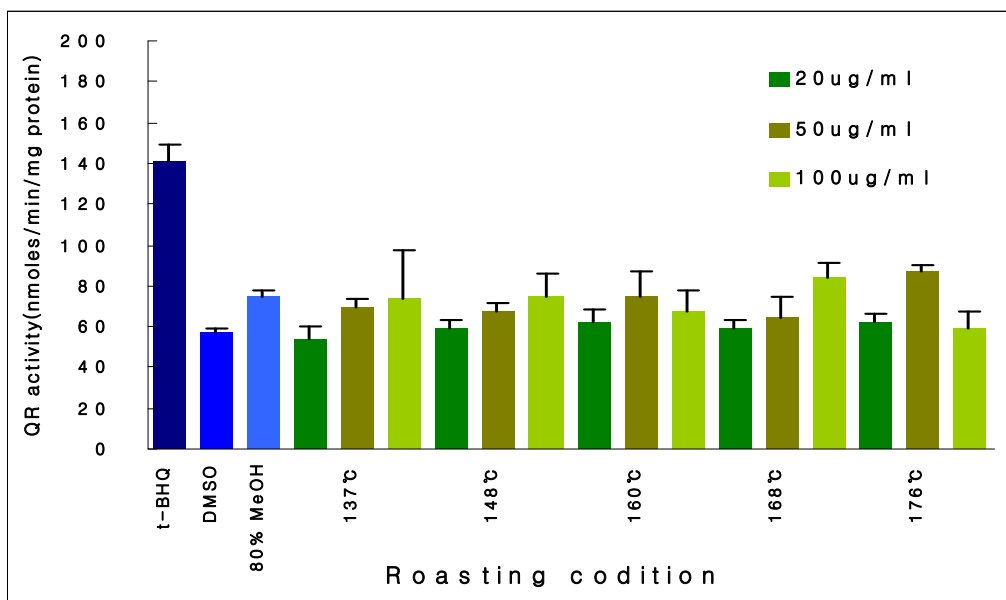


Fig. 10. Effect of methanolic extracts of roasted green tea seed on QR activity of hepa1c1c7 and BPRc1 cells.

제 9 절 녹차씨의 안전성평가

본 연구에서는 흰쥐를 대상으로 녹차씨 추출물을 경구투여 시 급성 경구독성여부를 알아보고자 실험을 수행하였다.

1. 급성 독성 평가

녹차씨 추출물을 투여하였을 때 2주일 동안의 실험동물의 치사율은 Table 3과 같다. 경구 투여 다음 날부터 5 g/kg에서 죽어갔으며 14일 후 희생하는 날까지 녹차씨 추출물 5 g/kg은 57.14 %, 2 g/kg은 71.42 %, 1 g/kg은 85.71 %, 0.5 g/kg이하에서는 100 %생존율을 보였다.

2. 녹차씨 섭취가 체중 및 장기별 무게에 미치는 영향

실험동물의 초기체중과 최종체중의 변화는 Fig. 11과 같다. 실험기간동안 대조군에 녹차씨를 투여한 군의 최종 체중이 조금 증가되었으나 5 g/kg의 농도에서는 오히려 감소된 것으로 나타났다. 이는 5 g/kg의 농도에서 실험동물이 사망된 원인과 연관이 있는 것으로 사료된다.

장기무게는 체중에 대한 상대적인 수치로 나타내었으며, 결과는 Table 4와 같다. 간과 신장, 비장, 소장, 위의 무게가 모두 대조군과 녹차씨 섭취군 간에 유의적인 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

Table 4. The mortality rates of mice during 14 days of administration of green tea seed extract

Dose (g/kg wt.)	Time of death (days)														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
0.5	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
1	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	6/7	6/7	6/7	6/7	6/7	6/7	6/7	6/7	6/7	6/7
2	7/7	7/7	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7
5	7/7	4/7	4/7	4/7	4/7	4/7	4/7	4/7	4/7	4/7	4/7	4/7	4/7	4/7	4/7

1) Values are number of animal dead/number of animals tested, cumulative

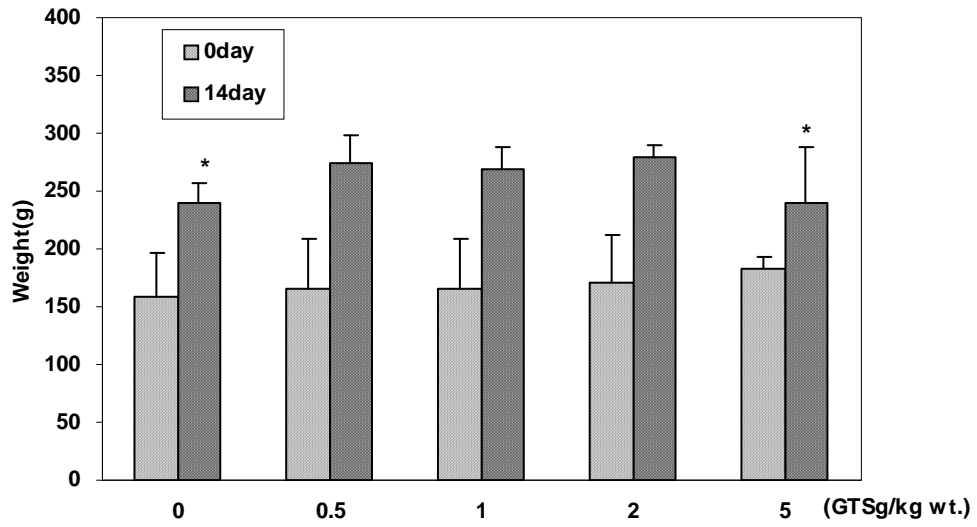


Fig. 11. Effect of methanolic extracts of roasted green tea seed on body weight of mice. The values with an asterisk indicate significant difference at $\alpha=0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

Table 5. The relative organ weights¹⁾ of mice administrated green tea seed extract for 14 days

	Group (GTS g/kg wt)					
	0	0.5	1	2	5	
Liver	5.13 ± 0.46 ^{ns}	4.73 ± 0.37 ^{ns}	5.06 ± 0.47 ^{ns}	4.81 ± 0.47 ^{ns}	4.63 ± 0.29 ^{ns}	
Kidneys	0.86 ± 0.05 ^{ns}	0.81 ± 0.11 ^{ns}	0.87 ± 0.07 ^{ns}	0.83 ± 0.12 ^{ns}	0.87 ± 0.12 ^{ns}	
Spleen	0.29 ± 0.06 ^{ns}	0.25 ± 0.04 ^{ns}	0.23 ± 0.10 ^{ns}	0.27 ± 0.05 ^{ns}	0.26 ± 0.05 ^{ns}	
Small intestine	2.68 ± 0.47 ^{ns}	2.98 ± 0.21 ^{ns}	2.90 ± 0.22 ^{ns}	3.06 ± 0.46 ^{ns}	3.02 ± 0.18 ^{ns}	
Stomach	0.57 ± 0.09 ^{ns}	0.59 ± 0.08 ^{ns}	0.63 ± 0.06 ^{ns}	0.58 ± 0.09 ^{ns}	0.66 ± 0.07 ^{ns}	

1) Relative organ weight (%) = organ weight(g)/body weight(g) × 100

2) Values are means±SD

3) ns; not significant

3. 녹차씨 분말 섭취가 혈액의 GOT와 GPT활성에 미치는 영향

녹차씨 추출물의 독성을 평가하기 위하여 마우스에게 14일간 시료를 섭취시키고, 간독성 지표인 혈액의 GOT와 GPT를 분석한 결과는 Fig. 12에 나타난 바와 같다. GPT는 처리군 간의 유의적인 차이가 없었으나 GOT에서는 1 g/kg이상을 공급한 군에서 유의적인 차이가 나타났다. 이로서 1 g/kg이상의 녹차씨의 공급은 실험동물에서 간독성을 나타내는 것으로 사료된다.

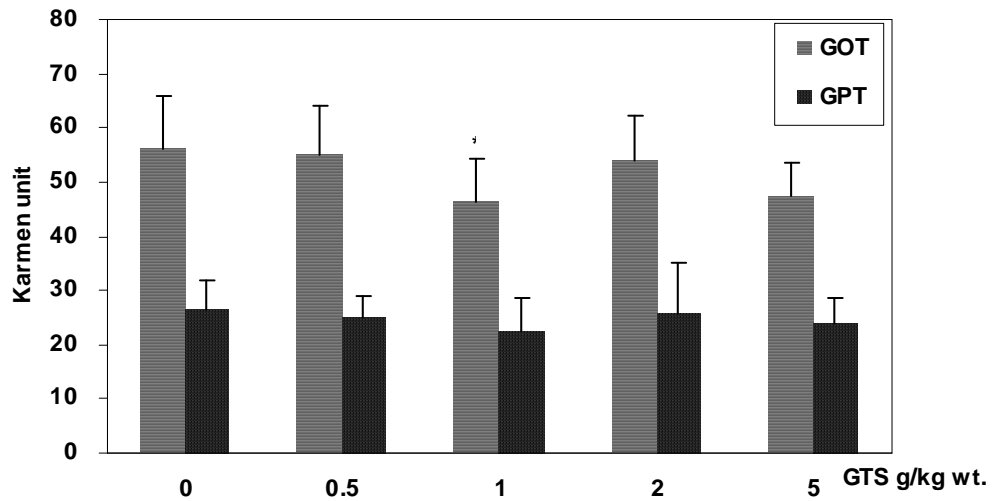


Fig. 12. Serum GOT and GPT activities of mice fed different doses of methanolic extracts of green tea seed for 14 days.

The values with an asterisk indicate significant difference at $\alpha=0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

제 10 절 녹차씨 및 잎 추출물의 유전독성 평가 (복귀돌연변이 시험)

녹차잎과 녹차씨의 추출물의 유전독성 (돌연변이원성)을 조사하기 위해 Maron과 Ames (1983)의 *Salmonella mutagenicity test*를 사용하여 복귀돌연 시험을 실시하였다. *Salmonella typhimurium* TA100 (염기치환형 변이주)과 TA98 (frame-shift mutant) 균주를 이용 하여 preincubation 방법을 실시하였다. 양성 대조군으로 S-9 mix에 의한 대사 활성화가 필요 없는 직접돌연변이원인 sodium azide (SA)를 사용하였다. 예비실험을 통해 세포의 생육은 저해하지 않으면서 변이원의 첨가량에 비례해 변이가 증가하는 범위를 먼저 결정하였다. 변이원인 SA는 멸균한 MilliQ water에 녹여 plate당 1.5 µg을 사용하였다. 녹차잎과 녹차 씨 추출물들은 80% methanol에 녹여 사용하였고 실험방법으로는 멸균된 cap tube에 0.2 M 인산완충액 (pH 7.4) 0.5 ml,에 80% methanol 농도로 녹인 추출물 0.1 ml, mutagen 0.1 ml 그리고 nutrient broth에서 하룻밤 배양한 균주 0.1 ml씩을 섞은 다음 37°C에서 20분간 둔 다음 45°C top agar 2 ml와 섞어 2-3초 혼합한 다음 최소배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양 후 자라는 균락 수를 헤아렸다. Vogel-Bonner minimal medium E배지를 사용하였으며 시료당 3개 plate를 사용하여 평균값으로 표시하였다.

1. 시험균주

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* LT2주 유래의 TA98 (frame-shift mutant), TA100 (염기치환형 변이주)균주를 경상대학교에서 분양받아 계대 유지한 것을 사용하였다.

2. 시험물질의 조제 및 농도

녹차씨와 녹차잎 추출물은 농도별로 희석하여 실험을 수행하였다. 본 실험에 앞서 TA98균주와 TA100균주를 이용하여 세포독성발현의 유무에 대한 예비실험을 수행한 결과 식품의약품안전청고시 제 1998-56호 “의약품 등의 독성시험기준”에서 무해하다고 인정하는 5 mg/plate에서 균 생육의 저해가

관찰되지 않았으므로 이 농도를 최고농도로 하여 일정한 비율로 희석 (0.125, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5.0 mg/plate) 하여 사용하였다.

3. 시험방법

Ames의 원법을 변형한 유전독성의 검색 감도가 비교적 높은 preincubation법으로 수행하였다. 균 현탁액 0.1ml에 설정농도의 녹차 씨와 녹차 잎 추출물 0.1 ml 및 인산완충액 (0.2M phosphate buffer, pH7.4) 0.5 ml 첨가하여 37℃에서 30분 preincubation 하였다. 그 후 50℃에서 용해한 top agar 2 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 변이원성 검색용 배지 (Vogel-Bonner minimal medium E) 위에 중층하여 37℃에서 2일간 (48시간) 배양한 후 복귀변이원성 콜로니 수를 계측하였다.

4. 녹차 씨 및 잎 추출물의 돌연변이원성

각 용량 당 3장의 plate를 이용하여 plate 당 복귀변이원성 콜로니 수의 평균치를 평가 대상으로 하였다. 시험물질을 처리한 모든 균에서 복귀변이체수가 음성대조군의 2배 이상이며, 용량-반응관계가 인정되고, 재현성이 있을 것의 세 가지 조건을 만족할 경우에 복귀변이 유발능 양성으로 판정하였다.

Table 6과 Table 7에 나타낸 바와 같이 녹차씨의 메탄올 추출물의 경우, *Salmonella typhimurium* TA100를 이용한 돌연변이원성 평가에서 1.25mg/plate이상의 농도에서는 돌연변이원성이 관찰되었으나, 그 이하의 농도에서는 음성 대조군과 콜로니 형성능에서 유의적인 차이가 없어 유전독성이 없는 것으로 나타났다.

한편, *Salmonella typhimurium* TA98를 이용한 경우에서도 녹차씨 추출물 농도가 5.0 mg/plate에서는 돌연변이원성이 관찰되었으나, 그 이하의 농도에서는 음성대조군과 유의적인 차이가 없어 유전독성이 약한 것으로 나타났다.

Table 6. *Salmonella typhimurium* TA100 및 TA98 ($2 \sim 4 \times 10^2$ /plate cell)에서
 녹차 씨와 녹차 잎 추출물의 돌연변이원성

추출물		변이원	- Sodium azide	+ Sodium azide* ①
녹차씨	TA100 (-) control		17	21
	5.0 mg/plate		170	67
	2.5 mg/plate		67	70
	1.25mg/plate		70	53
녹차잎	TA100 (-) control		17	21
	5.0 mg/plate		-	-
	2.5 mg/plate		10	10
	1.25mg/plate		3	3
녹차씨	TA98 (-) control		0	-
	5.0 mg/plate		87	-
	2.5 mg/plate		23	-
	1.25mg/plate		30	-
녹차잎	TA98 (-) control		0	-
	5.0 mg/plate		-	-
	2.5 mg/plate		0	-
	1.25mg/plate		0	-

Table 7. *Salmonella typhimurium* TA100 및 TA98 (2×10^4 /plate cell)에서 녹차씨와 녹차 잎 추출물의 돌연변이원성

추출물		변이원	- Sodium azide	+ Sodium azide* ①	+ Sodium azide* ②
녹차씨	TA100 (-) control		5030	1280	990
	0.5 mg/plate		1640	800	1060
	0.25 mg/plate		4370	3480	3200
	0.125 mg/plate		-	-	-
녹차잎	TA100 (-) control		5030	1280	-
	0.5 mg/plate		10	15	-
	0.25 mg/plate		-	-	-
	0.125 mg/plate		-	-	-
녹차씨	TA98 (-) control		0	0	-
	0.5 mg/plate		10	10	-
	0.25 mg/plate		55	30	-
	0.125 mg/plate		-	-	-
녹차잎	TA98 (-) control		-	-	-
	0.5 mg/plate		-	-	-
	0.25 mg/plate		-	-	-
	0.125 mg/plate		-	-	-

*Sodium azide농도: ① 1.5 µg/plate ② 3.0 µg/plate

제 11 절 녹차씨 함유 제품 개발

1. 실험방법

탈지한 녹차씨 분말을 이용하여 기존식품(초콜릿과 커피)에 첨가하여 식품소재로서의 가능성을 검토하였다. 즉, 시료를 0.5, 1, 2% 함유한 초콜릿을 제조하였으며, 커피가루 양의 0.5, 1, 2% 가 되도록 섞어서, 추출하여 커피음료를 제조하여 각각 관능검사를 하였다. 배합 비율과 관능검사 결과는 Table 8, 9와 같다.

Table 8. Formulations of chocolate and coffee drink

A. Chocolate

	1	2	3	4
Chocolate base (%)*	100	99.5	99	98
Green tea seed powder, defatted (%)	0	0.5	1	2

B. Coffee drink

	1	2	3	4
Coffee powder (%)	100	99.5	99	98
Green tea seed powder, defatted(%)	0	0.5	1	2

*Chocolate base; cocoa mass 10%, cocoa butter 25.4%, whole milk powder, sugar, lecithin, vanilla flavor

Table 9. Sensory properties of chocolate and coffee drink containing defatted green tea seed powder

A. Chocolate

	product 1	product 2	product 3	product 4
Color	6.90	5.00	6.30	6.70
Sweetness	6.20	7.80	6.50	6.20
Astringency (preference)	5.90	5.10	2.20	2.70
Flavor	6.33	5.97	5.00	5.20
Overall	7.20	6.30	4.20	4.90
평균	6.51	6.03	4.84	5.14
Astringency (strength)*	*****	*****	*****	*****

B. Coffee Drink

	product 1	product 2	product 3	product 4
Color	7.20	5.80	7.00	7.50
Sweetness	1.70	2.30	2.10	1.90
Astringency (preference)	3.20	3.00	2.90	3.80
Flavor	4.03	3.70	4.00	4.40
Overall	4.00	5.30	4.90	5.60
평균	4.03	4.02	4.18	4.64
Astringency (strength)*	***	***	***	*****

*The strength of astringency was graded from 1 (strong) to 9 (weak).

*, 3.51~3.75; **, 3.76~4.00; ***, 4.01~4.25; ****, 4.26~4.50;

*****, >4.50.

The other parameters for preference are scored from 1 (poor) to 9 (good).

제 12 절 결론

본 연구에서는 녹차씨의 암예방활성을 평가하고, 식품소재로서의 활용가능성을 평가하기 위하여 catechin함량을 HPLC로 분석하고 해독효소계 및 암세포 생육억제 활성을 조사하였다. 녹차잎과 비교하여 catechins의 함량은 낮은 수준이었으나, 해독효소계인 phase 1과 2상 효소계 유도 활성은 잎추출물보다 높은 것으로 나타났다. 또한 phase 2 해독효소계의 유도에는 ARE 및 Nrf2가 관여하는 것으로 나타났다. 즉, 녹차씨 추출물에 의하여 Nrf2가 Keap1과 분리되며 핵내로 들어와 phase 2 효소계 유전자의 promoter 부위의 ARE에 결합하여 transcriptional activation을 유도하는 것으로 추정된다. 그리고 녹차씨 추출물의 농도 의존적 세포독성이 관찰되어 이를 바탕으로 cell cycle에 미치는 영향을 분석한 결과, 녹차씨 추출물이 subG1 phase의 축적을 유도하는 것을 확인하였으며 이는 apoptosis를 일으킨다는 것을 암시한다. 이와 같이 녹차씨 추출물은 해독효소계의 활성을 유도하고 cell cycle을 조절하는 성분을 함유한 소재로서 향후 암예방물질로서 연구할 가치가 있다고 판단이 된다. 아직까지 녹차씨 추출물의 어떠한 화합물들이 이러한 항암효과를 발휘하는지에 대해서는 연구가 더 필요하다.

1. QR활성을 통하여 녹차씨 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 phase 2 enzyme인 QR의 활성을 2배 유도하며, 이는 양성 대조군으로 사용한 t-BHQ (20 μM)와 같은 활성이다.
2. QR활성의 유도가 2상 효소계 유전자의 promoter ARE sequence와 연관이 되어 있는지 알아보기 위하여 HepG2에 ARE를 transfection시킨 HepG2-C8세포에 시료를 투여하여 luciferase 활성을 측정된 결과, 녹차씨 추출물이 농도 의존적으로 luciferase의 활성을 유도하는 것으로 나타나, phase2 효소계 활성 증가는 ARE와 연관이 있는 것으로 추정된다.
3. ARE와 관련하여 transcription이 활성화되기 위해서는 세포질에 존재하는 Nrf2가 Keap1으로 부터 분리되어 핵내로 들어와 ARE와 결합 해야만 된다. 이러한 기전에

의해 ARE가 활성화 되었는지 여부를 Western blot으로 조사한 결과, Nrf2가 녹차씨 추출물에 의하여 농도 의존적으로 핵내로 이동되는 것을 확인하였다.

4. 녹차씨 추출물이 해독효소계 중 phase 1 enzymes인 CYP1A1, 1A2의 활성화에 미치는 효과를 조사한 결과, 농도 의존적으로 단백질의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다.
5. 녹차씨 추출물의 몇 가지 암세포에 대한 생육억제 활성을 세포독성관찰한 결과 IC₅₀은 사람 간암세포인 HepG2 경우 82 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 사람 유방암세포인 MDA-MB231과 MCF-7 각각 90, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나타나 비교적 높은 암세포 증식 억제 효과를 갖는 것이 확인되었다.
6. 녹차씨의 암세포에 대한 독성이 cell cycle과 관련이 있는지 조사해본 결과, 녹차씨 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에는 subG1 phase에 있는 세포의 비율을 54.44 % 로 증가시키는 것으로 확인되었다.
7. 녹차씨 추출물의 급성 경구독성 결과, 식품의약품안전청이 정한 저독성 기준인 5 g/kg에서 57.14 % 생존하였다.
8. 안전성평가의 지표인 체중 및 장기무게에서는 대조군과 녹차씨 추출물 섭취군간의 유의적인 차이가 없었다.
9. 녹차씨 추출물을 14일간 섭취시킨 쥐에서 간독성의 지표인 혈청 중 GPT의 수치에서는 유의적인 차이가 없었으나 GOT에서는 1 g/kg이상을 투여한 군에서 유의적인 차이가 나타났다.
10. 녹차씨의 메탄올 추출물의 경우, *Salmonella typhimurium* TA100와 *Salmonella typhimurium* TA98를 이용한 돌연변이원성 평가에서 각각 1.25mg/plate와 5.0 mg/plate 이하의 농도에서는 유전독성이 없는 것으로 나타났다.

제 2 협동과제 연구기관	국민대학교
연구 과제명	녹차씨로부터 생리활성물질의 분리정제 및 구조분석
연구책임자	김 영 균

제 13 절 재료 및 방법

1. 녹차씨로 부터 생리활성물질의 분리

가. 녹차씨 추출물 조제

녹차씨 껍질의 포함여부에 따라 추출물의 회수율 차이를 확인하기 위하여 녹차씨의 껍질을 제거한 것(GTA)과 제거하지 않은 것(GTB)으로 나누어 분석하였다. 먼저 녹차씨를 분쇄하여 50g씩 취하여 500mL의 메타놀로 각각 5시간씩 2회 추출하였다.

나. Low Pressure Liquid chromatography의 분석

녹차씨 메타놀 추출물의 성분을 TLC로 분석하여 상대적으로 분석·확인이 용이한 시료를 선정하여 Table 1과 같은 조건으로 Low Pressure Liquid Chromatography (LP-LC)를 실시하였다.

Table 1 Conditions of Low Pressure Liquid Chromatography for green tea seed methanol extract

Item	Condition
Stationary phase	RP 18 F254, Merck
Mobile Phase	Methanol(From 50% to 75%)
Flow rate	9.0 mL/ min
Fraction size	27mL × 35 times
Total used times	105 min

다. High pressure liquid chromatography의 분석

TLC에서 single spot으로 보이는 단일 물질의 순도를 알아보기 위해, HPLC (High pressure liquid chromatography)를 다음과 같은 조건으로 분석하였다.

Table 2 Conditions of HPLC for compound (single spot No. 2) isolated from green tea seed methanol extract.

Item	Condition
Stationary phase	Symmetry C ₁₈ 5μm (3.9*150mm)
Mobile Phase	60% MeOH
Detector	Waters Refractive index Detector 2414 Waters Tunable Absorbance Detector 486
Run time	15 mins
Flow rate	500μl/min
Pressure	1224 psi
Injection volume	10mg/1ml, 15μl inject. loop(200μl)
Sample	GTA_single spot No.2

2. 녹차씨 추출물의 항염증 및 항산화활성

가. 시료 제조 및 세포 배양

Chromatography에서 얻어진 GTA_single spot No.1(이하 GTA1)과 GTA_single spot No.2(이하 GTA 2) 및 GTA_single spot No.3(이하 GTA 3) 을 $0\mu\text{g/ml}$, $5\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $20\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 조제하였다. RAW 264.7 murine macrophage cell line은 ATCC에서 구입하여 37°C , 5% CO_2 조건 하에서 10% FBS와 2mL L-glutamine이 첨가된 DMEM에 배양하였다. 세포를 24-well plate(2×10^5 cells/well)에 주입하여 부착시켜 분석하였다.

나. NO 농도와 세포 생존율

농도별로 조제된 GTA 추출물을 각각의 농도별로 처리 하여 2hr 배양 한 후 LPS($1\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 산화적 스트레스를 유발시켜 20hr 배양하여 NO 생성 정도와 세포 생존율을 분석하였다.

3. 녹차씨의 생리활성 물질의 분리 정제 및 구조분석

가. 녹차씨로 부터 생리활성물질의 분리

1) 녹차씨 추출물 조제

껍질을 제거 한 녹차씨 1,200g을 MeOH를 이용하여 46°C 에서 5시간씩 3회에 걸쳐 추출물을 획득하였다. 획득한 추출물을 Filter paper를 이용하여 여과한 후 농축하여 184.94g의 추출물을 최종적으로 획득하였다.

나. Preparative Low Pressure Liquid Chromatography 분석

녹차씨 MeOH 추출물의 성분을 TLC로 분석하여 Preparative Low Pressure Liquid Chromatography(Prep-LPLC)을 이용하여 compound를 획득하였다.

다. 정제 및 구조 분석

이 물질의 구조정성을 위하여 ^1H 및 ^{13}C -NMR 과 DEPT를 확인하였으며 LC/MS를 이용하여 분자량을 측정하였다.

제 14 절 실험결과

1. 녹차씨 추출물의 회수율

녹차씨 메타놀 추출물의 회수율은 Table 3에서 보듯이 녹차씨 껍질을 제거한 GTA의 조추출물의 양은 8.5g으로 회수율 17.0%를 보였으며 껍질을 제거하지 않은 GTB의 조추출물의 양은 7.0g으로 14.0%였다. GTA가 GTB에 비해 상대적으로 높은 수확율을 보였다.

Table 3 Yield of crude methanol extracts with or without outer green tea seed coat

Treatment ¹⁾	Yield(%)
GTA	17.0%
GTB	14.0%

¹⁾GTA: Removed outer green tea seed coat

GTB: Not removed outer green tea seed coat

2. Low Pressure Liquid Chromatography

TLC의 분석결과 GTA의 성분에 대한 TLC 패턴이 분명하게 나타남으로 판단하여 GTA 메타놀 추출물을 농축하여 LC로 분석한 결과는 Fig. 1.과 같으며 3개의 분획물(GT-1과 GT-2 및 GT-3)을 얻었다.

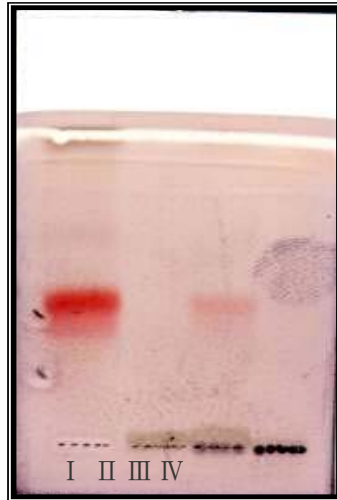


Fig.1. Chromatogram of methanol extract of dehulled green tea seed coat by Low Pressure Liquid Chromatography

Fraction code: I ; GTA II ; GT-1, III ; GT-2, IV ; GT-3

3. 크로마토그래피를 이용한 생리활성물질의 분리

가. TLC의 분석

녹차씨 메타놀 추출물의 성분을 일차적으로 TLC 분석(Fig. 4)을 통하여 single spot으로 확인되는 3개의 단일 물질을 정제하였다.

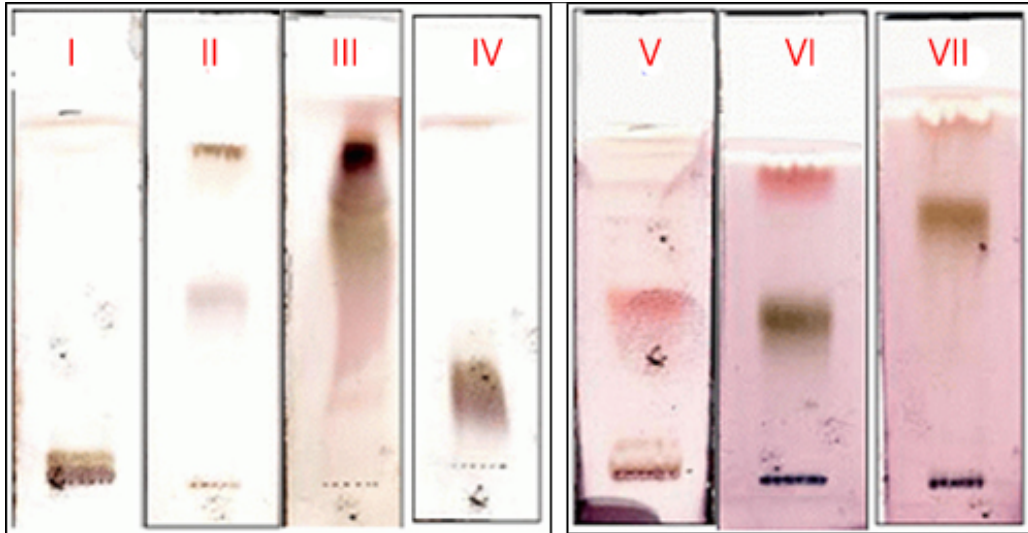
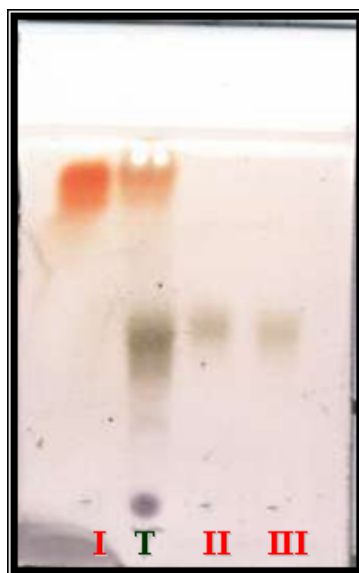


Fig. 4. Chromatogram of TLC for green tea seed methanol extract

- I: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 3:1:0.1(v/v) (H_2SO_4 발색, Normal phase plate)
- II: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 3:1(v/v) (H_2SO_4 발색, Reverse phase plate)
- III: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 1:1:0.1(v/v) (H_2SO_4 발색, Normal phase plate)
- IV: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 1.5:1:0.1(v/v) (H_2SO_4 발색, Normal phase plate)
- V: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 1:1(v/v) (vanillin 발색, Reverse phase plate)
- VI: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 3:1(v/v) (vanillin 발색, Reverse phase plate)
- VII: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 8:1(v/v) (vanillin 발색, Reverse phase plate)

나. Low Pressure Liquid chromatography의 분석

녹차씨 추출물의 Preparative Low Pressure Liquid Chromatography (Prep-LPLC)를 실시하여 정제한 결과는 Fig. 5와 같다.



75% MeOH developing
0.01% anisaldehyde 발색

Fig. 5. Chromatogram of LPLC for green tea seed methanol extract

I : GTA_single spot No.1
II : GTA_single spot No.2
III : GTA_single spot No.3
T : GTA_MeOH extract.

다. High pressure liquid chromatography의 분석

TLC에서 single spot으로 보이는 단일 물질의 순도를 알아보기 위해,
HPLC(High pressure liquid chromatography)로 분석한 결과는 Fig. 6과 같다.

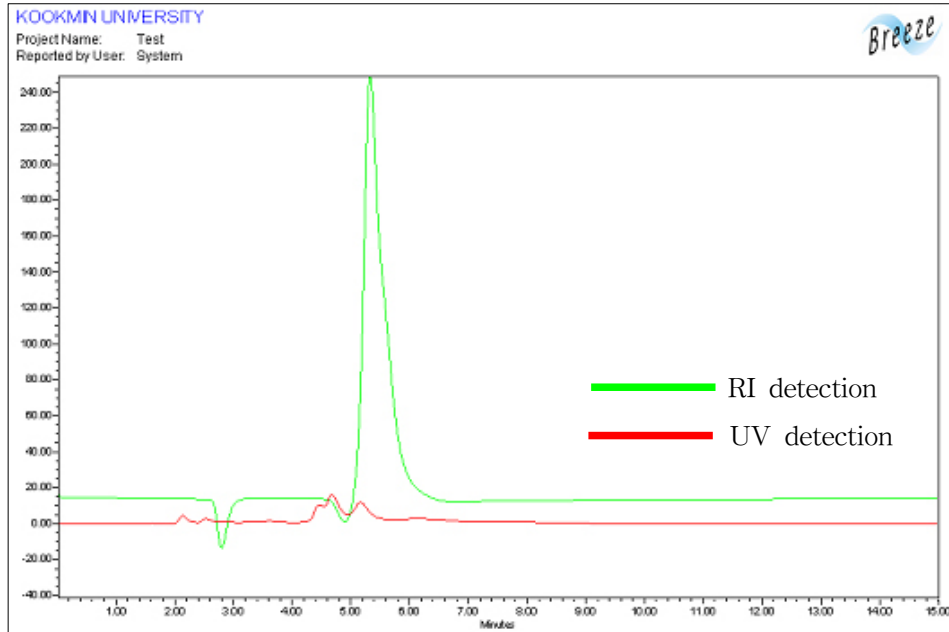


Fig. 6. Chromatogram of HPLC for green tea seed methanol extract

4. 분리한 물질의 항염증 및 항산화활성

가. NO 농도와 세포 생존율

Untreated군은 LPS를 처리하지 않은 negative control을 나타내고, control군은 LPS를 처리한 positive control을 나타낸 것이다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 GTA 1은 농도가 높을수록 세포 생존율이 증가하는 반면 GTA 2와 3은 농도가 높을수록 감소하는 경향을 보였다. GTA의 NO 생성량은 모든 군에서 농도가 높을수록 유의적으로 감소되는 경향을 보였으며(Fig. 8) 염증생성에 있어 효과적인 것으로 사료된다.

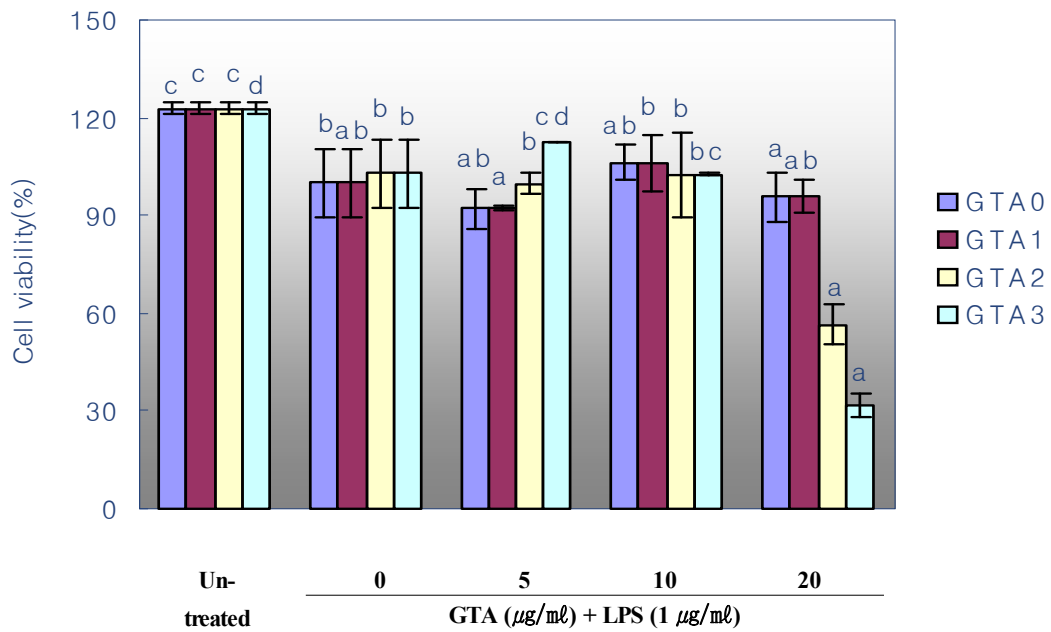


Fig. 7. Effect of GTA a on cell viability by neutral red assay. Cell viability was calculated as percent on untreated group. The cells (2×10^5 per 24well plate) were activated for 20 h with LPS($1 \mu\text{g/ml}$) with and without indicated concentrations of GTA. Data represent the means \pm S.D.

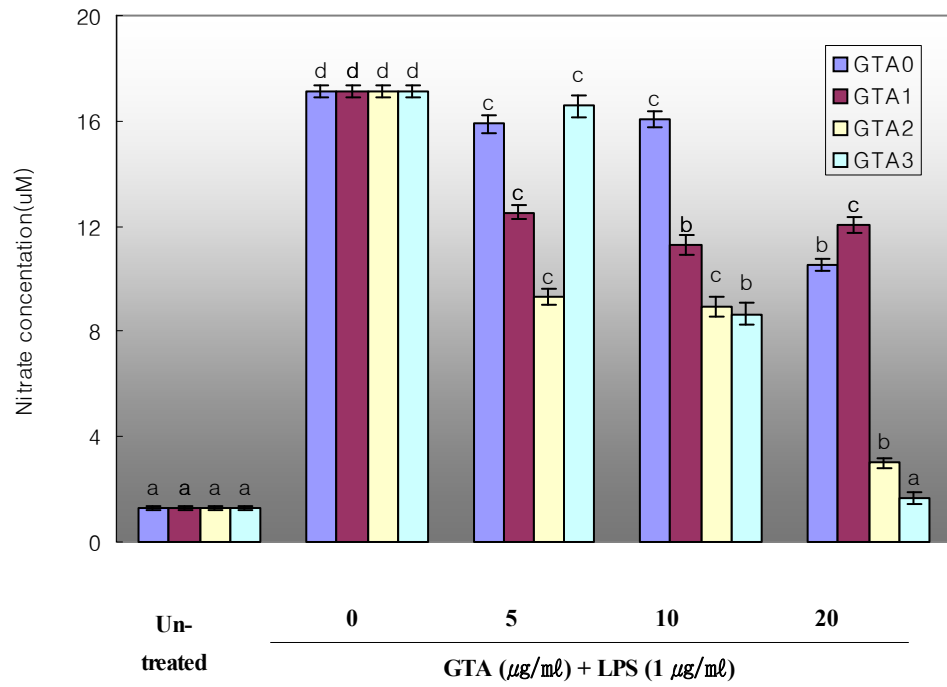


Fig. 8. Inhibitory effect of GTA on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Refer to Fig. 7.

5. 순수 물질 분리 및 구조 분석

CH₃OH:H₂O=3:1의 조건으로 C18 column chromatography를 실시하여 oil 성분을 제거하였다. Oil 성분이 제거된 fraction(YK-CSS2)을 가지고 Partition을 실시하여 4개의 sub-fractions을 획득하였다(YK-CSS21, YK-CSS22, YK-CSS23, YK-CSS24). 이 중 YK-CSS22를 가지고 column chromatography를 시행하여 다시 3개의 sub-fractions을 획득하였고 이 중 두 번째 fraction(YK-CSS222)에서 Fig. 9에서 보는 바와 같이 순수한 성분의 물질을 획득하였다(YK-CSS_com1). 분석결과 해당 물질은 C₁₈H₃₂O₂ 의 Linoleic acid로 밝혀졌다(Fig. 10-14).

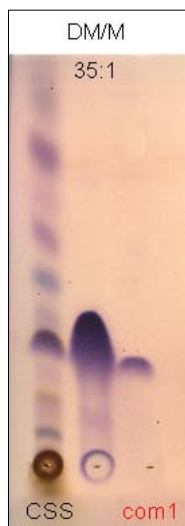


Fig. 9. 녹차씨 추출물의 순수 성분 물질 획득

CHCl₃/CH₃OH, 35:1(v/v) (Anisaldehyde 발색, Normal phase plate)

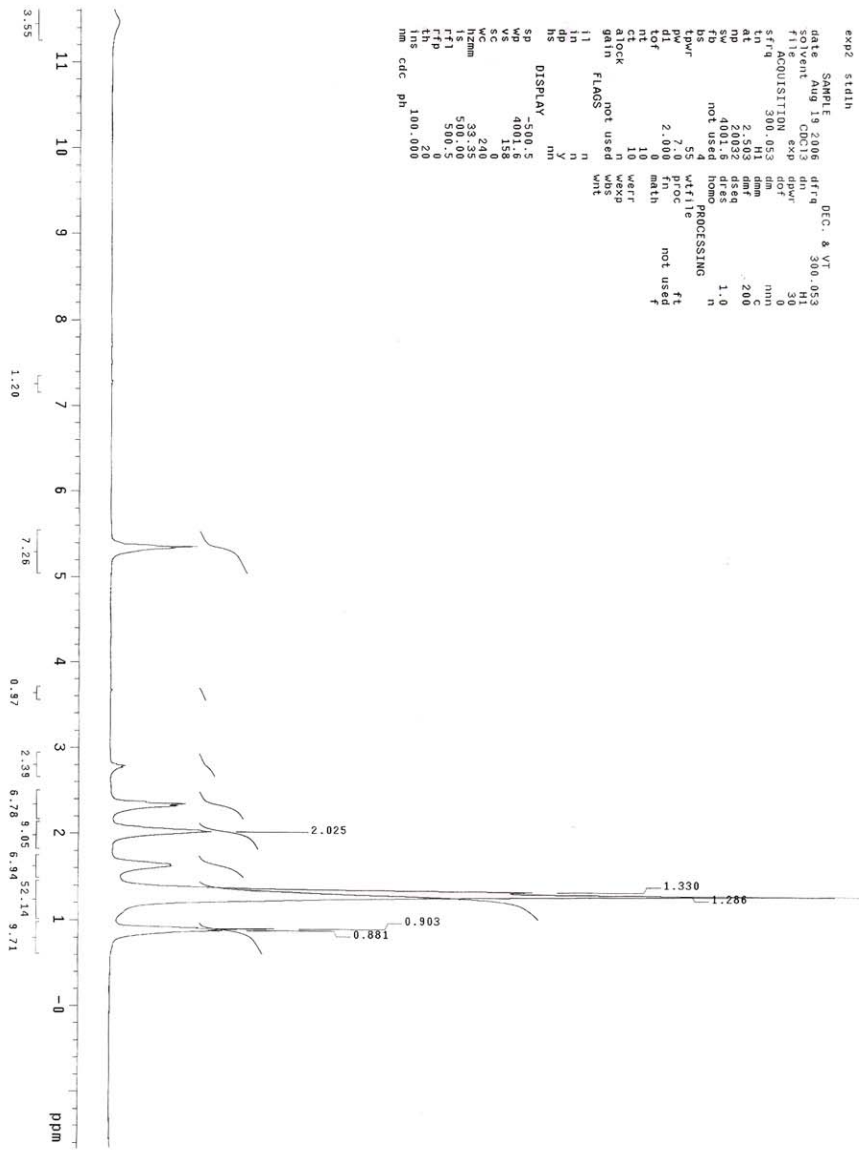


Fig. 10. YK-CSS_com1 ¹H FT-NMR

```

PG1145864.dft: s2p11
exp: s1d13c

SAMPLE DEC: & VT
date Aug 19 2006 dfrq 300.052
solvent CDCl3 dpr 37
f1 ACQUISITION -500.0
sfreq 75.435 dm
at 1.815 dmf
np 53904 deeq 1.0
sm 16501.7 dmeg
bs not used n
nt 4 nsmg
tpwr 55 10 file PROCESSING 1.00
pw 2.000 proc
tof 0 fn not used f
nt 100 math
atlock not used warr
gain not used wexp
flask n wnt
in n
ns DISPLAY nm
dp y
sp -888.5
wp 16501.7
ec 4832.0
wc 249
nzm 500.06
rf1 6888.5
rfp 0
ins 100.000
at no ph

```

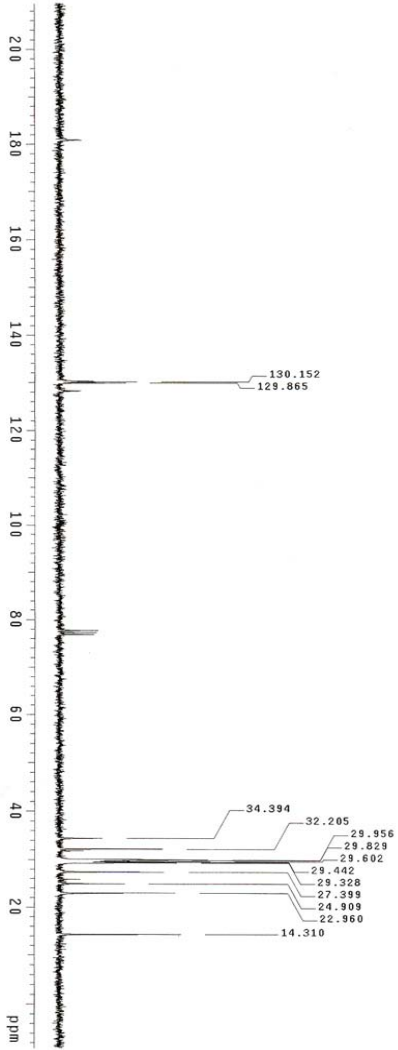


Fig. 11. YK-CSS_com1 ^{13}C FT-NMR

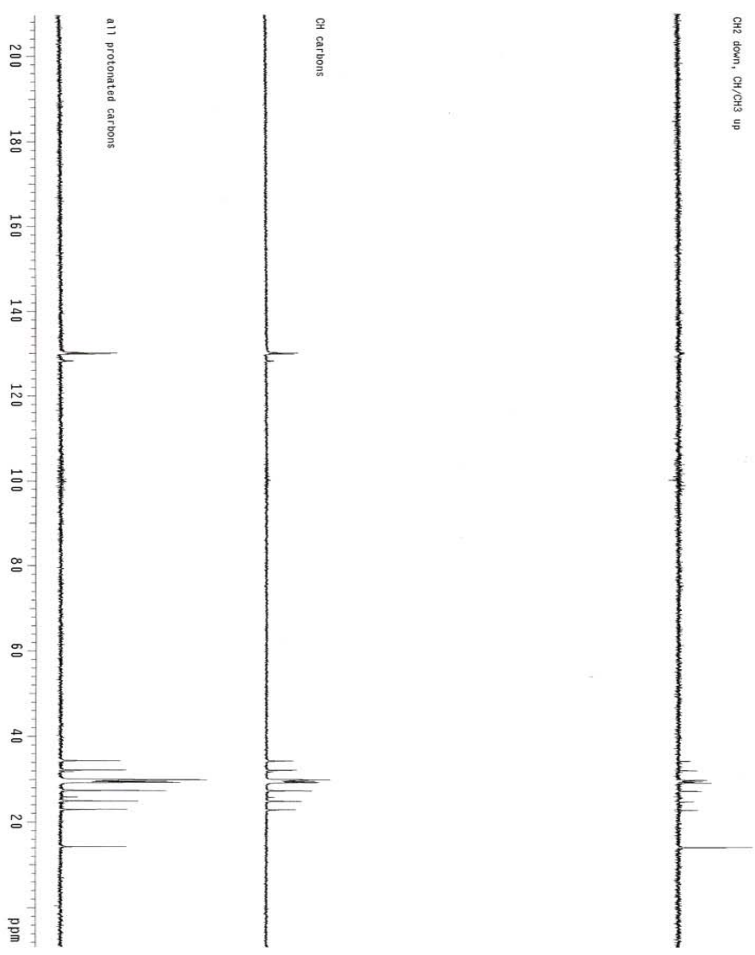


Fig. 12. YK-CSS_com1 DEPT

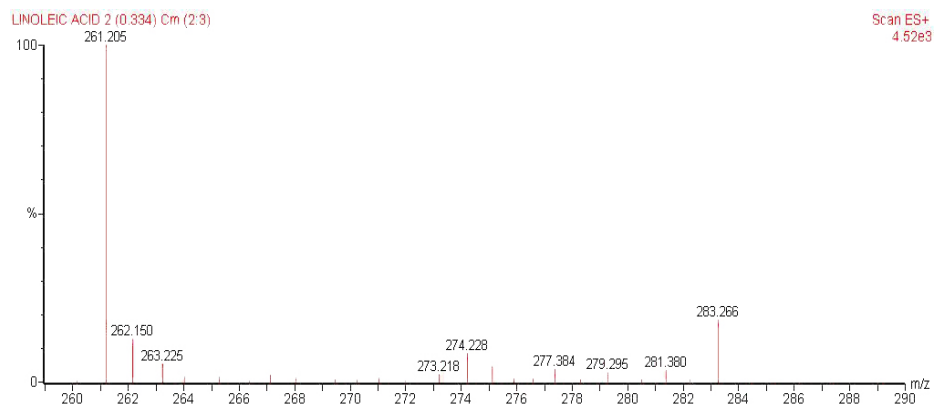


Fig. 13. ES+ LCMS

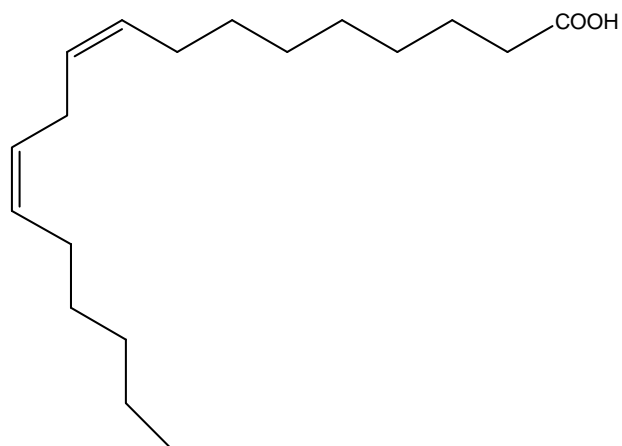


Fig. 14. (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienolic acid

제 15 절 활성물질을 이용한 기능성 제품 제조

1. 녹차씨유를 이용한 비누

녹차씨오일을 이용한 비누의 제조는 다음과 같은 방법으로 하였다. 먼저 650ml의 증류수에 275g의 NaOH를 용해시켰다. 기존의 제품과 비교하기 위하여 일반적으로 사용하는 코코넛오일과 팜오일을 35℃에서 잘 섞어준 다음, 미리 무게를 재 놓은 약간의 올리브오일, 호호바오일, 그리고 케스터오일이 함유된 녹차씨오일을 섞어주었다. 이들 전체 오일들을 잘 저어 주면서 적당히 식은 NaOH 수용액을 이 오일에 부어주었다. 이때의 온도는 110℃를 넘지 않게 하여 cold process 공정을 적용하였다. 이들을 계속해서 저어주면서 trace를 형성하였고, 이 때 수용성TiO₂를 넣어 주고 여러 가지의 essential oil 혼합물을 넣으면서 지속적으로 저어주었다. 완전히 균질한 상태의 trace 상태를 확인한 후, 성형틀에 넣고 고형화 시켰다. 성형틀에서 이틀간 고형화를 시킨 후, 틀에서 빼내어 한달간 상온에서 숙성시켰다. 적당한 크기로 절단한 후 완제품으로 사용하였다. 이 때 사용된 제조성분들은 아래 Table 4에 나타내었다.

2. 주정추출물 함유한 녹차씨유 비누

상기 기술한 방법과 동일한 방법을 적용하여 동량의 기존오일과 녹차씨유를 사용하여 제조하면서 마지막 단계에서 녹차씨의 주정추출물 0.5%를 첨가한 후 골고루 저은 후 성형틀에 부어 고형화시켰다. 역시 상기와 같은 방법으로 적당한 크기로 제품을 제조하였다(Fig. 15와 Fig. 16).

Table 4. Greentea Seed Oil Soap making ingredients

Item	Quantity (g)	percent (%)
Green Tea Seed Oil	700	35.0
Olive Oil	100	5.0
Coconut Oil	600	30.0
Palm Oil	300	15.0
Jojoba Oil	200	10.0
Caster Oil	100	5.0
Essential Oils (4 types)	40	0.2
GreenTea Seed alcohol extract	10	0.5
TiO ₂ (water soluble)	2	0.1
NaOH	275	5% superfat
Distilled Water	650ml	-

3. 시제품 제품평가

녹차씨의 주정추출물의 첨가를 제외하고는 같은 방법을 적용하여 녹차씨유를 주원료 (전체 함유오일의 35%) 로 하여 천연 고품비누를 제조하였다. 이 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 녹차씨유를 주원료로 하여 천연비누를 제조하였을 때 최종제품은 녹차씨유를 함유하지 않고 제조된 기존의 제품과 비교해볼 때, 상품성을 저하시키는 어떠한 문제점도 발견되지 않았다.

나. 녹차씨의 주정추출물을 첨가한 제품과 첨가하지 않은 제품의 성상을 비교할 때, 어떠한 품질 저하 요인이 발견되지 않았다. 단지, 주정추출물을 첨가한 경우의 제품은 첨가하지 않은 제품의 것보다 -다른 색소를 같은 양을 첨가할 경우-약간의 노란색을 띠는 제품이 얻어졌다.



A

B

Fig. 15. 녹차씨유를 주원료로 한 고품비누

A. 녹차씨주정추출물 함유비누 B. 주정추출물이 함유되지 않은 비누



A

B

Fig. 16. 녹차씨유를 주원료로 한 고품비누로 녹차씨 주정 추출물 함유비누 (A)와 주정 추출물을 첨가하지 않은 비누 (B)의 절단 후의 형태

제 16 절 결론

1. 녹차씨 메타놀 추출물의 회수율은 녹차씨 껍질을 제거한 GTA의 조추출물의 양은 8.5g으로 회수율 17.0%를 보였으며 껍질을 제거하지 않은 GTB의 조추출물의 양은 7.0g으로 14.0%였다. GTA가 GTB에 비해 상대적으로 높은 수확율을 보였다.
2. TLC의 분석결과 GTA의 성분에 대한 TLC 패턴이 분명하게 나타남으로 판단하여 GTA 메타놀 추출물을 농축하여 LC로 분석한 결과는 3개의 분획물(GT-1과 GT-2 및 GT-3)을 얻었다.
3. TLC로 분석하여 획득한 GTA의 세포 독성과 염증생성과 관련된 인자인 NO의 생성능을 RAW 264.7 macrophages cell line에서 비교한 결과 GTA 1은 농도가 높을수록 세포 생존율이 증가하는 반면 GTA 2와 3은 농도가 높을수록 감소하는 경향을 보였으며 NO 생성량은 모든 군에서 농도가 높을수록 유의적으로 감소되는 경향을 보였으며 염증생성에 있어 효과적인 것으로 나타났다.
4. 순수 물질 분리 및 구조 분석은 Oil 성분이 제거된 fraction(YK-CSS2)을 가지고 Partition을 실시하여 4개의 sub-fractions을 획득하였으며 (YK-CSS21, YK-CSS22, YK-CSS23, YK-CSS24). 이 중 YK-CSS22를 가지고 column chromatography를 시행하여 다시 3개의 sub-fractions을 획득하였고 이 중 두 번째 fraction(YK-CSS222)에서 순수한 성분의 물질을 획득하였다(YK-CSS_com1). 분석결과 해당 물질은 $C_{18}H_{32}O_2$ 의 Linoleic acid로 밝혀졌다.
5. 활성물질을 이용한 기능성 제품 결과 녹차씨 오일을 주원료로 하여 천연비누를 제조하였을 때 최종제품은 녹차씨 오일을 함유하지 않고 제조된 기존의 제품과 비교해볼 때, 상품성을 저하시키는 어떠한 문제점도 발견되지 않았다.
6. 녹차씨의 주정추출물을 첨가한 제품과 첨가하지 않은 제품의 성상을 비교할 때, 어떠한 품질 저하 요인이 발견되지 않았다. 단지, 주정추출물을 첨가한 경우의 제품은 첨가하지 않은 제품의 것보다 -다른 색소를 같은 양을 첨가할 경우-약간의 노란색을 띄는 제품이 얻어졌다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

녹차씨의 활용도 증진방안의 일환으로 녹차씨의 항염증과 항동맥경화 효과 및 항암 활성을 평가하였다. 항동맥경화 관련 효과로는 녹차씨 추출물은 산화적 스트레스 유발 상황에서 대식세포(RAW 264.7 macrophage cell line)의 TBARS의 생성을 억제하였으며 SOD, catalase, GSH-px, GSH-reductase 등의 항산화효소계 활성과 GSH함량을 증진시키고 iNOS protein 발현을 저해하여 NO 생성을 억제하는 것으로 나타났다. C57BL/6 mice를 이용한 전임상시험에서 동맥경화식이에 녹차씨유를 제공하였을 때 혈장과 복강대식세포에서 염증반응물질인 TNF- α , prostaglandin 및 interleukine β 4의 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 녹차씨 추출물을 C57BL/6 mice에게 보충시 혈장과 간의 지질 농도를 감소시켰으며 항산화 효소계를 활성화시키고 염증생성인자인 TNF- α 의 생성과 VCAM-1의 발현을 억제하며 eNOS의 발현을 증진시키는 것으로 확인되었다.

임상시험에서 혈장의 TG와 총 콜레스테롤의 농도 및 혈소관 응집력을 감소시키며, 항동맥경화 지수와 총 항산화능 및 적혈구에서의 항산화 효소계 활성을 증가시켰으며, 체내 염증생성인자인 TNF- α 의 생성 억제하는 것으로 확인되었다.

녹차씨 추출물이 간암, 유방암 등 여러 종류의 암세포의 생육을 억제하며, 발암물질해독 효소계의 활성을 증가시킨다는 것을 확인하였다. 특히, 해독 효소계 유도기전으로서 녹차씨 추출물이 Nrf-2의 핵내 이동을 촉진시키고, 2상효소계에 공통적으로 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 2상효소계의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 이러한 활성은 녹차잎 보다 높은 것이었으며, catechins과는 다른 성분에 의하여 이뤄지는 것으로 추정된다. Catechins, gallic acid, caffeine 등 함량은 잎보다 씨에 유의적으로 낮게 함유되어 있었으나, 암세포생육억제활성이나 항암 효소계 유도활성은 씨 추출물이 높은 것으로 나타났다. 한편 안전성 평가에서, 녹차씨는 체중 1kg당 1g까지 유의적인 독성을 발현하지 않는 것으로 나타났다. 우리나라 건강 기능 식품법에 따른 안전성을 확보하기 위해서는 아만성 독성, 만성독성, 유전독성 등 보다 체계적인 평가가 필요하지만, 본 연구로서 녹차씨의 건강기능식품소재로서의 가치는 충분히 검토된 것으로 판단한다. 따라서, 녹차씨의 항염증 및 항동맥경화와 항암 효능을 가진 소재 물질로서 동맥경화와 염증 및 암의 발생을 예방할 수 있는 물질로 사료된다.

녹차씨의 기능성 물질의 순수 분리는 TLC와 HPLC 및 ^1H ^{13}C -NMR, DEPT, LC/MS 로 분석하였으며 순수분리된 물질은 YK-CSS-com 1로 $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$, linoleic acid로 밝혀졌다.

녹차씨의 유용한 성분을 활용한 건강기능성 제품을 개발하여 산업화하기 위한 연구에서는 녹차씨유, 마요네즈, 미용비누 및 초코렛과 드링크를 제조하여 평가하였다. 녹차씨유를 추출하여 물리화학적 특성 및 저장안정성을 확인한 결과 식용유지로서의 가능성을 확인할 수 있었으며 녹차씨유를 사용하여 만든 마요네즈도 대두유에 비해 산화안정성과 기호도 조사에서 산화안정성과 전체적인 선호도가 높은 것으로 나타났다. 녹차씨유와 녹차씨 추출물을 함유한 화장비누를 제조하여 임상시험 한 결과 전체적인 선호도가 좋았으나 녹차씨 분말을 함유한 초코렛과 드링크는 선호도가 높은 수준은 아니었다. 따라서 본 연구에서 녹차씨를 활용한 건강기능성 제품으로는 녹차씨유, 마요네즈, 화장비누의 산업화 가능성과 상품성을 확인할 수 있었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용에 대한 건의

녹차씨유 및 녹차씨에 존재하는 phytochemicals의 생리기능성 규명은 녹차씨유 및 그 부산물을 다양한 건강보조 식품소재 및 건강 기능성 제품으로 개발 가능하도록 한다. 항염증, 항동맥경화, 항암 활성을 근거로 한 건강식품 소재화 및 성인병 예방을 위한 건강기능성 제품 개발 및 염증반응을 수반하는 다양 질병, 즉 위염, 피부염, 관절염 등의 질환에도 적용될 수 있는 기초자료가 된다. 알콜 섭취는 간손상 등 부작용을 수반하는데, 최근 이러한 부작용이 체내 존재하는 CYP2 E1 효소에 의해서 알콜이 분해 될 때 발생하는 free radical에 의한 것임이 밝혀졌으며 (Kessova 2003), 녹차의 polyphenol 성분이 이 효소활성을 조절하는 능력이 있는 것으로 보고되어 녹차씨 활성성분의 섭취가 알코올 섭취에 의하여 유도되는 간 손상을 예방할 가능성이 있음. 이와 관련된 녹차씨의 효능이 증명될 경우, 간 보호 기능성 식품소재로의 개발 성공 가능성이 높다. 녹차씨 추출물성분의 생리활성 탐색 방법, 기전의 규명방법의 정립으로 향후 다양한 농산자원에 대한 항동맥경화와 항염증 및 암 예방 활성 평가 시스템 구축한다. 녹차씨에서 분리되는 항염증·암예방 물질의 특허출원 및 항염증·암예방 (해독능력 증가) 건강기능성 식품의 제품화 기술의 특허를 출원하였으며 앞으로 녹차씨로 부터 신기능 식품소재의 물질의 특허를 받도록 한다.

녹차씨유 및 녹차씨를 이용한 제품을 산업화하는데 기초자료로 활용한다. 연구결과의 기술이전으로 유지 산업계의 새로운 제품개발(예: 기능성을 증진시킨 녹차씨유 제품)에 이용하도록 하며 녹차씨유 및 녹차씨에 함유된 활성성분의 기능적 특성을 홍보함으로써 해당제품의 소비촉진 및 가공을 통한 새로운 수요 창출한다. 그리고 규명된 녹차씨유의 기능성을 바탕으로 학술지와 언론 기고를 통해 녹차씨의 유용성과 경제성을 알리고 임업시험장, 농림기술센터의 협조를 받아 녹차씨의 채취를 권장한다.

녹차씨의 유용한 성분을 활용한 건강기능성 제품으로는 녹차씨유, 마요네즈, 화장비누의 산업화는 참여기업인 화개제다와의 협력으로 가능하다.

제 2 절 본 연구로부터 발생된 업적

1. 국내·외 전문학술지 논문 발표

- 가. 김종경, 김소희, 노경희, 장지현, 송영선. 녹차씨기름이 고콜레스테롤식을 섭취시킨 C57BL/6의 콜레스테롤, TBARS 및 염증반응에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 36(3): 284-290 (2007)
- 나. HA Lim, CH Jang, JH Kim, JR Kim, YR Ha, YS Song, YK Kim, and JS Kim. Antiproliferative and Anticarcinogenic Enzyme-Inducing Activities of Green Tea Seed Extract in Hepatoma Cells. *Food Sci. Biotechnol.* 15(6): 914-919 (2006)

2. 국내외학술대회 발표논문

- 가. 노경희, 김진주, 장지현, 조미경, 송영선. 녹차씨 추출물을 첨가한 비누의 물리적 특성 2006 *International symposium and annual meeting of Korean Society of Food Science and Nutrition*, Gyeongju, October 18-20, p 369 (2006)
- 나. MK Cho, KH Noh, JH Jang, JJ kim and YS Song. Anti-atherogenic and anti-oxidative effects of green tea seed extract supplementation in Korean male adult smokers. *29th The European Society for clinical Nutrition and Metabolism Congress*, Prague, September 8-11 (2007) - 발표예정
- 다. JH Jang, KH Noh, MK Cho, JJ Kim and YS Song. Green tea seed extract supplementation attenuates plasma lipid profiles and oxidative stress in Korean male adult smokers during postprandial lipemia. *29th The European Society for clinical Nutrition and Metabolism Congress*, Prague, September 8-11 (2007) - 발표예정
- 라. Lim HA, Jang CH, Kim JH, Kim JR, Song YS, Kim YK, Kim JS : Induction of anti-carcinogenic enzyme by methanolic extract of Green Tea Seed. *2005 International symposium and annual meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Gangwon-do (YongPyong Resort), October 19-21, p 492 (2005)
- 마. Ki-Hun Kim, Ji-Young Park, Young-Sun Song, Young-Kyoon Kim. Separation and In vitro Anti-inflammatory Effect of Tea (Camellia

sinensis L.) Seed Extract. 한국생약학회. 12월 2일, 부산대학교 약학대학 (2005)

바. 노경희, 김종경, 박충무, 박원중, 송영선. 추출조건에 따른 녹차씨유의 특성. KoSFoST Annual meeting. June 15-17, p114, Seoul (2005)

사. 노경희, 박원중, 송영선. 녹차씨유의 추출조건에 따른 저장안정성 비교. KoSFoST Annual meeting. June 15-17, p114, Seoul (2005)

자. Effects of green tea seed methanol extract on oxidative stress and iNOS expression in RAW 264.7 macrophages. Kim Jong -Kyung, Song Young-Sun. 2004년도 International conference on O-CHA(tea) culture and science, 11월 4-6일, 2004 Shizuoka, Japan

3. 특허 등록 및 출원 사항

가. 등록번호 10-06578405, 대한민국, 등록일 2006.12.08

녹차씨로부터 저장안정성과 맛이 뛰어난 녹차씨유를 추출하는 방법

발명자: 노경희, 송영선, 박원중, 김종경, 홍순창

출원인(학교법인 인제학원)

나. 등록번호 10-06400947, 대한민국, 등록일 2006.10.24

클레스테롤 저하 또는 항산화활성을 갖는 녹차씨유를 포함하는 조성물,

발명자: 송영선, 김종경, 노경희, 조혜연, 박지영, 이호선, 최춘연

출원인(학교법인 인제학원)

다. 출원번호 10-2006-0037737, 대한민국, 출원일 2006.04.26

항산화, 항염 및 항동맥경화 활성을 갖는 녹차씨 추출물을 함유하는 약학조성물

발명자: 노경희, 송영선, 박충무, 박지영, 김진주

출원인(학교법인 인제학원)

4. 기타

2006 녹차분야 우수기술발표회 및 전시회에서 발표, 순대학교. 2006년 3월 30일, 동물실험(C57BL/6 mice)에 의한 녹차씨의 항염증·항동맥경화 효과 및 기작 연구

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

중국에서는 후난성 창린지역에 녹차씨유를 비롯한 차 열매기름을 생산 판매하고 있으며 일본에서도 2005년부터 녹차씨유를 생산 판매하고 있다. 그러나 녹차씨로 부터 생리활성 물질을 확인하거나 이를 활용한 제품이 사업화된 예는 확인할 수 없었다.

제 7 장 참고문헌

1. 나효환, 백순옥, 한상빈, 복진영. 1992. 녹차 종자의 일반성분 *J. Korean Agric Chem Soc.*, 35(4): 272~275
2. 김동훈 1994 식용유지의 산패 고려대학교 출판부 p.45
3. 한진숙, 안승요. 1993. 정제공정이 참기름의 유지특성과 산화안정성에 미치는 영향. *J. Korean Agric Chem Soc.*, 36(4): 284~289
4. Kand MH, Chung HK, Song ES, Park WJ. 2002. Improved method for increasing of the oil yields in grape seed. *Korean J Food Sci Technol.*, 34(5): 931~934
5. Szentmihalyi K, Vinkler P, Lakatos B, Illes V, Then M. 2002. Rose hip(*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. *Biosource Technology* 82: 195~201
6. Gomez AM, Lopez CP, Ossa EM. 1996. Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. *The Chemical Engineering Journal* 6: 227~231
7. Ajiwe VIE, Okeke CA, Agbo HU. 1995. Short Communication : Extraction and utilization of *Afzelia africana* seed oil. *Biosource Technology* 53: 89~90
8. Besbes S, Blecker C, Deroanne C, Lognay G, Drira NE, Attia H. 2004. Heating effects on some quality characteristics of date seed oil. *Food Chemistry* 1~8
9. Lee YC, Oh SW, Chang JH, Kim IH. 2004. Chemical composition and oxidative stability of safflower oil prepared from safflower seed roasted with different temperatures *Food Chemistry* 84: 1~6
10. Song J, Bang JK, Park HW, Park CB, Seong NS. 2003. Oxidative stability and fatty acid composition during storage of Chufa oil. *Kor J Intl Agri* 15(1) : 31~37
11. Kang, HC, Min YK, Hwang JT, Kim SD, Kim TS. 1999. Extraction and mixing effects of grape (Campbell) seed oil. *Agri. Chem. Biotechnol.* 42: 175~191
12. Chin SF, Liu W, Storkson TM, Ha YL, Pariza HW. 1992. Dietary sources of

- conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Composition and Analysis* 5: 185~107
13. 식품공전
 14. 신호선. 2004. 식품분석(이론과 실험). 신광출판사 서울 pp.177~189
 15. Jo HG, Jo KY, Park CG, Cho GS, Chai SG, Ma SJ. 1994. Food Analysis. Yurim Pub. Co., Seoul pp.220~227
 16. 한국식품영양과학회편. 2000. 식품영양실험핸드북 식품편. 도서출판 효일 pp.202~207
 17. 日本油脂化學協會. 1994. 標準油脂分析試驗法 2.4.1~83
 18. AOAC. 1990. AOCS Official and tentative method. 2nd ed., *Am Oil Chem Soc.*, Chicago, Method Cd 8~53
 19. Sidwell CG, Salwin H, Mitchell JH. 1954. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 31: 579~603
 20. AOAC. 1985. Official method of analysis. Association of Official Analytical 16th ed. Chemists, Washington D.C.
 21. Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive virgin oils *Journal of American Oil Chemists Society* 58, 966~968
 22. Gunstone FD, Norris FA. 1983. Flavor stability and antioxidants in lipid in foods. Pergamon Press Ltd., Oxford, England, Chapt. 19(oven method)
 23. Park BH, Choi HK, Cho HS. 2001. Antioxidant effect of aqueous green tea on soybean oil. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(3): 552~556
 24. Shin DH, Chung JK. 1998. Changes during storage of rice germ oil and its fatty acid composition. *Korean J Food Sci Technol.* 30(1): 77~81
 25. 송재철, 박현정. 1995. 식품물성학, 울산대학교 출판부, pp.80~83
 26. Jang JK, Han JY. 2002. The antioxidant ability of grape seed extracts. *Korean J Food Sci Technol.* 34(3): 524~528
 27. Yoon WH, Choi JH, Lee KH, Kim CH. 2005. Antimicrobial and antitumor activities of seed extracts of *Camellia sinensis* L. *Korean J Food Sci Technol.* 37(1): 108~112
 28. Koh JH, Hwang MO, Moon JS, Hwang SY, Son JY. 2005. Antioxidative and antimicrobial activities of Pomegranate seed extracts. *Korean J Food Cookery*

- Sci.* 21(2): 171~179
29. Singh RP, Murthy KNG, Jayaprakasha GK. 2002. Studies on the antioxidant activity of Pomegranate(*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J Agric Food Chem* 50: 81~86
 30. Chung YM, Rhee CO, Eun JB. 2001. Refining of tea seed oil. *Food Sci Biotechnol.* 10(2): 193~198
 31. Mello MLS, Bora PS, Narain N. 2001. Fatty and amino acids composition of melon (*Cucumis melo var saccharinus*) seed. *Journal of Food Composition and Analysis.* 14: 69~74
 32. Eromosele IC, Eromosele CO, Innazo P, Njerim P. 1998. Studies on some seeds and seed oils. *Bioresources Technology.* 64: 245~247
 33. Dong S, Jung SH, Moon JS, Rhee SK, Son JY. 2004. Antioxidant activities of clove by extraction solvent. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 33(4): 609~613
 34. Park SI, Son JY. 2004. Effects of clove extracts on the autoxidation and thermal oxidation of soybean oil. *Korean J Food Cookery Sci.* 20(1): 81~85
 35. Oh DH, Ham SS, Lee SY, Park BK. 1998. Effect of irradiation and blanching on the quality of juices of *Spuriopinella bracycarpar* during storage. *Korean J Food Sci Technol.* 30(2): 333~340
 36. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *In Methods in Enzymology*, Fleischer S, Packer L, ed. Academic press, New York, USA. Vol 52, p302~306.
 37. Folch I, Lees M, Sranley GHS. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biochem* 223: 497~509
 38. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in antioxidant of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469~474
 39. Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 150: 121~6
 40. Tietza F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissue. *Anal Biochem* 27: 502~522
 41. Lawrence RA, Burk F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-

- deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res Comm* 71: 952
42. Inger C, Bengt M. 1985. In *Methods in Enzymology*, Fleischer S. Packer L, ed. Academic press, New York, USA. Vol 113, p484~490.
 43. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 72: 248~254
 44. Friedwald W. 1972. Estimation of the concentration of LDL in plasma without use of the preparative ultracentrifugation. *Clin Chem* 28: 499
 45. Gerberick GF, Robinson MK. 2000. A Skin Sensitization Risk Assessment Approach for Evaluation of New Ingredients and Products. *American Journal of Contact Dermatitis* 11(2): 65~73
 46. Jeong JM, Kim SK, Kang SK. 2005. A Study of Application to Efficacy Testing of Cosmetics-Ginkgo Biloba Leaf Extract Composition. *J. Kor. Soc. Cosm.* 11(1): 18~25
 47. Lee EH, Lee JK, Kim YK, Park KS, Ahn KS, Jung KM, Jung HK, Lee SH, Chung SY, Hong JT. 2001. Correlation Between Skin Irritation and Cytotoxicity of Anti-wrinkle Agents. *Yakhak Hoeji* 45(3): 310~319
 48. An BJ, Kang BY, Lee JT. 2002. Development of Cosmetic Material from Korean Crataegi Fructus Extract. *Kor. J. Herbology* 17(2): 39~50
 49. Kim YR, Ahn SH, Choi BD, Kang SJ, Shin GW, Oh MJ, Jung TS. 2004. *In vitro* Examination of Chondroitin Sulfates Extracted Midduck (*Styela clava*) and Munggae Tunics (*Halocynthia roretzi*) as a Cosmetic Material. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33(4): 646~652
 50. Kim BH, Ahn SH, Choi BD, Kang SJ, Kim YL, Lee HJ, Oh MJ, Jung TS. 2004. *In Vivo* Evaluation of Chondroitin Sulfates from Midduk (*Styela clava*) and Munggae Tunics (*Halocynthia roretzi*) as a Cosmetic Material. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33(4): 641~645
 51. Um SH, Gil EM, Kim TH. 2003. Photopatch Test in Patients with Allergic Contact Dermatitis to Cosmetics. *Korean Journal of Dermatology* 41(3): 302~307
 52. An BJ, Lee JT, Lee SA, Kwak JH, Park JM, Lee JY, Son JH. 2004.

- Antioxidant Effects and Application as Natural Ingredients of Korean *Sanguisorbae officinalis* L. *J. Korean Soc. Apple. Biol. Chem.* 47(2): 244~250
53. An BJ, Lee JT, Lee CE, Kim JH, Son JH, Kwak JH, Lee JY, Park TS, Bae HJ, Jang MJ, Jo CH. 2005. A Study on Physiological Activities of Coptidis Rhizoma and Application for Cosmetic Ingredients. *Kor. J. Herbology* 20(3): 83~92
 54. Lee CH, Shin YH, Lee UH. 1990. Studies on Application of Soybean Fatty Acid for Development of Cosmetic Formulation. *J. Kor. Pharm. Sci.* 20(2): 55~64
 55. Ha BJ. 2002. Studies on the Foaming Ability of Soaps. *한국미용학회지* 8(2): 93~98
 56. Chang SH, Lee TW. 1996. The Study on the Effect of Six Soaps on Cutaneous Irritation Measured by Noninvasive Techniques. *Korean Journal of Dermatology* 34(1): 116~121
 57. Choi HM, Myung KB, Kook HI. 1984. A Study for Assessing the Irritancy of Toilet Soaps and Soap Ingredients. *The Korean Journal of Dermatology* 22(5): 483~491
 58. Ha G, Lee HJ, Yoo HJ. 1998. A Study on the Property and the Skin Irritability of the Reclaimed Soap. *Korean Home Economics Association* 36(1): 1~11
 59. Ahn MS. 2003. 식품과 조리과학 실험서. 신광출판사: 118~123
 60. Chae SK, Kang KS, Lew ID, Ma SJ, Bang KW, Oh MH, Oh SH. 2006. 표준 식품분석학, 지구문화사: 328~351
 61. Chae SK, Kang KS, Ma SJ, Bang KW, Oh MH, Oh SH. 2003. 표준 식품분석학, 지구문화사: 699~703
 62. Rou FR, Park YS. 2004. Comparison of determined skin types by different factors of facial skin hydration, sebum content and surface pH levels. *대한피부미용교육학술지* 2(1): 67~81
 63. Park EK, Kang SM, Leem MH. 2003. A Study on the Variation of Skin Moisture, Oil(Sebum), Melanin and Erythema Index after Application of β -Glucan. *대한피부미용교육학술지* 1(3): 83~93

64. Kim WJ, Kang JH, Kim HY, Park MJ. 2004. Establishment of Optimal Containing Level of Materials in Mayonnaise Using Duck's Egg Yolk. *J. of Human Ecology* 8(1): 167~180
65. Kim WS, Lee MJ. 2002. Effects of water phase products during storage periods of Mayonnaise. *외식경영연구* 5(2): 37~55
66. Chun JA, Song ES. 1995. Sensory and Physical Properties of Low-fat Mayonnaise Made with Starch-based Fat Replacers. *Korean J. Food Sci. Technol* 27(6): 839~844
67. Park CS, Park EJ. 2002. Oxidative Stability of Green Tea-Added Mayonnaise. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 18(4): 407~412
68. Kim JW, Hong KJ, Chung BS, Hur JW. 1997. Characteristics of Mayonnaise Prepared with Palm Oil. *Korean J. Food Sci. Technol* 29(2): 261~265
69. Seo YJ, Na HG, Lee JS, Kundu JK, Cheon GS. 2003. Chemopreventive and Chemoprotective Effects of Green Tea Polyphenol on Oxidative and Inflammatory Tissue Damag. *제7회 국제 녹차 심포지엄*: 103~118
70. Kim YE, Oh SW, Kwon EK, Han DS, Kim IH, Lee CH. 2003. Effects of Green Tea, Buckwheat and Grape Leaves Extracts on lipid Metabolism, Antioxidative Capacity, and Antithrombotic Activity in Rats Fed High Cholesterol Diets. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36(6): 979~985
71. Park JH, Ha AW, Cho JS. 2005. Effects of Green Tea-Soybean Paste on Weights and Serum Lipid Profiles in Rats Fed High Fat Diet. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37(5): 806~811
72. Kim NY, Lee JG, Heo MY. 2006. Protective Effect of Green Tea Extracts on Oxidative Stress. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14(6): 322~328
73. Cha GS, Kim JW, Choi CU. 1988. A Comparison of Emulsion Stability as Affected by Egg Yolk Ratio in Mayonaise Preparation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20(2): 225~230
74. Yang SC, Han JY. 2002. The Effect of Vinegar Concentration the Emulsion Stability of Mayonnaise Dressing. *Korean Journal of Culinary Research* 8(3): 295~308
75. Kim HY, Park YK, Kim TS, Kang MH. 2006. The Effect of Green Vegetable

- Drink Supplementation on Cellular DNA Damage and Antioxidant Status of Korean Smokers. *The Korean Journal of nutrition* 39(1): 18~27
76. Kim JS, Kim HY, Park YK, Kim TS, Kang MH. 2003. The Effects of Green Vegetable Juice (*Angelica Keiskei*) Supplementation on Plasma Lipids and Antioxidant Status in Smokers. *The Korean Journal of nutrition* 36(9): 933~941
 77. Lim JY, Kim JH. 2002. The Effects of Smoking on Antioxidative Enzyme Activities in Male Adolescents. *Korean J. Community Nutrition* 7(6): 844~851
 78. Kim JW, Hong KJ, Chung BS, Hur JW. 1997. Characteristics of Mayonnaise Prepared with Palm Oil. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29(2): 261~265
 79. Min WG. 2003. The Long-term Ingestion Effects of Green Tea on Atherosclerotic Biological markers in Smokers. *Korean Society of Food Science and Technology* 7: 121~128
 80. Beyan C, Kaptan K, Ifran A. 2006. Platelet count, mean platelet volume, platelet distribution width, and plateletcrit do not correlate with optical platelet aggregation responses in healthy volunteers. *J Thromb Thrombolysis* 22(3): 161~164
 81. Takajo Y, Ikeda H, Haramaki N, Murohara T, Imaizumi T. 2001. Augmented oxidative stress of platelets in chronic smokers : Mechanisms of impaired platelet-derived nitric oxide bioactivity and augmented platelet aggregability. *Journal of American College of Cardiology* 38(5): 1320~1327
 82. Li KH, Park EJ, Lee HS, Khu DM, Love SL, Lim HT. 2006. Evaluation of Potato Varieties with High Antioxidant Activities by Measuring Phenolic Acids in Different Tuber Parts. *Hort. Environ. Biotechnol.* 47(3): 126~131
 83. Whang HJ. 1999. Changes of Phenolic Compounds in Korean Apple(Fuji) during Maturation. *Korean J. Food & Nutr.* 12(4): 364~369
 84. Park YK, Kim HM, Kang YH. 2000. Phenolic Compounds in Persimmon Fruits and Stabilization of Discoloring Compounds. *Korean J. Food & Nutr.* 13(2): 103~110
 85. Song KH, Kim HA. 2002. Comparison of Attitudinal Beliefs regarding Smoking and Antioxidant Vitamins Status in the College Male Smokers and

- Non-smokers. *Korean J. Dietary Culture* 17(3): 329~336
86. Adams JM, 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*, 17: 2481~2495
 87. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H, 1997. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 89: 1881~6
 88. Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P., 1980. Increase of NAD(P)H Quinone reductase by dietary antioxidants: Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Nat. Acad Sci*, 77: 5216~5520
 89. Borriello SP, Setchell KDR, 1985. Axelson M, Lawson AM. Production and Metabolism of lignans by the human faecal flora, *J Appli Bacterial*, 58: 37~3
 90. Cassidy A. 1991. Plant Oestrogens and their relation to hormonal status in women, Doctoral thesis, *Cambridge University Cambridge UK*
 91. Chai JK, Blaha V, Meguid MM, Laviano A, Yang Z, Varma M, 1999. Use of orchietomy and testosterone replacement to explore meal number-to-meal size relationship in male rats. *Am J Physiol.*, 276, R1366-1373
 92. Chmouliovsky L, Habicht F, James RW, Lehmann T, Campana A, Golay A, 1999. Beneficial effect of hormone replacement therapy on weight loss in obese menopausal women. *Maturitas*, 32: 147~153
 93. De Long MJ, Prochaska HJ, Talalay P. 1986. Induction of NAD(P)H:quinone reductase in murine hepatoma cells by phenolic antioxidants, azo dyes, and other chemoprotectors: A model system for the study of anticarcinogens. *Proc. Natl. Acad Sci*, 787~791
 94. Edwards YH, Potter J, Hopkinson DA, 1980. Human FAD-dependent NADPH diaphorase, *Biochem J*, 187:, 429~436
 95. Garcia LA, Pfaff GM, Schumacher MC, Walker AM, Hoffmeister H, 1990. Replacement estrogen use and body mass index. *Epidemiology*, 1: 219~223
 96. Geary N, Asarian L. 2001. Estradiol increases glucagon's satiating potency in ovariectomized rats. *Am J Physiol*, 281, R, 1290~194
 97. Homma H, Kuracho NY, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K,

- Ohmichi M, Matsuzawa Y, Murata Y. 2000. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element of the lipoprotein lipase promoter, *J Biol Chem*, 275: 11404~11411
98. Iqbal M, Okada S. 2003. Induction of NAD(P)H:quinone reductase by probucol: a possible mechanism for protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharm. & Toxi.* 93:, 259~263
99. Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, Waring MA, Nelson C. 1985. A Urinary profile study of dietary phytoestrogen. The identification and mode of metabolism of new isoflavones, *J steroid Biochem*, 54: 167~184
100. Jones MEE, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Weford N G., Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Ygo S, Simson ER, 2000. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 12735~12740
101. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem*, 72: 248~254
102. Folch I, Lees M, Sranley GHS. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biochem* 223: 497~509
103. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in antioxidant of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469~474
104. Kang, Park HC, Kim WJ, Park SD, Cheon J, 1998. Characterization of Grape Seed Oil, 韓國農化學會誌, 41, 8
105. Keller H, Givel F, Perroud M, Wahi W, 1995. Signal cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/ retinoid x receptor and estrogen receptor through estrogen receptor estrogen response elements, *Mol*, 9: 794~804
106. Kenneth DS, Linda ZN, Jinnan C, James EH, 1998. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life, *Am J Clin Nutr*, 1453~1461
107. Kudou S, Fluery Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okaubo

- K, 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds(glycine max Merrill), *Agric Biol Chem*, 55: 2227~2233
108. Kuiper JM, Carrson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta, *Endocrinology*, 139: 4252~4257
109. Lee W. Wattenberg. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 45
110. Nho CH, Jeffery E. 2001. The synergistic upregulation of phase II detoxification enzymes by glucosinolate break down products in cruciferus vegetables. *Toxi and App pharm.*, 174: 146~152
111. Miao W, Hu L, Kandouz M and Batist G. 2003. Oltipraz is a bifunctional inducer activating both phase I and phase II drug-metabolizing enzymes via the xenobiotic responsive element. *Mol Pharm*, 64:, 346~354
112. Wade, G.N., Gray, J.M. 1979. Gonadal effects on food intake and adiposity; A metabolic hypothesis. *Physiol Behav*, 22: 258~593
113. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65: 55~63
114. Okazaki, R, Inoue, D, Shibata, M, Saika, M, Kido, S, Ooka, H, Tomiyama, H, Sakamoto, Y, Matsumoto, T, 2002. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell line that express estrogen receptor α or β . *Endocrinology*, 143: 2349~2356
115. Surh Y. 1999. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mut Res*, 428: 305~327
116. Talalay P. 1989. Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Adv Enzy Regul*, 28: 237~250
117. Tchernof A, Calles-Escandon J, Sites CK, Poehlman ET, 1998. Menopause, central body fatness, and insulin resistance: effects of hormone-replacement therapy, *Artery Dis*, 9: 503~511
118. Wade GN, 1975. Some effects of ovarian hormones on food intake and body

- weight in female rats. *J Comp Physiol Psychol*, 88: 183~193
119. Wing RR, Matthews KA, 1991. Weight gain at the time of menopause, *Arch Int Med*, 151: 97~120
 120. Yang GY, Liao, Kim, KH, Yurkow, EJ, Yang, CS. 1998. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 19: 611~6
 121. Lind L. 2003. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 169: 203~214
 122. Chao LK, Hua KF, Hsu HY, Cheng SS, Liu JY, Chang ST. 2005. Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of cinnamomum osmophloeum. *J Agric Food Chem* 53: 7274~7278
 123. Hart PH, Brand C, Carson C, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. 2000. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*(tea tree oil), supresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Res* 49: 619~626
 124. Ryu OH, Lee J, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM. 2006. Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 71: 356~358
 125. Martin MA, Vazquez P, Fernandez AA, Ruiz GV. 2006. Supressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in simulated murine macrophages. *Free Radic Res* 40: 295~302
 126. Patrick L, Uzick M. 2001. Cardiovascular disease: c-reactrive protein and the inflammatory disease paradigm: HMG-Co A redustase inhibitors, alpha-tocopherol, red yeast rice, and olive oil polyphenols. A review of the literature. *Altern Med Rev* 6: 248~271